Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation structurale et fonctionnelle des séquences de régulation 5'-amont du gène PHO 81 de la levure Saccharomyces cerevisiae

Denoel, Philippe

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Caractérisation structurale et fonctionnelle des séquences de régulation 5'-amont du gène *PHO 81* de la levure *Saccharomyces cerevisiae* .

DENOEL Philippe

Résumé

PHO 81 est le gène situé au sommet de la cascade de régulation par le Pi extracellulaire de l'expression du gène *PHO 5* codant pour la phosphatase acide chez *Saccharomyces cerevisiae* . La région 5'-amont de *PHO 81* semble contenir trois UAS potentielles (US) susceptibles d'être reconnues par les protéines trans-activatrices (PHO 2 et PHO 4) du gène *PHO 5* . La délétion de ces US réalisée dans un travail précédent, n'affectait pas l'expression de *PHO 81* . Cependant, trois régions dans le vecteur de clonage ("UAS-like"), en amont de l'insert, présentent des homologies de séquences avec les US de *PHO 81* et pourraient se substituer à ces US. Nous avons ~~avons~~ éloigné les "UAS-like" en retournant l'insert et nous n'avons pas constaté de variation de l'expression de *PHO 81* . Les "UAS-like" n'ont donc pas le rôle fonctionnel qu'on leur supposait.
Ensuite, afin de tester le rôle régulateur potentiel des US de *PHO 81* , nous avons réalisé des fusions entre tout ou une partie de cette région amont avec un gène "reporter" (*lacZ*) dont l'expression permet dès lors de juger aisément du rôle régulateur spécifique de ces séquences US. Ces constructions nous ont permis d'une part, de situer une région de régulation par le Pi dans le promoteur proximal et d'autre part, d'attribuer un rôle répresseur (URS) à la région US. La protéine PHO 4 semble être un facteur trans-répresseur se liant à cette région URS.
Enfin, une expérience d'extension d'amorce a permis de localiser le site d'initiation de la transcription de *PHO 81* .

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Septembre 1991
Promoteurs : Profs. J. Vandenhaute et J. Delcour

FM B4/ 1991/9

GENE	LOCALISATION	FONCTION
PHO 2	bras gauche chr. IV	facteur positif activateur de *PHO 5*
PHO 3	centromère chr. II	phosphatase acide constitutive
PHO 4	bras droit chr. VI	facteur positif activateur de *PHO 5* et *PHO 8*
PHO 5	chr. II (à coté de *PHO 3*)	phosphtase acide répressible (fraction majeure)
PHO6		nécessaire à la synthèse de *PHO 3*
PHO 7		nécessaire à la synthèse de *PHO 3*
PHO 8	chr. IV	phosphatase alcaline répressible
PHO 9		protéinase A
PHO 10	télomère chr. VIII	phosphatase acide répressible (fraction mineure)
PHO 11	télomère chr. I	phosphatase acide répressible (fraction mineure)
PHO 80	chr. XV	facteur négatif
PHO 81	chr VII	médiateur
PHO 84	bras gauche chr. XIII	transporteur du Pi
PHO 85	bras gauche chr. XIV	protéine kinase (facteur négatif)

Figure I: Localisation chromosomique et fonction présumée des principaux gènes intervenants dans le métabolisme du phosphate.

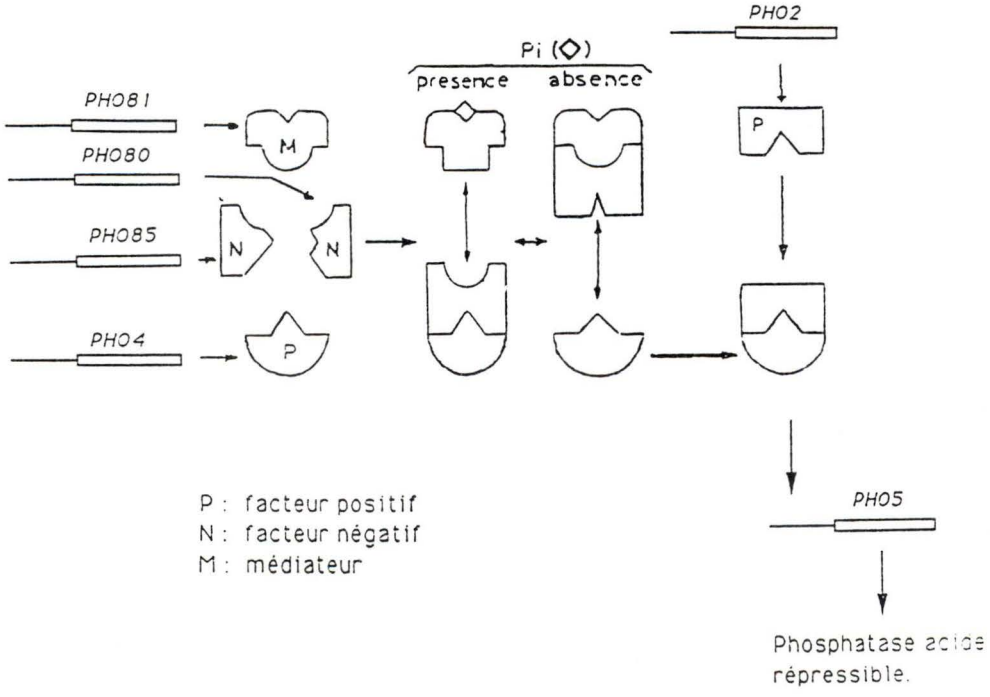


Figure II: Modèle du fonctionnement du circuit de régulation de la phosphatase acide répressible (Oshima, 1982).

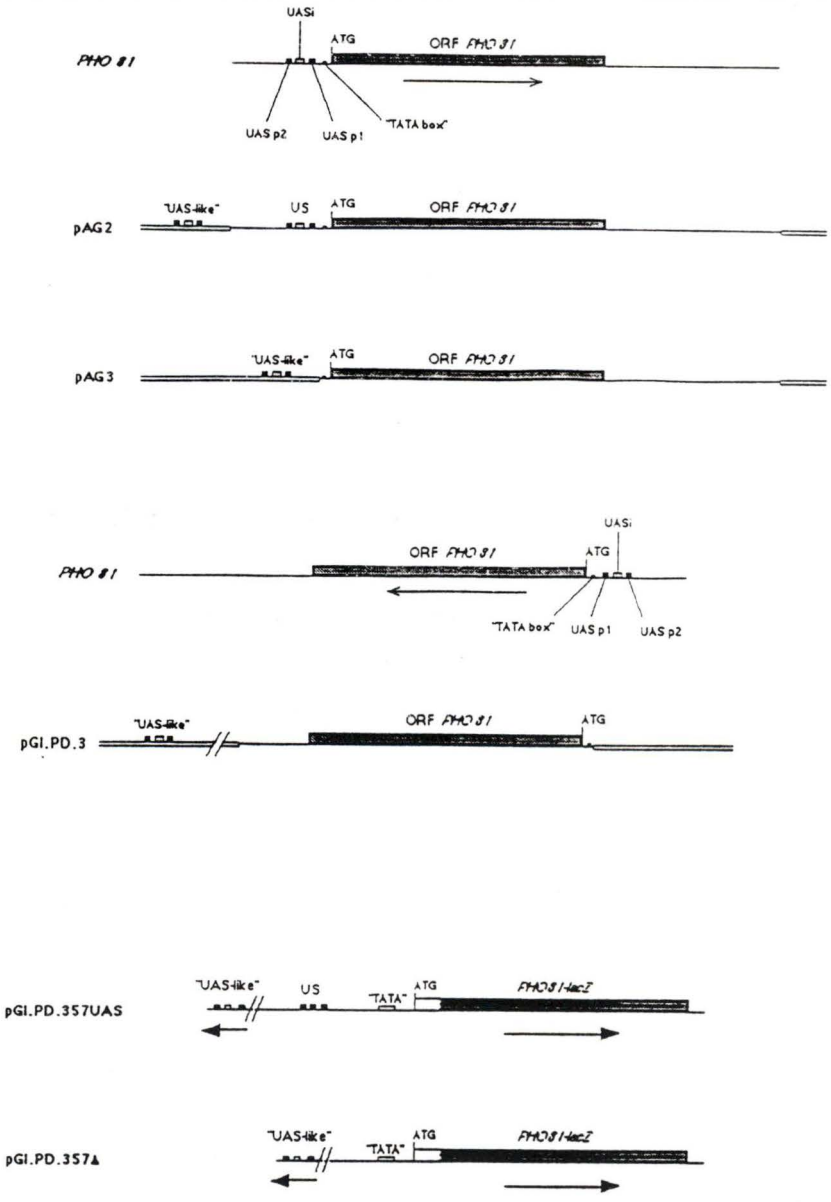


Figure III: Représentation shématique des principales constructions utilisées.

Cette année fut pour moi comme un voyage en haute mer... pendant trois ans ce périple a été préparé et puis une fois le départ pris, j'ai eu l'impression d'avoir oublié mes cartes.

Heureusement, plusieurs personnes m'ont aidé et même secouru dans les moments difficiles. Je voudrais ici les remercier toutes en espérant n'en oublier aucune.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur J. Vandenhaute et le Professeur J. Delcour qui ont affiné mon goût pour la génétique moléculaire et qui m'ont accueilli à leur bord.

Je tiens aussi à remercier Deborah Prozzi qui m'a appris les secrets de la navigation en génétique...

Toute ma reconnaissance à Madame D. Prozzi et à Messieurs E. Feytmans, A. Goffinet et F. Mainferme qui ont accepté de lire ce mémoire, mon carnet de bord en quelque sorte.

Je remercie aussi Véronique Gilliquet et surtout Gilbert Berben du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux qui plus d'une fois m'a lancé une bouée de sauvetage.

Je remercie tout spécialement Jean-Paul Cassart qui m'a inculqué les joies de la navigation parmi les récifs de ^{32}P...

Je remercie Véronique avec qui j'ai partagé la "table à cartes", Nathalie, Isabelle, Monique, Rose-Marie, Mme Libion, Fabienne, Jean-Marc, Pascal, Olivier et Hervé les compagnons de bord pour la bonne humeur et les petits coups de pouce...

Je remercie tout particulièrement Denis l'autre matelot du bateau qui a partagé les moments difficiles et de joie intense.

Je remercie aussi Olivier, Eric, Roger, Laurent et Didier mes compagnons de cabine.

Enfin, je remercie très sincèrement Valérie et mes parents sans qui cette extraordinaire aventure n'aurait jamais eu lieu...

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ATP	adénosine triphosphate
bp	paire de base ("base pair")
Chr	chromosome
DEAE	diéthyl aminoéthane
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
g	gramme
kb	kilobase
kd	kilodalton
l	litre
MCS	site multiple de clonage ("multiple cloning site")
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
ORF	phase ouverte de lecture("open reading frame")
pBS	pBluescript KS+
Pi	phosphate inorganique
PEG	polyéthylène glycol
pmole	picomole
PNK	polynucléotide kinase
rAPase	phosphatase acide répressible
rAlkPase	phosphatase alcaline répressible
RNase	ribonucléase
rpm	tour par minute
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	sodium dodécyl sulfate
site +1	site d'initiation de la transcription
U	unité
UAS	séquence activatrice amont
URS	séquence répressive amont
US	ultra-violet
UV	séquences 5'-amont de *PHO 81*
X	restreint par
µl	microlitre
µg	microgamme

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION 5

I.1) Généralités concernant la régulation de l'expression chez la levure 5

I.2) Régulation des gènes du métabolisme du phosphate inorganique chez la levure 5

I.2.1) Aperçu général du métabolisme du phosphate inorganique 5

I.2.2) Le système particulier de la phosphatase acide répressible (rAPase) de *Saccharomyces cerevisiae* 6

I.2.2.1) PHO 2 et PHO 4 activent la transcription de *PHO 5* 7

A) PHO 4 7

B) PHO 2 8

I.2.2.2) PHO 85 et PHO 80 répriment la transcription de *PHO 5* 10

A) PHO 85 10

B) PHO 80 10

I.2.2.3) PHO 81 11

A) Existence de régions UASp1, UASp2 et UASi homologues des UAS de PHO 5 dans le gène *PHO 81* 11

B) PHO 81 est le médiateur du système PHO 12

C) Considérations préliminaires 13

D) Résultats d'expériences préliminaires et hypothèse d'un effet du vecteur 14

I.3) Objectif du travail 16

II. MATERIEL ET METHODES 17

II.1) Souches et plasmides 17

II.1.1) Souche bactérienne 17

II.1.2) Souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* 18

II.1.3) Plasmides "navettes" Escherichia coli - Saccharomyces cerevisiae 19

II.1.3.1) Le plasmide YCp50 19

II.1.3.2) Le plasmide YEp357 19

II.2) Milieux de culture 20

II.2.1) Milieux de culture bactériens 20

II.2.2) Milieux de culture pour levure 21

II.3) La restriction d'ADN 24

II.4) Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose 25
II.5) Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose 27
II.5.1) Méthode des papiers 27
II.5.2) Méthode "Prep-A-Gene" 28
II.6) Ligation de molécules d'ADN linéaires ayant des bouts droits ou des bouts saillants 30
II.7) Purification et précipitation d'ADN 31
II.8) La transformation bactérienne 32
II.8.1) Préparation de cellules XL1blue compétentes 32
II.8.2) Transformation de cellules XL1 blue compétentes 33
II.9) Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* 34
II.10) Extraction rapide d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli* (miniprep) 35
II.11) Précipitation d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli* (maxiprep) 35
II.12) Quantification spectrophotométrique de l'ADN 38
II.13) Test de coloration d'activité de la phosphatase acide 38
II.14) Test coloré de détection de l'activité ß-galactosidase 39
II.15) Préparation d'ARN total 39
II.16) Purification d'ARN poly A⁺ à partir d'une solution d'ARN total 40
1) Hybridation 41
2) Lavage de la solution de "Streptavidin-Paramagnetic Particles" 41
3) Capture et lavage des mRNA-oligo(dT) 41
4) Elution de l'ARNm 42
II.17) Synthèse d'oligonucléotides 42
1) Structure des nucléosides 42
2) La synthèse 42
II.18) Réaction de "Primer Extension" 43
1) Marquage de la sonde 43
2) Vérification du marquage de la sonde 44
3) Réaction de primer extension 44
II.19) Réaction de séquençage 45
1) Réaction de séquençage 46
2) Electrophorèse en gel de polyacrylamide 47

III. RESULTATS 50

III.1) Description structurale de la région 5'-amont de régulation du gène *PHO 81* : Identification des sites caractéristiques de la région de régulation 50

III.1.1) Localisation du promoteur proximal et du site +1 initiateur de la transcription 50

III.1.2) Discussion 51

III.2) Caractérisation fonctionnelle de la région 5'-amont de régulation du gène *PHO 81* 52

III.2.1) Approche par complémentation 52

III.2.1.1) Construction du plasmide pGI.PD.3 52

A) Construction intermédiaire pGI.PD.1 53

A.1) Restrictions 53

A.2) Ligation 53

A.3) Transformation et analyse des clones recombinants 53

B) Construction de pGI.PD.3 54

B.1) Restrictions 50

B.2) Ligation du fragment de 3,3 kb et de la matrice pGI.PD.1 54

B.3) Transformation et analyse des clones recombinants 54

III.2.1.2) Test de complémentation 54

III.2.1.3) Commentaire 55

III.2.2) Etude de la régulation de PHO 81 via un gène reporter 56

III.2.2.1) Le gène de la ß-galactosidase 56

III.2.2.2) Construction de pGI.PD.357UAS 57

A) Restrictions 57

B) Ligation 57

C) Transformation et analyse des clones recombinants 57

III.2.2.3) Construction de pGI.PD.357Δ 58

A) Restrictions 58

B) Ligation 58

C) Transformation et analyse des clones recombinants 58

III.2.2.4) Souches de levure mutantes déficientes en activté rAPase 58

III.2.2.5) Mesure de l'expression du reporter ß-galactosidase par test coloré sur boîte de Pétri 59

III.2.2.6) Commentaire.....59
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE.....52
V. BIBLIOGRAPHIE.....68

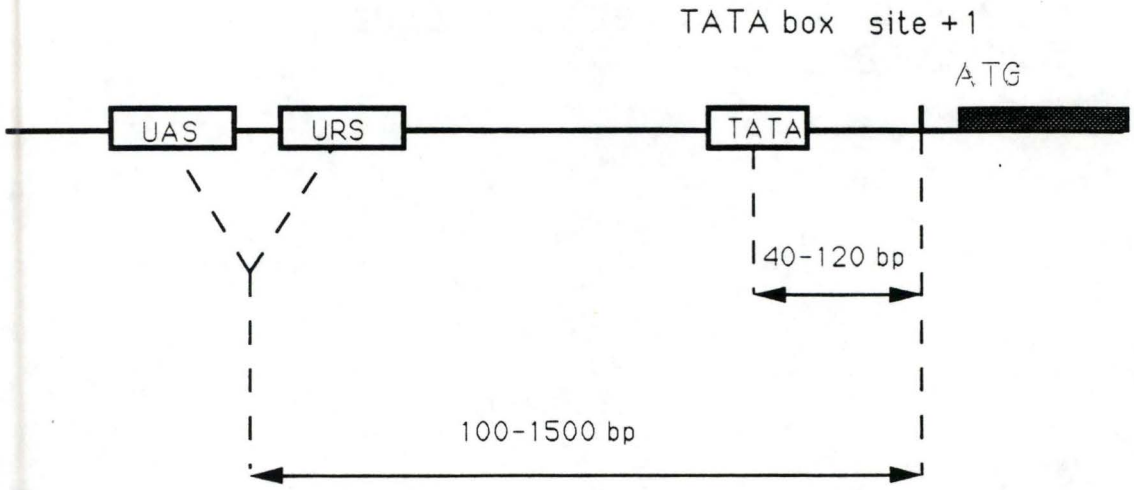


Figure I.1: Eléments de contrôle transcriptionnel dans un promoteur-type de gène de levure.

UAS = Upsteam Activating Sequence

URS = Upstream Repressing Sequence

= phase ouverte de lecture (ORF)

I. INTRODUCTION

I.1) Généralités concernant la régulation de l'expression chez la levure

La figure I.1 illustre les différentes régions 5'-amont susceptibles d'intervenir dans la régulation transcriptionnelle d'un gène de levure.

Le promoteur proximal contient une ou plusieurs "TATA box" et un ou plusieurs sites d'initiation de la transcription.

La "TATA box" joue un rôle important dans la sélection du site d'initiation de la transcription. En effet, sa délétion entraine que le site d'initiation devient variable. Le rôle de cette séquence pourraît donc être de positionner l'ARN polymérase de manière à ce qu'elle initie sur le site approprié (Lewin, 1987; Kingsman et Kingsman, 1988).

En amont du promoteur proximal, on trouve les éléments amonts (Upstream Elements = UE). Les UE interviennent dans la modulation du taux de transcription par liaison de facteurs trans-actifs (Guarente, 1984; Lewin, 1987; Kingsman et Kingsman, 1988; Struhl, 1989). Ces UE peuvent mener à une activation ou une répression du taux de transcription.

On distingue donc, les UAS (Upstream Activating Sequence) fixant des facteurs activateurs de la transcription et les URS (Upstream Repressing Sequence) fixant des facteurs répresseurs.

Ces UE peuvent exercer leur action même éloignées de 600 bp de la "TATA box" (Reznikoff, 1986) mais perdent de leur efficacité avec la distance (Brent et Ptashne, 1984). La présence de la "TATA box" est souvent indispensable pour l'action de ces UE (Struhl, 1989).

I.2) Régulation des gènes du métabolisme du phosphate inorganique chez la levure

I.2.1) Aperçu général du métabolisme du phosphate inorganique

La concentration intracellulaire en phosphate inorganique (Pi) est régulée par cinq enzymes-clés: des phosphatases acides, des phosphatases alcalines, des perméases, une polyphosphate kinase et une polyphosphatase (Bostian *et al.* , 1983).

La phosphatase acide (orthophosphoric monoester phosphohydrolase; EC 3.1.3.2) est secrétée dans l'espace périplasmique alors que la phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1) est

GENE	LOCALISATION	FONCTION
PHO 2	bras gauche chr. IV	facteur positif activateur de *PHO 5*
PHO 3	centromère chr. II	phosphatase acide constitutive
PHO 4	bras droit chr. VI	facteur positif activateur de *PHO 5* et *PHO 8*
PHO 5	chr. II (à coté de *PHO 3*)	phosphtase acide répressible (fraction majeure)
PHO6		nécessaire à la synthèse de *PHO 3*
PHO 7		nécessaire à la synthèse de *PHO 3*
PHO 8	chr. IV	phosphatase alcaline répressible
PHO 9		protéinase A
PHO 10	télomère chr. VIII	phosphatase acide répressible (fraction mineure)
PHO 11	télomère chr. I	phosphatase acide répressible (fraction mineure)
PHO 80	chr. XV	facteur négatif
PHO 81	chr VII	médiateur
PHO 84	bras gauche chr. XIII	transporteur du Pi
PHO 85	bras gauche chr. XIV	protéine kinase (facteur négatif)

Tableau I.2: Localisation chromosomique et fonction présumée des principaux gènes intervenants dans le métabolisme du phosphate.

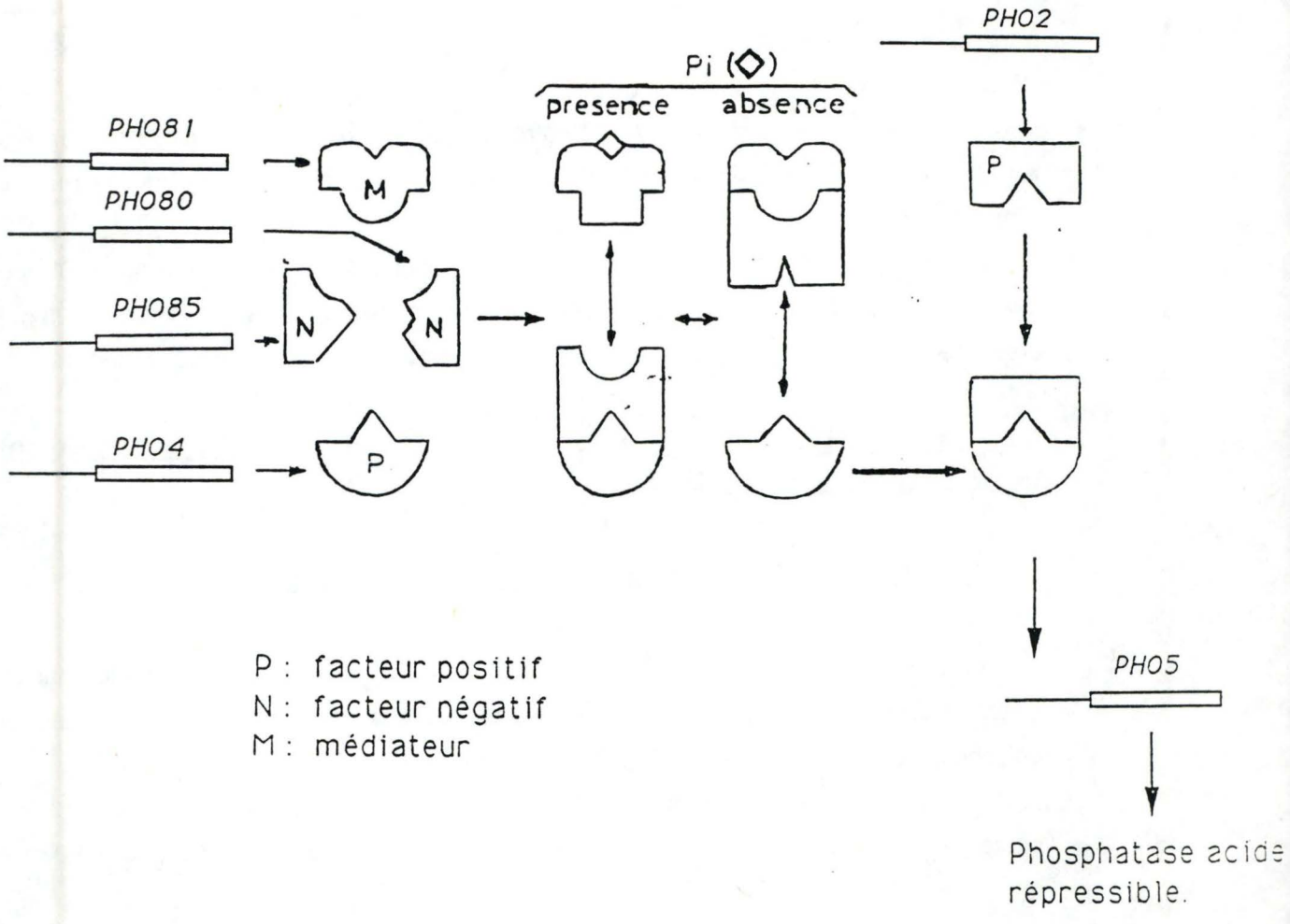


Figure I.3: Modèle du fonctionnement du circuit de régulation de la phosphatase acide répressible (Représentation shématique d'après Oshima (1982)).

intracellulaire (Oshima, 1982). Les phosphatases acides hydrolysent une large gamme de substrats monoesters phosphoriques et le Pi ainsi libéré peut traverser la membrane plasmique à l'aide de perméases (Berben, 1991). La levure est aussi capable de stocker le Pi sous forme d'un polymère accumulé dans les vacuoles (Wiame, 1947).

Les polyphosphatases ou les phosphatases alcalines peuvent hydrolyser les polyphosphates prélevant ainsi du phosphate dans les réserves vacuolaires (Bostian *et al.* , 1983). Les différentes enzymes du métabolisme du Pi maintiennent la teneur intracellulaire en Pi dans des limites bien définies (Bostian *et al.* , 1983). Dans ce cadre, la régulation transcriptionnelle occupe une place prépondérante (Bostian *et al.* , 1983; Berben, 1991).

Le gène *PHO 3* code pour la phosphatase acide constitutive qui nécessite deux autres gènes pour sa synthèse, *PHO 6* et *PHO 7* (Oshima, 1982). Le gène *PHO 5* code pour la phosphatase acide répressible (rAPase) et un système génétique d'au moins cinq autres gènes (*PHO 2* , *PHO 4* , *PHO 80* , *PHO 81* , *PHO 85*) participe à son expression en réponse à l'absence ou à la présence de Pi exogène (Oshima, 1982).

Les gènes *PHO 10* et *PHO 11* codent aussi pour la phosphatase acide répressible mais l'activité enzymatique principale est due au produit du locus *PHO 5* (Berben, 1991).

La phosphatase alcaline répressible est une protéine glycosylée (comme la phosphatase acide) issue de l'expression du gène *PHO 8* et doit être soumise à l'action de la protéinase A codée par *PHO 9* (= *PEP 4*) pour devenir l'enzyme pleinement fonctionnelle (Hayashi et Oshima, 1991; Berben, 1991).

Le tableau I.2 reprend les principaux gènes intervenant dans la régulation du phosphate avec leur localisation chromosomique et leur fonction présumée.

I.2.2) Le système particulier de la phosphatase acide répressible (rAPase) de *Saccharomyces cerevisiae*

Des études génétiques ont permis de montrer que l'expression du gène *PHO 5* en réponse au Pi est contrôlée par cinq gènes de régulation: *PHO 2* , *PHO 4* , *PHO 80* , *PHO 81* et *PHO 85* (Toh-e *et al.* , 1973). Oshima a proposé un modèle de ce mécanisme de régulation (Oshima, 1982) (figure I.3) en se basant sur des études de souches mutantes pour les différents gènes régulateurs.

Ce modèle suppose que le produit du gène *PHO 4* s'associe au produit du gène *PHO 2* formant ainsi un complexe protéique susceptible d'activer la transcription de *PHO 5* ; PHO 80 et PHO 85 s'associent formant ainsi un facteur négatif de l'expression de *PHO 5* .

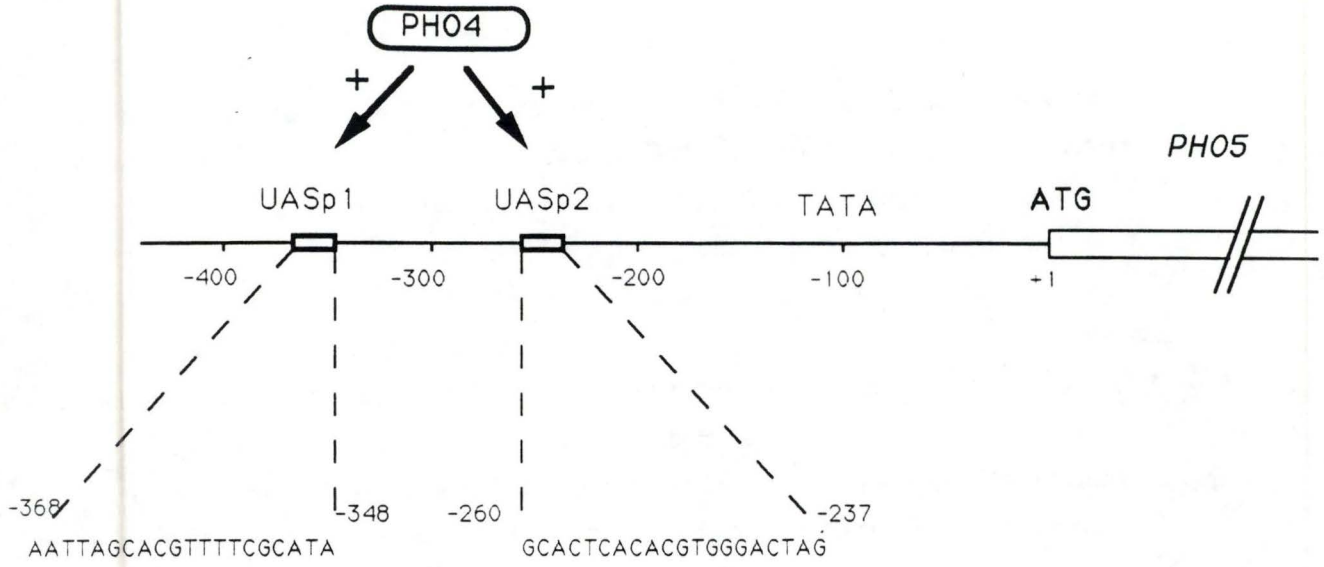


Figure I.4: La protéine PHO 4 est capable de se lier *in vitro* à deux séquences, l'UAS $_{p1}$ et l'UAS$_{p2}$, dans le promoteur de *PHO 5* et d'activer la transcription de celui-ci (Vogel *et al.*, 1989).

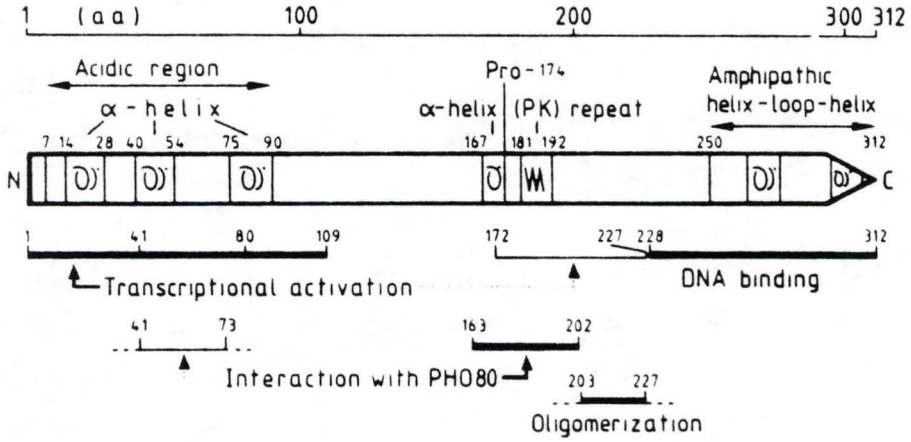


Figure I.5: Domaines fonctionnels potentiels de la protéine PHO 4 (d'après Ogawa et Oshima, 1990).

En conditions de répression (présence de Pi), le complexe PHO 80-PHO 85 se lie à la protéine PHO 4 et l'empêche de former le complexe activateur avec PHO 2.

En conditions de dérépression (absence de Pi), le produit de *PHO 81* , le médiateur, s'associe au complexe négatif PHO 80-PHO 85 supprimant ainsi l'affinité du complexe pour PHO 4. La protéine PHO 4 peut alors librement se lier à PHO 2 et ainsi activer la transcription de *PHO 5* .

Le médiateur est inhibé en présence de Pi et ne peut donc plus s'associer au complexe PHO 80-PHO 85.

Ce modèle de régulation suppose que tous les gènes de régulation sont exprimés de manière constitutive.

L'isolement et la caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans ce système sont nécessaires afin de vérifier la validité de ce modèle.

Nous présentons, ici, les gènes régulateurs séparément, les résultats de travaux réalisés sur chacun d'eux et leur implication dans le modèle de régulation de la rAPase.

I.2.2.1) PHO 2 et PHO 4 activent la transcription de *PHO 5*

A) PHO 4

La protéine PHO 4 joue sur *PHO 5* un rôle activateur.

Il a été montré que PHO 4 peut se lier *in vitro* au promoteur de *PHO 5* et ce même sans le concours de la protéine PHO 2 (Vogel *et al.* , 1989). Deux sites de liaison, UAS_{p1} et UAS_{p2}, ont été identifiés (figure I.4). De plus, *in vivo* , PHO 4 surproduit est capable de déréprimer l'expression des gènes de la rAPase en absence de PHO 2 (dans un mutant *pho 2* nul) (Berben, 1991). Donc, PHO 4 est capable de se lier au promoteur de *PHO 5* et de médier ainsi le signal d'activation de la transcription.

Signalons ici que seul PHO 4 active la transcription de *PHO 8* qui contient deux sites de liaison pour cette protéine dans son promoteur (Hayashi et Oshima, 1991).

L'analyse de la séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique (Legrain *et al.* , 1986; Koren *et al.* , 1986) a révélé au sein de PHO 4 non seulement la présence d'une région d'activation mais aussi celle d'un domaine de liaison à l'ADN (Ogawa et Oshima, 1990; Berben, 1991) (figure I.5).

La région d'activation a été mise en évidence par des expériences de fusion au domaine de liaison à l'ADN de LexA (Berben, 1990; Berben, 1991). Le domaine de liaison à l'ADN de PHO 4 a été découvert par homologie de séquences avec la séquence consensus du

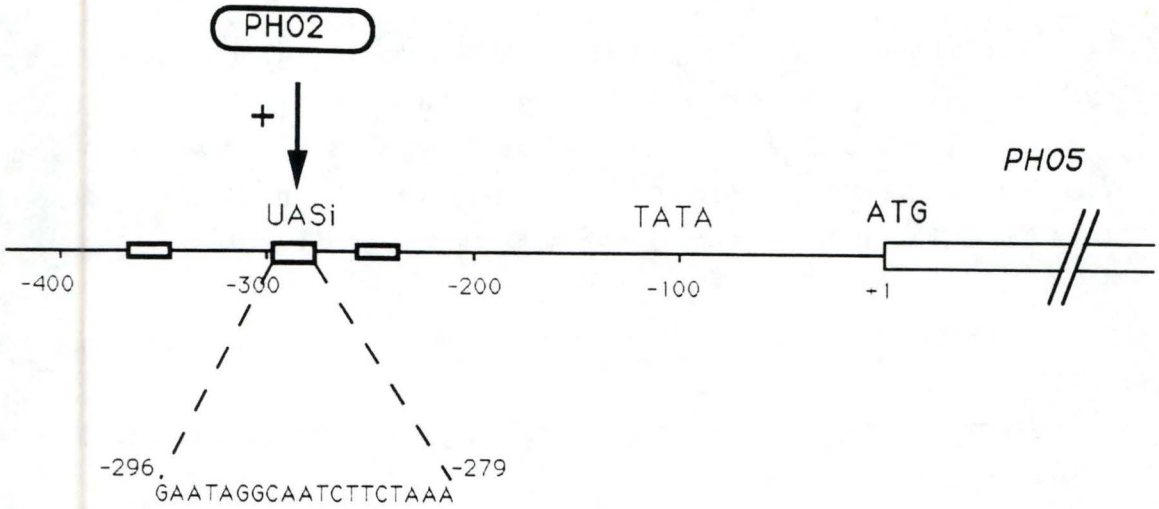


Figure I.6: La protéine PHO 2 est capable de se lier *in vitro* à une séquence, l'UASi, dans le promoteur de *PHO 5* et d'activer la transcription de celui-ci (Vogel *et al.*, 1989).

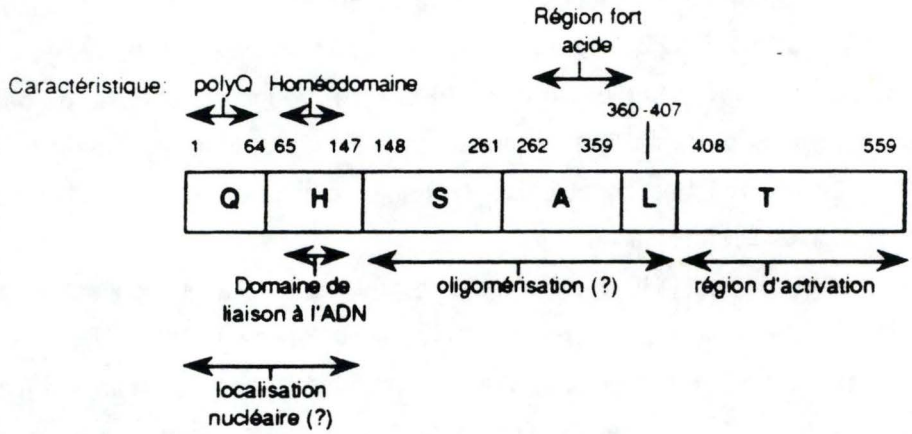


Figure I.7: Synthèse de l'analyse fonctionnelle de PHO2 (d'après Berben, 1991).

motif hélice-boucle-hélice (A-HLH: Alpha-Helix Loop Helix) (Murre *et al.* , 1989; Berben, 1991). Ce motif A-HLH caractérisé par deux hélices-α situées de part et d'autre d'une boucle et précédées par une région basique, a été trouvé sur la protéine c-myc ou les protéine E12 et E17 capables de se lier aux "enhancers" d'immunoglobulines.

Plusieurs caractéristiques de PHO 4 se retrouvent au sein des gènes régulateurs chez *Saccharomyces cerevisiae* (Legrain *et al.* , 1986; Koren *et al.* , 1986). Ainsi, PHO 4 est exprimé constamment à un niveau basal faible (indépendamment du Pi). La traduction se fait à un niveau faible en utilisant des codons de gènes faiblement exprimés. Enfin, la protéine PHO 4 est une petite protéine (310 acides aminés).

B) PHO 2

La protéine PHO 2 est aussi capable de se lier *in vitro* à un site spécifique du promoteur de *PHO 5* nommé UASi (Vogel *et al.* , 1989) (figure I.6). PHO 2 est aussi capable d'activer la transcription de *PHO 5* mais une surproduction de PHO 4 étant capable de remplacer sa fonction de régulation dans le système PHO (Berben *et al.* , 1990), la fonction de PHO 2 serait plutôt d'augmenter l'efficience de la transcription de *PHO 5* (Yoshida *et al.* , 1989; Berben, 1991).

Cependant, il ne faut pas oublier que le gène *PHO 2* est important pour le dévelopement de la levure *Saccharomyces cerevisiae* . En effet, la souche mutante *pho 2* est incapable de sporuler alors qu'une surproduction de la protéine PHO 2 est toxique pour la levure (Berben *et al.* , 1990).

Par mapping génétique et comparaison de séquences, il est apparu que le gène *PHO 2* est le même que le gène *BAS 2* requis dans le contrôle de l'expression de *HIS 4* codant pour une protéine intervenant dans la biosynthèse de l'histidine et de l'adénine (Arndt *et al.* , 1987). De même, PHO 2 (= BAS 2) contrôle l'expression de *TRP 4* intervenant dans la biosynthèse du tryptophane (Braus *et al.* , 1989). Le gène *PHO 2* est donc en fait un gène pléïotropique.

Très récemment, on signale l'isolement d'un mutant *pho 2* thermosensible (McCarthy *et al.* , 1991). Un seul changement d'acide aminé dans la protéine PHO 2 (asparagine 164 remplacée par une lysine) confère à la souche ce phénotype.

Comme pour le promoteur de *PHO 5* , il a été montré que PHO 2 se lie *in vitro* au promoteur de *HIS 4* et *TRP 4* . Cependant, les sites de liaison dans chacun des promoteurs se révèlent être différents bien qu'une séquence consensus ait tout de même été proposée $(TTAA)_n$ (Tice-Baldwin *et al.* , 1989). Dans chaque cas, la protéine PHO 2 exerce son action régulatrice avec une autre protéine régulatrice.

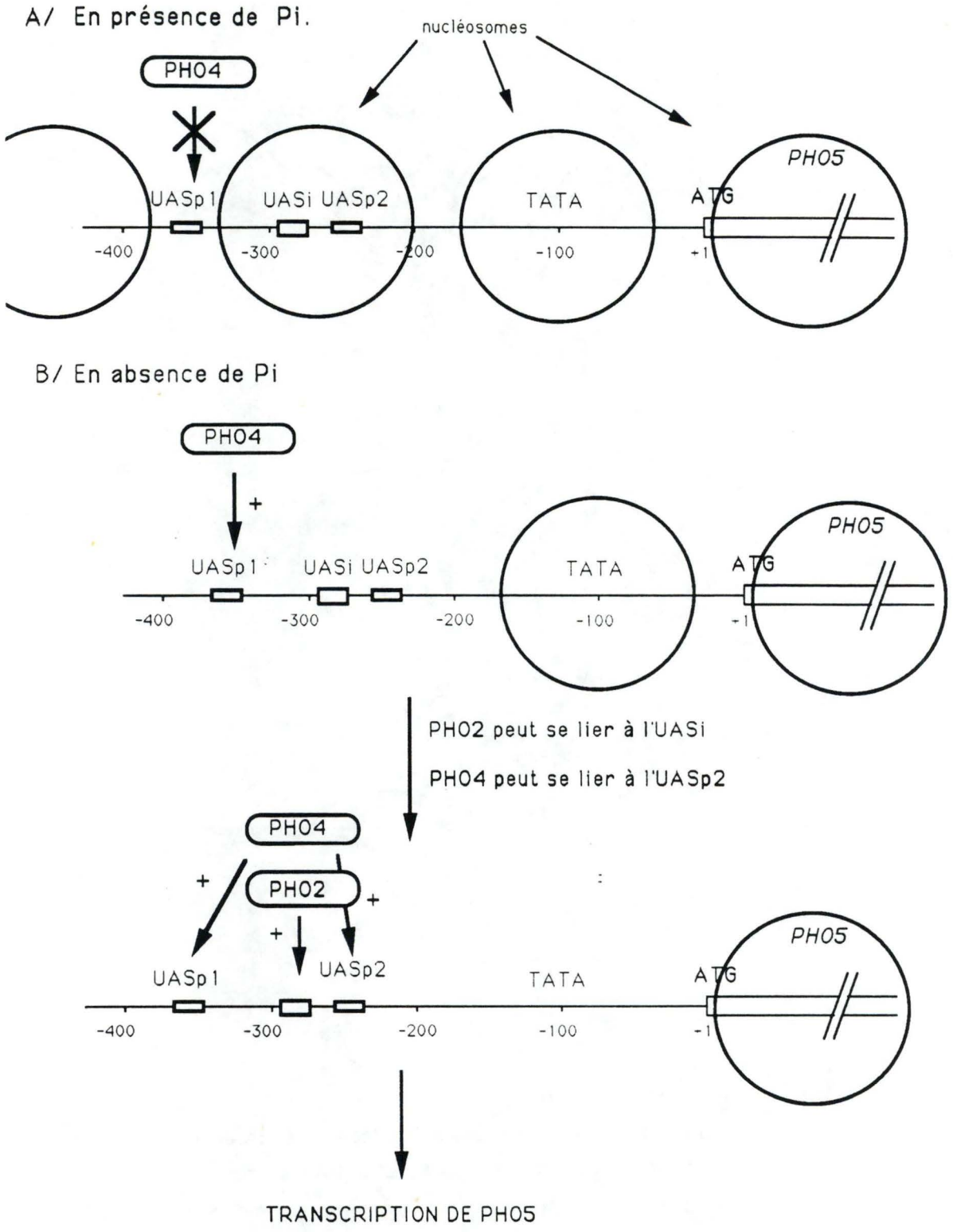


Figure I.8: Mécanisme d'activation de la transcription de *PHO 5* par les protéines PHO 2 et PHO 4 (Fasher *et al.* , 1990).

Selon les conditions (répression (A) ou activation (B)), la protéine PHO 4 se lie ou non à l'UAS $_{p1}$. Cette liaison produit une première modification de la structure des nucléosomes dans la région du promoteur qui entraine la suite du processus d'activation de celui-ci. Les cercles représentent des nucléosomes.

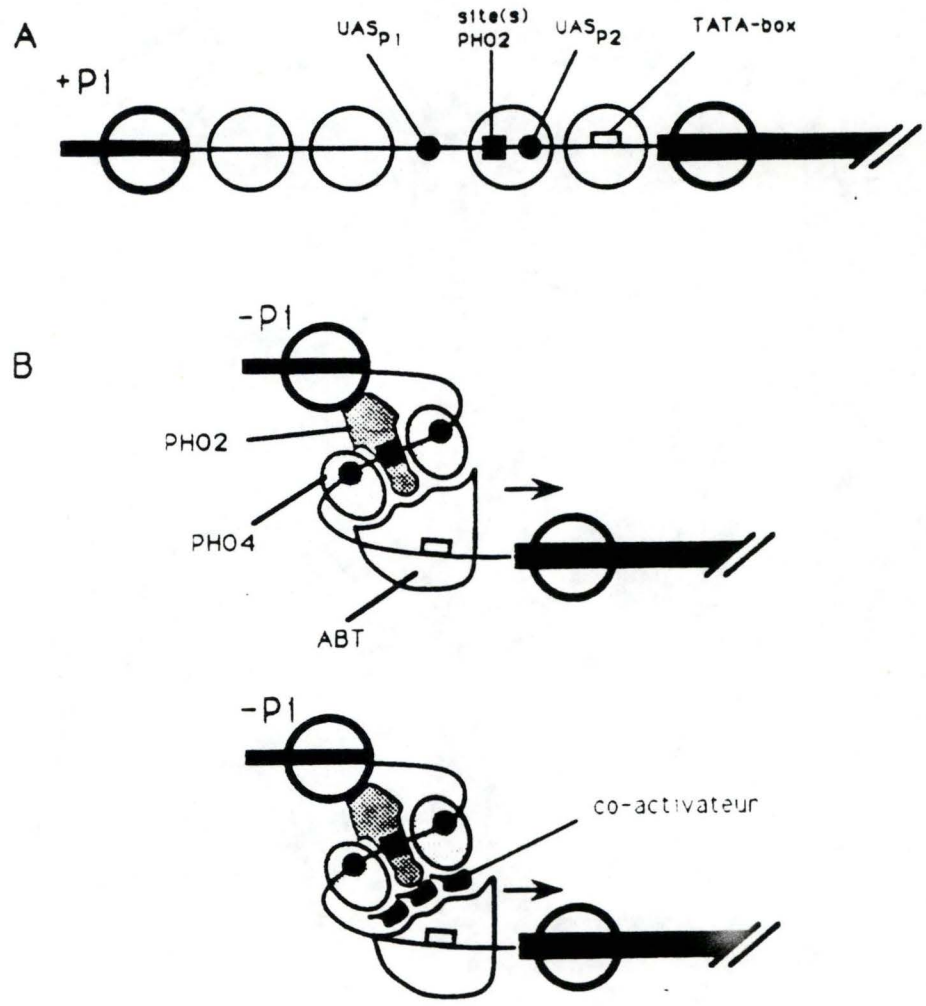


Figure I.9: Modèle de la régulation du gène *PHO 5* .

A) En condition de répression, les nucléosomes empêchent l'accès des facteurs de transcription au promoteur (sauf peut-être an niveau de l'UAS$_{p1}$).

B) En condition de dérépression, le promoteur de *PHO 5* libéré des nucléosomes fixe le complexe activateur qui forme alors le complexe d'initiation de la transcription avec l'ARN polymérase II. Deux situations sont envisagées selon que l'on fait intervenir ou non des co-activateurs.

ABT = Appareil Basal de Transcription

D'après G. Berben (1991).

L'analyse de la séquence protéique de PHO 2 (Senstag *et al.* , 1987; Berben *et al.* , 1988) révèle une région de polyglutamines contribuant au fonctionnement de PHO 2 qui se révèle cependant non-essentielle (Berben, 1991) (figure I.7). PHO 2 contient aussi un domaine de liaison à l'ADN recouvrant un homéodomaine (Bürling, 1988; Berben, 1991). Les homéodomaines ("homéobox") sont des séquences conservées dans la région codante des gènes qui contrôlent le développement chez *Drosophila melanogaster* . Il a été montré qu'une protéine de *Drosophila melanogaster* pourvue d'une séquence homéobox (la protéine En produit du gène *engrailed*) est capable de se lier *in vitro* au promoteur de *HIS 4* exactement au site de liaison de PHO 2 (Tice-Baldwin *et al.* , 1989).

En outre, une étude réalisée au moyen de fusions lexA a permis de délimiter une région d'activation dans la partie carboxy-terminale de PHO 2 (Berben, 1991).

L'expression de *PHO 2* diffère légèrement de celle de *PHO 4* en ce sens qu'elle se fait toujours à un niveau plus faible et qu'elle est réprimée par le Pi et probablement par le facteur PHO 2 lui même (Yoshida *et al.* , 1989).

La figure I.8 décrit un mécanisme d'activation de la transcription de *PHO 5* proposé par plusieurs auteurs (Almer *et al.* , 1986; Bergman *et al.* ,1986; Fasher *et al.* ,1990).

La structure du promoteur de *PHO 5* est totalement différente selon que la transcription est activée ou réprimée. En conditions de répression, la zone du promoteur de *PHO 5* est entierèment recouverte par des nucléosomes à l'exception d'une courte région englobant l'UAS_{p1}. Par contre, en cas de carence en phosphate (la transcription est induite), il y a un dégagement total du promoteur de *PHO 5* par le retrait des nucléosomes de part et d'autre de l'UAS_{p1}. Les autres sites de liaison deviennent ainsi accessibles et les facteurs activateurs peuvent s'y fixer.

Il a été montré que les protéines PHO 2 et PHO 4 sont nécessaires pour l'enlèvement des nucléosomes (Fasher *et al.*, 1990). On pense donc qu'en conditions d'activation, la protéine PHO 4 pourrait se lier à l'UAS_{p1} qui coïncide donc avec une région hypersensible à la DNase I dépourvue de nucléosomes. Cette liaison aurait en outre pour effet d'enlever les nucléosomes. L'UAS_{p2} reconnue par PHO 4 et l'UAS_i reconnue par PHO 2 sont intranucléosomiales et seraient dès lors accessibles une fois les nucléosomes enlevés. La transcription du gène *PHO 5* pourrait alors avoir lieu (Fasher *et al.* , 1990).

Ensuite, un repliement de l'ADN favoriserait l'interaction du complexe activateur PHO 4-PHO 2-PHO 4 avec l'appareil basal de transcription (Berben, 1991) (figure I.9).

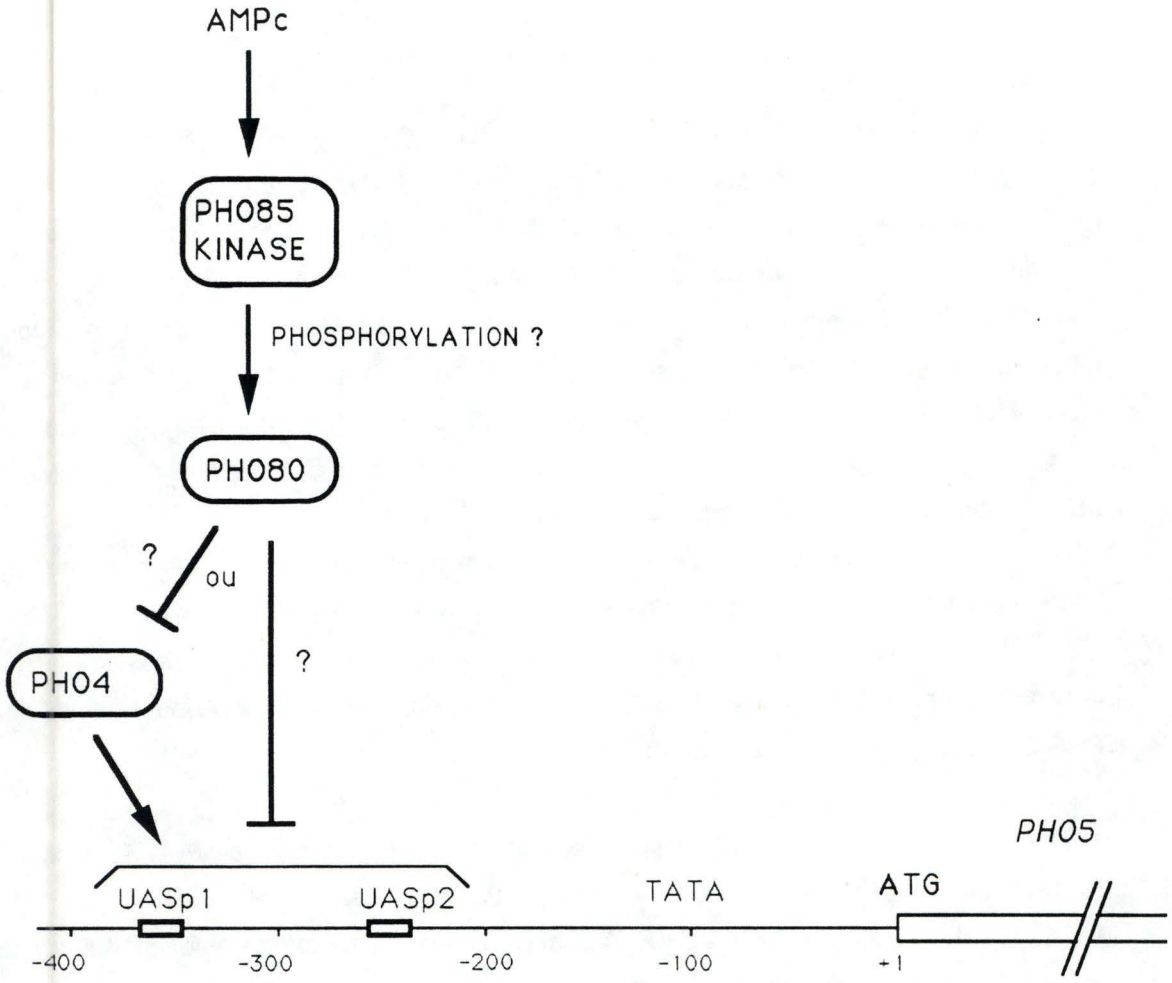


Figure I.10: Shéma illustrant le rôle probable des facteurs négatifs PHO 80 et PHO 85. PHO 80 exercerait sa répression en inactivant PHO 4 ou en se liant au promoteur de *PHO 5* entrant ainsi en compétition avec PHO 4.

I.2.2.2) PHO 85 et PHO 80 répriment la transcription de *PHO 5*

Les protéines PHO 80 et PHO 85 sont des facteurs négatifs qui répriment la transcription de *PHO 5* en conditions riches en Pi.

A) PHO 85

La comparaison de la séquence de PHO 85 avec d'autres protéines montre des homologies avec une protéine kinase CDC 28 (Toh-e *et al.* , 1988). CDC 28 est une protéine kinase AMP cyclique dépendante qui intervient dans le cycle de division cellulaire.

Dés lors, on pense que PHO 85 serait une protéine kinase AMPc-dépendante et que sa fonction serait de phosphoryler la protéine PHO 80. En effet, on trouve au sein de PHO 80 une séquence consensus de la phosphorylation par la protéine kinase C. De plus, cette séquence se trouve dans une région essentielle pour la protéine PHO 80 (Gilliquet *et al.* , 1990).

La protéine PHO 80 serait donc régulée par phosphorylation.

B) PHO 80

Le facteur PHO 80 (protéine de 293 aa) reste encore mal connu. Sa séquence nucléotidique à révélé que l'utilisation des codons ne correspond pas à ceux habituellement utilisés dans les gènes de structure à haut niveau d'expression.

Des analyses par délétions ont permis de localiser une région basique nécessaire pour la fonction répressive de PHO 80 (Madden *et al.* , 1990). Cette observation suggère deux hypothèses.

Les facteurs PHO 2 et PHO 4 contiennent des régions acides dont on sait qu'elles sont nécessaires au rôle activateur de ces facteurs (Ogawa et Oshima, 1990). L'interaction de la séquence basique de PHO 80 avec les régions acides de PHO 2 et de PHO 4 pourait être un moyen éventuel pour PHO 80 d'exercer son rôle répresseur.

D'autre part, on peut imaginer que la région basique de PHO 80 interagisse avec l'ADN du promoteur de *PHO 5* ce qui serait une autre possibilité pour PHO 80 de réprimer la transcription de *PHO 5* (Madden *et al.* , 1990) (figure I.10).

Bien que PHO 80 et PHO 85 soient exprimés de manière constitutive, PHO 85 est exprimé 6 à 10 fois plus que PHO 80. On pense aussi que des hautes concentrations en

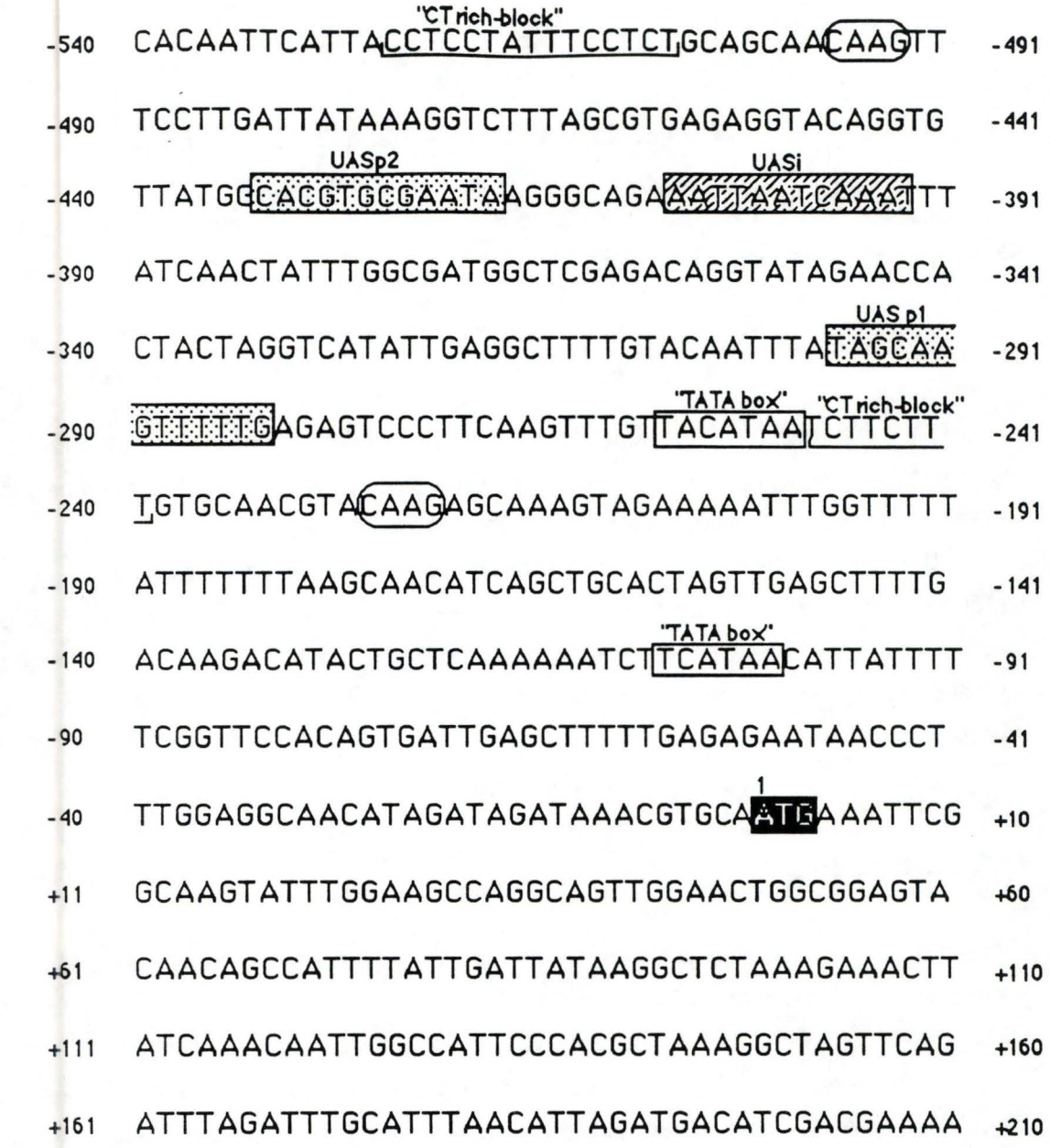


Figure I.11: Analyse de la région 5'-amont du gène *PHO 81* et comparaison des séquences UAS de *PHO 5* et *HIS 4* avec les US de *PHO 81* .

phosphate augmentent l'activité de PHO 85 et indirectement augmentent alors (suite à la phosphorylation par PHO 85) l'affinité de PHO 80 pour les facteurs positifs (Madden *et al.* , 1990).

Enfin, récemment, on a rapporté que PHO 80 et PHO 85 sont des gènes pléïotropiques. En effet, ils interviennent aussi comme facteurs répresseurs de la transcription du gène *MFα1* , le gène majeur codant pour le facteur α (Gilliquet *et al.* , 1991)

En résumé, la protéine PHO 85 serait une protéine kinase qui régulerait la fonction de PHO 80 par phosphorylation. La manière dont PHO 80 exerce son action sur *PHO 5* reste encore discutée.

I.2.2.3) PHO 81

Le facteur PHO 81 reste à ce jour le facteur le moins bien connu de la cascade PHO. Le gène *PHO 81* a été cloné (Vandenhaute *et al.* , 1988) et sa séquence a été établie dans notre laboratoire (Coche *et al.* , 1990). Ce gène comporte une ORF de 3531 bp.

A) Existence de régions UAS_{p1}, UAS_{p2} et UAS_i homologues des UAS de *PHO 5* dans le gène *PHO 81*

La figure I.11 montre une analyse de la région 5'-amont de *PHO 81* . Cette analyse été réalisée par alignement de séquences par A. Grifnée dans notre laboratoire.

On observe en particulier (Grifnée, 1990) la présence de régions présumées de liaison à l'ADN de la protéine PHO 4 (UAS_{p1} et UAS_{p2}).

L'UAS_{p2} située entre 344 et 332 bp en amont de l'ATG contient le motif CACGTG qui est le motif de base de liaison à l'ADN de la protéine PHO 4 (Hayashi et Oshima, 1991). En outre, le motif NNCANNTG (où N représente n'importe quel nucléotide) est suffisant pour la liaison d'une protéine comportant un motif "hélice-boucle-hélice" (Hayashi et Oshima, 1991). L'UAS_{p1} est située entre 244 et 236 bp en amont de l'ATG. Elle est similaire à l'UAS_{p1} de *PHO 5* avec un "mismatch" de 2 bp.

On observe aussi une région présumée de liaison à l'ADN de la protéine PHO 2. En effet, la région située entre 324 et 313 bp en amont de l'ATG présente une séquence similaire (mismatch de 3 bp) à celle de liaison à l'ADN de la protéine PHO 2 dans le promoteur de *HIS 4* (Tice - Baldwin *et al.* , 1989). Cette région est appelée UAS_i.

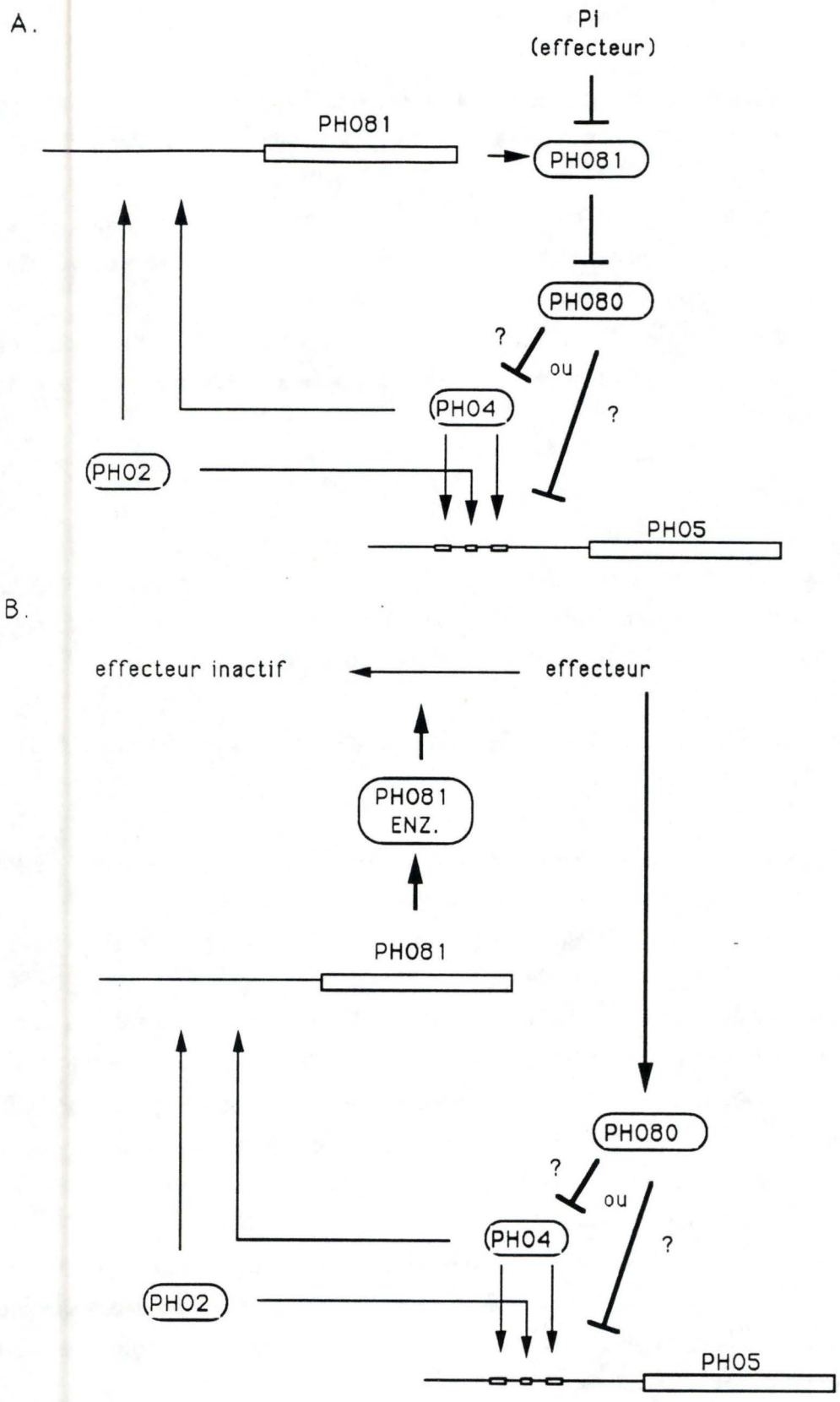


Figure I.12: Deux mécanismes hypothétiques de la fonction de PHO 81 (d'après Yoshida *et al.* ,1989).

A) PHO 81 a une fonction de protéine régulatrice qui inactive PHO 80 en absence de Pi.

B) PHO 81 a une fonction d'enzyme et métabolise l'effecteur en une forme inactive. En absence de Pi, PHO 80 n'est plus activé et n'exerce plus sa répression sur *PHO 5* .

Ces observations suggèrent que *PHO 81* au sommet de la cascade de régulation de *PHO 5* pourrait répondre au même type de régulation que le gène *PHO 5* . Les facteurs PHO 4 et PHO 2 activant *PHO 5* activeraient aussi l'expression de *PHO 81* .

Cependant, la simple homologie de certaines séquences amont de *PHO 81* avec des séquences activatrices ne nous permet pas de nous prononcer sur leur rôle. Aussi appelerons nous simplement dans la suite de ce travail ces séquences, séquences US (Upstream Sequences).

Deux "TATA box" ont été identifiées par homologie de séquence avec les consensus TATA (A/T)A(A/T) à 205 et à 86 bp de l'ATG.

On remarque enfin, la présence de "CT rich-blocks" suivis à une distance de 10 bp par la séquence CAAG qui se retrouve chez les gènes hautement exprimés, comme c'est le cas notamment pour le gène de la phosphoglycérate kinase (PGK) (Dobson *et al.* , 1982; Ogden *et al.* , 1986).

B) PHO 81 est le médiateur du système PHO

La protéine PHO 81 est le médiateur dans le modèle de régulation de la phosphatase acide mais contrairement à ce qui était proposé dans le modèle d'Oshima (1982), le gène *PHO 81* n'est pas exprimé de manière constitutive. En effet, les travaux de Yoshida *et al.* (1987) indiquent que la transcription de *PHO 81* est fortement réprimée en milieu riche en Pi alors qu'on observe un taux élevé d'ARN messagers en condition d'activation du système (faible concentration en Pi).

Par la suite, on a montré que la régulation de la transcription de *PHO 81* semble être la même que celle du gène *PHO 5* (Yoshida *et al.* , 1989). En effet, dans le mutant *pho 2* ou *pho 4* , on observe que la transcription du gène *PHO 81* n'est pas établie alors que PHO 81 est produite constitutivement dans le mutant *pho 80* ou *pho 85* . Donc, les protéines PHO 2 et PHO 4 seraient activatrices de la transcription de *PHO 81* alors que PHO 80 et PHO 85 joueraient un rôle négatif.

Deux mécanismes ont été proposés par Yoshida pour expliquer la fonction de PHO 81 (figure I.12).

Le premier mécanisme suppose une implication de la protéine PHO 81 dans la détection du signal Pi. En cas de carence en Pi ou de l'activateur, la protéine PHO 81 interagit avec PHO 80. Le facteur négatif PHO 80 inactivé de la sorte ne peut empêcher PHO 4 d'activer

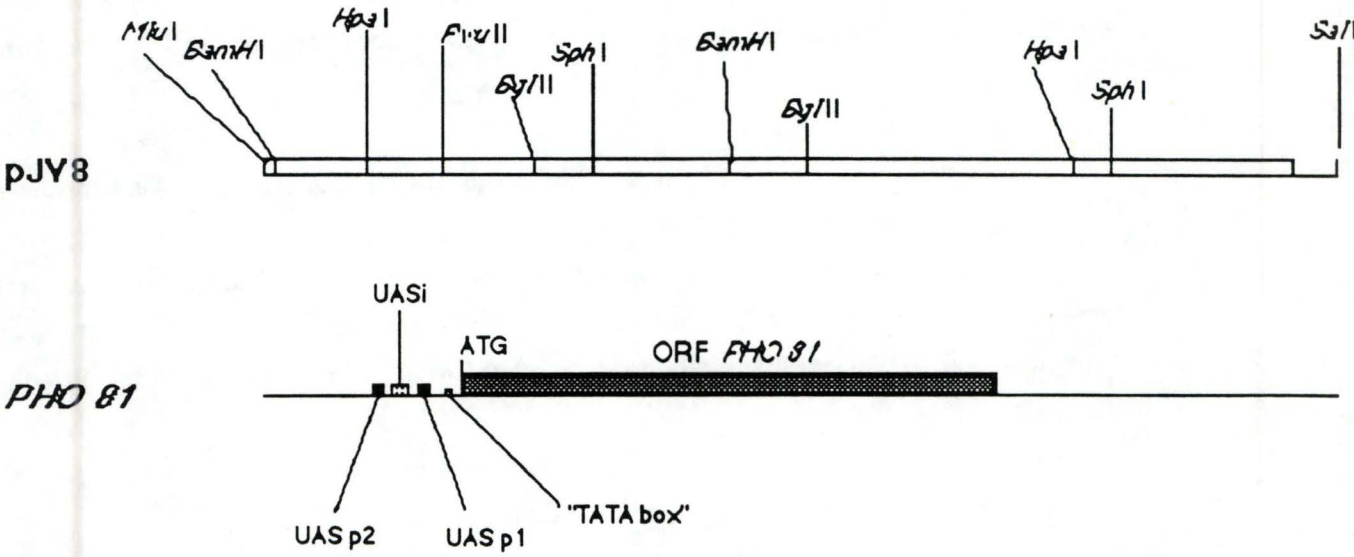


Figure I.13: Comparaison à l'échelle de l'insert *Mlu* I-*Sal* I du plasmide pJV8 avec l'ORF et les séquences amont de *PHO 81* .

la transcription de *PHO 5* . Par contre si la concentration en effecteur s'élève, PHO 81 est inactivé par cet effecteur et PHO 80 peut alors exercer sa répression.

Dans le second mécanisme, la protéine PHO 81 est considérée comme une enzyme métabolisant l'effecteur en une forme inactive. En condition de répression, PHO 80 est activée par l'effecteur et peut réprimer la transcription de *PHO 5* . A faible concentration en Pi, l'enzyme PHO 81 hautement exprimée métabolise l'effecteur et PHO 80 n'est plus activée. L'activation de *PHO 5* peut alors se faire librement.

Au vu de ces mécanismes hypothétiques et des résultats de Yoshida (1989), il apparaît que le système PHO serait un système régulateur en circuit fermé économique. En effet, le circuit est fermé car on observe une régulation en "retour" sur *PHO 81* par PHO 2 et PHO 4. Ce système est une économie pour la cellule car PHO 4 inhibé par PHO 80 n'activera pas la production de PHO 81 qui serait de toute façon inactivé par l'effecteur (premier mécanisme) ou qui métaboliserait l'effecteur supprimant ainsi la répression sur *PHO 5* (second mécanisme). Cependant, la fonction de PHO 81 demeure encore obscure.

Yoshida avance deux arguments en faveur du second mécanisme considérant PHO 81 comme une enzyme. En effet, au contraire des gènes régulateurs exprimés habituellement chez la levure à un faible niveau constitutif, *PHO 81* est exprimé à un niveau élevé et de façon régulée.

C) Considérations préliminaires

Le test de complémentation permet de vérifier l'intégrité fonctionnelle d'un gène porté par un vecteur transformé dans un mutant pour la fonction dudit gène. Ainsi, le rôle éventuel de certaines séquences amont du gène *PHO 81* pourra être éprouvé par l'examen de l'effet des délétions de ces séquences sur la complémentation. Par exemple, la non complémentation d'une souche mutante par un gène délété de certaines séquences montre le caractère essentiel de ces séquences.

A cette fin, nous disposons d'un mutant *pho 81* (la souche Vd33d, décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes); cette mutation entraîne l'absence d'activité rAPase détectable même en conditions d'activation c-à-d en milieu pauvre en phosphate inorganique (Pi). Si cette souche est transformée avec un plasmide contenant le gène *PHO 81* entier c'est à dire muni de l'ensemble des séquences amont indispensables à son expression, nous observons la complémentation de la mutation et donc une réponse positive au test de détection d'activité rAPase.

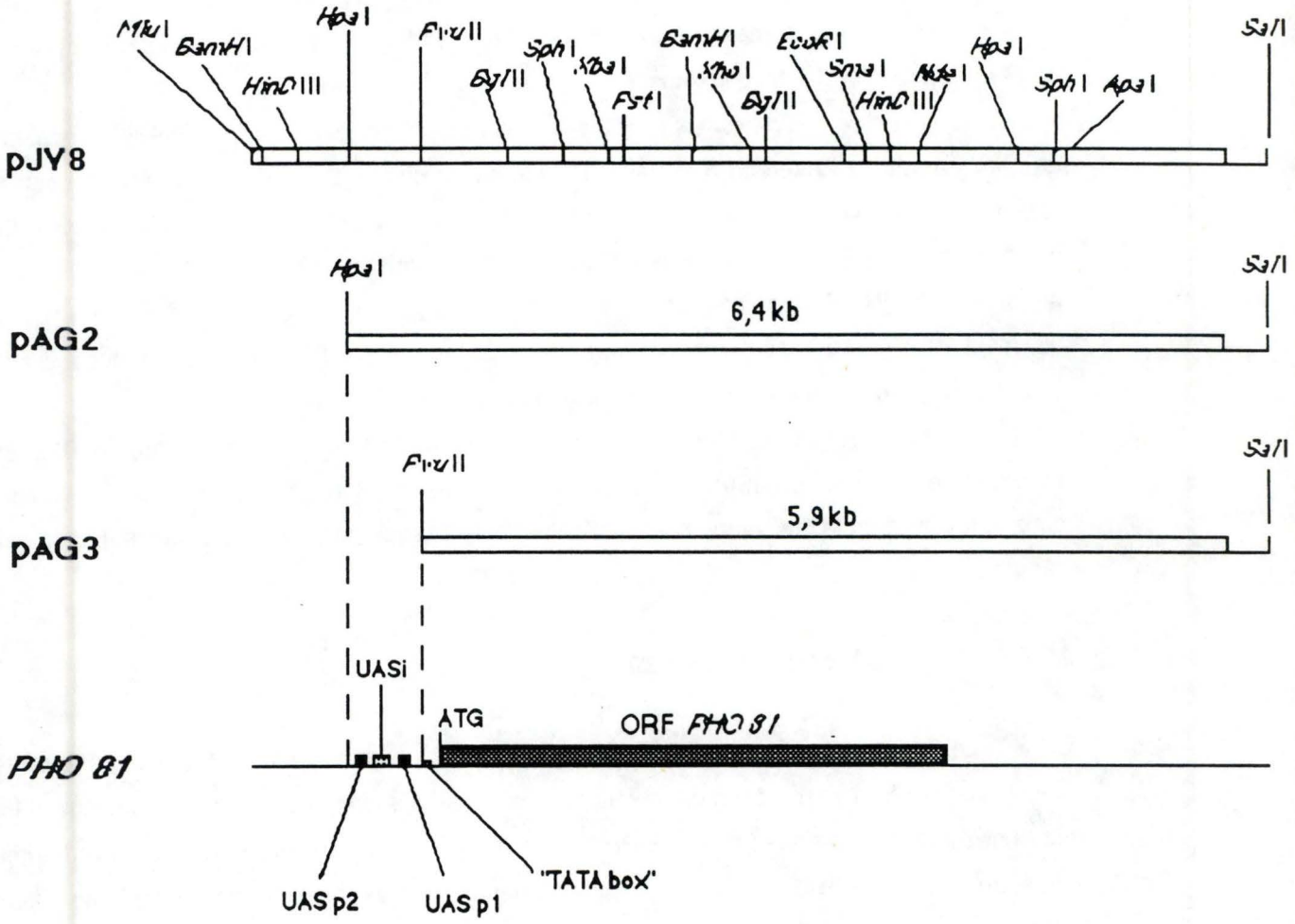


Figure I.14: Comparaison à l'échelle des inserts de pJV8, pAG2, pAG3 avec l'ORF et les séquences amont de *PHO 81* .

Des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont montré que le plasmide pJV8 est capable de complémenter la mutation *pho 81* (Vandenhaute *et al.* , 1988). Ce plasmide a été obtenu par sous-clonage à partir d'un clone complémentant Vd33d (pJV3), isolé d'une banque de levure sauvage établie dans le vecteur YCp50 (M. D. Rose *et al.* , 1987)). Il comporte un fragment génomique de levure *Mlu* I - *Sal* I de 7 kb contenant donc le gène *PHO 81* entier (figure I.13).

Les données de séquençage (Coche *et al.* , 1990) ont montré que le fragment *Mlu* I - *Sal* I contient, en amont de l'ATG initiateur du gène, une zone dont l'étendue (1400 bp) assure, en fonction de ce qui est connu chez la levure, qu'elle contient bien l'ensemble des signaux présumés de régulation de *PHO 81* . L'ablation de ces signaux et l'épreuve par test de complémentation permet d'en démontrer le rôle.

Il convient cependant de remarquer que tout résultat de complémentation doit être considéré avec précaution. En particulier, la complémentation d'une fonction déficiente d'un mutant par transformation ne suffit pas pour identifier le gène cloné au gène mutant. En effet, transférer un gène porté par un vecteur dans un mutant, réalise une situation très différente de la situation native d'un gène sauvage à son locus chromosomique. Un effet du vecteur peut résulter, d'une part, d'un phénomène de dosage génique en rapport avec le nombre de copies du plasmide dans l'hôte (effet exploité dans la recherche de suppresseurs) ou, d'autre part, d'éléments de séquence (signaux éventuels UAS, URS...) et/ou de structure intrinsèques au plasmide (superenroulements...) conduisant dès lors, dans l'un comme l'autre cas, à un biais dans l'interprétation des résultats.

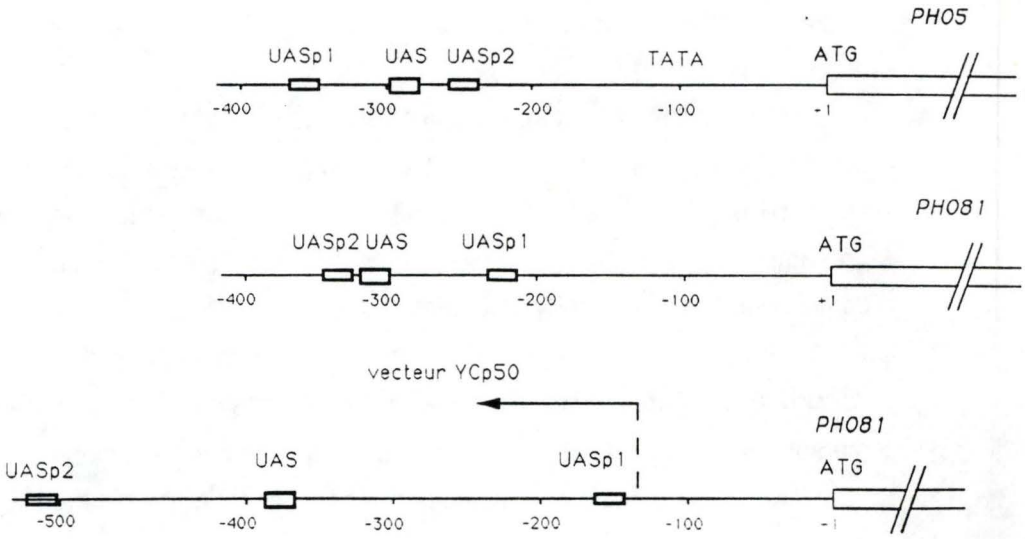
Dans le cas présent, nous utilisons le vecteur centomérique YCp50 présent en un ou deux exemplaires par cellule ce qui exclut l'éventualité d'un effet de dosage génique.

D) Résultats d'expériences préliminaires et hypothèse d'un effet du vecteur

La figure I.14 résume les constructions pAG2 et pAG3 réalisées antérieurement au laboratoire par A. Grifnée dans le vecteur YCp50 (Grifnée, 1990). pAG2 contient un insert *Hpa* I - *Sal* I de 6,4 kb; pAG3 contient un insert *Pvu* II - *Sal* I de 5,9 kb. Ces deux inserts proviennent de pJV8. pAG2 contient donc le gène *PHO 81* entier comportant les US présumées alors que pAG3 contient le gène *PHO 81* entier délété de ses US.

Les constructions pAG2 et pAG3 transformées dans la souche Vd33d complémentaient la mutation *pho 81* (Grifnée, 1990).

On serait donc en droit de conclure que les US n'ont pas de rôle fonctionnel (leur ablation ne semble pas affecter l'expression de *PHO 81* à fable concentration en Pi).



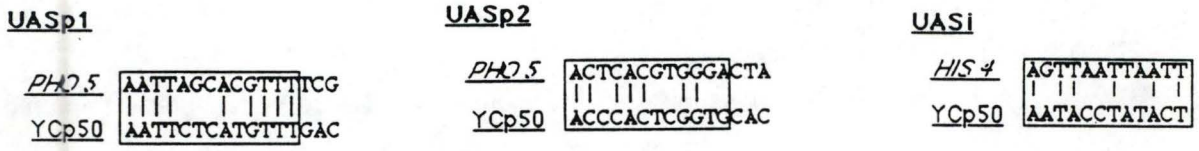


Figure I.15: Comparaison et localisation des régions UAS de *PHO 5* , *PHO 81* et YCp50.

Cependant, une hypothèse alternative avait déjà été proposée par A. Grifnée qui avait remarqué l'existence de certaines boîtes UAS dans le vecteur YCp50 (nous désignerons ces boîtes "UAS-like" dans la suite du texte) (Grifnée, 1990). Ces boîtes "UAS-like" sont en effet similaires aux trois UAS présumées (US) de *PHO 81* (figure I.15). Selon cette hypothèse, ces "UAS-like" activeraient la transcription de *PHO 81* en l'absence des boîtes authentiques (construction pAG3).

En conclusion, PHO 81 semble être le médiateur au sommet d'un système régulateur en circuit fermé, le système de la rAPase. Le gène *PHO 81* qui comporte au sein de son promoteur une région US similaire aux trois UAS de *PHO 5*, pourrait répondre au même type de régulation que le gène *PHO 5* qui est situé en bas de cette cascade.

I.3) Objectif du travail

Ce travail s'inscrit dans le cadre général de l'étude de la cascade de régulation de la phosphatase acide. Plus précisément, nous nous intéressons aux mécanismes de contrôle transcriptionnel du gène *PHO 81* situé au sommet de ce système régulateur.

La séquence du gène *PHO 81* a été établie dans notre laboratoire (Coche *et al.*, 1990). Elle révéle une phase ouverte de lecture (ORF) de 3531 bp et une région 5'-amont de régulation comportant des séquences homologues aux séquences UAS du gène *PHO 5* codant pour la phosphatase acide répressible (rAPase) (Grifnée, 1990).

Dans la perspective de l'étude de ces séquences amont et afin de les caractériser plus précisément, nous préciserons dans un premier temps le site d'initiation de la transcription du gène dans la région 5' par réaction d'extension d'amorce.

Dans un second temps, nous éprouverons l'hypothèse de l'influence d'un effet de certaines séquences du vecteur sur le gène *PHO 81* en éloignant et en retournant ces séquences par rapport à *PHO 81*.

Enfin, en vue d'étudier la problématique de la régulation de *PHO 81* (Yoshida *et al.*, 1987; Yoshida *et al.*, 1989) nous construirons un gène rapporteur comprenant les séquences 5'-amont et l'ATG de *PHO 81* fusionés au gène *lacZ* dont l'expression est aisément détectable.

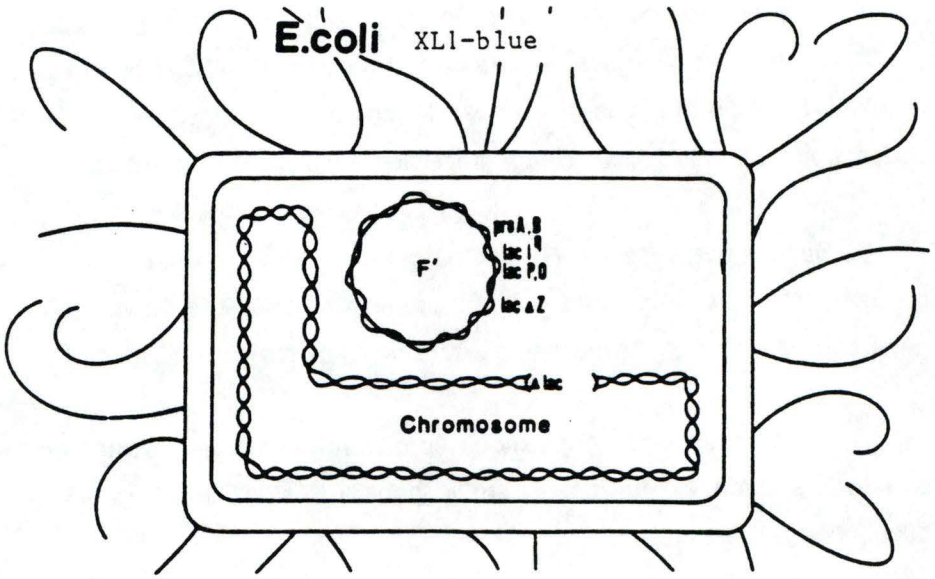


Figure II.1: Marqueurs présents dans une bactérie de la souche XL1blue

II. MATERIEL ET METHODES

II.1) Souches et plasmides

II.1.1) Souche bactérienne

Nous avons utilisé la souche *Escherichia coli* XL1blue (Bullock, 1987) (figure II.1) commercialisée par la firme Stratagene; elle contient l'épisome F' . Son génotype est le suivant :

rec A1
end A1
gyr A96
thi - 1
hsd R17 (rk^-,mk^+)
sup E44
rel A1
λ^-
(lac^-)
[F', *pro* AB, $lacI^q$ ZΔM15, Tn10 (tet^R)]

Quelques particularités de ce génotype sont intéressantes:

- *rec* A1: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène.

- *end* A1: améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléases.

La souche XL1blue délétée au niveau de l'opéron lactose, est incapable de métaboliser le lactose (lac^-).

L'épisome F' codant pour des pili sexuels présents en surface de la bactérie porte les caractères suivants:

- $lacI^q$ ZΔM15: permet la sélection des colonies contenant un plasmide recombinant par un test coloré bleu-blanc:

- lacI^q: mutation augmentant d'environ dix fois la force du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.

- ZΔM15: gène de la β-galactosidase délété dans sa partie N-terminale et produisant une protéine inactive. Ce fragment du gène *lac Z* donne, par complémentation intragénique avec un plasmide portant un autre fragment du gène *lac Z* (*lac Z'*), une coloration bleue à une colonie en présence du chromogène X-gal. Si au niveau du plasmide, le fragment *lac Z'* est disrupté (plasmide recombinant), la colonie sera blanche en présence de X-gal.

II.1.2) Souches de levure *Saccharomyces cerevisiae*

- FL100 est une souche de type sauvage. Elle ne porte aucune mutation. Son type sexuel est a (*MATa*). Elle est utilisée comme contrôle positif lors des tests colorés de l'activité de la phosphatase acide.

- Vd33d (Vandenhaute *et al.* , 1988) porte une mutation au locus *PHO 81* ainsi qu'au locus *URA 3* . Cette souche est donc déficiente en activité phosphatase acide et est incapable de synthétiser l'uracile.

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

- YH40-P2 (G. Berben, B. Horion, Gembloux) dérive de la souche YH40. Le gène *PHO 2* a été disrupté par le gène *LEU 2* . Cette souche est donc *PHO 2* mutante et est capable de synthétiser la leucine.

- VG151 (V. Gilliquet, Gembloux) dérive de la souche YH40. Le gène *PHO 4* a été disrupté par le gène *LEU 2* . Cette souche est donc *PHO 4* mutante et est capable de synthétiser la leucine.

Les souches YH40, YH40-P2 et VG 151 nous ont été aimablement fournies par le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

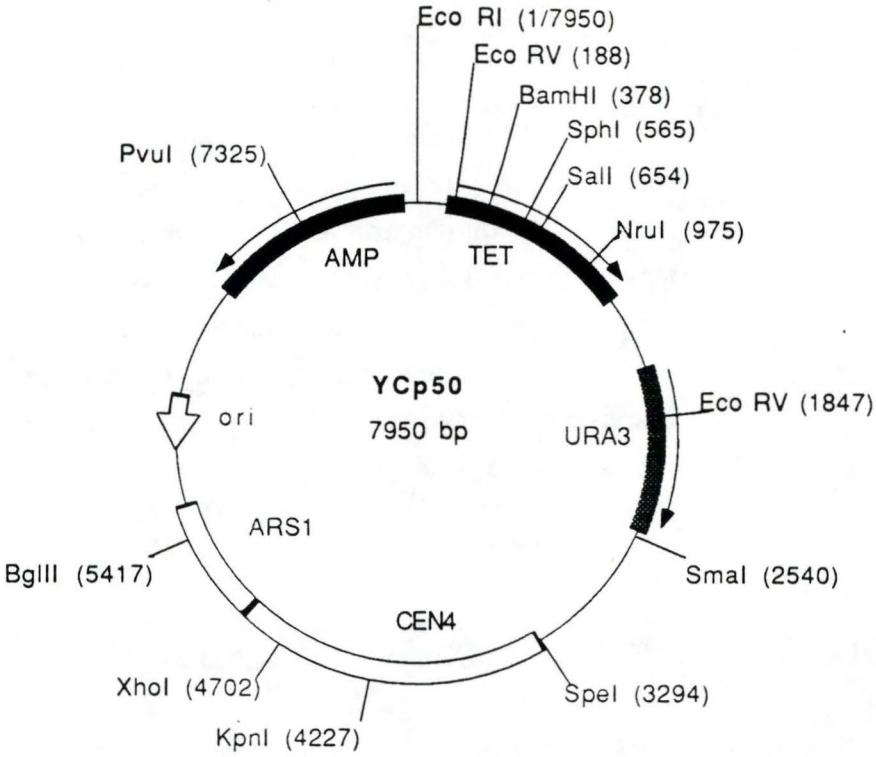


Figure II.2: Le plasmide YCp50.

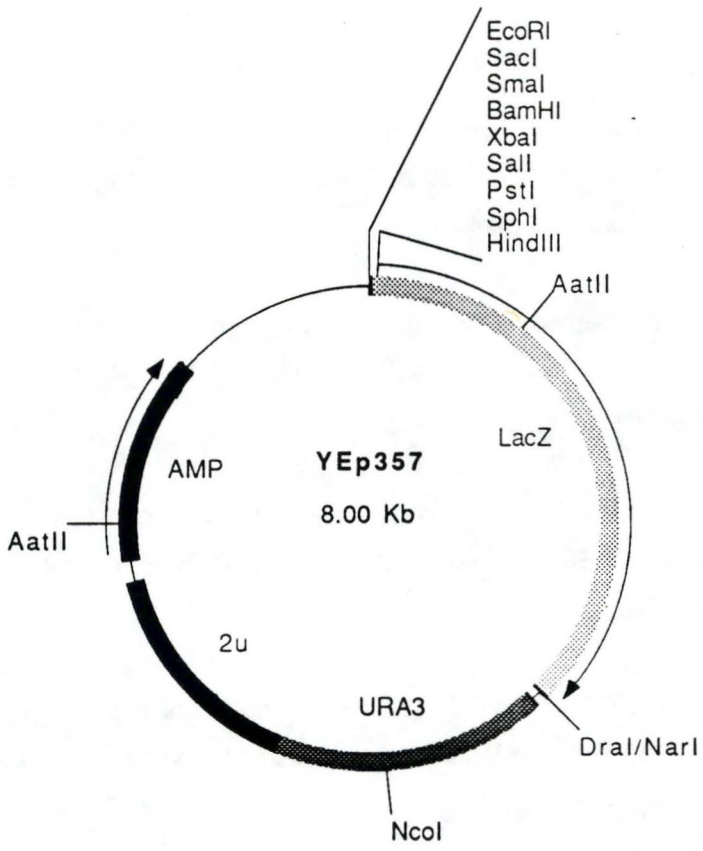


Figure II.3: Le plasmide YEp357.

Toutes ces souches sont cultivées à 30°C.

II.1.3) Plasmides "navettes" *Escherichia coli - Saccharomyces cerevisiae*

II.1.3.1) Le plasmide YCp50 (M. Johnston et R. W. Davis, 1987)

Le plasmide YCp50 (figure II.2) présente les caractéristiques suivantes:

- Il possède une origine de réplication pour *Escherichia coli* (ORI) permettant le maintient de ce plasmide dans *Escherichia coli* .

- Il possède les gènes de résistance aux antibiotiques tétracycline et ampicilline, ce qui permet une sélection dans *Escherichia coli* .

- Il contient une séquence ARS (Autonomous Replicating Sequence) du chromosome I de *Saccharomyces 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. Le nombre de copies de YCp50 par cellule de levure est donc faible (1 ou 2) et leur stabilité mitotique est élevée. (Yeast Centromere Plasmid)

- Il possède un marqueur de sélection *URA3* permettant la sélection dans des souches de levure mutantes.

- Il porte un MCS (Multiple Cloning Site) comprenant des sites de restriction uniques pour le clonage.

II.1.3.2) Le plasmide YEp357 (Myers *et al.*, 1986)

Ce vecteur (figure II.3) fait partie d'une famille de plasmides dérivant du vecteur YEp353 et présente les caractéristiques suivantes:

- Il possède une origine de réplication pour *Escherichia coli* (ORI) permettant le maintien de ce plasmide dans *Escherichia coli* .

- Il porte un gène de résistance à l'ampicilline ce qui permet la sélection dans *Escherichia coli* .

- Il possède le fragment 2µ provenant du phage 2µ. Il fait fonction d'origine de réplication multicopie dans la levure.

- Il possède un marqueur de sélection *URA3* permettant la sélection dans des souches de levure mutantes.

- Il possède le gène *lac Z* délété de son promoteur. En amont de la séquence *lac Z* se trouve un site multiple de clonage (MCS). Cette disposition particulière du MCS autorise la réalisation de fusions en phase. Il est donc possible d'insérer dans ce MCS un promoteur et le début de la séquence codante d'un gène. Si la phase de lecture est conservée, l'expression du gène *lac Z* reflétera ainsi l'expression du gène qui est naturellement sous la dépendance du promoteur inséré.

II.2) Milieux de culture

II.2.1) Milieux de culture bactériens

Milieu LB liquide

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

Porter à volume avec de l'eau distillée.
Autoclavage (20',120°C).

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

Milieu LB solide

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

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

Milieu LB sélectif

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

II.2.2) Milieux de culture pour levure

Milieu riche YPD

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

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

Porter à volume avec de l'eau distillée

Agar (Oxoïd)	16 g/l	si milieu solide

Autoclavage

Milieu minimum (MAM)

Yeast Nitrogen Base w/o ammonium sulfate and amino acids (Difco)	1,75 g/l	
$(NH_4)_2SO_4$	5 g/l	
Glucose (ou autre sucre)	20 g/l	
Agar (Oxoïd)	16 g/l	si milieu solide

Adénine	10,8 mg
Uracile	9 mg
L-Arginine HCl	12,6 mg
L-acide Aspartique	39,9 mg
L-Histidine HCl	8,4 mg
L-Isoleucine	7,9 mg
L-Leucine	15,8 mg
L-Lysine HCl	14,6 mg
L-Méthionine	9 mg
L-ß-phénylalanine	19,8 mg
L-Tyrosine	7,2 mg
L-Valine	25,8 mg
L-Tryptophane	12,2 mg
L-Thréonine	31 mg

Tableau II.1: Composition des milieux synthétiques pour 400 ml de milieu.

Porter à volume avec de l'eau distillée
Autoclavage

Milieux synthétiques

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

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

Milieu 165-30

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

$MgSO_4 7H_2O$	0,7 g
$CaCl_2 2H_2O$	0,4 g
NaCl	0,5 g
K_2SO_4	1,0 g
Ac. citrique ($C_6H_8O_7.H_2O$)	10,5 g
KOH	9,03 g

Milieu pauvre en Pi: 30 mg de KH_2PO_4 et 1,5 g de KCl
Milieu riche en Pi: 1,5 g de KH_2PO_4

Agar (Oxoïd)	16 g

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

Glucose 30%	100 ml
Asparagine 1,5%	7,5 ml
Traces métalliques (composition décrite ci-après)	0,1 ml
Vitamines 10X (composition décrite ci-après)	1 ml

Solution de traces métalliques

pour 1l de solution dans de l'eau distillée:

H_3BO_3 0,1%	10 ml
$CuSO_4.5H_2O$ 0,1%	1 ml
KI 0,1%	2 ml
$Na_2MnO4.2H_2O$ 0,1%	4 ml
Ac. citrique ($C_6H_8O_7.H_2O$)	10 g
$MnSO_4.H_2O$	400 mg
$FeCl_3.6H_2O$	5 g

porter à 1l au moyen d'eau distillée. Conserver à 4°C et à l'abri de la lumière. Préparer à partir de ce stock quelques aliquotes (25 ml) de solution stérilisée par filtration prête à l'emploi .

Solution de vitamines

pour une solution stock de 100 ml

Biotine	2,5 mg
Thiamine	100 mg
Panthoténate de calcium	200 mg
Inositol	1 g

Stériliser par filtration et conserver à 4°C

Milieu M7

Pou 400 ml:

KOH	1,75 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,9 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
NaCl	0,2 g
$CaCl_2.2H_2O$	0,16 g

Pvu II

5' CAG**CTG** 3'
3' GTC**GAC** 5'

Figure II.4: La séquence de reconnaissance de l'enzyme *Pvu* II qui génère des bouts francs.

EcoR I

5' G**AATTC** 3'
3' CTTAA**G** 5'

Figure II.5: La séquence de reconnaissance de l'enzyme *Eco* RI qui génère des bouts collants.

Milieu pauvre en phosphate: 0,012 g de KH_2PO_4 et 1,5 g de KCl

Milieu riche en phosphate: 1,5 g de KH_2PO_4

Porter à pH 7 avec du tampon Tris - HCl 2M pH7

Porter à volume avec de l'eau et ajouter 8 g d'agar.

Après autoclavage, ajouter:

- 40 ml de glucose 30%
- 30 ml d'asparagine 1,5%
- 0,4 ml de solution de traces métalliques (solution décrite ci-dessus)
- 4 ml de vitamines 10X (solution décrite ci-dessus)
- 20 mg de substrat X-gal (dissout dans 1 ml de N,N-diméthylformamide)

II.3) La restriction d'ADN

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

La plupart des enzymes de restriction ont un site de reconnaissance recouvrant une séquence de 4 à 6 paires de bases qui est un palindrome (la séquence est identique sur les deux brins d'ADN). Deux exemples sont les enzymes *Pvu* II et *Eco* RI dont les sites de reconnaissance sont des hexanucléotides palindromiques.

On distingue deux types d'enzymes: les premières coupent au milieu du site de reconnaissance faisant ainsi apparaître une coupure à "bouts droits" (francs) (figure II.4); les secondes coupent à quelques nucléotides de distance sur chacun des deux brins générant ainsi des "bouts protrudants" (collants) (figure II.5). Dans ce second cas, les extrémités libres peuvent être 3' OH ou 5' P.

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

La réaction de restriction se fait durant deux heures à 37°C (ou autre température spécifique de l'enzyme et précisée par la firme). Elle fait intervenir l'ADN (miniprep: 5 à 10 µl d'ADN; maxiprep: 250 à 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.

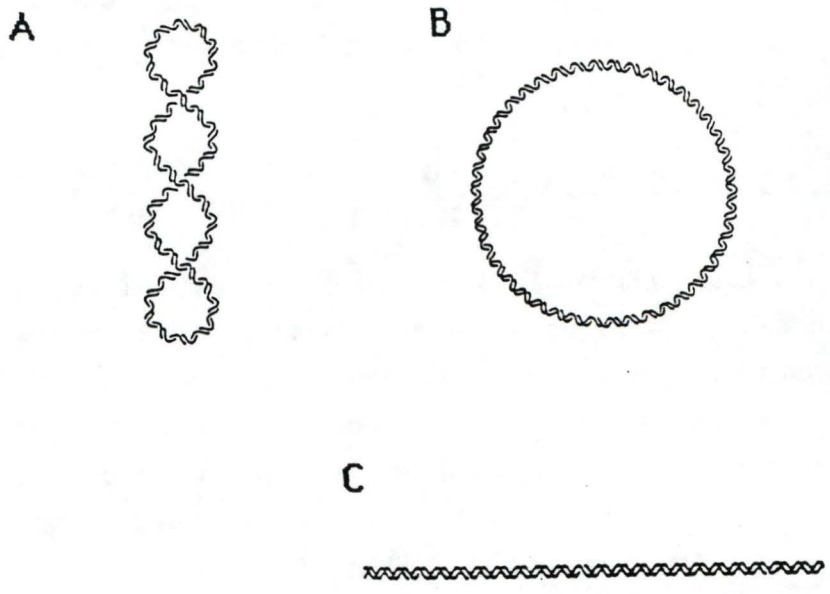


Figure II.6: Les trois configurations de l'ADN plasmidique:

(A) la forme CCC

(B) la forme OC

(C) la forme OL

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

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

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

- Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. En cas de voltage trop important, la résolution diminue.
- La concentration en agarose. Les gels à forte concentration (1,5 - 2%) permettent de séparer des molécules d'ADN de petite taille (100 à 1500 bp). Les gels à faible concentration (0,8 - 1%) permettent de séparer des molécules de taille supérieure (500 bp à plus de 10 kb).
- Le poids moléculaire des fragments d'ADN. Les molécules d'ADN double brin linéaires migrent à une vitesse inversément proportionnelle à leur poids moléculaire.
- La conformation de l'ADN (figure II.6). Les formes plasmidiques superenroulées ou CCC (Completely Closed Circular), circulaires cassées sur un seul brin (nick) ou OC (Open Circular) et OL (Open Linear) migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative de ces bandes dépend de différents facteurs et notamment des tours de superhélicité de la forme CCC; l'ordre de migration sera CCC>OL>OC.

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

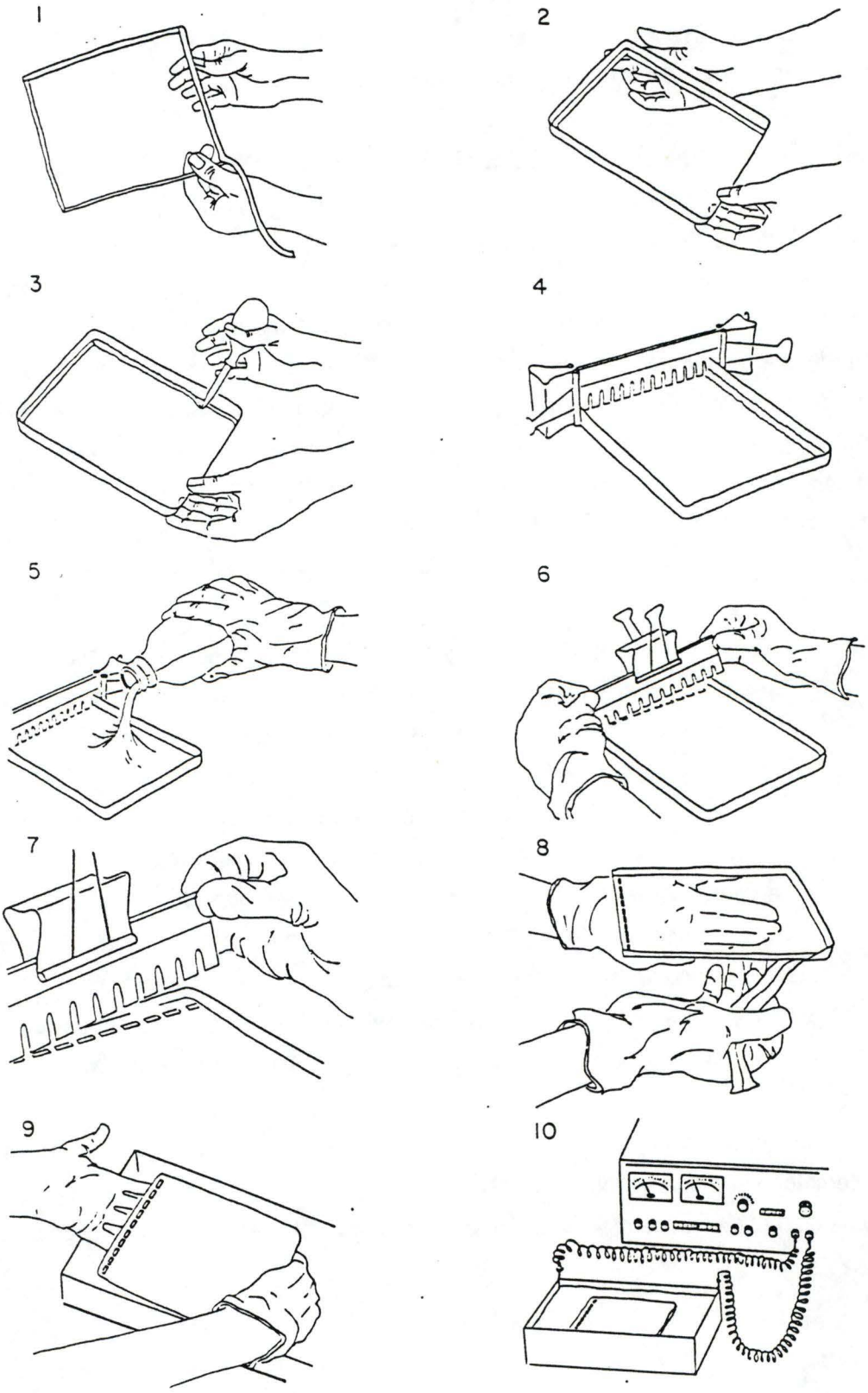


Fig II.7: Montage du gel pour électrophorèse en gel d'agarose

Solutions

-Tampon TBE

Tris	10,8 g/l
Acide Borique	5,5 g/l
EDTA	0,93 g/l (ou EDTA 0,5 M: 4 ml)

- Solution d'alourdisseur

pour 10 ml	
Bleu de bromophénol	25 mg
Glycérol	5 ml
EDTA (1M)	0,5 ml

porter à volume avec H_2O

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

Le gel encore liquide à cette température est coulé dans un moule en plexiglas sur lequel on a placé un peigne permettant de former des puits dans le gel refroidi et solidifié (figure II.7). La taille des dents du peigne est choisie selon le volume des échantillons à déposer sur gel, le plus souvent 15 à 20 µl. Après solidification, retirer le peigne et placer le gel dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE.

Introduire l'échantillon d'ADN alourdi par l'adjonction de 1/10 du volume final de solution d'alourdisseur à la micropipette dans un des puits. Le bleu de bromophénol qui migre à la même vitesse que les plus petits fragments visibles sur le gel permet de contrôler la migration.

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

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

Deux évaluations peuvent être réalisées:

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

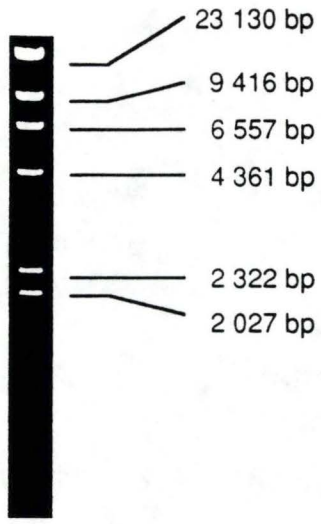


Figure II.8: Taille des fragments du marqueur λ restreint par *Hin* d III (les fragments de 564 bp et de 125 bp n'apparaîssent pas sur la photo). Gel d'agarose 1%.

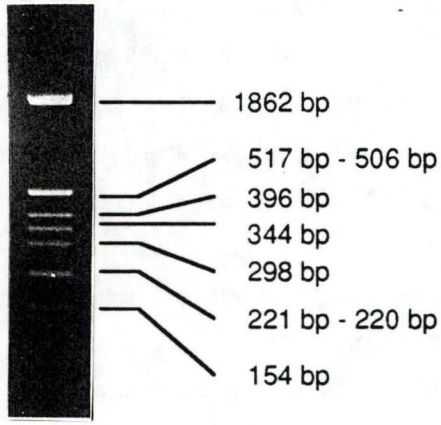


Figure II.9: Taille des fragments du marqueur pKK 233-2 restreint par *Hin* f I (la bande de 75 bp n'est pas visible sur la photo). La seconde et la sixième bande sont doubles [les fragments de 517 et 506 bp migrent à la même hauteur (idem pour les fragments de 221 et 220 bp)]. Gel d'agarose 2%.

- l'ADN du phage λ restreint par*Hin* d III (gels agarose 1%) (figure II.8)
- le plasmide pKK 233-2 restreint par *Hin* f I (gels agarose 2%) (figure II.9)

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

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

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

Ces méthodes permettent d'isoler d'un mélange de restriction le fragment d'ADN particulier qui nous intéresse.

II.5.1) Méthode des papiers (Dretzen, 1981)

Solutions

- Solution d'élution "High Salt Buffer"

Tris 20 mM pH 7,5
EDTA 1mM
NaCl 1,5M

- Tampon TE

Tris 10 mM pH 8
EDTA 1 mM

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

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

l'électrophorèse jusqu'à ce que l'ADN à récupérer soit entré dans le papier (vérifier la fluorescence des papiers sous UV).

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

Le papier est prélevé avec une pince, rincé dans de l'eau distillée froide, séché sur papier Whatman et placé dans un Eppendorf (E_1). Ajouter au tube E_1 350 µl de High Salt Buffer (solution d'élution). Le papier est défait par agitation manuelle et incubé 2 heures à 37°C avec agitation intermittente; les anions du sel vont ainsi déplacer l'ADN du papier vers la solution.

Percer ensuite le fond du tube E_1 avec une épingle chauffée et le placer sur un second Eppendorf E_2. Centrifuger les deux tubes dans cette disposition 5' à 12000 rpm. La solution contenant l'ADN passe ainsi dans le tube E_2 alors que le papier reste dans le tube E_1. Centrifuger le tube E_2 seul pour culoter le papier qui aurait pu passer dans le tube E_2 lors de la centrifugation précédente. Pipetter le surnageant et le placer dans un troisième Eppendorf.

Ajouter au surnageant 700 µl de butanol saturé en eau et centrifuger 30 secondes à 12000 rpm puis éliminer la phase supérieure (le butanol permet d'extraire le bromure d'ethidium).

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

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

II.5.2) Méthode "Prep-A-Gene" (BIO-RAD)

Solutions

- Tampon Binding Buffer:

Tris-HCl	50 mM	
EDTA	1mM	pH 7,5
$NaClO_4$	6M	

- Wash Buffer:

Tris-HCl	40 mM	
EDTA	4mM	pH 7,4
NaCl	0,8M	

Ajouter 1 volume d'ethanol 95%

- Elution Buffer:

Tris-HCl	10 mM	
EDTA	1M	pH 8

L'électrophorèse ayant séparé les fragments d'ADN, exciser la bande d'ADN à récupérer et placer le morceau d'agarose contenant l'ADN dans un Eppendorf. Cette opération doit se faire dans un temps minimum d'exposition aux UV pour éviter leur action mutagène.

Centrifuger quelques secondes afin que l'agarose soit dans le fond de l'Eppendorf.

Estimer le volume d'agarose et y ajouter 3 volumes de Binding Buffer. Placer le tube à 42°C pendant quelques minutes afin de dissoudre l'agarose. Ajouter de la matrice "Matrix" à raison de 1µl par 200 ng d'ADN à récupérer (pour des quantités inférieures à 1 µg, ajouter malgré tout 5 µl de matrice). Incuber 10' à température ambiante. Dans ces conditions, l'ADN se fixe aux billes de la matrice.

Centrifuger pendant 30 secondes à 12000 rpm et éliminer le surnageant.

Rincer le culot contenant le DNA accroché en le resuspendant dans 50 volumes (de culot) de Binding Buffer. Centrifuger comme précédemment et renouveler cette étape de rinçage.

Eliminer le surnageant et laver le culot avec 50 volumes (de culot) de Wash Buffer. Centrifuger 30 secondes à 12000 rpm et éliminer prudemment toute trace de liquide avec une micropipette.

L'élution de l'ADN se fait en ajoutant 1 volume (de culot) d'Elution Buffer. Incuber ensuite 5' à 42°C (l'ADN est déplacé des billes de la matrice vers la solution). Centrifuger 30 secondes à 12000 rpm.

Environ 75% de l'ADN se trouve alors dans le surnageant qui est récupéré. Cette dernière étape d'élution peut être recommencée une fois.

Centrifuger l'ADN 30 secondes à 12000 rpm afin d'éliminer les traces éventuelles de matrice.

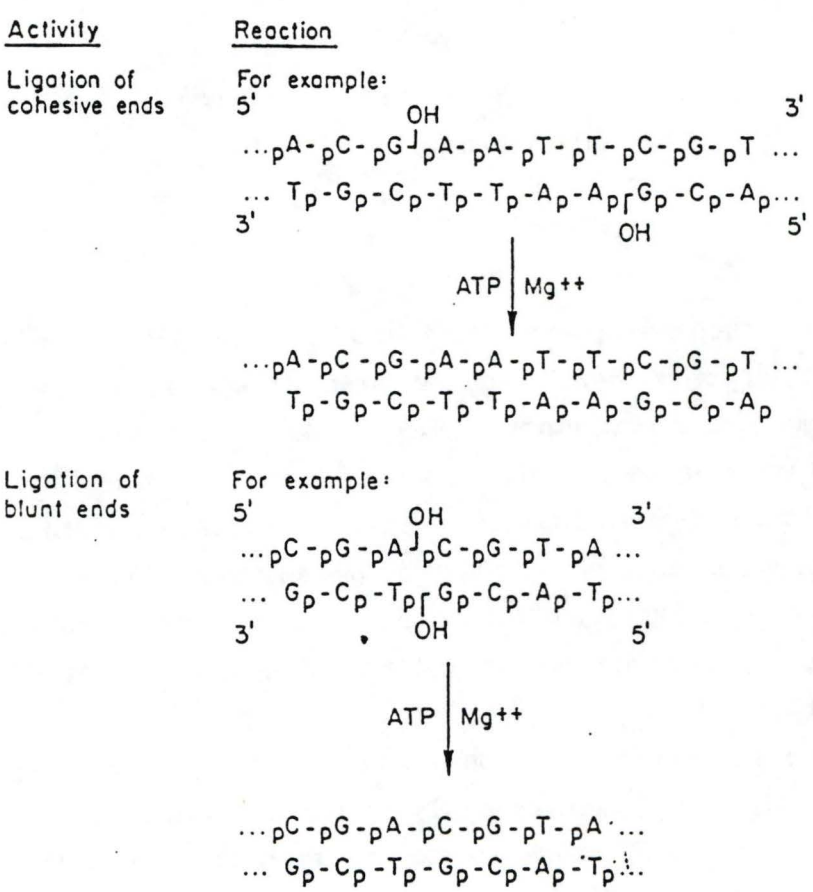


Figure II.10: Réaction catalysée par la T4 DNA Ligase.

II.6) Ligation de molécules d'ADN linéaires ayant des bouts droits ou des bouts saillants

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

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

Solutions

- Tampon de ligation (5X) (Gibco-BRL):

Tris HCl 20 mM pH 7,4
$MgCl_2$ 10 mM
DTT 10 mM
ATP 1 mM

La réaction se réalise classiquement comme suit:

1U de T4 DNA Ligase (Gibco-BRL)	1 µl
Tampon de ligation (5X)	5 µl
ADN en solution	19 µl

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

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

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

II.7) Purification et précipitation d'ADN

Certaines enzymes de restriction sont sensibles à la chaleur et sont dénaturables de cette manière.

D'autres peuvent être inactivées par l'EDTA: amener à une concentration finale 10 mM pH 7,5.

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

Solutions

- Solution de phénol:

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

- Solution de chloroforme:

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

- Solution de phénol-chloroforme:

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

Ajouter à un volume d'ADN (si le volume est petit, l'amener à 300 - 400 µl avec du TE) un volume égal de phénol-chloroforme. Vortexer et centrifuger 30 secondes à 12000 rpm.

Récupérer la phase aqueuse et répéter l'opération avec la solution de chloroforme afin d'éliminer toute trace de phénol.

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

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

Faire précipiter 30' à -80°C puis centrifuger 30 minutes à 12000 rpm à 4°C.

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

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

II.8) La transformation bactérienne

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

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

II.8.1) Préparation de cellules XL1blue compétentes

Solutions

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

La souche est cultivée à 37°C sur un milieu solide LB + tétracycline 100 µg/ml afin de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'. A partir d'une colonie, ensemencer un milieu liquide contenant 10 ml de LB + tétracycline. Cette culture est incubée entre 4 et 8 heures à 37°C 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 1 à 4 heures à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm de 0,3 (phase de croissance logarithmique).

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

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

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

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

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

II.8.2) Transformation de cellules XL1 blue compétentes

Méthode basée sur celle de Mandel et Higa.

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

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

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

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

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

Contrôles

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

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

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

II.9) Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

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

Solutions

- Solution de TE - LiOAc

  Acétate de litium (LiOAc) 0,1 mM

  TrisHCl 10 mM pH 7,5

  EDTA 1mM

- Solution de TE - LiOAc - PEG

  TE - LiOAc 1X

  PEG (polyethylène glycol) 4000 40%

Réaliser une culture de levure en milieu riche YPD.

Quand la culture à atteint une DO de 1 à 600 nm (1 à 2 10^7 cellules/ ml), la fractionner en aliquots de 20 ml et centrifuger 10' à 6000 rpm (rotor SS34 - Sorvall).

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

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

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

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

Centrifuger 10' à 12000 rpm.

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

Ajouter 50 µg d'ADN carrier (ADN de thymus de veau) et 10 µg d'ADN plasmidique (contenus dans 10 µl maximum).

Incuber 30' à 30°C avec agitation légère.

Ajouter 700 µl de TE - LiOAc - PEG et mélanger légèrement.

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

Choc thermique de 5' à 42°C.

Centrifuger 1' à 12000 rpm et éliminer le surnageant.

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

Contrôles

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

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

- Témoin de compétence des cellules: la transformation est réalisée avec un plasmide dont on sait qu'il transforme efficacement la souche de levure utilisée par la méthode de Ito (YCp50, YEp351 par exemple).

II.10) Extraction rapide d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli* (miniprep)

La miniprep est divisée en cinq étapes:

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

Solutions

- Tampon P1 - RNAase

  Tris HCl 50 mM
  EDTA 10 mM pH 8
  RNAase 400 µg/ml

- Tampon P2

  NaOH 200 mM
  SDS 1%

- Tampon P3

  KAc 2,55 M pH 4,8

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

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

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

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

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

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

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

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

Centrifuger 15' à 12000 rpm à température ambiante.

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

Centrifuger 15' à 12000 rpm à 4°C.

Eliminer le surnageant très délicatement et sécher sous vide.

Resuspendre dans de l'eau stérile ou du TE

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

II.11) Précipitation d'ADN plasmidique d' *Escherichia coli* (maxiprep)

Solution

- SSC 20X

NaCl 3 M

NaCitrate 0,3 M

porter à pH 7,5

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

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

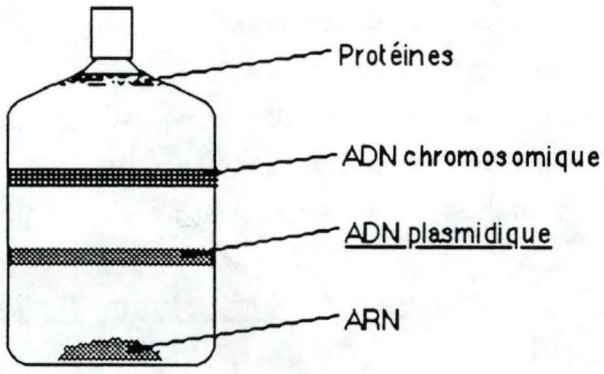


Figure II.11: Répartition des différents constituants cellulaires dans un gradient de chlorure de césium.

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

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

Centrifuger comme précédemment.

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

Placer à 37°C avec agitation et ajouter 1,2 ml de lysozyme (solution10 mg/ml Tris HCl 0,05 M pH 8) et 2,5 ml d'EDTA 0,5 M pH 8. Laisser agiter ainsi 15'.

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

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

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

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

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

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

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

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

Dissoudre le chlorure de cesium en agitant fortement le Sterilin.

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

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

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

Sous UV, après avoir coupé le col du tube, récupérer avec une pipette Pasteur, la bande inférieure contenant l'ADN plasmidique (figure II.11).

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

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

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

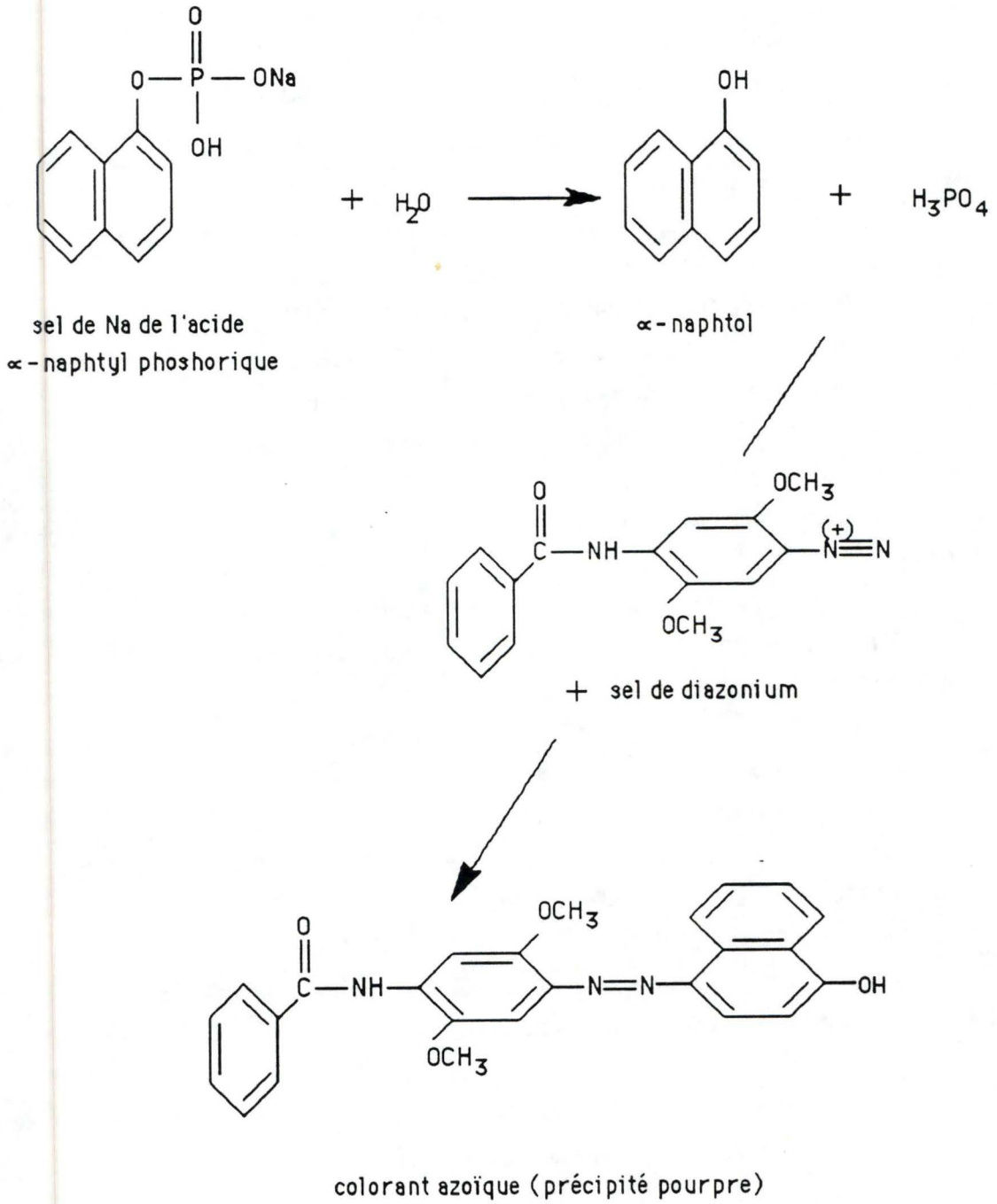


Figure II.12: Principe du test coloré de détection d'activité de la phosphatase acide. Le substrat utilisé est le sel de sodium de l'α-naphtyl phosphate. La phosphatase libère par hydrolyse le naphtol qui est capté ensuite par un sel de diazonium (Fast Blue B Salt). De ce couplage de deux substances incolores, résulte un colorant azoïque rouge. Un pH acide étant utilisé, la phosphatase acide sera révélée.

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

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

Eliminer le phenol - chloroforme et mettre la solution dans un sac à dialyse.

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

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

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

II.12) Quantification spectrophotométrique de l'ADN

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

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

II.13) Test de coloration d'activité de la phosphatase acide

Afin de tester la complémentation d'un mutant *PHO 81* (la souche Vd33d) par un plasmide contenant un fragment génomique éventuellement réarrangé par les techniques du génie génétique, l'activité phosphatase acide est détectée par un test de coloration (figure II.12).

Dans ce but, la phosphatase acide répressible est activée en faisant croître les colonies de levure sur un milieu carencé en phosphate inorganique (30 mg de dihydrogenophosphate de potassium par litre), le milieu 165-30.

Faire fondre une solution d'agar 1,6% acétate de potassium 0,1 m pH 4 et la maintenir à 55°C (1).

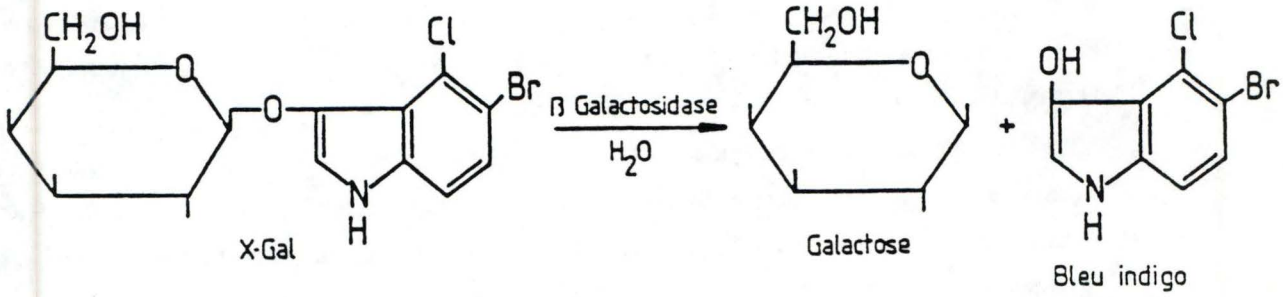


Figure II.13: Le 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl ß-D-galactopyranoside (Xgal) est un analogue du lactose: le glucose est remplacé par du 5-bromo, 4-chloro, 3-indole. L'hydrolyse de l'Xgal (incolore) par la ß-galactosidase libère le galactose et le 5-bromo, 4-chloro, 3-indole qui est de couleur bleue. L'Xgal est utilisé pour déceler la présence de ß-galactosidase *in vivo* .

Préparer une solution à 200 mg/ml de Fast Blue B Salt (O dianisidine tetrazotized zinc chloride) (Sigma) et la maintenir quelques minutes à 55°C (2).

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

Ajouter dans l'ordre dans un tube préchauffé à 55°C:

2 ml de (1)

1 ml de (2)

1 ml de (3)

Agiter et ajouter ce mélange rapidement sur les colonies de levure fraîches 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.

II.14) Test coloré de détection de l'activité β-galactosidase

Ce test se base sur la propriété du substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactopyranoside) (Stratagene) de devenir bleu une fois clivé par l'enzyme β-galactosidase (figure II.13).

Le milieu utilisé est le milieu M7 décrit précédemment. Ce milieu est porté à pH 7 avec du Tris-HCl 2M pH 7 avant d'autoclaver. L'X-gal est rajouté à raison de 50 mg/l dissout dans du N,N-dimethylformamide.

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

II.15) Préparation d'ARN total

L'ARN étant souvent délicat à préparer suite à sa sensibilité aux ribonucléases omniprésentes, traiter les solutions au diéthylpyrocarbonate (DEPC 0,2 %) et les autoclaver ensuite pour éliminer l'excès de DEPC. L'emploi de gants est également nécessaire.

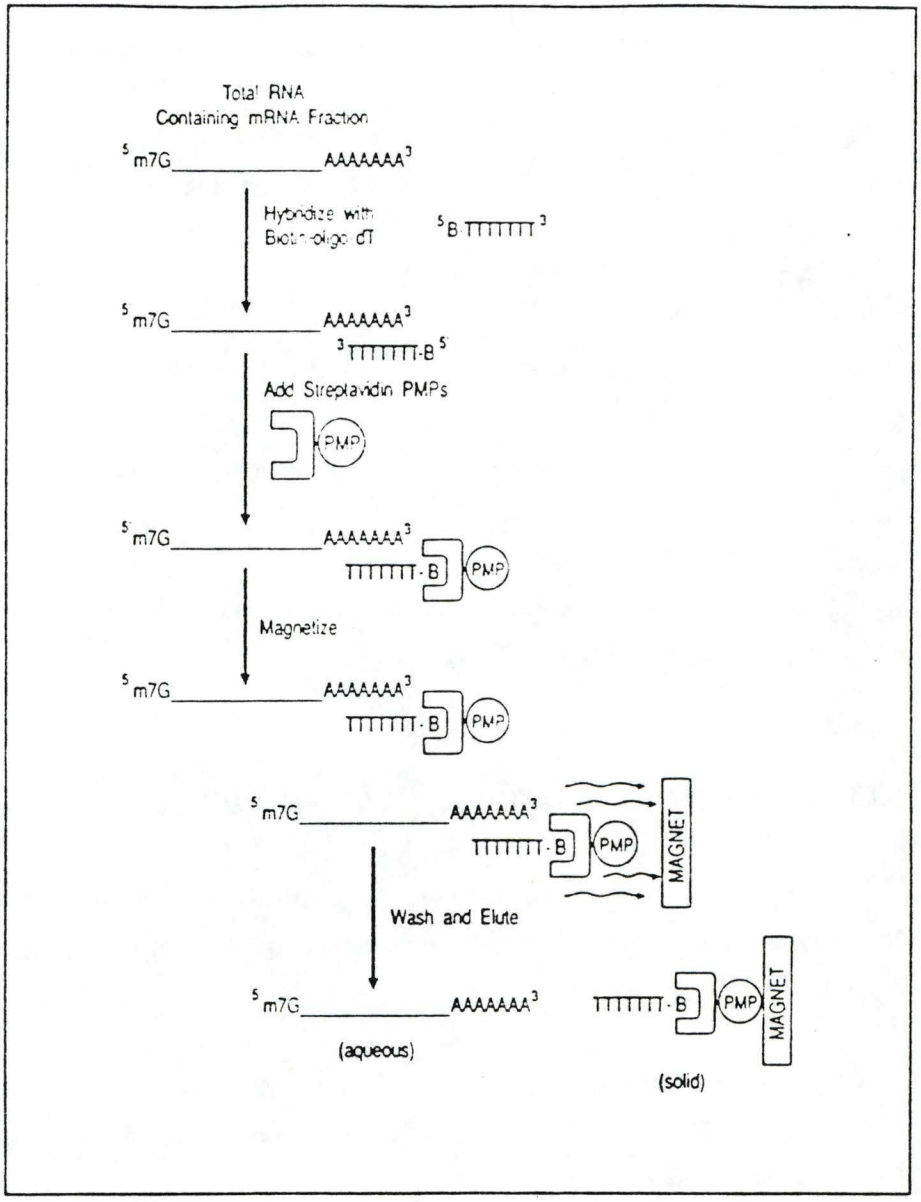


Figure II.14: Shéma résumant le procédé d'isolation d'ARNm avec le kit "PolyATtract™ mRNA Isolation System" (Promega).

Solution

Tampon A

Tris-HCl 50 mM pH 7,5
EDTA 10 mM
NaCl 0,1 M
SDS 5%

Centrifuger une culture de levure de 250 ml (DO_{600} = 0,6) et récupérer le culot.

Resuspendre le culot dans 4 ml de tampon A, répartir par 500 µl dans des tubes Eppendorf, passer au vortex quelques secondes avec 550 µl de phenol-chloroforme saturé en tampon A et laisser pendant 5 minutes à température ambiante.

Ajouter des billes de verre d'un diamètre égal à 0,4 mm au mélange et passer au vortex vigoureusement pendant 2 minutes.

Récupérer la phase aqueuse par centrifugation et réextraire la phase organique une seconde fois.

Rassembler les phases et les traiter avec 3 extractions au phénol-chloroforme saturé en tampon A et une extraction au chloroforme.

Précipiter l'ARN avec avec 1/10 de volume de NaAc 3 M pH 5,5 et 2, volumes d'ethanol absolu. Récupérer le culot après centrifugation et resuspendre dans 300 µl d'eau RNase free, précipiter une seconde fois puis laver dans l'ethanol 70% puis 100% avant de lyophiliser.

II.16) Purification d'ARN poly A$^+$ à partir d'une solution d'ARN total

Nous avons utilisé le kit "Poly ATtract mRNA isolation system" commercialisé par la firme Promega.

Le principe de la purification est résumé à la figure II.14. La solution d'ARN total est hybridée avec un oligo(dT) auquel a été couplé une molécule de biotine. Cet oligodT-Biotine s'hybride avec les ARN polyA$^+$ présents dans la solution. On ajoute ensuite à ce mélange de la streptavidine couplée à une particule paramagnétique (Streptavidin-Paramagnetic-Particles; SA-PMPs). La SA-PMPs se fixe aux ARN polyA$^+$ via la molécule de biotine. On attire ensuite avec un aimant les molécules de SA-PMPs, ce qui permet de séparer les ARN polyA$^+$ des

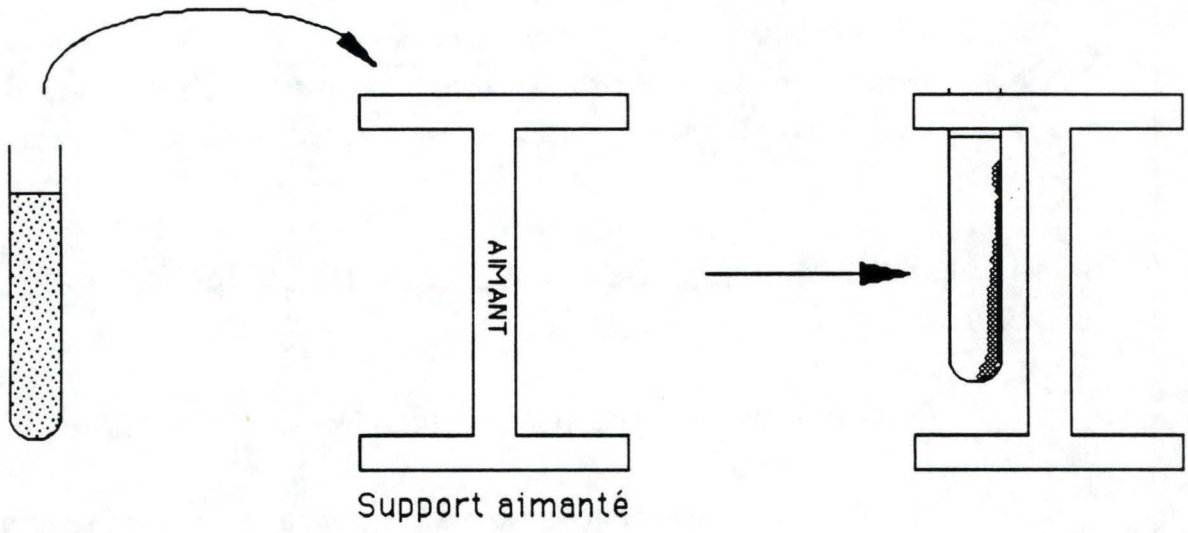


Figure II.15: Principe de la capture des SA-PMPs avec le support aimanté.

autres molécules d'ARN comprises dans la solution d'ARN total. Un lavage permet enfin d'éluer les ARN polyA+ ainsi purifiés.

Solutions

Toutes les solutions utilisées sont comprises dans le kit PolyATtract™ mRNA isolation system (Promega).

1) Hybridation

Dans un tube stérile, RNase-free de 5ml mettre jusqu'à 5mg d'ARN total et de l'eau RNase free jusqu'à un volume final de 2,430 µl. Placer ce tube 10 minutes à 65°C.

Ajouter 10 µl d'oligo(dT)-Biotine et 60 µl de SSC 20X. Agiter doucement et incuber à température ambiante jusqu'à ce que le tube soit refroidi (environ 30').

2) Lavage de la solution Streptavidin-Paramagnetic Particles

Resuspendre les SA-PMPs en agitant le tube. Placer le tube sur le support aimanté et laisser les particules migrer vers l'aimant. Enlever le surnagent avec précautions sans faire repasser les SA-PMPs en solution.

Laver trois fois les particules avec du SSC 0,5X (1,5 ml par lavage) en renouvellant l'opération décrite ci-dessus.

Resuspendre les SA-PMPs dans 0,5 ml de SSC 0,5X.

3) Capture et lavage des mRNA-oligo(dT)

Ajouter l'entièreté de la réaction d'hybridation au tube contenant les SA-PMPs lavés et incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

Capturer les SA-PMPs fixés aux mRNAs-oligo(dT)-Biotine avec le support aimanté et enlever le surnageant sans dissoudre le culot (figure II.15).

Laver 4X les paricules avec du SSC 0,1X (1,5 ml par lavage) comme décrit précédemment.

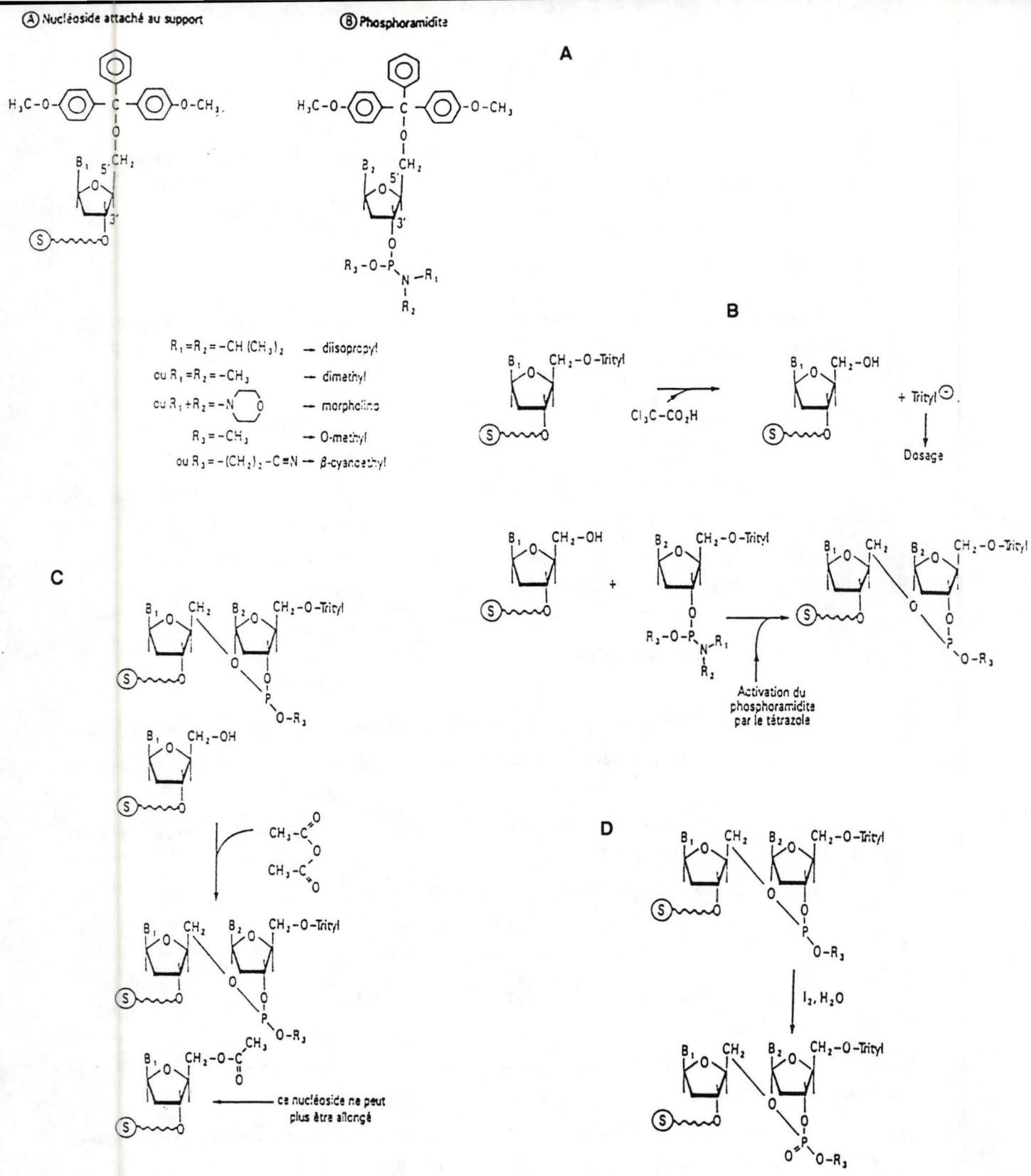


Figure II.16: Principe de la synthèse d'oligonucléotides.

A) Matières premières nécessaires à la synthèse chimique d'oligonucléotides.

B) Détritylation et addition.

C) Capping.

D) Oxydation.

4) Elution de l'ARNm

Resuspendre le culot lavé dans 1ml d'eau RNase free.

Capturer les SA-PMPs avec le support aimanté et récupérer le surnageant contenant l'ARN poly A^+.

Centrifuger le surnageant pendant 5' à 12000 rpm à 4°C et récupérer le surnageant. Cette dernière opération permet d'éliminer les SA-PMPs qui auraient pu passer dans le surnageant.

II.17) Synthèse d'oligonucléotides

Le principe de la synthèse d'un oligonucléotide est repris à la figure II.16.

Les réactions de synthèse se font en phase solide sur un support traditionnellement composé de billes de verre à porosité controlée sur lesquelles le premier nucléoside de la séquence est déjà attaché.

1) Structure des nucléosides

La synthèse démarre avec un 5' diméthoxytrityl nucléoside attaché au support par l'hydroxyle 3' du cycle désoxyribose.

Les nucléosides ajoutés ensuite possèdent un dérivé diméthoxytrityl en 5' et un groupe phosphoramidite lié à l'hydroxyle 3' du désoxyribose.

Ces deux groupements sont importants tant pour la solubilité des nucléosides dans le solvant (de nature organique) mais aussi pour la protection et la réactivité spécifique de certaines fonctions hydroxyles du nucléotide.

2) La synthèse

L'élongation du premier nucléoside se fait dans le sens 3' vers 5'. Un cycle de synthèse (le couplage entre deux nucléotides) comprend quatres étapes principales:

- une détritylation
- une addition
- un coiffage
- une oxydation

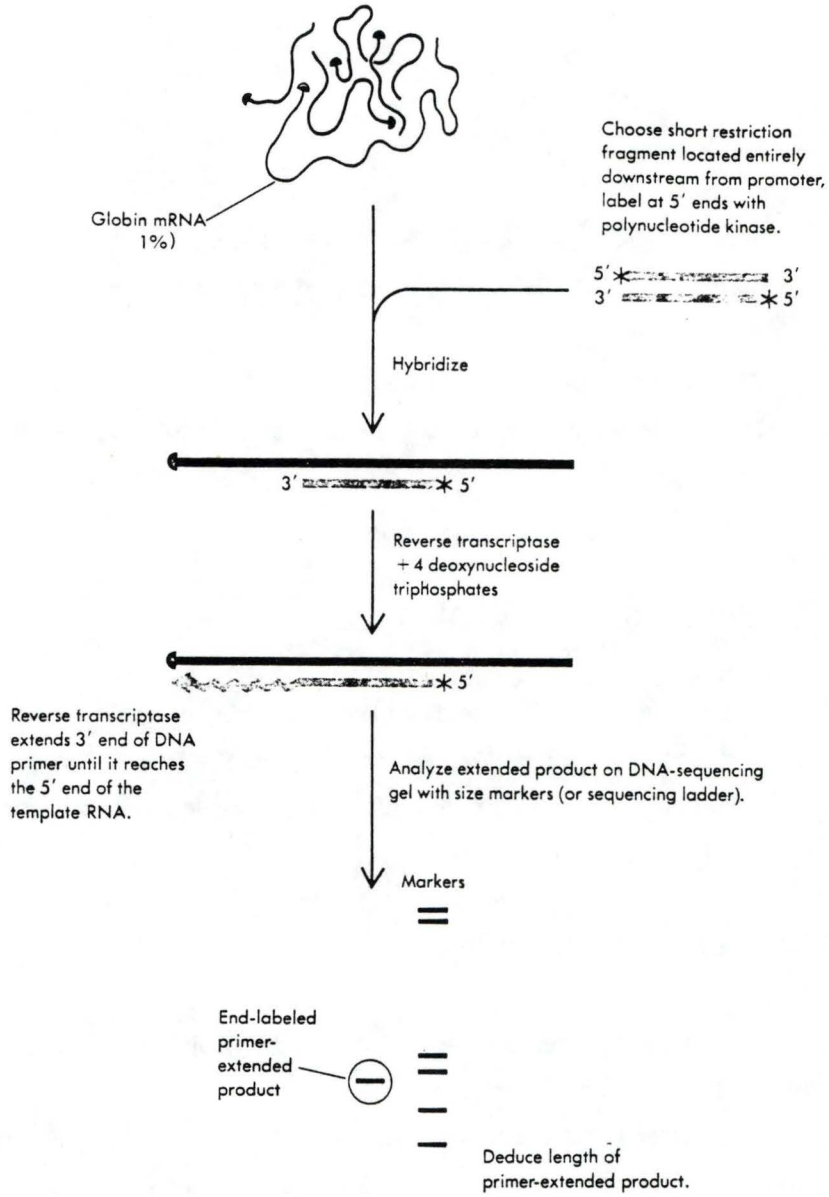


Figure II.17: Principe de la réaction de "Primer Extension".

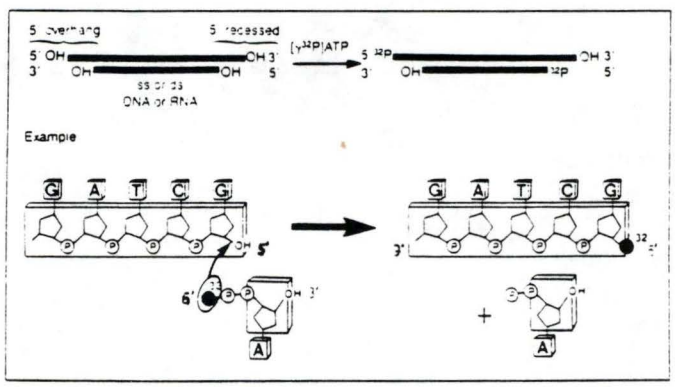


Figure II.18: Réaction catalysée par la polynucléotide kinase.

En fin de synthèse, les oligonucléotides sont décrochés de la phase solide, on réalise une mesure spectrophotométrique à 260 nm afin d'évaluer la quantité d'oligonucléotide synthétisée et une purification est mise en oeuvre afin d'éliminer les chaines trop courtes ayant été bloquées par coiffage.

L'oligonucléotide que nous avons utilisé lors de ce travail a été synthétisé par la firme Eurogentec S.A. à Liège.

II.18) Réaction de "Primer Extension"

Cette réaction permet de repérer le nucléotide +1 initiateur de la transcription d'un gène.

Le principe de cette réaction est décrit à la figure II.17.

Une sonde marquée spécifique d'une courte région de l'ARNm d'intérêt située entre 50 et 100 bp en aval de l'ATG, est hybridée avec une solution d'ARN messagers. La transcriptase réverse utilise cette sonde comme amorce pour la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire de la séquence 5' de l'ARNm. La synthèse s'arrête au premier nucléotide de l'ARNm, le site +1 de la transcription. Ce site d'initiation de la transcription peut ensuite être localisé en le visualisant sur un gel de polyacrylamide. Le brin d'ADN néoformé par la transcriptase réverse étant marqué radioactivement, sa taille peut être estimée sur un gel de polyacrylamide. Un échantillon de la réaction de primer extension est donc mis à migrer en parallèle avec une réaction de séquençage utilisant la même sonde.

1) Marquage de la sonde

Ajouter à 70 pmoles de sonde (oligonucléotide de synthèse), 30 pmoles de ^{32}P (Amersham), 2 µl de poly nucléotide kinase (firme) (figure II.18) et 3 µl de tampon PNK (polynucléotide kinase buffer). Porter le volume à 30 µl avec de l'eau RNase free.

Laisser 1 heure à 37°C.

Conserver à - 20°C.

2) Vérification du marquage de la sonde

Prendre 1 µl des 30 ul de la réaction de marquage et mettre dans 99 µl d'eau.

Prendre 2,5 µl des 100 µl et les mettre sur un filtre Millipore DE81. Renouveller l'opération.

Laver un des deux filtres successivement dans 5 bains de Na_2HPO_4, un bain d'eau et un bain d'ethanol 100%.

Une fois les filtres secs, les mettres dans deux fioles pour compteur à scintillation avec 5ml d'aqualuma.

Mettre les deux fioles au compteur. Le rapport cpm lavé/cpm non lavé X 100 donne le pourcentage d'incorporation.

3) Réaction de primer extension

Dans un Eppendorf, mettre:

0,7 µl d'eau RNase free
2,5 µl d'ARN polyA+
1,2 µl de KCl 1,25 M - Tris HCl 50 mM pH 8,3 (5X)
1,6 µl de sonde marquée

= 6 µl = Premix A

Mettre le Premix A dans un bain d'eau à 90°C et laisser descendre la température du bain à 30°C.

Dans un Eppendorf, mettre:

0,45 µl de dATP (0,5 mM)
0,45 µl de dCTP (0,5 mM)
0,45 µl de dGTP (0,5 mM)
0,45 µl de dTTP (0,5 mM)
0,45 µl de Tris-HCl 240 mM
0,45 µl de $Mg Cl_2$ 160 mM
0,45 µl de DTT 80 mM
5,85 µl d'eau RNase free
3 µl de Reverse Transcriptase RAV-2 (Amersham)

= 12 µl = Premix B

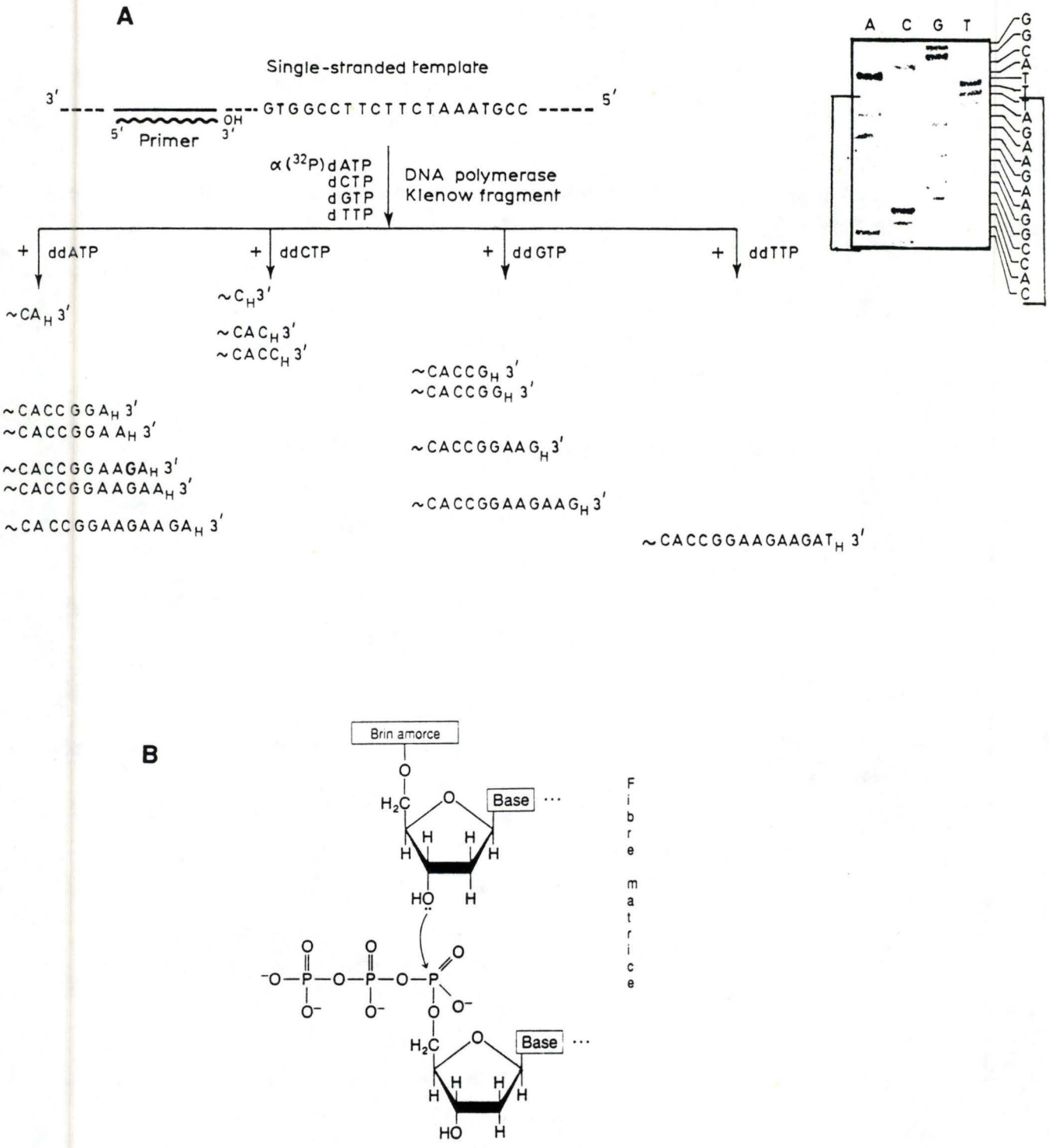


Figure II.19: A) Principe du séquençage selon la méthode au didésoxynucléotide de Sanger.

B) Réaction d'élongation de la chaine d'ADN catalysée par les ADN polymérases.

Mettre 8,25 µl de Premix B dans le Premix A et placer pendant 1 heure à 42°C.
Arrêter la réaction en ajoutant 2,625 µl de bleu "Stop Reaction" (Pharmacia).

Mettre 8 µl sur gel de polyacrylamide en parralèle avec la réaction de séquençage (voir plus loin).

II.19) Réaction de séquençage

La méthode de séquençage que nous avons utilisée lors de ce travail a été mise au point par Sanger (1971) (figure II.19A).

Une molécule d'ADN bicaténaire est dénaturée (séparation des deux brins). Un des deux brins (le brin "template" ou matrice) est hybridé à un oligonucléotide de synthèse (le "primer" ou amorce). Celui-ci est en fait complémentaire d'une courte portion du brin à séquencer (10 à 50bp) et est utilisé comme amorce pour l'ADN polymèrase (figure II.19B).

L'ADN polymérase commence la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire au "template" à partir du "primer" et ce dans un mélange comprenant les quatres désoxynucléotides (A,C,G,T) dont un est radioactif (désoxyadénosine 5'- α - ^{35}S - triphosphates; Amersham) et un des quatres didésoxynucléotides.

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

Quatre mélanges de polymérisation sont donc 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
didésoxy. présents	ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP

*marqué au ^{35}S

Dans chaque mélange, les proportions des constituants sont telles que statistiquement, on obtiendra l'arrêt prématuré de la synthèse d'au moins une molécule d'ADN

(marquée radioactivement) pour chaque position dans la séquence "template" comportant un nucléotide complémentaire au didésoxyribonucléotide présent.

Pour chaque mélange, on dépose sur un gel de polyacrylamide les brins radioactifs synthétisés. Ils sont ensuite séparés suivant leur taille par électrophorèse.

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

1) Réaction de séquençage

Solutions

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

1°) Dénaturation

Un nick (ou cassure dans la chaine d'ADN) offre une extrémité 3' OH qui peut servir de point de départ à l'ADN polymérase. Pour éviter des interférences, la solution d'ADN doit être la plus pure possible et les plasmides doivent se trouver sous forme CCC.

Mettre dans un Eppendorf: 1,5 à 2 µg d'ADN dans 8 µl (porter à volume avec de l'eau si nécessaire) et 2 µl de NaOH 2N. Laisser incuber 10' à température ambiante.

L'ADN dénaturé est précipité en ajoutant: 3 µl d'acétate de Na 3M pH 4,8
7 µl d'eau distillée stérile
60 µl d'éthanol 100% froid (-20°C).

Mélanger et placer 20' à -80°C.

Centrifuger 15' à 12000 rpm à 4°C et éliminer le surnageant.

Laver le culot (invisible) à l'éthanol 70% puis sécher sous vide.

Ne pas resuspendre le culot (cela entraînerait la réhybridation des brins d'ADN).

2°) "Annealing"

Cette étape permet l'hybridation du "primer" sur le brin "template".

Resuspendre le culot séché dans 10 µl d'eau stérile et ajouter rapidement 2 µl de primer (0,80 µM) et 2 µl d'Annealing Buffer.

Incuber 10' à température ambiante.

3°) "Labelling"

C'est l'étape de marquage du brin néoformé. La T7 DNA polymérase commence la synthèse en présence des quatres désoxyribonucléotides, dont le dATP marqué, permettant la formation d'un court brin marqué (le primer et quelques dizaines de nucléotides).

Ajouter au mélange d'annealing: 3 µl de "Labelling Mix" (solution de dCTP, de dGTP et de dTTP)

1 µl d'[α - ^{35}S] dATP (soit 10 µCi)

3 unités de T7 DNA polymérase diluée dans son tampon de dilution jusqu'à 1,5 U par µl

Incuber 5' à température ambiante.

4°) "Termination" ou "Sequencing"

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

Dans quatre 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 quatre Eppendorf 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 STOP" (arrête la réaction).

Stocker à -20°C.

2) Electrophorèse en gel de polyacrylamide

1°) Montage des plaques

Laver successivement les deux plaques de verre: à l'eau de ville

à l'eau distillée

à l'ethanol

Sécher les plaques.

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

Laisser sécher les plaques.

Déposer les "spacers" sur la plus grande des deux plaques et appliquer la petite plaque sur les "spacers".

Coller du tape à la jonction entre les deux plaques.

2°) Préparation du gel (gel dénaturant)

Dans un Berlin, ajouter à 42g d'urée:

10 ml de TBE 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 600 µl de persulfate d'ammonium (10%)puis 30 µl de TEMED.

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

Après polymérisation (45 à 60 minutes), le gel peut être stocké à 4°C.

3°) Migration et autoradiographie

Le gel est chauffé pendant 30 à 45 minutes ("prérun").

Les conditions de migration sont:

Puissance: 60 Watts

Tension: 1600 Volts

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

Après avoir arrêté la source de tension, placer les peignes et nettoyer les puits pour enlever l'urée, les bulles et les impuretés. Chauffer les échantillons à charger sur le gel (Eppendorfs A, C, G et T) durant 3 minutes à 85°C pour dénaturer l'ADN. Déposer 2,5 µl d'échantillon de chaque Eppendorf par puits (ordre standard de dépot: A, C, G, T).

Rebrancher la source de tension et laisser migrer l'échantillon pendant 1 heure ou plus.

Après migration, receuillir le gel sans le plier sur une des deux plaques de verre.

Placer cette plaque portant le gel dans un bain de fixateur (contenant de l'acide acétique)pendant 10 minutes.

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

Sécher sous vide pendant 45 minutes à 80°C.

Placer le gel adhérant au buvard dans une cassette à autoradiographie avec un film autoradiographique (Fuji X-ray film) et laisser une nuit.

Retirer le film de la cassette, le plonger dans un bain révélateur (Kodak) pendant 5 minutes, rincer à l'eau puis passer le film révélé dans un bain de fixateur durant 10 à 15 minutes.

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

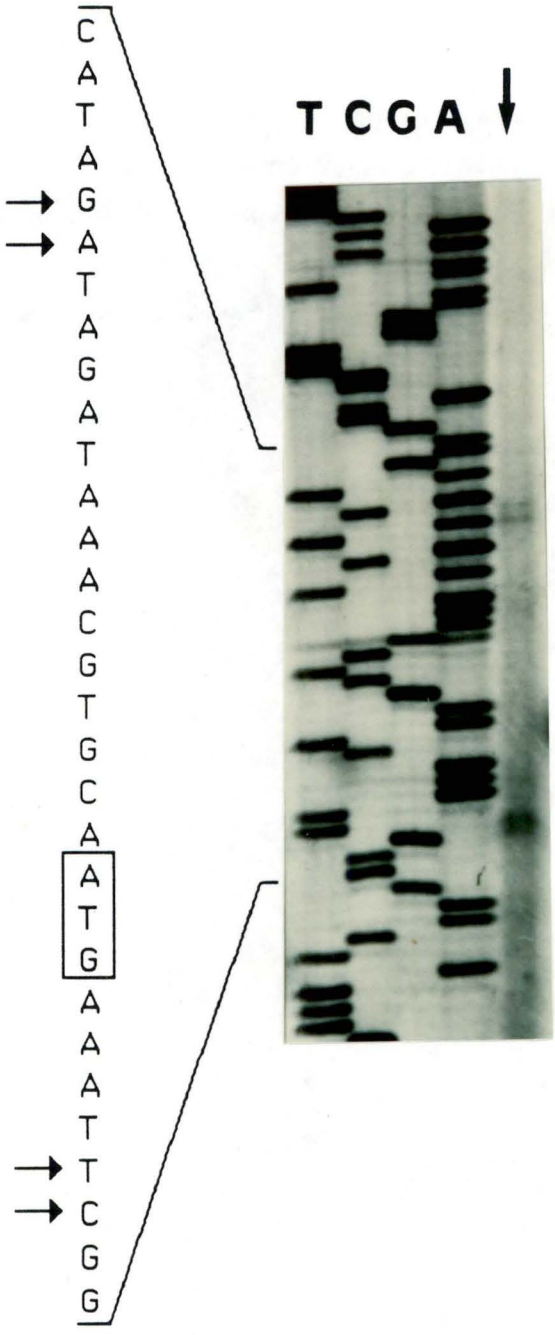


Figure III.1: Résultat d'une expérience de "primer extension mapping" réalisée sur le gène *PHO 81* .

III. RESULTATS

III.1) Description structurale de la région 5'-amont de régulation du gène *PHO 81* : Identification des sites caractéristiques de la région de régulation du gène *PHO 81*

L'identification des sites caractéristiques de la région 5' d'un gène repose sur une double approche. La première consiste à comparer la séquence de cette région avec des régions homologues d'autres gènes et des séquences-consensus afin d'y reconnaître des "boîtes" et des sites caractéristiques; dans un second temps, le rôle présumé de ces motifs de contrôle est éprouvé expérimentalement.

Il importe donc de définir aussi précisément que possible la région et les séquences cibles d'intérêt.

Outre les homologies pour reconnaître des "boîtes signal" présomptives, il y a lieu de considérer leurs distances relatives et leur distance par rapport à l'ATG et au site d'initiation de la transcription.

III.1.1) Localisation du promoteur proximal et du site +1 initiateur de la transcription

La position relative des séquences de régulation présumées ainsi que leur distance par rapport au site d'initiation de la transcription contribue à leur identification. La localisation du site d'initiation de la transcription s'impose donc.

La réaction d'extension d'amorce (réaction de "primer extension") a été décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes.

La figure III.1 présente le résultat d'une expérience d'extension d'amorce réalisée avec un oligonucléotide de synthèse défini à la figure III.2, permettant l'extension par la transcriptase réverse. Cet oligonucléotide reconnaît une séquence de 20 bp située à 90 bp de l'ATG, distance recommandée pour ce type d'expérience.

On observe que quatre bandes sont allumées dans la piste 5 correspondant à 2 zones distinctes du gène qui comporteraient chacune deux sites d'initiation potentiels juxtaposés.

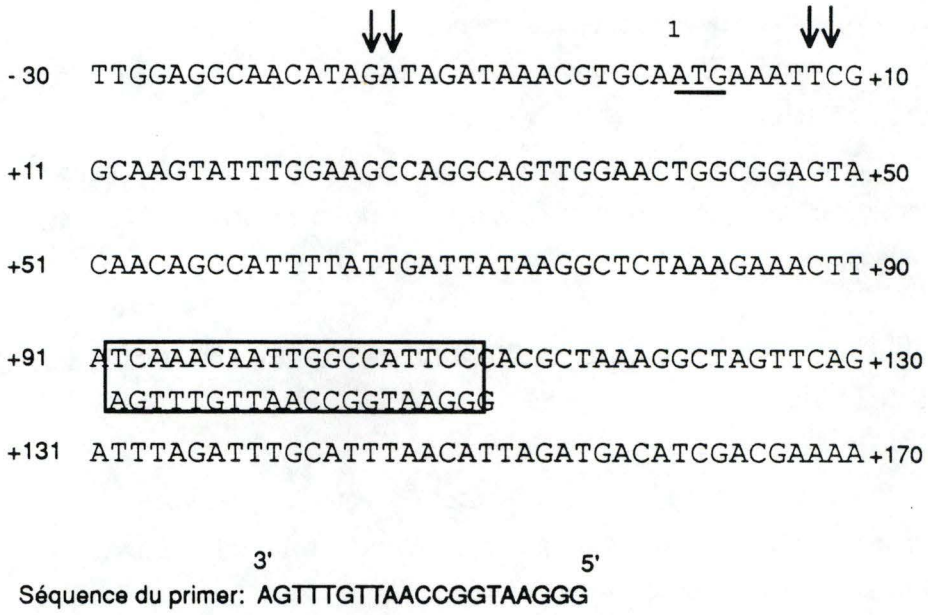


Figure III.2: Site d'hybridation de l'oligonucléotide de synthèse utilisé pour réaliser une expérience d'extension d'amorce ("primer extension mapping") sur *PHO 81* . Les flèches indiquent les sites d'arrêt de transcription réverse.

La première zone contient les sites situés à 15 et 16 bp en amont du A de l'ATG. Nous appellons cette zone la zone -15 -16. La seconde zone contient les sites situés à 8 et 9 bp en aval du A de l'ATG. Nous appellons cette zone la zone +8 +9.

III.1.2) Discussion

La zone -15 -16 se situe à 70 bp en aval d'une "TATA box" ce qui s'accorde à la situation, décrite par plusieurs auteurs, d'un site d'initiation situé dans une fenêtre de 40 à 110 bp en aval d'une "TATA box" (Guarente, 1984; Chen et Struhl, 1985; Mac Neil et Smith, 1986; Healy *et al.*, 1987).

Le fait de trouver deux sites d'initiation de la transcription adjacents comme nous l'observons ici a été souvent rapporté (Lewin, 1987; Rudolph et Hinnen, 1987).

La zone +8+9 se situe en aval de l'ATG, elle ne peut donc servir d'élément initiateur pour un ARNm comprenant cet ATG mais pourrait être fonctionnelle pour un autre ARNm utilisant la même séquence et comportant un ATG plus en aval de cette zone. Cependant, aucun ATG distant d'au plus 100 bp de cette zone n'ouvre d'ORF assez longue pour pouvoir être prise en considération (l'ATG initiateur d'une ORF le plus proche est distant de 900 bp). En effet, les sites +1 initiateurs chez la levure sont toujours situés entre 10 et 100 bp en amont de l'ATG (Kingsman et Kingsman, 1988).

Alternativement, l'arrêt de la transcription réverse responsable de l'apparition des bandes correspondant aux sites +8 et +9 pourrait aussi résulter d'une structure secondaire de l'ARN messager. En effet, des structures de type "hairpin" ou "hairloop" provoquent le détachement de la transcriptase réverse avortant ainsi la réaction de synthèse d'ADN avant le premier nucléotide (Cheong *et al.* ,1990; Hagerman, 1991). Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de structure de ce type et à cette position dans l'ARN de *PHO 81* .

Ces résultats tendent donc à authentifier l'ATG que nous avons situé en position1 sur les figures précédentes. Ajoutons que cet ATG est directement précédé et suivi d'une adénine comme c'est le cas chez de nombreux gènes de levure (*CYC-1* , *MAT-2* ...) (Dobson *et al.*, 1982).

En conclusion, nous avons donc déterminé par une expérience d'extension d'amorce, la position d'une zone d'initiation de la transcription comportant deux nucléotides initiateurs: un guanine à 16 bp en amont de l'ATG et une adénine à 15 bp en amont de l'ATG.La position de cette zone à 70 bp en aval d'une séquence TCATAA est en accord avec le rôle de "TATA box" qui lui est attribué.

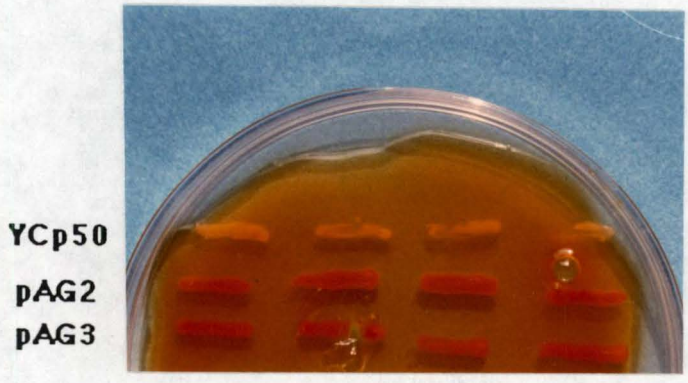


Figure III.3: Photographie des colonies de levure après croissance sur milieu 165-30 (en condition d'activation) et test de coloration qui met en évidence l'activité phosphatase.

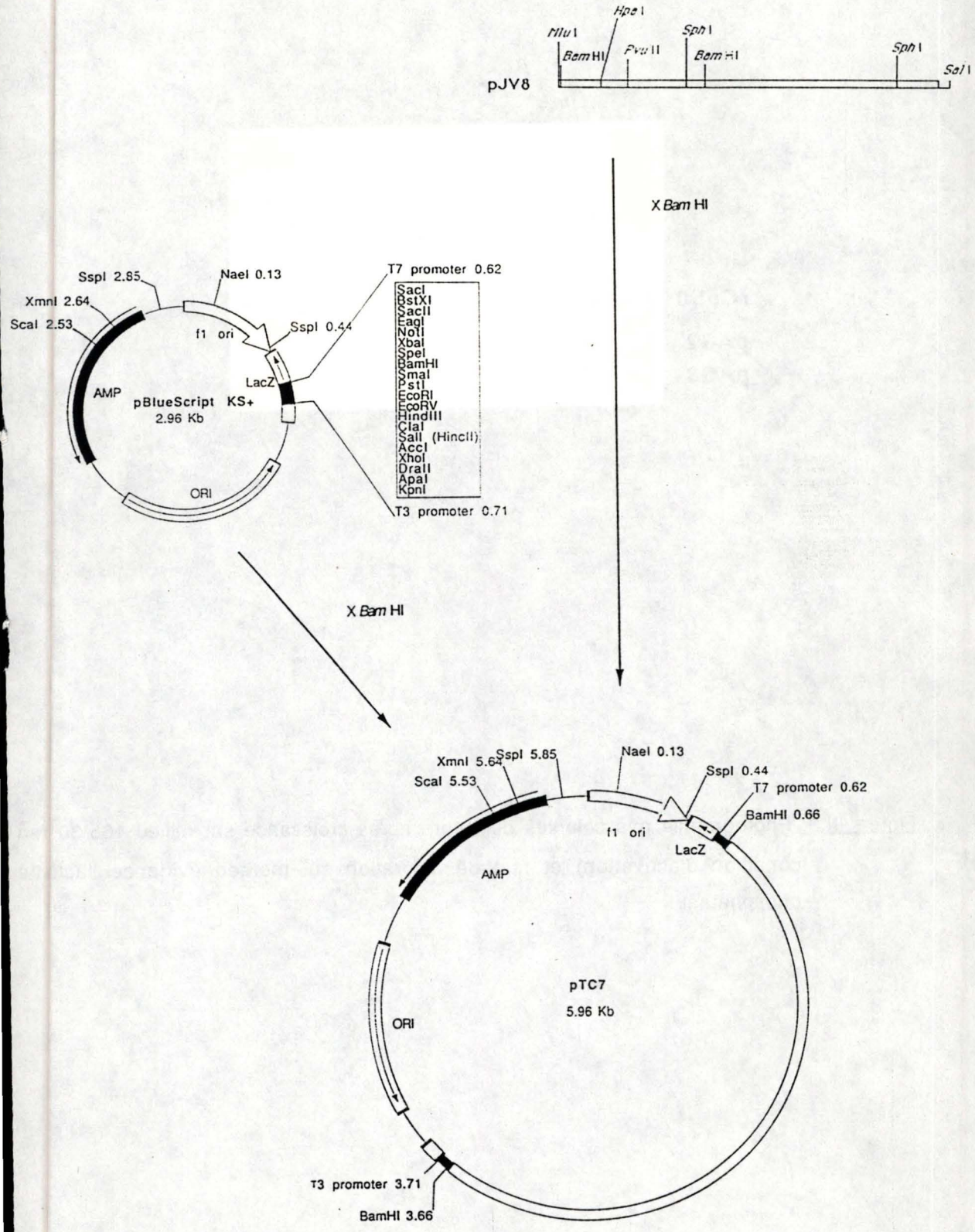


Figure III.6: Construction du plasmide pTC7.

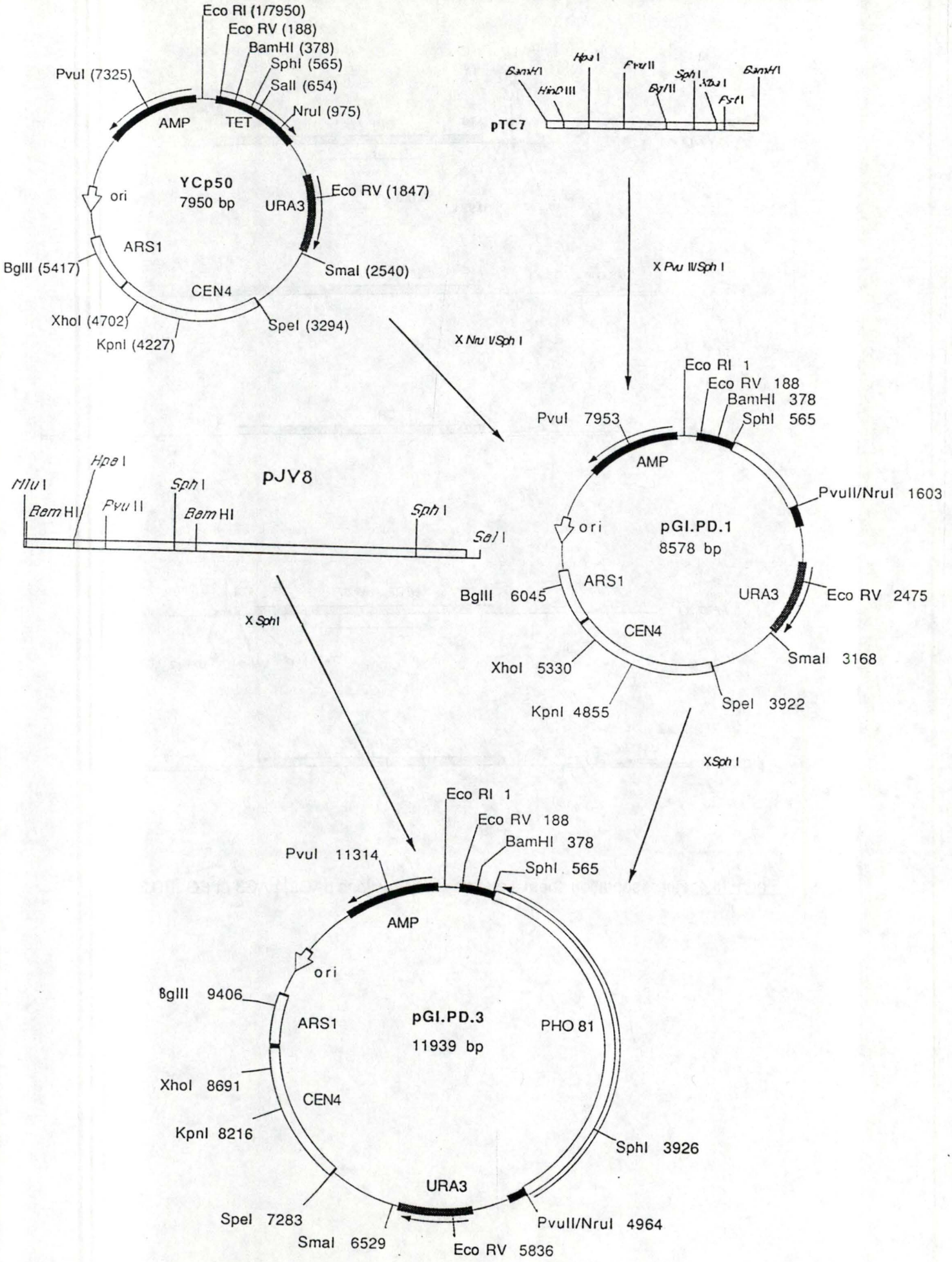


Figure III.5: Construction du plasmide intermédiaire pGI.PD.1 et du plasmide pGI.PD.3.

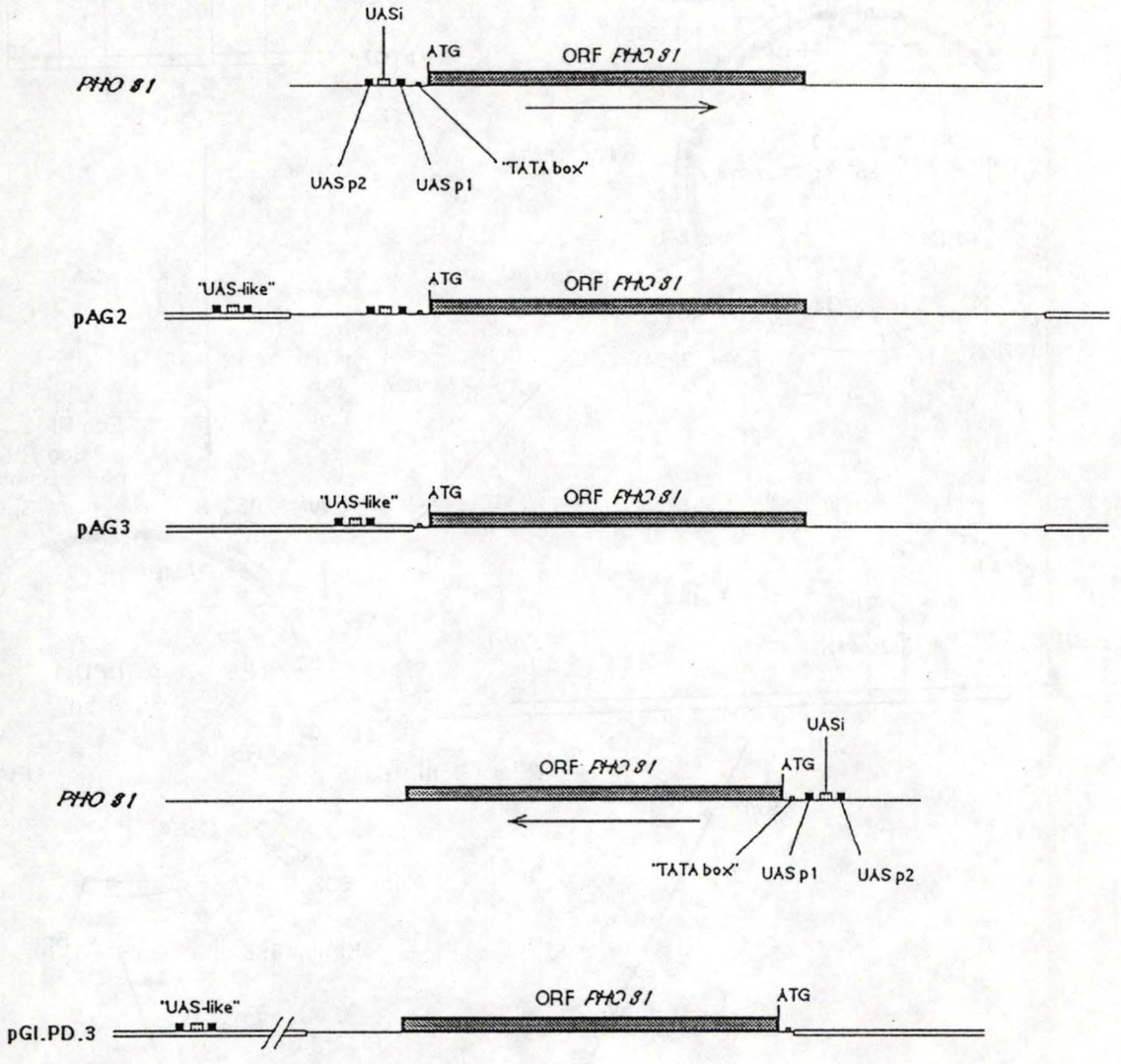


Figure III.4: Représentation shématique des constructions pAG2, pAG3 et PGI.PD.3.

Quant à la seconde zone, localisée dans l'ORF même de *PHO 81* , où se situe un arrêt de l'extension d'amorce, elle ne semble pas pouvoir correspondre à un site +1.

III.2)Caractérisation fonctionnelle des séquences de régulation 5'-amont du gène *PHO 81*

III.2.1) Approche par complémentation

Afin de confirmer les résultats expérimentaux apportés par A. Grifnée (1990), nous avons également transformé les deux constructions pAG2 et pAG3 qui ont été décrites dans l'introduction (voir I.2.2.3).

Les résultats que nous avons obtenus de façon répétée sont présentés à la figure III.3. Ils sont en accord avec des résultats rapportés antérieurement (Grifnée, 1990). Ainsi, les plasmides pAG2 et pAG3 complémentent effectivement la mutation portée par Vd33d.

Dans l'introduction (voir I.2.2.3), nous avons développé l'hypothèse d'un remplacement des US de *PHO 81* par des séquences du vecteur YCp50 situées en amont du point de clonage de l'insert ("UAS-like).

Afin de tester cette hypothèse, nous allons retourner l'insert *Pvu* II - *Sal* I et ainsi, soustraire le gène de l'effet des "UAS-like" supposé du vecteur (figure III.4).

III.2.1.1) Construction du plasmide pGI.PD.3

Cette construction a été réalisée en deux étapes (figure III.5) afin d'éviter les difficultés d'une triple ligation:

- Insertion du fragment *Pvu* II - *Sph* I de pTC7 (figure III.6) de 1kb dans le vecteur YCp50 donnant lieu au plasmide pGI.PD.1.
- Insertion du fragment *Sph* I - *Sph* I de pJV8 de 3,3 kb dans le plasmide pGI.PD.1 donnant lieu au plasmide pGI.PD.3.

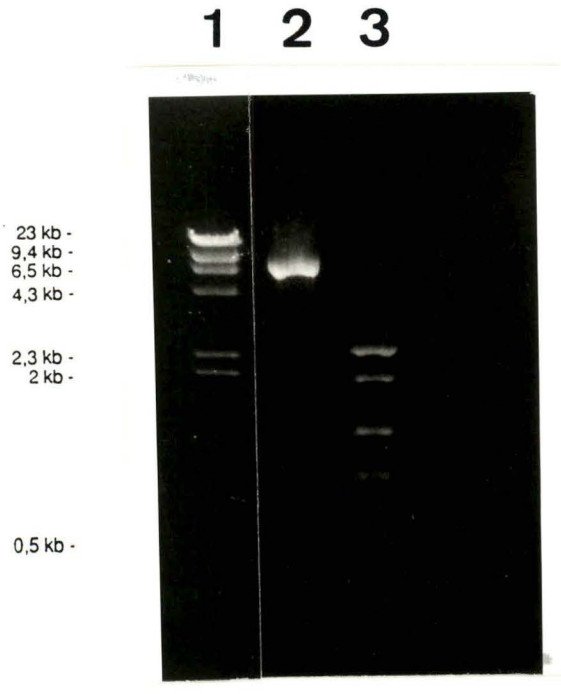


Figure III.7: Electrophorèse en gel d'agarose du plasmide YCp50 restreint par *Nru* I et *Sph* I et du plasmide pTC7 restreint par *Pvu* II et *Sph* I.

Piste 1: marqueur λ restreint par *Hin* dIII.

Piste 2: YCp50 restreint par *Nru* I et *Sph* I (7,5 kb et 0,4 kb).

Piste 3: pTC7 restreint par *Pvu* II et *Sph* I (2,5 kb, 2,2 kb, 1,4 kb et 1 kb).

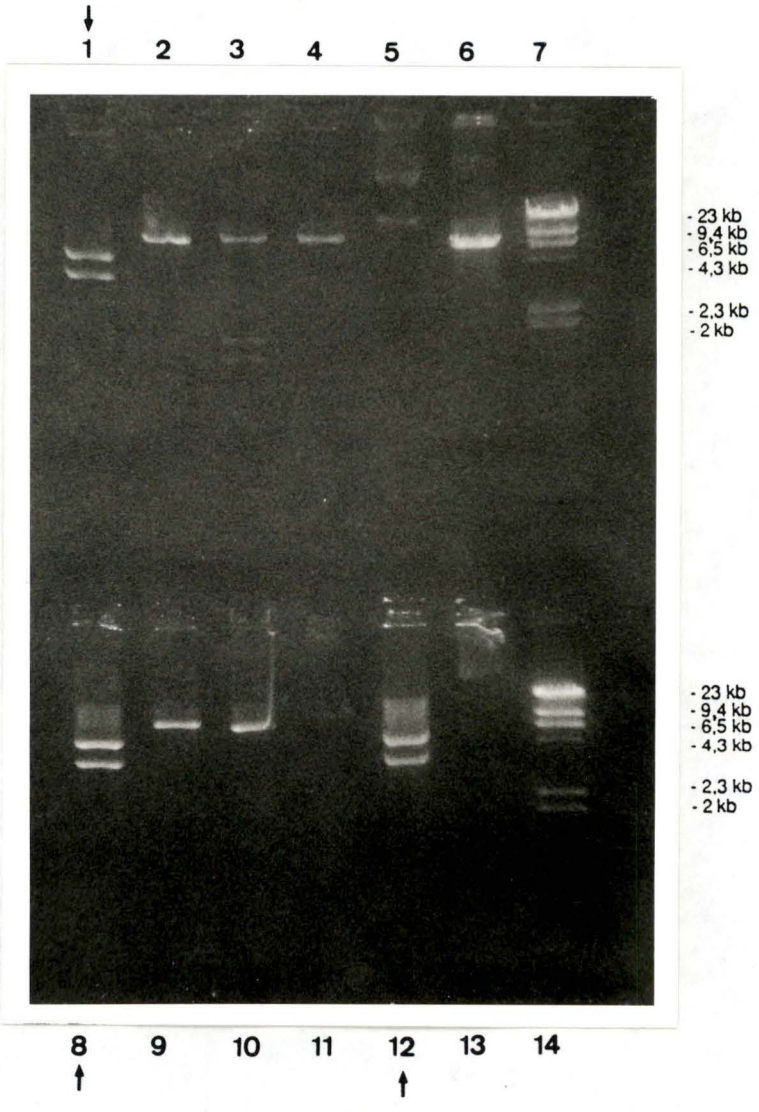


Figure III.8: Electrophorèse en gel d'agarose de la restriction par *Bgl* II de 12 clones transformants issus de la ligation entre le fragment *Nru* I-*Sph* I de 7,5 kb et le fragment *Pvu* II-*Sph* I de 1 kb.

Pistes 7 et 14: marqueur λ restreint par *Hin* dIII.

Pistes 1, 8 et 12: construction recherchée: pGI.PD.1 (5046 bp et 3532 bp).

A) Construction intermédiaire pGI.PD.1

A.1) Restrictions

Le vecteur YCp50 est restreint par les enzymes *Sph* I et *Nru* I et génère deux fragments de 7,5 kb et de 0,4 kb. La restriction est réalisée en deux étapes car les tampons pour ces deux enzymes sont différents. D'autre part, le plasmide pTC7 est restreint par les enzymes *Sph* I et *Pvu* II et génère quatre fragments de 2,5 kb, 2,2 kb, 1,4 kb et 1 kb. 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 (figure III.7).

Le mélange de restriction du plasmide pTC7 est ensuite déposé sur gel d'agarose et la bande de 1 kb est récupérée (voir Matériel et Méthodes).

A.2) Ligation

Une quantité équivalente à 200 ng du fragment *Sph* I- *Nru* I de 7,5 kb et 54 ng du fragment *Sph* I- *Pvu* II de 1kb sont mis en présence dans un tampon de ligation contenant une unité de T_4 DNA ligase. La ligation se fait 12h à 14°C et 2h à température ambiante.

A.3) Transformation et analyse des clones recombinants

Les cellules XL1 blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation puis étalées sur le milieu sélectf LB + ampicilline. Les colonies qui poussent sur ce milieu auront reçu le plasmide pGI.PD.1 qui porte le gène de résistance à l'ampicilline.

Douze colonies sont choisies au hasard et leur ADN est extrait par la méthode de miniprep (voir matériel et méthodes). L'analyse sur gel d'agarose de cet ADN après restriction *Bgl* II, nous donne bien le profil attendu pour plusieurs clones (figure III.8, pistes 1, 8, 12) c'est à dire deux fragments de 5046 bp et 3532 bp.

Nous avons donc construit le plasmide pGI.PD.1 et nous le préparons en grande quantité (maxiprep) afin de l'utiliser pour la construction de pGI.PD.3.

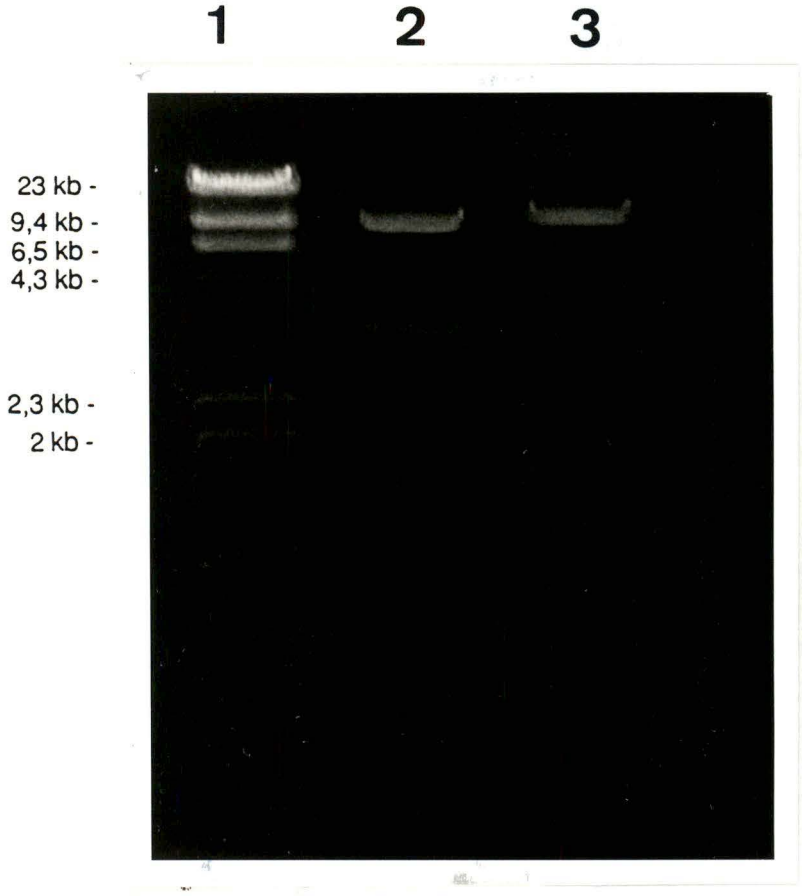


Figure III.9: Electrophorèse en gel d'agarose des plasmides pJV8 et pGI.PD.1 restreints par *Sph* I.

Piste 1: marqueur λ restreint par *Hin* dIII.

Piste 2: pJV8 restreint par *Sph* I (8 kb, 3,3 kb et 1,5 kb).

Piste 3: linéarisation de pGI.PD.1 par *Sph* I (8,5 kb).

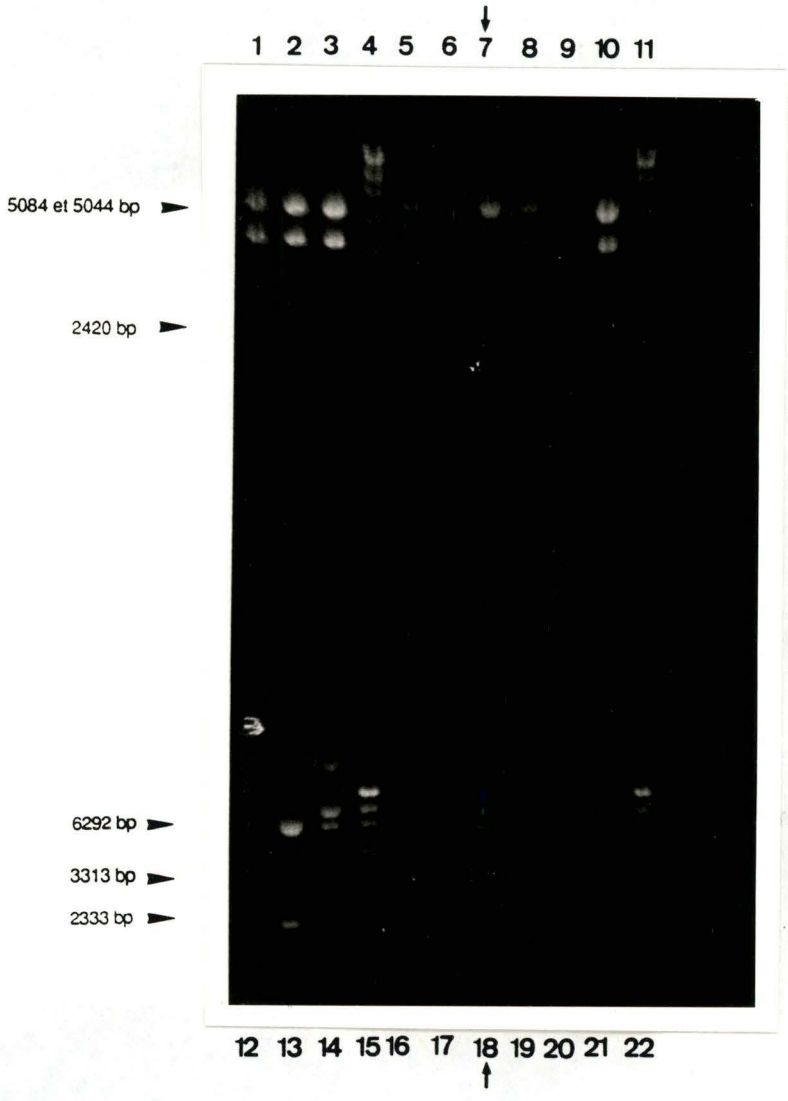


Figure III.10: Electrophorèse en gel d'agarose de la restriction par *Bgl* II (pistes 1 à 11) et par *Eco* RV (pistes 12 à 22) de 9 clones transformants issus de la ligation entre le fragment *Sph* I-*Sph* I de 3,3 kb et le plasmide pGI.PD.1.

Pistes 4, 11, 15 et 22: marqueur λ restreint par *Hin* dIII.

Piste 7: construction recherchée (5084 bp, 5044 bp et 2420 bp).

Piste 18: construction recherchée (6291 bp, 3313 bp et 2333 bp).

B) Construction de pGI.PD.3

B.1) Restrictions

Le plasmide pJV8 (figure III.9) est restreint par *Sph* I et génère trois fragments de 8 kb, 3,3 kb et 1,5 kb et le plasmide pGI.PD.1 est linéarisé par *Sph* I. Nous vérifions sur gel d'agarose avec un échantillon du mélange de restriction de pJV8 que nous obtenons bien les fragments attendus. De la même manière, nous vérifions la linéarisation du plasmide pGI.PD.1.

La bande de 3,3 kb issue de la restriction de pJV8 est extraite d'un gel d'agarose tandis que la matrice de pGI.PD.1 ouverte en *Sph* I est purifiée par extraction au phénol du mélange de restriction.

B.2) Ligation du fragment de 3,3 kb et de la matrice pGI.PD.1

Environ 250 ng du plasmide pGI.PD.1 linéarisé par *Sph* I est mis en présence de 200 ng du fragment *Sph* I-*Sph* Ide 3,3 kb et d'une unité de T_4 DNA ligase. La ligation se fait pendant 12h à 14°C.

B.3) Transformation et analyse des clones recombinants

Les cellules XL1 blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation puis étalées sur le milieu sélectif LB + ampicilline. Des cultures liquides sont ensemencées avec 24 colonies choisies au hasard. L'extraction rapide d'ADN plasmidique se fait à partir de ces cellules.

L'ADN plasmidique de chaque clone est restreint séparément par *Bgl* II et par *Eco* RV et analysé sur gel d'agarose 1% (figure III.10).

Le plasmide (piste 10) dont l'ADN donne les fragments de taille attendue est préparé en grande quantité (maxiprep) en vue de transformer la levure.

Ce plasmide est appelé pGI.PD.3.

III.2.1.2) Test de complémentation

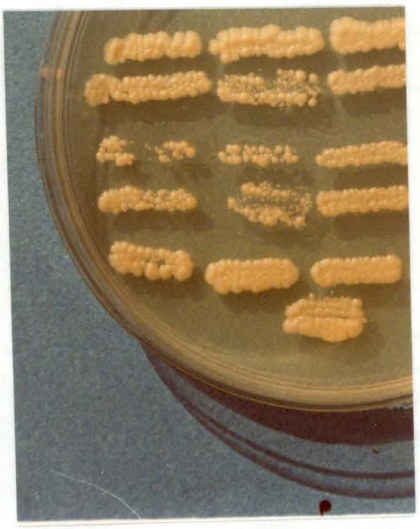
La souche mutante de levure Vd33d est transformée selon la méthode de Ito par 10 µg de pJV8, de pAG2, de pAG3, de pGI.PD.3 et de YCp50. Les transformants pJV8 et YCp50 serviront respectivement de contrôle positif et de contrôle négatif pour le test de

A

pAG2

pAG3

pGI.PD.3



B

pAG2

pAG3

pGI.PD.3



C

pAG2

pAG3

pGI.PD.3



Figure III.11: Photographie des répliques des colonies de levure après croisance sur le milieu 165-30:

A) Avant le test de coloration de mise en évidence l'activité phosphatase acide.

B) Après le test de coloration (milieu pauvre en Pi).

C) Après le test de coloration (milieu riche en Pi).

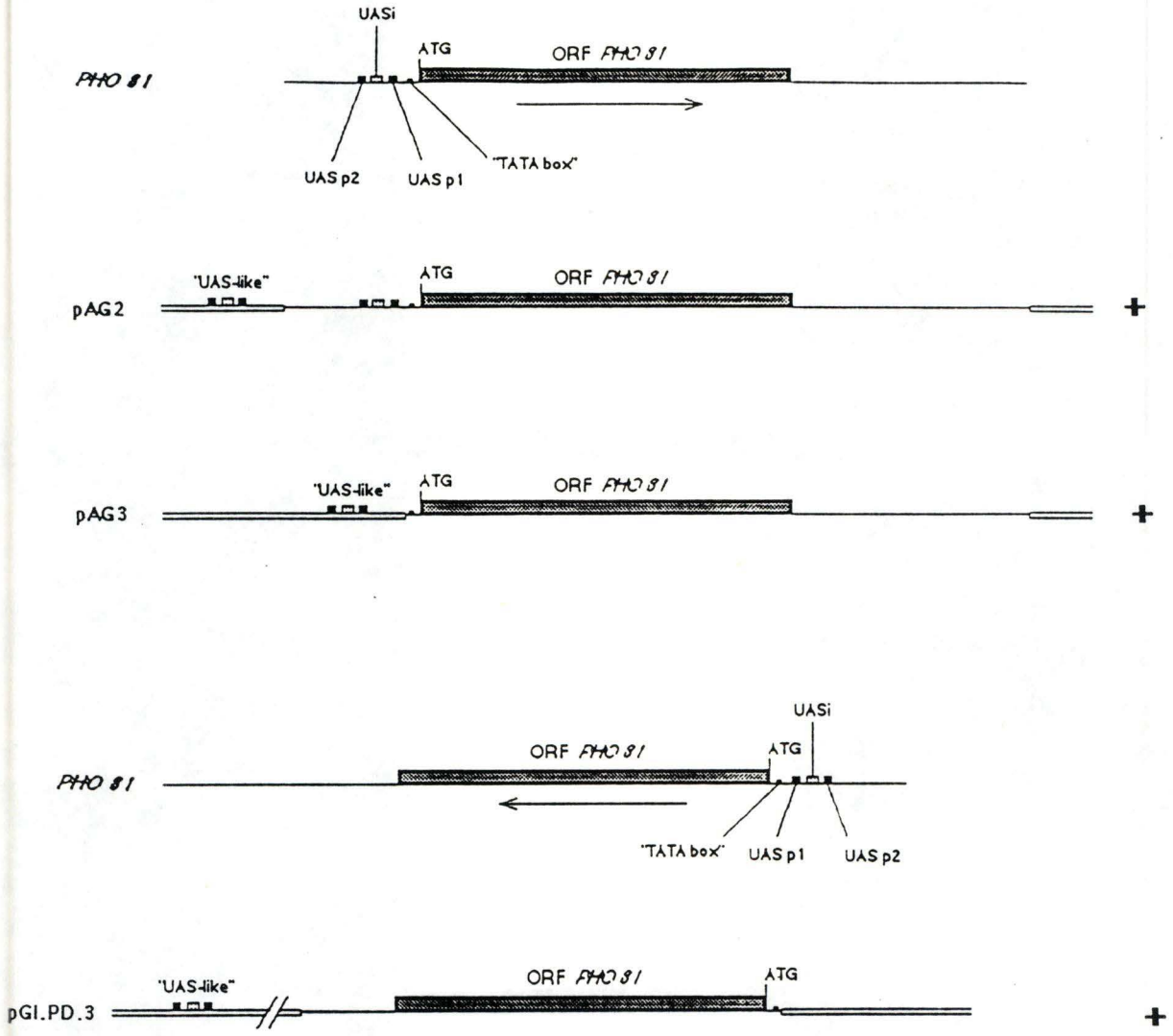


Figure III.12: Représentation shématique des constructions pAG2, pAG3 et pGI.PD.3 et résultat du test de complémentation de la mutation *pho 81* de Vd33d (+ signifie que la construction complémente Vd33d).

complémentation. Les transformants pAG2 et pAG3 ont été décrits précédemment; ils serviront ici de référence.

Après quatre jours de croissance sur milieu minimum à 30°C, des colonies sont repiquées sur le milieu 165-30 pauvre et riche en Pi. Le test de coloration est réalisé après deux jours de croissance à 30°C.

La figure III.11 montre que:

-les clones pJV8, pAG2, pAG3 et pGI.PD.3 possèdent une activité rAPase en conditions de faible concentration en Pi; cette activité ne s'exprime pas à haute concentration en Pi.

-le clone YCp50 (témoin négatif) ne possède pas d'activité rAPase.

III.2.1.3) Commentaire

La figure III.12 résume les résultats des tests de complémentation. Ces résultats montrent clairement que le plasmide pGI.PD.3 complémente la mutation *pho 81* de Vd33d (la coloration en milieu pauvre en Pi est clairement développée dans les colonies transformées) et qu'une régulation par le Pi subsiste (la répression en milieu riche en Pi est efficace). Cette complémentation se fait malgré la délétion des US de *PHO 81* et l'éloignement et le retournement des séquences du vecteur YCp50 supposées douées des mêmes propriétés.

Ceci nous amène à penser qu'il subsiste en dehors de la région US délétée dont le rôle ne saurait encore être établi, dans la zone jouxtant le promoteur proximal, des éléments permettant la transcription de *PHO 81* .

La complémentation des construction pAG3 et p.GI.PD.3 nous montre que les séquences "UAS-like" du vecteur n'ont en réalité pas de rôle fonctionnel car leur éloignement et leur retournement ne semble pas affecter pas la transcription de *PHO 81* délété de ses US. Nous ne tiendrons donc plus compte de ces "UAS-like" qui se sont révélées être une "vue de l'esprit" dans la suite de ce travail.

Cependant, le caractère essentiellement "tout ou rien" lié au niveau faible de sensibilité du test utilisé limite l'interprétation qu'on peut en faire. En particulier, nous ne pouvons savoir si la délétion est effectivement sans effet ou si celui-ci est simplement non détecté. En effet, le test coloré permet la simple détection d'activité phosphatase acide mais ne permet pas de quantifier des différences d'expression de celle-ci. De plus, l'effet observé (la coloration) résulte de l'activité de la phosphatase acide; nous visualisons donc un effet de fin de cascade (expression de *PHO 5*) et non l'effet transcriptionnel sur *PHO 81* qui est au sommet de cette cascade.

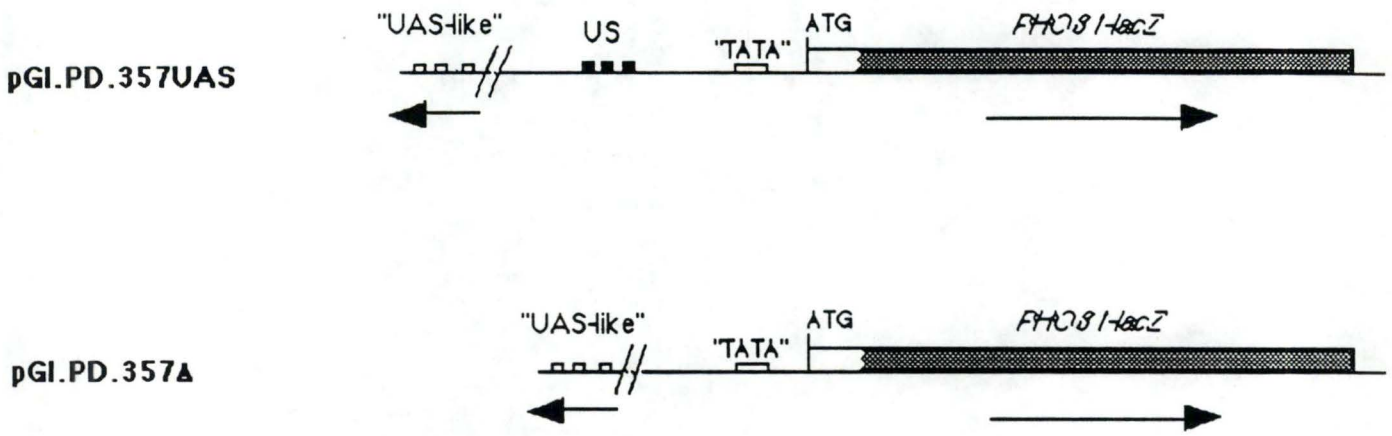


Figure III.13: Représentation shématique des gènes de fusion *PHO 81-lacZ* .

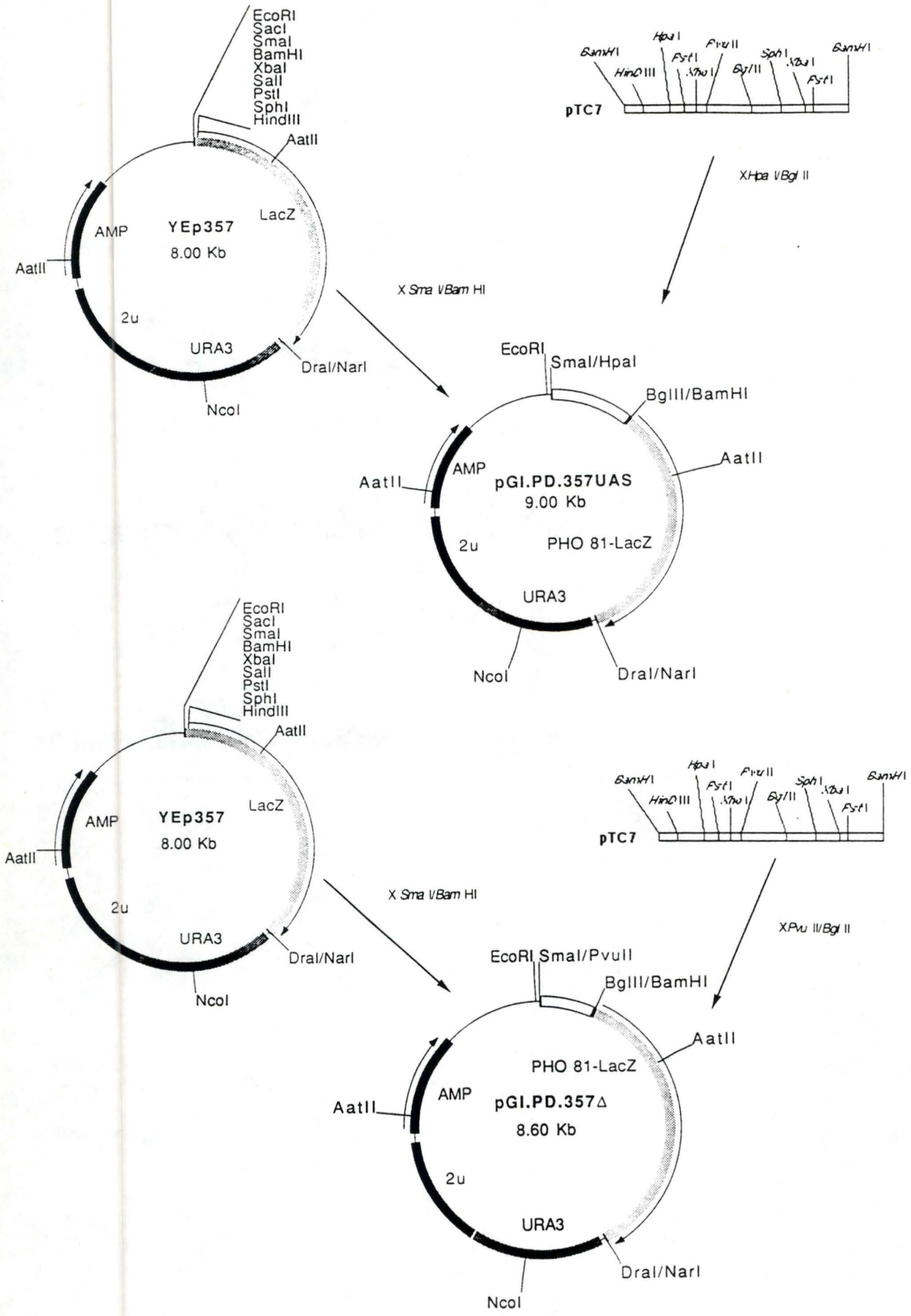


Figure III.13': Construction des plasmides pGI.PD.357UAS et PGI.PD.357Δ.

Bien qu'une concordance entre les sens des variations d'expression de ces deux gènes ait été montrée (Yoshida *et al.* , 1989), la mesure de l'activité phosphatase acide n'est pas la mesure de l'expression de *PHO 81* car il y a une série d'étapes intermédiaires entre l'expression de *PHO 81* et de *PHO 5* .

La régulation par le Pi toujours efficace laisse supposer qu'une zone de régulation par le Pi reste présente malgré la délétion. Cependant, nous ne pouvons en être certain et ce, parce que nous n'observons pas directement l'expression de *PHO 81* .

En vue de lever ces incertitudes, il convient donc de suivre directement l'expression de *PHO 81* . La protéine PHO 81, inconnue, ne peut être dosée et l'utilisation de "Northern" pour mesurer le taux d'ARN messagers présente des aléas et une mise en oeuvre complexe. Nous avons donc choisi d'utiliser un gène rapporteur (ou reporter) dont la régulation de l'expression reflètera la régulation de l'expression de *PHO 81* .

III.2.2) Etude de la régulation de *PHO 81* via un gène reporter

III.2.2.1) Le gène de la β–galactosidase

La β–galactosidase (encore appelée lactase) est une enzyme qui clive le lactose en ses deux constituants: le glucose et le galactose. Une particularité intéressante de la β–galactosidase est de cliver le substrat incolore X gal qui devient alors bleu. Une colonie de levure transformante (*Saccharomyces cerevisiae* ne possède pas naturellement d'activité ß-galactosidase) possédant une activité β–galactosidase vire au bleu en présence d'X gal. L'intensité de la coloration bleue sera fonction de la quantité de β–galactosidase produite.

Nous réaliserons deux constructions dans le vecteur YEp357. Ce vecteur contient le gène *lacZ* , codant pour la β–galactosidase, délété de ses séquences amont et de son ATG. Nous apporterons le promoteur et le début de la séquence codante de *PHO 81* . L'insertion se fera en respectant la phase de lecture (fusion en phase). Dès lors l'expression de la protéine β galactosidase reflètera la régulation transcriptionnelle s'exerçant suivant les signaux présents de *PHO 81* .

Une construction comprendra le gène *lacZ* avec le promoteur entier de *PHO 81* (pGI.PD.357UAS). Une autre construction comprendra le gène *lacZ* avec le promoteur de *PHO 81* délété des US (pGI.PD.357Δ) (figure III.13 et III.13').

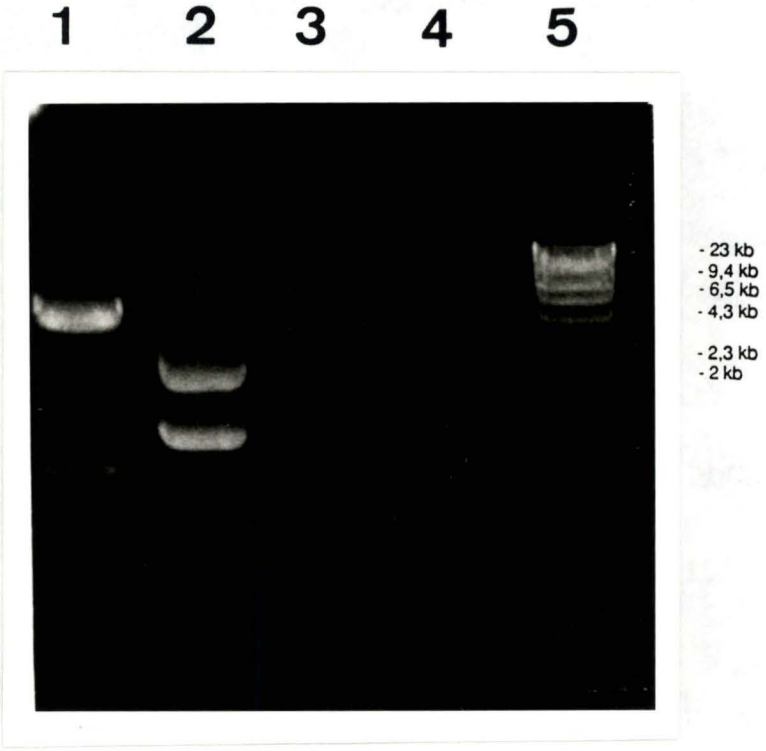


Figure III.14: Electrophorèse en gel d'agarose.

Piste 1: pTC7 restreint par *Bgl* II et *Hpa* I (5 kb et 1 kb).

Piste 2: pTC7 restreint par *Bgl* II et *Pvu* II (2,5 kb, 1,4 kb, 1,39 kb et 0,6 kb).

Piste 3: YEp357 restreint par *Sma* I (8 kb).

Piste 4: YEp357 restreint par *Bam* HI (8 kb).

Piste 5: marqueur λ restreint par *Hin* dIII.

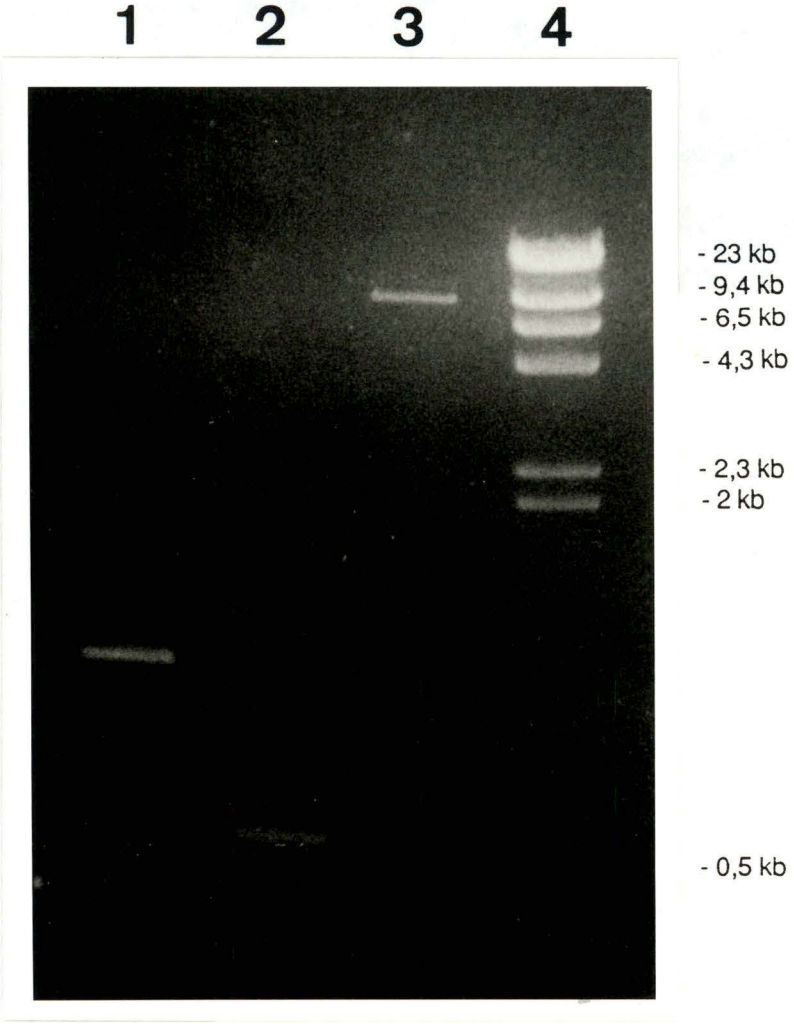


Figure III.15: Electrophorèse en gel d'agarose des fragments récupérés.

Piste 1: fragment de 1 kb (pTC7 restreint par *Bgl* II et *Hpa* I).

Piste 2: fragment de 0,6 kb (pTC7 restreint par *Bgl* II et *Pvu* II).

Piste 3: fragment de 8 kb (YEp357 restreint par *Bam* HI et *Sma* I).

Piste 4: marqueur λ restreint par *Hin* dIII.

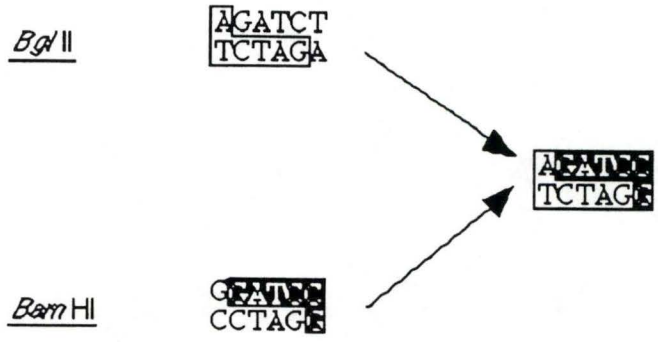


Figure II.16: Les enzymes *Bgl* II et *Bam* HI génèrent des extrémités saillantes compatibles.

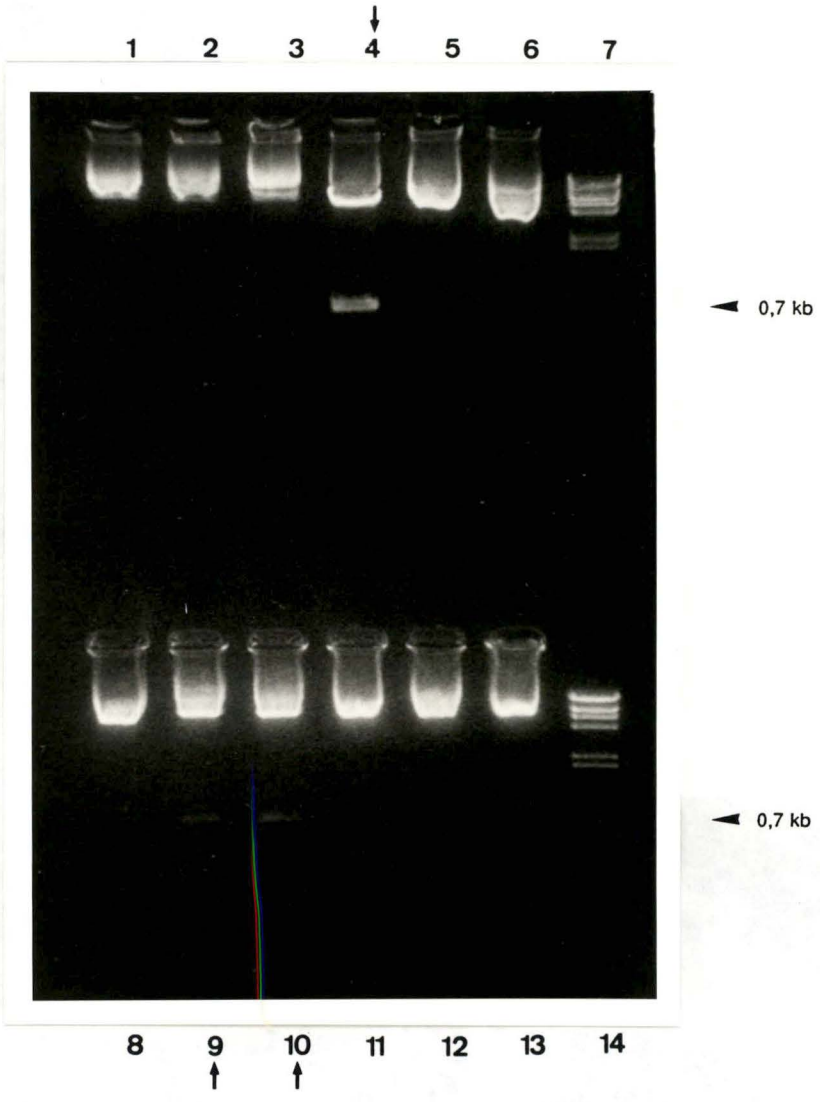


Figure III.17: Electrophorèse en gel d'agarose de la restriction par *Pst* I de 12 clones transformants issus de la ligation entre le fragment *Hpa* I-*Bgl* II de 1 kb et le fragment *Bam* HI-*Sma* I de 8 kb.

Pistes 4, 9 et 10: construction recherchée (7,3 kb et 0,7 kb).

Pistes 7 et 14: marqueur λ restreint par *Hin* dIII.

III.2.2.2) Construction de pGI.PD.357UAS

A) Restrictions

Le plasmide pTC7 est restreint par les enzymes *Hpa* I et *Bgl* II et génère deux fragments de 5 kb et de 1 kb. Le vecteur YEp357 est restreint au niveau du site multiple de clonage par les enzymes *Sma* I et *Bam* HI et génère deux fragments: un fragment de 8 kb et un très petit fragment de 3 bp. Cette restriction est réalisée en deux étapes car les tampons des deux enzymes sont différents.

Le fragment de 3 bp n'étant pas visible sur gel, nous testons auparavant séparément l'efficacité des deux enzymes sur le plasmide YEp357 (figure III.14).

L'électrophorèse en gel d'agarose 1% nous montre que nous obtenons les fragments attendus (figure III.14). Chaque mélange de restriction est alors déposé sur gel et les fragments d'intérêt sont récupérés, c-à-d le fragment *Hpa* I-*Bgl* II de 1 kb généré par la restriction de pTC7 et le fragment *Bam* HI-*Sma* I de 8 kb généré par la restriction de YEp357. Un échantillon des bandes récupérées est déposé sur gel pour en évaluer la quantité (figure III.15).

B) Ligation

Une quantité équivalente à 450 ng du vecteur YEp357 restreint par *Bam* HI et *Sma* I et 40 ng du fragment *Hpa* I-*Bgl* II de 1 kb sont rassemblés dans un mélange de ligation contenant 1 unité de T_4 DNA ligase. L'incubation se fait 12h à 14°C puis 2h à température ambiante.

La ligation peut se faire car les enzymes *Sma* I et *Hpa* I génèrent des bouts droits. La figure III.16 montre que les enzymes *Bam* HI et *Bgl* II génèrent des bouts protrudents et compatibles entre eux.

C) Transformation et analyse des clones recombinants

Les cellules XL1 blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation puis étalées sur milieu sélectif LB + ampicilline. Après 12h d'incubation à 37°C, l'ADN plasmidique de 12 colonies est extrait (miniprep) et analysé par restriction *Pst* I. L'électrophorèse en gel d'agarose nous montre bien le profil attendu (figure III.17).

Nous avons donc construit le plasmide pGI.PD.357UAS et nous le préparons en grande quantité (maxiprep) pour transformer la levure.

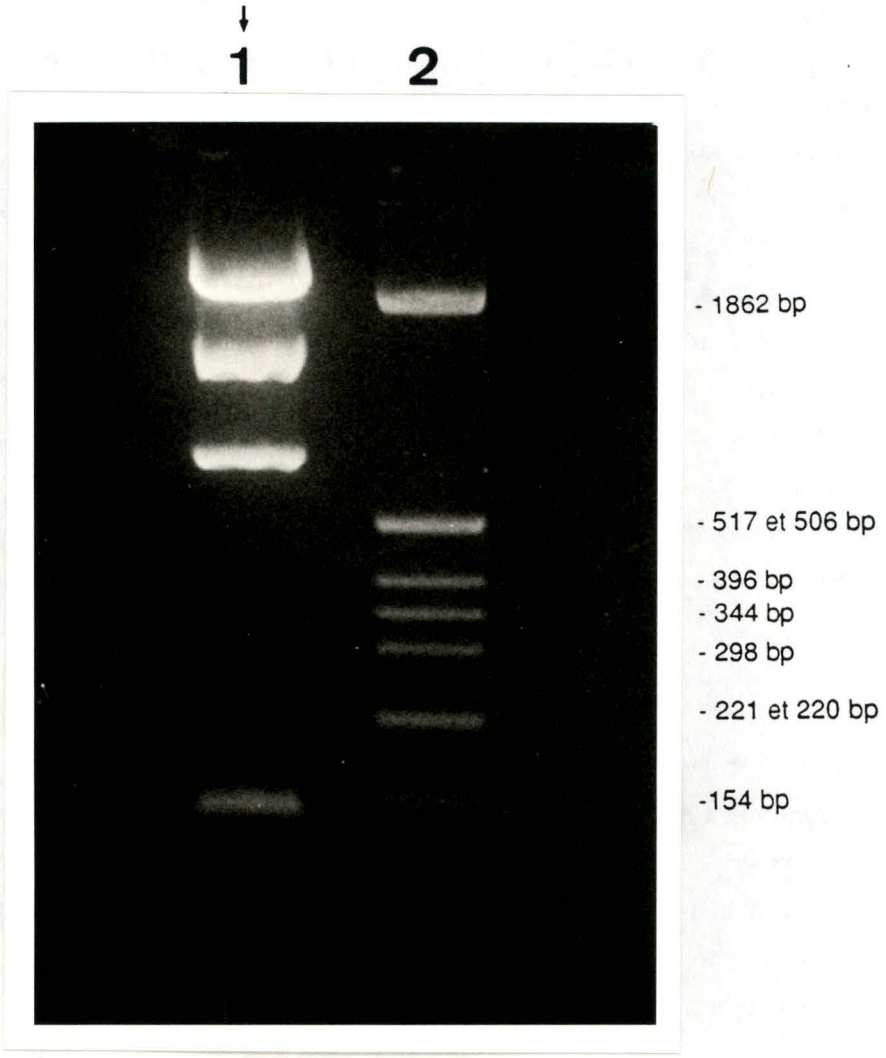


Figure III.18: Electrophorèse en gel d'agarose 2%.

Piste 1: pGI.PD.357Δ restreint par *Dra* I (6,5 kb, 1 kb, 0,55 kb et 0,15 kb).

Piste 2: marqueur pKK 233-2 restreint par *Hin* fI.

III.2.2.3) Construction de pGI.PD.357Δ

A) Restrictions

Le plasmide YEp357 subit les mêmes opérations que pour la construction précédente. Le plasmide pTC7 est restreint par les enzymes *Bgl* II et *Pvu* II et génère quatre fragments de 2,5 kb, 1,4 kb, 1,39 kb et 0,6 kb (figure III.14). Le mélange de restriction est déposé sur gel d'agarose et le fragment de 0,6 kb est récupéré. Un échantillon de la bande récupérée est déposé sur gel afin d'en évaluer la quantité (figure III.15).

B) Ligation

Une quantité équivalente à 450 ng de vecteur YEp357 restreint par les enzymes *Sma* I et *Bam* HI et 55 ng de la bande *Bgl* II-*Pvu* II de 0,6 kb sont rassemblés dans un mélange de ligation contenant une unité de T_4 DNA ligase. L'incubation se fait pendant 12h à 14°C puis 2h à température ambiante. La ligation peut se faire car les enzymes *Pvu* II et *Sma* I génèrent des bouts droits.

C) Transformation et analyse des clones recombinants

Les cellules XL1 blue compétentes sont transformées par le mélange de ligation puis étalées sur le milieu sélectif LB + ampicilline. Après analyse de l'ADN plasmidique de 12 colonies, nous obtenons la construction pGI.PD.357Δ (figure III.18). Nous préparons ce plasmide en grande quantité (maxiprep) pour transformer la levure.

III.2.2.4) Souches de levure mutantes déficientes en activté rAPase

Trois souches de levure nous ont été aimablement fournies par le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux. La souche YH40 (J. Boeke, Baltimore) est une souche de levure sauvage. Elle a été utilisée pour créer les souches VG151 et YH40-P2.

Dans la souche VG151 (V. Gilliquet, Gembloux), le gène *PHO 4* a été disrupté par le gène *LEU 2* . Cette souche est donc *pho 4* mutante. De même, dans la souche YH40-P2 (G. Berben et B. Horion, Gembloux), le gène *PHO 2* a été disrupté par le gène *LEU 2* . Cette souche est donc *pho 2* mutante.

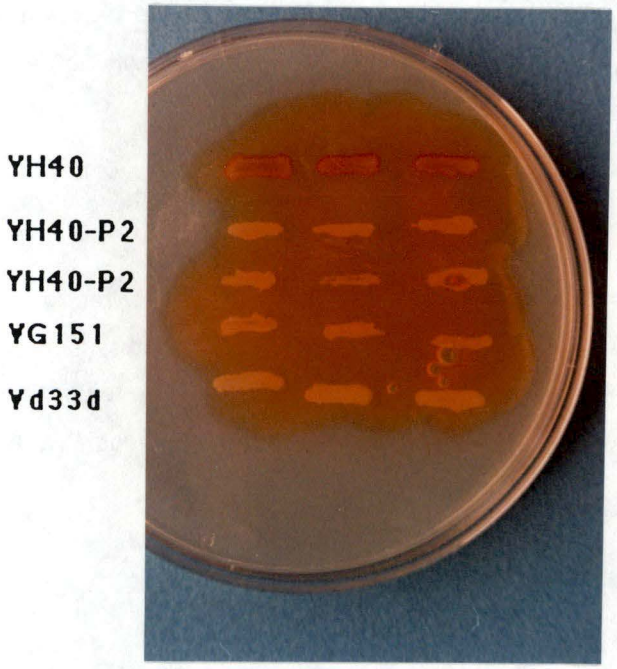


Figure III.19: Photographie des souches de levure sauvage YH40 et mutantes YH40-P2 (*pho 2*), VG151 (*pho 4*) et Vd33d (*pho 81*) après croissance sur le milieu 165-30 pauvre en Pi et test de coloration de l'activité phosphatase acide.

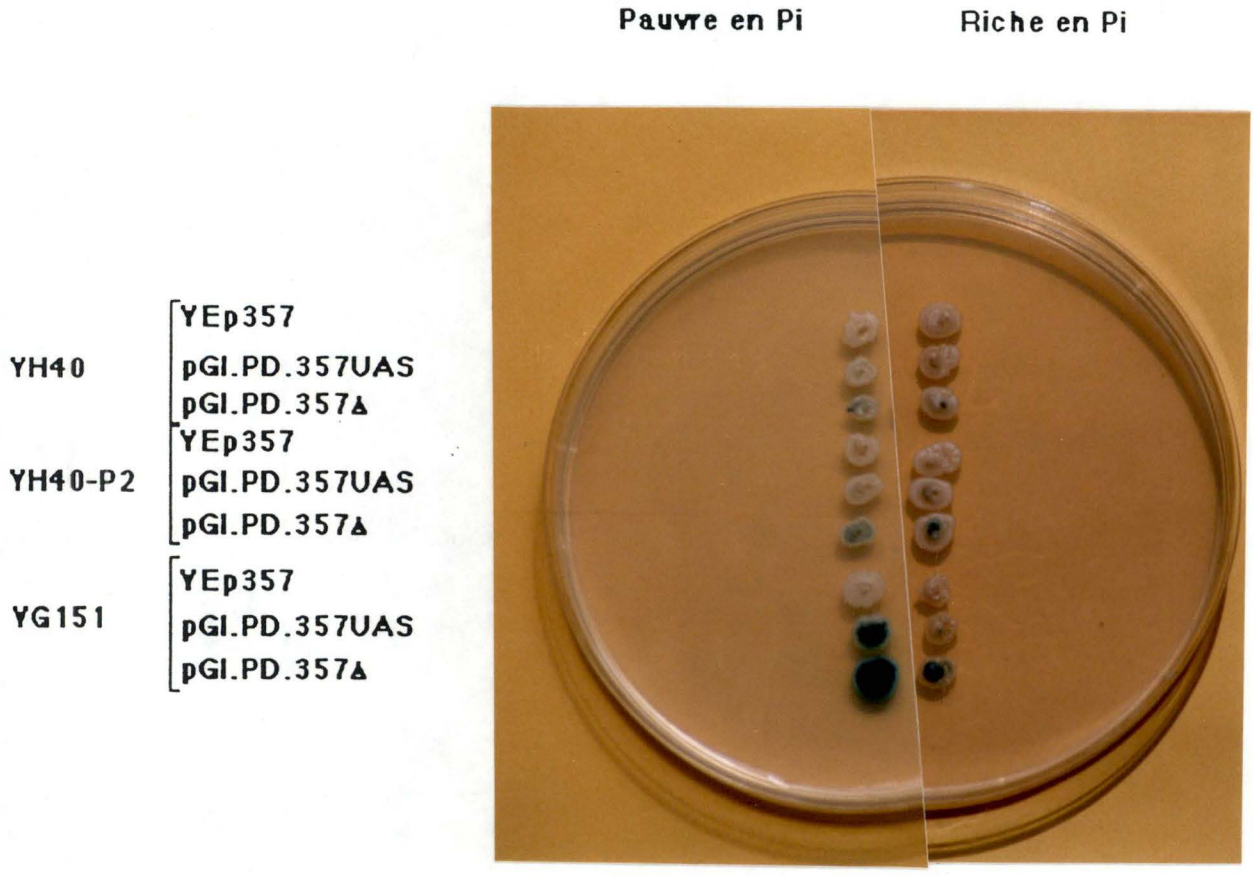


Figure III.20: Photographie des colonies de levure repiquées sur le milieu M7 pauvre et riche en phosphate inorganique.

		milieu pauvre en Pi	milieu riche en Pi
YH40 (sauvage)	YEp357	-	-
	pGI.PD.357UAS	+	-
	pGI.PD.357Δ	++	+
YH40-P2 (*pho 2*)	YEp357	-	-
	pGI.PD.357UAS	+	-
	pGI.PD.357Δ	++	+
VG151 (*pho 4*)	YEp357	-	-
	pGI.PD.357UAS	++	+
	pGI.PD.357Δ	+++	++

Figure III.21: Résumé des résultats de la mesure de l'expression des gènes hybrides *PHO 81-lacZ*.

- pas de coloration

+ légère coloration bleue

++ coloration bleue

+++ coloration bleue intense

Ces deux dernières souches de levure sont *PHO 3*$^+$, elles possèdent donc une légère activité phosphatase acide due au gène *PHO 3* codant pour la phosphatase acide constitutive (figure III.19).

III.2.2.5) Mesure de l'expression du reporter ß-galactosidase par test coloré sur boîte de Pétri

Les souches YH40, VG151 et YH40-P2 ont été transformées selon la méthode de Ito par les plasmides YEp357, pGI.PD.357UAS et pGI.PD.357Δ. Le plasmide YEp357 servira de contrôle négatif pour le test de coloration.

Après quatre jours de croissance sur milieu minimum supplémenté en leucine, histidine et tryptophane, une colonie prise au hasard est repiquée sur le milieu M7-Xgal riche ou pauvre en phosphate inorganique.

La figures III.20 montre les colonies repiquées sur ces milieux après 10 jours de croissance à 30°C.

III.2.2.6) Commentaire

La figure III.21 résume les résultats obtenus après 10 jours de croissance des colonies des divers transformants (YEp357, pGI.PD.357UAS et pGI.PD.357Δ) sur milieu riche ou pauvre en phosphate inorganique.

On constate que pour les transformants pGI.PD.357UAS, il y a une répression de l'expression du gène hybride en milieu riche en phosphate démontrant qu'il y a une régulation de l'expression de *PHO 81* par le phosphate. On constate aussi que cette régulation s'opère malgré l'effet de dosage génique engendré par le vecteur qui est un vecteur à copies multiples.

La construction où les US sont délétées (pGI.PD.357Δ) subit toujours une régulation par le phosphate inorganique.

Il doit donc y avoir une région de régulation par le Pi qui subsiste malgré la délétion des US de *PHO 81* .

Dans toutes les souches, en conditions d'activation (milieu pauvre en Pi), la délétion des US entraîne une activation de l'expression du gène reporter ce qui est en faveur d'un rôle répresseur plutôt qu'activateur comme présupposé, de la région US délétée .

Il semble donc que nous ayons mis en évidence une région URS.

Cette conclusion est renforcée par l'observation du mutant *pho 4* transformé par les plasmides porteurs du gène hybride *PHO 81 - lacZ* . On constate en effet que l'absence de la

protéine PHO 4 (souche VG151) augmente l'expression du gène *lacZ*. De plus on observe un même niveau d'expression dans le sauvage comportant le gène hybride sans les US de *PHO 81* (pGI.PD.357Δ)et dans le mutant *pho 4* transformé par pGI.PD.357UAS. Donc, l'absence de la région de reconnaissance du facteur trans-répresseur (YH40-pGI.PD.357Δ) ou l'absence de ce facteur trans-répresseur (VG151-pGI.PD.357UAS) conduit au même niveau d'expression. On peut donc supposer que PHO 4 est un facteur trans répresseur susceptible de se lier à la région US de *PHO 81* . L'absence de ce facteur supprime l'effet répresseur exercé via cette région.

Rappelons que deux sites potentiels de liaison à l'ADN de la protéine PHO 4 (UAS p1 et UAS p2) avaient été mis en évidence par alignement de séquences. Il nous est cependant impossible de savoir ici si ces deux régions sont toutes deux des sites effectifs de liaison à l'ADN de PHO 4 et si ces deux régions sont des région URS.

On constate aussi en comparant l'expression du gène hybride dans le mutant *pho 4* qu'il y a une augmentation de l'expression dans les transformants pGI.PD.357Δ par rapport aux transformants pGI.PD.357UAS. Dans ce cas, le facteur PHO 4 est toujours absent et l'enlèvement des US éleve augmente le niveau d'expression. Il semble donc que le facteur PHO 4 n'exerce pas seul la répression car si c'était le cas, il n'y aurait pas de différence d'expression.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence d'expression du gène reporter chez le mutant *pho 2* (YH40-P2) par rapport à la souche sauvage (YH40). Nous ne pouvons donc pas attribuer à la protéine PHO 2, une fonction qui s'exercerait via la région US.

L'UASi mise en évidence chez *PHO 81* par alignement de séquences, diffère de celle de *PHO 5* bien que similaire à celle du gène *HIS 4* mais avec un mismatch de 3 bp. Nous ne pouvons donc être certain que l'UASi trouvée chez *PHO 81* soit effectivement un domaine de liaison à l'ADN de la protéine PHO2.

En conclusion, nous avons mis en évidence que la région présupposée activatrice de *PHO 81* (US) est en réalité une région URS donc de régulation négative. La protéine PHO 4 semble être un facteur négatif se liant à cette région URS. Nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle de la protéine PHO 2 sur cette région.

Cependant, le vecteur utilisé est un vecteur à copies multiples ce qui peut engendrer un biais dans l'interprétation de ces résultats. En effet, il se peut qu'un effet de dosage génique s'opère et que la région URS que nous avons mis en évidence soit en fait une région activatrice souffrant d'un manque de facteurs trans. Ceux-ci, insuffisants pourraient engendrer un effet inverse à celui qui s'opère naturellement.

L'interprétation en faveur d'un trans-répresseur (PHO 4) exerçant son action via une région URS semble difficilement conciliable avec les résultats du groupe d'Oshima (Yoshida *et al.* , 1989) qui observaient une diminution des transcrits de *PHO 81* chez les mutants *pho 2* et *pho 4* .

Cependant, notre étude s'est faite sur un gène porté par un plasmide donc dans une situation différente de celle qu'il occupe naturellement à son locus chromosomique. De plus, le fragment génomique que nous avons utilisé ne comporte pas les séquences se trouvant naturellement en amont de la région URS que nous avons mis en évidence. Il est donc très probable qu'en amont de la région URS, se trouvent des séquences UAS reconnues par les protéines PHO 2 et PHO 4 comme le laissent supposer les résultats de Yoshida (1989). L'expression de *PHO 81* résulterait ainsi d'une modulation par les facteurs transactifs PHO 4 et PHO 2 via des séquences amont UAS et URS. Les URS seraient donc situées entre des séquences UAS (non identifiées) et la "TATA box" ce qui correspondrait à la situation habituellement observée chez les gènes de levure possèdant des URS (Guarente, 1984; Kingsman et Kingsman, 1988; Struhl, 1989).

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Dans le but d'étudier la place du gène *PHO 81* dans la cascade de régulation du gène *PHO 5* codant pour la phosphatase acide répressible, responsable du contrôle du métabolisme du phosphate inorganique chez la levure, ce gène a été cloné (Vandenhaute *et al.* , 1988) et séquencé (Coche *et al.* , 1990).

La découverte dans *PHO 81* d'une région à séquences UAS similaires (US) à celles observées en amont de *PHO 5* (Grifnée, 1990) a permis de supposer qu'elles étaient à l'origine de la réponse régulatrice coordonnée de ces deux gènes mise en évidence par Yoshida *et al.* (1989).

Dans un premier temps, nous avons voulu distinguer dans la région 5' amont les sites et les signaux caractéristiques impliqués dans l'initiation de la transcription et dès lors cibles pour une approche rétrogénétique des mécanismes régulateurs du gène que nous désirions entreprendre.

Une expérience de "primer extension" a permis de mettre en évidence deux régions de fin de transcription réverse portant chacunes deux sites +1 potentiels voisins. La position relative des "TATA box" et du codon ATG par rapport à ces deux régions porte à croire que seuls les nucléotides A et G de la région -15 -16 situés à 15 et 16 bp en amont de l'ATG correspondent à des sites d'initiation de la transcription fonctionnels. La seconde région située dans l'ORF (8 et 9 bp en aval de l'ATG) est une zone d'arrêt de l'extension d'amorce peut-être due à une structure secondaire (non détectée) dans le messager de *PHO 81* .

Par homologies de séquences, deux "TATA box" présomptives ont été mises en évidence (Grifnée,1990): une située à -205 bp de l'ATG et l'autre située à -86 bp de l'ATG. La localisation du site d'initiation de la transcription de transcription (cfr ci-dessus) suggère que la "TATA box" -86 est la "TATA box" fonctionnelle. En effet, sa situation par rapport au site d'initiation de la transcription (70 bp en amont) est en accord avec la fenêtre de 40 à 110 bp séparant la "TATA box" et le site d'initiation de la transcription décrite par de nombreux auteurs (Chen et Struhl, 1985; Mc Neil et Smith, 1986; Healy *et al.* , 1987; Kingsman et Kingsman, 1988; Struhl, 1989).

Le fait que l'homologie de la "TATA box" avec les consensus "TATA" soit relativement médiocre est à mettre en rapport avec la présence de "CT rich-blocks" dont on sait qu'ils caractérisent des gènes hautement exprimés ou des gènes dépourvus de "TATA box" caractéristique.

Enfin, la localisation du site +1 nous a permis de confirmer la localisation de l'ATG à 15 bp du site d'initiation de la transcription de transcription. En effet, les autres ATG en phase sont situés à plus de 1000 bp du site d'initiation de la transcription de transcription et les ATG proches du site d'initiation de la transcription mais compris dans une autre phase de lecture n'ouvrent pas d'ORF suffisamment longue pour pouvoir être considérée comme telle.

Dans un second temps, nous avons voulu éprouver le rôle éventuel des US du gène *PHO 81* . Nous disposions des plasmides pAG2 et pAG3 réalisés par A. Grifnée lors d'un travail précédent et contenant respectivement le gène *PHO 81* entier muni de ses séquences de régulation et le gène *PHO 81* délété de ses US (Grifnée, 1990). Ces deux constructions complémentaient la mutation *pho 81* et nous avons confirmé ces résultats.

A ce stade, le rôle fonctionnel de ces US était mis en question puisque leur ablation semblait sans effet. Cependant, l'examen de la séquence du vecteur de clonage (YCp50) a mis en évidence trois séquences ("UAS-like") similaires aux trois UAS présumées de *PHO 81* (Grifnée, 1990). Un rôle de remplacement des US de *PHO 81* pouvait donc être postulé pour ces "UAS-like".

Afin d'éprouver cette hypothèse, nous avons décidé de soustraire le gène à l'influence des "UAS-like" du vecteur. Pour cela, nous avons construit le plasmide pGI.PD.3 dans lequel l'insert *Pvu* II - *Sph* I est retourné ce qui a pour effet de mettre la zone d'initiation de la transcription hors de portée des "UAS-like" du vecteur.

Nos résultats montrent que ce plasmide complémente la mutation *pho 81* de la souche Vd33d. Le gène *PHO 81* continue d'être exprimé (la coloration rouge est clairement développée dans les colonies transformées) et régulé par la concentration en Pi (la répression en milieu riche en Pi est efficace); cela, malgré la délétion des US de *PHO 81* et des séquences vecteurs supposées douées des mêmes propriétés. Ceci nous amène à penser qu'il subsiste en dehors des US délétées dont le rôle n'est pas établi, dans la zone jouxtant le promoteur proximal, des éléments permettant la transcription de *PHO 81* .

La complémentation de Vd33d par les constructions pAG3 et p.GI.PD.3 nous montre que les séquences "UAS-like" du vecteur n'ont en réalité pas de rôle fonctionnel car leur éloignement et leur retournement ne semble pas affecter pas la transcription de *PHO 81* délété

de ses US. Ces "UAS-like" qui se sont révélées être une "vue de l'esprit" n'ont donc plus été prises en compte dans la suite de ce travail.

La régulation par le Pi, toujours efficace, laisse supposer qu'une zone de régulation par le Pi reste présente malgré la délétion.

Cependant, le caractère essentiellement "tout ou rien" lié au niveau faible de sensibilité du test utilisé limite cependant l'interprétation qu'on peut en faire. En particulier, nous ne pouvons savoir si la délétion est effectivement sans effet ou si celui-ci est simplement non détecté. En effet, le test coloré permet la simple détection d'activité phosphatase acide mais ne permet pas de quantifier des différences d'expression. De plus, l'effet observé (la coloration) résulte de l'activité de la phosphatase acide; nous visualisons donc un effet de fin de cascade (expression de *PHO 5*) et non l'effet transcriptionnel sur *PHO 81* qui est au sommet de cette cascade. Bien qu'une concordance entre les sens des variations d'expression de ces deux gènes ait été montrée (Yoshida *et al.* , 1989), la mesure de l'activité phosphatase acide n'est pas la mesure directe de l'expression de *PHO 81* car il y a une série d'étapes intermédiaires entre l'expression de *PHO 81* et de *PHO 5* .

Pour lever l'incertitude subsistant sur le rôle des US de *PHO 81* , il convient de suivre directement l'expression de celui-ci. A priori, cela peut être obtenu par quantification des ARN messagers ou de la protéine correspondante. Celle-ci, inconnue, ne peut être dosée. Quant à l'utilisation de "Northern" pour mesurer le taux d'ARNm, nous lui avons préféré la technique du reporter, plus simple et présentant moins d'aléas.

Nous avons réalisé des constructions (pGI.PD.357UAS et pGI.PD.357Δ) fusionnant le promoteur et le début de l'ORF de celui-ci à l'ORF d'un gène reporter (le gène *lacZ*), qui nous permettent de suivre directement le rôle régulateur tenu par les séquences amont de *PHO 81* via l'activité ß-galactosidase aisément détectée

Les résultats obtenus confirment que la région du promoteur proximal seule suffit pour l'expression du gène et pour la régulation par le phosphate. En outre, l'ablation de la région US de *PHO 81* conduit à une augmentation sensible de l'expression qui se manifeste par une intensité de couleur plus soutenue des colonies transformées par pGI.PD.357Δ contenant le gène reporter délété des US. Cette dernière région exerce donc un effet répresseur sur l'expression de *PHO 81* en conditions pauvres en Pi. Notons ici que des dosages phosphatase acide pourraient être réalisés pour vérifier au niveau de *PHO 5* la modulation de *PHO 81* que nous avons maintenant mise en évidence par le gène reporter. L'examen des tests colorés

phosphatase acide dont on a déjà mentionné leur caractéristique "tout ou rien" ne permet pas de suivre précisément le taux d'expression de *PHO 5* .

Il apparaît donc que des éléments de séquence à fonction URS sont présents dans la région délétée. L'hypothèse d'un mécanisme de trans-répression exercé par l'intermédiaire de facteurs trans et d'éléments cis (URS) est renforcée par l'observation d'une augmentation, aussi bien en milieu pauvre que riche en Pi, du niveau d'expression du reporter dans le mutant *pho 4* .

On constate en effet que l'absence de la protéine PHO 4 dans le mutant *pho 4* (souche VG151) augmente l'expression du gène *lacZ* . De plus on observe un même niveau d'expression dans le sauvage transformé par pGI.PD.357Δ et dans le mutant *pho 4* transformé par pGI.PD.357UAS. Donc, l'absence de la région de reconnaissance du facteur trans-répresseur (YH40-pGI.PD.357Δ) ou l'absence de ce facteur trans-répresseur (VG151-pGI.PD.357UAS) conduit au même niveau d'expression. On peut donc supposer que PHO 4 est un facteur trans répresseur susceptible de se lier à la région US de *PHO 81* . L'absence de ce facteur supprime l'effet répresseur exercé via cette région.

Rappelons que deux sites potentiels de liaison à l'ADN de la protéine PHO 4 (UAS p1 et UAS p2) avaient été mis en évidence par alignement de séquences. Il nous est cependant impossible de savoir ici si ces régions sont toutes deux des sites effectifs de liaison à l'ADN de PHO 4 et si ces deux régions sont toutes deux des région URS. Rappelons aussi que seule une de ces deux régions (UAS_{p2}) comporte le motif CACGTG qui est le motif de liaison à l'ADN de la protéine PHO 4 (Hayashi et Oshima, 1991). La région UAS_{p1} est cependant similaire à l'UAS_{p1} de *PHO 5* qui ne comporte pas non plus ce motif mais un motif proche: CACGTT (CAAGTT chez *PHO 81*).

On constate aussi en comparant l'expression de la ß-galactosidase du gène de fusion dans le mutant *pho 4* qu'il y a une expression plus élevée dans les transformants pGI.PD.357Δ par rapport aux transformants pGI.PD.357UAS. Dans ce cas, le facteur PHO 4 est toujours absent et l'enlèvement des US élève encore le niveau d'expression du reporter. Il semble donc que le facteur PHO 4 n'exerce pas seul la répression car, si c'était le cas, il n'y aurait pas de différence d'expression entre ces deux constructions.

Un effet semblable n'a pu être mis en évidence dans le mutant *pho 2* par le test sur boîte (coloration due à l'activité ß galactosidase); une mesure directe de l'activité ß-galactosidase pourraît être réalisée sur des extraits cellulaires.

Cependant, le vecteur utilisé est un vecteur à copies multiples ce qui peut engendrer un biais dans l'interprétation de ces résultats. En effet, il se peut qu'un effet de dosage génique s'opère et que la région URS que nous avons mise en évidence soit en fait une région

activatrice souffrant d'un manque de facteurs trans. Le nombre insuffisants de ceux-ci pourrait engendrer un effet inverse à celui qui s'exerce naturellement.

Cet effet pourrait être supprimé en clonant nos gènes de fusion *PHO 81-lacZ* dans un vecteur monocopie (YCp50).

L'ensemble de ces résultats et l'interprétation en faveur d'une trans-répression modulée par la protéine PHO 4 et vraisemblablement exercée via les séquences URS présentes en amont du gène *PHO 81* semble difficilement conciliable avec un travail récent du groupe d'Oshima (Yoshida *et al.* , 1989). En effet, ces auteurs observent une diminution des transcrits *PHO 81* chez les mutants *pho 2* et *pho 4* , l'effet étant plus marqué chez le mutant *pho 4* et en conditions de carence en Pi. Ils ont donc conclu à l'existence pour *PHO 81* d'un système régulateur comparable à ce qui est connu pour *PHO 5* , c-à-d positif.

Cependant, notre étude s'est faite sur un gène porté par un plasmide donc dans une situation différente de celle qu'il occupe naturellement à son locus chromosomique. De plus, le fragment génomique que nous avons utilisé ne comporte pas les séquences se trouvant naturellement en amont de la région URS que nous avons mis en évidence. Il est donc possible qu'en amont de la région URS, se trouvent des séquences UAS reconnues par les protéines PHO 2 et PHO 4 comme le laissent supposer les résultats de Yoshida (1989). L'expression de *PHO 81* résulterait ainsi d'une modulation par les facteurs transactifs PHO 4 et PHO 2 via des séquences amont UAS et URS. Les URS seraient donc situées entre des séquences UAS (non identifiées) et la "TATA box" ce qui correspondrait à la situation habituellement observée chez les gènes de levure possèdant des URS (Guarente, 1984; Kingsman et Kingsman, 1988; Struhl, 1989).

Les conséquences de la délétion de séquences amont d'un gène peuvent aussi s'expliquer par un changement de la structure tridimensionelle de cette région qui modifierait les interactions avec des facteurs trans. Ainsi, la structure de la chromatine et en particulier le déplacement des nucléosomes dans la région promoteur d'un gène conditionne l'expression de celui-ci (Han et Grunstein, 1988). Dans la régulation du gène *PHO 5* , les nucléosomes ont une influence capitale (Vögel *et al.* , 1990). Les nucléosomes pourraient donc aussi influencer la régulation de *PHO 81* . Nous ne pouvons pas exclure que la délétion des US modifie la structure de la chromatine du promoteur de *PHO 81* et influence ainsi l'expression du gène. L'équipe de Vögel a entrepris d'étudier ce point de la même manière qu'ils l'ont fait pour *PHO 5* mais cette fois sur le gène *PHO 81* que nous leur avons fait parvenir très récemment.

Pour réaliser une situation strictement homologue de celle du gène à son locus chromosomique (présence des séquences en amont des US étudiées lors de ce travail), on

pourrait "transplacer" le gène *PHO 81* par le gène de fusion ou simplement intégrer celui-ci au locus du gène chromosomique (et sélectionner les *lacZ*$^+$ stables).

La suite du travail devra substantier l'hypothèse d'un rôle répresseur de l'interaction $URS_{PHO\ 4}$ - protéine PHO 4. Dans ce but, les fusions réalisées pourront être utilisées pour tester par voie rétrogénétique, le rôle des éléments cis; par exemple, une simple restriction *Pml* I (enzyme reconnaissant le motif CACGTG qui est aussi le motif de liaison à l'ADN de la protéine PHO 4) et l'insertion d'un "linker" dans ce site, devrait inactiver une des $URS_{PHO\ 4}$.

Des expériences complémentaires de gel retard et de protection à la nucléase S1 devraient être réalisées pour démontrer la fixation des facteurs trans et délimiter précisément les éléments cis.

Mentionnons aussi que l'outil confectionné, le plasmide pGI.PD.357Δ comporte un promoteur fort et pourrait d'avantage être aménagé en vecteur de surexpression régulable chez la levure.

V. BIBLIOGRAPHIE

Almer, A., Rudolph H., Hinnen, A. and Hörz, W. (1986) Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO 5* promoter upon *PHO 5* induction releases additional upstream activating DNA elements. EMBO J. *5* , 2689-2696.

Arndt, K., Styles, C. and Fink, G.R. (1987) Multiple global regulators control *HIS 4* transcription in yeast. Science *237* , 874-880.

Berben, G. (1991) Etude des éléments activateurs PHO 2 et PHO 4 impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène *PHO 5* de la levure *Saccharomyces cerevisiae* . Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

Berben, G., Gilliquet, V., Legrain M. and Hilger, F. (1990) Toxicity of overexpressed *PHO 2* in yeast is due to the homeobox. Arch. Int. Physiol. Biochim. *98* , B116.

Berben, G., Legrain, M. and Hilger, F. (1988) Studies on the structure, expression and function of the yeast regulatory gene *PHO 2* . Gene *66* , 307-312.

Berben, G., Legrain, M. and Hilger, F. (1990) DNA-binding and activation domains of the yeast regulatory proteins PHO 2 and PHO 4. Arch. Int. Physiol. Biochim. *97* , B58.

Bergman, L.W., McClinton, D.C., Madden, S.L. and Preis, L.H. (1986) Molecular analysis of the DNA sequences involved in the transcriptional regulation of the phosphate-repressible acid phosphatase gene *PHO 5* of *Saccharomyces cerevisiae* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA *83* , 6070-6074.

Boeke, J.D., Lacroute, F. and Fink, G.R. (1984). Mol. Gen. Genet. *197* , 345-346.

Bostian, K.A., Lemire J.M. and Halvorson, H.O. (1983). Mol. Cell. Biol. *3* , 839-853.

Braus, G., Mösh, H.U., Vogel, K., Hinnen, A. and Hütter, A. (1989) Interpathway of the *TRP 4* gene of yeast. EMBO J. *8* , 939-945.

Brent, R. and Ptashne, M. (1984) A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. Nature *312* , 612-615.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with ß-galactosidase section. Biotechniques *5* , 376-379.

Bürling, T.R. (1988) The yeast regulatory gene *PHO 2* 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.

Cheong, C., Varani, G. and Ignacio Tinoco, Jr (1990) Solution structure of an unusually stable RNA hairpin, 5'GGAC(UUCG)GUCC. Nature *346* , 680-682.

Coche, T., Prozzi, D., Legrain, M., Hilger, F. and Vandenhaute, J. (1990) Nucleotide sequence of the *PHO 81* gene involved in the regulation of the repressible acid phosphatase gene in *Saccharomyces cerevisiae* . Nucl. Acids Res. *18* , 2176.

Dobson, M.J., Tuite, M.F., Roberts, N.A, Kingsman, A. and 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* , 2523-2528.

Fasher, K.D., Shmitz, J. and Hörz, W. (1990) Role of trans activating proteins in the generation of active chromatin at the *PHO 5* promoter in *Saccharomyces cerevisiae* . EMBO J. *9* , 2523-2528.

Gilliquet, V., Berben, G. and Hilger, F. (1991) *PHO 80* and *PHO 85* are pleiotropic genes in *Saccharomyces cerevisiae* . Arch. Int. Physiol. Biochim., B30.

Gilliquet, V., Legrain, M., Berben, G. and Hilger, F. (1990) Studies on the yeast regulatory genes *PHO 80* and *PHO 85* . Arch. Int. Physiol. Biochim. *98* , B130.

Grifnée, A. (1990) Contribution à la caractérisation structurale et fonctionnelle de la région 5' amont du gène *PHO 81* , régulateur de la phosphatase acide chez *Saccharomyces cerevisiae* . Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques. Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix (Namur).

Guarente, L. (1984) Yeast promoters: positive and negative elements. Cell *36* , 799-800.

Hagerman, P.J . (1991) RNA "tetraloops": living in *syn* . Current Biology *1* , 50-52.

Hayashi, N. and Oshima, Y. (1991) Specific *cis* -acting sequence for *PHO 8* expression interacts with PHO 4 protein, a positive regulatory factor in *Saccharomyces cerevisiae* . Mol. Cell. Biol. *11* , 785-794.

Healy, A.M., Helser, T.L. and Zitomer, R.S. (1987). Mol. Cell. Biol. *7* , 3785-3791.

Ito, H., Fukada, Y., Murata, H. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. *153* , 163.

Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J. (1988) Genetic engineering: an introduction to gene analysis and exploitation in eukaryotes. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Koren, R., Levitre, J. and Bostian, K. (1986) Isolation of the positive-acting regulatory gene *PHO 4* from *Saccharomyces cerevisiae* . Gene *41* , 271-280.

Legrain, M., De Wilde, M. and Hilger, F. (1986) Isolation, physical characterisation and expression analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* positive regulatory gene *PHO 4* . Nucl. Acids Res. *14* , 3059-3073.

Lewin, B. (1990) Genes IV. Wiley, J. & Sons, Inc. New-York.

MacCarthy, B.J., Creasy, C.L. and Bergman, L.W. (1991) Molecular analysis of a temperature sensitive allele of the *PHO 2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* . Nucl. Acids Res. *19* , 3463.

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

Mandel M. and Higa, H. (1970) Calcium dependant bacteriophage infection. J. Mol. Biol. *53* , 159-162.

McNeil, J.B. and Smith, M. (1986). J. Mol. Biol. *187* , 363-378.

Murre, C., MacCaro, P.S. and Baltimore, D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer, daughterless, MyoD and myc proteins. Cell *56* , 777-783.

Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M. and Lusty, C.J. (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. Gene *45* , 299-310.

Ogawa, N. and Oshima, Y. (1990) Functional domains of a positive regulatory protein PHO 4 for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae* . Mol. Cell. Biol. *10* , 2224-2236.

Ogden, J.E., Stanway, C., Sunyoung, K., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M. (1986) Efficient expression of the *Saccharomyces cerevisiae PGK* gene depends on an upstream activation sequence 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. In: Pharmacia Molecular Biochemicals (1984), DNA ligase, 27.

Reznikoff, W. and Gold, L. (1986) Maximizing gene expression. Butterworths. Boston.

Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Bostein, D. and Fink, G.R. (1987) A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. Gene *60* , 237-243.

Rudolph, H. and Hinnen, A. (1987) The yeast *PHO 5* promoter: phosphate-control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *84* , 1340-1344.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1971) DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad Sci. USA *74* , 5463-5467.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.

Senstag, C. and Hinnen, A. (1987) The sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *PHO 2* codes for regulatory proteins with unusual aminoacid composition. Nucl. Acids Res. *15* , 233-246.

Struhl, K. (1989) Molecular mechanism of transcriptional regulation in yeast. Ann. Rev. Biochem. *58* , 1051-1077.

Tice-Baldwin, K., Fink, G.R. and Arndt, K. (1989) BAS 1 has a Myb motif and activates *HIS 4* transcription only in combination with BAS 2. Science *246* , 931-935.

Toh-e, A., Tanaka, K., Uesono, Y. and Wickner, R.B. (1988) *PHO 85* , a negative regulator of the PHO system, is a homolog to the protein kinase gene *CDC 28* of *Saccharomyces cerevisiae* . Mol Gen. Genet. *214* , 162-164.

Toh-e, A., Veda, Y., Kakimoto, S. and Oshima, Y. (1973) Isolation and characterisation of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae* . J. Bacteriol. *113* , 727-738.

Vandenhaute, J., Legrain, M., Coquette, V., Tibor, A. and Hilger, F. (1988) Molecular cloning, genetic mapping and preliminary characterisation of *PHO 81* , a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the transcriptional regulation of the repressible acid phosphatase gene (*PHO 5*). Arch. Int. Physiol. Biochim. *96* , B46.

Vincent, C. (1986) Synthétiseurs et séquenceur d'ADN. Biofutur *6* . Le technoscope de Biofutur. 1-13.

Vogel, K., Hörz, W. and Hinnen, A. (1989) The two positively acting regulatory proteins PHO 2 and PHO 4 physically interact with *PHO 5* upstream activation regions. Mol. Cell. Biol. *9* , 2050-2057.

Wiame, J.M. (1947). Biochim. Biophys. Acta *1* , 234-255.

Yoshida, K., Kuromitsu, Z., Ogawa, N. and Oshima, Y. (1989) Mode of expression of the positive regulatory genes *PHO 2* and *PHO 4* of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae* . Mol. Gen. Genet. *217* , 31-39.

Yoshida, K., Kuromitsu, Z., Ogawa, N., Ogawa, K. and Oshima, Y. (1987) Regulatory circuits for phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* . In: Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. Torrinai-Gordini A., Silver, S., Yagil, E., Rothman, F.G. and Wright, A. Eds. American Society for Microbiology. Washington D.C., pp 49-55.

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