



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Recherche de partenaires de la protéine Dim1p par suppression phénotypique de mutants dim1 conditionnels

Van Mullem, Vincent

*Award date:*  
1996

*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.

FACULTES UNIVERSITAIRES  
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Reçu le 02 DEC. 1996

FACULTE DES SCIENCES

-----

SECRETARIAT BIOLOGIE  
F. U. N. D. P.  
Rue de Bruxelles, 64  
B - 5000 NAMUR

**Recherche de partenaires de la protéine Dim1p par suppression  
phénotypique de mutants *dim1* conditionnels**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
par  
Vincent Van Mullem  
1996-1997



## Recherche des partenaires de la protéine Dim1p par suppression phénotypique de mutants *dim1* conditionnels

VAN MULLEM Vincent

### Résumé

La biosynthèse du ribosome comprend le "processing" et la modification des ARN ribosomiques (ARNr) ainsi que leur assemblage séquentiel et stoechiométrique avec des r-protéines. Les ARNr sont issus d'un précurseur (le pré-ARNr 35S chez la levure) qui, peu après sa transcription, subit des clivages de maturation et des modifications au niveau de résidus spécifiques. La plus étudiée de ces modifications est certainement la méthylation.

La diméthylase Dim1p est impliquée dans la modification universellement conservée  $m^6A_{1779}$   $m^6A_{1780}$  (numérotation levurienne) de l'extrémité 3' de l'ARNr de la petite sous-unité (ARNr 18S) et dans le clivage de maturation du pré-ARNr 33S. La disruption du gène *DIMI* a montré que Dim1p était essentiel chez la levure. La maturation du pré-ARNr étant connue comme impliquant de nombreux facteurs *trans* associés en complexe, nous avons décidé de rechercher les partenaires interagissant avec la protéine Dim1p. Pour cela, nous avons adopté une stratégie génétique consistant au clonage de supresseurs extragéniques de mutants conditionnels. Cette recherche s'étant montrée infructueuse dans un mutant d'expression *GAL10::dim1*, notre étude s'est étendue aux mutants conditionnels pour la fonction (mutants thermosensibles). Trois mutants ont été sélectionnés sur base de leur caractère thermosensible évident. Une fois les mutations présentes identifiées par séquençage, une recherche de supresseurs à partir de cinq candidats *a priori* a été entreprise d'une part, dans des souches portant ces allèles ts plasmidiques et, d'autre part, dans des souches portant ces mêmes allèles ts intégrés au locus chromosomique. Quatre supresseurs extragéniques ont été isolés par cette méthode.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1996

**Promoteur:** Professeur J. Vandenhautte

**Co-promoteur:** Docteur M. Vidal

Je tiens à remercier tout spécialement le Professeur Vandenhautte pour m'avoir donné goût à la génétique moléculaire et pour le dévouement extrême dont il a fait preuve.

Merci aux membres du jury, M. Raes, X. Debolle, P. Denoël et R. Reszhohazy pour avoir prêté un oeil attentif à ce manuscrit.

Un grand merci à Monsieur Domi et Madame Isa pour m'avoir suivi et conseillé tout au long de cette année.

Pour la bonne humeur et l'énergie qu'ils apportent tous et toutes au labo, je remercie Rose-Ma, Monique, Jean-Pol, Damien, Isa G., Flore ainsi qu'Igor.

Je remercie tout particulièrement Dave et Sandrine pour leur amitié.

Je remercie enfin mes parents ainsi que Nat. pour leur soutien moral.

## Abreviations

5-FOA	acide 5-fluoro-orotique
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNr	ADN encodant les ARN ribosomaux
Amp	Ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
Br.Eth.	Bromure d'éthidium
DO	Densité optique
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
g	Gramme
Kb	Kilobase
l	Litre
LB	milieu de Luria-Bertani
mg	Milligramme
ml	Millilitre
$\mu$ l	Microlitre
mM	Milli-molaire
M	Molaire
nm	Nanomolaire
ORF	phase ouverte de lecture; <u>O</u> pen <u>R</u> eadin <u>F</u> rame
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PM	Poids moléculaire
RNase	ribonucléase
r-protéine	protéine ribosomale
SAM	S-adénosyl-méthionine
s-ARNr	ARNr de la petite sous-unité
SDS	Sodium dodécyl sulfate
snoRNA	petit ARN nucléolaire; <u>s</u> mall <u>n</u> ucleolar RNA
snoRNP	petite particule ribonucléique nucléolaire; <u>s</u> mall <u>n</u> ucleolar ribonucleoparticle
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
V	Volt
UV	Ultra-violet

# *Plan du travail*



## INTRODUCTION

<b>I. IDENTIFICATION ET ROLE(S) DES GENES ASSURANT LA DIMETHYLATION RIBOSOMIQUE.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Aperçu général des structure, fonction et biogenèse du ribosome.....</b>	<b>1</b>
I.1.1 Structure et fonction ribosomiale.....	1
I.1.2 La biogenèse du ribosome.....	2
<b>I.2 Les gènes encodant la diméthylase de l'extrémité 3' du s-ARNr.....</b>	<b>3</b>
I.2.1 Le gène <i>ksgA</i> d' <i>E. coli</i> .....	3
I.2.2 Le gène <i>DIM1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	4
<b>I.3 Indications en faveur du rôle double de Dim1p et de l'existence de partenaires.....</b>	<b>5</b>
<b>II. LA RECHERCHE DE PARTENAIRES DE DIM1P.....</b>	<b>6</b>
<b>II.1 Aperçu des approches biochimiques et génétiques.....</b>	<b>6</b>
II.1.1 Les approches biochimiques.....	6
II.1.1.1 La chromatographie d'affinité.....	6
II.1.1.2 La co-immunoprécipitation.....	6
II.1.2 Les approches génétiques.....	6
II.1.2.1 La méthode du double-hybride.....	6
II.1.2.2 La recherche de supresseurs de mutants conditionnels.....	7
<b>II.2 La suppression appliquée à la recherche de partenaires de Dim1p.....</b>	<b>9</b>

## BUT DU TRAVAIL

## RESULTATS

<b>I. TEST DE SUPPRESSEURS POTENTIELS D'UN MUTANT CONDITIONNEL D'EXPRESSION.....</b>	<b>12</b>
<b>I.1 Historique de la souche <i>GAL10::dim1</i>.....</b>	<b>12</b>
I.2 Test de candidats supresseurs potentiels.....	13
<b>I.2.1 Construction du pGIVV3 et pGIVV4.....</b>	<b>13</b>
<b>I.2.2 Test de suppression phénotypique.....</b>	<b>13</b>
<b>II. TEST DE SUPPRESSEURS POTENTIELS DE MUTANTS DIM1 TS PLASMIDIQUES.....</b>	<b>16</b>
<b>II.1 Historique: la création d'allèles thermosensibles pour le gène <i>DIM1</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>II.2 Vérification et choix de différentes souches ts.....</b>	<b>17</b>
II.2.1 Vérification du caractère plasmide-lié des phénotypes ts.....	17
II.2.2 Le choix des allèles ts.....	17
II.2.3 Séquençage de ces différents allèles.....	19

II.3 Test de suppression phénotypique des allèles <i>dim1</i> ts plasmidiques par les candidats potentiels.....	20
---	----

### III. TEST DE SUPPRESSEURS POTENTIELS DANS LES ALLÈLES TS INTÉGRÉS.....24

III.1 Intégration et étude des allèles <i>dim1</i> ts A7 et A12.....	24
III.1.1 Intégration dans la souche YPH 252 (Figure 16).....	24
III.1.2 Choix des températures non-permissives (cs et ts).....	25
III.1.3 Vérification de l'intégration par PCR pour nos deux souches.....	26
III.1.4 Vérification de la récessivité du caractère ts des allèles intégrés.....	27
III.2 Test de supresseurs <i>a priori</i> .....	27

## CONCLUSIONS

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## MATERIEL ET METHODES

### MATERIEL

I.1 LES TAMPONS.....	36
I.2 LES SOLUTIONS. ....	38

### METHODES

II.1 SOUCHES ET MILIEU DE CULTURE.....	39
II.1.1 Souches de bactéries.....	39
II.1.2 Souches de levures.....	40
II.1.3 Plasmides.....	41
II.2 MILIEU DE CULTURE.....	42
II.2.1 Milieu de culture bactérien.....	42
II.2.2 Milieux de culture levuriens.....	43
II.2 TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DE BACTERIES.....	45
II.2.1 Transformation de bactéries.....	45
II.2.1.1 Méthode au CaCl <sub>2</sub> .....	45
II.2.1.2 L'électroporation.....	46
II.3 TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DE LEVURES.....	48

<b>II.3.1 Transformation de levures.....</b>	<b>48</b>
II.3.1.1 La méthode au PEG.....	48
II.3.1.2 L'électroporation.....	48
<b>II.4 TECHNIQUES RELATIVES A L'ADN.....</b>	<b>50</b>
<b>II.4.1 Construction plasmidique.....</b>	<b>50</b>
II.4.1.1 Restriction d'ADN.....	50
II.4.1.2 Déphosphorylation.....	51
II.4.1.3 Purification et précipitation d'ADN.....	52
II.4.1.4 Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	53
II.4.1.5 Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose.....	55
II.4.1.6 Ligation.....	57
<b>II.4.2 Préparation d'ADN plasmidique.....</b>	<b>58</b>
II.4.2.1 Minipréparation.....	58
II.4.2.2 Midipréparation (NUCLEOBOND AX100).....	59
II.4.2.3 Maxipréparation (Wizard Maxipreps DNA Purification System).....	60
<b>II.4.3 La Polymerase Chain Reaction (PCR).....</b>	<b>61</b>
II.4.3.1 Principe général.....	61
II.4.3.2 Les paramètres et réactifs utilisés.....	61
<b>II.4.4. Le Séquençage.....</b>	<b>65</b>
II.4.4.1 Le Séquençage manuel. ( <sup>T77</sup> Sequencing™ kit Pharmacia. 27-1682-01).....	65
II.4.4.1.1 Principe du séquençage.....	65
II.4.4.1.2 Réactions de séquençage.....	65
II.4.4.2 Le Séquençage automatique.....	67

<b>BIBLIOGRAPHIE</b>
----------------------



# *Introduction*



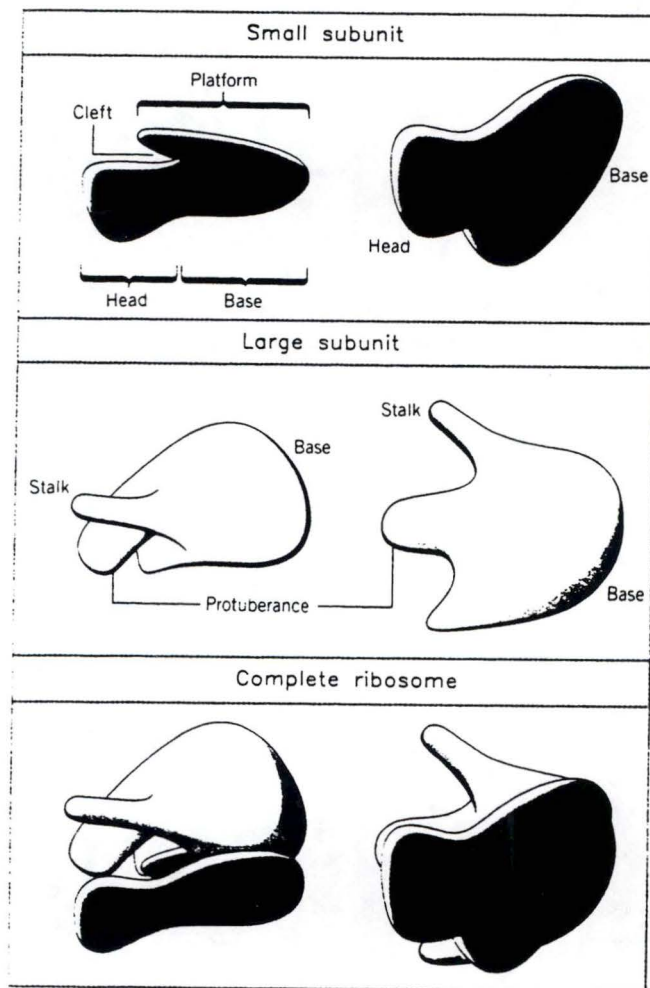


Figure 1: Modèle structural du ribosome (*E. coli*).

# INTRODUCTION

## I. Identification et rôle(s) des gènes assurant la diméthylation ribosomique.

### I.1 Aperçu général des structure, fonction et biogenèse du ribosome.

#### I.1.1 Structure et fonction ribosomiale.

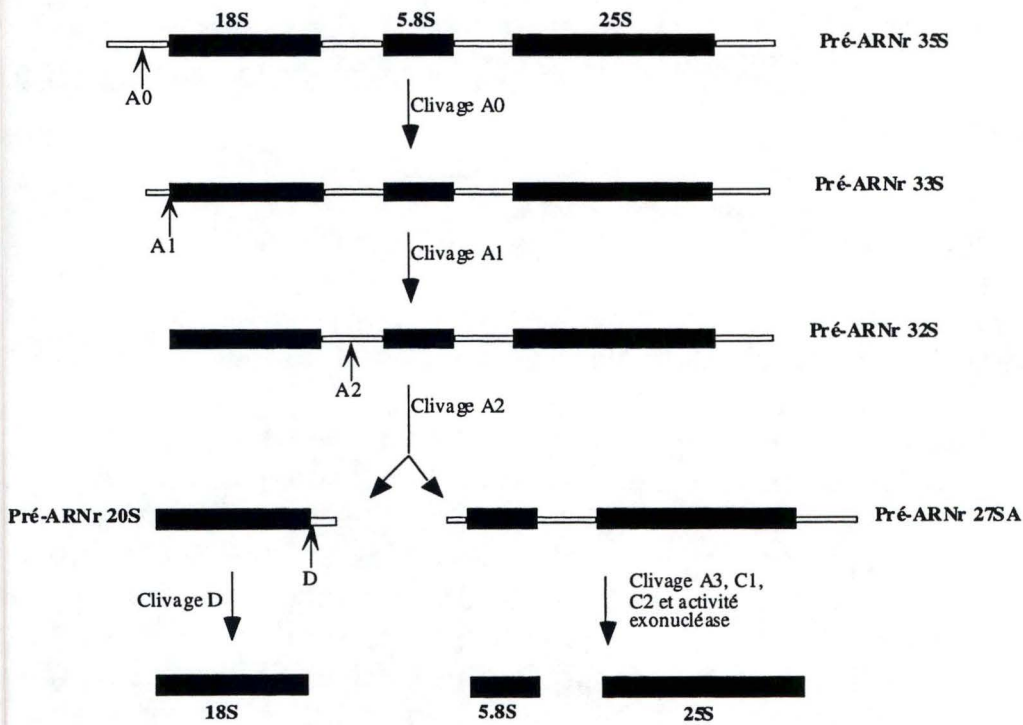
Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique responsable de la traduction des ARNm en peptides. Il se divise en deux sous-unités: une petite et une grande sous-unité, chacune constituée d'un ou plusieurs ARN ribosomiques (ARNr) et de nombreuses protéines presque toutes en une seule copie. Le tableau 1 établit une comparaison succincte de la composition des ribosomes pro- et eucaryotiques. On voit ainsi que la petite sous-unité (40S) du ribosome cytoplasmique chez la levure est constituée d'un ARNr 18S et de 33 protéines ribosomiales. La grande sous-unité (60S) est constituée d'un ARNr majeur 26S, de deux ARNr mineurs (l'ARNr 5.8S et l'ARNr 5S), et de 49 protéines.

Ribosome	Sous-unité	ARNr	Protéines
Bactérien (70S) masse: $2.5 \cdot 10^6$ d 66% RNA	50S	23S et 5S	31
	30S	16S	21
Eucaryotique (80S) masse: $4.2 \cdot 10^6$ d  60% RNA	60S	26S; 5.8S; et 5S	49
	40S	18S	33

Tableau 1: Composition des différentes sous-unités ribosomiales chez le procaryote et l'eucaryote.

Un modèle de structure du ribosome procaryote (Lake *et al.*, 1976) présente la petite sous-unité comme ayant une forme allongée et asymétrique, tandis que la grande sous-unité aurait une forme plus sphérique avec une protubérance centrale (Figure 1); les deux sous-unités s'assemblant au niveau de la plateforme. Une étude récente (Verschoor *et al.*, 1996) a montré qu'il existait des homologues de structure globales très importantes entre le ribosome procaryote et eucaryote ce qui ne fait que confirmer la très grande conservation structurale observée par ailleurs au niveau des composants tels les s-ARNr adoptant une structure secondaire et probablement aussi tertiaire très semblable.

A.



B.

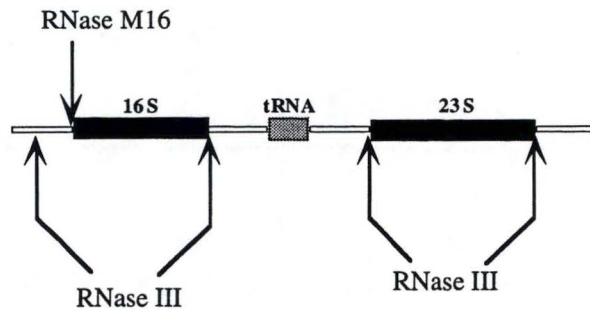


Figure 2:

A: "Processing" du pré-ARNr chez *S. cerevisiae*.

Le pré-ARNr 35S est séquentiellement clivé au sites A0, A1 et A2. Ce dernier clivage sépare les pré-ARNr de la petite et de la grande sous-unité. Le précurseur 20S va être clivé au site D donnant ainsi naissance à l'ARNr 18S. Le pré-ARNr 27S quant à lui, va subir un "processing" exo- et endonuléolytique afin de générer les ARNr 5.8S et 25S.

B: "Processing" du pré-ARNr chez *E. coli*.

Le "processing" du transcrit primaire chez *E. coli* se produit principalement par clivage par la RNase III ainsi que par la RNase M16.



## I.1.2 La biogenèse du ribosome.

La biogenèse du ribosome implique la synthèse et la maturation des ARN ribosomiques ainsi que leur assemblage stoéchiométrique avec les protéines ribosomiales (cfr. tableau 1).

La maturation des pré-ARNr (ou transcrit primaire) comporte le "processing"<sup>1</sup> et la modification chimique des résidus nucléotidiques. Des similitudes existent à ce niveau entre pro- et eucaryotes (Figure 2). Pour ce qui concerne en particulier *S. cerevisiae*, des progrès récents ont été enregistrés dans la connaissance des étapes essentielles du "processing". On sait en effet que les ARNr 18S, 26S et 5.8S sont issus d'un précurseur, le pré-ARNr 35S, transcrit par la RNA polymérase I. L'ARNr 5S quant à lui, est transcrit par la polymérase III et subit une maturation séparée. Comme montré dans la figure 2, le pré-ARNr 35S subit différents clivages exo- et endonucléolytiques. De nombreux renseignements concernant les facteurs agissant *in trans* ont été collectés ces dernières années grâce essentiellement à l'étude de mutants. Il a ainsi pu être montré que quelques protéines ainsi que de nombreux snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein particle) sont impliqués dans les différentes étapes de "processing". Ces snoRNP sont constitués d'une partie protéique et d'un petit ARN nucléolaire (snoRNA). Chose intéressante, il a été prouvé (Zagorski *et al.*, 1988) que la maturation de certains snoRNA impliquait les mêmes facteurs *trans* que ceux participant à la maturation ribosomiale. Cela suggérerait donc un mécanisme commun de régulation entre les snoRNA et l'ARNr.

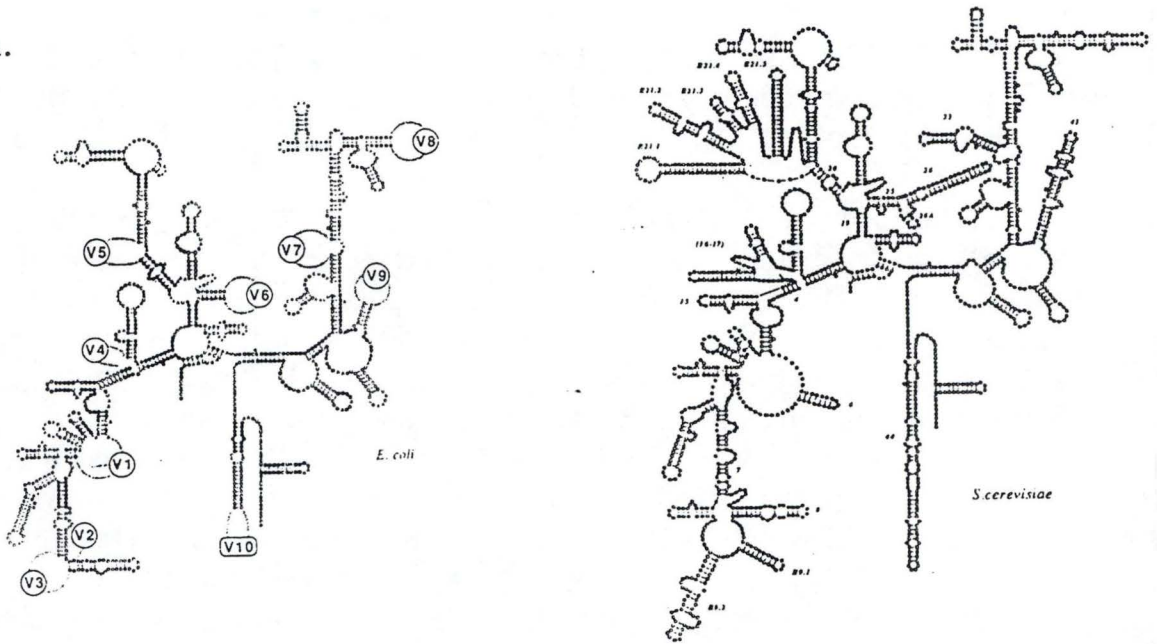
Outre ce "processing", les ARNr subissent également différentes modifications parmi lesquelles la méthylation est sans aucun doute la plus étudiée. Cette méthylation a lieu chez la levure majoritairement en position 2'-O du ribose mais peut également se produire au niveau des bases. Malgré le fait que ces méthylations aient lieu dans des régions de structure secondaire fortement conservée (figure 3) et que certaines sont conservées chez le procaryote comme chez l'eucaryote, leur rôle reste obscur.

Il est apparu depuis peu (Tollervey, 1996) qu'un rôle important concernant la spécificité de ces méthylations soit joué ici aussi par les snoRNA. Certaines familles de snoRNA servent en effet de guide lors de la méthylation de l'ARNr (Peculis *et al.*, 1996). Ces snoRNA pourraient d'un part, s'apparier spécifiquement à une séquence du pré-ARNr et d'autre part, s'associer à la méthylase via un site de fixation protéique. Il pourrait s'établir ainsi une interaction transitoire avec la méthylase, ou voire même la formation d'un complexe snoRNP, positionnant ainsi l'enzyme par rapport au pré-ARNr.

---

<sup>1</sup> Dans la suite de ce travail, nous entendrons par "processing" les différentes étapes de clivage des pré-ARNr.

A.



B.

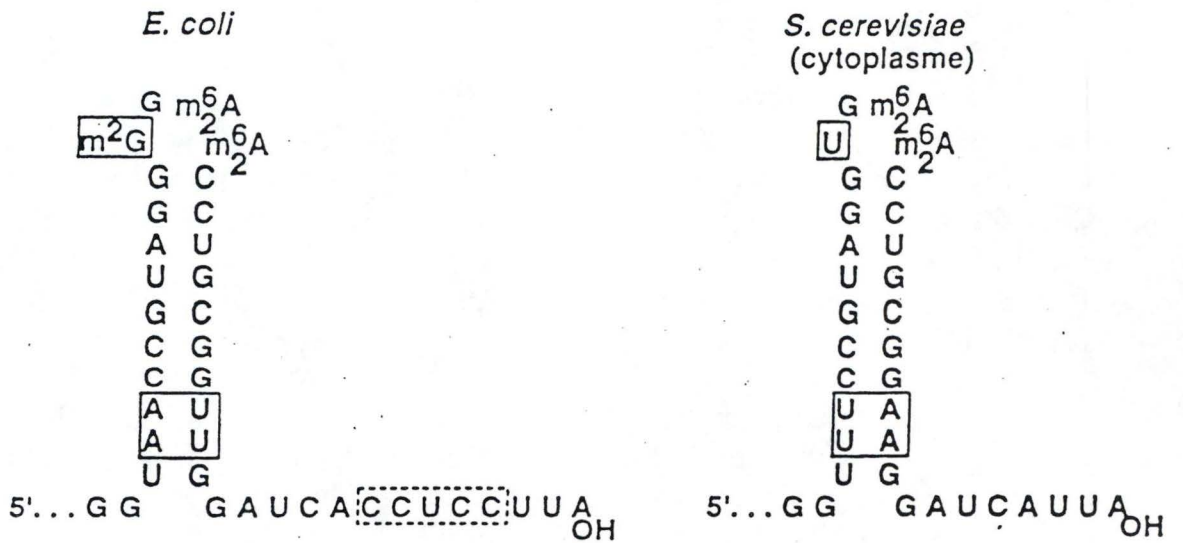


Figure 3:

A: Structure secondaire de l'ARNr 16S d'*E. coli* (à gauche) et de l'ARNr 18S de *S. cerevisiae* (à droite).

B: Comparaison de séquences et de méthylation des résidus  $A_{1518}$ ,  $A_{1519}$  d'*E. coli* (à gauche) et  $A_{1779}$ ,  $A_{1780}$  de *S. cerevisiae* (à droite) situés à l'extrémité 3' de l'ARNr de la petite sous-unité.



Tout au long de ces différentes étapes de "processing" et de modification, une ribonucléoparticule va se former par un assemblage progressif et coopératif d'ARNr avec les r-protéines. Chacune de ces liaisons, se faisant de manière permanente ou non, va induire un changement conformationnel du complexe en voie de formation. Certaines protéines étant incapables de se lier à de l'ARNr nu, cela suggère donc que c'est la conformation qui est reconnue, et non l'ARNr seul. En outre, il a également été démontré (Thammana *et al.*, 1974) que la conformation des ARNr jouait un rôle crucial pour leur propre modification. Ainsi, on sait que l'ARNr 16S seul ne peut servir de substrat lors de sa méthylation mais doit impérativement être lié à différentes protéines ribosomiales. La méthylation elle-même peut conditionner l'interaction avec des partenaires. A titre d'exemple, citons le rôle connu de méthylation discrète d'ARNr dans la sensibilité du ribosome à divers amino-glycosides (Helser *et al.*, 1972).

Il est important de souligner qu'une protéine liée transitoirement ou non au pré-ribosome peut jouer un rôle à la fois dans la biogenèse, tel par exemple l'assemblage, et également dans le fonctionnement du ribosome mature. Certaines modifications post-transcriptionnelles qui incluraient notamment la méthylation  $m^2A_{2503}$  de l'ARNr 23S d'*E. coli*, par exemple, sont clairement impliquées dans l'assemblage mais aussi dans la fonction de la grande sous-unité ribosomique (Green et Noller, 1996).

En résumé, la formation du ribosome est une suite de clivages, de modifications et d'assemblages d'ARNr et de protéines impliquant de nombreux facteurs et se produisant de manière séquentielle et coopérative.

## I.2 Les gènes encodant la diméthylase de l'extrémité 3' du s-ARNr.

### I.2.1 Le gène *ksgA* d'*E. coli*.

Même s'il existe une très grande conservation des résidus modifiés chez les eucaryotes (l'homme et la levure ont 17 modifications en commun sur 21), il n'en est pas de même entre les procaryotes et les eucaryotes. Il n'ont en effet qu'une seule modification commune dans la petite sous-unité ribosomiale au site  $m^6_2A_{1518}$   $m^6_2A_{1519}$  de l'ARNr 16S (Figure 3). A l'exception des ribosomes de chloroplastes d'*Euglena gracilis* et des mitoribosomes, cette modification de l'extrémité 3' de l'ARNr de la petite sous-unité est totalement conservée au cours de l'évolution (Van Knippenberg *et al.*, 1984). Différents groupes ont pu montrer que la diméthylation  $m^6_2A_{1518}$   $m^6_2A_{1519}$  se situe au niveau de l'interface des deux sous-unités (plateforme) où se localise l'ARNm au cours de la traduction.

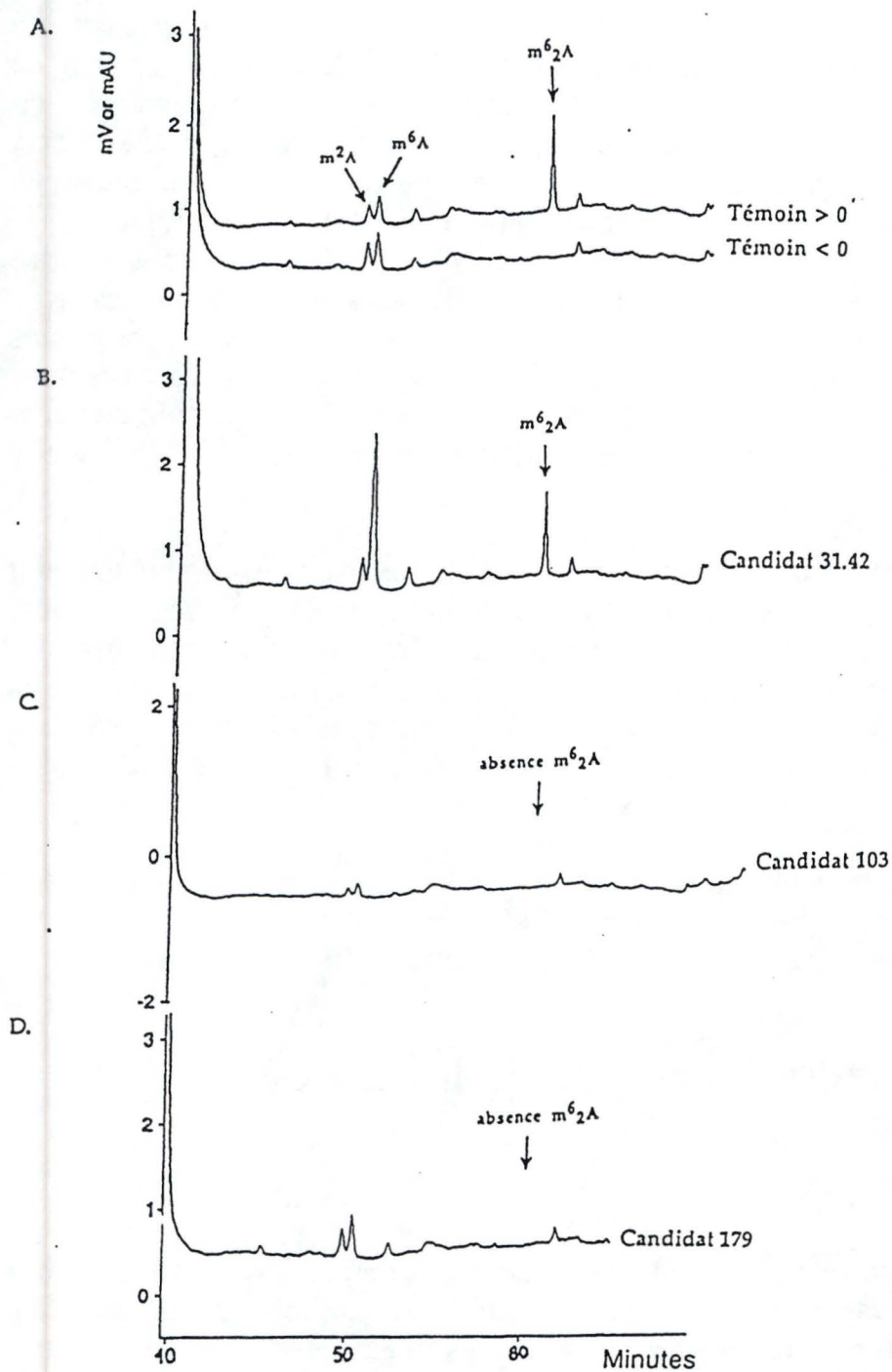


Figure 4: Profils HPLC des nucléosides de l'ARNr 16S isolés d'un mutant d'*E. coli* *KsgA*<sup>-</sup> transformé par:  
 A: Contrôle positif (plasmide pourtant l'allèle sauvage du gène *KsgA*)  
 Contrôle négatif.  
 B: pGIDL 31.42.  
 C: pGIDL 103.  
 D: pGIDL 179.



Dès 1971 (Helser *et al.*, 1971), la présence de la double diméthylation était reconnue comme responsable de la sensibilité à l'antibiotique kasugamycine inhibiteur de la traduction. Les souches non méthylées aux sites A<sub>1518</sub> et A<sub>1519</sub> sont en effet résistantes à la kasugamycine. L'existence de ces mutants naturels permit plus tard le clonage (par complémentation au moyen d'une banque sauvage d'*E. coli*) du gène *ksgA* responsable de cette modification (Van Knippenberg *et al.*, 1984).

Le processus de méthylation par la protéine *ksgAp* se déroulerait comme suit: cette enzyme interagirait fortement avec la sous-unité 30S non diméthylée. Une fois liée, elle méthylerait l'ARNr 16S, utilisant la S-adénosyl-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle. Cette modification entraînerait alors une augmentation de l'affinité de la sous-unité 30S pour le facteur d'initiation de la traduction (IF3) ainsi que pour la sous-unité 50S. Le recrutement de cette sous-unité 50S déplacerait finalement *ksgAp* (Van Knippenberg *et al.*, 1987).

Cette donnée associée à la localisation de la double diméthylation, laisse penser que les modifications m<sup>6</sup><sub>2</sub>A jouent un rôle dans l'initiation de la traduction. Dans le même ordre d'idée, d'autres données tentent à démontrer que la méthylation faciliterait l'interaction Shine-Dalgarno impliquée dans la reconnaissance de l'ARNm et du ribosome chez le procaryote. Ces rôles n'étant bien entendu pas essentiels comme le montre la viabilité du mutant *ksgA* d'*E. coli*.

### I.2.2 Le gène *DIM1* de *S. cerevisiae*.

Le gène *scDIM1* a été cloné au laboratoire par complémentation hétérologue d'un mutant *ksgA* chez *E. coli* (Lafontaine *et al.*, 1994).

Trois clones différents assurant une restauration de la sensibilité à la kasugamycine ont été clonés: le pGIDL31.42, le pGIDL103 et le pGIDL179. Le séquençage a permis de localiser une phase ouverte de lecture (ORF) de 957 paires de bases dans le pGIDL31.42 correspondant à la diméthylase *DIM1*. De plus, une analyse en HPLC de l'ARNr 16S des transformants par ce plasmide (Figure 4) a permis de mettre en évidence une restauration de la double diméthylation de l'extrémité 3' de l'ARN 16S chez *E. coli*.

Pour le pGIDL103 et le pGIDL179, aucune méthylation n'a pu être observée. Il s'agirait donc vraisemblablement de suppresseurs hétérologues du phénotype de résistance à la kasugamycine et non d'homologues de *ksgA*.



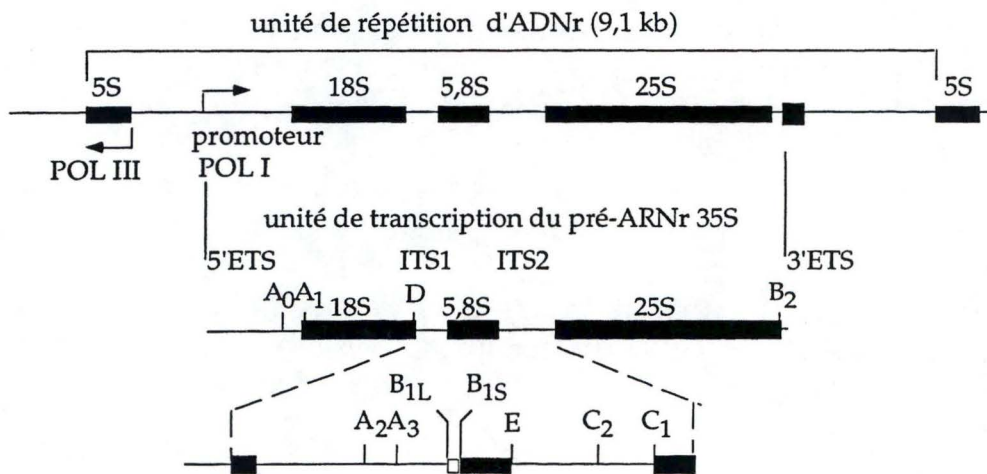


Figure 5: Structure de l'ADNr chez *S. cerevisiae* (Venema et Tollervey, 1995).

Le pré-ARNr 35S est transcrit par l'ARN polymérase I à partir de 140 à 200 unités de répétitions de l'ADNr. Ce pré-ARNr est bordé en 3' et en 5' de deux séquences transcrites externes (ETS = External Transcribed Spacers). Les séquences codant pour les ARNr 18S, 5.8S et 25S sont séparées par deux ITS (Internal Transcribed Spacers). Les sites de clivages A1 et A2 dans lesquels Dim1p intervient se situent respectivement dans le 5'ETS pour A1 et dans l'ITS1 pour A2.

### I.3 Indications en faveur du rôle double de Dim1p et de l'existence de partenaires.

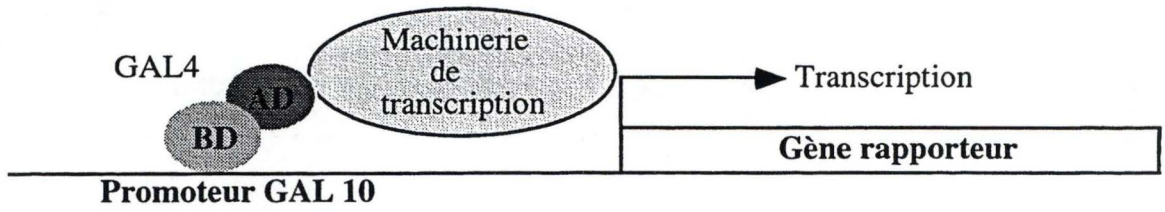
Contrairement au modèle procaryotique, l'initiation de la traduction chez l'eucaryote n'implique pas de reconnaissance Shine-Dalgarno mais implique que la sous-unité 40S du ribosome se déplace à partir de l'extrémité 5' coiffée jusqu'au premier AUG où débute la traduction (Kozak, 1983).

Au vu de cette différence et sachant le rôle que jouerait la méthylation au niveau de la reconnaissance Shine-Dalgarno chez le procaryote, il est donc vraisemblable que la double diméthylation, dont Dim1p est responsable, ne joue pas le même rôle chez les eucaryotes. De plus, il a été prouvé que contrairement au mutant *ksgA<sup>-</sup>*, un disruptant pour le gène *DIM1* n'est pas viable, ce qui démontre le caractère essentiel de *DIM1* chez la levure.

L'étude du rôle de Dim1p (Lafontaine *et al.*, 1995) a montré qu'indépendamment de son rôle de diméthylase, cette protéine intervenait dans le "processing" ribosomal au niveau des sites A1 et A2 situés de part et d'autre du pré-ARNr 20S (Figure 5). Le caractère crucial de cette étape a pour conséquence que seuls les ARNr méthylés se retrouvent dans les ribosomes matures. Cependant, le "processing" comme tel semble se faire en l'absence de ces modifications comme le suggère la création d'un mutant *cis* ne montrant pas de défaut de "processing" malgré le remplacement des deux adénosines diméthylées par des guanines non diméthylables. Cela tend donc à prouver que ce n'est pas la méthylation qui est impliquée dans la réaction de "processing" aux sites A1 et A2 mais une autre fonction liée à la protéine Dim1p *per se*.

L'existence de ces différents rôles joués par la protéine Dim1p, ajoutée aux données concernant la biogenèse et le fonctionnement du ribosome, a amené à penser que des interactions géniques avec Dim1p pourraient jouer un rôle dans la modulation de ses fonctions. En effet, il faut se rappeler que l'assemblage du ribosome, tout comme son "processing", sont conditionnés par de nombreuses interactions. La recherche de facteurs pouvant interagir avec Dim1p a donc été entreprise.

## Système transcriptionnel eucaryotique



## Le principe du double-hybride

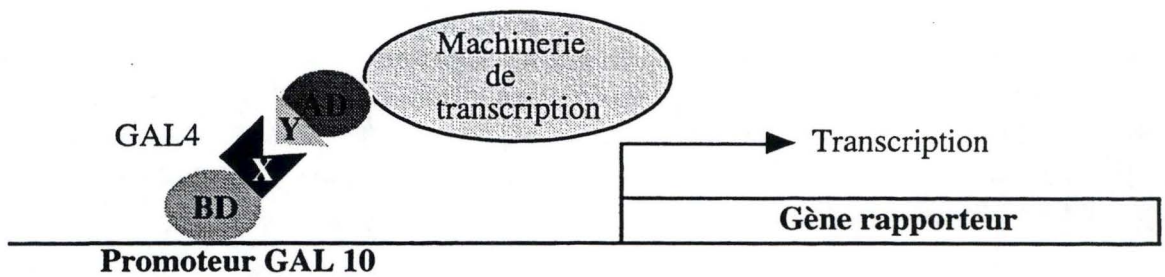
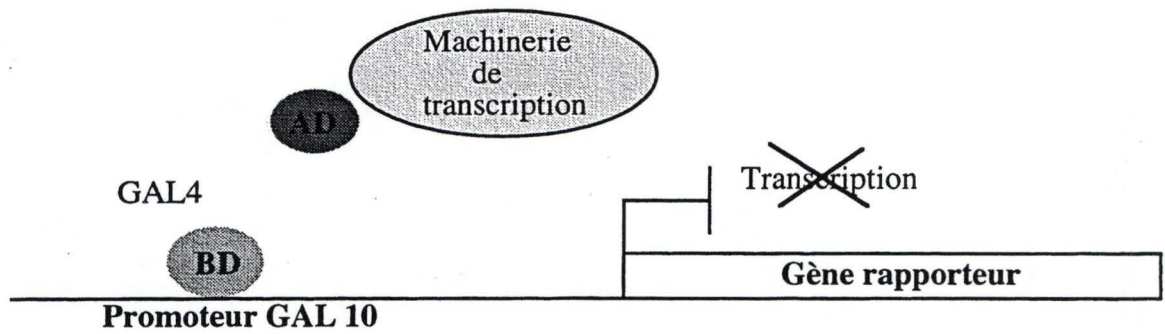


Figure 6: Principe du système double-hybride.



## II. La recherche de partenaires de Dim1p.

### II.1 Aperçu des approches biochimiques et génétiques.

La recherche de partenaires met en oeuvre des approches diverses dont quelques-unes seront mentionnées ci-dessous.

#### II.1.1 Les approches biochimiques.

##### II.1.1.1 La chromatographie d'affinité.

Il s'agit d'une méthode basée sur les interactions spécifiques pouvant exister entre protéines. Une protéine d'intérêt est fixée de manière covalente à un support solide (un gel de sépharose par exemple). Un mélange protéique est ensuite mis en contact avec ce support. Après plusieurs lavages, seules les protéines ayant une affinité suffisante pour la protéine d'intérêt restent fixées au support et sont finalement éluées par divers moyens.

##### II.1.1.2 La co-immunoprécipitation.

Le principe de cette méthode est de précipiter, au moyen d'anticorps, la protéine d'intérêt avec toute autre macromolécule qui y est fixée. Pour cela, après lyse des cellules, un extrait protéique est incubé avec les anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt et le complexe immun formé est ensuite précipité. L'analyse des constituants de ce complexe est réalisée par gel SDS-PAGE.

#### II.1.2 Les approches génétiques.

##### II.1.2.1 La méthode du double-hybride (Figure 6).

Ce système mis au point par Fields et Song en 1989, est une méthode utilisant, *in vivo*, l'activité transcriptionnelle d'un rapporteur comme révélateur d'une interaction protéine-protéine. Ce système est basé sur le modèle suivant: les activateurs de transcription chez l'eucaryote comportent deux domaines distincts: un domaine d'activation (Activation domain=AD) et un domaine de liaison à l'ADN (Binding domain=BD). L'"Activation domain" n'étant pas capable de se fixer à l'ADN et le "binding domain" ne pouvant à lui seul activer la transcription, la séparation de ces deux domaines entraîne une perte de fonction de l'activateur transcriptionnel.



Figure 7: Un modèle explicatif de la thermosensibilité.



Dans le système du double-hybride, le domaine de liaison à l'ADN est fusionné à la protéine d'intérêt X (Dim1p par exemple); tandis que le domaine d'activation est fusionné à une protéine Y. Dans ce cas, un complexe activateur pourra être reconstitué si, et seulement si, Y interagit physiquement avec la protéine d'intérêt.

En pratique, un gène rapporteur est mis, dans une souche de levure, sous contrôle d'un activateur transcriptionnel (*GAL 4*). Cette souche est ensuite co-transformée par deux vecteurs d'expression codant respectivement pour la fusion "Binding domain"-protéine d'intérêt et pour la fusion "Activation domain" et une banque de cDNA (contenant Y). Cette souche étant délétée pour le gène *GAL4*, il n'y a expression du rapporteur que si Y se lie physiquement à la protéine d'intérêt, reformant ainsi l'activateur transcriptionnel.

### II.1.2.2 La recherche de suppresseurs de mutants conditionnels.

#### a) Qu'est-ce qu'un mutant conditionnel ?

Une fonction biologique est souvent analysée par la disruption d'un gène et l'observation du phénotype résultant. Néanmoins, on entrevoit très vite les limites de cette approche génétique dans le cas de gènes essentiels, puisque leur disruption entraîne la mort de l'organisme. Une solution à ce problème a été fournie, dès 1948, par N.H. Horowitz préconisant que l'exploration de fonctions biologiques essentielles pouvait se faire via l'étude de mutants conditionnels.

On entend par "mutant conditionnel", un organisme qui exprime un phénotype sauvage dans certaines conditions, dites **permissives**, mais qui, par contre, dans des conditions appelées **restrictives** (ou non permissives), exprime un phénotype mutant. Ces conditions permissives ou restrictives pouvant être obtenues, par exemple, par le pH, la température, l'osmolarité ou encore, la composition du milieu.

Les plus étudiés de ces mutants sont, sans aucun doute, les mutants thermosensibles (ts). De tels mutants résultent en règle générale d'une modification de la séquence peptidique entraînant une déstabilisation de la protéine aux températures non permissives. Un modèle simpliste de ce phénomène est présenté en figure 7. Il est à noter que ces mutations entraînant le caractère thermosensible pouvant être ponctuelles, il est possible que des allèles différents affectent des fonctions différentes d'une même protéine multifonctionnelle.

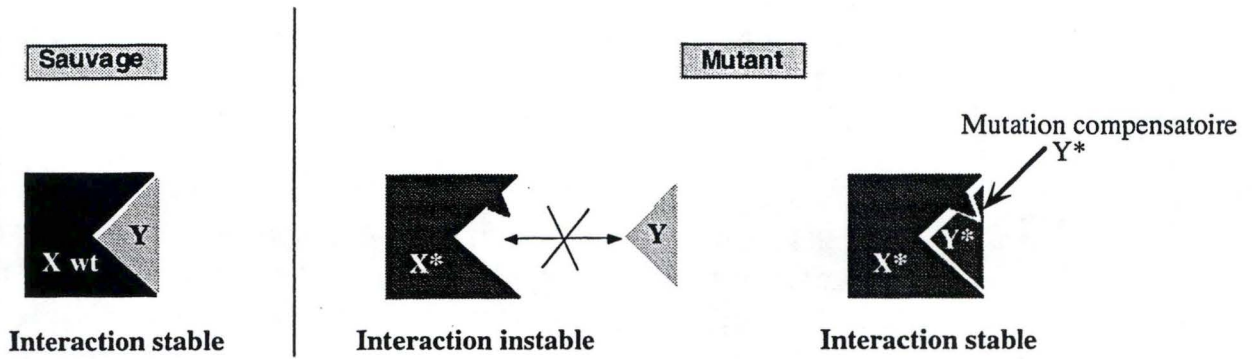
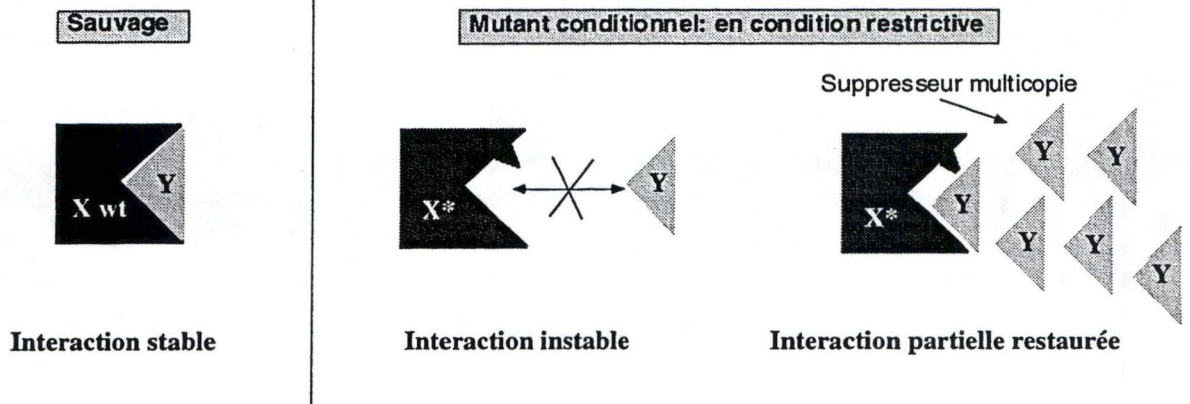


Figure 8: Suppression par mutation compensatoire.

a) Le cas d'une interaction physique



b) Le cas d'une interaction fonctionnelle

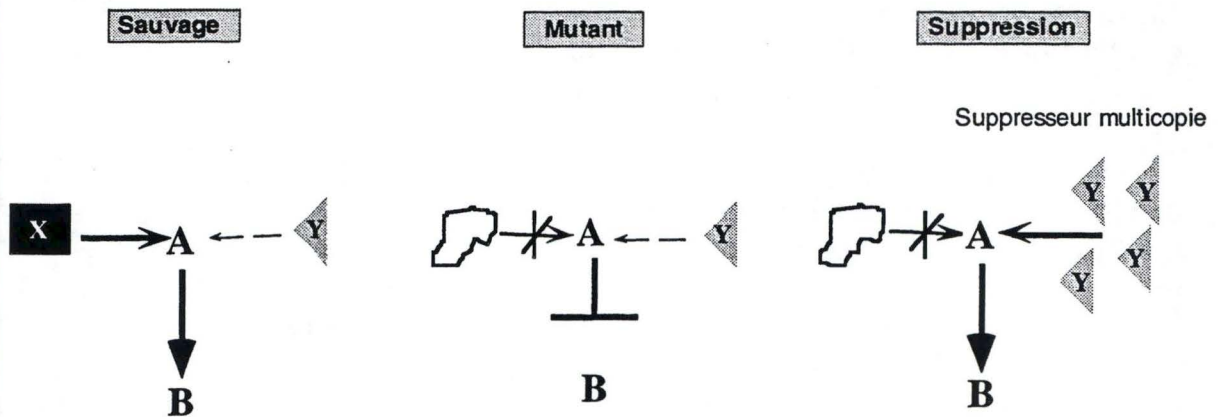


Figure 9: Suppression par dosage génique.



Mentionnons qu'à coté des **mutants conditionnels pour la fonction**, où la protéine est synthétisée en quantité normale mais se trouve être défective pour une ou plusieurs de ses fonctions (défaut qualitatif), existe également des **mutants d'expression**. Dans ce cas, le caractère mutant est lié à un défaut de synthèse de la protéine (défaut quantitatif).

#### b) Exemples de suppression d'un mutant conditionnel.

La suppression d'un phénotype mutant, comme par exemple la thermosensibilité pour la croissance, peut résulter de phénomènes divers. Seule la suppression indirecte<sup>2</sup> pouvant être mise à profit dans la recherche de partenaires, sera développée ici.

Un tel type de suppression implique qu'un ou des facteurs, non alléliques, interagissent de façon physique ou fonctionnelle avec le produit de l'allèle muté, cette interaction ayant comme conséquence la restauration du phénotype sauvage. Quelques illustrations de ce phénomène sont données ci-dessous:

#### Exemple 1: La suppression indirecte par **mutation compensatoire**.

Cet exemple (figure 8) décrit le cas où X et Y, formant un complexe fonctionnel, le phénotype causé par une mutation dans X (X\*) peut être supprimé par une "contre-mutation" dans la protéine Y (Y\*). La mutation de Y\* est alors appelée mutation compensatoire ou suppressive.

#### Exemple 2: La suppression par **dosage génique**.

La figure 9 illustre deux cas dans lesquels la suppression d'un mutant X\* est dépendante du nombre de copies d'un partenaire Y. Cette suppression liée au taux cellulaire de la protéine Y peut résulter:

- Soit d'une **interaction physique** avec X\* (figure 9a). Cet exemple illustre comment une augmentation de la concentration en Y pourrait favoriser la reformation du complexe en compensant la perte d'affinité induite par la mutation initiale.
- Soit d'une **interaction fonctionnelle** (figure 9b). Cet exemple parmi d'autres nous indique que la surexpression de la protéine Z lui confère un rôle semblable à X supprimant ainsi le phénotype mutant.

---

<sup>2</sup> Ce type de suppression est appelée indirecte par opposition à la suppression directe où la protéine touchée par une première mutation se voit "réparée" par une seconde mutation. Cette suppression directe peut être extragénique par changement de spécificité d'un ARNt ou intragénique par mutation compensatoire au sein de l'ORF du gène mutant lui-même.



En conclusion, la suppression d'un mutant conditionnel X\* par dosage génique résulte d'une interaction génique où les différents partenaires interagissent physiquement entre eux ou, alternativement, où les fonctions qu'ils assurent sont en interaction. Cette suppression peut être liée de façon qualitative ou quantitative à l'expression d'un partenaire.

## II.2 La suppression appliquée à la recherche de partenaires de Dim1p.

La recherche de supprimeurs par dosage génique consiste donc à transformer le mutant conditionnel par un plasmide multicopie exprimant le gène potentiellement supprimeur. On peut procéder au départ d'une banque plasmidique sauvage ou tester directement des gènes candidats.

### ***Description des différents candidats:***

#### A) Les clones pGIDL103 et pGIDL179.

Comme il a été décrit au point I.3.1, ces deux candidats ont été clonés en même temps que *DIM1* par un test de complémentation chez *E. coli*. Leur séquençage n'ayant montré aucune homologie de séquence avec la diméthylase Dim1p, il s'agit vraisemblablement de supprimeurs hétérologues du mutant *ksgA*<sup>-</sup> d'*E. coli*. Nous avons donc décidé de tester la suppression chez la levure.

#### Le pGIDL103.

Ce plasmide de 12 Kb contient deux gènes: le gène *SCS 3* encodant une protéine intervenant dans la synthèse des phospholipides inositol et, le gène *YGL125W* codant pour un homologue de la méthylène-tétrahydrofolate réductase impliquée dans la synthèse de la S-adénosyl-méthionine (SAM).

#### Le pGIDL179.

Ce plasmide de 11 Kb contient une ORF complète, codant pour la protéine ribosomiale L17A, ainsi que les 3600 premières paires de bases du gène *TEL1*. Ce gène code pour une kinase qui serait impliquée dans le maintien de la longueur du télomère. Il est à noter que le domaine kinase de cette protéine n'est pas encodé dans les 3600 paires de base du gène *TEL1* (10 Kb), se trouvant dans le pGIDL179.

B) Le pYCL 31C<sup>3</sup>.

Ce plasmide contient une seule ORF qui code pour une maturase ("rrp6 p") impliquée aux sites de clivage A1 et A2 du pré-ARNr 33S. Cette enzyme agissant aux mêmes sites de clivage que Dim1p (cfr. point I.3), elle apparaît comme un candidat suppresseur potentiel.

C) Le pYHR 21C et pYKL 156W<sup>3</sup>.

Ces deux plasmides codent respectivement pour la protéine ribosomiale S27 A et pour la protéine ribosomiale S27 B. Ces deux plasmides ont été isolés par A. Baudin comme suppresseurs d'un mutant conditionnel pour le gène *RRP6*.

Dans le cadre de ce mémoire, le clonage de partenaires de Dim1p a été entrepris par la recherche de suppresseurs de mutants conditionnels parmi ces cinq candidats suppresseurs.

---

<sup>3</sup> Ces plasmides ont été aimablement fournis par A. Baudin travaillant au centre CNRS de Gif sur Yvette (Département du Professeur Lacroute).

*Zeit du travail*



## BUT DU TRAVAIL

La biogenèse du ribosome implique l'établissement de très nombreuses liaisons souvent coopératives entre différents composants; certaines de ces liaisons étant définitives et d'autres, transitoires, le partenaire d'interaction quittant alors la particule ribonucléoprotéique après y avoir exercé son rôle. Ces associations faibles peuvent induire des trans-conformations d'assemblage mais s'accompagnent également de modifications covalentes telles la méthylation ou le clivage de l'ARNr.

On conçoit aujourd'hui que ce processus complexe est à toutes ses étapes multipartite. Il est clair que l'exercice des fonctions ribosomiques lui-même repose pour une part sur la structure et donc sur la présence de l'ensemble des composants correctement assemblés via ces mêmes interactions établies en cours de biogenèse. Ainsi, la disposition correcte d'une r-protéine dans un précurseur, ou une modification chimique intervenant sur un résidu donné pourrait conditionner la reconnaissance d'un site de la maturation par l'enzyme chargée d'effectuer la réaction mais aussi, les interactions fonctionnelles, par exemple avec des facteurs de traduction, qui impliquent ce domaine du ribosome dans son fonctionnement.

Dans ce contexte, la protéine Dim1p de *S. cerevisiae* est en quelque sorte à considérer comme une protéine de liaison transitoire à la particule ribonucléoprotéique qu'est le ribosome. En effet, si la fonction première qui lui donne son nom est la diméthylation de l'ARN ribosomique, elle possède en outre, comme des travaux antérieurs l'ont montré une fonction de maturase et ce, vraisemblablement en participant à des complexes ribonucléoprotéiques associés au pré-ARNr.

L'hypothèse que l'exercice de ce double rôle implique des partenaires nous a incité à rechercher ceux-ci par une approche génétique. Dans ce but, ce travail met en oeuvre la suppression phénotypique, au moyen de différents gènes candidats, du caractère conditionnel pour la croissance de mutants d'expression ou de perte de fonction de *dim1*.

# *Résultats*

# RESULTATS

## I. Test de supresseurs potentiels d'un mutant conditionnel d'expression.

### I.1 Historique de la souche *GAL10::dim1*.

*DIMI* étant essentiel chez la levure, la création d'un mutant conditionnel s'est avérée nécessaire pour l'étude fonctionnelle de la protéine Dim1p (Lafontaine *et al.*, 1995). Pour rappel, un mutant conditionnel pour la croissance se développe comme le sauvage dans des conditions dites permissives mais marque un défaut (éventuellement létal) de croissance dans des conditions dites restrictives (ou non-permissives).

Le mutant *GAL10::dim1* (YDL150-9), créé à l'EMBL par D. Lafontaine, voit l'expression de Dim1p régulée par la source de carbone du milieu. Cela a été réalisé en plaçant l'unique copie du gène *DIMI* sous le contrôle d'un promoteur inductible *GAL10* de levure. Concrètement, cela signifie que sur un milieu contenant du galactose, le gène *DIMI* est exprimé, alors qu'en présence de glucose, son expression est réprimée.

Différents tests de croissance, autant en milieu solide que liquide, ont permis de mettre en évidence que la souche *GAL10::dim1* marque un retard de croissance sur milieu glucose par rapport à la souche sauvage. Il est à noter que pour observer ce retard de croissance, chaque colonie doit être resuspendue dans environ 50  $\mu$ l d'eau stérile et diluée entre  $10^2$  et  $10^4$  fois, dont quelques microlitres sont déposés en gouttes sur milieux permissif et restrictif. Leur croissance est ensuite comparée.

La recherche de supresseurs d'un tel mutant conditionnel par transformation d'une banque n'est dès lors pas réalisable. Nous avons donc effectué des tests de suppression du défaut de croissance de ce mutant avec seulement quelques candidats supresseurs potentiels.



## I.2 Test de candidats supresseurs potentiels.

Les pGIDL103 et pGIDL179, décrits précédemment (chapitre Introduction, point II.2.A), portent tous deux leur insert dans une matrice pFL44S (marqueur *URA3*). Le test de suppression du phénotype de retard de croissance de la souche *GAL10::dim1 (URA3, leu2)* a donc nécessité au préalable de recloner ces inserts dans une matrice *LEU2*. Ces deux constructions sont respectivement appelées pGIVV3 (insert du pGIDL103) et pGIVV4 (insert du pGIDL179).

### I.2.1 Construction du pGIVV3 et pGIVV4.

Ce changement de marqueur va être réalisé par sous-clonage des inserts minimums des pGIDL103 et pGIDL179 dans un vecteur pFL46S portant le marqueur *LEU2*.

Le pGIVV3.

Il avait précédemment été mis en évidence que la séquence du pGIDL103 responsable de la restauration de la sensibilité à la kasugamycine chez *E. coli*, correspondait au gène *YGL125W* (homologue du gène *MTRH* encodant la méthylène-tétrahydrofolate réductase). Un fragment de 4500 paires de bases contenant ce gène a donc été sous-cloné dans le pFL46S selon la procédure décrite en annexe A.

Le pGIVV4.

Une expérience préliminaire nous a montré qu'un fragment du pGIDL 179 correspondant à l'extrémité 5' du gène *TEL1* était responsable de la suppression chez *E. coli* (résultat non montré). Le sous-clonage de cet insert dans le pFL46S est détaillé en annexe B.

### I.2.2 Test de suppression phénotypique.

La souche *GAL10::dim1* a été transformée:

- par les deux candidats supresseurs (pGIVV3 et 4)
- par un matrice pFL46S (contrôle négatif).
- par le pGIIIH501 portant l'allèle sauvage de *DIM1* (contrôle positif).

Les différents transformants sont resuspendus dans 50 µl d'eau stérile. Leur croissance est testée en gouttes (dilutions  $10^2$  et  $10^4$ ) sur un milieu galactose (conditions permissives) et sur un milieu glucose (conditions restrictives). Les résultats sont présentés ci-dessous dans la figure 9.

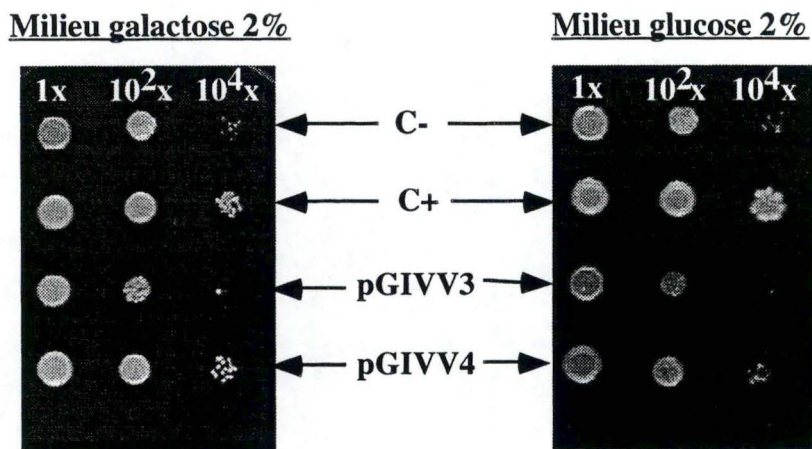


Figure 9: Test de suppression du phénotype conditionnel de la souche YDL150-9.

Les gouttes sont déposées sur milieu sans uracile ni leucine galactose 2% (condition permissive) et sur milieu sans uracile ni leucine glucose 2% (condition restrictive) et incubées 36h à 30°C. Les dilutions réalisées sont : 1 (pour la resuspension d'une colonie dans 50 µl d'eau),  $10^2$  et  $10^4$  fois.

Ce test nous montre un retard de croissance sur milieu glucose (dilution  $10^4$ ) entre le contrôle positif (grosses colonies) et le contrôle négatif (petite colonies). Cette différence de taille n'étant pas observable sur milieu galactose, nous pouvons en conclure que le retard de croissance entre les contrôles positif et négatif est bien lié à la répression transcriptionnelle du gène *DIM1*.

Les différents candidats testés montrent une croissance similaire au contrôle négatif en condition restrictive (colonies de petite taille), nous ne constatons donc pas d'effet de suppression dans les conditions du test.



### En conclusion:

Aucune suppression du phénotype de retard de croissance de la souche YDL150-9 en condition de répression du promoteur *GAL10* (sur milieu glucose) n'a pu être montrée pour les différents candidats. Le surdosage de ces deux protéines ne permet donc pas de supprimer le défaut conditionnel de croissance résultant de la diminution de la concentration de Dim1p.

Une interprétation serait que ces protéines ne sont pas des partenaires de Dim1p. Alternativement, il se peut qu'elles le soient mais que le nombre de complexes effectifs qu'elles forment avec Dim1p soit insuffisant pour restaurer une fonction indispensable à la croissance du fait de la quantité limitante du partenaire Dim1p lui-même. En d'autres termes, ce type de mutant conditionnel par défaut quantitatif de Dim1p pourrait s'avérer impossible à "sauver" en suppression phénotypique par dosage génique si la concentration de Dim1p est limitante pour sa fonction. *A priori*, cette situation peut-être attendue en particulier pour des fonctions non enzymatiques comme celle, précisément essentielle, attribuée à la protéine Dim1p *per se* dans la biogénèse.

Au vu de ces résultats, la recherche de supresseurs d'autres mutants conditionnels a été envisagée. La création d'allèles ts pouvant, comme il a déjà été montré, n'affecter que certaines fonctions d'une protéine, la suppression allèle spécifique devrait fournir des partenaires distincts de complexes fonctionnels à rôle spécifique. Un schéma du type de mécanisme de suppression en cause a été proposé à la figure 9.

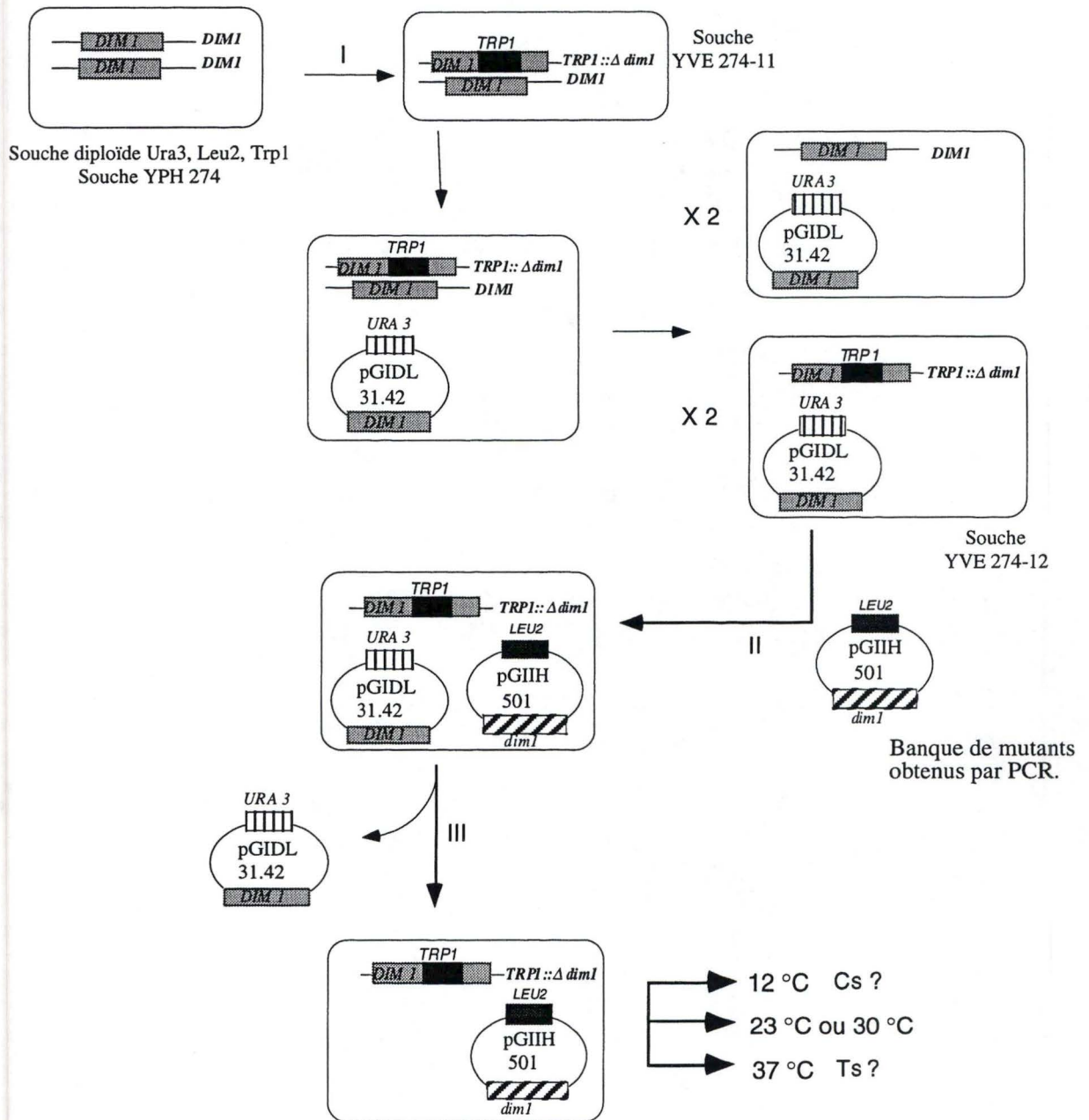


Figure 10: Construction des souches *dim1* ts.

I. Construction d'une souche hôte haploïde par disruption d'une copie chromosomique du gène *DIM1*, introduction d'une copie sauvage plasmidique et sporulation. Les spores *TRP1::Δdim1* sont sélectionnées sur milieu synthétique complet sans tryptophane ni uracile.

II. Transformation par une banque de mutants aléatoires obtenus par PCR.

III. "Plasmid shuffling" et sélection sur milieu 5-FOA.



## II. Test de supresseurs potentiels de mutants *dim1* ts plasmidiques.

### II.1 Historique: la création d'allèles thermosensibles pour le gène *DIMI*.

La création d'allèles thermosensibles de *Dim1p* (Réalisée par V. Evrard en 1995) comprend les étapes suivantes (figure 10):

(I) La première étape consiste à construire une souche haploïde où la copie chromosomique du gène *DIMI* est disruptée par un marqueur d'auxotrophie *TRP1*. Pour ce faire, la souche diploïde YPH 274 portant les marqueurs *leu2*, *ura3* et *trp1*, a été disruptée par le marqueur *TRP1* pour un de ses allèles *DIMI* par la méthode de "one-step gene disruption" (Rothstein, 1985). Après vérification de l'intégration de la construction *TRP1::Δ dim1*, l'hétérozygote (YVE 274-11) a été transformé par le plasmide pGIDL31.42 portant une copie sauvage *DIMI* ainsi qu'un marqueur de sélection *URA3*. Les transformants ont ensuite été mis sur milieu de sporulation. Les haploïdes portant la mutation *TRP1::Δ dim1* (YVE 274-12) sont sélectionnés pour leur phénotype *URA3* et *TRP1*.

(II) La seconde étape a consisté en la création d'une banque plasmidique de mutants aléatoires pour le gène *DIMI*. Cette banque a été réalisée *in vitro* par PCR en conditions mutagénéisantes sur l'ORF de *DIMI* laquelle fut ensuite clonée dans le pGIIH501 portant un marqueur *LEU2*.

(III) La recherche d'allèles *dim1* ts a été réalisée par transformation de la banque de mutants dans la souche YVE 274-12. Le but étant de remplacer ensuite par "plasmid shuffling" (Budd *et al.*, 1987) la copie plasmidique sauvage (marqueur *URA3*) par la copie mutante (marqueur *LEU2*). Pour sélectionner cet événement, les transformants sont repiqués sur un milieu contenant de l'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA). Le 5-FOA étant converti en un produit toxique par l'enzyme orotidine-5'-phosphate décarboxylase encodée par le gène *URA3*, seules les cellules contenant un plasmide *LEU2* portant une copie mutée *dim1* fonctionnelle peuvent passer ce crible. Leur éventuel caractère thermosensible ou cryosensible (cs) est analysé par repiquage sur trois boîtes: une boîte à 23°C (condition permissive); une boîte à 37°C et une à 14°C (conditions restrictives).

Treize allèles thermosensibles potentiels pour le gène *DIMI* ont été isolés.



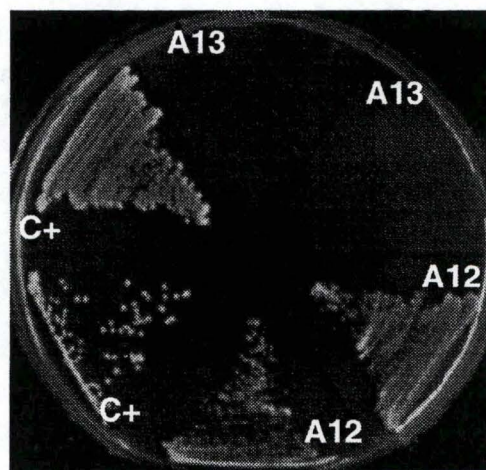


Figure 11: Sélection de la perte du plasmide pGIDL31.42(*URA3*) sur milieu 5-FOA.  
Stries sur milieu synthétique complet sans tryptophane ni leucine plus 5-FOA de la souche YVE274-12 transformée par l'allèle A12, l'allèle A13 et par le pGIIH501 (C+).

## II.2 Vérification et choix de différentes souches ts.

### II.2.1 Vérification du caractère plasmide-lié des phénotypes ts.

Nous avons commencé par vérifier que le caractère ts observé pour nos treize souches était bien "plasmide-lié" et non dû, par exemple, à une mutation secondaire d'un locus chromosomique.

Dans ce but, ces différents plasmides ont été re-transformés dans la souche YVE 274-12. L'étape ultérieure de "plasmid shuffling" a été réalisée comme mentionné au point II.2.1 (3). Deux passages sur milieu 5-FOA plus concentré (1.5g par litre) ont été effectués pour garantir la perte du plasmide *URA3 pGIDL31.42*.

Après cette vérification, seuls dix candidats ont été retenus comme véritables ts liés à la présence du plasmide portant le gène *dim1* muté. Deux candidats (A1 et A6) ont en effet "perdu" leur phénotype thermosensible et le candidat (A13) s'est avéré incapable de croître sur milieu synthétique complet + 5-FOA (figure 11).

### II.2.2 Le choix des allèles ts.

Le phénotype ts des clones à utiliser pour la recherche de suppresseurs doit impérativement être très net, en particulier si on souhaite rechercher des suppresseurs dans une banque génomique. Sans cette précaution, on risquerait en effet de retenir nombre de faux positifs témoignant simplement d'une atténuation purement fortuite du caractère ts, au départ peu marqué, et non due à une suppression.

Plusieurs colonies isolées pour chaque allèle ts sont testées en conditions permissives et en conditions restrictives. Ces tests ont été réalisés comme suit:

- Chaque colonie est d'abord striée en condition permissive sur milieu synthétique complet sans tryptophane et sans leucine. Une répétition de cette étape préliminaire à partir de colonies isolées va nous permettre de partir d'une population clonale au cours des tests ultérieurs.

- A partir de ces clones, des stries sont réalisées sur différentes boîtes milieu synthétique complet sans tryptophane et sans leucine. Le contrôle positif utilisé est une souche haploïde portant un allèle chromosomique *TRP1:: $\Delta$ dim1* transformée par le pGIIH501 portant le gène sauvage.



- Pour chaque allèle, quatre boîtes sont incubées à différentes températures (12°C-23°C-30°C-37°C). Un exemple de résultats obtenus pour les températures 30°C et 37°C est présenté à la figure 12.

Comme aucune différence phénotypique n'a été observée entre les cultures à 23°C et à 30°C, la température de 30°C a été retenue comme température permissive par la suite.

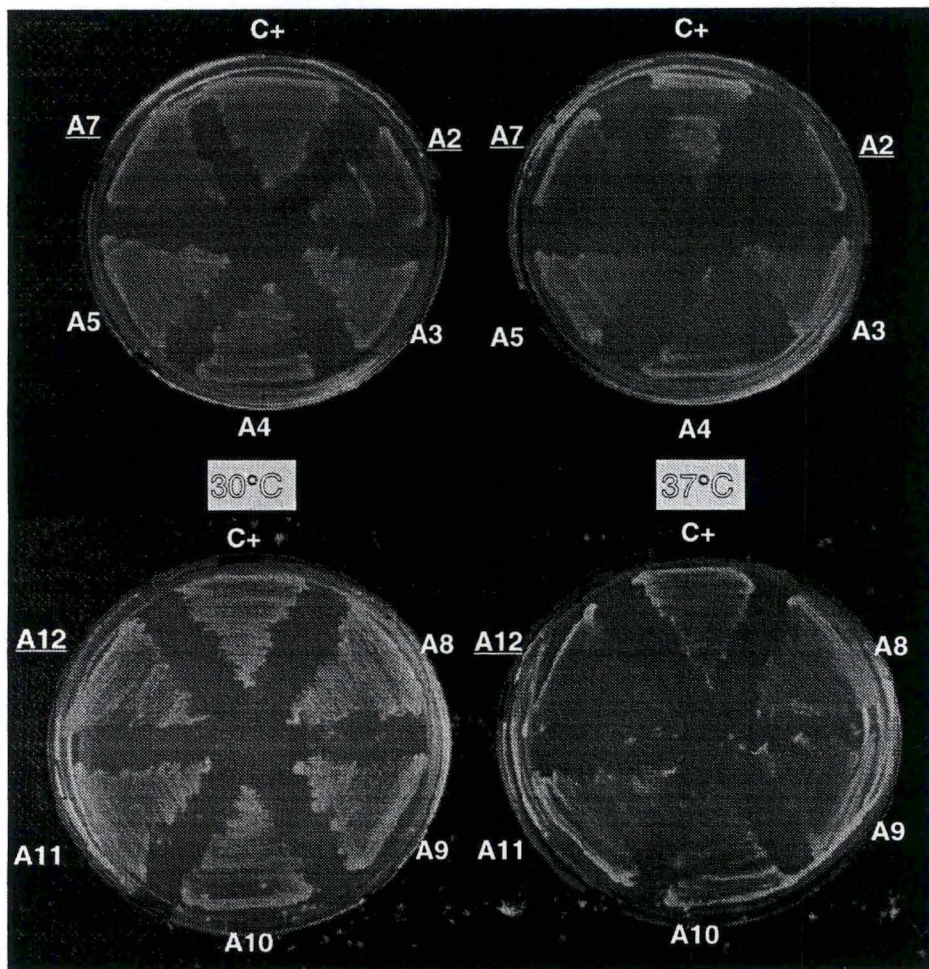


Figure 12: Test du caractère thermosensible des différents allèles.

Des stries à partir de colonies isolées ont été réalisées sur milieu synthétique complet sans tryptophane ni leucine (sélection du plasmide portant l'allèle *ts*). Les boîtes sont ensuite incubées aux températures permissives et restrictives. Les allèles thermosensibles qui ont été retenus par la suite sont soulignés.

Les allèles A2, A7 et A12 ont été retenus pour leur caractère thermosensible tranché. Aucun phénotype cryosensible n'a pu être détecté (résultat non montré).



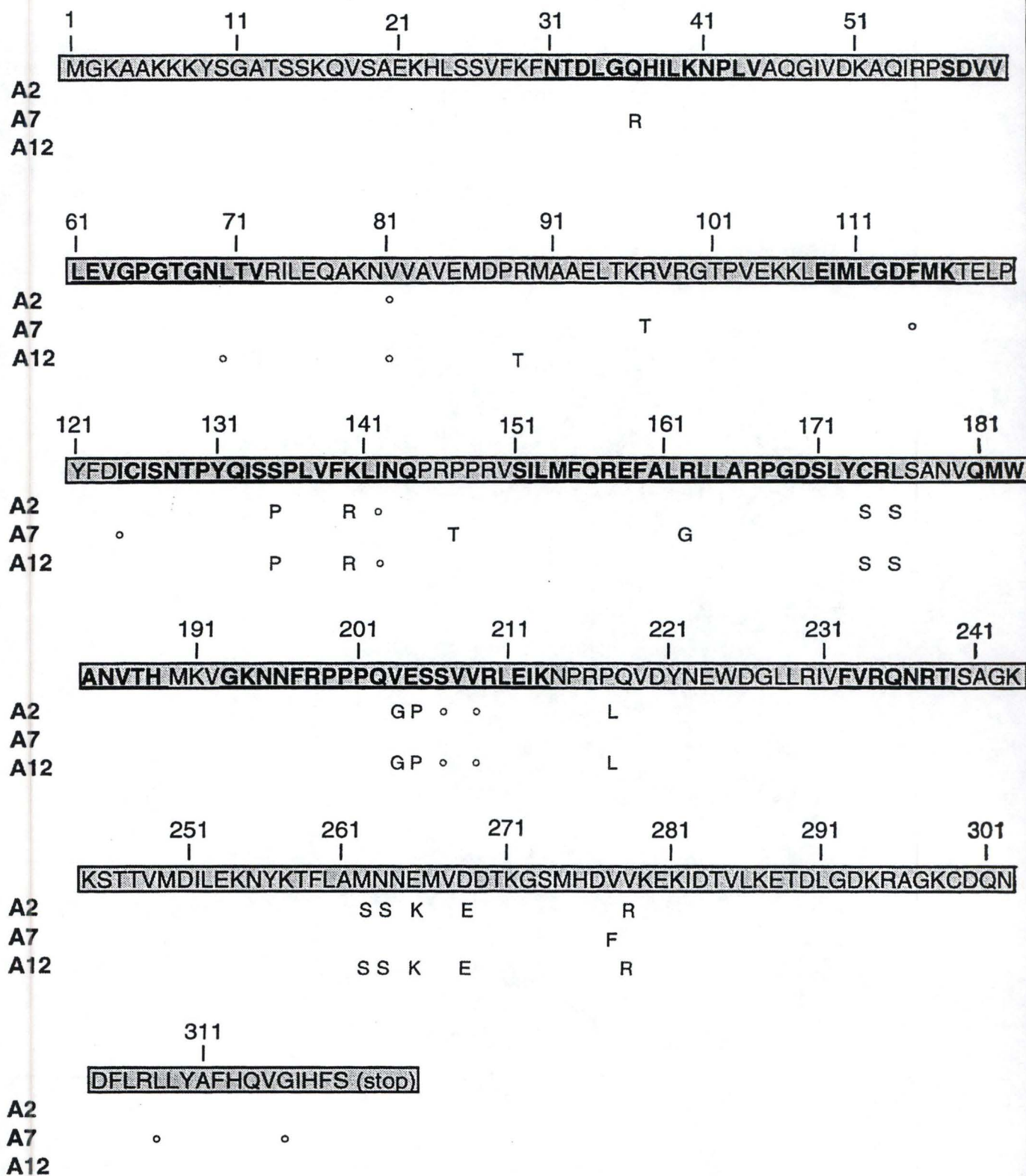


Figure 13: La séquence peptidique de la protéine Dim1p sauvage est présentée avec les régions conservées en gras. Les acides aminés modifiés dans les trois allèles (A2, A7, A12) sont notés par leur symbole; ° indique les mutations silencieuses.

L'identification des mutations de ces trois allèles ts a été réalisée par séquençage (voir ci-dessous).

### II.2.3 Séquençage de ces différents allèles.

La séquence des trois allèles thermosensibles (A2, A7 et A12) du gène *DIMI* a été obtenue par séquençage automatique (cfr. chapitre Matériel et méthodes). Ces réactions ont été faites par PCR à partir de six primers se trouvant sur les deux brins du gène. L'examen des séquences a permis de mettre en évidence les différentes mutations (Figure 13).

Deux catégories de mutations peuvent être distinguées:

(1) Les mutations silencieuses résultant du changement d'un codon en un codon redondant.

(2) Les mutations non silencieuses. Ces mutations peuvent affecter ou non la structure protéique selon qu'elles résultent en un remplacement d'un acide aminé par un autre de nature physico-chimique différente ou au contraire similaire.

Le tableau ci-dessous résume les modifications dans chaque allèle ts.

#### Allèle A2.

	<b>Codon redondant</b>	<b>Mutation en a.a. similaire</b>	<b>Mutation en a.a. NON similaire</b>
Codon n°	81	140	135
	142	203	173
	206	263	175
	208	268	204
			217
			262
			265
			278

#### Allèle A7.

	<b>Codon redondant</b>	<b>Mutation en a.a. similaire</b>	<b>Mutation en a.a. NON similaire</b>
Codon n°	114	277	36
	124		97
	308		147
	316		162



### Allèle A12.

	<b>Codon redondant</b>	<b>Mutation en a.a. similaire</b>	<b>Mutation en a.a. NON similaire</b>
Codon n°	70	140	89
	81	203	135
	142	263	173
	206	268	175
	208		204
			217
			262
			265
			278

Il apparaît que les différents allèles ont un nombre élevé de mutations (entre 9 et 18 codons mutés). Cette multiplicité de mutations interdit évidemment la possibilité d'attribuer sans équivoque à l'une ou l'autre de celle-ci la responsabilité du caractère ts.

Notons la très grande similitude entre les allèles A2 et A12 (le mutant A12 ne possède que deux mutations supplémentaires aux codons 70 et 89). Cette similitude s'étant vérifiée au plan des effets phénotypiques, seules les données concernant l'allèle A12 seront rapportées dans la suite du travail.

En conclusion de cette étape préliminaire, nous pouvons donc dire que les candidats A7 et A12 sont deux allèles différents, thermosensibles pour le gène *DIM1*.

### II.3 Test de suppression phénotypique des allèles *dim1* ts plasmidiques par les candidats potentiels.

Pour rappel, les cinq candidats mis à notre disposition, et considérés *a priori* comme candidats supprimeurs, sont:

- Le pGIDL103 (insert: gène *YGL125W* codant pour un homologue de la méthylène-tétrahydrofolate réductase et gène *SCS3*).
- Le pGIVV1 (insert: fin de l'ORF du gène *L17A* et les 3600 premières paires de bases du gène *TEL1* provenant du pGIDL179 (cfr. annexe C)).

Ces deux plasmides ont été clonés comme supprimeurs d'un mutant *ksgA* chez *E. coli*.

- Le pYCL 31C (insert: gène codant pour la protéine "rrp6 p")
- Le pYHR 21C (insert: gène codant pour la protéine ribosomiale S27 A)
- Le pYKL 156W (insert: gène codant pour la protéine ribosomiale S27 B)



La protéine "rrp6 p" est une maturase intervenant aux sites de clivage A1 et A2 de pré-ARNr 33S. Les deux protéines ribosomiales ont été isolées par un test de suppression d'un mutant conditionnel pour le gène *RRP6*. Ces trois clones sont considérés comme candidats supprimeurs en raison du fait que leurs inserts encodent des protéines en relation directe ou indirecte avec les sites de clivage dans lesquels Dim1p intervient.

Chaque plasmide a été transformé dans la souche de levure YVE 274-12 contenant le plasmide A7 (YVE 274-12-A7) ou le plasmide A12 (YVE 274-12-A12). Le pGIDL31.42 a été utilisé comme contrôle positif et le plasmide pFL44S a été utilisé comme contrôle négatif.

Les transformants ont été sélectionnés sur milieu synthétique complet sans tryptophane, sans leucine et sans uracile et sont incubés à la température permissive de 30°C pendant trois jours.

Des gouttes sont alors réalisées comme suit: des colonies de ces différents transformants sont resuspendues dans 50µl d'eau stérile, dont 5µl sont prélevés et déposés sur différentes boîtes incubées à 30°C (température permissive) et à 37°C (température restrictive). Les résultats pour la recherche de supprimeurs parmi les candidats *a priori* dans les souches YVE274-12-A7 et YVE274-12-A12 sont présentés respectivement aux figures 14 et 15.

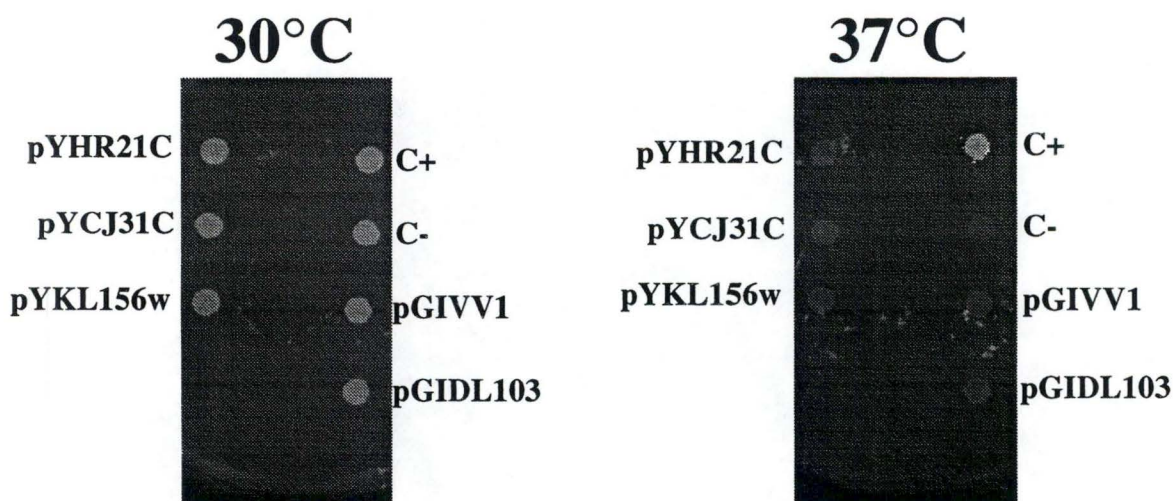


Figure 14: Recherche de supprimeurs dans la souche YVE 274-12-A7.

Les gouttes sont réalisées sur milieu synthétique complet sans tryptophane, leucine ni uracile et sont incubées à 30°C (température permissive) et à 37°C (température restrictive).



L'analyse de la figure 14 nous permet de constater que le contrôle positif ne montre pas de retard de croissance à 37°C; par contre, le contrôle négatif se développe sensiblement moins bien à cette température. Ces données vérifient donc le caractère thermosensible de l'allèle A7.

Par comparaison des taux de croissance à 30°C et à 37°C par rapport aux différents contrôles, nous concluons qu'aucun des différents candidats testés n'entraîne de suppression significative du phénotype thermosensible. Aucun partenaire potentiel n'a donc pu être mis en évidence lors de ces expériences.

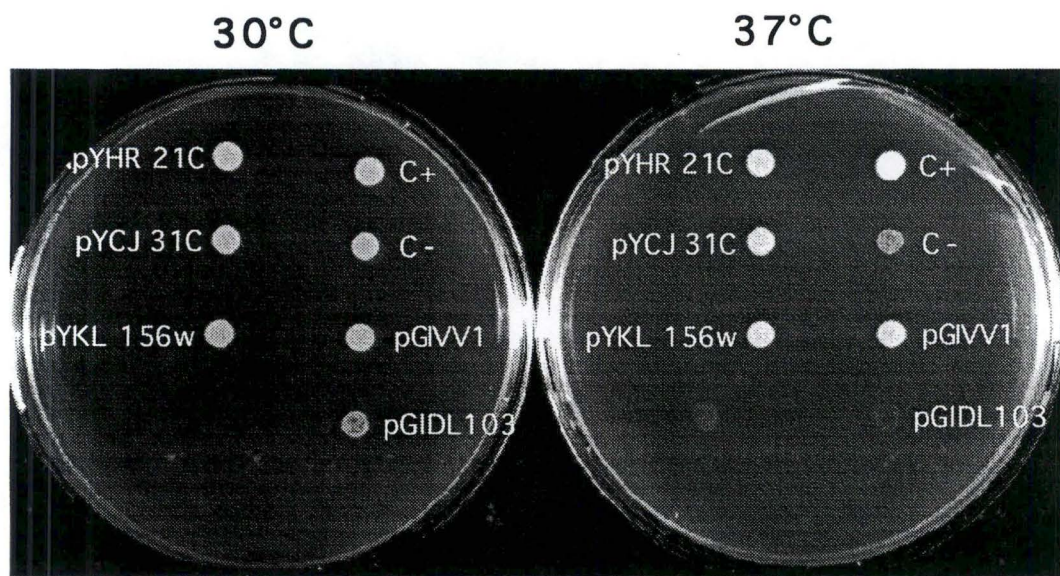


Figure 15: Recherche de supresseurs dans la souche YVE 274-12-A12.

Les gouttes sont réalisées sur milieu synthétique complet sans tryptophane, leucine ni uracile et sont incubées à 30°C (température permissive) et à 37°C (température restrictive).

La figure 15 nous montre, comme ce fut le cas pour l'allèle A7 (cfr. Figure 14), le caractère thermosensible de l'allèle A12.

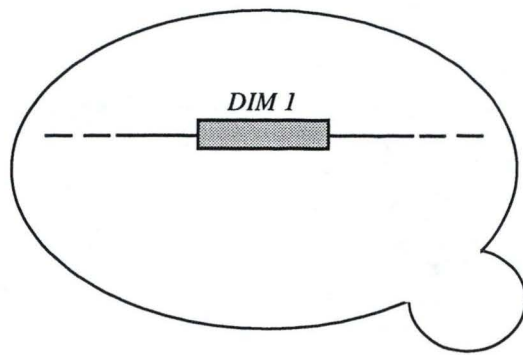
Une suppression très nette du caractère ts restaurant le phénotype normal (contrôle positif figure 15) s'observe lors des transformations de la souche YVE274-12-A12 par les plasmides pYHR21C; pYCL31C; pYKL156W et pGIVV1. Nous pouvons donc en conclure qu'une expression de ces différents candidats permet la suppression du phénotype thermosensible lié à la présence de l'allèle muté A12 plasmidique.

**En conclusion:**

Quatre supresseurs du mutant A12 plasmidique, mais aucun pour le mutant A7, ont donc pu être identifiés par les tests de candidats *a priori*.

Nous avons voulu confirmer le caractère supresseur dans des conditions plus "physiologiques" c'est-à-dire où l'intégration de l'allèle muté A12 au locus chromosomique du gène *DIMI* a été réalisée. Nous intégrerons également l'allèle A7 pour vérifier s'il peut être "supprimé" ou non dans ces conditions.





Souche  
YPH 252

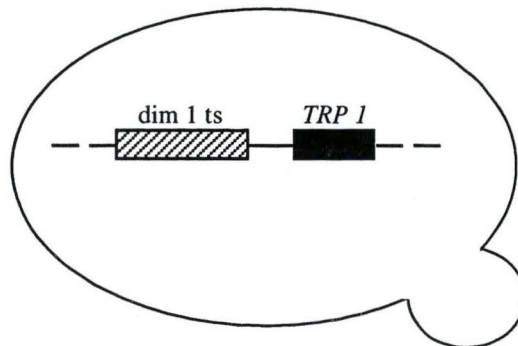
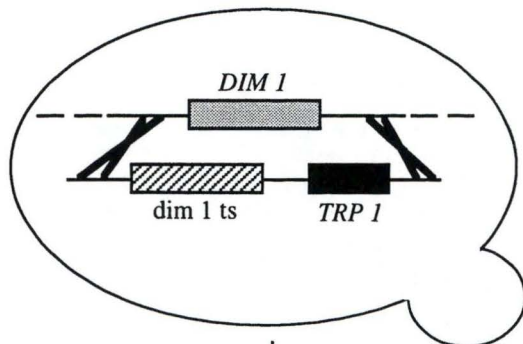
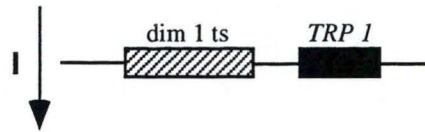


Figure 16: Technique d'intégration des allèles *dim 1 ts*.

I. Transformation de la souche YPH252 par les différents allèles *dim 1 ts*.

II. Les transformants sont sélectionnés sur milieu synthétique complet sans tryptophane.

### III. Test de suppresseurs potentiels dans les allèles ts intégrés.

#### III.1 Intégration et étude des allèles *dim1* ts A7 et A12.

##### III.1.1 Intégration dans la souche YPH 252 (Figure 16).

L'intégration a été réalisée par "transplacement" de l'allèle ts au locus du gène sauvage *DIM1* de la souche haploïde YPH 252 (*ura3, trp1, leu2*). Les différentes étapes nécessaires à cette intégration sont décrites ci-dessous:

*Clonage d'un marqueur de sélection TRP1 en 3' des allèles thermosensibles.*

Le sous-clonage d'un marqueur *TRP1* (cfr. Annexe C) en 3' de l'allèle *dim1* ts est rendu nécessaire afin de pouvoir suivre l'événement de "transplacement" de l'allèle sauvage par le mutant au locus chromosomique. Ces différentes constructions ont été appelées pGIVV57 pour l'allèle A7 et pGIVV512 pour l'allèle A12.

*Intégration dans la souche YPH 252.*

Ces plasmides ont été restreints de façon à libérer un fragment linéaire de 3400pb contenant *dim1 ts-TRP1*. Celui-ci a ensuite été transformé par électroporation (cfr. chapitre Matériel et méthodes) dans la souche haploïde YPH 252. Ce fragment n'ayant aucun moyen de se répliquer (fragment "suicide"), on sélectionne sur milieu sans tryptophane les cellules ayant intégré la construction *dim1 ts-TRP1*.

*Sélection des intégrants thermosensibles.*

Pour chacun des allèles, 25 transformants ont été testés. Chacun de ces transformants a été resuspendu dans 50 µl d'eau stérile dont 5 µl ont été déposés sur milieu sans tryptophane et incubés respectivement à 23°C et à 37°C. La souche de départ YPH 252 transformée par le pFL39 (marqueur *TRP1*) a été utilisée comme contrôle positif dans ce test de croissance.

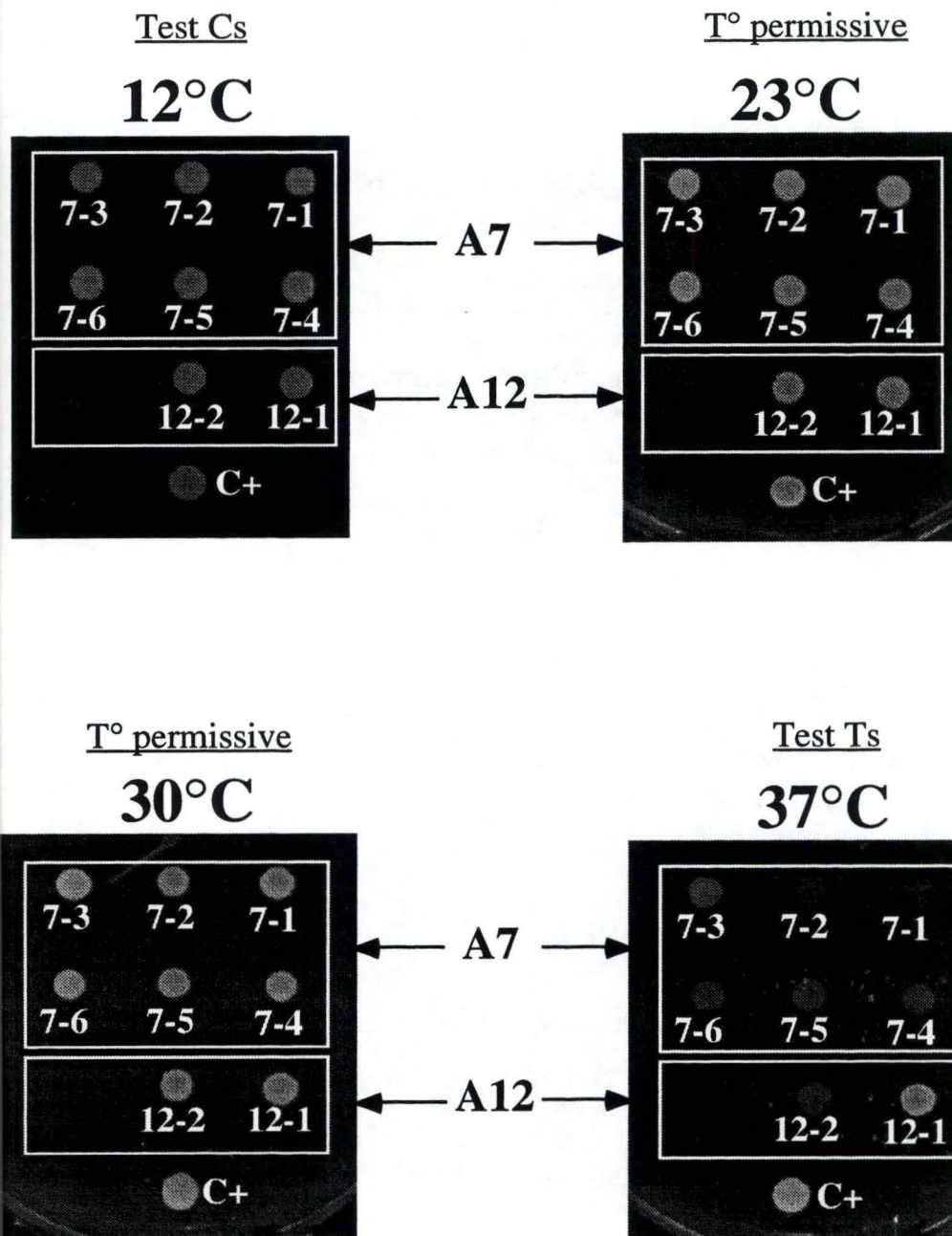


Figure 17: Test du caractère ts ou cs de différents intégrants *dim1-TRP1*.

Les gouttes ont été réalisées sur milieu synthétique complet sans tryptophane et incubées de 36 à 72 heures aux différentes températures.

Les six candidats pour l'allèle A7 sont numérotés dans la figure de 7-1 à 7-6.

Les deux candidats pour l'allèle A12 sont numérotés dans la figure de 12-1 à 12-2.

C+ indique le contrôle positif (souche YPH 252 transformée par une matrice pFL39).



Une comparaison de leur croissance relative à 23°C et 37°C par rapport au contrôle positif a permis d'isoler six candidats ts pour l'allèle A7 (numérotés de 7-1 à 7-6) et deux candidats pour l'allèle A12 (numérotés de 12-1 à 12-2). Leur phénotype a été testé une nouvelle fois ultérieurement (cfr. Figure 17).

### III.1.2 Choix des températures non-permissives (cs et ts).

Différentes températures (12°C, 23°C, 30°C, 37°C, 39°C) ont été testées pour nos huit candidats afin de choisir celles qui donnent la différence de croissance la plus marquée entre les conditions restrictives et permissives.

Pour chaque candidat, une colonie est resuspendue dans 100 µl d'eau stérile. Après une dilution jusqu'à une densité cellulaire comparable de ces échantillons (par mesure de DO à 600nm), des gouttes de 5µl ont été déposées sur milieu sans tryptophane et incubées aux différentes températures. Les résultats sont présentés à la figure 17.

Comme dans le cas des allèles plasmidiques, aucune différence notable n'a été remarquée entre les tests de croissance à 23°C et à 30°C (cfr. Figure 17); cette dernière sera utilisée comme température permissive. Par ailleurs, à 39°C le contrôle positif ne poussant pratiquement pas, aucun résultat ne sera montré pour cette température.

#### Test de la cryosensibilité (comparaison 12°C - 30°C à la figure 17):

Comme cela avait été démontré pour les allèles plasmidiques, aucun phénotype clair de cryosensibilité n'a pu être mis en évidence pour les intégrants.

#### Test de la thermosensibilité (comparaison 30°C - 37°C à la figure 17):

- Pour l'allèle A7: on peut observer que les six candidats sont thermosensibles à des degrés différents. Afin d'expliquer cette donnée, il faut se référer à la figure 16. On observe en effet que pour passer l'étape du crible sur milieu sans tryptophane, le marqueur *TRP1* doit s'intégrer. Une recombinaison doit donc impérativement se faire en 3' du marqueur. Par contre la recombinaison du côté 5' est beaucoup plus libre. Et donc, même s'il est admis qu'une recombinaison se fait préférentiellement aux extrémités d'une séquence linéaire, on ne peut exclure qu'elle puisse se produire tout au long du gène *dim1* ts éliminant par la même occasion certaines mutations situées en 5'. Une variabilité du nombre final de mutations chez les différents candidats pourrait rendre compte des différences de thermosensibilité observées.

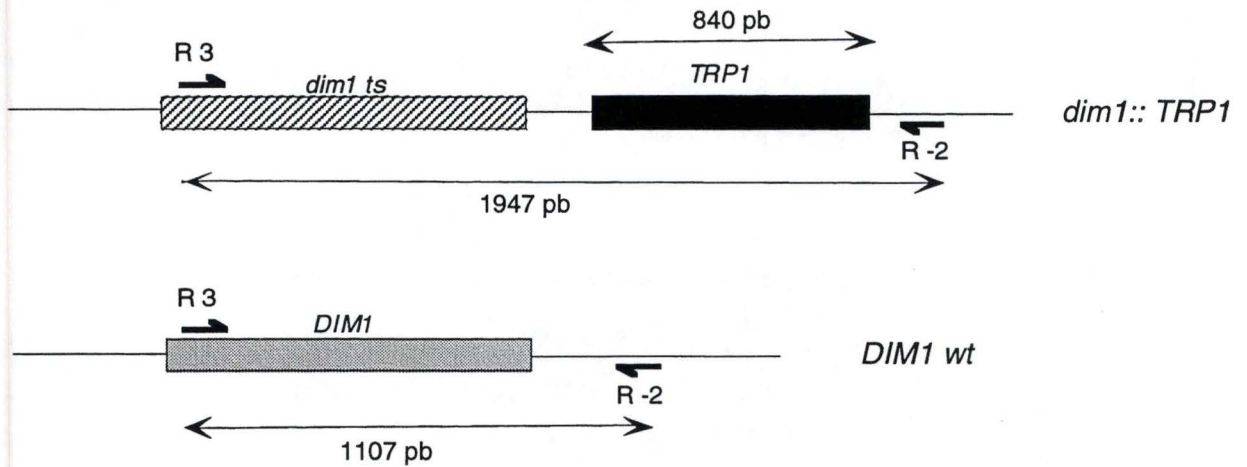


Figure 18: Shéma des PCR réalisée sur le gène *DIM1* sauvage (wt) et sur *dim1-TRP1*.

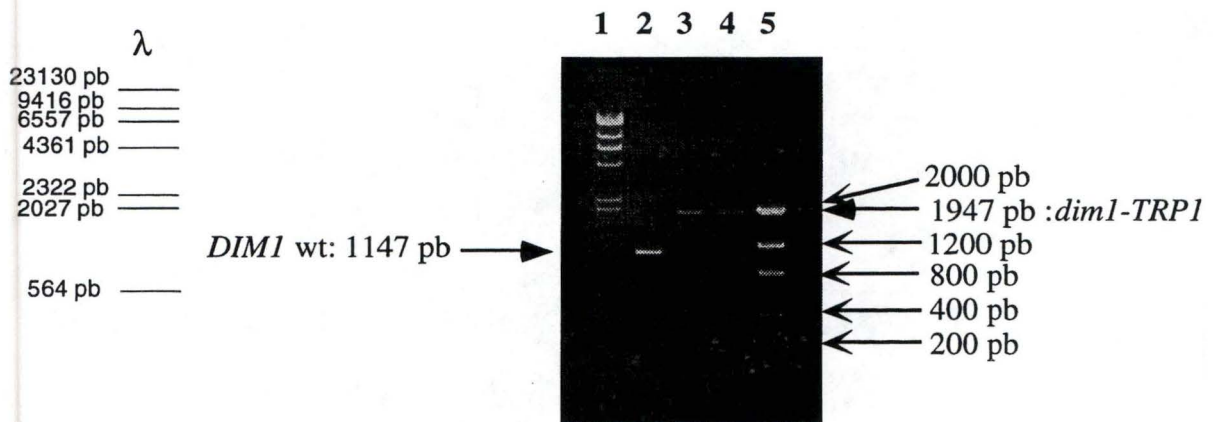


Figure 19: Vérification de l'intégration de *dim1ts-TRP1* par PCR.

Piste 1: Marqueur de taille  $\lambda$  *Hind* III.  
Piste 2: Amplification PCR *DIM1* wt.  
Piste 3: Amplification PCR *dim1* 7-6 - *TRP1*.  
Piste 4: Amplification PCR *dim1* 12-2 - *TRP1*.  
Piste 5: Marqueur de taille low DNA mass ladder.



- Pour l'allèle A12: ce test a permis de montrer que seul l'allèle A12-2 est thermosensible. Il semble en effet, qu'après vérification, l'allèle A12-1 ne soit pas ts.

Ces données sont résumées dans le tableau 2 ci-dessous:

Caractère ts \ Allèle	A7	A12
Fort	7-1	/
Moyen	7-2, 7-4, 7-5, 7-6	12-2
Faible	7-3	/
Nul	/	12-1

Tableau 2: Phénotype de thermosensibilité à 37°C des différents candidats.

Au vu de ces résultats, les souches utilisées pour les tests de suppression ont pu être choisies. Notre choix s'est évidemment porté sur les souches les plus thermosensibles (7-1 et 12-2). Néanmoins, il s'est avéré que la souche 7-1 ne survivait pas à la transformation par plasmide; qu'il s'agisse d'une électroporation ou d'une transformation au PEG (cfr. Chapitre Matériel et méthodes). La souche 7-6 a donc été choisie parmi les quatre autres candidats (7-2, 7-4, 7-5, 7-6).

### III.1.3 Vérification de l'intégration par PCR pour nos deux souches.

Une PCR (primers R3 et R-2 cfr. figure 18) sur colonie a été réalisée sur les souches 7-6 et 12-2. Le contrôle négatif utilisé est la souche YPH 252 portant une copie sauvage du gène *DIM1*.

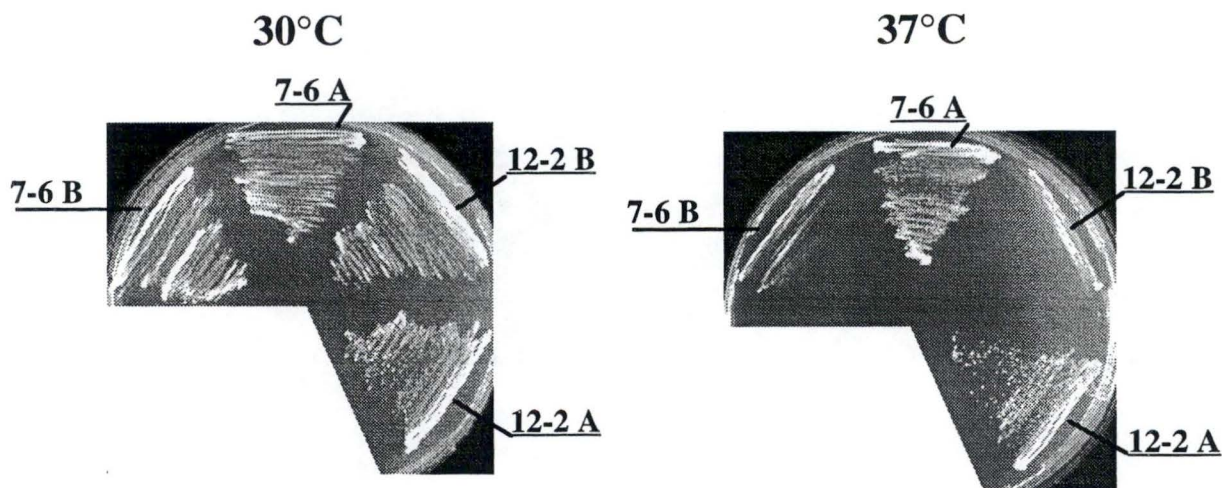
Les résultats de la figure 20 montrent une amplification PCR d'une taille de 1947 pb dans les souches 7-6 et 12-2, cela correspond donc à la construction *dim1 ts-TRP1*. Pour ces deux souches, aucune autre bande de la taille du gène sauvage n'a pu être observée.

Cette donnée associée au caractère ts de ces souches nous permet de conclure que l'allèle sauvage *DIM1* a été remplacé par un allèle muté. Nous avons donc vraisemblablement des souches thermosensibles pour le gène *dim1*.



### III.1.4 Vérification de la récessivité du caractère ts des allèles intégrés.

Cette dernière vérification a été faite par transformation des différentes souches ts par le plasmide pGIDL31.42 portant *DIM1*. Une transformation par le pFL44S a été utilisée comme contrôle négatif. Les résultats sont montrés dans la figure 20 ci-dessous.



Légende:

**7-6 A=** Souche ts 7-6  
+ pGIDL31.42

**12-2 A=** Souche ts 12-2  
+ pGIDL31.42

**7-6 B=** Souche ts 7-6  
+ pFL44S

**12-2 A=** Souche ts 12-2  
+ pFL44S

Figure 20: Test de la récessivité des différents intégrants.

Pour chaque transformant, une strie est réalisée sur milieu synthétique complet sans tryptophane ni uracile. ces stries sont ensuite inubées à 30°C et à 37°C.

On remarque très nettement une perte du phénotype ts lors de la transformation par le pGIDL 31.42. On peut donc en conclure que ce caractère ts est récessif.

### III.2 Test de supresseurs *a priori*.

Ces tests ont été entrepris dans les souches 7-6 et 12-2. Les différents candidats testés sont ceux déjà utilisés dans la recherche de supresseurs des mutants *dim1* plasmidiques. Pour rappel, il s'agit:

- Du pGIDL103 (insert: gène *YGL 125W* et gène *SCS3*)
- Du pGIVV1 (insert: fin du gène *L17A* et 3600 premières paires de bases du gène *TELI*)
- Du pYCL 31C (insert: gène codant pour la protéine "rrp6 p")
- Du pYHR 21C (insert: gène codant pour la protéine ribosomiale S27 A)

- Du pYKL 156W (insert: gène codant pour la protéine ribosomiale S27 B)

Ces cinq candidats ont été transformés (méthode au PEG cfr. chapitre Matériel et méthodes) dans les souches 7-6 et 12-2. Les gouttes ont été réalisées comme décrit précédemment (sur milieu synthétique complet sans tryptophane et sans uracile) et ont été incubées à 30°C et 37°C.

Les contrôles utilisés sont des transformants par le pGIDL31.42 (contrôle positif) et par le pFL 44S (contrôle négatif).

Les résultats de ces tests sont présentés ci-dessous:

Test de croissance du 7-6:

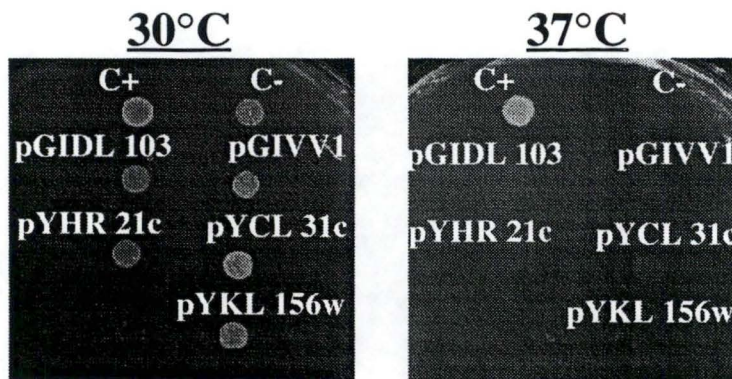


Figure 21: Test de suppression du phénotype ts de la souche 7-6.

Les différents transformants sont resuspendus dans 50 µl d'eau stérile dont 5 µl sont déposés sur milieu synthétique complet sans tryptophane ni uracile et incubés respectivement à 30°C et à 37°C.

Nous constatons que les différents candidats ont un taux de croissance similaire au contrôle négatif. Une déficience de la croissance à 37°C est en effet observable.

Nous pouvons donc conclure que, tout comme nous avons pu l'observer pour l'allèle plasmidique, aucune suppression par ces différents candidats n'a pu être mise en évidence.



Test de croissance du 12-2:

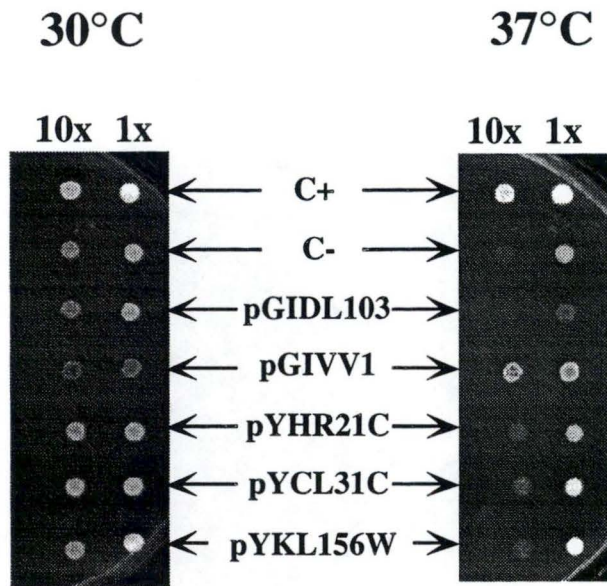


Figure 22: Test de suppression du phénotype ts de la souche 12-2.

Les différents transformants sont resuspendus dans 50  $\mu$ l d'eau stérile (dilution 1x et 10x) dont 5  $\mu$ l sont déposés sur milieu synthétique complet sans tryptophane ni uracile et incubés respectivement à 30°C et à 37°C.

Ces tests de croissance ont permis de mettre en évidence une perte du caractère thermosensible pour les souches transformées par le pGIVV1. Bien que quatre supprimeurs de l'allèle ts plasmidique avaient pu être identifiés, seul ce candidat semble supprimer nettement le phénotype thermosensible de l'allèle A12 à l'état intégré.

Nous sommes donc amenés à penser que les candidats pYHR21C, pYCL31C et pYKL156W ne seraient supprimeurs de l'allèle A12 que lorsque celui-ci est porté par un plasmide. Cette observation suggère que la suppression du caractère ts serait dépendante du nombre de copies de l'allèle thermosensible.



**En conclusion:**

Au terme de ces expériences, nous pouvons affirmer que le clone pGIVV1, qui restaure la sensibilité à la kasugamycine chez *E. coli*, est aussi capable de supprimer le phénotype thermosensible lié à la présence d'un allèle muté (A12) du gène *dim1* de levure. Cette suppression a en effet pu être observée aussi bien pour un allèle ts plasmidique que pour ce même allèle intégré.

En ce qui concerne les candidats pYHR 21C, pYCL 31C et pYKL 156W, aucune suppression des allèles intégrés n'a pu être observée.

*Conclusions,  
Discussion  
et  
Perspectives*

## CONCLUSIONS

La redondance des unités de répétition des ADN<sub>r</sub> interdisant pratiquement l'isolement aisé de mutants, il n'a pas été possible par la voie génétique d'explorer en profondeur les relations structure-fonction des ARN<sub>r</sub> dans le ribosome. En revanche, des mutants existent pour les protéines s'associant aux ARN<sub>r</sub> que ce soient les r-protéines elles-mêmes ou des protéines, enzymatiques ou non, intervenant dans la biogenèse ou la fonction intégrée du ribosome.

Comme nous l'évoquons dans le but de notre travail, la protéine Dim1p, dont le gène a été cloné au laboratoire et s'avère essentiel, est au nombre de ces facteurs s'associant transitoirement au pré-ribosome (et au ribosome ?). Outre sa fonction de diméthylation de l'ARN<sub>r</sub> 18S, elle joue clairement un rôle dans la maturation de celui-ci.

Le double rôle de la protéine Dim1p au niveau de la méthylation et du "processing" de l'ARN<sub>r</sub> nous ont amené à penser que des interactions physiques avec d'autres partenaires pourraient intervenir dans la modulation de ces fonctions.

Afin de progresser dans la compréhension des relations impliquant Dim1p dans la biogenèse et/ou le fonctionnement ribosomique, la recherche de suppresseurs d'un mutant conditionnel d'expression (*GAL10::dim1*), d'une part, et de mutants thermosensibles pour le gène *DIM1*, d'autre part, a été entreprise.

Nous nous sommes attachés dans le cadre de ce travail à tester dans ces mutants des candidats partenaires potentiels disponibles grâce à des travaux antérieurs.

### Test de suppression dans la souche *GAL10::dim1*.

Nous avons pu observer que le surdosage des protéines encodées par les plasmides pGIVV3 et pGIVV4 ne permettait pas la suppression du phénotype de retard de croissance en condition restrictive (condition de répression transcriptionnelle du gène *DIM1*). L'interprétation triviale de cette donnée est que ces deux candidats ne sont pas des partenaires de la protéine Dim1p. Alternativement, on peut imaginer que dans un mutant d'expression en conditions répressives la concentration de la protéine Dim1p tombe en-dessous d'un seuil où cette protéine devient limitante pour la fonction, la surexpression d'un partenaire ne pouvant évidemment pas compenser ce déficit quantitatif.



Notons que, *a priori*, le caractère éventuellement limitant de Dim1p est plus plausible pour sa fonction non enzymatique que pour sa fonction diméthylase. Dans l'optique où ce type de mutant d'expression ne pourrait être "supprimé" au moins pour une des deux fonctions de Dim1p par surdosage d'un partenaire, nous nous sommes tournés vers une autre voie consistant à rechercher des supprimeurs de mutants conditionnels thermosensibles pour la (ou les) fonction(s) de la protéine Dim1p. De tels ts pouvant être touchés dans l'une et/ou l'autre des fonctions de Dim1p, on s'attend à ce que les supprimeurs éventuels soient allèle-spécifiques.

#### Test de suppression dans les souches *dim1* thermosensibles.

Dix allèles ts avaient été obtenus par PCR en conditions mutagènes sur le gène *DIM1*. Des tests phénotypiques de croissance ayant montré que seuls trois d'entre eux (A2, A7 et A12) étaient clairement thermosensibles à 37°C, ceux-ci ont été utilisés pour la recherche de supprimeurs.

Le séquençage de ces trois mutants a permis de mettre en évidence des profils de mutations très similaires entre les allèles A2 et A12 (cfr. Figure 13). Par ailleurs, dans ces trois allèles les mutations sont multiples et réparties dans toute l'ORF. L'identification sans équivoque de la ou, des mutations responsables du caractère ts n'a de ce fait pas été possible.

La dernière étape de ce travail a consisté à tester les cinq supprimeurs potentiels vis à vis des allèles A2, A7 et A12 dans différentes souches portant l'allèle ts soit à l'état plasmidique soit intégré au locus chromosomique. Ces tests ont permis de mettre en évidence que trois des candidats (pYCL31C, pYHR21C et pYKL156W) sont des supprimeurs du phénotype de retard de croissance pour les mutants ts A2 et A12 plasmidiques et, que le candidat pGIVV1 supprime ce phénotype dans une souche portant l'allèle A12 à l'état plasmidique mais aussi intégré.

Le défaut de suppression observé pour les candidats pYCL31C, pYHR21C et pYKL156W lorsque le gène *dim1* ts est intégré nous a amené à penser que la suppression pouvait être liée au nombre de copies de l'allèle ts. Néanmoins, une expérience visant à suivre d'heure en heure en conditions permissives et restrictives (par mesure de la DO) la croissance d'une culture liquide de la souche ts transformée par ces trois candidats sera réalisée. Ce test devrait permettre par comparaison de leur croissance par rapport aux contrôles positif (allèle sauvage) et négatif (allèle ts non transformé) de mesurer avec plus de précision que sur milieu solide la suppression éventuelle du caractère ts par ces trois candidats.

Notons que ces différentes suppressions phénotypiques devront être confirmées en vérifiant la restauration du phénotype ts lorsqu'on cure la souche du plasmide portant le supprimeur. Cette expérience permet de vérifier que la suppression du phénotype ts est bien liée à la présence du candidat supprimeur et non à une mutation secondaire d'un locus chromosomique.



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce mémoire, nous avons isolé quatre supresseurs d'un mutant thermosensible pour la croissance. Quelques hypothèses concernant leur mode de suppression peuvent être envisagées:

### *Le pYCL 31C:*

Cet insert encode une maturase ("rrp6 p") intervenant au niveau des sites de clivages A1 et A2 (cfr. chapitre introduction figure 5). L'hypothèse la plus simple est l'appartenance de Dim1p et de rrp6p à un complexe commun. Des données supplémentaires concernant cette interaction génique pourraient être apportées par un test double-hybride.

### *Le pGIVV1:*

Mentionnons avant tout que le pGIVV1 (plasmide comprend les 3600 premières paires de bases du gène *TEL1*), isolé comme étant un supresseur du mutant ts A12, ne supprime pas le mutant ts A2 de séquence pourtant très similaire. Une vérification de la suppression phénotypique devra être réalisée par transformation d'un autre clone de ce mutant A12. De plus, il y a lieu de vérifier que la séquence complète de *TEL1* agit bien comme supresseur du mutant ts A12.

Par ailleurs, les données quant au rôle exact de la protéine encodée par ce gène n'étant encore que préliminaires, aucune hypothèse permettant d'expliquer la suppression du phénotype ts n'a pu être envisagée.

### *Les pYHR21C et pYKL156W:*

Ces plasmides encodent respectivement les protéines ribosomiales S27A et S27B. La localisation de ces deux protéines ribosomiales à proximité du site de méthylation de la protéine Dim1p nous encourage à poser l'hypothèse d'une liaison transitoire entre la protéine Dim1p et ces protéines ribosomiales recrutant peut-être par la même occasion d'autres partenaires nécessaires à la fonction de Dim1p.



### **\*\*\* Perspectives\*\*\***

Les allèles ts A7 et A12 devront être caractérisés du point de vue de la maturation et de la méthylation de façon à préciser la, ou les fonctions de Dim1p affectée(s) dans ces deux mutants ts. Cette information devrait nous permettre de préciser la nature de la suppression observée par les différents clones testés.

Dans un autre ordre d'idée, plusieurs approches par la voie des ts et de la suppression sont envisageables pour compléter et préciser les relations fonctionnelles faisant intervenir Dim1p dans la biogenèse et/ou le fonctionnement du ribosome.

Il serait indiqué tout d'abord de définir laquelle, ou lesquelles des mutations multiples dans les trois souches ts que nous avons obtenu est, ou sont responsable(s) du caractère ts. Dans ce contexte, un modèle de structure, même relativement sommaire, pourrait permettre de déterminer la position par exemple de surface ou non des résidus touchés.

Par ailleurs, on cherchera à créer d'autres allèles ts afin d'élargir la recherche de supresseurs et l'analyse des interactions impliquant Dim1p. La création d'allèles ts mutés dans des régions prédites pour être potentiellement d'interaction peut se faire sur un mode semi-aléatoire ou au contraire sur une base rationnelle dirigée. Une méthode de mutation transpositionnelle avec insertion de peptides décrit récemment (B. Hallet, communication personnelle) a permis de créer des mutants de la  $\beta$ -lactamase. Il s'est avéré que les boucles externes étaient la cible préférentielle de ces insertions. De tels mutants de surface pourraient donc se révéler dans le cas de Dim1p être des mutants d'interaction.

Alternativement, on pourrait recourir à la prédiction des régions de surface, cibles rationnelles d'une mutagenèse, au départ de la séquence protéique ou sur base d'un modèle structural de celle-ci.

# *Matériel et méthodes*

# MATERIEL ET METHODES

## I. Matériel.

### I.1 Les tampons.

#### **Tampon de ligation 5x (BRL):**

TrisHCl pH 7,4	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	10 mM
ATP	1 mM

#### **Tampon N2 (Nucleobond):**

Tris / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	0.9 M
pH 6.3	

#### **Tampon N3 (Nucleobond):**

Tris / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1.15 M
pH 6.3	

#### **Tampon N5 (Nucleobond):**

Tris / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1 M
pH 8.5	

#### **Tampon S1 (Nucleobond):**

TrisHCl pH 8.0	50 mM
EDTA pH 8.0	10 mM

Autoclaver et ajouter une solution de RNase A à une concentration finale de 400 µg/ml.

#### **Tampon S2 (Nucleobond):**

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Ne pas autoclaver.



**Tampon S3 (Nucleobond):**

KAc pH 5.2                      2.8 M

Ne pas autoclaver.

**Tampon SSC 20x:**

NaCl                                      3 M

Citrates de sodium              0,3 M

Ajuster à pH 7,0 avec de l'HCl.

**Tampon TE:**

TrisHCl pH 8/7,6 ou 7,4              10 mM

EDTA pH 8/7,6 ou 7,4              1 mM

**Tampon TBE**

TrisHCl                                  108 gr

acide borique                          55 gr

EDTA 0,5 M                              40 ml

Porter à 1 l pour TBE 10x.

Porter à 10 l pour TBE 1x.

**Tampon TAE 1x (pour 1 l):**

Tris    4,84 g

HAc    1,15 ml

EDTA 0,5 M                              2 ml

Porter à volume avec de l'eau distillée.

**Terminator Ready reaction Mix:**

- A-dye terminator.
- C-dye terminator.
- G-dye terminator.
- T-dye terminator.
- dITP, dATP, dCTP, dTTP.
- Tris-HCl pH9.
- MgCl<sub>2</sub>.
- Pyrophosphatase thermostable.
- AmpliTaq DNA Polymérase, FS.

**Tampon de chargement du séquençage automatique:**

- formamide désionisé: 250 µl.
- EDTA-Bleu dextran: 50 µl.

## **I.2 Les solutions.**

**Agarose (BRL):** 0,8%; 1 ou encore 2% dans du TAE 1x.

**Ampicilline 10%** (Boehringer) 100 mg/ml dans de l'eau distillée,  
à diluer 1000 x.

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm.

Ne pas ajouter les antibiotiques à des températures supérieures à 50-60°C.

**Kasugamycine** (Boehringer) 50 µg/ml final.

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm.

Ne pas ajouter les antibiotiques à des températures supérieures à 50-60°C.

### **Tétracycline**

12,5 mg/ml dans 50% d'eau distillée et 50% d'éthanol 100%.

Pas de stérilisation, à diluer 1000x.

**Solution stock de bromure d'éthidium:** 1, 2 ou 10 mg/ml dans de l'eau.

### **Solution d'alourdisseur/colorant:**

Glycérol	5 ml
Bleu de bromophénol	25 ng
EDTA 1M	0,5 ml

### **Solution de fixateur (pour gel de séquençage):**

Acide acétique	10%
Méthanol	10%

**RNase A** (Boehringer): 10 mg/ml.

Incuber 15 minutes à 100°C. Aliquoter et stocker à -20°C

### **SOC:**

Bactotryptone	2%
Yeast Extract	0,5%
NaCl	10 mM
Kcl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

Après autoclavage, ajouter 10 mM de MgSO<sub>4</sub> (solution 1 M filtrée).

### **EDTA-Bleu dextran:**

- EDTA: 25 mM.
- Bleu dextran: 50 mg/ml.

## II. Méthodes.

### II.1 Souches et milieu de culture

#### II.1.1 Souches de bactéries.

Différentes souches de bactéries ont été utilisées au cours de ce mémoire:

XL1-blue	<i>sup E44 hsd R17 rec A1 end A1 gyr A46 thi rel A1 lac<sup>-</sup> F' [pro AB<sup>+</sup> lac Iq lac ZΔM15Tn 10 (tet<sup>r</sup>)], dam</i>
DL101	<i>sup E thi Δ(lac -pro AB) F' [ tra D36 pro AB<sup>+</sup> lac Iq lac Z ΔM15] ksg A<sup>-</sup>pyr F<sup>-</sup></i>

La souche bactérienne XL1-blue est utilisée pour la réplication des constructions plasmidiques. Cette souche est mise en culture à 37°C dans du milieu de Luria-Bertani (LB). Dans le cas d'une sélection d'un plasmide amplicilline résistant, de l'ampicilline est ajoutée au milieu LB à une concentration de 100 µg/ ml.

Comme indiqué dans le tableau ci-dessus, cette souche bactérienne possède quelques caractéristiques intéressantes :

- *rec A1*: réduit le taux de recombinaison.
- *end A1*: diminue le taux d'endonucléase.
- *dam* : les souches *DAM* subissent une méthylation au niveau de leurs séquences GATC. Si cette séquence fait partie d'un site de restriction, la restriction peut être inhibée. La souche bactérienne XL1-blue étant *dam* , elle n'a pas cet inconvénient.

La souche bactérienne DL101: est utilisée dans le cadre d'un test de complémentation hétérologue du mutant *ksgA<sup>-</sup>* via la restauration de la sensibilité à la kasugamycine. Cette souche est mise en culture à 37°C sur un milieu minimum plus ampicilline (MinA).



## II.1.2 Souches de levures.

Différentes souches de levure ont été utilisées au cours de ce mémoire:

FL100	a
YPH274	<i>a/α ura 3 -52 /-lys 2 -801<sup>amber</sup> /- ade 2 -101<sup>ochre</sup> /- trp 1-Δ1 /- his 3-Δ200 /- leu 2-Δ1 /-</i>
YVE274-11	idem que YPH274 mais <i>dim 1Δ::TRP1/DIM1</i>
YVE274-12	souche haploïde de YVE274-11 portant le plasmide pGIDL31.42
YDL150-9	<i>a ura 3 -52 leu 2-3,112 ade 1-100 his 4-519 GAL<sup>+</sup> URA3-GAL10::dim1</i>
YPH252	<i>α ura3 -52 lys -801<sup>amber</sup> ade2 -101<sup>ochre</sup> trp1-Δ1 his3 -Δ200 leu2 -Δ1.</i>

La souche FL100 est une souche sauvage (*URA3*) qui a été utilisée comme contrôle négatif de croissance sur milieu 5-FOA (cfr. Point II.2.b).

La souche YPH274 est une souche *ura3*. Cette souche a été utilisée comme contrôle positif de croissance sur milieu 5-FOA.

La souche YVE274-11 a été obtenue à partir de la souche YPH274 par disruption d'un allèle *DIM1* par un marqueur *TRP1*.

La souche YVE274-12 a été obtenue par sporulation de la souche YVE274-11 et a servi de cellule hôte dans la recherche d'allèles *dim1* thermosensibles.

La souche YDL 150-9 est une souche haploïde dans laquelle la copie du gène *DIM1* est mise sous contrôle d'un promoteur *GAL10*.

La souche YPH 252 a été utilisée pour intégrer la construction *dim1 ts- TRP1*.

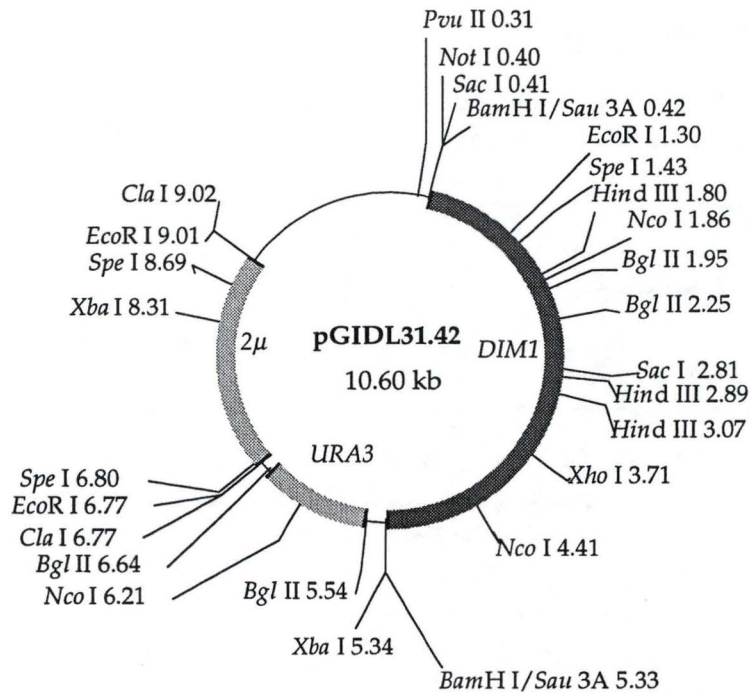


Figure M1: Le plasmide pGIDL31.42

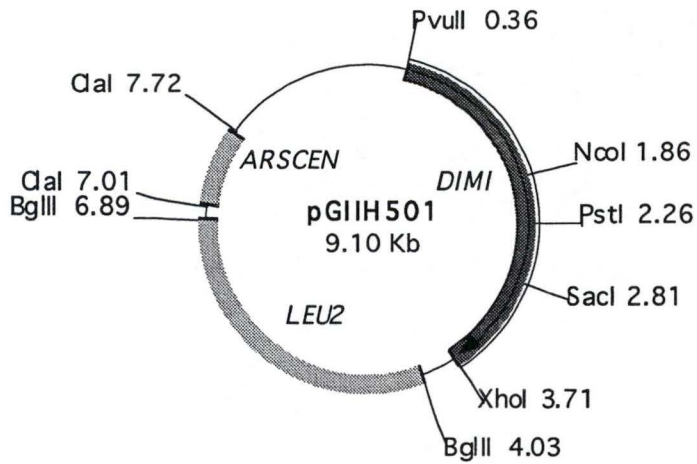


Figure M2: Le plasmide pGIIH501

### II.1.3 Plasmides.

a) Le plasmide pGIDL31.42 (Figure M1).

L'insert génomique contenant le gène *DIMI* cloné dans le vecteur navette *E. coli* / *S. cerevisiae* pFL44S en *Sau* 3A I a donné naissance au pGIDL31.42. Il contient une origine de réplication et un marqueur de sélection de bactérie (*ORI* et *AmpR*) et de levure ( $2\mu$  et *URA3*).

b) Le plasmide pGIIH501 (Figure M2).

L'insert génomique contenant *DIMI* a été cloné dans un vecteur navette pFL36 en *Pvu* II / *Xho* I. Il contient une séquence *ARS*, une séquence centromérique *CEN* et un marqueur de sélection *LEU2*.



## II.2 Milieu de culture.

Tout ces milieux doivent être autoclavés 20 minutes à 120°C avant usage.

### II.2.1 Milieu de culture bactérien.

#### a) 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.

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

#### b) Milieu LB solide.

Tryptone (Oxoid)	10 g/l
NaCl (Merck)	5 g/l
Yeast Extract (Oxoid)	5 g/l
Agar (Oxoid)	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Après avoir été autoclavé, ce milieu est refroidi à 55°C, coulé dans des boîtes de Petri, et conservé à 4°C.

Il est à noter que de l'ampicilline peut être ajoutée au milieu LB, qu'il soit liquide ou solide. Cet antibiotique est ajouté au milieu après autoclavage à une température de 55°C.

#### c) Milieu Minimum solide + Ampicilline (MinA).

Pour 400 ml:

Agar (Oxoid)	20 g/l
--------------	--------

Eau

Autoclaver 20 minutes à 120°C, puis refroidir à 55°C.

M9 salt 10X	40 ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	400 µl
CaCl <sub>2</sub> 0.1M	400 µl
Thiamine HCl 1M	800 µl
Glucose 20%	8 ml
Bacto-casamino acids 20%	4 ml
Ampicilline 0.1 g/ml	200 µl

Ce milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Petri et conservé à 4°C.

Dans le cadre d'un test de résistance de la souche à la kasugamycine, cet antibiotique est ajouté à une concentration de 50 mg par litre de milieu minimum.

M9 salt (pour 400 ml):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	24 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12 g
NH <sub>2</sub> Cl	4 g
NaCl	2 g

### II.2.2 Milieux de culture levuriens.

a) Milieu YPD liquide.

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

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Porter le pH à 4,8 avec de l'HCl 10N.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

b) Milieu YPD solide.

Ajouter 20 g/l d'Agar (Oxoïd) au milieu YPD liquide. Couler dans des boîtes de Petri, et conserver à 4°C.

c) Milieu minimum.

Yeast Nitrogen base W/O a.a. and W/O ammonium sulfate (Difco)	1,75 g/l
Ammonium sulfate	5,1 g/l
Glucose <u>ou</u> Galactose	20 g/l

Si milieu minimum solide, ajouter:

Agar (Oxoïd)	20 g/l
--------------	--------

Porter à volume avec de l'eau distillée. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

### Tableau 3

Pour 400 ml de milieu:

<u>Adénine</u>	10,8 mg
<u>Uracile</u>	9 mg
<u>L-Arginine HCl</u>	12,6 mg
<u>L-Acide aspartique</u>	39,9 mg
<u>L-Histidine HCl</u>	8,4 mg
<u>L-Isoleucine</u>	7,9 mg
<u>L-Leucine</u>	15,8 mg
<u>L-Lysine HCl</u>	14,6 mg
<u>L-Méthionine</u>	9 mg
<u>L-β-Phénylalanine</u>	19,8 mg
<u>L-Thyrosine</u>	7,2 mg
<u>L-Valine</u>	25,8 mg
<u>L-Tryptophane</u>	12,2 mg
<u>L-Thréonine</u>	31 mg



d) Milieu synthétique.

Le milieu synthétique est réalisé en ajoutant divers acides aminés et/ou bases azotées au milieu minimum. Les quantités sont détaillées dans le tableau 3 ci-contre.

Les acides aminés sont resuspendus dans de l'eau distillée et autoclavés sauf le L-Tryptophane et la L-Thréonine qui sont stérilisés par filtration sur filtre 0,22  $\mu\text{m}$ .

Si un milieu synthétique contient tout les constituants du tableau 3, il est appelé milieu synthétique complet.

e) Milieu synthétique + acide 5-fluoroorotique ( 5-FOA).

Pour 1 litre:

Préparer dans une première bouteille:

5-FOA	1 g (ou plus si nécessaire)
Uracile liquide 2,4 mg/ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml

Dissoudre pendant 1 heure sous agitation en chauffant légèrement. Stériliser en filtrant.

Dans une seconde bouteille:

Autoclaver 500 ml de milieu synthétique contenant tout les composants du tableau 3 sauf l'uracile.

Laisser refroidir à 65°C, et mélanger les deux bouteilles. S'il s'agit d'un milieu solide, il doit être coulé dans des boîtes de Petri et stocké à 4°C.

## II.2 Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.

### II.2.1 Transformation de bactéries.

La transformation de bactéries a pour but d'y faire pénétrer une molécule d'ADN exogène (plasmide). Pour ce faire, la paroi bactérienne doit être rendue perméable; la bactérie est alors dite compétente.

#### II.2.1.1 Méthode au $\text{CaCl}_2$

La bactérie va être soumise, lors de sa préparation, à une solution hypotonique de chlorure de calcium. Cette solution va déstabiliser la paroi bactérienne qui va alors prendre l'aspect de sphéroplast. Lors du mélange des cellules compétentes et de l'ADN, cet ADN va être complexé par le calcium.

C'est ce complexe qui va pénétrer dans la bactérie lors du choc thermique. Par la suite, les cellules transformées vont être incubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant au moins 30 minutes afin d'un part, de permettre la régénération de la paroi bactérienne et d'autre part, de permettre l'expression du gène de résistance porté par l'ADN exogène.

Cette méthode donne généralement entre  $10^5$  et  $10^6$  transformants par  $\mu\text{g}$  de plasmide.

#### Préparation de cellules compétentes:

- réaliser un préculture dans 5-10 ml de LB + tétracycline.
- incubé une nuit à  $37^\circ\text{C}$ .
  
- inoculer 200 ml de LB + tétracycline avec la préculture.
- laisser pousser à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'à une DO de 0,3 (mesurée à 600 nm).
- refroidir la culture sur glace pendant 10 min.
- centrifuger 5 min. à  $4^\circ\text{C}$  à une vitesse de 6000 rpm.
- resuspendre le culot dans 1/2 volume de la culture avec du  $\text{CaCl}_2$  50mM stérile.
- laisser 20 min. sur glace.
- centrifuger 2 min. à 5000 rpm.
- resuspendre le culot dans 1/10 volume de la culture avec du  $\text{CaCl}_2$  50mM stérile + 15 % de glycérol si les cellules doivent être stockées à  $-70^\circ\text{C}$ .

### Transformation bactérienne:

- laisser dégeler un aliquot de cellules du stock à  $-70^{\circ}\text{C}$  sur glace.
- mélanger 200  $\mu\text{l}$  de cellules avec l'ADN (de 0,1 ng à 1  $\mu\text{g}$  s'il s'agit d'une ligation).
- laisser 20 min. sur glace.
- réaliser le choc thermique en laissant le mélange 5 min. à  $42^{\circ}\text{C}$ .
- laisser 2 min. sur glace.
- incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  avec agitation pendant au moins 30 min.
- étaler sur milieu sélectif (sélection du plasmide).
- laisser pousser à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit.

### Remarque:

Il est possible de réaliser des contrôles positifs et négatifs de transformation:

- contrôle positif: transformation des cellules par une quantité connue de plasmide connu portant un gène de résistance.
- contrôle négatif: on peut étaler des cellules non transformées sur milieu sélectif.

### II.2.1.2 L'électroporation.

La préparation de cellules électro compétentes est ici beaucoup plus simple. Cela consiste essentiellement à laver les cellules à l'eau afin d'éliminer au maximum les sels de la solution. L'électroporation consiste à soumettre la cellule à un champ électrique qui provoque la formation de pores dans la membrane et permet ainsi à l'ADN de pénétrer dans la cellule.

Cette méthode donne en conditions optimales entre  $10^8$  et  $10^9$  transformants par  $\mu\text{g}$  de plasmide, soit un rendement de 100 à 1000 fois supérieur à celui de la méthode au  $\text{CaCl}_2$ .

### Préparation de cellules électro compétentes:

- réaliser un préculture dans 5-10 ml de LB plus tétracycline à raison de 12,5  $\mu\text{g}$  / ml.
- incuber une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$ .
- inoculer 1 l de LB + tétracycline avec la préculture.
- laisser pousser à  $37^{\circ}\text{C}$  avec agitation jusqu'à une DO comprise entre 0,5 et 0,8 (mesurée à 600 nm).
- refroidir la culture sur glace pendant 15 à 30 min.



**Attention:** à partir de cette étape, il est nécessaire de garder les cellules au maximum sur glace.

- centrifuger 10 min. à 5000 rpm à froid.
- retirer le plus possible de surnageant.
- resuspendre le culot dans 1 volume d'eau froide stérile.
- centrifuger 10 min. à 5000 rpm à froid.
- resuspendre le culot dans 1/2 volume d'eau froide stérile.
- centrifuger 10 min. à 5000 rpm à froid.
- resuspendre dans 20 ml de glycérol 10% froid.
- centrifuger 10 min. à 5000 rpm à froid.
- resuspendre le culot dans 2 ml de glycérol 10% froid.
- aliquoter et stocker à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### L'électroporation

- laisser dégeler un aliquot de cellules du stock à  $-70^{\circ}\text{C}$  sur glace.
- placer les cuvettes d'électroporation sur glace.
- mélanger dans un Eppendorf 40-100  $\mu\text{l}$  de cellules avec 1-3  $\mu\text{l}$  d'ADN.
- transférer le mélange dans la cuvette d'électroporation et laisser sur glace.
- régler l'appareil (Gene Pulser) sur 25  $\mu\text{F}$ ; 2,0 kV et 200  $\Omega$ .
- placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer.
- ajouter immédiatement après 1 ml de SOC ou de LB.
- transférer dans un Eppendorf et laisser 1 h à  $37^{\circ}\text{C}$ .
- étaler sur milieu sélectif.

Quelques précisions sur le réglage de l'électroporateur:

- capacitance: 25  $\mu\text{F}$ . C'est la valeur maximum que peut prendre l'appareil. La durée du choc électrique étant proportionnelle à la capacitance, on règle donc l'appareil pour avoir un choc aussi long que possible. Cela favorise l'entrée du plasmide.

- voltage: 2,0 kV. Il s'agit d'une valeur qui est un compromis entre la nécessité de créer des pores dans la membrane et la survie du plus grand nombre de cellules possible.

- résistance: 200  $\Omega$ . Cela correspond à la résistance de la solution contenue dans la cuvette d'électroporation.

## II.3 Techniques relatives à l'utilisation de levures.

### II.3.1 Transformation de levures.

Il existe différentes méthodes de transformation de levures. Dans le cadre de ce mémoire, seule la méthode au PEG et l'électroporation ont été utilisées.

#### II.3.1.1 La méthode au PEG

- réaliser une préculture d'environ 10 ml.
- incubé 2 jours à 30°C.
  
- centrifuger 1,5 ml de culture 5 sec. à 6500 rpm.
- décanter.
- incubé de l'ADN de sperme de saumon (ss) 2 min. à 65°C.
- ajouter 1 goutte de ss (salmon sperm) au culot.
- resuspendre le culot avec 10 ng - 1 µg de plasmide.
- ajouter 0,5 ml de PEG 40 % + EDTA 1M + Tris 10 mM pH 7,5 + LiAc 0,1 M.
- Mélanger et incubé 15 min. sur table.
- incubé 15 min. à 42°C.
- centrifuger 15 sec. à 6500 rpm et décanter.
- ajouter 1 ml d'eau stérile.
- centrifuger 15 sec. à 6500 rpm et décanter.
- ajouter 400 µl d'eau stérile.
- étaler sur milieu sélectif.

#### II.3.1.2 L'électroporation.

##### Préparation de cellules électro compétentes:

- inoculer 500 ml de milieu avec une préculture ou une colonie provenant d'une boîte.
- incubé à 30°C jusqu'à une DO de 1,3 - 1,4 (mesurée à 600 nm).
- centrifuger 5 min. à 4000 rpm et décanter.
- resuspendre le culot dans 500 ml d'eau stérile froide.
- centrifuger 5 min. à 4000 rpm et décanter.
- resuspendre le culot dans 250 ml d'eau stérile froide.
- centrifuger 5 min. à 4000 rpm et décanter.
- resuspendre le culot dans 20 ml de Sorbitol 1M froid.

- centrifuger 5 min. à 4000 rpm et décanter.
- resuspendre le culot dans 500  $\mu$ l de Sorbitol 1M froid.

Il est à noter que l'on obtient des cellules plus efficaces si on les utilise tout de suite sans les stocker à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### L'électroporation

- laisser dégeler un aliquot de cellules du stock à  $-70^{\circ}\text{C}$  sur glace.
- placer les cuvettes d'électroporation sur glace.
- mélanger dans un Eppendorf 40-100  $\mu$ l de cellules avec 1-3  $\mu$ l d'ADN.
- transférer le mélange dans la cuvette d'électroporation et laisser sur glace.
- régler l'appareil (Gene Pulser) sur 25  $\mu\text{F}$ ; 1,5 kV et 200  $\Omega$ .
- placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer.
- ajouter immédiatement après 1 ml de sorbitol 1M.
- étaler sur milieu sélectif.



*Pvu* II      5'-CAG ↓ CTG-3'  
                 3'-GTC ↑ GAC-5'

*Kpn* I      5'-G GTAC ↓ C-3'  
                 3'-C ↑ CATG G-5'

*EcoR* I      5'-G ↓ AATT C-3'  
                 3'-C TTAAT ↑ G-5'

Figure M3: Trois types d'enzymes de restriction.

## II.4 Techniques relatives à l'ADN.

### II.4.1 Construction plasmidique.

#### II.4.1.1 Restriction d'ADN.

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui se lient à l'ADN double brin en des sites spécifiques, généralement de 4 à 6 bp, et qui coupent l'ADN au niveau de ces séquences ou à proximité. Ces séquences sont majoritairement palindromiques.

On peut distinguer trois types d'enzymes de restriction (Figure M3):

- celles qui coupent les liens phosphodiesters de façon symétrique. On dit alors que l'ADN est coupé à bouts francs (ex: *Pvu* II).
- celles qui coupent les liens phosphodiesters de façon asymétrique laissant une extrémité 3' OH protrudante (ex: *Kpn* I).
- celles qui coupent les liens phosphodiesters de façon asymétrique laissant une extrémité 5' P protrudante (ex: *EcoR* I).

#### **En pratique:**

Mélanger dans un Eppendorf:

- l'ADN à restreindre.
- 1/10 du volume de tampon 10x.
- 1 unité d'enzyme par  $\mu\text{g}$  d'ADN à restreindre.
- porter à volume avec de l'eau distillée.
- incuber 1h30 à température spécifique (généralement 37°C).
- inactiver l'enzyme par chauffage (15 min. à 65°C) ou par extraction au phénol.

Les enzymes sont stockées à -20°C et sont gardées un maximum à cette température au cours de la manipulation.

Remarque: L'ADN peut être restreint par plusieurs enzymes en même temps si celles-ci fonctionnent dans un tampon commun.

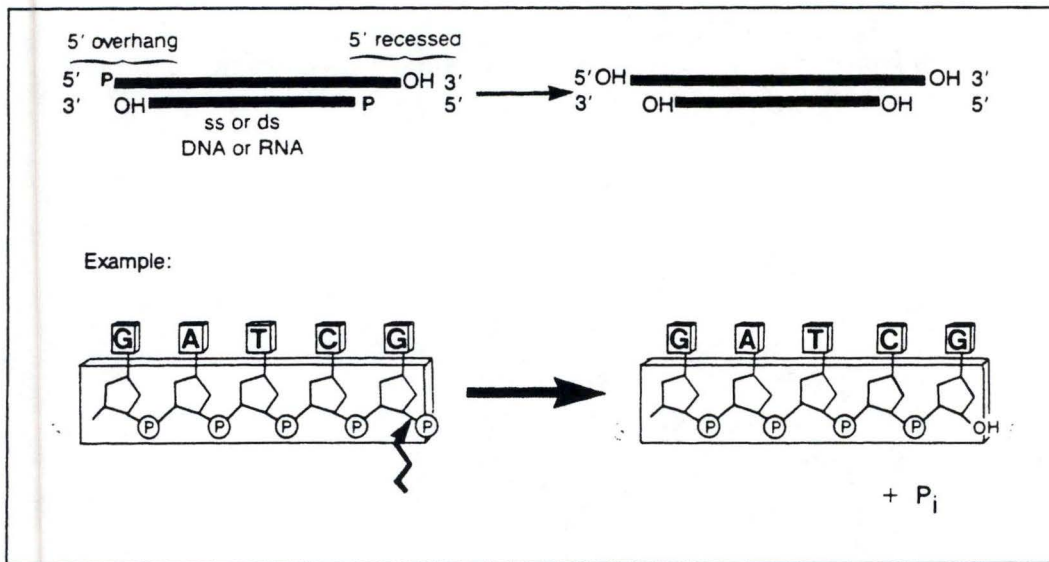


Figure M4: Réaction catalysée par la CIP.



#### II.4.1.2 Déphosphorylation.

La CIP (Calf intestinal alkaline phosphatase) est une glycoprotéine dimérique utilisée pour retirer les groupes 5'-phosphate de l'ADN linéaire (Figure M4). Ainsi, si un plasmide ouvert est déphosphorylé, il lui est impossible de se refermer sur lui même. Il doit donc pour se refermer se lier à un autre fragment d'ADN non déphosphorylé.

Chaque monomère de cette enzyme contient deux atomes de zinc essentiels à son activité. Cela justifie la présence de  $ZnCl_2$  dans le tampon déphosphorylation.

#### **En pratique:**

Mélanger dans un Eppendorf:

- l'ADN à déphosphoryler.
- 1/10 de tampon 10x.
- 0,5  $\mu$ l de CIP.
- porter à un volume de 50  $\mu$ l avec de l'eau distillée.

Si l'ADN a des extrémités 5' protrudantes:

- incuber 30 min. à 37°C.
- ajouter 0,5  $\mu$ l de CIP.
- incuber 30 min. à 37°C.

Si l'ADN a des extrémités 3' protrudantes ou des bouts francs:

- incuber 15 min. à 37°C.
- incuber 15 min. à 56°C.
- ajouter 0,5  $\mu$ l de CIP.
- incuber 15 min. à 37°C.
- incuber 15 min. à 56°C.

Dans les deux cas, inactiver l'enzyme comme suit:

- laisser la solution 5 min. sur glace.
- ajouter 5  $\mu$ l d' EGTA.
- incuber 10 min. à 65°C.
- ajouter de la protéinase K à une concentration finale de 100  $\mu$ g/ ml.
- incuber 30 minutes à 56°C.
- réaliser une extraction au phénol-chloroforme et une précipitation à l'éthanol.

### II.4.1.3 Purification et précipitation d'ADN.

Cette technique à pour but d'enlever les sels ainsi que les protéines présentes dans une solution.

#### **En pratique:**

- amener le volume d'ADN à 100 µl avec de l'eau distillée.
- ajouter 1 volume de phénol-chloroforme.
- vortexer 1 min.
- centrifuger à 13000 rpm pendant 2 - 3 min.
- récupérer la phase aqueuse supérieure.
- ajouter 5 volumes d'éther saturé en eau.
- centrifuger quelques secondes.
- éliminer la phase supérieure.
- ajouter 2,5 volume d'EtOH 100% froid.
- ajouter 0,1 volume de NaAc 3M pH 5,2.
- mélanger.
- incuber 15 min. à -80°C.
- centrifuger à 13000 rpm pendant 20 min. à 4°C.
- décanter.
- laver le culot à l'éthanol 90%.
- sécher 5-10 min. sous vide.
- resuspendre dans de l'eau ou du TE.

#### Solution utilisée:

##### Phénol-chloroforme:

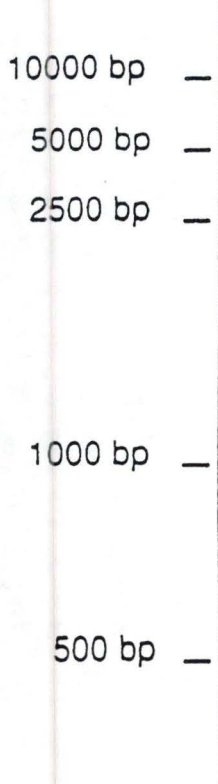
mélanger à volume égal une solution de phénol (Phénol auquel on ajoute de la 8-hydroxyquinoline 0,1%) et une solution de chloroforme (Chloroforme auquel on ajoute de l'alcool isoamylique 24:1).

#### Remarque:

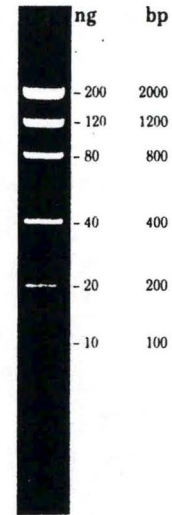
- La solution de phénol-chloroforme permet d'inactiver et d'extraire les protéines d'une solution d'ADN.
- L'alcool isoamylique facilite la séparation du chloroforme de la phase aqueuse.

a:

$\lambda$  *Hin* d III:



DNA Mass Ladder™



b:

$\lambda$ <i>Hin</i> d III (48502 bp)	Total de 600ng
Taille	Concentration
23130 bp	286 ng
9416 bp	116 ng
6557 bp	81 ng
4361 bp	53 ng
2322 bp	28 ng
2027 bp	25 ng
564 bp	7 ng
(125 bp)	(1,5 ng)

Figure M5:

a: Les marqueurs de taille.

b: Les marqueurs de masse.



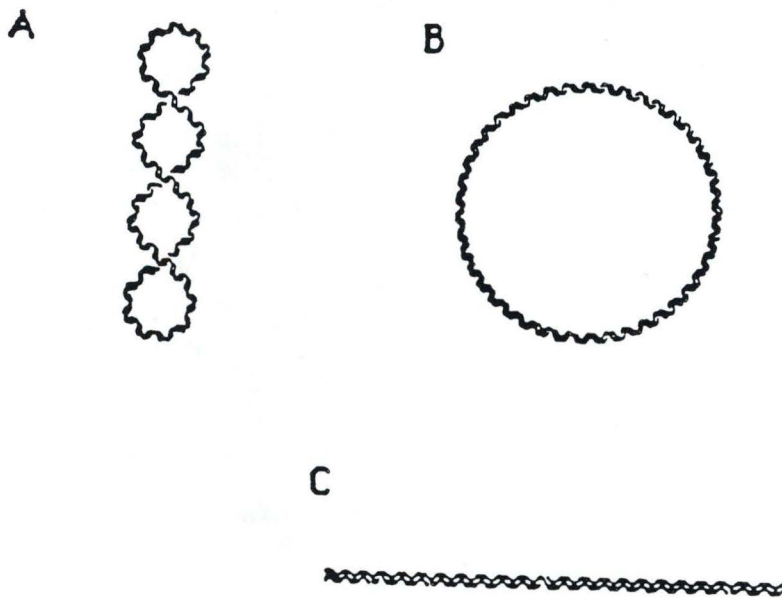


Figure M6: Les trois conformations de l'ADN.

A= Forme CCC  
B= Forme OC  
C= Forme OL

#### II.4.1.4 Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

Cette technique permet: - de séparer des fragments d'ADN de tailles différentes (dans un but diagnostique ou de purification).

- d'estimer la taille de fragments d'ADN via un marqueur de taille (Figure M5a).

- d'estimer la concentration d'ADN via un marqueur de masse (Figure M5b).

Le principe de cette technique est relativement simple: on soumet l'ADN à un champ électrique. Cet ADN étant chargé négativement, il va migrer vers l'anode. Différents facteurs peuvent influencer cette migration:

1) Le poids moléculaire des fragments d'ADN: il existe une relation inversement proportionnelle entre la vitesse de migration et le poids moléculaire d'un fragment d'ADN.

2) La conformation de l'ADN. Un même plasmide peut prendre différentes conformations (Figure M6). La forme plasmidique superenroulée ou CCC (Covalently Closed Circular) migre plus vite que les formes OL (Open Linear) et OC (Open Circular).

3) La concentration en agarose. Il y a une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité électrophorétique de l'ADN ( $\mu$ ) et la concentration de gel ( $\tau$ ). Cette relation est décrite par l'équation suivante:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau$$

où  $\mu_0$  est la mobilité électrophorétique libre et  $K_r$  le coefficient de retard (constante dépendant des propriétés du gel et de la taille de l'ADN).

En règle générale, un gel plus concentré (1,5 à 2%) permettra de séparer des fragments de petites tailles (100 à 3000 bp); tandis qu'un gel plus lâche permettra de séparer des fragments de plus grandes tailles. Vous trouverez ci-dessous la concentration de gel idéale pour les différentes tailles d'ADN à séparer.

Quantité d'agarose dans le gel (%)	Taille des fragments d'ADN séparés (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

d) Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est directement proportionnelle au voltage appliqué.

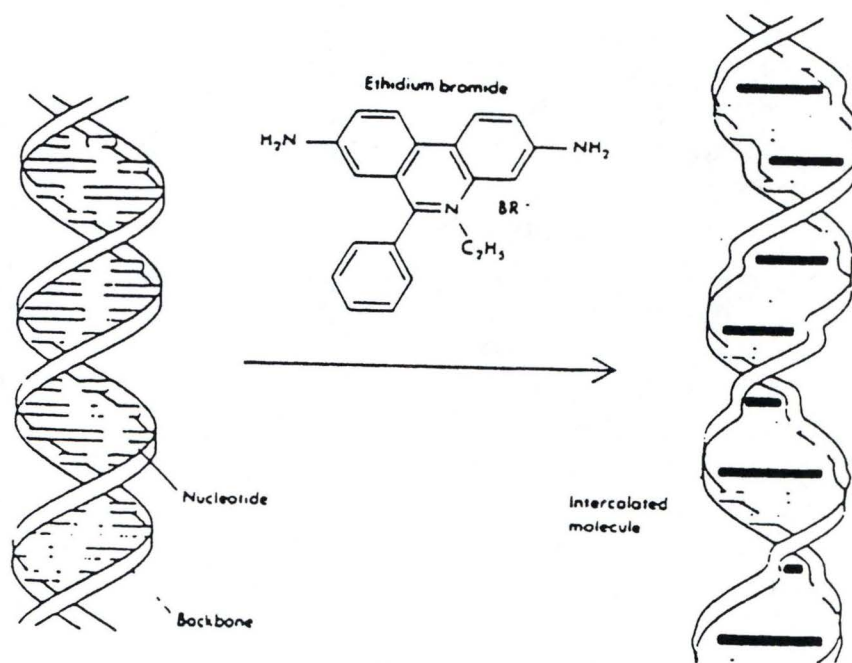


Figure M7: Schéma de fixation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN.



e) La composition du tampon d'électrophorèse. La mobilité électrophorétique de l'ADN est affectée par la composition et la force ionique du tampon d'électrophorèse. En l'absence d'ions, la conductivité électrique est minimale et l'ADN migre plus lentement. Néanmoins, une forte concentration ionique peut entraîner une conductivité électrique si importante qu'il peut se produire une forte augmentation de température dans le gel, ce qui peut entraîner une dénaturation de l'ADN.

Pour visualiser les bandes d'ADN, il est nécessaire de mélanger du bromure d'éthidium au gel d'agarose. Le bromure d'éthidium est une molécule fluorescente qui s'intercale entre les deux brins des molécules d'ADN (Figure M7) et permet ainsi de repérer l'ADN sous U.V. (à 302 nm). Il est à noter qu'il est possible de photographier le gel d'agarose sous U.V.

### **En pratique:**

- dissoudre en chauffant une quantité appropriée d'agarose dans du tampon TAE.
- ajouter 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium.
- couler le gel dans un support plexiglas.
- ajouter un ou deux peignes pour former des puits dans le gel.
- laisser le gel polymériser.
- enlever les peignes et démouler le gel.
- placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- immerger complètement le gel dans du tampon TAE (ou TBE).
- placer les échantillons alourdis par du bleu de bromophénol (solution d'alourdisseur/colorant) à raison de 1/10 du volume final dans les puits.
- charger également dans un ou plusieurs puits un marqueur de taille (ou de masse) approprié.
- laisser migrer.

Il est recommandé de ne pas migrer à un voltage supérieur à 100 Volts pour avoir une bonne séparation des différentes bandes d'ADN.

- visualiser les bandes d'ADN sous U.V.

**Attention:** il est recommandé d'utiliser des gants pour manipuler tout ce qui est, ou a pu, être en contact avec le bromure d'éthidium ainsi que de se protéger les yeux des rayons U.V. à l'aide d'un casque ou de lunettes en plexiglas.

#### II.4.1.5 Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose.

Au cours de ce mémoire, deux kits d'extraction d'ADN ont été utilisés: Geneclean II Kit (BIO 101) et Qiaex II. Dans les deux cas, le principe d'extraction est identique:

il se base sur la solubilisation de l'agarose, l'adsorption des particules d'ADN sur un support en silice et l'élution de cet ADN dans un milieu pauvre en sel.

##### Geneclean II Kit (BIO 101)

- découper la bande d'ADN du gel d'agarose.
- peser cette bande et ajouter 3 volumes de NaI.
- laisser 5 min. à une température comprise entre 45°C et 55°C.
- resuspendre le glassmilk.
- ajouter 5 µl de glassmilk

Si la quantité d'ADN à récupérer est supérieure à 5 µg, il est recommandé d'ajouter 1 µl de glassmilk par 0,5 µg d'ADN au dessus de 5 µg.

- incuber pendant 5 min. à température ambiante en mélangeant régulièrement.
- centrifuger quelques secondes à 13000 rpm et décanter.
- laver 3 fois le culot avec la solution de New Wash, décanter.
- resuspendre le culot dans un volume approprié d'eau distillée.
- incuber 5 min. à une température comprise entre 45°C et 55°C.
- centrifuger quelques secondes à 13000 rpm.
- récupérer le surnageant.

Après cela, on estime que 80% de l'ADN a été élué. Pour récupérer d'avantage, il est conseillé de resuspendre à nouveau le culot dans de l'eau distillée et de recommencer les trois dernières étapes.

##### Qiaex II

- extraire la bande d'ADN du gel.
- peser l'agarose et ajouter:
  - pour des fragments d'ADN < 100bp: 6 volumes de Buffer QX1
  - pour des fragments d'ADN > 4kb: 3 volumes de Buffer QX1  
+ 2 volumes d'eau.
- vortexer la matrice « Qiaex II » pendant 30 secondes.
- ajouter:
  - < 2 µg d'ADN: 10 µl de matrice
  - 2-10 µg d'ADN: 30 µl de matrice
  - tous les 10 µg supplémentaires: 30 µl de matrice en plus.
- incuber 10 min. à 50°C en mélangeant toutes les 2 minutes.
- centrifuger 30 secondes à 13000 rpm et décanter.



- laver le culot avec 500 µl de Buffer QX1.
- centrifuger et décanter.
- laver le culot avec 500 µl de Buffer PE.
- centrifuger et décanter.
- sécher le culot à l'air libre.
- resuspendre dans un volume approprié d'eau distillée.
- incuber:
  - pour des fragments d'ADN <4kb: 5 min. sur table
  - pour des fragments d'ADN 4-10kb: 5 min. à 50°C
  - pour des fragments d'ADN >10kb: 10 min. à 50°C
- centrifuger quelques secondes à 13000 rpm.
- récupérer le surnageant.

Une seconde élution peut ici aussi augmenter la quantité d'ADN récupéré.

La composition des différents tampons n'est pas précisée dans la notice accompagnant ces deux kits.

**Remarque:** Ces deux kits de récupération purifient l'ADN de toute trace d'agarose, mais également des protéines, des sels, du bromure d'éthidium. On peut donc les utiliser à la place d'une extraction au phénol-chloroforme. Dans ce cas, la première incubation à 50°C (destinée à dissoudre l'agarose) n'est pas nécessaire.



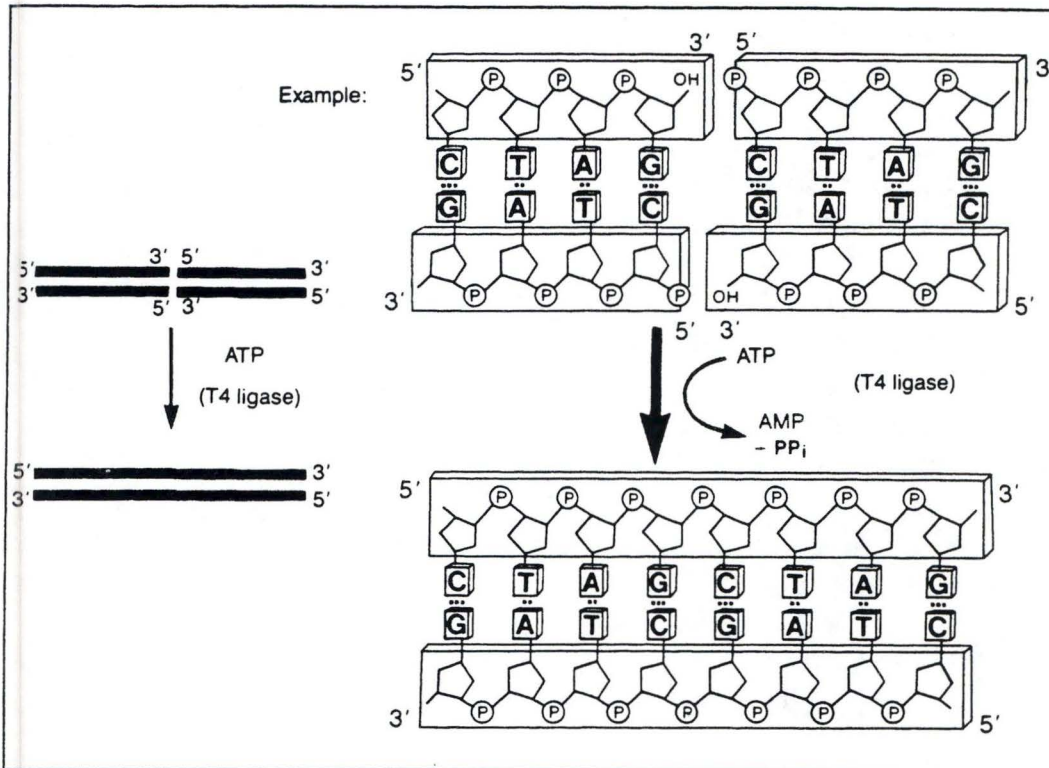


Figure M8: Activité de la T4 DNA ligase sur des bouts francs.

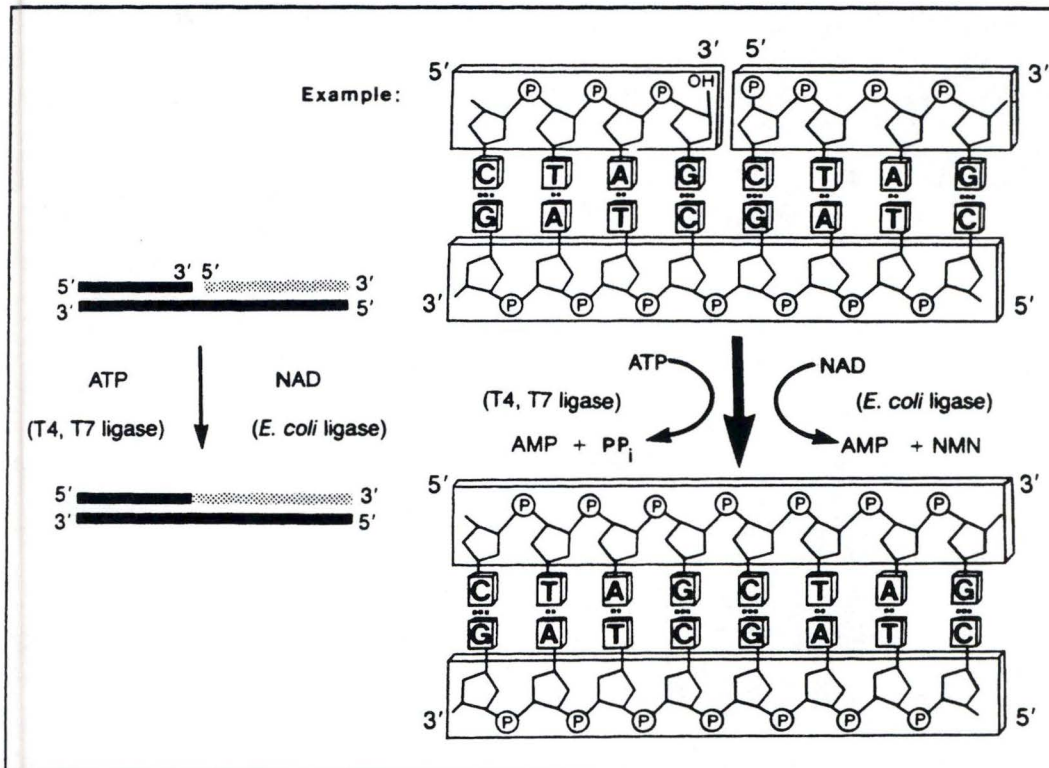


Figure M9: Activité de la T4 DNA ligase dans la réparation de l'ADN.

#### II.4.1.6 Ligation.

La T4 DNA ligase est une enzyme qui catalyse la formation de liens phosphodiester entre une extrémité 5' P et une extrémité 3' OH de l'ADN. Ce lien peut être intra- ou intermoléculaire. C'est-à-dire, que l'on peut s'en servir pour refermer un plasmide sur lui-même (après une délétion par exemple) ou pour lier deux morceaux d'ADN entre eux.

Cette enzyme permet donc:

- de lier deux extrémités d'ADN, ces extrémités pouvant être à bouts protrudants ou à bouts francs (Figure M8).
- de réparer des cassures éventuelles de l'ADN (Figure M9).

Le facteur limitant d'une ligation est la fréquence des rencontres entre les deux extrémités à lier. Dans le cas d'une ligation intermoléculaire, il est donc souhaitable de mettre une concentration suffisante des deux ADN à lier. Ces deux molécules d'ADN étant de préférence en quantités équimolaires.

#### **En pratique:**

Mélanger dans un Eppendorf:

- l'ADN à lier.
- 1/5 de tampon de ligation 5x.
- 0,5 à 5 µl de ligase (1U/µl).

**Remarque:** 0,5 µl d'enzyme sont suffisants pour réaliser une ligation entre deux bouts protrudants, une concentration plus élevée d'enzyme peut néanmoins s'avérer nécessaire dans le cas d'une ligation entre des bouts francs.

- porter à un volume de 10 à 20 µl avec de l'eau distillée.
- incubé de 12° à 30°C pendant 1 à 16 heures.

**Remarque:** Les ligations à bouts protrudants sont généralement réalisées à une température de 12° à 15°C, ce qui correspond à un équilibre entre l'activité de l'enzyme et l'"annealing" des extrémités protrudantes.

Les ligations à bouts franc sont quant à elles réalisées à température ambiante ce qui correspond à la température optimale de l'enzyme.

- stopper la réaction en ajoutant 2 µl d'EDTA 0,5M ou en chauffant 10 min. à 75°C.



## II.4.2 Préparation d'ADN plasmidique.

### II.4.2.1 Minipréparation.

Cette méthode a pour but l'extraction rapide d'une petite quantité d'ADN plasmidique (1-7  $\mu\text{g}$ ) afin, par exemple, de réaliser une restriction diagnostique.

La miniprep. se divise en quatre étapes:

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

La lyse bactérienne est réalisée grâce à une solution de sodium dodecyl sulfate (SDS) et du NaOH. Le SDS dénature les protéines et le NaOH dénature l'ADN chromosomique et plasmidique. Une solution de neutralisation permet ensuite l'"annealing" des brins plasmidiques. L'ADN simple brin ainsi que les protéines sont éliminées par précipitation.

#### **En pratique:**

- inoculer 5-10 ml de milieu LB (+ antibiotique) avec une colonie de bactéries transformantes.
- incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- centrifuger 1,5 ml de culture à 5000 rpm pendant 5 minutes.
- décanter le surnageant.
- resuspendre le culot dans 300  $\mu\text{l}$  de tampon P1.
- ajouter 300  $\mu\text{l}$  de tampon P2 (lyse alcaline) et mélanger doucement.
- incuber 5 min. sur table.
- ajouter 300  $\mu\text{l}$  de tampon P3 et mélanger doucement.
- centrifuger 15 min. à 13000 rpm à 4°C.
- récupérer le surnageant.
- ajouter 0,8 volume d'isopropanol (précipitation de l'ADN plasmidique).
- centrifuger 15 min. à 13000 rpm.
- décanter le surnageant.
- laver le culot à l'éthanol 70%.
- sécher le culot sous vide au Speedvac.
- resuspendre l'ADN dans un volume approprié d'eau ou de tampon TE.



#### II.4.2.2 Midipréparation (NUCLEOBOND AX100).

Cette méthode utilise les mêmes principes de lyse alcaline et précipitation que la miniprep. à la seule différence que dans ce cas, l'ADN est purifié par passage sur colonne. Une quantité pouvant aller jusqu'à 100 µg de plasmide peut être récupéré.

##### **En pratique:**

- inoculer 200 ml de LB (+ antibiotique) avec une colonie de bactérie ou une préculture.
- incuber une nuit à 37°C avec agitation.
  
- transférer la culture dans une bouteille Sorvall 250 ml.
- centrifuger 5 min. à 5000 rpm.
- décanter le surnageant.
- resuspendre le culot dans un corex 30 avec 4 ml de S1 RNase.
- ajouter 4 ml de tampon S2 et mélanger.
- incuber 5 min. à température ambiante.
- ajouter 4 ml de tampon S3 et mélanger.
- laisser 5-10 min. sur glace.
- centrifuger 30 min. à 13000 rpm.
- récupérer le surnageant dans un corex 30 ml et recentrifuger si le surnageant n'est pas clair.
  
- équilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2.
- ajouter le surnageant à purifier.
- ajouter 2 x 4 ml de tampon N3 pour laver.
- éluer l'ADN avec 2 ml de tampon N5.  
(l'ADN élué est récupéré dans un corex 15 ml)
- ajouter 0,7 volume d'isopropanol.
- centrifuger 30 min. à 13000 rpm.
- décanter le surnageant.
- ajouter 1 ml d'éthanol 70% froid pour laver le culot.
- centrifuger 5 min. à 13000 rpm.
- décanter le surnageant.
- sécher sous vide.
- resuspendre dans un volume approprié d'eau ou de TE.

### II.4.2.3 Maxipréparation (Wizard Maxipreps DNA Purification System).

Cette méthode n'est utilisée que lorsqu'on désire récupérer une quantité très importante d'ADN, cette quantité pouvant aller jusqu'à plusieurs mg d'ADN plasmidique.

#### En pratique:

##### A) Préparation de l'échantillon.

- lancer une culture de 400 ml LB (+Ampicilline) à partir d'une colonie.
- centrifugation 10 min à 3500 rpm (22-25°C); décanter.
- resuspendre avec 15 ml de *Cell Resuspension Solution*.
- ajouter 15 ml de *Cell Lysis Solution* ; mélanger doucement.  
(la solution doit être claire et visqueuse)
- ajouter 15 ml de *Neutralization Solution* ; mélanger tout de suite et doucement.
- centrifugation 15 min à 10.000 rpm (22-25°C).
- récupérer le surnageant en filtrant au travers d'un papier filtre  
-> on récupère dans un cylindre gradué (mesure du vol.).
- transférer le surnageant dans une bouteille à centrifuger.
- ajouter 0,5 volume d'isopropanol et mélanger (pas au vortex).
- centrifuger 15 min à 10.000 rpm (22-25°C); décanter.
- resuspendre le culot dans 2 ml de *TE buffer*.

##### B) Purification.

- ajouter 10 ml de *Wizard Maxipreps DNA Purification Resin*.
- brancher la colonne sur une pompe.
- transférer le DNA/résine sur la colonne; aspirer.
- ajouter 13 ml de *Colum Wash Solution* dans ce qui contenait le DNA et mettre sur colonne; aspirer.
- ajouter 12 ml de *Colum Wash Solution*; aspirer.
- ajouter 5 ml d'éthanol 80 %; aspirer pendant 1 min.
- insérer la colonne dans un tube de 50 ml.
- centrifuger 5 min à 2500 rpm (centrifugation horizontale).
- placer la colonne sur la pompe pendant 5 min.
- replacer la colonne sur un tube 50 ml.
- mettre 1,5 ml d'eau à 65-70°C; attendre 1 min.
- centrifuger 5 min à 2500 rpm.  
-> On a récupéré l'ADN.

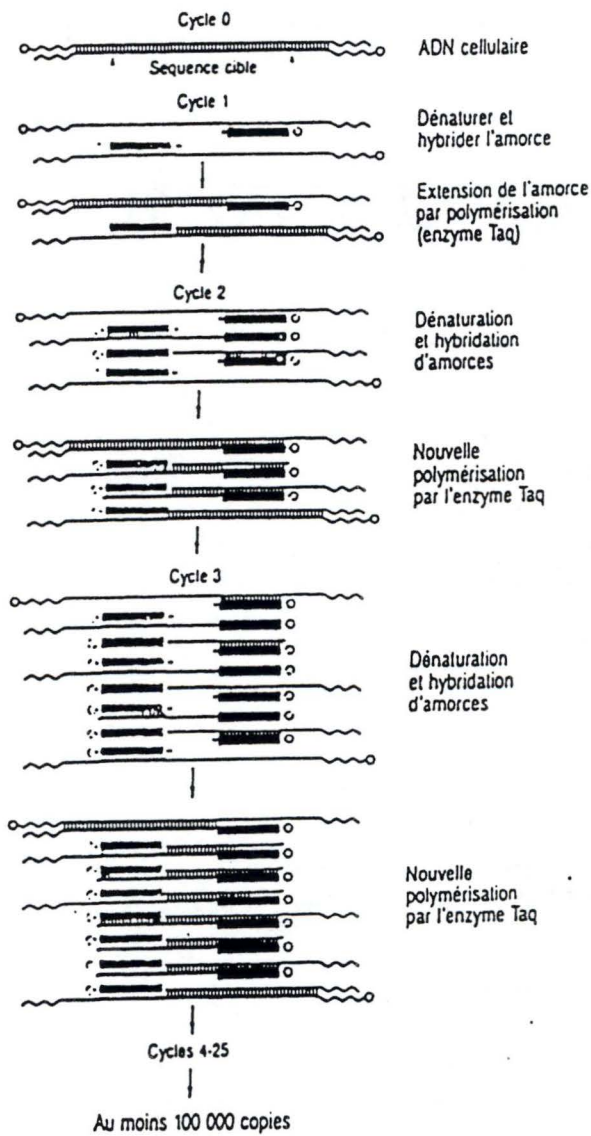


Figure M10: Principe de la réaction PCR.



## II.4.3 La Polymerase Chain Reaction (PCR).

### II.4.3.1 Principe général.

La PCR est utilisée pour amplifier un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues. Deux oligonucléotides (ou primers) complémentaires de ces séquences sont utilisés comme amorces de la réaction de PCR catalysée par une ADN Polymérase. Ces primers bordent donc la séquence à amplifier et doivent être le plus spécifique possible de ces régions.

L'ADN à amplifier, aussi appelé "ADN template", est d'abord dénaturé par chauffage en présence d'un large excès molaire de chacun des deux oligonucléotides et des quatre dNTP. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à une température qui permet aux primers de s'hybrider à leur séquence cible. Cette température est appelée température de melting. Le mélange est ensuite amené à une température propice à la réaction de polymérisation; cette température est en règle générale située aux alentours de 72°C. Ce cycle (Figure M10) de dénaturation, d'hybridation et de synthèse de l'ADN est répété plusieurs fois. De cette façon, les produits d'un cycle d'amplification servent de matrices aux amplifications suivantes. Le produit majeur de cette réaction exponentielle est un segment d'ADN double brin dont les extrémités sont définies par les extrémités 5' des deux primers et dont la longueur est définie par la distance séparant ces deux primers.

Cette réaction de Polymerase Chain Reaction étant exponentielle, il est bien entendu très important d'éviter toute contamination des réactifs par de l'ADN qui pourrait être amplifié.

### II.4.3.2 Les paramètres et réactifs utilisés.

#### Les oligonucléotides:

Ceux-ci doivent être d'une longueur minimale de 16 nucléotides afin de permettre une hybridation correcte à la matrice. Une concentration de 0,5 pmole de primer par  $\mu\text{l}$  de mélange réactionnel est généralement utilisée. Il est à noter qu'une trop forte concentration peut entraîner un amorçage erroné de la polymérisation à des sites non spécifiques.

### Les enzymes:

Différentes polymérase existent sur leur marché chacune d'elle ayant ses spécificités:

#### - La Taq DNA Polymerase:

Cette enzyme a une activité de polymérisation 5'-3' mais ne possède pas d'activité exonucléase 3'-5'. La Taq polymérase n'a donc pas d'activité « proofreading » exonucléasique.

Son temps de 1/2 vie est: > 2 h à une température de 92,5°C.  
40 min. à une température de 95°C.  
5 min. à une température de 97°C.

#### - La Pwo DNA Polymerase:

Contrairement à la Taq DNA Polymerase, cette enzyme possède une activité exonucléase 3'-5', ce qui lui confère une activité « proofreading ». On estime que cette enzyme a un taux d'erreurs 10x inférieur à la Taq DNA Polymerase.

Son temps de 1/2 vie est > 2 h à une température de 100°C.

#### *Remarque:*

Pour l'amplification de grands fragments ( < 20 Kb ), d'autres enzymes sont disponibles sur le marché. On peut citer par exemple: l'Elongase ou la TaKaRa.

### Les dNTP:

Les concentrations des 4 dNTP doivent être équivalentes et relativement basses, ce qui permet d'augmenter la fidélité de la polymérisation. En effet, une augmentation de la concentration en dNTP favorise l'élongation au détriment du système correcteur. Cela semble vrai en tout cas pour des concentrations > 1mM.

### Le tampon:

Le tampon standard contient:

KCl	50 mM
Tris-HCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5-2 mM

Le KCl facilite l'hybridation de la sonde. Quant au Magnésium, sa concentration est critique et peut affecter l'activité et la fidélité de l'enzyme assurant la polymérisation.



### L'Hybridation des primers:

La température et la durée requise pour l'hybridation des amorces dépend de leur composition nucléotidique, de leur longueur et de leur concentration. Pratiquement, on applique une température d'annealing de 5°C inférieure à la température de melting ( $T_m$ ) des primers. La température de melting se calcule en règle générale par la formule:  $T_m = (4^\circ\text{C} \times \text{le nombre de nucléotides GC}) + (2^\circ\text{C} \times \text{le nombre de nucléotides AT})$ .

Il est à noter que l'amplification est plus efficace si l'annealing se déroule à basse température (37°C). Mais à cette température, le taux d'hybridation erronée est important. Le choix d'une température d'annealing égale à  $T_m - 5^\circ\text{C}$  est donc un compromis entre l'efficacité et la spécificité.

Le nombre de cycles d'amplification dépend de la concentration de l'ADN cible dans le mélange réactionnel. Le nombre de molécules cibles doit être de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  molécules, ce qui équivaut à 10 ng d'ADN de levure et 1 ng d'ADN d'*E. coli*. Le nombre de cycles sera donc choisi en fonction du nombre de molécules cibles présentes:

3 $10^5$ molécules	25 à 30 cycles
1.5 $10^4$ molécules	30 à 35 cycles
1 $10^4$ molécules	35 à 40 cycles
50 molécules	40 à 45 cycles

### **En pratique:**

#### Pour la Taq DNA Polymerase:

Placer dans un tube PCR:

<u>Composants</u>	<u>Volume</u>	<u>[ ] finale</u>
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	4 $\mu\text{l}$	2 mM
Tampon PCR 10x	10 $\mu\text{l}$	1x
Mix dNTPs 10 mM	2 $\mu\text{l}$	0,2 mM chacun
Détergent W-1 1%	5 $\mu\text{l}$	0,05 %
Primer 5'	x $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
Primer 3'	x $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
ADN matrice	x $\mu\text{l}$	10 ng -1 $\mu\text{g}$
Taq Polymerase	0,4 $\mu\text{l}$	1 U

Porter à un volume de 100  $\mu\text{l}$  avec de l'eau stérile. Ajouter environ 100  $\mu\text{l}$  d'huile PCR dans le tube et 20  $\mu\text{l}$  dans les puits de l'appareil à PCR.



Réaliser le cycle suivant:

Dénaturation 2-3 minutes à 94°C	}	Réaliser 25 - 45 cycles
Dénaturation 1-5 minutes à 94°C		
Hybridation 2 minutes (50 à 65°C)		
Elongation 2 minutes (ou plus) à 72°C		
Terminaison 10 minutes à 72°C		

Pour la Pwo Polymerase:

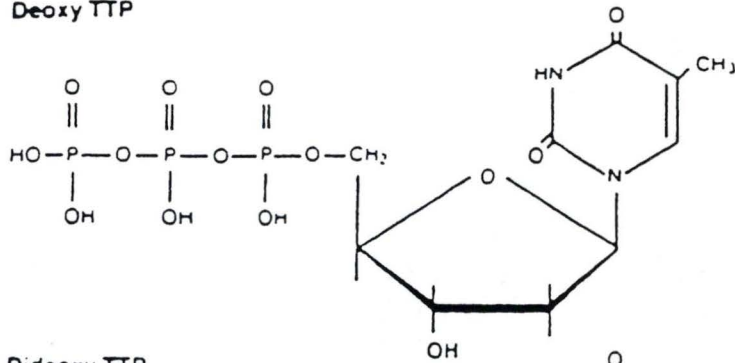
Placer dans un tube PCR:

<u>Composants</u>	<u>Volume</u>	<u>[ ] finale</u>
Tampon PCR 10x	10 µl	1x
Mix dNTPs 10 mM	8 µl	0,2 mM chacun
Primer 5'	x µl	0,5 µM
Primer 3'	x µl	0,5 µM
ADN matrice	x µl	10 ng -1 µg
Pwo Polymerase	0,5 µl	2,5 U

Porter à un volume de 100 µl avec de l'eau stérile. Ajouter environ 100 µl d'huile PCR dans le tube et 20 µl dans les puits de l'appareil à PCR.

Les cycles sont identiques que pour la Taq DNA Polymerase.

**A** Deoxy TTP



**B** Dideoxy TTP

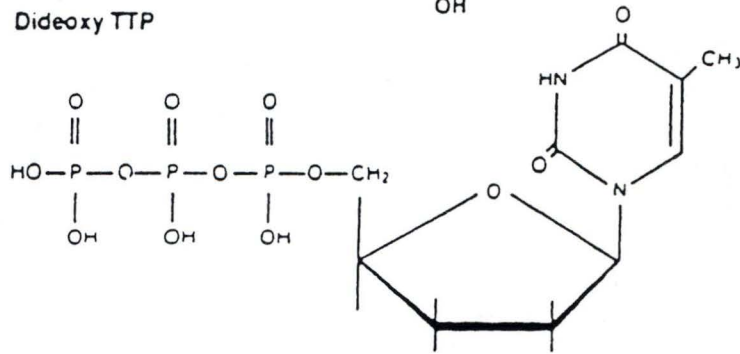


Figure M11:

A: Structure d'un déoxyribonucléotide.

B: Structure d'un didéoxyribonucléotide.

## II.4.4. Le Séquençage

II.4.4.1 Le Séquençage manuel. ( $^{32}\text{P}$ Sequencing<sup>TM</sup> kit Pharmacia. 27-1682-01).

### II.4.4.1.1 Principe du séquençage.

La méthode utilisée est celle des terminateurs de chaînes. (Sanger *et al*, 1977). Cette méthode consiste à faire synthétiser par une polymérase un brin complémentaire à celui que l'on désire séquencer. Cette polymérase requiert une matrice simple brin et une amorce lui fournissant un groupement 3'-OH libre. Le fragment à séquencer est cloné dans un plasmide.

Le primer utilisé est un oligonucléotide synthétique dont la séquence est complémentaire à celle qui borde l'insert sur le vecteur utilisé.

L'incorporation au hasard dans la chaîne naissante d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP), un analogue de désoxyribonucléotide ne possédant pas de groupements hydroxyle en 3' (Figure M11), interrompt l'élongation. Statistiquement la terminaison se produira au moins une fois en chaque point (Figure M12).

Quatre tampons d'élongation sont utilisés. Ils contiennent les quatre désoxyribonucléotides usuels (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dont un est marqué radioactivement ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP). Par contre, ils ne contiennent qu'un des quatre didésoxyribonucléotides.

Chacun des quatre tubes réactionnels contient en fin de réaction une population de fragments de taille variable. La taille de ces fragments permet de déterminer la position à laquelle s'est incorporé le ddNTP dans la chaîne en élongation et donc la position de la base complémentaire dans le brin que l'on a séquencé (Figure M12).

La migration concomitante des quatre mélanges réactionnels sur gel de polyacrylamide permet une lecture de la séquence d'ADN.



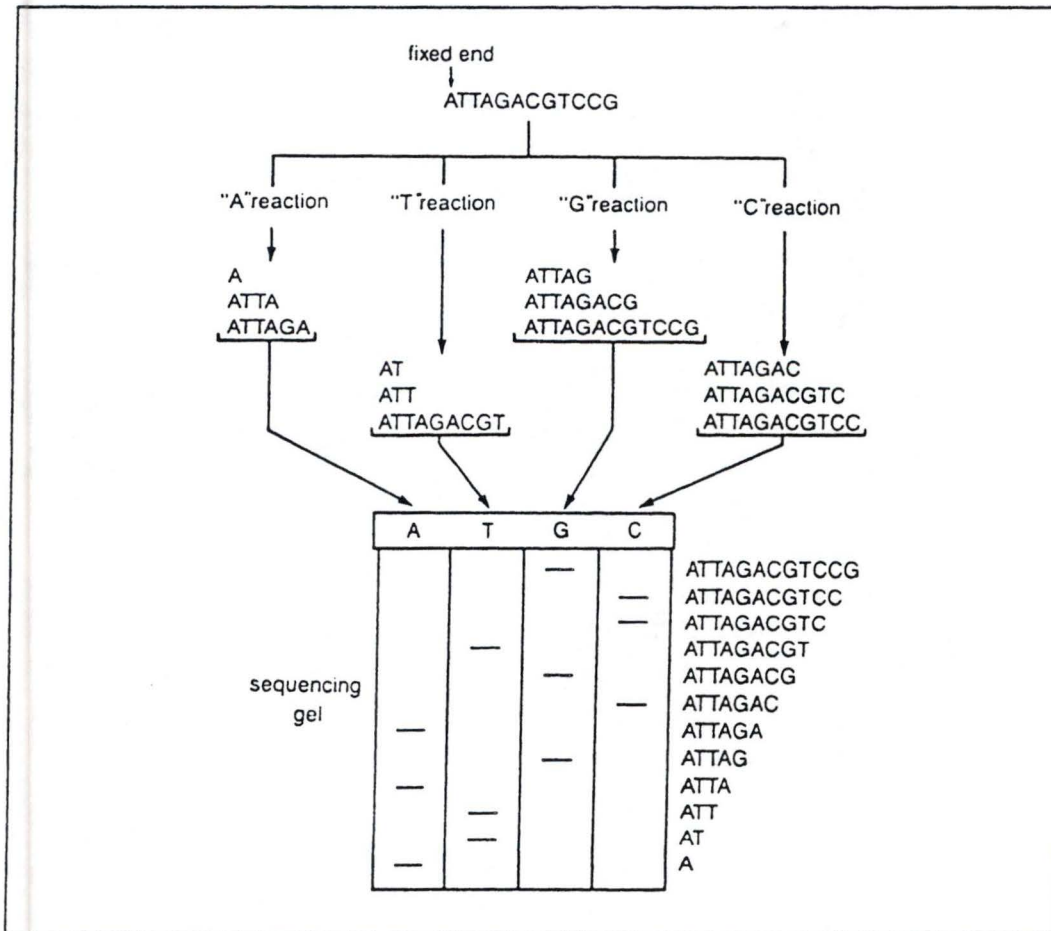


Figure M12: Principe du séquençage manuel.

Pour séquencer un fragment d'ADN, un set d'oligonucléotides simple brin marqués radioactivement est généré dans quatre réactions distinctes. Dans chacune des quatre réactions, les oligonucléotides ont une extrémité fixe et l'autre qui se termine de façon séquentielle respectivement à chaque A, C, G, T. Les produits de chaque réaction sont fractionnés par électrophorèse sur les lignes adjacentes d'un gel de polyacrylamide; Après autoradiographie, la séquence de l'ADN peut être lue directement sur le gel.

## II.4.4.1.2 Réactions de séquençage.

### Dénaturation

- utiliser 4 mg d'ADN.
- ajouter x ml d'eau de façon à ce que volume d'ADN + volume eau = 8µl.
- ajouter 2 ml NaOH 2N.
- incuber 10 minutes à température ambiante.
- ajouter 3 µl NaAc 3M PH 4,5.
- ajouter 7 µl d'eau.
- ajouter 60 µl EtOH 100 %.
- incuber 10 minutes à - 80° C.
- centrifuger 20 minutes à 15000 rpm.
- retirer l'éthanol 100 % et ajouter 60 µl d'EtOH 70 %.
- centrifuger 10 minutes.
- retirer l'éthanol et sécher.

### Annealing (Hybridation)

- ajouter
  - 10 µl d'eau sur l'ADN.
  - 2 µl ( 10 ng/µl ) primers utilisés.
  - 2 µl annealing buffer.
- incuber 20 minutes à 37° C puis 15 minutes à température ambiante.
- préparer 2.5 µl des ddNTP A, C, G, T par eppendorf.

### Labelling (marquage radioactif)

- ajouter à la réaction d'annealing - 3 µl labelling buffer.
  - 1 µl S 35 dATP.
  - 2 µl T 7 (dilution 5 fois dans enzyme buffer).
- quick spin.
- incuber 5 minutes à température ambiante.
- ajouter 4 à 5 µl de la solution labelling dans chaque eppendorfs contenant les différents ddNTP.
- incuber 5 minutes à 37° C.
- ajouter 5 µl de solution stop.
- éventuellement stocker à - 20°C.

### Préparation du gel

- mélanger:
  - 42 gr d'urée
  - 45 ml d'eau
  - 10 ml de TBE 10 x
  - 15 ml de solution de polyacrylamide.
- après dissolution de l'urée, filtrer au Buchner (filtre Millipore SA 78).
- ajouter:
  - 600 µl de persulfate
  - 30 µl de Temed.

### **Fabrication du gel de séquençage**

- nettoyer les plaques avec eau de ville - eau distillée - ethanol.
- "coater" la petite plaque avec 10 ml de dimethyl dichloro silane (silicone).
- placer les spacers.
- refermer les plaques et sceller au "tape" jaune (s'aider des pinces).
- couler le gel en oblique mais le laisser polymeriser à l'horizontal.
- faire une ligne de base avec deux peignes retournés.
- préchauffer le gel (15 minutes si utilisé tout de suite ou 30 minutes s'il a été mis à 4°C la nuit).

### **Mise sur gel**

- mettre les bases 3 minutes à 90°C pour les dénaturer avant de les charger sur le gel.
- laisser migrer 3 minutes après chaque chargement de quatre bases pour laisser pénétrer.
- laisser migrer le temps voulu.

### **Après la migration**

- retire la petite plaque de façon à ce que le gel reste sur la grande plaque.
- mettre la solution de fixateur sur le gel pendant 10 minutes.
- mettre un buvard whatman (3MM Chr) sur le gel afin que celui-ci se fixe dessus.
- recouvrir le gel transféré sur le buvard avec un saran.
- sécher sous vide à 80°C pendant une heure et demie.
- mettre le gel en cassette avec un film d'autoradiographie pendant 12 heures.
- révéler le film pendant 5 minutes.
- rincer à l'eau.
- fixer le film pendant 15 minutes.
- rincer à l'eau et sécher.

#### **II.4.4.2 Le Séquençage automatique.**

Le séquençage automatique, comme le séquençage manuel, est basé sur la méthode des terminateurs de chaînes (Sanger *et al*, 1977). Dans ce cas néanmoins, les terminateurs de chaîne ("dye-terminators") sont marqués par une molécule fluorescente qui, une fois excitée par un laser, émet un rayonnement d'une longueur d'onde précise. Chacune des quatre bases (A, C, G, T) est marquée par une molécule différente.

L'incorporation des quatre terminateurs de chaînes est réalisée en une seule réaction par PCR avec un seul primer. Les étapes successives de dénaturation, d'hybridation et d'extension ont pour résultat l'amplification des produits d'extension. Ces produits sont ensuite purifiés par précipitation à



l'éthanol afin d'éliminer les terminateurs en excès et chargés sur un gel de polyacrylamide. La lecture de ce gel est effectuée par un logiciel par détection des quatre rayonnements correspondant à chaque base. Il est à noter que les quatre "dye-terminators" étant chacun marqué différemment, ils sont mis à migrer sur une seule piste, contrairement au séquençage manuel.

## En pratique:

### La réaction de Cycle sequencing:

- mélanger:

Terminator ready reaction Mix:	8 $\mu$ l.
Primer (1 $\mu$ M):	3,2 $\mu$ l.
DNA template: - single-strand DNA:	+/- 100 ng.
- double-strand DNA:	+/- 400 ng.
- produit PCR:	+/- 200 ng.

- porter à 20  $\mu$ l avec de l'eau stérile.
- ajouter environ 30  $\mu$ l d'huile PCR dans le tube.
- réaliser les cycles PCR suivant:

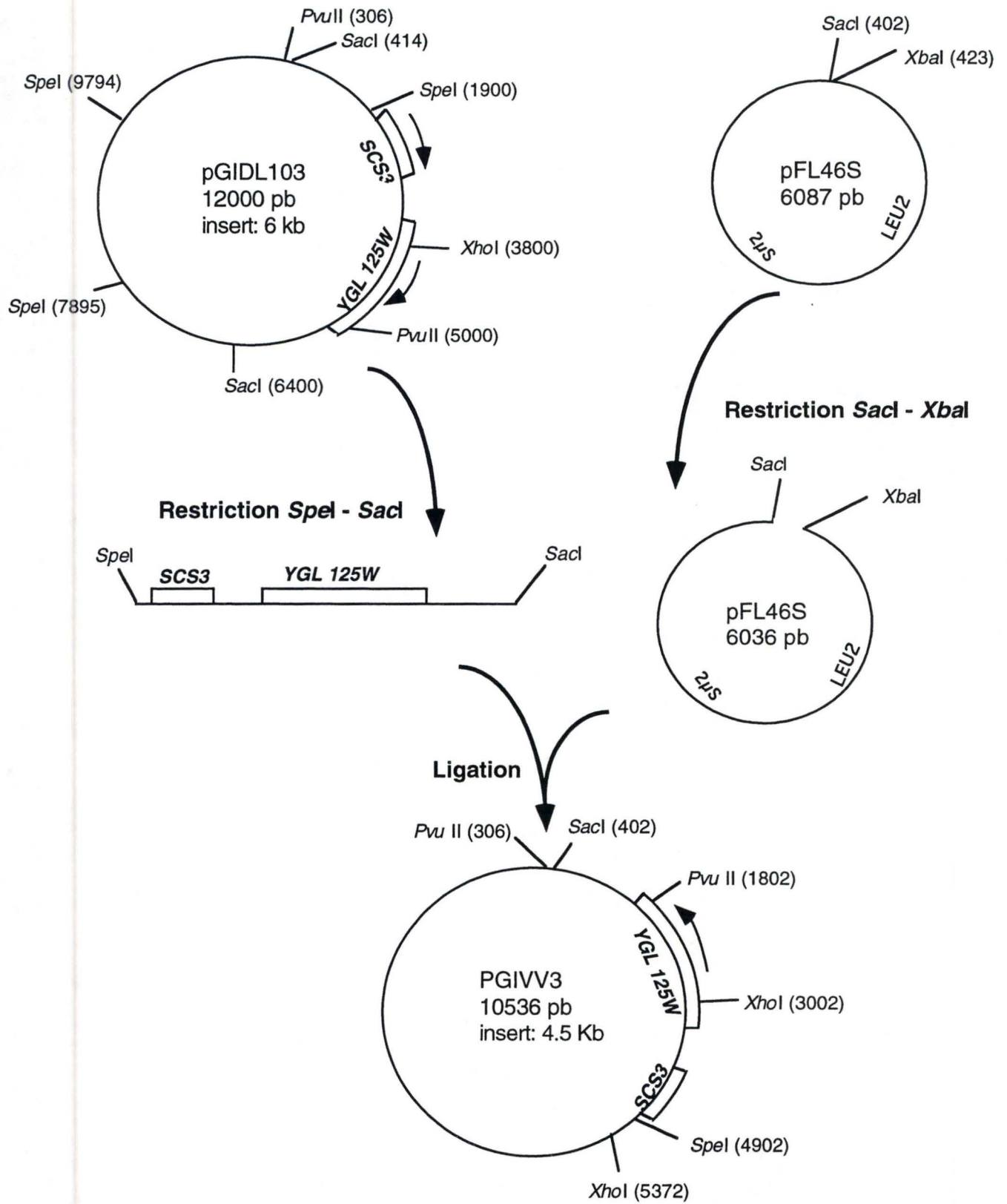
96°C pendant 30 secondes	} répéter 25 fois ce cycle.
50°C pendant 15 secondes	
60°C pendant 4 minutes	

### Purification des produits de la réaction:

- ajouter au produit PCR 2  $\mu$ l d'acétate de sodium 3M pH 4,6 et 50  $\mu$ l d'éthanol 95%.
- vortexer et mettre sur glace pendant 10 minutes.
- centrifuger pendant 30 minutes.
- éliminer l'éthanol.
- sécher le culot sous vide.
- resuspendre le culot dans 6  $\mu$ l de tampon de chargement.
- dénaturer cet échantillon pendant 2 min. A 90°C.
- déposer 1,5  $\mu$ l sur gel de polyacrylamide.

La composition des différents tampons est décrite au point I.1 de ce chapitre.

# *Annexes*





## ANNEXE A: Construction du pGIVV3.

Le plasmide pGIDL103 a été restreint par les enzymes *Sac* I et *Spe* I (Figure A1). Les différents fragments obtenus sont séparés en gel d'agarose. Le fragment de 4450 pb a ensuite été "ligué" dans le pFL46S restreint par les enzymes *Sac* I et *Xba* I (*Spe* I et *Xba* I étant compatibles). Ce mélange de ligation a été incubé un nuit à 14°C et transformé dans la souche X11 bleue de *E. coli*. L'ADN plasmidique de douze transformants a été obtenu par minipréparation (cfr. chapitre Matériel et méthodes).

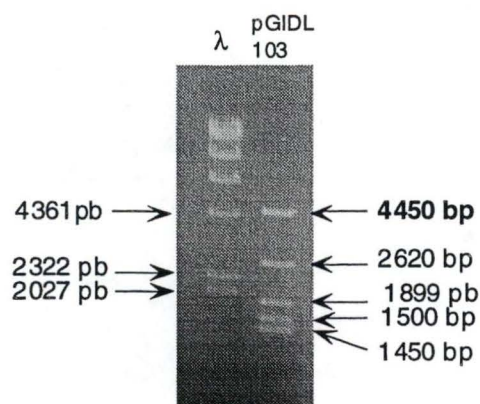


Figure A1: Restriction *Sac*I - *Spe*I du pGIDL103

La construction du pGIVV3 fut vérifiée par restriction aux sites *Xho* I et *Pvu* II (Figure A2). Les profils comportent, comme attendu, respectivement des bandes à 2370 pb et 8166 pb pour la restriction par *Xho* I et 1496 pb et 9040 pb pour la restriction par *Pvu* II.

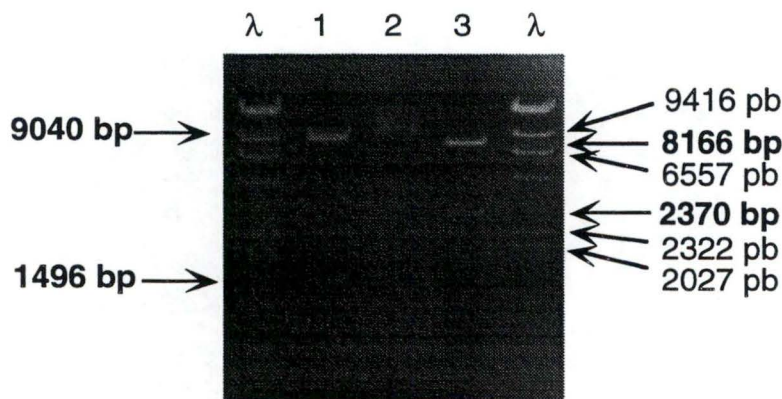
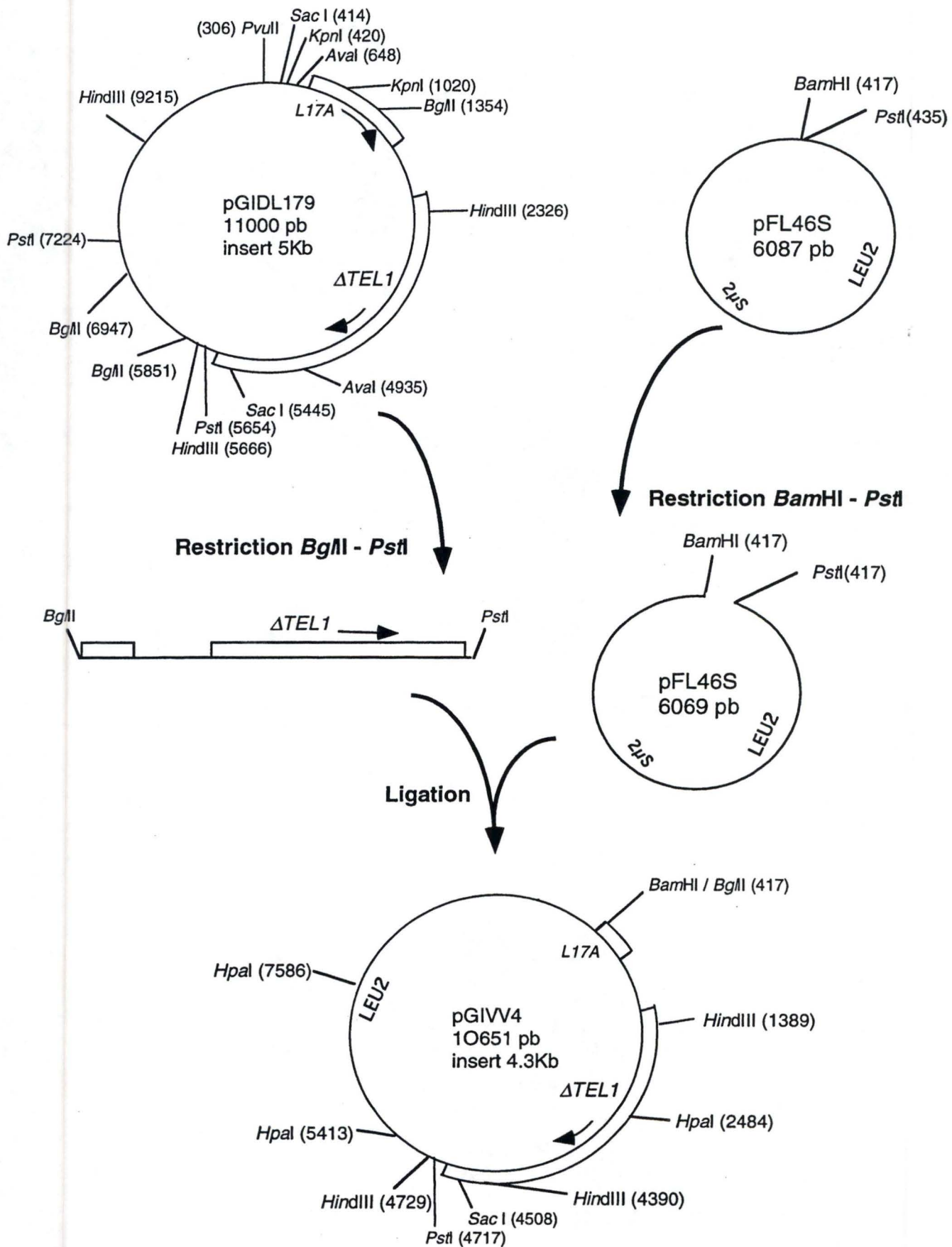


Figure A2: Restrictions diagnostiques sur le pGIVV3

Piste 1: Restriction *Pvu*II sur le pGIVV3 (9040 pb et 1496 pb au lieu de 6078 pb pour la matrice seule).

Piste 2: Non coupé.

Piste 3: Restriction *Xho*I sur le pGIVV3 (8166 pb et 2370 pb au lieu de 6078 pb pour la matrice seule).



## ANNEXE B: Construction du pGIVV4.

Le sous-clonage du pGIDL179 a été réalisé par restriction aux sites *Pst* I et *Bgl* II et ligation dans le pFL46S restreint aux sites *Pst* I et *BamH* I (*Bgl* II et *BamH* I étant compatibles). Au point de vue expérimental, cette construction a été réalisée de la même façon que le pGIVV3.

Le pGIVV4 ainsi construit, a été vérifié par restriction au site *Hpa* I ainsi que par restriction au site *Hind* III

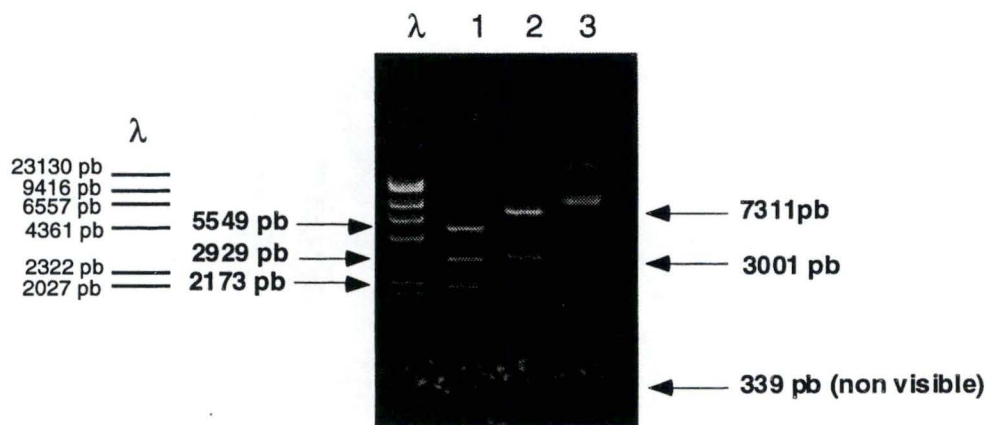


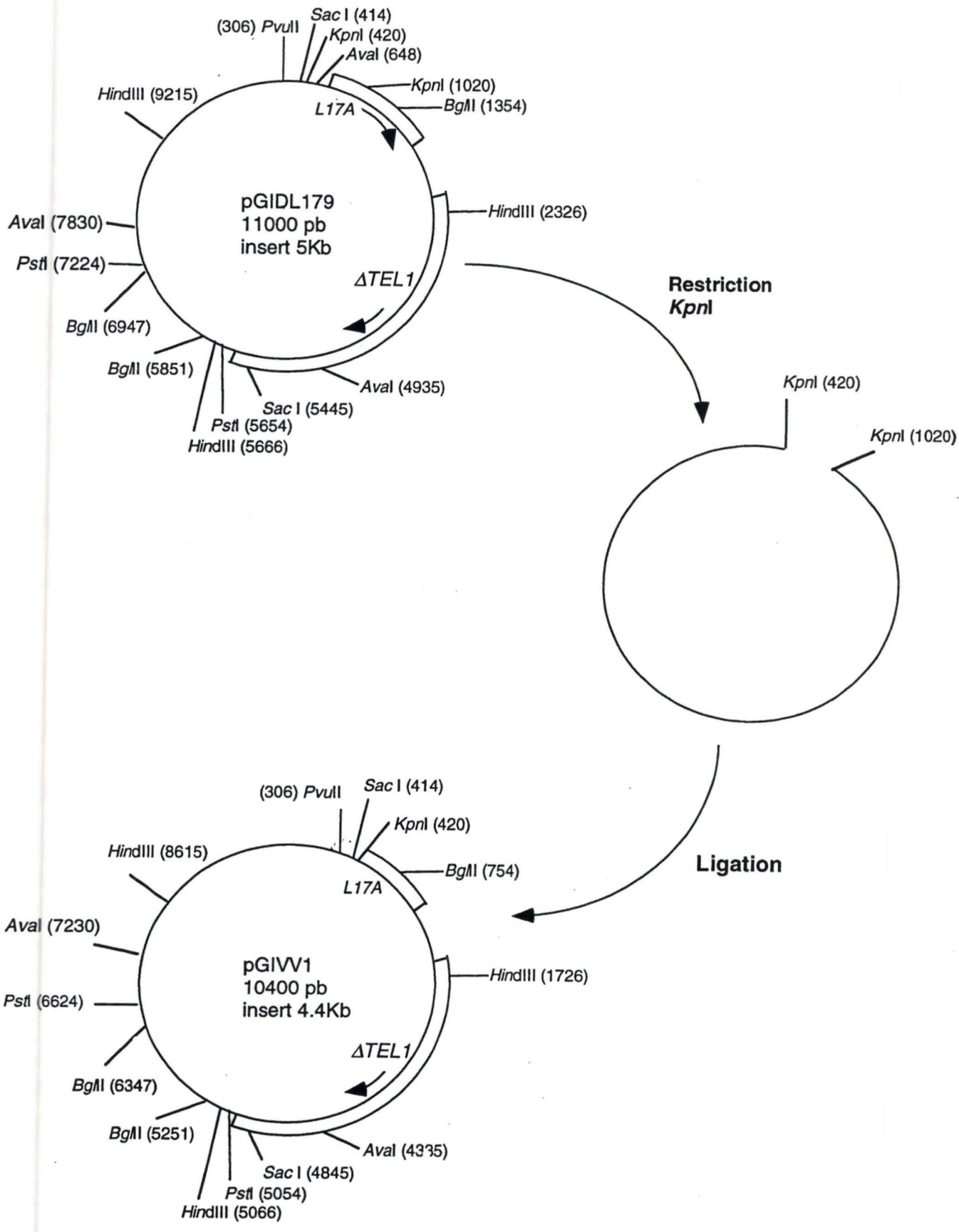
Figure A3: Restriction diagnostique sur le pGIVV4

Piste 1: Restriction *Hpa*I sur le pGIVV4 ( 2173 pb; 2929 pb et 5549 pb au lieu de 2173 pb et 3905 pb pour la matrice seule).

Piste 2: Restriction *Hind*III sur le pGIVV4 ( 7311pb ;3001 pb et 339 pb au lieu de 6078 pb pour la matrice seule).

piste 3: Non coupé.





Annexe C

## ANNEXE C: Construction du pGIVV1.

Le pGIVV1 a été obtenu par restriction aux sites *Kpn* I du pGIDL179 et par religation sur lui même. Après transformation du mélange de ligation dans la souche X11blue de *E. coli*, l'ADN plasmidique a été récupéré par minipréparation et restreint par l'enzyme de restriction *Sac* I et par l'enzyme de restriction *Ava* I.

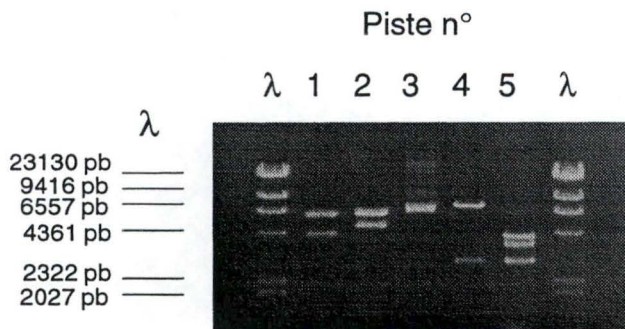


Figure A4 : Restrictions diagnostiques sur le pGIVV1 et pGIDL179

Piste 1: Restriction *Sac*I du pGIVV1 (4431pb et 5969 pb)

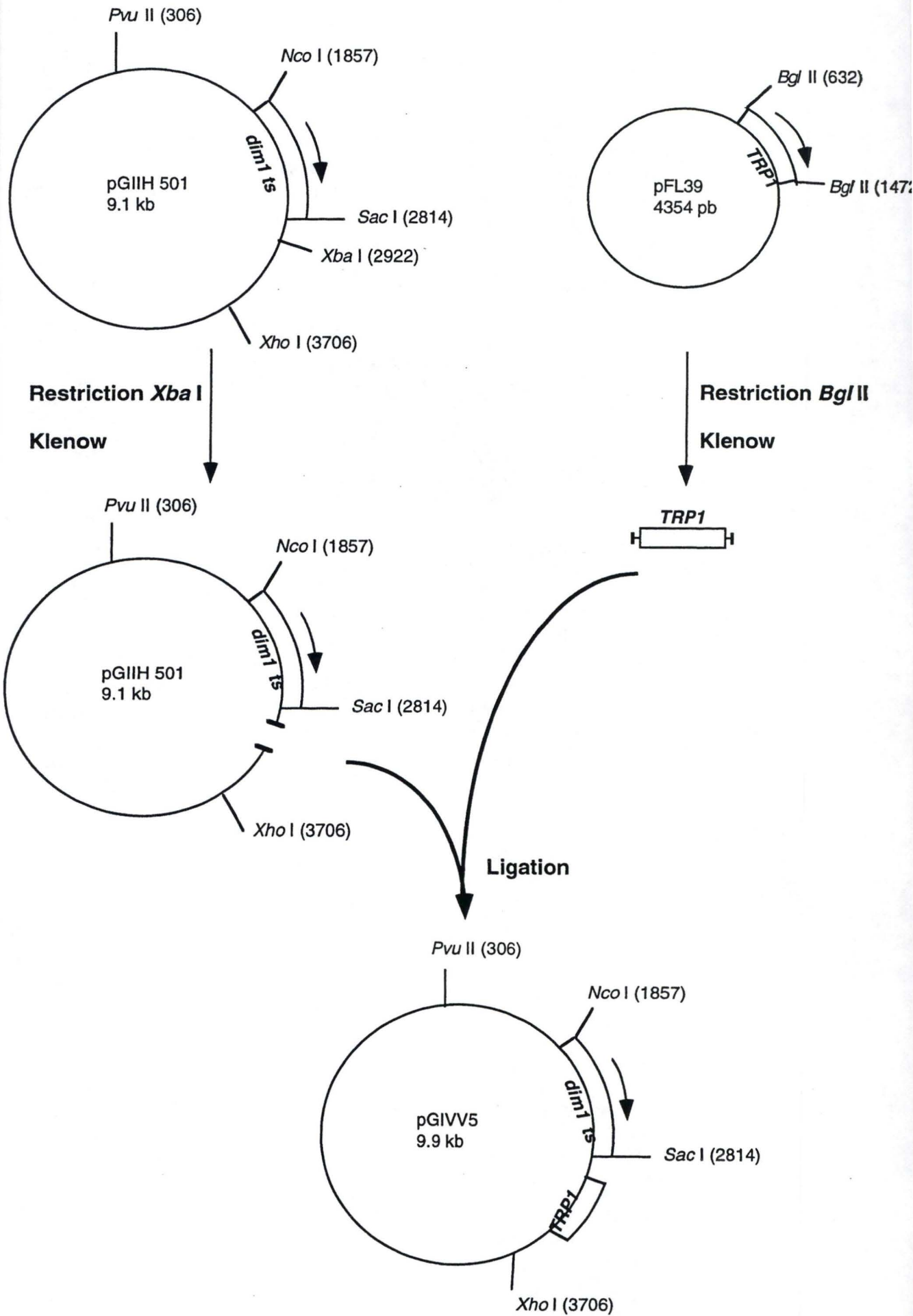
Piste 2: Restriction *Sac*I du pGIDL179 ( 5031 pb et 5969 pb)

Piste 3: Non coupé

Piste 4: Restriction *Ava*I du pGIVV1 (7505 pb et 2895 pb)

Piste 5: Restriction *Ava*I du pGIDL179 (4287; 3818 pb et 2895 pb)

Piste λ: Marqueur de taille λ restreint *Hind*III.



Annexe D



## **ANNEXE D: Construction des pGIVV57 et pGIVV512.**

Ces constructions ont été réalisées comme suit: le marqueur *TRP1* est extrait du pFL39 par restriction *Bgl* II. Les différents fragments (3514 pb et 840 pb) sont séparés en gel d'agarose; le fragment de 840 pb contenant le marqueur *TRP1* est récupéré ("Gene cleaner" cfr. chapitre Matériel et méthodes) et mis à bouts francs par traitement à la klenow. Le marqueur *TRP1* est ensuite ligué (4 heures sur table) dans les plasmides pGIA7 et A12 ouvert au site *Xba* I et mis également à bouts francs par traitement à la "klenow".

La transformation dans la souche XL1 blue et la minipréparation plasmidique ont été réalisées comme déjà décrit auparavant. Une restriction diagnostique par les enzymes *Pvu* II et *Xho* I a été réalisée (résultat non montré).

# *Bibliographie*

Adams, A.E.M. and Botstein, D. (1989). Dominant suppressors of yeast actin mutations that are reciprocally suppressed. *Genet. S. Am.* *121*, 675-683.

Aguilera, A. (1994). Formamide sensitivity: a novel conditional phenotype in yeast. *Genetics* *136*, 87-91.

Aguilera, A. and Benitez, T. (1986). Ethanol-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* *143*, 337-344.

Berteroan, R.W. and Hampsey, M. (1995). Sequence, map position and genome organization of the *RPL17B* gene, encoding ribosomal protein L17b in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *11*, 761-766.

Bousquet, I., Dujardin, G., and Slonimski, P.P. (1991). *ABC1*, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc1 complex. *EMBO J.* *10*, 2023-2031.

Budd, M. and Campbell, J.L. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *84*, 2838

Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 9578-9582.

Cigan, A.M., Pabich, E.K., Feng, L., and Donahue, T.F. (1989). Yeast translation initiation suppressor *sui2* encodes the  $\alpha$  subunit of eukaryotic initiation factor 2 and shares sequence identity with the human  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 2784-2788.

Cohn, M. and Blackburn, E.H. (1995). Telomerase in yeast. *Science* *269*, 396-400.

Evrard, V. (1995). Création par mutagenèse aléatoire in vitro utilisant la PCR, de mutants de Dim1p thermo ou cryosensibles pour la croissance. Mémoire de fin d'étude. Facultés Universitaires Notre Dame de la paix. Namur



Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Gramatikoff, K., Georgiev, O., and Schaffner, W. (1994). Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucl. Acids Res.* 22, 5761-5762.

Green, R. and Noller, H.F. (1996). In vitro complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for *Escherichia coli* 50S ribosomal subunit assembly and function. *RNA* 2, 1011-1021.

Greenwell, P.W., Kronmal, S.L., Porter, S.E., Gassenhuber, J., Obermaier, B., and Petes, T.D. (1995). *TELI*, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* 82, 823-829.

Helser, T.L., Davies, J.E., and Dahlberg, J.E. (1972). Mechanism of Kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nature New Biology* 235, 6-9.

Holliday, R. (1996). Endless quest. *BioEssays* 18, 3-5.

Hosaka, K., Nikawa, J., Kodaki, T., Ishizu, H., and Yamashita, M. (1994). Cloning and sequence of the *SCS3* gene which is required for inositol prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 116, 1317-1321.

Keegan, L., Gill, G., and Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699-704.

Kim, N.W. and et al., (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2014.

Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A.-L., Desgrès, J., and Vandenhoute, J. (1994). The *DIMI* gene responsible for the conserved m<sup>6</sup>Am<sup>6</sup>Am<sup>6</sup> dimethylation in the 3'-terminal loop of 18S rRNA is essential in yeast. *J. Mol. Biol.* 241, 492-497.

Lafontaine, D., Vandenhoute, J., and Tollervey, D. (1995). The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes & Dev.* 9, 2470-2481.

Lake, J.A. (1976). Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *J. Mol. Biol.* 105, 131-159.

Larson, D.E., Zahradka, P., and Sells, B.H. (1991). Control points in eucaryotic ribosome biogenesis. *Biochem. Cell. Biol.* 69, 5-22.

Linder, P. and Slonimski, P.P. (1989). An essential yeast protein, encoded by duplicated genes *TIF1* and *TIF2* and homologous to the mammalian translation initiation factor eIF-4A, can suppress a mitochondrial missense mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2286-2290.

Louis, E.J. (1995). The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1553-1573.

Louis, E.J. and Haber, J.E. (1992). The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1331, 559-574.

Ma, J. and Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51, 113-119.

Ma, J. and Ptashne, M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55, 443-446.

Maleska, R. and Clark-Walter, G.D. (1993). Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast* 9, 53-58.

Martin, C., Okamura, S., and Young, R. (1990). Genetic exploration of interactive domains in RNA polymerase II subunits. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1908-1914.

Novick, P., Osmond, B.C., and Botstein, D. (1989). Suppressors of yeast actin mutations. *Genetics* 121, 659-674.

Nègre, D., Weitzmann, C., and Ofengand, J. (1989). *In vitro* methylation of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA and 30S ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 4902-4906.



- Obermaier, B., Gassenhuber, J., Piravandi, E., and Domdey, H. (1995). Sequence analysis of a 78.6 kb of the left end of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome II. *Yeast* 11, 1103-1112.
- Peculis, B.A. and Mount, S.M. (1996). Ribosomal RNA: Small nucleolar RNAs make their mark. *Current Biol.* 6, 1413-1415.
- Phizicky, E. and Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 59, 94-123.
- Plessis, A. and Camonis, J.H. (199). Le système double-hybride mode d'emploi. *S. Fr. de Génétique*
- Poldermans, B., Goosen, N., and Van Knippenberg, P.H. (1979). Studies on the function of two adjacent N6, N6-dimethyladenosines near the 3' end of 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli* (I. The effect of kasugamycin on initiation of protein synthesis). *J. Biol. Chem.* 254, 9085-9089.
- Poldermans, B., Van Buul, C.P.J.J., and Van Knippenberg, P.H. (1979). Studies on the function of two adjacent N3, N6-dimethyladenosine near the 3' end of 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli* (II. The effect of the absence of the methyl groups on initiation of protein biosynthesis). *J. Biol. Chem.* 254, 9090-9093.
- Sanchez, Y., Desany, B., Jones, W.J., Liu, Q., Wang, B., and Elledge, S.J. (1996). Regulation of *RAD53* by the *ATM* - like kinases *MEC1* and *TEL1* in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 271, 357-360.
- Schneider, E., Blundell, M., and Kennell, D. (1978). Translation and mRNA decay. *Mol. Gen. Genet.* 160, 121-129.
- Singer, M.S. and Gotschling, E. (1994). *TLC1* : template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404-409.
- Sparling, P.F., Ikeya, Y., and Elliot, D. (1973). Two genetic loci for resistance to kasugamycin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 113, 704-710.
- Thammana, P. and Held, W.A. (1974). Methylation of 16S RNA during ribosome assembly *in vitro*. *Nature* 251, 682-686.



Thomas, D., Rothstein, R., Rosenberg, N., and Surdin-Kerjan, Y. (1988). *SAM2* encodes the second methionine S-adenosyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae* : physiology and regulation of both enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 8, 5132-5139.

Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1987). *SAM1*, the structural gene for one of the S-adenosylmethionine synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262, 16704-16709.

Tollervey, D. (1996). Small nucleolar RNAs guide ribosomal RNA methylation. *Science* 273, 1056-1057.

Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E.C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72, 443-457.

Van Buul, C.P.J.J., Damm, J.B.L., and Van Knippenberg, P.H. (1983). Kasugamycin resistant mutants of *Bacillus stearothermophilus* lacking the enzyme for the methylation of two adjacent adenosines in 16S ribosomal RNA. *Mol. Gen. Genet.* 189, 475-478.

Van Buul, C.P.J.J. and Van Knippenberg, P.H. (1985). Nucleotide sequence of the *ksgA* gene of *Escherichia coli* : comparison of methyltransferases effecting dimethylation of adenosine in ribosomal RNA. *Gene* 38, 65-72.

Van Charldrop, R. and Heus, H.A. (1981). Destabilization of secondary structure in 16S ribosomal RNA by dimethylation of two adjacent adenosines. *Nucl. Acids Res.* 9, 4413-4422.

Van Gemen, B., Koets, H.J., Plooy, C.A.M., Bodlaender, J., and Van Knippenberg, P.H. (1987). Characterization of the *ksgA* gene of *Escherichia coli* determining kasugamicin sensitivity. *Biochimie* 69, 841-848.

Van Knippenberg, P.H. (1986). Structural and functional aspects of the N6, N6 dimethyladenosines in 16S ribosomal RNA. In *Structure, fonction and genetics of ribosomes*. B. Hardesty and G. Kramer, eds. (New York: Springer-Verlag New York Inc.), pp. 412-424.

Verschoor, A., Srivastava, S., Grassucci, R., and Franck, J. (1996). Native 3D structure of eukaryotic 80S ribosome: morphological homology with the *E. coli* 70S ribosome. *J. Cell Biol.* *133*, 495-505.

Vester, B., Hansen, L.H., and Douthwaite, S. (1995). The conformation of the 23S rRNA nucleotide A2058 determines its recognition by the ErmE methyltransferase. *RNA* *1*, 501-509.

Wang, S. and Zakian, V. (1990). Sequencing of *Saccharomyces* telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 4415-4419.

Woodcock, J., Moazed, D., Cannon, M., Davies, J., and Noller, H.F. (1991). Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* *10*, 3099-3103.

Yang, X., Hubbard, E.J., and Carlson, M. (1992). A protein kinase substrate indentified by the two-hybrid system. *Science* *257*, 680-682.

Zagorski, J., Tollervey, D., and Fournier, M.J. (1988). Characterization of an *SNR* gene locus in *Saccharomyces cerevisiae* that specifies both dispensible and essential small nuclear RNAs. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 3282-3290.