



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Etude du rôle de l'ARNm triphosphatase PCT1 dans la transcription par l'ARN polymérase II chez *Schizosaccharomyces pombe*

Genevrois, Julie

*Award date:*  
2007

[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.



---

**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX**

**NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**ETUDE DU ROLE DE L'ARN<sup>m</sup> TRIPHOSPHATASE PCT1 DANS LA  
TRANSCRIPTION PAR L'ARN POLYMERASE II CHEZ  
*SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***

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

Julie GENEVROIS

Juin 2007

## Etude du rôle de l'ARNm triphosphatase Pct1 dans la transcription par l'ARN polymérase II chez *Schizosaccharomyces pombe*

GENEVROIS Julie

### Résumé

Le coiffage de l'extrémité 5' des ARNm est un processus commun à tous les messagers eucaryotes. Trois activités enzymatiques sont nécessaires à cette modification : les activités triphosphatase (T), guanylyltransférase (G) et méthylase (M). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, des immunoprécipitations de chromatine ont révélé que ces trois protéines du coiffage 5' sont majoritairement localisées dans les régions 5' des gènes étudiés, précisément à l'endroit où prend place le processus co-transcriptionnel d'ajout de la coiffe, et présentent un profil dégressif vers les régions 3'. Chez *Schizosaccharomyces pombe*, la guanylyltransférase et la méthylase présentent des profils d'occupation remarquablement similaires entre eux ainsi qu'à leurs homologues chez *S. cerevisiae*. Une expérience pilote a révélé que la triphosphatase (Pct1) présente un profil non dégressif, similaire à celui de l'ARN polymérase II, suggérant un rôle potentiel de la triphosphatase en cours d'élongation.

Le premier objectif de ce mémoire était l'optimisation du protocole d'immunoprécipitation chromatinienne. Deux étapes étaient particulièrement ciblées : la sonication et l'immunoprécipitation. Nous avons montré que le « biorupteur » et l'utilisation de billes magnétiques pourront remplacer avantageusement la sonication et les billes de sépharose.

Dans un second temps, nous avons confirmé le profil non dégressif de Pct1 sur 3 gènes distribués sur les 3 chromosomes de *S. pombe* et transcrits constitutivement (*act1*, *pma1* et *adh1*). Pour étudier les rôles potentiels de Pct1 lors de l'élongation, un mutant de déplétion a été construit mais s'est révélé inefficace. Comme alternative, nous avons entrepris la construction d'un allèle thermosensible de *pct1* qui devrait nous permettre d'inactiver la protéine à température élevée.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur J. Vandenhoute, promoteur de ce mémoire, ainsi que D. Hermand de m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Merci pour avoir consacré une partie de votre temps, ô combien précieux, à la correction de ce mémoire ainsi que pour vos conseils avisés.

Un grand merci à Monique; riieuse inconditionnelle et toujours là quand on a besoin d'elle (occupée ou pas, peu importe...). Qu'aurais-je fait sans ton aide et tes conseils si précieux ?

Merci à Allan de « m'avoir préparé le terrain » et de m'avoir conseillée, même si ce fut de courte durée. Je comprends bien que ton esprit était ailleurs. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Comment pourrais-je oublier « Maxou », mon bourreau ;o) !?! Avec ces innombrables rigolades et bons moments que nous avons partagés durant ces deux derniers mois! Merci pour ton aide, ta bonne humeur, ta gentillesse... (liste non exhaustive... :o)).

Je n'oublie pas ma petite bande de joyeux lurons avec qui j'ai passé de très bons moments (J'espère qu'il y en aura encore beaucoup d'autres) :

- Mirabelle et Sophie (amies de longue date...j'espère que nous le resterons encore longtemps)
  - Milou (le patriarche ;o) et qui possède une liste impressionnante de surnoms (Croquette... ;o))
  - Fanélie (ma très chère coéquipière)... Merci de m'avoir supporté pendant ces trois mois (je sais que ça a dû être pénible de me voir tous les jours ;o)). Merci aussi pour tous ces petits services du dimanche soir (pas seulement) que tu m'as rendus.
  - Aurore, éternelle optimiste, insouciante, impossible à mettre en rogne...vit surement dans un monde parallèle (lol)
  - Michael (alias Francis) ... autiste à ses heures perdues ...
  - Vaness', carolo dans l'âme (et dans l'accent), bonne riieuse, grande mangeuse (on se demande comment une telle quantité de nourriture peut rentrer dans un si petit corps (lol))
- Peu importe les choix que vous ferez, professionnels et personnels, je vous souhaite bonne chance pour la suite. Vous le méritez tous.

Je remercie aussi mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée durant ces quatre ans (entre autres), merci d'avoir supporté ma mauvaise humeur durant les périodes de blocus (et en dehors aussi d'ailleurs), tout ceci n'aurait pas été possible sans vous. Je n'oublie pas ma sœur qui a tenté, en vain (je l'avoue), de me distraire durant ces 4 années de dur labeur.

Je remercie également les lecteurs M. Raes, C. Michiels, C. Lambert et P. Godart pour l'attention qu'ils porteront à ce travail.

Liste des abréviations courantes.....	3
Avant-propos.....	4
Introduction.....	5
I. Schizosaccharomyces pombe.....	5
II. La transcription : vue générale.....	6
III. L'ARN polymérase II.....	8
III.1 Les sous-unités de l'ARN polymérase.....	8
III.2 Le CTD.....	8
III.3 Phosphorylations du CTD lors de la transcription.....	9
IV. Les enzymes de modification.....	10
IV.1 La formation de la coiffe.....	12
IV.2 L'importance du coiffage.....	13
IV.3 Les enzymes du coiffage à travers l'évolution.....	14
IV.4 La spécificité de l'ARN polymérase II.....	15
IV.5 Localisation sur la chromatine des enzymes du coiffage chez les levures.....	16
Cadre et objectifs.....	18
Résultats.....	19
I. Optimisation du protocole d'immunoprécipitation chromatinienne.....	19
I.1 L'immunoprécipitation chromatinienne chez <i>S. pombe</i> .....	19
I.2 Choix des gènes utilisés dans l'expérience ChIP.....	21
I.3 La méthode de sonication : sonicateur ou biorupteur (Diagenode).....	22
I.4 Les billes magnétiques (Actif Motive).....	24
II. Etude de la localisation de la protéine Pct1 lors de la transcription.....	26
II.1 Pct1-3HA.....	26
II.2 Profil d'abondance de Pct1 sur trois unités de transcription.....	29
II.3 Création de la souche <i>nmt81-pct1-TAP</i> .....	32
II.4 Création et analyse d'un allèle thermosensible de <i>pct1</i> .....	36
Conclusions.....	40
Perspectives.....	42
Matériels et méthodes.....	44
I. Matériels.....	44
I.1 Milieux de culture.....	44
I.1.1 Milieu riche pour levures: milieu YES (Yeast extract supplemented medium).....	44
I.1.2 Milieu minimum : milieu EMM (Edinburgh minimal medium).....	44
I.1.3 Milieu riche pour E.coli : milieu LB (Luria Bertani).....	44
I.2 Souches, plasmides et oligonucléotides (Tableaux 1 et 2).....	44
II. Méthodes.....	45
II.1 Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose.....	45
II.2 Polymerase chain reaction (PCR).....	46
II.3 Purification avec le kit PCR « QIAquick ».....	49
II.4 Transformation de levures.....	49
II.5 Minipréparation d'ADN plasmidique.....	50
II.6 Restriction d'ADN plasmidique purifié.....	50
II.7 Ligation.....	50
II.8 Transformation de bactéries CaCl <sub>2</sub> compétentes.....	51
II.9 La technique du Western blot.....	51
II.9.1 Solutions.....	51
II.9.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).....	52
II.9.3 Préparation des extraits protéiques totaux.....	52

---

II.9.4 Séparation des protéines par « SDS-PAGE » .....	52
II.9.5 Transfert des protéines.....	52
II.9.6 Immunodétection .....	53
II.10 Immunoprécipitation de chromatine (ChIP).....	55
II.10.1 Solutions .....	55
II.10.2 Produits .....	56
II.10.3 Préparation des cellules et fixation .....	56
II.10.4 Extraction de la chromatine .....	57
II.10.5 Sonication de la chromatine.....	57
II.10.6 Contrôle de la taille des fragments d'ADN.....	58
II.10.7 Immunoprécipitation.....	58
II.10.8 PCR quantitative.....	59
Bibliographie .....	61

## Liste des abréviations courantes

Gen	Généticine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	ARN messenger
kDa	10 <sup>3</sup> Daltons
dNTP	désoxyriboNucléoside 5' TriPhosphate
D.O.	Densité Optique
kb	10 <sup>3</sup> bases
mM	milliMolaire
M	Molaire
ORF	Open Reading Frame
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pol II	Polymérase II
Rpm	Rotations par minute
μl	microlitre
μM	microMolaire

# **Avant-propos**



## Avant-propos

La synthèse d'un ARN messenger dans le noyau d'une cellule eucaryote est un mécanisme complexe. Chaque étape de ce processus nécessite un nombre impressionnant de facteurs protéiques. Les identifier et découvrir la manière dont ils travaillent furent des objectifs majeurs des biologistes moléculaires durant ces deux dernières décennies. Basés sur des expériences *in vitro* montrant que les grandes étapes de l'expression génique (la transcription, le coiffage, l'épissage, et la polyadénylation) pouvaient être isolées et parce qu'intuitivement chacune d'entre elles semblait assez distincte les unes des autres, il a d'abord été proposé que la machinerie responsable de chaque étape était distincte et fonctionnait essentiellement indépendamment des autres. Cependant de nombreuses études, durant ces dernières années, ont fourni des preuves qui remettent en doute ces affirmations. Les différentes étapes successives de l'expression des gènes seraient interdépendantes ou s'influenceraient. Ainsi la polymérisation et les mécanismes de maturation des ARN pré-messagers présentent des interconnexions à de nombreux niveaux et, de plus, prennent place en même temps que la synthèse de l'ARNm. Le coiffage 5', par exemple, est réalisé dès la synthèse d'un oligoribonucléotide, il est donc à proprement parler co-transcriptionnel.

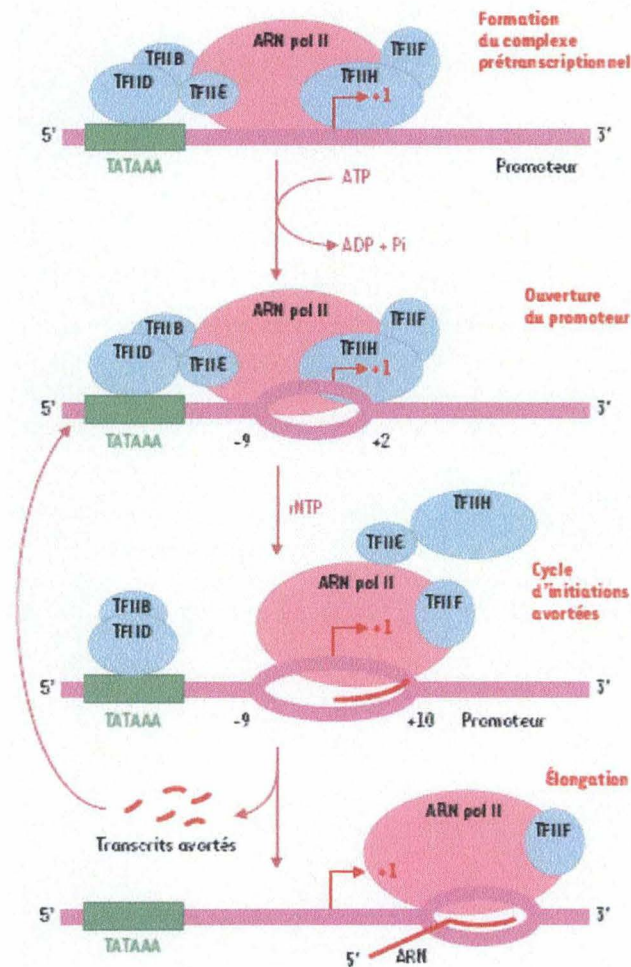
# **Introduction**

## Introduction

### ***I. Schizosaccharomyces pombe***

La levure *Schizosaccharomyces pombe* descend des Archaeascomycètes, une branche ancienne des champignons ascomycètes qui s'est séparée de celles des Hémiascomycètes (*S. cerevisiae*) et des Euascomycètes (*Neurospora*, *Aspergillus*) il y a environ un milliard d'années. Ainsi, la séparation des lignées de *S. pombe*, de *S. cerevisiae* et de la lignée dont descend l'homme remonte à peu près à la même époque. *S. pombe* a été isolée pour la première fois en 1890 par le biologiste allemand P. Lindner. Elle diffère de la levure de brasserie et de boulangerie, *Saccharomyces cerevisiae*, non seulement par la forme des cellules, allongée et cylindrique, mais aussi par de nombreuses autres caractéristiques biologiques (mode de division, métabolisme des ARNi, présence de nombreux introns...). Si *S. cerevisiae* est l'un des organismes modèles les plus utilisés en génétique et le premier eucaryote dont le génome complet fut séquencé (en 1996), *S. pombe* est également devenu un organisme modèle pour les biologistes et est utilisé notamment pour élucider les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire. Le séquençage de son génome, terminé en 2002, a révélé 4 824 gènes dont un quart était déjà connu chez d'autres espèces. En outre, au moins 50 gènes présents chez *S. pombe* sont également impliqués dans des maladies humaines dont la moitié sont des cancers. Comme *S. cerevisiae* et pour les mêmes raisons, c'est un micro-organisme eucaryote inoffensif et facile à cultiver sur un milieu contenant des sources de carbone et d'azote, la levure *S. pombe* est devenue un outil scientifique de premier plan. Pour les mêmes raisons, elle constitue également un modèle pédagogique extrêmement intéressant.

## II. La transcription : vue générale



**Figure 1 :** Étapes de la transcription par l'ARN polymérase II.

L'ARN polymérase II (ARN pol II) et les facteurs généraux de transcription s'assemblent d'abord sur le promoteur, pour former le complexe prétranscriptionnel. Puis, TFIIH catalyse l'ouverture du promoteur entre -9 et +2 par rapport au site d'initiation pour former la bulle transcriptionnelle, qui s'étend en aval au fur et à mesure que la transcription progresse. Jusqu'à la position +10, l'ARN pol II effectue un cycle d'initiations avortées. A la position +11, le promoteur se referme entre -9 et +2 et le complexe entre alors dans un mode d'élongation productive. La bulle transcriptionnelle reste alors ouverte entre -9 et +2 par rapport à la position du dernier rNTP ajouté (Langelier et al., 2002).

La transcription eucaryotique comporte différentes étapes conduisant à la synthèse de l'ARNm (Figure 1). L'initiation par l'ARN polymérase commence par la protéine TFIID qui est elle-même constituée de la protéine de liaison TBP qui va se fixer sur la boîte TATA ce qui va constituer le cœur du complexe d'initiation. Ensuite les différents facteurs de transcription viennent s'assembler sur ce « noyau ». La protéine TFIIA vient stabiliser le complexe TFIID-ADN, les protéines TFIIB et TFIIIE se lient à l'ADN, vient ensuite la protéine TFIIIF, qui est une hélicase ATP-dépendante, et enfin l'ARN polymérase II (Orphanides et al, 1996). Ainsi le facteur protéique TFIIH catalyse l'ouverture de la double hélice d'ADN entre les positions -9 et +2 de part et d'autre du site d'initiation de la transcription (site +1) pour former la bulle transcriptionnelle (Douziech et al, 2000). Ceci rendra possible l'appariement des ribonucléotides (rNTP) libres au brin matrice et donc l'initiation de la transcription. Après l'ajout du quatrième rNTP à l'ARNm en formation, le complexe prétranscriptionnel subit un changement de conformation qui conduit à la stabilisation du complexe ouvert. Jusqu'à l'atteinte de la position +10, l'ARN pol II entre dans un cycle d'initiations avortées (*abortive initiation*). À la position +11, une autre transition importante referme abruptement le promoteur entre -9 et +2, et le complexe entre alors dans le mode de l'élongation productive. Lors de la transition entre l'initiation et l'élongation, les facteurs généraux de transcription, à l'exception de TFIIIF, sont progressivement relâchés et la polymérase peut alors s'associer aux facteurs d'élongation. Au niveau du complexe d'élongation, un hybride ADN-ARN de 8 à 9 nucléotides se forme au sein de la bulle qui reste ouverte entre -9 et +2 par rapport au site +1. Les mécanismes de terminaison demeurent peu connus chez les eucaryotes, mais impliqueraient la présence de sites de pause en aval du signal de polyadénylation.

### III. L'ARN polymérase II

Contrairement aux bactéries et archéobactéries qui ne possèdent qu'une seule ARN polymérase, les cellules eucaryotes en ont trois : ARN pol I, II et III. La Pol I synthétise uniquement le pré-ARNr 35S, précurseur des ARNr 18S, 5.8S et 25S. La Pol II est responsable de la synthèse des ARNm, ainsi que de petits ARN nucléaires (« snRNA ») et nucléolaires (« snoRNA ») non traduits. Ces petits ARN sont impliqués respectivement dans l'épissage des ARNm et dans la maturation des ARNr (modification de nucléotides et clivage des pré-ARNr). Enfin, la Pol III produit les ARNt, l'ARN 5S et d'autres snRNA et snoRNA.

#### III.1 Les sous-unités de l'ARN polymérase

Trois caractéristiques de l'ARN pol II sont conservées entre les espèces eucaryotes (Coulombe & Burton, 1999). L'enzyme est toujours constituée de 10 à 12 sous-unités nommées Rbp1 à 12. Les deux plus grandes sous-unités, qui ont des poids moléculaires approximatifs de 220 et 140 kDa, sont respectivement homologues, en terme de séquence et de fonction, aux sous-unités  $\beta'$  et  $\beta$  de l'ARN polymérase bactérienne. Cinq sous-unités de l'ARN pol II, entre 7 et 28 kDa, sont partagées avec les ARN pol I et III. Bien que des rôles généraux aient été attribués à certaines sous-unités, leur implication précise dans les différentes étapes de la transcription restait floue jusqu'à la détermination récente par Roger Kornberg et ses collaborateurs de la structure de l'ARN pol II à une résolution de 2,8 Å (Cramer et al, 2001) et de la structure de l'enzyme en élongation à une résolution de 3,3 Å (Gnatt et al, 2001). Plusieurs structures ont été déterminées à plus faibles résolutions dans le passé, par cristallographie et par microscopie électronique (Poglitsch et al, 1999). Cependant, les structures récentes marquent un pas important dans la compréhension du mécanisme transcriptionnel en permettant de voir, à l'échelle atomique, les chaînes latérales des acides aminés de l'enzyme libre et, à une résolution légèrement moindre, les domaines de la polymérase interagissant avec les acides nucléiques lors de l'élongation.

#### III.2 Le CTD

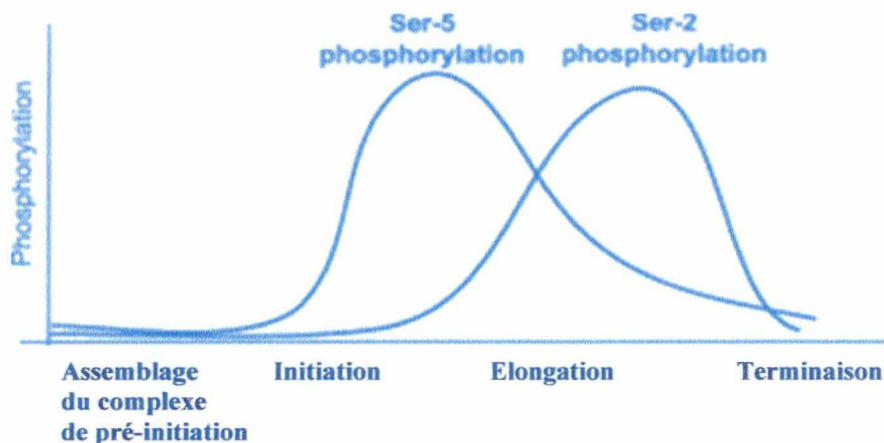
Le domaine C-terminal (CTD) de la grande sous-unité Rpb1 est constitué de répétitions de l'heptapeptide consensus Y1-S2-P3-T4-S5-P6-S7. Le nombre de répétitions varie selon les espèces entre 26 chez *S. cerevisiae*, 29 chez *S. pombe* et 52 chez les mammifères. La présence de plusieurs acides aminés phospho-accepteurs dans le consensus est cruciale pour la synthèse des ARNm nucléaires (Dahmus, 1995; Maniatis & Reed, 2002; Palancade & Bensaude, 2003; Proudfoot, 2004; Sims et al, 2004; Zorio & Bentley, 2004). Les deux résidus non-phosphorylables (Prolines 3 et 6) sont également susceptibles d'être modifiés, dans ce cas par isomérisation.

Sur les 5 acides aminés phosphorylables présents dans le consensus, deux sont majoritairement phosphorylés *in vivo* : les S2 et S5 (Corden et al, 1985; Zhang & Corden, 1991). On en déduit donc qu'il y a au moins 4 états de phosphorylation potentiels par répétition du CTD (non-phosphorylé, phosphorylé en S2, phosphorylé en S5 et phosphorylé en S2 et S5).

### III.3 Phosphorylations du CTD lors de la transcription

Il existe deux formes majoritaires de Pol II, nommées forme IIA et IIO (Schwartz & Roeder, 1975). La forme IIA désigne le CTD non-phosphorylé et la forme IIO le CTD hyperphosphorylé. Ces deux états de la Pol II, coexistant *in vivo*, peuvent être distingués lors du cycle de transcription. La forme IIA est l'unique forme retrouvée dans les régions promotrices, au sein du complexe d'initiation (Lu et al, 1991). Le démarrage de la Pol II nécessite l'hyper-phosphorylation du CTD et donc le passage de la forme IIA à la forme IIO pour la synthèse de l'ARN (Laybourn & Dahmus, 1990). La phosphorylation du CTD apparaît donc comme déterminant de l'initiation de la transcription. Par la suite, la forme IIO est déphosphorylée pour permettre le recyclage de la Pol II (Chesnut et al, 1992) (la forme IIO étant la seule capable d'intégrer le complexe de pré-initiation).

L'équipe de Steve Buratowski a décrit des variations de l'état de phosphorylation du CTD lors des différentes étapes de la transcription (Komarnitsky et al, 2000). L'utilisation d'anticorps spécifiques de la phosphorylation des sérines 2 et 5 (anti-S2P et anti-S5P) lors d'expériences d'immunoprécipitation de chromatine a permis de mettre en évidence que, selon l'étape de la transcription observée, l'état de phosphorylation S2-S5 variait : la phosphorylation de la S5 présente un maximum lors des étapes d'initiation et diminue en se rapprochant des régions de terminaison, et inversement pour S2 (Figure 2).

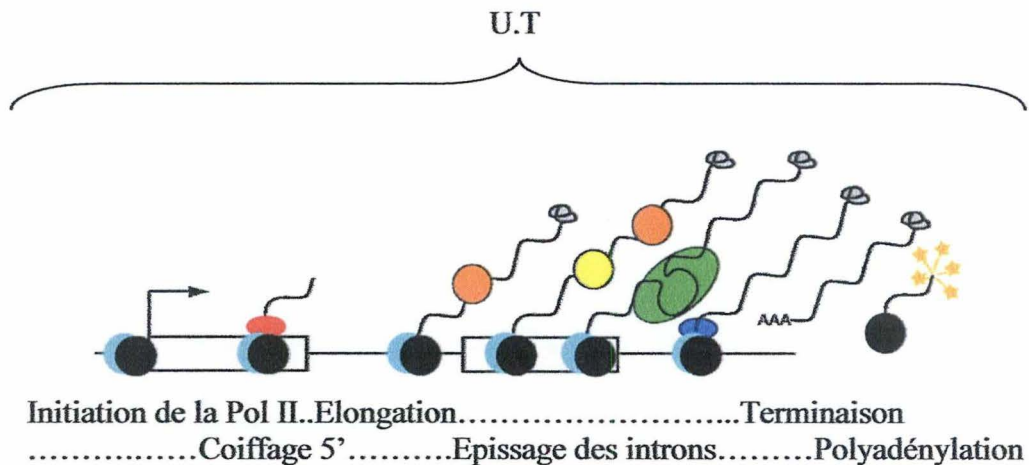


**Figure 2** : Variation de l'état de phosphorylation (S2/S5) lors de la transcription. Deux vagues de phosphorylations distinctes pour les sérines 2 et 5 de l'heptapeptide répété du CTD sont observables. La phosphorylation de la sérine 5 marque l'étape d'initiation tandis que la phosphorylation de la sérine 2 marque l'étape d'élongation (Komarnitsky et al, 2000; Svejstrup, 2004).

Il y a donc une organisation spatio-temporelle qui joue, clairement, un rôle clé pour la transcription.

#### IV. Les enzymes de modification

Le pré-ARNm est modifié et un grand nombre de données montre que ces modifications des pré-ARNm s'effectuent co-transcriptionnellement ou tout au moins débutent lors de la synthèse de l'ARN par la Pol II (Figure 3).



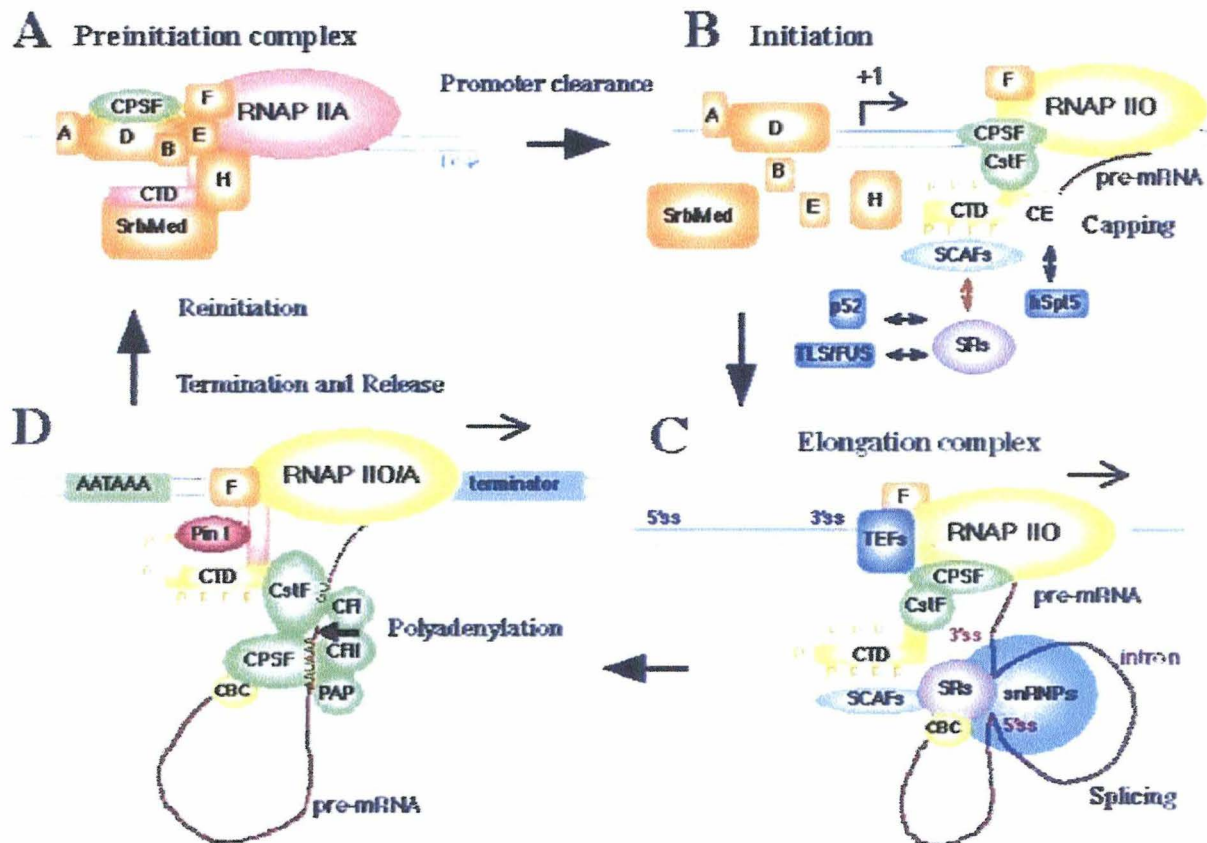
**Figure 3 :** Modifications co-transcriptionnelles des pré-ARNm.

Représentation schématique de la transcription et des événements de modification des pré-ARNm le long d'une unité de transcription (UT) de la Pol II. La Pol II (en noir) initie la transcription au promoteur (flèche) et progresse le long de l'UT lors de la phase d'élongation, de terminaison et de libération de l'ARN après le signal de polyadénylation. Certains facteurs de clivage et de polyadénylation (CPSF) lient la Pol II au départ de la transcription et sont présents tout au long de l'UT (en bleu). Les enzymes du coiffage 5' lient la Pol II juste après la phase d'initiation pour disparaître rapidement de l'UT. La coiffe 5' synthétisée est représentée par la casquette que porte le pré-ARNm. Puisque l'épissage des introns est co-transcriptionnel, les facteurs d'épissage ont été représentés lors de leur reconnaissance des sites d'épissage 5' et 3' (orange et jaune) et lors de l'assemblage du spliceosome (vert) le long de l'UT. Des facteurs additionnels du CPSF sont recrutés sur les régions en aval, en fin de transcription (bleu foncé). L'ARNm se dissocie du « template » et peut s'orienter vers le transport nucléaire (Neugebauer, 2002).

L'intimité entre la transcription *per se* et les modifications des pré-ARNm a été reconnue très tôt (Edery & Sonenberg, 1985; Jove & Manley, 1982) et soulève une série de questions : dans quelle mesure ces processus interagissent-ils avec la machinerie de transcription ? Pourquoi les modifications des messagers se réalisent-elles co-transcriptionnellement ?

Des réponses à ces questions furent proposées récemment, et les évidences d'interactivité entre la machinerie de transcription et les complexes de modification de l'ARNm aboutissent au modèle d'intégration des modifications du messager lors de la transcription par la Pol II (figure 4) au sein duquel le CTD constitue un véritable centre de recrutement et de relargage des complexes de modification.





**Figure 4 :** Intégration des modifications du pré-ARNm au cycle de transcription. (A) Les facteurs de transcription (TFIIA-H) et le complexe médiateur (orange) forment le PIC (Preinitiation complex) au promoteur. Les facteurs de polyadénylation CPSF sont également retrouvés dans ce complexe. (B) A proximité du départ de l'initiation, les enzymes du coiffage 5' (CE) sont recrutées et activées par le CTD de la forme IIO de la Pol II (Pol IIO). Les protéines SCAF peuvent également s'associer au CTD phosphorylé et médier (doubles flèches) le recrutement sur la Pol IIO des protéines SR, impliquées dans l'épissage des introns. Les interactions spécifiques entre certains facteurs de transcription (carrés bleus) avec les CE et SR sont indiquées par les doubles flèches. (C) La Pol IIO en élongation est associée avec des facteurs d'élongation (les TEFs : carrés bleus, (Reines et al, 1999) pour revue) qui aident le recrutement de la machinerie d'épissage des introns (protéines SR et ARNs) sur les sites d'épissage du pré-ARNm pour faciliter l'épissage des introns (ARN mauve). Le CBC représente le complexe de liaison de la coiffe, qui est suggéré comme capable de stimuler autant l'épissage des introns que la polyadénylation (Flaherty et al, 1997). (D) Après transcription du signal poly-A (AATAAA), les facteurs de polyadénylation (vert) associés au CTD forment un complexe fonctionnel sur l'ARNm pour catalyser le clivage endonucléotidique (flèche). Pin1 est capable de stimuler le changement conformationnel du CTD, permettant la formation de l'extrémité 3' de l'ARNm et la terminaison de la transcription (Hirose & Manley, 2000).

La représentation de l'intégration des processus de modification de l'ARNm lors de la transcription (certainement encore non exhaustive), représentée ci-dessus, nous montre que les processus de modification de l'ARNm sont intimement liés au processus de transcription. Tous les ARNm sont marqués par l'ajout de la coiffe à leur partie 5' terminale à la sortie de l'ARN de la Pol II, lorsque le pré-ARNm possède une taille de 20 à 30 nucléotides (Coppola et al, 1983; Moteki & Price, 2002; Rasmussen & Lis, 1993). Les enzymes du « capping » sont spécifiquement recrutées par le CTD phosphorylé sur le S5, à proximité des régions promotrices *in vivo* (Komarnitsky et al, 2000; McCracken et al, 1997) et *in vitro* (Chiu et al, 2002). L'interaction entre les enzymes de coiffage et les éléments de la machinerie transcriptionnelle est un bon exemple de communication bidirectionnelle entre les processus de modifications du pré-ARNm et la machinerie de transcription. Des résultats récents montrent qu'après leur recrutement, les enzymes du coiffage 5' peuvent agir directement sur la capacité transcriptionnelle de la Pol II (Kim et al, 2004; Schroeder et al, 2004).

#### IV.1 La formation de la coiffe

Le coiffage 5' est la première modification du pré-messager. La structure  $m^7GpppN(m)pN(m)p$  est présente à l'extrémité 5' de tous les ARNm cellulaires et viraux (Figure 5) (Furuichi & Shatkin, 1989; Shatkin et al, 1976). Les ARNm de la plupart des virus (adénovirus, herpèsvirus, papovirus) sont synthétisés par la Pol II cellulaire puisque ceux-ci se répliquent dans le noyau des cellules infectées. Par cela, l'extrémité 5' de ces ARNm viraux est modifiée par les enzymes cellulaires pour former la structure coiffe. Le virus de la vaccine possède un cycle de multiplication exclusivement cytoplasmique et possède ses propres enzymes responsables de la formation de la coiffe.

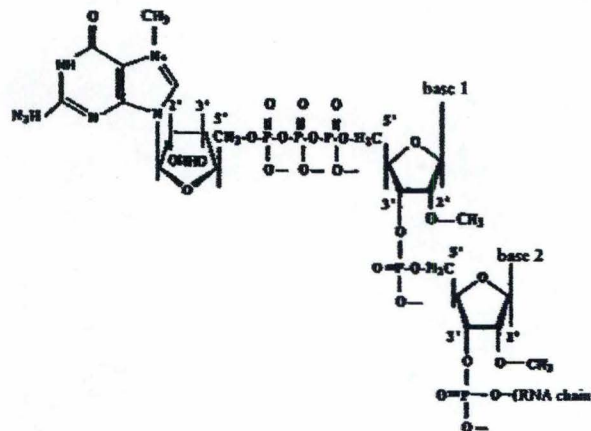
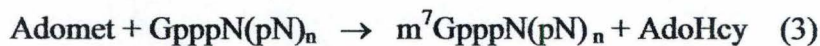
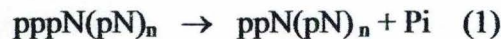


Figure 5 : Structure de la coiffe 5' de type 2.

L'entièreté des messagers coiffés possède un groupement méthyle sur le résidu guanine terminal à la position N-7, tandis que les deux nucléotides adjacents peuvent être 2'-O-méthylés, fournissant les bases de la nomenclature des coiffes :  $m^7GpppN$  (Coiffe 0),  $m^7GpppNm$  (Coiffe 1) et  $m^7GpppNmpNm$  (Coiffe 2). Les groupements méthyle de la structure Coiffe 0 et Coiffe 1 sont ajoutés dans le noyau tandis que la 2'-O-méthylation additionnelle de la Coiffe 2 est ajoutée dans le cytoplasme. Les eucaryotes unicellulaires,

comme les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*, possèdent essentiellement des ARNm présentant la structure Coiffe 0 tandis que les métazoaires présentent plus généralement une coiffe extensivement méthylée (Banerjee, 1980; Reddy et al, 1992).

L'analyse d'acides nucléiques viraux et des expériences de transcription *in vitro* ont initialement permis d'élucider les mécanismes impliqués dans la synthèse de la coiffe (Furuichi et al, 1976). Ces travaux ont révélé que trois activités enzymatiques sont requises pour la synthèse de cette structure (Figure 6): (1) une ARN 5'- triphosphatase hydrolyse le phosphate  $\gamma$  situé à l'extrémité triphosphorylée de l'oligo-ribonucléotide émergeant du site catalytique de la polIII; (2) une ARN guanylyltransférase catalyse ensuite l'ajout d'un groupement GMP (guanosine monophosphate) à l'extrémité diphosphorylée, induisant ainsi la formation d'une extrémité possédant un résidu guanosine rattaché par une liaison 5'-5' au premier nucléotide de l'ARNm; (3) enfin, une ARN (guanine-7) méthyltransférase assure la méthylation du résidu guanosine en position N7. Ces trois enzymes sont conservées et essentielles à travers les règnes.



**Figure 6** : Synthèse séquentielle de la coiffe ( $\text{m}^7\text{GpppN}$ )

Les trois étapes de synthèse de la coiffe nécessitent l'activité successive de l'ARN triphosphatase (1), de l'ARN guanylyltransférase (2) et de l'ARN méthyltransférase (3). Pour cette dernière, l'Adomet est le donneur de méthyle.

## IV.2 L'importance du coiffage

La présence de la coiffe est critique pour l'initiation de la synthèse protéique. Des essais de traduction *in vitro* ont démontré que les ARNm non coiffés ne sont pas traduits efficacement par la machinerie traductionnelle cellulaire (Banerjee, 1980). Ces études ont aussi clairement indiqué que la présence du groupement  $\text{m}^7\text{G}$  à l'extrémité 5' des ARNm augmente l'efficacité de la liaison des ARNm à la sous-unité ribosomique 40S lors de l'initiation de la traduction (Both et al, 1976). Certaines protéines cellulaires jouent un rôle critique au niveau de l'initiation de la traduction en reconnaissant de manière spécifique la coiffe des ARNm comme le complexe de liaison à la coiffe (eIF-4F) qui favorise l'accès du codon d'initiation AUG à la machinerie traductionnelle (Rozen et al, 1990).

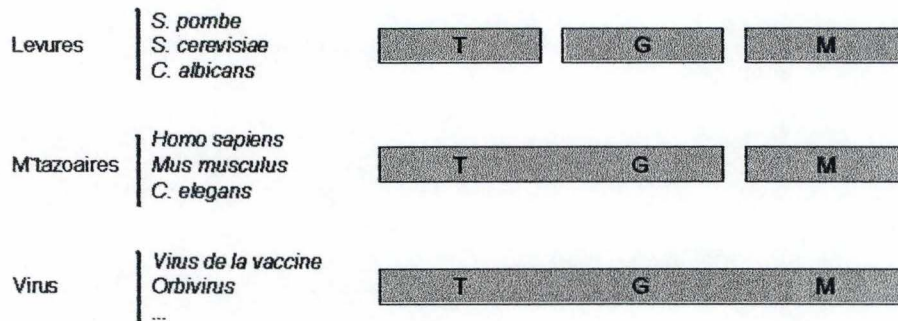
La coiffe possède également un rôle stabilisateur important pour les ARNm. Il a en effet été démontré, à l'aide d'ARNm viraux injectés dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, que les molécules possédant une structure  $\text{m}^7\text{GpppGm}$  ou  $\text{GpppG}$  à leur extrémité 5' sont dégradées plus lentement que les ARNm possédant des structures de type  $\text{pppGm}$ ,  $\text{pppG}$  ou  $\text{ppG}$  (Furuichi et al, 1977). De plus, des analyses cinétiques ont révélé des niveaux de dégradation similaires pour des molécules possédant des structures de type  $\text{m}^7\text{GpppGm}$  et  $\text{GpppG}$ . La présence en position 5' du groupement guanosine (sans méthylation) est donc apparemment suffisante pour la protection des ARNm contre les nucléases cellulaires exo 5'. On a d'ailleurs remarqué que les ARNm non coiffés sont dégradés dans la direction 5'-3' par les nucléases cellulaires (Beelman & Parker, 1995).

De nombreux gènes possèdent des séquences introniques non codantes qui doivent être éliminées lors de la maturation des ARNm. Des travaux utilisant des analogues de la coiffe ont clairement démontré le rôle essentiel de celle-ci dans l'épissage des ARNm, relayé par un complexe hétérodimérique composé des protéines CBP20 (*cap binding protein 20*) et CBP80 (*cap binding protein 80*) (Lewis & Izaurralde, 1997). Dans les cellules, l'élimination des introns se déroule au niveau d'un complexe nucléoprotéique (splicéosome) constitué de 5 petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP) (U1, U2, U4/U6, U5) et de nombreux autres facteurs d'épissage peu caractérisés. Le complexe CBP20-CBP80 facilite l'association de U1 au site d'épissage et participe ainsi à la formation du complexe nucléoprotéique requis pour l'épissage des ARNm (Lewis & Izaurralde, 1997). Enfin, le complexe formé des protéines CBP20 et CBP80 demeure associé aux ARNm lors du passage vers le cytoplasme et est également requis pour assurer le passage efficace des ARNm mûrs vers le cytoplasme (Lewis & Izaurralde, 1997).

Ces données montrent que le coiffage des pré-messagers est crucial pour la majorité des étapes suivantes qui mènent à la traduction de l'ARNm dans le cytoplasme.

### IV.3 Les enzymes du coiffage à travers l'évolution

Si les mécanismes de synthèse de la coiffe ont été découverts depuis plus d'une vingtaine d'années et bien que certains gènes codant pour les enzymes requises aient été clonés, le séquençage des génomes a permis une comparaison à grande échelle de ces mécanismes. L'expression, la purification et la caractérisation des diverses protéines ont permis de démontrer des différences significatives quant à l'organisation physique et fonctionnelle des enzymes nécessaires à la synthèse de la coiffe des ARNm chez divers organismes (métazoaires, levures, virus). Différentes stratégies ont été développées pour garantir une coordination étroite entre les trois activités enzymatiques du coiffage (Figure 7). Les sites actifs de l'ARN 5'-triphosphatase, de l'ARN guanylyltransférase et de l'ARN (guanine-7) méthyltransférase sont positionnés de façon modulaire au sein d'un unique peptide chez les virus à ADN se répliquant dans le cytoplasme des cellules infectées (virus de la vaccine, virus du fibrome de Shope, virus africain de la fièvre porcine) (Mao et al, 1995)). Les métazoaires (homme, souris, *Caenorhabditis elegans*) possèdent une protéine bifonctionnelle regroupant les activités ARN 5'-triphosphatase et ARN guanylyltransférase. Chez ces métazoaires, une autre protéine est responsable de l'activité ARN (guanine-7) méthyltransférase (Wang et al, 1997). Enfin, la formation de la coiffe chez les levures (*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Candida albicans*...) implique trois enzymes distinctes : ARN 5'-triphosphatase, ARN guanylyltransférase et ARN (guanine-7) méthyltransférase (Mao et al, 1995; Shibagaki et al, 1992; Tsukamoto et al, 1997). Chez certaines levures, un complexe hétéromérique existe et permet un couplage étroit entre les différentes activités enzymatiques.



**Figure 7 :** Evolution de l'organisation fonctionnelle des enzymes de la synthèse de la coiffe.

Les activités ARN triphosphatase (T), ARN guanylyltransférase (G) et ARN méthyltransférase (M) sont totalement compartimentées chez les levures, les activités T et G sont regroupées chez les métazoaires et les trois activités sont totalement fusionnées chez certains virus.

#### IV.4 La spécificité de l'ARN polymérase II

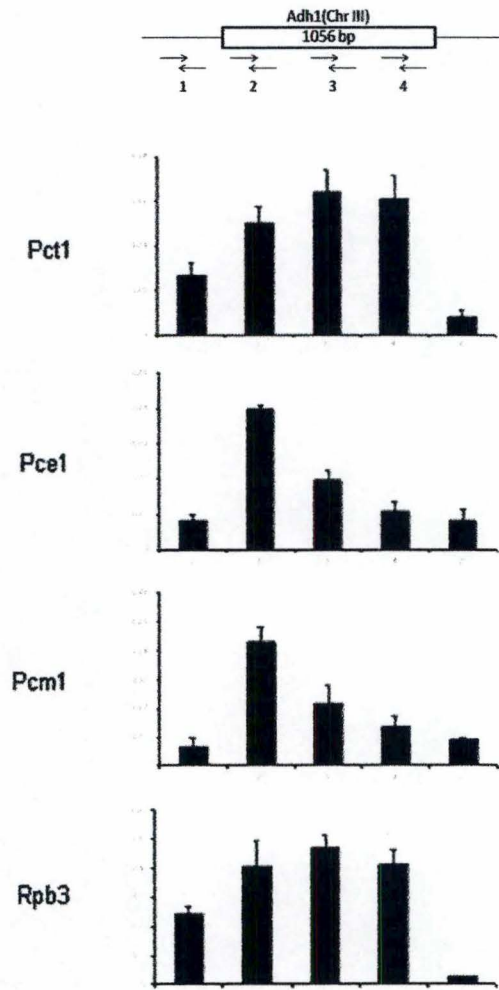
Dans les cellules eucaryotes, les ARNm synthétisés par l'ARN polymérase II sont coiffés de façon co-transcriptionnelle tandis que les ARN synthétisés par l'ARN polymérase I et III ne possèdent pas de coiffe à leur extrémité 5'. La raison de cette spécificité n'a été que récemment élucidée et implique le domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II. La phosphorylation du CTD sur la S5 est un pré-requis au recrutement des enzymes du coiffage qui n'ont pas ou peu d'affinité pour le CTD hypo-phosphorylé (McCracken et al, 1997; Yue et al, 1997). Chez les mammifères, l'activité ARN 5' triphosphatase est recrutée à ce complexe en raison de l'association physique entre l'ARN 5' triphosphatase et l'ARN guanylyltransférase présente au niveau du même peptide. Cependant, chez *S. cerevisiae*, c'est l'hétéromérisation des deux protéines (ARN 5' triphosphatase et ARN guanylyltransférase) qui assure leur stabilisation sur le CTD phosphorylé sur la S5. Confirmant ce modèle, l'analyse de cellules humaines a révélé que la présence d'un domaine carboxy-terminal possédant un nombre d'heptapeptides YSPTSPS restreint (5 plutôt que S2) entraîne une diminution marquée du nombre de molécules d'ARNm possédant une coiffe.

## IV.5 Localisation sur la chromatine des enzymes du coiffage chez les levures

L'identification des gènes responsables des trois activités enzymatiques nécessaires à la synthèse de la coiffe chez la levure a permis de mieux comprendre le rôle de ces protéines *in vivo*. L'analyse du gène *CEG1*, qui code pour l'ARN guanylyltransférase de la levure, a inauguré les études génétiques portant sur les enzymes cellulaires requises pour la formation de la coiffe (Shibagaki et al, 1992) et montré que des mutants thermosensibles ne permettent pas le maintien de la croissance cellulaire (Schwer & Shuman, 1994). L'identification subséquente des gènes de *S. cerevisiae* responsables des activités ARN (guanine-7) méthyltransférase (*ABD1*) et ARN 5'-triphosphatase (*CET1*) a également permis d'établir que les trois activités enzymatiques sont essentielles pour la survie des levures (Mao et al, 1995; Tsukamoto et al, 1997). Il a été suggéré que la létalité observée en l'absence de ces activités enzymatiques est le résultat des effets cumulatifs sur la stabilité, l'épissage, le transport et la traduction des ARNm non coiffés.

La mise au point de la méthode d'immunoprécipitation de chromatine chez la levure a fourni le premier modèle de cinétique transcriptionnelle de protéines du coiffage (Komarnitsky et al, 2000; Schroeder et al, 2000). Ces expériences montrent que les trois protéines du coiffage 5' sont majoritairement présentes dans les régions 5' des gènes étudiés, précisément à l'endroit où prend place le processus co-transcriptionnel d'ajout de la coiffe. Une différence entre les profils des trois enzymes est cependant à remarquer. Les trois protéines présentent un profil dégressif vers les régions 3', cependant, la méthylase de coiffe présente une diminution moins nette que les deux autres, suggérant qu'elle puisse posséder une fonction supplémentaire lors de la transcription (Kim et al, 2004; Komarnitsky et al, 2000; Schroeder et al, 2004).

Une expérience pilote a testé la distribution des 3 enzymes du coiffage chez *S. pombe* le long du gène *adh1* (Guiguen et al, 2007). Comme décrit à la figure 8, Pce1 (G) et Pcm1 (M) présentent des profils d'occupation remarquablement similaires avec un maximum localisé après la boîte TATA (sur base de la position de Tbp1 sur ce gène, (Guiguen et al, 2007)) et une diminution progressive vers les régions 3', suggérant une liaison et une dissociation concertées. Par contre, Pct1 (T) présente un profil corollaire à celui de la polII (suivie grâce à la sous-unité Rpb3). Ceci montre que Pct1 ne subit pas le même processus de relargage que Pce1 et Pcm1 chez *S. pombe*.



**Figure 8** : Profil d'abondance des protéines du coiffage lors de la transcription chez *S. pombe*. Analyse en ChIP des protéines Pct1, Pce1 et Pcm1, ainsi que Rpb3 le long du gène *adh1*. Dans la représentation schématique du gène *Adh1* (en haut), l'ORF est représentée par le rectangle et les barres numérotées en dessous du gène présentent la position approximée des produits PCR utilisés pour l'analyse ChIP. Toutes les expériences ChIP sont réalisées au moyen de protéines taggées-HA exprimées à leur locus. L'axe des ordonnées représente le ratio de l'ADN immunoprécipité sur l'ADN total. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de trois expériences indépendantes (Guiguen et al, 2007).

La localisation inattendue de Pct1 chez *S. pombe* pose la question d'un rôle additionnel de cette enzyme, peut-être indépendant de sa fonction triphosphatase, lors de l'élongation. C'est cette question qui fait l'objet de notre travail.

# **Cadre et objectifs**



## Cadre et objectifs

Mon mémoire comprend essentiellement deux grandes parties :

- L'optimisation du protocole d'immunoprécipitation chromatinienne.

Deux étapes sont particulièrement ciblées : la sonication, qui consiste à fractionner la chromatine pour produire de petits fragments d'ADN solubles, et l'immunoprécipitation, qui permet d'isoler des fragments d'ADN associés à la protéine ciblée par un anticorps spécifique.

Nous avons, tout d'abord, testé le biorupteur de la firme Diagenode (Cfr. Manuel de l'utilisateur en annexe). Autonome, rapide, pratique, il serait le remplaçant potentiel du sonicateur classique.

Ensuite, de nouveau pour une question pratique, nous avons testé les billes magnétiques commercialisées par la firme Active Motif qui remplaceraient les billes de sépharose habituellement utilisées lors de l'immunoprécipitation.

- La caractérisation en ChIP de l'ARN triphosphatase Pct1.

Le but de cette partie du travail est de prolonger l'expérience pilote présentée dans l'introduction et qui suggérait un profil inattendu pour la triphosphatase Pct1 chez *S. pombe*. Contrairement à ce que l'on peut observer pour la guanylyltransférase Pce1 et la méthyltransférase Pcm1 qui présentent des profils similaires à ceux décrits chez *S. cerevisiae* pour leurs homologues (Komarnitski et al., 2000).

Il faudra donc, d'une part, confirmer le profil constant de Pct1 en ChIP sur plusieurs unités de transcription et, d'autre part, tester l'influence de Pct1 sur l'ARNpol II en utilisant différents mutants.

# Résultats

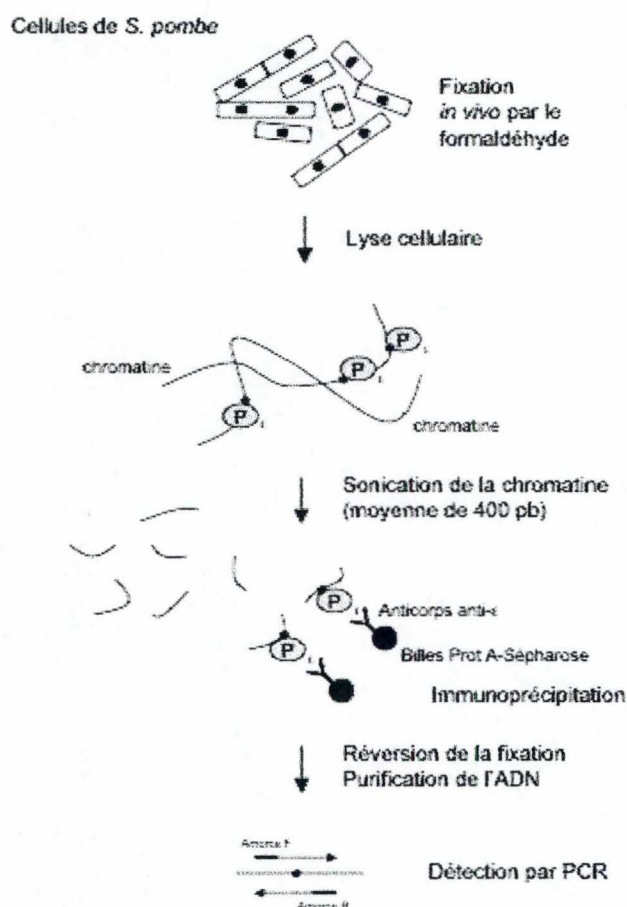
## Résultats

### ***I. Optimisation du protocole d'immunoprécipitation chromatinienne***

#### **I.1 L'immunoprécipitation chromatinienne chez *S. pombe***

La méthode d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) est une technique puissante qui permet d'identifier et de quantifier l'association de protéines sur différentes régions du génome. Cette technique (illustrée schématiquement à la figure 1) se divise en plusieurs étapes. Ces étapes comprennent la fixation covalente (« crosslink ») des protéines à l'ADN, la lyse des cellules et la fragmentation de l'ADN, l'immunoprécipitation de la protéine-cible et de l'ADN lié par celle-ci et, pour terminer, la réversion de la fixation suivie de la purification de l'ADN d'intérêt pour sa détection par PCR.

La fixation des protéines à l'ADN est réalisée grâce au formaldéhyde (Solomon & Varshavsky, 1985). Le formaldéhyde est une petite molécule dipolaire (HCHO) soluble, traversant les membranes et réagissant avec les groupements amine et imine des protéines (au niveau des chaînes latérales d'arginines, d'histidines et de lysines) et des acides nucléiques (adénines et cytosines). Le formaldéhyde permet les liaisons protéine-ADN mais aussi protéine-ARN (Moller et al, 1977) et protéine-protéine (Jackson, 1978), ce qui permet d'étudier des protéines qui ne sont pas directement liées à l'ADN mais qui dépendent d'interactions avec d'autres protéines pour leur liaison à la chromatine. La liaison au formaldéhyde a l'avantage d'être réversible (Jackson, 1978; Jackson & Chalkley, 1981), ce qui simplifie les caractérisations subséquentes d'interactions entre molécules. Les cellules sont lysées avec des billes de zirconium (les billes de verre, moins denses, étant, contrairement à ce que l'on observe chez *S. cerevisiae*, peu efficaces face à l'épaisse paroi de *S. pombe*) et la chromatine fixée est fractionnée par sonication pour produire des petits fragments d'ADN solubles. Par la suite, les fragments d'ADN associés à la protéine d'intérêt sont co-immunoprécipités au moyen d'un anticorps spécifique. Après réversion de la fixation et purification de l'ADN, les fragments d'ADN immunoprécipités sont testés pour la présence de régions spécifiques par PCR.



**Figure 1 :** Représentation schématique de la méthode ChIP.

La protéine d'intérêt (P), liée directement ou indirectement à la chromatine par le formaldéhyde, présente un épitope naturel ou génétiquement ajouté ( $\epsilon$ ). Cet épitope permettra l'immunoprécipitation de la protéine par un anticorps spécifique couplé à une matrice (dans ce cas, des billes de sépharose lié à la protéine A). Les autres commentaires explicatifs sont repris dans le texte.

Bien que largement utilisée ces dernières années pour les études transcriptionnelles chez *S. cerevisiae* (Kim et al, 2004; Komarnitsky et al, 2000; Schroeder et al, 2004), cette méthode n'était que peu décrite pour l'étude de la transcription chez *S. pombe*. Nous nous sommes basés sur les expérimentations réalisées chez *S. cerevisiae* pour optimiser l'expérience chez *S. pombe*. Le protocole expérimental, proche de celui décrit par Laurent Kuras (Kuras, 2004), est repris de façon détaillée dans la partie matériels et méthodes.

## I.2 Choix des gènes utilisés dans l'expérience ChIP

### 1. La taille des gènes

La taille des gènes à étudier en ChIP est en rapport avec la résolution fixée par l'expérimentation. La résolution d'une étude ChIP est limitée par la taille moyenne des fragments qu'il est possible de générer par sonication, c'est-à-dire environ 400 pb. Il est donc nécessaire de prévoir un espacement minimum de 400 pb entre chaque amplicon PCR. Afin de pouvoir quantifier l'abondance des protéines au moins dans les deux régions 5' et 3' des phases ouvertes de lecture (ORF), la taille minimum des ORF a été fixée à 1000 pb. Il ne semble pas exister de limite maximale de taille pour les gènes qu'on désire étudier en ChIP. Au contraire, plus la taille de ces gènes est importante, plus l'espacement entre régions sondées pourra être augmenté.

### 2. Environnement génique

L'environnement génique est également à prendre en compte, principalement pour pouvoir distinguer les zones d'initiation et de terminaison d'une unité de transcription. En effet, si la zone de terminaison d'une première unité de transcription présente une distance de moins de 400 pb avec la zone d'initiation d'une deuxième unité de transcription se trouvant sur le même brin d'ADN codant, il y aura interférence entre les zones de liaison des protéines entre les deux unités de transcription. Si la première unité de transcription se trouve en sens inverse sur l'ADN par rapport à la deuxième unité de transcription, dans ce cas, les zones d'initiation ou de terminaison des deux unités de transcription risquent de se chevaucher. La notion de résolution est à nouveau prépondérante et nous a poussé à fixer une distance d'au moins 1000 pb entre l'ORF candidate et les deux ORFs bordantes.

### 3. Niveau d'expression

Afin d'étudier les protéines de la transcription il est préférable de choisir des gènes cibles dont le taux de transcription est élevé. Outre les descriptions expérimentales ponctuelles de différents gènes, l'expression de l'ensemble des gènes de *S. pombe* a été quantifiée au moyen des microdamiers à ADN (Chen et al, 2003; Rustici et al, 2004). Cette ressource peut être consultée<sup>1</sup> afin de déterminer si le gène potentiel d'étude est bien exprimé.

### 4. Séquences géniques riches en A-T

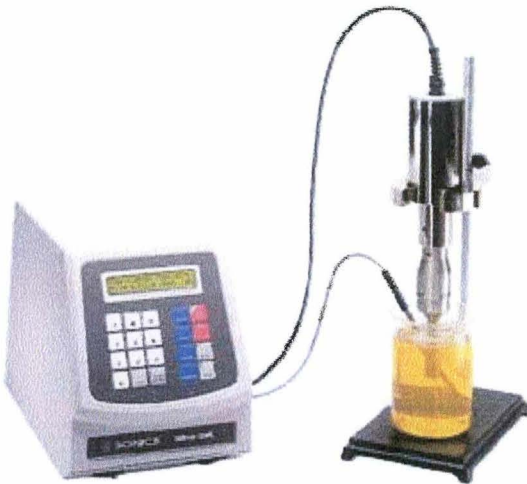

L'utilisation de la PCR comme méthode de quantification entraîne quelques contraintes. Selon la séquence d'ADN à sonder il peut apparaître des difficultés afin d'obtenir un couple d'oligonucléotides répondant aux caractéristiques techniques de la PCR (Matériels et méthodes). Ce sont principalement les zones riches en A-T, souvent retrouvées dans les régions promotrices et terminatrices, qui peuvent se retrouver incompatibles avec le choix d'oligonucléotides nécessitant un Tm approprié. Il est donc nécessaire de vérifier la possibilité d'obtenir des oligonucléotides pour les différentes zones à sonder avant de choisir un gène d'étude.

<sup>1</sup> <http://www.sanger.ac.uk/perl/SPGE/geexview>

En conséquence, nous avons choisi 3 gènes distribués sur les 3 chromosomes de *S. pombe* et transcrits constitutivement. Ces gènes sont : *act1* qui code l'actine (Mertins & Gallwitz, 1987), *pma1* qui code une pompe à protons (Ulaszewski et al, 1987) et *adh1*, qui code l'alcool déshydrogénase (Russell & Hall, 1983).

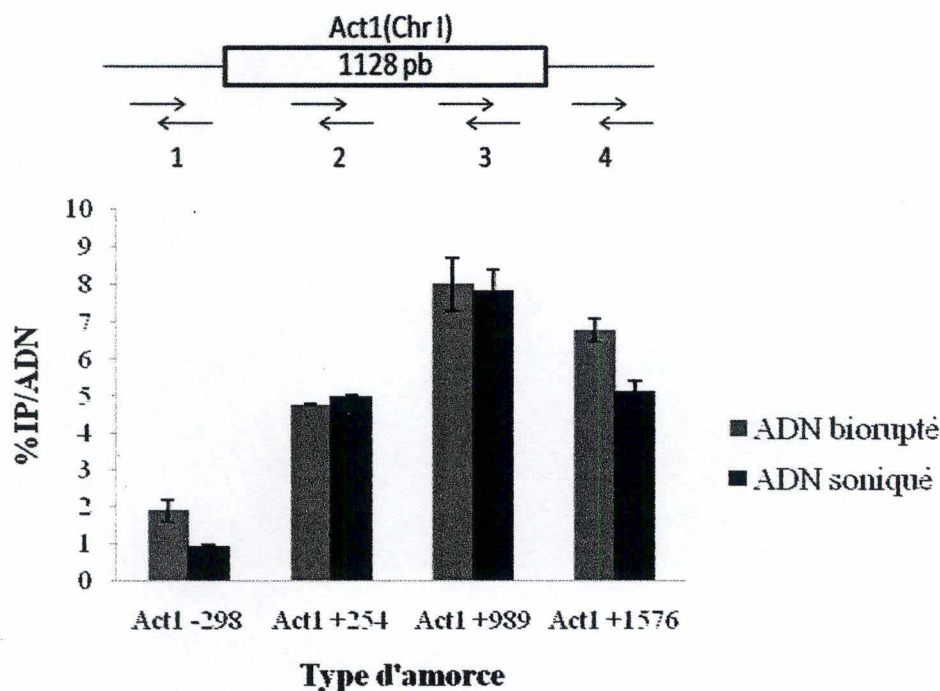
### I.3 La méthode de sonication : sonicateur ou biorupteur (Diagenode)

L'étape de sonication, visant à fragmenter l'ADN, est généralement réalisée grâce à un sonicateur. L'utilisation d'un sonicateur à sonde immergée présente quelques inconvénients (repris dans le tableau ci-dessous). Dans le but d'optimiser le protocole de CHIP, nous avons testé le biorupteur de la firme Diagenode (Crf. Manuel de l'utilisateur en annexe).

<p style="text-align: center;"><b>Sonicateur</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Biorupteur</b></p> 
Sonde en contact direct avec l'échantillon biologique → problème de reproductibilité	Pas de sonde
Système non automatique → fastidieux	Système entièrement automatique → rapidité
Traitement d'un seul échantillon à la fois	6 à 12 échantillons en même temps
Contamination possible d'un échantillon à l'autre	Aucune contamination possible
Ultrasons limités aux environs de la sonde	Transfert des ultrasons provenant des générateurs aux échantillons à travers tout le bain
Production de chaleur et émulsion	Peu d'échauffement, pas d'émulsion
Soniquer 5 x 40'' avec un intervalle de 20'' x le nombre d'échantillons	Temps de sonication = 10 minutes

Afin de comparer l'efficacité du sonicateur à sonde classique et du biorupteur nous avons sondé l'abondance de Rpb3, une des sous-unités de la polIII, le long du gène *act1*. Quatre couples d'amorces furent utilisés : Act1 -298, Act1 +254, Act1 +989 et Act1 +1576.

Le premier et le dernier couple s'hybrident respectivement 298 pb en amont et 448 pb en aval de l'ORF, tandis que les deux autres s'hybrident sur l'ORF (Figure 2).

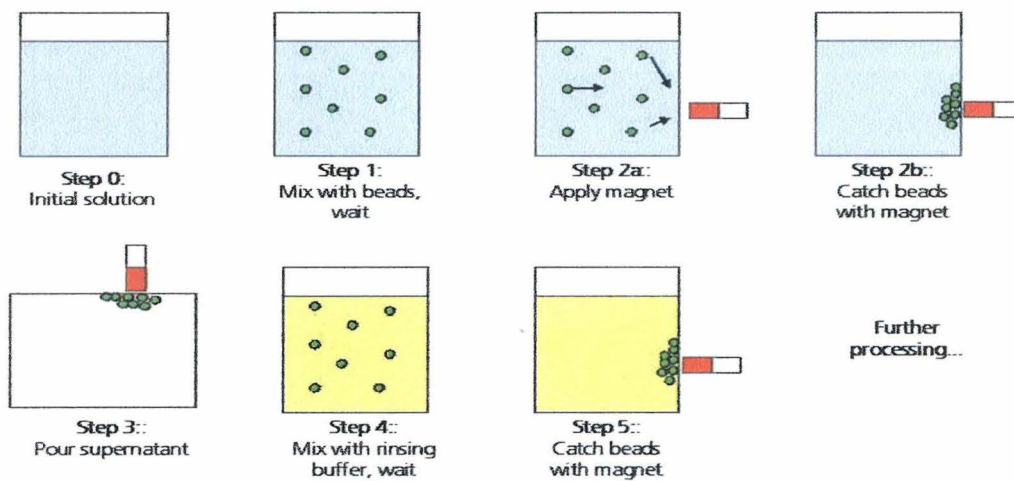


**Figure 2 :** Profil d'abondance en ChIP de la sous-unité Rpb3 de l'ARN pol II sur le gène *act1* chez *S. pombe*, après préparation de l'ADN par le sonicateur classique ou le biorupteur. Dans la représentation schématique du gène *act1* (en haut), l'ORF est représentée par le rectangle et les barres numérotées en-dessous du gène présentent la position approximée des amorces PCR utilisées pour l'analyse ChIP. L'axe des ordonnées représente le ratio de l'ADN immunoprécipité sur l'ADN total. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de deux expériences indépendantes.

Nous obtenons deux profils presque équivalents pour le sonicateur classique et le biorupteur, à savoir une augmentation de l'abondance de Rpb3 (et donc de la polymérase II) en fin d'ORF du gène *act1*. Le biorupteur donne des différences d'intensité un peu moins marquées mais qui ne modifient pas les conclusions. Il apparaît donc que le biorupteur est une très bonne alternative au sonicateur classique.

## I.4 Les billes magnétiques (Active Motif)

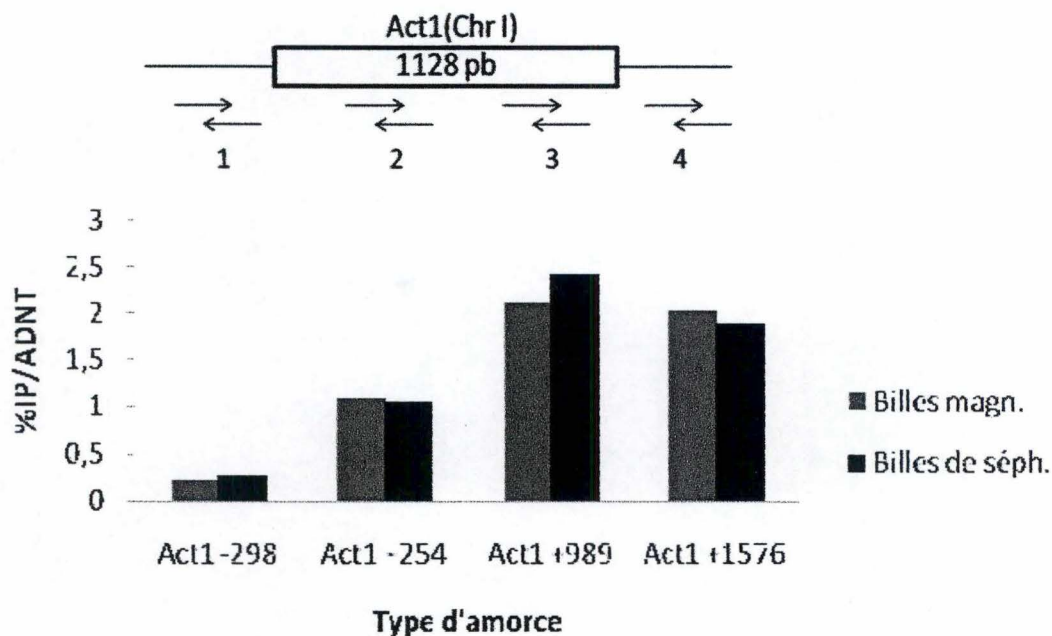
L'étape d'immunoprécipitation se réalise généralement grâce à l'utilisation de billes de sépharose couplées à des anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt ou du tag lié à celle-ci. Les billes de sépharose impliquent de nombreuses étapes de lavage qui sont rendues délicates par la faible densité des billes de sépharose. Il peut en résulter une grande variabilité dans les résultats. Nous avons testé l'efficacité de billes magnétiques commercialisées par la firme Active Motif (Figure 3).



**Figure 3 :** Procédure d'utilisation des billes magnétiques.

Afin de comparer l'efficacité des billes de sépharose et des billes magnétiques nous avons sondé comme précédemment l'abondance de Rpb3, une des sous-unités de la polII, le long du gène *act1* (Figure 4).





**Figure 4 :** Profil d'abondance en ChIP de la sous-unité Rpb3 de l'ARNpol II le long du gène *act1* chez *S. pombe*, suivant que l'immunoprécipitation est réalisée avec des billes de sépharose ou magnétiques.

Dans la représentation schématique du gène *act1* (en haut), l'ORF est représentée par le rectangle et les barres numérotées en-dessous du gène présentent la position approximée des amorces PCR utilisées pour l'analyse ChIP. L'axe des ordonnées représente le ratio de l'ADN immunoprécipité sur l'ADN total.

La similarité des résultats montre que les billes magnétiques sont utilisables dans le protocole de ChIP.

Au terme de cette première partie, nous avons optimisé deux étapes décisives dans le protocole d'immunoprécipitation de chromatine en montrant que l'utilisation du biorupteur et de billes magnétiques qui présentent les avantages que nous avons détaillés donne des résultats équivalents à ceux obtenus avec le protocole classique.

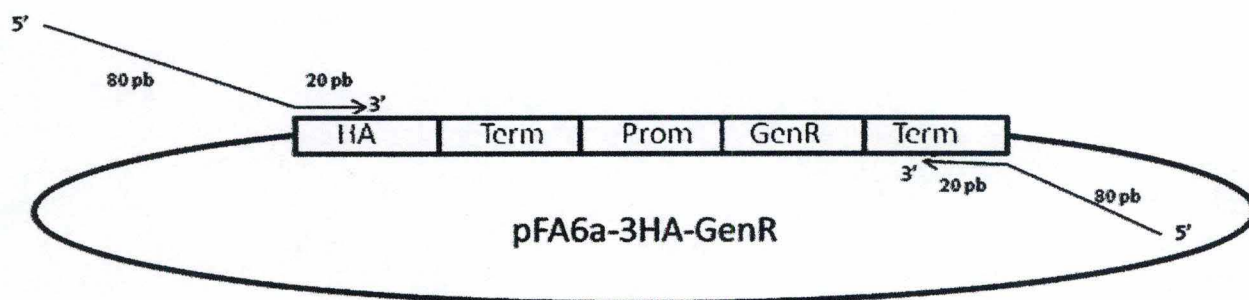
## II. Etude de la localisation de la protéine Pct1 lors de la transcription.

Pour étudier la localisation de l'ARNm triphosphatase Pct1 chez *S.pombe* par immunoprécipitation chromatinienne, nous avons d'abord « taggé » la protéine car il n'existe pas d'anticorps spécifique de Pct1.

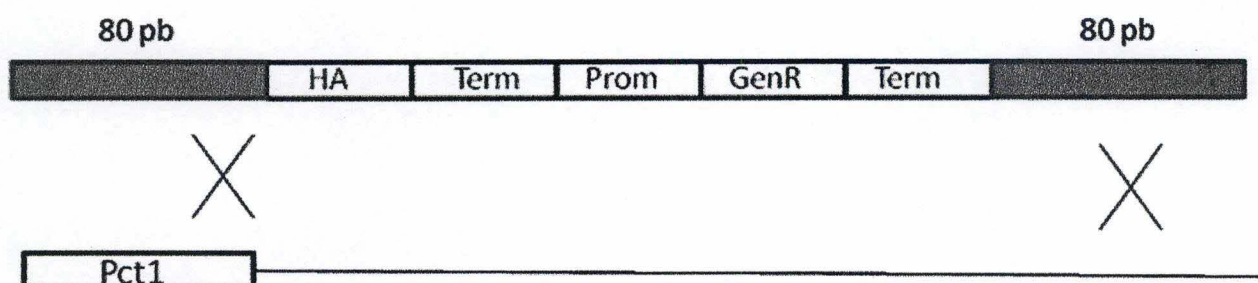
### II.1 Pct1-3HA

Sa petite taille et la spécificité des anticorps monoclonaux qui le reconnaissent ont fait d'une triple répétition d'un épitope de l'hémagglutinine (3HA) un des tags les plus répandus pour suivre une protéine en western blot ou en ChIP.

La levure présente l'intérêt de permettre l'intégration à la résolution du nucléotide d'un fragment d'ADN dont les extrémités recombinogènes ciblent une région du génome. Pour ce faire, une PCR est réalisée pour amplifier une cassette contenant le tag et un marqueur de sélection conférant le plus souvent la résistance à un antibiotique, la généticine dans notre cas (Figure 5). Les oligos utilisés présentent une région d'homologie de 20 pb avec le plasmide « template » et 80 pb homologues à la région du génome ciblée pour l'intégration (Figure 6).

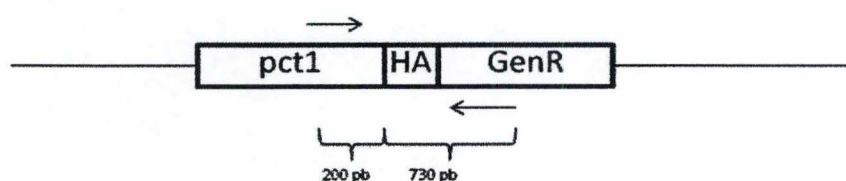


**Figure 5 :** Représentation schématique du plasmide template et des oligos utilisés pour générer le fragment recombinogène.



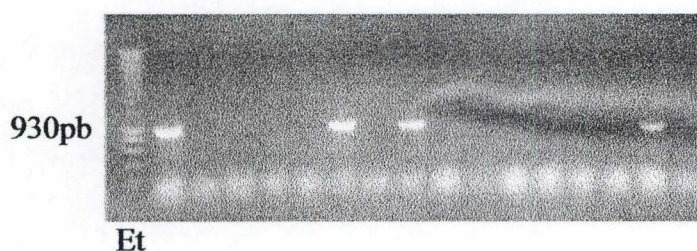
**Figure 6 :** Représentation schématique de l'intégration du fragment PCR.

Le fragment PCR est purifié et transformé dans la levure *S. pombe*. Les transformants ont été sélectionnés pour la résistance à la généticine. Comme une intégration ectopique est aussi possible, nous avons testé 16 clones par PCR diagnostique pour vérifier que l'intégration est au bon locus. Pour ce faire, un oligo « forward » est choisi dans l'ORF de Pct1, en amont de la région de recombinaison, et l'oligo « reverse » dans le marqueur de résistance à la généticine. La PCR est réalisée sur colonies (Figure 7).



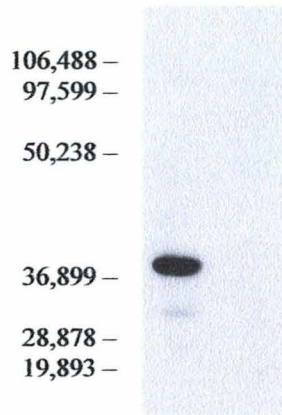
**Figure 7 :** PCR diagnostique afin de vérifier l'intégration de la cassette contenant le tag HA et un marqueur de résistance à la généticine au locus de Pct1. Pour ce faire, un oligo « forward » est choisi dans l'ORF de Pct1, en amont de la région de recombinaison, et l'oligo « reverse » dans le marqueur de résistance à la généticine. Le fragment attendu fait 930 pb.

Nous avons obtenu 4 transformants présentant un profil d'intégration au bon locus comme en témoigne la présence d'une bande de 930 pb, correspondant à la taille prédite (Figure 8).



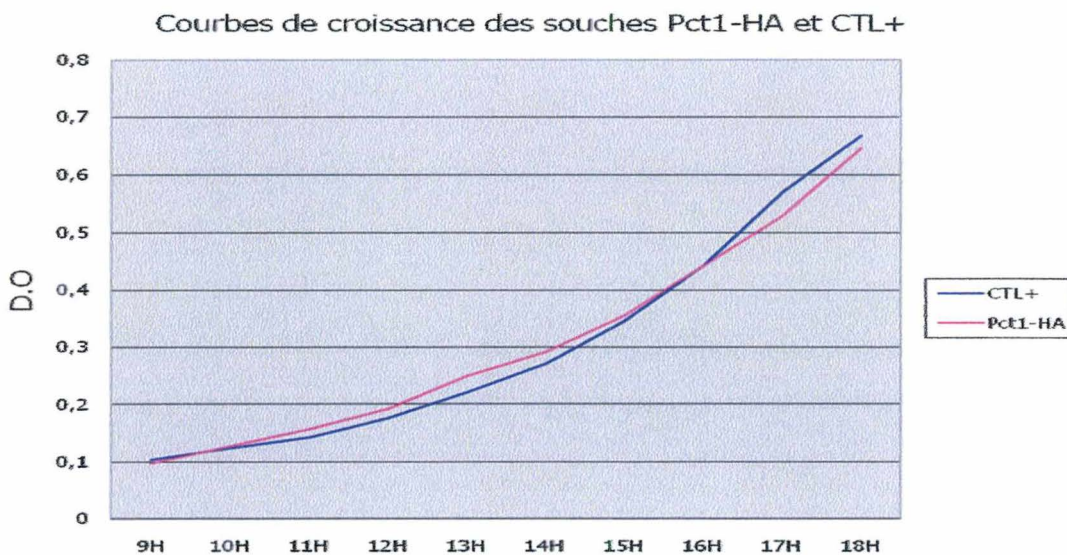
**Figure 8 :** Gel d'agarose illustrant le produit de la PCR diagnostique réalisée sur 16 clones différents. La première piste contient le marqueur de taille. La taille du fragment attendu est de 930 pb. Sur ces 16 clones, 4 sont des transformants positifs.

Pour vérifier que la protéine de fusion Pct1-3HA est produite, un western-blot est réalisé sur l'extrait total avec des anticorps anti-HA. La souche de départ, non « taggée », est utilisée comme contrôle (figure 9).



**Figure 9** : Vérification de la production de Pct1-HA via l'utilisation d'anticorps anti-HA. La première piste contient des extraits protéiques totaux de la souche sauvage et la seconde ceux de la souche « taggée ». En sachant que la protéine Pct1 a un poids moléculaire de 35,4 kDa et que le « tag » HA fait 3 kDa, nous nous attendons à obtenir une bande correspondant à un poids moléculaire de 38,4 kDa.

Nous avons également vérifié que le « tag » n'interférait pas avec la croissance en réalisant des courbes de croissance (Figure 10).

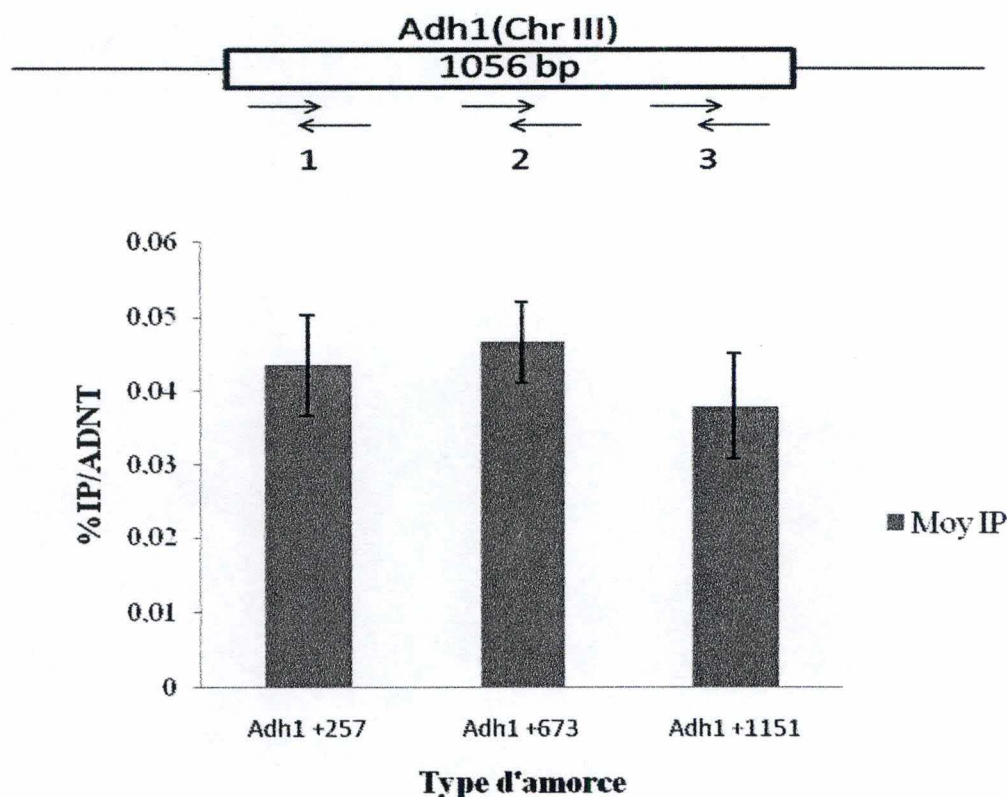


**Figure 10** : Comparaison des courbes de croissance des souches Pct1-HA et sauvage.

La souche contrôle et la souche « taggée » ont un temps de doublement équivalent. Le « tag » HA n'affecte donc pas la croissance de la souche Pct1-3HA.

## II.2 Profil d'abondance de Pct1 sur trois unités de transcription

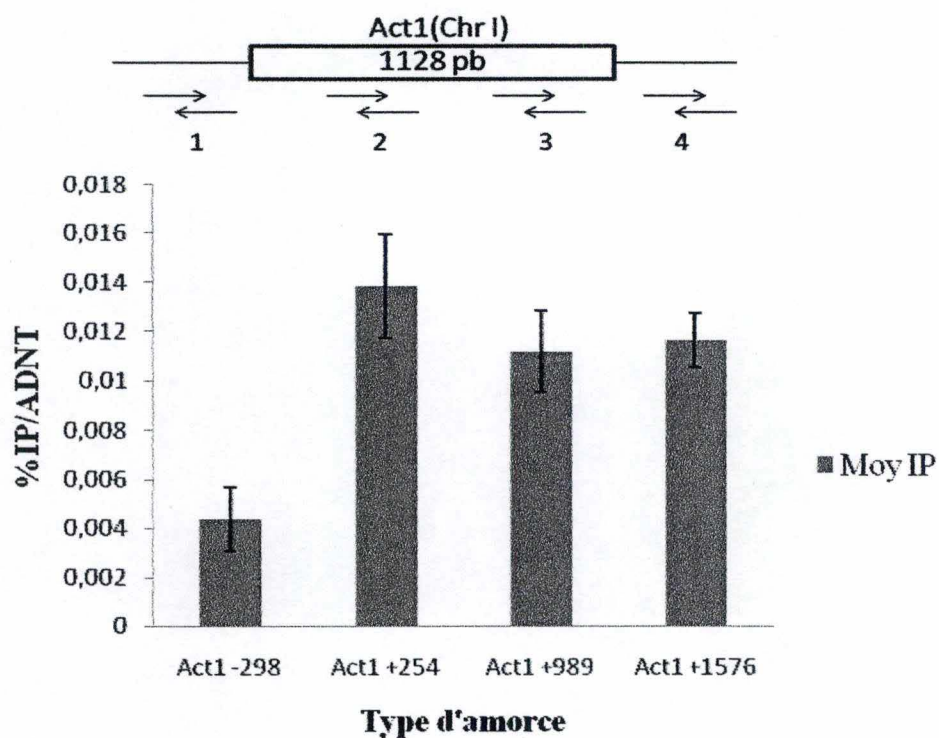
Le but de cette partie du travail était de prolonger l'expérience pilote présentée dans l'introduction et qui suggérait un profil inattendu pour la triphosphatase Pct1 chez *S. pombe*. Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer le profil non dégressif de Pct1 observé sur le gène *adh1*. Une expérience de ChIP a été réalisée en utilisant la souche *pct1-3HA* et 4 couples de primers ont permis de sonder l'abondance de Pct1 sur l'unité de transcription d'*adh1* (figure 11).



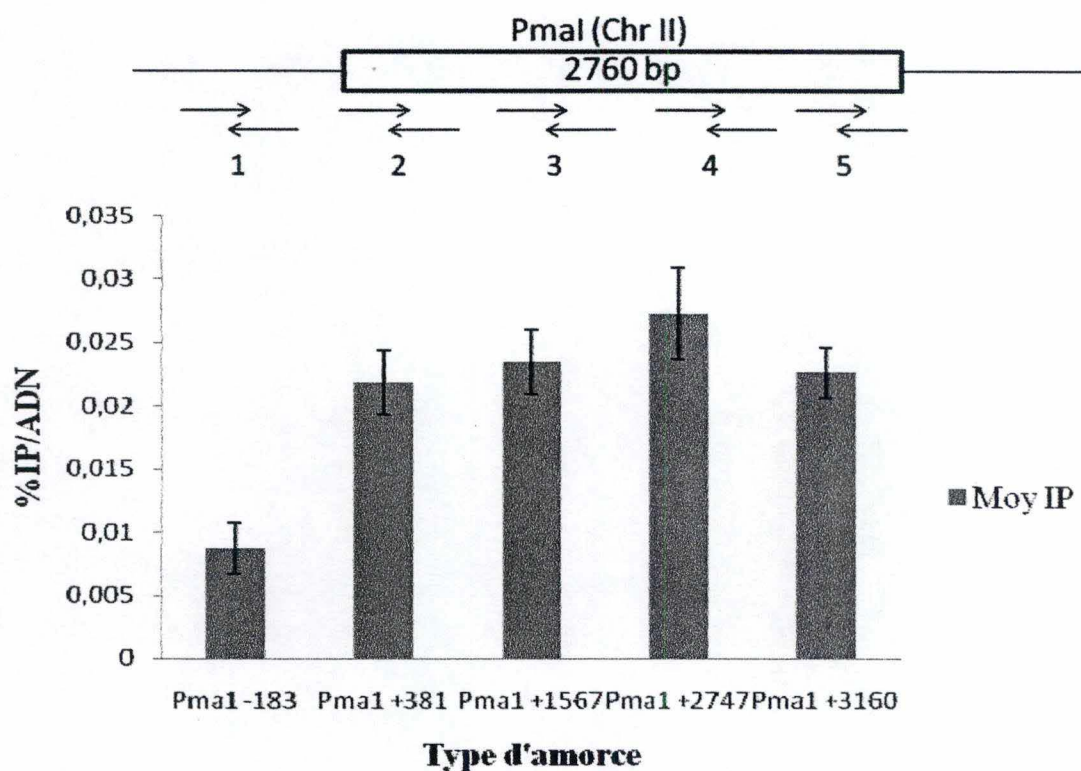
**Figure 11** : Profil d'abondance en ChIP de la protéine Pct1 le long du gène *adh1* chez *S. pombe*.

Dans la représentation schématique du gène *adh1* (en haut), l'ORF est représentée par le rectangle et les barres numérotées en-dessous du gène présentent la position approximée des amorces PCR utilisées pour l'analyse ChIP. L'axe des ordonnées représente le ratio de l'ADN immunoprécipité sur l'ADN total. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de trois expériences indépendantes.

Nous avons également utilisé des couples d'amorces pour sonder les unités de transcription de *act1* qui code l'actine (Mertins & Gallwitz, 1987) (Figure 12) et *pma1* qui code une pompe à protons (Ulaszewski et al, 1987) (Figure 13).



**Figure 12 :** Profil d'abondance en CHIP de la protéine Pct1 le long du gène *act1* chez *S. pombe*. La convention du schéma commence à la figure 11.



**Figure 13 :** Profil d'abondance en ChIP de la protéine Pct1 le long du gène *pma1* chez *S. pombe*. La convention du schéma commence à la figure 11.

Nos résultats confirment que l'ARNm triphosphatase Pct1 est présente tout au long du gène *adh1* chez *S. pombe*, ceci contrairement au profil dégressif de son homologue chez *S. cerevisiae* (Komarnitsky et al, 2000; Schroeder et al, 2000). Ce même profil non dégressif est également observé pour les gènes *act1* et *pma1*.

Cette caractéristique unique de Pct1 nous a amené à poser l'hypothèse que Pct1 pourrait avoir un second rôle lors du cycle transcriptionnel qui justifie sa présence continue aux côtés de la polymérase. Pour tester cette possibilité, nous avons généré un mutant de déplétion de Pct1 dans le but de pouvoir analyser l'effet de la disparition de Pct1 sur l'ARN polymérase II. Pour ce faire, le promoteur de *pct1* a été remplacé au locus par le promoteur *nmt81* dont l'activité est fortement réduite quand une vitamine, la thiamine, est ajoutée au milieu de culture (promoteur « switch off »).

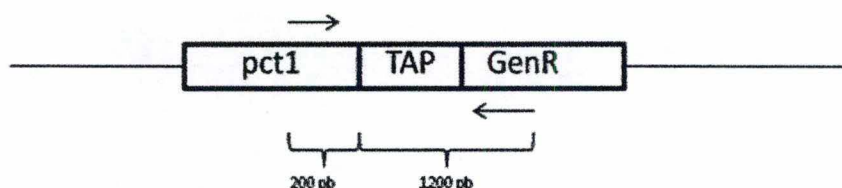
### II.3 Création de la souche *nmt81-pct1-TAP*

Notre but est de remplacer le promoteur de *pct1* par le *nmt81*. Pour pouvoir visualiser la protéine, nous avons également ajouté un « tag » (le module TAP) en C-terminal (Figure 14). L'amplification du fragment contenant le module TAP et l'intégration ont été réalisées de la même manière que celle du tag 3-HA (Figures 5 et 6) en utilisant le marqueur de sélection *kanR*.

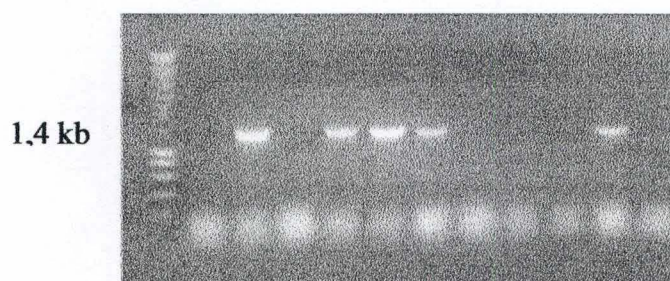


**Figure 14** : Représentation schématique du locus *nmt81-pct1-TAP*.

Comme précédemment, une PCR sur levures entières permet de vérifier que l'intégration s'est produite au locus de *pct1* (Figures 15 et 16).



**Figure 15** : PCR diagnostique afin de vérifier l'intégration de la cassette contenant le « tag » TAP et un marqueur de résistance à la généticine au locus de *Pct1*. Pour ce faire, un oligo « forward » est choisi dans l'ORF de *Pct1*, en amont de la région de recombinaison, et l'oligo « reverse » dans le marqueur de résistance à la généticine. Le fragment attendu fait 1,4 kb.

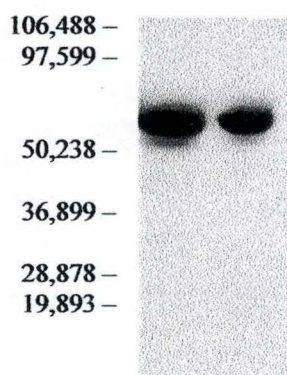


Et

**Figure 16** : Gel d'agarose illustrant le produit de la PCR diagnostique réalisée sur 11 clones différents. La première piste contient le marqueur de taille. La taille du fragment attendu est de 1,4 kb. Sur ces 11 clones, 5 sont des transformants positifs.



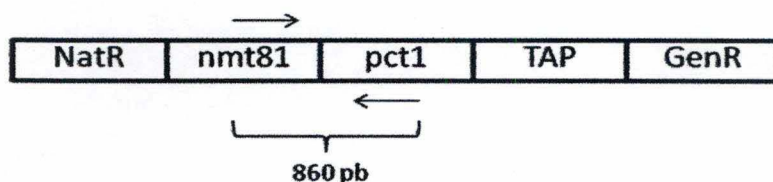
L'expression de la protéine de fusion Pct1-TAP a été vérifiée par western blot (Figure 17).



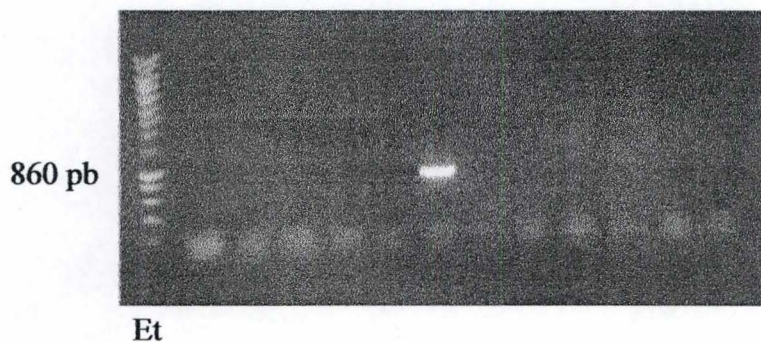
**Figure 17** : Vérification de la production de Pct1-TAP via l'utilisation d'anticorps anti-TAP. Les deux pistes contiennent des extraits protéiques totaux de deux souches taggées. En sachant que la protéine Pct1 a un poids moléculaire de 35,4 kDa et que le tag TAP fait 30 kDa, nous nous attendons à obtenir une bande correspondant à un poids moléculaire de 65,4 kDa.

La souche exprimant Pct1-TAP authentifiée, nous avons procédé au remplacement du promoteur endogène par le *nmt81*. Le principe est ici aussi identique mais le marqueur de sélection *natR* qui confère la résistance à la nouséothricine est utilisé. Contrairement à *kanR*, le marqueur *natR* est efficace en milieu minimum. Cette caractéristique est critique pour l'intégration du promoteur *nmt81* car le milieu complet contient de la thiamine et n'est donc pas compatible avec le système de promoteur « switch off » que nous utilisons.

Après amplification et transformation du fragment PCR recombinogène contenant *natR* et *nmt81*, 12 clones ont été testés par PCR sur levures entières et un seul a donné une bande de taille prédite (Figures 18 et 19).

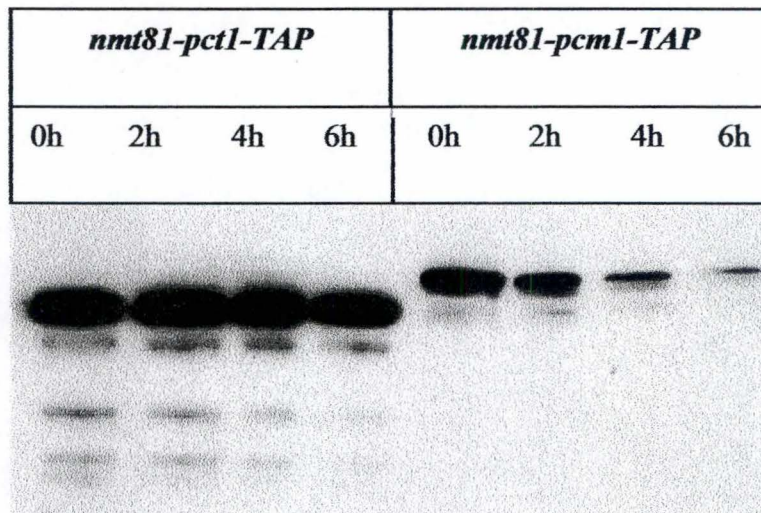


**Figure 18** : PCR diagnostique afin de vérifier l'intégration de la cassette contenant le promoteur *nmt81* et un marqueur de résistance à la nouséothricine au locus de Pct1. Pour ce faire, un oligo « forward » est choisi dans le promoteur *nmt81*, en amont de la région de recombinaison, et l'oligo « reverse » dans l'ORF de Pct1. Le fragment attendu fait 860 pb.



**Figure 19** : Gel d'agarose illustrant le produit de la PCR diagnostique réalisée sur 12 clones différents. La première piste contient le marqueur de taille. La taille du fragment attendu est de 860 pb. Sur ces 12 clones, 1 seul est positif.

A ce stade, la souche a été testée en présence de thiamine pour vérifier la déplétion de la protéine. En parallèle, nous avons utilisé comme contrôle la souche *nmt81-pcm1-TAP* qui permet de dépléter la cap-méthyltransférase (Guiguen et al. 2007). La thiamine a été ajoutée aux cultures (temps 0) et des aliquots ont été prélevés après 0, 2, 4 et 6 heures de culture en présence de thiamine. Les protéines totales ont été préparées et séparées par SDS-PAGE suivi d'un western blot pour détecter les protéines fusionnées au TAP (Figure 20).



**Figure 20** : Vérification de la déplétion des protéines Pct1-TAP et Pcm1-TAP via l'utilisation d'anticorps anti-TAP. Les deux pistes contiennent des extraits protéiques totaux de deux souches taggées. La thiamine a été ajoutée aux cultures (temps 0) et des aliquots ont été prélevés après 0, 2, 4 et 6 heures de culture en présence de thiamine.

Comme décrit dans la littérature, la protéine Pcm1-TAP est effectivement déplétée au cours du temps. Pour Pct1, par contre, nous n'avons observé aucune différence d'expression même après 6h de culture en présence de thiamine. Le système de promoteur « switch-off » n'est donc pas fonctionnel dans le cas de *pct1*. Une des raisons peut être la demi-vie élevée de la protéine au cours du temps.

Pour atteindre notre objectif, nous avons utilisé une stratégie alternative qui consiste à inactiver *pct1* en utilisant un allèle thermosensible (ts).

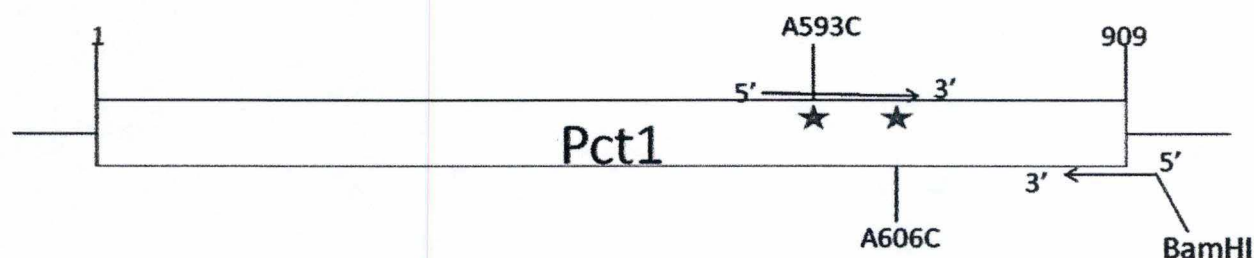
## II.4 Création et analyse d'un allèle thermosensible de *pct1*

Traditionnellement, la création d'allèles ts implique une mutagenèse aléatoire qui vise à générer un pool d'allèles mutés qui sont ensuite criblés pour le caractère ts. Vu le délai nécessaire pour mener à bien cette approche, nous avons profité de l'étude réalisée par Takase et al. (Takase et al, 2000) qui décrit la synthèse et l'analyse d'allèles ts de la triphosphatase *Cet1* de *S. cerevisiae*. Parmi les allèles générés lors de cette étude, le mutant *cet1-401* (qui possède la mutation D422A) a retenu notre attention car le résidu acide aspartique muté en alanine est conservé chez *S. pombe* (Figure 21). Les auteurs ont également montré que cette mutation déstabilisait la protéine à 37°C.



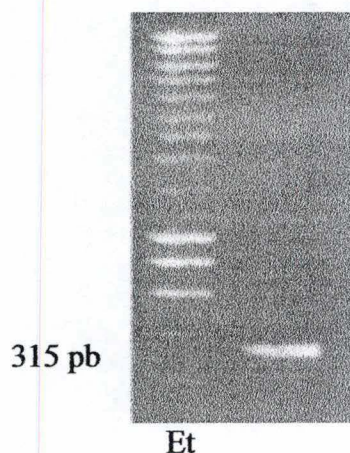
**Figure 21** : Alignement de séquences entre la triphosphatase *Cet1* de *S. cerevisiae* et son homologue *Pct1* chez *S. pombe* réalisé avec le logiciel clustal w (Thompson et al, 1994). Le résidu en rouge correspond à l'aspartate, conservé chez ces deux espèces, que l'on veut muter en alanine. Les traits correspondent à des gaps, les astérisques à des résidus identiques. Les simples et doubles points réfèrent au degré de similarité entre acides aminés.

Nous avons entrepris de reproduire cette mutation dans le gène *pct1* pour pouvoir tester après remplacement au locus si elle confère un phénotype *ts* chez *S. pombe*. Notre stratégie a été d'amplifier les derniers 315 nucléotides de *pct1* avec un primer « forward » contenant deux mutations : une mutation A593 → C qui mute l'acide aspartique 198 en alanine et la mutation silencieuse A606 → C qui génère un site de restriction EcoRV (GAT/ATC) (Figures 22 et 24). Le primer « reverse » permet d'éliminer le codon STOP de *Pct1* (voir plus loin) et d'ajouter un site de restriction BamHI (G/GATCC).

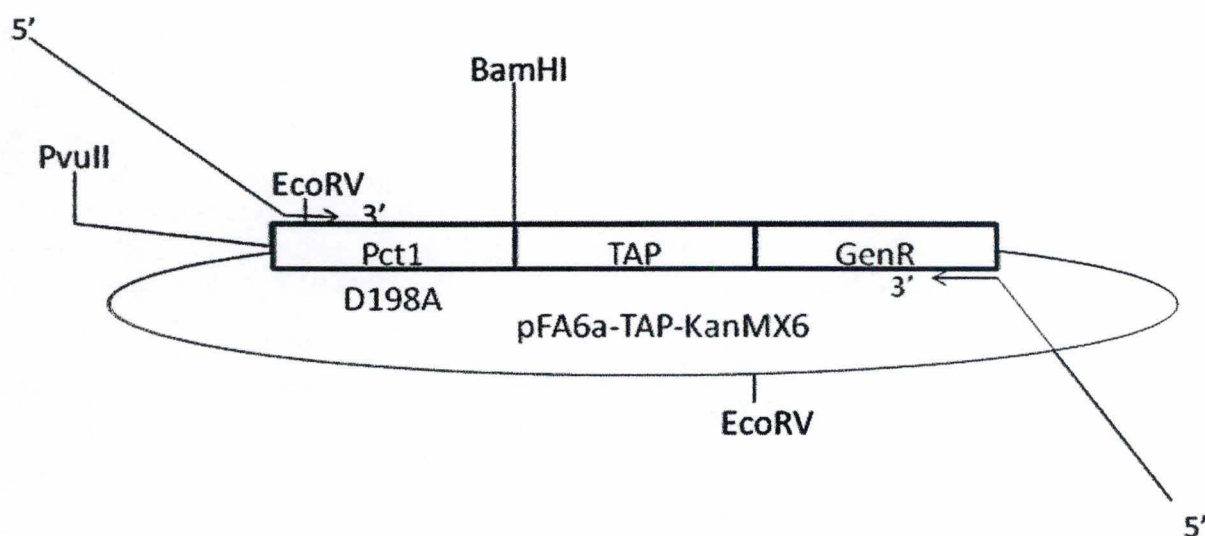


**Figure 22 :** Mutagenèse PCR visant à muter *Pct1*. Les oligonucléotides utilisés vont introduire deux mutations, l'une visant à muter *Pct1* et l'autre à insérer un site de restriction EcoRV supplémentaire.

Une réaction de PCR a été réalisée sur l'ADN génomique de *S. pombe* en utilisant ces deux oligos (Figure 23). Le fragment de 315 pb a été restreint par BamHI et purifié. Nous avons restreint la matrice pFA6A-TAP-KanMX6 (Figure 24) par PvuII (CAG/CTG) et BamHI (G/GATCC) et « ligués » les deux fragments avec la T4 DNA ligase. Nous avons ensuite transformé le produit de « ligation » dans la souche DH10B d'*E. coli* (Figure 24). Il est à noter qu'une extrémité du produit PCR est franche et est donc compatible avec le site à bouts francs PvuII (CAG/CTG). Cette construction permet de fusionner le fragment muté de *pct1* au TAP tag et de le faire suivre du marqueur d'intégration *kanR*.

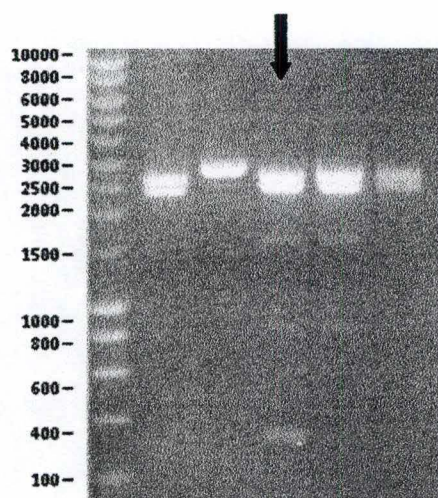


**Figure 23 :** Réaction PCR réalisée sur l'ADN génomique de *S. pombe* en utilisant un primer « forward » contenant deux mutations : une mutation A593 → C qui mute l'acide aspartique 198 en alanine et la mutation silencieuse A606 → C qui génère un site de restriction EcoRV (GAT/ATC). Le primer « reverse » permet d'éliminer le codon STOP de *Pct1* et d'ajouter un site de restriction BamHI (G/GATCC). Le fragment attendu a une taille de 315 pb.



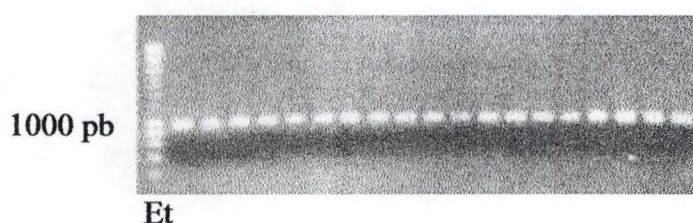
**Figure 24** : Schéma montrant le plasmide pDH34 contenant le dernier tiers de Pct1 muté. Les deux sites de restriction, PvuII et BamHI, ayant permis la ligation de l'insert et de la matrice sont indiqués, ainsi que les deux sites EcoRV. On peut également voir les oligonucléotides utilisés pour réaliser la PCR « expand » en vue d'une recombinaison homologe chez *S. pombe*.

Nous avons réalisé des restrictions diagnostiques (BamHI-EcoRV) sur des minipréparations d'ADN de clones issus de la transformation afin de vérifier la construction (Figure 25).

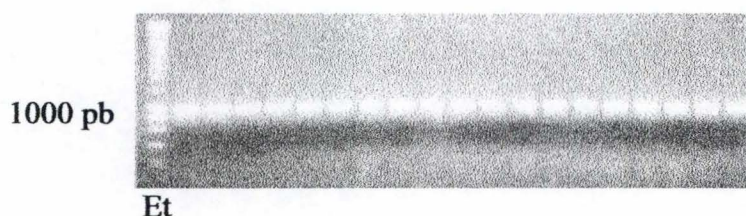


**Figure 25** : Gel d'agarose illustrant des restrictions diagnostiques effectuées avec les enzymes BamHI + EcoRV sur 4 clones issus de la transformation. La deuxième piste correspond à un contrôle négatif, la matrice seule. Trois bandes sont attendues : 2,44 kb; 2,23kb et 310 pb. La flèche indique un clone donnant le profil de restriction attendu. La première piste correspond à un marqueur de taille.

Après vérification de la présence de la mutation par séquençage, un fragment recombinogène *pct1-TAP-kanR* a été généré par PCR (Figure 24). Comme précédemment, ce fragment cible le locus *pct1* et doit permettre *in fine* d'exprimer une version TAP-tagguée de la protéine mutée Pct1D198A. Le fragment PCR est purifié et transformé dans la levure *S. pombe*. Les transformants ont été sélectionnés pour la résistance à la généticine. Nous avons testé 19 clones par PCR diagnostique. Pour ce faire, un oligo « forward » est choisi au début de l'ORF de Pct1 et l'oligo « reverse » à la fin de l'ORF de Pct1. La PCR est réalisée sur colonies. Nous obtenons une bande de 1000 pb comme attendu (Figure 26). Une restriction *EcoRV* a ensuite été réalisée. Deux bandes de 400 pb et 600 pb étaient attendues si le fragment muté s'est inséré au bon locus car un site *EcoRV* a été ajouté lors de la mutagenèse. Nous n'avons pas obtenu de transformants présentant un profil d'intégration au bon locus comme en témoigne la présence de la seule bande de 1000 pb (Figure 27).



**Figure 26 :** PCR diagnostique réalisée sur 19 clones issus de la transformation dans la levure *S. pombe*. Le primer « forward » s'hybride au début de l'ORF de Pct1 et le primer « reverse » à la fin de l'ORF de Pct1. Le fragment attendu a une taille de 1000pb. La première piste contient le marqueur de taille.



**Figure 27 :** Restriction diagnostique *EcoRV* sur 19 clones issus de la transformation. Deux bandes sont attendues à 400 pb et 600 pb si le mutant est présent au locus *pct1*. La première piste correspond à un marqueur de taille.

Nous concluons que dans aucun cas, la recombinaison n'a entraîné le remplacement de *pct1* par le fragment muté.

## **Conclusions**



## Conclusions

Le coiffage 5' de l'ARNm eucaryotique est un processus universel. Trois activités enzymatiques sont requises pour cette modification : les activités triphosphatase (T), guanylyltransférase (G) et méthylase (M). Chez *S. cerevisiae*, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont permis de localiser les trois protéines du coiffage dans les régions 5' des gènes étudiés, précisément à l'endroit où prend place le processus co-transcriptionnel d'ajout de la coiffe et présentent un profil dégressif vers les régions 3'. Chez *S. pombe*, la guanylyltransférase et la méthylase présentent des profils d'occupation remarquablement similaires entre eux ainsi qu'à leurs homologues chez *S. cerevisiae*. Notre travail a établi que la triphosphatase (Pct1), présente un profil non dégressif, similaire à celui de l'ARN polymérase II, ce qui suggère que l'enzyme voyage avec le complexe polII.

Le premier objectif de ce mémoire a été d'optimiser le protocole de l'immunoprécipitation chromatinienne. Deux étapes sont particulièrement ciblées : la sonication, qui consiste à fractionner la chromatine pour produire de petits fragments d'ADN solubles, et l'immunoprécipitation, qui permet d'isoler des fragments d'ADN associés à la protéine ciblée par un anticorps spécifique. Nous avons testé le biorupteur de la firme Diagenode comme alternative au sonicateur (Cfr. Manuel de l'utilisateur en annexe). Ensuite, de nouveau dans un but d'optimisation, nous avons testé les billes magnétiques commercialisées par la firme Active Motif comme alternative aux billes de sépharose classiques.

Afin de comparer l'efficacité du sonicateur et du biorupteur nous avons sondé l'abondance de Rpb3, une des sous-unités de la polII, le long du gène *act1*. Nous obtenons deux profils presque équivalents pour le sonicateur et le biorupteur, à savoir une augmentation de l'abondance de Rpb3 (et donc de la polymérase II) en fin d'ORF du gène *act1*. Le biorupteur donne des différences d'intensité un peu moins marquées mais qui n'entraînent pas les conclusions. Il apparaît donc que le biorupteur est une très bonne alternative au sonicateur.

Afin de comparer l'efficacité des billes de sépharose et des billes magnétiques nous avons sondé comme précédemment l'abondance de Rpb3, une des sous-unités de la polII, le long du gène *act1*. La similarité des résultats montre que les billes magnétiques sont utilisables dans le protocole de CHIP. Elles présentent l'avantage de réduire considérablement la durée de l'expérience et l'utilisation d'un aimant est nettement moins contraignante que les centrifugations traditionnelles.

Au terme de cette première partie, nous avons optimisé deux étapes décisives dans le protocole d'immunoprécipitation de chromatine en montrant que l'utilisation du biorupteur et de billes magnétiques qui présentent les avantages que nous avons détaillés donne des résultats équivalents à ceux obtenus avec le protocole classique.

Dans la seconde partie du travail, nous avons posé la question du rôle biologique de la triphosphatase Pct1 lors de la transcription. Pour réaliser des immunoprécipitations de chromatine avec la triphosphatase Pct1 chez *S.pombe*, nous avons d'abord « taggé » la protéine car il n'existe pas d'anticorps spécifique de Pct1. Le but de cette partie du travail était de prolonger l'expérience pilote qui suggérait un profil inattendu pour la triphosphatase Pct1 chez *S. pombe*. Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer le profil non dégressif de Pct1 observé sur le gène *adh1*. Une expérience de CHIP a été réalisée en utilisant la souche *pct1-3HA* et 4 couples de primers ont permis de sonder l'abondance de Pct1 sur l'unité de transcription d'*adh1*. Nous avons également utilisé des couples d'amorces pour sonder les unités de transcription de *act1* qui code l'actine (Mertins & Gallwitz, 1987) et *pma1* qui code une pompe à protons (Ulaszewski et al, 1987). Nos résultats confirment que l'ARNm triphosphatase Pct1 est présente tout au long du gène *adh1* chez *S. pombe*, ceci contrairement au profil dégressif de son homologue chez *S. cerevisiae* (Komarnitsky et al, 2000; Schroeder et al, 2000). Ce même profil non dégressif est également observé pour les gènes *act1* et *pma1*.

Cette caractéristique unique de Pct1 nous a amené à poser l'hypothèse que Pct1 pourrait avoir un second rôle lors du cycle transcriptionnel qui justifie sa présence continue aux côtés de la polymérase. Pour tester cette possibilité, nous avons généré un mutant de déplétion de Pct1 dans le but de pouvoir analyser l'effet de la disparition de Pct1 sur l'ARN polymérase II. La souche a été testée en présence de thiamine pour vérifier la déplétion de la protéine. En parallèle, nous avons utilisé comme contrôle la souche *nmt81-pcm1-TAP* qui permet de dépléter la cap-méthyltransférase. Comme décrit dans la littérature, la protéine Pcm1-TAP est effectivement déplétée au cours du temps (Guiguen et al. 2007). Pour Pct1, par contre, nous n'avons observé aucune différence d'expression même après 6h de culture en présence de thiamine. Le système de promoteur switch-off n'est donc pas fonctionnel dans le cas de *pct1*. Une des raisons peut être la demi-vie élevée de la protéine au cours du temps.

Pour atteindre notre objectif, nous avons utilisé une stratégie alternative qui consiste à inactiver *pct1* en utilisant un allèle thermosensible (ts). Pour mener à bien cette approche, nous avons profité de l'étude réalisée par Takase et al. (Takase et al, 2000) qui décrit la synthèse et l'analyse d'allèles ts de la triphosphatase Cet1 de *S.cerevisiae*. Nous avons entrepris de mimer la mutation D422A présente dans l'allèle *cet1-401* car le résidu acide aspartique muté en alanine est conservé chez *S. pombe*. Les auteurs ont également montré que cette mutation déstabilisait la protéine à 37°C. Une construction a été générée et un essai d'intégration réalisé. L'analyse de candidats intégrants a révélé qu'aucun clone ne possédait la mutation voulue.

# **Perspectives**

## Perspectives

A court terme, il serait intéressant de confirmer les profils en ChIP obtenus pour le biorupteur et les billes magnétiques. Les enzymes de restriction, considérées comme une alternative possible à la sonication, pourront être testées. Dans le but d'obtenir un mutant thermosensible nous devons réaliser des transformations supplémentaires. Une fois le mutant obtenu, il sera testé à 37°C. L'impact éventuel de la déplétion de Pct1 sur l'ARN polymérase sera alors étudié par ChIP.

A long terme il serait intéressant de savoir quels sont les déterminants de la différence de cinétique observée entre Pct1 et Pce1 chez *S. pombe*. Deux protéines différentes sont connues pour interagir physiquement avec Pct1 et Pce1. La première est Rpb1 qui interagit avec Pct1 et Pce1 via son CTD (Pei et al, 2001). La deuxième protéine est Spt5, un régulateur de l'élongation, qui, elle aussi interagit avec sa région C-terminale (CTR) avec Pct1 et Pce1 (Pei & Shuman, 2002). Si Pct1 et Pce1 ne semblent pas posséder de sites de liaison distincts sur le CTD (Pei et al, 2001), deux sites de liaison séparés sont retrouvés sur le CTR de Spt5. Pct1 se lie à la partie N-terminale du CTR de Spt5 tandis que Pce1 se lie près de la partie C-terminale du CTR de Spt5 (Pei & Shuman, 2002). Ceci nous montre que les sites de liaison de Pct1 et Pce1 sur le CTD de Spt5 sont différents chez *S. pombe* et que leur liaison peut dès lors être régulée différemment. L'étape subséquente serait de comprendre le rôle de ce domaine de Spt5 sur la localisation particulière de Pct1 tout au long de la transcription.

Les résultats que nous avons obtenus avec Pct1 nous confrontent à deux descriptions d'abondance différentes entre *S. pombe* et *S. cerevisiae*, ne permettant pas d'extrapoler un résultat pour le comportement de ces protéines lors de la transcription chez l'homme. La particularité des mammifères est que les activités triphosphatase et guanylyltransférase sont codées au sein d'un même gène (*hce1*) pour la production d'une protéine bifonctionnelle tandis que la méthylase de coiffe (*hcm1*) est indépendante. La question que nous nous posons est de savoir si la protéine Hce1 suivrait une cinétique transcriptionnelle proche de celle de Pct1 plutôt que celle de Pce1. Il est évident que la meilleure solution consisterait à décrire les profils d'abondance de ces enzymes chez l'homme. Il est cependant à noter que les profils de l'ARN polymérase ne sont pas constants sur les gènes humains et qu'il serait difficile de rationaliser les résultats sur base de ceux-ci (Morris et al, 2005). Une alternative consisterait à réaliser une complémentation hétérologue de Pct1 par la partie triphosphatase de Hce1 humaine et tester son abondance par ChIP chez *S. pombe*. Une approche plus poussée consisterait à déléter *pct1* et *pce1* chez la levure et compléter cette souche au moyen du gène *hce1* et parallèlement d'observer la localisation de Hce1 sur les gènes de *S. pombe*.

En raison du rôle primordial de la coiffe de l'extrémité 5' des ARNm, les protéines impliquées dans la formation de cette structure constituent une cible potentielle pour le développement de molécules thérapeutiques. L'ARN 5'-triphosphatase de la levure constitue une cible de choix pour le développement d'inhibiteurs antifongiques puisque: (1) l'activité ARN 5'-triphosphatase est essentielle pour la survie de la levure; (2) la structure primaire ainsi que la structure tridimensionnelle de la protéine semblent conservées chez les différentes espèces de levures (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *S. pombe*); (3) la structure et les mécanismes utilisés par la protéine sont différents de ceux retrouvés chez les mammifères; (4) et, enfin, les cellules de mammifères ne semblent pas posséder de protéines homologues de l'ARN 5'-triphosphatase de la levure. Le traitement d'infections fongiques opportunistes, telles que celles causées par *C. albicans* chez des patients immunodéprimés, pourrait donc

éventuellement être envisagé. Le développement de composés pouvant se loger spécifiquement dans le tunnel caractéristique des ARN 5'-triphosphatases de levures et/ou le développement de composés pouvant inhiber la liaison de l'ARN 5'-triphosphatase à l'ARN guanylyltransférase pourrait permettre de combattre certaines infections fongiques opportunistes. Ce type d'inhibition pourrait constituer une alternative aux traitements antifongiques actuels (azoles, amphotéricine B) qui reposent essentiellement sur des composés affectant la perméabilité cellulaire et possédant de nombreux inconvénients (résistance, toxicité). Le développement d'agents thérapeutiques visant à inhiber spécifiquement les activités ARN guanylyltransférase et ARN méthyltransférase s'avèrera probablement plus difficile puisque les données actuelles indiquent que la structure tridimensionnelle et les mécanismes d'action de ces protéines semblent conservés chez les mammifères et les divers agents pathogènes étudiés jusqu'à présent.

Idéalement, l'agent antiviral devra posséder un certain nombre de propriétés. Le composé devra se lier à la protéine cible avec une haute affinité, posséder une haute spécificité (par exemple, avoir un effet minimal sur des protéines similaires de l'hôte), posséder un faible niveau de toxicité, agir sur le plus grand nombre d'isolats viraux possibles, pouvoir agir de façon synergique avec d'autres composés utilisés pour combattre le virus et posséder une demi-vie suffisamment longue pour permettre le maintien de concentrations suffisantes pour combattre l'infection virale.

On le voit, une meilleure compréhension du rôle de Pct1 dans le coiffage mais aussi dans la dynamique transcriptionnelle aidera à rationaliser le développement de ces molécules antifongiques.

# **Matériels et méthodes**

## Matériels et méthodes

### I. Matériels

#### I.1 Milieux de culture

##### I.1.1 Milieu riche pour levures: milieu YES (Yeast extract supplemented medium)

Pour 400 ml d'eau bidistillée	Forme liquide	Forme solide (agar)
YES	14 g	14 g
Agar	-	8 g

##### I.1.2 Milieu minimum : milieu EMM (Edinburgh minimal medium)

Pour 400 ml d'eau bidistillée	Forme liquide	Forme solide (agar)
EMM	12,9 g	12,9 g
Agar	-	8 g
(ALU (Adénine – leucine – uracile))	24 ml	24 ml

##### I.1.3 Milieu riche pour *E. coli* : milieu LB (Luria Bertani)

Pour 400 ml d'eau bidistillée	Forme liquide	Forme solide (agar)
LB	8 g	8 g
Agar	-	7 g

Les milieux sont autoclavés 15 minutes à 116°C. Le milieu est refroidi à température ambiante puis additionné d'antibiotiques ou autres suppléments avant d'être coulé dans des boîtes de Petri.

#### I.2 Souches, plasmides et oligonucléotides (Tableaux 1 et 2)

Souches / plasmides	Génotype
<b>Souches</b>	
<i>S. pombe</i> :	
yDH19	<i>ura4-D18 leu1-32 ade6-210 h+</i>
yDH22	<i>ura4-D18 leu1-32 ade6-216 h-</i>
<i>E. coli</i> :	
DH10B	<i>F-, mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80dlacZΔlacX74, endA1, recA1, deoR Δ(ara, leu)7697, araD139, galU, galK, nupG, rpsL λ-</i>
<b>Plasmides</b>	
pDH191	pFA6a – 3HA – KanR
pDH34	pFA6a – 2TAP – KanR
pDH70	pFA6a – nmt81 – NatR

Tableau 1 : Souches et plasmides utilisés

Oligonucléotides	Séquence	Tm	Concentration	Usage
<b>PCR expand</b>				
Pct1 tagging F	5' GGAAGCTCCTTTGTTTCGGAGGGTACAGTTGTTTATGGACAAT GTTTCGTATTTTGAGACGAGAGCATTCTCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3'	70°C	100 µM	
Pct1 tagging R	5' GATGCAAAGCAAGGAACAATTATTAAGAAATGACTTAAGAATGT CAAATAAGTAGCAAAAAGTGTAAGAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'	65°C	100 µM	
nmt – Pct1 F	5' AGGAACTACCGAAAAGTGACAGTGTCAAGATCAATTAATATGTTTA CAAGAAGAAATGTATAATTAAGAAGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'	65°C	100 µM	
nmt – Pct1 R	5' TTTTCATCTATCTTTCCTTTTCAATAGAAGGCAGTTCGTTTCTTC ATGTAATAAACCTTTAAGGTCCATGATTTAAACAAAGCGACTATA 3'	64°C	100 µM	
Pct1 D198A F (pDH34)	5' GCCCTAATGCTGCTTTTGATATCCGAATTC 3'	55°C	100 µM	Primer pour amplifier pct1 D198A, mutation D198A (GAT -> GCT) soulignée plus SNIP EcoRV (ATA -> ATC) souligné.
Pct1 D198A R (pDH34)	5' CCCGGGGATCCGAGAATGCTCTCGTCTCAAATACG 3'	63°C	100 µM	Primer pour amplifier pct1 D198A, reverse avec STOP retiré et site BamHI ajouté pour cloner dans pDH34.
Pct1 D198A F	5' ATCAAAGTGACAATCAAGTTTTGGCCTGTGTGAAAAAGCGAAGAG TTGCTGATTATTTTATATTGCCCTAATGCTGCTTTTGATATCC 3'	67°C	100 µM	Intégration du D198A.
Pct1 C-term tagging R	5' AATGCAGTTTGACAGTGAGTGTGATGGATAAAAATCATTAACATCA TAACTCGTATCATTAATAAAGAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'	65°C	100 µM	C-term tagging, primer R.
<b>PCR diagnostique</b>				
Kan check	5' CGGATGTGATGTGAGAAGTGTATCCTAGC 3'	59°C	100 µM	Reverse dans kan (445- 417) dans pFA6a- KanMX6 à 400pb du site BamHI.
Pct1 tagging check F	5' CGTTGGCTATGTGCATCAGG 3'	48°C	100 µM	Oligo forward en 741- 760 dans Pct1.
nmt1 – Pct1 check R	5' CCTGATGCACATAGCCAACG 3'	48°C	100 µM	Oligo reverse en 760- 741 dans Pct1.
nmt1 - down	5' AAGAGGAATCCTGGCATATC 3'	48,1°C	0,1 nmol/µM	
<b>Séquençage</b>				
TAP check R	5' CTAAAGCGGTTGGCTGCTG 3'	62°C	100 µM	Oligo reverse dans TAP à 77 pb du site BamHI.

Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés

## II. Méthodes

### II.1 Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Les fragments sont visualisés grâce à une molécule fluorescente, le bromure d'éthidium, qui se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant dans la double hélice. Le bromure d'éthidium est visible sous les UV et permet donc de mettre en évidence l'ADN. L'émission est proportionnelle à sa taille mais également à la quantité d'ADN présente. Ainsi en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, il est possible d'estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.



- **Méthode :**

- Pour un gel d'agarose 1%, dissoudre 10 g d'agarose (Molecular Biology Grade) dans 1 litre de tampon TAE (Tris-acide acétique-EDTA) 1X.
- Autoclaver 15 minutes. Quand la température de la solution avoisine 55°C, couler le gel sur le support *ad hoc* muni d'un peigne permettant de faire les puits de chargement et ajouter 5 µl de bromure d'éthidium (10 mg/ml) pour 100 ml d'agarose avant la polymérisation du gel.
- Après solidification de l'agarose (15 minutes), immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE1 X.
- Déposer les échantillons additionnés de tampon de chargement dans les puits.
- La différence de potentiel appliquée est d'environ 125 V, l'ADN chargé négativement migre de la borne négative vers la borne positive.
- Visualiser l'ADN sous UV.

- **Marqueur de taille pour gel d'agarose :**

En parallèle des échantillons, on fait migrer 5 µl de marqueur de poids moléculaire afin de déterminer la taille du ou des fragments présents dans les échantillons. Le marqueur utilisé est le Smart ladder (Eurogentec).

## II.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt (amplicon). Des amorces nucléotidiques d'environ 20 bases, complémentaires à la séquence se trouvant de chaque côté de la région cible, s'hybrident chacune à un des deux brins. La longueur de la séquence cible est déterminée par la distance entre les deux amorces. Une ADN polymérase thermostable est utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce. Nous avons utilisé la *Taq* DNA Polymérase (Promega) pour les PCR diagnostiques et la Expand High Fidelity (Roche) et la Phusion (Finnzyme) pour générer des fragments destinés à être intégrés.

### Un cycle PCR comprend 3 étapes:

- La dénaturation, à 95°C, permet de séparer les deux brins d'ADN.
  - L'hybridation des amorces s'effectue à une température dépendant de la température de melting des amorces utilisées, le plus souvent entre 50 et 72°C.
  - L'élongation, à 68 ou 72 °C, permet la polymérisation des brins par l'enzyme.
- En répétant ce cycle une trentaine de fois, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la région cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting  $T_m$  des amorces. Celle-ci se calcule de la façon suivante:  $T_m = 59,92 + 0,41 (\% G + C) - (600/N)$ .

Il est également recommandé, de façon à limiter les amplifications non spécifiques, que l'amorce contienne un résidu G ou C aux extrémités. Les ponts hydrogènes formés par ces bases étant au nombre de trois, la liaison est plus forte et permet une stabilisation de l'oligonucléotide.

- **Protocole Gene Targeting chez *S. pombe* :**

Cette méthode vise à générer des fragments contenant des extrémités recombinogènes (cfr constructions dans la partie résultats). Le mélange de réaction est réalisé dans un eppendorf et est ensuite dispatché dans 4 tubes PCR :

Master Mix pour 4 x 100 µl :

Réactifs	Quantité
ADN portant la région à amplifier (matrice)	1,5 µl
Tampon 10X correspondant à la polymérase	40 µl (15 mM de MgCl <sub>2</sub> final)
Mélange dNTP's (20 mM)	20 µl (1mM final)
Primer 1 100 µM (Tableau 2)	3,2 µl (0,8 µM final)
Primer 2 100 µM (Tableau 2)	3,2 µl (0,8 µM final)
Expand polymérase	4 µl
Eau bidistillée	328 µl

Programme PCR (cycles) :

Température	Durée du cycle
94°C	2'
94°C	30''
50°C	1'
68°C	3'
→ 8x à partir de l'étape 2	
94°C	30''
58°C	1'
68°C	3'
→ 34x à partir de l'étape 6	
68°C	10'

Pour vérifier l'amplification du fragment cible, 1/10<sup>ème</sup> de la réaction PCR est déposé sur gel d'agarose.

- **PCR Phusion**

L'enzyme Phusion<sup>TM</sup> est née de la fusion d'une polymérase de *Pyrococcus* à un domaine de fixation aspécifique à l'ADN. Phusion<sup>TM</sup> est notamment fournie avec un tampon HF optimisé pour la fidélité ou le tampon GC (matrices difficiles à amplifier). Alors que la plupart des enzymes ayant une activité d'autocorrection (exo+) améliore la fidélité de l'amplification au détriment de la vitesse d'extension et de la processivité. L'utilisation de Phusion limite le décrochage de l'enzyme durant la phase d'extension et augmente considérablement sa processivité. Les principales caractéristiques de cette enzyme sont une haute fidélité (6 fois plus que la Pfu et 1,5 fois plus que la Pfu modifiée), une processivité élevée (10 fois celle de la Pfu), une réduction des temps de protocole et des quantités d'enzyme et enfin une grande robustesse.

Mix pour une réaction de 50  $\mu$ l :

Réactifs	Quantité
ADN génomique de <i>S. Pombe</i> (matrice)	1 $\mu$ l
Tampon HF 5X	10 $\mu$ l (15 mM de MgCl <sub>2</sub> final)
Mélange dNTP's (20 mM)	2 $\mu$ l (1mM final)
Primer 1 10 $\mu$ M (Tableau 2)	2,5 $\mu$ l (0,8 $\mu$ M final)
Primer 2 10 $\mu$ M (Tableau 2)	2,5 $\mu$ l (0,8 $\mu$ M final)
Phusion polymérase	0,5 $\mu$ l
Eau bidistillée	32 $\mu$ l

Programme PCR (cycles) :

Température	Durée du cycle
98°C	30''
98°C	10''
52°C	15''
72°C	10''
→ 29x à partir de l'étape 2	
72°C	10'

• **PCR sur colonies (diagnostique) :**

Cette méthode permet de diagnostiquer une intégration à un locus donné après une étape de transformation. Une partie de la colonie est additionnée au mélange PCR et sert de matrice ADN.

Mix pour une réaction de 100  $\mu$ l :

Réactifs	Quantité
Tampon 5X correspondant à la polymérase	20 $\mu$ l (15 mM de MgCl <sub>2</sub> final)
Mélange dNTP's (20 mM)	5 $\mu$ l (1mM final)
Primer 1 100 $\mu$ M (tableau 2)	0,7 $\mu$ l (0,7 $\mu$ M final)
Primer 2 100 $\mu$ M (tableau 2)	0,7 $\mu$ l (0,7 $\mu$ M final)
Taq polymérase "GO"	0,5 $\mu$ l (à ajouter après 10' à 100°C)
Eau bidistillée	73 $\mu$ l

Programme PCR (cycles) :

Température	Durée du cycle
100°C	10' (sans Taq pol)
94°C	4'
94°C	45''
T <sub>m</sub> - 3°C	30''
72°C	2'
→ 34x à partir de l'étape 3	
72°C	10'

Pour vérifier l'amplification du fragment cible, 1/10<sup>ème</sup> de la réaction PCR est déposé sur gel d'agarose.

### II.3 Purification avec le kit PCR « QIAquick »

Cfr. Protocole associé au kit ainsi qu'en annexe.

### II.4 Transformation de levures

- *Solutions*

#### LiAc-TE

Acétate de lithium 0,1M  
Tris pH7,5 10mM  
EDTA 1mM

#### LiAc-TE-PEG

LiAc  
40% PEG 4000

- *Méthode*

La transformation est un transfert génétique au cours duquel de l'ADN bicaténaire plasmidique ou linéaire est introduit dans un organisme. Son devenir dépend ensuite de la présence de régions d'homologie avec l'ADN chromosomique (pour une intégration) ou d'une origine de répllication (maintien d'un plasmide). Afin de rendre compétentes les levures utilisées, divers réactifs sont utilisés : le polyéthylène glycol (PEG) fragilise les parois cellulaires par perforation, l'acétate de lithium (LiAc) précipite l'ADN sur les membranes cellulaires, le diméthylsulfoxyde (DMSO), quant à lui, est un agent dénaturant des structures complexes de l'ADN et enfin l'ADN de sperme de saumon (ADN carrier) qui par un effet de masse favorise l'entrée de l'ADN exogène. On soumet ensuite le « mélange levures - ADN transformant » à un choc thermique à 42°C.

- Décongeler le carrier conservé à -20°C et le placer dans un bloc chauffant à 100°C pendant 5 minutes pour le dénaturer.
- Inoculer une culture cellulaire liquide pour générer 10<sup>8</sup> cellules par transformation.
- Centrifuger les cellules à 4000 rpm pendant 5 minutes puis enlever le surnageant.
- Laver les cellules avec environ 20 ml d'eau stérile et resuspendre.
- Centrifuger comme précédemment, enlever le surnageant.
- Ajouter 1 ml d'eau, resuspendre et transférer dans un eppendorf.
- Centrifuger 10 secondes (quickspin) puis enlever le surnageant.
- Ajouter 85 µl de LiAc et resuspendre.
- Ajouter 2 µl d'ADN carrier ainsi que 15 µl d'ADN PCR et resuspendre doucement.
- Laisser le tout 10 minutes à température ambiante.

- Ajouter 260 µl de PEG et resuspendre doucement.
- Ajouter 43 µl de DMSO, resuspendre doucement.
- Choc thermique dans un bain à 42° pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 3000 rpm pendant 1 minute et enlever le surnageant.
- Ajouter 300 µl d'eau bidistillée.
- Inoculer 100 µl de cellules par boîte.
- Etaler avec des billes en effectuant des mouvements de va-et-vient avec les boîtes.
- Incuber à l'étuve à 32°C (ou une autre température en fonction de la souche).
- Le lendemain, répliquer sur milieu sélectif si nécessaire.

## II.5 Minipréparation d'ADN plasmidique

Cfr. Protocole associé au kit nucleospin plasmid de la firme Macherey-Nagel ainsi qu'en annexe.

## II.6 Restriction d'ADN plasmidique purifié

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique : elles reconnaissent des sites de restriction, constitués par une séquence souvent palindromique, de 4 à 8 paires de bases. La coupure peut former des "bouts protrudants" ou générer des bouts francs. La ligation d'un bout protrudant n'est possible qu'avec un bout protrudant complémentaire. Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical.

Pour cela, on mélange dans un eppendorf

- 1/10 du volume total de la miniprep d'ADN plasmidique purifié.
- 1 µl d'enzyme de restriction.
- 1/10 du volume total du mélange de restriction de tampon de restriction 10X.
- Porter le volume à 20 µl avec de l'H<sub>2</sub>O bidistillée stérile.
- Incubation d'une heure à 37°C.

L'ADN restreint est ensuite séparé selon la taille des fragments par une électrophorèse en gel d'agarose. Pour cela, il faut ajouter un dixième du volume de chargement de tampon de chargement d'électrophorèse au produit de restriction et déposer sur gel d'agarose.

## II.7 Ligation

On utilise l'ADN ligase du phage T4 pour lier de manière covalente des fragments d'ADN. Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une autre extrémité. Pour être active l'enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg<sup>++</sup>.

Dans un eppendorf, placer un mélange de deux fragments à liguer dans un rapport moléculaire vecteur et insert de 1/3. Ajouter 1 µl de DNA ligase T4 (Invitrogen) ainsi que 1/10<sup>ème</sup> du volume total de ligation de tampon de ligation 10X.

Compléter avec de l'eau bidistillée stérile et incuber à 16°C pendant 16 heures si les extrémités sont à bouts francs ou quelques heures (2 à 3) à 25°C si les extrémités sont protrudantes. Réaliser également un contrôle négatif dans lequel l'insert n'est pas ajouté.

## II.8 Transformation de bactéries CaCl<sub>2</sub> compétentes

Le but de l'opération est de faire pénétrer un plasmide à l'intérieur d'une bactérie dont la membrane a été rendue perméable à l'ADN par un traitement au CaCl<sub>2</sub> + glycérol 15%. La souche utilisée est *E. coli* DH10B.

- Ajouter 10 µl de la solution contenant le plasmide à 200 µl de cellules compétentes.
- Laisser sur glace pendant 30 minutes.
- Incuber les cellules à 42°C pendant 2 minutes (choc thermique).
- Ajouter 1 ml de milieu LB.
- Incuber une heure à 37°C.
- Etaler de 100 à 200 µl de cellules sur LB Agar contenant l'antibiotique adéquat.

## II.9 La technique du Western blot

Le western blot permet de détecter spécifiquement une protéine dans un extrait cellulaire. Cette méthode combinant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) et la spécificité des anticorps comporte trois étapes :

- La séparation d'un mélange de protéines par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de SDS (SDS-PAGE).
- L'électrotransfert des protéines sur une membrane de PVDF.
- La détection immunologique de la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques.

### II.9.1 Solutions

#### Tampon de transfert :

- 48mM TRIS
- 39mM Glycine
- 0,037% SDS
- 20% méthanol

#### « Towbin Buffer » :

- 25mM TRIS
- 192mM Glycine
- 0,1% SDS
- 20% méthanol
- H<sub>2</sub>O bidistillée
- pH 8,2 – 8,4

### II.9.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Le principe de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou « SDS-PAGE » est une technique de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La séparation se fait dans un réseau tridimensionnel formé par la polymérisation des chaînes de polyacrylamide. Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide/bis-acrylamide. La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par du TEMED (tétraméthylhydramide). Suivant le pourcentage d'acrylamide choisi, on peut adapter la taille des pores du gel à la taille des protéines à séparer.

Le  $\beta$ -mercaptoéthanol présent dans le mélange protéique à séparer permet la rupture des ponts disulfures, formant des chaînes polypeptidiques complètement dénaturées. Le SDS, détergent anionique déroule les structures protéiques et se fixe stoechiométriquement à leurs chaînes, leur conférant une charge négative égale par unité de masse. Dans un champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonction de leur poids moléculaire uniquement. Les petites protéines auront moins de difficultés à traverser le réseau de polyacrylamide que les grosses. Elles migreront donc plus rapidement et plus loin.

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties : le stacking gel ou gel de tassement qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation et le running gel ou gel de séparation.

### II.9.3 Préparation des extraits protéiques totaux

- Récolter dans un FALCON 10 ml d'une culture cellulaire ayant une  $DO_{600}$  de 0,5.
- Centrifuger la culture 5 minutes à 4000 rpm. Laver le culot dans 1ml d'eau bidistillée et transférer dans un tube eppendorf de 1 ml. Reculoter 10 secondes à 13000 rpm et éliminer le surnageant.
- Ajouter 300  $\mu$ l d'eau bidistillée et 300  $\mu$ l de NaOH 0,6M. Incuber 10 minutes à température ambiante. Centrifuger 10 secondes à 13000 rpm et garder les culots des cellules.
- Ajouter 70  $\mu$ l du tampon de lyse et bouillir les échantillons 3 minutes à 100°C.
- Stocker les échantillons à -20°C.

### II.9.4 Séparation des protéines par « SDS-PAGE »

- Les échantillons sont bouillis 5 minutes, afin de dénaturer les protéines, centrifugés quelques secondes et, enfin, sont chargés sur le gel ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Low Range, Biorad). Ce dernier nous permettra de déterminer la taille des protéines détectées.
- Lancer la migration en suivant les paramètres suivants : 30mA et 300V, pendant 2 à 3 heures, selon la taille des protéines et la réticulation du gel.

### II.9.5 Transfert des protéines

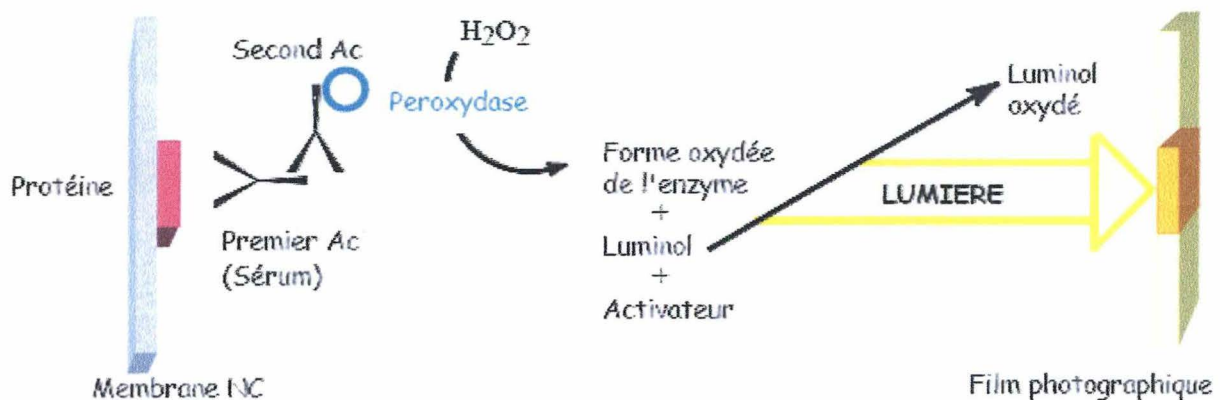
Le transfert des protéines sur une membrane de PVDF est un transfert de type semi-sec. Une différence de potentiel est appliquée entre le gel de polyacrylamide et une membrane de PVDF permettant aux protéines chargées négativement d'être transférées sur la membrane de PVDF, formant ainsi une réplique du gel.

- **Protocole :**

- Démouler le gel, découper une membrane de PVDF ainsi que 6 papiers Whatman aux dimensions du gel.
- La membrane est activée dans du méthanol et ensuite immergée dans le tampon de transfert. Les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert.
- Réaliser le montage « en sandwich » suivant : 3 papiers Whatman, le gel, la membrane puis de nouveau 3 papiers Whatman et le placer dans l'appareil de transfert (Owl, Panther).
- Transférer 1 heure à 12V (max) et 3mA par  $\text{cm}^2$  de surface de transfert.

### II.9.6 Immunodétection

Cette étape se base sur une technique de révélation dite indirecte où un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt reconnaît son épitope et s'y fixe. Un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase (Figure 1 ci-dessous), reconnaissant l'anticorps primaire permet de détecter la protéine d'intérêt.



**Figure 1 : Principe de la révélation immunologique par ECL.**

Les protéines transférées sur la membrane PVDF sont incubées avec des anticorps primaires. Les protéines ayant formé des complexes Ag /Ac réagissent ensuite avec des anticorps secondaires dirigés contre les premiers. Ces anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase. La peroxydase oxyde le luminol qui va émettre de la lumière permettant la révélation autoradiographique des complexes.

- **Étape de saturation**

Avant de mettre la membrane de PVDF en présence de l'anticorps primaire, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de la membrane pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Pour cela, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation dans une solution de saturation (PBS-lait 5 %). Cette étape peut aussi se faire à  $4^\circ\text{C}$  pendant une nuit.

Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifique, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope. La membrane est lavée trois fois quinze minutes avec du PBS-Tween 0,05%.



- ***Incubation avec l'anticorps primaire***

La membrane de PVDF est déposée dans une solution de PBS-lait 1% contenant l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt à la dilution souhaitée (le plus souvent 1000 fois), pendant une heure sous agitation. La solution contenant les anticorps est conservée à -20°C ou à 4°C. La membrane est lavée trois fois avec du PBS-Tween 0, 05% pendant quinze minutes.

- ***Incubation avec l'anticorps secondaire***

L'anticorps secondaire est dirigé contre le domaine F(c) de l'anticorps primaire. Il est conjugué à la peroxydase, enzyme permettant l'émission de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé.

L'anticorps secondaire utilisé est une IgG de chèvre anti-IgG de souris ou de lapin. La membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire dilué 2000 fois dans du PBS - lait 1 % sous agitation pendant une heure.

La membrane est lavée trois fois avec du PBS - Tween 0, 05% pendant quinze minutes.

- ***Révélation***

La technique de détection utilise les réactifs chémiluminescents « ECL » S1 et S2 (Amersham Pharmacia Biotech) et se déroule en chambre noire.

- La membrane est mise en présence d'un mélange en volume égal des deux solutions ECL: S1 et S2. Ce volume est fonction de la surface à couvrir (surface en  $\text{cm}^2$  x 0,125 ml).

- Incuber durant une minute.

- La solution de détection est éliminée et la membrane recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) est placée dans une cassette de révélation. Un film autoradiographique est alors exposé pendant différents temps en fonction de l'intensité du signal obtenu.

- La révélation se fait au moyen d'une développeuse FUJI FPM-1000A. Le film passe successivement dans un bain révélateur ensuite dans le fixateur et finalement rincé à l'eau de ville et séché.

## II.10 Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées au cours de ce travail suivent un protocole adapté de celui de *S. cerevisiae* (Kuras, 2004). Toutes les souches de levure créées lors de ce travail pour les expériences ChIP sont reprises dans le tableau ci-dessous.

### Génotype des souches utilisées en ChIP

Génotype des souches utilisées en ChIP
<i>rpb3-3HA KanR ade6-M210 ura4-D18 leu1-32</i>
<i>pct1-3HA KanR ade6 ura4-D18 leu1-32</i>

### II.10.1 Solutions

#### Hepes KOH 1M pH 7,5

Peser 11,915g d'Hepes (Rnase, Dnase free), tamponner avec du KOH concentré et ajuster à 50 ml final avec de l'eau bidistillée.

#### Tris 20mM pH 8

Solution stock 1 M stérilisée et filtrée.

#### Glycine 2,5 M

Solution filtrée et stérilisée.

#### FA/SDS/PMSF

Solutions stocks stériles. Tampon final filtré (sans le PMSF...).

- Hepes KOH pH 7,5 50 mM      25 ml de 1M
- NaCl 150 mM                      15ml de 5M
- EDTA 1 mM                        1ml de 0,5M + 444 ml H<sub>2</sub>O
- Triton X100 1%                    5ml de 100%
- Déoxycholate de Na 0,1%      5ml de 10%
- (solution à 10% : peser + H<sub>2</sub>O stérile et filtrer) 2 g/20 ml.
- SDS 0,1%                            5ml de 10%
- PMSF 1 mM final à ajouter extemporanément (T<sub>1/2</sub>=30 min en solution aqueuse): solution stock 200 mM dans de l'isopropanol.

#### Tampon pronase X5

Solutions stocks stériles.

- Tris pH7,5 125 mM                250 µl de 1M
- EDTA 25 mM                        100 µl de 0,5M + 1150 µl H<sub>2</sub>O
- SDS 2,5%                            500 µl de 10%

#### Tampon Phosphate pH 7

Solutions stériles. Filtrer le tampon final

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 1M : 17,8 g pour 100 ml autoclaver

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 1M : 13,8 g pour 100 ml autoclaver

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 20 mM      11,54 ml de 1M

-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	20 mM	8,46 ml de 1M
-NaCl	150 mM	30 ml de 5M
-EDTA	10 mM	20 ml de 0,5M
-H <sub>2</sub> O stérile		porter à 1 litre

Tampon IP

## Solutions stériles et Tampon final filtré

- Tris 10 mM pH8	0,5 ml de 1M
-LiCl 0,25M	12,5 ml de 1M
-EDTA 1 mM	0,1 ml de 0,5M
-NP40 0,5% (IGPAL)	0,25 ml de 100%
-Déoxycholate de Na 0,5%	2,5 ml de 10%
-H <sub>2</sub> O stérile	porter à 50 ml

Tampon d'échantillon

- 0,0625% Xylène cyanol
- 50% Glycérol
- 10 mM EDTA

II.10.2 Produits

Billes de Zirconium 0,5 mm (Merck eurolab cat :#11079105)

BSA acétylée (Sigma B-8894 5 ml): 20 mg/ml

Pronase (Roche cat :70018421) : 20 mg/ml

RNase A : 10 mg/ml

Ac anti-HA F7 Santa Cruz (200 mg/ml)

Protéine A-Sépharose CL4B (Sigma)

II.10.3 Préparation des cellules et fixation

- Sur base d'une préculture, faire croître une culture de 100 ml à 32°C sous agitation, pour arriver à une DO entre 0,4 et 0,8 à 600 nm.
- Ajouter sous hotte 3 ml de formaldéhyde 37% (Sigma). Laisser 10 min en agitant à la main toutes les 2 min.
- Arrêter le cross-link avec 20 ml de glycine 2,5 M pendant 5 min.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 10 min à 4°C dans des pots de 250 ml.
- Jeter le surnageant, ajouter 100 ml de Tris 20 mM pH8 4°C, resuspendre à la main et centrifuger comme précédemment.
- Jeter le surnageant, ajouter rapidement 1 ml de FA/SDS/PMSF (pour les extraits en phase stationnaire rajouter le cocktail d'inhibiteurs). Toujours travailler dans la glace.
- Transvaser dans des tubes adaptables au Fastprep en évitant de faire des bulles.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 10 min à 4°C. Aspirer le surnageant à la trompe à vide.
- Congélation des échantillons à l'azote liquide et stockage à -80°C.

### II.10.4 Extraction de la chromatine

- Ajouter 400 µl de FA/SDS/PMSF et 400 µl de billes de Zirconium (425-600 mkm) pour chaque tube.
- Au moyen du Fastprep, réaliser 3 cycles de lyse à 5,5 de puissance pendant 30 secondes. Entre chaque run laisser refroidir deux minutes sur glace.
- Percer les tubes avec une aiguille (0,7 x 30 mm ou 0,5 x 15 mm) chauffé à blanc, disposer sur tubes eppendorf de 1,5 ml et centrifuger 2000 rpm pendant 3 min à 4°C.
- Transférer le culot dans un tube corex de 15 ml et y ajouter 5 ml de FA/SDS/PMSF.
- Centrifuger à 16000 rpm pendant 20 min à 4°C. La chromatine cross-linkée fait un anneau transparent au dessus du culot opaque. Aspirer le surnageant à la trompe à vide avec précaution.
- Transférer le maximum du culot dans un tube eppendorf de 2 ml avec le bout fermé d'une pipette Pasteur flambée. Ajouter dans le Corex 1 ml de FA/SDS/PMSF et resuspendre avec la pipette Pasteur, transvaser dans l'eppendorf. Laver à nouveau le Corex avec 0,6 ml de FA/SDS/PMSF et transférer dans l'eppendorf de 2 ml.
- Homogénéiser au maximum dans le tube eppendorf avec la pipette Pasteur puis mettre sur roue rotative à 4°C pendant 1h.
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 20 min à 4°C. Aspirer le surnageant toujours avec précaution, ajouter 1,6 ml de FA/SDS/PMSF et remettre en suspension avec le bout fermé d'une pipette Pasteur flambée.

### II.10.5 Sonication de la chromatine

- ***Avec le sonicateur***

- Utiliser la boîte et le portoir spéciaux. La sonde du sonicateur doit atteindre le niveau de 0,5 ml et être parfaitement centrée dans un tube eppendorf de 2 ml sans toucher la paroi. Les tubes sont dans un mélange eau/glace /NaCl pendant la sonication.
- Pour un sonicateur Vibra Cell™ p.130w, f.20kHz (Sonics and Materials inc.): l'appareil est réglé sur puissance 60, pulse 1 seconde. Soniquer 5 fois 40 secondes avec un intervalle de 20 secondes sans sonication (taille moyenne des fragments attendue dans ces conditions : 400 pb).
- Transférer dans des tubes Greiner de 14 ml et ajouter 1 ml de FA/SDS/PMSF. Mettre sur roue rotative à 4°C, pendant 30 min, avec un angle d'inclinaison faible.
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 min à 4°C. La chromatine est maintenant soluble. Reprendre le surnageant, aliquoter trois tubes de 700 µl et 1 tube de 200 µl. Congeler dans de l'azote les 3 tubes de 700 µl et utiliser le tube de 200 µl pour vérifier la taille moyenne des fragments.

- ***Avec le biorupteur (Cfr. Manuel de l'utilisateur en annexe)***

- Ajouter de l'eau froide dans la cuve (jusqu'à la ligne bleue) avec 0,5 cm de glace pilée en surface pour maintenir la température autour de 10°C.
- Soniquer 10 min 30 sec (7 cycles ; 30 sec ON et 60 sec OFF) en position « high ».
- Transférer dans des tubes Greiner de 14 ml et ajouter 1 ml de FA/SDS/PMSF. Mettre sur roue rotative à 4°C, pendant 30 min, avec un angle d'inclinaison faible.
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 min à 4°C. La chromatine est maintenant soluble. Reprendre le surnageant, aliquoter trois tubes de 700 µl et 1 tube de 200 µl. Congeler dans de l'azote les 3 tubes de 700 µl et utiliser le tube de 200 µl pour vérifier la taille moyenne des fragments.

### II.10.6 Contrôle de la taille des fragments d'ADN

- Prendre un aliquot de 200 µl de chromatine, ajouter 50 µl de tampon pronase X5 et 12,5 µl pronase (20 mg/ml dissouts dans l'eau), incuber 1h à 37°C puis à 65°C O/N dans une étuve. Cette étape permet de digérer les protéines et de réverser le cross-link. Le lendemain, ajouter 0,7 ml de RNase (10 mg/ml) et incuber 1h à 37°C.
- Purifier l'ADN sur colonne (PCRapace kit de Invisorb) en suivant le protocole. Eluer avec 50 µl tampon d'éluion (ou Tris 10 mM pH 8,5). Analyse de la taille des fragments par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) avec 12 µl d'ADN purifié + 2,7 µl tampon d'échantillon Xylène Cyanol.

### II.10.7 Immunoprécipitation

#### IP 3HA (Protéine A-Sépharose)

##### *Préparation des billes couplées aux anticorps*

Avec la ProtA-Sépharose lyophilisée (CL-4B, Sigma):

- Resuspendre dans 1,5 ml d'eau.
- Incuber sur une roue rotative à température ambiante pendant 3 minutes. Centrifuger 2 minutes à 5000 rpm à température ambiante.
- Enlever le surnageant avec une pipette Pasteur effilée.
- Répéter 10 fois le lavage.
- Estimer le volume de gel et ajouter 3 volumes de tampon phosphate (les billes peuvent être conservées à 4°C).

##### *Réaction d'immunoprécipitation*

Pour une réaction d'immunoprécipitation, incuber dans 250 µl final :

- 60 µl de résine (ProtA-Sépharose) en suspension homogène.
- 20 µl d'Ac anti-HA (F7, Santa-Cruz).
- 12,5 µl de BSA-acétylée.
- 157,5 µl de tampon PO<sub>4</sub>.
- Incuber toute la nuit sur roue rotative à 4°C.

Le lendemain :

- Décongeler un tube de chromatine, centrifuger à 12000 rpm pendant 15 min à 4°C.
- Prélever 250 µl de billes couplées aux Ac anti-HA F7 par IP.
- Centrifuger à 2000 rpm 1 min.
- Enlever le surnageant.
- Laver avec 1 ml de tampon PO<sub>4</sub> sur roue rotative pendant 5 min.
- Centrifuger à 2000 rpm 1 min.
- Enlever le surnageant.
- Ajouter 25 µl de BSA acétylée et 500 µl de chromatine (les 100 µl de chromatine restants sont conservés à 4°C).
- Incuber à RT pendant 1h sur roue rotative.
- Centrifuger à 2000 rpm 1 min.
- Enlever le surnageant.
- Réaliser 3 lavages successifs avec 1,2 ml de FA/SDS auquel on a ajouté 350mM NaCl (500 mM final), soit 2,1 ml NaCl 5 M pour 30 ml de FA/SDS, sur roue rotative pendant 5 min.

- Centrifuger 1 min à 2000 rpm.
- Faire 1 lavage en Tampon IP puis 1 lavage en TE pH 8.
- Eluer pendant 20 min à 65°C dans un bloc chauffant à 1000 rpm avec 135 µl de tampon pronase 1X.
- Centrifuger 1 min à 13000 rpm.
- Reprendre délicatement le surnageant (125 µl).
- Ajouter 6,25 µl de pronase (20mg/ml). Vortexer légèrement.
- Incuber 1h à 37°C.
- Incuber toute la nuit à 65°C dans une étuve.

Dans un même temps, sur les 100 µl de chromatine restants non immunoprécipités (ADN total) :

- Ajouter 25 µl de tampon pronase X5 et 6,25 µl de pronase.
- Incuber 1h à 37°C.
- Incuber toute la nuit à 65°C dans une étuve.

Le lendemain, traitement à la RNase pour les ADN de l'IP et les ADN totaux :

- Ajouter 3,3 µl de RNase diluée 10 fois dans l'eau.
- Incuber 1h à 37°C.
- Purification des fragments d'ADN (PCRAPACE kit de Invisorb).
- Sécher les colonnes 5 min à 37°C après lavage.
- Eluer avec 50 µl de tampon d'éluion (ou Tris 10 mM pH 8,5) pendant 1 min.

### **Billes magnétiques**

Cfr. Protocole associé au kit Chip-IT Express Assay de Actif Motive

### **II.10.8 PCR quantitative**

La PCR quantitative, sensible et pratique à mettre en œuvre, nous permet de quantifier les ADN totaux et les ADN immunoprécipités afin d'obtenir le rapport (ADN immunoprécipité/ADN total) et par là, tenir compte des faibles variations de quantité d'ADN entre expérimentations.

Cette méthode utilise un programme PCR déterminé (40 cycles comprenant 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C) où les températures d'hybridation et d'élongation sont regroupées. Ces conditions PCR nécessitent la détermination d'amorces particulières prédites au moyen du logiciel Primer Express 1.0®.

### **Détermination de couples d'amorces au moyen du logiciel Primer Express**

Paramètres :

- Limiter les pourcentages en G-C importants aux extrémités 3'.
- Tm compris entre 58 et 60°C, optimum à 59°C.
- Taille des amorces comprise entre 8 et 25 pb, optimum de 22 pb.
- Taille de l'amplicon : minimum 80pb.

Conditions :

- Concentration des primers : 400 nM
- Sels : 50 mM
- Mg<sup>++</sup> : 2 mM

Vérifications :

- Structure secondaire des amorces : éviter les hybridations 3'-3'.
- Réaliser un Blast avec chaque amorce.
- Réaliser une PCR quantitative test et réaliser une courbe de dissociation afin de vérifier l'absence d'amplifications parasites.

L'ensemble des amorces utilisées lors de la réalisation de ce travail a été dessiné au préalable par Allan Guiguen (ref EMBO J).

Réalisation de la PCR quantitative

La méthode de quantification est basée sur une droite standard à valeurs absolues. Afin de réaliser celle-ci, un échantillon d'ADN total est utilisé pour disposer de trois points de quantification. Ces trois points sont obtenus au moyen de trois dilutions de l'ADN total :

- Une dilution 125x (valeur absolue = 1)
- Une dilution 3125x (valeur absolue = 0,2)
- Une dilution 78125x (valeur absolue = 0,04)

Ces trois dilutions ont été déterminées afin de disposer d'un spectre de quantification assez large pour que l'ensemble des quantifications s'y retrouve et ainsi éviter les extrapolations. Les autres échantillons d'ADN totaux sont dilués 125x et l'ADN immunoprécipité est quant à lui dilué 25x.

Dans une plaque 96 puits (MicroAmr® optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems), ajouter :

- 5 µl d'ADN purifié
- 1 µl de chaque amorce (10 pmol/µl)
- 12,5 µl de SYBR® Green PCR master mix
- 5,5 µl d'eau Dnase-Rnase free.

Les résultats de ce travail ont été obtenus par l'utilisation d'un appareil de type ABI PRISM 7900 HT (AppliedBiosystems).

# **Bibliographie**



**Bibliographie**

- Banerjee AK (1980) 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiological reviews* **44**: 175-205
- Beelman CA, Parker R (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* **81**: 179-183
- Both GW, Furuichi Y, Muthukrishnan S, Shatkin AJ (1976) Effect of 5'-terminal structure and base composition on polyribonucleotide binding to ribosomes. *Journal of molecular biology* **104**: 637-658
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bahler J (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular biology of the cell* **14**: 214-229
- Chesnut JD, Stephens JH, Dahmus ME (1992) The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit IIa. *The Journal of biological chemistry* **267**: 10500-10506
- Chiu YL, Ho CK, Saha N, Schwer B, Shuman S, Rana TM (2002) Tat stimulates cotranscriptional capping of HIV mRNA. *Molecular cell* **10**: 585-597
- Coppola JA, Field AS, Luse DS (1983) Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 1251-1255
- Corden JL, Cadena DL, Ahearn JM, Jr., Dahmus ME (1985) A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 7934-7938
- Coulombe B, Burton ZF (1999) DNA bending and wrapping around RNA polymerase: a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 457-478
- Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science (New York, NY)* **292**: 1863-1876
- Dahmus ME (1995) Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochimica et biophysica acta* **1261**: 171-182
- Douziech M, Coin F, Chipoulet JM, Arai Y, Ohkuma Y, Egly JM, Coulombe B (2000) Mechanism of promoter melting by the Xeroderma pigmentosum complementation group B helicase of transcription factor IIIH revealed by protein-DNA photo-cross-linking. *Molecular and cellular biology* **20**: 8168-8177

- Ederly I, Sonenberg N (1985) Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 7590-7594
- Flaherty SM, Fortes P, Izaurralde E, Mattaj JW, Gilmartin GM (1997) Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11893-11898
- Furuichi Y, LaFiandra A, Shatkin AJ (1977) 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266**: 235-239
- Furuichi Y, Muthukrishnan S, Tomasz J, Shatkin AJ (1976) Caps in eukaryotic mRNAs: mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal m<sup>7</sup>GpppGm-C. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **19**: 3-20
- Furuichi Y, Shatkin AJ (1989) Characterization of cap structures. *Methods in enzymology* **180**: 164-176
- Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD (2001) Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science (New York, NY)* **292**: 1876-1882
- Guiguen A, Soutourina J, Dewez M, Tafforeau L, Dieu M, Raes M, Vandehaute J, Werner M, Hermand D (2007) Recruitment of P-TEFb (Cdk9-Pch1) to chromatin by the cap-methyl transferase Pcm1 in fission yeast. *The EMBO journal* **26**: 1552-1559
- Hirose Y, Manley JL (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes & development* **14**: 1415-1429
- Jackson V (1978) Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent. *Cell* **15**: 945-954
- Jackson V, Chalkley R (1981) A new method for the isolation of replicative chromatin: selective deposition of histone on both new and old DNA. *Cell* **23**: 121-134
- Jove R, Manley JL (1982) Transcription initiation by RNA polymerase II is inhibited by S-adenosylhomocysteine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 5842-5846
- Kim M, Ahn SH, Krogan NJ, Greenblatt JF, Buratowski S (2004) Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *The EMBO journal* **23**: 354-364
- Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & development* **14**: 2452-2460
- Kuras L (2004) Characterization of protein-DNA association in vivo by chromatin immunoprecipitation. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **284**: 147-162

- Laybourn PJ, Dahmus ME (1990) Phosphorylation of RNA polymerase IIA occurs subsequent to interaction with the promoter and before the initiation of transcription. *The Journal of biological chemistry* **265**: 13165-13173
- Langelier MF, Trinh V, Coulombe B (2002) Gros plan sur l'ARN polymérase II. *Médecine/Sciences* **18**: 210-216
- Lewis JD, Izaurralde E (1997) The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *European journal of biochemistry / FEBS* **247**: 461-469
- Lu H, Flores O, Weinmann R, Reinberg D (1991) The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 10004-10008
- Maniatis T, Reed R (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**: 499-506
- Mao X, Schwer B, Shuman S (1995) Yeast mRNA cap methyltransferase is a 50-kilodalton protein encoded by an essential gene. *Molecular and cellular biology* **15**: 4167-4174
- McCracken S, Fong N, Rosonina E, Yankulov K, Brothers G, Siderovski D, Hessel A, Foster S, Shuman S, Bentley DL (1997) 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & development* **11**: 3306-3318
- Mertins P, Gallwitz D (1987) A single intronless action gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: nucleotide sequence and transcripts formed in homologous and heterologous yeast. *Nucleic acids research* **15**: 7369-7379
- Moller K, Rinke J, Ross A, Buddle G, Brimacombe R (1977) The use of formaldehyde in RNA-protein cross-linking studies with ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS* **76**: 175-187
- Morris DP, Michelotti GA, Schwinn DA (2005) Evidence that phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeats is similar in yeast and humans. *The Journal of biological chemistry* **280**: 31368-31377
- Moteki S, Price D (2002) Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Molecular cell* **10**: 599-609
- Neugebauer KM (2002) On the importance of being co-transcriptional. *Journal of cell science* **115**: 3865-3871
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & development* **10**: 2657-2683
- Palancade B, Bensaude O (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**: 3859-3870

- Pei Y, Hausmann S, Ho CK, Schwer B, Shuman S (2001) The length, phosphorylation state, and primary structure of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain dictate interactions with mRNA capping enzymes. *The Journal of biological chemistry* **276**: 28075-28082
- Pei Y, Shuman S (2002) Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5. *The Journal of biological chemistry* **277**: 19639-19648
- Poglitsch CL, Meredith GD, Gnatt AL, Jensen GJ, Chang WH, Fu J, Kornberg RD (1999) Electron crystal structure of an RNA polymerase II transcription elongation complex. *Cell* **98**: 791-798
- Proudfoot N (2004) New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current opinion in cell biology* **16**: 272-278
- Rasmussen EB, Lis JT (1993) In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7923-7927
- Reddy R, Singh R, Shimba S (1992) Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions. *Pharmacology & therapeutics* **54**: 249-267
- Reines D, Conaway RC, Conaway JW (1999) Mechanism and regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Current opinion in cell biology* **11**: 342-346
- Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N (1990) Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Molecular and cellular biology* **10**: 1134-1144
- Russell PR, Hall BD (1983) The primary structure of the alcohol dehydrogenase gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry* **258**: 143-149
- Rustici G, Mata J, Kivinen K, Lio P, Penkett CJ, Burns G, Hayles J, Brazma A, Nurse P, Bahler J (2004) Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nature genetics* **36**: 809-817
- Schroeder SC, Schwer B, Shuman S, Bentley D (2000) Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes & development* **14**: 2435-2440
- Schroeder SC, Zorio DA, Schwer B, Shuman S, Bentley D (2004) A function of yeast mRNA cap methyltransferase, Abd1, in transcription by RNA polymerase II. *Molecular cell* **13**: 377-387
- Schwartz LB, Roeder RG (1975) Purification and subunit structure of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase II from the mouse plasmacytoma, MOPC 315. *The Journal of biological chemistry* **250**: 3221-3228
- Schwer B, Shuman S (1994) Mutational analysis of yeast mRNA capping enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 4328-4332

- Shatkin AJ, Banerjee AK, Both GW, Furuichi Y, Muthukrishnan S (1976) Dependence of translation on 5'-terminal methylation of mRNA. *Federation proceedings* **35**: 2214-2217
- Shibagaki Y, Itoh N, Yamada H, Nagata S, Mizumoto K (1992) mRNA capping enzyme. Isolation and characterization of the gene encoding mRNA guanylyltransferase subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **267**: 9521-9528
- Sims RJ, 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes & development* **18**: 2437-2468
- Solomon MJ, Varshavsky A (1985) Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 6470-6474
- Svejstrup JQ (2004) The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochimica et biophysica acta* **1677**: 64-73
- Takase Y, Takagi T, Komarnitsky PB, Buratowski S (2000) The essential interaction between yeast mRNA capping enzyme subunits is not required for triphosphatase function in vivo. *Molecular and cellular biology* **20**: 9307-9316
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**: 4673-4680
- Tsukamoto T, Shibagaki Y, Imajoh-Ohmi S, Murakoshi T, Suzuki M, Nakamura A, Gotoh H, Mizumoto K (1997) Isolation and characterization of the yeast mRNA capping enzyme beta subunit gene encoding RNA 5'-triphosphatase, which is essential for cell viability. *Biochemical and biophysical research communications* **239**: 116-122
- Ulaszewski S, Van Herck JC, Dufour JP, Kulpa J, Nieuwenhuis B, Goffeau A (1987) A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry* **262**: 223-228
- Wang SP, Deng L, Ho CK, Shuman S (1997) Phylogeny of mRNA capping enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 9573-9578
- Yue Z, Maldonado E, Pillutla R, Cho H, Reinberg D, Shatkin AJ (1997) Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 12898-12903
- Zhang J, Corden JL (1991) Phosphorylation causes a conformational change in the carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit. *The Journal of biological chemistry* **266**: 2297-2302
- Zorio DA, Bentley DL (2004) The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways. *Experimental cell research* **296**: 91-97