



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude du rôle fonctionnel de MIG1 dans la répression glucose chez *Kluyveromyces lactis*

Georis, Isabelle

Award date:
1995

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.

0 1 DEC. 1995



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

**Etude du rôle fonctionnel de *MIG1*
dans la répression glucose
chez *Kluyveromyces lactis***

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

**Isabelle Georis
1995-1996**

Etude du rôle fonctionnel de *MIG1* dans la répression glucose chez *Kluyveromyces lactis*

GEORIS Isabelle

Résumé

La répression glucose est un mécanisme de régulation capital chez la levure : l'expression d'un grand nombre de gènes, superflue lorsque le glucose est présent dans le milieu, est réprimée par le glucose.

L'expression des gènes *GAL* de *Saccharomyces cerevisiae*, paradigme de la régulation de l'expression des gènes eucaryotes, est soumise à ce phénomène de répression glucose. Un effecteur central de cette répression est Mig1p.

Chez *Kluyveromyces lactis*, l'expression des gènes *GAL-LAC* est également soumise à la répression glucose, mais le mécanisme par lequel le glucose exerce son action reste à définir. Pour tenter de répondre à cette question, une première étape a consisté à cloner *KIMIG1* (Cassart & al., 1995) par criblage d'une banque génomique sauvage de *lactis* avec une sonde nucléotidique correspondant à la région codant pour les doigts de Zinc de *KmMIG1* (gène homologue de *Kluyveromyces marxianus*). Il a permis l'isolement d'un clone positif contenant une ORF d'environ 1300 bp.

Après avoir authentifié ce gène par Southern Blot, nous l'avons identifié structurellement à un gène *MIG* en établissant son homologie de séquence protéique avec d'autres membres de la famille *MIG*, et fonctionnellement par divers tests de complémentation hétérologue réalisés chez *cerevisiae* comme hôte.

Un alignement multiple, réalisé avec les homologues Mig1p connus chez trois levures (ScMig1p, KmMig1p, KIMig1p), a permis l'identification de quatre régions conservées. Pour deux d'entre elles, leur rôle de liaison à l'ADN (Nehlin & al., 1990) et de répression de la transcription (Östling & al., 1995) a pu être établi.

La place de *KIMIG1* chez *Kluyveromyces lactis* dans la régulation des gènes *GAL-LAC* a été abordé par la surexpression et la disruption du gène résident chez *lactis*. Nous avons montré que l'effet de la répression glucose des gènes *LAC4* et *GAL1* était réduit chez le disruptant.

Cependant, les cibles directes de la répression par Mig1p des gènes *GAL-LAC* chez *Kluyveromyces lactis* doivent encore être identifiées.

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication :

CASSART, J.-P., GEORIS, I., ÖSTLING, J., RONNE, H. AND VANDENHAUTE, J. (1995) The *MIG1* repressor from *Kluyveromyces lactis* : cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **371** : 191-194.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1995

Promoteur : J. Vandenahute

*"Une recherche n'est jamais complète.
C'est la gloire d'un travail bien fait qui ouvre la
voie à un autre, meilleur encore, et amène ainsi
rapidement sa propre éclipse.
L'objet de la recherche est l'avancement, non du
chercheur, mais de la Science."*

Sir Alexander Fleming

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Vandenhoute pour avoir fait naître en moi une passion sans limites pour la Génétique Moléculaire, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, et pour son dévouement extrême lors de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie les membres du jury, I. Alexandre, J.-P. Cassart, X. Debolle et E. Feytmans, d'avoir accepté de consacrer un peu de leur temps à la lecture de ce mémoire.

J'adresse toute ma reconnaissance à Jean-Pol, qui, durant ces trois dernières années, a renforcé mon goût pour la Génétique, et m'a initiée cette année aux joies et à la complexité de la répression glucose chez la levure.

I wish to thank Jonas Östling (Uppsala, Sweden) for performing complementation tests in strain H497 with *KIMIG1*, constructing many plasmids, providing strain H172 and giving early information about functional domains of ScMig1p.

I am also very grateful to Karin Breunig (Düsseldorf, Germany) for providing strains JA6 and JA6/912, the Gal1p antibody and having invited me for three weeks in her laboratory, allowing the characterization of the phenotype of the disruptant strain IG181. I am finally thanking Elisa, Petra and Frank for helping me making my firsts steps in Düsseldorf.

Mes remerciements vont également à Françoise, Isabelle, Rose-Marie, Monique, Véronique, M^{me} Libion, Damien, Dominique, Jean-Christophe, Pascal, sans qui ce laboratoire ne serait pas ce qu'il est, et à tous les membres de l'URBM pour les discussions fructueuses lors des réunions.

Tout grand merci à Flore, Isabelle, Natacha, Nathalie, Carl, Jean-Yves, Luis, pour toutes les activités "extra-mémoire".

Enfin, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour sans Philippe. Je le remercie du fond du coeur pour sa présence permanente à mes côtés, dans les bons moments comme dans les moins bons.

Si ce n'est déjà fait, je vous remercie vous, cher lecteur, qui allez parcourir ces pages relatant ce mémoire qui fut ma passion pendant l'année qui vient de s'écouler, et vous souhaite une agréable lecture.

ABREVIATIONS

A	Adénosine
a a	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
Amp ^r	Marqueur de résistance à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARS	Séquence de réplication autonome
B-CIP	Sel de 5-Bromo 4-Chloro 3-Indoyl phosphate-p-toluidin
bp	Paire de bases
BSA	Serum Albumine Bovine
C	Cytidine
CEN	Séquence centromérique
Ci	Curie
DMF	Diméthylformamide
DO	Densité optique
DRS	Séquences de régulation en aval ("Downstream Regulating Sequences")
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
g	Gramme
G	Guanosine
IPTG	Isopropyl, β-D thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
l	Litre
LB	Milieu de Luria-Bertani
M	Molaire
MCS	Site multiple de clonage ("Multiple Cloning Site")
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mU	Milliunité
N	A, C, G, T
NBT	Nitro Blue Tetrazoliumchloride
nM	Nanomolaire
ONPG	Ortho-nitrophényl β-D-galactopyranoside
ORF	Phase ouverte de lecture ("Open Reading Frame")
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne ("Polymerase Chain Reaction")
PIC	Complexe d'initiation de la polymérase
PM	Poids Moléculaire
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
R	A ou G
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide
T	Thymidine
TAF	Facteurs associés à la TBP
TBP	"TATA Binding Protein"
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
U	Uridine
UAS	Séquence d'activation en amont ("Upstream Activating Sequence")
URS	Séquence de répression en amont ("Upstream Repressing Sequence")
UV	Ultra-Violet
V	Volt
X-gal	5-Bromo 4-Chloro 3-indoyl, β-D galactopyranoside
Y	C ou T
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire

PLAN DU TRAVAIL

AVANT-PROPOS 1

1. RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE 2

1.1. L'IMPORTANCE CRUCIALE DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION . 2

1.2. LA FORMATION DU PIC 2

1.2.1. Les éléments CIS 2

 1.2.1.1. Les éléments de séquence proprement dits 2

 1.2.1.1.1. Les éléments proximaux 3

 1.2.1.1.2. Les éléments distaux 3

 1.2.1.2. Les autres éléments CIS 3

1.2.2. L'effecteur et les facteurs TRANS 3

2. LE MODÈLE D'ÉTUDE 5

2.1. L'ORGANISME : LA LEVURE 5

2.2. LE SYSTÈME : "RÉPRESSION GLUCOSE" 6

2.2.1. La répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* 6

 2.2.1.1. Généralités 6

 2.2.1.2. La répression glucose du gène *SUC2* 7

 2.2.1.2.1. Cadre général de la répression 7

 2.2.1.2.2. Voies de régulation du gène *SUC2* 7

 2.2.1.3. La régulation de l'expression des gènes *GAL* 8

 2.2.1.3.1. Cadre général de la régulation 8

 2.2.1.3.2. Mécanisme moléculaire d'induction des gènes *GAL* par le galactose 8

 2.2.1.3.3. L'expression des gènes *GAL* est réprimée en présence de glucose 9

2.2.2. Un facteur central de la répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* : la protéine Mig1p 10

2.2.3. Le système *GAL-LAC* et la répression glucose chez *Kluyveromyces lactis* 11

 2.2.3.1. Généralités 11

 2.2.3.2. Le système *GAL-LAC* chez *Kluyveromyces lactis* et comparaison avec *Saccharomyces cerevisiae* 11

 2.2.3.2.1. Voie métabolique d'utilisation du galactose et du lactose 11

 2.2.3.2.2. Organisation génomique des gènes *GAL-LAC* 12

 2.2.3.2.3. Induction des gènes *GAL-LAC*, par le galactose ou le lactose 12

 2.2.3.2.4. Répression des gènes *GAL-LAC* par le glucose 13

BUTS DU TRAVAIL	15
------------------------------	----

RÉSULTATS	16-36
------------------------	-------

1. LE GÈNE CLONÉ EST <i>KIMIG1</i>	16
---	----

1.1. LA STRUCTURE DU GÈNE CLONÉ LE DÉSIGNE COMME ÉTANT <i>KIMIG1</i>	16
---	----

1.1.1. La séquence du gène cloné est homologue de celle de <i>ScMIG1</i>	16
---	----

1.1.1.1. Historique du clone pGIKL2.3	16
---	----

1.1.1.2. Stratégie et résultats du séquençage	17
---	----

1.1.1.3. Analyse des séquences flanquantes de l'ORF	17
---	----

1.1.1.3.1. Analyse des séquences situées du côté 5' proximal de l'ORF	17
---	----

1.1.1.3.2. Analyse des séquences situées du côté 3' de l'ORF	18
--	----

1.1.1.4. Analyse de la séquence de l'ORF	18
--	----

1.1.1.4.1. Alignements simples de séquence	18
--	----

1.1.1.4.2. Alignements multiples	19
--	----

1.1.1.4.3. Conclusions	20
------------------------------	----

1.1.2. L'analyse en Southern confirme qu'il s'agit d'un gène de <i>Kluyveromyces lactis</i>	20
--	----

1.1.2.1. Introduction	20
-----------------------------	----

1.1.2.2. Résultats	21
--------------------------	----

1.1.2.3. Conclusions	21
----------------------------	----

1.1.3. Conclusions générales	21
---	----

1.2. LA FONCTION DU GÈNE <i>KIMIG1</i> EST HOMOLOGUE DE CELLE DE <i>ScMIG1</i> CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	22
--	----

1.2.1. Introduction	22
----------------------------------	----

1.2.2. <i>KIMIG1</i> supplée fonctionnellement <i>ScMIG1</i> au niveau du promoteur du gène <i>SUC2</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
---	----

1.2.2.1. Introduction	23
-----------------------------	----

1.2.2.2. Approche qualitative de la fonction de <i>KIMIG1</i>	23
---	----

1.2.2.2.1. Construction du sous-clone pGIKL2	23
--	----

1.2.2.2.2. Résultats de l'expérience de complémentation hétérologue	24
---	----

1.2.2.3. Approche quantitative de la fonction de <i>KIMIG1</i> par gène rapporteur	25
--	----

1.2.2.3.1. Résultats de l'expérience de complémentation hétérologue	25
---	----

1.2.2.4. Conclusions	25
----------------------------	----

1.2.3. <i>KIMIG1</i> supplée fonctionnellement <i>ScMIG1</i> au niveau du promoteur des gènes <i>GAL</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
--	----

1.2.3.1. Introduction	26
1.2.3.2. Construction du pGIKL6	27
1.2.3.3. Résultats	27
1.2.3.4. Conclusions	28
1.2.4. Conclusions générales	28
<u>2. PLACE DE KIMIG1 AU SEIN DE LA RÉPRESSION GLUCOSE CHEZ KLUYVEROMYCES LACTIS</u>	29
2.1. SUREXPRESSON DE KIMIG1 CHEZ KLUYVEROMYCES LACTIS	29
2.2. DISRUPTION DE KIMIG1 CHEZ KLUYVEROMYCES LACTIS	30
2.2.1. Introduction	30
2.2.2. Création de la souche de <i>Kluyveromyces lactis</i> IG181 (mig1::URA3)	30
2.2.2.1. "One-Step gene disruption"	30
2.2.2.2. Disruption <i>in vitro</i> : les deux constructions	31
2.2.2.2.1. Construction du pGIKL8	31
2.2.2.2.2. Construction du pGIKL9A	31
2.2.2.3. Disruption <i>in vivo</i>	32
2.2.2.4. Criblage des transformants par PCR sur colonie	32
2.2.2.5. Conclusions	33
2.2.3. Vérification du caractère nul de l'allèle (pGIKL9A) ayant servi à la disruption	33
2.2.3.1. Introduction	33
2.2.3.2. Résultats	33
2.2.4. Caractérisation du phénotype du disruptant	34
2.2.4.1. Influence de la disruption de <i>KIMIG1</i> sur l'activité β -galactosidase	34
2.2.4.1.1. Test phénotypique Blanc/Bleu sur milieu solide	34
2.2.4.1.2. Test phénotypique Blanc/Bleu en milieu liquide	34
2.2.4.1.3. Cinétique de l'induction de l'activité β -galactosidase	34
2.2.4.1.4. Conclusions	35
2.2.4.2. Influence de la disruption de <i>KIMIG1</i> sur l'expression de <i>GAL1</i>	35
2.2.4.2.1. Introduction	35
2.2.4.2.2. Résultats	35
2.2.4.2.2. Conclusions	36

1. SOLUTIONS ET TAMPONS	41
1.1. SOLUTIONS	41
1.2. TAMPONS	47
2. SOUCHES ET PLASMIDES	52
2.1. SOUCHES	52
2.1.1. Souches bactériennes	52
2.1.1.1. Souche XL1-Blue d' <i>E.coli</i>	52
2.1.1.2. Souche GM48 d' <i>E.coli</i>	53
2.1.2. Souches de levure	53
2.1.2.1. Souches de <i>Kluyveromyces lactis</i>	53
2.1.2.2. Souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
2.2. PLASMIDES	53
2.2.1. KEp6	53
2.2.2. YEp351	54
2.2.3. pRS313	54
2.2.4. pFL44S	54
2.2.5. pMIG1	54
2.2.6. pJO25	55
2.2.7. pJO99	55
2.2.8. pJO101	55
2.2.9. pJO114	55
3. MILIEUX DE CULTURE	56
3.1. POUR LES BACTÉRIES	56
3.1.1. Milieu LB	56
3.2. POUR LES LEVURES	56
3.2.1. Milieux riches	56
3.2.1.1. GPYA	56
3.2.1.2. YPD	56
3.2.2. Milieux sélectifs	57

4. TECHNIQUES RELATIVES À L'ADN RECOMBINANT	58
4.1. LES RÉACTIONS DE RESTRICTION	58
4.1.1. Principes généraux	58
4.1.2. En pratique	58
4.1.3. Remarques générales	59
4.2. L'ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE	59
4.2.1. Buts	59
4.2.2. Principe	59
4.2.3. Réalisation	60
4.3. PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN	60
4.3.1. Récupération sur papier	61
4.3.1.1. Préparation des filtres	61
4.3.1.2. Récupération du fragment d'ADN.....	61
4.3.2. Récupération par adsorption sur une matrice	61
4.3.3. Récupération par adsorption sur une colonne	62
4.4. LA RÉACTION DE LIGATION	63
4.4.1. Principe	63
4.4.2. En pratique	63
4.4.3. Remarques générales	63
4.5. LA TRANSFORMATION	63
4.5.1. Électroporation	63
4.5.1.1. Principe général	63
4.5.1.2. Préparation des cellules électrocompétentes	64
4.5.1.3. Electroporation des cellules XL1-Blue	64
4.5.2. Transformation utilisant le Chlorure de Calcium	64
4.5.2.1. Principe	64
4.5.2.2. Préparation de cellules CaCl ₂ compétentes	64
4.5.2.3. Transformation CaCl ₂	65
4.5.3. Sélection des transformants et des recombinants	65

4.6. PRÉPARATIONS D'ADN	66
4.6.1. Minipréparation d'ADN plasmidique	66
4.6.1.1. Culture	66
4.6.1.2. Lyse des cellules	66
4.6.1.3. Récupération des plasmides	66
4.6.2. Midipréparation d'ADN plasmidique	66
4.6.2.1. Culture	66
4.6.2.2. Lyse des cellules	67
4.6.2.3. Mise sur colonne	67
4.6.3. Préparation d'ADN génomique de levure	67
4.6.3.1. Culture	67
4.6.3.2. Sphéropastes	67
4.6.3.3. Précipitation des protéines	68
4.6.3.4. Phénol-Chloroforme	68
4.6.3.5. Précipitation de l'ADN	68
4.6.3.6. Traitement à la RNAase A	68
4.7. PURIFICATION ET PRÉCIPITATION DE L'ADN	68
4.7.1. Extraction au Phénol-Chloroforme	68
4.7.2. Précipitation de l'ADN	69
4.8. DÉPHOSPHORYLATION	69
4.9. POLYMERASE CHAIN REACTION	70
4.10. SÉQUENCAGE	71
4.10.1. Principe du séquençage	71
4.10.2. En pratique	71
4.10.3. Protocole	72
4.10.3.1. Dénaturation	72
4.10.3.2. Hybridation	72
4.10.3.3. Marquage radioactif	73
4.10.3.4. Réalisation du gel	73
4.10.3.5. Migration du gel	73
4.10.3.6. Après la migration	73
4.11. MARQUAGE DE SONDE PAR "RANDOM PRIME LABELING"	74
4.11.1. Principe	74
4.11.2. Protocole	74

4.12. SOUTHERN BLOT	75
4.12.1. Définition	75
4.12.2. Principe	75
4.12.3. Protocole	76
4.12.3.1. Restriction	76
4.12.3.2. Dénaturation	76
4.12.3.3. Transfert	76
4.12.3.4. Préhybridation	76
4.12.3.5. Hybridation	76
4.12.3.6. Lavages	76
4.12.3.7. Autoradiographie	77
5. TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTÉINES	78
5.1. PRÉPARATION D'UN EXTRAIT DE PROTÉINES SOLUBLES DE LEVURE	78
5.2. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ β -GALACTOSIDASE	78
5.2.1. Principe	78
5.2.2. En pratique	79
5.3. DOSAGE DES PROTÉINES	79
5.4. DÉTECTION IMMUNOLOGIQUE DE PROTÉINES IMMOBILISÉES (WESTERN BLOT)	79
5.4.1. Principe	79
5.4.2. Protocole	80
5.4.2.1. Séparation électrophorétique des échantillons	80
5.4.2.1.1. Principe	80
5.4.2.1.2. Protocole	80
5.4.2.2. Transfert des protéines	81
5.4.2.3. Liaison de l'anticorps primaire sur la protéine cible	81
5.4.2.4. Liaison de l'anticorps secondaire sur l'anticorps primaire	81
5.4.2.5. Détection de l'anticorps secondaire	82

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

La Biologie cherche à répondre à une série de questions relatives à l'essence même du phénomène vivant : "Comment les structures exercent-elles les fonctions, comment celles-ci sont-elles régulées ou au contraire perturbées en cours d'adaptation, de différenciation, ou dans le développement ? Enfin, comment en expliquer l'évolution ?"

Le biologiste aujourd'hui s'adresse immédiatement au programme du vivant. La question centrale devient dès lors : "Quels sont les gènes en cause et comment est assurée leur expression de concert ?"

La détermination du répertoire des gènes et l'identification de leur fonction individuelle est en cours pour divers organismes. A cette étape doit nécessairement faire suite l'élucidation des interactions fonctionnelles concernant ces gènes. Ceci inclut la mise en évidence de partenaires interagissant dans l'activation directe d'un gène participant à une fonction, comme aussi les cascades de gènes plus en amont, avec leur(s) propre(s) contrôle(s), le tout constituant une part d'un vaste système ou réseau interconnecté.

La complexité d'une telle problématique nécessite de l'aborder via des systèmes modèles judicieusement choisis.

Notre travail va s'inscrire dans le cadre des recherches du laboratoire visant à comprendre la régulation transcriptionnelle induite par le glucose chez la levure *Kluyveromyces lactis* prise comme modèle d'eucaryote simple.

L'introduction qui va suivre justifiera l'intérêt et expliquera notre objectif de recherche dans le cadre de la problématique générale soulevée.

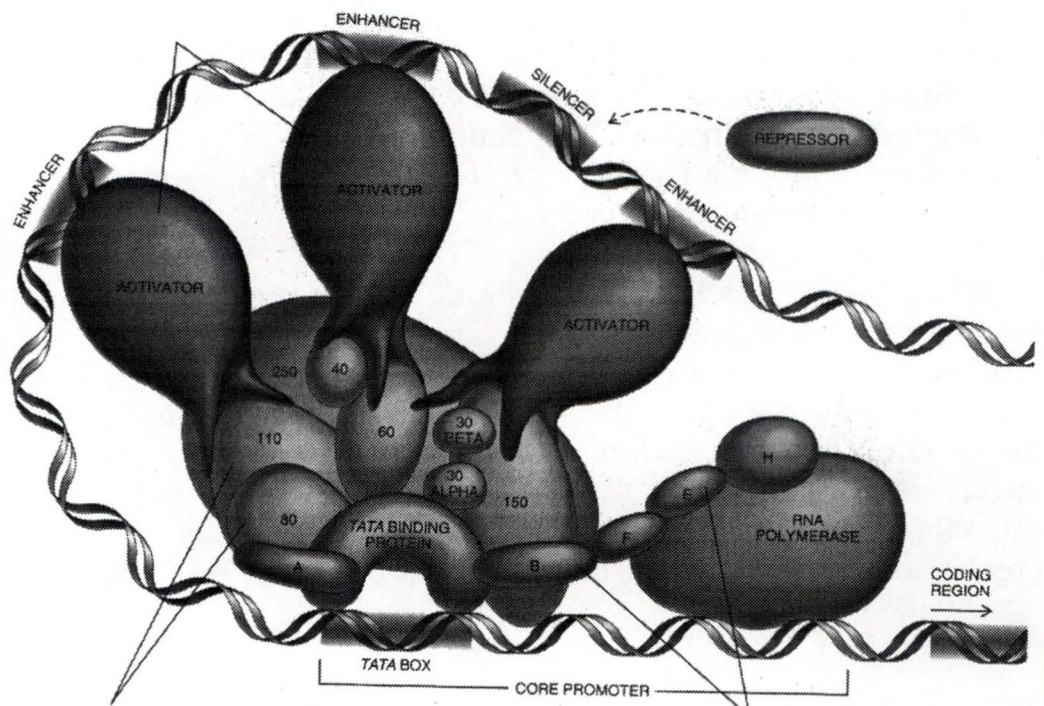


FIGURE 1 : Schéma simplifié d'un complexe d'initiation de la polymérase
 Commentaires : voir texte.
 (Source : Tijan, 1995)

1. LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE

(Tjian, 1995)

1.1. L'IMPORTANCE CRUCIALE DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

Les produits des gènes qu'un organisme est capable d'encoder ne sont jamais tous indispensables au même moment, à la même concentration, au même endroit dans un organisme. L'expression génétique est régulée à toutes les étapes de la synthèse des macromolécules. Cependant, c'est au niveau de l'initiation de la transcription que l'expression d'un grand nombre de gènes est réglée, en fonction des besoins. Le problème central revient donc à comprendre ce qui conditionne, pour un gène donné, la formation d'un PIC, ou complexe d'initiation de la polymérase.

1.2. LA FORMATION DU PIC

(Buratowski, 1994; Sheldon & al., 1995)

L'ARN polymérase II, composante centrale de la machinerie transcriptionnelle pour les ARN messagers, requiert *in vivo* la présence de protéines auxiliaires, appelées facteurs de transcription, ou facteurs TRANS. Par leur fixation sur des séquences d'ADN appelées éléments CIS et par leurs interactions entre eux, ces facteurs TRANS déterminent à quel moment, à quelle fréquence, et à quel endroit l'ARN polymérase II initie la transcription.

1.2.1. Les éléments CIS

On peut définir les éléments CIS comme étant des séquences discrètes de nucléotides intervenant dans le contrôle de l'aptitude de l'ARN polymérase II à initier la transcription.

L'ensemble de la région du gène concernée par la régulation de l'initiation de sa transcription est le promoteur. Il comprend une partie proximale ou promoteur basal commun, et des régions distales ou partie spécifique du promoteur.

1.2.1.1. Les éléments de séquence proprement dits

Les éléments de séquence proprement dits sont ceux qui ont été les plus étudiés. La figure 1 distingue deux types d'éléments CIS proprement dits.

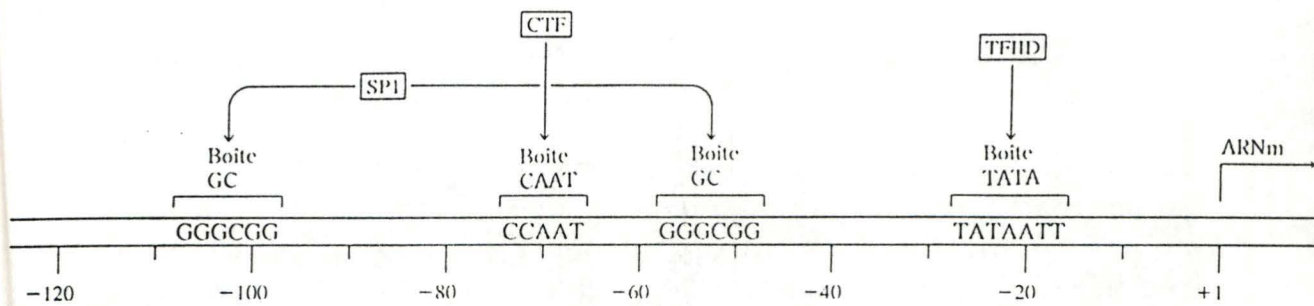


FIGURE 2 : Modèle de promoteur d'un gène transcrit par l'ARN polymérase II
Trois éléments CIS sont fréquemment rencontrés : La boîte TATA, cible de la fixation par la TBP (TATA Binding Protein), la boîte CAAT, qui fixe le CTF (CAAT box Transcription Factor), et la boîte GC, fixant SP1.
(Source : Rawn, 1990)

1.2.1.1.1. Les éléments proximaux

Ce sont des éléments de séquences localisés à proximité du site +1 de transcription. Ensemble, ils forment le promoteur proximal ou de base ("Core Promoter"). Un grand nombre de gènes eucaryotes présentent une organisation similaire au niveau de leur promoteur. La figure 2 présente un schéma simple d'un exemple de promoteur de classe II eucaryote. Dans ce promoteur, on distingue trois éléments de séquences : une boîte TATA, une boîte CAAT et des boîtes GC.

1.2.1.1.2. Les éléments distaux

Ces éléments sont situés à grande distance du promoteur proximal et responsables de la spécificité de l'expression de certains gènes. On peut les retrouver plusieurs milliers de nucléotides en amont ou en aval du promoteur. Situés en aval du promoteur, ces éléments de séquences sont appelés DRS (Downstream Regulating Sequences). Plus fréquemment, ces éléments sont situés en amont du promoteur. Ils sont alors dénommés UAS (Upstream Activating Sequences) s'ils sont activateurs, et URS (Upstream Repressing Sequences) s'ils sont répresseurs.

1.2.1.2. Les autres éléments CIS

(Bird, 1986; Roth, 1995; Wolffe, 1994a; Wolffe, 1994b; Majumder & al., 1995)

Nombre de travaux récents mettent en évidence le rôle de structures d'ordre élevé de l'ADN dans le contrôle de la transcription. Le repliement de l'ADN proposé dans la mise en place d'un PIC n'en est qu'un exemple. L'état réprimé ou déréprimé d'un gène à un locus donné serait fonction de la structure chromatinienne, elle-même en rapport avec le degré de méthylation (notamment aux îlots CpG), l'acétylation des histones, le déplacement des nucléosomes, et d'une dynamique mal connue de superenroulement de l'ADN.

1.2.2. L'effecteur et les facteurs TRANS

Comme déjà cité plus haut, l'ARN polymérase II est la composante principale de la machinerie de transcription des ARN messagers, puisque c'est à cette protéine qu'incombe la fonction effectrice de polymérisation de l'ARN.

Pendant, l'ARN polymérase II requiert la présence d'un certain nombre de protéines auxiliaires, les facteurs TRANS.

Les facteurs TRANS sont en principe de deux types fonctionnels, soit activateurs (Tjian & *al.*, 1993), soit répresseurs. Notons toutefois qu'un même facteur peut être répresseur ou activateur (Ip, 1995), selon la nature des partenaires avec lesquels il interagit dans les PIC de gènes distincts. Du point de vue de leur localisation dans le PIC, il faut aussi distinguer parmi les facteurs ceux qui interagissent directement avec l'ADN de ceux qui présentent exclusivement des interactions protéines-protéines. La figure 1 présente un schéma simplifié de la structure d'un PIC, distinguant :

- L'ARN polymérase II, effecteur de la machinerie de transcription des ARN messagers;
- Les activateurs, qui interagissent directement avec l'ADN, au niveau d'éléments CIS distaux activateurs;
- Les répresseurs, qui interagissent directement avec l'ADN, au niveau d'éléments CIS distaux répresseurs;
- La TATA Binding Protein (TBP), qui se lie au niveau de la boîte TATA du promoteur proximal eucaryote;
- Les facteurs associés à la TBP (TAF, pour TBP Associated Factors, symbolisés par des nombres correspondant à leur PM), qui intègrent les signaux originaires d'activateurs et peut-être de répresseurs, et relaient ce signal aux facteurs de transcription généraux;
- Les facteurs de transcription généraux, qui transmettent le signal envoyé par les activateurs ou les répresseurs à l'effecteur, l'ARN polymérase II. Ces facteurs sont TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIH et TFIIJ. Ils sont appelés généraux car en relation avec le "Core Promoter", commun à tout gène.

2. LE MODÈLE D'ÉTUDE

La régulation de la transcription est, nous l'avons vu, un phénomène biologique d'une extrême complexité par le nombre, la nature et les interactions entre partenaires qui y participent, surtout au sein de réseaux de régulation eux-mêmes interconnectés.

Analyser efficacement et en profondeur un tel mécanisme nécessite un choix judicieux du système modèle.

La répression glucose est un des systèmes de régulation les plus étudiés à ce jour chez *Saccharomyces cerevisiae*, tant pour ce qui concerne les connaissances des voies de régulation en réseau que les mécanismes moléculaires CIS-TRANS eux-mêmes.

L'existence de ce terme de référence -la répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae*- et le fait qu'il en existe des variants chez *Kluyveromyces marxianus* et *Kluyveromyces lactis* fournit au biologiste une clé pour tenter d'identifier les composants particuliers qui les spécifient et d'en disséquer le rôle.

2.1. L'ORGANISME : LA LEVURE

La levure est sans conteste le modèle prototype et l'outil de choix de la Génétique, de la Biologie moléculaire et de la Biologie cellulaire des eucaryotes.

Au titre des avantages que présente la levure, citons que c'est un microorganisme (mise en culture et sélection aisées), un eucaryote (des informations à propos de mécanismes moléculaires sont informatives pour l'étude de cellules d'organismes supérieurs), qu'elle est facile à cultiver, aussi bien à l'état haploïde que diploïde, et qu'elle est l'objet principal d'études fondamentales (et appliquées) chez les eucaryotes. L'arsenal des techniques disponibles classiques (croisement, sélection ...) ou moléculaires (clonage, complémentation, transplacement, ...) est donc vaste et les données accumulées sans égal. Rappelons à cet égard que le génome de *Saccharomyces cerevisiae* sera le premier de tous les eucaryotes à être complètement séquencé dans les mois à venir et que près de 20% des gènes humains connus jusqu'à présent ont leur homologue structural et fonctionnel chez *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.. LE SYSTÈME : "RÉPRESSION GLUCOSE"

2.2.1. La répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae*

(Gancedo, 1992; Ronne, 1995; Trumbly, 1992)

2.2.1.1. Généralités

Chez la levure, on observe une hiérarchie dans l'utilisation des sources de carbone : les substrats fermentables (glucose, fructose) sont métabolisés plus facilement que les sucres alternatifs (saccharose, galactose) et que les composés non fermentables (acétate, éthanol).

En général, le glucose réprime l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des sources de carbone alternatives. C'est le phénomène de répression glucose, dont le but serait d'économiser de l'énergie, en limitant l'expression d'enzymes superflues .

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, de nombreuses cibles de la répression glucose sont connues :

- Les enzymes du métabolisme des sucres alternatifs (codés par les gènes *SUC*, *MAL*, et *GAL*) et des substrats non fermentables (*AdhII*, acetyl coenzyme A synthétase).
- Les enzymes de la respiration (cytochromes).
- Les enzymes de la gluconéogenèse (*Isocitrate lyase*, *fructose-1,6-bisphosphatase*, codées respectivement par les gènes *ICL1* et *FBP1*).
- Les enzymes du développement mitochondrial et de la fonction peroxysomale.

Ce contrôle, exercé par le glucose, s'effectue essentiellement au niveau de la transcription des gènes concernés. Cependant, la répression glucose peut impliquer aussi un contrôle de la dégradation des ARN messagers, notamment au niveau de certains messagers respiratoires (Lombardo & *al.*, 1992), une inactivation enzymatique, notamment au niveau des enzymes de la gluconéogenèse (Entian & *al.*, 1992), ...

Les premières analyses de la voie de répression par le glucose ont été réalisées sur le modèle du gène *SUC2*.

Souche	Gène impliqué	Protéine	Phénotype
<i>snf1</i>	<i>SNF1</i>	Snf1p, dérépresseur	Snf1p ne peut plus déréguler <i>SUC2</i> , qui est donc réprimé constitutivement
<i>mig1</i>	<i>MIG1</i>	Mig1p, répresseur	Mig1p ne peut plus réprimer <i>SUC2</i> , qui est donc exprimé constitutivement

N.B. : Constitutivement = sans plus de régulation sur le phénomène

TABLEAU 1 : Exemples de mutations extragéniques de répression et de dérégulation affectant l'expression de *SUC2*.

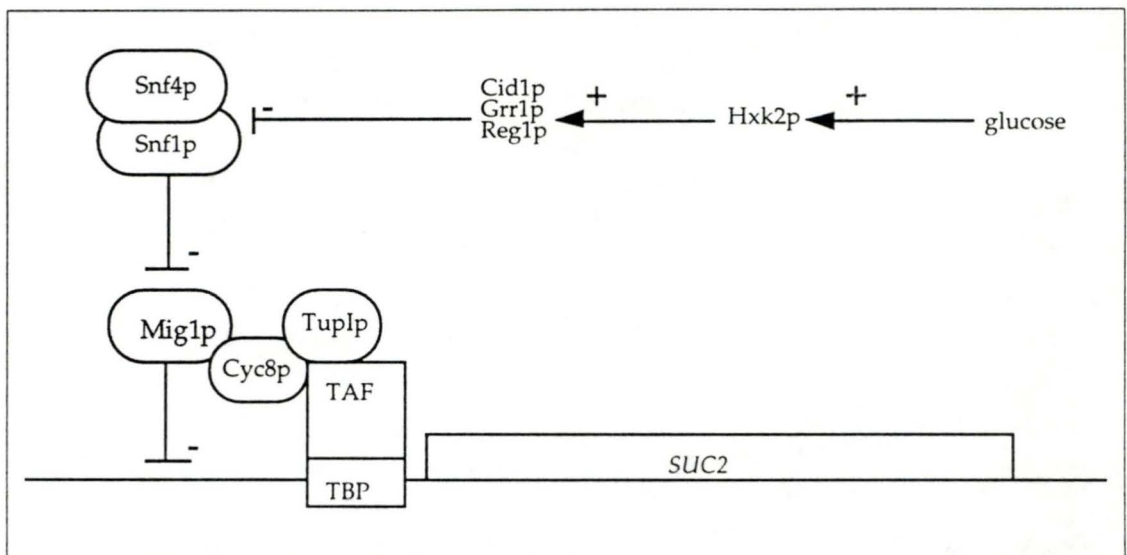


FIGURE 3 : Modèle simplifié présentant la régulation de l'expression du gène *SUC2*.

C'est vraisemblablement l'hexokinase PII, codée par le gène *HXK2*, qui joue le rôle de senseur pour le taux de glucose. Les activités biochimiques de Cid1p, Grr1p, et Reg1p sont de nature inconnue, mais elles doivent probablement servir de relais pour le signal engendré par Hxk2p, en inhibant ou en contrecarrant l'activité de la kinase Snf1p. La protéine Snf4p, physiquement associée à Snf1p, est requise pour une activité kinase maximale de Snf1p. Cette activité kinase de Snf1p contrecarre l'action de Mig1p en absence de glucose. En présence de glucose, Mig1p réprime l'expression de *SUC2*, par l'intermédiaire de Cyc8p et Tup1p.

2.2.1.2. La répression glucose du gène *SUC2* (Gancedo, 1992; Trumbly, 1992)

2.2.1.2.1. Cadre général de la répression

L'enzyme invertase, qui hydrolyse le saccharose en glucose et fructose, est codée par une famille de gènes *SUC* apparentés. Le plus étudié de ces gènes *SUC* est le gène *SUC2*, régulé de façon exclusive par le phénomène de répression glucose. Sa régulation apparaît donc moins complexe que celle d'autres gènes.

Les mutations appartenant à des groupes de complémentation autres que *SUC2* et affectant son expression peuvent être regroupées en deux classes (Tableau 1):

- Les mutations de dérépression, c'est-à-dire qui empêchent, constitutivement, la dérépression et donc l'expression de *SUC2*. C'est le cas des mutants *snf1* et *snf4*;
- Les mutations de répression, c'est-à-dire qui font en sorte que le gène *SUC2* est exprimé constitutivement. C'est le cas des mutants *hvk2*, *reg1*, *grr1*, *cid1*, *mig1*, *cyc8*, et *tup1*.

2.2.1.2.2. Voies de régulation du gène *SUC2*

Pour établir à quel niveau de la cascade de régulation les gènes correspondant à ces différentes mutations exercent leur action, les relations épistatiques entre ces gènes (étudiées via l'effet de doubles mutations sur l'expression de *SUC2*) ont été examinées. Par exemple, l'expression de la mutation *snf1*, entraînant seule une répression constitutive de *SUC2*, est supprimée par chacune des trois mutations *mig1*, *cyc8*, *tup1*. En effet, les doubles mutants *snf1-mig1*, *snf1-cyc8*, *snf1-tup1*, expriment de façon constitutive des taux élevés d'invertase. Ceci signifie que le gène *SUC2* n'est plus réprimé par le glucose (mutation de répression), donc que l'effet de la mutation *snf1* est masqué par celui des mutations *mig1*, *cyc8*, et *tup1*. On en déduit que les trois mutations *mig1*, *cyc8*, et *tup1* affectent une étape plus en aval de la voie de régulation par rapport à la mutation *snf1*.

Un modèle de répression de *SUC2* a donc pu être développé sur base des relations d'épistasie existant entre les différentes mutations de répression et de dérépression et sur base des propriétés biochimiques des produits des gènes concernés (Figure 3).

Ainsi que nous venons de le voir, les mutations extragéniques affectant l'expression du gène *SUC2* définissent une voie générale pour la répression glucose. Cette même voie de répression est également impliquée dans la régulation de

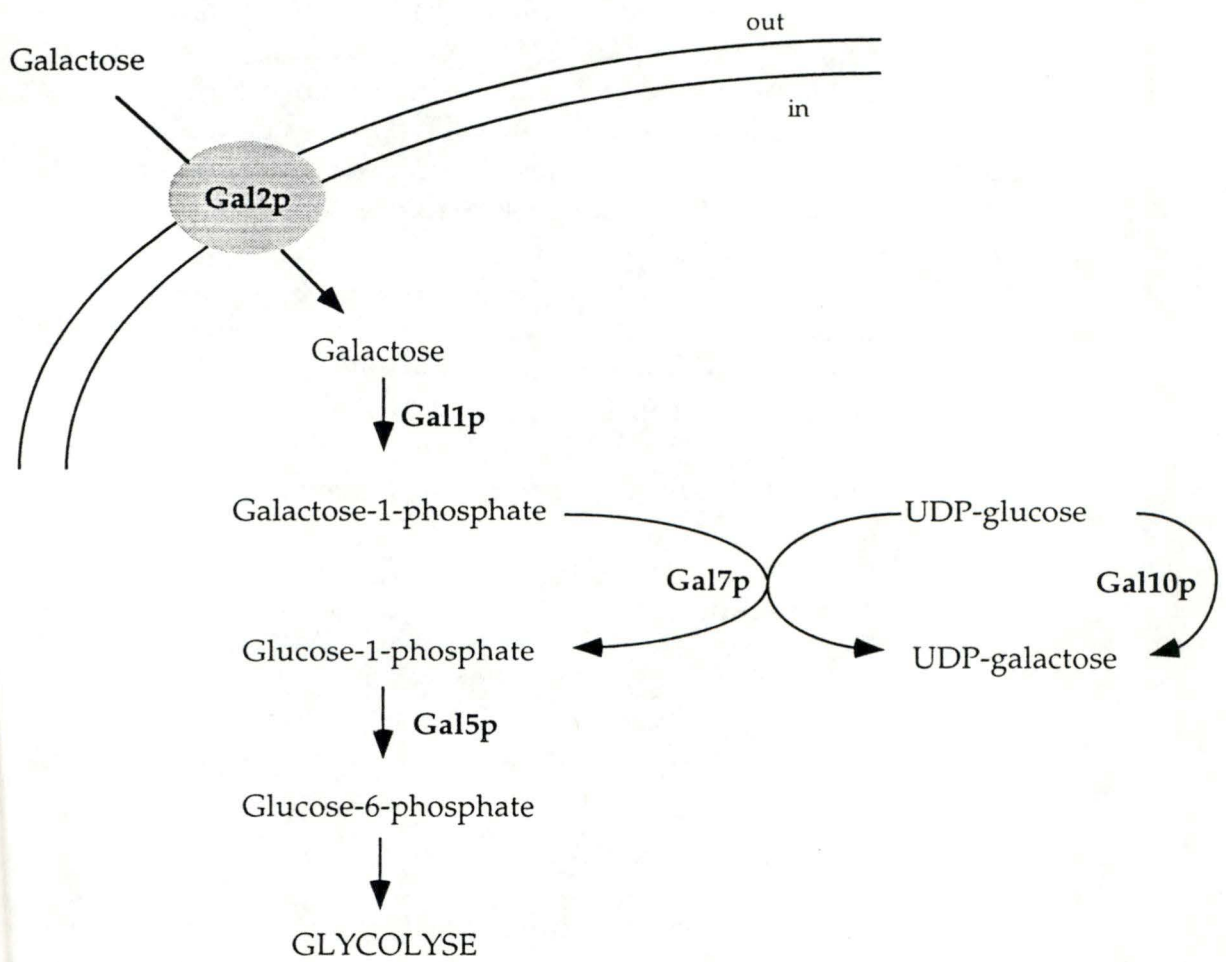


FIGURE 4 : Voie métabolique d'utilisation du galactose chez *Saccharomyces cerevisiae*
 Commentaires : voir texte.

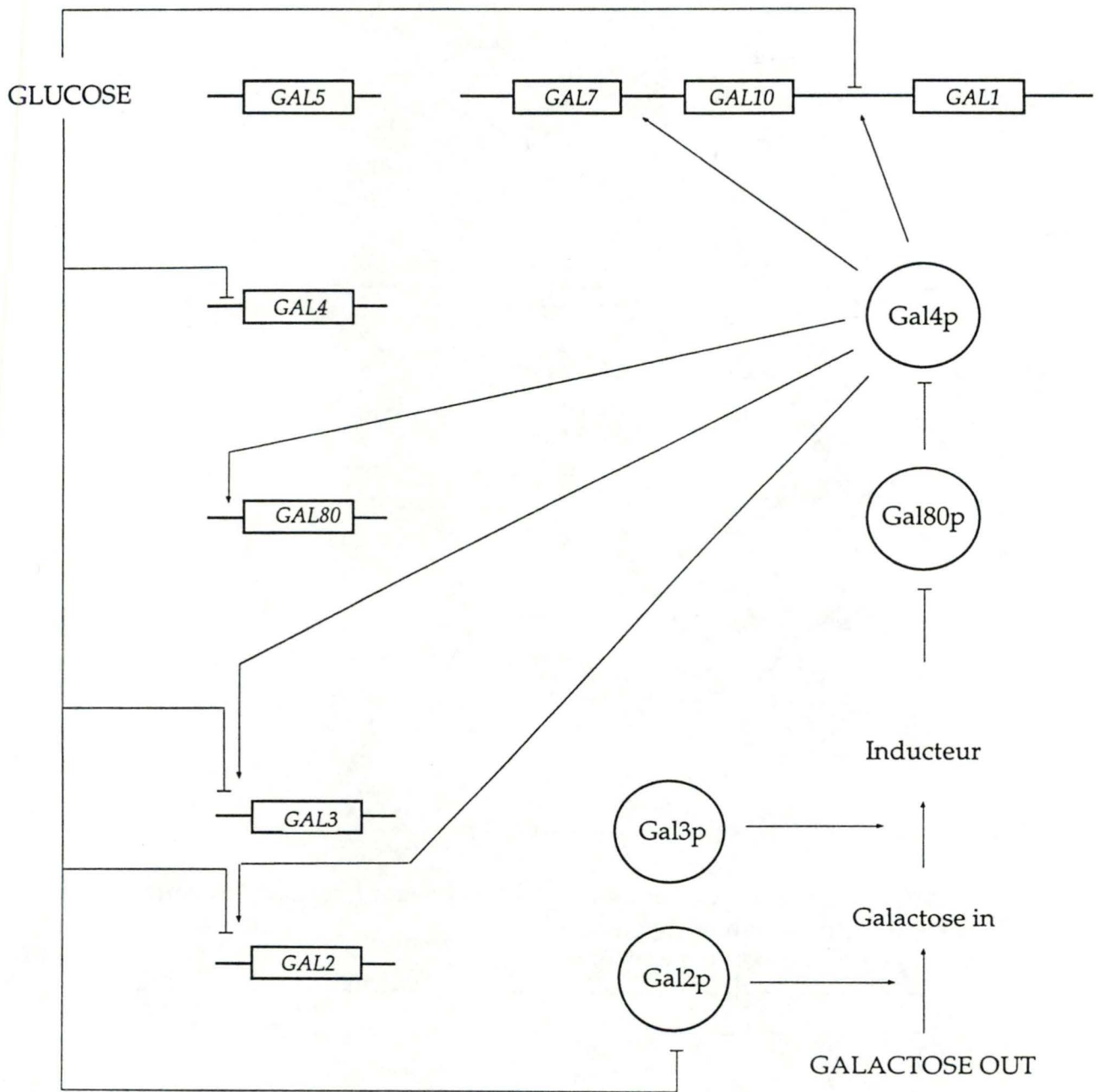


FIGURE 5 : Modèle de régulation de l'expression des gènes *GAL* chez *Saccharomyces cerevisiae*
 Commentaires dans le texte.

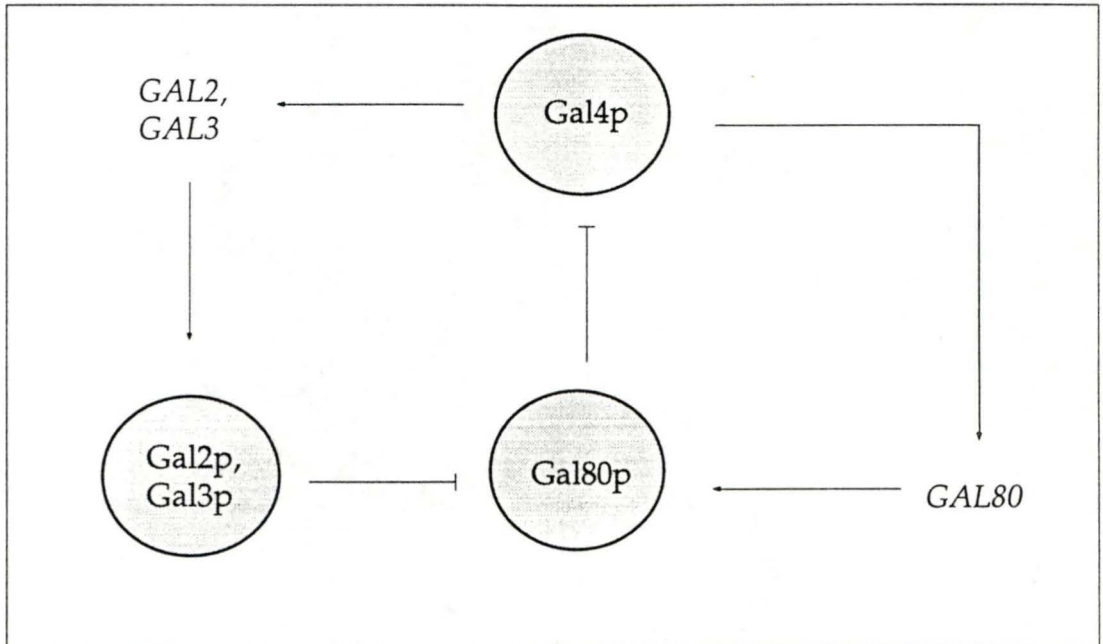


FIGURE 6 : Boucles de FeedBack positif et négatif concernant certains facteurs appartenant au système GAL
 Commentaires : voir texte.

l'expression d'un grand nombre de gènes réprimés par le glucose. C'est notamment le cas des gènes responsables du métabolisme du galactose, que nous allons étudier maintenant plus en détail.

2.2.1.3. La régulation de l'expression des gènes GAL

(Gancedo, 1992; Johnston, 1987; Johnston & al., 1992; Trumbly, 1992)

2.2.1.3.1. Cadre général de la régulation

Saccharomyces cerevisiae est une levure capable d'utiliser le galactose comme seule source de carbone et d'énergie.

La figure 4 présente la voie métabolique empruntée par le galactose chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le galactose entre dans la cellule par une perméase spécifique codée par le gène *GAL2*. Il est ensuite converti en glucose-6-phosphate par les enzymes de la voie Leloir. Ces enzymes sont codées par les gènes *GAL1* (kinase), *GAL7* (transférase), *GAL10* (épimérase) et *GAL5* (mutase).

Le figure 5 présente un modèle de régulation de l'expression des gènes *GAL* chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'induction des gènes *GAL* par le galactose requiert plusieurs étapes : le galactose entre dans la cellule par Gal2p. Un inducteur, de nature inconnue, bloque l'activité du répresseur Gal80p. Ce faisant, il rétablit l'activité de Gal4p, qui est alors capable d'activer la transcription des gènes *GAL*. Deux hypothèses sont avancées quant à la nature de l'inducteur. La première (Bajwa & al., 1988) propose que l'inducteur est produit à partir du galactose, grâce à l'activité catalytique de Gal3p. Selon la seconde (Bhat & al., 1992), le galactose convertit Gal3p en une forme capable d'empêcher Gal80p d'inactiver Gal4p. La répression des gènes *GAL* par le glucose s'exerce à plusieurs niveaux. Une série de gènes (*GAL1*, *GAL2*, *GAL3*, *GAL7*, et *GAL10*) sont ainsi soumis à ce double contrôle, inducteur et répresseur. Le gène *GAL5* est exprimé de manière constitutive.

D'autre part, l'activité de certains facteurs est soumise à un contrôle en boucle (Figure 6), assurant l'homéostasie des gènes *GAL* durant la période d'induction.

2.2.1.3.2. Mécanisme moléculaire d'induction des gènes GAL par le galactose

L'activation de la transcription des gènes *GAL* requiert la fixation de Gal4p, sous forme de dimère, au niveau de séquences CIS situées en amont des gènes *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL2*, *GAL3* et *GAL80*. Les séquences cibles, appelées UAS_{GAL}, sont au nombre de quatre dans la région intergénique séparant *GAL1* de

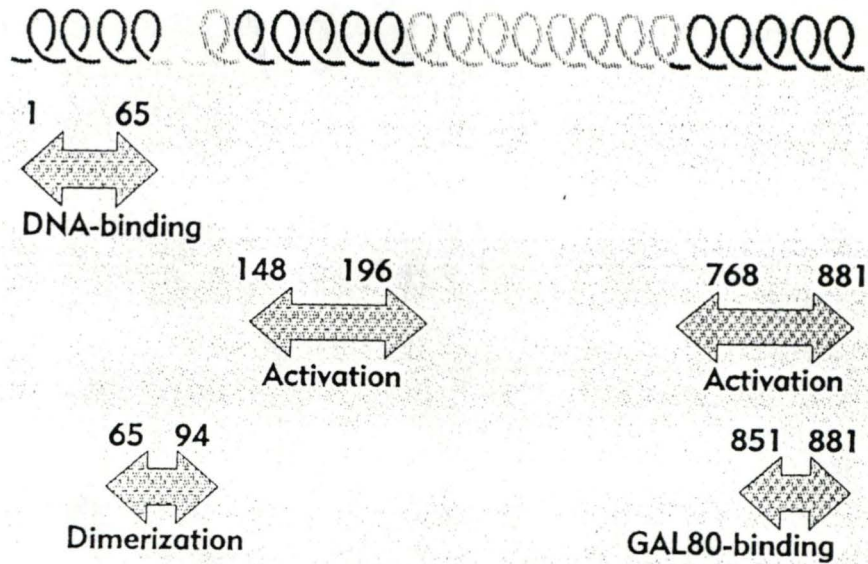
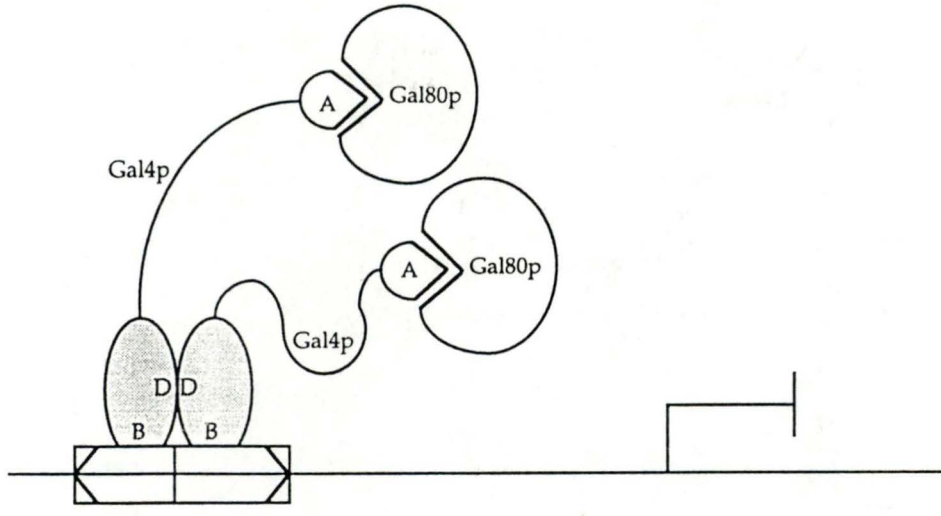


FIGURE 7 : Les domaines fonctionnels de Gal4p.

Sont présentés dans la figure : le domaine de liaison à l'ADN (amino-terminal), le domaine de dimérisation, les domaines d'activation (le central cryptique, le carboxy-terminal fonctionnel), et le domaine de liaison de Gal80p (carboxy-terminal).

(Source : Lewin, 1994)

a)



b)

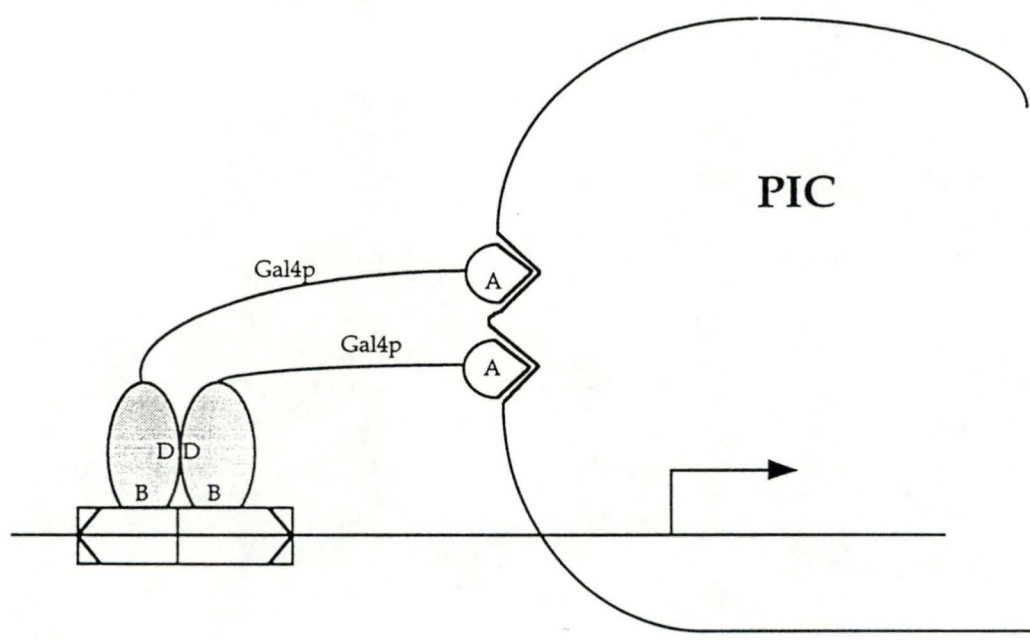


FIGURE 8 : Modèle représentant le mécanisme d'action de Gal4p et Gal80p en conditions non inductrices (a) et inductrices (b).
(A = Domaine d'activation de la transcription de Gal4p; B = domaine de liaison à l'ADN de Gal4p; D = Domaine de dimérisation de Gal4p; PIC = Complexe d'initiation de la Polymérase)
Commentaires dans le texte.

GAL10, en double exemplaire en amont des gènes *GAL7*, *GAL3* et *GAL2*, et en un seul exemplaire dans le promoteur de *GAL80*. La séquence consensus de ces sites est 5'-CGG(N)₅A/T(N)₅CCG-3'. Elle correspond à une séquence palindromique. Chaque sous-unité Gal4p se lie à une moitié de cette séquence palindromique. La protéine Gal4p possède plusieurs domaines (Figure 7): un domaine de fixation à l'ADN, deux domaines activateurs de la transcription, et un domaine de dimérisation. Le domaine de fixation à l'ADN se trouve du côté amino-terminal. Il forme un motif de type Zn(II)₂Cys₆ (Pan & *al.*, 1990), qui permet à l'activateur Gal4p de se fixer spécifiquement à l'ADN, au niveau des sites UAS_{GAL}. Le domaine de dimérisation recouvre partiellement le domaine de liaison à l'ADN. Le domaine activateur de la transcription adjacent à celui de dimérisation serait cryptique. Le second, localisé à l'extrémité carboxy-terminale, est la cible de l'inhibition par Gal80p. Il est donc probablement le domaine fonctionnel d'activation de la transcription.

La figure 8 présente le mécanisme par lequel la transcription des gènes *GAL* est empêchée en absence de galactose, induite en présence de galactose. En conditions non inductrices (en absence de galactose), Gal80p se fixe au niveau du domaine d'activation de la transcription, empêchant Gal4p d'interagir avec le PIC, et donc d'activer la transcription. En conditions inductrices (en présence de galactose), l'inducteur provoque la dissociation du complexe Gal80p-Gal4p. Gal4p est alors capable d'activer la transcription des gènes *GAL*.

2.2.1.3.3. L'expression des gènes *GAL* est réprimée en présence de glucose (Figure 5)

(Flick & *al.*, 1990; Griggs & *al.*, 1991; Johnston & *al.*, 1994; Lamphier & *al.*, 1992)

Le galactose étant une source de carbone alternative pour *Saccharomyces cerevisiae*, les enzymes responsables de sa dégradation, superflues en présence de glucose, sont sujettes à la répression glucose.

Cette répression se produit à différents niveaux :

- Le glucose inhibe la voie de transport du galactose en réprimant *GAL2* (Tschopp & *al.*, 1986) et en inactivant les perméases préexistantes, probablement via une activation de diverses protéases (Matern & *al.*, 1977).
- Le glucose inhibe la synthèse de l'inducteur, car l'expression de *GAL3* est réprimée lors de la croissance sur un milieu contenant du glucose (Bajwa & *al.*, 1988). Cette action pourrait être médiée par le répresseur Mig1p.



FIGURE 10 : Reconnaissance, par Mig1p, de sa séquence cible spécifique

(a) Modèle d'interaction des 2 doigts de Zinc (numérotés sur la figure) de Mig1p avec les deux triplets de bases au niveau de la boîte GC. Ce sont les acides aminés 15, 18, et 21 de chaque doigt de Zinc qui sont responsables de la reconnaissance spécifique (indiquée par des points entre l'acide aminé et la base de l'ADN) de la séquence cible par Mig1p.

(b) La boîte AT stabilise l'interaction entre Mig1p et sa cible via une pliure de cette région occasionnée par la fixation des 2 doigts de Zinc de Mig1p (numérotés sur la figure) au niveau des deux triplets riches en GC.

(Source : Lundin & *al.*, 1994)

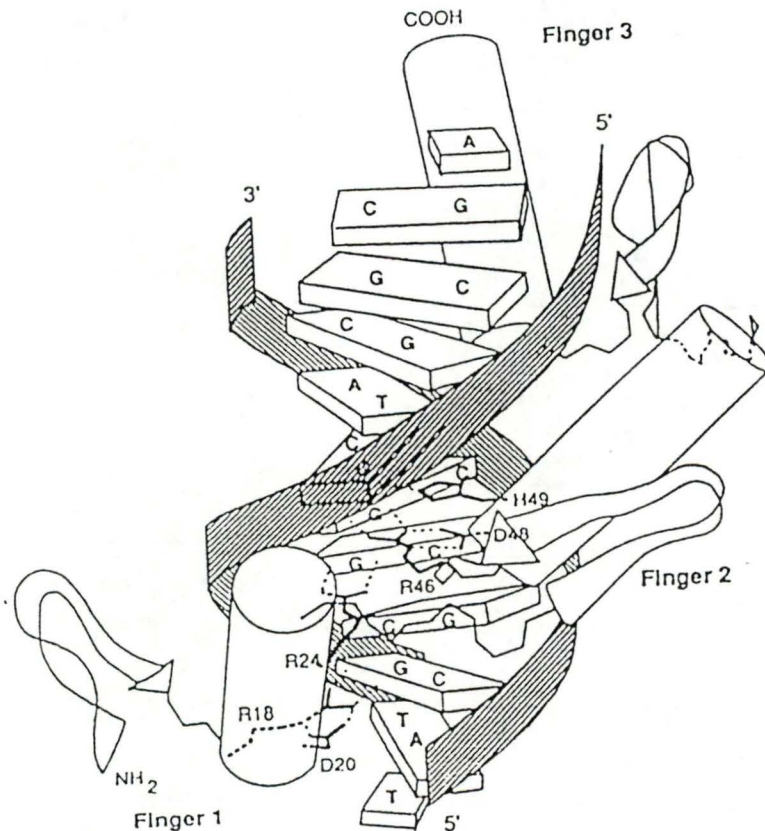


FIGURE 11 : Schéma réalisé à partir de la structure cristalline du complexe formé par Krox20p et sa cible dans l'ADN.

Les acides aminés impliqués dans la reconnaissance spécifique des bases de l'ADN sont indiqués par leur lettre, et numérotés à partir de l'extrémité amino-terminale, pour les doigts de Zinc 1 (R18, D20, R24) et 2 (R46, D48, H49). Les contacts du 3ème doigt (R74, D76, R80) ne sont pas indiqués car masqués par l'ADN.

Les hélices α sont représentées par des cylindres, les brins β par des flèches. Voir texte pour tout autre commentaire.

(Source : Pavletich & *al.*, 1991)

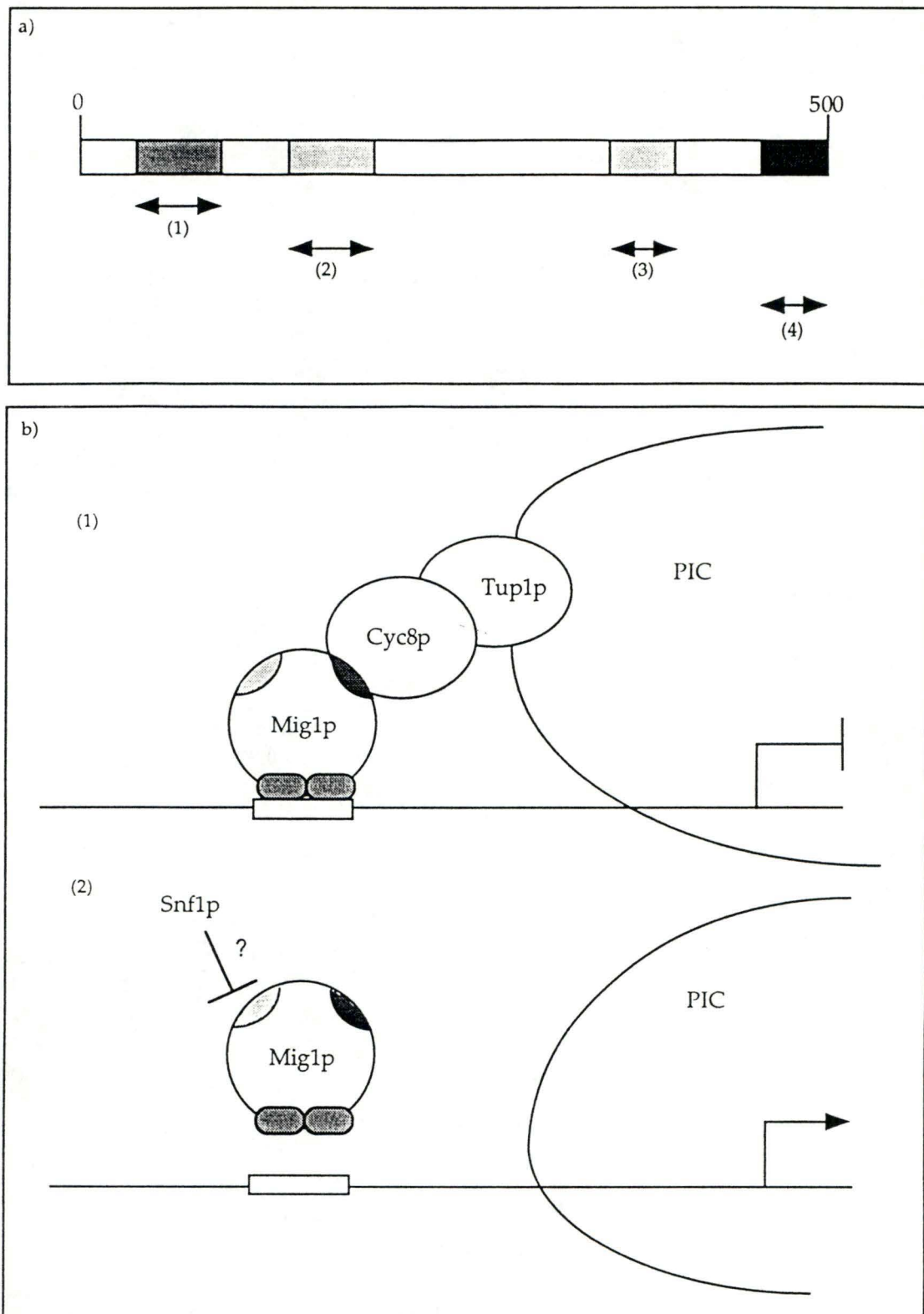


FIGURE 12 : Structure et mode d'action du répresseur Mig1p

- (a) Localisation des différentes régions fonctionnellement importantes de Mig1p. Domaine de liaison à l'ADN, correspondant aux deux doigts de Zinc (1). Domaines cibles de l'inhibition de l'activité de Mig1p en absence de glucose (2, 3). Domaine répresseur, carboxy-terminal (4).
- (b) Mécanisme moléculaire d'induction(1)/répression(2) de l'activité de Mig1p.

Commentaires : voir texte.

- Le glucose inhibe l'expression de *GAL4*. Cette répression de l'expression de *GAL4* est médiée par les produits des gènes *MIG1*, *CYC8*, et *TUP1* (Nehlin & *al.*, 1991).
- Enfin, le glucose réprime *GAL1* (indépendamment de Gal4p), via Mig1p (Nehlin & *al.*, 1991).

2.2.2. Un facteur central de la répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* : la protéine Mig1p

Un facteur central de la répression glucose est la protéine Mig1p.

Mig1p est un répresseur transcriptionnel qui exerce son action en se liant à l'ADN, au niveau de séquences CIS spécifiques situées en amont de ses gènes cibles (Nehlin & *al.*, 1990).

La protéine Mig1p est une protéine de la famille des protéines à doigts de Zinc de type C_2H_2 (Figure 9) (Angrand, 1993; Chouard & *al.*, 1994; Rhodes & *al.*, 1993) et de la sous-famille des GC Box Binding Proteins, se liant à des séquences CIS riches en G et en C. A cette sous-famille appartiennent également les protéines Sp1p, Kroxp/Egrp, une protéine de la tumeur de Wilms (WT1p), et CreAp, l'homologue de Mig1p chez *Aspergillus* (Dowzer & *al.*, 1991; Drysdale & *al.*, 1993). Le nombre de doigts de Zinc contenus dans la protéine peut varier au sein de cette famille : Mig1p en possède deux, Sp1 en a trois, et WT1p en comporte quatre.

Mig1p se lie à une séquence cible spécifique, qui se divise en deux parties (Figure 10) (Lundin & *al.*, 1994):

- Une région riche en GC, de 6 bases de long, dont le consensus est le suivant : (G/C)(C/T)GG(G/A)G. Le premier triplet de bases est reconnu par le deuxième doigt de Zinc, alors que le second triplet est reconnu par le premier doigt de Zinc de Mig1p. Une étude récente (Pavletich & *al.*, 1991) donne la structure cristalline du complexe formé par Krox20p, protéine mammalienne ayant un motif doigts de Zinc de type C_2H_2 , avec sa cible dans l'ADN. Elle identifie les résidus de chaque doigt qui sont responsables des contacts spécifiques avec les bases du triplet (Figure 11). Lundin & *al.* (1994) ont montré que ce principe de reconnaissance était également valide pour la reconnaissance de la boîte GC par les deux doigts de Zinc de Mig1p : ce sont les résidus 21, 18, et 15 de chaque doigt qui sont responsables de la reconnaissance spécifique des 1^{ère}, 2^{ème}, et 3^{ème} bases dans un triplet, respectivement.
- Une région riche en AT, qui précède la région riche en GC. Il a été montré que Mig1p courbe l'ADN en se fixant au niveau de cette boîte AT. Cette région pourrait de la sorte stabiliser l'interaction entre Mig1p et sa cible, adaptation développée parmi certaines protéines ne contenant que deux doigts de Zinc, afin d'assurer

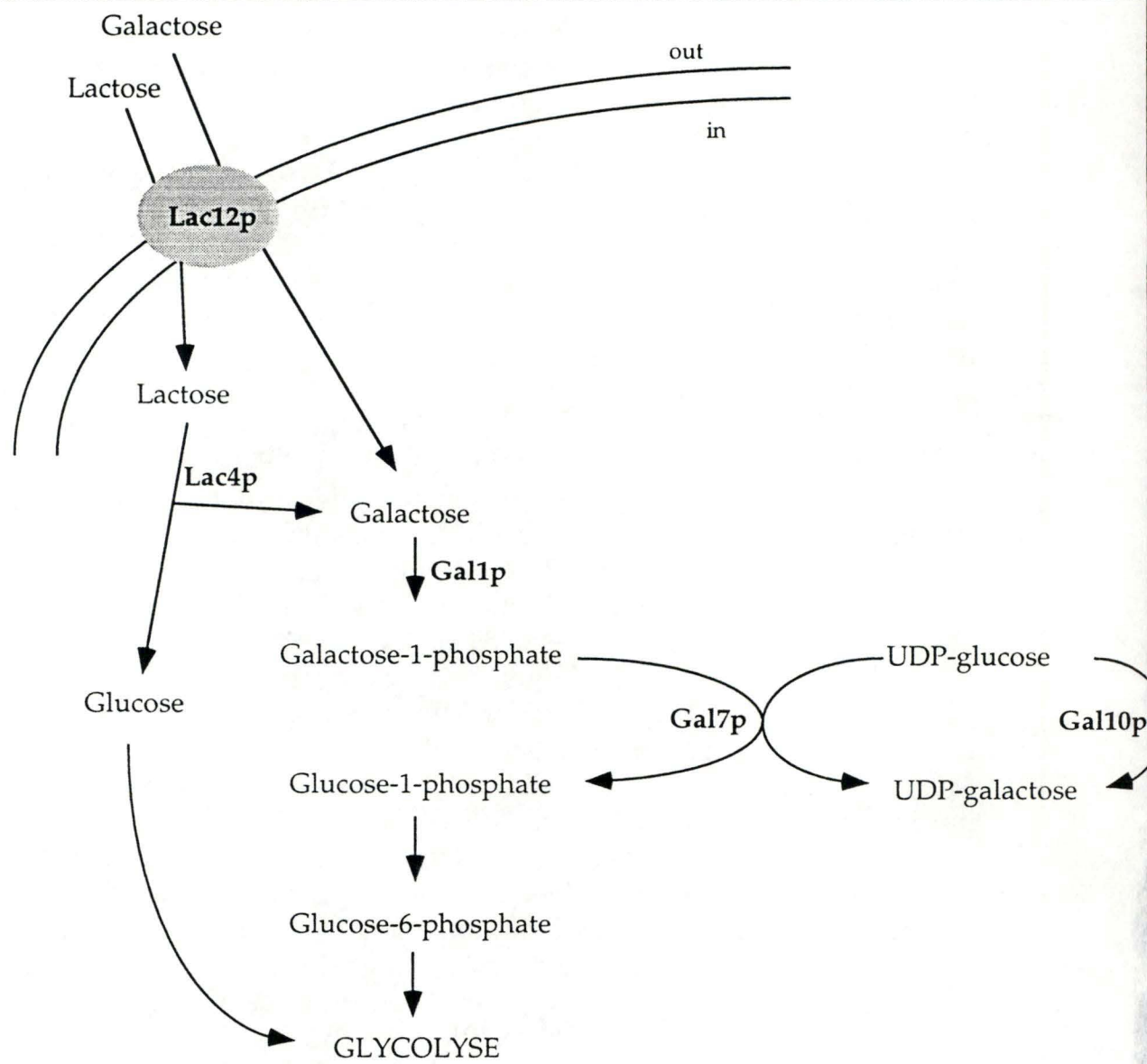


FIGURE 13 : Voie métabolique d'utilisation du lactose et du galactose chez *Kluyveromyces lactis*
 Commentaires : voir texte.

une fixation de haute affinité des protéines sur leur cible.

Cette séquence cible se retrouve dans les promoteurs d'une grande partie des gènes sujets à la répression glucose (*FBP1*, *HAP4*, *GAL4*, *GAL3*, *GAL1*, *SUC2*). Pour certains d'entre eux (*GAL4*, *GAL1*, *SUC2*), le rôle répresseur de Mig1 a d'ailleurs déjà été confirmé (Lundin & al., 1994; Nehlin & al., 1990; Nehlin & al., 1991).

L'effet répresseur de Mig1p est médié par un petit domaine protéique comprenant les 24 résidus carboxy-terminaux de la protéine (Östling & al., 1995). Ces 24 acides aminés pourraient être suffisants pour recruter le complexe général de répression contenant les protéines Cyc8p (adaptateur) et Tup1p (effecteur) (Keleher & al., 1992; Treitel & al., 1995; Tzamarias & al., 1994; Williams & al., 1991)(Figure 12).

En absence de glucose, l'activité de Mig1p est inhibée. Cette répression est médiée par deux éléments de séquence présents au sein de Mig1p. Le mécanisme par lequel ces deux régions inhibent l'activité de Mig1p pourrait dépendre d'une phosphorylation par la kinase Snf1p (Östling & al., 1995) (Figure 12).

2.2.3. Le système GAL-LAC et la répression glucose chez *Kluyveromyces lactis*

2.2.3.1. Généralités

Alors que chez *Saccharomyces cerevisiae* la croissance sur un milieu contenant du glucose a pour conséquence un changement drastique dans le "pattern" d'expression de ses gènes (voir 2.2.1.1.), la répression glucose chez *Kluyveromyces lactis* semble plus nuancée (Breunig, 1989).

2.2.3.2. Le système GAL-LAC chez *Kluyveromyces lactis* et comparaison avec *Saccharomyces cerevisiae*

(Riley & al., 1984; Webster & al., 1988a; Webster & al., 1988b)

2.2.3.2.1. Voie métabolique d'utilisation du galactose et du lactose (Figure 13)

Kluyveromyces lactis est une levure capable d'utiliser le galactose ou le lactose comme seule source de carbone et d'énergie, alors que *Saccharomyces cerevisiae* est incapable de métaboliser le lactose.

Chez *Kluyveromyces lactis*, le lactose entre dans la cellule par la lactose perméase, protéine transmembranaire spécifique codée par le gène *LAC12*. Il est ensuite clivé en glucose et en galactose par la β -galactosidase, codée par le gène *LAC4* (Sheetz & al., 1981). Le galactose pénètre notamment dans la cellule par la lactose perméase.

Le galactose intracellulaire, provenant du milieu extérieur ou d'une dégradation du lactose par la β -galactosidase, est métabolisé, comme chez *Saccharomyces cerevisiae*, par les enzymes de la voie Leloir, codées par les gènes *GAL1* (kinase), *GAL7* (transférase) et *GAL10* (épimérase) (Webster & al., 1988a; Webster & al., 1988b) (Figures 13 et 14).

2.2.3.2.2. Organisation génomique des gènes GAL-LAC

Les gènes *GAL1*, *GAL7* et *GAL10* de *Kluyveromyces lactis* sont homologues des gènes *GAL1*, *GAL7* et *GAL10* de *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, ils présentent une organisation très semblable (Figure 15) (Webster & al., 1988a; Webster & al., 1988b):

- Ils sont organisés sur un même chromosome, dans le même ordre par rapport au centromère
- Leurs transcrits présentent la même orientation et sont de taille semblable
- Les régions intergéniques séparant *GAL1* de *GAL10* et *GAL10* de *GAL7* sont de taille comparable. Cependant, des différences apparaissent dans la localisation des UAS_{GAL} .

Les gènes *LAC4* et *LAC12* sont situés sur un même chromosome et sont transcrits de façon divergente à partir d'une région intergénique commune (Gödecke & al., 1991).

2.2.3.2.3. Induction des gènes GAL-LAC, par le galactose ou le lactose (Figure 14)

L'expression des cinq gènes structuraux *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *LAC4*, et *LAC12* est, comme chez *Saccharomyces cerevisiae*, soumise à un double contrôle (induction par le galactose ou le lactose, répression par le glucose) et ils sont sous la dépendance de trois protéines régulatrices. Ces protéines sont, chez *Kluyveromyces lactis*, Gal1p, Lac9p et Gal80p.

On observe ici une première particularité de *Kluyveromyces lactis* : Gal1p est une protéine bifonctionnelle. En effet, la première fonction du produit du gène *GAL1* est l'activité galactokinase, requise dans la voie Leloir. La seconde fonction de Gal1p est nécessaire à l'induction des gènes GAL-LAC. En réalité, cette protéine remplit, chez *Kluyveromyces lactis*, le rôle joué par Gal3p chez *Saccharomyces cerevisiae* (Meyer & al., 1990; Meyer & al., 1991).

L'activation de la transcription des gènes GAL-LAC chez *Kluyveromyces lactis* requiert la fixation de Lac9p -homologue structural et fonctionnel de Gal4p de *Saccharomyces cerevisiae* (Breunig & al., 1987; Salmeron & al., 1986; Wray & al., 1987)- au niveau de séquences cibles situées en amont des gènes *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *LAC4*, *LAC12*, *LAC9* et *GAL80*. Ces séquences

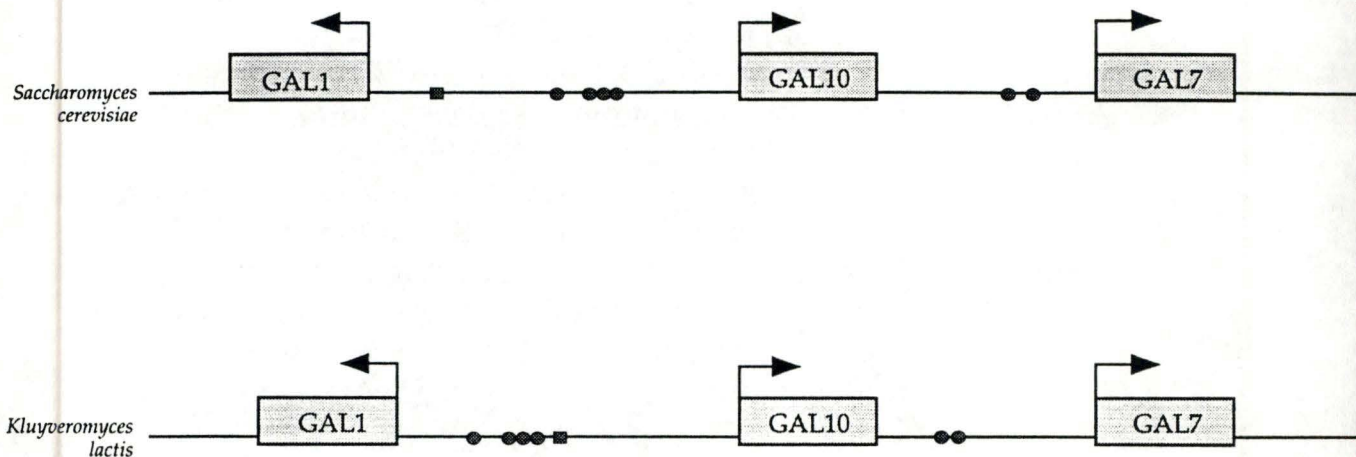


FIGURE 15 : Comparaison du cluster des gènes *GAL* chez *Kluyveromyces lactis* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les UAS_{GAL} (●), qui ont la même séquence consensus, sont étroitement liées chez les deux espèces de levures. Cependant, leur position diffère selon l'espèce : les UAS_{GAL} sont plus proches de *GAL1* et plus éloignées de *GAL7* chez *Kluyveromyces lactis* que chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Le site de fixation de Mig1p (■) est plus proche de *GAL1* chez *Saccharomyces cerevisiae* que chez *Kluyveromyces lactis*.

Commentaires : voir texte.

cibles, appelées, comme chez *Saccharomyces cerevisiae*, UAS_{GAL} , ont la même séquence consensus que chez *Saccharomyces cerevisiae*. Elles sont en même nombre en amont des gènes *GAL1*, *GAL10* (4 sites UAS_{GAL} dans la région intergénique séparant *GAL1* de *GAL10*), et *GAL7* (2 sites UAS_{GAL}) chez les deux espèces de levure (Figure 15) et sont au nombre de quatre dans la région intergénique séparant *LAC4* de *LAC12* chez *Kluyveromyces lactis* (Breunig, 1989; Das & al., 1985; Dickson & al., 1980; Ruzzi & al., 1987).

Une particularité apparaît chez *Kluyveromyces lactis* : des sites UAS_{GAL} sont présents au niveau du promoteur du gène *LAC9*. Nous sommes en présence d'une autoactivation de la transcription de *LAC9*. Cette autorégulation explique l'activation rapide de la transcription des gènes *GAL-LAC* en conditions inductrices (Czyz & al., 1993; Zachariae & al., 1993a).

L'activité de Lac9p est régulée négativement par Gal80p (Dickson & al., 1990; Salmeron & al., 1989; Zenke & al., 1993). En conditions non inductrices (en absence de galactose), Gal80p se fixe à l'extrémité carboxy-terminale de Lac9p -qui correspond à son domaine d'activation de la transcription- l'empêchant ainsi d'activer la transcription des gènes *GAL-LAC*. En présence de galactose (conditions inductrices), l'inducteur -de nature inconnue- provoque la dissociation du complexe Gal80p-Lac9p. Lac9p est alors capable d'activer la transcription des gènes *GAL-LAC* (Figure 14).

2.2.3.2.4. Répression des gènes *GAL-LAC* par le glucose

(Figure 14)

Au niveau des gènes *GAL-LAC* de *Kluyveromyces lactis*, la répression glucose correspond en réalité à une absence d'induction des gènes *GAL-LAC*, lorsque le glucose et le galactose sont présents simultanément dans le milieu de culture (Zachariae & al., 1993b).

Chez *Kluyveromyces lactis*, le glucose empêche l'induction des gènes *GAL-LAC* par le galactose dans certaines souches et pas dans d'autres.

Cette caractéristique souche-dépendante de la répression glucose des gènes *LAC-GAL* s'explique par des concentrations différentes en activateur Lac9p, résultant de différences observées au niveau du promoteur de Lac9p (Kuger & al., 1990; Kuzhandaivelu & al., 1992; Zachariae & al., 1993b). Il existe en fait un seuil critique de concentration en Lac9p à partir duquel l'effet de la répression glucose est surmonté.

Il apparaît donc que, chez *Kluyveromyces lactis* comme chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'expression des gènes *GAL(-LAC)* est

-entre autres- médiée par Lac9p-Gal4p, et que la répression glucose est présente (Kuzhandaivelu & al., 1992; Zachariae & al., 1993b). Toutefois, chez *Saccharomyces cerevisiae*, la répression de l'expression de GAL4 par le glucose est médiée par Mig1p (Nehlin & al., 1991). Chez *Kluyveromyces lactis*, il n'existe pas de séquence consensus de fixation de Mig1p au niveau du promoteur de LAC9. Cependant, un site potentiel de fixation de Mig1p est présent dans la région intergénique séparant GAL1 de GAL10 chez *Kluyveromyces lactis*, de sorte que GAL1 pourrait être contrôlé par le répresseur Mig1p (Zachariae & al., 1993b). GAL1 a un rôle crucial dans la régulation des gènes GAL-LAC chez *Kluyveromyces lactis* puisque Gal1p conditionne l'activité de Lac9p, l'activateur du système GAL-LAC (Figure 14). Notre hypothèse de travail est que MIG1 intervient dans la répression glucose chez *Kluyveromyces lactis* en réprimant l'expression du gène GAL1 (Cassart & al., 1995).

BUTS DU TRAVAIL

Le criblage d'une banque génomique sauvage de *Kluyveromyces lactis* avec une sonde nucléotidique, réalisée sur base de la séquence protéique -hautement conservée- de la région des doigts de Zinc des répresseurs ScMig1p et AsnCreAp, a permis l'isolement d'un clone positif contenant une ORF d'environ 1300 bp.

L'objectif de ce mémoire sera double :

La première démarche consistera en l'identification du gène cloné. A cette fin, deux approches seront suivies. D'une part, le gène sera identifié structurellement, par comparaison de sa séquence protéique déduite avec d'autres séquences protéiques connues. D'autre part, le gène sera identifié fonctionnellement, par divers tests de complémentation hétérologue, chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La seconde démarche consistera à aborder l'étude du rôle de *KIMIG1* au niveau de la régulation des gènes *GAL-LAC* chez *Kluyveromyces lactis*. Dans ce but, deux approches seront suivies : la surexpression et la disruption de *KIMIG1* dans des souches appropriées de *Kluyveromyces lactis*, ainsi que l'évaluation de l'impact qui en résulte au niveau des gènes *GAL-LAC* de cet organisme.

RÉSULTATS

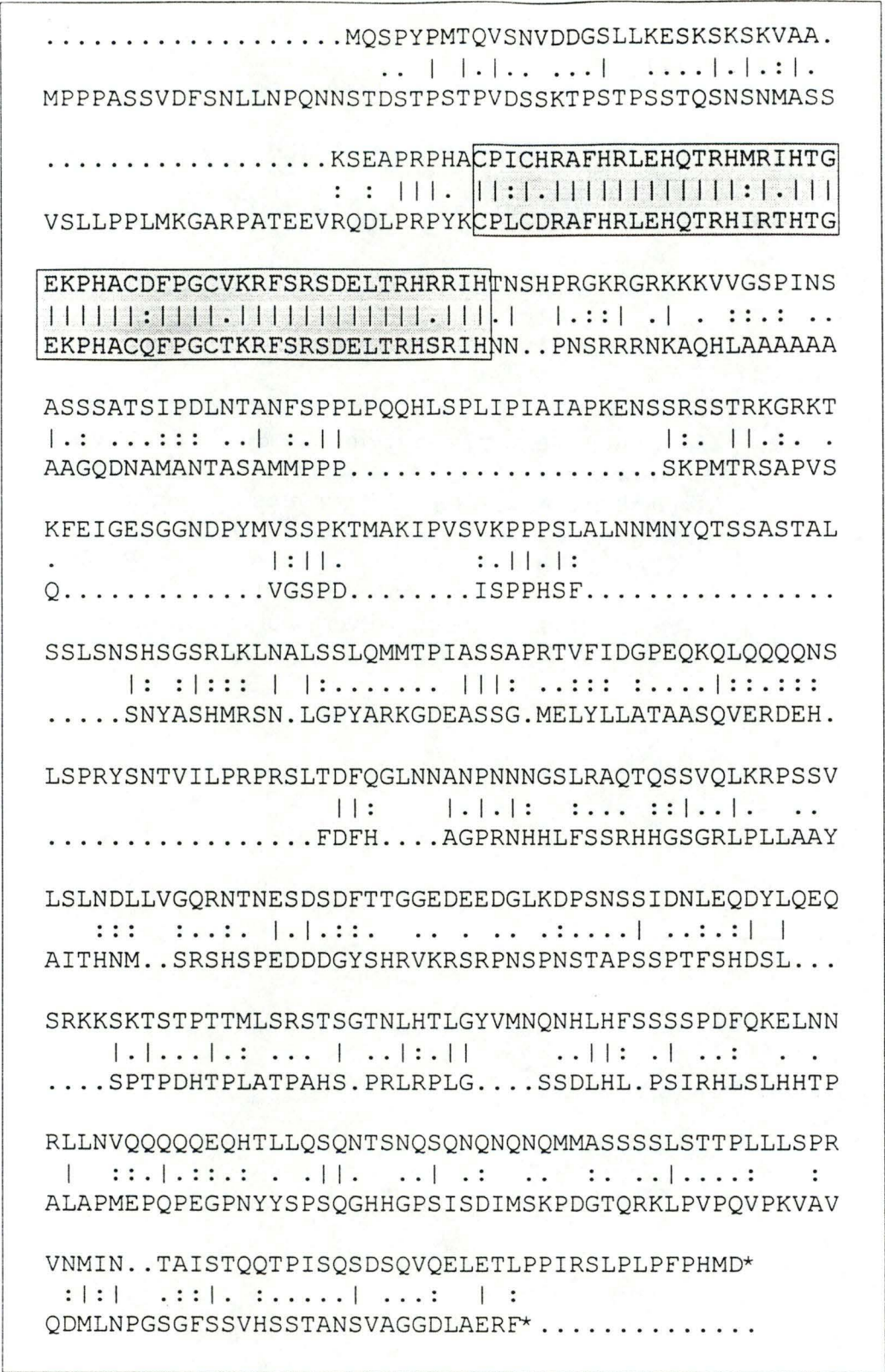


FIGURE 1: Aligment simple de la séquence de ScMig1p (en haut) avec celle de AsnCreAp (en bas)

L'alignement est réalisé par la fonction GAP du programme GCG. La région des doigts de Zinc est surlignée en gris. Les barres correspondent à des identités, les points à des similarités plus (deux points) ou moins (un point) intenses.

1) ScMig1 **C P I C H R A F H R L E H Q T R H M R I H T G E K P H A C D F P G C V K R F S R S D E L T R H R R**
 2) CREA **C P L C E R A F H R L E H Q T R H I R T H T G E K P H A C C F P G C S K R F S R S D E L T R H S R**
 3) 5' g ggaatt CAY AGA YTR GAR CAY CAR AC 3' 3' CTRCTY RAY TGM TCT GTR TCT ca
 4) KIMig1 R H I R T H T G E R P H A C D F P G C S K R F S R S
 5) KmMig1 R H I R T H T G E R P H A C D F P G C A K R F S R S

FIGURE 2 : Séquence protéique de la région des doigts de Zinc de ScMig1p (1) et AsnCreAp (2), et des fragments PCR correspondants de *Kluyveromyces lactis* (4) et *Kluyveromyces marxianus* (5)

Les oligonucléotides dégénérés sont indiqués en (3) et les séquences peptidiques conservées dont ils ont été dérivés sont encadrées en (1) et (2) par des boîtes claires. Les résidus cystéine et histidine des deux doigts de Zinc sont mis en évidence par des boîtes noires. Les résidus divergents sont surlignés en gris.

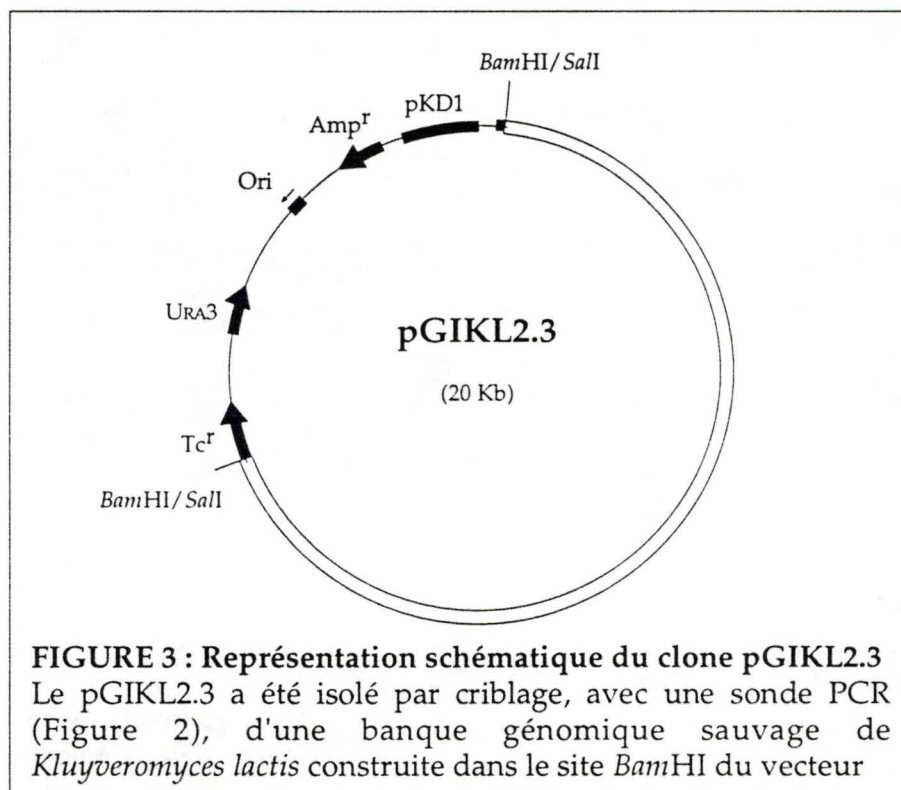


FIGURE 3 : Représentation schématique du clone pGIKL2.3
 Le pGIKL2.3 a été isolé par criblage, avec une sonde PCR (Figure 2), d'une banque génomique sauvage de *Kluyveromyces lactis* construite dans le site BamHI du vecteur

1. LE GÈNE CLONÉ EST *KIMIG1*

1.1. LA STRUCTURE DU GÈNE CLONÉ LE DÉSIGNE COMME ÉTANT *KIMIG1*

1.1.1. La séquence du gène cloné est homologue de celle de *ScMIG1*

1.1.1.1. Historique du clone pGIKL2.3

(Cassart & al., 1995)

Un alignement simple des séquences protéiques de CreAp et de Mig1p a été réalisé (Figure 1). Pour rappel, ces protéines sont toutes deux des protéines à doigts de Zinc de type C₂H₂ impliquées dans la répression glucose, chez *Aspergillus nidulans* et chez *Saccharomyces cerevisiae*, respectivement.

Les deux protéines précitées n'ont que 47% de similarité et 29% d'identité entre elles. Cependant, dans la région de la protéine correspondant aux deux doigts de Zinc (51 acides aminés), l'homologie de séquence s'accroît nettement (92% de similarité, 86% d'identité).

Deux oligonucléotides dégénérés ont été synthétisés. Ils correspondent à 6 acides aminés appartenant à la boucle de chacun des deux doigts de Zinc. Ces 2 groupes de 6 acides aminés sont identiques chez les deux espèces.

Les deux oligonucléotides dégénérés ont été utilisés pour réaliser une PCR sur l'ADN génomique de *Kluyveromyces marxianus* et de *Kluyveromyces lactis*. La séquence en acides aminés déduite de la séquence de la portion d'ADN amplifiée dans chaque cas, reportée à la figure 2, révèle qu'elles sont très similaires entre elles (1 substitution) et avec les séquences de CreAp et de Mig1p (3 et 4 substitutions, respectivement).

Étant donné que le fragment PCR de *Kluyveromyces marxianus* s'hybridait avec l'ADN génomique de *Kluyveromyces lactis*, il a été utilisé pour cribler une banque génomique de *Kluyveromyces lactis* (souche CBS 2359) réalisée dans le vecteur KEp6 (Matériel & méthodes).

Les clones positifs ont été la cible d'une amplification PCR, avec le même jeu d'amorces dégénérées. Lors de cette amplification PCR, un fragment identique au fragment PCR de *Kluyveromyces lactis* a été obtenu, avec pGIKL2.3, un des clones positifs (Figure 3).

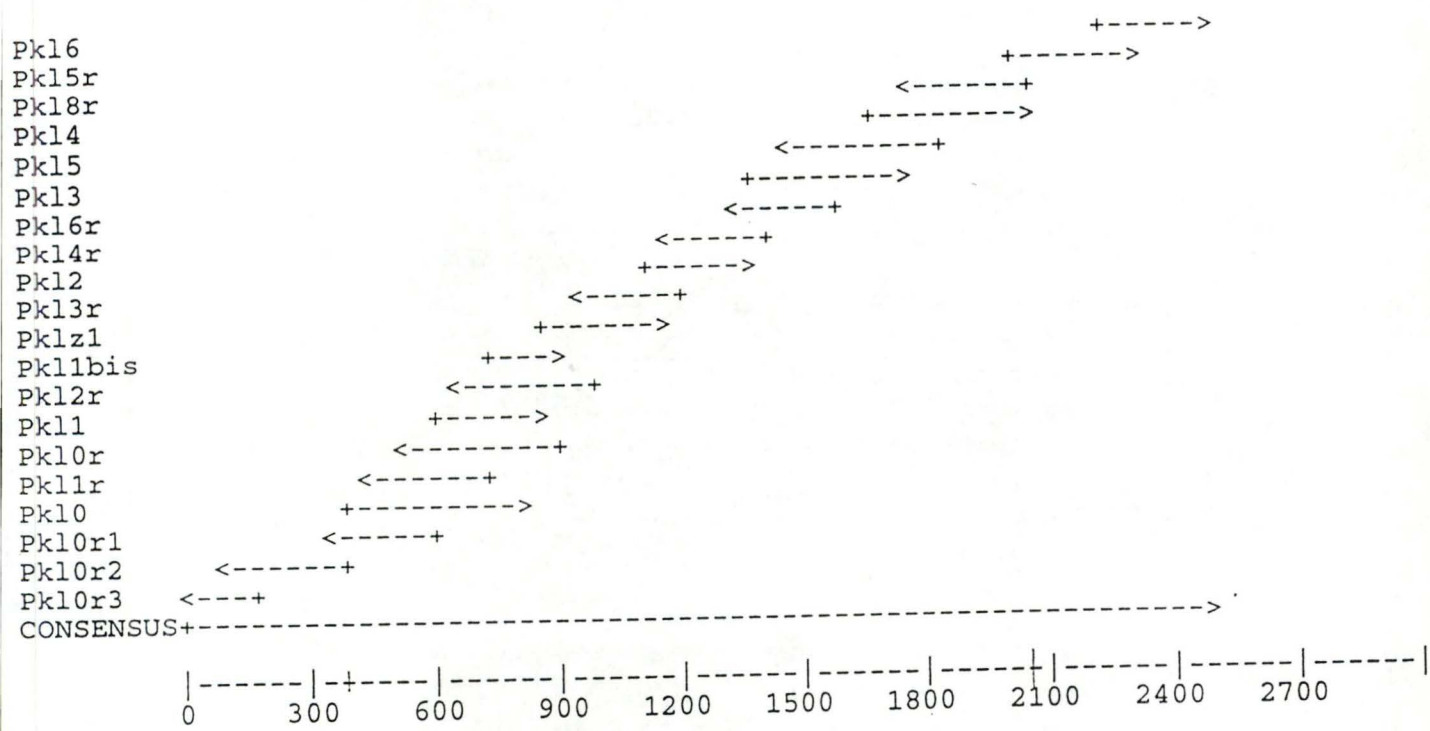


FIGURE 4 : Stratégie du séquençage

Le séquençage a débuté avec l'oligonucléotide pKLZ1. Il a permis d'obtenir la séquence d'une région de ± 200 bp, sur le brin positif. A partir de cette séquence, d'autres oligonucléotides ont été synthétisés (pKL2, pKL2R). Le séquençage effectué à partir de ces deux oligonucléotides élargit ainsi la zone dont la séquence est connue, sur les brins positif et négatif. On procède ainsi de suite, de façon progressive, pour finalement obtenir, en utilisant au total 20 oligonucléotides différents, une zone séquencée ayant une taille de 2,5 kb environ. La zone bénéficiant d'un séquençage sur les deux brins (positif et négatif) est plus restreinte (1700 bp, environ).

1 TGACAAGTGA TCGCTATTGC ATTGCCTAAC AGATTCCGTT TTTTGTGGTT
 51 AAAAAAACTA ATATATATCT TTGAGGTATT CTTGTCACTT TCTGAGATTT
 101 TGTTAAACTT CACACGTCAA CCATAGCGGT GTTCATCGAT AGTCGTATTA
 151 TTTGACTTC CTTTGTGAAA CGAAGCAATT TGTGGCTTCA AGAATCAGTT
 201 ATTTTATCCT GAAATCTACG TAAT^{pKLO3}CTCTC CAGTCTAATC TG^{pKLO3}CTTTTTT
 251 CTGAAGATTC TCGGAGGTAA AAAAGAAATT CAGCAAAACA TTTCTGATAT
 301 TGGGTCATC GATATTGTAA ATATTGTGTG AGACTATCTT AGTTTAAACG
 351 GGAAGTCAGT ACGACGTT^{pKLO}CAGCCTAAGTCTGAA TGTT^{pKLO}CGTTT
 401 CATTCCCAA AACACACAAA ATAAAAAGAC ACGATACTGG^{pKLO2} A^{pKLO2}TTTCATCAAG
 451 TGATCTGCTG GAGTTTTACA AACCTATCAT TTCAGCTTAT ACTTCCGTTT
 501 GTTTGACCAT ATCACGGGTC TTTCTGCTGT AATACTTCAA GGCAAGCTTC
 551 CATATTATTT TGGTTTTTGG TCTTGTATT TGGTGACTGA TACGA^{pKLO1}TAGG
 601 ^{pKLO1}ATATGAACTTAA AGCACCA ^{pKLO1}ATG^{pKLO1}CAGAGG CGATTATAGA GAAAAAAT
 651 CATAAGAAGT CTATCAATGA TCATGACAAG GATGGACCAA GGCCT^{pKLO1}TAGG
 701 ^{pKLO1bis}ATATGAACTTAA CAAAGGG GATTCCATCG ACTGGAACAT ^{ZF1}→ CAGACTAGGC
 751 ACATCAGAAC ACACACTGGG GAAAGACC^{pKLO1}CTACBAGAC ATAG^{pKLO1}AGGAT
 801 TGTTCAAAC GCTTTAGTAG AAGCGATGAA^{ZP1}← ^{pKLO1}CTACBAGAC ATAG^{pKLO1}AGGAT
 851 ^{pKLO1F}TCATGACAGT GATAAACCAA AGGGGAAAAG AGGAAGGAAA AAGAAGAGTG
 901 AGACGATAGC TCCTGAAAAG^{pKLO2} ^{pKLO2}GAATTAGAAT TGCAGCGGA AAAACAACGA
 951 AACGCAAACG ACTCTGCGGC TGTGATTCT GCTGGTGAA CGAGCGTAA
 1001 TGTCATAGAA CCAAACCACA AACTTCTGAA ATCCACTAAT TCGATTAAC
 1051 AAGATGGTTC AACATTTACT^{pKLO2R} ^{pKLO2R}GAACCTCTGA AATCGTTGAG^{pKLO2R} GTCGAAGCCA
 1101 ATGTTTGATC ^{pKLO2}TCCTTAGCCT TGAATNGGAT^{pKLO2} GAATGCGGTA TATATAGTGT
 1151 CCCACCTATT AGATCTCAGA ATAATAGTGG TAACATAGAC CTTCTGCTGA
 1201 ATGCTGCAAA ATTTGAGTCT GACAAAGCCT CATCCCTCTT CAAATTTATT^{pKLO3R}
 1251 GATAAACTAC CGTTGACTTC ATCTTCATCC TCTCCGTCAC TTTCTGTTAC
 1301 ATCTCATTCA ATCAACAACA GCAGTAGCGG ACTA^{pKLO3}TGTTA CCAAGACCG^{pKLO3}
 1351 ^{pKLO3}ATTCACGTGC TAAGCTTTCT GCTTTATCAT CATTACAAG AATGACACCC
 1401 TTGTCTCAA ATTACAGATC ATATAATCAT TCGCAACAGA ATCTAGTACA
 1451 TCTTCACCAT CCCGCAC^{pKLO4R}CCA ACCGACCATT GACCGAGTTT GTTGATAACG
 1501 AGTATATAAG TAACGGTCTG CCTAGAACCA GATCGTGGAC AAATCTGTGC
 1551 GAACAGCAAT CACCATCGGG CTTAGCTCC TCTGCACCTA ACTCCAGATT
 1601 CTGTCATCC AATAGTCTCA ACCAACTGAT^{pKLO5R} AGATCAACAT^{pKLO5R} TCAAGAAATT
 1651 CAAGTACTG^{pKLO4}AAGCATATCT ACTCTACTGA AGCAAGAAAC CGTAATCTCA
 1701 CAAGATGAGG ATATGAGTAC AGAAGATGCA TATGGCCGGC CACTTAAGAA
 1751 ATCAAAAGCC ATAATGCCCA TCATGAGACC TAGTCTTACA ATGCCACCAA
 1801 GTTCCGGCTC AGCTACAGAA GGAGAATTTT ATGATGAACT TCATTCGAAG
 1851 CTTAGATCGA TGGATCAACT GCCGGTA^{pKLO6R}AGG AACAGTAAGG ACGAAAAGA
 1901 TTACTATTTT CAAAGTCATT TTTCAAGTTT ACTGTGCACT CCAACGCACA
 1951 GTCCTCCACC GGAAGGATTG TTACCAG^{pKLO5}TT TGAATCAGAA^{pKLO5} TAA^{pKLO5}GCCAGTG
 2001 CAGTTGCCAT CACTTCGAAG CTTAGACCTT TTACCACCAA AATAATGACT
 2051 ACTAATGAAA ATGGACAGAA ATGTAAGCGC ACCGTCTCTT CATCGATCAA
 2101 TGTATTATAT TAACTCAAGA TATAAACTT TCACGCATAA TGAATATAGA
 2151 AT^{pKLO5R}TTACTAG CTCTTGTC^{pKLO5R}CA TCAATTATAT ATCATTTTCAT C^{pKLO5R}TAGCAATC
 2201 ^{pKLO6}ATATGACAA AACCATCCAA AATAGACTTT GTAAAGTTT CAGAGAACCT
 2251 GAAGCTTGCG ATCACCGAAG ATATTCTGTG TTCAGGATC TGGTTGTGAT
 2301 GCTCGTCTGA GGAAAAACAT CTTTCCATGA AGATATCAGC TGATATGTTT
 2351 GATATTCAA GTTTTTAACG GCTTTAACT GCAATAGTAT CAATCAATTT
 2401 AAAGGTTGCG TGATAGGAGC TGATGCAACC TTAGTAGCAG GTCGAACCCAG
 2451 TTGATTTTAT GAACTGACCT AATCGCACGT GGTACACTTA TGAATGCAGA
 2501 AACATAGAGA CGCCAGAAG ACG

FIGURE 5 : Séquence de l'ORF de KIMIGI et des régions amont et aval

La figure reprend la position du codon d'initiation de la traduction (ATG, entouré), celle du codon Stop (TAA, entouré), les signa impliqués dans la reconnaissance du codon ATG (bases -3 et +4, soulignées), et ceux impliqués dans la formation de l'extrémité 3' l'ARN messager (AATAA et TATATA, soulignés).

La position des amorces utilisées lors du séquençage du brin positif (surlignés en gris foncé) et du brin négatif (surlignés en gris clair), et pour les amplifications PCR (ZF1 et ZP1, indiqués par une flèche) est également indiquée.

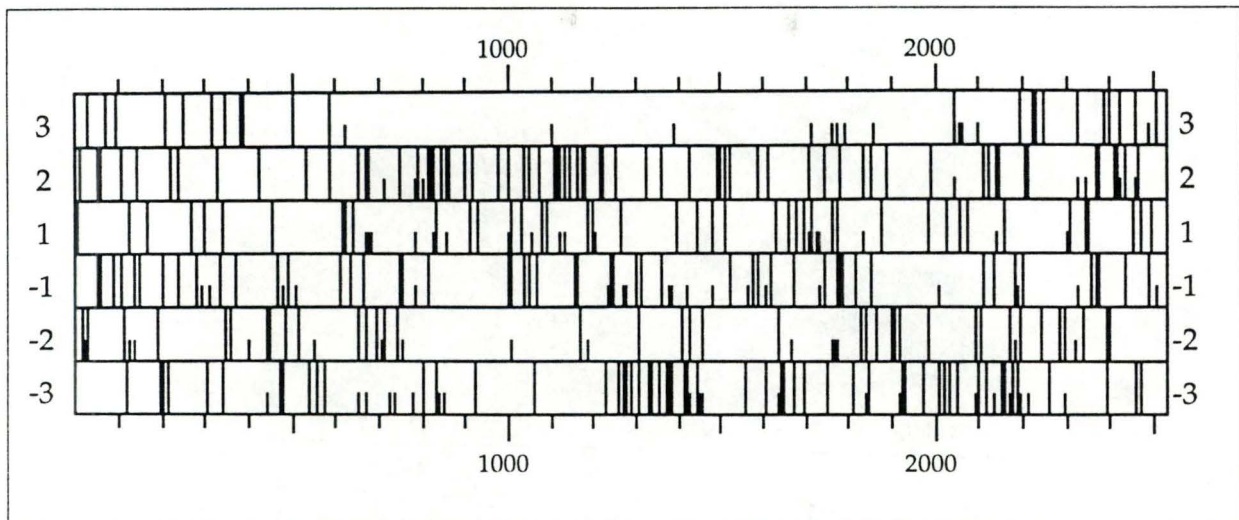


FIGURE 6 : Représentation schématique des phases ouvertes de lecture présentes dans les 6 phases potentielles de traduction de la région séquencée
 La région séquencée couvre une zone de 2500 bp. Les barres entières représentent les codons Stop, les demi-barres représentent les codons ATG d'initiation de la traduction. On détecte ici une ORF ("Open Reading Frame") de ± 1500 bp dans la phase 3 de lecture.

		-6	-5	-4	-3	-2	-1		+4	+5
Vertébrés n = 2595	A	20	19	25	58	28	17		25	24
	G	42	24	13	33	16	23		46	22
	C	20	37	48	6	45	53		15	37
	U	18	20	9	3	12	7		13	17
Consensus		G	C	C	A/G	C	C	AUG	G	C
Drosophile n = 192	A	32	22	21	65	47	39		26	28
	G	28	19	12	20	12	19		35	21
	C	17	36	53	7	23	34		19	30
	U	23	22	14	8	18	8		20	20
Consensus		A	C	C	A	A	A	AUG	G	C
Levure n = 461	A	35	35	43	66	46	43		26	23
	G	18	12	10	18	9	15		28	12
	C	17	22	26	7	22	20		12	43
	U	30	30	21	8	23	21		34	22
Consensus		A	A	A	A	A	A	AUG	U	C

FIGURE 7 : Tableau représentant les consensus décrits pour les régions flanquant le codon AUG chez les vertébrés, la drosophile, et la levure.

La valeur "n" correspond au nombre de séquences utilisées pour la compilation et la détermination de la séquence consensus.

(Source : Jean-Jean & *al.*, 1993)

1.1.1.2. Stratégie et résultats du séquençage

L'entièreté du séquençage a été réalisée sur le clone pGIKL2.3, selon une stratégie présentée à la figure 4.

Au terme du séquençage, on obtient la séquence nucléotidique d'une région couvrant ± 2500 bp (Figure 5). Une phase ouverte de lecture sans intron est détectée, couvrant une région de ± 1500 bp (Figure 6).

1.1.1.3. Analyse des séquences flanquantes de l'ORF (Oliver & *al.*, 1989)

1.1.1.3.1. Analyse des séquences situées du côté 5' proximal de l'ORF (Guarente, 1984; Struhl, 1987)

SÉQUENCES NÉCESSAIRES À L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

Comme décrit lors de l'introduction, le promoteur typique d'un gène eucaryote comporte généralement les boîtes TATA, GC, et CAAT (Figure 2, Introduction).

Au niveau de la séquence obtenue, une seule boîte TATA atypique (TATATA) est trouvée plus de 500 nucléotides en amont du site ATG probable d'initiation de la traduction (Figure 5) et on n'observe ni boîte GC, ni boîte CAAT. En l'absence de localisation du site +1, l'identification des séquences promotrices reste tout à fait incertaine.

SÉQUENCES NÉCESSAIRES À L'INITIATION DE LA TRADUCTION

(Kozak & *al.*, 1986; Kozak & *al.*, 1981; Jean-Jean & *al.*, 1993)

L'initiation de la traduction à un codon AUG dépend du contexte dans lequel se trouve ce codon. Des contextes favorables ont été identifiés par compilation des séquences flanquant l'AUG, et par des expériences de mutagenèse dirigée sur la séquence consensus tirée de la compilation. Le tableau présenté à la figure 7 montre que la séquence consensus varie selon l'embranchement phylogénique considéré. Le consensus général serait le suivant :

5'.....Pu N N A U G Pu N N3'

Au niveau de la séquence obtenue (Figure 5), ce consensus n'est pas respecté (pas de purine en -3). L'initiation de la traduction à ce codon n'est toutefois pas exclue, étant donné que les consensus décrits ci-avant ne sont pas les seuls contextes rencontrés au niveau de codons AUG fonctionnels.

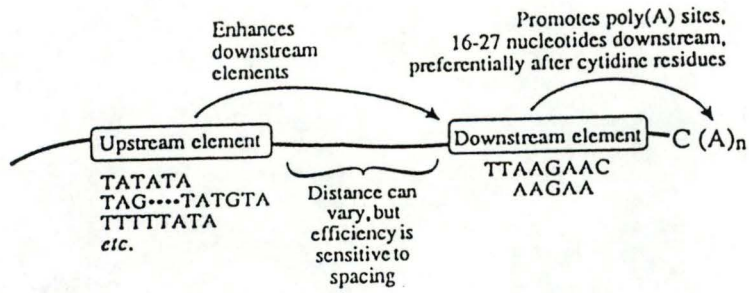


FIGURE 8 : Représentation schématique des éléments de séquence supposés agir de concert pour la formation de l'extrémité 3' de l'ARN messager chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Commentaires : voir texte

(Source : Russo & al., 1993)

ATGACAGAGCGGATTATAGAGAAAAAATCATAAGAAGTCTATCAATGATCATGACAAG
 M T E A I I E K K N H K K S I N D H D K
 GATGGACCAAGGCCTTACGTCTGTCCCATATGTCAAAGGGGATTCATCGACTGGAACAT
 D G P R P Y V C P I C Q R G F H R L E H
 CAGACTAGGCACATCAGAACACACACTGGGAAAGACCGCATGCATGTGATTTCCCGGGA
 Q T R H I R T H T G E R P H A C D F P G
 TGTCAAACGCTTTAGTAGAAGCGATGAACAAACAAGACATAGAAGGATACATGACAGT
 C S K R F S R S D E L T R H R R I H D S
 GATAAACCAAGGGGAAAGAGGAAGGAAAGAAAGAGAGTGAAGAGATAGCTCGTGAAGG
 D K P K G K R G R K K K S E T I A R E K
 GAATTAGAATTGCAGCGGCAAAAAACAACGAAACGCAACGACTCTGCGGGTGTGATTTCT
 E L E L Q R Q K Q R N A N D S A A V D S
 GCTGGTGAACGAGCGCTAATGTGCATAGAACCAACCACAACCTCTGAAATCCACTAAT
 A G G T S A N V I E P N H K L L K S T N
 TCGATTAAACAAGATGGTTCAACATTTACTGAACCTCTGAAATCGTTGAGGTCGAAGCCA
 S I K Q D G S T F T E P L K S L R S K P
 ATGTTTATCTCGGTAGCGATGAATCGGATGAATCGGGTATATATAGTCTCCACCTATT
 M F D L G S D E S D E C G I Y S V P P I
 AGATCTCAGAATAATAGTGGTAACATAGACCTTCTGTGTAATGTGCAAAATTTGAGTCT
 R S Q N N S G N I D L L L N A A K F E S
 GACAAAGCCTCATCCTCTTCAAATTTATGATAAACTACCGTTGACTTCATCTTCATCC
 D K A S S S F K F I D K L P L T S S S S
 TCTCCGTCACCTTTCGTTTACATCTCATTCAATCAACAACAGCAGTAGCGGACTATTGTTA
 S P S L S F T S H S I N N S S S G L L L
 CCAAGACCAGCTTACGTGCTAAGCTTTCTGCTTTATCATCATTACAAGAATGACACCC
 P R P A S R A K L S A L S S L Q R M T P
 TTGCTCAAATTCAGAGTCATATAATCATTGCAACAGAATCTAGTACATCTTACCAT
 L S Q N S E S Y N H S Q Q N L V H L H H
 CCCGACCCAACCGACCATTTGACCGAGTTTGTGATAACGAGTATATAAGTAACGGTCTG
 P A P N R P L T E F V D N E Y I S N G L
 CCTAGAACCAGATCGTGGACAAATCTGTCCGAACAGCAATCACCATCGGGCTTACGCTCC
 P R T R S W T N L S E Q Q S P S G F S S
 TCTGCACCTTAACCTCAGATTCTCGTCAATCAATAGTCTCAACCAACTGATAGATCAACAT
 S A L N S R F S S S N S L N Q L I D Q H
 TCAAGAAATTCAGTACTGTAAGCATATCTACTCTACTGAAGCAAGAAACCGTAATCTCA
 S R N S S T V S I S T L L K Q E T V I S
 CAAGATGAGGATATGAGTACAGAAGATGCATATGGCCGGCCACTTAAGAAATCAAAGGCC
 Q D E D M S T E D A Y G R P L K K S K A
 ATAATGCCCATCATGAGACCTAGTTCTACAATGCCCAAGTTCGGGCTCAGCTACAGAA
 I M P I M R P S S T M P P S S G S A T E
 GGAGAATTTTATGATGAACCTTCAAGGCTTAGATCGATGGATCAACTGCCGGTAAGG
 G E F Y D E L H S R L R S M D Q L P V R
 AACAGTAAGGACGAAAAAGATTACTATTTCCAAAGTCATTTTCAAGTTTACTGTGCACT
 N S K D E K D Y Y F Q S H F S S L L C T
 CCAACCCACAGTCCCTCCACCGAAGGATTTACCCAGTTTGAATCAGAATAAGCCAGT
 P T H S P P P E G L L P S L N Q N K P V
 CAGTTGCCATCACTTCGAAGCTTAGACCTTTTACCACCAAAATAA
 Q L P S L R S L D L L P P K *

FIGURE 9 : Séquence nucléotidique du gène *KIMIG1* et séquence protéique déduite
 Commentaires : voir texte.

1.1.1.3.2. Analyse des séquences situées du côté 3' de l'ORF (Heidmann & *al.*, 1994; Russo & *al.*, 1993)

La formation de l'extrémité 3' des messagers eucaryotes est une étape essentielle de la maturation du transcrit primaire en mRNA mature. Elle requiert plusieurs étapes : la terminaison de la transcription, le clivage du messenger précurseur, et l'addition de la queue de poly(A). Chez les eucaryotes supérieurs, les signaux gouvernant ces processus sont assez bien définis : outre la séquence AAUAAA requise pour la polyadénylation, on trouve un élément riche en T ou en GT, impliqué dans le processus de clivage du pré-mRNA.

Par contre, pour les gènes transcrits par l'ARN polymérase II chez *Saccharomyces cerevisiae*, il est plus difficile de définir des signaux nécessaires à la formation de l'extrémité 3' des messagers. La séquence AAUAAA et ses analogues (AAUAA, UAUAAA) ne sont présents que dans 50% des pré-mRNA de levure. La figure 8 résume les éléments de séquence généralement impliqués dans la formation de l'extrémité 3' du mRNA :

- L'élément amont (TATATA, TAG...TATGTA, TTTTATA), qui potentialise l'action des éléments situés en aval.
- L'élément aval (TTAAGAAC, AAGAA), qui favorise la formation de l'extrémité 3' au niveau du site de polyadénylation.
- Le site de polyadénylation, qui se trouve en général 16 à 27 nucléotides après l'élément aval, en général après une cytidine.

Au niveau de la séquence obtenue, on retrouve, en 3' du gène, la séquence AAUAA (Figure 5), rencontrée essentiellement chez les eucaryotes supérieurs. On trouve également une séquence correspondant au consensus d'un élément de type "amont" (TATATA, figure 5). En l'absence de la localisation du site de polyadénylation, l'identification des séquences responsables de la formation de l'extrémité 3' reste incertaine.

1.1.1.4. Analyse de la séquence de l'ORF

L'ORF du gène séquencé fait une taille de 1425 bp, codant pour une protéine de 474 acides aminés, d'un PM calculé de 53 kD (Figure 9).

1.1.1.4.1. Alignements simples de séquences

Visant à identifier structurellement le gène cloné, nous avons procédé à des alignements simples de la séquence en acides aminés déduite de la séquence du gène que nous venions de cloner avec d'autres séquences protéiques connues de la famille

MIG, à savoir les protéines Mig1p de *Saccharomyces cerevisiae*, Mig1p de *Kluyveromyces marxianus*, et CreAp d'*Aspergillus nidulans* (Figures 10-12).

Les alignements simples ont été réalisés par la fonction GAP du programme GCG.

Lorsque les alignements sont réalisés sur l'entièreté des protéines, on constate non seulement que le niveau de similarité est faible (Figures 10-12), mais également que la plupart des résidus conservés sont concentrés dans la région amino-terminale, qui correspond au domaine de liaison à l'ADN, possédant une structure en doigts de Zinc (voir plus loin).

Si on ne considère que la région des doigts de Zinc (51 résidus), le niveau de similarité augmente radicalement (Figures 10-12).

Ces observations nous amènent à conclure que la séquence du gène cloné le désigne comme étant l'homologue structural de *ScMIG1* chez *Kluyveromyces lactis*, c'est-à-dire, *KlMIG1*.

1.1.1.4.2. Alignements multiples

Visant à localiser des régions hautement conservées -et donc probablement fonctionnellement importantes (par exemple pour la liaison de Mig1p à l'ADN, la répression de la transcription par Mig1p, ou la régulation de son activité en fonction de la source de carbone)-, nous avons procédé à un alignement multiple des séquences protéiques des homologues de Mig1p, connues jusqu'à présent chez trois levures : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, et *Kluyveromyces marxianus*.

Le logiciel utilisé pour accomplir cet alignement multiple est la fonction PileUp du programme GCG. La mise en forme de l'alignement et le calcul de la séquence consensus a été réalisée par la fonction Pretty de ce même programme.

Cet alignement multiple a mis en évidence 4 régions conservées (Figure 13).

La région amino-terminale est responsable de la liaison à l'ADN. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, cette portion de la protéine correspond aux doigts de Zinc (Nehlin & al., 1990). Les résidus cystéine et histidine, responsables de la formation du doigt, et les résidus 15,18, et 21 de chaque doigt, responsables du contact spécifique entre Mig1p et sa cible (Lundin & al., 1994), sont strictement conservés entre les protéines Mig1p des trois espèces de levure.

Les deux régions centrales sont riches en sérines et thréonines, sites potentiels d'une phosphorylation par une kinase (Kennelly & al., 1991). Leur fonction éventuelle reste à définir.

La région carboxy-terminale contient des répétitions du dipeptide LP. Ce type de motif est également retrouvé dans le gène *ROX1*, répresseur des gènes hypoxiques chez *Saccharomyces*

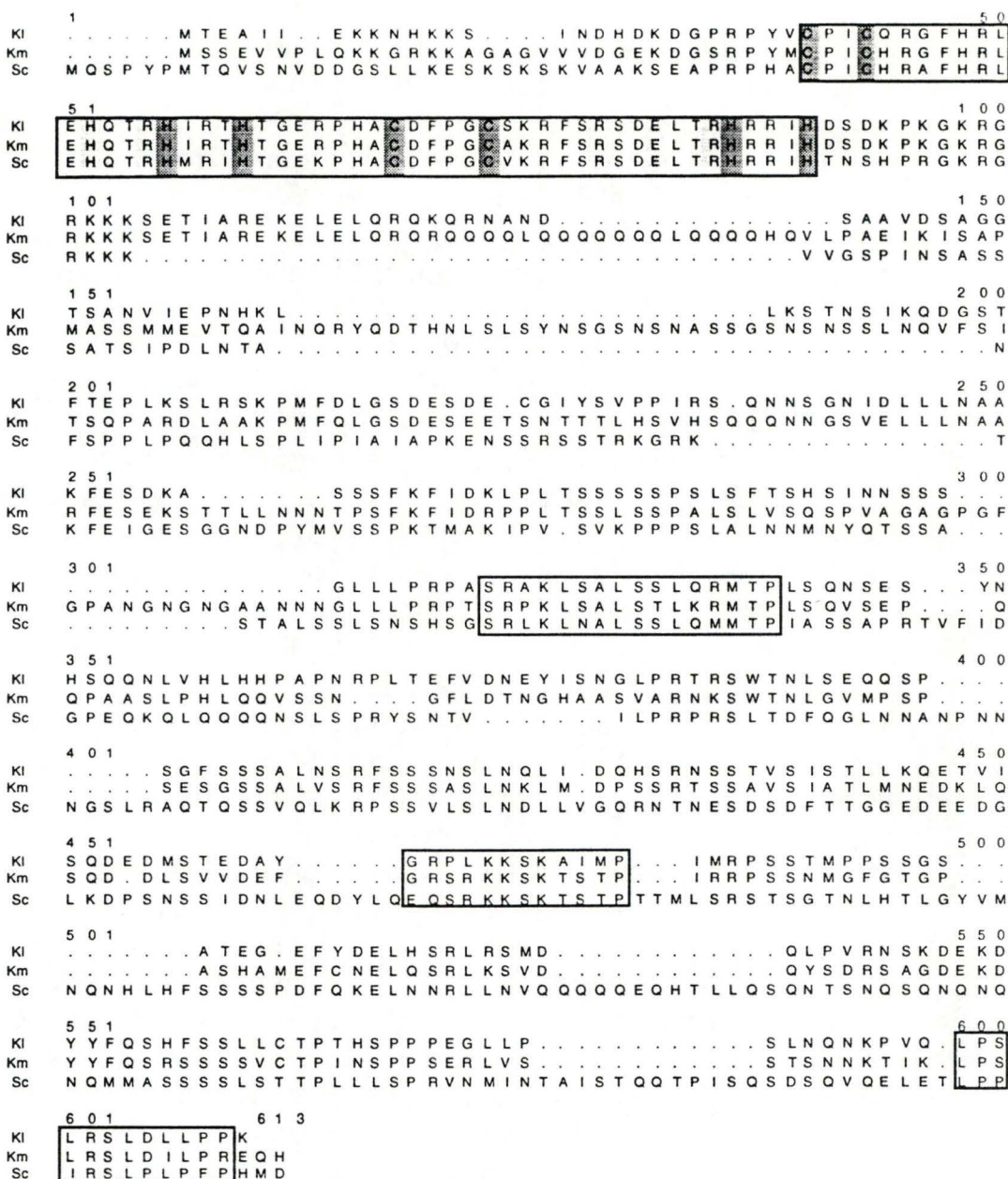


FIGURE 13: Résultat de l'alignement multiple réalisé avec les séquences protéiques des homologues de Mig1p chez trois espèces de levures (*Kluyveromyces lactis* [Kl], *Kluyveromyces marxianus* [Km], et *Saccharomyces cerevisiae* [Sc])

Les quatre boîtes détectées sont encadrées.

Les résidus cystéine et histidine responsables de la formation du doigt de Zinc sont surlignés en gris foncé. Les résidus impliqués dans la reconnaissance spécifique des bases de la boîtes GC sont surlignés en gris clair.

cerevisiae (Balasubramanian & al., 1993). Rox1p et Mig1p répriment toutes deux la transcription de leurs gènes cibles par l'intermédiaire de Cyc8p et Tup1p (Carlson & al., 1995; Balasubramanian & al., 1993). On pourrait donc s'attendre à ce que le motif riche en leucines et en prolines soit impliqué dans le recrutement du complexe Cyc8p-Tup1p. Une analyse par délétion de l'extrémité carboxy-terminale de Mig1p chez *Saccharomyces cerevisiae* a démontré son rôle dans la répression de la transcription (Östling & al., 1995).

1.1.1.4.3. Conclusions

L'analyse de la séquence du gène cloné démontre son homologie avec *ScMIG1* et l'existence de quatre régions conservées. Une analyse par délétion chez *Saccharomyces cerevisiae* (Östling & al., 1995) a attribué un rôle au domaine amino-terminal (la liaison à l'ADN), et définit le domaine carboxy-terminal comme étant responsable de la répression de la transcription.

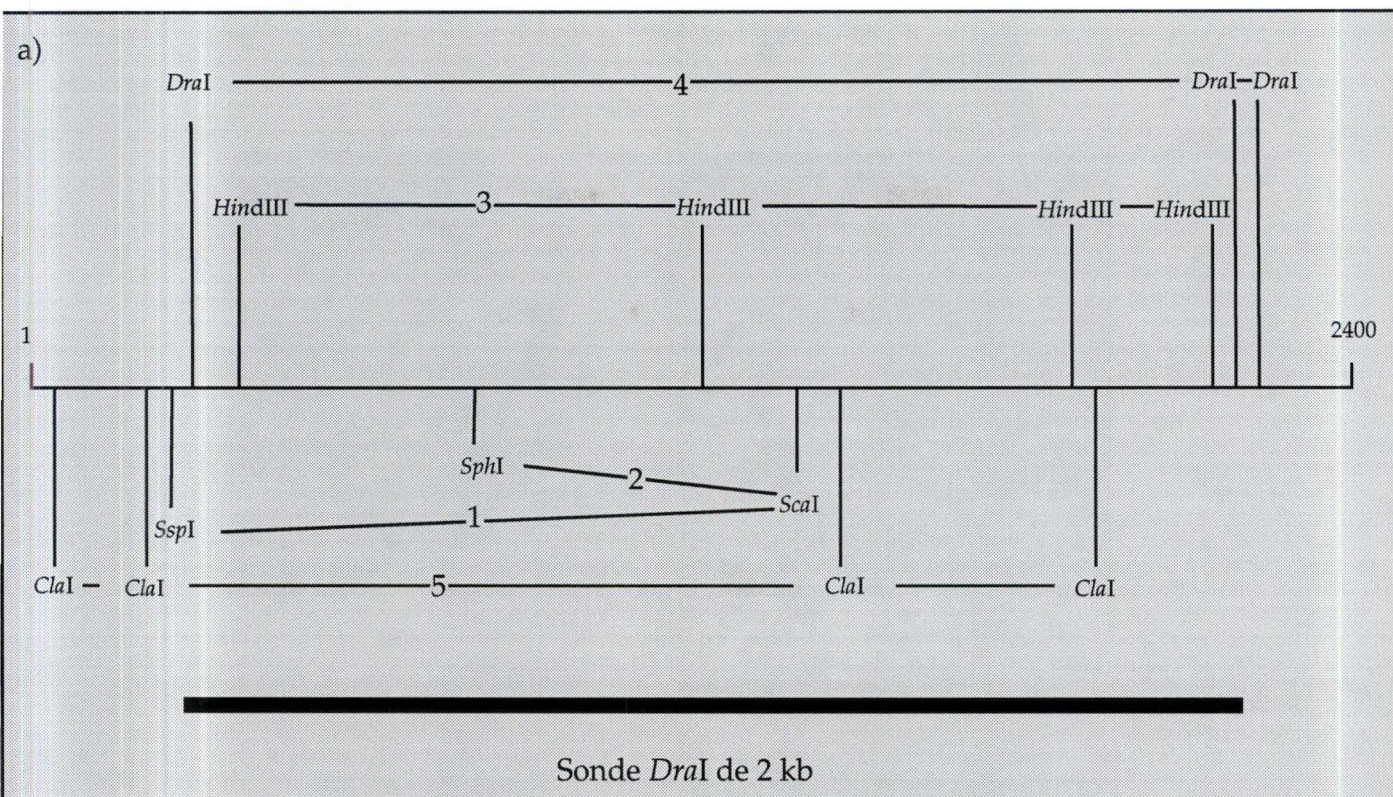
1.1.2. L'analyse en Southern confirme qu'il s'agit d'un gène de *Kluyveromyces lactis*

1.1.2.1. Introduction

Un nouveau gène a été cloné. Les alignements de séquences montrent que ce gène est l'homologue structural de *MIG1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour authentifier ce gène, c'est-à-dire prouver que ce gène appartient au génome de *Kluyveromyces lactis*, on réalise un Southern Blot.

L'ADN génomique de *Kluyveromyces lactis* est restreint par un jeu d'enzymes de restriction. On soumet les différents fragments de restriction à une séparation électrophorétique, on les transfère sur un filtre de Nylon, puis on révèle avec une sonde s'hybridant avec la région du gène cloné. Les enzymes de restriction et la sonde à utiliser ont été déterminées en fonction des sites de restriction présents au niveau du gène cloné, de telle sorte que le "pattern" de bandes révélées en Southern soit diagnostique du locus de *Kluyveromyces lactis*. Ce n'est que si les tailles des fragments du génome de *Kluyveromyces lactis* "allumés" par la sonde correspondent aux tailles "théoriques", calculées à partir des sites de restriction présents au niveau de la séquence du gène cloné, qu'on pourra conclure que le gène cloné appartient au génome de *Kluyveromyces lactis*.



b)

Enzymes de restriction	Tailles attendues
<i>SspI</i> - <i>ScaI</i>	1300 bp
<i>SphI</i> - <i>ScaI</i>	870 bp
<i>HindIII</i>	800, 600 bp
<i>DraI</i>	2000 bp
<i>ClaI</i>	1500 bp

FIGURE 14: Choix des couples sonde-enzymes utilisés pour le Southern Blot

a) Présentation des cinq couples sonde-enzymes utilisés pour le Southern Blot. La portion séquencée du pGIKL2.3 (2.4 kb) est représentée, ainsi que la position de la sonde et celle des différents sites de restriction présents au niveau de cette séquence. Les différents jeux d'enzymes de restrictions utilisés sont numérotés de 1 à 5.

b) Présentation des cinq jeux d'enzymes de restriction utilisés, avec les tailles attendues des fragments qui seront allumés par la sonde *DraI*.

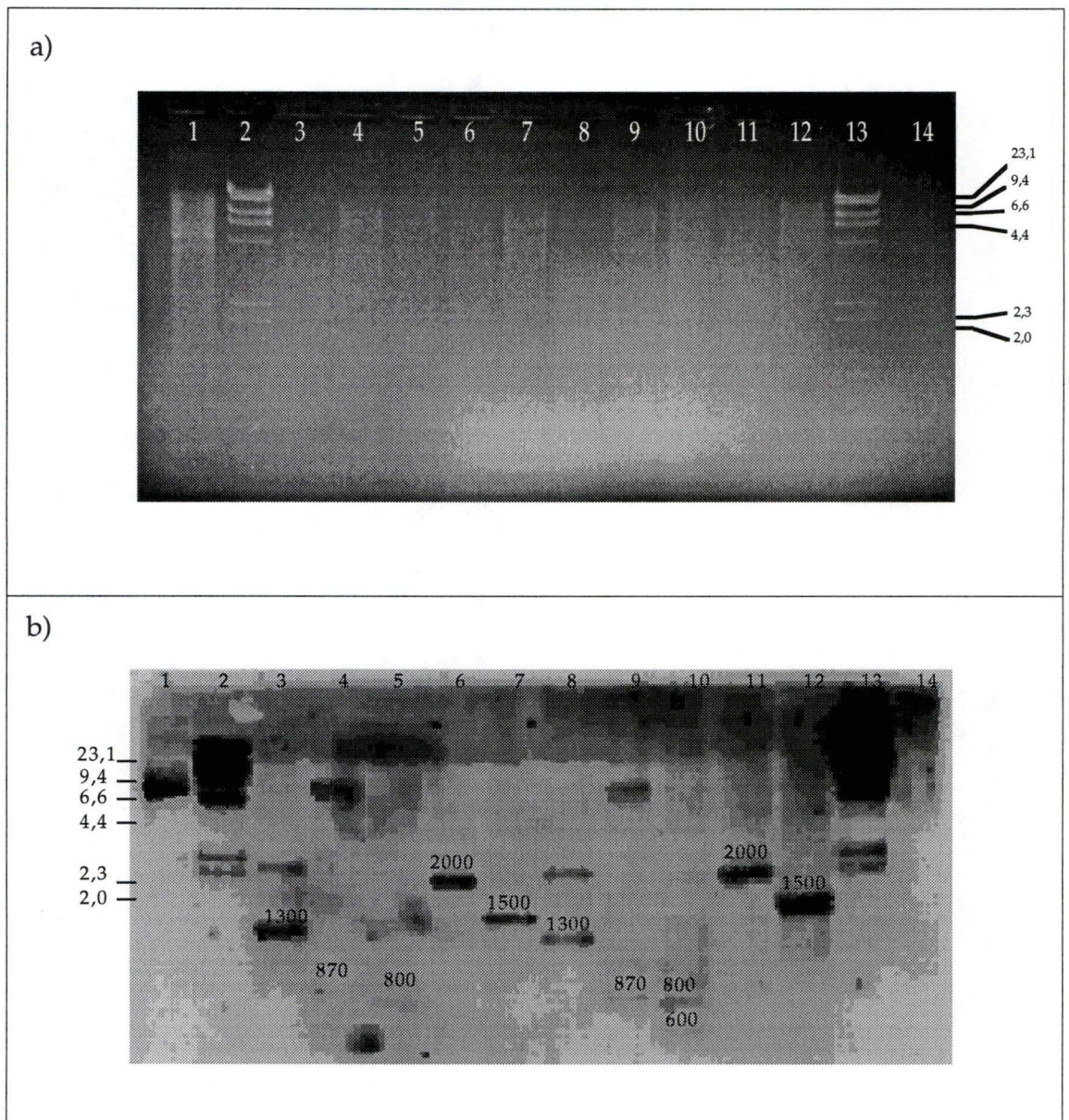


FIGURE 15 :

a) Séparation électrophorétique de l'ADN génomique restreint de *Kluyveromyces lactis*.
b) Southern Blot sur l'ADN génomique de deux souches de *Kluyveromyces lactis* restreint par 5 jeux différents d'enzymes de restriction et révélés par la sonde *DraI* de 2 kb. Les fragments diagnostiques attendus sont identifiés par leur taille (en bp). Commentaires : voir texte.

- Piste 1 : ADN génomique de *Kluyveromyces marxianus* restreint par *EcoRI*
- Piste 2 : Marqueur de taille λ restreint par *HindIII* (kb)
- Piste 3 : ADN génomique de CBS 2360 restreinte par *SspI-ScaI*
- Piste 4 : ADN génomique de CBS 2360 restreinte par *SphI-ScaI*
- Piste 5 : ADN génomique de CBS 2360 restreinte par *HindIII*
- Piste 6 : ADN génomique de CBS 2360 restreinte par *DraI*
- Piste 7 : ADN génomique de CBS 2360 restreinte par *ClaI*
- Piste 8 : ADN génomique de CBS 2359 restreinte par *SspI-ScaI*
- Piste 9 : ADN génomique de CBS 2359 restreinte par *SphI-ScaI*
- Piste 10 : ADN génomique de CBS 2359 restreinte par *HindIII*
- Piste 11 : ADN génomique de CBS 2359 restreinte par *DraI*
- Piste 12 : ADN génomique de CBS 2359 restreinte par *ClaI*
- Piste 13 : Marqueur de taille λ restreint par *HindIII* (kb)
- Piste 14 : ADN génomique de *Saccharomyces cerevisiae* restreint par *EcoRI*

1.1.2.2. Résultats

Pour l'obtention de la sonde *DraI* (Figure 14), on marque, au ^{32}P , par Random Prime Labeling (Matériel & méthodes), un fragment de restriction (2 kb) isolé à partir du clone pGIKL2.3 restreint par *EcoRI*. Une PCR diagnostique préalable réalisée sur ce fragment avec les amorces ZF1 et ZP1 (Figure 5) a produit l'amplicon de 150bp prédit par la séquence du gène *KIMIG1* (données non montrées).

La figure 14 présente les cinq jeux d'enzymes de restriction qui ont été choisis pour cliver l'ADN génomique de *Kluyveromyces lactis* et la taille attendue des fragments qui seront "allumés" par la sonde.

La figure 15 donne les résultats du Southern Blot :

- Le profil de Southern Blot est le même pour les souches ne différant qu'au niveau de leur type sexuel.
- Le contrôle est négatif chez *Saccharomyces cerevisiae*. Chez *Kluyveromyces marxianus*, on observe un signal d'hybridation, sans doute en raison du haut taux de similarité observé entre Mig1p de *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus*.
- Les tailles prévues par calcul à partir des sites de restriction présents au niveau de la séquence du gène cloné sont observées.
- D'autres fragments, de taille non prévue par calcul, sont "allumés" par la sonde *DraI*. Ils correspondent aux fragments bordant ceux dont la taille peut être prédite et sont également révélés car ils contiennent une portion homologue à la sonde.

1.1.2.3. Conclusions

Les résultats obtenus par le Southern Blot prouvent de façon indiscutable que le gène cloné appartient au génome de *Kluyveromyces lactis*.

1.1.3. Conclusions générales

Le gène *KIMIG1* a été cloné par criblage d'une banque génomique sauvage de *Kluyveromyces lactis* avec une sonde nucléotidique réalisée sur base de la séquence peptidique -hautement conservée- de la région des doigts de Zinc des protéines Mig1p de *Saccharomyces cerevisiae* et CreAp d'*Aspergillus nidulans*.

Un Southern Blot a authentifié l'origine du gène cloné : il appartient au génome de *Kluyveromyces lactis* et code pour une protéine de 474 acides aminés, contenue dans une ORF de 1425 bp.

Des alignements protéiques simples ont été effectués dans le but de donner une identité structurale au gène cloné. Les comparaisons pairées de la séquence prédite en acides aminés avec trois autres séquences protéiques de répresseurs à doigts de Zinc (KmMig1p, ScMig1p, et AsnCreAp) révèlent une homologie générale faible, mais une homologie importante au niveau de la seule région des doigts de Zinc. Ces observations désignent le gène cloné comme un homologue structural de *ScMIG1*.

Des alignements protéiques multiples ont ensuite mis en évidence des domaines fonctionnels conservés entre les trois homologues de Mig1p chez la levure (ScMig1p, KlMig1p, et KmMig1p). Sur base de travaux expérimentaux réalisés sur *ScMIG1* (Östling & al., 1995; Nehlin & al., 1990), on a pu identifier le domaine amino-terminal de liaison à l'ADN, qui correspond à la région des doigts de Zinc, le domaine carboxy-terminal de répression de la transcription, qui serait le site de recrutement du complexe co-répresseur Cyc8p-Tup1p, ainsi que deux autres domaines contenant des sites potentiels de phosphorylation dont la fonction reste à établir.

Cette approche structurale de la démarche d'identification du gène cloné étant clôturée, nous allons passer à un aspect plus fonctionnel de l'identification de *KIMIG1*.

1.2. LA FONCTION DU GÈNE *KIMIG1* EST HOMOLOGUE DE CELLE DE *ScMIG1* CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1.2.1. Introduction

L'identification fonctionnelle de *KIMIG1* à son homologue *ScMIG1* consiste à montrer que le gène cloné peut se substituer fonctionnellement à celui-ci. Cette approche fonctionnelle va se réaliser de différentes façons : le gène *KIMIG1* sera présent, en conditions hétérologues, en simple ou en multi-copie, et le test de complémentation hétérologue se fera dans deux systèmes différents : les gènes *GAL* et le gène *SUC2* de *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, le répresseur Mig1p joue un rôle central à ces niveaux (Lundin & al., 1994; Nehlin & al., 1990).

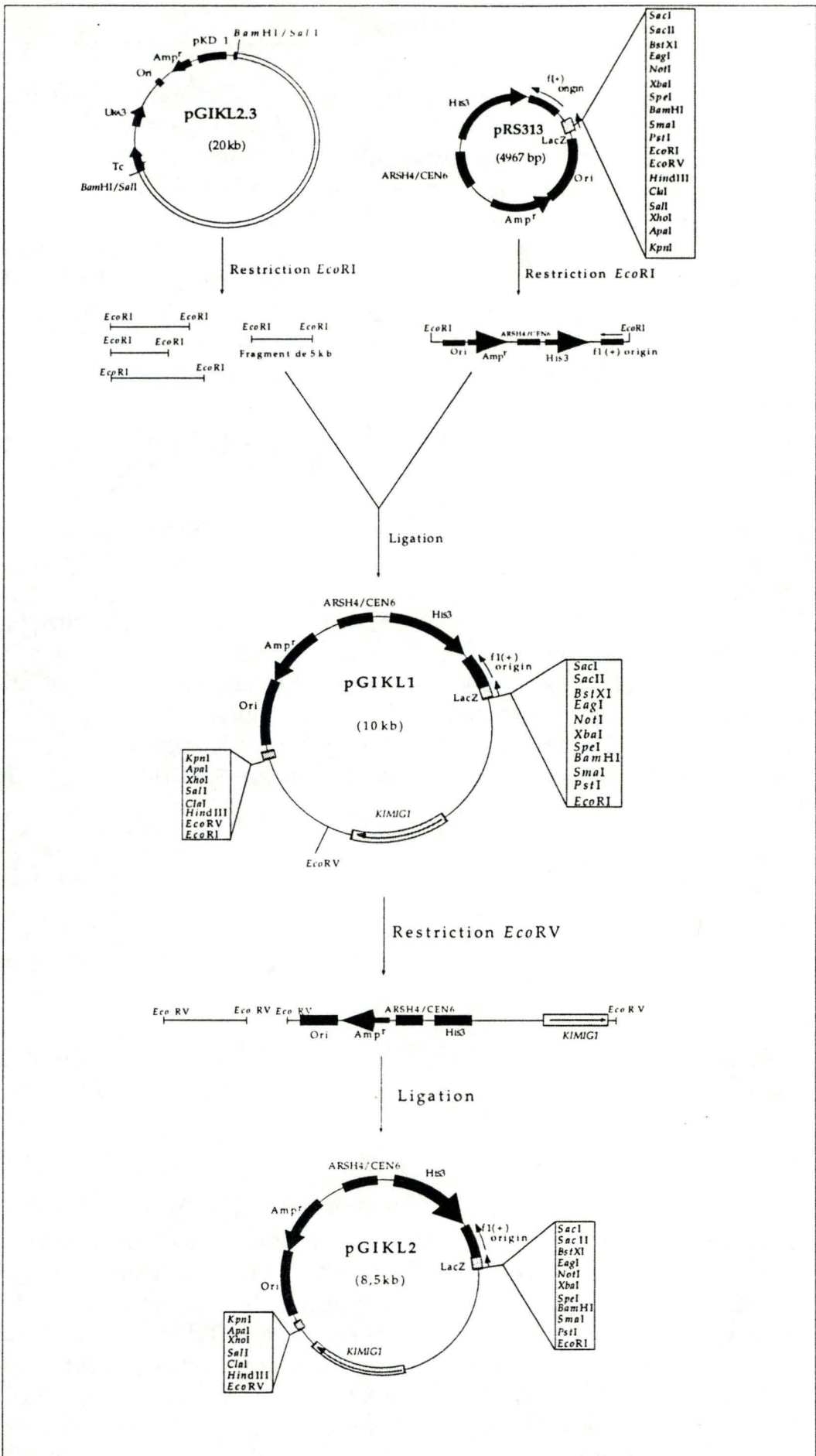


FIGURE 16 : Schéma représentant la construction du sous-clone pGIKL2
 Commentaires : voir texte.

1.2.2. KLMIG1 supplée fonctionnellement ScMIG1 au niveau du promoteur du gène SUC2 chez *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.2.1. Introduction

Le gène *SUC2* de *Saccharomyces cerevisiae* code pour une invertase capable de dégrader le saccharose (en glucose et fructose) et le raffinose (en mélibiose et en fructose).

Une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae* ne poussera pas sur un milieu contenant du 2DG (2-désoxy-glucose, un analogue non métabolisable du glucose) avec du raffinose comme seule source de carbone et d'énergie : en présence de glucose ou de 2DG dans le milieu de culture, l'expression du gène *SUC2* est réprimée par Mig1p.

Un mutant *mig1* (par exemple, la souche H497 de *Saccharomyces cerevisiae*, voir Matériel & méthodes), par contre, est capable de croître sur un milieu Raffinose + 2DG puisque le répresseur Mig1p est absent ou non fonctionnel.

Un test de complémentation hétérologue par *KLMIG1* du phénotype *mig1*⁻ consiste donc à observer une absence de croissance sur Raffinose + 2DG.

1.2.2.2. Approche qualitative de la fonction de KLMIG1

Un test de complémentation hétérologue dans le mutant *mig1* de *Saccharomyces cerevisiae* (souche H497) a été réalisé dans le but d'identifier fonctionnellement *KLMIG1*.

KLMIG1 va être apporté en copie unique et la complémentation sera testée sur Raffinose + 2DG.

1.2.2.2.1. Construction du sous-clone pGIKL2

Le gène *KLMIG1* a été sous-cloné dans un vecteur "navette", le pRS313 (Matériel & méthodes), qui est capable de se répliquer aussi bien chez *E.coli* (Ori) que chez *Saccharomyces cerevisiae* (ARSH4/CEN6). Ce vecteur, centromérique, ne sera présent qu'en une seule copie chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Le pGIKL2 a été construit en deux étapes : la première consiste en l'insertion de *KLMIG1* dans le pRS313, pour donner le pGIKL1, la seconde en la réduction de la taille de l'insert du pGIKL1, pour donner le pGIKL2.

La construction du pGIKL1 est détaillée à la figure 16. Un fragment de 5 kb provenant d'une restriction *EcoRI* du clone pGIKL2.3 a été "ligué" dans le vecteur pRS313, ouvert par une restriction *EcoRI* (données non montrées). Une PCR réalisée sur ce fragment de 5 kb (avec les amorces ZF1 et ZP1, figure 5), et un Southern Blot réalisé sur l'ADN génomique de *Kluyveromyces*

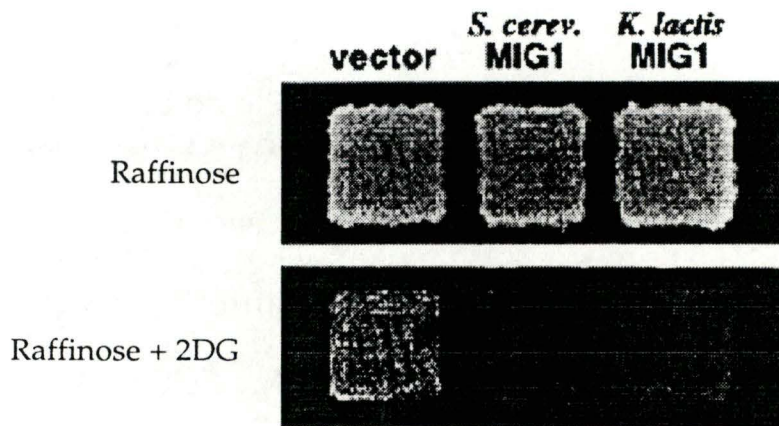


FIGURE 17 : Test de complémentation hétérologue qualitatif chez une souche de *Saccharomyces cerevisiae mig1* (H497)

Les trois souches sont capables de croître sur Raffinose.

La complémentation de la mutation *mig1* avec le gène *MIG1* de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Kluyveromyces lactis* restaure la répression du gène *SUC2* par le glucose, et donc la sensibilité sur Raffinose + 2DG.

Le contrôle négatif (H497 + vecteur) est toujours capable de croître sur Raffinose + 2DG.

Détails dans le texte.

lactis restreint par *EcoRI* (sonde PCR de *Kluyveromyces marxianus*, voir 1.1.1.1.) ont montré que ce fragment *EcoRI* de 5 kb contenait l'entièreté de l'ORF (données non montrées). Le produit de la ligation est transformé dans la souche XL1-Blue d'*E.coli*. Les colonies transformantes et recombinantes, soumises à un diagnostic par PCR (amorces pKL1 et pKL3R, figure 5), ont toutes produit l'amplicon de 600 bp prédit par la séquence du gène *KIMIG1* et attendu dans le cas du sous-clone pGIKL1 (données non montrées).

La construction du pGIKL2 est détaillée à la figure 16. Une restriction *EcoRV* du pGIKL1 donne deux fragments (données non montrées), dont la taille permet la détermination de la localisation et de l'orientation du gène dans l'insert. Le petit fragment, bordé par les sites *EcoRV*, est enlevé, la matrice récupérée et "liguée" sur elle-même. Le produit de la ligation est transformé dans la souche XL1-Blue d'*E.coli*. L'ADN plasmidique des colonies transformantes est soumis à une restriction diagnostique *EcoRV*. Toutes les restrictions produisent le fragment unique à 8.5 kb attendu dans le cas du pGIKL2 (données non montrées).

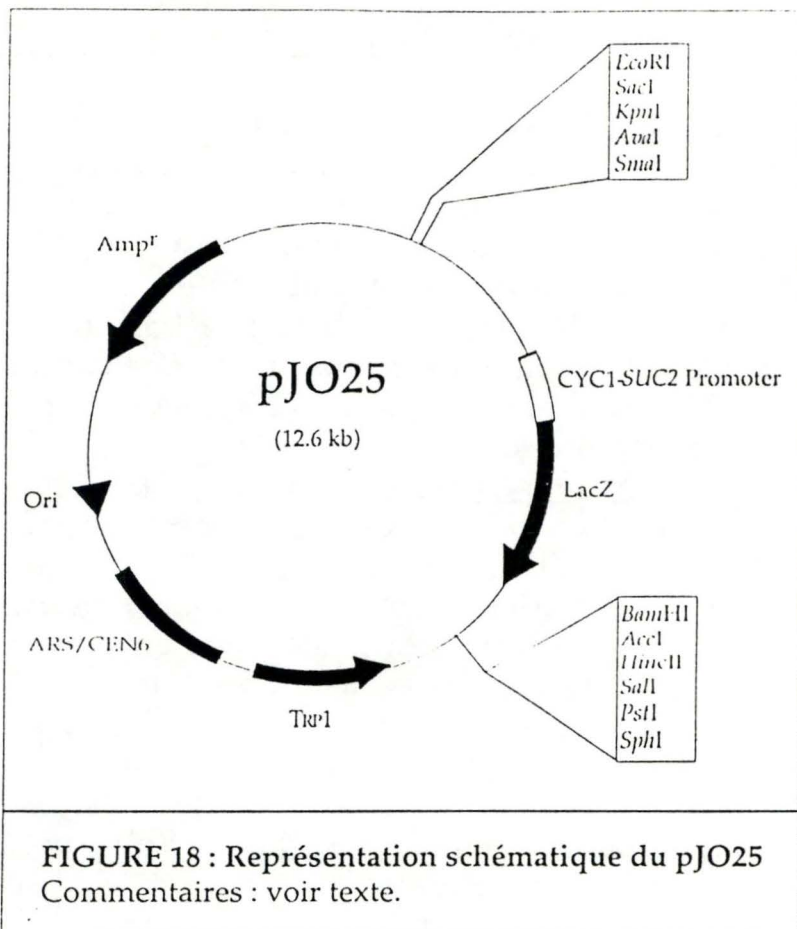
1.2.2.2. Résultats de l'expérience de complémentation hétérologue (Figure 17)

La souche H497 (*mig1*) de *Saccharomyces cerevisiae* a été transformée par le pGIKL2 (pour le test), par le pJO99 (pour le contrôle négatif, Matériel & méthodes) ou par le pJO101 (pour le contrôle positif, Matériel & méthodes).

Les transformants ont été soumis au test de complémentation hétérologue, présenté à la figure 17. Ils ont d'abord été mis en culture sur milieu contenant 2% de glucose, puis répliqués sur milieu contenant du raffinose (3%) comme seule source de carbone, avec (pour le test) ou sans (pour le contrôle de croissance) 2DG (200µg/ml). Entrait également dans la composition des milieux un inhibiteur de la respiration, le bromure d'éthidium (20µg/ml), afin de supprimer toute croissance aérobie non spécifique (les levures sont ainsi obligées de croître en n'utilisant que l'énergie produite par fermentation du raffinose).

Sur le milieu contenant du 2DG, les levures transformantes ayant reçu le gène *MIG1* en simple copie, que ce soit de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Kluyveromyces lactis*, sont incapables de croître. Il y a donc complémentation hétérologue par *KIMIG1*.

Sur le milieu ne contenant pas de 2DG, on observe que les trois types de transformants sont capables de pousser. Ceci suggère



Gene	β -gal. act.	St. Dev.
vector control	4.98	0.48
KIMIG1	1.49	0.28
ScMIG1	0.86	0.14

FIGURE 19 : Test de complémentation hétérologue quantitatif au niveau du promoteur du gène *SUC2*, qui dirige l'expression du gène rapporteur *LacZ*
L'activité β -galactosidase est mesurée (Valeurs indiquées en unités d'enzyme) pour le contrôle négatif (vector control), le test (*KIMIG1*), et le contrôle positif (*ScMIG1*). La valeur de l'activité β -galactosidase est une moyenne de 5 mesures indépendantes. La valeur de l'écart-type est également indiquée (Standard deviation).

que, en conditions de dérégulation (absence de glucose ou de 2DG), *KIMig1p* est inactivée comme son homologue *ScMig1p*.

1.2.2.3. Approche quantitative de la fonction de *KIMIG1* par gène rapporteur

La capacité de *KIMIG1* à se substituer à *ScMIG1* chez un mutant *mig1* de *Saccharomyces cerevisiae* va être quantifiée à l'aide d'un système rapporteur.

La souche H497 de *Saccharomyces cerevisiae* (*mig1*) est transformée par un premier plasmide, le pJO25 (Figure 18), qui porte le gène rapporteur *LacZ*, codant pour la β -galactosidase, sous la dépendance du promoteur du gène *SUC2*. Dans cette souche H497 l'expression de *LacZ* n'est donc pas réprimée en présence de glucose.

1.2.2.3.1. Résultats de l'expérience de complémentation hétérologue.

La souche H497 (*mig1*) de *Saccharomyces cerevisiae* est transformée successivement par deux plasmides. Le premier plasmide est le pJO25. Le second plasmide est le pJO99 (contrôle négatif), le pGIKL2 (test), ou le pJO101 (contrôle positif). Ces trois plasmides ont été décrits lors de l'expérience de complémentation hétérologue qualitative (1.2.2.3.)

Les doubles transformants ont été mis en culture en milieu synthétique liquide contenant 2% de glucose. Les cultures ont été arrêtées en phase logarithmique pour procéder au dosage de l'activité β -galactosidase.

La figure 19 résume les résultats obtenus. Les levures transformées par le plasmide portant le gène *KIMIG1* font montre d'une activité β -galactosidase réduite par rapport au contrôle négatif, ce qui témoigne d'une répression à attribuer à *KIMIG1*. Cependant, comparée à celle du contrôle positif (levures transformées par le plasmide portant *ScMIG1*), la répression par *KIMIG1* semble moins efficace.

1.2.2.4. Conclusions

Les deux expériences de complémentation hétérologue décrites ci-avant ont permis de démontrer que le gène *MIG1* de *Kluyveromyces lactis* était capable, en copie unique, de suppléer fonctionnellement le gène *MIG1* de *Saccharomyces cerevisiae* au niveau du promoteur du gène *SUC2* chez *Saccharomyces cerevisiae*.

En effet, une première approche -qualitative- a montré que l'apport du gène *MIG1* de *Kluyveromyces lactis* en copie unique chez un mutant *mig1* de *Saccharomyces cerevisiae* restaurait la sensibilité sur

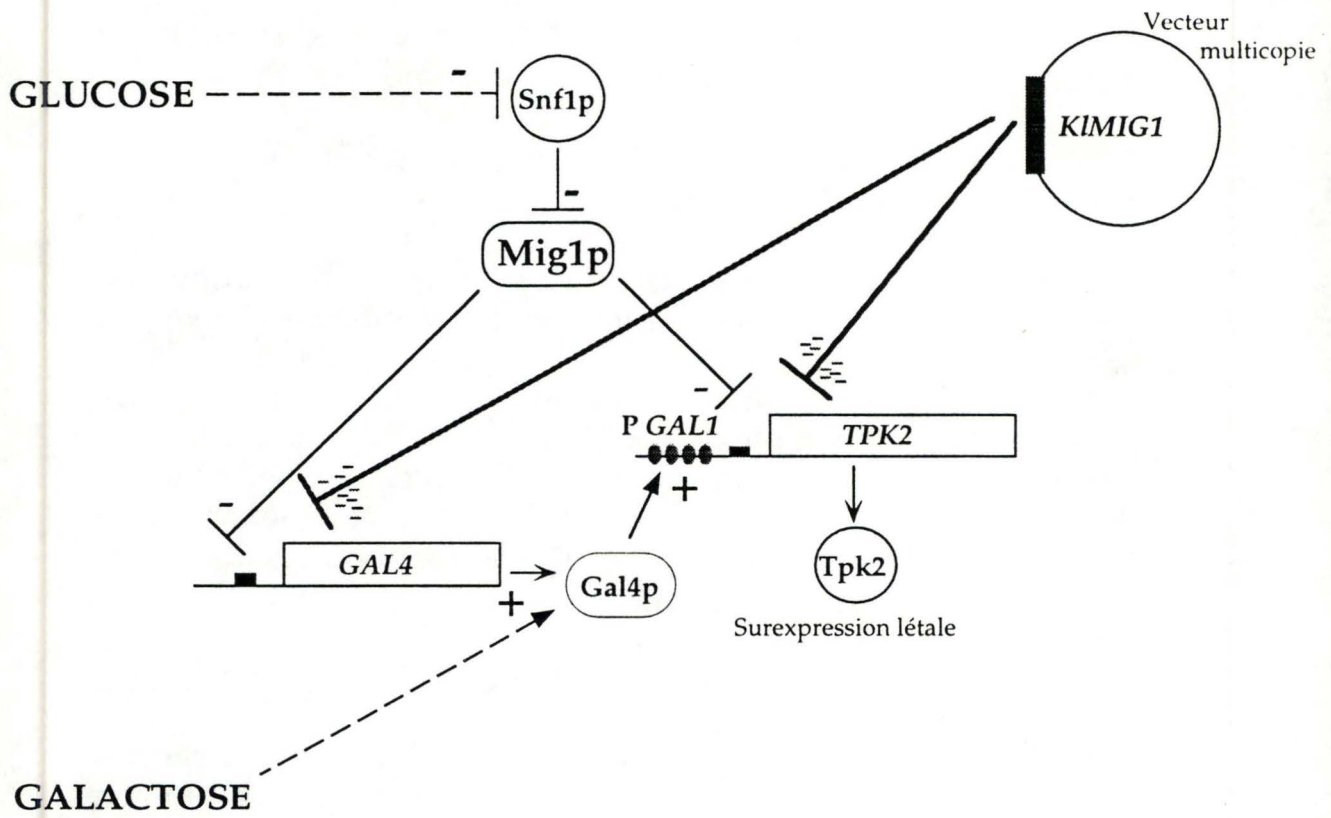


FIGURE 20 : Illustration schématique des cibles potentielles de KIMig1p en surconcentration dans la souche H172 de *Saccharomyces cerevisiae*
 Commentaires : voir texte.

un milieu contenant du raffinose + 2DG avec un inhibiteur de la respiration.

Enfin, une seconde approche -quantitative- a montré que le gène *MIG1* de *Kluyveromyces lactis* était capable, en simple copie, de réprimer l'expression du gène rapporteur LacZ lorsque son expression est sous la dépendance du promoteur du gène *SUC2*. L'effet répresseur de *KIMIG1* est cependant moins intense que celui de *ScMIG1* (répression de 3 fois pour *KIMIG1*, contre 6 fois pour *ScMIG1*).

En conclusion, toutes ces données démontrent que le gène *MIG1* de *Kluyveromyces lactis* est capable de se substituer au gène *MIG1* de *Saccharomyces cerevisiae* pour assurer la répression du gène *SUC2* chez *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'activité de *KIMIG1* est soumise, de la même façon que celle de *ScMIG1*, à une inhibition en absence de glucose.

1.2.3. *KIMIG1* supplée fonctionnellement *ScMIG1* au niveau du promoteur des gènes *GAL* chez *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.3.1. Introduction (Figure 20)

L'étude de la complémentation hétérologue du phénotype *mig1*⁻ par *KIMIG1* chez *Saccharomyces cerevisiae* va se faire dans la souche H172 de *Saccharomyces cerevisiae*, qui contient une copie du gène *TPK2* toxique placé sous la dépendance du promoteur du gène *GAL1* (inductible par le galactose, répressible par le glucose). Cette copie est intégrée dans le génome de H172, qui possède en outre un gène *MIG1* résident intact.

En présence de galactose dans le milieu de culture (conditions inductrices), la protéine Gal4p active la transcription des gènes qui sont sous sa dépendance, y compris celle du gène *TPK2*. La surexpression de ce gène étant létale pour la cellule, la souche H172 est incapable de croître sur un milieu ne contenant que du galactose et pas de glucose. Par contre, en présence de glucose dans le milieu de culture, le gène *MIG1* résident suffit à la répression des gènes *GAL* et de *TPK2* et la souche H172 est en conséquence capable de croître.

L'introduction de copies supplémentaires de *ScMIG1*, porté par un plasmide multi-copie (pMIG1, voir Matériel & méthodes), rend possible la croissance de la souche H172 sur un milieu ne contenant que du galactose : l'expression des gènes *GAL4*, *GAL1* et du gène *TPK2* est en effet réprimée par Mig1p parce que cette protéine, étant présente en concentrations très élevées, peut exercer son effet répresseur, même en conditions inductrices (galactose). On vérifie que dans ces conditions il y a effectivement surdosage de Mig1p par le fait que le transformant est incapable de fermenter

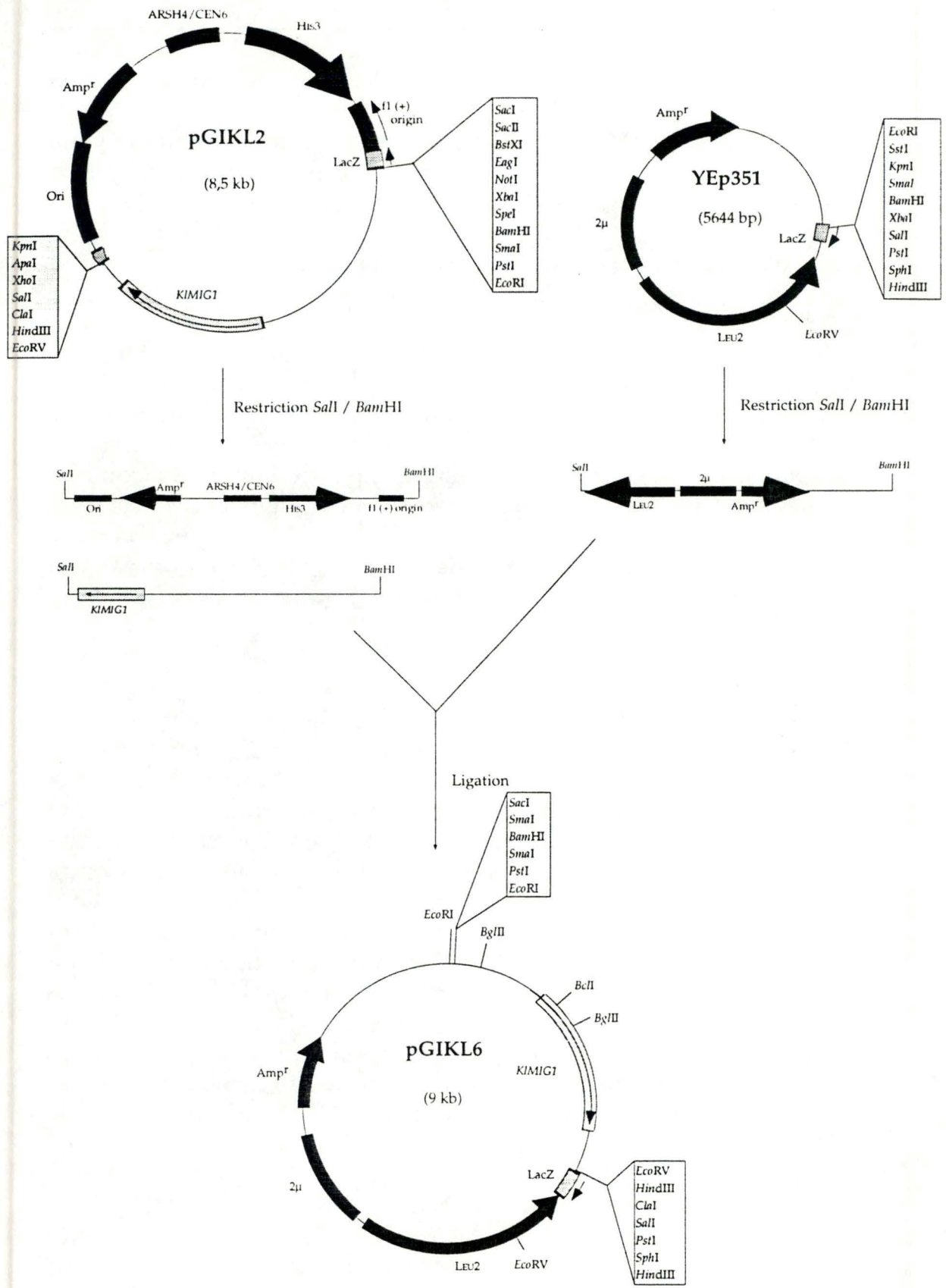


FIGURE 21 : Représentation schématique de la construction du pGIKL6
 Commentaires : voir texte

le galactose, étant donné que les gènes *GAL* demeurent réprimés par Mig1p.

La capacité de *KIMIG1* de se substituer fonctionnellement à *ScMIG1* va être testée dans cette souche en la transformant par un vecteur multicopie portant le gène *KIMIG1* et en vérifiant la capacité de croissance résultant de la répression du promoteur du gène *GAL1* contrôlant le gène *TPK2* toxique.

1.2.3.2. Construction du pGIKL6

Pour réaliser ce test de complémentation hétérologue dans la souche H172, le gène *KIMIG1* va être transféré sur un vecteur multicopie.

La construction du pGIKL6 est représentée à la figure 21. Une restriction *Sall/Bam*HI du pGIKL2 nous permet de récupérer l'entièreté de l'insert, lequel va être "ligué" dans le vecteur YEp351 (Matériel & méthodes) ouvert par la même restriction double *Sall/Bam*HI (données non montrées). Le produit de la ligation est transformé dans la souche XL1-Blue d'*E.coli*. L'ADN plasmidique récupéré à partir des colonies transformantes et recombinantes est soumis à une restriction diagnostique *EcoRV*. Les deux fragments de 1.1 et 8.9 kb attendus pour une restriction *EcoRV* du pGIKL6 sont obtenus dans tous les cas (données non montrées).

1.2.3.3. Résultats (Figure 22)

La souche H172 a été transformée avec les plasmides YEp351 (pour le contrôle négatif), pMIG1 (pour le contrôle positif), le pGIKL6 (pour le test) et le pGIKM12 (test, non discuté ici).

Les colonies transformantes sont resuspendues dans de l'eau stérile dont un aliquot est déposé en gouttes sur des milieux synthétiques solides de trois types : 2% glucose (milieu répresseur), 2% galactose (milieu inducteur), 2% galactose + antimycine (milieu inducteur, fermentation obligatoire).

Sur glucose seul, tous les transformants (sans *MIG1*, avec *KIMIG1*, ou avec *ScMIG1*) poussent puisque le gène *MIG1* résident de H172 suffit à empêcher la surexpression létale de *TPK2* en réprimant l'expression au départ du promoteur de *GAL1*.

Sur galactose seul, les transformants ayant une surdose de Mig1p sont capables de pousser. Le contrôle positif pousse car *ScMig1p* y est en surdose. Le contrôle négatif ne pousse pas, car il n'a pas reçu de copies supplémentaires de *MIG1*. Le test présente une croissance, ce qui suggère que *KlMig1p* est en surdose et se substitue à *ScMig1p* pour la répression du promoteur du gène *GAL1*.

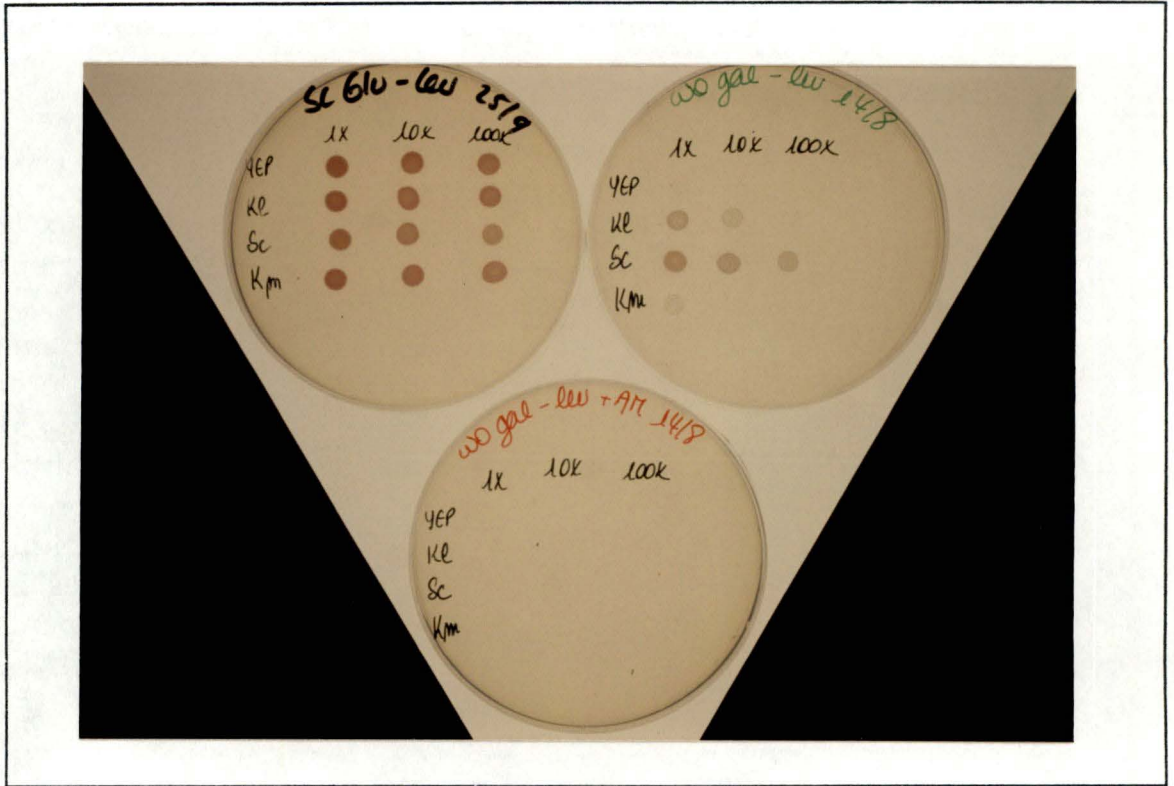


FIGURE 22 : Résultats du test de complémentation hétérologue dans H127
 Les différents milieux sont synthétiques, ne contiennent pas de leucine, et contiennent 2% de glucose (ScGlu - Leu), 2% de galactose (WoGal - Leu) ou 2% de galactose avec de l'antimycine (WoGal - Leu + AM).
 H127 est transformée avec YEp351 (YEP), pGIKL6 (Kl), pMIG1 (Sc), ou pGIKM12 (Km, non discuté), et déposée en gouttes non diluées (1X), ou diluées 10X, 100X, 1000X.
 Commentaires : voir texte et figure 20.

Sur galactose + antimycine, le contrôle négatif ne pousse pas car le gène *TPK2* est toujours surexprimé. Sur ce même milieu, le contrôle positif et le test ne poussent pas, car les cellules sont incapables de respirer (antimycine), et de fermenter (la seule source de carbone est le galactose et les gènes *GAL* sont réprimés par la surdose de Mig1p). Ce test confirme que la croissance de H172 sur galactose est rendue possible grâce à une surexpression de Mig1p.

1.2.3.4. Conclusions

Le gène *KIMIG1* est capable de se substituer à *ScMIG1* pour la répression des gènes *GAL* chez *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.4. Conclusions générales

L'identification structurale du gène cloné est confirmée par une étude fonctionnelle du gène en conditions hétérologues.

L'identification fonctionnelle de *KIMIG1* a été réalisée par divers tests de complémentation en conditions hétérologues, chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La complémentation est observée au niveau du promoteur du gène *SUC2*, dans des conditions d'expression physiologiques, et au niveau des gènes *GAL*, dans des conditions de surexpression.

Dans les deux cas, on observe que *KIMIG1* est capable d'assurer la fonction de *ScMIG1* chez *Saccharomyces cerevisiae*. Toutefois, l'effet de la complémentation n'est pas total, peut-être en raison de la distance évolutive existant entre les gènes homologues *MIG1* de *Kluyveromyces lactis* et de *Saccharomyces cerevisiae*.

2. PLACE DE *KIMIG1* AU SEIN DE LA RÉPRESSION GLUCOSE DES GÈNES *GAL-LAC* CHEZ *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Le gène *KIMIG1* a été cloné. Il code pour l'homologue structural et fonctionnel du répresseur *ScMig1p*, acteur central de la répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae*, notamment au niveau de l'expression des gènes *GAL*.

Nous allons rechercher une action éventuelle du gène *KIMIG1* au sein de la régulation des gènes *GAL-LAC* de *Kluyveromyces lactis* en posant les questions suivantes :

- Quel est l'effet d'une surexpression du gène *KIMIG1* sur la répression glucose des gènes *GAL-LAC* chez *Kluyveromyces lactis* ?
- Quel est l'effet d'une disruption du gène *KIMIG1* sur la répression glucose des gènes *GAL-LAC* chez *Kluyveromyces lactis* ?

2.1. SUREXPRESSON DE *KIMIG1* CHEZ *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Le gène *LAC4* étant corégulé avec les autres gènes *GAL-LAC* chez *Kluyveromyces lactis* (Gödecke & al., 1991), la mesure de l'activité β -galactosidase sera le rapporteur naturel du niveau d'expression des gènes *GAL-LAC* dans différentes conditions de répression.

La surexpression de *MIG1* ne pourra avoir d'effet sensible sur un rapporteur que si, dans les conditions normales, la répression n'est pas maximale. Pour cette raison, nous réalisons le test dans une souche (JA6/912, voir Matériel & méthodes) où, en conditions d'expression normale de *MIG1*, la répression de *LAC4* ne se manifeste pas et pourrait donc être observée à concentration élevée de *Mig1p*.

La région responsable de l'absence de répression glucose de *LAC4* dans la souche JA6/912 est localisée dans le promoteur du gène *LAC9* (Zachariae & al., 1993). La répression glucose étant médiée par la concentration en activateur *Lac9p*, toute mutation augmentant la force du promoteur de *LAC9* pourra avoir comme conséquence de masquer la répression glucose normale du gène *LAC4* (Zachariae & al., 1993).

La souche JA6/912 de *Kluyveromyces lactis* est transformée par le plasmide KEp6 (vecteur stable dans *Kluyveromyces lactis*, qui servira de contrôle négatif), ou par le clone pGIKL2.3 (*KIMIG1*, porté par le vecteur KEp6).

Deux souches non transformées de *Kluyveromyces lactis* seront utilisées comme contrôles négatif (JA6/912) et positif (JA6, voir Matériel & méthodes).

Les transformants sont mis en culture dans un milieu synthétique sans uracile. JA6 et JA6/912 sont chacune mises en culture dans un milieu synthétique complet. La croissance s'effectue jusqu'à une DO_{600nm} de 0.5

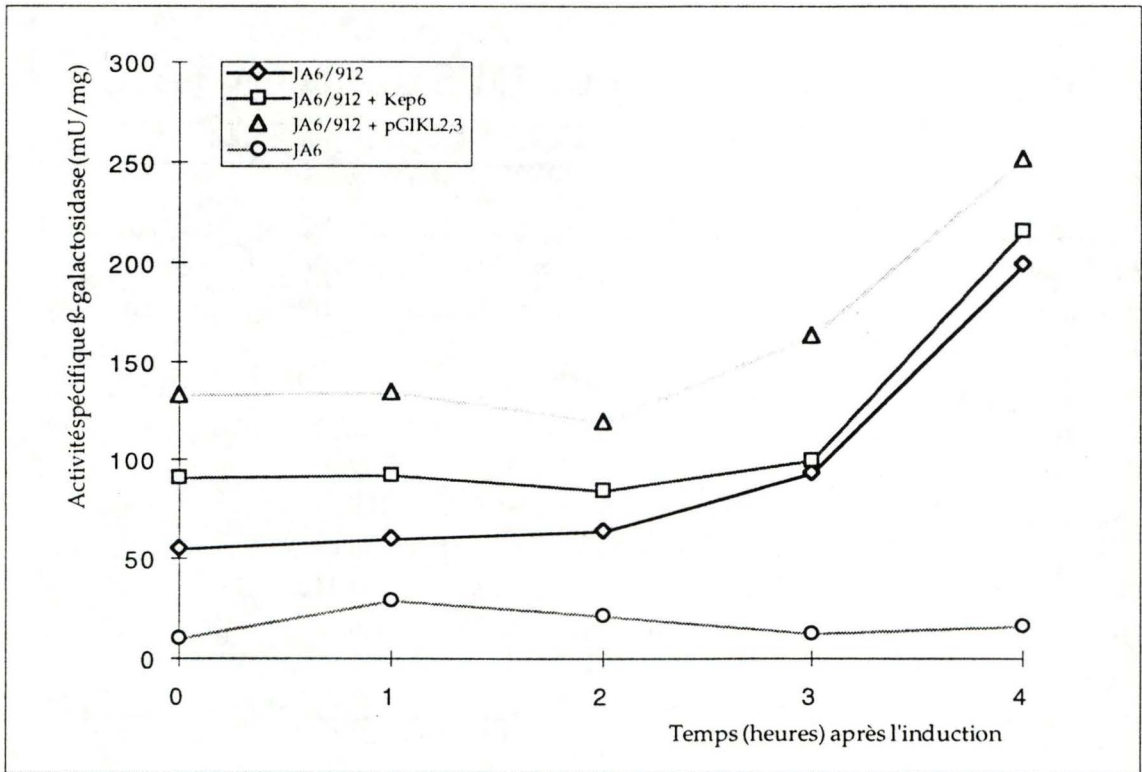


FIGURE 23 : Cinétique de l'induction de la β -galactosidase dans les souches JA6, JA6/912 et JA6/912 transformées par le clone pGIKL2.3 ou le vecteur KEp6. Ces différentes souches sont transférées d'un milieu glucose vers un milieu glucose/galactose au temps zéro.

en présence de 2% de glucose, ensuite, à partir du temps zéro, en présence de 2% de glucose et de 2% de galactose. Des prélèvements sont effectués au temps zéro, puis toutes les heures pendant 4 heures, et l'activité β -galactosidase est dosée.

Les résultats sont présentés à la figure 23. A partir du temps zéro, l'activité β -galactosidase augmente régulièrement chez JA6/912 et JA6/912 transformée par la matrice (contrôles négatifs), mais reste stable chez JA6, ce qui reflète la répression dépendante du gène *MIG1* résident. Dans les conditions de l'expérience test (JA6/912 transformée par le pGIKL2.3), cette répression n'est pas restaurée, ce qui peut témoigner d'un défaut d'expression de *MIG1* porté par le vecteur, ou, alternativement, de l'incapacité de *KlMig1p* de jouer ce rôle, soit que chez *Kluyveromyces lactis* il n'a pas de rôle dans le système *GAL-LAC*, soit qu'il exerce bien un rôle répresseur du système *GAL-LAC* en conditions normales non via *LAC9* mais par une autre voie inconnue qui, dans les conditions du test, ne sont pas à même de contrecarrer la force du promoteur de l'activateur *LAC9*.

2.2. DISRUPTION DE *KIMIG1* CHEZ *KLUYVEROMYCES LACTIS*

2.2.1. Introduction

L'impact d'une suppression de l'expression de *KIMIG1* sur l'expression des gènes *GAL-LAC* au niveau d'une souche de *Kluyveromyces lactis* est testé dans la souche JA6 (Matériel & méthodes), fortement sujette à la répression glucose de ces gènes.

2.2.2. Création de la souche de *Kluyveromyces lactis* IG181 (*mig1::URA3*)

2.2.2.1. "One Step Gene Disruption"

La disruption du gène *MIG1* résident de *Kluyveromyces lactis* va être réalisée par "One Step Disruption". Son principe repose sur deux étapes, schématisées à la figure 24 :

- Disruption *in vitro*
- Disruption *in vivo*

Chez *Kluyveromyces lactis*, l'intégration d'un fragment linéaire au sein du génome fait plus souvent intervenir un événement d'intégration aspécifique qu'un double événement de recombinaison homologue. En effet, seulement 1% des intégrations chez *Kluyveromyces lactis*, menées dans les conditions favorables où la taille des régions d'homologie bordant le fragment est importante, font intervenir un double événement de recombinaison homologue. L'intégration ectopique ne fait

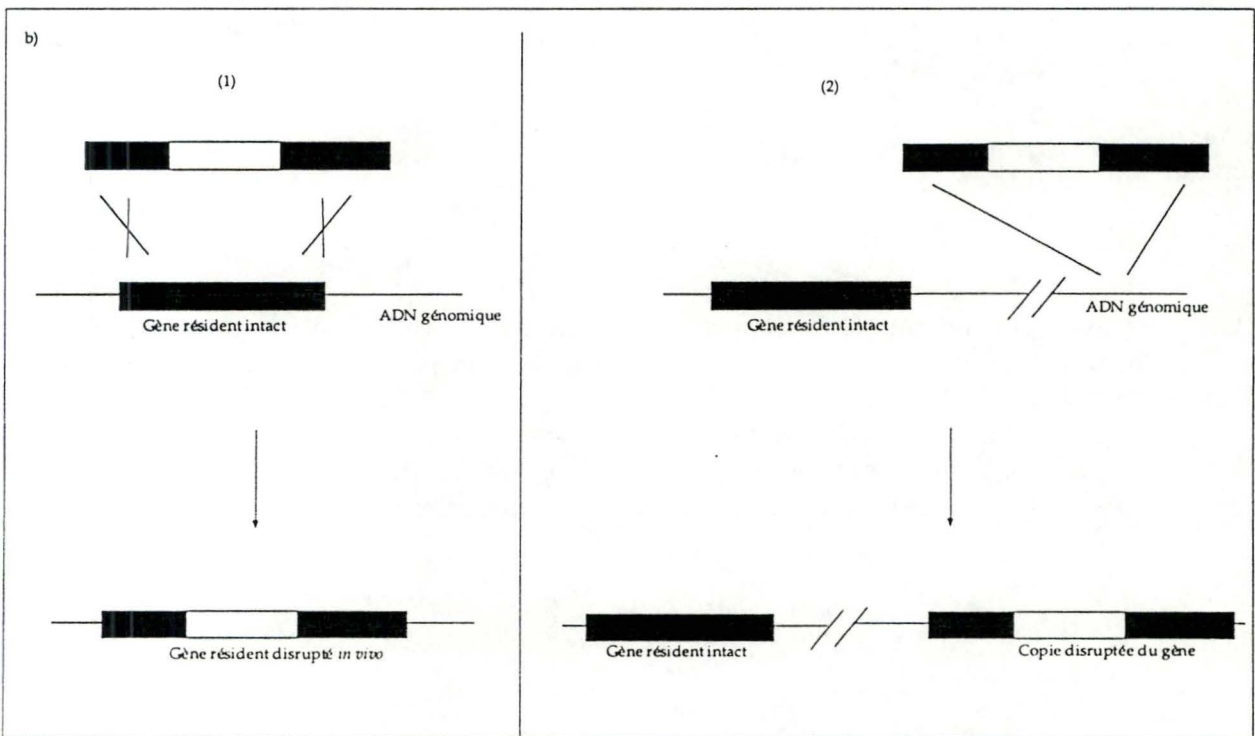
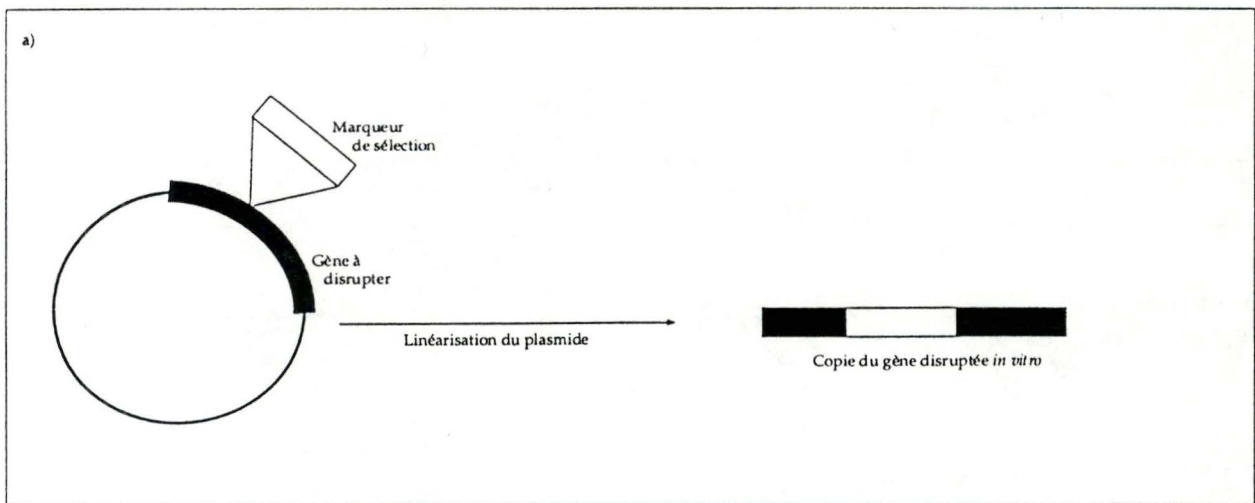


FIGURE 24 : Représentation schématique de la technique de "One-Step Gene Disruption"

a) Etape de disruption *in vitro*, par insertion du marqueur de sélection dans le gène à disrupter.

b) Etape de d'intégration du fragment linéarisé, contenant le gène disrupté *in vitro*, dans le génome de l'organisme cible.

(1) Disruption *in vivo*, par recombinaison homologue locus spécifique

(2) Intégration non disruptive *in vivo*, par recombinaison illégitime ectopique

		F8	F9A
Construction des fragments linéaires			
Intégrants génomiques	Locus spécifique		
	Ectopiques		
Taille des fragments diagnostiques PCR	Locus spécifique	Pas d'amplicon	2 kb
	Ectopiques	600 bp	0.9 et 2 kb

FIGURE 25 : Représentation schématique des fragments F8 et F9A utilisés pour la disruption *in vivo*. La localisation des amorces utilisées pour les amplifications PCR diagnostiques est indiquée pour F8 et F9A

L'appariement des amorces au niveau de l'ADN génomique des colonies transformantes (F8 et F9A) ainsi que les tailles attendues des fragments PCR sont représentés dans le cas d'intégrants disruptants (locus spécifique) et dans le cas d'intégrants non disruptants (ectopiques).

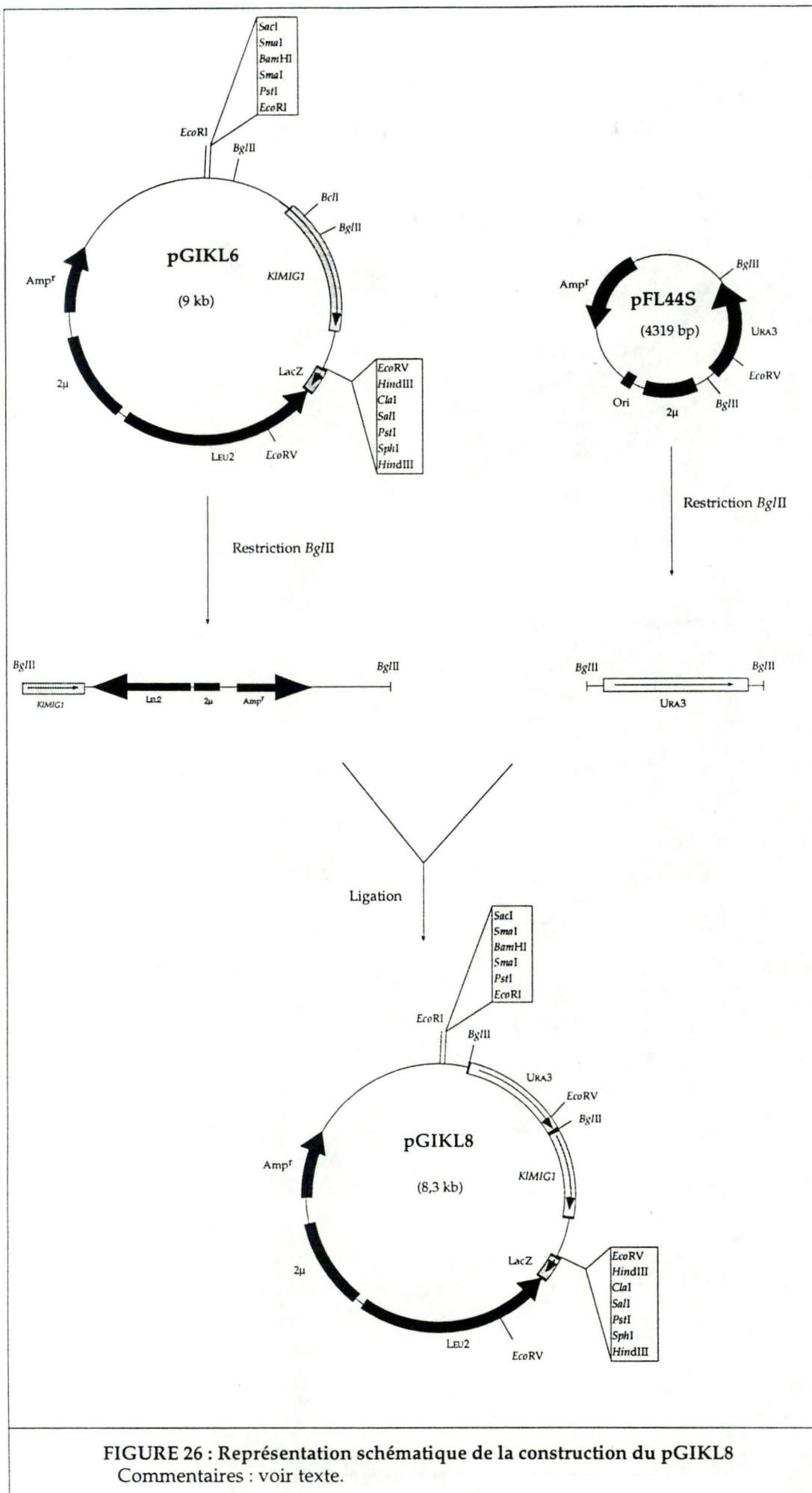


FIGURE 26 : Représentation schématique de la construction du pGIKL8
 Commentaires : voir texte.

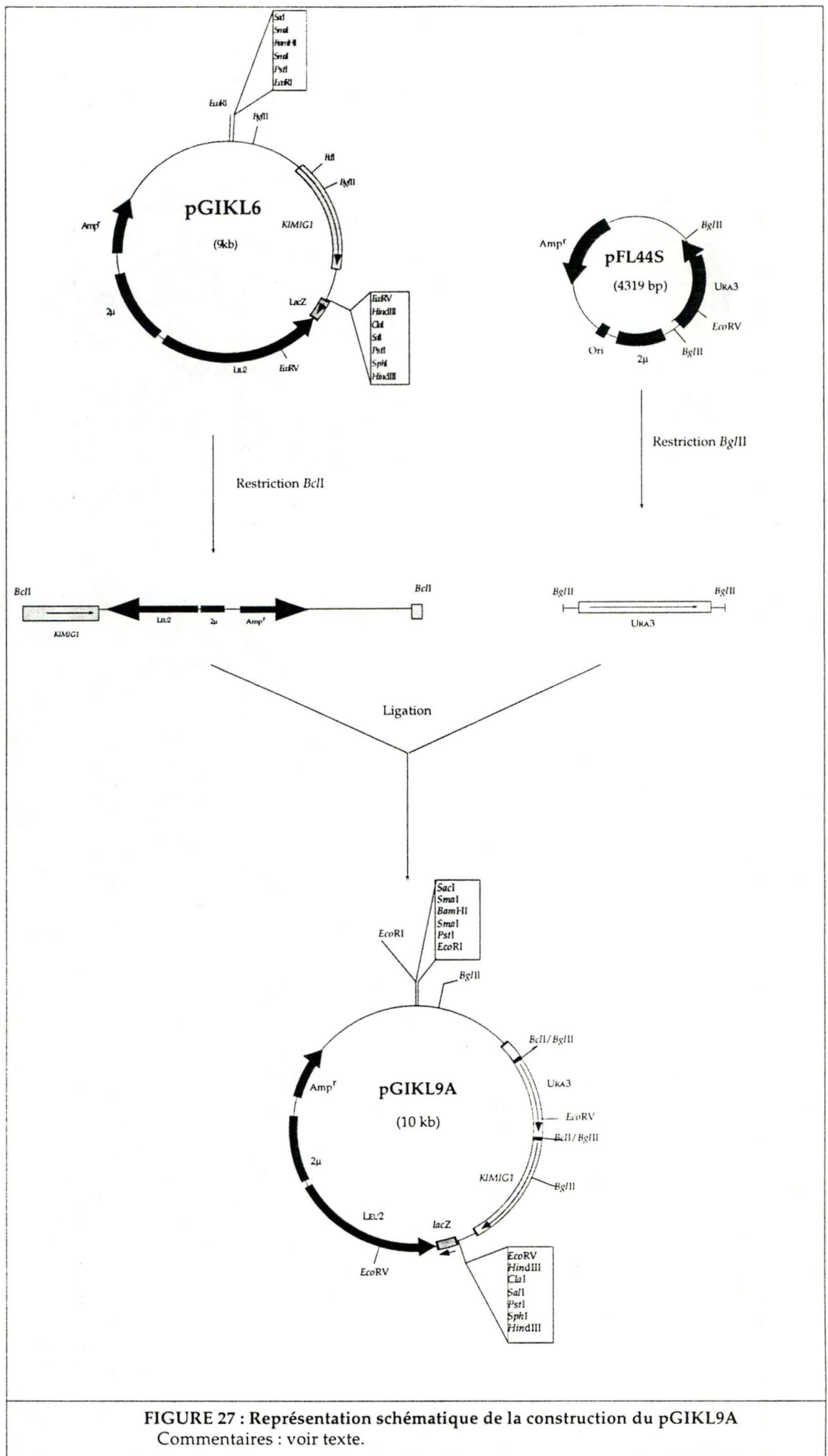


FIGURE 27 : Représentation schématique de la construction du pGIKL9A
 Commentaires : voir texte.

qu'ajouter la copie disruptée du gène quelque part dans le génome, et laisse intact le gène résident.

2.2.2.2. Disruption *in vitro* : les deux constructions

La disruption de *KIMIG1*, aboutissant à l'obtention d'un mutant nul pour ce gène, doit répondre à deux critères :

- Absence d'expression résiduelle, qui est réalisée de façon certaine lorsque le gène est délété.
- Remplacement du gène, par recombinaison homologue, qui est favorisé lorsque la taille des régions homologues bordant le marqueur est grande.

En fonction de ces deux critères, nous avons choisi de réaliser deux constructions pour la disruption *in vitro* : le pGIKL8 et le pGIKL9A. Ces constructions seront linéarisées pour la disruption *in vivo*, et donneront respectivement les fragments F8 et F9A. Le gène *MIG1* est délété pour le F8, mais la taille des régions d'homologie est réduite. La taille des régions homologues bordant le marqueur est plus importante pour le F9A, mais dans ce cas le gène *MIG1* n'est pas délété (Figure 25).

2.2.2.2.1. Construction du pGIKL8

Elle est schématisée à la figure 26. Le marqueur URA3, obtenu par restriction *Bgl*II du pFL44S (Matériel & méthodes), est inséré par ligation dans la matrice déphosphorylée obtenue par restriction *Bgl*II du pGIKL6 (données non montrées). Le produit de la ligation est transformé dans la souche XL1-Blue d'*E.coli*. L'ADN plasmidique des colonies transformantes est soumis à une restriction diagnostique *Eco*RV. Les fragments diagnostiques 1.2, 1.6, et 5.5 kb, attendus pour le pGIKL8, sont obtenus (données non montrées).

Le pGIKL8 est une construction renfermant une disruption de *KIMIG1* avec remplacement d'un fragment de 1.8 kb, bordé par les sites *Bgl*II, par le marqueur URA3 orienté dans le même sens que celui de *KIMIG1*.

2.2.2.2.2. Construction du pGIKL9A

Elle est représentée à la figure 27. Le marqueur URA3, obtenu par restriction *Bgl*II du pFL44S, est inséré par ligation dans la matrice déphosphorylée obtenue par ouverture du pGIKL6 via une restriction *Bcl*I (données non montrées). Le produit de la ligation est transformé dans la souche XL1-Blue d'*E.coli*. L'ADN plasmidique des colonies transformantes est soumis à une restriction diagnostique *Eco*RV. Les fragments diagnostiques

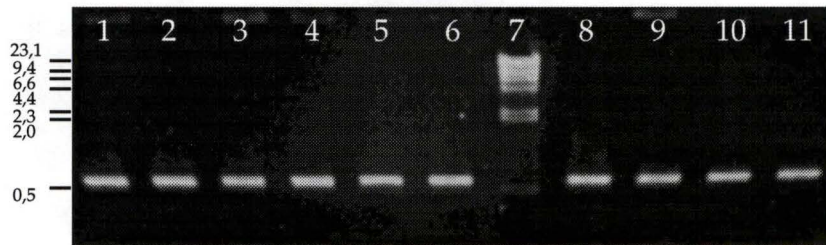


FIGURE 28 : Amplification PCR réalisée sur les transformants F8 avec les amorces pKL1 et pKL3R

Pistes 1-6; 8-11 : ADN amplifié à partir d'intégrants non disruptants

Piste 7 : Marqueur de taille λ restreint par *Hind*III (en kb)

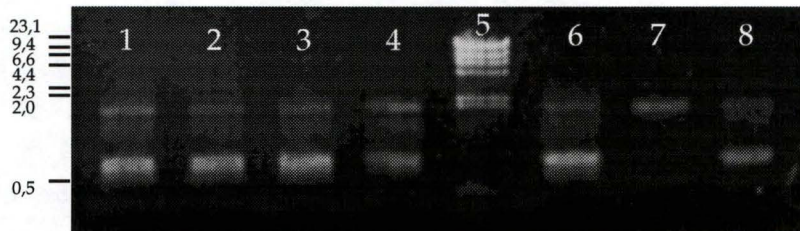


FIGURE 29 : Amplification PCR réalisée sur les transformants F9A avec les amorces pKL0 et pKL3R

Pistes 1-4; 6, 8 : ADN amplifié à partir d'intégrants non disruptants

Piste 7 : ADN amplifié à partir d'un intégrant disruptant

Piste 5 : Marqueur de taille λ restreint par *Hind*III (en kb)

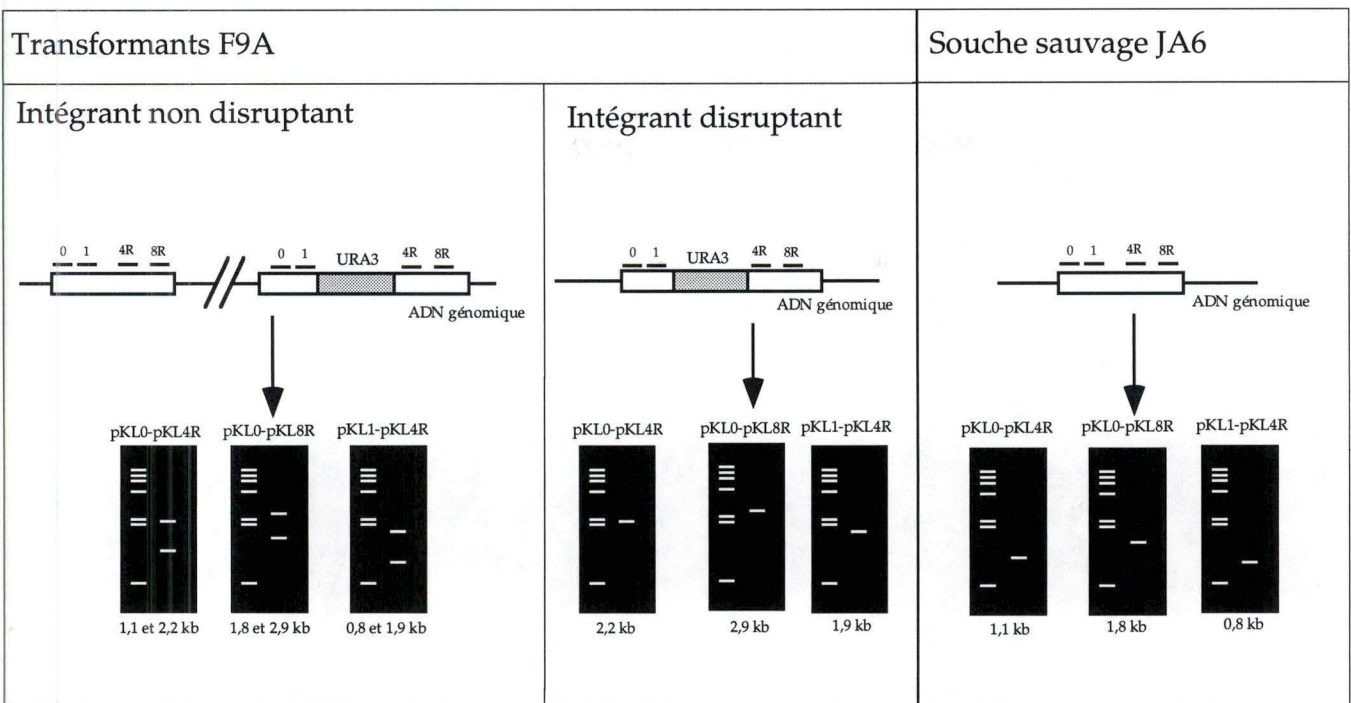


FIGURE 30 : Représentation schématique des fragments amplifiés, par PCR, sur des colonies de JA6, des colonies d'intégrants non disruptants, et des colonies d'intégrants disruptants, avec trois jeux d'amorces différents (pKL0-pKL4R, pKL0-pKL8R, pKL1-pKL4R)

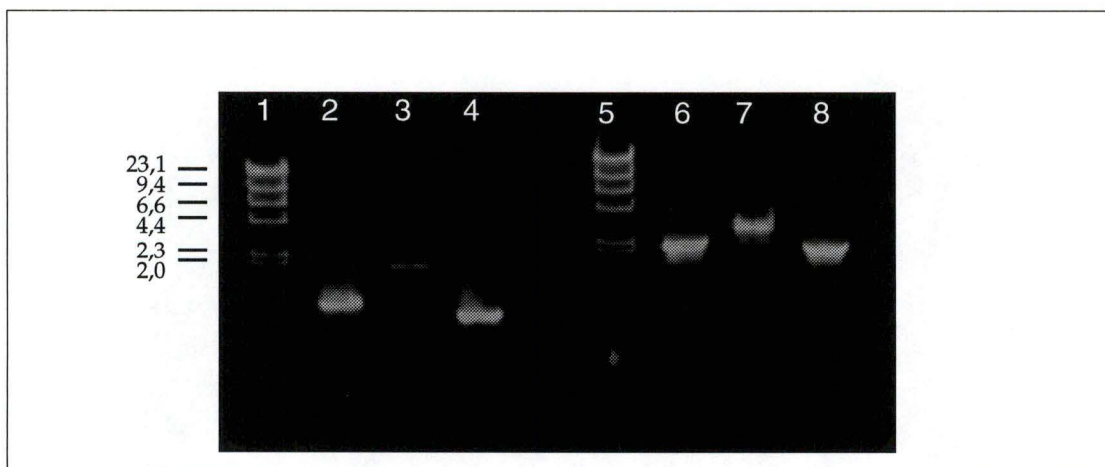


FIGURE 31 : Amplification PCR sur L'ADN génomique de JA6 et IG181, avec trois jeux d'amorces différents

Piste 1 : Marqueur de taille λ restreint par *Hin* dIII

Piste 2 : ADN génomique de JA6 amplifié avec les amorces pKL0 et pKL4R

Piste 3 : ADN génomique de JA6 amplifié avec les amorces pKL0 et pKL8R

Piste 4 : ADN génomique de JA6 amplifié avec les amorces pKL1 et pKL4R

Piste 5 : Marqueur de taille λ restreint par *Hin* dIII

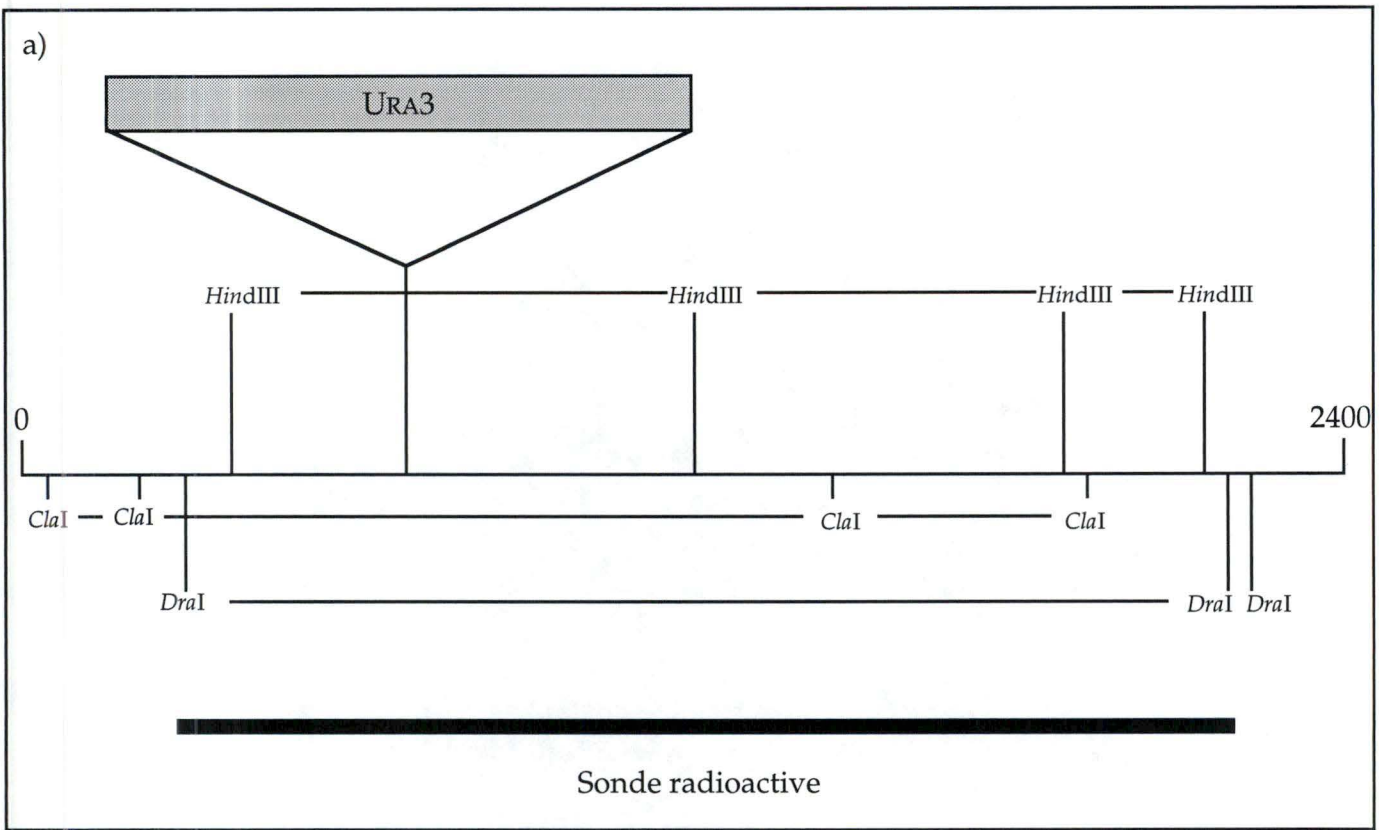
Piste 6 : ADN génomique de IG181 amplifié avec les amorces pKL0 et pKL4R

Piste 7 : ADN génomique de IG181 amplifié avec les amorces pKL0 et pKL8R

Piste 8 : ADN génomique de IG181 amplifié avec les amorces pKL1 et pKL4R

Les tailles du marqueur sont indiquées en kb.

Les tailles attendues des amplicons (Figure 30) sont observées.



b)

Enzymes de restriction	Tailles attendues des fragments allumés (bp)		
	JA6	Intégrant disruptant	Intégrant nondisruptant
<i>ClaI</i>	1548	1548 + autres	2648
<i>DraI</i>	2030	2030 + autres	3130
<i>HindIII</i>	818, 656	818, 656, + autres	1918

FIGURE 32 : Choix des couples sonde-enzyme utilisés pour le Southern Blot

a) Présentation des trois couples sonde-enzyme (*HindIII*, *ClaI*, *DraI*) utilisés pour le Southern. La portion séquencée du pGIKL2.3 (2.4 kb) est représentée, avec insertion du marqueur URA3 (1.1 kb), ainsi que la sonde *DraI* (2 kb). Les sites de restriction présents au niveau de la région séquencée sont mentionnés.

b) Présentation des trois enzymes de restriction utilisés pour le Southern, avec les tailles attendues des fragments qui seront allumés par la sonde *DraI*

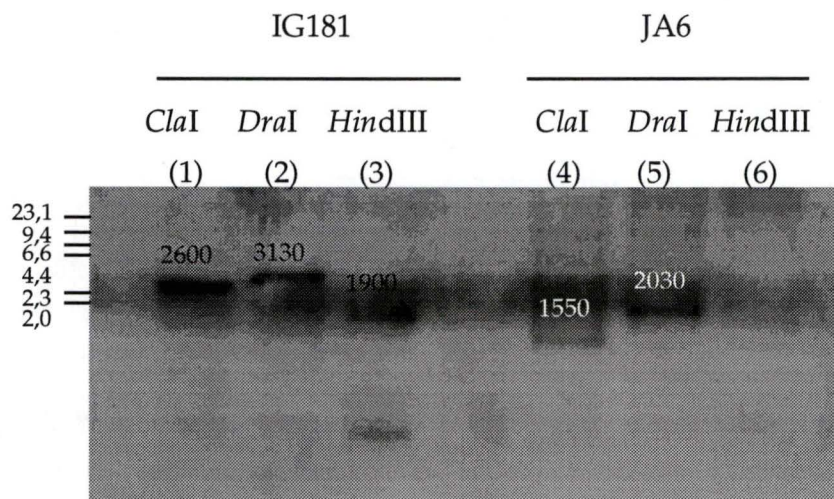


FIGURE 33 : Southern Blot sur l'ADN génomique de JA6 et IG181, restreints par trois enzymes différentes (*Cla*I, *Dra*I, *Hind*III). Les fragments dont la taille était prévue sont identifiés sur la photo par la valeur de leur taille, en bp.

Les tailles du marqueur λ restreint par *Hind*III sont indiquées en kb.

Piste 1 : ADN génomique de IG181 restreint par *Cla*I

Piste 2 : ADN génomique de IG181 restreint par *Dra*I

Piste 3 : ADN génomique de IG181 restreint par *Hind*III

Piste 4 : ADN génomique de JA6 restreint par *Cla*I

Piste 5 : ADN génomique de JA6 restreint par *Dra*I

Piste 6 : ADN génomique de JA6 restreint par *Hind*III

1.1, 2.1, et 6.8 kb, attendus dans le cas du pGIKL9A, sont obtenus (données non montrées).

Le pGIKL9A est une construction renfermant une disruption de *KIMIG1* avec insertion au site *BclI* (en amont de la région codant pour les doigts de Zinc), sans délétion, du marqueur *URA3* orienté dans le même sens que *KIMIG1*.

2.2.2.3. Disruption *in vivo*

Par une double restriction *EcoRI*-*AflIII* du pGIKL8 et du pGIKL9A, deux fragments linéaires, F8 et F9A, sont obtenus (Figure 25) et transformés dans la souche JA6.

Pour chaque transformation, ± 200 intégrations se sont produites. Une amplification PCR diagnostique déterminera si l'intégration s'est faite de façon spécifique ou ectopique.

2.2.2.4. Criblage des transformants par PCR sur colonie

Chaque colonie transformante est striée sur un milieu synthétique solide dépourvu d'uracile. Une colonie isolée est prélevée et resuspendue dans le volume d'eau stérile nécessaire pour la PCR. Les autres composants sont ajoutés et l'amplification PCR est réalisée comme décrit dans le Matériel & méthodes. La figure 25 indique les amorces de PCR utilisées et la taille des fragments diagnostiques dans chaque cas.

Les PCR réalisées sur 100 transformants "F8" amplifient un fragment d'une taille de 600 bp (Figure 28). C'étaient donc des intégrants non disruptants.

Les PCR réalisées sur 196 transformants "F9A" amplifient deux fragments ayant une taille de 0.9 et 2 kb (dans 194 cas sur 196), ou (dans 2 cas sur 196) un fragment ayant une taille de 2 kb. Ces deux derniers sont susceptibles d'être des intégrants disruptants (IG159 et IG181). Ceci a été vérifié pour la souche IG181 par d'autres amplifications PCR diagnostiques au moyen d'amorces différentes (Figures 30 et 31), et par Southern Blot (Figures 32). Les résultats du Southern Blot, présentés à la figure 33, montrent que les tailles des fragments allumés au niveau de JA6 sont celles attendues pour un locus sauvage (les mêmes que lors du Southern Blot réalisé sur les souches CBS2359 et CBS2360) et que les tailles des fragments allumés au niveau de la souche IG181 sont celles prévues pour un intégrant disruptant.

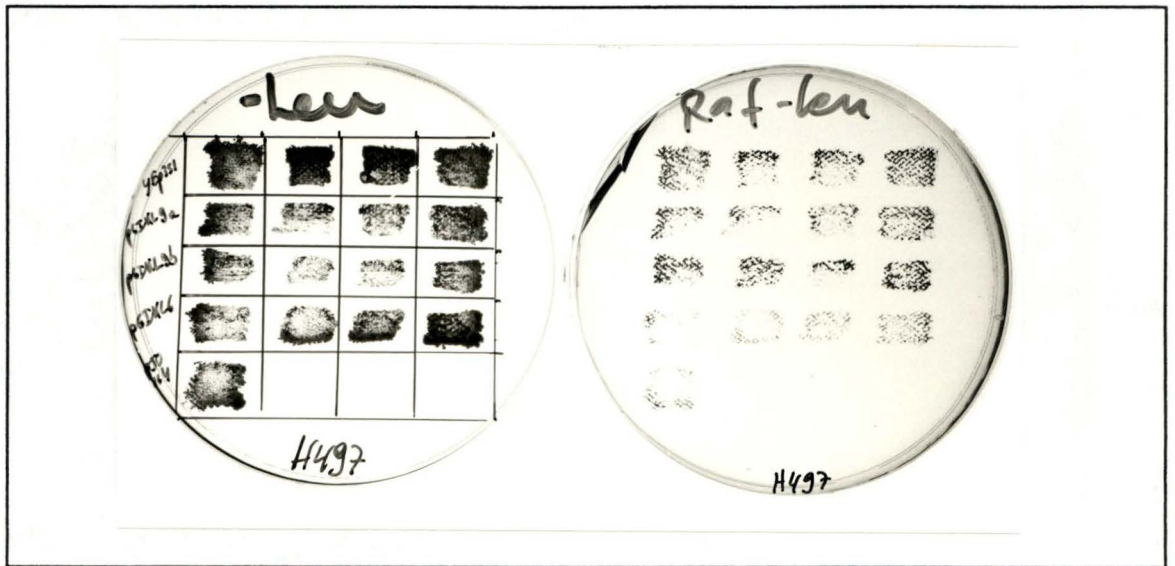


FIGURE 34 : Vérification du caractère nul de l'allèle utilisé pour la disruption

La souche H497 a été transformée avec YEp351, pGIKL9A, pGIKL9B (non discuté), pGIKL6, et pJO114.

Les transformants sont striés sur glucose 2% (- Leu), puis répliqués sur raffinose 3% (Raf - Leu) + 2DG.

2.2.2.5. Conclusions

La copie intacte du gène *KIMIG1* de la souche JA6 a été remplacée par une copie disruptée du gène dans la souche de *Kluyveromyces lactis* IG181.

La disruption a été réalisée par insertion, sans délétion, du marqueur URA3, au niveau du site *BclI* unique présent en amont de la région codant pour les doigts de Zinc.

2.2.3. Vérification du caractère nul de l'allèle (pGIKL9A) ayant servi à la disruption

2.2.3.1. Introduction

Afin de s'assurer que la seule insertion du marqueur URA3 au début de l'ORF suffit à supprimer totalement la synthèse de la protéine Mig1p, nous avons vérifié que le pGIKL9A est incapable de restaurer la répression chez un mutant *mig1* de *Saccharomyces cerevisiae* sur raffinose + 2DG.

2.2.3.2. Résultats

La souche H497 est transformée par les plasmides pGIKL6 et pJO114 (contrôles négatifs, qui contiennent une copie du gène *MIG1* de *Kluyveromyces lactis* et de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivement), par le vecteur YEp351 (contrôle positif, qui ne contient pas de gène *MIG1*), et par le pGIKL9A (test).

Les résultats sont présentés à la figure 34:

Sur un milieu contenant 2% de glucose, la souche test, les contrôles négatifs et le contrôle positif sont tous capables de croître.

Sur un milieu contenant 3% de Raffinose, 200µg/ml de 2DG, et de bromure d'éthidium (20µg/ml), les contrôles négatifs (H497 transformée par pGIKL6 ou pJO114) sont incapables de croître, par le fait que les plasmides apportent à la souche H497 une copie fonctionnelle du gène *MIG1* (*Kl-* et *Sc-MIG1*, respectivement). Le contrôle positif (H497 transformée par YEp351) pousse, puisque le plasmide dans ce cas n'apporte pas de gène *MIG1*.

La souche test (H497 transformée par le pGIKL9A) est quant à elle toujours capable de croître. Ceci suggère que la répression glucose est toujours inexistante dans la souche test et donc que le pGIKL9A n'apporte pas de copie fonctionnelle du gène *MIG1* complétant la mutation *mig1* de H497.

Ces résultats valident l'utilisation du fragment F9A pour disrupter le gène *MIG1* de *Kluyveromyces lactis*.

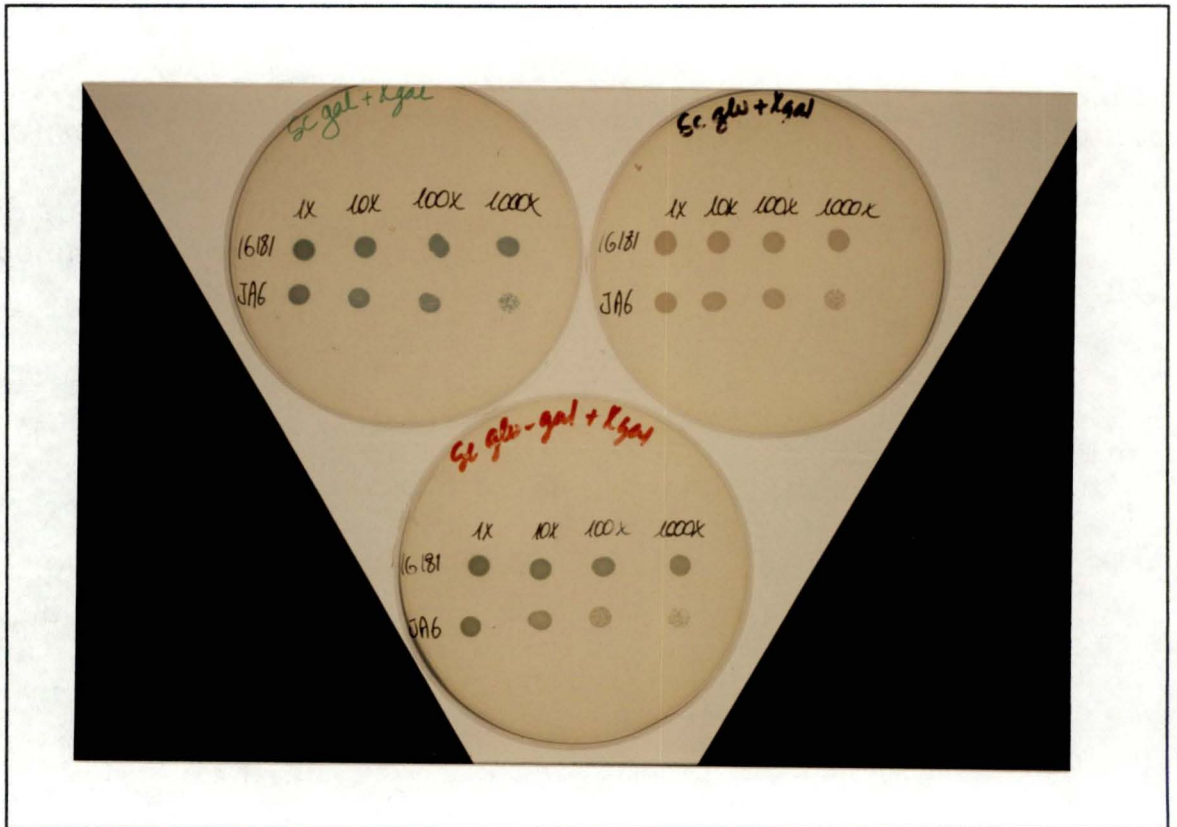


FIGURE 35 : Test Blanc/Bleu réalisé sur milieu solide avec les souches JA6 et IG181

Les différents milieux sont synthétiques, contiennent de l'X-gal, et, comme source de carbone, 2% de galactose (ScGal + X-gal), 2% de glucose (ScGlu + X-gal), ou 2% de glucose et 2% de galactose (ScGlu-Gal + X-gal).

IG181 et JA6 sont déposées en gouttes non diluées (1X), ou diluées 10X, 100X, 1000X.

2.2.4. Caractérisation du phénotype du disruptant

2.2.4.1. Influence de la disruption de *KIMIG1* sur l'activité β -galactosidase

L'expression du rapporteur naturel *LAC4* est utilisée pour mettre en évidence les différences entre la souche JA6 et la souche IG181 au niveau de la répression glucose des gènes *GAL-LAC*.

2.2.4.1.1. Test phénotypique Blanc/Bleu sur milieu solide

Les souches JA6 et IG181 sont resuspendues dans de l'eau, puis déposées en gouttes sur trois milieux différents : glucose 2%, galactose 2%, et glucose 2% + galactose 2%, en présence d'*X-gal* (50 $\mu\text{g/ml}$).

Les résultats sont présentés à la figure 35:

Sur un milieu contenant du glucose, les deux souches apparaissent blanches, parce qu'en absence de galactose ou de lactose, les gènes *GAL-LAC* ne sont pas induits, la β -galactosidase n'est pas produite, et l'*X-gal* n'est pas clivé en X + galactose.

Sur un milieu contenant du galactose, les deux souches apparaissent bleues, parce que les gènes *GAL-LAC* sont induits et non réprimés, la β -galactosidase produite, et l'*X-gal* dégradé en X + galactose.

Sur un milieu contenant du glucose et du galactose, les deux souches apparaissent bleues, peut-être parce que, après 12 heures, le glucose est métabolisé. On notera toutefois une apparition plus rapide de la couleur bleue des gouttes de la souche IG181, ce qui pourrait témoigner de l'effet de la disruption de *MIG1* permettant l'expression de *LAC4*, même en conditions de répression (glucose + galactose).

2.2.4.1.2. Test phénotypique Blanc/Bleu en milieu liquide

3 ml de milieu synthétique liquide contenant de l'*X-gal* à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$, 2% de glucose et 2% de galactose, sont inoculés avec JA6 ou IG181.

Après une nuit sous agitation à 30°C, la culture de JA6 est toujours blanche, tandis que celle d'IG181 est légèrement bleutée (données non montrées), ce qui confirme les résultats observés sur boîte.

2.2.4.1.3. Cinétique de l'induction de l'activité β -galactosidase

La technique de culture pour le dosage de l'activité β -galactosidase est la même que celle décrite au point 2.1.

Les résultats sont présentés à la figure 36.

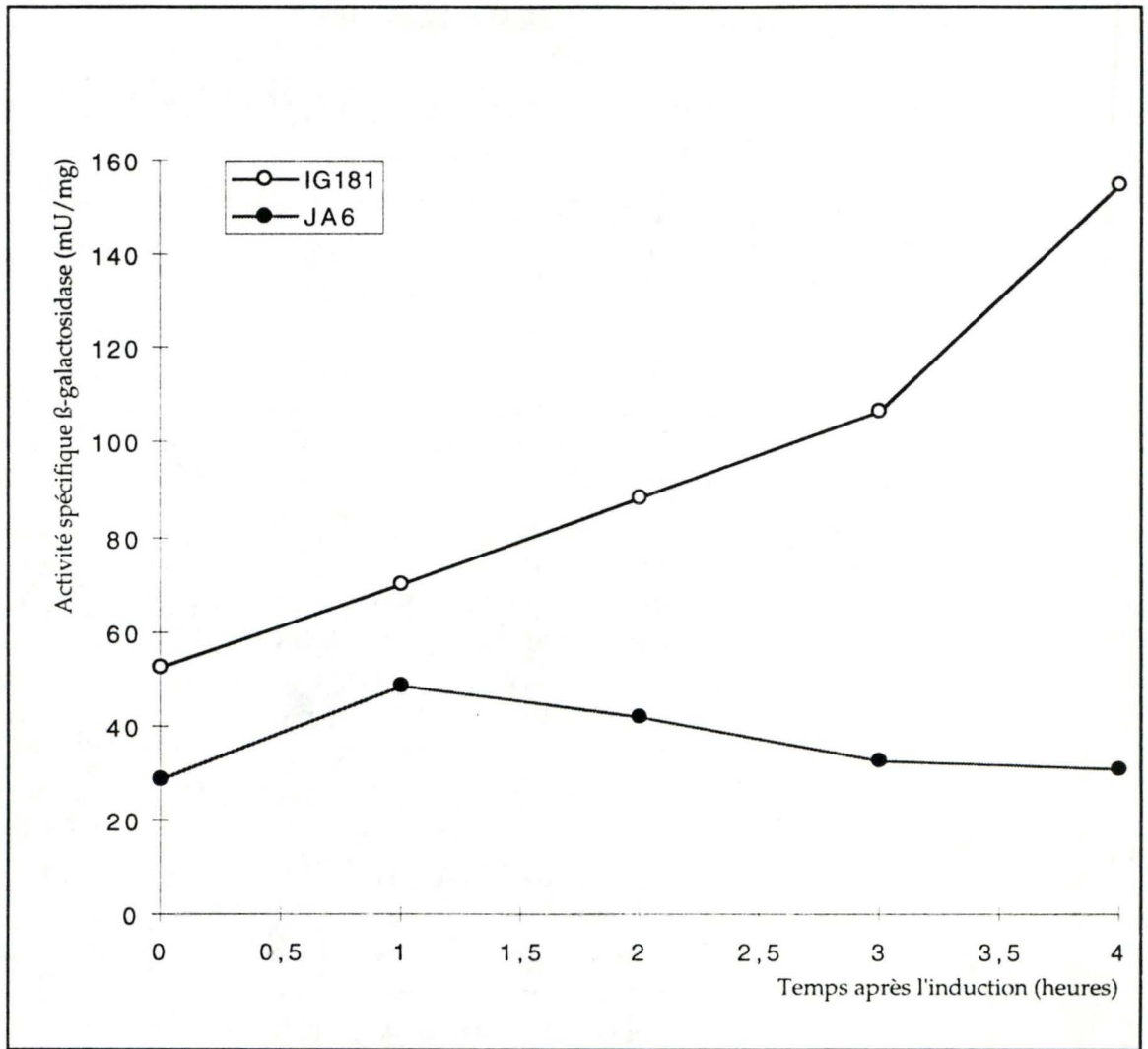


FIGURE 36 : Cinétique de l'induction de la β -galactosidase dans les souches JA6 et IG181.

Les deux souches sont transférées d'un milieu glucose vers un milieu glucose/galactose au temps zéro.

On remarque que l'activité de la β -galactosidase est induite au niveau de la souche IG181 lors du passage en milieu glucose/galactose. Cette induction n'est pas observée au niveau de la souche JA6.

2.2.4.1.4. Conclusions

La disruption du gène *MIG1* résident de *Kluyveromyces lactis* donne lieu à une augmentation de l'activité β -galactosidase en conditions de répression (glucose + galactose). En effet, les trois expériences décrites plus haut montrent que l'activité β -galactosidase est plus élevée, en conditions de répression (glucose + galactose), au niveau de la souche IG181 qu'au niveau de la souche JA6.

Le gène *LAC4* est donc une cible (vraisemblablement indirecte, étant donné l'absence de boîte *MIG* potentielle au niveau de la région intergénique séparant *LAC4* de *LAC12*) de la répression glucose par Mig1p.

2.2.4.2. Influence de la disruption de *KIMIG1* sur l'expression de *GAL1*

2.2.4.2.1. Introduction

Disposant d'un anticorps anti-Gal1p (Antisérums polyclonal de lapin dirigé contre la protéine Gal1p fusionnée à la glutathion-S-transférase), nous allons tester l'effet de la disruption de *MIG1* sur l'expression de cette protéine dans la souche IG181 en conditions de répression. Rappelons à cet égard qu'il existe une boîte *MIG* potentielle au niveau du promoteur de *GAL1*, et que Gal1p est une protéine requise pour l'induction des gènes *GAL-LAC*, de sorte que le glucose pourrait réprimer tous ces gènes en réprimant l'expression de *GAL1*.

2.2.4.2.2. Résultats

La concentration en protéine Gal1p va être estimée, dans les mêmes conditions de culture que lors du dosage de l'activité β -galactosidase, par une détection spécifique avec des anticorps anti-Gal1p.

La figure 37 montre le résultat du Western Blot. On observe qu'il y a plus de Gal1p chez le disruptant (IG181) que chez la souche sauvage (JA6).

L'intensité des bandes a été estimée à partir d'un "scan" du filtre de Nylon, par le système Millipore (logiciel "Bioimage" de Millipore, sur ordinateur SUN Spark Station II), qui délimite la surface de chaque bande et en détermine l'intensité, pixel par pixel. La valeur d'intensité ainsi obtenue est normalisée à celle du standard interne (une bande protéique à la taille de 50 kD

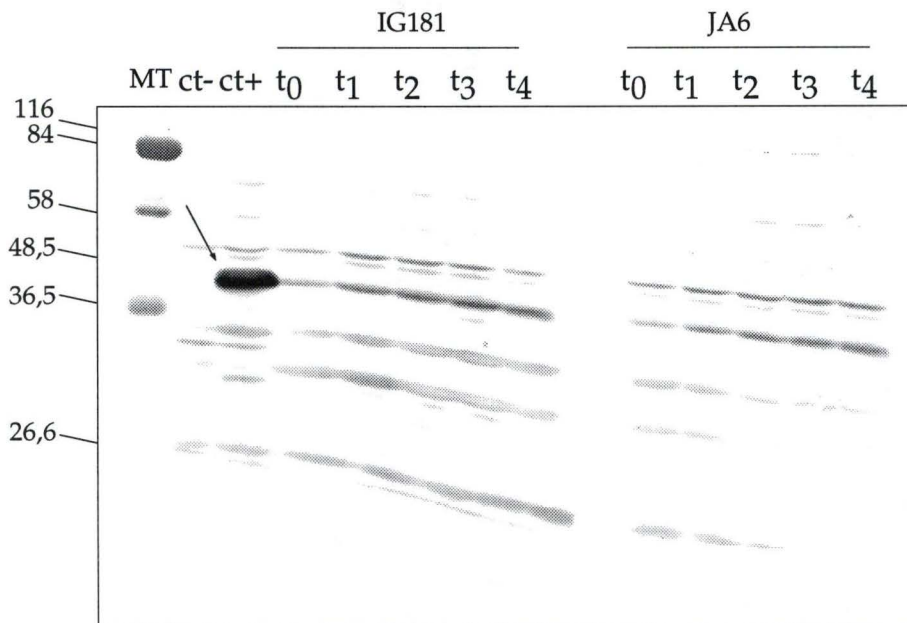


FIGURE 37 : Western Blot sur des extraits protéiques de IG181 et JA6 après induction par le galactose, en conditions de répression.

Piste 1 : Marqueur de taille "Sigma HMW Prestained"

Piste 2 : Contrôle négatif, sans Gal1p

Piste 3 : Contrôle positif, avec une quantité importante de Gal1p

Piste 4 : Extraits protéiques de IG181, au moment de l'induction

Piste 5 : Extraits protéiques de IG181, une heure après l'induction

Piste 6 : Extraits protéiques de IG181, deux heures après l'induction

Piste 7 : Extraits protéiques de IG181, trois heures après l'induction

Piste 8 : Extraits protéiques de IG181, quatre heures après l'induction

Piste 9 : Extraits protéiques de JA6, au moment de l'induction

Piste 10 : Extraits protéiques de JA6, une heure après l'induction

Piste 11 : Extraits protéiques de JA6, deux heures après l'induction

Piste 12 : Extraits protéiques de JA6, trois heures après l'induction

Piste 13 : Extraits protéiques de JA6, quatre heures après l'induction

Gal1p est indiquée par une flèche.

Les tailles du marqueur sont indiquées en kD.

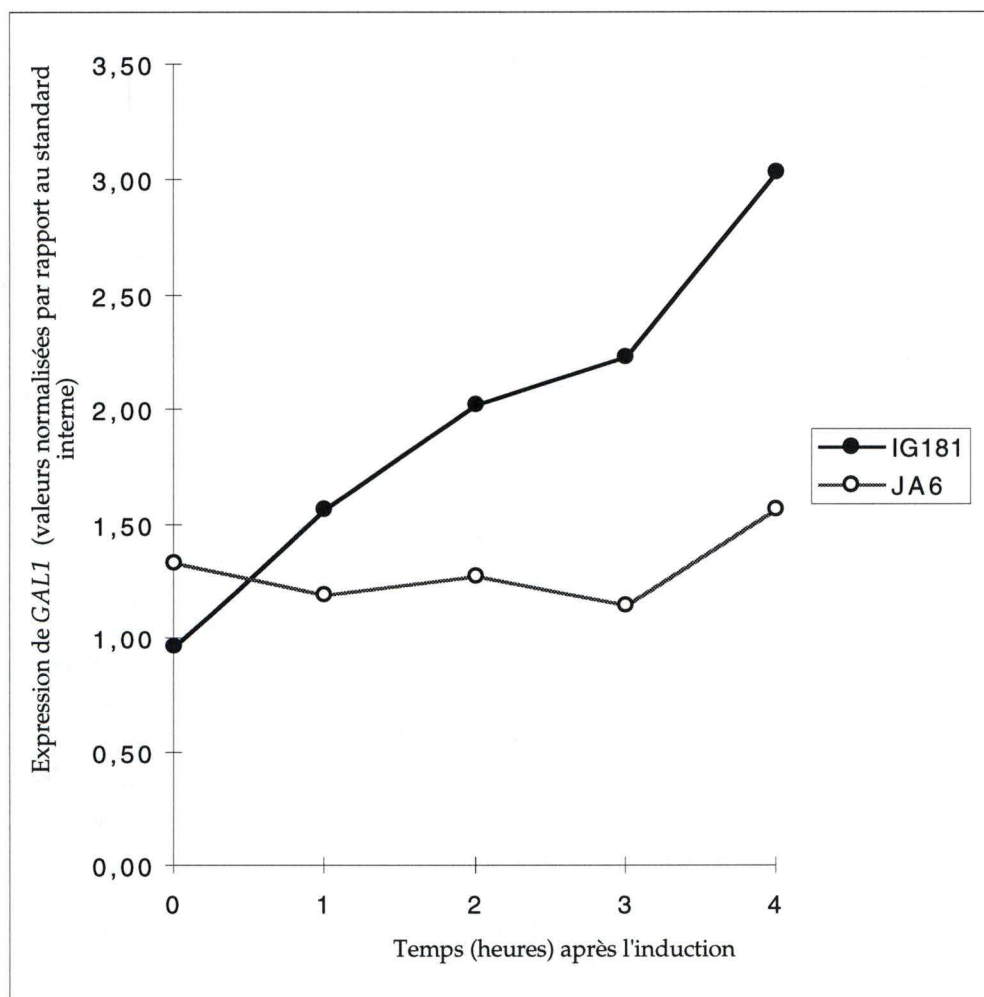


FIGURE 38 : Cinétique de l'induction de l'expression de *GAL1* dans les souches JA6 et IG181.

Ces deux souches sont transférées d'un milieu glucose vers un milieu glucose/galactose au temps zéro.

dont l'expression est indépendante de la source de carbone). La cinétique d'induction de *GAL1* ainsi obtenue est présentée à la figure 38.

2.2.4.2.3. Conclusions

L'expérience de Western Blot a permis de détecter une faible différence entre les deux souches (JA6 et IG181), au niveau de l'expression du gène *GAL1* en conditions de répression (glucose + galactose) : l'expression du gène *GAL1* est induite chez le disruptant (IG181) et pas chez la souche sauvage (JA6).

Ceci suggère que le gène *GAL1* est également une cible de *MIG1*, peut-être directement via un site potentiel de fixation de Mig1p au niveau du promoteur de *GAL1*.

RÉSUMÉ,
CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES

RÉSUMÉ, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Chez la levure, une série de gènes, codant pour des enzymes indispensables en présence de glucose, sont sujets à la répression glucose (Gancedo, 1992; Trumbly, 1992; Ronne, 1995). L'expression des gènes *GAL* de *Saccharomyces cerevisiae*, système modèle pour l'étude de la régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes, est réprimée en présence de glucose, notamment par la protéine Mig1p (Nehlin & al., 1991).

Les gènes *GAL-LAC* chez *Kluyveromyces lactis*, quoique présentant une organisation très similaire à celle des gènes *GAL* chez *Saccharomyces cerevisiae* (Webster & al., 1988b), font montre de certaines différences notables au niveau de leur régulation (Czyz & al., 1993; Meyer & al., 1991; Zachariae & al., 1993a). Par ailleurs, le mécanisme par lequel le glucose exerce la répression des gènes cibles n'est pas encore défini (Zachariae & al., 1993b; Kuzhandaivelu & al., 1992). Une protéine homologue de ScMig1p pourrait être impliquée, étant donné qu'il existe un site potentiel de fixation de Mig1p au niveau du promoteur de *GAL1*, dont l'expression est requise pour l'induction des gènes *GAL-LAC* (Meyer & al., 1991) (Figure 14, Introduction).

C'est dans le cadre de cette problématique que le clonage du gène *KIMIG1* a été entrepris par criblage d'une banque génomique sauvage de *Kluyveromyces lactis* avec une sonde nucléotidique dérivée de la séquence de *KmMIG1* codant pour les doigts de Zinc (Cassart & al., 1995).

Une fois le gène cloné, séquencé, et authentifié par Southern Blot, nous avons procédé à des alignements de séquences simples, dans le but de lui donner une identité structurale. La séquence protéique déduite de la séquence nucléique du gène a été comparée avec la séquence des protéines de la famille *MIG* (ScMig1p, KmMig1p, AsnCreAp). Ces alignements de séquences ont montré une homologie générale relativement faible, mais avec la région des doigts de Zinc hautement conservée, désignant le gène cloné homologue structural de *ScMIG1*.

Un alignement multiple entre les protéines Mig1p connues chez trois levures (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*) a mis en évidence quatre régions conservées. La fonction de deux d'entre elles est connue par des travaux expérimentaux sur ScMig1p : la région des doigts de Zinc correspond au domaine de liaison de l'ADN (Nehlin & al., 1990), la région carboxy-terminale est le domaine effecteur requis pour la répression de la transcription et serait

nécessaire au recrutement du complexe co-répresseur Cyc8p-Tup1p (Östling & al., 1995). Les deux autres régions sont riches en résidus sérine et thréonine, sites potentiels de phosphorylation, mais leur fonction est à ce jour indéterminée.

Différents tests de complémentation hétérologue ont été accomplis chez *Saccharomyces cerevisiae* dans deux systèmes cibles de la répression par ScMig1p : les gènes *GAL*, et le gène *SUC2*. Dans toutes les situations hétérologues testées, KIMig1p a été capable de se substituer fonctionnellement à ScMig1p pour réprimer les cibles de ScMig1p chez *Saccharomyces cerevisiae*. Notons toutefois que la répression de *SUC2*, quantifiée par un système rapporteur, n'est pas assurée par KIMig1p avec la même force que par ScMig1p, cette différence pouvant être attribuée aux différences structurales existant entre *KIMIG1* et *ScMIG1*.

L'étude du rôle de *KIMIG1* au niveau de la répression glucose chez *Kluyveromyces lactis* s'est focalisée sur son impact au niveau du système *GAL-LAC* utilisant d'une part la surexpression et d'autre part la disruption du gène.

La surexpression de *KIMIG1* dans la souche JA6/912 de *Kluyveromyces lactis*, non sujette à la répression glucose, n'a pas permis de restaurer celle-ci. Plusieurs explications peuvent être proposées : *KIMIG1* pourrait ne pas être exprimé à partir du vecteur. Alternativement, si cette expression a lieu, on peut imaginer que KIMig1p ne joue pas de rôle dans le système *GAL-LAC* de *Kluyveromyces lactis*, ou encore que KIMig1p joue bien un rôle répresseur chez *Kluyveromyces lactis* mais qui ne concerne pas la cible affectée dans la souche JA6/912.

La disruption de *KIMIG1* chez la souche JA6 de *Kluyveromyces lactis* a été réalisée par insertion du marqueur *URA3* dans l'ORF, en amont de la région codant pour les doigts de Zinc. Nous avons observé que l'effet de la répression glucose sur l'activité β -galactosidase et sur l'expression de *GAL1* était moindre chez la souche disruptante (IG181) que chez la souche sauvage (JA6). Ceci suggère que la répression glucose des gènes *GAL-LAC* chez *Kluyveromyces lactis* est, au moins en partie, médiée par KIMig1p.

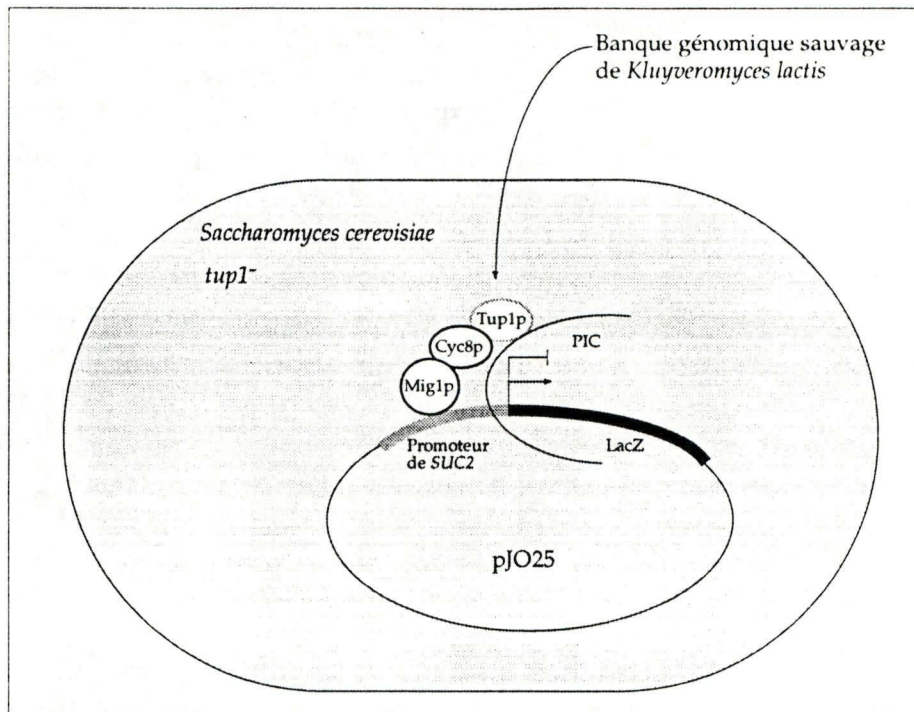


FIGURE 1 : Stratégie à envisager pour le clonage de *KITUP1* par complémentation hétérologue chez *Saccharomyces cerevisiae*, et applicable au clonage de *KICYC8*.

Une souche *tup1⁻* de *Saccharomyces cerevisiae* sera utilisée. Elle sera transformée par un premier plasmide, le rapporteur pJO25. Cette souche sera ensuite transformée par une banque de *Kluyveromyces lactis* réalisée dans un vecteur de *Saccharomyces cerevisiae*.

Les doubles transformants seront étalés sur glucose + X-gal. La répression glucose ne sera rétablie que si le clone apporte le gène *KITUP1* entier. Dans ce cas seulement, les colonies seront blanches, la répression glucose de LacZ étant rétablie grâce à l'apport de *KITUP1*.

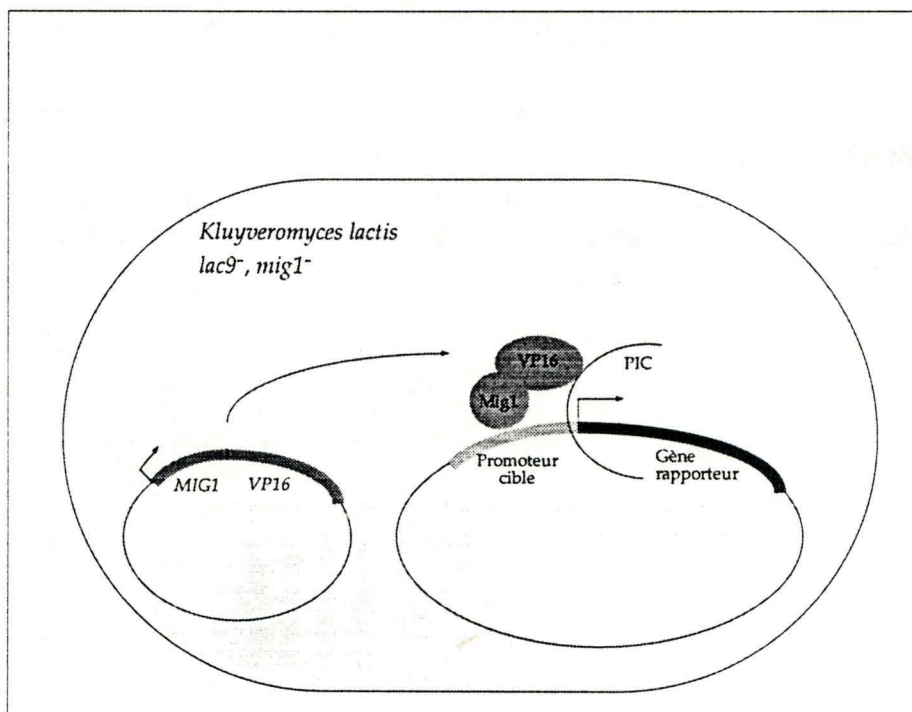


FIGURE 2 : Identification des cibles directes de la répression par KIMig1p au niveau du système GAL-LAC chez *Kluyveromyces lactis*.

Commentaires : voir texte.

Au terme de ce travail, un éventail de possibilités s'offre à nous. Nous devons tenter de déterminer par quel mécanisme KIMig1p réprime la transcription de ses gènes cibles, quels sont ses cibles directes, au niveau du système GAL-LAC et au niveau des systèmes formés par les gènes de la respiration et de la gluconéogenèse chez *Kluyveromyces lactis*.

Comment KIMig1p réprime-t-il la transcription de ses gènes cibles chez *Kluyveromyces lactis* ?

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, ScMig1p réprimerait la transcription de ses gènes cibles en recrutant le complexe co-répresseur Cyc8p-Tup1p (Treitel & al., 1995). La répression des cibles de ScMig1p par KIMig1p chez *Saccharomyces cerevisiae* (expériences de complémentation hétérologue, voir 1.2., Résultats) suggère que KIMig1p est également capable de recruter le complexe co-répresseur Cyc8p-Tup1p pour réprimer la transcription. Mais la répression par KIMig1p chez *Kluyveromyces lactis* s'effectue-t-elle de cette manière ?

Pour tenter de répondre à cette question, le clonage de *KICYC8* et *KITUP1* est à envisager, ainsi que l'étude de l'incidence de leur disruption respective sur la répression glucose par KIMig1p chez *Kluyveromyces lactis*. La figure 1 présente une stratégie possible pour le clonage des gènes *CYC8* et *TUP1* de *Kluyveromyces lactis*.

Quelles sont les cibles directes de KIMig1p au niveau du système GAL-LAC chez *Kluyveromyces lactis* ?

L'étude de l'impact de la disruption de *KIMIG1* chez *Kluyveromyces lactis* suggère que KIMig1p est un médiateur de la répression glucose des gènes GAL-LAC chez *Kluyveromyces lactis*.

Cependant, l'identification des cibles directes de KIMig1p reste à accomplir. Elle pourra être réalisée à l'aide d'un système rapporteur (Figure 2) où le promoteur du gène suspecté cible directe de la répression par KIMig1p est inséré en amont d'un gène rapporteur au niveau d'une construction plasmidique transformée dans une souche de *Kluyveromyces lactis lac9⁻*, où l'activation de la transcription du gène rapporteur sera indépendante d'une induction par le lactose ou le galactose, et *mig1⁻*, où la répression KIMig1p-dépendante du rapporteur sera inexistante.

Une activité de répression étant moins facile à déterminer qu'une activation, nous avons décidé de "convertir" KIMig1p en activateur, en remplaçant le domaine carboxy-terminal répresseur de KIMig1p par le domaine activateur de la transcription de VP16 (protéine du virus *Herpes simplex*; Östling & al., 1995), par fusion traductionnelle réalisée au niveau d'une seconde construction plasmidique, cotransformée avec la première construction dans la souche de *K.lactis lac9⁻ mig1⁻*.

Sur milieu non répresseur (galactose, par exemple), la protéine de fusion KIMig1-VP16p étant inactivée, le gène rapporteur ne sera pas exprimé.

Sur milieu répresseur (glucose), KIMig1-VP16p sera active. Le gène rapporteur ne sera exprimé que si le promoteur dont il est dépendant est le promoteur d'un gène étant la cible directe d'une répression par KIMig1p.

Les promoteurs testés seront ceux de *GAL1* (car il contient un site potentiel de fixation de KIMig1p), de *LAC9* (parce que *GAL4*, son homologue de *Saccharomyces cerevisiae*, est une cible directe de la répression par ScMig1p), de *LAC4* (parce que l'activité β -galactosidase est une cible -directe ou indirecte- de la répression par KIMig1p).

Quelles sont les cibles de KIMig1p au niveau des gènes de la respiration et de la gluconéogenèse chez *Kluyveromyces lactis* ?

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'expression des gènes de la respiration et de la gluconéogenèse est réprimée en présence de glucose. Leur transcription est sous la dépendance d'une protéine activatrice, Hap4p pour les gènes respiratoires (Ronne, 1995), Cat8p pour les gènes de la gluconéogenèse (Hedges & al., 1995). L'expression de ces activateurs transcriptionnels est réprimée par ScMig1p, de sorte que la répression des gènes de respiration et de gluconéogenèse par Mig1p s'effectue au sommet de la cascade transcriptionnelle, comme pour la répression des gènes *GAL* (Nehlin & al., 1991).

Chez *Kluyveromyces lactis*, l'expression des gènes de la respiration ne serait pas réprimée par le glucose comme chez *Saccharomyces cerevisiae* (Mulder, 1994). En ce qui concerne la gluconéogenèse, l'expression du gène *KIFBP1* est réprimée par le glucose (Zaror & al., 1993) mais, comme pour les gènes *GAL-LAC*, la répression est moins intense que chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'homologue structural de *HAP4* a été récemment cloné chez *Kluyveromyces lactis* (Bolotin, communication personnelle), celui de *CAT8* ne l'est pas encore. L'élucidation du mécanisme de la répression par le glucose de ces gènes pourra se faire par l'identification des cibles de KIMig1p au sein de ces systèmes, et par la compréhension du mécanisme par lequel KIMig1p y exerce son effet répresseur.

MATÉRIEL
&
MÉTHODES

1. SOLUTIONS ET TAMPONS

1.1. SOLUTIONS

Acrylamide pour gel de séquençage

		Pour 500 ml H ₂ O
Acrylamide	38%	190 g
Bisacrylamide	2%	10 g

Filtrer sur filtre plissé et conserver cette solution stock d'acrylamide 40% à 4°C.

Agarose

0,8%, 1% ou 2% dans du TBE 1X.

Alourdisseur / Colorant pour gels d'Agarose

		Pour 10 ml
Bleu de Bromophénol	0,25%	25 mg
EDTA	25 mM	0,5 ml d'EDTA 0,5 M
Glycérol	50%	5 ml
H ₂ O		4,5 ml

Antibiotiques

Ils sont tous à aliquoter et à stocker à -20°C.

Ampicilline 10% : 100 mg par ml d'eau bidistillée. Stériliser par filtration sur un filtre Millipore 0,22 µm. Lors de son utilisation, cette solution 10% est à diluer 1000X (400 µl d'ampicilline 10% pour 400 ml de milieu LB).

Antimycine 0,1% : la solution stock 0,1% est réalisée par dissolution d'1 mg d'antimycine dans 1 ml d'eau bidistillée. Lors de son utilisation, l'antibiotique doit être à une concentration finale de 0,04% (40 µl de solution stock par 100 ml de milieu).

Tétracycline : la solution stock est à une concentration de 12,5 mg/ml, dans 50% d'eau distillée et dans 50% d'éthanol absolu. Pas de stérilisation, à diluer 1000X (Concentration finale de 0,00125%)

β-Mercaptoéthanol

La solution commerciale est à une concentration de 14,3 M, donc à diluer 1000X pour l'utiliser.

Réactif de Bradford

Bleu de Coomassie G-250	100 mg
Ethanol 95%	50 ml
Acide Phosphorique 85%	100 ml
H ₂ O	ajuster à 1L

Filtrer sur Whatman N°1 et conserver à 4°C. A chaque nouveau stock de réactif, établir une nouvelle courbe d'étalonnage.

Bromure d'éthidium

2 mg par ml d'eau bidistillée.

Solution de coloration pour Western Blot

DigP3	50 ml
B-CIP	7 mg
NBT	50 mg
DMF	500 µl

Denhart's 50X

Ficoll 400	1%
Polyvinylpyrrolidone	1%
BSA (Bovine Serum Albumine)	1%

DigP3

TrisHCl pH9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM

dNTP 10 mM

Le stock fourni par Pharmacia se compose des 4 nucléotides séparés, à une concentration de 100 mM chacun. La solution utilisée lors de la PCR contient ces 4 nucléotides, à une concentration de 10 mM chacun.

dATP	50 μ l
dCTP	50 μ l
dGTP	50 μ l
dTTP	50 μ l
H ₂ O	295 μ l
Tris 1 M pH 7	5 μ l

Fixateur pour gel de séquençage

Acide Acétique	10%
Méthanol	10%

Isopropyl, β -D thiogalactopyranoside (IPTG)

Solution stock à une concentration de 100 mM (2,38 g dans 10 ml H₂O) dans de l'eau bidistillée, stérilisée par filtration sur un filtre Millipore 0,22 μ m, aliquotée et stockée à -20°C.

Marqueurs de poids moléculaire

- Deux types de marqueurs de taille seront utilisés lors de gels d'agarose :

λ restreint par *HindIII* : la solution fournie par BRL n'est pas prête à l'emploi : à 100 μ l de cette solution, on ajoutera 100 μ l de tampon 10X et 700 μ l d'eau. Après la dénaturation (10 minutes à 65°C), on ajoutera 100 μ l d'alourdisseur-colorant pour gels d'agarose. Pour un gel, 10 μ l de cette solution finale seront utilisés (Aliquots de 10 μ l).

Taille (kb)	Quantité (ng)
23,130	300
9,416	122
6,557	85
4,361	56,5
2,332	30
2,027	26,5
0,564	7,5
0,127	2

Composition du tampon 10X :

TrisHCl	200 mM	5 ml de 1 M
NaCl	200 mM	1 ml de 5 M
EDTA	1 mM	100 μ l de 250 mM
H ₂ O		19 ml

Marqueur de faible poids moléculaire : La solution fournie par BRL est prête à l'emploi. Il suffit d'ajouter 1 μ l de colorant pour ADN par 4 μ l de la solution reçue. On en utilise 5 μ l par gel d'agarose.

Taille (bp)	Quantité (ng)
2000	200
1200	120
800	80
400	40
200	20
100	10

- Un type de marqueur de poids moléculaire sera utilisé pour les gels protéiques : Sigma HMW, prestained :

Protéine	PM des sous-unités (kD)
Triose Phosphate Isomérase	26600
Lactic dehydrogenase	36500
Fumarase	48500
Pyruvate kinase	58000
Fructose-6-Phosphate Kinase	84000
β -galactosidase	116000
α 2-macroglobuline	180000

Solution d'ONPG

4 mg par ml de tampon β -gal

PBS 10X

Tampon phosphate pH 2	100 mM
NaCl	1,5 M

PBST 1X

PBS	1X
Tween20	0,3%

PBSTB 1X

PBS	1X
Tween20	0,3%
BSA	3%
Azide de Sodium	0,02%

Persulfate d'Ammonium (PAS)

10% dans de l'eau bidistillée, pour les gels de séquençage, et pour les gels protéiques. Stocker à 4°C.

Phénol - Chloroforme

Phénol	50 ml
Hydroxyquinoline	0,05 g
Alcool isoamylique	2 ml
Chloroforme	50 ml

Chauffer le Phénol à 50°C : il devient liquide. Ajouter l'hydroxyquinoline, laver trois fois avec un volume de TE (pH 7,5), et garder le dernier volume de TE. Ajouter enfin l'alcool isoamylique et le chloroforme.

Protéinase K

Solution à une concentration de 2 mg/ml d'eau bidistillée.

RNAase A

Solution stock à une concentration de 10 mg par ml d'eau bidistillée. Chauffer pendant 20 minutes à 100°C, aliquoter et stocker à -20°C.

Running Gel (7,5%)

Acrylamide 30% Bisacrylamide 0,8%	15 ml
Tampon de Running	15 ml
H ₂ O	30 ml
PAS 10%	250 µl
Temed	35 µl

Solution SB 2X

TrisHCl	pH 6,8	125 mM
SDS		4%
β-Mercaptoéthanol		10%
Glycérol		20%
Bleu de Bromophénol		0.004%

SDS 10%

10 g de SDS pour 100 ml H₂O.

SOC

		Pour un litre
Bactotryptone	2%	20 g
BactoYeastExtract	0.5%	5 g
NaCl	10 mM	2 ml de NaCl 5 M
KCl	2,5 mM	2,5 ml de KCl 1 M
MgCl ₂	10 mM	10 ml de MgCl ₂ 1 M
MgSO ₄	10 mM	10 ml de MgSO ₄ 1 M
Glucose	20 mM	3,96 g

Le MgSO₄ est à ajouter après autoclavage.

SSC 20X

		Pour un litre
NaCl	3 M	175,32 g
Citrate de Na	0,3 M	88,23 g

Stacking Gel

Acrylamide 30% Bisacrylamide 0,8%	6 ml
Tampon de Stacking	15 ml
H ₂ O	39 ml
PAS 10%	250 µl
Temed	35 µl

5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β-D galactopyranoside (X-Gal)

Solution à 2%, dans du N-N diméthylformamide (0,2 g dans 10 ml de diméthylformamide). Aliquoter et stocker à -20°C.

1.2. TAMPONS**HighSalt Buffer**

TrisHCl pH 7,5	20 mM
EDTA	1 mM
NaCl	1,5 mM

Tampon β -gal

Glycerol	5%
TrisHCl pH 7	5 mM
KCl	10 mM

Tampon de dénaturation pour Southern Blot

		Pour un litre
NaOH	0,5 M	20 g
NaCl	1,5 M	87,66 g

Tampon de migration pour électrophorèse protéique

		Pour un litre
Tris		3 g
Glycine		14,4 g
SDS		0,1%

Tampon N2

KCl	900 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N3

KCl	1150 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N5

KCl	1000 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	8,5

Tampon de ligation 5X

TrisHCl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (dithiothreitol)	10 mM
ATP	1 mM

Tampon de lyse

EDTA pH 8,5	50 mM
SDS	0,2%

Tampon de neutralisation pour Southern Blot

		Pour un litre
TrisHCl	1 M	121,14 g
NaCl	1,5 M	87,66 g

Mettre à pH 7,5.

Tampon phosphate 0,5 M pH 2

Na ₂ HPO ₄	0,5 M
NaH ₂ PO ₄	0,5 M

Mettre à pH 7,2

Tampon de préhybridation pour Southern Blot

Denhart's 50X	10 ml
SSC 20X	25 ml
SDS 10%	5 ml
Thymus DNA 10X	10 ml
H ₂ O	50 ml

Tampon P1

TrisHCl pH 8	50 mM
EDTA pH 8	10 mM

Autoclaver puis ajouter de la RNAase pour avoir une concentration finale de 400 mg/ml.

Tampon P2

		Pour 100 ml
NaOH	200 mM	800 mg
SDS	1%	1 g

Ne pas autoclaver.

Tampon P3

C'est une solution d'Acétate de Potassium à une concentration de 2,55 M, et ayant un pH de 4,8. Le pH est à ajuster avec une solution d'acide acétique 37%. Ne pas autoclaver.

Tampons de restriction**Tampons Biolabs**

Composition (mM)	Les différents tampons			
	1	2	3	4
Bis Tris Propane HCl	10	-	-	-
MgCl ₂	10	10	10	-
DTT	1	1	1	1
TrisHCl	-	10	50	-
NaCl	-	10	100	-
Tris acétate	-	-	-	20
Mg atétate	-	-	-	10
K acétate	-	-	-	50
pH à 25°C	7	7,9	7,9	7,9

Tampons Boehringer

Composition (mM)	Les différents tampons				
	A	B	L	M	H
Tris acétate	33	-	-	-	-
TrisHCl	-	10	10	10	50
Mg acétate	10	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10
K acétate	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
DTE	-	-	1	1	1
DTT	0,5	-	-	-	-
β-mercaptoéthanol	-	1	-	-	-
pH à 37°C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

Tampons BRL

Composition (mM)	Les différents tampons										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TrisHCl	50	50	50	20	10	50	50	20	50	100	10
MgCl ₂	10	10	10	5	8	6	10	10	5	10	12
NaCl	-	50	100	-	-	50	50	-	-	150	-
KCl	-	-	-	50	-	50	50	-	-	-	100
pH	8	8	8	7,4	8,2	7,4	8	7,4	8,5	7,6	9

Tampon de running

TrisHCl pH 8,8	0,5 M
SDS	0,4%

Tampon SCE

		Pour 250 ml
Sorbitol	1,2 M	54,6 g
Citrate de Na	0,1 M	7,4 g
EDTA	60 mM	5,58 g

Tampon de stacking

TrisHCl pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4%

Tampon TBE

	Pour 1 L de TBE 10X	Pour 10 L de TBE 1X
TrisHCl	108 g	108 g
Acide borique	55 g	55 g
EDTA	9,3 g	9,3 g

Porter à un ou à dix litres avec de l'eau bidistillée. La solution est déjà à pH 8.

Tampon TE

à pH 8 :

TrisHCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

à pH 7,5 :

TrisHCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 7,5	1 mM

Porter au volume désiré avec de l'eau bidistillée.

Tampon de transfert pour Western Blot

	Pour 1 litre
Tris	3 g
Glycine	14,4 g
Méthanol	20%

2. SOUCHES ET PLASMIDES

2.1. SOUCHES

2.1.1. Souches bactériennes

2.1.1.1. Souche XL1-Blue d'*E.coli* (Bullock & al., 1987)

CARACTÉRISTIQUES GÉNOMIQUES :

- recA1 : code pour une ATPase DNA-dépendante essentielle à la recombinaison chez *E.coli*. Les souches mutantes à ce locus présentent un taux de recombinaison mille fois inférieur à celui des souches non mutantes, ce qui permet de minimiser les recombinaisons entre l'ADN endogène et l'ADN exogène, mais également de propager les plasmides à l'état monomérique.
- thi : mutation au niveau du gène codant pour la vitamine B1. La présence de thiamine au niveau du milieu de culture est donc indispensable pour la croissance de cette souche.
- endA1 : mutation qui entraîne une diminution du taux d'endonucléase, ce qui améliore la quantité et la qualité de l'ADN plasmidique.
- D(lac-proAB) : délétion de l'opéron lactose, mais également des gènes voisins nécessaires à la biosynthèse de la proline.
- traD36 : mutation ayant pour conséquence la suppression du transfert du facteur F lors de la conjugaison bactérienne.

CARACTÉRISTIQUES PORTÉES PAR L'ÉPISOME F' :

- L'épisome F' est un plasmide naturel de 93 kb ; il est présent 1 ou 2 fois par cellule et code pour les protéines responsables de la formation des pili sexuels nécessaires au phénomène parasexuel de conjugaison. De plus, il est indispensable à la sélection des bactéries transformées par un plasmide recombinant (test Blanc/Bleu, voir 4.5.3.).
- Tn10 : marqueur de résistance à la tétracycline, permettant de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'.
- ProAB : l'épisome F' est porteur de la région chromosomique codant pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la proline, cette région étant délétée au niveau du chromosome chez la souche XL1-Blue. De cette façon, la croissance de XL1-Blue est assurée même sur des milieux dépourvus de proline.
- LacZΔM15 : portion du gène LacZ délétée dans la portion N-terminale (voir 4.5.3.).
- lacIq : mutation pour le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose, ce qui entraîne une surproduction de la β-galactosidase d'un facteur 10.

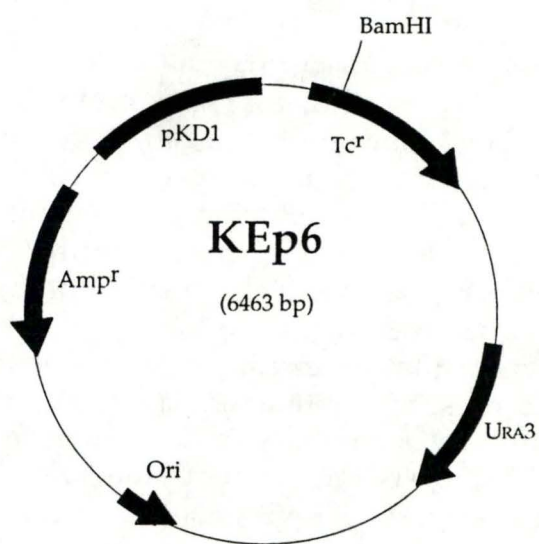


FIGURE 1 : Représentation schématique du vecteur KEp6

2.1.1.2. Souche GM48 d'*E.coli*

Cette souche d'*E.coli* a pour caractéristique d'être notamment dam^- et dcm^- . En conséquence, les plasmides amplifiés dans cette souche ne seront pas méthylés, et seront capables d'être clivés par des enzymes de restriction exigeant une déméthylation de l'ADN, par exemple *BclI*.

2.1.2. Souches de levure

2.1.2.1. Souches de *Kluyveromyces lactis*

CBS 2359 : c'est une souche sauvage de sexe "a", commercialisée par le Centraal Bureau voor Schimmelcultures.

CBS 2360 : c'est une souche sauvage de sexe "α", commercialisée par le Centraal Bureau voor Schimmelcultures.

JA6 : souche de sexe "α", ayant les caractéristiques suivantes : *ade1-600 adeT-600 trp1-11 ura3* (Breunig & al., 1987). Possédant l'allèle *LAC9-2*, c'est une souche répressible par le glucose.

JA6/912 : souche de sexe "α", est congénique de DL9 (Breunig & al., 1987). Cette souche DL9 est obtenue à partir de JA6 par disruption du locus *LAC9*, avec l'allèle *LAC9-1* (non répressible par le glucose) disrupté par *URA3*. JA6/912 est obtenue à partir de DL9 par remplacement de l'allèle *LAC9-1* disrupté par un allèle *LAC9-1* non disrupté (Zachariae & al., 1993b). JA6/912 n'est donc pas réprimée par le glucose.

2.1.2.2. Souches de *Saccharomyces cerevisiae*

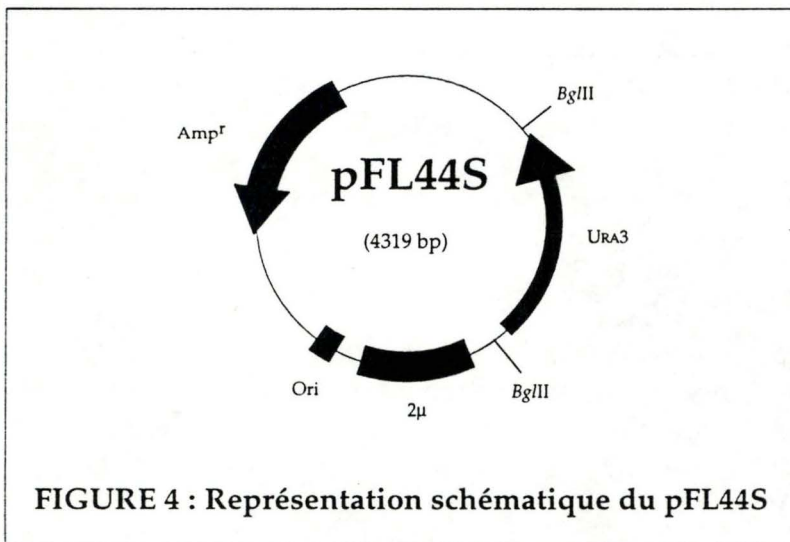
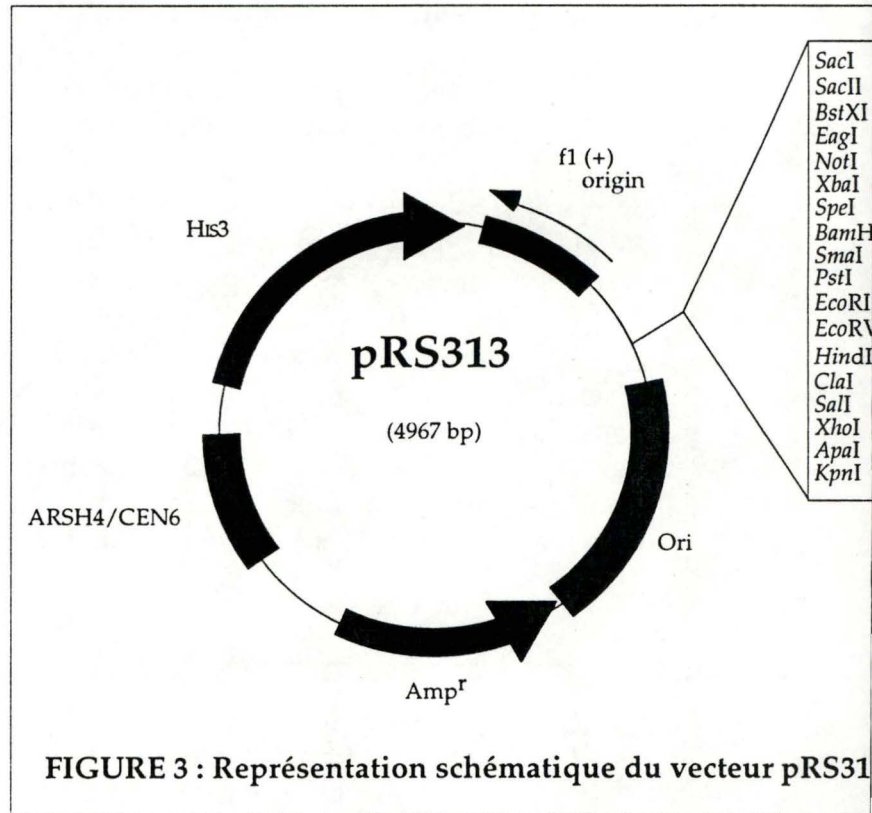
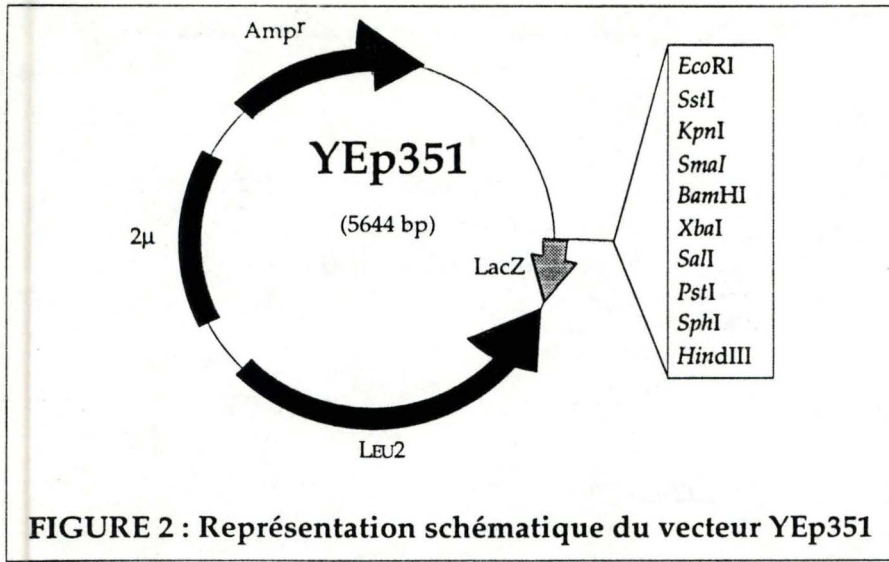
H172 : congénique de W303-1A (*MATa SUC2 GAL ade2-& can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*, Thomas & al., 1989), cette souche présente en outre le génotype suivant : *leu2::(GAL1:TPK2,HIS3)* (Nehlin & al., 1992).

H497 : elle est également congénique de W303-1A (Thomas & al., 1989). Son génotype est le suivant : *MATa SUC2 GAL ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1::hisG ura3-1 mig1-δ3* (Östling & al., 1995)

2.2. PLASMIDES

2.1.1. KEp6 (Figure 1)

Le plasmide KEp6 a une taille de 6463 bp. Il a été construit par l'insertion du fragment S11 de pKDI (Chen & al., 1986; Bianchi & al., 1987) au site *EcoRI* du plasmide YIp5 après remplissage par l'enzyme Klenow. Grâce à la présence de ce fragment S11, le KEp6 est capable de se répliquer chez



K.lactis; il est stable chez *Kluyveromyces lactis*, mais pas chez *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, il possède deux marqueurs de sélection chez *E.coli* (Amp^r et Tet^r) et un marqueur de sélection chez *K.lactis* (Le gène *URA3* de *Saccharomyces cerevisiae*, qui complémente la mutation *uraA* de *Kluyveromyces lactis*; de Louvencourt & al., 1983).

2.2.2. YEp351 (Hill & al., 1986; figure 2)

Ce plasmide fait une taille de 5644 bp. Il a été construit par une ligation de l'entièreté de la séquence du pUC18 avec un fragment d'ADN contenant à la fois la séquence 2μ , qui fait fonction d'origine de réplication multicopie chez *Saccharomyces cerevisiae*, et le gène *LEU2* (marqueur chez la levure).

En conséquence, ce plasmide est capable de se répliquer aussi bien chez *Saccharomyces cerevisiae* que chez *E.coli* (2μ et Ori), et possède un marqueur différent pour les deux organismes (Amp^r et *LEU2*). C'est donc un plasmide "navette" *E.coli* - *S.cerevisiae*.

De plus, le site multiple de clonage se trouve dans l'ORF de *LacZ*, donc une sélection Blanc/Bleu des transformants est possible.

2.2.3. pRS313 (Sikorski & al., 1989; figure 3)

Le pRS313 est un plasmide dérivé du pBLUESCRIPT (Stratagene).

Il contient une origine de réplication dans *E.coli* (f1 (+) origin), un marqueur pour *E.coli* (Amp^r) et un marqueur pour la levure (*HIS3*). En outre, ce plasmide est capable de se répliquer chez la levure et est présent chez elle en un nombre de copies restreint parce qu'il est porteur d'une cassette *ARSH4/CEN6* ("autonomously replication sequence", "centromere sequence").

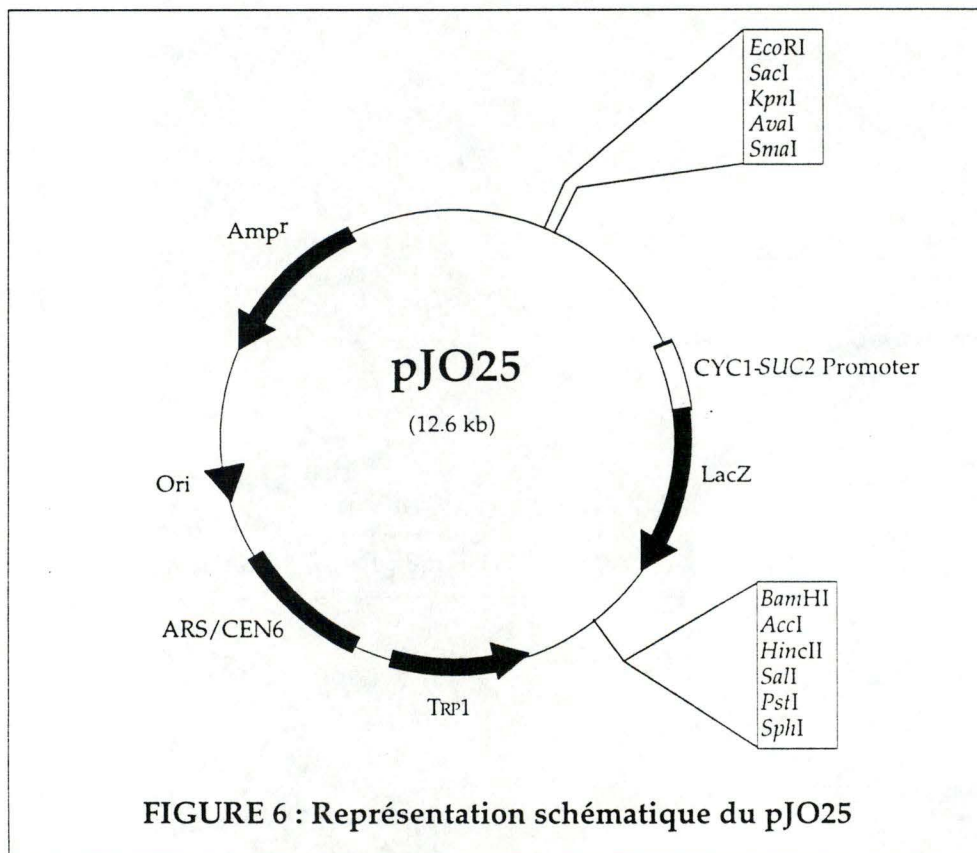
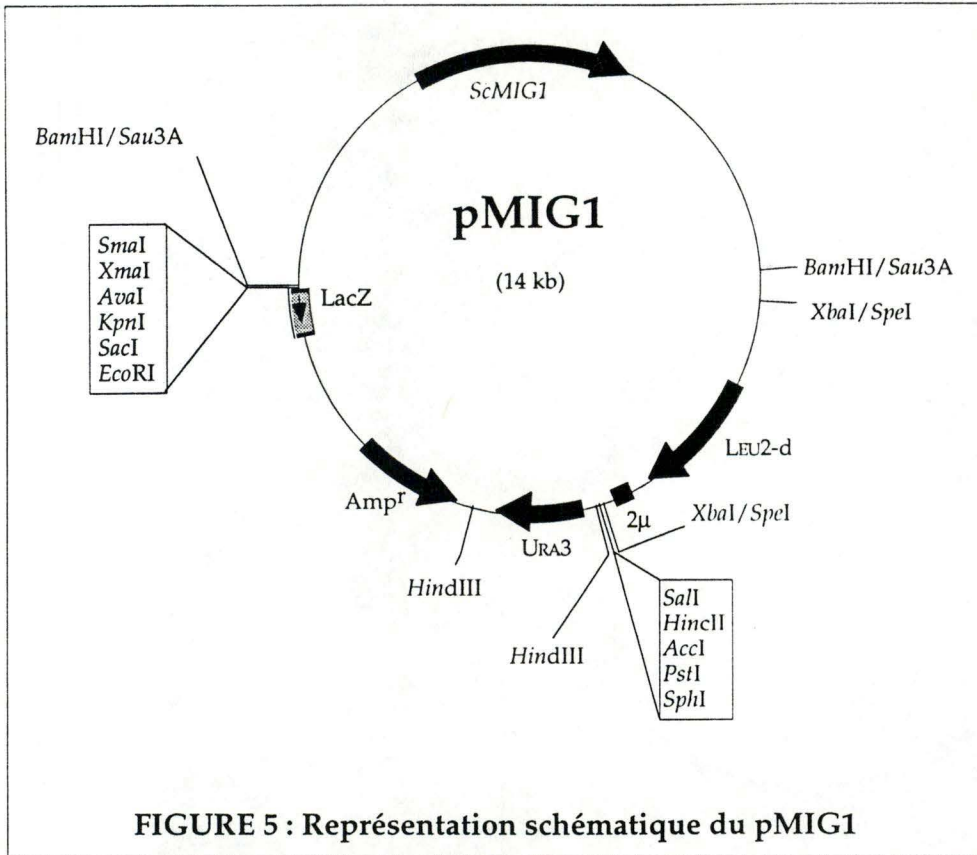
Enfin, le site multiple de clonage se trouve dans l'ORF de *LacZ*, ce qui permet une sélection Blanc/Bleu des plasmides recombinants.

2.2.4. pFL44S (Bonneaud & al., 1991; figure 4)

Ce plasmide contient le gène de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication chez *E.coli*, une séquence de réplication de type 2μ et le marqueur *URA3* de *Saccharomyces cerevisiae*, bordé par les sites de restriction *Bgl*II.

2.2.5. pMIG1 (Nehlin & al., 1990; figure 5)

Le pMIG1 a été obtenu à partir d'une banque de *Saccharomyces cerevisiae* construite dans le site *Bam*HI du vecteur pHR81 (Nehlin & al., 1989).



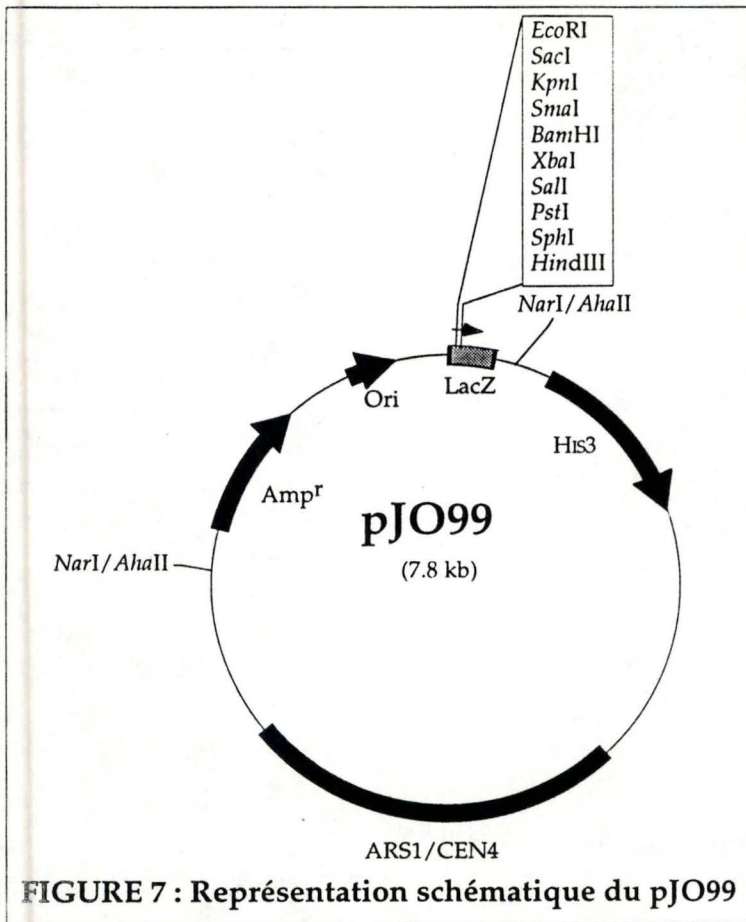


FIGURE 7 : Représentation schématique du pJO99

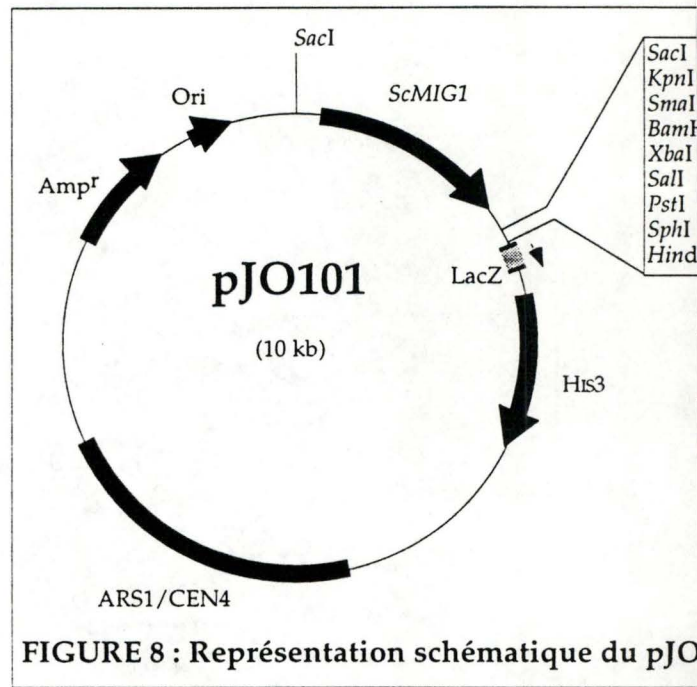


FIGURE 8 : Représentation schématique du pJO101

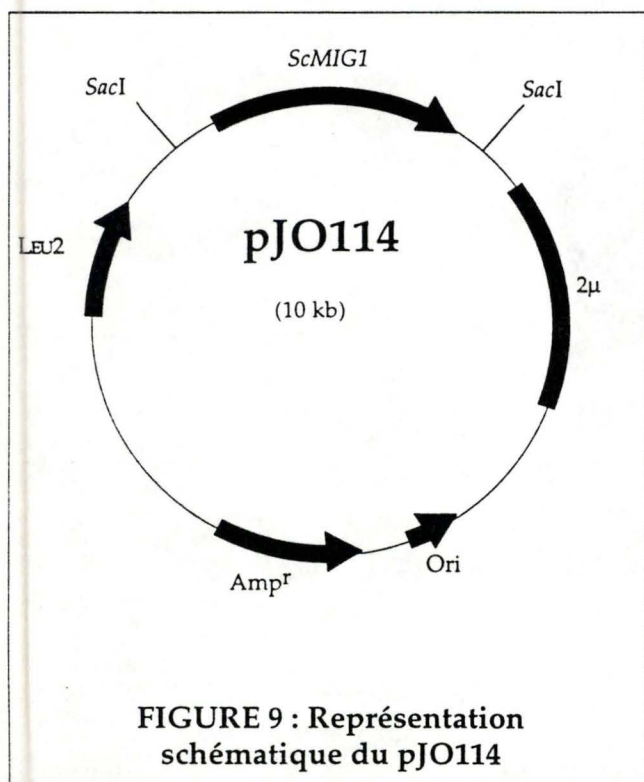


FIGURE 9 : Représentation schématique du pJO114

2.2.6. pJO25 (Östling & *al.*, 1995; figure 6)

Ce plasmide est basé sur le pLGΔ-312 (Guarente & *al.*, 1983) et sur le pFL39 (Kern & *al.*, 1990).

Premièrement, un fragment *XmaI*-*AgeI* du pLGΔ-312 contenant la fusion *CYC1-LacZ* a été cloné dans le site unique *XmaI* de pFL39, pour donner le pJO20. Ensuite, un fragment *HindIII*-*Sall* de pWJ210 (Nehlin & *al.*, 1990), qui contient l'*UAS* du gène *SUC2*, avec les deux sites de liaison de Mig1p, a été introduit au niveau des sites uniques *HindIII* et *XhoI*.

Ce plasmide porte donc le gène reporter *LacZ*, situé en aval du promoteur du gène *SUC2*, contenant les deux sites de liaison du répresseur Mig1p. La répllication dans la levure est assurée par la séquence centromérique de type CEN6. Les levures contenant ce plasmide pourront être sélectionnées via une auxotrophie pour le tryptophane, grâce à la présence sur le plasmide du marqueur TRP1.

2.2.7. pJO99 (Figure 7)

Ce plasmide est dérivé du pHR68 (Nehlin & *al.*, 1992) où le marqueur *URA3* est remplacé par le marqueur *HIS3*, via une insertion d'un fragment bordé par les sites *BamHI* contenant le marqueur *HIS3* au niveau des sites uniques *XbaI* et *NsiI* bordant le marqueur *URA3* au niveau du pHR68.

2.2.8. pJO101 (Figure 8)

Ce plasmide est dérivé du pMC120, via les mêmes opérations effectuées pour la réalisation du pJO99 à partir du pHR68, c'est-à-dire que le marqueur *URA3* du plasmide pMC120 est remplacé par le marqueur *HIS3*. Le pMC120 est dérivé du pHR68 par une insertion, au site *SacI* de pHR68, d'un fragment de 2160 bp, provenant du pMIG1, contenant le gène *ScMIG1*, bordé par les sites *SacI*.

2.2.9. pJO114 (Figure 9)

Le pJO114 est une construction contenant l'ORF de *ScMIG1* insérée dans le site *SacI* du vecteur multicopie YEp13.

3. MILIEUX DE CULTURE

3.1. POUR LES BACTÉRIES

3.1.1. Milieu LB :

		Pour 400 ml
Tryptone	1%	4 g
NaCl	0,5%	2 g
Yeast Extract	0,5%	2 g

Pour avoir du LB Solide, ajouter 2% d'Agar, c'est-à-dire, 8 g d'Agar par 400 ml de milieu.

Les produits thermolabiles (ampicilline, X-Gal, IPTG) sont ajoutés après autoclave, une fois que la température est en-dessous de 60°C.

Les cultures bactériennes se font à une température de 37°C, sous agitation mécanique pour les cultures liquides.

3.2. POUR LES LEVURES

3.2.1. Milieux riches

3.2.1.1. GPYA :

		Pour 1 l
Glucose		40 g
Peptone		5 g
Yeast Extract		5 g

Pour obtenir un milieu solide, ajouter 15 g d'Agar. Mettre à pH 5,0-5,2 avec HCl 37%. Autoclaver. Ce milieu est recommandé pour les cultures de *Kluyveromyces lactis*, qui se font à une température de 30°C.

3.2.1.2. YPD :

		Pour 1 l
Glucose		20 g
Peptone		20 g
Yeast Extract		10 g

Pour obtenir un milieu solide, ajouter 15 g d'Agar. Mettre à pH 4,8 avec HCl 37%. Autoclaver.

3.2.2. Milieux sélectifs

Yeast Nitrogen Base (with ammonium persulfate, without aminoacids)	2,7 g
Dextrose	8 g
Synthétique complet (sans ura, leu...)	20 ml
(Agar)	(8 g)

Composition d'une solution stock complète d'acides aminés concentrée 20X, pour 500 ml de solution :

	Complet	Sans uracile	Sans leucine
Adénine	270 mg	270 mg	270 mg
Uracile	224 mg	-	224 mg
L-Arginine HCl	316 mg	316 mg	316 mg
L-Acide aspartique	998 mg	998 mg	998 mg
L-Histidine HCl	209 mg	209 mg	209 mg
L-Isoleucine	197 mg	197 mg	197 mg
L-Leucine	394 mg	394 mg	-
L-Lysine HCl	365 mg	365 mg	365 mg
L-Méthionine	224 mg	224 mg	224 mg
L-β-Phénylalanine	496 mg	496 mg	496 mg
L-Tyrosine	181 mg	181 mg	181 mg
L-Valine	644 mg	644 mg	644 mg
L-Tryptophane	306 mg	306 mg	306 mg
L-Thréonine	774 mg	774 mg	774 mg

Tous ces composants peuvent être autoclavés, sauf le tryptophane et la thréonine, qui seront filtrés sur Millipore 0,22 µm.

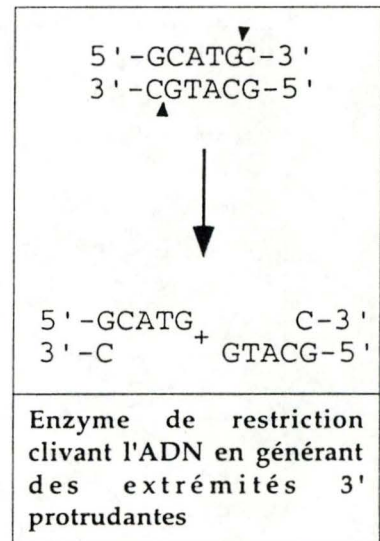
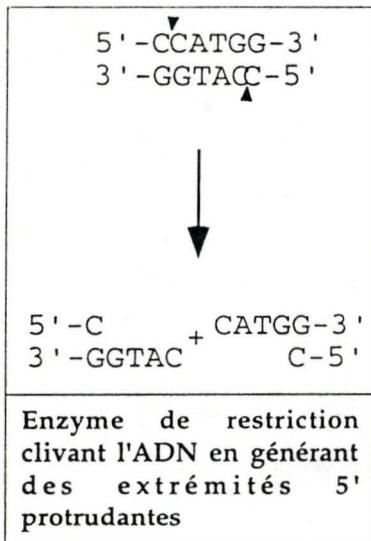
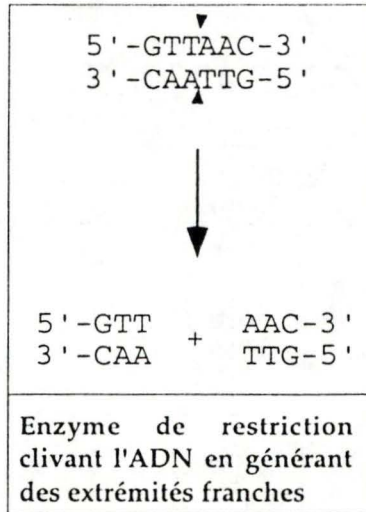


FIGURE 10 : Les différents types d'enzymes de restriction

4. TECHNIQUES RELATIVES À L'ADN RECOMBINANT

4.1. LES RÉACTIONS DE RESTRICTION

4.1.1. Principes généraux

Une molécule d'ADN peut être coupée par des enzymes appelées endonucléases de restriction. Ces enzymes hydrolysent, d'une manière site-spécifique, les liens phosphodiester qui lient les nucléotides entre eux. Cette hydrolyse produit des fragments d'ADN bordés par un groupement hydroxyle du côté 3'-terminal, et par un groupement phosphate du côté 5'-terminal.

Les enzymes de restriction peuvent être de plusieurs types (Figure 10):

- Enzymes de restriction produisant des "bouts francs" : ce sont, par exemple, *DraI*, *SmaI*, *HpaI*...
- Enzymes de restriction produisant des "bouts collants", qui, à leur tour, peuvent être de deux types :
 - soit elles génèrent des extrémités 3'-protrudantes (par exemple : *KpnI*, *SphI*,...)
 - soit elles génèrent des extrémités 5'-protrudantes (par exemple : *EcoRI*, *HindIII*,...)

4.1.2. En pratique

Lors d'une réaction de restriction, différents éléments sont mis en présence :

- L'ADN à restreindre;
- L'enzyme de restriction;
- Le tampon de restriction, qui est à diluer 10X lors de son utilisation;
- Porter au volume désiré avec de l'eau stérile (20 à 50 µl).

Ce mélange réactionnel est alors incubé environ une heure à une température optimale, cette température étant, pour la plupart des enzymes de restrictions, de 37°C (*SmaI* : 25°C; *BclI* : 50°C).

Au terme de cette réaction de restriction, l'enzyme peut être inactivée, soit par une augmentation de température, si l'enzyme est thermosensible, soit par une extraction au Phénol-Chloroforme.

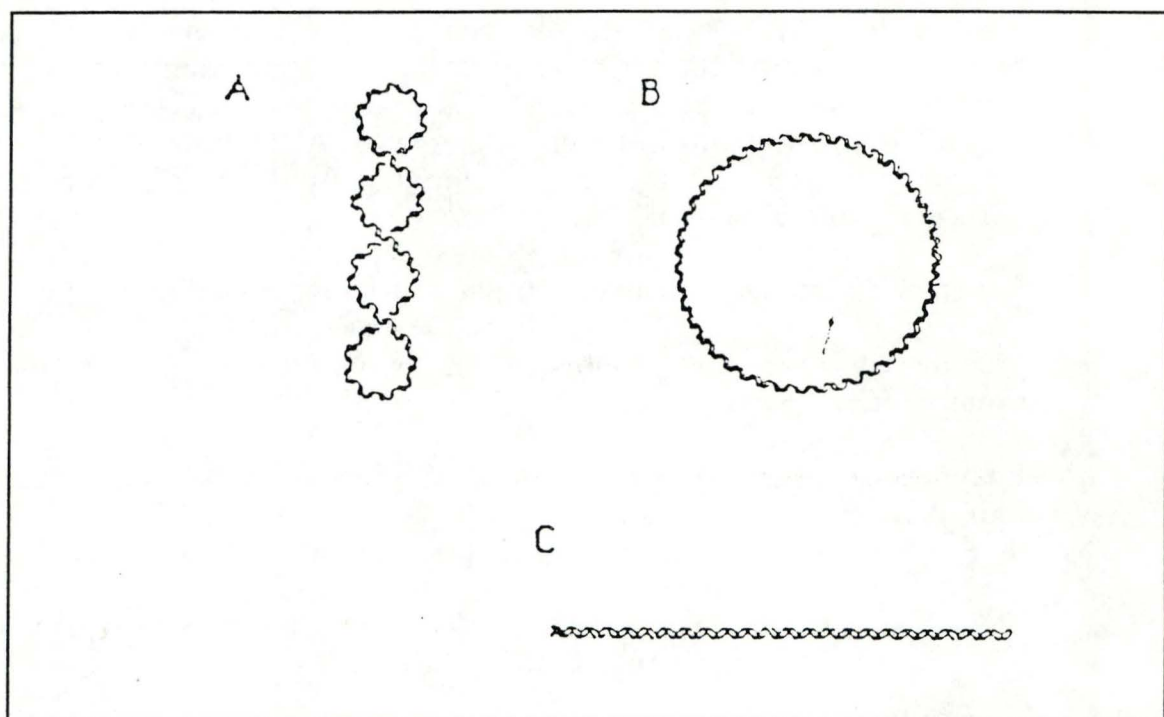


FIGURE 11 : Les trois conformations de l'ADN :

(A) CCC ("covalently closed circular")

(B) OC ("open circular")

(C) OL ("open linear")

4.1.3 Remarques générales

Les quantités d'enzyme de restriction à utiliser varient selon la quantité d'ADN que l'on veut restreindre : on utilisera entre 3 et 10 unités d'enzymes par mg d'ADN à restreindre.

Il faut cependant veiller à ne pas ajouter trop de volume d'enzyme de restriction (maximum 1/10 du volume final), car les enzymes sont stockées dans une solution comprenant 50% de glycérol et s'il se trouve, lors de la restriction, à une concentration supérieure à 5%, des effets néfastes peuvent se manifester, et l'enzyme peut alors :

- a) voir son activité décroître et n'engendrer que des restrictions partielles.
- b) faire montre d'une activité "star" : il a été montré que, sous des conditions extrêmes, les endonucléases de restrictions sont capables de cliver des séquences qui sont similaires mais pas identiques à leur site spécifique de clivage. Parmi ces conditions extrêmes, on cite notamment une concentration élevée en glycérol, mais également une trop forte concentration en ADN cible, une force ionique trop élevée, un pH trop élevé, la présence de solvants organiques tel l'éthanol, ...

4.2. L'ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE

4.2.1. Buts

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée à différentes fins. Premièrement, elle sert à séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Ensuite, elle offre la possibilité d'estimer la taille de ces fragments, mais également d'en évaluer la concentration. Enfin, elle permet l'évaluation de la qualité d'une préparation, son état de pureté.

4.2.2. Principe

On fait migrer, dans un champ électrique, des molécules d'ADN. Ces molécules d'ADN sont capables de se déplacer dans champ électrique du fait de la présence, en leur sein, de groupements phosphates.

Différents paramètres influencent la migration de l'ADN dans le champ électrique :

- **La taille du fragment** : la vitesse de migration des molécules dans le champ électrique est inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire. Plus les fragments d'ADN sont grands, moins vite et moins loin ils migreront dans le champ électrique imposé.
- **La concentration en agarose du gel** : Plus le gel contient de l'agarose, plus le réseau formé sera dense et serré, et une plus grande résistance sera opposée à la migration des molécules d'ADN dans le champ électrique.
- **La conformation de la molécule d'ADN** : Une molécule d'ADN peut exister sous trois conformations. La première, c'est lorsque cette molécule ne présente pas de coupure, c'est la forme CCC (Covalently

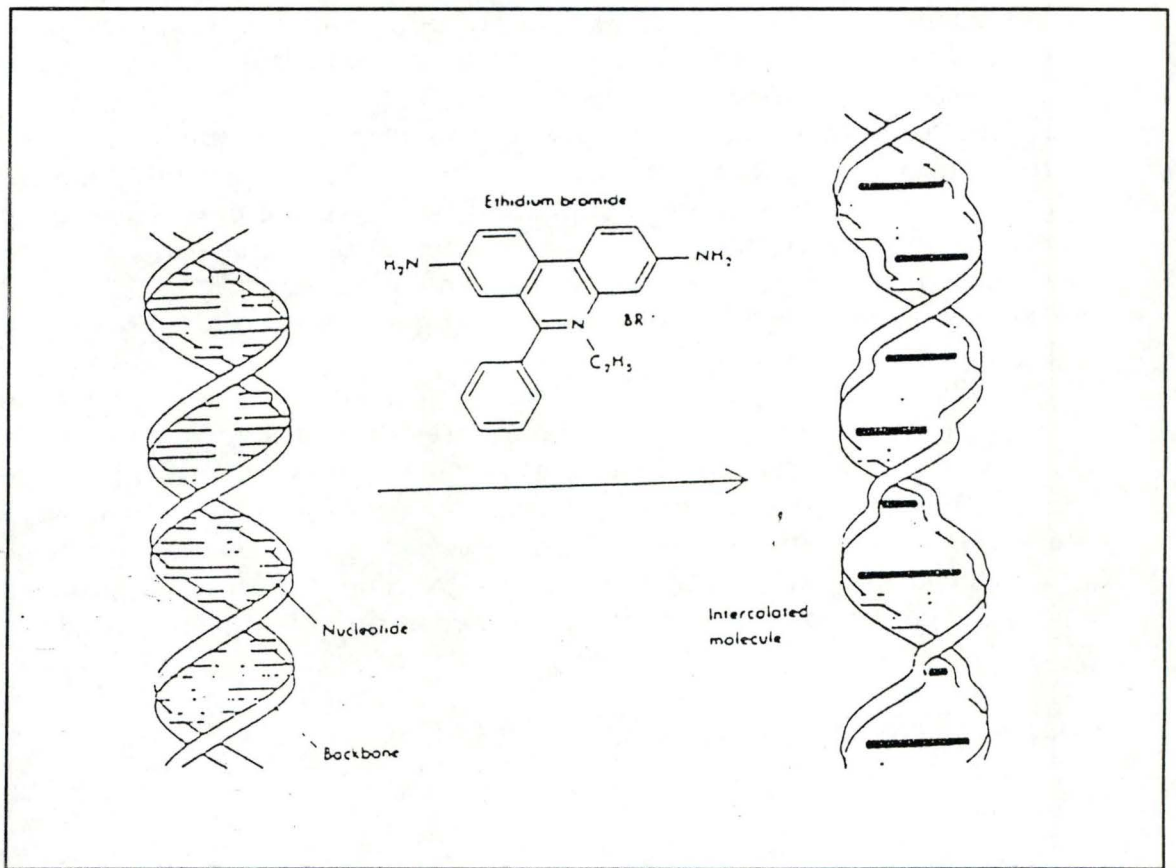


FIGURE 12 : Schéma représentant l'insertion du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN

Closed Circular). La seconde, c'est lorsqu'une coupure est présente en simple brin dans la molécule, c'est la forme OC (Open Circular). Enfin la troisième, c'est lorsqu'il y a une coupure double brin dans la molécule, c'est la forme OL (Open Linear). On remarque d'une façon générale que ces trois formes d'ADN migrent à des distances différentes au sein d'un même gel (Figure 11).

- **L'intensité du champ électrique** : Plus l'ampérage imposé à la cuve d'électrophorèse est faible, plus la vitesse de migration des molécules d'ADN faible.

Les fragments d'ADN peuvent être visualisés grâce à l'addition, dans le polymère d'agarose, de bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les bases de l'ADN. Lorsque ce composé est excité par les U.V. (302 nm), il devient fluorescent (Figure 12).

La taille et la quantité des fragments peuvent être estimées par leur comparaison avec un marqueur de taille, que l'on fait migrer simultanément, et dont on connaît la taille des fragments présents ainsi que leur quantité.

4.2.3. Réalisation

Une certaine quantité d'agarose est dissoute par chauffage dans du TBE 1X (1 g pour 100 ml pour un gel 1%). Après refoidissement aux alentours de 50°C, le gel est coulé dans un support en plexiglas, on ajoute le bromure d'éthidium, et on laisse solidifier en présence d'un peigne. Une fois le gel solidifié, on enlève le peigne. Le gel est placé dans une cuve à électrophorèse et immergé dans du TBE 1X.

Les échantillons d'ADN sont ajoutés dans les puits en présence d'alourdisseur/colorant pour gels d'agarose, solution dense et colorée, pour que l'ADN "tombe" au fond du puits, et que l'évolution de la migration soit visualisable.

Les électrophorèses peuvent être :

- **analytiques** : dans le but de déterminer la taille et/ou la quantité des fragments d'ADN.
- **préparatives** : dans le but de récupérer un fragment d'ADN de taille déterminée.

4.3. PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN

Lorsque l'on réalise une électrophorèse préparative, il est possible de récupérer un fragment particulier sur le gel, et ce dans le but de cibler la ligation ultérieure sur ce fragment particulier, facilitant ainsi le criblage qui s'ensuit.

On va distinguer trois principes :

- la récupération sur papier
- la récupération par adsorption sur une matrice
- la récupération par adsorption sur une colonne

4.3.1. Récupération sur papier (Dretzen & al., 1981)

4.3.1.1. Préparation des filtres

Des papiers Whatman DE81 sont découpés à la taille désirée. On les laisse tremper 3 heures dans du NaCl 0,5 M, on les lave ensuite plusieurs fois dans de l'eau distillée froide, puis on les conserve dans du TBE 1X.

4.3.1.2. Récupération du fragment d'ADN

Le gel est incisé avant et après la bande d'intérêt, on y glisse les papiers. On fait migrer 10 minutes à 100 Volts. Le papier qui se trouvait en aval du fragment d'intérêt est récupéré.

Il est rincé plusieurs fois dans de l'eau froide afin d'enlever le TBE. Il est ensuite séché sur un papier filtre absorbant, puis déposé dans un Eppendorf contenant 400 µl de tampon salin (HighSalt Buffer). On incube alors 2 heures à 37°C. A l'aide d'une épingle chauffée, on fait un trou dans le fond de l'Eppendorf, qui n'autorise que le passage du liquide, et pas celui du papier. Ce liquide est récupéré lors d'un QuickSpin à 13000 rpm (Janetzki). On ajoute 1 ml de Butanol à la phase aqueuse récupérée, pour éliminer le bromure d'éthidium, on mélange en "Vortexant" 30 secondes, on sépare les deux phases par une centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm, et on enlève la phase supérieure.

Puis vient la précipitation de l'ADN :

- ajouter 2,5 volumes d'Éthanol absolu froid. Laisser 15 minutes à -80°C.
- centrifuger 20 minutes à 4°C à 13000 rpm. Décanter.
- laver le culot avec 300 µl Éthanol 70%. Centrifuger 5 minutes à 4°C à 13000 rpm.
- sécher 5 minutes sous vide puis resuspendre dans 10 ml d'eau stérile.

4.3.2. Récupération par adsorption sur une matrice

La récupération de l'ADN se fait par le kit Prep-A-Gene, commercialisé par la firme Bio-Rad.

Le protocole est le suivant :

- Exciser la bande d'ADN désirée d'un gel d'agarose et la placer dans un Eppendorf. Estimer la quantité d'ADN présent dans la tranche
- Peser la tranche, et ajouter trois fois la masse d'agarose de Binding Buffer fourni dans le kit (Perchlorate de Sodium) pour dissoudre l'agarose en agitant doucement. Si nécessaire, chauffer le tube pendant quelques minutes à 37-55°C pour aider la dissolution.
- Ajouter 5 µl de Matrice Prep-A-Gene par µg d'ADN présent dans la tranche, mélanger doucement et incuber 5-10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 30 secondes, Enlever le surnageant



- Resuspendre dans une quantité de Binding Buffer équivalent à 25X la quantité de Matrice ajoutée précédemment
- Centrifuger 30 secondes, enlever le surnageant
- Laver le culot deux fois avec un volume de 25X celui de la Matrice de Wash Buffer
- Resuspendre le culot dans un volume de 1X celui de la Matrice d'Elution Buffer
- Incuber 5 minutes à 42°C
- Centrifuger une minute
- Récupérer le surnageant
- Resuspendre le culot dans 10 µl d'Elution Buffer
- Incuber 5 minutes à 42°C
- Récupérer le surnageant et le remettre avec le premier

4.3.3. Récupération par adsorption sur une colonne

La récupération se fait par le kit Qiaquick, commercialisé par Qiagen, ou par le kit NucleoSpin, commercialisé par la firme Macherey-Nagel.

QIAquick : protocole :

- Exciser le fragment d'ADN du gel d'agarose
- Peser la tranche de gel, et ajouter 3 volumes de tampon QX1
- Incuber 10 minutes à 50°C
- Placer la colonne fournie dans le kit dans un Tube de 2 ml fourni également dans le kit, et déposer l'échantillon sur cette colonne
- Centrifuger 60 secondes, puis enlever le liquide contenu dans le tube de 2 ml
- Laver en ajoutant 0,75 ml de tampon PE fourni dans le kit et centrifuger 45 secondes, puis enlever le liquide contenu dans le tube de 2 ml
- Centrifuger 60 secondes, pour enlever le tampon PE résiduel
- Placer la colonne dans un Eppendorf, ajouter 50 µl d'eau et centrifuger 1 minute (élution)

NucleoSpin : Protocole

- Exciser le fragment d'ADN dans le gel d'agarose
- Par 100 µg d'agarose, ajouter 300 µl de tampon NT1 fourni par le kit
- Incuber 10 minutes à 50°C
- Charger sur une colonne et placer cette colonne dans un tube de 2 ml
- Centrifuger 1 minute, enlever le liquide du tube de 2 ml
- Laver l'ADN avec 0,75 ml de tampon NT3, centrifuger 1 minute
- Enlever le liquide du tube de 2 ml
- Recentrifuger 1 minute, pour enlever le tampon NT3 résiduel
- Éluer l'ADN avec 50 µl d'eau stérile et centrifuger 60 secondes

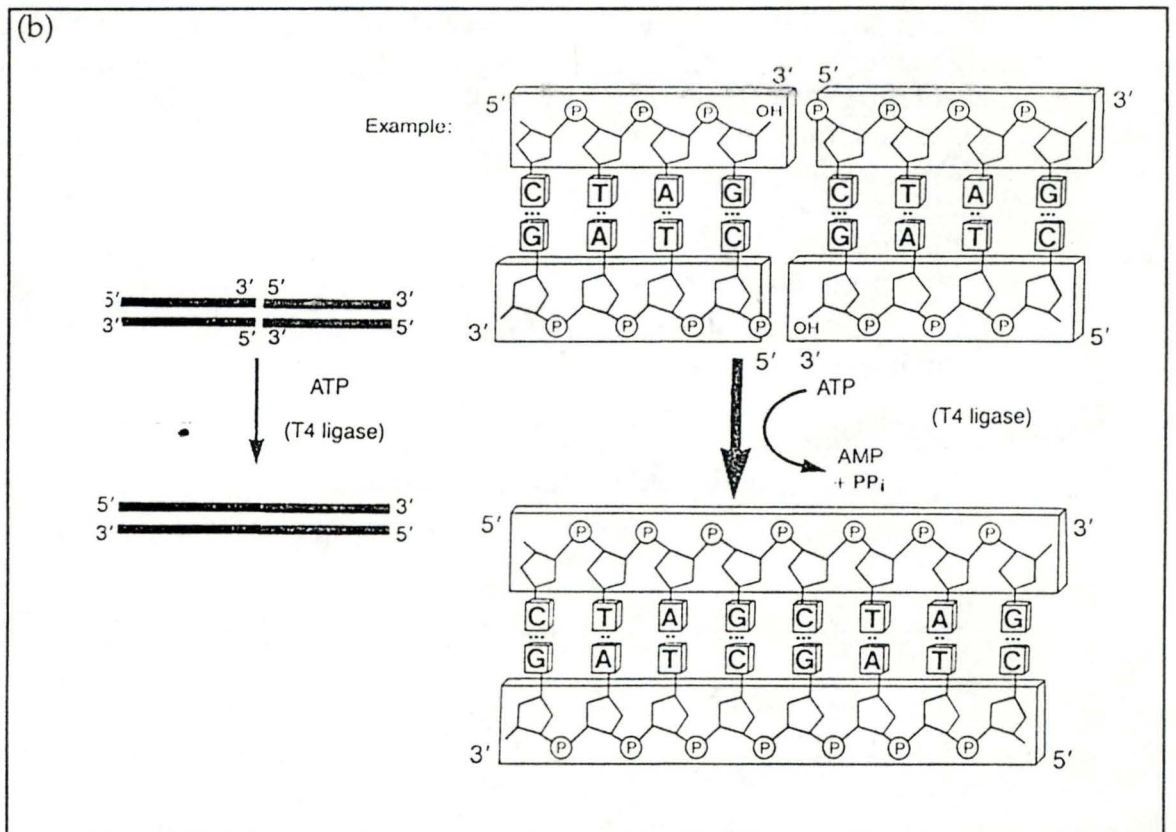
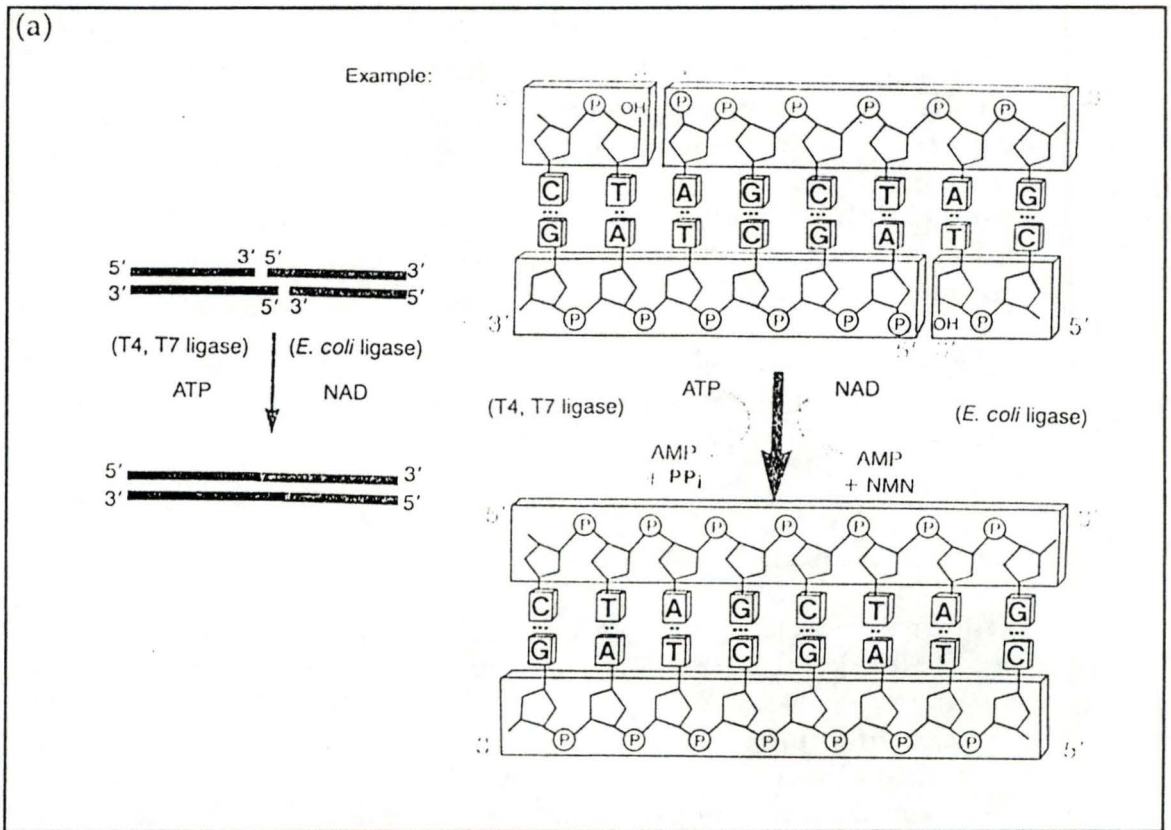


FIGURE 13 : Représentation du mode d'action de la ligase du phage T4
 (a) Au niveau d'extrémités collantes
 (b) Au niveau d'extrémités franches

4.4. LA RÉACTION DE LIGATION (Figure 13)

4.4.1. Principe

La formation de liens phosphodiesters entre un groupement 3'-hydroxyle et un groupement 5'-phosphate est une réaction catalysée par la Ligase du Phage T4. Pour ce faire, l'enzyme a besoin d'ATP et de Mg^{++} .

4.4.2. En pratique

Différents éléments sont mis en présence :

- la matrice linéarisée
- le fragment à insérer
- une unité de T4 DNA Ligase
- du tampon de ligation (5X)
- de l'eau stérile pour atteindre le volume désiré

4.4.3. Remarques générales

Lorsque la ligation n'implique que des bouts collants, elle se fait à 14°C, pendant une nuit, la formation des ponts hydrogènes étant favorisée à cette température.

Lorsque la ligation n'implique que des bouts francs, elle se fait pendant 3 heures à température ambiante, car l'activité de la T4 DNA Ligase est plus élevée à cette température.

Si enfin la ligation implique les deux types d'extrémités, les deux incubations sont successivement réalisées.

S'il n'y a qu'une possibilité d'insertion (si le clonage est forcé), la stoechiométrie matrice/insert sera de 1:1. Si par contre la matrice peut se refermer sur elle-même ou si la ligation implique des bouts francs, la stoechiométrie pourra atteindre 1:10.

4.5. LA TRANSFORMATION

4.5.1. Electroporation

4.5.1.1. Principe général

L'électroporation est un processus physique qui perméabilise, de façon transitoire, les membranes de tous types cellulaires avec un choc électrique, rendant possible le passage, dans ou hors de la cellule, d'une grande variété de molécules biologiques (nucléotides, ARN, protéines, hydrates de carbone, particules virales, ainsi que de très grandes molécules d'ADN).

Le principe de la transformation par électroporation repose sur le fait que la membrane cellulaire est incapable de laisser passer le courant (sauf au niveau des canaux ioniques). La soumission des cellules à un champ électrique de haut voltage résulte en leur cassure temporaire

et en la formation de pores, assez larges que pour laisser passer (entrée ou sortie) des macromolécules.

4.5.1.2. Préparation des cellules XL1-Blue électrocompétentes

- Inoculer une préculture de LB + tétracycline de 5 ml.
- Laisser pousser une nuit à 37°C sous agitation.
- Inoculer 200 ml de LB + tétracycline avec la préculture.
- Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une DO_{540nm} de 0,5-0,8.
- Stopper la culture sur glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 200 ml d'eau stérile froide.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 100 ml d'eau stérile froide.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 4 ml de glycérol 10% froid.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 400 μ l de glycérol 10% froid.
- Aliquoter 100 μ l par Eppendorf, conserver les cellules à -80°C jusqu'à leur utilisation.

4.5.1.2. Electroporation des cellules XL1-Blue

- Placer une cuvette d'électroporation dans la glace, y déposer 1 μ l d'ADN et 100 μ l de cellules compétentes. Incuber une minute.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (Gene Pulser-BioRad), réglé sur 25 μ F, 200 Ω et 2300 V.
- Choc électrique.
- Ajouter rapidement 1 ml de SOC.
- Transférer le tout dans un Eppendorf et incuber à 37°C pendant une heure.
- Etaler 300 μ l sur boîte et laisser pousser une nuit.

4.5.2. Transformation utilisant le Chlorure de Calcium

4.5.2.1. Principe :

Le Calcium, en se liant à l'ADN plasmidique, forme à proximité de la paroi bactérienne un complexe résistant aux DNAases. Les cellules sont compétentes. Le mélange DNA-cellules est alors exposé à un choc thermique, qui permet à l'ADN de pénétrer dans la cellule. Les cellules sont ensuite placées en milieu non sélectif pour permettre la synthèse des protéines (codées par le plasmide) responsables de la résistance aux antibiotiques, puis sont étalées sur milieu sélectif afin d'identifier les colonies contenant le plasmide.

4.5.2.2. Préparation de cellules $CaCl_2$ compétentes

- Inoculer une préculture de 5 ml de LB + tétracycline
- Laisser pousser la nuit à 37°C sous agitation
- Inoculer 400 ml de LB + tétracycline avec la préculture

- Incuber sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la culture ait atteint une DO_{540nm} de 0,6
- Stopper la croissance dans la glace pendant 10 minutes
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à 5°C
- Resuspendre les cellules dans 200 ml de $CaCl_2$ 50 mM froid
- Incuber 20 minutes dans la glace
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à 5°C
- Resuspendre les cellules dans 15 ml de $CaCl_2$ 50 mM + glycérol 15%
- Aliquoter dans des Eppendorfs prérefroidis et conserver à -80°C jusqu'à utilisation.

4.5.2.3. Transformation $CaCl_2$

- Mettre en présence 1 à 100 ng d'ADN plasmidique avec 200 μ l de cellules compétentes
- Incuber 30 minutes sur glace
- Réaliser un choc thermique à 42°C pendant 2 minutes
- Ajouter 1 ml de LB
- Incuber une heure à 37°C
- Etaler 200 μ l des cellules sur un milieu solide sélectif

4.5.3. Sélection des transformants et des recombinants

L'addition d'ampicilline dans le milieu permet de sélectionner les bactéries qui ont été transformées par un plasmide portant le marqueur de résistance à l'ampicilline ; ce marqueur est le gène codant pour la β -Lactamase, enzyme qui, excrétée dans l'espace périplasmique, y dégrade l'ampicilline.

En outre, les bactéries de la souche XL1-Blue transformées par un plasmide recombinant peuvent être sélectionnées par un test colorimétrique (Blanc/Bleu).

Cette souche est délétée pour l'opéron lactose au niveau de son chromosome, mais une partie de cet opéron est présent sur l'épisome F' de ces bactéries : il s'agit de la portion $LacZ\Delta M15$ codant pour la partie carboxy-terminale de la β -Galactosidase (peptide a').

Le reste de cet opéron est présent sur des vecteurs de type pKS et pUC. En effet, le pKS est porteur d'un fragment non opérationnel $LacI$ (le gène régulateur de l'opéron LAC) et d'un fragment $LacZ'$, qui contient le promoteur et l'opérateur de l'opéron LAC et la portion du gène $LacZ$ codant pour l'extrémité amino-terminale de la β -Galactosidase (peptide a).

La complémentation intragénique consiste alors en l'assemblage des peptides a et a' pour reconstituer une β -Galactosidase active, qui peut alors cliver le X-Gal en galactose et en un chromogène de couleur bleue. Le site multiple de clonage (MCS) est localisé dans l'ORF du fragment $LacZ'$. Donc, lorsqu'un fragment est inséré dans ce MCS, l'ORF est disruptée, le peptide a n'est plus synthétisé, il n'y a plus de complémentation intragénique. Par contre, s'il n'y a pas d'insertion dans le MCS, la complémentation intragénique reste possible, étant

donné que l'insertion du MCS dans l'ORF de LacZ' s'est faite en phase et dans une région peu importante pour l'activité β -Galactosidase. En conclusion, les bactéries transformées par un vecteur recombinant donneront lieu à des colonies de couleur blanche, tandis que des bactéries transformées par un vecteur non recombinant donneront naissance à des colonies de couleur bleue.

4.6. PRÉPARATIONS D'ADN

4.6.1. Minipréparation d'ADN plasmidique

Ce protocole permet l'obtention d'ADN plasmidique rapidement et en quantités suffisantes que pour pouvoir effectuer quelques restrictions diagnostiques.

4.6.1.1. Culture

- Inoculer une colonie dans 5 ml de LB + ampicilline
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation

4.6.1.2. Lyse des cellules

- Récupérer 1,5 ml dans un Eppendorf
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm (Janetzski)
- Enlever le surnageant
- Resuspendre le culot dans 300 μ l de P1 + RNAase
- Ajouter 300 μ l de P2 et mélanger
- Incuber 5 minutes
- Ajouter 300 μ l de P3 et mélanger
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm

4.6.1.3. Récupération des plasmides

- Récupérer le surnageant
- Ajouter 720 μ l d'Isopropanol tempéré pour précipiter l'ADN plasmidique
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm
- Enlever le surnageant
- Ajouter 200 μ l d'Éthanol 70% froid pour laver le culot
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm
- Enlever l'Éthanol
- Sécher au Speedvack
- Resuspendre l'ADN dans de l'eau stérile (50 μ l)

4.6.2. Midipréparation d'ADN plasmidique (Nucleobond AX100)

4.6.2.1. Culture

- Inoculer une préculture dans 200 ml de LB + Ampicilline
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation

4.6.2.2. Lyse des cellules

- Verser la culture dans une bouteille Sorvall 250 ml
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Enlever le surnageant
- Resuspendre le culot avec 4 ml de P1 + RNAase et le transférer dans un Corex de 30 ml
- Ajouter 4 ml de P2 et mélanger
- Incuber 5 minutes
- Ajouter 4 ml de P3 et mélanger
- Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm
- Récupérer le surnageant dans un Corex de 30 ml. Centrifuger à nouveau si le surnageant n'est pas clair

4.6.2.3. Mise sur colonne

Cette étape n'est nécessaire que si l'on veut obtenir une préparation d'ADN plasmidique très pure.

- Équilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2
- Déposer le surnageant sur la colonne
- Laver avec 2 X 4 ml de tampon N3
- Éluer avec 2 ml de tampon N5. Ces 2 ml sont récupérés dans un Corex de 15 ml.
- Précipiter l'ADN avec 1,6 ml d'Isopropanol (9,6 ml si on n'est pas passé sur colonne)
- Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm
- Enlever le surnageant
- Laver le culot avec 1 ml d'Éthanol 70% froid
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm
- Enlever l'Éthanol
- Sécher au Speedvack
- Resuspendre l'ADN dans 100 µl d'eau stérile

4.6.3. Préparation d'ADN génomique de levure

4.6.3.1. Culture

- lancer une culture dans 200 ml de YPD
- Incuber sous agitation à 30°C jusqu'à la phase stationnaire

4.6.3.2. Sphéroplast

- Verser la culture dans une bouteille Sorvall 250 ml
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Enlever le surnageant
- Laver le culot avec 100 ml d'eau stérile froide
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Resuspendre dans 10 ml de SCE et transférer dans un Corex de 30 ml
- Ajouter 10 µl de β-Mercaptoéthanol
- Ajouter 250 µl de Zymoliase concentrée à 5 mg/ml de glycérol 60%
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm dans un rotor angulaire

- Resuspendre dans 1 ml de tampon de lyse

4.6.3.3. Précipitation des protéines

- Chauffer 15 minutes à 70°C
- Ajouter 1 ml d'Acétate de Potassium 5 M
- Incuber 30 minutes dans la glace
- Centrifuger 10 minutes à 10000 rpm

4.6.3.4. Phénol-chloroforme

- Récupérer le surnageant dans un Corex à bouchon
- Ajouter 5 ml de Phénol-Chloroforme
- Mélanger en retournant le Corex
- Centrifuger 1/2 heure à 10000 rpm à 20°C

4.6.3.5. Précipitation de l'ADN

- Récupérer le surnageant
- Ajouter doucement 20 ml d'Éthanol 100% tempéré
- Centrifuger 10 minutes à 10000 rpm dans un rotor angulaire
- Rincer avec 1 ml d'Éthanol 70% - Décanter
- Laisser sécher 10 minutes à l'air libre
- Resuspendre dans 1 ml de TE

4.6.3.6. Traitement à la RNAase

La ribonucléase A est une endoribonucléase qui hydrolyse l'ARN de façon spécifique après un C ou un U. Une utilisation commune de la RNAase A est l'hydrolyse d'ARN qui contamine des préparations d'ADN.

Le clivage de l'ARN se produit entre le groupement 3'-phosphate d'un ribonucléotide pyrimidique et le groupement 5'-hydroxyle du nucléotide adjacent. Il est ainsi produit un phosphate cyclique (2' : 3'), qui sera ensuite hydrolysé pour donner les nucléosides 3'-phosphate correspondants.

Protocole

- Ajouter 250 µl de RNAaseA concentrée à 10 mg/ml dans de l'eau
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Ajouter 312 µl de Protéinase K concentrée à 2 mg/ml dans de l'eau
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Inactiver ces deux enzymes via un Phénol-Chloroforme puis récupérer l'ADN par une précipitation, et resuspendre dans 200 µl d'eau stérile

4.7. PURIFICATION ET PRÉCIPITATION DE L'ADN

4.7.1. Extraction au Phénol-Chloroforme

Cette opération a pour but d'enlever les sels et les protéines d'une solution contenant de l'ADN. On l'utilise notamment entre deux restrictions pour lesquelles les tampons d'incubation des enzymes sont

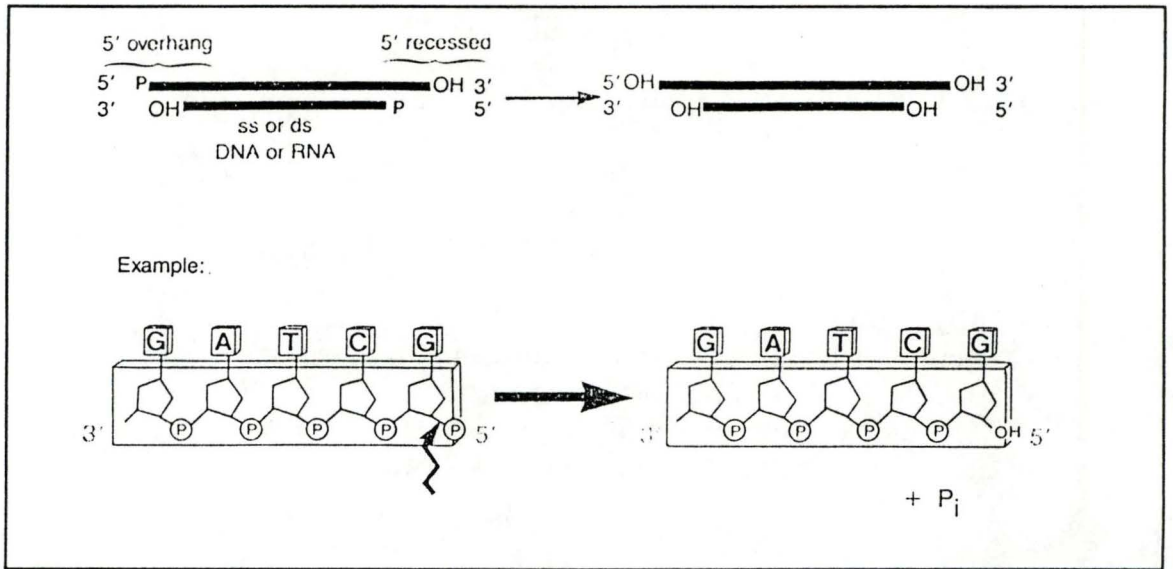


FIGURE 14 : Représentation de l'action de la phosphatase alcaline d'intestin de bovin.

différents, entre une réaction de restriction et de déphosphorylation, ou avant une ligation.

Protocole :

- Porter le volume de la solution à 200 μ l
- Ajouter 200 μ l de Phénol-Chloroforme
- Mélanger au Vortex - Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm
- Récupérer la phase supérieure
- Ajouter 500 μ l d'Ether
- Mélanger en retournant l'Eppendorf - Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm

A cette étape de purification fait suite l'étape de précipitation de l'ADN.

4.7.2. Précipitation de l'ADN

Suite au traitement au Phénol-Chloroforme, une étape de précipitation doit suivre, afin de récupérer l'ADN qui se trouve en solution.

Protocole :

- Récupérer la phase inférieure
- Ajouter 1/10 volume de NaAc 3M (ici : 20 μ l)
- Ajouter 2,5 volumes d'Éthanol 100% froid
- Incuber 15 minutes à -80°C
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Enlever le surnageant
- Rincer avec 200 μ l d'Éthanol 70% froid
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Enlever l'Éthanol
- Sécher 5 minutes au Speedvack
- Resuspendre dans un volume approprié d'eau stérile.

4.8. DÉPHOSPHORYLATION (Figure 14)

La phosphatase alcaline d'intestin de bovin (CIP) catalyse l'hydrolyse des résidus 5'-phosphate de l'ADN, l'ARN et des ribo- et désoxyribo-nucléosides triphosphates. Ainsi, un vecteur déphosphorylé est incapable d'être "ligué" sur lui-même. Donc, l'insertion de fragments d'ADN dans le vecteur est favorisée.

La CIP est fournie avec un tampon de déphosphorylation, concentré 10X.

Protocole :

- Mettre en présence les éléments suivants :
 - 10 μ l d'ADN vecteur (100 ng/ μ l)
 - 2 μ l de tampon de déphosphorylation 10X
 - 2 μ l phosphatase alcaline
 - 6 μ l eau stérile

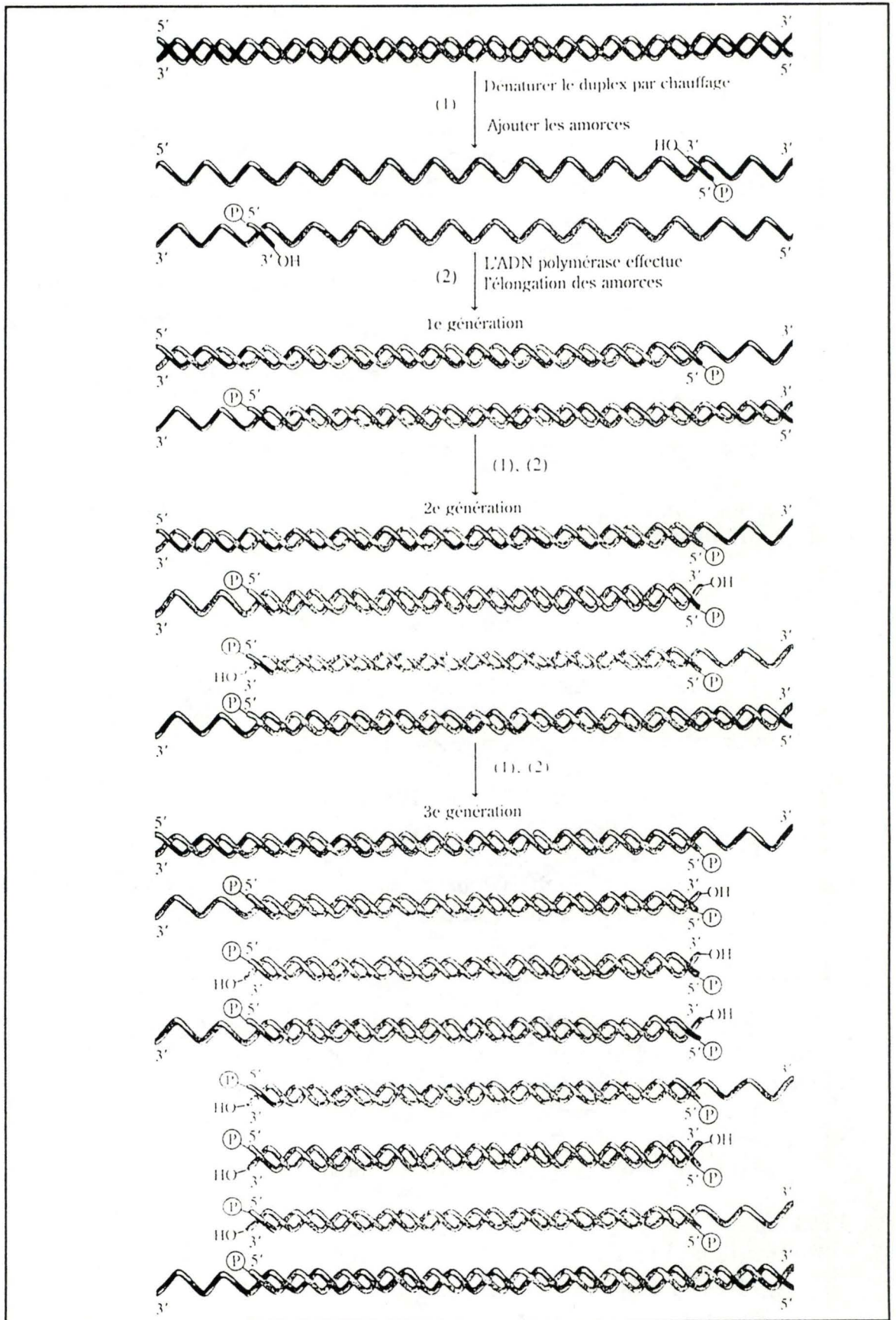


FIGURE 15 : Représentation de trois cycles de réaction de polymérisation en chaîne. (Source : Rawn, 1990)

- Incuber une heure à 37°C
- Stopper la réaction sur glace
- Ajouter 2 µl d'EGTA 200 mM
- Incuber 10 minutes à 65°C
- Purifier ensuite par un Phénol-Chloroforme, et une précipitation à l'éthanol

4.9. POLYMERASE CHAIN REACTION (Figure 15)

La PCR est un processus rapide d'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN spécifique.

Ce processus exige que l'on connaisse quelque information sur des séquences bordant un locus désiré (Ces séquences peuvent être, par exemple, tirées d'études de clonage préliminaires). Ces séquences servent à construire deux amorces oligonucléotidiques. Ces amorces vont aller s'hybrider au niveau de l'ADN cible, sur des brins opposés, orientés de sorte que leurs extrémités 3'-hydroxyle se font face.

L'ADN total est dénaturé par chauffage en présence d'un excès des deux amorces. En refroidissant, l'ADN cible se réassociera ainsi de préférence avec les amorces.

Ensuite vient l'étape d'élongation de l'amorce par synthèse d'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', en présence de nucléotides. Cette élongation est catalysée par une polymérase thermostable, isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, la Taq polymérase.

Après un cycle de synthèse, le mélange est de nouveau réchauffé pour dissocier l'ADN cible des brins néosynthétisés. Ce mélange est ensuite refroidi pour réassocier l'ADN cible (les brins néosynthétisés du cycle précédent deviennent à leur tour ADN cible) avec l'excès d'amorces en présence. Puis elles sont à nouveau soumises à l'élongation.

Le cycle est répété un grand nombre de fois (aux alentours de 30).

Le nombre total de brins d'ADN est, en théorie, doublé à chaque cycle. A partir du second cycle, le nombre de brins d'ADN dont les extrémités 5' et 3' sont l'une et l'autre définies par les amorces s'accroît en progression géométrique, tandis que le nombre de brins d'ADN portant des séquences extérieures aux amorces s'accroît, lui, en progression arithmétique. Il en résulte donc une amplification préférentielle de l'ADN bordé par les deux amorces. Au terme de la trentaine de cycles PCR, la séquence située entre les deux amorces représente la plus grosse partie de l'ADN du mélange réactionnel.

Protocole :

- Mettre en présence, dans un Eppendorf, pour une réaction dans 100 µl :
 - 4 µl MgCl₂ (50 mM)
 - 10 µl Tampon PCR (10X)
 - 2 µl dNTP Mix (10 mM chaque)
 - 5 µl détergent
 - 1 µl primer 1 (50 pmol/µl)
 - 1 µl primer 2 (50 pmol/µl)

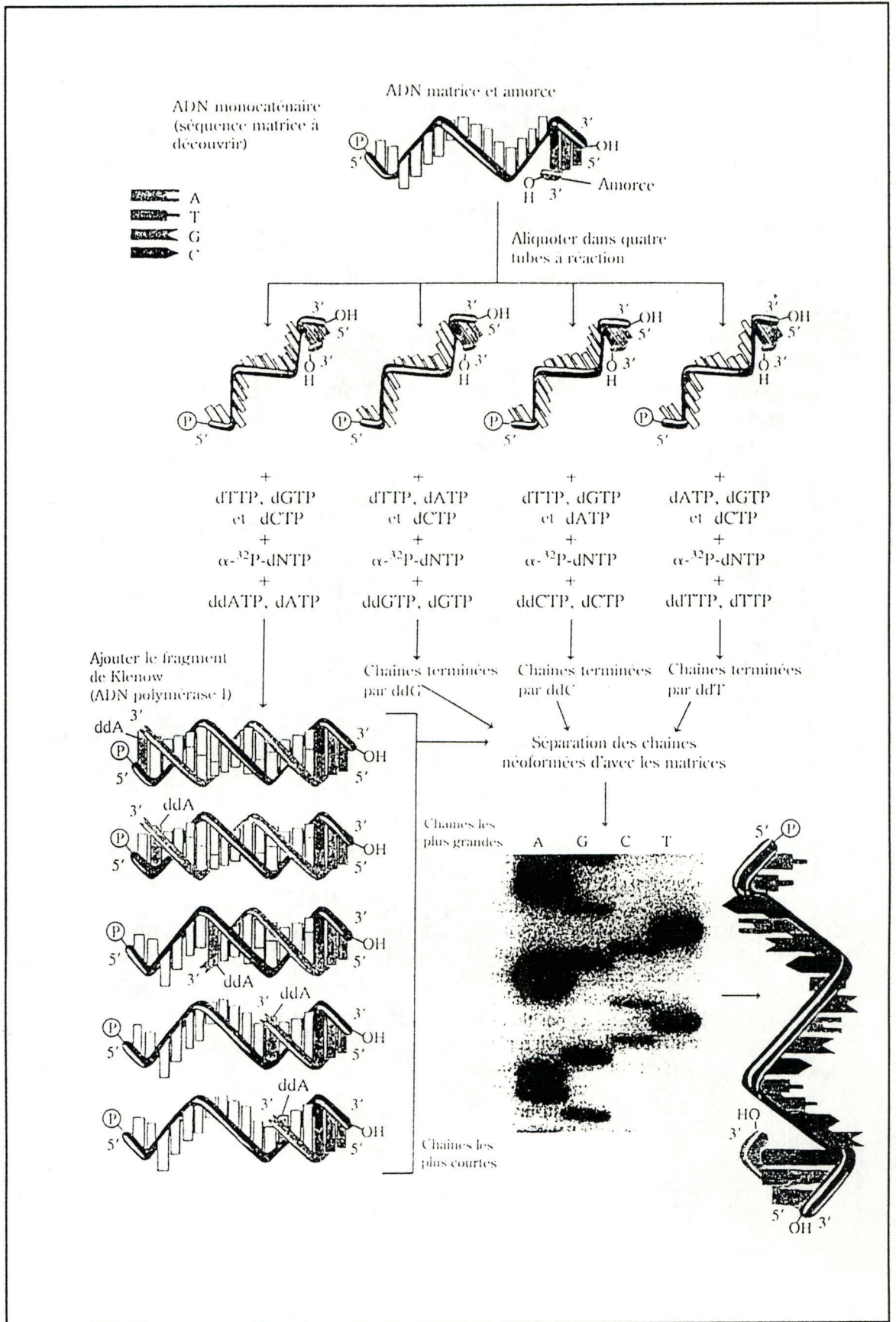


FIGURE 16 : Représentation de la méthode de Sanger pour le séquençage de l'ADN. (Source : Rawn, 1990)

- 75,6 µl H₂O
- 0,4 µl Taq (2,5 U/µl)
- 1 µl ADN à amplifier
- Réaliser les variations de températures suivantes :
 - 95°C pendant 4 minutes
 - 35 X :
 - 95°C pendant 1 minute 15 secondes
 - 55°C pendant 1 minute 15 secondes
 - 72°C pendant 3 minutes
 - 72°C pendant 10 minutes

4.10. SÉQUENCAGE (Sanger & *al.*, 1971; Figure 16)

4.10.1. Principe du séquençage

La méthode utilisée pour le séquençage est celle de Sanger. Elle repose sur l'utilisation de nucléotides triphosphates (ddNTPs, didéoxys, terminateurs de chaîne).

Les didéoxys se distinguent des dNTP par la substitution, en 3', d'un groupement hydroxyle par un Hydrogène. Ces didéoxys sont parfaitement reconnus par les ADN polymérase et sont greffés à la chaîne polynucléotidique en croissance. Cependant, comme le groupement hydroxyle leur fait défaut en 3', les didésoynucléotides sont incapables d'attaquer le nucléoside 5'-triphosphate suivant, étape nécessaire pour la formation du lien entre les nucléotides de la chaîne.

En conclusion, l'incorporation d'un ddNTP dans une chaîne d'ADN en croissance met un terme à cette croissance. En conséquence, l'introduction de petites proportions de didésoxyribonucléotides dans le milieu où s'effectue une réaction de réplication permet de terminer la synthèse d'ADN au hasard.

4.10.2. En pratique

Le séquençage selon la méthode de Sanger requiert les étapes suivantes :

- L'ADN à séquencer est isolé sous forme de molécule monocaténaire et additionné d'un court oligonucléotide complémentaire de la séquence d'ADN située du côté 3' de la séquence à déchiffrer, qui sert d'amorce au fragment Klenow de l'ADN polymérase I.
- Ce mélange est alors distribué en 4 aliquots dans 4 tubes de réaction. On introduit dans chacun :
 - la même quantité de ³⁵SdATP, qui servira à détecter l'ADN néoformé par autoradiographie
 - un excès des 4 dNTP non radioactifs
 - une petite quantité de l'un des 4 ddNTP.

Ainsi, dans le tube A, on introduit dTTP, dGTP, dCTP dATP et une petite quantité de ddATP. Dans ce tube, l'ADN polymérase I va de temps en temps incorporer un résidu de ddATP au lieu de dATP, ce qui mettra un terme à la croissance de la chaîne d'ADN. Comme le ddATP ne représente qu'une petite fraction du dATP, l'arrêt de la polymérisation se fera de façon aléatoire, donnant des chaînes de différentes longueurs se terminant toutes par un A. Dans les tubes T, G, et C, les chaînes produites se termineront par un T, un G, ou un C, respectivement. Après avoir séparé l'ADN néoformé des amorces, et séparé les produits de chaque type de réaction selon leur taille dans un gel de séquençage, on peut déduire directement la séquence en interprétant le profil du gel.

4.10.3. Protocole (T⁷⁷Sequencing™ kit Pharmacia)

4.10.3.1. Dénaturation

- Utiliser un volume d'ADN représentant 4 µg d'ADN
- Porter le volume à 8 µl
- Ajouter 2 µl de NaOH 2 N
- Incuber 10 minutes à température ambiante
- Ajouter 3 µl de NaAc 3 M pH 4,5
- Ajouter 7 µl d'eau stérile
- Ajouter 60 µl d'Éthanol 100%
- Incuber 15 minutes à -80°C
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm (Janetzski) à 4°C
- Enlever le surnageant et laver le culot avec 200 µl d'Éthanol 70%
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Retirer l'Éthanol et sécher au Speedvack

4.10.3.2. Hybridation (Annealing)

- Ajouter 10 µl d'eau stérile sur l'ADN
- Ajouter 2 µl de primer utilisé pour le séquençage, dilué à une concentration de 10 ng/µl
- Ajouter 2 µl d'Annealing Buffer

RMQ : ces trois étapes doivent se réaliser très rapidement, pour éviter un réappariement de l'ADN cible, à séquencer, et plutôt favoriser un appariement des primers avec l'ADN cible (les primers sont en excès par rapport à l'ADN cible)

- Incuber 20 minutes à 37°C
- Incuber 15 minutes à température ambiante
- Préparer quatre Eppendorfs contenant respectivement les solutions A,C,G,T fournies par le kit

4.10.3.3. Marquage radioactif (labelling)

- Ajouter, à la réaction d'annealing, sur la paroi de l'Eppendorf, 3 µl de Labelling Buffer (fourni par le kit), 1 µl de ³⁵SdATP, et 2 µl de T7 polymérase, diluée 5X dans le Dilution Buffer
- Faire un QuickSpin pour mettre les différents éléments en présence
- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter simultanément (Sur les bords de l'Eppendorf, puis faire un QuickSpin) 4,3 µl de cette solution Labelling dans chacun des quatre tubes A, C, G, T
- Incuber 5 minutes à 37°C
- Ajouter sur les bords des 4 Eppendorfs 5 µl de solution stop, puis faire un QuickSpin, de sorte que les réactions d'élongation soient arrêtées en même temps dans les 4 tubes
- Stocker éventuellement à -20°C, ou charger sur le gel

4.10.3.4. Réalisation du gel

- Nettoyer les plaques 2X avec de l'eau distillée et 2X avec de l'Éthanol
- Coater les plaques avec 10 ml de DiméthylDichloroSilane (Silicone)
- Placer les spacers
- Refermer les plaques et sceller avec du Tape
- Couler le gel, dont la composition est détaillée ci-après
- Faire une ligne de base avec deux peignes retournés
- Laisser polymériser le gel horizontalement

- Dissoudre 42 g d'Urée dans 45 ml d'eau
- Ajouter 10 ml de TBE 10X et 15 ml de solution de polyacrylamide
- Filtrer au Buchner (filtre Millipore SA78)
- Ajouter 600 µl de Persulfate et 30 µl de Temed

4.10.3.5. Migration du gel

- Préchauffer le gel 15 minutes s'il est utilisé directement après (60W) polymérisation, ou 30 minutes s'il a été conservé la nuit à 4°C
- Dénaturer l'ADN contenu dans les quatre Eppendorfs pendant 3 minutes à 90°C
- Charger le gel (4 µl par puits)
- Laisser migrer le temps désiré (60 W)

4.10.3.6. Après la migration

- Retirer la petite plaque de façon à ce que le gel reste sur la grande plaque
- Mettre délicatement une solution de fixateur sur le gel pendant 10 minutes
- Déposer doucement un buvard Whatman (3MM Chr) sur le gel afin que celui-ci se fixe dessus, tout en évitant de faire des bulles
- Recouvrir le gel transféré sur le buvard avec un film plastique

- Sécher sous vide à 80°C pendant 1 heure et 1/2
- Mettre le gel en cassette avec un film d'autoradiographie pendant 12 heures
- Révéler le film pendant 5 minutes
- Rincer à l'eau
- Fixer le film pendant 15 minutes
- Rincer à l'eau et laisser sécher

4.11. MARQUAGE DE SONDE PAR "RANDOM PRIME LABELING"

4.11.1. Principe

La méthode "Random Prime Labeling" est une méthode qui permet de marquer de l'ADN radioactivement.

Pour ce faire, il faut cliver l'ADN avec une enzyme de restriction appropriée. Si on le désire, on peut purifier le fragment d'ADN intéressant par électrophorèse en gel d'agarose et récupérer le fragment par une des méthodes décrites au point 4.3. Si la purification n'est pas nécessaire, une précipitation à l'éthanol suffit pour enlever le tampon de restriction (les ions Mg^{++} rendent l'ADN difficile à dénaturer).

Parmi les hexanucléotides aléatoires, il y en a quelques-uns qui sont complémentaires de l'ADN à marquer. Ceux-ci vont s'y hybrider au niveau de leur cible et servir d'amorces pour la synthèse d'ADN par la Klenow. Les fragments d'ADN qui seront marqués par cette méthode pourront donc avoir des tailles variables.

En pratique, il faut dénaturer l'ADN, puis le mettre en présence des hexanucléotides, des dNTP (sauf dCTP), du dCTP marqué au ^{32}P , de Klenow, et de tampon.

4.11.2. Protocole (Random Primers DNA Labeling System, commercialisé par Gibco BRL)

- Dénaturer 25 ng d'ADN cible, dans un volume total de 23 μ l en chauffant pendant 5 minutes dans un bain-marie, puis refroidir directement sur glace (faire un QuickSpin pour récupérer la vapeur)
- Réaliser les différentes additions sur glace :
 - 2 μ l de solution dATP fournie par le kit
 - 2 μ l de solution dGTP fournie par le kit
 - 2 μ l de solution dTTP fournie par le kit
 - 15 μ l de tampon fourni par le kit, comprenant les hexanucléotides
 - 5 μ l (environ 50 μ Ci) de $[\alpha\text{-}^{32}P]$ dCTP, 3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l
- Mélanger doucement
- Ajouter 1 μ l de Fragment Klenow fourni par le kit et mélanger doucement
- Incuber une heure à 25°C
- Stocker la sonde à -20°C

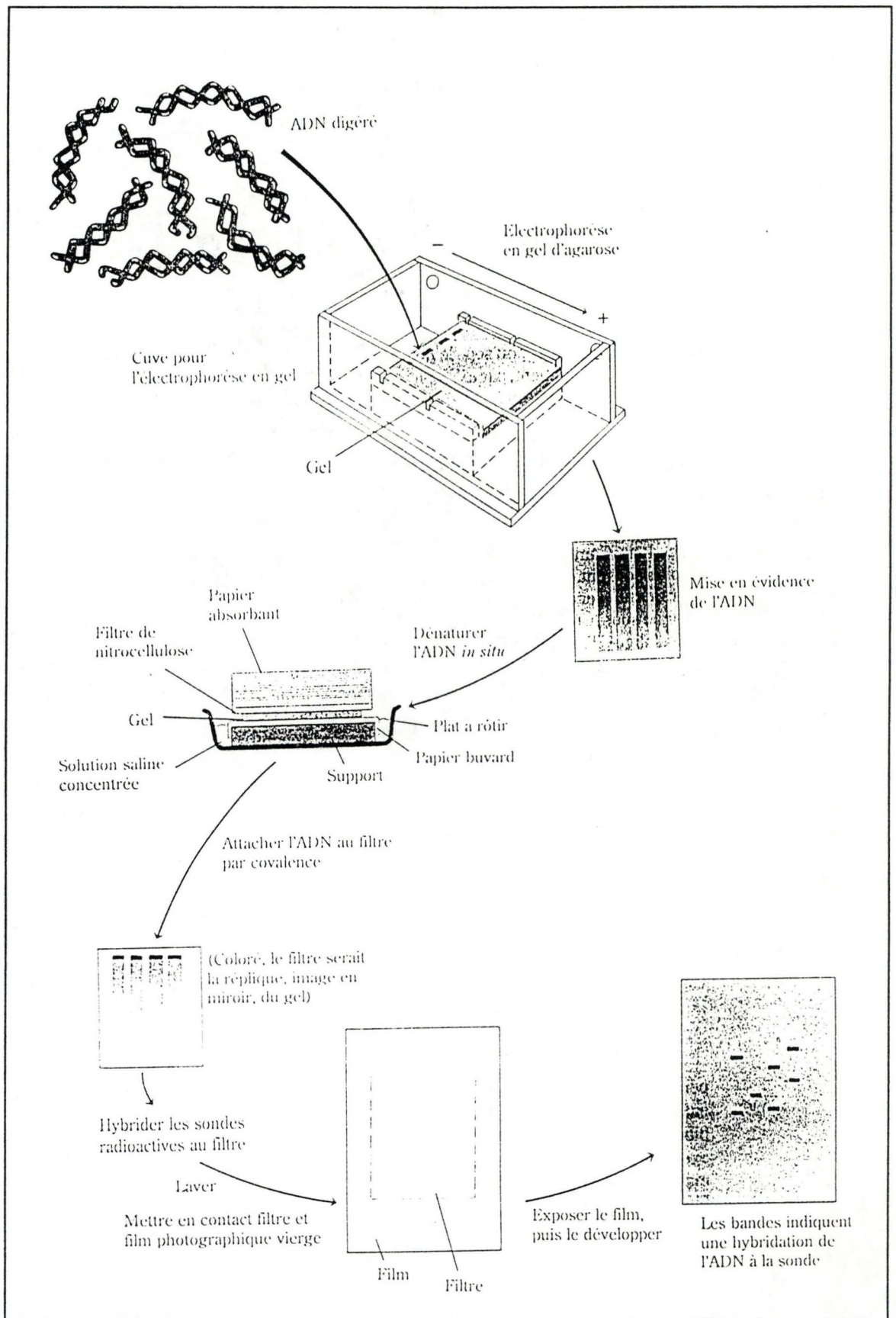


FIGURE 17 : Procédé de transfert de l'ADN sur filtre de nylon par la technique de Southern. (Source : Rawn, 1990)

4.12. SOUTHERN BLOT (Southern, 1975; Figure 17)

4.12.1. Définition

Le Southern Blot est une méthode d'analyse de l'ADN imaginée par Southern en 1975, pour visualiser les gènes ou toute séquence d'ADN génomique par hybridation d'une sonde spécifique marquée avec des fragments de restriction de DNA, préalablement séparés par électrophorèse, dénaturés et transférés sur une membrane.

4.12.2. Principe

L'ADN génomique est complètement digéré par une ou plusieurs endonucléases de restriction.

Les fragments d'ADN bicaténaires sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose. La coloration par le bromure d'éthidium permet, sans interférer sur la suite des opérations, de contrôler la qualité du DNA, de la migration et de la digestion enzymatique, trois paramètres très importants pour le résultat final. L'hybridation de la sonde est impossible au niveau du gel d'agarose, notamment à cause de la température nécessaire pour l'hybridation. L'idée de Southern a donc été de transférer l'ADN sur un support solide. A l'origine, le support solide était de la nitrocellulose ; on lui préfère maintenant le nylon, qui est nettement moins fragile. Le principe du transfert de l'ADN du gel d'agarose vers le nylon repose sur le phénomène de capillarité, d'où son nom de blotting.

En pratique, après la migration, le gel est agité doucement dans une solution d'Hydroxyde de Sodium qui diffuse à l'intérieur du gel, casse l'ADN en fragments courts (étape importante pour l'efficacité du transfert) et dénature l'ADN sous forme simple brin (indispensable pour l'hybridation ultérieure).

Intervient alors l'étape de transfert. Pour cela, le gel est déposé sur un système assurant son hydratation en continu par une solution de haute concentration saline et est recouvert de la membrane de nylon. Le tout est recouvert d'un épais paquet de papier très hydrophile absorbant le liquide contenu dans le gel d'agarose, créant un courant liquidien ascendant qui entraîne avec lui l'ADN. Toutes ces conditions assurent l'immobilisation de l'ADN sur le filtre, au point de contact entre le gel et le filtre, créant ainsi une réplique parfaite du gel. L'ensemble de ces opérations permet de récupérer la totalité du génome, séparé en fragments de taille parfaitement définie, supportant très bien les traitements nécessaires à l'hybridation.

Mais avant, une étape préalable est nécessaire : la préhybridation. En effet, le DNA transféré n'a saturé qu'une faible proportion des sites de fixation potentiels de la membrane. Si la sonde radioactive était apportée avant cette étape, elle irait directement se fixer sur ces sites plutôt que d'aller s'hybrider sur les séquences complémentaires de l'ADN génomique. La préhybridation a pour but de saturer tous ces sites non spécifiques par de l'ADN hétérologue (ADN de thymus de veau, ADN de sperme de saumon).

L'hybridation est ensuite pratiquée, dans des conditions de stringence données.

La membrane est alors lavée, pour enlever l'excès de sonde. C'est une étape critique, qui dépend des conditions de stringences que l'on impose (température, salinité) : une solution très saline est peu stringente; une solution peu saline est très stringente. Des conditions trop stringentes peuvent engendrer une déshybridation totale, alors que des conditions trop peu stringentes augmentent le bruit de fond. Un compromis doit donc être trouvé pour optimiser le rapport signal/bruit. En pratique, le lavage est progressif, et la stringence augmentée au cours des lavages successifs.

Au terme de ces lavages, on peut mettre en évidence, par autoradiographie du filtre, la position à laquelle s'est effectuée une liaison spécifique de la sonde.

4.12.3. Protocole

4.12.3.1. Restriction

Lancer les restrictions avec 1 µg d'ADN génomique. Charger le gel d'agarose 1% avec tout le volume de la restriction. Faire migrer suffisamment longtemps que pour avoir une bonne séparation des brins d'ADN.

4.12.3.2. Dénaturation

Immerger le gel pendant deux fois 1/4 d'heure dans un tampon de dénaturation. Transférer ensuite 1/4 d'heure dans le tampon de neutralisation.

4.12.3.3. Transfert

Réaliser le montage expliqué à la figure 17. Le transfert dure environ 5 heures.

4.12.3.4. Préhybridation

Déposer le filtre dans 100 ml de solution de préhybridation dans une boîte fermée. Incuber sous agitation une heure à 68°C.

4.12.3.5. Hybridation

Dénaturer les sondes pendant 3 minutes à 100°C, les déposer dans le tampon de préhybridation (50 µl de sondre *Dra*I, 1 µl de sonde contrôle λ *Hind*III). Incuber pendant 3-4 heures à une température de 68°C sous agitation

4.12.3.6. Lavages

Récupérer le liquide contenant l'excès de sonde.

Premier lavage : 15 minutes avec une solution SSC 2X, SDS 0,1% à température ambiante.

Second lavage : 15 minutes avec la même solution à température ambiante.

Sécher le filtre sur papier Whatman.

4.12.3.7. Autoradiographie

Mettre le filtre dans une cassette avec amplificateur pendant 48 heures à -80°C .

5. TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTÉINES

5.1. PRÉPARATION D'UN EXTRAIT DE PROTÉINES SOLUBLES DE LEVURE

Dans le cadre de ce travail, c'est la méthode de lyse mécanique aux billes de verre qui a été utilisée. Les cellules sont lysées dans un tampon adapté à l'usage que l'on désire faire de l'extrait protéique. Dans le cas d'un dosage enzymatique, les cellules sont lavées puis lysées dans le tampon utilisé au cours du dosage. Donc, la préparation des extraits protéiques pour le dosage de l'activité β -galactosidase fera intervenir des lavages et la lyse dans le tampon β -gal.

Les protéines obtenues par cette méthode de purification seront également utilisables pour une séparation électrophorétique en SDS-PAGE, pour le Western Blot.

Protocole :

LAVAGES

- 50 ml de cultures sont prélevés (DO_{600nm} : 0.4-1.0), mis sur glace, dans un tube Falcon, pour arrêter la croissance des cellules.
- Les Falcon sont centrifugés 5 minutes à 3000 rpm à 4°C
- Les cellules (dans le culot) sont resuspendues dans 1 ml de tampon β -gal froid, puis transférées dans un Eppendorf
- Centrifugation 5 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Resuspendre dans 1 ml de tampon β -gal
- Centrifugation 5 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Resuspendre dans 500 μ l de tampon β -gal froid

LYSE DES CELLULES

- Ajouter 500 μ l de billes de verre (\varnothing : 0.3-0.4 mm)
- Agiter au vortex pendant 6 minutes
- Centrifuger 10 minutes à 10000rpm à 4°C
- Le surnageant contient les protéines

5.2. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ β -GALACTOSIDASE

5.2.1. Principe

Le substrat chromogénique utilisé est l'ONPG (ortho-nitrophényl- β -D-galactoside). Sous l'action de la β -galactosidase, l'ONPG est dégradé en D-galactose et en ONP (ortho-nitrophénol). L'ONP est un composé coloré (jaune) qui absorbe à 420nm. Une mesure de l' A_{420nm} au spectrophotomètre permet donc la quantification de l'activité β -galactosidase. L'activité spécifique de β -galactosidase (mU/mg) est calculée comme suit :

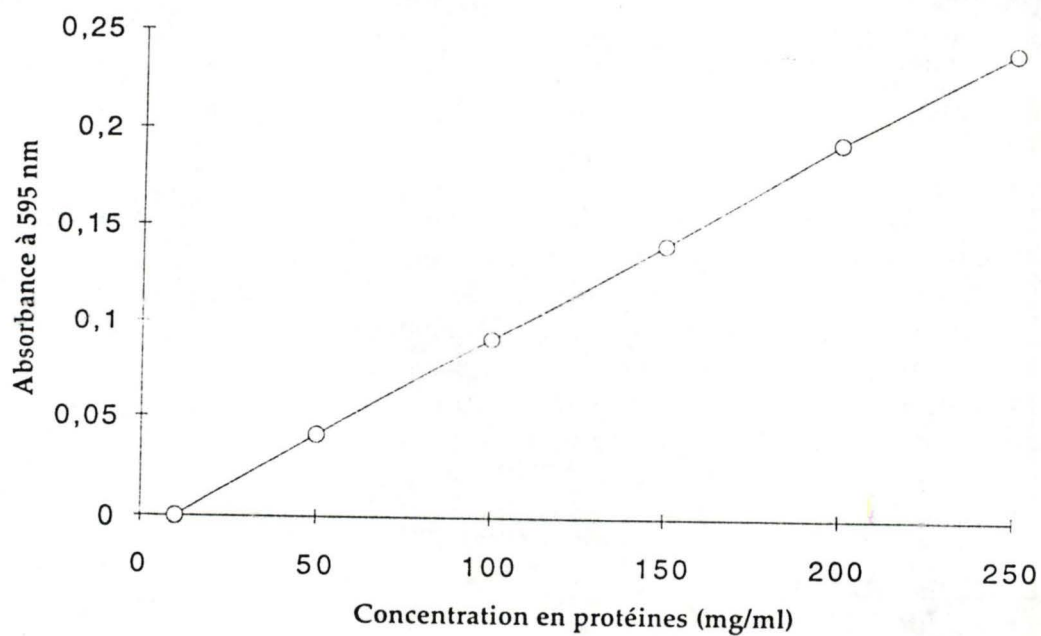


FIGURE 18 : Courbe d'étalonnage réalisée pour le dosage protéique par la méthode de Bradford.

$$\frac{[(\Delta A_{420\text{nm}}/\text{min})/(\text{coef. ext.})]}{[\text{Quantité de protéines utilisées pour l'assay, en mg}]}$$

Le coefficient d'extinction est déterminé à partir de valeurs d'absorbance standards. Il a une valeur de 0,0045 mU/(OD/min).

5.2.2. En pratique

Dans 1 ml d'ONPG (4 mg/ml) à une température de 30°C, on met une quantité connue d'extrait protéique (maximum 100 µl).

Des mesures d' $A_{420\text{nm}}$ sont effectuées toutes les 30 secondes, pendant 3 minutes. La vitesse de la réaction ($\Delta A_{420\text{nm}}/\text{min}$) est proportionnelle à l'activité β -galactosidase présente dans l'extrait.

5.3. DOSAGE DES PROTÉINES

La méthode utilisée est celle de Bradford. Elle repose sur la quantification de la liaison du Bleu de Coomassie à un échantillon protéique par rapport à une protéine standard, qui est d'habitude la BSA (Sérum Albumine Bovine). Cette méthode permet la quantification de 1 à 10 µg de protéines.

Protocole :

- Ajouter 1 ml de réactif de Bradford à 20 µl d'échantillon
- Laisser 15 minutes à température ambiante
- Lire l' $A_{595\text{nm}}$ et se référer à une courbe d'étalonnage pour quantifier les protéines de l'échantillon (Figure 18)

5.4. DÉTECTION IMMUNOLOGIQUE DE PROTÉINES IMMOBILISÉES (WESTERN BLOT)

5.4.1. Principe

Le Western Blot est aux protéines ce que le Southern Blot est à l'ADN. En effet, dans chacune des deux techniques, des fragments sont séparés par électrophorèse en fonction de leur taille, puis transférés du gel vers un support solide, et enfin détectés par des réactifs spécifiques d'une certaine séquence en acides aminés (Western) ou en nucléotides (Southern).

Dans le cas du Western Blot, la "sonde spécifique" est le plus souvent un anticorps, qui est spécifique d'un antigène présenté par la protéine d'intérêt, fixée sur le support solide. Cet anticorps primaire est marqué radioactivement ou alors détecté par une enzyme (peroxydase, phosphatase alcaline) couplée à l'anticorps secondaire, anti-IgG. Des substrats chromogéniques ou luminescents de ces enzymes sont alors utilisés pour visualiser leur activité *in situ*.

5.4.2. Protocole

5.4.2.1. Séparation électrophorétique des échantillons

5.4.2.1.1. Principe

Comme pratiquement toutes les électrophorèses protéiques, la séparation des protéines pour le Western Blot se fera dans des conditions qui assurent la dissociation des protéines en leur sous-unités polypeptidiques. Ces conditions regroupent l'action de la chaleur, du SDS, et d'un agent réducteur.

Les protéines dénaturées se lient au SDS, chargé négativement. Etant donné que la quantité de SDS liée à la protéine est toujours proportionnelle au poids moléculaire de la protéine, les complexes polypeptide-SDS migreront dans le gel uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

En utilisant des marqueurs de poids moléculaire connu, il devient alors possible d'estimer la taille des polypeptides. Dans le cas du Western Blot, on utilisera de façon préférentielle des marqueurs de PM précolorés. Ainsi, on pourra connaître l'orientation de la membrane et la taille des protéines après sa coloration.

5.4.2.1.2. Protocole

PREPARATION DES PROTEINES

- A 100 µl d'échantillon, on ajoute 100 µl de Solution SB 2X concentrée
- Dénaturer 10 minutes à 95°C
- En fonction de la quantité de protéines contenues dans l'échantillon, déterminée par un Bradford, calculer le volume à déposer sur le gel de façon à avoir 40 mg de protéine.

PREPARATION DU GEL

- Laver les plaques de verre à l'eau puis à l'Éthanol
- Assembler les plaques, disposer les Spacers, sceller avec de l'Agarose 1%
- Couler le Running Gel, ou gel de migration, qui servira à séparer les protéines en fonction de leur PM
- Laisser polymériser le gel en le couvrant d'1 ml d'Isopropanol
- Enlever l'Isopropanol, rincer deux fois avec le Stacking gel, puis couler le Stacking gel, ou gel d'empilement, qui servira à tasser la solution de protéines en une très fine bande
- Mettre un peigne, pour faire les puits
- Laisser polymériser
- Enlever le peigne et le Spacer du bas
- Remplir le haut et le bas du gel avec le tampon de migration
- Charger les protéines (max : 50 µl) et le marqueur de poids moléculaire (Sigma, HMW, prestained)
- Laisser migrer une nuit à 50 V

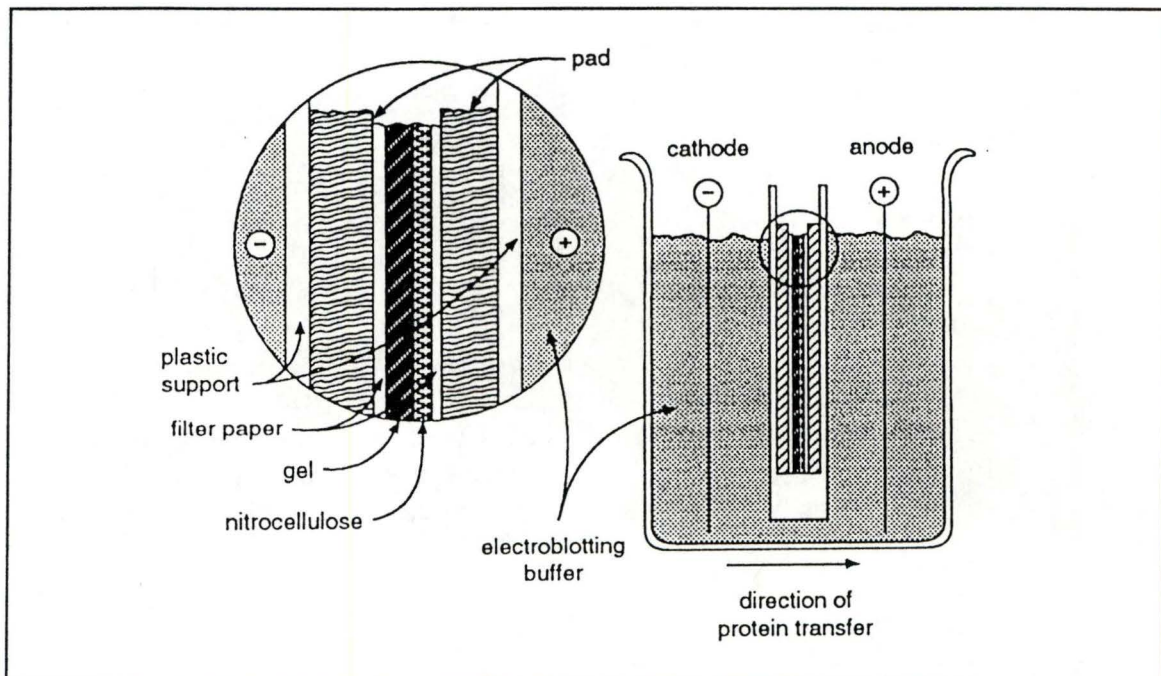


FIGURE 19 : Représentation du dispositif utilisé pour la réalisation du Western Blot

5.4.2.2. Transfert des protéines (Figure 19)

Quand la migration est terminée, démouler le gel protéique, enlever le gel d'empilement, et déposer le gel de migration dans le tampon de transfert.

Mettre la membrane de nylon (Millipore Immobilon P) 1-5 secondes dans du méthanol, rincer dans H₂O, puis la déposer dans le tampon de transfert.

Réaliser le montage suivant dans le tampon de transfert pour éviter les bulles :

Grille de plastique
Feutre
3X Whatman
Gel
Membrane
3X Whatman
Feutre
Grille de plastique

Disposer le tout verticalement dans la cuve de transfert remplie de tampon de transfert, le gel du côté négatif.

Le transfert se fait en chambre froide, sous agitation mécanique du tampon de transfert, à 55V pendant 2 heures et demie.

5.4.2.3. Liaison de l'anticorps primaire sur la protéine cible

Une fois le transfert terminé, récupérer la membrane de nylon, la déposer dans du PBSTB pendant une heure et demie, pour la stabiliser.

Reprendre la membrane, la déposer entre deux feuilles de plastique, sceller 3 des 4 côtés. Ajouter l'anticorps primaire dilué 2000X dans du PBSTB (10 ml). Sceller le 4^{ème} côté.

Incuber minimum deux heures en agitant.

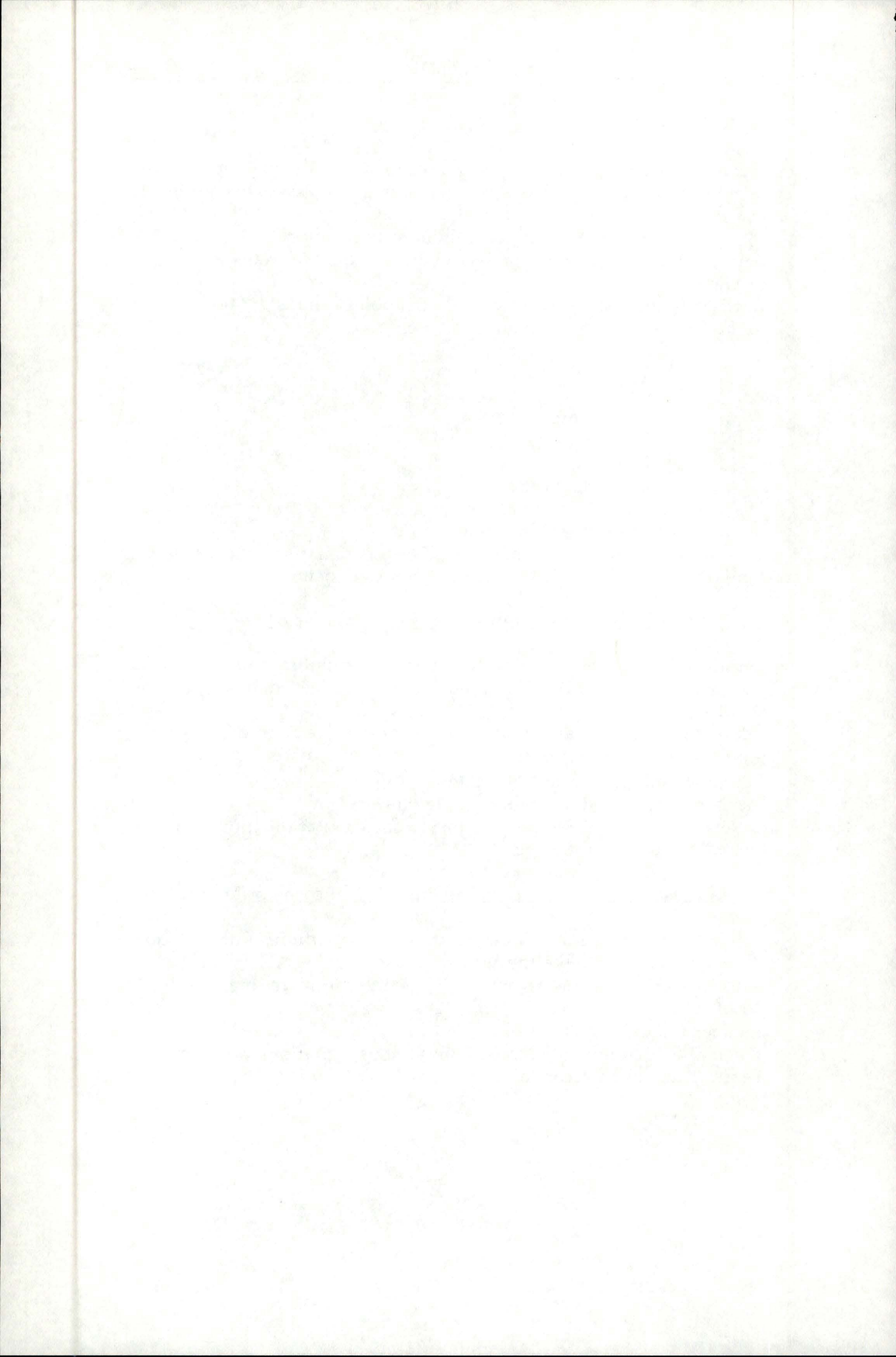
Laver 3X 10 minutes avec du PBST, sous agitation, pour enlever l'excès d'anticorps primaire.

5.4.2.4. Liaison de l'anticorps secondaire sur l'anticorps primaire

Ajouter l'anticorps secondaire (Blotting Grade Affinity Purified Goat Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Conjugate Human IgG Adsorbed) de la même façon que l'anticorps primaire, mais le diluer 3000X.

Incuber une heure.

Laver 3X 10 minutes avec du PBST, sous agitation, pour enlever l'excès d'anticorps secondaire.



5.4.2.5. Détection de l'anticorps secondaire

Déposer la membrane dans DIGP3 pendant 2 minutes.

Transférer la membrane dans la solution de coloration, pendant le temps désiré. Le substrat (BCIP/NBT) est converti *in situ* en un composé bleu très dense par l'action de la phosphatase alcaline.

Arrêter la réaction en déposant la membrane dans du tampon TE 1X.

Laisser sécher la membrane entre deux Whatman.

BIBLIOGRAPHIE

1. Angrand, P.-O. (1993) Les domaines de liaison de l'ADN des facteurs de transcription eucaryotes. *médecine/sciences* 9 : 725-736.
2. Bajwa, W., Torchia, T.E. and Hopper, J.E. (1988) Yeast regulatory gene *GAL3* : Carbon regulation; UAS_{Gal} elements in common with *GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL80*, and *MEL1*; encoded protein strikingly similar to yeast and *Escherichia coli* galactokinases. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 3439-3447.
3. Balasubramanian, B., Lowry, C.V. and Zitomer, R.S. (1993) The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 6071-6078.
4. Bhat, P.J. and Hopper, J.E. (1992) Overproduction of the *GAL1* or *GAL3* protein causes galactose independent activation of the *GAL4* protein : evidence for a new model of induction for the yeast *GAL/MEL* regulon. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 2701
5. Bianchi, M.M., Falcone, C., Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M., Frontali, L. and Fukuhara, H. (1987) Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 μ m circular plasmid pKD1. *Curr. Genet.* 12 : 185-192.
6. Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321 : 209-213.
7. Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L. and Lacroute, F. (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S.cerevisiae/E.coli* shuttle vectors. *Yeast* 7 : 609-615.
8. Breunig, K.D. (1989) Glucose repression of *LAC* gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator *LAC9*. *Mol. Gen. Genet.* 216 : 422-427.
9. Breunig, K.D. and Kuger, P. (1987) Functional homology between the yeast regulatory proteins *GAL4* and *LAC9* : *LAC9*-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the *GAL4* protein-binding site. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 4400-4406.
10. Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue : a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β -galactosidase section. *Biotechniques* 5 : 376-379.

11. Buratowski, S. (1994) The basics of basal transcription by RNA Polymerase II. *Cell* **77** : 1-3.
12. Cassart, J.-P., Georis, I., Östling, J., Ronne, H. and Vandenhoute, J. (1995) The MIG1 repressor from *Kluyveromyces lactis* : cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **371** : 191-194.
13. Chen, X.J., Saliola, M., Falcone, C., Bianchi, M.M. and Fukuhara, H. (1986) Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces drosophilorum*. *Nucleic Acids Res.* **14** : 4471-4481.
14. Chouard, T. et Yaniv, M. (1994) Le contrôle de l'expression des gènes. *La Recherche* **25** : 626-635.
15. Czyz, M., Nagiec, M.M. and Dickson, R.C. (1993) Autoregulation of GAL4 transcription is essential for rapid growth of *Kluyveromyces lactis* on lactose and galactose. *Nucleic Acids Res.* **21** : 4378-4382.
16. Das, S., Breunig, K.D. and Hollenberg, C.P. (1985) A positive regulatory element is involved in the induction of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis*. *EMBO J.* **4** : 793-798.
17. Dickson, R.C. and Markin, J.S. (1980) Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **142** : 777-785.
18. Dickson, R.C., Gerardo, C.J. and Martin, A.K. (1990) Genetic evidence for similar negative regulatory domains in the yeast transcription activators GAL4 and LAC9. *Nucleic Acids Res.* **18** : 5213-5217.
19. Dowzer, C.E.A., and Kelly, J.M. (1991) Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **11** : 5701-5709.
20. Dretzen, G., Ballard, M., Sassone-Corsin, P. and Chambon, P. (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **12** : 2523-2528.
21. Drysdale, M.R., Kolze, S.E. and Kelly, J.M. (1993) The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *cre A*. *Gene* **130** : 241-245.
22. Entian, K.-D. and Barnett, J.A. (1992) Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.* **17** : 506-510.
23. Flick, J.S. and Johnston, M. (1990) Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10** : 4757-4769.

24. Gancedo, J.M. (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **206** : 297-313.
25. Gödecke, A., Zachariae, W., Arvanitidis, A. and Breunig, K.D. (1991) Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2,6 kbp divergent promoter. *Nucleic Acids Res.* **19** : 5351-5358.
26. Griggs, D.W. and Johnston, M. (1991) Regulated expression of the *GAL4* activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** : 8597-8601.
27. Guarente, L. and Mason, T. (1983) Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32** : 1279-1286.
28. Guarente, L. (1984) Yeast promoters : positive and negative elements. *Cell* **36** : 799-800.
29. Hedges, D., Proft, M. and Entian, K.-D. (1995) *CAT8*, a new Zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15** : 1915-1922.
30. Heidmann, S., Schindewolf, C., Stumpf, G. and Domdey, H. (1994) Flexibility and interchangeability of polyadenylation signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14** : 4633-4642.
31. Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2** : 163-167.
32. Ip, T.Y. (1995) Converting an activator into a repressor. *Curr. Biol.* **5** : 1-3.
33. Jean-Jean, O., Cassan, M. and Rousset, J.-P. (1993) L'initiation de la traduction chez les eucaryotes, source de diversification et de modulation de l'expression des gènes. *médecine/sciences* **9** : I-XI.
34. Johnston, M. (1987) A model fungal gene regulatory mechanism : the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51** : 458-476.
35. Johnston, M. and Carlson, M. (1992) Regulation of carbon and phosphate utilisation.
in : The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* : gene expression, Volume II; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
36. Johnston, M., Flick, J.S. and Pexton, T. (1994) Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of *GAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14** : 3834-3841.

37. Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M. and Johnson, A.D. (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* **68** : 709-719.
38. Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266** : 15555-15558.
39. Kern, L., de Montigny, J., Jund, R. and Lacroute, F. (1990) The *FUR1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* : cloning, structure and expression of wild-type and mutant alleles. *Gene* **88** : 149-157.
40. Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eucaryotic ribosomes. *Cell* **44** : 283-292.
41. Kozak, M. (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eucaryotic ribosomes. *Nucleic Acids. Res.* **9** : 5233-5250.
42. Kuger, P., Gödeke, A. and Breunig, K.D. (1990) A mutation in the Zn-finger of the GAL4 homolog LAC9 results in glucose repression of its target genes. *Nucleic Acids Res.* **18** : 745-751.
43. Kuzhandaivelu, N., Jones, W.K., Martin, A.K. and Dickson, R.C. (1992) The signal for glucose repression of the lactose-galactose regulon is amplified through subtle modulation of transcription of the *Kluyveromyces lactis* *KI-GAL4* activator gene. *Mol. Cell. Biol.* **12** : 1924-1931.
44. Lamphier, M.S. and Ptashne, M. (1992) Multiple mechanisms mediate glucose repression of the yeast *GAL1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** : 5922-5926.
45. Lewin, B.
in : *Genes V* (1994); Oxford University Press (847-897).
46. Lombardo, A., Cereghino, G.P. and Scheffler, I.E. (1992) Control of mRNA turnover as a mechanism of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12** : 2941-2948.
47. de Louvencourt, L., Fukuhara, H., Heslot, H. and Wesolowski, M. (1983) Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **154** : 737-742.
48. Lundin, M., Nehlin, J.O. and Ronne, H. (1994) Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.* **14** : 1979-1985.

49. Majumder, S. and DePamphilis, M.L. (1995) A unique role for enhancers revealed during early mouse development. *Bioessays* 17 : 879-889.
50. Matern, H. and Holzer, H. (1977) Catabolite inactivation of the galactose uptake system in yeast. *J. Biol. Chem.* 252 : 6399-6402.
51. Meyer, J., Walker-Jonah, A. and Hollenberg, C.P. (1990) GAL1 of *Kluyveromyces lactis* is required for the induction of the Leloir enzymes and can complement the *gal3* long term adaptation-phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6 : 591.
52. Meyer, J., Walker-Jonah, A. and Hollenberg, C.P. (1991) Galactokinase encoded by GAL1 is a bifunctional protein required for induction of the GAL genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the *gal3* phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 5454-5461.
53. Mulder, W. (1994) A comparative study of transcriptional regulation of genes encoding mitochondrial components in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. Thesis Universiteit van Amsterdam.
54. Nehlin, J.O., Carlberg, M. and Ronne, H. (1989) Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. *Gene* 85 : 313-319.
55. Nehlin, J.O. and Ronne, H. (1990) Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J.* 9 : 2891-2898.
56. Nehlin, J.O., Carlberg, M. and Ronne, H. (1991) Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor : a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* 10 : 3373-3377.
57. Nehlin, J.O., Carlberg, M. and Ronne, H. (1992) Yeast SKO1 gene encodes a bZIP protein that binds to the CRE motif and acts as a repressor of transcription. *Nucleic Acids Res.* 20 : 5271-5278.
58. Oliver, S.G. and Warmington, J.R
in : The yeasts (1989); Academic Press Inc. (117-152).
59. Östling, J., Carlberg, M. and Ronne, H. (1995) Functional domains in the Mig1 repressor. *Mol. Cell. Biol.* Submitted for publication..
60. Pan, T. and Coleman, J.E. (1990) GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 2077-2081.

61. Pavletich, N.P. and Pabo, C.O. (1991) Zinc finger-DNA recognition : crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1Å. *Science* **252** : 809-817.
62. Rawn, J.D.
in : *Traité de biochimie* (1990); De Boeck Université (887-936).
63. Rhodes, D. and Klug, A. (1993) Zinc fingers. *Sci. Am.* 32-39.
64. Riley, M.I. and Dickson, R.C. (1984) Genetic and biochemical characterization of the galactose gene cluster in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **158** : 705-712.
65. Ronne, H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* **11** : 12-17.
66. Roth, S.Y. (1995) Chromatin-mediated transcriptional repression in yeast. *Curr. Op. Gen. Dev.* **5** : 168-173.
67. Rothstein R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101** : 202-211.
68. Russo, P., Li, W.-Z., Guo, Z. and Sherman, F. (1993) Signals that produce 3' termini in *CYC1* mRNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13** : 7836-7849.
69. Ruzzi, M., Breunig, K.D., Ficca, A.G. and Hollenberg, C.P. (1987) Positive regulation of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an upstream activation site that shows homology to the *GAL* upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 991-997.
70. Salmeron, J.M., Jr. and Johnston, S.A. (1986) Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene *LAC9* reveals functional homology to, but sequence divergence, from the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* gene. *Nucleic Acids Res.* **14** : 7767-7781.
71. Salmeron, J.M., Jr., Langdon, S.D. and Johnston, S.A. (1989) Interaction between transcriptional activator protein *LAC9* and negative regulatory protein *GAL80*. *Mol. Cell. Biol.* **9** : 2950-2956.
72. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1971) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 5463-5467.
73. Sheetz, R.M. and Dickson, R.C. (1981) *LAC4* is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **98** : 729-745.
74. Sheldon, M. and Reinberg, D. (1995) Tuning-up transcription. *Curr. Biol.* **5** : 43-46.

75. Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122** : 19-27.
76. Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** : 503-517.
77. Struhl, K. (1987) Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* **49** : 295-297.
78. Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56** : 619-630.
79. Tjian, R. (1995) Molecular machines that control genes. *Sci. Am.* 38-45.
80. Tjian, R. and Maniatis, T. (1994) Transcriptional activation : a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77** : 5-8.
81. Treitel, M.A. and Carlson, M. (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 3132-3136.
82. Trumbly, R.J. (1992) Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6** : 15-21.
83. Tschopp, J.F., EMR, S.D., Field, C. and Schekman, R. (1986) *GAL2* codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **166** : 313-318.
84. Tzamarias, D. and Struhl, K. (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature* **369** : 758-761.
85. Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M.
in : *Recombinant DNA* (1992); Scientific American Books (153-174).
86. Webster, T.D. and Dickson, R.C. (1988a) Nucleotide sequence of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.* **16** : 8192-8194.
87. Webster, T.D. and Dickson, R.C. (1988b) The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.* **16** : 8011-8028.
88. Williams, F.E., Varanasi, U. and Trumbly, R.J. (1991) The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Mol. Cell. Biol.* **11** : 3307-3316.
89. Wolffe, A.P. (1994a) Switched-on chromatin. *Curr. Biol.* **4** : 525.

90. Wolffe, A.P. (1994b) Transcription : in tune with the histones. *Cell* 77 : 13-16.
91. Wray, L.V., Jr., Witte, M.M., Dickson, R.C. and Riley, M.I. (1987) Characterization of a positive regulatory gene, *LAC9*, that controls induction of the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis* : structural and functional relationships to *GAL4* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 1111-1121.
92. Zachariae, W. and Breunig, K.D. (1993a) Expression of transcriptional activator *LAC9* (*KIGAL4*) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 3058-3066.
93. Zachariae, W., Kuger, P. and Breunig, K.D. (1993b) Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator *LAC9* (*KIGAL4*). *Nucleic Acids Res.* 21 : 69-77.
94. Zaror, I., Marcus, F., Moyer, D.L., Tung, J. and Shuster, J.R. (1993) Fructose-1,6-bisphosphatase of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Biochem.* 212 : 193-199.
95. Zenke, F.T., Zachariae, W., Lunkes, A. and Breunig, K.D. (1993) Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 7566-7576.