



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Clonage et séquençage du gène Sp. Skp1 identifié comme interacteur potentiel du complexe Mop1p-Mcs2p en double-hybride plus un

Bamps, Sophie

Award date:
1998

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**Clonage et séquençage du gène *Sp. Skp1* identifié comme interacteur
potentiel du complexe Mop1p-Mcs2p en "double-hybride plus un"**

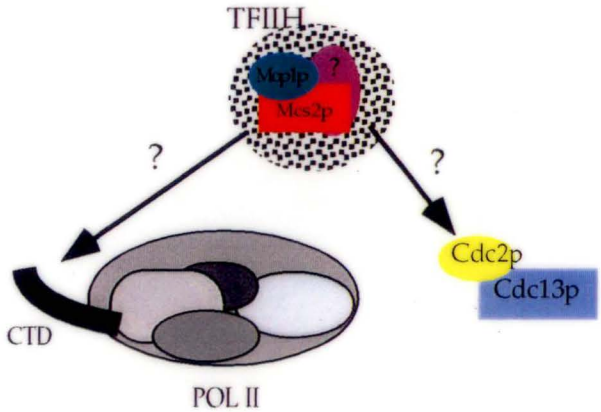
Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques

Sophie BAMPS

Juin 1998

Mop1p/Mcs2p : un carrefour hypothétique de deux voies :

- Transcription
- Cycle cellulaire



Les protéines F-Box servent d'adaptateurs des cibles à dégrader dans les complexes E3, autrement nommés SCF (pour Skip1p, Cdc53p et F-Box protein)

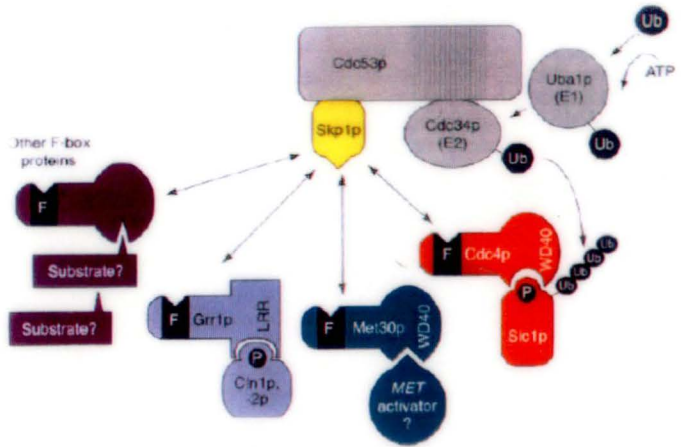


Schéma inspiré de Patton *et al*, 1998.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18. - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20.
E-mail: Joelle.Jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Clonage et séquençage du gène *Sp. Skp1* identifié comme interacteur potentiel du complexe Mop1p-Mcs2p en "double-hybride plus un"

BAMPS Sophie

Résumé

L'horloge du cycle cellulaire règle la progression des cellules eucaryotiques vers la croissance ou la prolifération. La machinerie centrale de cette horloge est constituée de CDK (pour Cyclin-dependant Kinase) et de leurs « dog guides », les cyclines. Outre leur rôle dans le cycle cellulaire, les CDK jouent dans d'autres voies de réponses cellulaires telles la transcription de gènes de classe II et le contrôle métabolique. Le processus par lequel s'exerce leur action est une simple phosphorylation de substrats divers. En réalité, derrière cette simplicité apparente s'articule un réseau complexe d'interactions protéiques impliquant CDK, cyclines, inhibiteurs, ... modulées elles-mêmes par le jeu de cascades de phosphorylation activatrices ou inhibitrices. Chez *Schizosaccharomyces pombe*, prototype classique d'approche du cycle cellulaire des mammifères, le couple Mop1p-Mcs2p est un candidat pour tenir le rôle de carrefour entre régulations du cycle cellulaire et transcription puisqu'il « assure » l'activation directe de Cdc2p/Cdc13p (par son activité CAK pour CDK-Activating Kinase) et intervient dans le contrôle de l'ARN polymérase II dont il phosphoryle le CTD (Domaine Carboxy-Terminal). L'existence de partenaires de ce complexe semble donc une nécessité pour orienter la réponse cellulaire vers l'une ou l'autre voie.

Un partenaire potentiel de Mop1p-Mcs2p, isolé lors d'un crible « double-hybride plus un », s'est avéré homologue de *Sc.Skp1p*. Cette protéine intervient dans l'appareil protéolytique, lequel a été récemment impliqué dans la dégradation de régulateurs du cycle cellulaire.

Le clonage et le séquençage d'un insert génomique contenant le gène complet de *S. pombe* ont été réalisés. La caractérisation de la structure du gène et son analyse fonctionnelle sont entreprises.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1998

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

C'est en pensant aux mouvements d'une symphonie,

Que je remercie ...

le chef d'orchestre, Monsieur Vandenhoute, pour son accueil au sein de son laboratoire, ainsi que pour ses précieux conseils qui ont inspiré tant la forme que le fond scientifique.

les lecteurs et critiques de cette partition, en leur souhaitant une agréable symphonie.

le soliste, Damien pour m'avoir initié aux différents sentiments de la recherche, tantôt piano, tantôt fortissimo, ...

le tenor, Domi pour son engouement, son intérêt et pour cette voix si pleine de bonne humeur et ses élucubrations,

les sopranos, Flore et Isa qui de leur nombreux conseils tant du point de vue manipulation que du côté rédaction ont adouci une fin allant crescendo.

les musiciens Vincent et David, qui ponctuent de leur rythme varié ces différents mouvements du concert.

les choristes, les Muses de ces nombreux concertistes, Rose-Marie et Monique, qui ont rendu ce concert encore plus agréable et qui donnent le ton, ainsi que Madame Libion.

Messieurs T. Makelä et P. Hieter qui ont enrichi notre répertoire de quelques nouveaux extraits (de levure).

Christophe Lamberts qui par son jeu de lumières (programme Match-Box et autres moins célèbres), a su accorder toutes les versions de cette partition.

J'ajouterai une mention toute spéciale pour

un public nombreux et chaleureux, formé de

mes parents qui ont permis à ce petit apprenti musicien d'aller jusqu'au bout de ses rêves et qui lui ont offert la chance de les réaliser,

mes voisins, qui sont au premier rang pour vivre les bons comme les mauvais mouvements, et qui plus que des voisins, sont une famille,

mes soeurs, souvent ignorantes de la beauté cachée de ces levures mais toujours présentes par leurs encouragements,

les amis qui réservent leur place au balcon ou dans les coulisses et qui sont source d'inspiration et de joie. Laura pour nos délires collectifs, et autres moments inénarrables, ... Sophie V. pour ses beaux moments de déconvenues, nos fausses notes simultanées, ... la bande des soupers délires, à savoir Caro ou Flabby brain, Fa, Mallau ou flabby flop, Flabby thees ou Jojo, Delphine, Manu ou Flabby W...., Hélène tous ceux avec qui on boit un verre après le spectacle, ... et les autres, spectateurs ou acteurs à leur heure,

Liste des abréviations courantes.¹

A	: Adénosine
aa	: acide aminé
Amp	: Ampicilline
ATP	: Adénosine TriPhosphate
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	: ADN complémentaire
ADNg	: ADN génomique
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNm	: ARN messenger
C	: Cytidine
Cfu	: Colony forming unit
Da	: Daltons
dNTP	: désoxyribonucléoside 5' triphosphate
ddNTP	: didéoxyribonucléoside 5' triphosphate
DO	: Densité Optique
G	: Guanosine
kb	: 10 ³ bases
LB	: milieu Luria-Bertani
mM	: millimolaire
M	: Molaire
NLS	: Nuclear Localisating Signal (signal de localisation nucléaire)
ORF	: Open Reading Fame
pb	: paire de bases
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PGK	: PhosphoGlycérate Kinase
RNase	: Ribonucléase
rpm	: rotation par minute
T	: Thymidine
TFIID	: Facteur de transcription de la PolII.

¹ Les abréviations et symboles des gènes, des protéines et des complexes utilisés sont expliqués dans le texte.

Conventions génétiques.

Notation du gène et de la protéine qu'il encode :

Les diverses conventions quant à la notation des gènes et des protéines sont reprises, au moyen d'exemples, dans le tableau ci-dessous.

Organisme	Gène	Protéine
<i>S. pombe</i>	<i>Mop1</i>	Mop1p
<i>S. cerevisiae</i>	<i>LEU2</i>	Leu2p
<i>E. coli</i>	<i>lexA</i>	LexA
mammifères	<i>Cdk2</i>	CDK2

Préfixes pour désigner l'appartenance spécifique d'un gène ou d'un produit d'un gène :

Sc	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sp	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Ec	: <i>Escherichia coli</i>
Hs	: <i>Homo sapiens</i>
At	: <i>Arabidopsis thaliana</i>
Ce	: <i>Caenorhabditis elegans</i>

I. Introduction.	1
Avant-propos.	1
1. Le cycle cellulaire	3
1.1. Quatre moments clés du cycle cellulaire.	3
1.2. Les CDK, régulateurs majeurs du cycle cellulaire et les bases moléculaires de leur activation cyclique.	4
1.2.1. Structure des CDK.	4
1.2.2. Régulation des CDK.	5
2. Le modèle d'étude	6
2.1. L'organisme : la levure <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , prototype classique d'étude du cycle.	6
2.2. Le système : le couple CDK-CAK dans la régulation du cycle cellulaire chez <i>S. pombe</i> .	7
2.2.1. Cdc2p est la CDK à rôle régulateur majeur du cycle cellulaire.	7
2.2.2. Mop1p/Mcs2p serait la CAK de Cdc2p.	8
2.3. Approche "double-hybride" pour rechercher les partenaires du couple Mop1p/Mcs2p.	9
2.3.1. L'hypothèse de l'existence de partenaires associés au complexe Mop1p/Mcs2p.	9
2.3.2. Le principe du "double-hybride"	10
3. Questions relatives au rôle de Skp1p chez <i>S. pombe</i>.	11
3.1. Rôles et fonctionnement de l'appareil protéolytique.	11
3.1.1. Vue d'ensemble de la cascade d'ubiquitination.	12
3.1.2. Les motifs d'ubiquitination.	12
3.1.3. Le protéasome 26S.	13
3.2. Un exemple particulier de régulation protéolytique : le rôle de Skp1p et du complexe SCF chez <i>S. cerevisiae</i> .	13
3.2.1. L'entrée en phase S chez <i>S. cerevisiae</i> est régulée par protéolyse.	13
3.2.2. Généralisation: il existe de nombreux SCF.	14
3.3. Un autre rôle pour <i>Sc.Skp1p</i> ?	15
3.4. Etat des lieux chez <i>S. pombe</i> et problématique générale du rôle de Skp1p.	15
II. Objectifs.	17
III. Résultats.	18
1. Isolement et caractérisation d'un ADNc candidat.	18
1.1. Principe du "double-hybride plus un".	18
1.2. La séquence de l'insert cloné présente une grande homologie avec le gène <i>SKP1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	20
1.2.1. Analyse d'homologie globale par "BLAST".	20
1.2.2. Un alignement protéique entre <i>Sc. Skp1p</i> et la séquence candidate <i>Sp. Skp1p</i> permet de détecter l'étendue de l'ADNc cloné.	21
1.3. L'interaction fonctionnelle du candidat en "double-hybride plus un" est confirmée.	21
1.3.1. La stratégie et sa mise en oeuvre.	21
1.3.2. Résultats.	22
1.4. Profil de restriction de l'insert d'ADNc cloné.	23
2. Clonage et séquençage de l'insert génomique contenant <i>Sp. Skp1</i>.	24
2.1. Authentification par "Southern-Blot" de l'origine du ADNc candidat.	24
2.1.1. Synthèse de la sonde.	24
2.1.2. Southern-Blot proprement dit.	24
2.2. Le clonage de <i>Sp. Skp1</i> par sondage d'une minibanque d'ADN génomique de <i>S. pombe</i> .	25
2.2.1. Constitution de la minibanque.	25
2.2.1.1. Un southern-Blot permet de choisir une gamme de taille des inserts à cloner.	25
2.2.1.2. Le clonage des inserts dans le vecteur pRS306.	26
2.2.1.3. Transformation du produit de la ligation dans <i>E. coli</i> .	26
2.2.2. Criblage de la minibanque et analyse des inserts génomiques candidats.	26
2.2.2.1. Le criblage de la minibanque permet une première sélection des clones candidats.	26
2.2.2.2. Un second crible plus fin réduit le nombre de candidats.	27
2.2.2.3. Une analyse diagnostique des douze clones est menée par restriction et par PCR.	28
2.3. Le séquençage et l'analyse de la séquence du gène <i>Skp1</i> de <i>S. pombe</i> .	29
2.3.1. L'insert génomique de 1,7 kb est séquencé.	29
2.3.2. Les alignements permettent de définir les zones introniques et des régions conservées.	30
3. Complémentation hétérologue et recherche de suppresseurs.	32
3.1. Complémentation hétérologue.	32

3.1.1. Principe de la complémentation.	32
3.1.2. Stratégie.	33
3.1.3. Construction des plasmides.	34
3.1.3.1. Construction du pYES- <i>ScSKPI</i> .	34
3.1.3.2. Construction du pRS306-Gal1-VP16-ADN <i>cSpSkp1</i> .	35
3.1.4. Résultats de la transformation.	35
3.2. Etude de la fonction de <i>Sp. Skp1p</i> par recherche de supprimeurs multi-copie.	36
IV. Conclusions, discussion générale et perspectives.	39
1. Conclusions et discussion générale.	39
2. Perspectives.	42
V. Matériel et méthodes.	43
1. Solutions et tampons.	43
1.1. Solutions	43
1.2. Tampons.	48
2. Milieu de culture.	51
2.1. Les bactéries.	51
2.2. Les levures.	51
2.2.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	51
2.2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	54
3. Souches, plasmides et banques.	58
3.1. Souches.	58
3.1.1. Souches de levures.	58
3.1.2. Souches de bactéries.	58
3.2. Plasmides.	59
3.3. Banque d'ADN <i>c</i> de <i>S. pombe</i> .	60
4. Techniques relatives à l'ADN.	61
4.1. Les réactions de restriction.	61
4.1.1. Principe.	61
4.1.2. Réalisation pratique.	61
4.1.3. Remarques.	62
4.2. L'extraction au phénol et la précipitation à l'alcool.	62
4.2.1. But.	62
4.2.2. Réalisation pratique.	63
4.3. L'électrophorèse sur gel d'agarose.	63
4.3.1. But.	63
4.3.2. Principe et paramètres.	64
4.3.3. Réalisation pratique.	65
4.4. La purification de l'ADN.	65
4.4.1. La récupération sur matrice.	66
4.4.2. La récupération sur colonne.	67
4.5. La réaction de ligation.	68
4.5.1. Principe.	68
4.5.2. Réalisation pratique.	68
4.6. La transformation.	68
4.6.1. La transformation bactérienne.	69
4.6.2. La transformation de levure.	70
4.7. La préparation d'ADN.	73
4.7.1. Minipréparation d'ADN plasmidique des bactéries.	73
4.7.2. Midipréparation d'ADN plasmidique des bactéries.	74
4.7.3. Préparation d'ADN génomique de levure.	75
4.8. La PCR ou Polymerase Chain Reaction.	76
4.8.1. Principe.	76
4.8.2. Réalisation pratique.	77
4.8.3. La purification sur colonne.	77
4.9. Le séquençage manuel et le séquençage automatique.	78
4.9.1. Principe.	78
4.9.2. Réalisation pratique.	79
4.10. La synthèse de la sonde radiomarquée.	82
4.11. Le Southern Blot.	83

4.11.1. Définition.	83
4.11.2. Principe.	83
4.11.3. Réalisation pratique.	84
4.12. Le screen d'une minibanque génomique de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> dans des bactéries.	86
4.12.1. Définition.	86
4.12.2. Principe.	86
4.12.3. Réalisation pratique.	86
VI. Bibliographie	88

1. Introduction

Avant-propos.

Depuis la conception de la théorie cellulaire par T. Schwann, le problème de la compréhension du cycle cellulaire est au centre de la biologie. La nécessité d'une coordination stricte entre le décours temporel du cycle et donc le contrôle des phases de sa progression avec la croissance cellulaire a été mise en lumière très tôt. Toutefois, c'est essentiellement la découverte de nombreux mutants de levure défectueux dans l'accomplissement du cycle (cdc mutants pour "cell division cycle mutants") (Hartwell *et al.*, 1973) qui a permis, dans un premier temps, de décrire les étapes discrètes qui le constituent et, ensuite, d'identifier les gènes dont les produits opèrent les transitions entre celles-ci.

Le nombre des acteurs génétiques en jeu est apparu extraordinairement élevé et leurs interactions en réseau d'une complexité inégalée. Le système régulateur doit en effet intégrer les signaux externes (nutriments, hormones, ... et autres facteurs trophiques) et internes (tels la taille cellulaire) pour signaler adéquatement vers quelles voies de croissance, de division ou de différenciation, la cellule sera engagée.

Les mécanismes moléculaires de la signalisation cellulaire qui orchestrent l'ensemble de ces processus reposent sur la transactivation (positive ou négative) de facteurs de transcription, en réponse à des cascades comprenant des kinases dépendantes de cyclines. Ce sont celles-ci qui contribuent à la spécificité du substrat des kinases auxquelles elles sont associées (Poon et Hunter, 1995).

Les CDKs et les cyclines (leur "guide dogs" Jacks et Weinberg, 1998) et les kinases elles-mêmes activatrices de ces CDK's (CAK's) sont donc les régulateurs centraux du cycle cellulaire et, à ce titre, des acquisitions assurément précoces dans l'histoire évolutive de la cellule eucaryote. Le tableau se complique encore toutefois avec la mise en évidence récente, chez les mammifères, d'un lien avec la transcription PolII et la différenciation. (Feaver *et al. in* Jacks et Weinberg, 1998)

Il apparaît que la compréhension fine des phénomènes moléculaires de la division cellulaire -essentiellement conservés chez tous les eucaryotes- représente un défi majeur pour la recherche fondamentale. Les progrès

enregistrés au cours de la décennie écoulée, principalement dans le modèle levure sont aussi directement pertinents de la recherche appliquée au domaine du cancer, lequel résulte d'une perte de contrôle de la régulation du cycle cellulaire.

Le présent travail s'inscrit dans un programme visant à analyser, chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, certains aspects du contrôle exercé sur le cycle cellulaire par le système des CDK.

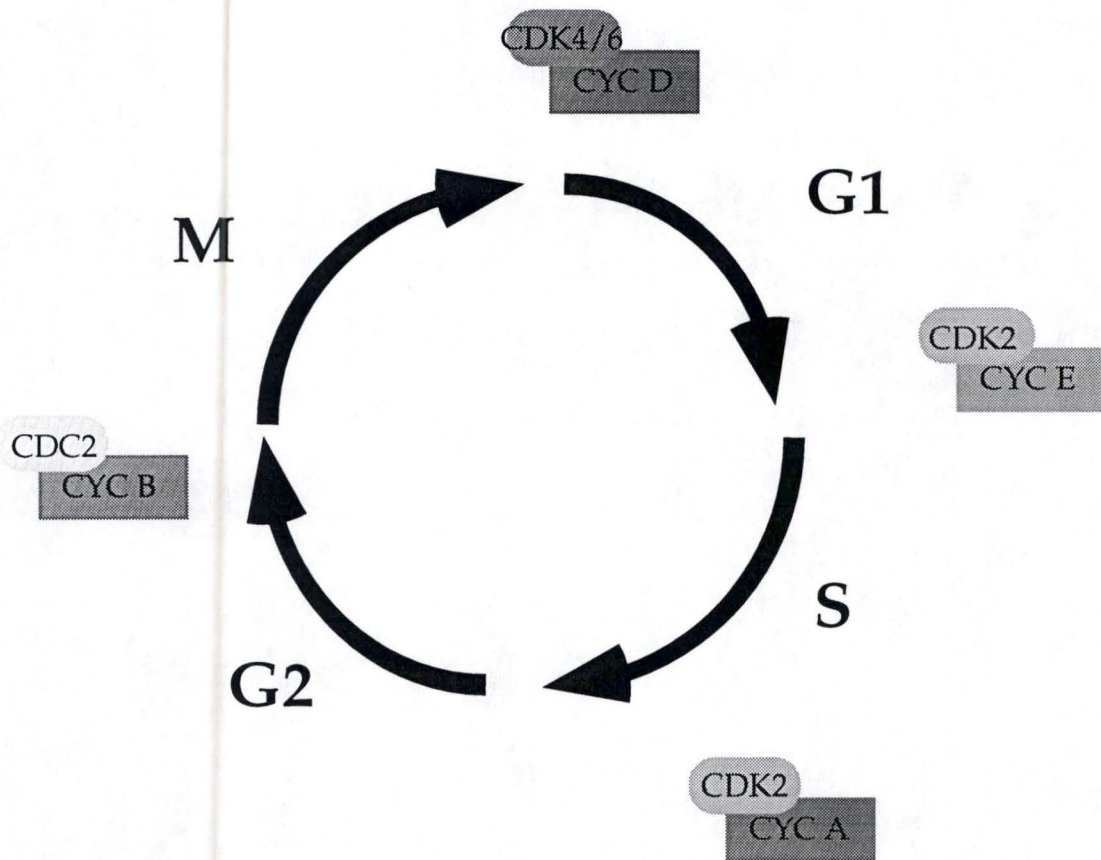


Figure 1.1 : Les principaux complexes cyclines-cdk impliqués dans la régulation du cycle cellulaire chez les mammifères.

1. Le cycle cellulaire

1.1. Quatre moments clés du cycle cellulaire.

La cellule eucaryote se multiplie par mitose pour générer des cellules filles semblables. Cette multiplication s'effectue au cours d'un phénomène nommé cycle cellulaire (Fig. 1.1). Ce cycle, propre aux eucaryotes est caractérisé par quatre étapes (Hutchison et Glover, 1995) :

- la phase G1 (pour GAP 1) au cours de laquelle la croissance cellulaire se manifeste. Celle-ci suppose la synthèse de protéines, la construction d'organites et le stockage de matériaux.
- la phase S (pour Synthèse) comprenant le processus de réplication de l'ADN.
- la phase G2 (pour GAP 2) qui permet la transcription et la traduction de gènes créant un environnement adéquat pour la mise en oeuvre de la dernière étape.
- la phase M ou mitose durant laquelle les chromosomes dupliqués sont répartis en deux lots identiques. Cette séparation s'articule autour de deux phénomènes précis : la caryocinèse ou mitose proprement dite et la cytokinèse.

C'est peu de temps avant le début de la phase S, en phase G1, qu'est prise la décision d'induire les mécanismes indispensables à la réalisation d'un cycle cellulaire complet. Afin de générer deux cellules filles viables, de nombreux contrôles sont effectués par des "cyclin-dependent kinase" ou CDK. Ces CDK sont des molécules clés dans le contrôle du cycle cellulaire.

On sait de longue date que, globalement, les caractéristiques principales du cycle cellulaire de tous les eucaryotes sont similaires, que ce soit chez la levure ou chez les cellules de mammifères (Nurse, 1997).

```

CDC28 DGNLKLGFDFGLARAFGVPLRAYTHEIVTLWYRAPEVLLGGKQYST
Cdc2  EGNLKLADFGLARSFGVPLRNYTHEIVTLWYRAPEVLLGSRHYST
H.s. Cdc2 KGTIKLADFGLARAFGIPIRVYTHEVVTLWYRSPEVLLGSARYST

CKD2  EGAIKLADFGLARAFGVVVRTYTHEVVTLWYRAPEILLGCKYYST
CDK3  LGAIKLADFGLARAFGVPLRTYTHEVVTLWYRAPEILLGSKFYTT
CDK4  NGTVKLADFGLARIYSYQMA.LTPVVVTLWYRAPEVLLQST.YAT

CDK7  DGQLKLADFGLARIFGSPERNFTHQVFARWYRAPELLFGTKQYGS
KIN28 DGQIKVADFGLARAIPAPHEILTSNVVTRWYRAPELLFGAKHYTS
Mop1  DGVLLADFGLSRDFGTPSH.MSHQVITRWYRPPPELFMGCRSYGT

```

Figure 1.2 : L'activation des CDK nécessite entre autres, leur phosphorylation sur un résidu très conservé, la thréonine (sérine pour Mop1p). Ce résidu est positionné à proximité du site catalytique au niveau du "T-loop". (cfr. fig. 1.3, Morgan, 1997)

1.2. Les CDK, régulateurs majeurs du cycle cellulaire et les bases moléculaires de leur activation cyclique.

Le cycle cellulaire nécessite une organisation temporelle et spatiale de l'activation et de la répression de l'expression des différents gènes impliqués. Cette organisation est assurée par les CDK qui modulent, notamment, l'activité des facteurs de transcription. Ces facteurs vont à leur tour agir sur des gènes cibles particuliers à des moments définis du cycle. Le contrôle de ces kinases constitue par conséquent le "pace-maker" qui ordonne les phases successives du cycle. Les cyclines -qui doivent leur nom au fait que la majorité d'entre elles apparaissent et sont dégradées de façon périodique au cours du cycle (Andrews et Measday, 1998)- contribuent à cette régulation. Ainsi, (fig. 1.1) la spécificité d'une même kinase dépend de la nature de la cycline associée. C'est cette activation cyclique des différents complexes CDK/cycline qui est le moteur des transitions du cycle cellulaire.

Les CDK appartiennent à une famille dotée de caractéristiques structurales et fonctionnelles précises permettant de jeter une lumière sur le fait que ces enzymes exercent leur activité kinase de manière cyclique et entièrement contrôlée.

1.2.1. Structure des CDK (pour une revue, Morgan, 1997).

Une CDK est une protéine formée de deux domaines, le domaine amino-terminal, principalement constitué d'un plan β anti-parallèle et le domaine carboxy-terminal riche en hélices α , séparés par une profonde cavité renfermant le site actif, siège de la catalyse (Fig. 1.3, Morgan, 1996). Les CDK sont des protéines qui, seules, n'exercent pas leur activité catalytique. Ces protéines acquièrent dans certaines conditions une activité sérine/thréonine kinase. Leur activation nécessite non seulement la formation d'un complexe binaire suite à la fixation d'une sous-unité régulatrice, la cycline, mais également la phosphorylation d'un résidu fortement conservé (Fig. 1.2) par une CDK-Activating Kinase ou CAK (Solomon, 1994; Gould *et al.*, 1991).

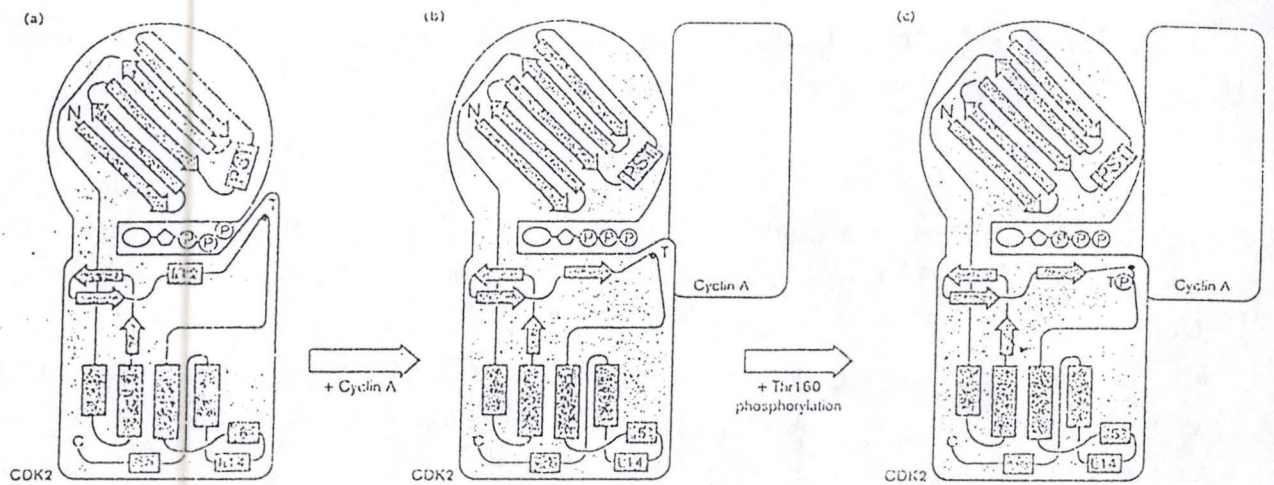


Figure 1.3 : Représentation topologique et modèle d'activation d'une CDK : l'exemple de CDK2 chez les mammifères.

(a) Structure de CDK2 inactive dans laquelle l'ATP est mal orienté et au sein laquelle le site catalytique est obstrué par le "T-loop".

(b) Fixation de la cycline A à CDK2. Cette fixation permet, par une réorganisation d'acides aminés, un bon positionnement de l'ATP afin de permettre le transfert du phosphate γ au substrat de la CDK (non représenté) mais également déplace légèrement le "T-loop" offrant la possibilité d'une activité catalytique faible.

(c) Phosphorylation du résidu thréonine du "loop". Cette phosphorylation accroît l'activité catalytique d'un facteur 80 à 300 fois en libérant le site catalytique de la CDK2.

(Morgan, 1996)

1.2.2. Régulation des CDK.

La figure 1.3 (Morgan, 1996) met en évidence deux obstacles empêchant l'activation d'une CDK à l'état de repos. D'une part, l'accès au site catalytique est obstrué par une grande boucle, le "T loop". D'autre part, le groupement phosphate γ de l'ATP a une orientation qui interdit le transfert du phosphate au substrat de la CDK, en aval de sa cascade d'activation (De Bondt *et al.*, 1993).

Deux étapes sont dès lors nécessaires pour assurer l'activation de la kinase. Celles-ci sont la fixation de la cycline et la phosphorylation du résidu T loop.

Les cyclines sont des protéines caractérisées par la présence d'une "cyclin box" composée de 5 hélices α . Cette région intervient dans la liaison aux CDK. Comme le montre la figure 1.3 relative à CDK2 chez les mammifères prise comme exemple, la fixation d'une cycline modifie l'orientation des phosphates de l'ATP dirigeant le phosphate γ de telle sorte qu'il puisse attaquer le groupement hydroxyle de la sérine ou de la thréonine du substrat de la kinase. Par ailleurs, elle entraîne un basculement du "T-loop" qui va permettre sa phosphorylation par une CAK. Cette phosphorylation stabilise le "T-loop" dans sa position active, les charges négatives du groupement interagissant avec des résidus chargés positivement dans le domaine carboxy-terminal (Russo, 1996).

La phosphorylation de la thréonine localisée sur le T loop accroît l'activité de la kinase d'un facteur 80 à 300 fois. Cette action conduit à une accessibilité et une fixation accrue du substrat sans intervenir sur la liaison et l'orientation de l'ATP (Fisher, 1997).

Mentionnons qu'outre les deux mécanismes indispensables cités ci-dessus, les CDK peuvent présenter des variations d'activités pour diverses autres raisons telles la fixation d'un inhibiteur, une phosphorylation inhibitrice ou encore la dégradation du partenaire cycline (Pagano *et al.*, 1995). L'ensemble des régulations permettent l'existence d'activations successives de différentes CDK et donc la progression du cycle cellulaire.

2. Le modèle d'étude

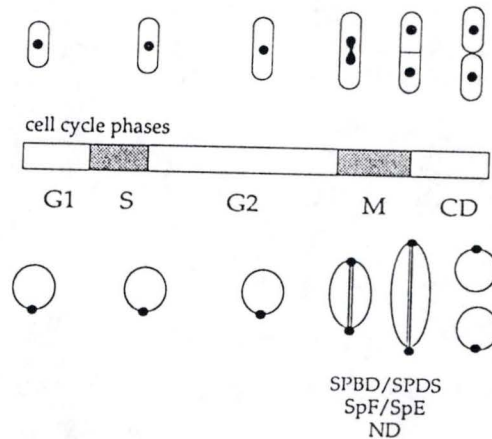
2.1. L'organisme : la levure *Schizosaccharomyces pombe*, prototype classique d'étude du cycle cellulaire (Nasim, Young et Jonshon, 1989).

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires qui constituent un excellent prototype d'étude des cellules de mammifères. Non seulement la biologie moléculaire y est largement développée mais elles sont aussi accessibles aux méthodes de la génétique moléculaire autant que de la génétique classique. C'est la disponibilité chez les levures des outils particulièrement puissants de la génétique qui ont permis une approche de la compréhension des systèmes de régulation aussi complexes que le cycle cellulaire. Parmi les avantages propres à la levure dans ce contexte, citons le fait qu'il s'agit d'un micro-organisme, par conséquent, aisément manipulable, que son cycle cellulaire est court et peut se dérouler sur milieu solide ou liquide, que sa croissance se réalise aussi bien à l'état haploïde que diploïde. Ajoutons que de nombreux mutants ont été isolés, que de multiples vecteurs existent à l'heure actuelle et que de nombreux gènes ont été isolés et étudiés. Parmi ceux-ci, nombreux sont ceux qui ont leur homologue chez l'homme (Botstein *et al.*, 1997).

La levure sans conteste la plus étudiée est *Saccharomyces cerevisiae* tant au plan fondamental qu'appliqué. C'est son génome (12,06 mégabases) qui a le premier de tous les eucaryotes été complètement séquencé, permettant entre autres, de déterminer de façon définitive le nombre de cyclines et de CDK encodées dans son génome.

Toutefois, à des égards importants, *S. pombe*, parente éloignée de *S. cerevisiae* constitue un meilleur terme de référence que celle-ci comme prototype des mammifères. C'est le cas tout particulièrement en ce qui concerne le cycle cellulaire. Les cellules de *S. pombe* croissent par une extension apicale et se divisent par une fission médiane. L'organisation du cycle chez *S. pombe* est typiquement représentative de celle des mammifères avec des phases discrètes G1, S, G2 et M. L'entrée en mitose de cet organisme est marquée par une condensation en chromosomes et par une rapide réorganisation des microtubules (Chang et Nurse, 1996). En effet, les microtubules du cytoplasme

A *S.pombe*



B *S.cerevisiae*

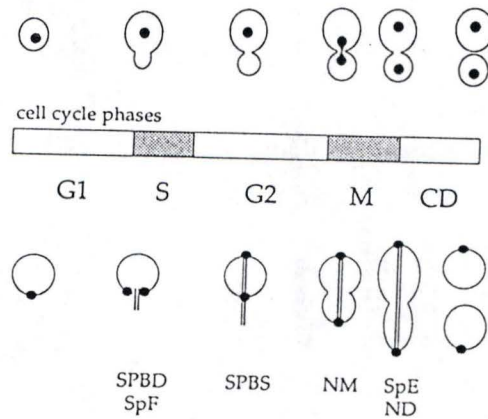


Figure 1.4 : Représentation schématique de l'organisation des cycles cellulaires de *S. pombe* (A) et de *S. cerevisiae* (B) montrant pour chaque levure, la morphologie cellulaire (partie supérieure du schéma), la durée relative des phases du cycle cellulaire (au centre du schéma) et le comportement des centrosomes et du fuseau mitotique (partie inférieure du schéma) (Hutchison et Glover, 1995).

Abréviations :

- SPBD : spindle pole body duplication
- SPBS : spindle pole body separation
- SpF : spindle formation
- SpE : spindle elongation
- NM : nuclear migration into bud neck
- ND : nuclear division

sont remplacés par un fuseau mitotique intranucléaire. Cette organisation du cycle de *S. pombe* est sensiblement différente de celle de *S. cerevisiae* où le court fuseau mitotique est formé de manière précoce en phase G1 et s'allonge progressivement au fur et à mesure de la progression du cycle (Macneill et Fantes, 1995) (Fig. 1.4). Outre ces arguments d'ordre phénotypique en faveur d'une grande proximité entre *S. pombe* et le modèle mammifère et humain, signalons que le clonage de *Cdc2* humain a été réalisé par une expérience de complémentation du mutant thermosensible *cdc2-33* de *S. pombe* (Lee et Nurse, 1987). Cette complémentation hétérologue permet d'établir la preuve formelle d'une proximité fonctionnelle entre *S. pombe* et l'homme.

2.2. Le système : le couple CDK-CAK dans la régulation du cycle cellulaire chez *S. pombe*.

Chez *S. cerevisiae*, cinq gènes de CDK ont pu être identifiés dans la séquence totale du génome, tandis que neuf CDK sont connues chez les mammifères (Nigg, 1995). Chez *S. pombe*, deux CDK, *Cdc2p* et *Mop1p*, ont été caractérisées, mais seule *Cdc2* est requise pour l'initiation de la réplication (transition G1-S) comme pour l'entrée en mitose (transition G2-M) (Beach *et al.*, 1982). La situation est similaire pour *CDC28*, son homologue chez *S. cerevisiae*.

A la différence des eucaryotes supérieurs (Fig. 1.1), il n'y a donc chez la levure qu'une seule CDK impliquée dans la régulation directe de la progression du cycle cellulaire (Nurse, 1987 cité in Gould *et al.*, 1991).

2.2.1. *Cdc2p* est la CDK à rôle régulateur majeur du cycle cellulaire.

La régulation directe du cycle cellulaire est donc laissée chez la levure à une seule CDK -*Cdc2p*- particulièrement étudiée chez *S. pombe*. C'est la raison pour laquelle nous allons développer quelque peu ici le rôle de *Cdc2p*, en la prenant pour exemple (Fig. 1.5) (Nurse, 1997).

Un des problèmes centraux lors de la progression dans le cycle est de s'assurer que la mitose ne commence pas tant que la réplication de l'ADN n'est pas terminée. A la phase G2-M, cette restriction est imposée par la phosphorylation de la tyrosine 15 (Y15) de *Cdc2p* par la kinase *Wee1p*. Cette phosphorylation empêche la liaison de l'ATP et garde donc la kinase inactive. Au contraire, si cette phosphorylation est éliminée, les levures entrent en mitose même si la

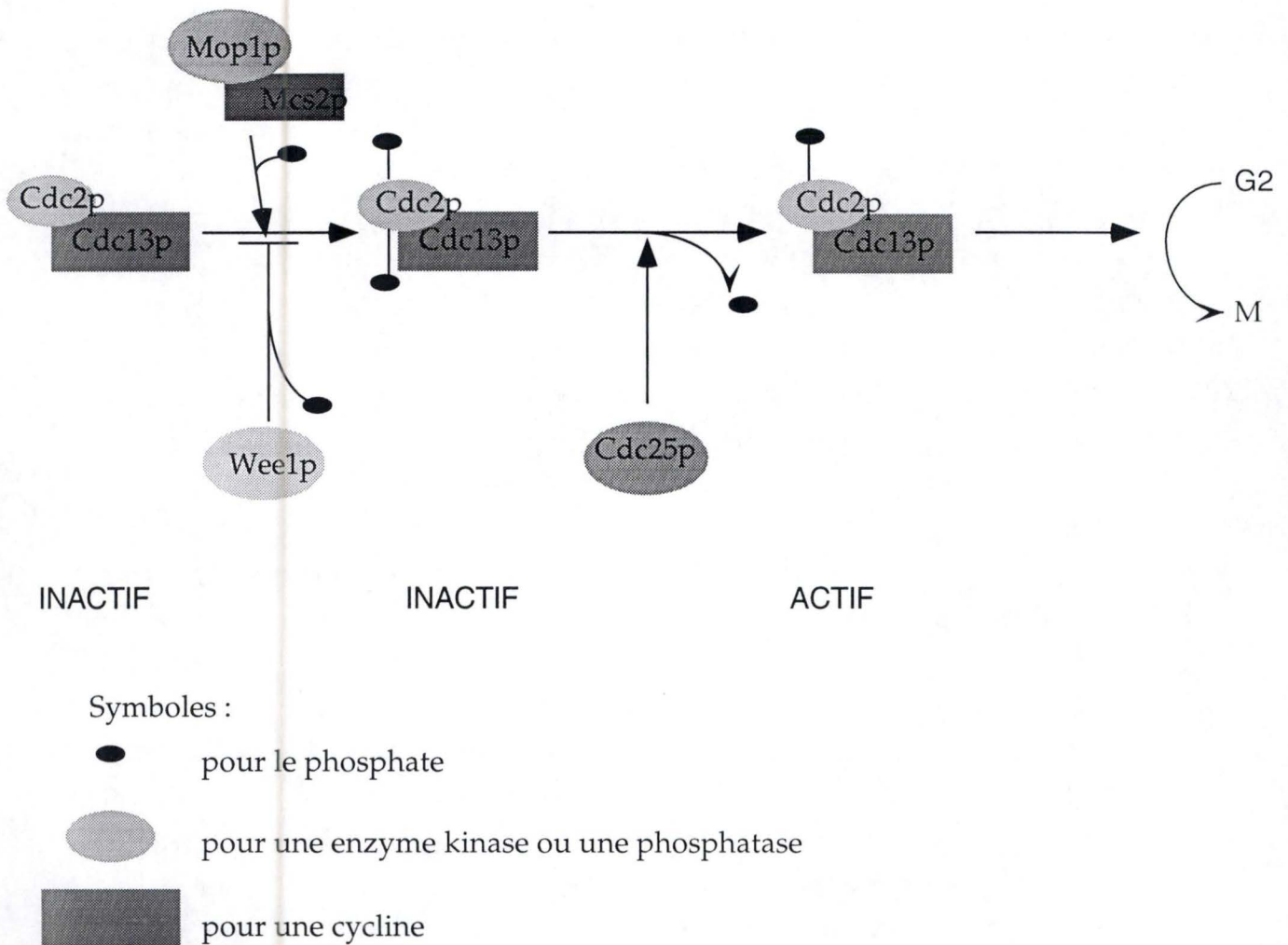


Figure 1.5 : Exemple type de régulation d'un couple CDK-cycline. Le cas modèle Cdc2p-Cdc13p (autrement appelée CyclineB) à la transition G2-M (d'après Macneil et Fantès, 1995).

Wee1p et Mop1p sont toutes deux des kinases et Cdc25p est une phosphatase. Cdc2p, couplé à la cycline Cdc13p subit une phosphorylation activatrice par Mop1p sur la thréonine 167 et une phosphorylation inhibitrice par Wee1 sur la tyrosine 15. Sous cet état bi-phosphorylé, Cdc2p est inactif. Il acquiert une activité suite à la déphosphorylation de la tyrosine 15 par la phosphatase Cdc25p.

réplication est en cours. On appelle ce contrôle un "checkpoint" puisqu'il impose qu'une contrainte soit réalisée avant de pouvoir poursuivre le cycle (Elledge, 1996).

La levure mesure l'état d'avancement de la réplication en "vérifiant" si les complexes de réplication de l'ADN formés à l'initiation sont toujours présents. Si c'est le cas, un signal, à ce jour encore inconnu, est envoyé pour bloquer la déphosphorylation de *Cdc2* sur Y15 par la phosphatase *Cdc25p* et donc maintenir *Cdc2p* inactif (Galaktianov et Beach, 1991).

Durant la phase G1, quand les complexes de réplication ne sont pas encore formés, c'est l'inhibiteur *Rum1p* (dont nous reparlerons au point 3) qui bloque le complexe *Cdc2p/Cdc13p*. A la transition G1-S, cet inhibiteur est dégradé.

Signalons que la déphosphorylation du résidu Y15 de *Cdc2p* ne suffit pas pour entraîner son activation maximale. En effet, comme nous l'avons mentionné, la kinase doit également être phosphorylée sur le résidu T167 par une CAK (pour CDK-Activating Kinase). Toutes les données actuelles permettent de proposer que le complexe *Mop1p-Mcs2p* assure le rôle de CAK, impliquant que la CAK de *Cdc2p* soit elle-même une CDK (Buck, *et al.*, 1995; Damagnez, *et al.*, 1995).

2.2.2. Mop1p/Mcs2p serait la CAK de Cdc2p.

La levure *S. pombe* présente de nombreux mutants dont le phénotype d'échec de cycle cellulaire, caractérisé par une hyperactivation de *Cdc2p* et donc par une entrée trop précoce en mitose est désigné sous le nom de "catastrophe mitotique".

Un crible génétique a été réalisé afin de trouver les suppresseurs extragéniques du phénotype de catastrophe mitotique qui restaurent la progression du cycle cellulaire (Molz *et al.*, 1989). Parmi les clones isolés (nommés *mcs* pour Mitotic Catastrophe Suppressors), on retrouve *Mop1p* (*Mcs6p*) et *Mcs2p* (Molz et Beach, 1993). Tous deux présentent une interaction de co-létalité allèle-spécifique⁽²⁾ avec des mutants de *Cdc2* et les phénotypes observés rappellent de façon remarquable ceux observés avec les mutants *Cdc13*, la cycline mitotique associée à *Cdc2*. Par ailleurs, *Mop1p-Mcs2p* présente une activité CAK *in vitro*. Enfin, il a été démontré que CDK7, l'homologue structural et fonctionnel de *Mop1p* chez les mammifères présente une activité CAK *in vivo* pour le complexe CDK2-CyclinA (Larochelle *et al.*, 1998). Toutes ces données ont permis d'avancer l'hypothèse que *Mop1p* est effectivement la CAK de *Cdc2p in vivo*.

²La co-létalité dite allèle-spécifique désigne le cas de deux mutations additives (pour la létalité) dans des protéines distinctes en interaction directe.

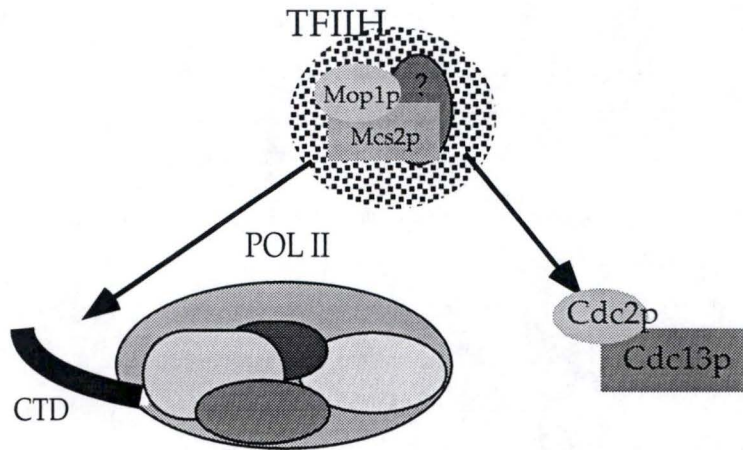


Figure 1.6 : Schéma hypothétique illustrant la participation de Mop1p-Mcs2p , à des complexes au carrefour entre les voies contrôlant le cycle cellulaire et la transcription.

Sur base des travaux réalisés sur les complexes homologues chez l'Homme et la levure *S. cerevisiae*, il a été postulé que Mop1p-Mcs2p est associé *in vivo* avec le facteur de transcription, TFIIH. Ce complexe phosphorylerait le CTD (domaine carboxy-terminal) de la Polymerase II et serait aussi capable de phosphoryler et d'activer le complexe Cdc2p-Cdc13p en phosphorylant le site d'activation conservé, la thréonine167.

La kinase CDK7 est aussi impliquée dans un processus cellulaire différent. On la trouve en complexe avec la CyclineH, associée au TFIIF, un des facteurs de transcription basaux. Associée à ce complexe de 10 protéines, CDK7 phosphoryle le CTD (Domaine Carboxy-Terminal de l'ARN polymérase II), une étape essentielle pour l'initiation de la transcription des gènes de classe II.

CDK7 semble donc constituer un carrefour entre le cycle cellulaire et la transcription (Fig. 1.6) (Nigg, 1996).

Vu la complémentation parfaite de la disruption de *Mop1* par CDK7 et l'homologie importante entre les deux kinases (46% d'identité au niveau protéique), on peut sans doute extrapoler cette fonction à Mop1p d'autant que le couple Mop1p-Mcs2p présente une activité CTD kinase *in vitro* (Damagnez, *et al.*, 1995).

Dès lors qu'un même facteur cellulaire possède plusieurs substrats sur lesquels agir dans une cellule, se pose la question des moyens d'assurer sa spécificité d'action. La recherche de partenaires du complexe Mop1p/Mcs2p est donc essentielle pour pouvoir approcher la spécificité de régulation des processus complexes que sont la transcription et le cycle cellulaire.

2.3. Approche "double-hybride" pour rechercher les partenaires du couple Mop1p/Mcs2p.

2.3.1. L'hypothèse de l'existence de partenaires associés au complexe Mop1p/Mcs2p.

Compte tenu du rôle potentiel de Mop1p/Mcs2p au carrefour d'au moins deux voies de réponses distinctes impliquant le complexe Cdc2p/CyclineB d'une part et, d'autre part, le complexe de l'ARN polymérase II (Fig. 1.6), on conçoit la nécessité de l'existence de partenaires distincts qui orientent les processus cellulaires dans l'une ou l'autre voie (Poon et Hunter, 1995). Plus généralement, il faut souligner que l'organisation fonctionnelle des systèmes biologiques -que ce soit des appareils de transcription, de traduction, de réplication ou des mécanismes associés (tels les complexes de "splicing", ...)- apparaît de plus en plus comme une réunion de systèmes d'interactions imbriqués les uns dans les autres et d'une complexité jusqu'il y a peu insoupçonnée.

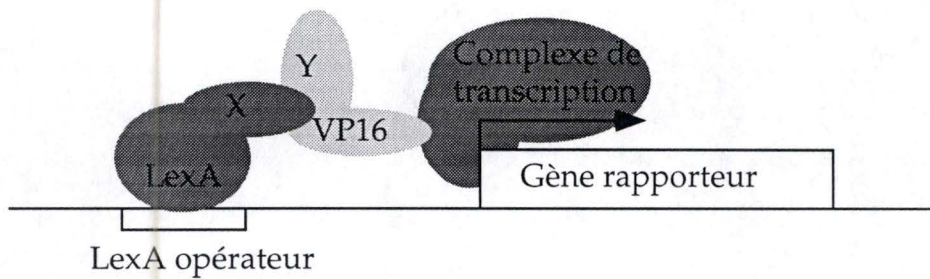


Figure 1.7 : Schéma général du "double-hybride".

Lorsque les deux protéines de fusion (domaine de liaison à l'ADN de LexA-X et Y-domaine transactivateur viral VP16) sont produites *in vivo* dans une souche de levure adéquate, l'interaction physique entre les deux partenaires X et Y est détectée par l'expression du gène rapporteur. X représente la protéine dont on cherche un partenaire et Y est une banque clonée en aval et en phase avec le domaine transactivateur viral VP16. De nombreuses variantes existent dont celle utilisant GAL4 (facteur activateur de la transcription chez *S. cerevisiae* par liaison à GAL_{UAS}) au lieu de LexA (represseur des gènes à "Lex Box" chez *E. coli*).

Dans le contexte présent, on voit que les complexes impliquant Mop1p/Mcs2p, par exemple, répondent à d'autres complexes pour "parler" au complexe PolIII, lui-même pouvant réunir, selon son état, de l'ordre de cent polypeptides distincts. Cette conception d'ensembles multimacromoléculaires à interactions emboîtées, successives ou en partie simultanées, -souvent non indépendantes de complexes associés à des structures subcellulaires elles-mêmes trop longtemps considérées comme inertes- s'impose à présent en biologie cellulaire, sans pour autant que toutes les conséquences fonctionnelles en soient perçues. La possibilité que certains partenaires interviennent dans diverses voies ou fonctions distinctes autorise des interactions dans des "cross-talks", des amplifications, des phénomènes de titrages et d'autres effets reflétant des combinaisons d'associations spécifiques.

2.3.2 Le principe du "double-hybride"(Fields et Song, 1989).

L'approche "double-hybride" constitue à présent une voie classique et routinière pour la mise en évidence de candidats-partenaires dans un complexe d'interactions protéiques. Cette technique dont le principe est représenté à la figure 1.7 repose sur un test fonctionnel d'interactions *in vivo* entre, d'une part, une protéine "appât" (bait) en fusion avec un facteur de transcription se liant au promoteur d'un rapporteur spécifique et, d'autre part, une banque supposée contenir des "proies" (prey), clonée en fusion avec un facteur médiant l'activation du complexe PolIII. L'interaction entre partenaires "appât-proie" "allume" le gène rapporteur.

Le crible en "double-hybride plus un" réalisé antérieurement au laboratoire a permis de rechercher des partenaires du complexe Mop1p/Mcs2p. Pour ce faire, on se sert d'une souche exprimant d'une part, une protéine de fusion LexA-Mop1p et la protéine Mcs2p surexprimée et, d'autre part, une protéine de fusion entre VP16 et les produits d'expression d'une banque d'ADNc de *S. pombe*.

Comme nous le verrons au point 1 des résultats, cinq candidats interagissent, dans ce système, avec Mop1p/Mcs2p. Parmi ces partenaires potentiels, un clone présente un intérêt particulier (*cfr.* point 3). En effet, il s'agit d'un ADN complémentaire homologue au gène *SKP1* (Suppressor of Kinetochore Protein 1) de différentes espèces telles que *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *H. sapiens*, ... (Krek, 1998). Ce gène candidat encode potentiellement un nouveau partenaire du complexe CDK/cycline.

3. Questions relatives au rôle de Skp1p chez *S. pombe*.

Le screen "double-hybride plus un" réalisé pour trouver des partenaires du complexe Mop1p-Mcs2p a permis d'isoler 5 candidats interacteurs potentiels. Comme annoncé, nous avons décidé d'investiguer plus avant la fonction d'un seul de ces candidats présentant une homologie substantielle avec le gène *SKP1* cloné chez *S. cerevisiae* et plusieurs métazoaires.

Notre choix est motivé par le rôle clé attribué au produit de ce gène lors de deux transitions des cycles cellulaire et chromosomique : l'entrée en phase S, d'une part, et l'anaphase, d'autre part. Bien qu'il s'agisse en apparence de deux phénomènes très différents, la protéine Skp1p y semble impliquée via une seule fonction, à savoir le contrôle de la protéolyse.

3.1. Rôles et fonctionnement de l'appareil protéolytique (King *et al.*, 1996).

La périodicité de la réplication de l'ADN et du phénomène mitotique chez les eucaryotes contraste avec la nature continue de la plupart des processus métaboliques responsables de la croissance cellulaire. Par exemple, le cycle chromosomique est constitué d'une série discrète et ordonnée d'événements, la réplication et la ségrégation du matériel génétique ne se superposant jamais au contraire de ce qui s'observe chez les procaryotes. Depuis peu l'appareil protéolytique a clairement été impliqué dans l'irréversibilité des transitions du cycle cellulaire comme du cycle chromosomique, et on sait maintenant qu'il en est le régulateur central.

Au cours du cycle cellulaire de *S. cerevisiae*, la protéolyse est médiée par deux systèmes distincts de conjugaison de l'ubiquitine : le premier "pathway" nécessitant Cdc34p permet le démarrage de la phase S en dégradant un inhibiteur de CDK (Sic1p), le second implique un volumineux complexe nommé APC (Anaphase Promoting Complex) qui, comme son nom l'indique, initie la ségrégation chromosomique. L'élément commun est l'ubiquitine, une petite protéine de 76 aa extrêmement conservée qui sert de marqueur pour les protéines qui seront *in fine* dégradées par le protéasome 26S.

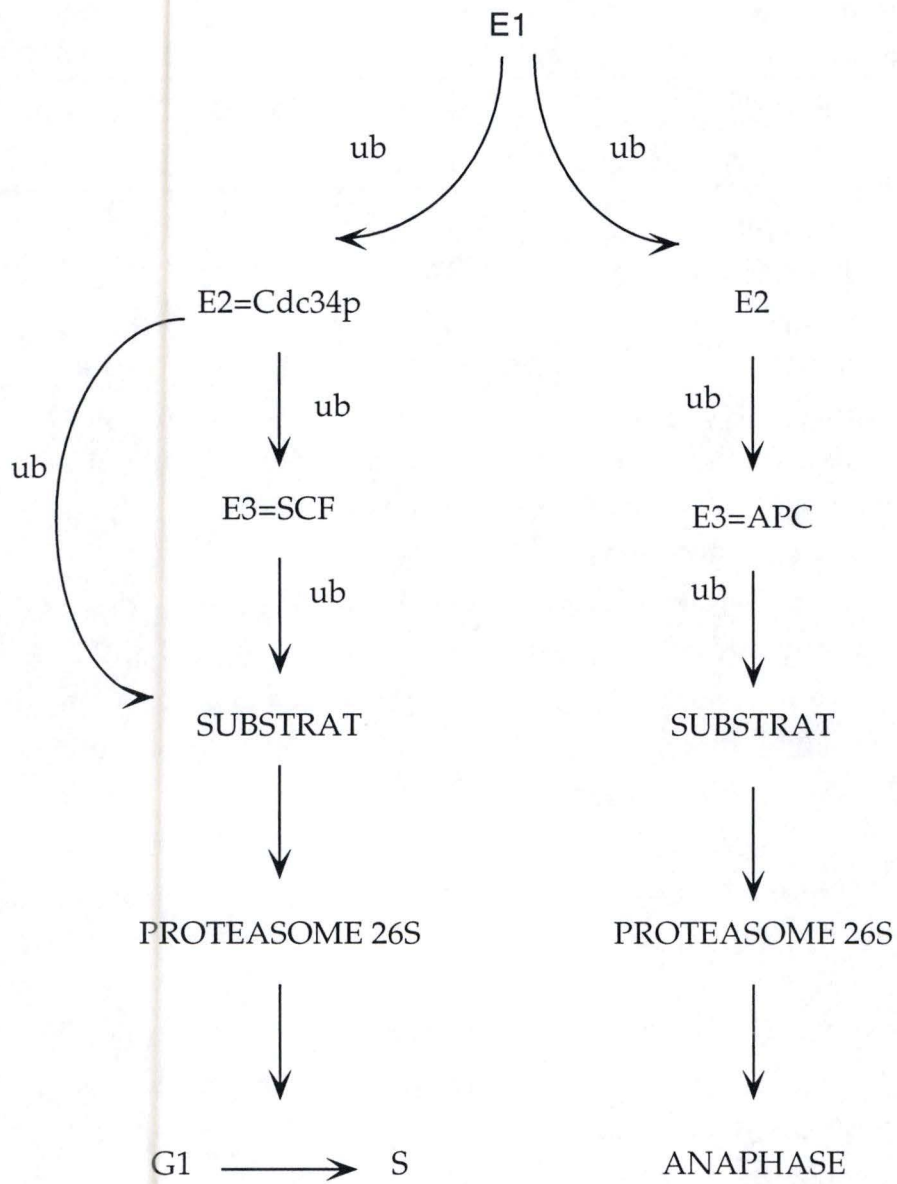


Figure 1.8 : Vue d'ensemble de la cascade d'ubiquitination. Cette cascade met en jeu E1 et des sets d'enzymes E2 et E3 différents et spécifiques des deux systèmes de protéolyse associée à la progression du cycle cellulaire : en G1-S d'une part et à l'anaphase d'autre part.

3.1.1. Vue d'ensemble de la cascade d'ubiquitination (Ciechanover, 1996).

De manière générale, on peut voir le "pathway" de protéolyse comme une cascade impliquant le plus souvent trois enzymes ou complexes enzymatiques nommés E1, E2 et E3. L'ubiquitine est d'abord activée par l'enzyme E1 (Ubiquitine activating enzyme) qui couple l'hydrolyse d'un ATP à la formation d'un lien thioester entre la glycine 76 de l'ubiquitine et une cystéine spécifique de E1. Ensuite, par réaction de transestérification, l'ubiquitine est transférée de E1 sur une cystéine d'un membre de la famille E2 (Ubiquitin conjugating enzyme) (on a trouvé 13 gènes potentiels appartenant à cette famille dans le génome de *S. cerevisiae*). L'ubiquitine est finalement transférée de E2 sur une lysine du substrat à dégrader, soit directement, soit via un complexe E3 (Ubiquitine ligase). Il semble que E3 soit principalement requis pour les cas de polyubiquitination et surtout pour assurer la spécificité de reconnaissance du substrat.

Dans les deux cas particuliers évoqués plus haut de protéolyse associée à la progression du cycle cellulaire chez *S. cerevisiae*, le premier système, intervenant en G1->S, comporte l'enzyme E1 tandis que le produit du gène *Cdc34* tient le rôle de E2 et un complexe nommé SCF (voir plus loin) assure la fonction E3. Le second système, intervenant en anaphase utilise également E1; un autre set d'enzymes en guise de E2 et enfin un complexe E3 qui est ici l'APC (Fig. 1.8).

3.1.2. Les motifs d'ubiquitination (Hilt et Wolf, 1996).

Plusieurs motifs *cis* indiquant qu'une protéine doit être dégradée ont été identifiés. Le premier qui ait été reconnu a donné lieu à l'énoncé de ce que l'on appelle la "N-end rule". Elle résulte notamment de plusieurs observations réalisées avec la β -galactosidase de *E. coli* montrant que la stabilité de celle-ci dans la levure est directement corrélée avec la nature de la séquence en acides aminés présente à son extrémité NH₂. Cependant, il faut noter que des levures bloquées dans les mécanismes répondant à la "N-end rule" ne présentent pas de phénotypes, ce qui indique que ce signal de dégradation n'est pas utilisé dans des processus vitaux.

Un autre motif dirigeant une protéine vers la protéolyse est la "Destruction box", une suite d'acides aminés conservés dont le consensus R-ALGDIGN se retrouve principalement dans l'extrémité amino-terminale des cyclines.

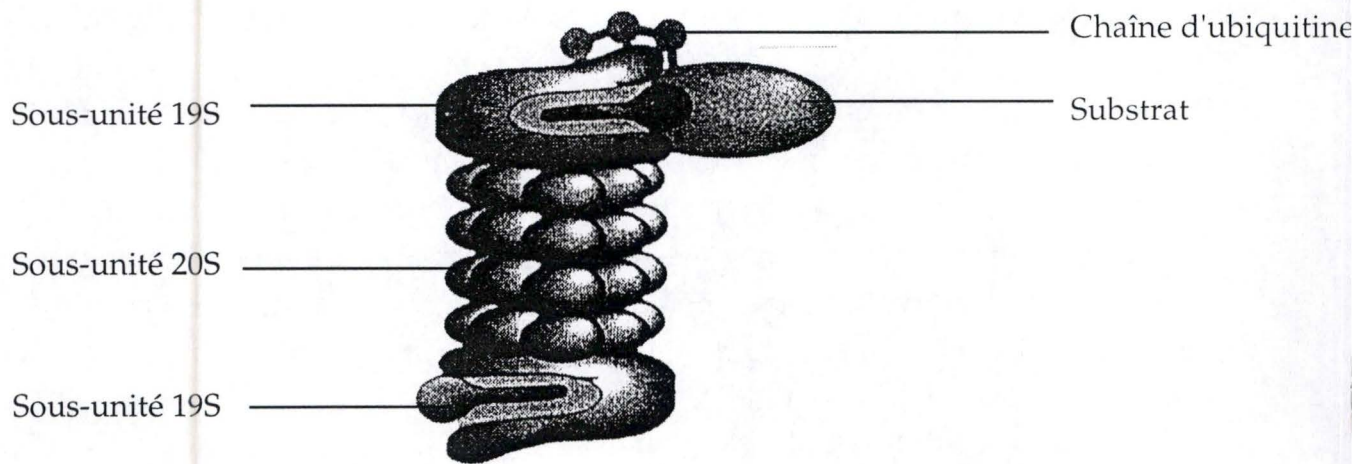


Figure 1.9 : Schéma du protéasome 26S.

Le protéasome 26S est formé de deux types de sous-unités : la sous-unité 20S constituée de quatre anneaux, eux-mêmes formés de sous-unités α et β , et la sous-unité 19S en double copie et placées en quinconce sur le corps 20S, lui octroyant une asymétrie caractéristique. (Hilt et Wolf, 1996)

Enfin, des séquences "PEST"(pour le symbole des acides aminés impliqués) semblent également servir d'éléments de reconnaissance par le système ubiquitine.

La question est bien sûr de savoir comment et quand ces signaux sont reconnus. Pour le premier pathway (*Cdc34*), c'est la phosphorylation cyclique qui semble "allumer" le signal, pour le second, c'est l'activité elle-même du complexe E3 (APC) qui fluctue au cours du cycle cellulaire.

3.1.3. Le protéasome 26S(Baumeister *et al.*, 1998).

Ce complexe enzymatique trouvé chez tous les eucaryotes reconnaît les protéines ubiquitinées et les dégrade en peptides de tailles variables (nous ne rentrons pas dans ces détails ici) tout en recyclant l'ubiquitine. Le protéasome se compose principalement d'une sous-unité 20S cylindrique composé elle-même de sous-unités de petit poids moléculaire disposées en 4 anneaux de 7 unités. Aux deux extrémités, deux structures 19S sont ajoutées pour former le protéasome complet (Fig. 1.9).

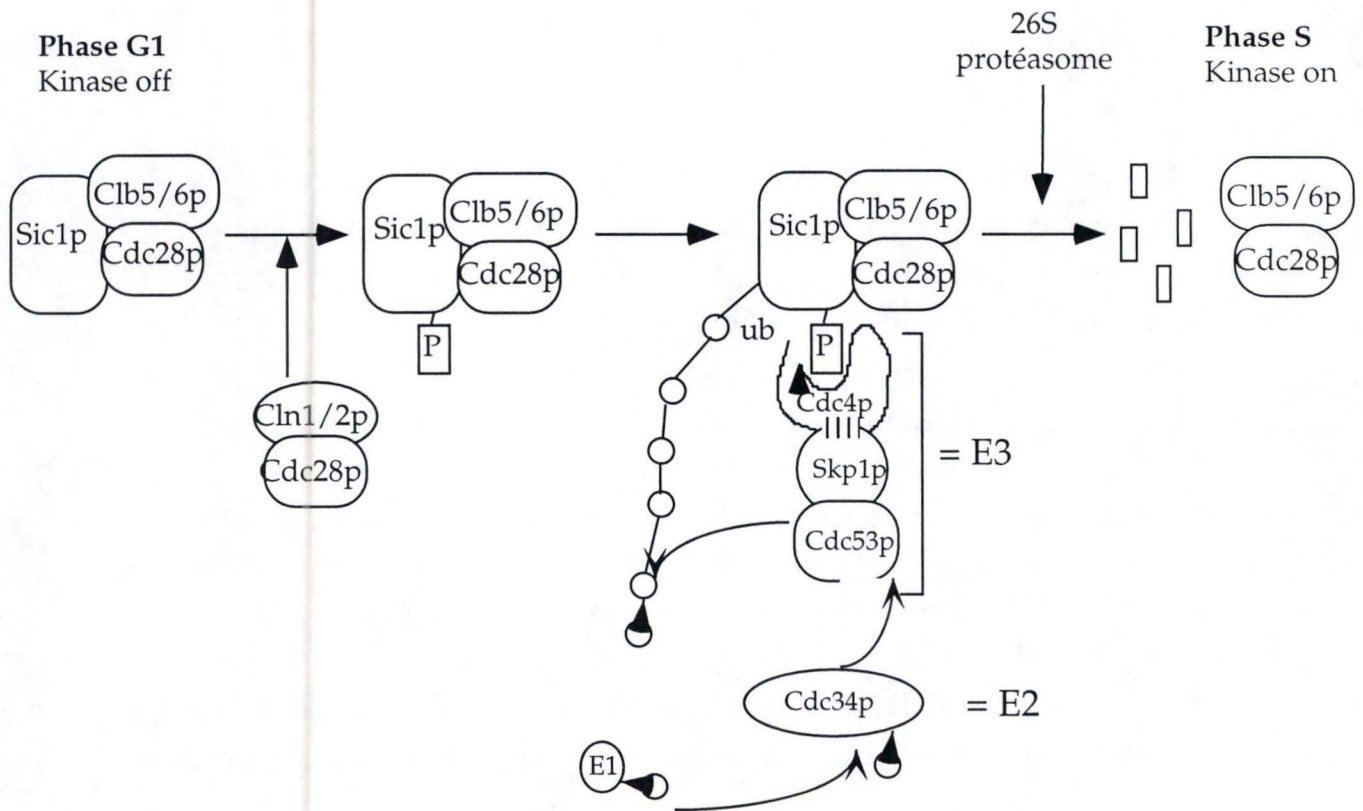
Une grande variété de substrats du protéasome a été caractérisée, et ce procédé de dégradation est effectif notamment dans la dégradation de protéines anormales, l'adaptation métabolique, la différenciation, et bien entendu le contrôle du cycle cellulaire.

3.2. Un exemple particulier de régulation protéolytique : le rôle de Skp1p et du complexe SCF chez *S. cerevisiae*.

Pour illustrer la place du protéasome et de la protéolyse dans la progression du cycle cellulaire, nous nous limiterons à un bref exposé du rôle de Skp1p et du complexe SCF dans ce contexte. L'exemple retenu est la dégradation de l'inhibiteur Sic1p lors de l'entrée en phase S chez *S. cerevisiae*.

3.2.1. L'entrée en phase S chez *S. cerevisiae* est régulée par protéolyse (Verma *et al.*, 1997; Feldman *et al.*, 1997).

Tant que la cellule ne possède pas l'environnement adéquat pour répliquer son ADN, le complexe CDK-cycline qui déclenche la phase S, à savoir Cdc28p-Clb5p/6p, doit rester silencieux. L'inhibiteur Sic1p se lie au complexe pour assurer cette inactivation. Une fois que la cellule est "prête" pour dupliquer ses



" |||| " représente la F box

Figure 1.10 : Modèle moléculaire de la transition G1 à S chez *S.cerevisiae*.

L'activité du couple Cdc28p-Clb5/6p est inhibée par Sic1p (CKI). Durant la phase G1, les complexes Cdc28p-Cln1/2p s'assemblent et vont phosphoryler Sic1p. Cette phosphorylation constitue un signal pour les complexes enzymatiques E2 (Cdc34p) et E3 (Skp1p/Cdc53p/Cdc4p), ce dernier également désigné SCF^{Cdc4p}, pour le transfert de l'ubiquitine vers le CKI (inhibiteur des CDK). Lorsque Sic1p est polyubiquitiné, il devient une cible pour le protéasome et va être dégradé. Cette dégradation active le couple Clb5/6p-Cdc28p qui initie la phase S. (schéma inspiré de Deshaies, 1997)

chromosomes, le niveau d'activité d'un autre complexe cycline-CDK, dans ce cas Cdc28p-Cln1p/2p, devient suffisant pour permettre la phosphorylation de Sic1p qui est alors reconnu comme substrat par le pathway d'ubiquitination. Il est rapidement dégradé et la phase S commence. Comme nous l'avons dit, le pathway d'ubiquitination implique une enzyme E1 qui transfère l'ubiquitine sur Cdc34p (E2). Ensuite E2 transfère l'ubiquitine sur le complexe E3 (Fig. 1.10).

Dans le cas particulier que nous décrivons, E3 est composé de trois protéines : Cdc53p, Skp1p et Cdc4p. Depuis peu, le rôle de ces trois partenaires est clair (Bai *et al.*, 1996; Feldman *et al.*, 1997).

- Cdc53p agit comme échafaudage du complexe; il appartient à une famille de protéines (les "Cullines") très conservée au cours de l'évolution.

- Cdc4p est une protéine à motif "F-box". Ce motif permet l'interaction avec Skp1p. Par ailleurs Cdc4p reconnaît le substrat phosphorylé. La protéine sert donc de pont entre le substrat et le complexe E3.

- Skp1p est le récepteur de Cdc4p (via la F-box de celle-ci), il n'intervient pas directement dans la liaison au substrat, mais recrute différentes protéines à "F-box" pour former différents E3 à spécificité de substrats distinctes.

Ce complexe E3 est également nommé SCF pour " Skp1p/Cdc53p/F-box protein". Si Cdc4p est la "F-box" protéine, on parle de SCF^{Cdc4}.

3.2.2. Généralisation: il existe de nombreux SCF (Patton *et al.*, 1998).

Nous pouvons maintenant généraliser. Dans l'exemple que nous avons pris, l'enzyme E2 (ou Cdc34p) transfère l'ubiquitine sur le complexe E3 (ou SCF^{Cdc4}) qui lui-même la transfère sur le substrat qu'il reconnaît via sa "F-box protein" Cdc4p.

C'est la protéine à "F-box" qui va cibler la reconnaissance du substrat phosphorylé (elle en reconnaît souvent plus d'un seul), et est ainsi l'adaptateur qui spécifie à E3 son substrat.

On comprend donc qu'il existe de nombreuses protéines à "F-box" (Grr1, Met30...) qui ont en commun de lier Skp1p via le motif "F-box" mais, par ailleurs, reconnaissent une gamme de substrats précis. Le rôle de Skp1p dépasse donc le cadre de la transition G1->S, puisqu'il est un composant du complexe E3 assurant le recrutement des adaptateurs de reconnaissance spécifiques des substrats. A ce titre il est en fait un facteur clé du pathway d'ubiquitination impliquant *cdc34*.

3.3. Un autre rôle pour *Sc.Skp1p*?

Historiquement, *Sc. SKP1* a d'abord été isolé lors de cribles génétiques réalisés avec des gènes mutants encodant des protéines du kinétochore (Stemmann et Lechner, 1996). Cette structure subcellulaire confondue avec le centromère chez *S. cerevisiae* est impliquée dans la liaison des chromosomes au fuseau achromatique et dans leur migration en anaphase. Le gène *Sc. SKP1* est un suppresseur de plusieurs composants kinétochoriques, d'où son nom Suppresseur of kinetochore proteins.

Sans rentrer ici dans les détails de la structure du kinétochore, disons simplement que sa taille varie fortement suivant les espèces puisqu'il couvre quelques centaines de paires de bases chez *S. cerevisiae* pour 40 kilobases chez *S. pombe* et une mégabase chez les mammifères.

Il a été suggéré que le mécanisme assuré par Skp1p est identique ici à celui que nous venons de décrire : il recruterait l'appareil protéolytique pour dégrader certains composants du kinétochore et permettre la séparation des chromatides soeurs en anaphase. Une donnée confirmant cette hypothèse est la ségrégation très perturbée des chromosomes à la température restrictive dans un mutant *Skp1* thermosensible (Connelly et Hieter, 1996).

3.4. Etat des lieux chez *S. pombe* et problématique générale du rôle de Skp1p.

Chez les "fission yeasts", il est très probable que le pathway d'ubiquitination soit globalement conservé par rapport à ce qu'on sait chez *S. cerevisiae*. En effet, la conservation du "pathway" d'ubiquitination entre *S. cerevisiae* et les mammifères est très importante et les deux acteurs identifiés chez *S. pombe* jusqu'ici se sont avérés être des homologues tant structuraux que fonctionnels des composants du "pathway" de *S. cerevisiae*. Ainsi, l'inhibiteur Rum1p, l'homologue de Sic1p, qui garde le complexe Cdc2p/Cdc13p silencieux en G1 est dégradé via un pathway impliquant Pop1p, l'homologue de Cdc4p (Kominami et Toda, 1997).

La donnée d'interaction que nous possédons entre le complexe Mop1p/Mcs2p et l'homologue putatif de Skp1p mérite donc d'être exploitée. On connaît en effet des exemples nombreux de cyclines dégradées via Skp1p chez *S. cerevisiae* et on a récemment montré que chez l'Homme, il existe un complexe SCF^{Skp2} associé

en phase S avec CDK2/CyclineA et assurant probablement sa dégradation cyclique (Zhang *et al.*, 1995). Nous posons donc l'hypothèse que le complexe Mop1p-Mcs2p pourrait s'associer de façon similaire avec un SCF, ce qui constituerait un mode de régulation.

Toutefois, il n'y a pas de motif "F-box" ni dans Mop1p, ni dans Mcs2p. On doit donc imaginer que lors du screen "double-hybride plus un" réalisé, une protéine à "F-box" endogène a fait le lien entre le complexe appât et la proie identifiée.

Il est évident que de nombreux travaux seront nécessaires pour étayer cette hypothèse. La première étape étant le clonage d'un insert génomique contenant *Sp. Skp1* ; c'est l'objet de ce travail.

11. Objectifs

Notre travail s'inscrit dans le cadre général de l'étude de la régulation du complexe Mop1p-Mcs2p chez *Schizosaccharomyces pombe*. Sur base des connaissances relatives aux différentes fonctions assurées par CDK7, l'homologue de Mop1p chez les mammifères, on pense que ce couple Mop1p-Mcs2p joue deux rôles essentiels au sein de la cellule : il régule la progression du cycle cellulaire et contrôle la transcription de gènes de classe II. L'orientation de la réponse cellulaire vers l'une ou l'autre voie requiert probablement la présence de partenaires spécifiques pour le complexe Mop1p-Mcs2p.

Afin de découvrir de nouveaux partenaires au couple CDK/cycline, un crible d'une banque d'ADNc de *S. pombe* par le système "double-hybride plus un" a été réalisé et plusieurs partenaires potentiels ont été identifiés. Un de ces candidats présente un intérêt particulier; il s'agit d'un ADNc codant pour un produit homologue de Skp1p de *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *H. sapiens*, ... Des études récentes ont montré que chez *S. cerevisiae*, la protéine Skp1p est impliquée dans la voie de protéolyse par le protéasome en relation avec la régulation du cycle cellulaire. L'objectif de notre travail est le clonage d'un insert génomique contenant le gène complet *Sp. Skp1*. Pour ce faire, une minibanque génomique va être réalisée et criblée. Une fois les clones positifs identifiés, le gène sera caractérisé tant au niveau structural que fonctionnel.

III. Résultats

Comme schématisé dans la figure 1.5, Mop1p-Mcs2p serait un complexe central au carrefour des voies de régulations de deux processus que sont le cycle cellulaire et la transcription. Cette hypothèse conduit à l'idée que Mop1p-Mcs2p orienterait la réponse cellulaire en fonction de signaux perçus par la levure. La recherche de partenaires susceptibles d'orienter cette réponse a été entreprise via le "double-hybride plus un". Un premier crible a permis d'identifier Skp1p comme partenaire potentiel du complexe Mop1p-Mcs2p. Cette protéine impliquée dans les processus de protéolyse pourrait de ce fait, constituer un moyen de régulation du complexe.

1. Isolement et caractérisation d'un ADNc candidat.

1.1. Principe du " double-hybride plus un ".

Dans ce contexte de partenariat spécifiant l'orientation de la réponse cellulaire, un crible "double-hybride" (Golemis et Brent, 1992) a été réalisé afin de détecter des interacteurs potentiels. Le "double-hybride" est un système *in vivo* d'étude des interactions entre protéines.

L'organisme de référence, *S. cerevisiae* est transformé par plusieurs plasmides. Le premier plasmide dit "appât", permet la synthèse d'une protéine de fusion entre la protéine de liaison à l'ADN, LexA et une protéine appât, à savoir, celle dont on recherche les interacteurs. Le deuxième plasmide appelé plasmide proie permet l'expression d'une protéine de fusion entre un domaine transactivateur viral de l'ARN polymérase II (VP16) et des interacteurs potentiels de la protéine appât provenant d'une banque d'ADNc de *S. pombe*. Lorsque la levure reçoit un plasmide de la banque codant pour un interacteur potentiel, un "facteur de transcription" est reformé, ce qui permet de recruter l'ARN polymérase II et d'initier la transcription des gènes rapporteurs. Deux gènes rapporteurs chromosomiques sont utilisés, le premier encode la β -galactosidase de *E. coli* et le second est le gène *LEU2* de *S. cerevisiae*. En amont de ces deux gènes, six répétitions de l'opérateur de LexA ont été clonées de façon à recruter LexA-

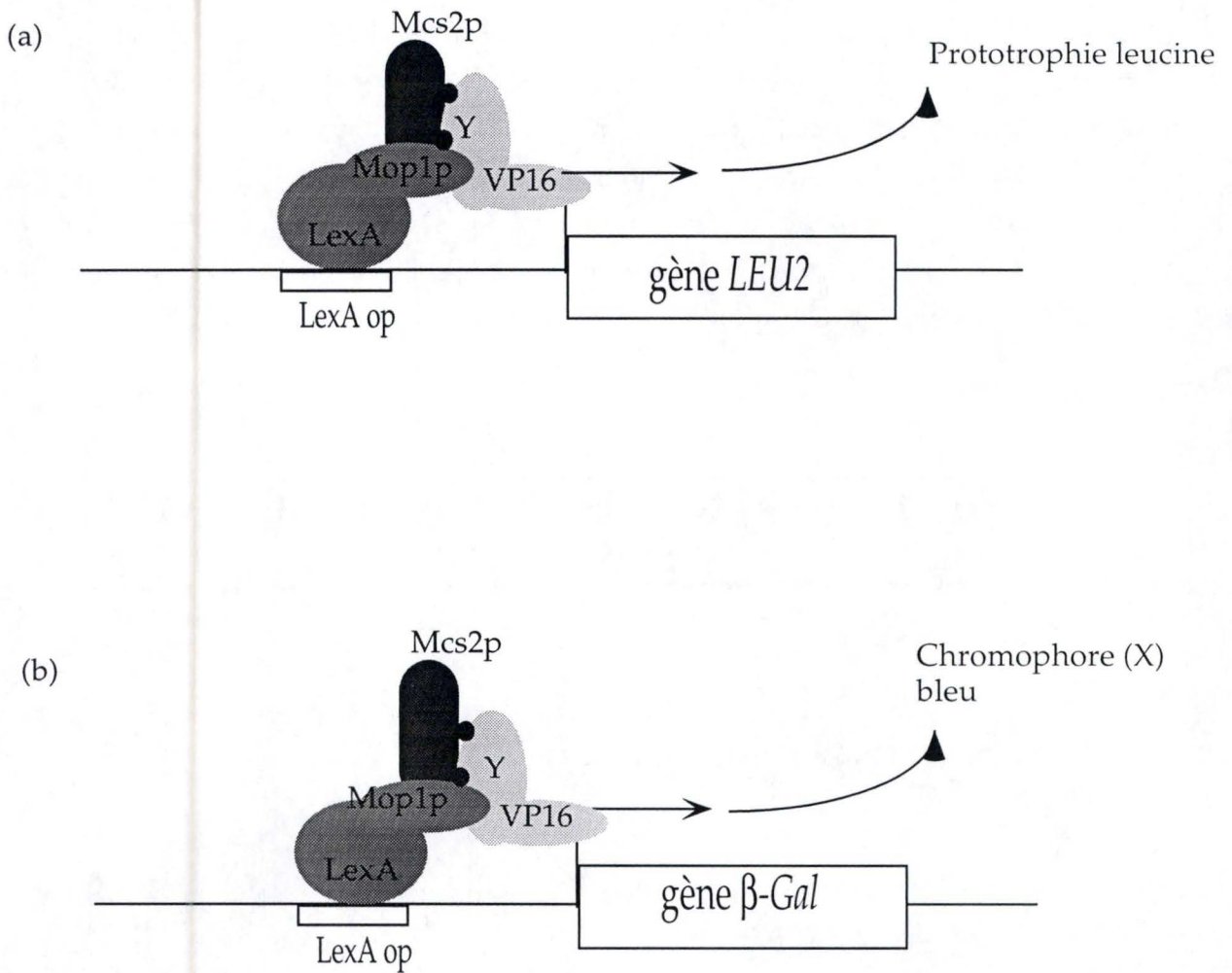


Figure 3.1 : Schéma du système "double-hybride plus un" utilisé. Lorsqu'un interacteur potentiel (Y-VP16) est présent, l'ARN polymérase II est recrutée et la transcription du gène rapporteur peut avoir lieu. Les levures possédant les trois partenaires (LexA-Mop1p, Mcs2p et Y-VP16) croissent sur un milieu sans leucine ou deviennent bleues en présence de X-Gal selon qu'il s'agit du rapporteur (a) ou (b) respectivement.

appât. L'expression des gènes rapporteurs est testée, soit en présence de X-GAL, soit sur un milieu dépourvu de leucine selon qu'il s'agit du rapporteur LacZ ou *LEU2*, respectivement (Fig. 3.1).

Dans l'étude de la régulation de Mop1p-Mcs2p, la recherche de partenaires nécessite l'utilisation d'un système "double-hybride plus un". Deux protéines de fusion sont produites, à savoir LexA-Mop1p et VP16-Y (Y représente les différents ADNc de la banque de *S. pombe*), mais en outre le gène encodant la cycline Mcs2p est surexprimé de telle sorte que s'établisse l'interaction Mop1p-Mcs2p. Celle-ci permet de recruter le partenaire Y capable d'interagir avec le complexe ainsi constitué.

Un premier crible a permis d'isoler vingt-huit candidats par sélection de la synthèse de β -galactosidase sur milieu X-GAL (le rapporteur *LEU2* n'a pu être utilisé pour des raisons exposées au point 1.3).

Ces clones ont été restriés sur le même milieu et cinq d'entre eux ont été sélectionnés pour leur capacité d'induire fortement la transcription du gène β -galactosidase. Ces cinq clones ont été séquencés et nous avons vérifié que la séquence des ADNc étaient bien en phase avec le transactivateur VP16. Les caractéristiques de ces cinq clones sont brièvement reprises dans le tableau ci-dessous.

N° du clone	Nom	Caractéristiques	Référence
8	Rad51p de <i>S. pombe</i>	Intervient dans la réparation de l'ADN	Jang <i>et al.</i> , 1996
23	Fac1p	une protéine à doigts de Zn	Zhu et Bowser, 1996
27	ATP synthase	joue un rôle dans le couplage ATP-gradient de protons	Falson <i>et al.</i> , 1993
57	homologue de <i>Sc. Skp1p</i>	Intervient dans la voie de protéolyse des régulateurs du cycle cellulaire	Bai <i>et al.</i> , 1997
79	homologue de la centrosomine de <i>H. sapiens</i>	encode pour un constituant du centrosome	Li et Haufman, 1996

Parmi ces candidats partenaires potentiels du complexe Mop1p-Mcs2p, nous avons décidé de porter notre attention sur le clone n°57. En effet, la protéolyse apparaît de plus en plus comme une voie de régulation centrale du cycle cellulaire et pourrait constituer un mode de régulation du complexe Mop1p-Mcs2p. Nous allons dans un premier temps cloner un insert génomique contenant le gène *Sp. Skp1* complet. Au préalable nous avons d'abord confirmé l'homologie entre l'ADNc cloné et le gène *SKP1* de *S. cerevisiae*.

1.2. La séquence de l'insert cloné présente une grande homologie avec le gène *SKP1* de *S. cerevisiae*.

1.2.1. Analyse d'homologie globale par "BLAST".

La séquence d'ADNc a été soumise à une analyse par BLAST-X (pour Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997). Ce système permet de traduire les séquences nucléiques dans les six phases et d'identifier les protéines présentant une grande homologie avec celles-ci. Le résultat du BLAST-X est résumé dans le tableau suivant :

Protéine retenue	Pourcentage d'identité
Skp1p <i>S. cerevisiae</i>	68%
CB34 yeast centromere DNA binding protein complex CBF 3 sous unité D	68%
Skp1p <i>A. thaliana</i>	64%
Skp1p <i>C. elegans</i>	55%
Skp1p = p19 associée au couple CDK2/CyclineA <i>H. sapiens</i>	62%

Ce BLAST-X identifie l'ADNc cloné comme codant pour une protéine homologue aux protéines Skp1p présentes chez beaucoup d'espèces telles que *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *C. elegans*, *H. sapiens*.

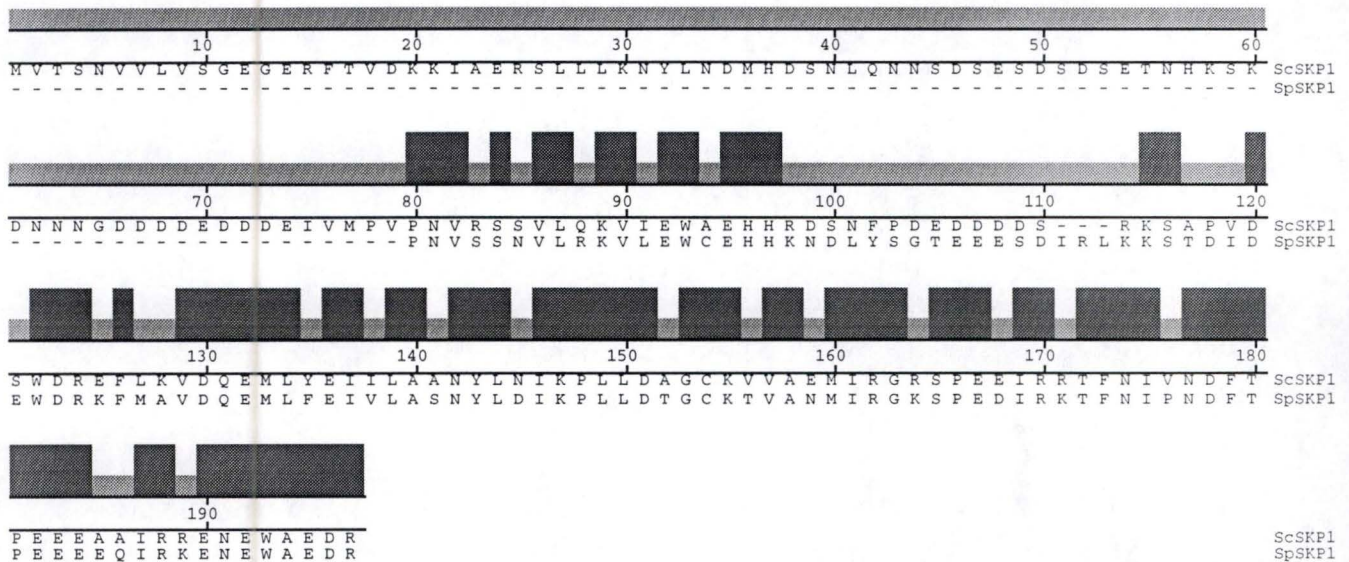


Figure 3.2 : Alignement entre *Sc. Skp1p* et la protéine tronquée encodée par l'ADNc partiel isolé de la banque d'ADNc de *S. pombe* lors du criblé en "double-hybride plus un".

La séquence d'ADNc a été soumise à un BLAST-X et révèle une grande homologie avec des Skp1p chez diverses espèces telles *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *C. elegans* et *H. sapiens* (cfr. texte).

L'alignement (Clustal par MegAlign) révèle que nous avons probablement cloné un ADNc partiel correspondant au domaine carboxy-terminal de la protéine. Les boîtes foncées indiquent les identités.

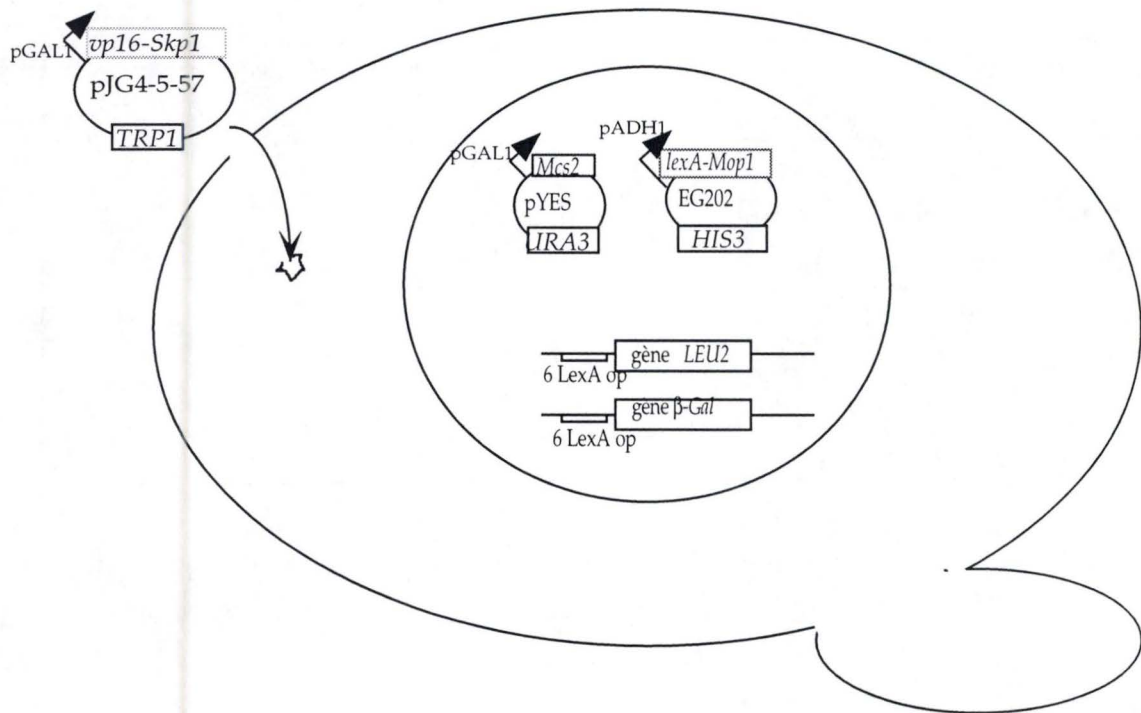


Figure 3.3 : Schéma représentant la transformation de la souche de *S. cerevisiae*, BUN contenant les plasmides EG202-LexA-Mop1 et pYES-Mcs2 par le plasmide pJG4-5-VP16-Skp1.

1.2.2. Un alignement protéique entre *Sc. Skp1p* et la séquence candidate *Sp. Skp1p* permet de détecter l'étendue de l'ADNc cloné.

La séquence de la protéine traduite à partir de l'ADNc de *S. pombe* a été alignée avec la séquence de la protéine homologue présente chez *S. cerevisiae*. Le programme MegAlign (il fait partie du "package" DNASTAR et utilise le programme d'alignement Clustal) est utilisé afin d'aligner les deux séquences. Ce programme délimite sous forme de boîtes les acides aminés identiques entre les deux séquences. Le résultat de cet alignement est représenté dans la figure 3.2. L'analyse de cet alignement nous permet d'émettre plusieurs hypothèses relatives à la protéine candidate. Premièrement, l'ADNc ne nous fournit probablement qu'une séquence partielle du gène. Deuxièmement, ce ADNc contient le codon STOP de traduction du gène et couvre le domaine carboxy-terminal de la protéine Skp1p.

En conclusion, nous avons un ADNc partiel codant pour une protéine qui présente 68% d'identité avec la protéine Skp1p de *S. cerevisiae*. Afin de confirmer l'interaction détectée dans l'expérience initiale, le candidat interacteur a été retransformé dans la souche utilisée lors du crible. C'est l'objet du paragraphe suivant.

1.3. L'interaction fonctionnelle du candidat en "double-hybride plus un" est confirmée.

1.3.1. La stratégie et sa mise en oeuvre.

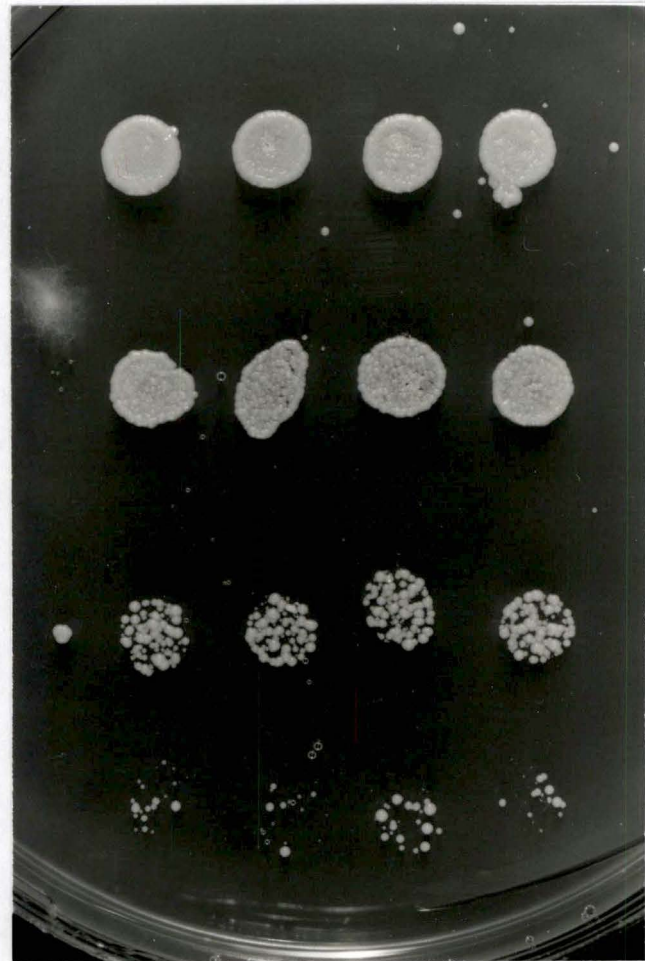
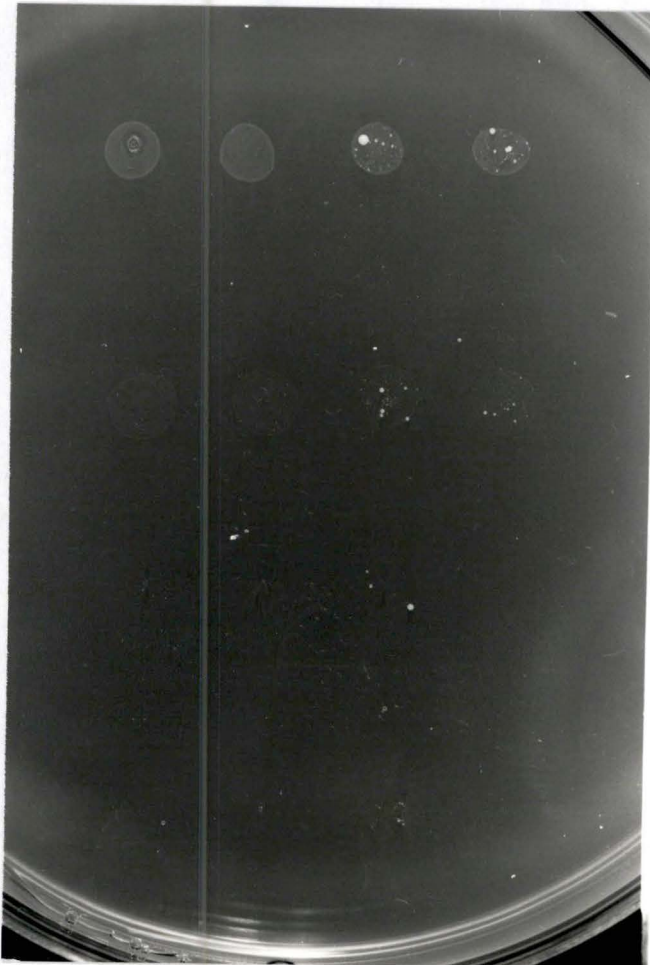
La souche de levure *S. cerevisiae* utilisée est la souche BUN (*cfr.* matériel et méthodes, souches et plasmides) au sein de laquelle les deux gènes rapporteurs sont chromosomiques et en amont desquels sont fusionnés six opérateurs de LexA.

Cette souche est transformée par deux plasmides : le premier (EG202-LexA-Mop1) porte le gène de fusion LexA-Mop1 sous contrôle du promoteur constitutif de l'ADH. Le second (pYES-mcs2) porte le gène *Mcs2* sous le contrôle du promoteur GAL1 inductible par le galactose. Ensuite, nous avons réalisé la transformation de cette souche BUN-Mop1p-Mcs2p par le plasmide n°57 isolé lors du crible initial -que nous nommons le pJG4-5-57- portant le gène de fusion

MILIEUX

SD-H-U-W-L

SGR-H-U-W-L



Protéines
exprimées

LexA-Mop1p

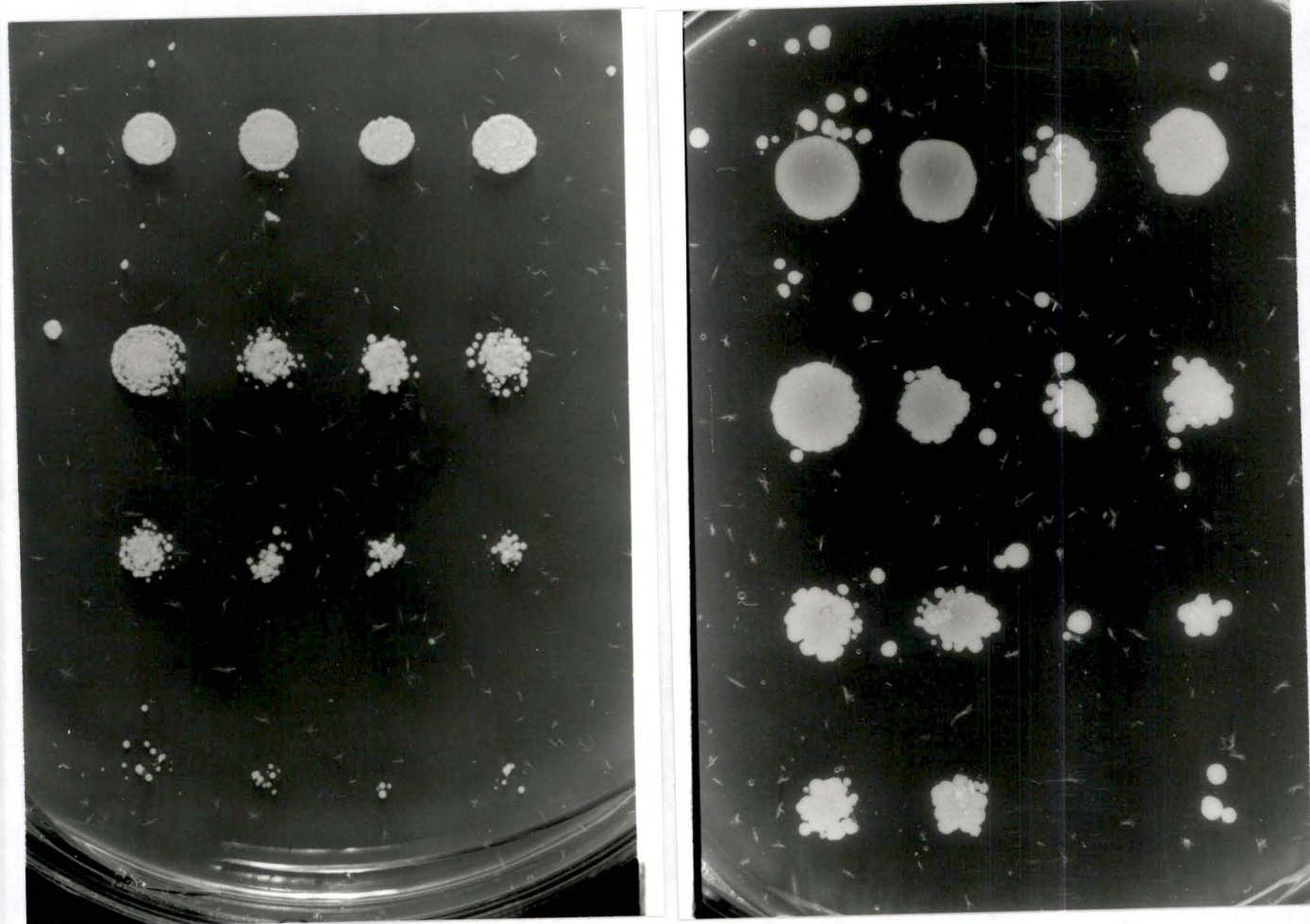
LexA-Mop1p	LexA-Mop1p
Mcs2p	Mcs2p
VP16-Skp1p	VP16

Figure 3.4 (a) : Photographies de l'expérience de "double-hybride plus un". Plusieurs dilutions de deux clones "test" (à gauche sur les photos) et de deux clones "contrôle" (à droite sur les photos) ont été déposées sur les milieux de sélection de l'interaction (*cfr.* texte). La sélection de l'interaction s'effectue dans ce cas, par l'expression du gène rapporteur *LEU2*.

MILIEUX

XD-H-U-W

XGR-H-U-W



Protéines
exprimées

LexA-Mop1p

LexA-Mop1p	LexA-Mop1p
Mcs2p	Mcs2p
VP16-Skp1p	VP16

Figure 3.4 (b) : Photographies de l'expérience de "double-hybride plus un". Plusieurs dilutions de deux clones "test" (à gauche sur les photos) et de deux clones "contrôle" (à droite sur les photos) ont été déposées sur les milieux de sélection de l'interaction (*cf.* texte). L'identification de l'interaction s'effectue dans ce cas, par l'expression du gène rapporteur β -galactosidase (Coloration peu visible sur le document).

VP16-ADNc partiel de *Skp1p* sous contrôle du promoteur *pGAL1* inductible par le galactose. La souche est également transformée par le *pJG4-5* seul comme contrôle négatif. La figure 3.3 schématise cette transformation. La souche transformée est placée sur milieu *SD-U-H-W* afin de sélectionner les levures contenant les trois plasmides. Après croissance des levures transformées, différentes dilutions de deux transformants sont déposées sur les milieux de sélection de l'interaction :

Milieux	Source de carbone	Substrat de β -gal
SD-U-H-W-L	Dextrose	/
SGR-U-H-W-L	Galactose/Raffinose	/
XD-U-H-W	Dextrose	X-GAL
XGR-U-H-W	Galactose/Raffinose	X-GAL

Le milieu galactose permet d'induire la transcription du gène *Mcs2* et du gène de fusion *VP16-ADNc* partiel de *Skp1p*. Sur ces milieux, les trois partenaires *Mop1p/Mcs2p*/domaine carboxy-terminal de *Skp1p* peuvent interagir et recruter l'ARN polymérase II et les facteurs de transcription indispensables. Les deux gènes rapporteurs β -galactosidase et *LEU2* sont exprimés et les levures peuvent croître sur milieu déficient en leucine et deviennent bleues en présence de X-Gal. Le tableau suivant résume les résultats attendus lorsqu'il y a interaction :

Milieux sélectifs	Croissance	Coloration
SD-U-H-W-L	-	-
SGR-U-H-W-L	+	-
XD-U-H-W	+	+
XGR-U-H-W	+	+

1.3.2. Résultats.

Nous avons transformé la souche *BUN-Mop1p-Mcs2p* par le plasmide *pJG4-5-57*. Une série de dilutions 10X a été réalisée et 10 μ l de chaque dilution ont été déposés sur les milieux sélectifs pour tester l'interaction.

Des dilutions d'un contrôle négatif ont été également réalisées. Ce contrôle négatif est la souche *BUN-Mop1p-Mcs2p* transformée par le plasmide *pJG4-5* sans insert.

Les résultats de cette expérience sont représentés à la figure 3.4.

(a)

<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
3300 bp	3300 bp
2100 bp	2100 bp
1350 bp	950 bp
600 bp	600 bp
	400 bp

(c)

<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
3300 bp	3300 bp
2100 bp	2100 bp
1350 bp	800 bp
600 bp	600 bp
150 bp	400 bp
	150 bp

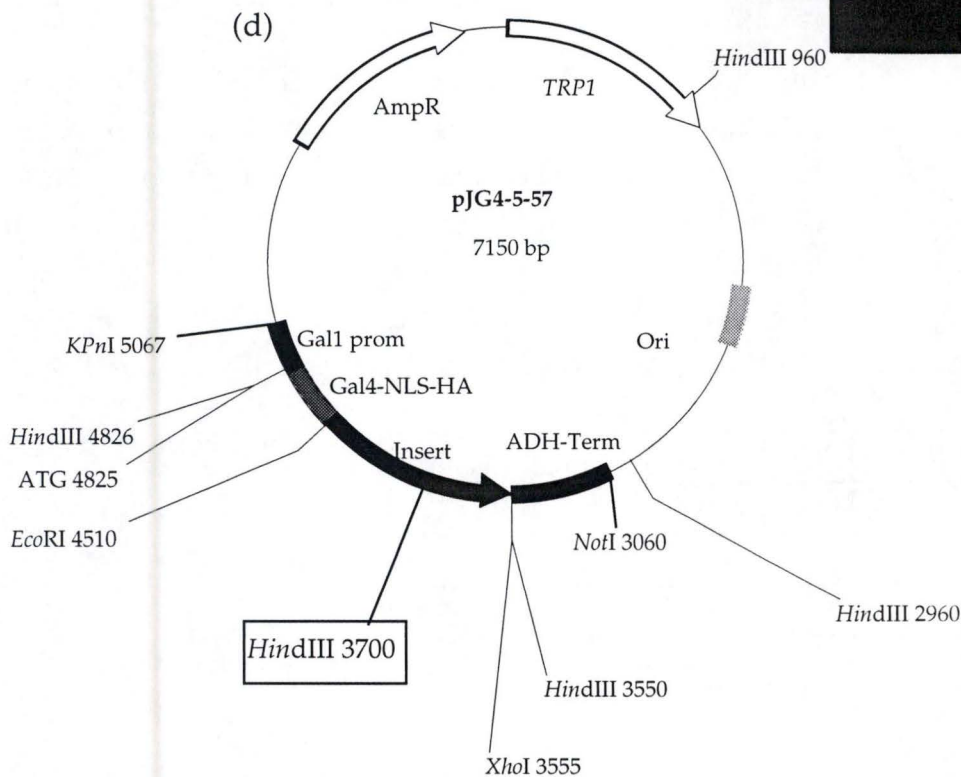
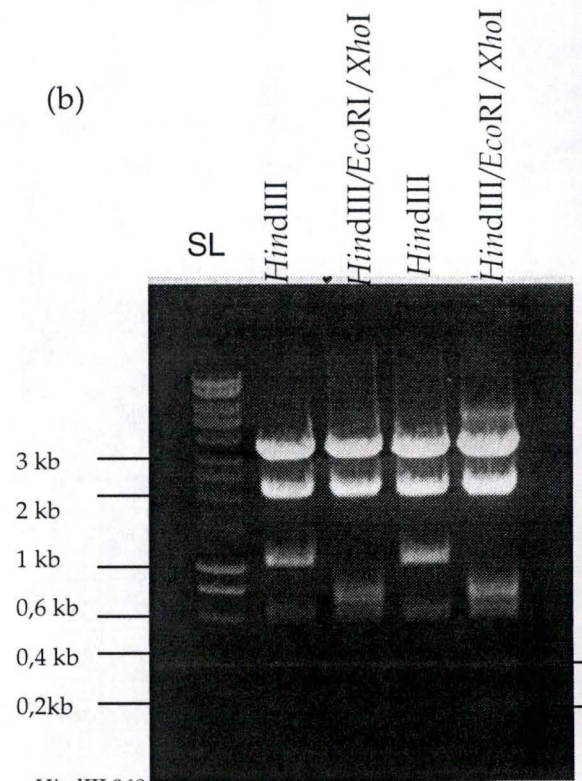


Figure 3.5: Analyse diagnostique du plasmide pJG4-5-57 par restrictions.

(a) Tableau indiquant les tailles attendues des fragments du plasmide restreint en *Hind*III, et en *Hind*III, *Eco*RI, *Xho*I.

(b) Profils de restriction obtenus sur deux minipreps de ce plasmide. (SL est le sigle pour Smartladder, un marqueur de taille). Les bandes de petites tailles ne sont pas visibles sur le document.

(c) Tableau indiquant les tailles obtenues lors de la restriction simple et composée.

(d) Carte du plasmide pJG4-5-57 établies sur base des profils de restrictions obtenus. Ces profils permettent d'identifier la présence d'un site *Hind*III (encadré), dans l'insert contenant entre autres l'ADNc partiel de *Sp. Skp1*.

Il est intéressant de noter que l'induction du gène *Mcs2* par le galactose conduit à l'expression du gène *LEU2* en absence de toute protéine fusionnée avec VP16. On peut donc conclure qu'une fois formé, le complexe LexA-Mop1p-Mcs2p est capable de recruter l'ARN polymérase II et de transcrire le gène *LEU2* à un niveau suffisant pour assurer la croissance sur milieu dépourvu de leucine. Le rapporteur β -galactosidase est plus "stringent" et nécessite la présence de VP16-ADNc partiel de Skp1p pour être transcrit à un niveau suffisant. C'est la raison pour laquelle seul ce rapporteur a été utilisé lors du crible initial.

Cette expérience de "double-hybride plus un" nous permet de confirmer *in vivo* l'interaction physique entre Mop1p-Mcs2p et Skp1p.

1.4. Profil de restriction de l'insert d'ADNc cloné.

Nous avons isolé un ADNc partiel encodant un partenaire potentiel du complexe Mop1p-Mcs2p. Ce candidat (le numéro 57) est cloné dans le plasmide pJG4-5 (*cfr.* matériel et méthodes, souches et plasmides). Nous avons restreint le plasmide avec *Hind*III et avec une combinaison d'enzymes : *Hind*III, *Eco*RI, *Xho*I. Cette combinaison est utile du fait que la banque a été réalisée en insérant l'ADNc en *Eco*RI/*Xho*I dans le pJG4-5 pour créer une fusion avec VP16 et que, par ailleurs, la présence de ces sites *Hind*III dans le pJG4-5 rend cette enzyme très diagnostique du vecteur. La carte du plasmide avec l'insert d'ADNc de 950 pb, ainsi que les tailles théoriques de bandes de restrictions sont représentées à la figure 3.5.a. Lorsque ces restrictions simples ou combinées sont réalisées sur le pJG4-5-57, nous obtenons un profil de restriction différent. La photographie du gel (fig. 3.5.b) montre qu'une bande de 150 bp apparaît dans une restriction *Hind*III et que dans la restriction composée, la bande à 950 bp est scindée en deux bandes dont les tailles sont de 800 et 150 bp. Ce résultat montre que l'insert d'ADNc contient un site *Hind*III localisé environ en position 3700 comme représenté dans la figure 3.5.d.

Compte tenu du fait de la présence fréquente d'introns dans les gènes de *S. pombe*, et afin de connaître la séquence du gène complet, nous allons cloner l'ADN génomique de ce gène. (Mount, 1982, Guthrie, 1986 cités in Russel, 1989)

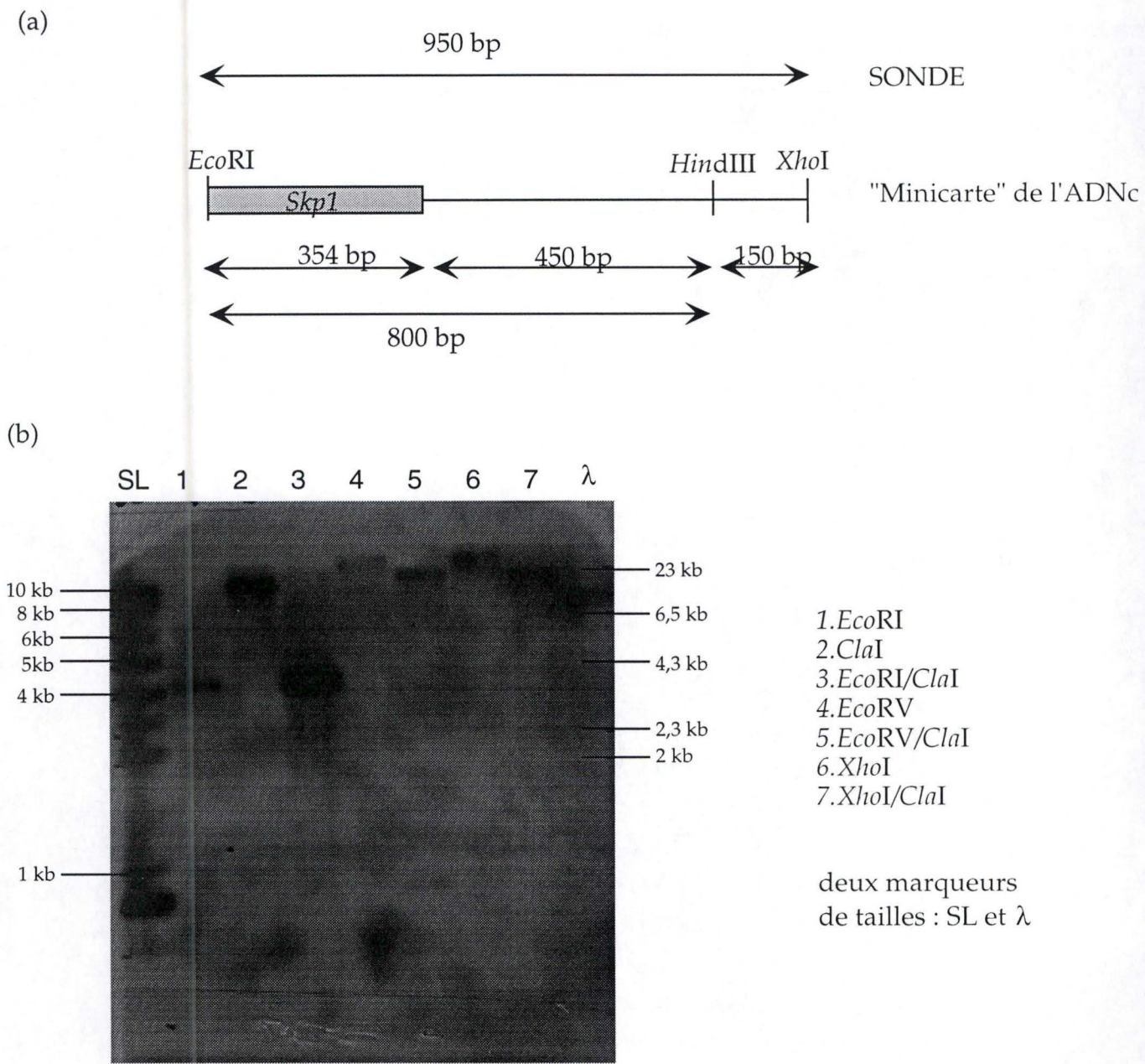


Figure 3.6 : Authentification de l'ADNc cloné comme appartenant au génome de *S. pombe*.

(a) Schéma de la sonde utilisée pour réaliser le crible.

Celle-ci provient du plasmide pJG4-5-57, restreint en *EcoRI/XhoI*. Cette restriction libère un fragment de 950 pb qui a servi de matrice pour la synthèse de la sonde par "random primed DNA labelling". Une "minicarte" est présentée pour information.

(b) Southern-Blot.

On voit que quelle que soit la restriction réalisée sur l'ADN génomique de la souche SPQ01 de *S. pombe*, la sonde fournit un signal positif pour toutes les pistes.

2. Clonage et séquençage de l'insert génomique contenant *Sp. Skp1*.

2.1. Authentification par "Southern-Blot" de l'origine du ADNc candidat.

Nous avons voulu vérifier par "Southern-Blot", que le génome de *S. pombe*. contient la séquence nucléotidique encodée par l'ADNc cloné.

2.1.1. Synthèse de la sonde.

Pour cribler l'ADN génomique de *S. pombe*, nous allons synthétiser une sonde radioactive au départ d'un "template" qui est l'ADNc isolé du "double-hybride plus un". Nous soumettons le plasmide pJG4-5-57 (Fig. 3.5.d) à une digestion *EcoRI/XhoI* afin d'exciser l'insert de 950 pb. Cet insert contient l'ADNc partiel encodant *Skp1p* (354 pb) et une séquence nucléotidique non connue (+/- 600 bp) (Fig. 3.6.a).

Ce fragment restreint en *EcoRI/XhoI* constitue la matrice à partir de laquelle la sonde va être synthétisée par "random primed DNA labelling" (*cfr.* matériel et méthodes, techniques relatives à l'ADN).

2.1.2. Southern-Blot proprement dit.

Nous avons restreint de l'ADN génomique de la souche SPQ01 de *S. pombe* par diverses enzymes ou combinaisons d'enzymes : *EcoRI, ClaI, EcoRI/ClaI, EcoRV, EcoRV/ClaI, XhoI, XhoI/ClaI* et réalisé le Southern-Blot comme décrit (*cfr.* matériel et méthodes, techniques relatives à l'ADN). L'autoradiographie résultante est représentée dans la figure 3.6.b.

Elle permet de détecter des fragments d'une taille variant entre 4 à 10 kb contenant une séquence nucléotidique complémentaire à la sonde. Nous pouvons conclure de cette expérience que l'ADNc candidat qui interagit en "double-hybride plus un" avec *Mop1p/Mcs2p* et qui encode un homologue de la

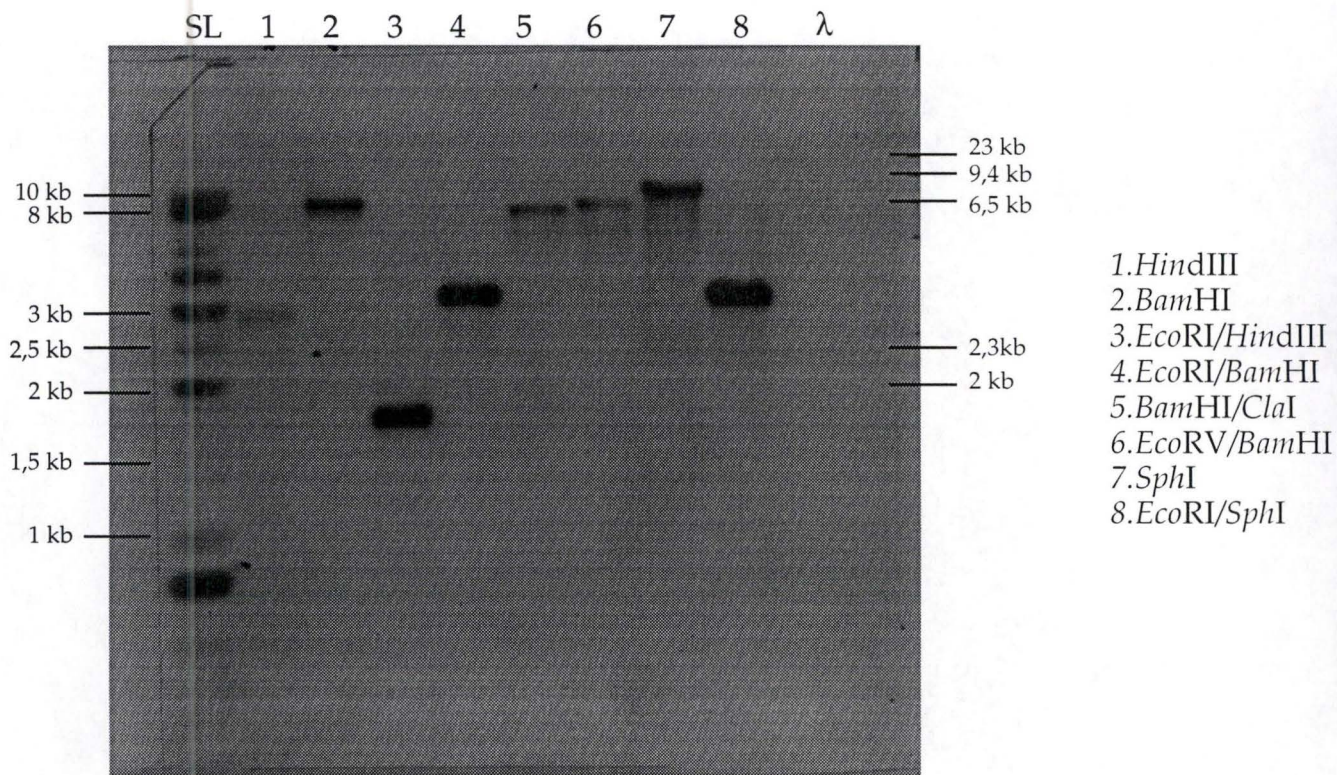


Figure 3.7 : Southern-Blot réalisé pour définir un couple d'enzymes de restriction générant un insert de taille modérée susceptible de contenir le gène *Skp1* entier de *S. pombe*.

Le Southern-Blot est réalisé sur de l'ADN génomique de la souche SPQ01 de *S. pombe*. Cet ADN a été soumis à diverses restrictions (1 à 8). La restriction de l'ADN génomique par le couple enzymatique *Eco*RI/*Hind*III fournit un fragment génomique de 1,7 kb qui s'hybride avec la sonde radioactive décrite à la figure 3.6 et qui sera retenu pour constituer la minibanque (*cf.* texte).

protéine Skp1p de nombreuses espèces, encode une séquence nucléotidique appartenant au génome de *S. pombe*.

2.2. Le clonage de *Sp. Skp1* par sondage d'une minibanque d'ADN génomique de *S. pombe*.

2.2.1. Constitution de la minibanque.

Ne disposant pas d'une banque génomique de *S. pombe*, nous avons créé une minibanque génomique destinée à être criblée par la sonde utilisée au point 2.1. Pour ce faire, un nouveau "Southern-Blot" a été réalisé afin de définir une gamme de tailles de fragments hybridés par la sonde en fonction d'une combinaison d'enzymes définies. Ces fragments doivent être ensuite clonés dans un vecteur afin de constituer la minibanque génomique.

2.2.1.1. Un southern-Blot permet de choisir une gamme de taille des inserts à cloner.

L'ADN génomique a été restreint par une série d'enzymes : *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI/HindIII*, *EcoRI/BamHI*, *BamHI/ClaI*, *EcoRV/BamHI*, *SphI*, *SphI/EcoRI*. Le Southern-Blot a été réalisé dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. La figure 3.7 représente l'autoradiographie obtenue après 14 heures d'exposition.

Il nous montre des fragments d'une taille variant de 1,7 à 10 kb hybridés par la sonde et restreints par des enzymes différentes. Pour constituer la minibanque, le choix du fragment restreint présente deux contraintes. Premièrement, il faut que la sonde radioactive allume une bande unique sur la piste de restriction; ce qui permet de supposer que l'entièreté du gène est présente dans cet insert. La seconde contrainte repose sur la taille de l'insert génomique à cloner. Celui-ci doit être suffisamment grand pour contenir le gène mais d'une taille raisonnable pour simplifier les problèmes de localisation dans l'insert et son séquençage. Compte tenu de ces contraintes, nous choisissons sur base de l'autoradiographie, de récupérer des fragments restreints par la combinaison d'enzymes de restriction *EcoRI*, *HindIII*, dont la taille est estimée à 1,7 kb.

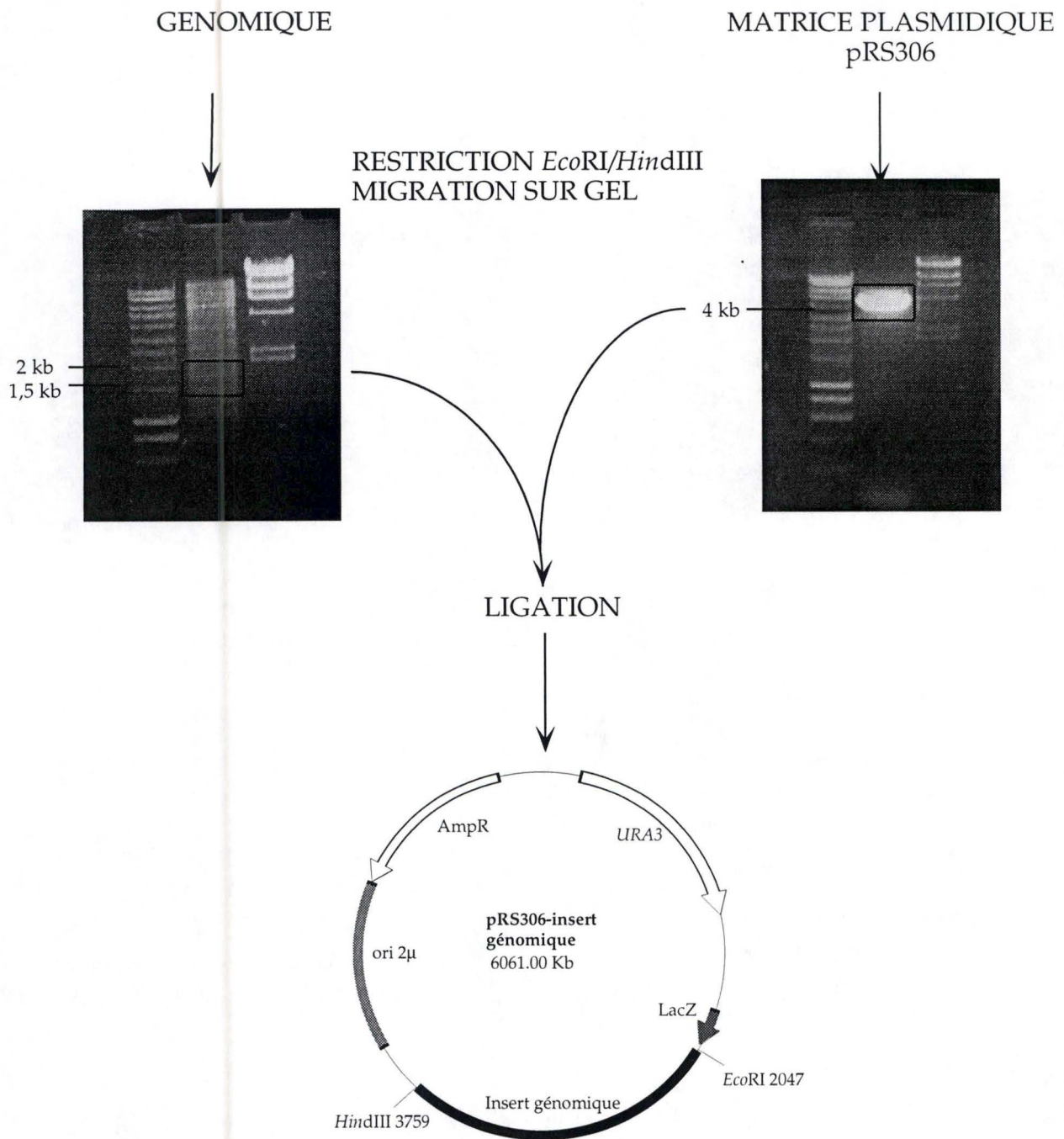


Figure 3.8 : Construction des plasmides qui vont constituer la minibanque. Les étapes sont : la restriction de la matrice et de l'ADN génomique de la souche SpQ01 de *S. pombe* par *EcoRI* et *HindIII*; la récupération des bandes sur gel, d'une part pour le fragment de taille adéquate pour la matrice et, d'autre part pour des fragments génomiques dont la taille varie entre 1,5 et 2,0 kb; la ligation des inserts et des matrices en un vecteur circulaire.

2.2.1.2. Le clonage des inserts dans le vecteur pRS306.

Nous avons choisi, grâce au "Southern-Blot", un couple d'enzymes de restriction générant un insert de 1,7 kb ayant une chance raisonnable de contenir le gène *Skp1* de *S. pombe*. Pour pouvoir constituer une minibanque riche en fragments de taille variant entre 1,5 et 2,0 kb, nous restreignons l'ADN génomique de *S. pombe* par les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII*. Après une électrophorèse sur gel d'agarose, nous découpons le fragment du gel d'agarose qui contient l'ADN de taille correspondante pour le cloner après purification dans un plasmide multi-copie, le pRS306 restreint en *EcoRI/HindIII* (cfr. matériel et méthodes, souches et plasmides). Les différentes étapes de cette construction plasmidique ainsi que la carte du plasmide obtenu sont présentées à la figure 3.8.

A partir de ce schéma du plasmide (fig. 3.8), nous pouvons correctement orienter le gène *Skp1* dans le plasmide. En effet, nous savons de par l'analyse du plasmide pJG4-5-57 (fig. 3.5), qu'à environ 400 bp du codon STOP du gène *Skp1*, se trouve un site de restriction *HindIII*. Or, clonant l'insert en *EcoRI/HindIII*, nous pouvons donc conclure que l'extrémité 5' du gène est à proximité du site *EcoRI* et que l'extrémité 3' du gène est localisée à proximité du site *HindIII*.

2.2.1.3. Transformation du produit de la ligation dans *E. coli*.

Le produit de la ligation est ensuite utilisé afin de transformer des cellules CaCl_2 compétentes de *E. coli*.

Nous avons obtenu 12500 clones sur milieu sélectif LB Amp. Ces clones ont reçu un plasmide répliatif contenant des inserts génomiques et représentent une minibanque qui sera criblée avec la même sonde radioactive que celle utilisée pour le "Southern-Blot".

2.2.2. Criblage de la minibanque et analyse des inserts génomiques candidats.

2.2.2.1. Le criblage de la minibanque permet une première sélection des clones candidats.

Nous avons constitué une minibanque de 12500 clones représentatifs de tous les fragments restreints en *EcoRI* et *HindIII*, de 1,5 à 2,0 kb du génome de *S. pombe*. Afin de sélectionner le ou les clone(s) ayant reçu le plasmide contenant *Skp1*,

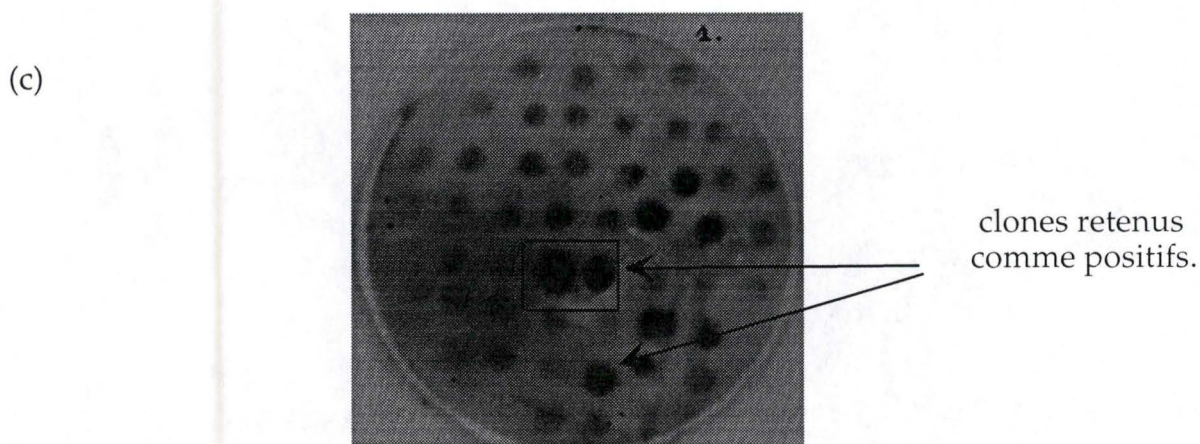
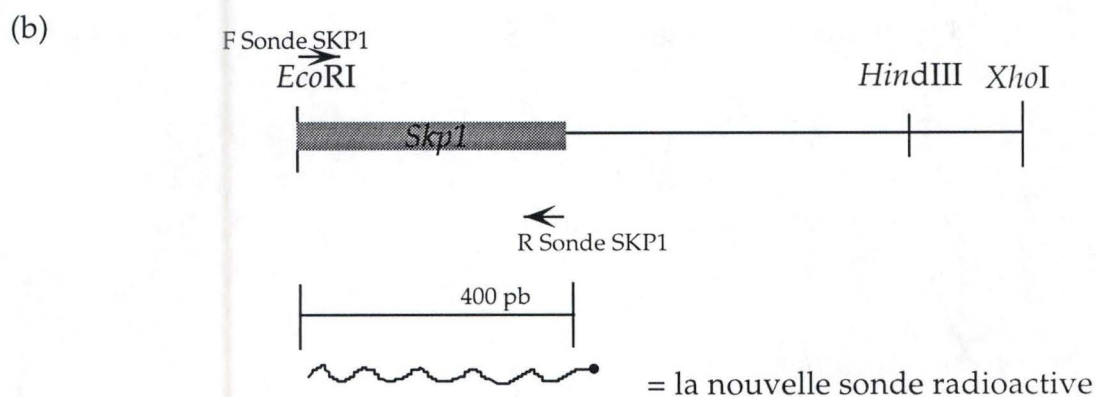
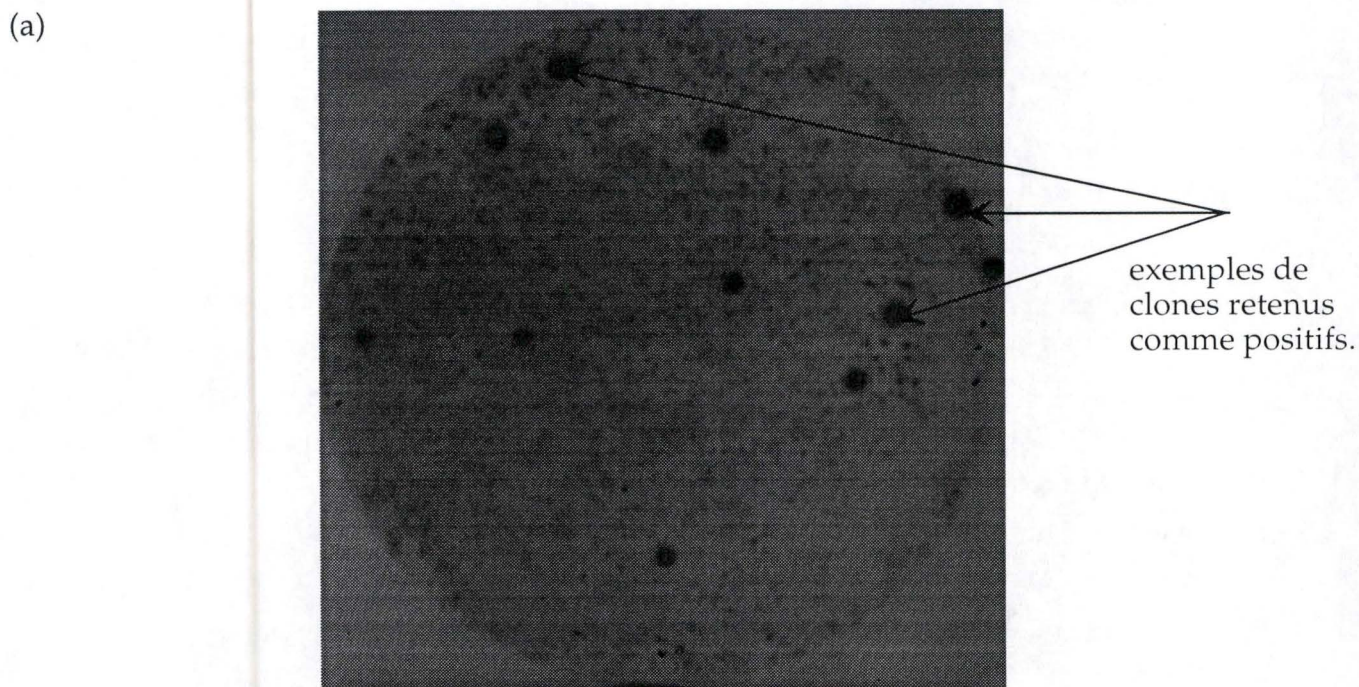


Figure 3.9 : Criblage de la minibanque de *S. pombe*.

(a) Autoradiographie d'un filtre de l'une des cinq boîtes, lors du 1er crible.

(b) Schéma de la nouvelle sonde synthétisée par PCR, spécifique au gène *Skp1*.

(c) Autoradiographie d'un filtre d'une des deux boîtes du 2nd crible. Celui-ci est effectué avec la sonde spécifique décrite en (b) et au départ de boîtes sur lesquelles 80 colonies "positives" du 1er crible ont été répliquées.

nous allons effectuer un crible sur colonies avec la même sonde radioactive que celle utilisée pour le "Southern-Blot" selon la procédure décrite dans le "matériel et méthodes, techniques relatives à l'ADN". La figure 3.9.a présente l'autoradiographie d'une des cinq boîtes.

Par comparaison entre l'autoradiographie et la boîte de Petri correspondante nous pouvons repérer la ou les colonies qui fournissent un signal positif. Etant donné la dispersion du rayonnement radioactif, il est difficile de sélectionner la colonie responsable du signal radioactif et donc susceptible de contenir le plasmide avec le gène d'intérêt.

Dès lors, un second "screen" plus fin est réalisé. Nous avons également souhaité augmenter la précision du crible par l'utilisation d'une sonde spécifique à *Skp1* seul, c'est-à-dire ne présentant pas de séquences 3' externes comme c'était le cas pour la sonde précédente.

2.2.2.2. Un second crible plus fin réduit le nombre de candidats.

Nous avons affiné le crible par deux procédés.

Tout d'abord, nous avons synthétisé par PCR une nouvelle sonde, spécifique de l'ADNc partiel *Skp1* uniquement. Lors de cette PCR, nous avons utilisé une combinaison de primers définis sur la séquence de l'ADNc partiel de *Skp1p* du pJG4-5-57. Ces deux primers, nommés "F sonde SKP1" et "R sonde SKP1", permettent d'amplifier un fragment de 400 pb sur l'ADNc (Fig. 3.9.b.).

Le second procédé permettant d'affiner le crible consiste à différencier de manière précise la source du signal radioactif en séparant nettement les différents clones potentiellement positifs. Nous repiquons tous les clones localisés dans les zones de signal positif (soit 80 clones au total) sur deux boîtes de Petri de 85 mm de diamètre de telle sorte que les colonies soient bien individualisées. Nous transférons ces colonies sur des membranes de nitrocellulose et nous recommençons un crible de ces colonies avec la nouvelle sonde, spécifique de *Skp1*. L'autoradiographie d'un des deux filtres de ce second crible, obtenu après une exposition de six heures est présentée sur la figure 3.9.c.

L'analyse des deux autoradiographies permet de sélectionner 12 clones pour lesquels le signal est intense.

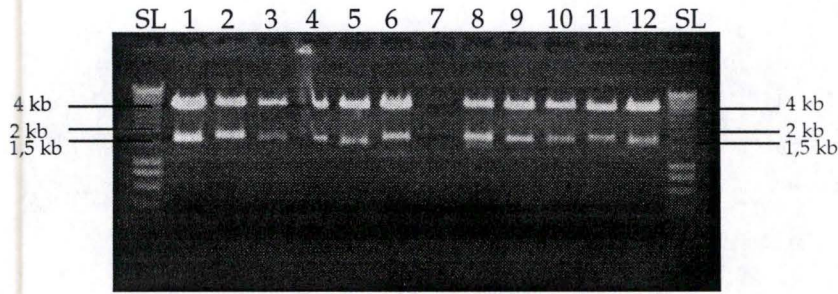


Figure 3.10 : Restriction diagnostique sur douze candidats suite au premier crible. La restriction *EcoRI/HindIII* permet d'exciser les inserts du plasmide. Deux bandes sont attendues, l'une à environ 1,7 kb et l'autre à 4,2 kb (cfr. Fig. 3.8 : structure du plasmide).

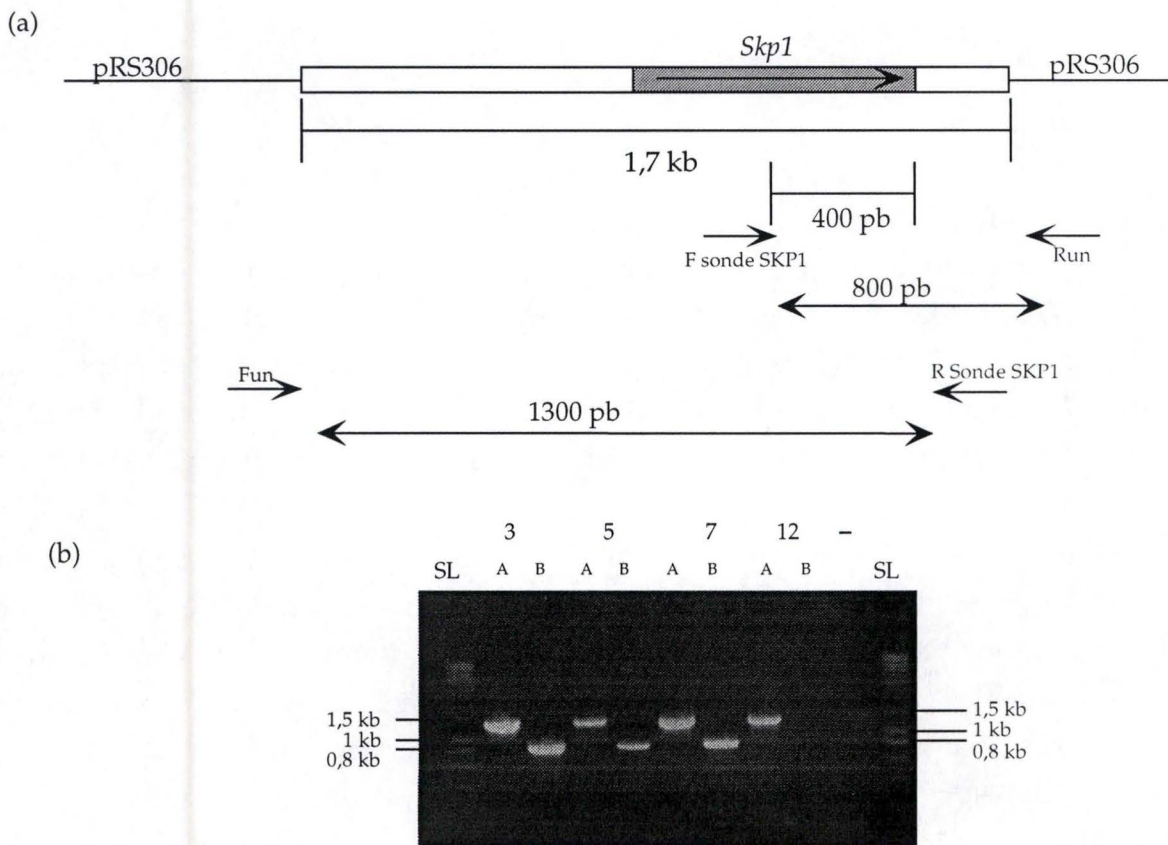


Figure 3.11 : Analyse diagnostique par PCR des quatre candidats potentiels (3, 5, 7 et 12) issus du second crible avec la sonde radioactive spécifique à *Skp1*.

(a) Schéma de la position et de l'orientation des primers utilisés dans cette PCR.

Les paires de primers, paire A et paire B, correspondent respectivement aux combinaisons R sonde SKP1 - Fun, et F sonde SKP1 - Run. Leur choix a été établi sur base de l'orientation connue du gène dans l'insert.

(b) Profil d'électrophorèse des bandes amplifiées par les deux combinaisons de primers mentionnées ci-dessus.

2.2.2.3. Une analyse diagnostique des douze clones est menée par restriction et par PCR.

Nous avons préparé de petites quantités d'ADN plasmidique des douze clones sélectionnés et nous réalisons sur cet ADN deux types de tests diagnostiques.

Le premier test permet par une restriction *EcoRI* et *HindIII* d'exciser les inserts des plasmides afin de vérifier leur taille respective qui sont 1,5 à 2,0 kb et 4,380 kb. La figure 3.10 présente les profils de restriction obtenus pour 12 clones ayant fourni un signal positif lors du crible de la minibanque. Huit des douze clones contiennent un insert génomique de 1,7 kb. Le profil des clones 1 et 5 montre un insert apparemment de plus petite taille tandis que les profils de clones 6 et 8 révèlent trois bandes de restrictions. Ce profil particulier peut être expliqué par le fait que lors de la récupération des fragments de 1,5 à 2,0 kb, certains inserts n'étaient pas totalement restreints mais ont, tout de même pu être cloné dans le pRS306 ou que la restriction diagnostique réalisée sur ces plasmides particuliers est partielle pour ces deux clones.

Le second test diagnostique est effectué sur quatre clones choisis arbitrairement. Il s'agit d'un test par PCR avec des combinaisons entre les primers universels s'hybridant sur le plasmide de part et d'autre du site multiple de clonage (SMC) et des primers spécifiques de l'ADNc *Skp1* (cfr. matériel et méthodes, techniques relatives à l'ADN). Il s'agit des primers F sonde et R sonde (Fig. 3.9.b). La séquence de ces primers a été déterminée sur base de la séquence de l'ADNc cloné. Leur position sur cet ADNc est représentée à la figure 3.11.a et permet l'amplification d'un fragment d'environ 400pb sur l'ADNc. Les combinaisons de primers utilisées sont F universel avec R sonde et R universel avec F sonde. Le résultat de la PCR est présenté à la figure 3.11.b. Nous observons une amplification des bandes d'une taille d'environ 1300 bp et d'environ 800 bp respectivement.

L'analyse de ce résultat montre que :

- le contrôle négatif de la PCR est négatif : aucun ADN contaminant n'a été amplifié.
- les combinaisons de primers ont fourni un signal positif pour trois des quatre clones testés. (En ce qui concerne le clone 12, la combinaison de primers, R universel et F sonde ne fournit pas de signal).
- les deux combinaisons de primers permettent d'amplifier une région commune de 400 bp. Soustrayant cette valeur de la somme des deux amplicons observés sur gel (1300 bp pour Fun-R sonde SKP1 et 800 bp

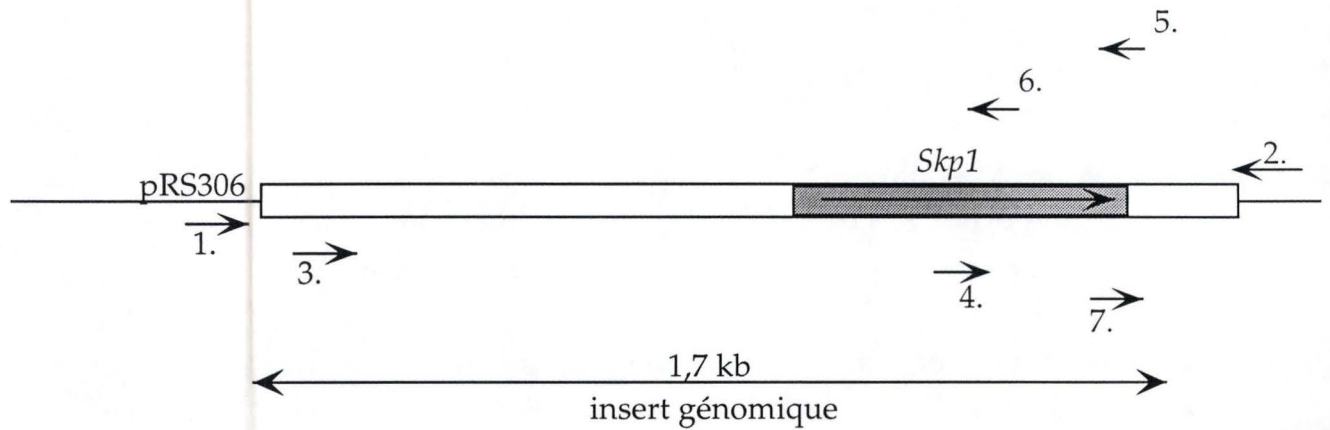


Figure 3. 12 : Schéma illustrant la stratégie de séquençage qui a été suivie.

Les primers de séquençage 1 et 2 correspondent respectivement à Fun (pour F universel) et à Run (pour R universel). Ces deux primers sont des primers dont la séquence a été définie de telle sorte qu'ils s'hybrident de part et d'autre de MCS (pour "Multiple Cloning Site") de n'importe quel plasmide commun.

Les primers suivants 3. pour SKP1 Fun , 4. pour F sonde SKP1, 5. pour R sonde SKP1, 6. pour F2 sonde SKP1 et 7. pour R2 sonde SKP1 utilisés pour le séquençage de chaque brin sont déduits de la séquence partielle de l'ADNc ou d'informations de séquences fournies par un "run" de séquence précédent.

Nous avons effectué un premier séquençage avec les primers 1, 2 , 4 et 5. Afin de pouvoir superposer des séquences partielles, nous avons recommencé le séquençage avec les trois autres primers. Jusqu'à présent, le séquençage n'a pas couvert la totalité de l'insert (travail en cours).

pour F sonde SKP1 et Run), on obtient 1,7 kb pour valeur de la taille de l'insert génomique présumé contenir tout le gène *Skp1* de *S. pombe* (Fig. 3.11.a).

En résumé, les analyses diagnostiques des clones positifs sélectionnés par le criblage de la banque indiquent que trois clones (les clones 3, 5 et 7) au moins contiennent un insert de 1,7 kb présumé contenir le gène *Skp1* de *S. pombe*.

2.3. Le séquençage et l'analyse de la séquence du gène *Skp1* de *S. pombe*.

2.3.1. L'insert génomique de 1,7 kb est séquencé.

Nous avons réalisé une première réaction de séquençage sur les trois clones retenus en utilisant les oligonucléotides suivants : F universel, F sonde, R sonde afin de vérifier que les trois clones présentent une séquence nucléotidique identique entre eux. L'analyse des séquences (données non présentées) nous révèle que nous avons trois inserts identiques contenant le gène *Skp1*. Nous allons établir la séquence complète du gène au départ d'un seul clone, le candidat 5. Afin d'être certain de la séquence, il est nécessaire d'avoir des séquences partielles qui se recouvrent. La figure 3.12 illustre la stratégie de séquençage suivie.

Les fragments de séquence ont été assemblés par recouvrement des séquences partielles résultant des différents séquençages ("primer walking") et nous obtenons une séquence d'un insert de 802 pb qui contient la totalité de l'ORF potentielle de *Sp. Skp1*. Une partie de cette séquence contenant l'ORF et la région 5' adjacente est présentée à la figure 3.13. L'extrémité 3' du gène est aisément identifiable grâce à un alignement avec le ADNc du pJG4-5-57 mais également par un BLAST-X avec les protéines Skp1p connues dans plusieurs espèces. Au contraire, l'extrémité 5' semble moins conservée parce que lorsqu'elle est soumise à un BLAST-X, l'intégralité de cette séquence n'est pas identifiée comme homologue à Skp1p de diverses espèces.

TAA TGA GGG TTA GCA CCT TTT CCC AAT ATC GAA TTA GTG AGT TCT GCC ACT GTA GGA ATA TCA GCA

Met Ser Lys

TAA CTA GAA ATG CTA ACA GCT TAA CTT TCA TTC ATC CAT TAC TTA CAT ACA TCA ACA ATG TCC AAA
-10 1 9

Ile Lys Leu Ile Ser Ser Asp Asn Glu Glu Phe Val Val
ATC AAA CTG ATT TCA TCT GAC AAT GAA GAG TTC GTG GTC G **GTA TGT AGA ACG GAG AAT GTT**
18 27 36 45 55 64

. Asp Gln Leu Ile Ala Glu Arg Ser Met
TTG AAT TGA GTG AAT TGA CAA ACT GTT TAT AG AT CAA CTG ATC GCT GAG AGA AGT ATG
73 82 91 100 110 119 128

Leu Ile Lys Asn Met Leu Glu
CTT ATA AAA AAT ATG CTT GAA G **GTA TGA TCT ATA CAA GCG CTT GTT GAG TGC AAT AAT**
137 146 156 165 174 183

. Asp Val Gly Glu Ile Asn
TAT TAT GGA CCC TGT TAC TAA AAT CTC AAT TTC AAT AG AC GTT GGT GAG ATT AAT
192 201 210 219 229 238

Val Pro Ile Pro Leu Pro Asn Val Ser Ser Asn Val Leu Arg Lys Val Leu Glu Trp Cys Glu His
GTC CCC ATT CCT CTT CCA AAC GTA TCA TCG AAC GTT TTG CGA AAG GTA CTC GAA TGG TGT GAG CAT
247 256 265 274 283 292 301

His Lys Asn Asp Leu Tyr Ser Gly Thr Glu Glu Glu Ser Asp Ile Arg Leu Lys Lys Ser Thr Asp
CAC AAA AAC GAT TTG TAT TCA GGA ACT GAG GAG GAA AGT GAC ATT AGA TTA AAA AAG TCT ACC GAT
310 319 328 337 346 355 364 373

Ile Asp Glu Trp Asp Arg Lys Phe Met Ala Val Asp Gln Glu Met Leu Phe Glu Ile Val Leu Ala
ATT GAT GAA TGG GAT CGT AAG TTT ATG GCC GTA GAC CAG GAA ATG TTG TTC GAG ATA GTT TTG GCA
382 391 400 409 418 427 436

Ser Asn Tyr Leu Asp Ile Lys Pro Leu Leu Asp Thr Gly Cys Lys Thr Val Ala Asn Met Ile Arg
AGC AAT TAT TTG GAT ATT AAA CCT TTG CTT GAT ACT GGT TGT AAA ACC GTT GCC AAC ATG ATT CGT
445 454 463 472 481 492 501

Gly Lys Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Thr Phe Asn Ile Pro Asn Asp Phe Thr Pro Glu Glu Glu
GGC AAG AGT CCT GAG GAC ATT CGG AAA ACA TTT AAC ATC CCT AAT GAT TTT ACG CCT GAG GAG GAA
510 519 528 537 546 555 564 572

Glu Gln Ile Arg Lys Glu Asn Glu Trp Ala Glu Asp Arg .
GAG CAA ATC CGT AAA GAA AAT GAA TGG GCC GAA GAC AGA TAG
581 590 599 608 614

Figure 3.13 : Séquences nucléotidique et protéique du gène *Sp. Skp1*.

Le gène de 611 pb contient deux introns entraînant à chaque fois un changement de phase (mis en gras dans la séquence) de taille respectives 53 et 74 bp, les séquences consensus de "splicing" de ceux-ci sont soulignées. Ce gène code pour une protéine de 161 acides aminés.

2.3.2. Les alignements permettent de définir les zones introniques et des régions conservées.

Nous avons traduit l'extrémité 5' de l'insert dans les trois phases. Nous avons soumis des séquences partielles de ces ORF potentielles traduites à un BLAST-X. Ce blast a permis d'identifier des parties de ces ORF comme appartenant au gène *Skp1*. Nous avons pu définir les limites de la protéine *Sp. Skp1p* par rapport à une séquence consensus établie à partir des séquences protéiques de *Skp1p* de sept organismes (Connelly et Hieter, 1996). Ensuite, de proche en proche par comparaison à la séquence consensus, nous avons recherché des résidus ou groupes de résidus conservés entre la séquence protéique que nous avons établie (quelle que soit sa phase de traduction) et les domaines amino-terminaux des homologues.

Cette stratégie nous a permis de définir trois régions d'homologie entre les séquences protéiques des homologues et la protéine de *S. pombe* ainsi que de déterminer la position de l'ATG initiateur. Le problème auquel nous sommes confrontés est que les trois régions d'homologie résultent de la traduction de la séquence dans trois phases différentes. Compte tenu de l'existence d'introns dans environ 44% des gènes de *S. pombe* et compte tenu du fait que les jonctions du site de splicing sont caractérisées par des courtes séquences consensus facilement détectables chez *S. pombe*, nous avons recherché des introns potentiels. La séquence consensus relative aux sites de "splicing" chez *S. pombe* est GTANG 19-99....NNCTPuAN...3-16...NAG où N représente n'importe quel nucléotide (Zhang et Marr, 1994). Nous avons dès lors déterminé deux introns au sein desquels les séquences consensus sont conservées et qui, lors de leur splicing entraînent un changement de phase. La taille des deux introns définis est respectivement de 53 pb et de 74 pb. Leur petite taille est caractéristique de la taille des introns de *S. pombe* estimée entre 36 pb et 129 bp (Mount, 1982; Guthrie, 1986 cités in Russel, 1989). Le programme BCM Gene Finder a confirmé la localisation et le nombre des introns.

Une preuve formelle de l'existence de ces introns devra être fournie par la séquence de l'ADNc, obtenue par une amplification par PCR réalisée sur une banque d'ADNc de *S. pombe* au moyen de primers définis sur les extrémités 5' et 3' du gène.

Nous pouvons conclure que le gène *Sp. Skp1* est constitué de trois exons séparés par deux introns d'une taille de 53 et 74 bp et débutant respectivement aux nucléotides 50 et 151. Le splicing de ces deux introns provoquent des

(a)

```
SpSKP1      --MSKI-----KLISSDNEEFVVDQLIAERSMLIKNML----- 31
ScSKP1      MVTISNV-----VLVSGEGERFTVDKKIAERSLLKKNYLNDMHDSNLQNSDSESDS 51
HsSKP1      --MPSI-----KLQSSDGEIFEVDVEIAKQSVTIKTMLEL----- 33
AtSKP1      MSAKKI-----VLKSSDGESEFEVEEVALESQTI AHMVED----- 35
CeSKP1      MSAPIVDAPAAEIVYKIISSDGVVSKMSEKAVQQSKTLSNLIEN----- 44
              :           : * . . : . . . * : :
Confind      2223332222222223333333333333333333333333322-----

SpSKP1      -----E-DVGEINVP IPLPNVSSNVL RRVLEWCEHHKNDLYSGTEEEESDI 76
ScSKP1      DSETNHKSKDNNNGDDDDDEDEIVMPV PNVRSV LQKVIEWAEHHRD---SNFPDEDDD 108
HsSKP1      -----LGMDDEGDDDPVPLPNVNAAILKKVIQWCTHHKDDP-P-PPEDDEN 77
AtSKP1      -----DCVDN-G----VPLPNVTSKILAKVIEYCKRHVEAA-ASKAEAVEG 75
CeSKP1      -----LGYTIENIETRDP I PVTNVNGKTMAKVAEWCEKHKAD---AIPEDNM 88
              :           : * . ** . : ** : . : * :
Confind      -----33555555555555555555555555-----

SpSKP1      RLKKSTDIDEWDRKFMAVDQEMLF EIVLASNYLDIKPLLD TGCKTVANMIRGKSPEDIRK 136
ScSKP1      DSRKSAPVDSWDREFLKV DQEMLYEII LAANYLN I KPLLDAGCKVVAEMIRGRSPEEIRR 168
HsSKP1      KEKRTDDIPVWDQEF LKVDQGT L FELILAANYLDIKGLLDVTC KTVANMIKGTPEEIRK 137
AtSKP1      AATSDDDLKAWDA DFMKIDQATL FELILAANYLN I KNLDDLTCQTVADMIKGTPEEIRT 135
CeSKP1      NVLKTLTIP EWDQKFLKIEDEALFDL I LASNFLDIKGLMYFGCKTVSNMARGKTTAELRE 148
              : ** . * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * :
Confind      -----555555555555555555555555555555555555555555555-----

SpSKP1      TFNIPNDFTP EEEEEQIRKEN EWAEDR 161
ScSKP1      TFNIVNDFTP EEEEA AIRRENEWAEDR 194
HsSKP1      TFNIKNDFT EEEEEQVRKEN QWCEEK 163
AtSKP1      TFNIKNDFT PEEEEVRREN QWAFE- 160
CeSKP1      IFGINTEQDAAEETAQRAAEVA-- 172
              * . * . * : :
Confind      555555555555555555555555555555555555555555555
```

(b)

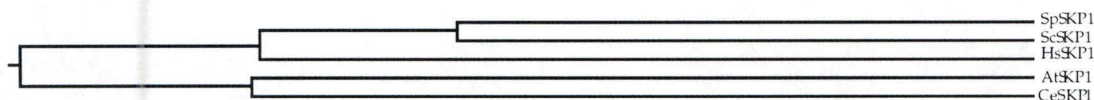


Figure 3.14 : Alignement protéique multiple de Skp1p de cinq organismes et l'arbre phylogénétique déduit de cet alignement.

(a) Quatre protéines homologues à Sp.Skp1p ont été alignées avec celle-ci. L'alignement présenté est établi par le programme ClustalW version 1.74 mais complété en tenant compte des résultats fournis par quatre autres programmes, par un indice de confiance (Confind) variant de 1 à 5, la valeur "5" représentant un accord parfait entre les 5 programme, "3" un accord parfait entre les 3 programmes d'alignement globaux et "2" un accord parfait entre les programmes Dialign et ClustalW. Le programme Clustal utilise une symbolique pour mettre en évidence les résidus importants : " * "pour résidu conservé dans toutes les séquences, ":" pour substitution conservée de résidus, "." pour substitution semi-conservée.

(b) Arbre phylogénétique proposé par le programme ClustalW. Ce programme établit, dans un premier temps des alignements paires, ensuite sur base des pourcentages de similarité qu'il obtient il établit un arbre phylogénétique.

changements de phase. En effet, si l'exon 1 doit être traduit dans la phase 2, l'exon 2 est traduit dans la phase 1 et l'exon 3 dans la phase 3. Toute erreur de phase fera apparaître très rapidement un codon STOP.

Un alignement multiple protéique de la protéine *Sp. Skp1p* avec les protéines *Skp1p* homologues chez *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *C. elegans*, et *A. thaliana* a été réalisé pour confirmer l'homologie structurale du nouveau gène avec la famille SKP1. Cet alignement a été réalisé en utilisant plusieurs programmes d'alignements à savoir des programmes d'alignements multiples globaux (MAP (Huang, 1994), DIALIGN 2.0 et ClustalW 1.74(Thompson *et al.*, 1994)) et des programmes d'alignements multiples locaux (Blocks (Henikoff *et al.*, 1995) et Match-Box (Depiereux *et al.*, 1997)). Nous avons établi un alignement consensus entre ces cinq séquences à partir des alignements obtenus par chacun des programmes utilisés. L'alignement consensus obtenu est très similaire à l'alignement réalisé par le programme ClustalW. La figure 3.14.a. présente l'alignement proposé par ClustalW seul complété par un indice de confiance (Confind) représentant le nombre de programmes étant en accord parfait pour l'alignement prédit.

On peut conclure de l'alignement multiple que le domaine carboxy-terminal est globalement mieux conservé entre les protéines *Skp1p* homologues. On note également une remarquable conservation entre les différents règnes puisque l'alignement a considéré des protéines provenant d'organismes très différents. Enfin, des résidus apparaissent parfaitement conservés dans toutes les protéines, ce qui témoigne sans doute de leur fonction essentielle dans la protéine. Il est intéressant de noter que le phénotype *ts* des deux souches de *S. cerevisiae*, utilisées au point 3 provient d'une mutation engendrant une substitution d'un de ces résidus parfaitement conservés.

Des alignements pairés ont permis de mettre en évidence une proximité plus nette de *Sp. Skp1p* avec *Sc.Skp1p* et *Hs.SKP1* (47,4 et 56,4%) d'identité respectivement, comme en témoigne l'arbre phylogénétique tracé par le programme Clustal et dessiné à la figure 3.14.b.

Il est intéressant de noter que la protéine *Skp1p* de *S. cerevisiae* présente une insertion de 28 acides aminés (résidus 37 à 64). Des expériences de délétion de cette région ont montré qu'un gène délété pour cette région complémente une souche contenant un allèle nul de *Sc. SKP1* (Connelly et Hieter, 1996). Nous

proposons que cette insertion pourrait résulter de la présence d'un intron qui est en phase avec les exons codant pour la protéine Skp1p. En effet, le second intron du gène de *S. pombe* est localisé dans la même région et a une taille similaire à l'insertion présente dans *Sc. SKP1*. Cependant, nous ne retrouvons pas dans la séquence nucléotidique du gène *SKP1* de *S. cerevisiae* les consensus relatifs aux sites de "splicing". On peut donc suggérer qu'il s'agit d'un "souvenir" d'un intron toujours présent chez *S. pombe*, mais dont les signaux d'épissage auraient disparu chez *S. cerevisiae*, ce dernier événement étant rendu possible par le fait que cette insertion maintient la phase.

3. Complémentation hétérologue et recherche de supresseurs.

L'analyse et la comparaison de la séquence protéique encodée par le gène *Sp. Skp1* avec des séquences de protéines homologues de diverses espèces nous a permis d'établir des homologies structurales. Nous voulons non seulement étudier si la fonction de cette protéine est conservée entre les divers organismes mais également, par une recherche de supresseurs d'allèles ts, éclairer les différentes interactions génétiques et physiques modulant l'activité de cette protéine.

3.1. Complémentation hétérologue.

3.1.1. Principe de la complémentation.

Nous avons cloné un insert génomique du gène *Skp1* de *S. pombe*. Comme *Skp1* est très conservé au cours de l'évolution, nous avons souhaité vérifier si l'homologie structurale entre *Sc. SKP1* et *Sp. Skp1* allait de pair avec une homologie fonctionnelle.

L'expérience adéquate pour tester cette hypothèse est la complémentation. Celle-ci consiste en la restauration d'un phénotype dans une souche mutée pour le gène X par l'apport d'une copie sauvage de X. Cette copie peut avoir pour

origine le même organisme (complémentation homologue) ou un organisme différent (complémentation hétérologue).

3.1.2. Stratégie.

Nous avons reçu de P. Hieter deux souches de *S. cerevisiae* mutées dans le gène *SKP1*. Ces mutants sont nommés *skp1-3* et *skp1-4* et présentent respectivement un arrêt de croissance à 37°C dans la transition G1-S et dans la transition G2-M (Connelly et Hieter, 1996). Ces mutants résultent de mutations ponctuelles obtenues lors de PCR. Le tableau ci-dessous montre la nature de la mutation provoquant ce phénotype ts.

Allèle	Nombre de mutations	Changement dans la séquence		
		codon	ADN	Protéine
<i>skp1-3</i>	1	172	ATC en AAC	Ile en Asn
<i>skp1-4</i>	1	146	TTG en TCG	Leu en Ser
		162	TCT en TCC	pas de
		4	TCT en TCC	changement

Nous allons transformer ces deux souches avec

- l'insert obtenu lors du "double-hybride plus un", codant pour un homologue de *Sc. Skp1p* chez *S. pombe*,
- l'insert génomique contenant *Skp1* de *S. pombe*, cloné dans le pRS306,
- le plasmide pRS306 ne contenant pas d'insert, (cette transformation constitue le contrôle négatif),
- un plasmide contenant le gène *SKP1* sauvage de *S. cerevisiae*, (cette transformation constitue le contrôle positif).

Tous ces plasmides portent le marqueur de sélection *URA3*. Par conséquent, le produit de la transformation sera placé sur des milieux déficients en uracile afin de sélectionner les clones ayant reçu un plasmide.

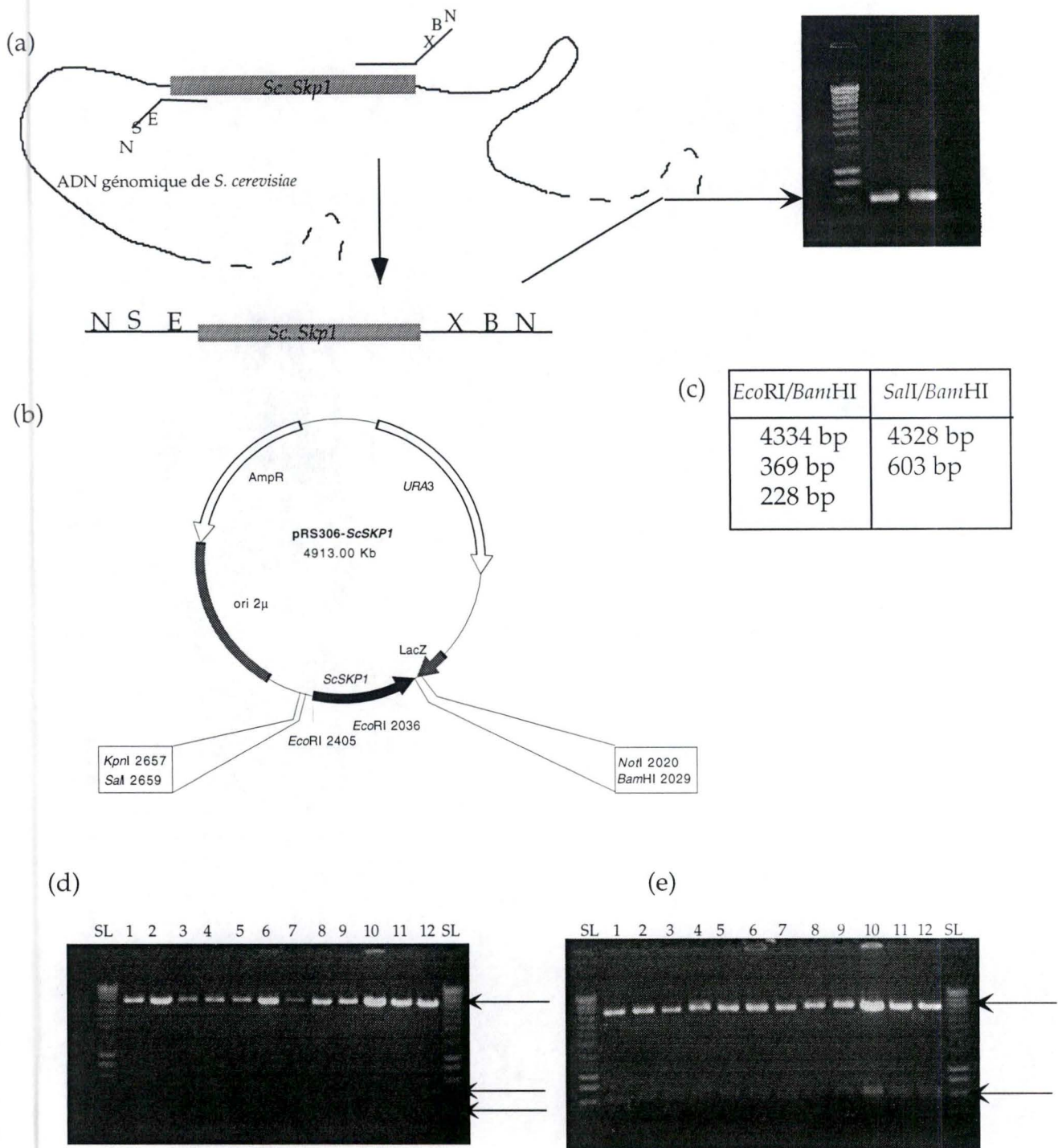


Figure 3.15 : Amplification du gène *Sc.SKP1* par PCR et construction du plasmide pRS306-*Sc.SKP1*.

(a) Amplification du gène *SKP1* au départ d'ADN génomique de *S. cerevisiae* et insertion de sites de restrictions aux extrémités de l'amplicon. (N pour *NotI*, S pour *SalI*, B pour *BamHI*, X pour *XhoI* et E pour *EcoRI*)

(b) Carte du nouveau plasmide formé. Les étapes principales sont la restriction de l'amplicon et de la matrice par les enzymes *SalI/BamHI* et la récupération et ligation des fragments de taille de 600 bp et 4300 bp.

(c) Profil de restriction attendu pour une digestion du plasmide par *EcoRI/BamHI* et *SalI/BamHI*.

(d) Restriction par *EcoRI/BamHI* de 12 clones étant potentiellement pRS306-*Sc. SKP1*. Les bandes de petite taille sont peu visibles sur la photographie.

(e) Restriction par *SalI/BamHI* de 12 clones étant potentiellement pRS306-*Sc. SKP1*.

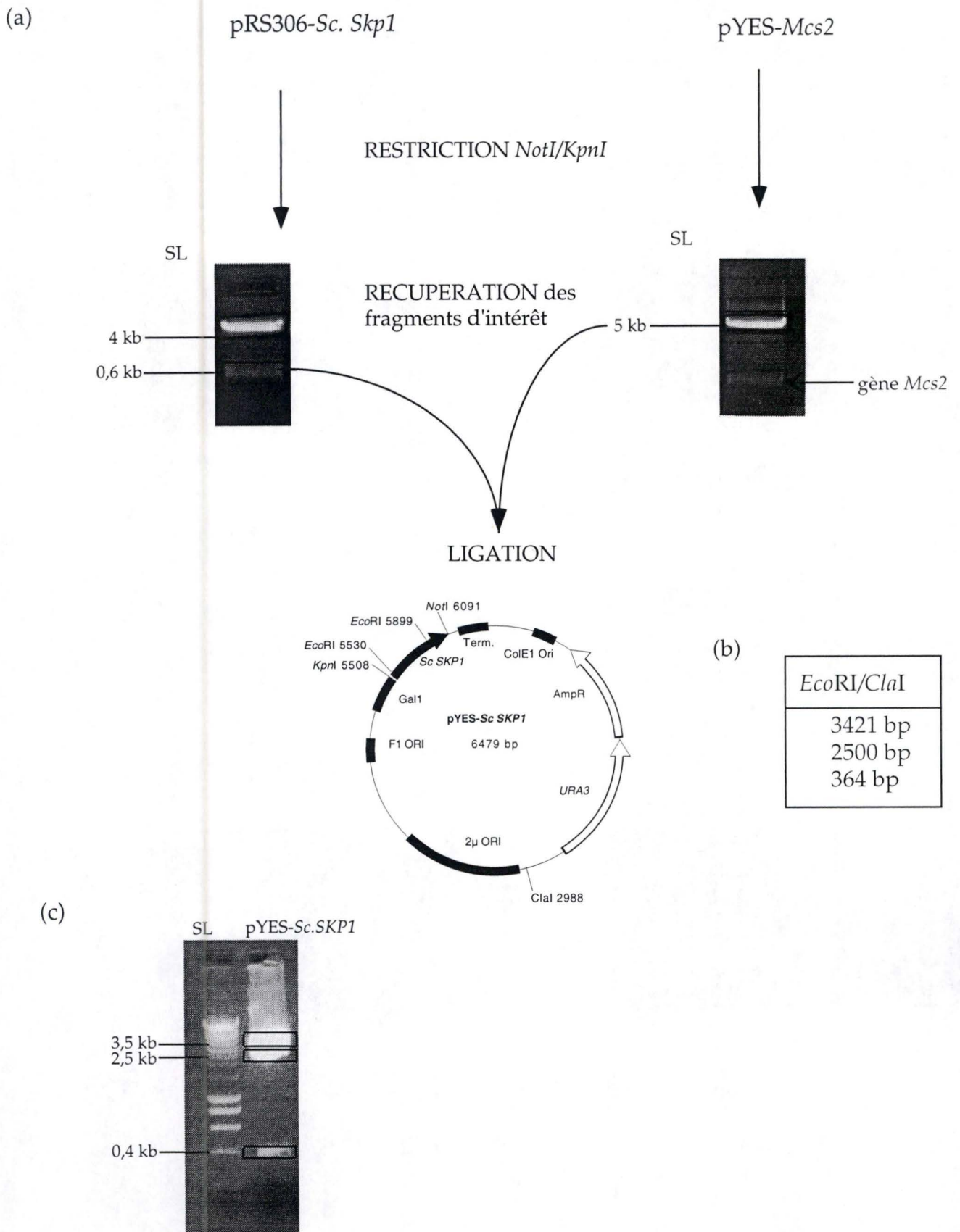


Figure 3.16 : Construction du plasmide pYES-*Sc.SKP1*.

(a) Schéma explicatif de la construction et carte du plasmide construit.

(b) Tableau du profil de restriction *EcoRI/ClaI* de ce plasmide.

(c) Restriction diagnostique *EcoRI/ClaI* afin de vérifier la nature du plasmide.

3.1.3. Construction des plasmides.

L'expérience de complémentation nécessite quatre plasmides :

- pRS306-*Sp. Skp1*, porteur de l'insert génomique cloné.
- pRS306-GAL1-VP16-*Skp1*ADNc permettant d'exprimer l'ADNc partiel en fusion avec VP16.
- pYES-*Sc. SKP1*, le contrôle positif.
- pRS306, le contrôle négatif.

Nous devons construire les deux plasmides : le pYES-*Sc. SKP1* et le pRS306-GAL1-VP16-*Skp1*ADNc.

3.1.3.1. Construction du pYES-*ScSKP1*.

Le gène *Sc. SKP1* a été obtenu par PCR sur de l'ADN génomique de *S. cerevisiae* avec une paire de primers insérant des sites de restriction de part et d'autre du gène. Les deux primers sont nommés SKP1F (N-S-E) et SKP1R (X-B-N) et permettent d'amplifier un insert de 585 bp bordé en 5' des sites *NotI*, *Sall*, *EcoRI* et en 3' des sites *XhoI*, *BamHI*, *NotI*, comme représenté à la figure 3.15.a. Cet amplicon a été cloné dans le pRS306 en *Sall/BamHI* (Fig. 3.15.b) et séquencé (données non présentées) afin de vérifier l'absence de mutation qui serait apparue lors de la PCR dans cet insert. Une analyse diagnostique a été également effectuée par restriction *EcoRI/BamHI* et *Sall/BamHI* sur 12 clones choisis de manière arbitraire, dans le but de vérifier la construction du plasmide (Fig. 3.15.c et 3.15.d).

Lorsque nous avons obtenu un clone contenant un insert sans mutation, nous avons restreint ce plasmide en *NotI/KpnI* et récupéré un fragment de 617 pb (Fig. 3.16.a). Nous avons cloné cet insert dans le plasmide pYES également restreint en *NotI/KpnI*. Pour ce faire, un plasmide existant, le pYES-*Mcs2* dont la restriction *NotI/KpnI* retire le gène *Mcs2* a été utilisé. Le gène *Sc. SKP1* est alors sous le contrôle d'un promoteur inductible par le galactose. Les étapes de ce clonage sont présentées à la figure 3.16.a. Après avoir transformé des cellules DH10B d'*E. coli* avec cette construction plasmidique, nous avons sélectionné des clones au hasard et réalisé une minipréparation d'ADN plasmidique restreinte avec *EcoRI/ClaI*. L'analyse électrophorétique diagnostique est représentée à la figure 3.16.c.

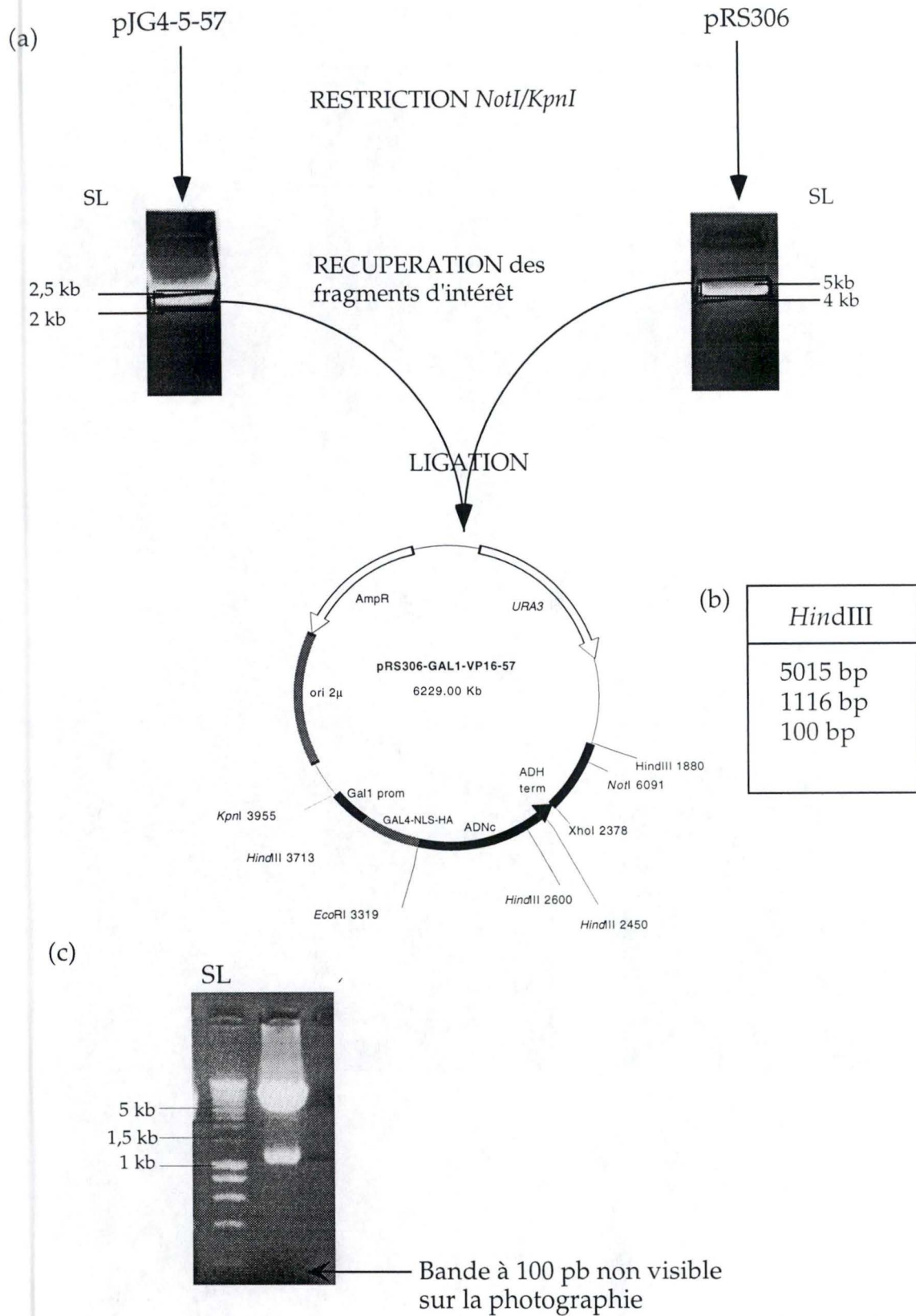


Figure 3.17 : Construction du plasmide pRS306-GAL1-VP16-57.

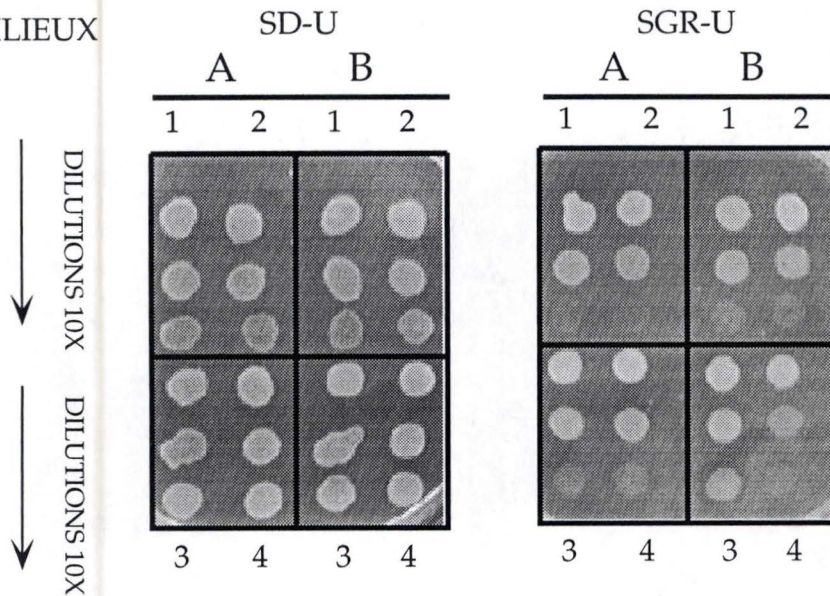
(a) Schéma explicatif de cette construction et carte du plasmide construit.

(b) Tableau du profil de restriction *HindIII* de ce plasmide.

(c) Restriction diagnostique *HindIII* afin de vérifier la nature du plasmide. La bande de 100 pb n'est pas visible sur la photographie.

A 30°C

MILIEUX



A 37°C

MILIEUX

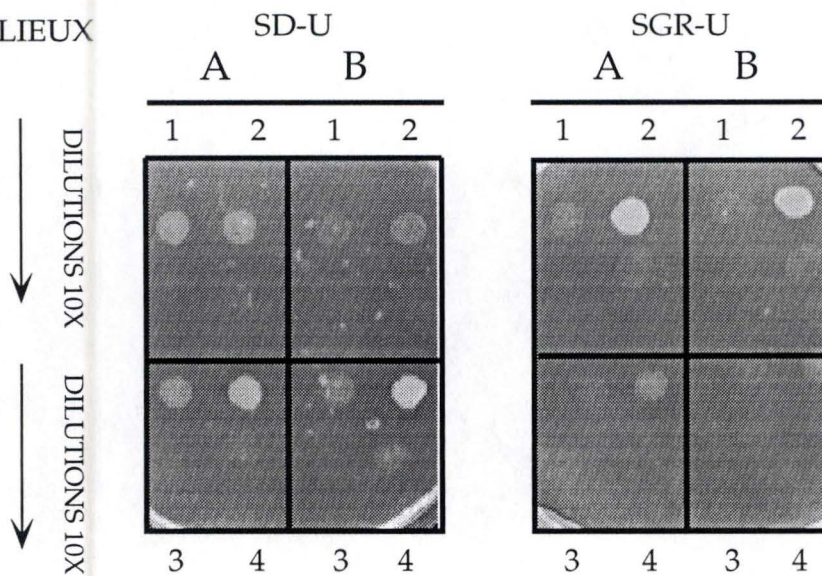


Figure 3.18 : Photographies de l'expérience de complémentation hétérologue des souches de *S. cerevisiae* ts : YPH1161 (A) et YPH1172 (B) pour le gène *SKP1*.

Pour chaque souche, plusieurs dilutions des quatre types de transformants ont été déposées sur les milieux de sélection déficients en uracile : pRS306 (1); pYES-*Sc.SKP1* (2); pRS306-*Sp.Skp1* génomique (3) et le pRS306-GAL1-VP16-*Sp.Skp1* (4). Le milieu galactose induit la transcription des gènes placés sous le contrôle de pGAL1, à savoir *Sc.SKP1* et l'ADNc isolé lors du crible en "double-hybride plus un"(cfr. texte).

3.1.3.2. Construction du *pRS306-Gal1-VP16-ADNcSp_{skp1}*.

L'ADNc *Sp. Skp1*(n°57) est cloné dans le pJG4-5-57 qui a été isolé en "double-hybride plus un". Nous souhaitons récupérer le gène de fusion ainsi que les zones promotrices et terminatrices localisées sur ce plasmide car le plasmide pJG4-5-57 ne possède pas les marqueurs de sélection adéquats pour tester la complémentation. Nous avons donc restreint ce plasmide en *NotI/KpnI* (Fig. 3.5 -la carte de restriction du pJG4-5-57) et récupéré un fragment de 2000 pb contenant le promoteur induit par le galactose, le gène de fusion *VP16-Skp1*(ADNc partiel) et le terminateur de l'ADH. Ensuite, nous avons cloné cet insert dans le pRS306 en *NotI/KpnI*. Le gène de fusion *VP16-Sp. Skp1* est alors sous le contrôle d'un promoteur inductible par le galactose. Les étapes de ce clonage sont présentées à la figure 3.17.a. Nous avons transformé par cette construction plasmidique des cellules DH10B de *E. coli* et nous avons réalisé une minipréparation d'ADN plasmidique suivie d'une restriction diagnostique *HindIII* afin de vérifier la construction de ce plasmide (Fig. 3.17.c).

3.1.4. Résultats de la transformation.

Nous avons transformé les deux souches de *S. cerevisiae* (*skp1-3* et *skp1-4*) avec les quatre plasmides décrits précédemment. Pour chaque transformation, nous avons réalisé des gouttes à différentes dilutions d'un clone sur deux milieux, l'un SD-U afin de vérifier la présence du plasmide et la croissance de la souche, l'autre sur milieu SGR-U afin d'induire la synthèse des protéines dont le gène est sous le contrôle du promoteur GAL1. Ces différentes boîtes sont placées à 30°C et 37°C.

La figure 3.18 présente les différents tests effectués :

- souche ts *skp1-3* transformée avec
 - pRS306-*Sp.Skp1* (insert génomique)
 - pRS306-Gal1-*VP16-Sp.Skp1* (n°57 ADNc)
 - pYES-*Sc. SKP1*
 - pYES
- souche ts *skp1-4* transformée avec
 - pRS306-*Sp.Skp1* (insert génomique)
 - pRS306-Gal1-*VP16-Sp.Skp1* (n°57 ADNc)
 - pYES-*Sc. SKP1*
 - pYES

Il est intéressant de noter que la complémentation homologue des deux souches ts avec le plasmide pYES-*Sc. SKP1* permet la restauration du phénotype sauvage et que la transformation des deux souches par le pRS306 vide permet aux levures ts transformées de croître à 30°C mais interdit leur développement à 37°C.

Nous constatons que l'insert génomique de *Sp. Skp1* ne complémente pas l'allèle ts, quelle que soit la souche. Ce résultat peut s'expliquer par la présence des introns dans l'insert génomique que nous avons cloné. Comme mentionné plus haut, les introns sont caractérisés par des séquences consensus, l'une interne et les autres localisées aux extrémités 5' et 3' des sites de "splicing". Ces séquences sont différentes entre *S. cerevisiae* et *S. pombe* et les "budding yeast" requièrent un consensus beaucoup plus strict pour assurer un splicing correct. Par conséquent, les systèmes de "splicing" des introns sont suffisamment différents et permettent d'expliquer que le splicing de transcrits primaires d'ARNm de *S. pombe* soit bloqué dans *S. cerevisiae*. Cet argument est renforcé par l'expérience de complémentation hétérologue du gène muté *cdc28* de *S. cerevisiae* par son homologue fonctionnel chez *S. pombe*, *Cdc2*. L'ADNc de *Cdc2* complémente parfaitement la souche mutée de *S. cerevisiae* tandis que la séquence génomique de *Cdc2* ne la complémente pas (Booher et Beach, 1986).

Nous constatons également que l'insert contenant l'ADNc partiel de *Sp. Skp1* ne complémente pas les allèles ts. La croissance observée sur le milieu SD-U à 37°C est explicable par un dépôt plus important de levures. Cette explication est appuyée par le fait que sur milieu dextrose, la protéine de fusion ADNc partiel de *Sp. Skp1* n'est pas exprimée puisqu'elle est sous le contrôle du promoteur pGAL1. Plusieurs arguments expliquent l'absence de complémentation des souches ts par cet insert : d'une part, la protéine formée est tronquée puisqu'il s'agit d'un ADNc et, d'autre part, la protéine synthétisée est en fusion avec le domaine transactivateur viral VP16.

3.2. Etude de la fonction de *Sp. Skp1p* par recherche de suppresseurs multi-copie.

Grâce aux deux souches de *S. cerevisiae* présentant un phénotype ts suite à une mutation dans le gène *SKP1*, nous allons rechercher des suppresseurs de ces mutations. Nous avons choisi arbitrairement, et pour des raisons de manque de temps, de ne travailler que sur la souche ts pour l'allèle *skp1-4*. Nous avons, à

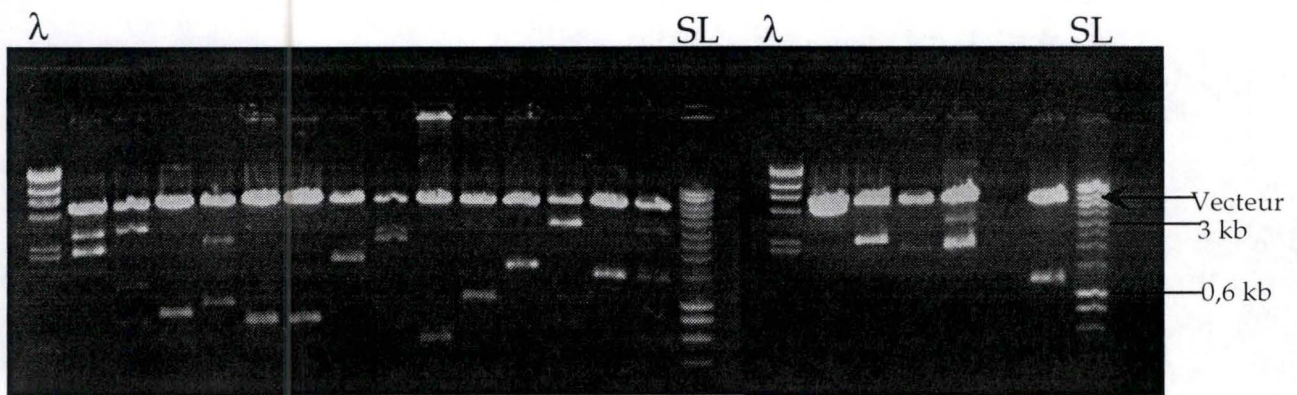


Figure 3. 19 : Validation de la banque de cDNA.

Restriction diagnostique *NotI* sur vingt clones résultant de la transformation de *E. coli* avec de l'ADN plasmidique de la banque. Cette restriction permet d'exciser l'insert cloné dans le vecteur de la banque.

notre disposition une banque d'ADNc de *S. pombe* (cfr. matériel et méthodes, souches et plasmides) (Minet, Dufour et Lacroute, 1992).

La banque d'ADNc utilisée a été fournie par M. Minet de l'Institut Curie (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Cette banque est constituée d'inserts de 0,6 à 3 kb obtenus par transcription reverse d'ARNm de la souche h-972 de *S. pombe*. Ces fragments ont été clonés aux sites *BstXI* du vecteur pFL61 portant le marqueur de sélection *URA3*. (cfr. matériel et méthodes, Banques, souches et plasmides).

Nous avons réalisé trente transformations indépendantes avec 2 µg de banque. La transformation terminée, tous les mélanges sont rassemblés (6 ml) et 600 µl de la transformation sont étalés sur milieu SD-U à 30°C afin de déterminer l'efficacité de la transformation tandis que le reste du milieu a été étalé sur 29 boîtes SD-U placés à 38°C. Toute colonie transformée par un plasmide portant un ADNc suppresseur de l'allèle muté *skp1-3* devrait permettre à la colonie de croître sur milieu SD-U à 37°C. Nous avons également transformé, dans les mêmes conditions la souche par le pRS306 sans insert. Ce plasmide porte un marqueur de sélection *URA3* et fournit un contrôle négatif. En effet, ce contrôle est étalé sur milieu SD-U et placé à 37°C. Aucune colonie n'est attendue sur cette boîte puisque le phénotype ts n'est pas supprimé.

Aucun suppresseur de la souche ts YPH1161 n'a pu être mis en évidence lors de cette expérience de suppression.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à ce résultat.

Premièrement, la validité de la banque peut être mise en doute. En effet, cette banque a été amplifiée plusieurs fois, par un procédé connu pour favoriser la diminution de la représentativité de la banque au profit des petits inserts et des vecteurs vides. Pour tester cette hypothèse, nous avons transformé les cellules DH10B de *E. coli* avec cette banque et réalisé une restriction diagnostique qui permet de sortir l'insert cloné en *NotI* du vecteur plasmidique pFL61. Le résultat de cette restriction présenté à la figure 3.19 nous montre que, sur vingt clones choisis de manière arbitraire parmi les transformants, les profils de restriction sont très variés. En effet, non seulement, aucun plasmide sans insert n'est présent parmi ces vingt clones choisis au hasard, mais les inserts libérés par la restriction *NotI* présente des tailles de 0,6 à 3 kb comme attendu dans cette banque. Nous pouvons donc affirmer que l'absence de suppresseur n'est pas due à un appauvrissement de la banque.

La deuxième hypothèse est que la banque ne contient pas de suppresseur du mutant étudié ce qui évidemment ne peut être exclu.

On peut aussi penser que le nombre de transformants obtenus ne couvre toute la banque.

Enfin, l'absence de suppresseur peut aussi s'expliquer par le fait que Skp1p intervient au niveau de la structure du kinétochore qui est une structure très divergente entre *S. cerevisiae* et *S. pombe* et que la souche ts choisie présente à température non restrictive un phénotype de mauvaise ségrégation chromosomique à la sortie de la mitose, signe d'un trouble lié au kinétochore et au centromère.

IV. Conclusions,
Discussion générale,
Perspectives

1. Conclusions et discussion générale.

Au sein de la cellule, le complexe Mop1p-Mcs2p pourrait se situer au carrefour de plusieurs voies de réponse cellulaire telles le cycle cellulaire et la transcription. L'existence de partenaires distincts du couple CDK/cycline apparaît indispensable pour orienter la réponse de la cellule vers l'une ou l'autre des voies spécifiques qui s'offrent à elle.

Dans le contexte d'une telle problématique, la technique du "double-hybride" se présente comme le moyen adéquat pour décrypter le réseau de partenaires susceptibles d'interagir avec Mop1p-Mcs2p et de moduler son rôle fonctionnel. Parmi les candidats obtenus dans un premier crible de "double-hybride plus un", réalisé antérieurement à notre travail, notre attention s'est portée sur un ADNc partiel, homologue du gène *SKP1* de *S. cerevisiae*. Le produit de ce gène est une protéine impliquée dans la voie de protéolyse de substrats variés et notamment de cyclines, et d'autres régulateurs du cycle cellulaire. Un rôle pour Skp1p a également été suggéré dans la ségrégation chromosomique en anaphase.

Dans un premier temps, nous avons d'une part, caractérisé l'insert d'ADNc cloné et, d'autre part, confirmé le résultat du crible initial de "double-hybride plus un" qui avait suggéré l'interaction de Skp1p avec le couple Mop1p-Mcs2p. Dans un second temps, nous avons cloné le gène complet *Sp. Skp1* et ses régions régulatrices. N'ayant pas de banque génomique à notre disposition, nous avons créé une "minibanque" représentative de fragments de restriction *HindIII/EcoRI* compris entre 1,5 et 2 kb. En effet, un Southern-Blot réalisé avec une sonde spécifique *Sp. Skp1* synthétisée sur le fragment d'ADNc a mis en évidence une bande unique de 1,7 kb sur de l'ADN génomique restreint par *HindIII/EcoRI*.

Douze clones parmi les 12500 criblés se sont révélés positifs. Un de ces clones a été séquencé. Par recouvrement des séquences partielles obtenues sur ce clone, nous avons établi la séquence du gène *Sp. Skp1*. Par alignement avec un ensemble de séquences protéiques disponibles (*H. sapiens*, *A. thaliana*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*), nous avons constaté que le domaine carboxy-terminal de cette protéine est très conservé au cours de l'évolution. Par contre, le domaine amino-terminal est peu conservé et plus difficile à aligner. Un examen détaillé

de la région 5' nous a conduits aux résultats rapportés à la figure 3.13. La structure du gène proposée révèle l'existence de deux introns situés aux nucléotides 49 et 150. Les consensus classiques sont observés aux limites exon/intron et la taille des introns 53 et de 74 pb correspond à celle généralement mentionnée pour *S. pombe* (Zhang et Marr, 1994). Il est intéressant de noter qu'un splicing alternatif, excisant non seulement les introns 1 et 2 mais également l'exon 2 conduirait à l'obtention d'une protéine déletée pour sa séquence centrale mais ayant toujours les domaines N et C-terminaux correctement traduits. Cependant, aucune évidence ne nous permet de penser que ceci est relevant d'une régulation *in vivo*.

La comparaison de la structure de ce gène avec ses homologues connus cités plus haut suscite une série de commentaires et d'observations.

D'une part, la séquence protéique apparaît globalement très conservée entre les organismes aussi différents que deux eucaryotes inférieurs, un invertébré, une plante et un mammifère supérieur.

D'autre part, la séquence de *S. cerevisiae* possède clairement une insertion de 28 acides aminés par rapport aux autres séquences alignées. Nous proposons que cette insertion est un reliquat d'un intron. Compte tenu du fait que cette insertion est en phase avec le reste de la séquence de la protéine *Sc. Skp1p*, des mutations ont pu s'accumuler et provoquer la perte des sites de "splicing" qui sont aujourd'hui non détectables. Cette hypothèse s'appuie sur deux observations : d'une part, cette insertion de 28 acides aminés est localisée dans la même région que le second intron de *Sp. Skp1* et, d'autre part, la délétion de cette insertion ne perturbe pas la fonction de *Sc.Skp1p* (Connelly et Hieter, 1996).

Enfin, des alignements pairés entre les homologues cités précédemment ont mis en évidence une proximité nette de *Sp. Skp1p* avec *Sc. Skp1p* et *Hs. Skp1p* avec des pourcentages d'identité respectivement de 47,4 et 56,4%. Ceci renforce l'idée que la levure est un modèle de choix d'étude de système eucaryote plus complexe et que les mécanismes centraux du contrôle cellulaire sont globalement conservés chez les eucaryotes.

Dans le cadre des régulations du cycle cellulaire de *S. pombe*, nous proposons deux hypothèses quant au processus requérant la présence conjointe de *Skp1p* et du couple *Mop1p-Mcs2p*.

Premièrement, *Mop1p-Mcs2p* est un couple CDK-cycline dont le rôle serait d'assurer non seulement la progression du cycle cellulaire via son activité CAK,

mais également un contrôle sur l'initiation de la transcription, via l'activité CTD kinase. Ce rôle doit être précis et régulé tant spatialement que temporellement. En effet, l'activation (via la CAK) et la désactivation cyclique de Cdc2p sont cruciales pour la progression dans le cycle cellulaire, et par ailleurs, on sait que la transcription est réduite à néant pendant la mitose. Plusieurs mécanismes de régulation de l'activité des CDK sont connus; rappelons notamment la liaison à une cycline, la phosphorylation, ... Des études récentes, réalisées principalement chez *S. cerevisiae* mettent en lumière le contrôle de l'activité des CDK grâce à des mécanismes de protéolyse impliquant l'ubiquitine et des partenaires protéiques spécifiques de celle-ci dont le SCF (pour Skp1p, Cdc53p, E box protéine) et l'APC (pour Anaphase Promoting Complex). La protéolyse permet en effet une transition irréversible et rapide dans la progression du cycle cellulaire. Nous proposons donc que l'activité Mop1p-Mcs2p pourrait être régulée négativement par Skp1p et ses partenaires dans la voie d'ubiquitination.

Notre seconde hypothèse conçoit qu'à un moment du cycle (probablement en fin de métaphase et en anaphase), Mop1p-Mcs2p se localise au niveau du kinétochore et interagit spécifiquement avec certains de ses composants. Pour rappel, le kinétochore est un complexe multimacromoléculaire dont Skp1p fait partie, il se fixe à l'ADN centromérique et joue un rôle essentiel lors de la ségrégation des chromosomes. Deux arguments appuient l'hypothèse de la localisation de Mop1p-Mcs2p dans le kinétochore. D'une part, le couple CDK-cycline, Cdc2p-Cdc13p, une des cibles potentielles de Mop1p-Mcs2p, est localisé sur le fuseau mitotique (Alfa *et al.*, 1990) et, d'autre part, le crible en "double-hybride plus un" réalisé antérieurement a permis d'identifier comme partenaire potentiel de Mop1p-Mcs2p, la centrosomine, un autre composant du centromère. Ces deux observations appuient l'hypothèse de la localisation transitoire de Mop1p-Mcs2p dans le kinétochore.

Comme Skp1p est une protéine impliquée dans le système de marquage des substrats pour la protéolyse, l'étude de la fonction de ce gène offre une perspective de compréhension des mécanismes de régulation des complexes situés en des points névralgiques de réseaux d'interactions, qui assurent par leurs connexions multiples, une réponse prompte et adaptée.

2. Perspectives.

Les publications récentes ont mis en évidence la grande complexité qui entoure tant le complexe Mop1p-Mcs2p que la protéine Skp1p associée au SCF chez *S. cerevisiae*.

Dans ce réseau touffu d'interactions, l'approche génétique consistant en la création de mutants et en la recherche de suppresseurs nous apparaît, dans un premier temps, la plus propice pour identifier les partenaires qui le composent. Compte tenu du caractère très probablement létal d'une inactivation du gène (le test est en cours), des mutants conditionnels létaux, ts pour la croissance, seront créés. La conception des mutants sera probablement grandement facilitée dans la mesure où nous pourrions calquer les mutations à réaliser sur celles connues pour entraîner, chez l'homologue *Sc.SKP1*, un phénotype ts (Connelly et Hieter, 1996). Avant d'analyser les suppresseurs, le phénotype des mutants à température non permissive, pourra fournir des informations quant à la fonction de Skp1p, vis-à-vis par exemple, de la stabilité du complexe Mop1p/Mcs2p.

Enfin, comme le « pathway » est mal compris chez *S. pombe*, il y a lieu de rechercher les partenaires de Skp1p responsables du recrutement spécifique des substrats de l'ubiquitination. (Rappelons que ni Mop1p, ni Mcs2p ne présente de motif « F box » et qu'ils ne sont donc pas susceptibles de jouer ce rôle.) Chez *S. cerevisiae*, Grr1p, une protéine à « F box » responsable du recrutement de la cycline, Cln1p a été identifiée par « double-hybride » et on sait que l'interaction dans ce cas n'est pas fugace (Li et Johnston, 1997). Nous nous proposons donc de rechercher par « double-hybride » en utilisant la banque d'ADNc de *S. pombe* les interacteurs de Skp1p dans l'espoir de décrypter les voies de dégradation jusqu'ici inconnues qui s'ouvrent avec le clonage de *Sp.Skp1*.

V. Matériel et
méthodes

1. Solutions et tampons.

1.1. Solutions

Agarose

1% 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 EDTA 0,5 M
Glycérol	50%	5 ml
Eau distillée		4,5 ml

Antibiotiques

Ils sont tous aliquotés par ml et stockés à -20 °C.

Amp 10% : 1 g/10 ml d'eau distillée.

Stériliser par filtration sur un filtre Millipore 0,22 µm. Lors de son utilisation, cette solution 10% doit être diluée 1000X c'est à dire 400 µl d'ampicilline 10% dans 400 ml de milieu LB.

Composition de la solution de polyacrilamide 40%.

Acrylamide.	40%
Bisacrylamide.	0,8%
Eau distillée.	ad 100ml

Bromure d'éthidium

2 mg par ml d'eau distillée.

Denhart's 50X

Ficoll	1%
Polyvynilpyrrolidone	1%
BSA Bovine Serum Albumine	1%

Composition de la solution de fixateur:

Acide acétique.	10%
Méthanol.	10%

dNTP 20mM

Le stock fourni par Eurogentec se compose du mélange des quatre nucléotides à une concentration de 20 mmoles/ μ l, chaque nucléotide étant à une concentration de 5 mmoles/ μ l. Lors de la PCR 4 μ l de cette solution des quatre nucléotides est utilisée dans un volume total de 100 ml.

Solution d'acétate de lithium (LiAc 1M)

La solution de LiAc est préparée et stockée à la concentration de 1,0 M dans l'eau distillée et est stérilisée par filtration. La solution ne doit pas être mise à pH car celui-ci peut varier entre 8,4-8,9 pour les applications réalisées.

Solution d'acétate de lithium 10X

Dissoudre 10,2 g de LiAc dans 50 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,5 avec une solution d'acide acétique. Amener le volume à 100 ml d'eau distillée. La solution est stérilisée par filtration.

Solution LiAc/TE

pour une solution de 70 ml :

TE 10X	7 ml
LiAc 10X	7 ml
Eau distillée	56 ml

Solution LiAc/TE/PEG

pour une solution de 5 ml :

TE 10X	0,5 ml
LiAc 10X	0,5 ml
PEG 50%	4 ml

Marqueurs de poids moléculaires pour gel d'agarose

* λ restreint par HindIII

La solution fournie n'est pas prête à l'emploi. A 100 ml de solution, on ajoute 100 ml de tampon 10X et 700 μ l d'eau distillée. On dénature la solution pendant 10 minutes à 65°C. On ajoute 100 ml d'alourdisseur/colorants pour gel d'agarose. Pour un gel, 10 μ l de la solution finale sont utilisés. La solution sera donc aliquotée en 10 μ l et stockée à -20°C.

Taille	Concentration (totale = 630 ng)
23,130 kb	300 ng
9,416 kb	122 ng
6,557 kb	85 ng
4,361 kb	56,5 ng
2,322 kb	30 ng
2,027 kb	26,5 ng
0,564 kb	7,5 ng
0,127 kb	2 ng

Composition du tampon 10X

Tris HCl	200 mM	5 ml de 1 M
NaCl	200 mM	1 ml de 5 M
EDTA	1 mM	100 ml de 250 mM
eau distillée		19 ml

* *Smartladder (Eurogentec)*

La solution fournie est prête à l'emploi. Pour un gel, 5 µl de la solution sont utilisés. Cette solution est conservée à 4°C.

Taille	Concentration (totale = 720 ng)
10000 bp	100 ng
8000 bp	80 ng
6000 bp	60 ng
5000 bp	50 ng
4000 bp	40 ng
3000 bp	30 ng
2500 bp	25 ng
2000 bp	20 ng
1500 bp	15 ng
1000 bp	10 ng
800 bp	80 ng
600 bp	60 ng
400 bp	40 ng
200 bp	20 ng

PEG Polyéthylène glycol

Placer 50 g de PEG MW 3350 (Sigma) dans un berlin de 150 ml et ajouter 35 ml d'eau distillée.

Mélanger au moyen d'un barreau magnétique jusqu'à dissolution complète. Cela prend environ 30 minutes. Transférer la solution dans un cylindre gradué de 100 ml et rincer le berlin avec une petite quantité d'eau distillée. Ajouter cela au cylindre gradué et amener la solution à un volume total de 100 ml. Mixer par inversion.

Stériliser par filtration au travers d'un filtre à pores de 0,45 µm et stocker la solution dans une bouteille fermant correctement afin d'éviter l'évaporation de l'eau distillée et donc l'augmentation de concentration du PEG. Une concentration en PEG plus élevée est néfaste pour l'efficacité de la transformation.

Phénol-chloroforme-isoamylique

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

Chauffer le phénol à 50°C : il devient liquide. Ajouter l'hydroxyquinoline, laver 3X avec un volume de TE (pH 7,5) et garder le dernier volume de TE. Ajouter enfin l'alcool isoamylique et le chloroforme.

RNAase A

La solution stock est à une concentration de 10 mg/ml d'eau distillée. La concentration souhaitée est de 1 mg/ml. On prend 1 ml de RNAase A dans 9 ml d'eau distillée. On chauffe pendant 20 minutes à 100°C afin d'inactiver les DNAases. On aliquote et on conserve à -20°C.

SDS 10%

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

Single-strand Carrier DNA

Peser 200 mg d'ADN de haut poids moléculaire (Deoxyribonucleic Acid Sodium Salt type III from Salmon Testes, Sigma D 1626) dans 100 ml de TE Buffer. Disperse l'ADN dans la solution grâce à une pipette 10 ml. Mixer vigoureusement avec un agitateur magnétique jusqu'à ce que tout soit dissous. Aliquoter l'ADN par un ml et le conserver à -20°C.

Avant l'utilisation, la solution doit être bouillie pendant 5 minutes et ensuite rapidement placée sur glace.

SSC 20X

Na ₃ citrate	0,3 M	88,23 g/l
NaCl	3 M	175,35 g/l

La solution doit être mise à pH 7.

5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β -D galactopyranoside (X-Gal)

Dissoudre 80 mg/ml dans du N N diméthylformamide. Stocker à -20°C.

1.2. Tampons.

TAE 50X

Pour 100 ml :

Tris HCl pH 8	40 mM
EDTA	0,002 M
Acide acétique glacial	51,7 ml

Tampon de dénaturation pour Southern blot

Pour un litre

NaOH	0,5 M	20 g
NaCl	1,5 M	87,66 g

Tampon de ligation (5X)

Tris HCl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (dithiothreitol)	10 mM
ATP	1 mM

Tampon de lyse pour la préparation d'ADN génomique de levure

EDTA pH 8,5	50 mM
SDS	0,2%

Tampon N2

KCl	900 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N3

KCl	1150 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N5

KCl	1000 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	8,5

Tampon de neutralisation pour le southern blot.

Pour un litre

Tris HCl	1 M	121,14 g
NaCl	1,5 M	87,66 g

La solution est à ajuster à pH 7,5

Tampon de préhybridation.

Denhart's 50X	5 ml
SSC 20X	10 ml
SDS 10%	0,5 ml
Thymus DNA de veau distillée (100 µg/ ml)	2 ml d'ADN de thymus d'une solution de 2,5 mg/ml
eau distillée	12,5 ml

La solution d'ADN de thymus de veau est à dénaturer 5 minutes à 95 °C et à placer directement sur glace.

Tampon P1 (tampon de resuspension)

Tris HCl pH 8	50 mM
EDTA pH 8	10 mM

Autoclaver puis ajouter de la RNAase pour obtenir une concentration finale de 100 µg/ml.

Tampon P2 (tampon de lyse)

Pour 100 ml

NaOH	200 mM	800 mg
SDS	1%	1 g

Tampon P3 (tampon de neutralisation)

C'est une solution d'acétate de potassium à une concentration de 2,55 M. Le pH de 4,8 est à ajuster avec une solution d'acide acétique 37 %. Cette solution ne doit pas être autoclavée.

TE Buffer

à pH 8

pour un litre

Tris HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1,0 mM

Tampon de restriction (conservés à -20°C)

Tampons fournis par la firme BRL.

	les différents tampons									
Composition (mM)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tris HCl	50	50	50	20	10	50	50	20	*	100
MgCl ₂	10	10	10	5	8	6	10	10	**	10
NaCl	-	50	100	-	-	50	50	-	-	150
KCl	-	-	-	50	-	50	50	-	***	-
pH	8	8	8	7,4	8,2	7,4	8	7,4	7,9	7,6

* 20 mM tris-acétate

** 10 mM Mg-acétate

*** 50 mM K-acétate

2. Milieu de culture.

2.1. Les bactéries.

Milieu LB (Luria Bertani)

pour 400 ml

Tryptone	1%	4 g
NaCl	0,5%	2 g
Yeast extract	0,5%	2 g

Pour un milieu solide, il faut rajouter 2% d'agar soit 8 g pour 400 ml de LB. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Les produits thermolabiles tels que l'ampicilline, ... doivent être ajoutés après l'autoclave lorsque la température est descendue en dessous de 60°C.

Les bactéries sont alors mises en culture à une température de 37°C, sous agitation pour les cultures liquides.

2.2. Les levures.

2.2.1. *Schizosaccharomyces pombe*.

Milieu riche

Pour un litre de milieu YES (Yeast Extract Supplemented), 35 capsules de milieu lyophilisé de la firme BIO101 sont placées dans un litre d'eau distillée. Ce milieu doit être autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu minimum

EMM (Edimburg Minimal Medium) est une poudre fournie par la firme BIO101 dont la quantité à utiliser est de 32g/litre.

Pour 500 ml, on prend 16 g de EMM que l'on dissout dans 480 ml d'eau distillée. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Le milieu EMM est un milieu plus complexe que le milieu minimum de *Sacharomyces cerevisiae*. Il contient en plus, des vitamines, des sels minéraux, ... Il doit être complété par Ade, URA, HIS, LYS, LEU suivant le génotype des souches utilisées.

	pour un litre	concentration finale
KH phthalate	3 g	14,7 mM
Na ₂ HPO ₄	2,2 g	15,5 mM
NH ₄ Cl	5 g	93,5 mM
Glucose	20 g	111 mM
Salts stock 50X	20 ml	
Minerals stock (10000X)	0,1 ml	
Vitamins stock (1000X)	1 ml	

Pour un milieu solide, ajouter 20 g/l d'agar. Amener à un litre avec de l'eau distillée. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Salts stock (50X)

	pour un litre	concentration finale
MgCl ₂ .6H ₂ O	53,3 g	5,2 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,735 g	0,1 mM
KCl	50 g	13,4 mM
Na ₂ SO ₄	2 g	0,28 mM

Dissoudre chaque composé séparément dans des volumes de 50 ml d'eau distillée. Les ajouter et amener avec de l'eau distillée au volume total de 1 litre. Stocker à -20°C ou aliquoter et garder à 4°C.

Minerals stock (10000X)

	pour 100 ml	concentration finale
H ₃ BO ₃	0,5 g	8,1 mM
MnSO ₄	0,4 g	2,37 mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,4 g	1,39 mM
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,2 g	0,74 mM
MoO ₄ .2H ₂ O	0,16 g	0,25 mM
KI	0,1 g	0,6 mM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04 g	0,16 mM
Acide citrique	1 g	4,76 mM

Dissoudre chaque composé séparément dans des volumes de 5 ml d'eau distillée. Les ajouter et amener avec de l'eau distillée au volume total de 100 ml. Stériliser par filtration. Stocker à -20°C ou aliquoter et garder à 4°C.

Vitamins stock (1000X)

	pour 100 ml	concentration finale
Acide nicotinique	1 g	81,2 mM
Inositol	1 g	55,5 mM
Biotine	1 mg	40,8 mM
Acide pantothenique	100 mg	4,2 mM

Dissoudre chaque composé séparément dans des volumes de 10 ml d'eau distillée. Les ajouter et amener avec de l'eau distillée au volume total de 100 ml. Stériliser par filtration. Stocker à -20°C ou aliquoter et garder à 4°C.

Milieu minimum sélectif pour un des marqueurs.

Composants à rajouter à la solution de base EMM :

Solutions stocks 100X ou 50X placées dans l'étuve à 30°C :

Leucine : 1,25 g/100 ml (50X) pour la souche LEU2-

Lysine : 0,175 g/100 ml (100X) pour la souche LYS2-

Histidine : 0,75 g/100 ml (100X) pour la souche HIS3-

Adénine : 0,375 g/100 ml (50X) pour la souche Ade6-

Uracile : 0,375 g/100 ml (50X) pour la souche URA4-

Bouteille	200 ml	400 ml	500 ml
Leucine	4 ml	8 ml	10 ml
Lysine	2 ml	4 ml	5 ml
Histidine	2 ml	4 ml	5 ml
Adénine	4 ml	8 ml	10 ml
Uracile	4 ml	8 ml	10 ml

Pour un milieu sans leucine par exemple, il faut rajouter tous les éléments exception faite de la leucine.

2.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*.

Milieu riche

Pour un litre de milieu YPD (Yeast Extract Dextrose).

Glucose	20 g
Peptone	20 g
Yeast Extract	10 g

Pour obtenir un milieu solide, ajouter 15 g d'agar. Mettre à pH 4,8 avec de l'HCl 37%, amener la solution à un litre avec de l'eau distillée. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Milieu minimum

Solution S :

Bacto Yeast Nitrogen Base (w/o AA et NH ₄ SO ₄)	1,7 g
Ammonium sulfate	5 g

Pour réaliser un milieu solide ajouter 25 g de Bactoagar.
Amener la solution à 800 ml par de l'eau distillée.
Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Milieu SD :

Pour un litre, ajouter dans les 800 ml de solution S :

Dextrose 20% autoclavé	100 ml
Mix d'AA 10X	100 ml

Milieu SGR :

Pour un litre, ajouter dans les 800 ml de solution S :

Galactose/raffinose 10 X	100 ml
Mix d'AA 10X	100 ml

Mix d'AA 10X :

Ce mix d'acides aminés et de bases est dépourvu de quatre éléments souvent employés comme marqueur de sélection :

- l'uracile,
- l'histidine,
- la leucine,
- le tryptophane.

Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée :

Adénine	0,3 g	Phénylalanine	0,6 g
Sérine	4,0 g	Isoleucine	0,3 g
Valine	1,5 g	Proline	0,3 g
Glutamate	1,0 g	Méthionine	0,3 g
Lysine	0,5 g	Thréonine	2,0 g
Tyrosine	0,6 g	Aspartate	1,2 g
Arginine	0,3 g		

Chauffer au micro-ondes quelques minutes pour tout dissoudre et amener à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Eléments à rajouter :

Pour un litre :

Leucine 1%	5 ml
Histidine 1%	3 ml
Tryptophane 1%	3 ml
Uracile 1%	3 ml

Pour un milieu sans leucine, il faut rajouter tous les éléments exception faite de la leucine.

Milieu XD :

Pour un litre, il faut préparer trois solutions.

Solution 1

Dextrose	20 g dans 100 ml
Mix d'AA 10X	100 ml

Amener à pH 7 avec du KOH. Ajouter de l'eau distillée pour un volume total de 250 ml. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Solution 2

Dissoudre 13,6 g de KH_2PO_4 dans 250 ml d'eau distillée. Ajuster à pH 7 avec du KOH 5M. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Solution 3

pour 500 ml

Agar	25 g
Bacto Yeast Nitrogen Base (w/o AA et NH_4SO_4)	1,7 g
Ammonium Sulfate	5 g

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

On mélange alors les 3 solutions et on ajoute 1 ml de X-Gal.

Milieu SGR :

Pour un litre, il faut préparer trois solutions.

Solution 1

Galactose/raffinose 10X	20 g dans 100 ml
Mix d'AA 10X	100 ml

Amener à pH 7 avec du KOH. Ajouter de l'eau distillée pour un volume total de 250 ml. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Solution 2

Dissoudre 13,6 g de KH_2PO_4 dans 250 ml d'eau distillée. Ajuster à pH 7 avec du KOH 5M. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Solution 3

pour 500 ml

Agar	25 g
Bacto Yeast Nitrogen Base (w/o AA et NH_4SO_4)	1,7 g
Ammonium Sulfate	5 g

Amener à volume avec de l'eau distillée.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

On mélange alors les 3 solutions et on ajoute 1 ml de X-Gal.

3. Souches, plasmides et banques.

3.1. Souches.

3.1.1. Souches de levures.

3.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*.

ScBOY (*MAT* α , *HIS3*, *TRP 1*, *ura 3::pSH18-34*, *6 lexAop-LEU2*)

La souche est *ura+* grâce au marqueur de sélection *URA3* porté par le plasmide *pSH18-34*, qui a été intégré dans le génome de la souche.

ScBUN est une souche **ScBOY** qui a subi plusieurs passages successifs sur 5-FOA afin de sélectionner les souches mutées dans le gène *URA3*. (Boeke, LaCroute et Fink, 1984). La souche est *ura-*. La situation chromosomique a été vérifiée afin de voir s'il ne s'agissait pas d'une délétion du plasmide intégré. (Nina Korsisaari; communication personnelle, Tomi Mäkelä résultats non publiés)

YPH 1161 (*MAT a*, *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *leu2- Δ 1*, *Skp1 Δ 1::TRP1*, *Leu2::Skp1-4*, *CFIII (Cen3.L.YPH 983)* *HIS3 SUP 11*). Cette souche est fournie par P. Hieter (Connelly et Hieter, 1996).

YPH 1172 (*MAT a*, *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *leu2- Δ 1*, *Skp1 Δ 1::TRP1*, *leu2::Skp1-3*, *CFIII (Cen3.L.YPH 983)* *HIS3 SUP 11*). Cette souche est fournie par P. Hieter (Connelly et Hieter, 1996).

3.1.1.2. *Schizosaccharomyces pombe*.

SpQ01 (*h+* *Leu 1-32*) cette souche est fournie par la firme Stratagène.

3.1.2. Souches de bactéries.

DH10B (*F⁻ mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*dlacZ Δ M15*, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ (*ara, leu*)7697, *galU*, *galK*, λ^- , *rspL*, *nupG*).

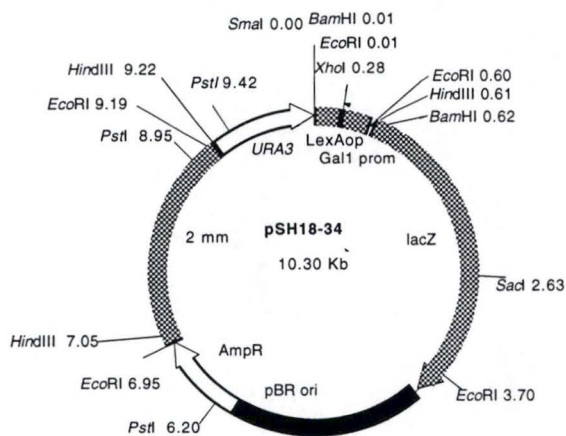


Figure 5.1 : Plasmide pSH18-34 est le plasmide rapporteur utilisé dans le cadre du double-hybride.

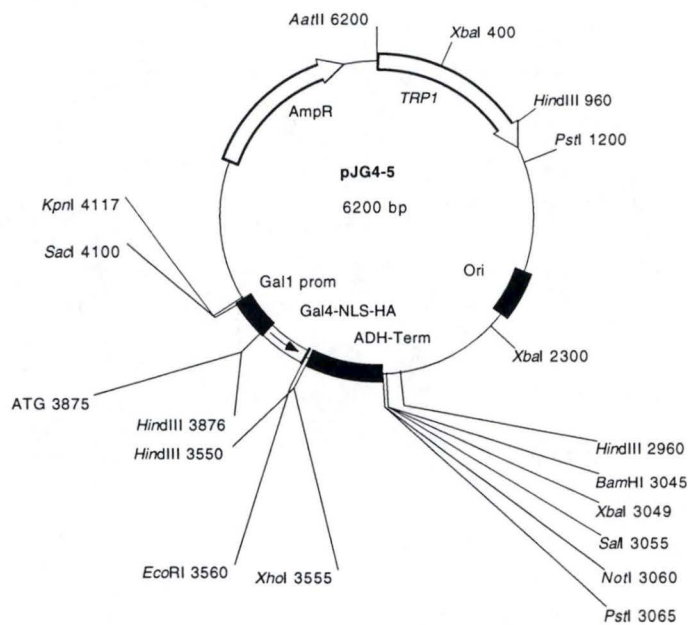


Figure 5.2 : Plasmide PGJ4-5 dans lequel on clone des gènes (X) en *EcoRI*/*XhoI* de telle sorte qu'en présence de galactose, on produise une protéine de fusion VP16-X qui sera utilisée dans le cadre du double-hybride.

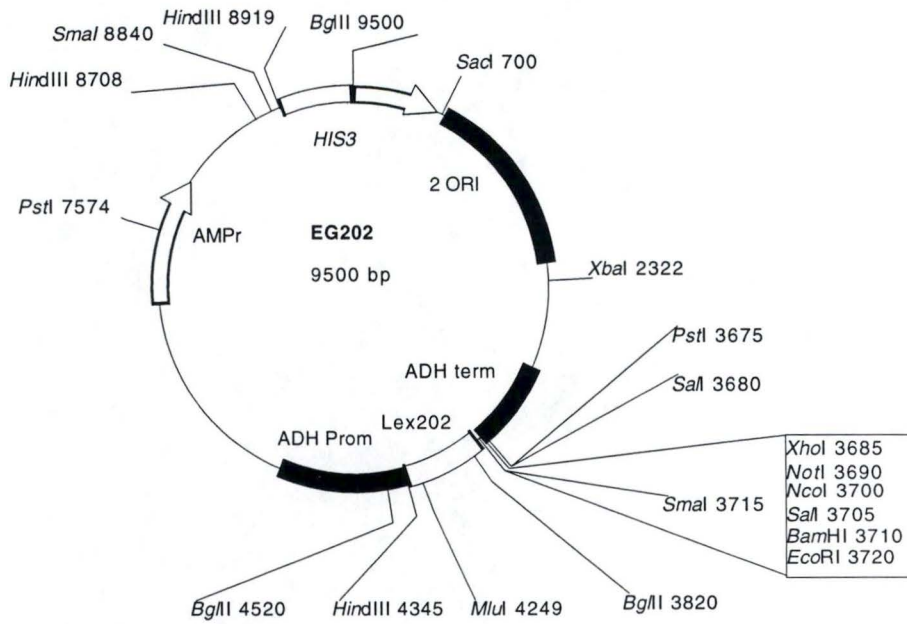


Figure 5.3 : Carte du plasmide pEG202 utilisé dans le cadre du double-hybride et permettant la synthèse d'une protéine de fusion LexA-Y. Les gènes d'intérêt (Y) sont clonés en *SalI*/*BamHI*.

HindIII, KpnI, SacI, BamHI, BstXI, EcoRI, BstXI, NotI, XhoI, SphI, XbaI

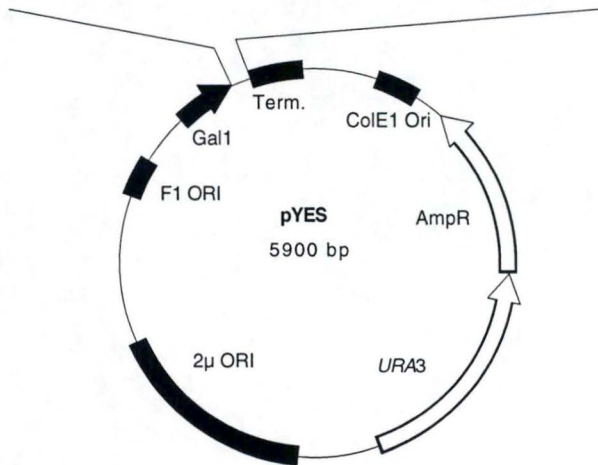


Figure 5.4 : Carte du plasmide pYES utilisé dans le cadre du double-hybride et permettant surexpression sur milieu galactose du produit du gène cloné dans le site multiple de clonage (MCS) sous le promoteur Gal1.

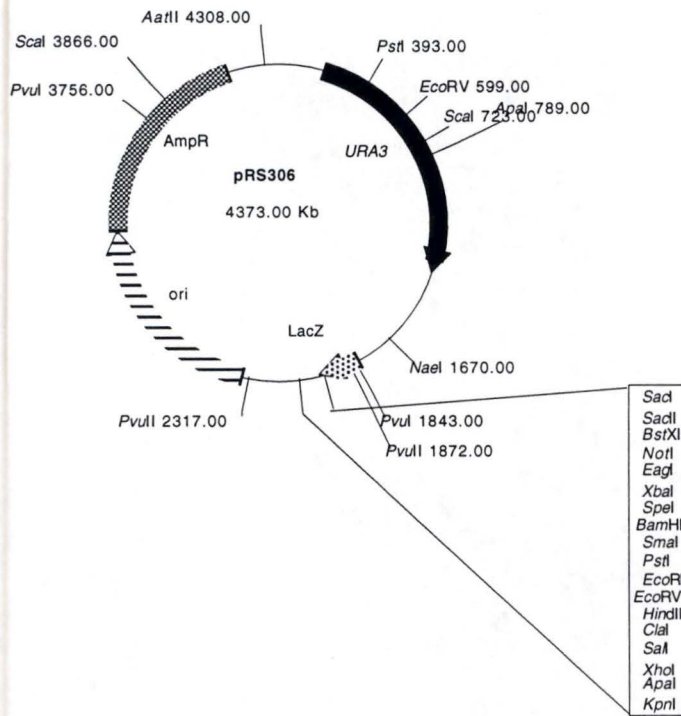


Figure 5.5 : Carte du plasmide pRS306, plasmide utilisé afin de cloner les inserts génomiques de la minibanque.

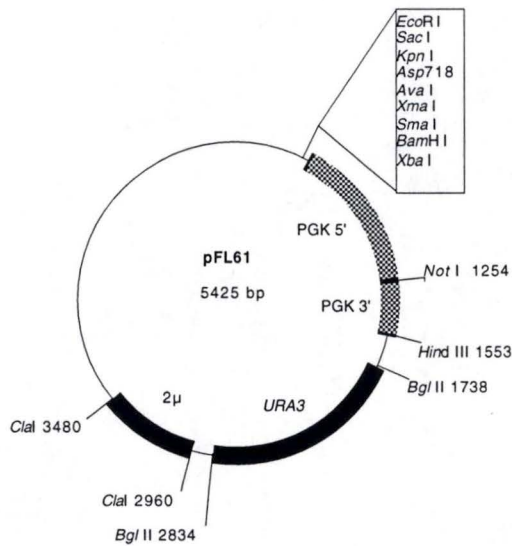


Figure 5.6 : Carte du plasmide pFL61, plasmide contenant la banque d'ADNc de *S. pombe*.

3.2. Plasmides.

pSH18-34 : ce vecteur est utilisé en tant que vecteur reporter dans un screen de "double-hybride". Ce plasmide contient comme marqueur le gène de résistance à l'ampicilline et le marqueur *URA3*. Il contient une ars (Autonomous Replication Sequence) et une ori (Origine de répllication bactérienne) afin de pouvoir se répliquer dans ses deux hôtes. Ce plasmide est doté de six opérateurs de *lexA* qui régulent la transcription de *lacZ*, un gène bactérien codant pour la β -galactosidase. Cette enzyme a la capacité de dégrader le X-Gal en un composé bleu (Fig. 5.1).

pJG 4-5 : ce vecteur est utilisé en tant que "vecteur proie" dans un screen de double hybride. Ce plasmide contient comme marqueur le gène de résistance à l'ampicilline et le marqueur *TRP1*. Il contient une ars et une ori afin de pouvoir se répliquer dans ses deux hôtes. Ce plasmide est doté d'un promoteur GAL1 qui permet l'expression d'un site d'importation nucléaire, du domaine transactivateur viral VP16 et d'un épitope de la protéine virale hémagglutinine, HA (INFLUENZA), suivi d'un polylinker permettant la réalisation d'un gène de fusion entre VP16 et le gène d'intérêt (Golemis et Brent, 1992) (Fig. 5.2).

pEG202 : ce vecteur est utilisé en tant que vecteur appât dans un screen de double hybride. Ce plasmide haute copie contient comme marqueur le gène de résistance à l'ampicilline et le marqueur *HIS3*. Il contient une ars et une ori afin de pouvoir se répliquer dans ses deux hôtes. Ce plasmide est doté d'un promoteur ADH qui régule la transcription des 202 premiers nucléotides du gène *LEXA* (*lex202*) de *E.coli*, suivi d'un polylinker. Celui-ci permet de créer un gène de fusion utile dans le cadre d'un double hybride (Golemis et Brent, 1992) (Fig. 5.3).

pYES2 : ce vecteur contient une ori et une ars afin de pouvoir se répliquer dans ses deux hôtes. Il possède les marqueurs de sélection *URA3* et résistance à l'ampicilline. Il est doté du promoteur *Gall1*, inductible par le galactose qui permettra l'expression de tout gène cloné grâce à la présence du polylinker (INVITROGEN) (Fig. 5.4).

pRS306 : ce vecteur présente les origines de répllication caractéristiques de *E. coli* et *S. cerevisiae*. Il présente deux types de marqueurs de sélection : un gène de résistance à l'ampicilline et *URA3*. (Fig. 5.5).

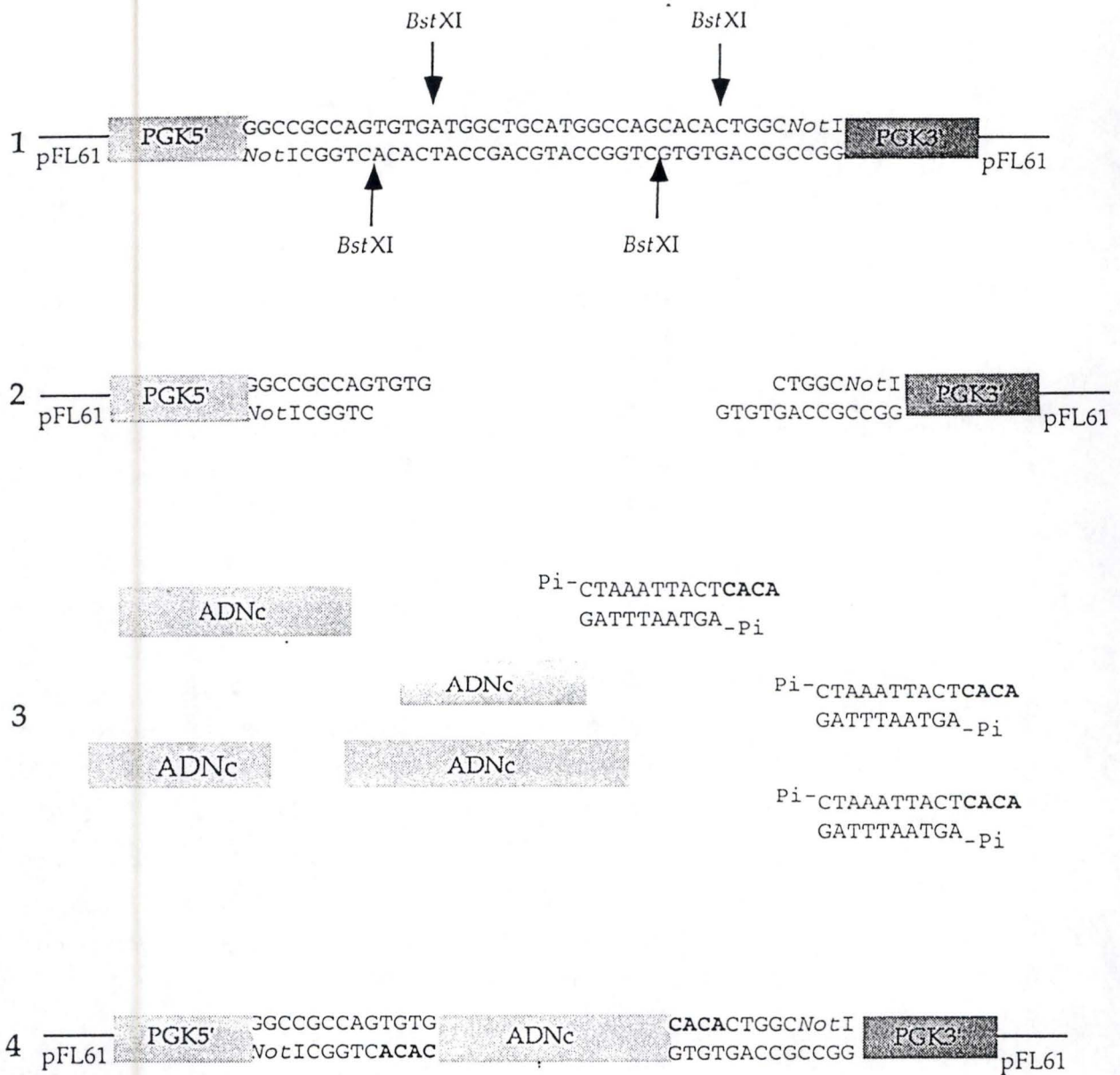


Figure 5.7 : Détails des différentes étapes de la construction de la banque d'ADNc dans le vecteur pFL61.

1. Insertion d'un "linker" possédant les sites de restriction *NotI* aux extrémités et les sites de restrictions *BstXI* internes entre les séquences promotrice et terminatrice de la PGK du vecteur pFL61.
2. Restriction *BstXI* du vecteur.
3. "Ligation" aux inserts d'ADNc d'adaptateurs dont les extrémités sont compatibles avec celles générées par la restriction *BstXI* du vecteur.
4. Clonage des inserts d'ADNc dans le vecteur.

pFL61 : ce vecteur a été construit pour le clonage de la banque d'ADNc de *S. pombe* (Minet *et al.*, 1992). Il contient les ori caractéristiques de ses deux hôtes principaux qui sont *E. coli* et *S. cerevisiae*, les zones promotrices et régulatrices de la phosphoglycérate kinase, un linker permettant l'insertion d'un fragment d'ADN d'intérêt, le marqueur de sélection *URA3* et le plasmide pUC19 (Fig. 5.6).

3.3. Banque d'ADNc de *S. pombe*.

La banque d'ADNc utilisée a été fournie par M.Minet de l'Institut Curie (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Cette banque est constituée d'inserts de 0,6 à 3 kb obtenus par transcription reverse d'ARN messagers de la souche h-972 de *S. pombe*.

Les étapes de la construction de cette banque sont détaillées dans la figure 5.7.

Les inserts sont clonés aux sites *Bst*XI du plasmide pFL61. Le pFL61 est un vecteur d'expression qui contient les séquences promotrice (-291 à -1) et terminatrice de la phosphoglycérate kinase (PGK). Entre ces deux séquences régulatrices, un "linker" *Not*I possédant deux sites de restriction *Bst*XI a été introduit. Des adaptateurs compatibles avec le site de restriction *Bst*XI ont été ajoutés aux extrémités de l'ADNc pour diriger son clonage. Le vecteur pFL61 possède en plus des zones régulatrices de la phosphoglycérate kinase, le marqueur de sélection *URA3*, l'origine de répllication du plasmide 2 μ de levure et le vecteur de coli, pUC19.

Pour amplifier cette banque, il est conseillé de transformer les souches adéquates par électroporation. L'efficacité de la transformation atteint 10^7 / μ g de banque d'ADN plasmidique). Toute amplification doit être réalisée sur milieu solide afin de conserver la représentativité de la banque et éviter la perte des plus grands inserts.

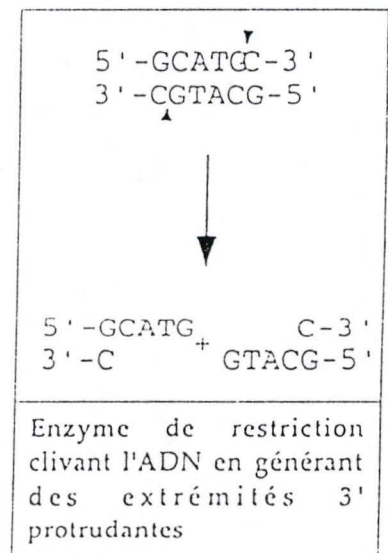
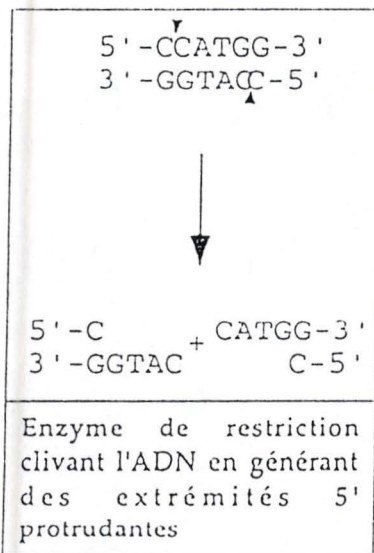
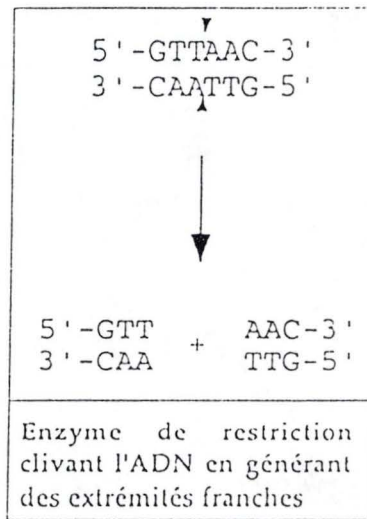


Figure 5.8 : Les différents types d'enzymes de restriction.

4. Techniques relatives à l'ADN.

4.1. Les réactions de restriction.

4.1.1. Principe.

Une enzyme de restriction est une endonucléase qui coupe en des sites spécifiques l'ADN. Ces enzymes hydrolysent le lien phosphodiester couplant deux nucléotides, libérant des fragments d'ADN dont l'un est bordé par un phosphate à l'extrémité 5' et l'autre est bordé d'un groupement hydroxyle à l'extrémité 3'. On différencie les endonucléases sur le mode de coupure (Fig. 5.8) :

- coupures en bouts francs, par exemple : *EcoRV*, *MboI*, ...
- coupures en bouts collants qui peuvent être à leur tour
 - à extrémités 5' protrudantes, par exemple : *SacI*, *KpnI*, ...
 - à extrémités 3' protrudantes. par exemple : *EcoRI*, *BamHI*, ...

4.1.2. Réalisation pratique.

La réaction nécessite la mise en présence dans un eppendorf des composants suivants :

- l'ADN à restreindre
- le tampon de restriction (concentré 10x)
- la ou les enzymes de restriction (On considère que 5 unités sont suffisantes pour restreindre 1 µg d'ADN. Cette règle doit être modulée en fonction de l'occurrence des sites)
- l'eau distillée pour amener au volume final désiré (de 20 à 50 µl).

La restriction se déroule à une température optimale de 37°C durant une heure.

La réaction est arrêtée par ajout de bleu alourdisseur ou par élévation de température pour les enzymes thermosensibles.

Les enzymes sont stockées à -20°C.

4.1.3. Remarques.

1. Toutes les enzymes de restriction ne travaillent pas à une température de 37°C. L'enzyme *SmaI* restreint à une température de 25°C tandis que *BclI* travaille à 50°C.
2. La quantité d'enzyme nécessaire varie de 3 à 10 unités/μg d'ADN à restreindre. Le volume ne doit pas excéder 1/10ème du volume final car les enzymes sont conservées dans du glycérol et le tampon de restriction contient également du glycérol. Si la concentration de glycérol excède 5%, alors il devient néfaste parce que
 - soit l'activité enzymatique diminue et la restriction est, dans ce cas, partielle;
 - soit l'enzyme acquiert une activité "star"
3. L'activité "star" d'une enzyme se manifeste sous des conditions particulières telles qu'une température élevée, une force ionique élevée, une forte concentration en ADN cible, la présence de solvants organiques (éthanol, ...), glycérol, ... Cette activité consiste en l'hydrolyse des liens phosphodiester en des sites similaires mais non identiques aux sites spécifiques de clivage de l'endonucléase.

4.2. L'extraction au phénol et la précipitation à l'alcool.

4.2.1. But.

L'extraction au phénol suivie de la précipitation à l'alcool doivent être envisagées, par exemple, lorsque la double restriction à appliquer à l'ADN nécessite des tampons de restrictions incompatibles. Afin de résoudre ce problème, la double restriction s'effectue en deux temps avec entre chacune des restrictions une étape de purification de l'ADN. Cette purification qui sépare l'ADN du mix de restriction c'est-à-dire enzyme et tampon se fait par une extraction au phénol et la précipitation à l'éthanol. En effet, le phénol et le chloroforme sont deux agents dénaturants pour les protéines dont les enzymes. La précipitation à l'alcool est l'étape qui permettra d'ôter le tampon de restriction.

4.2.2. Réalisation pratique.

4.2.2.1. L'extraction au phénol.

- Amener le volume à 100 µl avec de l'eau distillée.
- Ajouter 10 µl de NaAc 3M pH 5,2
- Ajouter 110 µl de phénol/chloroforme
- Vortexer 30 secondes
- Centrifuger 5 minutes à grande vitesse
- Récupérer la phase supérieure

4.2.2.2. La précipitation à l'alcool.

- Ajouter 2,5 volumes d'éthanol 100% froid
- Laisser 20 minutes à -80°C
- Centrifuger 20 minutes à 4°C
- Ôter le surnageant
- Ajouter 100 µl d'EtOH 70% froid
- Centrifuger 5 minutes à 4°C
- Enlever le surnageant
- Sécher le culot
- Resuspendre dans 20 µl d'eau distillée.

4.3. L'électrophorèse sur gel d'agarose.

4.3.1. But.

L'électrophorèse sur gel d'agarose peut être envisagée dans plusieurs cas de figures. Cette technique permet d'une part de séparer des fragments de taille différente, et d'autre part d'estimer la taille, la concentration de l'ADN grâce à la migration simultanée d'un marqueur de taille à une concentration connue. Une dernière possibilité offerte par cette technique est d'estimer la qualité de la préparation ainsi que son degré de purification.

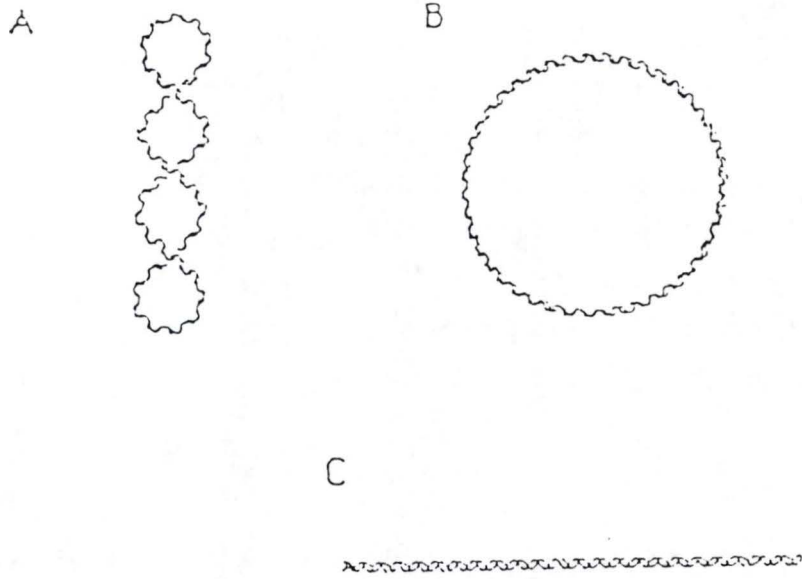


Figure 5.9: Les trois conformations de l'ADN.
(A) CCC ("covalently closed circular")
(B) OC ("open circular")
(C) OL ("open linear")

4.3.2. Principe et paramètres.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode de séparation de molécules, qui repose sur des vitesses de migration différentielles de molécules de taille différente. Plus la molécule est petite, plus vite elle migrera au sein du gel d'agarose.

La vitesse de migration dépend de plusieurs paramètres.

1. la taille des molécules ou fragments d'ADN : au plus le fragment est grand, au moins vite il migrera. En effet, la migration s'effectue de manière inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire;
2. le pourcentage d'agarose : au plus le pourcentage d'agarose est élevé, au plus on sépare efficacement les fragments de petite taille comme le présente le tableau suivant :

Agarose (%)	Tailles séparées de façon optimale (kb)
0,5	30 à 1
0,7	12 à 0,8
1,0	10 à 0,5
1,2	7 à 0,4
1,5	3 à 0,2

3. l'intensité du champ électrique : la migration sera d'autant plus rapide que l'ampérage est important;
4. la conformation de la molécule d'ADN. (Fig. 5.9)

La molécule d'ADN est rendue visible par l'utilisation du bromure d'éthidium, une molécule chimique qui s'intercale entre les deux brins d'ADN et rend celui-ci visible aux ultraviolets à une longueur d'onde de 302nm. (Fig. 5.10)

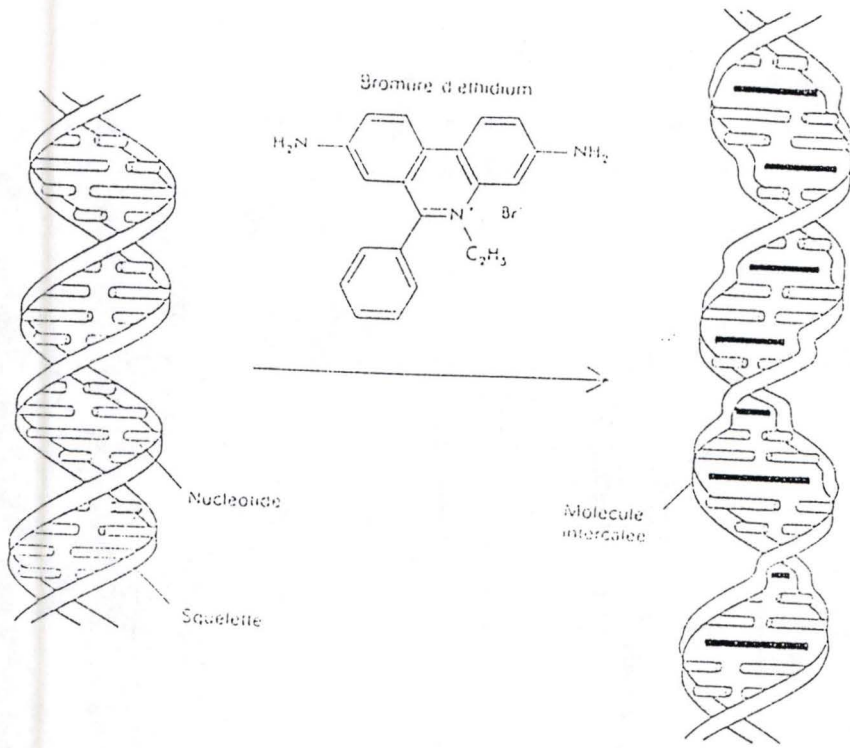


Figure 5.10: Schéma représentant l'insertion du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN.

4.3.3. Réalisation pratique.

4.3.3.1. La première étape : couler un gel.

On dissout par chauffage 1% d'agarose dans du TAE 1X. Ensuite on coule la solution liquide dans un support et on y ajoute une petite quantité de bromure d'éthidium (de l'ordre de 2 à 5 µl par 100 ml). Avant que la solution ne se solidifie, on rajoute le peigne permettant de créer le nombre et le volume de puits désirés.

4.3.3.2. La deuxième étape : charger le gel avec les échantillons.

Afin de pouvoir charger les échantillons dans les puits, il faut rajouter aux échantillons quelques µl de tampon de chargement (en général 1/10ème du volume total) afin que les solutions tombent au fond des puits.

4.3.3.3. La troisième étape : la migration proprement dite.

Dans le cas d'une migration analytique, il faut faire migrer de manière simultanée un marqueur de taille.

On distingue deux types de migration :

1. analytique dont le but est de déterminer la taille et la quantité d'ADN.
2. préparative dont le but est de récupérer un fragment de taille déterminée en vue de le cloner dans un vecteur.

4.3.3.4. La quatrième étape : visualiser les bandes aux ultraviolets.

4.4. La purification de l'ADN.

Suite à une électrophorèse préparative sur gel d'agarose, plusieurs techniques existent afin de récupérer un fragment d'ADN d'intérêt de taille déterminée. Ce fragment peut être engagé de manière spécifique dans une réaction de ligation.

On distingue deux types de méthodes :

1. la récupération sur matrice
2. la récupération sur colonne.

4.4.1. La récupération sur matrice.

Cette technique utilise le kit "GeneClean II kit" fourni par la Société BIO 101 ou le kit MBI FERMENTAS.

4.4.1.1. GeneClean II Kit.

Le temps nécessaire pour effectuer cette récupération est de 20 minutes.

Les étapes sont :

- exciser la bande d'intérêt du gel d'agarose au moyen d'un scalpel. Cette opération doit être réalisée le plus rapidement possible afin de diminuer l'exposition de l'ADN aux ultraviolets qui lui sont néfastes.
- ajouter trois volumes de solution stock de NaI et incubé entre 45 et 55°C pendant 5 minutes pour dissoudre l'agarose.
- vortexer la solution de glassmilk DNA (la matrice) avant l'emploi et ajouter 5 µl de cette solution à l'ependorf et vortexer. Incuber 5 minutes sur table.
- centrifuger à grande vitesse le complexe glassmilk pendant 5 secondes. Eliminer le surnageant.
- laver le culot 3 fois avec 500 µl de la solution de New Wash Buffer, fournie dans le kit. Disrupter le culot et centrifuger 5 secondes à grande vitesse. Oter le surnageant.
- éluer l'ADN dans 11 µl d'eau,
- incubé 2 minutes entre 45 et 55°C.
- centrifuger à grande vitesse pendant 5 secondes. Transférer le surnageant dans un eppendorf.

4.4.3.2. MBI FERMENTAS.

Le temps nécessaire pour effectuer cette récupération est de 20 minutes.

Les étapes sont :

- exciser la bande d'intérêt du gel d'agarose au moyen d'un scalpel. Cette opération doit être réalisée le plus rapidement possible afin de diminuer l'exposition de l'ADN aux ultraviolets qui lui sont néfastes.

- ajouter trois volumes de solution stock fournie dans le kit et incuber entre 45 et 55°C pendant 5 minutes pour dissoudre l'agar.
- vortexer la solution-matrice avant l'emploi et ajouter 5 µl de cette solution à l'eppendorf. Incuber 5 minutes à 55°C.
- centrifuger à grande vitesse le complexe matrice-ADN pendant 5 secondes. Eliminer le surnageant.
- laver le culot 3 fois avec 500 µl de la solution de lavage fournie dans le kit.
- centrifuger à grande vitesse pendant 5 secondes. Ôter le surnageant.
- éluer le DNA dans 11 µl d'eau,
- incuber 5 minutes entre 45 et 55°C.
- centrifuger à grande vitesse pendant 5 secondes. Transférer le surnageant dans un eppendorf.

4.4.2. La récupération sur colonne.

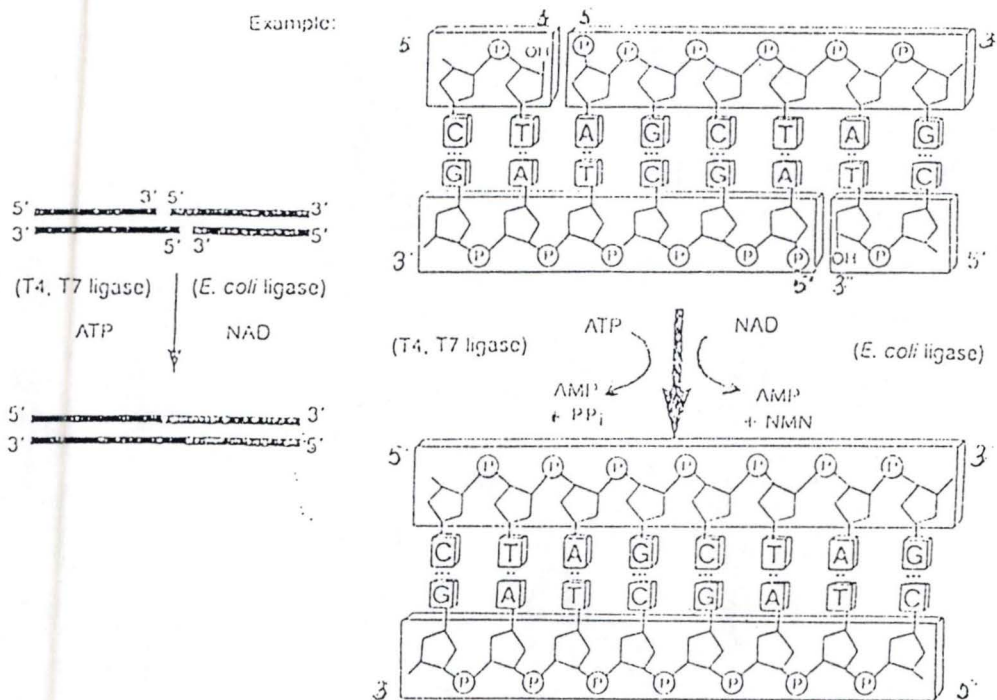
Cette technique utilise le kit "Nucléospin extract 2 in 1" fourni par la Société Macherey-Nagel.

Le temps nécessaire pour effectuer cette récupération est de 20 minutes.

Les étapes sont :

- exciser la bande d'intérêt du gel d'agarose au moyen d'un scalpel. Cette opération doit être réalisée le plus rapidement possible afin de diminuer l'exposition de l'ADN aux ultraviolets qui lui sont néfastes.
- pour chaque 100 mg de gel d'agarose, ajouter 300 µl de tampon NT1 fourni dans le kit. Pour des gels d'agarose plus concentrés (2%), ajouter le double du volume du tampon NT1.
- Incuber les échantillons 10 minutes à 50 °C. Vortexer les échantillons toutes les deux à trois minutes.
- charger chaque échantillon sur une colonne Nucleospin et placer chaque colonne sur un tube de 2 ml.
- centrifuger 60 secondes à 6000 X g.
- ôter le surnageant et replacer la colonne sur le tube, ajouter 700 µl de tampon NT3. Centrifuger à grande vitesse pendant 60 secondes.
- répéter l'opération de lavage une fois.
- ôter le surnageant, placer la colonne sur un tube et centrifuger 60 secondes à grande vitesse afin d'ôter tout le NT3. L'éthanol résiduel inhibe les réactions ultérieures.

(a)



(b)

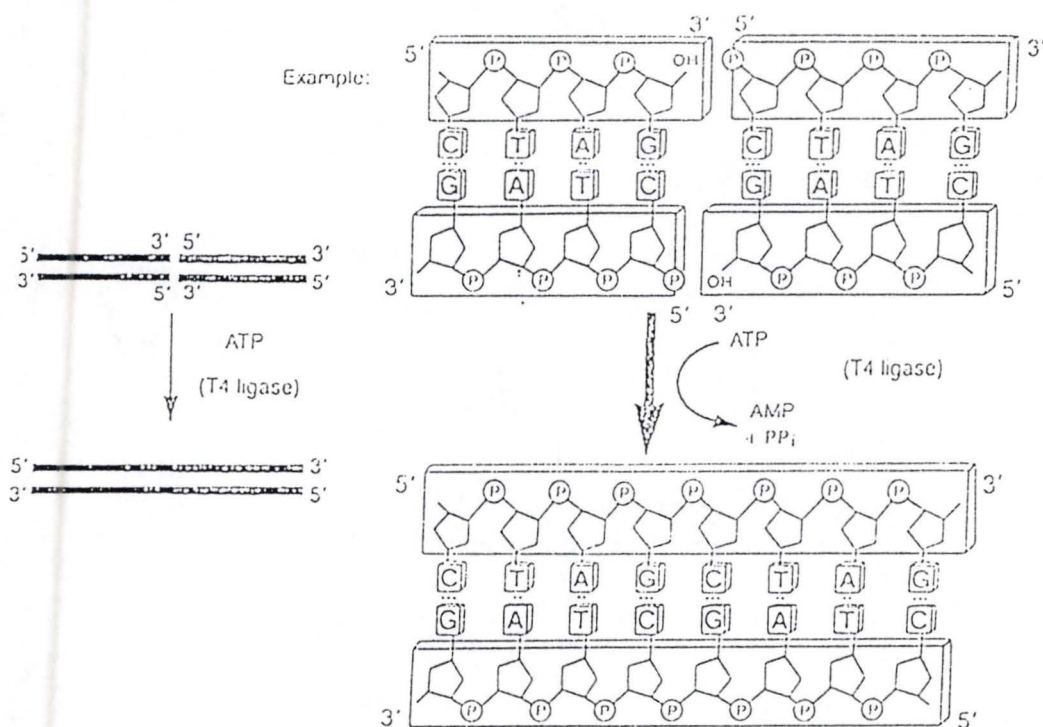


Figure 5.11 : Représentation du mode d'action de la ligase du phage T4.
(A) Au niveau des extrémités collantes
(B) Au niveau des extrémités franches

- placer la colonne sur un eppendorf de 1,5 ml et ajouter 20 µl d'eau, centrifuger 60 secondes à grande vitesse.

4.5. La réaction de ligation.

4.5.1. Principe.

La réaction de ligation consiste en la formation de liens phosphodiester entre une extrémité 3'-OH et une extrémité 5'-PO₄³⁻. Cette réaction est catalysée par une enzyme du phage T4 : la T4 DNA ligase. Cette synthèse est utilisée afin de lier un insert dans une matrice en un lieu déterminé. Pour fonctionner l'enzyme a besoin de Mg²⁺ et d'ATP. (Fig. 5.11)

4.5.2. Réalisation pratique.

La ligation est une réaction qui nécessite la mise en présence de divers réactifs :

- la matrice restreinte en ces deux extrémités,
- l'insert également restreint en des sites identiques ou compatibles à ceux de la matrice,
- le tampon de ligation (5X),
- la T4 DNA ligase,
- de l'eau stérile pour mettre au volume désiré.

Cette réaction peut se dérouler à une température de 16 °C toute la nuit ou sur table pendant deux heures, ou les deux méthodes utilisées de manière successive. On recherche un compromis entre activité et stabilité. A la température de 16°C, l'enzyme offre une grande stabilité mais une faible activité. A 25°C, l'enzyme présente une forte activité mais est moins stable.

4.6. La transformation.

La transformation est une manipulation qui consiste en l'introduction dans une cellule d'un vecteur portant la construction d'intérêt. Il existe différents procédés pour rendre les cellules compétentes, c'est-à-dire réceptrices à cette

introduction. On distingue la transformation bactérienne et la transformation de levure.

4.6.1. La transformation bactérienne.

Il existe différentes procédures pour transformer les cellules bactériennes. Ces procédures présentent des efficacités différentes.

- la transformation utilisant le chlorure de calcium.
- l'électroporation (non utilisée au cours de ce mémoire).

4.6.1.1. La transformation utilisant le chlorure de calcium.

1° principe.

Le calcium se lie à l'ADN plasmidique et le protège de l'action délétère des DNAases. Ce complexe ainsi formé se dépose sur les membranes cellulaires. Suite à un choc thermique, la membrane se fragilise légèrement et de l'ADN peut pénétrer dans la cellule. Ces cellules potentiellement transformées sont placées dans un milieu non sélectif (ex : du LB) afin de favoriser l'expression des protéines de sélection encodées par des gènes portés sur le plasmide. Afin de sélectionner les cellules réellement transformées, celles-ci sont placées en culture sur milieu sélectif. Seules les cellules dans lesquelles s'est introduit le plasmide pourront se développer sur ce milieu. L'efficacité de cette transformation est de 10^6 à 10^7 / μg d'ADN pour les cellules DH10B de *E. coli*.

2° préparation de cellules CaCl_2 compétentes.

- inoculer une préculture de cellules d'*E. coli* de 50 ml de LB,
- laisser pousser toute la nuit à 37°C sous agitation,
- inoculer 400 ml de milieu LB avec 4 ml de la préculture dans un récipient stérile de 2 litres,
- incuber sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une $\text{D.O.}_{590\text{nm}}=0,375$ (délai de 2 à 3 heures),
- aliquôter la culture dans 8 tubes stériles de 50 ml,
- stopper la croissance dans la glace pendant 10 minutes,
- centrifuger 7 minutes à 3000 rpm à 4°C,
- ôter le surnageant et resuspendre les cellules dans 10 ml d'une solution de CaCl_2 froide,
- centrifuger les cellules 5 minutes à 2500 rpm à 4°C.

- resuspendre les cellules dans 2 ml de CaCl₂ froid
- aliquôter par 200 µl dans des eppendorf prérefroidis et conserver à -70°C.

3° Transformation proprement dite .

- dégeler sur glace 200 µl de cellules compétentes,
- ajouter 10 ng de l'ADN plasmidique d'intérêt,
- incuber 30 minutes sur glace,
- effectuer un choc thermique à 42°C pendant deux minutes,
- ajouter rapidement 1 ml de LB;
- incuber à 37°C pendant une demi-heure à une heure afin de permettre l'expression des protéines de sélection,
- étaler 100 à 200 µl de culture sur milieu sélectif, le reste peut être stocké à 4°C

4.6.2. La transformation de levure.

4.6.2.1. La transformation utilisant LiAc.

1° principe.

Cette procédure permet de transformer des levures avec deux voire trois plasmides en même temps. Le LiAc et le choc thermique perméabilisent la membrane. Ceci permet des mouvements de molécules vers l'intérieur ou vers l'extérieur. Le DNA SINGLE STRAND sperme de saumon augmente l'efficacité de transformation car il offre une fonction de "carrier" à l'ADN plasmidique. L'efficacité de transformation est estimée de 10⁴ à 10⁵ transformants par µg d'ADN.

2° Transformation.

- inoculer 5 ml de milieu de sélection pour la levure et incuber sous agitation toute la nuit à 30°C.
- inoculer une culture de 15 ml du même milieu avec la préculture et incuber à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la D.O. _{600nm} = 0,8 (délai : entre 4 à 5 heures)

Pour deux transformations :

- transférer 10 ml de culture dans un falcon et centrifuger à 5000 rpm à température ambiante pendant 5 minutes. Oter le surnageant.

- resuspendre dans 10 ml d'eau stérile.
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante. Ôter le surnageant.
- resuspendre dans 200 µl de LiAc 100 mM et transférer dans un eppendorf.
- microcentrifuger les cellules à haute vitesse 15 secondes et ôter le LiAc.
- resuspendre dans du LiAc de telle sorte que le volume total représente 100 µl (le culot vaut environ 20 µl).
- séparer en deux tubes, un pour chaque transformation.

Pour une transformation (pour un tube) :

- faire bouillir 80 µl de SS DNA pendant 5 minutes et mettre sur glace.
- centrifuger à grande vitesse pendant 15 secondes et ôter le LiAc.
- ajouter le mix de transformation dans l'ordre mentionné ci-dessous car le PEG protège les cellules des effets néfastes des fortes concentrations de LiAc. Le mix de transformation est :
 - 240 µl de PEG (50% w/v)
 - 36 µl de LiAc 1M
 - 25 µl de SS DNA (2 mg/ml)
 - 50 µl d'ADN à intégrer (0,1 à 1 mg/ml)
- vortexer chaque tube pendant une minute.
- incuber 30 minutes à 30°C.
- heat shock pendant 20 minutes dans un bain à 42°C.
- centrifuger à 6000 rpm pendant 15 secondes et ôter le mix de transformation.
- ajouter 200 µl d'eau stérile et resuspendre avec la pipette doucement.
- étaler sur milieu solide sélectif pour les intégrants. Etaler sur une boîte 50 µl et sur l'autre 150 µl de la transformation.

4.6.2.2. *La transformation de levure pour un crible de banque.*

1° principe.

Le principe est identique à celui exposé ci-dessus. L'efficacité de cette transformation est de 50000 à 100000 transformants par µg d'ADN.

2° Transformation.

- inoculer 200 ml de milieu de sélection pour la levure et incuber sous agitation toute la nuit à 30°C. Cela peut prendre plusieurs jours.
- inoculer une culture de 500 ml du même milieu avec la préculture. La préculture doit être diluée pour obtenir une $D.O._{650nm} = 0,3$. Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la $D.O._{650nm} = 0,7$ (délai : entre 4 à 5 heures)
- effectuer deux lavages à l'eau stérile avec 1/10ème de volume (soit 50 ml) c'est à dire resuspendre dans 50 ml d'eau stérile et centrifuger 3 minutes à 6000 rpm à température ambiante. Oter le surnageant.
- resuspendre dans 50 ml de TE/LiAc. Cette solution doit être préparée juste avant l'emploi.
- centrifuger les cellules 3 minutes à 6000 rpm et ôter le TE/LiAc.
- resuspendre dans du TE/LiAc de telle sorte que les cellules soient concentrées 200X, soit 2,5 ml de TE/LiAc.

On réalise 30 transformations pour représenter 6 fois la banque d'ADNc.

- faire bouillir 2 ml de SS DNA pendant 5 minutes et mettre sur glace.

Par transformation :

- 2 µg de banque
- 50 µl d'ADN carrier (10 µg / µl)
- 100 µl de cellules
- 600 µl de 40% PEG 4000/Te/LiAc. Cette solution est préparé juste avant son utilisation.
- vortexer chaque tube pendant une minute.
- incuber 2h30 à 30°C.
- heat shock pendant 20 minutes dans un bain à 42°C.
- centrifuger à 10000 rpm pendant une minute et ôter le mix de transformation.
- ajouter 300 µl d'eau stérile et resuspendre avec la pipette doucement.
- étaler sur milieu solide sélectif pour les intégrants. Etaler sur une boîte 50 µl et sur l'autre 150 µl de la transformation.

4.7. La préparation d'ADN.

4.7.1. Minipréparation d'ADN plasmidique des bactéries.

Cette méthode a pour but d'isoler l'ADN plasmidique présent dans une souche. Cet ADN va nous permettre de vérifier, par exemple si les constructions réalisées sont obtenues ou bien si le clone dont provient l'ADN est le clone d'intérêt. La quantité d'ADN récupéré (quelques μg) est suffisante pour réaliser quelques restrictions diagnostiques

4.7.1.1. Culture des cellules.

- lancer des cultures de 5 ml de LB Amp, inoculées par un peu de colonies.
- incuber une nuit à 37°C sous agitation.

4.7.1.2. Lyse des cellules.

- transvaser 1,5 ml de chaque culture dans un eppendorf.
- centrifuger les colonies, 5 minutes à vitesse maximale.
- ôter le surnageant et ajouter 300 μl de P1 RNAase ou S1 RNAase afin d'éliminer l'ARN, ajouter 300 μl de P2 ou S2 pour lyser les cellules. Laisser agir pendant 5 minutes sur table.
- ajouter 300 μl de P3 ou S3 pour précipiter les membranes et débris cellulaires.
- centrifuger 20 minutes à 14000 rpm.
- récupérer le surnageant et ajouter 6 à 7 volumes (environ 630 μl) d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.
- centrifuger 20 minutes à 14000 rpm.

4.7.1.3. Récupération de l'ADN.

- ôter le surnageant et ajouter 500 μl d'éthanol 70% afin de laver le culot.
- centrifuger 5 minutes à 14000 rpm.
- sécher 5 minutes.
- resuspendre dans 50 μl d'eau distillée et vortexer.

4.7.1.4. Quantification de l'ADN.

Elle s'effectue par une comigration sur gel d'une petite quantité de plasmide linéarisé avec un marqueur de taille et de concentration.

4.7.2. Midipréparation d'ADN plasmidique des bactéries.

Cette méthode a pour but d'isoler l'ADN plasmidique présent dans une souche afin d'en obtenir un stock pour réaliser des constructions ultérieures ou des transformations, ou pour poursuivre les vérifications.

4.7.2.1. Culture des cellules.

- lancer des cultures de 200 ml de LB Amp, inoculées par 2% de précultures liquides.
- incubé une nuit à 37°C sous agitation.

4.7.2.2. Lyse des cellules.

- transvaser la culture dans un Sorval 250 ml.
- centrifuger les colonies, 10 minutes à 5000 rpm.
- ôter le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de P1 RNAase ou S1 RNAase afin d'éliminer l'ARN, transférer la solution dans un corex 30, ajouter 4 ml de P2 ou S2 pour lyser les cellules. Laisser agir pendant 5 minutes à température de la pièce.
- ajouter 4 ml de P3 ou S3 pour précipiter les membranes et débris cellulaires. Incuber 10 minutes sur glace.
- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C.
- récupérer le surnageant et le transférer dans un corex 30.
- centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C.

4.7.2.3. Mise sur colonne.

- Préparation de la colonne Nucleobond AX100 : équilibrage de la colonne avec 2 ml de solution N2.
- déposer l'ADN sur la colonne et attendre que tout soit élué.
- laver deux fois avec 4 ml de N3.
- éluer l'ADN grâce à 2 ml de N5 dans un corex 15.
- ajouter 1,4 ml d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.

- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C.
- éliminer le surnageant et rincer le culot au moyen de 1 ml d'éthanol 70%. Éliminer l'éthanol.
- sécher 5 minutes.
- resuspendre dans 70 µl d'eau et vortexer.

4.7.2.4. *Quantification de l'ADN.*

Elle s'effectue par une comigration sur gel d'une petite quantité de plasmide linéarisé avec un marqueur de taille et de concentration.

4.7.3. Préparation d'ADN génomique de levure.

Cette procédure permet de récupérer l'ADN génomique de levure débarrassé de son ARN et des protéines contaminantes.

4.7.3.1. *Culture des cellules.*

- lancer des cultures de 10 ml de milieu riche, inoculées par un prélèvement de levure sur boîte.
- incuber une nuit à 30°C sous agitation.

4.7.3.2. *Lyse des cellules.*

- transvaser la culture dans un falcon.
- centrifuger les colonies, 5 minutes à 3000 rpm à température ambiante.
- ôter le surnageant et resuspendre le culot dans 0,5 ml d'eau distillée. Transférer la solution dans un eppendorf.
- centrifuger 5 secondes à grande vitesse à température ambiante.
- ôter le surnageant et disrupter le culot par un bref vortex.
- resuspendre les cellules dans un tampon de lyse Breaking Buffer (200 µl). Ajouter 0,3 g de billes de verre d'un diamètre 0,4 à 0,5 mm (environ 200 µl) et 200 µl de phénol/isoamylalcohol/chloroform. Vortexer à grande vitesse pendant 3 minutes.
- ajouter 200 µl de TE Buffer pH 8, vortexer un peu et centrifuger pendant 5 minutes à grande vitesse à température ambiante.
- transférer la phase aqueuse dans un tube propre et centrifuger 5 minutes à grande vitesse à température ambiante. Transférer la phase aqueuse dans un autre eppendorf.

4.7.3.3. Récupération de l'ADN.

- ajouter 1 ml d'éthanol 100% et mix par inversion.
- microcentrifuger 3 minutes à haute vitesse à température ambiante.
- ôter le surnageant et resuspendre le culot dans 0,4 ml de TE buffer.
- ajouter 30 µl de RNAaseA 1 mg/ ml pour éliminer le RNA, mix et incuber 10 minutes à 37 °C.
- ajouter 10 µl d'acétate d'ammonium 4M et 1 ml d'éthanol 100%. Mix par inversion.
- microcentrifuger 3 minutes à grande vitesse à température de la pièce.
- ôter le surnageant et sécher 5 minutes.
- resuspendre dans 50 µl de TE buffer pH8.

4.7.3.4. Quantification de l'ADN.

Afin de quantifier l'ADN génomique récupéré, il faut mettre 10 µl de la solution finale sur gel avec 2 µl de bleu alourdisseur et faire migrer avec un marqueur de taille et de concentration.

4.8. La PCR ou Polymerase Chain Reaction.

4.8.1. Principe.

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt compris entre deux primers oligonucléotidiques. Les séquences bordant le fragment à amplifier doivent être connues afin de pouvoir synthétiser les oligonucléotides qui serviront d'amorce. Celles-ci sont complémentaires des brins opposés et leurs extrémités 3' sont orientées l'une vers l'autre. L'ADN total est dénaturé par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides. La diminution de température qui suit cette étape permet l'hybridation spécifique des oligonucléotides avec les séquences anticcomplémentaires. On amplifie l'ADN compris entre les deux amorces en présence de désoxynucléotides et d'une enzyme thermorésistante, la dynazyme ou Taq DNA Polymerase isolée de la bactérie *Thermus brockianus* qui allonge l'ADN de 5'en 3', ou la pfu isolée de *Pyrococcus furiosus*. Après une élongation des amorces sur base de la matrice à la température optimale d'action de l'enzyme, les deux brins (parental et

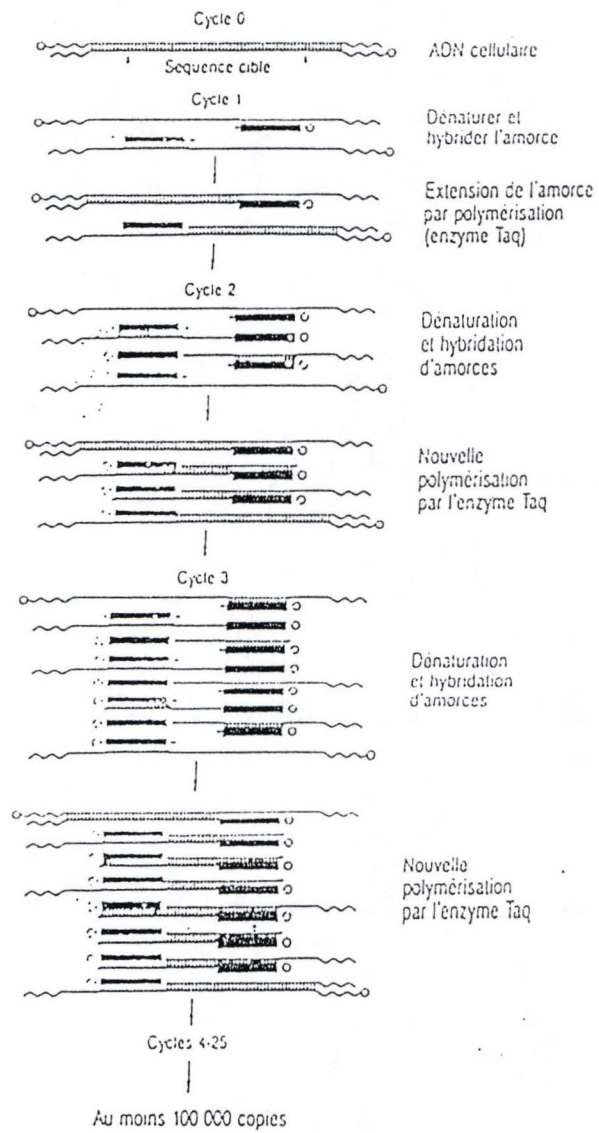


Figure 5.12 : Schéma d'une amplification PCR.

néosynthétisé) sont dénaturés par chauffage et le cycle de température recommence. On recommence ce cycle un nombre de fois déterminé de telle sorte que l'amplification reste exponentielle. Le nombre d'amplicons est, en théorie, doublé à chaque cycle. Le produit de la PCR peut être utilisé pour le séquençage, ou pour l'analyse diagnostique de clones ou pour son insertion dans un vecteur. (Fig. 5.12)

4.8.2. Réalisation pratique.

Différents éléments doivent être mis en présence :

- l'ADN d'intérêt
- les déoxynucléotides : 4 μ l d'une solution concentrée 20 mmolles/ μ l,
- les amorces oligonucléotidiques (concentration de 0,1nmole/ μ l: 5 μ l)
- le tampon de PCR(10X) : 10 μ l,
- l'enzyme : 1 μ l (l'activité est de 2 unités/ μ l),
- l'eau stérile afin d'arriver au volume désiré de 100 μ l.

Un contrôle négatif doit être réalisé afin de vérifier si l'ADN amplifié n'est pas contaminé. Dans le tube de contrôle, tous les réactifs seront placés exception faite de l'ADN qui sera remplacé à volume égal par de l'eau stérile. Ce contrôle sera soumis au même processus de cycle de température que les autres tubes.

Une partie ou la totalité du produit PCR additionné de bleu alourdisseur est placé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium afin de vérifier la taille de l'amplicon et, le cas échéant, de le récupérer.

4.8.3. La purification sur colonne.

Cette technique utilise le kit "Nucléospin extract 2 in 1" fourni par la Société Macherey-Nagel et permet de purifier l'ADN amplifié par PCR.

Le temps nécessaire pour effectuer cette purification est de 20 minutes.

Les étapes sont :

- ajuster le volume à 100 μ l au moyen du NE buffer fourni par le kit.
- ajouter 400 μ l de tampon NT2 fourni dans le kit.
- charger chaque échantillon sur une colonne Nucleospin et placer chaque colonne sur un tube de 2 ml.
- centrifuger 60 secondes à 6000 g.

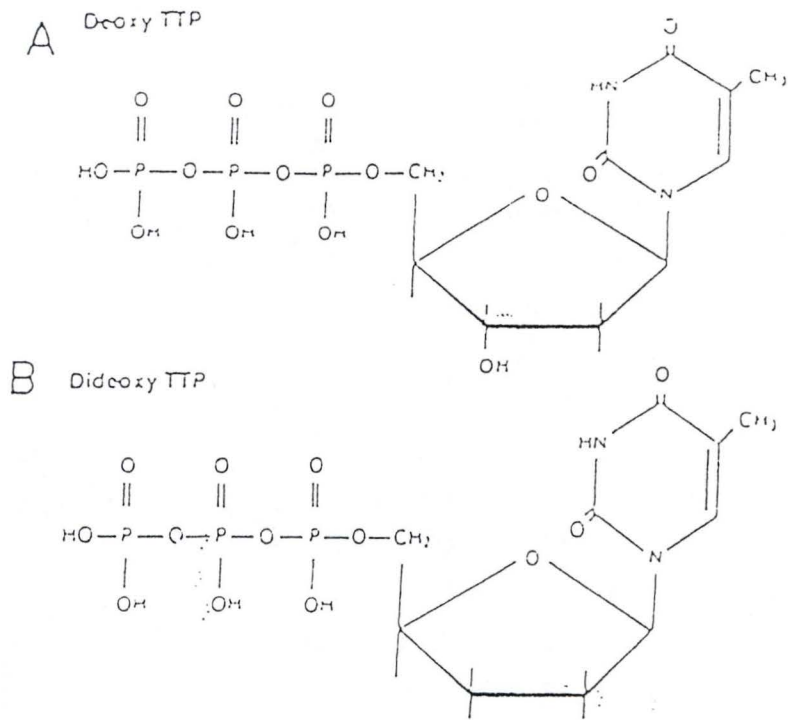


Figure 5.13: (A) Structure d'un déoxyribonucléotide.
(B) Structure d'un didéoxyribonucléotide.

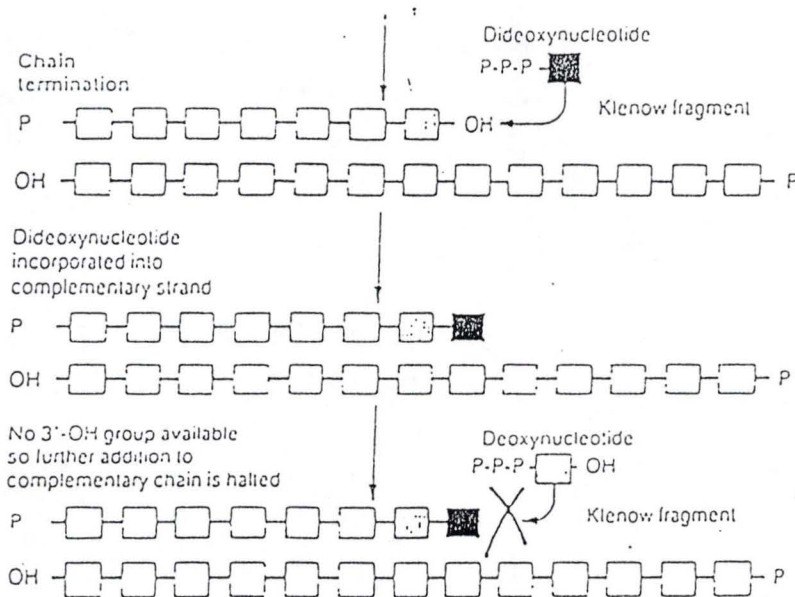


Figure 5.14: Terminaison de la synthèse d'ADN par incorporation d'un didéoxynucléotide.

- ôter le surnageant et replacer la colonne sur le tube, ajouter 700 µl de tampon NT3. Centrifuger à grande vitesse pendant 60 secondes.
- répéter l'opération de lavage une fois.
- ôter le surnageant, placer la colonne sur un tube et centrifuger 60 secondes à grande vitesse afin d'ôter tout le NT3. L'éthanol résiduel inhibe les réactions ultérieures.
- placer la colonne sur un eppendorf de 1,5 ml et ajouter 50 µl Buffer NE, centrifuger 60 secondes à grande vitesse.

4.9. Le séquençage manuel et le séquençage automatique.

4.9.1. Principe.

Le séquençage automatique se réalise au départ d'une élongation d'une chaîne d'ADN au départ d'un seul primer. Cette réaction utilise le principe de Sanger. (Sanger *et al.*, 1977) Au cours de la réaction, la polymérase ajoute des nucléotides triphosphates, soit des didéoxyribonucléotides (ddNTPs), soit des déoxyribonucléotides (dNTPs). Les didéoxyribonucléotides se distinguent des dNTPs par la présence en 3' d'un hydrogène à la place d'un hydroxyle (Fig. 5.13). Ces didéoxyribonucléotides sont parfaitement reconnus par la polymérase et sont ajoutés à la chaîne en croissance. Cependant, la perte du groupement hydroxyle en 3' leur interdit toute nouvelle formation d'un lien entre nucléotides. En conclusion, toute incorporation d'un didéoxyribonucléotide dans une chaîne d'ADN met un terme à son élongation (Fig. 5.14). En conséquence, comme l'incorporation d'un ddNTP plutôt que du dNTP correspondant est aléatoire, cette réaction permet la synthèse de chaînes d'ADN de longueurs variées. Le séquençage automatique permet d'établir la séquence de l'ADN en une seule réaction. En effet, chaque didéoxyribonucléotide est couplé de manière covalente à une molécule fluorescente de longueur d'onde déterminée. Celle-ci est spécifique du ddNTP utilisé. Le produit de la PCR est placé sur un gel de polyacrylamide en présence d'urée qui sépare sur base de leur taille, les différentes chaînes synthétisées. Au plus la chaîne d'ADN est grande, au moins elle migre. Le séquenceur lit et identifie les nucléotides incorporés dans la chaîne et fournit la séquence grâce à la différence de longueur des chaînes et aux molécules fluorescentes. (Fig. 5.15)

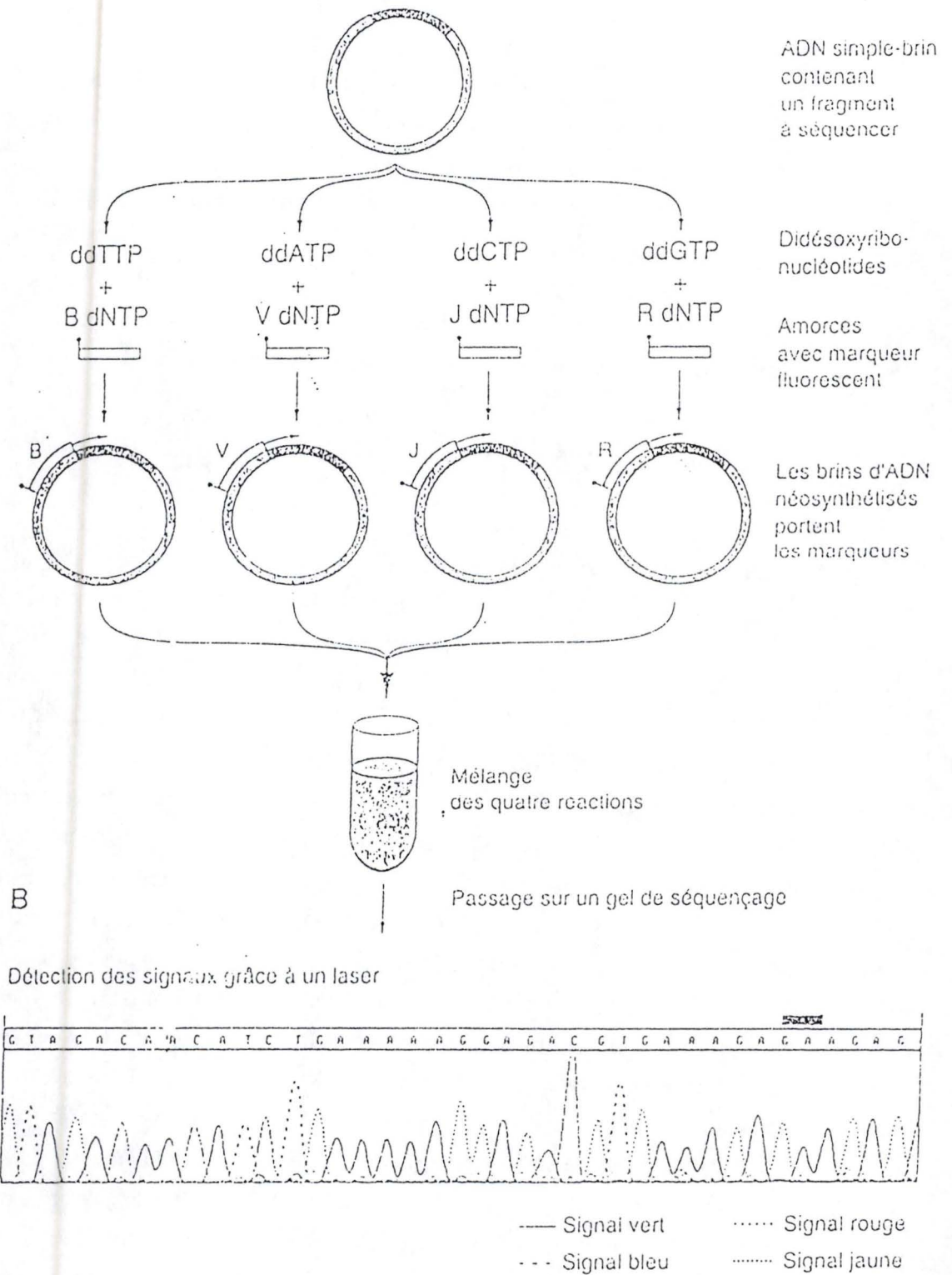


Figure 5.15 : Schéma du séquençage automatique.

4.9.2. Réalisation pratique.

4.9.2.1. Le séquençage manuel de l'ADN.

1° Réaction de séquençage.

- préparer le mix de terminaison en utilisant 2 μ l de "termination master mix" et en y ajoutant 0,5 μ l de chaque ddNTP radiomarqué pour chaque séquence. Pour une séquence on aura 4 tubes (A, C, G, et T).

- préparer le mix de réaction en mettant en présence les différents constituants suivants :

- tampon de réaction : 2 μ l,
 - DNA : 500 ng,
 - primer : 2,5 picomoles
 - Thermo Sequenase DNA polymerase : 2 μ l
 - H₂O : à ajouter pour atteindre un volume de 20 μ l.
- bien mélanger

2° Programme de séquençage.

- Transférer 4,5 μ l du mix de réaction aux 2,5 μ l du mix de terminaison dans chacun des tubes (A, C, G et T).

- Bien mélanger et ajouter 10 à 20 μ l d'huile.
- Programme est constitué de 30 à 60 fois le cycle :
 - 95°C pendant 30 secondes
 - 55°C pendant 30 secondes
 - 72°C pendant une minute.

3° Préparation des échantillons avant le chargement sur le gel.

- arrêter les réactions par ajout de 4 μ l de solution STOP.
- centrifuger rapidement pour séparer la phase aqueuse de l'huile.
- chauffer les échantillons à 70°C pendant 2 à 10 minutes et les charger sans attendre sur le gel tout en évitant l'huile.

4° *Electrophorèse en gel de polyacrylamide.*

Les plaques doivent être lavées à l'eau de ville, à l'eau distillée et à l'alcool pour assurer une polymérisation optimale du gel. La plus grande plaque est "coaté" avec 10 ml de diméthyl dichloro silane pour éviter une adhérence du gel au démoulage. On place ensuite les spacers, le montage est alors scellé par de l'adhésif et fixé par des pinces. On prépare le gel dans un berlin :

- 42g d' urée.
- 10 ml de TBE 10X.
- 15 ml de solution polyacrylamide 40%
- 45 ml d' eau distillée.
- après dissolution, filtrer sous vide avec filtre Gelman GN6.
- ajouter 600 ml de persulfate d' ammonium 10% et 30 ml de TEMED.
- couler rapidement le gel à la seringue en plaçant les plaques en oblique.
- placer les peignes à l envers pour délimiter la ligne de base.
- laisser polymériser environ une heure.

Le gel est alors placé dans le séquenceur rempli de tampon TBE1X. Il est préchauffé 30 minutes à 60W et 2000V.

- placer les dents du peigne contre la ligne de base.
- éliminer l'urée des puits à la pissette.
- dénaturer les échantillons 3 minutes à 85°C.
- charger 2,5 ml de chaque tube.

Trois temps de migration sont effectués: 1,5 heures, 3 heures et 4,5 heures. A chaque fois, les échantillons sont dénaturés et l'urée éliminée des puits.

5° *Après la migration.*

- démouler le gel;
- fixer le gel en l'aspergeant d' une solution de fixateur.
- déposer le gel sur papier Whatman 3MM et le sécher une heure à 80°C.

On place alors le filtre dans une cassette d'autoradiographie en présence d' un film pendant 12 heures. Le film est alors révéler 5 minutes et fixé 10 minutes. on le rince alors abondamment à l'eau. Les premières bases lues sur la migration de 2 heures sont situées à une trentaine de nucléotides de l'endroit où

l'oligonucléotide s'est hybridé. Avec les temps de migration préconisés plus haut, une séquence d' environ 350 nucléotides peut être lue.

4.9.2.2. *Le séquençage automatique.*

Nous utilisons le kit "ABI PRISM dye terminator" (Perkin Elmer). Le protocole est optimisé pour tout thermocycler de type PE Applied Biosystems thermal cyclers. Pour réaliser un séquençage correct, il est conseillé d'utiliser plusieurs primers qui répondent aux caractéristiques suivantes :

- un primer s'hybride sur un brin et l'autre sur le complémentaire.
- sur chaque brin, il est conseillé de choisir deux primers suffisamment distant pour permettre une connaissance de la séquence sur un grand nombre de paire de bases. Le séquenceur lit en une réaction 600 à 800 pb.

1° La réaction de synthèse des fragments de taille variable.

Pour chaque réaction, ajouter les réactifs suivants dans l'ordre mentionné ci-dessous :

- Terminator Ready reaction mix contenant les dRhodamine terminators : 4 μ l
- Matrice : ADN double brin (100 à 200 ng/ μ l) : 1 à 4 μ l
- Primer (0,001 ng/ μ l) : 1,6 μ l
- eau distillée pour aboutir à un volume total de 10 μ l.

Bien mélanger et centrifuger brièvement.

Le programme de la réaction dure deux heures. Les étapes sont les suivantes pour l'appareil présent au laboratoire :

- augmentation rapide de température à 96°C pour dénaturer l'ADN.
- 96°C pendant 30 secondes.
- modification rapide de température pour atteindre 50°C pour hybrider les primers.
- 50°C pendant 15 secondes.
- rapide augmentation de température à 60°C pour allonger la chaîne de nucléotides.
- 60°C pendant 4 minutes.
- recommencer tout le cycle 25 fois.

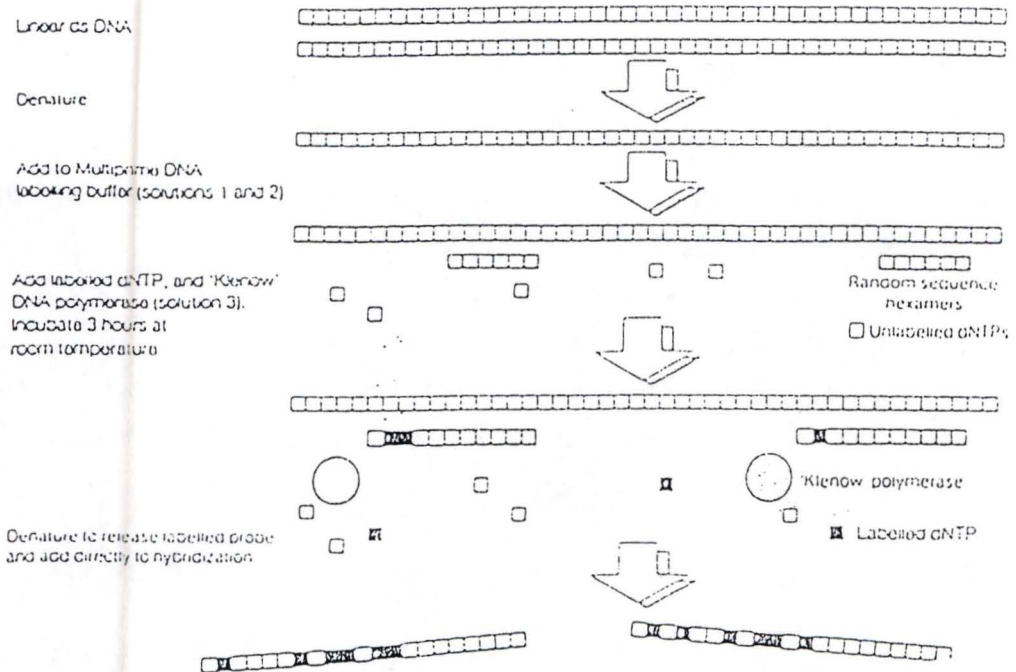


Figure 5.16 : Préparation des sondes radiomarquées par le "Multiprime DNA labelling system".

2° *La purification du produit.*

Pour chaque réaction de séquençage, préparer un eppendorf qui contient 1 µl d'acétate de sodium 3 M pH 4,6 et 25 µl d'éthanol 95%.

Ajouter à ce mix l'entièreté du produit et mélanger la solution.

Vortexer les tubes et les placer sur la glace 10 minutes afin de précipiter les produits.

Microcentrifuger à 4°C pendant 30 minutes à grande vitesse.

Oter le surnageant et laver le culot avec 125 µl d'Ethanol 70%.

Microcentrifuger 5 minutes à grande vitesse et ôter le surnageant.

Sécher le culot au Speed vak pendant trois minutes.

3° *L'électrophorèse sur ABI Prism 377.*

Elle est réalisée sur gel de polyacrylamide en présence d'urée.

4.10. La synthèse de la sonde radiomarquée.

Nous utilisons le kit "random primed DNA labelling", commercialisé par la firme BRL. La synthèse repose sur une fixation de nonanucléotides aléatoires en différents endroits de l'ADN que l'on cherche à détecter. Les nonanucléotides sont anticomplémentaire de certaines portions d'ADN et vont pouvoir servir de primers pour une polymérase, la Klenow. Le marquage est réalisé grâce à l'incorporation dans le mix de synthèse d'un des quatre nucléotides sous forme marquée au P³², c'est-à-dire que le groupement phosphate α est remplacé par un phosphate radioactif. Suite à cette synthèse, des fragments de taille variable seront obtenus, ceux-ci pourront s'hybrider avec le brin anticomplémentaire de l'ADN (Fig. 5.16).

Plusieurs étapes sont nécessaires et doivent être réalisées derrière une protection de plexiglas.

- dénaturer 25 ng d'ADN en solution dans un volume de 5 à 20 ml en chauffant 5 minutes à 100°C.
- placer sur glace pour empêcher la renaturation.
- ajouter au mélange :
 - 1 µl de dATP.

- 1 μl de dTTP.
- 1 μl de dGTP.
- 20 μl de random primer buffer mixture.
- 5 μl de α ^{32}P dCTP, 3000Ci/mMol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$.
- porter le volume à 49 μl avec de l'eau distillée.
- ajouter 1 μl de Klenow.
- incuber 10 minutes à 37°C.
- ajouter 5 μl de solution stop.
- utiliser directement la sonde ou la congeler. Si la sonde a été congelée, la dénaturer 10 minutes à 100°C et puis la verser dans la solution de préhybridation.

4.11. Le Southern Blot.

4.11.1. Définition.

Cette méthode a été mise au point par Ed Southern au milieu des années 70 afin de pouvoir détecter la présence d'un fragment d'ADN dans l'entièreté d'un génome en utilisant le principe de l'hybridation anticomplémentaire d'acides nucléiques.

4.11.2. Principe.

Cette méthode est basée sur les propriétés d'hybridation de séquences d'acides nucléiques anticomplémentaires. Dans cette méthode, l'ADN est digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction et les fragments d'ADN bicaténaire sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Ces fragments sont visualisés grâce aux ultraviolets, dénaturés par incubation du gel dans une solution d'hydroxide de sodium et ensuite transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose dans une solution de haute concentration saline, grâce à un transfert de capillarité. Ces conditions assurent l'immobilisation de l'ADN au point de contact entre le gel et le filtre. Ce processus permet de créer une réplique du gel sur une membrane. L'ADN est ensuite fixé de manière covalente à la membrane par chauffage. L'hybridation de la sonde d'acide nucléique (ADN radiomarqué) à l'ADN dénaturé fixé sur le filtre s'effectue dans des conditions de stringence données; après élimination de la sonde non fixée au filtre, on peut

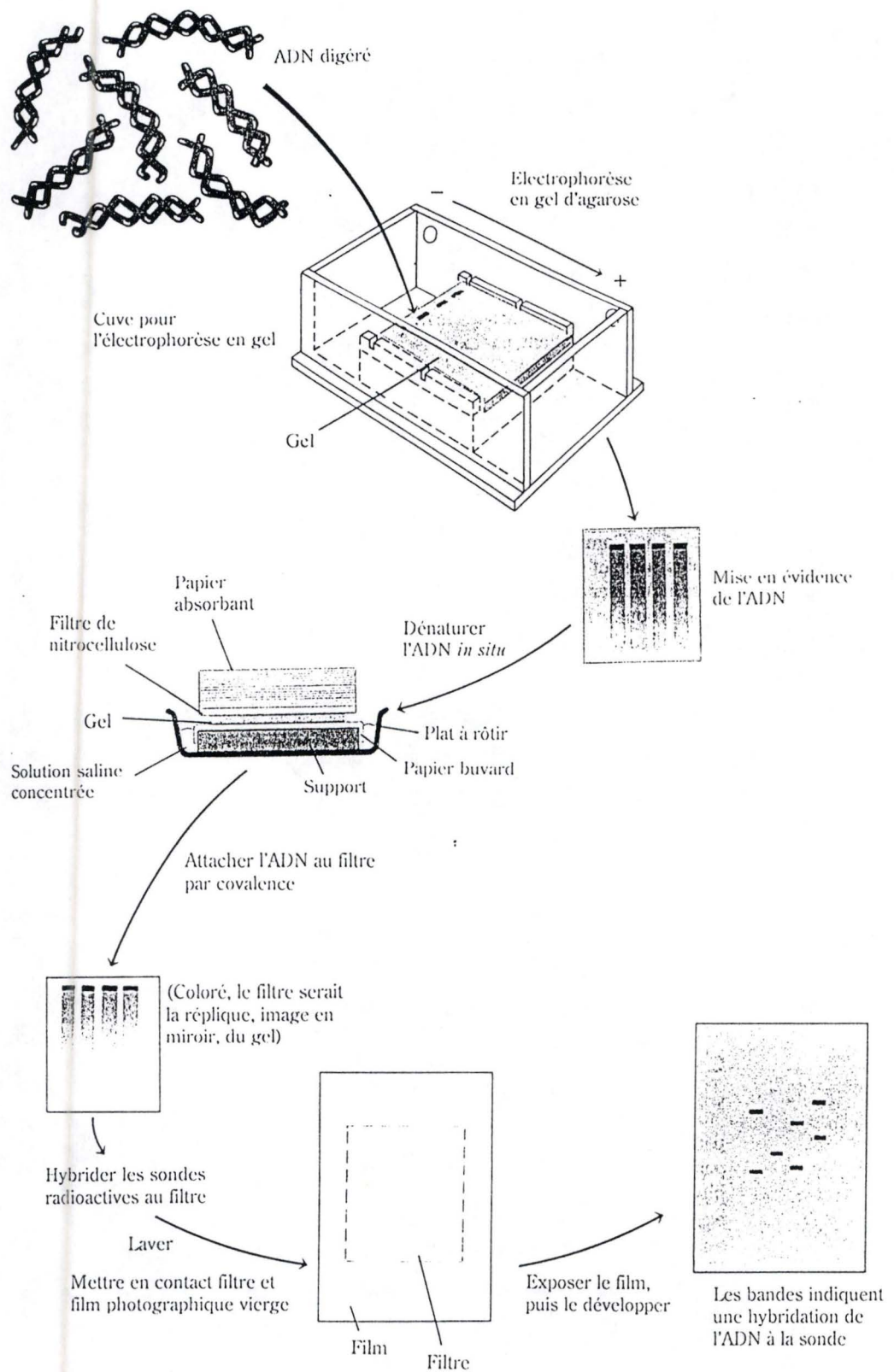


Figure 5.17 : Schéma du Southern Blot.

mettre en évidence par autoradiographie du filtre, la position à laquelle s'est effectuée l'hybridation spécifique de la sonde. On peut comparer directement le profil d'hybridation aux bandes du gel qui contiennent les séquences d'ADN auxquelles on s'intéresse. (Fig. 5.17)

4.11.3. Réalisation pratique.

4.11.3.1. Restriction.

On réalise une restriction sur 1 µg d'ADN génomique. On charge la totalité de la restriction sur un gel d'agarose 1%. Il est préférable de laisser migrer longtemps le gel afin d'assurer une bonne séparation des bandes. Des photos du gel doivent être prises; notamment une photo sur laquelle une latte à graduation visible aux ultra-violets est placée avec le 0 correspondant au fond des puits, pour déterminer ultérieurement les distances de migration.

4.11.3.2. Dénaturation de l'ADN sur le gel.

Le gel est alors placé 15 minutes dans une solution de dénaturation sous agitation. Cette étape assure la dénaturation des deux brins d'ADN et permettra l'hybridation à la sonde radiomarquée. Ensuite, le gel est immergé dans une solution de neutralisation pendant 15 minutes sous agitation et pour terminer dans une solution de SSC 20X pendant 15 minutes sous agitation.

4.11.3.3. Transfert.

Le transfert se réalise par capillarité et le montage est semblable à celui de la figure 5.19. La membrane doit être placée sur le gel de telle sorte que son extrémité supérieure corresponde à la base des puits du gel. Le transfert s'effectue durant toute la nuit.

4.11.3.4. Séchage de la membrane.

Cette étape permet de fixer de manière covalente l'ADN à la membrane. Elle s'effectue dans l'étuve à 80°C pendant une demi-heure à deux heures.

4.11.3.5. Préhybridation.

Cette étape permet de réduire le bruit de fond en hybridant de manière non spécifique la membrane avec de l'ADN non marqué de thymus de veau. La solution de préhybridation est ajoutée dans une boîte avec couvercle contenant la membrane. La boîte est placée à incuber à 68°C pendant deux heures sous agitation.

4.11.3.6. Hybridation.

Il est indispensable de dénaturer la sonde afin qu'elle puisse s'hybrider. Pour ce faire, on met la sonde à 100°C pendant 10 minutes. Ensuite, elle sera placée sur glace pour éviter qu'elle se renature. On ajoute la sonde à la solution de préhybridation en veillant à ne pas trop diluer la sonde. Le mélange est placé à 68°C sous agitation pendant une nuit.

4.11.3.7. Lavages.

A la fin de l'hybridation, le mélange préhybridation-sonde peut être récupéré et placé à -20°C afin d'être réutilisé.

La membrane va subir des lavages :

- deux lavages 10 minutes au SSC 5X SDS 0,1%.
- un ou deux lavages de 10 minutes au SSC 2X SDS 0,1%.

Le nombre et la durée des étapes est laissée à l'appréciation du manipulateur. Au plus la concentration en sel diminue, au plus la sonde se détache de la membrane.

4.11.3.8. Mise en cassette.

Le filtre est placé dans une cassette et recouvert d'un film autoradio. La cassette est maintenue à -80°C pendant 6 heures ou plus selon l'ancienneté de la sonde utilisée, la quantité d'ADN de départ, ...

4.11.3.9 Révélation.

Le film radio est placé dans une solution de révélation pendant 5 secondes. Après ce délai, il est conseillé de vérifier si quelque chose apparaît. Le film est

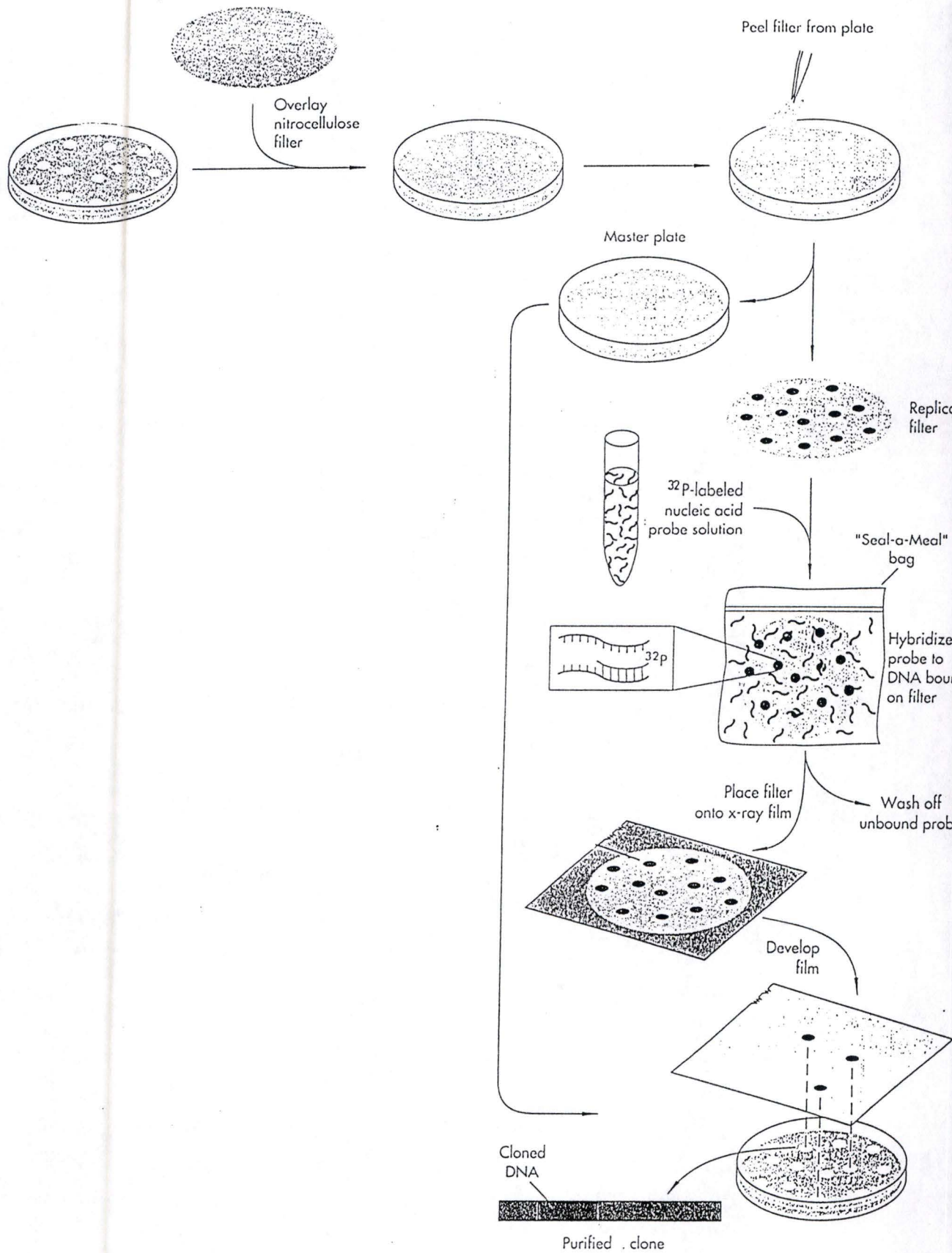


Figure 5.18 : Schéma du criblage de la minibanque.

ensuite replacé dans la même solution pendant un temps suffisant pour que le résultat soit observable sur un background minimal.

4.12. Le screen d'une minibanque génomique de *Schizosaccharomyces pombe* dans des bactéries.

4.12.1. Définition.

Cette méthode a été mise au point afin de cribler une banque en utilisant le principe de l'hybridation anticcomplémentaire d'acides nucléiques afin de détecter quelle cellule contient le clone désiré.

4.12.2. Principe.

Après avoir étalé la minibanque sur des boîtes de Petri, des répliques sur filtre sont réalisées. Les colonies sont transférées sur une membrane; elles sont lysées et l'ADN est fixé de manière covalente par passage en étuve à 80°C. Les filtres sont mis en présence d'une sonde radiomarquée capable de s'hybrider avec l'ADN complémentaire d'intérêt. Lorsqu'on a éliminé par lavages successifs l'excès de sonde non liée, la localisation de la sonde liée de manière spécifique est examinée par autoradiographie. La place sur le filtre d'une sonde liée correspond à la place dans la boîte de Petri d'une cellule contenant le clone désiré. Une culture de cette cellule permettra de réaliser des tests diagnostiques divers (Fig. 5.18).

4.12.3. Réalisation pratique.

4.12.3.1. Etaler le banque.

La banque est totalement représentée par un certain nombre de colonies de *E. coli*. Il est nécessaire d'étaler un nombre suffisant de bactéries de telle sorte que la banque soit représentée dans son entièreté au moins trois fois. Les colonies poussent sur milieu LB Amp et elles sont réparties de manière homogène en utilisant des billes de verre.

- prélever un volume contenant le nombre de bactéries adéquat et ensuite amener ce volume à 1,6 ml,
- étaler sur quatre boîtes LB Amp, 400 µl de la solution bactérienne,
- placer les boîtes à 37°C pendant toute une nuit.

4.12.3.2. Transfert et lyse des colonies.

- déposer de manière homogène un filtre NY Amp sur la boîte de petri et réaliser des repères afin de pouvoir repositionner le filtre sur la boîte pour retrouver les colonies,
- reprendre le filtre et le déposer sur une boîte de petri LB Amp vierge avec les colonies dirigées vers le haut de telle sorte qu'elles poussent sur le filtre,
- incubé à 37°C plusieurs heures jusqu'à ce que les colonies aient atteint une taille adéquate (pas trop d'ADN ni trop peu).

La lyse des colonies se réalise en quelques étapes simples :

- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de solution de dénaturation pendant 7 minutes,
- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de solution de neutralisation pendant 7 minutes,
- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de SSC 20X pendant 3 minutes,
- placer la membrane entre deux papiers filtres secs et passer avec un rouleau afin d'éliminer tous les déchets cellulaires qui resteront fixés au papier filtre supérieur.

4.12.3.3. Séchage de la membrane.

Cette étape permet de fixer de manière covalente l'ADN à la membrane. Elle s'effectue dans l'étuve à 80°C pendant une demi-heure à deux heures.

Toutes les étapes suivantes allant de la préhybridation à l'hybridation sont identiques à celles réalisées dans le cadre du Southern Blot. (Matériel et méthodes, techniques relatives à l'ADN, point 11)

VI. Bildergalerie

Alfa, C. E., Ducommun, B., Beach, D., and Hyams, J. S. (1990). Distinct nuclear and spindle pole body population of cyclin-cdc2 in fission yeast. *Nature* 347, 680-2.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-402.

Andrews, B., and Measday, V. (1998). The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* 14, 66-72.

Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-74.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-80.

Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 300, 706-9.

Boeke, J. D., LaCroute, F., and Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 197, 345-6.

Booher, R., and Beach, D. (1986). Site-specific mutagenesis of *cdc2+*, a cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3523-30.

Botstein, D., Chervitz, S. A., and Cherry, J. M. (1997). Yeast as a Model Organism. *Science* 277, 1259-1260.

Buck, V., Russell, P., and Millar, J. B. (1995). Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *Embo J.* 14, 6173-83.

Chang, F., and Nurse, P. (1996). How fission yeast fission in the middle. *Cell* 84, 191-194.

Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21.

Connelly, C., and Hieter, P. (1996). Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell* 86, 275-85.

Damagnez, V., Makela, T. P., and Cottarel, G. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *Embo J.* 14, 6164-72.

De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., and Kim, S. H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363, 595-602.

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

Deshaies, R. J. (1997). Phosphorylation and proteolysis: partners in the regulation of cell division in budding yeast [published erratum appears in *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1997 Jun;7(3):424]. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 7-16.

Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-72.

Falson, P., Penin, F., Divita, G., Lavergne, J. P., Di Pietro, A., Goody, R. S., and Gautheron, D. C. (1993). Functional nucleotide-binding domain in the F0F1-ATP synthase alpha subunit from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* 32, 10387-97.

Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B., and Deshaies, R. J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91, 221-30.

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

Fisher, R. P. (1997). CDKs and cyclins in transition(s). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 32-8.

Galaktionov, K., and Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* 67, 1181-94.

Golemis, E. A., and Brent, R. (1992). Fused protein domains inhibit DNA binding by LexA. *Mol Cell Biol* 12, 3006-14.

Gould, K. L., Moreno, S., Owen, D. J., Sazer, S., and Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *Embo J.* 10, 3297-309.

Hartwell, L. H., Mortimer, R. K., Culotti, J., and Culotti, M. (1973). Genetic control of the cell division cycle in yeast. V. Genetic analysis of cdc mutants. *Genetics* 74, 267-287.

Henikoff, S., Henikoff, J. G., Alford, W. J., and Pietrokovski, S. (1995). Automated construction and graphical presentation of protein blocks from unaligned sequences. *Gene* 163, GC17-26.

Hilt, W., and Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* 21, 96-102.

Huang, X. (1994). On global sequence alignment. *Comput Appl Biosci* 10, 227-35.

Hutchison, C., and Glover, D. M. (1995). Cell cycle control. In *Frontiers in Molecular Biology*, C. Hutchison and D. M. Glover, eds. (Oxford: IRL PRESS).

Jacks, T., and Weinberg, R. A. (1998). The expanding role of cell cycle regulators. *Science* 280, 1035-1036.

Jang, Y. K., Jin, Y. H., Shim, Y. S., Kim, M. J., Yoo, E. J., Choi, I. S., Lee, J. S., Seong, R. H., Hong, S. H., and Park, S. D. (1996). Identification of the DNA damage-responsive elements of the *rhp51+* gene, a *recA* and *RAD51* homolog from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 251, 167-75.

King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M., and Kirschner, M. W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-9.

Kominami, K., and Toda, T. (1997). Fission yeast WD-repeat protein *pop1* regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor *Rum1* and the S-phase initiator *Cdc18*. *Genes Dev.* 11, 1548-60.

Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K., and Suter, B. (1998). *Cdk7* is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev* 12, 370-81.

Lee, M. G., and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327, 31-5.

Li, F. N., and Johnston, M. (1997). *Grr1* of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through *Skp1*: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *Embo J* 16, 5629-38.

Li, K., and Kaufman, T. C. (1996). The homeotic target gene *centrosomin* encodes an essential centrosomal component. *Cell* 85, 585-96.

Macneill, S. A., and Fantes, P. A. (1995). Controlling entry into mitosis in fission yeast. In *Cell Cycle Control*, C. Hutchison and D. M. Glover, eds. (UK: Frontiers in molecular biology, IRL PRESS), pp. 63-105.

Minet, M., Dufour, M. E., and Lacroute, F. (1992). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* 2, 417-22.

Molz, L., and Beach, D. (1993). Characterization of the fission yeast *mcs2* cyclin and its associated protein kinase activity. *Embo J.* 12, 1723-32.

Molz, L., Booher, R., Young, P., and Beach, D. (1989). *cdc2* and the regulation of mitosis: six interacting *mcs* genes. *Genetics* 122, 773-82.

Moreno, S., and Nurse, P. (1994). Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1+* gene. *Nature* 367, 236-42.

Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13, 261-91.

Morgan, D. O. (1996). The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 767-72.

Nasim, A., Young, P., and Jonshon, B. F. (1989). *Molecular Biology of the Fission Yeast*, a. s. o. M. Cell Biology, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 469.

Nigg, E. A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 312-7.

Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17, 471-80.

Nurse, P. (1997). The Josef Steiner Lecture: CDKs and cell-cycle control in fission yeast: relevance to other eukaryotes and cancer. *Int. J. Cancer* 71, 707-8.

Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-5.

Patton, E. E., Willems, A. R., and Tyers, M. (1998). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis : don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.* 14, 236-243.

Poon, R. Y., and Hunter, T. (1995). Cell regulation. Innocent bystanders or chosen collaborators? *Curr. Biol.* 5, 1243-7.

Russel, P. (1989). Gene cloning and expression in fission yeast. In *Molecular biology of the fission yeast*, A. Nasim, P. Young and B. F. Jonshon, eds., pp. 243-271.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* 3, 696-700.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.

Solomon, M. J. (1994). The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase. *Trends Biochem. Sci.* 19, 496-500.

Stemmann, O., and Lechner, J. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore contains a cyclin-CDK complexing homologue, as identified by in vitro reconstitution. *Embo J.* 15, 3611-20.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through

sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80.

Verma, R., Feldman, R. M., and Deshaies, R. J. (1997). SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities. *Mol. Biol. Cell.* 8, 1427-37.

Zhang, H., Kobayashi, R., Galaktionov, K., and Beach, D. (1995). p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 82, 915-25.

Zhang, M. Q., and Marr, T. G. (1994). Fission yeast gene structure and recognition. *Nucleic Acids Res.* 22, 1750-9.

Zhu, P., and Bowser, R. (1996). Identification and analysis of the complete cDNA sequence for the human FAC1 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1309, 5-8.