



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation du gène codant pour la β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*

De Bolle, Xavier

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Download date: 03. May. 2024



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

Caractérisation du gène
codant pour la β -galactosidase
de *Kluyveromyces fragilis*

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

Xavier DE BOLLE
1989-1990

Je remercie les Professeurs J. Vandehaute et J. Delcour de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et suivi au cours de ce travail.

Merci aussi aux membres du laboratoire, Geneviève, Deborah, Rose-Marie, J. Libion, Jean-Pol, Jean-Marc, Pascal et Dominique, pour l'accueil chaleureux et l'attention bienveillante qu'ils m'ont offerts.

Je tiens à remercier tout spécialement Anne Tibor et Olivier Laloux, pour leur bonne humeur et l'assistance efficace qu'ils m'ont accordée.

Toute ma reconnaissance à Messieurs E. Feytmans, F. Mainferme, Y. Pournay et P. Van Cutsem, qui ont accepté de lire ce mémoire.

A mes amis, Maggi, Daniel et les autres mémorants, Nathalie, Isabelle, Patricia et Alain, pour le soutien moral réconfortant qu'ils m'ont apporté au cours de ce travail,

A mes parents, pour leur dévouement sans pareil et leurs encouragements constants tout au long de ces études et de ce mémoire,

merci.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur
Tél. 081/ 72.41 11. Têlex 59222 Facnam-b - Télêfax 081/ 23.03.91

Caractérisation du gène codant pour la β -galactosidase de *Kluyve- romyces fragilis*

DE BOLLE Xavier

Résumé

Dans le cadre d'un travail antérieur, trois clones contenant le gène codant pour la β -galactosidase de *K. fragilis* (LAC F) ont été isolés par complémentation du caractère *lac⁻* de la souche XLI blue de *E. coli*, au moyen d'une banque génomique de *K. fragilis* sauvage établie dans le vecteur YEp351. Nous avons établi la carte de restriction des inserts de ces 3 clones. Nous avons déterminé la position du gène LAC F dans ces inserts par comparaison avec la carte de restriction du gène de lactase de *K. lactis*. De plus, la comparaison des cartes de restriction des inserts suggère également que le gène de lactose perméase de *K. fragilis* a été cloné simultanément avec LAC F.

La régulation de LAC F a été étudiée chez *K. fragilis* sur base de l'hypothèse d'un contrôle transcriptionnel. Le séquençage de la région située en amont de LAC F a mis en évidence une séquence (appelée UAS1) homologue aux UAS_{GAL} (séquences d'activation des gènes GAL) de *S. cerevisiae*. Cette UAS1 pourrait être reconnue par le système de régulation (GAL4-GAL80) des gènes GAL de *S. cerevisiae*. Nous avons en effet mesuré une surexpression du gène LAC F chez *S. cerevisiae* en conditions d'induction des gènes GAL, ce qui démontre l'existence d'une régulation hétérologue. De surcroît, nous avons montré que les séquences situées en 5' de l'UAS1 ne sont pas nécessaires à l'induction de LAC F chez *S. cerevisiae*. La démonstration directe du rôle du système GAL4-GAL80 dans la régulation hétérologue demande des expériences additionnelles. La caractérisation complète par séquençage du gène LAC F et du gène associé de la perméase ainsi que l'étude comparative avec des séquences homologues devront être poursuivies.

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques

Juin 1990

Promoteur: J. Vandenhoute

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur
Tél. 081/ 72.41 11. Télex 59222 Facnam-b - Téléfax 081/ 23.03.91

Characterization of the gene coding for the β -galactosidase of
Kluyveromyces fragilis

DE BOLLE Xavier

Summary

In a previous study, three clones containing the gene coding for the *K. fragilis* β -galactosidase (LAC F) were isolated from a genomic bank constructed in vector YEp351 by complementation of the lac-*E. coli* strain XL1 blue. We have established the restriction maps of the inserts of these 3 clones. We have determined the position of the LAC F gene by comparison with the restriction map of the *K. lactis* lactase gene, which also suggests that we have simultaneously cloned the lactose permease gene.

The regulation of LAC F has been studied assuming of a transcriptional control. By sequencing the region upstream of LAC F, we have found a sequence (named UAS1), homologous to the UAS_{GAL} (activating sequence of the GAL genes) of *S. cerevisiae*. This UAS1 could be recognized by the GAL gene system (GAL4-GAL80) of *S. cerevisiae*. Indeed we have measured overexpression of LAC F in *S. cerevisiae* under inducing conditions of the GAL genes, which indicates heterologous regulation. Moreover, we have demonstrated that the sequences upstream of UAS1 are not necessary for LAC F induction in *S. cerevisiae*. Further experiments are necessary to prove the role of the GAL4-GAL80 system in the heterologous regulation. The complete characterization by sequencing of the LAC F and associated permease gene, as well as a comparative study with heterologous sequences will be pursued.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1990

Promoteur: J. Vandenhaute

Abréviations:

X-gal: 5-bromo 3-indolyl, β -D galactopyranoside
IPTG: Isopropyl, β -D thiogalactopyranoside
ONPG: ortho-nitrophényl β -D-galactopyranoside
SDS-PAGE: électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide
PM: poids moléculaire
kb: kilobase
pb: paire de bases
MCS: site multiple de clonage
UAS: séquence d'activation en amont

PLAN

CHAPITRE I: INTRODUCTION	8
1.1. Le clonage de gènes ouvre des perspectives	8
1.2. Le gène de β -galactosidase est parmi les mieux connus chez <i>E. coli</i>	8
1.3. Intérêts de l'étude d'un gène de β -galactosidase de levure	9
1.3.1. Intérêts fondamentaux	9
1.3.2. Intérêt appliqué	10
1.4. Intérêt de l'étude du gène de β -galactosidase de <i>K. fragilis</i>	11
1.4.1. Le gène de β -galactosidase LAC4 de <i>K. lactis</i>	12
1.4.2. Données actuelles sur la régulation de la β -galactosidase de <i>K. fragilis</i>	12
1.5. But du travail	13
CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSIONS	14
II.A. Clonage du gène codant pour la β -galactosidase de <i>K. fragilis</i>	14
II.A.1. Réalisation de la banque	14
II.A.2. Screening de la banque	15
II.A.3. Analyse des plasmides isolés	16
II.A.3.1. Analyse du pattern électrophorétique après restriction	16
II.A.3.2. Démonstration de la présence du gène dans les plasmides isolés	16
II.B. Délimitation du gène dans les trois inserts grâce à leur carte de restriction	18
II.B.1. Carte de restriction du plasmide pB2	18
II.B.2. Délimitation d'une région commune aux trois inserts (de pB1, pB2, pB3)	19
II.B.2.1. Carte physique de l'insert de pB3	19
II.B.2.2. Carte physique de l'insert de pB1	20
II.B.3. Délimitation du gène de β -galactosidase par comparaison avec la carte physique de LAC4 de <i>K. lactis</i>	20
II.B.4. Détection du gène codant pour la lactose perméase de <i>K. fragilis</i>	21
II.C. Chez <i>K. fragilis</i> , la production de β -galactosidase est régulée: influence des conditions de culture	22
II.C.1. Mesure de l'activité spécifique	22
II.C.2. Analyse des lysats par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS	22

II.D. Comparaison des séquences LAC4 et LAC F pour l'identification de signaux potentiels de régulation transcriptionnelle du gène LAC F de <i>K. fragilis</i>	24
II.D.1. Etude de la séquence de la région amont du gène LAC F	24
II.D.1.1. Clonage de la région amont de LAC F dans un vecteur pBluescript (pSB1)	24
II.D.1.2. Séquençage de la région amont du gène de β -galactosidase	24
II.D.2. Détection des signaux de régulation par comparaison de séquences avec LAC4 de <i>K. lactis</i>	25
II.E. Etude chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> du rôle régulateur de la séquence UAS1	26
II.E.1. Régulation de l'activité β -galactosidasique chez <i>S. cerevisiae</i> transformée par pB2	26
II.E.1.1. Transformation de <i>S. cerevisiae</i> et mise en culture des transformants	26
II.E.1.2. Dosage de l'activité spécifique β -galactosidasique	27
II.E.1.3. Mise en évidence de la β -galactosidase par SDS-PAGE	27
II.E.1.4. Séquences régulatrices potentielles en amont de LAC F	28
II.E.2. Construction de pB7, dérivé de pB2 par délétion des séquences en amont de l'UAS1	28
II.E.3. Régulation de l'activité β -galactosidasique chez <i>S. cerevisiae</i> transformée par pB7	29
CHAPITRE III: RESUME, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	31
III.A. Résumé	31
III.B. Perspectives	32
III.C. Considérations évolutives	33
III.C.1. Données taxonomiques et moléculaires concernant la proximité de <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> et <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>	33
III.C.2. Hypothèses concernant la parenté évolutive entre les deux variétés	34
CHAPITRE IV: MATERIELS ET METHODES	35
IV.1. Solutions et tampons	35
IV.1.1. Solutions	35
IV.1.2. Tampons	37
IV.2. Souches et plasmides	39
IV.2.1. Souche bactérienne	39
IV.2.2. Plasmide bactérien	39
IV.2.3. Souches de levures	41
IV.2.4. Plasmide navette <i>E.coli</i> - <i>S.cerevisiae</i>	41
IV.3. Milieux de culture	42
IV.3.1. Milieux de culture bactériens	42
IV.3.2. Milieux de culture pour levures	42

IV.4. Techniques d'ADN recombinant	43
IV.4.1. Réaction de restriction	43
IV.4.2. Electrophorèse en gel d'agarose	44
IV.4.2.1. Electrophorèse analytique	44
IV.4.2.2. Electrophorèse préparative	45
IV.4.3. Réaction de ligation	46
IV.4.4. Réaction de filling	46
IV.4.5. Purification de l'ADN	46
IV.4.6. Transformation bactérienne	49
IV.4.7. Transformation de levure <i>S. cerevisiae</i>	51
IV.4.8. Préparation rapide et en petites quantités d'ADN plasmidique de <i>E. coli</i> (miniprep)	52
IV.4.9. Préparation d'ADN plasmidique de <i>E. coli</i> (midiprep)	52
IV.5. Séquençage	53
IV.6. Techniques biochimiques	57
IV.6.1. Dosage des protéines	57
IV.6.2. Dosage enzymatique de la β -galactosidase	58
IV.6.3. Gel protéique en SDS-polyacrylamide	59
CHAPITRE V: BIBLIOGRAPHIE	61
ANNEXE	
1. Restrictions du plasmide pB2	
2. Restrictions du plasmide pB3	
3. Restrictions du plasmide pB1	

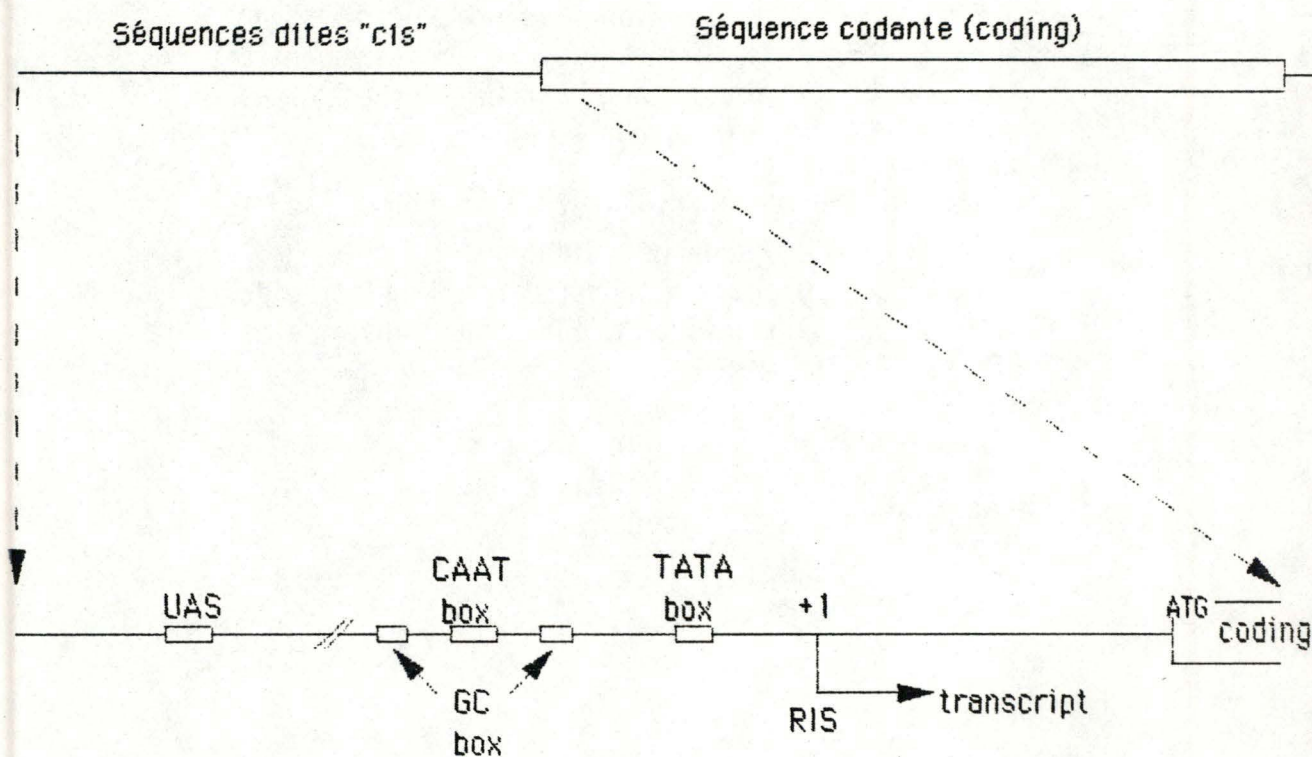


Fig.1.1. Modèle général d'un gène de levure.

En amont (soit côté 5') de la séquence codante, on trouve:

- un ou plusieurs sites +1: sites d'initiation de la transcription par la RNA polymérase II (RNA polymérase II Initiation Site: RIS),
- une ou plusieurs TATA box qui fixent le démarrage de la RNA polymérase II au site +1
- une ou plusieurs séquences d'activation (UAS: Upstream Activating Site) qui sont des séquences de régulations dites "cis", reconnues par des protéines régulatrices (elles-mêmes codées par des séquences dites "trans"). Notons que les UAS ne se trouvent pas toujours en amont de la (ou des) TATA box; dans certains cas elles peuvent même se trouver dans la séquence codante du gène et sont alors appelées DAS (pour Downstream Activating Site).

CHAPITRE I: INTRODUCTION

I.1. : Le clonage de gènes ouvre des perspectives :

Le clonage d'un gène offre plusieurs perspectives à l'expérimentateur. Outre les études d'homologie avec d'autres gènes connus, on pourra par exemple transformer avec ce gène des souches de la même espèce ou d'espèces différentes afin de leur conférer une caractéristique phénotypique nouvelle. On pourra aussi tenter de modifier les signaux de régulation de ce gène afin d'agir sur le taux d'expression de la protéine (fig. 1.1.). La surexpression d'un gène est un préalable souvent indispensable à l'étude structurale cristallographique ou autre de la protéine. Enfin, le "protein engineering" consiste à modifier la séquence d'une protéine, et par là ses propriétés, en modifiant la séquence de régions codantes déterminées du gène.

I.2. Le gène de β -galactosidase est parmi les mieux étudiés chez *E. coli* :

La β -galactosidase (aussi appelée lactase) est une enzyme qui clive le lactose en ses deux constituants : le glucose et le galactose (fig. 1.2.).

Chez *E. coli*, l'opéron lactose comprend (voir fig. 1.3.) :

- le gène *lacZ* : qui code pour la β -galactosidase
 - le gène *lacY* : qui code pour la β -galactoside perméase (protéine membranaire responsable de l'entrée du lactose dans la cellule)
 - le gène *lacA* : qui code pour une β -galactoside transacétylase (enzyme qui transfère le groupe acétyl de l'acétyl-CoA aux β -galactosides).
- En amont de ces trois gènes se trouve *lacI*, qui code pour un répresseur tétramérique.

Les trois gènes structuraux *lacZ*, *Y* et *A* sont transcrits en un même ARN messager (polycistronique). La régulation de la transcription de *lacZYA* a été particulièrement bien étudiée. La transcription de *lacZYA* à un contrôle positif et/ou négatif.

Le contrôle négatif de la transcription de *lacZYA* :

E. coli ne synthétise pas les protéines impliquées dans le métabolisme du lactose lorsque celui-ci est absent du milieu, car il y a répression de l'initiation de la transcription.

En effet (fig. 1.4.), le gène *lacI* code pour une protéine (PM : 38000) qui forme un homotétramère lequel, en absence d'inducteur, va se fixer à l'opérateur de *lacZYA*, empêchant la transcription de *lacZYA*. L'opérateur se situe juste en aval du promoteur, au site de fixation de la RNA polymérase.

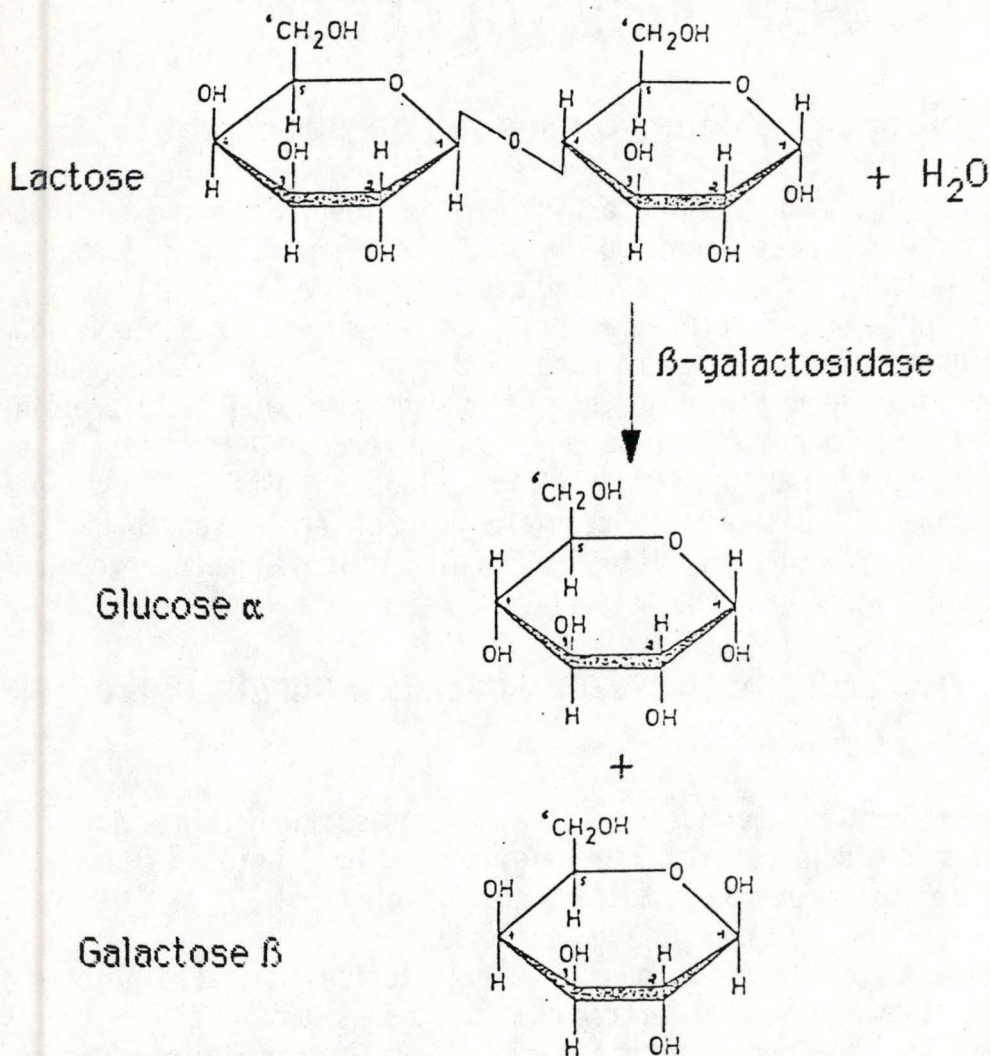


Fig.1.2. La β -galactosidase catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

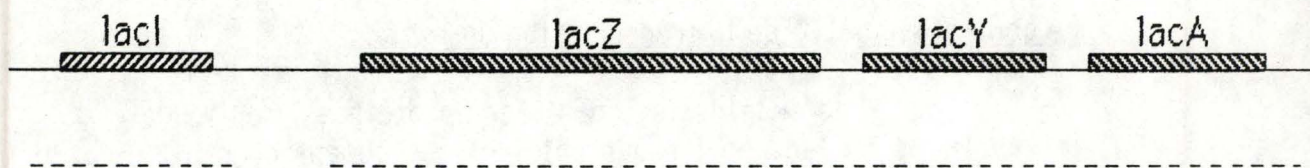


Fig.1.3. Représentation de l'opéron lactose (Lewin, 1988)
 ----- = ARN messagers

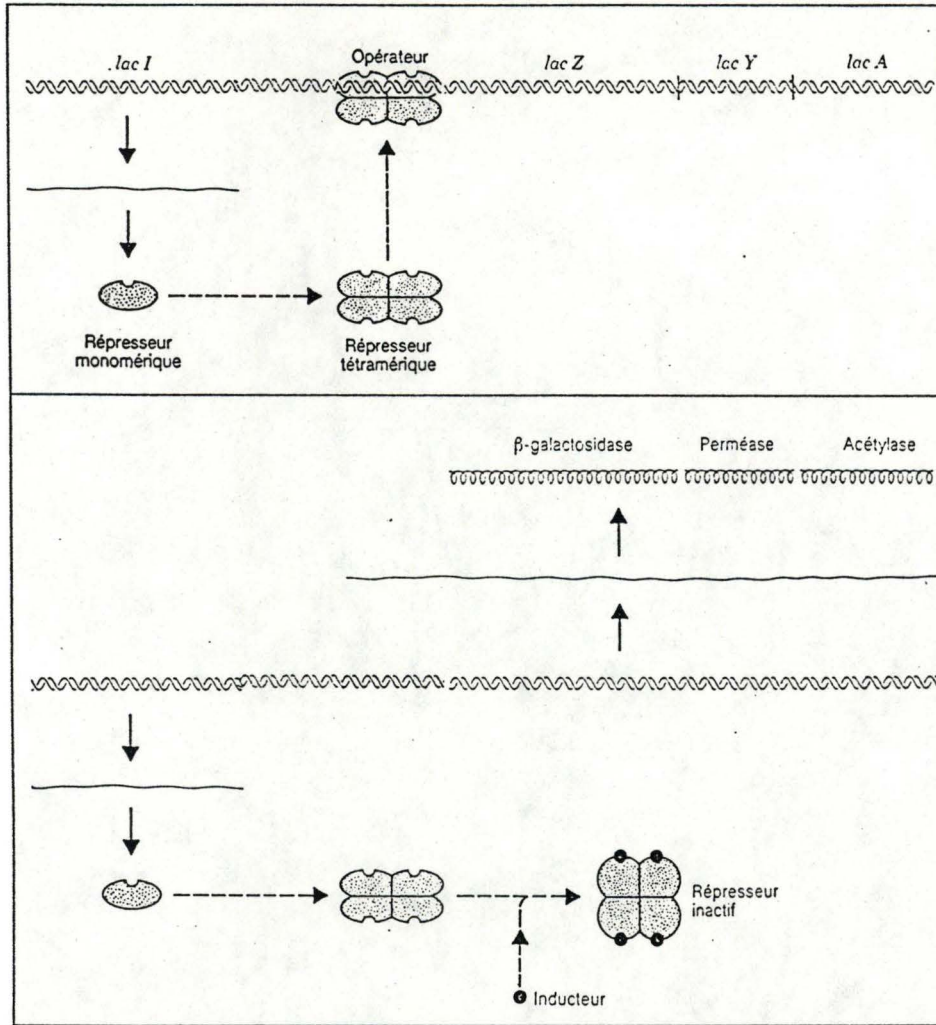


Fig.1.4 Représentation du contrôle négatif de l'opéron lactose par le répresseur codé par le gène *lacI* (Lewin, 1988).

En présence d'inducteur, celui-ci vient se fixer sur le répresseur qui se dissocie aussitôt de l'opérateur, rendant possible la transcription de *lacZ* γ A.

Notons que l'inducteur naturel de l'opéron est l'allolactose, le lactose ayant un léger effet anti-inducteur. La réaction prédominante de la β -galactosidase en présence de lactose est de cliver le lactose en glucose et galactose. Toutefois, une réaction "secondaire" transfère le galactose à une molécule acceptrice, produisant principalement l'allolactose et le galactobiose. L'induction implique l'entrée d'un peu de lactose dont une partie est transformée en allolactose par la β -galactosidase. La forte induction par une petite quantité d'allolactose, qui continue à être synthétisé, est suffisante pour contrebalancer le faible effet anti-inducteur du lactose.

Le contrôle positif de la transcription de *lacZ* γ A :

E. coli ne synthétise pas les protéines impliquées dans le métabolisme du lactose lorsqu'il y a du glucose dans le milieu, ce dernier étant considéré comme une source de carbone "préférentielle". C'est la répression catabolique. Celle-ci affecte le métabolisme du lactose et également celui du galactose et de l'arabinose par exemple.

En absence de glucose, la protéine CAP (Catabolite Activator Protein) ou CRP (Cyclic AMP Receptor Protein) peut être activée en fixant une molécule d'AMPC, synthétisé abondamment par l'adénylate cyclase à partir d'ATP. La protéine CAP va se fixer (sous forme de dimère) en amont du promoteur, pour induire la transcription de *lacZ* γ A, vraisemblablement par contact avec la RNA polymérase.

En présence de glucose, le taux d'AMPC chute dans la cellule d'*E. coli* et la protéine CAP ne peut plus fixer d'AMPC, elle reste donc inactive et ne peut induire la transcription de *lacZ* γ A.

1.3. Intérêts de l'étude d'un gène de β -galactosidase de levure :

1.3.1. Intérêts fondamentaux :

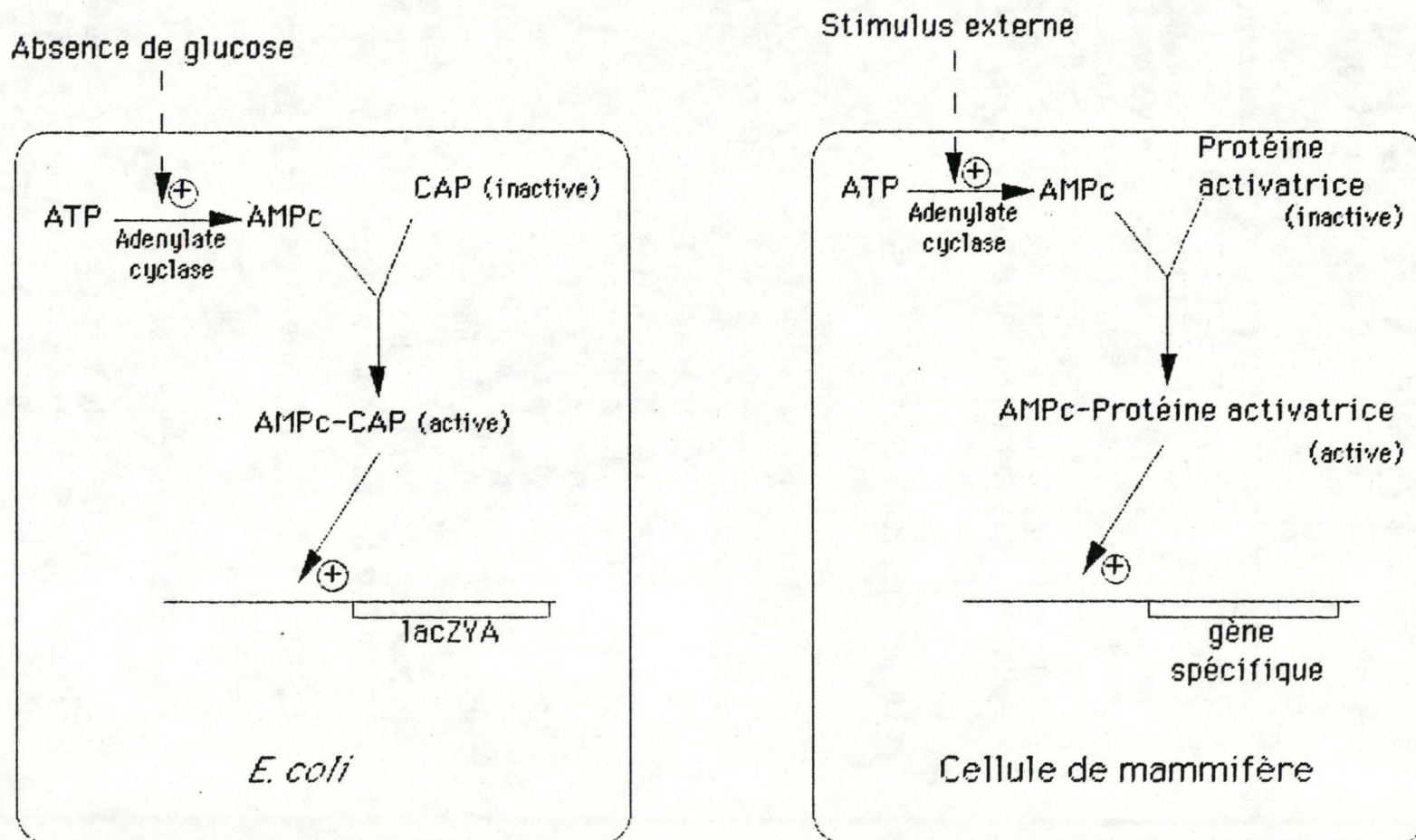
Le principal intérêt fondamental de l'étude d'un gène de β -galactosidase de levure est qu'elle peut mener à une comparaison d'un gène d'eucaryote avec des gènes de procaryotes (l'étude de ceux-ci étant poussée).

Les comparaisons de séquence entre gènes de β -galactosidase issus d'organismes différents permettent de préciser les relations phylogénétiques entre eux. En effet, la divergence observée est une mesure du temps écoulé depuis la séparation des deux lignées à partir d'un ancêtre commun.

Fig.1.5. Exemple de mécanisme de régulation conservé au cours de l'évolution:

Chez *E. coli*, l'AMPc est un signal intracellulaire "de famine" produit en absence de glucose. L'AMPc, en se fixant à la protéine CAP, permet entre autres l'induction de lacZYA (voir 1.2.) (Lewin, 1988).

Dans les cellules de mammifères, une voie d'activation cellulaire implique aussi l'AMPc (messager secondaire). Un stimulus externe induit la synthèse intracellulaire d'AMPc qui peut (entre autres), se fixer sur des protéines activatrices de la transcription de gènes spécifiques (Loomis, 1988).



Cependant, si on définit une mutation comme toute modification de la structure primaire au niveau de l'ADN génomique d'un individu, il est nécessaire (d'un point de vue évolutif) de classer les mutations en deux catégories (Loomis, 1988) :

- les mutations (silencieuses) n'ayant pas d'effet phénotypique.
- les mutations ayant un effet phénotypique. Ces mutations apparaissent au niveau de séquences qui interviennent dans l'expression d'un gène. Elles entraînent soit un avantage soit un désavantage sélectif. Dès lors, au cours de l'évolution, les séquences n'intervenant pas dans l'expression d'un gène se modifient rapidement car elles ne sont pas soumises à la pression sélective, à l'inverse de la séquence codante par exemple qui, soumise à la pression sélective, se modifie nettement plus lentement, ce qui explique un certain degré de conservation entre séquences de protéines de même fonction, issues d'espèces ayant divergé. Il n'y a pas que la séquence codante des gènes qui subit la pression sélective. Toutes les séquences intervenant dans le fonctionnement du gène la subissent aussi, ce qui explique la conservation observée dans les mécanismes de transcription et de régulation de la transcription.

La figure 1.5. illustre un exemple de similitude entre des systèmes de régulation de procaryotes et d'eucaryotes qui pourraient témoigner d'une origine évolutive commune.

La comparaison des régions codantes et de régulation entre gènes devrait permettre d'évaluer leur degré de parenté et de comprendre les bases moléculaires de différences au niveau de la régulation de l'expression et des propriétés fonctionnelles des protéines pour lesquelles ils codent. Ces comparaisons évolutives sont réalisables car plusieurs gènes de β -galactosidase (essentiellement de procaryotes) ont déjà été séquencés (*E. coli*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus stearothermophilus*) (Schmidt *et al.*, 1989).

1.3.2. Intérêt appliqué :

Le clonage d'un gène de β -galactosidase de levure permet d'envisager la construction de souches transgéniques de *S. cerevisiae* capables de métaboliser le lactose (Lac^+), ce que *S. cerevisiae* (Lac^-) est incapable de faire. Une application possible concernerait par exemple la valorisation du lactosérum. Ce sous-produit abondant de l'industrie fromagère (contenant du lactose) pourrait servir de milieu nutritif à *S. cerevisiae*, aux fins de produire de la biomasse ou de produits de fermentation (éthanol ou acétone par exemple).

L'approche consistant à exploiter le lactosérum par des souches transgéniques de levures (processus en une étape) semble préférable à celle qui est utilisée actuellement, consistant à cliver artificiellement le lactose par une lactase avant mise en culture (processus en deux étapes), étant donné le coût élevé des lactases.



Fig.1.6. Colonies de *Kluveromyces fragilis* après croissance sur milieu YEPD solide.

Kluveromyces fragilis produit une β -galactosidase, donnant aux colonies une couleur bleue (en présence d'un chromogène particulier) même en présence de glucose (conditions de répression catabolique)(Hewitt et Grootwassink, 1984).

Source	Producer	pH Optimum	pH Stability	Temperature Optimum (°C)	K_m (Lactose) (mM)	Cofactors
<i>Aspergillus niger</i>	Wallerstein, Rapidase	3.0-4.0	2.5-8.0	55	85	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	Tokyo Tanabe, Miles Lab.	5.0	2.5-7.0	55	50	-
<i>Kluveromyces fragilis</i>	Novo Ind.	6.6	6.5-7.5	30-35	14	Mn ²⁺ , K ⁺
<i>Kluveromyces lactis</i>	Gist Brocades	6.5-7.0	6.5-7.5	30-35	12-17	Mn ²⁺ , Na ⁺
<i>Escherichia coli</i>	Aldrich Chem.	7.2	6.0-8.0	35		Na ⁺ , K ⁺

Tableau 1.1.: Propriétés biochimiques de différentes β -galactosidases commercialisées, dont celle de *K. fragilis* (Crueger, 1984).

Vu le problème de l'absence de système d'importation du lactose chez *S. cerevisiae*, la création de souches Lac⁺ peut être menée selon deux stratégies :

1) Transformer *S. cerevisiae* avec un gène de β -galactosidase auquel on a greffé (au début de la séquence codante) une séquence codant pour un peptide signal. Ce peptide signal permettrait l'exportation de l'enzyme dans l'espace périplasmique.

2) Transformer *S. cerevisiae* avec un gène de lactose perméase (qui permet l'entrée du lactose dans la cellule) et avec le gène de β -galactosidase.

Le manque de données concernant l'exportation des protéines chez *S. cerevisiae* constitue un inconvénient majeur de la première stratégie. En revanche, la seconde stratégie permettra peut-être d'éviter de trop faibles rendements de fermentation, constatés quand *S. cerevisiae* croît sur un mélange glucose-galactose (Jackson et Jolly, 1989). Le glucose est en effet connu pour réduire la fermentation du galactose (Strathern *et al.*, 1982). La première stratégie se heurtera inmanquablement à ce problème.

1.4. Intérêt de l'étude du gène de β -galactosidase de *K. fragilis*:

Kluyveromyces fragilis (nom usuel de *K. marxianus* var. *marxianus*) est une des cinq levures qui produisent une β -galactosidase (*K. marxianus* var. *marxianus*, *K. marxianus* var. *lactis* - ou *K. lactis* -, *Cryptococcus laurentii*, *Debromyces hansenii* et *Pichia polymorpha*) (fig. 1.6.)

La firme "Novo Industries" produit industriellement la lactase de *K. fragilis* depuis 1979.

Les propriétés biochimiques de différentes β -galactosidases commercialisées dont celle de *K. fragilis* sont indiquées au tableau 1.1.

Récemment, du lait pauvre en lactose a été mis sur le marché. Le lactose de ce lait a été clivé par la β -galactosidase de *K. fragilis*. Le lait pauvre en lactose est recommandé aux personnes souffrant d'intolérance au lactose (leur lactase est réprimée à l'âge adulte) (Houts, 1988; Kocian, 1988).

Ce problème est important car il touche 70 à 90 % des asiatiques et des africains et 2 à 15 % des blancs américains et des européens (Crueger et Crueger, 1984).

Ces caractéristiques donnent donc à *K. fragilis* et à son enzyme β -galactosidase un statut relativement privilégié dans une perspective d'exploitation industrielle. En outre, comme nous allons le voir ci-dessous, l'étude comparée des gènes de β -galactosidase de *K. fragilis* et *K. lactis* et l'étude du contrôle hétérologue de son expression chez *S. cerevisiae* présentent un grand intérêt fondamental.

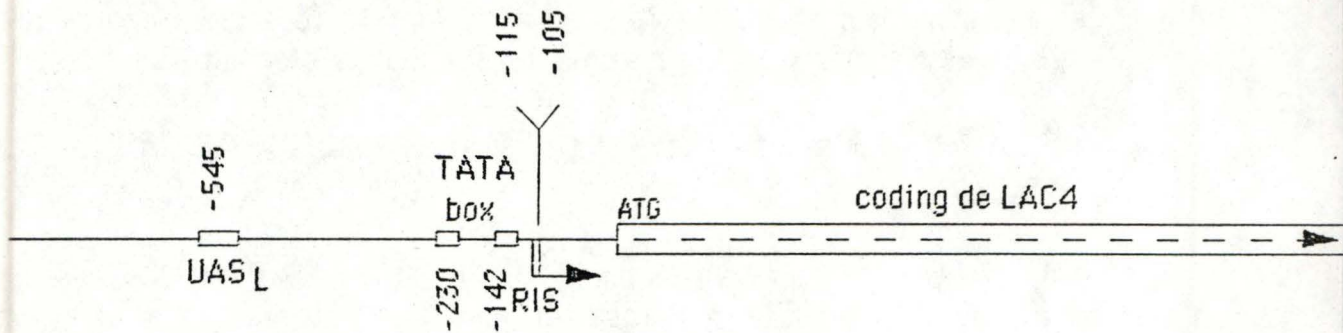


Fig.1.7. Modèle du gène LAC4 établi à partir des données de Ruzzi *et al.* (1987) et Ficca et Hollenberg (1989). Il existe une UAS à 545 nucléotides en amont de l'ATG qui est responsable de l'activation du gène en présence de lactose comme seule source de carbone pour une culture de *Kluyveromyces lactis*. De plus, il existe deux TATA box fonctionnelles à 230 et 142 nucléotides et deux RIS à 115 et 105 nucléotides en amont de l'ATG.

1.4.1. Le gène de β -galactosidase LAC4 de *K. lactis*:

Dickson et Markin (1978) ont cloné un fragment génomique de *K. lactis* contenant le gène LAC4, par complémentation d'un mutant *lacZ* de *E. coli*. Breunig *et al.* (1984) ont établi la carte de restriction de ce fragment génomique. Ils ont également séquencé la région amont et les 350 premières pb de la région codante du gène LAC4.

Un modèle de ce gène est présenté à la fig. 1.7. La régulation de ce gène a été étudiée par Ruzzi *et al.* (1987), qui ont déterminé des séquences en amont de la séquence codante, impliquées dans l'induction de l'initiation de la transcription du gène quand *K. lactis* croît sur lactose ou galactose. Le gène qui code pour la protéine régulatrice qui induit l'initiation de la transcription de LAC4, appelé LAC9, a été cloné et caractérisé par Wray *et al.* (1987). Cette protéine se fixe sur l'UAS_L qui se situe à 545 pb en amont de l'ATG de LAC4. Breunig (1989) a montré que LAC9 était aussi responsable de la répression par le glucose.

D'autres études fonctionnelles, menées par Ficca et Hollenberg (1989), ont montré que le gène LAC4 possède deux TATA box fonctionnelles, à 230 et 142 pb en amont de l'ATG. La TATA box à la position -230 semble jouer un rôle majeur, car elle permet l'initiation de la transcription à elle-seule.

1.4.2 Données actuelles sur la régulation de la β -galactosidase de *K. fragilis*:

Les travaux de Hewitt et Grootwassink (1984) ont montré que la production de β -galactosidase chez *K. fragilis* est induite par le lactose et le galactose et réprimée par le glucose.

Il est probable que cette régulation s'exerce au niveau de l'initiation de la transcription, comme chez *K. lactis*. Si tel est le cas, nous devrions retrouver en amont de la séquence codante du gène de *K. fragilis* des séquences régulatrices dites "cis", ainsi que les facteurs régulateurs interagissant avec ces séquences. Il sera intéressant de comparer le ou les mécanismes régulateurs intervenant entre eux ainsi qu'avec d'autres systèmes d'autres levures, telles que *S. cerevisiae*. L'étude de la régulation hétérologue du gène de *K. fragilis* chez *S. cerevisiae* par exemple permettrait de tester la conservation des mécanismes de régulation.

1.5. But du travail :

Ce travail se place dans le cadre général de la construction de souches transgéniques Lac⁺ de *S. cerevisiae*.

Dans ce but, le gène de β -galactosidase de *K. fragilis* avait été cloné en 1989.

Lors de ce travail, nous nous fixons comme objectif de caractériser le gène de β -galactosidase de *K. fragilis* tant au niveau structurel (établissement d'une carte de restriction) qu'au niveau fonctionnel, par l'étude de sa régulation chez *K. fragilis* (régulation homologue) et *S. cerevisiae* (régulation hétérologue).

Une comparaison évolutive des caractéristiques de ce gène avec celles de gènes de β -galactosidase d'autres taxa sera entreprise.

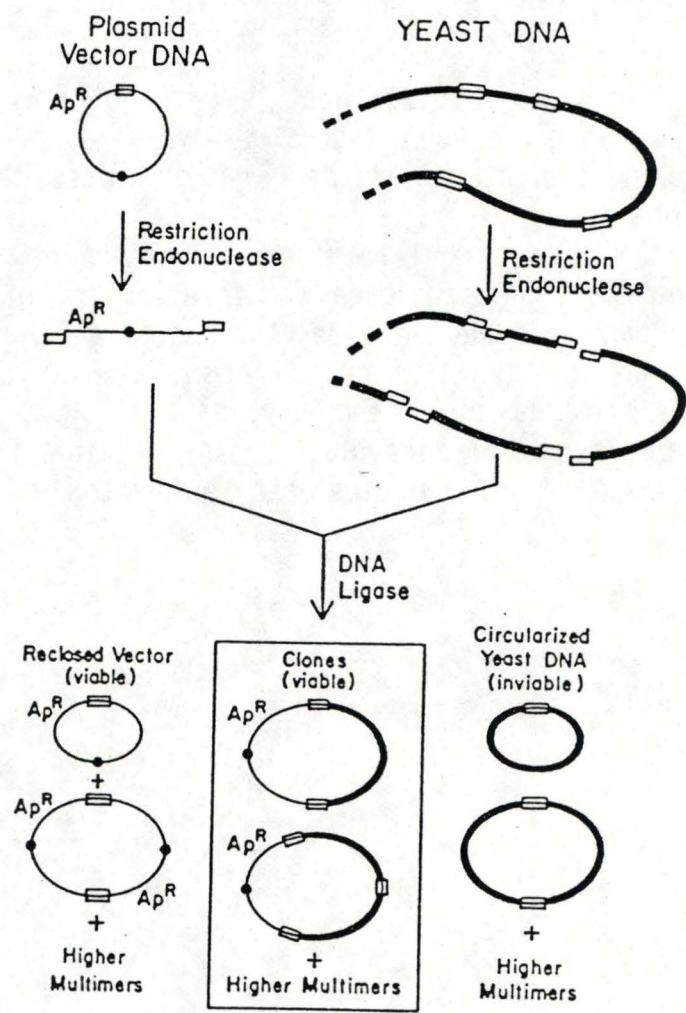


Fig.2.1. Résumé schématique de la construction d'une banque génomique dans un vecteur comme YEp351.

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSIONS:

II.A. Clonage du gène codant pour la β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* :

Préalablement à notre travail, le clonage du gène codant pour la β -galactosidase de *K. fragilis* a été réalisé au laboratoire par Olivier Laloux. Un bref rappel de son travail est fait ci-dessous.

II.A.1. Réalisation de la banque :

La banque génomique de *K. fragilis* a été réalisée en utilisant :

- l'ADN génomique de la souche ATCC12424 de *K. fragilis*.
- le vecteur YEp 351, vecteur navette (*E. coli* - *S. cerevisiae*) portant le marqueur LEU2 et l'origine de répllication 2μ pour la levure, ainsi que *lacZ'* (voir IV.2.4)
- la souche XL1 blue de *E. coli*, permettant la sélection blanc-bleu de transformants ayant acquis un plasmide recombinant (voir IV.2.1).

Le plan général de réalisation d'une banque génomique est indiqué à la figure 2.1.

L'ADN génomique de *K. fragilis* a été partiellement digéré par l'enzyme Sau 3A et les fragments d'ADN obtenus ont été séparés selon leur taille par sédimentation en gradient de sucrose. 5 pools de fragments d'ADN génomique ont ainsi été séparés. Le pool correspondant à des fragments d'ADN d'une taille moyenne de 10 kb est utilisé car cette taille élevée augmente les chances pour un insert de contenir un gène entier.

Le vecteur YEp351 est restreint au site BamHI du gène *lacZ'* et déphosphorylé par la BAP (phosphatase alcaline bactérienne). Les groupements phosphates en 5' sont ainsi éliminés, empêchant par conséquent YEp351 de se religuer sur lui-même.

9 μ g d'ADN génomique sont ligués à 9 μ g de vecteur YEp351 déphosphorylé. 90 transformations de XL1 blue sont réalisées, chacune avec 200 ng d'ADN du mélange de ligation (quantité d'ADN offrant un taux de transformation optimum). 30000 clones transformants sont obtenus sur milieu sélectif (avec ampicilline) parmi lesquels 90 % (soit 27000) sont recombinants (apparaissent sous forme de colonies blanches sur milieu X-gal + IPTG, preuve que le gène *lacZ'* est disrupté par l'ADN génomique inséré en BamHI) (voir IV.2.4).

L'analyse par électrophorèse en gel d'agarose des plasmides extraits de 40 colonies blanches prélevées au hasard montre que 100 % des plasmides sont recombinants. Le tiers de ceux-ci contient un insert de taille supérieure à 10 kb. Cette banque comprend donc approximativement (27000 \times 0,33 =) 9000 clones contenant un insert de 10 kb au moins.

La formule de Clarke et Carbon (1976) nous permet de calculer le nombre de clones minimum nécessaire pour avoir 99 chances sur 100 qu'une séquence quelconque du génome soit représentée dans la banque :

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

où P est la probabilité : 0,99

f est la proportion de génome contenue par recombinant soit : 10 kb / 14000 kb où 10 kb est la taille moyenne d'un insert

14000 kb est la taille approximative du génome de la levure *K. fragilis*

N est le nombre minimum de clones
donc, N = 6500

Vu le nombre de transformants obtenus, la banque peut être considérée comme représentative du génome de *K. fragilis*.

La banque est alors stockée. L'opération de stockage consiste à ajouter 1 ml de milieu (riche comprenant 15 % de glycérol) sur chacune des boîtes de Petri de la banque, puis à râcler les colonies, à rassembler les suspensions de cellules, à les répartir en aliquots et à les congeler à -80°C. La densité cellulaire est approximativement de 400.10⁶ cellules par ml.

II.A.2. Screening de la banque :

Nous posons comme hypothèse de départ que le gène de β -galactosidase de *K. fragilis* est exprimé en une enzyme active chez *E. coli*. Pour détecter, parmi les milliers de clones constituant la banque, les clones contenant le gène de β -galactosidase, un test phénotypique peut être mis à profit. En effet, les colonies productrices de β -galactosidase sont colorées en bleu sur un milieu contenant du X-gal, chromogène dont l'hydrolyse par la β -galactosidase libère un chromophore bleu.

Cependant, les plasmides non recombinants confèrent également une coloration bleue en présence de X-gal aux colonies de *E. coli* (car le gène *lacZ'* n'est pas disrupté, voir IV.B.). Les clones non recombinants représentant environ 10 % des clones de la banque, il est nécessaire de mettre au point un test phénotypique permettant de discriminer les clones non recombinants des clones porteurs du gène de β -galactosidase de *K. fragilis*.

Chez *E. coli*, le gène de β -galactosidase (qui, comme nous l'avons vu plus haut, a été particulièrement bien étudié) est régulé positivement par la présence de molécules inductrices (le lactose ou l'IPTG par exemple), et négativement par le glucose (répression catabolique). En absence d'inducteur et en présence de glucose (1 %) et de X-gal, des bactéries XL1 blue transformées par le plasmide sans insert (non recombinant) forment des colonies blanches, car l'expression du gène de β -galactosidase de *E. coli* est réprimée. D'autre part, il est probable que le gène de β -galactosidase de *K. fragilis* ne subisse pas la répression par le glucose

Milieu
avec IPTG,
sans glucose

Milieu
sans IPTG,
avec glucose

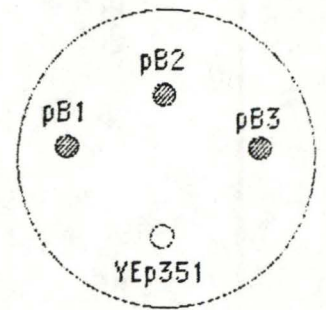


Fig.2.2. Les colonies de *E. coli* transformées par pB1, pB2 ou pB3 apparaissent bleues sur un milieu avec IPTG, sans glucose et sur un milieu sans IPTG, avec glucose. Les colonies de *E. coli* transformées par YEp351 apparaissent bleues sur un milieu avec IPTG, sans glucose et blanches sur un milieu sans IPTG, avec glucose car le gène *lacZ* subit la répression catabolique chez *E. coli*.

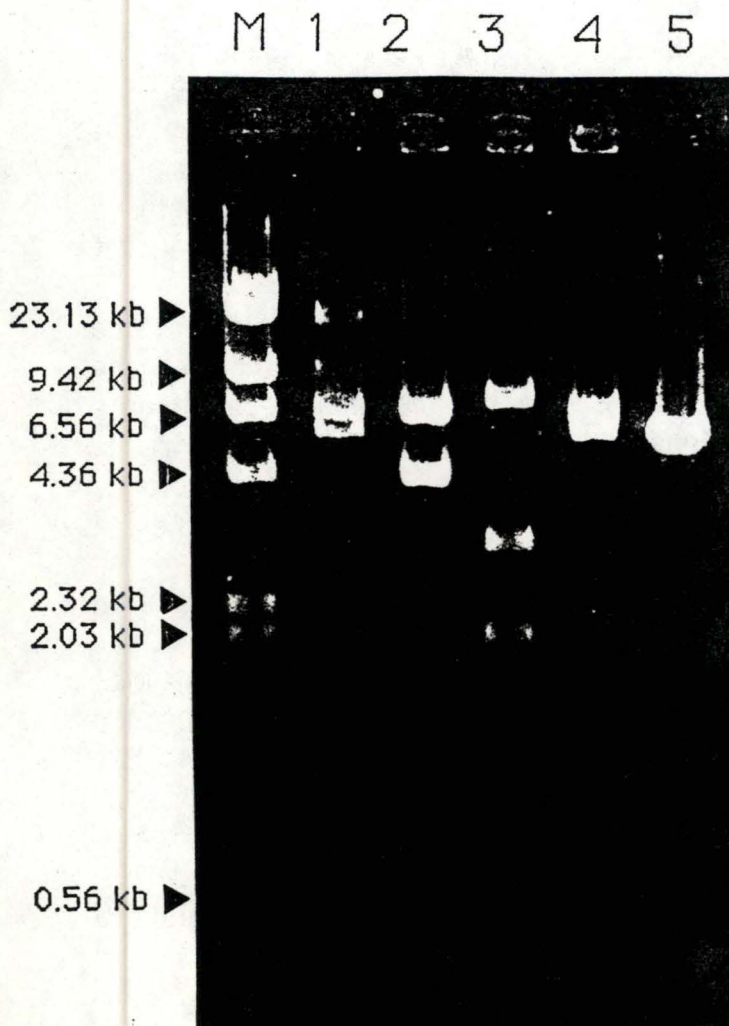


Fig.2.3. Profils en électrophorèse en gel d'agarose 0.8 % des 4 plasmides pB1 (1), pB2 (2), pB3 (3), pB4 (4) et de YEp351 (5) après restriction par l'enzyme HindIII. (M = marqueur de taille: phage λ restreint par HindIII)

chez *E. coli*. Vu la distance évolutive qui sépare les deux espèces, il est en effet probable que les mécanismes de répression par le glucose aient sensiblement divergé.

Isolement des clones :

Disposant d'un test phénotypique qui nous permettra probablement de détecter le ou les clones porteurs du gène recherché, les bactéries de la banque sont étalées sur des boîtes contenant le milieu défini ci-dessus (LB + ampicilline + X-gal + 1 % glucose). Après 2 jours d'incubation à 37°C, on distingue 4 colonies bleues parmi environ 80000 colonies (fig. 2.2.)

Les 4 plasmides extraits de ces colonies, appelés pB1, pB2, pB3 et pB4, sont supposés contenir le gène de β -galactosidase de *K. fragilis*, gène que nous symboliserons LAC F pour la suite du travail (cette appellation n'ayant d'application que dans le cadre de ce mémoire).

II.A.3. Analyse des plasmides isolés :

II.A.3.1. Analyse du pattern électrophorétique après restriction :

Ces quatre plasmides sont restreints par l'enzyme Hind III puis les fragments issus de cette restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % (fig. 2.3.). L'examen du gel nous montre que les trois plasmides pB1, pB2 et pB3 présentent des profils de restriction différents alors que le plasmide pB4 donne un profil identique à pB1. Les tailles des plasmides des trois clones indépendants (pB1, pB2 et pB3) peuvent être estimées, par référence à un standard de taille, à 15.5, 12.4 et 13.7 kb respectivement. Sachant que la taille de la matrice YEp351 est de 5.7 kb, nous pouvons estimer la taille de l'insert de chaque plasmide. Ceci donne :

15.5 kb - 5.7 kb = 9.8 kb pour l'insert de pB1

12.4 kb - 5.7 kb = 6.7 kb pour l'insert de pB2

13.7 kb - 5.7 kb = 8.0 kb pour l'insert de pB3

Notons que, après restriction par Hind III, les inserts des plasmides de ces trois clones indépendants présentent tous un fragment d'une taille approximative de 0.7 kb. Ceci tend à indiquer que ces trois clones sont apparentés, en ce sens qu'ils proviennent d'une même région génomique

II.A.3.2. Démonstration de la présence du gène dans les plasmides isolés :

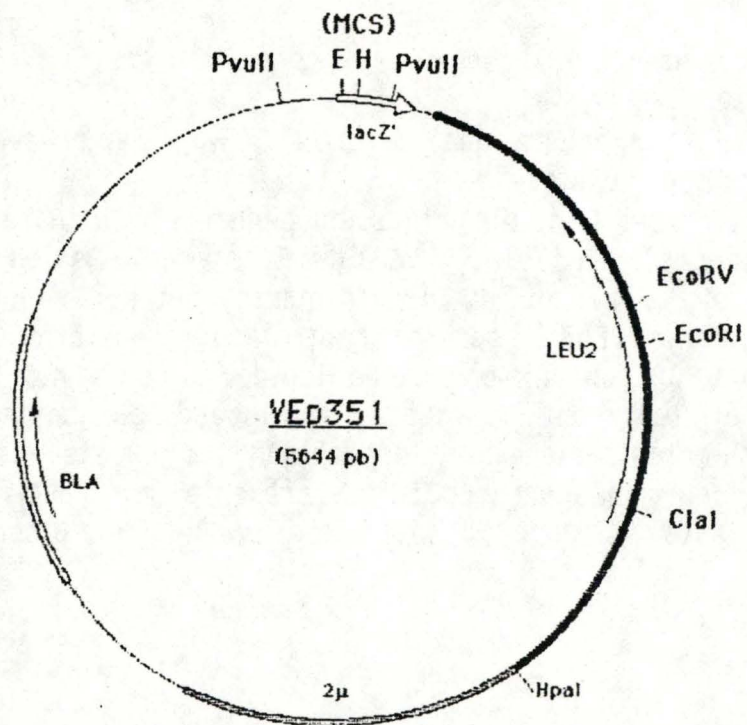
a. Retransformation de *E. coli* :

Les quatre plasmides sont utilisés pour retransformer la souche XL1 blue de *E. coli*. Des étalements sont réalisés sur des boîtes LB + ampicilline + X-gal, comprenant 1 % de glucose. Tous les transformants apparaissant bleus (correspondant à une activité β -galactosidase), le phénotype est restauré, ce qui démontre qu'il est bien lié à la présence du plasmide, constatation qui s'applique aux quatre plasmides.

b. Expression du gène chez *S. cerevisiae* :

Rappelons que *S. cerevisiae* ne présente pas d'activité β -galactosidasique.

Les trois plasmides indépendants sont utilisés pour transformer la souche GRF18 (*leu2, his3*) de *S. cerevisiae* selon la méthode de Ito *et al.* (voir IV.4.7.) et les transformants sont sélectionnés sur un milieu sans leucine. YEp351 sert de contrôle de transformation. Les transformants obtenus sont mis en culture liquide. Après une nuit d'incubation à 30°C, les cellules sont récoltées et lysées au chloroforme. L'activité β -galactosidasique est dosée sur les lysats. Le lysat de la souche transformée par YEp351 ne présente pas d'activité, contrairement aux lysats des souches transformées par les trois plasmides isolés.



(MCS) =

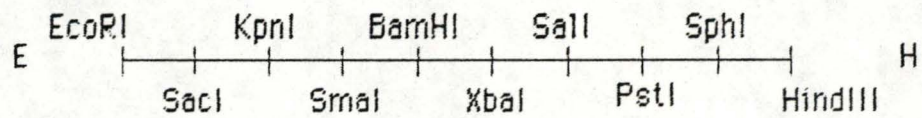


Fig.2.4 Carte de restriction du plasmide YEp351.
(MCS = Multiple Cloning Site)

II.B. Délimitation du gène dans les trois inserts grâce à leur carte de restriction :

Suite au clonage du gène codant pour la β -galactosidase de *K. fragilis* (que nous avons, dans le cadre de ce travail, nommé LAC F), nous disposons de trois plasmides (pB1, pB2, et pB3) comprenant chacun un insert génomique contenant le gène LAC F. Pour caractériser ces trois clones, nous établissons leur carte de restriction, c'est-à-dire la localisation des sites de clivage reconnus par une batterie d'enzymes de restriction.

Par électrophorèse en gel d'agarose, la taille des fragments obtenus après restriction de ces plasmides a été estimée. A partir de la taille des fragments de restriction, en connaissant la position des sites de clivage des enzymes de restriction dans la matrice du plasmide, on peut positionner les sites de clivage dans l'insert.

Nous avons commencé par établir la carte de restriction de l'insert de pB2, pour ensuite positionner les inserts de pB1 et pB3 par rapport à celui de pB2. Cela nous a permis de déterminer une région commune aux trois inserts. Ce fragment commun contient par conséquent le gène LAC F.

II.B.1. Carte de restriction de pB2 :

Rappelons que le plasmide pB2 est constitué d'une matrice (YEp351) dont nous connaissons la carte de restriction (fig. 2.4.) et d'un insert à étudier. Les données sur lesquelles on se base pour établir la carte de restriction de pB2 sont les positions des sites de clivage des enzymes de restriction dans la matrice de ce plasmide. Nous avons commencé par déterminer les enzymes de restriction qui n'avaient pas de site de clivage dans l'insert de pB2.

Afin de localiser tous les sites de clivage des enzymes de restriction testées, nous avons eu recours à des doubles restrictions. Lors d'une double restriction, on restreint tout d'abord le plasmide à caractériser par une enzyme dont le ou les sites de clivage sont déjà localisés. Par électrophorèse sur gel d'agarose d'un échantillon du mélange de restriction, on vérifie que cette restriction est complète. On soumet alors les fragments issus de cette première restriction à l'action d'une enzyme de restriction dont on cherche à positionner les sites de clivage. Le résultat de cette double restriction est analysé par électrophorèse en gel d'agarose.

Pour illustrer ce principe, utilisons un exemple concret : localisation des sites de clivage de l'enzyme *Cla*I. Après restriction de pB2 par *Cla*I, on obtient un fragment de 7.4 kb et un fragment de 4.9 kb. Nous en déduisons deux hypothèses illustrées ci-dessous, quant à la localisation des sites *Cla*I.

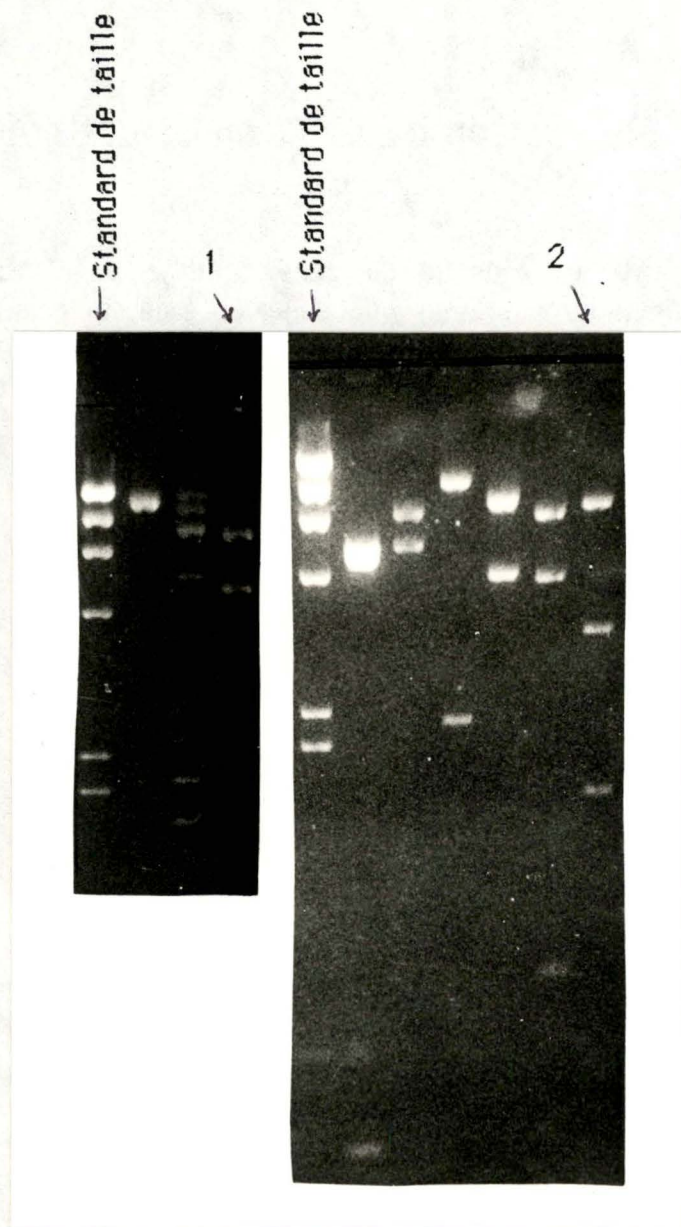
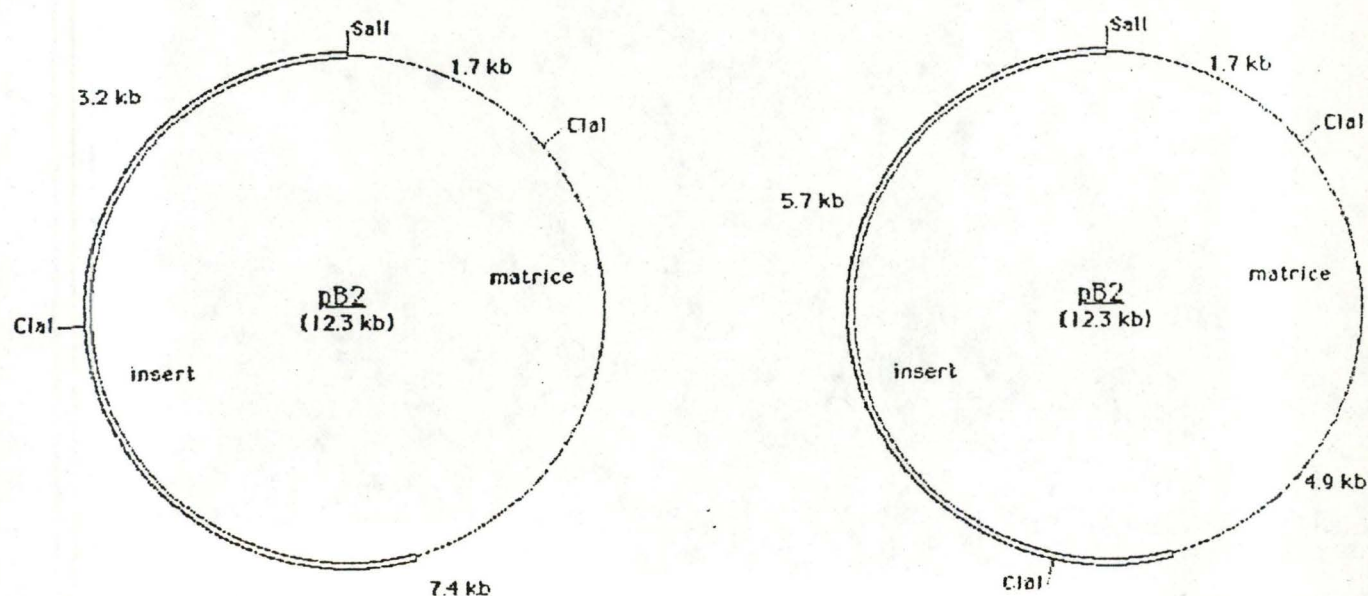


Fig.2.5. Analyse par électrophorèse en gel d'agarose:
piste 1 : pB2 restreint par ClaI
piste 2 : pB2 restreint par ClaI + Sall
standard de taille : phage λ restreint par HindIII



Donc, si on restreint le plasmide pB2 par Clal + Sall, on obtiendra :

- pour l'hypothèse 1 : des fragments de 7.4 kb ; 3.2 kb et 1.7 kb
- pour l'hypothèse 2 : des fragments de 5.7 kb ; 4.9 kb et 1.7 kb

Les profils de restriction après une double restriction Clal + Sall seront donc différents en fonction de l'hypothèse qui se vérifie. Dans le cas envisagé, la double restriction Clal + Sall donnant des fragments de 7.4 kb, 3.2 kb et 1.7 kb (fig. 2.5.) démontre que le site Clal est localisé comme proposé dans l'hypothèse 1.

Un exemple de gel obtenu lors de l'établissement de la carte de restriction de pB2 est présenté à la figure 2.6. Les enzymes de restriction utilisés, la taille estimée des fragments de restriction ainsi que le nombre et la localisation des sites de clivage sont présentés en annexe. La synthèse des résultats répertoriés en annexe nous permet d'établir la carte de restriction de l'insert de pB2 (fig. 2.7.)

II.B.2. Délimitation d'une région commune aux trois inserts (de pB1, pB2 et pB3) :

Nous savons que les trois plasmides (pB1, pB2 et pB3) portent chacun le gène LAC F. En établissant une carte de restriction sommaire des inserts pB3 et pB1, nous pouvons les positionner par rapport à l'insert pB2 et déterminer la région commune aux trois inserts, qui contient LAC F.

II.B.2.1. Carte physique de l'insert de pB3 :

Nous avons établi la carte physique de l'insert de pB3 selon le schéma expérimental utilisé pour l'établissement de celle de pB2, mais en disposant d'une donnée supplémentaire, à savoir que la carte physique de l'insert de pB2 doit chevaucher au moins partiellement celle de l'insert de pB3.

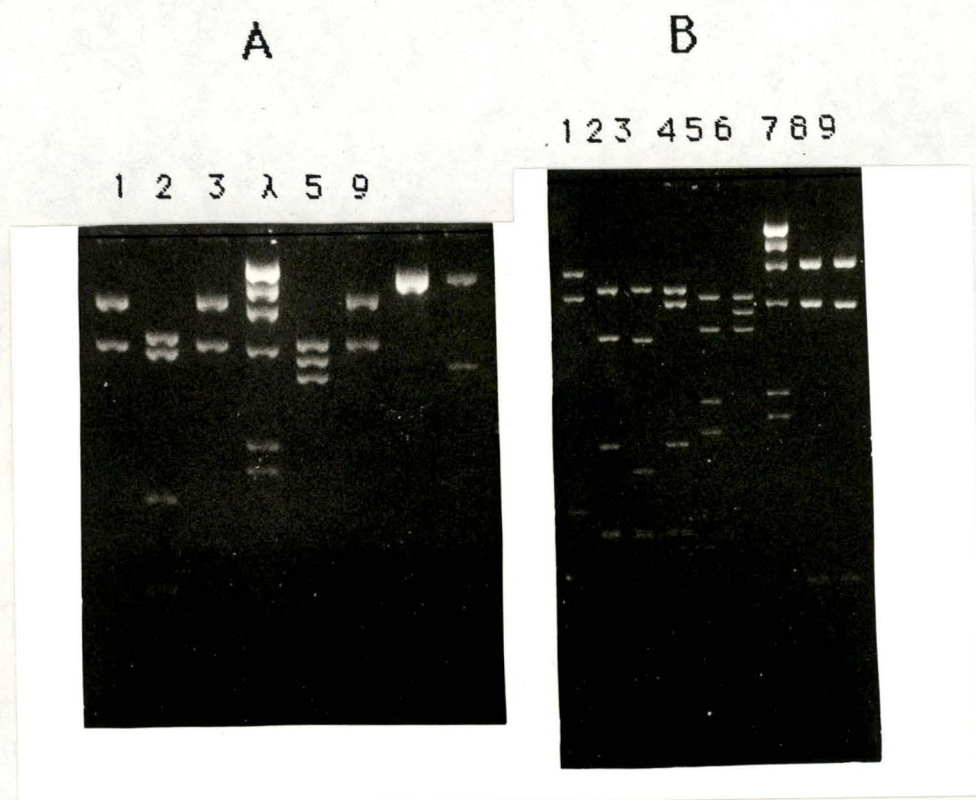
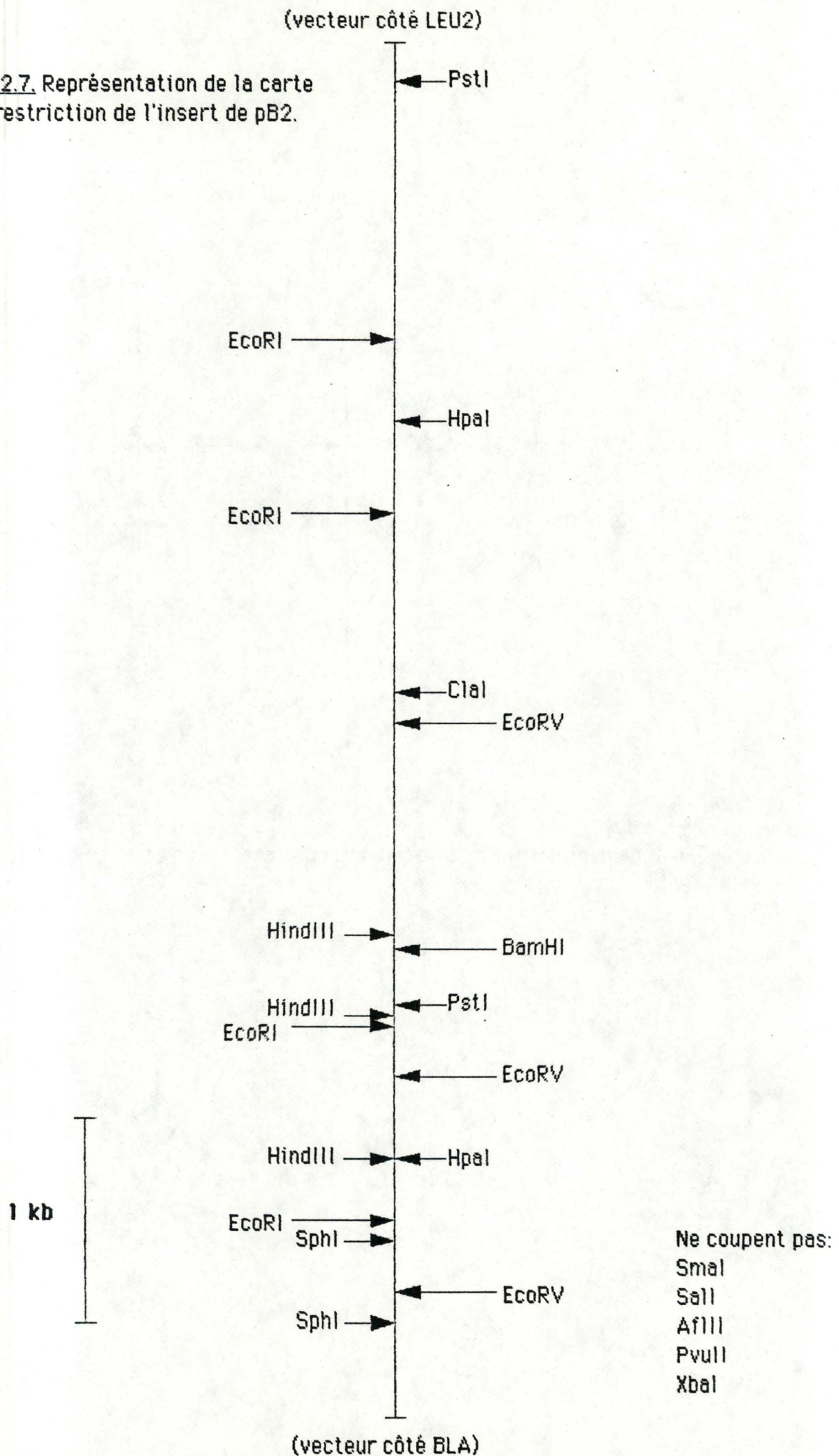


Fig.2.6. Exemple d'analyse de mélanges de restriction par électrophorèse en gel d'agarose, utilisée pour établir une carte physique de pB2. Le plasmide pB2 est restreint par les enzymes suivantes:
 (A) : gel contrôle: simples restrictions: piste 1: PstI, piste 2: EcoRV, piste 3: PstI, piste 5: HpaI, piste 9: PstI; ADN du phage λ restreint par HindIII (marqueur de taille).
 (B) : gel test: simples et doubles restrictions: piste 1: PstI + SphI, piste 2: EcoRV + Sall, piste 3: PstI + EcoRV, piste 4: EcoRV, piste 5: HpaI + Sall, piste 6: HpaI, piste 8: HindIII, piste 9: PstI + HindIII.
 Piste λ (A) et piste 7 (B): ADN du phage λ restreint par HindIII (marqueur de taille).

Fig.2.7. Représentation de la carte de restriction de l'insert de pB2.



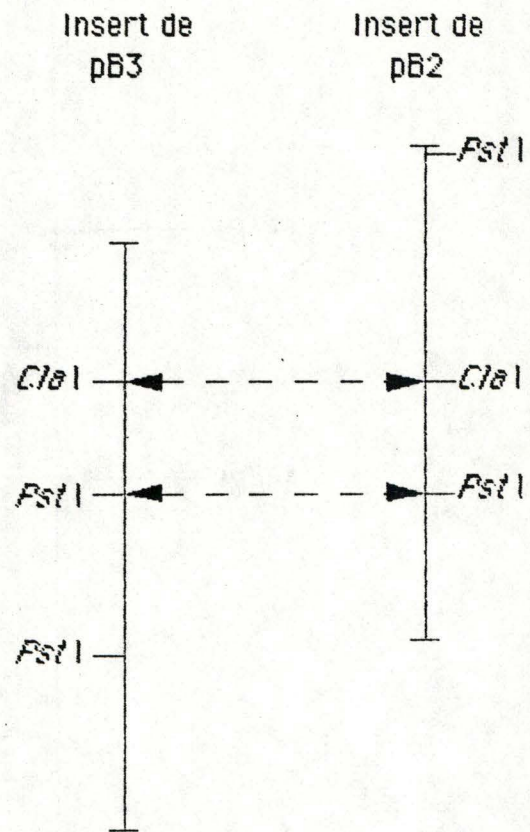


Fig.2.8. Alignement des inserts de pB2 et pB3 grâce à leur carte de restriction.

Les enzymes de restriction utilisés, la taille estimée des fragments de restriction ainsi que le nombre et la localisation des sites de clivage sont présentés en annexe. La synthèse de ces résultats nous permet d'aligner les inserts de pB2 et pB3 (fig. 2.6.) et d'établir la carte de restriction de l'insert de pB3, illustrée à la figure 2.9.

11.B.2.2. Carte physique de l'insert de pB1 :

La carte physique de l'insert de pB1 a été réalisée selon la même logique expérimentale que celle de l'insert de pB3.

Les enzymes de restriction utilisés, la taille estimée des fragments de restriction ainsi que le nombre et la localisation de sites de clivage sont présentés en annexe. La synthèse de ces résultats nous permet d'aligner les inserts de pB1, pB2 et pB3 (fig. 2.10.) et d'établir la carte de restriction de l'insert de pB1, illustrée à la fig. 2.11.

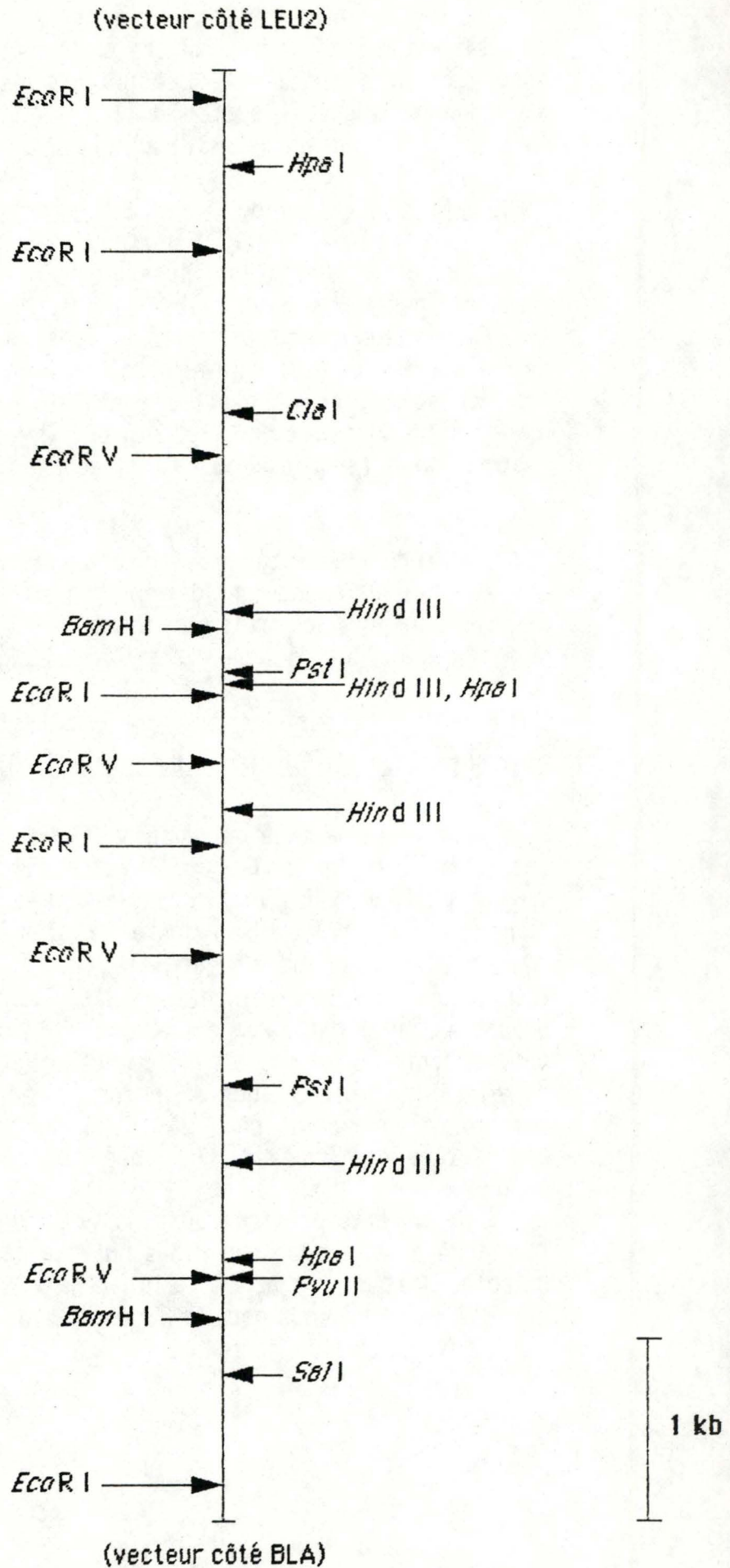
Au terme de cette caractérisation physique des trois plasmides pB1, pB2 et pB3 nous avons donc délimité une région de 5.4 kb (fig. 2.12.) commune aux inserts des trois plasmides et qui contient donc le gène codant pour la β -galactosidase de *K. fragilis* (LAC F).

11.B.3. Délimitation du gène de β -galactosidase par comparaison avec la carte physique de LAC4 de *Kluyveromyces lactis* :

LAC4 est le gène qui code pour la β -galactosidase chez *K. lactis*, une variété proche de *K. fragilis*. La carte de restriction de LAC4 de *K. lactis*, publiée par Breunig *et al* (1984), est alignée avec celle de la région commune pB1-pB2-pB3 à la figure 2.13. Nous constatons, pour la majorité des enzymes de restriction utilisées, que l'ordre des sites de clivage est identique et que la distance entre les sites de clivage est proche. Il est probable que les cartes physiques de LAC4 (*K. lactis*) et LAC F (*K. fragilis*) soient identiques et que les différences mineures qu'on constate ne soient dues qu'à des imprécisions de mesures (seul un site SphI supplémentaire est trouvé en aval du gène LAC F par rapport à LAC4). Cette hypothèse pourra être confirmée ou infirmée par séquençage et comparaison de séquences.

Si la carte physique du gène LAC4 de *K. lactis* est pratiquement identique à celle que nous avons obtenue pour le gène codant pour la β -galactosidase de *K. fragilis*, à la figure 2.14., on remarquera que la carte du gène *lacZ* (qui code pour la β -galactosidase) de *E. coli*, est complètement différente de celle de LAC F.

Fig.2.9. Représentation de la carte de restriction de l'insert de pB3.



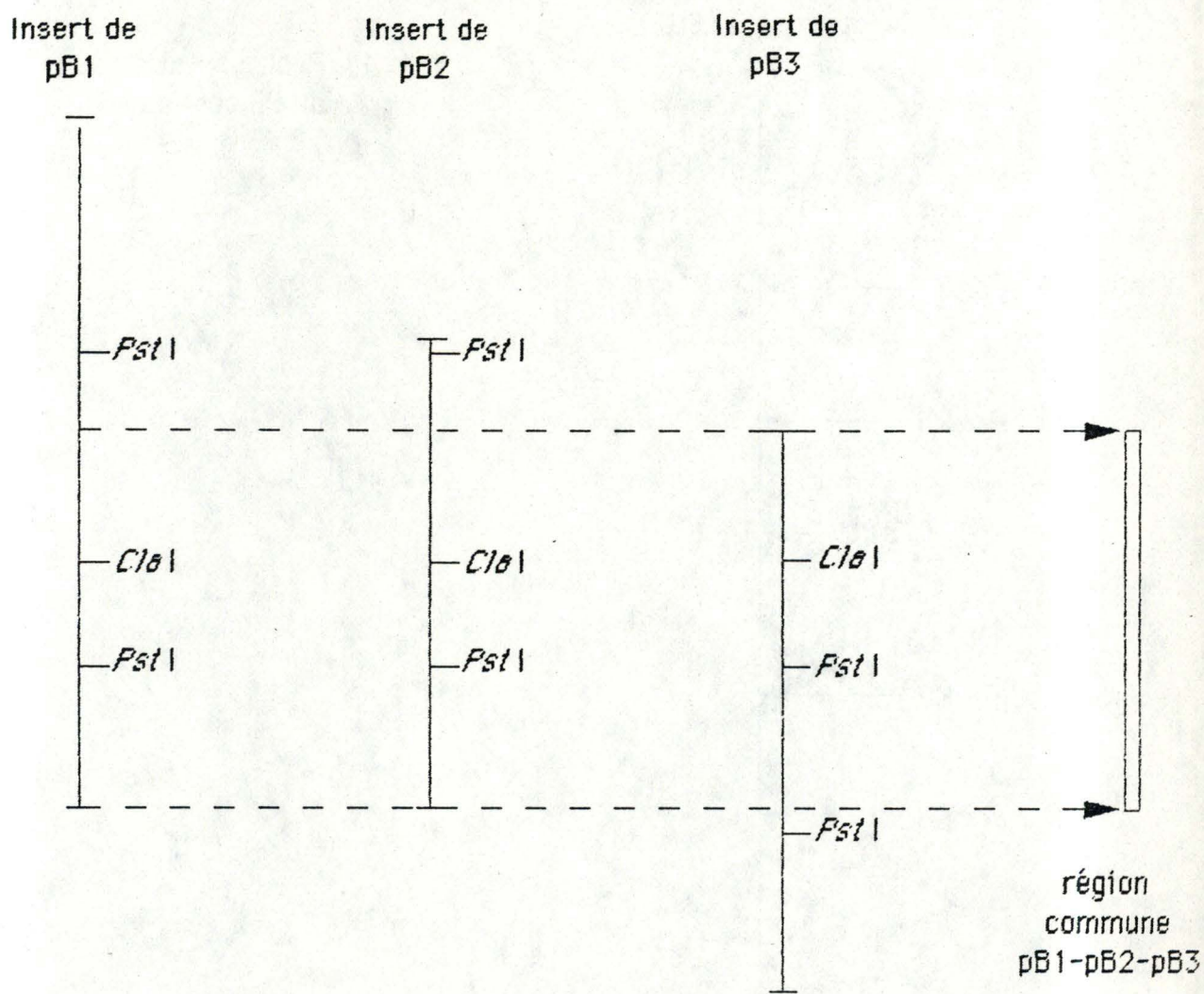
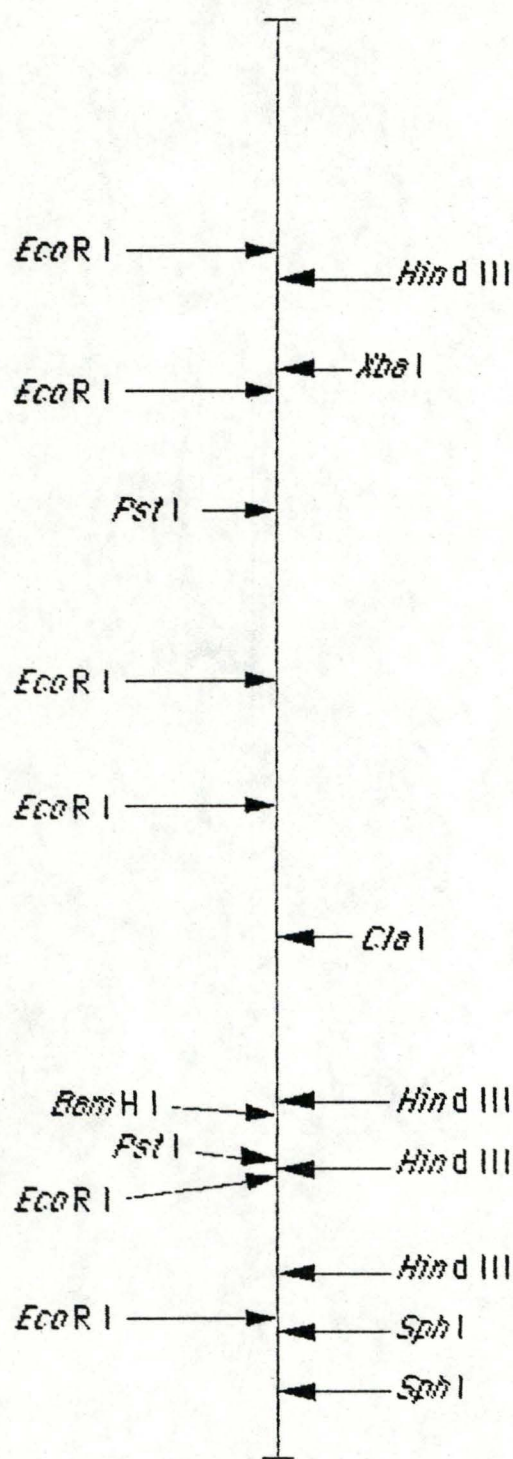


Fig.2.10. Alignement des inserts de pB1, pB2 et pB3 et délimitation d'une région commune.

(vecteur côté LEU2)



(vecteur côté BLA)

Fig.2.11. Représentation de la carte physique de l'insert de pB1

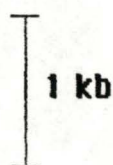


Fig.2.12. Représentation de la carte de restriction de la région commune aux inserts de pB1, pB2 et pB3.

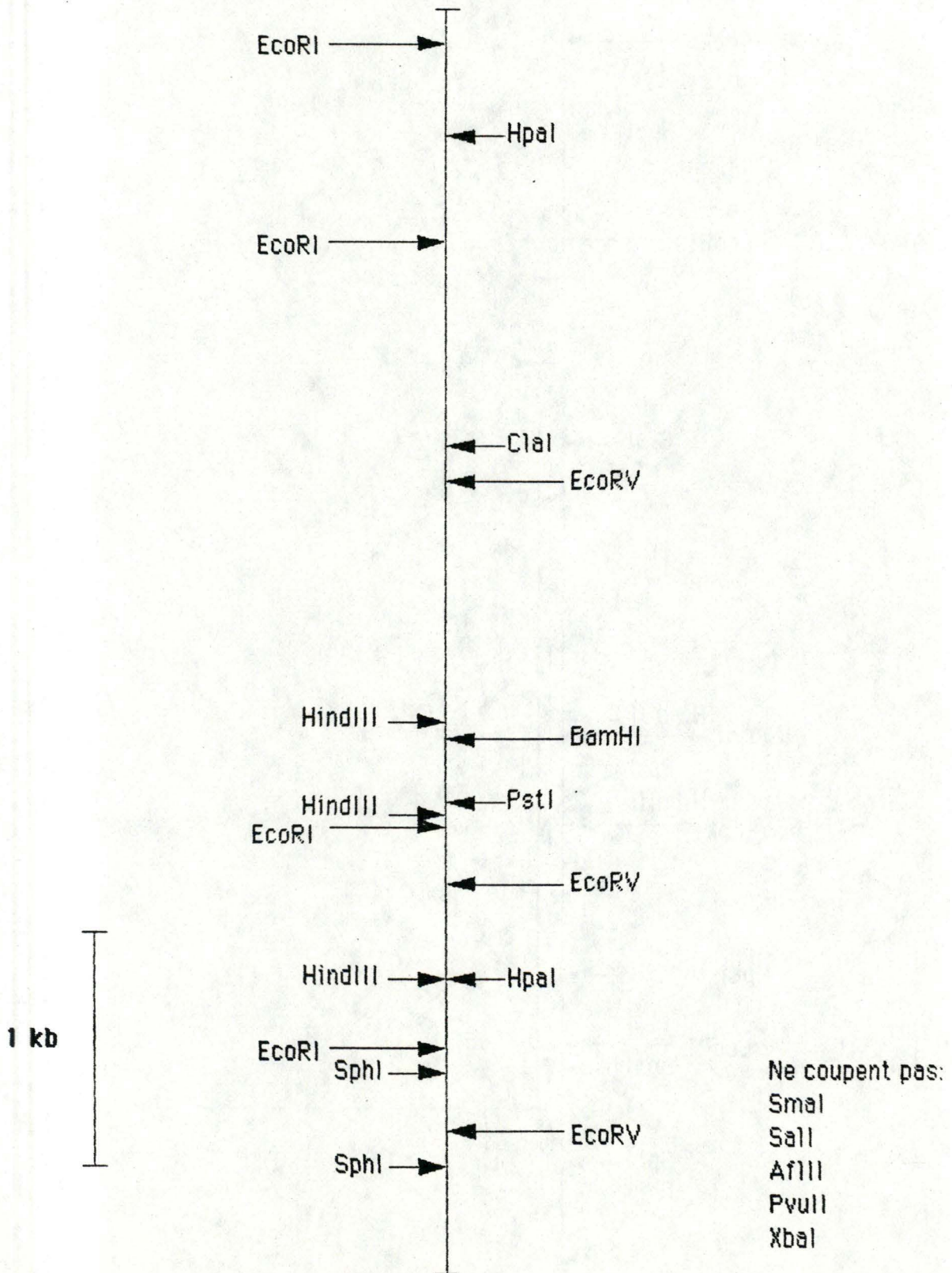


Fig.2.13. Alignement des cartes de restriction de la région commune aux inserts de pB1, pB2 et pB3 avec la région génomique de *K. lactis* comprenant le gène LAC4.

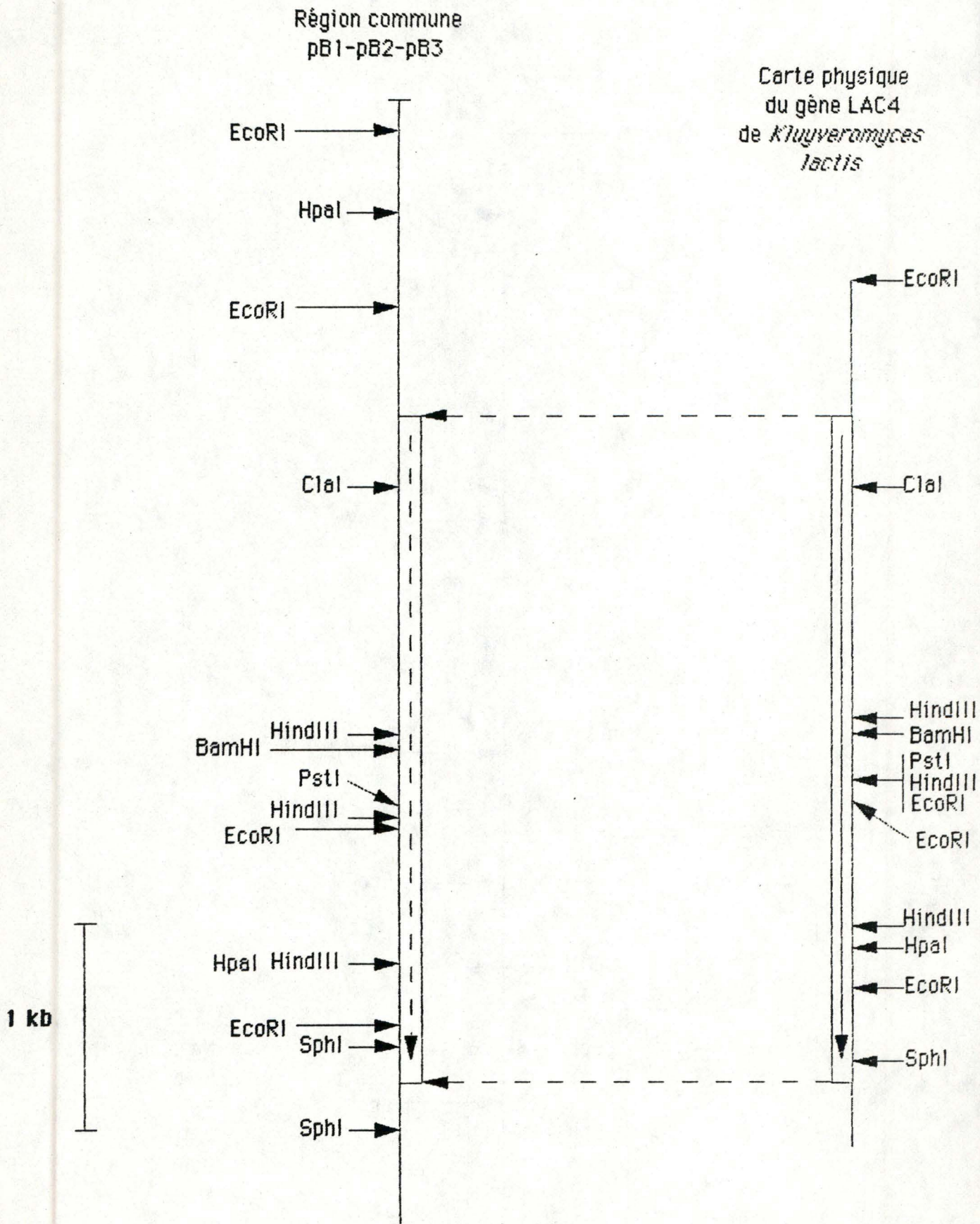
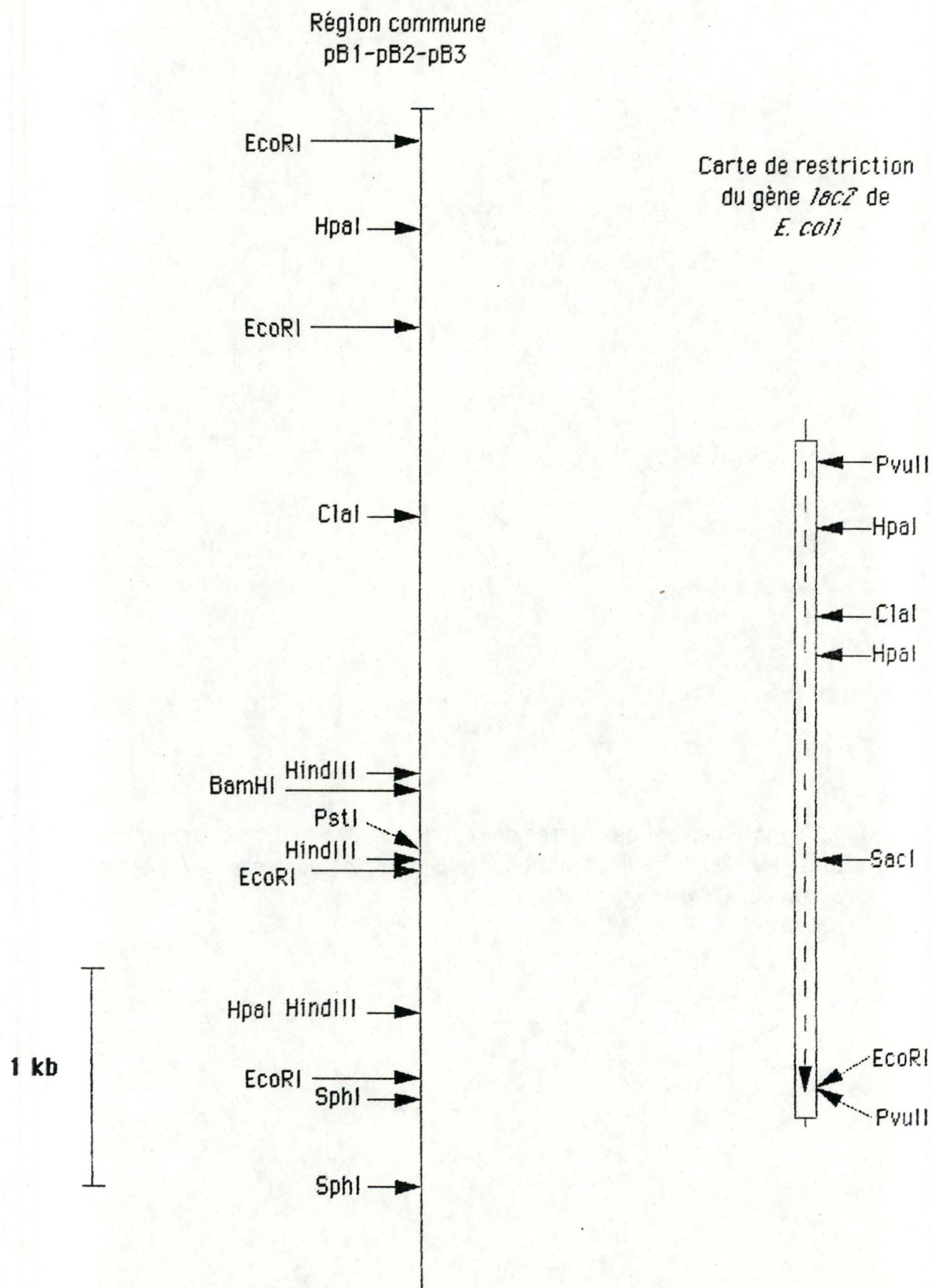
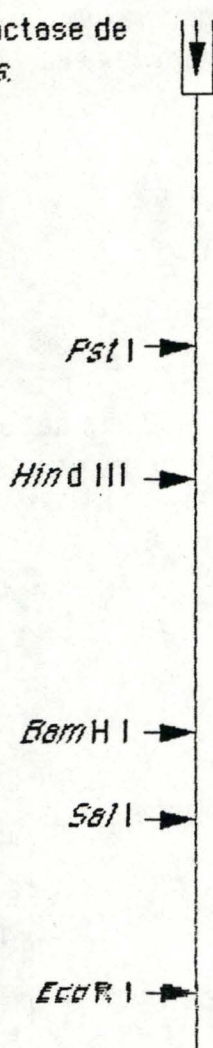


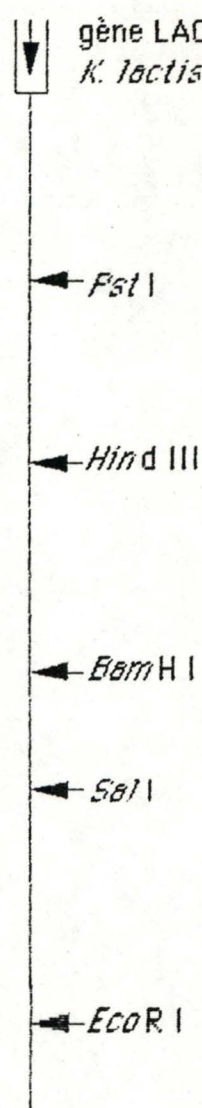
Fig.2.14. Alignement des cartes de restriction de la région commune aux inserts de pB1, pB2 et pB3 avec la région génomique de *E. coli* comprenant le gène *lacZ*.



gène de lactase de
K. fragilis.



gène LAC4 de
K. lactis



Ne coupe pas:
Cla I

1 kb

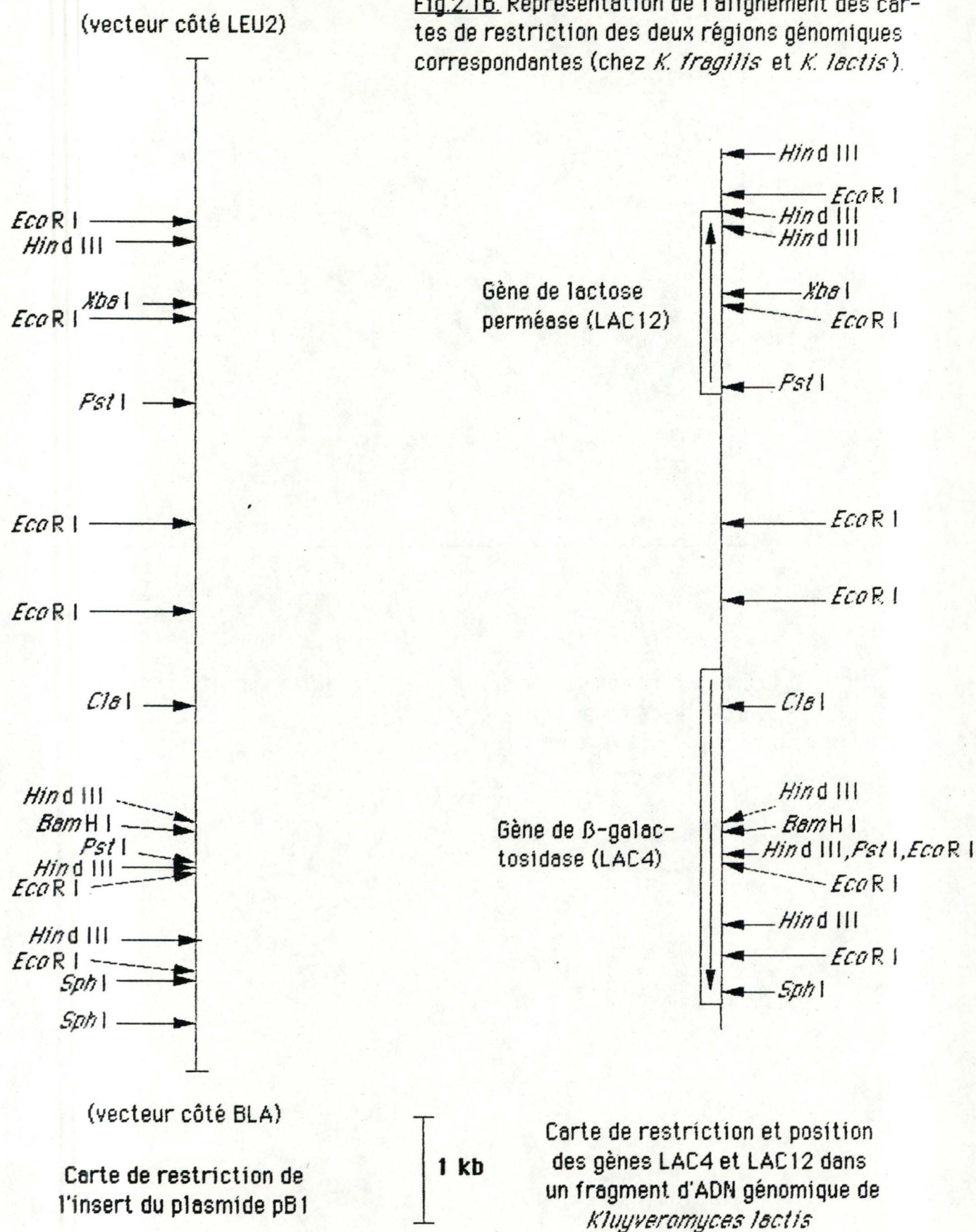
Fig.2.15. Alignement des cartes de restriction des régions génomiques situées en aval du gène codant pour la β -galactosidase chez *Kluyveromyces fragilis* et *Kluyveromyces lactis*.

II.B.4. Détection du gène codant pour la lactose perméase de *Kluyveromyces fragilis* :

Si on compare la carte de restriction de la région comprenant LAC4 de *K. lactis* avec la carte de restriction correspondante de *K. fragilis*, on constate une grande similitude qui couvre la région comprenant, chez *K. lactis*, le gène LAC12 (fig. 2.16.). Ceci laisse supposer l'existence, dans la région correspondante de pB1, d'un gène homologue à LAC12, codant pour la lactose perméase. Pour plus de commodité, nous avons nommé le gène codant pour la lactose perméase de *K. fragilis* "LAC P", ce nom n'ayant d'application que dans le cadre de ce travail.

Enfin, lorsqu'on compare les cartes de restriction de la région située en aval du gène LAC F avec la région située en aval du gène LAC4 (fig. 2.15.), on obtient encore une forte correspondance.

Fig.2.16. Représentation de l'alignement des cartes de restriction des deux régions génomiques correspondantes (chez *K. fragilis* et *K. lactis*).



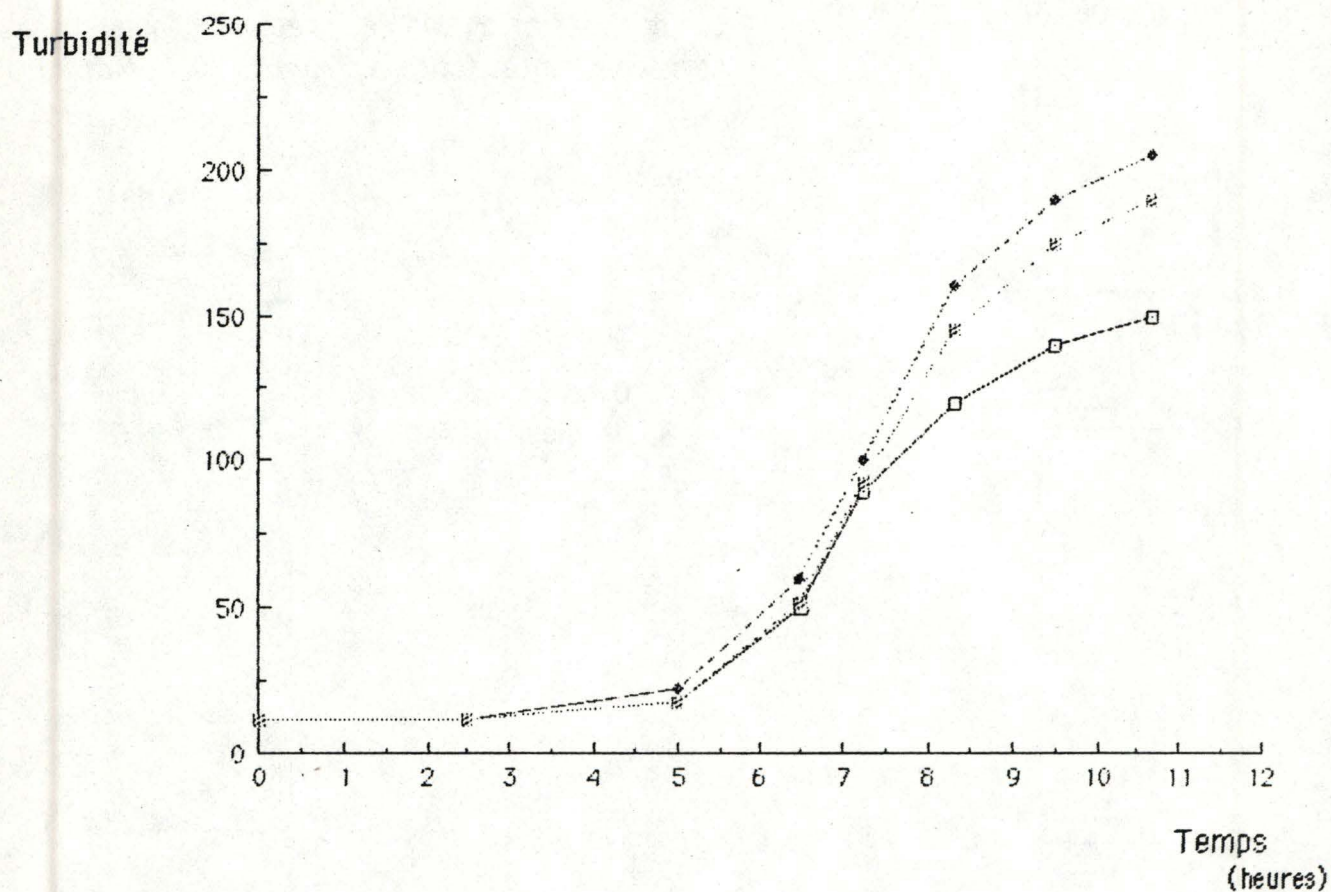


Fig.2.17. Courbes de croissance de cultures de *K. fragilis* sur différentes sources de carbone:

- : 2 % lactose
- : 2 % glucose
- * : 2 % lactose + 2 % glucose

II.C. Chez *Kluyveromyces fragilis*, la production de β -galactosidase est régulée : influence des conditions de culture :

Chez *K. fragilis*, il a été démontré par Hewitt et Grootwassink (1984) que :

- le lactose et le galactose induisent la synthèse de β -galactosidase
- le glucose (à une concentration supérieure à 1 mM) la réprime.

Nous avons suivi cette synthèse par la mesure de l'activité spécifique de la β -galactosidase et par analyse de SDS-PAGE (selon les protocoles décrits en matériels et méthodes) après croissance sur différents milieux de cultures :

- milieu minimum avec 2 % de lactose comme seule source de carbone (conditions d'induction).
- milieu minimum avec 2 % de glucose comme seule source de carbone (conditions de répression).
- milieu minimum avec 2 % de glucose et 2 % de lactose comme seules sources de carbone (conditions de répression).

II.C.1. Mesure de l'activité spécifique :

La mesure de l'activité spécifique de la β -galactosidase nécessite :

- la lyse aux billes de verre après culture jusqu'en fin de phase exponentielle (fig. 2.17.)
- le dosage de l'activité β -galactosidasique sur le lysat (tableau 2.1.)
- le dosage des protéines du lysat (tableau 2.1.)
- le calcul de l'activité spécifique de la β -galactosidase (tableau 2.1.)

Une unité β -galactosidasique spécifique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1 nmole d'ONPG par minute et par mg de protéines à 28°C et à pH 7.00.

Les valeurs d'activité spécifique que nous obtenons sont présentées au tableau 2.1. et représentées à la figure 2.18.

Nous avons donc un ratio : activité en conditions de répression (glucose et lactose) / activité en conditions d'induction (lactose) de 0,016.

Notre protocole de mesure d'activité β -galactosidasique nous permet donc de mettre en évidence l'induction et la répression de l'activité β -galactosidasique chez *K. fragilis* (souche ATCC12424) après croissance sur différents milieux.

II.C.2. Analyse des lysats par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS:

Par analyse des SDS-PAGE (fig. 2.19.), on met en évidence une bande protéique d'un PM de l'ordre de 140000 dans le lysat où nous mesurons une importante activité β -galactosidasique. Cette bande est absente du lysat de *K. fragilis* dans lequel nous ne détectons qu'une très faible activité β -

Source de carbone de la culture d'où provient le lysat	DOSAGE ACTIVITE			DOSAGE PROTEINES			Activité spécifique (en milliunités)
	Volume de lysat (μl)	ΔA _{420 nm}	[ONP] (en nmole/ml)	Volume de lysat (μl)	ΔA _{540 nm}	[protéines] (en μg/μl)	
- 2 % lactose	5	0.398	0.165	50	0.223	0.945	5220
- 2 % lactose +2 % glucose	50	0.084	0.0376	50	0.306	1.39	81
- 2 % glucose	50	0.052	0.0247	50	0.358	1.67	44

Tableau 2.1. Activité spécifique en fonction du milieu de culture de *K. fragilis*. Temps d'incubation à 28°C: 10 minutes.

Détermination de l'activité spécifique:

$$\text{Activité spécifique} = \text{dilution} \cdot \frac{[\text{ONP}]}{\text{temps} \cdot [\text{protéines}]}$$

$$\text{où dilution} = \frac{\text{volume final (1500 } \mu\text{l)}}{\text{volume de lysat (en } \mu\text{l)}}$$

[ONP] = concentration en ortho-nitrophénol

temps = temps d'incubation à 28°C (en minutes)

[protéines] = concentration en protéines (en μg/μl)

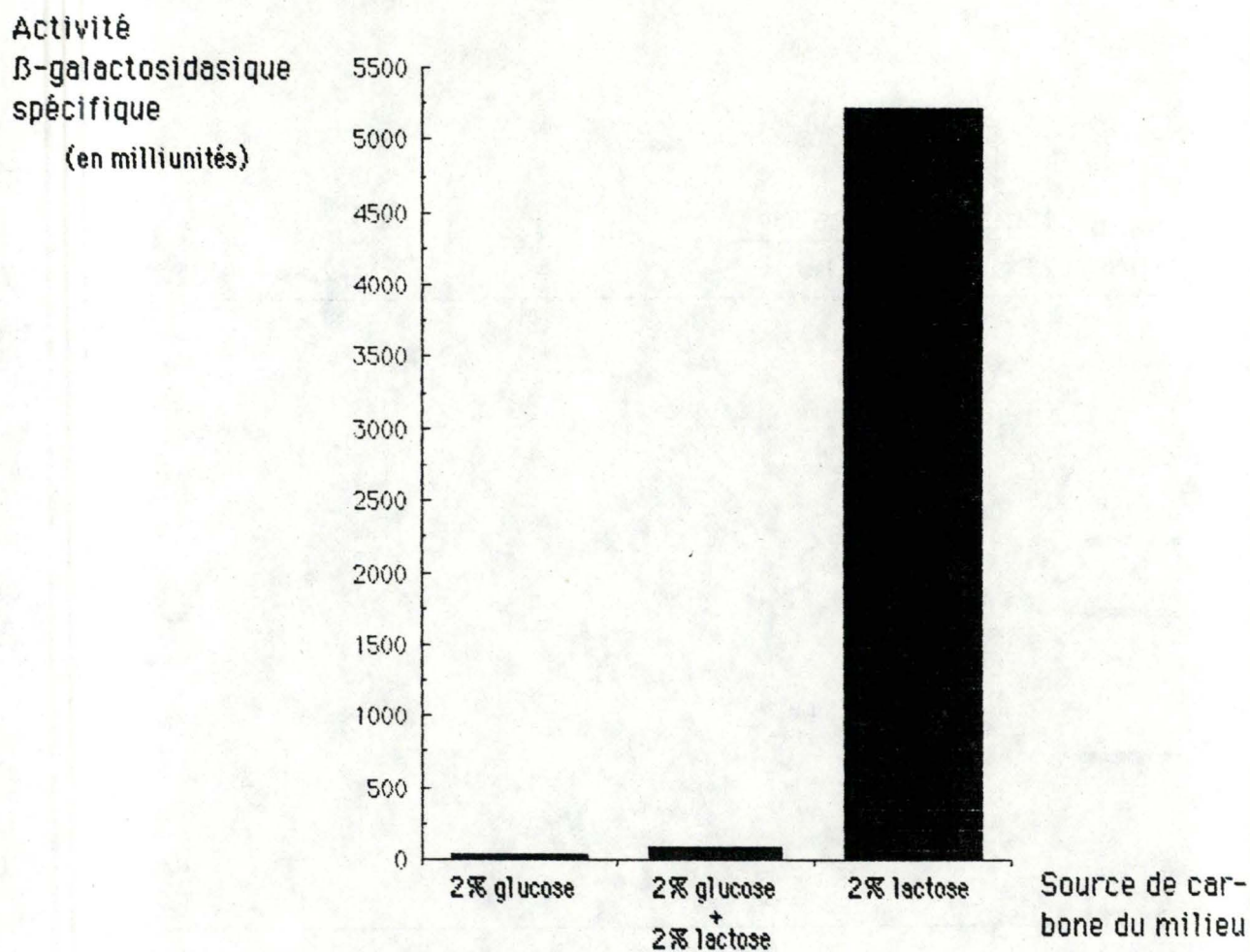


Fig. 2.18. Représentation des résultats obtenus pour le dosage de l'activité β-galactosidasique spécifique, en fonction de la source de carbone du milieu de culture.

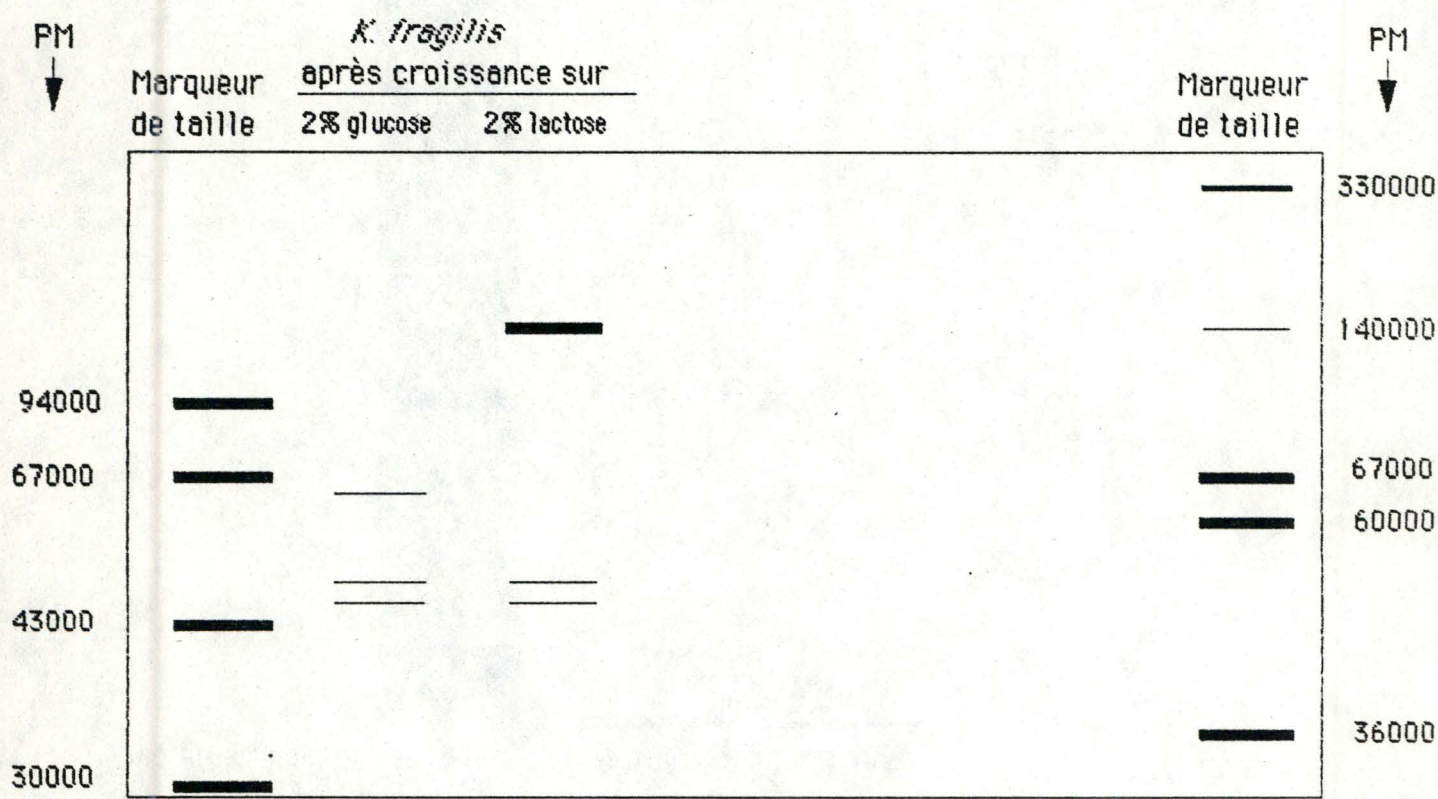


Fig.2.19. Schéma du gel présenté à la figure 2.29. Après croissance de *K. fragilis* sur un milieu comprenant 2 % de lactose comme seule source de carbone, le lysat présente une forte bande supplémentaire par rapport au lysat obtenu après croissance de *K. fragilis* sur un milieu comprenant 2 % de glucose comme seule source de carbone. Cette bande correspond à un poids moléculaire de 140000 pour le monomère, soit la valeur de PM attendue pour le monomère de β -galactosidase. A la figure 2.29., nous présentons une évidence attestant que cette bande correspond bien au monomère de β -galactosidase de *K. fragilis*.

galactosidasique. Précisons que le PM attendu pour le monomère de β -galactosidase de *K. fragilis* est de l'ordre de 135000. Nous en déduisons que la bande protéique observée correspond en toute vraisemblance au monomère de β -galactosidase.

Il existe donc un processus de régulation de la production de β -galactosidase en fonction des conditions de culture. A quel niveau de l'expression du gène de β -galactosidase ce mécanisme de contrôle s'exerce-t-il ? Par analogie à *K. lactis*, où le contrôle de l'expression de LAC4 est transcriptionnel, nous formulons l'hypothèse que le contrôle de l'expression du gène de β -galactosidase de *K. fragilis* est transcriptionnel.

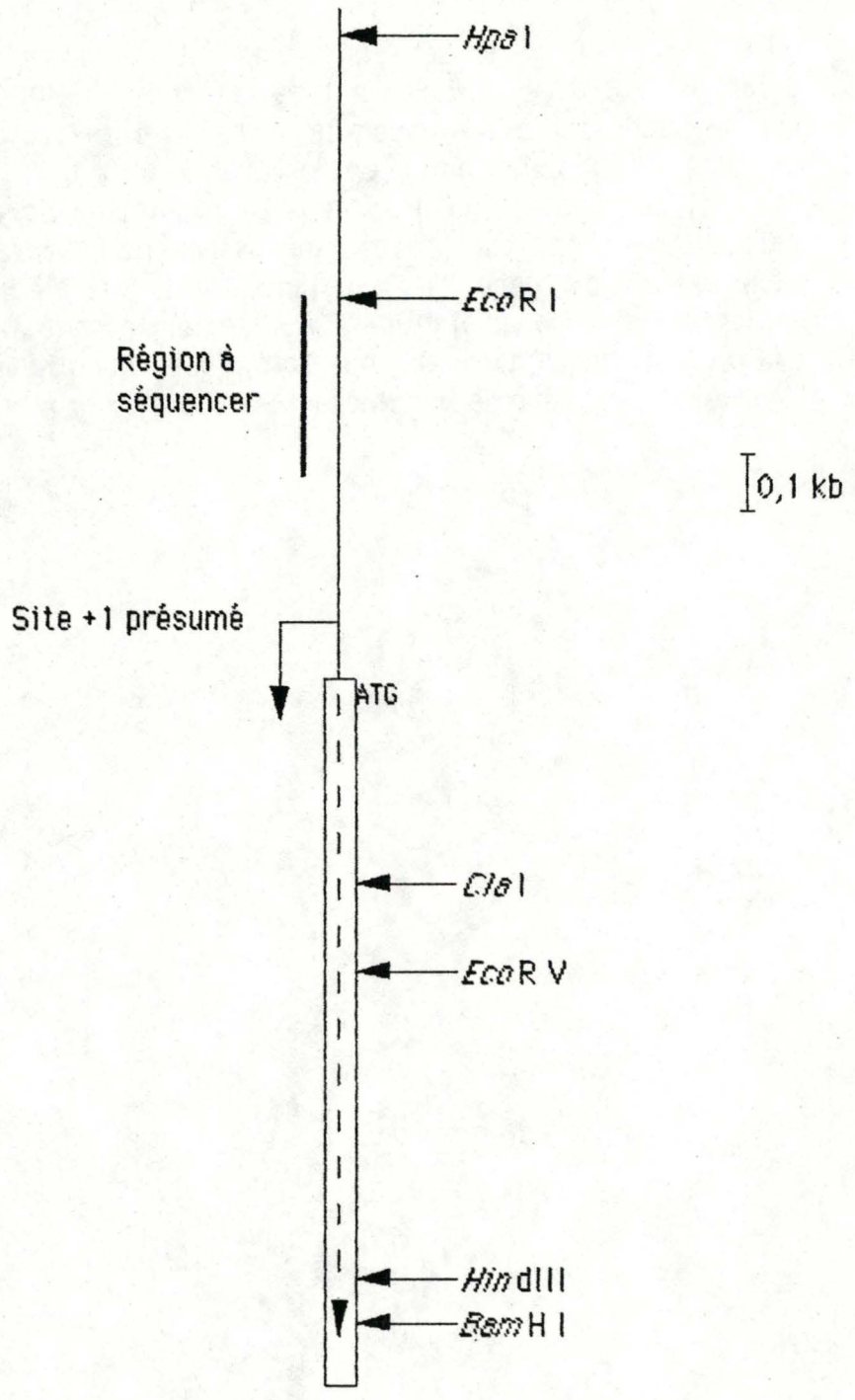


Fig.2.20. Position de la région à séquencer par rapport à la carte de restriction de la région en amont et de la première partie du gène LAC F.

II.D. Comparaison des séquences LAC4 et LAC F pour l'identification de signaux potentiels de régulation transcriptionnelle du gène LAC F de *Kluyveromyces fragilis* :

Notre hypothèse étant que le contrôle de la production de β -galactosidase par *K. fragilis* est de type transcriptionnel, comme il l'est pour LAC4 de *K. lactis*, nous avons recherché chez *K. fragilis* l'existence de signaux UAS (séquences régulatrices en amont du gène) décrits pour LAC4.

Par comparaison de séquences de gènes régulés, plusieurs auteurs ont identifié des séquences consensus conservées, en amont de ces gènes (parfois dans la séquence codante) et ces séquences jouent un rôle dans la régulation en s'associant avec des protéines régulatrices qui les reconnaissent spécifiquement. Une séquence régulatrice UAS est décrite en amont de LAC4 chez *K. lactis*. Après séquençage de la région amont de LAC F, nous rechercherons une UAS dans cette région.

II.D.1. Etude de la séquence de la région amont du gène LAC F :

II.D.1.1. Clonage de la région amont de LAC F dans un vecteur pBluescript (pSB1):

Vu la méthode de séquençage choisie (voir matériel et méthodes, IV.5), il est nécessaire de disposer d'un oligonucléotide (appelé primer) qui s'hybridera en amont de la région à séquencer et servira d'amorce pour la polymérase. Nous disposons d'un vecteur, le pBluescript KS+ conçu pour le séquençage selon la méthode de Sanger. En effet, il est fourni avec une série de primers capables de s'hybrider à des séquences situées de part et d'autre du MCS. Dans le but de séquencer la région amont du gène LAC F, nous l'insérerons dans le MCS de pBluescript KS+. La région à séquencer est représentée à la figure 2.20.

Nous choisissons d'introduire un fragment EcoRI-BamHI dans pBluescript KS+ (fig. 2.21.). La figure 2.21. décrit le protocole utilisé. Le mélange de ligation obtenu par ce protocole sert à transformer la souche XL1 blue d'*E. coli*. Les clones transformants de XL1 blue sont sélectionnés sur un milieu LB + ampicilline (sélection des transformants ayant acquis un plasmide portant le gène BLA) + IPTG + X-gal permettant de discriminer les clones non-recombinants (colorés en bleu) des clones recombinants (colorés en blanc). Après culture liquide de 6 colonies blanches choisies aléatoirement, nous avons extrait l'ADN plasmidique des cellules bactériennes (miniprep). L'ADN plasmidique de chacune des 6 préparations est restreint par l'enzyme EcoRV et les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1 %. Le profil de restriction de la construction recherchée comporte un fragment de 4.05 kb et un fragment de 1.05 kb (fig. 2.21.). Quatre des 6 plasmides issus des 6 transformants présentent ce profil.

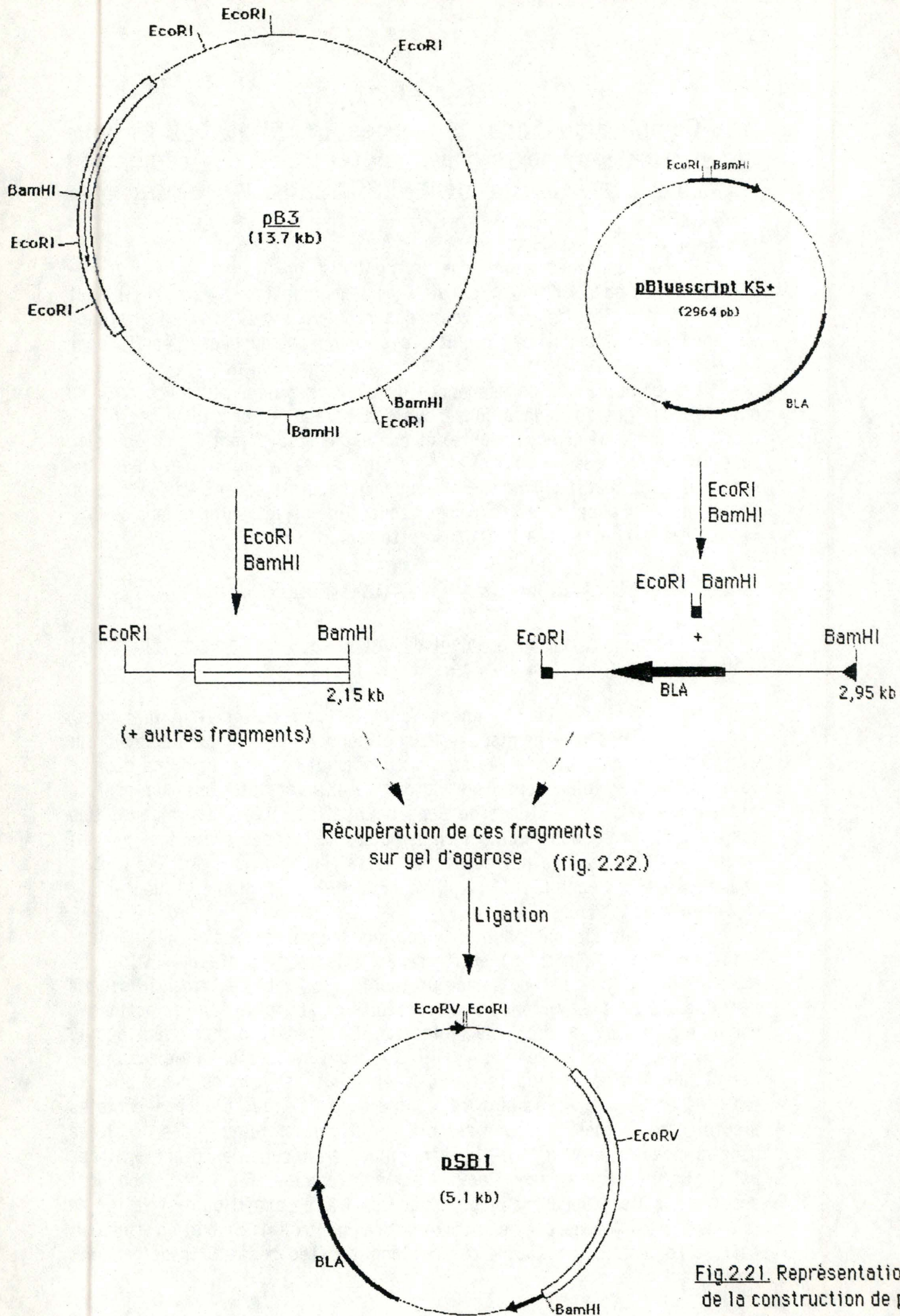


Fig.2.21. Représentation de la construction de pSB1

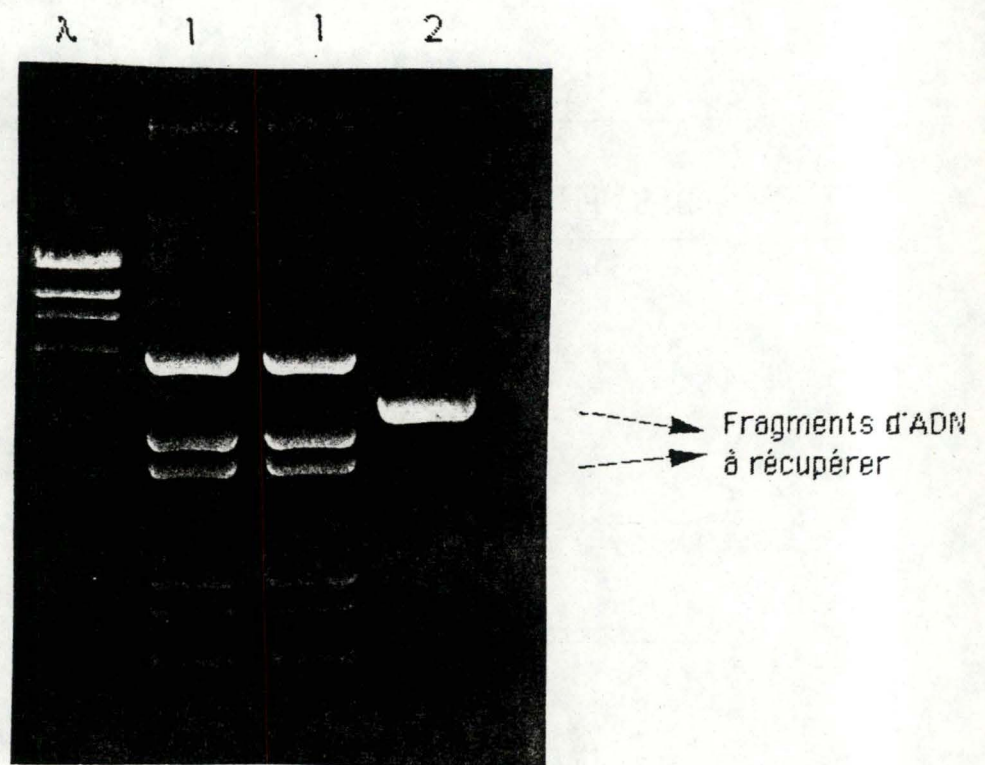


Fig.2.22. Electrophorèse en gel d'agarose: piste λ : marqueur de taille (ADN du phage λ digéré par l'enzyme HindIII); pistes 1: pB3 restreint par EcoRI + BamHI; piste 2: pBluescript KS+ restreint par EcoRI + BamHI.

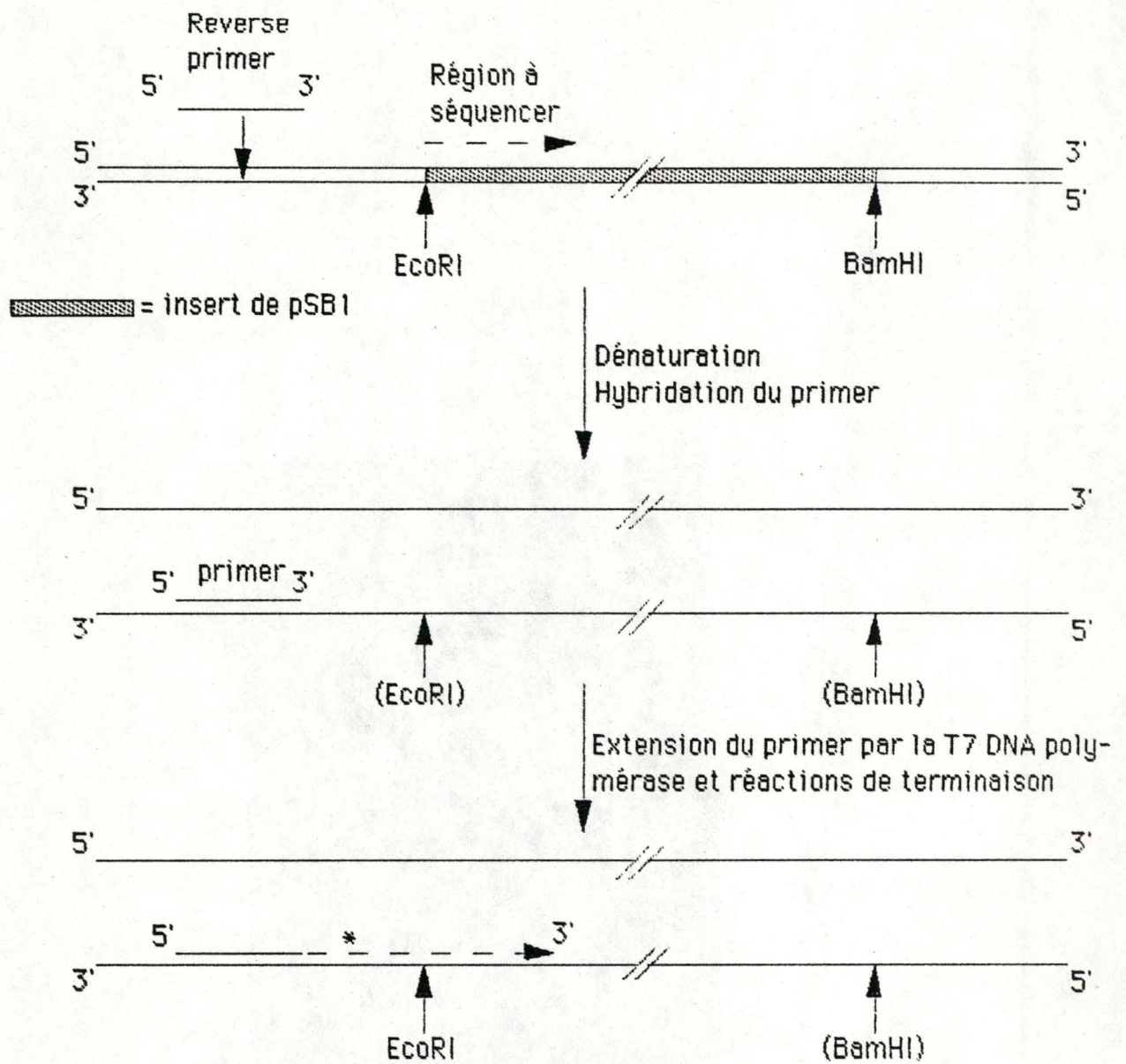


Fig.2.23. Stratégie de séquençage de la région en amont du gène LAC F grâce au plasmide pSB1.

Nous appelons pSB1 (plasmide Séquençage β -gal. 1) ce plasmide pBluescript ayant inséré dans son site multiple de clonage le fragment EcoRI-BamHI de 2.15 kb issu de pB3.

II.D.1.2. Séquençage de la région amont du gène de β -galactosidase :

Pour construire le plasmide pSB1, nous avons introduit le fragment EcoRI-BamHI au site multiple de clonage de pBluescript KS+. Pour séquencer d'EcoRI vers BamHI (fig. 2.23.) nous utilisons le "Reverse primer" (Pharmacia). Le séquençage s'est fait selon la méthode de Sanger, en suivant le protocole décrit (voir matériel et méthodes IV.5) avec des modifications du temps de migration et de la quantité de matériel déposé sur gel afin d'augmenter la résolution des gels, en particulier dans les zones d'ADN de grande taille (fig. 2.24.). 358 pb ont été séquencés :

- 67 pb : partie du site multiple de clonage de pBluescript KS+, située entre le site d'hybridation du primer et le site EcoRI

- 291 pb : de la région à séquencer, après le site EcoRI

L'analyse de cette séquence nous montre qu'il n'y a pas de phase ouverte de lecture et confirme l'absence effective d'un certain nombre de sites de restriction de la carte établie en II.B.2.2. (Fig. 2.12.).

II.D.2. Détection des signaux de régulation par comparaison de séquences avec LAC4 de *Kluyveromyces lactis* :

La séquence que nous avons obtenue est alignée à la séquence correspondante en amont de LAC4 de *K. lactis* à la figure 2.25. On y remarque le taux très élevé d'identité (plus de 98 % d'identité). La séquence de 236 à 252 peut être alignée avec l'UAS_L (UAS en amont du gène LAC4 de *K. lactis*) et avec la séquence consensus des UAS_{GAL} (UAS en amont des gènes GAL de *S. cerevisiae*) :

	239	255	
	5' - CGGAAATTTGTGGTCCG - 3'		
UAS _L	: 5' - CGGAAATTTGTGGTCCG - 3' (Ruzzi <i>et al.</i> , 1987)		
UAS _{GAL}	: 5' - CGGAgGACAGTCGTCCG - 3'		

La séquence de 239 à 255 est donc à considérer comme une UAS car elle est identique à UAS_L et conservée par rapport à UAS_{GAL}; elle est appelée UAS1.

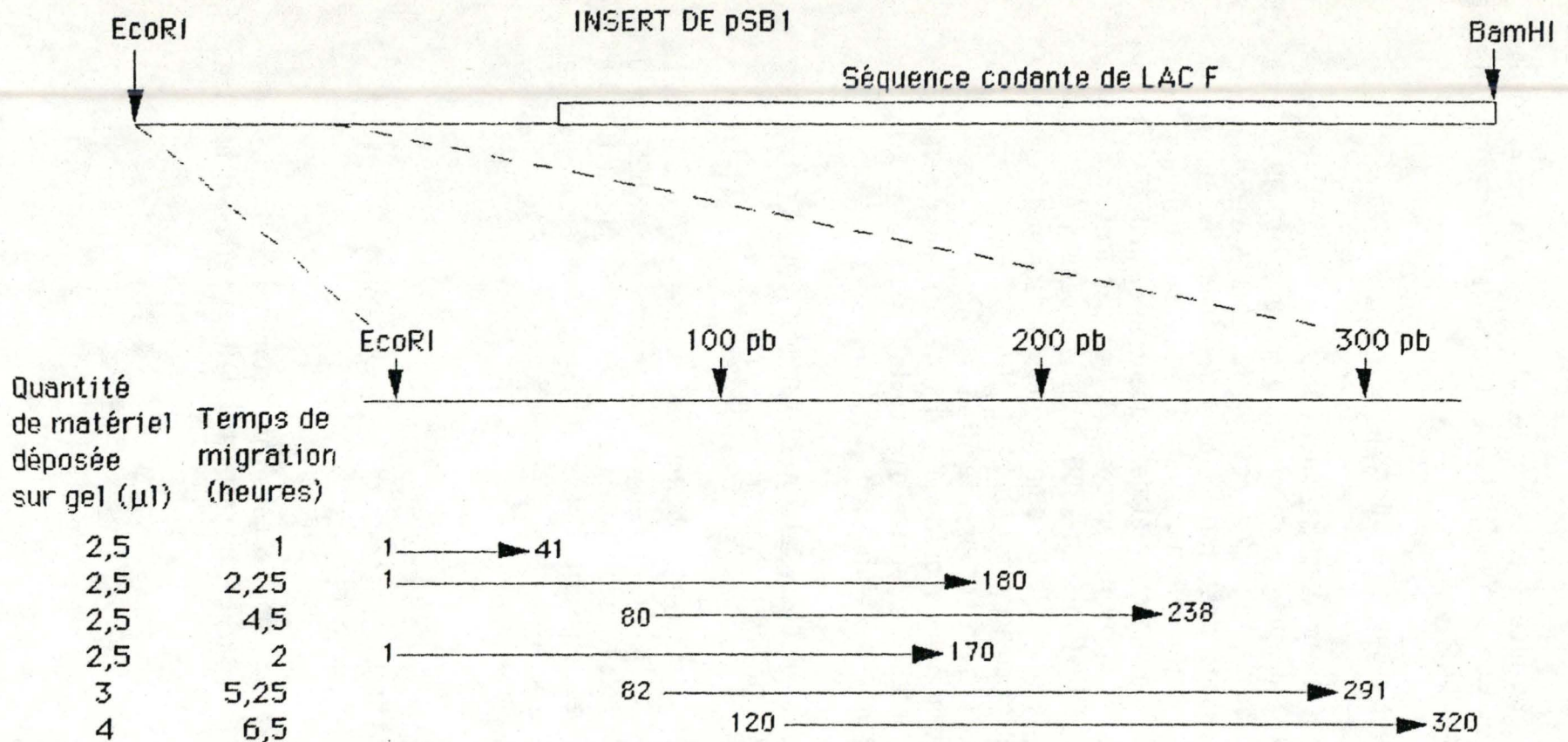


Fig.2.24. Séquences établies dans la région en amont du gène de LAC F: ces séquences se recouvrent entre elles, ce qui permet d'établir la séquence de 1 à 291 pb.

A

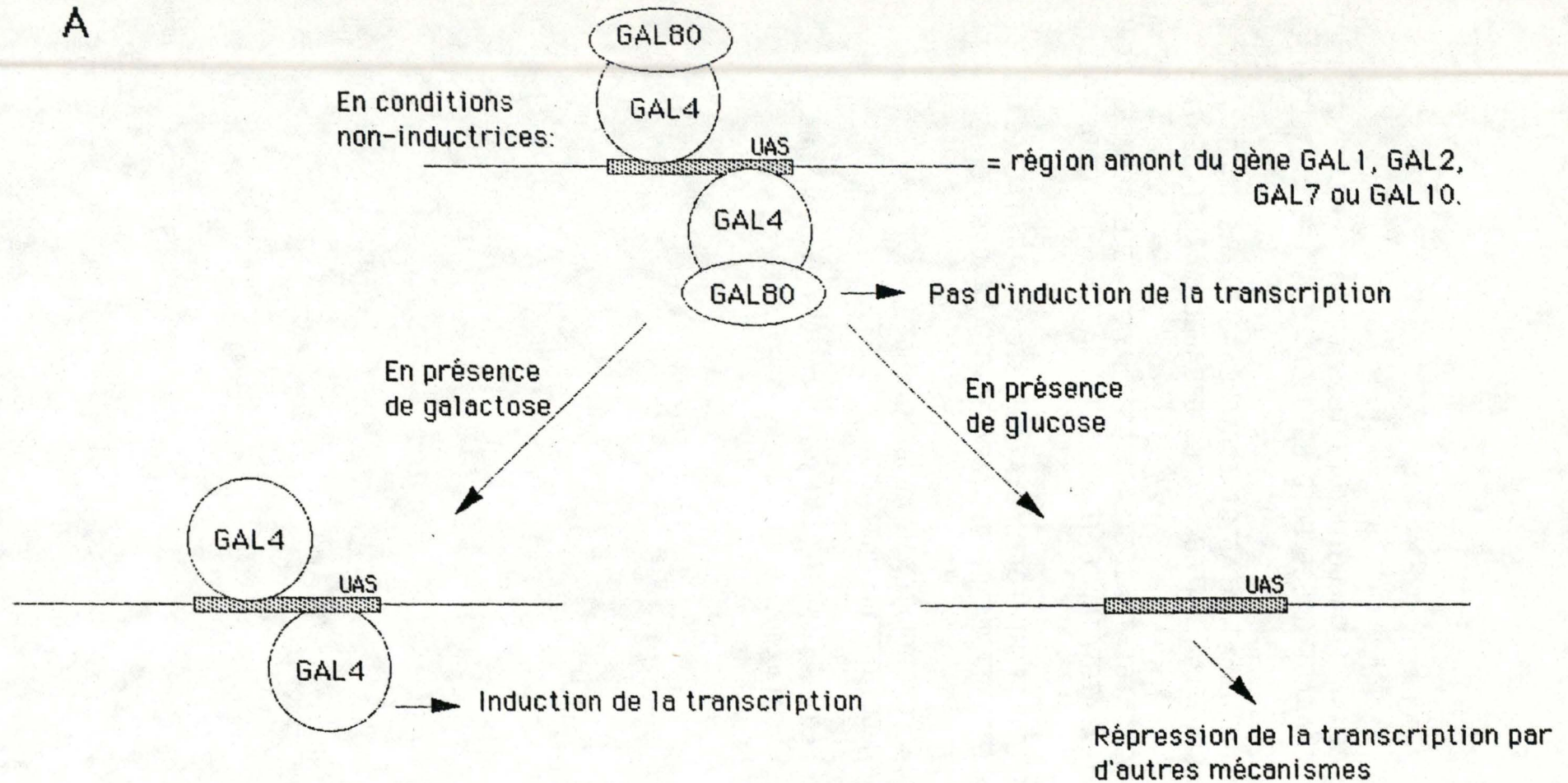


Fig.2.26. (A) : mécanisme simplifié du système GAL4-GAL80.

(B) : action des enzymes codées par GAL1, GAL2, GAL7 et GAL10 dans le métabolisme du galactose.

II.E. Etude chez *Saccharomyces cerevisiae* du rôle régulateur de la séquence UAS1 :

Comme nous l'avons montré, la séquence UAS1 est proche de la séquence consensus UASGAL. Les UASGAL sont impliquées dans le système de régulation GAL4-GAL80 de *S. cerevisiae*.

Rappelons brièvement en quoi consiste le système GAL4-GAL80. (fig. 2.26.). La protéine régulatrice GAL4 se fixe à l'UASGAL et la protéine GAL80 vient se fixer sur elle. En présence d'inducteur (galactose), la protéine GAL80 se détache de la protéine GAL4 et cette dernière peut alors exercer l'induction de la transcription du gène situé en aval de l'UAS à laquelle GAL4 est fixée. En présence de glucose, la protéine GAL4 se dissocie de l'UASGAL à laquelle elle était fixée et il n'y a donc plus d'induction de la transcription. Celle-ci est affectée par un mécanisme de répression catabolique par le glucose.

Chez *K. lactis*, Ruzzi *et al.* (1987) ont montré que l'UAS_L (en amont de LAC4) est fonctionnellement identique à la séquence consensus UASGAL de *S. cerevisiae*. En effet, LAC9, le gène qui code pour la protéine régulatrice qui se lie à l'UAS_L chez *K. lactis*, a été cloné par complémentation d'un mutant *gal4* de *S. cerevisiae*. D'autre part, Wray *et al.* (1987) ont constaté que le gène GAL4 pouvait compléter une mutation *lac9* chez *K. lactis*.

Notre hypothèse est que, si on transforme *S. cerevisiae* par un plasmide navette (*E. coli* - *S. cerevisiae*) portant le gène LAC F avec son UAS1, l'expression de ce gène sera induite en conditions d'induction des gènes GAL de *S. cerevisiae*. En effet, il est possible que la protéine GAL4 reconnaisse l'UAS1 plasmidique et qu'elle induise la transcription du gène LAC F en présence de galactose.

II.E.1. Régulation de l'activité β -galactosidasique chez *S. cerevisiae* transformée par pB2 :

II.E.1.1. Transformation de *S. cerevisiae* et mise en culture des transformants :

Le plasmide pB2 contient une matrice (YEp351) qui porte le marqueur LEU2. La souche GRF18 (*leu2, his3*) de *S. cerevisiae* est choisie pour être transformée par pB2 et par YEp351 (contrôle) selon la méthode de Ito (voir matériel et méthodes, IV,D,7) et les transformants sont sélectionnés sur un milieu minimum avec histidine et sans leucine.

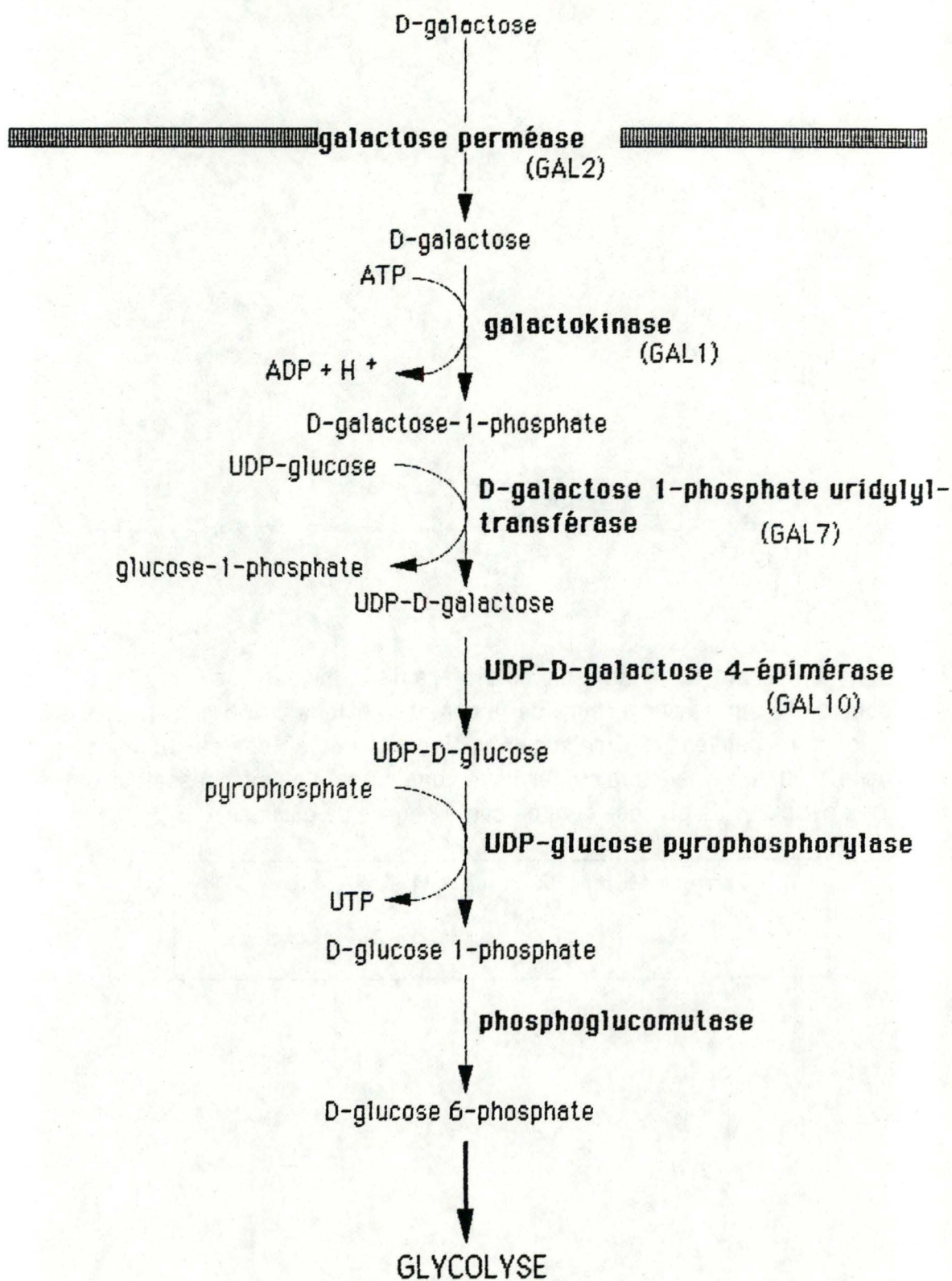
Les transformants servent à lancer des cultures liquides avec différentes sources de carbone : 2 % galactose (conditions d'induction)

2 % galactose + 2 % glucose (conditions de répression)

2 % glucose (conditions de répression)

Ces trois milieux ont été utilisés par West *et al.* (1984) pour montrer l'effet régulateur des UASGAL en fonction des conditions de culture.

B



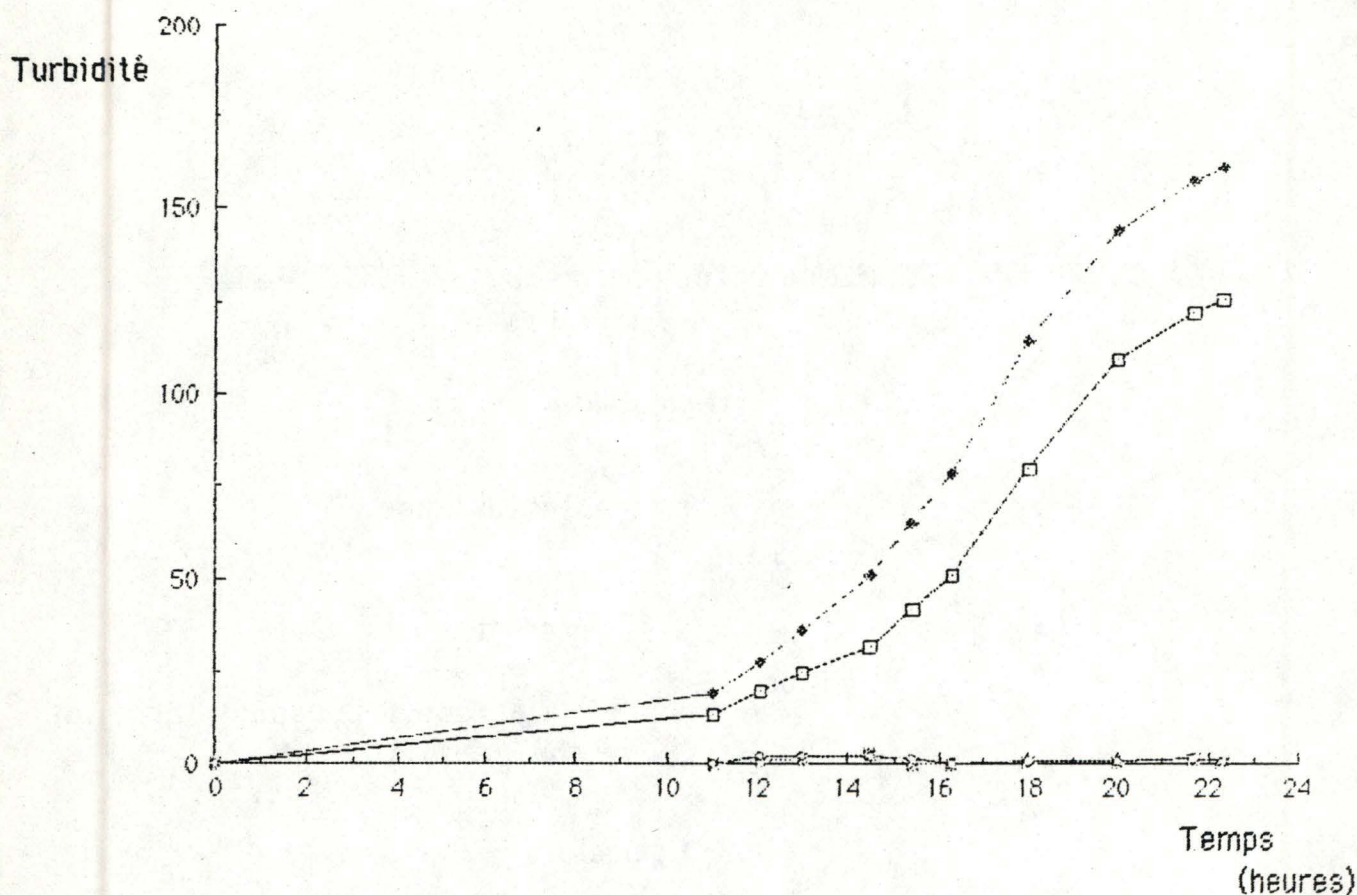


Fig.2.27. La turbidité de cultures de différents clones sur différentes sources de carbone a été suivie par mesure de la densité optique à 660 nm: il apparaît que ces clones ne peuvent croître sur un milieu où le galactose est la seule source de carbone si on ensemence la culture avec une colonie ayant poussé sur boîte (milieu avec 2 % de glucose comme seule source de carbone).

- | | |
|---|---------------------------------------------------|
| ◆ | - GRF18 transformée par pB2 sur MAM + 2 % glucose |
| ■ | - YEp351 |
| ▲ | - pB2 sur MAM + 2 % galactose |
| ● | - YEp351 |

Nous avons constaté que la souche de *S. cerevisiae* GRF18 transformée par pB2 ou par YEp351 ne pousse pas sur un milieu contenant 2 % de galactose comme seule source de carbone lorsqu'on utilise une colonie de boîte de transformation pour l'ensemencer (fig. 2.27.). Notre hypothèse est que les levures consomment toute l'énergie qu'elles avaient stockée au moment de l'inoculation de la culture avant d'avoir rendu leur voie métabolique du galactose fonctionnelle (par induction du système GAL). Par conséquent, nous inoculons d'abord une préculture de 10 ml dans un milieu contenant glucose (0.5 %) et galactose (2 %). Quand cette culture arrive en fin de phase exponentielle, elle sert à inoculer trois cultures de 20 ml de chacun des trois milieux susdits (avec histidine).

II.E.1.2. Dosage de l'activité spécifique de la β -galactosidase :

Quand les cultures arrivent en fin de phase exponentielle, on récolte les cellules à partir desquelles on réalise un dosage de l'activité spécifique de la β -galactosidase selon le protocole que nous avons éprouvé chez *Kluyveromyces fragilis*. On dose l'activité β -galactosidasique avec un volume de lysat de 5, 20 ou 100 μ l après une incubation de 15 minutes à 28°C. Les résultats obtenus sont consignés au tableau 2.2. et représentés à la fig. 2.28.

Comme attendu, la souche GRF18 transformée par YEp351 (contrôle) ne présente pas d'activité β -galactosidasique tandis que GRF18 transformée par pB2 présente une activité β -galactosidasique spécifique qui est faible en conditions de répression (284 et 384 milliunités sur glucose et glucose + galactose respectivement) et importante en conditions d'induction (1940 milliunités sur galactose). On a un ratio activité en conditions de répression (glucose + galactose) / activité en conditions d'induction (galactose) de 0,20.

Il y a bien régulation hétérologue, probablement due à une conservation des systèmes de régulation.

II.E.1.3. Mise en évidence de la β -galactosidase par SDS-PAGE :

Par analyse en SDS-PAGE (fig. 2.29.) de lysat de *K. fragilis* après croissance sur lactose, on voit apparaître une bande majeure qu'on ne retrouve pas dans le lysat de *K. fragilis* après croissance sur glucose. Cette bande correspond à un PM de l'ordre de 140000, ce qui correspond au PM attendu du monomère de β -galactosidase de *K. fragilis*. Cette bande est absente du lysat de GRF18 transformée par YEp351 (contrôle) mais présente dans le lysat de GRF18 transformée par pB2. Il est donc probable que cette bande corresponde au monomère de β -galactosidase de *K. fragilis*.

Plasmide transformant	Source de carbone de la culture d'où provient le lysat	DOSAGE ACTIVITE			DOSAGE PROTEINES			Activité spécifique (en milliunités)
		Volume de lysat (μ l)	$\Delta A_{420 \text{ nm}}$	[ONP] (en nmole/ml)	Volume de lysat (μ l)	$\Delta A_{540 \text{ nm}}$	[protéines] (en μ g/ μ l)	
YEp351	2 % galactose	100	0.002	0.004	50	0.214	0.897	4.45
	2 % galactose + 2 % glucose	100	0.000	0.000	50	0.161	0.613	0
	2 % glucose	100	0.000	0.000	50	0.220	0.929	0
pB2	2 % galactose	5	0.214	0.090	50	0.220	0.929	1940
	2 % galactose + 2 % glucose	20	0.125	0.054	50	0.178	0.704	384
	2 % glucose	20	0.115	0.050	50	0.211	0.881	284

Tableau 2.2. Résultats du dosage de l'activité β -galactosidasique spécifique après transformation de *S. cerevisiae* par pB2 et par YEp351. Temps d'incubation à 28°C : 15 minutes.

ΔA : différence d'absorbance

[ONP]: concentration en ortho-nitrophénol

Activité spécifique: une unité d'activité spécifique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1 nmole d'ortho-nitrophényl β -D-galactopyranoside par minute et par mg de protéines.

Activité spécifique
 β -galactosidasique
(en milliunités)

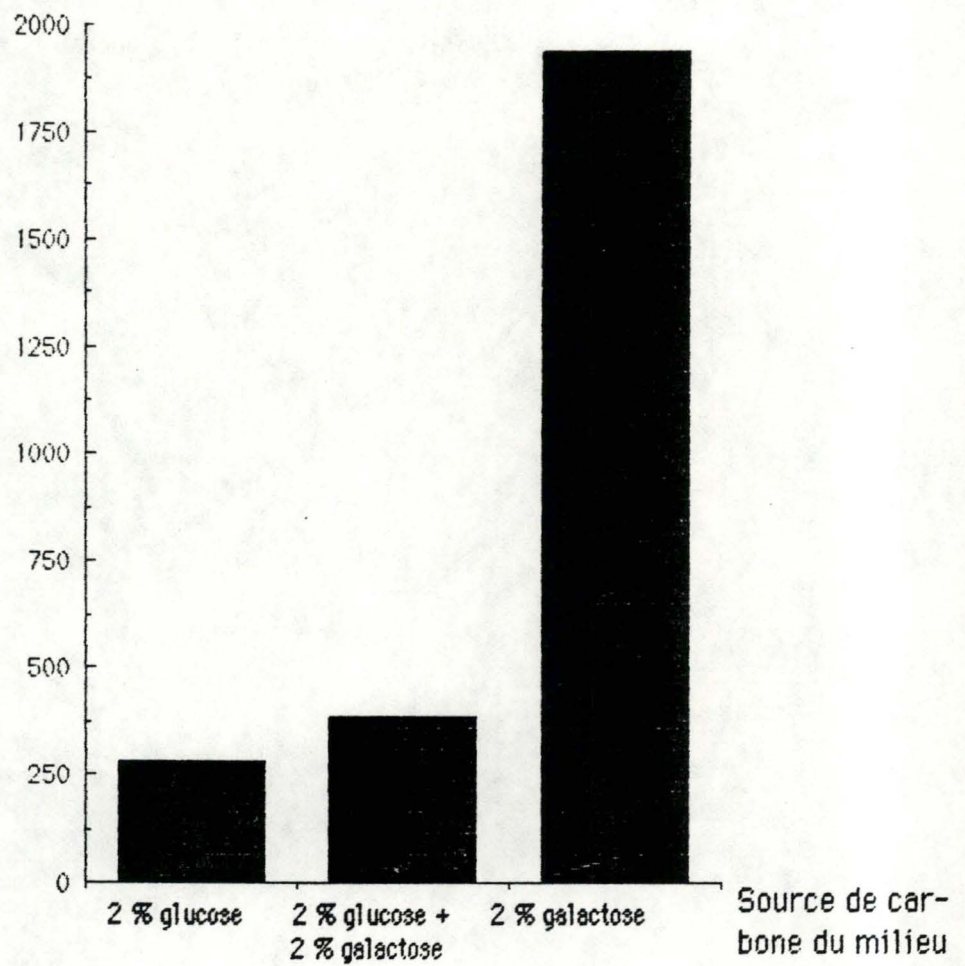


Fig.2.28. Activité β -galactosidasique spécifique de GRF18 transformée par pB2 mesurée après croissance sur différentes sources de carbone.

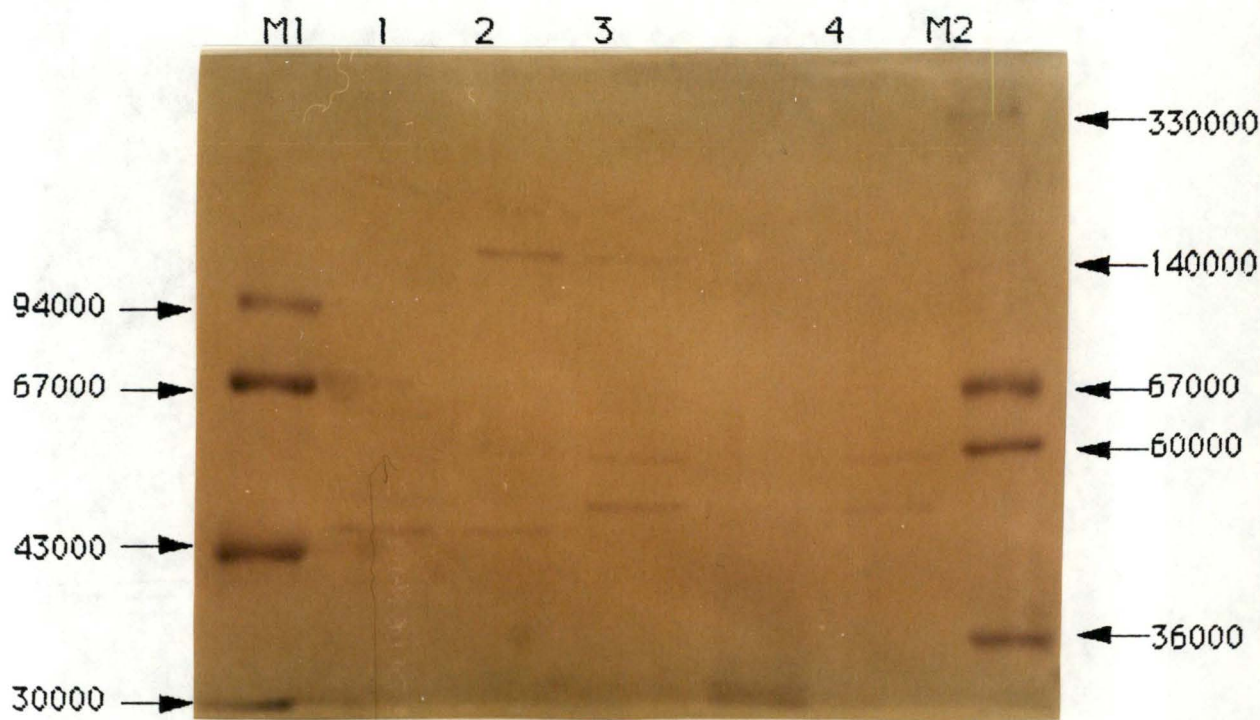


Fig.2.29. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS:

- piste M1: marqueurs de faibles PM
- piste 1: lysat de *K. fragilis* après croissance sur 2 % glucose.
- piste 2: lysat de *K. fragilis* après croissance sur 2 % lactose.
- piste 3: lysat de GRF18 transformée par pB2 après croissance sur 2 % galactose.
- piste 4: lysat de GRF18 transformée par YEp351 après croissance sur 2 % galactose (contrôle).

On voit, à la piste 2, apparaître une bande à un PM de l'ordre de 140000, on retrouve une bande à la même hauteur à la piste 3 (qu'on ne retrouve pas dans le contrôle, à la piste 4). Nous en concluons qu'il doit s'agir de monomères de β -galactosidase.

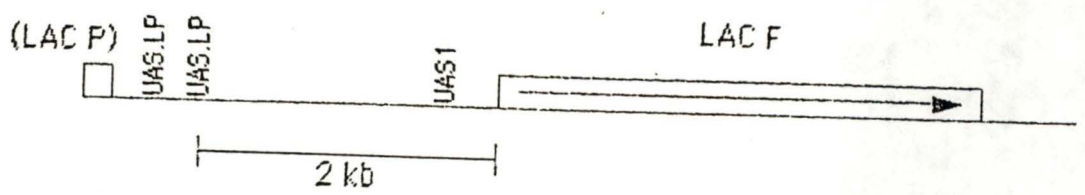


Fig.2.30. Position présumée des UAS potentielles de LAC P (UAS.LP) dans l'insert de pB2.

II.E.1.4. Séquences régulatrices potentielles situées en amont de LAC F :

Dans les 2.8 kb de séquence en amont du gène LAC F, au niveau de l'insert de pB2, il est probable que, outre l'UAS1, s'y trouvent aussi 2 UAS, qui seraient situées en amont du gène LAC P (fig. 2.30.). En effet, chez *K. lactis*, 2 UAS sont situées en amont du gène LAC 12 (de lactose perméase) et à 2 kb en amont de LAC4. Il est probable que cette situation soit identique chez *K. fragilis*, car d'une part, les cartes de restriction de cette région génomique chez *K. lactis* et *K. fragilis* sont proches et d'autre part, les 291 pb séquencées en amont de LAC F sont presque identiques chez ces deux levures.

Dans une première hypothèse, les 2 UAS supposées présentes pourraient intervenir dans la régulation de l'expression de LAC F en plus de l'UAS1. Selon une autre hypothèse, l'UAS1 seule jouerait un rôle régulateur dans l'expression de LAC F. La première hypothèse est supportée par le fait que, chez *S. cerevisiae* et *K. lactis*, des UAS peuvent servir à la régulation de deux gènes en même temps, au niveau du système GAL. Cependant, à l'appui de la deuxième hypothèse, les deux UAS supposées présentes en amont de LAC P seraient trop loin (2 kb) de LAC F, pour jouer un rôle dans sa régulation.

Pour tester ces hypothèses chez *S. cerevisiae*, la stratégie mise en oeuvre consiste à construire un sous-clone portant l'insert de pB2 délété des séquences situées en amont de l'UAS1 (par conséquent dépourvu des 2 UAS potentielles de LAC P) puis à comparer la régulation du gène LAC F chez la levure *S. cerevisiae* transformée avec pB2 ou avec ce sous-clone.

II.E.2. Construction de pB7, dérivé de pB2 par délétion des séquences en amont de l'UAS1 :

Notre but est ici de déléter les deux UAS qui pourraient se trouver en amont de LAC F (et de LAC P) et qui pourraient avoir un rôle régulateur dans l'expression de LAC F.

Rappelons que suite au séquençage, nous disposons du plasmide pSB1, qui comporte (dans une matrice pBluescript KS+) 0.65 kb de région amont du gène LAC F et la partie 5' de la région codante de ce gène. Nous allons ajouter la partie 3' de la région codante du gène à la suite de la partie 5' dans l'insert de pSB1. Le plasmide ainsi obtenu (qui sera appelé pB6) comprendra le gène LAC F entier avec son UAS1 en amont, sans les deux UAS qui pourraient se trouver en amont du gène LAC P. Ce plasmide pB6 ne conviendra pas pour la transformation de *S. cerevisiae* car il ne possède pas de marqueur de sélection, ni d'origine de répllication pour *S. cerevisiae*. Notre but étant de transformer la levure avec un plasmide contenant l'insert de pB6, nous placerons cet insert dans un vecteur nous permettant de transformer *S. cerevisiae* : YEp351. Le plasmide résultant sera appelé pB7.

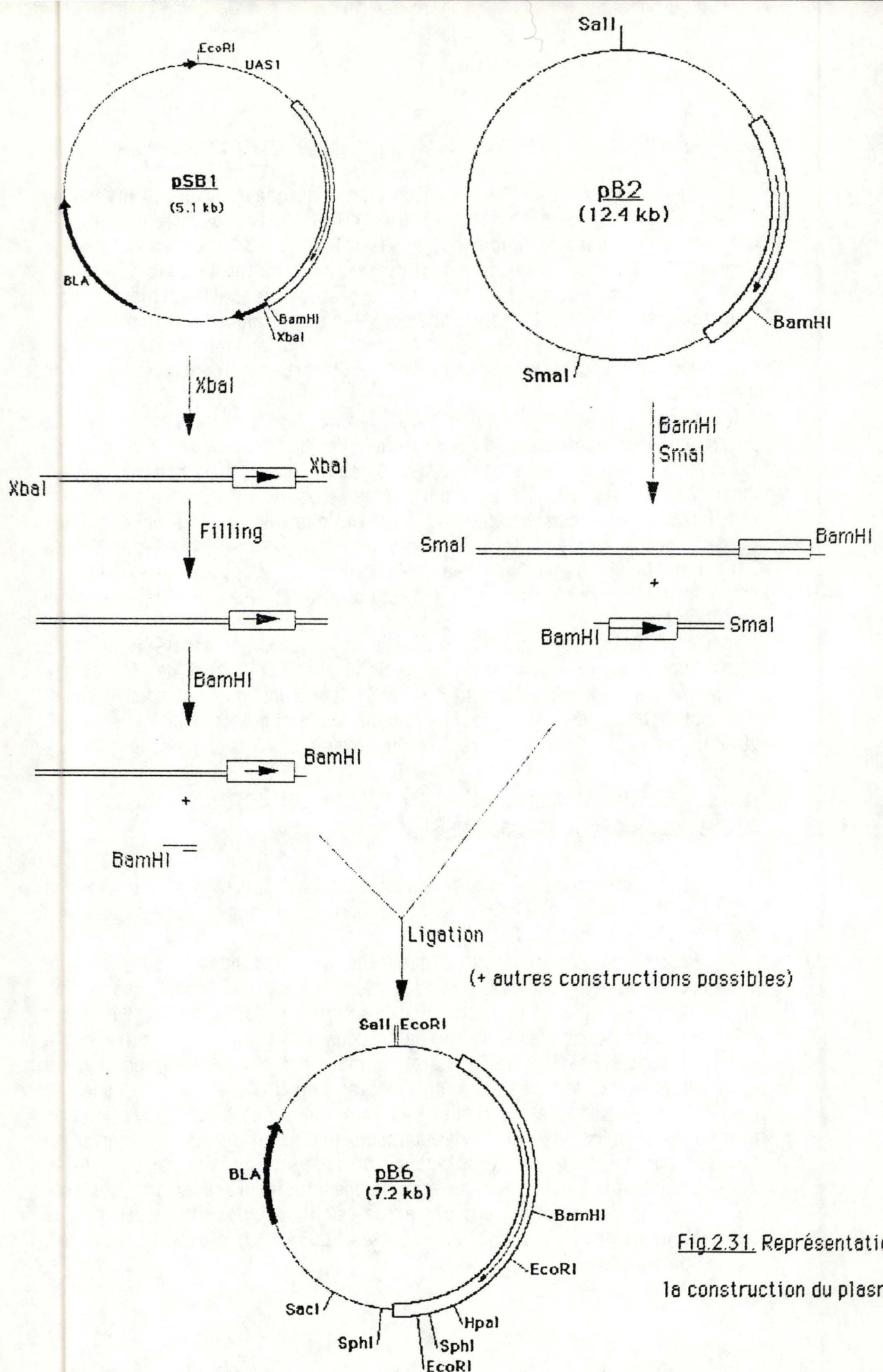


Fig.2.31. Représentation de la construction du plasmide

La stratégie de construction du sous-clone pB6 est présentée à la figure 2.31. Le mélange de ligation sert à transformer la souche XL1 blue d'*E. coli*. Les transformants sont sélectionnés sur LB + ampicilline + X-gal + 1 % glucose. Sur ce milieu, les transformants contenant un plasmide portant le gène LAC F entier apparaissent bleus (voir II.A.2.). Douze colonies bleues ont ainsi été obtenues et mises en cultures liquides. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries issues de ces cultures (miniprep) et restreint par HpaI. En effet, après séparation des fragments de restriction par électrophorèse en gel d'agarose (fig. 2.31.), cette digestion nous permet de discriminer pB2 de pB6 (plasmide attendu), qui confèrent tous deux une coloration bleue aux colonies et qui sont donc indiscernables sur la seule base du phénotype bleu-blanc. Deux des 12 colonies présentent le profil attendu sur gel. D'autres restrictions (par Sall + SacI, BamHI et SphI) analysées par électrophorèse en gel d'agarose nous ont confirmé que le plasmide obtenu est bien pB6 (fig. 2.31.).

Le plasmide pB6 nous servira à construire pB7, le sous-clone avec lequel *S. cerevisiae* sera transformée. La stratégie de construction de ce sous-clone pB7 est présentée à la figure 2.32. Le mélange de ligation sert à transformer la souche XL1 blue de *E. coli*. Les transformants sont sélectionnés sur LB + ampicilline + X-gal + 1 % glucose. Sur ce milieu les transformants par pB6 et par pB7 apparaissent bleus. Les 4 colonies bleues ainsi obtenues sont mises en cultures liquides. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries issues de ces cultures (miniprep) et restreint par EcoRI, qui permet de discriminer pB6 et pB7 (plasmide attendu) après électrophorèse en gel d'agarose. D'autres restrictions (par PstI et Hind III) analysées par électrophorèse en gel d'agarose nous ont confirmé que le plasmide obtenu est bien pB7 (fig. 2.32.).

Ce plasmide pB7 comporte :

- une matrice comprenant le marqueur de sélection LEU2 et l'origine de répllication de 2 μ (plasmide de levure).
- un insert comprenant le gène LAC F avec son UAS1, les séquences en amont de l'UAS1 étant délétées par rapport à pB2 (fig. 2.33.).

II.E.3. Régulation de l'activité β -galactosidasique chez *S. cerevisiae* transformée par pB7 :

Rappelons que l'induction comparée de l'activité β -galactosidasique dans les transformants de *S. cerevisiae* par pB2 et pB7 vise à démontrer le rôle éventuel des 2 UAS 5' présentes dans le seul pB2.

GRF18 a été transformée par pB7 et les transformants sont mis en culture dans les mêmes conditions que GRF18 transformée par pB2. Le dosage de l'activité spécifique de la β -galactosidase est aussi fait dans les mêmes conditions (voir II.E.1.2.). Les résultats obtenus sont consignés au tableau 2.3. et représentés graphiquement à la figure 2.34.

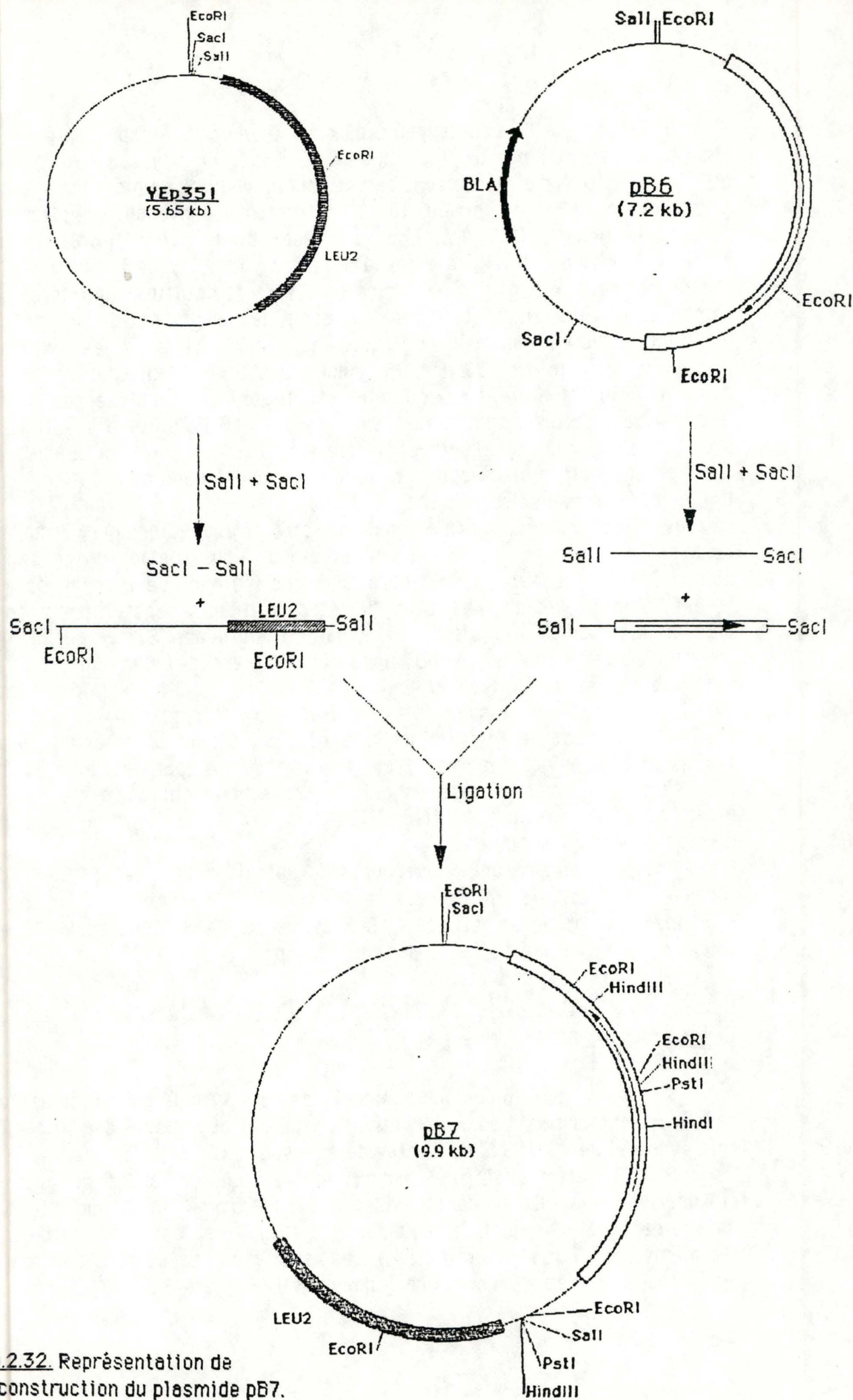


Fig.2.32. Représentation de la construction du plasmide pB7.

Le ratio d'activité spécifique réprimée (sur milieu glucose + galactose) / induite (sur milieu galactose) est de 0,20 pour les transformants de GRF18 par pB2 et de 0,21 pour les transformants de GRF18 par pB7. Vu les inserts de pB2 et pB7 (fig. 2.33.), on peut affirmer que la séquence en amont de l'UAS1, comprenant les 2 UAS hypothétiques n'est pas nécessaire à l'induction de LAC F chez *S. cerevisiae*.

Ces valeurs de ratio (activité spécifique réprimée/induite) peuvent être comparées à d'autres valeurs de ratio (activité spécifique réprimée / induite) obtenues pour LAC F chez *K. fragilis*: 0,02 et les gènes GAL de *S. cerevisiae*: 0,01 (West *et al.*, 1984). Ces valeurs indiquent une régulation plus marquée par rapport à la régulation hétérologue développée ci-dessus. Une explication possible de cette observation serait que les facteurs dits "trans", qui interviennent dans ces régulations, aient divergé au cours de l'évolution des deux levures, ce qui entraînerait une reconnaissance plus faible des séquences dites "cis" (qui sont restées proches). Il n'y a pas que la divergence évolutive qui entre en jeu pour expliquer que l'induction que nous observons est 10 fois moindre dans la régulation hétérologue (gène LAC F chez *S. cerevisiae*) que dans la régulation homologue (gène LAC F chez *K. fragilis* et gènes GAL chez *S. cerevisiae*). En effet, le nombre de copies de pB2 et pB7 varie entre 40 et 50 par cellule de levure. Toutes les copies de LAC F ne sont probablement pas toutes régulées simultanément (par le système GAL4 - GAL80), contrairement à la situation homologue où une seule copie du gène LAC F doit être régulée.

Enfin, nos données d'activité spécifique pour GRF18 transformée par pB2 et pB7 sur les milieux "inducteurs" et "répresseurs" (voir fig. 2.28. et 2.34.) suggèrent que le gène LAC F est réprimé sur un milieu comprenant du glucose chez *S. cerevisiae*.

En conclusion, chez *S. cerevisiae* l'activité β -galactosidasique est régulée en fonction des conditions de cultures. L'induction de cette activité après croissance sur un milieu galactose est conservée si on délète les séquences en 5' de l'UAS1 de LAC F.

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer si cette régulation s'exerce au niveau de l'initiation de la transcription de LAC F, grâce au système GAL4-GAL80, comme nous l'avons supposé. Il s'agira de tests de mesures d'activité spécifique par exemple dans des mutants *gal80* ou suite à une délétion de l'UAS1 ou une mutagenèse dirigée contre l'UAS1. D'autres tests devraient permettre de déterminer si, en conditions d'induction, on observe une augmentation de la quantité d'ARN messagers de LAC F.

Source de carbone de la culture d'où provient le lysat	DOSAGE ACTIVITE			DOSAGE PROTEINES			Activité spécifique (en milliunités)
	Volume de lysat (μ l)	$\Delta A_{420 \text{ nm}}$	[ONP] (en nmole/ml)	Volume de lysat (μ l)	$\Delta A_{540 \text{ nm}}$	[protéines] (en μ g/ μ l)	
2 % galactose	50	0.301	0.125	50	0.175	0.690	906
2 % galactose + 2 % glucose	50	0.533	0.219	5	0.156	5.86	187
2 % glucose	50	0.463	0.191	5	0.239	10.3	93

Tableau 2.3. Résultats du dosage de l'activité β -galactosidasique spécifique après transformation de la souche GRF 18 de *S. cerevisiae* par pB7.
(Temps d'incubation à 28°C: 15 minutes)

ΔA : différence d'absorbance

[ONP]: concentration en ortho-nitrophénol

Activité spécifique: une unité d'activité spécifique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1 nmole d'ortho-nitrophényl β -D-galactopyranoside par minute et par mg de protéines.

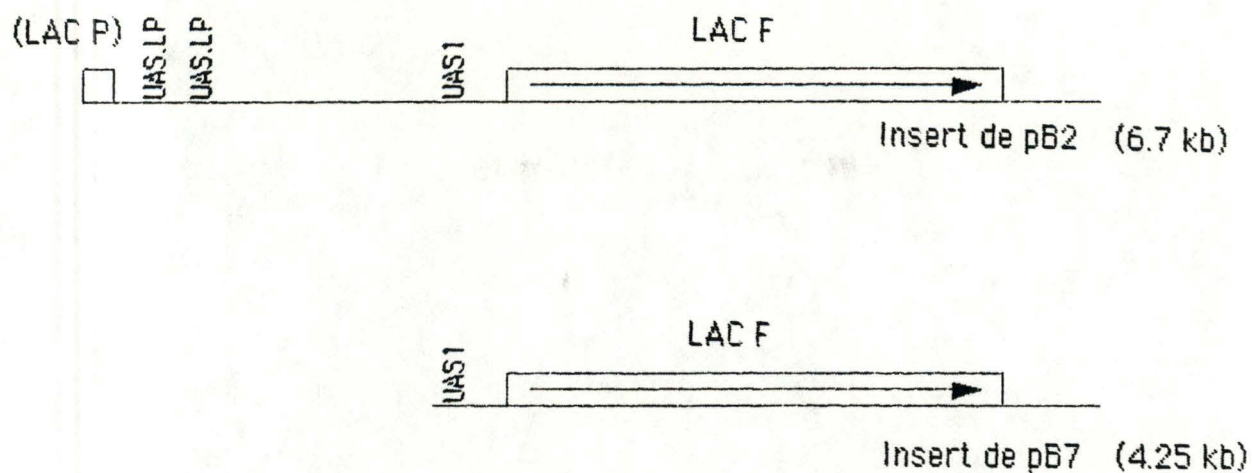


Fig.2.33. Alignement des inserts de pB2 et pB7.

Les deux UAS.LP représentent les deux UAS potentielles en amont de LAC P

Activité spécifique
 β -galactosidasique
 (en milliunités)

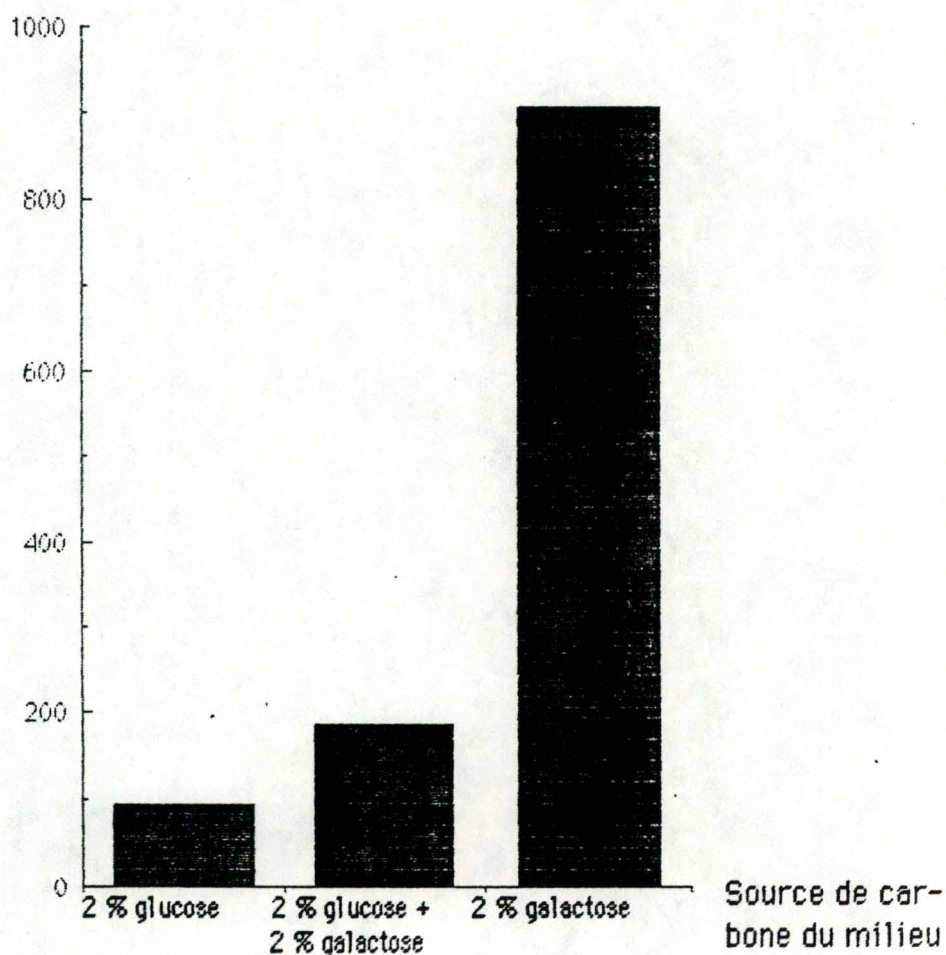


Fig.2.34. Activité β -galactosidasique spécifique de GRF 18 transformée par pB7 mesurée après croissance sur différentes sources de carbone.

CHAPITRE III: RESUME, CONCLUSION ET PERSPECTIVES:

III.A. Résumé :

Lors du criblage (screening) de la banque génomique de *Kluyveromyces fragilis* (encore appelée, selon la nouvelle taxonomie, *K. marxianus* var. *marxianus*), trois plasmides ont été isolés et nous avons montré que leur insert contient le gène de β -galactosidase (que nous avons symbolisé LAC F). Nous avons établi la carte physique des inserts et déterminé une région qui leur est commune par alignement de leurs cartes de restriction. Les trois plasmides conférant une activité β -galactosidasique à des transformants de *S. cerevisiae* et de *E. coli*, cette région commune doit contenir le gène qui code pour la β -galactosidase.

La carte physique de la région commune a été comparée à la carte physique du gène LAC4, codant pour la β -galactosidase de *K. lactis*. Ces deux cartes physiques étant très proches, nous avons situé la région codante du gène LAC F par rapport à la carte de restriction. En comparant les cartes de restriction des fragments génomiques dans les régions amont aux gènes LAC F et LAC4, nous avons émis l'hypothèse que le gène de lactose perméase (que nous avons symbolisé LAC P) se trouve en amont de LAC F et qu'il est probablement présent dans son entièreté dans un des inserts issus du clonage du gène LAC F de *K. fragilis*.

Dans la suite de notre caractérisation du gène, nous nous sommes intéressé à la régulation du gène de β -galactosidase. Nous avons confirmé que l'expression du gène est induite quand *K. fragilis* croît sur lactose tandis qu'elle est réprimée quand *K. fragilis* croît sur glucose. Nous avons donc cherché à identifier, en amont du gène, les séquences intervenant dans cette régulation. Dans ce but, nous avons séquencé 291 pb de la région située en amont du gène. La séquence obtenue s'est révélée contenir une séquence, que nous avons appelée UAS1, identique à l'UAS_L présente en amont du gène LAC4 de *K. lactis*, dont le rôle régulateur a été démontré par Ruzzi *et al.* (1987). L'UAS1 est également proche de la séquence consensus UAS_{GAL} intervenant dans la régulation de l'expression des gènes GAL (GAL 1,2,7 et 10) de *S. cerevisiae*. Wray *et al.* (1987) et Ruzzi *et al.* (1987) ont montré que l'UAS_L de *K. lactis* est fonctionnellement identique à l'UAS_{GAL} de *S. cerevisiae* en étudiant les gènes LAC9 (qui code pour la protéine régulatrice qui se fixe à l'UAS_L chez *K. lactis*) et GAL4 (qui code pour la protéine régulatrice qui se fixe sur l'UAS_{GAL} de *S. cerevisiae*). En effet, le gène LAC9 complémente une mutation *gal4* chez *S. cerevisiae* et le gène GAL4 complémente une mutation *lac9* chez *K. lactis*.

Nous avons étudié l'effet que pourrait avoir l'UAS1 sur la régulation de l'expression du gène LAC F chez *S. cerevisiae*. Dans ce but, nous avons transformé *S. cerevisiae* avec un plasmide issu de la banque portant ce gène et 2.8 kb de séquence amont. Après croissance sur différentes sources de carbone, nous constatons une augmentation de l'activité β -galactosidasique en présence de galactose. Cette induction n'est pas observée si le milieu contient également du glucose. Nos résultats indiquent également que les deux UAS potentielles en amont du gène de lactose perméase, ne sont pas nécessaires au processus d'induction de l'expression de LAC F. Le mécanisme moléculaire d'induction dans le système hétérologue de *S. cerevisiae* transformée avec un plasmide pB7, porteur du fragment génomique de *K. fragilis* contenant le gène LAC F et son UAS1 s'exercerait via les protéines transactives GAL4 et GAL80. Ces protéines interagiraient de manière cognitive avec l'UAS1 suivant le modèle proposé par Ptashne (1988). Cette hypothèse, pour être confirmée, requiert des expériences complémentaires.

III.B. Perspectives :

La perspective appliquée de ce travail, à long terme, est la construction de souches transgéniques de *S. cerevisiae* (de laboratoire et industrielles) capables de métaboliser le lactose.

Pour qu'une souche de *S. cerevisiae* transformée par un gène de β -galactosidase puisse croître sur lactose, il faut trouver un moyen de rendre ce substrat accessible à l'enzyme. Deux stratégies sont envisageables :

- 1- greffer en 5' de la région codante du gène de β -galactosidase une séquence nucléotidique codant pour un signal d'exportation.
- 2- transformer *S. cerevisiae* avec un gène de lactose perméase. Comme nous l'avons proposé dans l'introduction, la seconde stratégie est préférable à la première.

La comparaison des cartes de restriction de pB1 et du fragment génomique de *K. lactis* qui contient les gènes LAC4 et LAC12 (de lactose perméase) suggère fortement que pB1 possède également deux gènes côte à côte (LAC F et LAC P), avec leurs séquences de régulation. Afin d'établir que l'insert de pB1 contient bien le gène de β -galactosidase et le gène de lactose perméase fonctionnels, on vérifiera que ce plasmide confère à *S. cerevisiae* la capacité de croître sur un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone.

Tenant compte de l'observation de Sreekrishna et Dickson (1986), qui ont montré que le gène de lactose perméase de *K. lactis* n'est fonctionnel chez *S. cerevisiae* que lorsqu'il est intégré à un endroit précis du génome de *S. cerevisiae*, nous sous-clonerons l'insert de pB1 dans un vecteur qui nous permettra de transformer *S. cerevisiae* selon le mode intégratif. L'hypothèse que les auteurs avancent pour expliquer que le gène de lactose perméase n'est fonctionnel que lorsqu'il est intégré à un sous-locus précis du génome de *S. cerevisiae* est que le gène peut ainsi être activé. Le déterminisme moléculaire de l'effet de cette intégration site spécifique

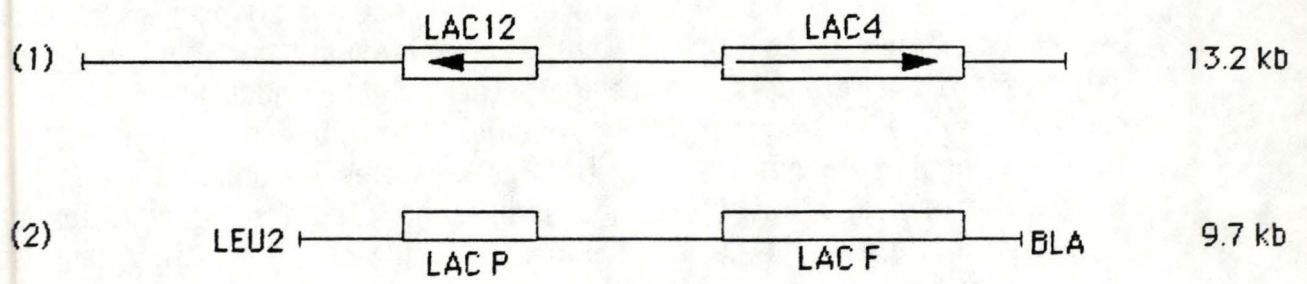


Fig.3.1. L'alignement de l'insert du plasmide qui à servi à transformer *S. cerevisiae* (Sreekrishna et Dickson, 1986) (1) avec l'insert du plasmide pB1 (2).

sur activation génique n'est pas élucidé et mériterait d'être étudié. Selon les auteurs, cette activation peut se faire soit par fusion du gène avec un promoteur de *S. cerevisiae*, soit par séparation du gène de séquences proches (de *K. lactis*), qui empêcheraient sa transcription ou sa traduction chez *S. cerevisiae*. Dans cette dernière hypothèse, sachant que le fragment d'ADN que Sreekrishna et Dickson ont intégré est plus grand (13.2 kb) que l'insert de pB1 (9.7 kb) (fig. 3.1.), il est possible que ce dernier ne contienne pas les séquences qui répriment l'expression du gène de lactose perméase chez *S. cerevisiae*. Il est donc possible que le gène LAC P porté par pB1 s'exprime chez *S. cerevisiae* même s'il n'est pas intégré à un locus spécifique.

Si il s'avère que le transformant Lac⁺ de *S. cerevisiae* a un taux de croissance faible sur un substrat lactosé, il sera envisageable d'optimiser l'expression des gènes LAC F. et LAC P par une approche rétro-génétique, afin d'intensifier le métabolisme du lactose. Dans cette perspective, une bonne connaissance de la régulation hétérologue des deux gènes chez *S. cerevisiae* est nécessaire.

III.C. Considérations évolutives :

III.C.1. Données taxonomiques et moléculaires concernant la proximité de *K. marxianus* var. *marxianus* et *K. marxianus* var. *lactis* :

D'après les données taxonomiques récentes, *Kluyveromyces fragilis* et *K. lactis* appartiennent en fait à la même espèce: *K. marxianus*, et en sont deux variétés : respectivement *K. marxianus* var. *marxianus* et *K. marxianus* var. *lactis*.

Au plan des données moléculaires, les cartes de restriction que nous avons établies pour les inserts des trois plasmides pB1, pB2 et pB3 sont pratiquement identiques aux cartes de restriction des régions génomiques correspondantes chez la variété *K. marxianus* var. *lactis*, indiquant une proximité sinon une identité de séquence de cette zone génomique. Nous avons confirmé cette hypothèse en comparant la séquence que nous avons obtenue en amont du gène de β -galactosidase avec la séquence correspondante chez *K. lactis* : on constate plus de 98 % d'identité entre ces deux séquences.

Nous nous sommes interrogés sur la signification évolutive de cette proximité, en l'intégrant dans l'ensemble des données acquises concernant les deux variétés. Il est surprenant d'observer l'identité presque complète entre les cartes physiques et les séquences des régions étudiées chez deux souches qui appartiennent à deux variétés différentes (*K. marxianus* var. *marxianus* et *K. marxianus* var. *lactis*). En effet, chez une espèce, au sein d'une même variété, le polymorphisme de restriction (différence entre les cartes de restriction de portions génomiques correspondantes) entre différents individus ou populations d'individus est courant (Gelinas *et al.*, 1985). Or nous sommes ici en présence de variétés réputées différentes. En

Tableau 3.1.

Différences constatées entre <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> et <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>	Source
Pattern d'électrophorèse de 7 isoenzymes	Sidenberg & Lachance, 1986
Electrophorèse de chromosomes en gel d'agarose (ou "chromoblots")	Sor & Fukuhara, 1989
Polymorphisme de restriction de l'ADN mitochondrial	Sor & Fukuhara, 1989
Hybridations ADN-ADN entre génomes	Johannsen, 1980
Contenu en Guanine-Cytosine des génomes	Johannsen, 1980
Croisement entre les deux variétés: obtention possible de diploïdes hybrides stables qui sporulent en redonnant l'une ou l'autre variété mais pas d'haploïde hybride (donc absence d'échange de matériel génétique)	Steensma <i>et al.</i> , 1988
Croissance sur inuline (pas de croissance pour <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>), critère le plus courant	Sidenberg & Lachance, 1986
Optimum de température pour la croissance (33°C pour <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i> et 37 à 40 °C pour <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i>).	Steensma <i>et al.</i> , 1988

effet, plusieurs auteurs (tableau 3.1.) ont mis en évidence une série de différences entre les deux variétés. L'ensemble de ces données a amené la plupart de ces auteurs à proposer d'élever ces deux variétés au rang d'espèce.

Dans le cas présent, l'identité révélée par le fragment que nous avons séquencé (98 % d'identité) est d'avantage encore étonnante dans la mesure où nous avons séquencé une région non-codante et dès lors vraisemblablement non soumise à la pression sélective.

III.C.2. Hypothèses concernant la parenté évolutive entre les deux variétés :

Les données présentées ci-dessus nous amènent à proposer deux hypothèses opposées . Dans la première hypothèse, les deux génomes seraient largement identiques et les différences constatées par les auteurs seraient des exceptions qui différencieraient deux souches voisines appartenant à la même variété. Dans la seconde hypothèse, seule une partie du génome incluant la région étudiée serait identique et le reste du génome présenterait un certain taux de divergence correspondant au degré d'apparement de variétés ou espèces.

Pour tester ces deux hypothèses, il est impératif d'étudier comparativement d'autres parties du génome de *K. fragilis* et de *K. lactis*.

A cet égard, la présence d'une activité inulinase chez la seule variété *K. fragilis* est intéressante. En effet, dans l'hypothèse d'une grande identité des deux génomes nucléaires, on s'attend à ce que *K. lactis* comporte le gène d'inulinase inactivé par mutation, ce qui peut être aisément révélé par un Southern blot.

Un sujet de comparaison intéressant entre les deux taxa est celui qui concerne leurs mitochondries. En effet, Sor et Fukuhara (1989) ont montré qu'il existe un polymorphisme de restriction de l'ADN mitochondrial. Certaines différences phénotypiques observées entre les deux taxa pourraient être en rapport avec ces seules différences, indépendamment du statut d'homologie relatif à leur génome nucléaire.

CHAPITRE IV: MATERIEL ET METHODES

IV.1 Solutions et tampons :

IV.1.1 Solutions :

Solutions stock d'antibiotiques :

Ampicilline (Boehringer) 100mg/ml
 Tétracycline (Sigma) 12.5 mg/ml
 stériliser par filtration sur millipore 0,22 µm,
 aliquoter et stocker à -20°C.

Solution stock d'isopropyl, β-D thiogalactopyranoside (IPTG) :

(Boehringer) 100 mM dans l'eau distillée.
 stériliser par filtration et stockée à -20°C.

Solution stock de 5-bromo 4-chloro 3-indolyl, β-D galactopyranoside (X-gal):

(Boehringer) 2 % dans du N-N diméthylformamide.
 stériliser par filtration et conserver à -20°C à l'abri de la lumière.

Solutions d'agarose :

0.6 %, 1 % ou 2 % d'agarose (BRL) dans du TBE.

Solution d'alourdisseur et de colorant :

Saccharose 80 %	2,7 ml
TBE 10%	0,3 ml
SDS 1 %	1 ml
EDTA 0,5M	1 ml
Bleu de bromophénol	1 mg

Solution de bromure d'éthidium :

2 mg/ml

Solution de phénol-chloroforme :

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

saturer avec 100 ml de TE (pH 7.5), centrifuger 5' à 5000 rpm (Rotor GSA Sorvall), éliminer le TE et recommencer deux fois (ne pas éliminer le dernier volume de TE).

Solution "TE + LiOAc" :

Acétate de lithium	0,1 M
TRIS.Cl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

Solution "TE + LiOAc + PEG" :

"TE + LiOAc"	1 X
PEG 4000	40 %

New Wash :

"New concentrate" (Geneclean)	7 ml
Eau distillée	140 ml
Agiter au vortex	
Ajouter 155 ml d'éthanol 100% froid (-20°C)	
Agiter au vortex	
Stocker à -20°C.	

Solution stock de RNaseA :

(Boehringer)	10 mg/ml de TRIS.Cl 10 mM (pH7,5) 15mM NaCl
Chauffer 15' à 100°C	
Aliquoter et stocker à - 20°C.	

Solution d'alourdisseur et de colorant (pour séquençage) :

Formamide	98 %
Bleu de bromophénol	0,1 %
EDTA	10mM
Xylène cyanol	0,1 %

Solution de fixateur (pour gel de séquençage) :

Acide acétique	10 %
Méthanol	10 %

Solution stock d'ortho-nitrophényl β -D-galactopyranoside (ONPG) :

0,4 % dans de l'eau distillée	
Stockée à -20°C.	

Solution SB (5X) :

TRIS.Cl	312,5 mM
SDS	10 %
Bleu de bromophénol	0,005 %
β -mercaptoéthanol	25 %
glycérol	50 %

Solution de coloration (SDS-PAGE) :

Brillant blue R (Bleu de Coomassie)	0,1 %
Acide acétique	10 %
Méthanol	40 %
Porter à volume avec de l'eau distillée	

Solution de décoloration (SDS-PAGE) :

Méthanol	40 %
Acide acétique	10 %
Porter à volume avec de l'eau distillée	

Solution de fixation (SDS-PAGE) :

Méthanol	30 %
Glycérol	3 %
Porter à volume avec de l'eau distillée.	

IV.1.2. Tampons :Tampon TE :

à pH 8,0		
TRIS.Cl pH 8,0		10 mM
EDTA pH 8,0		1 mM
à pH 7,5		
TRIS.Cl pH 7,5		10 mM
EDTA pH 7,5		1 mM

Tampon de ligation 5X (BRL) :

TRIS.Cl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (dithiothreitol)	10 mM
ATP	1 mM

Tampon de polymérase 10X :

TRIS.Cl pH 7,8	1 M	250 µl
MgCl ₂	1 M	25 µl
β-mercaptoéthanol	14 M	3,8 µl
Eau stérile		220 µl

Tampon TBE 10X :

TRIS	108 g
Borate	55 g
EDTA	9,3 g
Porter à 1 litre avec de l'eau distillée.	

Tampon P1 (QIAGEN) :

TRIS.Cl pH 8,0	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

Autoclaver

Ajouter extemporanément de la solution de RNaseA à une concentration finale de 400 µg par ml.

Tampon P2 (QIAGEN) :

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Ne pas autoclaver

Tampon P3 (QIAGEN) :

Acétate de potassium 2,55 M

Ajuster à pH 4,8 avec de l'acide acétique concentré

Ne pas autoclaver

Tampon QB (QIAGEN) :

NaCl 750 mM

MOPS (acide 3-[N-Morpholino]propane-sulfonique) 50 mM

Ethanol 15 %

Ajuster à pH 7,0 avec du NaOH

Tampon QC (QIAGEN) :

NaCl 1 M

MOPS 50 mM

Ethanol 15 %

Ajuster à pH 7,0 avec du NaOH

Tampon QF (QIAGEN) :

NaCl 1,2 M

MOPS 50 mM

Ethanol 15 %

Ajuster à pH 8,0 avec du NaOH

Tampon Z (dosage activité β -galactosidasique) :Par litre : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16,1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,5 g

KCl 0,75 g

 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,246 g β -mercaptoéthanol 2,7 mlTampon d'électrophorèse pour SDS-PAGE :

TRIS.Cl pH 25 mM

Glycine 0,192 mM

SDS 1 %

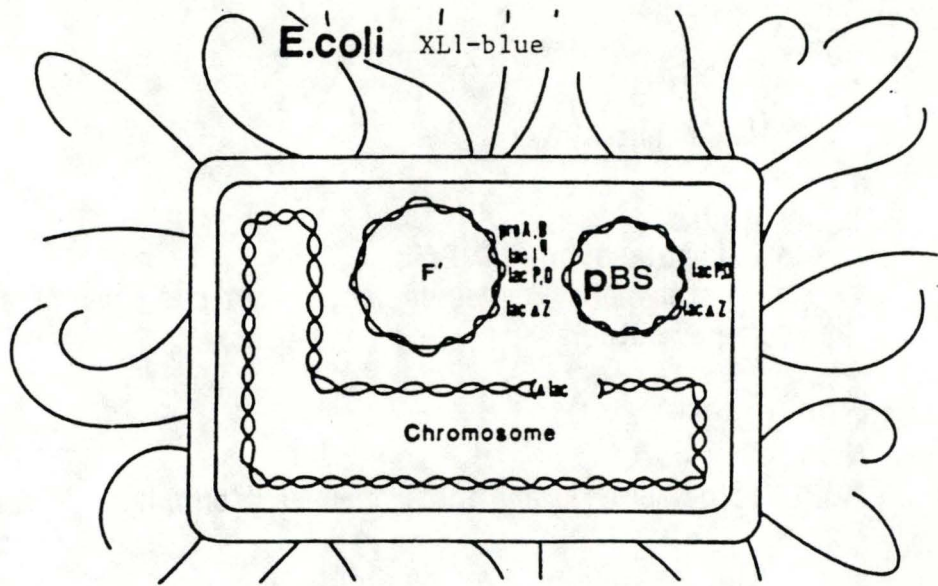


Fig.4.1. Marqueurs présents dans une bactérie de la souche XL1 blue hébergeant un plasmide pBluescript (pBS)

IV.2. Souches et plasmides :

IV.2.1. Souche bactérienne:

Nous avons utilisé la souche XL1 blue de *Escherichia coli*, commercialisée par Stratagene, qui contient l'épisome F' (fig.4.1.). XL1 blue est recA1, endA1, gyr A96, thi-1, hsd R17 (rk-,mk+), sup E44, rel A1, λ -,pro AB, (lac-), [F', pro AB, lac lqZ Δ M15, Tn 10 (tet^R)].

Rec A1 réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi les risques de réarrangements par recombinaison entre ADN endogène et exogène.

end A1 diminue le taux d'endonucléase, préservant de la sorte l'intégrité de l'ADN plasmidique préparé à partir de cette souche.

Une délétion au niveau de l'opéron lactose (lac ZYA) rend XL1 blue incapable de métaboliser le lactose (lac-), condition requise pour la sélection bleu-blanc (voir ci-dessous).

L'épisome F', responsable de la présence de pili sexuels en surface de la bactérie, porte un fragment Tn 10, qui contient un marqueur de résistance à la tétracycline, permettant de sélectionner les bactéries contenant l'épisome F' (sur un milieu contenant de la tétracycline).

L'épisome F' permet une sélection des clones portant un plasmide recombinant ou non par un test bleu-blanc. L'épisome F' contient un fragment du gène lacZ (Z Δ M15) qui, par complémentation intragénique avec un plasmide portant un autre fragment du gène lacZ (lacZ'), donne une coloration bleue à la colonie en présence d'un chromogène, le X-gal (voir plus loin). Si, au niveau du plasmide, le fragment lacZ' est disrupté (plasmide recombinant), la colonie sera blanche en présence de X-gal (voir légende Fig.4.2.).

Au niveau de l'épisome F', juste en amont de Z Δ M15, on trouve lacI^q, une mutation augmentant la force (10X) du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose

IV.2.2. Plasmides bactériens:

Le vecteur utilisé en vue du séquençage est le pBluescript KS+ commercialisé par Stratagene (Fig.4.3.).

Le plasmide pBluescript est en fait un phagemide, c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage, de 2964 paires de bases (pb). Il porte une origine de répllication pour *E. coli* (col E1 ORI) et l'origine de répllication phagienne f1; pBluescript peut ainsi se répliquer sous forme d'un plasmide bicaténaire ou d'un phage monocaténaire selon les conditions du milieu.

Caractéristiques de pBluescript:

BLA: gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase) permettant la sélection des colonies possédant le vecteur.

XL1 Blue

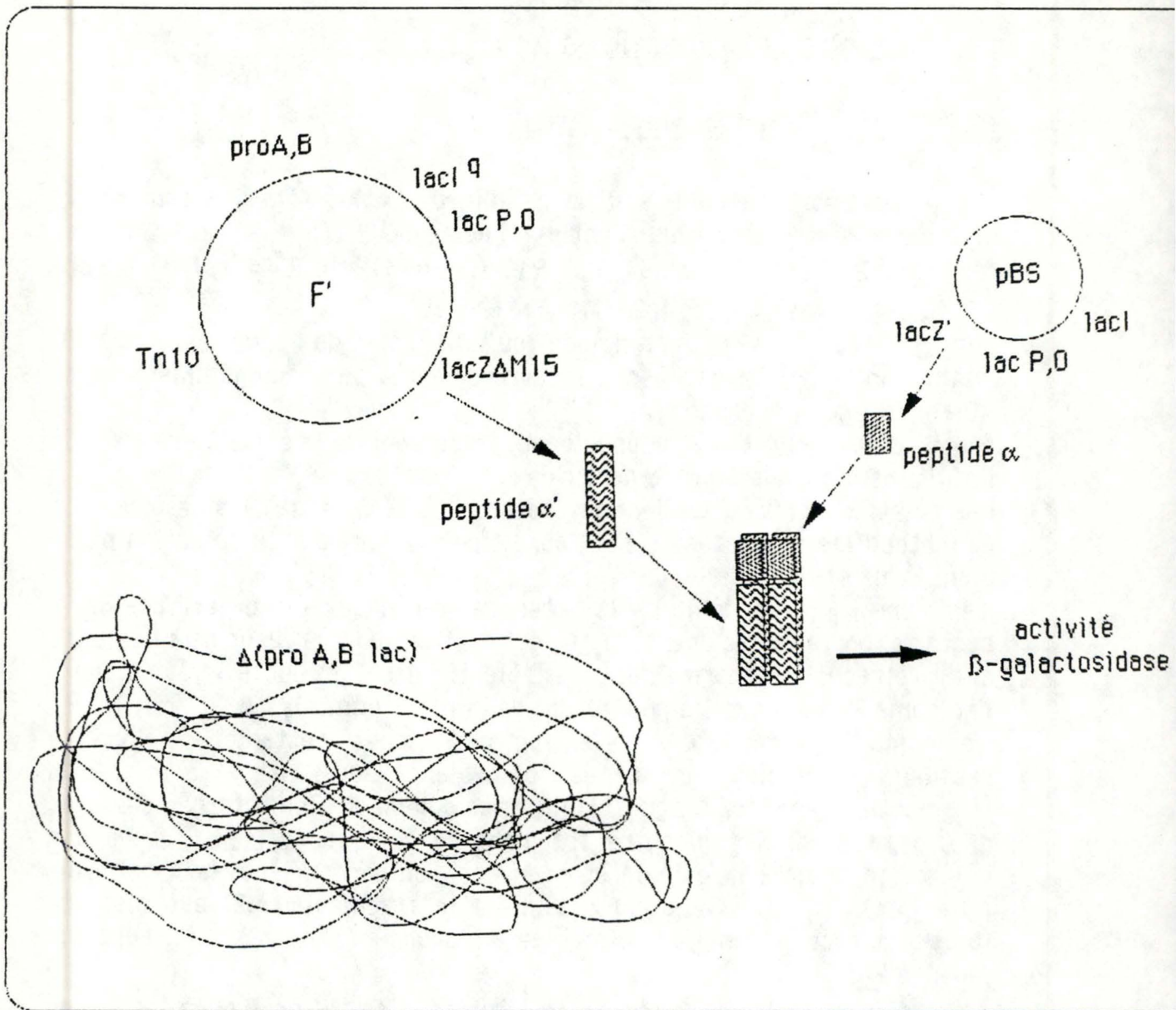


Fig.4.2. Système de complémentation intragénique permettant le test bleu-blanc dans XL1 blue

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

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

Le gène *lacI^q* porté par l'épisome F' de la souche XL1-blue est caractérisé par la force de son promoteur. La synthèse de répresseur est augmentée d'un facteur 10. La répression peut ainsi s'exercer sur les quelques copies de F' présentes dans une bactérie mais également sur les copies plus nombreuses de pBluescript. Cette répression empêche que l'expression des gènes portés par ce vecteur à nombre de copies élevé ne constitue un fardeau mortel pour la bactérie. Cependant en présence de lactose (en conditions naturelles), l'inducteur (l'allolactose ou le galactobiose, produit par une activité secondaire galactosyl-transférase de la β -galactosidase) se fixe au répresseur formant un complexe non lié à l'opérateur. Cette dérépression permet l'initiation de la transcription au promoteur. Nous utilisons un inducteur non dégradable, l'IPTG.

Le facteur de contrôle positif est la protéine CAP.

Le fragment *lacZ* du plasmide pBluescript contient:

lacI: un fragment non opérationnel du gène régulateur *lacI*.

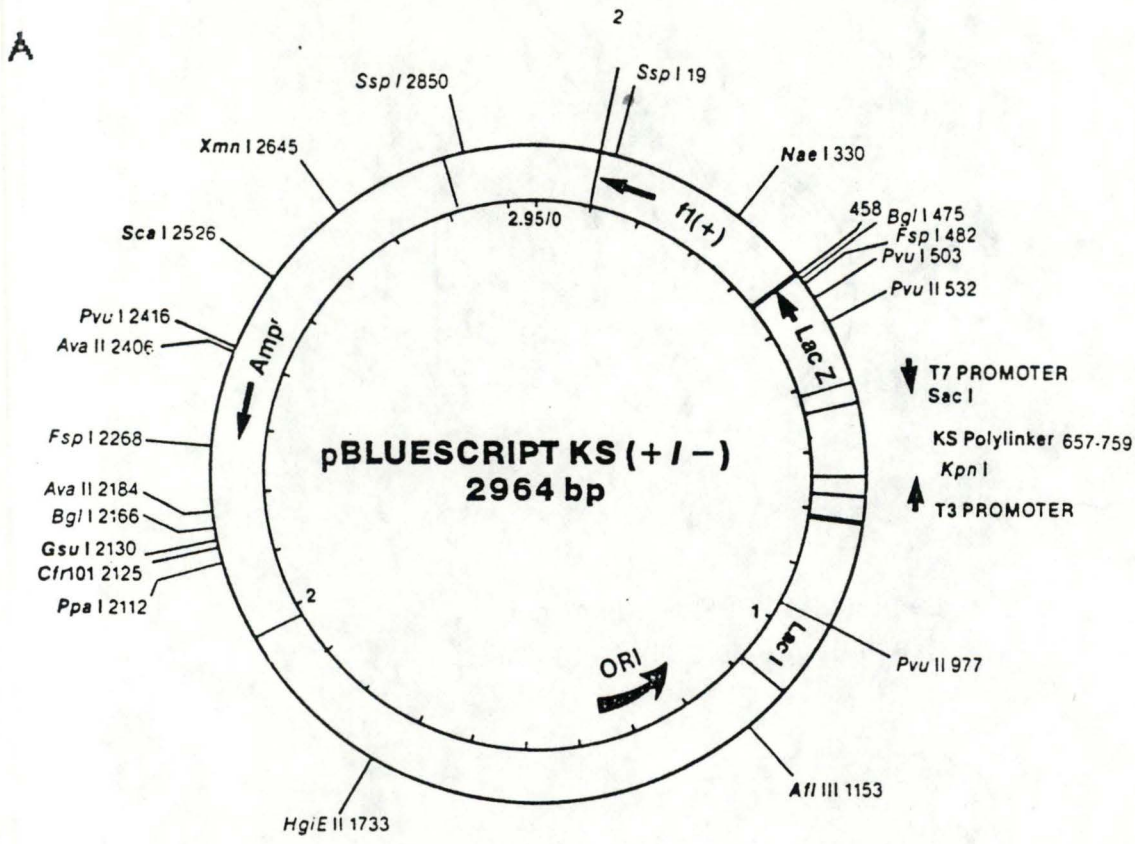
lacZ': contient le promoteur *lac*, l'opérateur et la partie N-terminale du gène de la β -galactosidase. Cette portion de gène code pour un peptide α qui est un peptide inactif. Lorsqu'un tel vecteur transforme une bactérie XL1-blue, la complémentation intragénique entre le peptide α (codé par le vecteur) et le produit du gène *lacZ Δ M15* (porté par F') permet d'obtenir une β -galactosidase fonctionnelle. L'activité β -galactosidasique est mise en évidence par un test coloré (Fig.4.2.).

En condition inductrices, le X-gal ajouté au milieu de culture est décomposé par la β -galactosidase, donnant naissance à un chromophore colorant les colonies en bleu.

A l'intérieur de l'extrémité N-terminale du gène *lacZ'* a été introduite une batterie de sites de clonage (oligonucléotide de synthèse) où sont localisés 21 sites de restriction uniques (Fig.4.3.). Cette insertion n'altère pas la capacité de complémentation du peptide α .

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

La batterie de sites est orientée de telle sorte que la transcription de *lacZ* se fait dans le sens Kpn I vers Sac I (d'où l'appellation KS). Cette batterie de sites de clonage est aussi appelée polylinker ou site multiple de clonage (en anglais: MCS pour "multiple cloning site").



B

Promoteur T7
 SacI ()
 BstXI) 3'
 SacII ()
 (EagI
) NotI
 5' (XbaI
) SpeI
 (BamHI

central
 (SmaI (FRANC
) PstI
) EcoRI
) EcoRV (FRANC
 (HindIII
) ClaI
 (SalI
 5') HincII
) AccI
 (XhoI
) DraII
) ApaI (3'
) KpnI)

Promoteur T3

Fig.4.3. Plasmide pBluescript KS+ (A) et son polylinker ou site multiple de clonage (B)

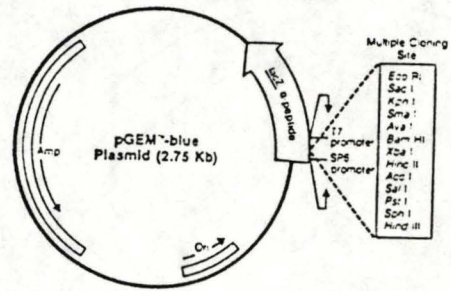


Fig.4.4 Le plasmide PGEM-blue et son site multiple de clonage (ou MCS)

Le vecteur pGEM-blue (commercialisé par Promega) est utilisé comme témoin de transformation (Fig.4.4).

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

IV.2.3. Souches de levures:

Nous avons utilisé la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 (*leu2, his3*) ainsi que la souche de *Kluyveromyces fragilis* ATCC12424 (American Type Culture Collection).

IV.2.4. Plasmide navette *E. coli* - *S. cerevisiae*:

Les plasmides navette *E. coli* - *S. cerevisiae* ont les caractéristiques communes suivantes:

- ils possèdent un marqueur de sélection (*LEU2*, *URA3*, *HIS3* par exemple) permettant la sélection dans des souches de levure mutantes pour le gène porté par le plasmide.
- ils portent une origine de répllication pour *E. coli* permettant le maintien du plasmide dans *E. coli*.
- ils possèdent un gène de résistance à un antibiotique (ampicilline et/ou parfois tétracycline) permettant la sélection dans *E. coli*.
- ils portent des sites uniques de restriction pour le clonage.

Il existe plusieurs types de plasmides navettes *E. coli* - *S. cerevisiae*:

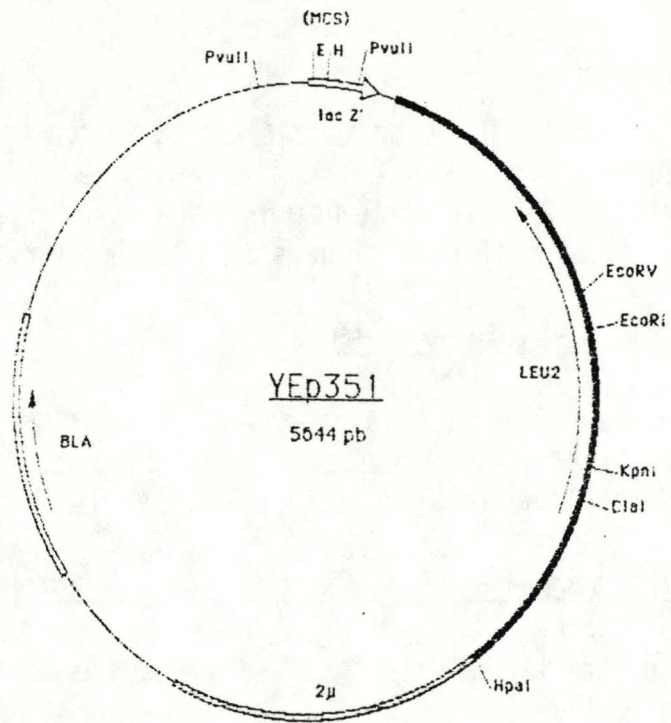
- les plasmides YCp (Yeast Centromeric plasmids) contiennent une séquence ARS (Autonomously Replicating Sequence) et une séquence centromérique fonctionnelle (CEN). Le nombre de copies de YCp par cellule de levure est faible (1 ou 2) et leur stabilité mitotique est élevée.
- les plasmides YEp (Yeast Episomal plasmids) contiennent un fragment du plasmide 2 μ de levure (qui comprend une origine de répllication pour la levure). Le nombre de copies de YEp par cellule de levure est élevé (25 à 100) et ils ont un taux de transformation élevé.
- les plasmides YRp (Yeast Replicating plasmids) contiennent une séquence ARS (Autonomously Replicating Sequence).
- les plasmides YIp (Yeast Integrating plasmids) ne sont pas à proprement parler des vecteurs navettes dans le sens où, si on peut les transférer de *E. coli* à *S. cerevisiae*, l'inverse est impossible car les YIp s'intègrent dans le génome de *S. cerevisiae* et on ne peut donc plus les récupérer.

Le plasmide que nous avons utilisé ici est YEp351 (5644 pb), construit par Hill *et al.* (1984) à partir de pUC18, du fragment de 2 μ et d'une séquence génomique de levure comprenant le marqueur *LEU2*.

Sont apportés par pUC18 (plasmide bactérien):

- le gène *BLA*, responsable de la résistance à l'ampicilline, codant pour une β -lactamase

A



B

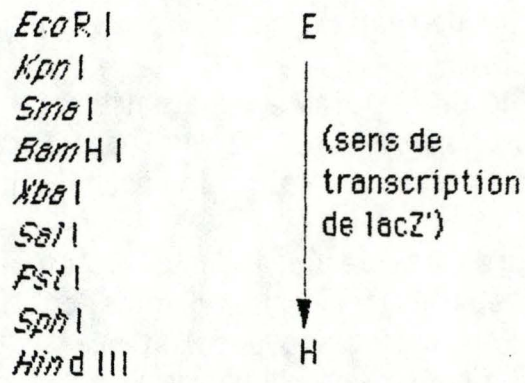


Fig.4.5. Le plasmide YEp351 (A) et son MCS (B)

- une origine de réplication pour *E. coli* (col E1 ORI)
 - un MCS (Multiple Cloning Site) où tous les sites de restriction sont uniques sauf EcoRI et KpnI, qu'on retrouve aussi au niveau de LEU2.
- Le plasmide YEp351 est représenté à la fig.4.5.

IV.3. Milieux de cultures:

IV.3.1. Milieu de culture bactérien:

LB :

Tryptone	(Oxoïd)	10 g/l
NaCl	(Merck)	5 g/l
Yeast extract	(Oxoïd)	10 g/l
Agar	(Oxoïd)	20g/l (si milieu solide)

Autoclavage

Les cultures se font à 37°C sous agitation pour les cultures liquides.

Les produits thermolabiles sont ajoutés quand le milieu est à 60°C:

- l'ampicilline: concentration finale de 100 µg/ml
- le X-gal: concentration finale de 40 µg/ml
- l'IPTG: concentration finale de 75 µg/ml

IV.3.2. Milieux de culture pour levures:

Milieu riche (YEPD) :

Glucose (Merck)	20 g/l
Yeast extract (Oxoïd)	10 g/l
Peptones (Difco)	20 g/l
Ajuster à pH 4,8 avec de l'HCl concentré	
Agar (Oxoïd)	20 g/l (si milieu solide)

Milieu minimum (MAM) et MAM complémenté:

Yeast Nitrogen Base without ammonium sulfate and aminoacids (Difco)	1,75 g/l
Ammonium sulfate (Merck)	5 g/l
Glucose (ou autre sucre)	20 g/l soit 2 %

En cas de complément d'acides aminés:

Histidine (Sigma)	25 mg/l
Leucine (Sigma)	25 mg/l
Ajuster à pH 4,8 si nécessaire	
Agar (Oxoïd)	20 g/l (si milieu solide)
Autoclavage	

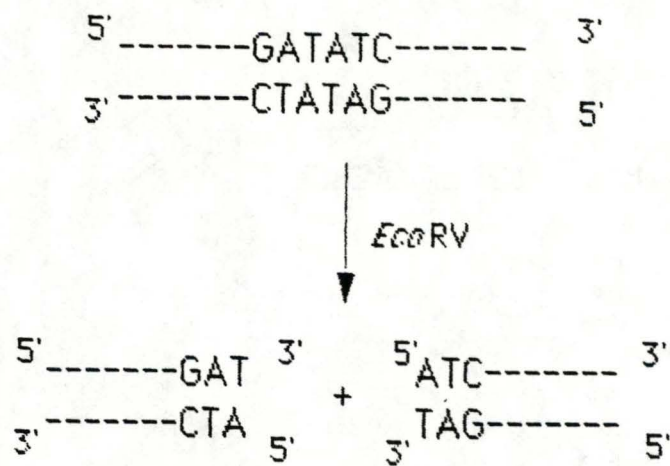


Fig.4.6. Exemple d'enzyme de restriction clivant l'ADN à bouts francs

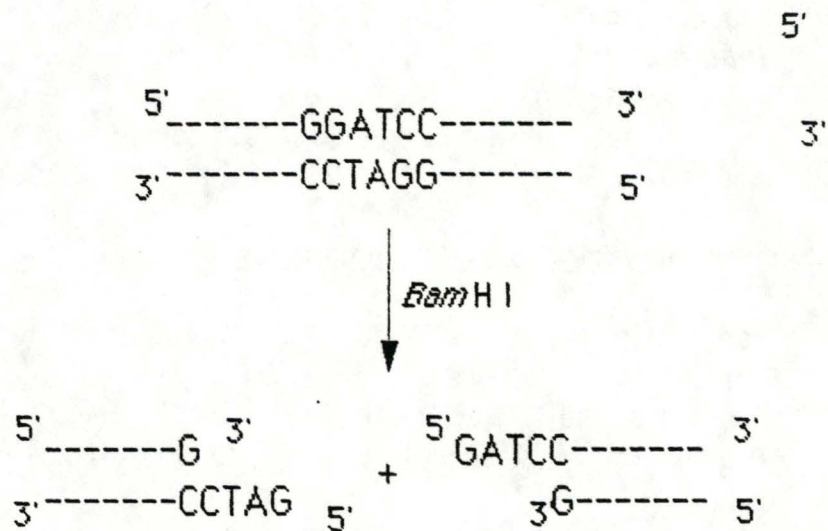


Fig.4.7. Exemple d'enzyme de restriction clivant l'ADN en bouts collants 5' protrudants

IV.4. Techniques d'ADN recombinant:

IV.4.1. Réaction de restriction:

Les endonucléases de restriction qui sont utilisées sont réparties en deux groupes:

-les enzymes hydrolysant les liens phosphodiester de la double hélice d'ADN de manière à produire des bouts francs ("blunt ends"). Par exemple: EcoRV, HpaI, ... (Fig.4.6.)

-les enzymes hydrolysant les liens phosphodiester de la double hélice d'ADN de manière à produire des bouts collants (extrémités adhésives). Ici, deux catégories sont distinguées:

-les enzymes qui produisent des extrémités 5' protrudantes (la majorité). Par exemple: BamHI, EcoRI, ... (Fig.4.7.)

-les enzymes qui produisent des extrémités 3' protrudantes. Par exemple: SphI, SacI, ... (Fig.4.8.)

Les fragments d'ADN obtenus après restriction ont:

- un groupement phosphate côté 5'
- un groupement hydroxyle côté 3'

Les tampons utilisés pour les réactions de restriction sont ceux recommandés par les firmes qui commercialisent les enzymes.

Conditions de réaction:

On mélange:

- ADN à restreindre
- Tampon de restriction 10%: 1/10 du volume final
- Enzyme de restriction: 3 à 10 unités/ μ g d'ADN à restreindre, suivant le degré de pureté de cet ADN.
- Eau stérile pour arriver au volume final

Le volume de solution d'enzyme de restriction qu'on ajoute ne doit jamais excéder 1/10 du volume final car les enzymes sont stockés dans une solution comprenant 50 % de glycérol. A une concentration en glycérol supérieure à 5 %, l'enzyme peut:

- être moins active et donner lieu à des restrictions partielles
- présenter une activité "star" (par exemple: l'activité "Eco star" pour EcoRV) et cliver l'ADN à des sites non reconnus dans des conditions normales.

Le mélange réactionnel est incubé une à deux heures à la température adéquate pour l'enzyme (conditions conseillées par le producteur).

Les enzymes de restriction, après réaction, peuvent être dénaturées:

- par la température s'ils sont thermosensibles
- par extraction au phénol-chloroforme

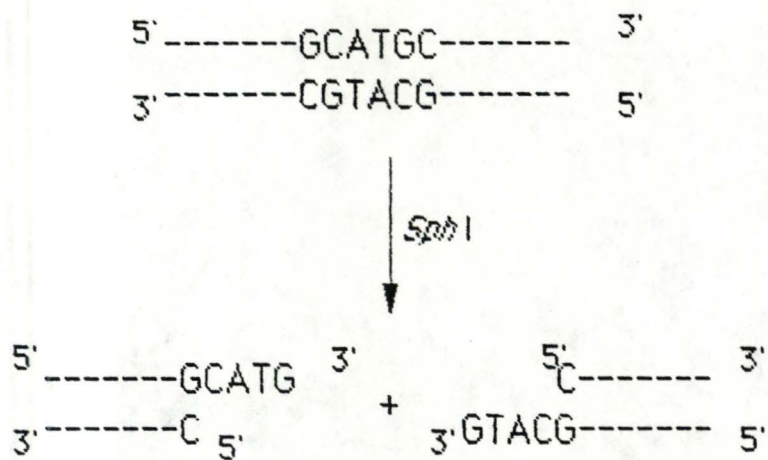


Fig.4.8. Exemple d'enzyme de restriction clivant l'ADN en bouts collants 3' protrudants

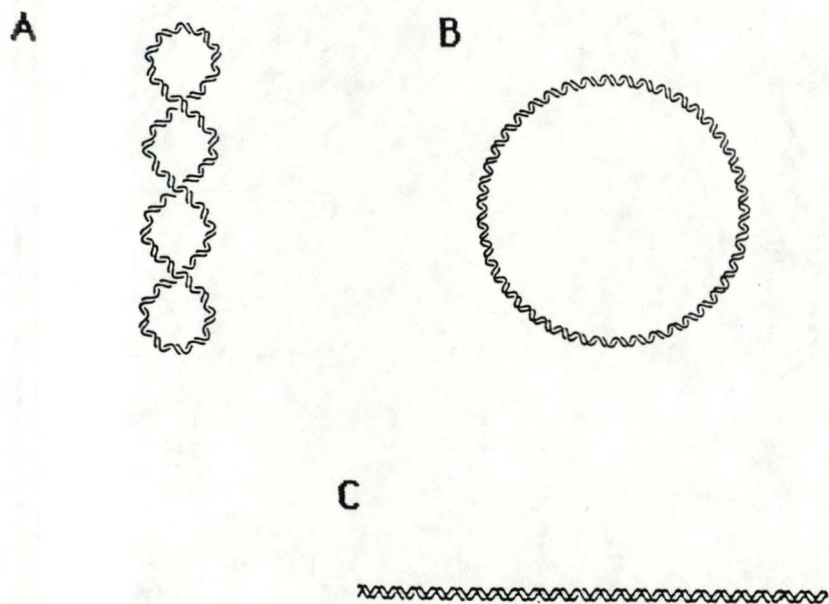


Fig.4.9. L'ADN plasmidique se trouve sous trois configurations différentes:
 (A) la forme CCC
 (B) la forme OC
 (C) la forme L

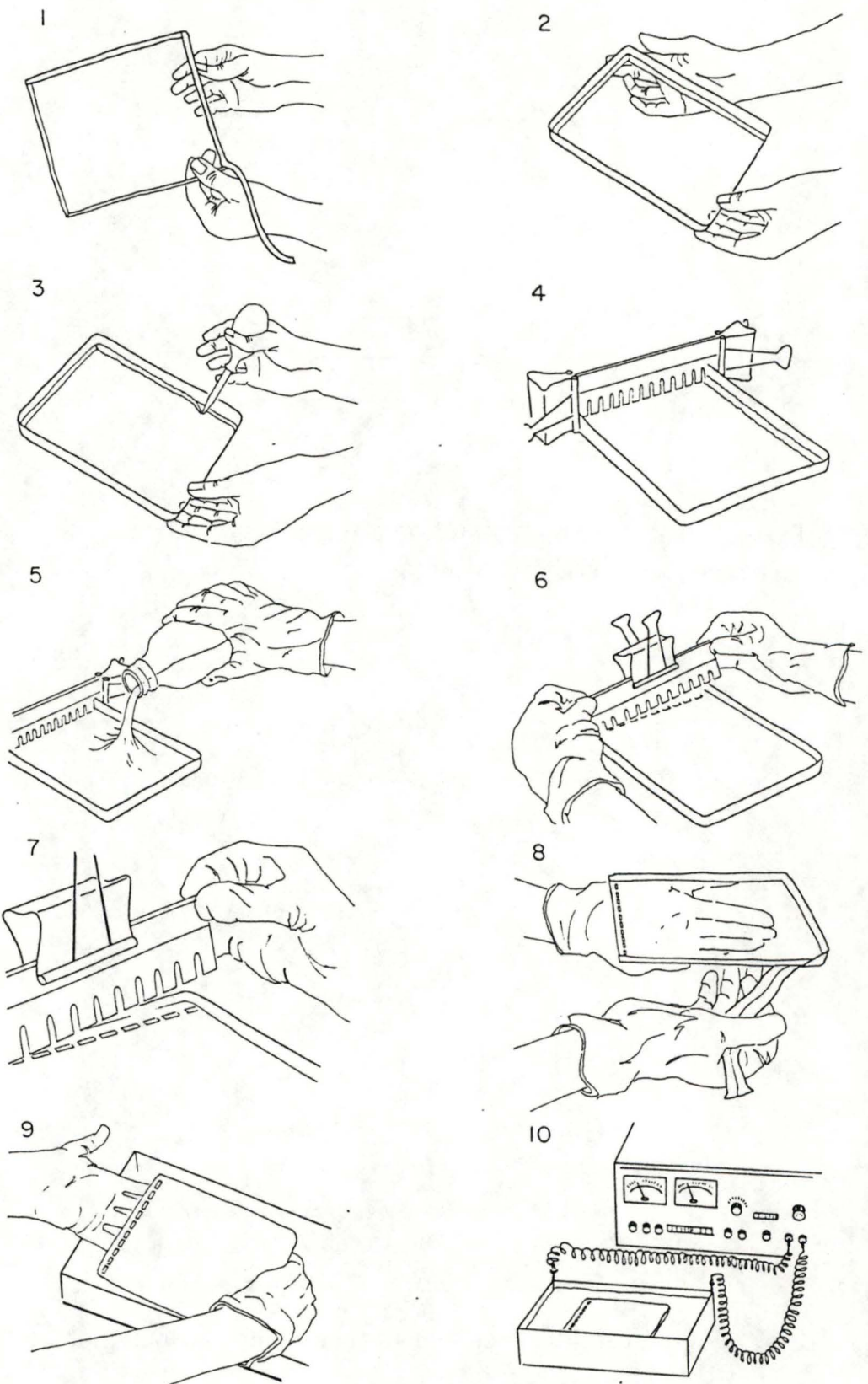


Fig.4.10. Montage du gel pour électrophorèse en gel d'agarose

IV.4.2. Electrophorèse en gel d'agarose:

IV.4.2.1. Electrophorèse analytique:

L'électrophorèse en gel d'agarose sert:

- à séparer des fragments d'ADN et à évaluer leur taille
- à évaluer la quantité d'ADN dans un échantillon

Principe:

Les molécules d'ADN sont chargées négativement (groupements phosphates). Le rapport entre la charge et la masse des molécules d'ADN est donc identique quelle que soit leur taille. La séparation des fragments d'ADN selon leur taille s'effectue en cours d'électrophorèse par un effet de freinage différentiel du gel sur ceux-ci.

La vitesse de migration de fragments d'ADN dans un gel d'agarose dépend essentiellement de quatre facteurs:

1) la conformation de l'ADN (Fig.4.9.). Un plasmide peut se présenter sous trois formes:

- superenroulée: CCC (Covalently Closed Circular), la plus abondante
- circulaire: OC (Open Circular), cette forme provient de la CCC où un nick (cassure sur un seul brin de l'ADN) s'est produit (ce qui a eu pour effet de "désuperenrouler" la molécule)
- linéaire: L (Linear), cette forme souvent non-visible sur gel résulte d'un double-nick au même niveau de la double hélice.

En général, la forme CCC migre plus vite que la forme L et celle-ci plus vite que la forme OC.

2) le poids moléculaire de l'ADN: les molécules d'ADN migrent à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire.

3) la concentration en agarose (0.8, 1 et 2 %) qui déterminera la taille des pores du gel.

4) le voltage appliqué: à faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué mais la vitesse de diffusion dans le gel intervient quand le voltage appliqué est trop faible. D'autre part lorsque le voltage s'accroît, l'efficacité de la séparation décroît.

Protocole:

L'agarose est chauffé dans un volume adéquat de TBE jusqu'à ébullition et dissolution complète de l'agarose. La solution obtenue est ensuite refroidie à 50°C, du bromure d'éthidium y est ajouté (à une concentration finale de 0.03 µg/ml), la solution est homogénéisée puis coulée dans un support en plexiglas (Fig.4.10.). Au niveau de ce support, un peigne a été disposé de manière à créer des puits dans le gel après sa solidification. Le gel est immergé sous un fin film de TBE dans la cuve d'électrophorèse.

Avant d'être chargés dans les puits, les échantillons sont additionnés de solution de colorant et d'alourdisseur (saccharose). Le saccharose

Longueur des fragments de restriction
du phage λ digéré par *Hind* III (en kb) :

23.130	≡
9.416	≡
6.557	≡
4.361	
2.322	—
2.027	
0.564*	
0.125*	

* rarement ou
jamais visible

Fig.4.11. Marqueur de taille obtenu par restriction
du phage λ par *Hind* III

Longueur des fragments de restriction
du plasmide pBR322 digéré par *Hinf* I (en pb)

1632	
517	
506	—
396	
344	
296	—
224	≡
220	≡
154	≡
75*	

* : rarement ou jamais
visible

Fig.4.12. Marqueur de taille obtenu par restriction
du plasmide pBR322 par *Hinf* I

augmente la densité de l'échantillon et entraîne celui-ci au fond du puits tandis que le colorant (bleu de bromophénol) permet de suivre le front de migration.

Sous une différence de potentiel de 80 à 100 Volts, l'électrophorèse dure environ deux heures (pour un gel de 10 cm, 0.9 % d'agarose). Après migration, les fragments d'ADN sont visualisés sous UV (longueur d'onde: 302 nm) grâce au bromure d'éthidium, composé fluorescent qui s'intercale entre les bases de l'ADN.

Evaluation de la taille d'un fragment d'ADN sur gel:

Dans un des puits du gel, on fait migrer un marqueur de taille c'est-à-dire une solution contenant des fragments d'ADN de taille connue et en quantité connue. Ces marqueurs de taille sont obtenus par restriction de phages ou de plasmides connus:

-le phage λ digéré par HindIII (Fig.4.11.): marqueur de taille le plus utilisé, il permet l'estimation de la taille de fragments de 0.6 à 8 kb.

-le plasmide pBR322 digéré par HinfI (Fig.4.12.): pour estimer des tailles de fragments d'ADN inférieure à 0.6 kb.

Grâce au marqueur de taille, on peut tracer une courbe d'étalonnage exprimant le logarithme du poids moléculaire en fonction de la distance de migration. A partir de cette courbe d'étalonnage, connaissant la distance de migration de fragments d'ADN, on peut estimer leur taille.

Evaluation de la quantité d'un fragment déposé sur gel:

La fluorescence d'une bande est proportionnelle au nombre de molécules de bromure d'éthidium intercalées. La fluorescence d'une bande est donc proportionnelle à la taille et à la quantité du fragment d'ADN. Donc on peut estimer la quantité d'un fragment d'ADN par comparaison avec l'intensité des bandes du marqueur de taille. La sensibilité du système permet de visualiser jusqu'à 10 ng.

IV.4.2.2. Electrophorèse préparative:

On peut extraire une bande d'ADN d'un gel d'agarose pour isoler un fragment intéressant d'un mélange de restriction.

La méthode décrite ci-dessous utilise un kit commercialisé par Geneclean (BIO 101 Inc.)

Principe:

Un morceau d'agarose comprenant la bande d'ADN qui nous intéresse est découpé. L'agarose est dissous et l'ADN est fixé sur de fines billes de verre, dans des conditions de concentration en sels élevée. Les billes sont récupérées, lavées, séchées et l'ADN en est détaché par resuspension dans de l'eau (concentration saline=0).

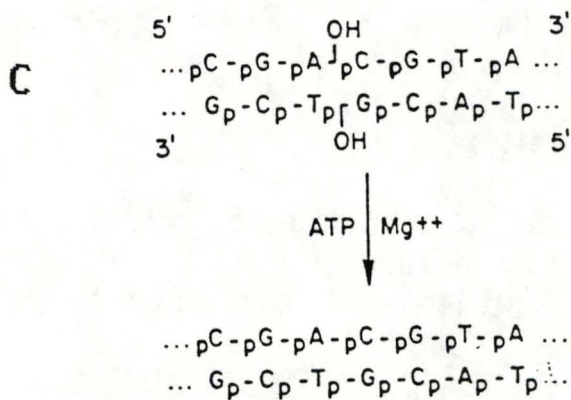
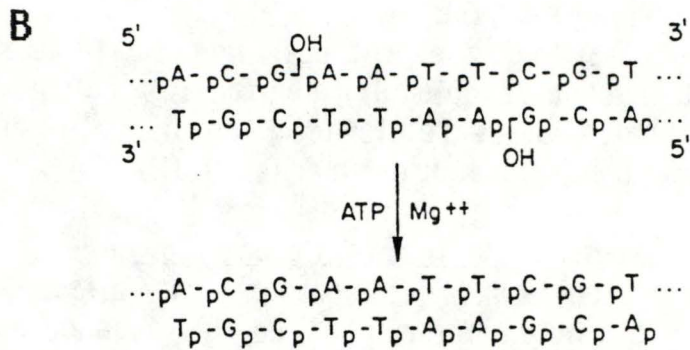
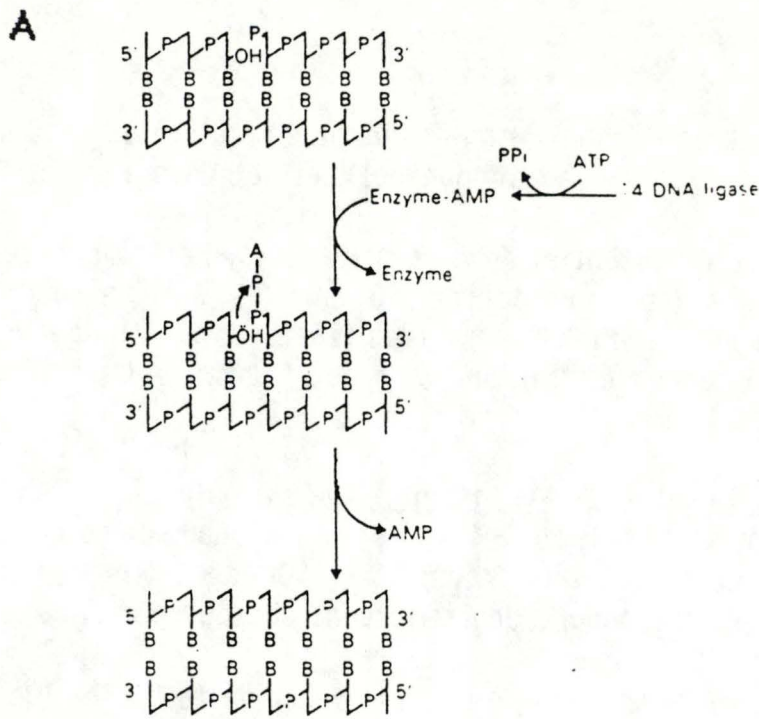


Fig.4.13. (A) Action générale de la T4 DNA ligase: le complexe ligase-AMP se lie au nick portant les groupements 3'-OH et 5'-P. L'AMP réagit avec le groupement phosphate. L'attaque par le 3'-OH génère un lien phosphodiester reliant les deux morceaux du brin.

(B) Exemple de ligation de bouts collants.

(C) Exemple de ligation de bouts francs.

Protocole:

Par bande à récupérer:

- découper un morceau de gel (le plus petit possible) comprenant la bande à récupérer et le placer dans un eppendorf
- ajouter 3 µg de NaI par mg de gel
- le mélange est incubé plusieurs fois 2 minutes à 50°C, en secouant entre chaque incubation et cela jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous.
- 5 µl de la suspension Glassmilk (suspension de billes de verre préalablement réhomogénéisée) sont ajoutés
- secouer à la main
- incuber sur glace pendant 5 à 10 minutes en mélangeant au vortex toutes les 1 à 2 minutes
- centrifuger 15 secondes à 12000 rpm (Janetzky) et éliminer le surnageant
- ajouter 300 µl de New Wash (maintenu sur glace), centrifuger 15 secondes et éliminer le surnageant
- recommencer deux fois l'étape précédente
- sécher 10 minutes sous vide
- resuspendre le culot dans 10 µl d'eau
- incuber 10' à 50°C
- centrifuger 1'
- récupérer le surnageant
- resuspendre une seconde fois le culot dans 10 µl d'eau
- incuber 10' à 50°C
- centrifuger 1'
- récupérer ce second surnageant et rassembler les deux surnageants
- cette solution est incubée 3' à 50°C et centrifugée 1'
- le surnageant qu'on récupère constitue la solution contenant le fragment d'ADN correspondant à la bande récupérée plus haut

IV.4.3. Réaction de ligation:

Elle est utilisée pour lier deux extrémités de fragments d'ADN. A cet effet, l'enzyme T4 DNA ligase (ADN ligase du phage T4) est utilisée. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre un groupement hydroxyle en 3' et un groupement phosphate en 5' (voir Fig.4.13.). L'enzyme nécessite la présence d'ATP et de Mg^{++} pour être active.

Trois cas peuvent se présenter:

- ligation entre deux molécules bicaténares à bouts collants compatibles
- ligation entre deux molécules bicaténares à bouts francs
- ligation entre deux molécules possédant chacune un bout collant et un bout franc

IV.4.3.1. Ligation de deux molécules bicaténaires à bouts collants:

Les ponts hydrogène pouvant se former entre les bouts collants complémentaires de deux molécules différentes augmentent la probabilité de ligation.

Protocole:

X µg de vecteur linéarisé

Y µg d'ADN à insérer (rapport nombre de molécules à insérer/nombre de molécules de vecteur linéarisé de 4 si le plasmide peut se refermer sur lui-même
de 1 dans le cas contraire)

8 µl de tampon de ligation 5X (BRL)

1 unité de T4 DNA ligase

Porter le volume à 40 µl avec de l'eau stérile

Incuber à 14°C pendant 10 à 14 heures

(le fait d'incuber à relativement faible température favorise la formation de ponts hydrogène)

IV.4.3.2. Ligation entre deux molécules bicaténaires à bouts francs:

Dans ce cas il n'y a pas de ponts hydrogène qui peuvent se former pour favoriser la ligation, qui aura donc une probabilité nettement moindre de se produire. Ce type de ligation est donc évité autant que possible, sauf cas exceptionnel (insertion de linker par exemple).

Protocole:

Le protocole de ligation est identique au précédent, cependant:

-il faut mettre en présence au moins 4 fois plus de molécules d'ADN à insérer que de molécules de vecteur linéarisé

-l'incubation se fait durant 4 heures à température ambiante, étant donné qu'ici l'activité enzymatique de la T4 DNA ligase prime sur la formation de ponts hydrogène.

IV.4.3.3. Ligation entre deux molécules bicaténaires possédant chacune un bout franc et un bout collant:

Ici, il faut à la fois favoriser la formation de ponts hydrogène et l'activité enzymatique de la T4 DNA ligase.

Protocole:

Le protocole de ligation est identique au précédent à l'exception des conditions suivantes:

-il faut mettre en présence deux fois plus de molécules d'ADN à insérer que de molécules de vecteur linéarisé.

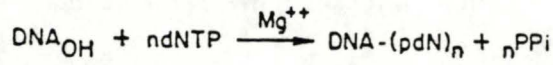
-l'incubation se fait en deux temps:

-10 à 14 heures à 14°C (favorise la formation de ponts hydrogène et donc la ligation entre bouts collants)

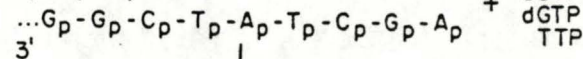
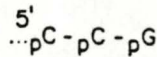
Activité

Réaction

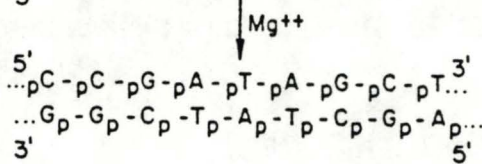
5' → 3'
Polymerase



For example:



filling de
l'extrémité 3'-OH



3' → 5'
Exonuclease

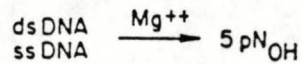


Fig.4.14. Activité du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I.
Cette enzyme à une activité 5'-3' polymérase et 3'-5' exonucléase
mais l'activité 5'-3' exonucléase lui manque.

-puis 4 heures à température ambiante (ligation entre bouts francs)

IV.4.3.4. Contrôles de ligation:

La ligation est toujours suivie d'une transformation.

On utilise deux contrôles:

- d'une part le vecteur restreint mais non ligué qui va servir à transformer (normalement aucun transformant ne doit être obtenu car un fragment linéaire d'ADN ne peut transformer *E. coli*)
- d'autre part un vecteur restreint et ligué qui va permettre d'évaluer l'efficacité de la T4 DNA ligase (après transformation)

IV.4.4. Réaction de filling (remplissage):

Elle sert à former un bout franc à partir d'un bout collant 5' protrudant. Elle est utilisée quand on veut liquer deux molécules d'ADN dont les extrémités sont incompatibles.

Pour mener à bien la réaction de filling (Fig.4.14.), on utilise l'activité enzymatique du fragment de Klenow de la DNA polymérase I de *E. coli*. Le fragment de Klenow est obtenu par une digestion de la DNA polymérase I par la trypsine.

Activité	DNA polymérase I	Fragment de Klenow
5'-3' polymérase	+	+
3'-5' exonucléase ("exo 3'")	+	+
5'-3' exonucléase ("exo 5'")	+	-

Protocole:

Pour un volume réactionnel de 40 µl:

- X µg d'ADN restreint
- 4 µl de tampon de polymérase 10X (préparé extemporanément)
- 2 µl d'une solution 0.1 mM en dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
- 2 unités de Klenow

Le volume est porté à 40 µl avec de l'eau distillée stérile

Incubation: 1 heure à 14°C (ou 30' à 30°C)

Passage 10' à 75°C (inactivation de l'enzyme)

IV.4.5. Purification de l'ADN:

IV.4.5.1. Extraction au phénol-chloroforme d'une solution aqueuse d'ADN pour éliminer les protéines:

L'emploi conjoint de phénol et de chloroforme permet une dénaturation de toutes les protéines, même les RNases, ce qui permet une déprotéinisation plus efficace.

Protocole:

Porter le volume de solution d'ADN à 100 ou 200 μ l avec de l'eau distillée stérile

Ajouter un volume égal de phénol-chloroforme

Mélanger au vortex pendant environ une minute

Centrifuger 5' à 12000 rpm (Janetzky)

Récupérer la solution aqueuse (supérieure) et éventuellement recommencer l'opération.

IV.4.5.2. Précipitation de l'ADN à l'éthanol à basse température en présence de cations monovalents:

Ajouter à la solution d'ADN un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 4.8

Ajouter 2.5 volumes d'éthanol 100 % froid (-20°C) et mélanger

Laisser précipiter 15 à 20 minutes à -80°C

Centrifuger à froid (+4°C) pendant 15 à 20 minutes à 12000 rpm (Janetzky)

Éliminer le surnageant délicatement

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

Centrifuger à froid (+4°C) pendant 15'

Éliminer le surnageant très délicatement

Sécher sous vide

Resuspendre dans le tampon approprié.

IV.4.6. Transformation bactérienne:Principe:

La transformation consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans un microorganisme. A cette fin, la paroi et la membrane bactériennes doivent devenir perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente. *E. coli*, bactérie Gram-, doit être rendue artificiellement compétente, par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium ou de chlorure de rubidium. Ces ions déstabilisent la paroi et la membrane de la bactérie, qui gonfle en prenant l'aspect d'un sphéroplaste.

Un choc thermique permet l'entrée de l'ADN dans la bactérie. Suite à cela un temps d'incubation d'au moins 30' à 37°C en milieu riche est nécessaire pour permettre à la bactérie de régénérer sa paroi et de commencer à exprimer le gène de résistance apporté par le plasmide. Enfin, les bactéries sont étalées sur un milieu sélectif où seules les bactéries transformées c'est-à-dire contenant un plasmide portant lui-même un gène de résistance à l'antibiotique (l'agent sélectif) pourront croître.

Protocole:(a) Préparation de cellules XL1-blue compétentes:

Culture de la souche à 37°C sur milieu solide LB + tétracycline 100 µg/ml afin de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'. A partir d'une de ces colonies, ensemencer une préculture contenant 10 ml de LB + tétracycline.

Incuber cette préculture à 37°C pendant environ 4 heures jusqu'à une absorbance à 550 nm comprise entre 1,5 et 2.

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

Arrêter la culture dans la glace pendant 10'.

Centrifuger la culture 5' à 4000 rpm à 4°C (Rotor SS34 SORVALL). Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl₂ 50 mM équivalent à la moitié du volume initial. Répéter cette étape une seconde fois.

Laisser la solution 20' dans la glace puis centrifuger 5' à 4°C à 4000 rpm. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl₂ 50 mM - 15 % glycérol équivalent au dixième du volume initial.

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

(b) Transformation:

A 100 à 200 µl de cellules compétentes:

-ajouter : soit 1 à 100 ng d'ADN suspendu dans de l'eau ou du TE
soit 10 µl ou plus de mélange de ligation

-incuber 30 à 45' sur glace

-2' de choc thermique à 42°C

-ajouter 0,5 ml à 1 ml de LB

-incuber entre 30 et 60' à 37°C

-étaier sur boîte avec milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C

Contrôles de transformation:

-Transformation par un vecteur non-restreint très efficient pour la transformation (pGEM-blue, pBluescript ou YEp351) afin de vérifier la compétence des cellules.

-Cellules compétentes sans ADN subissant les conditions de transformation, étalées en partie,

-sur milieu riche non sélectif comme contrôle de viabilité des cellules compétentes

-sur milieu sélectif comme contrôle de sensibilité, montrant ainsi la validité de ce milieu et la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

IV.4.7. Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*:

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

Protocole:

Soit une culture de cellules de levures en milieu YEPD.

- Quand la culture a atteint une DO de 1 à 600 nm (ce qui correspond à une densité de cellules de $1 \text{ à } 2 \cdot 10^7 / \text{ml}$), la fractionner en aliquots de 10 ml que l'on centrifuge 10' à 6000 rpm (Rotor SS34 SORVALL)
- Éliminer rapidement le surnageant (culot fragile)
- Resuspendre chaque culot dans 5 ml d'eau distillée stérile et les rassembler deux à deux
- Centrifuger 10' à 6000 rpm (Rotor SS34 SORVALL)
- Éliminer le surnageant et resuspendre chaque culot obtenu dans 2 ml de "TE + LiOAc"
- Répartir à raison de 1 ml par eppendorf (dans un eppendorf, on a donc l'équivalent de 10 ml de culture)
- Centrifuger 15" à 12000 rpm (Janetsky)
- Resuspendre dans 100 μl de "TE + LiOAc"
- Incuber une heure à 30°C sous agitation légère
- Ajouter 5 à 50 μg de DNA carrier (ADN de thymus de veau), c'est-à-dire 5 fois plus que la quantité d'ADN plasmidique qui servira à transformer les levures.
- Ajouter 1 à 10 μg d'ADN plasmidique
- Incuber 30' à 30°C sous agitation légère
- Ajouter 0,7 ml de "TE + LiOAc + PEG"
- Incuber à 30°C pendant une heure (ou pendant la nuit)
- Choc thermique de 5' à 42°C
- Centrifuger 1' à 12000 rpm (Janetsky) et éliminer le surnageant
- Resuspendre les cellules dans 200 μl d'eau distillée stérile et étaler sur milieu sélectif (100 μl par boîte).

Contrôles de transformation:

- Témoin de compétence des cellules: transformation avec un plasmide dont on sait qu'il transforme efficacement la souche de levure utilisée par la méthode de Ito (YEp351 par exemple).
- Témoin de viabilité des souches compétentes: ces dernières subissent le protocole de transformation mais sans ajout d'ADN plasmidique et sont étalées sur un milieu non sélectif.
- Détection des révertants sauvages spontanés: par étalement sur milieu sélectif de cellules ayant subi le protocole de transformation sans addition d'ADN plasmidique.

IV.4.8. Extraction rapide d'ADN plasmidique de *E. coli* (miniprep):

La miniprep est divisée en cinq étapes:

- lyse alcaline des bactéries
- précipitation des protéines et des débris cellulaires
- précipitation de l'ADN plasmidique
- lavage de l'ADN plasmidique
- resuspension

Protocole:

- Un milieu LB + ampicilline (100 µg/ml) est inoculé avec une colonie de bactéries transformantes
- Incubation une nuit à 37°C en bouteilles universelles agitées
- Prélever 2 à 3 ml de culture (selon le stade de croissance) dans un eppendorf et centrifuger 5' à température ambiante à 12000 rpm (Janetzky)
- Éliminer le milieu
- Ajouter 400 µl de tampon P1 et resuspendre les bactéries à la pipette
- Ajouter 400 µl de tampon P2 (lyse alcaline)
- Incuber 5' à température ambiante
- Ajouter 400 µl de tampon P3 (précipitation des protéines et des débris cellulaires)
- Centrifuger 15' à 4°C à 12000 rpm (Janetzky)
- Récupérer le surnageant
- Ajouter 0.8 volume d'isopropanol (précipitation de l'ADN plasmidique)
- Centrifuger 15' à température ambiante à 12000 rpm (Janetzky)
- Éliminer délicatement le surnageant
- Ajouter un volume d'éthanol 70 % (lavage de l'ADN)
- Centrifuger 15' à 4°C à 12000 rpm (Janetzky)
- Éliminer très délicatement le surnageant
- Sécher sous vide
- Resuspendre dans de l'eau stérile ou du TE

Cette méthode permet de récupérer 1 à 5 µg d'ADN plasmidique.

IV.4.9. Préparation d'ADN plasmidique de *E. coli* (midiprep):

- Un milieu de 50 à 80 ml de LB + ampicilline (100 µg/ml) estensemencé avec une colonie de bactéries transformantes ou avec 1 ml issu d'une préculture.
- Incubation une nuit à 37°C en fiole de Wiame agitée
- La culture est centrifugée à 9000 rpm (Rotor GSA SORVALL) à +4°C pendant une à deux minutes
- Éliminer le milieu
- Ajouter 4 ml de tampon P1 et y resuspendre les bactéries à la pipette
- Ajouter 4 ml de tampon P2 (lyse alcaline)

- Incuber 5' à température ambiante
- Ajouter 4 ml de tampon P3
- Centrifuger 30' à 13000 rpm (Rotor SS34 SORVALL) à +4°C
- Récupérer le surnageant
- Equilibrer une colonne QIAGEN P100 (commercialisée en kit par Westburg et utilisée selon le protocole QIAGEN) avec 2.5 ml de tampon QB. Ne jamais assécher la colonne.
- Appliquer le surnageant obtenu après centrifugation sur la colonne (débit optimum de la colonne: approximativement une goutte toutes les deux secondes)
- Appliquer deux fois 4 ml de tampon QC sur la colonne (élution de l'ARN, des protéines, ...)
- Appliquer 2 ml de tampon QF et récupérer l'éluat qui sort de la colonne à partir de ce moment
- Ajouter 0.8 volume d'isopropanol à l'éluat, mélanger
- Centrifuger 30' à 11000 rpm (Rotor HB4 SORVALL) à température ambiante
- Eliminer le surnageant
- Ajouter délicatement 2 ou 3 ml d'éthanol 70 %
- Centrifuger 10' à 11000 rpm (Rotor HB4 SORVALL) à + 4°C
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous vide
- Resuspendre dans de l'eau stérile ou du TE

IV.5. Séquençage:

Principe:

La méthode de séquençage utilisée a été mise au point par Sanger (1977)

Une molécule d'ADN bicaténaire à séquencer est dénaturée (les deux brins sont donc séparés). Un des deux brins (le brin "template" ou matrice) est hybridé à un oligonucléotide de synthèse (le "primer" ou amorce). Celui-ci est en fait complémentaire d'une séquence de pBluescript bordant la batterie de sites de clonage (Fig.4.15.). Ce primer est utilisé comme amorce pour l'ADN polymérase.

L'ADN polymérase commence la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (au brin template) à partir de l'amorce et ce dans un mélange réactionnel contenant:

- les quatre désoxyribonucléotides dont l'un est radioactif (dATP*, dCTP, dGTP, dTTP)
- un des quatre didésoxyribonucléotides

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

Pour chaque vecteur, quatre mélanges de polymérisation sont utilisés.

Mélange réactionnel	A	C	G	T
Désoxyribonucléotides présents	dATP*	dATP*	dATP*	dATP*
	dCTP	dCTP	dCTP	dCTP
	dGTP	dGTP	dGTP	dGTP
	dTTP	dTTP	dTTP	dTTP
Didésoxyribo- nucléotides présents	ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP

*: marqué au ^{35}S

Les proportions de constituants sont telles que statistiquement, on obtiendra l'arrêt prématuré de la synthèse d'au moins une molécule d'ADN monocaténaire pour chaque position dans la séquence template comportant un nucléotide complémentaire au didésoxyribonucléotide utilisé (Fig.4.16.)

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

L'analyse de l'autoradiographie du gel séché permet d'établir la séquence des 250 nucléotides (environ) en aval de la portion complémentaire de l'amorce.

Protocole:

1. Réactions de séquençage:

Toutes les solutions reprises ci-dessous sont comprises dans le kit de séquençage commercialisé par Pharmacia.

1.a. Dénaturation:

La solution d'ADN doit être la plus pure possible et les plasmides doivent se trouver sous forme CCC, c'est-à-dire sans nick (un nick fournit une extrémité 3'OH qui peut servir de point de démarrage pour l'ADN polymérase et peut donc provoquer des interférences).

Dans un eppendorf:

- 1.5 à 2 μg d'ADN dans 8 μl (porter à volume avec de l'eau stérile si nécessaire)
- Ajouter 2 μl de NaOH 2 N
- Incuber 10' à température ambiante

Précipitation de l'ADN dénaturé:

- Ajouter: 3 μ l d'acétate de Na 3 M pH 4.8
7 μ l d'eau distillée stérile
60 μ l d'éthanol 100 % froid (-20°C) et mélanger
- Placer 15' à -80°C
- Centrifuger 15' à + 4°C à 12000 rpm (Janetzky)
- Éliminer le surnageant et laver à l'éthanol 70 %
- Sécher sous vide

1.b. "Annealing":

Étape d'hybridation du primer (amorce) sur le brin "template" (matrice)

- Resuspendre le culot séché dans 10 μ l d'eau stérile
- Ajouter rapidement: 2 μ l de primer (amorce)
2 μ l d'Annealing Buffer
- Incuber 20' à 37°C
- Incuber 10' à température ambiante

1.c. "Labelling":

Étape de marquage du brin néoformé: la polymérisation par l'enzyme T7 DNA polymérase commence en absence de ddNTP et en présence des quatres dNTP dont un est marqué (de l' $[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP) permettant la synthèse d'un court brin marqué, extension du primer (amorce) de quelques dizaines de nucléotides.

Après l'annealing:

- Ajouter: 3 μ l de "labelling mix" (solution de dCTP, de dGTP et de dTTP)
1 μ l d' $[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP (soit 10 μ Ci)
3 unités de T7 DNA polymérase diluée dans son tampon de dilution jusqu'à 1.5 unité par μ l
- Incuber 5' à température ambiante

1.d. "Termination" ou "Sequencing":

Lors de cette étape, l'ensemble T7 DNA polymérase + brin template (matrice) avec primer (amorce) allongé sont mis en présence de dNTP et de ddNTP.

Dans 4 eppendorfs, on a 2.5 μ l de:

- "Short A" pour l'eppendorf A (dNTP + ddATP)
 - "Short C" pour l'eppendorf C (dNTP + ddCTP)
 - "Short G" pour l'eppendorf G (dNTP + ddGTP)
 - "Short T" pour l'eppendorf T (dNTP + ddTTP)
- Ces 4 eppendorfs sont préincubés à 37°C

- A chaque eppendorf ajouter 4.3 μ l du mélange obtenu après labelling.
- Incuber 5' à 37°C
- Ajouter 5 μ l de solution de bleu (arrête la réaction)
- Stocker à -20°C

2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide:

2.1. Montage des plaques:

- Laver les 2 plaques de verre: au savon
puis à l'eau de ville
puis à l'eau distillée
- Sécher les vitres
- Laver les vitres avec de l'éthanol-éther
- Siliconer les plaques (sur la face qui sera en contact avec le gel) avec 10 ml de "Repelcote" (Hopkin & Williams)
- Laver à l'eau distillée
- Sécher
- Déposer les "spacers" sur la plus grande des deux plaques
- Appliquer la petite plaque sur les "spacers"
- Coller du tape à la jonction entre les deux plaques et serrer les deux plaques avec des pinces

2.2. Préparation du gel (gel dénaturant):

- Dans un berlin, ajouter à 42 g d'urée:
 - 10 ml de TBE concentré 10%
 - 15 ml d'acrylamide 20 % bisacrylamide 0.8 %
 - 40 ml d'eau distillée
- Après dissolution de l'urée, filtrer la solution au Buchner (filtre Millipore SA 78 BUC)
- Ajouter rapidement et dans l'ordre: 600 μ l de persulfate d'amminium
30 μ l de TEMED
- Aspirer la solution avec une seringue de 100 ml (rapidement) et la couler entre les deux plaques après avoir retiré les pinces. Garder le reste de la solution comme témoin de polymérisation
- Après polymérisation (45 à 60'), le gel peut être stocké à +4°C

2.3. Migration et autoradiographie:

- Le gel est chauffé pendant 30 à 45', monté comme pour la migration mais sans échantillon ("prérin"). Les conditions de migration sont:
 - Puissance: 60 Watts
 - Tension: environ 1600 Volts
 - Le haut et le bas du gel baignent dans du TBE (1X)
- Après avoir arrêté la source de tension:
 - placer les peignes
 - nettoyer les puits pour enlever les bulles et les impuretés

- placer les échantillons-à charger sur gel (eppendorfs A, C, G et T)-
 durant 3' à 85°C pour dénaturer l'ADN
 déposer 2.5 µl d'échantillon de chaque eppendorf par puits (ordre
 standard de dépôt des échantillons: A, C, G et T)
- Rebrancher la source de tension et laisser migrer l'échantillon durant deux heures ou plus
 - Après migration, recueillir le gel (sans le plier) sur une des deux plaques de verre
 - Placer la plaque de verre qui porte le gel dans un bain de fixateur
 - Transférer le gel sur papier buvard Whatman 17 Chr et le couvrir d'un film plastique
 - Sécher le gel sous vide (environ 2 à 3 heures)
 - Placer le gel adhérent au papier buvard dans une cassette à autoradiographie avec un film autoradiographique (Kodak) et laisser une nuit.
 - Retirer le film autoradiographique de la cassette et le plonger dans un bain de révélateur (Kodak) durant 5'.
 - Rincer à l'eau
 - Transférer le film révélé dans un bain de fixateur durant 10 à 15'
 - Rincer abondamment le film avec de l'eau et sécher.

IV.6. Techniques biochimiques:

IV.6.1. Dosage des protéines:

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry (1951), utilisant le réactif de Folin.

Protocole:

- Diluer la solution de protéines dans de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 200 µl.
- Ajouter 200 µl de NaOH 1 N (dénaturation)
- Laisser agir 30' à température ambiante
- Ajouter 2 ml de solution A (préparée extemporanément):
 - 100 ml de Na₂CO₃ 2 %
 - + 1 ml de CuSO₄.5H₂O 0,04 M
 - + 1 ml de NaKC₄H₄O₆.H₂O 0,07 M
- Laisser agir 5 à 15' à température ambiante
- De minute en minute, ajouter 200 µl de réactif de Folin dilué deux fois et agiter immédiatement au vortex
- Après 30', lire l'absorbance à 540 nm (de minute en minute)

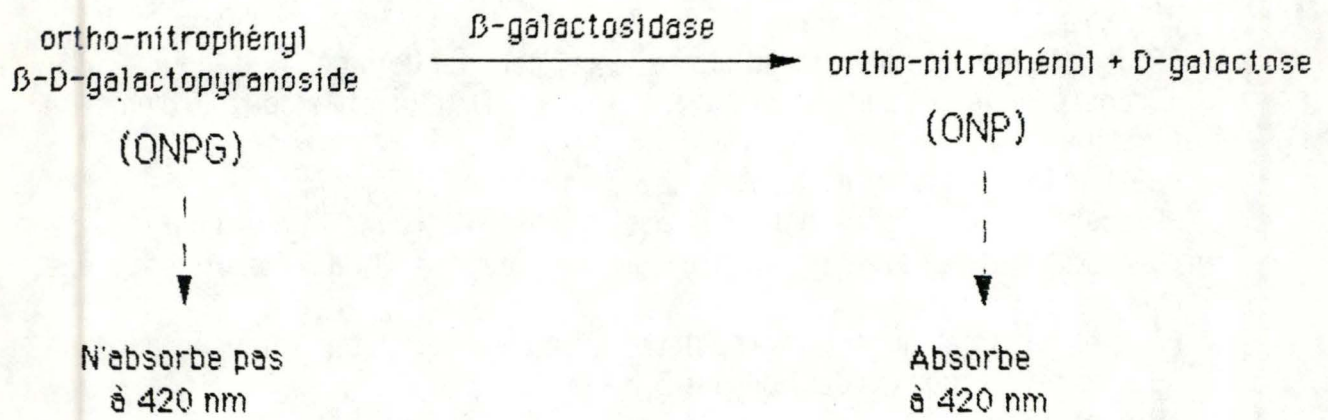


Fig.4.17. Réaction impliquée dans le dosage de l'activité de la β-galactosidase: l'enzyme hydrolyse l'ONPG en galactose et ONP, dont l'apparition est détectée par mesure de l'absorbance à 420 nm.

Témoins:

- un blanc (200 µl d'eau au départ)
- deux solutions étalon de concentration connue en protéine (ici la SAB ou BSA) correspondant aux limites de validité de la loi de Lambert-Beer pour ce dosage.

IV.6.2. Dosage de l'activité β -galactosidasique:

La réaction impliquée dans ce dosage est représentée à la fig.4.17.

Protocole:

- Une culture de cellules de levures (*K. fragilis* ou *S. cerevisiae*) est menée jusqu'en fin de phase exponentielle, début de phase stationnaire.
- Prélever 10 à 20 ml de culture et les centrifuger 10' à 6000 rpm (Rotor SS34 SORVALL)
- Éliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 1 ml de tampon Z (pH 7.0), transférer dans un eppendorf.
- Centrifuger 15" à 12000 rpm (Janetzky) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 200 µl de tampon Z
- Ajouter des billes de verre (diamètre: de 316 à 416 µm) jusqu'à environ 1 mm au dessous du ménisque de la suspension de cellules.
- Mélanger au vortex de manière à obtenir des bouillons dans l'eppendorf, trois fois 3', en déposant sur glace entre temps (lyse aux billes de verre).
- Centrifuger 5' à 12000 rpm (Janetzky) et récupérer le surnageant (lysate)
- En prélever un aliquot et porter le volume à 1 ml avec du tampon Z
- De minute en minute, ajouter 200 µl d'ONPG à 4 mg/ml (solution stock unique pour l'ensemble des expériences).
- Incuber 10 ou 15' à 28°C
- De minute en minute, ajouter 300 µl de Na₂CO₃ 1.67 M (arrêt de la réaction)
- Lire l'absorbance à 420 nm et la comparer avec la droite d'étalonnage

Témoins:

- Contrôle enzyme: remplacer les 200 µl d'ONPG par 200 µl d'H₂O, pour chaque aliquot de lysate.
- Contrôle substrat: remplacer la solution de lysate diluée (dans du tampon Z) par 1 ml de tampon Z.

A		
Protéine	PM des sous-unités	Autres PM visibles (dissociation partielle des monomères)
Thyroglobuline	330000	
Ferritine	18500	220000
Catalase	60000	
Lactate déshydrogénase	36000	140000
Albumine	67000	

B	
Proteine	PM des sous-unités
Phosphorylase b	94000
Albumine	67000
Ovalbumine	43000
Anhydrase carbonique	30000
Inhibiteur de la trypsine	20100
α -Lactalbumine	14400

Fig.4.18. Marqueurs de PM utilisés pour les SDS-PAGE:

(A) Marqueur de hauts PM (Pharmacia High Molecular Weight)

(B) Marqueur de faibles PM (Pharmacia Low Molecular Weight)

IV.6.3. Electrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide:

Cette électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes permet de séparer les sous-unités protéiques en fonction de leur poids moléculaire.

La migration se fait en deux temps:

- d'abord dans un gel d'empilement où la solution de protéines est tassée en une très fine bande
- ensuite dans un gel de migration, où les protéines sont séparées suivant leur PM.

3.1 Préparation des échantillons:

A) La quantité de protéines (x) est identique dans tous les échantillons déposés un gel. Le volume déposé sur gel ne doit pas excéder 25 μ l.

x μ g de protéines

1/5 de solution SB concentrée 5X

porter au volume final avec de l'eau distillée.

B) Pour les marqueurs de PM (Fig.4.18.):

1 μ l de solution stock de marqueur de PM (Pharmacia)

1,6 μ l de SB 5X

3 μ l de tampon Tris.Cl 0,5 M SDS 0,4 %

2,4 μ l d'eau distillée

soit 8 μ l au total

Incuber 3' à 100°C et charger sur le gel.

On utilise le système MINI PROTEAN™ II de BIORAD

3.2. Préparation du gel:

Préparer le "running gel" (gel de migration): dans le cas d'un gel 7.5 % :

1,875 ml d'acrylamide 30 % bisacrylamide 0,8 %

1,875 ml de Tris.Cl 1.5 M SDS 0.4 % pH 8,8

3,375 ml d'eau distillée

0,375 ml de persulfate d'ammonium

7,5 μ l de TEMED

Couler ce gel et le laisser polymériser.

Préparer le "stacking gel" (gel d'empilement):

0,5 ml d'acrylamide 30 % bisacrylamide 0,8 %

1,25 ml de Tris.Cl 0,5 M SDS 0.4 % PH 6,8

2,75 ml d'eau distillée

0,5 ml de persulfate d'ammonium 1 %

5 μ l de TEMED

Couler ce gel et le laisser polymériser.

Déposer les échantillons et lancer la migration.

3.3. Coloration (au bleu de Coomassie):

Après migration, laisser le gel colorer pendant environ 45'.
Remplacer la solution de coloration par la solution de décoloration (45').
Remplacer la solution de décoloration par la solution de fixation (45').
Récupérer le gel sur un papier buvard et le sécher sous vide.

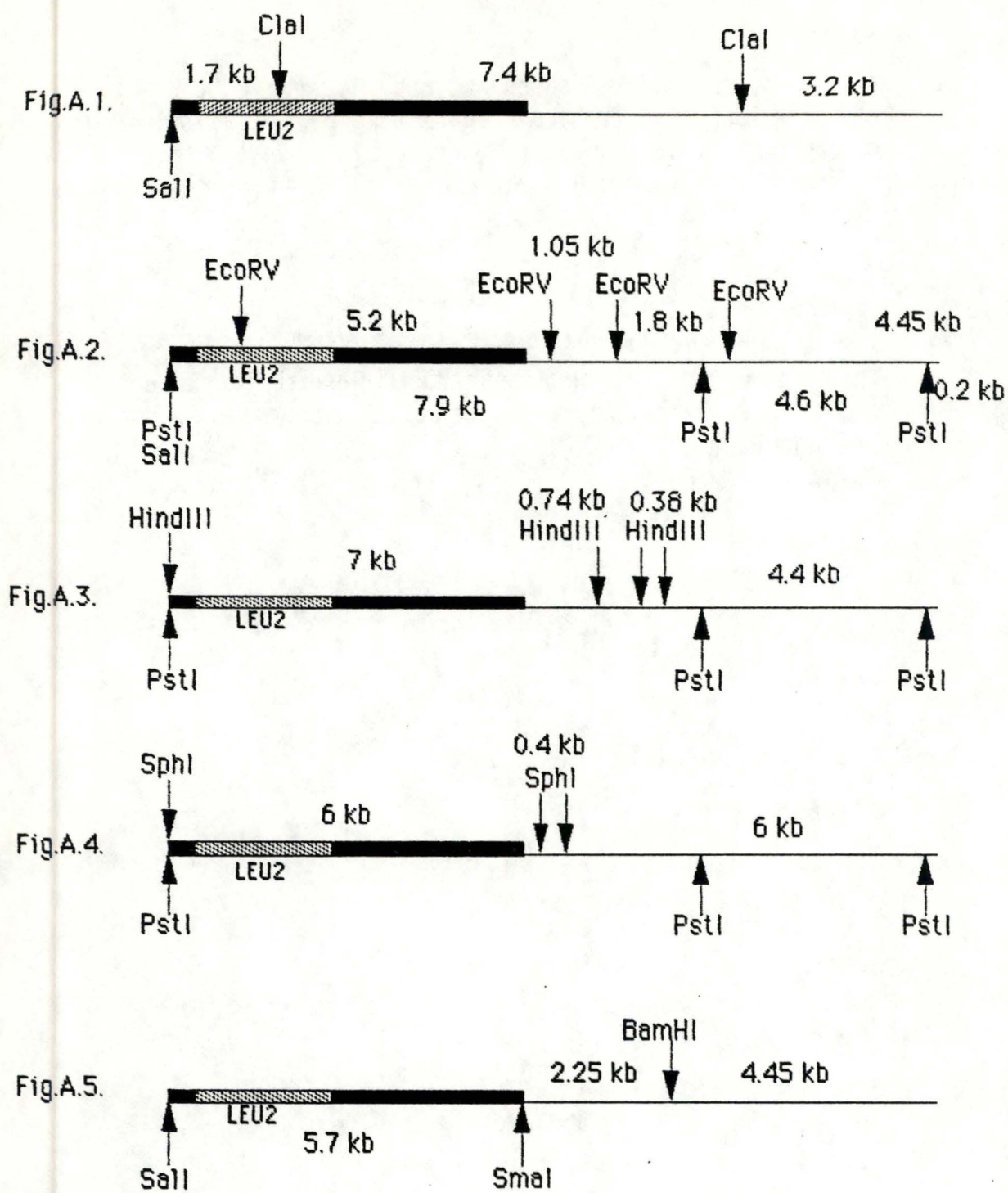
CHAPITRE V: BIBLIOGRAPHIE

- 1- Breuning, K.D., Dahlems, U., Das, S. and Hollenberg, C.P. (1984)
Analysis of a eukaryotic β -galactosidase gene : the N-terminal end of the yeast *Kluyveromyces lactis* protein shows homology to the *Escherichia coli lacZ* gene product.
Nucleic Acids Res., 12, 2327-2341.
- 2- Breunig, K.D. (1989)
Glucose repression of LAC gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC 9.
Mol. Gen. Genet., 216, 422-427.
- 3- Crueger A. and Crueger W. (1984)
Biotechnology: a comprehensive treatise (Rehm H.-J. & Reed G. editors)
Verlag Chemie, 6a. Biotransformations (Kieslich K. editor), 447-449.
- 4- Clarke, L. and Carbon, J. (1976)
A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome.
Cell, 9, 91.
- 5- Dickson, R.C. and Markin, J.S. (1978)
Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a yeast gene coding for β -galactosidase.
Cell, 15, 123-130.
- 6- Ficca, A.G. and Hollenberg, C.P. (1989)
Functional relationship among TATA sequences, gene induction and transcription initiation in the β -galactosidase, LAC 4, gene from *Kluyveromyces lactis*.
Curr. Genet., 15, 261-269.
- 7- Gelinas, R., Endlich, B., Pfeiffer, C.N., Yagi, M. and Stamatoyannopoulos, G. (1985)
G to A substitution in the distal CCAAT box of the $A\gamma$ -globin gene in Greek hereditary persistence of fetal hemoglobin.
Nature, 313, 323-324.
- 8- Hewitt, G.M. and Grootwassink, J.W.D. (1984)
Simultaneous production of inulinase and lactose in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*.
Enzyme Microb. Technol., 6, 263-270.

- 9- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. (1986)
Yeast / *E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites.
Yeast, 2, 163-167.
- 10- Houts, S.S. (1988)
Lactose intolerance.
Food technology, 42, 110-113.
- 11- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983)
Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.
J. Bacteriol., 153, 163.
- 12- Jacobson, G.K. and Jolly, S.O. (1989)
Biotechnology: a comprehensive treatise (Rehm H.-J. & Reed G. editors)
Verlag Chemie, 7b. Gene technology, 287-290.
- 13- Johannsen, E. (1980)
Hybridization studies within the genus *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt.
Antonie van Leeuwenhoek, 46, 177-189.
- 14- Kocian, J. (1988)
Lactose intolerance.
Int. J. Biochem., 20, 1-5.
- 15- Lewin, B. (1988)
Genes III.
Médecine-Sciences Flammarion, 219-240
- 16- Loomis, W. F. (1988)
Four billion years.
Sinuer Associates, Inc., pp. 286.
- 17- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Rondall, R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 18- Ptashne, M. (1988)
L'activation des gènes.
Pour la Science, 137, 62-69.

- 19- Ruzzi, M., Breunig, K.D., Ficca, A.G. and Hollenberg, C.P. (1987)
Positive regulation of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an upstream activation site that shows homology to the GAL upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol., 7, 991-997.
- 20- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.
- 21- Schmidt, B.F., Adams, R.M., Requadt, C., Power, S. and Mainzen, S.E. (1989)
Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus* β -galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 171, 625-635.
- 22- Sidenberg, D.G. and Lachance, M.A. (1986)
Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* populations and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt.
International Journal of Systematic Bacteriology, 36, 94-102.
- 23- Sor, F. and Fukuhara, H. (1989)
Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*.
Yeast, 5, 1-10.
- 24- Sreekrishna, K. and Dickson, R.C. (1985)
Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7909-7913.
- 25- Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (1982)
The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression.
Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 680.
- 26- Webster, T.D. and Dickson, R.C. (1988)
The organisation and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*.
Nuc. Acid. Res., 16, 8011-8028.
- 27- West, R.W., Yocum, R.R. and Ptashne, M. (1984)
Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 Divergent Promoter Region
Location and function of the Upstream Activating Sequence UASG.
Mol. Cell. Biol., 4, 2467-2478.

- 28- Wray, L.V., Witte, M.M., Dickson, R.C. and Riley, M.I. (1987)
Characterization of a positive regulatory gene, LAC 9, that controls
induction of the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*:
structural and functional relationships to GAL 4 of *Saccharomyces*
cerevisiae.
Mol. Cell. Biol., 7, 1111-1121.
- 29- Xiao, W. and Rank, G.H. (1989)
The construction of recombinant industrial yeast free of bacterial
sequences by directed gene replacement into nonessential region of
the genome.
Gene, 76, 99-107.



Représentation des cartes physiques du plasmide pB2 pour les enzymes de restriction citées ci-contre.

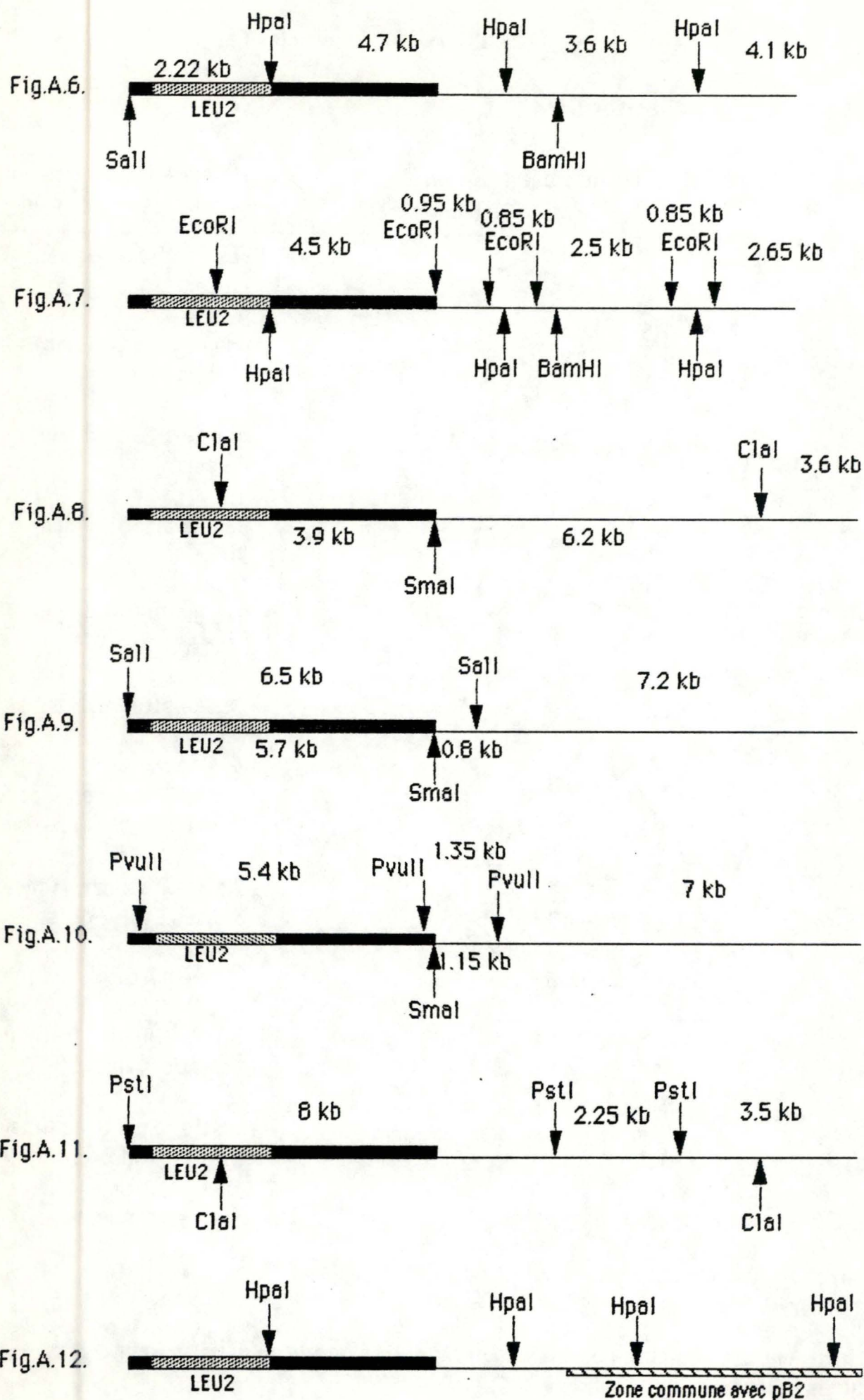
ANNEXE

1. Restrictions du plasmide pB2:

Enzymes de restriction	Taille estimée des fragments de restriction (en kb)	Nombre et localisation des sites de clivage
SmaI	10-20	Pas de site SmaI dans l'insert
SaII	10-20	Pas de site SaII dans l'insert
SacI	10-20	Pas de site SacI dans l'insert
XbaI	10-20	Pas de site XbaI dans l'insert
AflII	10-20	Pas de site AflII dans l'insert
PvuII	7 + 5.3	Pas de site PvuII dans l'insert
Clal	7.4 + 4.9	1 site Clal dans l'insert
Clal + SaII	7.4 + 3.2 + 1.7	Voir fig.A.1.
PstI	7.9 + 4.6 + 0.2*	2 sites PstI dans l'insert
EcoRV	5.3 + 4.45 + 1.8 + 1.05	3 sites EcoRV dans l'insert
EcoRV + SaII	5.2 + 3.35 + 1.8 + 2 x 1.05	Voir fig.A.2.
EcoRV + PstI	5.2 + 3.2 + 1.45 + 2 x 1.05	
HindIII**	7 + 4.4 + 0.74* + 0.38*	3 sites HindIII dans l'insert.
HindIII + PstI	7 + 4.2 + 0.74* + 0.35* + 0.2*	Voir fig.A.3.
SphI	2 x 6 + 0.4*	2 sites SphI dans l'insert
SphI + PstI	6 + 4.6 + 1.15 + 0.4* + 0.2*	Voir fig.A.4.
BamHI	10-20	1 site BamHI dans l'insert
BamHI + SmaI	10 + 2.25	
BamHI + SaII	8 + 4.45	Voir fig.A.5.

* : Ces valeurs ont été obtenues par analyse par électrophorèse en gel d'agarose 2 % (les autres valeurs, en gel d'agarose 1 %)

** : Suite à une restriction partielle de pB2 par HindIII, un fragment de 1.1 kb est apparu, indiquant que les fragments de 0.38 kb et 0.74 kb sont adjacents.



Représentation des cartes de restriction des plasmides pB2 (A.6 et 7) et pB3 (A.8 à 12).

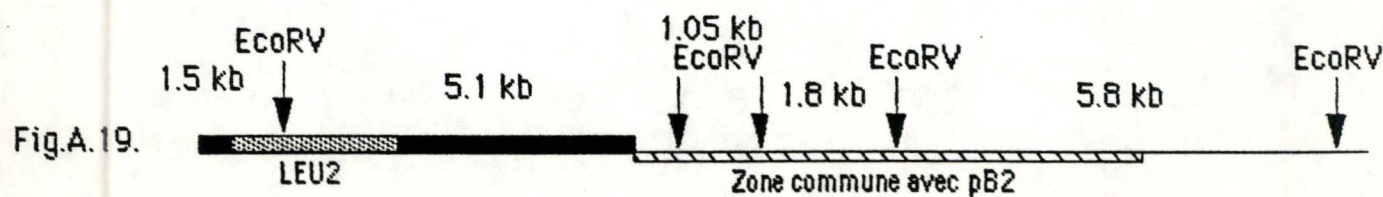
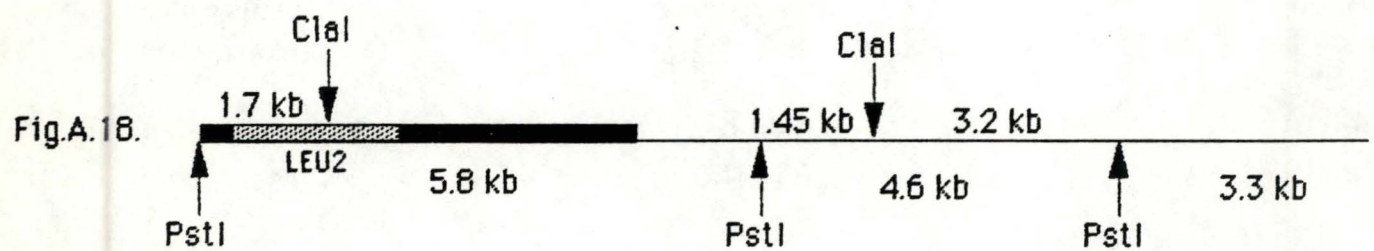
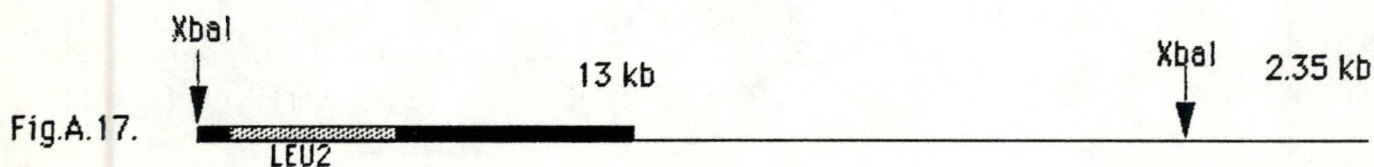
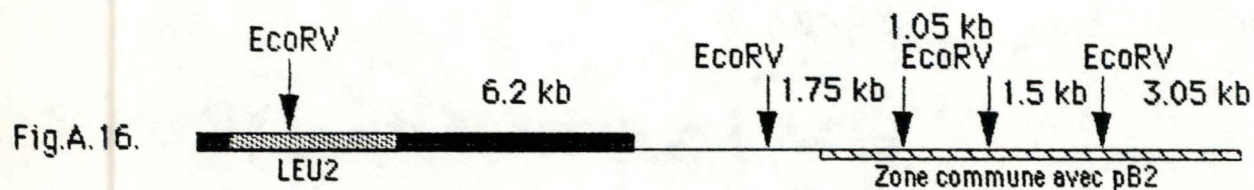
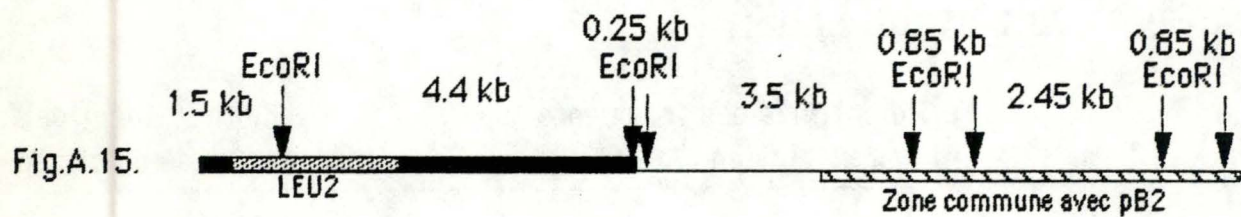
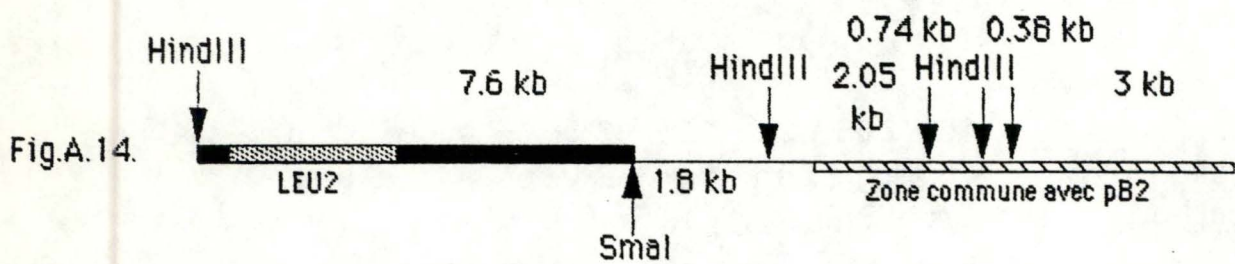
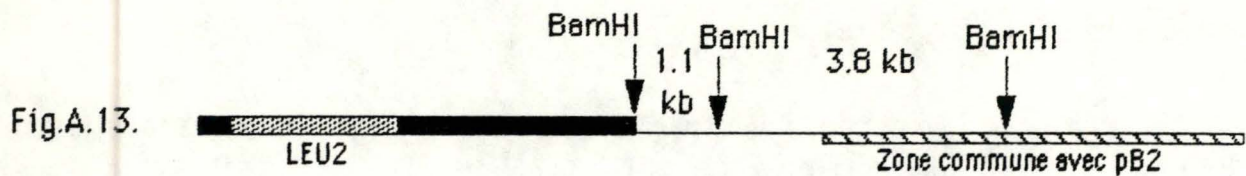
(Restrictions du plasmide pB2, suite)

Enzymes de restriction	Taille estimée des fragments de restriction (en kb)	Nombre et localisation des sites de clivage
HpaI	4.7 + 4.1 + 3.6	2 sites HpaI dans l'insert
HpaI + Sall	4.7 + 3.6 + 2.22 + 1.85	
HpaI + BamHI	4.7 + 4.1 + 2.6 + 1	Voir fig.A.6.
EcoRI	4.5 + 2.65 + 2.5 + 0.95 + 2 x 0.85	4 sites EcoRI dans l'insert
EcoRI + BamHI	4.5 + 2.6 + 2.15 + 0.95 + 2x0.85	
EcoRI + HpaI	3.45 + 2.65 + 2.5 + 1.05 + 0.95 + 0.7	Voir fig.A.7.

2. Restrictions du plasmide pB3:

Enzymes de restriction	Taille estimée des fragments de restriction (en kb)	Nombre et localisation des sites de clivage
SmaI	10-20	Pas de site SmaI dans l'insert
ClaI	10-15 + 3.6	1 site ClaI dans l'insert
ClaI + SmaI	6.2 + 3.9 + 3.6	Voir fig.A.8.
Sall	7.2 + 6.5	1 site Sall dans l'insert
Sall + SmaI	7.2 + 5.7 + 0.8	Voir fig.A.9.
PvuII	7 + 5.4 + 1.35	1 site PvuII dans l'insert.
PvuII + SmaI	7 + 5.4 + 1.15	Voir fig.A.10.
PstI	8 + 3.5 + 2.25	2 sites PstI dans l'insert.
PstI + ClaI	6.4 + 2.25 + 1.95 + 1.65 + 1.45	Voir fig.A.11.
HpaI	4.6 + 3.6 + 2.75 + 2.4	3 sites HpaI dans l'insert. Voir fig.A.12.
BamHI	8-10 + 3.8 + 1.1	2 sites BamHI dans l'insert, voir fig.A.13.
HindIII	7.6 + 3 + 2.05 + 0.74* + 0.38*	4 sites HindIII dans l'insert, voir fig.A.14.
HindIII + SmaI	5.7 + 3 + 2.05 + 1.8 + 0.74* + 0.38*	
EcoRI	4.65 + 3.5 + 2.45 + 1.5 + 2 x 0.85 + 0.25*	5 sites EcoRI dans l'insert. Voir fig.A.15.
EcoRV	6.2 + 3.05 + 1.75 + 1.5 + 1.05	4 sites EcoRV dans l'insert. Voir fig.A.16.

* : Ces valeurs ont été obtenues par analyse par électrophorèse en gel d'agarose 2 % (les autres valeurs, en gel d'agarose 1 %)



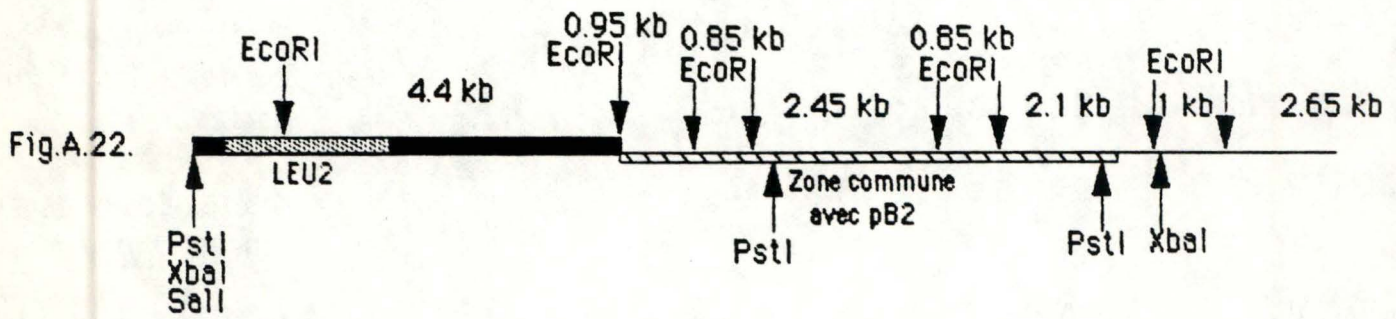
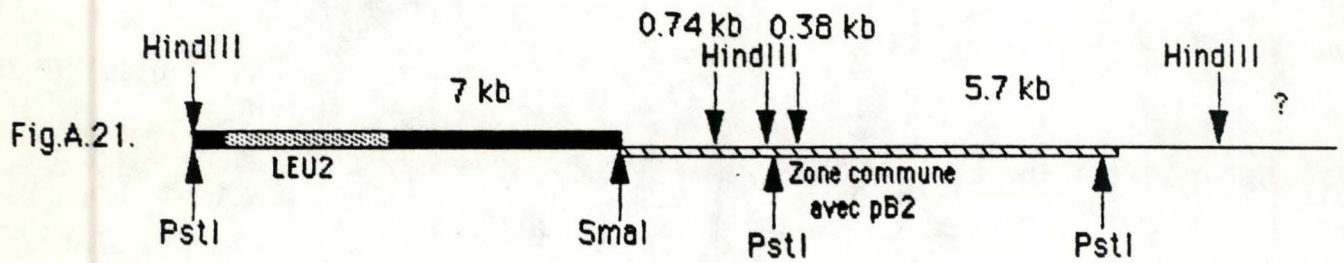
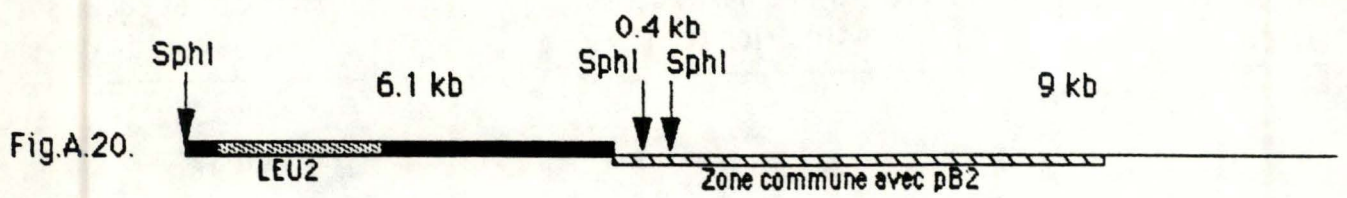
Représentation des cartes physiques des plasmides pB3 (A.13 à 16) et pB1 (A.17 à 19).

3. Restrictions du plasmide pB1:

Enzymes de restriction	Taille estimée des fragments de restriction (en kb)	Nombre et localisation des sites de clivage
SmaI	10-20	Pas de site SmaI dans l'insert
Sall	10-20	Pas de site Sall dans l'insert
PvuII	10 + 5.4	Pas de site PvuII dans l'insert
XbaI	10-20 + 2.35	1 site XbaI dans l'insert, voir fig.A.17.
PstI	7.5 + 4.6 + 3.3	2 sites PstI et
Clal	8-9 + 7.2-7.3	1 site Clal dans l'insert, voir fig.A.18.
PstI + Clal	5.8 + 3.3 + 3.2 + 1.7 + 1.45	
EcoRV	5.9 + 5.1 + 1.8 + 1.5 + 1.05	4 sites EcoRV dans l'insert, voir fig.A.19.
BamHI	10-20	1 site BamHI dans l'insert
SphI	9 + 6.1 + 0.4	2 sites SphI dans l'insert, voir fig.A.20.
HindIII**	7 + 5.7 + 1.1 + 0.73* + 0.38* + 0.28*	5 sites HindIII dans l'insert
HindIII + SmaI**	2 x 5.7 + 1.25 + 1.1 + 0.73* + 0.38* + 0.28*	Voir fig.A.21.
HindIII + PstI**	7 + 4.2 + 1.55 + 1.1 + 0.73* + 0.38* + 0.28*	
EcoRI	4.4 + 2.65 + 2.45 + 2.1 + 1 + 0.95 + 2 x 0.85	6 sites EcoRI dans l'insert
EcoRI + Sall	4.4 + 2.45 + 2.1 + 1.5 + 1.2 + 1 + 0.95 + 2 x 0.85	
EcoRI + XbaI	4.4 + 2.45 + 2.1 + 1.5 + 1.2 + 0.95 + 2 x 0.85	
EcoRI + PstI	4.4 + 2.35 + 2 x 1.5 + 1.2 + 0.95 + 2 x 0.85	Voir fig.A.22.

* : Ces valeurs ont été obtenues par analyse par électrophorèse en gel d'agarose 2 % (les autres valeurs, en gel d'agarose 1 %)

** : Tous les sites HindIII ne peuvent être situés sur l'insert de pB1 avec ces seuls résultats. La position des sites qui nous manquent n'a pas été recherchée car ces sites sont à grande distance de la région commune, qui contient le gène qui nous intéresse.



Représentation des cartes de restriction du plasmide pB1.