



THESIS / THÈSE

LICENCE EN ZOOLOGIE

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

Grifnée, Alain

Award date:
1990

Awarding institution:
Université 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.

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

GRIFNEE Alain

Résumé

PHO81 est le gène situé le plus en amont du système génétique régulant sous l'action du Pi, l'expression de la phosphatase acide (gène *PHO5*) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les études antérieures de notre laboratoire et celles du groupe de Yoshida, où le gène a été cloné indépendamment conduisent à des conclusions contradictoires quant à la taille de ce gène. En effet, selon Yoshida, un insert de 2,8 kb complèterait la mutation *pho81*, alors que le mRNA correspondant atteindrait 3,5 kb.

Nous avons testé la capacité de complémentation du mutant par différents sous-clones obtenus à partir d'un insert initial de 7kb contenant le gène entier. Les résultats démontrent que les sous-clones de taille inférieure à 4,7 kb ne complèment effectivement pas la mutation. D'autre part, le séquençage du gène auquel ce mémoire a contribué confirme ce résultat, puisqu'une ORF de 3531 pb a été mise en évidence. Par ailleurs, l'analyse de la région 5' amont de l'ORF a révélé par comparaison avec les séquences des UAS du gène *PHO5*, la présence de 3 UAS potentielles susceptibles d'être reconnues par les protéines trans-activatrices (*PHO2* et *PHO4*) du gène *PHO5*. La situation et l'arrangement de ces 3 UAS indiquent que la régulation de *PHO81* se ferait selon le même mode que *PHO5* comme cela avait été suggéré à partir de certains résultats de Northern publiés par Yoshida.

La démonstration directe du rôle de ces UAS dans le contrôle transcriptionnel de *PHO81* demande des expériences complémentaires.

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques
Juin 1990

Promoteurs: J. Vandenhautte et J. Delcour

ERRATA

ABREVIATIONS lire pBS : pBluescript KS+ au lieu de pBS : pBluescript KS+

page 1 : lire ...les gènes codants... au lieu de ...les gènes codant...

lire ..., des séquences non-informatives... au lieu de ..., des séquences non-informative...

lire ...alors qu'il existe trois codons stop :... au lieu de ...alors qu'il existe trois codon stop :...

page 4 : lire ... ne contrôle pas le site +1 de la transcription, au lieu de ... ne contrôle pas le site +1 de le transcription,

page 9 : lire ... les protéines PHO2 et PHO4 sont nécessaires... au lieu de ... les protéines PHO2 et PHO4 sont nécessaire...

page 10 : lire ..., le gène *PHO81* n'est pas exprimé... au lieu de ..., le gène PHO81 n'est pas exprimé...

page 21 : lire Mettre 5 μ l sur gel... au lieu de Mettre 5ml sur gel...

page 23 : lire 1 μ l=1unité ... au lieu de 1ml=1unité ...

page 35 : lire Le plasmide pTC3 (4 μ g)... au lieu de Le plasmide pTC3 (4mg)...

lire .. le vecteur YCp50 (2 μ g)... au lieu de .. le vecteur YCp50 (2mg)...

page 36 : lire ..., par 5 μ g de pAG1, ... au lieu de ..., par 5mg de pAG1, ...

Fig. III. 7. : ajouter : piste 1. YCp50 restreint par *Bam*HI et *Sa*I (la bande à 0,3kb n'est pas visible)

piste 2. pTC3 restreint par *Bam*HI et *Sa*I

piste 3. marqueur de taille λ restreint par *Hind*III.

page 37 : lire ... sont chacuns clonés dans pBluescript KS+... au lieu de ...sont chacun clonés dans pBluescript ...

Fig. III. 15 : lire A/ Schéma de la construction obtenue... au lieu de A/ Schéma de la construction obtenues...

lire ...la construction recherchée : pAG2 (11,4kb et 3,4kb). au lieu de ...la construction recherchée : pAG2 (10,4kb et 3,4kb).

page 38 : lire Le plasmide pTC7 (7,5 μ g) ... au lieu de Le plasmide pTC7 (7,5mg) ...

lire ... le vecteur pBluescript KS+ (1,2 μ g) ... au lieu de ... le vecteur pBluescript (1,2mg) ...

lire ...et les bandes de 2,4kb et de 11,4kb... au lieu de ...et les bandes de 2,4kb et de 11,7kb...

page39 : lire ... , pV11 (5µg)... au lieu de ... , pV11 (5mg)...

lire Le plasmide pAG1 (8µg) ... au lieu de Le plasmide pAG1 (8mg)...

page40 : lire Le plasmide pTC7 (6µg) ... au lieu de Le plasmide pTC7 (6mg) ...

Fig. III.19. lire .. et délimitation du gène *PHO81*... au lieu de .. et délimitation du gène PHO81...

page41 : lire ... selon la méthode de Ito par 5µg ... au lieu de ... selon la méthode de Ito par 5mg ...

page42 : lire En effet, la figure III.19. montre ... au lieu de En effet, la figure montre ...

page44 : lire ...et d'autre part du site multiple de clonage de pBluescript KS+. au lieu de ...et d'autre part du site multiple de clonage de pBluescript KS+MCS.

lire Au contraire, la séquence ... au lieu de Au contraire, la séquence ...

Fig. III.25. lire ORF: 3531bp au lieu de 3581bp

page46 : lire ... nous avons décidé... au lieu de .. nous avons décider...

Fig. III.26. : lire 595 au lieu de 596.

page47 : lire ...une grande ORF de 3531bp... au lieu de ..une grande ORF de 3528bp...

lire ...se termine au codon STOP TAA en position 4124 au lieu de ...se termine au codon STOP TAA en position 4121

lire ...contiendrait donc 3531 nucléotides. au lieu de ...contiendrait donc 3528 nucléotides.

page47 : lire ...une ORF de 3531bp au lieu de ...une ORF de 3528bp

page50 : lire ..., nous avons reconstitué ... au lieu de ..., nous avons reconstitué ...

page53 : lire ... le sous-clone pAG2 (complémentant la mutation) contient une ORF de 3531bp , alors que les sous-clones pAG1 et pAG4 (ne complémentent pas la mutation)... au lieu de ... le sous-clone pAG3 (complémentant la mutation) contient une ORF de 3531bp , alors que les sous-clones pAG1 et pAG4 (ne complémentant la mutation)...

ANNEXE : piste 4 : lire pDP47 restreint par *PvuI* et *EcoRI* au lieu de pDP47 restreint par *PvuI* et *Pst*

Je remercie les Professeurs J. Vandehaute et J. Delcour de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et suivi au cours de ce travail.

Merci aussi aux membres du laboratoire, Geneviève, Rose-Marie, J. Libion, Jean-Pol, Jean-Marc, Pascal et Dominique, Anne et Olivier pour l'accueil chaleureux et l'attention bienveillante qu'ils m'ont offerts.

Je tiens à remercier tout spécialement Deborah Prozzi, pour son assistance et sa disponibilité.

Toute ma reconnaissance à Messieurs A. Depelchin, F. Opperdoes et P. Van Cutsem, qui ont accepté de lire ce mémoire.

Aux autres mémorants, Nathalie, Isabelle, Patricia et Xavier pour le soutien moral réconfortant qu'ils m'ont apporté au cours de ce travail,

A mes amis et mes parents sans qui ces études et ce travail n'auraient pas été possibles.

merci.

LISTE DES ABREVIATIONS.

- aa: acide aminé.
ADN: acide désoxyribonucléique.
AMPC: adénosine monophosphate cyclique.
ARN: acide ribonucléique.
ARNm: ARN messenger.
ATP: adénosine triphosphate.
DEAE: diéthyl aminoéthane.
DO: densité optique.
DTT: dithiothréitol.
E. coli: Escherichia coli.
EDTA: éthylène diamine tétra acétate.
g: gramme.
kb: kilobase.
kd: kilodalton.
MCS: site multiple de clonage (multiple cloning site).
ORF: phase ouverte de lecture (open reading frame).
bp: paire de base (base pair).
pBS: pBluescript KS+.
Pi: phosphate inorganique.
PEG: polyéthylène glycol.
RNase: ribonucléase.
rpm: tour par minute.
SDS: sodium dodécyl sulfate.
UAS: séquence activatrice amont (upstream activating sequence).
UV: ultra-violet.
x: restreint par.

Les gènes de levure sont notés en italique.

Les protéines sont notées en caractère normal.

I. INTRODUCTION

- 1.1. Compréhension des mécanismes de régulation cellulaire par l'analyse de séquences de régulation
 - 1.1.1. La région codante du gène
 - 1.1.2. La région promoteur du gène
- 1.2. Les éléments de contrôle transcriptionnel chez la levure
 - 1.2.1. Les séquences de sélection du site +1 de transcription
 - 1.2.2. Les séquences de modulation du taux de la transcription
 - 1.2.2.1. Contrôle positif: les UAS
 - 1.2.2.2. Contrôle négatif: les URS
- 1.3. Le système particulier de la phosphatase acide répressible de *Saccharomyces cerevisiae*
 - 1.3.1. *PHO4* et *PHO2* activent la transcription de *PHO5*
 - 1.3.1.1. Rôle attribué à *PHO4*
 - 1.3.1.2. Rôle attribué à *PHO2*
 - 1.3.2. *PHO80* et *PHO85* répriment la transcription de *PHO5*
 - 1.3.3. *PHO81*
- 1.4. But du travail

II. MATERIEL ET METHODES

- II.1. Souches et plasmides
 - II.1.1. Souches bactériennes
 - A. XL1 blue
 - B. JM101
 - II.1.2. Plasmide bactérien
 - II.1.3. Souches de levure *Saccharomyces cerevisiae*
 - II.1.4. Plasmide "navette" *E. coli* - *S. cerevisiae*
- II.2. Milieux de cultures
 - II.2.1. Milieu de culture bactérien
 - II.2.2. Milieux de culture pour levures
- II.3. La restriction d'ADN plasmidique
- II.4. Electrophorèse dans un gel d'agarose
 - II.4.1. Principe
 - II.4.2. Protocole
 - II.4.3. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose
- II.5. Purification et précipitation de l'ADN
- II.6. Ligation de molécules d'ADN linéaires ayant des bouts droits ou des bouts protrudants collants
- II.7. Transformation bactérienne
- II.8. Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*
- II.9. Extraction rapide d'ADN plasmidique de *E. coli* (miniprep)
- II.10. Préparation d'ADN plasmidique de *E. coli* (midiprep)
- II.11. Séquençage
- II.12. Test de coloration d'activité de phosphatase acide

III.RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1.Complémentations

III.1.1.Entrée en matière

III.1.2.Le fragment *Bam*HI-*Sa*I de 4kb ne contient pas le gène entier

III.1.2.1.Construction de pAG1

A.Restrictions

B.Ligation

C.Transformation et analyse des clones recombinants

III.1.2.2.Test de complémentation

III.1.3.Délimitation d'un fragment minimum contenant le gène *FHOB1* entier

III.1.3.1.Etablissement de la carte de restriction

détaillée de l'insert *Mlu*-*Sa*I de 7 kb du clone primaire pJV8

III.1.3.2.Sous-clonage de trois fragments s'étendant au-delà du site interne *Bam*HI de l'insert *Mlu*-*Sa*I de 7kb

A.Construction de pAG2 comportant l'insert *Hpa*I-*Sa*I de 6.4 kb

B.Construction de pAG3 portant l'insert *Fvu*I-*Sa*I de 5.9 kb

C.Construction de pAG4 portant l'insert *Eg*AI-*Sa*I de 5.3 kb

III.1.3.3.Tests de complémentation

III.1.4.Discussion

III.2.Séquençage

III.2.1.Stratégie de séquençage

III.2.2.Séquençage du gène *FHOB1*

III.2.2.1.Entrée en matière

III.2.2.2.Construction et séquençage du sous-clone *Xba*I-*Eg*AI

III.2.2.3.Résultats

III.2.3.Analyse de la région 5' du gène *FHOB1*

III.2.3.1.Séquences de sélection du site +1 de transcription

III.2.3.2.Séquences qui modulent le taux de transcription

III.2.4. Discussion

III.2.4.1. Le séquençage du gène *PHO81* met en évidence l'existence d'un ATG initiateur situé à 2200 pb en amont de l'ATG défini antérieurement par Yoshida

III.2.4.2. Les UAS présentes dans la région distale du promoteur rendent compte des mécanismes semblables de régulation de *PHO5* et *PHO81*

III.2.4.3. L'absence d'UAS potentielles de *PHO81* pourrait être compensée par des séquences présentes dans la matrice du vecteur YCp50

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

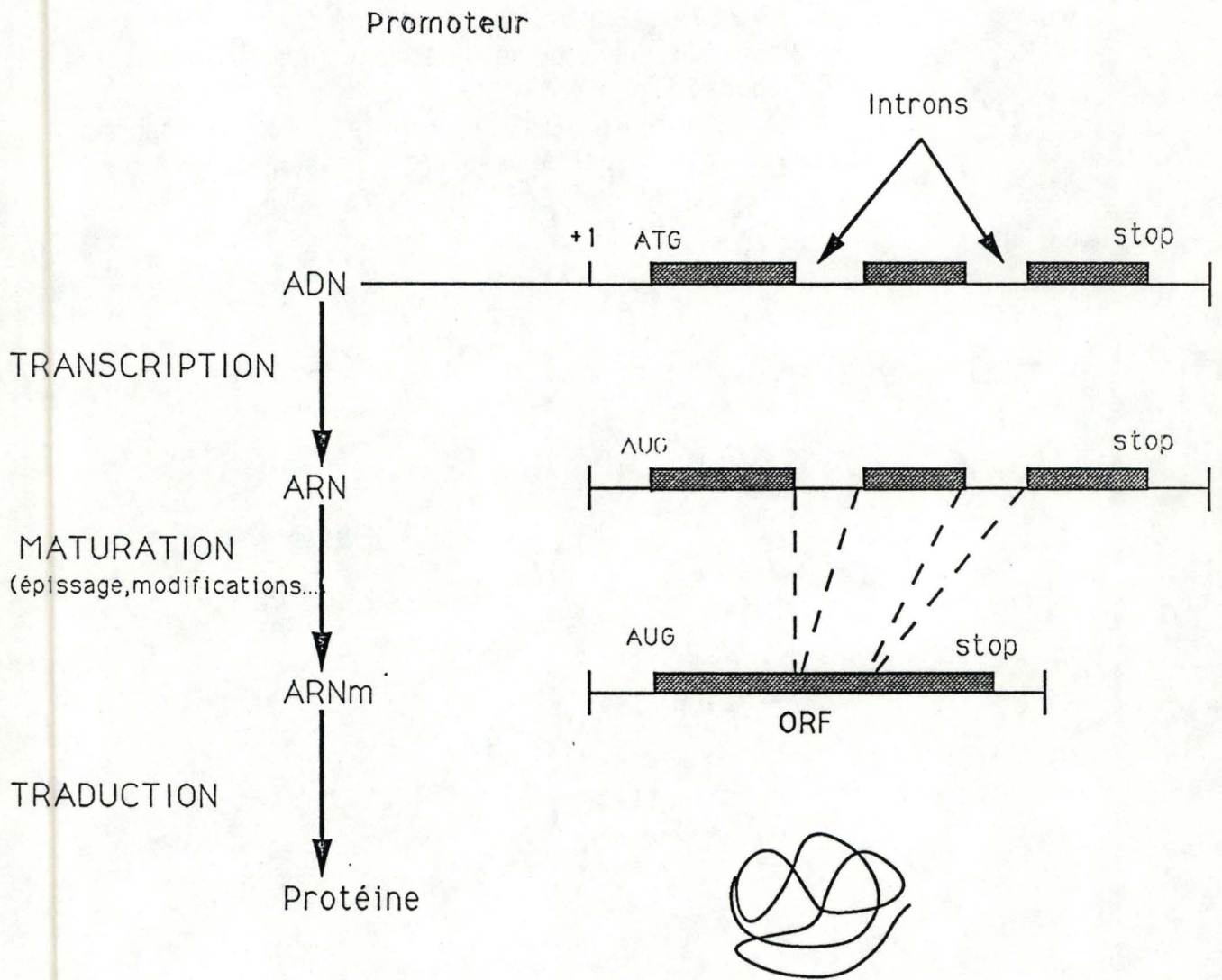


Fig. 1.1. Synthèse protéique à partir de l'information contenue dans l'ADN.
 (N.B. : la protéine peut être sujette à des modifications post-traductionnelles)

I. INTRODUCTION

I.1. COMPREHENSION DES MECANISMES DE REGULATION CELLULAIRE PAR L'ANALYSE DE SEQUENCES DE REGULATION.

Ces vingt dernières années ont vu naître un extraordinaire intérêt pour la biologie cellulaire. Des nouvelles techniques en microscopie, en immunologie ou en biochimie ont contribué largement à nos connaissances actuelles sur le fonctionnement de la cellule. Aujourd'hui, l'objectif ultime est d'expliquer en termes moléculaires comment la cellule croît, se divise ou réagit face à un environnement déterminé.

La structure et la fonction de la cellule sont basées sur une information contenue dans l'ADN : le programme génétique. Le gène est considéré comme l'unité de ce programme génétique. Grâce aux techniques de la génétique moléculaire, il est possible d'isoler un gène et de l'étudier. La première étude réalisée sur un gène cloné consiste d'abord à le délimiter, puis à caractériser sa structure au niveau moléculaire par le séquençage.

Le nombre de séquences connues de gènes ne cesse d'augmenter aujourd'hui, de même que les techniques de séquençage évoluent et s'automatisent à tel point que des projets de séquençage du génome entier de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou du génome humain ont vu le jour. Ce nombre élevé de séquences connues a permis de dégager les traits généraux de la structure d'un gène eucaryote et d'y identifier deux régions essentielles. Nous considérons exclusivement ici les gènes codant pour des protéines et transcrits par l'ARN polymérase II

1/ la région codante du gène.

Cette région contient l'information de la structure primaire de la protéine correspondante. L'expression de cette information comporte la transcription en ARN messagers et la traduction des ARN messagers en protéines. Il faut aussi noter que la région codante contient outre les séquences conservées dans l'ARN messager (les exons), des séquences non-informatives (les introns) destinées à être excisées.

La transcription et la maturation finies, l'ARN messager est alors traduit selon le code génétique par les ribosomes en chaînes polypeptidiques qui formeront la protéine. L'ARN messager est lu codon par codon de son extrémité 5' vers son extrémité 3'. Chaque codon consiste en un triplet nucléotidique représentant un acide aminé. Le codon de départ est le plus souvent un AUG alors qu'il existe trois codons stop : UAA, UAG et UGA.

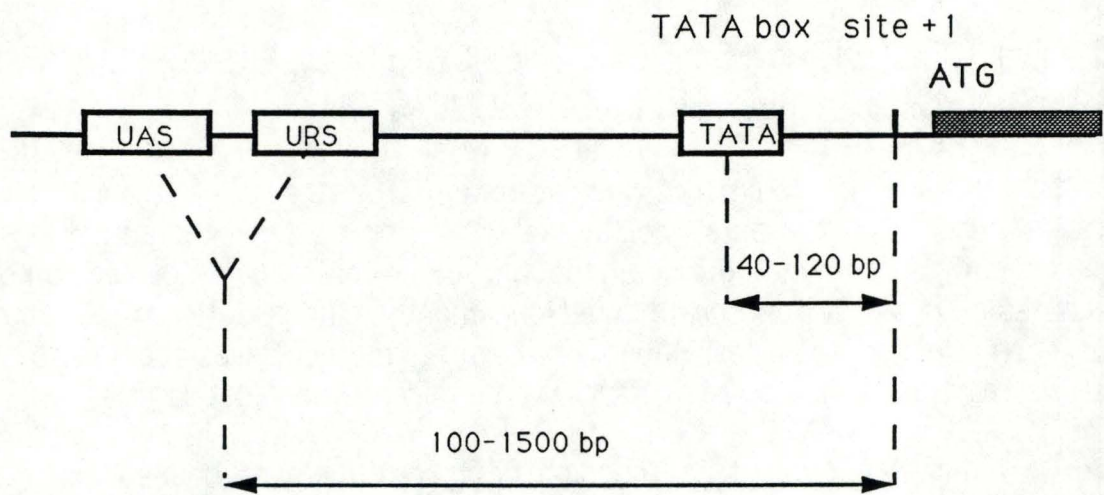


Fig. 1.2. Éléments de contrôle transcriptionnel d'un promoteur-type de gène de levure.
 UAS=Upstream Activating Sequence
 URS=Upstream Repressing Sequence

La région codante comprise entre le codon initiateur et de terminaison est appelée phase ouverte de lecture ou ORF (pour Open Reading Frame) (Fig.1.1.).

2/ La région promoteur du gène.

Cette région située en amont (en 5') de la région codante contient les signaux responsables de la régulation de la transcription. Cette région promoteur sera détaillée plus loin.

Le séquençage d'un gène permet donc d'identifier ces deux régions mais c'est aussi un point de départ pour l'étude du gène à deux niveaux :

- au niveau de la relation structure-fonction de la protéine codée par ce gène. En effet, l'établissement de la séquence nucléotidique de la région codante du gène nous informe sur la séquence en acides aminés de la protéine codée par ce gène. Par comparaison de séquences, il est possible de trouver des homologies avec des protéines dont la fonction est connue.

- au niveau des mécanismes de contrôle de l'expression du gène. La transcription est centrale dans l'expression des gènes. L'établissement de la séquence de la région promoteur permet d'identifier de éléments importants pour la transcription.

Nous allons nous intéresser particulièrement à ce deuxième niveau en détaillant les signaux responsables de la transcription d'un promoteur d'un gène de levure *Saccharomyces cerevisiae*

1.2. LES ELEMENTS DE CONTROLE TRANSCRIPTIONNEL CHEZ LA LEVURE.(Fig. 1.2.)

La plupart de nos connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la transcription des gènes eucaryotes sont issues des études réalisées sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, cet organisme bénéficie d'avantages intéressants tels que son taux de croissance rapide, la facilité d'isoler un mutant et la possibilité d'appliquer la technologie de l'ADN recombinant. De plus, *Saccharomyces cerevisiae* est un eucaryote inférieur et constitue un bon modèle d'étude de la régulation des gènes chez les eucaryotes dans la mesure où les mécanismes de régulation sont conservés des eucaryotes inférieurs jusqu'à l'homme.

Ceci explique l'intérêt de nombreuses recherches sur les promoteurs de levure. Le développement de la rétrogénétique a permis d'identifier et d'étudier le rôle des signaux que comporte le promoteur. La

stratégie de la rétrogénétique consiste à "manipuler" *in vitro* un gène cloné et à en tester les conséquences sur sa fonction dans un système *in vivo*. Pour le contexte évoqué, la "manipulation" du gène consiste à réaliser des délétions dans le promoteur et à contrôler *in vivo* si l'expression de ce gène est altérée.

Cette stratégie, mais aussi la comparaison de séquences de promoteurs de levure ont permis de montrer deux caractéristiques générales des promoteurs de levures. Le premier est la taille très grande de ces promoteurs. Des éléments du promoteur qui contrôlent l'activité transcriptionnelle peuvent s'étendre sur une région de plus de 300bp en amont du site de départ de la transcription (Struhl, 1981). L'autre caractéristique des promoteurs de levure est leur richesse en A-T. La région promoteur comprend habituellement 70 à 80% de A-T contre 50 à 60% dans la région codante (Holland et Holland, 1979).

Mais les résultats de ces deux types d'approche ont surtout permis de distinguer deux catégories de séquences promotrices : les séquences de sélection du site d'initiation et les séquences de modulation du taux de transcription

1.2.1. LES SEQUENCES DE SELECTION DU SITE +1 DE TRANSCRIPTION

La TATA box, séquence de 6 à 8bp riche en A et T, semble importante pour l'initiation de la transcription dans la plupart des gènes de la levure. Une délétion de la TATA box réduit fortement le taux d'ARN transcrits. La TATA box est localisée à distance de 40bp à 120bp du site +1 d'initiation de la transcription. Contrairement aux eucaryotes supérieurs où la distance séparant la TATA box du site +1 varie peu, il apparaît, en fait, que chez la levure, cette distance peut être variable. C'est le cas par exemple du gène *HIS3* où le déplacement de la TATA box de plusieurs dizaines de paires de bases n'altère pas la transcription (Chen et Struhl, 1985). Il semble de plus que chez certains gènes de levure, il existe plusieurs sites +1 de transcription. *HIS1* a, par exemple, 13 sites +1 de transcription qui sont répartis sur une distance de 110bp (Hinnebusch et Fink, 1983).

En insérant des oligonucléotides de synthèse dans des mutants où il manque la TATA box, Nagawa et Fink (1985) ont montré que les séquences TATA ou TATAA n'étaient pas suffisantes pour l'initiation de la transcription, alors que la séquence TATAAA fonctionne aussi bien que la séquence sauvage TATATAA.

Mais, il faut aussi noter que certains promoteurs ne contiennent pas de séquence consensus TATA box. D'autre part, des promoteurs à haute efficacité de transcription contiennent des TATA box qui n'ont pas une fonction essentielle. C'est le cas du promoteur du gène *PGK* (qui code pour

l'enzyme phosphoglycérokinase, très abondante chez la levure) (Ogden *et al.*, 1986).

Dans le cas où la TATA box ne contrôle pas le site +1 de la transcription, il semble alors que les séquences autour du site +1 de transcription jouent un rôle crucial. Plusieurs séquences consensus ont été proposées mais aucune n'est une caractéristique universelle pour tous les gènes de levure. Notons tout de même que par comparaison des séquences autour du site +1 de transcription d'un grand nombre de gènes de levure, deux séquences consensus sont apparues : TC(G/A)A et RRYRR (R=purine et Y=pyrimidine). Ces deux séquences consensus rendent compte de plus de la moitié des promoteurs comparés (Hahn *et al.*, 1985).

Certains auteurs ont aussi attiré l'attention sur d'autres séquences conservées chez la levure qui peuvent avoir une signification pour la transcription. Dobson *et al.* (1982) ont signalé que quelques gènes de levure fortement transcrits, contiennent des "CT-rich blocks" dans leur promoteur et sont suivis d'un tétranucléotide CAAG 8 ou 12bp en aval. Dans des gènes faiblement exprimés, soit ces séquences sont absentes, soit la distance entre la région "CT-rich block" et la séquence CAAG est plus grande. Par exemple, le gène *PGK* a une région "CT-rich block" suivie 10bp plus loin par CAAG. Par contre, le gène *TRP1* faiblement exprimé a une région "CT-rich block" mais suivie d'un CAAG 47bp plus loin. Pour démontrer l'importance de ces séquences, il serait nécessaire de faire varier la distance entre les "CT-block" et CAAG, par les techniques de mutagenèse *in vitro*, dans les promoteurs de gènes faiblement et fortement exprimés.

Donc, dans certains gènes de levure, la TATA box semble influencer le choix du site +1 de transcription alors que dans d'autres gènes la TATA box semble relativement moins importante que d'autres éléments de transcription.

1.2.2. LES SEQUENCES DE MODULATION DU TAUX DE LA TRANSCRIPTION.

1.2.2.1. CONTROLE POSITIF : LES UAS.

Les UAS (Upstream Activating Sequences) sont de courtes séquences de 6 à 30bp de longueur qui sont localisées dans le promoteur relativement loin du site +1 de transcription (100 à 1500 bp) et sont requises pour l'activation de la transcription. La mise en évidence des UAS a été rendue possible par des expériences de délétions mais aussi par la construction de gènes de fusion : les éléments UAS d'un gène sont remplacés par d'autres séquences amont d'autres gènes dont on suspecte qu'elles contiennent des UAS. Ainsi, on a montré qu'en remplaçant l'UAS authentique du gène *CYC1* par la séquence amont des gènes *GAL4* et *GAL10*, le gène *CYC1* est régulé de manière spécifique des gènes *GAL1* et *GAL10*.

Absence d'un acide aminé dans le milieu

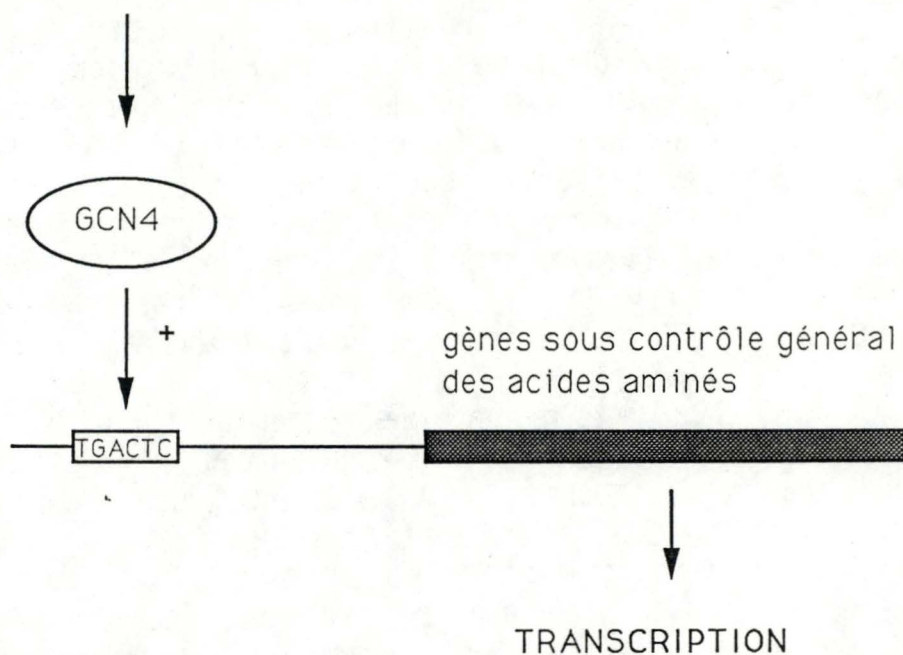


Fig.1.3. Contrôle général des acides aminés.

En absence d'un acide aminé dans le milieu de culture, la protéine GCN4 est activée et est capable de se lier à la séquence TGACTC située dans les promoteurs des gènes sous contrôle général des acides aminés. La transcription de ces gènes est ainsi activée.

(c'est-à-dire de manière dépendante du galactose (Guarente, 1987). L'UAS confère donc dans ce cas au gène une régulation spécifique.

En général, les éléments UAS trouvés par délétions dans différents promoteurs de levure ne présentent pas de séquences communes. Ceci confirme la spécificité de la régulation : les UAS seraient en fait des sites de liaisons spécifiques pour des protéines activatrices de la transcription. Ce principe peut être illustré par l'exemple du contrôle général des acides aminés (Fig.1.3).

Chez la levure, lorsqu'il manque un acide aminé dans le milieu, il y a une augmentation du taux d'expression de gènes de structure codant pour des enzymes de multiples voies de biosynthèse d'acides aminés. Une séquence consensus 5'TGACTC3' est répétée plusieurs fois dans les promoteurs de ces gènes de structure. Cette séquence est absente dans tous les autres gènes. Des expériences de délétions ont montré que le gène est toujours sous le contrôle général des acides aminés tant qu'il subsiste une seule copie TGACTC et ne l'est plus lorsque cette copie est absente (Donahue *et al.*, 1982).

C'est le produit du gène *GCN4* qui est l'activateur de la transcription des gènes sous le contrôle général des acides aminés. En effet, chez le mutant *gcn4* on n'observe pas d'augmentation du taux de transcription de ces gènes lorsqu'il manque un acide aminé. La protéine GCN4 peut se lier *in vitro* aux promoteurs de ces gènes et le site de liaison est TGACTC (Arndt et Fink, 1986).

Donc, la protéine GCN4 est capable de reconnaître l'UAS (TGACTC) dans les promoteurs de gènes sous contrôle général des acides aminés et d'activer leur transcription lorsqu'il manque un acide aminé dans le milieu.

Dans d'autres cas, les séquences reconnues par une protéine activatrice sont dégénérées c'est-à-dire qu'elles varient légèrement d'un promoteur à l'autre (Struhl, 1989).

Les UAS sont analogues aux enhanceurs d'eucaryotes supérieurs, dans le sens où ils activent la transcription quelle que soient leur orientation. Mais au contraire des enhanceurs, les UAS ne sont plus actives si elles sont placées à plus de 1500bp en amont de la TATA box ou en aval de celle-ci (Struhl, 1989).

1.2.2.2. CONTROLE NEGATIF : LES URS.

Chez les eucaryotes et plus particulièrement chez la levure, la régulation est le plus souvent positive. Toutefois, certains promoteurs de levure possèdent des séquences qui répriment le taux de transcription. Ces séquences sont appelées : URS (Upstream Repressing Sequence). Les URS

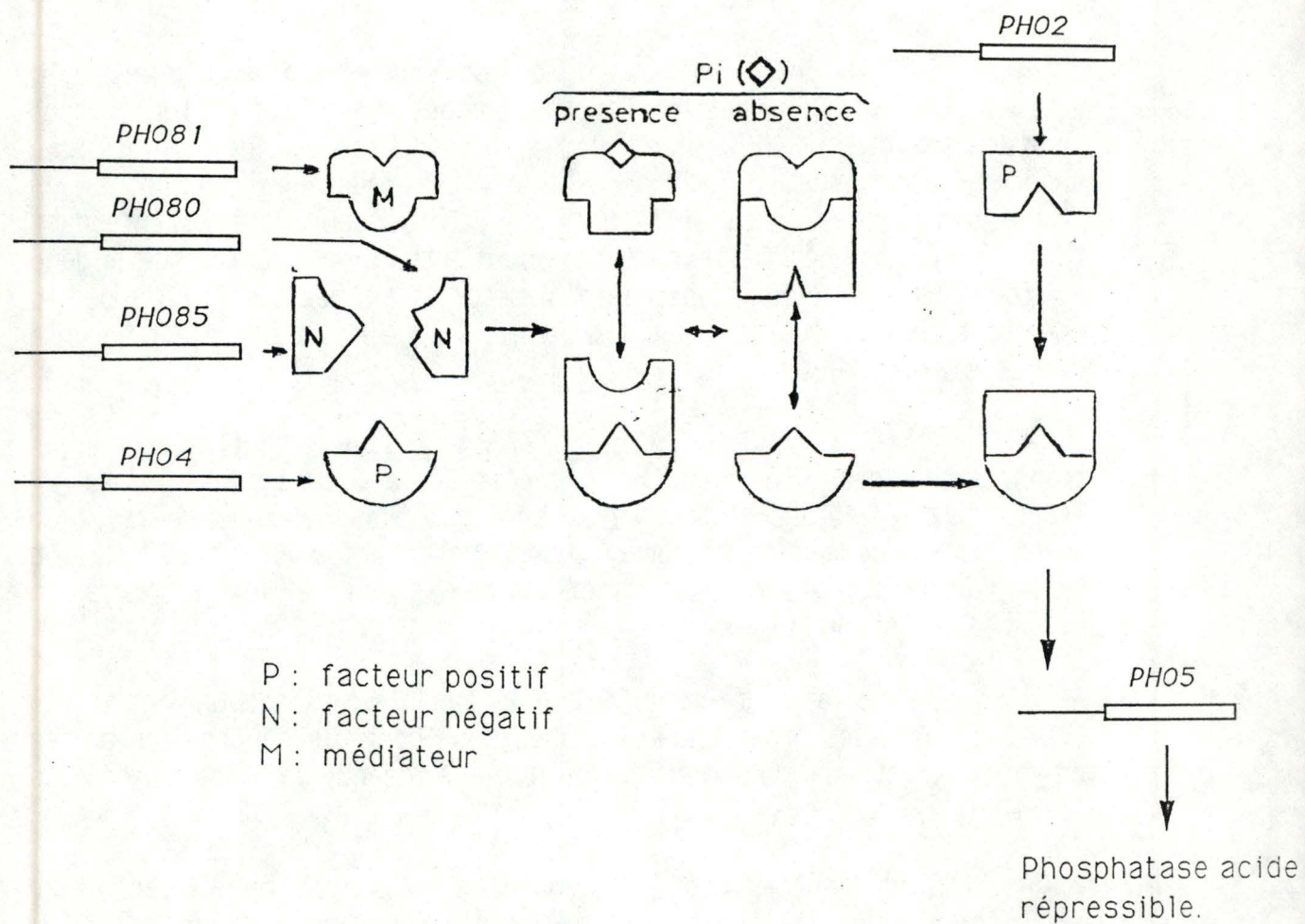


Fig. 1.4. Modèle du fonctionnement du circuit de régulation de la phosphatase acide répressible (Représentation schématique d'après Oshima Y. (1982))

sont similaires aux UAS dans le sens où elles sont des courtes séquences situées en amont de la TATA box à des distances variables et fonctionnelles dans les deux orientations. L'URS peut réprimer la transcription lorsqu'elle est en amont d'une UAS mais la répression est généralement plus efficace si elle est localisée entre l'UAS et la TATAbox (Struhl, 1989).

Nous avons donc vu quels sont les éléments importants d'un promoteur de levure pour l'initiation et la modulation de la transcription. Mais l'étude de la régulation des gènes vise à comprendre comment l'expression génétique peut être adaptée aux conditions de l'environnement. Dans ce but, plusieurs circuits de régulation de gènes soumis au contrôle d'un effecteur (=stimulus environnemental) ont été étudiés chez la levure, notamment : le contrôle général des acides aminés, le circuit régulateur du métabolisme du galactose (système *GAL*) ou encore le circuit régulateur de la synthèse des phosphatases. Parmi ces dernières, c'est le système de régulation de l'expression de la phosphatase acide répressible qui a été l'objet de nombreux travaux et nous intéresse plus particulièrement.

1.3. LE SYSTEME PARTICULIER DE LA PHOSPHATASE ACIDE REPRESSIBLE DE *Saccharomyces cerevisiae*.

La phosphatase acide répressible (E.C. 3.1.3.2.) est localisée dans l'espace périplasmique chez *Saccharomyces cerevisiae*. La fraction majeure de l'enzyme est codée par le gène *PHO5* (et la fraction mineure est composée des produits des gènes *PHO11* et *PHO10*). L'expression du gène *PHO5* est réprimée par un excès de phosphate inorganique (P_i) présent dans le milieu. Elle est au contraire activée à faible concentration en P_i . Des études génétiques ont permis de montrer que cette expression du gène *PHO5* en réponse au phosphate inorganique est contrôlée par 5 gènes de régulation : *PHO2*, *PHO4*, *PHO80*, *PHO81* et *PHO85* (Toh-e *et al.*, 1973). Un modèle de ce mécanisme de régulation a été proposé par Oshima (Oshima, 1982) (Fig. 1.4.)

Le produit du gène *PHO4* s'associe au produit de *PHO2* pour former un complexe protéique qui peut activer la transcription de *PHO5* tandis que le produit de *PHO80* et celui de *PHO85* s'associent pour former le facteur négatif de l'expression de *PHO5*.

En présence de P_i , donc en conditions de répression, le complexe *PHO80*-*PHO85* se lie à la protéine *PHO4* et empêche celle-ci de former avec le produit de *PHO2* le complexe activateur de la transcription de *PHO5*.

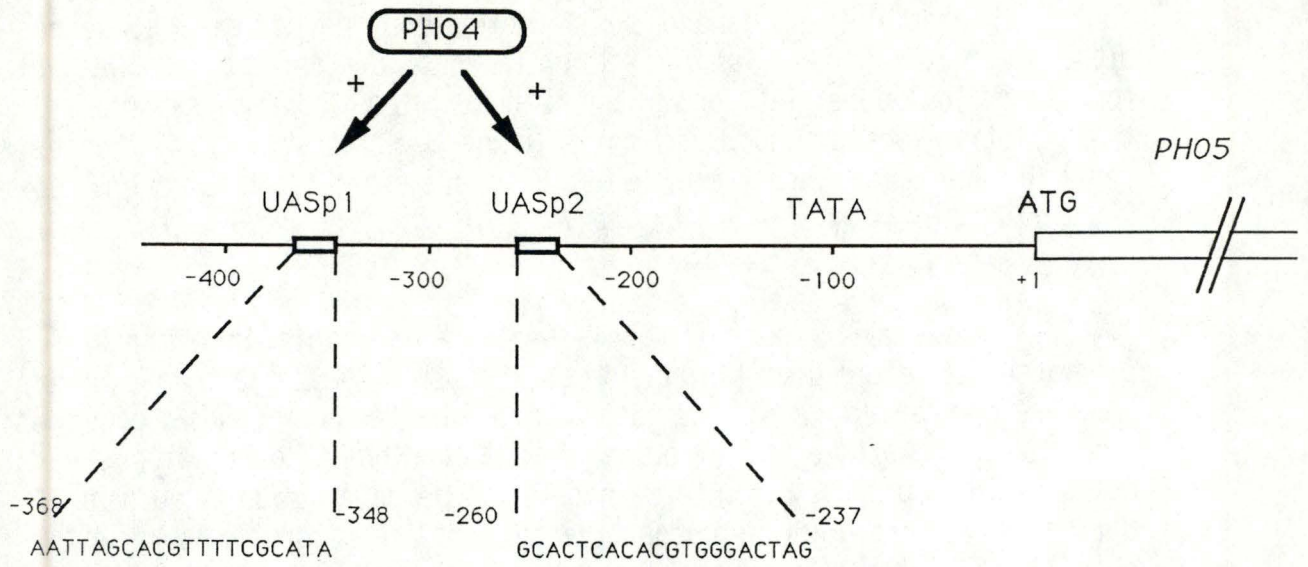


Fig. 1.5. La protéine PH04 est capable de se lier *in vitro* à deux séquences, l'UASp1 et l'UASp2, dans le promoteur du gène *PH05* et d'activer la transcription de celui-ci.

Par contre, en absence de Pi, le produit de *PHO81*, le médiateur, s'associe au complexe PHO80-PHO85 pour former un ensemble protéique sans affinité pour la protéine PHO4. Celle-ci peut alors s'associer au produit de *PHO2* et activer la transcription de *PHO5*. Le médiateur est inhibé en présence de Pi et donc incapable de s'associer au complexe PHO80-PHO85. Pour que le modèle s'applique, tous les gènes sont supposés être exprimés de manière constitutive.

Le modèle proposé ci-dessus est basé sur des études réalisées sur des souches comportant des mutations dans les différents gènes régulateurs. L'isolement et la caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans ce système sont nécessaires afin de vérifier les hypothèses émises par ce modèle.

Nous présentons, ici, les travaux réalisés sur ces différents gènes régulateurs, grâce aux techniques de génétique moléculaire et les implications des résultats de ces travaux sur le modèle de régulation de la phosphatase acide.

Nous examinerons d'abord les gènes *PHO4* et *PHO2* qui activent la transcription de *PHO5* puis les gènes *PHO80* et *PHO85* qui répriment la transcription de *PHO5* et enfin le médiateur *PHO81*.

1.3.1. *PHO4* et *PHO2* activent la transcription de *PHO5*.

1.3.1.1. Rôle attribué à *PHO4*

Rappelons que la protéine PHO4 est un facteur positif capable d'activer la transcription de *PHO5*. Il a été montré qu'elle peut se lier *in vitro* au promoteur de *PHO5* sans le concours de la protéine PHO2 (Vogel *et al.*, 1989). Deux sites de liaison, l'UASp1 et l'UASp2, ont été identifiés (Fig.1.5.). Donc, le produit du gène régulateur *PHO4* est capable de se lier seul au promoteur du gène *PHO5* et de médier ainsi le signal d'activation de transcription de celui-ci. La manière selon laquelle la protéine PHO4 se lie à l'ADN n'est pas encore connue. Mais, l'analyse de la séquence protéique de PHO4 déduite de la séquence nucléotidique (Legrain *et al.*, 1986 ; Koren *et al.*, 1986) révèle la présence d'un domaine de liaison à l'ADN (Ogawa et Oshima, 1990). En effet, la partie C-terminale de PHO4, dont le rôle a été confirmé par délétion (Berben *et al.*, 1990a), a une grande homologie avec un motif de liaison à l'ADN récemment décrit : "l'amphipatic helix-loop-helix" (ou A-HLH) (Murre *et al.*, 1989). Ce motif A-HLH a été trouvé sur la protéine c-myc ou les protéines E12 et E17 qui sont capables de se lier aux enhanceurs d'immunoglobulines. Le motif A-HLH est caractérisé par deux hélices α de part et d'autre d'un "loop" et précédées par une région basique.

De plus, le gène *PHO4* présente toutes les caractéristiques des gènes régulateurs chez *Saccharomyces cerevisiae* (Legrain *et al.*, 1986 ; Koren *et al.*, 1986) à savoir, un taux de transcription faible et constitutif

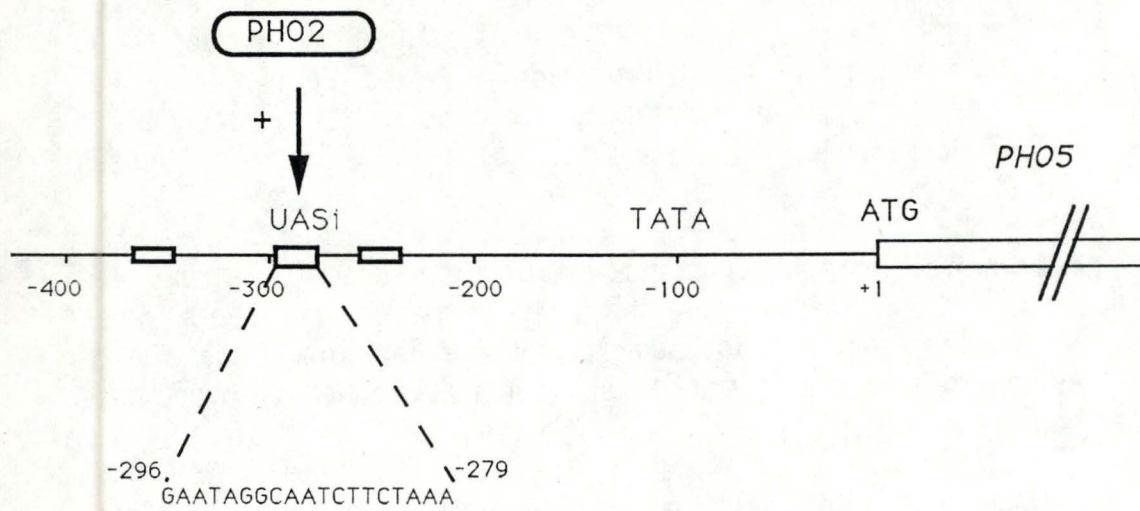


Fig.1.6. La protéine PH02 est capable de se lier *in vitro* à une séquence, l'UAS1 dans le promoteur de *PH05* et d'activer la transcription de celui-ci.

(indépendant du Pi), une traduction se faisant à un faible niveau en utilisant, préférentiellement, des codons de genes faiblement exprimés et enfin une taille faible de la protéine qui est de 310 acides aminés pour PHO4.

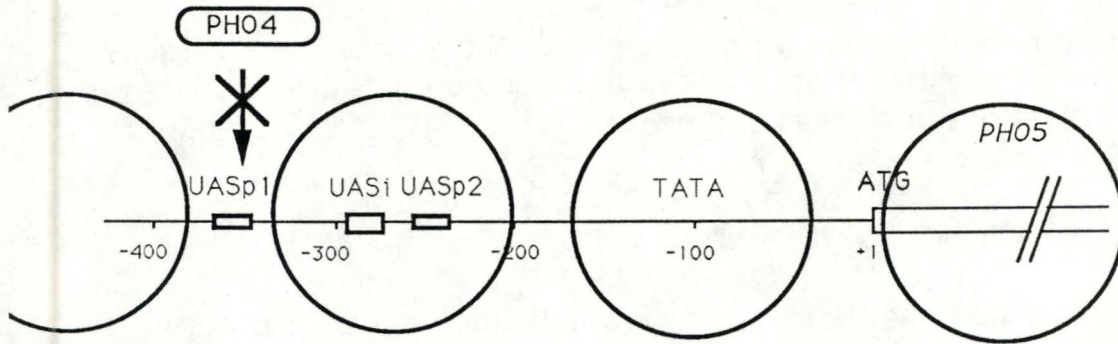
1.3.1.2. Rôle attribué à PHO2

La protéine PHO2 est aussi un facteur positif qui active la transcription de PHO5. Elle est aussi capable de se lier *in vitro* à un site spécifique du promoteur de PHO5, nommé UASi (Vogel *et al.*, 1989) (Fig. 1.6.). Une surproduction de PHO4 peut remplacer la fonction de régulation de PHO2 dans le système phosphatase (Berben *et al.*, 1988). La fonction de PHO2 serait alors d'augmenter l'efficacité de la transcription de PHO5 (Yoshida *et al.*, 1989a).

Mais, le gène régulateur PHO2 est aussi important pour le développement de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, la souche mutante *pho2⁻* est incapable de "sporuler" alors qu'une surproduction de PHO2 est toxique pour la levure. Cette toxicité est observée au niveau de la morphologie des cellules et d'un ralentissement du taux de croissance (Berben *et al.*, 1990b).

Le gène PHO2 est en fait un gène pléiotropique qui intervient dans différentes voies métaboliques. En effet, par mapping génétique et par comparaison de séquences, il est apparu que le gène PHO2 est le même que le gène BAS2. BAS2 est requis dans le contrôle basal de la transcription du gène HIS4, un gène qui code pour une protéine qui intervient dans la biosynthèse de l'histidine et de l'adénine (Arndt *et al.*, 1987). De plus, PHO2 (= BAS2) intervient aussi dans la biosynthèse du tryptophane en contrôlant l'expression du gène TRP4 (Braus *et al.*, 1989). Dans les deux cas, il a été montré que PHO2 se liait *in vitro* aux promoteurs de HIS4 et de TRP4. Les sites de liaison reconnus dans chacun des promoteurs (PHO5, HIS4, TRP4) se révèlent légèrement différents. Donc, les séquences reconnues par PHO2 dans les différents promoteurs sont dégénérées. Une séquence consensus a tout de même été proposée : (TTAA)ⁿ (Tice-Baldwin *et al.*, 1989). Dans chaque cas, la protéine PHO2 intervient avec une autre protéine régulatrice. L'analyse de la séquence protéique de PHO2 (Sengstag *et al.*, 1987 ; Berben *et al.*, 1988) révèle des sites éventuels de liaison avec l'ADN. Une région est entre autres homologue à une homéobox (Bürglin, 1988). Les homéobox sont des séquences conservées dans la région codante des gènes qui contrôlent le développement chez *Drosophila melanogaster*. On retrouve aussi ces séquences dans les gènes d'amphibiens et de mammifères intervenant dans le développement embryonnaire. Il a été montré qu'une protéine de *Drosophila melanogaster* pourvue d'une séquence homéobox (la protéine En produite par le gène *engrailed*) est capable de se lier *in vitro* au promoteur de HIS4 exactement au site de liaison de PHO2 (Tice-Baldwin *et al.*, 1989). Les protéines codées par ces gènes sont donc capables de se lier à l'ADN, mais le mécanisme de liaison n'est pas connu.

A/ En présence de Pi.



B/ En absence de Pi

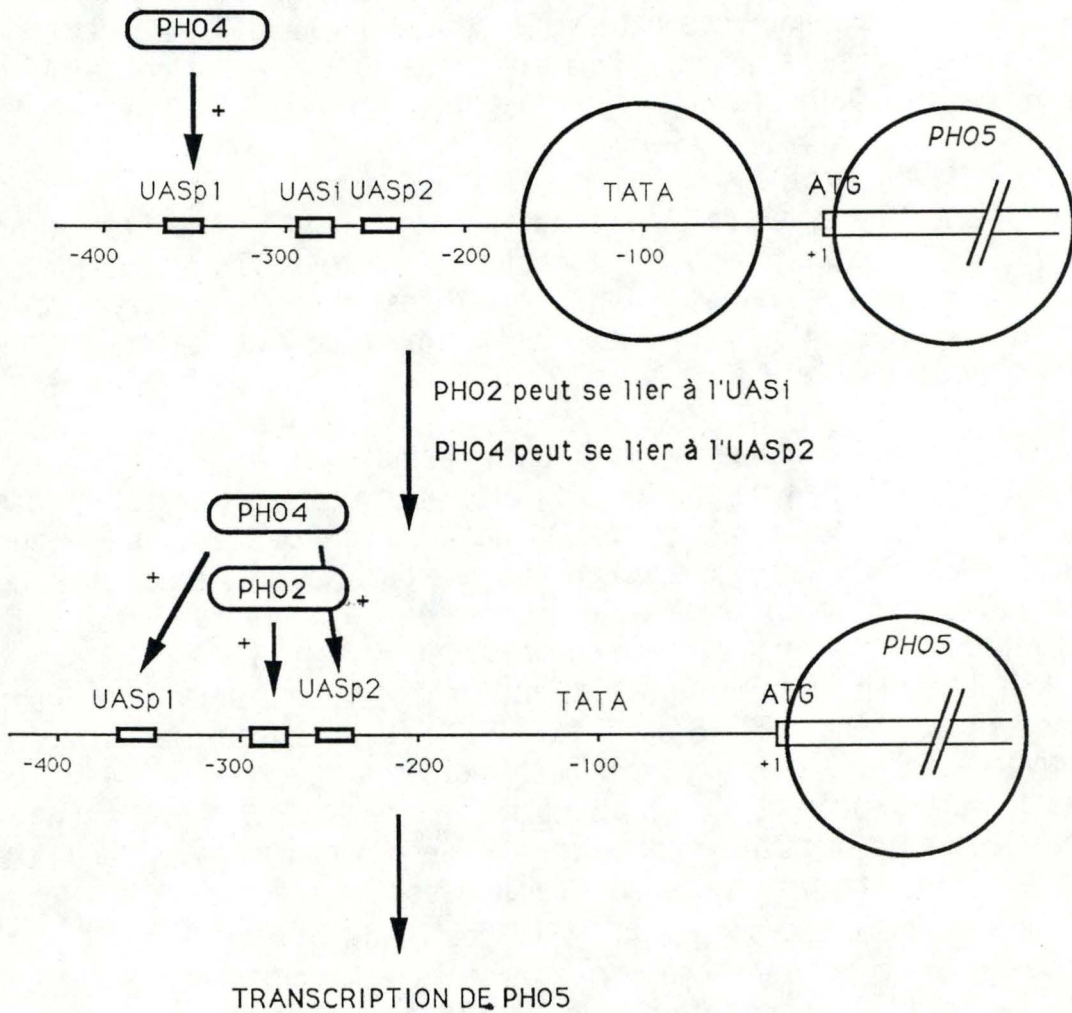


Fig. I.7. Mécanisme d'activation de la transcription de *PHO5* par les protéines PHO2 et PHO4.

Selon les conditions (répression (A) ou activation (B)), la protéine PHO4 se lie ou non à l'UASp1. Cette liaison produit une première modification de la structure des nucléosomes dans la région promoteur qui entraîne la suite du processus d'activation de celui-ci.

Les cercles représentent les nucléosomes.

Ceci confirme donc le fait que *PHO2* est un gène régulateur qui peut intervenir dans le développement en contrôlant différentes voies métaboliques. Dans la régulation de la phosphatase acide, sa fonction serait d'augmenter l'efficacité de transcription de *PHO5* après que le signal d'activation médié par *PHO4* soit enclenché.

Récemment, un mécanisme d'activation de la transcription de *PHO5* par les protéines *PHO2* et *PHO4* a été proposé (Fascher *et al.*, 1990) (Fig. 1.7.). Ce mécanisme est basé sur l'observation suivante : la structure de la chromatine dans la région du promoteur de *PHO5* est différente lorsque le gène est activé et serait donc importante pour la régulation de la transcription. En condition d'activation (faible concentration en P_i), on a constaté que quatre nucléosomes étaient enlevés du promoteur de *PHO5* (Almer *et al.*, 1986).

Il a été montré que les protéines *PHO2* et *PHO4* sont nécessaires pour l'enlèvement des nucléosomes. En condition d'activation, la protéine *PHO4* pourrait se lier à l'UASp1 en position -367 qui coïncide avec une région hypersensible dépourvue de nucléosomes. En se liant à l'UASp1, la protéine pourrait enlever deux nucléosomes. L'UASp2 reconnue par *PHO4* et l'UASi reconnue par *PHO2* qui sont intranucléosomiales seraient dès lors accessibles une fois le premier nucléosome enlevé. La protéine *PHO2* pouvant se lier à l'UASi aiderait la protéine *PHO4* (par interaction *PHO2-PHO4* ou par effet direct de *PHO2* sur la stabilité du nucléosome) à enlever le nucléosome adjacent. Les nucléosomes enlevés, la transcription du gène *PHO5* pourra avoir lieu. (Fascher *et al.*, 1990)

1.3.2. *PHO80* et *PHO85* répriment la transcription de *PHO5*

Les protéines *PHO80* et *PHO85* sont des facteurs négatifs qui répriment la transcription de *PHO5* lorsque le taux de P_i est élevé.

Le gène *PHO80* présente les caractéristiques des gènes régulateurs (Madden *et al.*, 1988 ; Toh-e & Shimauchi, 1986) à savoir, un taux de transcription faible et constitutif (indépendant du P_i), une utilisation des codons ne correspondant pas à ceux préférentiellement utilisés dans les gènes de structure à haut niveau d'expression et enfin une taille faible de la protéine qui est de 293 acides aminés pour *PHO80*.

Pour *PHO85*, par comparaison de séquences, une homologie avec une protéine kinase *CDC28a* a été trouvée (Toh-e *et al.*, 1988). *CDC28* est une protéine kinase AMP cyclique dépendante qui intervient, comme sa désignation l'indique (*CDC*), dans le cycle de division cellulaire.

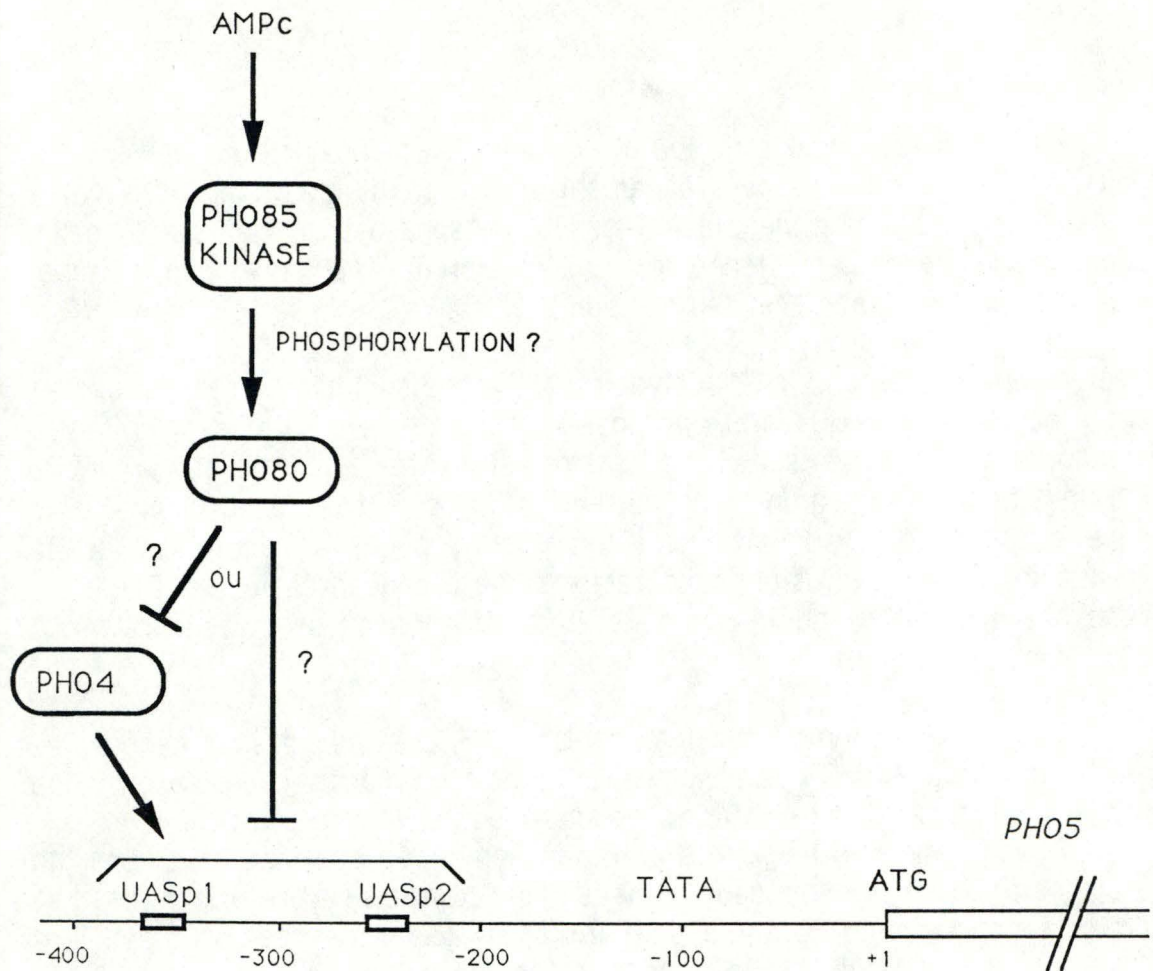


Fig. 1.8. Schéma illustrant le rôle probable des facteurs négatifs PHO80 et PHO85. PHO80 exercerait sa répression en inactivant PHO4 ou en se liant au promoteur de *PHO5* et entrerait ainsi en compétition avec PHO4.

PH085 serait alors une protéine kinase AMPc dépendante et sa fonction serait de phosphoryler la protéine PH080. En effet, on retrouve dans la protéine PH080 une séquence consensus de la phosphorylation pour la protéine kinase C. Cette séquence se trouve dans une région essentielle pour la fonction de la protéine PH080 (Gilliquet *et al.*, 1990). Donc, la fonction de PH080 serait régulée par phosphorylation.

La manière dont le produit du gène *PH080* exerce sa répression sur *PH05* n'est pas connue. Deux hypothèses sont avancées (Madden *et al.*, 1988) :

- soit la protéine PH080 se lie à la protéine PH04 et empêche cette dernière d'activer *PH05*
- soit la protéine PH080 se lie directement au promoteur de *PH05* pour réprimer sa transcription.

En vue de valider une de ces hypothèses, il faudra tester la capacité de liaison *in vitro* de la protéine PH080 au promoteur de *PH05*

En résumé, la protéine PH085 serait une kinase qui régulerait la fonction de PH080 par phosphorylation (Fig. 1.8.). La manière dont la protéine PH080 exerce la répression sur *PH05* n'est pas connue.

1.3.3. *PH081*

La protéine PH081 est le médiateur dans le modèle de régulation de la phosphatase acide présenté à la fig. 1.4. Mais, contrairement à ce qui a été proposé dans ce modèle, le gène *PH081* n'est pas exprimé de manière constitutive car les travaux de Yoshida *et al.* (1987) indiquent que la transcription de *PH081* est dépendante de la concentration en Pi. Il montre, par Northern, qu'un taux élevé d'ARN messagers du gène *PH081* est produit en conditions d'activation (faible concentration en Pi). En milieu de culture riche en Pi, la transcription du gène *PH081* est fortement réprimée.

Dans une étude complémentaire récente (Yoshida *et al.*, 1989b), les résultats semblent montrer que la régulation de la transcription du gène *PH081* est la même que celle du gène *PH05*. En effet, dans le mutant *pho4* ou *pho2*, la transcription du gène *PH081* n'est pas activée alors qu'elle est constitutive dans le mutant *pho80* ou *pho85*. Donc, comme pour la transcription de *PH05*, les protéines PH04 et PH02 seraient des facteurs positifs de la transcription de *PH081* et les protéines PH080 et PH085, des facteurs négatifs.

Il en découle alors un modèle d'un système régulateur en circuit fermé. Mais dans ce nouveau modèle, la fonction de la protéine PH081 n'apparaît pas clairement. Deux mécanismes ont été proposés par Yoshida pour expliquer la fonction de PH081. Dans les deux mécanismes proposés le rôle particulier de PH085 n'est pas précisé.

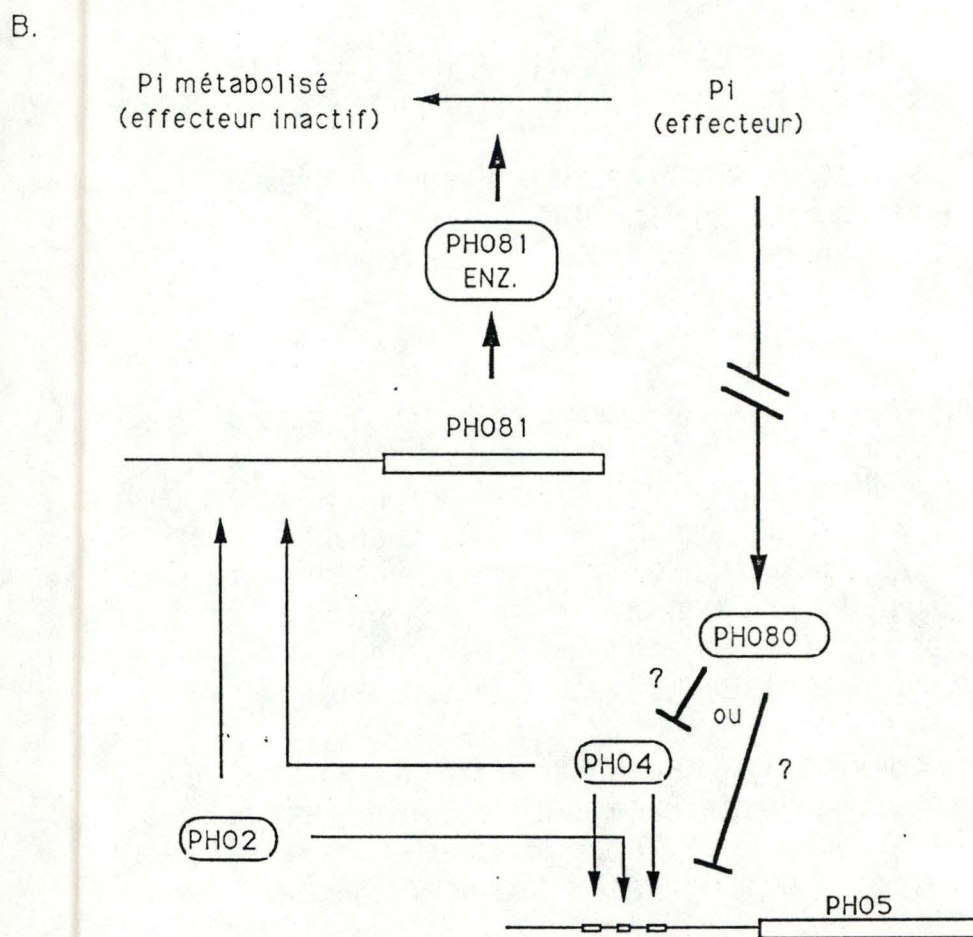
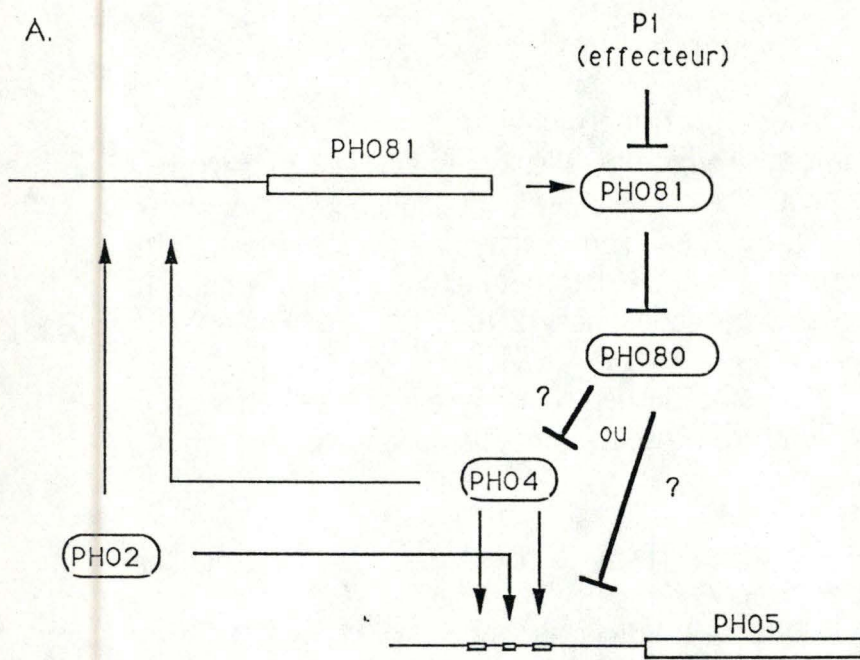


Fig.1.9. Deux mécanismes hypothétiques de la fonction de PHO81 (d'après Yoshida *et al.*, 1989b).

A./ PHO81 a une fonction de protéine régulatrice qui inactive PHO80 en absence de P_i (conditions d'activation de *PHO5*)

B./ PHO81 a une fonction d'enzyme et métabolise l'effecteur en une forme inactive. En absence de P_i , PHO80 n'est plus activé et n'exerce plus sa répression sur *PHO5*.

Selon un des mécanismes (Fig. 1.9.A.), la protéine PHO81 est impliquée dans la détection du signal de Pi. Lorsque la concentration de l'effecteur (le Pi ou un de ses dérivés) est faible, la protéine PHO81 interagit avec la protéine PHO80, le facteur négatif. La protéine PHO80 est alors inactivée, et la protéine PHO4 peut activer la transcription de PHO5. Par contre, lorsque la concentration de l'effecteur est élevée, la protéine PHO81 est inactivée par l'effecteur et la protéine PHO80 peut alors exercer sa répression.

Dans l'autre mécanisme (Fig. 1.9.B), la protéine PHO81 peut être considérée comme une enzyme qui métaboliserait l'effecteur en une forme inactive. Lorsque la concentration en Pi est élevée, la protéine PHO80 est activée par l'effecteur et peut exercer sa répression sur *PHO5*. A faible concentration en Pi, l'enzyme PHO81 fortement exprimée peut métaboliser l'effecteur en une forme inactive. La protéine PHO80 n'est alors plus activée et ne peut donc plus exercer sa répression.

Yoshida avance deux arguments en faveur du deuxième mécanisme attribuant à la protéine PHO81 une fonction d'enzyme. En effet, au contraire des gènes régulateurs exprimés à faible taux et de manière constitutive, le gène *PHO81* est exprimé à un taux élevé et de manière régulée.

Cependant, les résultats des travaux de Yoshida apparaissent contradictoires. En effet, lors de l'isolation du gène *PHO81* (Yoshida *et al.*, 1987), ses résultats montrent qu'un fragment de 12,4 kb complémente la mutation *pho81*. De ce fragment de 12,4 kb, est délimité un fragment réduit de 2,8 kb qui complémente toujours la mutation *pho81* (Fig. 1.10.). Le gène entier de *PHO81* serait donc contenu dans ce fragment de 2,8 kb qui, selon des résultats non publiés, comporterait une ORF de près de 2 kb.

Or, ces mêmes auteurs, dans des travaux plus récents (Yoshida *et al.*, 1989b), estiment sur base d'expérience de Northern la taille de l'ARN messager de *PHO81* à 3,5kb (Fig. 1.11.). Il est donc clair que la détermination de la taille du gène estimée précédemment à 2,8kb sur base de résultats de complémentation doit être revue.

Pour ce faire, nous allons réaliser la construction de différents sous-clones à partir d'un insert génomique contenant le gène *PHO81* entier afin de délimiter sans ambiguïté la taille minimale du gène. Les constructions sont réalisées dans des vecteurs à copie unique (YCp) au contraire du protocole suivi par Yoshida, ceci afin d'éviter les effets de dosage génique susceptible de biaiser les résultats. En effet, on peut craindre qu'un gène même tronqué produisant une protéine déficiente ou à taux réduit puisse complémenter une mutation s'il est porté par un vecteur à haut nombre de copie (YEp).

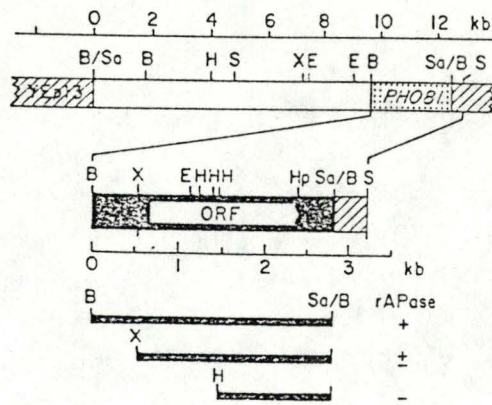


Fig. 1.10. Résultats des travaux de complémentations du mutant *pho81* (Yoshida et al., 1987)

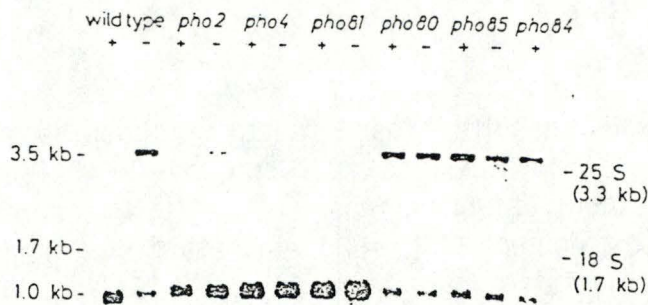


Fig. 1.11. Détection des transcrits *PHO81* par Northern chez différentes souches mutantes et une souche sauvage en présence (+) et en absence (-) de Pi. (Yoshida et al., 1989b)
 La sonde utilisée est le plasmide pUC18 marqué au ^{32}P ayant inséré un fragment de 1,4kb du gène *PHO81* et un fragment de 0,9kb du gène *LIRA3*.
 La taille de l'ARN messager du gène *PHO81* est estimée à 3,5kb. La taille de l'ARN messager du gène *LIRA3* est estimée à 0,9kb. A noter l'absence de transcript chez les mutants *pho2* et *pho4* en condition d'activation(-).

Nous pensons donc que le gène complet doit atteindre une taille minimale de l'ordre de 3,5kb. En se référant aux résultats de complémentation obtenus dans notre laboratoire (*cf.* résultats et discussion), un fragment génomique d'au moins 0,7kb devrait se situer en amont du site *Bam*HI de l'insert de 2,8kb pour que le gène *PHO81* soit entier.

I.4. BUT DU TRAVAIL

Ce travail est réalisé dans le cadre général de l'étude du gène *PHO81* qui intervient dans le système régulateur de la phosphatase acide chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette étude vise, d'une part, à élucider les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression du gène *PHO81* et, d'autre part, à expliquer la fonction de la protéine PHO81 dans le système de la phosphatase acide.

Une équipe de chercheurs japonais a publié à plusieurs reprises des données sur le gène *PHO81* (Yoshida *et al.*, 1987 et Yoshida *et al.*, 1989b). Cependant, les résultats présentés par ces auteurs apparaissent contradictoires. En effet, un fragment de 2,8 kb contenant le gène *PHO81* entier a été cloné par complémentation, alors même que la taille du mRNA, telle qu'elle apparaît sur Northern blot, est estimée à 3,5 kb.

Notre hypothèse est donc que le fragment de 2,8 kb porte le gène *PHO81* tronqué en sa région 5' d'une séquence d'au moins 0,7 kb.

Notre but est donc de déterminer les limites exactes du gène et de lever ainsi cette contradiction. Pour ce faire, nous disposons d'un vecteur (pJV8) portant un fragment génomique de 7 kb qui contient le gène entier *PHO81* (Vandenhoute *et al.*, 1988) et d'une souche (VD33d) de levure mutante pour ce même gène. A partir de ce fragment de 7 kb, nous allons construire une série de sous-clones et tester leur capacité de compléter la souche mutante. Nous délimiterons ainsi un fragment réduit qui contient le gène *PHO81* entier.

Par ailleurs, le séquençage du gène *PHO81* nous donnera finalement une information précise quant au début de la phase ouverte de lecture. De plus, l'analyse de la région amont (côté 5') nous permettra d'identifier des séquences éventuelles de régulation de la transcription. L'ensemble de ces données devrait permettre d'apporter des réponses aux questions relatives au contrôle de l'expression du gène *PHO81*.

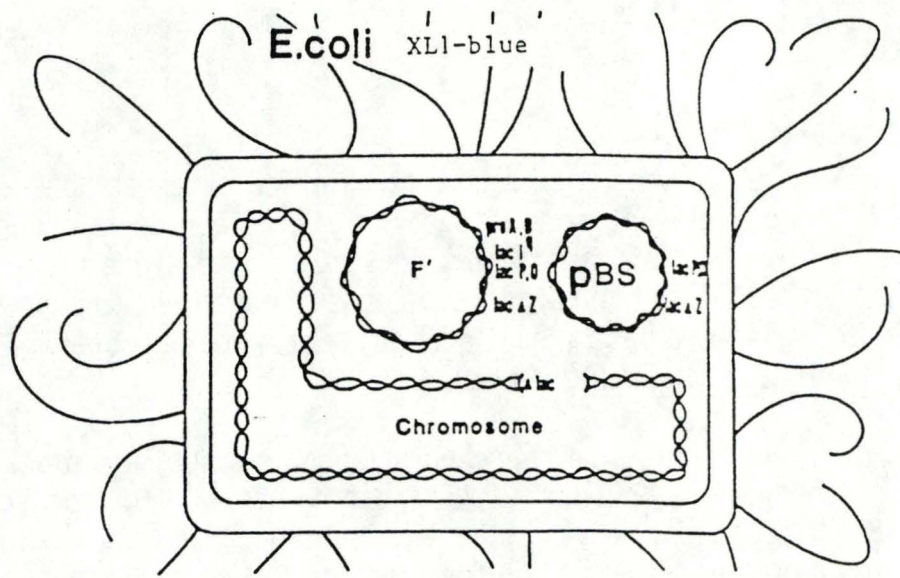


Fig. II.1. Marqueurs présents dans une bactérie de la souche XL1-Blue hébergeant un plasmide pBluescript (pBS).

II. MATERIEL ET METHODES.

II.1. Souches et plasmides.

II.1.1. Souche bactérienne

A. XL1 blue

Nous avons utilisé la souche XL1 blue de *Escherichia coli*, commercialisée par Stratagene, qui contient l'épisome F' (fig.II.1.). XL1 blue est recA1, endA1, gyr A96, thi-1, hsd R17 (rk-,mk+), sup E44, rel A1, λ -, proAB, (lac-), [F', pro AB, lac lqZ Δ M15, Tn 10 (tet^R)].

Rec A1 réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi les risques de réarrangements par recombinaison entre ADN endogène et exogène.

end A1 diminue le taux d'endonucléases, préservant de la sorte l'intégrité de l'ADN plasmidique préparé à partir de cette souche.

Une délétion au niveau de l'opéron lactose (lac ZYA) rend XL1 blue incapable de métaboliser le lactose (lac-), condition requise pour la sélection bleu-blanc (voir ci-dessous).

L'épisome F', responsable de la présence de pili sexuels en surface de la bactérie, porte un fragment Tn 10, qui contient un marqueur de résistance à la tétracycline, permettant de sélectionner les bactéries contenant l'épisome F' (sur un milieu contenant de la tétracycline).

L'épisome F' permet une sélection des clones portant un plasmide recombinant ou non par un test bleu-blanc. L'épisome F' contient un fragment du gène lacZ (Z Δ M15) qui, par complémentation intragénique avec un plasmide portant un autre fragment du gène lacZ (lacZ'), donne une coloration bleue à la colonie en présence d'un chromogène, le X-gal (voir plus loin). Si, au niveau du plasmide, le fragment lacZ' est disrupté (plasmide recombinant), la colonie sera blanche en présence de X-gal.

Au niveau de l'épisome F', juste en amont de Z Δ M15, on trouve lacI^q, une mutation augmentant la force (10X) du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose

B. JM101.

Nous avons aussi utilisé la souche d'*Escherichia coli* JM101 en vue des transformation avec le vecteur YCp50. Son génotype est : thi-1, sup E44, λ -, pro AB, (lac-) [F', pro AB, lac lqZ Δ M15].

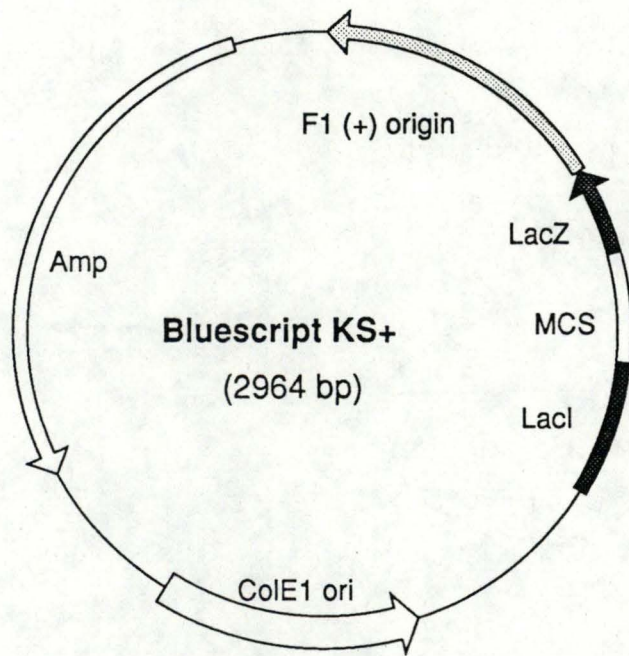


Fig. 11.2. Le plasmide pBluescript KS+.

XL1 Blue

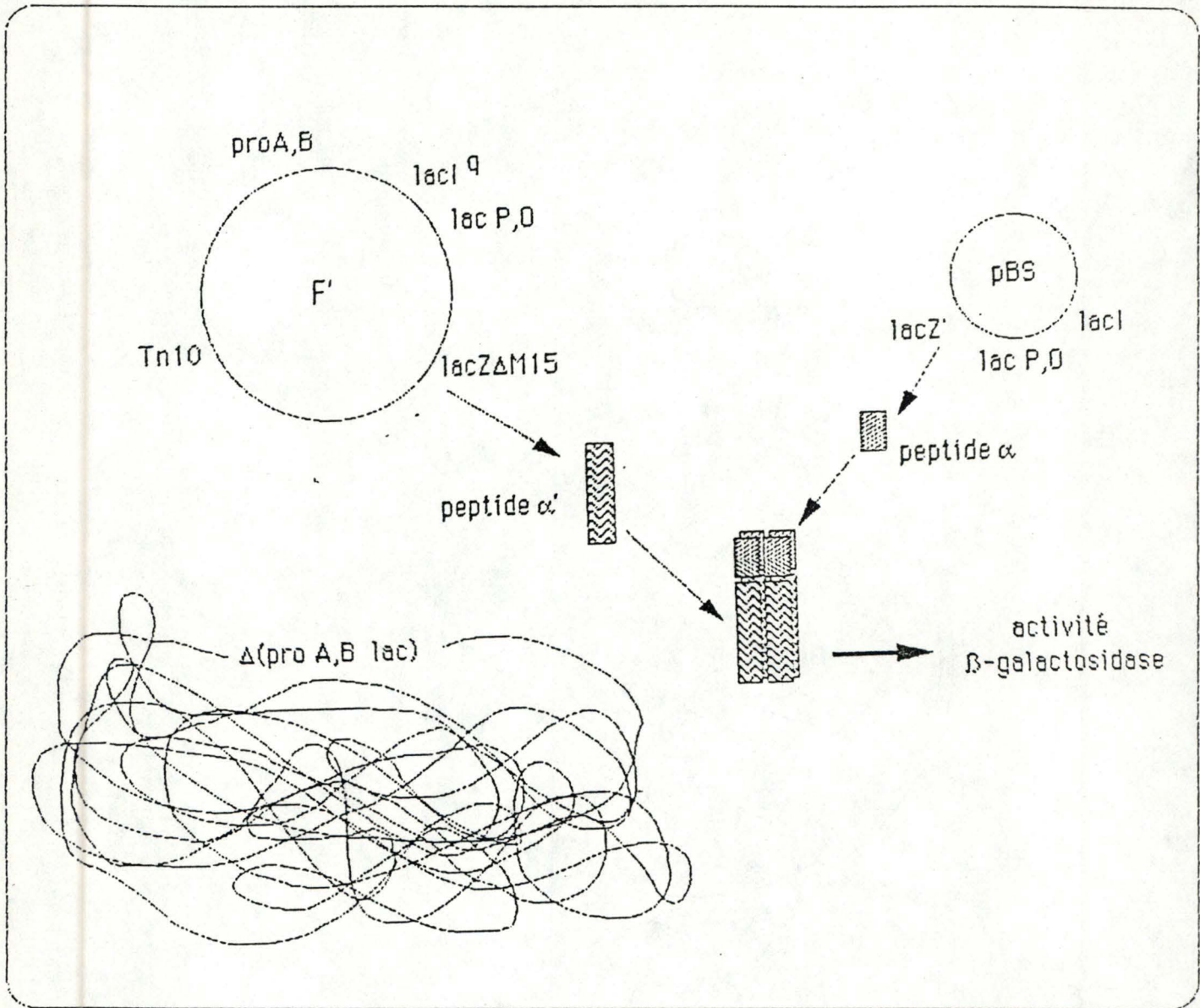


Fig. 11.3. Système de complémentation intragénique permettant le test bleu-blanc dans XL1 blue

II.1.2. Plasmide bactérien

Le vecteur utilisé en vue du séquençage est le pBluescript KS+ commercialisé par Stratagene (Fig.II.2.).

Le plasmide pBluescript est en fait un phagemide, c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage, de 2964 paires de bases (pb). Il porte une origine de répllication pour *E. coli* (col E1 ORI) et l'origine de répllication phagienne f1; pBluescript peut ainsi se répliquer sous forme d'un plasmide bicaténaire ou d'un phage monocaténaire selon les conditions du milieu.

Caractéristiques de pBluescript:

Amp: gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase) permettant la sélection des colonies possédant le vecteur.

Les gènes de structure de l'opéron lactose (lacZ, lacY et lacA) assurent le métabolisme du lactose et leur régulation est telle que ces gènes ne s'expriment ni en absence de lactose ni en présence de glucose, source de carbone préférentiellement métabolisée.

Le contrôle négatif de l'opéron est assuré par une protéine répresseur codée par le gène lacI. En se liant à l'ADN en un site opérateur, ce répresseur empêche l'initiation de la transcription de l'opéron.

Le gène lacI^q porté par l'épisome F' de la souche XL1-blue est caractérisé par la force de son promoteur. La synthèse de répresseur est augmentée d'un facteur 10. La répression peut ainsi s'exercer sur les quelques copies de F' présentes dans une bactérie mais également sur les copies plus nombreuses de pBluescript. Cette répression empêche que l'expression des gènes portés par ce vecteur à nombre de copies élevé ne constitue un fardeau mortel pour la bactérie. Cependant, en présence de lactose (en conditions naturelles), l'inducteur (l'allolactose ou le galactobiose, produit par une activité secondaire galactosyl-transférase de la β -galactosidase) se fixe au répresseur formant un complexe non lié à l'opérateur. Cette dérèpression permet l'initiation de la transcription au promoteur. Nous utilisons un inducteur non dégradable, l'IPTG.

Le facteur de contrôle positif est la protéine CAP.

Le fragment lacZ du plasmide pBluescript contient:

lacI: un fragment non opérationnel du gène régulateur lacI.

lacZ': contient le promoteur lac, l'opérateur et la partie N-terminale du gène de la β -galactosidase. Cette portion de gène code pour un peptide α qui est un peptide inactif. Lorsqu'un tel vecteur transforme une bactérie XL1-blue, la complémentation intragénique entre le peptide α (codé par le vecteur) et le produit du gène lacZ Δ M15 (porté par F') permet d'obtenir une β -galactosidase fonctionnelle. L'activité β -galactosidasique est mise en évidence par un test coloré (Fig.II.3.).

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

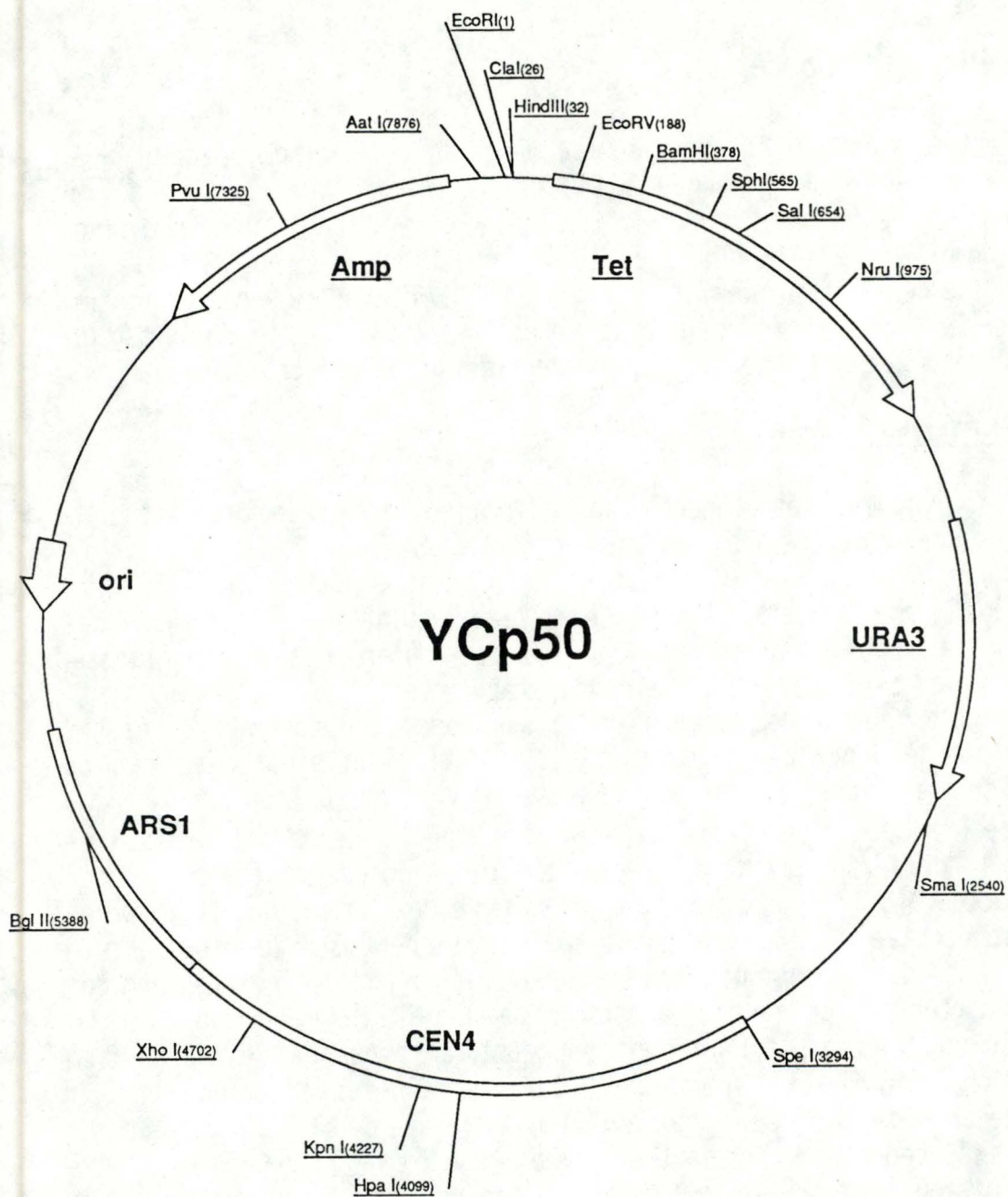


Fig. II.A. Le plasmide YCp50

A l'intérieur de l'extrémité N-terminale du gène *lacZ'* a été introduite une batterie de sites de clonage (par un oligonucléotide de synthèse) où sont localisés 21 sites de restriction uniques (Fig.II.9.). Cette insertion n'altère pas la capacité de complémentation du peptide α .

Cependant lors du clonage d'un fragment d'ADN dans un site de restriction de cette batterie (créant un plasmide recombinant), le gène *lacZ'* est disrupté entraînant l'absence de production du peptide α : la complémentation n'ayant plus lieu, les colonies restent blanches. Le test de coloration permet donc de discriminer les colonies possédant le plasmide natif et celles possédant un plasmide recombinant.

La batterie de sites est orientée de telle sorte que la transcription de *lacZ'* se fait dans le sens Kpn I vers Sac I (d'où l'appellation KS). Cette batterie de sites de clonage est aussi appelée polylinker ou site multiple de clonage (en anglais: MCS pour "multiple cloning site").

II.1.3. Souches de levure *Saccharomyces cerevisiae*

-FL100 est une souche de type sauvage c'est-à-dire qu'elle ne porte aucune mutation. Son type sexuel est α . Cette souche sera utilisée comme contrôle positif lors des tests de l'activité de la phosphatase acide.

-VD33d (Vandenhoute *et al*, 1988) porte une mutation au locus *pho81* ainsi qu'au locus *ura3*. Cette souche est donc déficiente en activité phosphatase acide répressible et est incapable de synthétiser de l'uracile.

II.1.4. Plasmide "navette" *E.Coli*-*S.Cerevisiae*

Nous avons utilisé le plasmide "navette" *E.Coli*-*S.Cerevisiae* YCp50 (Fig.II.A) qui présente les caractéristiques suivantes :

- il possède un marqueur de sélection *URA3* permettant la sélection dans des souches de levure mutantes pour le gène porté par le plasmide.
- il contient une séquence ARS (Autonomous Replicating Sequence) du chromosome I de *S.Cerevisiae* et une séquence CEN (Centromère) du chromosome IV. Cette séquence CEN permet au plasmide de se comporter comme un chromosome lors de la mitose. Ainsi, le nombre de copie de YCp50 par cellule de levure est faible (1 ou 2) et leur stabilité mitotique élevée.
- il porte une origine de replication pour *E. coli* permettant le maintien du plasmide dans *E. coli*
- il possède un gène de résistance à un antibiotique (ampicilline et tétracycline) permettant la sélection dans *E. coli*
- ils porte des sites uniques de restriction pour le clonage.

II.2. Milieux de cultures:

II.2.1. Milieu de culture bactérien:

LB:

Tryptone	(Oxoïd)	10 g/l
NaCl	(Merck)	5 g/l
Yeast extract	(Oxoïd)	10 g/l
Agar	(Oxoïd)	16 g/l (si milieu solide)

Autoclaver à 120°C pendant 20min.

Les cultures se font à 37°C sous agitation pour les cultures liquides.

Les produits thermolabiles sont ajoutés quand le milieu est à 60°C:

- l'ampicilline: concentration finale de 100 µg/ml
- la tétracycline : concentration finale de 12,5µg/ml
- le X-gal: concentration finale de 40 µg/ml
- l'IPTG: concentration finale de 75 µg/ml

II.2.2. Milieux de culture pour levures:

Milieu riche (YPD):

Glucose (Merck)	20 g/l
Yeast extract (Oxoïd)	10 g/l
Peptones (Difco)	20 g/l
Ajuster à pH 4,8 avec de l'HCl concentré	
Agar (Oxoïd)	16 g/l (si milieu solide)

Milieu minimum (MAM)

Yeast Nitrogen Base without ammonium sulfate and aminoacids (Difco)	1,75 g/l
Ammonium sulfate (Merck)	5 g/l
Glucose (ou autre sucre)	20 g/l soit 2 %
Agar (Oxoïd)	16 g/l (si milieu solide)
Autoclavage	

Milieu165-30:

Pour 1litre:

Sulfate de magnésium	0,7g
Chlorure de calcium	0,4g
Chlorurede sodium	0,5g
Sulfate de potassium	1,0g

EcoR V

#195

5' ... GAT ∇ ATC ... 3'
3' ... CTA \blacktriangle AG ... 5'

Fig. 11.4. La séquence de reconnaissance pour l'enzyme *EcoR* V qui génère des extrémités franches.

EcoR I

#101

5' ... G ∇ AATTC ... 3'
3' ... CTTA \blacktriangle AG ... 5'

Fig. 11.5. La séquence de reconnaissance pour l'enzyme *EcoR* I qui génère des extrémités protrudentes.

Acide citrique	10,5g
Hydroxyde de potassium	9,03g
Dihydrogenophosphate de potassium	0,030g
Chlorure de potassium	1,5g
Agar (Oxoïd)	16g (si milieu solide)

Ajouter au milieu 165-30 après autoclavage :

Pour 100 ml de milieu:

10ml de glucose 30% (stérilisé par autoclavage)
 7,5 ml d'asparagine 1,5% (stérilisé par filtration)
 0,1 ml de traces métalliques
 1 ml de vitamines 10x concentrée.

II.3. La restriction d'ADN plasmidique.

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent une séquence précise dans l'ADN double-brin et qui coupent à un endroit déterminé dans cette séquence de reconnaissance ou, pour certaines enzymes, à proximité. La plupart des enzymes de restriction ont une séquence de reconnaissance de 4 ou 6 pb qui est un palindrome (c'est à dire que la séquence est identique sur les deux brins de l'ADN). Deux exemples sont les enzymes EcoR I et EcoR V dont les sites de reconnaissance sont des hexanucléotides palindromiques (Fig. II.4). Il existe deux types d'enzymes: les premières coupent au milieu du site de reconnaissance, faisant ainsi apparaître une coupure à bouts droits (francs) (Fig. II.5.); les secondes coupent à quelques nucléotides de distance sur chacun des deux brins d'ADN générant des bouts collants (protrudants). Dans ce second cas les extrémités libres peuvent être 3'OH ou 5'P.

Les enzymes utilisées sont commercialisées par les firmes BRL, Boehringer et Biolabs. Elles sont conservées à -20°C.

Ces tampons sont concentrés 10X par rapport à la concentration d'utilisation dans la réaction de restriction. Ils sont le plus souvent livrés avec l'enzyme.

La réaction de restriction fait intervenir l'ADN (miniprep: 5 ou 10 µl d'ADN; maxiprep: 250 ou 500 ng d'ADN), un dixième du volume final de tampon adéquat concentré 10X, l'enzyme de restriction (1U par µg) et de l'eau stérile jusqu'au volume final.

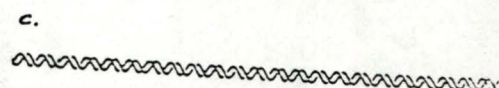
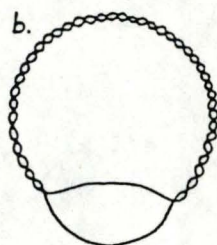
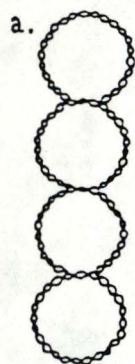


Fig. II.6. Représentation schématique des formes plasmidiques CCC (a), DC (b) et OL (c).

II.4. Electrophorèse d'ADN dans un gel d'agarose.

II.4.1.Principe.

Cette méthode de séparation des fragments d'ADN permet l'évaluation de la taille et de la quantité de ces fragments. Elle est basée sur le fait que l'ADN est chargé négativement (groupes phosphates) et donc migre vers l'électrode positive dans un champ électrique. Le rapport entre la charge et la masse des molécules d'ADN étant constant, il est nécessaire de réaliser cette électrophorèse dans un gel d'agarose pour séparer les molécules suivant leur taille, les pores du gel limitant la migration. Dans ces conditions la vitesse de migration dans le gel dépend essentiellement de 4 facteurs:

- le poids moléculaire des fragments d'ADN. Les molécules d'ADN double-brin linéaire migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

- la concentration en agarose. Les gels à forte concentration (1.5 ou 2%) servent à séparer des molécules d'ADN de petite taille (100pb à 1500pb) tandis qu'à faible concentration (0.8%) les gels servent à séparer des molécules de taille supérieure (500pb à plus de 10 kb).

- la conformation de l'ADN. Les formes plasmidiques CCC (Completely Closed Circular) ou superenroulée, OC (Open Circular) ou circulaire cassée sur un seul brin (nick) et OL (Open Linear) migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative de ces bandes dépend de différents facteurs et notamment des tours de superhélicité de la forme CCC; l'ordre de migration sera CCC>OL>OC (Fig. II.6).

- le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. Si ce voltage est trop important, la résolution diminue.

II.4.2.Protocole.

Composition des solutions et tampons utilisés:

le TBE dans lequel est réalisé et est plongé le gel:

pour 10 litres: 108 gr Tris	donc Tris 0.089M
55 gr Ac. Borique	Borate 0.089M
9.3 gr EDTA	EDTA 0.002M
(ou 40ml EDTA 0.5M pH8.0).	

La solution d'alourdisseur 10X: Bleu bromophenol 0.25%
glycérol 50%
EDTA 25mM.

L'agarose est ajouté à du TBE (solution à 0.8% ou 2%) et le tout est porté à ébullition puis refroidi à 50°C. Ajouter le bromure d'éthidium à une

Longueur des fragments de restriction
du phage λ digéré par *Hind* III (en kb) :

23.130	≡
9.416	≡
6.557	≡
4.361	
2.322	
2.027	—
0.564*	
0.125*	

* rarement ou
jamais visible

Fig. II.7. Marqueur de taille obtenu par restriction
du phage λ par *Hind* III

concentration finale de 0.5 mg/ml (solution stock à 10 mg/ml conservée à l'abri de la lumière). Le bromure d'éthidium a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN (par là même hautement mutagène et donc dangereux) et permet de repérer les bandes d'ADN car il fluoresce en rose-orange sous UV.

Le gel encore liquide à cette température est coulé sur une plaque de plexiglas sur laquelle on place un peigne qui permet d'obtenir des puits dans le gel refroidi et solidifié. La taille des dents du peigne est choisie en fonction du volume des échantillons à déposer, le plus souvent 15 ou 20 μ l. Enlever le peigne et introduire l'échantillon d'ADN à la micropipette dans un des puits. L'échantillon d'ADN aura été préalablement alourdi par l'adjonction de 1/10 du volume total final de solution d'alourdisseur 10X; cette opération permet à l'échantillon de rester au fond du puits grâce au glycérol, et le bleu de bromophénol qui migre à la même vitesse que les plus petits fragments visibles sur le gel permet de contrôler la migration.

Quand tous les échantillons sont introduits dans les puits, placer le gel dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE. Appliquer une différence de potentiel de 40 à 100 V aux extrémités de la cuve pendant environ 2 heures à 4 heures. Placer le gel sur un transilluminateur UV ($\lambda=302$ nm) pour visualiser les bandes d'ADN et photographier. Deux évaluations peuvent être réalisées:

*la taille des fragments. Dans un puits adjacent à celui ou ceux des échantillons, placer un marqueur de taille qui est une molécule d'ADN coupée par une enzyme de restriction générant des fragments de taille connue. Nous avons utilisé le marqueur de taille l'ADN du phage λ restreint par Hind III.(Fig. II.7.)

*la quantité d'ADN dans une bande. La fluorescence étant proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium intercalée dans l'ADN, elle sera d'autant plus intense que les fragments d'ADN d'une bande sont grands et nombreux. La quantité d'ADN du marqueur étant connue, il sera facile d'estimer par comparaison la quantité d'ADN de l'échantillon étudié. Une bande contenant 10ng d'ADN peut être vue sur un gel d'agarose mais la faible intensité de la bande dans ce cas ne permet pas à celle-ci de se marquer sur la photo.

II.4.3. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose (Dretzen, 1981).

Préparer des bouts de papier DEAE cellulose Whatman DE81 d'environ 1cm² et les faire tremper 2 à 3 heures dans une solution de NaCl 2.5M puis laver 3 fois à l'eau stérile avant de les stocker dans une solution d'EDTA 1mM à 4°C.

L'électrophorèse ayant séparé les fragments d'ADN, le gel est incisé devant la bande à récupérer (côté électrode +) et si nécessaire également

derrière pour ne pas contaminer la bande choisie par un fragment un peu plus grand. Introduire dans l'incision le papier Whatman préalablement rincé dans du TBE, en le poussant bien contre la paroi du plexiglas. Refermer le gel, le replacer dans la cuve et poursuivre l'électrophorèse jusqu'à ce que l'ADN soit entré dans le papier (vérifier la fluorescence sous UV).

Le papier est prélevé avec une pince, rincé dans l'eau distillée froide, séché sur papier Whatman et placé dans un Eppendorf (T1) auquel on ajoute 400 μ l de solution d'éluion (Tris HCl 20mM pH7.5, EDTA 1mM, NaCl 1.5M). Le papier est défait par agitation manuelle du tube T1 et incubé 2 heures à 37°C avec agitation intermittente ; les anions du sel vont ainsi déplacer l'ADN du papier vers la solution.

Retourner ensuite le tube Eppendorf T1, en percer le fond avec une épingle chauffée et le placer fermement sur un second tube Eppendorf (T2); placer le tout dans un tube Corex 30 et centrifuger 10 minutes à 8000 rpm dans un rotor SS34 Sorvall. La solution contenant l'ADN passe ainsi dans le tube T2 alors que le papier reste dans le tube T1. Centrifuger le tube Eppendorf T2 contenant la solution 7 à 8 minutes à 12000 rpm à 4°C. Pipetter le surnageant dans un autre tube (T3) sans reprendre le culot de petits morceaux de papier qui ont pu passer dans le tube T2 lors de la centrifugation précédente.

Ajouter au tube T3 (surnageant) 1ml de butanol saturé en eau et centrifuger 30 secondes à la centrifugeuse à Eppendorfs puis éliminer la phase supérieure (le butanol permet d'extraire le bromure d'éthidium).

Précipiter l'ADN en ajoutant 1ml d'éthanol absolu froid (-20°C) et placer 30 minutes à -70°C. Centrifuger 8 minutes à 12000 rpm en chambre froide, éliminer délicatement le surnageant et laver le culot avec 200 μ l d'éthanol froid à 90%. Placer 10 minutes à -70°C et centrifuger 5 minutes à 12000 rpm en chambre froide. Eliminer le surnageant, sécher sous vide et resuspendre dans 15 μ l de TE ou d'eau.

Mettre 5 ml sur gel pour contrôler la présence et la pureté de l'ADN extrait.

II.5.Purification et précipitation d'ADN.

Il est parfois nécessaire d'inactiver l'enzyme de restriction que l'on a fait réagir avec la solution d'ADN; c'est le cas si cet enzyme en inhibe une autre que l'on désire utiliser par la suite. On peut le faire de deux manières:

*dénaturer à la chaleur, mais certaines enzymes ne sont pas sensibles (se référer au catalogue ou à la fiche technique adéquate).

*inactiver par l'EDTA: amener à une concentration finale de 10mM pH7.5.

On peut aussi extraire les protéines d'une solution aqueuse d'ADN au phénol-chloroforme.

Les solutions à préparer sont:

*solution de phénol: phénol auquel on ajoute de la 8-hydroxyquinoline à une concentration finale de 0.1% et équilibrée contre le tampon adéquat (TE dans ce cas-ci). L'hydroxyquinoline est un antioxydant, un inhibiteur de RNase et donne à la solution une teinte jaune qui permet d'identifier les deux phases.

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

*solution de phénol-chloroforme: les deux solutions décrites ci-dessus équilibrées contre le même tampon (TE). Cette solution permet d'inactiver et d'extraire toutes les protéines d'une solution d'ADN.

Ajouter à un volume d'ADN (si le volume est trop petit, l'amener à 100 ou 200 μ l avec du TE) un volume égal de phénol-chloroforme. Vortexer et centrifuger à 12000 rpm 30 secondes. Récupérer la phase aqueuse supérieure dans un second Eppendorf et répéter l'opération avec la solution de chloroforme pour éliminer les traces de phénol.

Précipitation d'une solution aqueuse d'ADN.

Ajouter 1/10 du volume de la solution de Na acétate 3M pH5.2 et 2.5 volumes d'éthanol froid (-20°C).

Faire précipiter 10 à 30 minutes à -80°C puis centrifuger 30 minutes à 12000 rpm en chambre froide.

Éliminer le surnageant puis déposer 1 volume d'éthanol 70% pour éliminer les solutés piégés dans le culot. Centrifuger de même pendant 3 minutes, éliminer le surnageant et sécher sous vide.

Resuspendre dans la quantité désirée de TE.

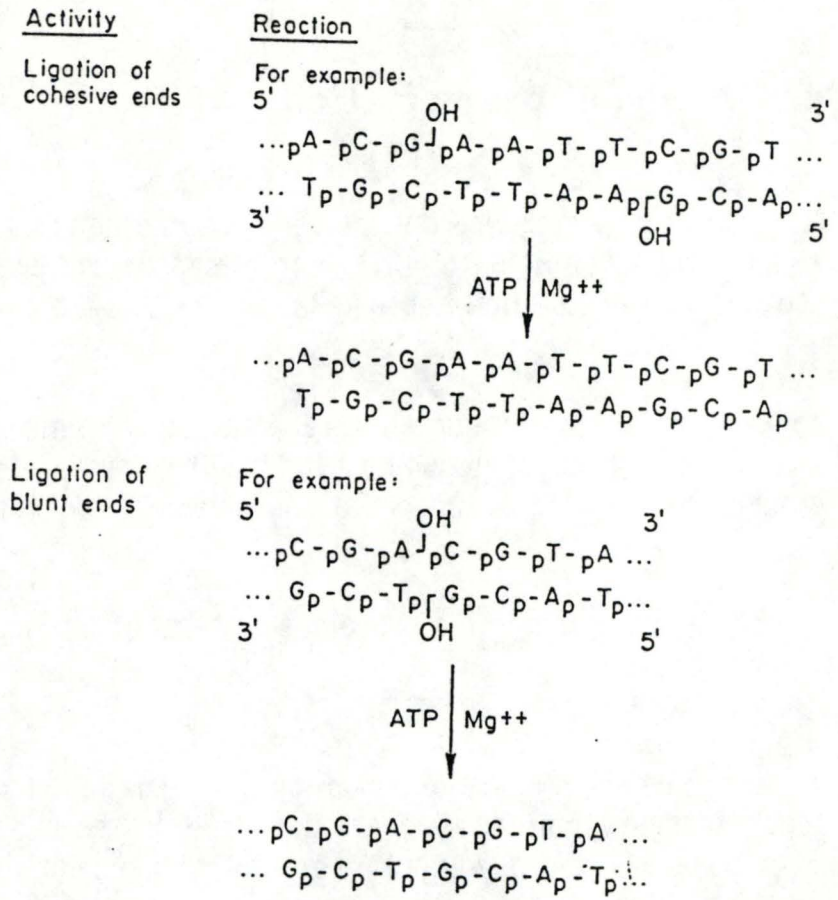


Fig. II.8. Réaction catalysée par la T4 DNA ligase.

II.6. Ligation de molécules d'ADN linéaires ayant des bouts droits ou des bouts protrudants collants.

La ligation de molécules d'ADN clivées à bouts droits, même par des enzymes différentes, est toujours possible, tandis que des molécules d'ADN clivées à bouts collants ne peuvent être assemblées entre elles que si les nucléotides protrudants se correspondent; dans ce cas les bouts protrudants sont dits compatibles.

La ligation est réalisée grâce à l'activité de l'enzyme ADN ligase du phage T4 (T4 DNA ligase). Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiester entre le phosphate 5' d'une extrémité d'une molécule d'ADN et une extrémité hydroxyle 3'. L'enzyme requiert de l'ATP et des cations Mg^{++} pour être active (Fig. II.8.) (Pheiffer, 1983).

La réaction est classiquement réalisée comme suit:

1ml = 1 Unité de T4 DNA Ligase (suffisant pour liquer 5mg d'ADN à bouts collants).

4 μ l de Buffer 5X (BRL). Composition: Tris HCl 20mM pH7.4.

MgCl₂ 10mM.

DTT 10mM.

ATP 1mM.

15 μ l d'ADN en solution.

Incuber 3 heures sur table ou 14 heures à 14°C.

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

II.7. Transformation bactérienne

Principe:

La transformation consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans un microorganisme. A cette fin, la paroi et la membrane bactériennes doivent devenir perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente. *E. coli*, bactérie Gram-, doit être rendue artificiellement compétente, par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium ou de chlorure de rubidium. Ces ions déstabilisent la paroi et la membrane de la bactérie, qui gonfle en prenant l'aspect d'un sphéroplaste. Un choc thermique permet l'entrée de l'ADN dans la bactérie. Suite à cela un temps d'incubation d'au moins 30' à 37°C en milieu riche est nécessaire pour permettre à la bactérie de régénérer sa paroi et de commencer à exprimer le gène de résistance apporté par le plasmide. Enfin, les bactéries sont étalées sur un milieu sélectif où seules les bactéries transformées c'est-à-dire contenant un plasmide portant lui-même un gène de résistance à l'antibiotique (l'agent sélectif) pourront croître.

Protocole:(a) Préparation de cellules XL1-blue compétentes:

Culture de la souche à 37°C sur milieu solide LB + tétracycline 100 µg/ml afin de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'. A partir d'une de ces colonies, ensemencer une préculture contenant 10 ml de LB + tétracycline.

Incuber cette préculture à 37°C pendant environ 4 heures jusqu'à une absorbance à 550 nm comprise entre 1,5 et 2.

Cette préculture sert à ensemencer 100 ml de LB + tétracycline. Agiter fortement la culture pendant environ 1 heure à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm de 0,3 (phase de croissance logarithmique).

Arrêter la culture dans la glace pendant 10'.

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

Laisser la solution 20' dans la glace puis centrifuger 5' à 4°C à 4000 rpm. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl₂ 50 mM - 15 % glycérol équivalent au dixième du volume initial.

Aliquoter la solution dans les eppendorfs et stocker à -80°C.

(b) Transformation:

A 100 à 200 µl de cellules compétentes:

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

-incuber 30 à 45' sur glace

-2' de choc thermique à 42°C

-ajouter 0,5 ml à 1 ml de LB

-incuber entre 30 et 60' à 37°C

-étaier sur boîte avec milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C

Contrôles de transformation:

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

II.8 Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

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

Protocole:

Soit une culture de cellules de levures en milieu YPD.

- Quand la culture a atteint une DO de 1 à 600 nm (ce qui correspond à une densité de cellules de 1 à $2 \cdot 10^7$ /ml), la fractionner en aliquots de 10 ml que l'on centrifuge 10' à 6000 rpm (Rotor SS34 SORVALL)
- Éliminer rapidement le surnageant (culot fragile)
- Resuspendre chaque culot dans 5 ml d'eau distillée stérile et les rassembler deux à deux
- Centrifuger 10' à 6000 rpm (Rotor SS34 SORVALL)
- Éliminer le surnageant et resuspendre chaque culot obtenu dans 2 ml de "TE + LiOAc"
- Répartir à raison de 1 ml par eppendorf (dans un eppendorf, on a donc l'équivalent de 10 ml de culture)
- Centrifuger 15" à 12000 rpm (Janetsky)
- Resuspendre dans 100 μ l de "TE + LiOAc"
- Incuber une heure à 30°C sous agitation légère
- Ajouter 5 à 50 μ g de DNA carrier (ADN de thymus de veau), c'est-à-dire 5 fois plus que la quantité d'ADN plasmidique qui servira à transformer les levures.
- Ajouter 1 à 10 μ g d'ADN plasmidique
- Incuber 30' à 30°C sous agitation légère
- Ajouter 0,7 ml de "TE + LiOAc + PEG"
- Incuber à 30°C pendant une heure (ou pendant la nuit)
- Choc thermique de 5' à 42°C
- Centrifuger 1' à 12000 rpm (Janetsky) et éliminer le surnageant
- Resuspendre les cellules dans 200 μ l d'eau distillée stérile et étaler sur milieu sélectif (100 μ l par boîte).

Contrôles de transformation:

- Témoin de compétence des cellules: transformation avec un plasmide dont on sait qu'il transforme efficacement la souche de levure utilisée par la méthode de Ito (YEp351 par exemple).
- Témoin de viabilité des souches compétentes: ces dernières subissent le protocole de transformation mais sans ajout d'ADN plasmidique et sont étalées sur un milieu non sélectif.
- Détection des révertants sauvages spontanés: par étalement sur milieu sélectif de cellules ayant subi le protocole de transformation sans addition d'ADN plasmidique.

II.9. Extraction rapide d'ADN plasmidique de *E. coli* (miniprep):

La miniprep est divisée en cinq étapes:

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

Protocole:

- Un milieu LB + ampicilline (100 µg/ml) est inoculé avec une colonie de bactéries transformantes
- Incubation une nuit à 37°C en bouteilles universelles agitées
- Prélever 2 à 3 ml de culture (selon le stade de croissance) dans un eppendorf et centrifuger 5' à température ambiante à 12000 rpm (Janetzky)
- Éliminer le milieu
- Ajouter 400 µl de tampon P1 et resuspendre les bactéries à la pipette
- Ajouter 400 µl de tampon P2 (lyse alcaline)
- Incuber 5' à température ambiante
- Ajouter 400 µl de tampon P3 (précipitation des protéines et des débris cellulaires)
- Centrifuger 15' à 4°C à 12000 rpm (Janetzky)
- Récupérer le surnageant
- Ajouter 0.8 volume d'isopropanol (précipitation de l'ADN plasmidique)
- Centrifuger 15' à température ambiante à 12000 rpm (Janetzky)
- Éliminer délicatement le surnageant
- Ajouter un volume d'éthanol 70 % (lavage de l'ADN)
- Centrifuger 15' à 4°C à 12000 rpm (Janetzky)
- Éliminer très délicatement le surnageant
- Sécher sous vide
- Resuspendre dans de l'eau stérile ou du TE

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

II.10.. Préparation d'ADN plasmidique de *E. coli* (midiprep)

- Un milieu de 50 à 80 ml de LB + ampicilline (100 µg/ml) estensemencé avec une colonie de bactéries transformantes ou avec 1 ml issu d'une préculture.
- Incubation une nuit à 37°C en fiole de Wiame agitée
- La culture est centrifugée à 9000 rpm (Rotor GSA SORVALL) à +4°C pendant une à deux minutes

Fig. 11.9. Sites d'hybridation des primers au niveau du MCS de Bluescript KS+

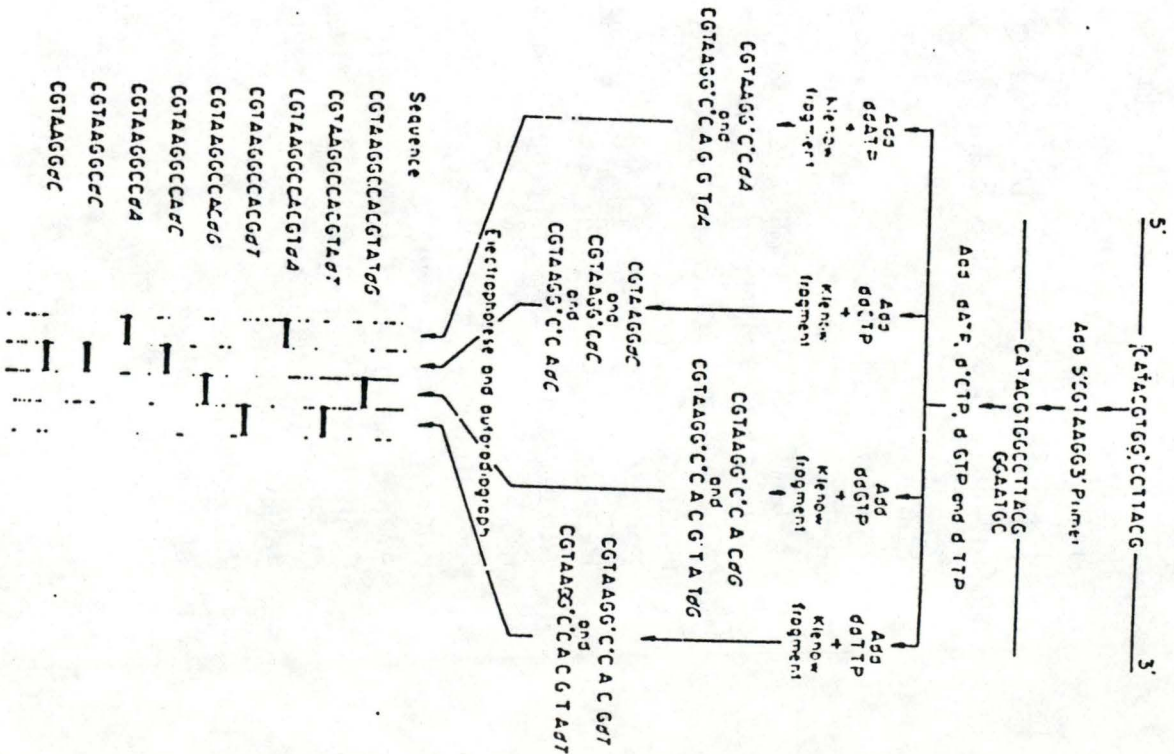
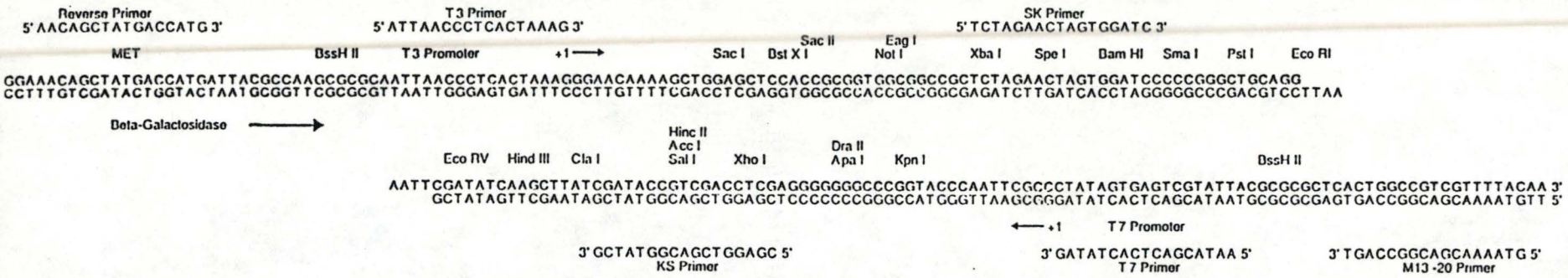


Fig. 11.10. Principe du séquençage selon la méthode au dideoxynucleotide de Sanger

- Éliminer le milieu
- Ajouter 4 ml de tampon P1 et y resuspendre les bactéries à la pipette
- Ajouter 4 ml de tampon P2 (lyse alcaline)
- Incuber 5' à température ambiante
- Ajouter 4 ml de tampon P3
- Centrifuger 30' à 13000 rpm (Rotor SS34 SORVALL) à +4°C
- Récupérer le surnageant
- Équilibrer une colonne QIAGEN P100 (commercialisée en kit par Westburg et utilisée selon le protocole QIAGEN) avec 2.5 ml de tampon QB. Ne jamais assécher la colonne.
- Appliquer le surnageant obtenu après centrifugation sur la colonne (débit optimum de la colonne: approximativement une goutte toutes les deux secondes)
- Appliquer deux fois 4 ml de tampon QC sur la colonne (élution de l'ARN, des protéines, ...)
- Appliquer 2 ml de tampon QF et récupérer l'éluat qui sort de la colonne à partir de ce moment
- Ajouter 0.8 volume d'isopropanol à l'éluat, mélanger
- Centrifuger 30' à 11000 rpm (Rotor HB4 SORVALL) à température ambiante
- Éliminer le surnageant
- Ajouter délicatement 2 ou 3 ml d'éthanol 70 %
- Centrifuger 10' à 11000 rpm (Rotor HB4 SORVALL) à + 4°C
- Éliminer le surnageant et sécher le culot sous vide
- Resuspendre dans de l'eau stérile ou du TE

II.11. Séquençage

Principe:

La méthode de séquençage utilisée a été mise au point par Sanger (1977)

Une molécule d'ADN bicaténaire à séquençer est dénaturée (les deux brins sont donc séparés). Un des deux brins (le brin "template") est hybridé à un oligonucléotide de synthèse (le "primer" ou amorce). Ce primer est utilisé comme amorce pour l'ADN polymérase. Nous avons utilisé deux primers (Fig. II.9) :

- le M13-20 PRIMER (ou FP) peut s'hybrider au brin + et permet ainsi le séquençage du brin non-codant pour la β -galactosidase.
- le REVERSE PRIMER (ou RP) peut s'hybrider au brin - et permet donc le séquençage du brin codant pour la β -galactosidase.

Les deux primers se trouvent de part et d'autre du MCS. Il est donc possible de séquençer le fragment d'ADN inséré dans un des sites de restriction du MCS sur les deux brins.

L'ADN polymérase commence la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (au brin template) à partir de l'amorce et ce dans un mélange réactionnel contenant: - les quatre désoxyribonucléotides dont l'un est radioactif (dATP*, dCTP, dGTP, dTTP)
- un des quatre didésoxyribonucléotides

Lorsque l'ADN polymérase incorpore un didésoxyribonucléotide, la synthèse s'arrête; en effet le didésoxyribonucléotide ne possédant pas d'hydroxyle en 3' ne peut former une liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant.

Pour chaque vecteur, quatre mélanges de polymérisation sont utilisés.

Mélange réactionnel	A	C	G	T
Désoxyribonucléotides présents	dATP*	dATP*	dATP*	dATP*
	dCTP	dCTP	dCTP	dCTP
	dGTP	dGTP	dGTP	dGTP
	dTTP	dTTP	dTTP	dTTP
Didésoxyribonucléotides présents	ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP

*: marqué au S³⁵

Les proportions de constituants sont telles que statistiquement, on obtiendra l'arrêt prématuré de la synthèse d'au moins une molécule d'ADN monocaténaire pour chaque position dans la séquence template comportant un nucléotide complémentaire au didésoxyribonucléotide utilisé (Fig.II.10)

Pour chaque mélange, les brins radioactifs de longueur variable ainsi synthétisés sont déposés dans des puits voisins d'un gel de polyacrylamide et séparés suivant leur taille par électrophorèse.

L'analyse de l'autoradiographie du gel séché permet d'établir la séquence des 250 nucléotides (environ) en aval de la portion complémentaire de l'amorce.

Protocole:

1. Réactions de séquençage:

Toutes les solutions reprises ci-dessous sont comprises dans le kit de séquençage commercialisé par Pharmacia.

1.a. Dénaturation:

La solution d'ADN doit être la plus pure possible et les plasmides doivent se trouver sous forme CCC, c'est-à-dire sans nick (un nick fournit une extrémité 3'OH qui peut servir de point de démarrage pour l'ADN polymérase et peut donc provoquer des interférences).

Dans un eppendorf:

- 1.5 à 2 μ g d'ADN dans 8 μ l (porter à volume avec de l'eau stérile si nécessaire)
- Ajouter 2 μ l de NaOH 2 N
- Incuber 10' à température ambiante

Précipitation de l'ADN dénaturé:

- Ajouter: 3 μ l d'acétate de Na 3 M pH 4.8
7 μ l d'eau distillée stérile
60 μ l d'éthanol 100 % froid (-20°C) et mélanger
- Placer 15' à -80°C
- Centrifuger 15' à + 4°C à 12000 rpm (Janetzky)
- Éliminer le surnageant et laver à l'éthanol 70 %
- Sécher sous vide

1.b. "Annealing":

Étape d'hybridation du primer (amorce) sur le brin "template" (matrice)

- Resuspendre le culot séché dans 10 μ l d'eau stérile
- Ajouter rapidement: 2 μ l de primer (amorce)
2 μ l d'Annealing Buffer
- Incuber 20' à 37°C
- Incuber 10' à température ambiante

1.c. "Labelling":

Étape de marquage du brin néoformé: la polymérisation par l'enzyme T7 DNA polymérase commence en absence de ddNTP et en présence des quatre dNTP dont un est marqué (de l' $[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP) permettant la synthèse d'un court brin marqué, extension du primer (amorce) de quelques dizaines de nucléotides.

Après l'annealing:

- Ajouter: 3 μ l de "labelling mix" (solution de dCTP, de dGTP et de dTTP)
1 μ l d' $[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP (soit 10 μ Ci)
3 unités de T7 DNA polymérase diluée dans son tampon de dilution jusqu'à 1.5 unité par μ l
- Incuber 5' à température ambiante

1.d. "Termination" ou "Sequencing":

Lors de cette étape, l'ensemble T7 DNA polymérase + brin template (matrice) avec primer (amorce) allongé sont mis en présence de dNTP et de ddNTP.

Dans 4 eppendorfs, on a 2.5 µl de:

"Short A" pour l'eppendorf A (dNTP + ddATP)

"Short C" pour l'eppendorf C (dNTP + ddCTP)

"Short G" pour l'eppendorf G (dNTP + ddGTP)

"Short T" pour l'eppendorf T (dNTP + ddTTP)

Ces 4 eppendorfs sont préincubés à 37°C

-A chaque eppendorf ajouter 4.3 µl du mélange obtenu après labelling.

-Incuber 5' à 37°C

-Ajouter 5 µl de solution de bleu (arrête la réaction)

Stocker à -20°C

2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide:

2.1. Montage des plaques:

-Laver les 2 plaques de verre: au savon
puis à l'eau de ville
puis à l'eau distillée

-Sécher les vitres

-Laver les vitres avec de l'éthanol-éther

-Siliconer les plaques (sur la face qui sera en contact avec le gel) avec 10 ml de "Repelcote" (Hopkin & Williams)

-Laver à l'eau distillée

-Sécher

-Déposer les "spacers" sur la plus grande des deux plaques

-Appliquer la petite plaque sur les "spacers"

-Coller du tape à la jonction entre les deux plaques et serrer les deux plaques avec des pinces

2.2. Préparation du gel (gel dénaturant):

-Dans un berlin, ajouter à 42 g d'urée:

10 ml de TBE concentré 10X

15 ml d'acrylamide 20 % bisacrylamide 0.8 %

40 ml d'eau distillée

-Après dissolution de l'urée, filtrer la solution au Buchner (filtre Millipore SA 78 BUC)

-Ajouter rapidement et dans l'ordre: 600 µl de persulfate d'amminium
30 µl de TEMED

-Aspirer la solution avec une seringue de 100 ml (rapidement) et la couler entre les deux plaques après avoir retiré les pinces. Garder le reste de la solution comme témoin de polymérisation

-Après polymérisation (45 à 60'), le gel peut être stocké à +4°C

2.3. Migration et autoradiographie:

-Le gel est chauffé pendant 30 à 45', monté comme pour la migration mais sans échantillon ("prérin"). Les conditions de migration sont:

Puissance: 60 Watts

Tension: environ 1600 Volts

Le haut et le bas du gel baignent dans du TBE (1X)

-Après avoir arrêté la source de tension:

placer les peignes

nettoyer les puits pour enlever les bulles et les impuretés

placer les échantillons-à charger sur gel (eppendorfs A, C, G et T)-

durant 3' à 85°C pour dénaturer l'ADN

déposer 2.5 µl d'échantillon de chaque eppendorf par puits (ordre

standard de dépôt des échantillons: A, C, G et T)

-Rebrancher la source de tension et laisser migrer l'échantillon durant deux heures ou plus

-Après migration, recueillir le gel (sans le plier) sur une des deux plaques de verre

-Placer la plaque de verre qui porte le gel dans un bain de fixateur

-Transférer le gel sur papier buvard Whatman 17 Chr et le couvrir d'un film plastique

-Sécher le gel sous vide (environ 2 à 3 heures)

-Placer le gel adhérent au papier buvard dans une cassette à autoradiographie avec un film autoradiographique (Kodak) et laisser une nuit.

-Retirer le film autoradiographique de la cassette et le plonger dans un bain de révélateur (Kodak) durant 5'.

-Rincer à l'eau

-Transférer le film révélé dans un bain de fixateur durant 10 à 15'

-Rincer abondamment le film avec de l'eau et sécher.

La séquence nucléotidique peut alors être lue et elle est encodée dans l'ordinateur (Macintosh) et analysée par le programme DNA STRIDER.

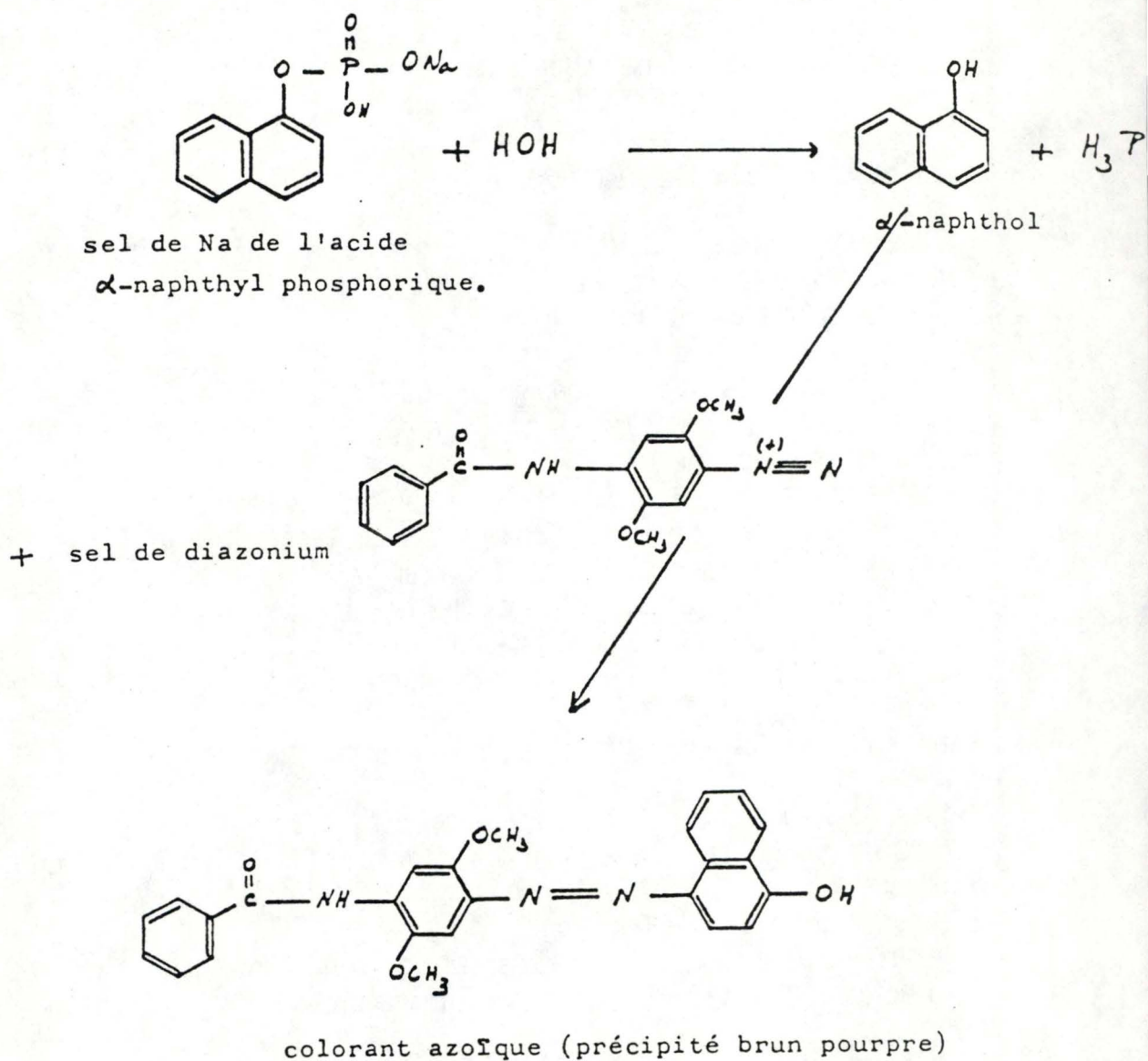


Fig. II.11. Le substrat utilisé est le sel de sodium de l' α -naphthyl phosphate. La phosphatase libère par hydrolyse le naphthol qui est capté ensuite par un sel de diazonium (Fast Blue B salt). De ce couplage de deux substances incolores résulte un colorant azoïque rouge. Un pH acide étant utilisé, la phosphatase acide sera révélée.

II.12. Test de coloration d'activité de phosphatase acide.

Afin de tester la complémentation d'un mutant *pho81* (la souche VD33d) par un plasmide contenant un fragment génomique, l'activité de la phosphatase acide est détectée par un simple test de coloration.

Dans ce but, la phosphatase acide répressible est activée en faisant croître les levures sur un milieu carencé en phosphate inorganique (30 mg de dihydrogénophosphate de potassium par litre)

Protocole :

1/ faire fondre une solution d'agar 1,6%-acétate de potassium 0,1M pH4 et la maintenir à 55°C.

2/ préparer une solution à 200mg/ml de Fast Blue B Salt (O-Dianisidine tetrazotized Zinc chloride complex) (Sigma) et la maintenir quelques minutes à 55°C.

3/ préparer une solution à 20mg/ml de 1 Naphtyle phosphate (sel de sodium monohydraté, Merck) et la maintenir quelques minutes à 55°C.

4/ ajouter dans l'ordre dans un tube 2ml de 1

1ml de 2

1ml de 3

agiter et ajouter ce mélange rapidement sur les colonies de levure au moyen d'une pipette pasteur.

Les colonies qui restent blanches ne possèdent pas l'activité phosphatase acide, celles qui rougissent ont une activité phosphatase acide (Fig. II.11).

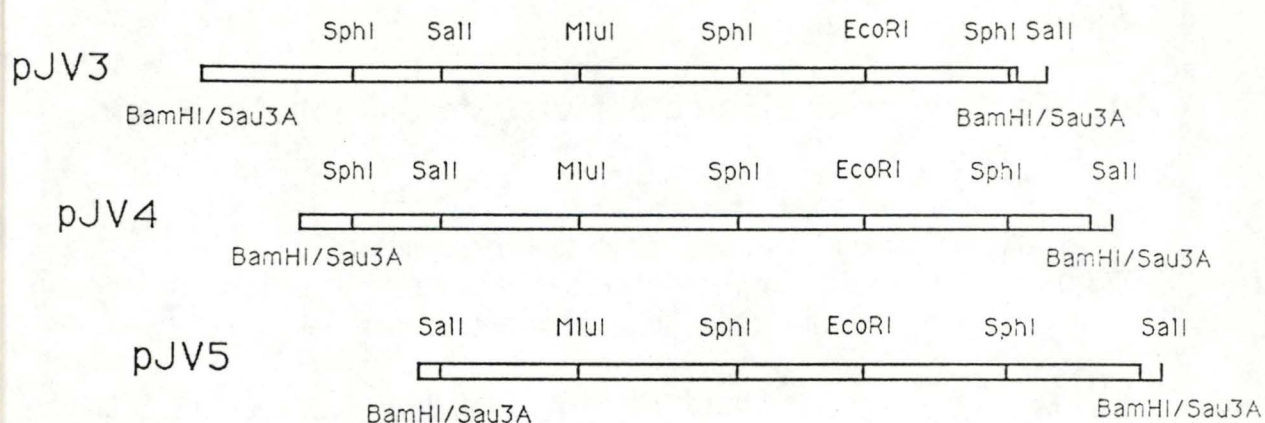


Fig. III.1. Carte de restriction des trois inserts des clones positifs isolés lors du test de complémentation du mutant *pho81* (VD33d), à partir d'une banque génomique de levure sauvage établie dans le vecteur YCp50

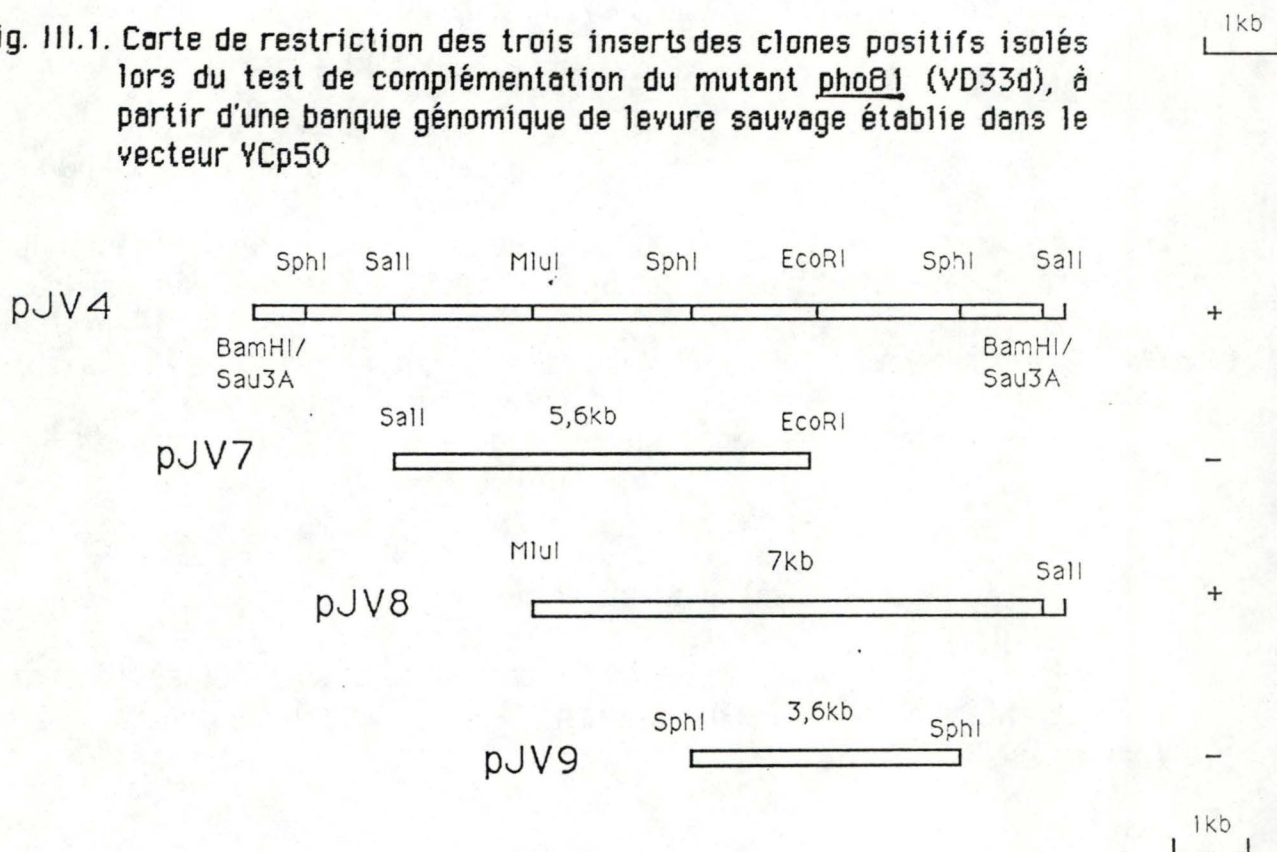


Fig. III.2. Comparaison des capacités de complémentation des différents fragments de restriction (Vandehaute *et al.*, 1988)

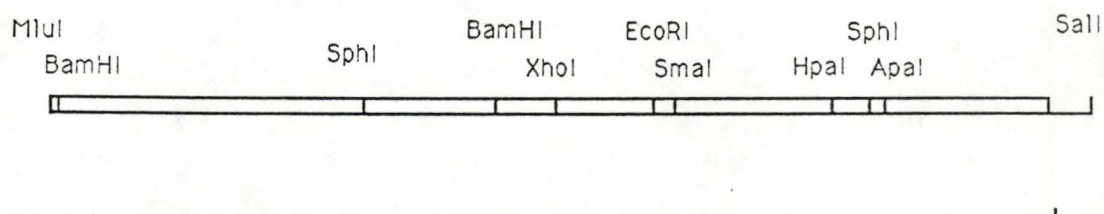


Fig. III.3. Carte de restriction du fragment *MluI-SalI* de 7kb (Tibor, 1988).

III. RESULTATS ET DISCUSSION.

III.1. COMPLEMENTATIONS.

III.1.1. ENTREE EN MATIERE.

Le test de complémentation nous permet de vérifier qu'un insert contient le gène *PHO81* entier.

Pour réaliser ce test, nous disposons d'un mutant *pho81* (la souche VD33d) ; cette mutation entraîne l'absence d'activité phosphatase acide même en conditions d'activation (faible concentration en Pi). Si nous transformons cette souche par un plasmide contenant le gène *PHO81* entier, nous observons alors la présence de l'activité phosphatase acide dans les mêmes conditions. Nous disons alors qu'il y a complémentation. Un test de coloration sur colonies permet de détecter l'absence ou la présence d'activité (cfr. matériel et méthodes).

Par complémentation du phénotype mutant *pho81* au départ d'une banque génomique de levure sauvage établie dans le vecteur YCp50 (Rose *et al.*, 1987), plusieurs clones ont été isolés et trois étudiés plus particulièrement (Vandenhoute *et al.*, 1988). Il s'agit des plasmides pJV3, pJV4, pJV5 (Fig. III.1). L'analyse des cartes de restriction des inserts de ces plasmides révèle qu'il s'agit de trois clones apparentés issus du même locus chromosomique. Une fois ces clones primaires isolés par complémentation, le même test peut servir à fixer les limites du gène. En effet, à partir du plasmide pJV4, divers sous-clones ont été construits dans le vecteur YCp50 ; le fragment *Sal*-*Eco*RI (pJV7) de 6kb s'est avéré incapable de restaurer le phénotype PHO81 sauvage de même que le fragment *Sph*I-*Sph*I (pJV9) de 3,5kb ; par contre le fragment *Mlu*-*Sal* (pJV8) de 7kb est capable de compléter la mutation PHO81 (Fig. III.2).

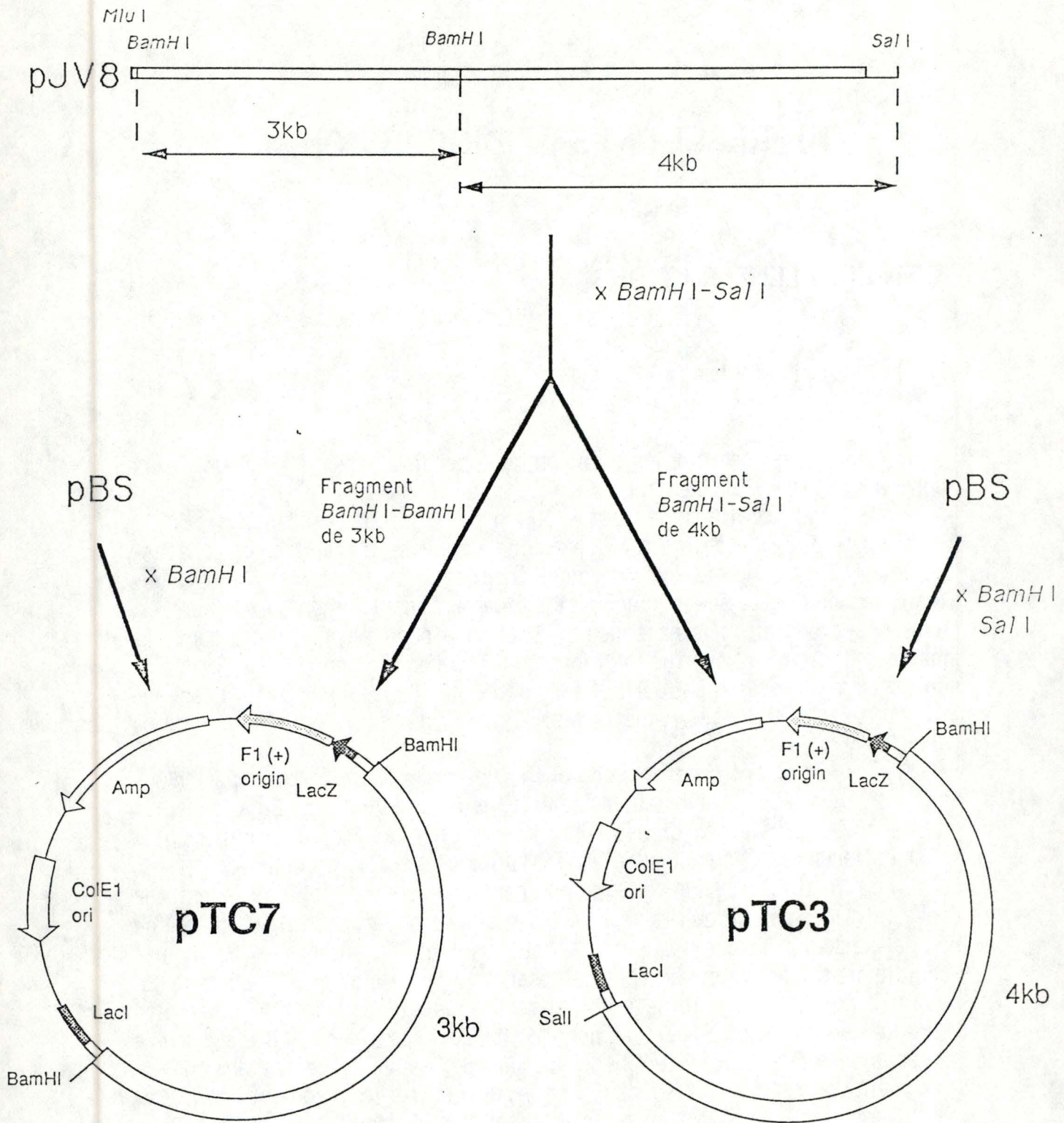


Fig. III.5. Construction des plasmides pTC3 et pTC7.

Une carte de restriction succincte du fragment *Mlu*-*Sal* de 7kb a été établie (Tibor, 1988) (Fig. III.3) De plus, ce fragment semble apparenté au fragment génomique isolé par Yoshida par le fait de la localisation semblable de certains sites de restriction. (Fig. III.4).

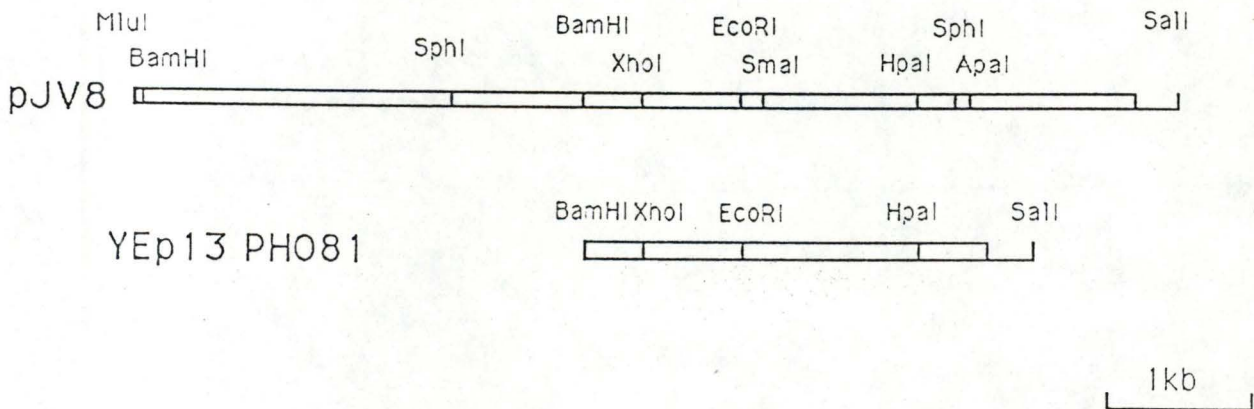


Fig. III.4. Comparaison des cartes de restriction des inserts de pJV8 et de YEpl3-PH081 (Yoshida *et al.*, 1987)

Afin de préciser la taille du gène contenu dans l'insert, nous nous proposons de poursuivre les complémentations avec différents sous-clones construits à partir de l'insert *Mlu*-*Sal* de 7kb. Cela nous permettra de résoudre l'incertitude qui existe à cet égard, du fait des résultats contradictoires de la littérature (Yoshida *et al.*, 1987 ; Yoshida *et al.*, 1989b) et de certaines données préliminaires de notre laboratoire.

A cette fin, nous disposons de deux plasmides pTC3 et pTC7 qui ont été construits à partir de pJV8 selon la stratégie décrite à la figure III.5. Une double restriction *Bam*HI-*Sal*I de pJV8 génère trois fragments de 8kb (la matrice YCp50), de 4kb et de 3kb. Le fragment *Bam*HI-*Sal*I de 4kb est cloné dans le vecteur pBluescript KS restreint aux sites *Bam*HI et *Sal*I. Ce plasmide ainsi formé est appelé pTC3. Le fragment *Bam*HI-*Bam*HI de 3kb est cloné dans le vecteur pBluescript KS+ au site *Bam*HI. et est appelé pTC7.

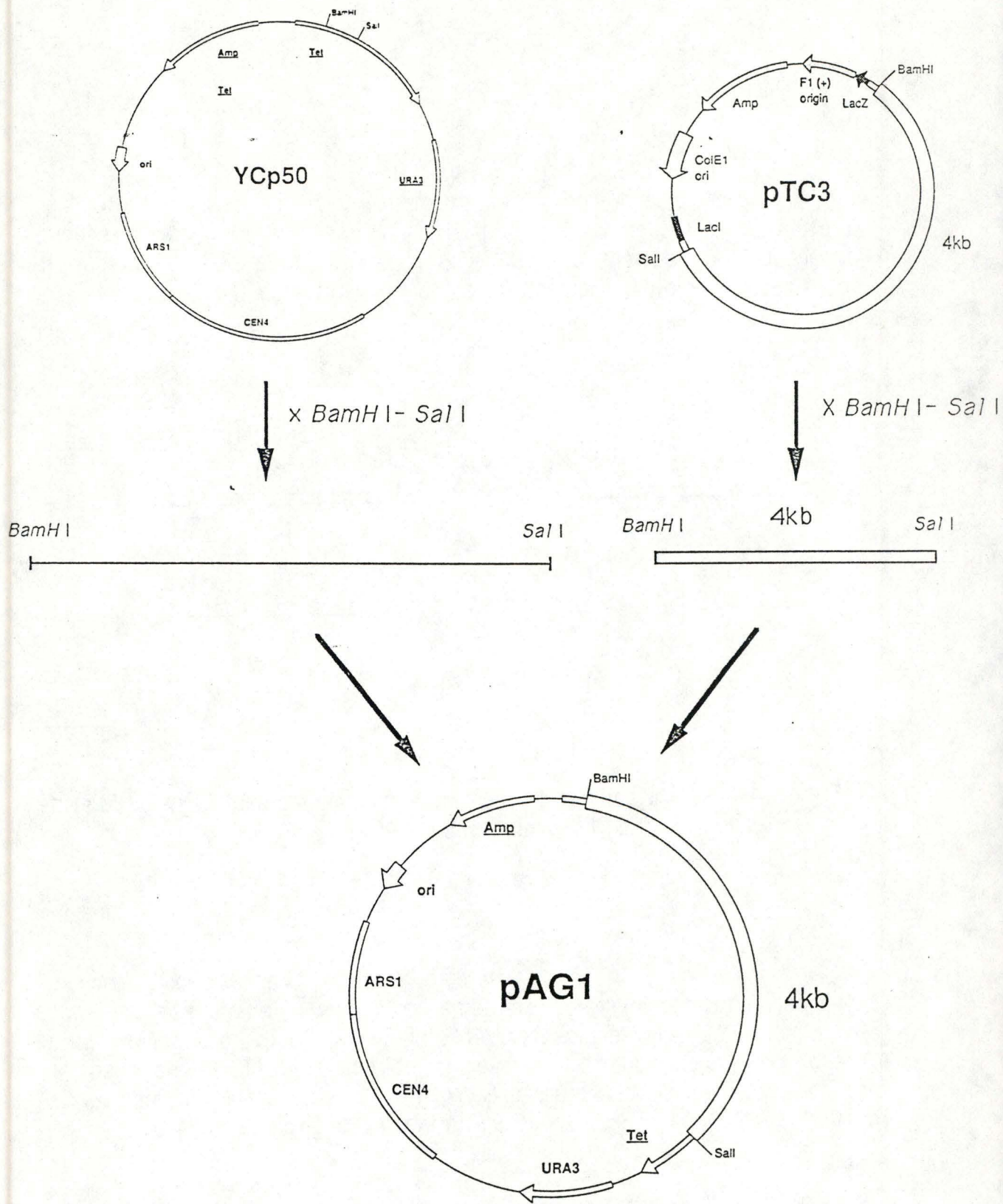


Fig.III.6. Schéma de la construction du plasmide pAG1.

III.1.2. LE FRAGMENT *Ban*HI-*Sa*I DE 4kb NE CONTIENT PAS LE GENE ENTIER.

Pour éprouver l'hypothèse selon laquelle le fragment *Ban*HI-*Sa*I de 4kb contient le gène entier, nous allons tester sa capacité de compléter la mutation *pho81* de la souche VD33d pour cela, nous allons cloner le fragment *Ban*HI-*Sa*I de 4kb du plasmide pTC3 dans le vecteur centromérique navette *E. coli*/levure YCp50 aux sites *Ban*HI et *Sa*I. Le plasmide résultant sera désigné pAG1 (Fig. III.6).

III.1.2.1 CONSTRUCTION DE pAG1

A. Restrictions.

Le plasmide pTC3 (4mg) est restreint par les enzymes *Ban*HI et *Sa*I et génère deux fragments de 4kb et de 2,9kb (la matrice pBluescript). D'autre part, le vecteur YCp50 (2mg) est restreint par les enzymes *Ban*HI et *Sa*I et génère un fragment de 7,7kb et un autre de 0,3kb. Les enzymes sont inactivées par une extraction au phénol.

L'électrophorèse en gel d'agarose (1%) d'un échantillon de chaque restriction montre que nous obtenons les fragments attendus. (Fig. III.7.)

Le mélange de restriction du plasmide pTC3 est alors déposé sur gel d'agarose et la bande à 4kb est récupérée (voir matériel et méthodes). Un échantillon de la bande récupérée est déposé sur gel pour en évaluer la quantité.

B. Ligation.

Une quantité équivalente à 110 ng de vecteur YCp50 restreint par *Ban*HI et *Sa*I et 55ng du fragment de 4kb sont rassemblés dans un mélange de ligation contenant 1 unité de T4 DNA ligase. L'incubation se fait 12h à 14°C.

C. Transformation et analyse des clones recombinants.

Les cellules JM101 compétentes sont transformées par le mélange de ligation, puis étalées sur milieu sélectif LB + Ampicilline. Après 12h. d'incubation à 37°C, les colonies sont "repiquées" à l'aide d'un cure-dent stérile sur milieu LB + Ampicilline + Tétracycline et sur milieu LB + Ampicilline.

Comme le fragment de 4kb a été inséré dans le gène de résistance à la tétracycline, les colonies qui possèdent le plasmide recombinant sont sensibles à la tétracycline. Six clones candidats capables de croître sur milieu LB + Ampicilline mais pas sur milieu LB + Ampicilline

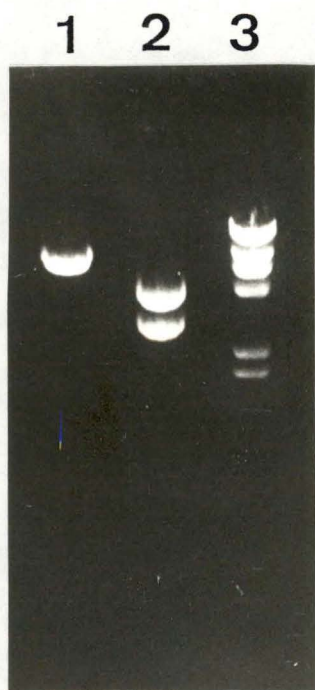


Fig. III.7. Electrophorèse en gel d'agarose des restrictions des plasmides YCp50 et pTC3.

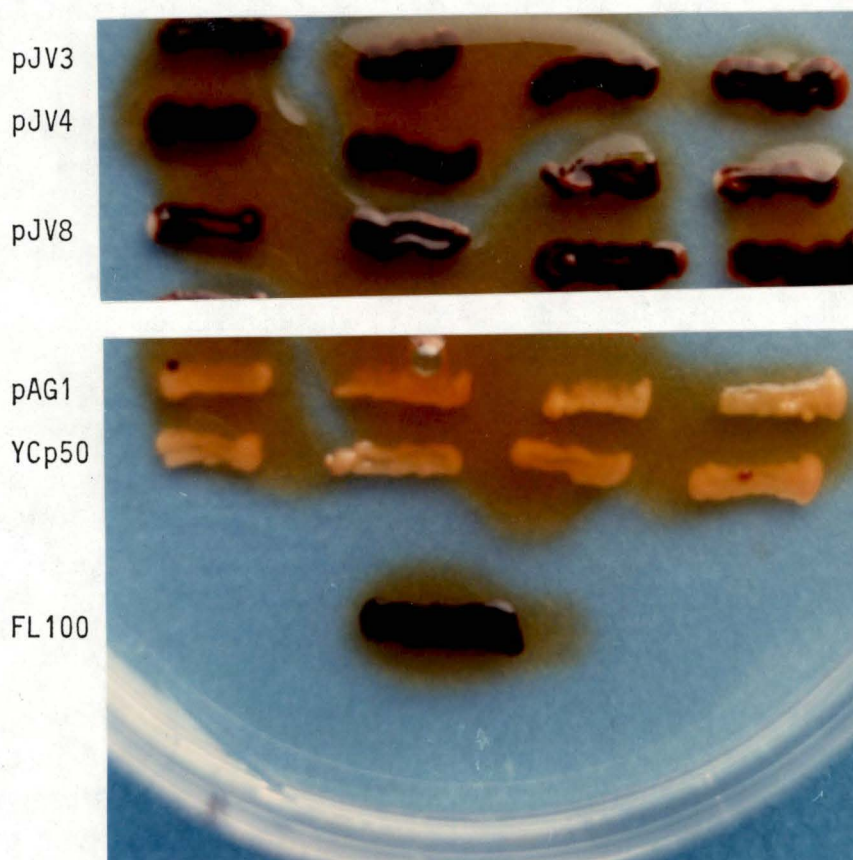


Fig. III.8. Photographie des colonies de levure après croissance sur milieu 165-30 (en condition d'activation) et test de coloration qui met en évidence l'activité phosphatase.

+ Tétracycline sont choisis au hasard et leur ADN est extrait par la méthode de miniprep (voir matériel et méthodes). L'analyse sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique des six clones après double restriction *Bam*HI-*Sal*I nous donne bien le profil attendu de pAG1 (photo non montrée) c'est-à-dire la matrice YCp50 de 7,7kb et l'insert de 4kb. Nous avons donc construit le plasmide pAG1 et nous le préparons en grande quantité (midiprep) pour transformer la levure.

III.1.2.2. TEST DE COMPLEMENTATION

La souche mutante de levure VD33d (*a,pho81, ura3*) est transformée, suivant la méthode décrite par Ito (Ito *et al.*, 1983), par 5mg de pAG1, de pJV3, pJV4, pJV8 et YCp50. Les plasmides pJV3, pJV4 et pJV8 serviront de contrôle positif pour le test de coloration alors que YCp50 sera le contrôle négatif.

Les mélanges de transformations sont étalés sur milieu minimum (dépourvu d'uracile). Après deux jours de croissance à 30°C, seules les colonies transformantes apparaissent, grâce au marqueur de sélection *URA3*. En effet, le vecteur monocopie YCp50 porte le gène sauvage *URA3* et confère à la cellule la capacité de synthétiser de l'uracile. Les cellules qui ne possèdent pas ce gène *URA3* ne sont pas viables sur milieu minimum.

Quatre colonies transformantes de chaque transformation sont alors "repiquées" sur milieu 165-30 (pauvre en phosphate inorganique.). Après trois jours de croissance à 30°C, nous effectuons le test de la phosphatase acide. (Fig. III.8.)

Les clones positifs apparaissent en rouge; ceux dépourvus d'activité phosphatase en condition d'activation (faible concentration en P_i) restent blancs. Nous observons que les clones correspondants à la souche sauvage (FL100) et aux mutants transformés par pJV3, pJV4 et pJV8 sont positifs alors que les transformants pAG1 et YCp50 ne possèdent pas d'activité phosphatase acide.

En conclusion, l'insert *Bam*HI-*Sal*I de 4kb de pAG1 ne complète pas la mutation *pho81* et ne contient donc pas le gène entier.

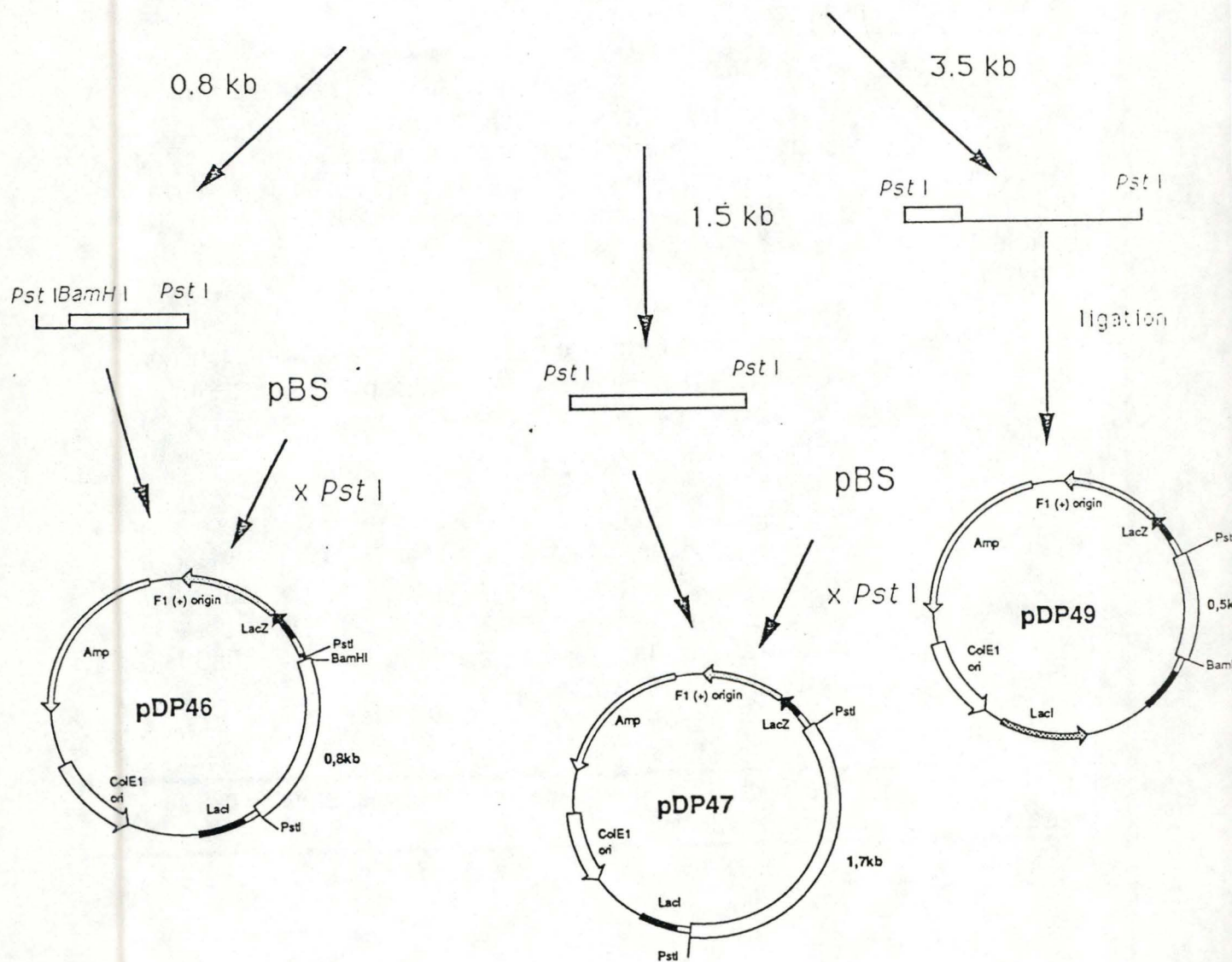
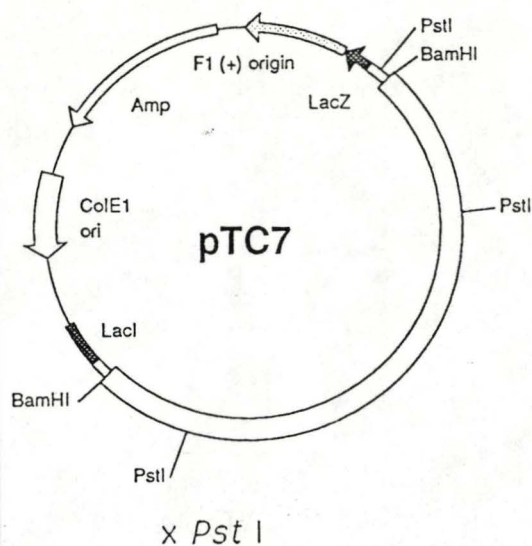


Fig. III.9. Construction des plasmides pDP46, pDP47 et pDP49.

III.1.3. DELIMITATION D'UN FRAGMENT MINIMUM CONTENANT LE GENE *PHO81* ENTIER

Nous concluons des résultats du test de complémentation avec pAG1 que l'insert de 4kb *Bam*HI-*Sal*I n'est pas à même de restaurer le phénotype sauvage au contraire des plasmides primaires pJV3, pJV4, pJV5 et pJV8. Il apparaît donc clairement que l'insert *Bam*HI-*Sal*I de 4kb ne contient pas le gène *PHO81* entier contrairement aux affirmations de Yoshida et aux conclusions qu'avaient suggérées un essai de complémentation réalisé antérieurement au laboratoire (Coquette, 1988). La délimitation exacte du gène nécessite donc le sous-clonage de fragments s'étendant au-delà du site de restriction *Bam*HI. Pour cela, il est nécessaire d'affiner la carte de restriction du fragment *Mlu*I-*Sal*I de 7kb qui dans l'état actuel n'offre pas un choix de sites adéquats dans cette région.

III.1.3.1. ETABLISSEMENT DE LA CARTE DE RESTRICTION DETAILLEE DE L'INSERT *Mlu*-*Sal* DE 7kb DU CLONE PRIMAIRE pJV8.

Pour établir la carte de restriction détaillée de la région au delà du site *Bam*HI, nous disposons de 3 sous-clones construits à partir du plasmide pTC7. Rappelons que le plasmide pTC7 porte le fragment *Bam*HI-*Bam*HI de 3 kb cloné dans dans le vecteur pBluescript (Fig.III.5). Les trois sous-clones ont été obtenus au départ d'une restriction *Pst*I du plasmide pTC7. La restriction *Pst*I génère 3 fragments de 3,5 kb, 1,7 kb et 0,8 kb. Le fragment de 3,5 kb, qui correspond à la matrice pBluescript et un insert de 0,5 kb est reliqué sur lui-même, pour former le plasmide pDP49. Les fragments de 0,8 kb et 1,7 kb sont chacun clonés dans pBluescript restreint par *Pst* I. Les plasmides ainsi formes sont appelés respectivement pDP46 et pDP47 (fig.III.9).

Les plasmides pDP46 et pDP47 ont été soumis à une série de restrictions par différentes enzymes. Les résultats sont présentés en annexe.

La carte de restriction détaillée du fragment *Bam*HI-*Sal*I de 4 kb (pTC3) a été établie antérieurement au laboratoire par T. Coche

Nous pouvons donc en combinant l'ensemble des données, présenter une carte de restriction du fragment *Mlu*I-*Sal*I de 7 kb (fig.III.10), qui complète celle obtenue antérieurement (fig. III.3.).

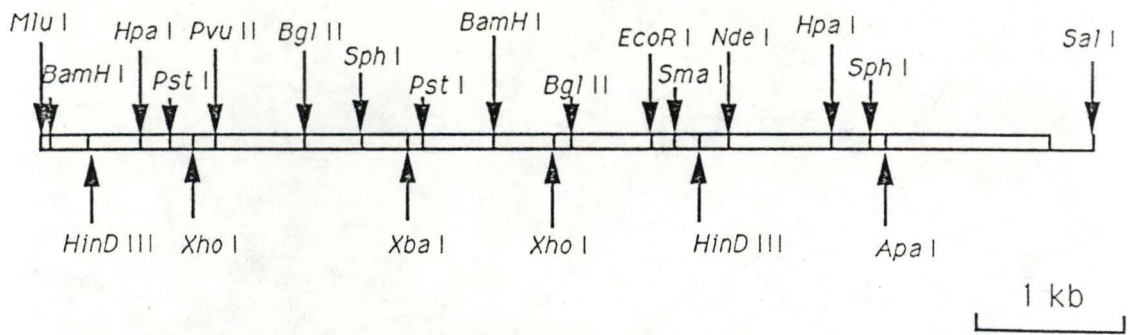


Fig. III.10. Carte de restriction détaillée du fragment *MluI-SalI* de 7kb.

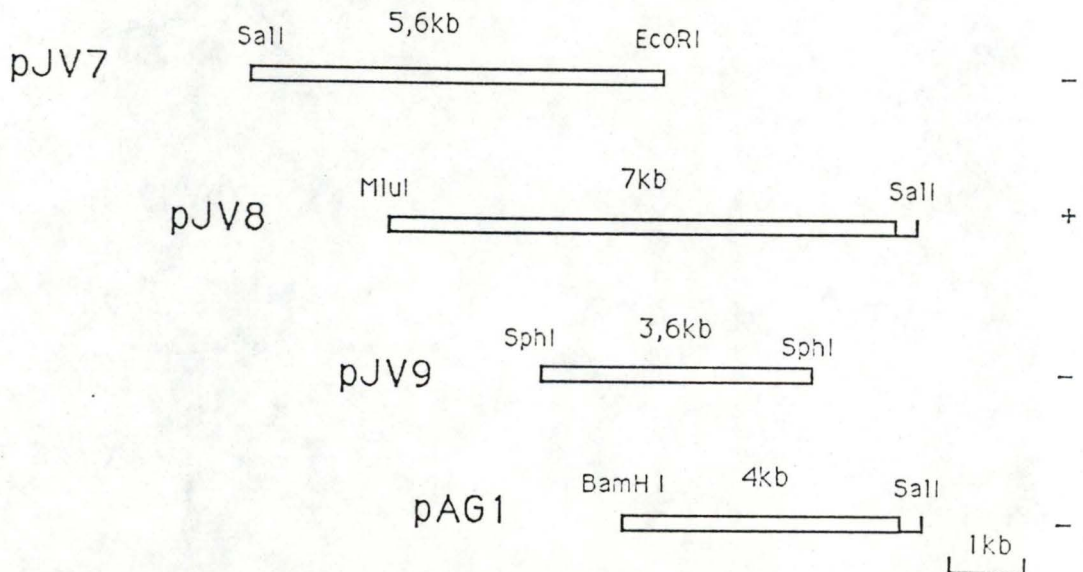


Fig. III.11. Capacité de complémentation des différents sous-clones pJV7, pJV8, pJV9 et pAG1.

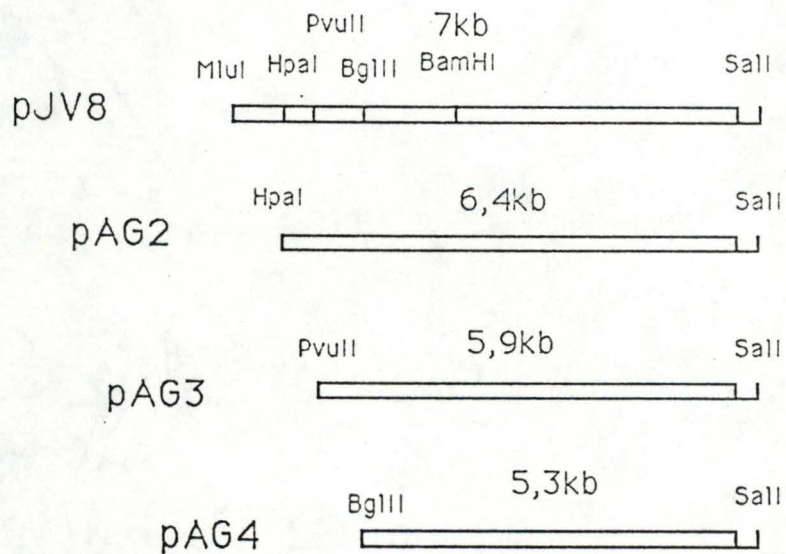


Fig. III.12. Aperçu des différents sous-clones qui vont être construits et qui serviront aux tests de complémentation de la souche mutante *pha81*.

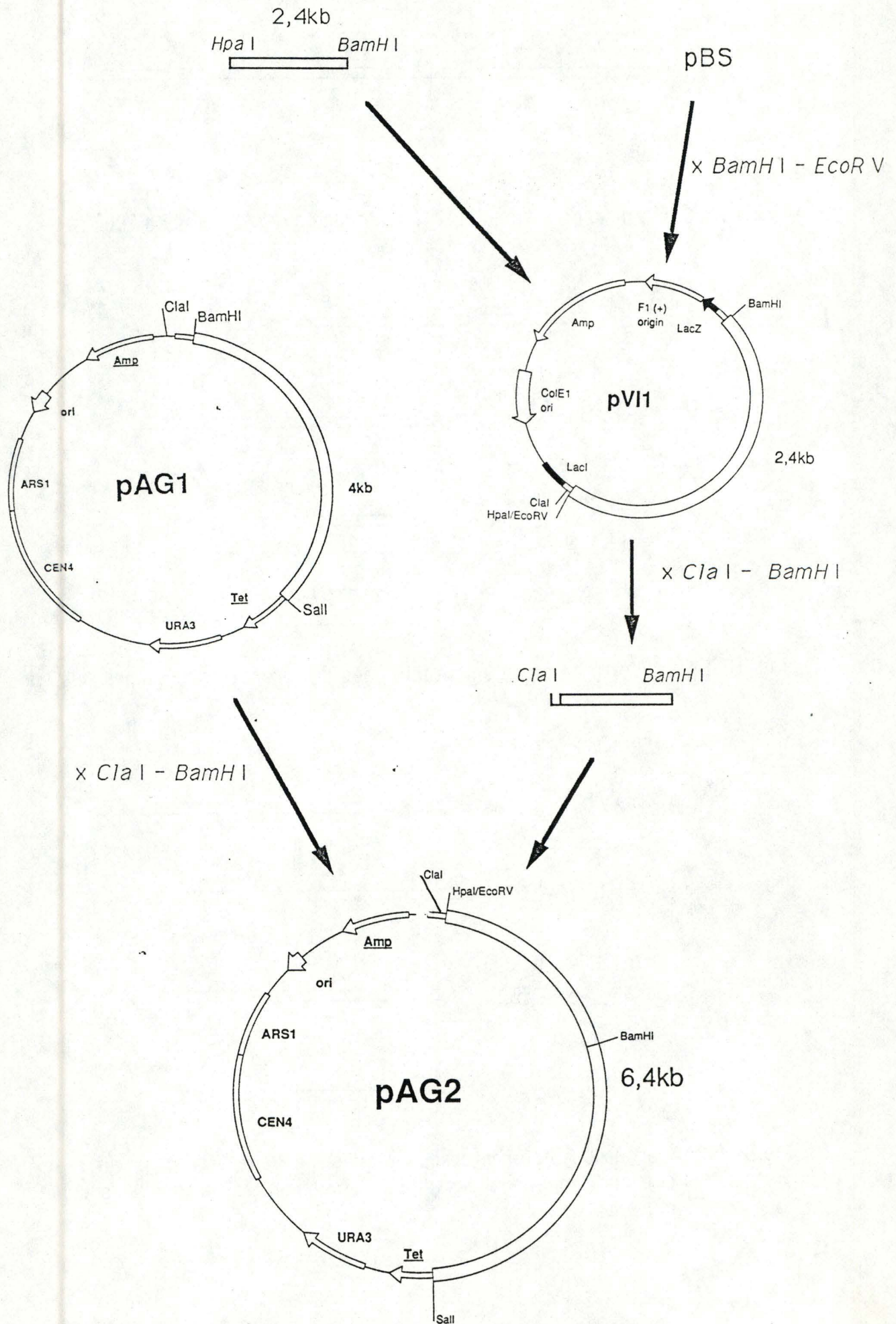


Fig. III.13. Schéma de la construction du plasmide pAG2.

III.1.3.2. SOUS-CLONAGE DE TROIS FRAGMENTS S'ETENDANT AU-DELA DU SITE INTERNE *Bam*HI DE L'INSERT *Mlu*I-*Sal*I DE 7kb.

Rappelons d'abord que pJV9, pJV7 et pAG1 ne complètent pas la mutation *pho81* alors que pJV8 la complète. (Fig. III.11). Connaissant ces résultats, nous voyons que seul un fragment plus grand que le fragment *Bam*HI-*Sal*I de 4kb pourra compléter.

L'établissement de la carte de restriction détaillée de l'insert *Mlu*I-*Sal*I de 7kb de pJV8 nous permet de choisir des sites adéquats pour obtenir ce fragment plus grand que le fragment *Bam*HI-*Sal*I de 4kb. Nous avons choisi les sites *Hpa*I, *Pvu*I et *Bgl*II pour réaliser les sous-clonages. Nous allons ainsi construire trois sous-clones (Fig.III.12) :

pAG2 avec un insert *Hpa*-*Sal*I de 6,4kb.
 pAG3 avec un insert *Pvu*I-*Sal*I de 5,9kb.
 pAG4 avec un insert *Bgl*II-*Sal*I de 5,3kb.

La stratégie de leur construction (décrite aux figures III.13.,III.16.et III.17) est particulière car les sites *Hpa*I, *Pvu*I et *Bgl*II ne sont pas uniques.

A Construction de pAG2 comportant l'insert *Hpa*-*Sal*I de 6,4kb. (Fig. III.13)

A.1. Restriction et recuperation de la bande *Hpa*I-*Bam*HI.

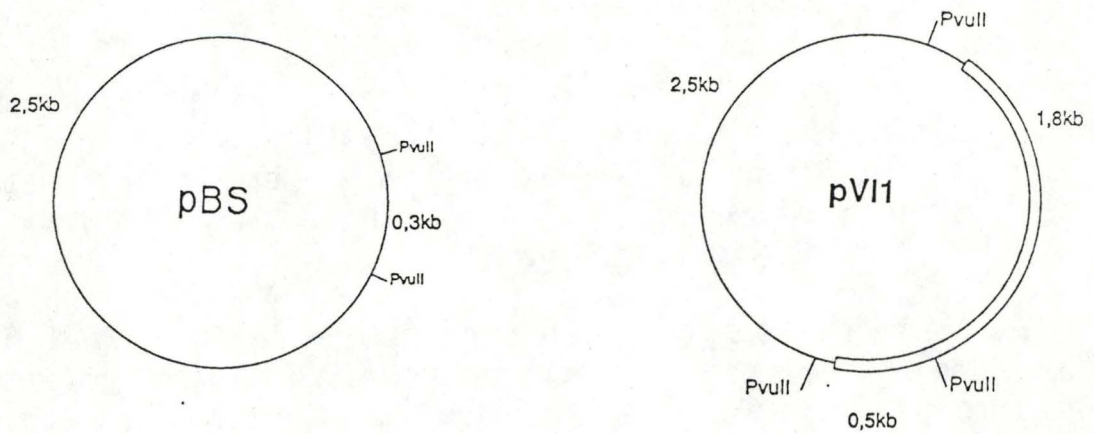
Le plasmide pTC7 (7,5mg) est restreint par l'enzyme *Hpa*I et le vecteur pBluescript (1,2mg) est restreint par *Eco*RV. Nous vérifions sur gel d'agarose avec un échantillon de chaque mélange de restriction, la linéarisation du plasmide et du vecteur. Les enzymes sont inactivées à la chaleur et l'ADN est précipité à l'éthanol.

Le plasmide pTC7 linéarisé est ensuite restreint par *Bam*HI et trois fragments de 2,9kb (la matrice) , de 2,4kb et de 0,6kb sont obtenus. La bande à 2,4kb est récupérée sur gel d'agarose et nous en évaluons la quantité récupérée en déposant un échantillon sur gel d'agarose.

D'autre part, le vecteur pBluescript linéarisé est aussi restreint par *Bam*HI et l'ADN est précipité après inactivation de l'enzyme à la chaleur.

Les restrictions sont réalisées en deux étapes car les tampons des différentes enzymes de restriction sont incompatibles.

a



b

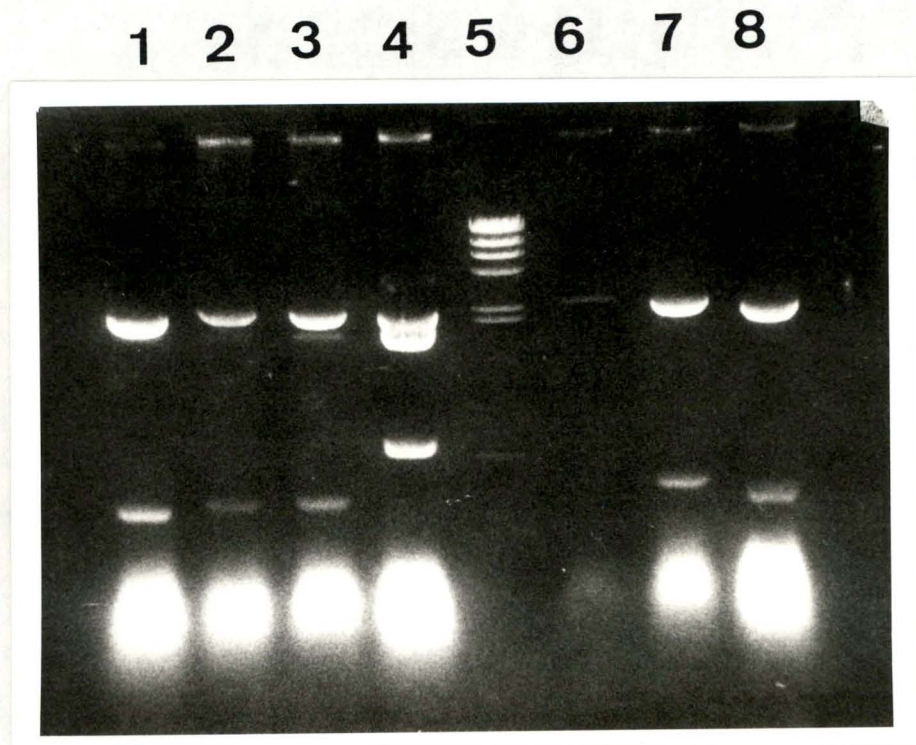
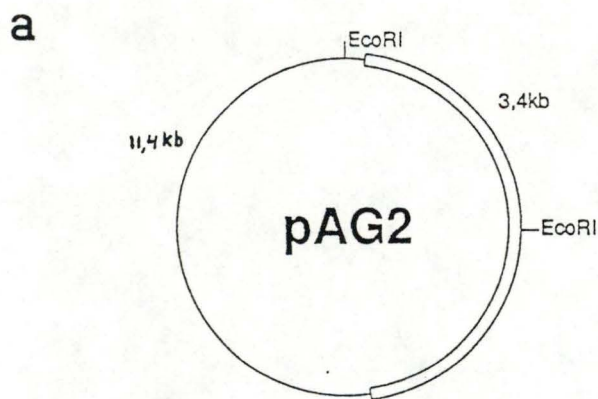


Fig. III.14 A/ Schéma des deux constructions possibles obtenues après ligation du fragment *HpaI-BamHI* de 2,4kb et du vecteur pBluescript KS+ et tailles obtenues après restriction par *PvuII*.

B/ Electrophorèse en gel d'agarose de la restriction par *PvuII* des sept clones transformants issus de la ligation entre le fragment *HpaI-BamHI* de 2,4kb et et le vecteur pBluescript KS+.

La piste 4 correspond à la construction recherchée : pVI1 (2,5, 1,8 et 0,5kb).

La piste 5 correspond au λ restreint par *Hind III*.



b

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

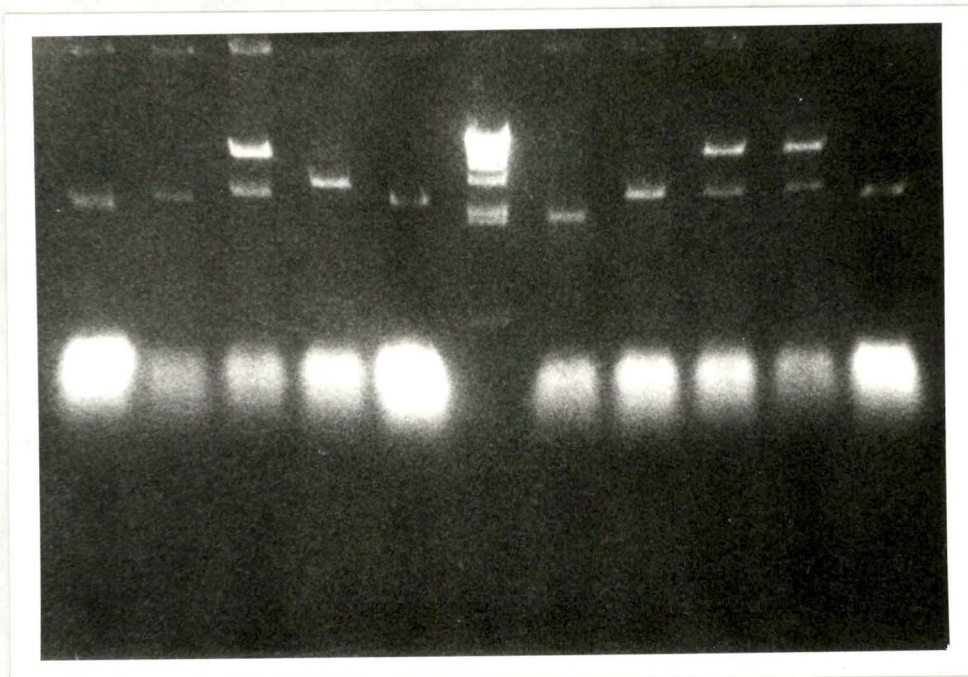


Fig.III.15. A/ Schéma de la construction obtenues après ligation du fragment *Cla*-*Bam* HI de 2,4kb et du fragment *Cla*-*Bam* HI de 11,4kb.

B/ Electrophorèse en gel d'agarose de la restriction par *Eco*RI des 10 clones transformants issus de la ligation du fragment *Cla*-*Bam* HI de 2,4kb et du fragment *Cla*-*Bam* HI de 11,4kb.

les pistes 3, 9 et 10 correspondent à la construction recherchée : pAG2. (10,4kb et 3,4kb).

la piste 6 correspond au λ restreint par *Hind* III

A.2. Ligation.

Environ 300ng de fragment *Hpa*-*Bam*HI de 2,4kb est ligué par une unité de T4 DNA Ligase avec 300ng de vecteur pBluescript. L'incubation se fait pendant 12h. à 14°C et 5h. à 20°C. La ligation peut se faire car *Hpa* et *Eco*RV sont des enzymes qui génèrent des bouts francs.

A.3. Transformation et analyse des clones recombinants.

Les cellules XLI-Blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation puis étalées sur milieu sélectif LB + Ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C, sept colonies transformantes servent à ensemercer des cultures liquides afin de préparer de l'ADN plasmidique par extraction rapide.

L'ADN plasmidique de chaque clone est restreint par *Pvu*II et déposé sur gel d'agarose 1% (Fig. III.14). Un clone qui correspond aux tailles attendues, c'est-à-dire 2,5kb, 1,8kb et 0,5kb, est retenu et nous préparons l'ADN plasmidique en grande quantité (MIDIPREP). Ce clone est désigné pVI1.

A.4. Restriction et récupération de la bande *Cla*-*Bam*HI.

Le vecteur intermédiaire, pVI1 (5mg), est restreint par les enzymes *Bam*HI et *Cla*I qui génèrent deux fragments, de 2,9kb et de 2,4kb. Le plasmide pAG1 (8mg) est restreint par les mêmes enzymes générants deux fragments de 11,7kb et de 0,3kb.

Un échantillon de chaque mélange de restriction est déposé sur gel pour vérifier si la restriction est complète. Les deux mélanges de restriction sont alors déposés sur gel d'agarose et les bandes de 2,4kb et de 11,7kb sont récupérées et un échantillon de chaque bande est déposé pour en évaluer la quantité.

A.5. Ligation.

Environ 500ng de fragment *Cla*I-*Bam*HI de 2,4kb est ligué avec environ 350ng de fragment *Cla*I-*Bam*HI de 11,4kb en présence d'une unité de T4 DNA ligase. L'incubation se fait une nuit à 14°C.

A.6. Transformation et analyse des clones recombinants.

Les cellules JM101 compétentes sont transformées par le mélange de ligation, puis étalées sur milieu sélectif LB + Ampicilline. L'extraction rapide d'ADN plasmidique se fait à partir de dix cultures liquides ensemercées par les colonies transformantes et incubées une nuit à 37°C.

L'ADN plasmidique de chaque clone est restreint par *Eco*RI et analysées sur gel d'agarose 1% (Fig. III.15). Le plasmide dont l'ADN restreint donne les fragments de la taille attendue est préparé en grande quantité (midiprep). Ce plasmide est appelé pAG2.

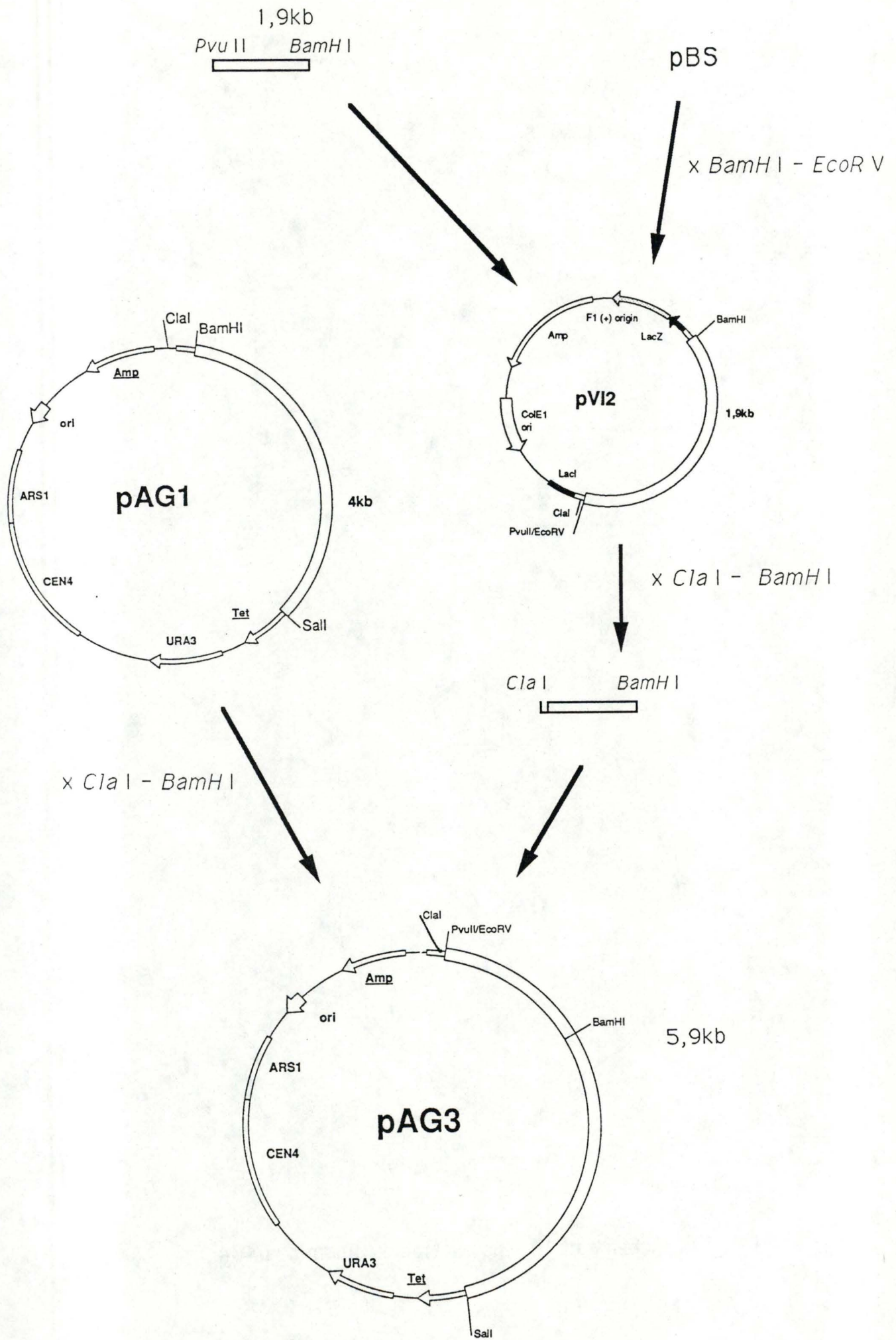


Fig. III.16. Schéma de la construction du plasmide pAG3.

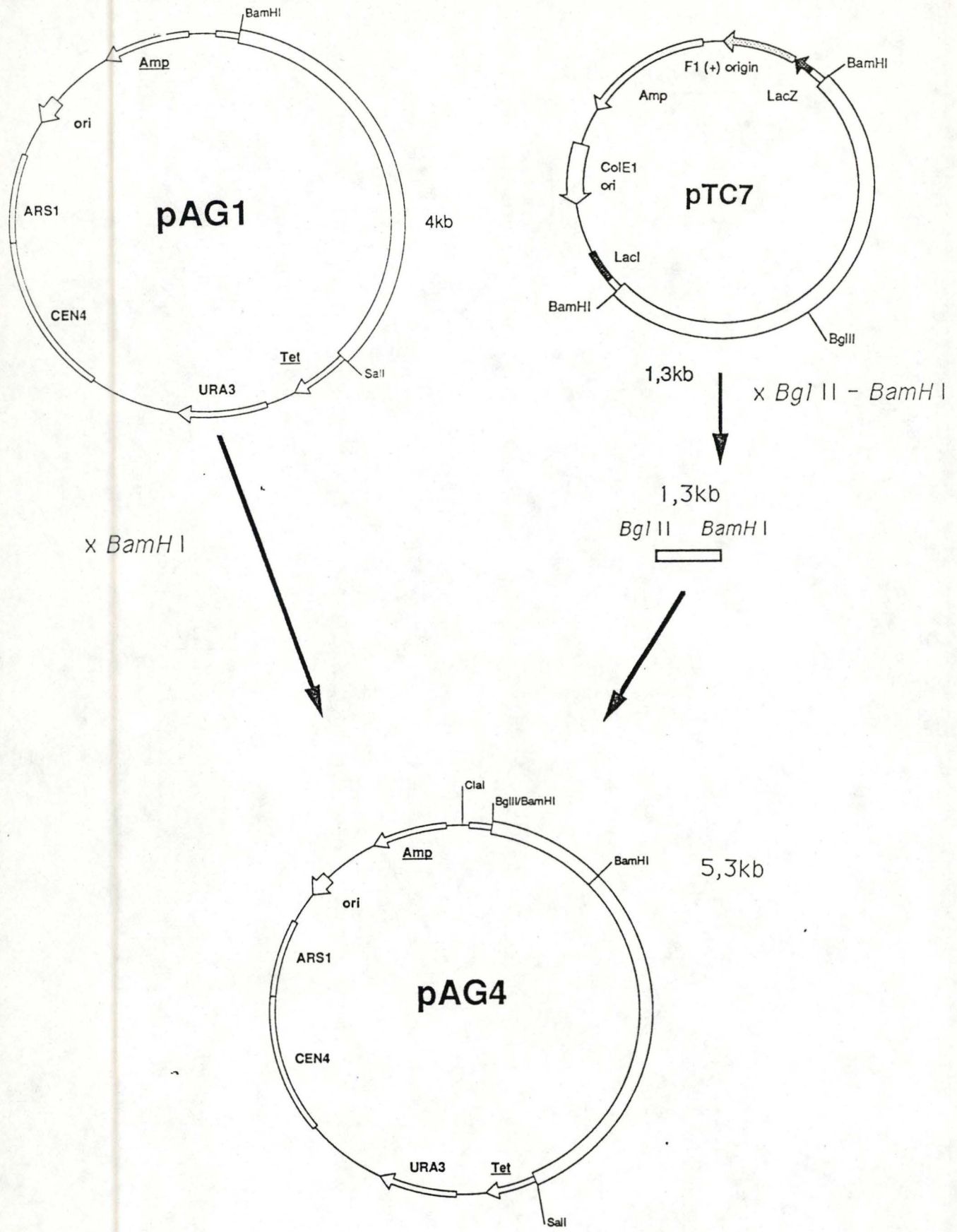


Fig. III.17. Schéma de la construction du plasmide pAG4.

B. Construction de pAG3 portant l'insert *PvuII-SalI* de 5,9kb (Fig. III.16)

Nous ne détaillerons pas les étapes de construction de pAG3 car elles sont les mêmes que celles de pAG2 à l'exception de la première étape où le plasmide pTC7 est restreint par *PvuII* et non par *HpaI*. Nous récupérons alors la bande *PvuII-BamHI* de 1,9kb. Nous pouvons liguer ce fragment avec le vecteur pBluescript restreint par *BamHI* et *EcoRV* car *PvuII* génère une coupure à bouts francs. Le vecteur pVI2 est ainsi formé et les étapes suivantes sont identiques à celles de la construction de pAG2. Nous nommons le nouveau plasmide formé pAG3.

C. Construction de pAG4 portant l'insert *BglII-SalI* de 5,3kb (Fig. III.17).

C.1. Restriction.

Le plasmide pTC7 (6mg) est restreint par les enzymes *BamHI* et *BglII*, générant ainsi trois fragments de 3kb, 1,7kb et 1,3kb. Le fragment de 1,3kb est récupéré sur gel d'agarose et nous en évaluons la quantité récupérée en déposant un échantillon sur gel.

D'autre part, le plasmide pAG1 est linéarisé par la restriction de l'enzyme *BamHI*. L'enzyme est ensuite inactivée par une extraction au phénol.

C.2. Ligation.

Environ 110ng du fragment *BglII-BamHI* de 1,3kb est ligué avec 500ng de pAG1 linéarisé. L'incubation se fait 12h. à 14°C. La ligation peut se faire car le site *BamHI* est compatible avec le site *BglII*.

C.3. Transformation et analyse des clones recombinants.

Les cellules XLI-Blue compétentes sont transformées par ce mélange de ligation pour être ensuite étalée sur milieu LB + Ampicilline. Après incubation une nuit à 37°C, vingt colonies sont prélevées pour une extraction rapide de l'ADN. L'ADN plasmidique des vingt clones est restreint par *SspI* et les tailles des fragments sont analysées sur gel d'agarose. Le clones qui correspond aux tailles attendues est amplifié et nous préparons l'ADN plasmidique en grande quantité (MIDIPREP).

FL100
pJV8
pAG1
pAG2
pAG3
pAG3
pAG4
pAG4
Yc50

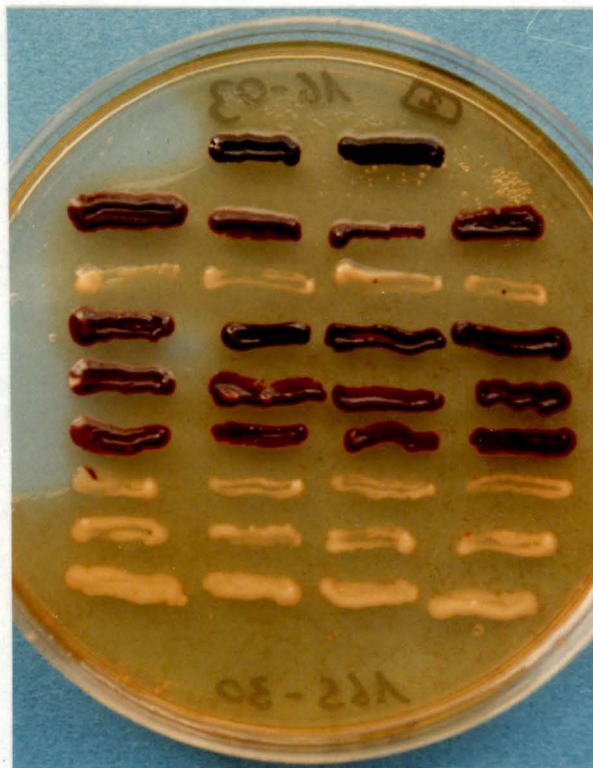


Fig. III.18. Photographie des colonies de levure après croissance sur milieu 165-30 (en condition d'activation) et test de coloration qui met en évidence l'activité phosphatase.

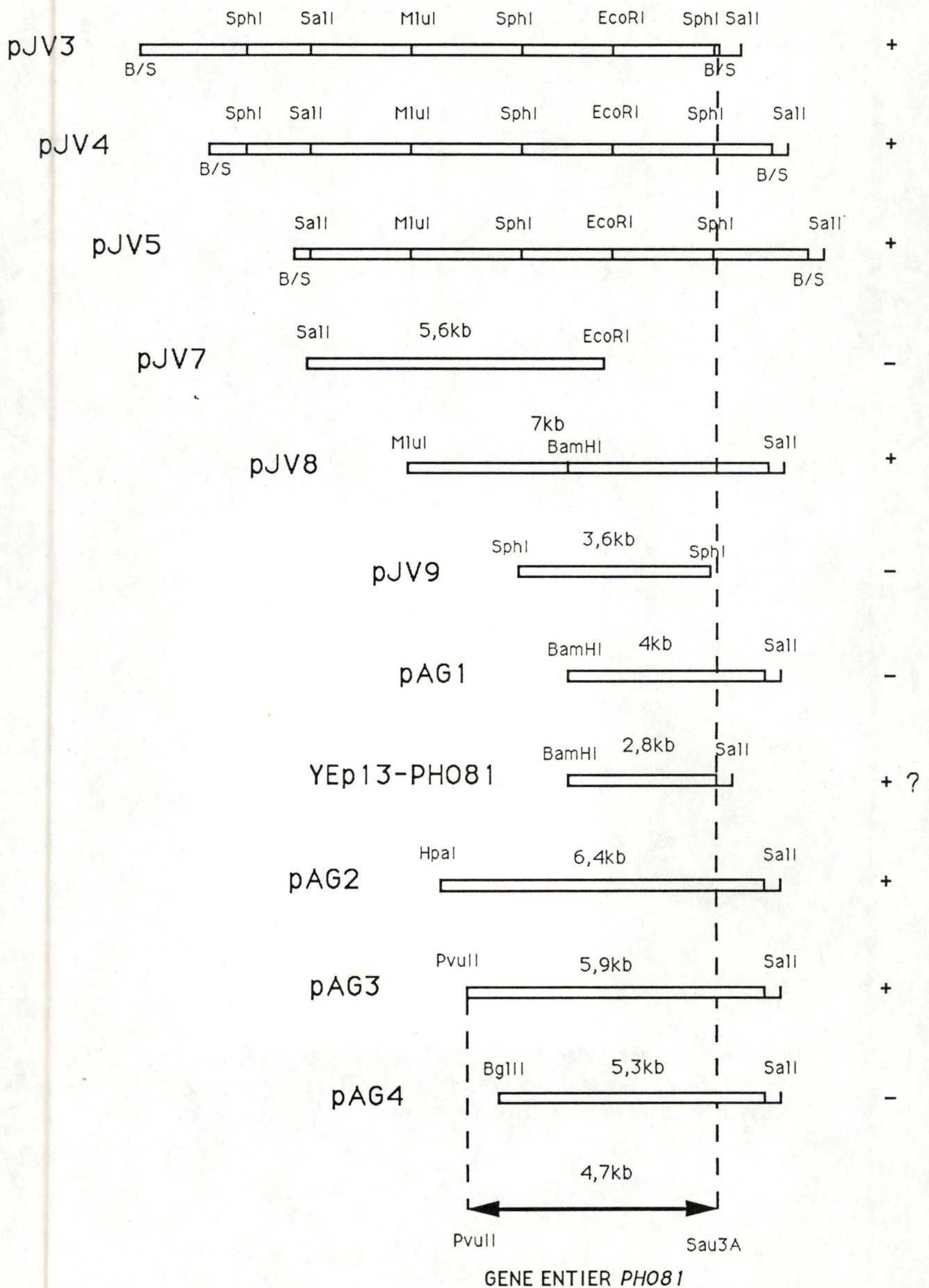


Fig. III.19. Résumé des résultats des tests de complémentation des différents sous-clones et délimitation du gène PHO81 (B/S=*Bam*HI/*Sau*3A).

III.1.3.3. TESTS DE COMPLEMENTATION.

La souche mutante de levure VD33d est transformée selon la méthode de Ito par 5mg de pAG2, de pAG3, de pAG4, de pJV8 et d'YCp50. Ces deux derniers serviront respectivement de contrôle positif et de contrôle négatif pour le test de coloration. Après deux jours de croissance sur milieu minimum à 30°C, les colonies sont "repiquées" sur milieu 165-30. Le test de coloration est effectué après deux jours de croissance à 30°C. (Fig. III.18)

Nous observons que les clones correspondants à la souche sauvage FL100 et aux mutants transformés par pJV8, pAG2, pAG3 sont positifs alors que les transformants YCp50 et pAG4 ne présentent pas d'activité phosphatase.

En conclusion, le fragment *Hpa*-*Sal* de 6,4kb et le fragment *Pvu*I-*Sal* de 5,9kb complètent la mutation *pho81* tandis que le fragment *Bgl*I-*Sal* de 5,3kb ne la complète pas.

III.1.4. DISCUSSION.

En considérant les différents résultats obtenus lors des tests de complémentation, nous pouvons déduire que le gène entier *PHO81* doit se trouver dans un fragment de 4,7kb limité par les sites *Hpa*I et *Sal*IIA. (Fig.III.19).

Nous avons montré, sans équivoque, que l'insert *Bam*HI-*Sal*I de 4kb de pAG1 ne complète pas la mutation *pho81*. Ceci éclaire d'un jour nouveau les résultats contradictoires antérieurs. En effet, il faut se rappeler que Yoshida situait le gène entier *PHO81* dans un fragment *Bam*HI-*Sal*IIA de 2,8kb environ. Ceci se fondait, d'une part, sur les résultats des tests de complémentation du mutant NA95-4B (a, *pho81*, *leu2-3*, 112) par le même insert génomique cloné dans le vecteur YEp13 et, d'autre part, sur des données de séquençage obtenues par les auteurs (non publiées). Une donnée de complémentation obtenue au cours d'un travail préliminaire dans notre laboratoire semblait en faveur de cette thèse (Coquette, 1988). La contradiction, dès lors, résultait du fait que la taille de l'ARN messager telle qu'elle apparaissait sur Northern blot (Yoshida *et al.*, 1989) était estimée à 3,5kb alors que l'insert complétant n'atteignait que 2,8kb. Nos résultats montrent, sans ambiguïté, qu'il faut un insert de 4,7kb pour compléter la mutation *pho81*.

Les raisons de ces résultats de tests de complémentation différents peuvent être recherchées à plusieurs niveaux. Les différences peuvent résulter de la nature du mutant *pho81*, de l'insert servant dans les complémentations ou du type de vecteur utilisé.

Dans le cas présent, la mutation *pho81* et les inserts utilisés pour les tests de complémentation sont identiques. Par contre, nous avons effectué la complémentation de VD33d avec un vecteur centromérique (YCp50) c'est-à-dire pratiquement monocopie. Les tests de complémentation de Yoshida, quant à eux sont réalisés avec un vecteur multicopie de type YEp (construction Yep13-*PHO81*). Ceci pourrait expliquer que le gène même tronqué (dans une portion de contrôle ou dans une région codante de moindre importance) serait capable de compléter la mutation *pho81* s'il est en un nombre de copies suffisant.

Au regard aux résultats contradictoires de Yoshida, nous avons émis l'hypothèse dans l'introduction qu'il manquait à l'insert *Bam*HI-*Sau*3A de 2,8kb, un fragment d'au moins 0,7kb pour que le gène *PHO81* soit entier (cfr. p.12). L'hypothèse est donc vérifiée mais nous ne savons pas si la portion tronquée du gène correspond à une séquence de régulation ou à une région codante.

L'hypothèse d'une délétion d'une séquence de régulation compensée par le dosage génique (grâce au vecteur multicopie) est cependant difficilement conciliable avec les données. En effet, la figure montre clairement que les plasmides pAG1 et pAG4 ne complètent pas la mutation *pho81* alors que pAG2 la complète. La région manquante au fragment *Bam*HI-*Sal*I de 4kb de pAG1 se situe donc entre *Pvu*II et *Bgl*II, soit à plus de 1,8kb du site *Bam*HI. La séquence de régulation qui ferait défaut devrait se situer à plus de 2kb du début de l'ORF que Yoshida situe à environ kb en aval du site *Bam*HI (Yoshida *et al*, 1987 ; séquence non publiée). Ceci est peu plausible dans la mesure où chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'UAS la plus éloignée connue chez *Saccharomyces cerevisiae* est à 1,4kb du début de l'ORF). L'hypothèse qu'il s'agisse d'une région codante est plus vraisemblable. Mais dans ce cas, le début de l'ORF de la séquence de *PHO81* selon Yoshida n'est pas correcte. L'analyse de la séquence de l'insert *Pvu*II-*Sal*I complétant nous permettra de lever avec certitude la controverse.

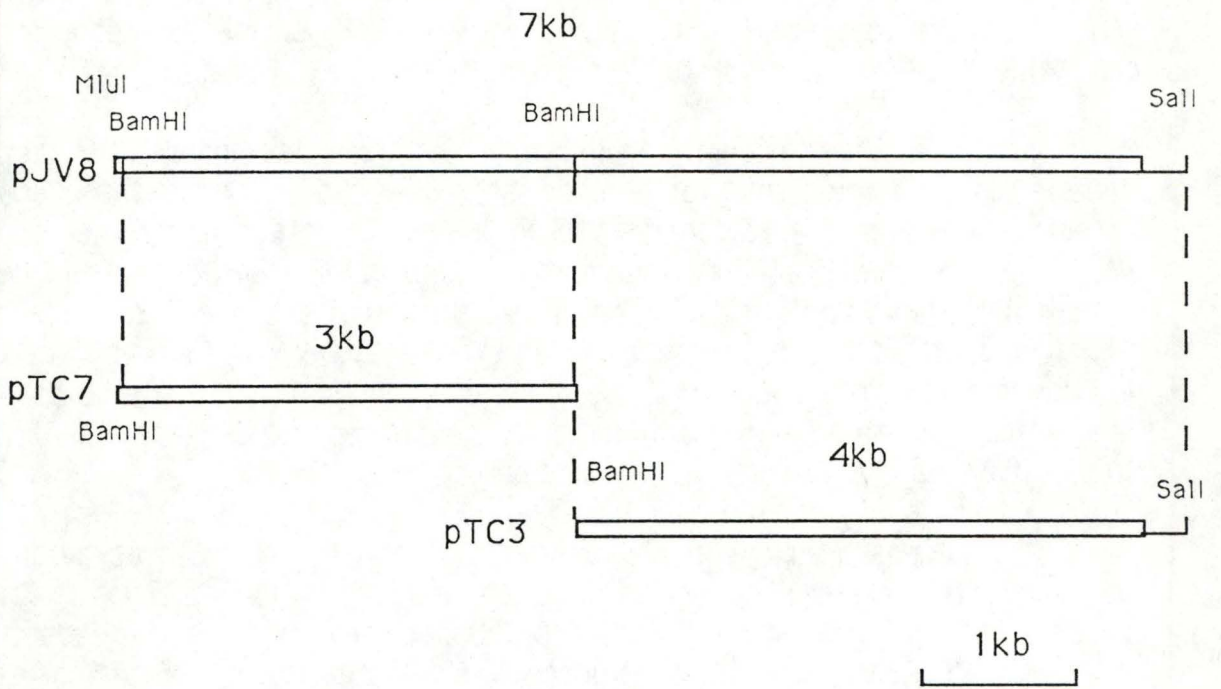


Fig. III.20 Constructions des plasmides pTC7 et pTC3.
 Les fragments *Bam*HI-*Bam*HI de 3kb et *Bam*HI-*Sall* de 4kb sont
 issus du fragment *Mlu*I-*Sall* de 7kb et clonés dans le vecteur
 pBluescript pour former les plasmides pTC7 et pTC3.

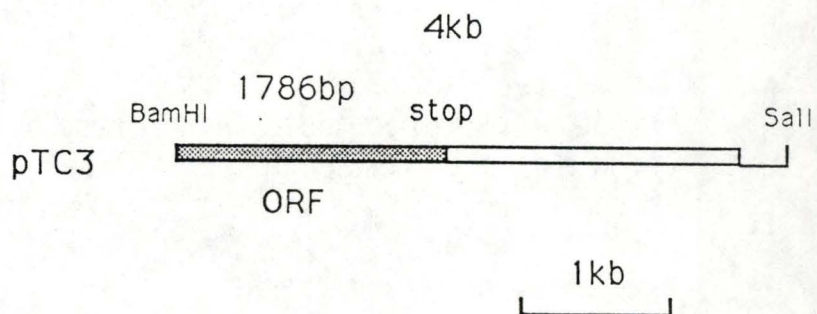


Fig. III.21. La séquence du fragment *Bam*HI-*Sall* de 4kb révèle une ORF de
 1786bp.

III.2. SEQUENCAGE

Comme nous venons de le conclure des données obtenues par les tests de complémentation, la controverse liée à la position des limites du gène *PHO81* ne sera levée avec certitude que par l'analyse de sa séquence.

III.2.1. Stratégie de séquençage

Le séquençage du gène *PHO81* nécessite de le "morceler" en plusieurs petits fragments. Ces fragments sont clonés dans le site multiple de clonage (MCS) du vecteur pBluescript KS+ conçu pour le séquençage par la méthode de Sanger. En effet, il est fourni avec une série de primers, et notamment le reverse primer (RP) et le M13-20 primer (FP), capable de s'hybrider à des séquences situées de part et d'autre du MCS (voir matériel et méthodes). Par la méthode de Sanger, il est possible de séquencer 200 à 300bp en aval du primer; les fragments clonés devront donc idéalement avoir une taille de l'ordre de 500bp de telle sorte que la séquence totale de l'insert soit reconstituée en une seule opération. Si la taille de l'insert du sous-clone est plus grande, la séquence complète pourra être obtenue à partir d'un primer synthétique dont sa séquence sera telle qu'il s'hybride avec la fin de la séquence obtenue.

III.2.2. Séquençage du gène *PHO81*.

III.2.2.1. ENTREE EN MATIERE.

La séquence entière du gène *PHO81* a été établie par ailleurs au laboratoire par Thierry Coche et Deborah Prozzi (Coche *et al.*, 1990). Une contribution de ma part y a été apportée.

Nous disposons de deux sous-clones, pTC3 et pTC7, pour établir cette séquence. Rappelons que pTC3 est le vecteur pBluescript KS+ avec un insert *Ban*HI-*Sal*I de 4kb qui contient une partie du gène *PHO81*. Le plasmide pTC7 est le vecteur pBluescript KS+ avec un insert *Ban*HI-*Ban*HI de 3kb qui contient l'autre partie du gène.(Fig.III.20)

A partir de pTC3, le fragment *Ban*HI-*Sal*I de 4kb a été séquencé entièrement par Thierry Coche. La séquence révèle une ORF de 1786bp en aval du site *Ban*HI (Fig.III.21).

La partie en amont de *Ban*HI a été séquencée à partir de trois sous-clones issus du plasmide pTC7 dont leurs constructions ont été décrites précédemment : pDP46, pDP47, pDP49 (*cf.* Fig.III.9.)

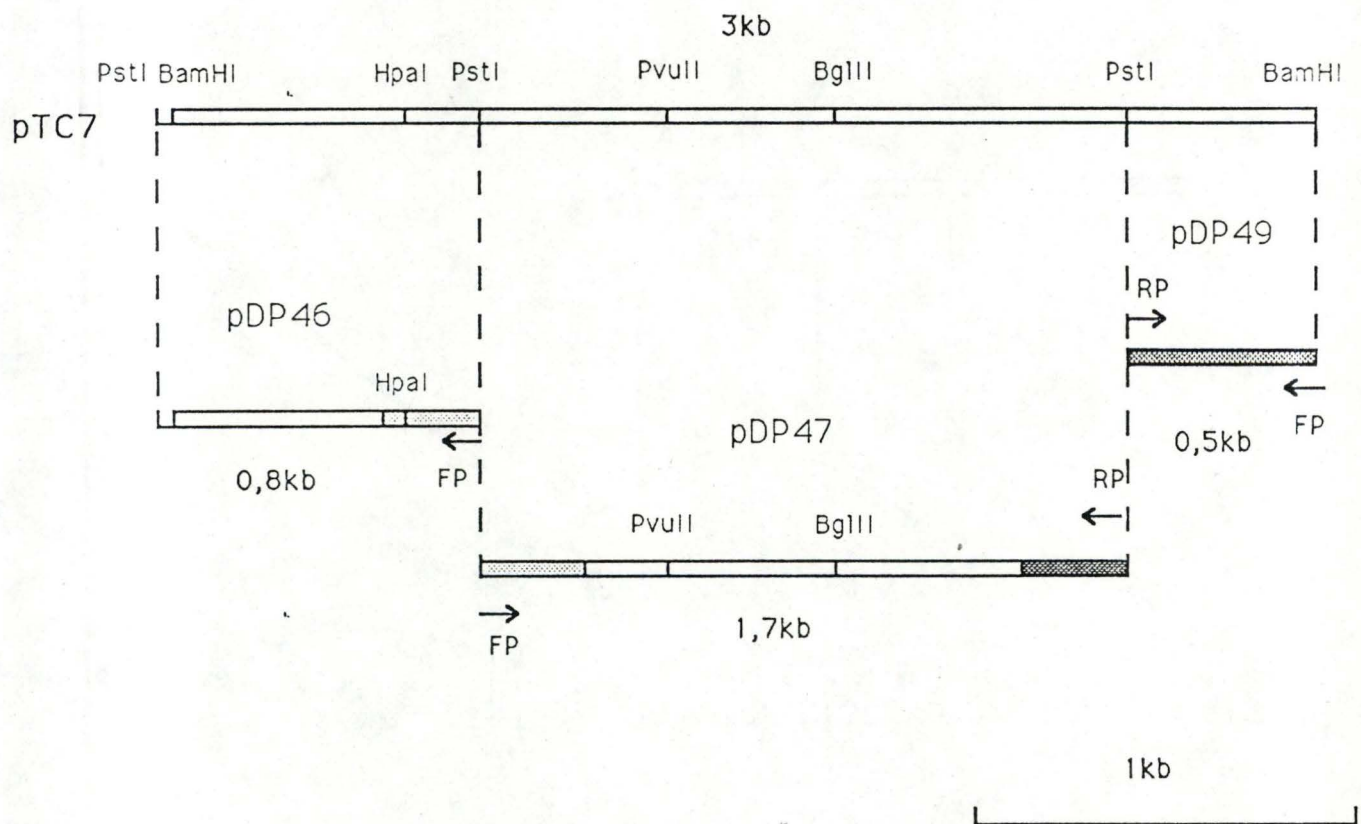
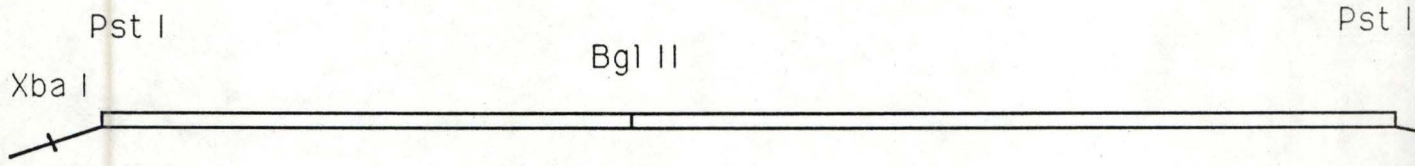


Fig. III.22. Schéma illustrant les résultats de séquençages partiels réalisés sur les trois sous-clones du plasmides pTC7 (pDP46, pDP47 et pDP49). Les ORF mises en évidence sont indiquées par des secteurs pleins. Les secteurs pointillés représentent des séquences sans ORF.

pDP47

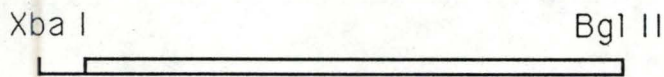
1,7kb



x Bgl II - Xba I

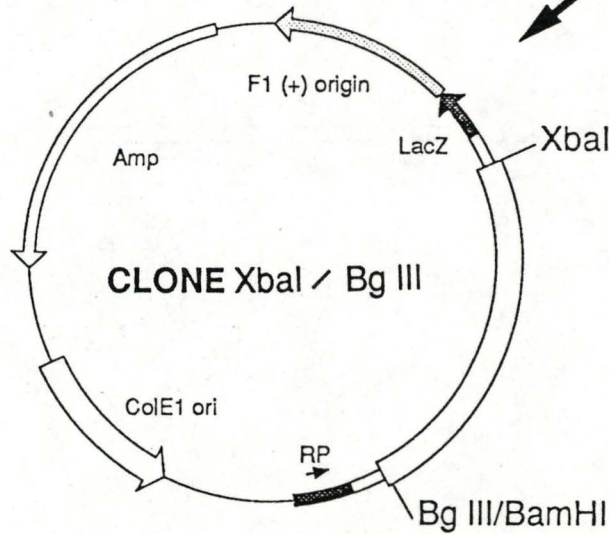


0,9kb



pBS

x BamH I - Xba I



→ Séquençage avec reverse primer

0,1kb



Fig. III.23. Construction du sous-clone *XbaI*-*Bg*III.

Le sous-clone pDP49 qui contient un insert de 0,5kb a été séquencé complètement au départ de deux primers (le reverse primer (RP) et le M13 -20 primer (FP)) qui se trouvent de part et d'autre du site multiple de clonage de pBluescriptKS+MCS. La séquence de cet insert de 0,5kb révèle une ORF. (Fig. III.22)

L'insert de 1,7kb du sous-clone pDP47 a été séquencé partiellement au moyen des deux primers FP et RP. Le séquençage par le RP met en évidence une ORF de 250bp qui est en continuité avec l'ORF de l'insert de 0,5kb de pDP49. Au contraire, la séquence établie à l'autre extrémité de l'insert de pDP47 (avec le FP) ne montre pas d'ORF (Fig.III.22.). Dès lors le début de l'ORF complète doit se situer à l'intérieur de l'insert de pDP47.. Pour déterminer la position de l'ATG et séquencer entièrement ce fragment de 1,7kb, différents sous-clones ont été construits à partir de pDP47.

Nous allons détailler la construction d'un de ces sous-clones dont la réalisation nous a été confiée dans le cadre de ce mémoire et nous présentons les résultats de la séquence que nous avons établie.

III.2.2. 2.CONSTRUCTION ET SEQUENCAGE DU SOUS-CLONE *Xba*-*Bgl*II. (Fig.III.23)

La double restriction de pDP47 par les enzymes *Xba*-*Bgl*II génère trois fragments de 2,9kb, de 0,9kb et de 0,7kb Le fragment de 0,9kb qui nous intéresse est récupéré par extraction de bande d'ADN sur gel d'agarose. Ce fragment *Xba*-*Bgl*II est ligué avec le vecteur de pBluescript préalablement restreint par *Xba* et *Bam*HI. Le site *Bam*HI est compatible avec le site *Bgl*II .

La souche XLI-blue est alors transformée par ce mélange de ligation pour être ensuite étalée sur milieu sélectif LB+Ampicilline+Xgal+IPTG. Après incubation une nuit à 37°C, six colonies blanches sont prélevées pour une extraction rapide de l'ADN. L'ADN plasmidique est restreint par *Pvu*II et les tailles des fragments sont analysées sur gel d'agarose.

Le clone dont l'ADN fournit par restriction les fragments de tailles attendues est amplifié et son ADN est préparé en grande quantité (MIDIPREP).

Le reverse primer est utilisé pour séquencer de *Bgl*I vers *Xba*I. Une séquence de 217bp est obtenue avec une phase ouverte de lecture :

AGAGTCCGATTTAAGAATAAAATTCAATATATTACACTCAAATATAAAG
ATTATAAGATAAATGGTAAGCTAAACTCAAACCAAGCTACCTCATTTAAA
AACTTATATGCGGCTTTCAAAAAGTTTCAAAGGATCTTAGAAATTTGGAG
CAGTATGTTGAGTTAAATAAAACGGGATTTTCAAAGCTCTGAAGAAATGG
GACAAGAGATCT 217bp

*Bgl*I

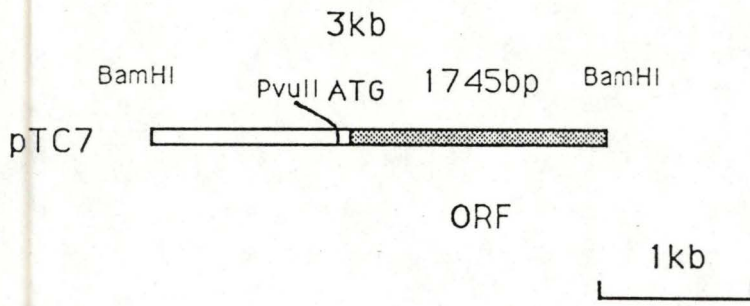


Fig. III.24. La séquence du fragment *Bam*HI-*Bam*HI de 3kb révèle une ORF de 1745bp

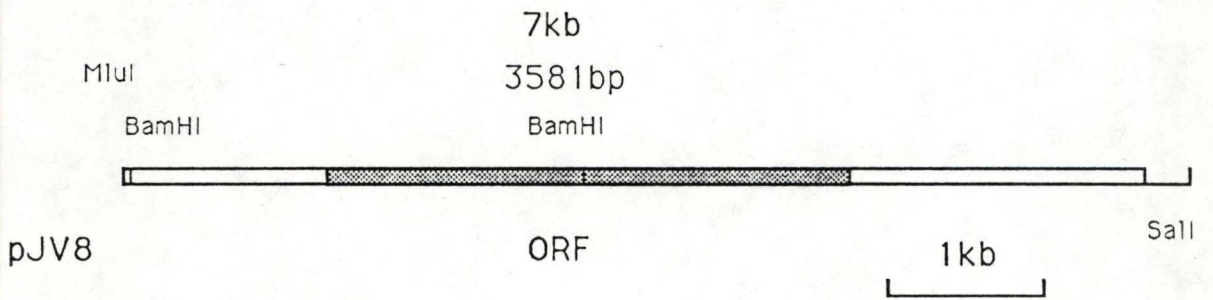


Fig. III.25 Le séquençage du gène *PHOB1* révèle la présence d'une ORF de 3531bp.

III.2.2.3. RESULTATS.

D'autres sous-clones ont été construits de la même manière décrite ci-dessus et ils ont permis de séquencer entièrement le fragment de 1,7kb sur les deux brins. Des primers synthétiques ont été utilisés pour les zones d'ambiguïté ou lorsque la construction d'un sous-clone n'était pas possible.

Lorsque nous regroupons les données de séquençage des deux sous-clones pDP47 et pDP49, nous observons que le fragment *Pvu*I-*Bam*HI de 1,9kb, comporte dans sa séquence une phase ouverte de lecture de 1745bp (Fig. III.24).

Lors des tests de complémentation, nous avons observé que pAG3 complémente la mutant *pho81*. Dès lors, la position du site *Pvu*I constituait la limite du gène complet incluant le promoteur. Ceci est surprenant dans la mesure où, chez la levure, la région promoteur couvre plusieurs centaines de paires de bases et ne pourrait donc en principe être contenue dans les 132bp comprises entre l'ATG et le site *Pvu*I. La question qui se pose maintenant est de savoir comment la complémentation du mutant *pho81* s'exerce dans l'hypothèse où le gène est effectivement tronqué. L'étude de cette question sera abordée plus loin.

Alternativement, un examen de la région 5', en amont du site *Pvu*II devra révéler des signaux potentiels de transcription. C'est pourquoi nous avons décidé de procéder au séquençage d'une partie de l'insert de 0,8kb du sous-clone pDP46 jusqu'au site *Hpa*I (Fig.III.22). Nous obtenons ainsi une séquence de 593bp du site *Hpa*I jusqu'à l'ATG que nous allons analyser.

1 50
 GTTAACCATCTTTATCACAAAATATACAATTAACCAACTACTTAATCAAT
 51 100
 TCGGTTATATTGCTTAGTATATACGTCTTTGGCACGCGATTGAAACGCGC
 101 150
 TAATTGCATCAGCCTATCTTTCTATGCAAGAATGCAAGAAAATTGATGT
 151 200
 GATGTGCCTTATCACAATTCATTACCTCCTATTTCTCTGCAGCAACAAG
 201 250
 TTTCTTGATTATAAAGGTCTTTAGCGTGAGAGGTACAGGTGTTATGGCA
 UASp2 (PHO4 binding site) UAS1 (PHO2 binding site)
 251 300
 CGTGCGAATAAGGGCAGAAATTAATCAAATTTATCAACTATTTGGCGATG
 301 350
 GCTCGAGACAGGTATAGAACCACTACTAGGTCATATTGAGGCTTTTGTAC
 UASp1 (PHO4 binding site) "CT-rich blocks"
 351 400
 AATTTATAGCAAGTTTTTGAGAGTCCCTTCAAGTTTGTACATAAATCTTC
 401 450
 TTTGTGCAACGTACAAGAGCAAAGTAGAAAAATTTGGTTTTTATTTTTTT
 451 500
 AAGCAACATCAGCTGCACTAGTTGAGCTTTTGACAAGACATACTGCTCAA
 501 550
 AAAATCTTCATAACATTATTTTTTCGGTTCCACAGTGATTGAGCTTTTTTGA
 551 596
 GAGAATAACCCTTTGGAGGCAACATAGATAGATAAACGTGCAATG

Fig. III.26. Analyse de la région 5' amont du gène *PHO81*.

III.2.3. ANALYSE DE LA REGION 5' DU GENE *PHO81* (Fig. III.26)

Le séquençage du gène *PHO81* révèle la présence d'un grande ORF de 3528 pb qui commence avec l'ATG en position 593 et se termine au codon STOP TAA en position 4121 (fig.III.25). Cet ATG qui serait le premier côté 5' du transcript jouerait le rôle de codon d'initiation de la traduction. Notons que le fragment *Bgl*II-*Sa*II de 5,3kb qui contient le deuxième ATG rencontré dans l'ORF (position 1465) ne complémente pas la mutation *pho81*.

Malgré l'incertitude qui subsiste quant à la position du site +1 de transcription, on peut donc conclure que la traduction de l'ARN messenger de *PHO81* est initiée à l'ATG en position 593. L'ORF ainsi délimitée contiendrait donc 3528 nucléotides. Les séquences hautement conservées d'épissage du pré-ARN messenger chez la levure (5' CTATGT 3' au site 5' d'épissage et 5' TACTAAC 3' dans la partie 3' de l'intron) sont absentes.

La région codante identifiée, nous allons pouvoir analyser la région 5' du gène et identifier des séquences éventuelles de régulation de la transcription.

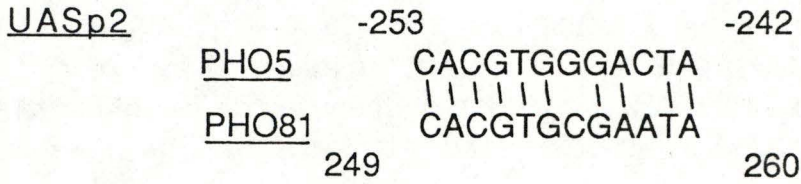
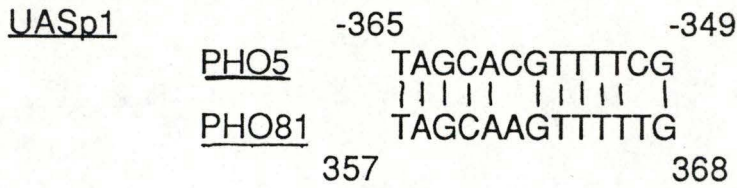
III.2.3.1 SEQUENCES DE SELECTION DU SITE +1 DE TRANSCRIPTION.

Dans un premier temps, nous avons analysé la séquence de 132bp du site *Pvu*I jusqu'à l'ATG constituant la région 5' du gène. Cet examen n'a pas révélé de signaux caractéristiques susceptibles de jouer un rôle important dans la transcription. Notons cependant l'existence d'une séquence apparentée à la TATA box en position 508 et deux sites +1 potentiels en position 497 et 554. Mais le positionnement exact du site +1 exige la réalisation d'expérience de type mapping S1

En ce qui concerne la région plus en amont du site *Pvu*I qui s'étend du site *Hpa*I jusqu'à l'ATG, nous observons différents signaux de transcription. En effet, deux séquences CAAG avec, 10 pb en amont, 2 "CT-rich blocks", en position 175-189 et 396-409. Rappelons que de telles séquences se retrouvent dans des gènes hautement exprimés, tel que le gène de la phosphoglycerate kinase (PGK) (Dobson *et al.*, 1982).

III.2.3.2. SEQUENCES QUI MODULENT LA TAUX DE TRANSCRIPTION.

PHO4 binding site:



PHO2 binding site:

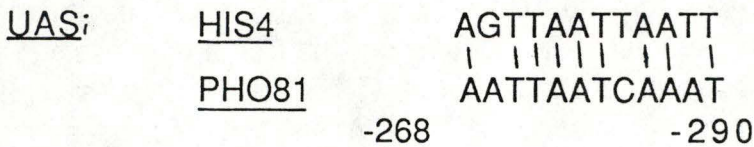


Fig. III.27. Comparaison des séquences UAS et apparentées dans la région 5' des gènes *PHO81*, *PHO5* et *HIS4*.

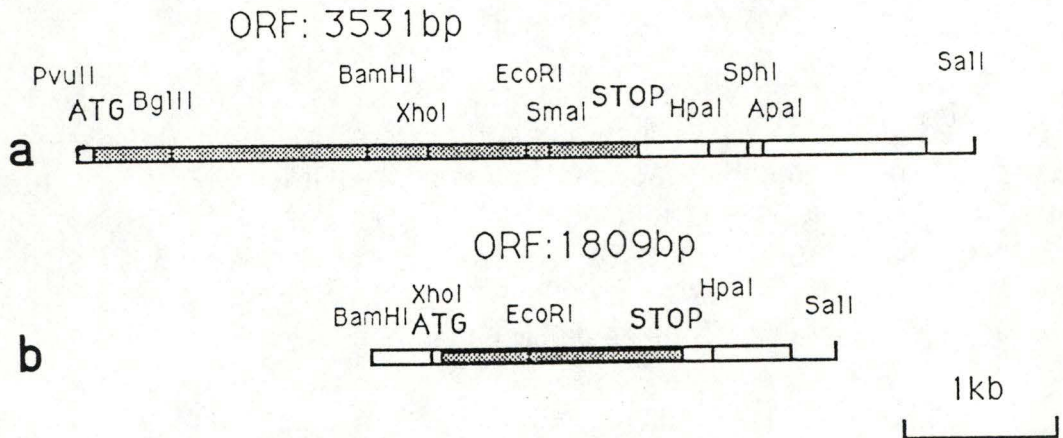


Fig. III.28. Délimitation des ORF dans l'insert génomique complétant le mutant *pho81*.
 A/ Données de notre laboratoire : une ORF de 3531bp
 B/ données de Yoshida : une ORF de 1809bp.

Par les travaux de Yoshida (Yoshida *et al.*, 1989b), nous savons que la transcription du gène *PHO81* est régulée par le Pi, comme le gène de structure de la phosphatase acide, *PHO5*. Yoshida suggérait que les protéines PHO2 et PHO4 activeraient la transcription de *PHO81* comme celle de *PHO5*. Deux UAS (UASp1 et UASp2) ont été identifiés comme site de liaison de la protéine PHO4 dans le promoteur de *PHO5*, et une UASi comme site de liaison de la protéine PHO2 (Vogel *et al.*, 1989).

Nous avons cherché des séquences similaires à ces UAS dans la région promoteur de *PHO81*. Une séquence de 13pb avec un mismatch de 2 pb s'est révélée similaire à l'UASp1, en position 357-369, alors qu'une séquence de 12pb avec un mismatch de 2pb est similaire à l'UASp2 en position 246-260. (Fig. III.27)

Aucune séquence homologue n'a été trouvée avec l'UASi reconnue par la protéine PHO2 dans le promoteur de *PHO5*, mais une séquence de 12 pb avec un mismatch de 3 pb est similaire à la séquence reconnue par la protéine PHO2 dans le promoteur *HIS4* (Tice-Baldwin *et al.*, 1989) en position 268-290 (Fig. III.27).

Donc, comme pour le promoteur de *PHO5*, une UAS reconnue par la protéine PHO2 est entourée de 2 UAS reconnues par la protéine PHO4.

III.2.4. DISCUSSION.

III.2.4.1. Le séquençage du gène *PHO81* met en évidence l'existence d'un ATG initiateur situé à 2200bp en amont de l'ATG initiateur défini antérieurement par Yoshida.

Nous avons délimité lors des tests de complémentation, un fragment *PvuI-SalIA* de 4,7kb qui contient l'information du gène *PHO81*. Après le séquençage, ce fragment révèle une ORF de 3528bp. Ce résultat est en contradiction avec les conclusions des données de séquençage (non publiées) rapportées par Yoshida (Yoshida *et al.*, 1987). La taille et les limites de l'ORF que nous mettons en évidence ne correspondent pas à celles de l'ORF de 1809bp trouvée par Yoshida. L'ORF selon la séquence établie au laboratoire commence en fait à environ 2200bp en amont de l'ATG initiateur fixé par Yoshida et se termine à 500bp en amont du codon STOP défini par ces auteurs. (Fig. III.28).

Les différences entre nos données et celles de Yoshida font appel à plusieurs commentaires :

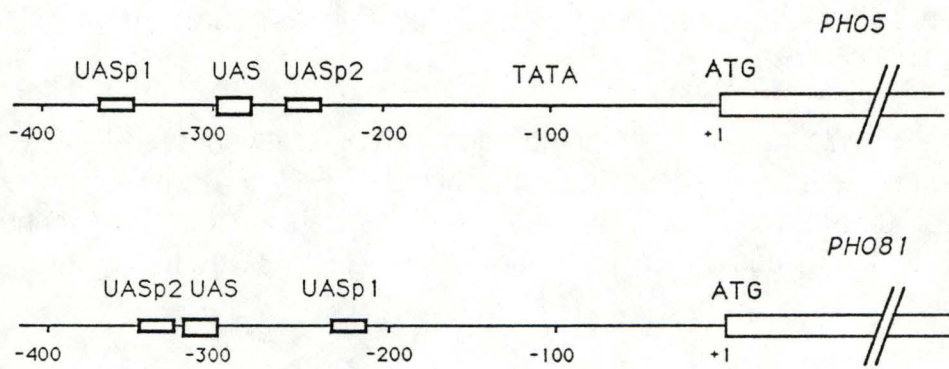


Fig. III.29. Comparaison de la localisation des UAS de PH05 et des séquences apparentées de PH081.

- les tests de complémentation réalisés avec un vecteur monocopie ont montré que les fragments *Ban*HI-*Sal* de 4kb et *Bgl*II-*Sal* de 5,3kb ne complémentent pas la mutation *pho81*. Ces résultats sont en accord avec notre séquence car ces fragments ne contiennent qu'une partie de l'ORF. Mais ces résultats ne s'expliquent au regard de la séquence de Yoshida car le fragment *Bgl*II-*Sal* de 5,3kb contient toute la séquence codante définie par les auteurs avec une région 5' de plus de 1800bp.
- la taille de l'ARN messenger de *PHO81* estimée par Northern est de 3,5kb (Yoshida et al., 1989B) ce qui est en accord la taille attendue pour messenger comptant une ORF.de 3528bp.
- l'ATG fixé en position 593 dans notre séquence est isolé dans l'extrémité 5' de l'ORF et la présence d'une purine en position 590 est en accord avec la situation habituelle des ATG initiateurs (Kozak, 1981).

Ces données sont donc en faveur de la situation où l'ATG en position 593 est le codon initiateur de la traduction de l'ARN messenger de *PHO81*.

III.2.4.2. Les UAS présentes dans la région distale du promoteur rendent compte des mécanismes semblables de régulation de *PHO5* et de *PHO81*.

L'analyse de la région 5' du gène n'a pas montré de séquence consensus typique de TATA box. Il est possible que la fonction de la sélection du site+1 de transcription ne soit pas remplie par une TATA box. Ainsi, les séquences CAAG précédées 10bp en amont de "CT-rich blocks" pourrait alors être importantes. Notons que ces séquences se retrouvent dans les promoteurs de gènes hautement exprimés tel que la PGK qui ne requiert pas de TATA box pour son expression (Ogden *et al*, 1986). La détermination de la position du site +1 par mapping S1 et des expériences de mutagenèse des signaux présomptifs de la transcription sont nécessaires pour en évaluer leur importance

Par comparaison de séquences, nous avons trouvé trois UAS potentielles dans le promoteur de *PHO81*. Une UAS susceptible d'être reconnue par la protéine PHO2 est entourée de deux UAS, l'UASp1 et l'UASp2, répondant à la protéine PHO4. L'arrangement des trois UAS putatives dans le promoteur de *PHO81* est le même que celui observé pour les UAS fonctionnant dans le promoteur de *PHO5* (Fig.III.29). Cet arrangement suggère que le mécanisme d'activation du gène *PHO81* par les protéines PHO2 et PHO4 est semblable à celui du gène *PHO5*



Fig. III.30. Reconstitution de la séquence amont de l'insert PvuII-SalI du plamide pAG3.
 UASp1, UASp2 et UASi désignent les trois "UAS-like" trouvé dans la matrice YCp50.(voir fig.3)
 la séquence du pBluescript KS+ est indiquée en minuscule.
 promoteur *PHO81* désigne la séquence en amont de l'ATG du gène.

A PHO4 binding site:

<u>UASp1</u>	<u>PHO5</u>	174	AATTAGC	ACGTTT	186
	<u>YCp50-PHO81</u>	362	AATTCTC	ATGTTT	374
<u>UASp2</u>	<u>PHO5</u>	284	ACTCAC	ACGTTG	294
	<u>YCp50-PHO81</u>	27	ACCCACT	CGTTG	37

PHO2 binding site:

<u>UAS</u>	<u>PHO5</u>	246	GAATAGG	CACTCTCT	260
	<u>YCp50-PHO81</u>	146	GAATACT	CACTCTCT	160

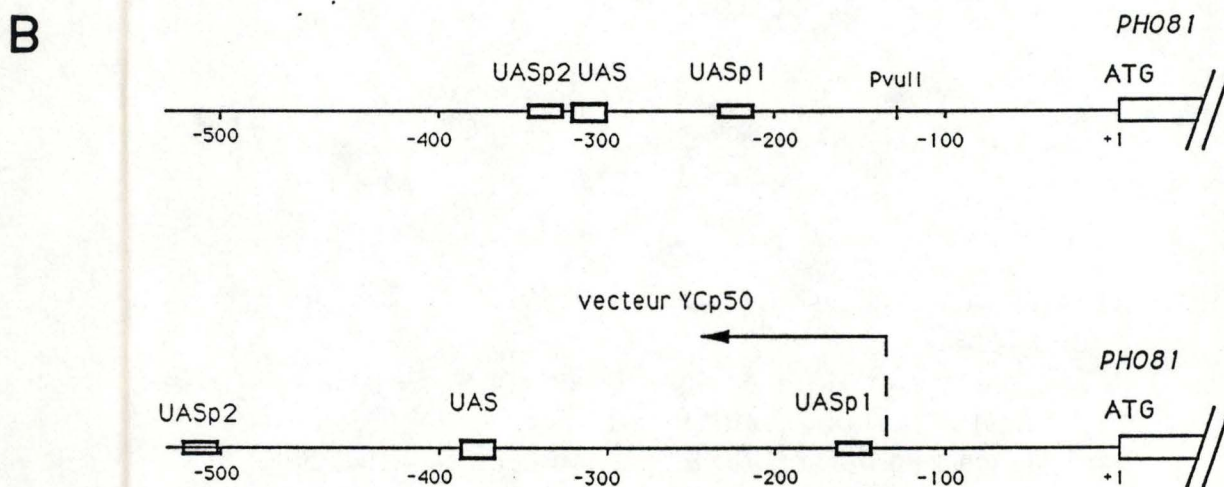


Fig. III.31. Mise en évidence de séquences "UAS-Like" dans la matrice du vecteur YCp50.

A/ Comparaison des séquences UAS et apparentées dans la région 5' des gènes *PHO81* et *PHO5*.

B/ Comparaison de la localisation des séquences UAS potentielles dans le promoteur authentique du gènes *PHO81* et dans la matrice YCp50.

III.2.4.3. L'absence d'UAS potentielles de *PHO81* pourrait être compensée par des séquences présentes dans la matrice du vecteur YCp50.

Les trois UAS que nous venons d'identifier sont localisées en amont du site *PvuII*. Or, lors des tests de complémentation, le plasmide pAG3 qui contient l'insert *PvuII-SalI* de 5,9kb où les UAS sont donc absentes, est capable de compléter la mutation *pho81*. Deux hypothèses découlent de cette observation :

- soit la séquence qui fait défaut n'est pas nécessaire pour l'expression du gène *PHO81*.
- soit il y a un "effet plasmide" c-à-d. que les séquences du vecteur dans lequel le fragment a été cloné, tiennent un rôle analogue aux UAS.

Rappelons que la taille habituelle de la région promoteur chez la levure est supérieure à la taille de la région 5' amont présent dans l'insert du plasmide pAG3 (132bp). Il est donc peu plausible que cette région suffise à une expression correcte de *PHO81*. L'examen de la séquence n'a pas révélé la présence de signaux particulier de transcription en dehors d'une séquence ayant une certaine homologie avec une TATA box. Bien qu'on ne puisse exclure que la séquence de 132bp suffise à assurer un certain taux basal de transcription permettant la complémentation de la mutation *pho81*, il convient d'essayer la deuxième hypothèse.

Pour confirmer la deuxième hypothèse, nous avons reconstitué la séquence amont du fragment *PvuII-SalI* de 5,9kb. Rappelons que pour cloner ce fragment au site *ClaI* du plasmide pAG1, nous sommes passé par un vecteur intermédiaire (Fig.III.19). Nous avons donc en amont de *PvuII* une séquence de 13bp du plasmide pBluescript KS+ et puis la séquence du vecteur YCp50 à partir du site *ClaI* où le fragment a été cloné (Fig.III.30). Cette séquence amont a été comparée avec les UAS reconnues par les protéines PHO2 et PHO4 dans le promoteur de *PHO5*. Une séquence de 13bp avec un mismatch de 3bp s'est révélé similaire à l'UASp1 reconnue par la protéine PHO4 et une séquence de 11bp avec un mismatch de 2bp similaire à l'UASp2. Une autre séquence de 15bp avec un mismatch de 4bp en position est similaire à l'UASi reconnue par PHO2 (Fig. III.31). Il y aurait donc dans la séquence amont du fragment *PvuII-SalI* de 5,9kb, des éléments pouvant activer l'expression du gène.

Pour vérifier l'hypothèse d'un effet plasmide, le fragment *PvuII-SalI* de 5,9kb devra être cloné dans un vecteur qui ne présente aucune séquence similaire aux UAS

De plus, pour prouver l'importance des UAS éventuelles que nous avons identifiées, des délétions plus "fines" devront être effectuées et leurs effets analysés sur l'expression du gène en mesurant le taux d'ARN messager de *PHO81* ou encore en suivant l'expression d'un autre gène "reporter" dont le produit protéique est aisément détectable.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Le système régulateur de la phosphatase acide répressible de *Saccharomyces cerevisiae* illustre à souhait la complexité des mécanismes de régulation de l'expression génétique chez cet eucaryote. Le gène *PHO81*, dont on sait qu'il exerce le rôle de médiateur dans ce système, est étudié dans notre laboratoire afin de comprendre tant les mécanismes de sa propre régulation que la manière dont la protéine PHO81 agit.

Le gène *PHO81* a été cloné antérieurement (Vandenhoute *et al.*, 1988 Yoshida *et al.*, 1987 et Yoshida *et al.*, 1989b). Cependant, certains résultats obtenus par Yoshida sur ce gène *PHO81* apparaissent contradictoires. En effet, un fragment de 2,8kb cloné par ces auteurs, complèterait un mutant *pho81*, ce qui suggère que ce clone contient le gène entier. Or, la taille du mRNA du gène sauvage, telle qu'elle apparaît sur Northern blot présenté par ces auteurs, est estimée à 3,5 kb, soit une taille plus élevée que le gène lui-même, ce qui est inconcevable.

Nous avons repris le problème ainsi posé. Pour cela, nous avons testé la capacité de différents sous-clones, construits dans un vecteur navette *E.coli-S.cerevisiae* monocopie au départ d'un fragment génomique de 7 kb qui contient le gène *PHO81* entier, de complèter la même mutation *pho81*. Nous avons pu ainsi délimiter un fragment *PvuII-SalI* de 4,7 kb qui contient toujours le gène *PHO81* entier, alors qu'un fragment *BamHI-SalI* de 4 kb, comprenant le fragment de 2,8 kb, ne complèment pas. Les raisons de la différence entre les résultats des tests de complèmentation de Yoshida et les nôtres peuvent s'expliquer de différentes façons. Si on exclut des raisons triviales telles la confusion ou l'interprétation erronée du test de détection de la phosphatase, on peut penser qu'en revanche, le type de vecteur utilisé pour complèmenter le mutant *pho81* peut avoir son importance. Nous avons effectué en effet la complèmentation du mutant VD33d avec un vecteur monocopie de type YCp alors que Yoshida a utilisé un vecteur multicopie de type YEp. Par l'effet de dosage génique que ce vecteur YEp entraîne, il pourrait se faire que le gène tronqué soit toujours capable de complèmenter dans une certaine mesure la mutation. La délétion pourrait affecter une région de régulation du gène et/ou une région codante non-essentielle de la protéine.

La détermination formelle de cette hypothèse explicative des résultats de complémentation rapportés par l'équipe des japonais consisterait à vérifier que l'insert de 4 kb dans un vecteur de type YEp entraîne chez le transformant une réponse positive en test de coloration.

Une autre vérification consiste à séquencer le gène *PHO81*. Nous avons montré que le sous-clone pAG3 (complémentant la mutation) contient une ORF de 3531 bp, alors que les sous-clones pAG1 et pAG4 (ne complémentant la mutation) ne contiennent qu'une partie de celle-ci et sont en outre délétés des éléments de contrôle de la transcription situés en amont de l'ORF. De tels signaux potentiels ont effectivement été mis en évidence dans la région 5' amont du gène. En effet, par comparaison avec les séquences des UAS du promoteur de *PHO5*, nous avons détecté trois UAS potentielles dont deux sont homologues d'UAS reconnues par PHO4 et la troisième homologue de l'UAS_i reconnues par PHO2. La situation et l'arrangement de ces trois UAS dans le promoteur de *PHO81* semblable à la situation de *PHO5* permet de rendre compte, sur une base moléculaire, d'observations antérieures (Yoshida *et al.*, 1989b) montrant que l'expression régulée de *PHO81* et de *PHO5* se faisait de manière coordonnée (les mutants *pha2* et *pha4* ne montrent pas de transcript de *PHO81* ni de *PHO5* en Northern blot).

Le mode d'action de la protéine PHO81 demeure quant à lui, inconnu. Cependant, pour expliquer la fonction de la protéine PHO81 dans le système de la phosphatase acide répressible, Yoshida avait proposé deux hypothèses (Yoshida *et al.*, 1989b) :

- soit la protéine PHO81 est une protéine régulatrice au même titre que plusieurs autres protéines du système de la phosphatase acide
- soit PHO81 est une enzyme qui métabolise l'effecteur (Pi) en une forme inactive.

Les informations que nous avons obtenues, jointes aux données de la littérature, nous permettent d'avancer des arguments en faveur de la deuxième hypothèse :

- 1/ Comme le suggèrent les expériences de Northern blot de Yoshida et la nature des séquences régulatrices (trois UAS) que nous avons mises en évidence en amont du gène, *PHO81* n'est pas exprimé de manière constitutive, comme le sont les autres gènes de nature régulatrice dans le système.
- 2/ La taille très grande de l'ORF que nous mettons en évidence (codant pour 1779 aa), distingue également ce gène des autres gènes régulateurs du système (codant pour des protéines de

300 aa environ), et est davantage compatible avec la nature enzymatique de la protéine PHO81.

Pour étayer d'avantage cette hypothèse, il y aurait lieu de vérifier par mutagenèse dirigée le rôle régulateur effectif des UAS présumées du gène *PHO81*. Par ailleurs, des recherches d'homologies avec les séquences d'autres protéines pourraient suggérer des hypothèses quant à la nature exacte de l'activité de l'enzyme.

La mise à l'épreuve de l'hypothèse alternative attribuant à PHO81 un rôle régulateur demanderait de vérifier sa capacité à interagir (*in vivo* et/ou *in vitro*) avec les autres éléments du système (séquences d'ADN et/ou protéines).

BIBLIOGRAPHIE

- Almer A., Rudolf H., Hinnen A. and Horz W. (1986) Removal of positioned nucleosome from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* **5**, 2689-2696.
- Arndt K., and Fink G.R. (1986) GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *PNAS USA* **83**, 8516-8520.
- Arndt K., Styles C. and Fink G.R. (1987) Multiple global regulators control *HIS4* transcription in yeast. *Science* **237**, 874-880.
- Berben G., Legrain M., Hilger F. (1988) Studies on the structure, expression, and function of the yeast regulatory gene *PHO2* *Gene* **66**, 307-312.
- Berben G., Legrain M., Gilliquet V., Brunelle N., and Hilger F. (1990a) DNA-binding and activation domains of the yeast regulatory proteins PHO2 and PHO4. *Arch. int. Physiol. Biochim.* **97**, B58.
- Berben G., Gilliquet V., Legrain M., and Hilger F. (1990b) Toxicity of overexpressed *PHO2* in yeast is due to the homeobox. *Arch. int. Physiol. Biochim.* **98**, B116.
- Braus G., Mösch H.U., Vogel K., Hinnen A., and Hütter A. (1989) Interpathway regulation of the *TRP4* gene of yeast. *EMBO J.* **8**, 939-945.
- Bürglin T.R. (1988) The yeast regulatory gene *PHO2* encodes a homeobox. *Cell* **53**, 339-340.
- Chen W., and Struhl K. (1985) Yeast mRNA initiation sites are determined primarily by specific sequences, not by the distance from the TATA element. *EMBO J.* **4**, 3273-3280.
- Coche T., Prozzi D., Legrain M., Hilger F., and Vandenhaute J. (1990) Nucleotide sequence of the *PHO81* gene involved in the regulation of the repressible acid phosphatase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **18**, 2176.

- Coquette V. (1988) Contribution au clonage, à la caractérisation physique et sous-clonage dans un vecteur Bluescript aménagé du gène *PHO81* de levure. Mémoire présenté en vue du diplôme de licencié en Sciences biologiques.
- Donahue T., Farabough P. and Fink G.R. (1982) The nucleotide sequence of the *HIS4* region of yeast. *Gene* 18, 47-59.
- Dobson M.J., Tuite M.F., Roberts N.A., Kingsman A., Kingsman S. (1982) Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae* *Nucl. Acids Res.* 10, 2625-2637.
- Dretzen G., Ballard M., Sassone-Corsi P. and Chambon P. (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 12, 295-298.
- Fascher K.D., Schmitz J. and Hörz W. (1990) Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the *PHO5* promoter in *Saccharomyces cerevisiae* *EMBO J.* 9, 2523-2528.
- Gilliquet V., Legrain M., Berben G., and Hilger F. (1990) Studies on the yeast regulatory genes *PHO80* and *PHO85* *Arch. int. Physiol. Biochim.* 98, B130.
- Guarente L. (1987) Regulatory proteins in yeast. *Ann. Rev. Genet.* 21, 425-452.
- Hahn S., Haer E.T. and Guarente L. (1985) Each of the three "TATA elements" specifies a subset of the transcription initiation site at the *CYC1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* *PNAS USA* 82, 8562-8566.
- Hinnebusch A. and Fink G.R. (1983) Repeated DNA sequences upstream from *HIS1* also occur at several other co-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* *J. Biol. Chem.* 258, 5238-5247.
- Holland J.P. and Holland M.J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9839.
- Ito H., Fukada Y., Murata H. and Kimura A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bact.* 153, 163.
- Koren R., Levitre J. and Bostian K. (1986) Isolation of the positive-acting regulatory gene *PHO4* from *Saccharomyces cerevisiae* *Gene* 41, 271-280.

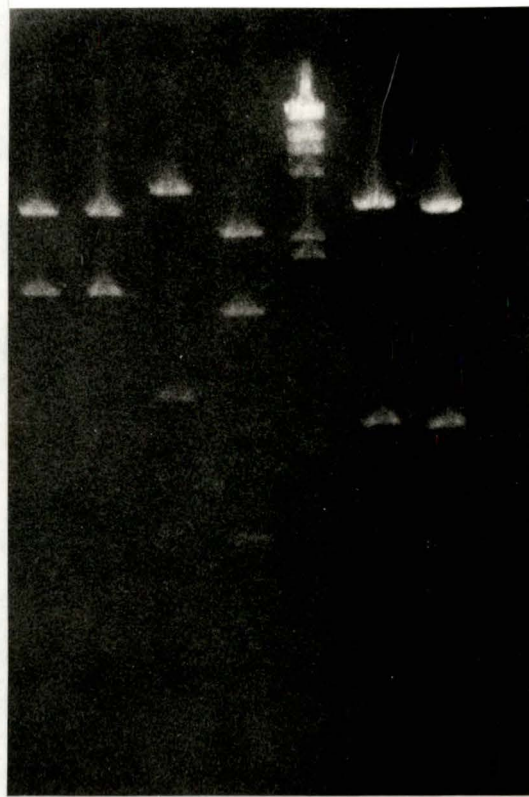
- Kozak M. (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucl. Acids Res.* *9*, 5233-5252.
- Legrain M., De Wilde M. and Hilger F. (1986) Isolation, physical characterization and expression analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* positive regulatory gene *PHO4*. *Nucl. Acids Res.* *14*, 3059-3073.
- Murre C., MacCaro P.S. and Baltimore D. (1988) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer, daughterless, MyoD and myc proteins. *Cell* *56*, 777-783.
- Nagawa F., and Fink G.R. (1985) The relationship between the "TATA" sequence and transcription initiation sites at the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS USA* *82*, 8557-8561.
- Ogawa N. and Oshima Y. (1990) Functional domains of a positive regulatory protein PHO4 for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 2224-2236.
- Ogden J. E., Stanway C., Sunyoung K., Mellor J., Kingsman A. and Kingsman S. (1986) Efficient expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGK gene depends on upstream activation sequences but does not require TATA sequences. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 4335-4343.
- Oshima Y. (1982) Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and phosphate. In the *Molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Strathern J.M. Lone E.W. and Broach J.R. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Vol II.
- Pfeiffer B.H. and Zimmerman S.B. (1983) *Nucl. Acids Res.* *11*, 1853.
- Rose M.D., Novick P., Thomas J., Botstein D. and Fink G. (1987) A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* *60*, 237-243.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *PNAS USA* *74*, 5463-5467.
- Sengstay C., and Hinnen A. (1987) The sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *PHO2* codes for regulatory proteins with unusual amino acid composition. *Nucl. Acids Res.* *15*, 233-246.
- Struhl K. (1981) Deletion mapping of an eukaryotic promoter. *PNAS USA* *78*, 4461-4465.

- Struhl K. (1989) Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 1051-1077.
- Tibor A. (1988) Mapping génétique et contribution à la caractérisation moléculaire du gène *PHO81*, régulateur de la phosphatase acide chez *Saccharomyces cerevisiae* Mémoire présenté en vue du diplôme de licencié en Sciences biologiques.
- Tice-Baldwin K., Fink G.R. and Arndt K. (1989) BAS1 has a Myb motif and activates *HIS4* transcription only in combination with BAS2. *Science* 246, 931-935.
- Toh-e A., Veda Y., Kakimoto S. and Oshima Y. (1973) Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae* *J. Bact.* 113, 727-738.
- Toh-e A. and Shimauchi T. (1986) Cloning and sequencing of the *PHO80* gene and *CEN15* of *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* 2, 129-139.
- Toh-e A., Tanaka K., Uesono Y., and Wickner R.B. (1988) *PHO85*, a negative regulator of the PHO system, is a homolog to the protein kinase gene *CDC28* of *Saccharomyces cerevisiae* *Mol. Gen. Genet.* 214, 162-164.
- Vandenhoute J., Legrain M., Coquette V., Tibor A. and Hilger F. (1988) Molecular cloning, genetic mapping and preliminary characterization of *PHO81*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the transcriptional regulation of the repressible acid phosphatase gene (*PHO5*). *Arch. int. Physiol. Biochim.* 96, B46.
- Vogel K., Hörz W., and Hinnen A. (1989) The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with *PHO5* upstream activation regions. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2050-2057.
- Yoshida K., Kuromitsu Z., Ogawa N., Ogawa K. and Oshima Y. (1987) Regulatory circuit for phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. in Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. Torrinai-Gorini A., Silver S., Yagil E., Rothman F.G. and Wright A. Eds. American Society for Microbiology. Washington D.C., pp 49-55.
- Yoshida K., Kuromitsu Z., Ogawa N. and Oshima Y. (1989a) Mode of expression of the positive regulatory genes *PHO2* and *PHO4* of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 217, 31-39.

Yoshida K., Ogawa N. and Oshima Y. (1989b) Function of the *PHO* regulatory genes for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 217, 40-46.

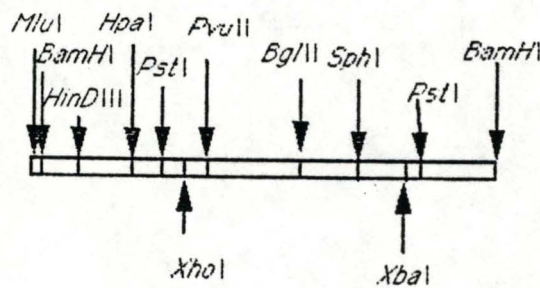
ANNEXE.

1 2 3 4 5 6 7



Electrophorèse en gel d'agarose de différentes restriction des plasmides pDP47 et pDP46.

- piste 1. pDP47 restreint par *Xba*
- piste 2. pDP47 restreint par *Xhd*
- piste 3. pDP47 restreint par *Bgl*II et *Eco*R I
- piste 4. pDP47 restreint par *Pvu*II et *Pst*I
- piste 5. marqueur de taille λ restreint par *Hind*III
- piste 6. pDP46 restreint par *Hpa*I et *Eco*R I
- piste 7. pDP46 restreint par *Hind*III et *Bam*HI



1 kb

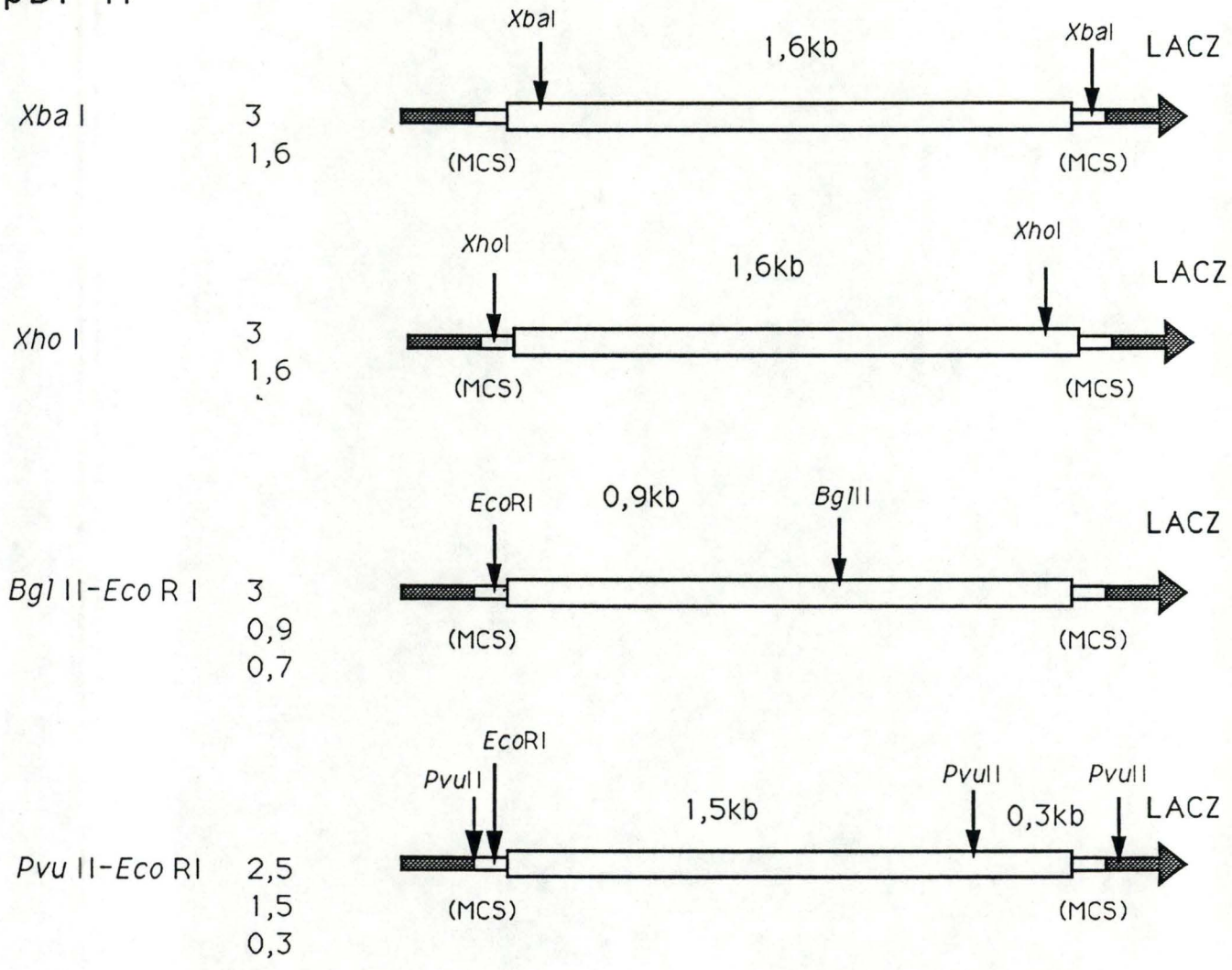
Carte de restriction détaillée du plasmide pTC7.

Enzymes de restriction

Taille estimée des fragments de restriction(en kb)

Localisation des sites sur pDP47 et pDP46

pDP47



pDP46

