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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Délétions dans les séquences de régulation en amont du gène ADH2 de Saccharomyces cerevisiae en vue de l'étude du rôle fonctionnel de ces séquences

Mertens, Pascal

Award date:
1989

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

250889

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Telex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Titre du Mémoire:
Délétions dans les séquences de régulation en amont du gène ADH2 de *Saccharomyces cerevisiae* en vue de l'étude du rôle fonctionnel de ces séquences.

MERTENS Pascal.

Résumé

Le gène ADH2 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* code pour l'ADH II, une enzyme glucose-répressible responsable de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde lors de la croissance de la levure sur un milieu à l'éthanol. Les séquences de service en amont de ce gène interviennent dans la régulation de sa transcription. En vue de l'étude ultérieure de ces séquences au niveau moléculaire dans la modulation de l'expression de l'ADH II, nous avons obtenu, par le système Exo/Mung, des délétions dans la séquence de sélection du site d'initiation qui s'étend de la TATA box jusqu'au premier codon du gène ADH2.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1989
Promoteur : Prof. J. Vandenhaute.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Telex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Titre du Mémoire:
Délétions dans les séquences de régulation en amont du gène ADH2 de *Saccharomyces cerevisiae* en vue de l'étude du rôle fonctionnel de ces séquences.

MERTENS Pascal.

Résumé

Le gène ADH2 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* code pour l'ADH II, une enzyme glucose-répressible responsable de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde lors de la croissance de la levure sur un milieu à l'éthanol. Les séquences de service en amont de ce gène interviennent dans la régulation de sa transcription. En vue de l'étude ultérieure de ces séquences au niveau moléculaire dans la modulation de l'expression de l'ADH II, nous avons obtenu, par le système Exo/Mung, des délétions dans la séquence de sélection du site d'initiation qui s'étend de la TATA box jusqu'au premier codon du gène ADH2.

Abstract

The ADH2 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* codes for ADH II, a glucose-repressible enzyme catalyzing the oxidation of ethanol into acetaldehyde when yeast is grown on a ethanol-containing medium. Sequences upstream of the coding region intervene in transcription regulation. In order to study at the molecular level the role of these sequences in the modulation of expression of ADH II, we have obtained, by the Exo/Mung system, a series of deletions in the start-site selection sequence, from the TATA box to the first codon of the ADH2 gene.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1989
Promoteur : Prof. J. Vandenhaute.

Je voudrais remercier les Professeurs J. Delcour et J. Vandenhaute de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et de m'avoir guidé tout au long de l'année.

Je remercie tout particulièrement Deborah pour son dévouement et sa patience maternelle prodigués dans les moments les plus laborieux.

Mes remerciements vont aussi à Mademoiselle M. Raes et à Messieurs E. Feytmans et F. Mainferme qui ont accepté de lire ce mémoire.

Merci à Mesdames M. Dewez-Jadin, J. Libion et R.-M. Wilmet-Génicot pour leur assistance technique et leur amitié.
Merci à Agnès, Anne, Maryline, Jean-Marc, Jean-Pol, Olivier et Thierry pour leur aide précieuse et leurs nombreux conseils et pour l'ambiance chaleureuse qu'ils ont su créer et maintenir.

Enfin, merci à tous mes amis, à ma soeur et à mes parents sans qui ces études et ce travail n'auraient pas été possibles.

BARONVILLE, août 1989.

LISTE DES ABREVIATIONS.

aa: acide aminé.
ADH: alcool déshydrogénase.
ADN: acide désoxyribonucléique.
AMPc: adénosine monophosphate cyclique.
ARN: acide ribonucléique.
ARNm: ARN messager.
ATP: adénosine triphosphate.
cAPK: kinase AMPc-dépendante.
C-term.: carboxy-terminale.
DEAE: diéthyl aminoéthane.
DO: densité optique.
DR: répétition directe (direct repeat).
DTT: dithiothréitol.
E. coli: *Escherichia coli*.
EDTA: éthylène diamine tétra acétate.
Exo III: Exonucléase III.
IR: répétition inverse (inverted repeat).
kb: kilobase.
kd: kilodalton.
LADH: ADH de foie (liver ADH).
MCS: site multiple de clonage (multiple cloning site).
NADH: nicotinamide dinucléotide.
N-term.: amino-terminale.
ORF: phase ouverte de lecture (open reading frame).
pb: paire de base.
PEG: polyéthylène glycol.
RNAse: ribonucléase.
rpm: tour par minute.
S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*.
SDS: sodium dodécyl sulfate.
tRNA: ARN de transfert.
UAS: séquence activatrice amont (upstream activating sequence).
UV: ultra-violet.

Les gènes et les enzymes ADH de levure sont notés comme dans les articles récemment parus:

ADH1, 2, 3, ou 4: gènes de structure codant pour les 4 alcool déshydrogénases.

ADH I, II, III, IV: les 4 ADH synthétisées par la levure.

ADR1, 3, 4, 6: gènes de régulation de la transcription du gène ADH2.

ADR I: le produit du gène ADR1.

INTRODUCTION.....1
1. Problématique générale.....1
2. Choix de l'approche et du gène modèle.....3
2.1. Arguments en faveur du choix du gène modèle: le gène ADH2.....3
2.1.1. La levure Saccharomyces cerevisiae.....3
2.1.2. Le gène ADH2.....3
2.2. Le génie génétique est une technique puissante dans l'étude des relations structure-fonction au sein du gène.....4
3. Justification du choix du gène ADH2 de S.c.....4
3.1. Rappel de la conception générale actuelle de la structure et de la fonction du gène eucaryote.....4
3.1.1. Structure générale du gène eucaryote.....4
3.1.2. Déterminisme moléculaire de la régulation de l'expression des protéines.....4
3.1.2.1. Les partenaires intervenant dans la formation du complexe de préinitiation.....5
3.1.2.2. Les types d' interactions cognitives protéine-ADN et protéine-protéine.....10
3.1.2.3. Hypothèses actuelles sur les mécanismes moléculaires de l'initiation de la transcription.....12
3.1.3. Déterminisme moléculaire de la structure des protéines.....14
3.2. Intérêt particulier du système ADH de levure.....16
3.2.1. L'homologie fonctionelle des effecteurs et des modulateurs de la transcription.....16
3.2.2. L'abondance des données physiologiques et moléculaires des enzymes du système ADH suggère des hypothèses sur les relations structure-fonction tant au niveau de l'expression génétique qu'au niveau de l'activité catalytique.....18
3.2.2.1. La réaction catalysée par l'ADH.....18
3.2.2.2. La levure est par excellence l'organisme qui réalise la fermentation alcoolique.....18
3.2.2.3. Les régulations de l'expression des gènes ADH1 et ADH2 sont très différentes en accord avec leur rôle physiologique.....20

3.2.2.4. Les séquences des gènes ADH1 et 2 et des protéines correspondantes ont été comparées. 27
3.2.3. L'application de la rétrogénétique dans la levure Saccharomyces cerevisiae. 29
4. Le but du travail. 30

MATERIEL ET METHODES. 31
1.Souche et plasmides utilisés. 31
1.1.Souche bactérienne. 31
1.2.Plasmides. 32
1.2.1.pBLUESCRIPT SK+ 32
1.2.2.pGEM-blue 33
1.2.3.pBR322 33
1.3.Milieux de culture pour bactéries. 34
1.3.1.LB liquide. 34
1.3.2.LB solide. 34
2.Extraction d'ADN plasmidique d'une souche bactérienne 34
2.1.Extraction rapide d'ADN plasmidique de E.coli: "miniprep" 34
2.2.Extraction d'ADN plasmidique de E.coli en grandes quantités: "maxiprep" 35
3.La restriction d'ADN plasmidique 37
3.1.Les enzymes de restriction 37
3.2.Les tampons de restriction. 38
3.3.Réaction de restriction 39
4.Electrophorèse d'ADN dans un gel d'agarose. 40
4.1.Principe. 40
4.2.Protocole. 41
4.3. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose 42
5.Purification et précipitation d'ADN. 43
6.Ligation de molécules d'ADN linéaires 45
7.Délétion d'ADN sur un brin d'un vecteur et dans un seul sens ("nested deletion"). 46
7.1.Ce système de délétion fait appel à deux enzymes l'Exonucléase III et la Mung Bean nuclease. 46
7.2.Protocole de "nested deletion". 47
8.Transformation bactérienne 49

RESULTATS.....52
1.Stratégie.....52
2.Construction du vecteur destiné a subir les délétions.....53
3.Stratégie d'analyse des résultats.....53
4.Mise en œuvre des techniques et résultats obtenus.....57
5.Conclusions.....67

INTRODUCTION.

1. Problématique générale.

La cellule est une entité organisée qui fonctionne. On sait que tant sa structure que sa fonction sont basées sur une information contenue dans l'ADN: le programme génétique. C'est l'expression correcte, modulée, de ce programme qui, en dernière analyse, est nécessaire pour assurer l'adaptation et la multiplication cellulaire, ce que l'on peut appeler les "performances" de la cellule.

Concernant la nature originelle du programme, une hypothèse plausible veut que le gène "primitif" ait consisté en une séquence (un "programme élémentaire") codant pour un domaine protéique responsable d'une fonction restreinte soit de structure, soit de catalyse, soit de reconnaissance. L'apparition ultérieure de séquences de "service" capables de moduler le taux d'expression de la portion du programme concernée (codant pour le domaine protéique) en fonction de paramètres du milieu, constitue une étape de complexification essentielle de l'évolution des systèmes organisés.

En outre,au cours de l'évolution , les séquences codant pour des domaines protéiques se seraient rassemblés en un gène (la structure primitive en introns-exons en serait un reliquat). Les protéines actuelles sont ainsi composées de plusieurs domaines, responsables chacun d'une fonction déterminée (par exemple une protéine de reconnaissance et trans-membranaire). Certaines protéines globulaires sont même constituées de domaines distincts séparés par des "crevasses" où le substrat vient se loger(Lewin,1987).Enfin, suite à la duplication génique suivie de divergence, de nouvelles fonctions cellulaires ont pu se faire jour.

Le gène actuel est constitué de deux parties:

1°)Une portion (généralement 5' c-à-d du côté 5' terminal de la molécule) contenant les signaux de "service" amont (= 5') responsables de la régulation de l'expression du gène adjacent.

2°)Une portion (généralement en 3' des signaux) destinée à être copiée (transcrite) et contenant, outre des séquences conservées dans l'ARNm (les exons où on trouve les séquences informatives codantes) , des séquences non-informatives (les introns) destinés à être excisées.

On peut considérer pour la simplicité que le gène dans son état fonctionnel serait en fait représenté par le messager (ARNm). Au niveau de l'ADN, c'est à dire dans sa forme de stockage, on dira qu'il est associé à des signaux (habituellement 5') de service et qu'il comprend les séquences non-conservées (introns). Selon le contexte on inclut aussi ces signaux , même si quelquefois ils peuvent être très dispersés, dans la définition du "gène". Les thèmes majeurs de la recherche actuelle en biologie moléculaire se situent dans ce contexte: établir un lien entre la structure et la fonction du gène à deux niveaux:

*au niveau des mécanismes d' expression et de régulation de l'expression d' un gène en relation avec le rôle physiologique de cette régulation; on étudie pour cela les séquences signaux des gènes.

*au niveau des mécanismes biochimiques de la formation et du fonctionnement des protéines par l' étude des séquences codantes de l' ADN et des structures d' ordre 1,2,3 et 4 des protéines.

Le cadre général de notre problématique sera d' étudier au niveau moléculaire un gène modèle choisi, grâce à l'exploration par le génie génétique des divers éléments structuraux du gène afin d' en préciser les fonctions respectives.

2. Choix de l'approche et du gène modèle.

2.1. Arguments en faveur du choix du gène modèle : le gène ADH2 codant pour l'alcool déshydrogénase II (ADH II) de la levure *Saccharomyces cerevisiae.*

2.1.1. La levure *Saccharomyces cerevisiae.*

a. La levure est un eucaryote qui présente de nombreuses homologies avec les eucaryotes supérieurs (notamment les mammifères) au niveau de l'expression génétique.

b. La levure constitue un outil de choix pour mettre en pratique les techniques nécessaires à la rétrogénétique.

Nous reviendrons plus loin sur ces deux points, pour les éclairer.

2.1.2. Le gène ADH2.

a. Ce gène est régulé de façon très complexe; le réseau de régulation a été partiellement élucidé et constitue un modèle à rétroactions et interactions moléculaires très riche. L'existence de ces nombreuses interactions, bon nombre restant à découvrir, font l'intérêt de ce gène.

b. Ce gène fait partie d'une famille de gènes fortement homologues au niveau de leur séquence codante et dont les produits ont une même fonction de base; des différences entre les isozymes ont été mises en évidence: la stabilité thermique, l'activité catalytique (valeurs de Km différentes),... L'étude du lien structure-fonction au niveau moléculaire bénificiera fortement des comparaisons structurales qu'il sera ainsi possible d'établir.

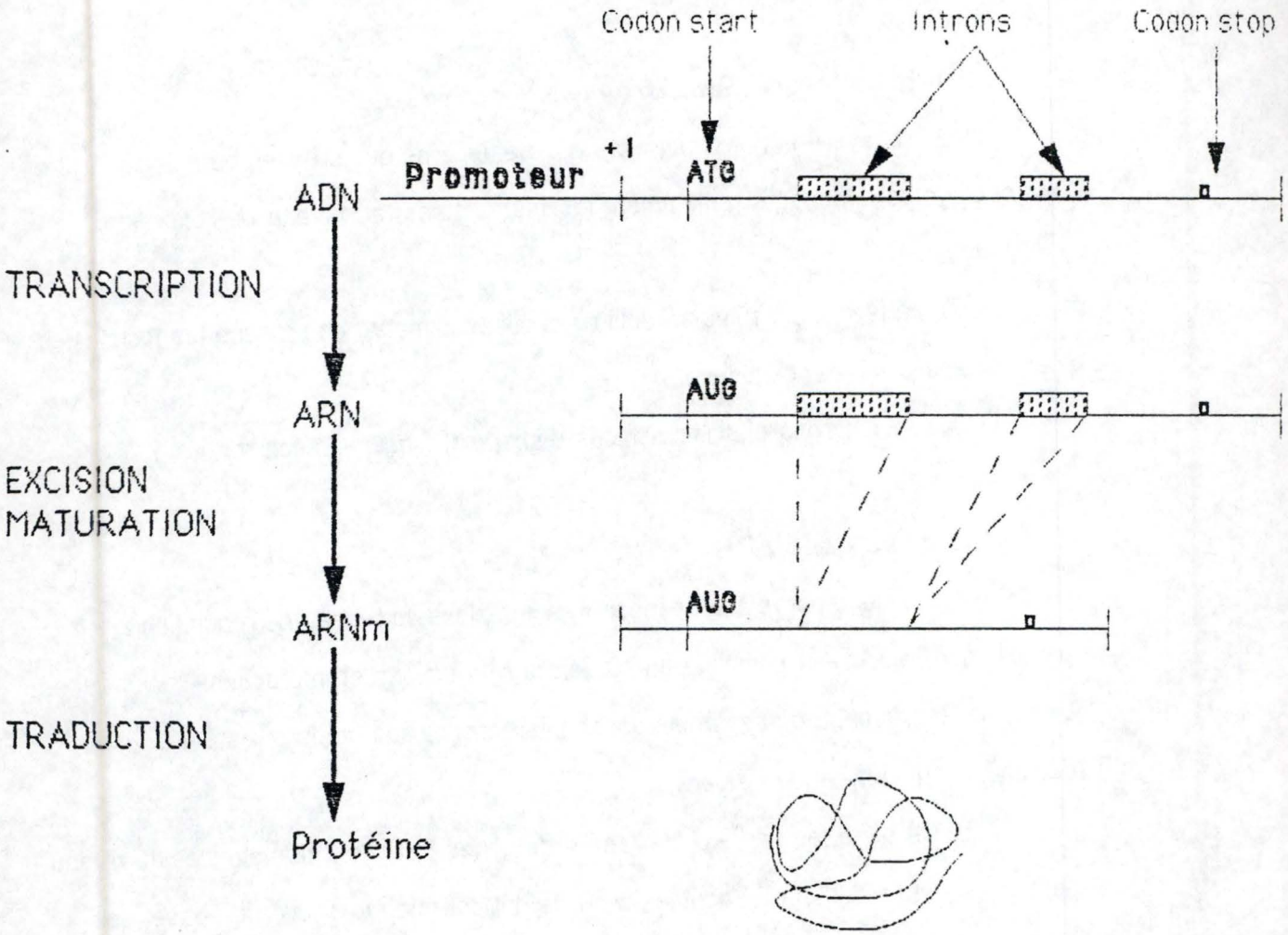


FIG.1 Synthèse protéique à partir de l'information contenue dans l'ADN. (N-B: la protéine peut être sujette à des modifications post-traductionelles).

2.2. Le génie génétique est une technique puissante dans l'étude des relations structure-fonction au sein du gène.

Il permet la modification des séquences, tant codante que signal, de l' ADN en vue de tester l'influence de ces changements sur les caractéristiques de la protéine étudiée (taux d' expression, stabilité, activité catalytique,...).

Pour mieux comprendre ce choix, rappelons ce qui dans la structure du gène détermine l'expression et la structure des protéines.

3. Justification du choix du gène ADH2 de S.c.

3.1. Rappel de la conception générale actuelle de la structure et de la fonction du gène eucaryote.

3.1.1. Structure générale du gène eucaryote.

Le gène eucaryote est constitué de deux régions essentielles: la région comprenant les signaux de service, régulateurs de l'expression du gène (aussi appelée la région promoteur du gène), et la partie codante qui est transcrite en ARN. Dans le cas plus précis des gènes de structure qui nous occupe, c'est l'ARN polymérase II qui effectue la transcription du gène en ARNm. L'ARNm est ensuite maturé si nécessaire puis traduit en chaîne polypeptidique.(FIG.1). Notons qu'il existe encore une régulation post-traductionelle de l'expression protéique.

3.1.2. Déterminisme moléculaire de la régulation de l'expression des protéines.

Il est nécessaire que l' ARN polymérase soit placée adéquatement sur l'ADN pour effectuer correctement la transcription à partir du site d' initiation (site+1). Cette étape, appelée initiation, mène à la formation du complexe de préinitiation. Trois types d'intervenants coopèrent à la formation de ce complexe:

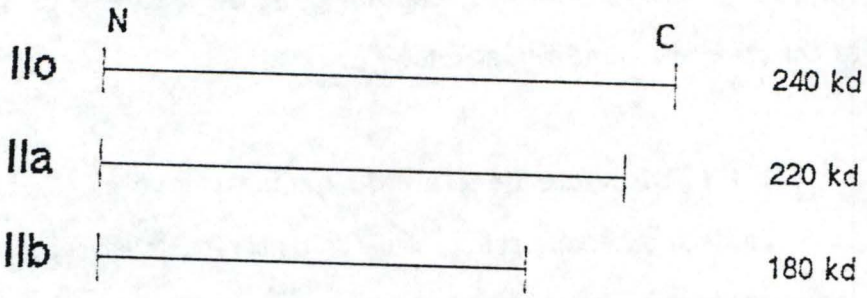


FIG.2 Les trois formes de la sous-unité II de l'ARN polymérase II.
N: extrémité N-terminale.
C: extrémité C-terminale.

Tyr Ser Pro Thr Ser Pro Ser

FIG.3 Consensus de la partie CT7n de la polymérase II. Les résidus aa sont d'autant plus soulignés qu'ils sont plus conservés (les aa conservés 3 fois le sont à 100%) (Sigler, 1988).

*les séquences signal du gène, le plus souvent situées dans la région amont (=5') de la séquence codante, sur le même brin d' ADN: on parle donc de séquences cis-actives.

*les protéines trans-actives, codées par d' autres gènes.

*l' ARN polymérase II qui constitue la"machinerie " de transcription proprement dite.

Au plan de leur rôle mutuel dans la transcription, on retrouve cette situation chez tous les eucaryotes, de la levure à l'homme. Qui plus est, comme on le verra, dans certains cas précis on a pu démontrer une conservation fonctionelle et structurelle au niveau de la polymérase II, mais aussi de certains signaux et des protéines trans-activatrices, entre la levure et les mammifères dont l'homme.

3.1.2.1. Les partenaires intervenant dans la formation du complexe de préinitiation.

L'ARN polymérase II, agent effecteur de la transcription.

L'ARN pol II (anciennement B) est composée de 9 à14 sous-unités dont la plus grande et la plus connue est la sous-unité II. La séquence amino-acidique de celle-ci est hautement conservée au sein des eucaryotes, de la levure jusqu'aux mammifères.

La sous-unité II existe sous plusieurs formes, la forme IIa étant la plus fréquemment observée (FIG.2). Les formes IIa et IIb dérivent de la forme IIo par hydrolyse de l'extrémité carboxy-terminale qui est fragile. La partie C-terminale des formes IIo et IIa est responsable de la fixation au promoteur du gène. En effet la sous-unité IIb transcrit l'ADN non-spécifiquement (à partir d'un nick qui agit comme pseudo-promoteur).

La partie C-terminale de la sous-unité II est composée d'une séquence de 7 aa répétée 52 fois chez les eucaryotes supérieurs (mammifères) et 26 fois chez la levure; cette partie est notée CT7n, n étant le nombre de répétitions (FIG.3). Un domaine CT7n raccourci à 11 répétitions chez la levure (CT7-11) ou 23 répétitions chez les

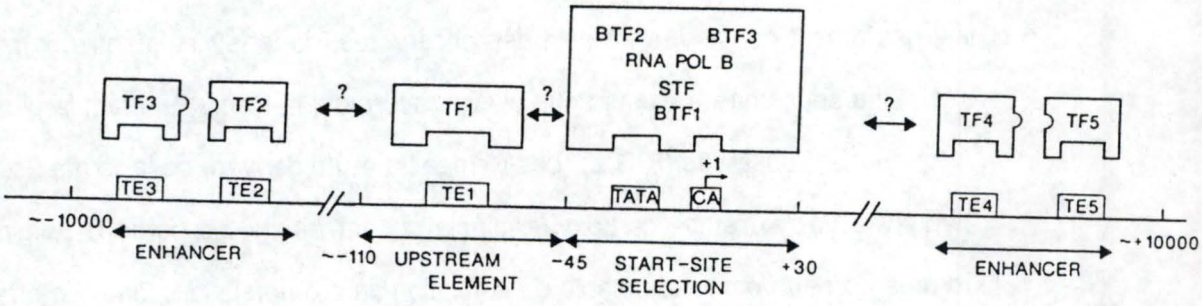


FIG.4 Modèle du promoteur de gène eucaryote (Wasylyk, 1988 b).

TF: facteur de transcription.
TE: élément de transcription.
BTF1: facteur de liaison à la TATA box.
STF: stabilisateur du complexe de préinitiation.
BTF2 et 3: facteurs interagissant avec l'ARN polymérase II.

mammifères (CT7-23) permet encore à la polymérase II de fonctionner mais moins bien que si le domaine est entier.

Un domaine CT7n de hamster fusionné à la partie N-terminale de la sous-unité II de levure permet d'obtenir une polymérase hétérologue capable de fonctionner chez la levure , ce qui prouve la conservation fonctionnelle du domaine CT7n de l'ARN polymérase II chez les eucaryotes.

Les résidus hydrophiles du domaine CT7n lui confèrent une forme éténdue qui ne se replie pas dans le milieu aqueux intracellulaire. L'ARN polymérase II possède donc un site de reconnaissance aspécifique de l'ADN dans la partie catalytique ("tête" globulaire) et une longue partie hydrophile libre qui lui confère sa spécificité vis-àvis du promoteur ("queue", FIG.16). De plus, cette queue hydrophile est facilement phosphorylable. On verra plus loin que cette structure particulière et cette capacité d'être phosphorylée sont importantes, dans un modèle proposé pour décrire la formation d'un complexe de préinitiation et pour l'élongation de la transcription.

La structure des signaux de "service" en amont de la séquence codante des gènes.

Le cas des eucaryotes supérieurs (FIG.4; Guarente 1987 et 1988, Wasylyk 1988 a et b).

Deux catégories de séquences promotrices peuvent être distinguées: les séquences de sélection du site d' initiation et les séquences de modulation du taux de transcription.

Les séquences de sélection du site d'initiation sont comprises dans une région qui sétend des nucléotides -45 à +30 (le site d' initiation de la transcription est noté +1); elle comprend la TATA box de consensus TATAAA dont la position varie peu (-25 à-30)ainsi que la séquence CA au site +1 (le nucléotide A est le +1). D'autres régions de cette séquence interviennent probablement dans certains promoteurs. Cette séquence de sélection du site d' initiation est commune à tous les promoteurs d'

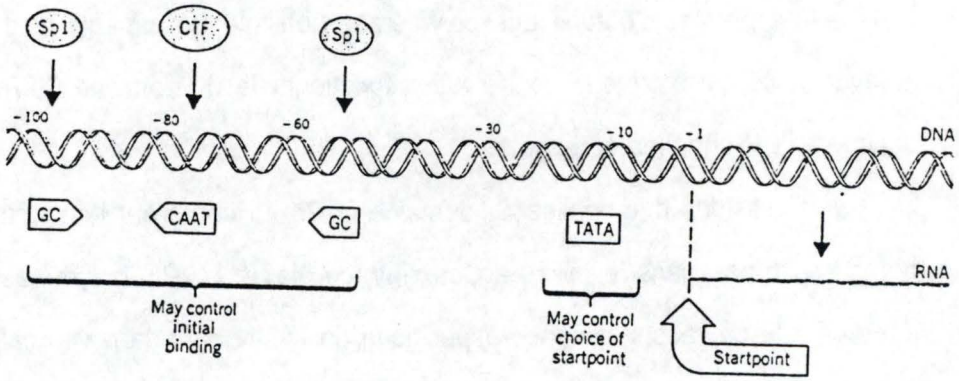


FIG.5 Un promoteur-type pour l'ARN polymérase II, contenant les éléments de base nécessaires à la transcription (Lewin, 1987).

eucaryotes supérieurs pour la polymérase II et est suffisante pour un taux basal de transcription en l'absence de signaux et facteurs de régulation. Elle est responsable du placement correct de l'ARN polymérase II par rapport au site +1 et dicte le sens de transcription.

Les séquences de modulation de la transcription permettent la régulation de l'expression d' un gène en interagissant avec des facteurs dont la présence (ou l'état activé) dépend de l'état métabolique de la cellule. Ces séquences sont de deux types: les séquences juste en amont de la séquence de sélection du site d' initiation (que nous appellerons upstream elements) situées entre -45 et -110, et les séquences enhancer situées à des distances plus grandes.

Les upstream elements ne sont pas toujours présents; il s'agit le plus souvent de CAAT box et de GC box (contenant la séquence GGGCGG) dont le nombre, la position, et l'orientation sont variables (FIG.5). Ils agissent probablement en fixant un (ou des) facteur(s) de transcription spécifique(s) qui pourront interagir avec l'ARN polymérase II. Cette organisation génétique peut être considérée comme organisation de base pour les gènes qui sont exprimés à un taux similaire dans la plupart des cellules et qui répondent de façon simple à un ou plusieurs éléments de contrôle, notamment les "house keeping genes".

Les séquences enhancer sont également régulatrices et peuvent exercer leur influence quelle que soit leur orientation mais à des distances de plusieurs centaines de paires de bases (jusqu'à 30000pb) en amont comme en aval du site+1. Un enhancer agit sur la transcription via un facteur qui se lie spécifiquement à lui et qui interagit avec la polymérase II ou avec d' autres facteurs trans-actifs de régulation de la transcription. Le rôle des enhancers est de moduler l'expression des gènes en réponse à un signal physiologique ou à un signal spécifique du type cellulaire.

Remarquons que les signaux 5' des eucaryotes sont très généralement des signaux positifs (UAS, enhancers, ...). Signalons toutefois l'existence dans certains cas de "silencers", séquences de régulation négative de l'expression des gènes.

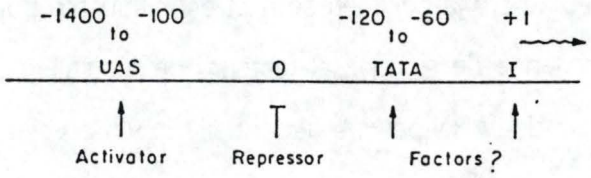


FIG.6 Les éléments cis-actifs d'un promoteur-type de gène de levure (Guarente, 1987).

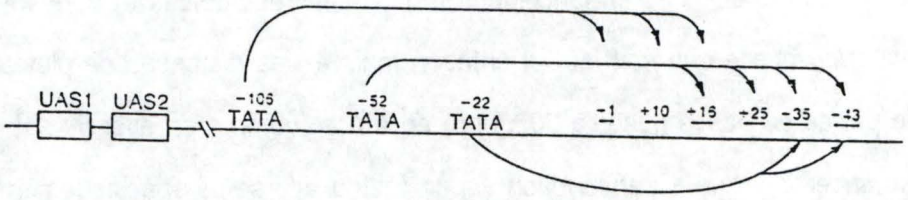


FIG.7 Le promoteur du gène CYC1. Trois TATA box initient la transcription à partir d'un sous-ensemble de six sites d'initiation (Hahn, 1985).

Le cas des eucaryotes inférieurs(FIG.6).

La structure du promoteur est semblable à celle des eucaryotes supérieurs mais comporte quelques particularités. Le site +1 fait partie d'une boîte mieux définie que chez les eucaryotes supérieurs. Deux séquences consensus de cette boîte rendent compte de plus de la moitié des promoteurs comparés. Le premier consensus est TC(G/A)A, le site+1 étant le plus souvent le nucléotide C ou un des deux nucléotides adjacents. Le second consensus est constitué d'une pyrimidine entourée d'au moins deux purines de chaque côté (RRYRR).(Hahn, 1985). Le rôle de cette boîte+1 dans le placement correct de l'ARN polymérase II est sans doute très important car, contrairement aux eucaryotes supérieurs où la distance séparant la TATA box du site+1 varie peu, chez la levure, cette distance varie de 40 à 120pb en amont du site+1, suivant les promoteurs étudiés (Chen, 1985 et Guarente,1987). Une preuve en est que dans le gène HIS3, il y a deux sites d'initiation, un étant sujet à une régulation, l'autre étant constitutif (Guarente,1987).

De nombreux travaux ont montré que la distance entre la TATA box et le site+1 n'était pas importante pour l'expression du gène mais que des séquences en aval de la TATA box et aux alentours du site+1 étaient essentielles; c'est notamment le cas des gènes HIS4 (Nagawa, 1985), PHO5 (Rudolph,1987) et de constructions des séquences promotrice du gène HIS3 et codante du gène DED1 et inversement (Chen, 1985). Dans plusieurs cas, tel celui du gène CYC1, il faut noter qu'en réalité plusieurs sites+1 et plusieurs TATA box coexistent (respectivement 6 et 3 pour le promoteur du gène CYC1) chaque TATA box pouvant initier la transcription à un sous-ensemble de ces sites+1 (FIG.7).

La modulation de l'expression chez la levure est réalisée via deux types de séquences: les sites opérateurs et les UAS. Le site opérateur (O) qui sert au contrôle négatif de l'expression ne se trouve que dans certains promoteurs, le contrôle de l'expression chez les eucaryotes dont la levure, étant le plus souvent positif (Guarente,1987).

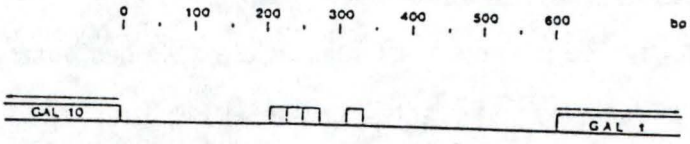


FIG.8 Les gènes GAL 10 et GAL 1 ont 4 UAS communs.

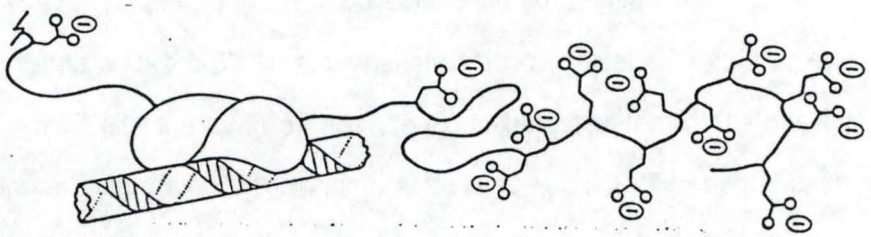


FIG.9 Une protéine-type de régulation transcriptionelle composée d'un domaine de liaison à l'ADN souvent dimérique et d'un peptide peu structuré (ici, pas du tout) constitué de chaînes latérales chargées négativement (Sigler, 1988).

La mise en évidence des UAS (upstream activation site) a été rendue possible par la construction de gènes de fusion: on remplace les éléments UAS d'un gène (CYC1) par des séquences amont d'autres gènes dont on suspecte qu'elles contiennent des UAS. Ainsi on a montré qu'en remplacant l'UAS authentique du gène CYC1 par la séquence amont des gènes GAL1 et GAL10 (FIG.8), le gène CYC1 est régulé à la manière spécifique des gènes GAL1 et GAL10 (ç-à-d de manière dépendante du galactose). (Guarente,1987)

Les UAS sont nécessaires à l'activation de la transcription. Ils sont comparables phénoménologiquement aux enhancers des eucaryotes supérieurs; comme eux, ils sont actifs quelle que soit leur orientation mais ils ne le sont que dans une région comprise entre 100 et 1400 pb en amont de la TATA box et ne sont pas actifs s'ils sont placés en aval de celle-ci.

Les protéines trans-activatrices

Les protéines activatrices sont composées de domaines à fonction spécifique: un ou plusieurs domaines de fixation et un ou plusieurs domaines d' activation(FIG.9).. Ces domaines sont tout à fait indépendants les uns des autres; la preuve en est que la délétion de la région activatrice des gènes codant pour les protéines régulatrices GAL4 ou GCN4 n'empêche pas les protéines de pouvoir se lier correctement à l'ADN (Sigler,1988;Keegan,1986). De plus, des constructions géniques comprenant un domaine activateur d' une protéine (GAL4 ou GCN4) fusionné avec la protéine bactérienne de liaison à l'ADN lexA active la transcription de manière spécifique au domaine de liaison de la protéine lexA (Wasylyk,1988b).

Les domaines de liaison sont responsables de la liaison à l'ADN au niveau des séquences amont des gènes régulés (UAS, enhancer, upstream elements, TATA box,...) et des interactions entre ces facteurs. Les domaines activateurs de nombreux facteurs trans-actifs connus de l'ARN polymérase II ne présentent pas de structure particulière mais une caractéristique commune: ils contiennent tous des résidus aa acides (contenant des charges négatives); on parle de "negative noodles". Cette

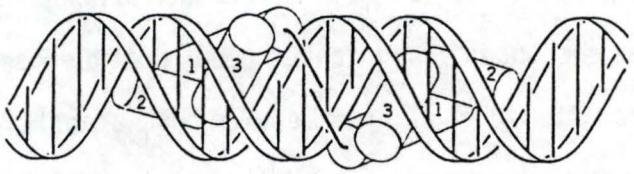


FIG.10 Un répresseur ayant le motif helix-turn-helix s'insère parfaitement dans la double-hélice de l'ADN (Lewin, 1987).

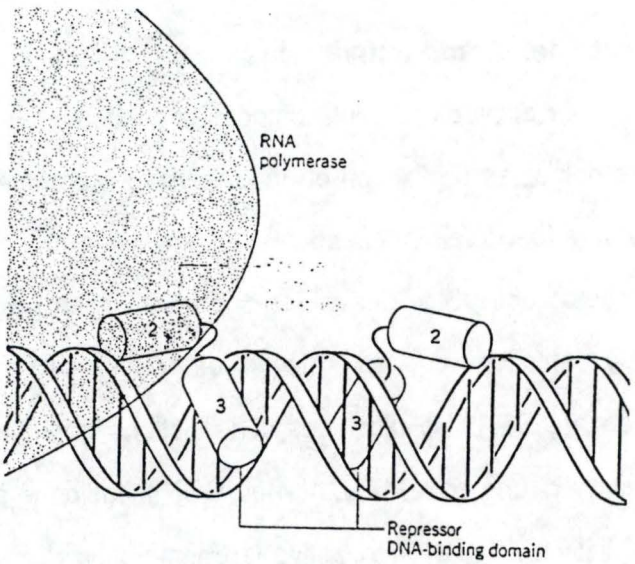


FIG.11 Le répresseur lié à l'ADN peut interagir avec l'ARN polymérase II (Lewin, 1987).

caractéristique est importante pour définir le modèle de la formation du complexe de préinitiation qui sera présenté par la suite.

3.1.2.2. Les types d' interactions cognitives protéine-ADN et protéine-protéine.

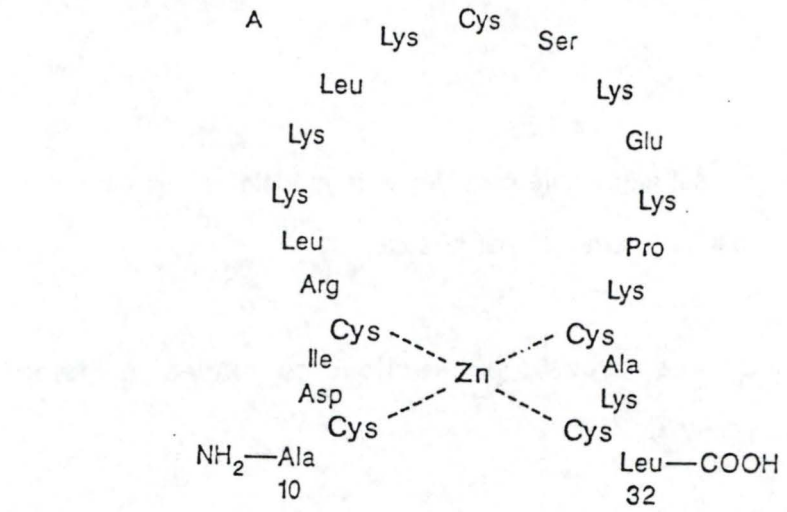
Le motif helix-turn-helix (FIG.10).

De courtes régions en hélice alpha sont reliées par des peptides qui donnent un angle particulier entre ces hélices leur permettant de se placer dans le sillon de l'ADN (Lewin,1987). Cette structure est commune à plusieurs protéines de liaison à l'ADN des procaryotes ; les hélices alpha sont amphiphiles c'est à dire qu'un côté est hydrophobe et l'autre hydrophile. La face hydrophile est chargée négativement, et pourrait entrer en contact avec la polymérase (Lewin,1987,FIG.11; Wasylyk,1988 b).

L'unité activatrice de base de la protéine GAL4 de levure semble être une hélice alpha amphiphile avec une face hydrophile chargée négativement et une face hydrophobe. Mais une telle structure ne peut rendre compte de la propriété activatrice d' une des régions fonctionnelle de GAL4 (Wasylyk,1988 b).

La structure en "Zinc finger" (doigt de zinc).

Elle a été découverte pour la première fois dans le facteur de transcription TFIIIA de *Xenopus laevis* qui contient 9 motifs en zinc finger. Chez la levure, cette structure a été mise en évidence dans de nombreux facteurs de transcription (FIG.12). Un atome de zinc est lié à 4 résidus cystéine (2 résidus cystéine et 2 résidus histidine dans le TFIIIA) d' une boucle de la protéine ("doigt"). L'interdigitation entre les zinc fingers du TFIIIA est telle que peut s'y insérer parfaitement le sillon majeur de l'ADN. Le nombre élevé de résidus formant des liaisons à l'ADN semble indiquer que la structure en doigt permet un contact direct avec l'ADN; on parle de "contrainte tactile". (Blumberg,1987)



B

	10																												
GAL4	Ala	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Cys	Ser	Lys	Glu	Lys	Pro	Lys	Cys	Ala	Lys	Cys	Leu
	94																						
LAC9	Ala	Cys	Asp	Ala	Cys	Arg	Lys	Lys	Lys	Trp	Lys	Cys	Ser	Lys	Thr	Val	Pro	Thr	Cys	Thr	Asn	Cys	Leu
	33																						
PPR1	Ala	Cys	Lys	Arg	Cys	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Lys	Cys	Asp	Gln	Glu	Phe	Pro	Ser	Cys	Lys	Arg	Cys	Ala
	20																						
ARGR2	Gly	Cys	Trp	Thr	Cys	Arg	Gly	Arg	Lys	Val	Lys	Cys	Asp	Leu	Arg	His	Pro	His	Cys	Gln	Arg	Cys	Glu
	63																						
HAP1	Arg	Cys	Thr	Ile	Cys	Arg	Lys	Arg	Lys	Val	Lys	Cys	Asp	Arg	Leu	Arg	Pro	His	Cys	Gln	Gln	Cys	Thr
	75																						
QA-1F	Ala	Cys	Asp	Gln	Cys	Arg	Ala	Ala	Arg	Glu	Lys	Cys	Asp	Gly	Ile	Gln	Pro	Ala	Cys	Phe	Pro	Cys	Val
	7																						
MAL63	Ser	Cys	Asp	Cys	Cys	Arg	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Cys	Asp	Arg	Asn	Lys	Pro		Cys	Asn	Arg	Cys	Ile
CONSENSUS	Ala	CYS	Asp	x	CYS	ARG	Pho	Lys Arg	Lys Arg	Pho	LYS	CYS	Asp	Arg Lys	x	x	PRO	x	CYS	x	Arg Lys	CYS	Pho
		4	7	4		7	7	5	6	7	5	7	7	5	4			7	7		4	7	5

FIG.12 Le doigt de zinc ("zinc finger").
A. Le "zinc finger" de la protéine GAL4.
B.Comparaison des séquences de "zinc fingers" de protéines de levure et consensus du "zinc finger" chez la levure.

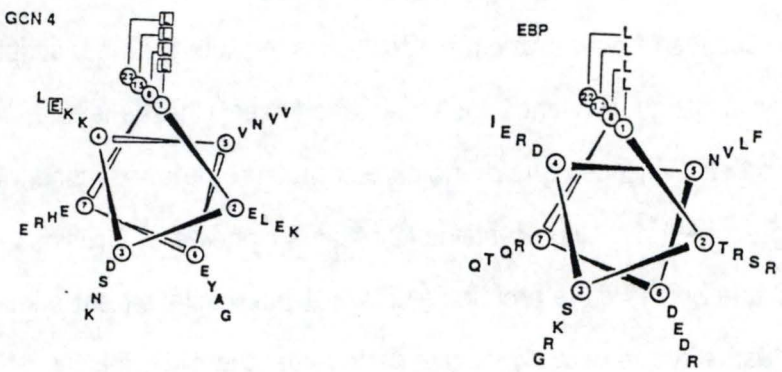


FIG.13 Vue schématique d'une portion en hélice alpha des protéines GCN4 de levure et EBP de rat montrant les résidus leucine se projettant sur la même face de l'hélice alpha (Landschulz, 1988).

La structure en zinc finger des domaines de liaison à l'ADN des facteurs trans-activateurs de levure (ainsi que des récepteurs stéroïdiens des cellules de mammifères) a été proposée à la suite de la découverte de la présence des deux couples de cystéine à distance constante dans ces domaines mais n'a pas été montrée structurellement, ce qui laisse planer un doute sur la structure réelle de ces domaines de liaison à l'ADN. Néanmoins, le facteur de transcription de levure SW15 et le facteur humain Sp1 possèdent bien cette structure en zinc finger et la liaison spécifique à l'ADN de ces deux protéines requiert la présence de zinc (Freedman,1988). Les variations de séquence observées entre les zinc fingers des divers facteurs reflètent sans doute la diversité des séquences de l'ADN reconnues et donc la spécificité des protéines trans-activatrices à un ou quelques gènes.

Le "negative noodle" (Sigler,1988).

Cette structure évoquée plus haut est un peptide dont la structure tertiaire est peu développée; le "negative noodle" comporte des chaînes latérales acides responsables du caractère activateur du peptide. La preuve la plus flagrante du caractère indifférent de la séquence dans la partie activatrice de la protéine a été montrée en fusionnant le domaine de liaison à l'ADN de la protéine trans-activatrice GAL4 avec des polypeptides encodés par des fragments du génome d' *Escherichia coli* pris au hasard. Les polypeptides de fusion qui pouvaient activer la transcription contenaient un excès de chaînes acidiques (FIG.9).

La structure en "leucine zipper" (tirette éclair en leucine) (Landschulz,1988;Wasylyk,1988 b).

Cette structure consiste en une répétition de résidus leucine tous les 7 aa de telle manière que dans une hélice alpha, les chaînes latérales de leucine se projettent sur une face de l'hélice (FIG.13). Les chaînes latérales de leucine de deux protéines possédant la structure en leucine zipper se pénétreraient comme les dents d' une tirette éclair (FIG.14); ceci constituerait un des types d'interactions inter-protéiques

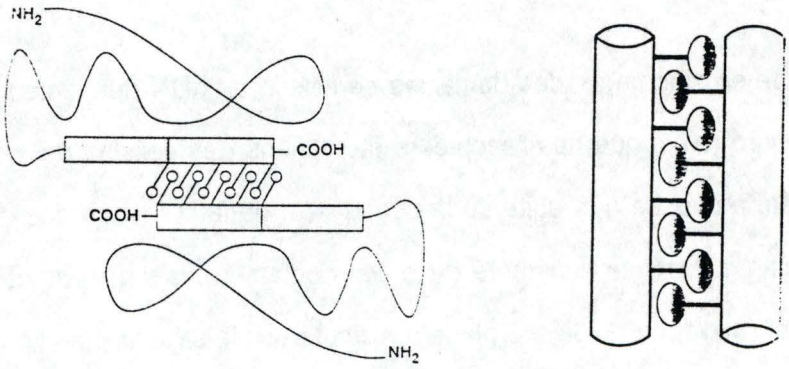


FIG.14 Interactions possibles entre deux structures en "leucine zipper" (Landschulz, 1988).

possibles entre des facteurs de transcription. Cette structure existe dans les protéines oncogènes Fos et Jun de mammifère, dans la protéine GCN4 de levure ainsi que dans le C/EBP ("CAAT" et enhancer binding protein de rat).

3.1.2.3. Hypothèses actuelles sur les mécanismes moléculaires de l'initiation de la transcription (Guarente 1987,1988).

Première hypothèse.

Les protéines activatrices, en altérant la structure de la chromatine, rendent la région de la TATA box accessible à ses facteurs de liaison et à la polymérase II. Les régions acides des trans-activateurs pourraient interagir avec les histones pour défaire l'empaquetage de l'ADN. Dans ce modèle, la conservation de la structure fonctionnelle des domaines activateurs pourrait venir de leur interaction avec les composants structurels de la chromatine qui sont eux-mêmes hautement conservés chez les eucaryotes.

Deuxième hypothèse.

L'ARN polymérase II entre au niveau de l'UAS puis glisse jusqu'à la TATA box et au site +1 où elle commence la transcription. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'introduction d' un site de terminaison de la transcription de levure entre l'UAS et la TATA box réduit l'activité transcriptionelle. Mais le fait que certains gènes comportent plusieurs TATA box et plusieurs sites +1 (le gène CYC1) semble indiquer dans ces derniers cas que ce modèle ne fonctionnerait pas..

En outre, ces deux premiers modèles n'expliquent pas les interactions entre les divers facteurs au niveau moléculaire.

Troisième hypothèse.

Il se forme une boucle dans l'ADN qui permet le rapprochement de la TATA box et de l'UAS via les facteurs de liaison à àces deux séquences qui pourraient alors

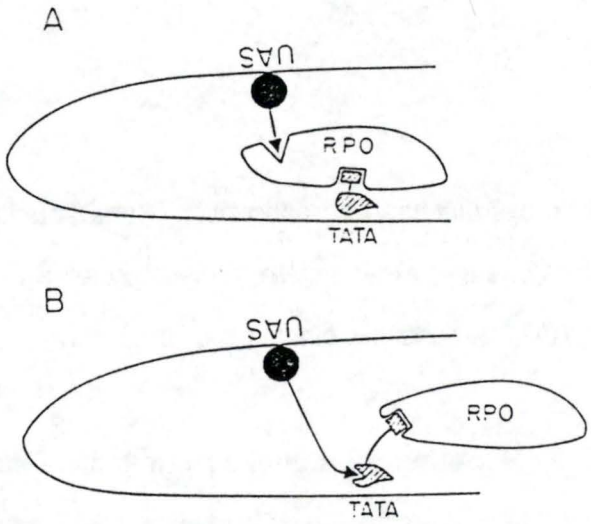


FIG.15 Les deux mécanismes possibles de l'activation transcriptionelle chez les eucaryotes par formation d'une boucle dans l'ADN (Guarente, 1988).

A. Un activateur lié à l'UAS (figure pleine) et un facteur de liaison à la TATA box (figure hachurée) interagissent avec l'ARN polymérase II.
B. L'activateur interagit avec le facteur de liaison à la TATA box qui à son tour interagit avec l'ARN polymérase II.

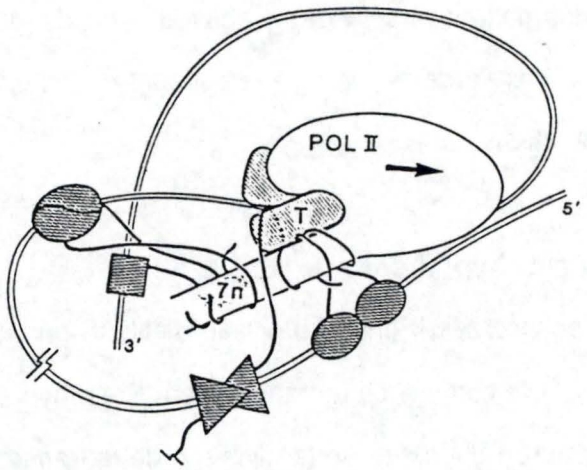


FIG.16 Un modèle du complexe de préinitiation de la polymérase II (POL II) (Sigler, 1988).
La flèche indique le domaine catalytique (tête) de la polymérase; 7n indique le domaine CT7n (queue) où des interactions avec les "negatives noodles" et le facteur de liaison à la TATA box (T) permettent le placement correct de la polymérase II. Les domaines fortements hachurés sont les domaines de liaison à l'ADN des protéines trans)activatrices qui se lient aux enhancers (ou aux UAS). Les domaines légèrement hachurés interagissent avec la polymérase II et peuvent également entrer en contact avec les "negative noodles".

interagir avec l'ARN polymérase II (FIG.15). La boîte +1 (région conservée autour du site +1) guiderait l'ARN polymérase II à l'endroit exact d' initiation de la transcription, peut-être via un facteur de liaison à cette séquence. Remarquons quechez les procaryotes, de telles interactions existent, provoquant des courbures dans l'ADN; notamment, le répresseur du phage lambda peut se lier à l'ADN et provoquer des courbures dans celui-ci. Cette hypothèse expliquerait le fait que les distances de l'UAS à la TATA box puissent varier très fort. Un argument a été proposé à l'encontre de l'hypothèse d' une boucle dans l'ADN. Il se pourrait en effet que dans le cas où les UAS sont très près de la TATA, la localisation du site+1 et le taux de transcription ne soient pas affectés. Bien que la formation d'une boucle dans l'ADN ne soit vraisemblablement pas possible sur de si courtes distances, il se pourrait néanmoins que les facteurs liés à l'UAS et à la TATA box puissent interagir directement, permettant la transcription du gène.

Un modèle analogue mais un peu plus précis au niveau des interactions moléculaires a été proposé (FIG.16; Sigler,1988). Les protéines trans-activatrices liées à leur séquence spécifique de l'ADN par leur domaine de fixation activeraient la polymérase II par leur domaine en "negative noodle". Les interactions à ce niveau se feraient entre les groupements carboxyls des "noodles" et les groupements hydroxyls du CT7n (FIG.17a). Ce caractère peu spécifique de l'interaction activatrice constitue une nécessité fonctionnelle dans la mesure où le domaine CT7n d'un organisme sert dans une variété très large d' unités de transcription de cet organisme. Une fois que les composants d' un complexe de pré-initiation stable ont été assemblés, l'ARN polymérase doit être libérée du complexe pour effectuer l'élongation de la chaîne d' ARN. Les groupements hydroxyles de la partie CT7n seraient phosphorylés au niveau des sites d' interaction avec le domaine activateur (FIG.17b). Les groupements phosphates chargés négativement repousseraient la protéine activatrice de même charge et empêcheraient la formation de ponts hydrogènes entre le CT7n hydroxylé et le produit de transcription; ceci semble important car la formation de ponts hydrogènes

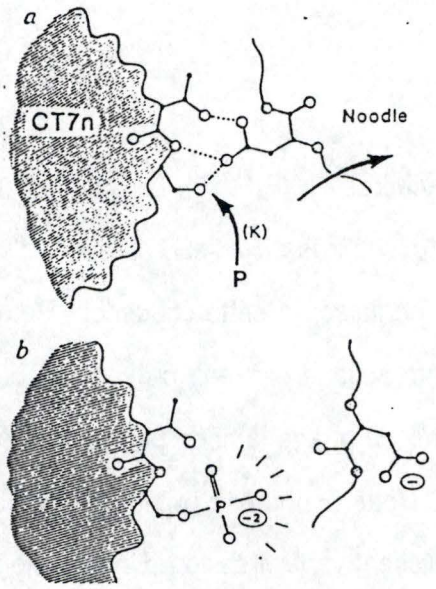


FIG.17 a. Contact entre les résidus acides du domaine activateur de la transcription et les groupements hydroxyls du domaine CT7n de la polymérase II.

b. La phosphorylation du CT7n par une kinase (K) libère la polymérase, permettant ainsi la transcription proprement dite (Sigler, 1988).

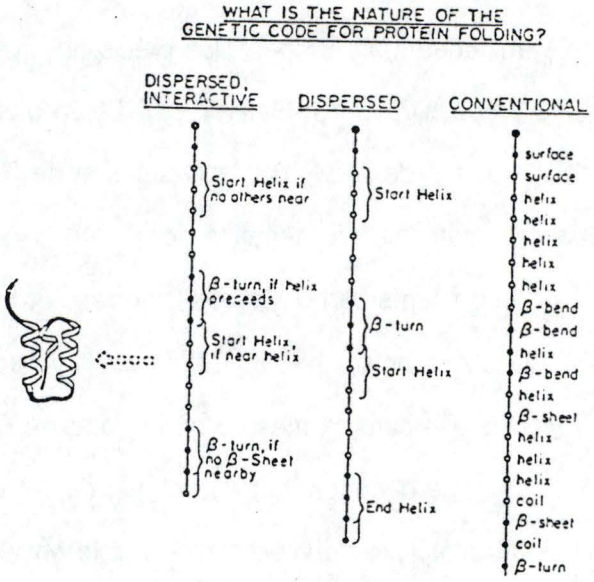


FIG.18 Les trois modèles décrivant l'importance des aa dans la détermination de la structure spatiale d'un peptide formant une structure en "helix-turn-helix" (King, 1986).

entre le domaine CT7n et l'ARNm aurait pour conséquence l'arrêt de la transcription, la polymérase II étant retenue par ces liens.

On connaît encore peu de choses des facteurs de liaison à la TATA box et seules des études biochimiques et génétiques approfondies permettront de préciser leur rôle et de compléter ce modèle (Sigler,1988).

3.1.3. Déterminisme moléculaire de la structure des protéines.

Le repliement ("folding") de la structure primaire d' une protéine pour acquérir sa structure conformationelle est encore mal connu. Or la conaissance de la structure spatiale d' une protéine est importante; cette structure est responsable de l'interaction de la protéine avec ses cofacteurs, son substrat, et de l'appariement des monomères dans le cas d' une protéine multimérique et *in fine* de l'activité catalytique et de la stabilité de la protéine. Des éléments de structure du gène jouent un rôle dans l'établissement de la configuration fonctionnelle de la protéine; c'est en effet la structure primaire qui détermine les structures d'ordre supérieur.

Plusieurs hypothèses quant à l'importance de la structure primaire ont été envisagées (FIG.18):

*Chaque aa est important dans la détermination de la structure secondaire et tertiaire d' une protéine. Diverses observations et expériences infirment cette hypothèse: les hémoglobines de différentes espèces varient assez fort dans leur séquence mais ont la même structure tertiaire générale; il en est de même pour les cytochromes (Lewin,1987; King,1986).

*L'information conformationnelle est totalement dispersée, quelques aa seulement déterminent la structure tertiaire. Cette hypothèse a évolué pour devenir la troisième hypothèse.

*L'information est dispersée mais les aa importants dans la détermination de la structure tertiaire subissent l'influence du microenvironnement, c'est-à-dire des aa voisins et du solvant (King, 1986).

Le repliement des protéines est souvent considéré soit comme séquentiel c'est-à-dire qu'il a lieu lors de la synthèse de la protéine, soit coopératif c'est-à-dire après la synthèse, certaines interactions en amenant d' autres.

L'hypothèse du repliement séquentiel se base sur le fait que de nombreuses protéines dénaturées ne peuvent pas être renaturées, même si elles sont replacées dans leur milieu physiologique. Il se pourrait que la conformation ne puisse être acquise que pendant la synthèse protéique, différentes régions ne pouvant interagir qu'en l'absence d' autres régions (celles qui n'ont pas encore été synthétisées). Dans ce cas une protéine est active sous une forme qui peut être intrinsèquement moins stable que sa forme la plus stable (Lewin, 1987).

L'hypothèse du repliement coopératif se base sur des expériences où une protéine qui a été dénaturée peut recouvrer sa configuration active si on la replace dans des conditions non-dénaturantes. C'est le cas par exemple de la ribonucléase pancréatique bovine dénaturée par l'urée et de l'hémoglobine dénaturée dans un milieu basique (Szulmajster, 1988).

Récemment, des modèles assez précis ont été avancés pour expliquer le "folding" des protéines; ils sont notamment basés sur le fait qu'il existe des intermédiaires partiellement repliés entre les formes non-repliée et active. La présence de ces intermédiaires biens définis indique que les chaînes protéiques suivent un cheminement précis pour atteindre leur structure native (King, 1986). Les études de ces structures partiellement repliées sur des petits peptides et des structures résiduelles de protéines dénaturées ont permis de développer entre autres les modèles de type diffusion-collision qui semblent les plus intéressants sur base des données expérimentales actuelles: des microdomaines structurés se forment rapidement suivis de diffusion et collisions qui mènent à la forme native de la protéine (Wright, 1988).

Le "folding" type semble être le suivant: des régions localisées de la chaîne protéique adoptent une structure secondaire en quelques microsecondes car seuls quelques aa très proches entrent en jeu. Ensuite ces régions interagissent pour former

un domaine dont la structure tertiaire est définie, puis ces domaines sont assemblés par des liaisons spécifiques pour donner à la protéine sa configuration native (Szulmajster, 1988). Bien que l'on soit encore loin de pouvoir évaluer ces modèles , il semble certain que l'information conformationelle est diffuse dans la protéine et qu'une bonne partie des aa d' une protéine peuvent être changés sans influencer la structure tertiaire de celle-ci (King ,1986). Cependant, ces changements d' aa peuvent influencer l'activité et/ou la stabilité de la protéine, même si la structure tertiaire est conservée. En effet, des aa qui ne sont pas impliqués dans l'information de la structure spatiale peuvent faire partie du site de liaison à un cofacteur ou à un ion nécessaires au fonctionnement catalytique de la protéine, à la liaison du substrat ou encore à l'établissement des interactions entre monomères dans le cas de protéines multimériques. L'importance de ces résidus d' aa conformationellement informatifs est actuellement très étudiée grâce à la technique puissante de mutagenèse dirigée. Elle permet de changer un ou plusieurs nucléotides dans la séquence codante d' un gène et ce faisant un ou plusieurs aa dans la chaîne protéique pour cerner le rôle de ces aa pour les caractéristiques structurales et/ou fonctionnelles de la protéine.

3.2. Intérêt particulier du système ADH de levure dans le contexte de la compréhension de la relation srtructure-fonction du gène.

3.2.1. L'homologie fonctionelle des effecteurs et des modulateurs de la transcription a été démontrée, dans certains cas, entre la levure et des mammifères, dont l'homme.

Les facteurs généraux de transcription et les activateurs ont été montrés comme fonctionnellement interchangeables entre l'homme et la levure (Wasylyk,1988 b). Une protéine de levure peut remplacer fonctionnellement la protéine de liaison à la TATA box des mammifères (BTF1,FIG.4) pour l'initiation correcte à partir d' un promoteur de mammifère. De plus un facteur de transcription amont de mammifère stimule la

transcription que l'on utilise une TATA box humaine ou de levure dans un système in vitro (Wasylyk,1988 b; Buratowski,1988).

La protéine trans-activatrice de levure GAL4 exprimée dans une cellule de mammifère active la transcription à partir d' un promoteur de mammifère contenant le site de liaison à GAL4 ou même à partir d' un promoteur minimum contenant seulement le site de liaison à GAL4 et une TATA box, et cela par les même séquences protéiques que celles qui activent la transcription chez la levure. De plus, on a montré que les 114 aa C-term de GAL4 ou une séquence de 19 aa de GCN4 fusionnés avec la partie de fixation à l'ADN d' un récepteur humain à l'oestrogène (qui est une protéine trans-activatrice humaine) active la transcription par le site de liaison au récepteur de l'oestrogène(Guarente, 1987, 1988). Ces expériences montrent qu'une protéine trans-activatrice de levure peut se fixer par son domaine de liaison à son UAS correspondant dans un noyau de cellule de mammifère et que les domaines activateurs peuvent interagir avec les éléments généraux de la transcription chez les mammifères .

En outre, on a montré que les protéines de transcription GCN4 de levure et AP1 (c-jun) humaine sont homologues dans leur séquence en aa et se lient spécifiquement à une séquence d' ADN similaire.

Le dernier exemple concerne les activateurs qui se lient à la CAAT box; ce sont des complexes hétérodimériques chez la levure comme chez l'homme. Des complexes hybrides composés de sous-unités de levure (HAP2 ou HAP3) et de mammifères (CP1A ou CP1B) reconstituent un complexe spécifique de l'ADN (Wasylyk, 88 b).

Ces expériences démontrent à souhait les homologies fonctionnelles de l'initiation de la transcription découvertes entre la levure et les eucaryotes supérieurs qui étaient pressenties au vu des homologies structurelles des divers éléments intervenant dans ce phénomène.

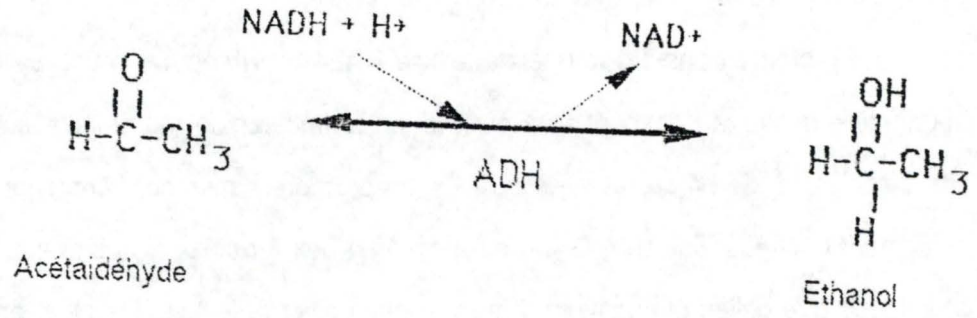


FIG.19: Réaction catalysée par l'alcool déshydrogénase.

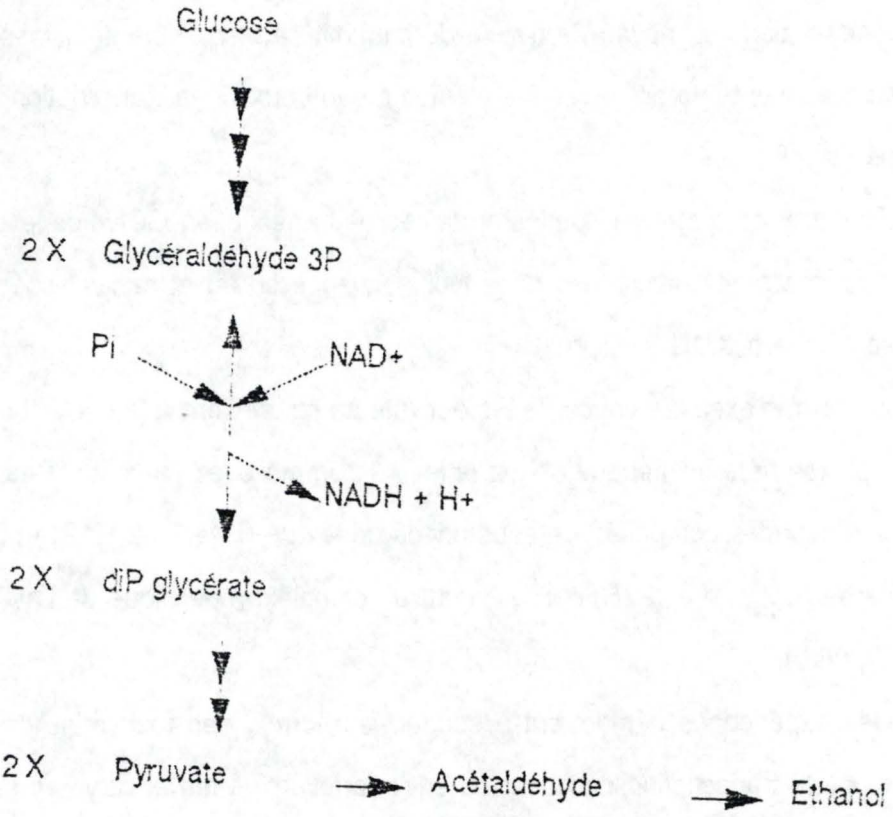


FIG.20. La fermentation alcoolique est greffée sur la glycolyse.

3.2.2. L'abondance des données physiologiques et moléculaires des enzymes du système ADH suggère des hypothèses sur les relations structure-fonction tant au niveau de l'expression génétique qu'au niveau de l'activité catalytique.

3.2.2.1. La réaction catalysée par l'ADH.

L'ADH catalyse la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol qui s'accompagne de l'oxydation du NADH+H+ en NAD+ (FIG.19). Cette réaction se réalise en fin de glycolyse (FIG.20). La transformation de glucose en éthanol s'appelle la fermentation alcoolique. Le NAD+ régénéré lors de la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol est utilisé par la glycéraldéhyde 3P déshydrogénase et permet ainsi la glycolyse continue en conditions anaérobies (Stryer, 1988; FIG 21). Cette capacité a été exploitée pour la sélection de souches de levure possédant une ADH au moins: seules ces souches peuvent pousser dans des conditions non-respiratoires (antimycine A dans le milieu de culture) (Williamson, 1981). L'ADH peut également réduire d' autres alcools et des stéroïdes (c'est surtout le cas des ADH de mammifères) (Branden, 1975).

3.2.2.2. La levure est par excellence l'organisme qui réalise la fermentation alcoolique.

Son système ADH est composé de 4 enzymes.

L'ADH IV a une séquence primaire tout à fait différente des 3 autres ADH, mais elle est homologue à celle de l'ADH de la bactérie *Zymomonas mobilis*. La fonction physiologique de l'ADH IV dans la levure demeure inconnue, mais il semble qu'elle soit un reliquat car une souche de *S. cerevisiae* dans laquelle le gène ADH 4 (codant pour la protéine ADH IV) est disrupté ne confère pas de phénotype détectable à cette souche. Ce gène qui est très peu exprimé dans la plupart des souches et des conditions de laboratoire semble néanmoins fournir de plus grandes quantités d' ADH active dans des souches de brasserie (Williamson, 1987; Drewke, 1988).

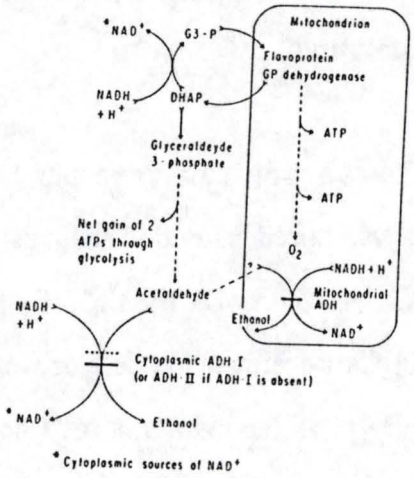


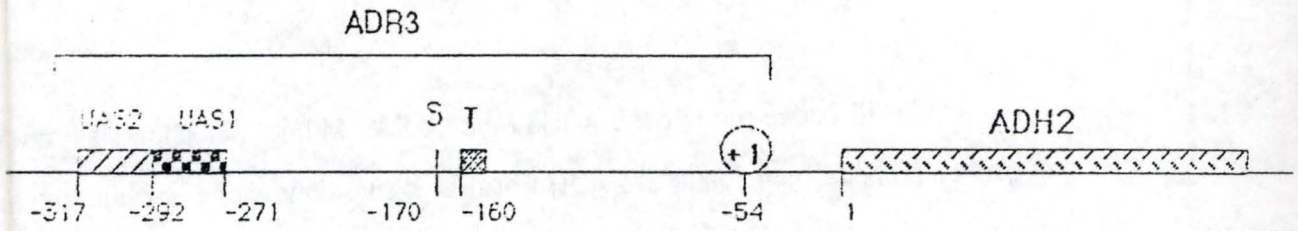
FIG.21 La régénération du NAD+ par le système ADH permet la glycolyse continue en conditions non-respiratoires (Wills, 1975).

L'ADH III codée par le gène ADH3 (anc. ADM3, M pour Mitochondrial), a une séquence primaire homologue des ADH I et II et dérive donc d'une enzyme parente commune avec les ADH I et II; elle possède en plus de ces deux ci une séquence aa (peptide de transit) responsable de la destination mitochondriale de cet isozyme. Son degré de parenté avec les ADH I et II donne à penser qu'elle était précédemment cytosolique, avant l'adjonction de la séquence codant pour le peptide de transit. Elle est caractérisée par sa localisation dans la membrane mitochondriale interne et par sa stabilité thermique supérieure aux autres ADH. Un rôle proposé pour cette enzyme est la production d' ATP et d' acétyl CoA pendant la biogenèse mitochondriale permettant la production des phospholipides nécessaires à la formation de la membrane mitochondriale. L'expression du gène ADH3 étant réprimée par le glucose et sa localisation mitochondriale ont donné à penser que l'enzyme avait une fonction respiratoire mais l'altération du gène n'empêche pas la croissance de la levure sur milieu respiratoire (Young, 1985; Van Loon, 1986).

Les ADH I et II ont été bien mieux étudiées tant au niveau génétique que biochimique, leur régulation et leurs caractéristiques cataboliques corroborant leur fonction physiologique.

L'ADH I est constitutive et catalyse la réduction d' acétaldéhyde en éthanol lors de la fermentation. L'ADH II est glucose-répressible et catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde lors de la croissance oxydative de la levure sur un milieu contenant de l'éthanol ou après plusieurs heures (20) de croissance fermentante sur glucose qui s'est enrichi en éthanol (Fowler, 1972). Notons que sa spécificité marquée pour les alcool en C3 et C4 lui permettrait de jouer également un rôle de détoxification de la levure vis-à-vis des alcools supérieurs (Schimpfessel, 1968).

A.



(+1) site d'initiation le plus utilisé dans le promoteur de ADH2.

T : TATA box.

S : site de restriction *Sph*I.

B.

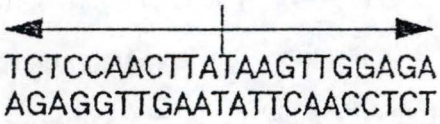


FIG.22. A. Le locus ADR3 est le promoteur de ADH2.
B. L'UAS1 est une dyade (palindrôme) de 22 pb.

ADR3 Allele	ADH Activity (mU/mg protein)	
	Growth on Glucose	Growth on Ethanol
Wild-type	15	1850
3-1[c]	590	880
3-2[c]	630	950
3-3[c]	468	220
3-4[c]	516	4440
3-5[c]	410	4680
3-6[c]	783	1590
3-7[c]	522	746
3-8[c]	184	183
3-9[c]	690	380

Tableau 1. Les mutations ADR3c rendent la souche ADH II-constitutive (au moins partiellement) (Williamson, 1981).

3.2.2.3. Les régulations de l'expression des gènes ADH1 et ADH2 sont très différentes en accord avec leur rôle physiologique.

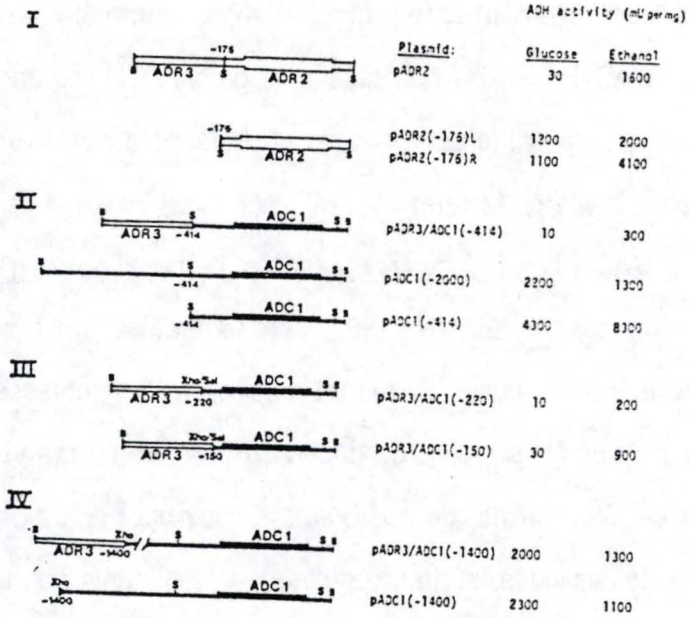
L'ADH I est dite constitutive, le gène ADH1 (ou anciennement ADC1, C pour Constitutif) s'exprime sur un substrat de fermentation (glucose) ou de respiration (éthanol, glycérol, lactate).

L'ADH II est glucose-répressible; l'expression du gène ADH2 (noté ADR2, R pour Repressible, jusqu'en 1984) est réprimée sur un milieu au glucose et déréprimée de 60 à 200 fois sur un milieu de respiration (Schimpfessel, 1968; Ciriacy, 1975). La régulation de l'expression du gène ADH2 est complexe et n'est pas encore totalement élucidée. Néanmoins, de nombreux travaux ont permis de cerner les principaux éléments impliqués, surtout par l'étude des mutants permettant l' expression constitutive de l'ADH II ou empêchant sa dérépression.

Les éléments 5' cis-actifs de la régulation de l'expression du gène ADH II .

Le locus ADR3 (FIG.22).

Les deux UAS et la séquence se trouvant en amont de la TATA box du gène ADH2 ont d' abord été décrits comme étant un gène séparé, le gène ADR3, lié à ADH2 et régulateur de celui-ci (Ciriacy, 1976). Le locus ADR3 est responsable de la répression par le glucose; en effet la présence d' un élément d' insertion de levure dans le gène ADR3, refoulant ainsi les UAS loin en amont du site+1, rend la souche ADH II constitutive; le gène est alors signalé ADR3c (Williamson, 1981;TABLEAU 1). L'effet ADR3c a été obtenu en délétant la séquence d' ADN en amont du site de restriction *Sph* I situé à -176 pb de l'ORF de ADH2. Cette délétion permet de conserver la TATA box située à -160 pb de l'ORF mais élimine les séquences 5' de la TATA box dont les UAS (Beier, 1982;TABLEAU 2 [I]). Le rôle régulateur du locus ADR3 a été réellement démontré par le clonage de ADR3 (séquence amont de la TATA box de ADH2) devant la TATA box de ADH1, rendant ainsi l'ADH I glucose-répressible et



	Plasmid:	ADH activity (mU per mg) Glucose	Ethanol
I	pADR2	30	1600
	pADR2(-176)L	1200	2000
	pADR2(-176)R	1100	4100
II	pADR3/ADC1(-414)	10	300
	pADC1(-2000)	2200	1300
	pADC1(-414)	4300	8300
III	pADR3/ADC1(-220)	10	200
	pADR3/ADC1(-150)	30	900
IV	pADR3/ADC1(-1400)	2000	1300
	pADC1(-1400)	2300	1100

Tableau 2. Activité de l'ADH II en conditions de répression (glucose) et de dérépression (éthanol) de différentes construction génétiques (Beier, 1982).

fortement exprimée en conditions de dérépression (Beier, 1982). Par contre, la délétion de portions d' ADN plus restreintes englobant les UAS ou la délétion dirigée de l'UAS1 (dyade de 22 pb située de -271 à -292) (FIG.22b) empêche la dérépression normale de l'ADH II (ou de l'ADH I dans la construction hybride précitée) (Beier, 1982 et 1985; Schuster, 1986). L'UAS1 est donc nécessaire à la dérépression sur le promoteur adjacent et ne conditionne pas la répression sur le milieu au glucose, ce qui est en accord avec le modèle de l'UAS proposé dans la présentation du gène eucaryote (Beier, 1985).

L'indépendance des phénomènes de répression et de dérépression a été montrée par une expérience sur une construction hybride ADR3-ADH1. Le clonage de la séquence ADR3 à 1300 pb en amont du promoteur de ADHI conserve la constitutivité de l'ADH I (TABLEAU 2 [IV]). Les UAS de ADR3 n'ont pas d' effet à grande distance ce qui explique par ailleurs les mutations ADR3c lors de la présence d' un élément d' insertion de 5.6 kb entre ces UAS et le promoteur de ADH2. Le clonage de ADR3 à 300 pb en amont du promoteur de ADH1 confère la répressivité au glucose à l'ADH I mais une dérépression optimale nécessite le clonage à 30 pb du promoteur de ADH1 (TABLEAU 2 [II et III]).

De plus la dérépression n'est possible que dans une souche CCR1 (ce locus sera expliqué par la suite), la répression étant indépendante vis-à-vis de ce gène ce qui confirme l'indépendance des phénomènes de répression et de dérépression (Beier, 1982). Les séquences précises responsables de la répression de l'expression sur milieu au glucose n'ont pas encore été mises en évidence actuellement.

Dans le locus ADR3 d'autres séquences que les UAS jouent un rôle dans la dérépression mais le mécanisme qui y est associé n'est pas connu bien que l'on sache que le facteur de liaison à l'UAS1 (ADR I, présenté plus loin) interagit avec une de ces séquences au moins (Beier, 1985; Shuster, 1986).

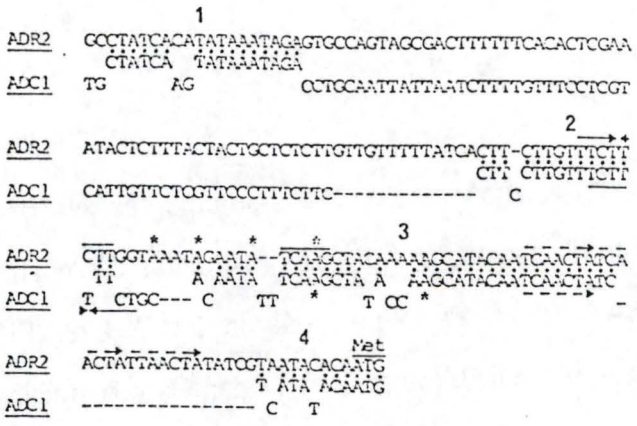


FIG.23 Comparaison des séquences de sélection du site d'initiation des gènes ADH1 (ADC1) et ADH2 (ADR2) (Russel, 1983).

1, 2, 3 et **4**: les 4 régions homologues entre les deux gènes.
Les flèches en continu: répétitions inverses (IR).
Les flèches en pointillés: répétitions directes (DR).
*: sites +1 de transcription.

FIG.24 La présence d'un élément d'insertion en aval de la TATA box (entourée en gras) est responsable de la mutation 8c (Williamson, 1983).

FIG.25 Fin de la séquence Δ limitant l'élément d'insertion. Les séquences soulignées contiennent les TATA box potentielles pour l'initiation du gène ADH2 de la souche mutante ADR3-8c (Williamson, 1983).

Mutant	Insertion site[b]	5-bp duplications[c]	ADHII activity (μg/mg of protein)[a]	
			Glucose	Ethanol
Wild type			15	1,850
ADR3-2[c]	−210	CATAG	630	950
ADR3-7[c]	−199	GGTTC	522	746
ADR3-3[c]	−169	CTATC	468	220
ADR3-6[c]	−161	TATAA	738	1,590
ADR3-8[c]	−125	CGAAA	184	183

Tableau 3. La mutation ADR3-8c rend la souche partiellement ADHII-constitutive (Williamson, 1983).

La séquence de sélection du site d' initiation qui va de la TATA box au site d' initiation de la transcription (site+1) est primordiale pour l'expression du gène ADH2 (FIG.23).

Cette région est homologue entre les gènes ADH1 et ADH2, la conservation de la séquence nucléotidique étant de plus de 40%; on y distingue 3 sous-régions presque totalement conservées: la région de la TATA box, une région en aval riche en pyrimidines, la région comprenant les sites d' initiations (4 dont 2 principaux pour ADH2, 2 pour ADH1). De plus une quatrième région homologue est observée dans la séquence du gène en amont du codon ATG de démarrage de l'ARNm. Des régions homologues similaires existent dans des gènes codant pour des ARNm abondants; on pense donc que ces régions sont importantes pour assurer une transcription suffisante de ces gènes (Russel, 1983).

La TATA box se trouve à plus de 100 pb du site +1 le plus utilisé, dans le cas du gène ADH1 comme de ADH2. Un mutant noté ADR3-8c analogue aux mutants ADR3c précédemment décrits a été étudié (FIG. 24). La mutation vient de la présence d' un élément d' insertion, non pas entre les UAS et la TATA box mais bien en aval de celle-ci, la refoulant 5.6 Kb en amont du site d' initiation. Les trois régions d' homologie avec ADH1 autres que celle de la TATA box sont conservées et la partie terminale de l'élément d' insertion (appelée séquence Δ) contient une région qui pourrait jouer le rôle de la TATA box (FIG.25). Par cette mutation l'ADH II devient partiellement constitutive mais à un taux inférieur aux autres mutations ADR3c (TABLEAU 3); cela est compréhensible car la nouvelle TATA box se retrouve à 130 pb en amont du site +1 principal (c-à-d 30 pb plus loin que le gène original) et elle est différente de la séquence exacte de la TATA box (Williamson, 1983). On voit donc que si on augmente la distance séparant la TATA box de la région d' initiation, le taux d' expression diminue; il serait intéressant de savoir jusqu'à quelle distance du site+1 la TATA box permet l'activation, et si l'effet inverse est observé lors du rapprochement de la TATA box.

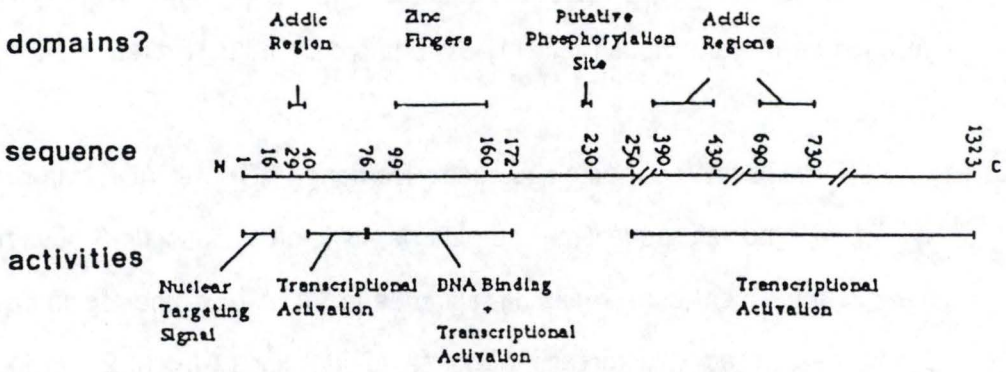


FIG.26 Caractéristiques structurales et régions fonctionelles de ADR I (Thukral, 1989).

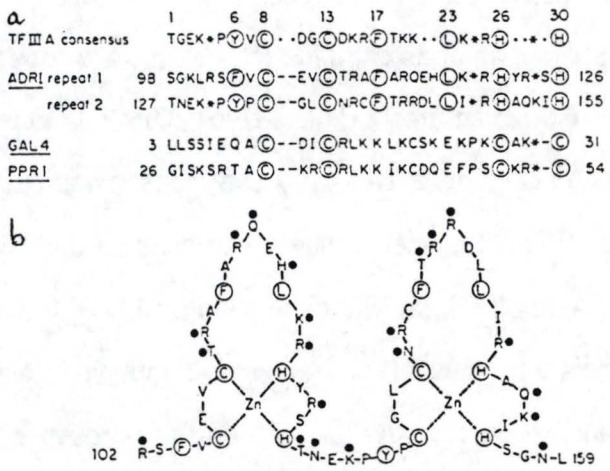


FIG.27 a. Comparaison des séquences en aa des deux "zinc fingers" de ADR I avec le consensus de TFIIIA et avec deux autres "zinc fingers" de protéines de levure (Hartshorne, 1986).

La deuxième région conservée avec le gène ADH1 est située des nucléotides -86 à -71, est riche en pyrimidines et est composée en partie d' une séquence inversement répétée (IR); elle n'a pas de rôle connu mais pourrait intervenir dans des interactions avec des facteurs de transcription lors de l'initiation (Russel, 1983).

La troisième région comprend les 4 sites d' initiation dans le gène ADH2. Trois des quatres sites +1 font chacun partie d' une boîte +1 correspondant à un des deux consensus précédemment décrits: soit RRYRR (R=purine, Y=pyrimidine), soit TC(G/A)A. Le site en position -67 fait partie de la séquence GGTAA, le site en -63 de la séquence AATAG, le site -58 de la séquence AATAT (diffère par un nucléotide du consensus) et le site +1 le plus utilisé en position -54 , de la séquence TCAA. Cette même troisième région comprend aussi le début d' une série de trois répétitions directes dans ADH2 dont une seule est conservée dans ADH1.

La quatrième région, contiguë avec la troisième dans ADH1, comprend le codon ATG de démarrage de la traduction ainsi que quelques pb en amont et servirait au placement correct de la machinerie de traduction sur l'ARNm (Russel, 1983).

Les éléments trans-actifs de la régulation de l'expression du gène ADH2.

La protéine ADRI (1323 aa), produit du gène ADR1 est le facteur trans-actif le plus étudié; il permet l'accumulation d' ARNm de ADH2 (FIG.26; Denis,1981).

a. La protéine ADR I se lie à des séquences signal en amont du gène ADH2.

Il contient dans sa partie amino-terminale deux structures en zinc finger (aa 102 à 159) comparables à celle bien connue du TFIIIA du Xenope décrite dans la partie concernant les interactions protéine-ADN (FIG.27). Les zinc fingers de la protéine ADR I se distinguent des structures observées dans les autres protéines activatrices de levure; en effet la liaison avec l'atome de zinc est réalisée par deux cystéines et deux histidines comme dans les zinc fingers de TFIIIA et non pas par 4 cystéines

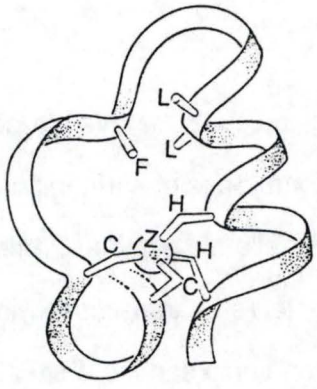


FIG.28 Configuration spatiale d'un doigt de zinc de la protéine ADR I (Parraga, 1988).

Amino acids encoded in fusion	Enzyme activity			
	ADHII (mU/mg)		β-Galactosidase (A_{420}/min per A_{600} × 1.000)	
	Repressed	Derepressed	Repressed	Derepressed
1. 1–642	3,400	13,000	14	12
2. 1–16,24–642	3,000	10,500	11	13
3. 1–16,40–642	2,600	9,600	11	14
4. 1–16,76–642	840	4,100	45	47
5. 1–16,99–642	10	41	42	30
6. 1–172	170	900	120	100
7. 1–16,24–172	120	1,100	130	140
8. 1–16,76–172	130	690	180	180
9. 1–16,99–172	4	49	260	327
10. *adrl*-Δ1	5	12		

Tableau 4. Les aa 76 à 98 de ADRI sont nécessaires pour assurer son rôle activateur de la transcription de ADH2 (comparer les lignes 4 et 5, 8 et 9) (Thukral, 1989).

(Hartshorne, 1986). La structure conformationelle d' un des zinc fingers a été déterminée (FIG.28). Dans cette figure, on remarque l'importance des résidus hydrophiles conservés (leucine et phénylalanine) pour que l'hélice alpha puisse se rapprocher des résidus cystéine. En outre, l'atome de zinc est essentiel pour la formation du doigt de zinc comme on pouvait s'y attendre (Parraga, 1988).

Des expériences démontrent que cette région de liaison à l'ADN est essentielle pour la fixation de ADR I; d' une part la fixation de ADR I sur les UAS de ADH2 est dépendante vis-à-vis du zinc (Eisen, 1988); d' autre part des mutations affectant un des aa (cys ou his) qui lie le zinc, rendant la souche incapable de déréprimer le gène ADH2 sur milieu à l'éthanol, prouvant par là-même la nécessité des deux doigts de zinc pour une liaison correcte aux UAS de ADH2 (Blumberg, 1987). Ce dernier résultat à été confirmé par des expériences de délétion montrant la nécessité de l'entièreté des séquences aa formant les 2 zinc fingers (Thukral, 1989).

Plusieurs expériences ont permis de montrer que l'essentiel de la fixation de ADR I sur les séquences amont du gène ADH2 se font au niveau de l'UAS1, une dyade de 22 pb situé de -271 à -292 en amont de l'ORF de ADH2. Des délétions comprenant cette région (Beier,1985) ou une délétion dirigée des 22 pb (Shuster, 1986) rendent la souche non-déréprimable et insensible aux mutations du locus ADR1. Des mutations ponctuelles dans l'UAS1 diminuent sensiblement la fixation; la moitié de l'UAS1 (1/2 dyade) bien que permettant une légère fixation de ADR I ne permet pas l'activation de ADH2 (Yu, 1989). De plus des expériences de footprinting ont montré que la fixation la plus forte du facteur ADR I se réalisait au niveau de l'UAS1 (Eisen, 1988).

Ces mêmes expériences ont permis de montrer que la présence de l'UAS2(la séquence qui comprend les 25 pb juste en amont de l'UAS1) en plus de l'UAS1 permettait une meilleure fixation du facteur ADRI que l'UAS1 seul (Eisen, 1988).

La localisation d' un domaine de liaison minimal dans la protéine ADR I par délétion a confirmé ces résultats: la séquence allant des aa 76 à 98 est nécessaire en plus des aa 99 à 172 (qui contiennent les deux doigts de zinc) pour se lier à l'ADN et

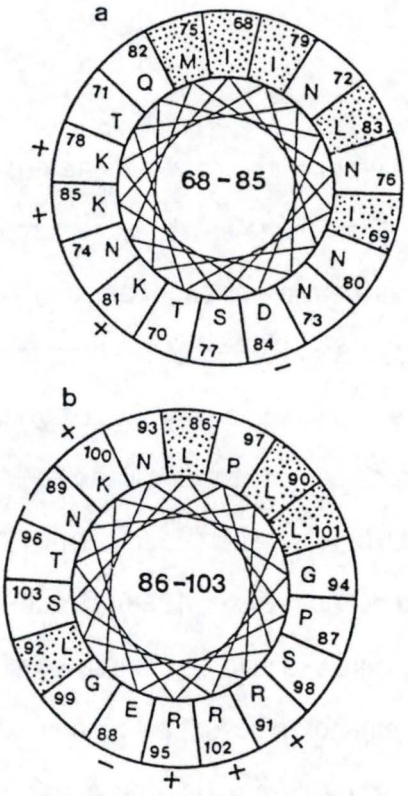


FIG.29 Représentation en hélice alpha des résidus amino-acidiques 68 à 85 (a) et 86 à 103 (b) de la protéine ADR I (Thukral, 1989).
+ et -: résidus basiques et acides respectivement.
Zones plus sombres: résidus hydrophobes.

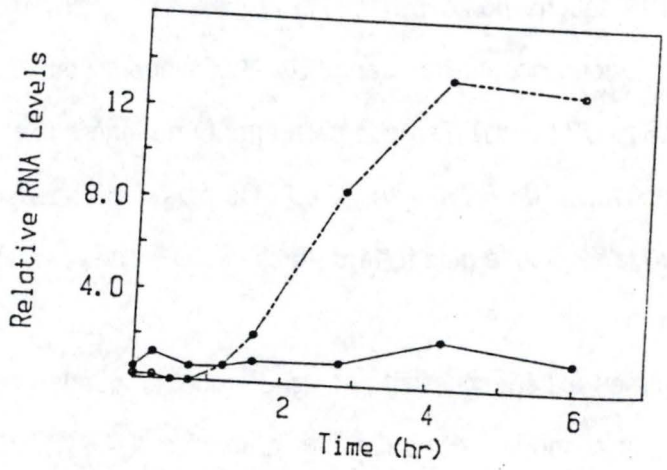


FIG.30 Le taux d'ARN de ADR1 (___) ne varie pas en conditions de dérépression alors que l'ARN de ADH2 (_ _ _) augmente fortement (Denis, 1986).

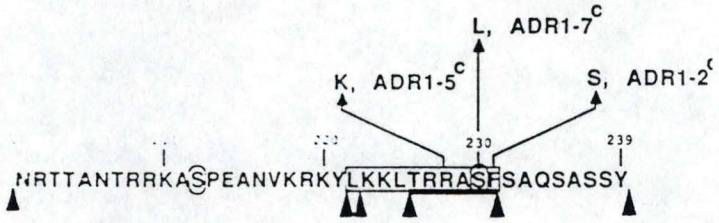


FIG.31 Localisation des mutations affectant la phosphorylation du résidu sérine 230 (Cherry, 1989).

ADR1 allele	base pair change	nucleotide number	amino acid change	residue
ADR1-2C,4C	T to C	692	Phe to Ser	231
ADR1-5C	G to A	683	Arg to Lys	228
ADR1-7C	C to T	689	Ser to Leu	230

c

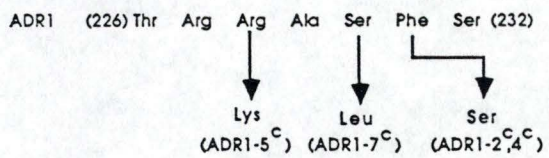


FIG.32 Mutations nucléotidiques responsables des phénotypes observés (Cherry,1989).

activer la transcription (TABLEAU 4). On remarque qu'une hélice alpha formée par les aa 68 à 103 serait très amphipatique, un côté de l'hélice étant tout à fait hydrophobe et l'autre portant des charges, surtout positives (FIG.29). Une telle structure pourrait être responsable d'interactions entre deux molécules ADR I permettant la formation de dimères de ADR1; chacun des 4 doigts de zinc de la molécule dimérique serait responsable de la liaison à 5.5 pb de la dyade de 22 pb (Thukral, 1989). Des mutations adr1 (pas de dérépression) obtenues en remplaçant des aa hydrophiles en aa hydrophobes au niveau de cette région semblent confirmer cette hypothèse (Thukral, 1989).

b. L'effet activateur de la protéine ADR I a été attribué a plusieurs régions de la protéine (FIG.26).

La protéine ADR I est régulée post-traductionnellement. En effet le taux d' ARNm de ADR1 ne varie pas que l'on passe d' un milieu au glucose à un milieu à l'éthanol et il est le même pour une souche ADR1c, un mutant constitutif pour l'ADH II (FIG.30). La protéine ADR I ne doit pas sa fonction activatrice de la transcription du gène ADH2 à sa concentration propre; elle est donc activée elle-même lors de la croissance de la levure sur un milieu dépourvu de glucose (Denis, 1986). Ces expériences ont été confirmées par des expériences utilisant une construction ADR I-béta galactosidase (Blumberg, 1988).

Plusieurs mutations ADR1c ont été étudiées (FIG.31 et 32). La mutation ADR1-5c est un changement de l'aa arginine en lysine en position 228; la mutation ADR1-7c est un changement de l'aa serine en leucine en position 230. Le résidus sérine est justement celui qui est phosphorylé in vitro dans la séquence de la FIG.29, une séquence de reconnaissance pour la phosphorylation par une protéine kinase AMPc-dépendante (cAPK). Il en résulte que la mutation ADR1-7c produit un aa non-phosphorylable et que la mutation ADR1-5c diminue la phosphorylabilité de la sérine 230. Il existe sans doute d' autres sites de phosphorylation comme les résidus sérine 212 et thréonine 226 qui sont des accepteurs potentiels. La régulation par le glucose

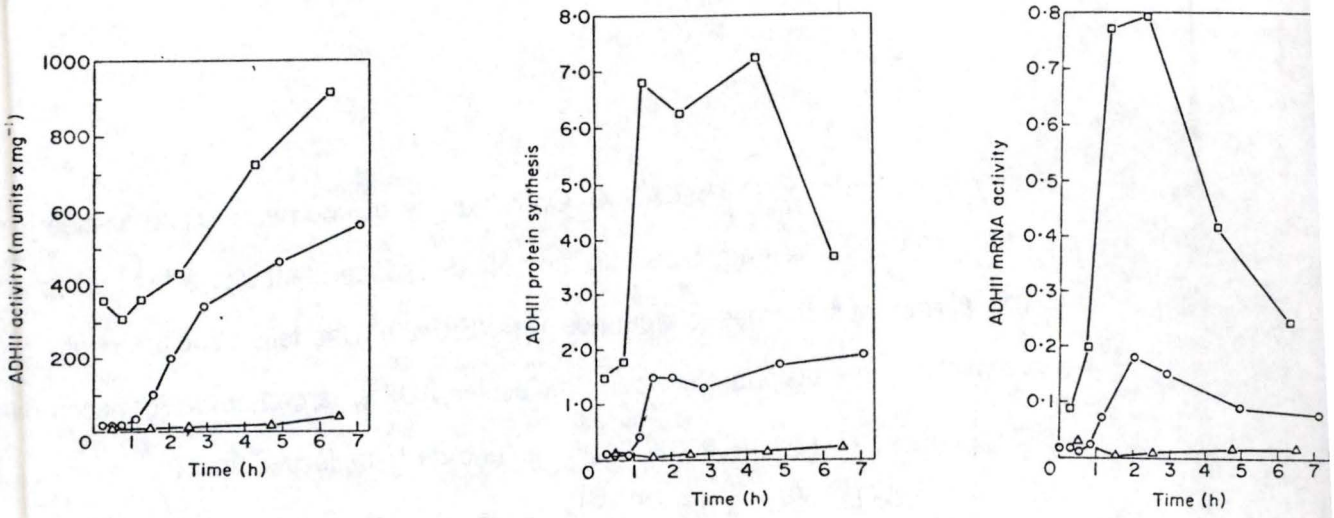


FIG.33 Les cinétiques de production d'ARNm de ADH2, de la production de la protéine ADH II et le taux d'activité de celle-ci augmentent fortement lors de la dérépression (——o——o——: souche ADR1 ADH2). Une souche mutante constitutive (——□——□——: ADR1-c ADH2) a un profil de dérépression semblable alors qu'une souche mutante déficiente (——△——△——: adr1 ADH2) ne peut être déréprimée (Denis, 1981).

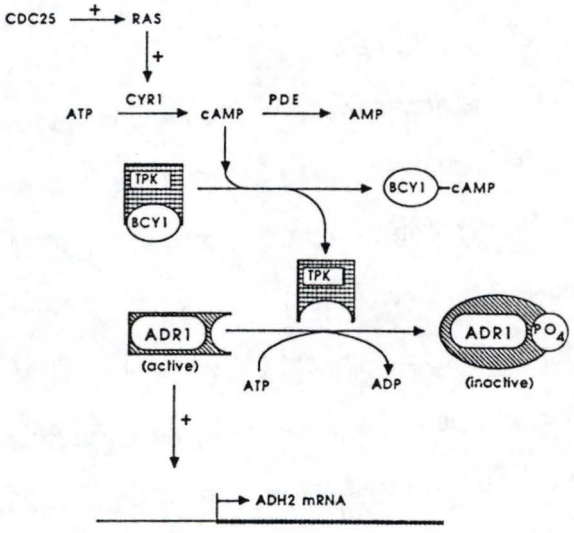


FIG.34 La régulation de la transcription du gène ADH2 par le glucose se fait via l'AMPc (Cherry, 1989).

se réalise donc en partie par une cAPK; en présence de glucose la quantité d' AMPc augmente et la cAPK phosphoryle la protéine ADR I qui ne peut pas activer la transcription de ADH2. La régulation par phosphorylation n'est pas responsable de toute la dérépression; en effet le mutant ADR1c en conditions de répression n'a que 20% de l'activité d' une souche ADR1 en dérépression, et la cinétique de dérépression de ADR1c est la même que celle de ADR1 (Denis, 1981; FIG.33). De plus la délétion de la région de phosphorylation (aa 220 à 253) ne rend pas l'ADH II insensible à la répression au glucose (Bemis, 1988).

Le système de la régulation par le glucose est représenté à la FIG.34; le glucose pourrait intervenir à différents niveaux de cette régulation, mais les connaissances actuelles ne permettent pas de dire quels gènes et quelles protéines sont les plus importantes. On remarque que la régulation de l'ADH II par phosphorylation est indirecte; ce manque de rapidité est accepté par la cellule certainement par le fait que cette enzyme n'est pas centrale pour la survie cellulaire et que des variations de son taux dans la cellule ne sont pas léthales (Cherry, 1989).

Un autre locus important pour la dérépression de l'ADH II et de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif est le locus CCR1 (CCR2 et CCR3 ont le même effet).

Le mutant ccr1 empêche la dérépression de l'ADH II et est partiellement épistatique sur l'allèle ADR1c; CCR1 semble agir avec ou via ADR1 pour activer ADR2 et est nécessaire pour la dérépression complète de l'ADH II. La mutation ccr1 ne fait pas varier le taux d' ARNm de ADR1; l'action de CCR1 sur ADR1 est sans doute post-traductionnelle mais le rôle exact de CCR1 n'est pas encore connu (Ciriacy,1977 et 1979; Denis 1986 et1987).

Le facteur ADR4.

Il n'est génétiquement lié ni à ADH1 ni à ADH2; il a été découvert grâce à l'existence d' une mutation récessive (adr4) responsable de l'expression constitutive

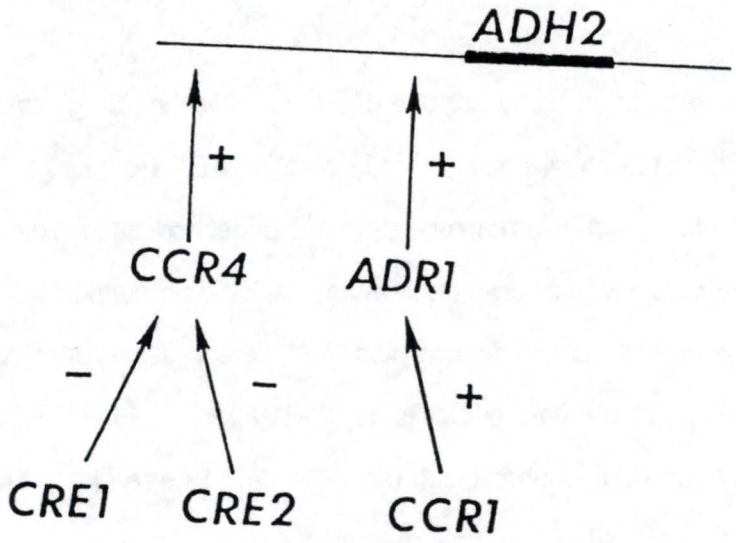


FIG.35 Les produits des gènes CCR1, CCR4, CRE1 et CRE2 jouent un rôle dans la régulation de la transcription du gène ADH2 (Denis, 1984).

Strain	Relevant genotype		ADHII enzyme activity (milliunits/mg)	
			Glucose	Ethanol
553-4b		*cre1-1*	175	2200
553-4b-10	*ccr4-10*	*cre1-1*	23	500
Segregants*	*ccr4-10*		12	40

Tableau 5. Effet des mutations ccr4 et cre1 sur la transcription de ADH2 et sur l'activité ADH II (Denis, 1984).

Genotype*		ADHII specific activity (milliunits/mg)*	
ADH2	*ADR6*	Glucose*	Glycerol
6′	+	690 (520–1200)	910 (310–2900)
6′	–	170 (93–210)	27 (19–32)
+	+	9.5 (6.6–13)	3200 (1500–4100)
+	–	3.2 (0.0–8.0)	220 (98–340)

Tableau 6. La mutation adr6 provoque la diminution de l'activité ADH II tant en répression qu'en dérépression dans une souche ADH2+ comme dans une souche ADH2-6c (Taguchi, 1987 a).

de l'ADH II d' une souche ccr1 ADR1c compensant phénotypiquement la mutation ccr1 de cette souche. Le niveau d' action de ce facteur de régulation négative demeure à ce jour inconnu (Ciriacy, 1979).

Les facteurs CCR4, CRE1 et CRE2 sont liés entre eux dans la régulation de la transcription de l'ADH II.

Le facteur CCR4 active l'expression de ADH2 (la mutation ccr4 bloque la dérépression d' une souche ADR1); il est réprimé par les facteurs CRE1 et CRE2 (les mutations cre1 et cre2 incapables d' inhiber le facteur CCR4 rendant l'ADH II partiellement constitutive sauf dans le cas d' une mutation ccr4)(FIG.35; TABLEAU 5;Denis, 1984).

Le dernier facteur à avoir été étudié est le facteur ADR6.

Son locus n'est pas lié à celui de ADR1. Une souche mutante adr6 voit son taux d' ARNm de ADH2 diminuer ainsi que l'activité ADH II (TABLEAU 6). Une souche notée ADH2-6c ou ADR3-6c où la mutation de constitutivité vient de la présence d' un élément d' insertion au niveau de la TATA box (FIG.24), subit la même influence d' une mutation adr6; le facteur ADR6 agit donc vraisemblablement au niveau de la TATA box ou de la partie aval (3') de celle-ci pour assurer la production d' un ARNm stable et mature en permettant soit l'initiation ou l'élongation correcte de la transcription, soit la maturation de l'ARNm (Taguchi, 1987 a et b).

3.2.2.4. Les séquences des gènes ADH1 et 2 et des protéines correspondantes ont été comparées.

Les différences observées ont été rapportées à la structure tertiaire prédite par la comparaison de l'ADH de levure avec la LADH (Liver ADH) de cheval dont la structure tertiaire est connue (Jörnval, 1977 a et b, 1978; Wills, 1979).

Les ADH I et II de levure sont des tétramères de 150000 daltons. Chaque monomère est constitué de 347 aa et contient 1 ou 2 atomes de zinc. L'ADH I de

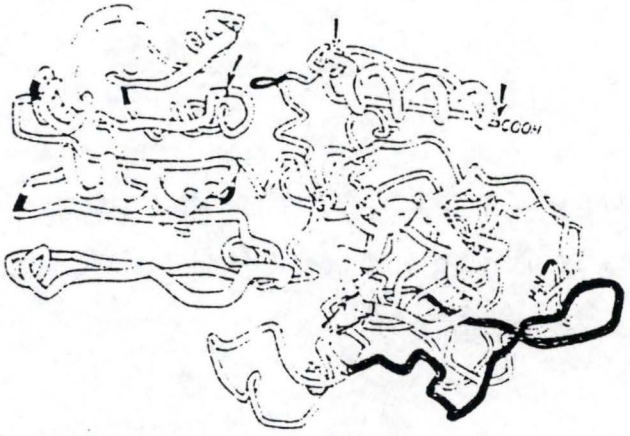


FIG.36 Structure tertiaire de la LADH de cheval.
Les parties noircies ne se trouvent pas dans l'ADH de levure.
Les flèches indiquent des aa ne se trouvant pas dans la LADH mais bien dans l'ADH (Jörnvall, 1978).

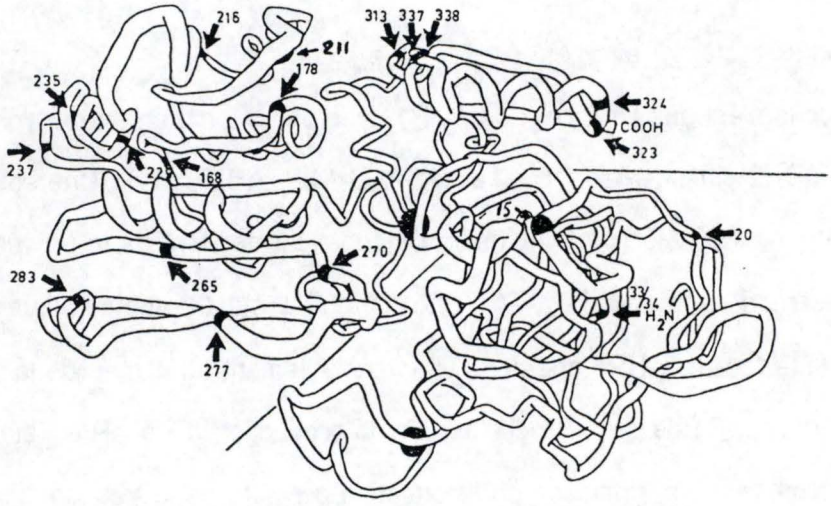


FIG.37 Position des aa de l'ADH de levure dans la structure tridimensionelle (Wills, 1979).

levure est homologue à 40% de la LADH de cheval, ce qui a permis de faire correspondre entre ces deux enzymes des résidus structurels et fonctionnels et de déduire la structure tertiaire probable de l'ADH I de celle de la LADH de cheval (FIG.36). A partir de cette structure, il a été possible de situer les aa qui diffèrent entre l'ADH I et l'ADH II.

Les gènes ADH1 et ADH2 diffèrent par 117 nucléotides sur 1044 entraînant 23 modifications de résidus aa dont 10 neutres et 13 changements de charge (TABLEAU 7). Certains de ces changements ne doivent pas être pris en ligne de compte car ils sont observés entre le même isozyme de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* . Un sous-ensemble de 7 changements entre les 2 isozymes que l'on a trouvés dans 4 souches différentes par séquençage d' ADN et protéique a été défini; ce sont les résidus : 15, 168, 211, 229, 265, 270 et 283 (Russel,1983).

La figure 34 reprend la localisation de ces aa (ainsi que d'autres aa repris dans une étude antérieure comparant les ADH I et II et la préparation commerciale d'ADH de levure où 284 des 347 aa avaient pu être comparés). Les aa 265, 270 et 283 se trouvent dans la région de l'interface entre les sous-unités et peuvent être responsables de différences de coopérativité entre monomères des 2 isozymes, tandis que les autres aa sont superficiels. Seul l'aa 15 fait partie du domaine catalytique, les 6 autres faisant partie du domaine de liaison au cofacteur (FIG.37).

Sans connaître l'importance relative de ces 7 résidus, il est certain qu'ils sont responsables des différences de Km du cofacteur et du substrat observés entre les 2 isozymes et donc de leur rôle métabolique (TABLEAU 8) ainsi que des différences de stabilité thermique entre les deux isozymes (TABLEAU 9).

Des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées sur le gène ADH1 afin de voir l'importance de certains aa dans la fonction catalytique de cette enzyme. Notamment l'aa 270 (position 294 dans la LADH) est un résidu Met dans l'ADH I et une Leu dans l'ADH II (et l'ADH III); il fait partie des 7 aa considérés comme les principaux responsables des différences catalytiques entre les enzymes.Ce changement semble important car il se trouve à l'interface entre les sous-unités et est

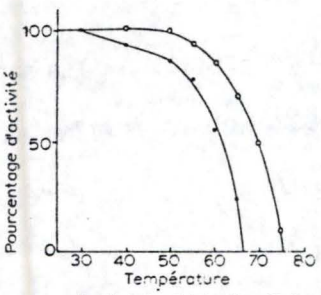
Amino acid differences between yeast alcohol dehydrogenase isozymes

Position[a]	Alcohol dehydrogenase I sequence[b]	Alcohol dehydrogenase II sequence[c]
8	Gly	Ala
9	Val	Ile
15	His	Asn
30	Ala	Pro
58	Val	Thr
127	Gln	Glu
147	Gln	Glu
168	Met	Arg
173	Val	Ala
204	Glu	Pro
211	Arg	Thr
213	Ile	Leu
229	Gly	Ser
232	Leu	Val
236	Asp	Asn
242	Val	Cys
259	Val	Cys
265	Thr	Val
270	Met	Leu
277	Cys	Ser
283	Gln	His
324	Thr	Ser
338	Val	Ala

Tableau 7. Les 23 aa différant entre les ADH I et II (Russel, 1983).

	Variable substrate			
Enzymes	Ethanol[a] (mM)	NAD[b] (mM)	Acetaldehyde[c] (μM)	$NADH_2$[d] (μM)
ADH-2	1.2	0.38	38	0.29
ADH-1	9	1	22	0.24

Tableau 8. Constantes de Michaëlis-Menten des ADH I et II (Lutstorf, 1968).



. Activité résiduelle d'alcool déshydrogénase après un traitement thermique de 5 min à différentes températures; ●, extrait de levures cultivées sur glucose; ○, extrait de levures cultivées sur éthanol.

TEMPÉRATURE D'INACTIVATION DE L'ALCOOL DÉSHYDROGÉNASE SUIVANT L'ORIGINE DE L'EXTR

Origine de l'extrait	*Température d'inactivation*	*Type d'alcool déshydrogénase*
Glucose/air	59°	alcool déshydrogénase I
Glucose/N_2	60°	alcool déshydrogénase I
Ethanol	70°	alcool déshydrogénase II
Lactate	65.5°	alcool déshydrogénase I et II

Tableau 9. L'ADH II est plus stable thermiquement que l'ADH I (Schimpfessel, 1968).

suspecté d' être un site de liaison à l'alcool. Mais le changement de la Met en Leu dans l'ADH I ne provoque pas de changement, ce qui infirme l'hypothèse proposée. La mutagenèse dirigée concernant les autres aa permettrait d' élucider les résidus d' acides aminés responsables de la spécificité physiologique de ces 2 enzymes (Ganzhorn, 1987).

3.2.3. L'application de la rétrogénétique dans la levure *Saccharomyces cerevisiae.*

La levure présente l'avantage par rapport à d' autres organismes de pouvoir être utilisé en rétrogénétique; cette technique est le moyen adéquat de répondre aux questions et aux hypothèses tant au niveau de la régulation de l'expression qu'au niveau des différence des propriétés des isozymes.

L'approche de cette technique est diamétralement opposée à l'approche classique. Cette dernière consiste à partir d' un mutant dont le phénotype particulier a été observé et de rechercher la mutation responsable de la caractéristique phénotypique. La rétrogénétique consiste dans une première étape en la création d' une mutation (changement d' un ou plusieurs nucléotides, délétion ou ajout de séquences) au niveau d' un gène préalablement isolé; la deuxième étape est le remplacement du gène chromosomique sauvage d' une souche de levure, par le gène muté. On peut ainsi voir l'effet phénotypique d' une mutation précise et choisie.

Cette technique est aussi applicable chez les mammifères mais elle est dans ce cas beaucoup plus compliquée et la réussite des recombinaisons est très faible. La levure est donc l'outil par excellence de l'étude des mécanismes transcriptionnels des eucaryotes inférieurs qui sont généralisables à tous les eucaryotes, vu les homologies structurelles et fonctionnelles décrites précédemment.

4. Le but du travail.

Ce travail se situe dans le cadre général de l'exploration des éléments de structure du gène ADH2 responsables de l'activité et de la stabilité de l'enzyme et du contrôle régulé de son expression dans la levure.

Nous nous sommes intéressés spécifiquement au rôle des séquences 5' de sélection du site d'initiation du gène ADH2, allant de la TATA box au codon ATG du gène, et comprenant 4 séquences homologues avec le promoteur du gène ADH1. On suspecte cette même région de contenir une cinquième séquence particulière, distincte des précédentes, et responsable d'une interaction avec le facteur ADR6.

Dans le but de localiser la cinquième séquence et de montrer l'importance des 5 séqences pour la régulation de la transcription, nous allons réaliser des délétions progressives, à partir d'un site se trouvant en amont de la TATA box et dirigées vers le début de la séquence codante du gène. Ces délétions devraient nous permettre d'obtenir un ensemble de gènes ADH2 diversement délétés dans la séquence de sélection du site d'initiation.

Les expériences ultérieures de rétrogénétique permettront de tester d'une part la capacité des gènes délétés à être transcrits, et d'autre part l'influence des délétions sur le phénotype d'une souche adr6; il sera ainsi possible de cerner des régions importantes de la régulation de l'expression de l'ADH II.

MATERIEL ET METHODES.

1.Souche et plasmides utilisés.

1.1.Souche bactérienne.

La souche utilisée est Escherichia coli XL1-Blue (Bullock, 1987).

Son génotype est :

endA1, hsdR17(rk-,mk+), supE44, thi-1, l-, recA1, gyrA96, relA1, (lac-).

Les principales caractéristiques de son phénotype sont:

endA1:améliore le rendement et la qualité des minipreps d'ADN plasmidique en diminuant la concentration d'endonucléases.

recA1:réduit la recombinaison au millième de son taux normal;la recombinaison entre ADN endogène et exogène est ainsi minimisée.

(lac-):délétion au niveau de l'opéron lactose;la souche ne peut pas métaboliser le lactose.

Cette souche possède l'épisome F' permettant la formation de pili sexuels;il porte les caractères suivants:

proAB, laclq ZDM15, Tn10(TetR).

Les principales caractéristiques phénotypiques qui en découlent sont:

Tn10(TetR):confère à la souche la résistance à la tétracycline. La protéine codée par ce gène modifie la membrane de la bactérie et empêche ainsi le transport de l'antibiotique dans la cellule.

lac lqZDM15:permet la sélection des plasmides recombinants par un test de couleur (qui sera détaillé dans la présentation du plasmide pBLUESCRIPT SK+).

* lac lq:mutation qui augmente la force du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.

* lac ZDM15:gène de la b-galactosidase (un des gènes de l'opéron lactose) délété dans la partie codant pour l'extrémité N-terminale de la protéine;il y a production d'une protéine inactive pouvant être complémentée intragéniquement.

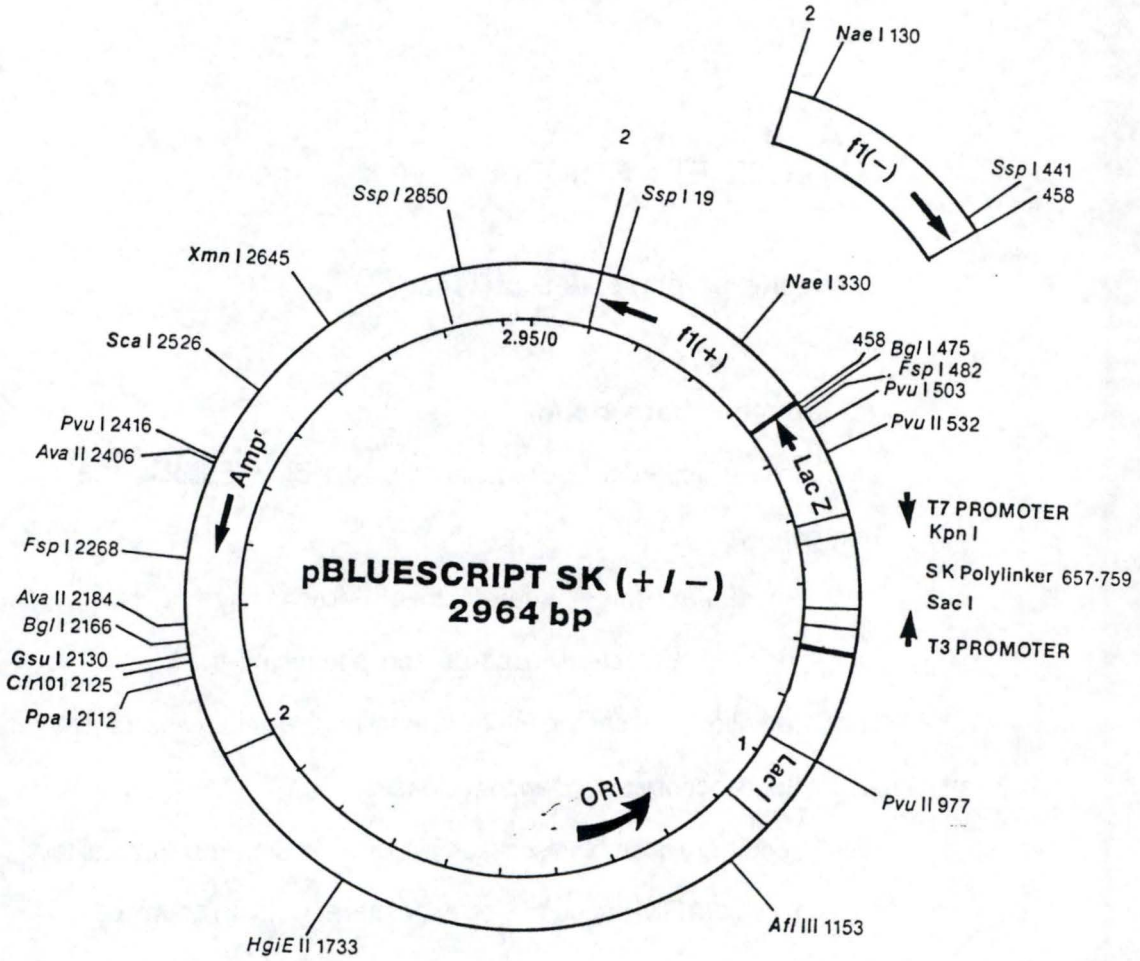


FIG.38 Le vecteur pBLUESCRIPT SK+.

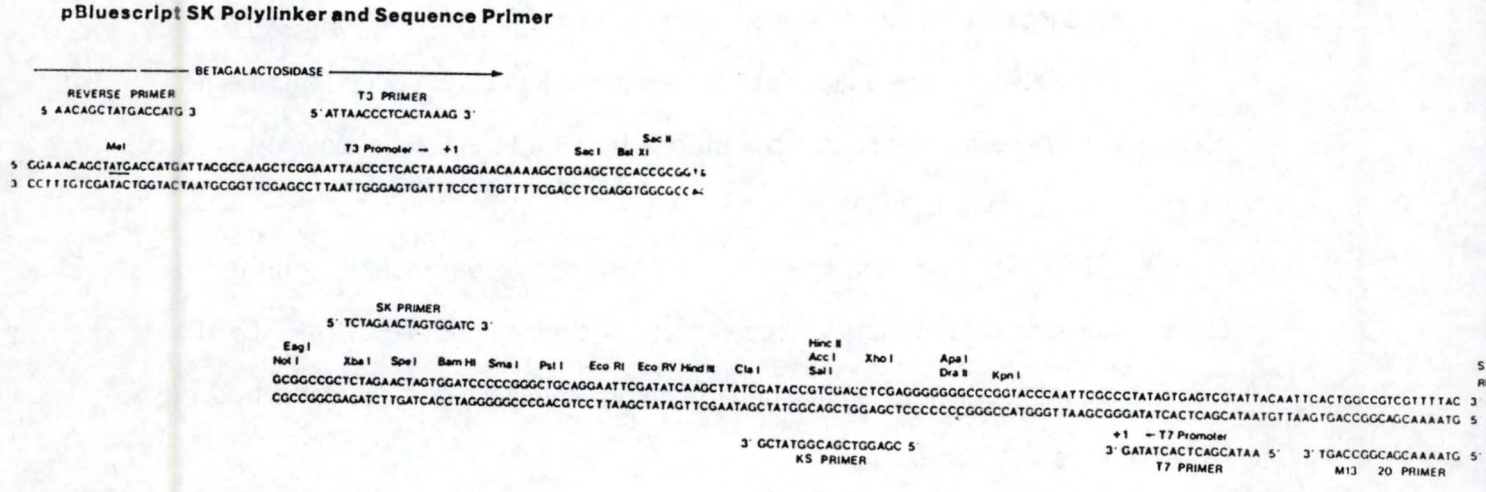


FIG.39 Le MCS du vecteur pBLUESCRIPT SK+.

1.2.Plasmides.

1.2.1.pBLUESCRIPT SK+ (commercialisé par Stratagene) (FIG.38).

Ce vecteur d'une longueur de 2964 pb , est un phagemide, c'est à dire un hybride entre un plasmide et un phage.

Il possède une origine de réplication dans E. coli (ORI colE1) qui lui permet de se trouver en un grand nombre dans la cellule (vecteur "multicopy"); il possède également une origine de réplication phagienne.

Son gène AmpR de résistance à l'ampicilline est responsable de la production d'une b-lactamase qui clive la boucle b-lactame de l'ampicilline et permet ainsi aux clones possédant ce vecteur de pousser sur un milieu contenant cet antibiotique;le gène AmpR est donc un marqueur de choix pour sélectionner ces colonies.

Le gène lacZ précédemment évoqué fait partie de l'opéron lactose; il code pour la B-galactosidase, une enzyme métabolisant le lactose.Le pBLUESCRIPT possède le promoteur lac, l'opérateur et la partie du gène codant pour l'extrémité N-terminale de la protéine (appelée peptide a, inactive sans la partie C-terminale). Lorsqu'une une souche E. coli XL1-Blue a été transformée par pBLUESCRIPT, il y a complémentation intragénique, les parties N-terminale (codée par le plasmide) et C-terminale (codée par l'épisome F') de la protéine permettant d'obtenir une enzyme fonctionnelle.

Dans la partie N-terminale du gène lacZ porté par pBLUESCRIPT se trouve une série de 21 sites de restriction, introduits via un oligonucléotide de synthèse; cette insertion permet encore au peptide a de complémenter la souche XL1-Blue pour l'activité b-galactosidase. Cet ensemble de sites de restriction est appelé Site Multiple de Clonage (MCS; FIG.39). L'introduction d'un fragment d'ADN dans un des sites de restriction du MCS entraîne la disruption du gène lacZ de pBLUESCRIPT et la disparition de la production de peptide a. Lors de la transformation de *E. coli* XL1-Blue, il n'y aura plus de β-galactosidase fonctionnelle , ce qui est facilement repérable par un test coloré des colonies bactériennes.

Les deux sites extrêmes du MCS sont Kpn I et Sac I; suivant l'orientation du MCS dans le vecteur, celui-ci sera appelé pBLUESCRIPT SK ou KS. Dans le

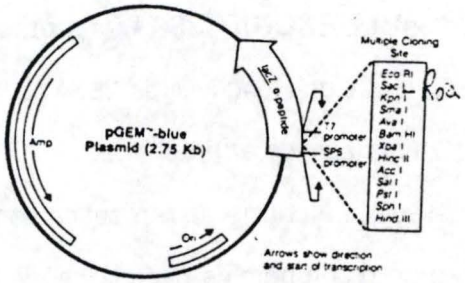


FIG.40 Le vecteur pGEM-blue.

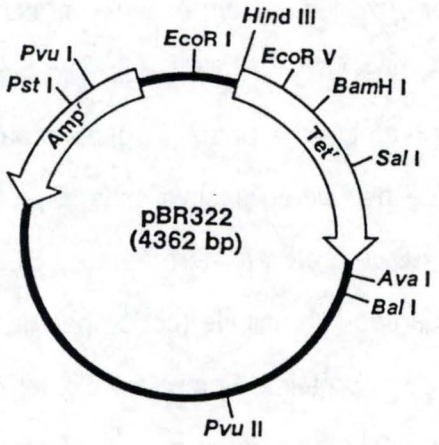


FIG.41 Le vecteur pBR322.

pBLUESCRIPT SK, la transcription de lacZ se fait du site Sac I vers le site Kpn I. Le plasmide utilisé dans ce travail est dérivé de pBLUESCRIPT SK: le site Kpn I a été remplacé par un site Bgl II.

De part et d'autre du MCS se trouvent les promoteurs T3 et T7. Ces promoteurs phagiens permettent la transcription des deux brins de l'ADN inséré dans leMCS en ARN grâce aux polymérases T3 et T7. Donc quelque soit le sens d'insertion de l'ADN cloné, il est possible de transcrire le brin d'ADN ayant la séquence codante.

L'origine de réplication f1 du phage filamenteux F permet d'obtenir un brin monocaténaire du vecteur avec l'aide d'un phage helper; celui-ci rend possible la réplication et l'empaquetage de ce simple brin en virion qui peut ainsi être exporté comme une particule de phage. Il existe deux variantes du vecteur pBLUESCRIPT: + et -, suivant l'orientation de l'origine f1. Le vecteur utilisé est pBLUESCRIPT SK+, la forme monocaténaire obtenue lors de la réplication phagienne contenant les brins codants des gènes lacZ et AmpR.

1.2.2.pGEM-blue (commercialisé par Promega Biotec)(FIG.40).

Ce plasmide, d'une longueur de 2.75 Kb (kilobases) possède:

*le gène AmpR, marqueur de résistance à l'ampicilline .

*l'origine de réplication pour E. coli (col E1).

*le gène lacZ codant pour la partie N-terminale de la ß-galactosidase (peptide α).

Le site multiple de clonage MCS se trouvant dans le gène lacZ-peptide a contient 15 sites de restriction et est flanqué de deux promoteurs phagiens : T7 et SP6.

1.2.3.pBR322 (FIG.41)(Bolivar, 1977).

Ce plasmide de 4363 pb possède:

*le gène AmpR , marqueur de résistance à l'ampicilline.

*le gène TetR , marqueur de résistance à la tétracycline.

*l'origine de réplication dans E.coli (col E1).

1.3.Milieux de culture pour bactéries.

Dans ce travail, le milieu utilisé est toujours un milieu riche contenant de l'ampicilline et de la tétracycline. Il existe sous deux formes : liquide et solide.

1.3.1.LB liquide.

Composition: Bactotryptone (Oxoïd) 10g/l.

Yeast Extract (Oxoïd) 5g/l.

NaCl (Merck) 5g/l.

Autoclaver à la chaleur: 120°C pendant 20 minutes.

Lorsque le milieu est refroidi (environ 55°C), on ajoute les antibiotiques, soit l'ampicilline (Boehringer) à une concentration finale de 100mg/ml (stock : 100mg/ml d'eau stérile; conserver à -20°C) ou la tétracycline (Sigma) à une concentration finale de 12.5mg/ml (stock de tétracycline : 12.5mg/ml d'eau stérile ;conserver à -20°C).

1.3.2.LB solide.

Il est de même composition que le LB liquide, auquel on ajoute un gélifiant, le Bacteriological agar (Oxoïd) 16g/l.

Couler stérilement dans des boîtes de Petri. Laisser solidifier, sécher et conserver en chambre froide.

2.Extraction d'ADN plasmidique d'une souche bactérienne.

2.1.Extraction rapide d'ADN plasmidique de E.coli : "miniprep" (Tibor, 1988).

Composition des tampons utilisés dans ce protocole:

*TES: Tris 50mM pH8.0

EDTA 50mM pH8.0

saccharose 15%.

*TE: Tris 10mM

EDTA 1mM pH8.0 (autoclavé).

Protocole:

*culture:inoculer un universel contenant 5ml de milieu LB+Amp+Tet par une colonie de bactéries transformées. Incuber une nuit à 37°C.

*Prélever 1.5ml de chaque bouteille et le placer dans un tube Eppendorf. Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm puis éliminer le surnageant.

*Ajouter 150µl de TES et vortexer.

*Ajouter 25µl de solution de lysozyme et vortexer. Incuber 15 minutes sur table. Solution de lysozyme: 10mg/ml d'eau stérile, préparée extemporanément ou aliquotée et conservée à -20°C.

*Ajouter 400µl d'eau stérile froide et incuber 5 minutes à 0°C.

*Placer 15 minutes au bain-marie à 72°C puis centrifuger 10 minutes dans une microfuge (Beckman) pour bien tasser le culot au fond de l'Eppendorf.

*Enlever le culot à l'aide d'un cure-dents ; ajouter 70µl de NaClO4 5M et homogénéiser en retournant. Ajouter 400µl d'isopropanol et vortexer légèrement puis centrifuger 15 minutes à 12000 rpm à température ambiante. L'ADN et l'ARN sont ainsi précipités au fond du tube.

*Enlever le surnageant et ajouter délicatement 400µl d'éthanol à 90% pour éliminer les traces d'isopropanol. Centrifuger 3 minutes à 12000rpm en chambre froide puis éliminer le surnageant.

*Sécher 5 minutes sous vide et resuspendre le culot d'ADN dans 25 à 50 µl de TE et conserver à -20°C.

2.2.Extraction d'ADN plasmidique de E.coli en grandes quantités: "maxiprep" (Clewell, 1972).

Composition du tampon SSC 20X utilisé dans cette expérience:

NaCl 3M

Na citrate 0.3M

pH5.0 (autoclavé).

Protocole:

*Préculture: inoculer 5ml de LB+Amp+Tet par une colonie de bactéries transformées et faire pousser une nuit à 37°C sur un agitateur.

*Culture: inoculer 200ml de LB+Amp+Tet dans un Erlen stérile par 2ml de préculture.Incuber une nuit à 37°C sur un agitateur.

*Transférer les 200ml de culture dans un tube pour rotor GSA SORVALL et centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes. Jeter le surnageant.

*Dissoudre le culot dans 200ml de Tris 50mM pH8.0 et tenir sur glace.

*Recentrifuger à 5000rpm pendant 15 minutes. Jeter le surnageant.

*Dissoudre le culot dans 12ml de solution de saccharose (33.3g de saccharose par 100ml de Tris 50mM pH8.0).

*Mettre au bain-marie à 37°C et ajouter 1.2ml de solution de lysozyme (10mg/ml dans du Tris 50mM pH8.0) + 2.5ml EDTA 0.5M pH8.0 .

*Agiter faiblement à 37°C durant 15 minutes puis ajouter 10ml de Triton X 100 à 3% et agiter de même pendant encore 10 minutes.

*Remplir dans des tubes pour rotor Beckman 60Ti, équilibrer et centrifuger dans ce rotor pendant 60 minutes à 30000 rpm et à 5°C.

*Recueillir le surnageant. Ajouter 1/9 en poids de NaCl 5M et 1/9 en poids de PEG et faire dissoudre en agitant à 37°C. Placer dans des tubes Corex 30 pendant une nuit au frigo pour précipiter les acides nucléiques.

*Centrifuger 15 minutes à 8000rpm dans un rotor SS34. Dissoudre le culot avec 4ml de SSC 1/10 (solution stock SSC 20X à diluer 200X).

*Ajouter 9.7ml de SSC 1/10 +13.7g de CsCl + 0.7ml de bromure d'éthidium (10mg/ml). Remplir dans des tubes quick seal pour ultracentrifugeuse et équilibrer avec de l'huile de paraffine. Sceller ces tubes et centrifuger 16 heures à 45000 rpm et à 20°C dans un rotor vertical TV865B.

*On peut voir sous UV deux bandes d'ADN: la bande supérieure correspond à de l'ADN chromosomique de E.coli et aux formes OC et OL de l'ADN plasmidique et la bande inférieure correspond à de l'ADN plasmidique sous forme CCC. Couper le

EcoR I
#101

5' . . . G▼A A T T C . . . 3'
3' . . . C T T A A▲G . . . 5'

FIG.42 La séquence de reconnaissance pour l'enzyme *Eco*R I qui génère des extrémités 5' protrudantes.

EcoR V
#195

5' . . . G A T▼A T C . . . 3'
3' . . . C T A▲T A G . . . 5'

FIG.43 La séquence de reconnaissance pour l'enzyme *Eco*R V qui génère des extrémités aveugles.

Apa I
#114

5' . . . G G G C C▼C . . . 3'
3' . . . C▲C C G G G . . . 5'

FIG.44 Clivage 3' protrudant de l'enzyme *Apa*I.

enzyme	sequence
Ava II	**GG(AT)CC(AT)GG**
*Eco*O 109 I	**PuGGNCCAGG**
*Eco*R II	**CC(AT)GG**
*Sau*96 I	**GGNCC(AT)GG**
*Scr*F I	**CC(AT)GG**
Stu I	**AGGCCTGG**

enzyme	sequence
Bcl I	**TGATCA**
Cla I	**GATCGAT**
Hph I	**GGTGATC**
Mbo I	**GATC**
Mbo II	**GAAGATC**
Nru I	**GATCGCGA**
Taq I	**GATCGA**
Xba I	**TCTAGATC**

Tableau 10. A. Enzymes de restriction dont l'activité est sensible à la méthylation *dam*.
B. Enzymes de restriction dont l'activité est sensible à la méthylation *dcm*.
(les séquences de reconnaissance pour les enzymes de restriction sont imprimées en caractère gras).

bouchon du tube à ras avec un scalpel chauffé. Eliminer l'ADN chromosomique avec une pipette Pasteur et récupérer la bande inférieure.

*Extraire deux fois la solution d'ADN plasmidique à l'alcool isoamylique saturé en CsCl; cette étape sert à éliminer le bromure d'éthidium.

*Transférer la solution d'ADN dans un un tube à dialyse (bouilli) et dialyser 3 heures contre 2 litres de SSC 1/10 à température ambiante (changer le SSC 1/10 après 1 heure 30).

*Extraire au phénol. Pour ce faire, transférer l'ADN en solution dans un tube Greiner, ajouter un volume équivalent de phénol, vortexer et centrifuger 15 minutes à 8000 rpm (rotor SM-34 Sorvall).

*Récupérer la phase aqueuse surnageante sans prendre l'interface qui contient les protéines et placer dans un tube à dialyse. Dialyser dans 2 litres de SSC 1/10 en chambre froide pendant 3 jours en changeant le SSC tous les jours.

*Quantifier spectrophotométriquement l'ADN. La mesure de densité optique (DO) à 260 nm permet de quantifier l'ADN en solution. Une DO de 1 à 260 nm correspond à une concentration de 50 mg d'ADN par ml (cette relation étant linéaire pour une DO allant de 0.5 à O.8, il est nécessaire de diluer l'ADN de maxiprep 10 à 20 fois). La DO à 280 nm permet d'évaluer la qualité de la maxiprep: des préparations pures ont un rapport DO260/DO280 allant de 1.6 à 1.8.

*Stocker la solution d'ADN à -20°C.

3.La restriction d'ADN plasmidique.

3.1.Les enzymes de restriction.

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent une séquence précise dans l'ADN double-brin et qui coupent à un endroit déterminé dans cette séquence de reconnaissance ou, pour certaines enzymes, à proximité. La plupart des enzymes de restriction ont une séquence de reconnaissance de 4 ou 6 pb qui est un palindrome (c'est à dire que la séquence est identique sur les deux brins de l'ADN).

Buffer components	Final concentration in mmol/l (1:10 diluted set buffer)				
	A	B	L	M	H
Tris acetate	33	–	–	–	–
Tris-HCl	–	10	10	10	50
Mg-acetate	10	–	–	–	–
$MgCl_2$	–	5	10	10	10
K-acetate	66	–	–	–	–
NaCl	–	100	–	50	100
Dithioerythritol (DTE)	–	–	1	1	1
Dithiothreitol (DTT)	0.5	–	–	–	–
2-Mercaptoethanol	–	1	–	–	–
pH at 37°C	7.9	8.0	7.5	7.5	7.5

Tableau 11. Tampons de restriction fournis par la firme Boehringer.

Reaction Conditions

Use REact™ 2. REact™ 2
is the 10X concentrate assay
buffer supplied for use with
EcoR V. Dilute 1 part in 10
in final reaction mixture.
Final concentration:
50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM $MgCl_2$
50 mM NaCl
Assay at 37°C.
Store buffer at +4°C
or -20°C.

Tableau 12. Conditions de restriction lors de l'utilisation du tampon REact TM 2 (firme BRL).

Deux exemples sont les enzymes EcoR I et EcoR V dont les sites de reconnaissance sont des hexanucléotides palindromiques (FIG.42 et 43). Il existe deux types d'enzymes: les premières coupent au milieu du site de reconnaissance, faisant ainsi apparaître une coupure à bouts droits (francs, aveugles) comme dans le cas de l'enzyme EcoR V (FIG.43); les secondes coupent à quelques nucléotides de distance sur chacun des deux brins d'ADN générant des bouts collants (protrudants). Dans ce second cas les extrémités libres peuvent être 3'OH comme l'enzyme Apa I (FIG.44) ou 5'P comme l'enzyme EcoR I (FIG.42).

Le clivage de l'ADN par certaines enzymes de restriction peut être empêché par la méthylation des bases de l'ADN. En effet, la plupart des souches d'E.coli dont XL1-Blue possèdent deux méthylases de l'ADN "site-spécifiques". La dam méthylase transfère un groupement méthyl sur l'adénine dans la séquence GATC. La dcm méthylase méthyle le résidu cytosine dans les séquences CCAGG et CCTGG. Ces méthylations inhibent le clivage de l'ADN par certaines endonucléases de restriction dont la séquence de restriction est identique ou englobe (totalement ou partiellement) la séquence d'action d'une de ces méthylases (TABLEAU 10).

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

3.2.Les tampons de restriction.

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

Tampons utilisés:

Dans la première partie du travail, les tampons sont préparés suivant les conditions de restriction décrites dans le catalogue "New England Biolabs".

Par la suite, on utilise les tampons livrés avec les enzymes:

*pour les enzymes Boehringer: Buffer A, B, M, H (TABLEAU 11).

*pour les enzymes BRL: React TM2 (TABLEAU 12).

3.3.Réaction de restriction.

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

On ajoute parfois 3 μl de RNAse dans le cas où l'on doit observer des bandes d'ADN de petite taille, l'ARN migrant au niveau des molécules d'ADN de mois de 200 pb.

Incuber 2 heures à la température conseillée (le plus souvent 37°C).

Le nombre d'unités d'enzyme à ajouter est calculé comme suit: par définition, une unité d'enzyme coupe 1mg d'ADN de phage l. Connaissant d'une part la taille de ce phage (50 Kb) et le nombre de sites de restriction de l'enzyme utilisée dans le phage et d'autre part la taille du plasmide à restreindre et le nombre de sites de clivage pour l'enzyme dans ce même plasmide il est aisé de calculer la quantité d'enzyme à utiliser.

Exemple: restriction de 500 ng de pBR322 par l'enzyme Pst I.

Le plasmide pBR322: contient un site de restriction pour Pst I.

a une taille de 4363pb, soit 4,3 Kb.

Le phage l: contient 7 sites de restriction pour Pst I.

a une taille d'environ 50 Kb.

Sachant qu'une unité d'enzyme coupe 1mg d'ADN de phage l, il nous faudra utiliser 1U d'enzyme

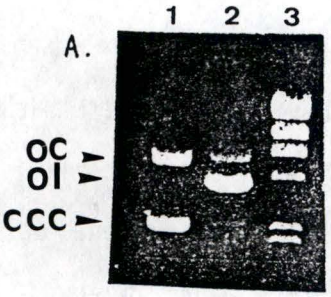
*divisée par 2 car on n'utilise que 500 ng de plasmide.

*divisée par 7 car il y a 7 fois moins de sites de restriction donc 7 fois moins de coupures à réaliser par molécule.

*multipliée par 50/4.3 car la taille du plasmide étant inférieure à celle du phage, le nombre de molécules pour une même quantité d'ADN sera supérieure.

La formule à appliquer est:

$$\frac{1U \times \text{quantité d'ADN } (\mu gr) \times 50 \text{ kb} \times \text{nombre de sites}}{1\ \mu gr \times \text{taille du plasmide} \times \text{sites du phage l}}$$



Piste: 1: plasmide non-restreint.
2: plasmide partiellement restreint.
3: marqueur de taille λ / *Hin*dIII.

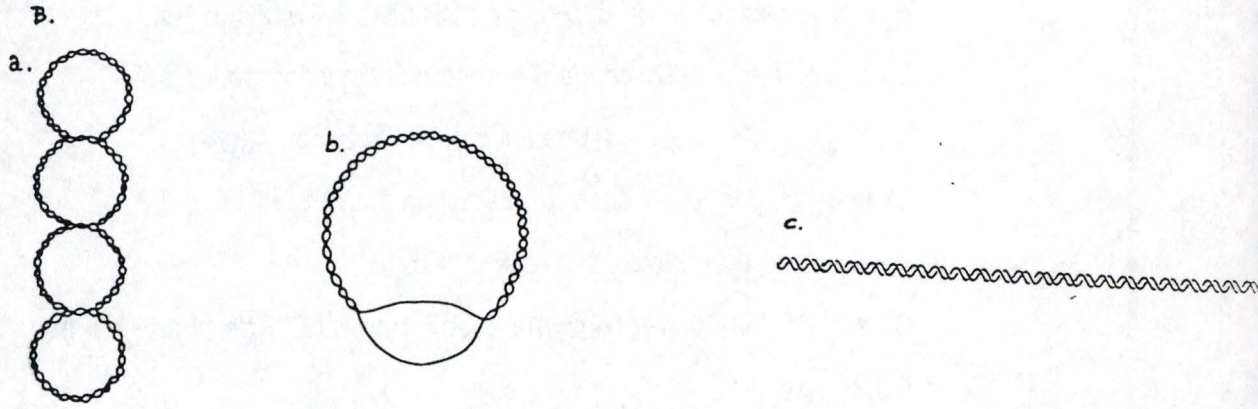


FIG.45 A. Ordre de migration des formes OC, OL et CCC sur un gel d'agarose.
B. Représentation schématique des formes CCC (a), OC (b) et OL (c).

Il faudra utiliser 1Ux(1/2)x(1/7)x(50/4.3)=0.83 U soit 1U.

Le volume d'enzyme ajouter ne peut pas dépasser 10% du volume total de réaction sinon l'enzyme est inhibée par le glycérol de son tampon de stockage.

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

4.1.Principe.

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

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

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

- la conformation de l'ADN. Les formes plasmidiques CCC (Completely Closed Circular) ou superenroulée, OC (Open Circular) ou circulaire cassée sur un seul brin (nick) et OL (Open Linear) migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative de ces bandes dépend de différents facteurs et notamment des tours de superhélicité de la forme CCC; l'ordre de migration sera CCC>OL>OC (FIG.45).

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

4.2.Protocole.

Composition des solutions et tampons utilisés:

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

pour 10 litres: 108 gr Tris donc Tris 0.089M

55 gr Ac. Borique Borate 0.089M

9.3 gr EDTA EDTA 0.002M

(ou 40ml EDTA 0.5M pH8.0).

La solution d'alourdisseur 10X: Bleu bromophenol 0.25%

glycérol 50%

EDTA 25mM.

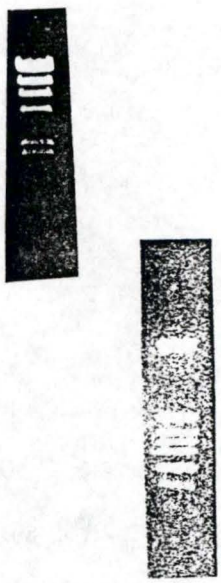
L'agarose est ajouté à du TBE (solution à 0.8% ou 2%) et le tout est porté à ébullition puis refroidi à 50°C. Ajouter le bromure d'éthidium à une concentration finale de 0.5 mg/ml (solution stock à 10 mg/ml conservée à l'abri de la lumière). Le bromure d'éthidium a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN (par là même hautement mutagène et donc dangereux) et permet de repérer les bandes d'ADN car il fluoresce en rose-orange sous UV.

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

FIG.46 Marqueurs de taille pour les gels d'agarose 0.8% (λ*Hin*d III) et 1.5 ou 2% (pBR322*Hin*f I).

λ*Hin*d III Tailles (pb): 23130
9416
6657
4361
2322
2027
(564)

pBR322*Hin*f I Tailles (pb): 1632
517/506
396
344
298
221/220
154
(75)



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

*la taille des fragments. Dans un puits adjacent à celui ou ceux des échantillons, placer un marqueur de taille qui est une molécule d'ADN coupée par une enzyme de restriction générant des fragments de taille connue. Les deux marqueurs les plus utilisés dans ce travail sont l/Hind III et pBR322/Hinf I, le premier pour évaluer des bandes de 0.5 kb à10 kb et le second des bandes plus petites que 1.5 kb (FIG.46). Par comparaison avec le marqueur de taille on peut ainsi évaluer la taille des fragments observés.

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

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

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

L'électrophorèse ayant séparé les fragments d'ADN, le gel est incisé devant la bande à récupérer (côté electrode +) et si nécessaire également derrière pour ne pas contaminer la bande choisie par un fragment un peu plus grand . Introduire dans l'incision le papier Whatman préalablement rincé dans du TBE, en le poussant bien contre la paroi du plexiglas. Refermer le gel, le replacer dans la cuve et poursuivre

l'électrophorèse jusqu'à ce que l'ADN soit entré dans le papier (vérifier la fluorescence sous UV). Le papier est prélevé avec une pince, rincé dans l'eau distillée froide, séché sur papier Whatman et placé dans un Eppendorf (T1) auquel on ajoute 400 µl de solution d'élution (Tris HCl 20mM pH7.5, EDTA 1mM, NaCl 1.5M). Le papier est défait par agitation manuelle du tube T1 et incubé 2 heures à 37°C avec agitation intermittente ; les anions du sel vont ainsi déplacer l'ADN du papier vers la solution. Retourner ensuite le tube Eppendorf T1 , en percer le fond avec une épingle chauffée et le placer fermement sur un second tube Eppendorf (T2); placer le tout dans un tube Corex 30 et centrifuger 10 minutes à 8000 rpm dans un rotor SS34 Sorvall. La solution contenant l'ADN passe ainsi dans le tube T2 alors que le papier reste dans le tube T1. Centrifuger le tube Eppendorf T2 contenant la solution 7 à 8 minutes à 12000 rpm à 4°C. Pipetter le surnageant dans un autre tube (T3) sans reprendre le culot de petits morceaux de papier qui ont pu passer dans le tube T2 lors de la centrifugation précédente.

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

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

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

5.Purification et précipitation d'ADN.

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

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

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

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

Les solutions à préparer sont:

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

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

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

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

Précipitation d'une solution aqueuse d'ADN.

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

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

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

Resuspendre dans la quantité désirée de TE.

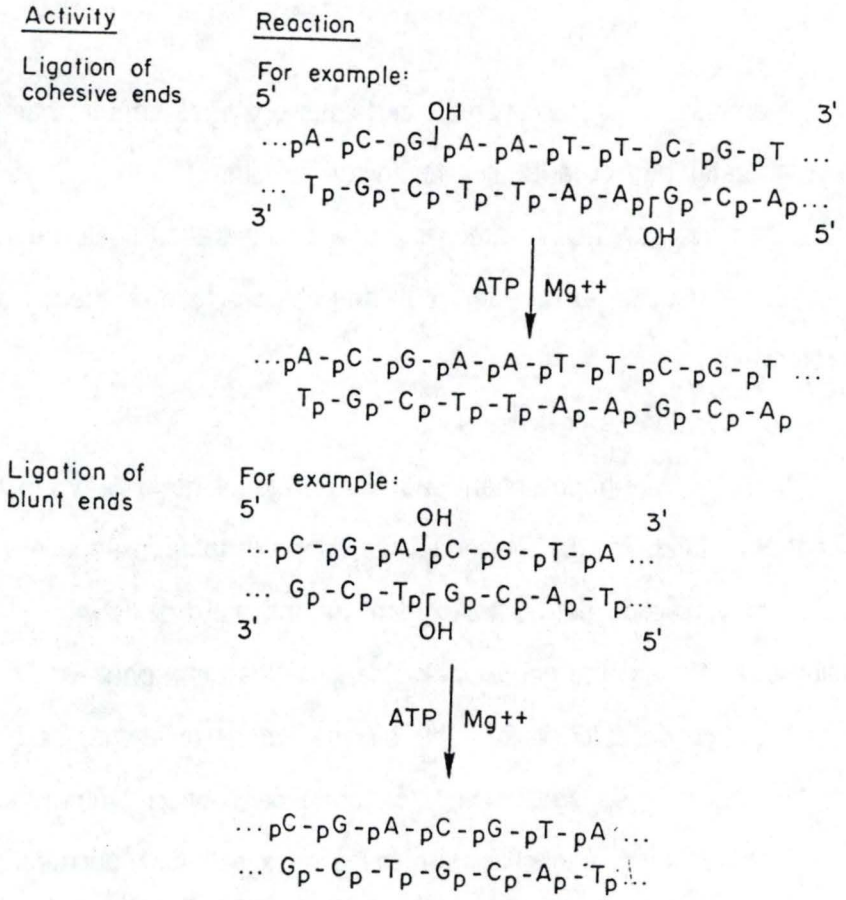


FIG.47 Réaction catalysée par la T4 DNA ligase.

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

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

La ligation est réalisée grâce à l'activité de l'enzyme ADN ligase du phage T4 (T4 DNA ligase). Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiesters entre le phosphate 5' d'une extrémité d'une molécule d'ADN et une extrémité hydroxyle 3'. L'enzyme requiert de l'ATP et des cations Mg++ pour être active (FIG.47)(Pheiffer, 1983).

La réaction est classiquement réalisée comme suit:

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

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

MgCl2 10mM.

DTT 10mM.

ATP 1mM.

15 μl d'ADN en solution.

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

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

Lors d'une réaction de ligation, il est nécessaire d'effectuer un contrôle positif pour vérifier l'activité de la ligase dans les conditions qui lui ont été imposées. Pour ce faire, on réalise la réaction sur un vecteur linéarisé par une enzyme de même type que celle utilisée dans l'expérience et on vérifiera sa relinéarisation.

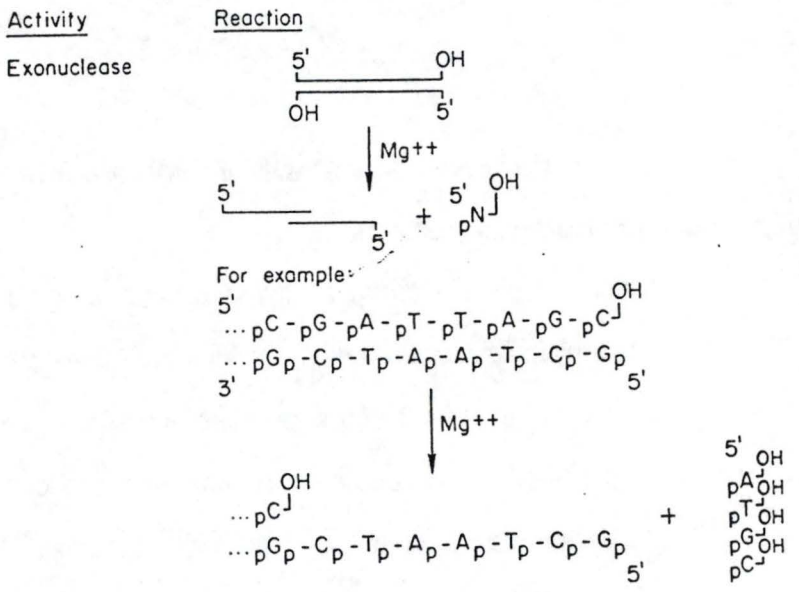


FIG.48 Réaction catalysée par l'exonucléase III.

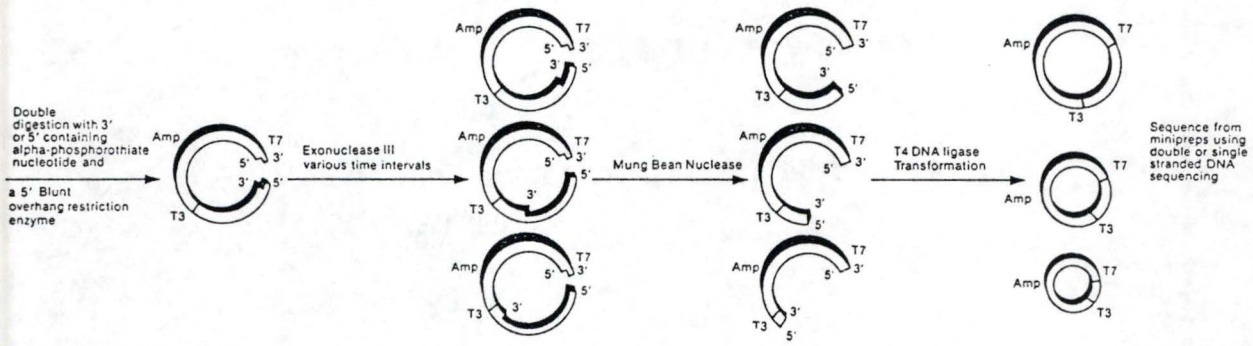


FIG.49 Délétions progressives ("nested deletions") créées par le système Exo/Mung.

37° C approximately 400 bp/minutes
34° C approximately 375 bp/minutes
30° C approximately 230 bp/minutes
23° C approximately 125 bp/minutes

Tableau 13. Prévisions des vitesses de délétion par l'Exo III en fonction de la température (fiche technique du kit Exo/Mung commercialisé par la firme Stratagene).

7.Délétion d'ADN sur un brin d'un vecteur et dans un seul sens ("nested deletion").

7.1.Ce système de délétion fait appel à deux enzymes : l'Exonucléase III et la Mung Bean nuclease.

L'Exonuclease III de E.coli catalyse l'hydrolyse de liens phosphodiesters à partir des extrémités 3' OH d'une molécule d'ADN double-brin dans le sens 3' vers 5', libérant ainsi des mononucléotides 5'. Il lui est impossible de catalyser cette réaction sur une molécule d'ADN monocaténaire (FIG.48) (Rogers, 1980).

La Mung Bean nuclease dégrade l'ADN simple-brin en mono- ou oligonucléotides 5'phosphates. Elle peut aussi attaquer l'ADN double-brin si celui-ci est exposé à de très grandes quantités de cette enzyme. Elle est utilisée pour rendre droits les bouts protrudants d'une molécule d'ADN (Kroeker, 1978).

Pour effectuer une "nested deletion" il faut d'abord cliver l'ADN avec deux enzymes de restriction; une enzyme générant des bouts 5' protrudants au début de la région à déléter et une enzyme générant des bouts 3' protrudants à l'opposé de la région à déléter par rapport au premier site de restriction (FIG.49). L'Exonuclease III ne pourra s'attaquer qu'à l'extrémité 3'OH générée par la première enzyme, la seconde restriction servant à protéger l'ADN en amont de la région que l'on désire déléter.

On fait ensuite agir l'Exonucléase III pendant différents temps pour obtenir différentes longueurs de délétion. Les temps sont choisi en fonction de la longueur des délétions que l'on désire obtenir; des vitesses de délétions sont données en fonction de la température d'incubation à l'Exo III (Tableau 13).Les brins monocaténaires sont alors digérés par la Mung Bean nuclease et les molécules d'ADN sont rendues bouts droits.

7.2.Protocole de la firme Stratagene qui commercialise le kit de "nested deletion".

Tampons fournis avec le kit:

*2X Exo III Buffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0.
10 mM MgCl2
20 mg/ml tRNA.

*10X Mung Bean Buffer: 300 mM Na AC, pH 5.0.
500 mM Na Cl.
10 mM Zn Cl2.
50% glycerol.

*1X Mung Bean dilution Buffer: 10 mM Na AC, pH 5.0.
0.1 mM Zn AC.
1 mM cystéine.
0.1% Triton X-100.
50% glycerol.

*10X ligation Buffer: 500 mM TRIS-HCl, pH 7.5.
70 mM Mg Cl2.
10 mM DTT.

Solutions et tampons à préparer:

*ß-mercaptoéthanol 100 mM.

*SDS 20%.

*Tris-HCl 1M, pH 9.5.

*LiCl 8M.

*Phénol-chlorophorme (1/1) équilibré par du Tris-HCl 1M à pH 9.5.

*Na AC 3M pH 7.0.

*ATP 5mM, pH 7.0 à 7.5.

Préparer pour chaque temps la solution pour arrêter l'Exonuclease III: 20 μl de 10X Mung Bean Buffer dans 155 μl d'eau dans un Eppendorf.

On choisi de réaliser 5 temps de délétion différents:

X 5 µl d'ADN deux fois restreint (1mg/ml).

X 12.5 µl de 2X Exo III Buffer.

X 2.5 µl de β-mercaptoethanol 100 mM.

X 100 U = 500 U d'Exo III (= 5 µl).

X 5 µl d'H2O.

X 25 µl.

Incuber à la température choisie pendant 5 temps différents.

Pour arrêter la délétion au temps choisi, prélever 25 µl et les transférer dans les 175 µl de Mung Bean Buffer prédilué.

Quand toutes les délétions sont effectuées, chauffer au bain-marie à 68°C durant 15 minutes puis placer sur glace.

Ajouter à chaque tube 15U de Mung Bean nuclease (si nécessaire diluer dans le 1X Mung Bean Dilution Buffer pour atteindre un volume pipetable) et incuber 30 minutes à 30°C.

Ensuite, ajouter: 4 µl de SDS 20%.

10 µl de Tris-HCl 1M, pH 9.5.

20 µl de LiCl 8M.

250 µl de phenol-chloroforme (pH 9.5).

Vortexer et centrifuger 1 minute (centrifugeuse à Eppendorf). Transférer la couche aqueuse supérieure dans des autres Eppendorf et extraire avec une solution de chloroforme (cf. purification d'ADN).

Ajouter 25 µl de Na AC 3M pH 7.0 à la phase aqueuse et 0.65 ml d'éthanol froid (-20°C). Précipiter à -80°C pendant 10 minutes et centrifuger 20 minutes à 12000 rpm pendant 20 minutes.

Ecarter le surnageant et laver les culots avec de l'éthanol 80% froid; précipiter et centrifuger de même. Ecarter les surnageants et sécher sous vide.

Resuspendre les culots dans 15 µl TE.

De ces 15 µl, 1 µl servira à la ligation, 7 µl serviront à visualiser les délétions sur gel d'agarose et les 7 µl restant sont stockés à - 20°C.

Gel d'agarose: on peut mettre le plasmide délété directement sur gel d'agarose 8% (amener au bon volume avec de l'eau et 10% de solution d'alourdisseur) ou restreindre préalablement par une enzyme qui permet d'obtenir des fragments de taille inférieure sur lesquels va se répercuter la délétion.

Ligation: 1 µl d'ADN délété.

2 µl de 10 X Ligation Buffer.

2 µl d'ATP 5 mM, pH 7.0 à 7.5.

2 µl de T4 DNA Ligase.

13 µl d'H2O.

Incuber 4 heures sur table ou la nuit à 4°C.

Prendre 10 µl pour transformer 100 µl de E.coli XL1-Blue compétentes et étaler sur boîtes de milieu LB+Amp+Tet. Réaliser des minipreps à partir des colonies transformantes et évaluer la délétion par perte des sites de restriction.

8.Transformation bactérienne (basée sur la méthode de Mandel et Higa, 1970).

Cette réaction consiste à faire pénétrer un plasmide dans une bactérie. Les conditions expérimentales sont telles qu'une seule molécule d'ADN pénètre par bactérie. Cette bactérie doit laisser entrer la molécule d'ADN et doit donc avoir une paroi et une membrane perméables à cet ADN; elle est alors dite compétente. La bactérie E.coli , Gram-négative doit être rendue artificiellemnt compétente en étant plongée dans une solution hypotonique de sel (notamment CaCl2). On pense que la membrane et la paroi se déstabilisent, la bactérie se gonfle, prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN formerait avec le Ca un complexe résistant aux désoxyribonucléases qui peut pénétrer dans la cellule lors du choc thermique à 42°C. Les cellules transformées sont ensuite placées dans du milieu riche (LB liquide) qui

permet aux cellules de régénérer une paroi normale et au(x) gène(s) de résistance introduit(s) de commencer à s'exprimer.

L'étalement sur boîte de milieu solide contenant les antibiotiques adéquats (Amp et Tet), permet l'isolement des colonies transformantes.

Le protocole est divisé en deux étapes:

Préparation de E.coli XL1-Blue compétentes.

*Culture de la souche à 37°C sur milieu solide LB+Tet (100 mg/ml) qui sélectionne les cellules contenant l'épisome F'.

*A partir de ces colonies, ensemencer une préculture de 10 ml de LB+Tet et incuber 4 heures à 37°C jusqu'à une absorbance comprise entre 1.5 et 2 à 550 nm.

*Cette préculture sert à ensemencer une culture de 100 ml de LB+Tet qui est incubée pendant 1 heure à 37°C, soumise à une forte agitation, jusqu'à une absorbance de 0.3 à 550 nm (phase de croissance exponentielle).

*Arrêter la croissance sur glace pendant 10 minutes.

*Centrifuger 5 minutes à 4000 rpm à 4°C (rotor SS34 Sorvall).

*Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl2 50mM équivalant à la moitié du volume initial.

*Répéter cette étape une seconde fois.

*Laisser 20 minutes sur la glace puis centrifuger 5 minutes à 4000rpm à 4°C et resuspendre le culot dans un volume de CaCl2 50mM-15% glycérol équivalent à 1/10 du volume initial.

*Aliquoter dans des Eppendorf et stocker à -80°C.

Transformation des bactéries par un plasmide.

*Ajouter 10 à 100 µl d'ADN en solution ou 10 µl de mélange de ligation à 50 µl de cellules compétentes et incuber 30 à 45 minutes sur glace pour adsorber les molécules d'ADN plasmidique sur les cellules.

*Placer dans un bain-marie à 42°C pendant 2 minutes pour faire pénétrer le plasmide dans la cellule.

*Ajouter 0.5 à 1ml de LB liquide et incuber 1 heure à 37°C pour la phase de récupération.

*Etaler (200 µl) sur boîte avec milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Des témoins de transformation sont réalisés:

*témoin positif: transformer avec un vecteur pour vérifier la compétence des cellules.

*témoin négatif: les cellules compétentes subissent toutes les étapes de la transformation sans ADN. Elles sont étalées sur milieu riche non-sélectif pour le contrôle de la viabilité des cellules et d'autre part sur un milieu sélectif pour montrer la validité de ce milieu et l'abscence de mutants spontanés résistants à l'antibiotique ou de contaminants.

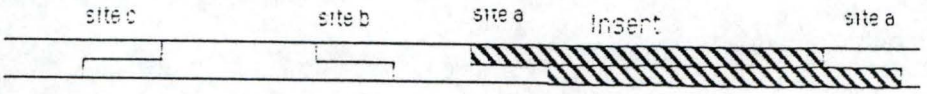


FIG.50 Disposition des sites de restriction requise pour effectuer des "nested deletions".
site a: site d'insertion du fragment d'ADN.
site b: site d'amorce pour l'Exo III.
site c: site protecteur contre l'Exo III.

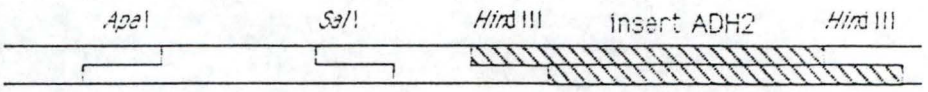


FIG.51 Les sites a, b et c choisis sont respectivement: *Hind* III, *Sal* I et *Apa* I.

RESULTATS.

1.Stratégie.

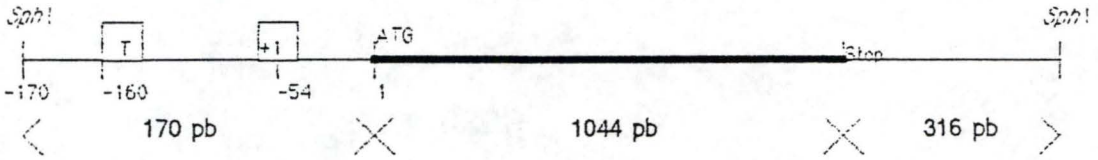
Rappelons que dans le but de localiser des régions importantes pour la régulation de la transcription du gène ADH2, nous voulons réaliser des délétions progressives dans la séquence de sélection du site d'initiation, débutant en amont de la TATA box et s'étendant jusqu'au premier codon du gène (codon ATG).

Nous avons choisi de mettre en œuvre le système de "nested deletions" Exo/Mung. Le vecteur pBluescript utilisé dans notre travail est le vecteur conçu et conseillé pour ce type d'expérience. Son site multiple de clonage (MCS) possède des sites uniques de restriction 3' protrudants externes (*Kpn* I, *Apa* Id'un côté du MCS; *Sac* I, *BstX* I, *Sac* II de l'autre côté) et des sites uniques de restriction 5' protrudants internes au MCS (FIG.39). Ces derniers constituent les amorces pour la délétion par l'Exo III, tandis que les sites 3' protrudants protègent le plasmide contre la délétion. Il suffit donc de cloner le fragment d'ADN dans un site interne du MCS (site a) en s'assurant qu'il y a un site 5' protrudant (site b) entre le site a et le site 3' protrudant protecteur (site c) du côté de l'insert où les délétions seront effectuées (FIG.50). Il faut en outre que le site b, qui constituera l'amorce pour l'Exo III, ne soit pas présent dans l'insert.

Le site protecteur choisi (site c) est le site *Apa* I le site d'insertion du gène de l'ADH2 est *Hind* III (site a); le site d'amorce pour les délétions (site b) est le site *Sal* I, mais le choix du site b changera en cours de travail et se portera sur le site *Cla* I (FIG.51).

Remarquons que le vecteur utilisé est un vecteur pBluescript SK+ dans lequel le site *Kpn* I a été remplacé par le site *Bgl* II portant la taille du plasmide à 2970 pb. Celui-ci étant 5' protrudant, le seul site protecteur restant de ce côté du MCS est le site *Apa* I. Ce nouveau vecteur est appelé pDP14. Ce changement n'entrera pas en ligne de compte pour l'élaboration de la méthode.

La première étape nécessaire est donc l'insertion du gène ADH2 dans le vecteur pDP14.

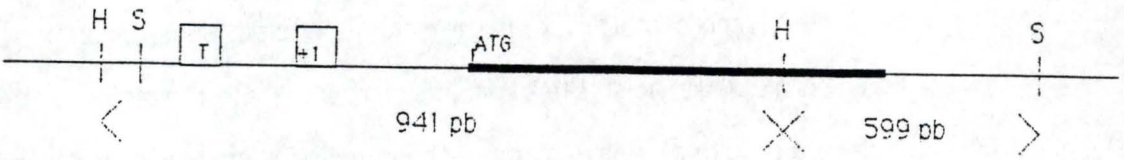


T TATA box

+1 site d'initiation

FIG.52 Le fragment *Sph* I/*Sph* I du gène ADH2.

pGEM-blue:



H = *Hind* III; S = *Sph*I.

Rem.: les schémas des gènes ne sont pas représentés à l'échelle.

FIG.53 Sous-clonage du fragment *Sph* I/*Sph* I dans le site *Sph* I du MCS de pGEM-blue.

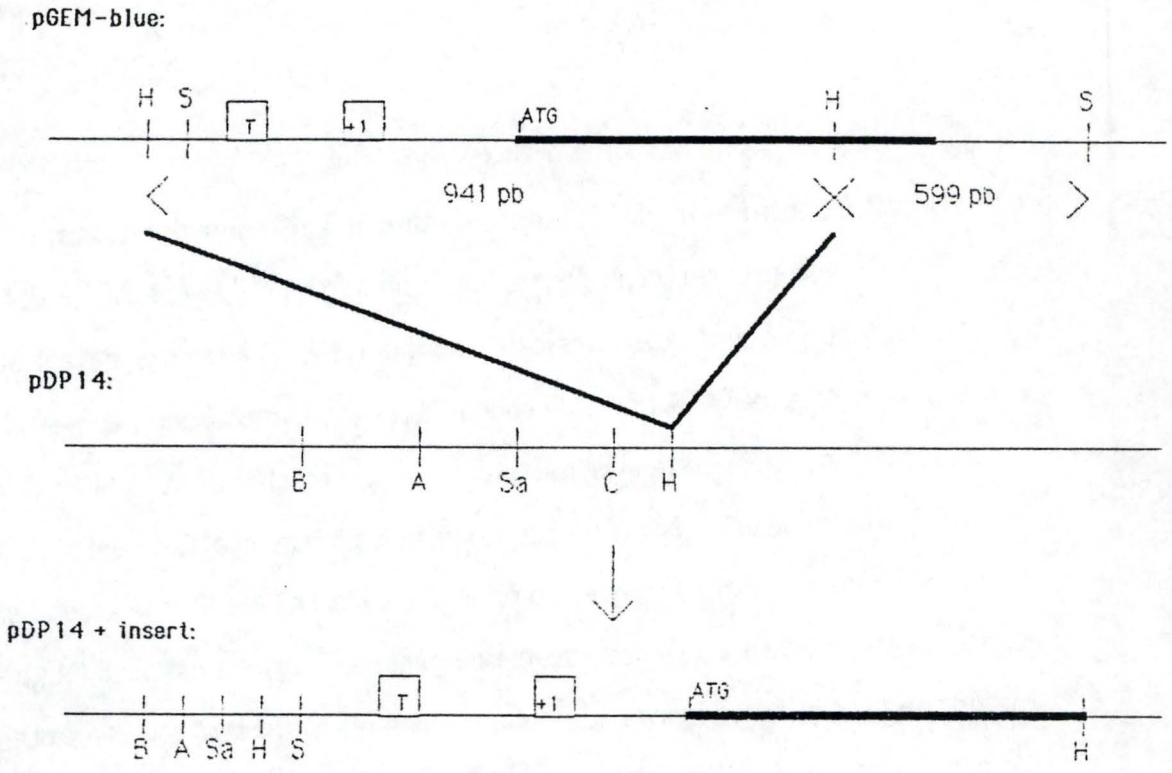
2.Construction du vecteur destiné a subir les délétions.

Ce vecteur est obtenu par clonage d'un fragment du gène ADH2 dans pDP14 (pBluescript SK+ aménagé). Les délétions que l'on désire réaliser devant être comprises entre la TATA box et le codon Start (ATG), le choix du fragment du gène ADH2 à cloner s'est porté sur la séquence comprise entre les deux sites de restrictions *Sph* I existant dans le gène (FIG.52). En effet, le premier site *Sph* I est situé à -170 pb de l'ORF de ADH2 et à quelques pb en amont de la TATA box et le second site se trouve en aval de la séquence codante du gène; ce fragment est donc tout à fait indiqué pour les expériences que nous voulons réaliser. Mais le vecteur pDP14 ne contient pas de site *Sph* I dans son MCS. Il faut donc placer momentanément ce fragment dans un autre vecteur, pGEM-blue qui contient un site *Sph* I dans son MCS. Le clonage du fragment *Sph* I/*Sph* I du gène ADH2 dans le site *Sph* I de pGEM-blue permet de positionner un site *Hin*d III en amont du gène ADH2 (FIG.53). Le fragment *Hin*d III/*Hin*d III de cette nouvelle construction peut alors être placé dans le site *Hin*d III du MCS de pDP14 (FIG.54). La partie C-terminale de la séquence codante du gène ADH2 restera dans le plasmide pGEM-blue, tandis que la partie N-terminale de la séquence codante et la séquence de sélection du site d'initiation seront insérées dans le vecteur pDP14 pour y subir des délétions. A la suite de celles-ci, la partie C-terminale de la séquence codante pourra être liguée à la portion ayant subi la délétion.

La construction ainsi réalisée permettra la mise en oeuvre des délétions désirées. Les parties amont (le locus ADR3 contenant les UAS) et aval (extrémité C-terminale de la séquence codante) du gène seront religuées par la suite afin de reconstituer un gène ADH2 délété dans la séquence de sélection du site d'initiation.

3.Stratégie d'analyse des résultats.

Dans le but d'estimer l'ampleur des délétions, une première analyse sera réalisée à partir de la solution d'ADN non-ligué de chaque échantillon (un échantillon par temps de délétion). Cette analyse se fera sur un grand nombre de molécules



B = *Bgl*II; A = *Apa*I; Sa = *Sal*I; C = *Cla*I.

FIG.54 Sous-clonage du fragment *Hin*dIII/*Hin*d III de pGEM-blue, comprenant une partie du gène ADH2, dans pDP14.

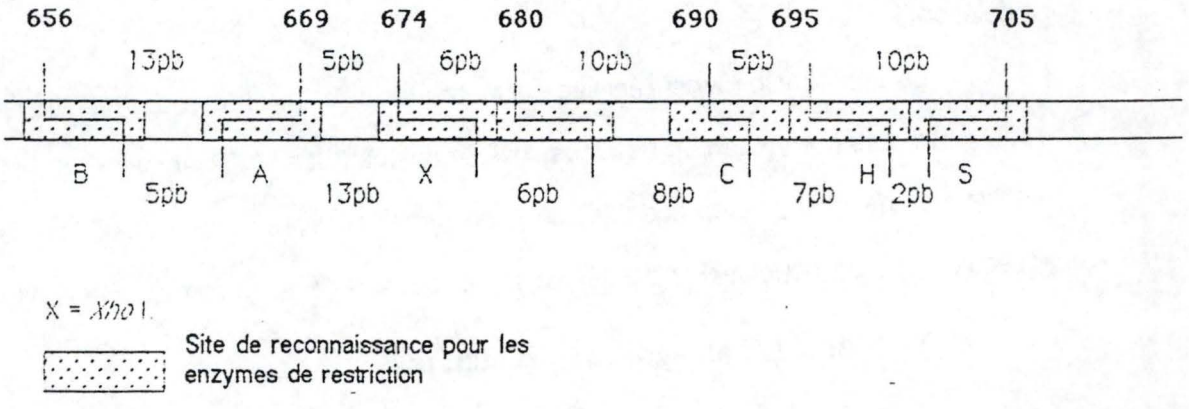


FIG.55 Disposition des sites de restriction en amont de l'insert *Hin*dIII/*Hin*d III (ADH2) dans pDP14.

d'ADN qui, bien qu'ayant été en contact pendant le même temps avec la solution d'Exo III pour chaque échantillon, n'auront pas toutes été délétées du même nombre de pb. Notre but sera d'estimer pour chaque temps quelle longueur a été délétée en moyenne, en espérant que la variation de l'amplitude des délétions pour un même temps est faible .

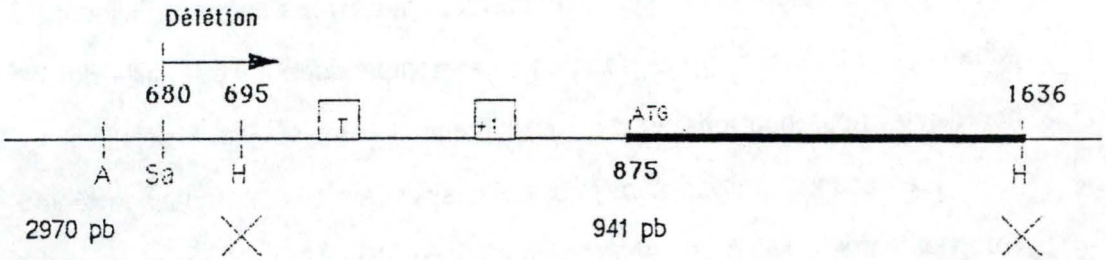
Pour effectuer cette première analyse, nous ferons migrer un aliquot de chaque échantillon d'ADN sur un gel d'agarose; par comparaison avec la taille du plasmide non-délété, nous pourrons estimer grossièrement l'ampleur de la délétion.

La seconde analyse aura pour but d'isoler des délétants dans la région comprise entre la TATA box et le codon ATG du gène ADH2. A partir du ou des échantillons d'ADN dont la délétion estimée lors de la première analyse est comprise entre 0 et 200 pb (la TATA box étant distante de 160 pb du codon ATG), nous isolerons des plasmides. Les résultats de l'analyse de ces plasmides permettront de situer approximativement l'endroit atteint par la délétion dans chaque plasmide.

Nous réaliserons une ligation de chaque solution suivie de la transformation de cellule d'*E. coli* compétentes. Nous avons vu précédemment que seuls les vecteurs refermés sur eux-mêmes sont capables de transformer, à raison d'un plasmide par cellule. Des minipreps seront réalisées sur certains de ces transformants et seront analysées. Des restriction de ces minipreps permettront d'évaluer l'ampleur de la délétion dans chaque cas et de localiser, dans la région étudiée, jusqu'où la délétion a progressé.

La première vérification est de montrer que la double restriction précédant la délétion a été effective. La restriction du plasmide par chacune des deux enzymes *Apa* I et *Sal* I ne devra plus être possible, les deux sites de reconnaissance et de coupure pour ces enzymes ayant disparu. Sur un gel d'agarose 0,8%, on observera un profil de plasmide non-restreint.

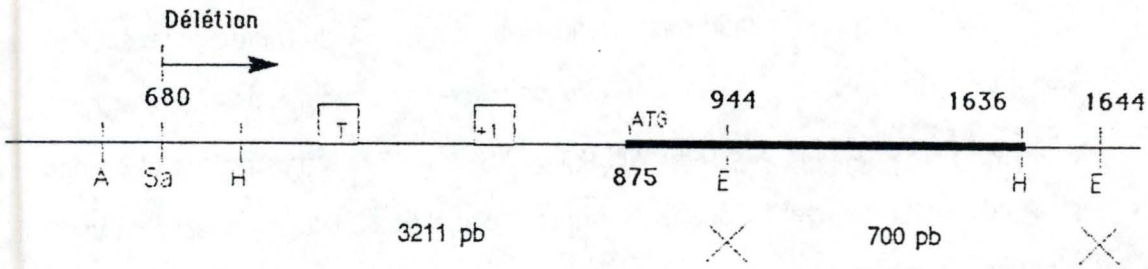
La deuxième vérification sert à montrer que la délétion a eu lieu (10 premières pb disparues); elle permet également de s'assurer que la délétion n'a pas éliminé l'entièreté du fragment du gene ADH2. Elle sera réalisée avec l'enzyme *Hind* III (FIG.56).



HindIII A'AGCT_T

Cuts at: 695 1636
Size: 941 2970

FIG.56 La restriction du plasmide par *Hin*dIII.



E = *Eco*R V

EcoRV GAT'ATC

Cuts at: 944 1644
Size: 700 3211

FIG.57 La restriction du plasmide par *Eco*R V génère deux fragments.

1°. Si l'enzyme coupe deux fois, la délétion n'a pas dépassé 10 pb, c'est à dire la distance entre l'extrémité 3' du site *Sal* I sur le brin inférieur de l'ADN, et le début du site de reconnaissance *Hind* III (FIG.55). Dans ce cas, la séquence du gène ADH2 n'a subi aucune modification.

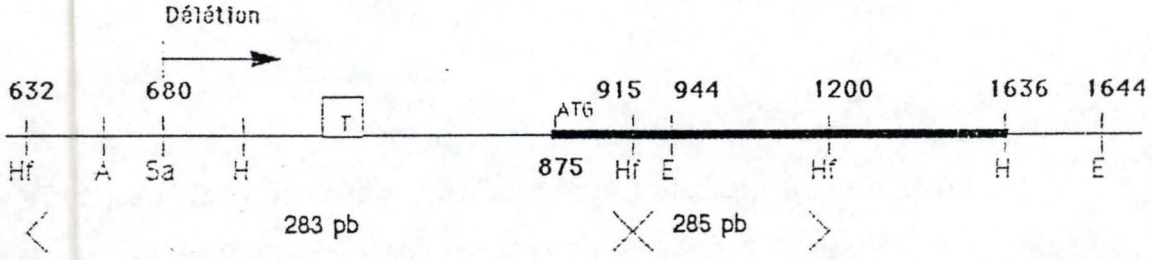
2°. Si l'enzyme coupe une fois, c'est que le site *Hind* III 695 a disparu et que la délétion n'a pas atteint le site *Hind* III 1636. Ce sont ces délétants que nous retiendrons. Sur gel d'agarose 0.8%, on observera une bande comprise entre 3 kb et 3.9 kb .

3°. Si l'enzyme ne coupe pas du tout, on en déduit que les deux sites *Hind* III ont disparu; dans ce cas toute la séquence provenant du gène ADH2 a été délétée.

La présence d'un site *Eco*R V (944) dans l'insert ADH2 va permettre de mieux localiser l'étendue des délétions. Un second site de restriction *Eco*R V(1644) se trouve dans le MCS, à quelques paires de bases en aval du site *Hind* III 1636 limitant l'insert (FIG.57). Les échantillons que nous recherchons ne doivent pas être délétés plus loin que le codon ATG (875); nous retiendrons ceux qui ont conservé les deux sites de restriction pour *Eco*R V et qui peuvent donc être coupés deux fois par cette enzyme. Sur un gel d'agarose 0.8%, on observera 2 bandes: une première de longueur constante (1644-944=700) et une seconde de longueur comprise entre environ 3200 et 2950 pb suivant les différents délétants.

Les délétions retenues étant confinées à la région qui s'étend du site *Hind* III 695 au site *Eco*R V 944, deux restrictions supplémentaires vont nous permettre de préciser l'étendue des délétions. Ces deux restrictions seront réalisées avec des endonucléases ayant de nombreux sites de reconnaissance dans le plasmide, générant ainsi des fragments d'ADN de plus petite taille. Les différences de longueur dues aux délétions se marqueront sur certains de ces fragments et seront estimées grâce à l'électrophorèse dans un gel d'agarose 2% qui permet une meilleure résolution des petits fragments.

La délétion n'ayant pas dépassé le site 944 (vérification par *Eco*R V), lors de la restriction par l'enzyme *Hinf* I, seuls les fragments de 283 et 285 pb pourront varier (FIG.58). Remarquons que ces deux fragments sont confondus sur gel d'agarose,



Hf = *Hin*fI.

HinfI G'AnT_C

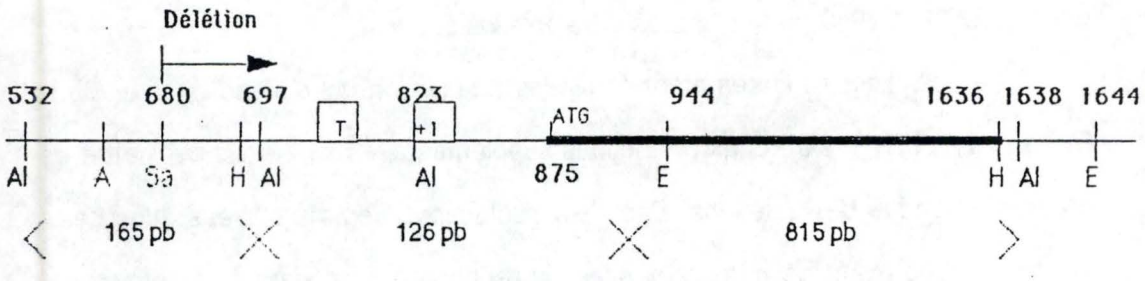
Cuts at:	154	176	632	915	1200	1465	1935	2000	2075
Size:	22	456	283	285	265	470	65	75	

Cuts at:	2075	2471	2988	154
Size:	396	517	1077	

Fragments arranged by size:

1077	517	470	456	396	285	283	265
75	65	22					

FIG.58 La restriction par *Hin*fI.



Al = *Alu*I

AluI AG^CT

Cuts at:	57		314		532		697		823		1638		1704		1710		174			
Size:		257		218		165		126		815		66		6		33				
Cuts at:	1743		1765		1860		1924		2042		2268		2358		2404		266			
Size:		22		95		64		118		226		90		46		257				
Cuts at:	2661		3182		3282		3345		57											
Size:		521		100		63		623												

Fragments arranged by size:

815	623	521	257	257	226	218	165
126	118	100	95	90	66	64	63
46	33	22	6				

FIG.59 La restriction par *Alu*I.

formant une bande double, deux fois plus intense. Nous recherchons des délétions qui n'ont pas dépassé le site 875 (codon ATG) pour lesquelles le fragment de 285 pb sera toujours présent. L'intensité de la bande à 285 pb sera similaire à celle des bandes simples de taille comparable sur la même piste. La délétion se marquera sur le seul fragment de 283 pb. Celui-ci va être ramené à 37 pb (distance séparant le site *Hin*d I 632 du site *Apa* I 669 restreint) plus la distance X séparant le site atteint par la délétion et le site *Hin*d I 915. La disparition du site *Hin*d III 695 étant vérifiée, cette distance X sera comprise entre 0 et 915-695=220 pb. Le fragment reconstitué variera donc entre 37 et 257 pb (N.-B.: seuls les fragments d'au moins 100 à 150 pb sont visibles sur un gel d'agarose à 2%).

Si on observe par exemple un fragment que l'on estime à 170 pb, la délétion est allée 257-170=90 pb plus loin que le site *Hin*d III 695 c'est à dire jusqu'au site 785.

La dernière enzyme qui sera utilisée est *Alu* I. La restriction par cette enzyme permettra de confirmer les estimations faites grâce aux restrictions précédentes.

Le gène ADH2 possède un site de restriction *Alu* I 823 juste en aval de la région des 4 sites+1; le site+1 en position -54 de l'ORF (site 821 du plasmide) et le plus proche de celle-ci fait partie de la séquence de reconnaissance pour l'enzyme *Alu* I. La perte ou non de ce site *Alu* I lors des délétions permet de localiser l'avancée des délétions étudiées, de part et d'autre de ce site *Alu* I 823 (FIG.59).

1°. Si la délétion n'a pas atteint le site de reconnaissance pour *Alu* I (de 821 à 824), seuls les fragments de 165 et 126 pb varieront. Dans le cas où la délétion atteint juste le site de reconnaissance pour *Alu* I 697, celui-ci est perdu (vérifié par la perte du site *Hin*d III 695); le fragment reformé sera de 137 pb (*Alu* I 532 à *Apa* I 669) + 126 pb (*Alu* I 697 à *Alu* I 823) =263 pb. Dans le cas où la délétion est proche du site de reconnaissance pour *Alu* I 823 sans l'atteindre, au plus loin 821, le fragment reformé aura une longueur de 137 pb +2 pb =139 pb. Pour des délétions comprises entre ces sites 697 et 823, on pourra observer tous les intermédiaires entre ces deux longueurs extrêmes: 139 et 263 pb; la distance séparant l'endroit de délétion du site 697 est à soustraire à 263 pb. Si on observe sur le gel d'agarose 2% par exemple une bande à

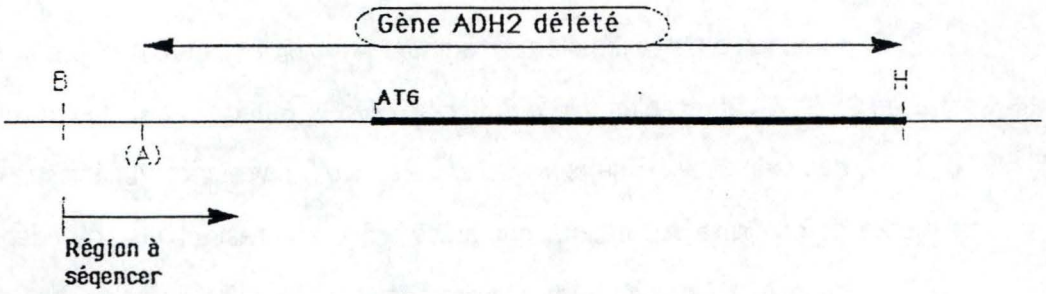


FIG.60 Le séquneçage de la région en aval du site *Bgl*II permettra de définir la délétion à la base près.

175 pb (les bandes à 126 et 165 pb ayant disparu), la délétion a atteint le site 697+(263-175)=785.

2°. Si la délétion a atteint le site *Alu* I 823, elle a pu progresser jusqu'au site 944 (vérification antérieure par *Eco*R V). Dans le cas où la délétion s'est arrêtée au site *Alu* I 823, le fragment reformé aura une longueur de 137 + 815(*Alu* I 823 à *Alu* I 1638) =952 pb. Dans le cas où la délétion approche le site de restriction *Eco*R V 944 sans l'atteindre, le fragment reformé aura une longueur de 137 pb (*Alu* I 532 à *Apa* I 669) + 694 pb (*Eco*R V 944 à *Alu* I 1638) =831 pb. Pour des délétions intermédiaires comprises entre les sites *Alu* I 823 et *Eco*R V 944, on observera sur le gel d'agarose 2% une bande allant de 831 à 952 pb, les bandes à 126, 165 et 815 pb ayant disparu (N.-B.: une bande à 830 pb ne peut être distinguée d'une bande à 815 pb faisant partie du profil de restriction par *Alu* I).

L'analyse conjuguée de ces restrictions nous permettra d'estimer assez précisément l'ampleur des délétions dans les différents plasmides. La certitude sur l'étendue des délétions (à la base près) des échantillons retenus sera possible grâce au séquençage de la région où la ligation a été opérée (FIG.60).

4.Mise en œuvre des techniques et résultats obtenus.

Nous partons de douze clones d'*Escherichia coli* XL1-Blue contenant le plasmide pDP14 dans lequel a été inséré le fragment *Hind* III/*Hind* III du gène ADH2 venant de pGEM-blue (FIG.54).

La première étape consiste en la préparation de l'ADN plasmidique pour les délétions.

Des minipreps de ces 12 clones ont été réalisées. Nous vérifions tout d'abord la présence de l'insert dans le plasmide en coupant celui-ci par *Hind* III. Sur un gel d'agarose à 0.8%, nous observons pour chaque échantillon deux bandes, correspondant au fragment de 2970 pb (matrice du vecteur pDP14) et de 941 pb (insert ADH 2), comme attendu. Nous vérifions ensuite que le sens de l'insert dans le plasmide est bien celui désiré. Pour cela nous allons restreindre par une enzyme qui

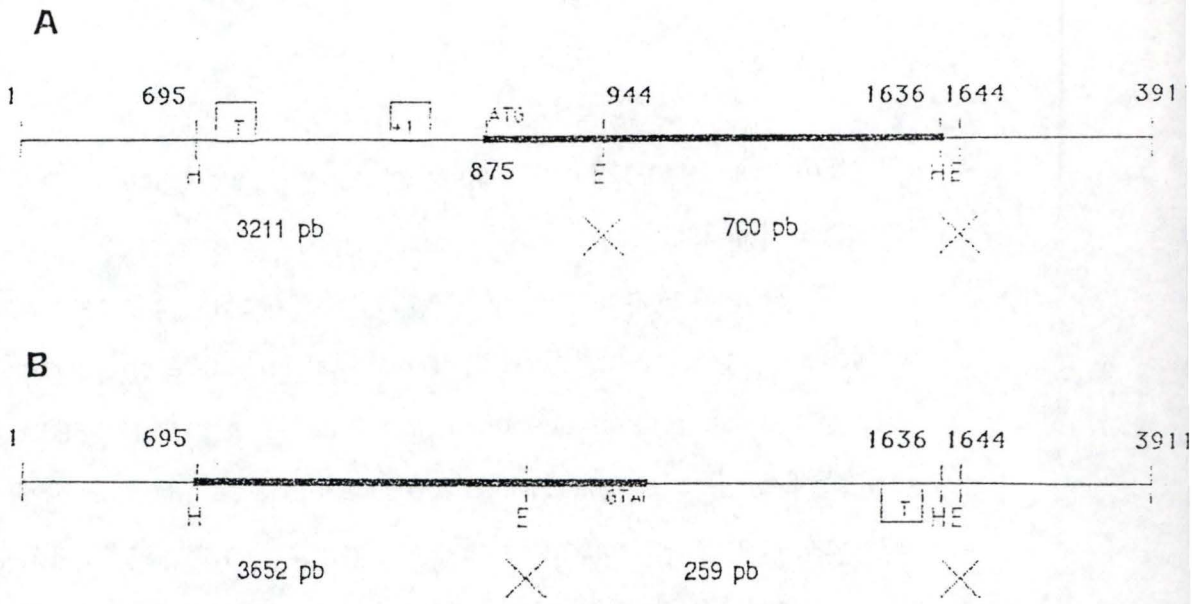


FIG.61 A. Insert *Hind*IIII/*Hind* III dans l'orientation désirée.
B. Insert *Hind*IIII/*Hind* III dans l'orientation non-désirée.

Apa I
#114

5′ . . . G G G C C C . . . 3′
3′ . . . C C C G G G . . . 5′

Assay Conditions: 6 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM $MgCl_2$, 6 mM 2-mercaptoethanol, 100 µg/ml bovine serum albumin, and DNA. *Apa* I is inhibited by high concentrations of salt.

Sal I
#138

5′ . . . G T C G A C . . . 3′
3′ . . . C A G C T G . . . 5′

Assay Conditions: 150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM $MgCl_2$, 6 mM 2-mercaptoethanol, 100 µg/ml bovine serum albumin, and DNA.

FIG.62 La concentration en NaCl des tampons de restriction pour *Apa* I et *Sal* I sont tout à fait différentes.

possède un site de restriction asymétrique dans l'insert: *Eco*R V. Si l'insert se trouve dans le sens voulu, nous obtiendrons par restriction *Eco*R V 2 fragments de 3211 et 700 pb. Si l'insert se trouve dans l'autre sens, la restriction permettra d'obtenir deux fragments de 259 et 3652 pb (FIG.61). Sur le gel d'agarose 0.8%, nous observons que 2 des 12 échantillons ont les 2 fragments de longueur recherchée alors que 9 échantillons ont l'insert dans l'autre sens et que 1 échantillon donne des fragments de longueur non-prévue.

Les maxipreps des deux plasmides qui nous intéressent sont réalisées; elles sont désignées pDP27 et pDP28. La mesure spectrophotométrique nous indique que la concentration en ADN de la maxiprep pDP27 est de 81µg/ml et que celle de la maxiprep pDP28 est de 31µg/ml. La vérification de ces maxipreps est réalisée en coupant chacun des 2 plasmides 2 fois, respectivement par *Hin*d III et par *Eco*R V, comme pour la vérification des minipreps.

Le plasmide pDP27 est d'abord restreint par *Apa* I et *Sal* I, restrictions destinées respectivement à protéger la matrice du plasmide contre les délétions et à amorcer la délétion par l'Exo III. Or la restriction simultanée par ces deux enzymes n'est pas possible car les tampons de restriction diffèrent par la concentration en NaCl (FIG.62); on coupe donc d'abord par *Apa* I puis on ajuste la concentration en NaCl telle qu'elle soit optimale pour *Sal* I.

On estime la quantité des enzymes de restriction qu'il sera nécessaire d'utiliser pour obtenir une restriction complète en testant ces enzymes séparément sur une petite quantité d'ADN, soit 250 ng. Nous testons aussi l'activité de l'enzyme *Sal* I dans le tampon de l'enzyme *Apa* I ajusté en NaCl. Ces vérifications faites, on restreint 25µg de pDP27 par *Apa* I puis on ajuste la concentration en NaCl (150 mM final) et on restreint par *Sal* I. Ensuite on inactive les enzymes de restriction par un traitement au phénol-chloroforme puis on précipite l'ADN. La resuspension se fait dans 25 µl de tampon TE afin de porter l'ADN à une concentration de 1µg/µl.

Les délétions sont effectuées tel qu'il est décrit dans le protocole du système Exo/Mung. Les 5 temps de délétion choisis vont de 30" à 2'30" (de 30" en 30"). La température d'incubation de l'ADN avec l'Exo III étant de 23°C, la vitesse de délétion

prévue est de 125 pb/min; les délétions devraient donc être comprises entre 60 et 300 pb environ. Une première partie de chaque échantillon est mise sur un gel d'agarose à 0.8%. On constate qu'il n'y a pas eu de délétion: même pour 2'30" de réaction de l'Exo III, l'échantillon migre à la même hauteur qu'un échantillon de pDP27 linéarisé (coupé 1 fois, par *Apa* I).

Une seconde partie sert à la ligation. Les plasmides ligués servent à la transformation de cellules XL1-Blue compétentes.

Par temps de délétion, 5 minipreps sont réalisées à partir de transformants pris au hasard. La restriction de ces 25 minipreps de délétants par *Hind* III nous permet d'observer, sur un gel d'agarose 0.8%, deux fragments. Les délétions n'ont donc pas atteint le site *Hind* III 695 situé 10 pb après le début des délétions. De plus les restriction par *Sal* I et *Xho* I (situé entre *Apa* I et *Sal* I)(FIG.55) linéarisent les plasmides indiquant que ces deux sites sont toujours présents dans les plasmides. La restriction par *Sal* I n'a donc pas été effective. Avant de procéder à des délétions, il est donc toujours nécessaire de vérifier que la double restriction est complète

Deux nouvelles maxiprep sont réalisées pour obtenir des quantités suffisantes de plasmide. La maxiprep pDP35 contient 280 µg/ml d'ADN; la maxiprep pDP36 contient 480 µg/ml d'ADN. Ces maxipreps sont vérifiées comme l'ont été les maxipreps pDP27 et pDP28.

Lors des expériences de délétion ultérieures nous utiliserons *Cla* I et non plus *Sal* I, car *Cla* I, contrairement à *Sal* I est active dans le même tampon que *Apa* I (tampon A de Boehringer). Nous avons vérifié cette activité de l'enzyme *Cla* I sur pDP36 dans le tampon A.

Comme lors de la première expérience de délétions, nous allons tout d'abord préparer le plasmide pour les délétions. On restreint 25 µg de pDP36 par *Apa* I. On prélève 250 ng d'ADN pour mettre sur gel d'agarose à 0.8% afin de vérifier que *Apa* I a restreint complètement pDP36, ce qui est le cas. On coupe ensuite le plasmide linéarisé par *Cla* I et on ligue 500 ng de l'ADN doublement restreint dans le but de vérifier si la restriction double est totale; si c'est le cas, la ligation ne se fera pas, les extrémités libres créées par la double restriction n'étant pas compatibles. On observe

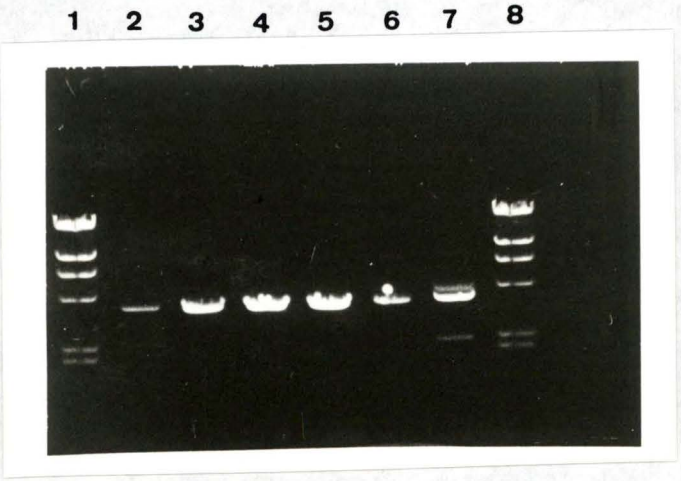


FIG.63 On n'observe pas l'image "en escalier" à laquelle on s'attendait entre les pistes 2 et 6.

Pistes:	Echantillon:
1	λ/*Hind* III
2	pDP36 Δ1
3	Δ2
4	Δ3
5	Δ4
6	Δ5
7	pDP36/*Apa* I
8	λ/*Hind* III

néanmoins quelques colonies transformantes. Il se peut que le petit fragment de 21 pb libéré lors de la double restriction se soit replacé dans la matrice du plasmide provoquant ainsi la recircularisation du plasmide pDP36. Pour vérifier cette hypothèse, nous faisons migrer 250 ng du plasmide pDP36 deux fois restreint dans un gel d'agarose 0.8%. L'ADN de la bande située à environ 4 kb est extrait. On fait migrer une partie de cet ADN dans un gel d'agarose 0.8% afin de vérifier que l'on a bien récupéré l'ADN de cette bande uniquement, ce qui est le cas. On ligue et on transforme de même que précédemment et cette fois-ci, aucune colonie transformée ne pousse. Il n'y a donc pas eu de transformation ni par conséquent de ligation; la double-restriction était donc totale.

Ces vérifications réalisées, nous précipitons l'ADN après extraction des protéines au phénol-chloroforme, et le resuspendons dans 25 µl de TE (1µg/µl). Nous procédons ensuite aux délétions; les 5 temps de délétion choisis vont de 45" à 2'05", de 20" en 20". Suivant les prédictions du catalogue, les délétions s'étaleront de 95 pb à 250 pb ce qui devrait suffire, la délétion maximale recherchée étant de moins de 200 pb.

Les 7 µl de chaque échantillon placés dans un gel d'agarose 0.8% ne permettent pas de mettre en évidence des délétions (on ne voit pas une image en "escalier" sur le gel)(FIG.63). Afin de conclure si oui ou non il y a eu délétion et, dans la négative, afin de découvrir où se situe le problème (restriction, délétion proprement dite, ...) nous nous référerons à l'analyse des plasmides transformants.

On réalise une ligation de chaque échantillon et on transforme des cellules XL1-Blue compétentes dans les mêmes conditions que lors de la première expérience de délétion.

Trente-deux minipreps sont réalisées à partir des transformants. L'analyse fine n'est possible que sur 8 de ces minipreps; les 24 autres ne permettent pas une bonne observation sur le gel d'agarose 2%. Les 8 plasmides ont perdu les sites de restriction *Apa* I et *Cla* I (profil de plasmide non-restreint sur gel d'agarose 0.8%), ont conservé 1 site *Hind* III (1 bande) et les 2 sites *Eco*R V (2 bandes dont une à 700 pb). Les

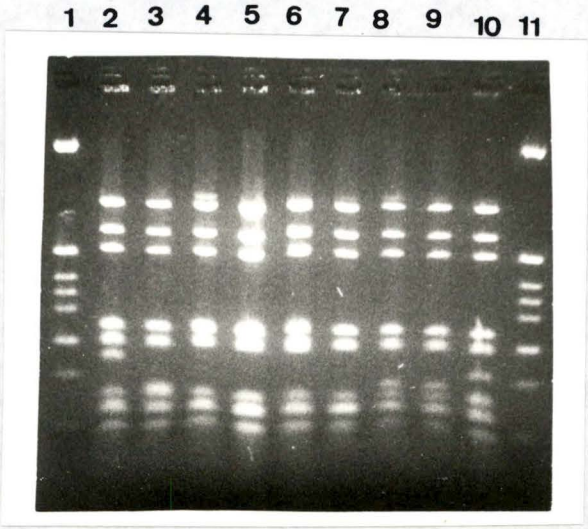


FIG.64 Restriction de délétants par *Alu* I.

Pistes:	Echantillon:
1 et 11	pBR322/ *Hin* f I
2	pDP36 Δ1.2,21/ *Alu* I
3	Δ1.2,22/ *Alu* I
4	Δ1.2,23/ *Alu* I
5	Δ1.2,24/ *Alu* I
6	Δ1.3,3/ *Alu* I
7	Δ1.5,1/ *Alu* I
8	Δ1.5,21/ *Alu* I
9	Δ1.5,22/ *Alu* I
10	pDP36/ *Hin* f I

FIG.65 Restriction des délétants par *Hin* f I.

Pistes:	Echantillon:
1 et 11	pBR322/ *Hin* f I
2 à 9	même disposition quela figure 64 / *Hin* f I
10	pDP36/ *Hin* f I

restrictions par *Alu* I et *Hinf* I vont permettre de préciser les délétions dans ces 8 plasmides.

1°.Le plasmide pDP36 Δ1.3,3.

La restriction par *Alu* I (FIG.64): sur gel d'agarose 2%, on observe que le fragment de 165 pb a disparu et que la bande double à 126-118 pb est devenue simple suite à la perte du fragment de 126 pb. La bande double à 218-226 semble plus intense et plus large (étirée vers le bas) ce qui signifierait qu'une troisième bande de ± 215 pb est apparue. Si tel est le cas, la délétion a atteint le site 697+(263-215)=745.

La restriction par *Hinf* I (FIG.65): la bande à 285 pb n'est pas plus intense que ses voisines sur la même piste du gel contrairement au plasmide pDP36, ce qui était attendu. Une nouvelle bande apparaît à 210 pb environ. La délétion a atteint le site 740, soit environ 45 pb (257-210) plus loin que le site *Hind* III 695, ce qui confirme la prédiction faite à partir du profil de la restriction par *Alu* I.

2°.Les plasmides pDP36 Δ1.5,21 et Δ1.5,22 sont semblables.

Les restrictions par *Alu* I (FIG.64): un nouveau fragment apparaît à 140 pb environ; la délétion atteint donc vraisemblablement le site 697+(263-140)=820.

Les restrictions par *Hinf* I (FIG.65): un fragment apparaît à 130 pb environ; la délétion a donc atteint le site 820, soit environ 125 pb (257-130) plus loin que le site 695.

Nous pouvons préciser que les délétions n'ont certainement pas atteint le site 822, car le site de reconnaissance pour *Alu* I (822 à 825) n'a pas été touché comme nous avons pu le déduire des observations faites sur le profil de restriction.

3°.Les plasmides pDP36 Δ1.2,22 , Δ1.2,23 et Δ1.2,24.

Lors de la restriction par *Alu* I (FIG.64), on observe pour les 3 délétants que la bande à 257 pb est plus intense que la bande double à 218-226 pb. Dans ce cas la bande à 257 pb serait triple suite à l'apparition d'un nouveau fragment de ±255 pb (la bande est déjà double lorsqu'on restreint pDP36 par *Alu* I). La délétion a donc atteint le site 697+(263-257)=705.

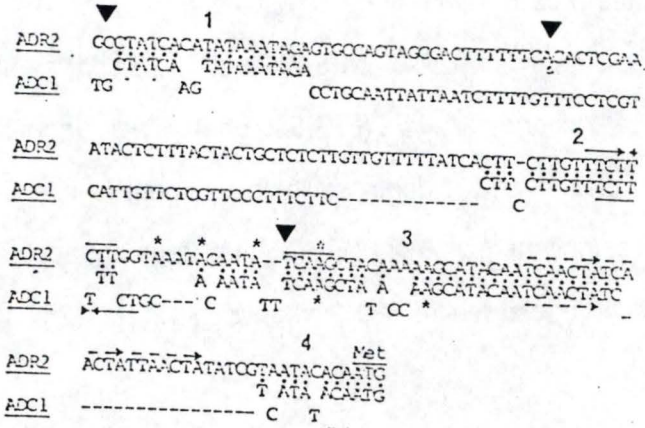


FIG.66 Localisation de la première série de délétants.

La restriction par *Hinf* I (FIG.65) fait apparaître une nouvelle bande à 245 pb environ. La délétion a donc atteint le site 695+(257-245)=707 ce qui est en accord avec la première conclusion.

4'.Le plasmide pDP36 Δ1.2.21.

La restriction par *Alu* I fait apparaître un fragment à 180 pb (FIG.64). La délétion semble donc avoir atteint le site 697+(263-180)=780.

Lors de la restriction par *Hinf* I (FIG.65), le fragment de 456 pb disparaît et est remplacé par un fragment d'environ 650 pb, ce qui n'était pas du tout prévisible. Ce délétant ne sera donc pas retenu.

5'. Le plasmide pDP36 Δ1.5,1.

La restriction par *Alu* I (FIG.64) ne permet pas d'observer l'apparition d'un nouveau fragment mais les fragments de 165 et 126 pb ont disparu comme prévu.

La restriction par *Hinf* I (FIG.65) provoque l'apparition d'un fragment de 550 pb environ ainsi que la perte du fragment de 456 pb. Comme dans le cas du plasmide Δ1.2,21, ce délétant ne sera pas retenu.

La localisation approximative des délétants est reprise à la figure 66. L'utilité de ces délétants sera discutée ultérieurement.

L'analyse que nous venons d'effectuer nous indique que les temps de délétion utilisés ont été trop faibles pour atteindre les 3 répétitions directes du gène ADH2 et la quatrième région d'homologie avec le gène ADH1. Il faudra donc par la suite augmenter les temps précédemment choisis afin que les délétions atteignent le codon ATG du gène ADH2.

Pour réaliser la deuxième expérience de délétion sur le plasmide pDP36, on restreint 25 µg de pDP36 par *Apa* I et *Cla* I dans les mêmes conditions que précédemment et avec les mêmes vérifications; celles-ci sont positives. Dès lors, les restrictions peuvent être effectuées. Les temps choisis sont 1'30", 3', 4'30", 6' et 7'30". Les 5 échantillons de plasmides délétants (Δ2.1 à Δ2.5) sont resuspendus chacun dans 15 µl TE.

De chaque échantillon, 7 µl sont migrés dans un gel d'agarose 0.8%. Cette migration ne nous a pas permis de mettre en évidence des délétions, l'échantillon

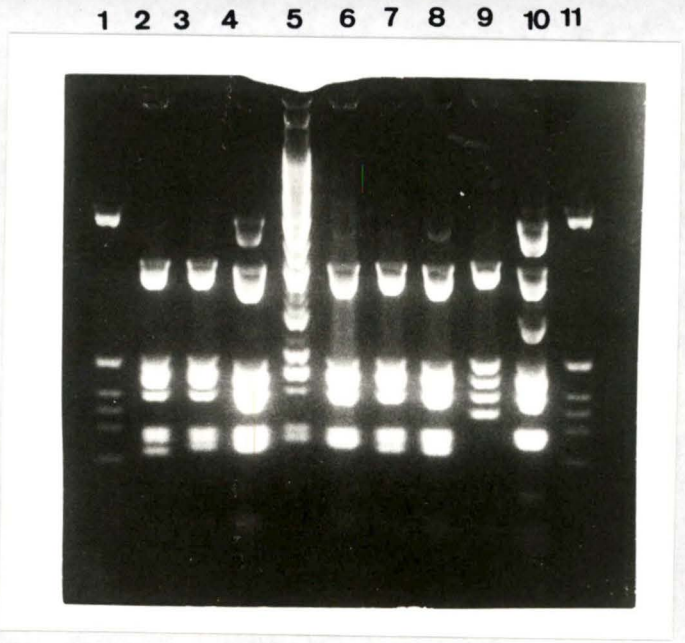


FIG.67 Délétants restreints par *Hin*f I.

Pistes à observer:	Echantillon:
1, 10 et 11:	voir figure figure 65.
2, 3, 4, 7, 8:	délétants du premier groupe comportant une nouvelle bande variant entre 230 et 250 pb.

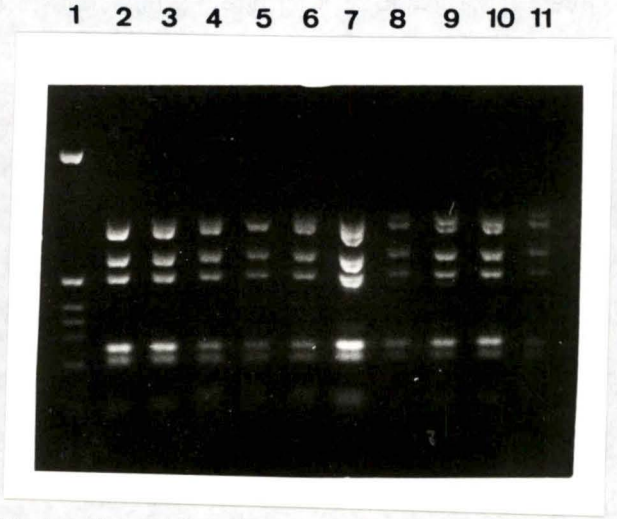


FIG.68 La disposition des échantillons de cette figure est identique à celle de la figure 67; les délétants sont restreints par *Alu*I.
On remarque les triples bandes à 257 pb.

correspondant à la délétion la plus longue (7'30") migrant à la même hauteur que le plasmide pDP36 linéarisé.

On ligue 1µl de l'ADN pour chaque temps et on transforme des cellules d'*E.coli* XL1-Blue compétentes. A partir des transformants obtenus, 35 minipreps sont réalisées. De celles-ci, 19 ont conservé les 2 sites de restriction pour *Hind* III; 15 des 16 échantillons restants sont clivables 2 fois par l'enzyme *Eco*R V et serviront aux analyses ultérieures. Les restrictions par *Alu* I et *Hinf* I permettent de définir 2 groupes dans ces 15 plasmides .

1°.Le premier groupe contient 13 délétants: Δ2.1(1,2,6) Δ2.3(1,3,4,5) Δ2.4(2,3,4,5) et Δ2.5(3,4).

La restriction de ces 13 plasmides par *Hinf* I fait apparaître un nouveau fragment de taille variant entre 230 et 250 pb suivant les cas (FIG.67). Les délétions sont donc comprises entre les sites 720 (=695+257-230) et 700 (=695+257-250).

La restriction par *Alu* I provoque l'apparition d'une triple bande à 257 pb (FIG.68), un peu plus large que la double bande du plasmide parent dans certains cas. Les délétions ont donc atteint environ le site 703 (=697+263-257). La triple bande à 257 peut contenir des fragments de taille légèrement supérieure ou inférieure, surtout dans les cas où elle est plus large; les prévisions obtenues via la restriction par *Hinf* I semblent donc correctes.

2°.Le second groupe contient deux délétants: Δ2.13 et Δ 2.24.

La restriction par *Hinf* I: la bande à 285 pb est toujours présente; la délétion n'a donc pas dépassé le site 915. Nous ne pouvons pas mieux préciser par cette restriction la localisation de la délétion car nous ne voyons pas la bande correspondant au nouveau fragment.

La restriction par *Alu* I (FIG.69): il semble y avoir une nouvelle bande entre la bande 128 et la bande double 218-226, mais le gel est flou. Cette bande est estimée à170 pb. Dans ce cas, la délétion aurait atteint le site 697+(263-170)=790.

Remarquons qu'avant toute utilisation ultérieure, la validité de nos estimations sera vérifiée par le séquençage de tous les délétants

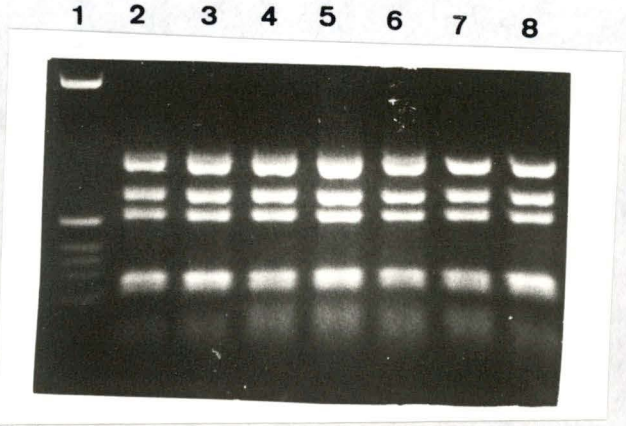


FIG.69 La restriction par *Alu*I ; les pistes à observer sont les pistes 4 et 5.

Pistes: Echantillons:

1 pBR322/ *Hin*fI
4 pDP36 Δ2.1.3/ *Alu*I
3 Δ2.2.4/ *Alu*I

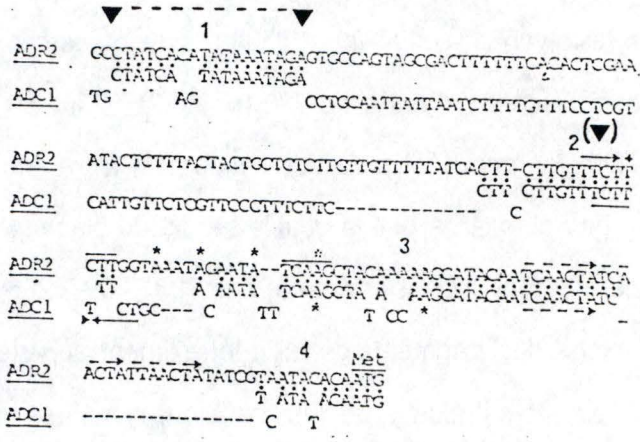


FIG.70 Localisation de la deuxième série de délétants.

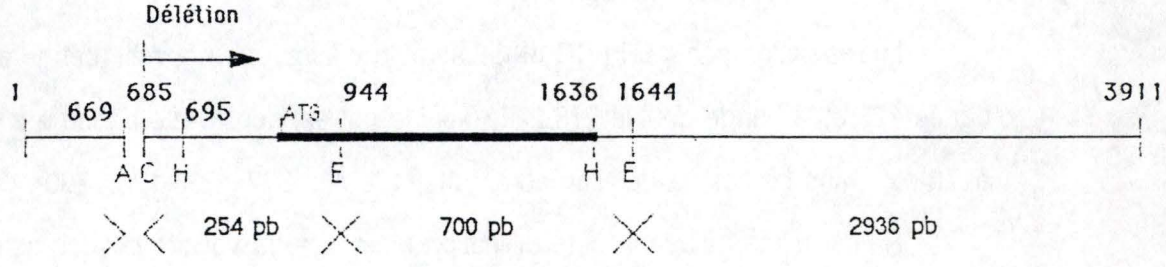


FIG.71 La restriction par *Eco*R V permet de visualiser l'ampleur de la délétion rapportée à un fragment de 254 pb.

La localisation des délétions est reprise à la figure70; il y a 2 délétants dans la deuxième région d'homologie avec le gène ADH1 et 13 autres distribués dans la première région d'homologie, dont certains ont sans doute perdu la TATA box.

Cette deuxième série de délétants ne répond pas tout à fait à notre attente. En effet, nous aurions voulu obtenir des délétions d'une plus grande ampleur; de plus nous constatons que les délétions les plus longues que nous avons pu préciser correspondent aux deux temps les plus courts d'activité Exo III. Les transformants des trois temps les plus longs ont soit conservé les deux sites *Hind* III soit été délétés jusqu'aux alentours de la TATA box. Remarquons toutefois qu'un plasmide délété 7'30" a perdu un de ses deux sites *Eco*R V.

L' étape suivante consistera en un contrôle de l'activité de l'Exo III, afin de vérifier que celle-ci délète effectivement les molécules d'ADN.

Il n'est pas possible, via l'analyse des quelques plasmides délétés pris au hasard, d'approximer la vitesse de l'activité exonucléotidique de l'Exo III. Pour tenter de visualiser les délétions sur l'ADN non-ligué, nous faisions migrer celui-ci sur un gel d'agarose 0.8%, mais nous n'avons pas pu observer le gel 'en escalier' que nous espérions voir. Afin de mieux marquer les différences de longueur des fragments dues aux délétions, nous allons préalablement restreindre cet ADN non-ligué par l'enzyme de restriction *Eco*R V. La figure 71 nous montre que la délétion se marquera sur un fragment de 254 pb et non plus sur les 3911 pb du plasmide entier. Si les délétions ont dépassé le site 944, le fragment de 254 pb disparait et les délétions supplémentaires se marquent sur le fragment de 700 pb. Cette expérience est réalisée sur l'ADN des deux dernières expériences de délétion. Dans chaque cas, on utilise 5 µl des 15 µl d'ADN resuspendu dans le tampon TE, que l'on restreint par *Eco*R V. Pour les deux séries de délétants, aucune délétion n'est mise en évidence, les fragments de 254 pb restant présents. L'Exo III n'a donc été active que sur une petite partie des molécules (ainsi que nous l'avons déduit de l'analyse des délétants); il semble que la solution d'enzyme ait été inactivée et que dès lors, les expériences n'ont pas pu se dérouler normalement.

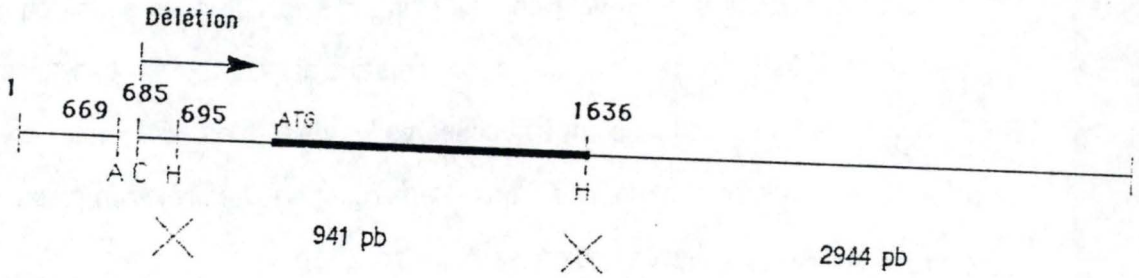


FIG.72 La restriction par *Hind* III permet de visualiser l'ampleur des délétions (hormis les 10 premières bases) rapportées à un fragment de 941 pb.

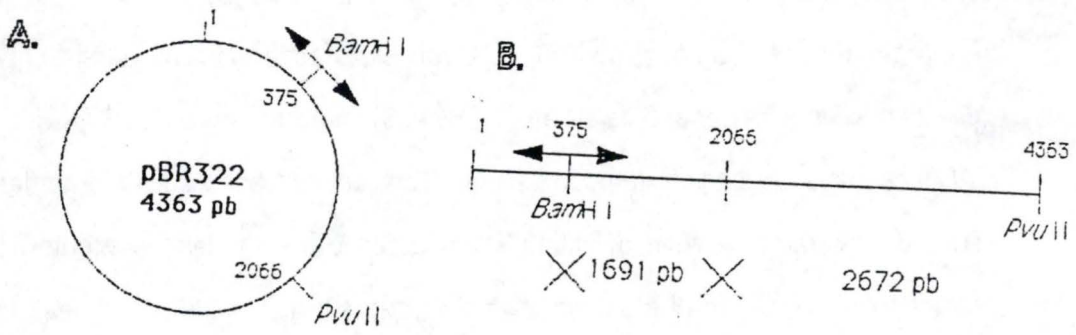


FIG.73 La restriction par *Pvu* II de pBR322 permet de visualiser les délétions sur deux fragments de 1691 et 2672 pb.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons procéder à la troisième expérience de délétion sur pDP36, durant 30' et 60' à 37°C; le plasmide devrait être ainsi complètement digéré.

La double restriction et les délétions sont réalisées comme précédemment mais à une échelle 5 fois plus petite (5µg d'ADN au lieu de 25µg). Les échantillons de délétion sont digérés par *Hind* III avant d'être migrés sur un gel d'agarose 2%. Comme nous le voyons à la figure 72, les délétions se marqueront sur un fragment de départ de 941 pb au lieu de 3911 pour le plasmide initial. On observe qu'il n'y a pas ou peu de délétion; l'Exo III utilisée ne fonctionne donc pas.

Afin de savoir si le problème se situe réellement au niveau de l'Exo III et sachant que la source d'ADN peut influencer l'activité de l'Exo III, nous allons tester l'enzyme sur un vecteur couramment utilisé comme vecteur de référence dans ce type d'expérience: pBR322. Les délétions seront réalisées sur ce plasmide restreint par *Bam*H I (bouts 5' protrudants); elles se feront donc dans les deux sens à partir de ce site, aucune restriction protectrice n'étant réalisée (FIG.73 A). L'expérience de délétion est réalisée (en double) comme précédemment sur 2X1µg d'ADN; la délétion dure une heure à 37°C. De l'ADN de chaque échantillon est mis tel quel sur gel d'agarose 0.8%: aucune délétion n'est visible. Manifestement, la qualité du lot d'enzyme est à remettre en cause.

De nouveaux tests sont réalisés sur pBR322 en utilisant un nouveau lot d'enzyme Exo III.

Nous allons réaliser des délétions de 1', 2', 5' et 10' à 37°C sur 4X1µg de pBR322 coupé en *Bam*H I. Des aliquots sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 0.8% où nous observons une image en 'escalier' indiquant qu'il y a eu délétion. Pour estimer le plus précisément possible la vitesse de délétion, nous allons réaliser une restriction préalablement à la mise sur gel.

En coupant par *Pvu* II, les délétions vont se marquer sur les deux fragments (la délétion se faisant dans les deux sens à partir du site de coupure *Bam*H I); ces deux fragments font 2672 et 1691 pb (FIG.73 B). On réalise cette restriction et on fait migrer sur un gel d'agarose 1.5% (FIG.74). La délétion pendant une minute a été d'environ

FIG.74 La délétion de pBR322 à 37°C est d'environ 80 pb/min.

Pistes:	Echantillons:
1	λ/ *Hin*d III
3 à 6:	pBR322 délétés (1', 2',5', 10') / *Pvu*II
2 et 7	pBR322/ *Pvu*II
8	pBR322/ *Hin*f I

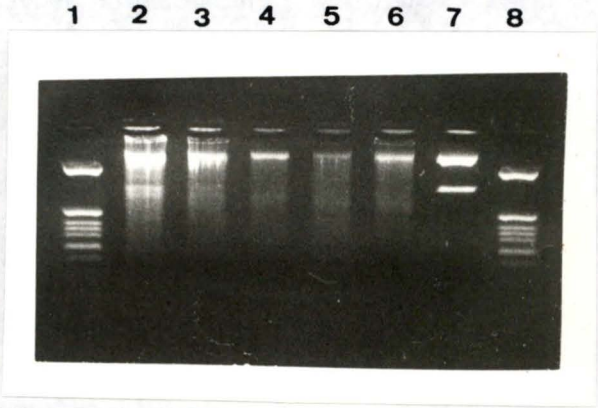


FIG.75 Restriction des plasmides pDP36 délétés par *Hin*dIII.

Pistes:	Echantillons:
1 et 8	pBR322/ *Hin* f I
2 à 6	pDP36 délétés (1',2', 2'30",3',3'30")/ *Hin*d III
7	pDP36/ *Hin*d III

100 pb; celle de deux minutes ne semble guère supérieure; celle de 5 minutes est d'environ 500 pb et celle de 10 minutes de 700 à 900 pb environ (les bandes sont plus floues et ne permettent pas de dire avec précision quelle est la position du fragment). La vitesse de délétion est donc d'environ 80 pb/minute.

Ayant pu montrer que l'enzyme est active et que la vitesse de délétion à 37°C est d'environ 80 pb/ min. sur pBR322, nous allons réaliser une quatrième expérience de délétion du plasmide pDP36.

Les 25µg du plasmide pDP36 sont restreint par les enzymes *Cla* I et *Apa* I et les vérifications habituelles sont opérées; les délétions sont ensuite réalisées durant 1', 2', 2'30", 3' et 3'30" à 37°C.

Pour chaque temps de délétion, un échantillon est restreint par *Eco*RV avant la mise sur gel d'agarose 2%. Dans aucune piste, on ne voit de bande inférieure ou égale à 254 pb mais la bande à 700 pb est toujours présente. Il est probable que les délétions n'ont pas atteint le site 944 et que l'on ne voit pas de bande sous 254 pb car la trop faible intensité de ces bandes ne nous permet pas de les voir. Pour mieux visionner les délétions, nous allons restreindre une quantité double d'ADN par *Hind* III de façon à marquer les délétions sur un fragment de 941 pb. La migration sur un gel d'agarose nous montre qu'il y a eu des délétions; en effet, le fragment de 941 pb est raccourci d'autant plus que le temps de délétion est important. On remarque des traînées sur le gel, tant à partir du grand fragment (2944 pb) qu'à partir du petit fragment (<941 pb) (FIG.75). Ce fait sera interprété par la suite, grâce à l'analyse des transformants.

La ligation d'un µl de chaque échantillon suivie de la transformation de cellules compétentes permet l'obtention de nombreux transformants. Nous réalisons 33 minipreps pour chaque temps de délétion. De nombreux délétants ont perdu les deux sites *Hind* III et les deux sites *Eco*R V (éloignés de 8 pb seulement), respectivement 19, 14, 12, 14 et 11 pour les cinq temps choisis. Sur l'ensemble des échantillons restants, une grande partie n'ont conservé qu'un site de restriction pour *Eco*R V: 11, 14, 18, 15, 18 pour les cinq temps, respectivement. Il reste donc à analyser par *Alu* I et *Hin*f I: 3 plasmides pour le premier temps de délétion (Δ4.1x), 5 plasmides Δ4.2x, 3 plasmides

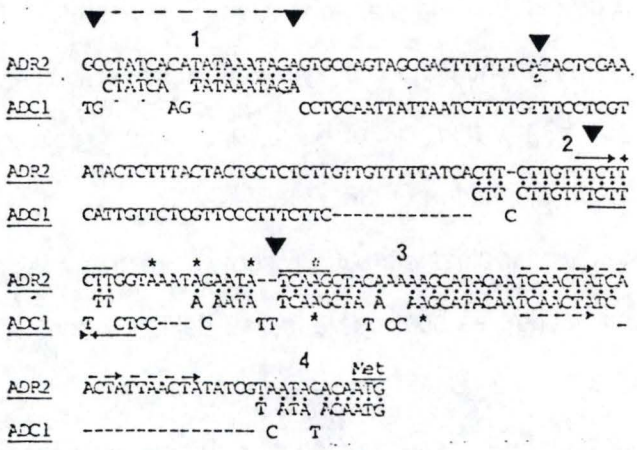


FIG.76 Position approximative des délétions obtenues dans la séquence de sélection du site d'initiation.

Δ4.3x, 4 plasmides Δ4.4x et 4 plasmides Δ4.5x. Dans chaque cas, le profil observé n'était pas du tout prévisible; des fragments de taille nouvelle apparaissent tandis que d'autres disparaissent alors qu'ils sont tout à fait éloignés de la région de délétion. Aucun profil ne correspond à un délétant que nous recherchions.

Sur l'ensemble des expériences de délétion réalisées, nous n'avons pas pu contrôler l'activité de l'Exo III de façon à pouvoir prévoir la vitesse de délétion en fonction de la température. Néanmoins, les analyses de plasmides transformants nous ont permis d'isoler des plasmides délétés dans la région désirée et de déterminer l'étendue des délétions sur chacun d'eux. La figure 76 reprend la position approximative des délétions dans la séquence de sélection du site d'initiation; notons que la détermination exacte (à la base près) de la position de chaque délétion ne sera possible que par le séquençage de l'ADN qui permettra de préciser ou d'infirmer les estimations que nous avons réalisées.

5.Conclusions.

Le contrôle de l'intensité du rognage par l'Exo III pour obtenir des délétions fines n'a pas été maîtrisé; nous allons tenter d'en expliquer les causes probables et d'y remédier.

L'activité 3' exonucléolytique de l'Exo III dépend de plusieurs facteurs: de la température et du temps d'incubation du plasmide et de l'enzyme mis en présence, du rapport de leur concentration, du pH, de la concentration de divers ions et du substrat lui-même. Les conditions ioniques et le pH ainsi que le rapport des concentrations du substrat par rapport à l'enzyme ayant été optimalisés, les facteurs qui servent à "régler" l'activité de l'enzyme sont la température et le temps. Toutefois, les vitesses de délétions de l'enzyme en fonction de la température (TABLEAU 13) ne sont que des estimations grossières et ne peuvent pas être extrapolées avec fiabilité; en effet, la source d'ADN influence fortement l'activité exonucléolytique. La vitesse à laquelle les mononucléotides sont hydrolysés varie d'un nucléotide à l'autre; l'ordre décroissant d'hydrolyse est: C»A≈T»G (Linxweiler, 1982). L'activité de l'enzyme doit donc être

déterminée dans chaque type d'expérience et pour chaque plasmide sur lequel on la fait agir.

Lors des expériences avec le premier lot d'exonucléase III, il est apparu que l'enzyme était partiellement inactivée et que seuls quelques-uns des plasmides transformants analysés ont été délétés. Il n'a pas été possible dans ces conditions de déterminer la vitesse approximative de délétion par l'Exo III à la température choisie.

Lors des expériences avec le second lot d'enzyme, il avait été possible d'approximer la vitesse de délétion au vu des préparations d'ADN migrées sur gel d'agarose: 80 pb/min. sur pBR322 à 37°C. Sur le plasmide pDP36, l'analyse des délétants sur gel d'agarose n'a pas permis d'évaluer la vitesse des délétions. En effet, des traînées ont été observées sur le gel et correspondent vraisemblablement à toute une série d'inserts et de plasmides diversément délétés. L'analyse des transformants, quant à elle, a montré, par des disparitions non-attendues de certaines bandes dans les profils de restriction, que de nombreux plasmides ont été délétés à divers endroits de leur séquence c'est-à-dire selon un procédé différent de l'exonucléolyse 3' progressive.

Pour expliquer que des délétions aient été possible à divers endroit du plasmide, l'hypothèse qui nous paraît la seule possible est la présence de "nicks" dans le plasmide, c'est-à-dire l'absence de lien phosphodiester entre deux nucléotides adjacents dans un des deux brins de l'ADN. Si tel est le cas, on comprend le pourquoi des traînées observées sur le gel où ont migré 2 µl d'ADN non-ligué restreints par *Hind* III. En effet, les délétions "illégitimes" ont pu se faire tant sur l'insert d'ADN compris entre les deux sites *Hind* III (le fragment de 941 pb) que sur la matrice du plasmide (2944 pb car la séquence de *Apa* I 669 à *Hind* III 695 à disparu). Ces mêmes délétions "illégitimes" expliqueraient le fait que certaines bandes apparaissent ou disparaissent de manière inattendue lors des restrictions de vérification et d'analyse.

L'activité exonucléolytique de l'Exo III peut effectivement s'amorcer à partir de "nicks" dans le plasmide. Cette activité de l'Exo III se fait dans le sens 3'OH vers 5'P sur de l'ADN double brin. Elle s'amorce à partir de l'extrémité 3' d'une coupure 5' protrudante d'une molécule d'ADN consécutive à une restriction par une enzyme

spécifique; mais elle peut également débuter à partir d'un "nick" dans un des deux brins de l'ADN (Linn, 1982). Les "nicks" dans les plasmides peuvent provenir de différentes sources.

1°. Lors de la maxiprep d'ADN, l'étape de centrifugation en gradient de CsCl permet de séparer la forme CCC d'ADN plasmidique des formes OC, OL et de l'ADN chromosomique de *E.coli*. L'ADN plasmidique récupéré se trouve principalement sous forme CCC, mais la forme OC (qui comporte un ou des "nicks") est également présente. L'obtention d'ADN plasmidique à un degré de pureté supérieur est possible grâce à une deuxième étape de centrifugation en CsCl lors de la maxiprep; elle est également possible grâce à la méthode de CIRCLE PREP (Jauniaux J-M., communication personnelle) ou à l'utilisation d'une colonne d'affinité QIAGEN.

2°. Lors de la double restriction précédant la délétion, une activité "nickante" contaminante peut apparaître. Notamment, on observe couramment une telle activité dans certains lots d'enzyme *Apa* I, d'où les problèmes parfois rencontrés suite à l'utilisation de cette enzyme (Jauniaux J-M., communication personnelle).

Il s'avère donc absolument nécessaire de vérifier l'absence de "nicks" dans la préparation d'ADN plasmidique de départ. Pour ce faire il suffit de faire agir l'Exo III sur un échantillon de cette préparation. Si il n'y a pas de "nicks" dans l'ADN, l'Exo III ne pourra pas agir et on n'observera pas de délétions dans le plasmide. De même il est nécessaire de vérifier l'absence d'activité "nickante" parasite dans la solution d'enzyme *Apa* I en faisant agir l'Exo III sur un échantillon d'ADN plasmidique restreint par l'enzyme *Apa* I. L'Exo III ne pourra agir que s'il y a des "nicks"s dans l'ADN puisque *Apa* I entraîne l'apparition d' extrémités 3' protrudantes protectrices contre les délétions.

Perspectives: tests à réaliser sur les gènes ADH2 délétés.

L'utilisation de ces délétants dans des expériences de rétrogénétique permettra de préciser le rôle et l'importance de certaines séquences du promoteur et l'influence des modifications des distances séparant les différents éléments du promoteur entre eux. Rappelons que les séquences amont (le locus ADR3 contenant les UAS) et aval (extrémité C-terminale de la séquence codante) du gène seront religuées par la suite

afin de reconstituer un gène ADH2 où seules la séquence délétée par l'Exo III manque. Le remplacement du gène résidant d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* par le gène ADH2 délété conduira à l'obtention d'une souche dont la capacité à transcrire le gène ADH2 et donc à produire une ADH II active, sera testée grâce à deux expériences complémentaires.

1°. Le premier test vise à sélectionner les souches Adh+, ayant au moins un gène ADH fonctionnel. Il se base sur l'incapacité d'une souche Adh- de pousser sur un milieu contenant de l'antimycine A (Williamson, 1980). Cet antibiotique empêche le transfert d'électron du cytochrome b au cytochrome c1, provoquant l'arrêt de la production d'ATP. Dans ces conditions non-respiratoires, la levure ne peut recevoir de l'énergie que par la glycolyse. Or celle-ci ne pourra se réaliser en continu qu'en présence de NAD+ nécessaire à l'oxidation du glycéraldéhyde 3P en 1,3 diP glycérate. La régénération du NAD+ lors de la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol permet la glycolyse continue en conditions anaérobies (FIG.21). Seule une souche possédant au moins une ADH active sera capable de pousser sur un milieu contenant de l'antimycine A.

2°. Le second test vise à sélectionner les souches Adh- qui ne produisent aucune ADH active. Il se base sur l'incapacité d'une souche Adh+ de pousser sur un milieu contenant de l'alcool allylique (Wills, 1976). La (ou les) ADH présente(s) dans cette souche vont transformer l'alcool allylique en acroléine, substance toxique pour les cellules. Seule une souche Adh- (ne contenant aucune ADH active) sera capable de pousser sur un tel milieu.

Dans les expériences de rétrogénétique, nous utiliserons deux souches: une souche Adh- (a) et une souche dans laquelle seule l'ADH II est active (b). La souche (a) pousse sur un milieu à l'alcool allylique et ne pousse pas sur un milieu à l'antimycine A. Le remplacement du gène ADH2 résident par le gène test provoquera le changement de phénotype de la souche sur les deux milieux si le gène permet la production d'une ADH II fonctionnelle. Dans le cas contraire, le phénotype de la souche (a) restera inchangé.

Un comportement inverse est observé avec la souche (b). Dans ce cas-ci, seul le remplacement du gène ADH2 résident fonctionnel par un gène test adh2 non-fonctionnel conduira au changement de phénotype sur les deux milieux.

Dans les cas où le gène test permet la transcription et la production de l'ADH II, le taux de l'enzyme dans les cellules en conditions répressives et dérépressives sera mesuré afin de voir l'importance des différentes séquences délétées dans la régulation de l'initiation de la transcription du gène ADH2.

La localisation de la séquence cible du facteur ADR6 est également une des possibilités d'utilisation des délétants en rétrogénétique.

Nous avons vu que l'activité spécifique de l'ADH II est plus faible dans une souche adr6 que dans une souche ADR6 en conditions de répression ou de dérépression. De plus grâce à la mutation ADH2-6c, la région d'action du facteur ADR6 a pu être grossièrement localisée: elle est comprise entre la TATA box et le codon ATG, c'est à dire la région visée par les délétions. L'expression des gènes ADH2 délétés pourra être testée dans des souches ADR6 et adr6 où le gène aura été introduit; dans le cas où l'activité spécifique de l'ADH II sera similaire dans les deux souches, la séquence cible pour le facteur ADR6 aura été délétée. Cette séquence ayant disparu, l'activité ADH II mesurée sera sans doute d'un niveau comparable a celui d'une souche ADH2 adr6.

BIBLIOGRAPHIE

Beier D.R., Young E.T., 1982.Characterization of a regulatory region upstream of the ADR2 locus of *S. cerevisiae*. Nature, 300, 724-728.

Beier D.R., Sledziewski A., Young E.T., 1985. Deletion analysis identifies a region, upstream of the ADH2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which is required for ADR1-mediated derepression. Mol. Cell. Biol., 5, 1743-1749.

Bemis L.T., Denis C.L., 1988. Identification of functional regions in the yeast transcriptional activator ADR1. Mol. Cell. Biol., 8, 2125-2131.

Blumberg H., Eisen A., Sledziewski A., Bader D., Young E.T., 1987. Two zinc fingers of a yeast alcohol regulatory protein shown by genetic evidence to be essential for its function. Nature, 328, 443-445.

Blumberg H., Hartshorne T.A., Young E.T., 1988. Regulation of expression and activity of the yeast transcription factor ADR1. Mol. Cell. Biol., 8, 1868-1876.

Bolivar F., Rodriquez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heynecker H.L., Boyer H.W., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene, 2, 95-113.

Bränden C.-I., Jörnvall H., Eklund H., Furugren B., 1975. Alcohol dehydrogenases. In: The enzymes (Boyer P., ed.) 3rd edn, 11, 103-190.

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

Buratowski S., Hahn S., Sharp P.A., Guarente L., 1988. Function of a yeast element-binding protein in a mammalian transcription system. Nature, 334, 37-42.

Chen W., Struhl K., 1985. Yeast mRNA initiation sites are determined primarely by specific sequences, not by the distance from the TATA element. EMBO J., 4, 3273-3280.

Cherry J.R., Johnson T.R., Dollard C., Shuster J.R., Denis C.L., 1989. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. Cell, 56, 409-419.

Ciriacy M., 1975. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*.II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. Molec. gen. Genet., 138, 157-164.

Ciriacy M., 1976. Cis-dominant regulatory mutations affecting the formation of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADH II) in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. gen. Genet., 145, 327-333.

Ciriacy M., 1977.Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite derepression. Mol. Gen. Genet., 154, 213-220.

Ciriacy M., 1979. Isolation and caracterisation of further cis- and trans-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose repressible alcohol dehydrogenase (ADH II) in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet., 176, 427-431.

Clewell D.B., 1972. J. Bacteriol., 110, 667-676.

Denis C.L., Ciriacy M., Young E.T., 1981. A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Mol. Biol., 148, 355-368.

Denis C.L., Young E.T., 1983. Isolation and characterization of the positive regulatory gene ADR1 from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 3, 360-370.

Denis C.L., 1984. Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. Genetics, 108, 833-844.

Denis C.L., Gallo C., 1986. Constitutive RNA synthesis for the yeast activator ADR1 and identification of the ADR1-5c mutation : Implications in posttranslational control of ADR1. Mol. Cell. Biol., 6, 4026-4030.

Denis C.L., 1987. The effects of ADR1 and CCR1 gene dosage on the regulation of the glucose repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet., 208, 101-106.

Dretzen G., Ballard M., Sassone-Corsi P., Chambon P., 1981. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem., 12, 295-298.

Drewke C., Ciriacy M., 1988. Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta, 950, 54-60.

Eisen A., Taylor W.E., Blumberg H., Young E.T., 1988. The yeast regulatory protein ADR1 binds in a zinc-dependent manner to the upstream activating sequence of ADH2. Mol. Cell. Biol., 8, 4552-4556.

Fowler P.W., Ball A.J.S., Griffiths D.E., 1972. The control of alcohol dehydrogenase isozyme synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Biochem., 50, 35-43.

Freedman L.P., Yamamoto K.R., Luisi B.F., Sigler P.B., 1988. More fingers in hand. Cell, 54, 444.

Ganzhorn A.J., Green D.W., Hershey A.D., Gould R.M., Plapp B.V., 1987. Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. J. Biol. Chem., 262, 3754-3761.

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

Guarente L., 1987. Regulatory proteins in yeast. Ann. Rev. Genet., 21, 425-452.

Guarente L., 1988. UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. Cell, 52, 303-305.

Hahn S., Hoar E.T., Guarente L., 1985. Each of three "TATA elements" specifies a subset of the transcription initiation sites at the CYC-1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8, 8562-8566.

Hartshorne T.A., Blumberg H., Young E.T., 1986. Sequence homology of the yeast regulatory protein ADR1 with *Xenopus* transcription factor TFIIIA. Nature, 320, 283-287.

Jörnvall H., 1977 (a). The primary structure of yeast alcohol dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 72, 425-442.

Jörnvall H., 1977 (b). Differences between alcohol dehydrogenases. Eur. J. Biochem., 72, 443-452.

Jörnvall H., Eklund H., Bränden C.-I.,1978. Subunit conformation of yeast alcohol dehydrogenase. J. Biol. Chem., 253, 8414-8419.

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

King J., 1986. Genetic analysis of protein folding pathways. Bio/Technology, 4, 297-303.

Kroeker W.D., Kowalski D.,1978. Biochemistry, 17, 3236. In: Stratagene 1989 product catalog, Mung Bean Nuclease, 71.

Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L., 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science, 240, 1759-1764.

Lewin B., 1987. Genes. Third edition. John Wiley & Sons.

Linn S.M., 1982. The deoxyribonucleases of *Escherichia coli*. in: Nucleases (Linn S.M. and Roberts R.J. ed., Cold Spring Harbor Laboratory), 291-309.

Linxweiler W., Hörz W., 1982. Nucl. Acid. Res., 6, 831. In fiche technique de: Exonuclease III, molecular biology boehringer mannheim.

Lutstorf U.,MegnetR.,1968. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4. Arch. Biochem. Biophys., 126, 933-944.

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

Nagawa F., Fink G.R., 1985. The relationship between the "TATA" sequence and transcription initiation sites at the HIS4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8557-8561.

Parraga G., Horvath S.J., Eisen A., Taylor W.E., Hood L., Young E.T., Klevit R.E., 1988. Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1. Science, 241, 1489-1492.

Pheiffer B.H., Zimmerman S.B., 1983. Nucl. Acid. Res., 11, 7853. In: Pharmacia Molecular Biological (1984), DNA ligase, 27.

Rogers S.G., Weiss B., 1980. Exonuclease III of *Escherichia coli*K-12, an AP endonuclease. in: Method. enzymol., 65, 201.

Rudolph H., Hinnen A., 1987. The yeast PHO5 promoter: Phosphate control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1340-1344.

Russel D.W., Smith M., Williamson V.M., Young E.T., 1983. Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. J. Biol. Chem., 258, 2674-2682.

Schimpfessel L., 1968. Présence et régulation de la synthèse de deux alcool déshydrogénases chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta, 151, 317-329.

Shuster J., Yu J., Cox D., Chan R.V.L., Smith M., Young E.T., 1986. ADR1-mediated regulation of ADH2 requires an inverted repeat sequence. Mol. Cell. Biol., 6, 1894-1902.

Sigler P.B., 1988. Acid blobs and negative noodle. Nature, 333, 210-212.

Stryer L., 1988. Biochemistry. (International student ed.) 3rd edn, 363-364.

Szulmajster J., 1988. Protein folding. Bioscience Reports, 8, 645-651.

Taguchi A.K.W., Young E.T., 1987 (a). The identification and caracterisation of ADR6, a gene required for sporulation and for expression of the alcohol dehydrogenase II isozyme from *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 116, 523-530.

Taguchi A.K.W., Young E.T., 1987 (b). The cloning and mapping of ADR6, a gene required for sporulation and for expression of the alcohol dehydrogenase II from *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 116, 531-540.

Thukral S.K., Tavianini M.A., Blumberg H., Young E.T., 1989. Localisation of a minimal binding domain and activation regions in yeast regulatory protein ADR1. Mol. Cell. Biol., 9, 2360-2369.

Tibor A., 1988. Mapping génétique et contribution à la caractérisation moléculaire du gène PHO81 régulateur de la phosphatase acide chez *Saccharomyces cerevisiae*. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences Biologiques. Facultés Universitaires N.D. de la Paix, Namur.

van Loon A.P.G.M., Young E.T., 1986. Intracellular sorting of alcohol dehydrogenase isoenzymes in yeast: a cytosolic location reflects absence of a terminal targeting sequence for the mitochondrion. EMBO J., 5, 161-165.

Wasylyk B., 1988 (a). Transcription elements and factors of RNA polymerase B promoters of higher eucaryotes. CRC Crit. Rev. Biochem., 23, 77-120.

Wasylyk B., 1988 (b). Enhancers and transcription factors in the control of gene expression. Biochim. Biophys. Acta, 951, 17-35.

Williamson V.M., Bennetzen J., Young E.T., 1980. Isolation of the structural gene for alcohol dehydrogenase by genetic complementation in yeast. Nature, 283, 214-216.

Williamson V.M., Young E.T., Ciriacy M., 1981. Transposable elements associated with constitutive expression of yeast alcohol dehydrogenase II.
Cell, 23, 605-614.

Williamson V.M., Cox D., Young E.T., Russel D.W.,Smith M.,1983. Characterization of transposable element-associated mutations that alter yeast alcohol dehydrogenase II expression. Mol. Cell. Biol., 3, 20-31.

Williamson V.M., Paquin C.E., 1987. Homology of *Saccharomyces cerevisiae* ADH4 to an iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. Mol. Gen. Genet., 209, 374-381.

Wills C., Phelps J., 1975. A technique for the isolation of yeast alcohol dehydrogenase mutants with altered substrate specificity. Arch. Biochem. Biophys., 167, 627-637.

Wills C., 1976. Production of yeast alcohol dehydrogenase isoenzymes by selection. Nature, 261, 26-29.

Wills C., Jörnvall H., 1979. The two major isozymes of yeast alcohol dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 99, 323-331.

Wright P.E., Dyson H.J., Lerner R.A., 1988. Conformation of peptide fragments of proteins in aqueous solution: implications for initiation of protein folding. Biochemistry, 27, 7167-7175.

Young E.T., Pilgrim D., 1985. Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 5, 3024-3034.

Yu J., Donoviel M.S., Young E.T., 1989. Adjacent upstream activation sequence elements synergistically regulate transcription of ADH2 in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 9, 34-42.