



THESIS / THÈSE

LICENCE EN ZOOLOGIE

Analyse fonctionnelle des signaux de régulation transcriptionnelle du gène PHO81 de *Saccharomyces cerevisiae* par l'étude in vivo de l'expression d'un reporter LacZ

Canon, Laurence

Award date:
1992

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.

Analyse fonctionnelle des signaux de régulation transcriptionnelle du gène *PHO81* de *Saccharomyces cerevisiae* par l'étude *in vivo* de l'expression d'un reporter *LacZ*.

CANON Laurence

Résumé

La région 5'amont de *PHO81* contient 3 UAS potentielles susceptibles d'être reconnues par les protéines *trans*-activatrices Pho2 et Pho4 qui agissent elles-mêmes sur le promoteur de *PHO5*. Nous avons réalisé des fusions du promoteur *PHO81* différentiellement délété avec un gène-rapporteur (*lacZ*). L'expression de celui-ci, facilement détectable par l'activité de l'enzyme β -galactosidase, permet de déterminer le rôle régulateur spécifique de ces UAS. D'autre part, l'expression de ces rapporteurs dans les souches sauvages et mutantes (*pho2* et *pho4*) nous donne des informations quant à la fonction des facteurs *trans*. Nos résultats, en accord avec ceux obtenus par l'équipe d'Oshima (comm.pers.) ont conduit à proposer un rôle d'UAS, pour la région 5' distale, sous le contrôle des facteurs Pho2 et Pho4 (expliquant ainsi le rétro-contôle positif sur *PHO81* de Pho4 et Pho2 activés via l'expression de *PHO81*) et d'URS pour la boîte proximale (UASp1) sous le contrôle d'un facteur inconnu. En outre, une délétion de la région UASp1 autorisant l'expression du rapporteur confirme l'hypothèse d'un site+1 différent de celui identifié par Oshima et dans cette optique, l'existence d'une région promotrice plus amont est proposée.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1992

Promoteur : Prof.J. Vandenhautte

Co-promoteur : Prof. J. Delcour

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue au cours de ce mémoire.

Je remercie plus particulièrement le Professeur Jean Vandehaute et le Professeur Jean Delcour pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, ainsi que Déborah Prozzi, Jean-Pol Cassart et tous les membres du laboratoire de Génétique Moléculaire .

Toute ma reconnaissance à Mademoiselle A. Tibor, Madame D. Prozzi, Monsieur G. Berben et Monsieur A. Goffinet qui ont accepté de lire ce mémoire.

Enfin, je remercie mes parents et Philippe pour leur soutien tout au long de mes années d'études.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMP ^R	résistance à l'ampicilline
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
bp	paire de base ("base pair")
DO	densité optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	éthylène diamine tétra-acétique
kb	kilobase
MCS	site multiple de clonage ("multiple cloning site")
ORF	phase ouverte de lecture ("open reading frame")
ORI	origine de réplication
pBS	pBluescript
Pi	phosphate inorganique
pmole	picomole
P PHO81	promoteur de <i>PHO81</i>
rAPase	phosphatase acide répressible
rAlkase	phosphatase alcaline répressible
rpm	tour par minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAB	albumine du sérum bovin
SDS	sodium dodécyl sulfate
site +1	site d'initiation de la transcription
U	unité
UAS	séquence activatrice amont
X	restreint par

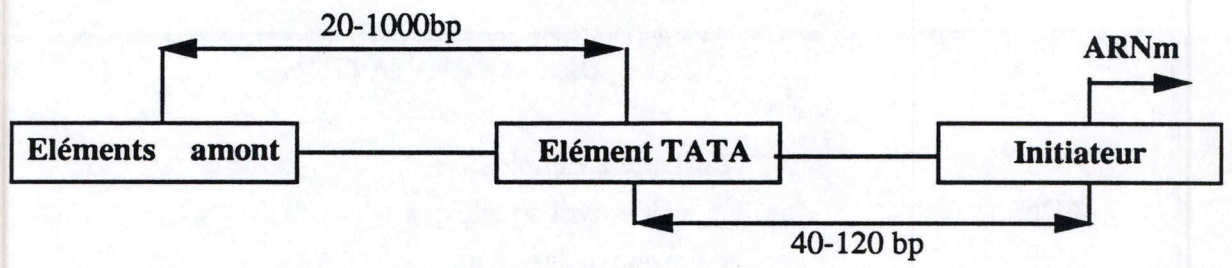


Figure I.1 : structure d'un promoteur de levure (Struhl, 1989)

I.INTRODUCTION.

I.1. Régulation transcriptionnelle chez la levure (Sigler,1988 ; Struhl, 1989 ; Woychick et Young, 1990).

La transcription est la première étape de l'expression génique et constitue l'étape principale où se fait le contrôle. La transcription d'un chaîne d'ARN messenger par l'enzyme ARN polymérase II. La réaction peut être divisée schématiquement en trois étapes :

- * l'initiation constitue la phase critique où la "décision" de transcription sera prise. Elle nécessite la formation d'un complexe comprenant l'ARN polymérase II, le promoteur et les facteurs de transcription.

- * l'élongation

- * la terminaison du transcrit.

I.1.1. Les éléments impliqués dans la transcription.

Les promoteurs de l'ARN polymérase II contiennent une variété d'éléments *cis* qui peuvent être reconnus par des facteurs *trans*..

Les éléments cis sont représentés par (figure I.1) :

- les éléments proximaux ou généraux :

- * l'élément "TATA" (TATA box) : est nécessaire à l'initiation exacte et efficiente de la transcription.

- * l'initiateur (ou site+1 ou site CAP) : chez la levure, la transcription peut débuter entre 30 et 120 paires de bases en aval de la boîte TATA. C'est l'initiateur qui définit la position d'initiation.

- Les éléments en amont ou spécifiques, sont impliqués dans la régulation des gènes. Parmi eux, les UAS (Upstream Activating Sequences) sont des séquences activatrices de 9 à 30 paires de bases ayant un rôle majeur dans la spécificité de la régulation. Elles fonctionnent quelle que soit leur orientation et peuvent agir à des distances relativement grandes par rapport à la boîte TATA.

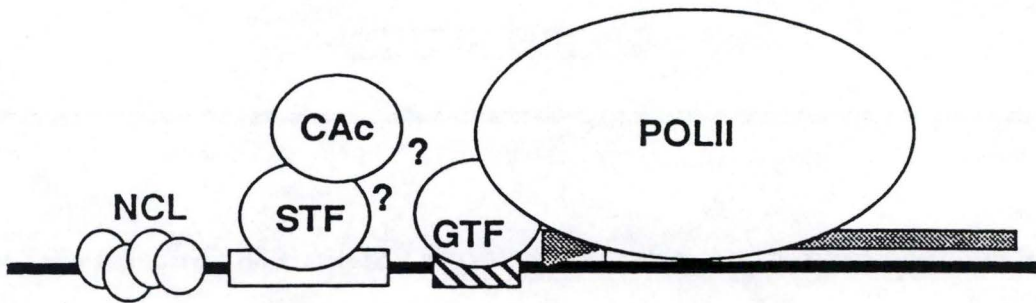


Figure I.2 : facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle. POLII : ARN polymérase II ; GTF : facteurs généraux de transcription ; STF : facteur(s) spécifique(s) de transcription ; NCL : nucléosomes ; CAc : coactivateurs ; ? : interactions non démontrées ; ▨ promoteur ; □ enhancer ; (Vidal, 1991).

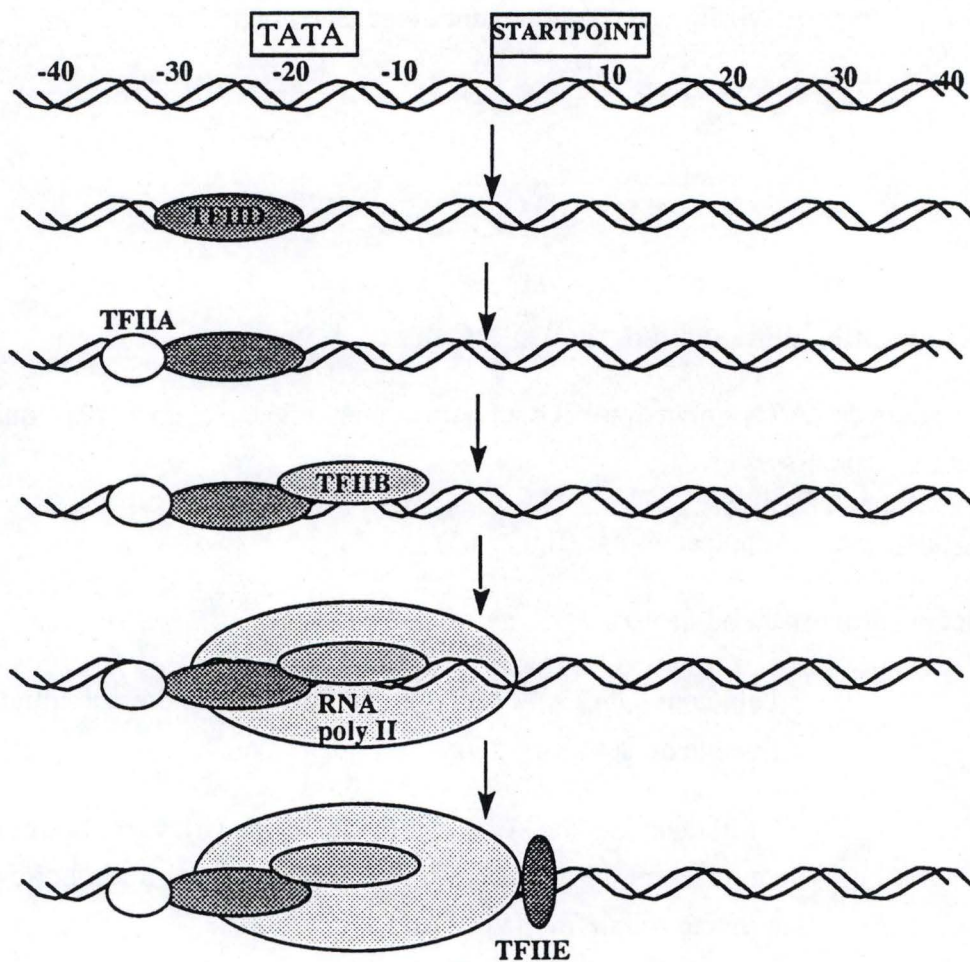


Figure I.3 : l'ARN polymérase II se lie au promoteur durant l'assemblage du complexe de transcription. Ce complexe de transcription contient plusieurs facteurs de transcription (Lewin, 1990).

D'autres séquences dites URS (Upstream Repressing Sequence) fixant des facteurs répresseurs ont également été mises en évidence.

Les facteurs *trans* comprennent d'une part les facteurs généraux, constituant avec les éléments *cis* proximaux, l'appareil basal de transcription. Ils sont indispensables pour diriger, avec l'ARN polymérase II, la transcription. D'autre part, en plus de l'appareil basal, des protéines régulatrices spécifiques sont responsables de l'activation (ou de la répression) de la transcription. Cette activation ou répression se fait via des interactions faisant intervenir les séquences *cis* spécifiques amont (figure I.2).

A - Les facteurs généraux de la transcription et l'ARN polymérase II.

L'ARN polymérase II de *Saccharomyces cerevisiae* est un multimère de 11 sous-unités codées par les gènes *RPD* (Reduced Potassium Dependency) qui s'avèrent être tous indispensables à la viabilité cellulaire (Woychick et Young, 1990). Le gène *RPD1* code pour la plus grande sous-unité. Celle-ci a son extrémité carboxy-terminale constituée d'un motif répété de 7 acides aminés : tyr-ser-pro-thr-ser-pro-ser (code des acides aminés en trois lettres) appelé CT7n. Le domaine carboxy-terminal contient 17 à 26 motifs chez la levure. La délétion d'un trop grand nombre de ces motifs est létale. En fait, ce domaine jouerait un rôle important dans l'initiation de la transcription (Sigler 1988 ; figure I.5).

L'initiation de la transcription des gènes eucaryotiques demande 5 composantes essentielles : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF qui agissent dans un ordre défini afin de construire un complexe d'initiation lié à l'ARN polymérase II. La première étape de la formation du complexe est la liaison du facteur TFIID à la boîte TATA.(figure I.3)

Chez la levure, le gène du facteur TFIID (γ TFIID) a été cloné et ne révèle aucun domaine à motif connu de liaison à l'ADN (voir ci-dessous). Par contre, il présente simplement un domaine à caractère basique dans sa région carboxy-terminale. Les autres facteurs généraux de transcription restent à déterminer.

B - Les activateurs transcriptionnels.

Les activateurs transcriptionnels sont munis d'un domaine de liaison à l'ADN qui assure "l'ancrage" de la protéine à des séquences cibles (UAS) situées en amont du gène et d'une région d'activation impliquée dans l'interaction avec un élément de l'appareil basal de transcription.

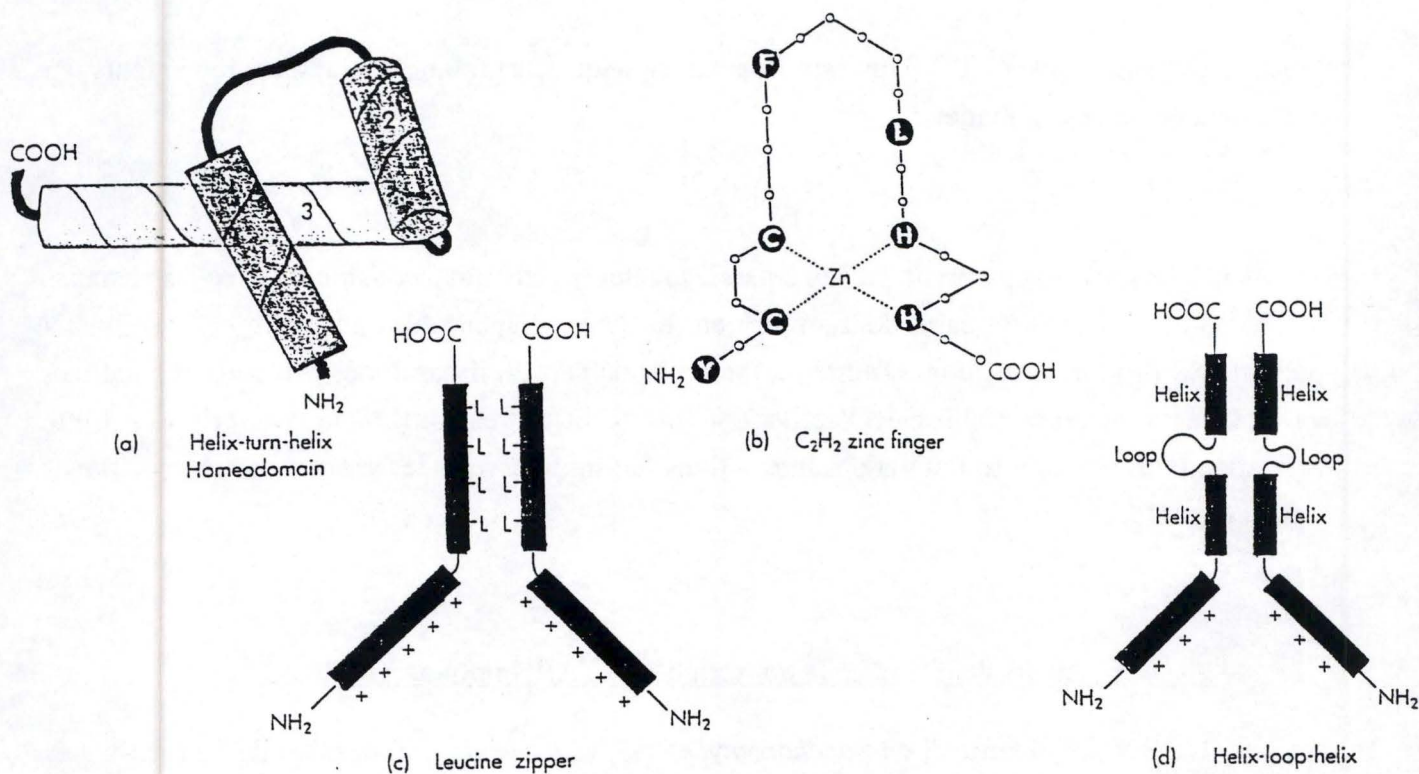


Figure I.4 : modèles structuraux des domaines de liaison à l'ADN des activateurs transcriptionnels.

a) Le motif helix-turn-helix : l'hélice 3 formerait le contact avec l'ADN.

b) Le motif zinc finger : un atome de zinc est complexé par 2 cystéines et 2 histidines.

c) Le motif leucine zipper : agit en tant que dimère. Les résidus leucines sont placés périodiquement dans la séquence primaire fournissant une surface hydrophobe pour l'interaction des 2 sous-unités. Une région basique serait responsable de la liaison à l'ADN (Watson, 1992)

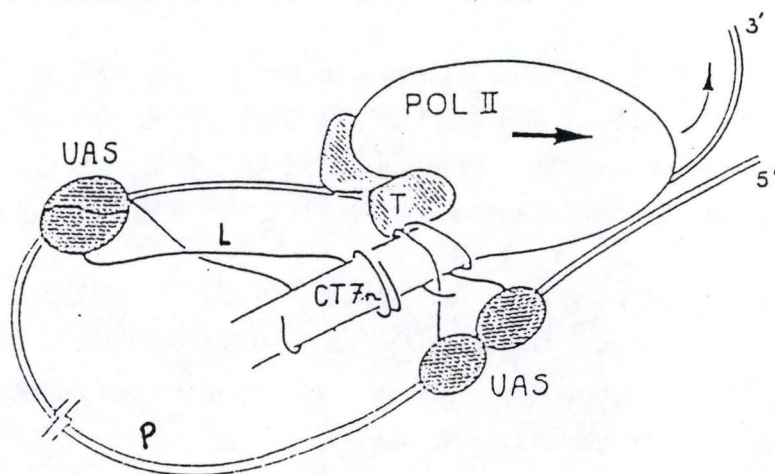


Figure I.5 : le modèle de Sigler (1988) montre les interactions entre les régions acides des activateurs et l'ARN polymérase II.

T : facteurs généraux de transcription ; P : promoteur ; UAS : séquences activatrices où se fixent les protéines activatrices ; L : lacet = régions activatrices acides ; CT7_n : queue de l'ARN polymérase II.

* Les domaines de liaison à l'ADN : on connaît de nombreux types de domaines de liaison à l'ADN : les motifs "helix-turn-helix", les "zinc finger", les "leucine zipper" (l-zip) et les "helix-loop-helix" (HLH) sont parmi les plus fréquentes (Watson, 1992 ; figure I.4).

Le modèle "helix-loop-helix" représente deux hélices amphipathiques séparées par une boucle et flanqué d'une région basique du côté amino-terminal. Ce domaine de liaison à l'ADN est de nature bipartite : un segment (la région basique, notée b) procure l'interface de liaison à l'ADN et l'autre (helix-loop-helix, noté HLH) fournit l'interface de dimérisation. Chez *S. cerevisiae*, on retrouve ce motif (bHLH) dans la protéine Pho4, l'activateur du gène *PHO5* (Berben *et al*, 1990 *in* Berben, 1991; Ogawa et Oshima, 1990).

* Les régions d'activation : Les activateurs transcriptionnels (et les répresseurs) doivent entrer en contact des composants de l'appareil basal de transcription. Ce contact se fait par l'intermédiaire de régions spécifiques qui possèdent, en général, un caractère acide ("negative noddles", Sigler, 1988). Il semble que la répartition de ces charges négatives ne soit pas aléatoire : beaucoup formeraient des hélices α amphipathiques c'est à dire une hélice dont les résidus hydrophiles se retrouvent d'un côté et les résidus hydrophobes de l'autre (Giniger et Ptashne, 1987).

Mais ces caractéristiques ne paraissent pas ubiquitaires : l'abondance en résidus glutamines ou prolines, ou encore la phosphorylation peuvent jouer sur la fonction d'activation (Sorger et Pelham, 1988). Un des rôles supposés des zones chargées négativement dans l'initiation pourrait consister en une interaction avec les motifs répétés (CT7n) de l'extrémité carboxy-terminale de l'ARN polymérase II. Cette interaction consisterait à mettre les différents partenaires en place pour l'initiation et elle prendrait fin après la phosphorylation de certains résidus des motifs CT7n (figure I.5).

Il faut également mentionner l'influence que la chromatine pourrait avoir sur la transcription des gènes. En effet des expériences récentes suggèrent que l'activation transcriptionnelle résulte d'une compétition entre les facteurs transcriptionnels et les histones pour la liaison au promoteur (Felsenberg, 1992).

I.1.2 Les mécanismes de la régulation transcriptionnelle (Ptashne, 1986 ; Ptashne, 1988)

Quatre mécanismes (le twisting, le sliding, l'oozing, le looping ; figure I.6) ont été élaborés afin d'expliquer comment des protéines régulatrices, qui se lient à des sites de l'ADN parfois très

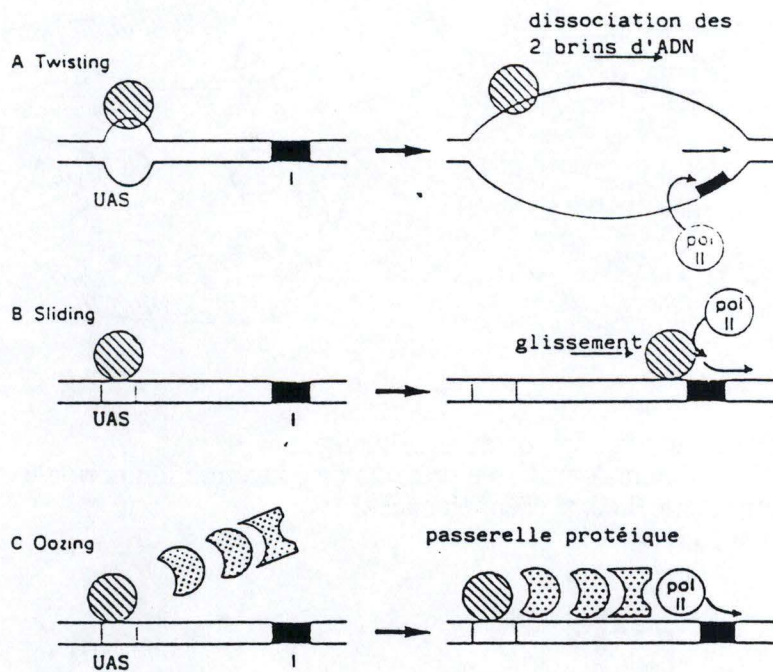


Figure I.6 : a) twisting : l'activateur lié à son UAS modifie la conformation de l'ADN qui se propage jusqu'au site d'activation de la transcription et permet ainsi l'accès de la machinerie de la transcription.

b) sliding : l'activateur fixé sur son UAS "glisse" jusqu'à une cible proche du site d'activation.

c) oozing : la présence de l'activateur sur l'UAS se transmet via une série de protéines intermédiaires créant une "passerelle" entre l'activateur et une cible proche du site d'initiation (Ptashne, 1986 *in* Berben, 1991).

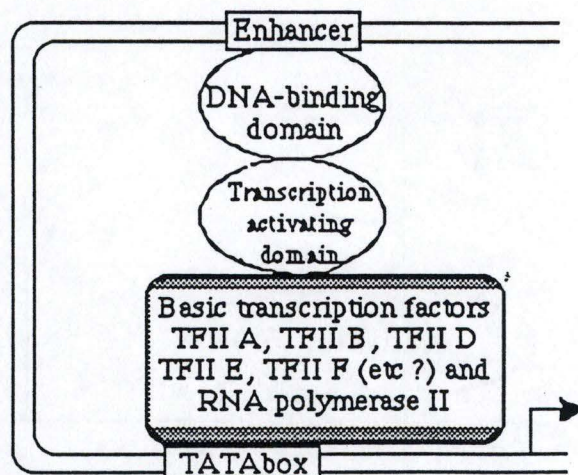


Figure I.7 : modèle du complexe d'initiation de la transcription, modèle du looping (Martin, 1991).

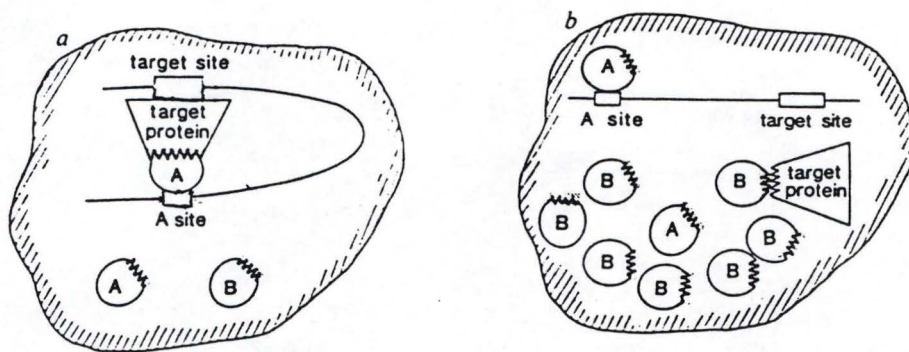


Figure I.8 : le phénomène du squelching :

a) Les activateurs A et B sont présents en concentration normale

b) L'activateur B est présent en excès.

(Ptashne, 1988)

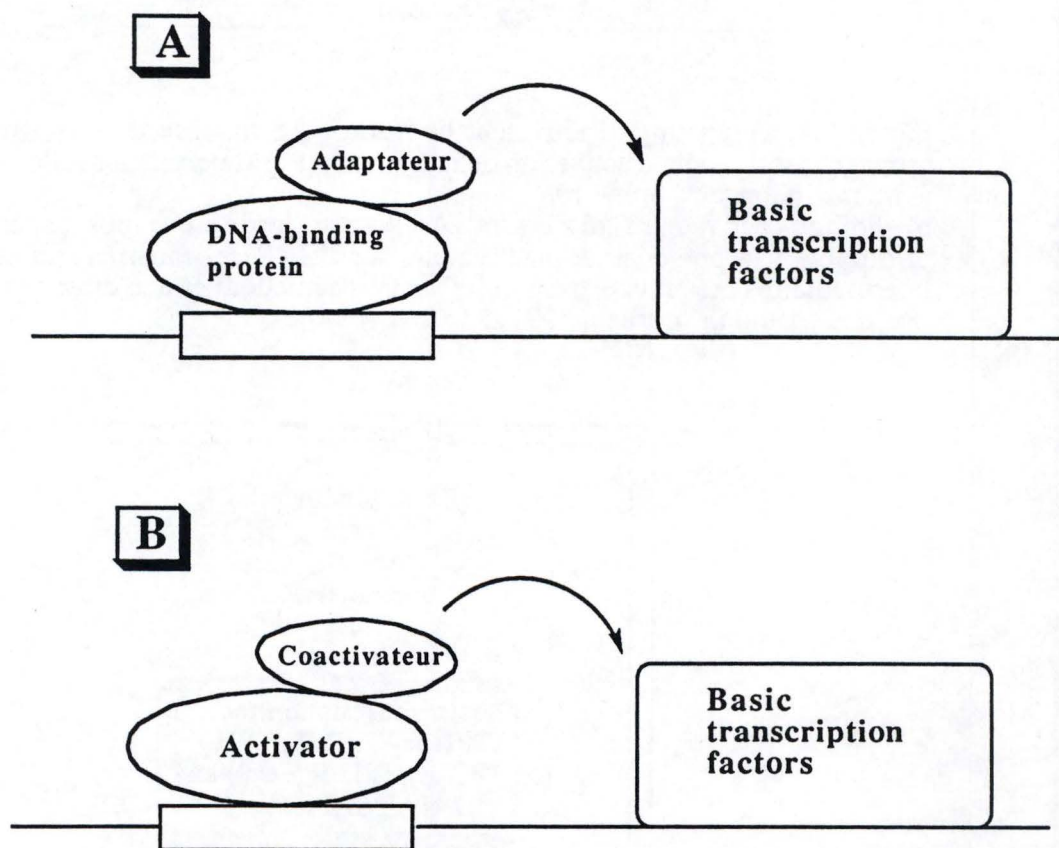


Figure I.9 : Diagramme des complexes d'initiation de la transcription impliquant :

A) un adaptateur qui se lie à une protéine, elle-même liée au promoteur, et qui contient une région d'activation interagissant avec les facteurs généraux de transcription;

B) un coactivateur qui contacte directement, avec un autre activateur, le(s) facteur(s) généraux

(Martin, 1991).

éloignés du site d'initiation de la transcription (enhancer, UAS...), peuvent influencer l'activité de l'ARN polymérase II et ainsi agir sur le taux de transcription (Ptashne 1986). Le modèle du looping est le plus souvent retenu. Celui-ci suppose que grâce à la courbure du promoteur, l'activateur lié à un UAS est mis en contact au moyen de sa région d'activation avec une cible protéique du complexe d'initiation. Ce contact activerait la transcription par stabilisation du facteur cible lié au promoteur ou par la conversion de ce même facteur en une forme active (figure I.7).

La surexpression d'un activateur peut inhiber la transcription normale de la plupart des gènes par l'ARN polymérase II. En effet, le facteur cible serait lié en solution avec l'activateur présent en surnombre, séquestrant la cible et l'empêchant ainsi d'activer la transcription des gènes régulés par ce facteur cible. Ce phénomène s'appelle le "squenching" (figure I.8). La nature de la cible reste à déterminer (Ptashne, 1988).

Selon cette optique, les activateurs agiraient directement sur le facteur cible de la machinerie de transcription. Mais Berger et ses collaborateurs supposent la présence d'adaptateurs (ou de co-activateurs) entre l'activateur et la machinerie de transcription (Berger *et al* , 1990 ; figure I.9).

Notons également que l'activation pourrait être due à la modification de la conformation de l'ADN et plus particulièrement à l'enlèvement des nucléosomes situés sur le promoteur. Il permettrait aux protéines de base de la machinerie cellulaire d'accéder plus facilement au promoteur. (Felsenberg 1992)

Ces différents mécanismes peuvent se conjuguer dans le processus de l'initiation de la transcription.

I.2. Régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme du phosphate inorganique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

I.2.1. Le métabolisme du phosphate.

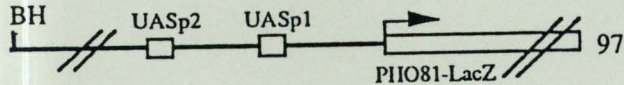
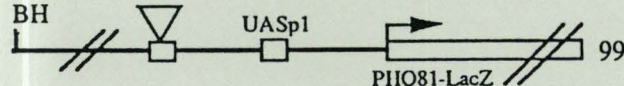
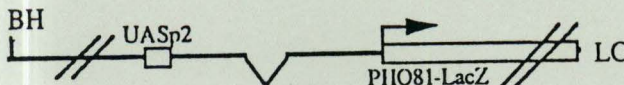
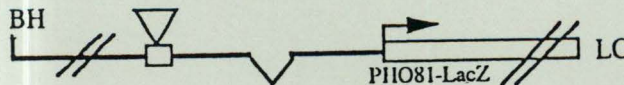
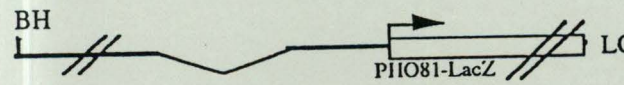
I.2.1.1 Vue d'ensemble du métabolisme du phosphate inorganique. (Oshima, 1982)

Le phosphore, que l'on retrouve généralement sous la forme oxydée des phosphates est un élément indispensable à la vie. Les ions phosphates ou les molécules organiques phosphorylées constituent une source de phosphate pour les micro-organismes qui ont élaboré des systèmes de régulation en vue d'assimiler le phosphate inorganique (Pi).

Tableau I.1 :Localisation chromosomique et fonction présumée des principaux gènes intervenant dans le métabolisme du phosphate.

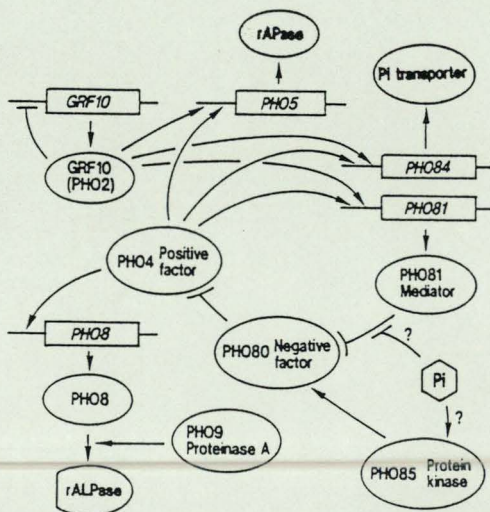
GENE	LOCALISATION	FONCTION
<i>PHO2</i>	bras gauche du chromosome IV	facteur positif activateur de Pho5
<i>PHO3</i>	centromère du chromosome II	phosphatase acide constitutive
<i>PHO4</i>	bras droit du chromosome IV	facteur positif activateur de Pho5 et Pho8
<i>PHO5</i>	chromosome II (à côté de PHO3)	phosphatase acide répressible (fraction majeure)
<i>PHO6</i>		nécessaire à la synthèse de Pho3
<i>PHO7</i>		nécessaire à la synthèse de Pho3
<i>PHO8</i>	chromosome IV	phosphatase alcaline répressible
<i>PHO9</i>		protéinase A
<i>PHO10</i>	télomère du chromosome VIII	phosphatase acide répressible (fraction mineure)
<i>PHO11</i>	télomère du chromosome I	phosphatase acide répressible (fraction mineure)
<i>PHO80</i>	chromosome XV	facteur négatif
<i>PHO81</i>	bras droit du chromosome VII	médiateur
<i>PHO84</i>	bras gauche du chromosome XII	transporteur du phosphate
<i>PHO85</i>	bras gauche du chromosome XIV	protéine kinase (facteur négatif)

Tableau récapitulatif des constructions réalisées et des résultats qualitatifs des dosages.

Construction schématique	Sauvage	YH40-P2 (Δ pho2)	VG151 (Δ pho4)
 <p>BH // UASp2 UASp1 PII081-LacZ // 97</p>	++	-	-
 <p>BH // ∇ UASp2 UASp1 PII081-LacZ // 99</p>	-	-	-
 <p>BH // UASp2 ∇ UASp1 PII081-LacZ // LC3</p>	++(+)	++	-
 <p>BH // ∇ UASp2 ∇ UASp1 PII081-LacZ // LC6</p>	-	-	-
 <p>BH // ∇ UASp2 UASp1 PII081-LacZ // LC7</p>	-	-	-

Localisation chromosomique et fonction présumée des principaux gènes intervenant dans le métabolisme du phosphate.

GENE	LOCALISATION	FONCTION
<i>PHO2</i>	bras gauche du chromosome IV	facteur positif activateur de Pho5
<i>PHO3</i>	centromère du chromosome II	phosphatase acide constitutive
<i>PHO4</i>	bras droit du chromosome IV	facteur positif activateur de Pho5 et Pho8
<i>PHO5</i>	chromosome II (à côté de <i>PHO3</i>)	phosphatase acide répressible (fraction majeure)
<i>PHO6</i>		nécessaire à la synthèse de Pho3
<i>PHO7</i>		nécessaire à la synthèse de Pho3
<i>PHO8</i>	chromosome IV	phosphatase alcaline répressible
<i>PHO9</i>		protéinase A
<i>PHO10</i>	télomère du chromosome VIII	phosphatase acide répressible (fraction mineure)
<i>PHO11</i>	télomère du chromosome I	phosphatase acide répressible (fraction mineure)
<i>PHO80</i>	chromosome XV	facteur négatif
<i>PHO81</i>	bras droit du chromosome VII	médiateur
<i>PHO84</i>	bras gauche du chromosome XII	transporteur du phosphate
<i>PHO85</i>	bras gauche du chromosome XIV	protéine kinase (facteur négatif)



circuit de régulation des gènes de la cascade de régulation de la phosphatase acide répressible (Oshima, 1991).

Différentes enzymes règlent la concentration intracellulaire en Pi chez la levure *S. cerevisiae* :

* des phosphatases acides, qui sont des glycoprotéines, hydrolysent une large gamme de substrats monoesters phosphoriques. Elles sont sécrétées dans l'espace périplasmique.

* le Pi ainsi libéré passe à travers la membrane plasmique via des perméases et grâce à un transport actif qui consiste en deux transporteurs de Pi : l'un à forte affinité, qui est réprimé par le Pi du milieu et l'autre à faible affinité.

* Le phosphate présent en excès dans la cellule est mis en réserve sous forme de polyphosphates inorganiques (polymère linéaire de résidus) dans les vacuoles principalement. La phosphatase kinase réalise la biosynthèse de ces polyphosphates dans les vacuoles à partir d'ATP. Afin de maintenir un taux suffisant de Pi et d'ATP nécessaires aux biosynthèses, la dégradation de ces réserves se fait par l'activité de 3 enzymes différentes : la phosphatase kinase qui peut catalyser la formation d'ATP à partir d'ADP et de polyphosphates ; la phosphatase alcaline et la polyphosphatase qui hydrolysent les polyphosphates en phosphates.

I.2.1.2. Les gènes de structure (Oshima, 1982 ; § tableau I.1)

On relève deux phosphatases acides chez *S. cerevisiae* (Toh-e *et al*, 1973 *in* Oshima, 1982).

- la phosphatase acide répressible (rAPase) est composée de plusieurs sous-unités. Sa fraction majeure est la protéine p60 codée par le gène *PHO5* et les fractions mineures sont les protéines p58 et p56 codées respectivement par *PHO10* et *PHO11*. Un système génétique d'au moins 5 gènes (*PHO2-PHO4-PHO80-PHO85-PHO81*) participent à leur expression en réponse à la présence ou à l'absence de phosphate exogène (Toh-e *et al*, 1985 *in* Oshima, 1982).

- la phosphatase acide constitutive p57 est codée par le gène *PHO3*. Elle nécessite deux autres gènes pour son expression, *PHO6* et *PHO7* (Toh-e *et al*, 1975 *in* Oshima 1982).

Une phosphatase alcaline non spécifique (rAlkPase) répressible est issue de l'expression du gène *PHO8*. (Toh-e *et al*, 1976 *in* Oshima 1982). En fait, ce gène code pour un précurseur qui sera converti en une enzyme active par une protéinase A codée par *PHO9*.

Le transporteur de haute affinité présent dans la membrane est codée par le gène *PHO84*. Celui-ci est réprimé par le Pi au niveau transcriptionnel. (Ueda et Oshima, 1975 *in* Oshima, 1982).

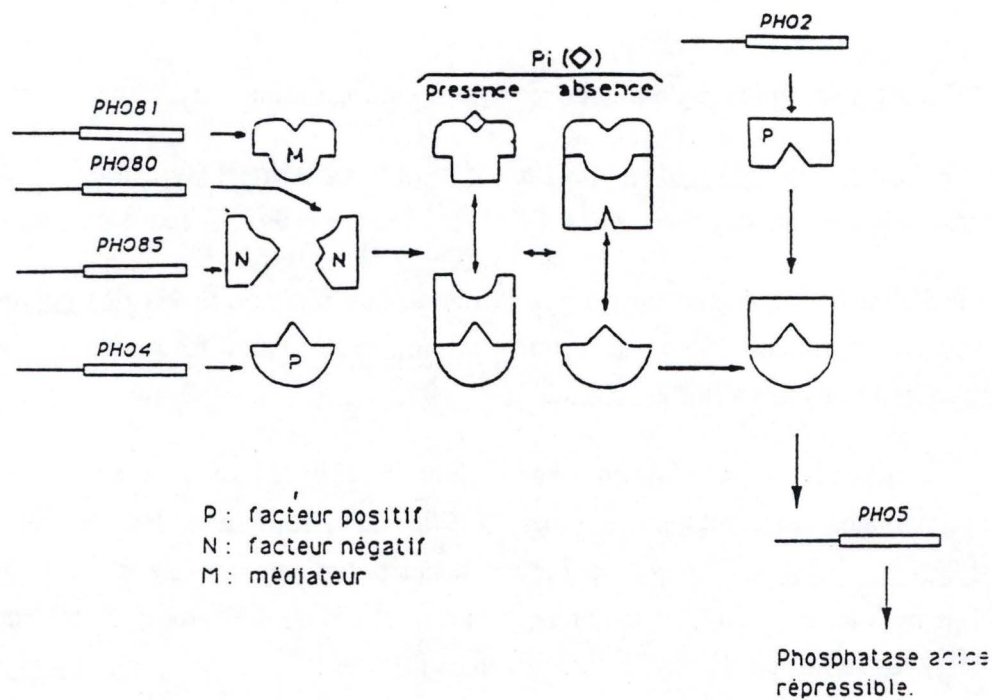


Figure I.10 : modèle de fonctionnement du circuit de régulation de la phosphatase acide répressible (Oshima, 1982).

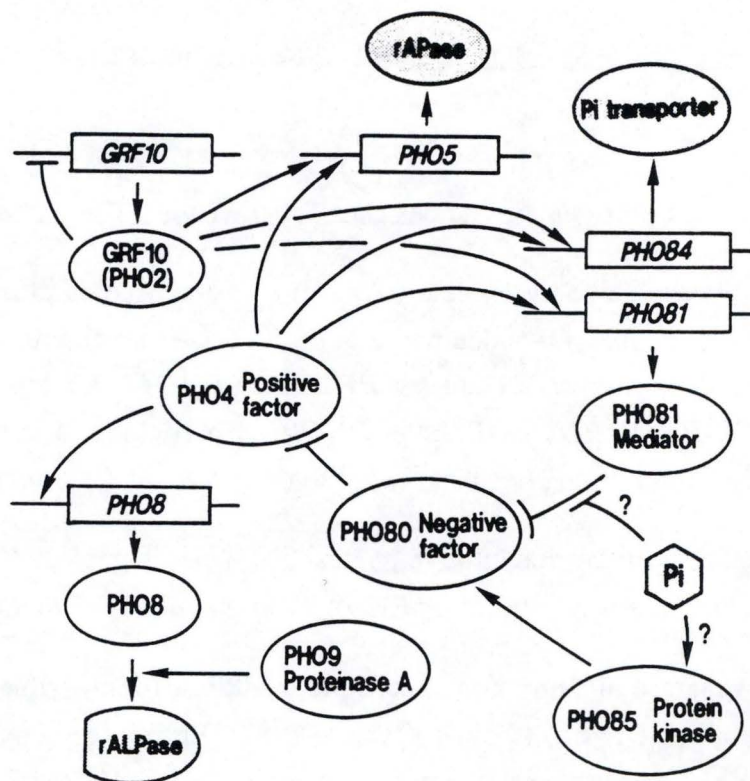


Figure I.11 : circuit de régulation des gènes de la cascade de régulation de la phosphatase acide répressible (Oshima, 1991).

I.2.2 Le système de régulation de la phosphatase acide répressible.

Le modèle de fonctionnement du circuit de régulation proposé par Oshima (en 1982, figure I.10), confirmé et amélioré depuis lors, a été établi sur base de l'étude de mutants affectés dans l'expression du gène *PHO5*. On a montré qu'au moins 4 gènes *PHO2*, *PHO80*, *PHO81* et *PHO85* ainsi qu'un "cluster" *PHO82-PHO4* participent à la régulation transcriptionnelle des gènes de structure *PHO5* et *PHO8* en réponse à l'absence ou à la présence de Pi dans le milieu (Toh-e et al, 1973 *in* Oshima, 1982 ; Ueda 1975 *in* Oshima, 1982 ; Toh-e et Oshima 1974 *in* Oshima, 1982).

Selon le modèle actuel (Oshima, 1991) on peut expliquer le fonctionnement du système PHO de la manière suivante : les facteurs positifs codés par les gènes *PHO2* et *PHO4* sont tous deux nécessaires à l'activation de la transcription du gène *PHO5* (figure I.11).

* En présence de Pi : (condition de répression), le facteur négatif codé par le gène *PHO80* interagit avec la protéine Pho4 afin de former un complexe protéique Pho4-Pho80 qui masquerait la région d'activation de Pho4 et l'empêcherait ainsi d'activer la transcription de *PHO5*. En fait, la protéine kinase Pho85 phosphorylerait Pho80, ce qui aurait comme conséquence d'augmenter l'affinité pour Pho4 (Uesono *et al*, 1992).

* En absence de Pi : (condition de dérégulation), l'activateur Pho4 est libéré par action du médiateur Pho81 et Pho4 peut activer avec Pho2 la transcription de la phosphatase acide.

Ce système est soumis à un rétrocontrôle positif parce qu'une production de la protéine Pho81 dépend de l'activation transcriptionnelle par les facteurs Pho2 et Pho4.

L'effecteur est le phosphate inorganique (ou un métabolite du phosphate).

Ce modèle de régulation suppose que tous les gènes de régulation, sauf *PHO81*, soient exprimés de manière constitutive. Le modèle de régulation s'applique aux gènes de structure *PHO10*, *PHO11*, *PHO84* et partiellement à *PHO8*.

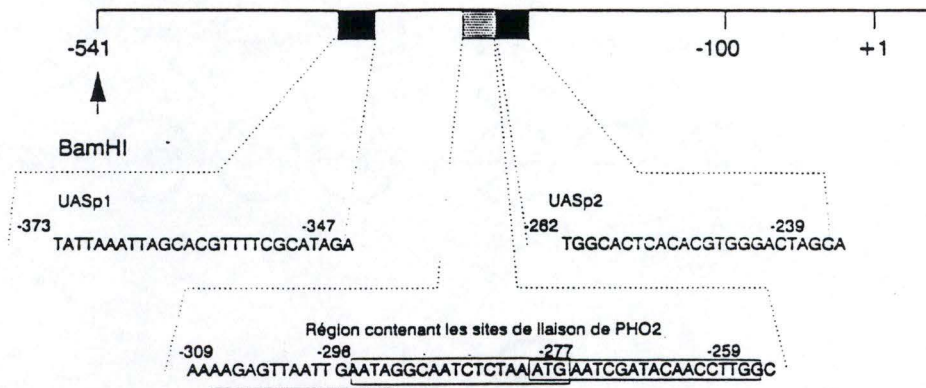


Figure I.12 : structure du promoteur de Pho5 reprenant les sites de liaison de Pho4 et Pho2 (Vogel *et al* , 1989).

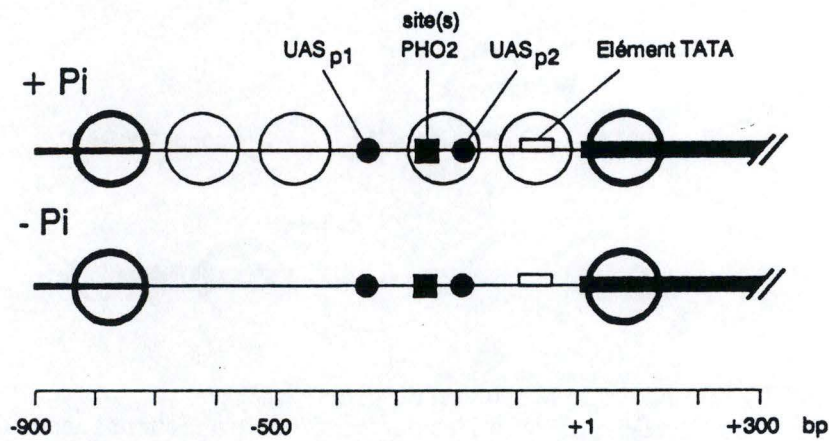


Figure I.13. : Disposition des nucléosomes sur le promoteur du gène *PHO5* en condition de répression (+Pi) et d'induction (-Pi) de ce gène (Fasher *et al* , 1990).

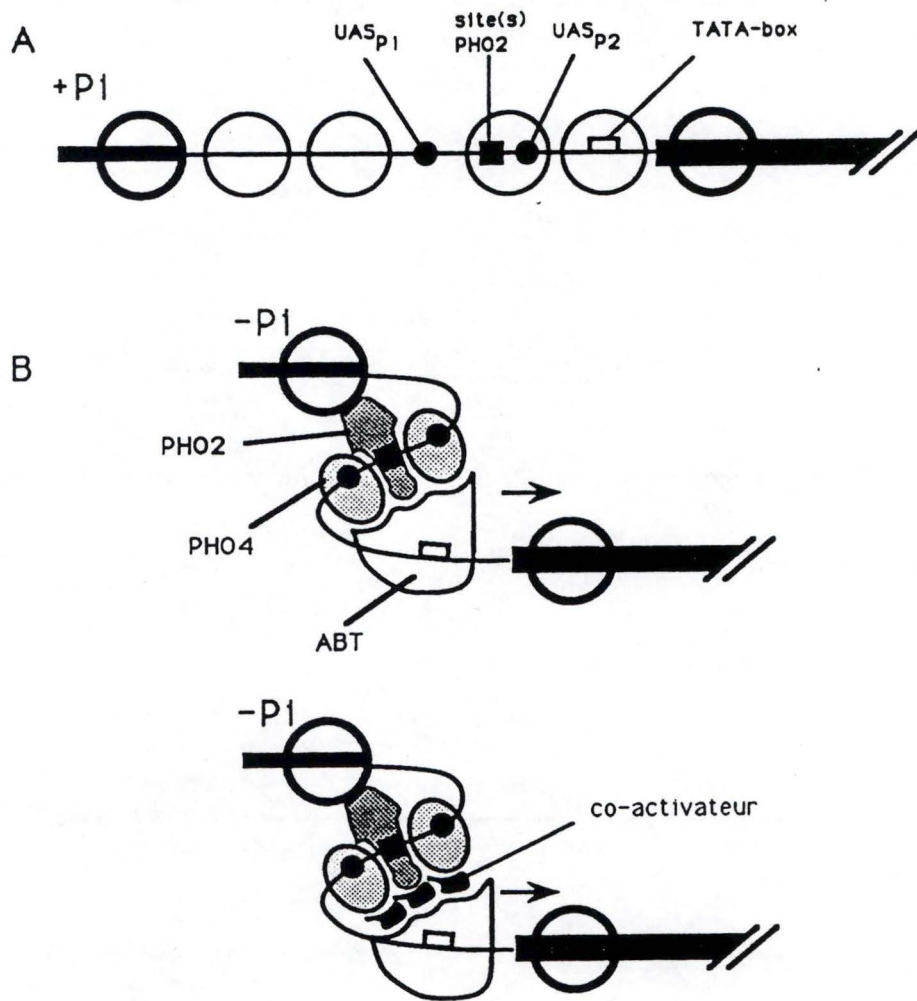


Figure I.14 : modèle de régulation du gène *PHO5* :

A) En condition de répression, les nucléosomes empêchent l'accès des facteurs de transcription au promoteur (sauf peut-être au niveau de l'*UASp1*).

B) En condition d'induction, le promoteur de *Pho5* est libre et les facteurs de transcription parviennent à former le complexe d'initiation de la transcription avec l'ARN polymérase II. Deux situations sont représentées selon que l'on fait intervenir ou non des coactivateurs.

ABT : appareil basal de transcription (Berben, 1991).

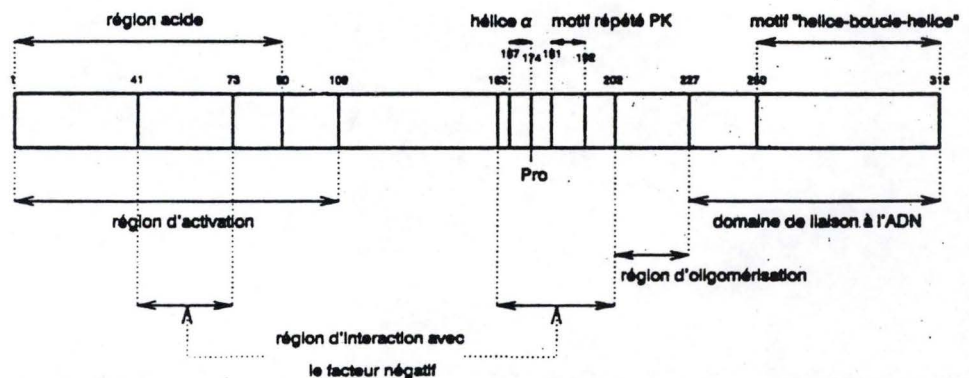


Figure I.15 : les différentes régions fonctionnelles de la protéine *Pho4*. (Ogawa *et* Oshima, 1990).

I.2.3. Les éléments impliqués dans la régulation.

I.2.3.1. Le gène *PHO5*.

Le gène *PHO5* codant pour la phosphatase acide répressible (rAPase) est induit lorsque le Pi du milieu fait défaut. On a pu déterminer que la régulation dépendait de la fonction des gènes *PHO2* et *PHO4* (Sengstag et Hinnen, 1988 *in* Vogel *et al*, 1989). Afin d'étudier ce mécanisme de régulation, des délétions de la région 5' amont du gène ont été réalisées (Nakao *et al*, 1986). Deux sites de liaison pour la protéine Pho4 (UASp1 et UASp2) ont été identifiées ainsi qu'un site de liaison de la protéine Pho2, l'UASi (Vogel *et al*, 1989). Les deux sites de liaison de Pho4 contiennent une même séquence de 6 paires de bases (5' CACGTG/T 3') qui est essentielle pour la liaison de Pho4 (Fisher *et al*, 1991; figure I.12).

La structure de la chromatine est un facteur important pour la régulation. Un modèle a été élaboré (figure I.13) sur base d'un changement drastique de la structure chromatidique du promoteur pour expliquer le système répression-dérépression du gène *PHO5* (Fasher *et al*, 1990). En condition de répression, le promoteur est entièrement recouvert par les nucléosomes sauf une petite région de 60 à 70 paires de bases qui comprend l'UASp1. En condition d'induction, deux nucléosomes sont retirés de part et d'autre de l'UASp1 : UASp2 et UASi ainsi que la TATA box sont libérés et donc accessibles aux facteurs *trans* actifs.

En fait, les nucléosomes rendraient les UAS inaccessibles aux protéines régulatrices Pho2 et Pho4 (Han *et al*, 1988) mais il semble que la présence de Pho2 et Pho4 soit nécessaire à l'ouverture de la chromatine lors de l'activation (Fasher *et al*, 1990). En milieu pauvre en phosphates, la machinerie de transcription a accès au promoteur de *PHO5* et l'étape d'initiation de cette transcription serait activée par un mécanisme de type "looping" (Berben, 1991 ; figure I.14).

I.2.3.2. Les facteurs positifs Pho2 et Pho4.

Le gène *PHO4* est situé sur le bras droit du chromosome VI (Toh-e, 1980 *in* Oshima, 1982). Il code pour une protéine de 312 résidus qui est un activateur transcriptionnel du gène *PHO5* (Legrain *et al*, 1986).

Des analyses fonctionnelles réalisées sur la protéine Pho4 ont permis de délimiter 4 domaines (Ogawa et Oshima, 1990 ; figure I.15) :

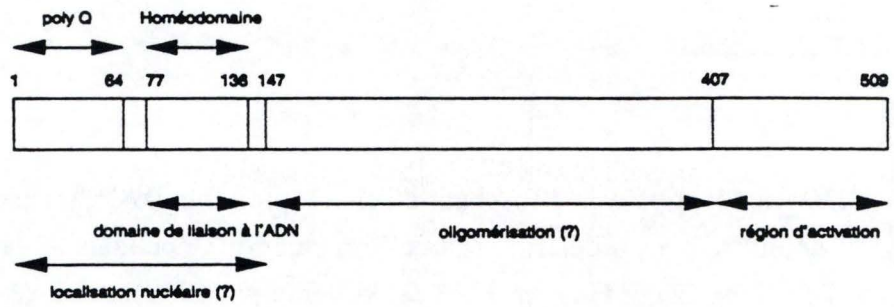


Figure I.16 : Les différentes régions fonctionnelles de la protéine Pho2 (Berben, 1991).

(a) une région de liaison à l'ADN au promoteur de *PHO5* situé à l'extrémité carboxy-terminale (acides aminés 227 à 312) a été déterminé par la technique du retard sur gel. De plus la séquence primaire de la région carboxy-terminale a des similarités avec le motif amphipathique "helix-loop-helix" de la protéine C-myc.

(b) des analyses par délétions sur la protéine Pho4 ont montré que 2 régions (des acides aminés 41 à 73 et de 163 à 202) interagissent avec le facteur Pho80.

(c) une région d'activation est située à l'extrémité amino-terminale (résidus 1 à 109). La région comprenant les 95 premiers acides aminés a un caractère acide ce qui constitue une des propriétés classiques des régions d'activation. La fonction d'activation de protéines hybrides comprenant des parties de la protéine Pho4 fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de LexA (Berben *et al*, 1990).

(d) une région d'oligomérisation a été positionnée par Ogawa et Oshima (1990) entre les acides aminés 202 et 237. On peut mentionner également que, *in vivo*, la surproduction de Pho4 peut déréguler l'expression des gènes de la rAPase dans un mutant *pho2 nul* (Berben, 1991). On sait aussi que le promoteur du gène *PHO8* contient deux sites de liaison de Pho4 qui active seule la transcription.

Le gène *PHO2* est situé sur le bras gauche du chromosome IV (Toh-e, 1980 *in* Oshima, 1982), il code pour une protéine de 559 acides aminés qui se lie à un site spécifique (UASi) du promoteur *PHO5* (Vogel *et al*, 1989).

PHO2 est un gène pléiotropique (encore appelé *BAS2* ou *GRF10*). Il est impliqué dans le contrôle d'autres gènes incluant plus spécifiquement ceux en relations avec la croissance et la division ou le cycle de vie (Berben *et al*, 1988).

Le gène *PHO2* est important pour la croissance cellulaire. En effet, la croissance d'un mutant *pho2* est normale en milieu riche en Pi alors qu'elle est mauvaise en milieu dépourvu de Pi. Les mutants *pho2 nul* sont incapables de sporuler et une surexpression de Pho2 est toxique pour la levure.

Cette protéine peut également être définie en plusieurs régions fonctionnelles. Certaines régions dites potentielles seront définies par comparaison de séquences, d'autres l'ont été par expérience (figure I.16).

(a) La région potentielle de liaison à l'ADN a été située aux acides aminés 77 à 136, identifiée à partir de son homologie avec l'homéo-domaine des eucaryotes supérieurs (Berben *et al*, 1988). Il a été montré que Pho2 se lie en plus au promoteur de *PHO5*, *in vitro*, au promoteur de *HIS4* et *TRP4*. Bien que les sites de liaison soient relativement

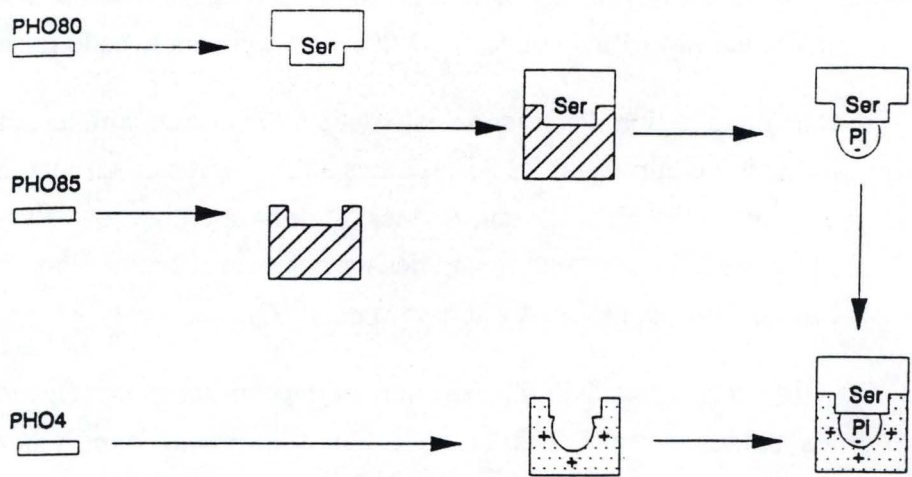


Figure I.17 : modèle d'action des facteurs Pho80 et Pho85 sur la protéine Pho4 (Gilliquet, 1992).

différents, une séquence consensus a pu en être tirée : (TTAA)_n (Tice-Baldwin *et al*, 1989).

(b) Une région potentielle de localisation nucléaire (résidus 1 à 147) (Berben *et al*, 1988).

(c) Une région potentielle d'oligomérisation (Berben, 1991).

(d) Une région d'activation transcriptionnelle à l'extrémité carboxy-terminale (résidus 408 à 509). Cette région a été définie par des expériences de fusions de parties de la protéine Pho2 au domaine de liaison à l'ADN de LexA (Berben *et al*, 1988).

I.2.3.3. Les facteurs négatifs Pho80 et Pho85

Les facteurs négatifs Pho80 et Pho85 répriment la transcription de la rAPase en milieu riche en Pi (voir modèle).

Le gène *PHO80*, situé près du centromère du chromosome XV (Lange et Hansche, 1980 *in* Toh-e *et al*, 1986) code pour une protéine de 293 acides aminés (Toh-e *et al*, 1986) dont la séquence ne présente aucune homologie avec des protéines connues. L'examen de sa composition révèle une richesse en acides aminés phosphorylables Ser-Thr-Tyr et un caractère hydrophile et basique (Gilliquet, 1992). Des analyses par *Northern* et fusion Pho80- β -galactosidase ont indiqué que le niveau de transcription du gène *PHO80* est indépendant du taux de phosphate inorganique et de l'activité des gènes *PHO2*, *PHO4*, *PHO81*, *PHO85* (Toh-e et Shimauchi, 1986 ; Gilliquet, 1992 ; Madden *et al*, 1990).

Le gène *PHO85* est localisé sur le bras gauche du chromosome XVI (Toh-e *et al*, 1980 *in* Gilliquet 1992). Toh-e et ses collaborateurs (1988) ont trouvé une homologie entre la séquence primaire de Pho85 et de la protéine CDC28 codant pour une protéine kinase (AMPc dépendante) qui intervient dans le cycle cellulaire. Dès lors, on pense que Pho85 serait une protéine kinase qui activerait le facteur Pho80. Cette hypothèse est appuyée par les récents travaux de Uesono (Uesono *et al*, 1992).

La phosphorylation pourrait assurer une meilleure liaison entre Pho80 et Pho4. Ogawa et Oshima (1990) ont montré que dans la protéine Pho4, la région principale d'interaction avec le facteur négatif Pho80 est chargée positivement. La protéine Pho80, globalement basique, serait phosphorylée au niveau des sérines ou des thréonines, ce qui induirait la présence de charges négatives et favoriserait son interaction avec Pho4 qui ne serait alors plus disponible pour son rôle transcriptionnel de *PHO5* (Gilliquet, 1992 ; figure I.17).

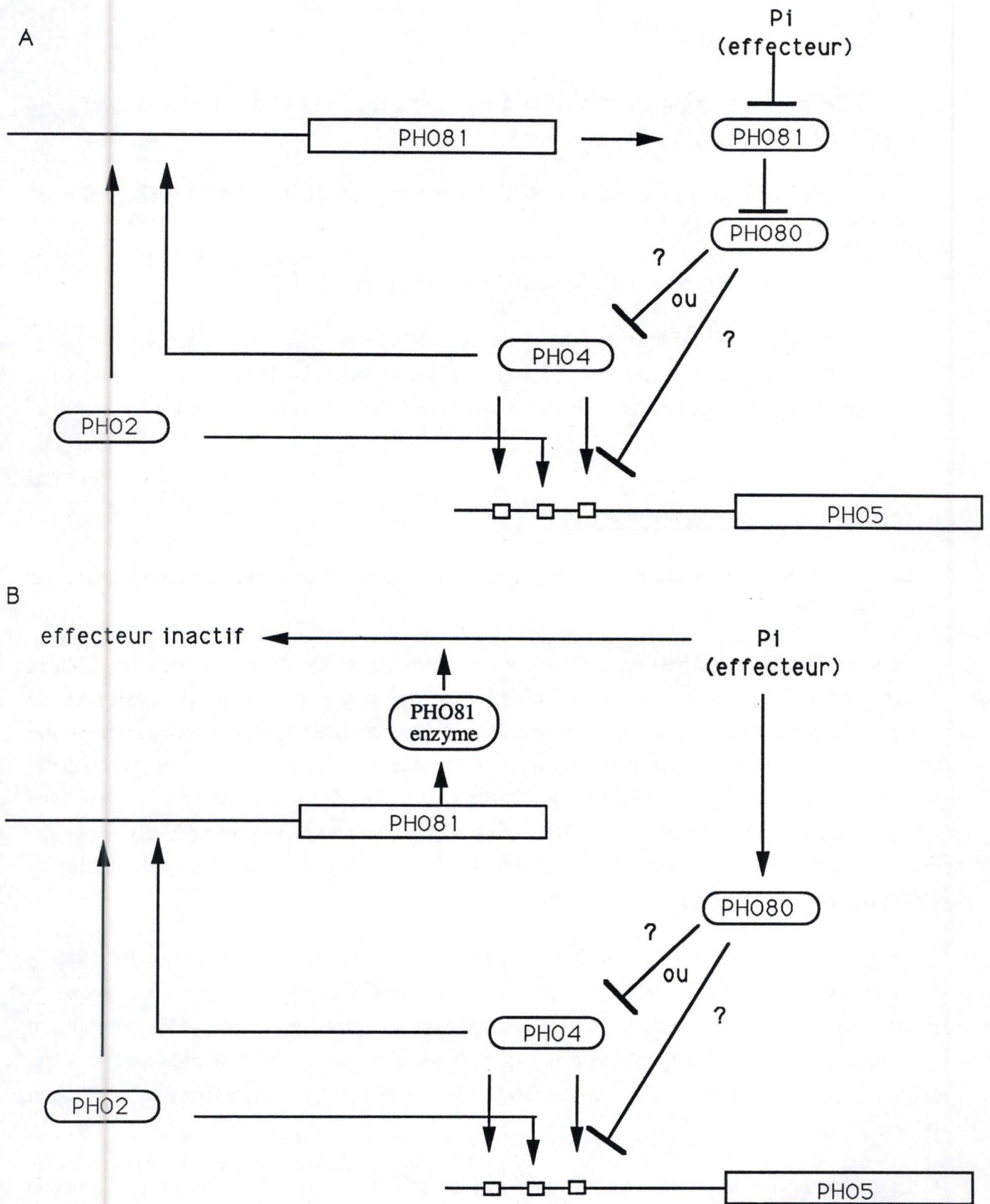


Figure I.18 : Deux mécanismes hypothétiques de la fonction de Pho81 (Yoshida *et al* , 1989)

A) Pho81 a une fonction de protéine régulatrice qui inactive Pho80 en absence de Pi ;

B) Pho81 a une fonction d'enzyme et métabolise l'effecteur en une forme inactive. En absence de Pi , Pho80 n'est plus activé et n'exerce plus sa répression sur PHO5.

I.2.3.4. Le gène *PHO81*.

Le gène *PHO81* est localisé sur le bras droit du chromosome VII (Vandenhoute *et al*, 1988) et présente une phase ouverte de lecture (ORF) de 3531 paires de bases (Coche *et al*, 1990). La protéine de 1177 résidus aminés contient une région riche en asparagines et six répétitions homologues à celles de l'ankyrine. Les fonctions supposées des répétitions sont l'interaction avec un composé membranaire et/ou avec un élément du cytosquelette. (Lux *et al*, 1990) Contrairement aux autres gènes de régulation du système PHO, la transcription de *PHO81* n'est pas constitutive, en condition inductrice (concentration faible en Pi), le taux d'ARNm est élevé alors qu'en conditions de répression, il reste faible (Yoshida *et al*, 1989).

Le rôle de Pho81 est celui d'un médiateur dont le mécanisme n'est pas encore compris (figure I.18) : en conditions d'induction, la protéine Pho81 entraînerait une suppression de l'effet de Pho80 (le facteur négatif) et la manifestation de l'effet transactivateur de Pho4 sur le gène *PHO5* peut se réaliser. En cas de répression, l'effecteur (voir plus loin) inactiverait Pho81 et Pho80 peut exercer sa répression.

Alternativement, Pho81 peut aussi intervenir comme une enzyme qui à faible concentration en Pi métabolise l'effecteur en une forme inactive, ainsi Pho80 n'est plus activée et *PHO5* est transcrit. En condition de répression, par contre, l'effecteur active Pho80 qui interagit avec Pho4 et empêche la transcription de *PHO5*. (Yoshida *et al*, 1989).

I.2.3.4. L'effecteur.

Peu d'études ont été consacrées à la recherche du signal qui provoque la répression des gènes du système PHO. On sait que le Pi intracellulaire reste élevé lorsque les cellules sont cultivées sur un milieu pauvre en Pi. Le phosphate cellulaire provient de la dégradation des polyphosphates (Bostian *et al*, 1983 in Gilliquet 92).

Le Pi exogène est le composé susceptible de réprimer la synthèse de la rAPase acide. On peut supposer que le Pi exogène agit sur un composant membranaire qui jouerait le rôle d'effecteur ou le synthétiserait. Le composé membranaire impliqué dans la formation de l'effecteur pourrait être le transporteur de Pi de haute affinité codé par *PHO84* (Gilliquet, 1992).

En relation avec cela, une mutation *pho81* suppressive d'une mutation *pho84* a été isolée. Ceci suggérant justement un modèle dans lequel la protéine Pho81 est impliquée dans le métabolisme du Pi et peut être associée au transporteur Pho84 (Ogawa, communication personnelle).

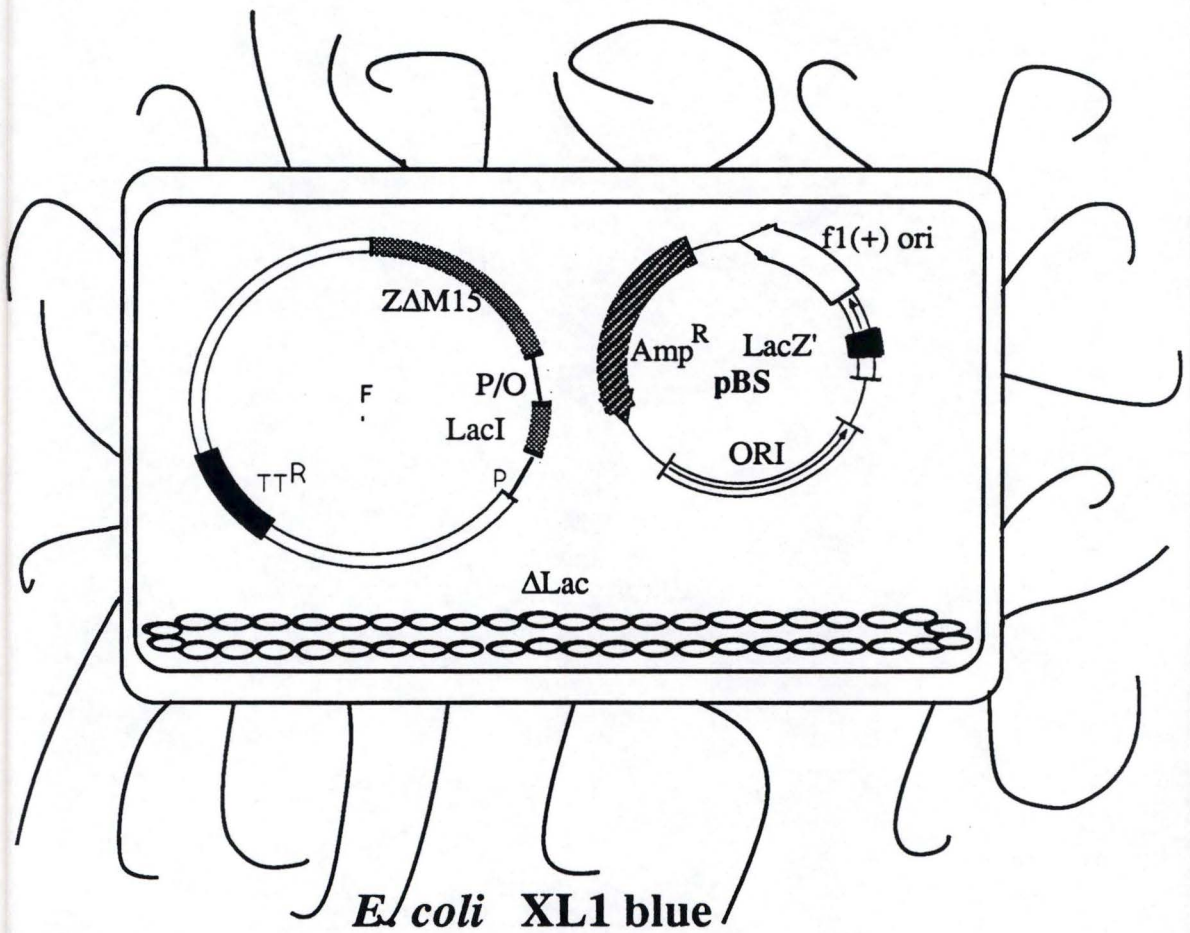
I.3. But du travail.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la cascade de régulation du gène de la phosphatase acide chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux mécanismes de contrôles transcriptionnels du gène *PHO81* codant pour le médiateur agissant au sommet de cette cascade.

Une telle étude se réalise en suivant l'expression d'un gène-rapporteur (dans notre cas, le gène de la β -galactosidase), c'est-à-dire un gène dont l'expression de la séquence codante est soumise au contrôle d'un promoteur, lequel fera l'objet de mutations.

Les travaux précédents ont montré que les conclusions qu'on pouvait tirer des tests colorés de détection de la β -galactosidase sur boîte de Pétri sont ambiguës (Denoël, 1991). C'est la raison pour laquelle, dans ce travail, nous avons réalisé les dosages β -galactosidasiques sur lysats cellulaires.

En parallèle, nous avons envisagé l'intégration du gène-rapporteur au locus chromosomique de *PHO81*. L'intégration permet de retrouver l'environnement nucléosomal réel du gène *PHO81* (on sait que celui de *PHO5* est important ; Fasher *et al*, 1990) et d'éviter les risques d'effet de titration de facteurs engendrés par l'usage de vecteurs multicopies.



***E. coli* XL1 blue**

Figure II.1 : marqueurs présents dans la bactérie *Escherichia coli* de souche XL1-blue (Bullock, 1987).

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Souches et Plasmides

Nous avons utilisé la souche XL1-Blue de *Escherichia coli* qui est présentée à la figure II.1 (Bullock, 1987). Cette souche est commercialisée par la firme Stratagène. Son taux de transformation atteint 10^9 transformants par μg de PUC 18 (plasmide contrôle).

Le génotype de cette souche est le suivant :

* Au niveau chromosomique, une délétion au niveau de l'opéron lactose rend XL1-Blue incapable de métaboliser le lactose (devient *lac-*), condition requise pour la sélection blanc-bleu. (voir plus loin).

Les gènes de structure de l'opéron lactose assurent le métabolisme du lactose. L'opéron Lac est constitué de 3 gènes :

LACZ code pour la β galactosidase (le tétramère est actif)

LACY code pour la β galactosyl perméase

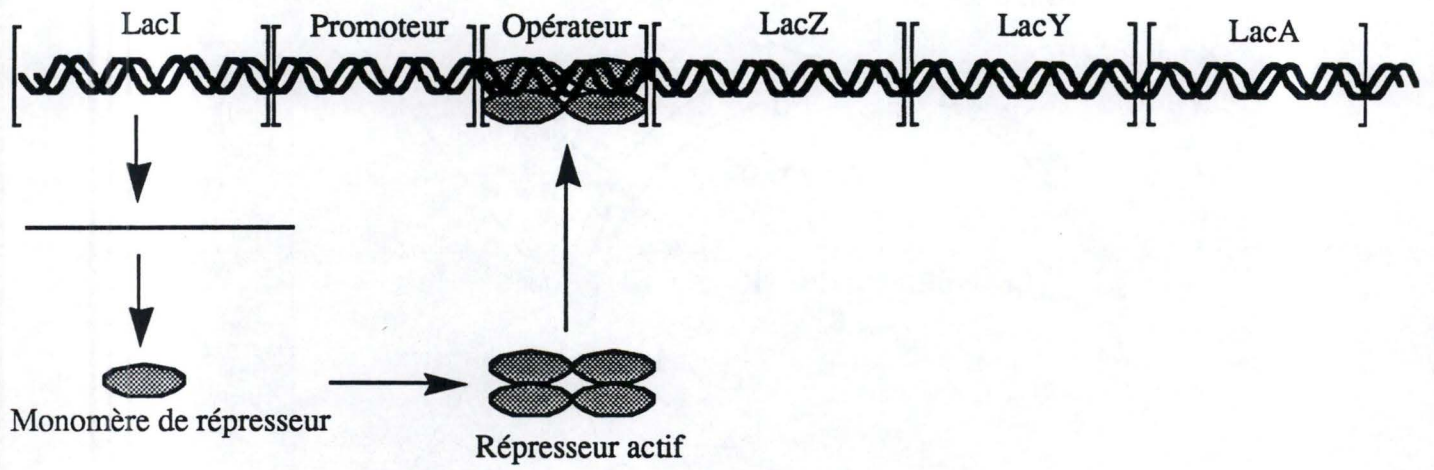
LACA code pour la β galactosyl transacétylase

Ces gènes sont contrôlés par une régulation négative : le régulateur empêche l'expression du gène de structure et est ainsi appelé protéine répresseur. La protéine répresseur est codée par le gène *LacI* situé en amont de l'opéron. Elle se lie à l'ADN en un site opérateur empêchant ainsi l'initiation de la transcription de l'opéron Lac. En présence de lactose (en conditions naturelles), l'inducteur (l'allolactane ou galactobiose, produit par une activité secondaire galactosyl-transférase de la β -galactosidase) se fixe au répresseur formant un complexe non lié à l'opérateur et la transcription peut s'initier (figure II.2).

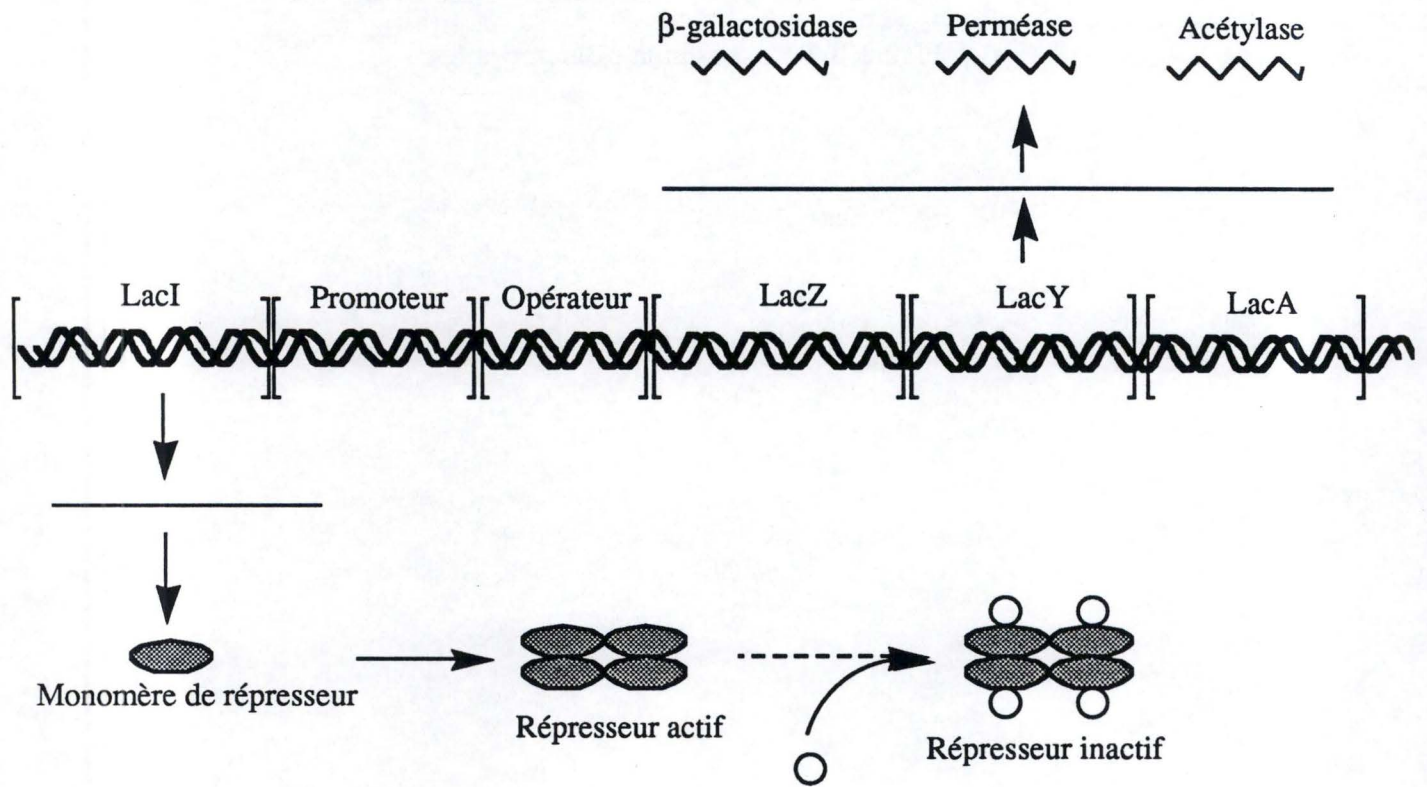
Nous utilisons un inducteur non dégradable, l'IPTG (isopropyl- β -thio-galactopyranoside) pour le test blanc-bleu.

* Cette souche contient l'épisome F' (figure II 1) :

- cet épisome est responsable de la présence de pili sexuels en surface de la bactérie.
- il contient un fragment Tn10 porteur du marqueur de résistance à la tétracycline : l'ajout de tétracycline dans le milieu permettra la sélection des bactéries possédant l'épisome F'.
- il permet la sélection blanc-bleu des clones portant un plasmide recombinant ou non recombinant (introduit dans la cellule par électroporation ou par une autre méthode). En effet, l'épisome F' détient un fragment du gène *LACZ* (*Z Δ M15*) qui par complémentarité intragénique avec un plasmide non recombinant (par exemple pBS) portant un autre fragment du gène *LACZ* (*LacZ'*) donne une coloration bleue à la colonie



a/ Le gène *LacI* synthétise un répresseur dont la forme tétramérique se lie à l'opérateur et prévient la transcription de l'opéron.



b/ l'addition d'un inducteur convertit le répresseur en forme inactive.

Figure II.2 : description de l'opéron lactose (Lewin B., 1990).

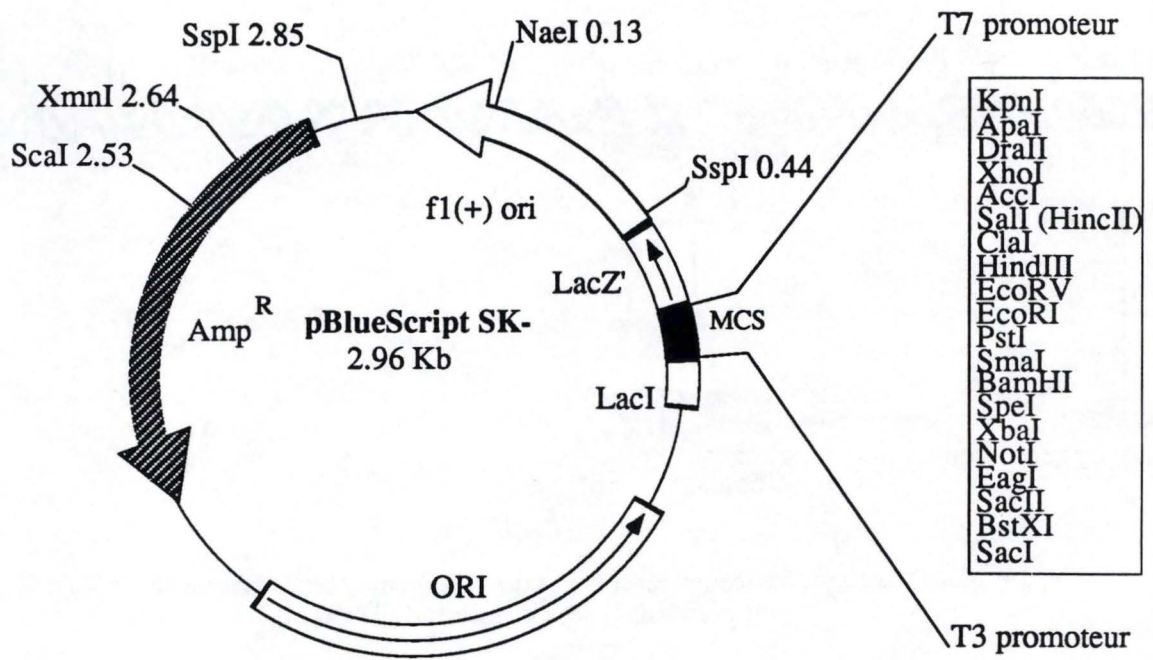


Figure II.3 : le plasmide pBluescript SK-

en présence d'un chromogène (X-gal, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside). Par contre, la colonie sera blanche si le plasmide introduit est recombinant c'est à dire si *LACZ* est disrupté (par l'insertion d'un fragment d'ADN).

- De plus en amont de Δ M15, une mutation *LacI^q* augmente la force du promoteur de ce gène. La synthèse du répresseur est augmentée d'un facteur 10. La répression peut ainsi s'exercer sur les quelques copies de F' présentes dans une bactérie mais également sur les copies plus nombreuses de pBluescript. Cette répression empêche que l'expression des gènes portés par ce vecteur à nombre de copies élevé ne constitue un fardeau mortel pour la bactérie.

- XL 1 blue est *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*rk⁻*, *mk⁺*), *supE44*, *relA1*, λ^- , *proAB*, (*lac⁻*), [F', *proAB*, *lac lq* Δ M15, Tn10(*tet^R*)]

RecA1 réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi les risques de réarrangements par recombinaison entre ADN endogène et exogène.

EndA1 diminue le taux d'endonucléase préservant de la sorte l'intégrité de l'ADN plasmidique préparé à partir de cette souche.

II.1.1.Plasmides bactériens

a/ Le plasmide pBluescript II SK+/- est en fait un phagemide (figure II 3), c'est-à-dire un hybride entre un phage et un plasmide, de 2961 paires de bases (pb). Il porte une origine de réplication pour *E.coli* (ORI) et une origine de réplication phagienne *f1* : pBluescript peut ainsi se répliquer sous forme d'un plasmide bicaténaire ou d'un phage monocaténaire selon les conditions du milieu.

Il possède :

*BLA : est un gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase), noté AMP^R, permettant la sélection des colonies possédant le vecteur.

*Le fragment de *LACZ* du plasmide pBluescript contient :

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

lacZ : qui contient le promoteur *lac*, l'opérateur et la partie N-terminale du gène de la β -galactosidase. Cette portion du gène code pour un peptide α qui est un peptide inactif. Lorsqu'un tel vecteur transforme une bactérie XL-1 blue, la complémentation intragénique entre le peptide α (codé par le vecteur) et le produit du gène *lacZ* Δ M15 (porté par F') permet d'obtenir une β -galactosidase fonctionnelle. L'activité β -galactosidasique est mise en évidence par le test coloré blanc-bleu énoncé plus haut (figure II 4).

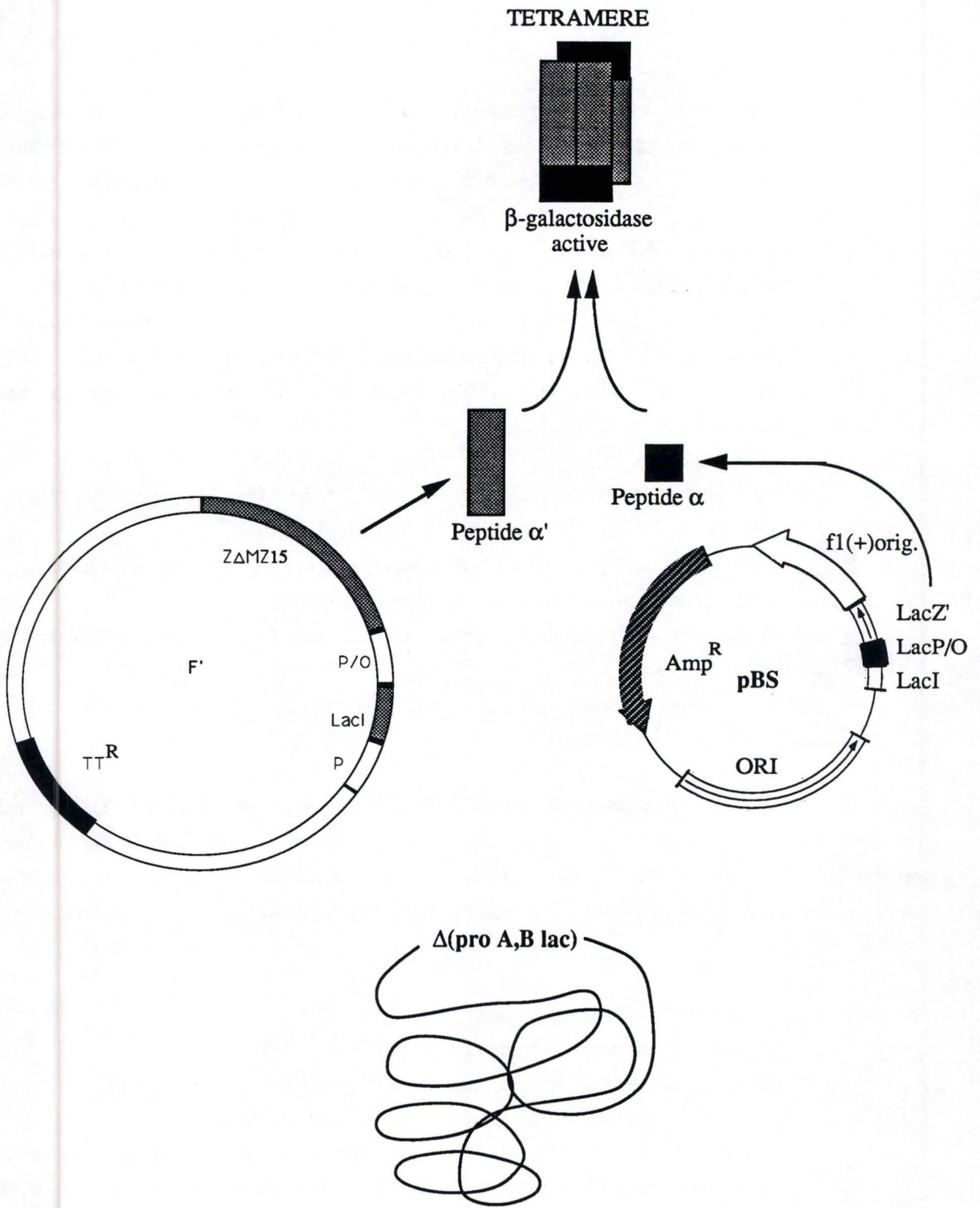


Figure II.4 : système de complémentation intragénique permettant le test blanc-bleu dans XL1-blue.

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

A l'intérieur de l'extrémité N-terminale du gène *lacZ'* a été introduite une batterie de sites de clonage (oligonucléotides de synthèse) où sont localisés 21 sites de restrictions uniques (figure II 3). Cette insertion n'altère pas les capacités de complémentation du peptide α . Cependant, lors du clonage d'un fragment d'ADN dans un site de restriction de cette batterie (créant ainsi un plasmide recombinant), le gène *lacZ'* est disrupté entraînant l'absence de production du peptide α : il n'y a plus de complémentation, les colonies restent blanches. Ce test de coloration permet de discriminer entre plasmide natif et recombinant.

La batterie de sites est orientée de telle sorte que la transcription de *LACZ* se fait dans le sens de *SacI* vers *KpnI* (d'où l'appellation "SK"). Cette batterie de sites de clonage est aussi appelée *polylinker* ou *site multiple de clonage* (MCS pour "multiple cloning site").

II.1.2. Souches de levure *Saccharomyces cerevisiae*

a/YH40 (J.Boeke, Baltimore). Cette souche est MAT α (son type sexuel est α). Elle porte une mutation aux loci *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* et *URA3*. La souche YH40 est donc incapable de synthétiser l'histidine, le tryptophane, la leucine et l'uracile.

b/YH40-P2 (G.Berben, B.Horion, Gembloux) dérive de la souche YH40. Le gène *PHO2* a été disrupté par le gène *LEU2*. Cette souche est donc *pho2* mutante et est capable de synthétiser la leucine.

c/VG151 (V.Gilliquet, Gembloux) dérive de la souche YH40. Le gène *PHO4* a été disrupté par le gène *LEU2*. Cette souche est donc *pho4* mutante et est capable de synthétiser la leucine.

II.1.3. Plasmides navettes *E. coli* - *S. cerevisiae*

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

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

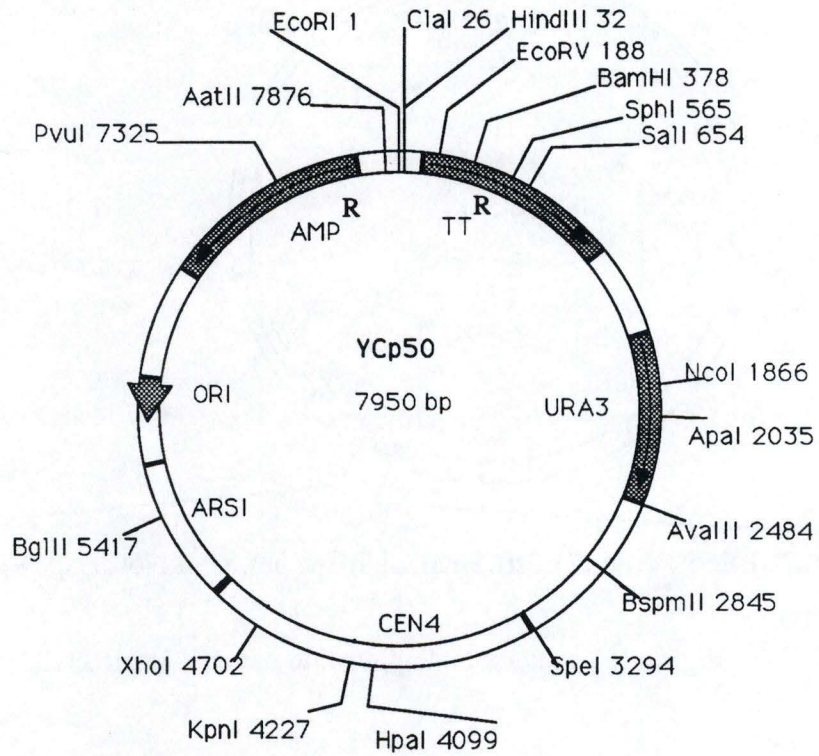


Figure II.5 : exemple de plasmide YCp (Yeast centromeric plasmid).

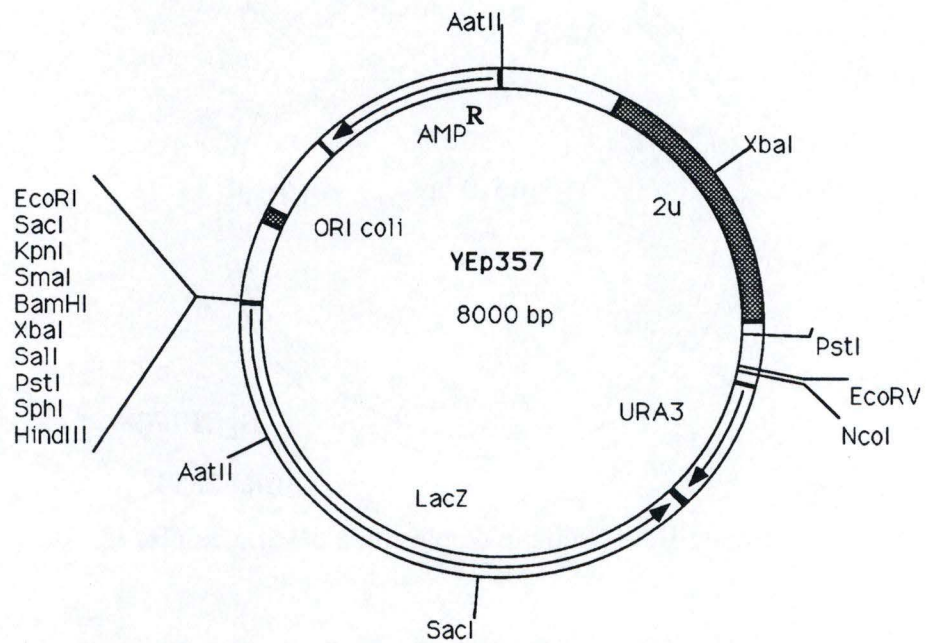
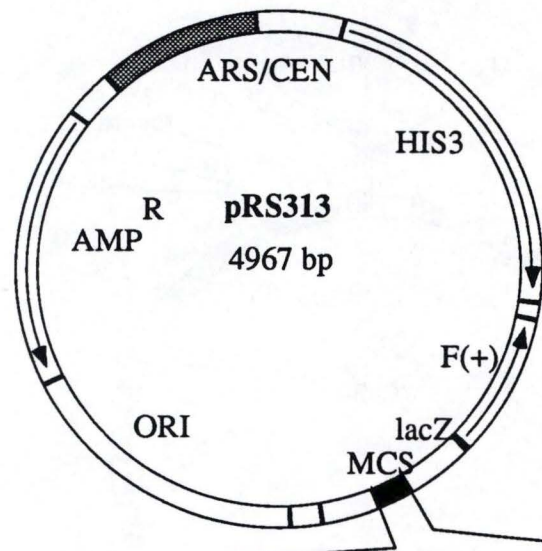


Figure II.6 : exemple de plasmide YEp (Yeast episomal plasmid).



KpnI. ApaI. XhoI. SalI. ClaI. EcoRV. EcoRI. PstI. SmaI. BamHI. SpeI. XbaI. NotI. EagI. SacII. BstXI. SacI

Figure II.7 : exemple de plasmide navette, le pRS313.

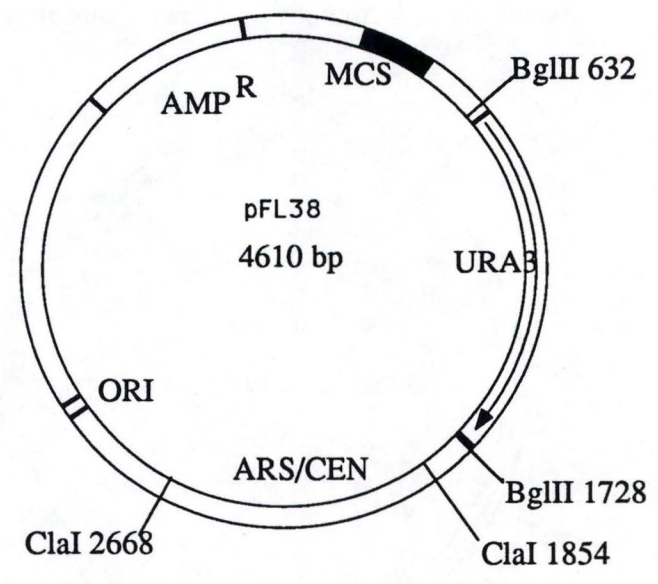


Figure II.8 : exemple de plasmide navette, le pFL38.

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

- les plasmides YCp (Yeast Centromeric plasmids) contiennent une séquence ARS (Autonomously Replicating Sequence) et une séquence centromérique fonctionnelle (CEN). Le nombre de copies de YCp par cellule de levure est faible (1 à 2) et leur stabilité mitotique est élevée (figure II 5).
- les plasmides YEp (Yeast Episomal plasmids) contiennent un fragment du plasmide 2 μ de levure (qui comprend une origine de réplication pour la levure). Le nombre de copies YEp par levure est élevé (25 à 100) et ils ont un haut taux de transformation (figure II 6).

Le plasmide qui est utilisé ici est YEp357 (figure II 5) (Myers *et al* , 1986). Il possède le gène *LACZ* délété de son promoteur. A l'extrémité 5' de la séquence *LACZ* se trouve un site multiple de clonage (MCS). Cette disposition particulière du MCS autorise la réalisation de fusion en phase. Il est donc possible d'insérer dans ce MCS un promoteur et la début de la séquence codante d'un gène qui est naturellement sous la dépendance du promoteur inséré.

Nous avons également utilisé comme plasmide navette pRS313 et pFL38. Ce sont des plasmides stables mitotiquement. Ils possèdent une séquence centromérique CEN et une séquence de réplication autonome ARS de levure. Outre la séquence ARSCEN, ils possèdent les caractéristiques classiques des plasmides navettes : AMP^R et ORI coli.

Le pRS313 (figure II 7) utilisé ici est, en plus des caractéristiques décrites ci-dessus, porteur du marqueur *HIS3* et du gène *LACZ*. (Hieter *et al*, 1989)

Le pFL38 (figure II 8) que nous avons utilisé est quant à lui porteur du marqueur de sélection URA3 (Bonneaud *et al*, 1989).

II.2. Milieux de culture

II.2.1 Milieux de culture bactériens

Milieu LB liquide

Tryptone (Oxoid)	10 g/l
NaCl (Merck)	5 g/l
Yeast Extract (Oxoid)	5 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Autoclavage (20', 120°C).

Les cultures liquides se font à 37°C dans des bouteilles universelles ou dans des Erlenmeyers avec contre-pales, sous agitation.

Milieu LB solide

De même composition que le LB liquide, ce milieu contient 1,6 % d'Agar (Oxoid).

Ce milieu autoclavé et refroidi à 55°C est coulé dans des boîtes de Pétri (conservées à 4°C après solidification).

Milieu LB sélectif

Ce milieu contient de l'ampicilline. Cet antibiotique étant thermolabile, il sera ajouté au milieu autoclavé et refroidi à 55°C à une concentration finale de 50 µg/ml.

Milieu LB "bleu-blanc"

C'est le milieu requis pour la mise en évidence d'une activité β galactosidase : au milieu autoclavé refroidi (55°C), on ajoute de l'X-gal et de l'IPTG à raison de 800 µl de Xgal (20mg/ml N,Ndiméthylformamide) et 1,6 ml d'IPTG 100 mM pour 400 ml de milieu et cela en plus de l'ampicilline et de la tétracycline.

II.2.2. Milieux de culture pour levure

Milieu riche YPD

Glucose (Merck)	20 g/l
Yeast extract (Oxoid)	10 g/l
Peptone (Difco)	20 g/l

Ajuster à pH 4,8 avec de l'HCl concentré
Porter à volume avec de l'eau distillée

Agar (Oxoid)	16 g/l si milieu solide
--------------	-------------------------

Autoclavage

Tableau II.1 : composition des milieux synthétiques pour 1 litre de milieu
(Maniatis *et al* , 1989)

Composant	Concentration finale dans le milieu préparé (mg/l)	Concentration de la solution stock (mg/100ml)
Adénine (sel hémissulfate)	40	500
L-arginine (HCl)	20	240
L-aspartate	100	1200
L-glutamate	100	1200
L-histidine	20	240
L-leucine	60	720
L-lysine (mono-HCl)	30	360
L-méthionine	20	240
L-phénylalanine	50	600
L-sérine	375	4500
L-thréonine*	200	2400
L-tryptophane*	40	480
L-tyrosine	30	1800
L-valine	150	1800
Uracile	20	240

* ces produits sont thermolabiles, ils ont été stérilisés par filtration.

Se conservent à 4°C sauf l'adénine, l'aspartate, le glutamate, la leucine, la phénylalanine, la tyrosine et l'uracile qui se conservent à température ambiante.

Milieu minimum (MAM)

Yeast Nitrogen Base w/o ammonium sulfate and amino acids (Difco)	1,75 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
Glucose (ou autre sucre)	20 g/l
Agar (Oxoid)	16 g/l si milieu solide

Porter à volume avec de l'eau distillée

Autoclavage

Milieus synthétiques

Aux constituants du milieu minimum, on ajoute les acides aminés ou les bases azotées requis. La composition est donnée au tableau II.1. Si le milieu est un milieu synthétique complet, le milieu minimum sera enrichi de tous les constituants du tableau.

Les acides aminés sont pesés, resuspendus dans de l'eau distillée et autoclavés. Le L-tryptophane et la L-thréonine sont stérilisés par filtration sur filtre 0,22 µm.

Milieu 165 , riche ou pauvre en phosphate

Pour 1l de solution finale dans de l'eau distillée:

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,7 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4 g
NaCl	0,5 g
K ₂ SO ₄	1,0 g
Ac. citrique (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	10,5 g
KOH	9,03 g

Milieu pauvre en Pi: 30 mg de KH₂PO₄ et 1,5 g de KCl

Milieu riche en Pi: 1,5 g de KH₂PO₄

Agar (Oxoid)	16 g
--------------	------

Ajouter après autoclavage (120°C, 20 min) :

Glucose 30% (stérilisé par autoclavage)	100 ml
Asparagine 1,5% (stérilisé par filtration)	75 ml

Traces métalliques	1 ml
(composition décrite ci-après)	
Vitamines 10X	0,25 ml
(composition décrite ci-après)	

Pour tout autre apport (cas d'auxotrophies), réaliser une solution à une concentration finale de 50 µg/ml.

Solution de traces métalliques

1. Solutions stock pour préparer les solutions,

H ₃ BO ₃	0,1%
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1%
KI	0,1%
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,1%
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4%

Stériliser par filtration. Stocker les solutions à l'abri de la lumière, à température ambiante. Il est nécessaire de refaire les solutions stock tous les 5 mois.

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

H ₃ BO ₃ 0,1%	10 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O 0,1%	1 ml
KI	2 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,1%	4 ml
ZnSO ₄ .7H ₂ O 1,4%	1 ml
y ajouter	
acide citrique	10 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,4 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	5 g

Porter à 1 litre au moyen d'eau distillée et répartir en aliquots. Stériliser par filtration et conserver à l'abri de la lumière, en chambre froide.

Solution de vitamines (10 x concentrées)

Pour un litre :

Biotine	2,5 mg
Thiamine	1 g
Panhoténate de calcium	2 g
Pyridoxine	1 g
Inositol	10 g

Stériliser par filtration et conserver à 4°C.

Milieu M7 solide

Pour un litre :

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g/l
NaCl	0,25 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,25 g/l
KOH	4,37 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4 g/l

Pour un milieu riche en phosphate :

KH ₂ PO ₄	13,6g/l
---------------------------------	---------

mettre à pH 7,0 avec quelques gouttes de TRIS-HCl 1M

Pour un milieu pauvre en phosphate :

KH ₂ PO ₄	0,03 g/l
KCl	1,5 g/l

mettre à pH 7,0 avec le tampon TRIS-HCl à concentration finale ≤ à 50 mM

Porter à volume avec de l'eau distillée et ajouter 16 g d'agar, autoclaver (20', 120°C)

ajouter :

glucose 30%	100 ml
Asparagine 1,5%	75 ml
Traces métalliques	1 ml
Vitamines (10 X)	1 ml
X-gal	20 mg

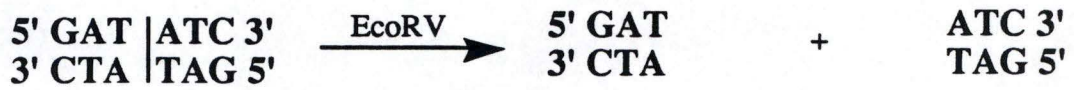
(dissous dans 1 ml de N-N-diméthylformamide)

Il faudra de plus tenir compte des auxotrophies éventuelles. Les produits seront ajoutés à une concentration finale de 50 µg/ml.

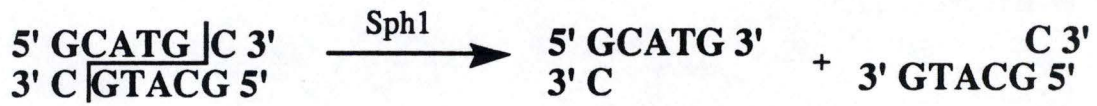
II.3. La restriction d'ADN

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent une séquence précise dans l'ADN double brin et qui coupent à un endroit déterminé dans cette séquence de reconnaissance ou, pour certaines enzymes, à proximité.

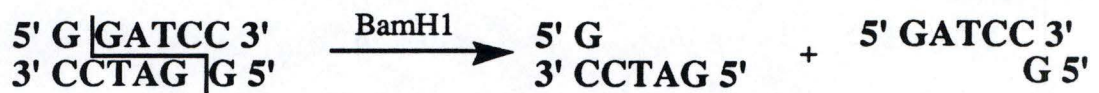
La plupart des enzymes de restriction ont un site de reconnaissance recouvrant une séquence de 4 à 6 paires de bases qui est un palindrome (la séquence est identique sur les deux brins d'ADN).



a/ exemple d'enzyme formant des bouts francs



b/ exemple d'enzyme formant des extrémités 3' protrudantes



c/ exemple d'enzyme formant des extrémités 5' protrudantes

Figure II.9 : exemples de restrictions

On distingue deux types d'enzymes: les premières coupent au milieu du site de reconnaissance faisant ainsi apparaître une coupure à "bouts droits" (francs) (figure II 9a); les secondes coupent à quelques nucléotides de distance sur chacun des deux brins générant ainsi des "bouts protrudants" (collants) (figure II 9b et II.9c). Dans ce second cas, les extrémités libres peuvent être 3' OH ou 5' P.

Les enzymes utilisées sont commercialisées par les firmes Gibco-BRL, Boehringer, Pharmacia et Biolabs. Elles sont conservées à -20°C. Les tampons sont concentrés 10X par rapport à leur concentration d'utilisation dans la réaction de restriction. Ils sont le plus souvent livrés avec l'enzyme.

La réaction de restriction se fait durant deux heures à 37°C (ou autre température spécifique de l'enzyme et précisée par la firme). Elle fait intervenir l'ADN, un dixième du volume final de tampon adéquat concentré 10X, l'enzyme de restriction (1U par µg d'ADN) et de l'eau stérile jusqu'au volume final.

La réaction est arrêtée en inactivant l'enzyme par chauffage pendant 15 min à 65°C si elle est thermosensible, sinon par extraction au phénol (§ II.9).

II.4. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

Cette méthode de séparation des fragments d'ADN permet l'évaluation de la taille et de la quantité de ces fragments. Les groupements phosphates confèrent à l'ADN une charge globale négative. L'ADN migre donc vers l'électrode positive dans un champ électrique. Le rapport entre la charge et la masse des molécules d'ADN étant constant, il est nécessaire de réaliser cette électrophorèse dans un gel d'agarose pour séparer les molécules suivant leur taille, les pores du gel limitant la migration. Dès lors, la vitesse de migration des acides nucléiques dans le gel dépend des quatre facteurs suivants:

- Le voltage appliqué : à faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. En cas de voltage trop important, la résolution diminue.
- La concentration en agarose : les gels à forte concentration (1,5 - 2%) permettent de séparer des molécules d'ADN de petite taille (100 à 1500 bp). Les gels à faible concentration (0,8 - 1%) permettent de séparer des molécules de taille supérieure (500 bp à plus de 10 kb).
- Le poids moléculaire des fragments d'ADN : les molécules d'ADN double brin linéaires migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.
- La conformation de l'ADN : Les formes plasmidiques superenroulées ou CCC (Completely Closed Circular), circulaires cassées sur un seul brin (nick) ou OC (Open Circular) et OL (Open Linear) migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative de ces bandes dépend de différents

facteurs et notamment des tours de superhélicité de la forme CCC; l'ordre de migration sera CCC>OL>OC.

Le repérage des bandes se fera sous UV. Le bromure d'éthidium a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN (Il est par là même hautement mutagène et donc dangereux) et permet de repérer les bandes d'ADN car il fluoresce en rose-orange sous UV.

Solutions

-Tampon TBE

TRIS-HCl	10,8 g/l
Acide Borique	5,5 g/l
EDTA	0,93 g/l

- Solution d'alourdisseur

pour 10 ml :

Bleu de bromophénol	25 mg
Glycérol	5 ml
EDTA (1M)	0,5 ml

porter à volume avec H₂O

Pratiquement.

Ajouter l'agarose à du TBE et porter le tout à ébullition puis laisser refroidir à 50°C. Ajouter du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 mg/ml (solution stock à 10 mg/ml conservée à l'abri de la lumière).

Le gel, encore liquide à cette température, est coulé dans un moule en plexiglas sur lequel on a placé un peigne formant des puits dans le gel refroidi et solidifié. La taille des dents du peigne est choisie selon le volume des échantillons à déposer sur gel, le plus souvent 15 à 20 µl. Après solidification, retirer le peigne et placer le gel dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE.

A la micropipette, introduire l'échantillon d'ADN alourdi par l'addition de 1/10 du volume final de solution d'alourdisseur dans un des puits. Le bleu de bromophénol permet de contrôler le front de migration.

Appliquer une différence de potentiel de 40 à 100 volts aux extrémités de la cuve pendant 2 à 4 heures.

Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur UV ($\lambda=302$ nm) pour visualiser les bandes d'ADN et photographier.

Deux évaluations peuvent être réalisées:

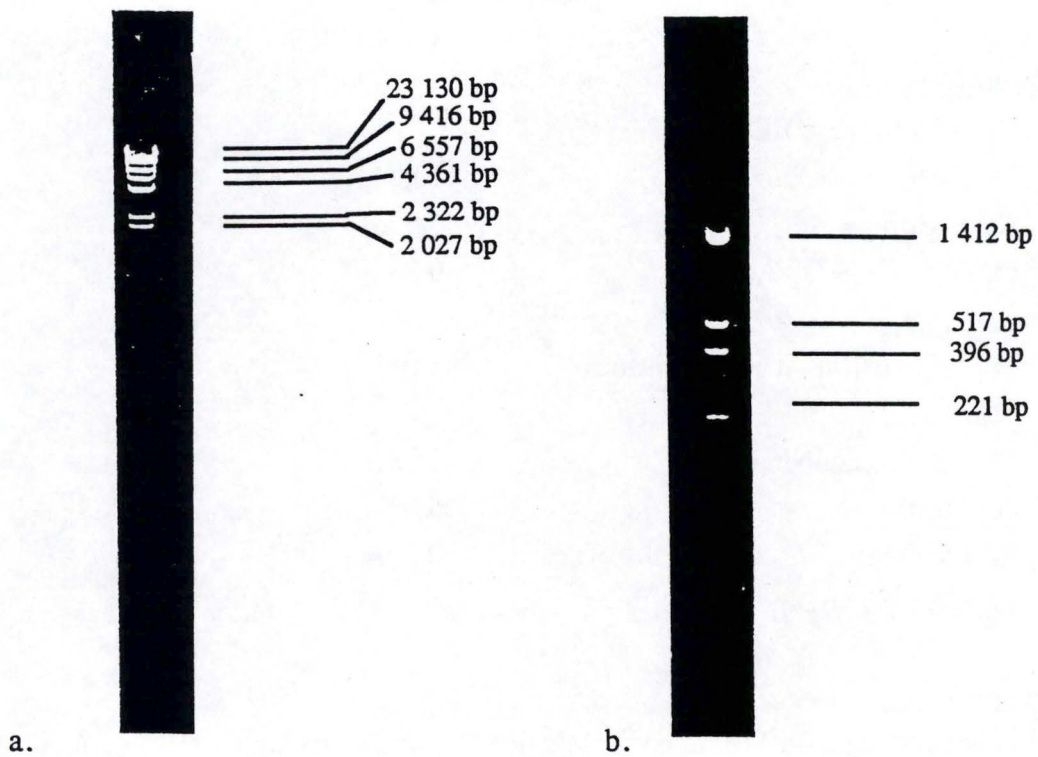


Figure II.10 : taille des fragments des marqueurs λ et PUC18.

a) le marqueur λ est restreint par HindIII (les fragments de 564 bp et de 125 bp ne sont pas visibles sur la photographie). Gel d'agarose 1%.

b) le marqueur PUC18 est restreint par HinfI (les fragments de 75 bp et de 65 bp ne sont pas visibles sur la photographie). Gel d'agarose 2%.

- La taille des fragments. Dans un des puits du gel, on place un marqueur de taille qui est une molécule d'ADN coupée par un enzyme de restriction générant des fragments de taille connue. Nous avons utilisé:

- l'ADN du phage λ restreint par *HindIII* (gels agarose 1%)
- le plasmide pUC 18 restreint par *HinfI* (gels agarose 2%) (figure II.10)

- La quantité d'ADN dans une bande. La fluorescence étant proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium intercalée dans l'ADN, elle sera d'autant plus intense que les fragments d'ADN d'une bande sont grands et nombreux. La quantité d'ADN du marqueur étant connue, il sera facile d'estimer par comparaison, la quantité d'ADN de l'échantillon étudié.

Une bande correspondant à 10 ng d'ADN peut être vue sur un gel d'agarose mais la faible luminosité de la bande dans ce cas ne permet pas à celle-ci de se marquer sur photo.

II.5. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose

Méthode des papiers (Dretzen, 1981)

Cette méthode permet d'isoler d'un mélange de restriction le fragment d'ADN particulier qui nous intéresse.

Solutions

- Solution d'élution "High Salt Buffer"

Tris 20 mM

EDTA 1mM

NaCl 1,5M

pH 7,5

- Tampon TE

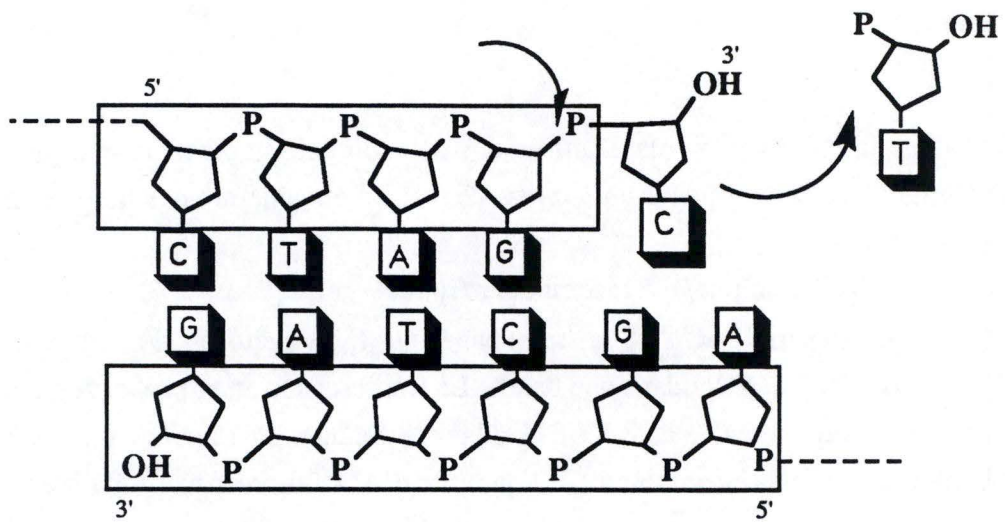
Tris 10 mM

EDTA 1 mM

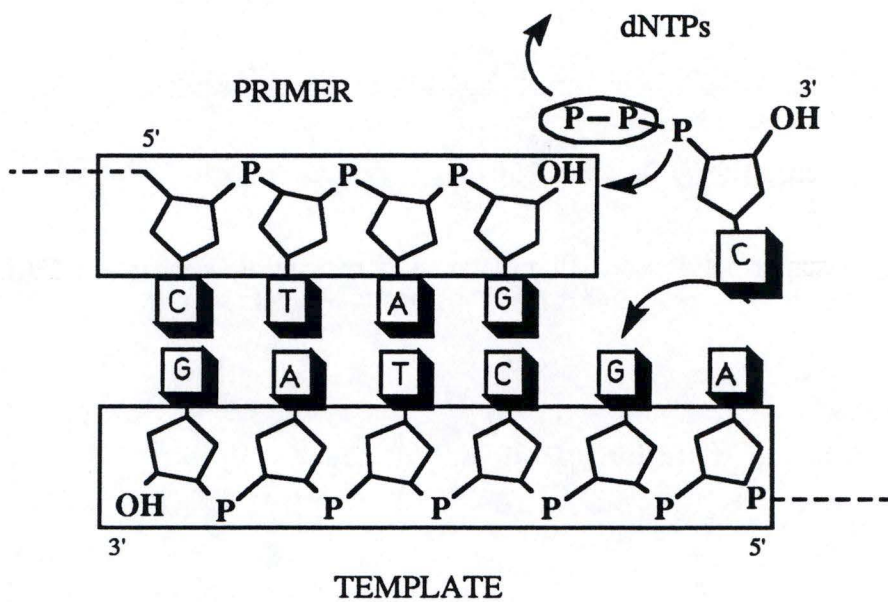
pH 8

Préparer des bouts de papier DEAE cellulose Whatman DE81 d'environ 1 cm² et les faire tremper 2-3 heures dans une solution de NaCl 2,5 M. Laver ensuite, 3X à l'eau stérile avant de les stocker dans une solution d'EDTA 1mM à 4°C.

L'électrophorèse ayant séparé les fragments d'ADN, le gel est incisé devant la bande à récupérer (côté électrode positive) et si nécessaire derrière cette bande pour empêcher une contamination par des fragments de plus grande taille. Introduire dans l'incision le papier Whatman préalablement rincé dans du TBE en le poussant bien contre la paroi du moule. Replacer le gel dans la cuve et poursuivre l'électrophorèse jusqu'à ce que l'ADN à récupérer soit entré dans le papier (vérifier la fluorescence des papiers sous UV).



a/ activité exonucléase 3'-->5' du fragment Klenow



b/ activité polymérase 5'-->3' du fragment Klenow

Figure II.11 : activités du fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*E.coli*.
(Maniatis *et al*, 1990).

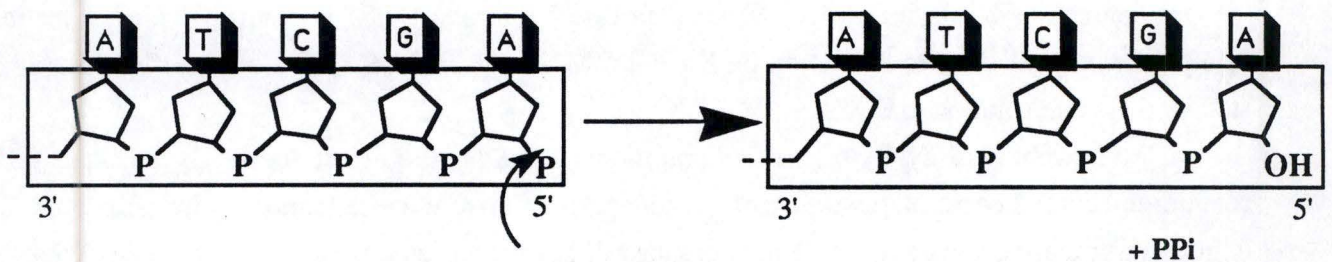


Figure II.12 : action de la phosphatase alcaline (Maniatis *et al*, 1990).

Ces dernières opérations doivent se faire avec un éclairage UV d'un temps minimum pour éviter l'action mutagène des rayons ultra-violet.

Le papier est prélevé avec une pince, rincé dans de l'eau distillée froide, séché sur papier Whatman et placé dans un Eppendorf (E₁). Ajouter au tube E₁ 400 µl de la solution d'élution. Le papier est défait par agitation manuelle et incubé 2 heures à 37°C avec agitation intermittente; les anions du sel vont ainsi déplacer l'ADN du papier vers la solution.

Percer ensuite le fond du tube E₁ avec une épingle chauffée et le placer sur un second Eppendorf E₂. Centrifuger les deux tubes dans cette disposition 5' à 12000 rpm. La solution contenant l'ADN passe ainsi dans le tube E₂ alors que le papier reste dans le tube E₁. Centrifuger le tube E₂ seul pour sédimenter les fragments de papier qui auraient pu passer dans le tube E₂ lors de la centrifugation précédente. "Pipetter" le surnageant et le placer dans un troisième Eppendorf.

Ajouter au surnageant 1 ml de butanol saturé en eau et centrifuger 30 secondes à 12000 rpm puis éliminer la phase supérieure (le butanol permet d'extraire le bromure d'ethidium).

L'ADN est précipité en ajoutant 700 µl d'éthanol absolu froid (-20°C) et en le plaçant 10' à -80°C. Centrifuger ensuite 20' à 4°C à 12000 rpm. Eliminer le surnageant. Laver avec de l'éthanol à 70% et sécher sous vide. Resuspendre dans 15 µl de TE ou d'eau stérile.

Mettre 1/10 sur gel pour contrôler la présence et la pureté de l'ADN extrait.

II.6. Réaction de "filling" (remplissage)

La réaction de "filling" permet de former un bout franc à partir d'un bout collant 5' protrudant. Elle est utilisée lorsqu'on veut liquer deux molécules d'ADN dont les extrémités sont incompatibles. La réaction de remplissage est réalisée par l'activité enzymatique du fragment "Klenow" de l'ADN polymérase I de *E.coli.*. La Klenow, disponible commercialement, est constituée d'une seule chaîne polypeptidique (PM=76000) et est obtenue par clivage de l'holoenzyme par la trypsine. De ce fait, la Klenow est dépourvue de l'activité 5'-3' exonucléase ("exo5'") mais a gardé son activité polymérase et son activité 3'-5' exonucléase (figure II 11a et 11b).

Protocole :

Ajouter à la solution de *filling* 4 X 2µl d'une solution 0,1mM en dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP), 2 unités de Klenow et le tampon de polymérase (10X).

Incuber 1h à 14°C ou 30' à 30°C

Passer à 75°C pendant 10' afin d'inactiver l'enzyme.

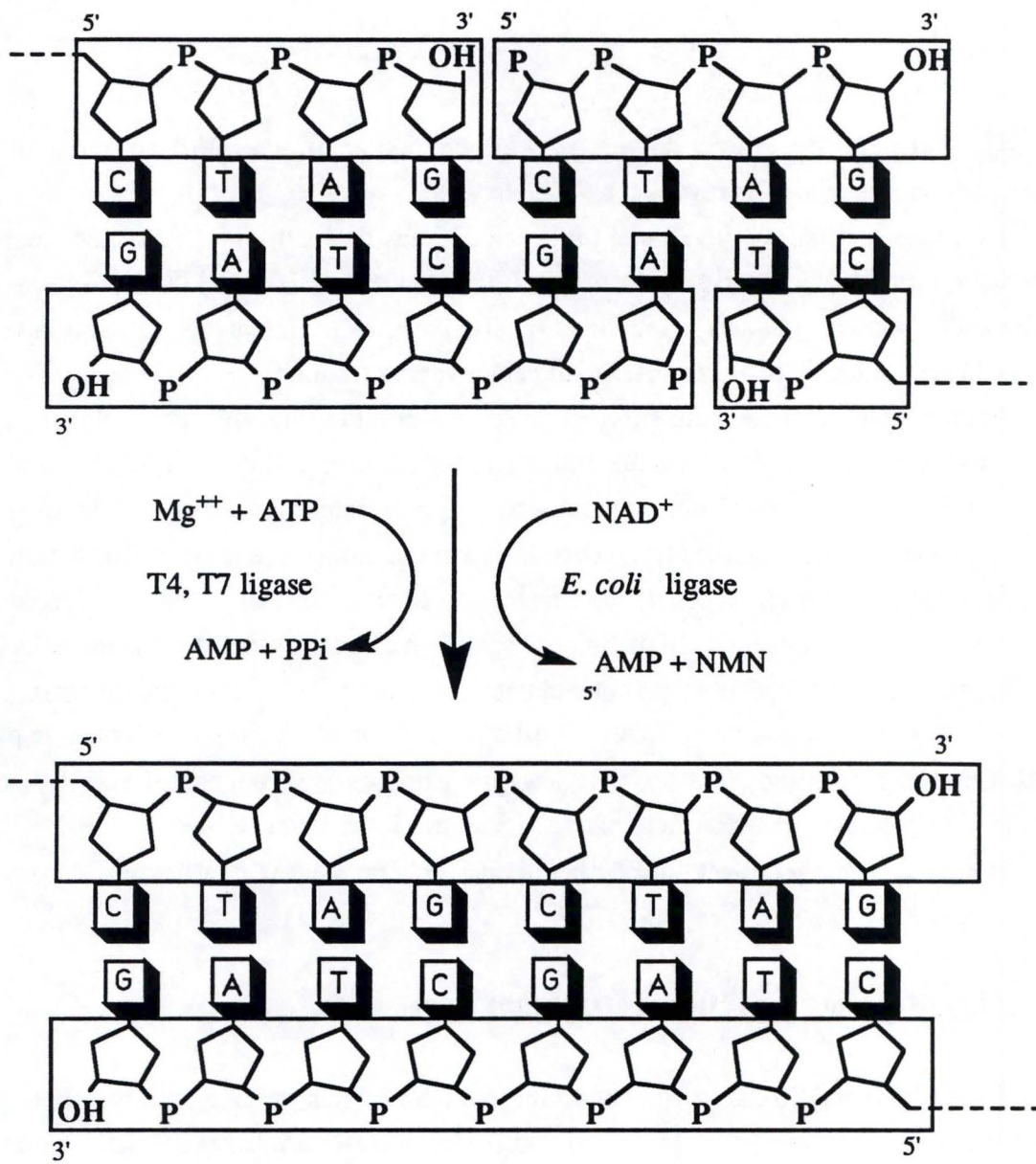


Figure II.13 : activité de la ligase sur des extrémités cohésives (Maniatis *et al.*, 1990).

II.7.La réaction de déphosphorylation

Afin qu'un plasmide restreint par une enzyme ne se referme sur lui-même lors d'une ligation avec un autre fragment, il est utile de déphosphoryler les extrémités 5' phosphorylées de l'ADN ouvert. (figure II.12)

protocole : 50 picomoles d'ADN sont incubées avec 1 U de phosphatase alcaline à 37°C pendant 1h dans un tampon adéquat.

II. 8 Ligation de molécules d'ADN linéaires ayant des bouts droits ou des bouts saillants

La ligation de molécules d'ADN clivées à bouts droits, même par des enzymes différentes est toujours possible, tandis que des molécules d'ADN clivées à bouts collants ne peuvent être assemblées entre elles que si les nucléotides protrudants forment des extrémités cohésives (c-à-d sont anticomplémentaires), dans ce cas, les bouts protrudants (saillants) sont dits compatibles.

La ligation est réalisée grâce à l'activité de l'enzyme ADN ligase du phage T4 (T4 DNA Ligase). Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiester entre le phosphate 5' d'une molécule d'ADN et une extrémité hydroxyle 3'. L'enzyme requiert de l'ATP et des cations Mg^{++} pour être active (figure II.13 ; Maniatis *et al*, 1989).

Solutions

- Tampon de ligation (10X) (Gibco-BRL):

Tris HCl 20 mM

MgCl₂ 10 mM

DTT 10 mM

ATP 1 mM

pH 7,4

La réaction se réalise classiquement comme suit:

1U de T4 DNA Ligase (Gibco-BRL) 1 μ l

Tampon de ligation (10X) 2.5 μ l

ADN en solution 19 μ l

Une unité de T4 DNA Ligase est suffisante pour liguer 5 μ g d'ADN.

Incuber 14 h à 14°C pour les bouts collants et 2 h à température ambiante pour les bouts francs.

La ligation à bouts francs étant souvent moins efficace, il est nécessaire d'augmenter de 10 à 100 fois la quantité d'enzyme.

II.9. Purification et précipitation d'ADN

Certaines enzymes de restriction sont sensibles à la chaleur et sont dénaturables de cette manière. D'autres peuvent être inactivées par l'EDTA, pour cela on amène la solution à une concentration finale 10 mM pH 7,5.

On peut aussi extraire les protéines d'une solution aqueuse avec du phénol-chloroforme.

Solutions

- Solution de phénol:

Phénol auquel on ajoute de la 8-hydroxyquinoline à une concentration finale de 0,1% et équilibrée contre le tampon adéquat (TE dans ce cas ci). L'hydroxyquinoline est un antioxydant, un inhibiteur de RNAase et donne à la solution une teinte jaune qui permet d'identifier les deux phases.

- Solution de chloroforme:

Chloroforme auquel on ajoute de l'alcool isoamylique (24:1) qui facilite la séparation du chloroforme par rapport à la phase aqueuse.

- Solution de phénol-chloroforme:

Les deux solutions ci-dessus en proportions égales et équilibrées contre le même tampon (TE). Cette solution permet d'inactiver et d'extraire les protéines d'une solution d'ADN.

Ajouter à un volume d'ADN un volume égal de phénol-chloroforme. Si le volume est petit, l'amener à 300 - 400 μ l avec du TE. Agiter vigoureusement et centrifuger 30 secondes à 12000 rpm.

Récupérer la phase aqueuse et répéter l'opération avec la solution d'éther saturé en eau afin d'éliminer toute trace de phénol.

La précipitation d'une solution aqueuse d'ADN peut se faire comme suit :

Ajouter à l'ADN en solution 1/10 du volume en acétate de sodium (3M pH 4,8) et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid (-20°C).

Faire précipiter 10' à -80°C puis centrifuger 20' à 12000 rpm à 4°C.

Éliminer le surnageant puis, déposer prudemment un volume d'éthanol 70% froid (-20°C) pour éliminer les solutés piégés dans le culot. Centrifuger comme précédemment, éliminer le surnageant et sécher sous vide.

Le culot est resuspendu dans le volume adéquat d'eau ou de TE.

II.10. La transformation bactérienne

II.10.1. Méthode au chlorure de calcium.

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

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

II.10.1.1 Préparation de cellules XL1blue compétentes

Solutions

- Solution de CaCl₂ 50 mM
- Solution de CaCl₂ 50 mM, 15% glycérol

La souche est cultivée à 37°C sur un milieu solide LB + tétracycline 100 µg/ml afin de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'. A partir d'une colonie, ensemercer un milieu liquide contenant 10 ml de LB + tétracycline. Cette préculture est incubée entre 4 et 8 heures à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm comprise entre 1,5 et 2. Elle sert à ensemercer 100 ml de LB + tétracycline.

Agiter fortement la culture pendant 1 à 4 heures à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm de 0,3 (phase de croissance logarithmique).

La culture est arrêtée par un passage de 10' dans la glace

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

La solution est laissée entre 20' et 60' dans la glace.

Centrifuger 5' à 4000 rpm et à 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl₂ 50 mM 15% glycérol équivalent au dixième du volume initial (soit ici 10 ml).

Répartir la solution de cellules compétentes en Eppendorfs stériles et stocker à -80°C.

II.10.1.2. Transformation de cellules XL1 blue compétentes

Méthode basée sur celle de Mandel et Higa.

A 100 à 200 µl de cellules compétentes (dégelées sur glace ou "fraîches"), ajouter :

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

Incuber 30 à 40 minutes sur glace puis 2 minutes à 42°C (choc thermique).

Ajouter 0,5 à 1 ml de LB et incuber 30 à 60 minutes à 37°C (régénération)

Étaler sur boîte avec un milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Contrôles

- Contrôle négatif: Des cellules compétentes sans ADN subissant les conditions de transformation sont étalées sur milieu sélectif comme contrôle de sensibilité, montrant ainsi la validité de ce milieu et la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

- Contrôle positif: Dans le cas d'une transformation avec un mélange de ligation, une transformation en parallèle avec une quantité connue d'un plasmide est réalisée dans les mêmes conditions ce qui permet de contrôler le taux de transformation.

- Contrôle de viabilité: Des cellules compétentes sans ADN ayant subi les mêmes conditions de transformation sont étalées sur un milieu non sélectif comme contrôle de leur viabilité.

II.10.2. Electroporation ou électrotransformation

L'électroporation est une méthode de transformation de *E. coli* plus efficace que les méthodes chimiques. On obtient couramment 10^9 à 10^{10} transformants /µg de DNA avec diverses souches et de nombreux plasmides (Biorad).

Solutions

- solution SOC

Bactotryptone (Oxoïd)	2%
Bactoyeast extract (Oxoïd)	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

- solution de glycérol 10 %

II.10.2.1. Préparation de cellules XL1blue compétentes

Inoculer 400 ml de milieu LB avec une préculture (1/100 du volume final)

Faire croître les cellules à 30°C sous une vigoureuse agitation jusqu'à obtenir une D.O. de 0,5 à 0,8 (Absorbance à 540 nm). Placer les cellules sur glace pendant 15 à 30 minutes. Récolter les cellules par centrifugation à 4°C dans un rotor froid à 4000g. Oter le maximum de surnageant. Resuspendre délicatement le culot dans 400 ml d'eau froide. Centrifuger comme ci-dessus.

Laver à nouveau avec 200 ml d'eau et centrifuger comme ci-dessus.

Resuspendre dans 8 ml de glycérol 10% froid. La concentration finale des cellules doit être de $1-3 \times 10^{10}$ cell. /ml.

Cette suspension de cellules peut être conservée à -80°C. Ces cellules resteront compétentes durant 6 mois.

II.10.2.2 Electro-transformation proprement dite et étalement

Ramener les cellules à température ambiante en les placant sur glace. Refroidir la cuvette d'électroporation.

Mélanger, dans un tube stérile, 100 µl de suspension de cellules compétentes et 1 µl de mélange de ligation. Placer le tout 0,5 à 1 minute sur glace.

Régler le Gene Pulser sur 2,5 kV (cuvette de 0,2 cm, 1,50 kV pour des cuvettes de 0,1 cm) et 25 µF et le Pulse Controller sur 200 Ω. Ceci produit un pulse de 4,5 à 5 msec.

Transférer la suspension de cellules et de DNA dans la cuvette d'électroporation, placer la cuvette dans la chambre de l'électroporateur. Appliquer un pulse.

Retirer la cuvette et ajouter immédiatement 1 ml de milieu SOC froid et resuspendre délicatement les cellules avec une pipette pasteur. Transférer le tout dans un tube de culture. Ce tube sera placé 1 heure à 37°C.

Etaler les transformants sur des milieux de sélections.

II.11. Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

II.11.1. D'après la méthode de Ito (1983) à l'acétate de lithium.

Solutions

- Solution de TE - LiOAc

Acétate de lithium (LiOAc) 0,1 mM

TrisHCl 10 mM

EDTA 1mM

pH 7,5

- Solution de TE - LiOAc - PEG
- TE - LiOAc 1X
- PEG (polyéthylène glycol) 4000 40%

Réaliser une culture de levure en milieu riche YPD.

Quand la culture a atteint une DO 660 de 1 (1 à 2 10^7 cellules/ml), la fractionner en aliquots de 20 ml et centrifuger 10' à 6000 rpm (rotor SS34 - Sorvall).

Éliminer rapidement et prudemment le surnageant (culot fragile). Resuspendre chaque culot dans 5 ml d'eau stérile.

Centrifuger 10' à 6000 rpm (rotor SS34 - Sorvall).

Éliminer rapidement et prudemment le surnageant et resuspendre chaque culot dans 5 ml de TE - LiOAc.

Répartir à raison de 1 ml par Eppendorf (on a donc l'équivalent de 10 ml de culture par Eppendorf).

Centrifuger 10' à 12000 rpm.

Éliminer le surnageant, ajouter 100 μ l de TE - LiOAc et incuber 1 heure à 30°C avec agitation légère.

Ajouter 50 μ g d'ADN carrier (ADN de thymus de veau) et 10 μ g d'ADN plasmidique (contenus dans 10 μ l maximum).

Incuber 30' à 30°C avec agitation légère.

Ajouter 700 μ l de TE - LiOAc - PEG et mélanger légèrement.

Incuber à 30°C pendant 1 heure ou une nuit avec agitation légère.

Choc thermique de 5' à 42°C.

Centrifuger 1' à 12000 rpm et éliminer le surnageant.

Resuspendre les cellules dans 200 μ l d'eau distillée stérile et étaler sur milieu sélectif (100 μ l/boîte).

Contrôles

- Témoin de viabilité des souches compétentes: ces dernières subissent le protocole de transformation mais sans ADN et sont étalées sur un milieu non sélectif.

- Détection des révertants sauvages spontanés: par étalement sur milieu sélectif de cellules ayant subi le protocole de transformation sans addition d'ADN plasmidique.

- Témoin de compétence des cellules: la transformation est réalisée avec un plasmide dont on sait qu'il transforme efficacement la souche de levure utilisée par la méthode de Ito (YEp351 par exemple).

II.11.2. Par électroporation

Le protocole d'une électro-transformation de *Saccharomyces cerevisiae* est rapide et efficient, sans pré-traitement chimique des cellules. Il suffit de centrifuger 5 minutes pour concentrer et laver les cellules et de les resuspendre dans un milieu 1 M sorbitol afin de stabiliser les cellules durant et après le *pulse*. Une préculture n'est pas nécessaire et les cellules électroporées peuvent être directement étalées sur un milieu solide contenant du sorbitol (l'agar n'est pas nécessaire). L'efficiency est de 2 à 5 x 10⁵ colonies/μg (Biorad).

Solutions

Sorbitol 1M

II.11.2.1 Préparation de cellules de levures compétentes

Inoculer 500 ml de YPD à partir d'une préculture ou à partir d'une colonie mise sur boîte de Pétri.

Faire croître les cellules à 30°C sous une vigoureuse agitation jusqu'à obtenir une D.O. de 0,5 à 0,8 (les meilleurs résultats sont obtenus quand les cellules sont récoltées en phase exponentielle).

Récolter les cellules par centrifugation à 4°C dans un rotor froid (GSA-Sorval) à 4000 g. Oter le plus de surnageant possible.

Laver les cellules en les resuspendant dans 500 ml d'eau stérile froide. Centrifuger à nouveau (4000 g, 5 minutes, 4°C) et écarter le surnageant.

Laver à nouveau avec 250 ml d'eau stérile froide et centrifuger comme ci-dessus.

Resuspendre dans 20 ml de sorbitol 1M froid. Centrifuger comme ci-dessus et écarter le surnageant.

Resuspendre dans 0,5 ml de sorbitol 1M froid jusqu'à un volume final de 1 à 1,5 ml (cellules + solution).

II.11.2.2 Electro-transformation et étalement

Refroidir sur glace une cuvette d'électroporation et placer la chambre blanche de l'électroporateur dans la glace.

Mélanger, dans un tube stérile, 40 μl de suspension de cellules de levures et moins de 5 μl de plasmide. Placer le tout 5 minutes sur glace.

Régler le Gene Pulser sur 1,5 kV et 25 μF et le Pulse Controller sur 200 Ω. Ceci produit un pulse de 4,5 à 5 msec.

Transférer la suspension de cellules et de DNA dans la cuvette d'électroporation, placer la cuvette dans la chambre de l'électroporateur. Appliquer un pulse.

Retirer la cuvette et ajouter immédiatement 1 ml de solution de sorbitol 1M froide. Transférer le tout dans un tube de culture.

Etaler les transformants sur les milieux de sélection contenant du sorbitol 1M.

II.12. Extraction rapide d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli* (miniprep)

La miniprep est divisée en cinq étapes:

- Lyse alcaline des bactéries
- Précipitation des protéines et des débris cellulaires
- Précipitation de l'ADN plasmidique
- Lavage de l'ADN plasmidique
- Resuspension

Solutions

- Tampon P1 - RNAase

Tris HCl 50 mM

EDTA 10 mM

pH 8

RNAase 400 µg/ml

- Tampon P2

NaOH 200 mM

SDS 1%

- Tampon P3

KAc 2,55 M

pH 4,8

Un milieu LB + ampicilline (100 µg/ml) (ou autre antibiotique sélectif) est inoculé avec une colonie de bactéries transformantes. Incubation une nuit à 37°C avec agitation en bouteilles universelles.

Prélever 1,5 à 3 ml de culture (selon le stade de croissance) dans un Eppendorf et centrifuger 5' à 12000 rpm.

Éliminer le milieu et resuspendre le culot de bactéries dans 300 µl de tampon P1 - RNAase

Ajouter 300 µl de tampon P2 (lyse alcaline) et mélanger. Incuber 5' à température ambiante.

Ajouter 300 µl de tampon P3 (précipitation des protéines et des débris cellulaires).

Centrifuger 5' à 12000 rpm horizontalement (Beckman microfugeB).

Centrifuger 20' à 12000 rpm à 4°C (Janetzky).

Récupérer le surnageant et y ajouter 0,8 volumes d'isopropanol à température ambiante (précipitation de l'ADN plasmidique).

Centrifuger 15' à 12000 rpm à température ambiante.

Éliminer prudemment le surnageant (le culot est presque invisible). Ajouter 300 µl d'éthanol 70% (lavage de l'ADN plasmidique)

Centrifuger 15' à 12000 rpm à 4°C.

Éliminer le surnageant très délicatement et sécher sous vide.

Resuspendre dans de l'eau stérile ou du TE

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

II.13. Précipitation d'ADN plasmidique d' *Escherichia coli* (maxiprep)

Solution

- SSC 20X

NaCl 3 M

NaCitrate 0,3 M

porter à pH 7,5

Une préculture de la colonie bactérienne contenant le plasmide dans 10 ml de LB + ampicilline (en bouteille universelle) est laissée quelques heures à 37°C avec agitation.

A partir de cette préculture, ensemer 200 à 400 ml de LB + ampicilline. Incuber avec agitation à 37°C jusqu'à ce que la culture arrive en phase stationnaire.

Centrifuger 200 ml de la culture à 5000 rpm à 4°C pendant 15' (rotor GSA - Sorvall).

Éliminer le surnageant et dissoudre le culot dans 200 ml de Tris HCl 0,05 M pH 8 froid (sur glace).

Centrifuger comme précédemment.

Éliminer le surnageant et dissoudre le culot dans 12 ml de Tris HCl 0,05 M pH 8 - 33% saccharose froid (sur glace).

Placer à 37°C avec agitation et ajouter 1,2 ml de lysozyme (solution 10 mg/ml Tris HCl 0,05 M pH 8) et 2,5 ml d'EDTA 0,5 M pH 8. Laisser agiter ainsi 15'.

Ajouter 10 ml de Triton X-100 3% et laisser agiter 10' à 37°C.

Centrifuger 1 h 30' à 30000 rpm à 5°C (rotor 60Ti - Beckman)

Récupérer le surnageant dans un Erlenmeyer de 100 ml et peser.

Ajouter 1/9 du poids en NaCl 5 M et 1/9 du poids en PEG 7000. Laisser dissoudre 10' à 37°C avec agitation.

Transférer dans des tubes Corex et précipiter l'ADN une nuit à 4°C (ou 3 h sur glace et au frigo).

Centrifuger 15' à 8000 rpm à 4°C (rotor SS34 - Sorval).

Éliminer prudemment le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de SSC 1/10 puis transférer la solution dans un Sterilin.

Ajouter 9,7 ml de SSC 1/10, 13,7 g de chlorure de césium.

Dissoudre le chlorure de césium en agitant fortement le Sterilin.

Ajouter 0,7 ml de bromure d'éthidium 10 mg/ml.

Remplir une bouteille à gradient (Quick Seal) avec cette solution. Compléter jusqu'au col avec de l'huile de paraffine et sceller la bouteille.

Centrifuger 16 h à 45000 rpm à 25°C (rotor TV865B - Beckman).

Sous UV, après avoir coupé le col du tube, récupérer avec une pipette Pasteur, la bande inférieure contenant l'ADN plasmidique.

NB: sous le col ou sous la paroi du tube, s'est déposée un film composé d'un complexe formé par le bromure d'éthidium et les protéines.

Extraire 2 à 3X la solution avec de l'alcool isoamylique saturé en chlorure de césium (l'alcool isoamylique permet d'extraire le bromure d'éthidium):

Ajouter 1 volume d'alcool isoamylique, agiter, deux phases apparaissent, la phase supérieure rosée est éliminée (alcool isoamylique contenant du bromure d'éthidium).

Placer la solution dans un sac à dialyse (préalablement bouilli) et dialyser 3 heures contre du SSC 1/10 à température ambiante en changeant le SSC 1/10 à mi-temps.

Transférer la solution dans un tube Greiner. Ajouter un volume de phénol - chloroforme et centrifuger 15' à 8000 rpm (rotor SS34 - Sorval).

Éliminer le phénol - chloroforme et mettre la solution dans un sac à dialyse.

Dialyser 3 jours contre du SSC 1/10 en chambre froide en changeant le SSC 1/10 tous les jours.

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

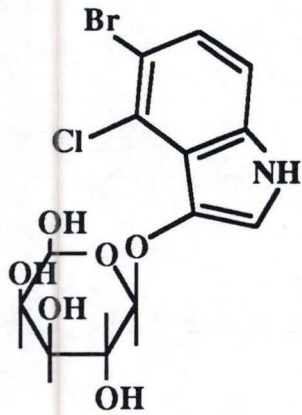
Cette méthode permet de récupérer plus de 200 µg d'ADN.

II.14. Quantification spectrophotométrique de l'ADN

La mesure d'absorbance (DO) à 260 nm permet de calculer la concentration des acides nucléiques. Une absorbance à 260 nm égale à 1 correspond à une concentration de 50 µg d'ADN bicaténaire par ml.

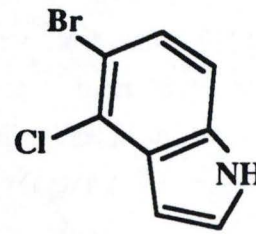
Le rapport entre les absorbances à 260 nm et à 280 nm permet une estimation de la pureté de l'ADN. Des préparations pures ont un rapport DO^{260}/DO^{280} de 1,8. S'il y a contamination de la solution par du phénol ou des protéines, ce rapport sera inférieur et une quantification exacte de l'ADN ne sera pas possible par cette méthode.

5-bromo-4-chloro-3-indoyl
 β -D-galactopyranoside



β -galactosidase

5-bromo-4-chloro-
indole + D-galactose



Bleu indigo

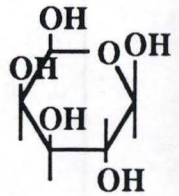
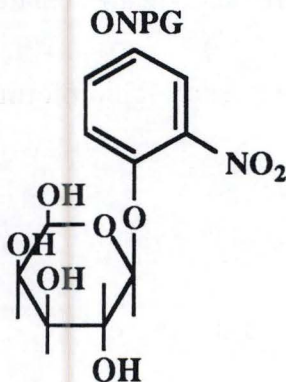


Figure II.14a : activité de la β -galactosidase sur le 5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranoside (Xgal).

ortho-nitrophényl
 β -D-galactopyranoside

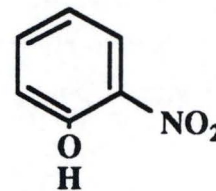


N'absorbe pas à 420 nm

β -galactosidase

ortho-nitrophénol + D-galactose

ONP



Absorbe à 420 nm

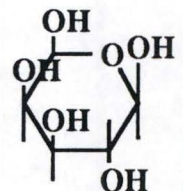


Figure II.14b : réaction impliquée dans le dosage de l'activité de la β -galactosidase : l'enzyme hydrolyse l'ONPG en galactose et en ONP, dont l'apparition est détectée par mesure de l'absorbance à 420 nm.

II.15. Test coloré de détection de l'activité β -galactosidase

II.15.1. Dosage qualitatif de l'activité β galactosidase.

Ce test se base sur la propriété du substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranoside) (Stratagène) de devenir bleu une fois clivé par l'enzyme β -galactosidase (figure II.14a).

Le milieu utilisé est le milieu M7 décrit précédemment. Ce milieu est porté à pH 7 qui est l'optimum d'efficacité de la réaction. L'X-gal est ajouté à raison de 50 mg/l dissous dans du N,N-diméthylformamide.

Les colonies de levure possédant une activité β -galactosidase deviennent bleues sur ce milieu.

II.15.2. Dosage quantitatif de l'activité β galactosidase.

Ce protocole décrit le dosage de l'activité β -galactosidase à partir d'une culture de levures. La méthode repose sur l'utilisation d'un substrat chromogénique, l'ONPG (*ortho*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside). La β -galactosidase hydrolyse l'ONPG (incolore) en D-galactose et en *ortho*-nitrophénol (ONP, jaune) dont l'apparition est détectée par mesure de l'absorbance à 420 nm (figure II 14b). Une activité β galactosidasique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1 μ M d'ONPG par minute et par mg de protéines à 28°C et à pH 7,0.

Solutions

- Na ₂ CO ₃	1,67 M
- ONPG	4 mg/ml
- Tampon Z :	
Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1mM
β -mercaptoéthanol	50mM

Porter à pH 7. Ne pas autoclaver.

Billes de verre

Billes de verre d'un diamètre de 316 à 416 μ m. Elles seront lavées à l'HCl 1N puis rincées à l'eau.

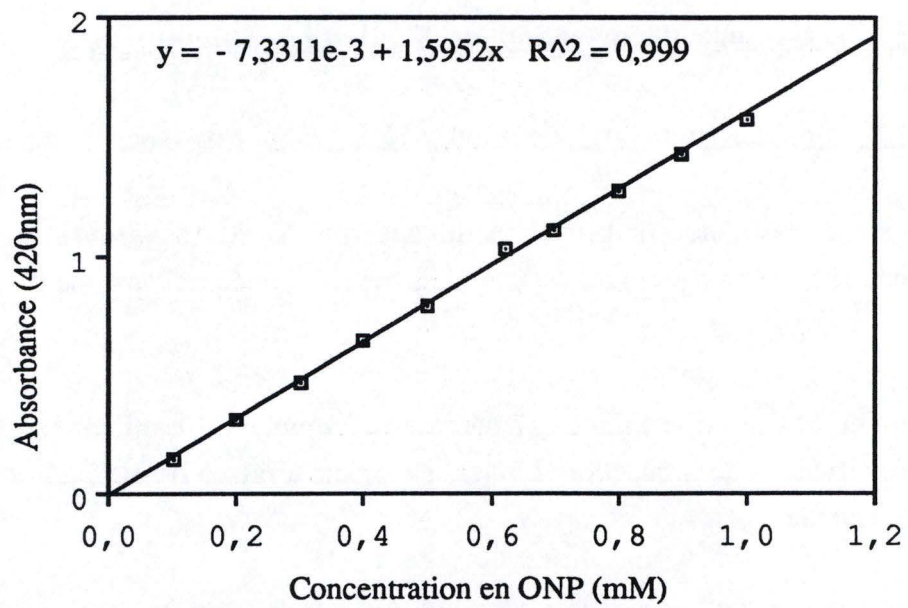


Figure II.15.: droite étalon pour le dosage de l'ONP.

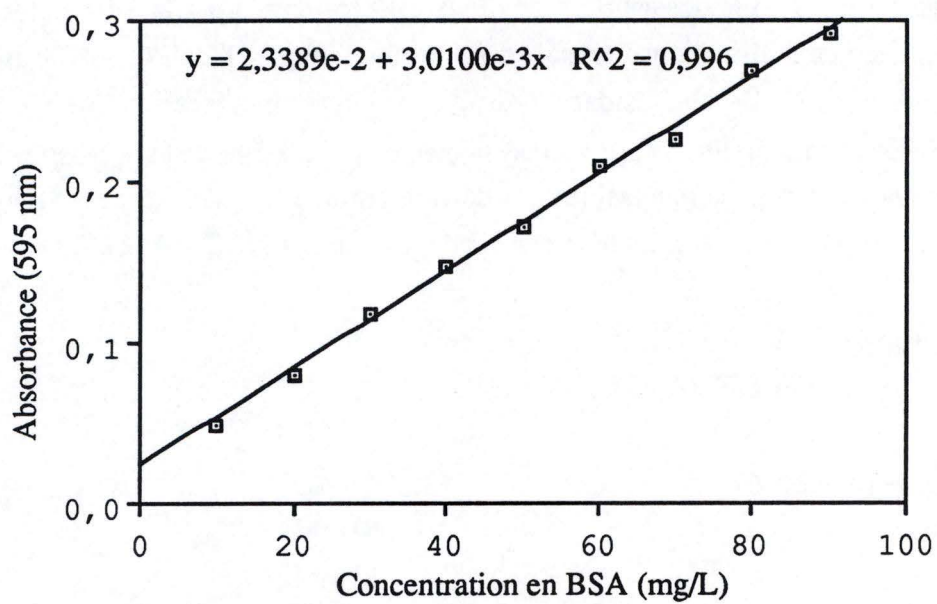


Figure II.16 : droite étalon pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Pour effectuer ces dosages, les levures ont été précultivées à 30°C dans 5ml de milieu riche en phosphate (et additionner les composants correspondant aux auxotrophies). Les cellules sont récoltées, lavées avec de l'eau stérile et inoculées d'une part dans un milieu pauvre en phosphate et d'autre part dans un milieu riche en phosphate. Les levures seront récoltées à une D.O.660 déterminée

Prélèver 10 à 20 ml de culture et centrifuger 10' à 6000 rpm (Rotor SS34 SORVALL)

Après élimination du surnageant, resuspendre les cellules dans 1 ml de tampon Z (pH 7,0) et transférer dans un eppendorf.

Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm (Janetsky) et éliminer le surnageant.

Resuspendre les cellules dans 200 µl de tampon Z

Ajouter ensuite des billes de verre (diamètre de 316 à 416 µm) jusqu'à environ 1 mm au dessous du ménisque de la suspension des cellules.

Mélanger au vortex de manière à obtenir un bouillonnement dans l'eppendorf, trois fois 3 minutes en déposant sur glace entretemps (lyse des cellules aux billes de verre).

Centrifuger à nouveau 5 minutes à 12000 rpm (Janetzky) et récupérer le surnageant (lysate). Prélever un aliquot et porter le volume à 1 ml avec du tampon Z.

De minute en minute, ajouter 200 µl d'ONPG à 4 mg/ml. Laisser incuber 15 minutes à 28°C, puis, ajouter de minute en minute 300 µl de Na₂CO₃ 1,67 M pour stopper la réaction.

Lire l'absorbance à 420 nm et comparer avec la droite étalon (figure II.15).

Contrôles

- Contrôle enzyme : remplacer dans le protocole les 200 µl d'ONPG par 200 µl d'eau pour chaque aliquot de lysat.
- Contrôle substrat : remplacer la solution de lysat diluée par 1 ml de tampon Z

Calcul de l'activité spécifique.

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

L'activité spécifique est exprimée en U/mg de protéines (une unité étant la métabolisation de 1 µmole de substrat par minute). La dilution est le rapport du volume final du test (en µl) et du volume de lysat utilisé (en µl).

[ONP] est la concentration en *ortho*-nitrophénol en µM calculé selon la droite étalon présenté à la figure II.15.

[protéines] est la concentration en protéine en mg/l du lysat calculé selon la droite étalon présenté à la figure II.16, la méthode sera expliquée au paragraphe II.16.

Le temps utilisé est celui du temps d'incubation en minutes.

II.16. Dosages des protéines

La concentration en protéines est mesurée par la technique de coloration de Bradford (Bradford,1976): un colorant , le bleu de Coomassie G250, s'associe aux protéines en modifiant le spectre d'absorption de façon à former une bande intense dont le maximum est à 595 nm. C'est une méthode très sensible (de 1 à 10 µg/ml). Il est nécessaire de construire une courbe étalon avec une protéine standard (la SAB, sérum albumine bovine ; figure II.16).

Solutions :

- Solution de Bradford

Bleu de Coomassie G250 (Sigma B1131)	0,1g
Ethanol 95% (mixer 1h)	50 ml
H ₃ PO ₄ 85%	100 ml

Ajouter de l'eau de manière à atteindre 200 ml de volume final
se conserve à 4°C

- Solution de travail :

1 volume stock 5X
4 volume d'H₂O

Filtrer sur un filtre plissé Whatman.

La solution se conserve 2 semaines à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- solution de NaCl 0,15 M

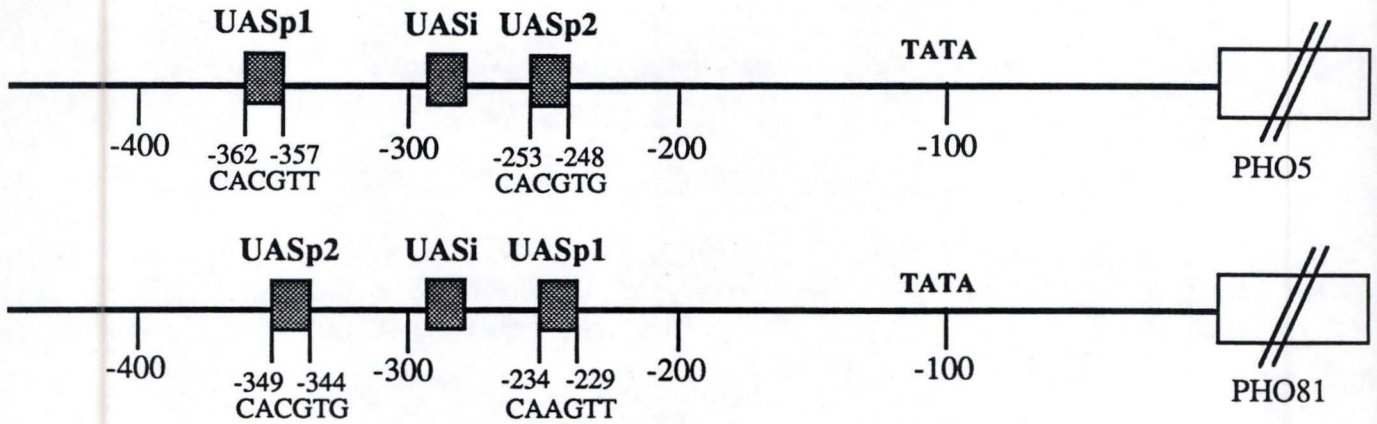
Protocole :

Pour chaque solution de protéines à doser, prélever un aliquot de 50 µl de protéines (en double exemplaire chaque fois) préalablement diluées.

ajouter 50 µl de la solution de NaCl et 1 ml de solution de Bradford.

Incuber 15' à température ambiante et mesurer l'absorbance à 595 nm pour chaque répliquat d'aliqots.

La concentration en protéines sera déduite de la droite étalon (figure II.16).



Sites de liaison de la protéine PHO4 :

UASp1



Site de liaison de la protéine PHO2

UASi



UASp2



Figure III.1. : comparaison de la localisation des UAS de PHO5 et des régions apparentées de PHO81. Les séquences UASp2 et UASp1 de PHO81 ont été déterminées par comparaison de séquences (l'UASp1 et p2 avec le promoteur de PHO5 et l'UASi avec HIS4). Les séquences UASp1, UASp2 et UASi sont donc des séquences putatives (Grifnée, 1990).

III. RESULTATS.

III.1. Description du promoteur *PHO81*.

Les séquences amont du gène *PHO81* ont été étudiées dans notre laboratoire (Grifnée, 1990 ; Denoël, 1991). Par comparaison de séquences du promoteur de *PHO81* avec le promoteur *PHO5*, on a relevé l'existence dans le promoteur de *PHO81* de séquences similaires aux UASp1 et UASp2 du promoteur de *PHO5* : les UASp1 et UASp2 sont les sites de liaison à l'ADN de la protéine Pho4. Par contre, aucune séquence homologue avec l'UASi (reconnue par la protéine Pho2) du promoteur de *PHO5* n'a été retrouvée dans le promoteur de *PHO81*. Mais une séquence de 12 paires de bases similaire à la séquence reconnue par la protéine Pho2 dans le promoteur *HIS4* est observée dans le promoteur *PHO81* et est provisoirement désignée UASi (Tice-Baldwin *et al*, 1989 ; figure III.1).

L'arrangement de ces 3 UAS putatives (déterminées par comparaison de séquences) dans le promoteur de *PHO81* est le même que celui observé dans le promoteur de *PHO5* où on a reconnu deux sites Pho4 de part et d'autre du site Pho2 : ceci suggère que le mécanisme d'activation de *PHO81* est le même que celui de *PHO5*. Il apparaît ainsi que le système PHO serait un système régulateur en circuit fermé : on observe une régulation en "retour", sur *PHO81*, par Pho2 et Pho4 (Yoshida *et al*, 1989).

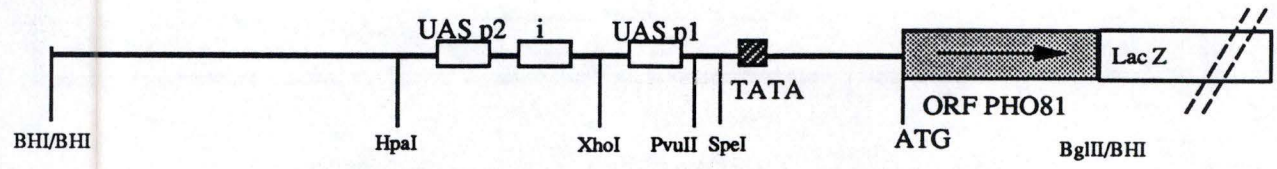
Afin d'établir le rôle éventuel de ces différentes boîtes, nous avons réalisé des délétions de chacune de ces boîtes dans le promoteur de *PHO81* et étudié la régulation de ce gène par la technique du gène-rapporteur.

III.2. Etude de la régulation par un gène-rapporteur.

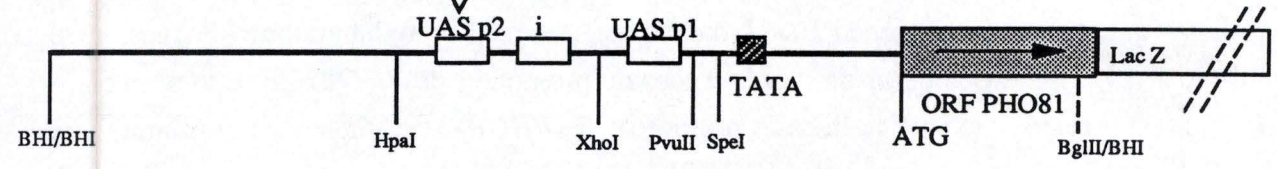
III.2.1. Introduction.

Afin d'étudier directement la régulation du gène *PHO81*, nous avons choisi la technique du gène-rapporteur : les régions régulatrices du gène *PHO81* sont fusionnées avec la séquence codante du gène de la β -galactosidase (Lac Z) dont l'activité enzymatique pourra être aisément détectée en réponse aux régulateurs transcriptionnels du système PHO.

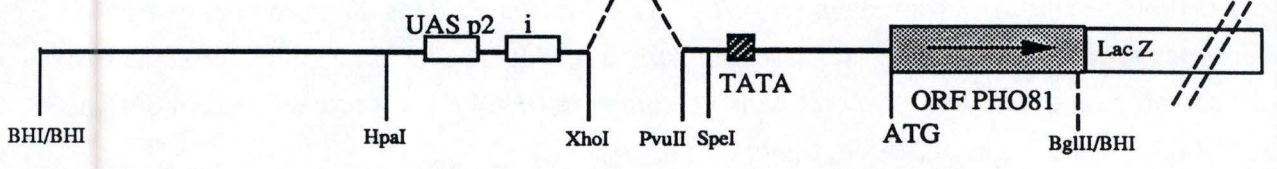
pGI DP97



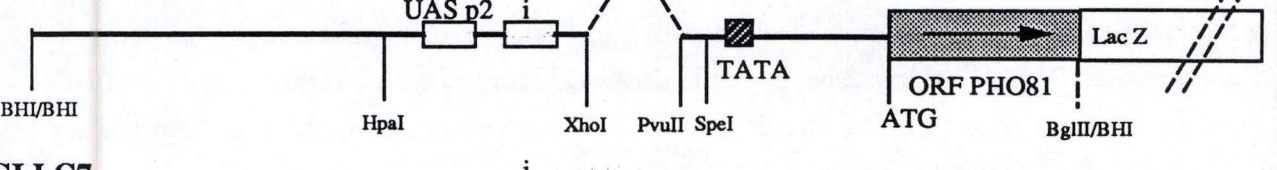
pGI DP99



pGI LC3



pGI LC6



pGI LC7



Figure III.2.: description des 5 gènes-rapporteurs.

Nous avons choisi la fusion des 1702 premiers nucléotides de *PHO81* (dont 157 acides aminés) avec le gène *LacZ* du YEp357 dépourvu de son ATG et de ses séquences amont. Cinq constructions seront réalisées et comprendront (figure III.2) :

- * le pGI.DP.97 portant le promoteur de *PHO81* intact ;
- * le pGI.DP.99 portant le promoteur de *PHO81* avec l'UASp2 disruptée ;
- * le pGI.LC.3 portant le promoteur de *PHO81* avec l'UASp1 délétée ;
- * le pGI.LC.6 portant l'UASp1 délétée et l'UASp2 disruptée ;
- * le pGI.LC.7 portant l'UASp1, l'UASp2 et l'UASi délétées.

III.2.2. Description des constructions.

Les constructions des pGI.DP.97 et pGI.DP.99 ont été réalisées antérieurement à ce travail au laboratoire (Prozzi D., 1991 ; figures III.3 et III.4).

Construction du pGI.LC.3. (figure III.5).

Le pGI.LC.3 comprend le promoteur *PHO81* délété de l'UASp1

* **Restrictions** : Le plasmide pGI.DP.97 est restreint par les enzymes SpeI et XhoI : ce qui permet de déléter l'UASp1. La double restriction génère deux fragments : la matrice de 9,6 kb et un fragment de 165 pb (fragment XhoI-SpeI) visibles après électrophorèse sur gel d'agarose 2% (photo III.1). Le mélange de restriction est déposé sur gel 1% et la bande de 9,6 kb est récupérée par la méthode des papiers (§ II.5).

* Les deux enzymes utilisées génèrent des bouts 5' protrudants non compatibles, c'est pourquoi l'utilisation de la **Klenow** (§ II.6) est requise : elle créera des extrémités collantes qui pourront être liguées.

* **Ligation** : l'ADN ayant été soumis à la Klenow, est mis en présence du tampon de ligation et de la T4 DNA ligase (§ II.8) 14 heures à 14°C suivi de 2 heures à température ambiante.

* **Transformation** : les cellules XL1-blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation (§ II.10.1) puis sont étalées sur le milieu sélectif LB+ampicilline. Les colonies

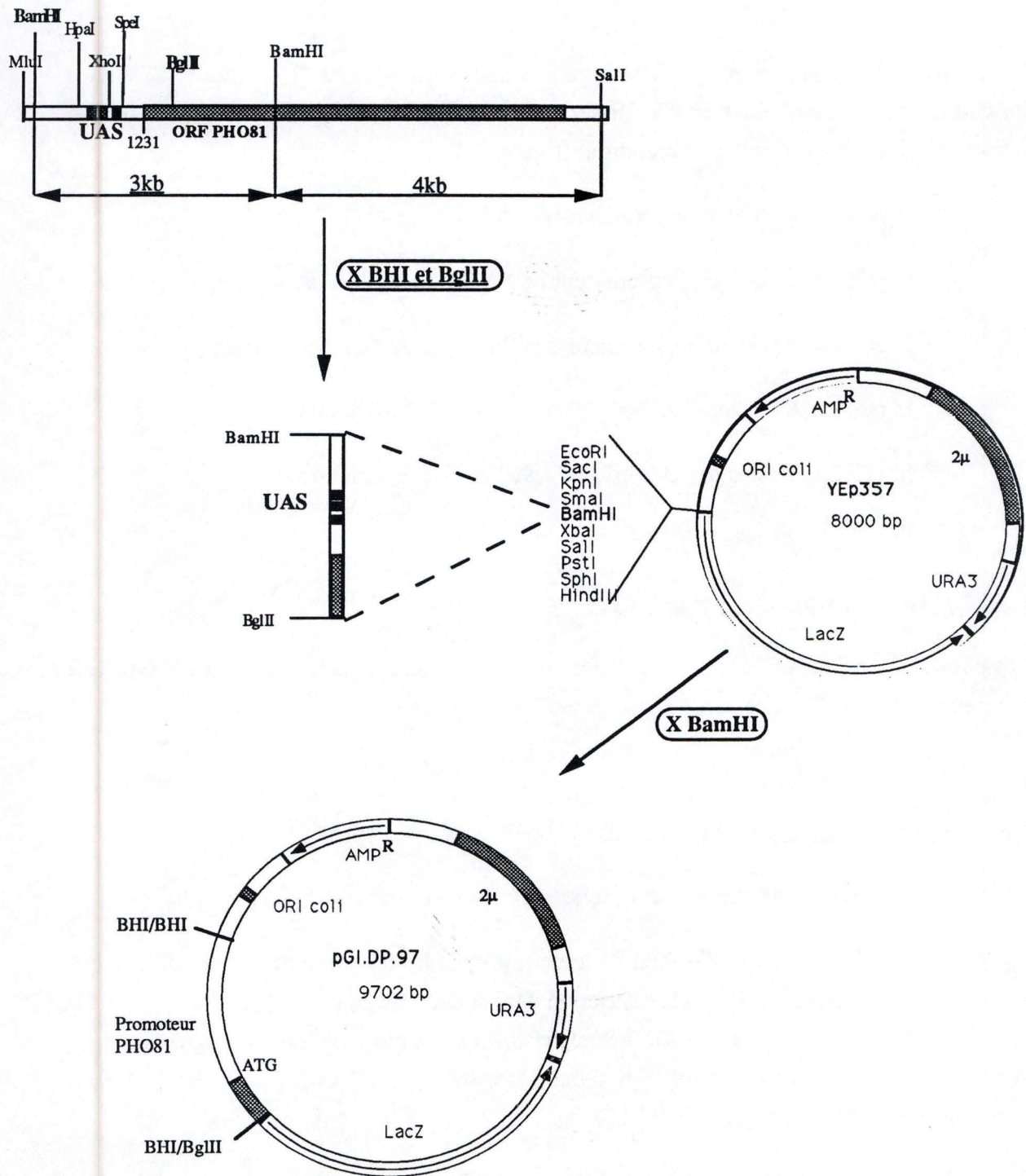


Figure III.3. : détail de la réalisation du plasmide pGI.DP.97 contenant le promoteur *PHO81* intact (construction réalisée par Prozzi D., 1991).

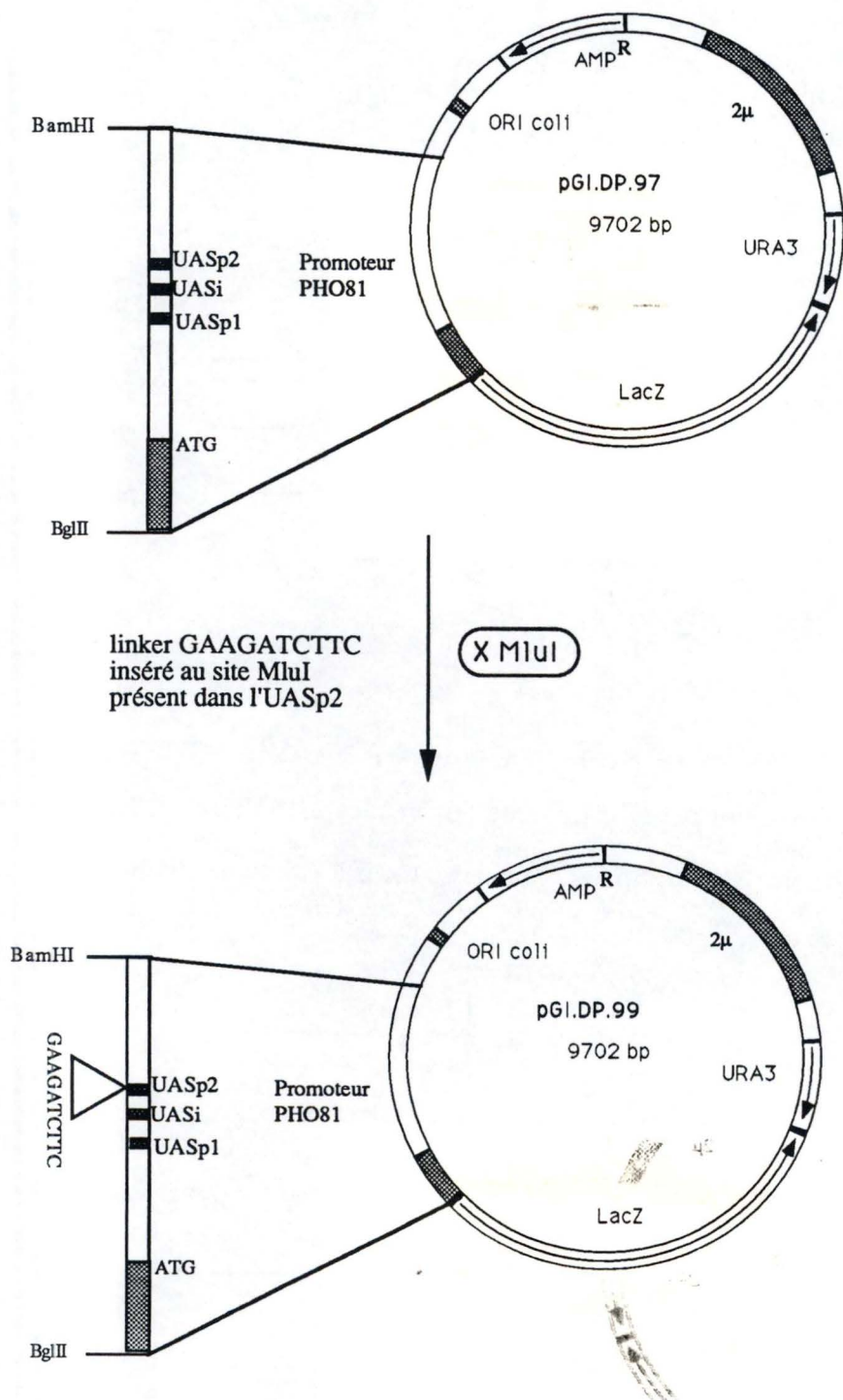


Figure III.4. : détail de la construction du plasmide pGI.DP.99 contenant l'UASp2 disruptée (construction réalisée par Prozzi D., 1991).

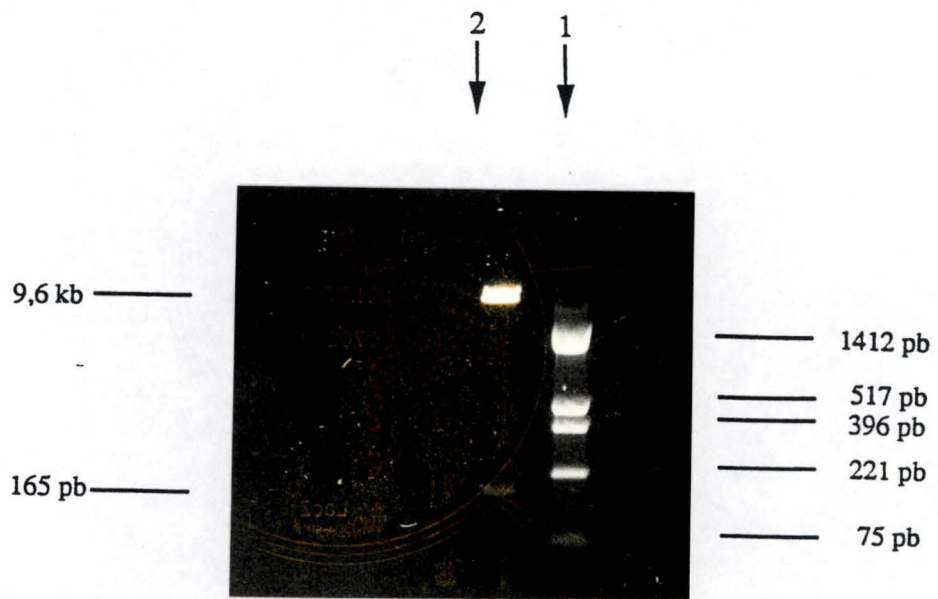


Photo III.1 : électrophorèse en gel d'agarose 2% du plasmide pGI.DP.97 restreint par SpeI et XhoI.

Piste 1 : le marqueur pUC18, restreint par HinfI, donne des bandes à 1412 bp, 517 bp, 396 bp, 221 bp et 75 bp.

Piste 2 : le pGI.DP.97, restreint par XhoI et SpeI, donne des bandes à 9,6 kb et 165 pb.

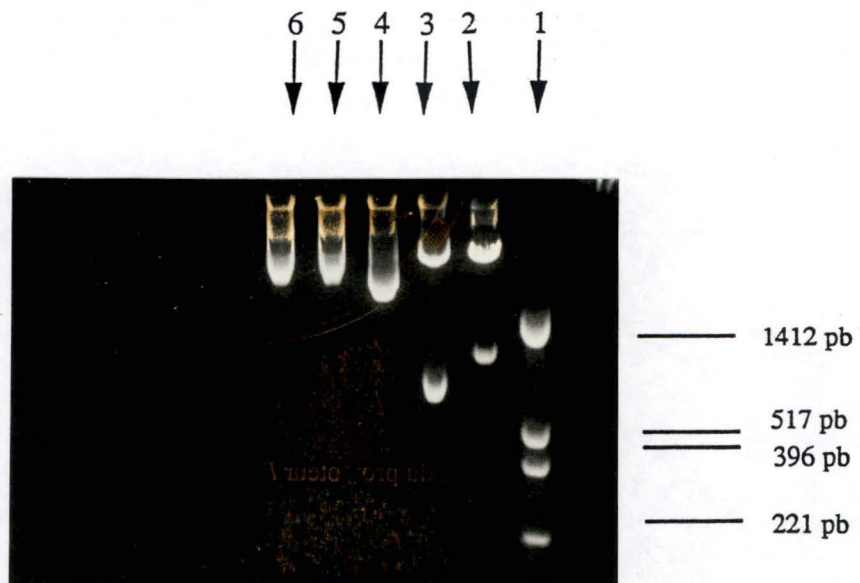


Photo III.2 : électrophorèse en gel d'agarose 2% de la restriction PstI de 4 clones transformants issus de la délétion du fragment XhoI-SpeI du plasmide pGI.DP.97.

Piste 1 : le marqueur pUC18, restreint par HinfI, donne des bandes à 1412 bp, 517 bp, 396 bp et 221 bp.

Piste 2 : le pGI.DP.97, restreint par PstI, montre la matrice à 9,5 kb et 880 bp du fragment non délété.

Piste 3 : le clone 1 restreint par l'enzyme PstI, montre le profil attendu : une bande à 9,6 kb et une autre à 711 bp.

Piste 4, 6 et 7 : les clones 2, 3 et 4 respectivement ne présentent pas le bon profil.

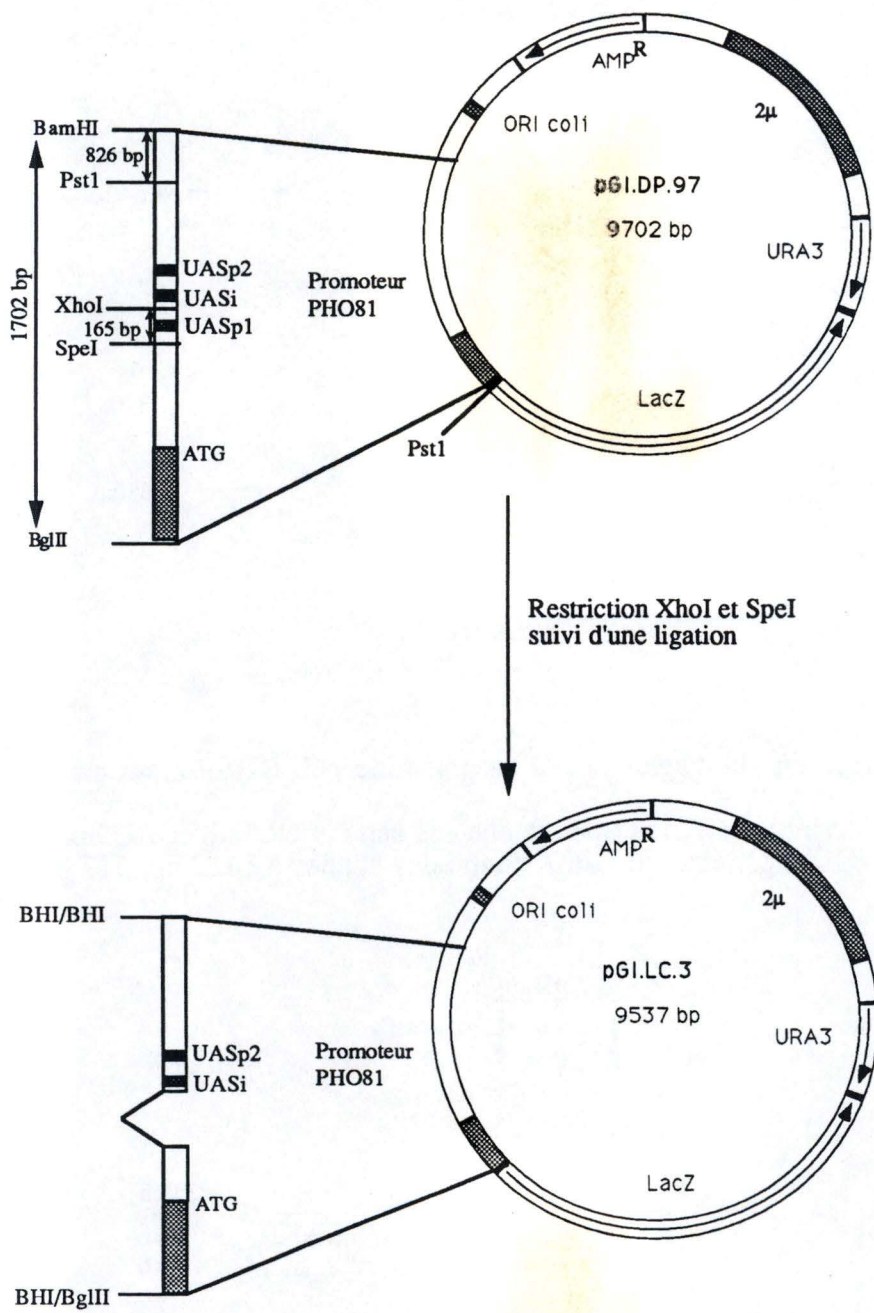


Figure III.5. : détail de la construction du promoteur *PHO81* déléte de son *UASp1* putative

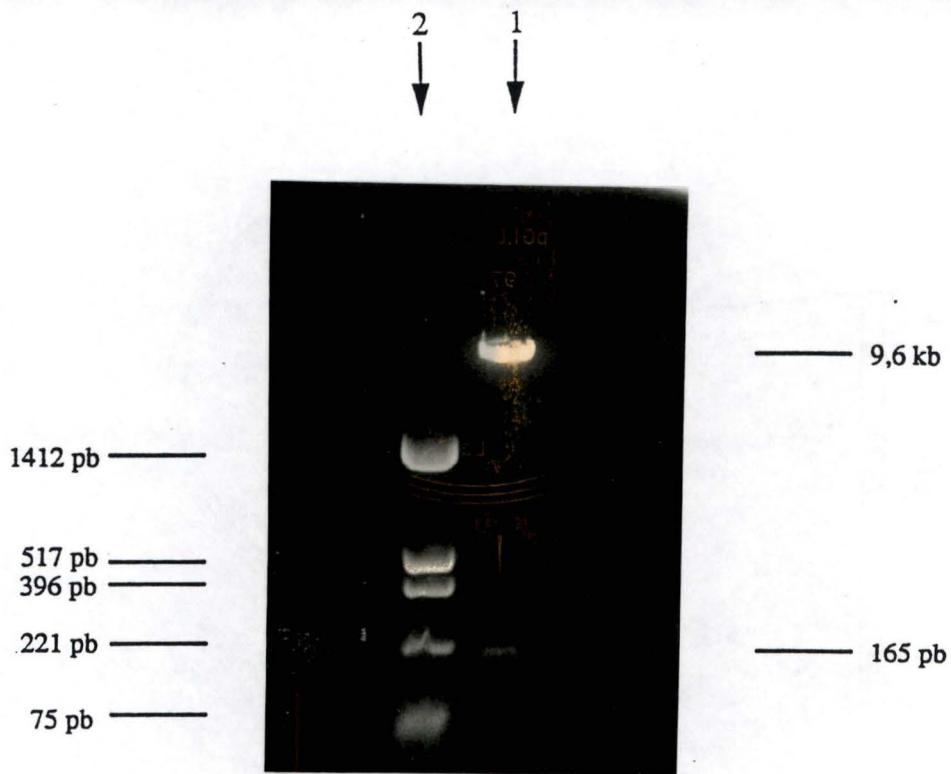


Photo III.3 : électrophorèse en gel d'agarose 2% du plasmide pGI.DP.99 restreint par SpeI et XhoI.

Piste 1 : le pGI.DP.99, restreint par XhoI et SpeI, donne des bandes à 9,6 kb et 165 pb.

Piste 2 : le marqueur pUC18, restreint par HinfI, donne des bandes à 1412 bp, 517 bp, 396 bp, 221 bp et 75 bp.

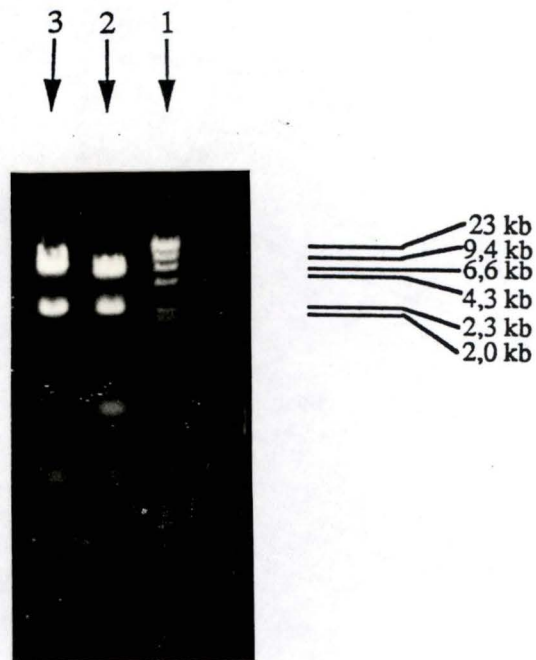


Photo III.4 : électrophorèse en gel d'agarose 1% du plasmide pGI.LC.6 restreint par PvuII.

Piste 1 : le marqueur de taille λ , restreint par HindIII, donne des bandes à 23 kb ; 9,4 kb ; 6,6 kb ; 4,3 kb ; 2,3 kb ; 2,0 kb.

Piste 2 : le plasmide pGI.DP.99 restreint par PvuII montre 4 bandes

Piste 3 : le plasmide pGI.LC.6 restreint par PvuII présente 3 bandes, le site PvuII présent dans les 165 bp délétées a disparu..

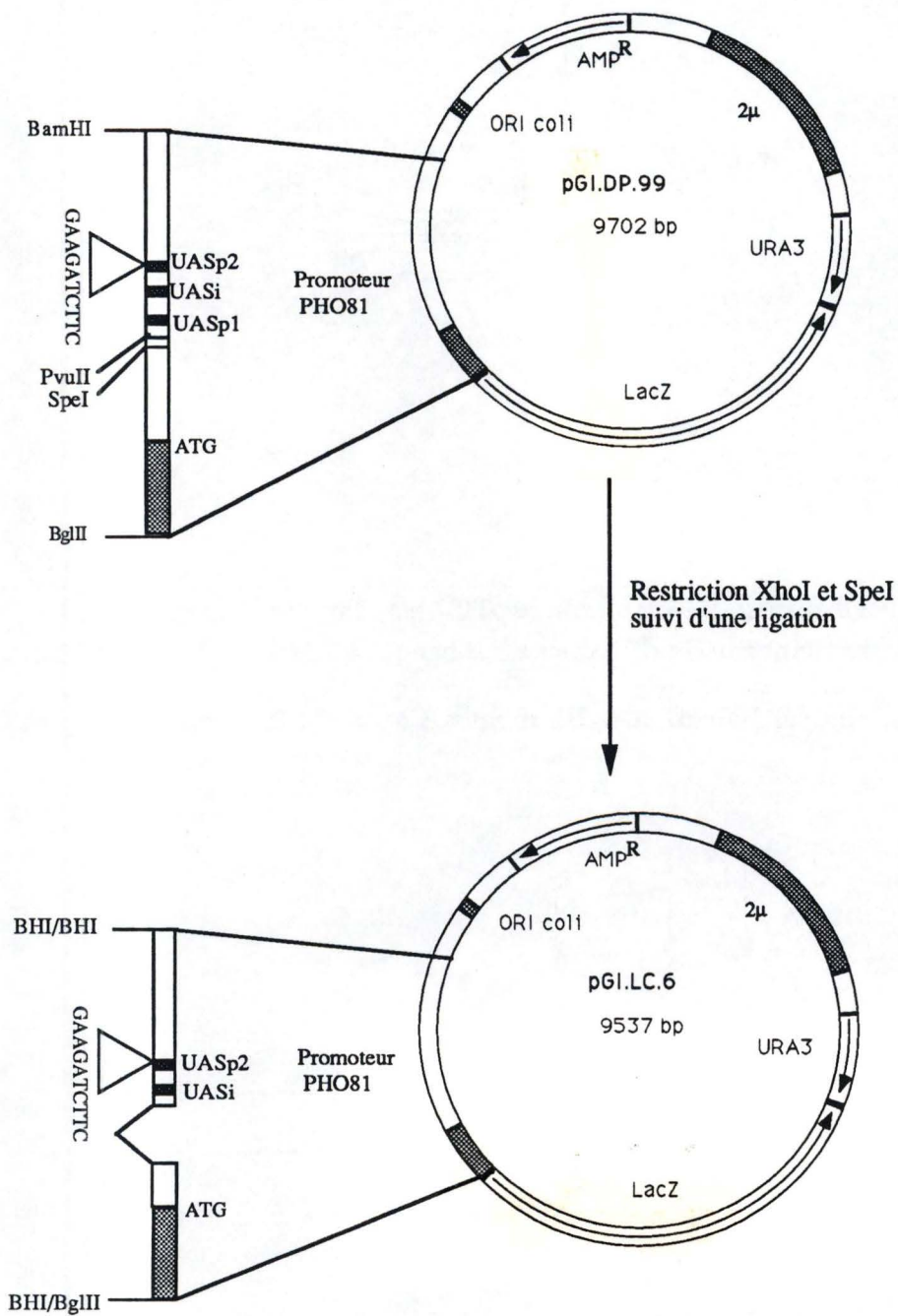


Figure III.6. : détail de la construction du gène-rapporteur contenant le promoteur *PHO81* délété de son UASp1 et dont l'UASp2 est disruptée.

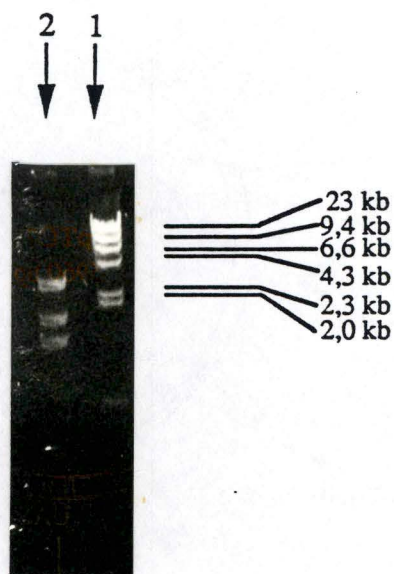


Photo III.5 : électrophorèse en gel d'agarose 1% du plasmide pTC7 restreint par BamHI et BglII.
Piste 1 : le marqueur de taille λ , restreint par HindIII, donne des bandes à 23 kb ; 9,4 kb ; 6,6 kb ; 4,3 kb ; 2,3 kb ; 2,0 kb.
Piste 2 : le plasmide pTC7, restreint par BamHI et BglII, montre 3 bandes : 2964 bp, 1700 bp et 1300 bp.

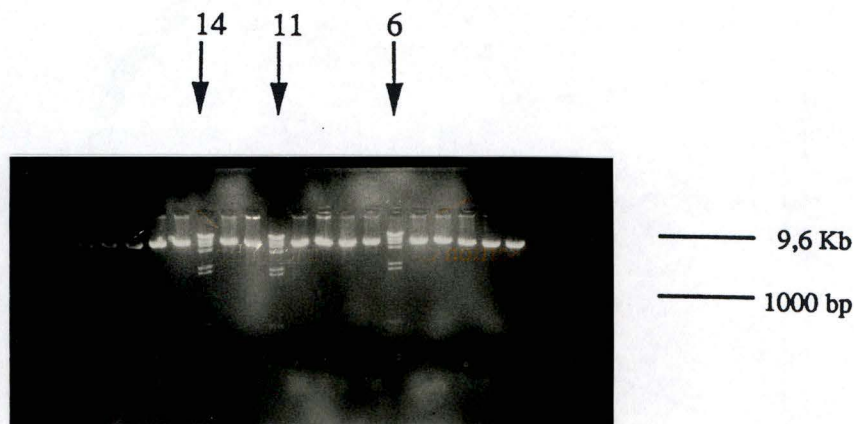


Photo III.6 : électrophorèse en gel d'agarose 1% de l'ADN restreint par HindIII de 17 clones.
Pistes 1 à 5 ; 7 à 10 ; 12 ; 13 ; et 15 à 19 ne présentent pas le bon profil.
Piste 6, 11 et 14 : le marqueur de taille λ , restreint par HindIII, donne des bandes à 23 kb ; 9,4 kb ; 6,6 kb ; 4,3 kb ; 2,3 kb ; 2,0 kb.
Piste 20 : le clone présente le profil attendu d'une bande à 9,6 kb et une bande à 1000 bp.

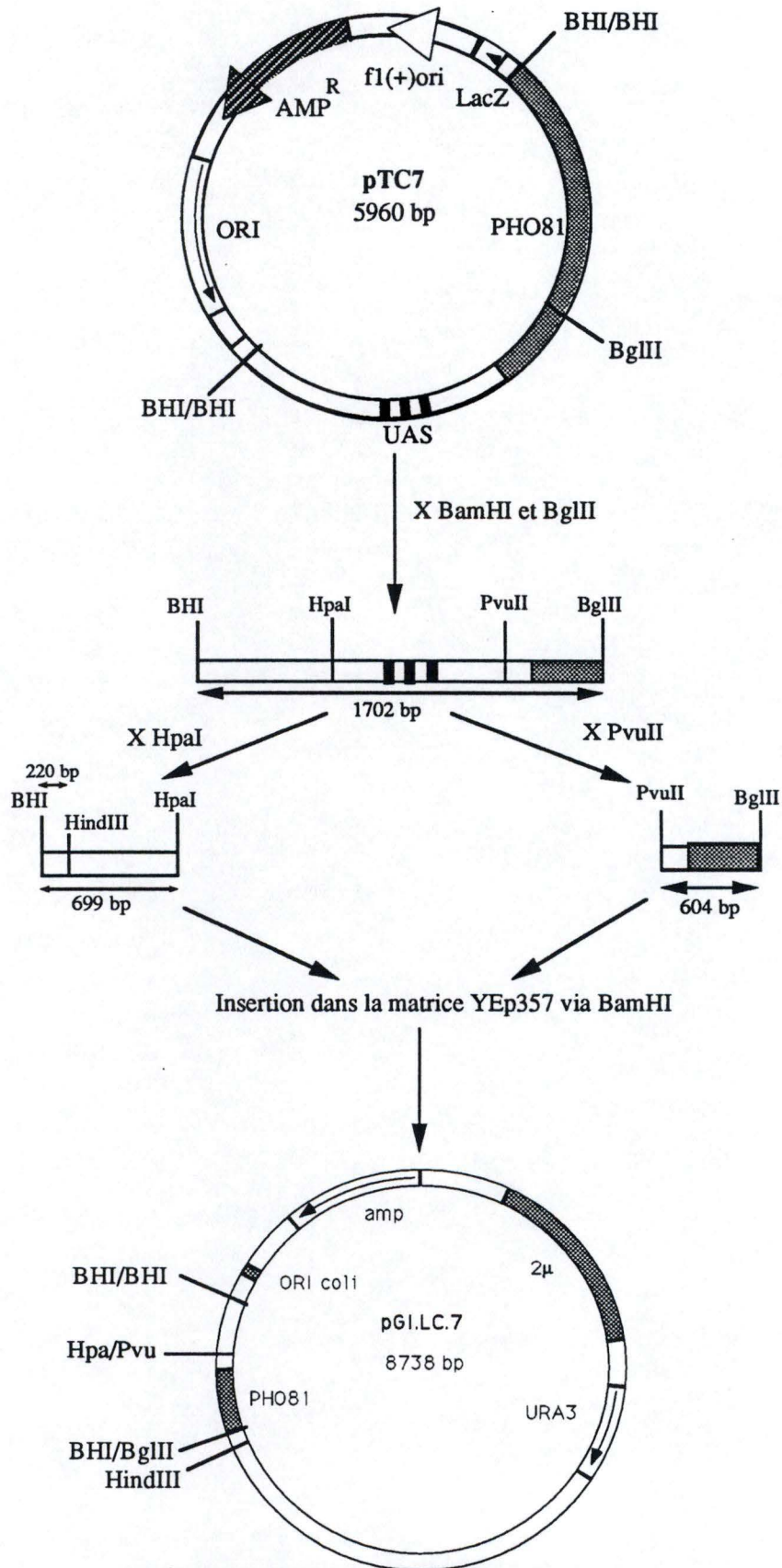


Figure III.7. : détail de la construction où le promoteur *PHO81* est déléte de ses trois UAS putatives.

transformées possèdent le gène *BLA* porté par le plasmide pGI.LC.3 et sont capables de pousser sur ce milieu.

* L'ADN des colonies qui ont poussé sur le milieu LB+ampicilline liquide est extrait par miniprep (§ II.12).

* L'analyse de l'ADN sur gel d'agarose après restriction Pst1 nous donne le profil attendu : une bande de 9,6 kb et une bande de 711 pb (photo III.2). Le plasmide est ensuite préparé en grande quantité par midiprep.

Construction du pGI.LC.6.(voir figure III.6).

Le même protocole est suivi pour cette construction sauf en ce qui concerne le plasmide de départ qui est le pGI.DP.99. Le pGI.LC.6 comprend le promoteur *PHO81* délété de l'UASp1 et l'UASp2 de ce même promoteur est disrupté par l'insertion d'un linker (photos III.3 et III.4).

* Restrictions : Le plasmide pGI.DP.99 est restreint par les enzymes SpeI et XhoI : ce qui permet de déléter l'UASp1. La double restriction génère deux fragments : la matrice de 9,6 kb et un fragment de 165 pb (fragment XhoI-SpeI) visibles après électrophorèse sur gel d'agarose 2% (photo III.3). Le mélange de restriction est déposé sur gel 1% et la bande de 9,6 kb est récupérée par la méthode des papiers (§ II.5).

* Les deux enzymes utilisées génèrent des bouts 5' protrudants non compatibles, c'est pourquoi l'utilisation de la Klenow (§ II.6) est requise : elle créera des extrémités collantes qui pourront être liguées.

* Ligation : l'ADN ayant été soumis à la Klenow, est mis en présence du tampon de ligation et de la T4 DNA ligase (§ II.8) 14 heures à 14°C suivi de 2 heures à température ambiante.

* Transformation : les cellules XL1-blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation (§ II.10.1) puis sont étalées sur le milieu sélectif LB+ampicilline. Les colonies transformées possèdent le gène *BLA* porté par le plasmide pGI.LC.3 et sont capables de pousser sur ce milieu.

* L'ADN des colonies qui ont poussé sur le milieu LB+ampicilline liquide est extrait par miniprep (§ II.12).

* L'analyse de l'ADN sur gel d'agarose après restriction PvuII montre que le site PvuII présent dans le fragment de 165 pb délété a disparu (photo III.4). Le plasmide est ensuite préparé en grande quantité par midiprep.

Construction du pGI.LC.7. (figure III.7).

Le plasmide pGI.LC.7 porte le promoteur de *PHO81* délété simultanément des 3 boîtes putatives.

* Restrictions : le plasmide pTC7 est restreint par les enzymes BamH1 et BglII ; la vérification de la restriction sur gel d'agarose 1 % nous donne les trois bandes attendues : 2964 pb, 1700 pb et 1300 pb (photo III.5). La bande de 1700 pb est récupérée par la méthode des papiers (§ II.5). Ce fragment récupéré est restreint d'une part par l'enzyme HpaI , un fragment BamH1-HpaI de 639 pb en résulte, et d'autre part par l'enzyme PvuII qui génère un fragment PvuII-BglII de 604 pb. Les fragments de 639 et 604 pb sont à récupérer.

Le plasmide YEp357 est ouvert en BamH1 , le mélange de restriction est purifié par extraction au phénol (§ II.9). Pour éviter que la matrice ne se referme sur elle-même, nous l'avons soumis à la phosphatase alcaline (§ II.7) après quoi on procède à une nouvelle extraction au phénol.

* Ligation : 650 ng de YEp357 ouvert en BamH1 (8,8 kb) sont mis en présence de 50 ng du fragment BamH1-HpaI et 50 ng du fragment PvuII-BglII dans un tampon de ligation contenant une unité de T4 DNA ligase (§ II.8).

Les sites HpaI et PvuII sont coupés à bouts droits et les sites BglII et BamH1 produisent des extrémités compatibles ; les fragments peuvent se situer différemment les uns par rapport aux autres.

* Transformation : les cellules XL1-blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation (§ II.10.1) et sont ensuite étalées sur le milieu LB+ampicilline. Après 12 heures, seules les colonies porteuses du marqueur AMP^R poussent. L'ADN des colonies résistantes à l'ampicilline est extrait par miniprep (§ II.12). Ces colonies peuvent être porteuses de plusieurs types de plasmides recombinants mais après restriction HindIII, et migration sur gel, on observe le profil voulu de 2 bandes : 9,6 kb, 1000 pb (photo III.6).

Nous avons obtenu le plasmide pGI.LC.7 dont toutes les boîtes putatives (UASp2, UASi,UASp1) ont été délétées. Nous en préparons une grande quantité.

Tableau III.1. : caractéristiques des souches isogéniques utilisées.

NOM	GENOTYPE	REFERENCE
YH40	MATa, <u>his3</u> , <u>trp1Δ1</u> , <u>ura3-167</u> , <u>leu2</u>	J. Boeke, Baltimore
YH40-P2	MATa, <u>his3</u> , <u>trp1Δ1</u> , <u>ura3-167</u> , <u>leu2</u> , <u>Δpho2#LEU2</u>	F. Berben, B. Horion, Gembloux
VG151	MATa, <u>his3</u> , <u>trp1Δ1</u> , <u>ura3-167</u> , <u>leu2</u> , <u>Δpho4#LEU2</u>	V. Gilliquet, Gembloux

Ces souches nous ont été aimablement fournies par le laboratoire de Microbiologie et d'Ingénierie Génétique des Facultés Agronomiques de Gembloux.

Ces 5 constructions réalisées permettront d'étudier l'effet des délétions des boîtes putatives (élément *cis*) sur le promoteur de *PHO81* dans la souche sauvage (YH40) mais aussi dans les mutants *pho2* (YH40-P2) et *pho4* (VG151) c'est à dire les souches mutantes pour l'un ou l'autre des facteurs trans actifs. Les trois souches nous ont été aimablement fournies par le laboratoire de Microbiologie de la faculté des sciences agronomiques de Gembloux (III.1).

Ces trois souches seront transformées par les 5 constructions.

III.3. Etude de l'expression de la β -galactosidase des gènes-rapporteurs dans les trois souches.

La mesure de l'expression β -galactosidasique des rapporteurs a été réalisée jusqu'à présent par test coloré sur boîte de Pétri (Denoël, 1991). Cependant, ces tests colorés ne sont qu'indicatifs de l'activité β -galactosidasique et non quantitatifs et ont donné des résultats ambigus ; c'est pourquoi la mesure de l'activité β -galactosidase se fait par dosage sur un lysat cellulaire (§ II.15.2).

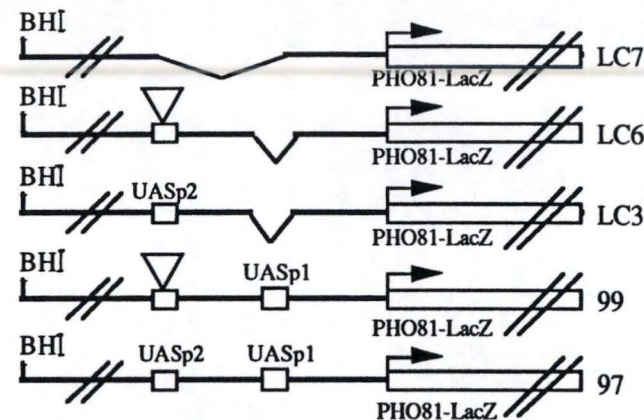
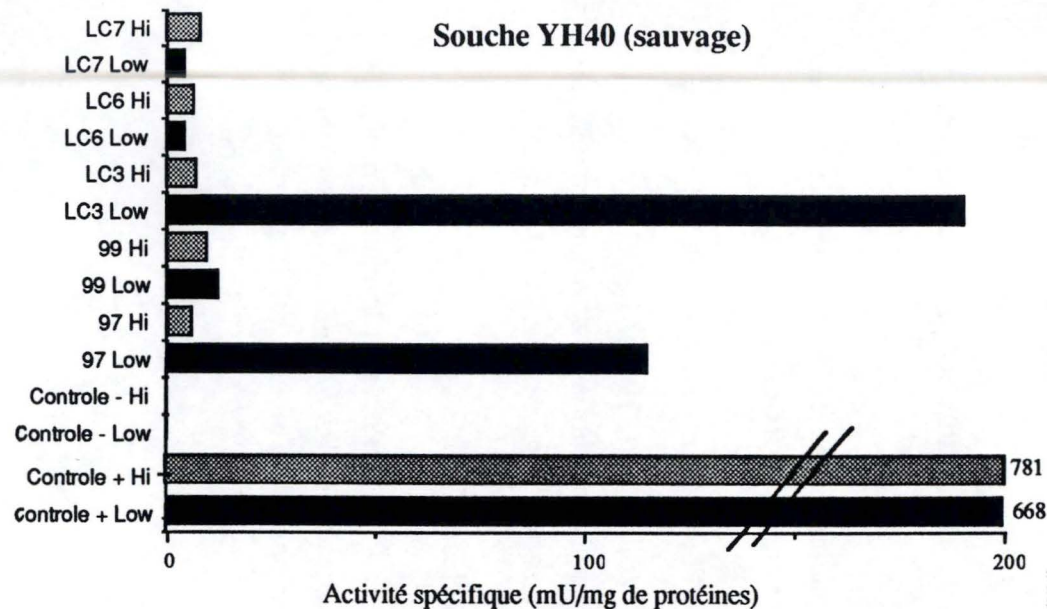
III.3.1. Expression de la β -galactosidase des gènes rapporteurs chez la souche sauvage YH40.

Les deux facteurs *trans* étant présents (les protéines Pho2 et Pho4), quels seraient les éléments *cis* intervenant dans le contrôle de la transcription de *PHO81* ?

Dans le promoteur du gène *PHO5*, la protéine Pho4 se lie au consensus 5'CACGT $\frac{G}{T}$ 3' présent dans les 2 UASp (UASp1 et UASp2) (Vogel *et al*, 1989). Par contre, dans le promoteur *PHO81*, l'UASp1 putative proposée sur base d'une similarité de séquence (Grifnée, 1990) ne comporte pas le consensus exact précité alors qu'il possède l'UASp2 (figure III.1).

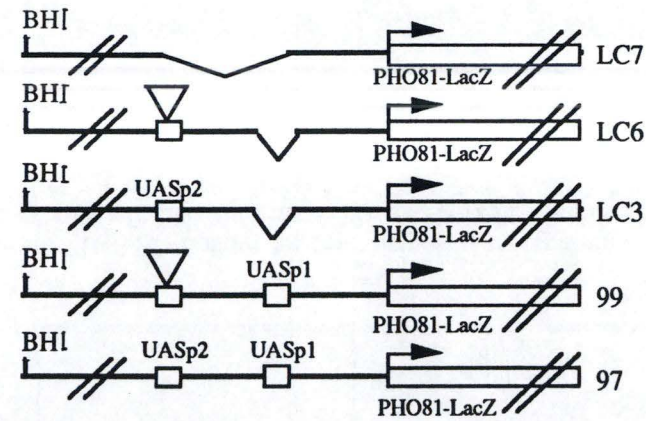
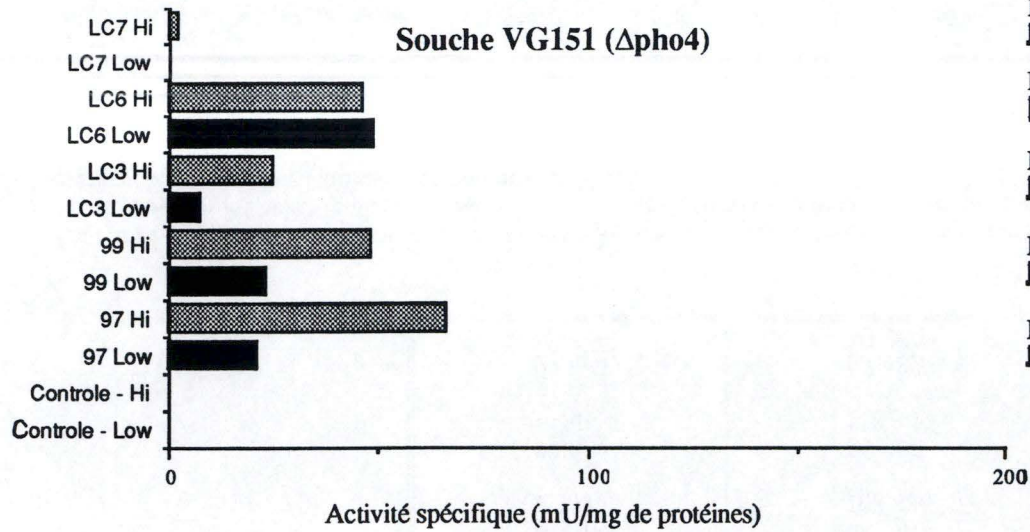
L'UASp1 lie-t-elle la protéine Pho4 ? (tableau III.2)

Rappelons que les conditions inductrices du gène *PHO81* s'opèrent lorsque le milieu est carencé en Pi. Les promoteurs *PHO81* présents sur les pGI.DP.97 et pGI.LC.3 assurent une activité β -galactosidasique comparable en conditions inductrices ; or, le promoteur du pGI.LC.3 ne possède pas l'UASp1 putative (avec le motif 5'CAAGTT3') de liaison de la



CONSTRUCTION	[ONP] μ M	[PROTEINE] mg/l	ACTIVITE. SPECIFIQUE mU/mg de protéine
LC7 low	17,361	81,037	8,570
LC7 high	35,541	43,859	12,207
LC6 low	15,481	74,398	4,152
LC6 high	26,764	85,353	6,271
LC3 low	486,894	51,162	190,334
LC3 high	35,541	105,870	6,714
99 low	34,287	54,481	12,587
99 high	32,406	67,427	9,612
97 low	374,683	65,436	114,519
97 high	21,749	70,747	6,148

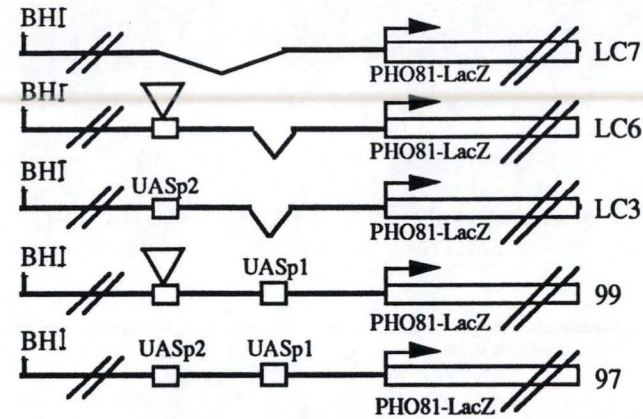
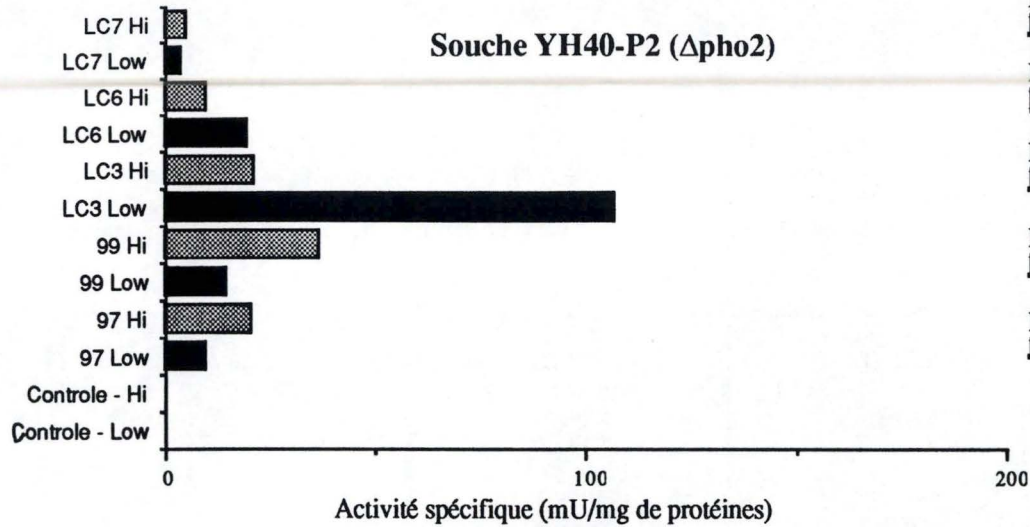
Tableau III.2. : tableau récapitulatif des dosages β -galactosidasiques réalisés dans la souche sauvage YH40. Le contrôle positif est représenté par la souche sauvage porteuse du YEp356 ADH₁ P LacZ. Ce plasmide est porteur du gène de fusion comprenant le promoteur fort ADHI suivi d'un bout d'ORF de PHO2 fusionné en phase avec Lac Z. Le contrôle négatif est représenté par la souche sauvage porteuse du YEp357.



CONSTRUCTION	[ONP] μM	[PROTEINE] mg/ml	ACTIVITE. SPECIFIQUE mU/mg de protéine
LC7 low	0,000	46,515	0,000
LC7 high	8,980	83,693	0,002
LC6 low	92,567	37,884	48,879
LC6 high	180,350	78,382	46,018
LC3 low	19,242	53,164	7,239
LC3 high	101,363	55,145	40,847
99 low	81,930	70,415	23,271
99 high	118,916	49,502	48,045
97 low	73,780	70,083	21,055
97 high	268,740	81,369	66,055

Tableau III.3. : tableau récapitulatif des dosages β -galactosidases réalisés dans la souche VG151 ($\Delta pho2$). Le contrôle positif est représenté par la souche sauvage porteuse du YEp356 ADH₁ P LacZ. Ce plasmide est porteur du gène de fusion comprenant le promoteur fort ADHI suivi d'un bout d'ORF de PHO2 fusionné en phase avec Lac Z. Le contrôle négatif est représenté par la souche sauvage porteuse du YEp357.

Souche YH40-P2 (Δ pho2)



CONSTRUCTION	[ONP] μ M	[PROTEINE] mg/ml	ACTIVITE. SPECIFIQUE mU/mg de protéine
LC7 low	17,100	85,685	3,991
LC7 high	8,980	39,212	4,580
LC6 low	13,600	14,950	19,194
LC6 high	27,391	53,473	9,701
LC3 low	505,701	47,510	106,441
LC3 high	108,886	51,826	21,010
99 low	39,302	53,485	14,696
99 high	138,349	75,394	36,700
97 low	57,482	57,801	9,945
97 high	91,960	44,855	20,502

Tableau III.4. : tableau récapitulatif des dosages β -galactosidasiques réalisés dans la souche YH40-P2 (Δ pho2). Le contrôle positif est représenté par la souche sauvage porteuse du YEp356 ADHI P LacZ. Ce plasmide est porteur du gène de fusion comprenant le promoteur fort ADHI suivi d'un bout d'ORF de PHO2 fusionné en phase avec Lac Z. Le contrôle négatif est représenté par la souche sauvage porteuse du YEp357.

protéine Pho4. Ceci suggérerait que l'UASp1 ne serait pas une boîte de liaison à l'ADN de la protéine Pho4.

L'UASp2 lie-t-elle la protéine Pho4 ?

Quand l'UASp2 (avec le motif 5'CACGTG3') est disruptée, comme c'est le cas dans les promoteurs des pGI.LC.6, pGI.LC.7 et pGI.DP.99, l'activité de la β -galactosidase mesurée est presque nulle.

D'une part, l'absence d'effet de l'ablation de l'UAS putative p1 (5'CAAGTT^o3') et d'autre part l'effet radical de la disruption de l'UAS putative p2 (5'CACGTG3'), suggère que le motif 5'CACGTG/T 3' est indispensable pour la liaison de la protéine Pho4.

III.3.2. Expression de la β -galactosidase des gènes-rapporteurs chez le mutant *pho4* (VG151).

Il s'est avéré que la protéine Pho4, et son élément *cis* correspondant, sont primordiaux dans l'expression de la phosphatase acide répressible (PHO5). *En est-il de même pour le gène PHO81 ?* (tableau III.3).

Nous avons déjà vu que dans la souche sauvage YH40, l'élément *cis* (UASp2) de Pho4 serait indispensable pour l'expression régulée du gène *PHO81*. On voit clairement que le facteur *trans* l'est aussi : on constate l'absence de dérèpression sur le promoteur complet présent sur le pGI.DP.97 ainsi que sur tous les promoteurs différentiellement délétés présents sur les autres plasmides. La délétion totale sur le pGI.LC.7 ne montre presque pas d'expression β -galactosidasique.

Il est à remarquer que sur le milieu riche en Pi (non activation du gène *PHO81*), l'activité β -galactosidasique est souvent supérieure à celle observée dans les deux autres souches.

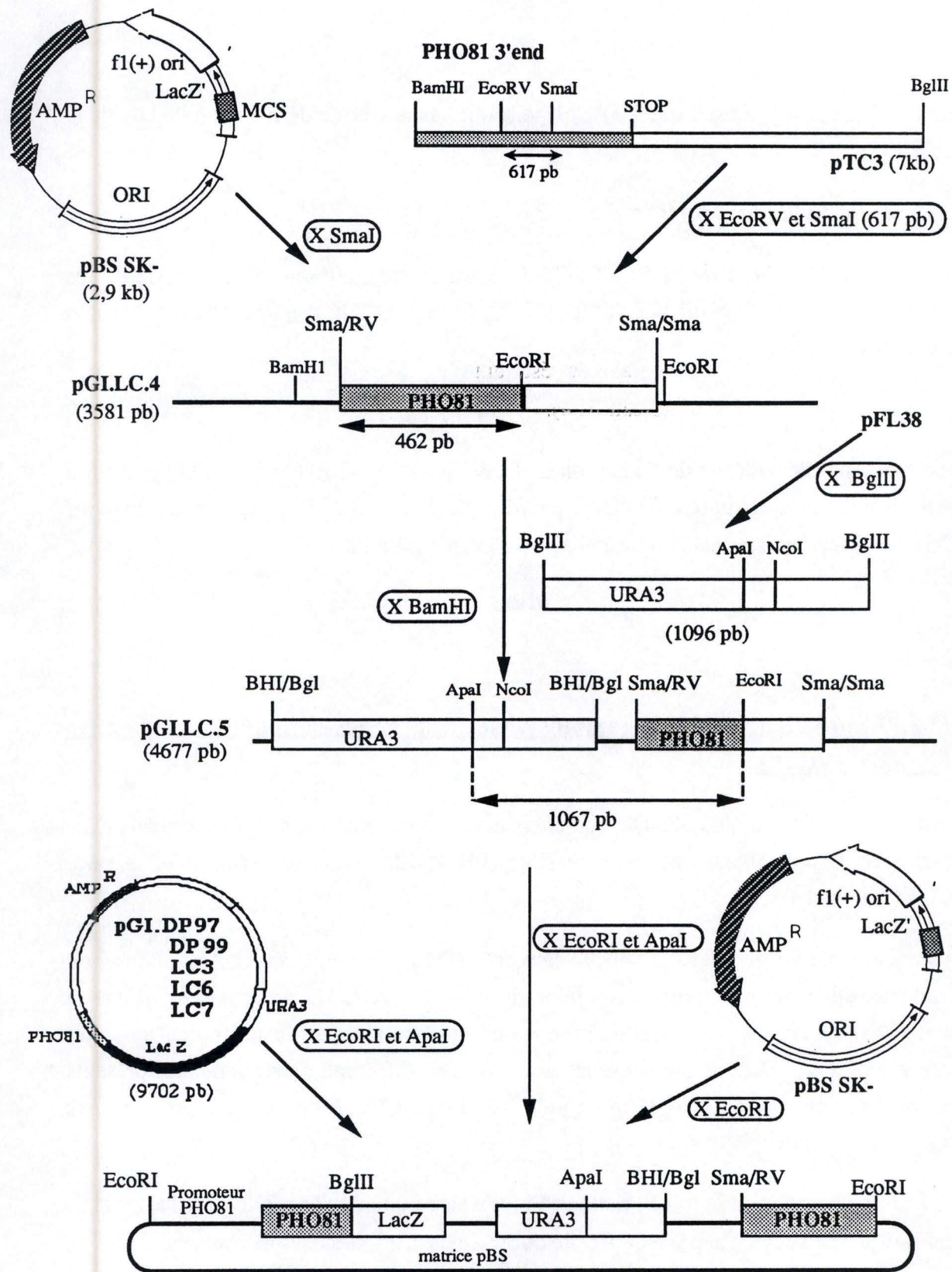


Figure III.8. : protocole conduisant à la fabrication du vecteur d'intégration.

La ligation est réalisée grâce à l'activité de l'enzyme ADN ligase du phage T4 (T4 DNA Ligase). Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiester entre le phosphate 5' d'une molécule d'ADN et une extrémité hydroxyle 3'. L'enzyme requiert de l'ATP et des cations Mg^{++} pour être active (figure 10) (Pfeiffer, 1983).

13

Solutions

- Tampon de ligation (10X) (Gibco-BRL):

Tris HCl 20 mM	
MgCl ₂ 10 mM	
DTT 10 mM	
ATP 1 mM	pH 7,4

La réaction se réalise classiquement comme suit:

1U de T4 DNA Ligase (Gibco-BRL)	1 µl
Tampon de ligation (10X)	2.5 µl
ADN en solution	19 µl

Une unité de T4 DNA Ligase est suffisante pour liguer 5 µg d'ADN.

Incuber 14 h à 14°C pour les bouts collants et 2 h à température ambiante pour les bouts francs.

La ligation à bouts francs étant souvent moins efficace, il est nécessaire d'augmenter la quantité d'enzyme. 10 à 100X

II.9. Purification et précipitation d'ADN

Certaines enzymes de restriction sont sensibles à la chaleur et sont dénaturables de cette manière. D'autres peuvent être inactivées par l'EDTA, pour cela on amène la solution à une concentration finale 10 mM pH 7,5.

On peut aussi extraire les protéines d'une solution aqueuse avec du phénol-chloroforme.

Solutions

- Solution de phénol:

Phénol auquel on ajoute de la 8-hydroxyquinoline à une concentration finale de 0,1% et équilibrée contre le tampon adéquat (TE dans ce cas-ci). L'hydroxyquinoline est un antioxydant, un inhibiteur de RNAase et donne à la solution une teinte jaune qui permet d'identifier les deux phases.

III.3.3. Expression de la β -galactosidase des gènes-rapporteurs chez le mutant *pho2* (souche YH40-P2).

Dans ce cas-ci, le facteur *trans* -actif, Pho2, est absent. *La protéine Pho2 influe-t-elle la transcription du gène PHO81 pourvu des promoteurs différemment modifiés ?*

L'analyse de l'activité β -galactosidasique résultant des différentes constructions permet de donner des éléments de réponse (tableau III.4).

Les promoteurs *PHO81* présents sur les plasmides pour lesquels l'UASp2 est disruptée (pGI.LC.6, pGI.LC.7 et pGI.DP.99) montrent une activité β -galactosidasique quasiment nulle. Ceci a déjà été montré pour la souche sauvage.

La comparaison de l'activité du gène-rapporteur généré à partir des plasmides pGI.LC.3 et pGI.DP.97 est intéressante : le promoteur du pGI.DP.97 qui contient les 3 UAS putatives montre une activité β -galactosidasique quasi nulle, ce qui indique que le facteur *trans* - actif Pho2 est nécessaire à la dérèpression du gène *PHO81*. Par ailleurs, le promoteur *PHO81* du pGI.LC.3 qui porte la délétion de l'UASp1 putative en l'absence du facteur Pho2 retrouve paradoxalement une régulation correcte.

III.4. Expression de la régulation *in situ* pour l'intégration au site chromosomique de *PHO81*

Afin d'étudier la régulation *in situ*, nous avons établi, en parallèle avec les dosages de la β -galactosidase sur plasmide multicopies, un protocole qui conduit à l'intégration des différentes délétions réalisées dans le promoteur de *PHO81* au site chromosomique *PHO81* (schéma général, figure III.8).

L'intégration est intéressante parce qu'elle remet le gène *PHO81* dans son contexte : la structure de la chromatine et plus particulièrement la position des nucléosomes peut être importante pour la régulation des gènes : Fasher et ses collaborateurs ont élaboré un modèle expliquant le système répression-dérèpression du gène de la rAPase (*PHO5*) par un changement nucléosomal au niveau de la chromatine (§ I.2.3.1).

L'intégration se fera par recombinaison homologue au site *PHO81*. L'ADN plasmidique exogène qui contient des séquences de levure s'intègre au locus chromosomique homologue

Bleu de bromophénol	25 mg
Glycérol	5 ml
EDTA (1M)	0,5 ml
porter à volume avec H ₂ O	

Pratiquement,

Ajouter l'agarose à du TBE et porter le tout à ébullition puis laisser refroidir à 50°C. Ajouter du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 mg/ml (solution stock à 10 mg/ml conservée à l'abri de la lumière).

Le gel, encore liquide à cette température, est coulé dans un moule en plexiglas sur lequel on a placé un peigne formant des puits dans le gel refroidi et solidifié. La taille des dents du peigne est choisie selon le volume des échantillons à déposer sur gel, le plus souvent 15 à 20 µl. Après solidification, retirer le peigne et placer le gel dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE.

A la micropipette, introduire l'échantillon d'ADN alourdi par l'addition de 1/10 du volume final de solution d'alourdisseur dans un des puits. Le bleu de bromophénol permet de contrôler le front de migration.

Appliquer une différence de potentiel de 40 à 100 volts aux extrémités de la cuve pendant 2 à 4 heures.

Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur UV ($\lambda=302$ nm) pour visualiser les bandes d'ADN et photographier.

Deux évaluations peuvent être réalisées:

- La taille des fragments. Dans un des puits du gel, on place un marqueur de taille qui est une molécule d'ADN coupée par un enzyme de restriction générant des fragments de taille connue.

Nous avons utilisé:

- l'ADN du phage λ restreint par *HindIII* (gels agarose 1%) (~~mettre photo gel~~)
- le plasmide pUC 18 restreint par *HindI* (gels agarose 2%)

- La quantité d'ADN dans une bande. La fluorescence étant proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium intercalée dans l'ADN, elle sera d'autant plus intense que les fragments d'ADN d'une bande sont grands et nombreux. La quantité d'ADN du marqueur étant connue, il sera facile d'estimer par comparaison, la quantité d'ADN de l'échantillon étudié.

Une bande correspondant à 10 ng d'ADN peut être vue sur un gel d'agarose mais la faible luminosité de la bande dans ce cas ne permet pas à celle-ci de se marquer sur photo.

II.5. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose

Méthode des papiers (Dretzen, 1981)

photo gel
fig 10

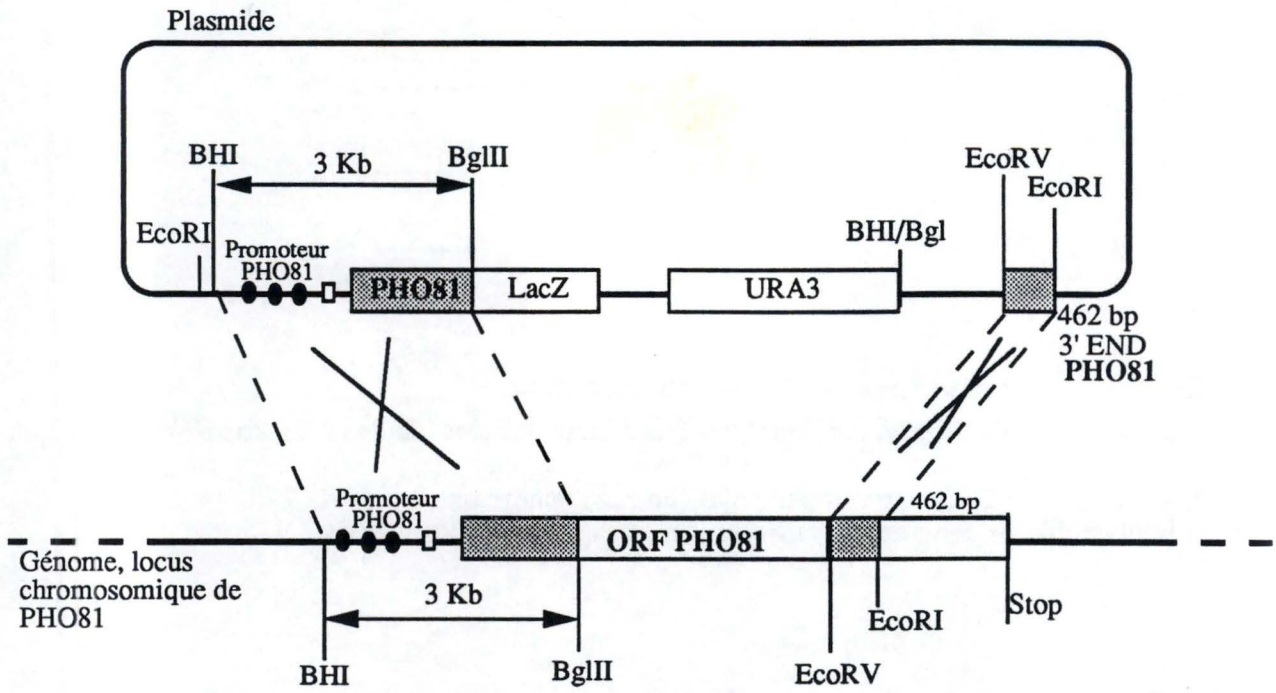


Figure III.9. : la recombinaison homologue au site chromosomique de *PHO81*.

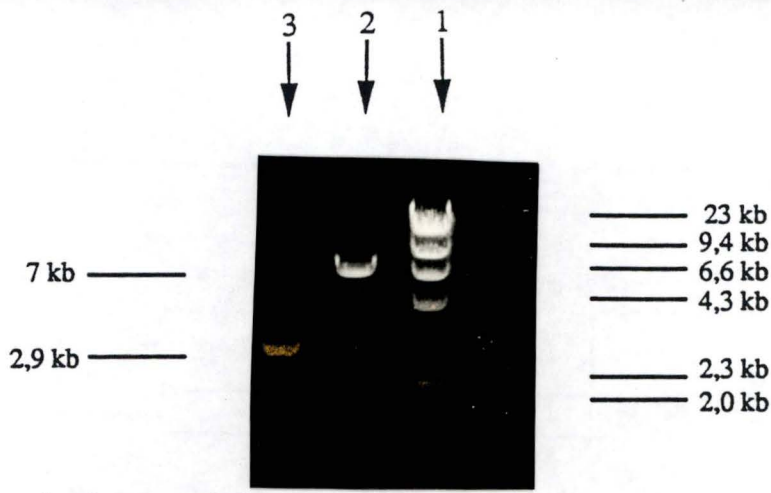


Photo III.7 : électrophorèse en gel d'agarose 1% reprenant :

Piste 1 : le marqueur de taille λ , restreint par HindIII, donne des bandes à 23 kb ; 9,4 kb ; 6,6 kb ; 4,3 kb ; 2,3 kb ; 2,0 kb.

Piste 2 : le plasmide pTC3 restreint par SmaI (un site) génère une bande de 7 kb.

Piste 3 : le plasmide pBS restreint par SmaI (un site) génère une bande de 2,9 kb

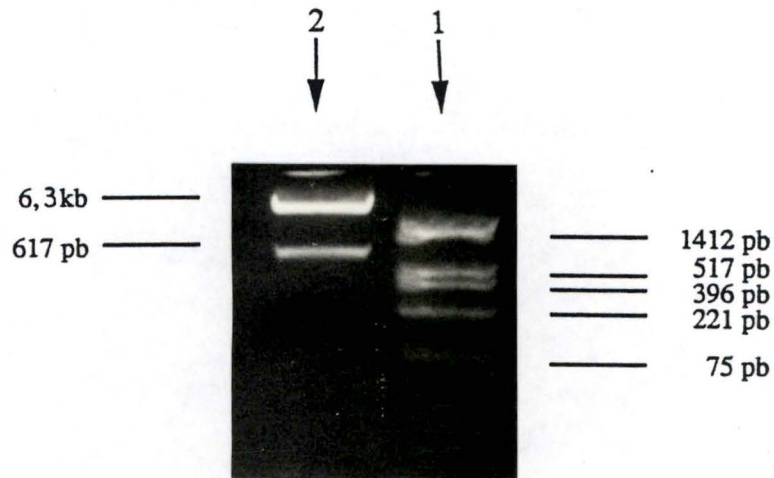


Photo III.8 : électrophorèse en gel d'agarose 2% reprenant :

Piste 1 : le marqueur PUC18, restreint par HinfI, donne des bandes à 1412 bp, 517 bp, 396 bp, 221 bp et 75 bp.

Piste 2 : le plasmide pTC3, restreint par SmaI et EcoRV, montre une bande de 617 pb et une bande de 6,3 kb.

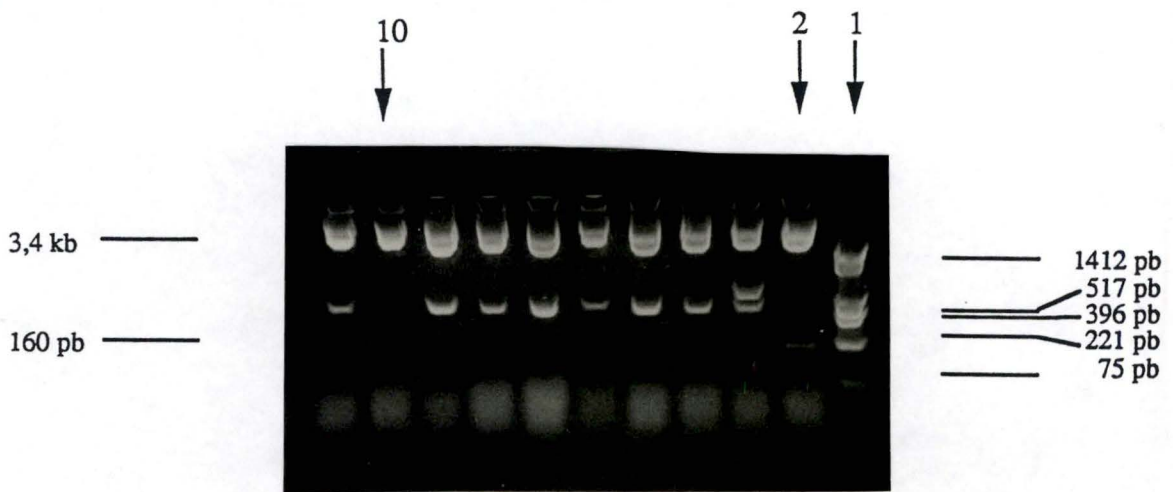


Photo III.9 : électrophorèse en gel d'agarose 2% après restriction par EcoRI de 10 clones :

Piste 1 : le marqueur PUC18, restreint par HinfI, donne des bandes à 1412 bp, 517 bp, 396 bp, 221 bp et 75 bp.

Piste 2 et 10 : clones présentant le profil de restriction attendu 3,4 kb et 160 pb.

II.10.1.1 Préparation de cellules XL1 blue compétentes

Solutions

- Solution de CaCl_2 50 mM
- Solution de CaCl_2 50 mM, 15% glycérol

La souche est cultivée à 37°C sur un milieu solide LB + tétracycline 100 µg/ml afin de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'. A partir d'une colonie, ensemercer un milieu liquide contenant 10 ml de LB + tétracycline. Cette préculture est incubée entre 4 et 8 heures à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm comprise entre 1,5 et 2. Elle sert à ensemercer 100 ml de LB + tétracycline.

Agiter fortement la culture pendant 1 à 4 heures à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm de 0,3 (phase de croissance logarithmique).

La culture est arrêtée par un passage de 10' dans la glace

Centrifuger la culture 5' à 4000 rpm et à 4°C (rotor SS34 - Sorvall). Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl_2 50 mM équivalent à la moitié du volume initial (soit ici 50 ml). Répéter cette étape une seconde fois.

La solution est laissée entre 20' et 60' dans la glace.

Centrifuger 5' à 4000 rpm et à 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl_2 50 mM 15% glycérol équivalent au dixième du volume initial (soit ici 10 ml).

Répartir la solution de cellules compétentes en Eppendorfs stériles et stocker à -80°C.

II.10.1.2. Transformation de cellules XL1 blue compétentes

Méthode basée sur celle de Mandel et Higa.

A 100 à 200 µl de cellules compétentes (dégelées sur glace ou "fraîches"), ajouter :

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

Incuber 30 à 40 minutes sur glace puis 2 minutes à 42°C (choc thermique).

Ajouter 0,5 à 1 ml de LB et incuber 30 à 60 minutes à 37°C (régénération)

Étaler sur boîte avec un milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Contrôles

- Contrôle négatif: Des cellules compétentes sans ADN subissant les conditions de transformation sont étalées sur milieu sélectif comme contrôle de sensibilité, montrant ainsi la validité de ce milieu et la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

après transformation. La transformation se fera avec la séquence linéaire plasmidique. En effet, pour garantir que la séquence plasmidique s'intègre au locus chromosomique d'intérêt, une coupure est réalisée dans la séquence de levure du plasmide, ainsi la fréquence de la transformation (c'est-à-dire l'intégration) augmente de 10 à 100 fois par rapport à un plasmide circulaire non coupé. En plus, la linéarisation du plasmide dirige l'intégration à la région chromosomique homologue de la région coupée (Rothstein, 1991 ; figure III.9).

Le gène *PHO81* n'est pas indispensable à la survie de la levure mais il apparaît que *PHO81* est nécessaire pour l'étude de la régulation abordée ici : en effet, les mutations récessives aux loci *pho81*, *pho2* et *pho4* empêchent la dérégulation de la rAPase (Oshima, 1982). En d'autres termes, le gène *PHO81* est nécessaire à l'étude des effets Pho2 et Pho4 dans la cascade (§ I.2.2). Il en résulte que les intégrants obtenus (où le gène *PHO81* résidant sera donc disrupté) doivent être transformés par un plasmide monocopie (YCp50) portant le gène intact *PHO81*.

Description des étapes conduisant au vecteur d'intégration.

1ère étape :

* Restrictions : d'une part, le plasmide pBS est restreint par l'enzyme *SmaI* coupant à bouts francs, un fragment de 2,96 kb est généré (photo III.7). Le mélange de restriction est purifié par une extraction au phénol. Le plasmide restreint est soumis à la phosphatase alcaline et à nouveau purifié.

D'autre part, le plasmide pTC3 contenant l'extrémité carboxy-terminale du gène *PHO81* est restreint successivement par les enzymes *SmaI* et *EcoRV*. Le fragment de 617 pb résultant est récupéré (photo III.7 et III.8).

* Ligation : 125 ng de matrice pBS est mis en présence de 75 ng du fragment de 617 pb dans le tampon de ligation avec 1 unité de T4 DNA Ligase. La ligation est faite en 14 heures à 14°C et 4 heures à 37°C.

* Transformation : les cellules XL1-blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation puis étalées sur un milieu LB+ampicilline+IPTG+Xgal +tétracycline. En effet, le plasmide pBS permet la sélection blanc-bleu (§ II.1).

Les cultures liquides sont ensemencées avec des colonies blanches obtenues. L'extraction d'ADN plasmidique se fait par miniprep (§ II.12) à partir de ces cellules. L'analyse, après restriction par *EcoRI*, sur gel d'agarose 2% montrent 2 colonies qui ont le profil attendu : une bande à 3,4 kb et une autre à 160 bp. Le plasmide obtenu est appelé pG.I.L.C.4 et est produit en grande quantité (photo III.9).

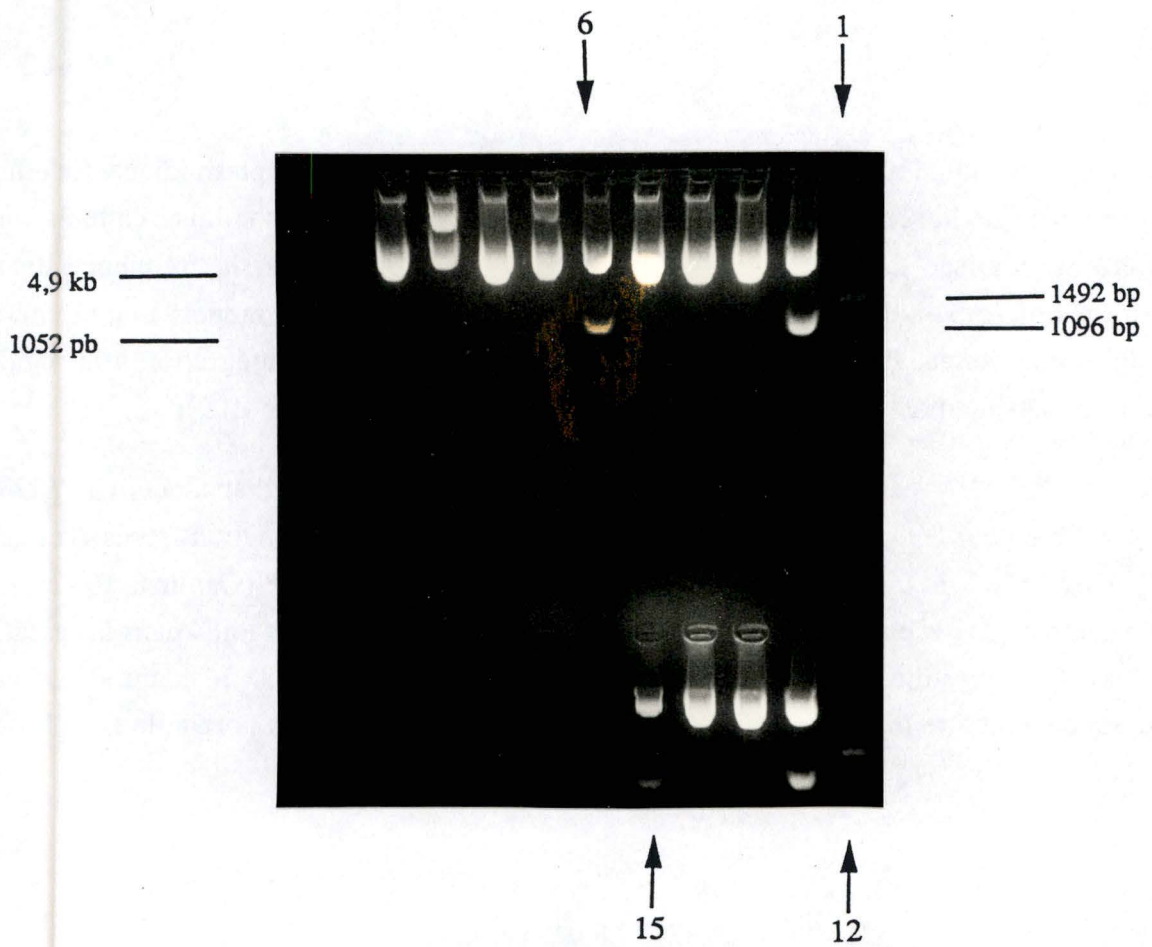


Photo III.10 : électrophorèse en gel d'agarose 2% après restriction par EcoRV de 11 clones susceptibles de porter la construction pGI.LC.5 :

Piste 1 et 11 : le marqueur PUC18, restreint par HinfI, donne des bandes à 1412 bp, 517 bp, 396 bp, 221 bp et 75 bp.

Piste 2 et 12 : le pFL38 restreint par BglII génère une bande de 1096 pb.

Piste 6 et 15 : les clones montrent la construction recherchée : une bande à 4,9 kb et une à 1052 bp.

Yeast Extract (Oxoid)

5 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Autoclavage (20', 120°C).

Les cultures liquides se font à 37°C dans des bouteilles universelles ou dans des Erlenmeyers avec contre-pales, sous agitation.

Milieu LB solide

De même composition que le LB liquide, ce milieu contient 1,6 % d'Agar (Oxoid).

Ce milieu autoclavé et refroidi à 55°C est coulé dans des boîtes de Pétri (conservées à 4°C après solidification).

Milieu LB sélectif

Ce milieu contient de l'ampicilline. Cet antibiotique étant thermolabile, il sera ajouté au milieu autoclavé et refroidi à 55°C à une concentration finale de 50 µg/ml.

Milieu LB "bleu-blanc"

C'est le milieu requis pour la mise en évidence d'une activité β galactosidase : au milieu autoclavé refroidi (55°C), on ajoute de l'X-gal et de l'IPTG à raison de 800 µl de Xgal (20mg/ml N,Ndiméthylformamide) et 1,6 ml d'IPTG 100 mM pour 400 ml de milieu et cela en plus de l'ampicilline et de la tétracycline.

II.2.2. Milieux de culture pour levure

Milieu riche YPD

Glucose (Merck)

20 g/l

Yeast extract (Oxoid)

10 g/l

Peptone (Difco)

20 g/l

Ajuster à pH 4,8 avec de l'HCl concentré

Porter à volume avec de l'eau distillée

Agar (Oxoid)

16 g/l si milieu solide

2ème étape :

* Restrictions : le plasmide pFL38 (§ II.1.3) possède le marqueur URA3. Ce marqueur permettra la sélection des clones qui auront intégré les différentes constructions réalisées.

Le pFL38, préparé en maxi-préparation (§ II.13), est restreint par l'enzyme BglII qui ressort le marqueur URA3 long de 1096 bp. Ce fragment est récupéré.

Le pG.I.L.C.4 est restreint par l'enzyme BamHI; le mélange de restriction est purifié par extraction au phénol suivi d'une déphosphorylation et à nouveau une extraction au phénol.

* Ligation : 100 ng de matrice pG.I.L.C.4 sont mis en présence de 100 ng du fragment URA dans un tampon de ligation contenant une unité de T4 DNA Ligase. La réaction se fait 14 heures à 4°C et 4 heures à 37°C.

* Transformation : les cellules XL1-blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation et ensuite étalées sur le milieu LB+ampicilline. Les clones obtenus sont mis en culture et l'ADN extrait est restreint par l'enzyme EcoRV et déposé sur un gel d'agarose 2%. Deux clones possèdent le profil attendu : une bande à 4,9 kb et une bande à 1052 pb (photo III.10).

Nous avons ainsi obtenu le plasmide pG.I.L.C.5, nous en produisons une grande quantité.

3ème étape :

* Restrictions : les plasmides comprenant le promoteur *PHO81* différentiellement délété (les pGI.DP.97, pGI.DP.99, pG.I.L.C.3, pG.I.L.C.6, pG.I.L.C.7) sont restreints successivement par les enzymes ApaI et EcoRI. Le profil de restriction montre deux bandes : une à 5580 pb et une à 4120 pb. La bande à 5580 pb est à récupérer.

Le plasmide pG.I.L.C.5 est restreint successivement par les enzymes ApaI et EcoRI. La bande à 1067 pb est à récupérer (photo III.11).

Le plasmide pBS est restreint par l'enzyme EcoRI. Le mélange de restriction est successivement purifié par extraction au phénol, soumis à la phosphatase alcaline, à nouveau purifié par extraction au phénol.

* Ligation : 100 ng de pBS sont mis en présence de 100 ng du fragment de 1067 pb du pG.I.L.C.5 et 50 ng de chaque plasmide contenant le promoteur de *PHO81* différentiellement délété.

* Transformation : les cellules XL1-blue compétentes sont transformées par électroporation (§.II.10.2) par les 5 mélanges de ligation obtenus et sont étalés sur milieu LB+ampicilline+IPTG+Xgal. Les clones obtenus sont mis en culture. L'ADN extrait et

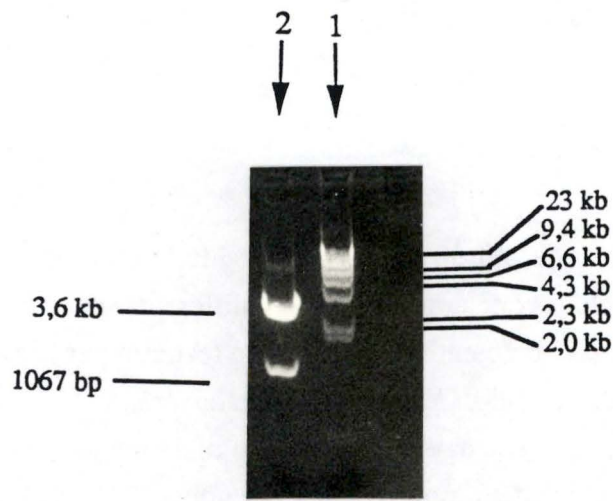


Photo III.11 : électrophorèse en gel d'agarose 1% présentant :

Piste 1 : le marqueur de taille λ , restreint par HindIII, donne des bandes à 23 kb ; 9,4 kb ; 6,6 kb ; 4,3 kb ; 2,3 kb ; 2,0 kb.

Piste 2 : le plasmide pGI.LC.5 restreint par les enzymes ApaI et EcoRI : 2 bandes sont générées, l'une à 3,6 kb et l'autre à 1067 bp.

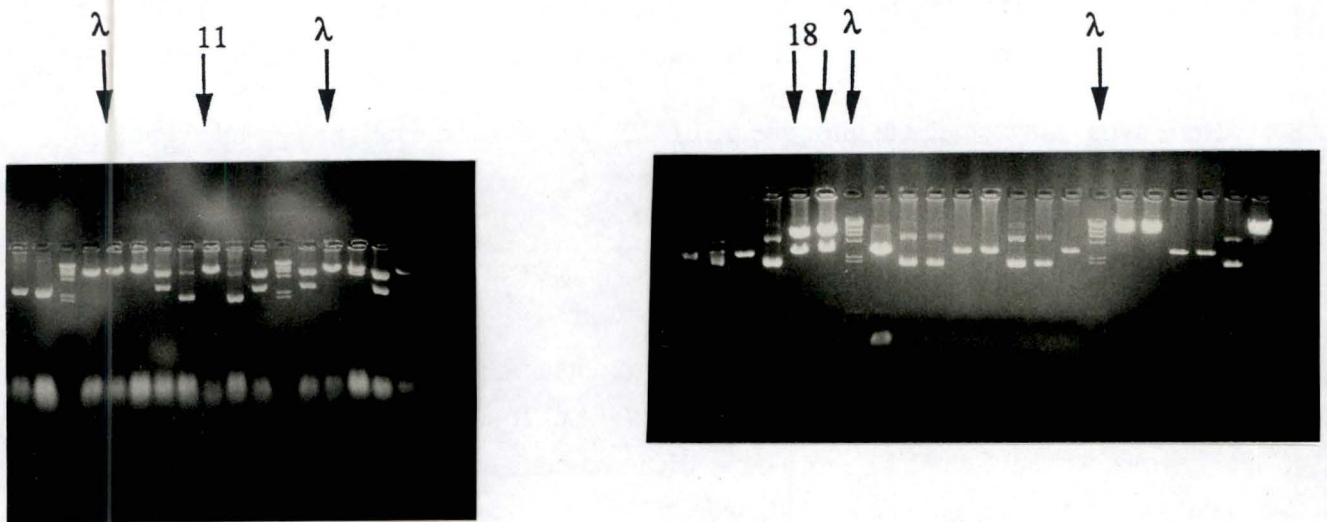


Photo III.12 et III.13 : électrophorèses en gel d'agarose 1% des clones susceptibles de porter les constructions recherchées.

photo II.12 :

pistes 6 et 15 : le marqueur de taille λ , restreint par HindIII, donne des bandes à 23 kb ; 9,4 kb ; 6,6 kb ; 4,3 kb ; 2,3 kb ; 2,0 kb.

pistes 1 à 10 : clones susceptibles de porter la construction pGI.DP.99.

pistes 2, 5 et 7 présentent le profil attendu de 6,6 kb et de 2,9 kb.

pistes 11 à 17 : clones susceptibles de porter la construction pGI.CCP.3. La piste 11 présente le profil attendu de 6,6 kb et 2,9 kb.

photo II.13 :

pistes 7 et 16 : le marqueur de taille λ , restreint par HindIII, donne des bandes à 23 kb ; 9,4 kb ; 6,6 kb ; 4,3 kb ; 2,3 kb ; 2,0 kb.

pistes 1 à 22 : clones susceptibles de porter la construction pGI.CCP.7. Les pistes 17 et 18 montrent le profil attendu de 6,6 kb et 2,9 kb.

restreint par l'enzyme EcoRI montre, après migration sur gel d'agarose 1%, deux bandes : une à 6647 pb et une à 2964 pb (photos III.12 et III.13). Les plasmides résultant de cette triple ligation sont appelés pGI.CCP.99, pGI.CCP.3 et pGI.CCP.7 selon le type de plasmide d'accueil.

Remarque : Les colonies qui s'avèrent avoir la bonne construction présentent une couleur bleue clair sur boîte LB+ampicilline+IPTG+Xgal. Le pBS est bien disrupté mais cette couleur pourrait résulter de l'activité β -galactosidasique du gène *LacZ* présent dans l'insert. Le promoteur *PHO81* aurait des séquences reconnaissables par la machinerie d'*Escherichia coli*.

4ème étape :

Les plasmides résultant de toutes ces étapes, pGI.CCP.99, pGI.CCP.3 et pGI.CCP.7, sont restreints par l'enzyme EcoRI et le mélange de restriction est purifié par extraction au phénol. Une grande quantité de matériel linéarisé ($\pm 1 \mu\text{g}$) est électroporé en présence de chacune des trois souches rendues compétentes. Ces cellules sont étalées sur un milieu complet sans uracile.

Nous avons obtenu des souches ayant intégré les constructions pGI.CCP.99, pGI.CCP.3 et pGI.CCP.7 .

Dans la suite de notre travail, les mutants *PHO81* doivent être transformés par un plasmide portant le gène *PHO81* entier et des dosages de la β -galactosidase seront réalisés à partir de ces souches.

IV.DISCUSSION et CONCLUSION GÉNÉRALE.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au gène *PHO81* de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cloné et séquencé dans notre laboratoire (Vandenhoute *et al*, 1988 ; Coche *et al*, 1990). Il intervient dans la cascade de régulation de la phosphatase acide répressible en réponse au taux de phosphate inorganique du milieu (Oshima, 1982).

Sur base de comparaison de séquences, on a proposé la présence dans le promoteur de *PHO81*, de 3 UAS similaires à celles présentes dans le promoteur de *PHO5*, à savoir de 5' vers 3', l'UASp2, l'UASi et l'UASp1 (Grifnée, 1990).

Il fallait déterminer si ces régions UASp1,p2 et UASi étaient des sites effectifs de liaison à l'ADN de la protéine Pho4 et de la protéine Pho2 respectivement.

Pour cela, nous avons choisi la technique du rapporteur : 5 fusions comprenant le promoteur de *PHO81* différenciellement modifié, le début de l'ORF de *PHO81* et l'ORF du gène rapporteur (*LACZ*) ont été construites (les gènes-rapporteurs sont présents les plasmides pGI.DP.97, pGI.DP.99, pGI.LC.3, pGI.LC.6 et pGI.LC.7).

L'expression des 5 gènes rapporteurs dans les 3 souches (sauvage, YH40 ; mutant *pho2*, YH40-P2 ; mutant *pho4*, VG151) a permis d'étudier les rôles imputés aux UAS potentielles du promoteur *PHO81* en présence ou en absence des facteurs *trans* correspondants.

Dans le mutant *pho4* (souche VG151), on constate qu'il n'y a pas de dérèglement du gène *PHO81* quelle que soit la construction utilisée. Pho4 est un élément indispensable à l'activation

transcriptionnelle de *PHO81*, comme il l'est pour Pho5, vraisemblablement via la boîte UASp2 présentant un consensus parfait avec les boîtes UASp1 et p2 de Pho5.

Dans la souche sauvage (YH40), on constate que la délétion de l'UASp1 ne supprime pas la régulation, ce qui indique qu'il n'y a pas d'effet transactivateur indispensable de Pho4 sur cette boîte. Ceci réfute l'hypothèse fonctionnelle de l'UASp1 de *PHO81* établie sur base d'une similarité de séquences avec la boîte (UASp2) du gène *PHO5* (figure III.1).

La séquence 5'CAAGTT3' de l'UASp1 de *PHO81* diverge de l'UASp2 (5'CACGTG3') de *PHO81* et de l'UASp1 (5'CACGTT3') de *PHO5* par la position 3 (un A remplace le C), ce qui suggère le rôle déterminant de ce nucléotide dans l'interaction cognitive avec la protéine Pho4. Récemment des expériences de retard sur gel (Ogawa et al ; comm.pers.) ont prouvé la liaison de Pho4 avec un fragment UASp2 et démontré que cette liaison était strictement dépendante du consensus parfait 5'CACGT $\frac{G}{T}$ 3'.

Il est à noter que la délétion enlevant l'UASp1 non seulement ne supprime pas la régulation mais l'activité spécifique semble être plus élevée (comparaison des résultats obtenus pour les constructions pGILC.3 et pGIDP.97 dans la souche sauvage).

Dans le mutant *pho2* (souche YH40-P2), le promoteur *PHO81* complet (pGIDP.97) ne permet pas la réponse régulée normale. En effet, sur un milieu pauvre en Pi (induction), on n'observe pas l'induction de l'activité β -galactosidasique ; en revanche, avec le promoteur délété de sa région UASp1, on observe une réponse comparable à celle obtenue dans les mêmes conditions dans une souche sauvage.

Les facteurs régulateurs modulant l'activité du complexe basal d'initiation sont, dans cette hypothèse, pour les facteurs positifs : Pho4 strictement indispensable, Pho2 indispensable seulement si une zone proximale (s'étendant sur 165 pb allant du site XhoI au site SpeI, fragment correspondant à la délétion de l'UASp1) est conservée ; et comme facteur négatif un facteur inconnu ayant son site de fixation dans cette zone proximale.

Les travaux non publiés du groupe d'Oshima confirme l'existence d'une région proximale responsable de la dépendance de la réponse régulée pour le facteur Pho2. Toutefois, ces auteurs suggèrent que cette région comporterait un site de liaison pour cette protéine elle-même plutôt que

HpaI
 GTTAACCATCTTTATCACAAAATATACAATTAACCAACTACTTAATCAAT -543
 TCGGTTATATTGCTTAGTATATACGTCTTTGGCACGCGATTGAAACGCGC -493
 TAATTGCATCAGCCTATCTTTCTATGCAAGAATGCAAGAAAAATTGATGT -443
 GATGTGCCTTATCACAAATTCATTACCTCCTATTTCTCTGCAGCAACAAG -393
 TTTCTTGATTATAAAGGTCTTTAGCGTGAGAGGTACAGGTGTTATGGCA -343

UASp2 (PH04 binding site) **UAS** (PH02 binding site)
 CGTGCGAATAAGGGCAGAAATTAATCAAATTTATCAACTATTTGGCGATG -293

XhoI
 GCTCGAGACAGGTATAGAACCACTACTAGGTCATATTGAGGCTTTTGTAC -243

UASp1 (PH04 binding site)
 AATTTATAGCAAGTTTTTGGAGAGTCCCTTCAAGTTTGTTACATAATCTTC -193
 TATA box Ogawa

TTTGTGCAACGTACAAGAGCAAAGTAGAAAAATTTGGTTTTTATTTTTT -143

SpeI
 AAGCAACATCAGCTGCCTAGTTGAGCTTTTGACAAGACATACTGCTCAA -93

AAAATCTTCATAACATTATTTTTTCGGTTCCACAGTGATTGAGCTTTTTGA -43
 TATA box Denoël → +1 de Ogawa

GAGAATAACCCTTTGGAGGCAACATAGATAGATAAACGTGCAATG
 → +1 de Denoël

Figure IV.1 : séquence nucléotidique du promoteur *PHC21* (Coche *et al.*, 1990).

pour le facteur négatif que nous postulons. Le clonage d'un tel facteur constituerait la réponse définitive qui permettrait de répondre aux incertitudes actuelles sur le modèle de contrôle proposé.

Les observations qui précèdent suggèrent l'existence d'un mode de contrôle de la réponse transcriptionnelle du gène *PHO81* jusqu'ici insoupçonné (sous réserve que les différences relevées dans les activités en fonction du type de construction soient validées statistiquement).

En effet, si le promoteur complet de *PHO81* exige bien, pour être régulé correctement, la présence des facteurs Pho4 et Pho2, ce dernier devient dispensable dans le cas où la région de l'UASp1 du promoteur est absente (cas du pGL.LC.3 dans le mutant *pho2*). La dépendance de la protéine Pho2 pour le contrôle est levée. Curieusement, la présence du facteur Pho2 dans le cas du promoteur délété de sa région UASp1 s'accompagne d'une nette augmentation de l'amplitude de la réponse de régulation positive (comparaison du pGL.LC.3 et du pGL.DP.97 dans la souche sauvage) ce qui suggère qu'un élément de contrôle négatif a été supprimé. Une hypothèse serait qu'un "silencer" est présent dans la région délétée : un facteur négatif inconnu exercerait un effet "silencer" via cette région et réduirait l'effet inducteur (comparaison du pGL.LC.3 et du pGL.DP.97 dans la souche sauvage et comparaison du pGL.LC.3 et du pGL.DP.97 dans le mutant *pho2*).

La comparaison de nos résultats avec ceux d'Ogawa et ses collaborateurs (comm. pers.) met en évidence une autre différence quant aux résultats de la dissection du promoteur *PHO81*. En effet, sur base d'une expérience d'extension d'amorce, ils situent le site+1 en position -66 ; alors que selon les données antérieures du laboratoire (Grifnée, 1990 ; Denoël, 1991), les nucléotides situés à 15 et 16 paires de bases en amont de l'ATG correspondent à des sites d'initiation de la transcription (déterminé par extension d'amorce).

Rappelons que l'élément TATA est nécessaire à l'initiation de la transcription de la plupart des gènes de levure et que la TATAbox est définie par le consensus général $TA \begin{smallmatrix} A \\ T \end{smallmatrix} AA \begin{smallmatrix} A \\ T \end{smallmatrix}$ localisé quelque part entre 40 et 120 paires de base en amont du site+1 (Struhl, 1989).

Les TATAbox les plus plausibles, en vertu du consensus énoncé ci-dessus, sont situées à -86 paires de bases (Grifnée, 1990) et -204 paires de bases (Ogawa, comm. pers.) par rapport à l'ATG, soit à -70 et -138 paires de bases par rapport à leur site+1 respectif (figure IV.1). Si l'on tient compte de ce qu'on sait de la séquence et de la position de la TATAbox chez la levure, on

remarque que la séquence de la TATA en position -86 est plus éloignée du consensus général que la TATA déterminée en -204 mais sa position par rapport au site+1 est plus en accord avec la fenêtre de 40 à 120 paires de bases généralement observée.

L'observation importante qui porte à admettre le caractère fonctionnel de la TATAbox que nous proposons est le fait que la délétion de la région UASp1 (fragment XhoI-SpeI) permet la transcription du rapporteur alors que cette délétion inclut la zone portant la TATAbox d'Ogawa. Pour vérifier ce point, l'expérience d'extension d'amorce devra être reprise dans des conditions qui permettent de vérifier si effectivement les deux sites+1 sont détectables dans un promoteur complet.

Une part importante du travail présenté dans ce mémoire a consisté à réaliser des constructions visant à répéter les différentes expériences réalisées mais cette fois via l'intégration du rapporteur au locus chromosomique *PHO81*. Cette démarche se justifie pleinement dans la mesure où l'utilisation de vecteurs multicopies pour suivre les variations de l'expression d'un rapporteur en fonction des conditions risque de donner lieu à des interprétations biaisées.

En effet, on doit craindre d'une part, que le dosage génique puisse avoir pour effet de titrer différemment certains facteurs *trans*-actifs et dès lors ne plus permettre au contrôle de s'exercer correctement ; d'autre part, que le promoteur, étant en dehors du contexte chromosomique, tant au point de vue des séquences que dans la structure nucléosomique, ne soit pas soumis au contrôle réel.

L'ensemble des vecteurs nécessaires pour effectuer l'intégration a été réalisé. Toutefois, la communication des résultats provenant d'une série d'intégrations obtenue par le groupe d'Oshima (avec des constructions réalisant des situations du promoteur comparables à celles que nous testons nous-même) nous montre une concordance avec nos résultats obtenus par des vecteurs multicopies.

Aussi les conclusions que nous tirons quant au modèle de régulation transcriptionnelle du gène *PHO81* chez *S. cerevisiae* se trouvent par là confirmées.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Berben G.

Etude des éléments activateurs PHO2 et PHO4 impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène PHO5 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Thèse de doctorat, Faculté des sciences agronomiques de Gembloux ; (1991).

Berben G., Legrain M., Gilliquet V., Brunelle N., Hilger F.

DNA-binding and activation domains of the yeast regulatory proteins PHO2 and PHO4.

Société belge de Biochimie, LLN. ; (1990) ; B58.

Berben G., Legrain M., Hilger F.

Studies on the structure, expression and function of the yeast regulatory gene PHO2.

Genes ; (1988) ; 66 : 307-312

Berger S.L., Cress D. W., Cress A., Triezenberg S.J., Guarente L.

Selective inhibition of activated but not basal transcription by acidic activation domain of VP16 : evidence for transcriptional adaptators.

Cell ; (1990) ; 61 : 1199-1208

Bonneaud N., Ozier-Kalogeropoulos O., Li G., Labouesse M., Minvielle-Sebastia L., Lacroute F.

A family of low and high copy replicative, integrative and single stranded *Saccharomyces cerevisiae* / *Escherichia coli* shuttle vectors.

Yeast ; (1991) ; 7 : 609-615

Bradford M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilising the principle of proteins dye binding.

Anal. Biochem. ; (1976) ; 72 : 248-254

Bullock W.O., Fernandez J. M., Short J.M.

XL1-blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase section.

Biotechniques ; (1987) ; 5 : 376-379

Coche T., Prozzi D., Legrain M., Hilger F., Vandenhautte J.
Nucleotide sequence of the PHO81 gene involved in the regulation of the repressible acid phosphatase gene in *Saccharomyces cerevisiae*.
Nucleic Acids Res. ; (1990) ; 18 : 2176

Denoël P.
Caractérisation structurale et fonctionnelle des séquences de régulation 5' amont du gène PHO81 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
Mémoire, Facultés Notre Dame de la Paix, Namur ; (1991).

Dretzen G., Ballard M., Sassone-Corsi P., Chambon P.
A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels.
Anal. Biochem. ; (1981) ; 12 : 2523-2528

Fasher K.D., Schmitz J., Hörz W.
Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the PHO5 promotor in *Saccharomyces cerevisiae*.
EMBO-J. ; (1990) ; 9 : 2523-2528

Felsenberg G.
Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism.
Nature ; (1992) ; 355 : 219-224

Fisher F., Jayaraman P. S., Goding C.R.
C-MYC and the yeast transcription factor PHO4 share a common CACGTG-binding factor.
Oncogene ; (1991) ; 6 : 1099-1104

Gilliquet V.
Étude de PHO80 et PHO85, régulateurs négatifs de la transcription du gène PHO5 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
Thèse de doctorat, Faculté des sciences agronomiques de Gembloux ; (1992) ;

Giniger, Ptashne M.
Transcription in yeast activated by a putative amphipathic α helix linked to a DNA binding unit.
Nature ; (1987) ; 330 : 670-672

Grifnée A.

Contribution à la caractérisation structurale et fonctionnelle de la région 5' amont du gène PHO81, régulateur de la phosphatase acide chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Mémoire, Facultés Notre Dame de la Paix, Namur ; (1990)

Han M., Ung-Jim K., Kayne P., Grunstein M.

Depletion of histone H4 and nucléosomes activates the PHO85 gene in *Saccharomyces cerevisiae*.

EMBO J.; (1988) ; 7 : 2221-2228

Hayashi N., Oshima Y.

Specific cis-acting sequence for PHO8 expression interacts with PHO4 protein, a positive regulatory factor in *Saccharomyces cerevisiae*.

Mol. Cell. Biol. ; (1991) ; 11 : 785-794

Hieter P., Sikorski R.S.

A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics ; (1989) ; 122 : 19-27

Ito H., Fukada Y. , Murata H., Kimura A.

Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.

J. Bacteriol. ; (1983) ; 153 : 163

Legrain M., Dewilde M. , Hilger F.

Isolation, physical characterization and expression analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* positive regulatory gene PHO4.

Nucleic Acids Res. ; (1986) ; 14 : 3059-3073

Lewin B.

Genes IV

Oxford Cell Press ; (1990) ;

Lux S., John K.M., Bennett V.

Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue differentiation and cell-cycle control proteins.

Nature ; (1990) ; 344 : 36-42

Madden S.L., Johnson D. L., Bergman L.W.
Molecular and expression analysis of the negative regulators involved in the transcriptional regulation of acid phosphatase production in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. ; (1990) ; 10 : 5950-5957

Maniatis T., Fritsh E. F., Sambrook J.
Molecular cloning, a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press ; (1989) ;

Martin J. K.
The interactions of transcription factors and their adaptators, coactivators and accessory proteins.
Bioessays ; (1991) ; 13 : 499-503

Myers, Tzagdoff, Kinney D.M., Lusty C.J.
YEp357, yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of LacZ regions.
Gene ; (1986) ; 45 : 299-310

Nakao J., Miyanochara A. , Yoh-e A., Matsubara K.
***Saccharomyces cerevisiae* PHO5 promotor region : location and function of the upstream activation site.**
Mol. Cell. Biol. ; (1986) ; 6 : 2613-2623

Ogawa N., Noguchi K. , Yamashita Y., Yasuhara T., Hayashi N., Yoshida K., Oshima Y.
Promotor analysis of the PHO81 gene encoding a 134 kDa protein bearing ankyrin repeats in the phosphatase regulon of *Saccharomyces cerevisiae*.
in press

Ogawa N., Oshima Y.
Functional domains of a positive regulatory protein, PHO4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. ; (1990) ; 10 : 2224-2236

Oshima Y.
Impact of the Douglas-Hawthorne model as a paradigm for elucidating cellular regulatory mechanisms in fungi.
Genetics ; (1991) ; 128 : 195-201

Oshima Y.

Regulatory circuits for gene expression : the metabolism of galactose and phosphate.

The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ; (1982) ; 2 : 159-180

Ptashne M.

Gene regulation by proteins acting nearby and at distance.

Nature ; (1986) ; 322 : 697-701

Ptashne M.

How eukaryotic transcriptional activators work ?

Nature ; (1988) ; 335 : 683-689

Rothstein R.

Targeting, disruption, replacement and allele rescue : integrative DNA transformation in Yeast.

Method in Enzymology ; (1991) ; 194 : 281-301

Sigler P. B.

Acid blobs and negative nodules.

Nature ; (1988) ; 333 : 210-212

Sorger P.K., Pelham H.R.B.

Yeast heat shock factor is an essential DNA binding protein that exhibit temperature dependent phosphorylation.

Cell ; (1988) ; 54 : 855-864

Struhl K.

Molecular mechanism of transcriptional regulation in yeast.

Ann. Rev. Biochem. ; (1989) ; 58 : 1051-1077

Tice-Baldwin K., Fink G. R., Arndt K.T.

BAS1 has a myb motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2.

Science ; (1989) ; 246 : 931-935

Toh-e A., Shimauchi T.

Cloning and sequencing of the PHO80 gene and CEN15 of *Saccharomyces cerevisiae*.

Yeast ; (1986) ; 2 : 129-139

Toh-e A., Tanaka K., Uesono Y., Wickner R.B.
PHO85, a negative regulator of the PHO system is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Gen. Genet. ; (1988) ; **214** : 162-164

Uesono Y., Tokai M., Tanaka K., Toh-e A.
Negative regulators of the PHO system of *Saccharomyces cerevisiae* : characterisation of PHO80 and PHO85.
Mol. Gen. Genet. ; (1992) ; **231** : 426-432

Vandenhoute J., Legrain M., Coquette V., Tibor A., Hilger F.
Molecular cloning, genetic mapping and preliminary characterisation of PHO81, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the transcriptional regulation of the repressible acid phosphatase gene (PHO5).
Société Belge de Biochimie, LLN ; (1988) ; B116 :

Vidal M.
Study of the *Saccharomyces cerevisiae* RPD genes involved in transcriptional regulation.
Thèse de doctorat, Facultés des sciences agronomiques de Gembloux. ; (1991) ;

Vogel K., Hörz W., Hinnen A.
The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with PHO5 upstream activation regions.
Mol. Cell. Biol. ; (1989) ; **9** : 2050-2057

Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zotler M.
Recombinant DNA
W.H. Freeman (2nd edition) ; (1992).

Woychick N. A., Young R. A.
RNA polymerase II : subunit structure and function.
TIBS ; (1990) ; **15** : 347-350

Yoshida K., Kuromitsu Z., Ogawa N., Oshima Y.
Mode of expression of the positive regulatory genes PHO2 and PHO4 of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Gen. Genet. ; (1989) ; **217** : 31-39

VI. TABLE DES MATIERES.

	Page
<u>I. INTRODUCTION.</u>	1
I.1. Régulation transcriptionnelle chez la levure.	1
I.1.1. Les éléments impliqués dans la transcription.	1
A - Les facteurs généraux de la transcription et l'ARN polymérase II.	2
B - Les activateurs transcriptionnels.	2
I.1.2 Les mécanismes de la régulation transcriptionnelle	3
I.2. Régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme du phosphate inorganique chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	3
I.2.1. Le métabolisme du phosphate.	4
I.2.1.1 Vue d'ensemble du métabolisme du phosphate inorganique.	4
I.2.1.2. Les gènes de structure	5
I.2.2 Le système de régulation de la phosphatase acide répressible.	6
I.2.3. Les éléments impliqués dans la régulation.	7
I.2.3.1. Le gène <i>PHO5</i> .	7
I.2.3.2. Les facteurs positifs Pho2 et Pho4.	7
I.2.3.3. Les facteurs négatifs Pho80 et Pho85.	9
I.2.3.4. Le gène <i>PHO81</i> .	10
I.2.3.4. L'effecteur.	10

<u>I.3. But du travail.</u>	10'
<u>II.MATERIELS ET METHODES</u>	11
II.1. Souches et Plasmides	11
II.1.1.Plasmides bactériens	12
II.1.2. Souches de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
II.1.3. Plasmides navettes <i>E. coli</i> - <i>S. cerevisiae</i>	13
II.2. Milieux de culture.	14
II.2.1 Milieux de culture bactériens.	14
II.2.2. Milieux de culture pour levure.	15
II.3. La restriction d'ADN	18
II.4. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose.	19
II.5. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose.	21
II.6. Réaction de "filling" (remplissage).	22
II.7.La réaction de déphosphorylation.	23
II. 8 Ligation de molécules d'ADN linéaires ayant des bouts droits ou des bouts saillants.	23
II.9. Purification et précipitation d'ADN.	24
II.10. La transformation bactérienne.	25
II.10.1. Méthode au chlorure de calcium.	25
II.10.1.1 Préparation de cellules XL1blue compétentes.	25
II.10.1.2.Transformation de cellules XL1 blue compétentes.	26
II.10.2. Electroporation ou électrotransformation.	26

II.10.2.1. Préparation de cellules XL1blue compétentes.	27
II.10.2.2 Electro-transformation proprement dite et étalement.	27
II.11. Transformation de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	27
II.11.1. D'après la méthode de Ito (1983) à l'acétate de lithium.	27
II.11.2. Par électroporation	29
II.11.2.1 Préparation de cellules de levures compétentes.	29
II.11.2.2 Electro-transformation et étalement.	29
II.12. Extraction rapide d'ADN plasmidique d'<i>Escherichia coli</i>	30
II.13. Précipitation d'ADN plasmidique d' <i>Escherichia coli</i>	31
II.14. Quantification spectrophotométrique de l'ADN.	32
II.15. Test coloré de détection de l'activité β-galactosidase.	33
II.15.1. Dosage qualitatif de l'activité β galactosidase.	33
II.15.2. Dosage quantitatif de l'activité β galactosidase.	33
II.16. Dosages des protéines.	35
<u>III. RESULTATS</u>	36
III.1. Description du promoteur <i>PHO81</i>.	36
III.2. Etude de la régulation par un gène-rapporteur.	36
III.2.1. Introduction.	36
III.2.2. Description des constructions.	37
Construction du pGI.LC.3.	37

Construction du pGILC.6.	38
Construction du pGILC.7.	39
III.3. Etude de l'expression de la β-galactosidase des gènes rapporteurs des trois souches.	40
III.3.1. Expression de la β-galactosidase des gènes-rapporteurs chez la souche sauvage YH40.	40
III.3.2. Expression de la β-galactosidase des gènes-rapporteurs chez le mutant <i>pho4</i> (VG-151).	40
III.3.3. Expression de la β-galactosidase des gènes-rapporteurs chez le mutant <i>pho2</i> (souche YH40-P2).	42
III.4. Expression de la régulation <i>in situ</i> pour l'intégration au site chromosomique de PHO81	42
<u>IV.DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE.</u>	46
<u>V.REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	50
<u>VI.TABLE DES MATIERES</u>	56