



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Analyse par double hybride de l'interaction entre les sous-unités A 12.2 et A 135 de l'ARN polymérase I de *Saccharomyces cerevisiae*

Landrieux, Emilie

Award date:
1999

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**Analyse par double hybride de l'interaction entre les sous-unités A12.2 et
A135 de l'ARN polymérase I de *Saccharomyces cerevisiae***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade

de Licencié en Sciences

biologiques

Par

Emilie Landrieux

1998-1999

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR

Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20

E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Analyse par double-hybride de l'interaction entre les sous-unités A12.2 et A135 de l'ARN polymérase I de *Saccharomyces cerevisiae*

LANDRIEUX Emilie

Résumé

L'ARN polymérase I de *Saccharomyces cerevisiae* est une enzyme multimérique composée de 14 sous-unités. Son rôle est la synthèse du précurseur des ARN ribosomiaux 35S. Dans le complexe de la polymérase, nous nous sommes intéressés à la sous-unité A12.2, évolutivement conservée, non essentielle et possédant deux paralogues B12.6 et C11 respectivement dans les polymérases II et III. Des travaux antérieurs ont permis de localiser A12.2 par immunolocalisation, près du site actif de l'ARN polymérase I et il a été montré que sa délétion cause un phénotype thermosensible pour la croissance. Un crible double-hybride réalisé avec la sous-unité A12.2 a mis en évidence, comme proie, un fragment A135, laquelle est la seconde plus grande sous-unité de l'ARN polymérase I.

Nous avons prédit, *in silico*, l'existence de deux domaines dans A12.2 sur base d'homologies avec les paralogues pour un premier domaine, côté N-terminal et avec le facteur d'élongation TFIIS de l'ARN polymérase II pour un second, côté C-terminal. Des tests de complémentation ont confirmé l'existence du premier domaine en mettant en évidence le caractère suffisant de ce domaine pour la complémentation du phénotype ts et montré que la délétion du second domaine ne cause pas de phénotype ts. Les deux domaines ont ensuite été testés en double-hybride contre le fragment de A135 et les résultats obtenus ont établi que la présence du premier domaine est suffisante pour cette interaction.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1999

Promoteur : J. Vandenhoute, Laboratoire de Génétique Moléculaire, U.R.B.M.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Vandenhoute pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour le soutien et le dévouement extrême dont il a fait preuve.

Merci aux membres du jury, X. De Bolle, P. Mertens, J. Remacle et P. Thuriaux, pour l'attention et le regard critique qu'ils ont accordé à ce manuscrit.

Un grand merci à Vincent pour le temps qu'il m'a consacré, pour ses conseils sans oublier son soutien et sa bonne humeur.

Merci à Sophie pour m'avoir fait une place dans son bureau et surtout pour son aide précieuse et ses conseils des derniers instants.

Je tiens également à remercier Max, Domi, Damien, Isa, Flore, David, Rose-Marie, Monique et Godefroid pour leur sympathie et pour tout ce qu'ils apportent à la vie du labo.

Merci à Jean-Pol et Fabienne pour m'avoir si bien conseillée et pour la confiance qu'ils m'ont portée.

Je remercie enfin ma famille et mes amis pour leur soutien moral et leurs encouragements.

ABREVIATIONS

- ATP : adénosine triphosphate
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- ARN : acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- BET : bromure d'éthidium
- D : daltons
- dNTP : désoxyribonucléotide 5' triphosphate
- DO : densité optique
- EDTA : éthyl- diamine-tétra-acétique
- g : gravité ou gramme
- L : litre
- LB : milieu Luria-Bertani
- mM : millimolaire
- M : molaire
- ml : millilitre
- pb : paire de base
- PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
- PEG : polyéthylèneglycol
- RNase : ribonucléase I
- rpm : rotation par minute
- SDS : sodium dodésyl sulfate (sodium lauryl sulfate)
- Tris : tri-(hodrométhyl)-amino-méthane

INTRODUCTION	1
1. DESCRIPTION GÉNÉRALE DES ARN POLYMÉRASES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.	3
1.1. Les sous-unités homologues aux sous-unités procaryotiques $\alpha_2\beta\beta'$	3
1.2. Les sous-unités communes aux trois polymérases.	6
1.3. Les sous-unités spécifiques.	6
2. L'ARN POLYMÉRISE I DE <i>S. CEREVISIAE</i>	8
2.1. Sa fonction et sa spécificité.	8
2.2. Sa structure.	8
3. LA SOUS-UNITÉ A12.2.	10
3.1. L'état de la question.	10
3.2. Les stratégies expérimentales adoptées.	11
3.2.1. Principe de l'approche par complémentation pour définir un domaine fonctionnel.	11
3.2.2. Principe de l'approche par double-hybride pour définir un domaine d'interaction.	12
4. BUT DU TRAVAIL.	13
RESULTATS	14
1. MISE EN ÉVIDENCE DE DEUX DOMAINES FONCTIONNELS DANS LA SOUS-UNITÉ A12.2.	14
1.1. Prédiction <i>in silico</i> de régions distinctes dans A12.2.	14
1.2. Pertinence <i>in vivo</i> de deux domaines dans A12.2.	15
1.2.1. Délimitation du premier domaine par délétion progressive de la région 3'.	17
1.2.1.1. Quatre mutants ont été construits (travail antérieur au laboratoire).	17
1.2.1.2. Les tests de complémentation.	18
1.2.2. Délimitation du second domaine par délétion progressive de la région 5'.	19
1.2.2.1. Quatre mutants ont été réalisés par délétions successives du côté 5'.	19
1.2.2.2. Tests de complémentation.	20
1.3. Conclusion.	22
2. ANALYSE PAR DOUBLE-HYBRIDE DU RÔLE FONCTIONNEL DES DOMAINES DE A12.2 DANS LE COMPLEXE POL I.	23
2.1. Evidences préalables d'une interaction double-hybride entre A12.2 et A135.	23
2.2. Détermination du domaine de A12.2 responsable de l'interaction avec A135.	25
2.2.1. Mise en œuvre du système.	25
2.2.1.1. Caractérisation du système double-hybride.	25
2.2.1.2. Description des constructions.	25
2.2.1.3. Tests préliminaires.	26
2.2.1.3.1. Tests de l'expression.	27
2.2.1.3.2. Tests de sensibilité au 3AT.	29
2.2.2. Tests double-hybride entre le fragment de A135 et les domaines de A12.2.	30
2.2.2.1. Résultats des tests entre les différents fragments de A12.2 et A135.	30
2.2.2.2. Contrôle négatif du test double-hybride.	31
2.3. Conclusion.	33
CONCLUSIONS ET DISCUSSION GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	34
MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
1. MATÉRIEL.	38
1.1. Les tampons.	38
1.2. Les solutions.	40
2. MÉTHODES.	42
2.1. Souches et plasmides.	42
2.1.1. Souche de bactéries.	42
2.1.2. Souche de levures.	42

2.1.3. Plasmides.....	43
2.1.3.1. Le plasmide pCM185 :.....	43
2.1.3.2. Le plasmide pAS-CYH2 :.....	43
2.1.3.3. Le plasmide pACTII :.....	43
2.2. <i>Milieux de culture</i>	44
2.2.1. Milieux de culture bactérien.....	44
2.2.1.1. Milieu LB Liquide.....	44
2.2.1.2. Milieu LB solide.....	44
2.2.2. Milieux de culture levurien.....	44
2.2.2.1. Milieu YPD liquide.....	44
2.2.2.2. Milieu YPD solide.....	45
2.2.2.3. Milieu minimum.....	45
2.2.2.4. Milieu synthétique.....	45
2.2.2.5. Milieu synthétique + 3-aminotriazol (3AT).....	46
2.3. <i>Techniques relatives à l'utilisation de bactéries</i>	47
2.3.1. Transformation de bactéries.....	47
2.3.2. Mise en collection de <i>E. coli</i>	48
2.4. <i>Techniques relatives à l'utilisation de levures</i>	49
2.4.1. Transformation de levures.....	49
2.4.2. Coloration X-GAL.....	49
2.5. <i>Techniques relatives à l'ADN</i>	51
2.5.1. Construction plasmidique.....	51
2.5.1.1. Restriction d'ADN.....	51
2.5.1.2. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	51
2.5.1.3. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose.....	53
2.5.1.4. Ligation.....	54
2.5.1.5. Préparation d'ADN plasmidique.....	55
2.5.1.5.1. Minipréparation d'ADN plasmidique.....	55
2.5.1.5.2. Minipréparation (QIAprep Spin Miniprep Kit – QIAGEN).....	56
2.5.1.5.3. Midipréparation (NUCLEOBOND AX100).....	57
2.5.1.6. La Polymerase Chain Reaction (PCR).....	58
2.5.1.6.1. Principe général.....	58
2.5.1.6.2. Les paramètres et réactifs utilisés.....	58
2.5.2. Le Séquençage.....	61
2.5.2.1. Principe du séquençage.....	61
2.5.2.2. Le Séquençage automatique.....	62
ANNEXES	64
ANNEXE 1 : SEQUENCES NUCLEOTIDIQUE ET PROTEIQUE DE A12.2.....	64
ANNEXE 2 : ALIGNEMENT DE SEQUENCES DES PARALOGUES DE A12.2 PAR MATCH-BOX.....	65
ANNEXE 3 : SEQUENCES NUCLEOTIDIQUE ET PROTEIQUE DE A135.....	66
ANNEXE 4 : PUBLICATIONS.....	69
BIBLIOGRAPHIE	71

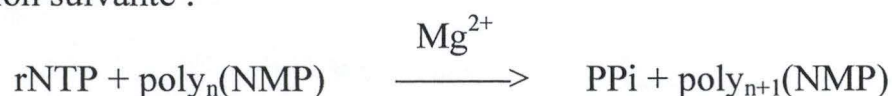
Introduction

INTRODUCTION

Chez les cellules eucaryotes, trois ARN polymérases nucléaires ont été mises en évidence. Ces trois enzymes sont impliquées dans le processus de synthèse de différents ARN.

L'ARN polymérase I (pol I) synthétise le précurseur des grands ARN ribosomiaux, l'ARN polymérase II (pol II) transcrit essentiellement les gènes encodant des protéines et l'ARN polymérase III (pol III) produit les ARN de transfert (ARNt) ainsi que divers ARNr de petite taille.

Ces polymérases catalysent la réaction de polymérisation des ARN selon la réaction suivante :



Cette synthèse d'un transcrit passe par trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Les ARN polymérases sont capables de transcrire l'ADN mais ne peuvent pas, seules, reconnaître les séquences promotrices qui assurent une initiation correcte de la transcription. Ces séquences sont reconnues par différents facteurs de transcription qui reconnaissent des séquences spécifiques dans le promoteur.

Toutefois, à cet égard, deux modèles de fonctionnement, en particulier de Pol II, ont été décrits : le modèle séquentiel et le modèle de l'*holoenzyme*.

Dans le modèle séquentiel (Buratowski *et al.*, 1989), les différents facteurs de transcription s'associent successivement, dans un ordre précis, au promoteur et ainsi forment le complexe de pré-initiation. Ce complexe recrute ensuite la polymérase ainsi que d'autres complexes d'initiation. Le complexe complet alors formé porte le nom de complexe de transcription.

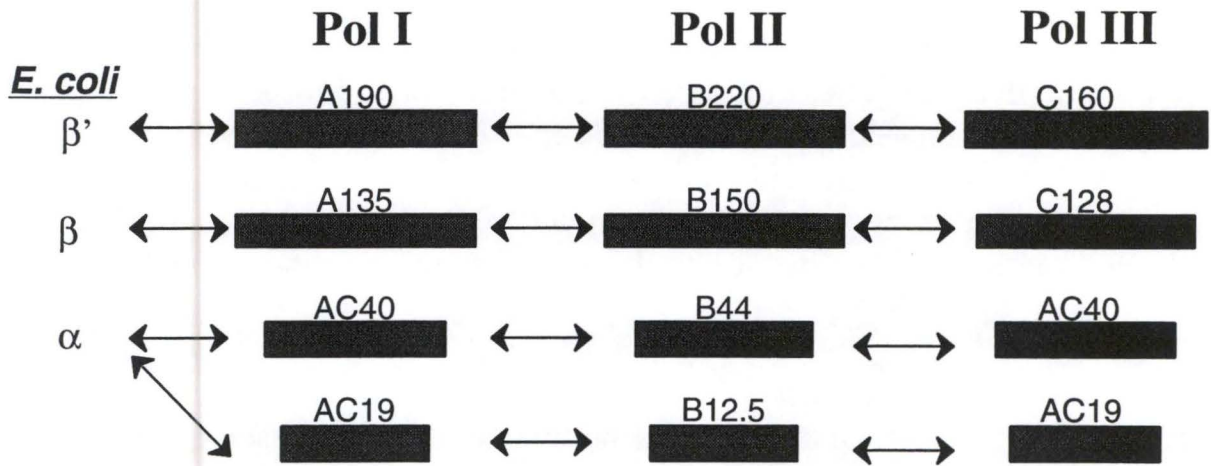
Par contre, dans le second modèle, l'*holoenzyme* (Thompson *et al.*, 1993), complexe pré-assemblé de la polymérase II et de différents facteurs généraux de transcription, se fixerait comme un tout au niveau des séquences promotrices. Dans ce cas, il n'y aurait pas de complexe de pré-initiation à proprement parler mais seulement un complexe de transcription. Cette situation a été décrite chez la levure.

Ces deux modèles proposent des mécanismes de mise en place des polymérases qui diffèrent, mais les différentes évidences décrites ne permettent pas à ce jour de clarifier la situation. La composition de l'*holoenzyme* varie suivant les conditions de purification. De plus, la forme assemblée ne représente qu'une fraction minoritaire par

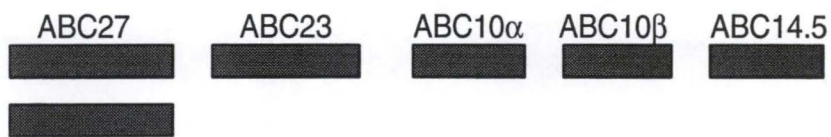
rapport à la fraction polymérase seule lors des différents essais de purification. Une coexistence des deux modèles n'est pas à exclure. On propose, par exemple, que l'holoenzyme agirait lors du premier cycle de transcription, alors que pour les cycles suivants, la polymérase agirait selon le modèle séquentiel, c'est-à-dire reconnaîtrait les facteurs de transcription préassociés au promoteur (Dieci et Sentemac 1996). Dans le cas de la polymérase I, la relevance de l'un ou l'autre des deux modèles n'est pas connue.

Quel que soit le mécanisme d'assemblage du complexe de transcription, il se compose toujours d'une machinerie transcriptionnelle minimale associée à des facteurs de transcription spécifiques.

SOUS-UNITES HOMOLOGUES AUX SOUS-UNITES PROCARYOTES



SOUS-UNITES COMMUNES



SOUS-UNITES SPECIFIQUES

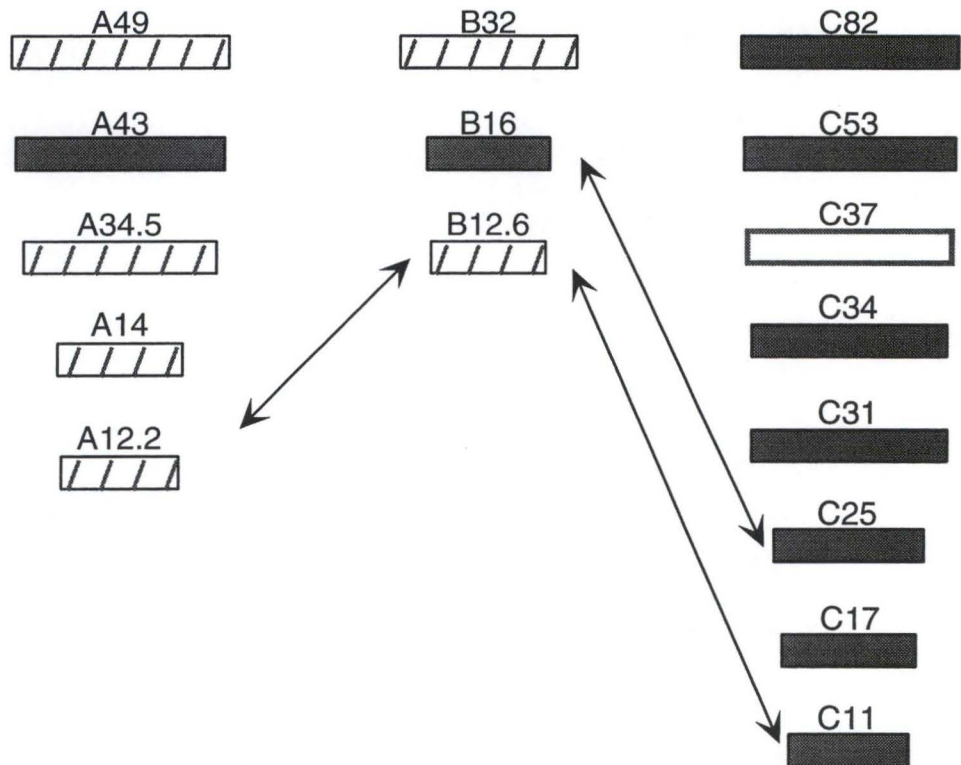


Figure 1 : Classification des différentes sous-unités des trois ARN polymérases de *Saccharomyces cerevisiae*.

Sur la figure, sont représentés :

- Par une flèche bidirectionnelle: une homologie.
- Par un rectangle plein : une sous-unité essentielle.
- Par un rectangle hachuré : une sous-unité non essentielle.
- Par un rectangle vide : une sous-unité dont le caractère essentiel n'a pas encore été testé.

1. Description générale des ARN polymérases de Saccharomyces cerevisiae.

Les trois polymérases sont des complexes de 500 à 700 kD, composés de deux grosses sous-unités et de 10 à 15 polypeptides (Figure 1).

Les critères initiaux définissant une sous-unité sont : la copurification avec l'activité enzymatique et la coprécipitation avec des anticorps spécifiques. De ce fait la polymérase est donc la machinerie transcriptionnelle minimale.

Les différentes sous-unités peuvent être réparties en trois groupes :

- Les sous-unités homologues aux sous-unités procaryotiques $\alpha_2\beta\beta'$
- Les sous-unités communes aux trois polymérases
- Les sous-unités spécifiques.

La nomenclature utilisée désigne les sous-unités par les lettres A, B et C selon leur appartenance respectivement aux polymérases I, II et III, suivies de leur masse moléculaire.

Nous allons donc voir successivement les trois groupes de cette classification en présentant leurs caractères généraux principaux.

1.1. Les sous-unités homologues aux sous-unités procaryotiques $\alpha_2\beta\beta'$.

Ces sous-unités sont au nombre de quatre pour chaque polymérase. Les deux plus grandes sous-unités représentent à elles seules près de 70 % de la masse totale de l'enzyme. De plus, elles seraient responsables de la plupart des activités catalytiques des ARN polymérases (Thuriaux et Sentenac, 1992).

L'ARN polymérase procaryotique de référence est l'ARN polymérase de *E. coli*. Il s'agit d'une complexe de 450 kD qui se présente sous deux formes, l'enzyme minimale, composée de deux sous-unités α , d'une sous-unité β ainsi que d'une sous-unité β' et l'holoenzyme est constituée de l'enzyme minimale (core) en association avec la sous-unité σ .

Certaines sous-unités des ARN polymérase présentent des homologies avec les sous-unités procaryotiques. Il s'agit pour chacune des trois polymérase des deux plus grosses sous-unités (A190 et A135 pour la pol I ; B220 et B150 pour la pol II ; C160 et C128 pour la pol III) qui sont homologues respectivement à β' et à β , et de deux sous-unités plus petites qui sont elles homologues à la sous-unité α (AC40 et AC19 pour la pol I et la pol III ; B44 et B12.5 pour la pol II). Ces différentes sous-unités sont toutes essentielles.

L'analyse des séquences des deux plus grosses sous-unités des polymérase eucaryotes (A190, A135, B220, B150, C160 et C128) et procaryotes (β et β') a permis de délimiter de boîtes conservées (figures 2 et 3).

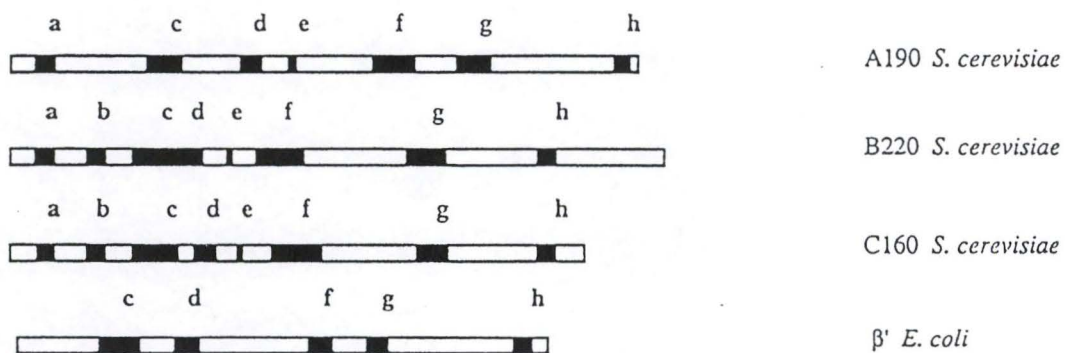


Figure 2 : Disposition des régions conservées entre les plus grandes sous-unités des ARN polymérase (A190, B220 et C160 de *S. cerevisiae* et la sous-unité β' de *E. coli*). (Thuriaux et Sentenac, 1992)

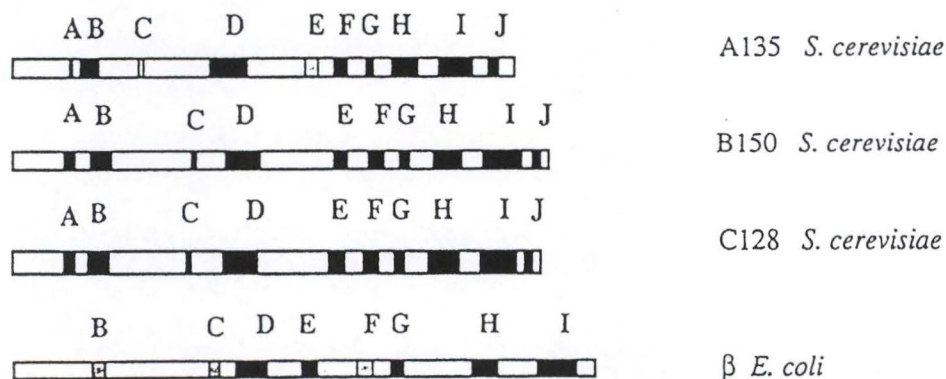


Figure 3 : Disposition des régions conservées entre les secondes plus grandes sous-unités des ARN polymérase (A135, B150 et C128 de *S. cerevisiae* et la sous-unité β de *E. coli*). (Thuriaux et Sentenac, 1992)

Il existe de nombreux motifs potentiels de doigts de zinc dans les sous-unités des polymérases. Les séquences consensus des motifs ne permettent pas de définir *a priori* un rôle à cette structure. L'étude des séquences des deux plus grandes sous-unités des trois polymérases montre que :

- les plus grandes sous-unités (A190, B220 et C160) possèdent le motif consensus de doigt de zinc suivant : C-X₂-C-X₉-H-X₂-H. Ce motif se retrouve au niveau de la boîte a (Figure 2) des sous-unités (du côté NH₂-terminal).
- les secondes plus grandes sous-unités (A135, B150 et C128) présentent le motif du doigt de zinc suivant : C-X₂-C-X₁₁-C-X₂-C qui est observé au niveau de la boîte I (Figure 3) c'est-à-dire du côté COOH-terminal.

Pour les différents motifs et donc pour chaque sous-unité, l'activité de liaison du zinc a été vérifiée (Treich *et al.*, 1991) en péalable à la recherche de leur rôle. Les deux plus grandes sous-unités possèdent chacune une structure en doigt de zinc (Treich *et al.*, 1991) qui jouaient un rôle important comme indiqué sur base d'évidences génétiques.

Par exemple, dans le cas de la polymérase I, deux mutations au niveau du doigt de zinc situé dans le domaine a de la sous-unité A190 (Figure 2), causent un phénotype thermosensible (Wittekind *et al.*, 1988). Ces mutations sont respectivement des substitutions des acides aminés 75 et 77. L'histidine 75 est remplacée par une tyrosine et la glycine 77 par un acide aspartique. Ce phénotype ts est supprimé par une mutation compensatoire au niveau du doigt de zinc localisé dans le domaine J de la sous-unité A135 (Yano et Nomura, 1991) (Cf. annexe 3). Ceci permet de proposer que les domaines a de A190 et J de A135 sont physiquement proches l'un de l'autre dans la polymérase et que les doigts de zinc sont impliqués dans la stabilisation du complexe pol I.

Dans le cas de la polymérase III, des mutations au niveau des résidus cystéines ou histidines du doigt de zinc de la sous-unité C160 sont létales (Werner *et al.*, 1992). L'utilisation de mutations affectant des résidus du doigt de zinc, autres que les cystéines et les histidines, permettent d'obtenir des mutants présentant un phénotype thermosensible. Chez ces mutants, la polymérase présente un caractère instable révélé, dans la coimmunoprécipitation de la polymérase, par la perte de trois sous-unités spécifiques C82, C34 et C31 (Werner *et al.*, 1992). La létalité des mutations affectant les résidus cystéines ou histidines du doigt de zinc résulte du fait que le doigt de zinc de cette sous-unité est indispensable à l'activité de l'ARN polymérase III car il intervient dans la stabilisation du complexe. Ainsi la perte du doigt de zinc cause la perte des trois sous-unités essentielles C82, C34 et C31, ce qui entraîne une perte létale d'activité de cette polymérase.

L'analyse des sous-unités homologues à la sous-unité α de *E. coli*, de taille plus petite, montrent dans le cas des polymérases I et III, que les deux sous-unités AC40 et AC19 interagissent entre elles mais également avec ABC10 β , l'une des sous-unités communes aux trois polymérases (Lalo *et al.*, 1993). Pour cela, AC40 et AC19 doivent former un hétérodimère afin que ABC10 β puisse s'associer. Dans la polymérase III, la

sous-unité AC19 est présente sous une forme phosphorylée, comme c'est aussi le cas pour A190 et B220, présentes respectivement au sein des complexes pol I et pol II sous une forme phosphorylée. Aucune explication n'a été avancée pour ces phosphorylations.

1.2. Les sous-unités communes aux trois polymérases.

Les sous-unités communes aux trois polymérases sont au nombre de cinq. Il s'agit des sous-unités ABC27, ABC23, ABC10 β , ABC10 α et ABC14.5. Bien que les gènes de ces différentes sous-unités aient été clonés, peu d'informations sur les fonctions de ces différentes sous-unités sont connues.

Il a été montré que ces 5 sous-unités sont extrêmement conservées au sein des eucaryotes et toutes les cinq essentielles à l'activité de transcription de l'enzyme.

Par ailleurs, certaines interactions ont été mises en évidence. Ainsi, l'interaction entre la sous-unité ABC10 β et l'hétérodimère AC40/AC19 suggère que cette sous-unité joue un rôle important dans l'assemblage des polymérases I et III (Lalo *et al.*, 1993).

1.3. Les sous-unités spécifiques.

Les trois ARN polymérases transcrivent des groupes de gènes différents. Trois classes de promoteurs ont été définies : les classes de promoteur I, II et III qui permettent la transcription respectivement par les polymérases I, II et III.

Cette spécificité est uniquement due au promoteur des gènes. En effet, il est possible de transcrire le gène du précurseur des grands ARNr par la polymérase II (normalement transcrit par la polymérase I) pourvu qu'il soit flanqué d'un promoteur de classe II (Nogi *et al.*, 1991).

La spécificité des ARN polymérases est donc essentiellement due à la capacité de reconnaître spécifiquement et de s'associer tout aussi spécifiquement aux facteurs de transcriptions spécifiques de leur classe de promoteurs.

Les polymérases vont reconnaître les facteurs de transcription qui leur sont spécifiques et par des interactions protéine-protéine formeront le complexe de transcription. La spécificité des interactions entre une polymérase et ses facteurs de transcription est vraisemblablement à imputer, au moins en partie, aux sous-unités spécifiques de la polymérase.

Le nombre des sous-unités spécifiques est variable suivant les polymérases : les ARN polymérases I, II, III de *S. cerevisiae* possèdent respectivement 5, 3 et 8 sous-unités qui leur sont propres.

Notons que des homologies existent entre des sous-unités spécifiques des trois polymérases. Par exemple, par des alignements de séquences, il a été démontré que les sous-unités A12.2, B12.6 et C11, appartenant respectivement aux polymérases I, II et III, sont des paralogues. En effet, ces sous-unités de petite taille possèdent toutes deux domaines conservés centrés autour de leur deux doigts de zinc.

La figure 1 illustre l'observation que certaines sous-unités ne sont pas essentielles dans les polymérases I (A49, A34.5, A14 et A12.2) et II (B32 et B12.6). Néanmoins, dans la polymérase III, toutes les sous-unités sont essentielles.

2. L'ARN polymérase I de *S. cerevisiae*.

2.1. Sa fonction et sa spécificité.

L'ARN polymérase I, localisée dans le nucléole, est l'ARN polymérase la plus abondante dans la cellule ; elle assure à elle seule la synthèse de 80 % des ARN totaux. Elle est responsable de la synthèse du précurseur des grands ARNr. Cette synthèse est un processus complexe dont l'exécution contrôlée conditionne les étapes ultérieures de la biogénèse des ribosomes.

La spécificité de l'ARN polymérase I est due au jeu d'interactions entre signaux cis, localisés dans le promoteur du rDNA dit de classe I et facteurs trans appartenant à la machinerie transcriptionnelle comprenant la polymérase I. La spécificité du processus repose principalement sur la capacité de reconnaissance entre la polymérase I, via ses sous-unités spécifiques constitutives (c'est-à-dire des sous-unités non partagées par les polymérases II et III) et des facteurs, eux aussi spécifiques, s'associant aux signaux de classe I.

La question demeure de savoir si la reconnaissance se passe par l'intermédiaire de deux sous-complexes distincts : un complexe transcriptionnel ou machinerie minimale avec un complexe de pré-initiation, seul capable de reconnaître le promoteur, ou au sein d'une seule holoenzyme se fixant comme un tout aux éléments du promoteur.

La polymérase I est un complexe de 650 kD. Elle comprend 14 sous-unités (Figure 1) : 4 sont homologues à des sous-unités procaryotiques (A190, A135, AC40 et AC19), 5 sont communes aux deux autres polymérases (ABC27, ABC23, ABC10 β , ABC10 α et ABC14.5) et 5 lui sont spécifiques (A43, A49, A34.5, A14 et A12.2). Parmi ces sous-unités spécifiques seule la sous-unité A43 est essentielle*.

2.2. Sa structure.

La structure en 3 dimensions de l'ARN polymérase I (Figure 4) a été établie par analyse des aires des cristaux en 2 dimensions obtenus par interaction de l'ARN polymérase I avec une couche lipidique chargée positivement (Schultz *et al.*, 1993).

* On entend par essentiel un gène dont la délétion ou l'inactivation entraîne la létalité de la cellule.

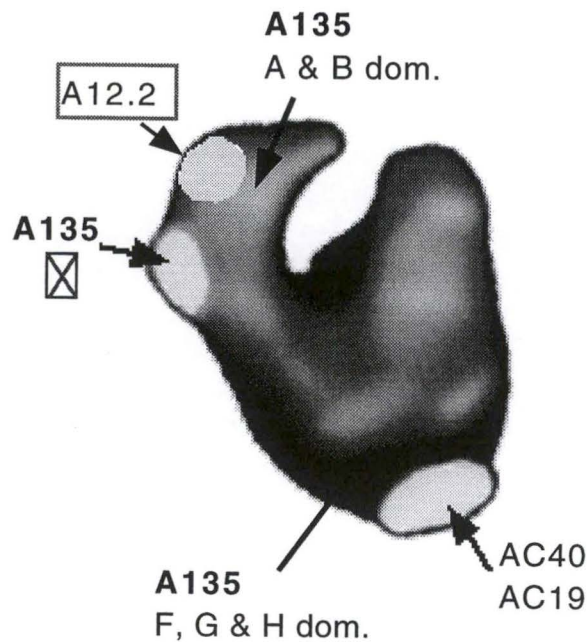


Figure 4 : Structure 3D de l'ARN polymérase I (Schultz *et al.*, 1993) et localisation de certaines sous-unités par immunolocalisation (Klinger *et al.*, 1996).

Les dimensions de la polymérase I sont : 11 nm x 11nm x 15 nm.

Cette structure est dite en main droite incurvée. On distingue sur la figure : les doigts à droite, la paume au centre et le pouce à gauche.

Le site catalytique de la polymérase a été localisé au niveau de la paume, c'est-à-dire au dessous du sillon où se place l'ADN matrice. Les deux plus grosses sous-unités de la polymérase, A190 et A135, ont été, situées par immunolocalisation, respectivement au niveau des doigts et du pouce (Klinger *et al.*, 1996). D'autres sous-unités ont également été localisées comme par exemple AC40, AC19 et A12.2 (Figure 4).

3. La sous-unité A12.2.

3.1. L'état de la question.

Cette sous-unité A12.2 (figure 5), spécifique de l'ARN polymérase I encodée par le gène *RRN4* (Nogi *et al.*, 1993) renommé *RPA12*, est une protéine de 125 acides aminés. On trouve au niveau de sa séquence (annexe 1) deux motifs C-X₂-C-X₁₂-C-X₂-C spécifiques des doigts de zinc (Treich *et al.*, 1991).

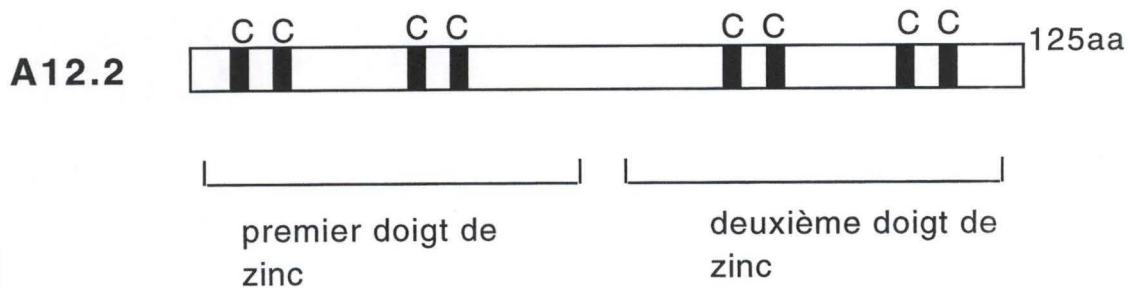


Figure 5 : Schéma de la sous-unité A12.2 de l'ARN polymérase I de *S. cerevisiae*.

Les cystéines des doigts de zinc sont ici symbolisées par les rectangles noirs.

Les régions centrées autour de ces doigts de zinc sont conservées entre les sous-unités B12.6 (pol II) et C11 (pol III), ce qui a permis de dire que ces trois sous-unités A12.2, B12.6 et C11 sont paralogues*.

La recherche d'autres homologues a montré que A12.2 est évolutivement conservée puisque l'on trouve des orthologues de A12.2 chez les Archéobactéries mais aussi chez l'homme.

La délétion de cette sous-unité cause un phénotype thermosensible létal à 34°C (Nogi *et al.*, 1993). Ceci signifie que A12.2 ne soit pas nécessaire à des températures permissives (en-dessous de 34°C) mais au contraire nécessaire à des températures supérieures.

* On entend par paralogues des gènes homologues dans un même génome. Orthologues désigne des gènes homologues au sein de génomes d'espèces différentes. Homologue se réfère à l'origine évolutive commune.

Dans le contexte général du complexe de transcription pol I et de sa spécificité, discuté au point 2., l'étude des sous-unités spécifiques, dont celle de A12.2, de l'ARN polymérase I présente un intérêt double : d'une part pour leur rôle de structure dans le complexe de la polymérase et, d'autre part, dans la reconnaissance des facteurs de transcription spécifiques.

La compréhension des fonctions des sous-unités du complexe implique d'identifier précisément les éléments de structure qui sont en cause. Deux méthodes expérimentales, l'une génétique et l'autre moléculaire, s'offrent pour aborder cette problématique.

3.2. Les stratégies expérimentales adoptées.

Deux approches vont être pratiquées pour mettre en évidence l'existence de domaines fonctionnels au sein de la sous-unité A12.2, la première, génétique, qui consiste à tester la capacité de domaines de cette sous-unité à compléter un phénotype de délétion de la sous-unité complète, la seconde, biochimique ou moléculaire, cherche à éclairer le rôle de ces domaines distincts dans des tests d'interaction double-hybride avec des sous-unités partenaires de la polymérase I.

3.2.1. Principe de l'approche par complémentation pour définir un domaine fonctionnel.

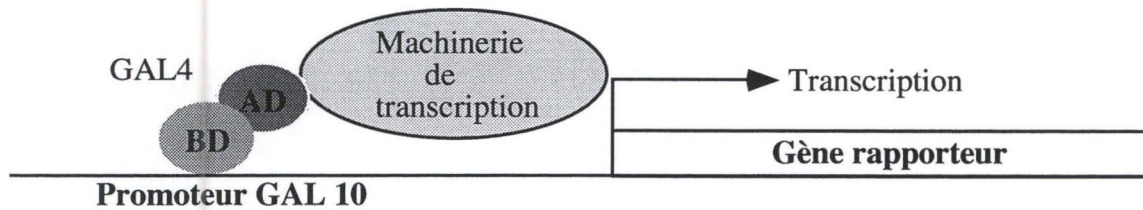
La méthode génétique de la complémentation permet de vérifier si un ADN cloné exprimé dans un mutant est capable ou non de "sauver" le phénotype de celui-ci. Dans le cadre de ce mémoire, des fragments du gène sauvage seront testés pour leur capacité de restaurer le phénotype sauvage au mutant délété pour le gène de la sous-unité de la polymérase I.

Dans la cas d'un gène essentiel, il s'impose que le phénotype soit conditionnel. Les mutants conditionnels tels que les mutants thermosensibles sont couramment utilisés pour étudier des protéines essentielles ou des protéines multifonctionnelles.

Le phénotype thermosensible s'observe chez des mutants qui sont dits conditionnels. Ces mutants expriment un phénotype sauvage dans des conditions de température dites permissives et un phénotype mutant dans des conditions de température dites restrictives.

Ce phénotype peut être obtenu par une mutation ou une délétion partielle ou totale d'un gène.

Système transcriptionnel eucaryotique



Le principe du double-hybride

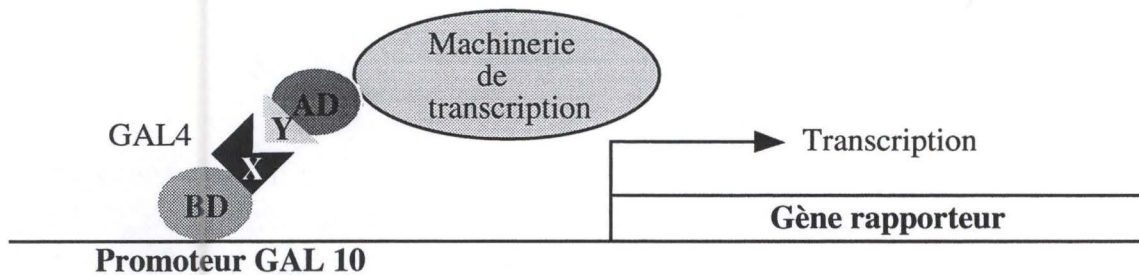
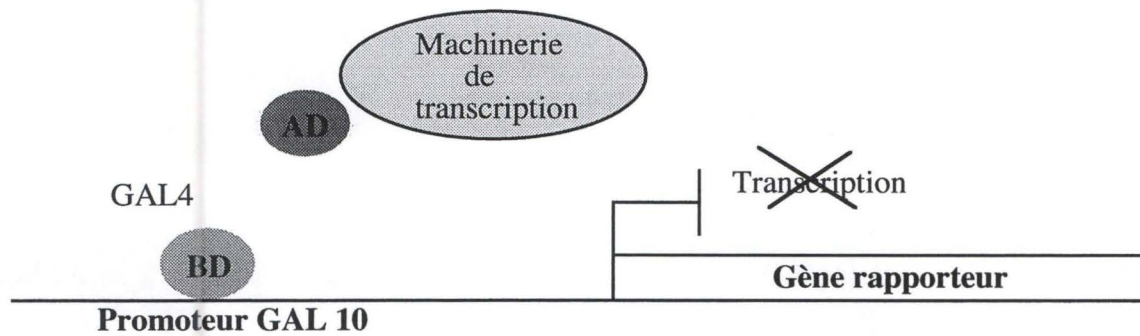


Figure 6: Principe du système double-hybride.

Dans ce système, la protéine d'intérêt (X) fusionnée au domaine de liaison BD (Binding Domain) interagit avec la protéine Y fusionnée au domaine d'activation AD (Activating Domain) pour reconstituer un facteur de transcription actif qui recrute la machinerie de transcription et permet la transcription du gène rapporteur.

Dans le cas présent, la délétion de A12.2 cause un phénotype thermosensible létal conditionnel. En effet, la létalité ne se manifeste pas à 25°C mais bien à 34°C. L'interprétation habituelle est que le mutant voit, à la température non permissive, survenir une déstabilisation accentuée d'une structure, inactivant celle-ci. Dans le cas d'un délétant, on imagine que la déstabilisation concerne le complexe à la structure duquel la sous-unité contribue. Dans le cas étudié, le complexe déstabilisé sera la polymérase I.

En pratique, on opère en transformant différents fragments de la sous-unité délétée dans la souche nulle correspondante. La croissance des mutants, à la température non permissive, est comparée à la croissance d'une souche sauvage placée dans les mêmes conditions.

Dans le cas d'un mutant conditionnel présentant un phénotype thermosensible létal à 34°C, les fragments capables de compléter la délétion de la sous-unité entière restaureront donc une croissance normale à 34°C.

3.2.2. Principe de l'approche par double-hybride pour définir un domaine d'interaction.

La méthode du double-hybride (Figure 6) est une approche moléculaire qui tire parti du caractère modulaire des facteurs de transcription. Les domaines BD (Binding Domain) de liaison à l'ADN et AD (Activating Domain) d'activation dissociés peuvent, le cas échéant, s'ils sont rapprochés par le jeu d'interactions faibles s'exerçant entre partenaires auxquels ils sont l'un et l'autre fusionnés de manière covalente, reconstituer *in vivo* un complexe activateur de transcription.

Dans le système double-hybride, mis au point par Fields et Song, le domaine de liaison à l'ADN est fusionné à la protéine d'intérêt (A12.2 ou un domaine de cette sous-unité par exemple) appelée "appât"; tandis que le domaine d'activation est fusionné à une protéine Y appelée "proie". Dans ce cas, le complexe activateur sera reconstitué et donc capable d'activer la transcription si et seulement si les protéines X et Y interagissent physiquement. Ce système est donc une méthode utilisant, *in vivo*, l'activité transcriptionnelle d'un rapporteur comme révélateur d'une interaction protéine-protéine.

En pratique, le test se réalise dans une souche test qui comporte un ou deux gènes rapporteurs sous le contrôle d'un activateur transcriptionnel (GAL4). Une co-transformation des deux vecteurs d'expression encodant respectivement la "fusion Binding Domain-protéine" (l'"appât"-X) et le domaine d'activation en fusion avec une banque d'ADNc (où la "proie" Y est recherchée) est réalisée dans la souche test. Cette souche étant délétée pour le gène GAL4, il n'y a expression du ou des rapporteurs que si Y et X se lient physiquement, reformant ainsi l'activateur transcriptionnel.

4. But du travail.

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'une étude en cours sur la fonction de la sous-unité A12.2 de l'ARN polymérase I. En 1993, les travaux de Nogi ont montré que la délétion de A12.2 (mutant *rpa12*) entraînait un phénotype thermosensible (ts) pour la croissance. De plus, dans la souche mutante Δ A12.2, la concentration cellulaire de A190, la plus grande sous-unité de la Pol I, est inférieure à celle d'une souche sauvage. L'hypothèse proposée fut que A12.2 joue un rôle dans l'assemblage de A190 dans un complexe Pol I stable.

Par ailleurs, une interaction entre A12.2 et A135, deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase I, a été mise en évidence (Flores *et al.*, sous presse). Dès lors, on peut émettre l'hypothèse que le phénotype ts est dû à une perte d'interaction entre A12.2 et A135 laquelle causerait la déstabilisation du complexe pol I.

Notre approche met en œuvre une analyse structurale de A12.2 par homologie de séquence *in silico*. Ensuite, par complémentation fonctionnelle, nous cherchons à définir le fragment ou domaine suffisant à la fonction perdue causant le phénotype ts. Enfin, nous nous attacherons à la mise en évidence, dans cette sous-unité, par double-hybride, de zones ou domaines d'interaction avec le partenaire A135 suspecté.

Résultats

RESULTATS*

1. Mise en évidence de deux domaines fonctionnels dans la sous-unité A12.2.

1.1. Prédiction in silico de régions distinctes dans A12.2.

La sous-unité A12.2 (figure 1) de l'ARN polymérase I de *Saccharomyces cerevisiae* est une protéine de 125 acides aminés comprenant deux doigts de zinc à 4 cystéines chélatées.

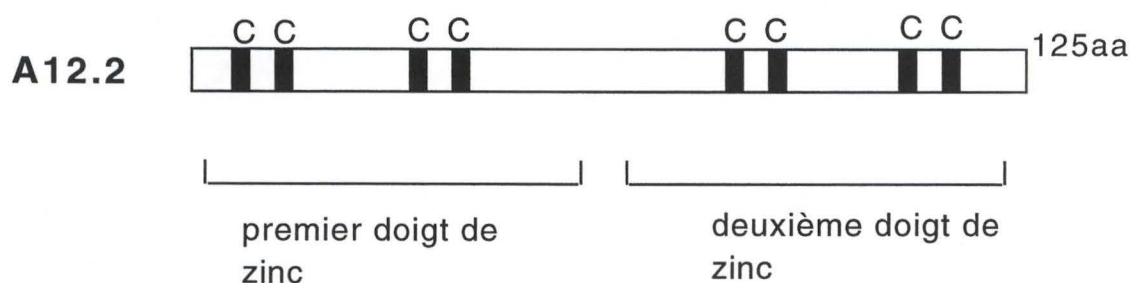


Figure 1 : Schéma de la sous-unité A12.2.

Cette sous-unité est évolutivement conservée. En effet, la recherche d'homologues de A12.2 dans les banques de données a mis en évidence l'existence de A12.2 chez les Archéobactéries mais aussi chez l'Homme. Des alignements de séquences entre A12.2 et ses homologues, en particulier ses paralogues (cf. annexe 2 : Alignement de séquences des paralogues de A12.2 par le programme Match-Box (Depiereux *et al.*, 1997)), ont permis de proposer l'existence de deux domaines :

- Le premier domaine centré autour du premier doigt de zinc (Figure 2A). Par alignement pairé entre A12.2 et B12.6 (homologue polymérase II) et C11 (homologue polymérase III), on trouve, pour ce domaine, dans les différentes comparaisons deux à deux, un pourcentage d'identité d'environ 25% (cf. figure 2A : alignement pairé entre A12.2 et C11).
- Le second domaine est centré autour du second doigt de zinc. Par alignements pairés, il apparaît que ce domaine est homologue aux sous-unités B12.6 et C11 mais également à la partie C-terminale du facteur d'élongation TFIIS de l'ARN polymérase II (Figure 2B : alignement pairé entre A12.2 et TFIIS). En

* Ces résultats ont fait l'objet de publications dans Archives of Physiology and Biochemistry (1999) présentées en annexe 4.

effet, on trouve un pourcentage d'identité de 52 % entre le domaine de A12.2 et celui de TFIIS.

La partie centrale de la sous-unité A12.2 présente peu de résidus identiques aux résidus des homologues des deux autres polymérases de *S. cerevisiae* mais aussi peu de résidus évolutivement conservés (par comparaison aux l'homologues de A12.2 des banques de données). Pour cette région aucune homologie n'a pu être mise en évidence que ce soit avec les homologues des polymérases II et III ou avec l'homologue A12.2 humain.

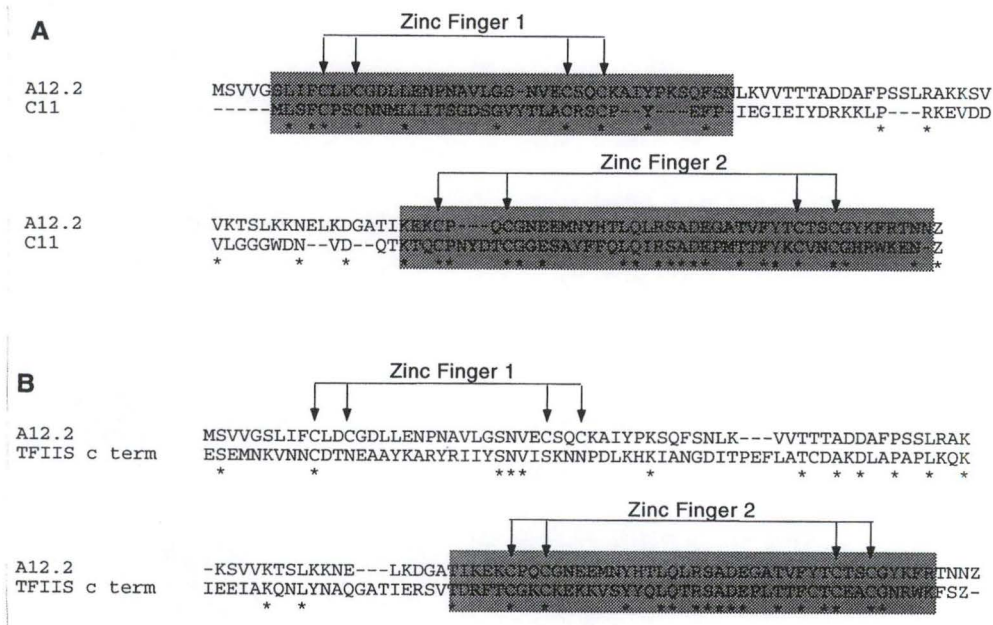


Figure 2 : Alignements pairés de séquences montrant les zones conservées (en gris) et les identités (*) entre A12.2 et C11 en A et la région C-terminale de TFIIS en B (Alignements réalisés avec le programme Clustal).

Ainsi donc, sur base d'homologies de séquences, deux domaines peuvent être définis dans A12.2 : le premier domaine homologue à B12.6 et C11 et le second domaine homologue à B12.6, C11 et à la partie C-terminale de TFIIS. Nous allons donc, au cours de ce mémoire, nous attacher à éprouver la pertinence, *in vivo*, de l'existence de ces deux domaines de la sous-unité A12.2.

1.2. Pertinence *in vivo* de deux domaines dans A12.2.

Des travaux préalables ont montré que la délétion de la sous-unité A12.2 entière cause un phénotype thermosensible (ts). Afin de montrer la pertinence fonctionnelle de la présence de deux domaines dans A12.2, nous allons chercher à savoir si l'apparition du phénotype ts peut être rapportée à une fonction propre à l'un de ces deux domaines.

Nous procéderons par des délétions successives du côté 3' et 5' de l'insert. De la sorte, des fragments où l'un des domaines de A12.2 est supprimé ou déstructuré, vont être obtenus. Ces différents fragments seront ensuite testés en complémentation dans une souche nulle pour le gène *RPA12* encodant A12.2*. ce qui permettra de déterminer le fragment de A12.2 capable de remplacer la sous-unité A12.2 entière, c'est-à-dire suffisant pour la fonction.

La souche utilisée pour réaliser ces tests de complémentation est la souche SL9-6b. Il s'agit d'une souche où *RPA12* est disrupté par le gène *LEU2*. Cette souche présente un phénotype thermosensible létal à 34°C (figure 3) et un retard de croissance dès 24°C. Dans cette souche, la complémentation se traduira donc par la restauration de la croissance à la température restrictive de 34°C.

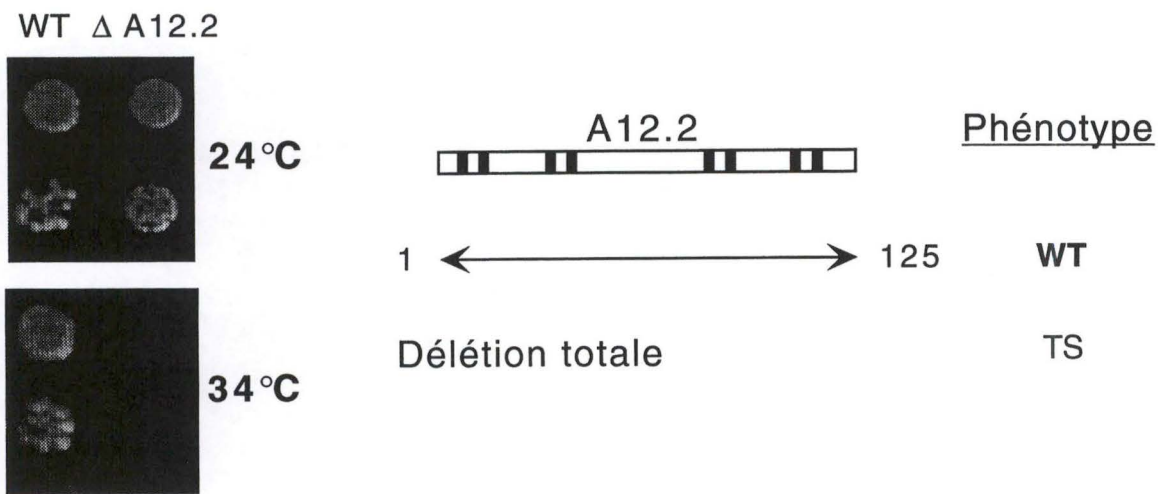


Figure 3 : Le phénotype ts de la souche SL9-6b.

Des gouttes à partir de cultures de colonies isolées ont été réalisées sur milieu synthétique complet. Les boîtes sont ensuite incubées à 24°C et 34°C.

Le contrôle utilisé est une souche sauvage (WT) exprimant A12.2 au complet (le rectangle avec les traits épais correspondant aux doigt de zinc et la fêche pour le peptide de 1 à 125). ΔA12.2 désigne la souche SL9-6b délétée pour la sous-unité A12.2, thermosensible (TS) pour la croissance.

Pratiquement, les fragments de A12.2 obtenus après délétion des extrémités vont être testés en complémentation et pour cela, seront clonés dans le vecteur d'expression le pCM185 (cf. Matériel et Méthodes). Ce vecteur est un plasmide centromérique et il possède un promoteur régulable par la tétracycline. En l'absence de tétracycline, ce promoteur est un promoteur de force "moyenne" chez la levure. L'utilisation de ce

* Dans le texte, *RPA12* désigne le gène encodant la sous-unité A12.2. A12.2 désigne le produit du gène.

plasmide centromérique possédant un promoteur de force "moyenne" permet de ne pas avoir de surexpression tout en assurant un taux d'expression des inserts suffisant (Gari *et al.*, 1997).

Ce vecteur portant A12.2 entier servira de contrôle positif de complémentation et le vecteur vide de contrôle négatif.

1.2.1. Délimitation du premier domaine par délétion progressive de la région 3'.

1.2.1.1. Quatre mutants ont été construits (travail antérieur au laboratoire).

Les quatre constructions (constructions 1 à 4 sur la figure 4) ont été réalisées par délétions progressives de la partie N-terminale de la sous-unité A12.2.

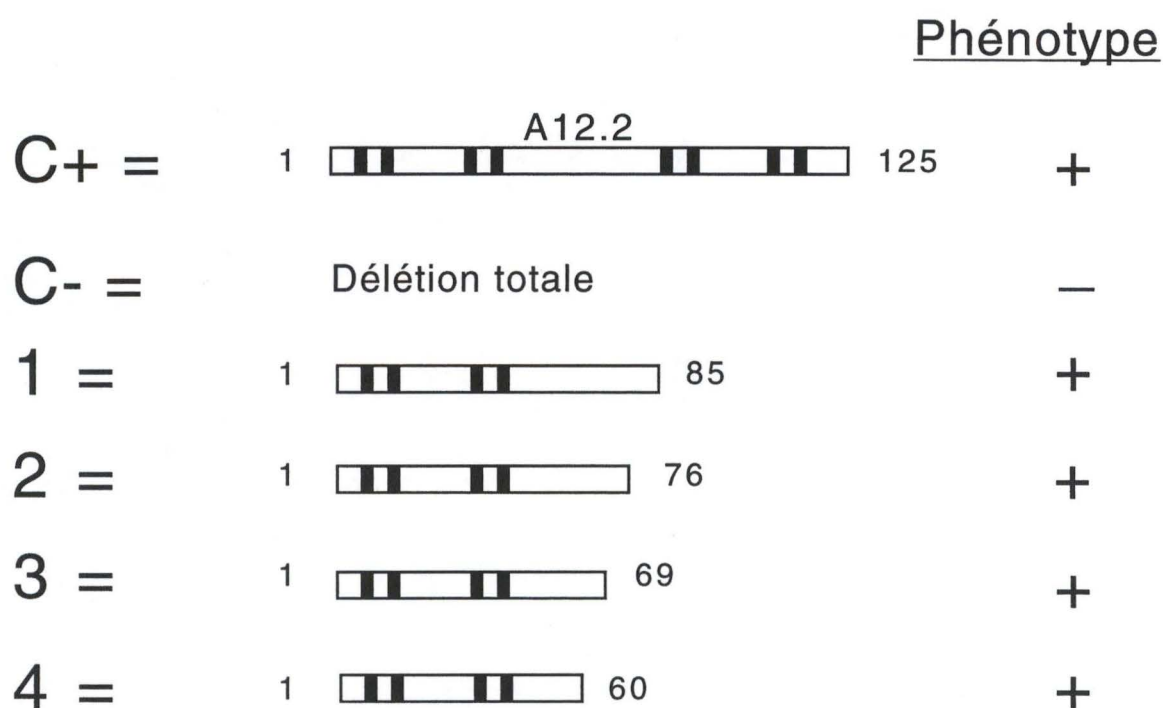


Figure 4 : Schéma des fragments de A12.2 obtenus par délétion progressive du coté COOH terminal. A droite, les résultats des tests de complémentation (cf. figure 5).

La première construction comprend les acides aminés 1 à 85. En pratique la limite de ce fragment a été choisie dans la séquence juste en amont du motif C-X₂-C-X₁₂-C-X₂-C (motif caractéristique des doigts de zinc) afin d'obtenir un fragment ne comportant pas le second doigt de zinc.

Les limites des autres fragments se situent dans la partie intermédiaire de A12.2. Les délétions successives concernent chaque fois un fragment de 7 à 9 acides aminés.

Compte tenu du peu de conservation observé dans cette partie (cf. plus haut), on ne trouve dans les délétions correspondante que deux ou trois résidus qui soient identiques à l'un des paralogues B12.6 ou C11.

L'importance des résidus conservés de cette partie intermédiaire pourra être testée et nous pourrons définir la plus petite construction de A12.2 capable de compléter le phénotype ts du mutant nul.

Ces différents fragments (1 à 4) ont été amplifiés par PCR et restreints par les enzymes de restrictions *Bam*HI et *Cla*I. Les différents inserts obtenus ont été clonés dans le vecteur d'expression pCM185 en *Bam*HI-*Cla*I.

1.2.1.2. Les tests de complémentation.

Les différentes constructions et les contrôles sont transformés dans la souche SL9-6b et les transformants sélectionnés sur milieu synthétique complet sans tryptophane (marqueur de sélection du plasmide pCM185). Des stries sont réalisées sur le même milieu et placées à 25°C. Une population monoclonale de chaque mutant sélectionné est ensuite incubée à différentes températures : 25°C et 37°C (Figure 5).*

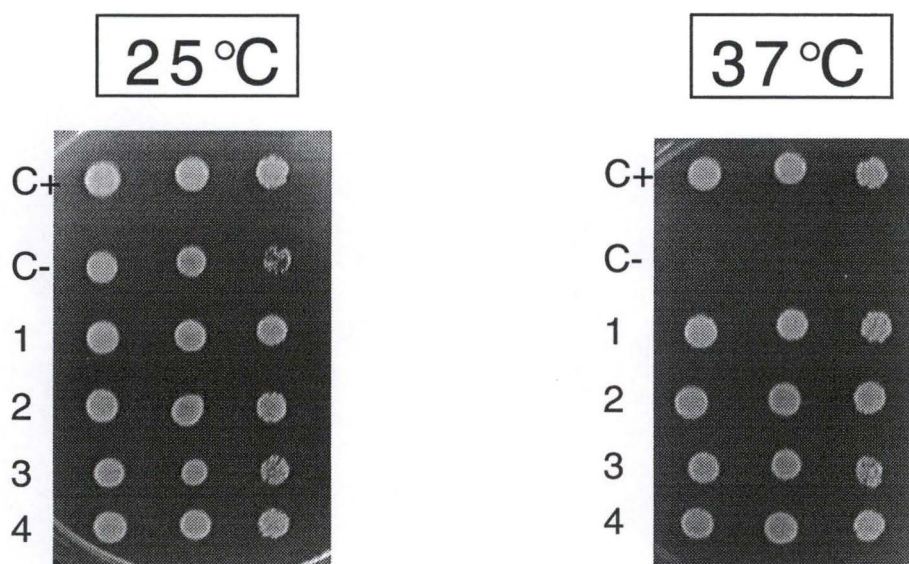


Figure 5 : Test de complémentation par les constructions 1 à 4 dans la souche SL9-6b.

Une colonie de chaque transformant est resuspendue dans 50 µl d'eau stérile dont 4 µl sont déposés sur milieu de sélection. Les boîtes sont ensuite incubées respectivement à 25°C et 37°C.

Pour les mutants de la souche SL9-6b contenant les différentes constructions 1 à 4, la croissance observée à 25°C et à 37°C est comparée à celle des contrôles.

* Au cours de ce mémoire, les différents tests ont été réalisés en stries afin d'obtenir des colonies isolées. Pour la sélection des transformants, il est indispensable de pouvoir obtenir des populations monoclonales. Toutefois, pour la simplicité des documents, les tests ont été refaits et sont présentés en gouttes (gouttes réalisées à partir de populations monoclonales).

Ainsi, une croissance aux deux températures (comme pour le contrôle positif C+) montre une complémentation et inversement une absence de croissance à 37°C (comme pour le contrôle négatif C-) montre une absence de complémentation.

On constate que pour les différentes constructions testées (constructions 1 à 4), la croissance des mutants aux différentes températures est identique à la croissance du contrôle positif.

En conclusion, les fragments 1 à 4 de la sous-unité A12.2 sont capables de restaurer une croissance normale de la souche délétée pour la sous-unité A12.2 à la température restrictive de 37°C et donc complètent.

Le plus petit fragment testé capable de compléter la disruption du gène *RPA12* est donc le fragment qui comprend les acides aminés 1 à 60, ce qui confirme l'existence d'un premier domaine fonctionnel correspondant à la région d'homologie coté N-terminus de la sous-unité, identifié *in silico*.

1.2.2. Délimitation du second domaine par délétion progressive de la région 5'.

1.2.2.1. Quatre mutants ont été réalisés par délétions successives du coté 5'.

Les quatre fragments numérotés 5 à 8 sur la figure 6 ont été construits par délétions successives de la partie C-terminale de la sous-unité A12.2.

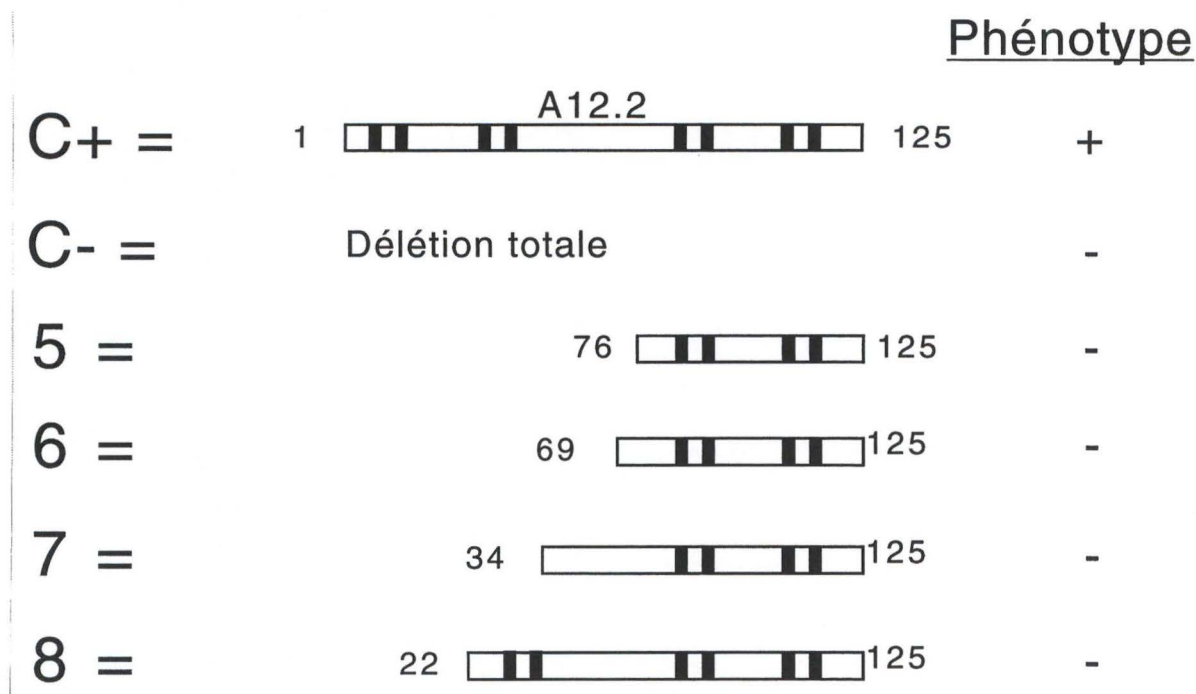


Figure 6 : Schéma des fragments de A12.2 obtenus par délétions successives du coté NH₂-terminal. A droite, les résultats des tests de complémentation (cf. figure 7).

Les inserts 5 et 6 sont les fragments du second domaine de A12.2 obtenus par délétion respectivement des fragments 2 et 3 du premier domaine, décrits au point 1.2.1. de ce chapitre. Il s'agit donc de fragments comportant les acides aminés 76 à 125 pour la construction 5 et 69 à 125 pour la construction 6.

L'insert 7 (figure 6) débute à l'acide aminé 34 qui est l'acide aminé qui suit, dans la séquence protéique, la dernière cystéine du premier doigt de zinc. L'insert 8 comprend les acides aminés 22 à 125. Ce fragment débute au niveau de la seconde moitié du premier doigt de zinc.

Ainsi, nous pourrions investiguer l'implication du premier doigt de zinc dans la complémentation grâce aux différentes constructions. Les constructions 7 et 8 doivent permettre de déterminer précisément si la complémentation obtenue avec les fragments 1 à 4 est due au premier doigt de zinc ou au contraire est due à une partie de la séquence protéique qui le suit (acides aminés 34 à 60). Cette dernière hypothèse paraît respectable compte tenu de la très faible homologie entre les paralogues dans cette région.

Les différents inserts ont été clonés de la même manière que les constructions 1 à 4, c'est-à-dire par amplification PCR et restriction, dans le même vecteur (pCM185) en *Bam*HI-*Cla*I.

1.2.2.2. Tests de complémentation.

Ces différentes constructions sont transformées dans la souche SL9-6b et les mutants sélectionnés sur milieu synthétique sans tryptophane et incubés à 25°C. Une population monoclonale de chacun des mutants est ensuite incubée à 25°C et à 37°C en présence des mêmes contrôles qui ont été utilisés lors du premier test de complémentation.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 7.

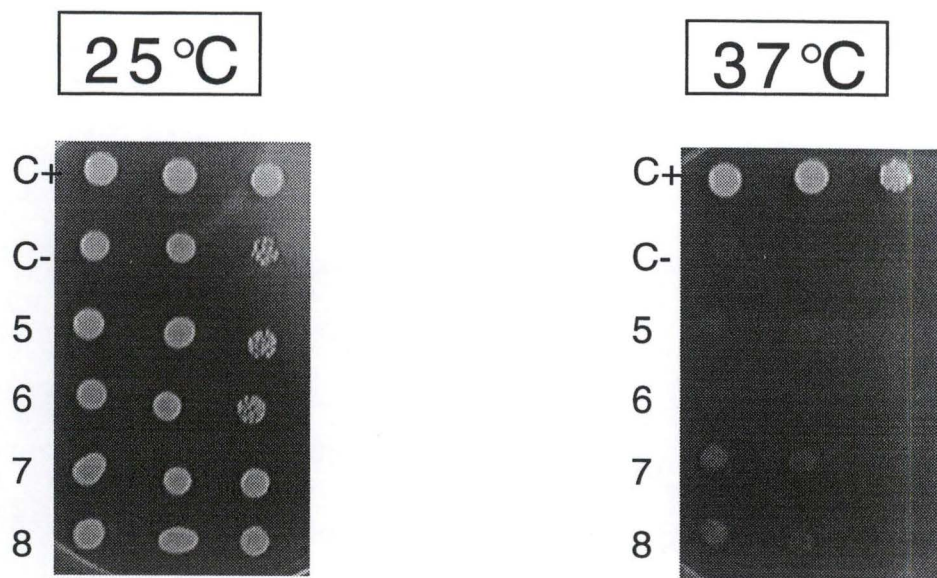


Figure 7 : Test de complémentation par les constructions 5 à 8 dans la souche SL9-6b.

Une colonie de chaque transformant est resuspendue dans 50 μ l d'eau stérile dont 4 μ l sont déposés sur milieu de sélection. Les boîtes sont ensuite incubées respectivement à 25°C et 37°C.

Sur la figure 7 on observe la croissance du contrôle positif aux deux températures et l'absence de croissance du contrôle négatif et des différents mutants obtenus par la transformation des constructions 5 à 8 dans la souche SL9-6b à la température restrictive de 37°C.

En conclusion, les fragments 5 à 8 de la sous-unité A12.2 ne complètent pas la disruption. Les transformants obtenus présentent toujours un phénotype thermosensible (comme le contrôle négatif).

Nous n'avons cependant pas formellement démontré que les constructions par lesquelles la souche SL9-6b était transformée donnaient bien lieu à une expression. Toutefois, comme les constructions ont toutes été clonées dans le même vecteur et selon le même protocole que les constructions pour lesquelles l'expression a été prouvée, on est en droit de croire que la transcription de toutes les constructions s'effectue bien de la même manière.

Sans cette réserve, il apparaît que le deuxième domaine, qui, rappelons-le, est hautement conservé (ce domaine présente un pourcentage d'identité de 52 % à la partie C-terminale du facteur d'élongation TFIIS), ne permet pas la complémentation du phénotype ts de la souche délétée pour la sous-unité A12.2.

1.3. Conclusion.

La pertinence de l'existence des deux domaines de A12.2 définis *in silico* sur base d'alignement de séquences a été éprouvée *in vivo* par les tests fonctionnels de complémentation décrits ci-dessus.

Les résultats ont montré que le premier domaine de A12.2 défini comme étant le plus petit fragment de A12.2 testé et capable de compléter la disruption du gène de cette sous-unité se limite au fragment 4 qui est composé des acides aminés 1 à 60 de A12.2. De plus, par des délétions, il a été montré que c'est le doigt de zinc de ce domaine de A12.2 et lui seul qui, par sa structure et/ou sa séquence, est nécessaire à la complémentation.

Le second domaine quant à lui, caractérisé par une forte homologie (52 % d'identité) au facteur d'élongation TFIIS de l'ARN polymérase II, a été délété sans qu'aucun phénotype ne soit détecté.

En conclusion de ces résultats, il apparaît donc que le phénotype ts de la souche disruptée pour le gène *RPA12* est dû à l'absence du premier doigt de zinc. Le premier doigt de zinc est suffisant pour restaurer la fonction touchée dans le mutant délété pour A12.2. L'absence ou la présence du second domaine détecté *in silico* n'a pas montré d'effets visibles *in vivo*. L'hypothèse que A12.2 exerce son action dans le complexe de la polymérase I via des interactions où interviennent l'un ou l'autre des domaines N- et C-terminaux, sera testé par l'approche double-hybride.

2. Analyse par double-hybride du rôle fonctionnel des domaines de A12.2 dans le complexe Pol I.

2.1. Evidences préalables d'une interaction double-hybride entre A12.2 et A135.

Dans le cadre du programme européen TAPIR ("Two-hybrid Analysis of Proteins involved in RNA metabolism") et dans le but de trouver des partenaires d'interaction des différentes sous-unités des trois ARN polymérases, des cribles double-hybride ont été réalisés avec différentes sous-unités.

Pour ces cribles, une banque génomique de 5.10^6 clones indépendants, constituée de fragments aléatoires d'une taille moyenne de 700 pb a été clonée dans le vecteur double-hybride pACTII (Matériel et Méthodes, point 2.1.3.).

Un crible a été réalisé en utilisant comme appât la sous-unité A12.2. Ce crible avait pour but de rechercher tous les fragments du génome codant pour un peptide ayant de l'affinité pour cet appât (Flores *et al.*, sous presse).

Parmi les différentes proies pêchées lors de ce crible, une a particulièrement attiré notre attention : un fragment de A135 (figure 8).

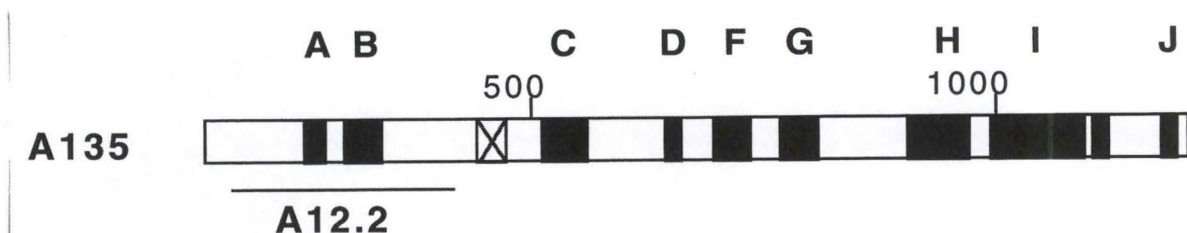


Figure 8 : Représentation schématique des régions constituant la sous-unité A135 de l'ARN polymérase I.

Sur cette figure, sont représentés :

- par des carrés noirs : les boîtes conservées définies par alignement des séquences de différentes protéines homologues à la sous-unité β de *E. coli*.
- par un trait : le fragment de 1041 pb pêché en double-hybride lors du crible réalisé avec A12.2.
- par une croix : la séquence encodant l'épitope (annexe 3) reconnu par l'anticorps utilisé pour localiser cette sous-unité par immunolocalisation.

Les raisons de cet intérêt particulier résident dans le fait que différents arguments tendent à conforter la réalité *in vivo* de cette interaction.

Le premier argument est que la proie et l'appât appartiennent au complexe Pol I. En effet, le fragment pêché est un fragment de A135, seconde plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase I. De plus, lors de nombreux cribles réalisés dans le cadre du programme TAPIR, ce fragment n'a été pêché que lors du crible utilisant la sous-unité A12.2 comme appât. Ce candidat apparaît aussi comme spécifique et n'appartenant donc pas à la série des faux positifs classiques rencontrés dans le programme TAPIR.

Enfin, le dernier argument et sans doute le plus relevant en faveur de la réalité de l'interaction est que par immunolocalisation A135 et A12.2 ont été localisés toutes les deux au niveau du pouce de l'ARN polymérase I (figure 9). On se rappellera que l'épitope dans A135 reconnu par l'anticorps pour l'immunolocalisation se trouve dans la séquence entre les boîtes B et C (figure 8 et annexe 3). Cet épitope a été localisé près de A12.2 (figure 8) or, le fragment de A135 pêché lors du crible double-hybride réalisé avec A12.2 se révèle contenir les 1041 premières paires de bases, ce qui englobe précisément les boîtes A et B (cf. annexe 3). L'interaction double-hybride et l'indication de la proximité *in vivo* entre A12.2 et A135 vont donc dans le même sens.

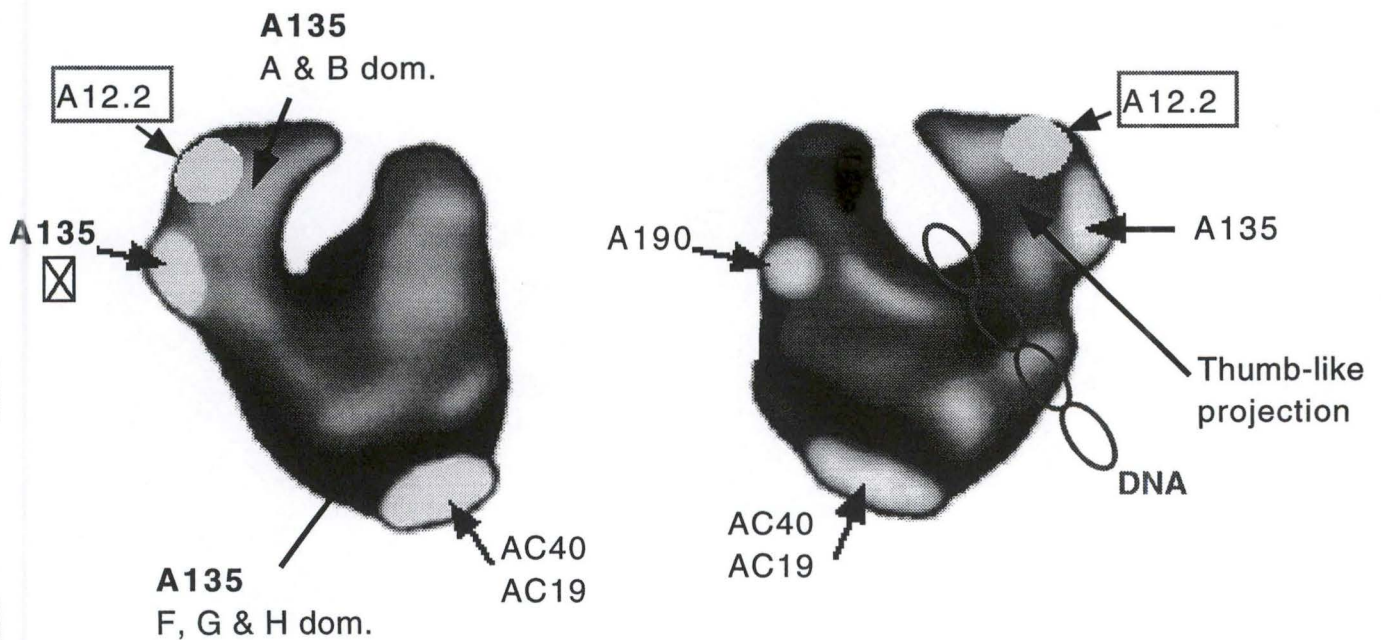


Figure 9 : Immunolocalisation de différentes sous-unités de l'ARN polymérase I sur sa structure 3D (Klinger *et al.*, 1996).

Le modèle, dit de la main droite incurvée, est présenté sous deux axes différents. On note différentes parties : le pouce où sont localisées A12.2 et A135, la paume formant le plancher du canal où passe l'ADN et les doigts où se situe A190. Les dimensions sont 11 nm x 11 nm x 15 nm.

Nous avons donc décidé d'investiguer plus précisément cette interaction en cherchant à déterminer le ou les domaines de la sous-unité A12.2 impliqués dans cette interaction.

2.2. Détermination du domaine de A12.2 responsable de l'interaction avec A135.

2.2.1. Mise en œuvre du système.

2.2.1.1. Caractérisation du système double-hybride.

Le système double-hybride choisi est le même système que celui utilisé dans le cadre du programme TAPIR. On utilise la souche-hôte Y190 qui comprend les deux gènes rapporteurs *LacZ* et *HIS3* clonés en aval d'un promoteur GAL4.

L'appât est cloné dans le vecteur pAS-CYH2 permettant d'obtenir des protéines de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et l'appât.

Dans le cadre de ce mémoire, les différents fragments de A12.2 seront testés en tant qu'appât.

La proie est un fragment isolé lors du crible avec A12.2. Il s'agit du fragment de A135 (cf. annexe 3), issu de la banque génomique décrite précédemment, cloné dans le vecteur pACTII. Ce clonage permet de réaliser une fusion entre le domaine de transactivation de GAL4 et le fragment de A135.

L'appât et la proie sont réunis par transformation dans la souche-hôte et la transactivation des gènes rapporteurs *LacZ* et *HIS3* sera respectivement évaluée par une coloration X-GAL et par la mesure de la sensibilité au 3-aminotriazol (3AT).

2.2.1.2. Description des constructions.

Les inserts 2 à 8 (figure 10) testés en complémentarité ont été clonés par amplification PCR dans le plasmide pAS-CYH2.

A12.2 entier cloné dans ce vecteur a été utilisé dans les tests double-hybride comme contrôle positif.

Phénotype

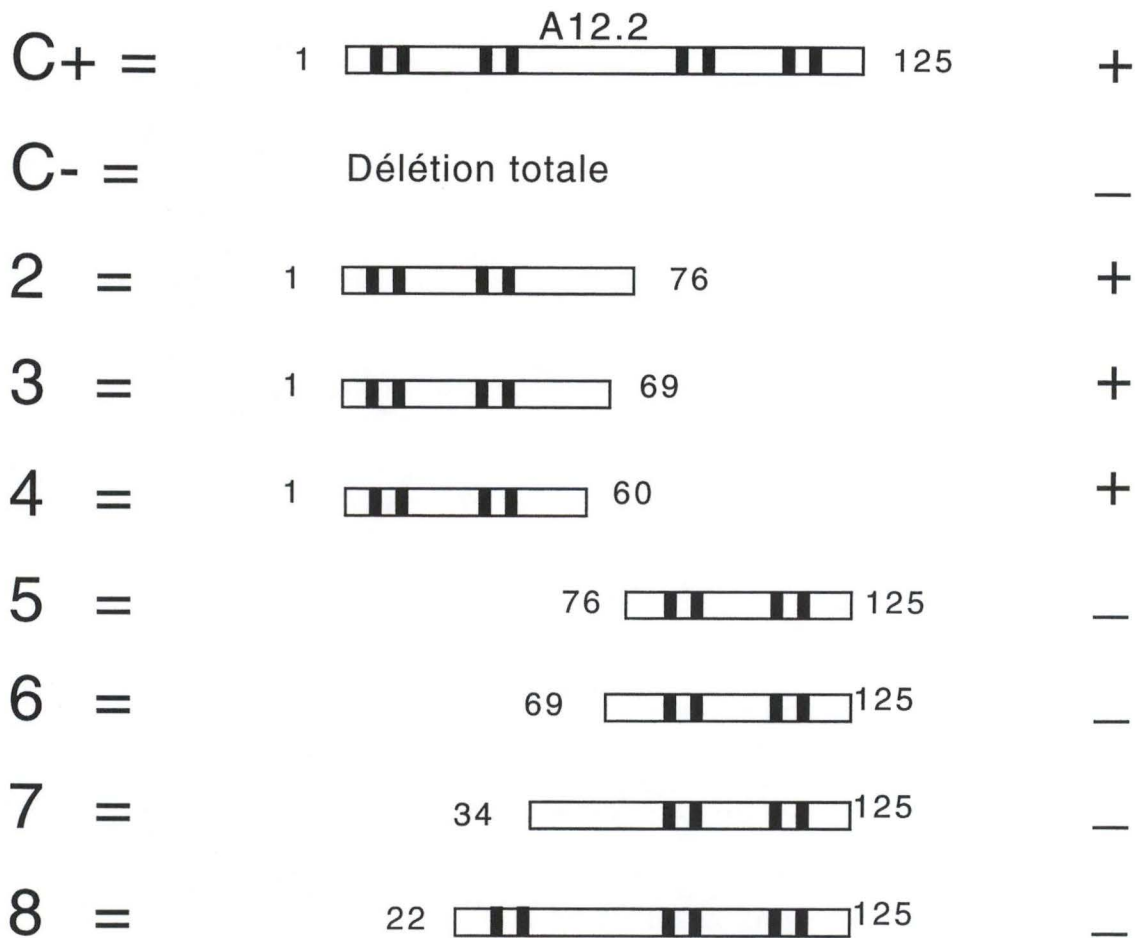


Figure 10 : Schéma des fragments de A12.2 testés en double-hybride.

Les contrôles C+ et C- sont respectivement A12.2 entier dans le pAS-CYH2 et ce même vecteur vide. Les fragments 2 à 8 sont ici schématisés en précisant le numéro du premier et du dernier acide aminé de chaque insert. De plus, les résultats obtenus en complémentation avec ces fragments sont rappelés. Le signe + indique que le fragment est capable de compléter le phénotype *ts* et réciproquement le signe - indique une absence de complémentation.

2.2.1.3. Tests préliminaires.

Avant de réaliser le test double-hybride proprement dit, différents tests préliminaires ont été réalisés. Les premiers visent à vérifier l'expression des protéines de fusion. Les seconds tests ont pour but de déterminer les conditions expérimentales adéquates (concentration en 3AT) telles que la transactivation du gène rapporteur *HIS3* n'ait lieu que comme résultat d'une interaction "proie"- "appât" spécifique. La validité

de toute conclusion relative au rôle potentiel d'un domaine ou l'absence de rôle de celui-ci dans une interaction avec une "proie", en double-hybride, est évidemment subordonnée à la vérification que les partenaires potentiels sont bien exprimés dans ce système. Ceci a été établi pour la "proie". Les tests préliminaires le vérifient pour l'"appât".

2.2.1.3.1. Tests de l'expression.

Lors des tests de complémentation décrits dans la première partie de ce chapitre, il a été mis en évidence que les fragments 1 à 4 sont capables de remplacer la sous-unité A12.2 entière. Ces fragments complètent la disruption de gène *RPA12* et permettent la croissance des mutants à la température restrictive de 34°C.

Or, les protéines de fusion sont composées du domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et les mêmes fragments 1 à 4 de A12.2. Les protéines incluant les fragments de A12.2 devraient donc compléter ce qui par le fait même prouverait leur expression. Ainsi, afin de vérifier l'expression des protéines de fusion comprenant les inserts 1 à 4, les différentes constructions clonées dans le pAS-CYH2 ont été transformées dans la souche SL9-6b qui est disruptée pour la sous-unité A12.2 et qui présente un phénotype ts.

Les transformants obtenus et sélectionnés sur milieu synthétique sans tryptophane sont striés à 25°C. Une population monoclonale de chaque mutant est incubée à 25°C et 34°C.

Pour les différents mutants, la croissance aux différentes températures est comparée à la croissance du contrôle positif (A12.2 entier dans le pAS-CYH2) et du contrôle négatif (pAS-CYH2 vide). Le contrôle positif, dont la protéine de fusion est constituée par le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et par la sous-unité A12.2 entière, complète le phénotype ts du disruptant pour la sous-unité A12.2. Pour le contrôle négatif, seul le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 est présent et ne permet pas la complémentation.

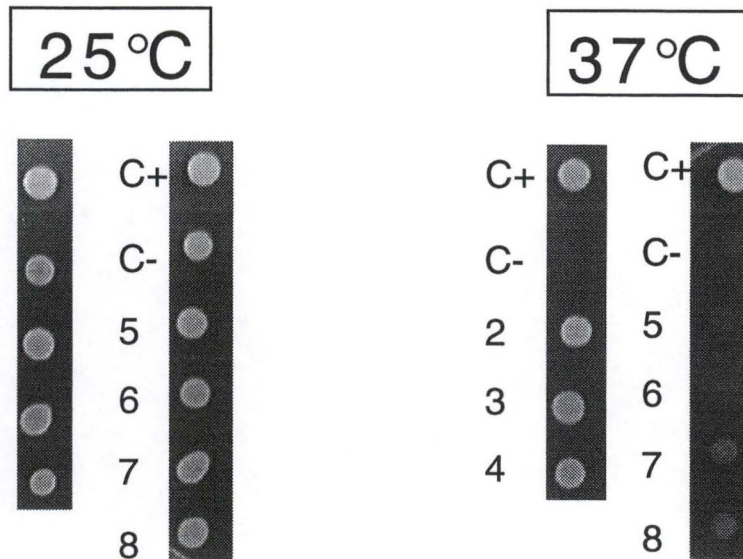


Figure 11 : Tests de complémentation de la souche SL9-6b, délétée pour A12.2, par les différentes protéines de fusions, utilisées en double hybride, contenant les fragments de A12.2.

Une colonie de chaque transformant est resuspendue dans 50 μ l d'eau stérile dont 4 μ l sont déposés sur milieu de sélection. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C et 37°C.

C+ : A12.2 entière (dans le pAS-CYH2) dans SL9-6b.

C- : vecteur vide (pAS-CYH2) dans SL9-6b.

Les numéros indiqués correspondent à ceux des fragments de A12.2 (cf. figure 10) clonés dans le pAS-CYH2. Pour chaque température, les résultats présentés à gauche ont été obtenus avec les fragments complétement (2 à 4) et ceux de droite ont été obtenus avec les fragments incapables de complétement (5 à 8).

Les constructions double-hybride sont donc testées en complémentation. Les résultats (figure 11) montrent que les protéines de fusion (2, 3 et 4) sont capables de complétement comme les fragments (2, 3 et 4) de A12.2 exprimés par le vecteur d'expression.

La complémentation observée avec les protéines de fusion contenant les inserts 1 à 4 permet de conclure que ces protéines sont normalement exprimées.

Nous n'avons pas pu vérifier, par cette approche, l'expression des protéines de fusion contenant les inserts 5 à 8 puisque ces fragments de A12.2 ne complétement pas (figure 11).

Toutefois, comme les constructions ont toutes été clonées dans le même vecteur et selon le même protocole que les constructions pour lesquelles l'expression a été prouvée, on est en droit croire que la transcription de toutes les constructions s'effectue bien de la même manière. La vérification rigoureuse de l'expression de ces protéines de fusion exige un western blot qui n'a pas encore été réalisé.

2.2.1.3.2. Tests de sensibilité au 3AT.

Les différentes constructions ont été transformées dans la souche test : Y190. Cette souche est utilisée en double-hybride, elle possède, comme décrit dans le Matériel et Méthodes, deux gènes rapporteurs : *LacZ* et *HIS3* en aval d'un promoteur GAL4.

Dans ce système, avec le rapporteur *HIS3*, nous observons des "faux positifs", c'est-à-dire que l'on note une transactivation du gène rapporteur *HIS3* sans qu'il y ait dans la souche un transactivateur reconstitué par l'interaction entre les deux protéines testées. L'explication est que la présence dans cette souche des protéines de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et les fragments de A12.2 entraîne une transactivation basale du gène rapporteur *HIS3*. Le 3AT (3-aminotriazol) est un inhibiteur de la protéine *HIS3*. Son utilisation à des doses adéquates, dans le système double-hybride, permet d'éliminer les "faux positifs" dont l'intensité de transactivation basale est insuffisante pour dépasser le seuil d'inhibition imposé par le 3AT. Pour quantifier la transactivation spécifique de chaque construction et définir la concentration adéquate de 3AT requise, les différents mutants de Y190 obtenus dans un premier temps sont sélectionnés sur milieu synthétique sans tryptophane et sans uracile et puis sont striés à 30°C.

Les stries sont ensuite reprises sur le même milieu (pour contrôle) et sur des milieux synthétiques sans tryptophane, sans uracile, sans histidine et contenant du 3AT à des concentrations de 10 mM, 25 mM et 50 mM afin de déterminer la sensibilité de chaque mutant au 3AT.

Pour toutes les constructions testées, on observe une sensibilité au 3AT à partir d'une concentration de 10 mM. Ainsi, la sélection des mutants lors du test double-hybride pourra se faire sur un milieu synthétique sans tryptophane, sans uracile, sans histidine et avec du 3AT à une concentration minimale de 10 mM.

Dans ce cas, la croissance des mutants, sur les milieux contenant du 3AT à 10 mM, permettra de dire que la transactivation spécifique du gène *HIS3* est supérieure à la transactivation de base. Cette augmentation de la transactivation, qui la rend observable sur 10 mM de 3AT, est alors spécifiquement imputable à l'interaction fonctionnelle entre l'appât et la proie, dont la mise en évidence est l'objectif de ce test.

Remarquons qu'en utilisant pour la sélection lors des tests double-hybride des concentrations de 3AT de 10 mM, 25 mM et même 50 mM, il sera possible d'estimer la force de l'interaction entre l'appât et la proie dans le mutant sélectionné.

Toutes les interactions seront alors mises en évidence sur un milieu contenant du 3AT à 10 mM mais seules les interactions plus fortes permettront la transactivation nécessaire pour assurer une croissance sur un milieu contenant 25 ou 50 mM de 3AT.

2.2.2. Tests double-hybride entre le fragment de A135 et les domaines de A12.2.

2.2.2.1. Résultats des tests entre les différents fragments de A12.2 et A135.

Le fragment de A135 pêché lors du crible double-hybride réalisé avec A12.2 est porté par le plasmide pACTII. Pour tester ce fragment contre les différentes constructions de A12.2, ce fragment est transformé dans les mutants de la souche-hôte contenant les différentes constructions (constructions 2 à 8 ainsi que C+ et C-).

La sélection des transformants obtenus se réalise sur un milieu synthétique sans tryptophane, sans uracile et sans leucine. Les transformants sont striés sur le milieu de sélection et repris en stries et en gouttes sur le milieu de sélection et sur un milieu synthétique sans tryptophane, sans uracile, sans leucine, sans histidine et avec du 3AT à la concentration de 10 mM.

Les gouttes sur milieu de sélection sont colorées suivant le protocole de la coloration X-GAL (Matériel et Méthode, 2.4.2.). Les résultats obtenus par coloration sont montrés sur la figure 12.

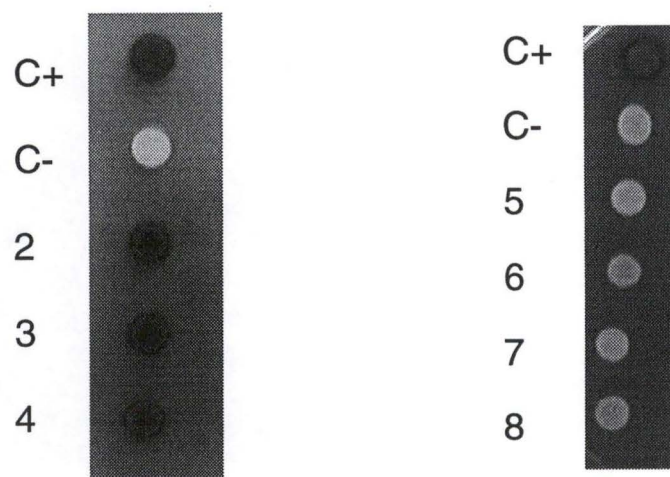


Figure 12 : Tests double-hybride entre les différents fragments de A12.2 et le fragment de A135.

Une colonie de chaque transformant est resuspendue dans 50 μ l d'eau stérile dont 4 μ l sont déposés sur milieu de sélection. Le dosage colorimétrique de l'activité β -galactosidase est réalisé selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes (point 2.4.2.).

C+ : A12.2 entière (dans le pAS-CYH2) contre A135 (dans le pACTII).

C- : vecteur vide (pAS-CYH2) contre A135 (dans le pACTII).

Les numéros indiqués correspondent à ceux des fragments de A12.2 (cf. figure 10) clonés dans le pAS-CYH2 qui sont testés ici contre pACTII-A135. Les résultats présentés à gauche ont été obtenus avec les fragments complémentant (2 à 4) et ceux de droite ont été obtenus avec les fragments incapables de compléter (5 à 8).

En conclusion, l'analyse de la figure 12 permet de conclure que les constructions 2 à 4 sont capables d'interagir avec le fragment de A135 et que les autres constructions testées (constructions 5 à 8) ne montrent pas d'interaction. Les résultats (non montrés) obtenus sur milieu synthétique sans tryptophane, sans uracile, sans leucine, sans histidine et avec du 3AT à la concentration de 10 mM permettent d'aboutir aux mêmes conclusions.

2.2.2.2. Contrôle négatif du test double-hybride.

Afin de vérifier que les protéines de fusion entre le domaine de liaison de GAL4 et les fragments de A12.2 ne pouvaient pas interagir directement avec le domaine de transactivation de GAL4 sans interaction spécifique avec A135 en fusion, le même test double-hybride a été réalisé avec le pACTII vide. Ce plasmide a été transformé dans les

mutants de la souche-hôte contenant les différentes constructions (2 à 8 ainsi que pour C+)

La sélection des transformants obtenus se réalise sur un milieu synthétique sans tryptophane, sans uracile et sans leucine. Les transformants sont striés sur le milieu de sélection et repris en stries et en gouttes sur le milieu de sélection.

Les gouttes sur milieu de sélection sont colorées suivant le protocole de la coloration X-GAL (Matériel et Méthode, 2.4.2.). Les résultats obtenus par coloration sont montrés sur la figure 12 (résultats pour les constructions 5 et 6 non montrés).

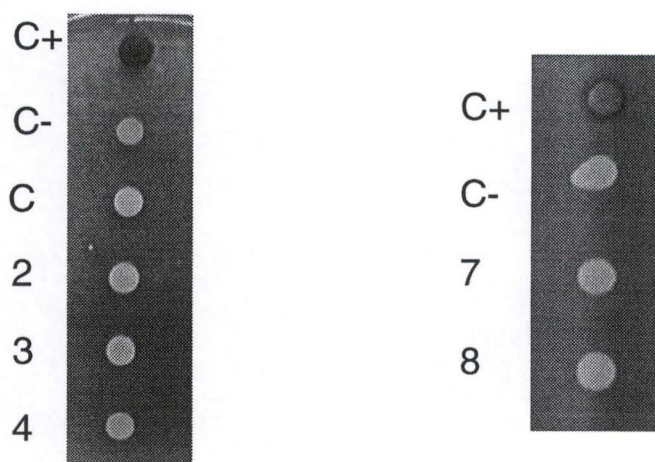


Figure 13 : Contrôle négatif du test double-hybride pour vérifier l'absence d'interaction entre l'"appât" et la partie GAL4 activateur non spécifique de la "proie" A135-GAL4.

Une colonie de chaque transformant est resuspendue dans 50 μ l d'eau stérile dont 4 μ l sont déposés sur milieu de sélection. Le dosage colorimétrique de l'activité β -galactosidase est réalisé selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes au point 2.4.2..

C+ : A12.2 entière dans le pAS-CYH2 contre pACTII-A135.

C- : pAS-CYH2 vide contre pACTII-A135.

C : A12.2 entière dans le pAS-CYH2 contre pACTII.

Les numéros indiqués correspondent à ceux des fragments de A12.2 (cf. figure 10) clonés dans le pAS-CYH2 qui sont testés ici contre pACTII. Les résultats présentés à gauche ont été obtenus avec les fragments complémentant et inversement les résultats de droites ont été obtenus avec les fragments incapables de compléter.

En conclusion de l'analyse de la figure 13, on peut donc conclure qu'aucune des protéines de fusions testées n'est capable d'interagir avec le domaine de transactivation de GAL4. Ainsi, les interactions mises en évidence lors du test double-hybride réalisé (point 2.3.3.1.) font bien intervenir ces deux sous-unités.

2.3. Conclusion.

Les résultats obtenus, après les vérifications nécessaires ayant rapport à l'expression des protéines de fusion et mise au point avec une dose seuil de 3AT pour éliminer les "faux positifs" avec le rapporteur HIS3, montrent que le premier domaine identifié *in silico*, est suffisant pour permettre l'interaction entre les sous-unités A12.2 et A135 de l'ARN polymérase I.

De plus, par des délétions supprimant (ou déstructurant) le premier doigt de zinc, il a été montré que c'est le doigt de zinc du premier domaine de A12.2 et lui seul qui, par sa structure et/ou sa séquence, est nécessaire à l'interaction avec le fragment de A135.

Ainsi, les tests double-hybride permettent de mettre en évidence un rôle potentiel du premier domaine et plus précisément du premier doigt de zinc. Ceci est à corrélérer au premier rôle fonctionnel de ce domaine déterminé par les tests de complémentation, à savoir son caractère suffisant dans la complémentation du phénotype thermosensible de la souche délétée pour la sous-unité A12.2.

Le second domaine, dont la délétion ne cause pas de phénotype, n'est pas capable d'interagir avec A135. Nos résultats ne permettent donc pas de confirmer, pour ce domaine, cependant le plus conservé comme le montre les analyses *in silico*, un rôle identifiable *in vivo*.

*Conclusions, et
Discussion
générales, et
Perspectives.*

CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALES ET PERSPECTIVES

L'étude des sous-unités spécifiques des l'ARN polymérase présente un intérêt double : d'une part pour leur rôle dans l'édifice du complexe multimérique de la polymérase elle-même et, d'autre part, dans la fonction de reconnaissance de facteurs spécifiques (facteurs de transcription) ou de facteurs non spécifiques s'associant à celle-ci.

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'une étude fonctionnelle de la sous-unité A12.2, spécifique de l'ARN polymérase I et se propose par une approche double-hybride d'investiguer le rôle de la sous-unité A12.2 au sein même de la polymérase I.

Notons que A12.2 possède deux paralogues, B12.6 et C11, respectivement dans les complexes pol II et pol III. L'homologie entre ces trois sous-unités a été mise en évidence par alignements de séquences et a permis de proposer deux régions dans chacune des sous-unités, centrées autour des doigts de zinc. Des alignements pairés de ces trois sous-unités permet d'établir que le pourcentage d'homologie est de 25 % pour un premier domaine N-terminal. Un second domaine carboxy-terminal de chacune des sous-unités présente une forte homologie avec la région C-terminale du facteur d'élongation TFIIS de l'ARN polymérase II.

Une observation antérieure a montré que la délétion de la sous-unité A12.2 (mutant *rp12*) entraînait un phénotype thermosensible pour la croissance (Nogi *et al.*, 1993). Des tests de complémentation ont été mis en œuvre dans la souche mutante Δ A12.2, avec des fragments de A12.2 obtenus par sous-clonage. Les résultats ont permis de confirmer l'existence fonctionnelle du premier domaine de A12.2 prédit *in silico*. En effet, ce domaine, composé des acides aminés 1 à 60 et comprenant le premier doigt de zinc de la sous-unité A12.2, suffit à la complémentation du phénotype thermosensible, c'est-à-dire que ce domaine restaure la fonction touchée par la délétion de la sous-unité A12.2.

La fonction du second domaine, centré autour du second doigt de zinc et prédit *in silico* sur base de son homologie à TFIIS, n'a quant à elle pas été identifiée faute de phénotype lié à sa délétion.

Rappelons que l'étude de la souche mutante Δ A12.2 (Nogi *et al.*, 1993) a montré que la concentration cellulaire de A190, la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase I est inférieure à celle d'une souche sauvage et que le phénotype ts peut être supprimé par *RPA190* en multicopie (gène encodant la sous-unité A190). Au vu de ces résultats, l'hypothèse émise est que A12.2 joue un rôle dans l'assemblage de la sous-unité A190 dans une structure stable de l'ARN polymérase I.

Les données de complémentation permettent maintenant de conclure que la thermosensibilité observée résultant d'une déstabilisation du complexe de l'ARN polymérase I, est à incriminer uniquement à la délétion du premier domaine de A12.2. Ces résultats confirment, de ce fait, un rôle à A12.2 dans la stabilisation de la polymérase.

Lors d'un crible double-hybride réalisé avec A12.2 (Flores *et al.*, 1999), un fragment de 1041 pb de A135 a été isolé. A135 est la seconde plus grande sous-unité de l'ARN polymérase I et le fragment pêché comporte les boîtes A et B conservées entre les paralogues A135, B150 et C128 et l'orthologue sous-unité β de *E. coli*. Le caractère "relevant" de cette interaction est conforté par différentes évidences de la littérature.

La première de ces évidences est la proximité topographique des sous-unités A12.2 et A135 au sein du complexe pol I. Ceci a été montré par une immunolocalisation de ces sous-unités au niveau du pouce de la polymérase (Klinger *et al.*, 1996). Pour cette immunolocalisation, l'épitope de A135 reconnu par l'anticorps est une partie de la séquence de A135 située juste en aval de la boîte B. L'anticorps a permis de localiser cet épitope près de la sous-unité A12.2, ce qui vient à l'appui de la donnée double-hybride.

La seconde évidence a été apportée par des expériences de reconstitution de l'ARN polymérase de *E. coli* à partir de sous-unités fractionnées (Severinov *et al.*, 1996). Les résultats obtenus montrent que, pour qu'une polymérase active soit reconstituée, le début de la sous-unité β comprenant la boîte B ne doit pas être fragmenté. Ceci tend à prouver que cette partie de la sous-unité est un domaine propre capable d'"autofolding". Par homologie, il est logique de penser que le fragment de A135 pêché est correctement foldé.

Nous avons donc décidé d'analyser l'interaction entre A12.2 et A135, l'approche a été menée par des tests double-hybride entre les domaines de A12.2 définis *in silico* et le fragment de la sous-unité A135. Les résultats obtenus ont montré que le premier domaine de A12.2, centré autour du premier doigt de zinc et conservé au niveau des paralogues B12.6 et C11, est suffisant pour l'interaction avec A135.

En conclusion, les évidences apportées par les approches de complémentation et de double-hybride, réalisées dans ce mémoire, confirment l'existence du premier domaine de A12.2, prédit *in silico*, et montrent que ce domaine est à la fois impliqué dans la complémentation du phénotype *ts* et dans l'interaction avec la seconde plus grande sous-unité de la polymérase (A135). Ces deux fonctions peuvent être corrélées afin de proposer une explication au phénotype *ts* observé lors de la délétion de la sous-unité A12.2 entière. Selon cette explication, la sous-unité A12.2 exerce un rôle dans la stabilisation de l'ensemble de l'ARN polymérase I via une interaction avec la sous-unité A135 de ce complexe. L'absence d'interaction, dans le mutant Δ A12.2, entre A12.2 et A135 dans le complexe Pol I, cause une déstabilisation de celui-ci qui se traduit par le phénotype thermosensible.

Les données que nous avons obtenus demandent à être intégrées dans l'ensemble des travaux qui se poursuivent pour comprendre les relations phylogéniques et fonctionnelles entre les différentes polymérases eucaryotes.

Ainsi, *in silico*, des domaines ont été proposés dans les sous-unités B12.6 et C11, paralogues de A12.2 respectivement dans pol II et pol III. Ces domaines ont été prédits par référence à la situation décrite pour A12.2.

Parallèlement à notre travail sur le mutant *ts* délété pour A12.2, des tests de complémentation ont été réalisés au laboratoire (Van Mullem *et al.*, 1999) dans la souche thermosensible et cryosensible délétée pour la sous-unité B12.6. Par la même approche que celle utilisée pour la sous-unité A12.2, quatre fragments de cette sous-unité ont été construits par délétions successives de la région 3'. Les résultats des tests en complémentation montrent que le premier domaine de B12.6 est suffisant pour restaurer la fonction touchée par la délétion de la sous-unité B12.6. Au vu de ces résultats, le caractère du premier domaine de B12.6 comprenant le premier doigt de zinc de cette sous-unité et ayant comme paralogues les sous-unités A12.2 et C11, a été confirmé.

Dans la polymérase III, l'approche utilisée pour caractériser la sous-unité C11 (paralogue de A12.2) a été la mutagenèse (Chédin *et al.*, 1998). La mutation ponctuelle des deux cystéines du second doigt de zinc a permis de montrer, par sa létalité, que le second domaine est essentiel à la polymérase. Le deuxième domaine de C11 proposé *in silico* est donc un domaine essentiel et fonctionnel. De plus, cette sous-unité est impliquée dans l'activité de clivage de l'ARN polymérase III et dans la terminaison de la transcription.

De même que pour A12.2, un crible double-hybride réalisé avec C11 (Flores *et al.*, 1999) a permis d'isoler un fragment de C128 homologue à celui de A135 pêché. Par homologie à l'immunolocalisation de A135 et A12.2 dans la polymérase I, une localisation de C128 et C11 a été suggérée au niveau du pouce de la pol III (Chédin *et al.*, 1998).

De l'ensemble de ces données se dégage l'idée d'une conservation sur le plan fonctionnel des paralogues A12.2, B12.6 et C11, dans les trois polymérases puisque le premier domaine de chaque sous-unité, comprenant le premier doigt de zinc, est suffisant à la fois pour compléter le phénotype *ts* de la souche nulle correspondante et pour l'interaction avec la seconde plus grande sous-unité de leur polymérase. Chaque paralogue aurait donc un rôle dans la stabilisation de la polymérase, à laquelle il appartient, via une interaction avec la seconde plus grande sous-unité.

Toutefois, il apparaît, pour le second domaine, que l'idée d'une conservation fonctionnelle ne peut être suggérée que entre A12.2 et B12.6. En effet, la délétion du second domaine de ces sous-unités, centré autour du second doigt de zinc et prédit *in silico* sur bases d'homologies à TFIIS, ne cause pas, dans la pol I et la pol II, de phénotype thermosensible pour la croissance alors que la mutation de deux résidus dans le second domaine de C11 est létale. On serait donc confronté pour le second domaine à deux systèmes différents : un où le second domaine n'est pas essentiel (cas de A12.2 et B12.6) et un second où ce domaine est essentiel (cas de C11). Cette observation suscite bien entendu la question de savoir la nature du rôle spécifique additionnel joué par C11 dans la seule ARN polymérase III des eucaryotes.

Afin de mettre en évidence, formellement, la fonction commune des trois sous-unités A12.2, B12.6 et C11, la détermination des domaines de B12.6 et de C11 suffisants pour l'interaction avec la seconde plus grande sous-unité de la polymérase, à laquelle ils appartiennent, est en cours. Les résultats permettront de désigner la mutagenèse ponctuelle, dans les domaines responsables, pour déterminer sans équivoque quels résidus sont nécessaires à la complémentation et/ou à l'interaction.

Le purification biochimique de la polymérase I privée de la sous-unité A12.2, devrait permettre d'établir si d'autres interactions avec d'autres sous-unités existent entre A12.2 et la polymérase I.

*Matériel et
Méthodes*

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel.

1.1. Les tampons.

Tampon de ligation 5x (Gibco BRL):

TrisHCl	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
ATP	1 mM

Tampon marqueur de taille :

Tris	10 mM
NaCl	5 mM
EDTA	0.1 mM

Tampon N2 (Nucleobond):

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

Tampon N3 (Nucleobond):

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

Tampon N5 (Nucleobond):

Tris / H ₃ PO ₄	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1 M
pH 6.3	

Tampon P1 + RNase (Qiagen):

TrisHCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml
Ajuster à pH 8.0 avec HCl 1N et stocker à 4°C	

Tampon P2 (Qiagen):

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Tampon de la Cloned *Pfu* turbo DNA polymerase (Startagene) :

TrisHCl pH 8.8	200 mM
MgSO ₄	20 mM
KCl	100 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
Triton [®] X-100	1 %
Nuclease-free BSA	1 mg/ml

Tampons de restriction 10x (BRL): à conserver à -20°C

Composition	Les différents tampons									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TrisHCl	50	50	50	20	10	50	50	20	*	100
MgCl ₂	10	10	10	5	8	6	10	10	**	10
NaCl	-	50	100	-	-	50	50	-	-	150
KCl	-	-	-	50	-	50	50	-	***	-
PH	8	8	8	7.4	8.2	7.4	8	7.4	7.9	7.6

* 20 mM tris-acétate

** 10 mM Mg-acétate

*** 50 mM K-acétate

Tableau M1: Composition des différents tampons de restriction.**Tampon S1 (Nucleobond):** à conserver à 4°C

TrisHCl pH 8.0	50 mM
EDTA pH 8.0	10 mM

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

Tampon S2 (Nucleobond):

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Tampon S3 (Nucleobond):

KAc pH 5.2	2.8 M
------------	-------

Tampon TAE 1x (pour 1 l):

Tris	4,84 g
HAc	1.15 ml
EDTA 0,5 M	2 ml
Porter à volume avec de l'eau distillée.	

Terminator Ready reaction Mix:

- A-Dye terminator.
- C-Dye terminator.
- G-Dye terminator.
- T-Dye terminator.
- dITP, dATP, dCTP, dTTP.
- Tris-HCl pH 9.
- MgCl₂.
- Pyrophosphatase thermostable.
- AmpliTaq DNA Polymérase, FS.

Tampon de chargement du séquençage automatique:

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

Tampon K-PO₄ 1 M pH 7 :

- Préparer K₂HPO₄ 1 M soit 87.09 g de K₂HPO₄ complété à 500 ml avec de l'eau distillée.
- Préparer KH₂PO₄ 1 M soit 68.045 g de KH₂PO₄ complété à 500 ml avec de l'eau distillée.
- Stériliser les deux solutions précédentes par filtration sur millipore 0.45 µm.
- Pour obtenir du tampon K-PO₄ 1 M pH 7 mélanger :
 - 61.5 ml de K₂HPO₄
 - 38.5 ml de KH₂PO₄

1.2. Les solutions.

Agarose (BRL): quantité nécessaire pour obtenir le pourcentage voulu dans du TAE 1x.

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

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm.

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

Solution de 3AT 2 M (3-aminotriazol (Sigma)) :

- Dissoudre 8.4 g de 3AT dans 50 ml d'eau distillée.
- Stériliser par filtration sur filtre millipore 0.22 µm.
- Stocker à 4°C.

Solution stock de bromure d'éthidium: 10 mg/ml dans de l'eau.

Solution d'alourdisseur/colorant:

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

Solution de fixateur (pour gel de séquençage):

Acide acétique	10%
Méthanol	10%

RNase A (Boehringer): 10 mg/ml.

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

SOC:

Bactotryptone	2%
Yeast Extract	0,5%
NaCl	10 mM
Kcl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM

Après autoclavage, ajouter 10 mM de MgSO₄ (solution 1 M filtrée).

Lithium acétate 1 M :

LiAc 10.2 g

Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et autoclaver

Polyéthylène glycol (4000) 50 % :

PEG 4000 50 g

Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée, agiter avec une puce magnétique tout en chauffant et autoclaver.

Solutions d'acides aminés :

Quantité en g / 100 ml H ₂ O	Acide aminé
0.2	Adénine sulfate
0.2	Histidine HCl
0.3	L-leucine
0.2	L-tryptophane
0.2	Uracile

Autoclaver les solutions.

2. Méthodes.

2.1. Souches et plasmides.

2.1.1. Souche de bactéries.

La souche utilisée au cours de ce mémoire est la souche bactérienne DH 10B : *F^r mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi80dlacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara,leu)7697$, *galU*, *galK*, λ , *rspL*, *nupG*

Cette souche possède des caractéristiques intéressantes :

- *recA1* réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène,
- *endA1* améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique en diminuant le taux d'endonucléase,
- Δlac est une délétion de l'opéron lactose qui la rend incapable de métaboliser le lactose.

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

2.1.2. Souche de levures.

Nom de la souche	Génotype
YPH 500	MAT α <i>ade2-101 uaa lys2-801 uag ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
SL9-6b	MAT α <i>ade2-101 lys2-801 ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 rpa12-Δ : :LEU2</i>
Y190	MAT α <i>gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-102 + URA3 : :gal \rightarrow lacZ, LYS2 : :GAL(UAS) \rightarrow HIS3 cyh^r</i>

Tableau M2 : Génotypes des différents souches utilisées pour le mémoire.

La souche SL9-6b a été obtenue par une transformation intégrative de YPH500 avec le fragment *rpa12- Δ : :LEU2*. Cette souche présente un phénotype thermosensible létal à 34°C et une croissance ralentie à 30°C. Cette souche a été utilisée pour tester les constructions des différents fragments du gène *RPA12* en complément.

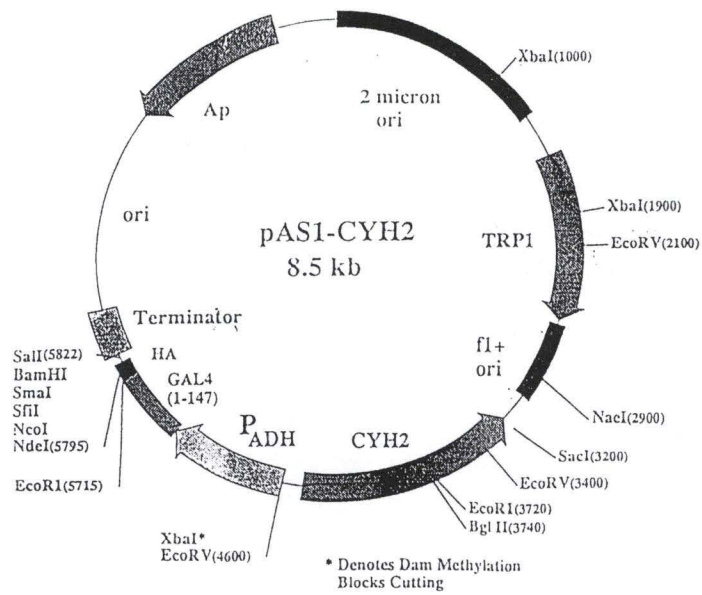


Figure M1: Le plasmide pAS-CYH2.

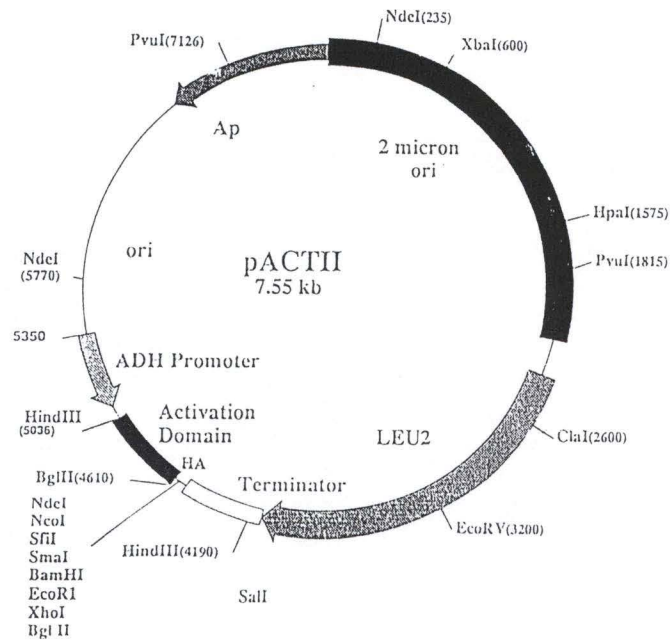


Figure M2: La plasmide pACTII.

La souche Y190 est la souche utilisée en double-hybride et portant deux gènes rapporteurs : *lacZ* et *HIS3* sous le contrôle d'un promoteur GAL4. Cette souche a été utilisée comme souche teste en double-hybride.

2.1.3. Plasmides.

2.1.3.1. Le plasmide pCM185 :

Ce plasmide centromérique possède les gènes de *E.coli* : tetR-VP16 et Amp, le gène de levure : *TRP1* et le promoteur tetO₇. L'élément ptetO₇ est suivi du promoteur CYC1, d'un polylinker *Bam*HI-*Pme*I-*Stu*I-*Hpa*I-*Cla*I-*Not*I-*Sfi*I-*Apa*I-*Pst*I et d'un terminateur CYC1.

Il s'agit d'un vecteur d'expression qui a la particularité de posséder un promoteur régulable par des concentrations en tétracycline. Ce promoteur est un promoteur de force « moyenne » chez la levure.

Ce vecteur a été utilisé pour cloner les différents fragments du gène *RPA12*.

2.1.3.2. Le plasmide pAS-CYH2 :

Ce plasmide multicopie (figure M1) possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *TRP1*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine de liaison à l'ADN de GAL4, suivi en aval par un polylinker permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine de liaison à l'ADN de GAL4.

2.1.3.3. Le plasmide pACTII :

Ce plasmide multicopie (figure M2) possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *LEU2*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine d'activation de GAL4, suivi en aval d'un polylinker permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine d'activation de GAL4.

Une banque génomique de levure composée de fragments d'une taille moyenne de 700 pb a été clonée au niveau du polylinker afin de générer des fusions utilisées en double-hybride.

2.2. Milieux de culture.

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

2.2.1. Milieux de culture bactérien.

2.2.1.1. Milieu LB Liquide.

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

Porter à volume avec de l'eau distillée.

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

2.2.1.2. Milieu LB solide.

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

Porter à volume avec de l'eau distillée.

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

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

2.2.2. Milieux de culture levurien.

2.2.2.1. Milieu YPD liquide.

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

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

2.2.2.2. Milieu YPD solide.

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

2.2.2.3. Milieu minimum.

Yeast Nitrogen base sans acide aminé et sans ammonium sulfate	1,75 g/l
Ammonium sulfate	5,1 g/l
Glucose	20 g/l

Si milieu minimum solide, ajouter:

Agar	20 g/l
------	--------

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

2.2.2.4. Milieu synthétique.

Le milieu synthétique est réalisé en ajoutant divers acides aminés et/ou bases azotées au milieu minimum.

Un mix des composants du milieu synthétique sans adénine, sans uracile, sans tryptophane, sans histidine et sans leucine est préparé en mélangeant les différents constituants résumés dans le tableau suivant :

Produit	Quantité
Yeast nitrogen base (sans acide aminé et sans ammonium sulfate)	25 g
Ammonium sulfate	72.3 g
L-arginine sulfate	0.3 g
L-isoleucine	0.45 g
L-lysine-HCl	0.45 g
L-méthionine	0.3 g
L-phénylalanine	0.75 g
L-tyrosine	0.45 g
L-valine	2.25 g

Tableau M3 : Composants du mix pour les milieux synthétiques levuriens

En pratique :

Mélanger :

- 2.92 g de mix de milieu synthétique
- 8 g de glucose
- et si le milieu est solide :
- 8 g d'agar

Compléter le volume à 400 ml avec de l'eau et autoclaver.

Ajouter ensuite 1 ml par 100 ml de milieu des solutions d'acide aminé décrites dans le chapitre 1.1. de ce Matériel et Méthodes pour obtenir le milieu synthétique désiré.

Couler le milieu synthétique solide dans des boîtes de Pétri et conservé à 4°C.

Si un milieu synthétique contient tout les constituants du tableau et tout les acides aminés en solution, il est appelé milieu synthétique complet.

2.2.2.5. Milieu synthétique + 3-aminotriazol (3AT).

- Préparer dans une bouteille de 400 ml milieu synthétique solide contenant tout les composants et les acides aminés sauf l'histidine.

- Autoclaver et laisser refroidir mais pas solidifier à 55-65°C.

- Ajouter la quantité de 3AT 2 M liquide nécessaire pour obtenir la concentration finale voulue. Les concentrations utilisées sont généralement 10 mM, 25 mM et 50 mM.

Couler le milieu dans des boites de Pétri et conserver à 4°C.

2.3. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.

2.3.1. Transformation de bactéries.

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

La transformation des bactéries a été faite par électroporation.

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

Cette méthode donne en conditions optimales entre 10^8 et 10^9 transformants par microgramme de plasmide, soit un rendement de 100 à 1000 fois supérieur à celui de la méthode au CaCl_2 (non décrite dans ce mémoire) qui permet également de transformer des bactéries.

Préparation de cellules électrocompétentes:

- Réaliser une préculture dans 5-10 ml de LB.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Inoculer 1 l de LB avec la préculture.
- Laisser pousser à 37°C avec agitation jusqu'à une DO comprise entre 0,5 et 0,8 (mesurée à 600 nm).

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

- Centrifuger 15 min. à 4000 rpm à froid (4°C).
- Retirer tout le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1 volume d'eau froide stérile.
- Centrifuger 15 min. à 4000 rpm à froid.
- Resuspendre le culot dans 1/2 volume d'eau froide stérile.
- Centrifuger 15 min. à 4000 rpm à froid.
- Resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10% froid.
- Centrifuger 15 min. à 4000 rpm à froid.
- Resuspendre le culot dans 2 ml de glycérol 10% froid.
- Aliquoter et stocker à -80°C.

L'électroporation

- laisser dégeler un aliquot de cellules du stock à -80°C sur glace.
- placer les cuvettes d'électroporation stériles sur glace.
- mélanger dans un Eppendorf 40-100 μl de cellules avec 0.1-10 μg d'ADN.
- transférer le mélange dans la cuvette d'électroporation et laisser sur glace 5 minutes.
- régler l'appareil (Gene Pulser) sur 25 μF ; 2,0 kV et 200 Ω .
- placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer.
- ajouter immédiatement après 1 ml de SOC ou de LB.
- transférer dans un Eppendorf et laisser 1 h à 37°C .
- étaler sur milieu sélectif.

Quelques précisions sur le réglage de l'électroporateur:

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

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

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

2.3.2. Mise en collection de *E. coli*.

La mise en collection des souches permet de conserver la souche à long terme.

En pratique :

Mélanger 1.8 ml de la culture à mettre en collection avec 125 μl de DMSO (diméthyl sulfoxyde) dans un tube de 2 ml possédant un bouchon à vis.

Placer les tubes de mise en collection à -80°C .

2.4. Techniques relatives à l'utilisation de levures.

2.4.1. Transformation de levures.

Il existe différentes méthodes de transformation de levures. Dans le cadre de ce mémoire, seule la méthode au LiAc a été utilisée. Le but de la transformation est de faire entrer dans les cellules de l'ADN exogène (plasmide).

En pratique :

- Inoculer 50 ml de milieu liquide (YPD ou milieu synthétique liquide suivant la souche).
- Incuber sous agitation afin d'atteindre une DO comprise entre 0.6 et 1.
- Culoter les cellules en centrifugeant 5 minutes à 5000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 25 ml d'eau stérile et centrifuger 5 minutes à 5000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de LiAc 100 mM et transférer le tout dans un tube de 1.5 ml.
- Réaliser un top speed de 15 secondes et retirer le LiAc.
- Resuspendre le culot dans 400 µl de LiAc 100 mM.
- Faire bouillir du SS-DNA (ADN de sperme de saumon) pendant 5 minutes.
- Vortexer les cellules et prélever 50 µl par transformation.
- Centrifuger et retirer le surnageant.
- Ajouter dans l'ordre :
 - 240 µl de PEG 50 %,
 - 36 µl de LiAc 1 M,
 - 25 µl de SS-DNA,
 - 50 µl d'eau + plasmide (0.1 à 10 µg).
- Vortexer chaque tube jusqu'à resuspension du culot.
- Incuber 30 minutes à 30°C.
- Choc thermique à 42°C pendant 20-25 minutes.
- Centrifuger à 6-8000 rpm pendant 15 secondes et retirer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1 ml d'eau distillée stérile.
- Déposer 2 à 200 µl sur milieu sélectif.

2.4.2. Coloration X-GAL.

La coloration X-GAL des levures permet de quantifier l'activité β -galactosidase de la souche, c'est-à-dire indirectement la transactivation de la transcription du gène *lacZ* de l'opéron lactose.

En pratique :

Pour une boîte :

- Préchauffer le bain marie à 50°C.
- Préparer 5 ml d'agarose 1% dans de l'eau.
- Refroidir l'agarose à 50 °C.
- Préchauffer 5 ml de tampon K-PO₄ pH 7 1 M à 50°C.
- Mélanger l'agarose et le tampon K-PO₄ pH 7 1 M.
- Ajouter 0.05 ml de SDS 10 % et mélanger.
- Ajouter 0.25 ml de NN'diméthylformamide (DMF) et mélanger en gardant toujours le mélange à 50°C.
- Ajouter 0.1 ml de la solution XGAL 2 % dans DMF au mélange.
- Mélanger le tout et verser sur la boîte en évitant de passer avec la pipetteau dessus des colonies.
- Attendre 5 minutes que le mélange se solidifie.
- Incuber à 30°C over night.

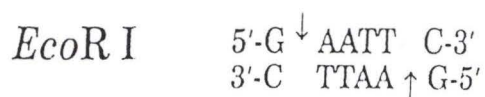
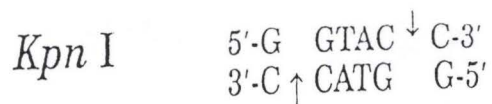
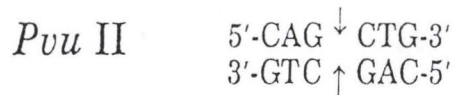


Figure M3: Trois types d'enzymes de restriction.

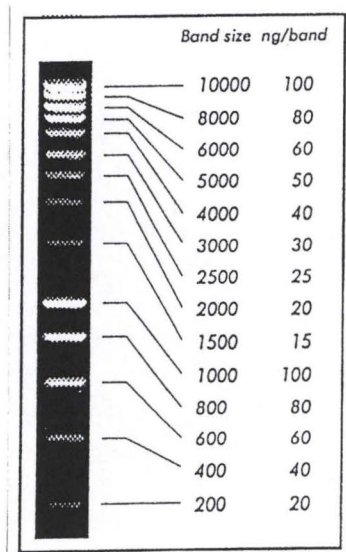


Figure M4: le marqueur de taille et de masse.

2.5. Techniques relatives à l'ADN.

2.5.1. Construction plasmidique.

2.5.1.1. Restriction d'ADN.

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

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

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

En pratique:

Mélanger dans un Eppendorf:

- l'ADN à restreindre.
- 1/10 du volume de tampon 10x.
- 1 unité d'enzyme par μg d'ADN à restreindre.
- Porter à volume avec de l'eau distillée.
- Incuber 1h30 à température spécifique (généralement 37°C).
- Inactiver l'enzyme par chauffage (15 min. à 65°C) ou par extraction au phénol.

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

Remarque: L'ADN peut être restreint par plusieurs enzymes en même temps si celles-ci fonctionnent dans un tampon de restriction commun. La composition des différents tampons de restriction se trouve au point 1.1. de ce chapitre.

2.5.1.2. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

Cette technique permet :

- De séparer des fragments d'ADN de tailles différentes (dans un but diagnostique ou de purification).
- D'estimer la taille de fragment d'ADN via un marqueur de taille (Figure M4).
- D'estimer la concentration d'ADN via un marqueur de masse (Figure M4).

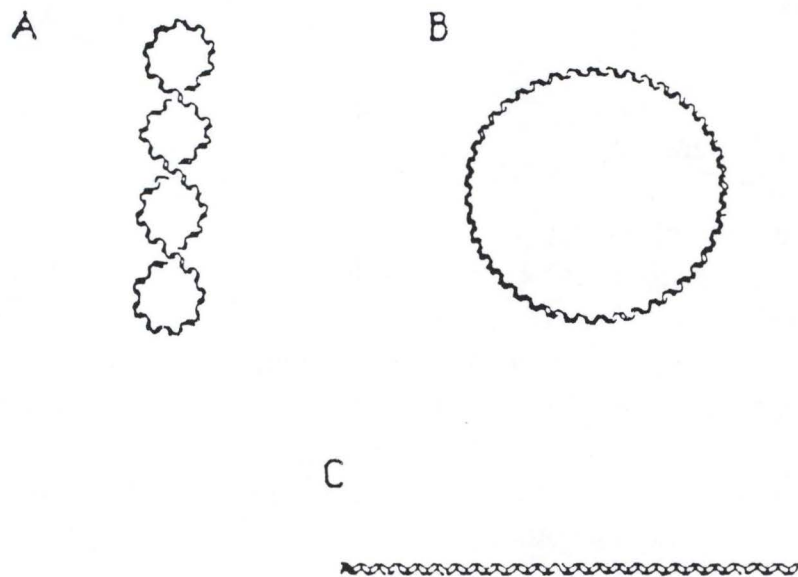


Figure M5: Les trois conformation de l'ADN.

A: Forme CCC

B: Forme OC

C: Forme OL

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

- a) Le poids moléculaire des fragments d'ADN: il existe une relation inversement proportionnelle entre la vitesse de migration et le poids moléculaire d'un fragment d'ADN.
- b) La conformation de l'ADN. Un même plasmide peut prendre différentes conformations (Figure M5). La forme plasmidique superenroulée ou CCC (Covalently Closed Circular) migre plus vite que les formes OL (Open Linear) et OC (Open Circular).
- c) La concentration en agarose. Il y a une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité électrophorétique de l'ADN (μ) et la concentration de gel (τ). Cette relation est décrite par l'équation suivante:

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

où μ_0 est la mobilité électrophorétique libre et K_r le coefficient de retard (constante dépendant des propriétés du gel et de la taille de l'ADN).

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

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

- d) Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est directement proportionnelle au voltage appliqué.
- e) La composition du tampon d'électrophorèse. La mobilité électrophorétique de l'ADN est affectée par la composition et la force ionique du tampon d'électrophorèse. En l'absence d'ions, la conductivité électrique est minimale et l'ADN migre plus lentement. Néanmoins, une forte concentration ionique peut entraîner une conductivité électrique si importante qu'il peut se produire une forte

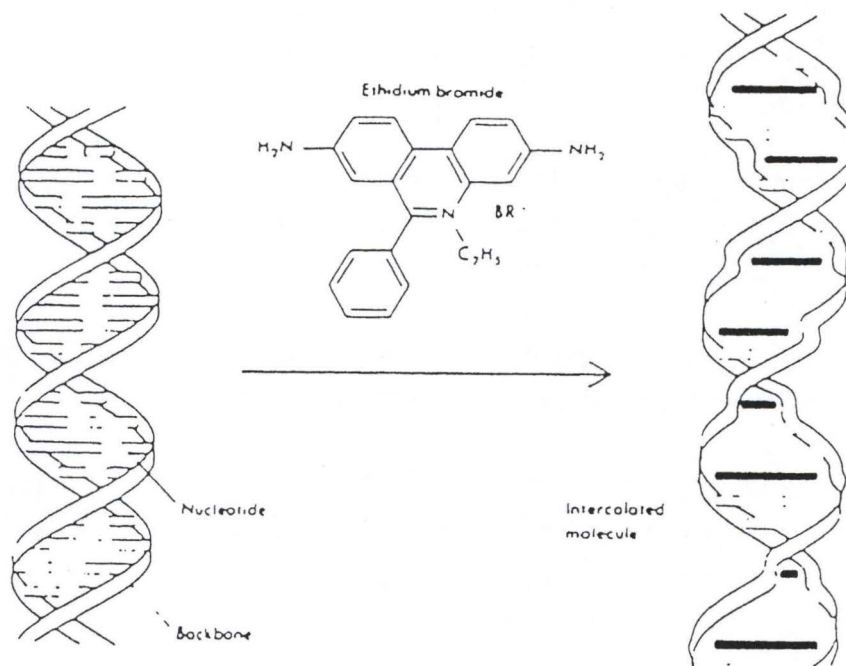


Figure M6: Schéma de fixation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN.

augmentation de température dans le gel, ce qui peut entraîner une dénaturation de l'ADN.

Pour visualiser les bandes d'ADN, il est nécessaire de mélanger du bromure d'éthidium au gel d'agarose. Le bromure d'éthidium est une molécule fluorescente qui s'intercale entre les deux brins des molécules d'ADN (Figure M6) et permet ainsi de repérer l'ADN sous U.V. (à 302 nm). Il est à noter qu'il est possible de photographier le gel d'agarose sous U.V.

En pratique:

- Dissoudre en chauffant une quantité appropriée d'agarose dans du tampon TAE.
- Ajouter 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium.
- Couler le gel dans un support plexiglas.
- Ajouter un ou deux peignes pour former des puits dans le gel.
- Laisser le gel polymériser.
- Enlever les peignes et démouler le gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Immerger complètement le gel dans du tampon TAE.
- Placer les échantillons alourdis par du bleu de bromophénol (solution d'alourdisseur/colorant) à raison de 1/10 du volume final dans les puits.
- Charger également dans un ou plusieurs puits un marqueur de taille (ou de masse) approprié.
- Laisser migrer.
- Il est recommandé de ne pas migrer à un voltage supérieur à 100 Volts pour avoir une bonne séparation des différentes bandes d'ADN.
- Visualiser les bandes d'ADN sous U.V.

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

2.5.1.3. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose.

Au cours de ce mémoire, le kit d'extraction d'ADN utilisé est le Kit DNA Extraction Kit (MIB Fermentas). Le principe d'extraction est le suivant :

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

DNA Extraction Kit (MBI Fermentas)

- Découper la bande d'ADN du gel d'agarose.
- Peser cette bande et ajouter 3 volumes de NaI.

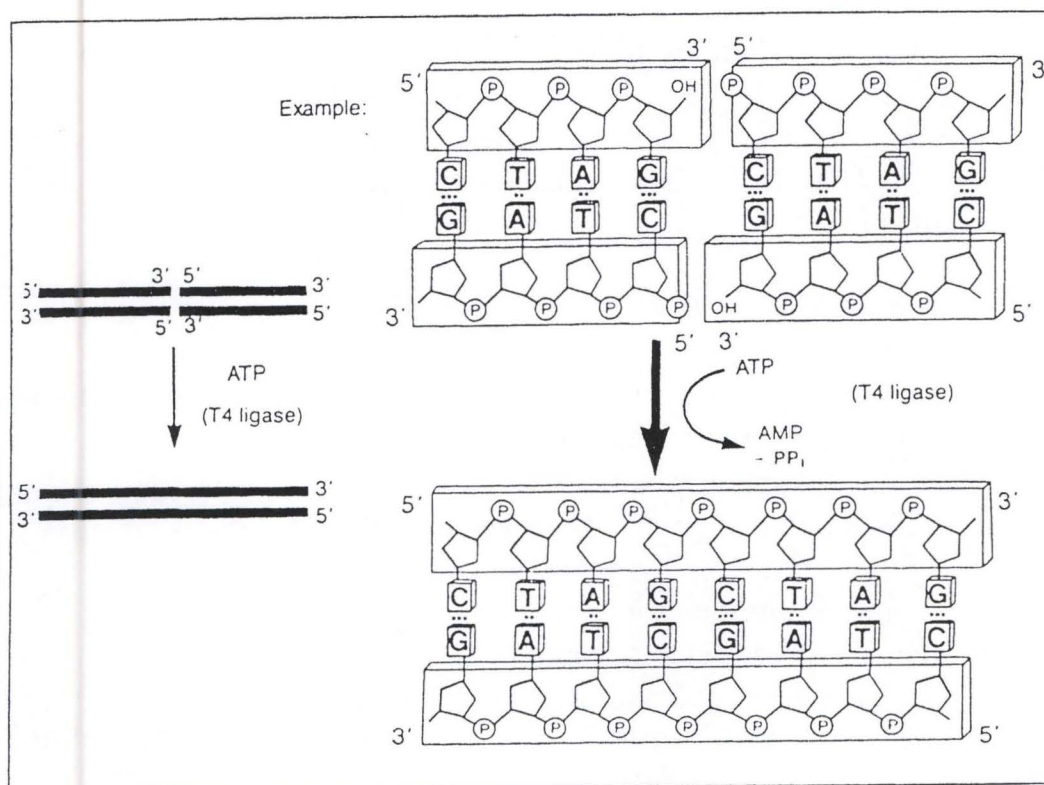


Figure M7: Activité de la T4 DNA ligase sur des bouts francs.

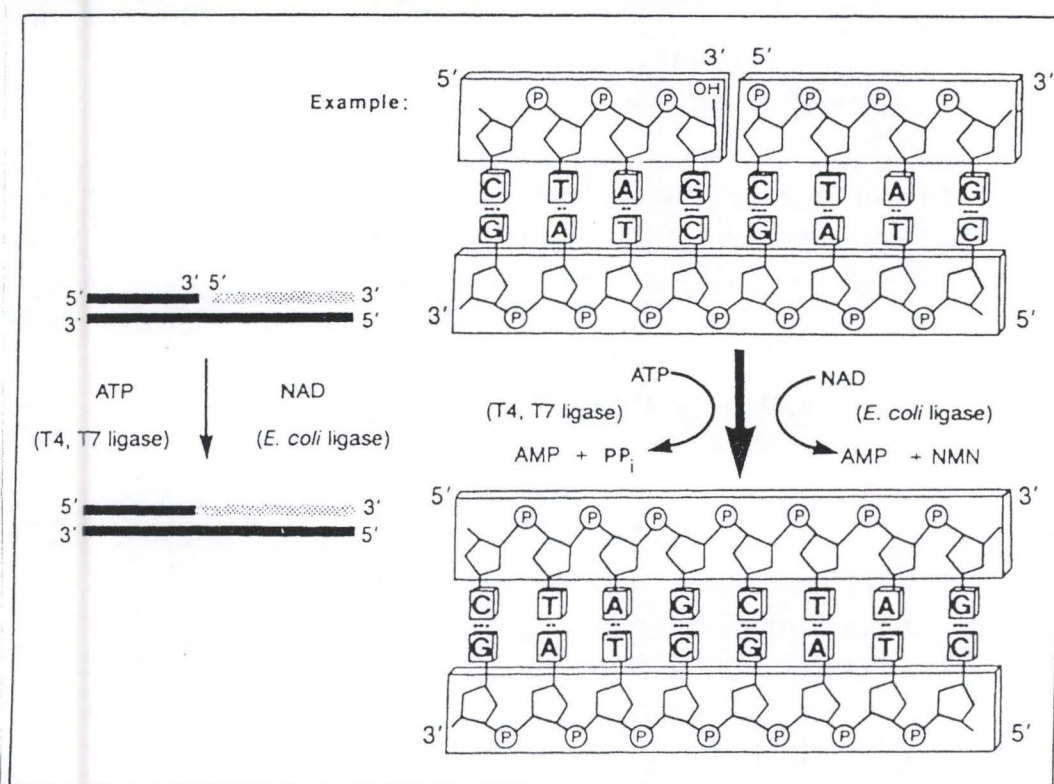


Figure M8: Activité de la T4 DNA ligase dans la réparation de l'ADN.

- Laisser 5 min. à une température de 55°C tout en secouant les tubes toutes les 2 minutes.
- Agiter ou vortexer la suspension de billes de silice.
- Ajouter 5 µl de la suspension de billes de silice.
- Si la quantité d'ADN à récupérer est supérieure à 5 µg, il est recommandé d'ajouter 1 µl de la suspension de billes de silice par 0,5 µg d'ADN au dessus de 5 µg.
- Agiter les tubes.
- Incuber pendant 10 min. à 55°C en mélangeant régulièrement.
- Centrifuger quelques secondes à 13000 rpm et décanter.
- Laver 2 fois le culot avec 500 µl de la solution de Wash Buffer, décanter.
- Resuspendre le culot dans un volume approprié d'eau distillée.
- Incuber 5 min. à une température de 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.

2.5.1.4. Ligation.

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

Cette enzyme permet donc:

- de lier deux extrémités d'ADN, ces extrémités pouvant être à bouts protrudants ou à bouts francs (Figure M7).
- de réparer des cassures éventuelles de l'ADN (Figure M8).

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

En pratique:

Mélanger dans un Eppendorf:

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

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

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

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

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

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

2.5.1.5. Préparation d'ADN plasmidique.

2.5.1.5.1. Minipréparation d'ADN plasmidique.

Cette méthode a pour but l'extraction rapide d'une petite quantité d'ADN plasmidique (1-7µg) afin, par exemple, de réaliser une restriction diagnostique.

La minipréparation se divise en quatre étapes:

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

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

En pratique:

- Inoculer 5-10 ml de milieu LB (+ antibiotique) avec une colonie de bactéries transformantes.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de culture à 5000 rpm pendant 5 minutes.
- Décanter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 300 µl de tampon S1 + RNase.

- Ajouter 300 µl de tampon P2 (lyse alcaline) et mélanger doucement.
- Incuber 5 min. sur table.
- Ajouter 300 µl de tampon P3 et mélanger doucement.
- Centrifuger 15 min. à 13000 rpm à 4°C.
- Récupérer le surnageant.
- Ajouter 700 µl d'isopropanol (précipitation de l'ADN plasmidique).
- Centrifuger 15 min. à 13000 rpm.
- Décanter le surnageant.
- Laver le culot à l'éthanol 70%.
- Sécher le culot sous vide au Speedvac.
- Resuspendre l'ADN dans un volume approprié d'eau.

2.5.1.5.2. Minipréparation (QIAprep Spin Miniprep Kit – QIAGEN).

Cette méthode utilise les mêmes principes de lyse alcaline et précipitation que la minipréparation à la seule différence que dans ce cas, l'ADN est purifié par passage sur colonne. Elle a permis donc une extraction rapide d'une quantité d'ADN plasmidique de 10 µg.

Ce Kit permet en plus d'obtenir une solution d'ADN plasmidique de meilleure qualité, ce qui est nécessaire s'il faut réaliser sur cet ADN des réactions de séquençage.

En pratique :

- Inoculer 5-10 ml de milieu LB (+ antibiotique) avec une colonie de bactéries transformantes.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de culture à 5000 rpm pendant 5 minutes.
- Décanter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 250 µl de tampon P1 + RNase.
- Ajouter 250 µl de tampon P2 (lyse alcaline) et mélanger en retournant 6-8 fois les tubes.
- Ajouter 350 µl de tampon N3 et mélanger en retournant 6-8 fois les tubes.
- Centrifuger 10 min. full speed.
- Placer les colonnes du kit sur les tubes de 2 ml prévus à cet effet.
- Déposer le surnageant sur la colonne.
- Centrifuger 30-60 sec. full speed.
- Ajouter 0.75 ml de tampon PE.
- Centrifuger 30-60 sec. full speed.
- Centrifuger 30-60 sec. la colonne à vide à full speed.
- Placer la colonne sur un microtube propre et ajouter 50 µl d'eau.
- Incuber 1 min. à température ambiante.
- Centrifuger 1 min. à full speed.

Les solutions d'ADN plasmidiques ainsi obtenues se conservent à -20°C.

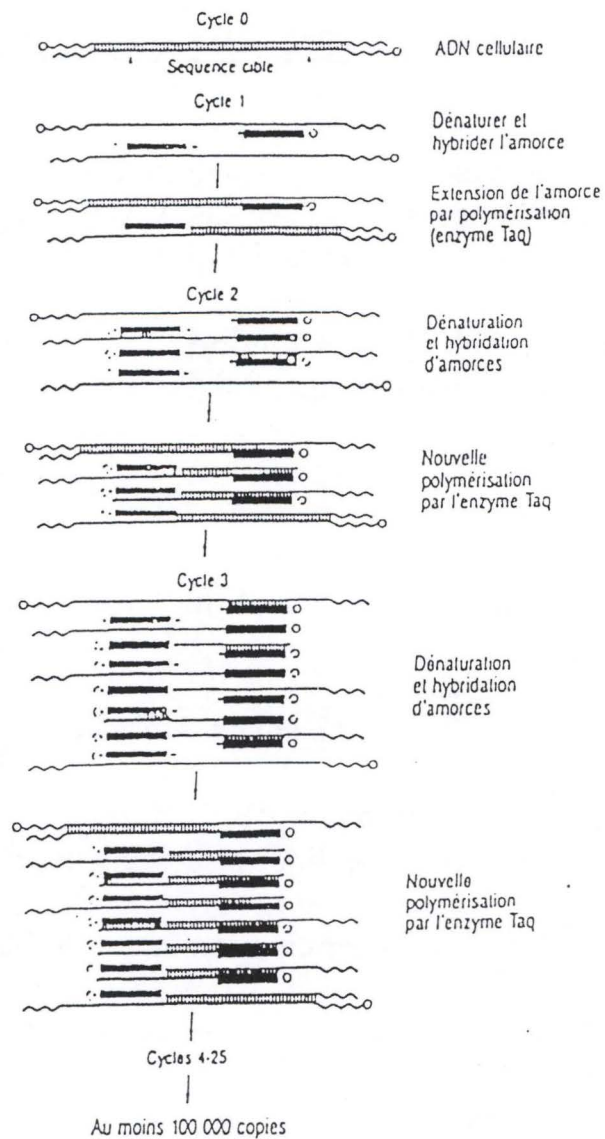


Figure M9: Principe de la réaction PCR.

2.5.1.5.3. Midipréparation (NUCLEOBOND AX100).

Cette méthode est basée sur le même principe que les minipréparations par le Kit Qiagen. La différence entre les deux est que pour ces midipréparations la quantité peut aller jusqu'à 100 µg de plasmide récupéré.

En pratique:

- Inoculer 200 ml de LB (+ antibiotique) avec une colonie de bactérie ou une préculture.
- Incuber une nuit à 37°C avec agitation.
- Transférer la culture dans une bouteille Sorvall 250 ml.
- Centrifuger 5 min. à 5000 rpm.
- Décantier le surnageant.
- Resuspendre le culot dans un corex 30 avec 4 ml de S1 RNase.
- Ajouter 4 ml de tampon S2 et mélanger.
- Incuber 5 min. à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de tampon S3 et mélanger.
- Laisser 5-10 min. sur glace.
- Centrifuger 30 min. à 13000 rpm.
- Récupérer le surnageant dans un corex 30 ml et recentrifuger si le surnageant n'est pas clair.
- Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2.
- Ajouter le surnageant à purifier.
- Ajouter 2 x 4 ml de tampon N3 pour laver.
- Eluer l'ADN avec 2 ml de tampon N5.
- (l'ADN élué est récupéré dans un corex 15 ml)
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol.
- Centrifuger 30 min. à 13000 rpm.
- Décantier le surnageant.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 70% froid pour laver le culot.
- Centrifuger 5 min. à 13000 rpm.
- Décantier le surnageant.
- Sécher sous vide.
- Resuspendre dans un volume approprié d'eau.

2.5.1.6. La Polymerase Chain Reaction (PCR).

2.5.1.6.1. Principe général.

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

L'ADN à amplifier, aussi appelé "ADN template", est d'abord dénaturé par chauffage en présence d'un large excès molaire de chacun des deux oligonucléotides et des quatre dNTP. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à une température qui permet aux primers de s'hybrider à leur séquence cible. Cette température est appelée température de melting. Le mélange est ensuite amené à une température propice à la réaction de polymérisation; cette température est en règle générale située aux alentours de 72°C. Ce cycle (Figure M9) de dénaturation, d'hybridation et de synthèse de l'ADN est répété plusieurs fois. De cette façon, les produits d'un cycle d'amplification servent de matrices aux amplifications suivantes. Le produit majeur de cette réaction exponentielle est un segment d'ADN double brin dont les extrémités sont définies par les extrémités 5' des deux primers et dont la longueur est définie par la distance séparant ces deux primers.

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

2.5.1.6.2. Les paramètres et réactifs utilisés.

Les oligonucléotides:

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

Les enzymes:

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

- La Taq DNA Polymérase:

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

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

- La Pfu turbo DNA polymérase :

Contrairement à la Taq DNA Polymérase, cette enzyme possède une activité exonucléase 3'-5', ce qui lui confère une activité « proofreading ». On estime que cette enzyme a une fréquence de mutation de 1.3×10^{-6} par paire de base par duplication.

De plus cette polymérase est thermiquement très stable puisqu'elle conserve 94-99 % de son activité après une heure à 95°C.

Remarque:

Pour l'amplification de grands fragments (< 20 Kb), d'autres enzymes sont disponibles sur le marché.

Les dNTP:

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

Le tampon:

Le tampon standard contient:

KCl	50 mM
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	1,5-2 mM

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

L'Hybridation des primers:

La température et la durée requise pour l'hybridation des amorces dépend de leur composition nucléotidique, de leur longueur et de leur concentration. Pratiquement, on applique une température d'annealing de 5°C inférieure à la température de melting (T_m) des primers. La température de melting se calcule en règle générale par la

formule: $T_m = (4^\circ\text{C} \times \text{le nombre de nucléotides GC}) + (2^\circ\text{C} \times \text{le nombre de nucléotides AT})$.

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

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

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

En pratique:

Pour la Taq DNA Polymérase:

Placer dans un tube PCR:

<u>Composants</u>	<u>Volume</u>	<u>[] finale</u>
MgCl ₂ 50 mM	4 μl	2 mM
Tampon PCR 10x	10 μl	1x
Mix dNTPs 10 mM	2 μl	0,2 mM chacun
Détergent W-1 1%	5 μl	0,05 %
Primer 5'	x μl	0,5 μM
Primer 3'	x μl	0,5 μM
ADN matrice	x μl	10 ng -1 μg
Taq Polymerase	0,4 μl	1 U

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

Remarque : on peut se dispenser de l'huile si on utilise un appareil PCR avec un couvercle chauffant.

Réaliser le cycle suivant:

Dénaturation 2-3 minutes à 94°C

Dénaturation 1-5 minutes à 94°C

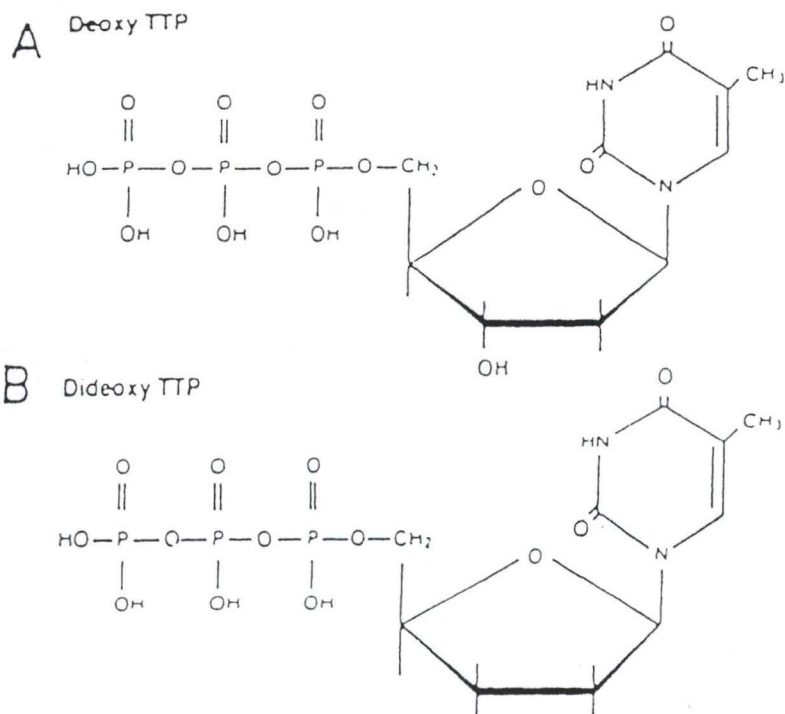


Figure M10:

A: Structure d'un déoxyribonucléotide.

B: Structure d'un didéoxyribonucléotide.

Hybridation 2 minutes (50 à 65°C)
Elongation 2 minutes (ou plus) à 72°C
Terminaison 10 minutes à 72°C

Réaliser 25 – 45 fois le cycle.

Pour la Pfu turbo DNA Polymérase:

Placer dans un tube PCR:

<u>Composants</u>	<u>Volume</u>	<u>[] finale</u>
Tampon PCR 10x	5 µl	1x
Mix dNTPs 5 mM	4 µl	20 pM
Primer 5'	x µl	100 pM
Primer 3'	x µl	100 pM
ADN matrice	x µl	300 ng -1 µg
Pfu Polymerase	2 µl	5 U

Porter à un volume de 50 µl avec de l'eau stérile. Ajouter environ 50 µl d'huile PCR dans le tube si l'appareil à PCR ne possède pas de couvercle chauffant.

Les cycles sont identiques que pour la Taq DNA Polymérase.

2.5.2. Le Séquençage.

2.5.2.1. Principe du séquençage.

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

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

L'incorporation au hasard dans la chaîne naissante d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP), un analogue de désoxyribonucléotide ne possédant pas de groupements hydroxyle en 3' (Figure M10), interrompt l'élongation. Statistiquement la terminaison se produira au moins une fois en chaque point (Figure M11).

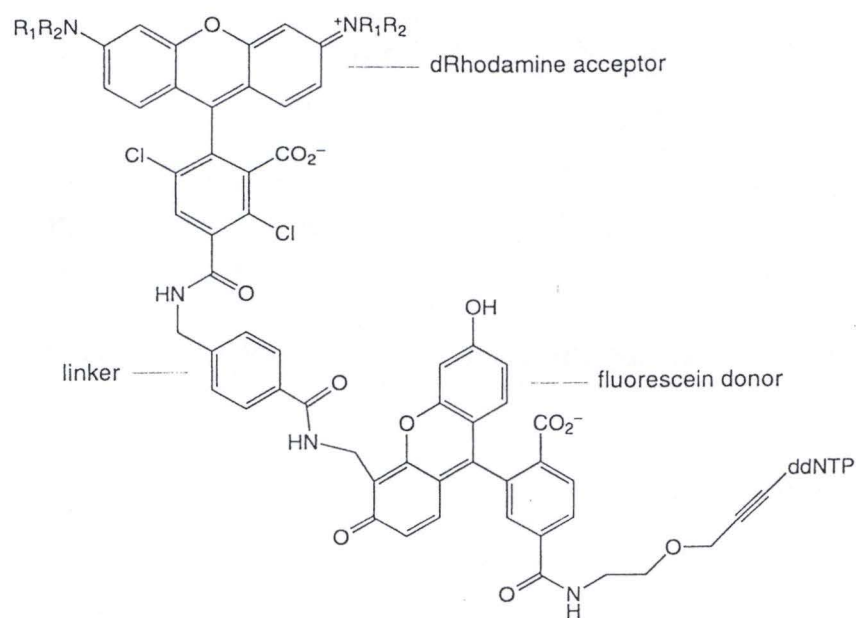


Figure M12: Structure générale des BigDye Terminators.

Quatre tampons d'élongation sont utilisés. Ils contiennent les quatre désoxyribonucléotides usuels (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dont un est marqué radioactivement ($[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP). Par contre, ils ne contiennent qu'un des quatre didésoxyribonucléotides.

Chacun des quatre tubes réactionnels contient en fin de réaction une population de fragments de taille variable. La taille de ces fragments permet de déterminer la position à laquelle s'est incorporé le ddNTP dans la chaîne en élongation et donc la position de la base complémentaire dans le brin que l'on a séquencé (Figure M11).

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

2.5.2.2. Le Séquençage automatique.

Le séquençage automatique, comme le séquençage manuel, est basé sur la méthode des terminateurs de chaînes (Sanger *et al*, 1977). Dans ce cas néanmoins, les terminateurs de chaînes ("BigDye-terminators") sont marqués par une molécule fluorescente qui, une fois excitée par un laser, émet un rayonnement d'une longueur d'onde précise. La figure M12 présente la structure général des BigDye terminators. Chacune des quatres bases (A, C, G, T) est marquée par une molécule différente (tableau 4).

Terminator	Acceptor Dye
A	DR6G
C	dROG
G	dR110
T	dTAMRA

Tableau M4 : Nature des Dye acceptors de chaque BigDye terminator

L'incorporation des quatres terminateurs de chaînes est réalisée en une seule réaction par PCR avec un seul primer. Les étapes successives de dénaturation, d'hybridation et d'extension ont pour résultat l'amplification des produits d'extension. Ces produits sont ensuite purifiés par précipitation à l'éthanol afin d'éliminer les terminateurs en excès et chargés sur un gel de polyacrylamide. La lecture de ce gel est effectuée par un logiciel par détection des quatres rayonnements correspondant à chaque base. Il est à noter que les quatres "BigDye-terminators" étant chacun marqué différemment, ils sont mis à migrer sur une seule piste, contrairement au séquençage manuel.

En pratique:

La réaction de Cycle sequencing:

- Mélanger:
 - Terminator ready reaction Mix : 8 μ l.
 - Primer (1 μ M): 3,2 μ l.
 - DNA template: - single-strand DNA : +/- 100 ng.
 - double-strand DNA : +/- 400 ng.
 - produit PCR : +/- 200 ng.
- Porter à 20 μ l avec de l'eau stérile.
- Ajouter environ 30 μ l d'huile PCR dans le tube si l'appareil PCR ne possède pas de couvercle chauffant
- Réaliser le cycle PCR suivant:
 - 96°C pendant 30 secondes
 - 50°C pendant 15 secondes
 - 60°C pendant 4 minutes
- Répéter 25 fois ce cycle.

Purification des produits de la réaction:

- Ajouter au produit PCR 2 μ l d'acétate de sodium 3M pH 4,6 et 50 μ l d'éthanol 95%.
- Vortexer et mettre sur glace pendant 15 minutes.
- Centrifuger pendant 30 minutes à 15000 rpm.
- Laver le culot avec 100 μ l d'éthanol 70%.
- Sécher le culot sous vide.
- Resuspendre le culot dans 6 μ l de tampon de chargement.
- Dénaturer cet échantillon pendant 2 min. A 90°C.
- Déposer 1,5 μ l sur gel de polyacrylamide.


La composition des différents tampons est décrite au point 1.1 de ce chapitre.

Annexes

*Annexe 1:
Séquences
nucléotidique et
protéique de
A12.2*

1	ATG TCT GTT GTA GGA TCG TTA ATT TTT	TGC TTG GAC TGT GGT GAT CTC CTG GAA AAT CCT	60
1	M S V V G S L I F	C L D C G D L L E N P	20
61	AAT GCC GTA TTA GGC TCT AAC GTT GAA TGC AGC CAA TGT	AAA GCC ATA TAT CCC AAG TCA	120
21	N A V L G S N V E C S Q C	K A I Y P K S	40
121	CAA TTC TCC AAT TTA AAA GTC GTC ACC ACG ACG GCA GAC GAT GCG TTT CCA TCT TCT CTT		180
41	Q F S N L K V V T T T A D D A F P S S L		60
181	AGA GCC AAG AAA TCC GTG GTT AAA ACT TCT TTG AAG AAG AAC GAA CTG AAA GAC GGC GCT		240
61	R A K K S V V K T S L K K N E L K D G A		80
241	ACT ATC AAG GAA AAG	TGT CCT CAG TGT GGA AAT GAA GAG ATG AAC TAT CAT ACT TTA CAG	300
81	T I K E K	C P Q C G N E E M N Y H T L Q	100
301	TTA AGA TCT GCA GAT GAA GGT GCT ACT GTC TTC TAT ACA TGC ACT TCC TGT	GGT TAC AAG	360
101	L R S A D E G A T V F Y T C T S C	G Y K	120
361	TTC CGT ACC AAC AAT TGA		378
121	F R T N N *		126

LEGENDE :

 : séquence du motif des doigts de zinc.

*Annexe 2:
Alignement de
Séquences des
paralogues de
A12.2 par Match-
Box*

	10	20	30	40	50	60	70
	+	+	+	+	+	+	+
1	MSVVGslifcldcgdl lenpnAVLGSNVE--csqckaiypksqFSNLK-----vvtttadda						
2	---MTtfrfcrdcnmlpreDKENRLLFEcrtcsyveeagsPLVYRHELITNIGETAGVvdigsdpt						
3	-----mlsfpcscnml litsGDsgvYTLA-crscpyefpiegIEIYDRKKLPRKEVDD--vlgggdv						
	3332222222223555		333333333777			777777777	
	80	90	100	110	120	130	140
	+	+	+	+	+	+	+
1	FPSSLRAKKSvvKtSLKKNELKDGAtikekcpqcgneemNY---htlqlrsadegatvfyctscgykfr						
2	LP-----rsdrecpkchsrenVF---fqsqrrkdtsmvlffvclscshift						
3	D-----qtktqcpnydtcggESAYFfqlqirsadepmttfykcvcnchrwk						
			3333333333577		5555555555222222222333		
	150	160	170	180	190	200	210
	+	+	+	+	+	+	+
1	tnN-----						
2	sdQKNKRTQFS						
3	en-----						

33

LEGENDE :

- séquence de A12.2
- séquence de B12.6
- séquence de C11

Les coefficients qui apparaissent au niveau de l'alignement sont inversement proportionnels à la similarité observée entre les résidus alignés.

*Annexe 3:
Séquences
nucléotidique et
protéique de A135*

1 ATG AGC AAA GTG ATT AAG CCG CCT GGC CAA GCC AGA ACT GCT GAT TTC CGT ACC TTA GAA 60
 1 M S K V I K P P G Q A R T A D F R T L E 20

 61 CGT GAA TCT AGG TTC ATC AAT CCA CCT AAG GAT AAA TCA GCA TTT CCA CTA TTA CAG GAA 120
 21 R E S R F I N P P K D K S A F P L L Q E 40

 121 GCT GTT CAA CCT CAT ATT GGG TCT TTT AAC GCA TTA ACA GAA GGT CCG GAT GGA GGT TTG 180
 41 A V Q P H I G S F N A L T E G P D G G L 60

 181 TTA AAT CTT GGT GTT AAA GAC ATC GGT GAA AAA GTT ATA TTT GAT GGA AAA CCA CTC AAT 240
 61 L N L G V K D I G E K V I F D G K P L N 80

 241 TCT GAA GAC GAA ATA TCC AAC AGC GGA TAC CTC GGG AAT AAG CTT TCT GTT AGT GTG GAA 300
 81 S E D E I S N S G Y L G N K L S V S V E 100

 301 CAA GTG TCT ATT GCG AAG CCA ATG TCT AAC GAT GGT GTT TCT TCT GCA GTA GAG AGA AAA 360
 101 Q V S I A K P M S N D G V S S A V E R K 120

 361 GTT TAC CCA AGT GAG TCA AGA CAA AGG CTT ACT TCT TAC AGA GGT AAA TTA CTT TTA AAG 420
 121 V Y P S E S R Q R L T S Y R G K L L L K 140

 421 TTG AAG TGG TCC GTG AAC AAT GGC GAG GAG AAC TTA TTT GAA GTA AGA GAT TGT GGT GGT 480
 141 L K W S V N N G E E N L F E V R D C G G 160

 481 CTA CCA GTT ATG CTA CAG AGT AAC AGA TGT CAC TTG AAC AAG ATG TCA CCA TAT GAA CTG 540
 161 L P V M L Q S N R C H L N K M S P Y E L 180

 541 GTA CAA CAC AAG GAA GAA TCC GAT GAA ATA GGT GGT TAT TTC ATT GTT AAC GGT ATA GAA 600
 181 V Q H K E E S D E I G G Y F I V N G I E 200

 601 AAG CTT ATT AGA ATG CTG ATT GTG CAA CGT AGA AAT CAT CCT ATG GCT ATC ATC AGA CCT 660
 201 K L I R M L I V Q R R N H P M A I I R P 220

 661 TCC TTC GCT AAC AGG GGT GCA TCC TAT TCT CAT TAC GGT ATT CAA ATT AGA TCT GTC AGG 720
 221 S F A N R G A S Y S H Y G I Q I R S V R 240

 721 CCG GAT CAA ACT TCC CAA ACT AAT GTT TTG CAT TAC TTA AAT GAC GGT CAA GTT ACA TTT 780
 241 P D Q T S Q T N V L H Y L N D G Q V T F 260

 781 AGA TTT TCT TGG AGA AAA AAT GAA TAT TTA GTT CCT GTT GTT ATG ATT TTA AAA GCC TTG 840
 261 R F S W R K N E Y L V P V V M I L K A L 280

 841 TGT CAT ACC AGC GAT AGG GAA ATT TTT GAT GGT ATT ATT GGT AAT GAC GTT AAG GAT TCC 900
 281 C H T S D R E I F D G I I G N D V K D S 300

 901 TTT TTG ACC GAT CGT TTA GAA TTA CTG TTA CGT GGT TTT AAG AAA AGA TAT CCT CAT TTA 960
 301 F L T D R L E L L L R G F K K R Y P H L 320

 961 CAA AAT CGC ACA CAA GTC TTG CAA TAT TTA GGA GAC AAA TTT CGT GTT GTC TTT CAA GCT 1020
 321 Q N R T Q V L Q Y L G D K F R V V F Q A 340

 1021 TCC CCT GAT CAA TCT GAT TTA GAA GTC GGA CAA GAA GTC CTT GAT CGC ATC GTT CTC GTG 1080
 341 S P D Q S D L E V G Q E V L D R I V L V 360

 1081 CAT TTG GGT AAG GAT GGC AGC CAG GAT AAA TTC AGA ATG TTA TTG TTC ATG ATC AGA AAG 1140
 361 H L G K D G S Q D K F R M L L F M I R K 380

 1141 TTG TAT TCC TTG GTT GCA GGC GAA TGT TCT CCA GAT AAC CCA GAT GCT ACG CAA CAT CAA 1200
 381 L Y S L V A G E C S P D N P D A T Q H Q 400

 1201 GAA GTT CTT TTG GGT GGT TTC TTA TAT GGT ATG ATC CTA AAA GAA AAG ATT GAT GAG TAC 1260
 401 E V L L G G F L Y G M I L K E K I D E Y 420

 1261 TTA CAG AAT ATT ATT GCT CAA GTC AGG ATG GAT ATT AAC CGT GGT ATG GCC ATT AAT TTC 1320
 421 L Q N I I A Q V R M D I N R G M A I N F 440

 1321 AAA GAC AAA AGG TAC ATG TCA AGA GTT TTA ATG AGG GTT AAT GAA AAC ATT GGT TCC AAA 1380
 441 K D K R Y M S R V L M R V N E N I G S K 460

1381 ATG CAA TAC TTT TTA TCA ACT GGT AAC CTG GTG TCC CAG TCT GGG TTA GAT TTA CAA CAA 1440
461 M Q Y F L S T G N L V S Q S G L D L Q Q 480
1441 GTT TCT GGT TAT ACT GTG GTT GCA GAA AAA ATT AAC TTC TAC CGT TTT ATC TCT CAT TTT 1500
481 V S G Y T V V A E K I N F Y R F I S H F 500
1501 AGA ATG GTT CAT AGA GGC TCC TTT TTT GCG CAA TTG AAA ACT ACC ACA GTC AGA AAG TTG 1560
501 R M V H R G S F F A Q L K T T T V R K L 520
1561 CTA CCT GAG TCG TGG GGA TTC CTG TGC CCT GTT CAT ACA CCA GAT GGT TCT CCT TGT GGT 1620
521 L P E S W G F L C P V H T P D G S P C G 540
1621 TTA TTA AAC CAT TTT GCG CAC AAG TGT CGT ATA TCA ACT CAG CAA TCT GAC GTC TCA AGA 1680
541 L L N H F A H K C R I S T Q Q S D V S R 560
1681 ATT CCT TCT ATA TTA TAC TCA CTT GGT GTT GCT CCG GCA TCT CAC ACC TTT GCT GCT GGT 1740
561 I P S I L Y S L G V A P A S H T F A A G 580
1741 CCT TCT CTG TGT TGT GTT CAA ATT GAT GGT AAA ATT ATT GGC TGG GTC TCT CAT GAA CAA 1800
581 P S L C C V Q I D G K I I G W V S H E Q 600
1801 GGT AAG ATC ATT GCG GAT ACA TTG AGA TAT TGG AAA GTT GAA GGC AAG ACG CCT GGG TTA 1860
601 G K I I A D T L R Y W K V E G K T P G L 620
1861 CCG ATT GAT CTA GAA ATT GGA TAT GTT CCT CCC TCA ACT CGT GGT CAA TAT CCA GGT CTC 1920
621 P I D L E I G Y V P P S T R G Q Y P G L 640
1921 TAC CTA TTT GGT GGT CAT TCT AGG ATG CTG CGT CCT GTT CGT TAC CTG CCT TTG GAT AAA 1980
641 Y L F G G H S R M L R P V R Y L P L D K 660
1981 GAA GAC ATT GTT GGA CCT TTT GAG CAA GTG TAC ATG AAC ATT GCT GTC ACT CCT CAA GAA 2040
661 E D I V G P F E Q V Y M N I A V T P Q E 680
2041 ATT CAA AAT AAC GTT CAT ACA CAC GTA GAA TTT ACG CCC ACA AAT ATT CTT TCT ATT TTG 2100
681 I Q N N V H T H V E F T P T N I L S I L 700
2101 GCT AAT TTG ACT CCA TTT TCT GAT TTC AAC CAG TCT CCA AGA AAC ATG TAT CAA TGT CAG 2160
701 A N L T P F S D F N Q S P R N M Y Q C Q 720
2161 ATG GGT AAA CAA ACA ATG GGT ACT CCG GGT GTA GCT TTG TGC CAT CGT TCC GAC AAT AAG 2220
721 M G K Q T M G T P G V A L C H R S D N K 740
2221 CTG TAT AGG TTG CAA ACA GGT CAA ACG CCT ATC GTA AAA GCT AAT TTA TAT GAT GAT TAT 2280
741 L Y R L Q T G Q T P I V K A N L Y D D Y 760
2281 GGC ATG GAT AAC TTT CCA AAC GGG TTT AAT GCT GTT GTT GCG GTC ATC TCG TAT ACT GGT 2340
761 G M D N F P N G F N A V V A V I S Y T G 780
2341 TAT GAT ATG GAT GAT GCA ATG ATT ATA AAC AAA TCA GCA GAT GAA AGA GGT TTC GGT TAT 2400
781 Y D M D D A M I I N K S A D E R G F G Y 800
2401 GGT ACT ATG TAT AAG ACT GAG AAA GTG GAT TTA GCA CTT AAC AGA AAC CGT GGT GAC CCA 2460
801 G T M Y K T E K V D L A L N R N R G D P 820
2461 ATT ACA CAG CAT TTT GGT TTC GGG AAT GAC GAA TGG CCA AAG GAG TGG CTT GAG AAA TTA 2520
821 I T Q H F G F G N D E W P K E W L E K L 840
2521 GAC GAG GAT GGT TTG CCA TAC ATT GGC ACT TAT GTT GAA GAG GGT GAT CCA ATC TGC GCA 2580
841 D E D G L P Y I G T Y V E E G D P I C A 860
2581 TAC TTT GAC GAT ACT TTA AAT AAG ACC AAA ATC AAG ACA TAT CAC TCC TCT GAA CCA GCA 2640
861 Y F D D T L N K T K I K T Y H S S E P A 880
2641 TAT ATC GAA GAG GTA AAT TTA ATC GGT GAT GAA TCC AAT AAG TTC CAA GAA CTA CAA ACT 2700
881 Y I E E V N L I G D E S N K F Q E L Q T 900
2701 GTT AGC ATA AAA TAT CGT ATT AGA AGA ACG CCT CAA ATT GGT GAT AAA TTT TCT TCT AGA 2760
901 V S I K Y R I R R T P Q I G D K F S S R 920
2761 CAC GGT CAA AAA GGT GTT TGT TCA AGA AAA TGG CCA ACC ATT GAT ATG CCT TTT AGC GAA 2820
921 H G Q K G V C S R K W P T I D M P F S E 940

2761 CAC GGT CAA AAA GGT GTT TGT TCA AGA AAA TGG CCA ACC ATT GAT ATG CCT TTT AGC GAA 2820
 921 H G Q K G V C S R K W P T I D M P F S E 940
 2821 ACA GGT ATC CAA CCA GAC ATC ATC ATT AAC CCT CAT GCT TTC CCT TCG CGT ATG ACC ATT 2880
 941 T G I Q P D I I I N P H A F P S R M T I 960
 2881 GGT ATG TTC GTC GAA TCT TTA GCA GGT AAA GCG GGG GCA TTG CAT GGT ATT GCA CAG GAC 2940
 961 G M F V E S L A G K A G A L H G I A Q D 980
 2941 TCT ACA CCT TGG ATC TTT AAC GAG GAC GAT ACC CCA GCC GAT TAC TTT GGT GAG CAA CTA 3000
 981 S T P W I F N E D D T P A D Y F G E Q L 1000
 3001 GCG AAG GCG GGT TAC AAC TAC CAT GGT AAT GAG CCA ATG TAC TCA GGT GCT ACT GGT GAA 3060
 1001 A K A G Y N Y H G N E P M Y S G A T G E 1020
 3061 GAA TTA AGG GCA GAT ATT TAT GTT GGT GTT GTC TAC TAC CAA AGA TTA CGT CAT ATG GTC 3120
 1021 E L R A D I Y V G V V Y Y Q R L R H M V 1040
 3121 AAT GAC AAG TTC CAA GTT CGT TCC ACT GGT CCT GTG AAT AGT TTG ACT ATG CAG CCT GTC 3180
 1041 N D K F Q V R S T G P V N S L T M Q P V 1060
 3181 AAA GGT AGA AAG AGA CAT GGT GGT ATT CGT GTC GGT GAA ATG GAA AGA GAT GCT TTG ATT 3240
 1061 K G R K R H G G I R V G E M E R D A L I 1080
 3241 GGG CAT GGT ACA TCT TTT CTA TTA CAA GAT CGT CTG CTA AAT TCA TCA GAC TAC ACA CAG 3300
 1081 G H G T S F L L Q D R L L N S S D Y T Q 1100
 3301 GCA TCC GTA TGT CGC GAG TGT GGT TCT ATT TTG ACC ACG CAA CAG AGT GTG CCA AGA ATT 3360
 1101 A S V C R E C G S I L T T Q Q S V P R I 1120
 3361 GGT TCG ATT TCC ACC GTT TGT TGC CGT CGT TGT TCC ATG AGA TTC GAA GAT GCA AAG AAG 3420
 1121 G S I S T V C C R R C S M R F E D A K K 1140
 3421 CTA TTG ACT AAA TCA GAA GAT GGA GAG AAA ATT TTT ATT GAC GAC TCT CAA ATT TGG GAA 3480
 1141 L L T K S E D G E K I F I D D S Q I W E 1160
 3481 GAT GGA CAA GGT AAC AAA TTT GTT GGT GGT AAT GAA ACA ACT ACG GTG GCC ATA CCA TTT 3540
 1161 D G Q G N K F V G G N E T T T V A I P F 1180
 3541 GTG TTG AAG TAC TTG GAC TCT GAG CTA TCC GCA ATG GGT ATA AGA TTG CGT TAT AAT GTA 3600
 1181 V L K Y L D S E L S A M G I R L R Y N V 1200
 3601 GAG CCC AAA TAG 3612
 1201 E P K * 1204

LEGENDE :

- : Le fragment pêché en double-hybride avec A12.2.
- : La séquence du doigt de zinc qui interagit avec le doigt de zinc de A190.
- NNNN : La séquence nucléotidique des boîtes conservées entre les homologues. Les boîtes représentées sont les boîtes A (258-426) et B (466-618).
- NNNN : La séquence des acides aminés de l'épitope utilisé pour immunolocaliser cette sous-unité (acides aminés 325 à 362).

*Annexe 4:
Publications*

The question of the functional conservation between the RNA polymerase I subunit A12.2 and its homologues in the polymerases II and III.

V. Van Mullem^a, E. Landrieux^a, P. Thuriaux^b and, J. Vandenhaute^a.

^a Laboratoire de Génétique Moléculaire, Fac. Univ. Notre Dame de la Paix – Namur (Belgique)

^b Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, C.E.A. Saclay – Gif/Yvette (France)

The *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I is a multimeric enzyme composed of 14 subunits involved in the 35S pre-ribosomal RNA (pre-rRNA) transcription¹. In this complex, we have focused our attention on the conserved (from archea to human) non essential subunit A12.2. This protein is located in the so-called « active site » of the RNA polymerase I² and has homologues in the RNA polymerases II and III. A12.2 and its homologues are composed of two domains : a first one whose deletion, in the case of A12.2, is responsible for a thermosensitive phenotype and, a second homologous to the transcription elongation factor TFIIS.

With the aim of investigating the functional conservation of these two domains, we have first compared the precise location of the two domains in the RNA polymerase I (A12.2) and II (B12.6) subunits. In a second step, we have investigated the specific function(s) of each domain of the A12.2 protein by looking for the partners of this subunit. We follow different approaches involving a two-hybrid screen³ and, a genetic screen (research of second site mutation suppressors). The yeast two-hybrid screen already allowed the cloning of fragments of different proteins (see Landrieux *et al.* in this same session). In the genetic screen we have isolated 24 suppressors corresponding to two loci. Cloning and characterization of these two genes are in progress and results will be discussed in the poster.

Keywords : *S. cerevisiae*, transcription, RNA polymerase I, rDNA

1 Y. Nogi, R. Yano and M. Nomura (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3962-66

2 S. Chedin, M. Riva, P. Schultz, A. Sentenac and C. Carles (1998). *Genes & Dev.* **12** :3857-3871

3 S. Fields and O.-K. Song (1989). *Nature* **340**, 245-246

Vincent Van Mullem is supported by the « Fonds pour la Formation a la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture »

Study of the role of A12.2 subunit from RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae* by a two-hybrid approach.

E. Landrieux^a, V. Van Mullem^a, C. Torchet^b, S. Hermann^b, P. Thuriaux^c and J. Vandenhoute^a.

^a Laboratoire de Génétique Moléculaire U.R.B.M, Fac. Univ Notre Dame de la Paix – Namur (Belgique)

^b Laboratoire de Génétique Moléculaire. ENS. 75005 PARIS. (France)

^c Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, C.E.A. Saclay – Gif/Yvette (France)

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the RNA polymerase I is a multiproteic complex involved in the synthesis of the pre-ribosomal RNA (pre-rRNA)¹. We take an interest in the function of A12.2 subunit in the polymerase I because this non essential subunit is evolutionarily conserved and have homologues in the two other polymerases (B12.6 and C11 respectively in the RNA polymerase II and III). Moreover, structural studies of the polymerase I have localized A12.2 near the so-called « active site »².

In a two-hybrid³ screen realized with A12.2 subunit, two interesting peptides were isolated : a fragment of A135 (the second largest subunit of the RNA polymerase I) and 88 amino acids of Rrp5p (a protein involved in the 35S rRNA maturation at the cleavage sites A1, A2 and A3). These fragments are more extensively studied.

The interaction between A12.2 and Rrp5p could be one interesting sign of a relation between the 35S pre-rRNA transcription and maturation. But so far, no other evidence of this interaction has been observed *in vivo*. Indeed, no maturation defect could be observed in a growth thermosensitive A12.2 lacking strain. Furthermore, overexpression of RRP5 could not suppress this ts phenotype.

A fragment of A135 including the domains A, B and C have been isolated. This data give us an additional information about the active site of the RNA polymerase I. The two domains of A12.2 determined by complementation assay (see Van Mullem *et al.* in the same session) are currently tested in two-hybrid against the A135 fragment.

Keywords : *S. cerevisiae*, two-hybrid, transcription, RNA polymerase I, rDNA

1 Y. Nogi, *et al.* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3962-66

2 S. Chedin, *et al.* (1998). *Genes & Dev.* **12** :3857-3871

3 S. Fields and O.-K. Song (1989). *Nature* **340**, 245-246

Vincent Van Mullem is supported by the « Fonds pour la Formation a la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture »

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-61.

Chedin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A., and Carles, C. (1998). The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes Dev.* 12, 3857-71.

Darst, S. A., Edwards, A. M., Kubalek, E. W., and Kornberg, R. D. (1991). Three-dimensional structure of yeast RNA polymerase II at 16 Å resolution. *Cell* 66, 121-8.

Depiereux, E., Baudoux, G., Briffeuil, P., Reginster, I., De Bolle, X., Vinals, C., and Feytmans, E. (1997). Match-Box_server: a multiple sequence alignment tool placing emphasis on reliability. *Comput. Appl. Biosci.* 13, 249-56.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.

Flores, A., Briand, J.-F., Gadal, O., Andrau, J.-C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A., and Werner, M. (sous presse). A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

Gadal, O., Shpakovski, G. V., and Thuriaux, P. (1999). Mutants in ABC10beta, a conserved subunit shared by all three yeast RNA polymerases, specifically affect RNA polymerase I assembly. *J. Biol. Chem.* 274, 8421-7.

Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 837-48.

Klinger, C., Huet, J., Song, D., Petersen, G., Riva, M., Bütz, E. K., Sentenac, A., Oudet, P., and Schultz, P. (1996). Localization of yeast RNA polymerase I core subunits by immunoelectron microscopy. *Embo J.* 15, 4643-53.

Lalo, D., Carles, C., Sentenac, A., and Thuriaux, P. (1993). Interactions between three common subunits of yeast RNA polymerases I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5524-8.

Landrieux, E., Van Mullen, V., Torchet, C., Hermann, S., Thuriaux, P., and Vandenhoute, J. (1999). Study of the role of A12.2 subunit from RNA polymerase I in

Saccharomyces cerevisiae by a two-hybrid approach. Arch. int. Physiol. Biochem. Biophys. 107, B16.

Memet, S., Gouy, M., Marck, C., Sentenac, A., and Buhler, J. M. (1988). RPA190, the gene coding for the largest subunit of yeast RNA polymerase A. J. Biol. Chem. 263, 2830-9.

Nogi, Y., Vu, L., and Nomura, M. (1991). An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 7026-30.

Nogi, Y., Yano, R., Dodd, J., Carles, C., and Nomura, M. (1993). Gene RRN4 in *Saccharomyces cerevisiae* encodes the A12.2 subunit of RNA polymerase I and is essential only at high temperatures. Mol. Cell. Biol. 13, 114-22.

Nogi, Y., Yano, R., and Nomura, M. (1991). Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 3962-6.

Schultz, P., Celia, H., Riva, M., Sentenac, A., and Oudet, P. (1993). Three-dimensional model of yeast RNA polymerase I determined by electron microscopy of two-dimensional crystals. Embo J. 12, 2601-7.

Severinov, K., Mustaev, A., Kukarin, A., Muzzin, O., Bass, I., Darst, S. A., and Goldfarb, A. (1996). Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. Introducing archaeobacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Biol. Chem. 271, 27969-74.

Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M., and Young, R. A. (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. Cell 73, 1361-75.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic. Acids Res. 22, 4673-80.

Thuriaux, P., and Sentenac, A. (1992). Yeast Nuclear RNA Polymerases. In The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* : Gene Expression, C. S. H. L. Press, ed.

Treich, I., Riva, M., and Sentenac, A. (1991). Zinc-binding subunits of yeast RNA polymerases. J. Biol. Chem. 266, 21971-6.

Van Mullen, V., Landrieux, E., Thuriaux, P., and Vandenhaute, J. (1999). The question of the functional conservation between the RNA polymerase I subunit A12.2 and its homologues in the polymerases II and III. *Arch. int. Physiol. Biochem. Biophys.* *107*, B25.

Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A., and Thuriaux, P. (1992). Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 1087-95.

West, R. W., Jr., Yocum, R. R., and Ptashne, M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mol. Cell. Biol.* *4*, 2467-78.

Wittekind, M., Dodd, J., Vu, L., Kolb, J. M., Buhler, J. M., Sentenac, A., and Nomura, M. (1988). Isolation and characterization of temperature-sensitive mutations in *RPA190*, the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 3997-4008.

Yano, R., and Nomura, M. (1991). Suppressor analysis of temperature-sensitive mutations of the largest subunit of RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: a suppressor gene encodes the second-largest subunit of RNA polymerase I. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 754-64.