

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution au clonage du gène ADH 1 de *Kluyveromyces fragilis*

Ladriere, Jean-Marc

Award date:
1989

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.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Telex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Titre du Mémoire:
Contribution au clonage du gène *ADH 1* de *Kluyveromyces fragilis*

LADRIERE Jean-Marc

Abstract

The present work contributes to the cloning of the *ADH 1* gene of yeast *Kluyveromyces fragilis* (ATCC 12424) by heterologous complementation of an ADH nul strain (302.21) from *Saccharomyces cerevisiae* carrying *his 4* and *trp 1* auxotrophies.

The genomic library of *K. fragilis* in use in our lab was constructed in plasmid YEp 351 containing the *LEU 2* gene; "classic" complementation was therefore not directly possible.

Complementation was approached in two different ways:

- First, we tried "direct" complementation of fermentative function in 302.21 strain by the DNA of the genomic library. Three ADH I+ clones were isolated from which we failed to isolate a plasmid. We conclude that if there is a plasmid, it has partially or totally integrated the clones chromosomal DNA.

- As a second approach, we constructed pJM 1 plasmid to bring *his 2* auxotrophy to 302.21 strain by "integrative disruption". It'll make us able to perform a "classic" complementation procedure.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1989

Promoteur : Prof. J. Vandenhaute.

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pu être réalisé sans l'aide et l'expérience d'un certain nombre de personnes auxquelles je tiens à exprimer ma reconnaissance :

Les professeurs J. Delcour et J. Vandenhoute, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et ont bien voulu assurer la direction de mon mémoire.

Le professeur E.T. Young de l'université de Washington qui nous a aimablement procuré les clones de la souche 302.21 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Deborah Prozzi, Anne Tibor, Jean-Pol Cassart et mon tuteur Olivier Laloux, qui m'ont chaperonné.

Mesdames R.M. Génicot et M. Jadin.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont accepté de lire ce mémoire.

Et j'ai une pensée toute spéciale pour mes parents, qui m'ont bien sûr permis d'entreprendre ces études, mais les ont également vécues avec moi.

LISTE DES ABREVIATIONS

- A : adénine
- a.a. : acide aminé
- ADH : alcool déshydrogénase
- ADN ou DNA : acide désoxyribonucléique
- ARN ou RNA : acide ribonucléique
- ARS : autonomously replicating sequence
- ATP : adénosine triphosphate
- bp : paire de bases
- C : cytosine
- Cys : cystéine
- D.O. : densité optique
- g : gramme
- G : guanine
- His : histidine
- Kb : kilobase
- LB : milieu riche pour bactérie
- λ : longueur d'onde
- M : molaire
- MAM : milieu minimum pour levure
- Maxiprep : préparation en grande quantité d'ADN plasmidique
- mg : milligramme
- μ g : microgramme
- ml : millilitre
- μ l : microlitre
- mM : milli molaire
- M & M : matériel et méthodes
- NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
- ng : nanogramme

LISTE DES ABREVIATIONS (suite)

RMP : rotation par minute

T : thymine

thr : thréonine

trp : tryptophane

YADH : alcool déshydrogénase de levure

YPD : milieu riche pour levures

TABLE DES MATIERES

	Pages
CHAPITRE I : INTRODUCTION	
1.1. LES ALCOOL DESHYDROGENASES	2
1.1.1. ASPECTS EVOLUTIFS	3
1.1.1.1. Ce que nous apprennent les protéines	4
1.1.1.2. Ce que nous apprennent les introns	5
1.1.2. ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS	7
1.1.2.1. Les résidus conservés	7
1.1.2.2. Les ions métalliques	8
1.1.2.3. La poche de liaison du substrat	9
1.1.2.4. La structure quaternaire	10
1.1.2.5. Les relations évolutives entre alcool déshydrogénases	11
1.1.3. LES GENES DE L'ADH CHEZ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.1.3.1. Le gène de l'ADH I	12
1.1.3.2. Le gène de l'ADH II	14
1.1.3.3. Le gène de l'ADH III	15
1.1.3.4. Le gène de l'ADH IV	15
1.2. LA LEVURE <i>Kluyveromyces fragilis</i>	16
1.3. STRATEGIES DE CLONAGE CHEZ LA LEVURE	19
1.3.1. QU'EST-CE QUE LE CLONAGE ?	19
1.3.2. LE CLONAGE PAR COMPLEMENTATION	19
1.3.2.1. La réalisation d'une banque génomique	20
1.3.2.2. La sélection des hôtes transformés	20
1.3.2.3. Le "screening" des transformants	21
1.4. L'OBJECTIF DU TRAVAIL	22

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

2.1. LES SOUCHES UTILISEES	23
2.1.1. SOUCHES DE LEVURES	23
2.1.1.1. La souche 302.21 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.1.1.2. La souche GRF 18 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.1.1.3. La souche FL 100 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.1.1.4. La souche ATCC 12424 de <i>Kluyveromyces fragilis</i>	24
2.1.2. SOUCHE DE BACTERIE	24
2.1.2.1. La souche XLI blue d' <i>Escherichia coli</i>	24
2.2. LES PLASMIDES	24
2.2.1. LES PLASMIDES CHEZ LA LEVURE	25
2.2.2. LES PLASMIDES UTILISES	28
2.2.2.1. Le plasmide YEp 351	28
2.2.2.2. Le plasmide pJO 158	28
2.3. CULTURES ET MILIEUX UTILISES	29
2.3.1. CULTURES LIQUIDES	29
2.3.2. CULTURES SOLIDES	29
2.3.3. MILIEUX DE CULTURE	29
2.3.3.1. Milieux pour bactéries	29
2.3.3.2. Milieux pour levures	31
2.4. TECHNIQUES D'ADN RECOMBINANT	32
2.4.1. REACTION DE RESTRICTION	32
2.4.2. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	34
2.4.2.1. Electrophorèse analytique	34
2.4.2.2. Electrophorèse préparative	37
2.4.3. LA REACTION DE LIGATION	38
2.4.4. TRANSFORMATION	39
2.4.4.1. Transformation de bactéries	40
2.4.4.2. Transformation de levures	41

2.4.5. PREPARATION DE PLASMIDE EN PETITE QUANTITE (MINIPREP)	43
2.4.5.1. Miniprep à partir d' <i>E. coli</i>	43
2.4.5.2. Miniprep à partir de levures	43
2.4.6. PREPARATION DE PLASMIDE EN GRANDE QUANTITE A PARTIR D' <i>E. coli</i> (MAXIPREP)	46
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSION	
3.1. LA COMPLEMENTATION DIRECTE	50
3.1.1. MISE EN EVIDENCE DE LA SYNTHESE D' <i>ADH</i> CHEZ LA LEVURE	50
3.1.1.1. Les milieux à forte concentration en glucose	50
3.1.1.2. Le milieu à l'antimycine A	52
3.1.1.3. Les milieux à l'alcool allylique	53
3.1.2. TRANSFORMATION DE LA SOUCHE 302.21 PAR L' <i>ADN</i> DE LA BANQUE GENOMIQUE DE <i>K. Fragilis</i>	54
3.1.3. IDENTIFICATION DES COLONIES TRANSFORMANTES	56
3.1.4. EXTRACTION DU PLASMIDE	56
3.2. REALISATION D'UNE CONSTRUCTION VISANT A APPORTER L'AUXOTRO- PHIE leu 2 A LA SOUCHE 302.21 DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
3.2.1. PRINCIPE DE LA DISRUPTION INTEGRATIVE	58
3.2.2. LE CHOIX DU PLASMIDE	60
3.2.3. AMENAGEMENT DE pJO 158 EN PLASMIDE INTEGRATIF	60
3.2.4. CONSTRUCTION DU PLASMIDE pJM 1	61
3.2.4.1. Stratégie de construction	61
3.2.4.2. Mise en oeuvre de la construction	62
CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	
4.1. CONCLUSIONS	67
4.2. PERSPECTIVES	69
BIBLIOGRAPHIE	

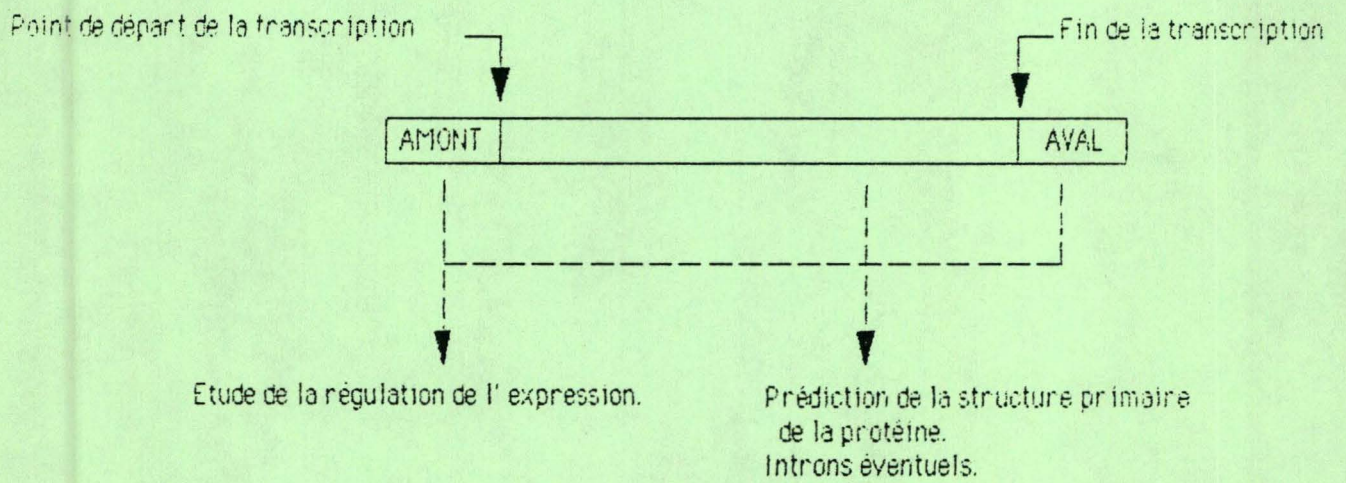


Fig. 1.1 Les 2 niveaux d' étude permis par la structure d' un gène.

1. INTRODUCTION

Les techniques actuelles permettent d'élargir le champ d'étude des molécules biologiques à leur structure. Pour étudier la relation existant entre la structure des molécules biologiques et leur fonction, il est devenu une pratique courante de les modifier afin d'observer l'altération de leurs propriétés.

Les modifications peuvent être produites chimiquement, en agissant sur les acides aminés des protéines, ou génétiquement, en changeant les nucléotides des gènes par mutagenèse dirigée (1).

Au cours de l'évolution, la nature elle-même a procédé à des essais. Les gènes constituent la mémoire de ceux qui furent fructueux. Aussi les comparaisons de séquences, qu'elles soient d'acides aminés ou de nucléotides, permettent-elles la mise en évidence de motifs particulièrement conservés, donnant une indication de leur importance (2).

Ces motifs sont retrouvés dans le cas d'enzymes homologues (principalement) ou dans les séquences régulatrices de gènes régis par un même type de mécanisme d'expression.

En plus des aspects fonctionnels, ils permettent d'aborder des aspects évolutifs par les filiations que l'on peut établir entre les protéines et entre les organismes.

L'approche génique permet d'effectuer l'étude à deux niveaux (fig 1.1).

- La partie codante du gène permet de prédire la structure primaire de la protéine pour laquelle il code. Elle contribue également à la compréhension des mécanismes évolutifs, de par la mise en évidence de sa fragmentation éventuelle en introns.
- Les séquences situées en amont et en aval de la partie codante du gène rendent possible l'étude des mécanismes

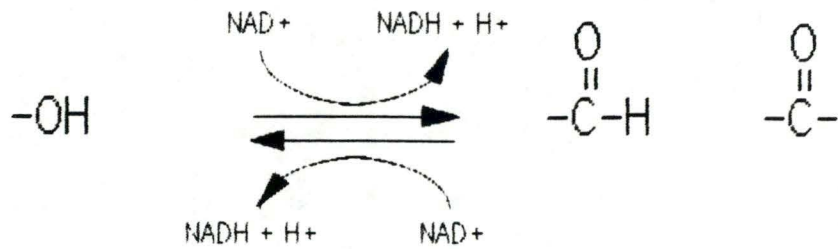


Fig. 1.2 Les ADHs catalysent l'interconversion des alcool et de leur produits d'oxydation, les aldéhydes et les cétones.

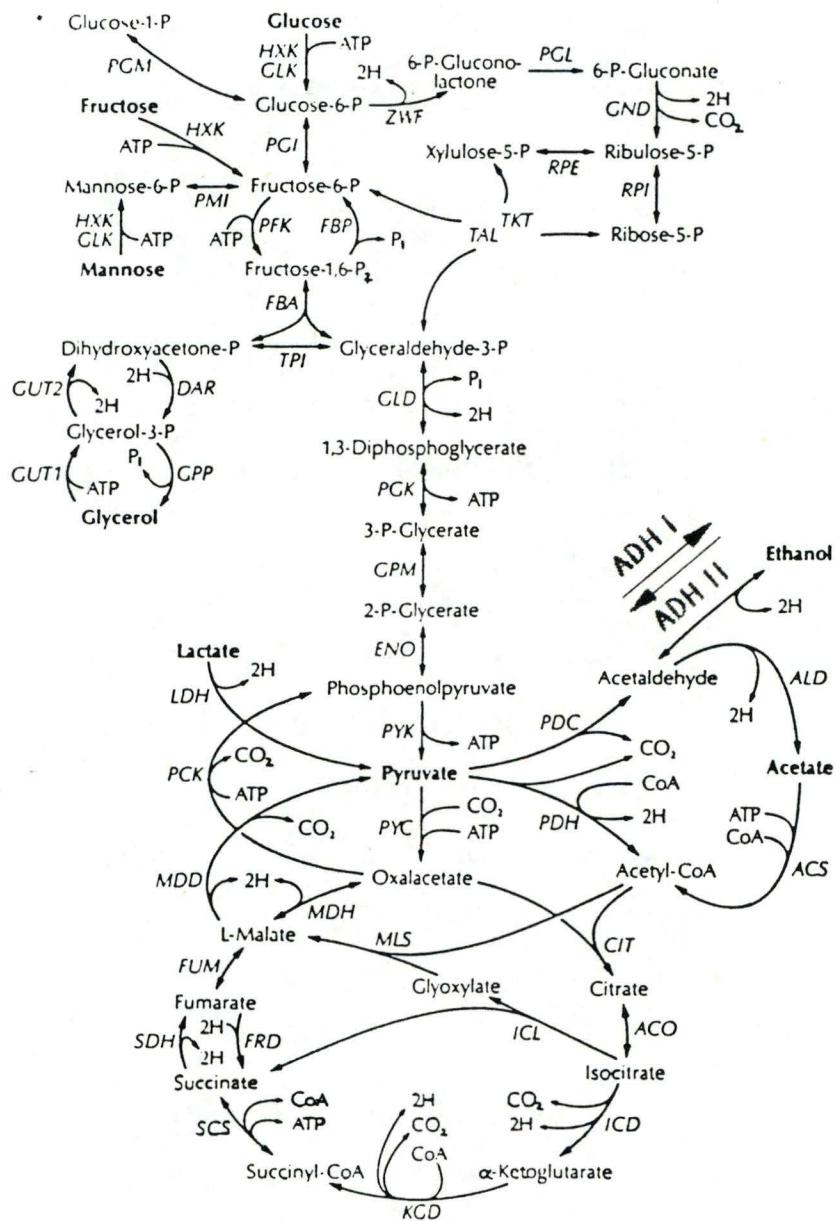


Fig. 1.3 Le rôle physiologique des isozymes ADH I et ADH II chez Saccharomyces cerevisiae.

contrôlant la transcription (synthèse de l'ARN messager) et la traduction (synthèse de la protéine).

C'est dans ce contexte génique que se situe notre travail.

Les comparaisons effectuées entre les alcool déshydrogénases d'organismes différents ont contribué à établir ce que l'on connaît à leur propos. Dans le cadre de ces études, l'alcool déshydrogénase de levure occupe une place particulière. Elle offre une structure suffisamment conservée pour permettre des connexions avec d'autres alcool déshydrogénases et s'en distingue assez pour donner plus d'informations générales, tant structurelles qu'évolutives (3).

Notre propos est d'étudier le gène de l'alcool déshydrogénase I de la levure *Kluyveromyces fragilis*, proche parente de *Saccharomyces cerevisiae* dont le gène correspondant est déjà isolé (4).

En comparant les gènes de l'alcool déshydrogénase I de ces deux levures, on peut s'attendre à mettre en évidence de fines différences de structure, à mettre en rapport avec :

- Leurs tolérances respectives vis-à-vis de leurs conditions d'action (pH, température, ...) et leurs différences d'activité.
- Des différences d'expression, que l'on peut étudier notamment en comparant l'expression des deux gènes chez la même levure ou celle d'un des deux gènes chez les deux levures (l'expression d'un gène chez un organisme dont il n'est pas issu est dite "hétérologue").

1.1. LES ALCOOL DESHYDROGENASES

Les alcool déshydrogénases sont des enzymes que l'on trouve aussi bien au sein du règne animal que du règne végétal.

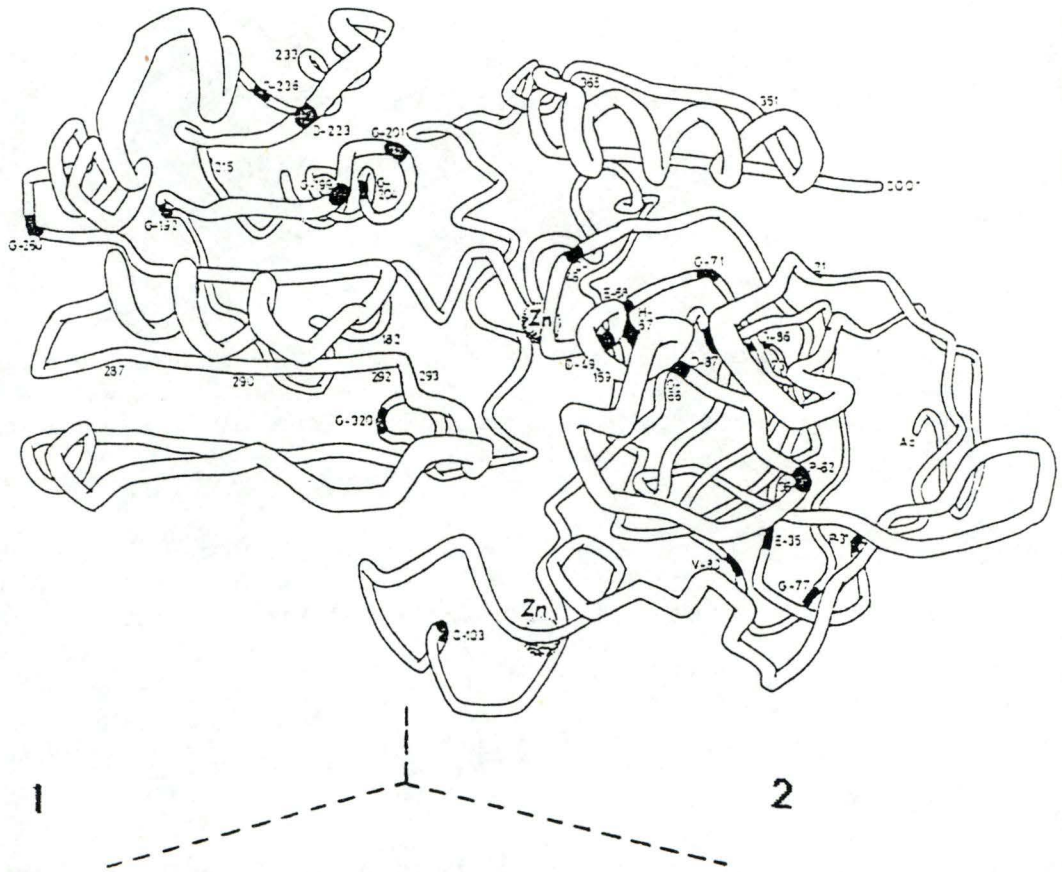


Fig. 1.4 Le domaine de liaison du coenzyme (1) et le domaine catalytique (2) de la sous-unité de l'ADH de foie de cheval.

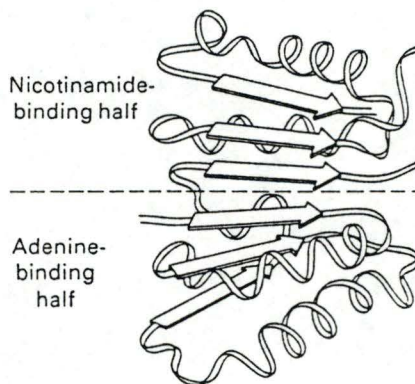


Fig. 1.5 Schéma du domaine de liaison du NAD⁺ des déshydrogénases.

Ces enzymes catalysent l'interconversion des alcools et de leurs produits d'oxydation, les aldéhydes et les cétones, avec oxydation ou réduction concomitante du système NADH / NAD⁺ (fig 1.2.). Le rôle physiologique de l'ADH I de levure (nomenclature de l'U.I.B. E.C. 1.1.1.1) est de catalyser la dernière étape de la fermentation alcoolique : la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol, accompagnée de l'oxydation de son coenzyme, le NADH (fig 1.3).

Les alcool déshydrogénases diffèrent en structure primaire, tant en séquence qu'en taille (379 aa pour la sous-unité de maïs, 374 aa pour celle du cheval et 347 aa pour celle de la levure) (5).

Les alcool déshydrogénases sont formées de sous-unités. Leur structure tertiaire permet d'y distinguer (fig 1.4) :

- Un domaine catalytique, formant une poche accueillant le substrat, et contenant éventuellement un ou deux atomes métalliques. En fonction de la présence ou absence d'atomes métalliques et de leur nature, on peut discerner 3 types d'alcool déshydrogénases : celles à zinc (mammifères et levures, par exemple), celle à fer (la bactérie *Zymomonas mobilis*, et celles sans atome métallique (la drosophile) (5), (6).

Un domaine de fixation du coenzyme, formé d'une alternance d'hélices α et de feuillets β (fig 1.5) (6).

Leur structure quaternaire est de deux types :

- Dimérique pour les ADHs des mammifères et des végétaux.
- Tétramérique pour les ADHs de levure (sauf l'ADH IV de *S. cerevisiae*, dimérique) et des moisissures.

1.1.1. ASPECTS EVOLUTIFS

Une première chose qui frappe lorsque l'on compare les séquences

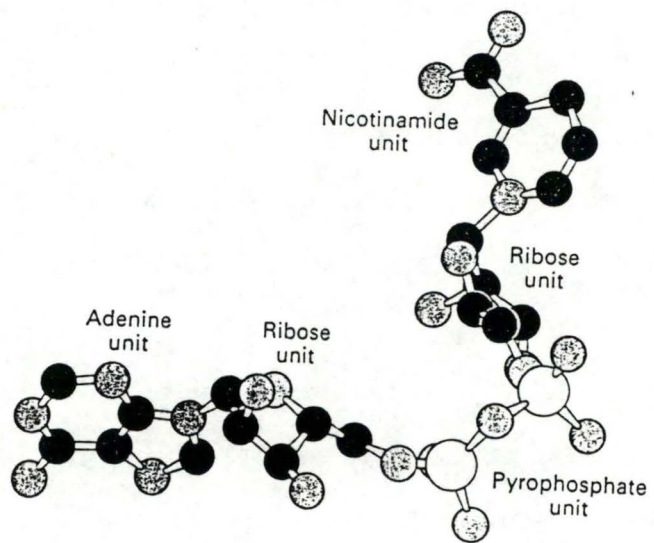


Fig. 1.6 Modèle de la molécule de NAD⁺.

des ADHs, c'est le fait que leurs similitudes (c'est à dire les résidus inchangés et les résidus de même type) sont parmi les plus faibles au sein de la famille des déshydrogénases.

Ces divergences ont été mises en évidence en comparant les ADHs et d'autres déshydrogénases (comme la glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase ou la lactate déshydrogénase) entre elles, et ce au sein des mêmes organismes (7).

1.1.1.1. Ce que nous apprennent les protéines

La structure tertiaire de l'ADH de cheval a été étudiée en cristallographie aux rayons X. Elle permet de distinguer deux parties par sous-unité : un domaine catalytique et un domaine de liaison du coenzyme, formé d'une alternance d'hélices α et de feuilletts β (6). Bien que la structure de chaque domaine soit modulaire (7), cette caractéristique est plus marquée dans le cas du domaine de liaison du coenzyme. Le coenzyme de l'ADH étant un dinucléotide, son site de liaison est un site de liaison de dinucléotide. Il est formé de deux modules de liaison de mononucléotide (fig 1.5 et 1.6).

En ne comparant que les ADHs entre elles, on met en évidence des identités (c'est à dire le pourcentage de résidus conservés) et des similitudes (c'est à dire le pourcentage de résidus conservés et de même type) du même ordre de grandeur pour les deux domaines.

Cependant, en comparant les ADHs à d'autres déshydrogénases, on s'aperçoit que la structure générale et la manière de lier le coenzyme du domaine de liaison du coenzyme restent similaires. Dans les mêmes comparaisons les domaines catalytiques divergent fortement. C'est ce qui a amené à penser que le module de liaison de mononucléotide pourrait bien être une structure extrêmement vieille et évolutivement conservée (3).

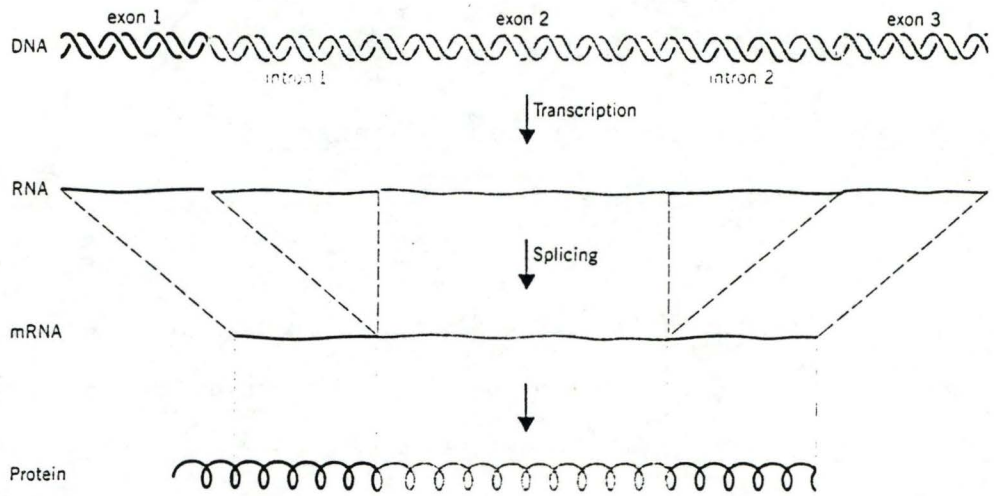


Fig. 1.7 L' excision des introns à partir d' un ARN précurseur aboutit à la formation de l' ARN messager.

Sur base de l'étude des protéines, deux théories cohabitaient concernant l'origine des deux domaines. Certains pensaient que les deux domaines provenaient de deux gènes différents qui avaient fusionné, tandis que d'autres pensaient qu'un gène initial s'était dupliqué, donnant naissance à deux domaines ayant évolué de manière différente (3), (6). Nous allons voir ce que les introns ont pu nous apprendre à ce sujet.

1.1.1.2. Ce que nous apprennent les introns

Les introns sont caractéristiques des gènes d'eucaryotes ; ce sont des séquences d'ADN non codant, bordées par des motifs précis. Ils fragmentent en exons la partie du gène effectivement traduite lors de la synthèse des protéine. L'ARN copié subira une maturation au cours de laquelle les introns seront éliminés et les exons resoudés (fig 1.7) (8).

Avant même la mise en évidence des introns, il avait été suggéré que les enzymes complexes avaient évolué par fusion de gènes codant pour des polypeptides ancestraux. Lors de la découverte des introns, Gilbert a proposé qu'ils pourraient bien constituer les jonctions entre ces polypeptides ancestraux.

Sur base de cette hypothèse, on devrait donc s'attendre à voir le gène de la sous-unité de l'ADH subdivisé par des introns en des parties correspondant au domaine catalytique et au domaine de liaison du coenzyme.

C'est bien ce que révèle le gène de l'ADH de maïs (fig 1.8). Il ne compte pas moins de neuf introns.

De fait, on s'aperçoit que l'intron 4 sépare exactement la partie codant pour le domaine catalytique de celle codant pour le domaine de liaison du coenzyme. L'intron 9 constitue la seconde séparation, qui n'est cependant pas aussi nette :

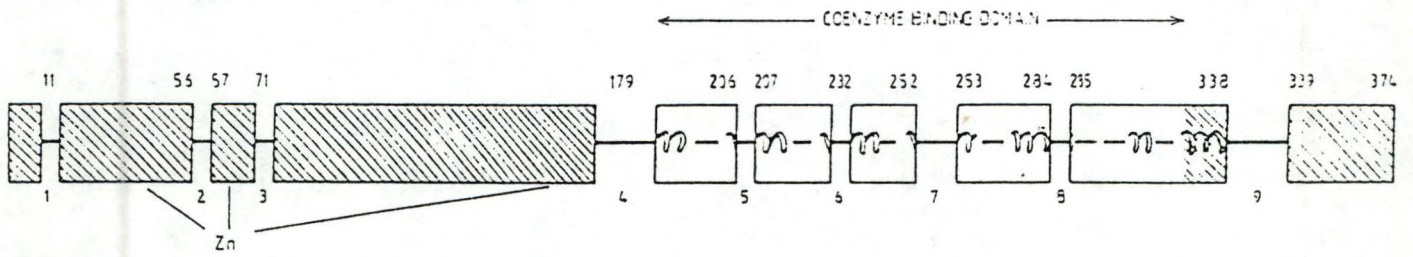


Fig. 1.8 La structure du gène de l' ADH de maïs.

vingt acides aminés constituent dans la protéine une hélice effectuant la jonction entre les deux domaines. On retrouve également le même type de jonction dans le cas de la glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase et de la lactate déshydrogénase.

Examinons maintenant plus précisément le domaine de liaison du coenzyme (fig 1.8). Les premières observations avaient mis en évidence sa nature modulaire, la liaison du coenzyme étant assurée par deux modules de liaison de mononucléotide. Il est remarquable de retrouver cette séparation au niveau du gène de maïs, effectuée de manière précise par l'intron 7. Plus encore, si on examine le premier module de liaison de mononucléotide (fig 1.8), on s'aperçoit qu'il a lui-même une structure modulaire, car formé d'exons (5,6 et 7) ayant une structure semblable : α, β, α . L'examen du second module (exons 8 et 9) permet d'avancer deux hypothèses quant à son origine :

- Il est possible qu'il dérive du premier module, en s'en étant écarté suite à des remaniements.
- Il peut aussi avoir une origine différente du premier, l'hélice α adjacente à l'exon 9 apportant la propriété d'effectuer la jonction avec le domaine catalytique.

Rappelons que cette situation est retrouvée dans le cas d'autres enzymes.

Les hypothèses actuelles vont donc dans le sens d'une origine distincte pour les domaines catalytique et de liaison du coenzyme (9).

Position	Horse	Yeast	Position	Horse	Yeast
11	Ala	Gly	189	Val	Leu
12	Ala	Val	195	Cys	Val
13	Val	Ile	196	Ala	Ala
14	Leu	Phe	197	Val	Ile
21	Phe	Leu	198	Phe	Ser
26	Val	Ile	200	Leu	Ala
36	Val	Leu	203	Val	Leu
38	Ile	Ile	204	Gly	Gly
40	Met	Val	207	Val	Ala
43	Thr	Ser	208	Ile	Val
45	Ile	Val	211	Cys	Ala
52	Val	Ala	219	Ile	Val
59	Thr	Thr	220	Ile	Leu
63	Val	Leu	221	Gly	Gly
64	Ile	Val	222	Val	Ile
65	Ala	Gly	232	Ala	Phe
69	Ala	Gly	237	Ala	Gly
70	Ala	Ala	250	Ile	Val
73	Val	Val	254	Leu	Leu
80	Val	Val	262	Val	Ala
83	Val	Trp	264	Phe	Gly
89	Val	Ala	266	Phe	Ile
90	Ile	Gly	268	Val	Val
91	Pro	Ile	278	Ala	Ser
140	Phe	Tyr	281	Cys	Tyr
143	Thr	Asp	282	Cys	Val
145	Thr	Ser	288	Val	Thr
146	Phe	Phe	290	Val	Val
150	Thr	Ala	292	Val	Val
151	Val	Thr	328	Val	Asp
152	Val	Ala	331	Leu	Glu
157	Val	Ala	332	Val	Ala
160	Ile	Ile	335	Phe	Phe
166	Leu	Leu	336	Met	Phe
169	Val	Val	342	Leu	Leu
171	Leu	Pro	352	Phe	Leu
172	Ile	Val	355	Ile	Leu
173	Gly	Leu	359	Phe	Tyr
176	Phe	Gly	362	Leu	Met
183	Ala	Ala	370	Thr	Tyr
186	Val	Ser	372	Leu	Val
187	Ala	Ala	374	Phe	Thr

Fig. 1.9 Comparaison des résidus du noyau hydrophobe des ADHs de foie de cheval et de levure (la numérotation des résidus est celle de l' ADH de foie de cheval).

1.1.2. ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS

1.1.2.1. Les résidus conservés

En examinant les structures primaires des sous-unités des ADHs, il apparaît que leurs similitudes sont relativement faibles. La structure tertiaire de l'ADH de cheval, déterminée par des études cristallographiques, permet cependant la mise en évidence des résidus ayant une influence prépondérante sur la conformation de ses sous-unités. Nous allons voir que sur base de ces données, on peut prédire que la sous-unité de l'ADH de levure a une structure tertiaire semblable à celle de l'ADH de cheval (6).

- Le noyau hydrophobe : 93 acides aminés le constituent dans la sous-unité de l'ADH de cheval. Les résidus hydrophobes sont d'une importance capitale : l'hydrophobicité du milieu intraprotéique stabilise la structure de la protéine. A ce titre, l'apparition de résidus chargés provoquerait une perturbation qui rendrait un changement de conformation obligatoire.

Sur les 93 résidus trouvés chez le cheval, 90 sont, chez la levure, soit identiques, soit équivalents. Les 3 autres résidus sont chargés négativement, mais, suite à des modifications intéressant d'autres régions, ils se trouvent selon toute vraisemblance en surface chez la levure (fig 1.9) (7).

- Les résidus glycine et cystéine : ils sont particulièrement conservés : à raison respectivement de 45 % et de 75 %. C'est aisément compréhensible quand on connaît l'importance des résidus glycine dans les régions où les contraintes stériques sont plus importantes et celle des résidus cystéine comme ligands des atomes de zinc (3).

Horse liver		Yeast	
26 Val	64 Ile	Ile	Val
14 Leu	52 Val	Phe	Ala
63 Val		Leu	
36 Val	89 Val	Leu	Ala
83 Val	157 Val	Trp	Ala
90 Ile	173 Gly	Gly	Leu
92 Leu	328 Val	Lys	Asp
172 Ile	177 Ser	Val	Ile
181 Gly	210 Gly	Gap	Tyr
189 Val	264 Phe	Leu	Gly
195 Ser		His	
195 Cys	211 Cys	Val	Ala
198 Phe	231 Cys	Ser	Tyr
277 Thr		Ala	
200 Leu	201 Gap	Ala	Ala
205 Leu		Ser	
206 Ser	345 Leu	Leu	Ser
222 Val	250 Ile	Ile	Val
241 Val		Ile	
249 Pro	251 Gln	Ile	Gly
267 Glu	270 Gly	Asn	Val
274 Thr		Ala	
347 Thr	368 Ile	Ile	Gly

Fig. 1.10 Les échanges compensatoires entre les ADHs de foie de cheval et de levure.

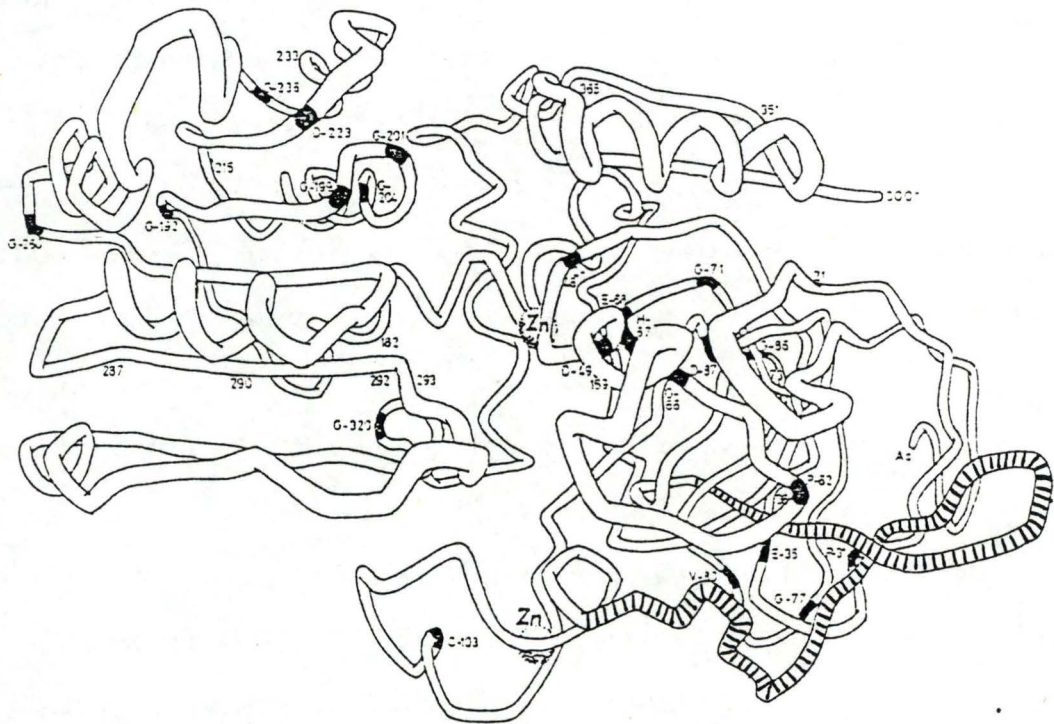


Fig. 1.11 La sous-unité de l'ADH de foie de cheval (en hachuré, le segment de 20 acides aminés qui est délété chez l'ADH de levure.

- Les échanges compensatoires. Des résidus se trouvent en vis-à-vis dans la structure tertiaire. Les échanges compensatoires consistent à ce que, lorsqu'un résidu a été modifié, son partenaire ait subi une modification inverse. Ces modifications peuvent concerner le volume ou la charge des résidus.

Des échanges compensatoires sont trouvés à au moins 16 endroits dans la structure tertiaire (fig 1.10) (7).

Ces exemples, et ceux trouvés dans le cas d'autres enzymes que l'ADH, amènent à penser qu'il faut plus raisonner en termes de conservation d'une propriété qu'en termes de conservation de résidus particuliers (1).

1.1.2.2. Les ions métalliques

- Chez le cheval : on sait que le domaine catalytique de la sous-unité de l'ADH de foie de cheval contient deux atomes de zinc. Par des modifications chimiques sélectives agissant sur les ligands de ces atomes, on a déterminé qu'un des deux atomes jouait un rôle important dans la catalyse. Ses ligands sont les résidus cys-46, his-67 et cys-174. Le second atome de zinc, dont les ligands sont cys-97, cys-100, cys-103 et cys-111, est situé plus en périphérie et à proximité d'une boucle pointant vers l'extérieur (fig 1.11 et 1.12) (6). Il s'est d'abord vu attribuer un rôle structural mais on est revenu sur cette hypothèse, et sa fonction demeure inconnue (7).

- Chez la levure : les ligands des atomes de zinc sont retrouvés identiques. Les résidus cystéine que l'on trouve parmi eux sont les seuls qui soient communs aux ADHs de cheval et de levure (3). Toutefois, une partie de la boucle qui entourait le second

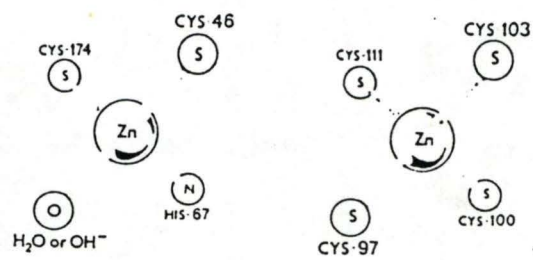


Fig. 1.12 Les ligands des atomes de zinc de la sous-unité de l'ADH de foie de cheval.

atome de zinc chez le cheval est déléetée chez la levure (fig 1.12). Cela aurait pour conséquence de rendre le noyau hydrophobe de la sous-unité de l'ADH de levure partiellement accessible au solvant et d'affecter la liaison du second atome de zinc (7).

Les données concernant le contenu en zinc de la sous-unité de l'ADH de levure sont contradictoires. Certains ont mesuré un contenu d'un atome par sous-unité (6), tandis que d'autres ont mesuré un contenu de deux atomes par sous-unité (10).

On peut donc retenir de ce qui vient d'être énoncé que :

- L'atome de zinc impliqué dans le mécanisme catalytique chez l'ADH de cheval est retrouvé chez l'ADH de levure.
- L'atome de zinc dont la fonction est inconnue est selon certaines mesures conservé et selon d'autres pas. Cette ambiguïté est peut-être le reflet d'une liaison moins forte de cet atome (3), bien que ses ligands soient, comme dans le cas de l'autre atome, intégralement conservés.

1.1.2.3. La poche de liaison du substrat

Les résultats obtenus concernant l'oxydation des alcools aliphatiques montrent que, exception faite du méthanol, les alcools sont des substrats d'autant meilleurs pour l'ADH de levure que la longueur de leur chaîne carbonée diminue. De plus, les alcools primaires sont de meilleurs substrats que les alcools secondaires (6).

En comparant ces résultats à ceux obtenus pour l'ADH de cheval, on remarque que cette dernière a un spectre d'activité plus large que celui de l'ADH de levure. Une des différences

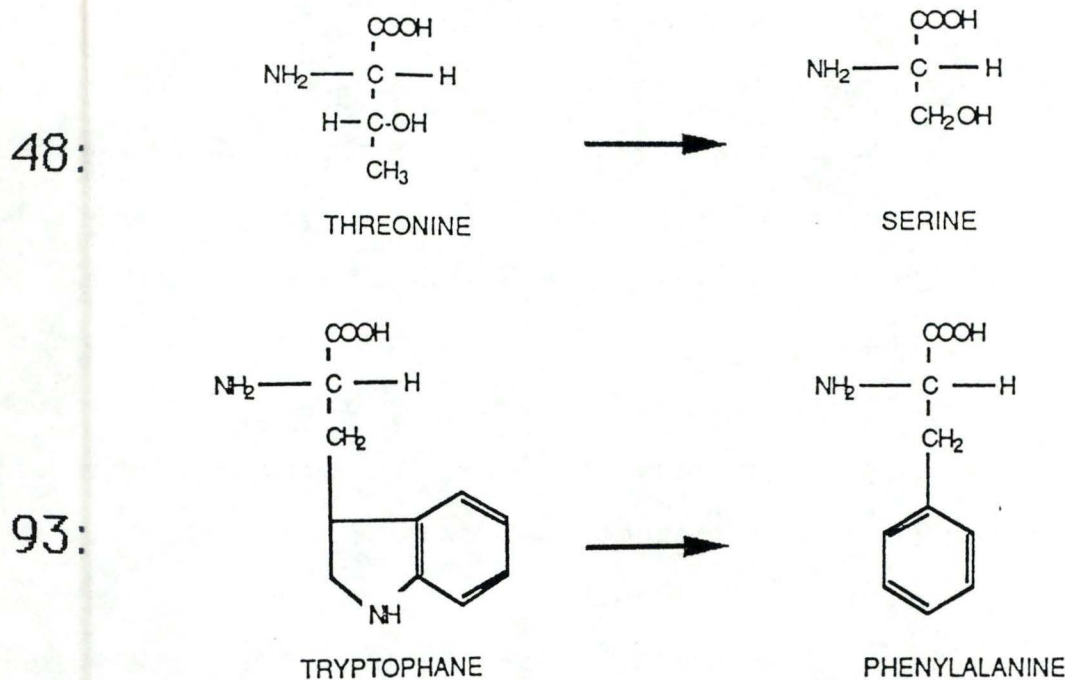


Fig. 1.13 Les acides aminés changés par mutagenèse dirigée en position 48 et 93 dans l'ADH I de *Saccharomyces cerevisiae*.

Substrate	ADH-I V_{\max}	ADH-M1 V_{\max}	ADH-M1/ADH-I	ADH-I K_m ($M \times 10^{-3}$)	ADH-M1 K_m ($M \times 10^{-3}$)
Ethanol	7.01	7.01	1.00	1.3	1.3
n-Propanol	3.8	4.78	1.23	2.0	2.1
n-Butanol	1.25	1.88	1.50	1.7	1.8
n-Pentanol	0.525	0.83	1.67	1.9	2.0
n-Hexanol	0.14	0.45	3.21	0.21	0.25
n-Heptanol	0.15	0.553	3.68	0.33	0.34
n-Octanol	0.041	0.254	6.19	0.73	1.12
Cinnamyl alcohol	1.13	1.95	1.65	0.9	0.92

Fig. 1.14 Comparaison des paramètres cinétiques de l'ADH I de *S. cerevisiae* et de l'ADH I modifiée par mutagenèse dirigée (ADH-M1).

les plus intéressantes à ce sujet est que le cyclohexanol est un substrat pour l'ADH de cheval, mais n'en est pas un pour l'ADH de levure (6).

Lors d'études comparatives concernant la structure et la cinétique enzymatique des ADHs de levure et de cheval, il fut avancé que la présence d'une poche à substrat plus encombrée chez la levure pouvait contribuer à établir son spectre d'activité plus étroit. Deux résidus furent plus précisément incriminés : les résidus trp 93 et thr 48 (6).

On a par la suite changé, par mutagenèse dirigée, ces acides aminés pour les substituer par d'autres dont les chaînes latérales sont plus petites. Le tryptophane fut remplacé par la phénylalanine, tandis que la thréonine fut remplacée par la sérine (fig 1.13).

L'enzyme modifié a montré une vitesse de réaction plus grande que celle de l'enzyme d'origine vis-à-vis du bon nombre d'alcools (fig 1.14). Son activité était également deux fois plus grande, bien qu'elle reste faible, vis-à-vis des alcool branchés que sont l'isopropanol et l'isobutanol. Notons toutefois son affinité de substrat était légèrement plus faible que celle de l'enzyme non modifiée (2).

1.1.2.4. La structure quaternaire

Une différence importante entre les ADHs de foie de mammifères et celles des levures, c'est que les premières sont dimériques alors que les dernières sont tétramériques (6), l'ADH IV de *Saccharomyces cerevisiae* mise à part (13).

En examinant les structures primaires des ADHs de cheval et de levure, on remarque en surface des différences qui, à la

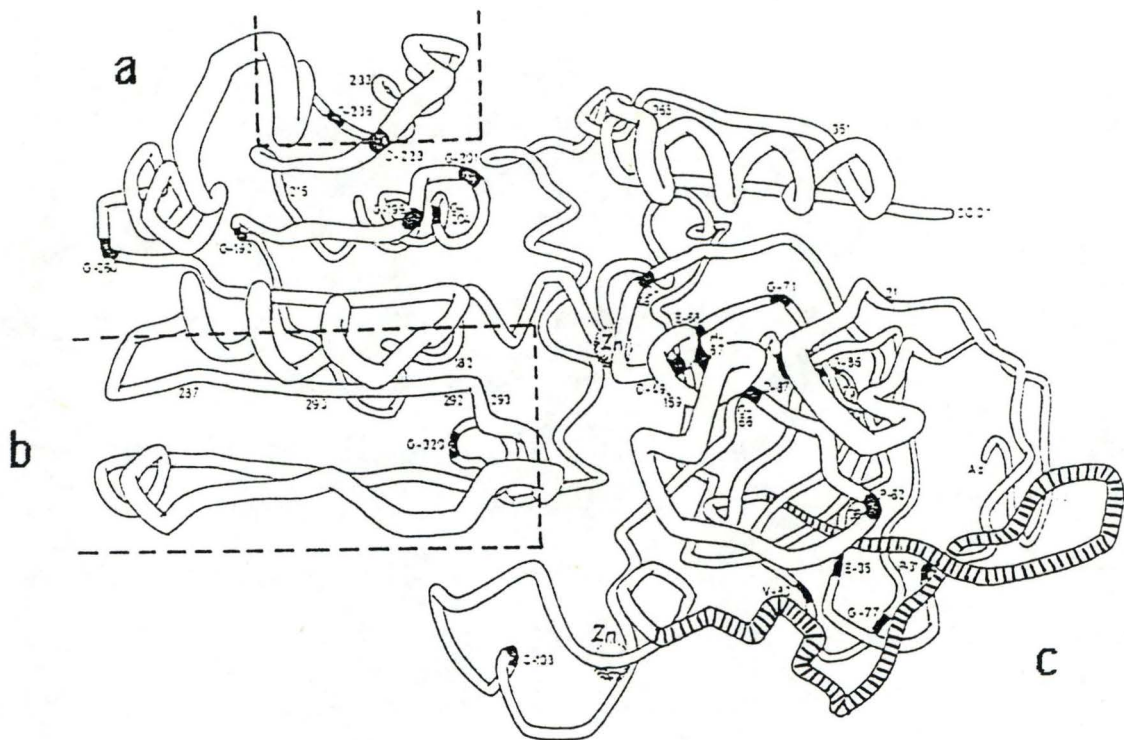


Fig. 1.15 les trois zones où des changements intervenant en surface entre l'ADH de cheval et celle de levure pourraient contribuer à établir leur différence de structure quaternaire.

- a. apparition d'un "patch" négatif.
- b. identité plus faible dans une moitié du domaine de liaison du coenzyme.
- c. boucle déléetée chez la levure.

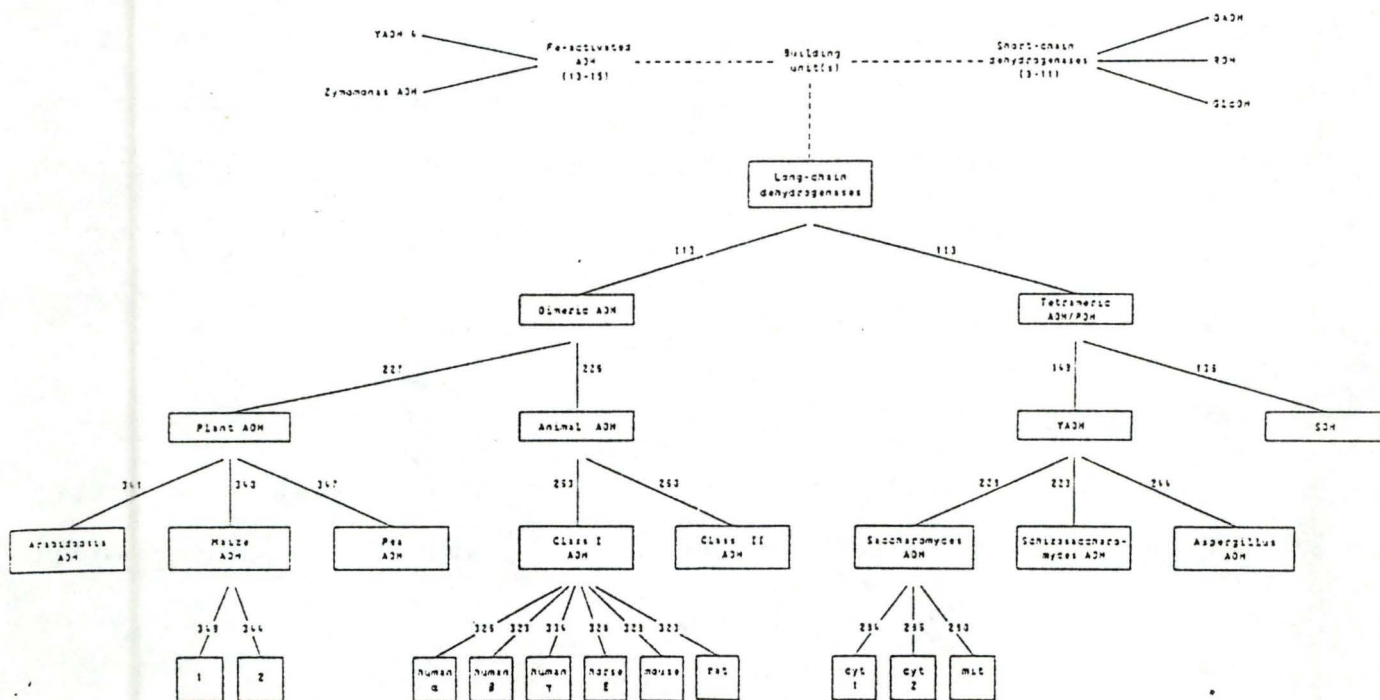


Fig. 1.16 Relations proposées entre les ADHs jusqu'ici identifiées.

lueur de la structure tertiaire de l'ADH de cheval, pourraient refléter cet état de fait (7) :

- D'une manière générale, il n'y a pas davantage de résidus chargés à la surface de la sous-unité d'ADH de levure que dans le cas de l'ADH de cheval.

Une région fait cependant exception : les résidus 226, 229, 230, 242, 246, et 248 ont tous été changés en acide glutamique ou aspartique chez la levure. Si la structure tridimensionnelle trouvée chez la levure est semblable à celle trouvée chez le cheval, cela devrait provoquer l'apparition d'une zone fortement négative en surface (fig 1.15 a) (7).

- En examinant les similitudes des deux moitiés du domaine de liaison du coenzyme, il s'avère que la composition en acides aminés de l'une d'elles varie plus entre l'ADH de levure et celle de cheval. Il se fait que c'est justement celle dont on sait qu'elle est à l'origine de la principale interaction entre sous-unités chez l'ADH de cheval (fig 1.15 b) (3), (7).

- Un segment de 21 acides aminés (les résidus 123 à 143) est délété chez la levure. Il correspond à une boucle pointant vers l'extérieur chez l'ADH de cheval (fig 1.15 c) (3), (7).

1.1.2.5. Les relations évolutives entre alcool déshydrogénases

Des parentés ont été proposées entre les alcools déshydrogénase jusqu'ici caractérisées. Elles l'ont été sur base des similitudes de leurs structures primaires, et en tenant compte de leur structure quaternaire et de leur contenu métallique (fig 1.16) (5). Un module ancestral est proposé comme étant à l'origine des différentes alcool déshydrogénases.

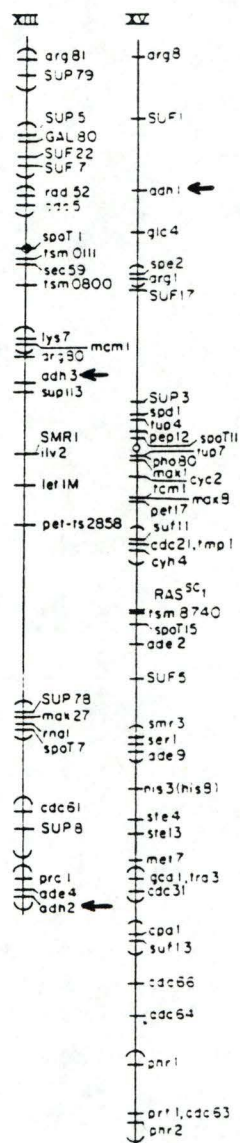


Fig. 1.17 La localisation chromosomique des gènes *ADH 1*, *ADH 2* et *ADH 3* de *Saccharomyces cerevisiae*.

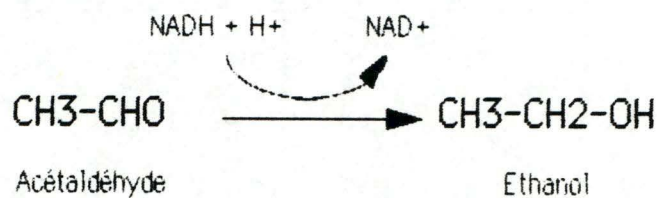


Fig. 1.18 Le rôle physiologique de l' *ADH I* chez la levure.

Notons toutefois que contrairement à ce qui est avancé, l'isozyme ADH IV de *Saccharomyces cerevisiae* (notée YADH 4) ne contient pas du fer mais du zinc comme les autres isozymes de cette levure. Cette observation et la forte similitude de cette enzyme avec l'ADH de la bactérie *Zymomonas mobilis* devrait donc lui faire occuper une position intermédiaire (12).

1.1.3. LES GENES DE L'ADH CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède quatre isozymes de l'alcool déshydrogénase, dont trois sont cytoplasmiques et une est mitochondriale. Ces quatre formes enzymatiques sont codées par quatre gènes structuraux différents ; celui de l'ADH I est situé sur le bras gauche du chromosome XV, et ceux de l'ADH II et de l'ADH III se trouvent sur le bras droit du chromosome XIII (fig 1.17). Le gène de l'ADH IV, bien que cloné, n'a pas encore été localisé.

N.B. : Conventionnellement, les gènes sont numérotés par des chiffres arabes afin de les distinguer de leur produits, affectés de chiffres romains.

1.1.3.1. Le gène de l'ADH I

Le rôle physiologique de l'ADH I est de catalyser l'étape finale de la fermentation alcoolique (fig 1.18) (12).

L'enzyme ADH I a d'abord été considérée comme étant produite constitutivement (4). Toutefois, des études ont depuis montré que sa synthèse diminue fortement quand les levures passent du glucose à l'éthanol comme source de carbone (13).

Le gène *ADH 1* (anciennement *ADC 1* sera décrit plus précisément car c'est celui qui nous intéresse dans le cadre de ce travail (fig 1.19).

- Séquences en amont de la région codante

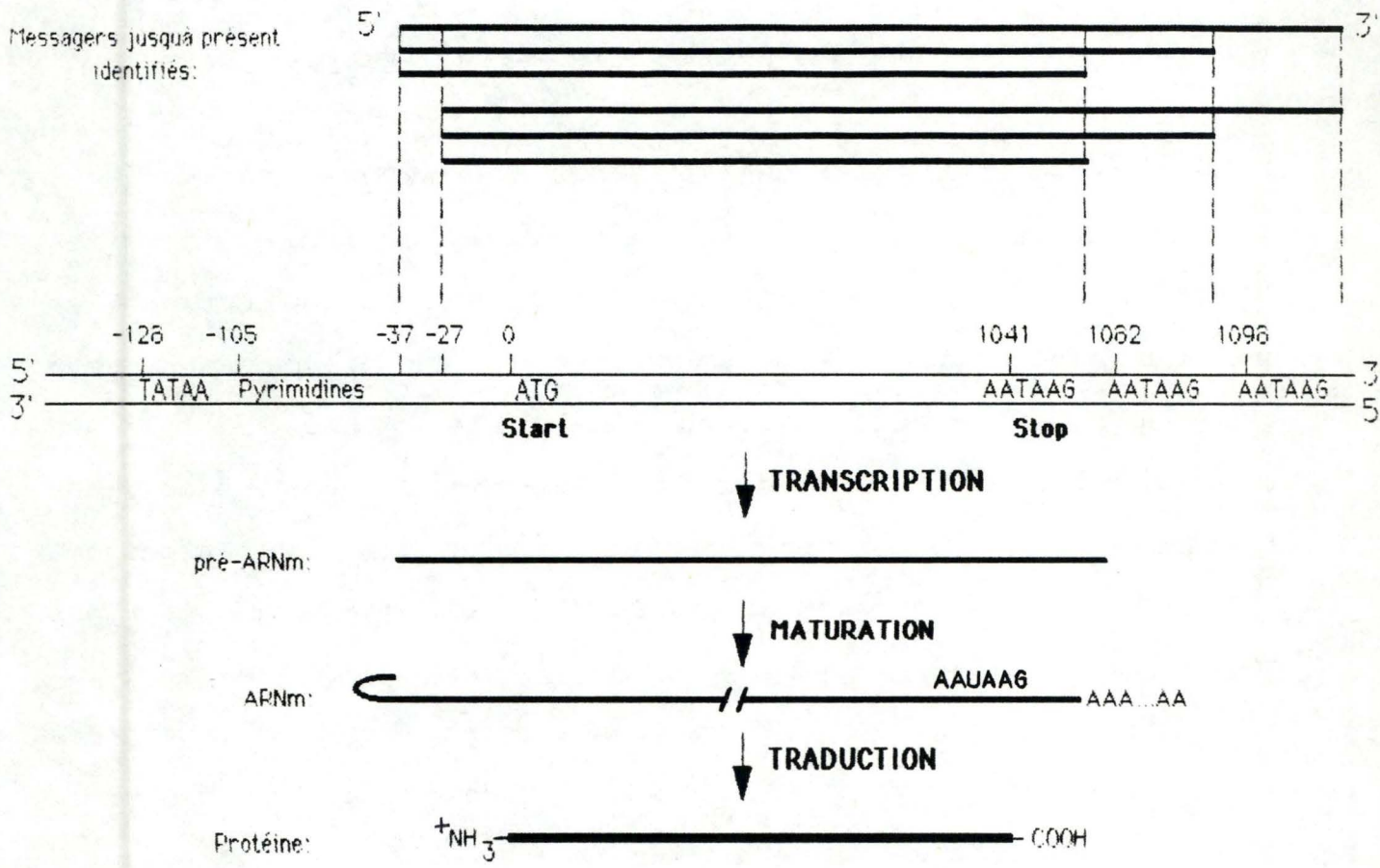


Fig. 1.19 La structure du gène *ADH 1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Des quatre isozymes de l'ADH que possède la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'ADH I est la plus représentée : 1 % et plus des protéines cellulaires quand le glucose est la source de carbone de son milieu de culture. Le promoteur (séquence initiant la transcription) que l'on trouve en amont de la région codante du gène est un promoteur fort.

On y observe la séquence TATAAA, appelée TATA box ou Hogness box, caractéristiques des promoteurs de la RNA polymérase II des eucaryotes. Cette séquence est située, comme c'est le cas chez toutes les levures, à une distance plus grande du point de départ de la transcription que chez les eucaryotes supérieurs (13), (14).

Entre la TATA box et le point de départ de la transcription, on trouve une séquence de 56 nucléotides riche en bases pyrimidiques (60 % de T et 27 % de C) (13). Ce type de séquence, appelée CT-block est caractéristique d'un haut niveau de transcription chez la levure (14).

Le point de départ de transcription est variable : il en existe au moins deux (13) (fig 1.19).

- Région codante

Elle est longue de 1041 nucléotides et ne contient pas d'introns (14).

- Séquences en aval de la région codante

L'étude des extrémités 3' des ARN messagers du gène ADH 1 a montré qu'une vaste majorité (90 %) d'entre eux se terminaient approximativement 83 nucléotides en aval de la région codante. On s'est aperçu que pour chacune des 3 extrémités possibles, une séquence AATAAG se trouvait entre 28 et 34 nucléotides en

amont de l'extrémité 3' du messenger. Suite à des comparaisons, on a émis l'hypothèse que ces séquences pourraient être impliquées dans les processus de terminaison de la transcription et de polyadénylation.

La prédominance de la forme la plus longue de l'ARN messenger serait dans ce cas due au fait que les enzymes impliquées dans sa maturation remontent le long de celui-ci dans le sens 3'5'. Selon ce mécanisme, la première séquence AATAAG rencontrée serait celle située le plus en aval de la région codante (13) (fig 1.19).

Cette hypothèse, qui date de quelques années, n'a été ni confirmée ni infirmée depuis.

1.1.3.2. Le gène de l'ADH II

Le gène *ADH 2* (anciennement *ADR 2*), qui code pour l'enzyme ADH II, est cataboliquement régulé. Sa transcription est réprimée quand les levures utilisent les sucres fermentescibles, dont le glucose, comme source principale de carbone. Elle est dérèprimée d'un facteur d'au moins 200 en l'absence de glucose. Sa régulation est assurée par des facteurs protéiques interagissant avec le promoteur du gène qui, sans eux, est sous forme inactive.

Parmi les gènes codant pour des facteurs dérèprimant *ADH 2*, on trouve *CCR 1*, *CCR2*, *CCR3* et *CCR 4* qui ne sont pas spécifiques et agissent sur d'autres gènes réprimés par le glucose. Le gène *ADR 1*, quant à lui, assure la production d'une protéine dérèprimant de manière spécifique *ADH 2* (15).

Le rôle physiologique de l'ADH II est d'oxyder l'éthanol, produit par la fermentation, en acétaldéhyde qui peut être métabolisé

via le cycle de Krebs ou servir d'intermédiaire dans la gluconéogenèse (16).

ADH II ne diffère d'ADH I que par 22 acides aminés des 347 résidus que comptent leurs sous-unités, soit une identité entre les deux enzymes de 94 % (17).

1.1.3.3. Le gène de l'ADH III

L'isozyme ADH III est associée à la mitochondrie, et plus précisément localisée dans sa membrane interne (18). ADH III montre une identité d'environ 80 % avec ADH I et ADH II (16).

Le gène *ADH 3* est nucléaire : ADH III est produite dans le cytoplasme et sa translocation dans la mitochondrie est assurée par un peptide de transit, situé dans sa portion N-terminale, qui est ensuite excisé (18).

Le rôle métabolique d'ADH III est inconnu. On sait en tout cas qu'elle ne fonctionne pas, ou pas assez, dans des conditions de fermentation : les levures ne possédant que l'ADH III ne peuvent pas survivre sans respiration. Un rôle dans le métabolisme respiratoire a été suggéré, qui serait en accord avec la localisation mitochondriale de l'enzyme. Il est toutefois à noter que les mutants ne possédant pas l'ADH III ne présentent aucun phénotype qui permette de les distinguer de levures normales. Ils ont le même taux de croissance et produisent des spores viables. ADH III n'est donc pas essentiel à la levure (16).

1.1.3.4. Le gène de l'ADH IV

ADH IV est à bien des égards à distinguer des 3 autres isozymes de l'ADH chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Son activité n'est pas détectable chez une levure normale.

Elle fut mise en évidence suite à l'insertion d'un élément transposable dans la région promotrice du gène *ADH 4* (19).

En comparant la séquence d'ADH IV à celle des isozymes ADH I, ADH II et ADH III, on ne trouve pas d'identité significative. Chez ADH IV, certaines des positions des résidus structurellement ou fonctionnellement importants qui sont conservés entre l'ADH de cheval et l'ADH I de levure sont différentes (parmi elles, positions des cystéines, ligands des atomes de zinc). Plus encore, des études ont montré qu'ADH IV est un dimère, contrairement aux autres ADHs de *S. cerevisiae* qui sont des tétramères (19).

ADH IV présente une forte identité avec l'ADH d'une bactérie appelée *Zymomonas mobilis* et sa spécificité de substrat est semblable.

Elle s'en distingue toutefois par l'ion métallique qu'elle contient : il s'agit de zinc alors que celui de *Z. mobilis* est du fer (11).

Comme dans le cas de l'ADH III, aucune fonction physiologique n'a pu être attribuée à ADH IV qui est une enzyme cytoplasmique. On sait toutefois que, une fois surexprimée, elle permet à des mutants ne possédant pas les autres isozymes de l'ADH de survivre en fermentant le glucose, assurant là le rôle de l'ADH I. A l'inverse, le phénotype des mutants ne possédant pas l'ADH IV ne les rend pas discernables des levures normales, indiquant que l'enzyme n'est pas nécessaire à la survie de la levure (19).

1.2. LA LEVURE *Kluyveromyces fragilis*

Le gène étudié dans le cadre de ce travail est celui de l'ADH I de *Kluyveromyces fragilis*.

Cette levure, proche parente de *Saccharomyces cerevisiae*, présente des caractéristiques physiologiques qui rendent son étude intéressante.

A priori, le monde des levures peut paraître homogène. La biologie moléculaire a en ce sens largement contribué à sa caractérisation.

C'est ainsi que *Kluyveromyces fragilis* faisait au départ partie du genre *Saccharomyces*. Les connaissances acquises à son sujet ont par la suite motivé son rattachement au genre *Kluyveromyces*. *Kluyveromyces fragilis* diverge par exemple de *Saccharomyces cerevisiae* par son nombre de chromosomes : 5 à 7 selon les estimations contre 16 à 17 chez *S. cerevisiae*, et ce pour une taille de génome semblable d'environ 14.000 Kb (20).

Des études systématiques récentes ont encore modifié sa dénomination et *K. Fragilis* est aujourd'hui devenue *Kluyveromyces marxianus*, variété "marxianus" (20). Son ancienne dénomination a été conservée dans ce travail car elle est certainement plus présente à l'esprit de chacun ; d'autre part le genre *Kluyveromyces* est encore sujet à des remaniements systématiques.

Parmi les caractéristiques physiologiques qui distinguent *Kluyveromyces fragilis* de *Saccharomyces cerevisiae*, on peut notamment citer :

- Son bagage enzymatique

Il lui permet de croître sur une large gamme de substrats. *K. fragilis* possède une enzyme appelée "inulinase", qui lui permet de libérer du fructose à partir de l'inuline, un polyfructane d'origine végétale (21).

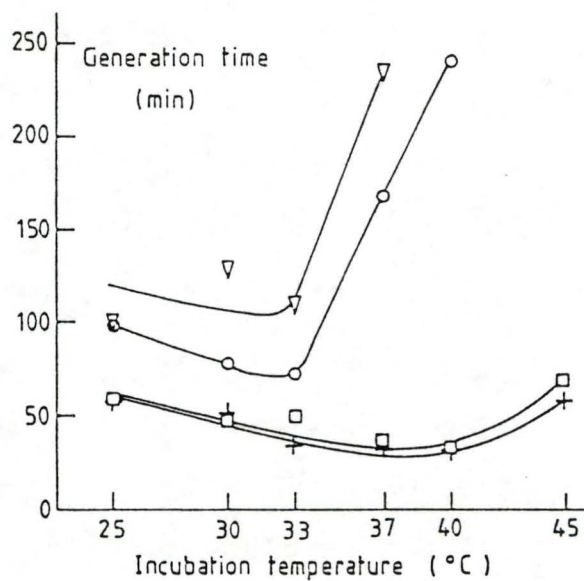


Fig. 1.20 Comparaison des temps de génération en fonction de la température des variétés "lactis" (▽, o; anciennement *K. lactis*) et "marxianus" (□, +; anciennement *K. fragilis*) de *Kluyveromyces marxianus*.

La lactase est également synthétisée par *K. fragilis*. Cette enzyme lui permet de scinder de lactose en glucose et galactose (22).

- Sa tolérance vis-à-vis de la température

L'optimum de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, et des levures en général, est obtenu pour des températures avoisinant 30°C. *K. fragilis* se distingue des autres levures, puisque sa croissance est optimale pour une température se situant entre 37°C et 42°C.

Les écarts à la température optimale affectent en général la croissance des levures de façon marquée surtout vers les températures élevées. Dans le cas de *K. fragilis*, on voit que si la croissance est affectée, elle l'est cependant dans une proportion bien moindre (fig 1.20) (23).

La seule levure qui soit à ce jour utilisée couramment comme hôte pour le clonage de gènes est *Saccharomyces cerevisiae*. Des systèmes de clonage ont cependant été développés récemment pour les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Kluyveromyces lactis*.

Les particularités avantageuses de *Kluyveromyces fragilis*, dont sa vitesse de croissance, la plus grande jamais enregistrée chez une levure, ont été à la base du développement de systèmes de clonage chez cette levure (24).

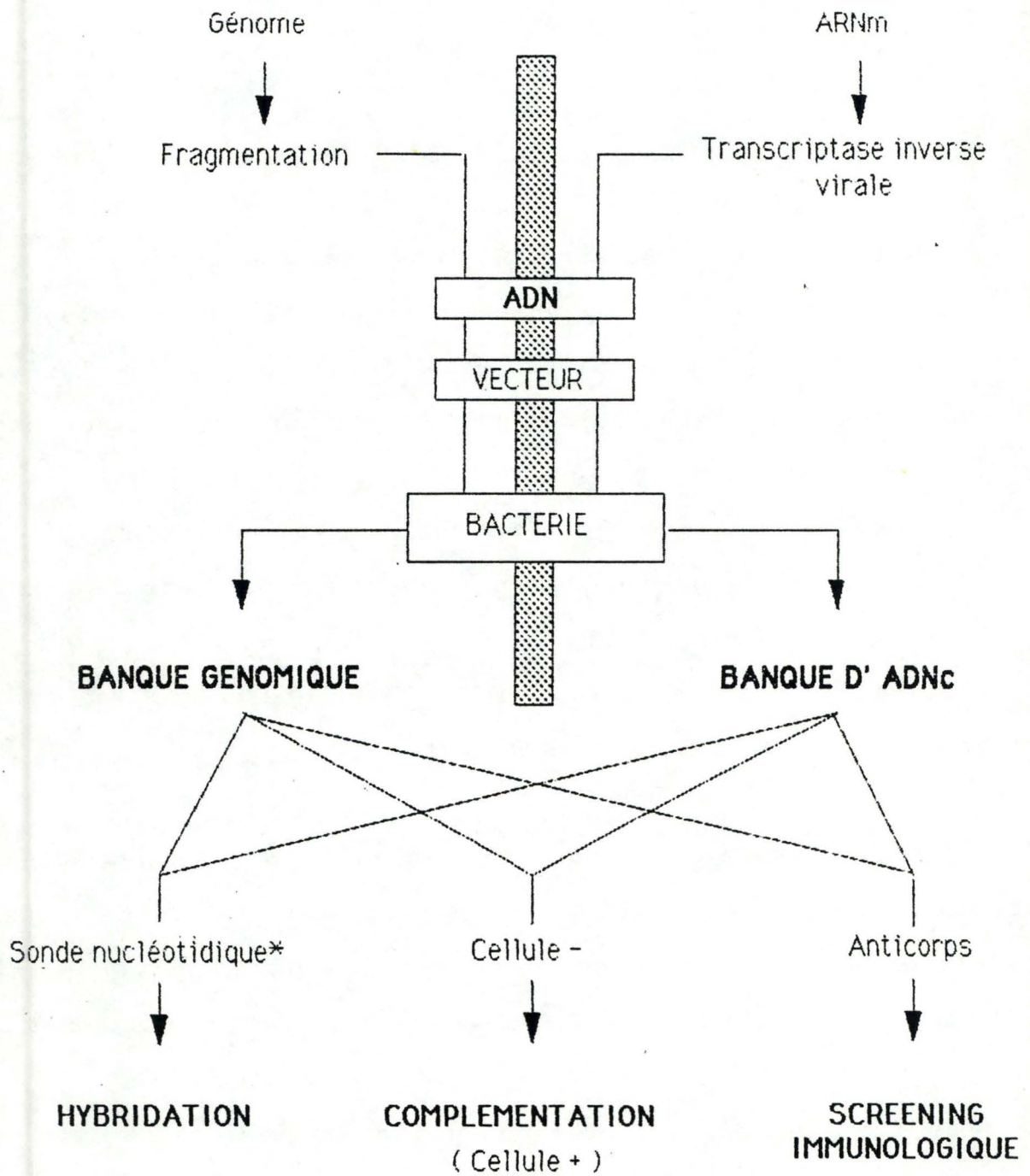


Fig. 1.21 Les différentes stratégies de clonage possibles.
 (voir le texte pour les détails)

1.3. LES STRATEGIES DE CLONAGE CHEZ LA LEVURE

Une fois le gène choisi, il faut l'isoler du génome de l'organisme qui le contient. Dans le cas présent, il s'agit d'isoler un fragment de 1 à 2 Kb, taille moyenne d'un gène de levure, d'un génome d'environ 14.000 Kb.

1.3.1. QU'EST CE QUE LE CLONAGE ?

Un fragment d'ADN est inséré dans une molécule (la plupart du temps circulaire) d'ADN appelée plasmide, produisant une molécule recombinante.

Une fois dans le plasmide, l'insert est manipulable. L'étape suivante consiste à faire pénétrer la molécule recombinante, par un procédé appelé transformation, dans la cellule hôte où elle sera répliquée.

Suite à un grand nombre de divisions, au cours desquelles le plasmide est transmis à la descendance de l'hôte, une colonie ou clone apparaît. La colonie est formée de cellules hôtes identiques ; l'insert qu'elles contiennent est alors dit "cloné". Il est à noter que le concept de clonage s'applique tant au niveau moléculaire qu'au niveau cellulaire ou même organismique. Le clonage aboutit à la formation d'une population de molécules d'ADN, de cellules ou d'organismes identiques (25).

L'étape suivante consiste alors à isoler les clones contenant l'insert que l'on recherche. Cela peut se faire selon différentes stratégies présentées en figure 1.21.

1.3.2. LE CLONAGE PAR COMPLEMENTATION (fig 1.22)

Il s'agit ici de sélectionner le bon clone sur base de l'apparition d'un phénotype absent chez les cellules hôtes.

Ce type de clonage passe par les étapes suivantes :

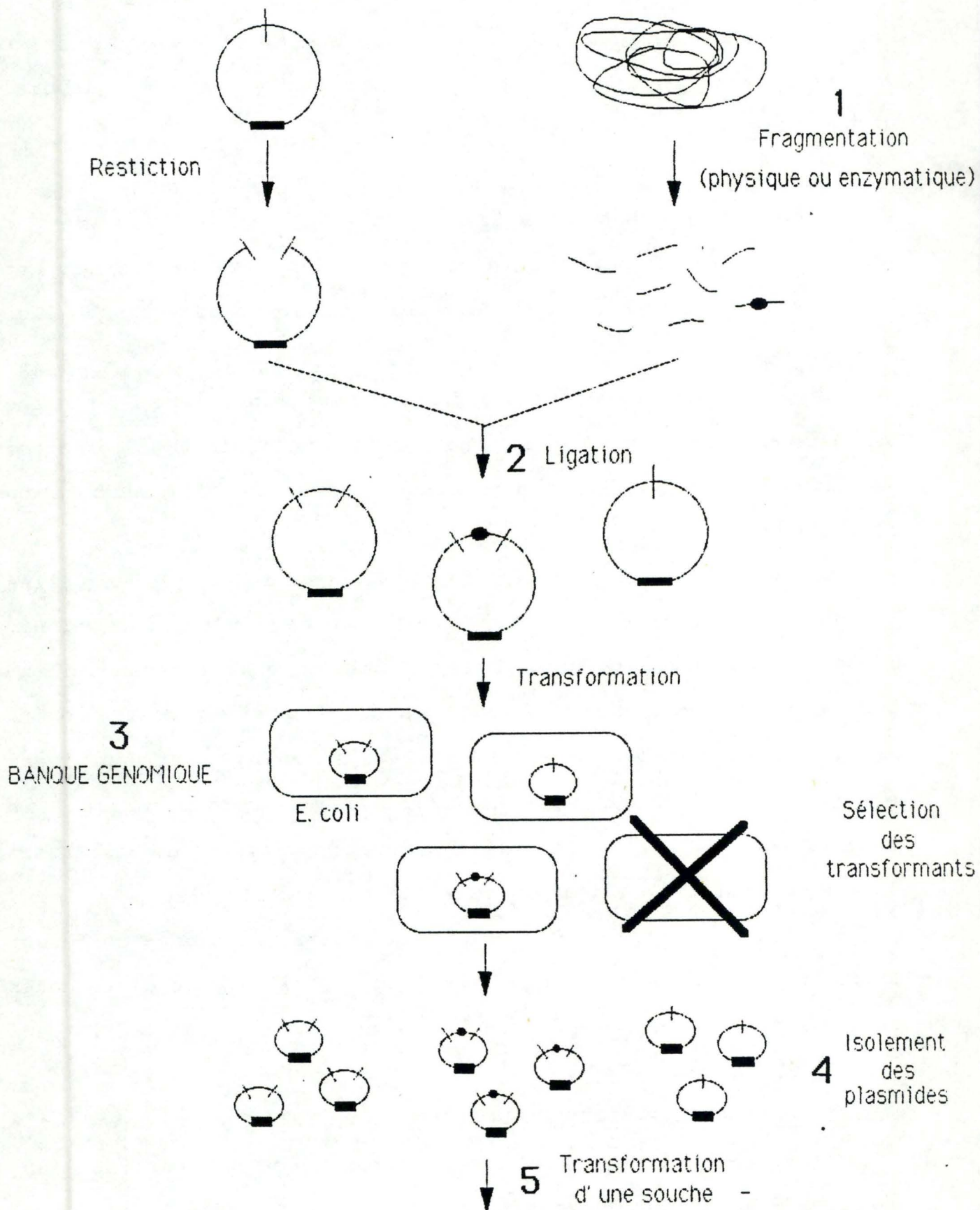


Fig. 1.22 Le clonage par complémentation chez la levure.
(voir le texte pour les détails)

1.3.2.1. La réalisation d'une banque génomique

Le clonage par complémentation se réalise dans la pratique au départ d'une banque génomique. L'étape préliminaire à la réalisation de ce type de banque est l'isolement du génome de l'organisme. Il est ensuite fragmenté ; il peut l'être notamment sous l'action d'une enzyme de restriction. Les enzymes de restriction sont isolées au départ de microorganismes et coupent l'ADN à des sites qui leur sont spécifiques (fig 1.22,1).

La fragmentation est effectuée en tenant compte du fait que les fragments générés doivent être assez grands pour contenir un gène entier. Les fragments sont ensuite sélectionnés en fonction de leur taille (sur un gradient, par exemple). On choisit habituellement ceux de taille supérieure à 5 Kb. Ils sont alors insérés par ligation dans un plasmide préalablement restreint (fig 1.22,2).

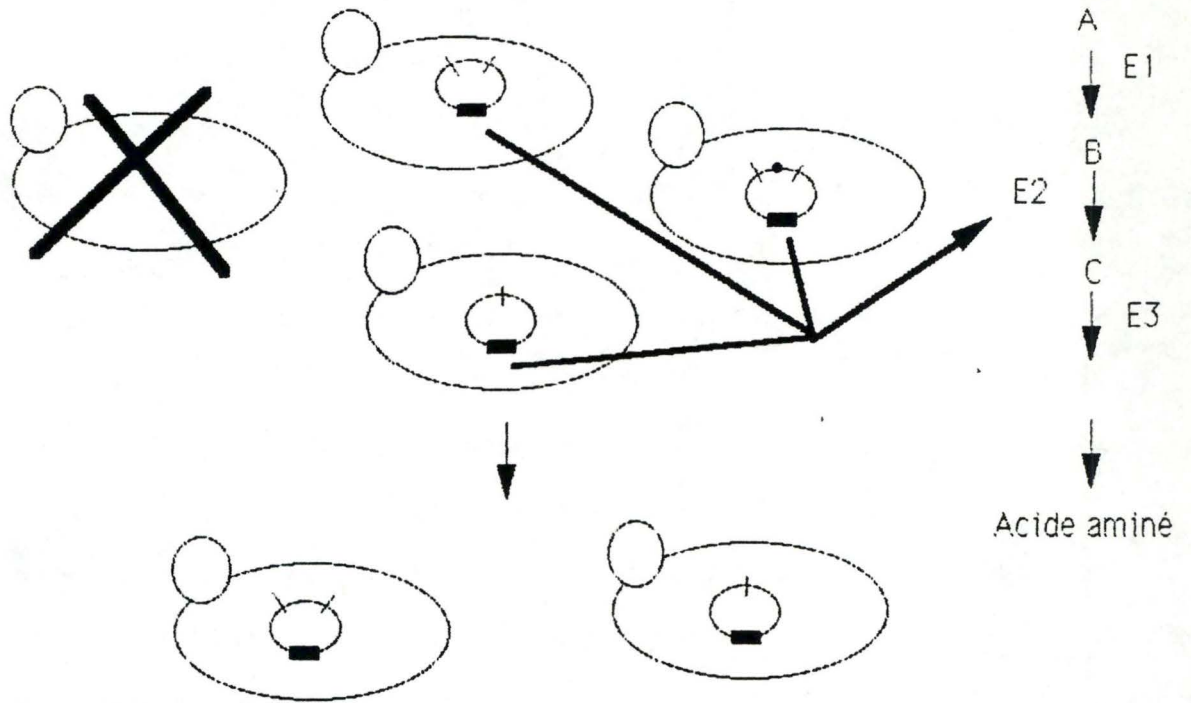
La collection de molécules d'ADN recombinantes résultant de cette opération sert à la transformation de bactéries. Une première sélection s'opère ici, qui ne permet la survie que des bactéries contenant effectivement un plasmide. Elles forment une collection de clones qui constitue une banque génomique (fig 1.22,3).

Après amplification, les molécules d'ADN recombinantes seront extraites des bactéries. Elles serviront à la transformation de l'hôte que l'on a choisi pour le clonage (26) (fig 1.22,4 et 5).

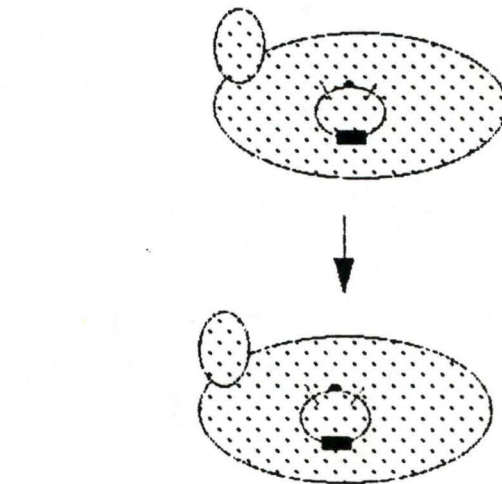
1.3.2.2. La sélection des hôtes transformés

Avant de rechercher le phénotype désiré, une première étape consiste à sélectionner les hôtes transformés. Chez les bactéries,

6
Sélection
des
transformants



7
Screening
des
transformants



8 :LE BON CLONE
(souche +)

Fig. 1.22 Le clonage par complémentation chez la levure.
(voir le texte pour les détails)

cette sélection s'opère sur base d'une capacité de résistance à un antibiotique apportée par le plasmide. Chez les levures, le principe est le plus souvent différent. Les levures choisies comme hôte possèdent en général une auxotrophie, c'est à dire un blocage de la voie de synthèse d'un acide aminé par l'absence de l'activité d'une enzyme y intervenant. Le plasmide apporte à l'hôte le gène codant pour l'enzyme manquante. La sélection s'opère donc en fonction de la restauration d'une prototrophie (25) (fig 1.22,6).

Par exemple, l'hôte peut présenter l'auxotrophie *leu 2*: la voie de synthèse de la leucine est chez lui bloquée par l'absence de l'enzyme codée par le gène *LEU 2*. Un plasmide contenant le gène *LEU 2* restaurera chez l'hôte la capacité de synthétiser la leucine. Il pourra dans ce cas survivre sur un milieu ne contenant pas cet acide aminé, chose qu'il ne saurait faire sans la présence du plasmide.

1.3.2.3. Le "screening" des transformants

Une fois sélectionnés, les transformants sont placés dans des conditions où la présence du gène recherché se traduit par l'apparition d'un phénotype aisément détectable (25) (fig 1.22,7 et 8).

Le clonage par complémentation est une voie royale, préférée aux autres méthodes quand il est réalisable. Il assure, puisque la sélection est opérée en fonction d'un phénotype, que l'insert sélectionné contient, à l'état fonctionnel, le gène que l'on recherche. Il est basé sur un critère physiologique alors que les autres stratégies sont basées sur des critères physiques.

1.4. L'OBJECTIF DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail est le clonage du gène de l'ADH I de la levure *Kluyveromyces fragilis*. La stratégie adoptée est le clonage par complémentation qui consiste à observer la restauration d'un phénotype ADH I+ dans une souche dépourvue de l'activité correspondante.

Disposant d'un mutant ADH nul de *Saccharomyces cerevisiae* (c'est à dire ne possédant pas de gènes ADH 1,2 et 3 fonctionnels) et d'une banque génomique de *Kluyveromyces fragilis* sauvage, nous tenterons la complémentation "hétérologue" du mutant par le gène ADH 1 de *K. fragilis*.

Deux pistes seront explorées en parallèle :

- Un essai de complémentation directe, sur base de la nature du fragment génomique de *K. fragilis*, où le seul critère de sélection est le phénotype ADH I+.

- Une complémentation "classique" passant par deux phases : la sélection des transformants sur base d'un marqueur d'auxotrophie, suivie de l'identification de ceux qui présentent le phénotype ADH I+.

La réussite du clonage du gène ADH I complet nous mettra en mesure d'étudier sur une base moléculaire la relation existant entre la structure du gène et - son mécanisme d'expression

- les caractéristiques de l'enzyme ADH I de *Kluyveromyces fragilis*.

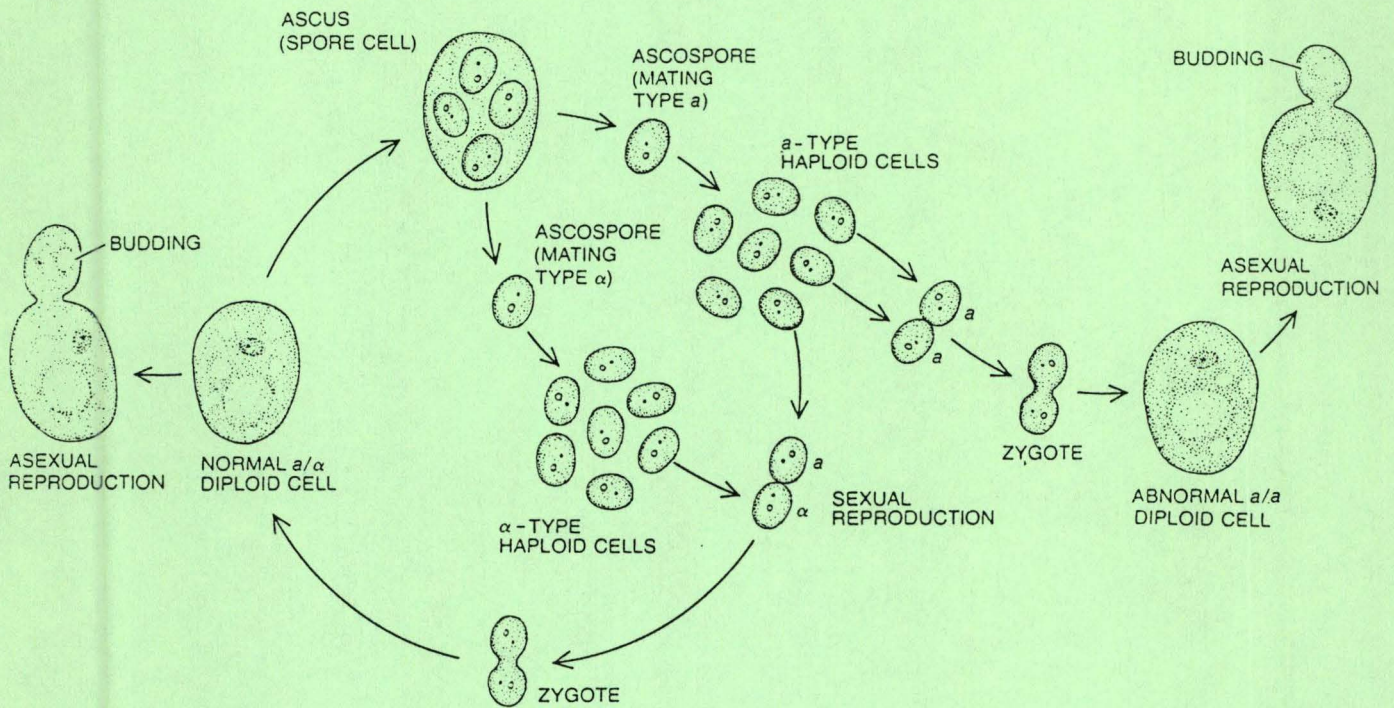


Fig 2.1 Le cycle de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. LES SOUCHES UTILISEES

2.1.1. SOUCHES DE LEVURES

2.1.1.1. La souche 302.21 de *Saccharomyces cerevisiae* (4)

Elle provient du croisement des souches SF-1C-M3 et H 293-4-2 de *Saccharomyces cerevisiae*. Son génotype est le suivant :
Mat α , *trp* 1, *his* 4, *adc* 1, *adr* 2, *adm*.

Mat α : Les levures sont capables de se reproduire de façon asexuée (par bourgeonnement ou fission) ou de façon sexuée (par fusion d'une ascospore α avec une ascospore a). *Mat* α , pour "mating type α ", signifie que la souche 302.21 produit des ascospores α (fig 2.1) (22).

trp 1, *his* 4 : Il s'agit de mutations affectant des voies de synthèse d'acides aminés (auxotrophies). En ce qui concerne le tryptophane, la voie est bloquée par l'absence de l'enzyme codée par le gène *TRP 1*, tandis que la voie de synthèse de l'histidine est bloquée par l'absence de l'enzyme codée par le gène *HIS 4*. Il est à noter que la numérotation ne correspond pas à l'ordre d'intervention des enzymes.

adc 1, *adr* 2, *adm* : La souche ne possède pas de gènes fonctionnels codant pour les isozymes ADH I (codée par *ADR 1*, anciennement *ADC 1*), ADH II (codée par *ADH 2*, anciennement *ADR 2*) et ADH III (codée par *ADH 3*, anciennement *ADM*).

2.1.1.2. La souche GRF 18 de *Saccharomyces cerevisiae*

Cette souche possède les auxotrophies *his 3* et *leu 2*.

2.1.1.3. La souche FL 100 de *Saccharomyces cerevisiae*

Il s'agit d'une souche ne possédant aucune auxotrophie.

2.1.1.4. La souche ATCC 12424 de *Kluyveromyces fragilis*

Il s'agit d'une souche sauvage, c'est à dire ne possédant aucun gène muté.

2.1.2. SOUCHE DE BACTERIE

2.1.2.1. La souche XLI blue d'*Escherichia coli*

La souche XLI blue, développée par la société Stratagène, contient un épisome F'.

Son génotype est le suivant : rec A- (*rec A1*, *lac-*, *end A1*, *gyr A96*, *thi*, *hsd R17*, *sup E44*, *rel A1*, F' pro AB, *lac IQ*, *lac Z M15*, Tn 10).

De ces caractéristiques, on peut retenir qu'elle est résistante à la tétracycline et qu'elle possède une mutation permettant la sélection des clones recombinants par un test bleu/blanc.

2.2. LES PLASMIDES

Un plasmide est une molécule d'ADN extrachromosomique le plus souvent circulaire. On peut y distinguer :

1. Une séquence initiant sa répllication dans la cellule hôte, si le plasmide n'est pas intégratif (voir plus loin).
2. Des sites de restriction permettant d'y insérer un fragment d'ADN à cloner.

3. Un ou plusieurs gènes permettant de sélectionner les cellules qu'il a transformées.

Cette sélection se fait :

- Chez la bactérie par une résistance à un ou deux (selon le plasmide) antibiotique(s) qu'il confère à son hôte.

- Chez la levure, le plus souvent, sur base de la restauration d'une prototrophie : le plasmide apporte à son hôte auxotrophe le gène qui est inactif chez lui. Seules les levures transformées pourront croître sur un milieu ne contenant pas l'acide aminé correspondant à l'auxotrophie de la souche à laquelle elles appartiennent.

2.2.1. LES PLASMIDES CHEZ LA LEVURE

Les plasmides employés chez la levure sont des "navettes". Cela signifie qu'ils comportent des séquences propres à initier leur réplication aussi bien chez la bactérie *E. coli* que chez la levure *S. cerevisiae*, à l'exception des plasmides intégratifs qui ne possèdent pas d'origine de réplication chez la levure.

Ils permettent donc, au cours d'un processus de clonage, de passer de la bactérie à la levure et vice versa. Cette ambivalence est nécessaire : la levure est un organisme à croissance plus lente et de manipulation moins aisée que la bactérie. On réalisera donc chez cette dernière la plupart des étapes aboutissant au clonage d'un gène chez la levure.

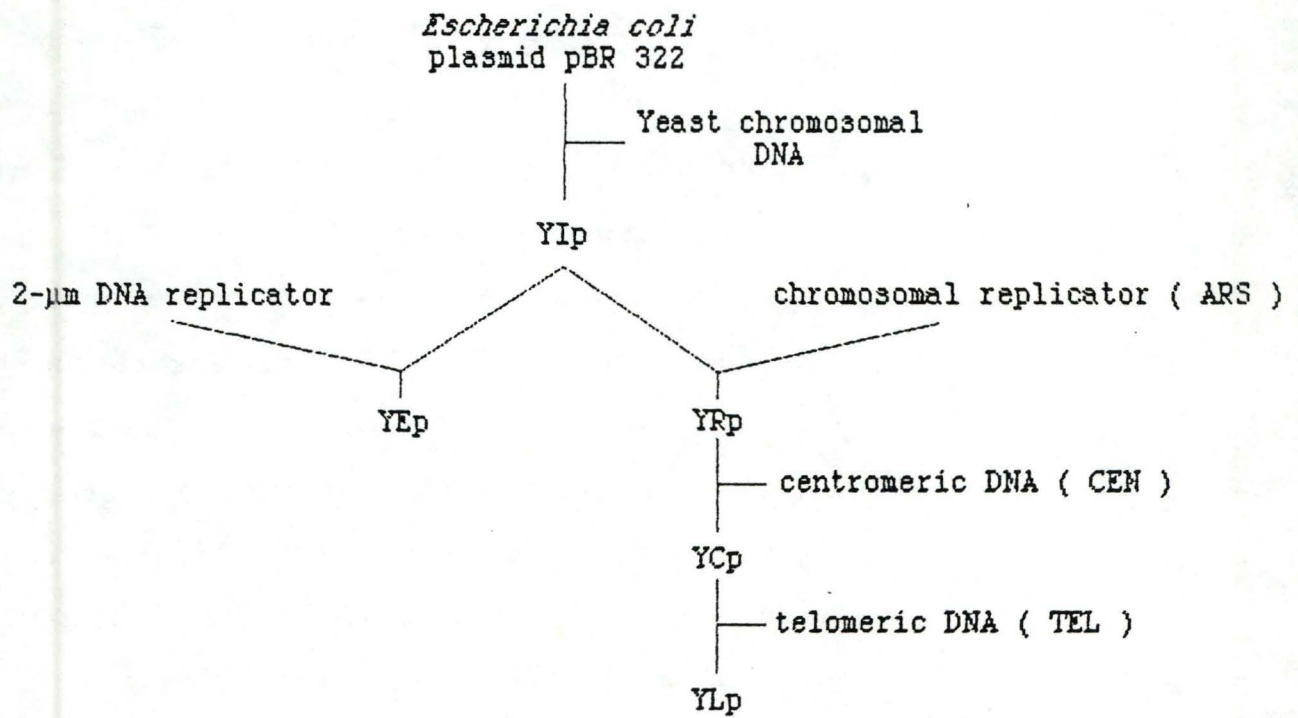


Fig. 2.2 "Généalogie" des plasmides chez la levure.

Les plasmides employés dans ce travail appartiennent à la famille de ceux qui complètent une auxotrophie chez la levure.

Les plasmides de ce type comportent :

- Une partie bactérienne dérivant du plasmide pBR 322 (origine de répllication et gène de résistance à l'ampiciline et éventuellement gène de résistance à la tétracycline).

- Une partie levurienne en fonction de laquelle on peut distinguer (fig 2.2) :

1) Les plasmides intégratifs (YIp ; yeast integrating plasmids) chez lesquels on trouve un gène de *S. cerevisiae* destiné à compléter une auxotrophie et un fragment de son génome destiné à l'intégration du plasmide. Ne contenant pas d'origine de répllication chez la levure, ces plasmides ne peuvent en effet se maintenir de façon autonome chez leur hôte ; ils pourront toutefois s'intégrer dans un ou plusieurs de ses chromosomes par recombinaison homologue.

2) Les plasmides épisomiques (YEp ; yeast episomic plasmids), contiennent en plus d'un marqueur d'auxotrophie certaines séquences d'un plasmide naturel appelé "2 μ ". Ce plasmide 2 μ , trouvé chez la levure, contient essentiellement des séquences assurant sa maintenance, parmi lesquelles une origine de répllication.

Les séquences extraites du plasmide 2 ^h apportent aux plasmides épisomiques à la fois une origine de répllication et des gènes de régulation responsables de leur stabilité et de leur faible nombre de copies.

3) Les plasmides répllicatifs (YRp ; yeast replicating plasmids). La répllication de ces plasmides est initiée par une séquence d'origine chromosomique appelée ARS (autonomously replicating sequence). Ici, l'absence de séquences régulatrices confère à ces plasmides l'avantage d'être présents en un grand nombre de copies et le désavantage d'être instables.

4) Les plasmides centromériques (YCp ; yeast centromeric plasmids). En plus des séquences trouvées chez un vecteur répllicatif, ils possèdent une séquence centromérique appelée "CEN". Cette séquence assure au plasmide un mode de ségrégation chromosomique, basé sur son interaction avec le fuseau mitotique. A ce titre, ils sont présents en une seule copie par génome haploïde, avec une stabilité proche, bien qu'inférieure, de celle des chromosomes.

5) Les plasmides linéaires (YLp ; yeast linear plasmids). Ce sont des "chromosomes artificiels" : en plus des séquences caractérisant

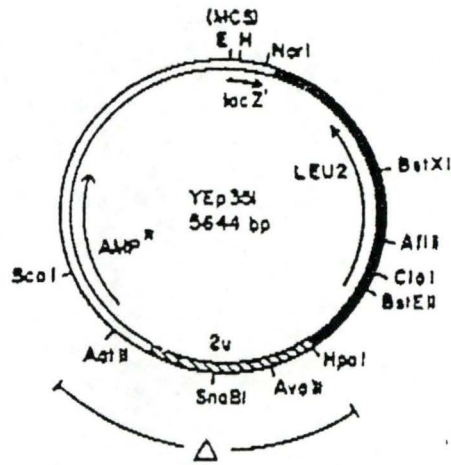


Fig 2.3 Carte du plasmide YEp 351.

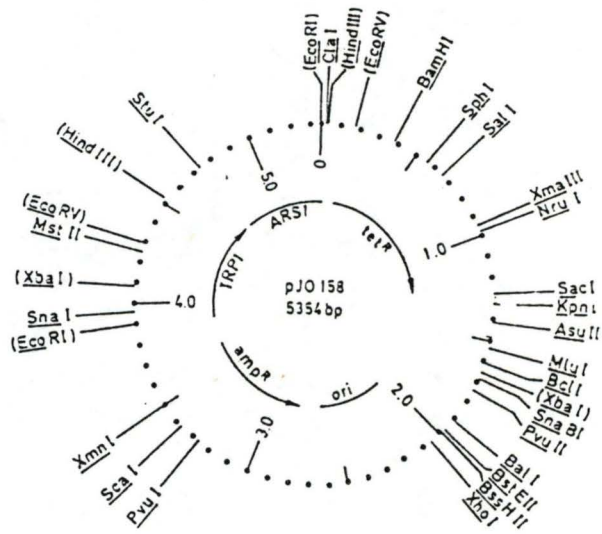


Fig 2.4 Carte du plasmide pJO 158.

les plasmides centromériques, ils possèdent à chacune de leurs extrémités une séquence télomérique (les télomères constituent les extrémités des chromosomes des eucaryotes). De grande taille (jusqu'à environ 50 Kb), leur stabilité et leur nombre de copie dépend largement de la distance séparant les séquences télomériques de la séquence CEN (27).

2.2.2. LES PLASMIDES UTILISES

2.2.2.1. Le plasmides YEp 351 (fig 2.3.)

Il s'agit d'un plasmide épisomique d'une taille de 5644 bp.

Pour sa partie bactérienne, il dérive du plasmide pUC 18 qui confère la résistance à l'ampiciline et possède une origine de répllication (ORI) chez *E. coli*.

Chez la levure, il complémente l'auxotrophie *leu 2* et sa répllication est assurée par des séquences dérivant du plasmide 2^h.

2.2.2.2. Le plasmide pJO 158 (fig 2.4.) (28)

Ce plasmide répllicatif a une taille de 5354 bp.

Sa partie bactérienne dérive du plasmide pJRD 158, apportant une origine de répllication chez *E. coli* et la résistance à l'ampiciline et à la tétracycline.

Il complémente chez la levure l'auxotrophie *trp 1* et sa répllication y est assurée par la séquence ARS 1.

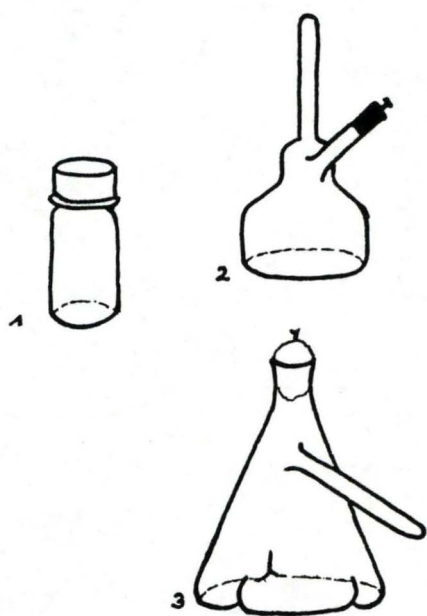


Fig. 2.5 Récipients utilisés pour la culture en milieu liquide de levures et de bactéries: 1. "Universel", 2. Fiole de Wiame, 3. Erlenmeyer.

2.3. CULTURES ET MILIEUX UTILISES

Tous les milieux et les récipients utilisés sont stérilisés avant usage, par passage à l'autoclave (20 minutes à 120°C).

Les bactéries et les levures peuvent être cultivées en milieu liquide ou sur milieu solide, à une température de 37°C pour les bactéries et de 30°C pour les levures.

2.3.1. CULTURES LIQUIDES

Elles sont réalisées dans des récipients agités par rotation. Par ordre de capacité croissante, on distingue les "universels" (jusqu'à 10 ml), les fioles de Wiame (jusqu'à +/- 50 ml) et les erlenmeyer (jusqu'à 2 litres). Ces deux derniers récipients permettent, grâce à une émergence cylindrique, de suivre l'avancement de la culture par mesure de sa densité optique (fig 2.5).

2.3.2. CULTURES SOLIDES

Elles sont réalisées dans des boîtes de Petri. Une fois le milieu gélifié, les boîtes sont séchées 20 minutes dans une hotte à flux laminaire.

2.3.3. MILIEUX DE CULTURE

Les compositions données le sont pour des milieux de culture liquides. Dans le cas de cultures solides, il faut leur adjoindre 2 % d'agar bactériologique comme gélifiant.

2.3.3.1. Milieux pour bactéries

- Milieu riche LB

composition : 1 % de bactotryptone

0,5 % de yeast extract

1 % de Na Cl

Si l'on désire sélectionner des bactéries transformées, on lui adjoindra l'antibiotique correspondant au gène de résistance apporté par le plasmide employé.

Solutions stock d'antibiotiques (29) :

- Ampiciline : dissoudre 50 mg/ml d'eau distillée. Ensuite filtrer (\emptyset pores : 0,22 m) et conserver à -20°C .

- Tétracycline : dissoudre 10,5 mg/ml d'éthanol 50 %. Ensuite filtrer (\emptyset pores : 0,22 m) et conserver à -20°C à l'abri de la lumière.

On ajoutera l'ampiciline à raison d'1 ml de solution stock par litre de milieu de culture, pour atteindre une concentration finale de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu.

La tétracycline sera également ajoutée à raison de 1 ml de solution stock par litre de milieu de culture, atteignant une concentration finale de 10,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu.

Les antibiotiques sont ajoutés au milieu autoclavé une fois que sa température est tombée à 50°C .

2.3.3.2. Milieux pour levures

- Milieu riche YPD

Composition : 2 % de glucose

1 % de yeast extract

2 % de peptone de caséine

Le pH du milieu est porté, avant passage à l'autoclave, à 4,8 par adjonction d'HCl 37 %.

- Milieu riche à l'alcool allylique

Composition : 2 % de glucose

1 % de yeast extract

2 % de peptone de caséine

1 % d'alcool allylique

Son pH est porté à 4,8. L'alcool allylique est ajouté au milieu autoclavé une fois que sa température est tombée à 50°C.

- Milieu riche pour l'expression d'ADH 1 (YPD/ADH 1)

Composition : 5 % de glucose

1 % de yeast extract

2 % de peptone de caséine

0,4 μ g/ml d'antimycine A

Solution stock d'antimycine A :

Dissoudre 1 mg d'antimycine/ml d'éthanol absolu. Conserver à température ambiante, à l'abri de la lumière. Eviter tout contact.

	pour 200 ml
Arginine	6,3 mg
Acide aspartique	20 mg
Histidine	4,2 mg
Isoleucine	3,9 mg
Leucine	7,9 mg
Lysine	7,3 mg
Méthionine	4,5 mg
Phénylalanine	9,9 mg
Tyrosine	3,6 mg
Valine	12,9 mg
Tryptophane	6,1 mg
Thréonine	15,8 mg

Fig. 2.6 Les acides aminés rajoutés à la composition de base du milieu MAM pour permettre la croissance de levures auxotrophes (n'autoclaver ni le thyptophane ni la thréonine).

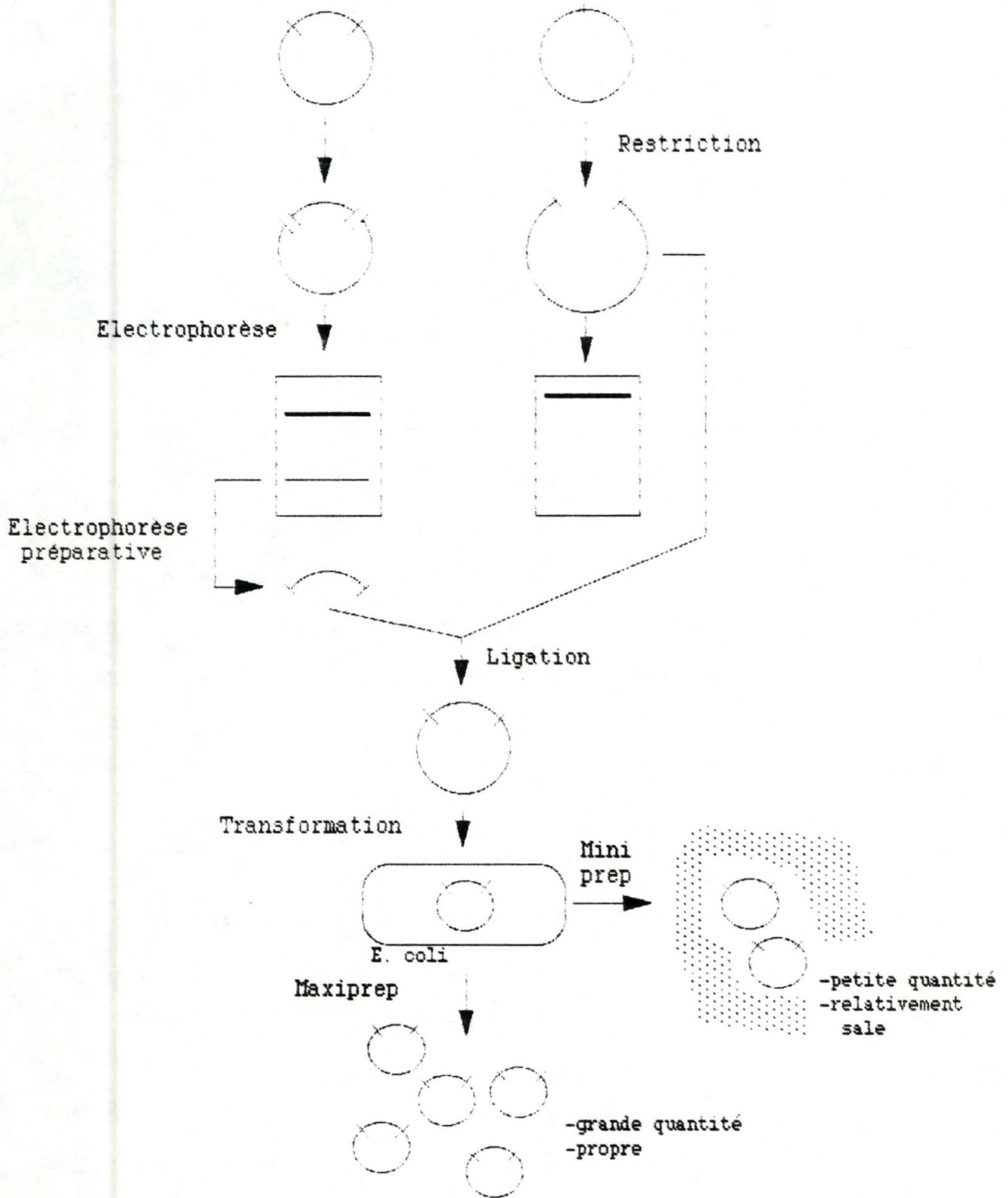


Fig. 2.7 Quelques unes des techniques d' ADN recombinant et la façon dont elles peuvent éventuellement s' enchaîner.

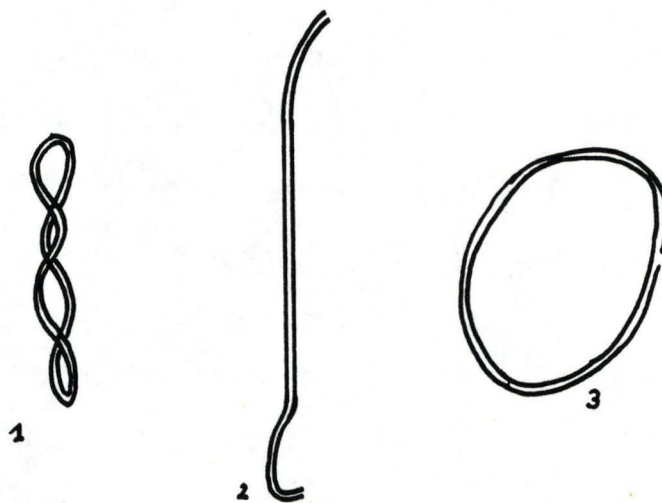


Fig. 2.8 Les 3 formes sous lesquelles peut se trouver l' ADN plasmidique: 1. CCC (covalently closed circular)
2. L (linéaire)
3. OC (open circular)

2.4.2. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

2.4.2.1. Electrophorèse analytique (29)

Cette technique permet la séparation des fragments d'ADN, ainsi que l'évaluation de leur taille et de leur quantité.

Principe

Dans un champ électrique, les molécules d'ADN migrent à une vitesse proportionnelle à leur taille et à leur charge nette. Celle-ci étant déterminée par les groupements phosphate, la molécule se déplacera vers l'anode.

L'électrophorèse en gel d'agarose séparera les acides nucléiques selon leur taille.

La vitesse de migration de l'ADN sera fonction de :

- Sa conformation, en ce qui concerne l'ADN plasmidique, qui peut exister sous forme (fig 2.8) :

- CCC (covalently closed circular) : forme superenroulée.
- Linéaire
- OC (open circular) : forme circulaire dont un des deux brins est ouvert.

La forme CCC migrera le plus loin, suivie de la forme linéaire puis de la forme OC. Il peut également exister des formes multimériques, qui migreront elles aussi à une distance propre.

- Son poids moléculaire : la distance de migration est inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire de l'ADN.

- La concentration en agarose du gel : plus elle sera élevée, plus le réseau formé par l'agarose sera étroit. La concentration usuelle est de 0,8 %, mais elle pourra atteindre 2 % si l'on désire accentuer les différences entre petites molécules de poids proche.
- Le voltage appliqué : les migrations sous haut voltage seront plus rapides, mais la résolution des molécules sera plus faible. Le voltage moyen est d'environ 80 volts.

Protocole

L'agarose en solution dans un volume approprié de tampon TBE (0,089 M Tris borate ; 0,089 M acide borique ; 0,002 M EDTA) est porté à ébullition. Une fois la température redescendue à 50°C, on ajoute du bromure d'éthidium pour une concentration finale de 0,5 μ g/ml.

Après homogénéisation, la solution est coulée sur un support muni d'un peigne dont les dents formeront des puits dans le gel durci (leur taille sera choisie en fonction du volume de l'échantillon).

Le gel est déposé avec son support dans un bac à électrophorèse et immergé dans du tampon TBE. Avant de déposer l'échantillon dans le puit, on lui adjoint une solution 5x de bleu de bromophénol + sucrose (0,25 % bleu de bromophénol, 40 % sucrose). Le sucrose alourdit l'échantillon qui reste de ce fait au fond du puit. Le bleu de bromophénol, en migrant à la vitesse de fragments d'ADN de quelques dizaines de nucléotides, permet de suivre l'avancement de la migration.

Taille	Quantité ($\Sigma = 630$ ng)
23,130 Kb	300 ng
9,416 Kb	122 ng
6,557 Kb	85 ng
4,361 Kb	56,5 ng
2,322 Kb	30 ng
2,027 Kb	26,5 ng
0,564 Kb	7,5 ng
0,127 Kb	2 ng

pas visible

Fig. 2.9 Le marqueur de taille utilisé pour les électrophorèses sur gel d'agarose: l'ADN du phage λ restreint par l'endonucléase Hind III.

La migration s'effectue sous une différence de potentiel d'environ 80 volts, pendant une durée variable (de une à quelques heures).

Après arrêt de l'électrophorèse, les fragments sont visualisés par exposition du gel aux ultraviolets (transluminateur ; $\lambda = 302 \text{ nm}$). Le bromure d'éthidium s'intercale en effet entre les bases des polynucléotides et émet, lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets, une fluorescence rosâtre.

Estimation de la taille d'un fragment sur gel

Dans un des puits du gel, on dépose un marqueur de taille. Il s'agit d'ADN restreint dont les fragments sont de taille connue.

L'étalon le plus couramment utilisé est l'ADN du phage λ restreint par l'enzyme Hind III (fig 2.9).

La migration du marqueur de taille permet de réaliser une courbe d'étalonnage exprimant le logarithme de la taille des fragments en fonction de leur distance de migration.

Estimation de la quantité d'un fragment sur gel

La fluorescence visualisée sous ultraviolets est d'autant plus importante que le fragment d'ADN est grand, mais elle augmente également avec la quantité de ce fragment.

Connaissant la quantité d'ADN que représente le marqueur de taille, on peut comparer sa fluorescence à celle de l'échantillon déposé afin d'estimer la quantité d'ADN que contient ce dernier (fig 2.9).

2.4.2.2. Electrophorèse préparative (30)

Cette technique permet d'isoler d'un mélange de restriction un fragment particulier.

Après une migration qui a permis la séparation des fragments de tailles différentes, le gel d'agarose est incisé devant et derrière le fragment à isoler. On place alors dans les incisions un papier DEAE cellulose préalablement traité de la manière suivante :

Le papier DEAE cellulose coupé aux dimensions désirées est immergé quelques heures dans une solution 2,5 M de NaCl. Il est ensuite lavé plusieurs fois à l'eau stérile puis stocké à 4°C dans de l'EDTA 1 mM.

Il sera trempé dans du tampon TBE juste avant son emploi .

Une fois les papiers mis en place, l'électrophorèse est poursuivie une dizaine de minutes au terme desquelles l'ADN se retrouve sur le papier DEAE cellulose. La fluorescence du papier est vérifiée aux U.V.

Les papiers retirés sont lavés à l'eau stérile et séchés entre deux filtres. Ils sont alors placés dans un eppendorf et on leur ajoute 300 à 700 μ l d'un tampon à haute concentration en sel (High salt buffer : Tris pH 7,5 20mM ; EDTA 1mM : NaCl 1,5 M).

On agite l'eppendorf jusqu'à obtention d'une pâte homogène qui est incubée 2 heures à 37°C. Les ions négatifs déplacent l'ADN du DEAE cellulose ; il se retrouve ainsi en solution.

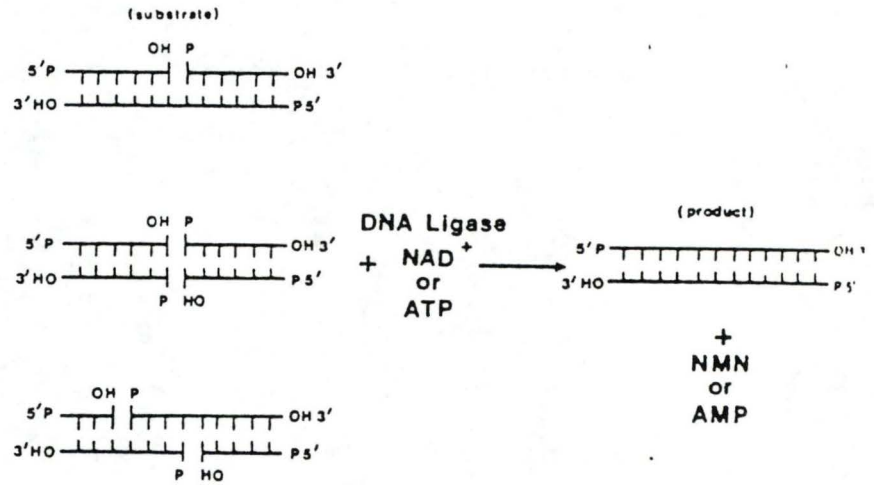


Fig. 2.10 La formation de liens phosphodiester entre le groupement hydroxyle 3' et le groupement phosphate 5' de molécules d' ADN est catalysée par l' ADN ligase.

Pour éliminer le papier, l'eppendorf est percé à l'aide d'une aiguille chauffée et enfoncé dans un second eppendorf. L'ensemble est centrifugé 5 minutes à 13.000 RPM : les fibres du papier restent dans l'eppendorf percé tandis que la solution s'en échappe et est recueillie dans le second eppendorf.

Le bromure d'éthidium est alors extrait. Pour ce faire, on ajoute 3 volumes de N butanol saturé en eau. On centrifuge 5 minutes à 13.000 RPM et le N butanol (phase supérieure) est éliminé. Cette étape est suivie d'une précipitation de l'ADN par l'adjonction à la solution de 2 volumes d'éthanol absolu froid (-20°C). La solution est placée 10 minutes à -70°C.

Elle est ensuite centrifugée 20 minutes à 13.000 RPM à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot éventuellement lavé à l'éthanol 70 % puis séché sous vide. Le culot sera resuspendu dans du tampon TE (Tris pH 8 10 mM ; EDTA 1mM).

2.4.3. LA REACTION DE LIGATION

L'enzyme ADN ligase du phage T4 catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle de l'extrémité 3' et le phosphate de l'extrémité 5' des molécules d'ADN. Cette réaction permet de liguer de façon covalente des fragments d'ADN qui constituent alors une molécule recombinante (fig 2.10).

L'enzyme nécessite la présence d'ATP et de Mg ++ pour être active.

Protocole (31)

4 x μ g d'ADN à insérer
x μ g d'ADN de plasmide linéarisé
Tampon de ligation 5 x (contient l'ATP et le Mg ++)
T4 DNA-ligase (1 unité/5 μ g d'ADN à liguer)
Eau stérile pour un volume final de 40 μ l.

En fonction des extrémités à liguer, on distingue des ligations d'extrémités cohésives et des ligations à bouts francs :

- Dans le cas d'extrémités cohésives, le mélange réactionnel sera incubé 10 heures à 4°C.
- Dans le cas d'extrémités à bouts francs, la quantité de T4 DNA-ligase employée sera 10 fois plus importante et le mélange réactionnel sera incubé 4 heures à température ambiante.

2.4.4. TRANSFORMATION

La transformation consiste à faire pénétrer de l'ADN exogène dans un organisme. Dans le cas présent, l'ADN est un plasmide et l'organisme une bactérie ou une levure.

Ces microorganismes ne sont pas dans leur état naturel aptes à laisser pénétrer l'ADN au travers de leur paroi puis de leur membrane ; cette opération nécessite donc un traitement perméabilisant au terme duquel ils seront rendus "compétents".

2.4.4.1. Transformation de bactéries (29)

a) Préparation de cellules XLI blue d'*E. coli* compétentes

La souche est d'abord cultivée sur milieu LB + tétracycline à 37°C, afin de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'. A partir d'une de ces colonies, on ensemence une préculture de 10 ml de LB + tétracycline, incubée à 37°C jusqu'à une absorbance comprise entre 1,5 et 2 à 550 nm.

Cette préculture est employée pour ensemencer une culture de 100 ml de milieu LB + tétracycline. Elle sera agitée fortement pendant environ une heure à 37°C jusqu'à une absorbance de 0,3 à 550 nm (phase de croissance exponentielle).

A ce stade, la culture est stoppée dans la glace pendant 10 minutes puis centrifugée 5 minutes à 4.000 RPM à 4°C (Rotor SS34 SORVALL). Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans un volume de CaCl₂ 50 mM correspondant à la moitié du volume initial. L'opération est répétée une seconde fois.

La suspension est laissée 20 minutes dans la glace puis centrifugée 5 minutes à 4.000 RPM à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans un volume de CaCl₂ 50 mM - glycérol 15 % correspondant au dixième du volume initial.

La suspension est alors aliquotée par 200 μ l dans des eppendorfs et stockée à -70°C.

b) Transformation (30)

à 100 μ l de cellules compétentes, on ajoute
100 ng d'ADN plasmidique
ou 10 μ l de mixture de ligation.

Le tout est incubé 40 minutes sur glace, puis soumis à un choc thermique de 2 minutes à 42°C. Au cours de ce choc, le complexe résistant aux DNases que forme l'ADN avec le calcium pénètre dans la cellule.

1 ml de milieu LB est ajouté aux cellules qui sont ensuite incubées 1 heure à 37°C. Durant cette étape, les cellules régénèrent une paroi normale et commencent à exprimer le ou les gène(s) de résistance apporté(s) par le plasmide qui les a transformées.

Les cellules sont étalées sur milieu sélectif solide.

2.4.4.2. Transformation de levures (32)

Une quantité adéquate (10 ml/transformation) de milieu YPD liquide estensemencée et incubée à 30°C jusqu'à une absorbance de 1 à 600 nm (soit 1 à $2 \cdot 10^7$ cellules/ml).

La culture est scindée en fractions de 20 ml et centrifugée à 6.000 RPM à 20°C pendant 10 minutes (Rotor SS34 SORVALL). Le culot de cellules est resuspendu dans 5 ml d'eau stérile par tube.

La suspension obtenue est centrifugée à 6.000 RPM à 20°C pendant 10 minutes (Rotor SS34 SORVALL). Le culot est resuspendu dans 2 ml de Li O Ac-TE par tube (Li O Ac-TE : acétate de lithium 0,1 M ; Tris pH 7,5 10 mM ; EDTA 1 mM).

Les 2 ml sont séparés en 2 x 1 ml dans des eppendorfs et centrifugés 10 minutes à 6.000 RPM à température ambiante. Le culot est resuspendu dans 100 μ l de Li O Ac-TE par eppendorf.

Les cellules sont alors incubées à 30 °C avec agitation durant 1 heure.

50 μ g de DNA carrier (ADN de thymus de veau) sont ajoutés par eppendorf ainsi que l'ADN plasmidique (1 à 20 μ g).

L'ensemble est placé 30 minutes à 30°C avec agitation. On lui ajoute ensuite 700 μ l de TE-Li O Ac-PEG (TE-Li O Ac+ 40 % de polyéthylène glycol) et on incube 1 heure (ou une nuit) à 30°C avec agitation.

Les cellules subissent à ce stade un choc thermique de 5 minutes à 42°C, après quoi elles sont centrifugées 1 minute à 6.000 RPM à température ambiante.

Le culot est resuspendu dans 200 μ l d'eau stérile. La suspension obtenue est étalée sur milieu sélectif.

2.4.5. PREPARATION DE PLASMIDE EN PETITE QUANTITE (MINIPREP)

2.4.5.1. Miniprep à partir d'*E. coli* (33)

10 ml de milieu LB sélectif sont ensemencés avec une colonie bactérienne et incubés une nuit à 37°C.

On prélève 1,5 ml de cette culture, que l'on centrifuge 5 minutes à 13.000 RPM. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 150 μ l de TES (Tris pH 8 50 mM ; EDTA 50 mM ; sucrose 15 %).

On lui ajoute 25 μ l d'une solution 10 mg/ml de lysozyme et on incube 15 minutes à température ambiante.

400 μ l d'eau stérile froide sont ajoutés et les cellules sont placées 5 minutes dans la glace, puis 15 minutes à 72°C.

On centrifuge 10 minutes à 13.000 RPM et on ajoute au culot 70 μ l de NaClO₄ 5M (homogénéiser).

400 μ l d'isopropanol à température ambiante sont ajoutés et on centrifuge 15 minutes à 13.000 RPM. On peut éventuellement laver le culot à l'éthanol 90 %.

Le culot est séché 5 minutes sous vide et resuspendu dans 50 μ l de TE.

2.4.5.2. Miniprep à partir de levures

Deux méthodes ont été employées dont une implique une lyse mécanique des levures par des billes de verre et l'autre une lyse enzymatique par la zymolyase.

a) Méthode impliquant une lyse aux billes de verre (34)

4 ou 5 colonies fraîchement poussées sur milieu sélectif solide sont raclées avec une anse de platine. Les levures sont suspendues dans 300 μ l de sucrose 25 % - tris pH 7,5 50 mM. On leur ajoute 12 μ l de NaCl 5M pour une concentration finale 0,2 M.

Des billes de verre (préalablement lavées à l'HCl 1N, rincées et passées au four, pour détruire les nucléases) sont ajoutées et l'ensemble est passé 5 minutes au Vortex. On lui ajoute rapidement 300 μ l de phénol équilibré dans du TE pH 8.

On repasse deux fois au Vortex pendant 3 minutes.

La phase aqueuse est récupérée et réextraite avec 300 μ l de phénol équilibré dans du TE. Elle est ensuite traitée 3 fois avec de l'éther saturé en eau.

Les traces d'éther sont éliminées par évaporation 5 à 10 minutes à 65°C.

L'ADN est précipité 30 minutes à -70°C par deux volumes d'éthanol absolu.

La solution est centrifugée 15 minutes à 4°C et le culot éventuellement lavé à l'éthanol 70 %.

Le culot est alors séché sous vide et resuspendu dans 200 μ l de TE.

On utilisera 1 μ l, 5 μ l, 10 μ l et 20 μ l de la solution obtenue pour transformer *E. coli*.

b) Méthode impliquant une lyse à la zymolyase (35)

4 ou 5 colonies fraîchement poussées sur milieu sélectif sont suspendues dans 200 μ l d'une solution comprenant pour 2 ml :

- 1,67 ml de sorbitol 1,2 M.
- 100 μ l de tris pH 7,5 1 M.
- 2 μ l de mercaptoéthanol.
- 1 mg de zymolyase.

Les cellules sont incubées 1 heure à 37°C. On leur additionne alors 400 μ l de NaOH 0,2 M, et l'ensemble est mélangé puis placé 5 minutes dans la glace.

300 μ l de KAc 2,7 M pH 4,8 sont ajoutés et les cellules placées 5 minutes dans la glace. Après quoi elles sont centrifugées 1 minute à 13.000 RPM.

On adjoint 6/10 de volume d'isopropanol au surnageant, qui est placé 10 minutes à -70°C.

La solution est centrifugée 10 minutes à 13.000 RPM et le culot éventuellement lavé par 400 μ l d'éthanol 90 %.

Il est ensuite resuspendu dans 20 μ l de TE.

2.4.6. PREPARATION DE PLASMIDE EN GRANDE QUANTITE A PARTIR D'

E. coli (MAXIPREP) (33)

Une préculture de LB liquide sélectif est employée pour ensemençer une culture de 400 ml qui est incubée à 37°C jusqu'à une absorbance de 0,8 à 660 nm.

Elle est centrifugée 10 minutes à 5000 RPM à 4°C (Rotor GSA SORVALL). Le culot est resuspendu dans 10 ml de Tris pH 8 50 mM - Sucrose 25 % qui sont scindés en 2 x 5 ml.

1 ml de TNE contenant 10 mg/ml de lysozyme (à préparer juste avant l'emploi) est ajouté à chaque suspension de 5 ml. Les cellules sont incubées 5 minutes dans la glace.

On additionne 2 ml d'EDTA 0,25 M. La suspension est homogénéisée et incubée 5 minutes dans la glace.

2 ml de SDS 10 % y sont ajoutés et l'ensemble est incubé 10 minutes dans la glace en le mélangeant de temps en temps. On additionne 2,5 ml de NaCl 5 M et on mélange doucement par inversion, puis les tubes sont placés dans la glace entre 2 heures et une nuit.

Les tubes sont centrifugés à 13.000 RPM à 4°C pendant 1 heure (Rotor SS34 SORVALL). Le surnageant est repris et on lui ajoute de l'isopropanol froid (-20°C) à raison de 6/10 de volume. On place 30 minutes à -20°C.

La solution est centrifugée à 7.000 RPM à 4°C pendant 30 minutes (Rotor SS34 SORVALL) et le surnageant éliminé.

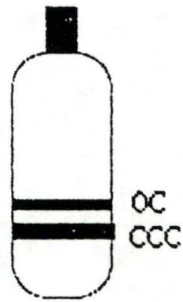


Fig. 2.11 Les bandes formées par l' ADN plasmidique dans le gradient de chlorure de césium d' une maxiprep.

Le culot est partiellement séché sous vide (10 minutes) puis resuspendu dans 4 ml de TE par tube. La solution est transférée dans un Stériline et le tube rincé par 9,7 ml de TE également transférés.

On ajoute alors par Stériline :

13,7 g de chlorure de césium

0,7 ml d'une solution à 10 mg/ml de bromure d'éthidium

La dissolution du chlorure de césium est aidée en plaçant la solution à 37°C.

Le contenu du Stériline est transféré à la pipette pasteur dans un crimper (SORVALL). Les crimpers sont équilibrés au dixième de gramme près avec de l'huile de paraffine ; ils sont ensuite scellés et leur étanchéité est vérifiée.

On centrifuge durant 16 heures à 45.000 RPM à 20°C (Rotor vertical TV865B SORVALL).

Au terme de la centrifugation, deux bandes sont formées dans le gradient par l'ADN plasmidique (fig 2.11). Elles sont visualisées sous U.V. par la fluorescence du bromure d'éthidium. La bande inférieure correspondant à la forme CCC est récupérée et son volume mesuré.

On lui additionne 1 volume d'alcool isoamylique pour extraire le bromure d'éthidium. L'opération est recommencée jusqu'à ce que l'alcool isoamylique (phase supérieure) ne soit plus rose (le plus souvent quatre fois).

Le volume de la solution est mesuré et 1 volume d'eau stérile à température ambiante est ajouté, puis un volume d'éthanol absolu à température ambiante équivalent à l'ensemble. On mélange et la solution est laissée 2 heures à température ordinaire.

Elle est ensuite centrifugée à 13.000 RPM à température ambiante pendant 30 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 200 μ l de TE. On additionne 38 μ l d'une solution de LiCl 5 M (concentration finale 0,8 M), puis 2,5 volumes d'éthanol absolu.

On place une nuit à -20°C ou une heure à -70°C .

On centrifuge ensuite à 12.0000 RPM à 4°C et on sèche le culot sous vide. Il est resuspendu dans 200 μ l de TE. La solution est aliquotée (par exemple 10 x 20 μ l).

Quantification spectrophotométrique de l'ADN (29)

La mesure de l'absorbance à 260 nm permet de calculer la concentration des acides nucléiques : une absorbance égale à 1 à 260 nm correspond à 50 μ g d'ADN bicaténaire par ml.

Le rapport entre les absorbances à 260 nm et à 280 nm donne une estimation de la pureté de l'ADN.

Les préparations pures ont un rapport D.O. 260/D.O. 280 de 1,8. Si il y a contamination de la solution par

des protéines, ce rapport sera moindre et une quantification exacte de l'ADN ne sera pas possible par cette méthode.

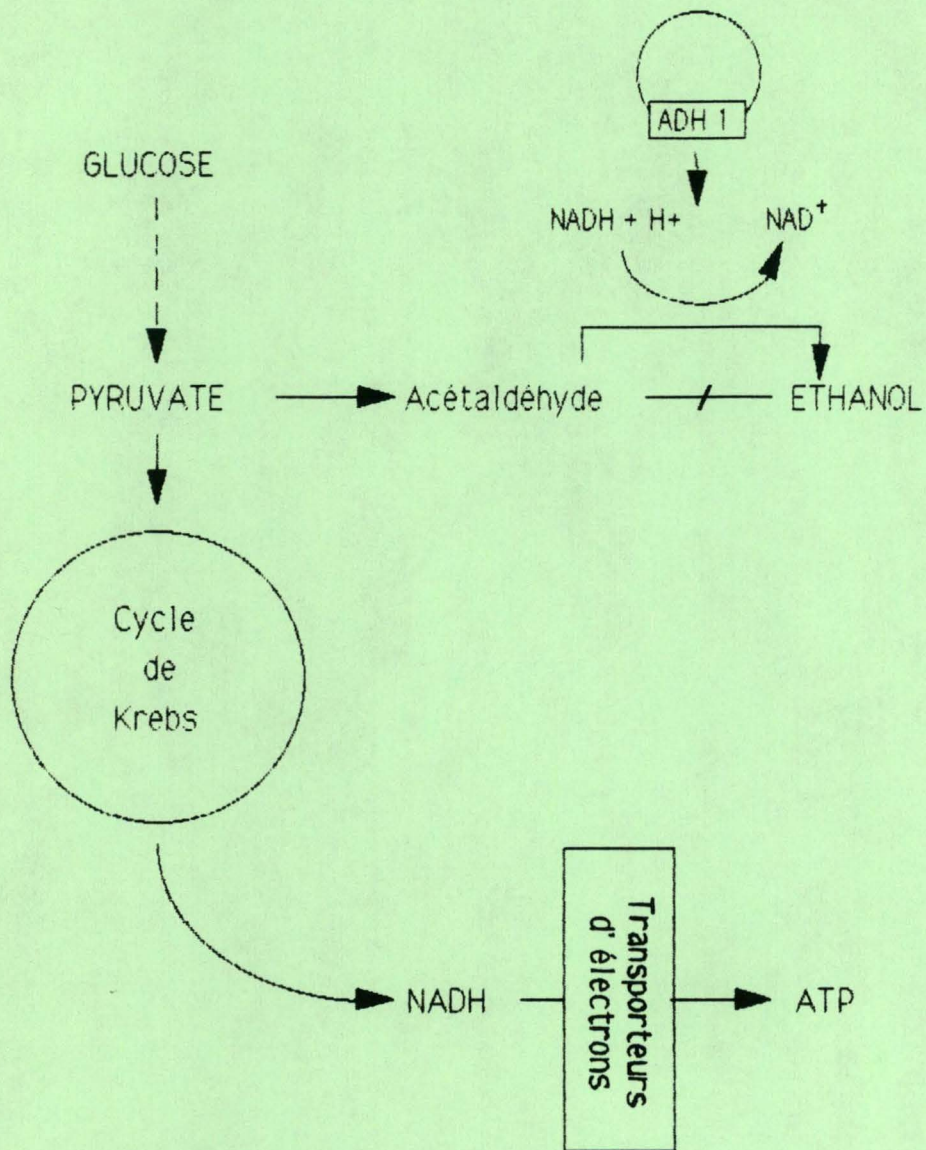


Fig. 3.1 La complémentation hétérologue de la fonction fermentaire chez la souche 302.21 de *Saccharomyces cerevisiae* par le gène *ADH 1* de *Kluyveromyces fragilis*.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons choisi de procéder au clonage du gène *ADH 1de Kluyveromyces fragilis* par complémentation hétérologue d'une souche ADH nul de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette voie a été préférée aux autres car sa réussite assure la présence dans l'insert hétérologue d'un gène fonctionnel de l'ADH I. Rappelons que bon nombre de gènes de levure ont pu être clonés de cette manière à partir d'une banque de levure utilisée pour transformer des mutant d'*E. coli*.

Pour mémoire, le clonage par complémentation passe par la transformation d'un hôte au moyen de l'ADN d'une banque génomique. Les transformants sont sélectionnés sur base de la restauration d'une prototrophie. C'est parmi eux que l'on cherche ensuite ceux présentant le phénotype recherché.

Le souche ADH nul de *Saccharomyces cerevisiae* en notre possession, 302.21, présente les auxotrophies *his 4* et *trp 1*, alors que la banque génomique dont nous disposons complète l'auxotrophie *leu 2*.

La réalisation d'une nouvelle banque génomique avec un plasmide complétant une des deux auxotrophies de la souche 302.21 représenterait un travail beaucoup trop important. C'est ce qui a justifié notre engagement dans les deux voies suivantes :

- 1) Une sélection des transformants sur base de l'insert apporté par l'ADN de la banque génomique (complémentation directe). La souche 302.21 ne peut mener à bien la dernière étape de la fermentation alcoolique. En la plaçant dans des conditions où la respiration est inhibée, sa survie passe par la présence d'un gène fonctionnel de l'ADH I. Ce gène lui sera apporté, suite à une transformation, par l'ADN de la banque génomique de *Kluyveromyces fragilis* (fig 3.1). L'ADH II pouvant remplir le rôle physiologique de l'ADH I

en l'absence de cette dernière, il est nécessaire de réaliser le clonage dans des conditions où sa synthèse est réprimée. Cela évitera que la restauration de la capacité de fermenter de la souche 302.21 soit due à la présence du gène *ADH 2* de *Kluyveromyces fragilis* apporté par l'ADN de la banque génomique.

- 2) Une construction visant à apporter l'auxotrophie *leu 2* à la souche 302.21 sera réalisée. Elle permettra d'aménager la souche, afin de pouvoir procéder au clonage par complémentation de manière classique, au cas où l'autre voie envisagée ne fournirait pas les résultats escomptés.

3.1. LA COMPLEMENTATION DIRECTE

3.1.1. MISE EN EVIDENCE DE LA SYNTHÈSE D'ADH CHEZ LA LEVURE

Afin de mettre au point les conditions de clonage du gène *ADH 1* de *K. fragilis*, nous avons testé différents milieux susceptibles de mettre en évidence la synthèse d'ADH chez la levure, soit en inhibant la respiration, soit par l'utilisation d'un substrat suicide (Utilisé par l'ADH, il sera transformé par elle en un produit provoquant la mort de la levure).

Dans chaque cas, les levures employées furent une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae* (FL 100), une souche sauvage de *Kluyveromyces fragilis* (ATCC 12424), et une souche ADH nul de *S. cerevisiae* (302.21).

3.1.1.1. Les milieux à forte concentration en glucose

Il s'agit ici d'exploiter un phénomène naturel de répression catabolique appelé "effet Crabtree".

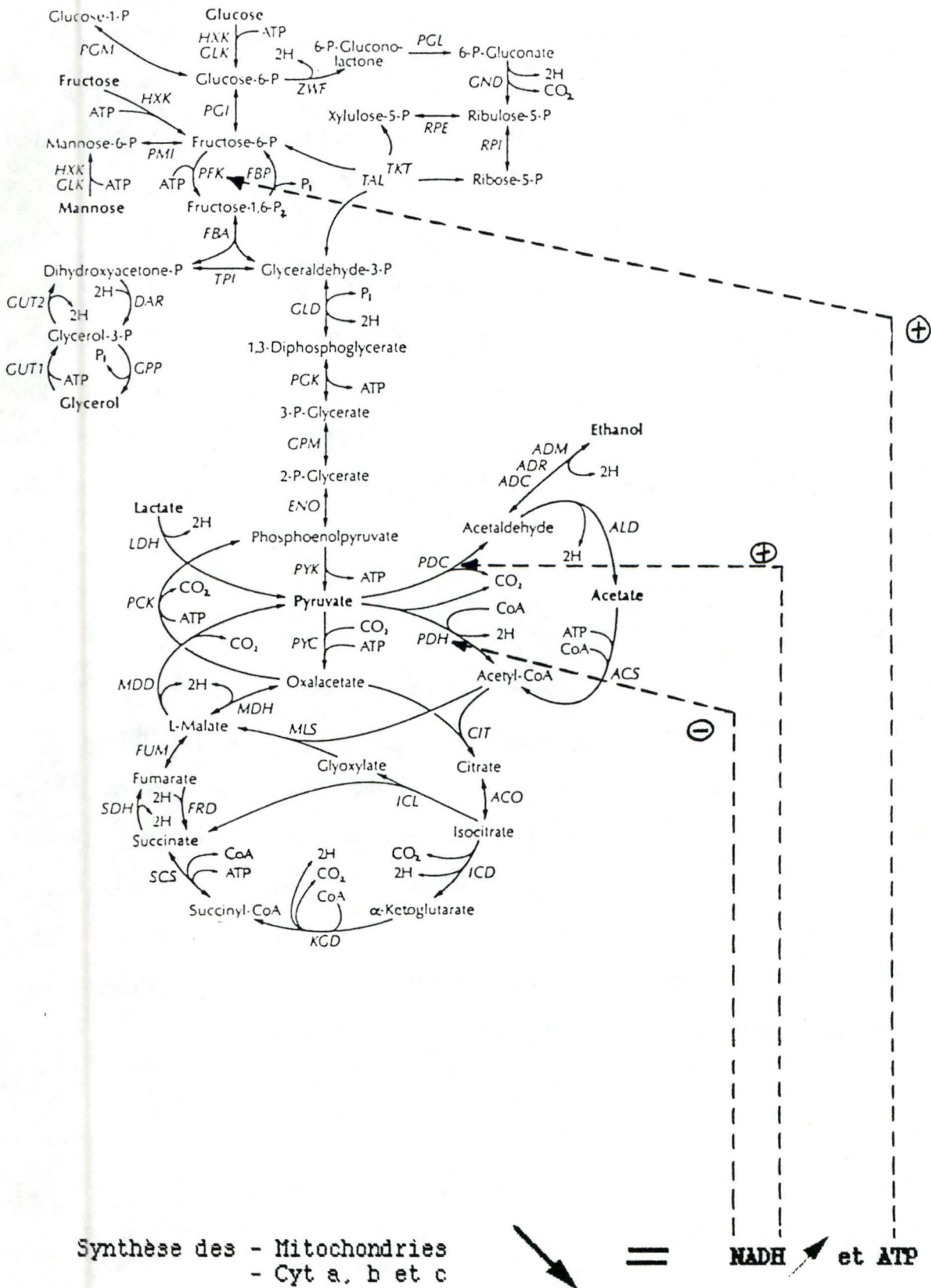


Fig. 3.2 Les répercussions des hautes concentrations en glucose (effet Crabtree) sur le métabolisme des levures.

L'effet Crabtree consiste en une répression de la respiration par les fortes concentrations en glucose, et ce indépendamment de la quantité d'oxygène disponible. Ce phénomène fut observé pour la première fois dans des cultures de cellules tumorales mais se déroule également chez les levures et chez les bactéries.

On ne connaît pas encore le mécanisme cellulaire exact qui est à son origine, mais on a pu observer que les fortes concentrations en glucose répriment la synthèse des cytochromes a, b et c ainsi que la formation des mitochondries chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La baisse de capacité de respiration qui s'ensuit provoque une accumulation de NADH, inhibant le système de la pyruvate déshydrogenase, tandis qu'une nouvelle enzyme est induite : la pyruvate décarboxylase (fig 3.2).

La perte de phosphorylation oxydative, donc de production d'ATP, aurait une action à deux niveaux dans le métabolisme du glucose (fig 3.2):

- Le transport membranaire du glucose via le système perméase - ATPase serait sévèrement affecté ; la quantité de glucose effectivement disponible pour le métabolisme baisse donc.
- La quantité d'ATP diminuant, l'inhibition allostérique (cfr. effet Pasteur) de la phosphofructokinase serait levée. Le flux de carbone passant par la glycolyse augmenterait donc.

Globalement, et ce dans des conditions aérobies, la levure passe du métabolisme respiratoire au métabolisme fermentaire (12), (36).

Dans la pratique, les souches sauvages de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Kluyveromyces fragilis*, ainsi que la souche ADH nul de *S. cerevisiae*, furent testées pour leur croissance sur des milieux contenant 5 et 10 % de glucose. L'effet des

	5% Glucose	10% Glucose
<i>S. cerevisiae</i> FL 100	+	+
<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	+	+
<i>S. cerevisiae</i> 302.21	+ / 4	+ / 4

Fig. 3.3 Répercussions de l' effet Crabtree sur la croissance de la souche 302.21 de *S. cerevisiae*.
Témoins: souches sauvages de *S. cerevisiae* et de *K. fragilis*.

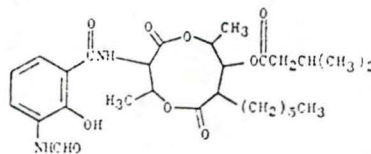


Fig. 3.4 Structure moléculaire de l' antimycine A1.

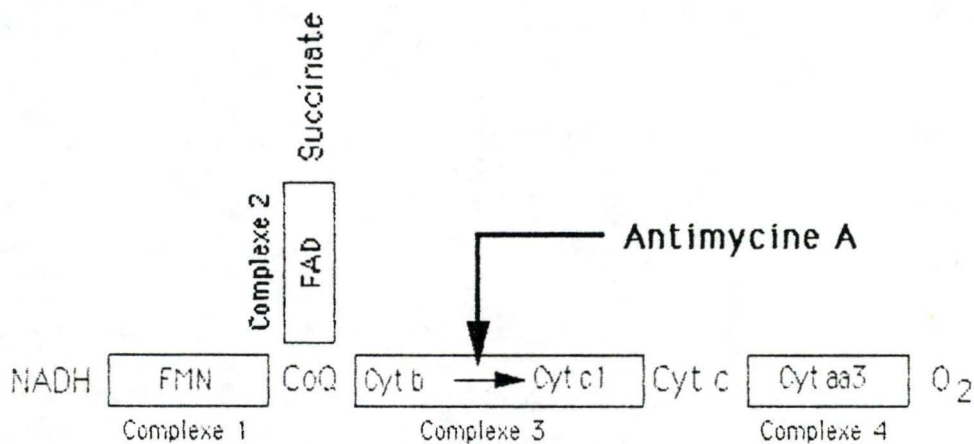


Fig. 3.5 L' action de l' antimycine A sur la chaîne de transporteurs d' électrons mitochondriale.

deux milieux sur leur croissance est quantitativement le même : les souches sauvages montrent une croissance bien plus importante (environ quatre fois, sur base de la taille des colonies formées) que la souche mutante de *S. cerevisiae* (fig 3.3).

En effet, vu l'importante concentration en glucose, le métabolisme respiratoire des trois souches est atteint, mais les répercussions de l'effet Crabtree sur la croissance de la souche mutante ADH nul sont plus importantes, celle-ci étant incapable de fermenter.

La faible croissance que manifeste quand même la souche mutante indique que l'effet est partiel, comme ce fut déjà rapporté (37). On sait que la baisse de croissance liée à l'effet Crabtree se stabilise une fois qu'un équilibre est atteint entre la production d'ATP et le transport du glucose (36).

Nous désirions une différence de croissance plus marquée entre levures capable de fermenter et celles qui en sont incapables. Aussi nous sommes-nous tourné vers un moyen d'inhiber totalement la respiration : l'antimycine A.

3.1.1.2. Le milieu à l'antimycine A

L'antimycine A (fig 3.4) est une substance antibiotique produite par les champignons de genre *Streptomyces* (38). Il s'agit d'un inhibiteur de la respiration, bloquant le complexe 3 de la chaîne des transporteurs d'électrons de la mitochondrie (fig 3.5) (39). La préparation commerciale utilisée est un mélange de deux formes proches de cet antibiotique (antimycine A1 et A4).

L'effet de l'antimycine A est total pour une concentration de 0,4 μ g/ml de milieu. Dans ces conditions, les souches sauva-

	Antimycine A 0,4 µg/ml
<i>S. cerevisiae</i> FL 100	+
<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	+
<i>S. cerevisiae</i> 302 21	0

Fig. 3.6 Effet de l' antimycine A sur la croissance de la souche 302.21 de *S. cerevisiae*.
Témoins: souches sauvages de *S. cerevisiae* et de *K. fragilis*.

Substrate	Relative reaction rate*			
	ADH I	ADH II	ADH III	ADH IV
ethanol	100	100	100	100
n-propanol	46	117	36	82
isopropanol	5	33	0	0
allyl alcohol	59	110	85	34
n-butanol	24	121	25	0
no substrate	0	22	0	0

* Reaction rates are presented as a percentage of the rate obtained with ethanol as substrate.

Fig. 3.7 Taux de réaction relatif des 4 isozymes de l' ADH de *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis de différents alcools dont l' alcool allylique.

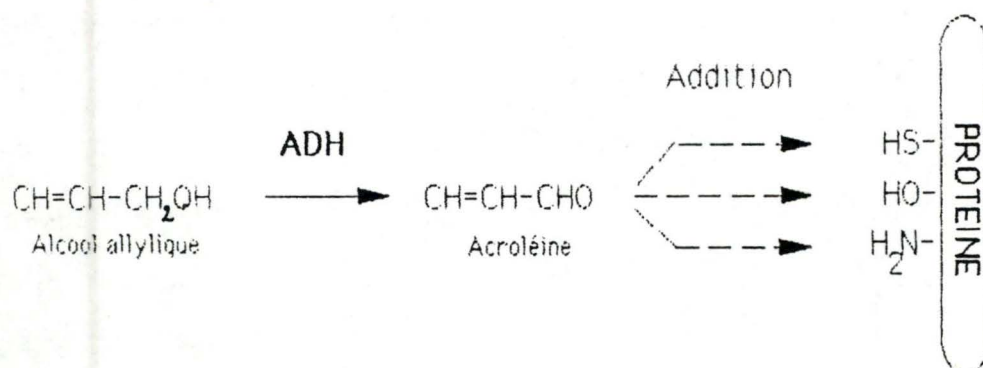


Fig. 3.8 L' ADH oxyde l' alcool allylique en acroléine, aldéhyde alkylant les protéines.

ges de *S. cerevisiae* et *K. fragilis* manifestent une croissance normale alors que la souche mutante 302.21 de *S. cerevisiae* ne pousse pas. L'inhibition de la respiration par l'antimycine A est donc totale (fig 3.6).

Un milieu contenant 0,4 μ g/ml d'antimycine A mais aussi 5 % de glucose fut utilisé. Le glucose fut ajouté dans le but de réprimer la synthèse de l'ADH II qui peut remplir le rôle physiologique de l'ADH I lorsque cette dernière est absente suite à une mutation (12). Il fallait éviter que la restauration de la capacité de fermenter de la souche mutante 302.21 soit due à la présence d'ADH II et non d'ADH I.

3.1.1.3. Les milieux à l'alcool allylique

Alors que l'antimycine A constitue un moyen de sélection positif, ne permettant la croissance que des levures capables de fermenter, l'alcool allylique est un moyen de sélection négatif provoquant leur mort.

L'alcool allylique, au même titre que d'autres alcools β insaturés, est un substrat suicide pour l'alcool déshydrogenase. L'ADH, qu'elle soit cytoplasmique ou mitochondriale (fig 3.7) oxyde l'alcool allylique en acroléine (40), un aldéhyde β insaturé susceptible de réagir dans une réaction d'addition avec les fonctions thiol, amine ou hydroxyle des acides aminés (fig 3.8) (41). Il s'ensuit une alkylation, tant de l'ADH que d'autres protéines, qui aboutit à la mort de la levure (42).

Des concentrations de 0,1 %, 1 % et 3 % en alcool allylique furent testées. Les résultats montrent que les levures sauvages de *S. cerevisiae* et *K. fragilis* ne poussent dans aucun de ces trois cas. La souche mutante ADH nul de *S. cerevisiae* pousse par contre sans gêne apparente, et aussi bien que sur un milieu

	Alc. allylique 0,1%	Alc. allylique 1%	Alc. allylique 3%
<u>S. cerevisiae</u> FL 100	0	0	0
<u>K. fragilis</u> ATCC 12424	0	0	0
<u>S. cerevisiae</u> 302 21	+	+	+

Fig. 3.9 Effet de l' alcool allylique sur la croissance de la souche 302.21 de *S. cerevisiae*.

Témoins: souches sauvages de *S. cerevisiae* et de *K. fragilis*.

ne contenant pas d'alcool allylique (fig 3.9).

Nous avons opté pour la concentration intermédiaire de 1%.

La sensibilité d'une levure à ce type de milieu constitue un bon test négatif, permettant de détecter chez elle la synthèse d'ADH. Ce critère de sélection est toutefois d'un emploi malaisé dans le cadre du clonage du gène *ADH 1*, puisque ce sont les clones recherchés qui disparaissent, c'est-à-dire ceux chez qui le gène *ADH 1* de *Kluyveromyces fragilis* restaure la capacité de fermenter. C'est pourquoi il ne fut employé dans ce travail qu'à titre de vérification. Le critère de sélection choisi fut la résistance à l'antimycine A, qui ne se manifeste que chez les clones recherchés.

Une fois les conditions du clonage mises au point, nous avons procédé à la transformation de la souche 302.21 par les plasmides de la banque génomique construite dans le vecteur YEp 351.

3.1.2. TRANSFORMATION DE LA SOUCHE 302.21 PAR L'ADN DE LA BANQUE GÉNOMIQUE DE *K. fragilis*

Cette transformation a été effectuée par la méthode de ITO. (cfr M & M).

Vingt transformation par 15 μ g de plasmides de la banque génomique furent réalisées.

Les levures furent ensuite étalées sur 20 boîtes de milieu à l'antimycine A et incubées.

Les contrôles effectués au cours de la transformation furent les suivants :

- Un contrôle de viabilité, en étalant des levures rendues compétentes mais non transformées sur un milieu contenant de l'histidine et du tryptophane, les acides aminés correspondant aux auxotrophies de la souche 302.21.
- Un contrôle de réversion, en étalant des levures rendues compétentes mais non transformées sur un milieu à l'antimycine A.
- Un contrôle des caractéristiques de la souche 302.21 (*his 4*, *trp 1* et *adh 1, 2* et *3*)

Il n'existe pas à notre connaissance, de souches de *S. cerevisiae* qui ne soient transformables par la méthode que nous avons employée (méthode ITO). La souche 302.21 est elle-même décrite comme étant transformable par cette méthode (17).

Disposant de ce renseignement, et sachant que le taux de transformation dépend de la souche et du plasmide utilisé, nous avons transformé la souche GRF 18 (auxotrophies *his 3* et *leu 2* par le plasmide YEp 351, qui fut utilisé pour la construction de la banque génomique.

Nous avons obtenu, pour une transformation réalisée par 10 μ g de YEp 351, plus de 15.000 clones transformants. Cela indique que le traitement appliqué rend bien les cellules compétentes et que le plasmide YEp 351 donne un taux de transformation important.

Après quelques jours, 3 colonies sont apparues parmi les 20 boîtes correspondant aux cellules 302.21 transformées. Il s'agissait alors de les identifier comme étant bien des levures de la souche 302.21 chez lesquelles le phénotype ADH I+ était restauré et non des levures contaminantes.

	YPD	MAM	His	Trp	His Trp	Alc. allyl.	Anti A
Clone 1	+	0	0	0	+	0	+
Clone 2	+	0	0	0	+	0	+
Clone 3	+	0	0	0	+	0	+
FL 100	+	+	+	+	+	0	+
302.21	+	0	0	0	+	+	0

Fig. 3.10 Tests de croissance sur milieu solide des 3 clones
ADH I+.
Témoins: souche sauvage FL 100 et ADH nul 302.21
de S. cerevisiae.

3.1.3. IDENTIFICATION DES COLONIES TRANSFORMANTES

Pour ce faire, il faut vérifier :

- Que les 3 clones présentent bien les auxotrophies à l'histidine et au tryptophane caractéristiques de la souche 302.21. La souche 302.21 non transformée et la souche sauvage FL 100 de *Saccharomyces cerevisiae* furent utilisées comme témoins.

Les résultats montrent que les trois clones possèdent les auxotrophies de la souche 302.21 (fig 3.10 et 3.11).

- Que les 3 clones possèdent bien un gène ADH 1 fonctionnel. Ce fut testé par ^{leur} croissance sur un milieu à l'antimycine A et sur un milieu contenant de l'alcool allylique.

Les résultats obtenus (fig 3.10 et 3.11) accréditent la présence d'un gène *ADH 1* fonctionnel, le comportement des trois clones étant identique à celui de la levure sauvage FL 100.

3.1.4. EXTRACTION DU PLASMIDE

Après avoir authentifié la souche transformée comme étant bien la souche 302.21, l'extraction du plasmide soupçonné d'être responsable du phénotype ADH I+ des trois clones fut réalisée.

Cette extraction fut entreprise plusieurs fois, selon deux méthodes différentes (cfr M & M) :

- Une méthode impliquant une lyse enzymatique des levures (lyse à la zymolyase).
- Une méthode impliquant une lyse mécanique des levures (lyse aux billes de verre).

Dans le même temps, une miniprep de plasmide à partir de la souche GRF 18 transformée par YEp 351 fut réalisée, afin de tester la validité des méthodes employées.

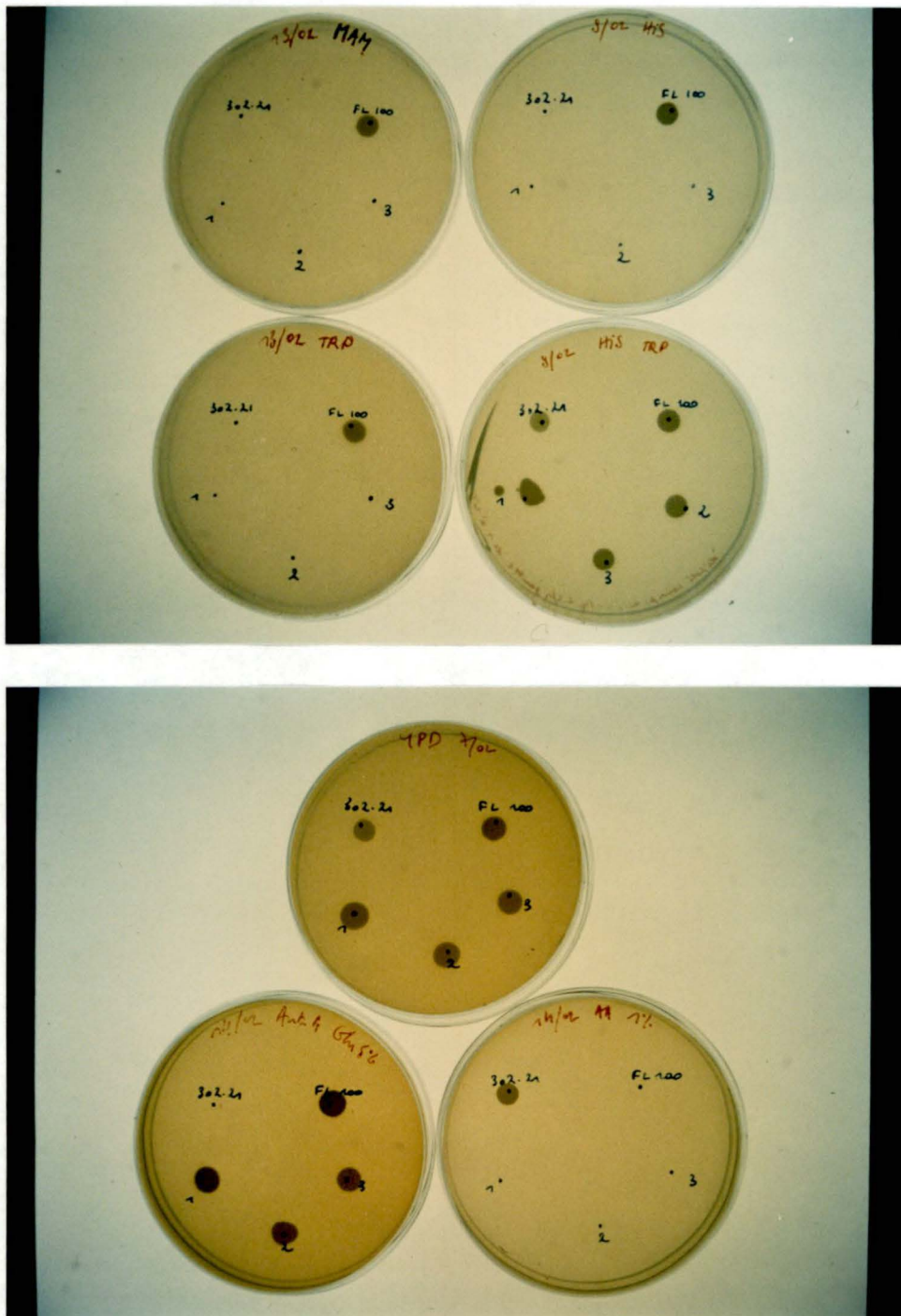
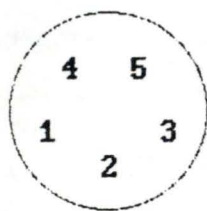
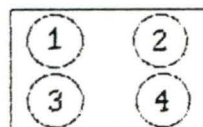


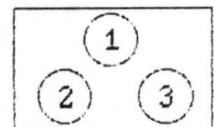
Fig. 3.11 Photographies des tests de croissance sur milieu solide des trois clones ADH I+.
Témoins: souche sauvage FL 100 et souche mutante ADH nul de *S. cerevisiae*.



1, 2, 3: clones ADH I+
4: 302.21
5: FL 100



1: MAM, 2: His
3: Trp, 4: His/Trp



1: YPD
2: Antimycine A
3: Alc. allyl.

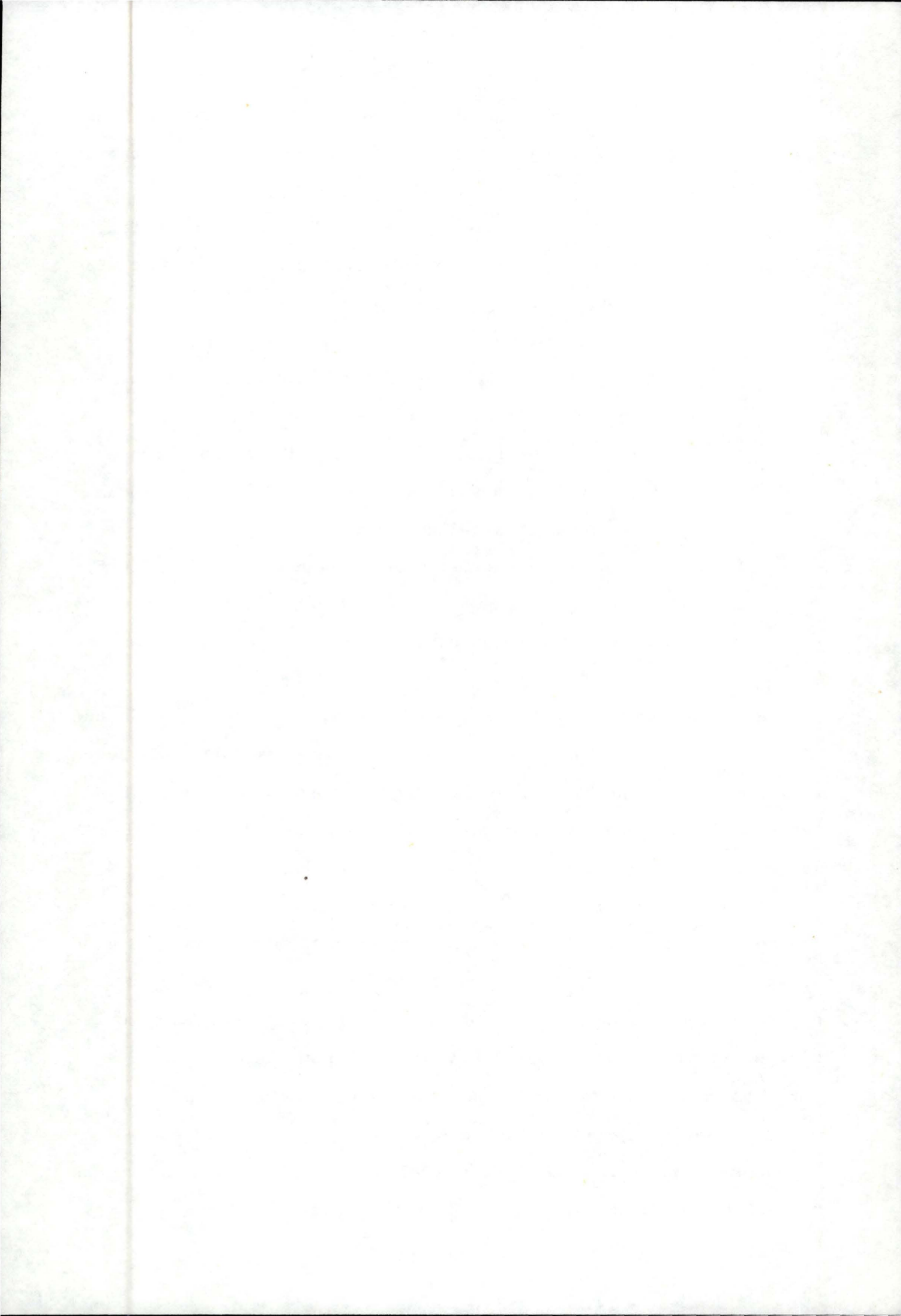
Les préparations de plasmides à partir de levures ont deux caractéristiques qui les distinguent de celles réalisées à partir de bactéries :

- Les plasmides sont présents chez les levures en un faible nombre de copies (au maximum quelques dizaines contre plusieurs centaines chez la bactérie *E. coli*). Cela a pour conséquence de rendre la quantité de plasmide que l'on peut extraire de levures trop faible pour être visualisée sur gel d'agarose.
- Les préparations de plasmide à partir de levures restent, malgré les purifications qu'elles subissent, fort contaminées par des protéines cellulaires. Elles sont donc trop sales pour permettre l'action d'enzymes de restriction, qui peuvent fournir entre autre une estimation de la taille du plasmide.

En fonction de ces deux limitations, la seule chose que l'on puisse faire d'une préparation de plasmide à partir de levures, est la transformation de la bactérie *Escherichia coli*. Cet hôte ne présente en effet aucune ^{des} limitations inhérentes à la levure.

Il fut donc procédé à la transformation de cellules de la souche XLI blue *E. coli* à partir des préparations de plasmide effectuées (cfr M & M). Dans aucun des cas il n'y eut apparition de clones bactériens possédant la résistance à l'ampiciline conférée par le plasmide YEp 351 de la banque génomique.

Des transformations de cellules de la souche XLI blue *E. coli* par les minipreps effectuées à partir de la souche GRF 18 transformée par YEp 351 furent réalisées. Elles ont fourni en moyenne une cinquantaine de clones transformants d'*E. coli*.



Les clones ADH I+ de la souche 302.21 ne contiennent donc pas de plasmide libre.

A ce stade, deux hypothèses sont possibles :

- Les trois clones ne possèdent pas de plasmide. L'apparition du phénotype ADH I+ est donc la conséquence d'une mutation de retour (retour au phénotype sauvage).
- Les trois clones possèdent un plasmide, mais à l'état intégré. Dans ce cas, un de leurs chromosomes contient entièrement ou partiellement un plasmide de la banque génomique dans lequel se trouve un fragment porteur du gène ADH 1 de *Kluyveromyces fragilis*.

On aurait pu tenter de mettre en évidence l'intégration d'un plasmide par un sondage du génome des trois clones au moyen d'un fragment radioactif du plasmide YEp 351 (Southern blot).

Cependant, dans une perspective de clonage, un plasmide intégré est un plasmide dont l'insert est irrécupérable. Il ne nous a donc pas paru opportun de poursuivre dans cette voie, bien que la question demeure en soi intéressante.

C'est pourquoi nous nous sommes tourné vers la deuxième voie prévue : celle de l'aménagement de la souche 302.21, afin de lui apporter l'auxotrophie *leu 2*.

3.2. REALISATION D'UNE CONSTRUCTION VISANT A APPORTER L'AUXOTROPHIE *leu 2* A LA SOUCHE 302.21 DE *Saccharomyces cerevisiae*

La technique employée pour l'aménagement de la souche 302.21 sera celle de la disruption intégrative.

3.2.1. PRINCIPE DE LA DISRUPTION INTEGRATIVE

Les recombinaisons sont fréquentes chez la levure. Cette

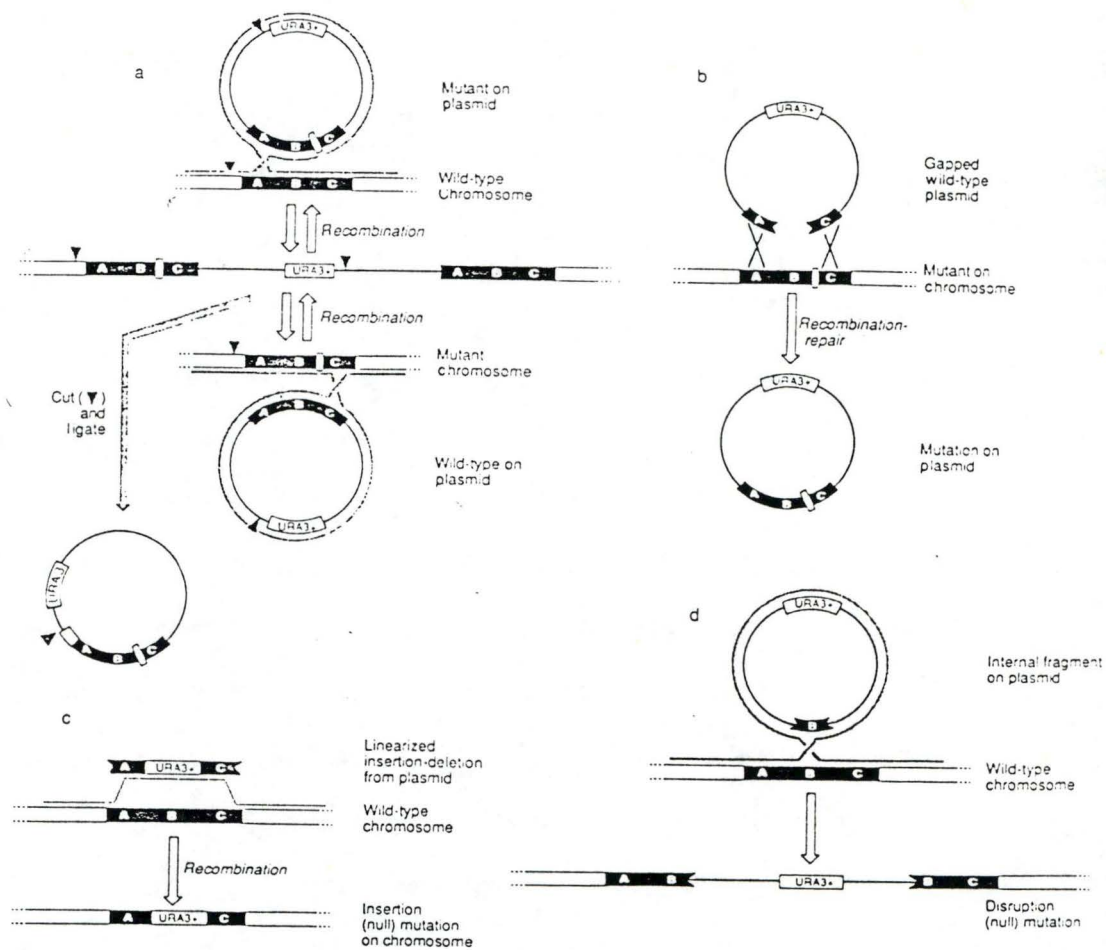


Fig. 3.12 L' utilisation de la recombinaison homologue pour transférer des mutations dans et en dehors d' un gène.

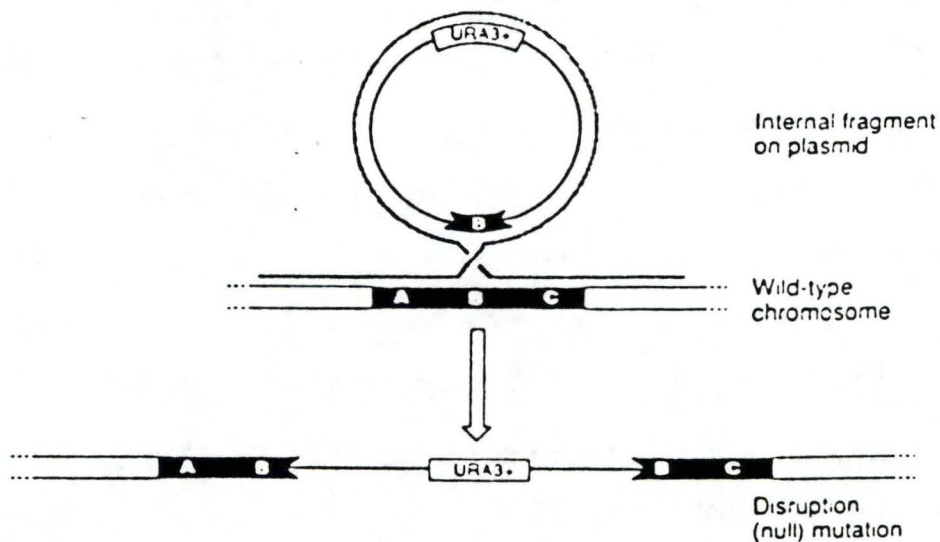


Fig. 3.13 Le principe de la disruption intégrative: l' intégration d' un plasmide au site homologue chromosomique aboutit à la duplication partielle du gène en deux parties incomplètes.

caractéristique est notamment employée pour transférer une mutation à un gène sauvage ou, à l'inverse, "réparer" un gène muté (fig 3.12).

La disruption intégrative est basée sur l'intégration dans le génome d'un plasmide ayant une région d'homologie avec le gène que l'on désire muter (fig 3.13). Dans ce cas précis, le plasmide à utiliser doit contenir un fragment interne du gène à inactiver, et son intégration au niveau du gène par recombinaison homologue aboutit à une duplication partielle du gène en deux parties incomplètes et donc inactives ; le gène est alors "disrupté".

La réussite de l'opération d'intégration se manifeste par la prototrophie apportée par le marqueur de sélection (URA 3+ dans la figure 3.13) et la disparition du phénotype associée au gène disrupté (43).

On a observé que la linéarisation d'un plasmide en un site donné augmentait sensiblement le taux de recombinaison au site homologue du chromosome, et par là l'intégration du plasmide au niveau de ce site. C'est pourquoi le fragment interne du gène contenu dans le plasmide doit être pourvu d'un site de restriction, afin de diriger son intégration au site désiré.

Dans le cas qui nous occupe, nous avons besoin :

- D'un plasmide - intégratif
 - complémentant une des deux auxotrophies (*his 4* et *trp 1*) de la souche 302.21 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- D'un fragment interne du gène *LEU 2* pourvu d'un site de restriction permettant de diriger l'intégration du plasmide au niveau du gène *LEU 2* de la souche 302.21.

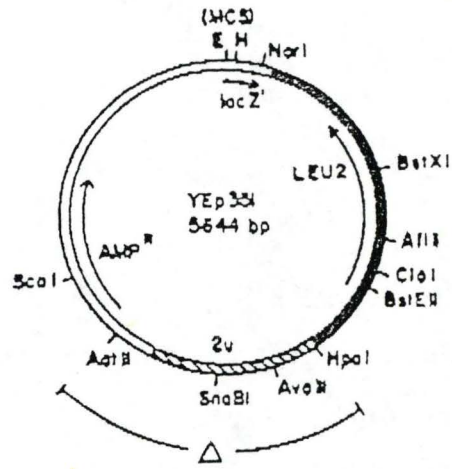


Fig. 3.14 La carte du plasmide YEp 351.

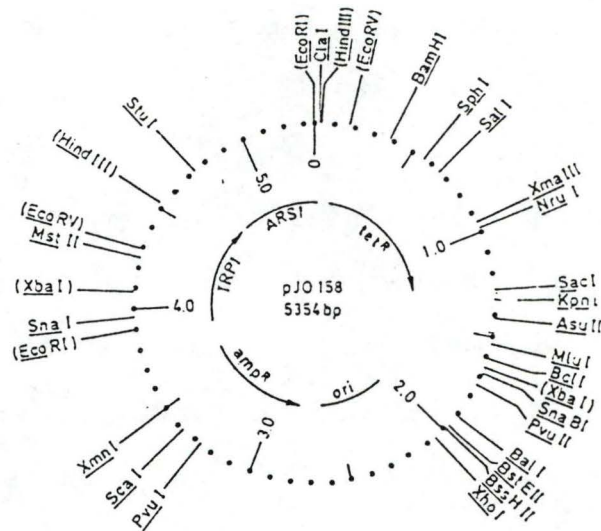


Fig. 3.15 La carte du plasmide pJO 158.

Nous isolerons le fragment interne du gène *LEU 2* à partir du plasmide YEp 351 (fig 3.14), pour l'introduire dans le plasmide pJO 158 (fig 3.15). Le plasmide ainsi formé servira à la disruption du gène *LEU 2* de la souche 302.21.

3.2.2. LE CHOIX DU PLASMIDE

Ce plasmide doit compléter une des deux auxotrophies de la souche 302.21, à savoir *his 4* et *trp 1*. Le marqueur d'auxotrophie à l'histidine des plasmides disponibles commercialement¹ est le gène *HIS 3* ; ils sont à ce titre inutilisables dans le cas présent. C'est pourquoi le plasmide choisi est pJO 158 qui est un plasmide *TRP 1* (fig 3.15).

La disruption intégrative étant basée sur une recombinaison, elle nécessite un plasmide d'intégration, c'est-à-dire qui ne puisse pas se maintenir à l'état autonome (voir "les plasmides chez la levure" dans "matériel et méthodes").

Or le plasmide pJO 158 est répliatif, par la présence de séquence ARS 1 (Autonomously replicating sequence). Il demande donc à être aménagé en vecteur intégratif par l'ablation de ARS 1 et l'insertion d'un fragment interne du gène *LEU 2*.

3.2.3. AMENAGEMENT DE pJO 158 EN PLASMIDE INTEGRATIF

Le gène *TRP 1*, marqueur d'auxotrophie, et la séquence ARS 1, assurant la répliation du vecteur pJO 158, ont pour origine un même fragment du génome de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce fragment de 1,4 Kb provient de la région centromérique du chromosome IV de cette levure (44) ; il est retrouvé chez la plupart des plasmides *TRP 1*.

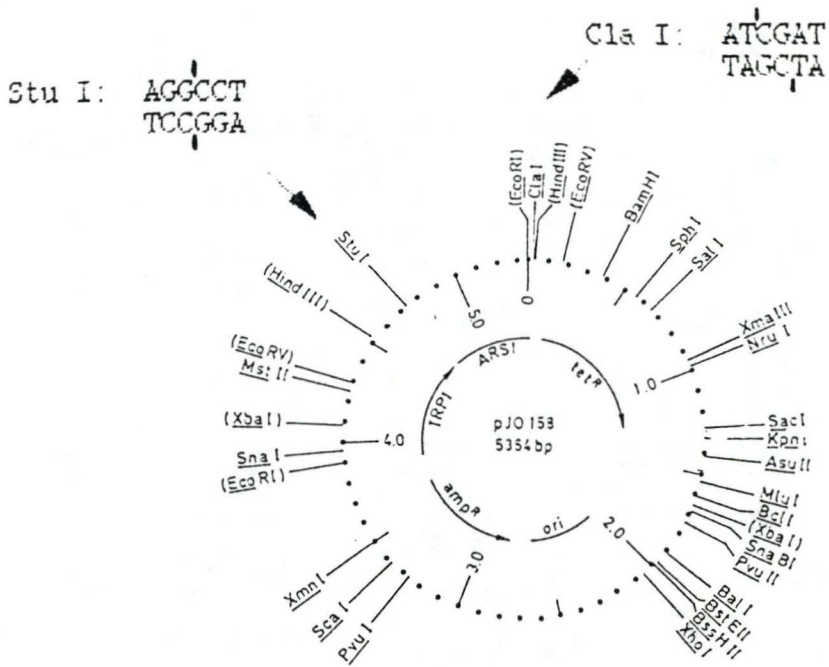


Fig. 3.16 Les restrictions effectuées sur le plasmide pJ0 158.

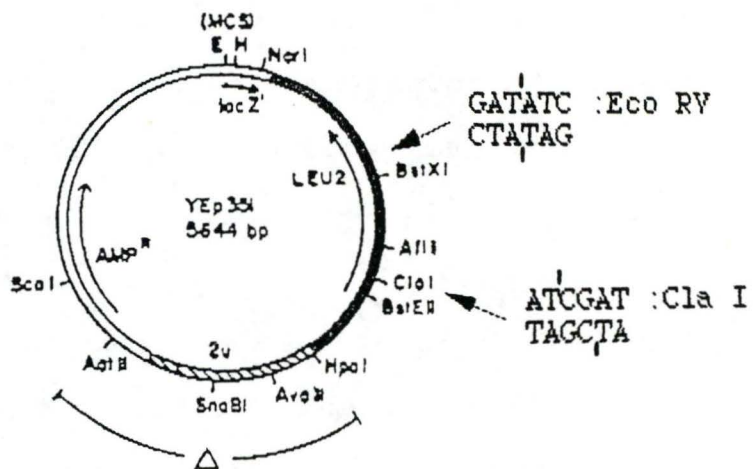


Fig. 3.17 Les restrictions effectuées sur le plasmide YE p 351.

TRP 1 et *ARS 1* sont contigus, et on n'exclut pas qu'ils puissent se chevaucher (28), (45).

Dans le cas présent, il est nécessaire d'avoir un gène *TRP 1* fonctionnel et une séquence *ARS 1* la moins fonctionnelle possible. C'est ce qui a justifié le choix des restrictions à opérer sur le plasmide pJO 158.

3.2.4. CONSTRUCTION DU VECTEUR pJM 1

Elle nécessite l'obtention du fragment interne du gène *LEU 2* de YEp 351 et la délétion de la séquence *ARS 1* de pJO 158. Les fragments générés seront ligués et le plasmide pJM 1 ainsi formé sera préparé en grande quantité. On s'attachera ensuite à en vérifier les caractéristiques.

3.2.4.1. Stratégie de construction

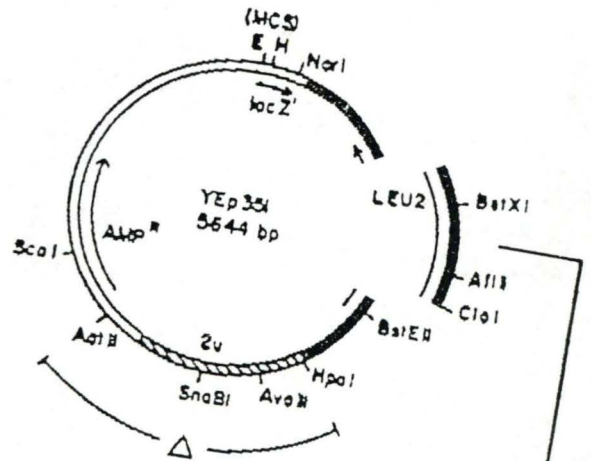
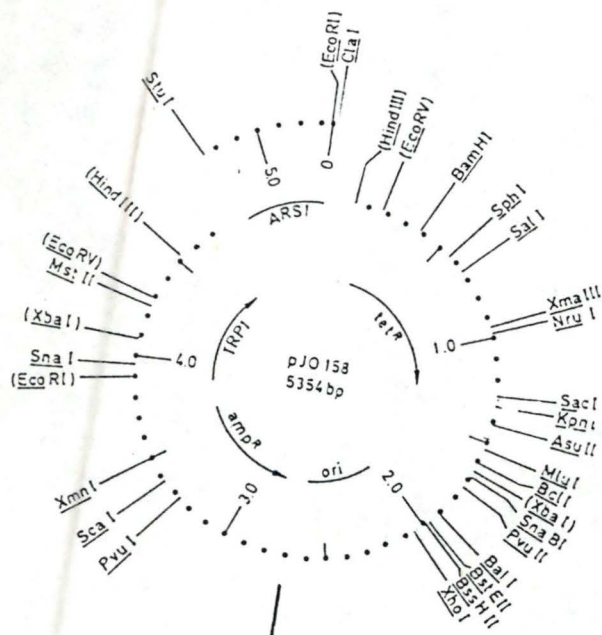
Pour la facilité des constructions, des sites à extrémités compatibles sont de préférence choisis.

A) Restriction de pJO 158

Dans la région d'environ 200 bp suspectée d'être une zone de recouvrement entre *TRP 1* et *ARS 1*, se trouvent deux sites de restriction : celui de l'endonucléase *Stu I* et celui de l'endonucléase *Hind III* (fig 3.16). *Stu I* coupe à proximité ou peut-être dans *ARS 1*, tandis que *Hind III* coupe à proximité ou peut-être dans *TRP 1*. Il y avait lieu de ménager l'intégrité de *TRP 1* tout en réduisant au maximum la séquence *ARS 1* ; c'est pourquoi le site *Stu I* fut choisi. Le second site de restriction choisi fut celui de l'endonucléase *Cla I*, situé de l'autre côté de la séquence *ARS 1* (fig 3.16).

B) Restriction de YEp 351

La seule contrainte est d'avoir un fragment interne du gène *LEU 2* pourvu d'un site de restriction. C'est pour-



pJM 1

Fig. 3.18 Construction du plasmide pJM 1 à partir des plasmides pJO 158 et YEp 351.

Le résultat de la récupération a été visualisé en réalisant l'électrophorèse sur gel d'agarose d'un aliquot des fragments isolés (fig 3.20, 1 et 2).

Compte tenu de la fraction de volume déposée, et en se référant à la fluorescence de l'étalon, on peut estimer le rendement de la récupération à :

- Environ 50 % dans le cas du fragment de 597 bp de YEp 351, puisque 1/5 de la solution obtenue au terme de l'isolement a été déposé sur gel et que sa fluorescence correspond à environ 100 ng d'ADN.
- Environ 50 % dans le cas du fragment de 4705 bp de pJO 158, puisque 1/25 de la solution obtenue au terme de l'isolement a été déposé sur gel et que sa fluorescence correspond à environ 80 ng d'ADN.

B) Ligation des fragments

- Mise au point :

Pour rappel, il existe deux types d'enzymes de restriction : celles qui produisent des extrémités cohésives et celles qui coupent à bouts francs. On sait que l'efficacité de la ligation est bien plus grande dans le cas d'extrémités cohésives que dans celui d'extrémités à bouts francs.

Afin d'estimer la différence d'efficacité existant entre les deux types de ligation, nous avons linéarisé le vecteur pJO 158, dans un cas par une enzyme coupant à bouts francs et dans l'autre par une enzyme formant des extrémités cohésives. Le vecteur linéarisé fut ensuite reliqué et utilisé pour la transformation de la souche XLI blue d'*Escherichia coli* (fig 3.21).

Sur base du nombre de transformants obtenus, on peut estimer que l'efficacité de la ligation d'extrémités cohési-

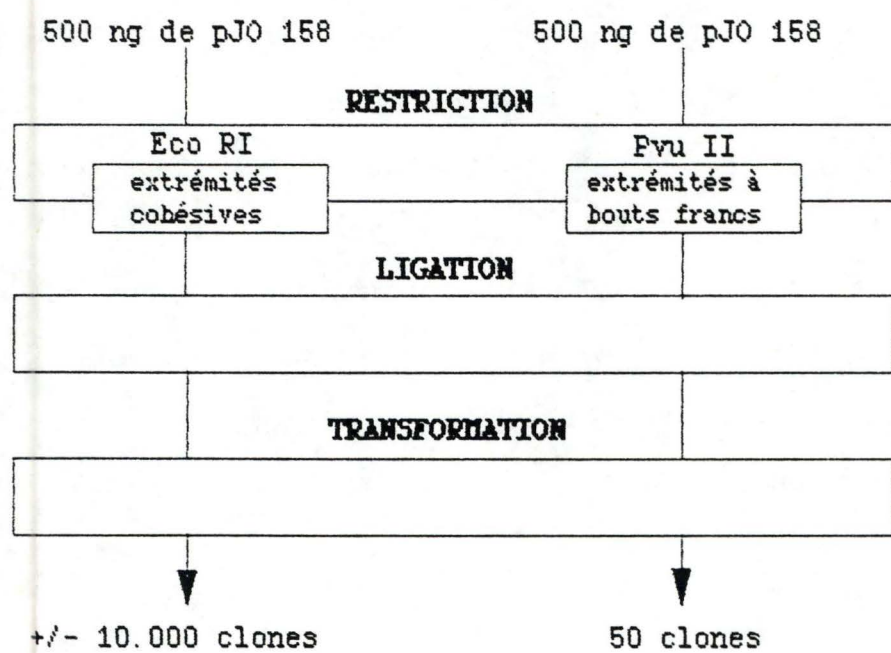


Fig. 3.21 Schéma du test de ligation effectué: toutes choses étant égales, pJO 158 restreint à bouts francs puis religué donne 200 fois moins de transformants que le même plasmide religué après une restriction ayant généré des extrémités cohésives.

ves est 200 fois plus grande que celle d'extrémités à bouts francs.

Intuitivement, on comprend que le problème soit encore plus marqué quand il ne s'agit plus simplement de religuer un vecteur linéarisé mais de liguer entre eux des fragments.

Par ailleurs, on sait que la ligation à bouts francs est plus efficace lorsque les fragments en présence sont incubés 4 heures à température ambiante plutôt que 12 heures à 14°C (condition recommandée habituellement pour la ligation d'extrémités cohésives).

De plus, la ligation à bouts francs exige 10 à 20 fois plus d'enzyme T₄ DNA ligase qu'une ligation d'extrémités cohésives (31).

Nos résultats confirment ces observations puisque après avoir été tentée sans succès dans des conditions habituelles, la ligation a réussi dans ces conditions particulières.

- Ligation proprement dite (cfr M & M)

Tenant compte de ce qui précède, nous avons procédé à la ligation des fragments dans les conditions suivantes :

- 450 ng du fragment de 597 bp de YEp 351
- 500 ng du fragment de 4705 bp de pJO 158
- 3 unités de T₄ DNA ligase
- 7 μ l de tampon de ligation 5 x

Le tout dans un volume total de 35 μ l.

La ligation a été effectuée pendant 4 heures à température ambiante suivies de 12 heures à 14°C.

C) Transformation de la souche XLI blue d'*Escherichia coli*

Après avoir visualisé la ligation en déposant 100 ng d'ADN sur un gel d'agarose, il fut procédé à la transformation de cellules d'*E. coli* XLI blue de la façon suivante (cfr M & M):

	Bgl II	Stu I	Afl II
pJO 158	3144 bp 2210 bp	5354 bp	/
pJM 1	5302 bp	/	5302 bp
BILAN:	perte d'un site chez pJM 1	perte du site chez pJM 1	gain du site chez pJM 1

Fig. 3.22 Les différences auxquelles on doit s'attendre entre pJO 158 et pJM 1 en ce qui concerne les restrictions Bgl II, Stu I et Afl II.

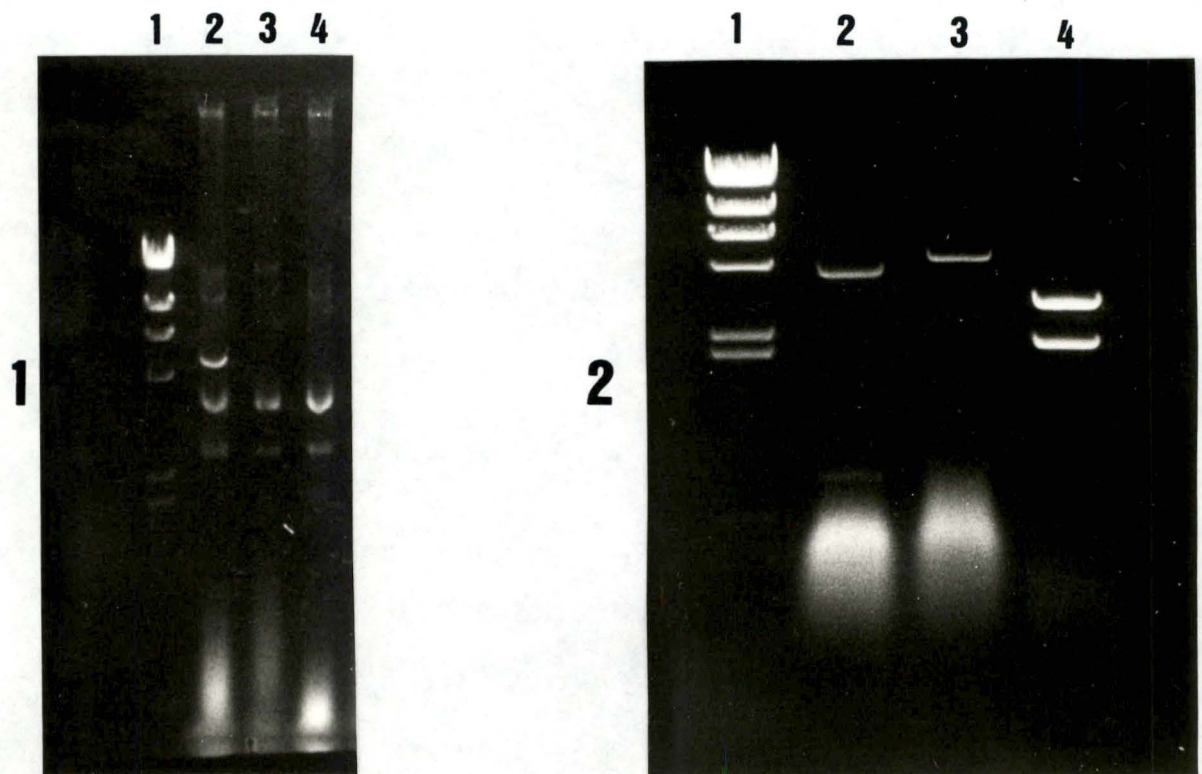


Fig. 3.23 Gels d' agarose des restrictions effectuées sur le plasmide extrait par miniprep du clone transformant d' *E. coli* obtenu après transformation par la mixture de ligation.

1) piste 1: étalon x Hind III
 piste 2: plasmide x Afl II
 piste 3: plasmide non restreint
 piste 4: plasmide x Stu I

2) piste 1: étalon x Hind III
 piste 2: plasmide x Hind III
 piste 3: plasmide x Bgl II
 piste 4: pJO 158 x Bgl II

- Deux transformations par un aliquot contenant 54 ng d'ADN dilué 5 fois par rapport au mélange de ligation.
- Une transformation par un aliquot contenant 730 ng d'ADN non dilué.

Les tests suivants furent réalisés :

- Un test de viabilité , en étalant des cellules compétentes non transformées sur milieu non sélectif.
- Un test de sensibilité aux antibiotiques, en étalant des cellules compétentes non transformées sur milieu sélectif.
- Un test de compétence, en étalant des cellules compétentes transformées par pJO 158 sur milieu sélectif.

An terme d'une nuit d'incubation à 37°C, un clone transformant est apparu sur la boîte correspondant aux cellules transformées par 730 ng d'ADN.

Ce taux de transformation extrêmement faible met bien en évidence les problèmes de ligation cités plus haut.

D) Première vérification de l'identité du plasmide porté par le clone transformant

10 ml de milieu LB + ampiciline et tétracycline furentensemencés par la colonie transformante et incubés une nuit à 37°C.

Les cellules obtenues ont servi à la préparation en petite quantité ("Miniprep") du plasmide (cfr M & M).

Des restrictions furent effectuées sur l'ADN obtenu par miniprep, afin d'estimer la taille du plasmide et de vérifier les différences de digestion auxquelles on doit s'attendre entre pJO 158 et pJM 1 (fig 3.22).

Les restrictions dont le résultat est visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose, donnent bien les résultats attendus (fig 3.23).

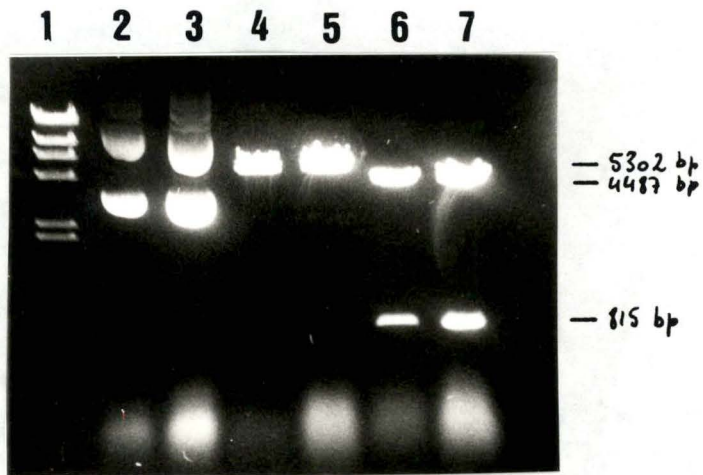


Fig. 3.24 Gel d' agarose des restrictions effectuées sur le plasmide pJM 1 préparé par maxiprep.
 piste 1: étalon x Hind III
 piste 2 et 3: pJM 1 non restreint.
 piste 4 et 5: pJM 1 x Afl II
 piste 6 et 7: pJM 1 x Hind III

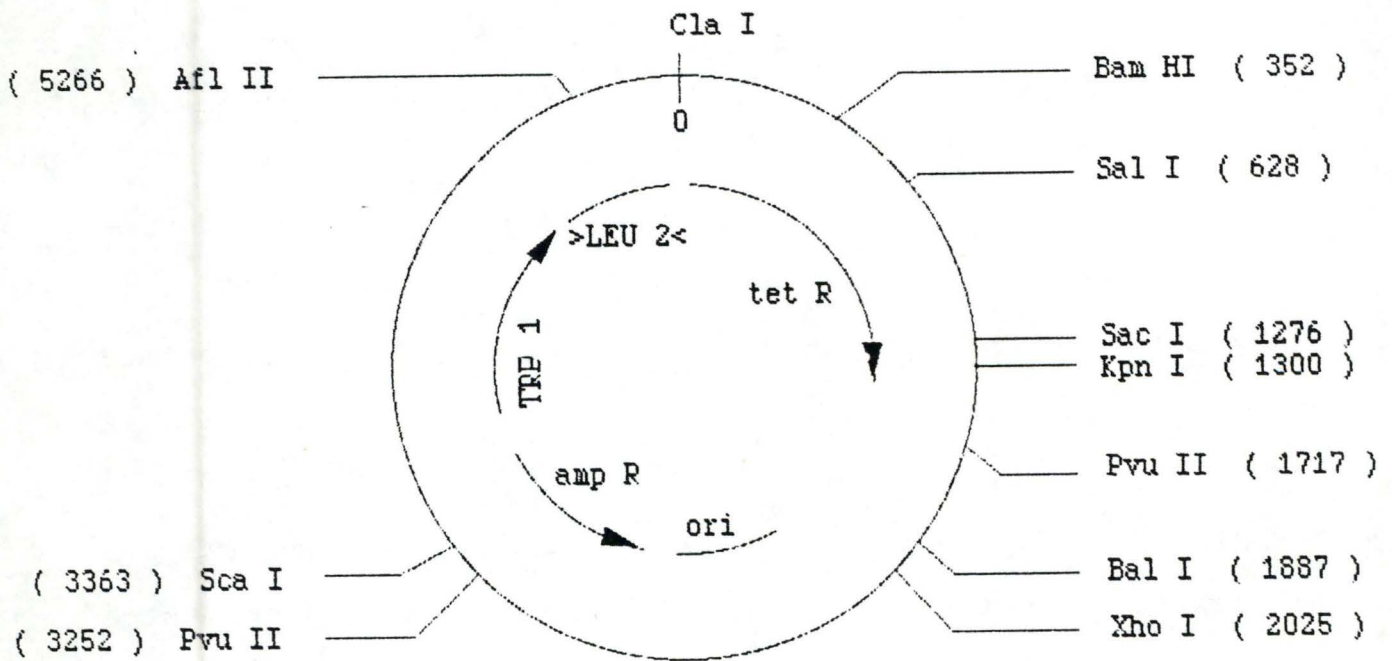


Fig. 3.25 Carte du plasmide pJM 1.

Le plasmide étant identifié, il fut alors préparé en grande quantité.

E) Préparation du plasmide pJM 1 en grande quantité ("Maxiprep")

Elle fut effectuée à partir d'une culture de 400 ml de milieu sélectif ensemencée par les cellules transformées.

Une fois extrait, le plasmide a été purifié sur un gradient de chlorure de césium duquel nous avons récupéré la forme CCC du plasmide (cfr M & M).

Estimation de la quantité de plasmide

Elle fut mesurée par lecture au spectrophotomètre. Sachant qu'une D.O. à 280 nm correspond à peu près à 50 μ g/ml d'ADN double brin, la quantité de plasmide fut estimée à 544 μ g (cfr M & M).

Pureté du plasmide

Elle est estimée par le rapport de la D.O. à 260 nm sur la D.O. à 280 nm. Un rapport de 1,8 caractérise une préparation de bonne qualité. Dans le cas d'une solution du plasmide pJM 1 diluée 40 x, le rapport était : $0,272/0,146 = 1,86$. La préparation est donc dans un état de pureté satisfaisant.

Les restrictions Hind III et AFL II furent effectuées sur le plasmide issu de la maxiprep. Leur résultat est visualisé par le gel d'agarose de la figure 3.24.

F) Carte du plasmide pJM 1

La carte de pJM 1, maintenant qu'il est identifié avec sûreté peut être dressée (fig 3.25). Le site Cla I est pris comme référence.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

4.1. CONCLUSIONS

Nous nous sommes proposé de cloner le gène *ADH 1* de *Kluyveromyces fragilis* par complémentation hétérologue d'une souche ADH nul de *Saccharomyces cerevisiae*.

Aucune des deux auxotrophies de la souche ADH nul ne correspond au marqueur du plasmide de la banque génomique de *K. fragilis* en notre possession, ce qui interdit une complémentation classique.

C'est pourquoi deux voies ont été envisagées :

- 1) Une complémentation que nous avons qualifiée de "directe" ne se basant que sur la réapparition du phénotype ADH I+.
- 2) L'aménagement de la souche 302.21 par une méthode de disruption intégrative, qui permettra de réaliser le clonage par complémentation de façon classique.

Nous sommes arrivés au terme de la première démarche. Elle ne nous a pas permis d'isoler le gène *ADH 1* de *K. fragilis*, en raison du fait que les trois clones ADH I+ obtenus ne possèdent pas de plasmide libre.

Dès lors, l'apparition du phénotype ADH I+ peut s'expliquer de ~~deux façons~~ ^{deux façons} : soit il s'agit de levures ayant subi une réversion (mutation de retour), soit un plasmide de la banque génomique portant le gène *ADH 1* de *K. fragilis* s'est intégré, totalement ou en partie, dans le génome des clones.

Nous n'avons pas jugé utile de trancher entre ces deux possibilités, dans la mesure où, même s'il s'agit de transformants, il y a eu intégration et dès lors le gène est irrécupérable.

Cette démarche est bien évidemment plus risquée qu'une

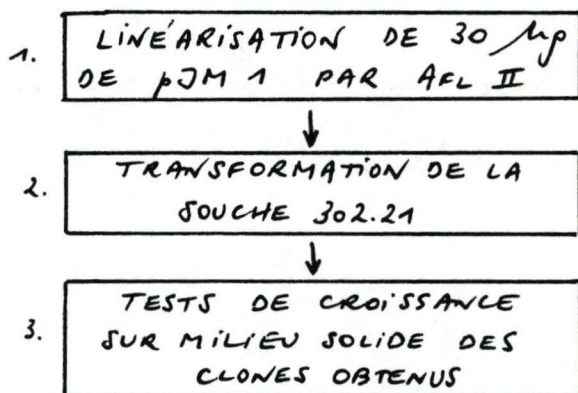


FIG 4.1 ÉTAPES AYANT ABOUTI À L'IDENTIFICATION DE CLONES DE LA SOUCHE 302.21 POSÉDANT L'ANXOTROPHIE $\text{Am}2$.

complémentation classique car elle ne se base que sur l'apparition du phénotype recherché et ne permet pas de contrôler le taux de transformation.

La probabilité de réversion ou d'intégration d'un plasmide n'est cependant pas plus grande que dans le cas d'une complémentation classique. Le problème vient de ce qu'une complémentation de ce type ne permet pas de prime abord de distinguer les levures ayant subi une réversion de celles ayant été transformées.

La voie de la complémentation directe nous permet de conserver un acquis important : nous avons mis au point des conditions de clonage utilisables dans le cadre d'une complémentation classique.

D'autre part, nous nous sommes engagés dans la voie de la complémentation classique. Nous avons en effet construit un plasmide permettant d'apporter l'auxotrophie *leu 2*, que complète le plasmide de la banque génomique, par disruption intégrative.

L'obtention de la souche aménagée permettra non seulement le clonage par complémentation du gène *ADH 1* de *K. fragilis*, mais aussi le clonage d'*ADH 2* et *ADH 3*.

Les derniers résultats obtenus au terme de ce mémoire indiquent que la souche recherchée a effectivement été obtenue. La fig 4.1. résume les étapes essentielles des expériences réalisées. La preuve formelle que l'intégration s'est bien effectuée pourra être obtenue par l'examen comparatif de la taille des fragments de restriction dans la région cible (Southern blot) pour les transformants par intégration disruptive et le contrôle.

Sous réserve de cette vérification, nous pensons donc être à pied d'oeuvre pour entreprendre le clonage d'*ADH 1* (et d'autres

gènes de l'ADH) de *Kluyveromyces fragilis*.

4.2. PERSPECTIVES

A court terme, la possession de la souche 302.21 aménagée permettra de cloner par complémentation le gène *ADH 1* de *K. fragilis* et ensuite d'en obtenir la séquence.

A long terme, la possession de ce gène ouvre des perspectives au plan d'études génétiques et enzymologiques.

Perspectives génétiques

Des comparaisons entre l'expression du gène dans son environnement homologue (*K. fragilis*) et dans un environnement hétérologue (*S. cerevisiae*) pourront être effectuées, ainsi que la comparaison des niveaux d'expression des deux gènes dans le même environnement.

Les observations découlant de ces études seront à mettre en rapport avec la structure des signaux de transcription et de traduction des deux gènes. Les hypothèses avancées pourront être éprouvées par les répercussions des modifications de séquence par mutagenèse dirigée sur les mécanismes d'expression.

Dans une optique plus appliquée, le clonage du gène *ADH 1* de *K. fragilis* nous mettra en possession d'un promoteur fort sous le contrôle duquel un gène aura chez cette levure un haut niveau de transcription.

Perspectives enzymologiques

Les différences de séquence en acides aminés existant entre l'ADH I de *K. fragilis* et de l'ADH I de *S. cerevisiae* pourront être mises en parallèle avec leurs différences d'activité et d'optimum d'action.

Ici aussi, la mutagenèse dirigée permettra de vérifier le bien-fondé des présomptions que l'on pourra avoir à ce sujet.

Conjuguant les deux types de perspectives énoncés, la réalisation de gène de fusion (qu'il s'agisse de fusion des signaux d'un gène avec la partie codante de l'autre ou de fusion de parties codantes) constitue une approche particulièrement séduisante du problème des relations structure - fonction régissant la synthèse et / ou l'activité de l'ADH I.

BIBLIOGRAPHIE

1. A.T. PROFY & P. SCHIMMEL. (1988). Complementary use of chemical modification and site-directed mutagenesis to probe structure-activity relationships in enzymes, 1-26. // W.E. Cohn & K. Moldave (eds.), Progress in nucleic acid research and molecular biology, 35, Academic press, inc.
2. C. MURALI & E.H. CREASER. (1986). Protein engineering of alcohol dehydrogenase - 1. Effect of two amino acid changes in the active site of yeast ADH 1. Protein engineering, 1, 55-57.
3. H. JÖRNVALL. (1977). Differences between alcohol dehydrogenases. Eur. J. Biochem. 72, 443-452.
4. V.M. WILLIAMSON, J. BENNETZEN, E.T. YOUNG, K. NASMYTH & B.D. HALL. (1980). Isolation of the structural gene for alcohol dehydrogenase by genetic complementation in yeast. Nature, 283, 214-216.
5. H. JÖRNVALL, B. PERSSON & J. JEFFERY. (1987). Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. Eur. J. Biochem. 167, 195-201.
6. C.I. BRÄNDEN, H. JÖRNVALL, H. EKLUND & B. FURUGREN. (1975). Alcohol dehydrogenases, 103-190. // P.D. Boyer (ed.), The enzymes, 11, 3d ed. Academic press, inc.
7. H. JÖRNVALL, H. EKLUND & C.I. BRÄNDEN. (1978). Subunit conformation of yeast alcohol dehydrogenase. J. Biol. Chem. 253, 8414-8419.
8. B. LEWIN. (1987). Genes, 3d ed. Wiley.
9. C.I. BRÄNDEN, H. EKLUND, C. CABBILLAU & A.J. PRYOR. (1984). Correlation of exons with structural domains in alcohol dehydrogenases. The EMBO Journal, 3, 1307-1310.

10. A.J. GANZHORN & B.V. PLAPP. (1988). Carboxyl groups near the active site zinc contribute to catalysis in yeast alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 263, 5446-5454.
11. C. DREWKE & M. CIRIACY. (1988). Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 950, 54-60.
12. J.N. STRATHERN, E.W. JONES, J.R. BROACH. (1982). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, 1st ed. Cold spring harbor laboratory.
13. J.L. BENNETZEN & B.D. HALL. (1982). The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase I. *J. Biol. Chem.* 257, 3018-3025.
14. A.J.P. BROWN & G.J. LITHGOW. (1987). The structure and expression of nuclear genes in *Saccharomyces cerevisiae*, 1-26. In J.R. Kinghorn (ed.), *Gene structure in eucaryotic microbes*, 1st ed. IRL press.
15. J. YU, M.S. DONOVIEL & E.T. YOUNG. (1989). Adjacent upstream activation sequence elements synergistically regulate transcription of ADH 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 34-42.
16. E.T. YOUNG & D. PILGRIM. (1985). Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3024-3034.
17. A.J. GANZHORN, D.W. GREEN, A.D. HERSHEY, R.M. GOULD & B.V. PLAPP (1987). Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 8, 3754-3761.
18. A. P.G.M. VAN LOON & E.T. YOUNG. (1986). Intracellular sorting of alcohol dehydrogenases isoenzymes in yeast: a cytosolic location reflects absence of an amino-terminal targeting sequence for the mitochondrion. *EMBO J.* 5, 161-165.

19. V.M. WILLIAMSON & C.E. PAQUIN. (1987). Homology of *Saccharomyces cerevisiae* ADH4 to an iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*.
Mol. Gen. Genet. 209, 374-381.
20. F. SOR & H. FUKUHARA. (1989). Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*.
Yeast, 5, 1-10.
21. R.J. ROUWENHORST, L.E. VISSER, A.A. VAN DER BAAN, W.A. SCHEFFERS & J.P. VAN DIJKEN. (1988). Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.
Appl. Envir. Microbiol. 54, 1131-1137.
22. H.J. PHAFF. (1981). Industrial microorganisms, 15-27. /n Industrial microbiology and the advent of genetic engineering.
Freeman.
23. H.Y. STEENSMA, F.C.M. DE JONGH & M. LINNEKAMP. (1988). The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*.
Curr. Genet. 14, 311-317.
24. S. DAS, E. KELLERMANN & C.P. HOLLENBERG. (1984). Transformation of *Kluyveromyces fragilis*.
J. Bacteriol. 158, 1165-1167.
25. T.A. BROWN. (1988). Gene cloning: an introduction, 2d ed.
Van Norstrand Reinhold.
26. D.T. SUZUKI, A.J.F. GRIFFITHS, J.H. MILLER, R.C. LEWONTIN. (1986). An introduction to genetic analysis, 3d ed.
Freeman.
27. G. BOGUSLAWSKI. (1985). Yeast transformation, 161-195. /n Gene manipulation in fungi.
Academic press.
28. M. HEUSTERSPREUTE, J. OBERTO, V. HA-THI & J. DAVISON. (1985). Vectors with restriction-site banks - III. *Escherichia coli* - *Saccharomyces cerevisiae* shuttle vectors.
Gene, 34, 363-366.

29. T. MANIATIS, E.F. FRITSCH & J. SAMBROOK. (1982). Molecular cloning (A laboratory manual).
Cold spring harbor laboratory.
30. F.M. AUSUBEL, R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.A. SMITH, J.G. SEIDMAN & K. STRUHL. (1987). Current protocols in molecular biology.
Wiley interscience.
31. P.V. KING & R.W. BLAKESLEY. (1986). Optimasing DNA ligations for transformation.
Focus, 8, 1-3.
32. H. ITO, Y. FUKUDA, K. MURATA & A. KIMURA. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.
J. Bacteriol. 153, 163-168.
33. L.G. DAVIS, M.D. DIBNER & J.F. BATTEY. (1986). Basic methods in molecular biology.
Elsevier.
34. C.S. HOFFMAN & F. WINSTON. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*.
Gene, 57, 267-272.
35. F. SHERMAN, G.R. FINK, J.B. HICKS. (1986). Laboratory course manual for methods in yeast genetics.
Cold spring harbor laboratory.
36. H.W. DOELLE. (1981). Basic metabolic processes, 113-212. // H.J. Rehm & G. Reed (eds.), Biotechnology, a comprehensive treatise in 8 volumes, 1.
Verlag chemie.
37. U. LUTSTORF & R. MEGNET. (1968). Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*.
Archives of biochemistry and biophysics, 126, 933-944.
38. P.G. STECHER, M. WINDHOLZ, D.S. LEAHY. (1968). The Merck index, 8th ed.
Merck & co., inc.

39. A.L. LEHNINGER. (1985). Principe de biochimie, 1e ed.
Flammarion Medecine-Science.
40. C. WILLS & J. PHELPS. (1975). A technique for the isolation of yeast
alcohol dehydrogenase mutants with altered substrate
specificity.
Arch. biochem. biophys., 167, 627-637.
41. A.P. RYLES, K. SMITH & R.S. WARD. (1980). Essential organic
chemistry for students of the life sciences.
wiley
42. W. LOROWITZ & D. CLARK. (1982). *Escherichia coli* mutants with a
temperature-sensitive alcohol dehydrogenase.
J. Bact. 152, 935-938.
43. D. BOTSTEIN & G.R. FINK. (1988). Yeast: An experimental organism for
modern biology.
Science, 240, 1439-1443.
44. D.T. STINCHOMB, K. STRUHL & R.W. DAVIS. (1979). Isolation and
characterisation of a yeast chromosomal replicator.
Nature, 282, 39-43.
45. G. TSCHUMPER & J. CARBON. (1980). Sequence of a yeast DNA
fragment containing a chromosome replicator and the TRP 1 gene.
Gene, 10, 157-166.