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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Clonage et caractérisation du gène KlINV1 encodant l'invertase de Kluyveromyces lactis

Colonval , Igor

Award date:
1996

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

Clonage et caractérisation du gène *KlINV1* encodant l'invertase de *Kluyveromyces lactis*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

Colonval Igor

1996-1997

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

Clonage et caractérisation du gène *KlINV1* encodant l'invertase de *Kluyveromyces lactis*

COLONVAL Igor

Résumé

Parmi la famille des gènes de ß-fructosidases, le gène *SUC2* de *Saccharomyces cerevisiae*, encodant l'invertase, constitue un paradigme, non seulement pour les études enzymologiques, mais également pour l'étude de la régulation génique par répression glucose.

Ce travail porte sur le clonage et la caractérisation préliminaire de *KlINV1*, encodant l'invertase chez une autre levure évolutivement proche du terme de référence qu'est *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*.
Une sonde correspondant à une région de *KmINU1* conservée dans une grand nombre de ß-fructosidases, validée par un "Southern Blotting" sur l'ADN génomique de *K. lactis*, fut utilisée pour cribler une banque génomique de *K. lactis*. Dix-neuf clones s'hybridant avec la sonde furent isolés et soumis à une amplification PCR diagnostique réalisée au moyen d'amorces dégénérées dérivées de la sonde *KmINU1*. Deux de ces 19 clones, le pGICI1 et le pGICI2, fournirent un signal d'amplification de taille attendue. Un profil de restriction sommaire révéla que ces deux clones partageaient une séquence commune.
Le séquençage, réalisé sur le pGICI1, permit l'obtention d'une séquence nucléotidique d'environ 3 kb renfermant une ORF de 1380 bp. Un alignement pairé entre Suc2p et la séquence protéique déduite de la séquence du gène cloné révéla 71% de similarité et 57% d'identité, justifiant notre choix d'appellation pour ce nouveau gène.
Le promoteur de *KlINV1* a bénéficié de notre plus grande attention. Nous y avons notamment remarqué la présence de séquences cibles de la fixaiton de l'effecteur central de la répression glucose Mig1p. La répression glucose de l'expression de *KlINV1* a été éprouvée par un test fonctionnel sur un milieu contenant du raffinose, un substrat de l'invertase, et du 2-désoxyglucose, un analogue du glucose non métabolisable. Les résultats obtenus semblent indiquer que l'expression de *KlINV1* est réprimée en présence de glucose, mais que cette répression ne s'effectue pas par l'intermédiaire de KlMig1p, du moins pas majoritairement.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Décembre 1996

Promoteur: Prof. J. VANDENHAUTE

Co-promoteur: Prof. M. DUCHIRON (Reims)

Je remercie tout particulièrement le Professeur Jean Vandenhaute de m'avoir accueilli dans son laboratoire et suivi au cours de l'année.

Je remercie les membres du jury , Messieurs J.P. Cassart, J.J. Letesson et P. Van Cutsem et Madame I. Knott d'avoir lu mon mémoire.

Je remercie Pascal Briffeuil pour son aide lors des alignements multiples de séquences.

Je remercie Rose-Marie, Monique, Mme Libion, Dominique, Damien, Flore, David, Vincent, Isabelle G. et Isabelle H. pour la bonne humeur qu'ils apportent au labo.

Je tiens à remercier tout particulièrement Jean-Pol pour sa bonne humeur, sa disponibilité et pour m'avoir suivi tout au long de ce mémoire.

Je remercie également Mademoiselle IG pour son aide précieuse pendant le Rush final.

Je voudrais également remercier mes parents pour leur aide ainsi que tous les amis avec lesquels il m'a toujours été agréable de déstresser, et tout particulièrement Christophe et Karl.

ABREVIATIONS

A	Adénosine
a a	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
Amp^r	Marqueur de résistance à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARS	Séquence de réplication autonome
bp	Paire de bases
C	Cytidine
CEN	Séquence centromérique
Ci	Curie
2-DG	2-Désoxyglucose
DO	Densité optique
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
g	Gramme
G	Guanosine
IPTG	Isopropyl, ß-D thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
l	Litre
LB	Milieu de Luria-Bertani
M	Molaire
MCS	Site multiple de clonage ("Multiple Cloning Site")
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mU	Milliunité
N	A, C, G, T
nM	Nanomolaire
ORF	Phase ouverte de lecture ("Open Reading Frame")
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne ("Polymerase Chain Reaction")
PM	Poids Moléculaire
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
R	A ou G
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide
T	Thymidine
Tris	Tri-(hydoxyméthyl)-aminométhane
U	Uridine
UAS	Séquence d'activation en amont ("Upstream Activating Sequence")
URS	Séquence de répression en amont ("Upstream Repressing Sequence")
UV	Ultra-Violet
V	Volt
X-gal	5-Bromo 4-Chloro 3-indoyl, ß-D galactopyranoside
Y	C ou T
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire

TABLE DES MATIERES

I INTRODUCTION 1

1) LA REPRESSION GLUCOSE: PROBLEMATIQUE GENERALE. 1

1.1) Le métabolisme du carbone chez les fungi.

1.2) Les gènes qui sont réprimés par le glucose. 2

1.3) Mécanisme de la répression glucose. 2
1.3.1) Propriétés générales. 2
1.3.2) Quels sont les effecteurs de la répression glucose ? 3
1.3.3) Mode d'actions des répresseurs. 3
1.3.4) Action de Mig1p. 3

2) LE PARADIGME DE LA REPRESSION GLUCOSE CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* : LE GENE *SUC2*. 4

2.1) Les gènes *SUC*. 4
2.1.1) Les mutants de dérépression. 5
2.1.2) Les mutants de répression. 6

2.2) Mécanismes de contrôle de l'expression de l'invertase (Ronne, 1995; Gancedo, 1992; Trumbly, 1992). 6

3) LA REPRESSION GLUCOSE CHEZ *KLUYVEROMYCES LACTIS*. 7

3.1) Le métabolisme du carbone chez *K. lactis*. 8

3.2) La répression par le glucose chez *K. lactis*. 9

II. BUT DU TRAVAIL 10

II RESULTATS 11

1) MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE DE ß-FRUCTOSIDASE DE TYPE INVERTASE CHEZ *KLUYVEROMYCES LACTIS*. 11

2) CLONAGE ET SEQUENÇAGE DU GENE DE L'INVERTASE. 11

2.1) Choix de la sonde: 11

2.2) Validation de la sonde utilisée: 11

2.3) Caractéristiques de la banque génomique de *K. lactis* utilisée. 12

2.4) Isolement de 19 clones au moyen de la sonde *KmINU1*. 12

2.5) Identification des clones porteurs du gène *KlINV1* par PCR diagnostique. 12

2.6) Séquençage du gène *KlINV1* contenu dans l'insert plasmidique. 13
2.6.1) Obtention d'une séquence homologue à *KlINV1*. 13
2.6.2) Stratégie générale de séquençage et séquence de *KlINV1*. 13

3) LE GENE CLONE EST LE GENE DE L'INVERTASE DE *K. LACTIS*. 14

3.1) Le nouveau gène cloné est un gène de *K. lactis*. 14

3.2) Alignements simples de séquences. 15

3.3) Conclusions. 15

4) ANALYSE DE L'ORF DU GENE CLONE. 16

5) ANALYSE DES SEQUENCES FLANQUANTES DE L'ORF. 17

5.1) Analyse des séquences de la région en amont de l'ORF. 17
5.1.1) Signaux communs aux gènes de levures. 17
5.1.2) Signaux de type *ScSUC2* et *KmINU1*. 17

5.2) Analyse des séquences situées du côté 3' de l'ORF. 18

6) ETUDE DE LA REPRESSION PAR LE GLUCOSE DU GENE *KLINV1*. 19

IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 21

V MATÉRIEL ET MÉTHODES 23

1) SOLUTIONS ET TAMPONS 23

1.1) Solutions. 23

1.2) Tampons. 27

2) SOUCHES ET PLASMIDES. 30

2.1) Souches. 30
2.1.1) Souche de bactérie : Xl1-Blue d'E. coli. 30
2.1.2) Souches de levure. 31
2.1.2.1) Souches de Kluyveromyces lactis. 31
2.1.2.2) Souches de Kluyveromyces marxianus. 31
2.1.2.3) Souches de Saccharomyces cerevisae. 31

2.2) Plasmides. 32
2.2.1) KEp6 (**Figure 1**). 32
2.2.2) pGEM-T (**Figure 2**). 32
2.2.3) pGICI1 (**Figure 3**). 32

2.2.4) pGICI2 (**Figure 4**). 32
2.2.5) pGICI3 (**Figure 5**). 32

3) MILIEUX DE CULTURE 33

3.1) Le milieu de culture pour les bactéries: LB. 33

3.2) Les milieux de cultures pour les levures. 33
3.2.1) Milieu riche. 33
3.2.1.1) Milieu YPD. 33
3.2.2) Milieu minimum complet. 33

4) TECHNIQUES DE L'ADN RECOMBINANT. 34

4.1) Constructions génétiques. 34
4.1.1) Principe général des constructions génétiques. 34
4.1.2) Restriction d'ADN. 35
4.1.2.1) Généralités. 35
4.1.2.2) Au point de vue pratique. 35
4.1.2.3) Remarques générales. 36
4.1.3) Déphosphorylation. 36
4.1.3.1) Introduction. 36
4.1.3.2) Protocole. 36
4.1.4) Ligation. 37
4.1.4.1) Principe. 37
4.1.4.2) En pratique. 37
4.1.4.3) Remarques générales. 37

4.2) Electrophorèse analytique sur gel d'agarose. 38
4.2.1) Critères de séparation des fragments d'ADN. 38
4.2.2) Visualisation de l'ADN sur le gel. 38
4.2.3) Estimation de la taille et de la quantité des fragments d'ADN. 38
4.2.4) Réalisation. 39

4.3) Récupération d'ADN inclus dans un gel d'agarose. 39
4.3.1) Introduction. 39
4.3.2) Geneclean II Kit (BIO 101). 39
4.3.3) Qiaex II. 39

4.4) La transformation. 40
4.4.1) Transformation dans *E. coli* XL1-Blue. 40
4.4.1.1) Electroporation. 40
4.4.1.2) Par la technique utilisant le chlorure de calcium. 41
4.4.1.3) Sélection des transformants. 42

4.5) Préparation d'ADN plasmidique. 42
4.5.1) Introduction. 42
4.5.2) La minipréparation. 42
4.5.2.1) Culture bactérienne. 42
4.5.2.2) Lyse des cellules. 42
4.5.2.3) Récupération des plasmides. 43
4.5.3) La midipréparation. 43
4.5.3.1) Introduction. 43
4.5.3.2) Culture. 43
4.5.3.3) Lyse des cellules. 43
4.5.3.4) Mise sur colonne. 44
4.5.4) La maxipréparation. 44

4.5.4.1) Introduction. 44
4.5.4.2) Préparation de l'échantillon. 44
4.5.4.3) Purification. 44

4.6) Purification et préparation de l'ADN. 45
4.6.1) Extraction au phénol-chloroforme. 45
4.6.2) Préparation d'ADN génomique de levure. 45

4.7) La Polymerase Chain Reaction : PCR. 46
4.7.1) Introduction. 46
4.7.2) Protocole. 47
4.7.3) Remarques générales. 47

4.8) Le séquençage. 47
4.8.1) Le séquençage manuel. 47
4.8.1.1) Principe du sequençage. 47
4.8.1.2) Réactions de séquençage. 48
4.8.2) Le séquençage automatique. 50
4.8.2.1) Introduction. 50
4.8.2.2) Protocole. 50

4.9) Southern blot. 51
4.9.1) Préparation du gel d'agarose au transfert de l'ADN. 51
4.9.2) Montage pour le transfert (**Figure 13**). 52
4.9.3) Préhybridation. 52
4.9.4) Synthèse de la sonde radioactive (**Random prime DNA labelling system**). 52
4.9.5) Hybridation. 52
4.9.6) Lavages. 53
4.9.7) Révélation. 53

4.10) Hybridation sur colonies. 53
4.10.1) Transfert des colonies sur filtre. 53
4.10.2) Lyse des cellules. 53
4.10.3) Préhybridation, hybridation, lavages et révélation. 53

INTRODUCTION

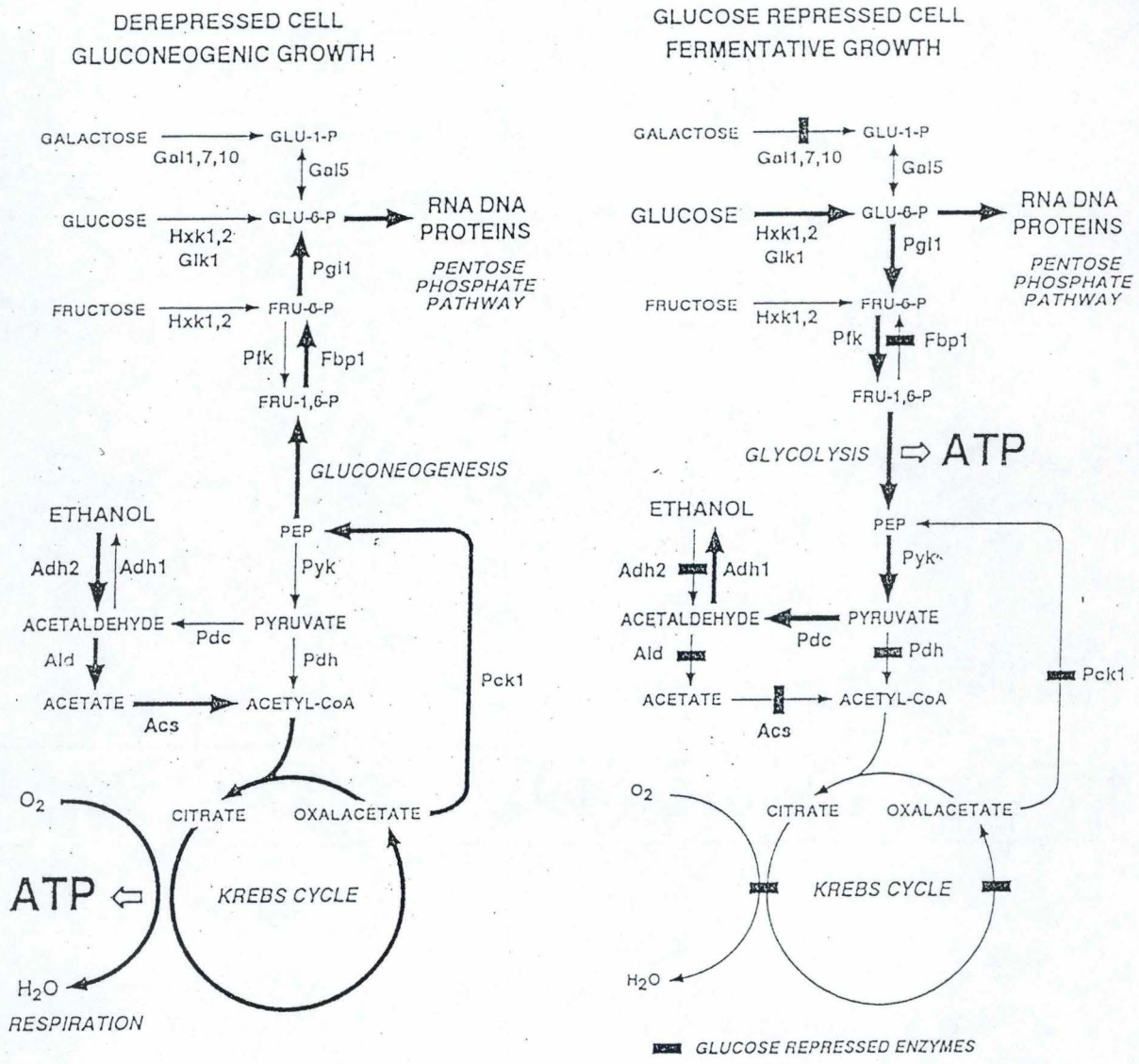


Figure 1 : Vue simplifiée du métabolisme du carbone dans des cellules de levure cultivées en présence de glucose (Ronne, 1995). Les enzymes sont appelées par le nom du gène correspondant.

I. INTRODUCTION.

1) La répression glucose: problématique générale.

Les microorganismes éteignent un grand nombre de gènes en présence de glucose. Ce phénomène permet aux microorganismes de faire face aux modifications de la source de carbone présente dans l'environnement et d'économiser de l'énergie en réprimant l'expression d'un grand nombre de gènes requis pour le métabolisme d'autres sources de carbone.

Ce phénomène a été fortement étudié chez les bactéries où on l'a dénommé répression catabolique. La présence de glucose dans le milieu induit une diminution de la concentration intracellulaire en AMPc nécessaire à l'activation de la protéine CAP, un transactivateur des gènes cataboliques.

Les levures et d'autres fungi montrent également une réponse au glucose, appelée la répression glucose. Toutefois, le mécanisme de la répression glucose est totalement différent chez les levures puiqu'il n'est pas médié par une diminution de la concentration interne en AMPc et implique un contrôle négatif direct des promoteurs cibles par un répresseur qui se lie à l'ADN (Ronne, 1995).

1.1) Le métabolisme du carbone chez les fungi.

Afin de comprendre le mécanisme de la répression par le glucose, il faut connaître les mécanismes d'utilisation des différentes sources de carbone par les fungi (**Figure 1**).

Les sources de carbone non fermentescibles, comme l'éthanol, sont métabolisées via le cycle de Krebs, avec gain d'ATP par la respiration. La cellule a également besoin d'hexoses-phosphate pour les réactions de biosynthèse. En absence de glucose, ils doivent être produits par la voie de la gluconéogenèse. La plupart des étapes de la gluconéogenèse sont catalysées par les enzymes de la glycolyse mais deux étapes sont irréversibles, et donc catalysées par des enzymes uniques à la gluconéogenèse; il s'agit de la fructose biphosphatase (Fbp1) et la PEP carboxykinase (Pck1).

Les sources de carbone fermentescibles comme le glucose sont métabolisées par la voie de la glycolyse. Le pyruvate formé pourra ensuite être métabolisé via le cycle de Krebs. Toutefois, cela ne se déroule pas de la sorte chez la levure puisque les fonctions mitochondriales sont réprimées par le glucose. Le pyruvate est décarboxylé et ensuite réduit en éthanol pour

régénérer le NAD^+ consommé durant la glycolyse. Le glucose n'est donc pas complètement métabolisé et l'ATP est produit par fermentation en moindre quantité que durant une croissance oxydative.

Cette croissance fermentaire pourrait être perçue comme une pure perte mais le carbone n'est pas perdu, il est conservé sous forme d'éthanol. Cependant, quand il n'y a plus de glucose dans le milieu, la production des enzymes mitochondriales est déréprimée et l'éthanol formé va à son tour pouvoir être métabolisé. En fait, la conversion rapide de tout le glucose disponible en éthanol confère un avantage séléctif à la levure dans le cas d'une compétition avec un autre organisme incapable d'utiliser l'éthanol.

1.2) Les gènes qui sont réprimés par le glucose.

On distingue 3 catégories de gènes réprimés par le glucose :

a) Les gènes codant pour les deux enzymes uniques à la gluconéogenèse (*FBP1* et *PCK1*). La répression des gènes par le glucose permet d'éviter que la gluconéogenèse et la glycolyse ne se déroulent simultanément.

b) Les gènes codant pour les enzymes mitochondriales impliquées dans le cycle de Krebs et dans la respiration.

c) Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des autres sources de carbone. Ces enzymes sont les produits des gènes *GAL*, *SUC* et *MAL* qui catalysent respectivement les étapes initiales du métabolisme du galactose, du sucrose et du maltose. Ces sucres entrent dans la voie glycolytique comme hexose-phosphate.

1.3) Mécanisme de la répression glucose.

1.3.1) Propriétés générales.

Le signal de la répression par le glucose n'est pas encore identifié mais l'hexokinase semble jouer un rôle important dans le déclenchement de la réponse au glucose (Ronne, 1995). Des mutations dans l'hexokinase Hxk2 abolissent la répression par le glucose. Le glucose n'est pas le seul sucre à pouvoir générer le signal: le fructose, le mannose et dans certaines conditions le galactose peuvent provoquer la répression par le glucose (Gancedo, 1992).

On a découvert qu'une protéine kinase dénommée Snf1p joue un rôle important dans la répression par le glucose. L'activité de cette kinase est

requise pour l'expression de tous les gènes réprimés par le glucose (Ronne, 1995). Les cellules qui ne possèdent pas Snf1p sont incapables d'utiliser une source de carbone autre que le glucose. Le glucose inhiberait ou contrecarrerait l'activité de Snf1p mais il n'y a pas de preuve directe de la régulation négative de l'activité de Snf1p par le glucose.

1.3.2) Quels sont les effecteurs de la répression glucose ?

Deux effecteurs spécifiques de la répression par le glucose ont été identifiés chez les fungi : le répresseur Mig1p chez la levure *S. cerevisiae* et le répresseur CREA chez *Aspergillus nidulans*. Le gène *MIG1* encode une protéine à doigts de zinc de 56 kDa. Mig1p se lie à des boîtes GC sur l'ADN, un motif présent dans beaucoup de promoteurs de gènes régulés par le glucose. Le rôle de Mig1p dans la répression par le glucose est suggéré par deux observations. La perte de Mig1p provoque une dérépression partielle de beaucoup de gènes réprimés par le glucose quand les cellules sont dans un milieu contenant du glucose. La perte de Mig1p permet aux cellules déficientes pour la protéine Snf1p de croître sur galactose et sucrose (Ronne, 1995). Ces observations suggèrent qu'une fonction de Snf1p serait d'empêcher Mig1p de réprimer les gènes *GAL* et *SUC* en absence de glucose. Toutefois, Snf1p doit également avoir d'autres fonctions, vu que la perte de Mig1p n'est pas suffisante pour permettre aux cellules déficientes en Snf1p de croître sur les sources de carbone gluconéogéniques (Ronne, 1995). Le gène CREA d'*A. nidulans* code pour un homologue de Mig1p. CREA se lie aux mêmes boîtes GC que la protéine Mig1 et le gène *MIG1* peut partiellement complémenter une mutation *creA*.

1.3.3) Mode d'actions des répresseurs.

Les répresseurs peuvent agir de différentes façons: par liaison compétitive avec un activateur pour un même site de fixation à l'ADN, en masquant un domaine d'activation, en interagissant avec des facteurs d'initiation de la transcription ou encore en interagissant avec un co-répresseur.

1.3.4) Action de Mig1p.

L'action du répresseur Mig1p sur la transcription serait le recrutement d'un complexe contenant les protéines Tup1 et Cyc8 sur le promoteur cible (Tzamarias et Struhl, 1995; Treitel et Carlson, 1995).

La protéine Cyc8 contient 10 copies de motifs TPR (Tetratrico Peptide Repeat) (Sikorski *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1990) qui sont nécessaires à la fonction de Cyc8p (Schultz *et al.*, 1990).
La protéine Tup1 contient 6 répétitions du motif WD (connu aussi comme motif ß-transducin). Tup1p contient également un domaine qui est responsable de la répression transcriptionnelle. Des travaux récents ont montré en effet que Tup1p est la sous-unité effectrice tandis que Cyc8p assurerait le contact avec des répresseurs fixés à l'ADN (Ronne, 1995). Le mécanisme par lequel Tup1p inhibe la transcription n'est pas encore clairement défini et on ignore si Mig1p agit seul sur Tup1p ou si d'autres mécanismes sont impliqués.

La cible précise par laquelle le mécanisme de la répression par Tup1p s'exerce reste inconnu. Deux mécanismes possibles de répression sont envisagés : soit le complexe Cyc8-Tup1 réprime la transcription en interagissant avec des facteurs d'initiation de la transcription appartenant à la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II (Herschbach et Johnson, 1993), soit le complexe Cyc8-Tup1 réprime la transcription par des interactions avec des histones et la structure de la chromatine ainsi établie serait inaccessible aux facteurs transcriptionnels (Cooper *et al.*, 1994).

2) Le paradigme de la répression glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* : le gène *SUC2*.

Le paradigme du contrôle négatif de la transcription est la répression par le glucose chez *S. cerevisiae*. Chez la levure *S. cerevisiae*, la répression par le glucose affecte les enzymes requis pour le métabolisme des sucres (sucrose, maltose et galactose), des sources de carbone non fermentescibles comme le glycérol (gène *GUT*), l'éthanol (gène *ADH2*) ainsi que les enzymes gluconéogéniques et respiratoires (Trumbly, 1992).

2.1) Les gènes *SUC*.

L'enzyme invertase, qui hydrolyse le sucrose ou le raffinose extracellulaire, est codée par les gènes de la famille *SUC*. Différentes souches ont habituellement un seul gène *SUC* actif qui peut se trouver en différentes positions sur le chromosome. Le gène *SUC* le plus étudié est *SUC2* qui, au contraire de la majorité des gènes *SUC*, n'est pas localisé près du télomère. Les gènes *SUC* sont exclusivement régulés par la répression glucose, l'expression des gènes *SUC* étant réprimée au moins 100 fois par le glucose (Carlson et Botstein, 1982).

L'analyse génétique chez la levure a permis d'identifier deux types de mutants affectant l'expression du gène *SUC2* (Gancedo, 1992) :

- Les mutants de dérépression n'expriment pas le gène *SUC2* (répression constitutive), même en absence de glucose. Ils sont défectueux pour les facteurs nécessaires à l'expression de *SUC2*.
- Les mutants de répression expriment l'invertase en présence ou en absence de glucose (expression constitutive). Ils sont défectueux pour les facteurs négatifs (Trumbly, 1992).

2.1.1) Les mutants de dérépression.

Les mutants incapables de produire l'invertase ne peuvent fermenter le sucrose ou le raffinose. Les gènes affectés ont été désignés par *SNF* (Sucrose Non Fermenting) (Carlson, 1987) et ont été clonés par complémentation de mutants *snf* incapables de croître sur raffinose.
SNF3 code pour un transporteur de glucose et ne semble pas être directement impliqué dans la régulation de l'expression de *SUC2* (Marshall-Carlson *et al.*, 1990).
Le produit du gène *SNF1* (=*CAT1*) (Zimmerman *et al.*, 1977) présente une homologie avec la famille des protéines kinases et son activité de protéine kinase a été démontrée par sa capacité à s'autophosphoryler sur les résidus sérine et thréonine (Celenza et Carlson, 1986).
La protéine Snf4 (=*CAT3*) est physiquement associée à la protéine kinase Snf1p et est requise pour une activité kinasique maximale (Celenza *et al.*, 1989; Entian et Zimmerman, 1982). Les facteurs qui régulent l'activité de Snf1p ne sont pas encore identifiés.
Les gènes *SNF2*, *SNF5* et *SNF6* sont fonctionnellement nécessaires puisque leur inactivation empêche la dérepression de plusieurs gènes réprimés par le glucose. Les protéines de fusion lexA-Snf2 et lexA-Snf5 peuvent activer la transcription à partir des sites de fixation de lexA chez la levure (Laurent *et al.*, 1991). Ces trois protéines semblent donc être des activateurs positifs de la transcription pour un grand nombre de gènes.
Le regroupement d'un point de vue fonctionnel des mutants *snf* est renforcé par l'analyse des mutations supprimant les phénotypes *snf*. Les mutations qui permettent aux mutants *snf1* d'utiliser le raffinose et le sucrose sont dénommées *ssn1-8* (suppressor of snf) (Carlson *et al.*, 1984). Par exemple, la mutation *ssn6* (=*cyc8*) permet l'expression constitutive de l'invertase et d'autres enzymes réprimées par le glucose.
Par suppression multicopie du phénotype ts (thermosensible) chez certains mutants *snf1*, on a pu identifier le gène *MSN1*. Le gène *MSN1* code pour une protéine de 382 acides aminés, riche en sérine, thréonine, asparagine et glutamine. La protéine Msn1p agit comme un activateur de transcription, de concert avec d'autres protéines. Une souche dont le gène *MSN1* est disrupté montre un taux d'invertase réduit de 3 à 4 fois. Le faible effet de la disruption

de *MSN1* sur la dérépression du gène de l'invertase suggère que d'autres gènes ont une fonction redondante avec *MSN1* et affectent l'expression de *SUC2*.

2.1.2) Les mutants de répression.

Les mutants résistants à la répression du gène de l'invertase par le glucose ont été sélectionnés en recherchant les mutants capables de croître sur milieu contenant du raffinose et du 2-désoxyglucose. Ce dernier est un sucre non métabolisable mais déclencheur du signal de répression. Par cette méthode, il a été possible de mettre en évidence les mutations *hxk2* (*=hex1*), *reg1* (*=hex2*), *grr1* (*=cat80*) et *cid1* (Neigeborn et Carlson, 1987; Schüller et Entian, 1991; Zimmerman et Scheel, 1977).
HXK2 encode l'hexokinase PII, une des trois enzymes capables de phosphoryler le glucose chez la levure. *REG1* et *GRR1* sont également impliqués dans la répression des gènes *GAL* par le glucose (Matsumoto *et al.*, 1983; Bailey et Woodward, 1984). L'hexokinase PII encodée par *HXK2* joue un rôle important dans la répression par le glucose, peut-être en agissant comme senseur initial pour le taux de glucose présent dans l'environnement. Certaines mutations *hxk2* affectent la répression glucose mais pas l'activité de phosphorylation du glucose de l'hexokinase PII, ce qui renforce l'hypothèse de domaines différents dans la protéine pour les activités catalytique et de régulation (Entian et Frölich, 1984). L'étude de nombreux mutants a toutefois démontré qu'il y avait une bonne corrélation entre l'activité d'hexokinase et la répression par le glucose (Ma *et al.*, 1989).
Des mutations dans les deux autres gènes codant pour des enzymes phosphorylant le glucose (*glk1* codant pour la glucokinase et *hxk1* codant pour l'hexokinase PI) ne montrent pas d'effet significatif sur la répression par le glucose.
Des mutations dans les gènes *CYC8* et *TUP1* produisent les mêmes phénotypes, incluant la dérépression constitutive de nombreux gènes réprimés par le glucose.

2.2) Mécanismes de contrôle de l'expression de l'invertase (Ronne, 1995; Gancedo, 1992; Trumbly, 1992).

La protéine Mig1p sert de répresseur pour *SUC2* et d'autres gènes régulés par le glucose. Des mutants de délétion dans le gène *MIG1* réduisent mais n'éliminent pas totalement la répression glucose du gène *SUC2*, il y a donc probablement d'autres mécanismes impliqués dans la répression de *SUC2*.

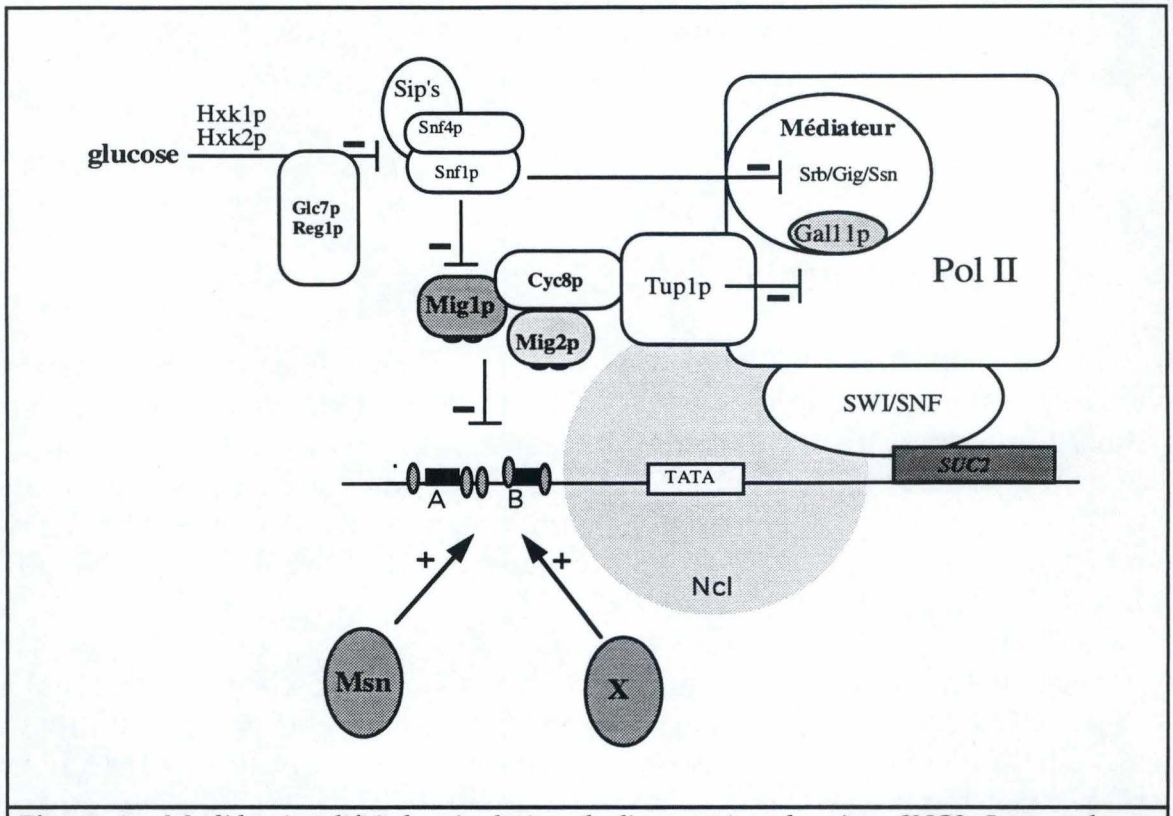


Figure 2 : Modèle simplifié de régulation de l'expression du gène *SUC2*. Les ovales grisés représentent les UAS ("Upstream Activating Sequence") et les rectangles noirs indiquent la postion des URS ("Upstream Repressing Sequence") pour le répresseur Mig1p.
En absence de glucose, la kinase Snf1p est active. Elle contrôle négativement le répresseur Mig1p. *SUC2* est probablement transcrit par l'intermédiaire des activateurs Msn1 et d'autres activateurs inconnus X qui reconnaissent les UAS.
En présence de glucose, certains intermédiaires, comme Hxk1p et Hxk2p favoriserait la formation de la forme inactive du complexe SNF1-SNF4. Quand ce complexe est inactif, le complexe CYC8-TUP1 est activé et il facilite la liaison et/ou l'activité du répresseur Mig1p. Ce complexe inhibe également la liaison et/ou l'activité du facteur X. Msn1 est réprimé par le glucose indépendamment de SNF1. Ces différents contrôles ont pour résultat une baisse de la transcription de *SUC2* en présence de glucose.

On peut conclure de l'étude des différentes mutations que (**Figure 2**):
- Le complexe Snf2-Snf5-(Snf6) semble jouer un rôle direct dans l'activation de la transcription du gène *SUC2*. Le fait qu'il ne soit pas prouvé que Snf2p ou Snf5p se lie à l'ADN suggère que ce complexe pourrait agir comme un adaptateur pour la transcription ou comme un médiateur entre le complexe de l'ARN polymérase II et un facteur d'activation X qui se lierait à l'ADN.
- *MSN1*, qui n'est pas absolument nécessaire pour la transcription de *SUC2*, n'agirait qu'en augmentant le taux d'expression de *SUC2*. Msn1p n'agirait qu'en absence de glucose.
- Le complexe Cyc8-Tup1 inhiberait la transcription de *SUC2*.
- Snf1p et Snf4p agiraient en modifiant le complexe Cyc8-Tup1.
- Les produits des gènes *HXK2*, *HEX2* et *GRR1* agiraient en amont, probablement en signalant la présence de glucose dans le milieu à Snf1p et Snf4p.

Le glucose, en présence des protéines Hxk2, Hex2 et Grr1 déplacerait l'équilibre entre la forme active et la forme inactive du complexe Snf1-Snf4 vers la forme inactive. En absence de glucose, le complexe Snf1-Snf4 est sous sa forme active et inactive le complexe Cyc8-Tup1, peut-être en le phosphorylant (Gancedo, 1992).
Le taux de transcription de *SUC2* dépend de la balance entre l'activation par Msn1p et X et l'inhibition par Mig1p. Le complexe Cyc8-Tup1 pourrait à la fois augmenter la liaison et/ou l'activité du répresseur Mig1p et interférer avec la liaison et/ou l'activité du facteur d'activation X (Gancedo, 1992).
Le glucose pourrait agir en modifiant le taux de transcription de certains des gènes de régulation décrits ci-dessus, mais on observe que le taux de ces protéines est indépendant de la présence ou de l'absence de glucose dans le milieu de culture. Il semblerait plutôt que le glucose agisse en modifiant l'activité d'un ou de plusieurs de ces facteurs (Gancedo, 1992).

3) La répression glucose chez *Kluyveromyces lactis*.

K. lactis est relativement insensible à la répression par le glucose. En conditions aérobies, le système respiratoire de *K. lactis* continue à fonctionner, même en présence de glucose. Au contraire, la levure *S. cerevisiae* croît sur glucose essentiellement de manière fermentaire et la voie de la respiration est induite seulement quand la concentration en glucose est très faible. Cet effet dû au glucose constitue un mécanisme majeur de beaucoup de processus métaboliques chez *S. cerevisiae* tandis que la réponse de *K. lactis* au glucose est nettement différente et dévolue essentiellement à la répression de différentes classes de gènes.

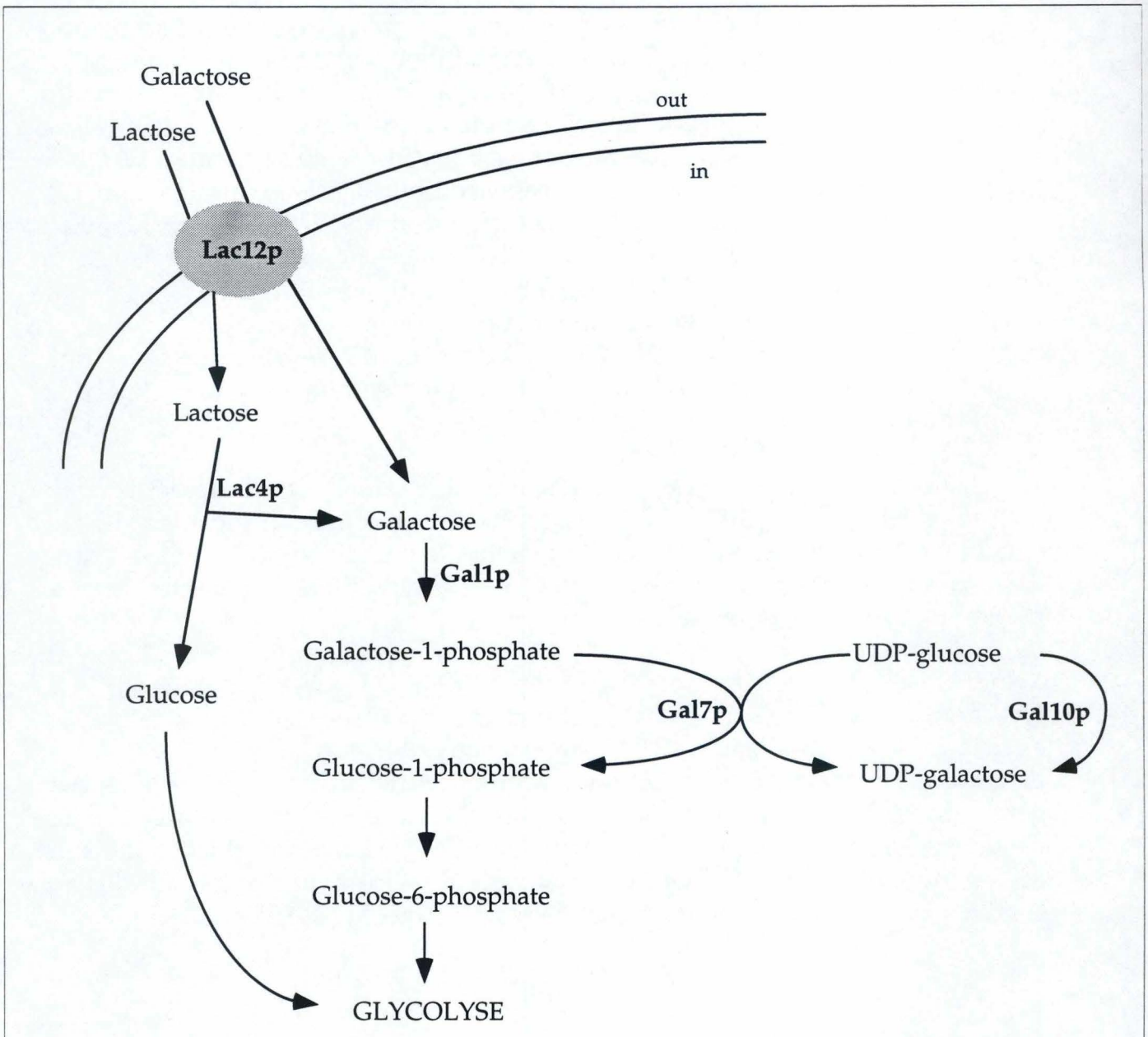


Figure 3 : Voie métabolique du glucose et du galactose chez *K. lactis*.
Commentaires : voir texte.

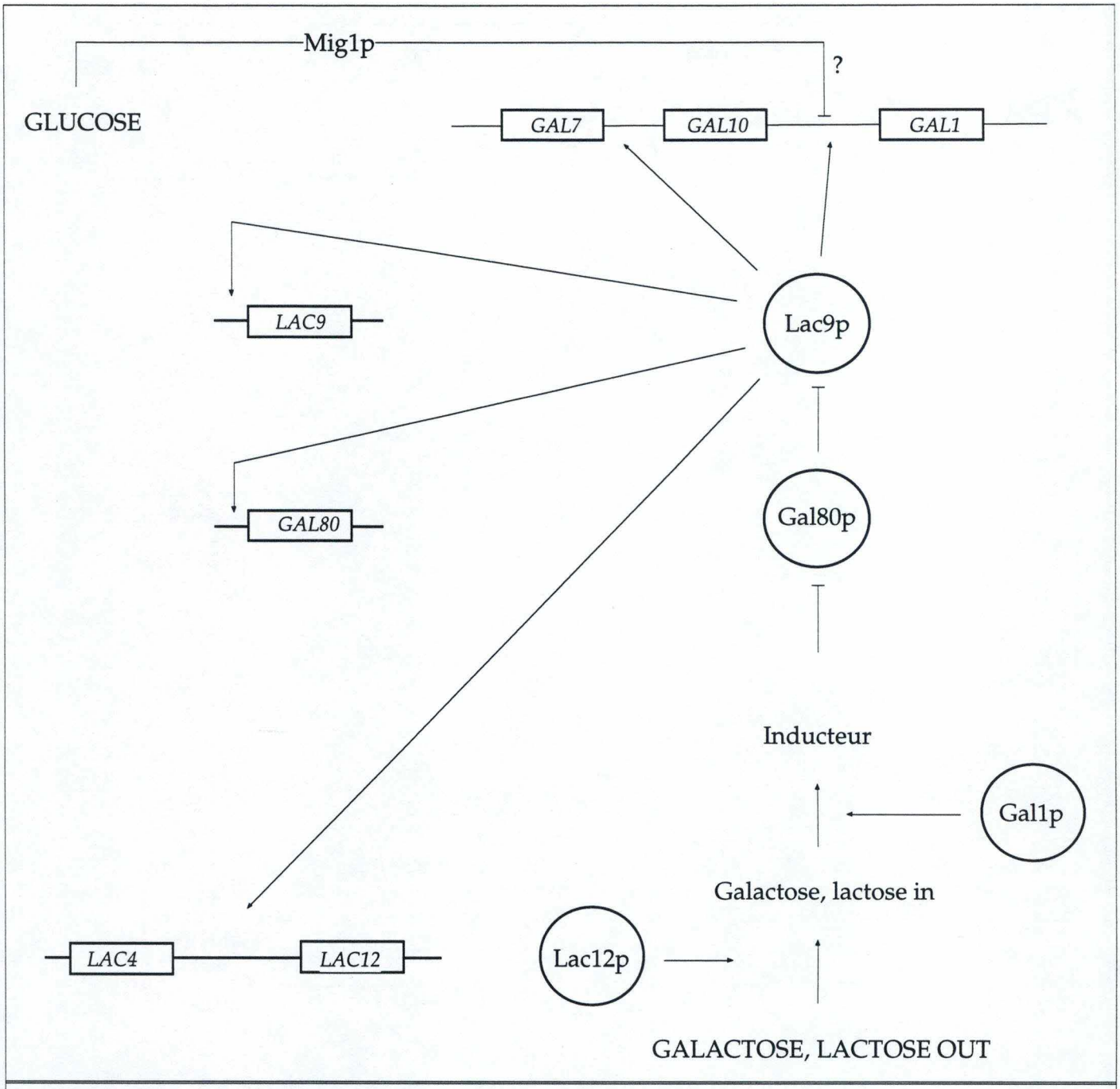


Figure 4 : Modèle de régulation de l'expression des gènes *GAL-LAC* chez *K. lactis*.
Commentaires : voir texte.

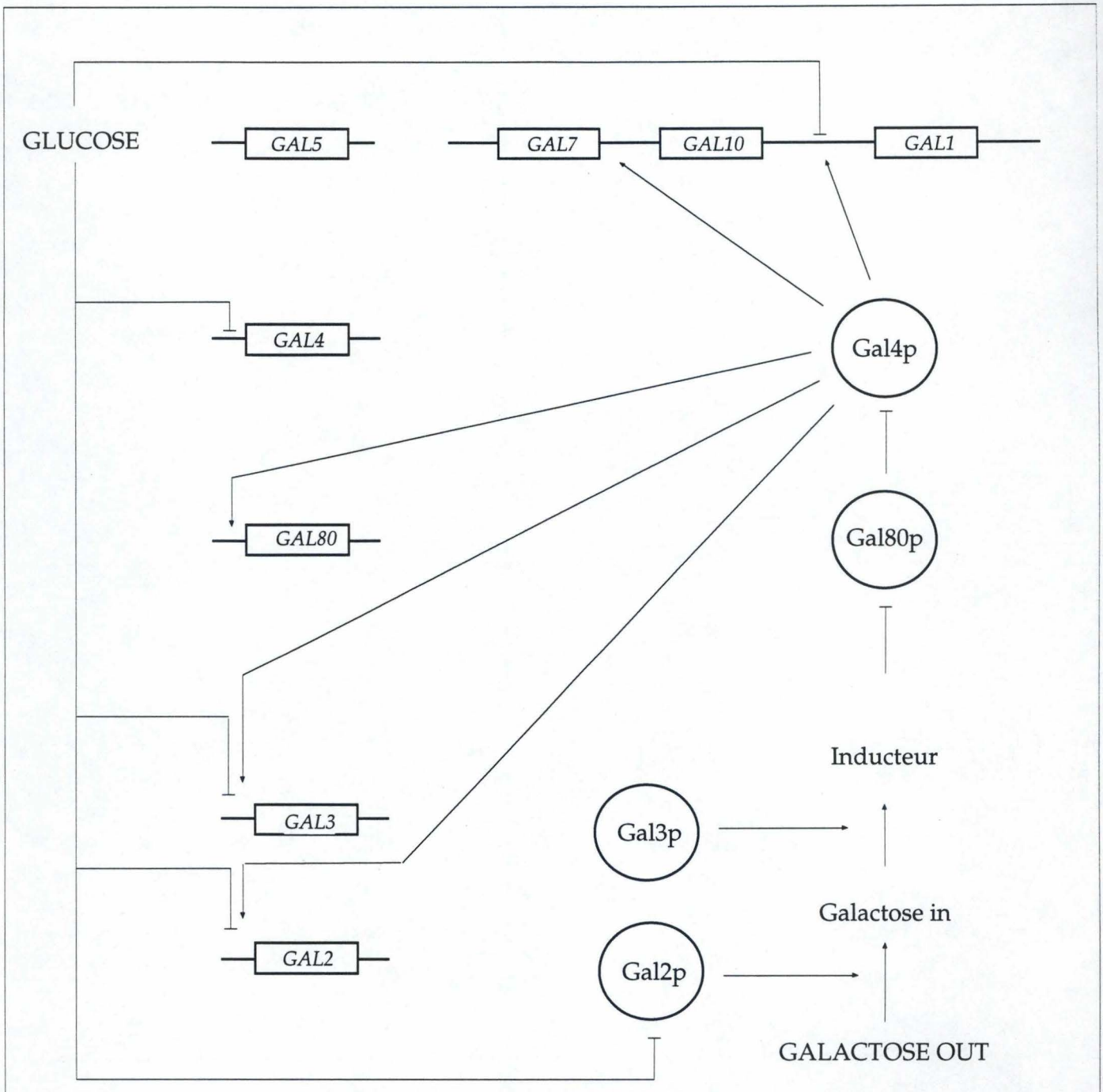


Figure 5 : Modèle de régulation de l'expression des gènes *GAL-LAC* chez *S. cerevisiae*.
Commentaires : voir texte.

3.1) Le métabolisme du carbone chez *K. lactis.*

Une des propriétés qui distingue *K. lactis* de *S. cerevisiae* est la capacité qu'a *K. lactis* d'utiliser le lactose comme seule source de carbone et d'énergie. Le métabolisme du lactose est contrôlé par deux gènes liés, *LAC4* codant pour une ß-galactosidase (Dickson et Markin, 1978; Dickson, 1980; Poch *et al* ., 1992), et *LAC12* codant pour une lactose perméase (Chang et Dickson, 1988) (**Figure 3**). Quand ces gènes sont introduits chez *S. cerevisiae*, ils sont suffisants pour que celle-ci puisse croître sur un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone.
Les premières études génétiques sur le métabolisme du lactose (Herman., 1963; Herman et Halvorson, 1963) ont permis d'identifier deux loci non liés, *LAC1* et *LAC2*, chacun d'eux pouvant exister à l'état de mutant récessif dans la population naturelle.
Le contrôle majeur dans le métabolisme du lactose se déroule au niveau de la transcription des nombreux gènes impliqués dans ce processus (Lacy et Dickson, 1981). Parmi ces gènes, on trouve *LAC4* (Sheetz et Dickson, 1981), *LAC12* (Sreekrishna et Dickson, 1985), *LAC5*, *LAC8*, *LAC9* (Sheetz et Dickson, 1980), *LAC10* (Dickson *et al.*, 1981) et *LAC11* (Riley et Dickson, 1984). Les gènes *LAC5*, *LAC8* et *LAC11* codent pour les enzymes de la voie de Leloir dans le métabolisme du galactose et ont été renommés respectivement *GAL7*, *GAL10* et *GAL1* conformément à leur homologue chez *S. cerevisiae*. Ces gènes sont co-régulés avec *LAC4* et *LAC12* au niveau transcriptionnel par les gènes de régulation *LAC9* et *KlGAL80*. *LAC9* ou *KlGAL4* code pour un activateur transcriptionnel, l'équivalent chez *K. lactis* de Gal4p (Salmeron et Johnston, 1986; Wray *et al.*, 1987; Witte et Dickson, 1990; Pan et Coleman, 1990) (**Figures 4 et 5**). La fonction de Lac9p est régulée par le régulateur négatif Gal80p de manière semblable à Gal4p (Zenke *et al.*, 1993; Dickson *et al.*, 1990; Salmeron *et al.*, 1989). Les promoteurs contrôlés par Lac9p peuvent être activés par Gal4p et vice-versa (Riley *et al.*, 1987; Salmeron et Johnston, 1986), les deux activateurs reconnaissant la même séquence consensus (Breunig et Kuger, 1987). Le promoteur *GAL1-GAL10* de *S. cerevisiae* est efficacement exprimé et régulé chez *K. lactis*. Les gènes *GAL7*, *GAL10* et *GAL1* de *K. lactis* ne sont pas seulement arrangés de manière similaire, mais le nombre et la position des sites de fixation de Lac9p dans le promoteur *GAL1-GAl10* sont également conservés. L'induction par le lactose requiert une activité ß-galactosidasique indiquant que l'activation de la fonction de Lac9p nécessite la présence de galactose. Ces deux sucres peuvent être pris en charge par le produit du gène *LAC12*. Pour inactiver la fonction de répression de Gal80p, la galactokinase encodée par *GAL1* est nécessaire (Meyer *et al.*, 1991; Meyer, 1993). Par mutation, la fonction de régulation peut-être séparée de l'activité de phosphorylation du galactose et quelques mutants *gal1*$^-$ sont encore inductibles (Riley et Dickson, 1984; Meyer *et al.*, 1991; Meyer, 1993).
Chez *S. cerevisiae*, la même fonction de régulation semble être redondante avec les produits des gènes *GAL1* et *GAL3* (Bhat et Hopper, 1992).

Par rapport à *S. cerevisiae*, où l'induction du promoteur *GAL1-GAL10* nécessite plusieurs heures quand les cellules passent d'un milieu contenant du glucose à un milieu contenant du galactose, l'induction chez *K. lactis* est plus rapide compte tenu de la moindre répression par le glucose. De plus, le promoteur peut devenir constitutif, très actif même en milieu glucose si on disrupte le gène *KlGAL80* (Zenke *et al.*, 1993). Chez *S. cerevisiae*, le promoteur d'un mutant *gal80* est encore fortement réprimé (Nehlin *et al.*, 1991). Cette différence est en partie due à la concentration en activateur, qui est plus importante pour des cellules en milieu glucose chez *K. lactis* que chez *S. cerevisiae*.

3.2) La répression par le glucose chez *K. lactis*.

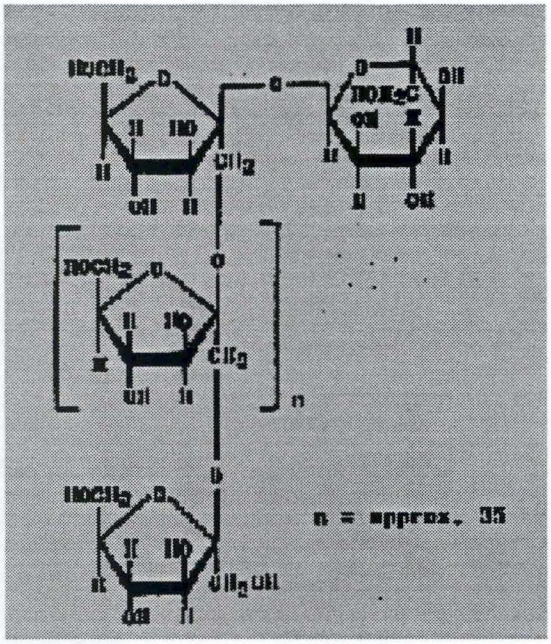
La présence simultanée du glucose et du galactose dans le milieu peut inhiber le métabolisme du galactose mais l'utilisation préferentielle du glucose au lieu du galactose varie selon les souches utilisées (Breunig, 1989). Chez *S.cerevisiae*, la répression par le glucose des gènes *GAL* suggère une régulation complexe où des mécanismes dépendants et indépendants de Gal4p se chevauchent (Flick et Johnston, 1990; Lamphier et Ptashne, 1992; Finley *et al.*, 1990). Dans la voie dépendante de Gal4p, l'expression des gènes de *GAL4* est réprimée 5 fois par le glucose, la répression étant médiée par *MIG1* (Griggs et Johnston, 1991; Nehlin *et al.*, 1991). L'induction par le galactose et la répression par le glucose sont deux phénomènes antagonistes et l'efficacité de la répression glucose dépend essentiellement de l'activité de Lac9p. Une des causes expliquant la différence dans la répression glucose des gènes *LAC/GAL* entre les différentes souches est une variation allélique dans le promoteur de *LAC9* qui affecte le taux d'expression de *LAC9* (Zachariae *et al.*, 1993; Kuzhandaivelu *et al.*, 1992). Même dans les souches répressibles, la répression glucose n'est pas très prononcée chez *K. lactis*. Les gènes qui sont fortement réprimés par le glucose chez *S. cerevisiae* le sont plus modérement chez *K. lactis*. Il existe une corrélation entre la consommation et la sensibilité au glucose entre différentes souches de *K. lactis*. La consommation de glucose est généralement plus faible que chez *S. cerevisiae* (Weirich, 1992) indiquant que la régulation de la prise du glucose peut être un point crucial dans la répression par le glucose.

BUT DU TRAVAIL

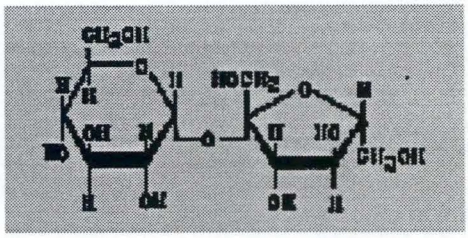
II. BUT DU TRAVAIL.

La répression catabolique a été intensément étudiée chez la bactérie *E. coli*. Chez la levure *S. cerevisiae*, la répression glucose obéit à des mécanismes tout à fait différent de ce qui s'observe chez *E. coli*. Toutefois, le paradigme *SUC2* chez *S. cerevisiae* n'est sans doute pas le modèle idéal pour comprendre les mécanismes de répression dépendants du glucose chez les eucaryotes. En effet, la préference de *S. cerevisiae* pour la fermentation plutôt que la respiration fait de celle-ci une exception à la règle générale qui prévaut chez les eucaryotes en général et même au sein des levures. En relation avec cette situation particulière, il faut noter que *S. cerevisiae* induit, en réponse au glucose, une série de mécanismes de répression à des niveaux différents, et aussi d'activation, qui peuvent interférer compliquant de ce fait l'analyse et l'interprétation du phénomène.
Pour ces raisons, il s'impose d'étendre le phénomène de répression glucose dans un contexte phylogénique moins complexe et plus "normal". La levure *K. lactis*, apparentée à *S. cerevisiae*, est à cet égard un modèle de choix dans la mesure où elle possède un métabolisme respiratoire typique des organismes aérobiques. Par ailleurs, cette levure offre, comme *S. cerevisiae*, l'avantage de se prêter à l'approche génétique de type classique aussi bien que par ADN recombinant.
Le but immédiat de ce travail est donc de cloner le gène *KlINV1* de *K. lactis* afin de pouvoir le comparer d'un point de vue structural et fonctionnel à son homologue chez *S. cerevisiae*, le gène *SUC2*.

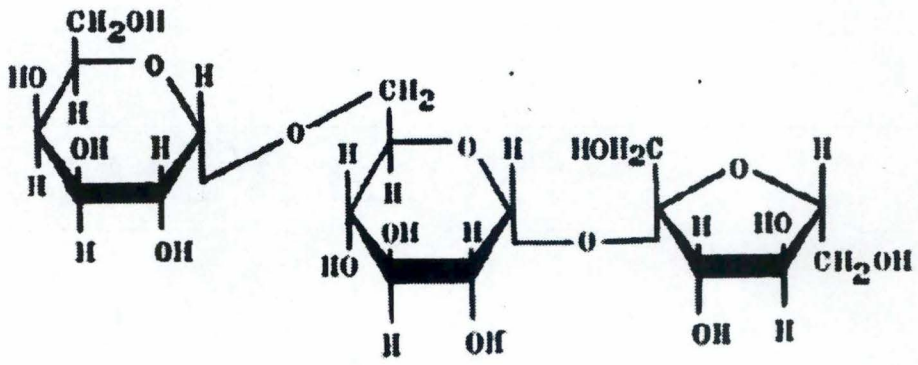
RESULTATS



Inuline



Sucrose



Raffinose

Figure 1a : Structure générale du sucrose, du raffinose et de l'inuline.

III. RESULTATS

1) Mise en évidence d'une activité de ß-fructosidase de type invertase chez *Kluyveromyces lactis*.

Afin de confirmer si la levure *K. lactis* possède une activité invertase, des tests de croissance sur des milieux solides minimum contenant différentes source de carbone ont été effectués (Rouwenhorst *et al.*, 1990). Les substrats utilisés sont le sucrose, le raffinose et l'inuline (**Figure 1a**). Le sucrose est un disaccharide composé d'une unité glucose et d'une unité fructose, l'invertase le clive en ses deux monosaccharides. Le raffinose est constitué d'un sucrose, d'un fructose et d'un galactose. Le raffinose est clivé en sucrose et en mélibiose par l'invertase. L'inuline est un polysaccharide formé de chaînes de fructose avec une molécule terminale de glucose. L'hydrolyse de l'inuline par l'inulinase libère des unités fructose. Les résultats des tests de croissance montrent que *K. lactis* est capable de croître sur sucrose et raffinose mais pas sur inuline, contrairement à la levure *K. marxianus* qui possède le gène *INU1* codant pour une inulinase et qui pousse sur inuline. La levure *S. cerevisiae*, dont le gène *SUC2* encode une invertase, croît sur sucrose et raffinose mais pas sur inuline (**Figure 1b**). Ces résultats confirment la présence chez *K. lactis* d'une activité d'invertase et non d'inulinase.

2) Clonage et séquençage du gène de l'invertase.

Nous avons opté pour une stratégie de clonage par sondage nucléotidique hétérologue d'une banque génomique de *K. lactis*.

2.1) Choix de la sonde:

Nous avons utilisé une sonde "Polyprime" provenant de la région du site actif du gène *KmINU1*, dont l'homologie élevée avec le gène *SUC2* encodant l'invertase de *S. cerevisiae* était établie par ailleurs (Laloux *et al.*, 1991) (**Figure 2**). Le fragment nucléique utilisé a une taille de 900 bp (restriction *Nco*I) (**Figure 3**).

2.2) Validation de la sonde utilisée:

La technique du Southern permet de s'assurer que la sonde synthétisée sur base de l'ORF du gène *KmINU1* et utilisée pour le criblage de la banque est capable de s'hybrider à des fragments d'ADN génomique de *K. lactis*.

L'ADN génomique de *K. lactis* restreint par les enzymes de restriction *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I et *Xho*I est soumis à l'éléctrophorèse en

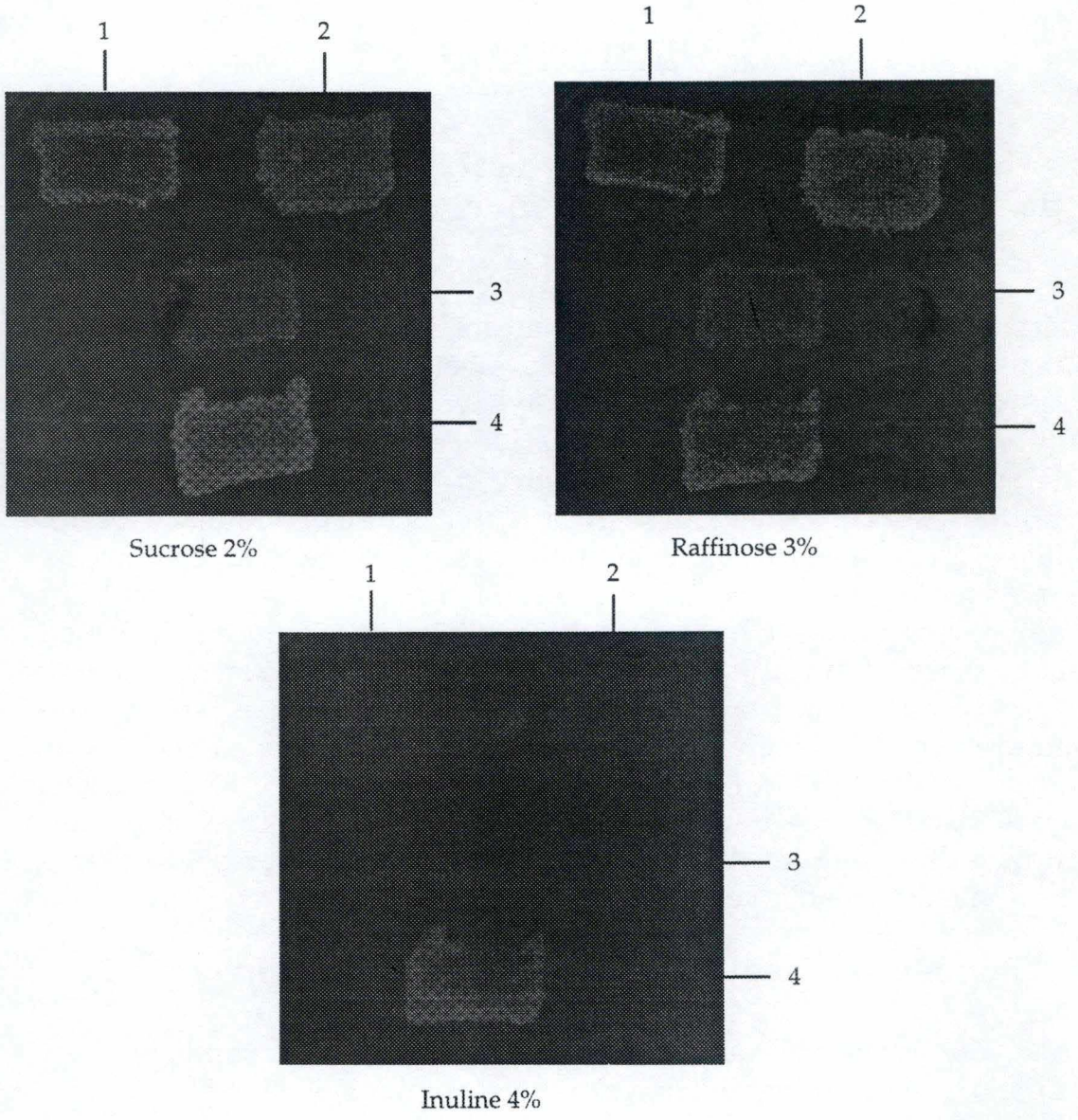


Figure 1b : Tests de croissance de diverses levures sur milieux solides minimum contenant différentes sources ce carbone

1 : Souche CBS2359 de *K. lactis.*
2 : Souche JA6 de *K. lactis.*
3 : Souche W303 de *S. cerevisiae.*
4 : Souche KG11 de *K. marxianus.*

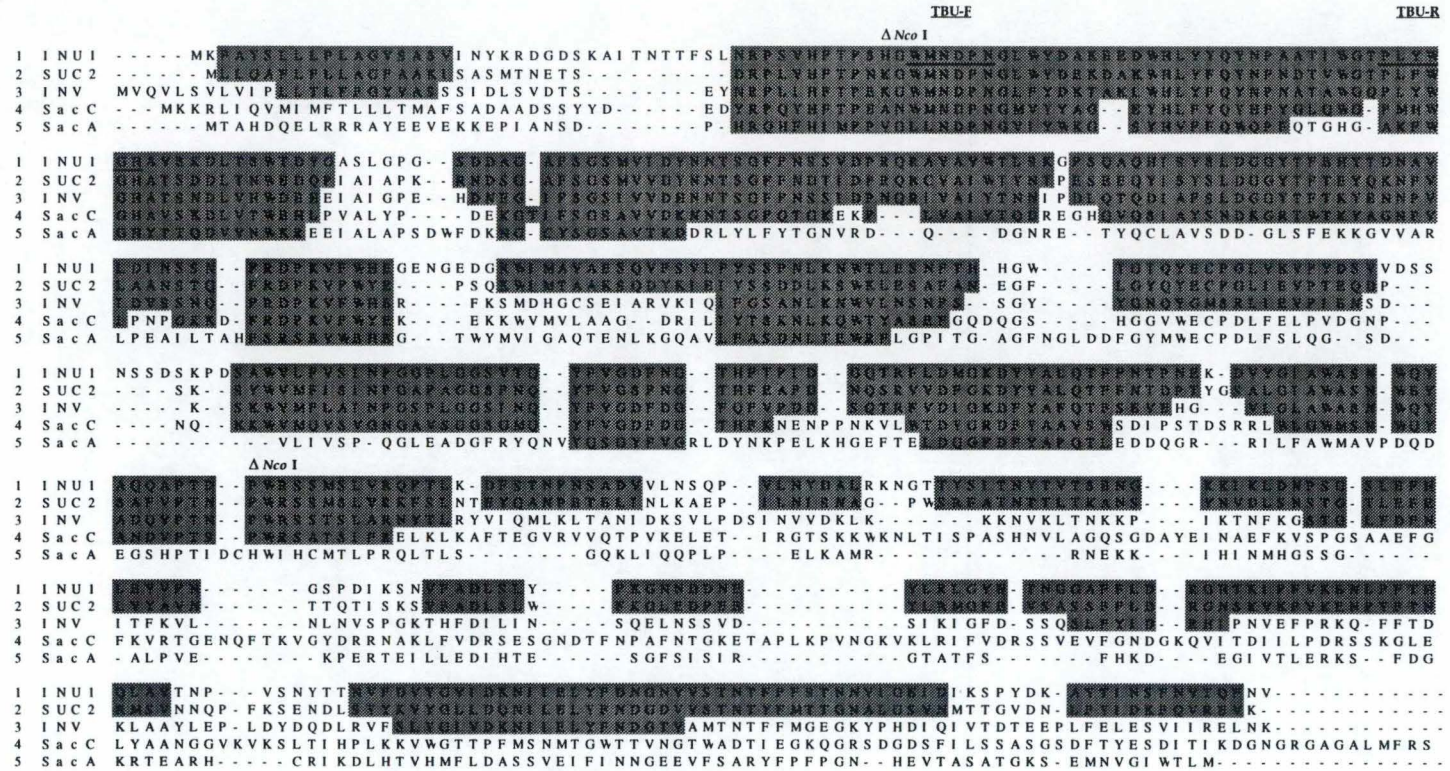


Figure 2 : Alignement multiple de 5 β-fructosidases réalisé avec le programme "Clustaw" (Thompson *et al* ., 1994). Les séquences en acides aminés ont été générées par traduction des séquences nucléotidiques.

Séquence 1 : séquence protéique de l'inulinase de *K. marxianus*

Séquence 2 : séquence protéique de l'invertase de *S. cerevisiae*

Séquence 3 : séquence protéique de l'invertase de *S. occidentalis*

Séquence 4 : séquence protéique de la levanase de *B. subtilis*

Séquence 5 : séquence protéique de la sucrase de *B. subtilis*

La région de la sonde utilisée pour le criblage de la banque génomique de *K. lactis* est comprise entre les deux Δ. La position des amorces TBU-F et TBU-R est également renseignée.

Pour des raisons de clarté, seuls les 560 premiers acides aminés de la levanase de *B. subtilis* (SacC, 677 résidus au total) ont été représentés.

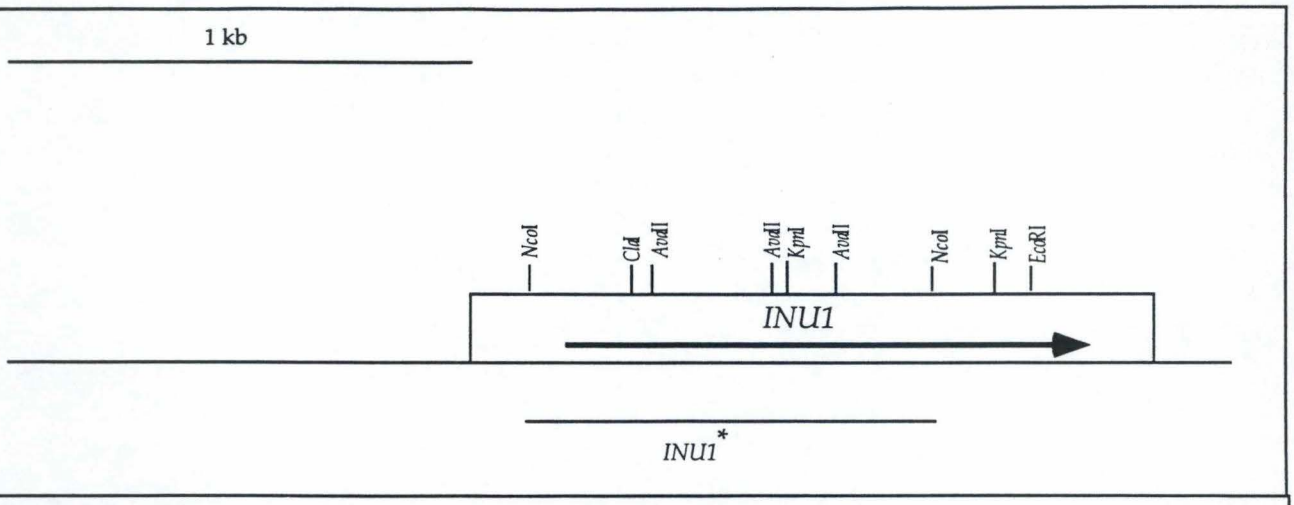


Figure 3 : Position de la sonde *KmINU1* par rapport à l'ORF du gène *INU1*.
Le fragment servant à produire la sonde est obtenu par restriction *Nco*I sur l'ORF du gène *INU1* (détails dans le texte).

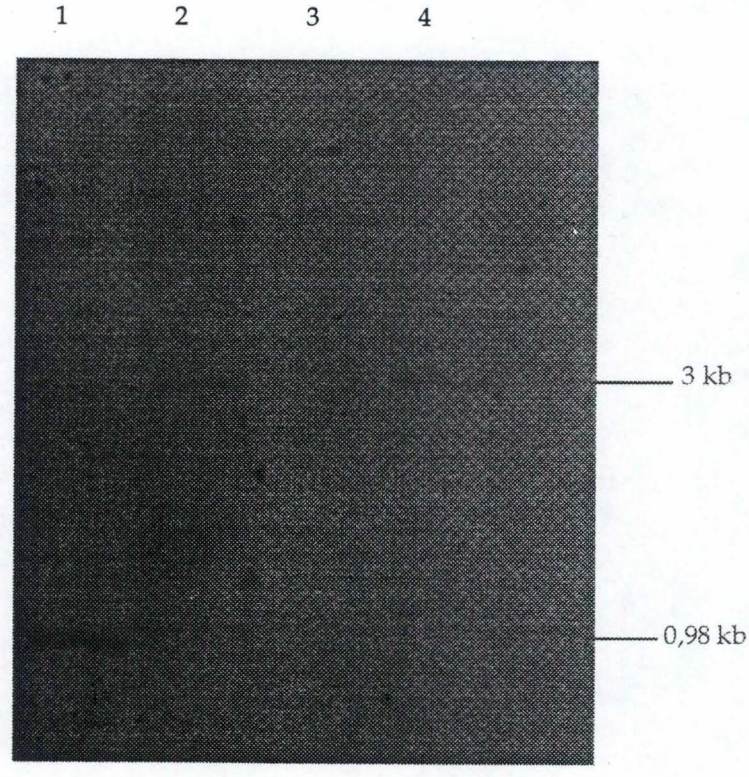


Figure 4 : Expérience de Southern blot avec la sonde décrite (fig.2) sur de l'ADN génomique de *K. lactis* restreint par *Eco*RI (piste1), *Hin*dIII (piste2), *Pst*I (piste3) et *Xho*I (piste 4).

gel d'agarose 1% (cfr chapitre Matériel & méthodes 4.2). L'ADN est ensuite transféré sur une membrane en nylon selon la technique du Southern et hybridé avec la sonde *INU1*.

L'existence de fragments hybridés chez *K. lactis* par la sonde *INU1* (**Figure 4**) permet de confirmer la validité du choix d'une méthode de clonage par une sonde nucléique hétérologue pour le clonage du gène de l'invertase de *K. lactis* par criblage d'une banque génomique.

2.3) Caractéristiques de la banque génomique de *K. lactis* utilisée.

La banque génomique utilisée nous a été aimablement fournie par M. Wésolowski-Louvel de l'institut Curie (CNRS, Orsay, France). Cette banque est constituée d'inserts de 5 à 20 kb obtenus par restriction partielle *Sau*3A de l'ADN génomique de *K. lactis* CBS 2359. Ces fragments ont été clonés au site *Bam*HI du vecteur KEp6 (cfr chapitre Matériel & méthodes 2.2.1).

La qualité de la banque a été vérifiée par restriction *Eco*RI sur les plasmides issus de douze transformants. On observe (**Figure 4bis**) que tous les vecteurs isolés possèdent un insert. La diversité apparente des inserts clonés est excellente.

2.4) Isolement de 19 clones au moyen de la sonde *KmINU1*.

Par criblage des membranes avec la sonde *INU1*, 19 colonies positives sont détectées en autoradiographie (cfr chapitre Matériel & méthodes 4.10) (**Figure 5**).

2.5) Identification des clones porteurs du gène *KlINV1* par PCR diagnostique.

Nous disposions des amorces TBU-F et TBU-R (**Figure 6**) qui avaient été établies antérieurement sur cette région du gène *KmINU1* (**Figure 7**) afin de servir au clonage de gènes de β-fructosidases de nature et d'origine diverses chez les champignons.

Les résultats de la PCR sont présentés à la figure 8. Sur les 19 clones, 2 ont montré un fragment amplifié ayant la taille attendue d'environ 150 bp .

Ces clones correspondent aux pGICI1 et pGICI2. Le pGICI1 a une taille de 17 kb et le pGICI2 de 20 kb, ce qui correspond respectivement à des inserts de 10 et 13,5 kb environ.

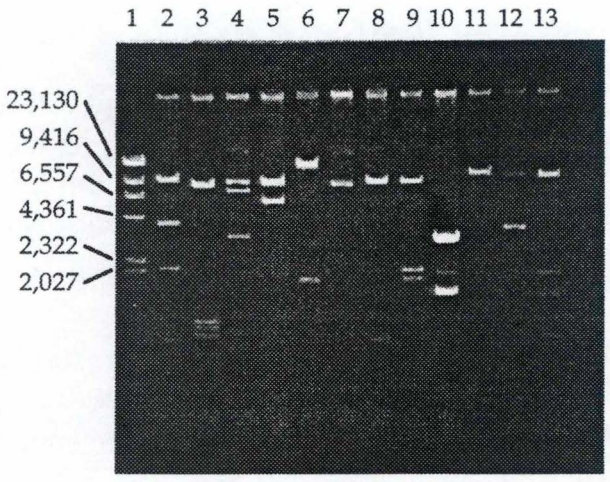


Figure 4bis : Qualité de la banque d'ADN génomique de *K. lactis*. La banque a été transformée dans la souche XL1-Blue d'*E. coli*. Douze extraits plasmidiques ont été digérés par l'enzyme *Eco*RI et soumis à une électrophorèse d'agarose 0,8% (piste 2 à 13). La piste 1 correspond au marqueur de taille dont les valeurs sont indiquées en kb à la gauche de la photo.

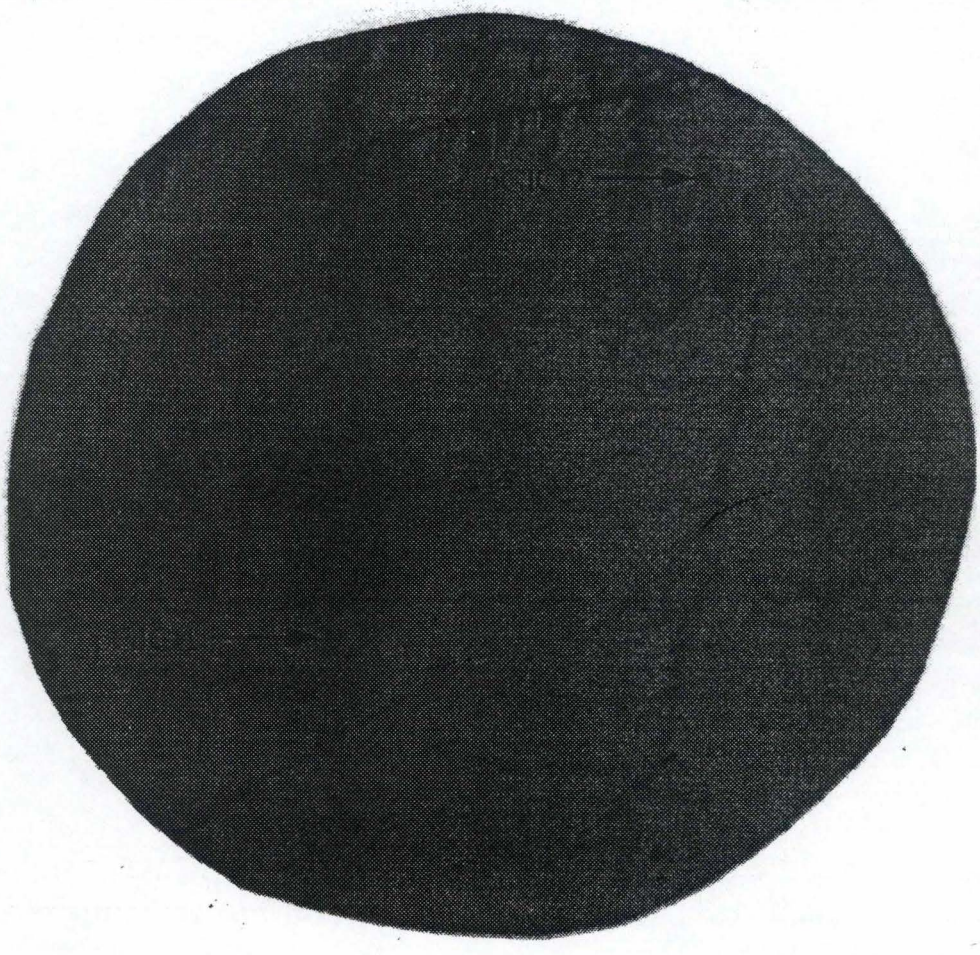


Figure 5 : Exemple d'autoradiographie d'un filtre après hybridation avec la sonde *KmINU1*. Les flèches correspondent aux clones porteurs des plasmides pGICI1 et pGICI2.

Amorce	Séquence	dégénérescence	Tm
TBU F	5'-GGGAATTCTGGATGAAYGAYCCNAAYGG-3'	32 X	56.3°C
TBU R	5'-GGGAATTCRTGRCCCCARWASARYGG-3'	128 X	56.8°C

Détermination des amorces:

-> TBU-F

W	M	N	D	P	N
TGG	ATG	AAT	GAT	CCT	AAT
		AA	GAC	CCG	AAC
				CCC	
				CCA	

-> TBU-R

P	L	Y	W	G	H
CCT	TTG	TAT	TGG	GGT	CAT
CCG	TTA	TAC		GGG	CAC
CCC	CTT	TTT		GGC	
CCA	CTG	TTC		GGA	
	CTC				
	CTA				

Les séquences 5'-GGGAATTC-3' au début des primers sont permettent l'introduction d'un site *Eco*RI dans l'amorce.

Figure 6 : Séquences des amorces TBU-F et TBU-R.

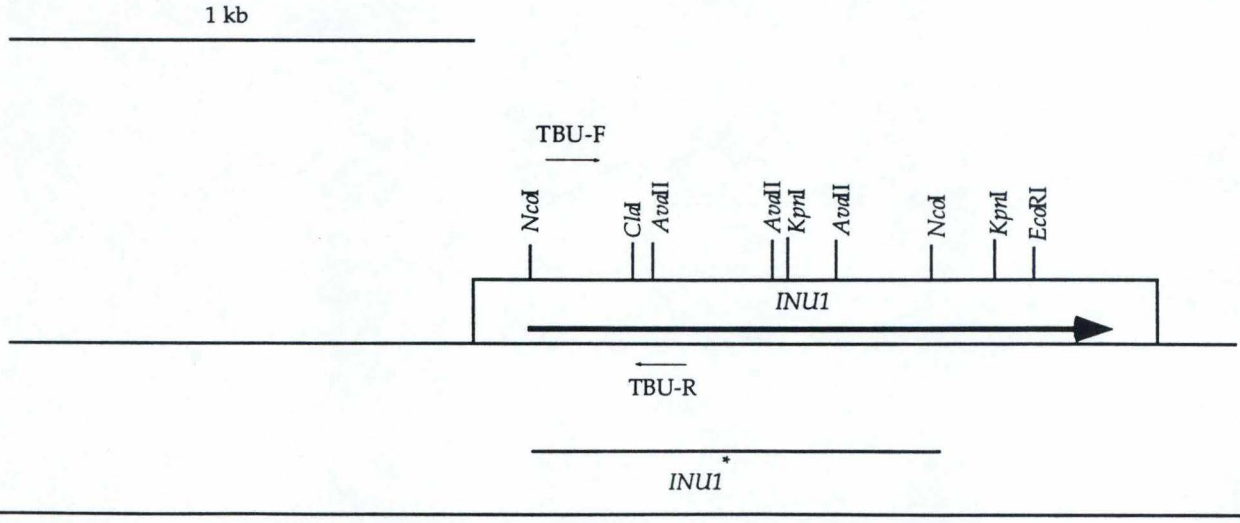


Figure 7 : Position des amorces dégénérées TBU-F et TBU-R par rapport au gène *INU1*.
Ces amorces ont été choisies dans la région N-terminale du gène *INU1*, dans une région bien conservée qui correspond au site actif de l'enzyme.

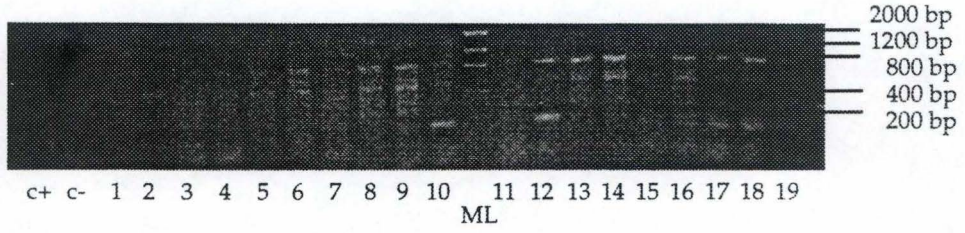


Figure 8 : Eléctrophorèse des produits d'amplification PCR avec les amorces dégénérées TBU-F et TBU-R (fig.6) sur les 19 colonies (piste 1 à 19) ayant été hybridées par la sonde *KmINU1*. ML correspond au marqueur de taille dont les valeurs sont mentionnées à droite de la photo. Le contrôle positif (C+) utilisé est de l'ADN génomique de *K. marxianus*. Le contrôle négatif (C-) est effectué sur une colonie n'ayant pas été allumée en autoradiographie. Les autres conditions sont décrites au point 4.2 du chapitre matériel & méthodes.

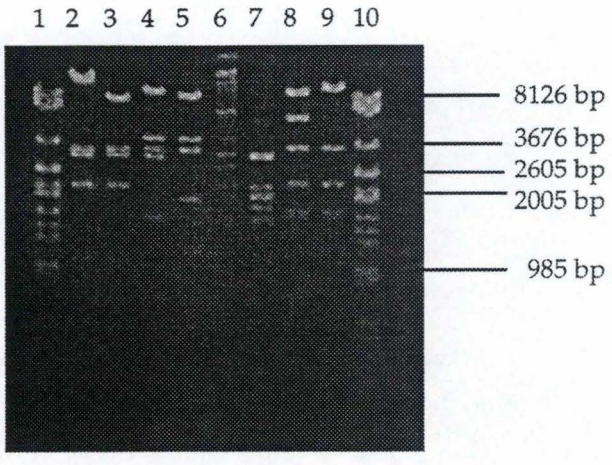


Figure 9 : Eléctrophorèse de l'ADN plasmidique des clones pGICI1 et pGICI2 restreints par différentes enzymes. En marge, les valeurs du marqueur de taille ayant migré piste 10.

Piste 1 : pGICI2 restreint par *Eco*RI.
Piste 2 : pGICI1 restreint par *Eco*RI.
Piste 3 : pGICI2 restreint par *Hin*dIII.
Piste 4 : pGICI1 restreint par *Hin*dIII.
Piste 5 : pGICI2 restreint par *Pst*I.
Piste 6 : pGICI1 restreint par *Pst*I.
Piste 7 : pGICI2 restreint par *Xho*I.
Piste 8: pGICI1 restreint par *Xho*I.

PV1-F

---------->

5'-CCTAATGGGTGGTTGTGGTTTGATCCTAAGGAAGAAGATTGGCATATATACTATCAGTAC-3'
3'-GGATTACCCACCAACACCAAACTAGGATTCCTTCTTCTAACCGTATATATGATAGTCATG-5'

<----------

PV1-R

Figure 10 : Séquence obtenue à partir de l'amplicon de 150 bp amplifié par TBU-F et TBU-R sur de l'ADN génomique de K. lactis (l'amplicon et la séquence ont été obtenu comme décrit chapitre Matériel & méthodes 4.7 et 4.8). La position des amorces PV1-F et PV1-R est soulignée sur la séquence.

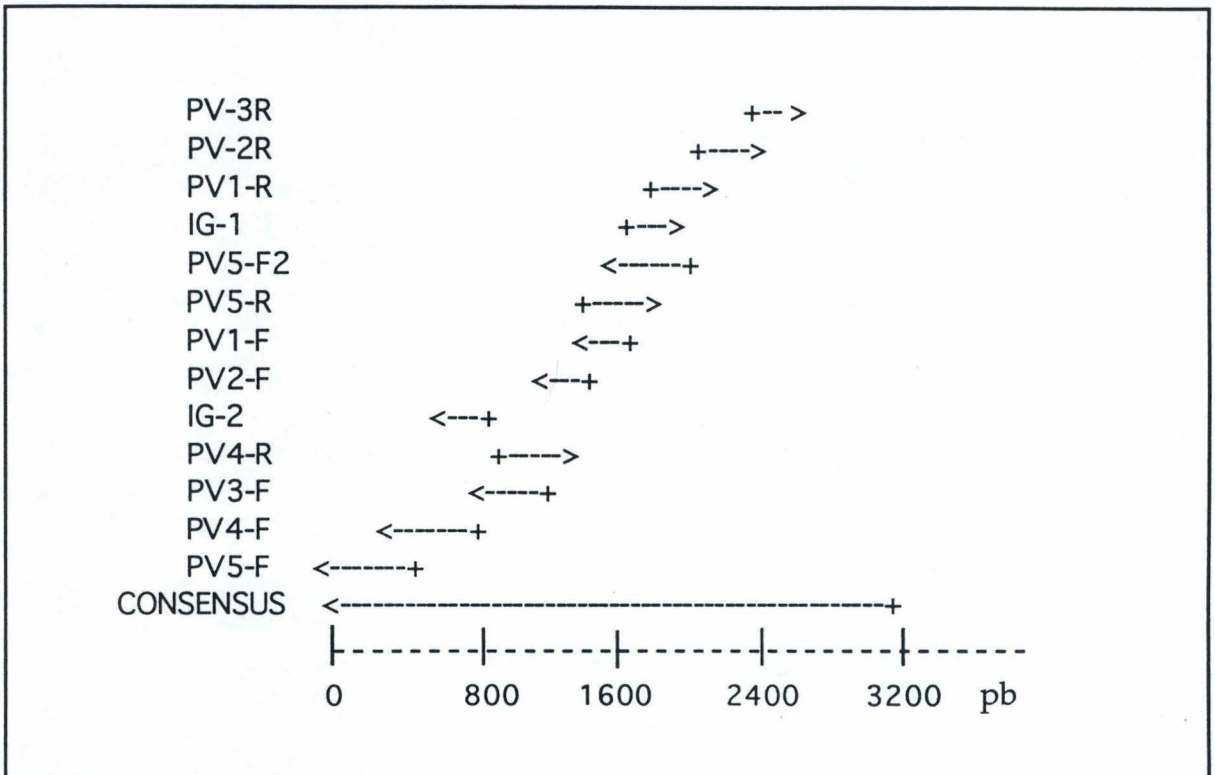


Figure 11 : Stratégie de séquençage.
Le séquençage du pGICI1 a débuté avec les oligonucléotides PV1-F et PV1-R.
A partir des séquences obtenues, d'autres oligonucléotides ont été synthétisés (PV2-F et PV2-R).
Le séquençage effectué à partir de ces deux oliginucléotides élargit la zone dont la séquence est connue sur les brins positifs et négatifs. On procède ainsi de suite, de façon progressive, pour finalement obtenir, en utilisant au total 13 oligonucléotides différents, une zone séquencée ayant une taille de 3 kb environ.

Afin de s'assurer que ces deux clones possèdent bien une partie commune dans leur insert, ils ont été restreints par les mêmes enzymes *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I et *Xho*I qui avaient été utilisés lors de l'expérience de Southern blot sur l'ADN génomique de *K. lactis* (**Figure 9**). On peut observer que pour chacune des enzymes de restriction, ces deux clones ont des profils de restriction présentant des bandes communes indiquant qu'ils contiennent chacun une région semblable dans leur insert.

Ces deux plasmides sont donc apparentés. Ils contiennent des fragments commun entre-eux et de taille identique au locus chromosomique de *K. lactis* reconnu par la sonde interne à l'ORF du gène *INU1* de *K. marxianus.*

Nous concluons que ces deux clones sont porteurs du gène *KlINV1* encodant l'invertase de *K. lactis.*

2.6) Séquençage du gène *KlINV1* contenu dans l'insert plasmidique.

2.6.1) Obtention d'une séquence homologue à *KlINV1.*

Compte tenu de la taille élevée des inserts, on ne pouvait raisonnablement espérer obtenir une séquence du gène à l'aide du primer universel du plasmide.

Nous avons donc "désigné" deux premières amorces internes au gène, nommées PV1-F et PV1-R, dans la séquence de l'amplicon de 150 bp obtenu par amplification PCR au départ des primers TBU-F et TBU-R sur de l'ADN génomique de *K. lactis* (**Figure 10**).

2.6.2) Stratégie générale de séquençage et séquence de *KlINV1.*

Les amorces PV1-F et PV1-R ont été utilisées pour commencer le séquençage du pGICI1. La suite de la procédure s'est déroulée selon les étapes schématisées à la figure 11.

Au terme du séquençage, on obtient la séquence nucléotidique d'une région couvrant ± 3000 bp (**Figure 12**). Une phase ouverte de lecture couvre une région de ± 1400 bp (**Figure 13**).

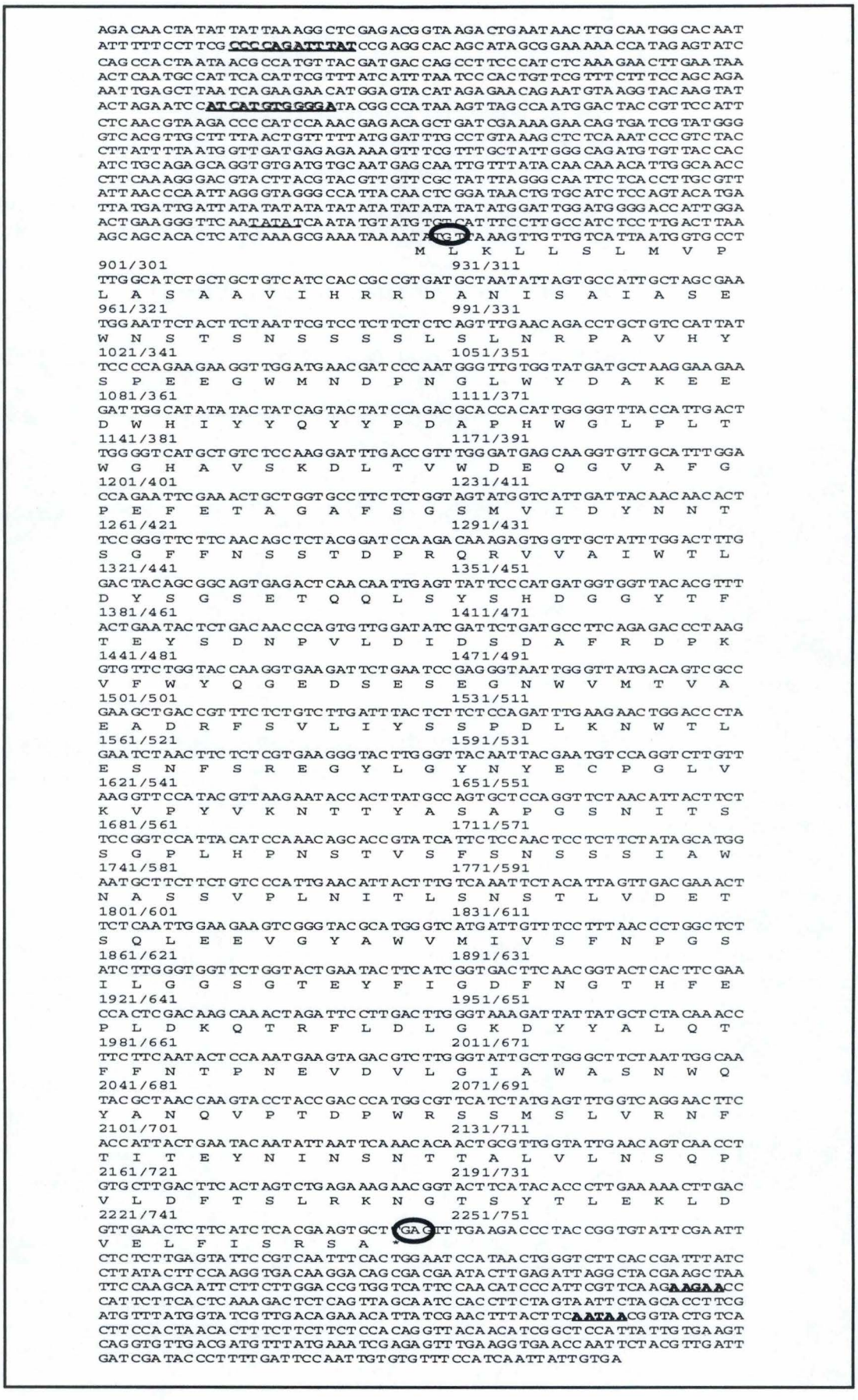


Figure 12 : Séquence de l'ORF de KlINV1, de sa séquence protéique déduite et des régions amont et aval.

La figure reprend la position des boîtes MIG (en relief), de la boîte TATA (soulignée), du codon d'initiation de la traduction (ATG entouré), du codon stop (TGA entouré) et des sites impliqués dans la formation de l'extrémité 3' de l'ARN messager.

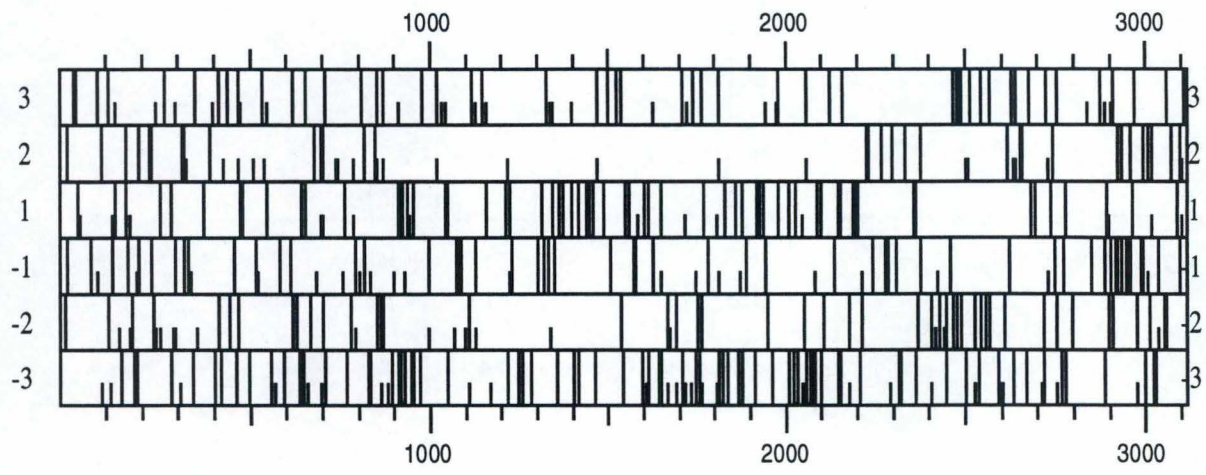
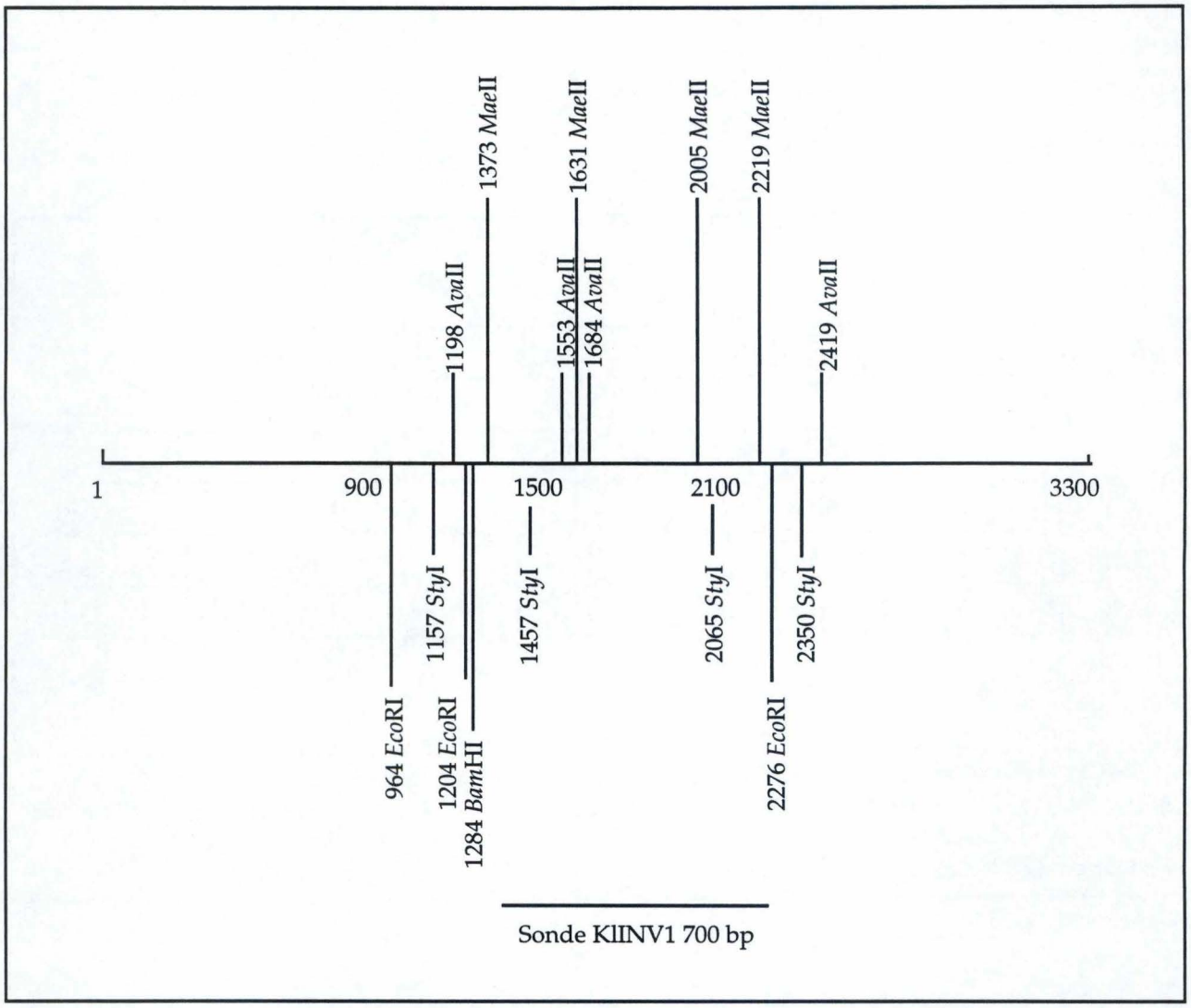


Figure 13 : Représentation schématique des phases ouvertes de lecture présentes dans les 6 phases potentielles de traduction de la région séquencée. Cette région couvre une zone de 3140 bp. Les barres entières représentent les codons Stop, les demi-barres représentent les codons ATG d'initiation de la traduction. On détecte une ORF ("Open Reading Frame") de 1380 bp dans la phase 2 de lecture.

a)



b)

Enzymes de restriction	Taille attendue
*Ava*II	- 129 bp - 355 bp - 737 bp
*Mae*II	- 214 bp - 250 bp - 374 bp
*Sty*I	- 285 bp - 295 bp - 613 bp
*Bam*HI	- au moins 1800 bp
*Eco*RI	- 1072 bp

Figure 14 : Choix des couples sonde-enzymes utilisés pour le Southern blot.
a) Présentation des différents couples sonde-enzymes utilisés pour le Southern blot. La portion séquencée du pGICI1 est représentée ainsi que les sites des différentes enzymes de restriction au niveau de cette séquence.
b) Les différentes enzymes utilisées avec les tailles attendues des fragments qui seront allumés par le Southern blot.

3) Le gène cloné est le gène de l'invertase de *K. lactis*.

3.1) Le nouveau gène cloné est un gène de *K. lactis*.

Afin de prouver que le gène cloné appartient au génome de *K. lactis*, un Southern blot a été réalisé (cfr chapitre Matériel & méthodes 4.9).

Les enzymes de restriction et la sonde utilisée ont été choisis en fonction des sites de restriction présents au niveau du gène cloné, de telle sorte que le profil des bandes allumées par le Southern soit diagnostique du locus de *K. lactis* (**Figure 14**).

Si les tailles des fragments du génome de *K. lactis* allumés en Southern par la sonde correspondent aux tailles calculées à partir des sites de restriction présents au niveau de la séquence du gène cloné, on pourra conclure que le gène cloné appartient au génome de *K. lactis*.

La sonde *KlINV1* est synthétisée par amplification PCR à l'aide des amorces PV2-F et PV4-R (**Figure 11**) utilisées pour le séquençage. Le produit PCR est ensuite marqué au ^{32}P par "Random prime DNA labelling system" (cfr chapitre Matériel & méthodes 4.9.4).

Résultats du Southern :

Restriction *Ava*II: Les bandes attendues possèdent des tailles de 737, 355 et 129 bp correspondant à ce qui est observé.

Restriction *Mae*II: Les bandes attendues possèdent des tailles de 374, 250 et 214 bp conforme à ce qui est observé.

Restriction *Sty*I: Les bandes attendues possèdent des tailles de 613, 295 et 285 bp. Les bandes de 295 et 285 bp n'apparaissent pas sur l'autoradiographie du Southern, cela peut s'expliquer par le recouvrement trop faible de la sonde sur le fragment d'ADN génomique de *K. lactis*.

Restriction *Bam*HI: La bande attendue possède une taille supérieure à 1800 bp, on observe que la sonde allume un fragment de l'ordre de 2,5 kb.

Restriction *Eco*RI: La bande attendue a une taille de 1072 bp. Cette bande est allumée par la sonde.

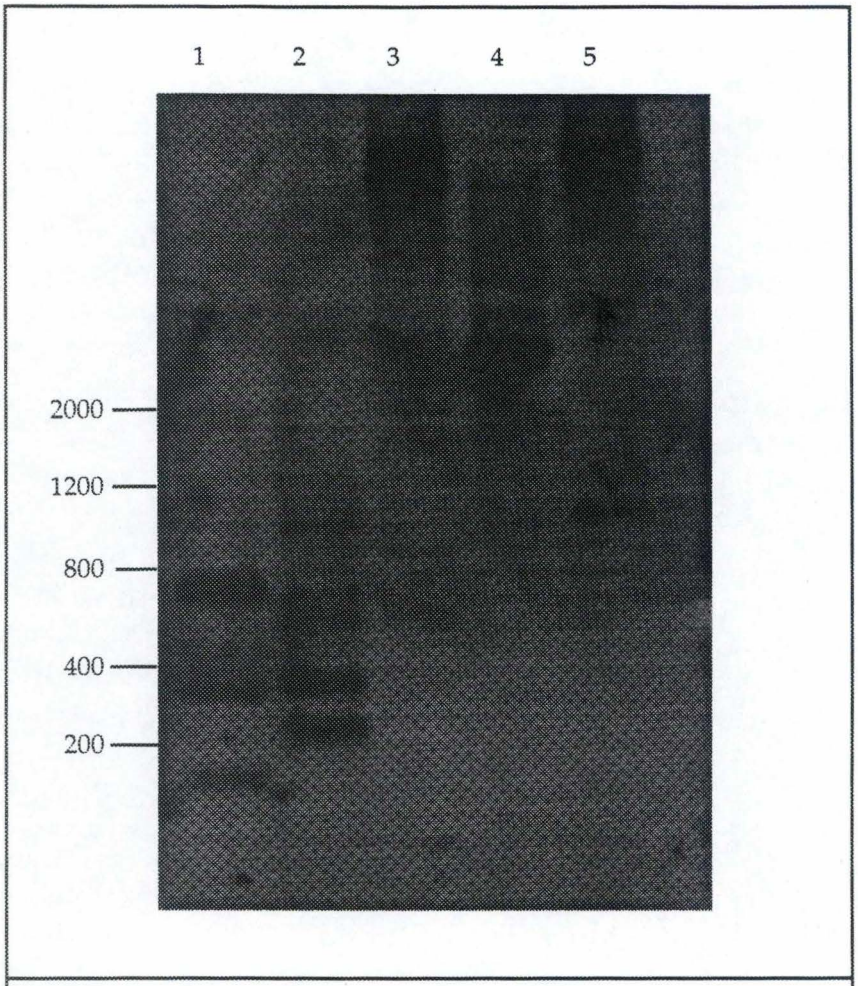


Figure 15 : Expérience de Southern blot avec la sonde *KlINV*1 sur l'ADN génomique de *K. lactis* restreint par différentes enzymes.
Piste 1 : ADN génomique de *K. lactis* restreint par *Ava*II.
Piste 2 : ADN génomique de *K. lactis* restreint par *Mae*II.
Piste 3 : ADN génomique de *K. lactis* restreint par *Sty*I.
Piste 4 : ADN génomique de *K. lactis* restreint par *Bam*HI.
Piste 5 : ADN génomique de *K. lactis* restreint par *Eco*RI.

Dans le cas des restrictions *Mae*II et *Sty*I, on observe des bandes qui ne possèdent pas la taille attendue. Ces bandes, de tailles trop élevées, sont probablement le résultat d'une restriction partielle de l'ADN génomique.

La figure 15 montre les résultats du Southern.

3.2) Alignements simples de séquences.

Visant à identifier le gène cloné, nous avons procédé à des alignements simples de la séquence en acides aminés déduite de la séquence du gène avec d'autres séquences protéiques connues de la famille des β-fructosidases, à savoir les protéines INU1p de *K. marxianus*, SUC2p de *S. cerevisiae* (**Figure 16-17**).

Les alignements simples ont été réalisés par la fonction GAP du programme GCG.

Les alignements, réalisés sur l'entièreté des séquences protéiques, révèlent des niveaux de similarité élevés (71 et 80% de similarité avec SUC2p et INU1p respectivement). Ces alignements montrent également que les résidus les plus conservés sont concentrés dans la région amino-terminale de la protéine, qui est impliquée dans le processus catalytique de l'enzyme (Reddy et Maley, 1990).

3.3) Conclusions.

Le gène *KlINV1* a été cloné par criblage d'une banque génomique avec une sonde nucléotidique provenant de la région N-terminale hautement conservée du gène codant pour l'inulinase de *K. marxianus*.

Un Southern blot sur de l'ADN génomique de *K. lactis* avec la sonde *KlINV1* a authentifié l'origine du gène cloné qui appartient bien au génome de *K. lactis* (**Figure 15**) et code pour une protéine de 460 acides aminés, contenue dans une ORF de 1380 bp.

Des alignements protéiques simples ont été effectués afin de caractériser structuralement le nouveau gène cloné. Les comparaisons pairées avec les séquences de ScSUC2p et KmINU1p ont révélé que le nouveau gène cloné était apparenté à la famille des β-fructosidase.

Ce gène est désigné *KlINV1* sur base du clonage par criblage avec la sonde *INU1* de *K. marxianus* et des homologies structurales avec *SUC2* et *INU1*, sachant qu'aucune activité d'inulinase n'est mise en évidence chez *K. lactis*.



Figure 16 : Alignement simple entre les séquences de l'ORF du pGICI1 (au-dessus) et ScSUC2p (en-dessous).
Le taux de similarité est de 71%, celui d'identité de 57%.
Les barres correspondent à une identité, les points à une similarité plus (deux points) ou moins (un point) forte.

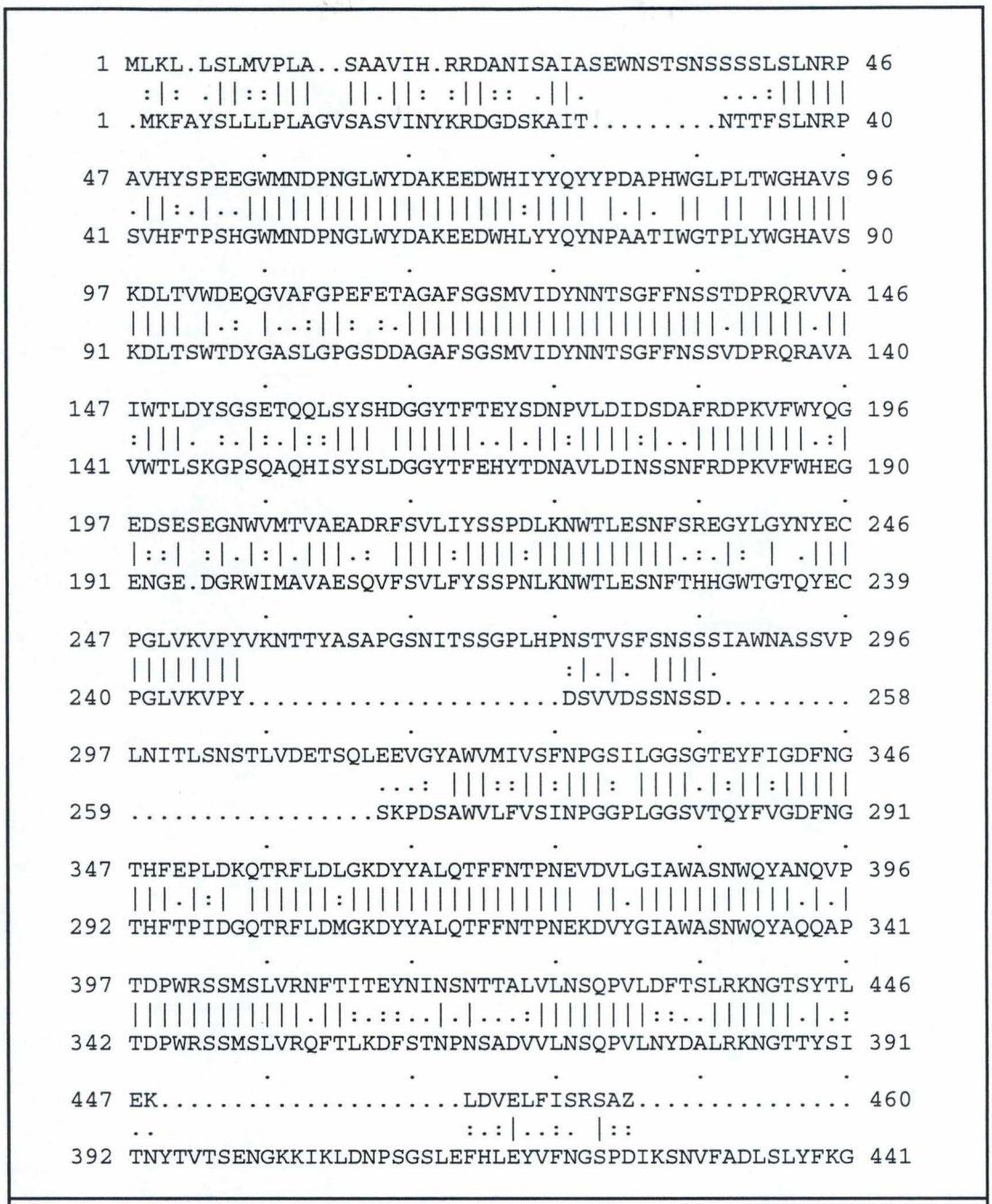


Figure 17 : Alignement simple entre les séquences de l'ORF du pGICI1 (au-dessus) et KmINU1p (en-dessous).
Le taux de similarité est de 80%, celui d'identité de 66%.
Les barres correspondent à une identité, les points à une similarité plus (deux points) ou moins (un point) forte.

```
1/1                                                 31/11
ATG TTA AAG TTG TTG TCA TTA ATG GTG CCT TTG GCA TCT GCT GCT GTC ATC CAC CGC CGT
M   L   K   L   L   S   L   M   V   P   L   A   S   A   A   V   I   H   R   R
61/21                                               91/31
GAT GCT AAT ATT AGT GCC ATT GCT AGC GAA TGG AAT TCT ACT TCT AAT TCG TCC TCT TCT
D   A   N   I   S   A   I   A   S   E   W   N   S   T   S   N   S   S   S   S
121/41                                              151/51
CTC AGT TTG AAC AGA CCT GCT GTC CAT TAT TCC CCA GAA GAA GGT TGG ATG AAC GAT CCC
L   S   L   N   R   P   A   V   H   Y   S   P   E   E   G   W   M   N   D   P
181/61                                              211/71
AAT GGG TTG TGG TAT GAT GCT AAG GAA GAA GAT TGG CAT ATA TAC TAT CAG TAC TAT CCA
N   G   L   W   Y   D   A   K   E   E   D   W   H   I   Y   Y   Q   Y   Y   P
241/81                                              271/91
GAC GCA CCA CAT TGG GGT TTA CCA TTG ACT TGG GGT CAT GCT GTC TCC AAG GAT TTG ACC
D   A   P   H   W   G   L   P   L   T   W   G   H   A   V   S   K   D   L   T
301/101                                             331/111
GTT TGG GAT GAG CAA GGT GTT GCA TTT GGA CCA GAA TTC GAA ACT GCT GGT GCC TTC TCT
V   W   D   E   Q   G   V   A   F   G   P   E   F   E   T   A   G   A   F   S
361/121                                             391/131
GGT AGT ATG GTC ATT GAT TAC AAC AAC ACT TCC GGG TTC TTC AAC AGC TCT ACG GAT CCA
G   S   M   V   I   D   Y   N   N   T   S   G   F   F   N   S   S   T   D   P
421/141                                             451/151
AGA CAA AGA GTG GTT GCT ATT TGG ACT TTG GAC TAC AGC GGC AGT GAG ACT CAA CAA TTG
R   Q   R   V   V   A   I   W   T   L   D   Y   S   G   S   E   T   Q   Q   L
481/161                                             511/171
AGT TAT TCC CAT GAT GGT GGT TAC ACG TTT ACT GAA TAC TCT GAC AAC CCA GTG TTG GAT
S   Y   S   H   D   G   G   Y   T   F   T   E   Y   S   D   N   P   V   L   D
541/181                                             571/191
ATC GAT TCT GAT GCC TTC AGA GAC CCT AAG GTG TTC TGG TAC CAA GGT GAA GAT TCT GAA
I   D   S   D   A   F   R   D   P   K   V   F   W   Y   Q   G   E   D   S   E
601/201                                             631/211
TCC GAG GGT AAT TGG GTT ATG ACA GTC GCC GAA GCT GAC CGT TTC TCT GTC TTG ATT TAC
S   E   G   N   W   V   M   T   V   A   E   A   D   R   F   S   V   L   I   Y
661/221                                             691/231
TCT TCT CCA GAT TTG AAG AAC TGG ACC CTA GAA TCT AAC TTC TCT CGT GAA GGG TAC TTG
S   S   P   D   L   K   N   W   T   L   E   S   N   F   S   R   E   G   Y   L
721/241                                             751/251
GGT TAC AAT TAC GAA TGT CCA GGT CTT GTT AAG GTT CCA TAC GTT AAG AAT ACC ACT TAT
G   Y   N   Y   E   C   P   G   L   V   K   V   P   Y   V   K   N   T   T   Y
781/261                                             811/271
GCC AGT GCT CCA GGT TCT AAC ATT ACT TCT TCC GGT CCA TTA CAT CCA AAC AGC ACC GTA
A   S   A   P   G   S   N   I   T   S   S   G   P   L   H   P   N   S   T   V
841/281                                             871/291
TCA TTC TCC AAC TCC TCT TCT ATA GCA TGG AAT GCT TCT TCT GTC CCA TTG AAC ATT ACT
S   F   S   N   S   S   S   I   A   W   N   A   S   S   V   P   L   N   I   T
901/301                                             931/311
TTG TCA AAT TCT ACA TTA GTT GAC GAA ACT TCT CAA TTG GAA GAA GTC GGG TAC GCA TGG
L   S   N   S   T   L   V   D   E   T   S   Q   L   E   E   V   G   Y   A   W
961/321                                             991/331
GTC ATG ATT GTT TCC TTT AAC CCT GGC TCT ATC TTG GGT GGT TCT GGT ACT GAA TAC TTC
V   M   I   V   S   F   N   P   G   S   I   L   G   G   S   G   T   E   Y   F
1021/341                                            1051/351
ATC GGT GAC TTC AAC GGT ACT CAC TTC GAA CCA CTC GAC AAG CAA ACT AGA TTC CTT GAC
I   G   D   F   N   G   T   H   F   E   P   L   D   K   Q   T   R   F   L   D
1081/361                                            1111/371
TTG GGT AAA GAT TAT TAT GCT CTA CAA ACC TTC TTC AAT ACT CCA AAT GAA GTA GAC GTC
L   G   K   D   Y   Y   A   L   Q   T   F   F   N   T   P   N   E   V   D   V
1141/381                                            1171/391
TTG GGT ATT GCT TGG GCT TCT AAT TGG CAA TAC GCT AAC CAA GTA CCT ACC GAC CCA TGG
L   G   I   A   W   A   S   N   W   Q   Y   A   N   Q   V   P   T   D   P   W
1201/401                                            1231/411
CGT TCA TCT ATG AGT TTG GTC AGG AAC TTC ACC ATT ACT GAA TAC AAT ATT AAT TCA AAC
R   S   S   M   S   L   V   R   N   F   T   I   T   E   Y   N   I   N   S   N
1261/421                                            1291/431
ACA ACT GCG TTG GTA TTG AAC AGT CAA CCT GTG CTT GAC TTC ACT AGT CTG AGA AAG AAC
T   T   A   L   V   L   N   S   Q   P   V   L   D   F   T   S   L   R   K   N
1321/441                                            1351/451
GGT ACT TCA TAC ACC CTT GAA AAA CTT GAC GTT GAA CTC TTC ATC TCA CGA AGT GCT TGA
G   T   S   Y   T   L   E   K   L   D   V   E   L   F   I   S   R   S   A   *
```

Figure 18 : Séquence nucléotidique du gène KlINV1 et séquence protéique déduite. L'ORF du gène séquencé a une taille de 1380 bp, codant pour une protéine de 460 acides aminés.

4) Analyse de l'ORF du gène cloné.

L'ORF du gène séquencé fait une taille de 1380 bp pour une protéine de 460 acides aminés, d'un PM calculé de 51236 Da (**Figure 18**).

Afin de localiser les régions conservées et donc potentiellement importantes au niveau fonctionnel, des alignements multiples ont été réalisés entre les séquences protéiques de diverses β-fructosidases et la séquence en acides aminés de *KlINV1* (**Figure 19**).

Les séquences utilisées sont celles de l'invertase de *S. cerevisiae* (SUC2p), de l'inulinase de *K. marxianus* (INU1p), de l'invertase de *S. occidentalis* (INVp), de la levanase de *B. subtilis* (SacCp), de la sucrase de *B. subtilis* (SacAp), de l'invertase de *P. anomala* (INV1p).

L'alignement de ces différentes séquences a été réalisé au moyen du logiciel "Match box II" (Depiereux & Feytmans, 1992).

L'alignement multiple a mis en évidence la présence de douze boîtes conservées entre les différentes protéines. Il a été démontré que la région amino-terminale était impliquée dans le processus catalytique de l'enzyme (Reddy et Maley, 1990). Par mutagenèse dirigée, le rôle de l'acide aspartique (D) en position 23 de la protéine SUC2p a pu être mis en évidence. Quand ce résidu est changé en une asparagine (N), l'invertase mutante qui en résulte est inactive ce qui confirme un rôle pour l'acide aspartique 23 dans l'activité de la protéine. Il est intéressant de remarquer que ce résidu est totalement conservé dans les sept β-fructosidases que nous avons étudié et est inclus dans une zone de similarité définie par le programme "Match box II". D'autres expériences ont montré une corrélation entre la perte d'activité et la modification d'un seul résidu tryptophane (W) ainsi que l'implication d'un résidu histidine (H) dans la catalyse (Reddy et Maley, 1990). La localisation de cette histidine et de ce tryptophane putatif n'est pas encore connue mais il intéressant de noter la mise en évidence par le programme de deux histidines et de trois tryptophanes totalement conservés dans les sept séquences et inclus dans des zones de similarité situées dans la portion amino-terminale de ces protéines (**Figure 19**). Les autres résidus totalement conservés dans les sept séquences, surmontés d'une astérisque, sont majoritairement localisés dans la portion amino-terminale des différentes protéines. Pour des raisons de clarté, seuls les 550 premiers acides aminés de la levanase (SacC, 677 résidus au total) ont été représentés.

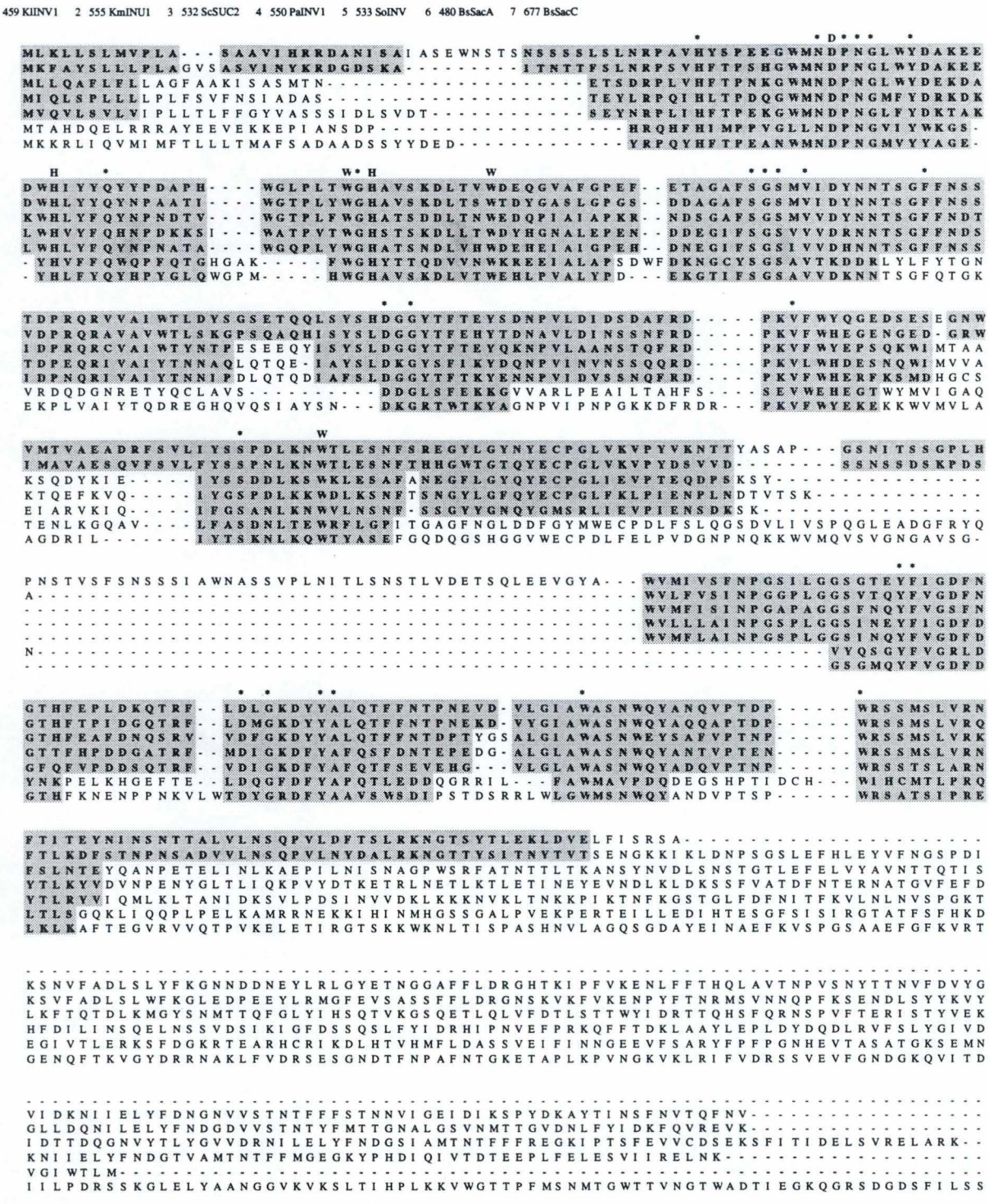


Figure 19 : Alignement multiple de diverses β-fructosidases avec le programme "Match box II" (Depiereux et Feytmans, 1991).

Les séquences protéiques utilisées sont:

1) Séquence protéique de l'invertase de *K. lactis*
2) Séquence protéique de l'inulinase de *K. marxianus*
3) Séquence protéique de l'invertase de *S. cerevisiae*
4) Séquence protéique de l'invertase de *P. anomala*
5) Séquence protéique de l'invertase de *S. occidentalis*
6) Séquence protéique de la sucrase de *B. subtilis*
7) Séquence protéique de la levanase de *B. subtilis*

Commentaires : voir texte.

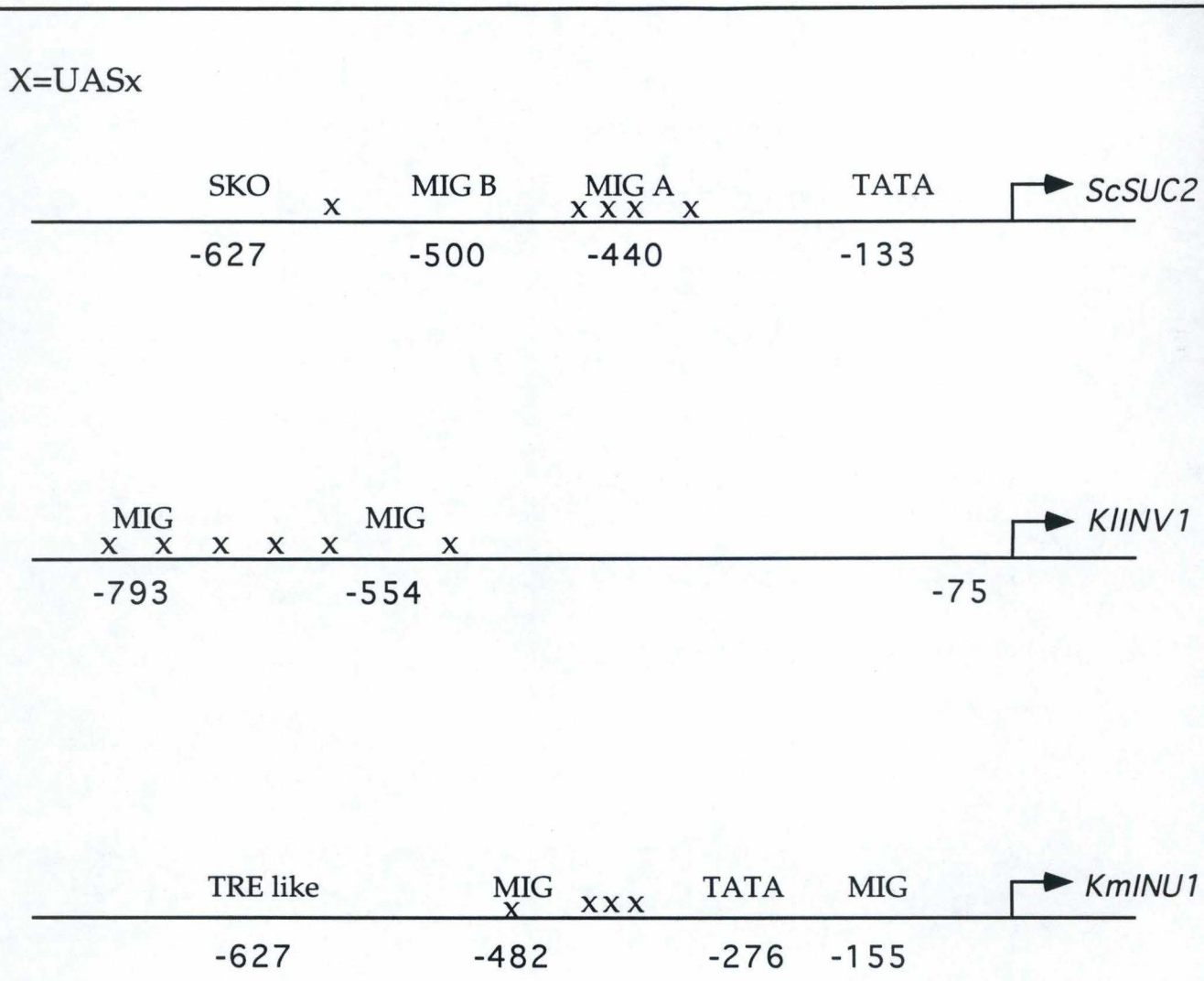


Figure 20 : Représentation schématique des promoteurs des gènes *SUC2* de *S. cerevisiae*, *INU1* de *K. marxianus*, *INV1* de *K. lactis*.

5) Analyse des séquences flanquantes de l'ORF.

5.1) Analyse des séquences de la région en amont de l'ORF.

5.1.1) Signaux communs aux gènes de levures.

Séquences nécessaires à l'initiation de la transcription:

Une TATA box atypique (TATAT) a été décelée 75 nucléotides en amont du site ATG d'initiation de la traduction, aucune autres TATA box potentielle n'a pu être localisée dans la séquence obtenue.

Séquences nécessaires à l'initiation de la traduction:

(Kozak *et al.*, 1986; Kozak *et al.*, 1981; Jean-Jean *et al.*, 1993)

L'initiation de la traduction à un codon AUG dépend du contexte dans lequel se trouve ce codon. Par compilation des séquences flanquant l'AUG et par des expériences de mutagenèse dirigée sur la séquence consensus tirées de la compilation, des contextes favorables ont pu être identifiés. La séquence consensus varie selon l'embranchement phylogénique considéré. Le consensus général serait le suivant: 5' ....ANNAUGTNN ....3'.

Au niveau de la séquence obtenue (**Figure 12**), ce consensus est respecté : on trouve un A en position -3 et un T en position +4. De plus, le codon AUG est précédé d'une région riche en A et pauvre en G, ce qui rend l'environnement plus favorable pour l'initiation de la traduction.

5.1.2) Signaux de type *ScSUC2* et *KmINU1*.

Dans le promoteur du gène *SUC2*, deux sites de liaison à l'ADN pour le répreseur Mig1p sont présents. Ces deux sites sont tous deux situés en amont de la TATA box qui se trouve en position -133, on les nomme site A et site B (Nehlin et Ronne, 1990). Ils sont respectivement localisés en -440 et -500 en amont du site +1. Un motif CRE est également présent en -627 (**Figure 20**). Ce motif serait lié par le régulateur Sko1 (Nehlin *et al.*, 1991). A proximité des motifs reconnus par Mig1p (boîtes MIG), on trouve quatre répétitions d'un motif heptamérique 5'-(A/C)(A/G)GAAAT-3' (UASx). Ce motif est impliqué dans l'activation de la transcription du gène *ScSUC2* (Sarokin et Carlson, 1986).

Deux boîtes MIG sont également présentes dans le promoteur du gène *KmINU1*. Néanmoins, il est intéressant de noter que ces motifs sont séparés par la TATA box. En effet, la TATA box est localisée en -276 alors que la première boîte MIG rencontrée se situe en position -155 par rapport au site +1. La seconde boîte MIG est localisée en -482. On

	P	O	S	I	T	I	O	N		
GENE	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6
SUC2 site A	A	A	A	A	T	G	C	G	G	G	G
SUC2 site B	A	T	T	A	T	C	C	G	G	G	G
INU1 -155	T	A	A	A	T	C	C	G	G	G	G
INU1 -482	T	T	T	T	C	C	T	G	G	G	G
KlINV1 -793	T	A	A	A	T	C	T	G	G	G	G
KlINV1 -554	A	T	C	A	T	G	T	G	G	G	G
CONSENSUS	**W**	**W**	**W**	**W**	**T**	**S**	**Y**	**G**	**G**	**G**	**G**

Figure 21 : motifs de différentes boîtes MIG observées chez les levures. Les nucléotides qui ne correspondent pas au consensus sont en grisés.

remarque aussi la présence de quatre répétitions du motif de l'UASx 5'-AGGAAAA-3' (Cassart *et al.*, 1993).

Après analyse du promoteur du gène *KlINV1*, deux boîtes de type MIG ont été mise en évidence. La figure 21 présentent les différentes séquences observées dans les boîtes MIG chez les levures. Comme pour la boîte MIG du gène *KmINU1* située en -482, on peut voir qu'il y a également un nucléotide qui ne correspond pas au consensus dans la boîte MIG du gène *KlINV1* localisée en -554. Elles sont toutes deux situées en amont de la TATA box, comme dans le promoteur du gène *SUC2* de *S. cerevisiae*. La première boîte MIG est située 554 bp en amont de l'ATG du gène tandis que la seconde est en position -793. On retrouve également des motifs dont la séquence est proche du consensus 5'-(A/C)(A/G)GAAAT-3' (UASx) observé dans le promoteur des gènes *SUC2* et *INU1*. Six séquences de ce type ont été décelées à proximité des boîtes MIG, deux de ces séquences chevauchent la boîte MIG localisée en -793. Un chevauchement comparable, observé dans le promoteur *SUC2*, est à la base d'un modèle de régulation de la transcription par des phénomènes de compétition entre un activateur non-identifié reconnaissant l'UASx et le répresseur Mig1p (Nehlin et Ronne, 1990).

5.2) Analyse des séquences situées du côté 3' de l'ORF.

La formation de l'extrémité des messagers eucaryotes est une étape essentielle de la maturation du transcrit primaire en mRNA mature. Elle requiert plusieurs étapes : la terminaison de la transcription, le clivage du messager précurseur et l'addition de la queue de poly(A). Les signaux régissant ces processus sont assez bien définis chez les eucaryotes supérieurs, il s'agit de la séquence AAUAAA requise pour la polyadénylation ainsi que d'un élément riche en T ou en GT impliqué dans le processus de clivage du pré-mRNA. Par contre, pour les gènes transcrits par l'ARN polymérase II chez *S.cerevisiae*, il est plus difficile de définir des signaux nécessaires à la formation de l'extrémité 3' des messagers. La séquence AAUAAA et ses analogues (AAUAA, UAUAAA) ne sont présents que dans 50% des pré-mRNA de levure. La figure x résume les éléments de séquences généralement impliqués dans la formation de l'extrémité 3' du mRNA:

- L'élément amont (TATATA, TAG...TATGTA, TTTTTATA) augmente l'action des éléments en aval.
- L'élément aval (TTAAGAAC, AAGAA) qui favorise la formation de l'extrémité 3' au niveau du site de polyadénylation.
- Le site de polyadénylation qui se trouve en général 16 à 27 nucléotides après l'élélent aval, souvent après une cytidine.

Divers éléments correspondant aux consensus décrits ci-avant sont retoruvés en 3' de l'ORF de KlINV1 : deux boîtes AATAA sont présentes,

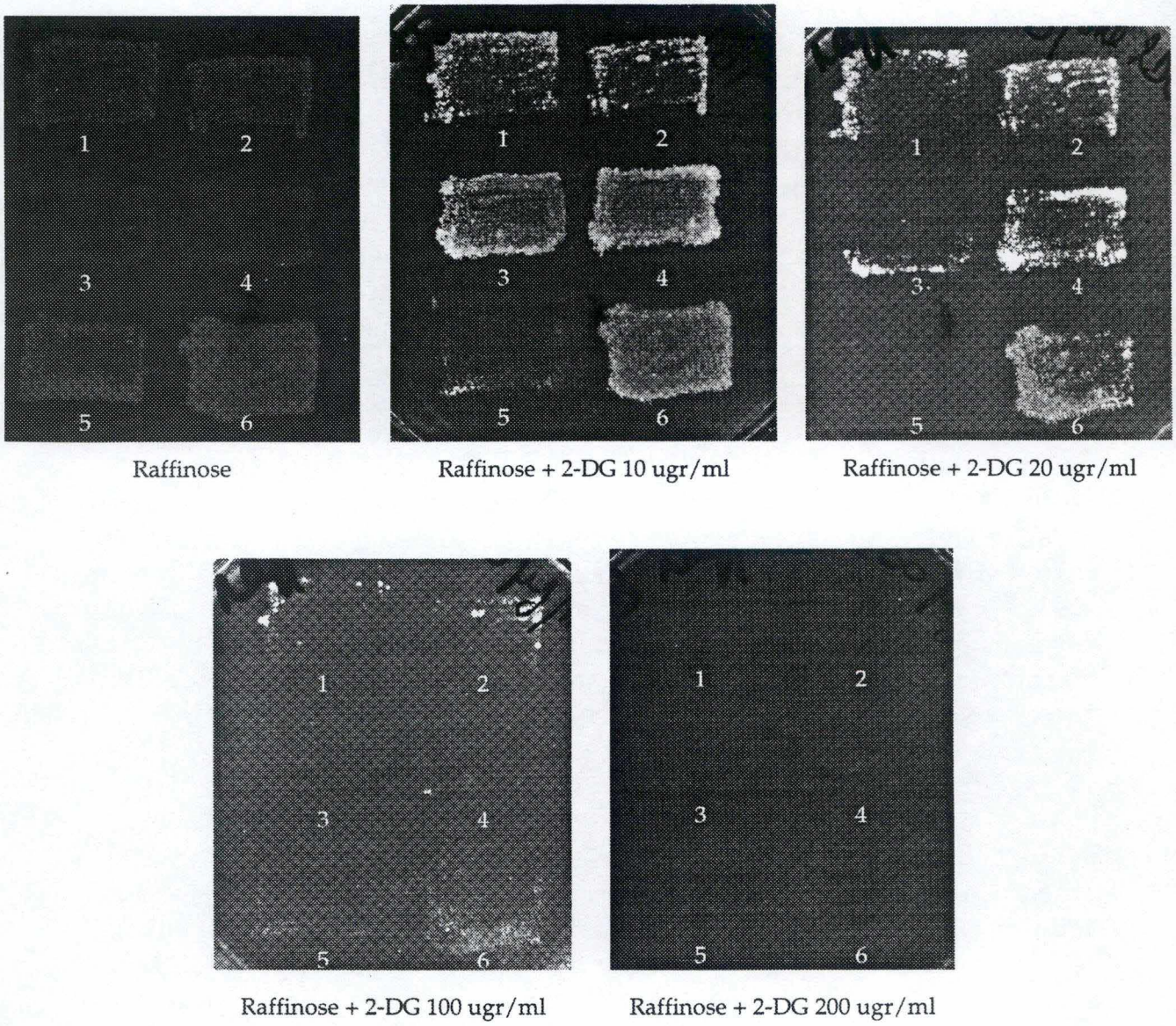


Figure 22 : Test de résistance au 2-DG. Les milieux contiennent du raffinose 3% et du 2-DG à différentes concentrations. Les milieux contiennent également de l'antimycine (0,4 µgr/ml) afin d'inhiber la respiration et d'obliger la croissance fermentaire.

l'une 315 bp après le codons Stop, et l'autre à 885bp. Une séquence de type AAGAA se retrouve 201 bp après le codon Stop.

6) Etude de la répression par le glucose du gène *KlINV1*.

Chez *S. cerevisiae*, la synthèse d'invertase est réprimée plus de 800 fois par le glucose (Gancedo, 1992). ScMig1p est l'effecteur principal de cette répression transcriptionnelle (Nehlin et Ronne, 1990). Chez *K. marxianus*, le gène *KmINU1* est également réprimé par KmMig1p (Cassart *et al.*, soumis). Dans le but d'éprouver l'expression de *KlINV1* chez *K. lactis* en présence de glucose et de préciser le rôle de KlMig1p dans ces conditions, nous avons entrepris d'observer la syntèse d'invertase dans une souche sauvege (JA6) et dans une souche où le gène *KlMIG1* est disrupté par l'insertion du marqueur *URA3* de *S. cerevisiae* en amont de la région encodant les doigts de zinc. D'autres souches de levure ont été également analysées dans les mêmes conditions. Dans la souche H497 de *S. cerevisiae*, l'entièreté de l'ORF de *ScMIG1* a été délétée (Östling *et al.*, 1996). La souche isogénique sauvage est W303. Dans la souche *Kmmig1* de *K. marxianus*, le second doigt de zinc est remplacé par le marqueur *URA3* (Cassart *et al.*, soumis). La souche isogénique est KG11.
Les différentes souches ont été répliquées sur des milieux au raffinose 3% avec des concentrations croissantes en 2-DG. Les milieux représentés à la figure 22 contiennent également de l'antimycine (0,4µg/ml).

Le raffinose est la seule source de carbone disponible dans le milieu : l'invertase, ou l'inulinase dans le cas de *K. marxianus*, est donc nécessaire pour la croissance des cellules.

Le 2-DG est un sucre non-métabolisable mais qui a un résultat similaire du point de vue de la répression par le glucose. Les concentrations de 2-DG dans les milieux sont de 10, 20, 100 et 200 µgr/ml.

De l'antimycine est ajoutée au milieu afin d'inhiber la respiration, donc d'empêcher la levure de "respirer" les acides aminés, et d'obliger la croissance fermentaire.

Si la répression par le glucose dans ces différentes souches de levures est uniquement médiée par le répresseur Mig1p, les souches *mig* ne devraient pas être affectées par la présence du 2-DG dans le milieu alors que la croissance des souches sauvages devrait être inhibée.

En absence de 2-DG, toutes les souches sont capables de croître sur un milieu contenant du raffinose (fig.22). La souche KG11 de *K.*

marxianus semble être la plus sensible à la présence de 2-DG dans le milieu de culture. En effet, cette souche est incapable de croître en présence d'une concentration de 10µg/ml de 2-DG. La répression glucose semble être essentiellement médiée par le répresseur Mig1p dans la souche KG11 de *K. marxianus* cr un mutant Kmmig1 manifeste une croissance sur ce milieu. A cette concentration en 2-DG, les souches sauvages de *K. lactis* et *S. cerevisiae* ne manifestent pas de défaut de croissance.andis que dans le cas de *K. lactis* et de *S.cerevisiae,* un autre mécanisme de répression semble être impliqué.

A la concentration de 20 µgr/ml de 2-DG, la souche KG11 de *K. marxianus* est incapable de croître. Quant à la souche W303 de *S. cerevisiae,* sa croissance est fortement diminuée par rapport à ce que l'on pouvait observer à une concentration de 10 µgr/ml de 2-DG. La souche JA6 semble être la moins affectée par la concentration croissante en 2-DG.

Les souches de *S. cerevisiae* ne poussent plus du tout à la concentration de 100 µgr/ml de 2-DG. Une très faible croissance est détectée pour les souches de *K. lactis*.

L'incapacité de la souche sauvage JA6 de *K. lactis* de croître sur un milieu raffinose + 2-DG nous indique que la synthèse d'invertase, et donc l'expression du gène *KlINV1* est réprimée en présence de glucose. Contrairement aux souches *mig1* de *S. cerevisiae* (H497) et de *K. marxianus* (Kmmig1), la souche IG181 ne manifeste pas une résistance à la répression par le 2-DG. Il semble donc que Mig1p n'intervient pas ou peu dans le contrôle de l'expression de l'invertase chez *K. lactis*. Il convient toutefois de préciser que le répresseur KlMig1p pourrait encore être exprimé dans la souche IG181. En effet, rappelons ici que la souche IG181 a été créée par insertion du marqueur *ScURA3* dans la phase ouverte de lecture de *KlINV1*, sans aucune délétion, pouvant être responsable de quelqu'expression résiduelle. La création d'un mutant nul *mig1* de *K. lactis*, dans lequel au moins un des deux doigts de zinc est délété, est à envisager.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Il a été demontré que la levure *K. lactis* est capable de faire montre d'une activité invertase. Le gène en étant responsable a été cloné par criblage d'une banque génomique à l'aide d'une sonde nucléotidique hétérologue provenant de la région amino-terminale très conservée du gène encodant l'inulinase de *K. marxianus*. Le nouveau gène cloné a été authentifié par une expérience de Southern blot, il a été dénommé *KlINV1* étant donné le haut taux d'homologie existant entre la protéine de 460 acides aminés encodée par l'ORF de 1380 bp et la séquence protéique de deux autres ß-fructosidases connues, l'invertase de *S. cerevisiae* (SUC2p) et l'inulinase de *K. marxianus* (INU1p).

Un alignement multiple a été réalisé avec six autres ß-fructosidases. Il a permis de localiser les régions conservées de la protéine KlInv1p. Les régions les plus conservées sont essentiellement situées dans la région amino-terminale de la protéine. L'importance de plusieurs résidus localisés dans cette région avait déjà été démontrée (Reddy et Maley, 1990) dont celui d'un acide aspartique en position 23 de la protéine mature. Cet acide aspartique est conservé dans la protéine KlInv1p, suggérant qu'il y assure également un rôle catalytique.

Des boîtes MIG sont présentes au niveau de la séquence du promoteur du gène *KlINV1*. Ces boîtes MIG sont localisées en amont de la TATA box, comme chez *S. cerevisiae*.. Des tests de croissance ont été effectués sur des milieux raffinose + antimycine + 2-DG avec différentes souches de levures, dont des mutants pour le gène *MIG*. Si la répression par le glucose n'était due qu'à l'action du répresseur Mig1p, les souches mutantes montreraient un phénotype de résistance au 2-DG. Les résultats de ce test ne nous ont pas permis de démontrer que la répression par le glucose du gène *KlINV1* était médiée par Mig1p vu que le mutant IG181 ne pousse pas sur 2-DG. Remarquons cependant que le mutant IG181 a été construit par l'insertion, sans délétion, du gène *URA3* en amont de la région des doigts de zinc, et il est envisageable que la protéine soit encore exprimée, empêchant de ce fait l'apparition d'une résistance au 2-DG.

Le clonage de ce nouveau gène issu de la levure *K. lactis*, dont nous avons dit qu'elle possédait un mécanisme de répression par le glucose sans doute plus conforme à la situation généralement admise dans les cellules eucaryotes supérieures, devrait nous permettre par la suite de mieux comprendre le phénomène de répression glucose.

Au terme de ce travail, diverses possibilités s'offrent à nous. Il serait intéressant de doser l'activité invertase en condition de répression (glucose 2%) et de non répression (raffinose 3%) afin de déterminer le taux de répression. Parallèlement, un Northern blot devrait être effectué dans les

mêmes conditions de répression et de dérépression afin de quantifier les mRNA produits au départ du gène codant pour l'invertase. La comparaison entre les valeurs obtenues pour ces deux expériences nous permettrait de déterminer le niveau auquel s'effectue la répression. Si, en conditions de répression, l'activité est diminuée mais que les mRNA sont toujours produits au même taux qu'en conditions de dérépression, cela signifierait que la répression agirait au niveau traductionnel. Par contre, si on observe une diminution des messagers et également une baisse de l'activité, c'est que la répression est transcriptionnelle. Dans le cas de la répression par le glucose du gène *KlINV1*, on s'attend à observer une répression au niveau transcriptionnel comme pour le gène *SUC2* de *S. cerevisiae*. Pour mieux cerner le rôle de Mig1p, ces tests devraient être effectués dans des souches de levures dont le gène *MIG* est intact ainsi que dans des souches mutantes.

Pour caractériser l'expression de *KlINV1*, on pourrait également un système de gène rapporteur. Le promoteur du gène *KlINV1* serait fusionné au gène lacZ, on pourrait ainsi suivre l'expression de la ß-galactosidase sur un milieu contenant de l'X-Gal ou en dosant l'activité ß-galactosidase, et ce pour différentes souches en conditions de répression ou de dérepression. Pour localiser les sites du promoteur qui sont impliqués dans la répression, on peut envisager une dissection de ce promoteur en faisant des délétions successives du promoteur jusqu'à ce que l'on n'observe plus de répression par le glucose, ce qui signifiera que la région impliquée dans la répression a été délétée.

Etant donné qu'il faut émettre quelques réserves sur le mutant IG181, il serait intéressant de faire des tests de résistance au 2-DG avec un délétant plutôt qu'avec un mutant d'insertion, car dans ce cas la protéine risque d'être encore produite. On pourrait de la sorte définir plus clairement si Mig1p est le médiateur unique de la répression par le glucose du gène *KlINV1*.

MATERIEL ET METHODES

V MATERIEL ET METHODES.

1) Solutions et tampons

1.1) Solutions.

Acrylamide pour gel de séquençage

		Pour 500 ml H_2O
Acrylamide	38%	190 g
Bisacrylamide	2%	10 g

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

Agarose

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

Alourdisseur / colorant pour gels d'agarose

		Pour 10 ml
Bleu de Bromophénol	0,25%	25 mg
EDTA	25 mM	0,5 ml d'EDTA 0,5 M
Glycérol	50%	5 ml
H_2O		4,5 ml

Ce stock est concentré 10X.

Antibiotiques

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

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

Ampicilline 10% : 100 mg par ml d'eau bidistillée. Stériliser par filtration sur un filtre Millipore 0,22 micromètre. Cette solution stock est concentrée 1000X.
Ex. d'utilisation : 400 µl d'ampicilline 10% dans 400 ml de LB.

Antimycine 0,1% : 1g d'antimycine dans 1ml d'eau bidistillée. Cet antibiotique est utilisé en concentration finale de 0,04%.
Ex. d'utilisation : 40 µl de la solution stock dans 100 ml de milieu.

ß-mercaptoéthanol

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

Bromure d'éthidium

2 mg par ml d'eau bidistillée.

Denhart's 50X

Ficoll 400 :	1%
Polyvinylpyrrolidone :	1%
BSA (Bovine Serum Albumine) :	1%

dNTP 10mM pour PCR

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

dATP	50 ml
dCTP	50 ml
dGTP	50 ml
dTTP	50 ml
H_2O	295 ml
Tris 1 M pH 7	5 ml

Fixateur pour gel de séquençage

Acide Acétique	10%
Méthanol	10%

Isopropyl, ß-D thiogalactopyranoside (IPTG)

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

Marqueurs de poids moléculaire

Deux marqueurs de poids moléculaires ont été utilisés :

- λ/*Hin*dIII : la solution achetée chez BRL n'est pas prête à l'emploi. A 100 µl de cette solution, on ajoute 100 µl de tampon 10X et 700 µl

d'eau. Le tout est dénaturé par un passage de 10 minutes à 65°C. Après cette dénaturation, on ajoute 100 µl d'alourdisseur-colorant pour gels d'agarose. 10 µl de cette solution finale est chargé par puits. Il est à noter que ce marqueur permet également de quantifier l'ADN d'un échantillon par rapport à l'intensité des différentes bandes du marqueur.

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

Composition du tampon 10X :

TrisHCl	200 mM	5 ml de 1 M
NaCl	200 mM	1 ml de 5 M
EDTA	1 mM	100 ml de 250 mM
H_2O		19 ml

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

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

Ne sont indiquées ici que les masses moléculaires des bandes ou groupes de bandes qu'il est possible d'utiliser facilement pour le diagnostic.

Persulfate d'ammonium

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

Phénol-chloroforme

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

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

Protéinase K

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

RNAase A

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

SCEß

Sorbitol	1,2M
Citrate de Sodium	0,1M
EDTA	0,06M
ß-Mercaptoethanol	14mM

SDS 10%

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

SOC

		Pour un litre
Bactotryptone	2%	20 g
BactoYeastExtract	0.5%	5 g
NaCl	10 mM	2 ml de NaCl 5 M
KCl	2,5 mM	2,5 ml de KCl 1 M
$MgCl_2$	10 mM	10 ml de $MgCl_2$ 1 M
$MgSO_4$	10 mM	10 ml de $MgSO_4$ 1 M
Glucose	20 mM	3,96 g

Le $MgSO_4$ est à ajouter après autoclavage.

Solution de lyse

EDTA	50mM pH8,5
SDS	0,2%

SSC 20X

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

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

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

1.2) Tampons.

Tampon de ligation 5X

TrisHCl pH 7,4	20 mM
$MgCl_2$	10 mM
DTT (dithiothreitol)	10 mM
ATP	1 mM

Tampon N2

KCl	900 mM
Tris/H_3PO_4	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N3

KCl	1150 mM
Tris/H_3PO_4	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N5

KCl	1000 mM
Tris/H_3PO_4	100 mM
EtOH	15%
pH	8,5

Tampon S1

TrisHCl pH 8	50 mM
EDTA pH 8	10 mM

Tampon S2

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

Tampon S3

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

Tampons de restriction

Tampons Biolabs

	Les différents tampons			
Composition (mM)	1	2	3	4
Bis Tris Propane HCl	10	-	-	-
$MgCl_2$	10	10	10	-
DTT	1	1	1	1
TrisHCl	-	10	50	-
NaCl	-	10	100	-
Tris acétate	-	-	-	20
Mg atétate	-	-	-	10
K acétate	-	-	-	50
pH à 25°C	7	7,9	7,9	7,9

Tampons Boerhinger

	Les différents tampons				
Composition (mM)	A	B	L	M	H
Tris acétate	33	-	-	-	-
TrisHCl	-	10	10	10	50
Mg acétate	10	-	-	-	-
$MgCl_2$	-	5	10	10	10
K acétate	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
DTE	-	-	1	1	1
DTT	0,5	-	-	-	-
ß-mercaptoéthanol	-	1	-	-	-
pH à 37°C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

Tampons BRL

	Les différents tampons										
Composition (mM)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TrisHCl	50	50	50	20	10	50	50	20	50	100	10
$MgCl_2$	10	10	10	5	8	6	10	10	5	10	12
NaCl	-	50	100	-	-	50	50	-	-	150	-
KCl	-	-	-	50	-	50	50	-	-	-	100
pH	8	8	8	7,4	8,2	7,4	8	7,4	8,5	7,6	9

Tampon TAE

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

Tampon TE

à pH 8 :

TrisHCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

à pH 7,5 :

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

Tampon TBE

	Pour 1 l de TBE 10X	Pour 10 l de TBE 1X
TrisHCl	108 g	108 g
Acide borique	55 g	55 g
EDTA	9,3 g	9,3 g

2) Souches et plasmides.

2.1) Souches.

2.1.1) Souche de bactérie : Xl1-Blue d'E. coli.

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

Caractéristiques génomiques :

recA1 : code pour une ATPase DNA-dépendante essentielle à la recombinaison chez *E. coli.* Les souches mutantes à ce locus présentent un taux de recombinaison mille fois inférieur à celui des souches non mutantes, ce qui permet de minimiser les recombinaisons entre l'ADN endogène et l'ADN exogène, mais également de propager les plasmides à l'état monomérique.

thi : mutation au niveau du gène codant pour la vitamine B1. La présence de thiamine dans le milieu de culture est donc indispensable pour la croissance de cette souche.

endA1 : mutation qui entraîne une diminution du taux d'endonucléase, ce qui améliore la quantité et la qualité de l'ADN plasmidique.

D(lac-proAB) : délétion de l'opéron lactose, mais également des gènes voisins nécessaires à la biosynthèse de la proline.

traD36 : mutation ayant pour conséquence la supression du transfert du facteur F lors de la conjugaison bactérienne.

Caractéristiques portées par l'épisome F':

L'épisome F' est un plasmide naturel de 93 kb; il est présent 1 ou 2 fois par cellule et code pour les protéines responsables de la formation des pili sexuels nécessaires au phénomène parasexuel de conjugaison. De plus, il est indispensable à la séléction des bactéries transformées par un plasmide recombinant (test Blanc/Bleu).

Tn10 : marqueur de résistance à la tétracycline, permettant de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'.

ProAB : l'épisome F' est porteur de la région chromosomique codant pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la proline, cette région étant délétée au niveau du chromosome chez la souche XL1-Blue. De cette façon, la

croissance de XL1-Blue est assurée même sur des milieux dépourvus de proline.
LacZDM15 : portion du gène *LacZ* délétée dans la portion N-terminale.
LacIq : mutation pour le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose, ce qui entraîne une surproduction de la b-galactosidase d'un facteur 10.

2.1.2) Souches de levure.

2.1.2.1) Souches de Kluyveromyces lactis.

CBS 2359 : c'est une souche sauvage de sexe "a", commercialisée par le Centraal Bureau voor Schimmelcultures.

CBS 2360 : c'est une souche sauvage de sexe "a", commercialisée par le Centraal Bureau voor Schimmelcultures.

JA6 : souche de sexe "a", ayant les caractéristiques suivantes : *ade1-600 adeT-600 trp1-11 ura3* (Breunig et Kuger, 1987). Possédant l'allèle *LAC9-2*, c'est une souche répressible par le glucose.

IG181 : souche congénique de JA6, où l'ORF de *KlMIG1* est disruptée par insertion du marqueur *URA3* de *Saccharomyces cerevisiae* en amont de la région encodant les doigts de zinc (Georis, 1995).

2.1.2.2) Souches de Kluyveromyces marxianus.

KG11 : Souche dérivée de la souche SGE1 isolée par le Dr Galzy de l'Université de Montpellier. Elle est auxotrophe pour l'uracile et probablement haploïde.

KmMig- : Souche congénique de KG11 où une partie de l'ORF de *KmMIG1* est délétée et remplacée par le marqueur (Cassart, soumis)

2.1.2.3) Souches de Saccharomyces cerevisae.

W303-1A : *MATa SUC2 GAL ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1* (Thomas et Rothstein, 1989)

H497 : elle est congénique de W303-1A. Son génotype est le suivant: *MATa SUC2 GAL ade2-1 can 1-100 his3-11,15 leu 2-3,112 trp1::hisG ura3-1 mig1-d3* (Östling *et al.*, 1996).

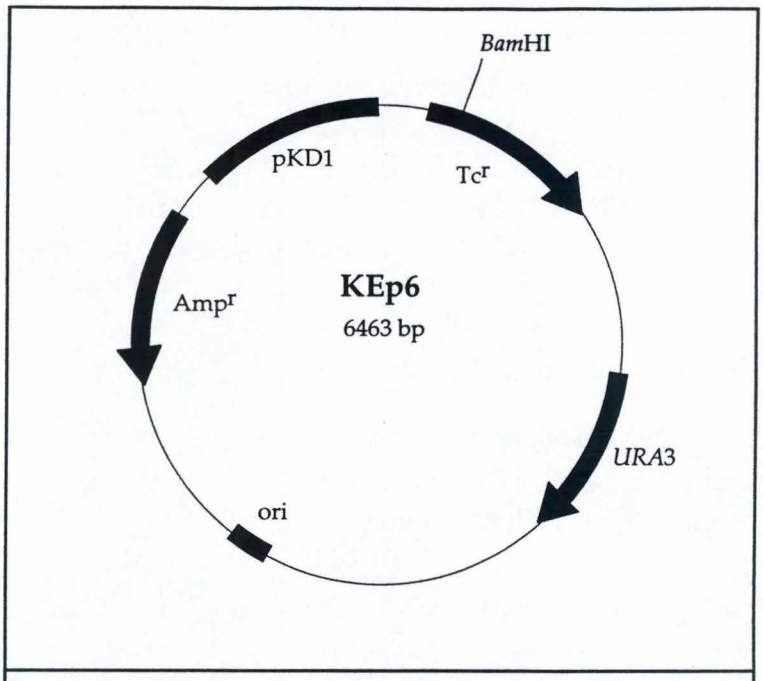


Figure 1 : Représentation schématique du vecteur KEp6.

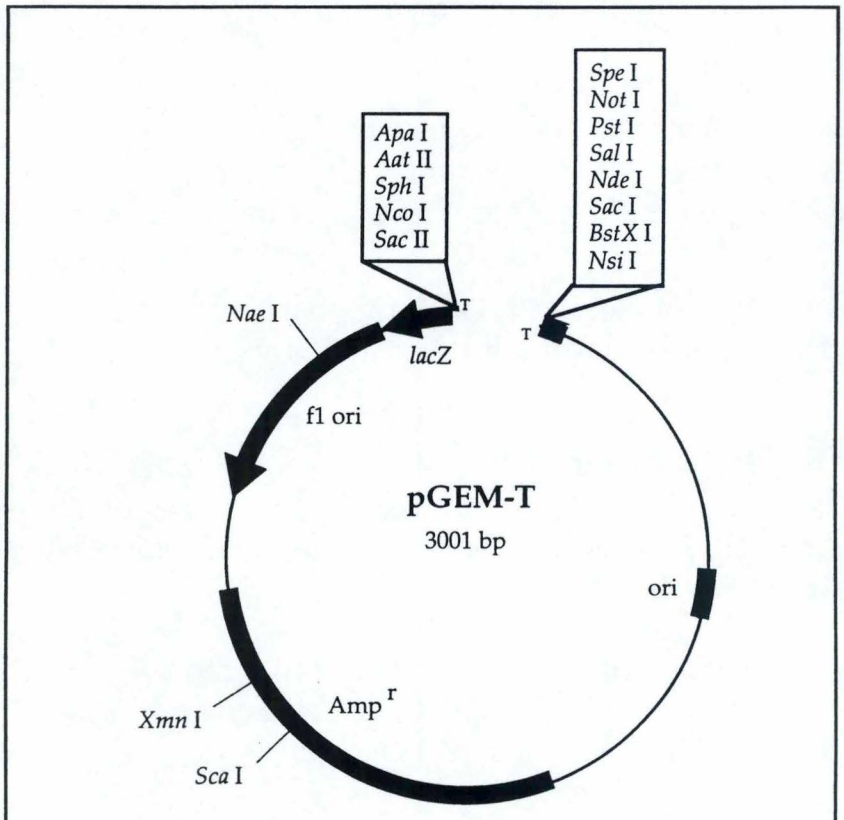


Figure 2 : Représentation schématique du vecteur pGEM-T.

2.2) Plasmides.

2.2.1) KEp6 (**Figure 1**).

Le plasmide KEp6 a une taille de 6463 bp. Il a été construit par l'insertion du fragment S11 de pKD1 (Chen *et al.*, 1986; Bianchi *et al.*, 1987) au site *Eco*RI du plasmide YIp5 après remplissage par l'enzyme Klenow. Grâce à la présence de ce fragment S11, le Kep6 est capable de se répliquer chez *K. lactis*; il est stable chez *K. lactis*, mais pas chez *S. cerevisiae*. En outre, il possède deux marqueurs de sélection chez *E. coli* (Amp^r et Tet^r) et un marqueur de sélection chez *K. lactis* (le gène *URA3* de *S. cerevisiae*, qui complémente la mutation *uraA* de *K. lactis*; de Louvencourt *et al.*, 1983).

2.2.2) pGEM-T (**Figure 2**).

Le pGEM-T est construit à partir du pGEM-5Zf(+) restreint par l'enzyme *Eco*RV, auquel on a ajouté une thymidine 3' terminale aux 2 brins. Ces thymidines 3' protrudantes au site d'insertion augmentent l'efficacité de la ligation d'un produit PCR dans le plasmide, car certaines polymérases thermostables ajoutent une déoxyadénosine à l'extrêmité 3' terminale du produit PCR.

2.2.3) pGICI1 (**Figure 3**).

Le pGICI1 est construit par l'insertion d'un fragment d'ADN génomique de *K. lactis* d'une taille d'environ 10 kb dans le KEp6. Ce fragment d'ADN génomique contient une séquence codant pour le gène de l'invertase de *K. lactis*.

2.2.4) pGICI2 (**Figure 4**).

Le pGICI2 est construit par l'insertion d'un fragment d'ADN génomique de *K. lactis* d'une taille d'environ 13,5 kb dans le KEp6. Ce fragment d'ADN génomique contient une séquence codant pour le gène de l'invertase de *K. lactis*.

2.2.5) pGICI3 (**Figure 5**).

Le pGICI3 est construit par l'insertion dans le pGEM-T du fragment amplifié par PCR avec les amorces TBU-F et TBU-R sur de l'ADN génomique de *K. lactis*. Ce produit PCR a une taille d'environ 150 bp.

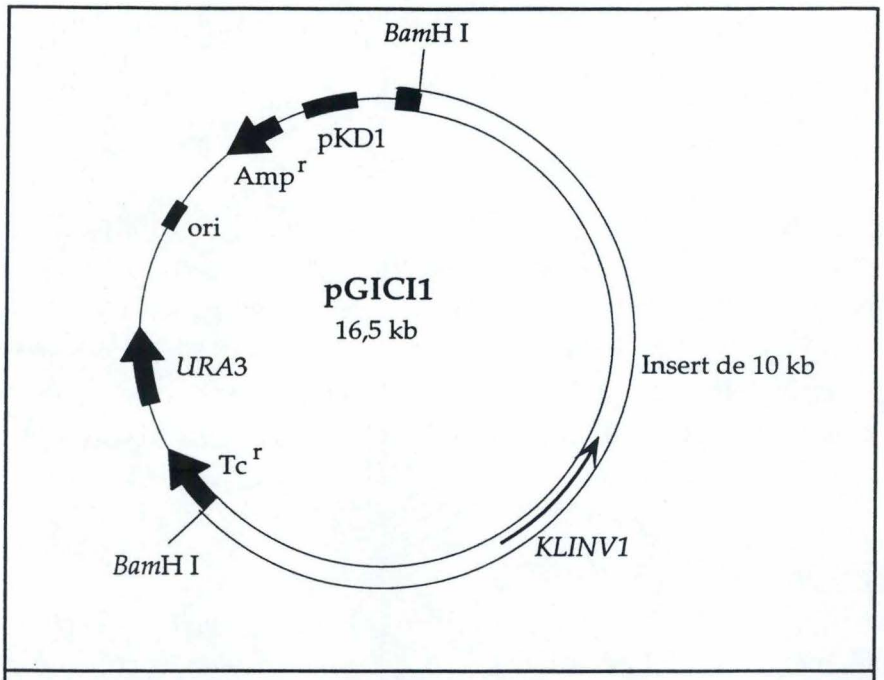


Figure 3 : Représentation schématique du pGICI1.

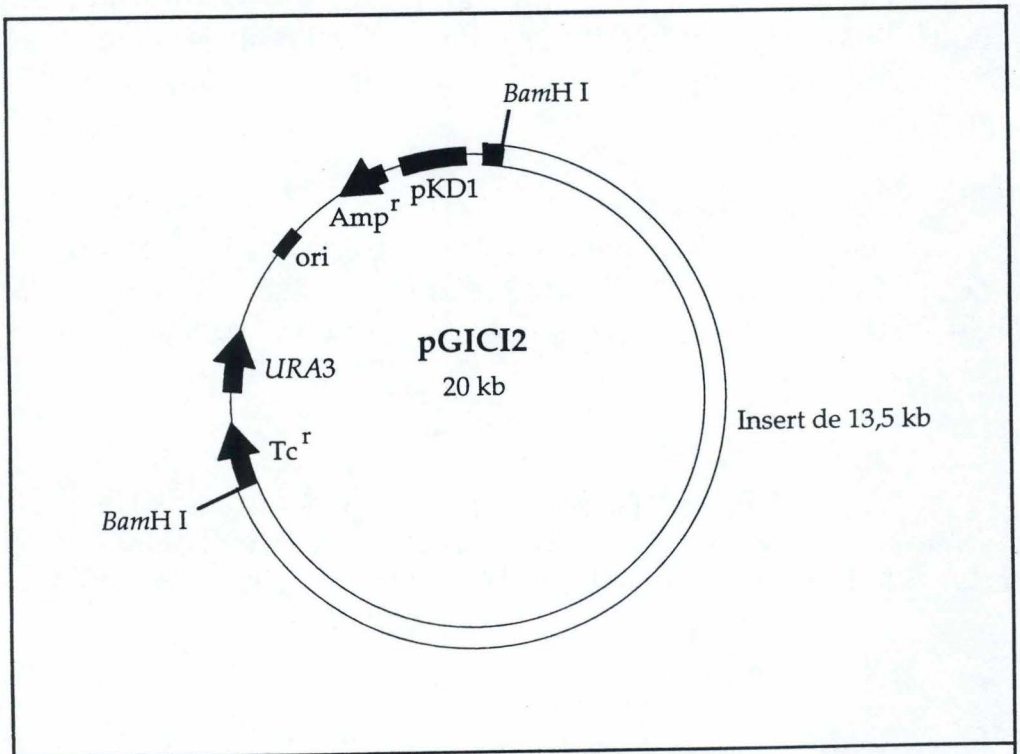


Figure 4 : Représentation schématique du pGICI2. La localisation de *KIINV1* ainsi que son orientation n'ont pu être déterminés

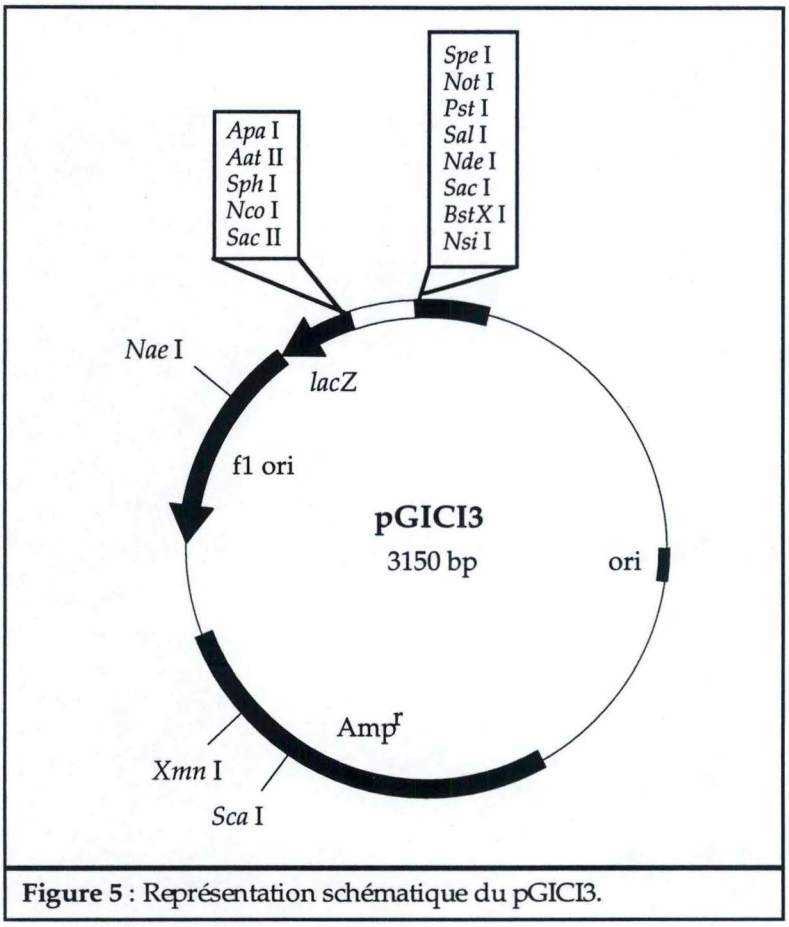


Figure 5 : Représentation schématique du pGICI3.

3) Milieux de culture

3.1) Le milieu de culture pour les bactéries: LB.

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

Pour obtenir du milieu solide à couler dans des boîtes de Petri, il faut ajouter à la composition du milieu 2% d'Agar.

Les produits thermolabiles qui doivent parfois être ajoutés aux milieux de culture sont à ajouter après l'autoclavage. Cet ajout doit se faire de préférence à une température de 55-60°C pour l'ampicilline et les autres antibiotiques.

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

3.2) Les milieux de cultures pour les levures.

3.2.1) Milieu riche.

3.2.1.1) Milieu YPD.

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

En ajoutant 2% d'agar à cette composition, on obtient un milieu solide qui peut être coulé dans des boîtes de Petri.
Mettre à pH 4,8 avec HCl 37%. Autoclaver.

3.2.2) Milieu minimum complet.

Pour maintenir les plasmides dans les levures, l'acide aminé (ou la base) correspondant au marqueur de sélection porté par le plasmide est omis du milieu de culture. Les autres acides aminés (et les bases) nécessaires à la croissance optimale des levures sont fournis par un mélange (Omission Media Mix).
Pour 1 litre de milieu, utiliser 7,35 g d'un mélange (en poudre) dont la composition est présentée au tableau 1.

Tableau 1.
Omission Media Mix

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

Le milieu est complété par un des sucres suivants : glucose (2%), sucrose (2%), raffinose (3%) ou inuline (4%).
Pour inhiber la respiration, on ajoute de l'antimycine A (0,4 mg/ml).
Pour les tests de résistance au 2-désoxyglucose (2-DG), on ajoute dans un milieu au raffinose 3%, du 2-DG (200 mg/ml; stock à 200 mg/ml dans H_2O à 4°C).

4) Techniques de l'ADN recombinant.

4.1) Constructions génétiques.

4.1.1) Principe général des constructions génétiques.

La plupart des techniques utilisées en génie génétique sont basées sur l'existence des plasmides. Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire circulaires et autoréplicatives, sur lesquelles il est possible d'effectuer une série d'opérations. Il s'agit de la restriction, de la ligation et de la transformation.
Les plasmides sont restreints à l'aide d'enzymes de restriction diverses reconnaissant un site spécifique sur l'ADN (souvent une séquence palindromique de 4 ou 6 pb). Le nombre de fragments générés dépend de la fréquence d'occurence du site dans la molécule d'ADN.
Ces fragments peuvent ensuite être ligués à l'aide de la T4 DNA ligase. Pour autant que les extrémités des morceaux que l'on désire assembler soient compatibles.
Deux cas peuvent se présenter: soit l'enzyme clive l'ADN en générant des extrémités à bouts francs (ex : *Hpa* I), soit en générant des bouts collants. Si la

restriction génère des bouts collants, ils seront 5' protrudants (ex : *Nco* I) ou 3' protrudants (ex : *Sph* I).
Tous les fragments qui se terminent par des bouts francs sont compatibles entre eux. Par contre, ceux dont les extrémités sont des bouts collants doivent, pour être compatibles, présenter des extrémités protrudantes de même longueur et de séquence nucléotidique complémentaire.
Les constructions ainsi élaborées sont introduites par transformation dans une souche bactérienne afin d'être amplifiées, ou de levure pour observer les phénotypes auxquels elles donnent naissance.

4.1.2) Restriction d'ADN.

4.1.2.1) Généralités.

Les enzymes utilisées pour restreindre l'ADN double brin s'appellent des endonucléases de restriction. Ces enzymes sont spécifiques, c'est-à-dire qu'elles reconnaissent chacune des séquences (souvent de 4 ou de 6 nucléotides) différentes. Les enzymes qui coupent l'ADN au même site sont appelées isoschizomères. Les séquences reconnues par ces enzymes sont souvent palindromiques (ex : *Bam*H I reconnait le site GGATCC).

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

- des bouts francs, c'est-à-dire que les deux brins d'ADN ont la même longueur. Cette forme de coupure est obtenue par exemple avec l'enzyme *Eco*R V, *Dra* I, *Sma* I,....
- des bouts collants, qui, à leur tour, peuvent être de deux types : soit on obtient une extrémité 3'-protrudante (par exemple : *Kpn* I, *Sph* I,...), soit on obtient une extrémité 5'-protrudante (par exemple :*Eco*R I, *Hin*d III,...)

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

4.1.2.2) Au point de vue pratique.

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

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

Ce mélange réactionnel est alors incubé environ une heure à une température optimale, cette température étant, pour la plupart des enzymes

de restrictions, de 37°C. Mais certaines enzymes sont plus actives à d'autres températures : par exemple, *Sma* I est efficace à 25°C alors que *Bcl* I a son optimum d'activité à 50°C.

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

4.1.2.3) Remarques générales.

Les quantités d'enzyme de restriction à utiliser varient selon la quantité d'ADN que l'on veut restreindre : on utilisera entre 3 et 10 unités d'enzyme par mg d'ADN à restreindre.
Il faut cependant veiller à ne pas ajouter trop de volume d'enzyme de restriction (maximum 1/10 du volume final), car les enzymes sont stockées dans une solution comprenant 50% de glycérol et s'il se trouve, lors de la restriction, à une concentration supérieure à 5%, des effets néfastes peuvent se manifester, et l'enzyme peut alors :

a) voir son activité décroître et n'engendrer que des restrictions partielles.

b) faire montre d'une activité "star" : il a été démontré que, sous des conditions extrêmes, les endonucléases de restriction sont capables de cliver des séquences qui sont similaires mais pas identiques à leur site spécifique de clivage. Parmi ces conditions extrêmes, on cite notamment une concentration élevée en glycérol, mais également une trop forte concentration en ADN cible, une force ionique trop élevée, un pH trop élevé, la présence de solvants organiques tel l'éthanol, ...

4.1.3) Déphosphorylation.

4.1.3.1) Introduction.

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

4.1.3.2) Protocole.

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

A - Si l'ADN a des extrémités 5' protrudantes:
- incuber 30 min. à 37°C
- ajouter 0,5 µl de CIP
- incuber 30 min. à 37°C

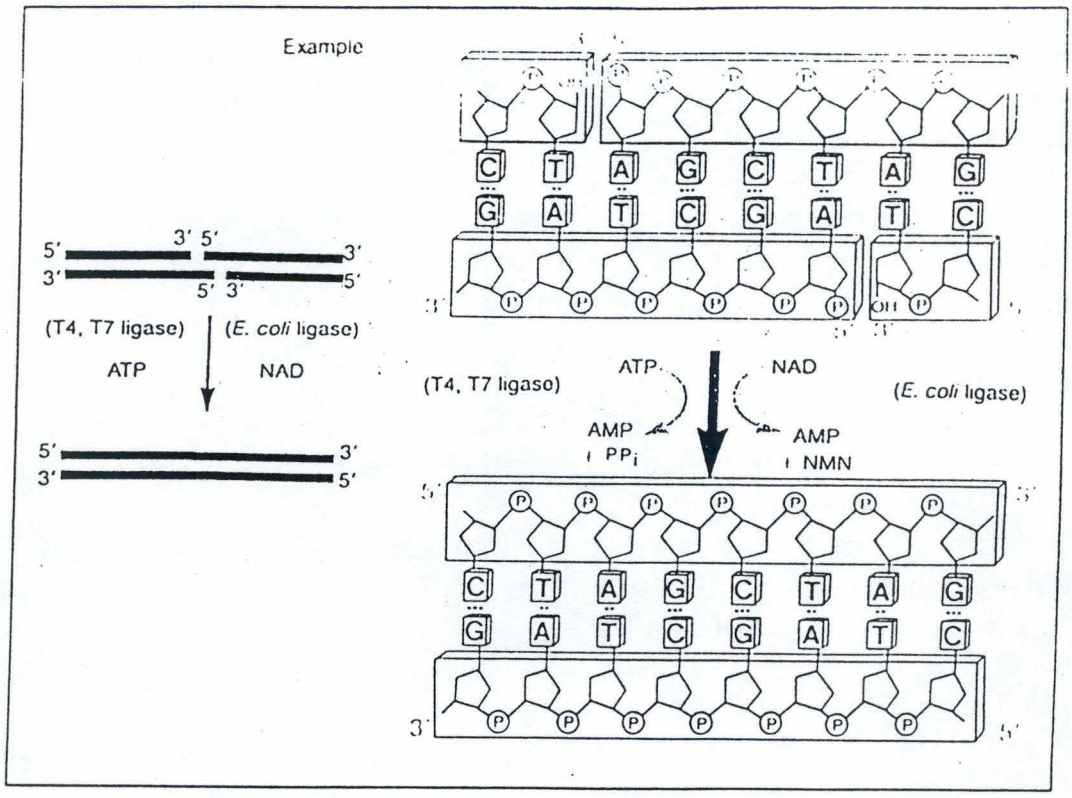
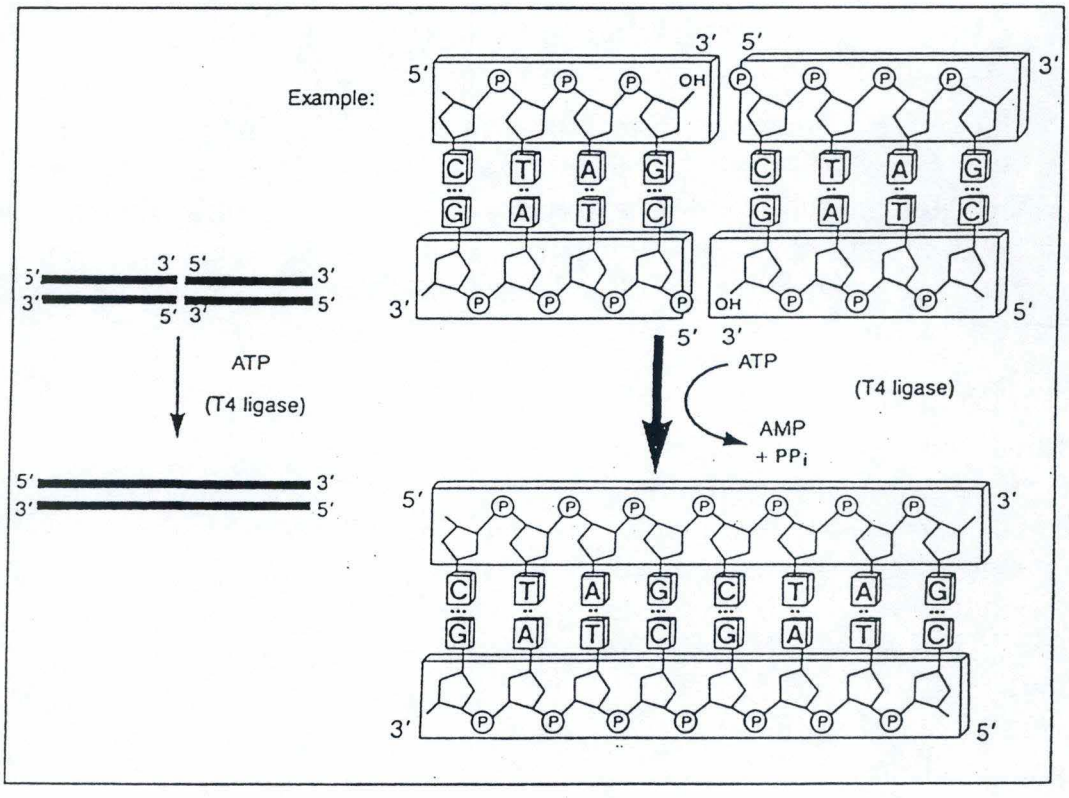


Figure 6: A. Activité de la T4 DNA ligase sur les bouts francs.
B. Activité de la T4 DNA ligase sur les bouts collants.



B - Si l'ADN a des extrémités 3' protrudantes ou des bouts francs:
- incuber 15 min. à 37°C
- incuber 15 min. à 56°C
- ajouter 0,5 µl de CIP
- incuber 15 min. à 37°C
- incuber 15 min. à 56°C

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

4.1.4) Ligation.

4.1.4.1) Principe.

La formation de liens phosphodiesters entre un groupement 3'-hydroxyle et un groupement 5'-phosphate est une réaction catalysée par la ligase du phage T4. Pour ce faire, l'enzyme a besoin d'ATP et de Mg^{++} (**Figure 6**).

4.1.4.2) En pratique.

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

4.1.4.3) Remarques générales.

Lorsque la ligation n'implique que des bouts collants, elle se fait à 14°C, pendant une nuit, la formation des ponts hydrogènes étant favorisée à cette température.
Lorsque la ligation n'implique que des bouts francs, elle se fait pendant 3 heures à température ambiante, car l'activité de la T4 DNA ligase est plus élevée à cette température.
Si enfin la ligation implique les deux types d'extrémités, les deux incubations sont successivement réalisées.

S'il n'y a qu'une possibilité d'insertion (si le clonage est forcé), la stoechiométrie matrice/insert sera de 1:1. Si par contre la matrice peut se

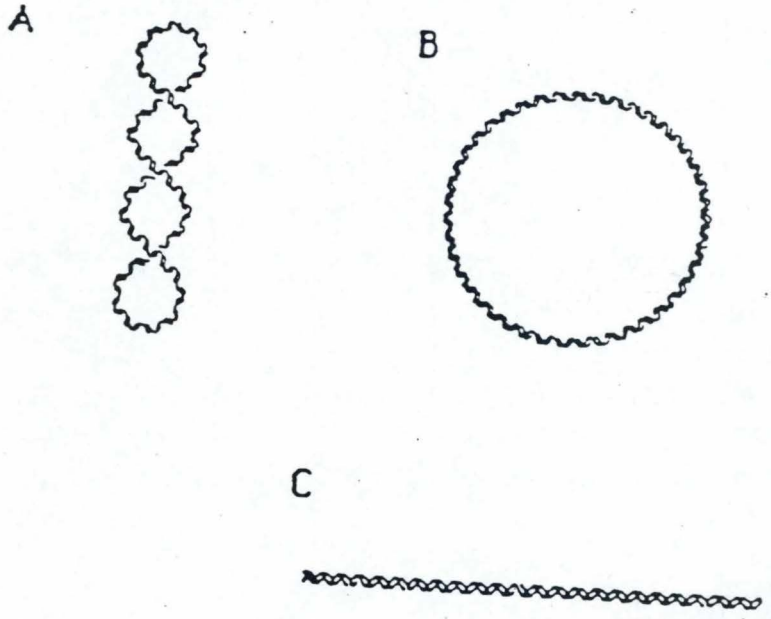


Figure 7: Les trois conformations de l'ADN.
A: CCC
B: OC
C: OL

refermer sur elle-même ou si la ligation implique des bouts francs, la stoechiométrie pourra atteindre 1:10.

4.2) Electrophorèse analytique sur gel d'agarose.

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée pour séparer des fragments d'ADN, estimer leur taille, leur concentration et l'état de pureté d'une préparation (absence de protéines et d'ARN).

4.2.1) Critères de séparation des fragments d'ADN.

Une molécule chargée, placée dans un champ électrophorétique, migre vers l'électrode de signe opposé à sa charge. L'ADN étant chargé négativement (groupements phosphate), il se déplace vers l'anode.
Différents paramètres influencent la migration de l'ADN dans le champ. Il s'agit de la conformation, du poids moléculaire (PM), de la concentration en agarose du gel et de l'ampérage appliqué à la cuve d'électrophorèse.
Les molécules d'ADN existent sous trois conformations différentes. La conformation la plus abondante est la forme CCC (Covalently Closed Circular). Si cette forme présente un nick (absence de lien phosphodiester) sur un des deux brins, on obtient la conformation OC (Open Circular). Enfin, la forme linéaire présente un nick sur chacun des deux brins, c'est la conformation OL (Open Linear) (**Figure 7**).
La forme CCC migre plus vite que la forme OL qui migre elle-même plus vite que la forme OC.
Les molécules d'ADN migrent à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur PM. Du haut vers le bas, on trouvera donc des fragments de PM de plus en plus petit.
La concentration en agarose (par ex: 0,8-1-2%) est également déterminante pour la mobilité de l'ADN. On peut augmenter cette concentration afin de séparer plus efficacement des fragments de petite taille.
Quand le voltage appliqué à la cuve est faible, la vitesse de migration est linéaire. Elle augmente proportionnellement en fonction du voltage appliqué.

4.2.2) Visualisation de l'ADN sur le gel.

L'ajout de bromure d'éthidium dans le polymère d'agarose, permet à ce celui-ci de s'intercaler entre les bases de l'ADN (**Figure 8**). Lorsque ce composé est excité par des U.V (302 nm), il devient fluorescent.

4.2.3) Estimation de la taille et de la quantité des fragments d'ADN.

La taille et la quantité des fragments peuvent être estimées par leur comparaison avec un marqueur de taille, que l'on fait migrer simultanément, et dont on connaît la taille des fragments présents ainsi que leur quantité (**Figure 9**).

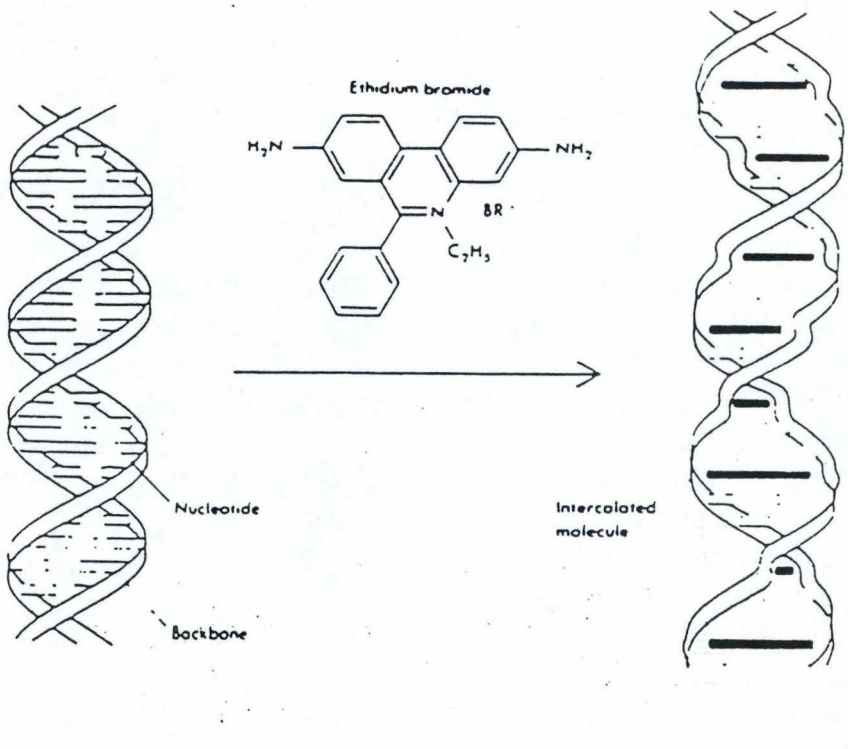


Figure 8: Schéma de l'intercalation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN

4.2.4) Réalisation.

- Dissoudre la quantité appropriée d'agarose dans du tampon TAE 1X en chauffant
- Laisser refroidir à 50°C
- Ajouter le Bromure d'Ethidium (concentration finale 0,5 µg/ml), mélanger
- Couler le gel dans un support en plexiglas et y ajouter un peigne
- Enlever le peigne lorsque le gel est polymérisé
- Placer le gel dans une cuve à électrophorèse et immerger dans du tampon TAE 1X

4.3) Récupération d'ADN inclus dans un gel d'agarose.

4.3.1) Introduction.

Au cours de ce mémoire, deux kits d'extraction d'ADN ont été utilisés : Geneclean II Kit (BIO 101) et Qiaex II. Dans les deux cas, le principe d'extraction est identique : il se base sur la solubilisation de l'agarose, l'absorption des particules d'ADN sur un support en silice et l'élution de cet ADN dans un milieu pauvre en sel.

4.3.2) Geneclean II Kit (BIO 101).

- découper la bande d'ADN du gel d'agarose
- peser cette bande et ajouter 3 volumes de NaI
- laisser 5 min. à une température comprise entre 45°C et 55°C
- vortexer le glassmilk
- ajouter 5 µl de glassmilk

Si la quantité d'ADN à récupérer est supérieure à 5 µg, il est recommandé d'ajouter 1 µl de glassmilk par 0,5 µg d'ADN au dessus de 5 µg

- incuber pendant 5 min. à température ambiante en mélangant régulièrement
- centrifuger quelques secondes à 13000 rpm et décanter
- laver 3 fois le culot avec la solution de New Wash, décanter
- resuspendre le culot dans un volume approprié d'eau distillée
- incuber 5 min. à une température comprise entre 45°C et 55°C
- centrifuger quelques secondes à 13000 rpm
- récupérer le surnageant

Après cela, on estime que 80% de l'ADN à été élué. Pour récupérer davantage, il est conseillé de resuspendre à nouveau le culot dans de l'eau distillée et de recommencer les trois dernières étapes.

4.3.3) Qiaex II.

- extraire la bande d'ADN du gel
- peser l'agarose et ajouter:

pour des fragments d'ADN<100bp : 6 volumes de Buffer QX1
pour des fragments d'ADN>4kb : 3 volumes de Buffer QX1

λ *Hin* d III (48502 bp)	Total de 600ng	pBR322 *Hin* f I (4363 bp)	Total de 1µg
Taille	Concentration	Taille	Concentration
23130 bp	286 ng	1632 bp	374 ng
9416 bp	116 ng	517+506 bp	118+113 ng
6557 bp	81 ng	396 bp	90 ng
4361 bp	53 ng	344 bp	78 ng
2322 bp	28 ng	298 bp	68 ng
2027 bp	25 ng	221+220 bp	50+50 ng
564 bp	7 ng	154 bp	35 ng
(125 bp)	(1,5 ng)	(75 bp)	(17 ng)

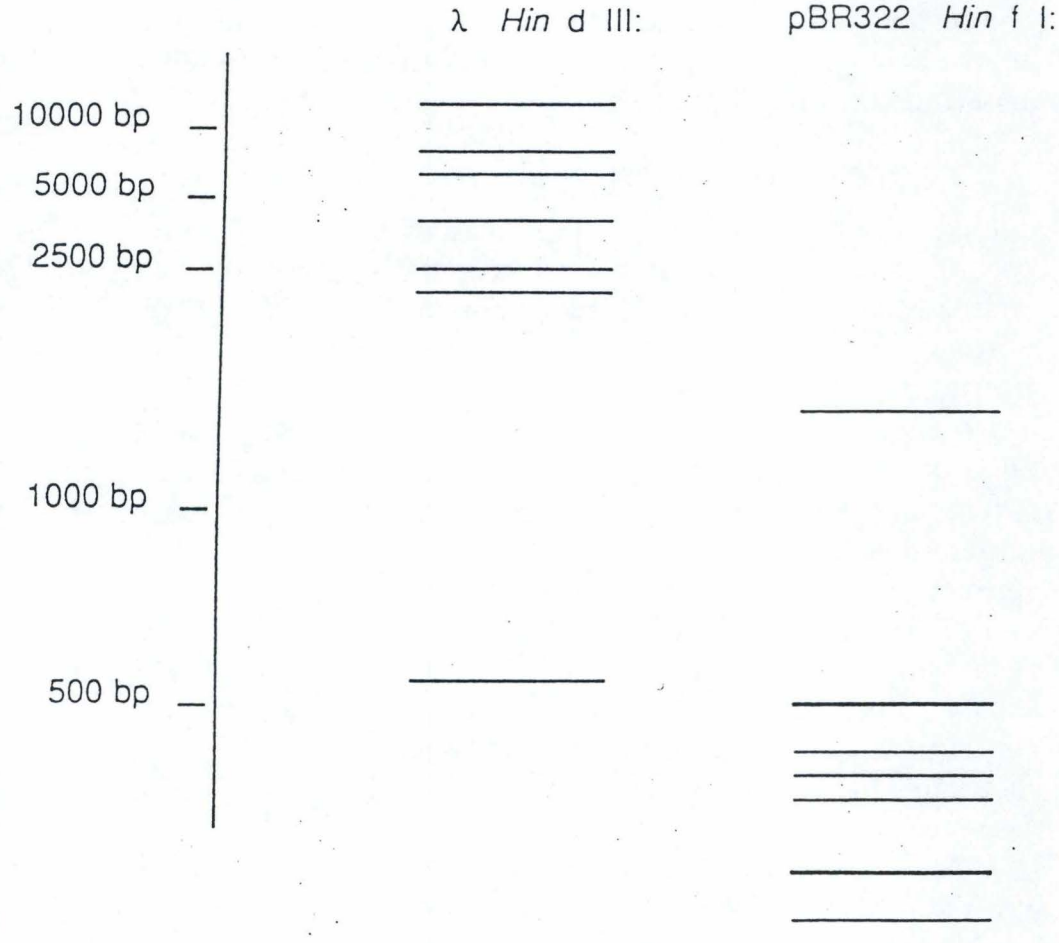


Figure 9: Les marqueurs de taille.

+ 2 volumes d'eau
- vortexer la matrice " Qiaex II " pendant 30 secondes

- ajouter:
  <2 µg d'ADN : 10 µl de matrice
  2-10 µg d'ADN : 30 µl de matrice
  tous les 10 µg supplémentaires : 30 µl de matrice en plus
- incuber 10 min. à 50°C en mélangeant toutes les 2 minutes
- centrifuger 30 secondes à 13000 rpm et décanter
- laver le culot avec 500 µl de Buffer QX1
- centrifuger et décanter
- laver le culot avec 500 µl de Buffer PE
- centrifuger et décanter
- sécher le culot à l'air libre
- resuspendre dans un volume approprié d'eau distillée
- incuber:
  pour des fragments d'ADN<4kb : 5 min. sur table
  pour des fragments d'ADN 4-10kb : 5 min. à 50°C
  pour des fragments d'ADN >10kb : 10 min. à 50°C
- centrifuger quelques secondes à 13000 rpm
- récupérer le surnageant

Une seconde élution peut ici aussi augmenter la quantité d'ADN récupéré.

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

4.4) La transformation.

4.4.1) Transformation dans *E. coli* XL1-Blue.

4.4.1.1) Electroporation.

4.4.1.1.1) Introduction.

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

4.4.1.1.2) Préparation des cellules XL1-Blue électrocompétentes.

- Inoculer une préculture de LB + tétracycline de 5 ml
- Laisser pousser une nuit à 37°C sous agitation
- Inoculer 200 ml de LB + tétracycline avec la préculture
- Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une DO_{540nm} de 0,5-0,8
- Stopper la culture sur glace pendant 30 minutes
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm
- Resuspendre les cellules dans 200 ml d'eau stérile froide

- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm
- Resuspendre les cellules dans 100 ml d'eau stérile froide
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm
- Resuspendre les cellules dans 4 ml de glycérol 10% froid
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 5000 rpm
- Resuspendre les cellules dans 400 ml de glycérol 10% froid
- Aliquoter 100 ml par Eppendorf, conserver les cellules à -80°C jusqu'à leur utilisation

4.4.1.1.3) Electroporation des cellules XL1-Blue.

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

4.4.1.2) Par la technique utilisant le chlorure de calcium.

4.4.1.2.1) Introduction.

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

4.4.1.2.2) Préparation des cellules XL1-Blue $CaCl_2$ compétentes.

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

4.4.1.2.3) Transformation par la technique $CaCl_2$.

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

4.4.1.3) Sélection des transformants.

L'ampicilline est l'antibiotique le plus utilisé et permet la sélection des colonies transformées par un plasmide portant le marqueur de résistance à l'ampicilline. Ce marqueur de résistance code pour la ß-lactamase qui est une enzyme secrétée hors de la cellule et qui est capable de dégrader l'ampicilline.

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

4.5) Préparation d'ADN plasmidique.

4.5.1) Introduction.

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

4.5.2) La minipréparation.

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

4.5.2.1) Culture bactérienne.

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

4.5.2.2) Lyse des cellules.

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

4.5.2.3) Récupération des plasmides.

- Récupérer le surnageant
- Ajouter 720 ml d'Isopropanol tempéré pour précipiter l'ADN plasmidique
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm
- Enlever le surnageant
- Ajouter 200 ml d'Éthanol 70% froid pour laver le culot
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm
- Enlever l'Éthanol
- Sécher au Speedvack
- Resuspendre l'ADN dans de l'eau stérile (50 ml)
- Procéder ensuite à des restrictions diagnostiques des plasmides purifiés afin d'en estimer la quantité ainsi que la nature

4.5.3) La midipréparation.

4.5.3.1) Introduction.

Ce protocole est habituellement utilisé pour obtenir en grande quantité un plasmide. Si ce plasmide est le fruit d'une construction, il aura au préalable été identifié après une minipréparation. Contrairement à la minipréparation qui nous fournit un matériel plasmidique principalement consacré au diagnostique, la midipréparation permet d'obtenir une quantitié suffisante d'ADN pour permettre d'envisager de nouvelles constructions. Il est dès lors important que l'ADN plasmidique obtenu par la midipréparation soit non seulement en quantité suffisante mais également relativement pur. C'est à cette fin que les colonnes AX100 et AX500 de Nucléobond sont utilisées.

4.5.3.2) Culture.

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

4.5.3.3) Lyse des cellules.

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

4.5.3.4) Mise sur colonne.

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

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

4.5.4) La maxipréparation.

4.5.4.1) Introduction.

Cette méthode n'est utilisée que lorsque l'on désire récupérer une quantité très importante d'ADN. Cette quantité pouvant aller jusqu'à plusieurs mg d'ADN plasmidique.

4.5.4.2) Préparation de l'échantillon.

- Lancer une culture de 400 ml LB (+ampicilline) à partir d'une colonie
- Centrifugation 10 min à 3500 rpm (22-25°C); décanter
- Resuspendre avec 15 ml de *Cell Resuspension Solution*
- Ajouter 15 ml de *Cell Lysis Solution* ; mélanger doucement
  (la solution doit être claire et visqueuse)
- Ajouter 15 ml de *Neutralization Solution*; mélanger tout de suite et doucement
- Centrifugation 15 min à 10.000 rpm (22-25°C)
- Récupérer le surnageant en filtrant au travers d'un papier filtre
  -> on récupère dans un cylindre gradué (mesure du vol.)
- Transférer le surnageant dans une bouteille à centrifuger
- Ajouter 0,5 volume d'isopropanol et mélanger (pas au vortex)
- Centrifuger 15 min à 10.000 rpm (22-25°C); décanter
- Resuspendre le culot dans 2 ml de *TE buffer*

4.5.4.3) Purification.

- Ajouter 10 ml de Wizard Maxipreps DNA Purification Resin
- Brancher la colonne sur une pompe
- Transférer le DNA/résine sur la colonne; aspirer
- Ajouter 13 ml de Colum Wash Solution dans ce qui contenait le DNA et mettre sur colonne; aspirer
- Ajouter 12 ml de Colum Wash Solution; aspirer

- Ajouter 5 ml d'éthanol 80 %; aspirer pendant 1 min
- Insérer la colonne dans un tube de 50 ml
- Centrifuger 5 min à 2500 rpm (centrifugation horizontale)
- Placer la colonne sur la pompe pendant 5 min
- Replacer la colonne sur un tube 50 ml
- Mettre 1,5 ml d'eau à 65-70°C; attendre 1 min
- Centrifuger 5 min à 2500 rpm ; ceci élue l'ADN. C'est la denière étape.

4.6) Purification et préparation de l'ADN.

4.6.1) Extraction au phénol-chloroforme.

Cette opération a pour objet d'enlever les sels et les protéines. On l'utilise notamment entre deux restrictions pour lesquelles les tampons d'incubation des enzymes sont différents.

- Porter le volume à 100 µl avec de l'eau
- Ajouter un volume de phénol / TE, ou phénol / chloroforme
- Vortexer une minute
- Centrifuger 2 à 3 minutes à 13000 rpm (Janetzki)
- Prendre la phase aqueuse supérieure et la placer dans un nouvel Eppendorf
- Ajouter 500 µl d'éther saturé en eau
- Centifuger quelques secondes
- Eliminer la phase supérieure
- Ajouter: -2,5 volumes d'éthanol 100% froid
  -0,1 volume de NaAc 3M pH 5,2
- Incuber 15 minutes à -80°C
- Culoter l'ADN en centrifugeant 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki)
- Décanter
- Laver le culot à l'éthanol 90%
- Sécher 10 minutes sous vide puis resuspendre dans un volume approprié d'eau stérile

4.6.2) Préparation d'ADN génomique de levure.

On peut via ce protocole préparer de l'ADN génomique de levure en vue de la réalisation d'un Southern.

- Centrifuger une culture de 100 ml en phase stationnaire 5 minutes à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA)
- Resuspendre les cellules dans 10 ml de tampon SCEb et ajouter 2 mg de Zymolyase 1000 00 diluée dans du glycérol 60 %
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Centrifuger les sphéroblastes 5 minutes à 5000 rpm (rotor Sorvall SS34) puis les resuspendre dans 10 ml de solution de lyse
- Placer 15 minutes à 70°C
- Ajouter 1 ml d'acétate de potassium 5 M et placer 30 minutes sur glace
- Centrifuger 10 minutes à 10000 rpm (rotor Sorvall SS34)

- Extraire le surnageant au phénol-Chloroforme puis centrifuger 30 minutes à 13 000 rpm à 20°C (rotor Sorvall SS34). Répéter l'opération jusqu'à ce que l'interface soit propre
- Prélever la phase aqueuse avec précaution et ajouter 2 volumes d'éthanol absolu. Il se forme alors un écheveau d'ADN que l'on peut récupérer avec un cône de pipette
- Rincer l'ADN à l'éthanol 70 %
- Resuspendre l'ADN dans 1 ml de TE
- Ajouter 250 µl de RNAse à 10 mg/ml et incuber 30 minutes à 37°C
- Ajouter 312 µl de protéinase K à 2 mg/ml et incuber 30 minutes à 37°C
- Extraire au phénol/chloroforme puis centrifuger 15 minutes à 13000 rpm (rotor Sorvall SS 34)
- Ajouter avec précaution 2 volumes d'éthanol absolu à la phase aqueuse. De nouveau il se forme un écheveau d'ADN que l'on peut récupérer avec le cône d'une pipette
- Rincer l'ADN à l'éthanol 70 %
- Laisser légèrement sécher l'ADN et le resuspendre dans de l'eau ou du TE

4.7) La Polymerase Chain Reaction : PCR.

4.7.1) Introduction.

La PCR est un processus rapide d'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN spécifique.
Ce processus exige que l'on connaisse quelque information sur des séquences bordant un locus désiré (ces séquences peuvent être, par exemple, tirées d'études de clonage préliminaires). Ces séquences servent à désigner deux amorces oligonucléotidiques. Ces amorces vont aller s'hybrider au niveau de l'ADN cible, sur des brins opposés, orientés de sorte que leurs extrémités 3'-hydroxyle se font face.
L'ADN total est dénaturé par chauffage en présence d'un excès des deux amorces. En refroidissant, l'ADN cible se réassociera ainsi de préférence avec les amorces.
Ensuite vient l'étape d'élongation de l'amorce par synthèse d'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', en présence de nucléotides. Cette élongation est catalysée par une polymérase thermostable, isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, la Taq polymerase.
Après un cycle de synthèse, le mélange est de nouveau réchauffé pour dissocier l'ADN cible des brins néosynthétisés. Ce mélange est ensuite refroidi pour réassocier l'ADN cible (les brins néosynthétisés du cycle précédent deviennent à leur tour ADN cible) avec l'excès d'amorces en présence. Puis elles sont à nouveau soumises à l'élongation.
Le cycle est répété un grand nombre de fois (aux alentours de 30).
Le nombre total de brins d'ADN est, en théorie, doublé à chaque cycle. A partir du second cycle, le nombre de brins d'ADN dont les extrémités 5' et 3' sont l'une et l'autre définies par les amorces s'accroît en progression géométrique, tandis que le nombre de brins d'ADN portant des séquences extérieures aux amorces s'accroît, lui, en progression arithmétique. Il en

résulte donc une amplification préférentielle de l'ADN bordé par les deux amorces. Au terme de la trentaine de cycles PCR, la séquence située entre les deux amorces représente la plus grosse partie de l'ADN du mélange réactionnel.

4.7.2) Protocole.

Mettre en présence, dans un Eppendorf, pour une réaction dans 100 µl :
- 4 ml $MgCl_2$ (50 mM)
- 10 ml Tampon PCR (10X)
- 2 ml dNTP Mix (10 mM chaque)
- 5 ml détergent
- 1 ml primer 1 (50 pmol/ml)
- 1 ml primer 2 (50 pmol/ml)
- 75,6 ml H_2O
- 0,4 ml Taq (2,5 U/ml)
- 1 ml ADN à amplifier

-Réaliser les variations de températures suivantes :
- 95°C pendant 4 minutes
- 35 X :

95°C	pendant	1	minute	15	secondes
55°C	pendant	1	minute	15	secondes
72°C	pendant	3	minutes		

- 72°C pendant 10 minutes

4.7.3) Remarques générales.

Une bonne PCR est le fruit d'une optimisation de différents paramètres. Pour améliorer soit le rendement, soit la spécificité de la PCR, il faut trouver le bon compromis entre :
- la température d'hybridation des primers
- le nombre de cycles
- la longueur des primers (en général, on ulilise de 17-mères)
- les concentrations en $MgCl_2$ et autres composants organiques des tampons
- le temps d'élongation
- les concentrations en template, en amorces, en enzyme, en dNTP,...

4.8) Le séquençage.

4.8.1) Le séquençage manuel.

($T7^{Sequencing}$™ kit Pharmacia.27-1682-01)

4.8.1.1) Principe du sequençage.

La méthode utilisée est celle des terminateurs de chaînes. (Sanger *et al.*,1977).

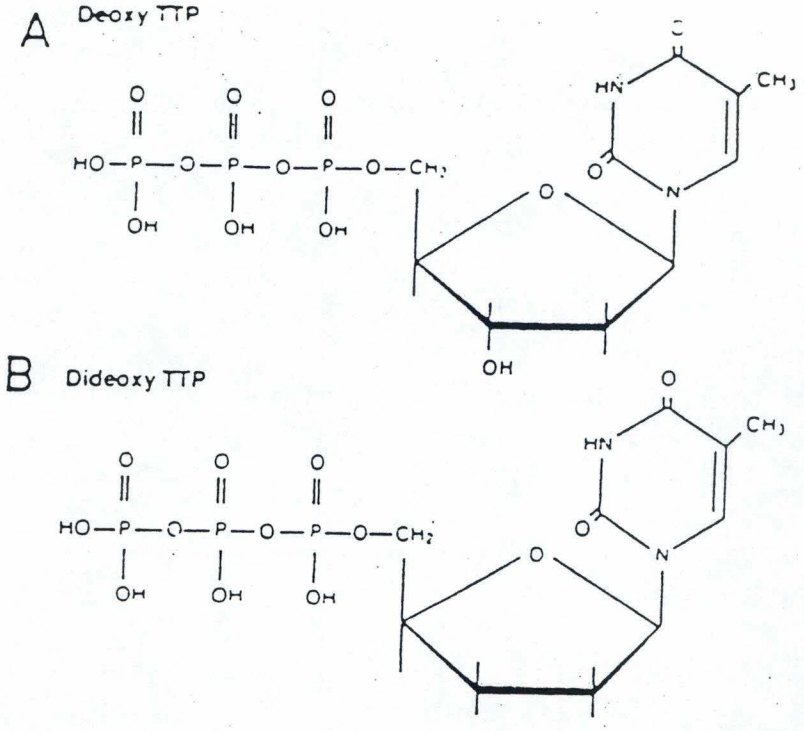


Figure 10: A. Structure d'un déoxyribonucléotide.
B. Structure d'un didéoxyribonucléotide.

Cette méthode consiste à faire synthétiser par une polymérase un brin complémentaire à celui que l'on désire séquencer. Cette polymérase requiert une matrice simple brin et une amorce lui fournissant un groupement 3'-OH libre. Le fragment à séquencer est cloné dans un plasmide .

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

L'incorporation au hasard dans la chaîne naissante d'un didéoxyribonucléotide (ddNTP), un analogue de déoxyribonucléotide ne possédant pas de groupements hydroxyle en 3' (**Figure 10**), interrompt l'élongation. Statistiquement la terminaison se produira au moins une fois en chaque point (**Figure 11**).

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

Chacun des quatre tubes réactionnels contient en fin de réaction une population de fragments de taille variable. La taille de ces fragments permet de déterminer la position à laquelle s'est incorporé le ddNTP dans la chaîne en élongation et donc la position de la base complémentaire dans le brin que l'on a séquencé (**Figures 11 et 12**).

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

4.8.1.2) Réactions de séquençage.

4.8.1.2.1) Dénaturation.

- Utiliser 4 mg d'ADN
- Ajouter x ml eau de façon à ce que volume d'ADN + volume eau = 8µl.
- Ajouter 2 ml NaOH 2N
- Incuber 10 minutes température ambiante
- Ajouter 3 µl NaAc 3M PH 4.5
- Ajouter 7 µl eau
- Ajouter 60 µl EtOH 100 %
- Incuber 10 minutes à - 80° C
- Centrifuger 20 minutes à 15000 rpm
- Retirer l'éthanol 100 % et ajouter 60 µl d'EtOH 70 %
- Centrifuger 10 minutes
- Retirer l'éthanol et sécher

4.8.1.2.2) Annealing (Hybridation).

- Ajouter -10 µl d'eau sur l'ADN
  - 2 µl oligo (10 ng/µl) primers utilisés
  - 2 µl annealing buffer
- Incuber 20 minutes à 37° C puis 15 minutes à température ambiante
- Préparer 2,5 µl des ddNTP A, C, G, T par Eppendorf

4.8.1.2.3) Labelling (marquage radioactif).

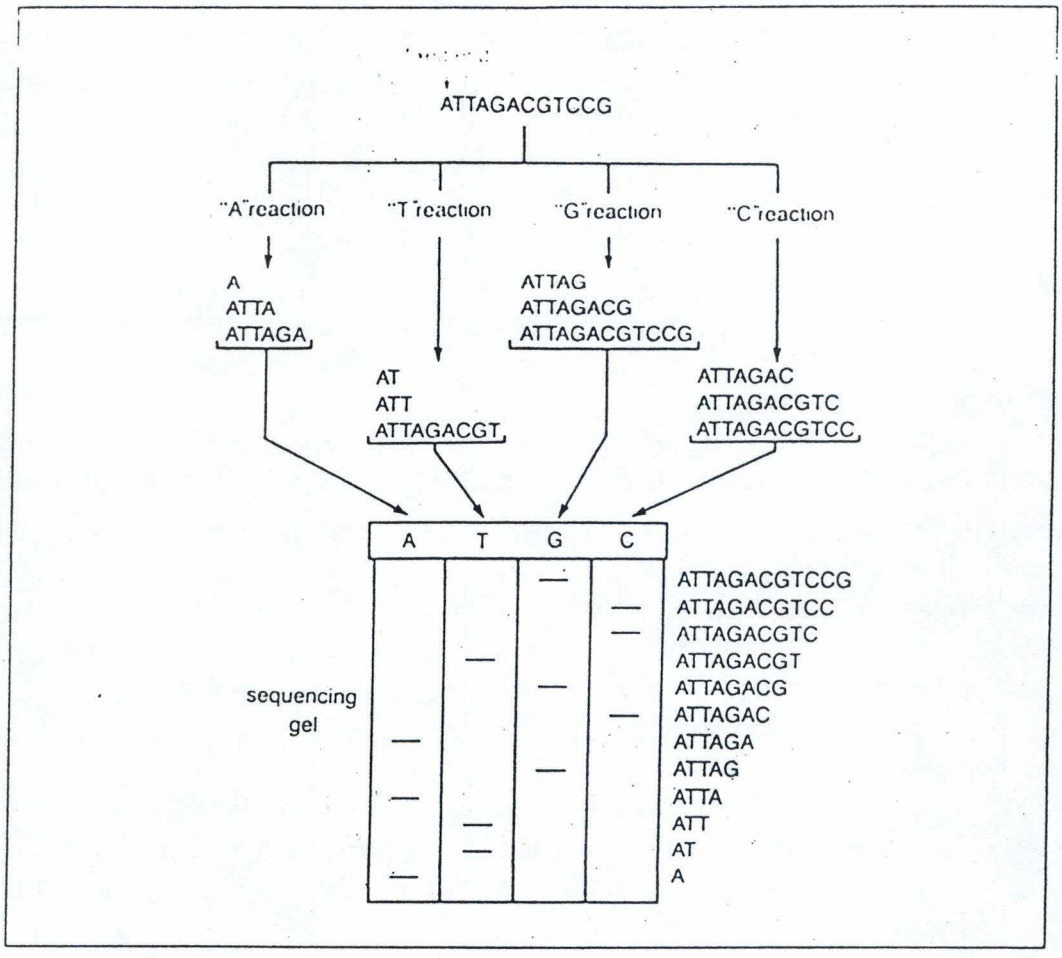


Figure 11: Stratégie générale du séquençage.
Pour séquencer un fragment d'ADN, un set d'oligonucléotides simples brin marqués radioactivement est généré dans quatre réactions distinctes. Dans chacune des quatre réactions, les oligonucléotides ont une extêmité fixe et l'autre qui se termine de façon séquentielle à respectivement chaque A, C, G et T. Les produits de chaque réaction sont fractionnés par éléctrophorèse sur les lignes adjacentes d'un gel de polyacrylamide. Après autoradiographie, la séquence de l'ADN peut être lue directement sur le gel.

- Ajouter à la réaction d'annealing:
  - 3 µl labelling buffer
  - 1 µl ^{35}S de dATP
  - 2 µl T 7 (dilution 5 fois dans enzyme buffer)
- Quick spin
- Incuber 5 minutes température ambiante
- Ajouter 4 à 5 µl de la solution labelling dans chaque Eppendorfs contenant les différents ddNTP
- Incuber 5 minutes à 37° C
- Ajouter 5 µl de solution stop
- Eventuellement stocker à - 20°C

4.8.1.2.4) Préparation du gel.

Mélanger:
- 42 gr d'urée
- 45 ml d'eau
- 10 ml de TBE 10 X
- 15 ml de solution de polyacrylamide

- Après dissolution de l'urée, filtrer au Buchner (filtre Millipore SA 78)
- Ajouter:
  - 600 µl de persulfate
  - 30 µl de Temed

4.8.1.2.5) Fabrication du gel de sequençage.

- Nettoyer les plaques avec eau de ville - eau distillée - ethanol
- "Coater" la petite plaque avec 10 ml de dimethyl dichloro silane (silicone)
- Placer les spacers
- Refermer les plaques sceller au tape jaune (s'aider des pinces)
- Couler le gel en oblique mais le laisser polymeriser à l'horizontal
- Faire une ligne de base avec deux peignes retournés
- Préchauffer le gel (15 minutes si utilisé tout de suite ou 30 minutes s'il a été mis à 4°C la nuit)

4.8.1.2.6) Mise sur gel.

- Mettre les bases 3 minutes à 90° pour les dénaturer avant de les charger sur le gel.
- Laisser migrer 3 minutes après chaques chargement de quatre bases pour laisser pénétrer
- Laisser migrer le temps voulu

4.8.1.2.7) Après la migration.

- Retire la petite plaque de façon à ce que le gel reste sur la grande plaque.
- Mettre solution de fixateur sur le gel pendant 10 minutes
- Mettre un buvard whatman (3MM Chr) sur le gel afin que celui-ci se fixe dessus.
- Recouvrir le gel transféré sur le buvard avec un saran
- Sécher sous vide à 80°C pendant une heure et demie.
- Mettre le gel en cassette avec un film d'autoradiographie pendant 12 heures

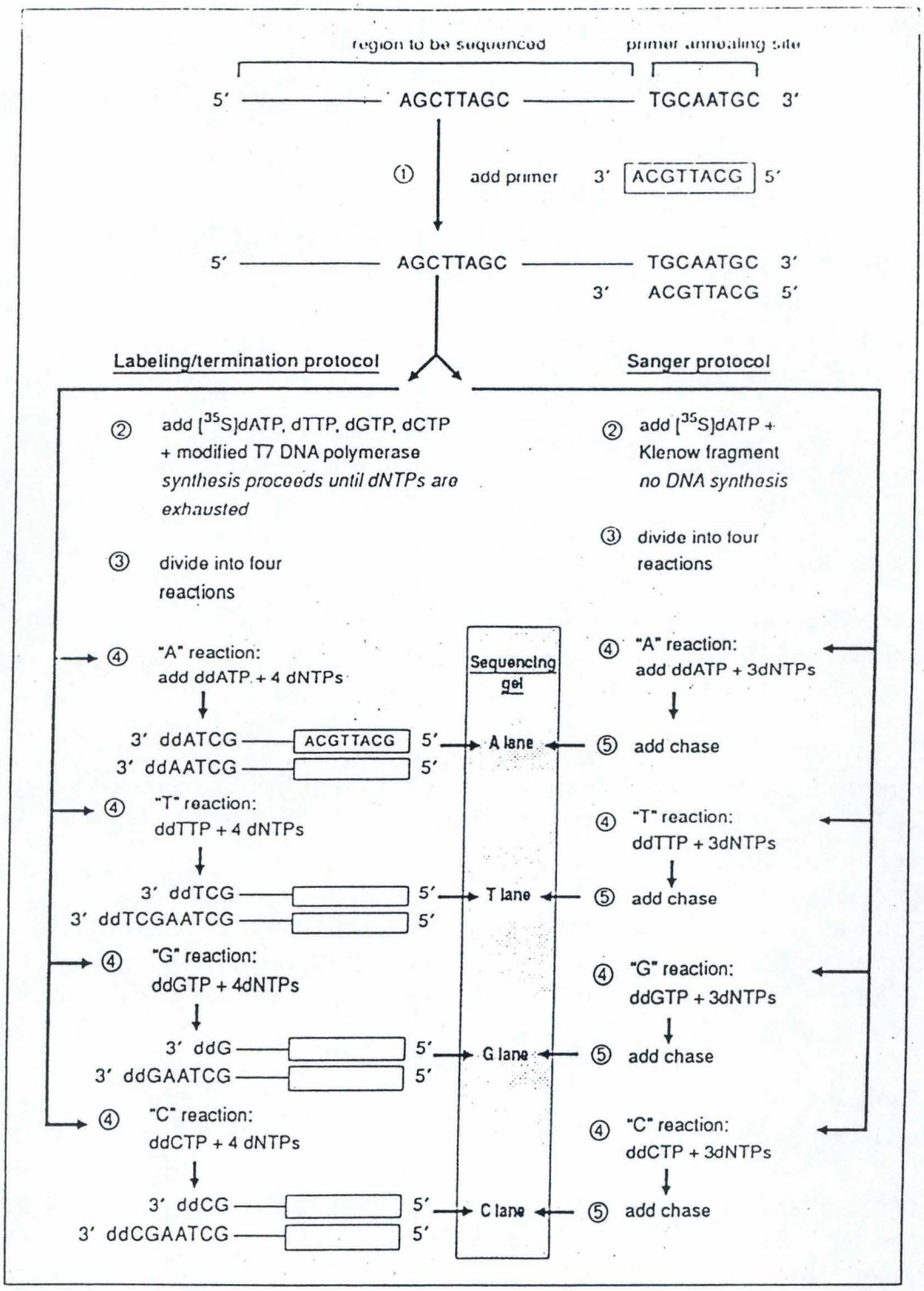


Figure 12: Méthode de séquençage par les didéoxynucléotides.
Un fragment d'ADN simple brin est hybridé avec un primer oligonucléotidique pour la polymérisation (étape 1). Les fragments Klenow et les dATP marqués radioactivement sont ajoutés (étape 2). La réaction est divisée en quatre aliquots (étape 3) et les 3 autres dNTPs ainsi que soit les ddATP, ddTTP ou les ddCTP sont ajoutés (étape 4). La synthèse de l'ADN se poursuit jusqu'à l'incorporation d'un ddNTP.

- Révéler le film pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau.
- Fixer le film pendant 15 minutes.
- Rincer à l'eau et sécher.

4.8.2) Le séquençage automatique.

4.8.2.1) Introduction.

Le séquençage automatique, comme le séquençage manuel, est basé sur la méthode des terminateurs de chaîne décrite par Sanger (Sanger & *al.*, 1977). Dans le cas du séquençage automatique, les nucléotides terminateurs de chaîne (ou "dye-terminators") sont marqués par des molécules fluorescentes qui émettent à une longueur d'onde précise lorsqu'on les excite avec un laser. Chacune des quatre bases (A, C, G, T) est marquée par une molécule différente.

Principe de la réaction de séquençage : il s'agit de réaliser une réaction PCR ("Cycle sequencing"), avec un seul primer, pour l'incorporation des dye-terminators. Les étapes successives de dénaturation, d'hybridation et d'extension ont pour résultat l'amplification linéaire (et non exponentielle, comme c'est le cas lorsqu'on utilise deux primers) des produits d'extension. Ces produits sont ensuite purifiés (par précipitation à l'éthanol) afin d'éliminer les terminateurs en excès, puis chargés sur un gel de polyacrylamide. La lecture de ce gel est ensuite exécutée par un logiciel afin de détecter les quatre couleurs correspondant à chaque base.
Rem : alors que le séquençage manuel nécessite que la réaction se face dans quatre tubes différents, le séquençage automatique, lui, ne requiert qu'un seul tube. Les quatre couleurs (et donc les quatre bases) sont donc détectées dans une seule piste de gel.
Le séquenceur utilisé est un produit de la firme Perkin-Elmer (ABI PRISM^{TM} 377 DNA Sequencer); il permet de lire en moyenne 500 nucléotides avec une précision de plus de 95%.

4.8.2.2) Protocole.

4.8.2.2.1) La réaction de Cycle Sequencing.

-la réaction se fait dans un volume de 20 ml :

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

-porter à 20 ml avec de l'eau stérile
-ajouter environ 30 ml d'huile minérale dans le tube
-placer le tube dans un appareil PCR et réaliser les cycles suivants :

1°) 96°C pendant 30 secondes
2°) 50°C pendant 15 secondes
3°) 60°C pendant 4 minutes
4°) répéter 25 fois les 3 premières étapes
5°) conserver le produit de la réaction à 4°C

Terminator Ready Reaction Mix : -A-dye terminator
-T-dye terminator
-C-dye terminator
-G-dye terminator
-dGTP, dATP, dCTP, dTTP
-Tris-HCl pH 9
-$MgCl_2$
-Pyrophosphatase thermostable
-AmpliTAq DNA Polymérase, FS

4.8.2.2.2) Purification des produits de la réaction.

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

Tampon de chargement : -formamide désionisée : 250 ml
-EDTA-Bleu dextran : 50 ml

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

4.9) Southern blot.

Le Southern blot est le transfert de fragments d'ADN d'un gel d'électrophorèse ou ils ont été séparés vers un filtre de nylon sur lequel ils seront fixés.
Ces fragments pourront par la suite être hybridés avec une sonde en vue d'analyser leur nature.

4.9.1) Préparation du gel d'agarose au transfert de l'ADN.

Placer le gel dans les bains suivant
- 15 minutes dans HCl 0.25 M
- 2 X 15 minutes dans : du tampon de dénaturation
du tampon de neutralisation
du SSC 20 X

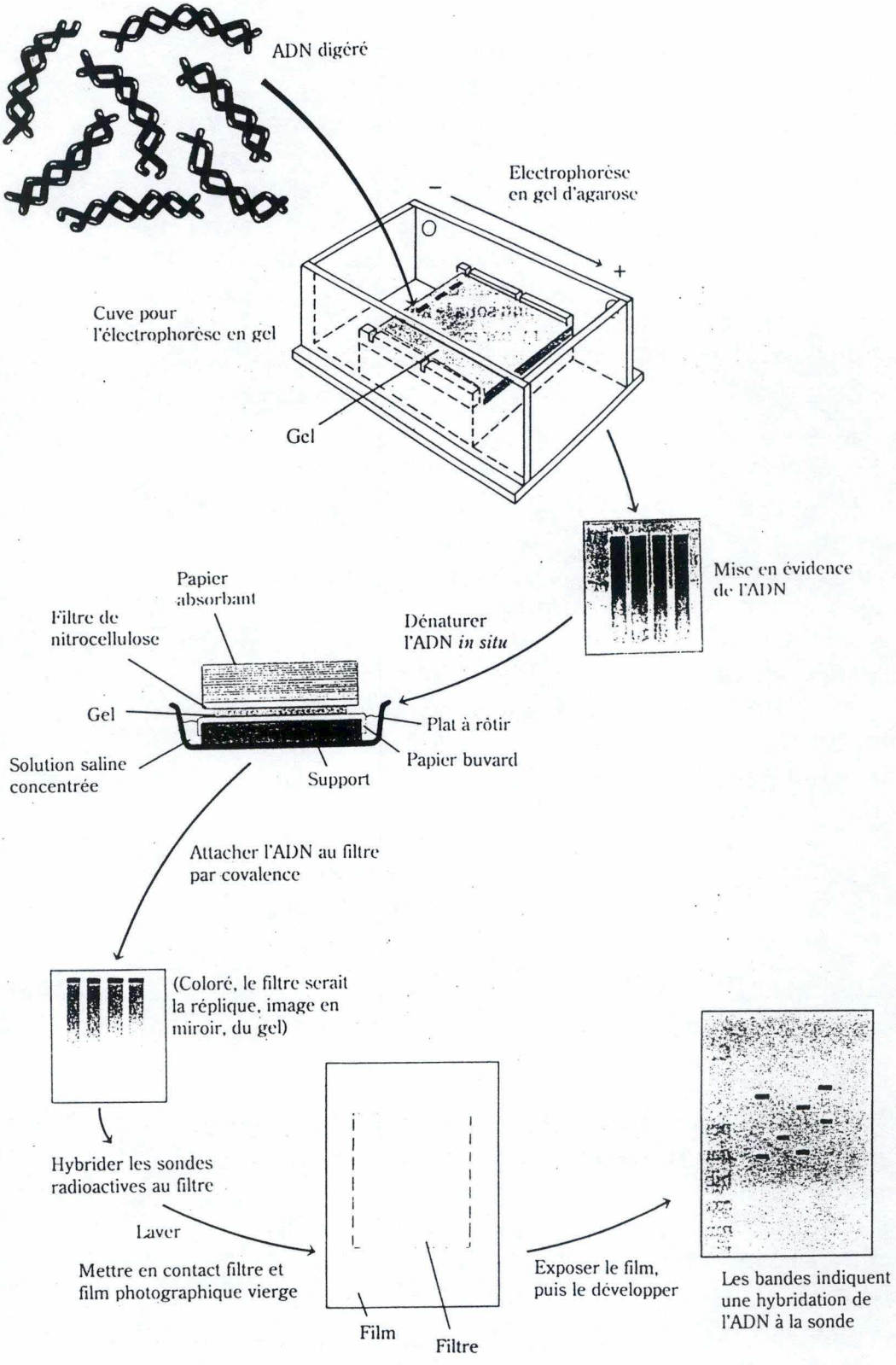


Figure 13: Schéma du montage pour le transfert d'ADN sur la membrane en nylon (Southern blot).

4.9.2) Montage pour le transfert (**Figure 13**).

Réaliser le montage suivant pour que l'ADN soit transféré du gel vers la membrane de nitrocellulose par capillarité.

- Sur une plaque de verre servant de support, déposer un papier whatman 3MM imbibé de SSC 20X. Ce papier sert de mèche puisqu'il est trempé dans un bain contenant du SSC 20X. Placer le gel à l'envers bien à plat sur le papier
- Déposer une feuille de nylon (Hybond-N, Amersham) aux dimensions du gel sur celui-ci
- Mettre quelques feuilles de papier Whatman 3MM sur la membrane ainsi que plusieurs couches de papier buvard
- Placer sur le tout une plaque de verre sur laquelle repose un poids de 1 Kg
- Laisser transférer toute la nuit à température ambiante
- Récupérer la membrane et vérifier, sur le gel le transfert de l'ADN aux ultra-violets
- Fixer l'ADN en mettant la membrane 10 minutes à 80°C

4.9.3) Préhybridation.

- Placer le filtre dans un récipient contenant:
  - 10 ml de solution de Denhart's 50X
  - 10 ml de SSC 20 X
  - 10 ml d'ADN de thymus de veau (2.3 mg/ml)
  - 0.5 ml de SDS 10 %
- Porter le volume à 50 ml avec de l'eau stérile
- Incuber pendant deux heure dans un bain à 68°C

4.9.4) Synthèse de la sonde radioactive (**Random prime DNA labelling system**).

- Dénaturer 25 ng d'ADN dissous dans 5-20 µl d'eau distillée en le chauffant pendant 5 minutes à 100°C
- Placer sur glace pour éviter la renaturation
- Ajouter successivement:
  - 2 µl dATP solution
  - 2 µl dGTP solution
  - 2 µl dTTP solution
  - 15 µl de random primer buffer mixture
  - 5 µl de [a-32P] dCTP, 3000 Ci/mMol, 10µCi/µl
- Porter le volume à 49 µl avec de l'eau distillée
- Mélanger rapidement
- Ajouter 1 µl de Klenow, mélanger et centrifuger brièvement
- Incuber une heure à 25°C et ajouter 5 µl de solution STOP

4.9.5) Hybridation.

- Dénaturer la sonde en la mettant 10 minutes à 100°C
- Ajouter la sonde au récipient contenant la membrane
- Sceller le récipient
- Incuber une nuit à 68°C

4.9.6) Lavages.

- Laver le filtre deux fois 10 minutes dans une solution SSC 2X et SDS 0.1% à température ambiante
- Si la membrane est encore fortement radioactive
- Laver de nouveau deux fois 10 minutes dans une solution SSC 0.2X et SDS 0.1%
- Si la membrane est encore fortement radioactive on peut faire de nouveaux lavage à la température de 68°C

4.9.7) Révélation.

- Placer le filtre en cassette avec un film d'autoradiographie
- Placer 4 heures à -80°C
- Révéler le film pendant 5 minutes
- Fixer le film pendant 5 minutes
- Rincer à l'eau et sécher

4.10) Hybridation sur colonies.

Des colonies sur boîtes sont transférées sur un filtre de nylon rond. Le filtre est ensuite traité afin de lyser les cellules et de fixer leur ADN.
Le filtre portant l'ADN des cellules est hybridé avec une sonde afin de repérer les cellules porteuses de la séquence d'intérêt.

4.10.1) Transfert des colonies sur filtre.

- Etaler sur boîtes LB+ ampicilline les cellules d' *E.coli* transformées par les plasmides de la banque
- Incuber une journée à 37°C
- Transférer les colonies sur un filtre de Nylon
- Au moyen d'une aiguille stérilisée à la flamme, faire 3 trous dans le filtre et indiquer leurs positions relatives sur la boîte afin de pouvoir orienter celui-ci
- Poser le filtre sur une boîte LB + Amp colonies et incuber pendant 3-4h

4.10.2) Lyse des cellules.

- Déposer le filtre sur une feuille de papier imbibée de solution de dénaturation et laisser 7 minutes
- Transférer sur une feuille imbibée de solution de neutralisation et laisser 7 minutes
- Transférer sur une feuille imbibée de SSC 20 % et laisser 3 minutes
- Mettre une feuille de papier Whatman sur le filtre et passer avec un rouleau pour ôter les débris cellulaires (l'ADN reste fixé sur le filtre)
- Mettre le filtre 10 minutes à 80°C

4.10.3) Préhybridation, hybridation, lavages et révélation.

Toutes ces étapes sont identiques à celles décrites pour le Southern et ne sont donc plus décrites.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Bailey R.B. et Woodward A. (1984) *Mol. Gen. Genet.* **193**: 507-512.

Bhat P.J., Oh D. et Hopper, J.E. (1990) *Genetics* **125**: 281-291.

Bianchi M.M., Falcone C., Chen X.J., Wésolowski-Louvel M., Frontali L. et Fukuhara H. (1987) *Curr. Genet.* **12**: 185-192.

Breunig K.D. (1989) *Mol. Gen. Genet.* **216**: 422-427.

Breunig K.D. et Kuger P. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4400-4406.

Carlson M. (1987) *J. Bacteriol.* **169**: 4873-4877.

Carlson M. et Botstein D. (1982) *Cell* **28**: 145-154.

Carlson M., Osmond B.C., Neigeborn L. et Botstein D. (1984). *Genetics* **107**: 19-32.

Cassart J.-P., Delcour J. et Vandenhaute J. (1993) *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **101**: B29.

Cassart J.-P., Östling J., Ronne H. et Vandenhaute J., soumis.

Celenza J.L. et Carlson M. (1986) *Science* **233**: 1175-1180.

Celenza J.L., Eng F.J. et Carlson M. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5045-5054.

Chang X.-J. et Dickson R.C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 16696-16703.

Chen X.J., Saliola M., Falcone C., Bianchi M.M. et Fukuhara H. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**: 4471-4481.

Cooper J.P., Roth S.Y. et Simpson R.T. (1994) *Genes Dev.* **8**: 1400-1410.

Depiereux E. et Feytmans E. (1992) *Cabios* **8**: 501-509.

Dickson R.C., Gerardot C.J. et Martin A.K. (1990) *Nucl. Acids. Res.* **18**: 5213-5217.

Dickson R.C. et Markin J.S. (1978) *Cell* **15**: 123-130.

Dickson R.C. et Markin J.S. (1980) *J. Bactériol.* **142**: 777-785.

Entian K.D. et Frölich K.U. (1984) *J. Bacteriol.* **158**: 29-35.

Entian K.D. et Zimmermann F.K. (1982) *J. Bacteriol.* **151**: 1123-1128.

Flick J.S. et Johnston M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4757-4769.

Gancedo J.M. (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**: 297-313.

Georis I. (1995) Mémoire de Licence en Sciences Biologiques. FUNDP Namur.

Griggs W.D. et Johnston M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8597-8601.

Herman A.I. (1963) Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, Madison.

Herman A.I. et Halvorson H.O. (1963) *J. Bacteriol.* **85**: 901-910.

Herschbach B.M. et Johnson A.D. (1993). *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**: 479-509.

Hirano T., Kinoshita N., Marikawa K. et Yanagida M. (1990) *Cell* **60**: 319-328.

Jean-Jean O., Cassan M. et Rousset J.-P. (1993) *Méd./Sci.* **9**: I-IX.

Kozak M. (1986) *Cell* **44**: 283-292.

Kozak M. (1981) *Nucl. Acids Res.* **9**: 5233-5250.

Kuzhandaivelu N., Jones W.K., Martin A.K. et Dickson R.C. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1924-1931.

Lacy L.R. et Dickson R.C. (1981) *Mol. Cell. Biol.* **1**: 629-634.

Laloux O., Cassart J.-P., Delcour J. et Vandenhaute J. (1991) *FEBS Lett.* **289**: 64-68.

Lamphier M.S. et Ptashne M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5922-5926.

Laurent B.C., Treitel M.A. et Carlson M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2687-2691.

de Louverncourt L., Fukuhara H., Heslot H. et Wésolowski M. (1983) *J. Bactériol.* **154**: 737-742.

Ma H., Bloom L.M., Walsh C.T. et Botstein D. (1989) *Mol. Cell. Biol.* : 5630-5642.

Marshall-Carlson L. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1105-1115.

Matsumoto K., Uno I., Ishikawa T. et Oshima Y. (1983) *J. Bacteriol.* **156**: 898-900.

Meyer J. (1993) PhD Thesis. Düsseldorf : Heinrich-Heine-Universität.

Meyer J., Walker-Jonah A. et Hollenberg C.P. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5454-5461.

Nehlin J.O., Carlberg M. et Ronne H. (1991) *EMBO J.* **10**: 3373-3377.

Nehlin J.O. et Ronne H. (1990) *Embo J.* **9**:2891-2898.

Neigeborn L. et Carlson M. (1987) *Genetics* **112**: 741-753.

Östling J., Carlsberg M. et Ronne H. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**: 753-761.

Pan T. et Coleman J.E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2077-2081.

Poch O., L'Hôte H., Dallery V. Bebeaux F. Fleer R. et Sodoyer R. (1992) *Gene* **118**: 55-63.

Reddy V.A. et Maley F. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 10817-10820.

Riley M.I., Hopper J.E., Johnston S.A. et Dickson R.C. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**: 780-786.

Riley M.I. et Dickson R.C. (1984) *J. Bactériol.* **158**: 705-712.

Ronne H. (1995). *Trends Genet.* **11**: 12-17.

Rouwenhorst R.J., Ritmeester W.S., Scheffers W.A. et Van Dijken J.P. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3329-3336.

Salmeron J.M. Jr et Johnston S.A. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**: 7767-7781.

Salmeron J.M. Jr, Langdon S.D. et Johnston S.A. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2950-2956.

Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 5463-5467.

Sarokin et Carlson, 1986)

Sikorski R.S., Boguski M.S., Goebl M. et Hieter P. (1990) *Cell* **60**: 307-317.

Schüller H.J. et Entian K.D. (1991) *J. Bacteriol.* **173**: 2045-2052.

Schultz J., Marshall-Carlson L. et Carlson M. (1990). *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4744-4756.

Sheetz R.M. et Dickson R.C. (1980) *Genetics* **95**: 877-890.

Sheetz R.M. et Dickson R.C. (1981) *Genetics* **98**: 729-745.

Sreekrishna K. et Dickson R.C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7909-7913.

Thomas B.J. et Rothstein R.J. (1989) *Cell* **56**: 619-630.

Treitel M.A. et Carlson M. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3132-3136.

Trumbly R.J. (1992). *Mol. Microbiol.* **6**: 15-21.

Tzamarias D. et Struhl K. (1995). *Genes Dev.* **9**: 821-831.

Weirich J. (1992) PhD Thesis. Düsseldorf : Heinrich-Heine-Universität.

Witte M.M. et Dickson R.C. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5128-5137.

Wray L.V. Jr, Witte M.M., Dickson R.C. et Riley M.I. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1111-1121.

Zachariae W., Kuger P. et Breunig K.D. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**: 69-77.

Zenke F.T., Zachariae W., Lunkes A. et Breunig K.D. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7566-7576.

Zimmermann F.K. (1977) *Mol. Gen. Genet.* **151**: 95-103.

Zimmermann F.K. et Scheel I. (1977) *Mol. Gen. Genet.* **154**: 75-82.