

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Analyse par mutagenèse dirigée des domaines fonctionnels du répresseur transcriptionnel KmMig1p chez *Saccharomyces cerevisiae*

Wyngaert, David

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.

Analyse par mutagenèse dirigée des domaines fonctionnels du répresseur transcriptionnel KmMig1p chez *Saccharomyces cerevisiae*

WYNGAERT David

Résumé

La protéine Mig1p est un facteur central de la répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il intervient dans la répression de trois classes de gènes correspondant à trois voies métaboliques différentes: le métabolisme des sources alternatives de carbone, la gluconéogenèse et la respiration. En présence de glucose, la répression par Mig1p requiert à la fois sa liaison à l'ADN par deux motifs en doigts de zinc et le recrutement des protéines Cyc8p et Tup1p par son domaine effecteur. En absence de glucose, Mig1p est inhibé via l'action directe ou indirecte de la kinase Snf1p. Dans le but de compléter les connaissances des relations structure-fonction de Mig1p, nous avons procédé à une analyse structurale des protéines homologues Mig1p des levures du genre *Kluyveromyces*, relativement proche du genre *Saccharomyces*. Bien que la similarité entre les trois protéines homologues Mig1p de *K. marxianus*, *K. lactis* et *S. cerevisiae* soit relativement faible hormis la région des doigts de zinc, un alignement multiple a permis de déterminer 12 motifs dont certains sont contenus dans les domaines précédemment identifiés fonctionnellement chez ScMig1p par le groupe de H. Ronne. Nous avons réalisé une dissection fonctionnelle de KmMig1p par mutagenèse dirigée. Nous avons démontré que le domaine de régulation de ScMig1p est conservé dans KmMig1p, que la région adjacente aux doigts de zinc, incluant les domaines B (basique) et Q (polyglutamine) est nécessaire à la répression et enfin que la répression par KmMig1p est, comme pour ScMig1p, dépendante des protéines Cyc8p et Tup1p.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Décembre 1996

Promoteur: Prof. J. VANDENHAUTE

Je remercie tout d'abord le professeur Vandenhautte pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et suivi tout au long de ces dix mois.

Je remercie les membres du jury, M. Vidal, J-P. Cassart, I. Alexandre, J-M. Ladrière pour avoir lu ce mémoire.

Pour leur bonne humeur, je remercie tous les membres du laboratoire de génétique, merci Rose-ma, Monique, Domi, MMe Isa, Flore, Damien, Madam Libion et bien sûr Jean-Pol.

Je remercie ma mère, mon frère, Sandrine et ses parents pour leur soutien.

Un merci particulier à Isa. G. pour le coup de pouce lors de la rédaction...

ABREVIATIONS

A	Adénosine
a a	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPK	Kinase activée par l'AMP
AMPc	AMP cyclique
Amp ^r	Marqueur de résistance à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARS	Séquence de réplication autonome
bp	Paire de bases
C	Cytidine
CEN	Séquence centromérique
CTD	Carboxy-Terminal Domain
dNTP	désoxyribonucléoside-5'-triphosphate
DO	Densité optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
g	Gramme
G	Guanosine
Inr	élément initiateur de la transcription
IPTG	Isopropyl, β-D thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Litre
LB	Milieu de Luria-Bertani
M	Molaire
MCS	Site multiple de clonage ("Multiple Cloning Site")
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mU	Milliunité
N	A, C, G, T
nM	Nanomolaire
ONPG	Ortho-nitrophényl β-D-galactopyranoside
ORF	Phase ouverte de lecture ("Open Reading Frame")
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne ("Polymerase Chain Reaction")
PIC	Complexe d'initiation de la polymérase
PM	Poids Moléculaire
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide
T	Thymidine
TAF	Facteurs associés à la TBP
TBP	"TATA Binding Protein"
TPR	Tetratrico peptide repeat
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
U	Uridine
UAS	Séquence d'activation en amont ("Upstream Activating Sequence")
URS	Séquence de répression en amont ("Upstream Repressing Sequence")
UV	Ultra-Violet
V	Volt
X-gal	5-Bromo 4-Chloro 3-indoyl, β-D galactopyranoside
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

1. L'IMPORTANCE DE LA REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION GENETIQUE.....	1
2. LA REPRESSION GLUCOSE CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ...	2
2.1. Les cibles de la répression glucose.....	2
2.2. Le paradigme de la répression glucose : le gène <i>SUC2</i>	3
2.2.1. Introduction.....	3
2.2.2. Mécanisme proposé pour le contrôle du gène <i>SUC2</i>	4
2.2.3. Le promoteur du gène <i>SUC2</i> et les facteurs TRANS	4
2.3. La protéine ScMig1p, effecteur central de la répression glucose.....	5
2.3.1. Introduction.....	5
2.3.2. Les doigts de zinc et la liaison à l'ADN.....	5
2.3.3. Le domaine basique : ses rôles potentiels.....	7
2.3.4. Le domaine effecteur et le recrutement du complexe de co-répression	7
2.3.5. Le domaine de régulation, cible directe ou indirecte de la kinase Snf1p.....	8
3. LE REPRESSEUR <i>KMMIG1P</i> DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>	8
3.1. Le clonage de <i>KmMIG1</i>	8
3.2 Analyse structurale comparative des protéines Mig1p connues.....	9

RESULTATS

1. DESCRIPTION DU TEST DE COMPLEMENTATION DES ALLELES DE <i>KMMIG1</i> DANS <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	11
1.1. Principe du test de complémentation	11
1.2. Les éléments du système rapporteur.....	12
1.2.1. Les souches receveuses.....	12
1.2.2. Le gène rapporteur.....	12
1.2.3. Le promoteur	12
1.2.4. Le plasmide rapporteur	13
1.2.5. Les plasmides tests.....	13
2. ETUDE FONCTIONNELLE DE L'ALLELE <i>KMMIG1</i> SAUVAGE PAR LE TEST DE COMPLEMENTATION.....	13
2.1. KmMig1p se substitue fonctionnellement à ScMig1p.....	14
2.1.1. But de l'expérience	14

Table des matières

2.1.2. Résultats.....	14
2.1.3. Conclusions.....	15
2.2. KmMig1p est régulé chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.2.1. But de l'expérience	16
2.2.2. Résultats.....	16
2.2.3. Conclusions.....	17
2.3. Importance des protéines Ssn6p et Tup1p dans le rôle du répresseur KmMig1p	18
2.3.1. But de l'expérience	18
2.3.2. Résultats.....	18
2.3.3. Conclusions.....	19
2.4. Conclusion générale.....	20
3. ETUDE FONCTIONNELLE D'ALLELES MUTES DE <i>KMMIG1</i> PAR LE TEST DE COMPLEMENTATION	20
3.1. La régulation par le glucose se fait sur la région R de KmMig1p.....	21
3.1.1. But de l'expérience	21
3.1.2. Résultats.....	21
3.1.3. Conclusions.....	22
3.2. Les domaines B et Q sont nécessaires à la répression par KmMig1p	23
3.2.1. But de l'expérience	23
3.2.2. Résultats.....	23
3.2.3. Conclusions.....	24
3.3. Conclusion générale	25

DISCUSSION

1. <i>KMMIG1P</i> REGULE LE PROMOTEUR <i>PSUC2</i> A LA MANIERE DE <i>SCMIG1P</i>	26
1.1. KmMig1p réprime le promoteur pSUC2.....	26
1.2. KmMig1p est sous le contrôle de la voie de régulation glucose.....	26
1.3. KmMig1p serait régulé par la protéine kinase Snf1p.....	26
1.4. La fonction de répression de KmMig1p nécessite les protéines Ssn6p et Tup1p.....	27
1.5. Importance fonctionnelle des domaines B et Q de KmMig1p.....	28

2. IL EXISTE UNE VOIE DE REPRESSION DE PSUC2 INDEPENDANTE DE MIG1P 29

MATERIEL ET METHODES

1. SOLUTIONS ET TAMPONS 32

 1.1. Solutions..... 32

 1.2. Tampons 37

2. SOUCHES ET PLASMIDES..... 40

 2.1. Souches..... 40

 2.1.1. Souche de bactérie : XI1Blue d'*E. coli* 40

 2.1.2. Souches de *Saccharomyces cerevisiae*..... 40

 2.2. Plasmides..... 41

 2.2.1. pJO25 41

 2.2.2. pHR68 41

 2.2.3. pMc120 42

 2.2.4. pJO132XH 42

 2.2.5. pGIKm14 42

3. MILIEUX DE CULTURE 43

 3.1. Les milieux de culture bactériens..... 43

 3.1.1. Le milieu LB..... 43

 3.2. Les milieux de culture pour les levures..... 43

 3.2.1. Milieu YPD..... 43

 3.2.2. Milieu minimum complet 44

4. TECHNIQUES RELATIVES A L'ADN..... 45

 4.1. La transformation 45

 4.1.1. Transformation dans *E. coli* XL1-Blue..... 45

 4.1.1.1. Electroporation..... 45

 4.1.1.2. Par la technique utilisant le chlorure de calcium..... 46

 4.1.1.3. Sélection des transformants..... 47

 4.1.2. Transformation de levure..... 47

 4.1.2.1. Par la méthode PEG..... 47

 4.2. Purification d'ADN par extraction au phénol-chloroforme..... 48

 4.2.1. Introduction..... 48

 4.2.2. Purification..... 48

 4.2.1.3. Précipitation de l'ADN plasmidique..... 48

Table des matières

4.3. Restriction d'ADN.....	49
4.3.1. Généralités	49
4.3.2. Au point de vue pratique.....	49
4.3.3. Remarques générales.....	50
4.4. Electrophorèse.....	51
4.4.1. Buts	51
4.4.2. Principe	51
4.4.3. Au point de vue pratique.....	52
4.5. Récupération d'ADN inclus dans un gel d'agarose.....	52
4.5.1. Introduction.....	52
4.5.2. GeneClean II Kit (BIO 101).....	53
4.5.3. Qiaex II	53
4.5.4. Remarque.....	54
4.6. Déphosphorylation	54
4.6.1. Introduction.....	54
4.6.2. Protocole.....	54
4.7. Ligation.....	55
4.7.1. Principe	55
4.7.2. En pratique.....	55
4.7.3. Remarques générales.....	55
4.8. Préparation d'ADN plasmidique.....	56
4.8.1. Introduction.....	56
4.8.2. La minipréparation.....	56
4.8.2.1. Culture bactérienne.....	56
4.8.2.2. Lyse des cellules	56
4.8.2.3. Récupération des plasmides	56
4.8.3. La midipréparation.....	57
4.8.3.1. Introduction.....	57
4.8.3.2. Culture.....	57
4.8.3.3. Lyse des cellules	57
4.8.3.4. Mise sur colonne	58
4.9. La Polymerase Chain Reaction : PCR.....	58
4.9.1. Introduction.....	58
4.9.2. Protocole.....	59
4.9.3. Remarques générales.....	59
4.10. Le séquençage	60
4.10.1. Le séquençage manuel.....	60
4.10.1.1. Principe du séquençage.....	60
4.10.1.2. En pratique	60
4.10.1.3. Protocole (T ⁷⁷ Sequencing™ kit Pharmacia).....	61
4.10.2. Le séquençage automatique.....	63
4.10.2.1. Introduction	63
4.10.2.2. Protocole.....	64

5. TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTEINES	66
5.1. Dosage de l'activité β -galactosidase	66
5.1.2. Introduction.....	66
5.1.3. Protocole.....	66

INTRODUCTION

1. L'importance de la répression transcriptionnelle dans la régulation de l'expression génétique

(Lewin, 1994; Alberts, 1994)

L'ADN d'un organisme encode les ARN et les protéines nécessaires à la construction et à l'organisation fonctionnelle des cellules. Qu'il s'agisse des quelques millions de nucléotides d'un génome bactérien ou des quelques milliards de nucléotides des génomes d'organismes supérieurs, une régulation de tous les gènes est capitale pour assurer l'économie et le bon fonctionnement cellulaire et, d'une manière générale, d'un organisme entier.

Chez les organismes supérieurs, les cellules somatiques se différencient grâce au contrôle de l'expression génétique bien qu'elles possèdent généralement le même matériel génétique. Chez les eucaryotes, ce contrôle peut s'exercer, en principe, à des niveaux divers; citons le contrôle transcriptionnel, le contrôle de la maturation, du transport et de la dégradation des ARN-m, le contrôle traductionnel et post-traductionnel et enfin le contrôle de l'activité et de la stabilité des protéines.

Parmi toutes ces régulations potentielles, le contrôle transcriptionnel est le plus important. Il permet à toutes les cellules d'activer des gènes encodant les protéines nécessaires à certains moments du cycle cellulaire ou dans certaines conditions environnementales ou, au contraire, de réprimer d'autres gènes lorsque leur expression devient inutile.

L'étape d'initiation de la transcription est la cible principale du contrôle de l'expression des gènes de classe II (qui sont les gènes encodant les protéines). De nombreux facteurs interviennent au niveau de l'initiation de la transcription. Certains de ces facteurs favorisent la formation d'un PIC (complexe de pré-initiation de la polymérase II) alors que d'autres l'empêchent ou la rendent plus difficile. Nous ne passerons pas en revue toutes les caractéristiques de chacun des facteurs intervenant dans la formation du PIC puisqu'on connaît déjà plus de 70 polypeptides (Berk, 1995) associés à la formation de ce complexe. L'assemblage de ces différents constituants est souvent considéré comme un processus séquentiel (Lewin, 1994).

Il n'est apparu que récemment qu'un complexe dit 'holoenzyme de la polymérase II' ou 'transcriptosome' existe à l'état préassemblé dans la cellule. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, cet holoenzyme semble

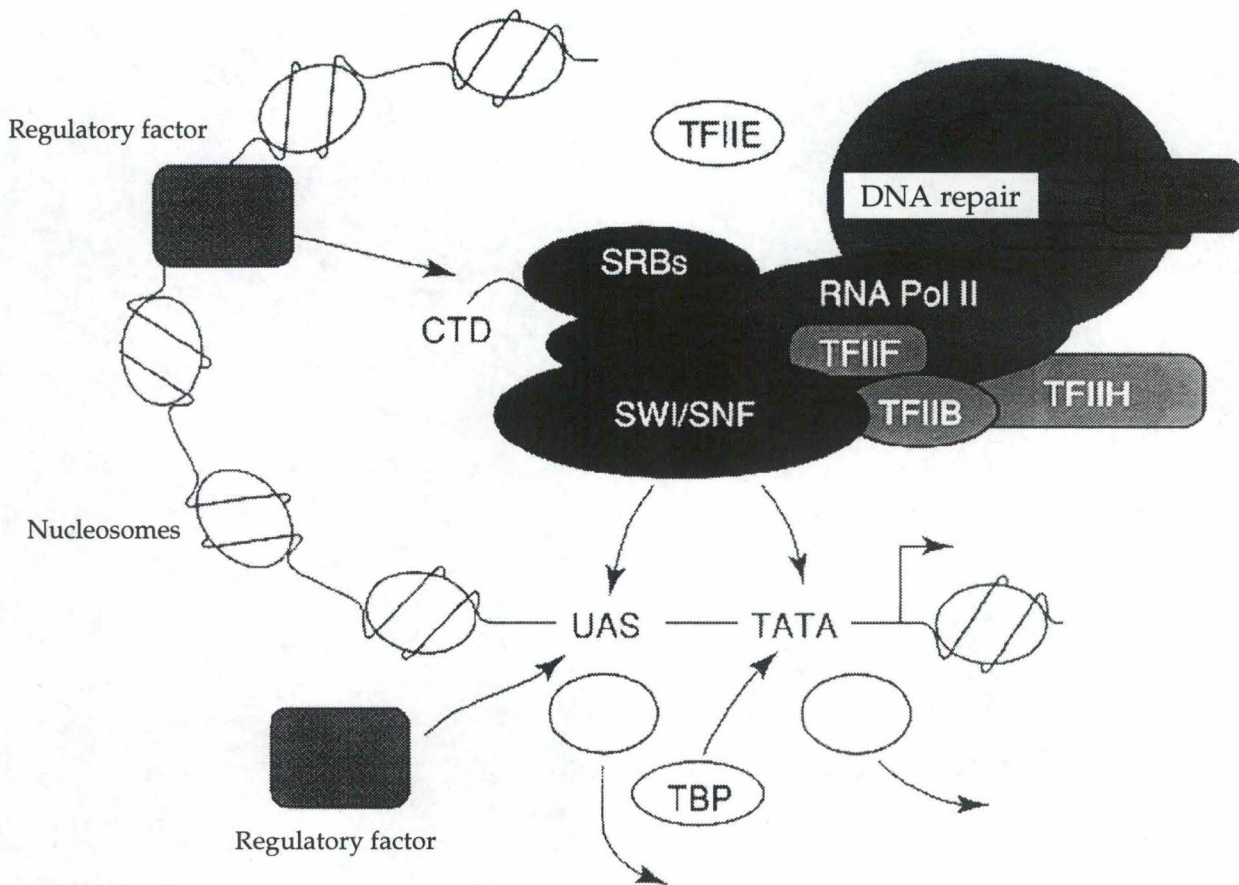


Figure 1 : Représentation schématique de la machinerie transcriptionnelle Pol II. Les protéines SWI/SNF ainsi que des composants de la machinerie de réparation de l'ADN peuvent s'associer avec l'holoenzyme de l'ARN polymérase II. L'holoenzyme est composé de plusieurs sous-unités : l'ARN polymérase II, les protéines SRB, les facteurs de transcription TFIIB, TFIIH et TFIIF. Le 'CTD' est le domaine C-terminal de la grande sous-unité de l'ARN Pol II. Les protéines SWI/SNF sont capables de déplacer les nucléosomes localisés près d'une UAS ou de la boîte TATA ; elles facilitent donc la fixation de facteurs de régulation ainsi que la fixation de la TBP (TATA Binding Protein) sur la boîte TATA.

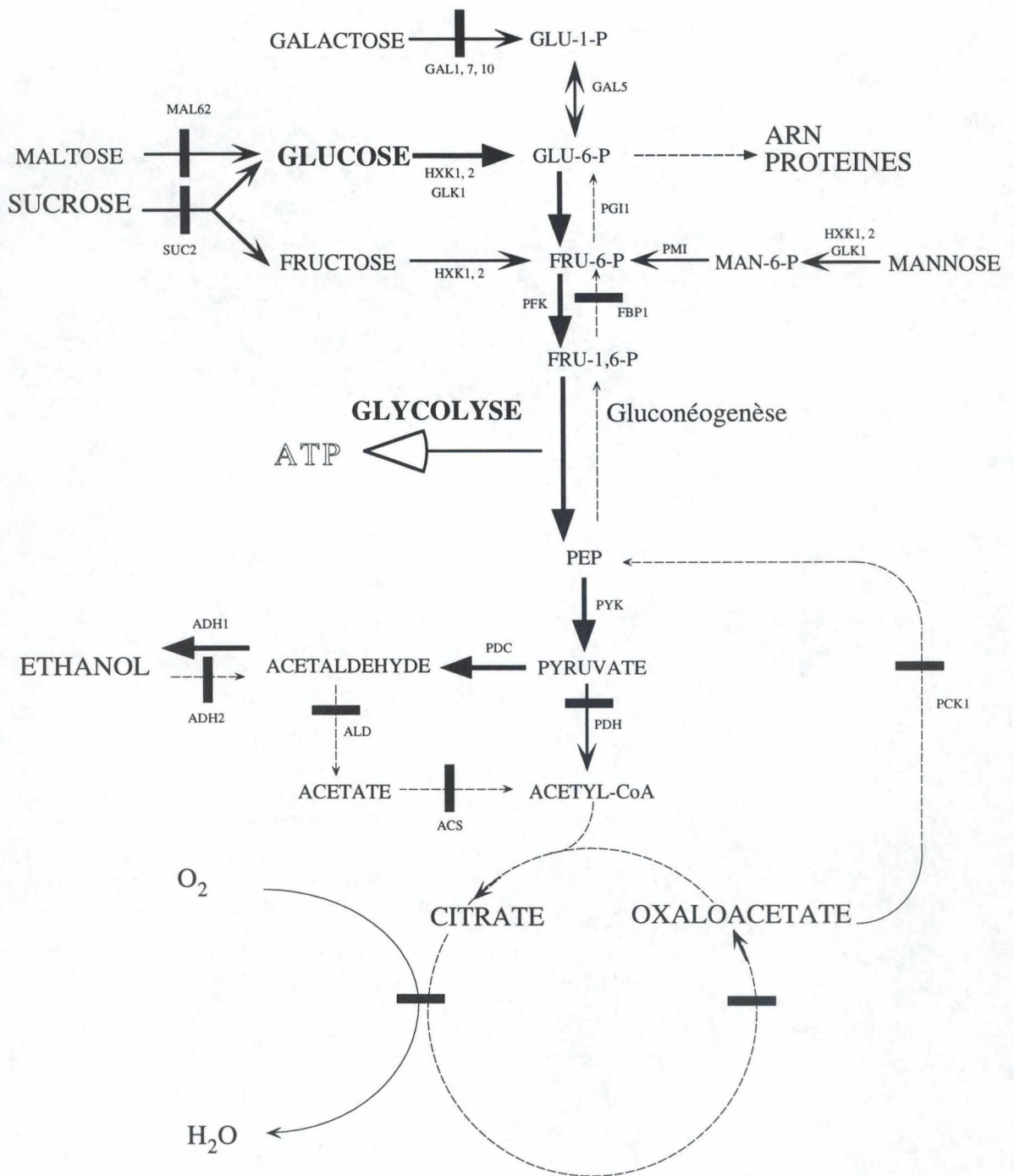


Figure 2 : Schéma simplifié du métabolisme du carbone dans des cellules de levure en présence de glucose (Ronne, 1995). Les flèches en traits épais renseignent la voie métabolique impliquée dans l'utilisation du carbone. Les flèches en traits discontinus représentent la voie de la gluconéogenèse. Les flèches barrées d'un trait épais représentent les étapes enzymatiques pour lesquelles le gène est réprimé en présence de glucose.

interagir avec le complexe multiprotéique SWI/SNF; cette association faciliterait l'accès de l'holoenzyme aux gènes à transcrire grâce au déplacement des nucléosomes par le complexe SWI/SNF. Actuellement, on pense que le transcriptosome est aussi capable d'interagir avec la machinerie de réparation de l'ADN. L'association de ces trois complexes (holoenzyme de l'ARN polymérase II, complexe SWI/SNF et complexe de réparation de l'ADN) forment un énorme complexe protéique (3MDa) dont la taille serait proche de celle du ribosome. Notons également qu'un complexe de la même taille (voire plus grand) serait également présent dans les cellules de mammifères (Halle, 1996).

La **Figure 1** donne une vue d'ensemble simplifiée de la conception actuelle d'un transcriptosome.

2. La répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae*

2.1. Les cibles de la répression glucose

(Gancedo, 1992) (Trumbly, 1992) (Ronne, 1995)

La 'carbon catabolite repression' est un exemple de régulation négative classique bien étudié chez *Escherichia coli*. En présence de glucose (source de carbone préférée), la synthèse des enzymes requises pour le métabolisme des sucres alternatifs est réprimée principalement au niveau transcriptionnel.

Chez *Saccharomyces cerevisiae* où le glucose est la source préférentielle de carbone, on parle de la répression par le glucose¹. Ce phénomène central est impliqué à différents niveaux (**Figure 2**) :

- dans le métabolisme des sucres alternatifs tels le sucrose, le maltose et le galactose (codés par les gènes *SUC*, *MAL* et *GAL*).
- dans le métabolisme des sources de carbone non fermentescibles tels le glycérol, l'éthanol et l'acétate (*ADH2*, Acétyl co-A synthétase).
- dans la gluconéogenèse (Isocitrate lyase, fructose 1,6-biphosphatase, codées respectivement par les gènes *ICL1* et

¹ En présence de glucose, on parle de conditions de répression ; lorsqu'il n'y a pas de glucose dans le milieu, on parle de conditions de dérpression.

FBP1). Notons que l'Isocitrate lyase est plus spécialement impliquée dans la voie du glyoxylate.

- du métabolisme respiratoire (cytochromes tel l'iso1 cytochrome c encodé par le gène *CYC1*).
- dans le développement mitochondrial et la fonction peroxysomale.

Ces différents contrôles par le glucose sont majoritairement de type transcriptionnel. Notons que l'expression du gène *CYC1* (codant pour l'iso1 cytochrome c) est régulée à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau de la stabilité du m-RNA (Gancedo, 1992).

2.2. Le paradigme de la répression glucose : le gène *SUC2*

2.2.1. Introduction (Trumbly, 1992)

L'invertase est l'enzyme qui hydrolyse le sucrose extracellulaire en glucose et en fructose. Cette enzyme est encodée par les gènes *SUC* constituant une famille de gènes. Habituellement, un seul gène *SUC* est actif dans une souche déterminée.

Le gène *SUC2* est le mieux caractérisé de cette famille. Ce gène fournit un bon modèle d'étude de la répression glucose puisqu'il est uniquement régulé par cette voie de régulation et nullement par activation (Nehlin et Ronne, 1990).

Selon les conditions de culture (absence ou présence de glucose), on peut observer des différences de plus de 800 fois au niveau de l'expression du gène *SUC2* (Gancedo, 1992).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, deux types de mutations ont été isolées parmi celles qui affectent la régulation du gène *SUC2* :

- Les mutations de dérépression où le gène *SUC2* est toujours réprimé même en absence de glucose. La répression du gène est donc dite constitutive. (cas des mutants *snf1* et *snf4* (Sucrose Non-Fermenting)).
- Les mutations de répression où le gène *SUC2* est toujours exprimé et ce, même en présence de glucose. L'expression du

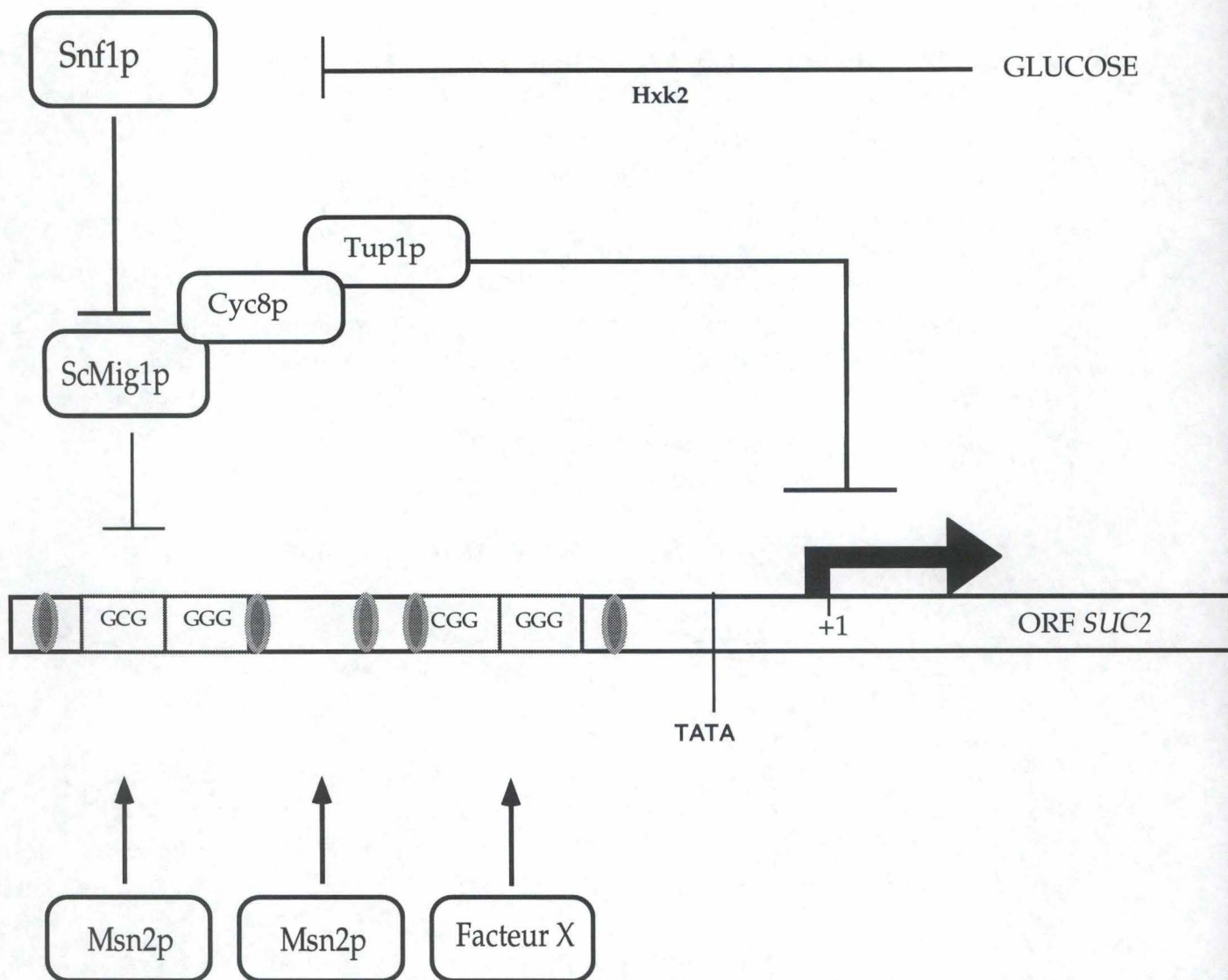


Figure 3 : Voie de régulation de l'expression du gène *SUC2* établie essentiellement à partir de données épistatiques. La quantité de glucose est détectée par la protéine Hxk2p, ce qui crée un signal permettant l'inhibition de Snf1p. En présence de glucose, la kinase Snf1p est donc inactive et ne peut pas inhiber le répresseur ScMig1p. Le complexe répresseur Ssn6p-Tup1p est alors recruté par la protéine ScMig1p et empêche la transcription du gène *SUC2*.

Le facteur X est un facteur activateur non-identifié capable d'activer la transcription en se fixant aux UAS. Les protéines Msn2p et Msn4p sont capables de se fixer aux URS spécifiques de ScMig1p et ainsi de favoriser la transcription. Pour plus de détails, voir texte.

Légende :

→ Activation

—| Répression / inhibition

+1 Site d'initiation de la transcription

ORF: Phase ouverte de lecture

● UAS : Upstream Activating Sequence

□ URS : Upstream Repressing Sequence

➤ Initiation de la transcription par la machinerie de l'ARN polymérase II

TATA : Boîte TATA

gène *SUC2* est constitutive (cas des mutants *hxx2*, *reg1*, *grr1*, *cid1 mig1*, *cyc8* et *tup1*).

2.2.2. Mécanisme proposé pour le contrôle du gène *SUC2* (Trumbly, 1992) (Gancedo, 1992)

Une étude des relations épistatiques entre différents mutants a permis de déterminer l'ordre d'intervention des différents gènes impliqués dans la cascade de régulation du gène *SUC2*. Ainsi, la mutation de dérépression *snf1* (qui génère une répression constitutive du gène *SUC2*) est supprimée par chacune des trois mutations *mig1*, *ssn6* et *tup1*. En effet, dans les doubles mutants *snf1-mig1*, *snf1-ssn6* et *snf1-tup1*, l'expression du gène *SUC2* est restaurée. Ceci signifie que les trois mutations *mig1*, *ssn6* et *tup1* interviennent dans une étape plus en aval de la voie de régulation du promoteur *SUC2* par rapport à *SNF1*.

Un modèle (**Figure 3**) de la cascade de régulation par le glucose du promoteur *SUC2* a pu être développé grâce à ces études génétiques.

2.2.3. Le promoteur du gène *SUC2* et les facteurs TRANS

Cinq séquences UAS, indispensables à l'expression, ont été identifiées dans le promoteur du gène *SUC2* mais le facteur positif impliqué reste inconnu (facteur X de la Figure 3).

Dans ce promoteur, on retrouve également deux URS dont la séquence est riche en résidus GC. Différentes protéines sont capables de ce fixer à ces deux URS :

- Deux facteurs *trans*-activateurs : les protéines Msn2p et Msn4p sont codées par un groupe de gènes comprenant également les gènes MSN1 et MSN3. Ces gènes ont été isolés comme des suppresseurs en copies multiples de mutants *snf1* thermosensibles (Multicopy Suppressor of snf1) (Gancedo, 1992) (Estruch et Carlson, 1993).
- Les activateurs transcriptionnels Msn ne semblent pas jouer un rôle important sur l'expression du gène *SUC2*. Ces activateurs participent probablement à la régulation d'autres gènes, comme cela a été proposé pour les protéines Msn2p et Msn4p. En effet, elles sont nécessaires au métabolisme du galactose puisque un mutant *msn2* comme un mutant *msn4* n'est pas capable de croître sur milieu galactose (Estruch et Carlson, 1993).

ZnF : Doigts de zinc

B : Domaine basique

R : Domaine de régulation

E : Domaine effecteur

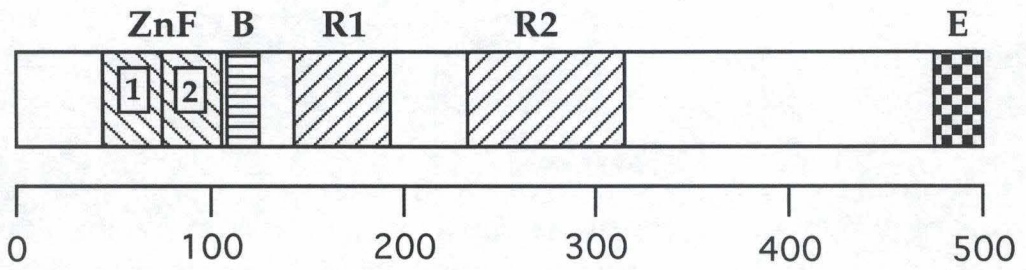


Figure 4 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de la protéine ScMig1p (selon Östling, 1996)

- Deux facteurs *trans*-répresseurs : les protéines ScMig1p (voir 2.3; Nehlin et Ronne, 1990) et ScMig2p (Luftiyya et Johnston, 1996) sont deux protéines redondantes qui se fixent probablement aux mêmes sites sur l'ADN (URS parfois appelée MIG Box). Différentes données concernant ces protéines sont à souligner (Luftiyya et Johnston, 1996) :
 1. La protéine ScMig2p semble ne pas jouer de rôle dans la répression du pSUC2 lorsque la protéine ScMig1p est présente. En effet, la délétion du gène *MIG2* ne semble pas avoir de conséquence sur la régulation du promoteur pSUC2.
 2. L'analyse des mutants *mig1* et *mig2* indique que la protéine ScMig1p réprime, en présence de glucose, 30 fois plus le promoteur *SUC2* que ne le fait la protéine ScMig2p.

2.3. La protéine ScMig1p, effecteur central de la répression glucose

2.3.1. Introduction

Le gène *ScMIG1* 'Multi-copy Inhibitor of *GAL* genes' a été cloné grâce à sa faculté de réprimer en copies multiples le promoteur *GAL1* (Nehlin et Ronne, 1990). Ce gène code pour une protéine à doigts de zinc de type Cys₂-His₂ de 504 acides aminés et d'un poids moléculaire de 56kDa. Cette protéine est connue pour être l'effecteur central de la répression glucose chez *S. cerevisiae*. En effet, il a été montré que ce répresseur transcriptionnel joue un rôle dans la régulation des gènes *SUC2*, *GAL1* et *GAL4* en se fixant de manière spécifique sur le promoteur de ces gènes (Nehlin et Ronne, 1990) (Nehlin *et al.*, 1991).

Les récents travaux de Östling (1996) ont permis de déterminer quatre régions fonctionnelles dans la protéine ScMig1p : le domaine des doigts de zinc (ZnF), le domaine basique (B), le domaine de régulation par le glucose incluant les sous-domaines R1 et R2, le domaine effecteur (E) (**Figure 4**) (Östling *et al.*, 1996).

2.3.2. Les doigts de zinc et la liaison à l'ADN (Lundin *et al.*, 1994)

Les protéines à doigts de zinc C₂H₂ forment une famille de protéines qui sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes et qui ont la faculté de se fixer à l'ADN. Les protéines de cette famille qui se

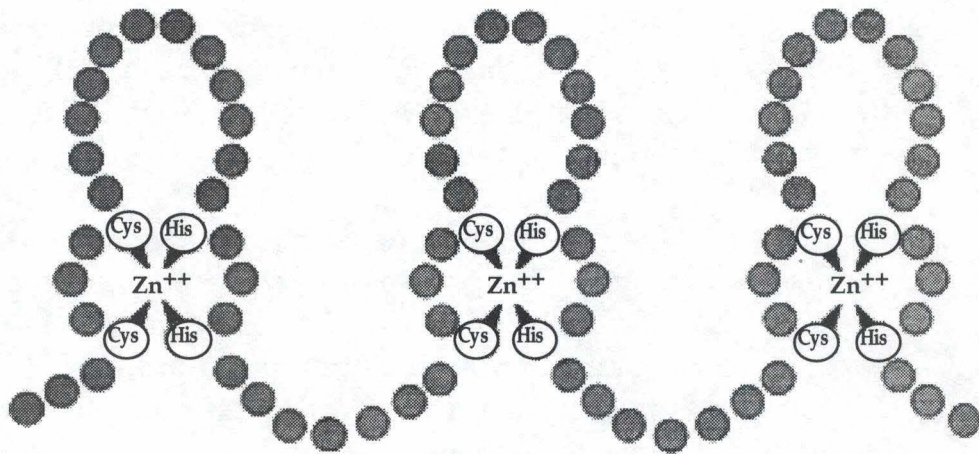


Figure 5A : Le facteur de transcription SP1 a une série de trois doigts de zinc qui lui permettent de reconnaître de façon spécifique son site de fixation à l'ADN.

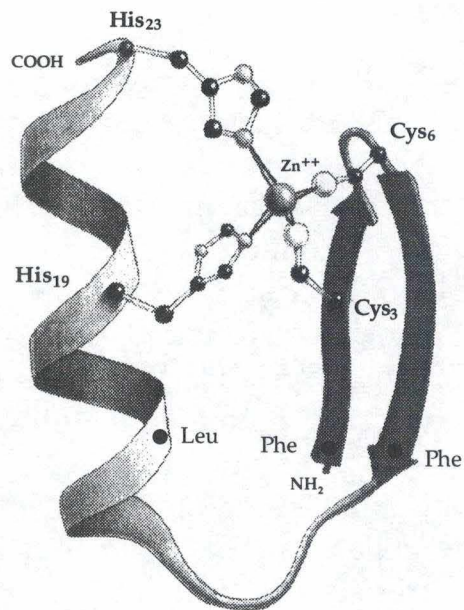


Figure 5B : Structure tridimensionnelle schématique du motif de doigt de zinc de type C₂H₂ de la protéine Zif268 de Xénope. Les feuillettes β sont représentés sous forme de flèche ; l'hélice α est représentée par un ruban. L'ion de zinc est maintenu en place par les résidus Cys₃, Cys₆, His₁₉ et His₂₃.

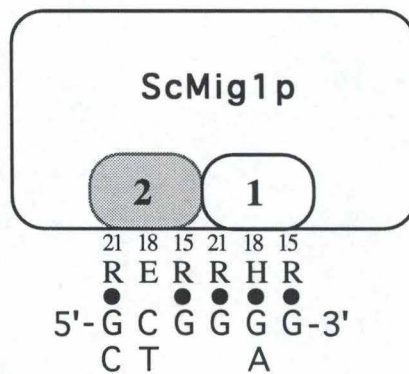
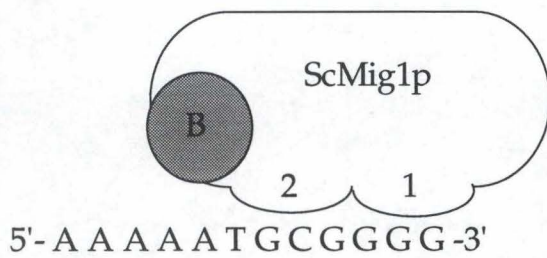
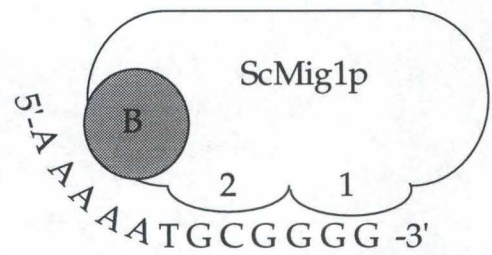


Figure 6 : Schéma (selon Lundin, 1994) de l'interaction des doigts de zinc (1 et 2) du répresseur ScMig1p avec sa boîte cible (dont le consensus est : G/C₁ C/T₂ G₃G₄G₅G₆). Pour les détails, voir texte.



Faible affinité



Forte affinité

Figure 7 : Modèle en deux étapes de la liaison du répresseur transcriptionnel ScMig1p à sa séquence CIS spécifique. La première étape consisterait en la fixation de la protéine ScMig1p sur les deux triplets de la boîte GC. La deuxième étape stabiliserait l'interaction par une courbure de l'ADN ; ceci expliquerait la nécessité de la région riche en AT en amont de la boîte GC (Lundin *et al.*, 1994). Pour plus de détails, voir texte.

Légende



Domaine basique

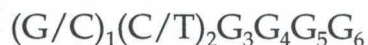
1 2

correspondent aux deux doigts de zinc de la protéine

fixent sur des boîtes GC sont regroupées dans une sous-famille évolutive dans laquelle on retrouve notamment la protéine Sp1 (facteur de transcription), les protéines mammaliennes Egr/Krox et WT1 (proto-oncogène impliqué dans la tumeur de Wilm's), la protéine ScMig1p ainsi que CREA, l'homologue de *MIG1* chez *Aspergillus nidulans*. Le nombre de doigts de zinc varie selon les protéines : 2 chez ScMig1p et chez CREA, 3 chez Sp1, 4 chez WT1. Ces protéines à doigts de zinc sont capables de se fixer à l'ADN au niveau de boîtes spécifiques.

Un doigt de zinc est composé d'environ 23 acides aminés et la jonction entre deux doigts de zinc est souvent constituée d'un oligopeptide d'une longueur de 7 ou 8 acides aminés. Ces doigts de zinc sont des structures protéiques capables de complexer un ion zinc entre quatre acides aminés (dans ce cas, deux histidines et deux cystéines) (**Figure 5**).

La comparaison des sites sur lesquels la protéine ScMig1p se fixe, (c'est-à-dire les boîtes spécifiques que l'on retrouve dans le promoteur des gènes *SUC2*, *GAL1* et *GAL4*) a permis de déterminer la séquence consensus reconnue par cette protéine :



Un modèle d'interaction (**Figure 6**) entre les résidus 15, 18 et 21 des doigts de zinc et la séquence cible a été proposé par Lundin (Lundin *et al.*, 1994). Selon ce modèle, les résidus RHR du premier doigt de zinc se fixerait au deuxième triplet de la séquence consensus tandis que les résidus RER du deuxième triplet serait spécifique du premier triplet de l'URS.

Néanmoins, la reconnaissance de cette boîte n'est pas suffisante à la liaison de ScMig1p à l'ADN puisqu'une séquence riche en AT en 5' de la boîte GC est également nécessaire (Lundin *et al.*, 1994). Un processus en deux étapes a été proposé pour expliquer la fixation de ScMig1p sur les séquences cibles. La première étape consisterait en la reconnaissance (de faible affinité) par les doigts de zinc de la séquence consensus présentée ci-dessus. La deuxième étape servirait à stabiliser l'interaction ScMig1p-ADN par un phénomène de courbure de l'ADN (donc a augmenter l'affinité du complexe protéine-URS). Un site riche en AT en amont de la boîte GC pourrait, par interaction avec le domaine B (basique), contribuer à cette courbure (voir 2.3.3.) (**Figure 7**) (Lundin *et al.*, 1994).

2.3.3. Le domaine basique : ses rôles potentiels

Le groupe de H. Ronne a montré que cette structure basique est essentielle à la fonction d'un activateur hybride ScMig1p-VP16 (Östling *et al.*, 1996). Deux fonctions sont proposées pour ce domaine basique :

- Ce domaine contiendrait une séquence NLS (Nucleolar Localization Signal) permettant l'importation nucléaire de la protéine ScMig1p. En effet, ce type de domaine basique est observé par exemple dans le cas de la protéine nucléaire Swi5p (Moll *et al.*, 1991).
- Ce domaine pourrait être nécessaire à la fixation de Mig1p à l'ADN. Selon cette hypothèse, les résidus basiques adjacents aux doigts de zinc pourraient interagir avec la région riche en AT en amont de la boîte GC (voir point 2.2.2.) et induire la courbure de l'ADN observée lors de la fixation de ScMig1p (**Figure 7**) (Lundin *et al.*, 1994).

2.3.4. Le domaine effecteur et le recrutement du complexe de co-répression

Les 24 derniers acides aminés de ScMig1p sont nécessaires et suffisants pour réprimer la transcription à partir du promoteur pSUC2. Ces 24 résidus carboxy-terminaux constituent ce que l'on appelle le domaine effecteur de ScMig1p (Östling *et al.*, 1996). Son rôle serait de recruter le complexe général de co-répression incluant les protéines Ssn6p et Tup1p. Ce complexe co-répresseur constitue une entité protéique de plus de 1.200 kDa (Williams *et al.*, 1991).

Chez *S. cerevisiae*, différentes voies de régulation ont recours à ce complexe co-répresseur. Cela a été montré pour la voie de régulation par l'oxygène (via le répresseur Rox1p), pour la voie de régulation dépendante du type sexuel cellulaire (via Mcm1/ α 2 et a1/a2) et aussi pour la répression glucose impliquant ScMig1p (Tzamarias et Struhl, 1994).

Dans le complexe co-répresseur, la protéine Ssn6p serait un adaptateur entre le répresseur (ex: Rox1p, ScMig1p, ...) et le complexe co-répresseur comme le suggèrent les résultats du double-hybride indiquant que les protéines Ssn6p et ScMig1p interagissent entre elles (Treitel et Carlson, 1995). La protéine Tup1p est quant à elle considérée comme la sous-unité active du complexe. Elle interagit directement

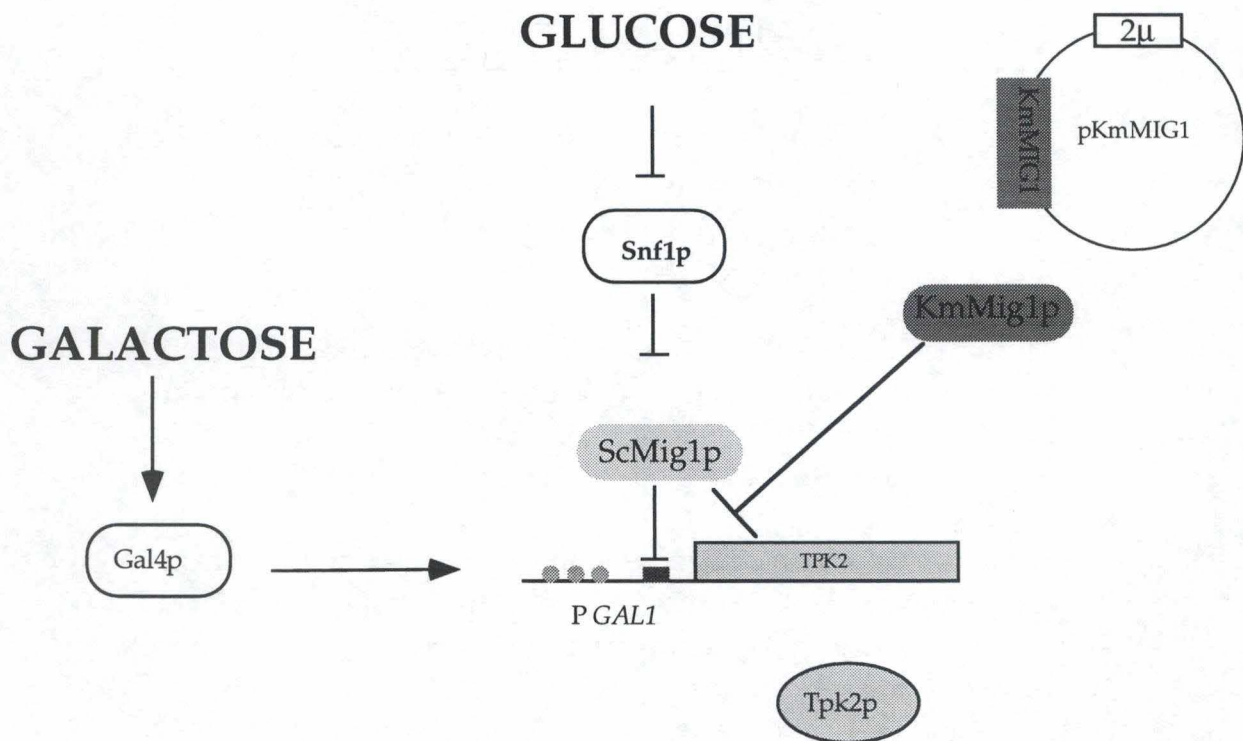


Figure 8 : Schéma illustrant le clonage de *KmMIG1*. Dans le promoteur de *GAL1*, les UAS sont représentées par des ovaux grisés, l'URS spécifique de *ScMig1p* est représentée par un rectangle noir. En présence de galactose le gène toxique *TPK2* est exprimé sauf si un plasmide présent en grand nombre de copies porte un gène encodant une protéine capable de réprimer le promoteur du gène *GAL1* (*PGAL1*). Les détails du clonage sont repris dans le texte.

Dans ce schéma, les protéines sont représentées par des ovaux et les gènes par des rectangles.

Légende :

→	Activation	■	URS MIG1
—	Répression / inhibition	●	UAS GAL4

avec les histones H3 et H4 au niveau de leur extrémité aminoterminal (Edmondson *et al.*, 1996). La répression dépendante de ce complexe serait associée à un mécanisme de positionnement des nucléosomes et d'une façon générale associée à une réorganisation de la chromatine (Tzamarias et Struhl, 1994).

2.3.5. Le domaine de régulation, cible directe ou indirecte de la kinase Snf1p

Les travaux réalisés par Treitel et Carlson (1995) ont montré que la protéine ScMig1p est phosphorylée différemment en conditions de répression et de dérèpression. D'autres travaux (Östling *et al.*, 1996) montrent que deux domaines internes, appelés R1 et R2, sont impliqués dans la régulation de ScMig1p par le glucose et dans la régulation d'un activateur ScMig1-VP16 par la kinase Snf1p. L'action de la kinase Snf1p pourrait être la cause de l'inactivité de la protéine ScMig1p en conditions de dérèpression (Östling *et al.*, 1996). Cette action de la protéine Snf1p peut être directe ou indirecte puisqu'on retrouve, dans la protéine ScMig1p, à la fois deux sites potentiels de phosphorylation par la kinase Snf1p et quatre sites probablement reconnus par une autre kinase (détails à la Figure 9).

Dans des conditions de répression, la kinase Snf1p serait inactivée par une cascade de régulation dépendante du glucose et ne pourrait donc plus inhiber ScMig1p. ScMig1p pourrait alors réprimer les gènes cibles de la répression glucose (Trumbly, 1992).

3. Le répresseur KmMIG1p de *Kluyveromyces marxianus*

3.1. Le clonage de KmMIG1

Le clonage de *KmMIG1* a été réalisé au laboratoire (Cassart, Thèse 1996) par une stratégie ayant recours à un crible fonctionnel positif (Figure 8) (Nehlin et Ronne, 1990).

La souche *S. cerevisiae* H172 utilisée possède une copie intégrée du gène *TPK2* dont l'expression est contrôlée par le promoteur *GAL1*. Le gène *TPK2* code pour la sous-unité catalytique d'une kinase dépendante d'AMPc. La surexpression de *TPK2* étant toxique, cette souche de *S. cerevisiae* n'est pas capable de croître sur un milieu contenant du galactose.

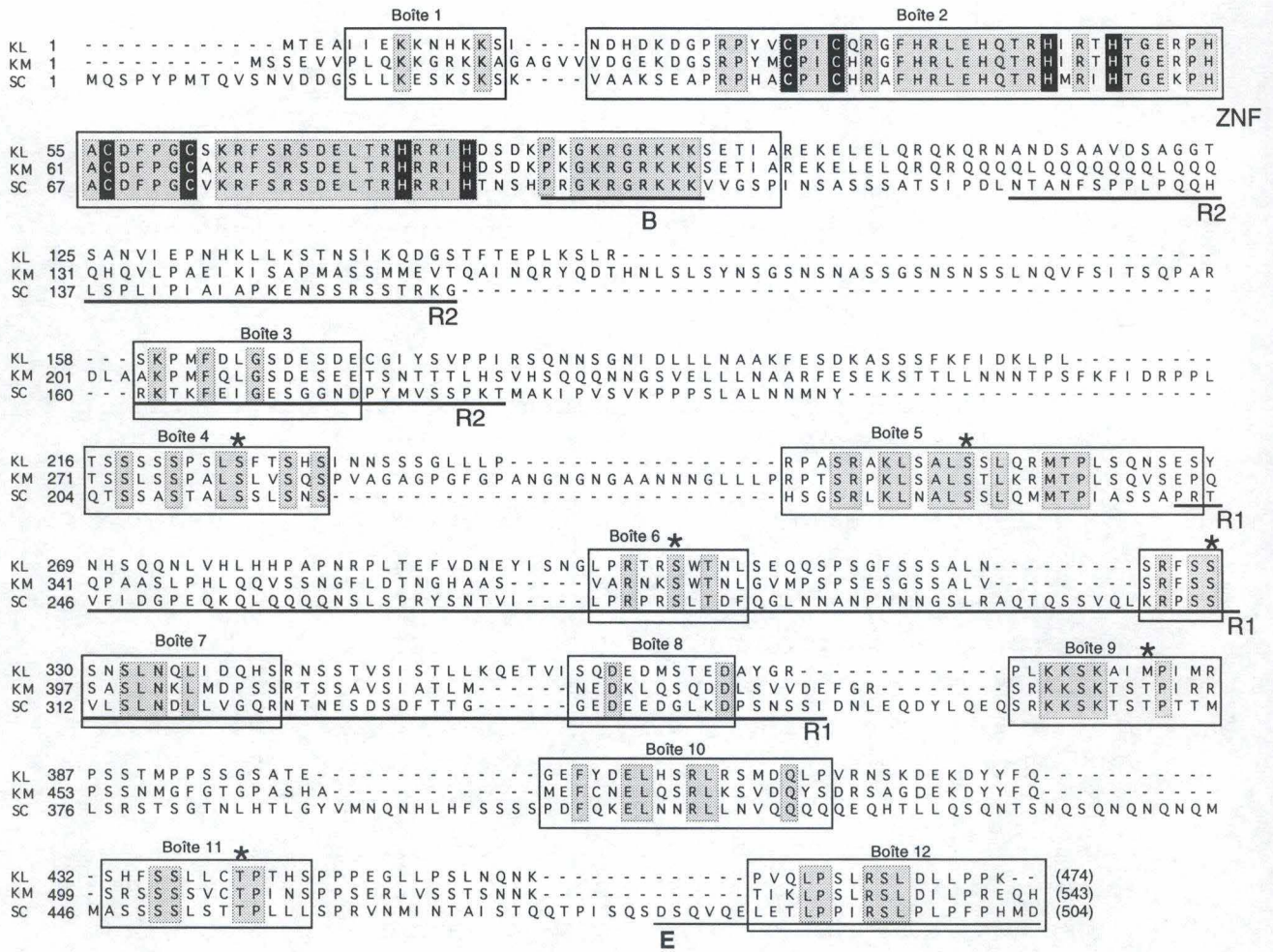


Figure 9 (Cassart, Thèse 1996) : Alignement multiple simultané de différentes protéines Mig1p de *K. lactis* (KL), *K. marxianus* (KM) et *S. cerevisiae* (SC). Cet alignement a été réalisé par le programme Match-box II (Depiereux et Feytmans, 1992). La numérotation au début de chaque ligne renseigne la position des acides aminés. Les interruptions d'alignement sont représentées par des traits discontinus. Les boîtes délimitent les régions qui sont conservées entre les trois séquences. Les résidus dans ces boîtes qui sont identiquement conservés dans les trois séquences sont dans des cases ombrées. Dans la boîte deux, les résidus histidines et cystéines des motifs C2H2 des doigts de zinc sont dans des cases noires. Les domaines fonctionnels localisés par ailleurs dans ScMig1p sont délimités par un trait noir épais sous la séquence de ScMig1p (östling *et al.*, 1996). Ces domaines sont représentés comme suit, B : domaine Basique ; R1 et R2 : domaines de Régulation; E : domaine Effecteur. Les sites de phosphorylation potentiels sont indiqués par une étoile.

Une banque sauvage de *K. marxianus* établie dans un vecteur multicopie (puisque portant l'origine de réplication 2 μ) a été transformée dans la souche H172. Le mélange de transformation a été dans un premier temps étalé sur milieu glucose. Ensuite, les colonies obtenues sont transférées sur milieu galactose. Seules les colonies possédant un plasmide capable de causer la répression du promoteur *GAL1* étaient capables de vivre sur ce milieu. Parmi les 80 plasmides ainsi isolés se trouvait notamment un plasmide portant le gène *KmMIG1*, mais également des plasmides portant les gènes *KmBCY1*, *KmGAL* ainsi qu'un gène non-identifié.

3.2 Analyse structurale comparative des protéines Mig1p connues

Les séquences des protéines homologues Mig1p de *K. lactis* (Cassart *et al.*, 1995), *K. marxianus* et *S. cerevisiae* ont fait l'objet d'un alignement multiple simultané (Cassart, Thèse 1996). Le programme Match-box II (Depiereux et Feytmans, 1992) délimite des zones, sous forme de boîtes, qui présentent des profils physico-chimiques très semblables et qui coïncident généralement avec des régions structurellement et fonctionnellement conservées. Le résultat de cet alignement est présenté à la **Figure 9**.

Douze boîtes ont été définies par l'alignement multiple réalisé :

- La boîte 2 présente un taux d'identité élevé (90%) et contient les deux doigts de zinc des protéines Mig1p. Les résidus 15, 18 et 21 des deux doigts de zinc sont parfaitement conservés entre les trois protéines. Nous voyons également que cette boîte contient la structure basique décrite au point 2.2.3.
- Les boîtes 3, 6, 7 et 8 se trouvent dans les domaines R1 et R2 de ScMig1p. La région R2 contient la boîte 3 et le domaine R2, les boîtes 6, 7 et 8.
- La dernière boîte (boîte 12) correspond au domaine effecteur décrit pour la protéine Mig1p de *S. cerevisiae*.
- Les boîtes 1, 4, 5, 9, 10 et 11 ne se trouvent dans aucun domaine fonctionnel délimité chez *S. cerevisiae* par les travaux de Östling (Östling *et al.*, 1996).

BUT DU TRAVAIL

Notre travail s'inscrit dans la problématique du rôle et des mécanismes de la répression transcriptionnelle chez les eucaryotes dont on sait qu'elle tient une place cruciale dans le contrôle de la régulation génétique.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le gène *SUC2* encodant l'invertase est contrôlé exclusivement par la répression glucose, ce qui facilite grandement son étude. *SUC2* constitue en fait le paradigme des études de la répression glucose.

Le but de ce travail est de contribuer à la dissection fonctionnelle du répresseur Mig1p par une approche de mutagenèse dirigée.

Pour guider cette approche, nous avons tiré parti de la comparaison des séquences protéiques encodées par les gènes *ScMIG1*, *KIMIG1* et *KmMIG1*, ces deux derniers ayant été clonés récemment au laboratoire. Cette comparaison a mis en évidence une série de boîtes conservées et potentiellement impliquées dans les fonctions de régulation, de liaison à l'ADN et de médiation de la répression.

La création de délétants du gène *MIG1* de *K. marxianus* correspondant à différentes boîtes ainsi que leur analyse fonctionnelle dans *S. cerevisiae* contribuera à l'élucidation des relations structure-fonction au sein de la protéine Mig1p.

RESULTS

1. Description du test de complémentation des allèles de KmMIG1 dans *Saccharomyces cerevisiae*

1.1. Principe du test de complémentation

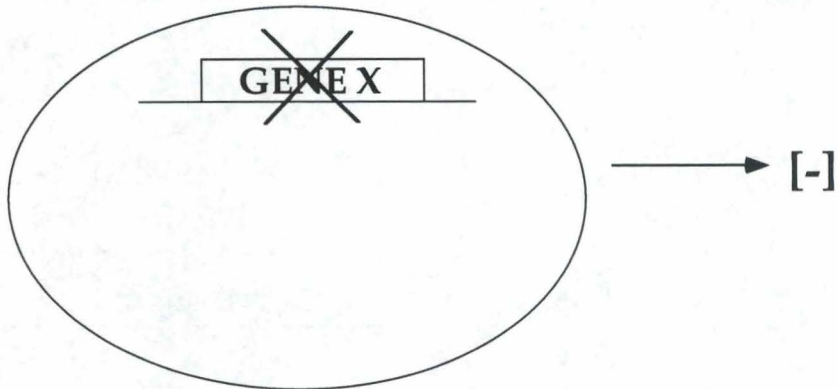
Lorsqu'un gène est muté chez la levure comme chez les autres organismes, cette mutation peut entraîner un phénotype généralement dû à une perte de fonction (LOF : loss of function) qui est le plus souvent récessive. Si on introduit dans cette souche mutante un gène qui restaure la fonction perdue, on revient vers le phénotype sauvage. Ce phénomène est appelé complémentation. Une complémentation est dite homologue si le gène que l'on amène dans la souche mutante provient de la même espèce, c'est-à-dire s'il est véritablement l'allèle sauvage correspondant au gène muté. L'expérience de complémentation est dite pour cela test fonctionnel d'allélisme. Différentes mutations peuvent donc constituer une même série allélique d'un gène sauvage donné. On parlera de complémentation hétérologue¹ si le gène qui complémente provient d'une autre espèce que celle de la souche mutante.

Les gènes candidats pour la complémentation de la souche mutante peuvent être testés sous forme génomique (par croisement entre souches) ou sous forme plasmidique (par transformation). La **Figure 1** schématise un test de complémentation de ce dernier type.

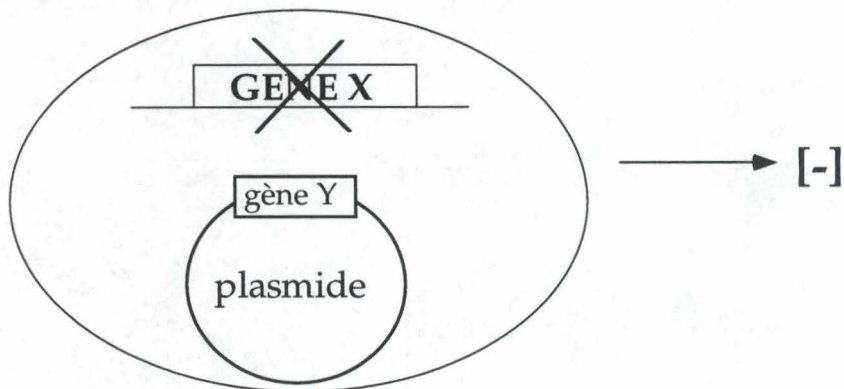
Tous les tests qui ont été réalisés dans le cadre de ce mémoire, sont des tests de complémentation hétérologue avec des gènes portés par des plasmides. Nous avons étudié la faculté du gène *KmMIG1* (et de ses variants) de compléter le phénotype de la souche mutante de *Saccharomyces cerevisiae* H497 (*mig1*) ou de souches qui en dérivent. Le gène *ScMIG1*, comme nous l'avons vu en introduction, est un effecteur central de la répression glucose chez *S. cerevisiae*. Afin de visualiser aisément la complémentation d'un mutant *S. cerevisiae mig1* par le gène *KmMIG1* w.t. ("wild type") ainsi que le caractère fonctionnel des différentes délétions effectuées sur ce gène, un système rapporteur a été mis au point. Ce dernier est décrit au point suivant.

¹ Le qualificatif d'hétérologue s'applique aux conditions du test : la source du gène complémantant est d'origine distincte, non allèle, par exemple du mutant *mig1* de la cellule-hôte *S. cerevisiae*. Notons cependant que la complémentation en conditions dites hétérologues met en évidence une homologie fonctionnelle.

Un gène X muté entraîne un phénotype [-]



Non complémentation du gène X muté par le gène Y



Complémentation du gène X muté par le gène Z

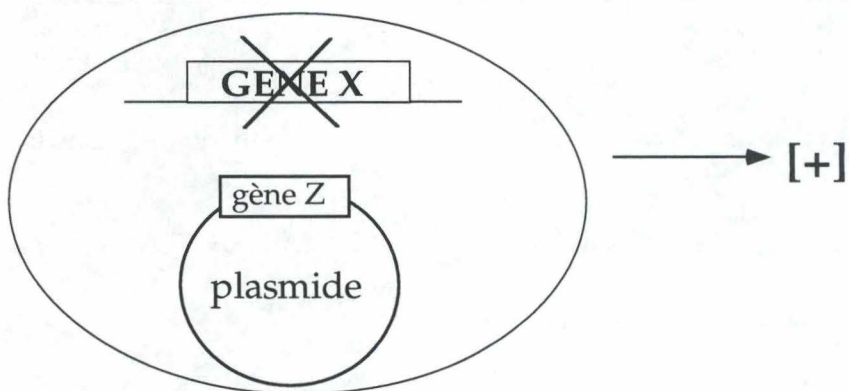
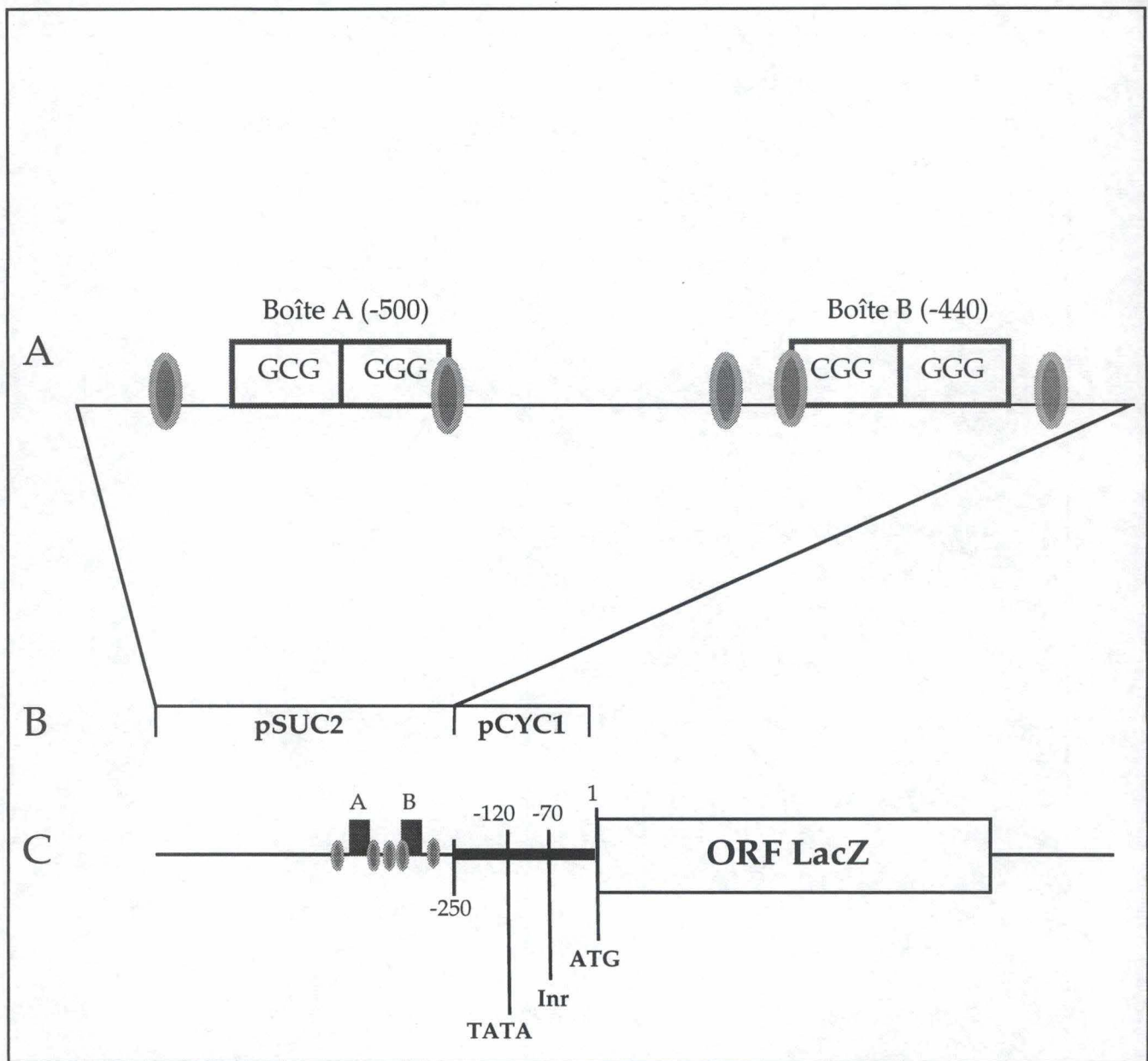


Figure 1 : Illustration d'un test de complémentation.
[-] et [+] correspondent respectivement au phénotype muté et au phénotype sauvage.



Légende



UAS : Upstream Activating Sequence



URS : Upstream Repressing Sequence

pCYC1 : Promoteur du gène *CYC1*

ORF: Phase ouverte de lecture

Inr : Élément initiateur de la transcription

TATA : Boîte TATA

pSUC2 : Promoteur du gène *SUC2*

Figure 2 : Schéma représentant le promoteur hybride placé en amont du gène *LacZ* dans le système rapporteur utilisé. En **A**, détail de la partie correspondant au promoteur pSUC2. La protéine ScMig1p peut se fixer sur ses boîtes spécifiques (URS). Les activateurs de transcription tels que les protéines Msn1p et Msn2p peuvent également se fixer sur ces URS. Les UAS sont les cibles d'un facteur activateur X (voir point 2.2.3. du chapitre Introduction). En **B**, représentation générale du promoteur hybride. En **C**, vue plus détaillée du promoteur hybride : l'élément initiateur ainsi que la TATA box sont ceux du pCYC1. L'endroit de la fusion des promoteurs pSUC2 (en trait fin) et pCYC1 (en trait gras) se situe en -250. Les différents éléments du promoteur sont localisés par rapport à l'ATG.

1.2. Les éléments du système rapporteur

1.2.1. Les souches receveuses

Plusieurs souches receveuses sont utilisées : la souche *Saccharomyces cerevisiae* H497 (Östling *et al.*, 1996) dont le gène *ScMIG1* est déléetée, la souche H443 (Östling *et al.*, 1996) déléetée pour les gènes *ScMIG1* et *TUP1* et la souche H686 (Östling, communication personnelle) déléetée pour les gènes *ScMIG1* et *SSN6*. Les caractéristiques génotypiques de ces trois souches sont décrites au chapitre Matériel et Méthodes.

1.2.2. Le gène rapporteur

Un gène rapporteur est ainsi nommé parce que son activité est facilement mesurable; il peut être placé sous le contrôle d'un promoteur d'intérêt (dans ce cas un promoteur cible de *ScMig1p*) de telle sorte que le taux d'expression du rapporteur mesure l'activité du promoteur. Le gène rapporteur utilisé est le gène *LacZ* codant pour l'enzyme β -galactosidase d'*Escherichia coli* qui n'a pas de correspondant chez *S. cerevisiae*. La β -galactosidase dégrade un β -galactoside en ses composants sucrés; par exemple, le lactose est clivé en une molécule de glucose et une molécule de galactose.

Le β -galactoside chromogène que nous avons utilisé est l'ONPG (ortho-nitrophényl- β -D-galactoside). Sous l'action de la β -galactosidase, l'ONPG est dégradé en D-galactose et en ONP (ortho-nitrophénol). L'ONP est une molécule colorée (jaune) absorbant à une longueur d'onde de 420nm. La quantité d'ONP produite par la réaction enzymatique est quantifiable par spectrophotométrie et est une mesure indirecte de l'activité de β -galactosidase présente, pour autant que la quantité d'ONPG ne soit pas limitante.

1.2.3. Le promoteur

Le promoteur qui a été placé en amont du gène *LacZ* est un promoteur hybride. Ce promoteur contient d'une part, les cinq UAS ('Upstream Activating Sequence') ainsi que les deux boîtes *Mig1* (URS : 'Upstream Repressing Sequence') du promoteur *pSUC2*, et d'autre part, la boîte TATA ainsi que l'élément initiateur de la transcription (noté *Inr*) du promoteur *pCYC1* (Figure 2). Les seuls éléments CIS intervenant dans la régulation de l'expression à partir de ce promoteur hybride sont donc ceux du promoteur *pSUC2*; les variations de l'activité de ce promoteur hybride dépendront, comme c'est le cas de l'expression du promoteur *pSUC2*, uniquement de la répression glucose (voir point 2.2. du chapitre Introduction; Trumbly, 1992).

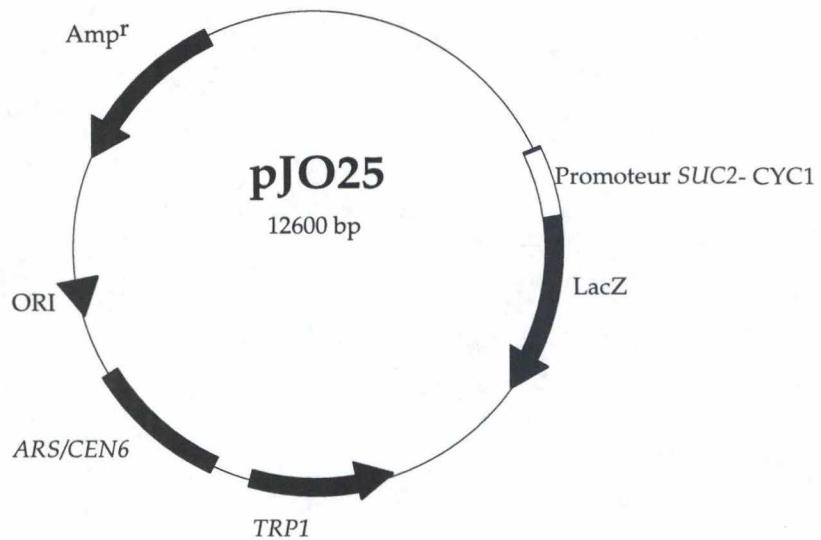


Figure 3 : Représentation schématique du pJO25. Ce plasmide porte les marqueurs de sélection *TRP1* et *Amp^r*. On trouve aussi les origines de réplication *ORI* (pour *E. coli*) et *ARS* (pour la levure). pJO25 se trouve en monocopie dans la levure puisqu'il porte *CEN6*. Le gène rapporteur *LacZ* est en aval du promoteur synthétique *SUC2-CYC1* représenté par une boîte blanche. Pour les détails, voir texte et point 2.2. du chapitre Matériel et Méthodes.

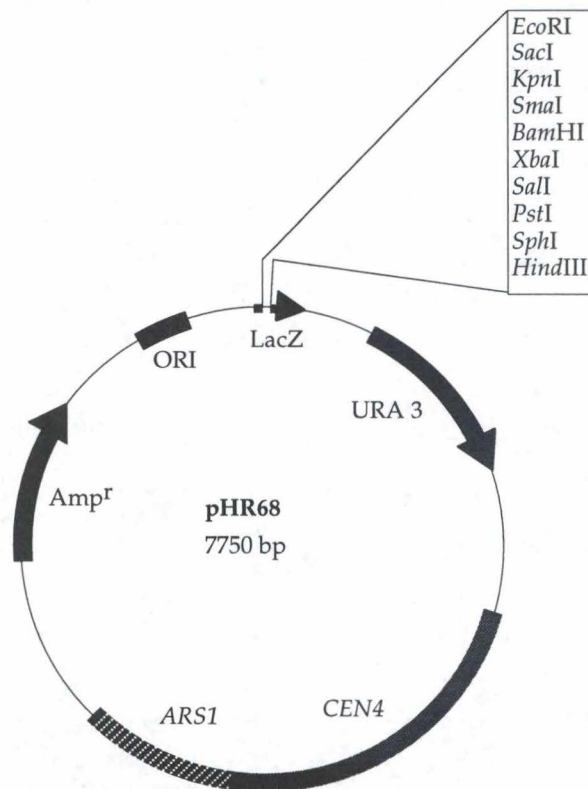


Figure 4 : Représentation schématique du pHR68. Seul le site multiple de clonage (encarts) contenant les sites de restrictions *Sac I* et *Xba I* est repris. Pour plus de détails, voir texte et point 2.2. du chapitre Matériel et Méthodes.

1.2.4. Le plasmide rapporteur

pJO25 est représenté à la **Figure 3**. Le promoteur hybride (appelé pSUC2 dans le reste du manuscrit) est placé en amont de l'ORF (phase ouverte de lecture) du gène *LacZ* dans une matrice *ARS-CEN6* (c'est-à-dire pourvue d'une origine de répllication *ARS* de levure et d'une séquence centromérique *CEN* laquelle lui conférant une ségrégation de type chromosomique). Les plasmides centromériques sont dits monocopies car il ne se trouvent qu'en très petit nombre de copies (généralement 1 ou 2) dans la levure. Ce plasmide porte également le marqueur de sélection *TRP1* assurant aux cellules transformées la capacité de croître sur un milieu ne contenant pas de tryptophane.

1.2.5. Les plasmides tests

Aussi bien le *KmMIG1* w.t. (l'allèle sauvage) que ses allèles mutés ont été clonés en *SacI/XbaI* du pHR68. Ces allèles sont sous le contrôle du promoteur de *KmMIG1* (**Figure 4**). Le pHR68 est un vecteur navette puisqu'il qu'il possède une origine de répllication (*ori*) et un marqueur de sélection (*Amp^r*) pour *E. coli* ce qui permet les étapes de clonage chez cette bactérie et qu'il possède également *ARS-CEN* et le marqueur *URA3* permettant son utilisation pour les tests chez *S. cerevisiae*.

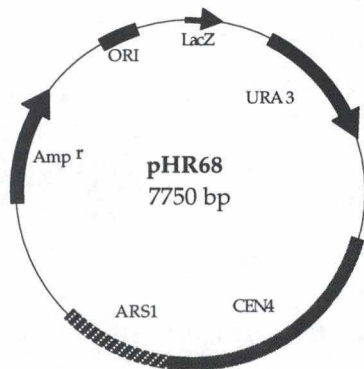
Etant centromérique, il est donc pratiquement en monocopie dans la levure, ce qui permet d'effectuer les tests de complémentation dans une situation relativement proche de celle du gène authentique à son locus chromosomique.

2. Etude fonctionnelle de l'allèle *KmMIG1* sauvage par le test de complémentation

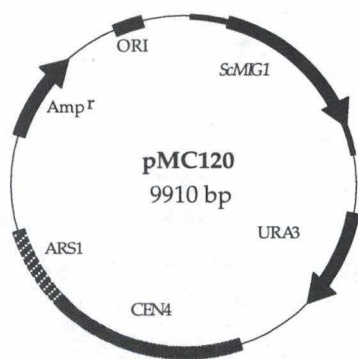
La première étape de l'étude des relations structure-fonction de *KmMig1p* a été de vérifier que *KmMIG1* est un homologue fonctionnel de *ScMIG1* ou, pour le dire autrement, que *KmMIG1* est capable de compléter la mutation *mig1* de la souche *S. cerevisiae* H497.

La deuxième étape a été de vérifier si la régulation s'opérait dans *Saccharomyces cerevisiae* sur la protéine étrangère comme sur la protéine native de *S. cerevisiae*.

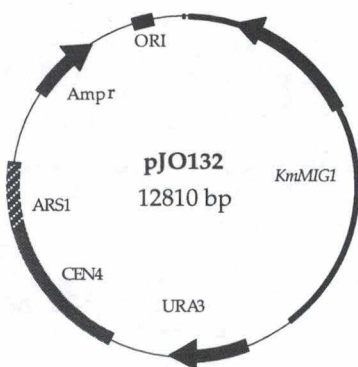
La troisième étape a été de vérifier si les protéines *Ssn6p* et *Tup1p* du complexe général de co-répression étaient également nécessaires à la fonction de répression de *KmMig1p*.



Matrice = vecteur contrôle



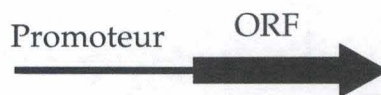
Matrice + *ScMIG1*



Matrice + *KmMIG1*

Légende

Pour les gènes *ScMIG1* et *KmMIG1*, la convention suivante est observée :



ORF : Phase ouverte de lecture.

Figure 5 : Représentation des différents plasmides tests : le pHR68 est la matrice qui a servi à cloner les gènes *ScMIG1* et *KmMIG1*. Dans les plasmides pMC120 et pJO132, les gènes *ScMIG1* et *KmMIG1* sont clonés avec leur promoteur propre. Détails, voir texte. Les plasmides sont détaillés au point 2.2. du chapitre Matériel et Méthodes.

2.1. *KmMig1p se substitue fonctionnellement à ScMig1p*

2.1.1. But de l'expérience

Le but de l'expérience est de vérifier que le gène *KmMIG1* peut se substituer fonctionnellement au gène *ScMIG1* dans une souche de *S. cerevisiae* H497.

2.1.2. Résultats

Nous avons cotransformé la souche H497 (*mig1*) de *S. cerevisiae* par deux plasmides, à savoir le pJO25 qui est le plasmide rapporteur décrit ci-dessus et un des plasmides test suivants : le pHR68 (matrice seule comme contrôle négatif), le pMC120 (portant le gène *ScMIG1* comme contrôle positif) ou le pJO132 (portant le gène *KmMIG1*). Une représentation schématique de ces trois plasmides test se trouve à la **Figure 5**. L'activité du promoteur pSUC2 a été mesurée dans des conditions de répression pour ces trois co-transformants.

Ces résultats sont résumés à la **Figure 6**

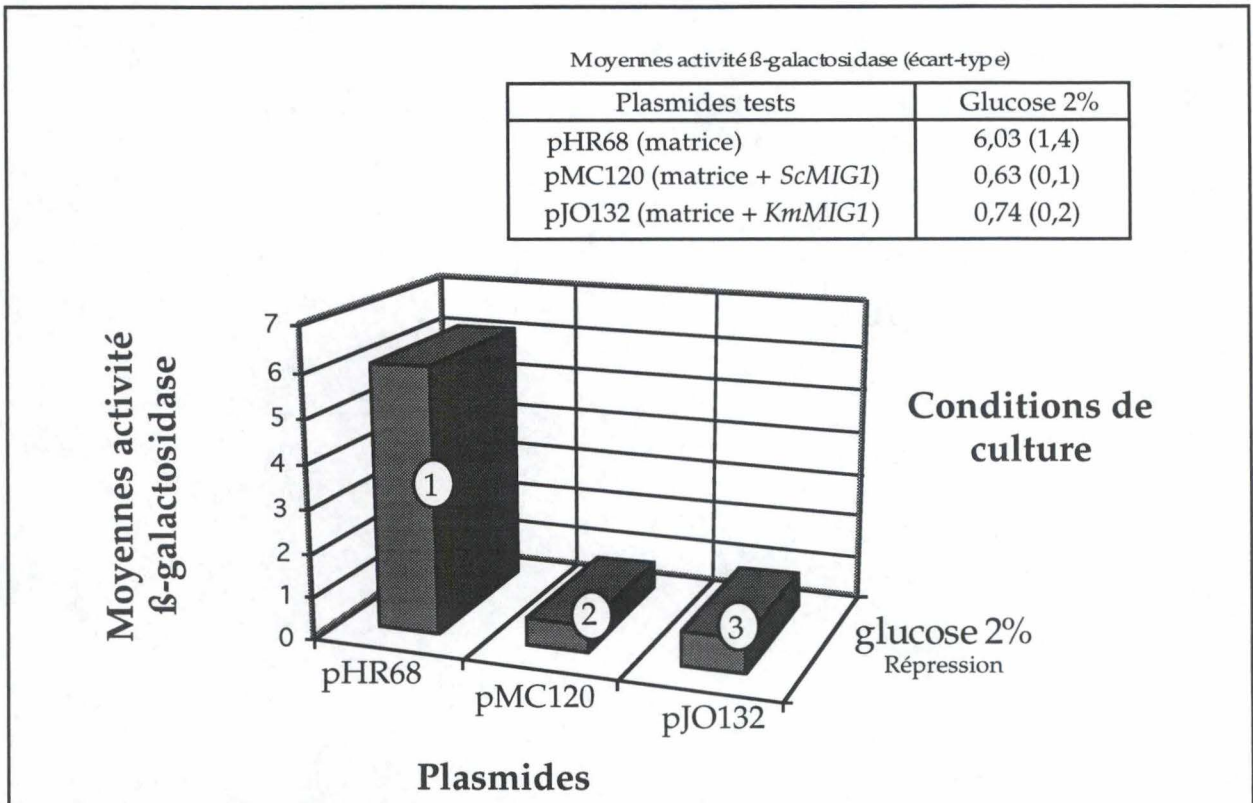


Figure 6 : Tests de répression effectués dans la souche de *Saccharomyces cerevisiae* H497 (*mig1*) co-transformée par le plasmide rapporteur pJO25 et par un plasmide test : soit le pHR68 (bloc 1), soit le pMC120 (bloc 2), soit le pJO132 (bloc 3). Le tableau (en haut à droite) reprend les moyennes de l'activité β -galactosidase calculées sur au moins quatre échantillons ; l'écart-type est repris entre parenthèses. Les moyennes sont représentées dans le graphique sous forme de blocs. Les techniques ainsi que la formule (Miller *et al.*, 1972) sont décrites au point 5. du chapitre Matériel et Méthodes. Pour plus de détails, voir texte.

2.1.3. Conclusions

D'une part, la différence d'un facteur 10 observée entre les moyennes 1 et 2 démontre que le système rapporteur répond à la répression glucose médiée par *ScMig1p*.

D'autre part, la comparaison des moyennes 1, 2 et 3 nous indique que, dans des conditions de répression, *KmMig1p* (bloc 2) et *ScMig1p* (bloc 3) entraînent tous deux une répression d'environ 10 fois du rapporteur pSUC2-LacZ. *KmMIG1* se substitue donc à *ScMIG1* et répond de façon équivalente à *ScMIG1* à la répression glucose dans l'hôte *S. cerevisiae*.

2.2. *KmMig1p* est régulé chez *Saccharomyces cerevisiae*

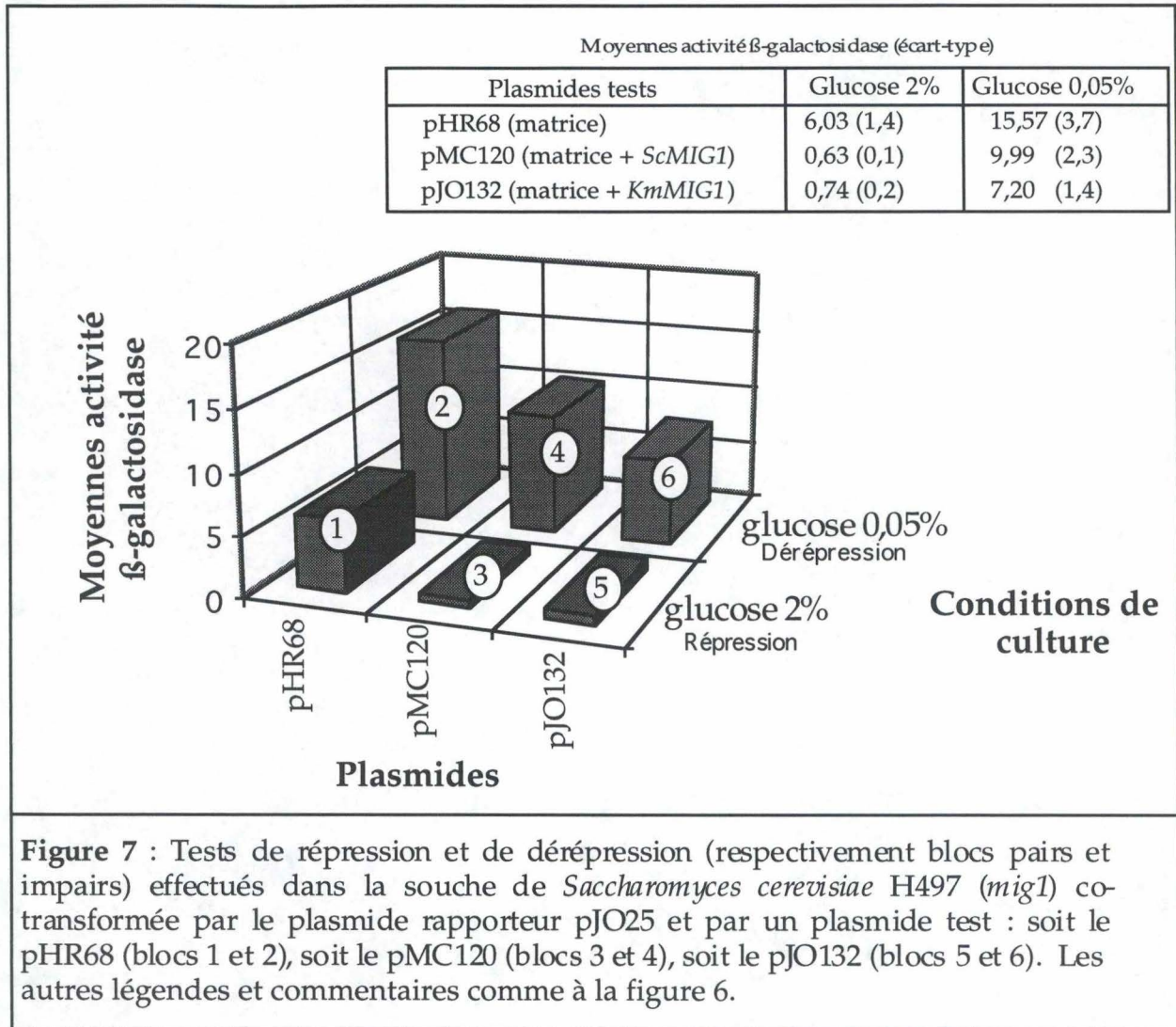
2.2.1. But de l'expérience

Le but de cette expérience est de vérifier que la répression exercée par *KmMig1p* sur le promoteur *pSUC2* est régulée par le glucose dans une souche de *S. cerevisiae* H497.

2.2.2. Résultats

On a mesuré l'activité de *pSUC2* en conditions de dérèpression pour les trois co-transformations décrites au point 2.1.2. Les conditions de dérèpression sont obtenues par transfert des levures d'un milieu riche en glucose vers un milieu ne contenant que 0,05 % de glucose. La mesure de l'activité du *pSUC2* en conditions de dérèpression se fait trois heures après ce transfert.

Les résultats obtenus sont résumés à la **Figure 7**.



2.2.3. Conclusions

Une dérépression de plus ou moins 10 fois s'exerce au niveau du pSUC2 en présence des protéines ScMig1p et KmMig1p comme on l'observe en comparant la moyenne 3 à la moyenne 4 pour ScMig1p et en comparant la moyenne 5 à la moyenne 6 pour KmMig1p. KmMig1p s'avère donc régulé, comme ScMig1p, par une voie de régulation dépendante des conditions glucose.

La différence entre la moyenne 2 (contrôle négatif) et les moyennes 4 et 6 (situations en présence de Mig1p) suggère que, en conditions de dérépression, il subsiste une certaine répression au niveau du pSUC2 qui est due aux protéines ScMig1p et KmMig1p. La dérépression n'est donc pas totale.

Une comparaison des moyennes 1 et 2 indique qu'il y a une dérépression au niveau du promoteur pSUC2 de 2,5 fois même dans une

souche où aucune protéine Mig1p n'est présente. Le promoteur pSUC2 est donc réprimé par une voie de régulation indépendante de *MIG1*.

2.3. Importance des protéines Ssn6p et Tup1p dans le rôle du répresseur KmMig1p

Chez *S. cerevisiae*, la répression médiée par ScMig1p sur ses gènes cibles est dépendante des protéines Ssn6p et Tup1p (voir point 2.3.4. chapitre Introduction). Ces deux protéines font partie du complexe général de co-répression recruté par ScMig1p pour réprimer la transcription par le complexe de l'ARN polymérase II.

2.3.1. But de l'expérience

Le but de l'expérience est de savoir si la répression exercée par KmMig1p sur le promoteur pSUC2 dans *S. cerevisiae* est, comme pour ScMig1p, dépendante des protéines Ssn6p et Tup1p.

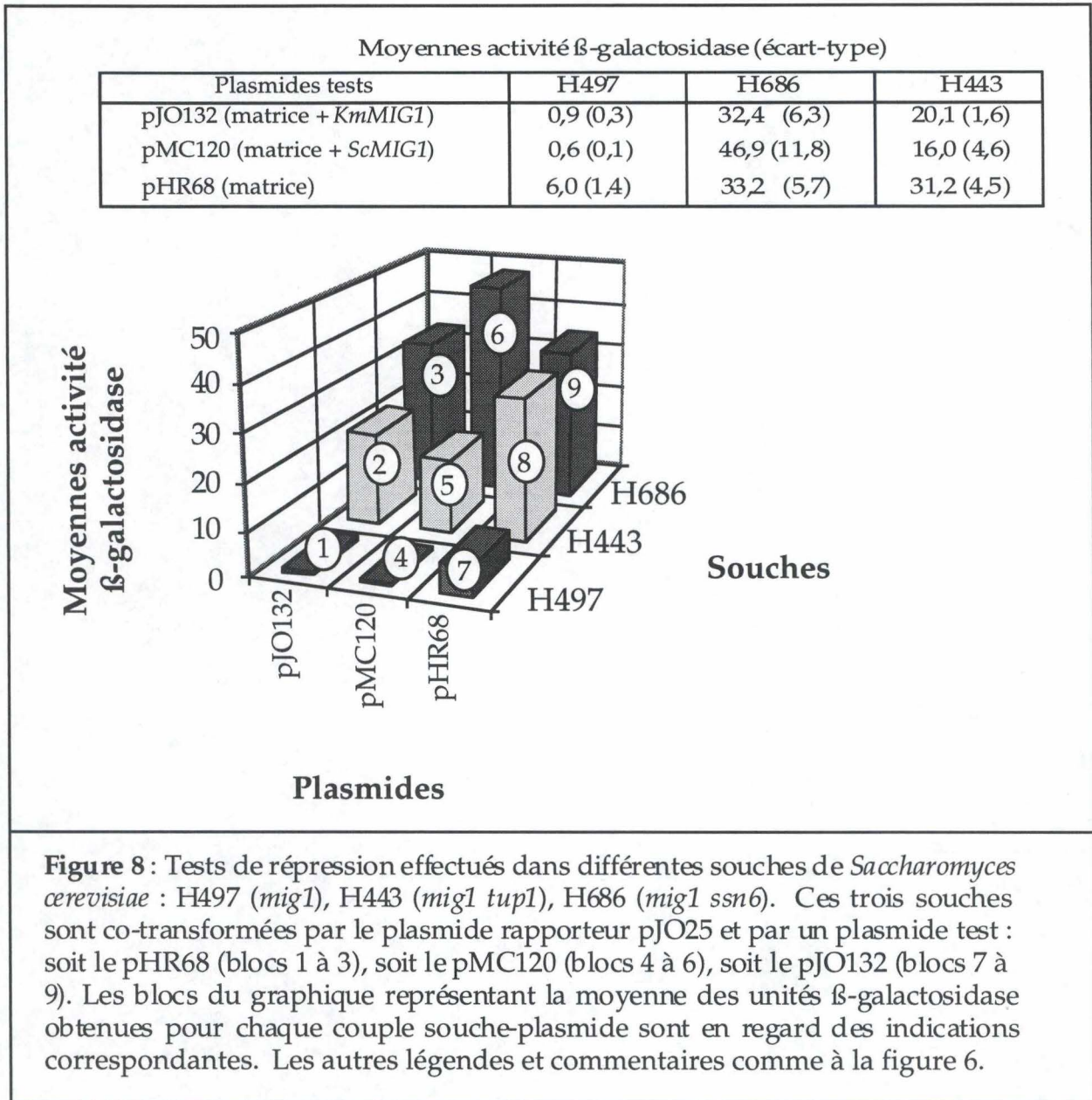
2.3.2. Résultats

Dans cette expérience, le plasmide rapporteur pJO25 et un plasmide test (soit le pHR68, soit le pMC120 ou encore le pJO132) ont été cotransformés dans différentes souches de *S. cerevisiae* :

- la souche H 497 : *mig1*
- la souche H686 : *mig1, ssn6*
- la souche H443 : *mig1, tup1*

La mesure de l'activité du pSUC2 dans ces neuf co-transformants a été faite en conditions de répression (glucose 0,05%).

Les résultats obtenus sont résumés à la **Figure 8**.



2.3.3. Conclusions

La répression du promoteur pSUC2 par les protéines ScMig1p (blocs 4 à 6) et KmMig1p (blocs 1 à 3) est dépendante des protéines Tup1p et Ssn6p. En effet, l'activité du promoteur pSUC2 est 20 fois plus élevée dans la souche H443 que dans la souche H497 (ceci est valable pour les protéines ScMig1p et KmMig1p). Cet effet est encore plus marqué dans la souche H686 (*mig1 ssn6*) puisque, toujours en se référant aux valeurs obtenues dans la souche H497, on observe une activité 35 fois et 80 fois plus élevée respectivement pour les protéines KmMig1p et ScMig1p.

En comparant les moyennes obtenues pour le contrôle négatif (pHR68) dans les différentes souches de *S. cerevisiae* (moyennes 7 à 9), on constate que

l'expression du gène rapporteur est cinq fois moindre dans la souche H497 (*mig1*). Ce résultat suggère que les protéines Ssn6p et Tup1p sont nécessaires à la répression du promoteur pSUC2 par la voie de régulation indépendante de Mig1p mise en évidence au point 2.2.3.

La comparaison des moyennes 6 (ScMig1p) et 9 (contrôle négatif) suggère que, dans une souche H686 (*mig1 ssn6*), la présence de la protéine ScMig1p favoriserait l'expression du gène rapporteur placé en aval du promoteur pSUC2. Ce phénomène n'est pas observé pour la protéine KmMig1p.

2.4. Conclusion générale

Le répresseur KmMig1p est l'équivalent fonctionnel de son homologue ScMig1p. Il réprime le promoteur pSUC2 en présence de glucose et est dérèprimable lors du passage dans un milieu de culture pauvre en glucose (0,05%).

Pour KmMig1p comme pour ScMig1p, la répression exercée sur le promoteur pSUC2 nécessite la présence des protéines Ssn6p et Tup1p du complexe général de co-répression décrit chez *S. cerevisiae*.

De plus, les expériences sur le comportement de ScMig1p dans les différentes souches de *S. cerevisiae* nous ont permis de mettre en évidence une fonction activatrice de ScMig1p dans la souche H686 (*mig1, ssn6*) en présence de glucose.

3. Etude fonctionnelle d'allèles mutés de *KmMIG1* par le test de complémentation

Dans le but d'identifier les éléments structuraux impliqués dans la régulation s'exerçant sur KmMig1p et dans les deux fonctions de répression (la liaison à l'ADN et le recrutement) de cette protéine, des délétions au niveau du gène *KmMIG1* ont été réalisées. Ces délétions visaient à attribuer un rôle aux boîtes conservées mises en évidence par l'alignement multiple des séquences protéiques décrit dans l'introduction. Nous nous sommes principalement focalisés sur la région alignée avec les domaines de régulation par le glucose de ScMig1p (domaines R1 et R2) ainsi que sur la région très conservée comprenant le domaine basique (domaine B) et la région de polyglutamine (domaine Q). Rappelons que cette dernière n'est présente que dans la séquence de KmMig1p (voir Figure 8 du chapitre Introduction).

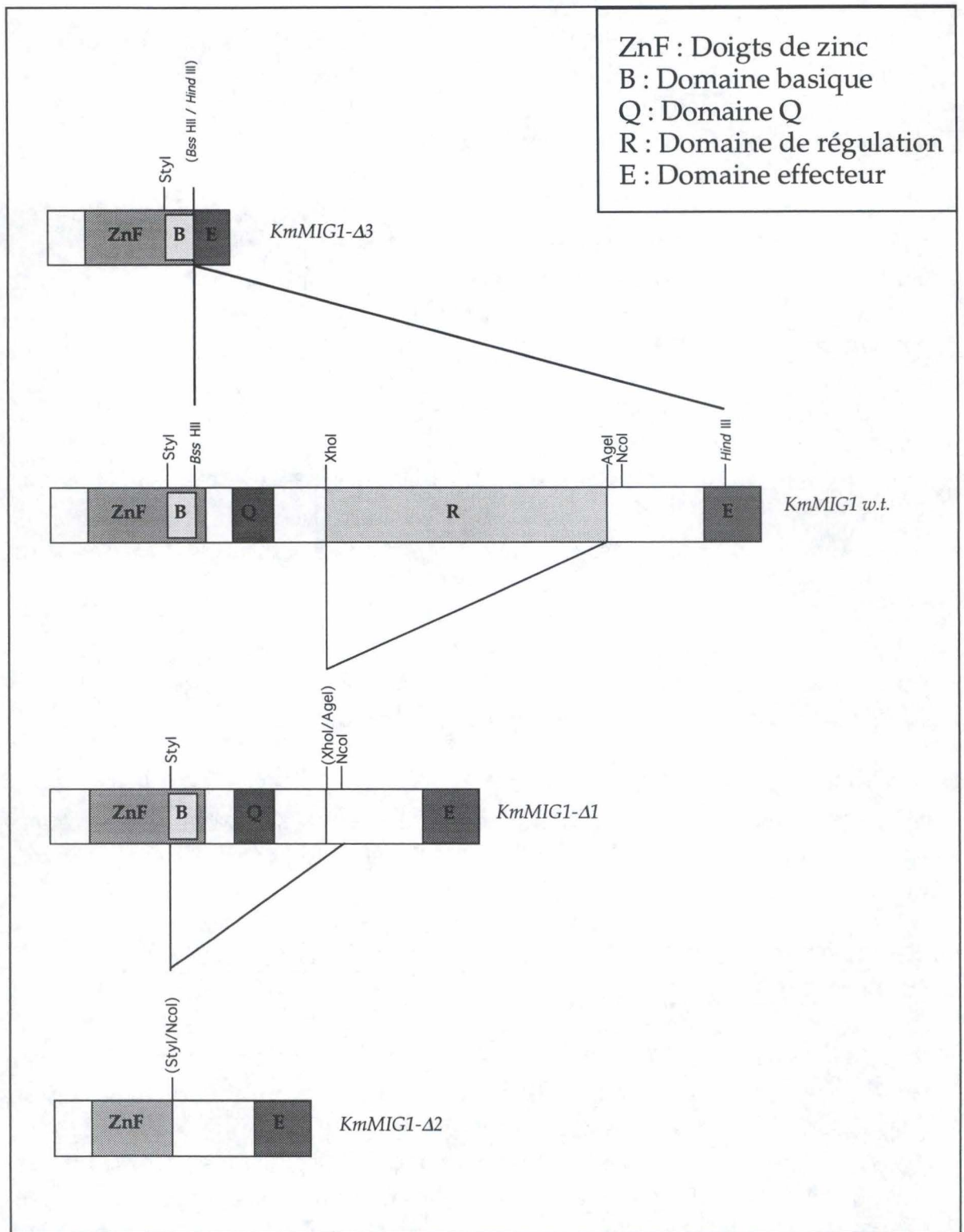


Figure 9 : Représentation schématique des différents allèles de *KmMIG1* créés *in vitro*. Les sites de restrictions utilisés sont mentionnés. La fusion de deux sites est indiquée entre parenthèses. Les différents domaines fonctionnels sont représentés par des boîtes grisées. Les abréviations utilisées pour les différents domaines sont répertoriées en haut à droite. Le domaine Q est une région très riche en résidus glutamine. Pour les détails, voir texte.

Les différents allèles que nous avons construits *in vitro* sont repris schématiquement à la **Figure 9** (le détail de leur construction est donné en Annexe).

3.1. La régulation par le glucose se fait sur la région R de KmMig1p

Les travaux réalisés par Östling (Östling *et al.*, 1996) ont démontré qu'il existe une région de régulation par le glucose sur la protéine ScMig1p de *S. cerevisiae*; cette région est subdivisée en deux sous-régions R1 et R2 qui contiennent différents sites potentiels de phosphorylation dont deux pourraient être la cible de la kinase Snf1p. Néanmoins, aucun de ces sites ne s'est avéré indispensable pour la régulation puisque la perte d'une seule de ces régions n'est pas suffisante pour perdre complètement le contrôle par le glucose.

3.1.1. But de l'expérience

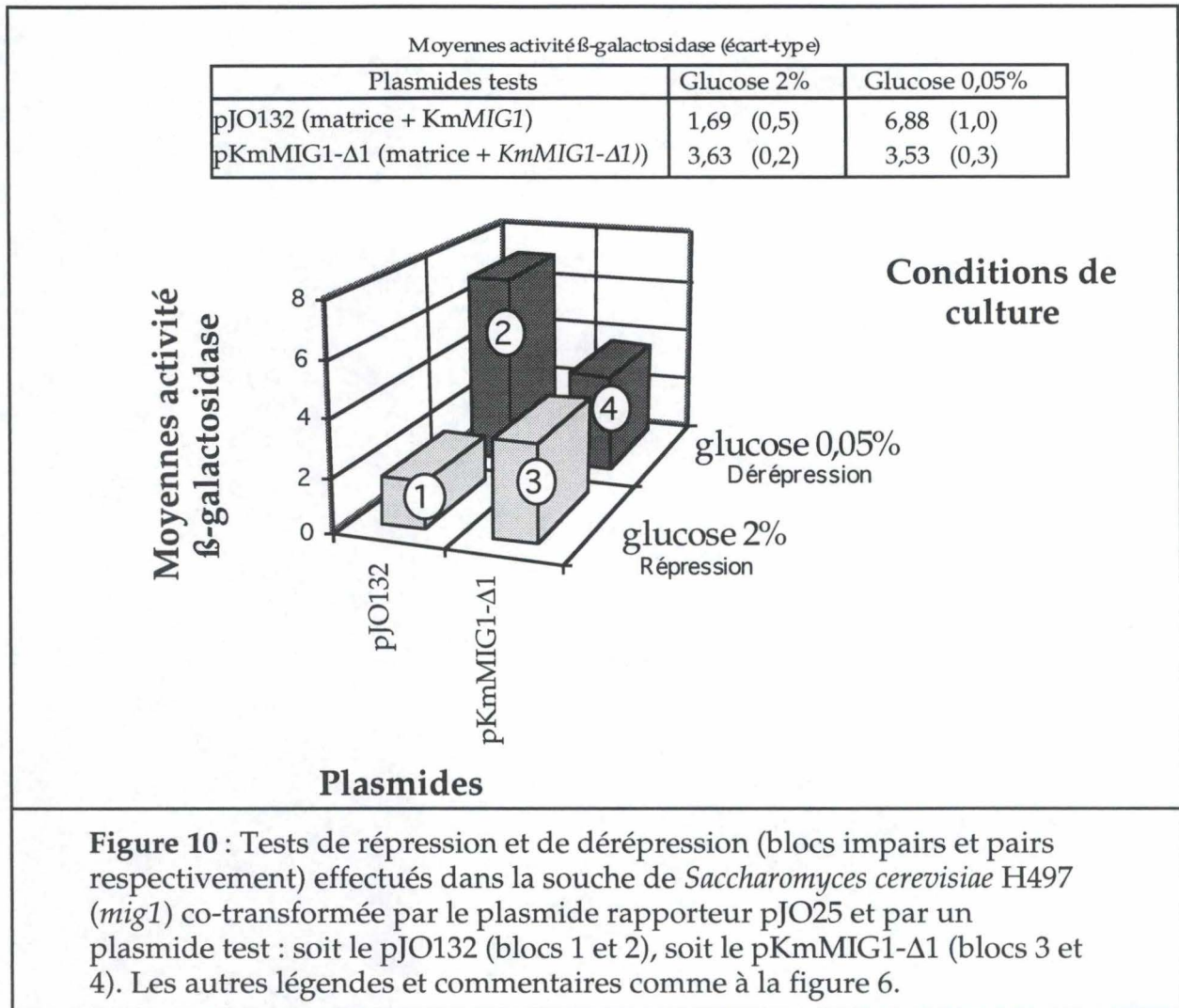
La question abordée dans cette expérience est de savoir si, chez KmMig1p, les boîtes identifiées par alignement multiple dans les régions R1 et R2 de ScMig1p, correspondent à une région de régulation par le glucose.

En effet, l'alignement de séquence entre les protéines de *K. lactis*, *K. marxianus* et *S. cerevisiae* montre quatre boîtes (3, 6, 7 et 8) conservées dans les régions R1 et R2 de ScMig1p. Rappelons que dans la région R1, seule la boîte 3 est conservée (voir point 3.2. du chapitre Introduction).

3.1.2. Résultats

Un délétant pour l'ensemble de ces quatre boîtes a été créé : le KmMIG1- Δ 1. La protéine produite par ce gène délété a été testée en même temps que la protéine 'sauvage' dans la souche de *S. cerevisiae* H497 (*mig1*) dans des conditions de répression et de dérépression.

Les données obtenues sont reprises à la **Figure 10**.



3.1.3. Conclusions

En présence de glucose, on peut constater que la protéine KmMig1p- Δ 1 réprime le promoteur pSUC2 deux fois moins que la protéine KmMig1p 'sauvage' (comparaison des moyennes 1 et 3).

De plus, il est intéressant de noter que la protéine KmMig1p- Δ 1 n'est plus régulée par le glucose. En effet, on voit que pour les deux tests avec le KmMIG1- Δ 1 (comparaison des moyennes 5 et 6), contrairement aux tests avec le KmMIG1 w.t. (comparaison des moyennes 3 et 4), la quantité de β -galactosidase produite est la même en conditions de répression et en conditions de dérépression. La région délétée dans ce mutant serait donc une région sur laquelle la régulation par le glucose intervient. Cette région de KmMig1p a été nommée domaine R.

3.2. Les domaines B et Q sont nécessaires à la répression par KmMig1p

3.2.1. But de l'expérience

Le but de l'expérience est de délimiter les régions nécessaires à la répression de KmMig1p au niveau le promoteur pSUC2.

3.2.2. Résultats

La souche *S. cerevisiae* H497 (*mig1*) a été co-transformée par le plasmide rapporteur pJO25 et un des plasmides test : pHR68, pJO132, pKmMIG1- Δ 1, pKmMIG1- Δ 2, ou pKmMIG1- Δ 3. La mesure de l'activité du promoteur pSUC2 a été réalisée dans des conditions de répression pour chacun de ces co-transformants.

Les résultats obtenus sont résumés à la **Figure 11**.

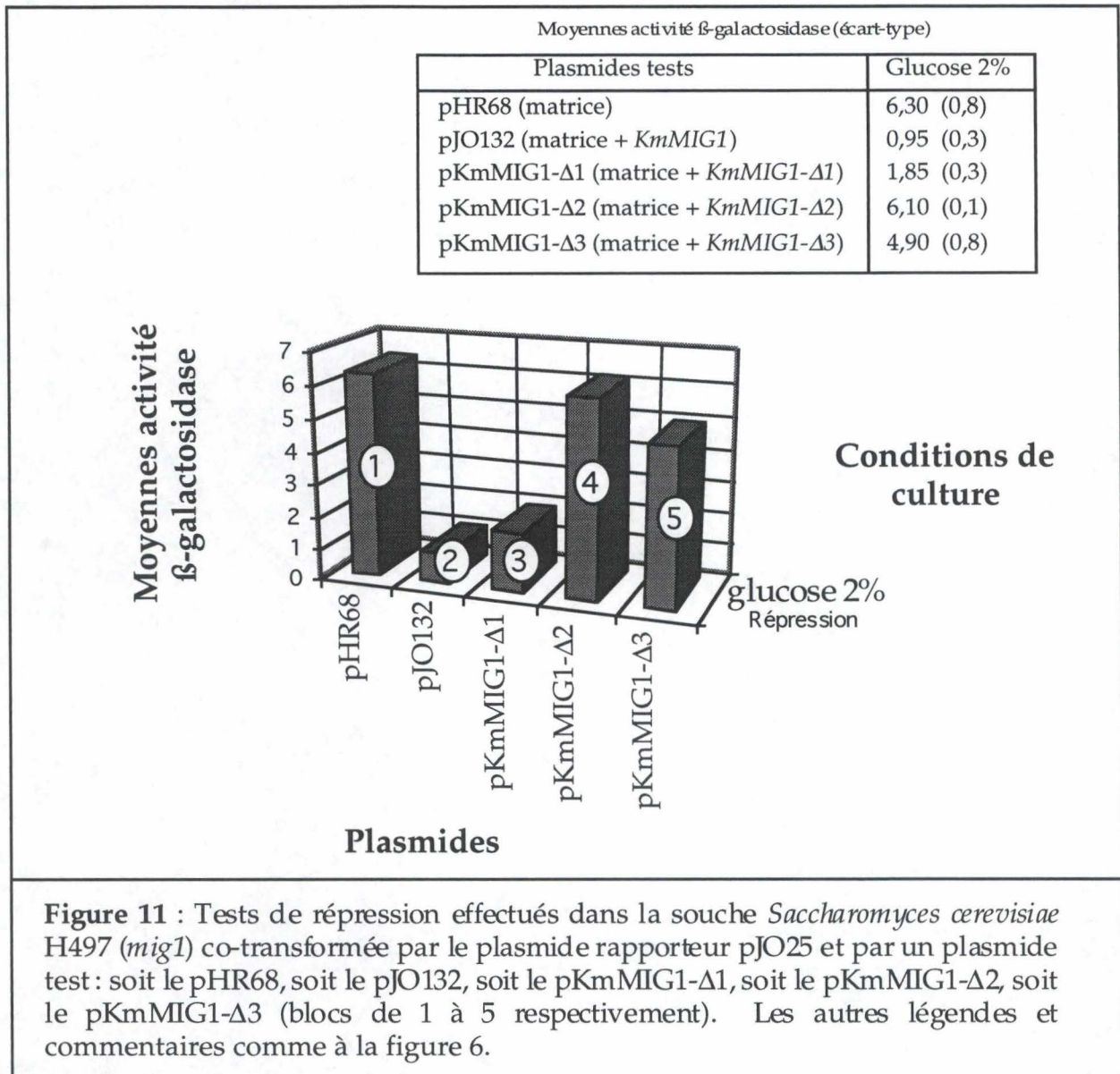


Figure 11 : Tests de répression effectués dans la souche *Saccharomyces cerevisiae* H497 (*mig1*) co-transformée par le plasmide rapporteur pJO25 et par un plasmide test : soit le pHR68, soit le pJO132, soit le pKmMIG1- Δ 1, soit le pKmMIG1- Δ 2, soit le pKmMIG1- Δ 3 (blocs de 1 à 5 respectivement). Les autres légendes et commentaires comme à la figure 6.

3.2.3. Conclusions

Les résultats présentés dans le graphique ci-dessus mettent en évidence une répression claire avec la protéine *KmMig1p- Δ 1* (moyenne 3 figure 12) alors que plus aucune répression n'est observée en présence de la protéine *KmMig1p- Δ 2* (moyenne 4 figure 12). Nous pouvons dès lors mettre en relation la perte de fonction avec les délétions propres au *KmMig1p- Δ 2*, c'est-à-dire les domaines B, Q et une partie du domaine R.

Le *KmMIG1- Δ 3* (moyenne 5 figure 12) est un allèle qui ne possède que les doigts de zinc, le domaine B et une partie du domaine effecteur (en l'occurrence, la partie codant pour les 7 derniers acides aminés de ce domaine). Cet allèle manifeste par rapport au contrôle négatif une baisse

significative du taux de transcription de la β -galactosidase. Il est donc capable de réprimer, ne fût-ce que légèrement, le pSUC2.

3.3. CONCLUSION GENERALE

Nous avons montré que le domaine R serait la région de la protéine KmMig1p sur laquelle s'effectue la régulation par le glucose.

La région contenant les domaines B et Q apparaît nécessaire à la fonction de répression de cette protéine. Nous avons montré que le domaine B serait également impliqué dans la fonction KmMig1p.

DISCUSSION

1. KmMig1p régule le promoteur pSUC2 à la manière de ScMig1p

1.1. KmMig1p réprime le promoteur pSUC2

Il a été montré dans ce travail que *KmMIG1* est l'homologue fonctionnel de *ScMIG1* et donc, que KmMig1p se substitue fonctionnellement à ScMig1p chez *Saccharomyces cerevisiae*. Au point 2.1. du chapitre des Résultats, nous avons montré que la protéine KmMig1p réprime presque aussi bien le promoteur pSUC2 que la protéine ScMig1p lorsqu'on se trouve dans des conditions de répression.

De plus, les acides aminés 15, 18 et 21 des doigts de zinc qui sont supposés interagir avec les éléments CIS spécifiques (Lundin *et al.*, 1994) sont identiques dans les trois protéines Kl-, Km- et ScMig1p (voir 3.2. du chapitre Introduction). Nous avons donc de bonnes raisons de penser que la protéine KmMig1p se fixe sur les mêmes URS que la protéine ScMig1p.

1.2. KmMig1p est sous le contrôle de la voie de régulation glucose

La protéine KmMig1p est sous le contrôle d'une voie de régulation dépendante du glucose chez *S. cerevisiae*. En effet, nous avons montré qu'en présence de la protéine KmMig1p, l'expression du gène rapporteur varie en fonction des conditions de culture : il est réprimé en présence de glucose et déréprimé en absence de glucose (2.1. et 2.2. chapitre Résultats).

Nous avons également montré que le promoteur pSUC2 est réprimé constitutivement en présence de la protéine KmMig1p- $\Delta 1$ (3.1. chapitre Résultats). La régulation de la protéine KmMig1p par le glucose s'exerce donc sur un ou plusieurs domaines inclus dans la région délétée dans la protéine KmMig1p- $\Delta 1$. Cette région a été alignée à la région de régulation de la protéine ScMig1p contenant les domaines R1 et R2 (Östling *et al.*, 1996) et sera appelé par la suite domaine R de KmMig1p (voir Figure 1)

1.3. KmMig1p serait régulé par la protéine kinase Snf1p

L'inactivation d'une protéine hybride KmMig1p-VP16 en absence de glucose est dépendante de la kinase Snf1p; cette protéine hybride est une protéine KmMig1p pour laquelle le domaine effecteur a été remplacé par l'activateur transcriptionnel viral VP16 de l'*Herpes simplex*. La transformation du répresseur KmMig1p en un activateur transcriptionnel est nécessaire pour étudier la régulation négative de KmMig1p par la kinase Snf1p.

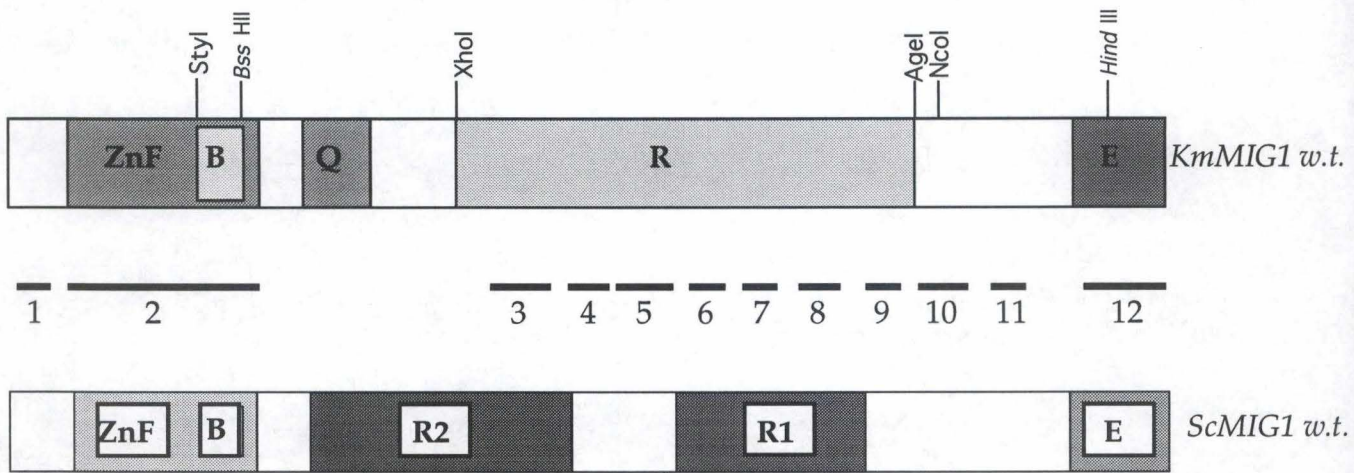


Figure 1 : Position relative des domaines fonctionnels des deux protéines Mig1p de *K. marxianus* et *S. cerevisiae*. Les 12 boîtes mises en évidence par l'alignement multiple des trois protéines Mig1p (voir figure 9 du chapitre Introduction) sont représentées par des traits épais.

Ceci est lié au fait que, dans une souche *snf1*, même en absence de *ScMIG1*, l'expression du gène *SUC2* (et donc de notre gène rapporteur) est constitutivement réprimée par des mécanismes indépendants de Mig1p, ces mécanismes de répression étant sous le contrôle négatif de la kinase Snf1p.

En supposant que la régulation par le glucose puisse se faire aussi bien sur le KmMig1p-VP16 que sur la protéine KmMig1p, on peut dire que la protéine KmMig1p est régulée, chez *S. cerevisiae*, par la protéine Snf1p, de façon directe ou indirecte. Une régulation directe de la protéine KmMig1p par la kinase Snf1p est possible puisqu'on retrouve dans la région délétée de la protéine KmMig1p- Δ 1 deux sites potentiels de phosphorylation par la kinase Snf1p. Ces deux sites potentiels de phosphorylation se trouvent dans les boîtes 4 et 5 déterminées par l'alignement de séquence (point 3.2. du chapitre Introduction). Ces deux boîtes ne sont pas incluses dans un des deux domaines fonctionnels de régulation localisés chez ScMig1p (Östling *et al.*, 1996). Une régulation par d'autres kinases est également possible puisqu'on retrouve quatre autres sites de phosphorylation potentiels dans la protéine KmMig1p (Cassart, Thèse Doctorale 1996).

1.4. La fonction de répression de KmMig1p nécessite les protéines Ssn6p et Tup1p

Nous avons montré au point 2.2 du chapitre Résultats que la répression par KmMig1p sur le promoteur pSUC2 est dépendante des protéines Ssn6p et Tup1p. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la protéine Ssn6p est actuellement considérée comme la protéine adaptatrice du complexe de co-répression alors que la protéine Tup1p est considérée comme la sous-unité active de ce complexe. Cette conception est corroborée chez *S. cerevisiae* par des évidences obtenues en double-hybride (Treitel et Carlson, 1995). Nous avons donc de fortes présomptions quant à l'existence d'un lien physique pouvant exister entre le domaine effecteur de la protéine KmMig1p et la protéine Ssn6p. Notons néanmoins qu'aucune interaction entre Ssn6p et ScMig1p n'a pu être mise en évidence par une expérience de co-immunoprécipitation (Tzamarias et Struhl, 1995). Il n'est donc pas impossible que d'autres protéines puissent faire le lien entre KmMig1p et Ssn6p.

Nous avons également noté une légère fonction d'activation de la protéine ScMig1p au niveau de l'expression du gène rapporteur dans une souche H686 (*mig1 ssn6*). Un phénomène d'activation similaire a déjà été décrit pour la protéine de fusion LexA-ScMig1p sur le promoteur pSUC2 dans une souche *ssn6* (Treitel et Carlson, 1995). Dans cette expérience, le système rapporteur utilisait le promoteur bactérien Lex-A (en amont du gène LacZ)

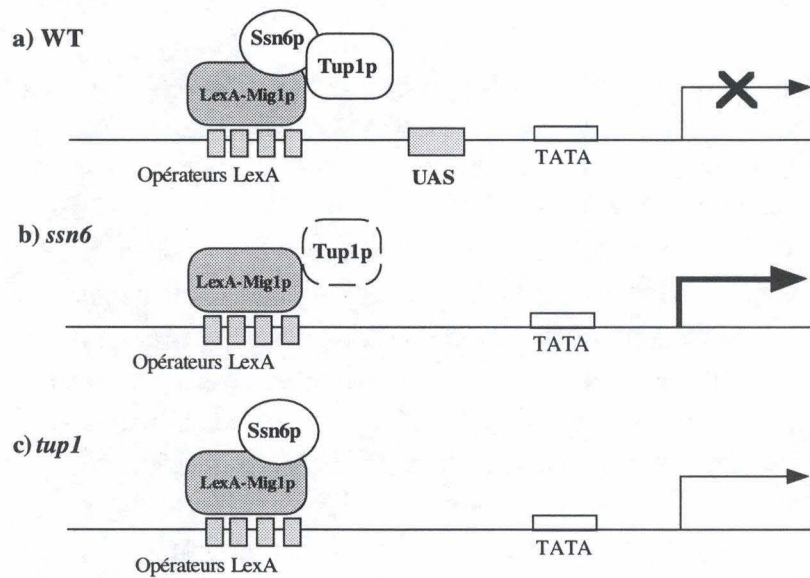


Figure 2 : Modèle de répression et d'activation par LexA (d'après Treitel et Carlson, 1995). **a)** Chez un sauvage (WT), LexA-Mig1 recrute les protéines Ssn6p et Tup1p pour réprimer la transcription d'un promoteur contenant des UAS. D'autres protéines peuvent assister Mig1 dans son interaction avec Ssn6p et Tup1p. **b)** Chez un mutant *ssn6*, LexA-Mig1 active fortement la transcription d'un promoteur ne contenant pas d'UAS. L'association de Mig1 avec Tup1 est incertaine (Tup1 en pointillé). **c)** Dans un mutant *tup1*, LexA-Mig1 est associé avec Ssn6p et active faiblement. Il n'est pas exclu que cette activation résulte d'une instabilité partielle de Ssn6p.

qui n'est pas reconnu par les protéines de levure, ceci afin d'éviter toute interaction avec d'autres voies de régulation. D'après ces données, il avait été proposé que la protéine ScMig1p possède un domaine d'activation qui serait masqué lorsque la protéine Ssn6p interagit avec ScMig1p. En l'absence de Ssn6p, ce domaine d'activation serait rendu accessible au partenaire trans-activateur (inconnu). Une représentation schématique de ce modèle est présentée à la **Figure 2** (Treitel et Carlson, 1995).

Un tel phénomène d'activation par KmMig1p n'a pas été mis en évidence dans les expériences réalisées dans ce travail; cela peut être lié à un manque relatif de sensibilité du système rapporteur utilisé ou à toutes autres choses.

1.5. Importance fonctionnelle des domaines B et Q de KmMig1p

Les données obtenues au point 3.2. du chapitre Résultats nous indiquent clairement que la région comprenant les domaines B, Q et une partie du domaine R est nécessaire à la fonction de répression de la protéine KmMig1p. Différentes hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer la perte de répression observée pour la protéine KmMig1p- $\Delta 2$ (par rapport au KmMig1p- $\Delta 1$):

- Une explication triviale est que la protéine produite à partir du gène *KmMIG1- $\Delta 2$* est trop endommagée pour adopter une conformation correcte lui permettant d'accomplir les deux fonctions essentielles à la répression, à savoir, la liaison à l'ADN et le recrutement du complexe co-répresseur. Cette hypothèse paraît devoir être à rejeter puisqu'une protéine de ScMig1p délétée pour toutes les régions se trouvant entre le domaine B et le domaine effecteur est fonctionnelle (Östling et al., 1996).
- La région délétée riche en résidus basiques serait indispensable à la fixation à l'ADN. On peut proposer qu'il existe une interaction entre les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN et les charges positives portées par les résidus basiques du domaine B de la protéine. Ce domaine basique serait impliqué dans la courbure de l'ADN mise en évidence chez *S. cerevisiae*, lors de la fixation de ScMig1p sur sa cible (Lundin et al., 1994; Figure 7 ainsi que point 2.3.3. du chapitre Introduction).
- Enfin, la région délétée contiendrait des séquences (NLS : "Nuclear Localization Signals") impliquées dans l'importation nucléaire de KmMig1p. Ces séquences sont connues pour être fortement basiques et

**Conservation du domaine basique de la boîte 2
délimitée par l'alignement de séquences**

ScMig1p	P	R	G	K	R	G	R	K	K	K
KlMig1p	P	K	G	K	R	G	R	K	K	K
KmMig1p	P	K	G	K	R	G	R	K	K	K
KmMig1p (boîte 1)	P	L	Q	K	K	G	R	K	K	A
Swi5p	P	R	-	K	R	G	R	P	R	K

Figure 3 : Comparaison des séquences basiques (domaines B) conservées entre les 3 répresseurs Mip1p avec le NLS de Swi5p (Moll *et al.*, 1991). Pour KmMig1p, la séquence basique délimitée dans la boîte 1 de l'alignement (voir Figure 9 du chapitre Introduction) est également représentée. Les aa identiques à ceux du domaine basique ScMig1p sont dans des cases grisées (Östling *et al.*, 1996).

contiennent très souvent une majorité de lysines et d'arginines (Boulikas, 1994). On peut constater que la séquence correspondant au domaine basique est très conservée entre les trois protéines Mig1p et la protéine nucléaire Swi5p. Ces quatre protéines ont fait l'objet d'un alignement de séquence multiple dont le résultat est repris à la **Figure 3** (Cassart, Thèse Doctorale 1996). Il est donc possible que le domaine B de KmMig1p contienne un NLS.

Des informations complémentaires concernant cette région (contenant les domaines B et Q) sont apportées par le KmMig1p- $\Delta 3$. Cette protéine contenant le domaine B est capable de réprimer le promoteur pSUC2. Ceci indique que le domaine B restaure une fonction perdue dans le KmMig1p- $\Delta 2$ (qui ne possède pas le domaine B). Néanmoins, la faible répression du promoteur pSUC2 par le KmMig1p- $\Delta 3$ peut être expliquée de deux façons :

- La délétion des 7 premiers acides aminés du domaine effecteur pourrait engendrer une baisse substantielle de l'affinité entre la protéine KmMig1p- $\Delta 3$ et la protéine Ssn6p.
- Un mauvais positionnement du domaine B est possible en l'absence du domaine Q (comparaison du KmMig1p- $\Delta 2$ et du KmMig1p- $\Delta 1$). Ce domaine Q est une région très riche en résidus glutamine (18 glutamines sur 23 acides aminés), acide aminé polaire non chargé à pH physiologique. Cette région serait exposée en surface de la protéine, entraînant avec elle le domaine B qui lui est contigu.

2. Il existe une voie de répression de pSUC2 indépendante de Mig1p

Nous avons observé (voir point 2.2. chapitre Résultats) qu'en absence de Mig1p, le promoteur pSUC2 est régulé négativement par le glucose. Ceci indique que le promoteur pSUC2 est réprimé, en présence de glucose, par une (ou plusieurs) voie(s) de régulation indépendante(s) de Mig1p.

Une autre indication concernant cette voie de régulation est qu'elle est dépendante des protéines Ssn6p et Tup1p (voir point 2.3. chapitre Résultats). On peut donc proposer que la (ou les) voie(s) de régulation mise(s) en évidence dans ces expériences utilise(nt), comme effecteur final, un facteur transrépresseur capable de se fixer au promoteur pSUC2 et de recruter le complexe général de co-répression.

Ces observations sont à mettre en rapport avec les données très récentes démontrant l'existence chez *S. cerevisiae* d'un gène *MIG2*, lequel encode une protéine qui a une fonction de répression sur le promoteur pSUC2. L'étude de ce gène a montré que la protéine Mig2p qu'il encode est capable de se fixer au site A (URS) du promoteur du gène SUC2. De plus, une protéine de fusion LexA-Mig2p est capable de recruter les protéines Ssn6p et Tup1p. Cette étude a également montré que dans un double mutant *Saccharomyces cerevisiae mig1 mig2*, une légère répression du pSUC2 en conditions de répression est toujours présente (Luftiyya et Johnston, 1996). Ces données suggèrent donc que des facteurs 'trans'-répresseurs supplémentaires (autres que ScMig1p et ScMig2p) régulés par le glucose seraient impliqués dans la régulation du pSUC2 chez *S. cerevisiae*.

PERSPECTIVES

La première des perspectives sera de déterminer de manière non équivoque le rôle respectif des domaines B et Q de la protéine KmMig1p. Ceci sera rendu possible par la création de deux nouveaux allèles de *KmMIG1*; le premier sera délété uniquement pour le domaine B (appelé ci-dessous *KmMIG1-Δ4*) alors que le deuxième ne sera délété que pour le domaine Q. Nous envisageons de créer ces délétants par PCR en utilisant des amorces bordant les régions à déléter. Ces deux mutants seront testés en conditions de répression (glucose 2%). Nous pourrons ainsi savoir si le domaine Q est nécessaire pour la répression par Mig1p. S'il s'avère que *KmMIG1-Δ4* n'est pas capable de réprimer le promoteur du gène *SUC2*, le rôle hypothétique du domaine B dans l'importation nucléaire de Mig1p pourra être étudié en réalisant des protéines hybrides. Deux protéines seront construites et testées : une protéine de fusion KmMig1-TAG et une protéine de fusion délétant B-TAG. Ce TAG, par exemple la GFP ("Green Fluorescent Protein"), permettra la localisation cellulaire *in vivo* des protéines de fusion (Yokoe et Meyer, 1996). Si ce test met en évidence une incapacité de la part de la protéine de fusion délétée pour le domaine B de se localiser dans le noyau, cela indiquerait que le domaine B joue un rôle dans l'importation nucléaire de la protéine KmMig1p.

Dans un deuxième temps, nous envisagerons l'étude des mécanismes d'action impliqués dans la régulation de la protéine Mig1p. Cette analyse se fera par mutation ponctuelle des résidus localisés dans les sites de phosphorylation potentiels. Ces mutants seront obtenus par PCR. L'étude de ces mutants se fera dans une souche H497 afin de déterminer les résidus importants dans la régulation de KmMig1p par le glucose. Une fois ces résidus déterminés, on pourra tester les mutants dans une souche *snf1* afin de déterminer si l'action de Snf1p sur KmMig1p est directe. Notons que ces expériences se feront avec un KmMig1p-VP16 pour les mêmes raisons que celles expliquées dans la discussion au point 1.3.

Enfin, l'étude des interactions de Mig1p avec d'autres protéines de la cascade de régulation par le glucose pourra se faire via des tests double-hybride et des tests d'affinités chromatographiques.

MATERIEL ET METHODES

1. SOLUTIONS ET TAMPONS

1.1. Solutions

Acrylamide pour gel de séquençage

		Pour 500 ml H ₂ O
Acrylamide	38%	190 g
Bisacrylamide	2%	10 g

Ces solutions sont à filtrer sur filtre plissé et à stocker à 4°C.

Agarose

0,8%, 1% ou 2% dans du TAE 1X.

Alourdisseur / colorant pour gels d'agarose

		Pour 10 ml
Bleu de Bromophénol	0,25%	25 mg
EDTA	25 mM	0,5 ml d'EDTA 0,5 M
Glycérol	50%	5 ml
H ₂ O		4,5 ml

Ce stock est concentré 10X. Donc mettre 2 µl pour un volume total de 20 µl.

Antibiotiques

Tous les antibiotiques en solutions sont stockés à -20°C.

Ampicilline 10% : 100 mg par ml d'eau bidistillée. Stériliser par filtration sur un filtre Millipore 0,22 micromètre. Cette solution stock est concentrée 1000X.

Ex. d'utilisation : 400 µl d'ampicilline 10% dans 400 ml de LB.

Antimycine 0,1% : 1 mg d'antimycine dans 1 ml d'éthanol. Cet antibiotique est utilisé en concentration finale de 0,04%.

Ex. d'utilisation : 40 µl de la solution stock dans 100 ml de milieu.

Tétracycline : Faire un mélange 50/50 d'eau distillée et d'éthanol absolu. Ajouter à ce mélange 12,5 mg par ml du mélange. Pas de stérilisation ; ce stock est concentré 1000X.

β-mercaptoéthanol

La solution stock est vendue à une concentration de 14,3 M et à diluer 1000X pour l'utilisation.

Bromure d'éthidium

2 mg par ml d'eau bidistillée.

dNTP 10mM pour PCR

Le stock de dNTP que l'on reçoit de la firme Pharmacia est à une concentration de 100 mM pour chacun des 4 nucléotides. La concentration finale utilisée lors des PCR est de 10 mM pour chacun des nucléotides.

dATP	50 µl
dCTP	50 µl
dGTP	50 µl
dTTP	50 µl
H ₂ O	295 µl
Tris M pH 7	5 µl

EDTA-Bleu dextran

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

Fixateur pour gel de séquençage

Acide Acétique	10%
Méthanol	10%

Isopropyl, β-D thiogalactopyranoside (IPTG)

La solution stock est à une concentration de 100 mM, soit 2,38 g dans 10 ml d'eau bidistillée.

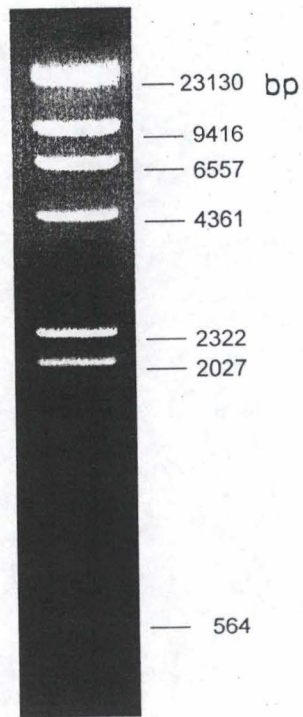


Figure 1 : Profil de migration du marqueur de taille λ HindIII dans un gel d'agarose 1%.

Marqueurs de taille

Deux marqueurs de taille ont été utilisés (**Figure 1**) :

- λ *Hind* III : la solution achetée chez BRL n'est pas prête à l'emploi. A 100 μ l de cette solution, on ajoute 100 μ l de tampon 10X et 700 μ l d'eau. Le tout est dénaturé par un passage de 10 minutes à 65°C. Après cette dénaturation, on ajoute 100 μ l d'alourdisseur-colorant pour gels d'agarose. 10 μ l de cette solution finale sont chargés par puits. Il est à noter que ce marqueur permet également de quantifier l'ADN d'un échantillon par rapport à l'intensité des différentes bandes du marqueur.

Taille (kb)	Quantité (ng)
23,130	300
9,416	122
6,557	85
4,361	56,5
2,332	30
2,027	26,5
0,564	7,5
0,127	2

Composition du tampon 10X :

TrisHCl	200 mM	5 ml de 1 M
NaCl	200 mM	1 ml de 5 M
EDTA	1 mM	100 ml de 250 mM
H ₂ O		19 ml

- λ *Avu* II : la solution achetée est utilisable directement pour autant qu'on ajoute à cette solution de l'alourdisseur-colorant pour gels d'agarose (10X) dans un rapport de 1/10. 3 μ l de cette solution sont déposés sur gel d'agarose.

Taille (kb)	Taille (kb)
8,126	0,985
6,500	0,894
3,676	0,590
2,600	0,510
2,005	0,433
1,612	0,398
1,420	0,345
1,284	0,310

Ne sont indiquées ici que les tailles des bandes ou groupes de bandes qu'il est possible d'utiliser facilement en diagnostic.

Solution d'ONPG (O-Nitrophényl β -D Galactopyranoside)

4 mg par ml de tampon Z.

Persulfate d'ammonium

10% dans de l'eau bidistillée pour les gels de séquençage.

Phénol-chloroforme

Phénol	50 ml
Hydroxyquinoline	0,05 g
Alcool isoamylique	2 ml
Chloroforme	50 ml

Le phénol doit être liquéfié à la température de 50°C. Après cela, ajouter l'hydroxyquinoline, laver 3 fois avec un volume de TE (pH = 7,5), et garder le dernier volume de TE. Ajouter ensuite l'alcool isoamylique et le chloroforme.

Protéinase K

Solution stock à une concentration de 2 mg par ml d'eau bidistillée. Cette solution est conservée à -20°C.

RNAase A

Solution stock à une concentration de 10 mg par ml d'eau bidistillée. Chauffer pendant 20 minutes à 100°C avant d'aliquoter et de stocker à -20°C.

SDS 10%

10 g de SDS dans 100 ml d'eau bidistillée.

SOC

		Pour un litre
Bactotryptone	2%	20 g
BactoYeastExtract	0.5%	5 g
NaCl	10 mM	2 ml de NaCl 5 M
KCl	2,5 mM	2,5 ml de KCl 1 M
MgCl ₂	10 mM	10 ml de MgCl ₂ 1 M
MgSO ₄	10 mM	10 ml de MgSO ₄ 1 M
Glucose	20 mM	3,96 g

Le MgSO₄ est à ajouter après autoclavage.

Solution de transformation au 'PEG'

PEG 4000	40%
EDTA	1 mM
Tris HCl PH7.5	10 mM
LiAc	100 mM

SSC 20X

		Pour un litre
NaCl	3 M	175,32 g
Citrate de Na	0,3 M	88,23 g

Solution "Salmon Sperm DNA"

- Dissoudre du "Salmon Sperm DNA" (Sigma, D-1626) dans de l'H₂O stérile (5 mg/ml dans la solution finale) pendant 2 à 4 heures.
- Ajouter du NaCl 5M jusqu'à une concentration finale de 0.1M.
- Pratiquer environ 12 passages de la solution dans une seringue (et aiguille) de 50 ml.
- Faire bouillir pendant 10 minutes, aliquoter et stocker à -20°C.

5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β-D galactopyranoside (X-gal)

Solution stock à 2% dans du N-N diméthylformamide. Aliquoter et stocker à -20°C.

1.2. Tampons

Tampon de chargement séquençage:

-formamide désionisée : 250 ml.
-EDTA-Bleu dextran : 50 ml.

Tampon de ligation 5X

TrisHCl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (dithiothreitol)	10 mM
ATP	1 mM

Tampon N2

KCl	900 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N3

KCl	1150 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N5

KCl	1000 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	8,5

Tampon S1

TrisHCl pH 8	50 mM
EDTA pH 8	10 mM

Tampon S2

		Pour 100 ml
NaOH	200 mM	800 mg
SDS	1%	1 g

Tampon S3

Solution d'acétate de sodium 2,55 M à amener à pH 4,8 avec une solution d'acide acétique 37%.

Tampons de restriction

Tampons Biolabs

Composition (mM)	Les différents tampons			
	1	2	3	4
Bis Tris Propane HCl	10	-	-	-
MgCl ₂	10	10	10	-
DTT	1	1	1	1
TrisHCl	-	10	50	-
NaCl	-	10	100	-
Tris acétate	-	-	-	20
Mg atétate	-	-	-	10
K acétate	-	-	-	50
pH à 25°C	7	7,9	7,9	7,9

Tampons Boehringer

Composition (mM)	Les différents tampons				
	A	B	L	M	H
Tris acétate	33	-	-	-	-
TrisHCl	-	10	10	10	50
Mg acétate	10	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10
K acétate	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
DTE	-	-	1	1	1
DTT	0,5	-	-	-	-
β-mercaptoéthanol	-	1	-	-	-
pH à 37°C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

Tampons BRL

Composition (mM)	Les différents tampons										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TrisHCl	50	50	50	20	10	50	50	20	50	100	10
MgCl ₂	10	10	10	5	8	6	10	10	5	10	12
NaCl	-	50	100	-	-	50	50	-	-	150	-
KCl	-	-	-	50	-	50	50	-	-	-	100
pH	8	8	8	7,4	8,2	7,4	8	7,4	8,5	7,6	9

Tampon TAE

	Pour 1 l de TAE 50X	Pour 1l de TAE 1X
TrisHCl	242 g	4,84 g
Acide acétique	57,1 g	1,14 g
EDTA 0,5 M pH8	100 ml	9,3 g

Tampon TE

à pH 8 :

TrisHCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

à pH 7,5 :

TrisHCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 7,5	1 mM

Tampon Z

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	60 mM
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 mM
β-mercaptoéthanol	50 mM

2. SOUCHES ET PLASMIDES

2.1. Souches

2.1.1. Souche de bactérie : Xl1Blue d'E. coli

Cette bactérie est utilisée pour la réplication plasmidique. Ceci se fait par une mise en culture dans du LB (+ ampicilline) de la souche transformée par le plasmide d'intérêt. La préparation du plasmide se fait par une méthode décrite dans la partie consacrée aux techniques relatives à l'ADN (mini-, midi- ou maxipréparation).

Génotype : *sup E44 hsd R17 rec A1 end A1 gyr A46 thi
rel A1 lac⁻ F' [pro AB⁺ lac Iq
lac ZΔM15Tn 10 (tet^r), dam*

Caractéristiques principales :

1- Cette souche est *recA1* : le taux de recombinaison dans cette souche est donc 1000 fois plus faible que dans une souche non délétée pour ce gène. Ceci permet d'éviter les recombinaisons entre l'ADN endogène et l'ADN exogène mais également de propager les plasmides à l'état monomérique.

2- *endA1* : la mutation de ce gène entraîne une diminution du taux d'endonucléase, ce qui est un facteur améliorant la quantité ainsi que la qualité de l'ADN plasmidique.

2.1.2. Souches de *Saccharomyces cerevisiae*

Toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées lors de ce mémoire sont congéniques de la souche W303-1A : *MATa SUC2 GAL ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu 2-3,112 trp1-1 ura3-1* (Thomas et Rothstein, 1989)

souches	génotypes	Références
H497	<i>trp1::hisG mig1-Δ3</i>	Östling <i>et al.</i> , 1996
H443	<i>tup1-Δ1::HIS3 mig1-Δ1::LEU2</i>	Östling <i>et al.</i> , 1996
H686	<i>cyc8-Δ1::HIS3 trp1::hisG mig1-Δ3</i>	*

* Le gène *CYC8* est disrupté dans cette souche par le marqueur HIS 3 qui est inséré aux sites de restrictions uniques *Spe I* et *Bsp1407 I*. (J.Östling, communication personnelle)

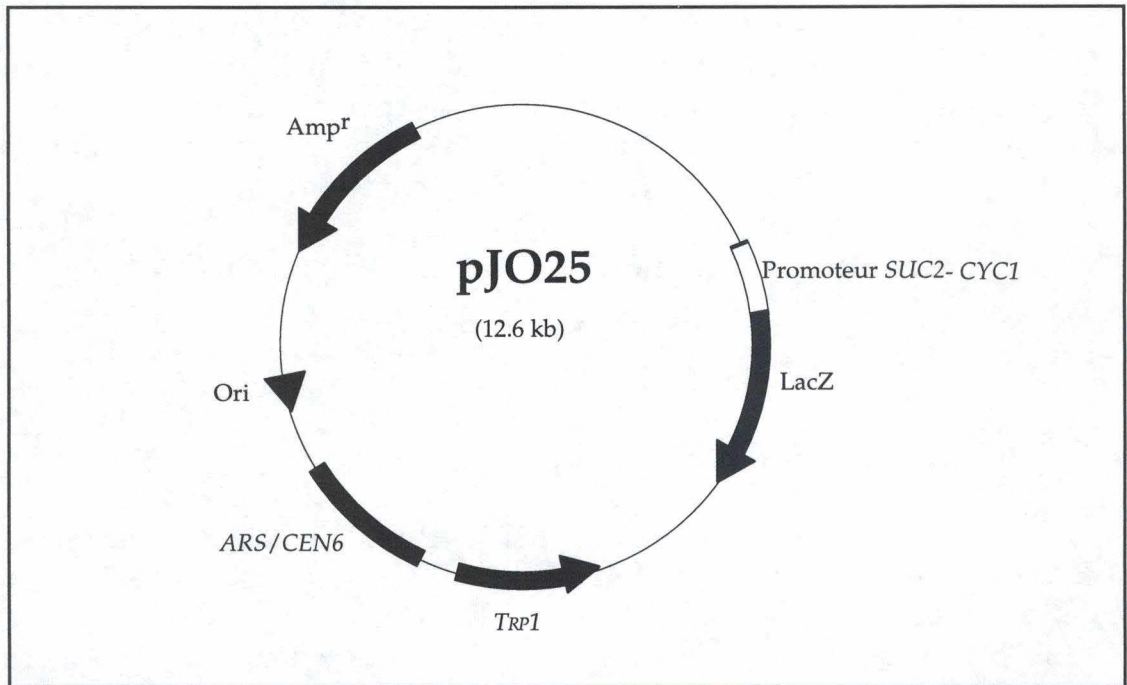


Figure 2 : Représentation schématique du pJO25. Ce plasmide porte les marqueurs de sélection *TRP1* et *Amp^r*. On trouve aussi les origines de réplication ORI (pour *E. coli*) et ARS (pour la levure). pJO25 se trouve en monocopie dans la levure puisqu'il porte CEN6. Le gène rapporteur LacZ est en aval du promoteur synthétique *SUC2-CYC1* représenté par une boîte blanche. Pour les détails, voir texte.

2.2. Plasmides

2.2.1. pJO25 (Östling *et al.*, 1996)

Ce plasmide (**Figure 2**) porte le système rapporteur qui est utilisé pour quantifier la complémentation lors de tous les tests réalisés dans ce mémoire. Le pJO25 est basé sur le pLGD-312 (Guarente *et al.*, 1983) et sur le pFL39 (Kern *et al.*, 1990). Premièrement, un fragment *Xma* I-Age I du pLGD-312 contenant la fusion *CYC1-LacZ* a été cloné dans le site unique *Xma* I de pFL39, pour donner le pJO20. Ensuite, un fragment *Hind* III-*Sal* I de pWJ210 (Nehlin *et al.*, 1990), contenant les trois UAS et les deux sites de liaison de Mig1p du gène *SUC2*, a été introduit au niveau des sites uniques *Hind* III et *Xho* I du pJO20 pour donner le pJO25.

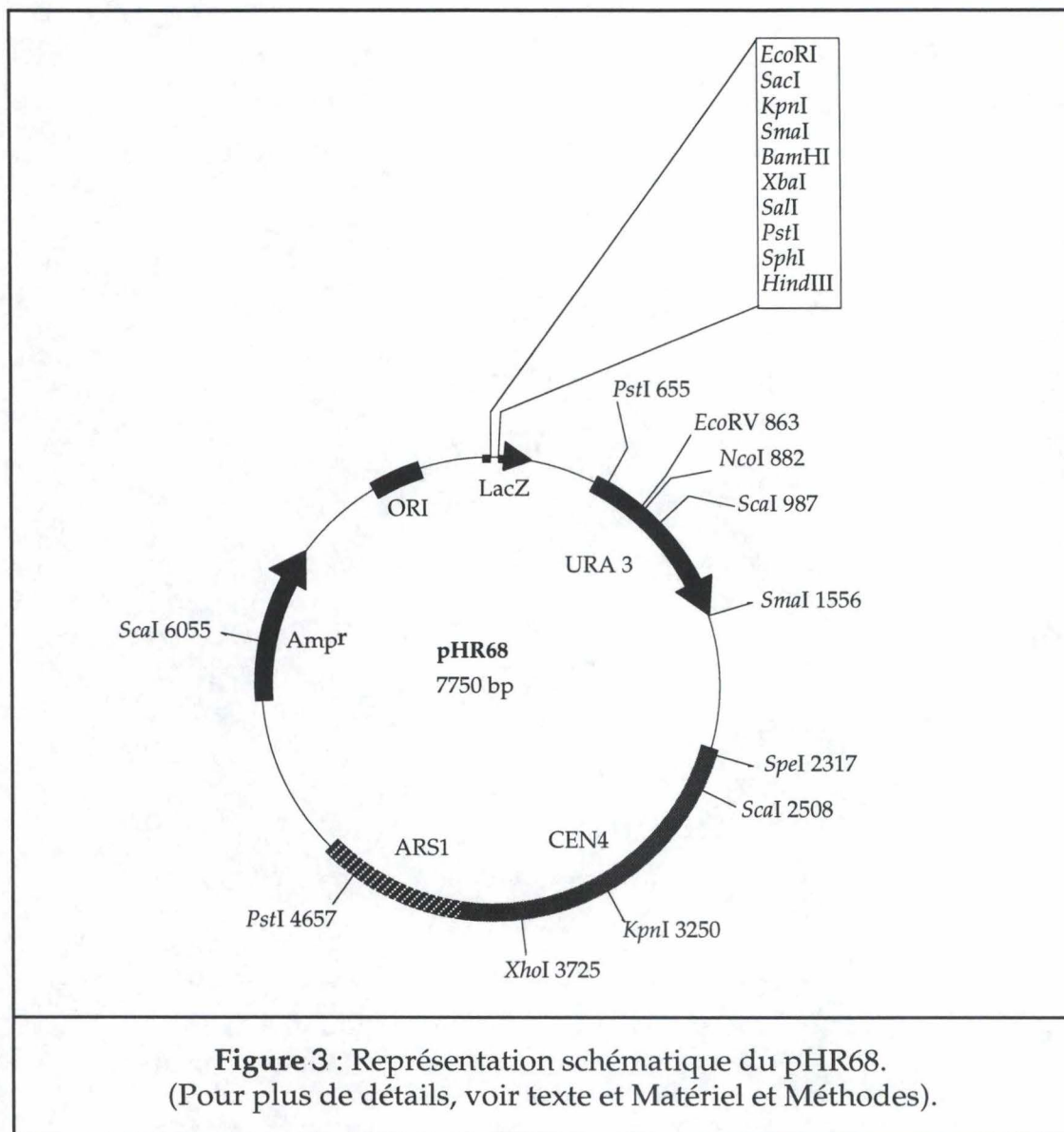
Ce plasmide porte donc le gène reporter LacZ, situé en aval du promoteur du gène *SUC2*, contenant les deux sites de liaison du répresseur Mig1p. La répllication dans la levure est assurée par la séquence centromérique de type *CEN6*. Les levures contenant ce plasmide pourront être sélectionnées via une auxotrophie pour le tryptophane, grâce à la présence sur le plasmide du marqueur *TRP1*.

2.2.2. pHR68 (Nehlin et Ronne, 1990)

Aussi bien le *KmMIG1* w.t. (l'allèle sauvage) que ses allèles mutés ont été clonés en *Sac* I/*Xba* I du pHR68 (**Figure 3**) sous le contrôle de leur propre promoteur. Le pHR68 possède une origine de répllication (*ori*) et un marqueur de sélection (*Amp^r*) pour *E. coli* ce qui permet les étapes de clonage chez cette bactérie. Il possède également *ARS-CEN* et le marqueur de sélection *URA3* ; ces éléments permettent son utilisation chez *S. cerevisiae* pour les tests de complémentation.

Etant centromérique, on le trouve en monocopie dans la levure et il permet d'effectuer les tests de complémentation dans une situation relativement proche de celle du gène authentique à son locus chromosomique.

Ce plasmide a également été utilisé comme contrôle négatif dans les expériences de complémentation hétérologue.



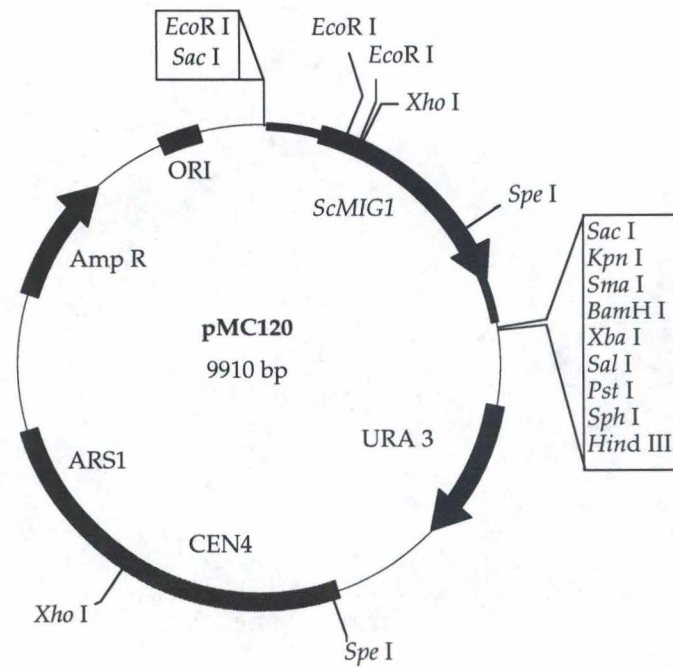


Figure 4 : Représentation schématique du pMC120. Les sites multiples de clonage sont représentés par des encarts. Pour plus de détails, voir texte.

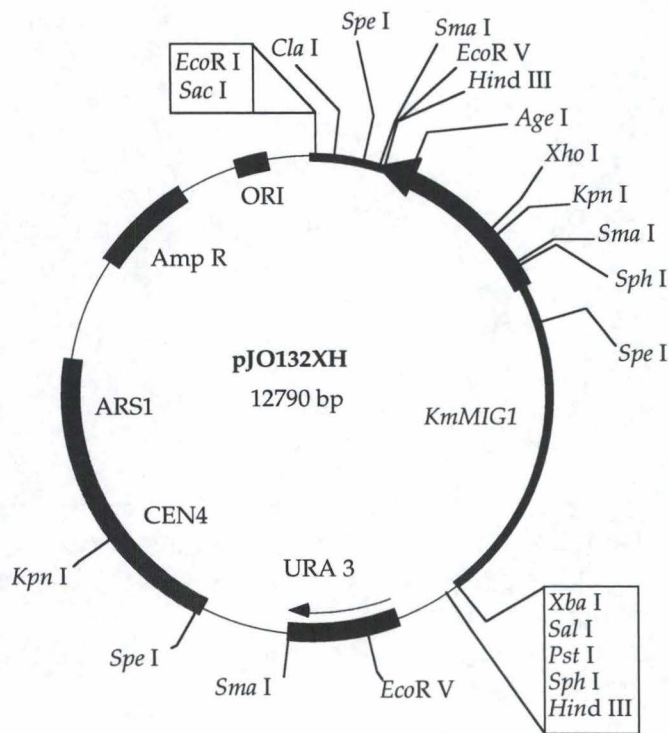


Figure 5 : Représentation schématique du pJO132XH. Les sites multiples de clonages sont sous forme d'encarts.

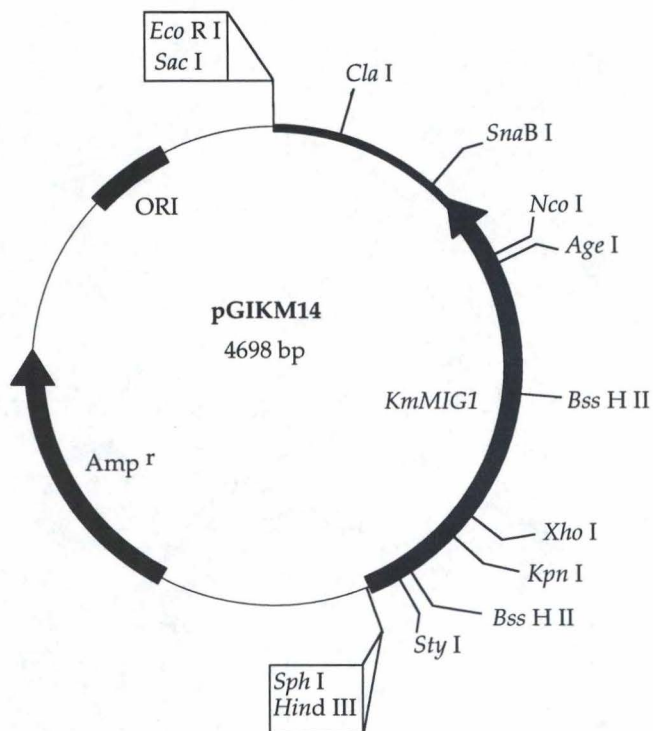


Figure 6 : Représentation schématique du pGIKM14. Les sites multiples de clonage sont représentés sous forme d'encarts. Pour les détails voir texte.

2.2.3. pMc120 (Östling *et al.*, 1996)

Le pMc120 (**Figure 4**) est le résultat de l'intégration du gène *ScMIG1* de *Saccharomyces cerevisiae* dans la matrice pHR68 aux sites *Sac* I et *Eco*R I.

2.2.4. pJO132XH (Cassart J.-P., Thèse 1996)

Le pJO132XH (**Figure 5**) est le résultat du sous-clonage à partir du pGIKm12 d'un fragment *Sac* I-*Xba* I de 5060 bp contenant le gène *KmMIG1* dans la matrice du pHR68XH ouverte en *Sac* I-*Xba* I.

2.2.5. pGIKm14 (Cassart J.-P., Thèse 1996)

Le pGIKm14 (**Figure 6**) est le résultat du sous-clonage à partir du pGIKm12 d'un fragment *Sac* I-*Sph* I de 2051 bp dans un pUC18 ouvert au niveau de son site multiple de clonage en *Sac* I-*Sph* I.

3. MILIEUX DE CULTURE

3.1. Les milieux de culture bactériens

3.1.1. Le milieu LB

		Pour 400 ml
Tryptone	1%	4 g
NaCl	0,5%	2 g
Yeast Extract	0,5%	2 g

Pour obtenir du milieu solide à couler dans des boîtes de Petri, il faut ajouter à la composition du milieu 2% d'Agar. Les produits thermolabiles qui doivent parfois être ajoutés aux milieux de culture sont à ajouter après l'autoclavage. Cet ajout doit se faire préférence vers une température de 55-60°C pour l'ampicilline et les autres antibiotiques.

La culture des bactéries se fait dans des Erlenmeyers avec contre-pales ou dans des bouteilles 'universelles' dans le cas des minipréparations. La croissance de ces cultures bactériennes est optimale vers 37°C, sous agitation mécanique pour les cultures liquides.

3.2. Les milieux de culture pour les levures

3.2.1. Milieu YPD

		Pour 1 l
Glucose		20 g
Peptone		20 g
Yeast Extract		10 g

En ajoutant 2% d'agar à cette composition, on obtient un milieu solide qui peut être coulé dans des boîtes de pétri.

Mettre à pH 4,8 avec HCl 37%. Autoclaver.

3.2.2. Milieu minimum complet

Pour maintenir les plasmides dans *S. cerevisiae*, l'acide aminé (ou la base) correspondant au marqueur de sélection porté par le plasmide est omis du milieu de culture. Les autres aa (et les bases) nécessaires à la croissance optimale des levures sont fournis par un mélange (Omission Media Mix).

Pour 1 litre de milieu, utiliser 7.35 g d'un mélange (en poudre) dont la composition est présentée au tableau ci-dessous :

Omission Media Mix

	En g
Yeast Nitrogen Base w/o aa and ammonium sulfate	100
Ammonium sulfate	293.11
adenine sulfate	1.2
L-arginine sulfate	1.2
L-histidine-HCl	1.2
L-isoleucine	1.8
L-leucine	3.6
L-lysine-HCl	1.8
L-methionine	1.2
L-phenylalanine	3.0
L-tryptophan	1.2
L-tyrosine	1.8
uracile	1.2
L-valine	9.0

4. TECHNIQUES RELATIVES A L'ADN

4.1. La transformation

4.1.1. Transformation dans *E. coli* XL1-Blue

4.1.1.1. Electroporation

4.1.1.1.1. Introduction

Le principe de cette technique est d'endommager la membrane cellulaire via un choc électrique. Cette technique permet de créer des cassures membranaires par lesquelles de nombreuses molécules peuvent entrer et sortir de la cellule. La taille de ces molécules va du nucléotide aux très grandes molécules que sont les plasmides.

4.1.1.1.2. Préparation des cellules XL-1Blue électrocompétentes

- Inoculer une préculture de LB + tétracycline de 5 ml.
- Laisser pousser une nuit à 37°C sous agitation.
- Inoculer 200 ml de LB + tétracycline avec la préculture.
- Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une DO_{540nm} de 0,5-0,8.
- Stopper la culture sur glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 200 ml d'eau stérile froide.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 100 ml d'eau stérile froide.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 4 ml de glycérol 10% froid.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 400 μ l de glycérol 10% froid.
- Aliquoter 100 μ l par Eppendorf, conserver les cellules à -80°C jusqu'à leur utilisation.

4.1.1.1.3. Electroporation des cellules XL-1Blue

- Placer une cuvette d'électroporation dans la glace, y déposer 1 μ l d'ADN et 100 μ l de cellules compétentes. Incuber une minute.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (Gene Pulser-BioRad), réglé sur 25 μ F, 200 Ω et 2300 V.
- Choc électrique.
- Ajouter rapidement 1 ml de SOC.
- Transférer le tout dans un Eppendorf et incuber 1 heure à 37°C.
- Etaler 300 μ l sur boîte et laisser pousser une nuit.

4.1.1.2. Par la technique utilisant le chlorure de calcium

4.1.1.2.1. Introduction

Le technique consiste en l'adsorption de l'ADN plasmidique sur la paroi des cellules préparées au CaCl_2 (voir ci-dessous). Le calcium forme un complexe avec l'ADN plasmidique. Ce complexe est alors résistant au DNases cellulaires. Un choc thermique permet la traversée de la paroi par ce complexe ADN plasmidique-calcium. Les cellules sont alors incubées pendant une heure sur milieu non-sélectif pour permettre la synthèse des protéines permettant la résistance à certains antibiotiques portées par le plasmide. Ces cellules sont alors étalées sur milieu sélectif (contenant les antibiotiques appropriés) afin d'identifier les colonies contenant le plasmide d'intérêt.

4.1.1.2.2. Préparation des cellules XL-1Blue CaCl_2 compétentes

- Inoculer une préculture de 5 ml de LB + tétracycline
- Laisser pousser la nuit à 37°C sous agitation
- Inoculer 400 ml de LB + tétracycline avec la préculture
- Incuber sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la culture ait atteint une $\text{DO}_{540\text{nm}}$ de 0,6
- Stopper la croissance dans la glace pendant 10 minutes
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à 5°C
- Resuspendre les cellules dans 200 ml de CaCl_2 50 mM froid
- Incuber 20 minutes dans la glace
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à 5°C
- Resuspendre les cellules dans 15 ml de CaCl_2 50 mM + glycérol 15%
- Aliquoter dans des Eppendorfs prérefroidis et conserver à -80°C jusqu'à utilisation.

4.1.1.2.3. Transformation par la technique CaCl_2

- Mettre en présence 1 à 100 ng d'ADN plasmidique avec 200 μl de cellules compétentes
- Incuber 30 minutes sur glace
- Réaliser un choc thermique à 42°C pendant 2 minutes
- Ajouter 1 ml de LB
- Incuber une heure à 37°C
- Etaler 200 μl des cellules sur un milieu solide sélectif

4.1.1.3. Sélection des transformants

L'ampicilline est un antibiotique qui permet la sélection des colonies transformées par un plasmide portant le marqueur de résistance Amp^r. Ce marqueur de résistance code pour la β -lactamase qui est une enzyme sécrétée hors de la cellule et qui est capable de dégrader l'antibiotique.

Il arrive que des colonies ne possédant pas le plasmide codant pour la β -lactamase poussent sur un milieu contenant de l'ampicilline. Ceci est relativement fréquent aux abords d'une colonie possédant le plasmide d'intérêt puisque celle-ci dégrade localement l'ampicilline. Ces colonies parasites sont parfois appelées colonies périphériques.

4.1.2. Transformation de levure

4.1.2.1. Par la méthode PEG

4.1.2.1.1. Introduction

Cette technique est analogue à la technique au CaCl₂ employée pour transformer XL-1Blue. En effet, il s'agit dans les deux cas d'une transformation ayant recours à un choc thermique pour permettre la création de cassures et de pores dans la membrane des cellules à transformer.

Dans ce cas-ci, il n'y a pas besoin de préparation préalable des cellules à transformer.

4.1.2.1.2. En pratique

- Prendre 1,5 ml d'une culture en phase stationnaire.
- Centrifuger 5 secondes à 6500 rpm (Janetzki) et décanter.
- Ajouter une goutte de la solution de "Salmon Sperm DNA"
- Resuspendre avec l'ADN plasmidique à transformer (dans un volume maximal de 5 μ l).
- Ajouter 0.5 ml de la solution de transformation.
- Mélanger et incuber 15 minutes à température ambiante.
- Incuber 20 minutes à 42°C (choc thermique).
- Centrifuger 5 secondes à 6500 rpm (Janetzki) et laver les cellules avec 1 ml H₂O stérile.
- Resuspendre les cellules dans 200 μ l d'H₂O stérile et étaler sur milieu sélectif.

4.2. Purification d'ADN PAR Extraction au phénol-chloroforme

4.2.1. Introduction

Cette opération a pour but d'enlever les sels et les protéines d'une solution contenant de l'ADN. On l'utilise notamment entre deux restrictions pour lesquelles les tampons d'incubation des enzymes sont différents, entre une réaction de restriction et de déphosphorylation, ou avant une ligation.

4.2.2. Purification

- Porter le volume de la solution à 200 µl
- Ajouter 200 µl de Phénol-Chloroforme
- Mélanger au Vortex
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm (Janetzki)
- Récupérer la phase supérieure
- Ajouter 500 µl d'Ether
- Mélanger en retournant l'Eppendorf - Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm (Janetzki)

A cette étape de purification fait suite l'étape de précipitation de l'ADN.

4.2.1.3. Précipitation de l'ADN plasmidique

Suite au traitement au Phénol-Chloroforme, une étape de précipitation doit suivre, afin de récupérer l'ADN qui se trouve en solution.

Protocole :

- Récupérer la phase inférieure
- Ajouter 1/10 volume de NaAc 3M (ici : 20 µl)
- Ajouter 2,5 volumes d'Éthanol 100% froid
- Incuber 15 minutes à -80°C
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Enlever le surnageant
- Rincer avec 200 µl d'Éthanol 70% froid
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Enlever l'Éthanol
- Sécher 5 minutes au Speedvack
- Resuspendre dans un volume approprié d'eau stérile.

4.3. Restriction d'ADN

4.3.1. Généralités

Les enzymes utilisées pour restreindre l'ADN double brin s'appellent des endonucléases de restrictions. Ces enzymes sont sites-spécifiques, c'est-à-dire qu'une enzyme ne sait reconnaître qu'un site (souvent de 4 ou de 6 nucléotides). Les enzymes qui coupent l'ADN au même site sont appelées isoschizomères. Les séquences reconnues par ces enzymes sont souvent palindromique (ex : *Bam*H I reconnaît le site GGATCC).

Les enzymes de restriction peuvent être classées selon le type de coupure qu'elles occasionnent. On distingue les enzymes qui produisent :

- des bouts francs, c'est-à-dire que les deux brins d'ADN ont la même longueur. Cette forme de coupure est obtenue par exemple avec l'enzyme *Eco*R V, *Dra* I, *Sma* I,....

- des "bouts collants", qui, à leur tour, peuvent être de deux types :
soit on obtient une extrémité 3'-protrudante (par exemple : *Kpn* I, *Sph* I,...)
soit on obtient une extrémité 5'-protrudante (par exemple : *Eco*R I, *Hind* III,...)

Les enzymes de restrictions sont des enzymes que l'on retrouve dans la nature. Elles sont produites à partir de différentes espèces de microorganisme. Le nom porté par une enzyme de restriction nous donne des renseignements quant à l'organisme dont elle provient : par exemple, l'enzyme *Eco*R I, est une enzyme d'*E. coli*.

4.3.2. Au point de vue pratique

Différents éléments sont à mettre en présence pour réaliser une restriction :

- 1- L'ADN à restreindre;
- 2- L'enzyme de restriction;
- 3- Le tampon de restriction, qui est à diluer 10X lors de son utilisation;
- 4- Porter au volume désiré avec de l'eau stérile (20 à 50 µl).

Ce mélange réactionnel est alors incubé environ une heure à une température optimale, cette température étant, pour la plupart des enzymes de restriction, de 37°C. Mais certaines enzymes sont plus active à d'autres températures : par exemple, *Sma* I est efficace à 25°C alors que *Bcl* I a une activité optimale à 50°C.

Au terme de cette réaction de restriction, l'enzyme peut être inactivée, soit par une augmentation de température, si l'enzyme est thermosensible, soit par une extraction au Phénol-Chloroforme.

Si l'on veut que la restriction d'un plasmide ne soit pas totale afin de récupérer un fragment précis alors que plusieurs sites identiques sont présents sur le plasmide, il faut avoir recours à une restriction partielle. En pratique, on distingue deux étapes pour faire une restriction partielle :

- 1- La première étape est une mise au point : faire une restriction classique mais à laquelle on retire des aliquots tous les minutes et que l'on place directement à -20°C après y avoir ajouté de l'alourdisseur-colorant. Ensuite, on met tous ces échantillons sur gel d'agarose pour connaître le temps de restriction optimum pour obtenir la proportion maximale du fragment qui nous intéresse.
- 2- On refait une restriction exactement dans les mêmes conditions que pour la première étape (même quantité d'ADN, d'enzyme, même volume,...). Cette restriction est arrêtée après un temps d'incubation déterminé à l'étape 1.

4.3.3. Remarques générales

Les quantités d'enzyme de restriction à utiliser varient selon la quantité d'ADN que l'on veut restreindre : on utilisera entre 3 et 10 unités d'enzymes par µg d'ADN à restreindre.

Il faut cependant veiller à ne pas une proportion trop élevée d'enzyme de restriction (maximum 1/10 du volume final), car les enzymes sont stockées dans une solution comprenant 50% de glycérol et s'il se trouve, lors de la restriction, à une concentration supérieure à 5%, des effets néfastes peuvent se manifester, et l'enzyme peut alors :

- a) voir son activité décroître et n'engendrer que des restrictions partielles.
- b) faire montre d'une activité "star" : il a été montré que, sous des conditions extrêmes, les endonucléases de restrictions sont capables de cliver des séquences qui sont similaires mais pas identiques à leur site spécifique de clivage. Parmi ces conditions

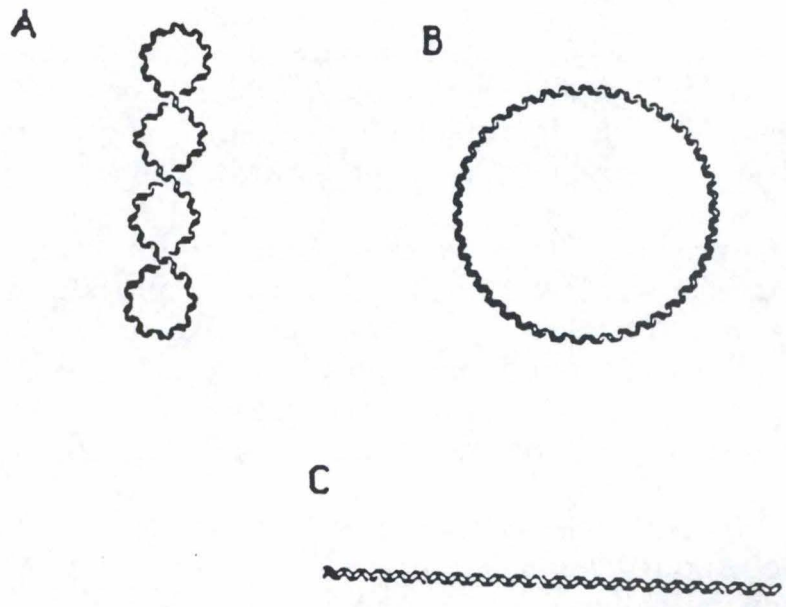


Figure 7: Les trois conformations de l'ADN

- A: Forme CCC
- B: Forme OC
- C: Forme OL

extrêmes, on cite notamment une concentration élevée en glycérol, mais également une trop forte concentration en ADN cible, une force ionique trop élevée, un pH trop élevé, la présence de solvants organiques tel l'éthanol, ...

4.4. Electrophorèse

4.4.1. Buts

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée à différentes fins. Premièrement, elle sert à séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Ensuite, elle offre la possibilité d'estimer la taille de ces fragments, mais également d'en évaluer la concentration. Enfin, elle permet l'évaluation de la qualité d'une préparation, son état de pureté.

4.4.2. Principe

On fait migrer, dans un champ électrique, des molécules d'ADN. Ces molécules sont capables de se déplacer dans champ électrique du fait de la présence, en leur sein, de groupements phosphates. Différents paramètres influencent la migration de l'ADN dans le champ électrique :

- 1- La taille du fragment** : la vitesse de migration des molécules dans le champ électrique est inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire. Plus les fragments d'ADN sont grands, moins vite et moins loin ils migreront dans le champ électrique imposé.
- 2- La concentration en agarose du gel** : Plus le gel contient d'agarose, plus le réseau formé sera dense et serré. Dans ce cas, une plus grande résistance sera opposée à la migration des molécules d'ADN dans le champ électrique.
- 3- La conformation de la molécule d'ADN** : Une molécule d'ADN palsmidique peut exister sous trois conformations. La première, c'est lorsque cette molécule ne présente pas de coupure, c'est la forme CCC (Covalently Closed Circular). La seconde, c'est lorsqu'une coupure est présente en simple brin dans la molécule, c'est la forme OC (Open Circular). Enfin la troisième, c'est lorsqu'il y a une coupure double brin dans la molécule, c'est la forme OL (Open Linear). On remarque d'une façon générale que ces trois formes d'ADN migrent à des distances différentes au sein d'un même gel (**Figure 7**).
- 4- L'intensité du champ électrique** : Plus l'ampérage imposé à la cuve d'électrophorèse est faible, plus la vitesse de migration des molécules d'ADN faible.

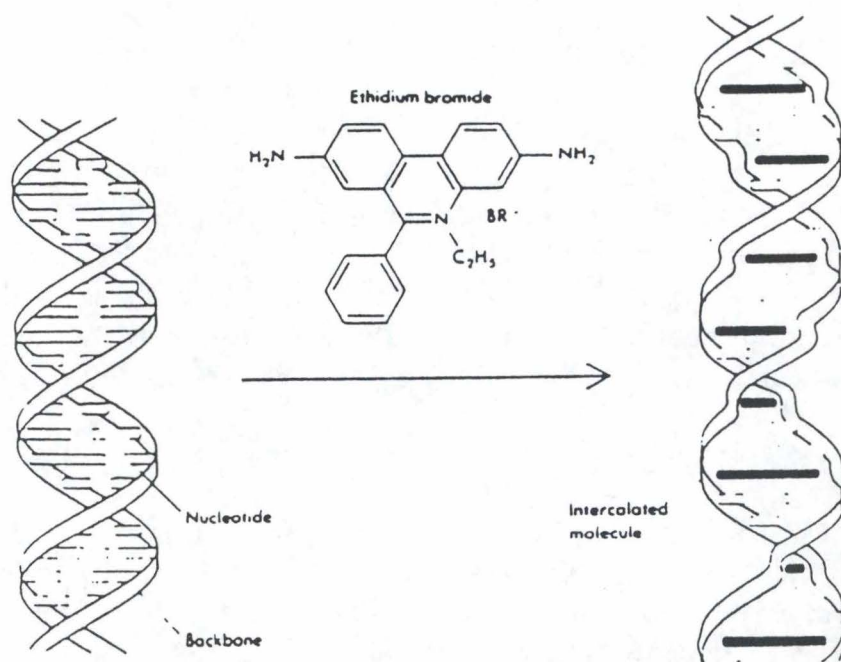


Figure 8: Schéma de fixation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN.

Les fragments d'ADN peuvent être visualisés grâce à l'addition, dans le polymère d'agarose, de bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les bases de l'ADN (**Figure 8**). Lorsque ce composé est excité par les U.V. (302 nm), il devient fluorescent.

La taille et la quantité des fragments peuvent être estimées par leur comparaison avec un marqueur de taille, que l'on fait migrer simultanément, et dont on connaît la taille des fragments présents ainsi que leur quantité.

4.4.3. Au point de vue pratique

Une certaine quantité d'agarose est dissoute par chauffage dans du TAE 1X (1 g pour 100 ml pour un gel 1%). Après refroidissement aux alentours de 50°C, le gel est coulé dans un support en plexiglas, on ajoute le bromure d'éthidium, et on place un peigne permettant la formation des puits de chargement. Une fois le gel solidifié, on enlève le peigne. Le gel est placé dans une cuve à électrophorèse et immergé dans du TAE 1X.

Les échantillons d'ADN sont ajoutés dans les puits en présence d'alourdisseur/colorant pour gels d'agarose, solution dense et colorée, pour que l'ADN "tombe" au fond du puits, et que l'évolution de la migration soit visualisable.

Les électrophorèses peuvent être :

- 1- **analytiques** : dans le but de déterminer la taille et/ou la quantité des fragments d'ADN ainsi que la pureté de l'ADN.
- 2- **préparatives** : dans le but de récupérer un fragment d'ADN de taille déterminée.

4.5. Récupération d'ADN inclus dans un gel d'agarose

4.5.1. Introduction

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'absorption des particules d'ADN sur un support en silice et l'élution de cet ADN dans un milieu pauvre en sel.

4.5.2. 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.
- vortexer 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 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 à 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.

4.5.3. Qiaex II

- extraire la portion du gel contenant la bande d'ADN.
- 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 supplémentaire: 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.

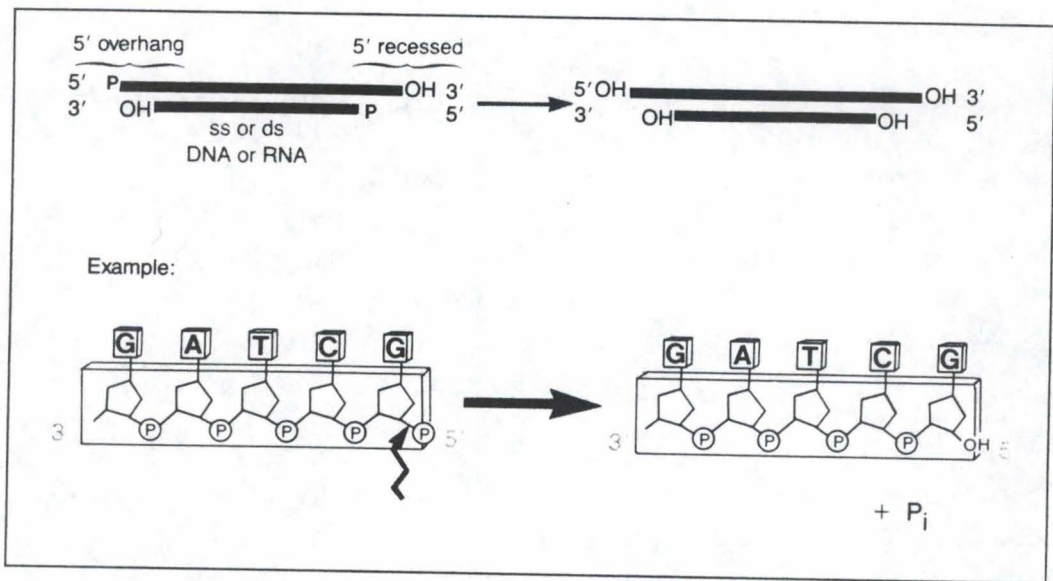


FIGURE 9 : Représentation de l'action de la phosphatase alcaline d'intestin de bovin.

- 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 augmenter la quantité d'ADN récupéré.

La composition des différents tampons, ainsi que de la matrice, n'ont pas été indiqués dans la notice accompagnant ces deux kits.

4.5.4. 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.

4.6. Déphosphorylation

4.6.1. Introduction

La phosphatase alcaline d'intestin de bovin (CIP pour Calf Intestine alcaline Phosphatase) catalyse l'hydrolyse des résidus 5'-phosphate de l'ADN, l'ARN et des ribo- et désoxyribo-nucléosides triphosphates (**Figure 9**). Ainsi, un vecteur déphosphorylé est incapable d'être "ligué" sur lui-même. Donc, l'insertion de fragments d'ADN dans le vecteur est favorisée. La CIP est fournie avec un tampon de déphosphorylation, concentré 10X.

4.6.2. Protocole

- Mettre en présence les éléments suivants :
 - 10 µl d'ADN vecteur (100 ng/ml)
 - 2 µl de tampon de déphosphorylation 10X
 - 2 µl phosphatase alcaline
 - 6 µl eau stérile

A - Si l'ADN a des extrémités 5' protrudantes:

- Incuber 30 min. à 37°C
- Ajouter 0,5 µl de CIP
- Incuber 30 min. à 37°C

B - 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 µl de CIP
- Incuber 15 min. à 37°C
- Incuber 15 min. à 56°C

A et B

- Stopper la réaction : 5' sur glace
- Ajouter 5 ml d'EGTA 200 mM
- Incuber 10 minutes à 65°C
- Ajouter de la protéinase K à une concentration finale de 100 µg/ ml
- Incuber 30 minutes à 56°C
- Purifier ensuite par un Phénol-Chloroforme, et une précipitation à l'éthanol

4.6. Ligation

4.6.1. Principe

La formation de liens phosphodiesters entre un groupement 3'-hydroxyle et un groupement 5'-phosphate est une réaction catalysée par la Ligase du Phage T4. Pour ce faire, l'enzyme a besoin d'ATP et de Mg^{++} .

4.6.2. En pratique

Différents éléments sont mis en présence :

- la matrice linéarisée
- le fragment à insérer
- une unité de T4 DNA Ligase
- du tampon de ligation (5X)
- de l'eau stérile pour atteindre le volume désiré

4.6.3. Remarques générales

Lorsque la ligation n'implique que des bouts collants, elle se fait à 14°C, pendant une nuit, la formation des ponts hydrogènes étant favorisée à cette température.

Lorsque la ligation n'implique que des bouts francs, elle se fait pendant 3 heures à température ambiante, car l'activité de la T4 DNA Ligase est plus élevée à cette température.

Enfin, si la ligation implique les deux types d'extrémités, les deux incubations sont successivement réalisées.

S'il n'y a qu'une possibilité d'insertion (si le clonage est forcé), la stoechiométrie matrice/insert sera de 1:1. Si par contre la matrice peut se refermer sur elle-même ou si la ligation implique des bouts francs, la stoechiométrie pourra atteindre 1:10.

4.7. Préparation d'ADN plasmidique

4.7.1. Introduction

La technique utilisée est la même pour toutes les préparations d'ADN plasmidique présentées ici. Seules les quantités de réactifs varient. *E. coli* est l'organisme le plus utilisé pour les réplifications plamidiques.

4.7.2. La minipréparation

Ce protocole permet l'obtention d'ADN plasmidique rapidement et en quantités suffisantes que pour pouvoir effectuer quelques restrictions diagnostiques.

4.7.2.1. Culture bactérienne

- Inoculer une colonie dans 5 ml de LB + ampicilline
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation

4.7.2.2. Lyse des cellules

- Récupérer 1,5 ml dans un Eppendorf
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm (Janetzki)
- Enlever le surnageant
- Resuspendre le culot dans 300 µl de P1 + RNAase
- Ajouter 300 µl de P2 et mélanger
- Incuber 5 minutes
- Ajouter 300 µl de P3 et mélanger
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm

4.7.2.3. Récupération des plasmides

- Récupérer le surnageant
- Ajouter 700 µl d'Isopropanol tempéré pour précipiter l'ADN plasmidique
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm
- Enlever le surnageant

- Ajouter 200 µl d'Éthanol 70% froid pour laver le culot
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm
- Enlever l'Éthanol
- Sécher au Speedvack
- Resuspendre l'ADN dans de l'eau stérile (50 µl)
- Procéder ensuite à des restrictions diagnostiques des plasmides purifié afin d'en estimer la quantité ainsi que la nature.

4.7.3. La midipréparation

4.7.3.1. Introduction

Ce protocole est habituellement utilisé pour obtenir en grande quantité un plasmide. Si ce plasmide est le fruit d'une construction, il aura au préalable été identifié après une minipréparation. Contrairement à la minipréparation qui nous fournit un matériel plasmidique principalement consacré au diagnostic, la midipréparation permet d'obtenir une quantité suffisante d'ADN pour permettre d'envisager de nouvelles constructions. Il est dès lors important que l'ADN plasmidique obtenu par la midipréparation soit non seulement en quantité suffisante mais également relativement pur. C'est à cette fin que les colonnes AX100 de Nucléobond sont utilisées.

4.7.3.2. Culture

- Inoculer une préculture dans 200 ml de LB + Ampicilline
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation

4.7.3.3. Lyse des cellules

- Verser la culture dans une bouteille Sorvall 250 ml
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Enlever le surnageant
- Resuspendre le culot avec 4 ml de P1 + RNAase et le transférer dans un Corex de 30 ml
- Ajouter 4 ml de P2 et mélanger
- Incuber 5 minutes
- Ajouter 4 ml de P3 et mélanger
- Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm
- Récupérer le surnageant dans un Corex de 30 ml. Centrifuger à nouveau si le surnageant n'est pas clair

4.7.3.4. Mise sur colonne

Cette étape n'est nécessaire que si l'on veut obtenir une préparation d'ADN plasmidique très pure.

- Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2
- Déposer le surnageant sur la colonne
- Laver avec 2 X 4 ml de tampon N3
- Eluer avec 2 ml de tampon N5. Ces 2 ml sont récupérés dans un Corex de 15 ml.
- Précipiter l'ADN avec 1,6 ml d'isopropanol (9,6 ml si on n'est pas passé sur colonne)
- Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm
- Enlever le surnageant
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70% froid
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm
- Enlever l'éthanol
- Sécher au Speedvack
- Resuspendre l'ADN dans 100 µl d'eau stérile

4.8. La Polymerase Chain Reaction : PCR

4.8.1. Introduction

La PCR (**Figure 10**) est un processus rapide d'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN spécifique. Ce processus exige que l'on connaisse quelque information sur des séquences bordant un locus désiré (ces séquences peuvent être, par exemple, tirées d'études de clonage préliminaires). Ces séquences servent à construire deux amorces oligonucléotidiques. Ces amorces vont aller s'hybrider au niveau de l'ADN cible, sur des brins opposés, orientés de sorte que leurs extrémités 3'-hydroxyle se font face. L'ADN total est dénaturé par chauffage en présence d'un excès des deux amorces. En refroidissant, l'ADN cible se réassociera ainsi de préférence avec les amorces. Ensuite vient l'étape d'élongation de l'amorce par synthèse d'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', en présence de nucléotides. Cette élongation est catalysée par une polymérase thermostable, isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, la Taq polymerase.

Après un cycle de synthèse, le mélange est de nouveau réchauffé pour dissocier l'ADN cible des brins néosynthétisés. Ce mélange est ensuite refroidi pour réassocier l'ADN cible (les brins néosynthétisés du cycle précédent deviennent à leur tour ADN cible) avec l'excès d'amorces en présence. Puis elles sont à nouveau soumises à l'élongation. Le cycle

est répété un grand nombre de fois (aux alentours de 30). Le nombre total de brins d'ADN est, en théorie, doublé à chaque cycle. A partir du second

cycle, le nombre de brins d'ADN dont les extrémités 5' et 3' sont l'une et l'autre définies par les amorces s'accroît en progression géométrique, tandis que le nombre de brins d'ADN portant des séquences extérieures aux amorces s'accroît, lui, en progression arithmétique. Il en résulte donc une amplification préférentielle de l'ADN bordé par les deux amorces. Au terme de la trentaine de cycles PCR, la séquence située entre les deux amorces représente la plus grosse partie de l'ADN du mélange réactionnel.

4.8.2. Protocole

- Mettre en présence, dans un Eppendorf, pour une réaction dans 100 μ l :
 - 4 μ l $MgCl_2$ (50 mM)
 - 10 μ l Tampon PCR (10X)
 - 2 μ l dNTP Mix (10 mM chaque)
 - 5 μ l détergent
 - 1 μ l primer 1 (50 pmol/ μ l)
 - 1 μ l primer 2 (50 pmol/ μ l)
 - 75,6 μ l H_2O
 - 0,4 μ l Taq (2,5 U/ μ l)
 - 1 μ l ADN à amplifier
- Réaliser les variations de températures suivantes :
 - 95°C pendant 4 minutes
 - 35 X :
 - 95°C pendant 1 minute 15 secondes
 - 55°C pendant 1 minute 15 secondes
 - 72°C pendant 3 minutes
 - 72°C pendant 10 minutes

4.8.3. Remarques générales

Une PCR est le fruit d'une optimisation de différents paramètres. Pour améliorer soit le rendement, soit la spécificité de la PCR, il faut trouver le bon compromis entre :

- la température d'hybridation des primers
- le nombre de cycles
- la longueur des amorces (en général, on utilise de 17-mères)
- les concentrations en $MgCl_2$ et autres composants organiques des tampons
- le temps d'élongation
- les concentrations en ADN-cible, en amorces, en enzyme, en dNTP,...

Il existe différentes enzymes commercialisées. Les moins onéreuses (comme la DNAzyme) sont moins efficaces et ne sont pas proofreading. D'autres permettent d'amplifier des fragments de plus de 20kb en limitant le nombre d'erreurs commises par une activité exo3'-exo5' (elles sont alors dites proofreading). C'est le cas par exemple de l'élongase qui est en fait un mélange de différentes enzymes.

4.9. Le séquençage

4.9.1. Le séquençage manuel

4.9.1.1. Principe du séquençage

La méthode utilisée pour le séquençage est celle de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Elle repose sur l'utilisation de nucléotides triphosphates (ddNTPs, didéoxys, terminateurs de chaîne).

Les didéoxys se distinguent des dNTP par la substitution, en 3', d'un groupement hydroxyle par un Hydrogène. Ces didéoxys sont parfaitement reconnus par les ADN polymérases et sont greffés à la chaîne polynucléotidique en croissance. Cependant, comme le groupement hydroxyle leur fait défaut en 3', les didésoynucléotides sont incapables d'attaquer le nucléoside 5'-triphosphate suivant, étape nécessaire pour la formation du lien entre les nucléotides de la chaîne.

En conclusion, l'incorporation d'un ddNTP dans une chaîne d'ADN en croissance met un terme à cette croissance. En conséquence, l'introduction de petites proportions de didésoxyribonucléotides dans le milieu où s'effectue une réaction de réplication permet de terminer la synthèse d'ADN au hasard.

4.9.1.2. En pratique

Le séquençage selon la méthode de Sanger requiert les étapes suivantes :

- L'ADN à séquencer est isolé sous forme de molécule monocaténaire et additionné d'un court oligonucléotide complémentaire de la séquence d'ADN située du côté 3' de la séquence à déchiffrer, qui sert d'amorce au fragment Klenow de l'ADN polymérase I.
- Ce mélange est alors distribué en 4 aliquots dans 4 tubes de réaction. On introduit dans chacun :

-
- la même quantité de $^{35}\text{SdATP}$, qui servira à détecter l'ADN néoformé par autoradiographie
 - un excès des 4 dNTP non radioactifs

 - une petite quantité de l'un des 4 ddNTP.

Ainsi, dans le tube A, on introduit dTTP, dGTP, dCTP dATP et une petite quantité de ddATP. Dans ce tube, l'ADN polymérase I va de temps en temps incorporer un résidu de ddATP au lieu de dATP, ce qui mettra un terme à la croissance de la chaîne d'ADN. Comme le ddATP ne représente qu'une petite fraction du dATP, l'arrêt de la polymérisation se fera de façon aléatoire, donnant des chaînes de différentes longueurs se terminant toutes par un A. Dans les tubes T, G, et C, les chaînes produites se termineront par un T, un G, ou un C, respectivement. Après avoir séparé l'ADN néoformé des amorces, et séparé les produits de chaque type de réaction selon leur taille dans un gel de séquençage, on peut déduire directement la séquence en interprétant le profil du gel.

4.9.1.3. Protocole (T⁷⁷ SequencingTM kit Pharmacia)

4.9.1.3.1. Dénaturation

- Utiliser un volume d'ADN représentant 4 µg d'ADN
- Porter le volume à 8 µl
- Ajouter 2 µl de NaOH 2 N
- Incuber 10 minutes à température ambiante
- Ajouter 3 µl de NaAc 3 M pH 4,5
- Ajouter 7 µl d'eau stérile
- Ajouter 60 µl d'Éthanol 100%
- Incuber 15 minutes à -80°C
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm (Janetzki) à 4°C
- Enlever le surnageant et laver le culot avec 200 µl d'Éthanol 70%
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Retirer l'Éthanol et sécher au Speedvack

4.9.1.3.2. Hybridation (Annealing)

- Ajouter 10 µl d'eau stérile sur l'ADN
- Ajouter 2 µl de primer utilisé pour le séquençage, dilué à une concentration de 10 ng/µl
- Ajouter 2 µl d'Annealing Buffer

Remarque : ces trois étapes doivent se réaliser très rapidement, pour éviter un réappariement de l'ADN cible, à séquencer, et plutôt favoriser un appariement des primers avec l'ADN cible (les primers sont en excès par rapport à l'ADN cible)

- Incuber 20 minutes à 37°C
- Incuber 15 minutes à température ambiante
- Préparer quatre Eppendorfs contenant respectivement les solutions A,C,G,T fournies par le kit

4.9.1.3.3. Marquage radioactif (labelling)

- Ajouter, à la réaction d'annealing, sur la paroi de l'Eppendorf, 3 µl de Labelling Buffer (fourni par le kit), 1 µl de ³⁵SdATP, et 2 µl de T7 polymérase, diluée 5X dans le Dilution Buffer
- Faire un QuickSpin pour mettre les différents éléments en présence
- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter simultanément (Sur les bords de l'Eppendorf, puis faire un QuickSpin) 4,3 µl de cette solution Labelling dans chacun des quatre tubes A, C, G, T
- Incuber 5 minutes à 37°C
- Ajouter sur les bords des 4 Eppendorfs 5 µl de solution stop, puis faire un QuickSpin, de sorte que les réactions d'élongation soient arrêtées en même temps dans les 4 tubes
- Stocker éventuellement à -20°C, ou charger sur le gel

4.9.1.3.4. Réalisation du gel

- Nettoyer les plaques 2X avec de l'eau distillée et 2X avec de l'Éthanol
- Coater les plaques avec 10 ml de DiméthylDichloroSilane (Silicone)
- Placer les spacers
- Refermer les plaques et sceller avec du Tape
- Couler le gel, dont la composition est détaillée ci-après
- Faire une ligne de base avec deux peignes retournés
- Laisser polymériser le gel horizontalement
- Dissoudre 42 g d'Urée dans 45 ml d'eau
- Ajouter 10 ml de TBE 10X et 15 ml de solution de polyacrylamide
- Filtrer au Buchner (filtre Millipore SA78)
- Ajouter 600 µl de Persulfate et 30 µl de Temed

4.9.1.3.5. Migration du gel

- Préchauffer le gel 15 minutes s'il est utilisé directement après (60W) polymérisation, ou 30 minutes s'il a été conservé la nuit à 4°C
- Dénaturer l'ADN contenu dans les quatre Eppendorfs pendant 3 minutes à 90°C
- Charger le gel (4 µl par puits)
- Laisser migrer le temps désiré (60 W)

4.9.1.3.6. Après la migration

- Retirer la petite plaque de façon à ce que le gel reste sur la grande plaque
- Mettre délicatement une solution de fixateur sur le gel pendant 10 minutes
- Déposer doucement un buvard Whatman (3MM Chr) sur le gel afin que celui-ci se fixe dessus, tout en évitant de faire des bulles
- Recouvrir le gel transféré sur le buvard avec un film plastique
- Sécher sous vide à 80°C pendant 1 heure et 1/2
- 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 laisser sécher

4.9.2. Le séquençage automatique

4.9.2.1. Introduction

Le séquençage automatique, comme le séquençage manuel, est basé sur la méthode des terminateurs de chaîne décrite par Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Dans le cas du séquençage automatique, les nucléotides terminateurs de chaîne (ou "dye-terminators") sont marqués par des molécules fluorescentes qui émettent à une longueur d'onde précise lorsqu'on les excite avec un laser. Chacune des quatre bases (A, C, G, T) est marquée par une molécule différente. Il s'agit de réaliser une réaction PCR ("Cycle sequencing"), avec un seul primer, pour l'incorporation des dye-terminators. Les étapes successives de dénaturation, d'hybridation et d'extension ont pour résultat l'amplification linéaire (et non exponentielle,

comme c'est le cas lorsqu'on utilise deux primers) des produits d'extension. Ces produits sont ensuite purifiés (par précipitation à l'éthanol) afin d'éliminer les terminateurs en excès, puis chargés sur un

gel de polyacrylamide. La lecture de ce gel est ensuite exécutée par un logiciel afin de détecter les quatre couleurs correspondant à chaque base.

Remarque : alors que le séquençage manuel nécessite que la réaction se face dans quatre tubes différents, le séquençage automatique, lui, ne requiert qu'un seul tube. Les quatre couleurs (et donc les quatre bases) sont donc détectées dans une seule piste de gel.

Le séquenceur utilisé est un produit de la firme Perkin-Elmer (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer) ; il permet de lire en moyenne 500 nucléotides avec une précision de plus de 95%.

4.9.2.2. Protocole

4.9.2.2.1. La réaction de Cycle Sequencing

La réaction se fait dans un volume de 20 µl :

-Terminator Ready Reaction Mix :	8 µl.
-Primer (1 mM) :	3,2 µl.
-DNA Template :	
-single-strand DNA :	+/- 100 ng.
-double-strand DNA :	+/- 400 ng.
-PCR product :	+/- 200 ng.

-porter à 20 µl avec de l'eau stérile.

-ajouter environ 30 µl d'huile minérale dans le tube.

-placer le tube dans un appareil PCR et réaliser les cycles suivants :

1°) 96°C pendant 30 secondes.

2°) 50°C pendant 15 secondes.

3°) 60°C pendant 4 minutes.

4°) répéter 25 fois les 3 premières étapes.

5°) conserver le produit de la réaction à 4°C.

<u>Terminator Ready Reaction Mix</u> :	-A-dye terminator.
	-T-dye terminator.
	-C-dye terminator.
	-G-dye terminator.
	-dITP, dATP, dCTP, dTTP.
	-Tris-HCl pH 9.
	-MgCl ₂ .

-
- Pyrophosphatase thermostable.
 - AmpliTAq DNA Polylérase, FS.

4.9.2.2.2. Purification des produits de la réaction

- à chaque réaction, ajouter 2 μ l d'acétate de sodium 3M pH 4,6 et 50 μ l d'éthanol 95%.
- vortexer et mettre sur glace pendant 10 minutes.
- centrifuger pendant 30 minutes.
- éliminer l'éthanol puis laver le culot avec 250 μ l d'éthanol 70%.
- éliminer l'éthanol puis sécher le culot sous vide.
- resuspendre ce culot dans 6 μ l de tampon de chargement.
- dénaturer cet échantillon pendant 2 minutes à 90°C.
- déposer 1,5 μ l de cet échantillon sur le gel de polyacrylamide.

5. TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTEINES

5.1. Dosage de l'activité β -galactosidase

5.1.2. Introduction

La β -galactosidase est une enzyme capable de dégrader des β -galactosides par hydrolyse. Le β -galactoside chromogénique que nous avons utilisé est l'ONPG (ortho-nitrophényl- β -D-galactoside). Sous l'action de la β -galactosidase, l'ONPG est dégradé en D-galactose et en ONP (ortho-nitrophénol). L'ONP est une molécule colorée (jaune) absorbant à une longueur d'onde de 420nm dont l'absorbance peut être mesurée au spectrophotomètre. Donc, si la quantité d'ONPG est suffisamment élevée pour ne pas être le facteur limitant de la réaction, la quantité de β -galactosidase présente est quantifiable puisque la quantité d'ONP produit est proportionnelle à la quantité d'enzyme et au temps de réaction.

L'activité β -galactosidase est calculée selon la méthode de Miller (1972). Pour le calcul des unités β -galactosidase, l'absorbance de l'ONP à 420nm est normalisée sur l'absorbance de la culture des cellules de levures à 600 nm.

$$\text{Unités (Miller, 1972)} = \text{DO}_{420} / (\text{DO}_{600} \times \text{temps})$$

DO₄₂₀ = absorbance de l'ONP dans le mélange réactionnel à 420 nm.

DO₆₀₀ = absorbance de la culture cellulaire à 600 nm.

Temps = temps d'incubation à 28°C en minutes.

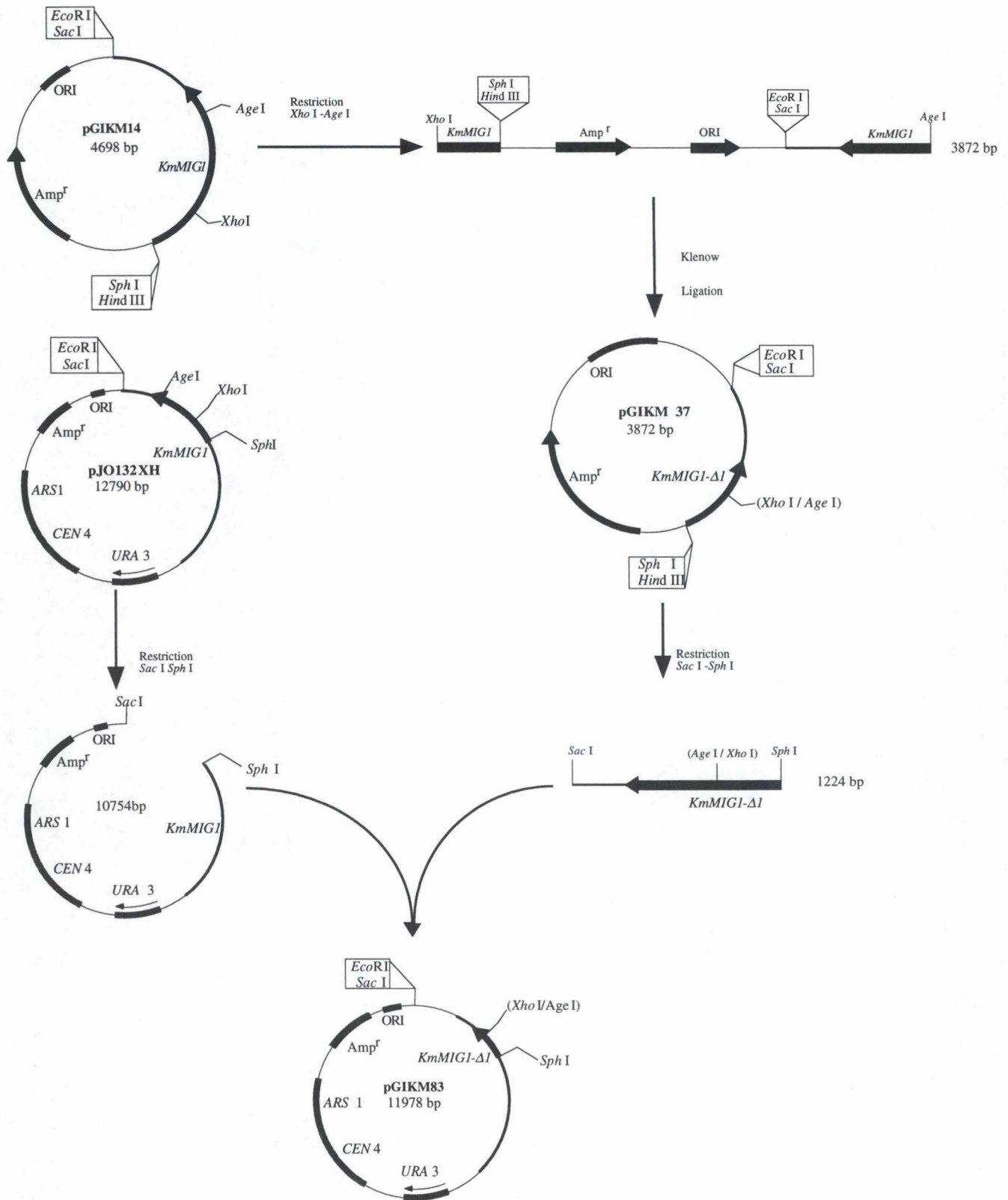
5.1.3. Protocole

- Inoculer 10 ml de milieu avec une préculture de manière à obtenir une absorbance à 600 nm de 0.1.
- Incuber sous agitation constante à 30°C jusqu'à une absorbance de 0.4 DO.
- Centrifuger la culture 20 minutes à 3500 RPM.
- Resuspendre les cellules dans 1 ml de tampon Z.
- Ajouter (à l'aide d'une pipette Pasteur) 3 gouttes de chloroforme et 2 gouttes de SDS 0.1%.
- Agiter au vortex pendant 10 secondes et incuber 5 minutes à 28°C.
- Ajouter 0.2 ml d'ONPG (4 mg/ml) et poursuivre l'incubation à 28°C jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune.

-
- Inactiver l'enzyme en ajoutant 0.5 ml de Na_2CO_3 .
 - Transférer le mélange dans un tube de 1.5 ml, centrifuger pendant 15 minutes à 14000 RPM (pour éliminer les débris cellulaires), et lire l'absorbance à 420 nm.

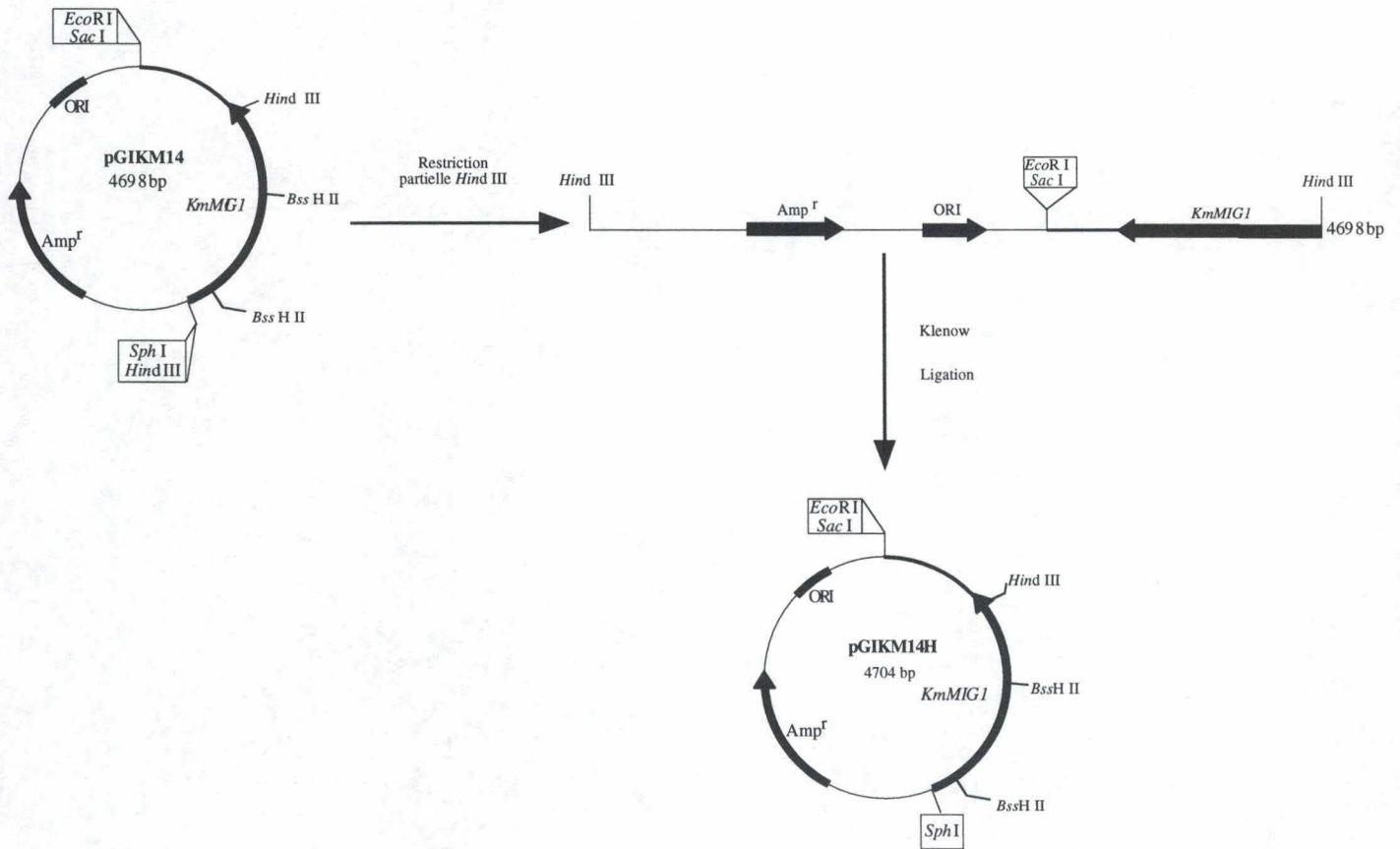
ANNEXES

Annexe 1 : Création du *KmMIG1-Δ1*



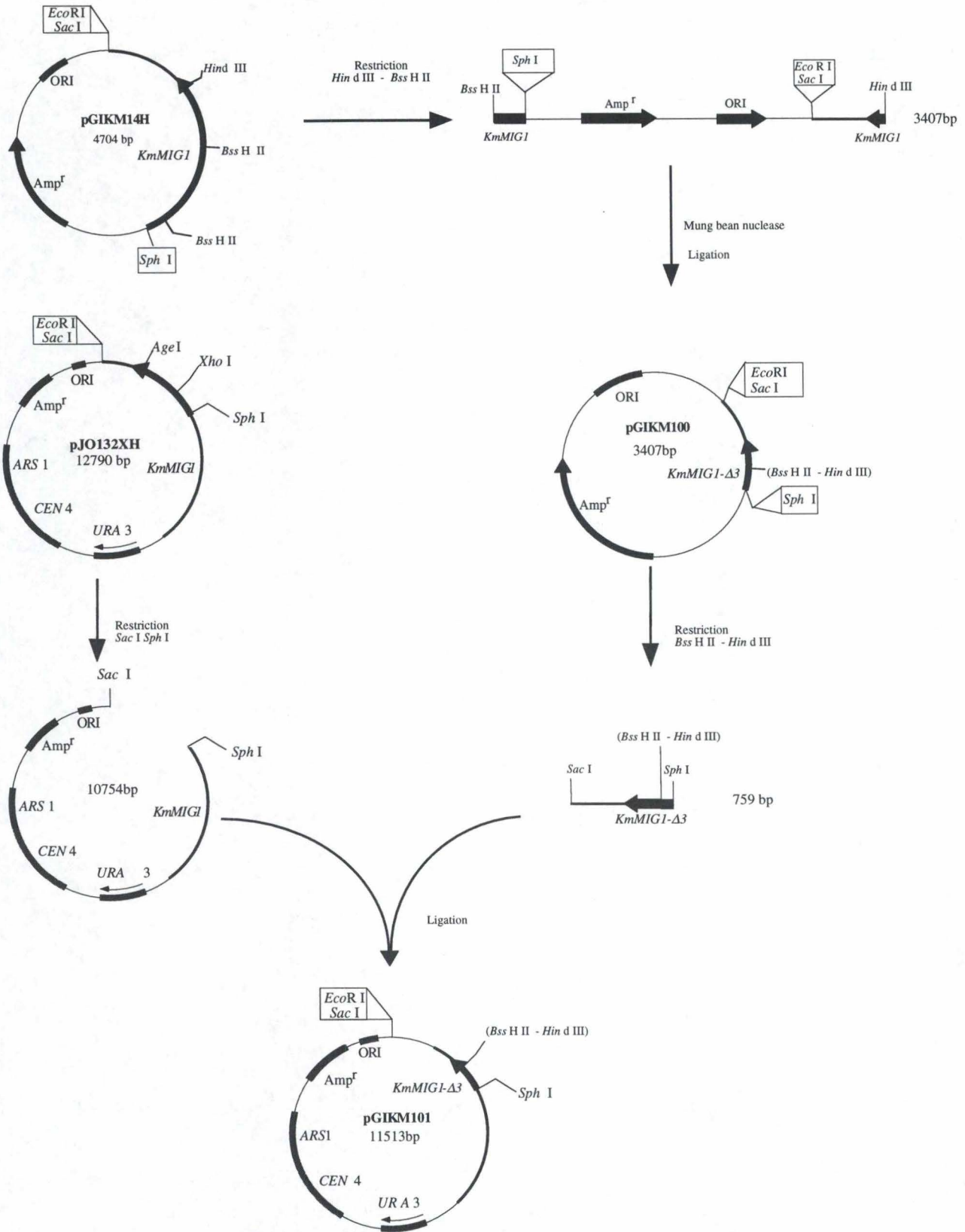
Note : La création de l'allèle *KmMIG1-Δ1* est représentée ci-dessus. Les différentes étapes du clonage sont représentées. L'enzyme Klenow polymérase est décrite au chapitre Matériel et Méthodes.

Annexe 2 : Création du pGIKM14H



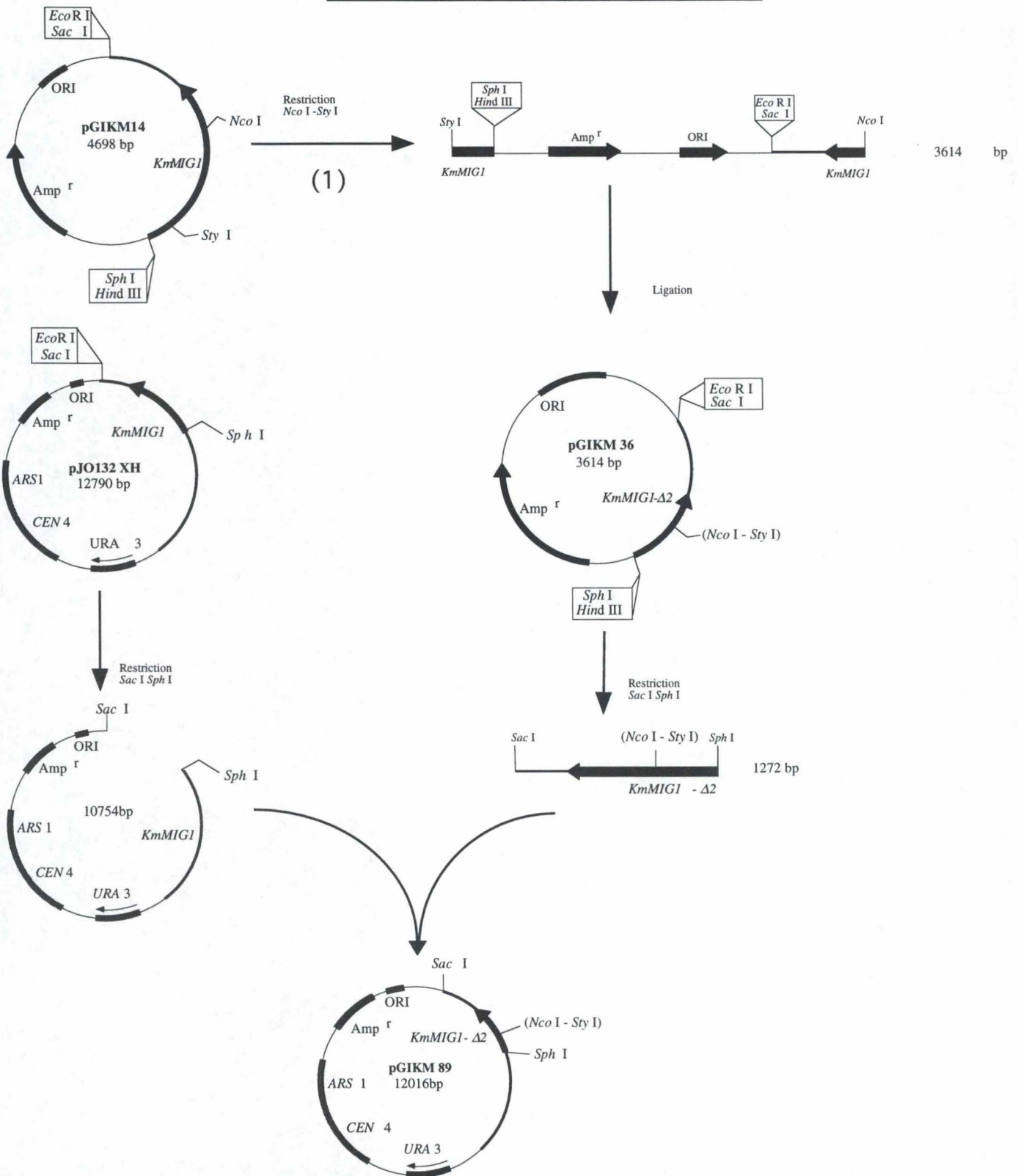
Note : La construction de ce plasmide fait partie de la création de l'allèle *KmMIG1-Δ3*. En effet, il était nécessaire de supprimer le site *Hind* III du site multiple de clonage du pGIKM14 pour réaliser la délétion de la région située entre les sites *Hind* III et *Bss*HII comme indiqué dans l'annexe 3.

Annexe 3 : Création du *KmMIG1-Δ3*



Note : La création de l'allèle *KmMIG1-Δ3* est représentée ci-dessus. Les différentes étapes du clonage sont représentées. L'enzyme Mung Bean Nuclease est décrite au chapitre Matériel et Méthodes.

Annexe 4 : Création du *KmMIG1-Δ2*



Note : La première étape (1) est constituée de deux sous-étapes : le plasmide pGIKM14 est ouvert en *Nco* I et traité à la Klenow polymérase. Ensuite, une restriction *Sty* I est réalisée ; enfin, le fragment obtenu est traité à la Mung Bean nucléase. La suite de la construction est détaillée dans la figure. Les détails concernant les enzymes utilisées sont repris au chapitre Matériel et Méthodes.

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D. (1994) Biologie moléculaire de la cellule. Troisième édition. Médecine/Sciences. Flammarion.
- Berk A.J. (1995). Biochemistry meets genetics in the holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11952-11954.
- Boulikas T. (1994). Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. *J. Cell. Biochem.* **55**: 32-58.
- Cassart J.-P. (1996) Etude des relations structure-fonction du répresseur transcriptionnel KmMig1p de *Kluyveromyces marxianus*. Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences, FUNDP
- Cassart J.-P., Georis I., Östling J., Ronne H. et Vandenhoute J. (1995). The Mig1 repressor from *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS lett.* **371**: 191-194.
- Depiereux E. et Feytmans E. (1992). Match-Box: a fundamentally new algorithm for the simultaneous alignment of several protein sequences. *Cabios* **8**: 501-509.
- Edmondson D.G., Smith M.M. et Roth S.Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev.* **10**: 1247-1259.
- Estruch F. et Carlson M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3872-3881.
- Gancedo J.M. (1992). Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **206**: 297-313.
- Guarente L. et Mason T. (1983). Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32**: 1279-1286.
- Halle J.-P. et Meisterernst M. (1996). Gene expression: increasing evidence for a transcriptosome. *Trends Gen.* **12**: 161-163.
- Kern L., de Montigny J., Jund R. et Lacroute F. (1990). The *FUR1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* : cloning, structure and expression of wild-type and mutant alleles. *Gene* **88**: 149-157.
- Lewin, B. (1994). Genes V, Oxford University Press.

- Lundin M., Nehlin J.O. et Ronne H. (1994). Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1979-1985.
- Lutfiyya L.L. et Johnston M. (1996). Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4790-4797.
- Miller J.H. (1972). Experiments in molecular genetics, pp. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Moll T., Tebb G., Surana U., Robitsch H. et Nasmyth K. (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* **66**: 743-758.
- Nehlin J.O., Carlberg M. et Ronne H. (1991). Control of yeast *GAL* genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *Embo J.* **10**: 3373-3377.
- Nehlin J.O. et Ronne H. (1990). Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *Embo J.* **9**: 2891-2898.
- Östling J., Carlberg M. et Ronne H. (1996). Functional domains in the Mig1 repressor. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 753-761.
- Ronne H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends Gen.* **11**: 12-17.
- Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R. (1971). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Thomas B.J. et Rothstein R.J. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**: 619-630.
- Treitel M.A. et Carlson M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3132-3136.
- Trumbly R.J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**: 15-21.
- Tzamarias D. et Struhl K. (1994). Functional dissection of the Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature* **369**: 758-761.
- Tzamarias D. et Struhl K. (1995). Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.* **9**: 821-831.