

Université de Montréal

**Développement d'un essai de complémentation protéique
avec la Renilla luciférase et étude de la voie de
biosynthèse des acides aminés aromatiques
chez *Saccharomyces cerevisiae*.**

Par
Nathalie Berger

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
en biochimie

Novembre 2005

© Nathalie Berger, 2005



W

4

U58

2005

V. 170

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Développement d'un essai de complémentation protéique
avec la Renilla luciférase et étude de la voie de
biosynthèse des acides aminés aromatiques
chez *Saccharomyces cerevisiae*.**

Présenté par :

Nathalie Berger

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Franz Bernd Lang	Président-rapporteur
Dr. Stephen W. Michnick	Directeur de recherche
Dr. Pascal Chartrand	Membre du jury

Résumé

Les voies biochimiques sont des systèmes dynamiques de réarrangement des complexes protéiques. Pour pouvoir comprendre et moduler ces différents événements cellulaires, il est alors important de connaître les caractéristiques des protéines et les interactions entre elles. En ayant comme hypothèse de base que tous les transferts d'information, d'énergie et de masse dans les réseaux biochimiques impliquent les interactions protéines-protéines, il fallait mettre au point une méthode pour mesurer la dynamique des interactions chez les cellules vivantes. Notre laboratoire a développé une stratégie pour l'étude des interactions protéine-protéine un essai de complémentation protéique (PCA). Le PCA permet de préserver l'arrangement spatial, le compartiment d'origine et le réseau des protéines, d'étudier la dynamique des interactions entre les protéines et de cartographier les voies biochimiques. Mais, comme toutes les méthodes rapporteuses pour les interactions protéine-protéine, les PCAs développés jusqu'à maintenant ne permettent pas facilement l'étude des interactions dans un système d'expression endogène. Nous avons élaboré un nouvel essai PCA extrêmement sensible basé sur la luminescence avec la Renilla luciférase de *Renilla reniformis*. Nous avons élaboré un modèle hypothétique de la structure de l'enzyme et nous avons identifié un site de coupure au niveau de L110 qui permet de retrouver 29,6% de l'activité enzymatique de l'enzyme native lorsqu'il y a interaction entre deux protéines. Nous avons ensuite étiqueté les gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques de *S. cerevisiae* avec les fragments de la Renilla luciférase et effectué un criblage de celle-ci. Nous avons identifié 31 interactions entre les protéines impliquées dans cette voie.

Mots clés : Interaction protéine-protéine, essai de complémentation protéique (PCA), Renilla luciférase, *S. cerevisiae*, voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques.

Abstract

Biochemical pathways are dynamic systems of rearranging protein complexes. To understand these cellular events, it is crucial to understand the characteristics of proteins and their interactions with other proteins. If we begin with the hypothesis that all information transfer, energy and mass in biochemical networks occur through protein-protein interactions, then we must develop methods to measure the dynamics of these interactions in living cells. Our laboratory has developed a general strategy to study protein-protein interactions, called protein-fragment complementation assays (PCA). These methods allow for the direct detection of spatial and temporal changes in protein-protein complexes and can thus be used to study the dynamic of interactions and to map out the organization of biochemical pathways. Like others reporter methods for protein-protein interactions, PCAs developed so far are not sensitive enough to study interactions at endogenous levels; a requirement to study complex dynamics while minimizing perturbation of cellular pathways. We describe a new, highly sensitive PCA based on the Renilla luciferase of *Renilla reniformis*. We determined a hypothetical model of the enzyme structure and identified a fragmentation site (at Leucine 110) that resulted in a PCA with 29.6% of native activity. We demonstrate the sensitivity of this PCA by introducing PCA fragments directly into the genome of *S. cerevisiae* by homologous recombination and identify 31 interactions among enzymes of the aromatic amino acid biosynthetic pathway.

Keywords : protein-protein interaction, protein-fragment complementation assay (PCA), Renilla luciferase, *S. cerevisiae*, homologous recombination, aromatic amino acids biosynthetic pathway.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction	1
Méthodes d'études des interactions protéine-protéine	3
L'essai double-hybride	3
Le BRET et le FRET	6
Le PCA	9
Un PCA avec la Renilla luciférase.....	12
La voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez <i>S. cerevisiae</i>.....	18
Buts et objectifs	23
Matériel et Méthodes.....	26
Recombinaison homologue des cassettes de résistance pour l'hygromycine B (hph) et la nourseothricine (sat) dans les vecteurs p413ADH et p416ADH respectivement.	27
Diagnostic des clones de la recombinaison homologue	30
Clonage de la Renilla luciferase (hRluc)	31
Recombinaison homologue de zipper-linker, Ras-linker et Raf-linker ...	34
Accouplement de mat a et mat a.....	35
Essai de luminescence en milieu liquide	40
Extraction de protéines et immunobuvardage	43
Recombinaison homologue des fragments de hRluc dans le génome de <i>S. cerevisiae</i>.....	44

Résultats	55
I-Développement d'un essai PCA avec la Renilla luciférase	56
Clonage des cassettes de résistance pour l'hygromycine B (hph) dans le vecteur p413ADH et pour la nourseothricine (nat1) dans le vecteur p416ADH	56
Modélisation de la structure de la Renilla luciférase	56
Clonage des fragments de la Renilla luciférase et de sa forme pleine longueur dans les vecteurs p413ADH-hph et p416ADH-sat.	62
Essai PCA avec les différentes paires de fragments de la hRluc en milieu liquide	67
II-Étude de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques avec le PCA Renilla.....	72
Validation du PCA Renilla lorsqu'il est étiqueté dans le génome de <i>S. cerevisiae</i>	72
Criblage des interactions de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques de <i>S. cerevisiae</i>	75
Discussion	83
I-Développement d'un essai PCA avec la Renilla luciférase	84
II-Étude de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques avec le PCA Renilla.....	86
Références.....	91

Liste des figures

- Figure 1** : Représentation schématique de la technique du double hybride.4
- Figure 2** : Représentation schématique de la technique de BRET (« Bioluminescence Resonance Energy transfer »).....7
- Figure 3** : Représentation schématique de la technique du PCA, un essai de complémentation protéique.....10
- Figure 4** : Représentation schématique de la modélisation par homologie pour l'élaboration d'une structure hypothétique d'une protéine..... 14
- Figure 5** : Représentation de la structure tertiaire modélisée de la Renilla luciférase..... 16
- Figure 6** : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez la levure *S. cerevisiae* (image modifiée de King).20
- Figure 7** : Représentation schématique de la stratégie de recombinaison homologue sur plasmides.....38
- Figure 8** : Représentation schématique de la recombinaison homologue dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae*.....50
- Figure 9** : Représentation schématique d'un alignement de séquences protéiques obtenu avec Modeller.....58
- Figure 10** : Représentation d'un alignement de structure secondaire entre le Renilla luciférase et 1EDE, une haloalcane dehalogenase de *Xanthobacter autotrophicus*..... 60
- Figure 11** : Représentation schématique des sites de coupures choisis sur la Renilla luciférase.....63
- Figure 12** : Représentation schématique des contrôles positifs et négatifs.....65
- Figure 13** : Histogramme de la luminescence obtenue A) pour les essais PCA avec les six sites de coupure de la hRluc et B) pour le PCA avec la coupure 110 et ses fragments seuls, et pour les contrôles positifs et négatifs avec le PCA coupure 110.....68
- Figure 14** : Expression des protéines de fusion pour chaque site de coupure de l'essai PCA présenté à la figure 11.....70

Figure 15 : Interaction entre CDC24 et BEM1 détectée avec le PCA DHFR et le PCA Renilla.....	73
Figure 16 : Criblage des interactions de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez <i>S. cerevisiae</i>	76
Figure 17 : Matrice des interactions de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez <i>S. cerevisiae</i>	79
Figure 18 : Réseau des interactions de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez <i>S. cerevisiae</i>	81

Liste des tableaux

Tableau I :	Fonction(s) des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez <i>S. cerevisiae</i> et leur niveau d'expression en milieu riche (Données tirées de Ghaemmaghami S. et al, 2003 (48)).....	24
Tableau II:	Amorces permettant d'amplifier les cassettes de résistance sat et hph, et d'ajouter les séquences de recombinaison homologue pour les vecteurs p413ADH et p416ADH respectivement.....	28
Tableau III :	Amorces utilisées pour amplifier les différents fragments de la Renilla luciférase.....	32
Tableau IV :	Amorces permettant A) d'ajouter la séquence charnière en 3' de Ras, Raf(RBD) et du zipper de leucine de la protéine GCN4 et B) d'ajouter les séquences de recombinaison homologue pour le promoteur ADH et les fragment de la Renilla luciférase sur Ras-linker, Raf(RBD)-linker et zipper-linker.....	36
Tableau V :	Accouplement des deux types sexuels de la levure (mat a et mat α).....	41
Tableau VI :	A) Amorces utilisées pour ajouter de part et d'autre des cassettes linker-hRluc1_110-CYC1-hph et linker-hRluc2_110-CYC1-sat les séquences de recombinaison homologue pour CDC24 et BEM1. B) Amorces utilisées pour vérifier l'incorporation des cassettes linker-hRluc1_110-CYC1-hph et linker-hRluc2_110-CYC1-sat en aval de CDC24 et BEM1 dans le génome de mat a et mat α respectivement.....	45
Tableau VII :	Amorces utilisées pour ajouter de part et d'autre des cassettes linker-hRluc1_110-CYC1-hph et linker-hRluc2_110-CYC1-sat les séquences de recombinaison homologue pour les 17 gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques.....	47
Tableau VIII :	Amorces utilisées pour vérifier l'incorporation des cassettes linker-hRluc1_110-CYC1-hph et linker-hRluc2_110-CYC1-sat dans le génome de mat a et mat α respectivement.....	52

Liste des abréviations

AD : Domaine d'activation

ADH : alcool déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMP: Ampicilline

ATP: Adénosine-5`-triphosphate

BD: Domaine de liaison

BRET: Bioluminescence Resonance energy Transfer

CloNat : Nourseothricine

DHFR: Dihydro Folate Reductase

EtBr: Bromure d'éthidium

FRET: Fluorescence Resonance energy Transfer

Hph: Hygromycine B Phosphotransférase

hRluc: Renilla luciférase

HygB: Hygromycine B

kDa: kiloDalton

ORF : Cadre ouverts de lecture

PCA : Essai de complémentation protéique (Protein-fragment Complementation Assay)

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

Phe : Phenylalanine

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF : Polyvinylidene fluoride

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

Sat : Strepto-thricine Acetyl Transférase

TBS : Tris Buffer Saline

Trp : Tryptophane

Tyr : Tyrosine

Introduction

Le séquençage du génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui a été complété en avril 1996 (1), a permis d'identifier environ 6000 ORFs (cadres ouverts de lecture) potentiels d'au moins 100 codons (2). Parmi ceux-ci, plusieurs sont des gènes codant pour des protéines dont la fonction est connue, mais nombreux sont les ORFs qui n'ont pas de protéine identifiée associée (2). Différentes stratégies ont été utilisées pour déterminer la fonction des protéines associées aux ORFs potentiels. Tout d'abord, l'alignement de séquences permet d'identifier, par homologie, les grands domaines (kinase, phosphatase, etc.) d'une protéine (3). D'autre part, il est possible d'identifier la fonction des protéines à l'aide des interactions protéine-protéine (4,5). Celles-ci permettent d'identifier les partenaires d'interaction d'une protéine inconnue et, ensuite, d'en caractériser la fonction (4,5). Ces interactions protéine-protéine ont donc permis d'identifier plusieurs voies régulatrices et catalytiques opérant en réseaux (6). Les voies de signalisation, les boucles de rétroaction et les croisements de voies en sont quelques exemples d'accès (6).

Les interactions protéine-protéine sont essentielles pour plusieurs processus biologiques allant de la formation de structures macromoléculaires et des complexes enzymatiques aux voies de transduction du signal et de la régulation (7). Au fil des ans, de nombreuses méthodes ont été développées pour détecter les associations moléculaires *in vitro* et *in vivo* tant à petite qu'à grande échelle (8). Parmi celles-ci, notons le buvardage d'affinité de type Western (9), la co-immunoprécipitation (9)(10), la chromatographie d'affinité (11,12) et le pontage chimique (9,13) qui sont des méthodes d'étude *in vitro*. D'autre part, les approches du double hybride (14), du FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») (15), du BRET (« Bioluminescence Resonance Energy Transfer ») (15,16) et l'essai de complémentation protéique (PCA) (17) sont quelques exemples de techniques qui ont lieu *in vivo*¹.

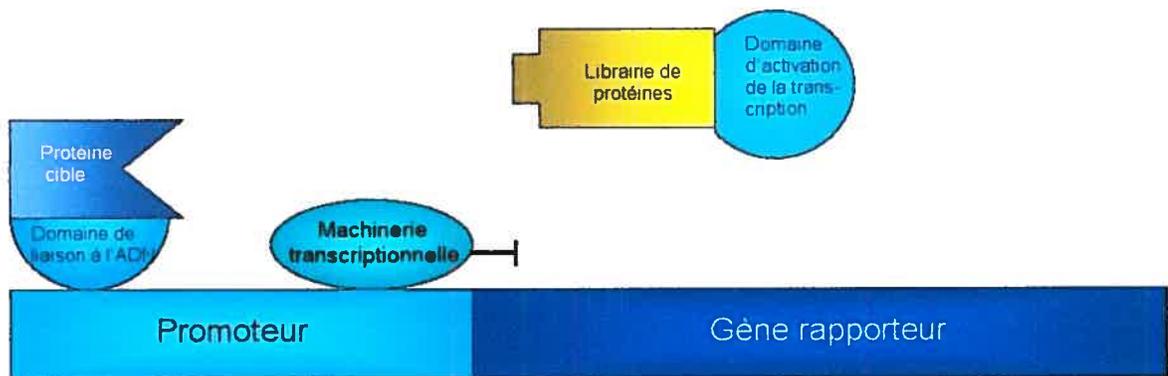
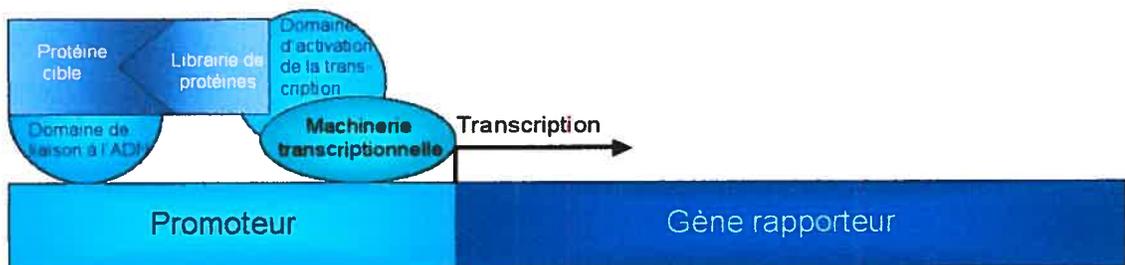
¹ Les références ne sont pas exhaustives.

Méthodes d'études des interactions protéine-protéine

L'essai double-hybride

L'essai de double hybride est une approche génétique à l'identification et l'analyse des interactions protéine-protéine chez la levure (14). Cette technique est fondée sur l'idée que le domaine de liaison à l'ADN (BD) et le domaine d'activation de la transcription (AD) de plusieurs protéines sont fonctionnellement et physiquement séparables (18). Le BD agit pour localiser la protéine dans la séquence d'ADN spécifique à travers le génome et l'AD recrute la machinerie transcriptionnelle de base pour activer la transcription du gène (18). Si le BD d'un facteur de transcription est physiquement séparé de son AD, il ne peut pas y avoir d'interaction entre les deux. Il n'y a donc pas d'activation des gènes répondant à ce facteur de transcription (18). Pour construire cet essai, des protéines hybrides sont générées en fusionnant une protéine X au BD et une protéine Y à l'AD d'un facteur de transcription (14). Lors de l'interaction entre X et Y, il y aura reconstitution de l'activité du facteur de transcription et cela mènera à l'activation de la transcription des gènes rapporteurs suite à la reconnaissance d'un site spécifique par le domaine de liaison à l'ADN (figure 1) (14). Un des aspects intéressants de cette technique est qu'elle permet d'utiliser une protéine d'intérêt fusionnée au BD comme cible pour cribler une librairie de protéines hybrides contenant l'AD, et ce, dans le but d'identifier les partenaires d'interaction (14). Cependant, certaines interactions connues, comme celles impliquant des protéines ayant un signal fort pour un compartiment cellulaire autre que le noyau ou encore celles qui sont membranaires, ne sont pas détectées par cette technique (14,18). Certaines protéines hybrides cibles, comme les facteurs de transcription ou les protéines à propension acide, peuvent autoactiver l'expression des gènes rapporteurs (18). Cela est d'autant plus problématique que plus de 10% des ADNc insérés dans un vecteur cible peuvent activer l'expression des gènes rapporteurs (18,19).

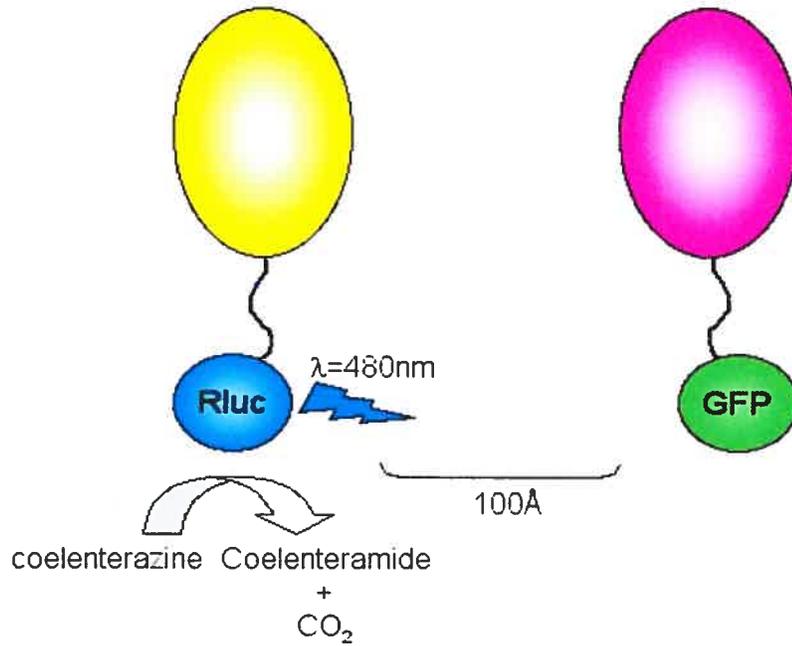
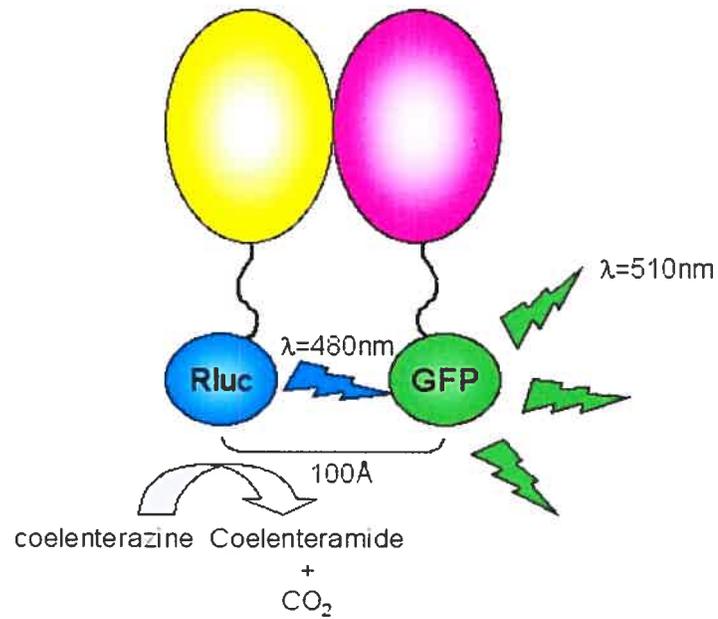
Figure 1 : Représentation schématique de la technique du double hybride. La protéine cible est fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et la librairie de protéines est fusionnée au domaine d'activation de la transcription de ce même facteur **A)** En absence d'interaction entre la protéine cible et une librairie de protéines, la transcription du gène rapporteur n'est pas activée. **B)** Lors de l'interaction entre la protéine cible et une protéine de la librairie, il y a reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnellement actif et activation de la transcription du gène rapporteur.

A) Aucune interaction protéine-protéine**B) Interaction protéine-protéine**

Le BRET et le FRET

D'autres techniques, tel le BRET et le FRET peuvent aussi être utilisées pour étudier les interactions entre les protéines dans un contexte *in vivo* (15,16). Le BRET est un phénomène naturel qui a lieu chez les organismes marins tels que *Renilla reniformis* et *Aequorea victoria* (16). Cette technique se base sur la fusion d'une molécule donneuse et d'une molécule acceptrice à deux protéines d'intérêt (16). La molécule donneuse, une enzyme bioluminescente, va émettre de la lumière lors de la dégradation de son substrat (16). Cette lumière a une longueur d'onde qui va exciter la molécule acceptrice, une protéine fluorescente, permettant l'émission de fluorescence à une longueur d'onde caractéristique (voir figure 2) (16). Tout comme le BRET, le FRET se base sur le transfert d'énergie, mais l'enzyme bioluminescente est remplacée par un fluorophore qui peut être activé par une lumière monochromatique de longueur d'onde appropriée (15). L'énergie émise par l'accepteur comparée à celle émise par le donneur constitue le signal BRET ou FRET selon le cas (15,16). Le signal BRET/FRET dépend, en plus des propriétés spectrales, du ratio, de la distance et de l'orientation du donneur et de l'accepteur, de la force et de la stabilité de l'interaction entre les protéines d'intérêt (15,16). Le BRET et le FRET permettent l'étude des interactions protéine-protéine dans le compartiment cellulaire d'origine (15,16). Le BRET/FRET se produisent dans des cellules en temps réel et permettent une analyse quantitative de la dynamique des interactions protéine-protéine en réponse à des modulations variées à travers le temps (15,16). Le signal BRET ou FRET est cependant affecté par l'orientation du donneur et de l'accepteur dû au changement de conformation de la protéine augmentant ou diminuant l'interaction entre les protéines (15,16). De plus, le BRET/FRET ne peuvent pas détecter les interactions entre les protéines endogènes puisque les protéines d'intérêts ont besoin d'être étiquetées (16). Il s'ensuit l'utilisation d'un système d'expression artificiel pouvant mener à la détection d'interactions non physiologiques causées par la sur expression des protéines (16).

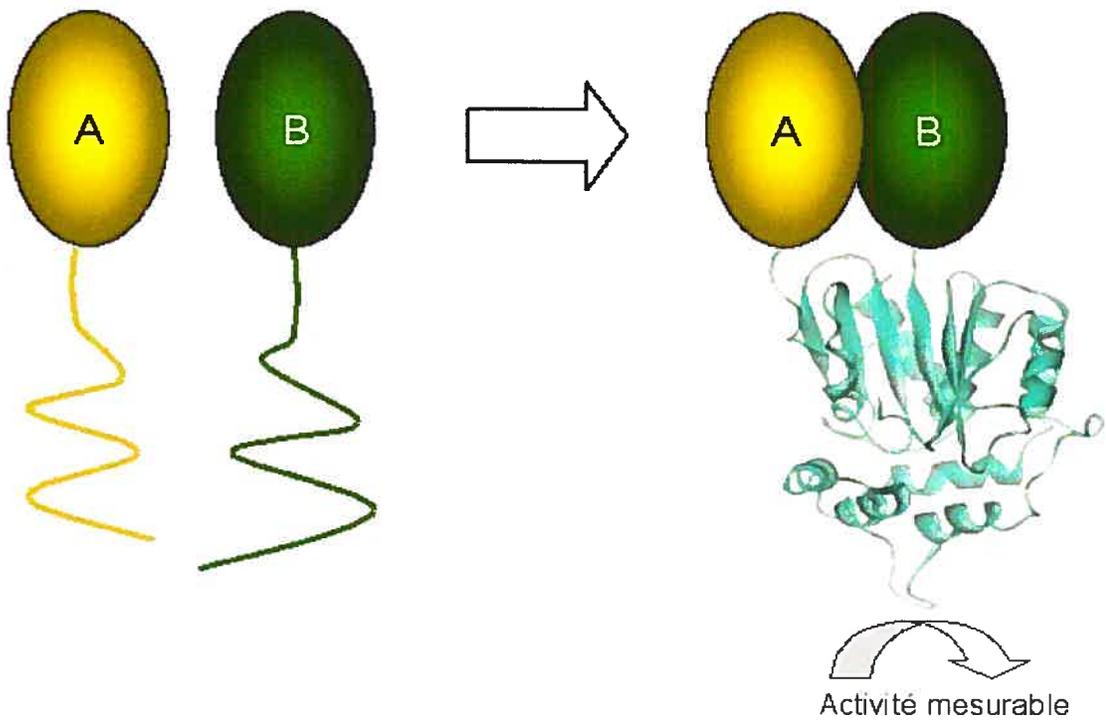
Figure 2 : Représentation schématique de la technique de BRET (« Bioluminescence Resonance Energy transfer ») **A)** En absence d'interaction, seul le signal en provenance de la Rluc ($\lambda=480\text{nm}$) est détecté tandis que **B)** lorsqu'il y a interaction entre les deux protéines d'intérêt, l'énergie émise par la Rluc ($\lambda=480\text{nm}$) est en partie transférée à GFP. Cette énergie transférée va exciter la GFP et celle-ci va émettre de l'énergie à une longueur d'onde de 510nm.

A) Aucune interaction protéine-protéine**B) Interaction protéine-protéine**

Le PCA

Notre laboratoire a développé une stratégie pour l'étude des interactions protéine-protéine, le PCA ("Protein-fragment Complementation Assay"), un essai de complémentation protéique qui permet la mesure de l'organisation de l'information cellulaire et des réseaux biochimiques (17). Le point de départ de cette technique est la coupure d'une enzyme en deux fragments et la fusion de chaque fragment à une protéine d'intérêt (17). La protéine d'intérêt et le fragment d'enzyme sont reliés par une séquence charnière composée de 10 acides aminés (GGGGS)₂ conférant une flexibilité au fragment, sans toutefois permettre la reconstitution spontanée de l'enzyme (17). La stratégie consiste donc en la reconstitution de l'activité enzymatique lors de l'interaction entre les deux protéines d'intérêt par le repliement unimoléculaire de l'enzyme (*figure 3*) (17). Le PCA, qui permet l'étude des interactions protéine-protéine *in vivo*, a pour avantages de préserver l'arrangement spatial, le compartiment d'origine et le réseau des protéines dans la cellule (20). C'est une méthode sensible qui permet de détecter autant les interactions induites que les interactions constitutives (20). Pour répondre à différents types d'études, plusieurs stratégies de PCA (DHFR, β -lactamase, protéines auto-fluorescentes) ont été développées chez les cellules de mammifères et chez la bactérie *E. coli*. Plus récemment, certains d'entre eux ont été portés chez *S. cerevisiae* (PCA DHFR (essai de survie) et PCAvenus (auto-fluorescence)) et un nouveau a été développé (PCA cytosine deaminase (yCD) (essai de mort et de survie)). Cependant, ces types de PCA ne permettent pas facilement l'étude de la dynamique des interactions. Il fallait donc mettre au point une stratégie PCA très sensible qui pourrait mesurer la dynamique des interactions chez *S. cerevisiae*.

Figure 3 :Représentation schématique de la technique du PCA. Chaque fragment d'une enzyme est fusionné à une protéine d'intérêt via une séquence charnière de 10 acides aminés (GGGGS)₂. Lorsqu'il y a interaction entre les deux protéines d'intérêts, il y a repliement unimoléculaire de l'enzyme et reconstitution de l'activité enzymatique.



Un PCA avec la Renilla luciférase

L'élaboration d'un PCA passe d'abord par le choix d'une enzyme qui convient au type d'étude dans lequel elle sera utilisée. Elle doit être petite, monomérique et sa structure tridimensionnelle doit être connue (21). Ensuite, il faut déterminer l'endroit où l'enzyme doit être coupée, ce qui constitue un des points critiques de l'élaboration d'un PCA (21). On choisit généralement des boucles qui se situent à l'extérieur de la structure afin de diminuer le risque d'affecter le bon repliement de la protéine (21). Puisque nous avons déjà un PCA basé sur la fluorescence chez la levure, nous avons porté notre choix vers le développement d'un essai PCA basé sur la luminescence. Nous avons alors choisi la luciférase provenant de la *Renilla reniformis*.

Renilla reniformis est un corail mou (*Anthozoon*) qui émet de la bioluminescence dans le bleu-vert suite à la décarboxylation oxydative de la coelenterazine par la Renilla luciférase (22). La coelenterazine, une imidazolopyrozinone luciférine qui est au cœur de la bioluminescence marine en général (23), est transformé en coelenteramide (22). Du CO₂ est libéré et des photons (λ 480nm) sont aussi émis (22).

C'est en 1971 que la Renilla luciférase a été isolée pour la première fois et que ses propriétés ont été élucidées (24). Cette même année, DeLuca et al ont démontré que le système de luminescence de la Renilla impliquait la production oxydative de CO₂ (25). Mais, ce n'est qu'en 1991 que l'ADNc de la Renilla luciférase a été isolé et exprimé dans *E. coli* (22). Depuis, l'ADNc de la Renilla luciférase a été exprimé dans de nombreux organismes (26).

Lorsque nous avons fait le choix de la Renilla luciférase pour élaborer un essai PCA, plusieurs éléments ont été pris en compte. Tout d'abord, la Renilla luciférase ne requiert pas de cofacteur tel ATP et Mg²⁺ comme c'est le cas pour la firefly luciférase (27). C'est une petite protéine monomérique de 311 acides aminés qui ne requiert pas de modification post-traductionnelle pour être active (27). Cependant, la structure tridimensionnelle de cette enzyme n'est pas encore connue. Cette difficulté peut néanmoins être surmontée en élaborant un

modèle hypothétique de la structure de l'enzyme. Pour cela, deux approches peuvent être envisagées : la modélisation par homologie et la modélisation par filetage.

La modélisation par homologie a pour but de trouver des homologues avec un pourcentage d'identité élevé (>40%) (28). Elle se base donc sur la comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine d'intérêt avec celles de protéines dont la structure tridimensionnelle est déjà connue (28). Les structures des protéines, dont la séquence en acides aminés est identifiée comme homologue à la protéine d'intérêt, sont ensuite superposées et les éléments de structure secondaire qui sont communs sont identifiés (28). Les fragments d'acides aminés de la protéine d'intérêt restant sont alors ajoutés pour compléter ce squelette de la structure en formant les boucles et en ajoutant les chaînes latérales (28). Des contraintes physiques et chimiques sont ensuite imposées à la structure modélisée pour favoriser sa stabilité et, finalement, la structure est raffinée (figure 4) (28).

Lorsque le pourcentage d'identité est plus faible (entre 20% et 40%) il est préférable d'utiliser la méthode de modélisation par filetage (31). Cette méthode se base sur la création d'une librairie de structures alignées (31). On crée alors des patrons de structures secondaires avec la séquence cible et on calcule les pseudo-énergies impliquées lors du repliement (31). Ces motifs structuraux de la séquence cible sont ensuite alignés avec chaque structure de la librairie (31). L'alignement qui obtient le meilleur score est choisi (31). Dans le cas de la Renilla luciférase, le pourcentage d'identité obtenu était de 40%. Étant donné que cette valeur est à la limite pour le choix d'une des deux méthodes présentées, les deux ont été appliquées et les résultats obtenus ont convergés vers un même point, une haloalcané déshalogénase. La structure modélisée de la Renilla luciférase est présentée à la figure 5.

Figure 4 : Représentation schématique de la modélisation par homologie pour l'élaboration d'une structure hypothétique d'une protéine.

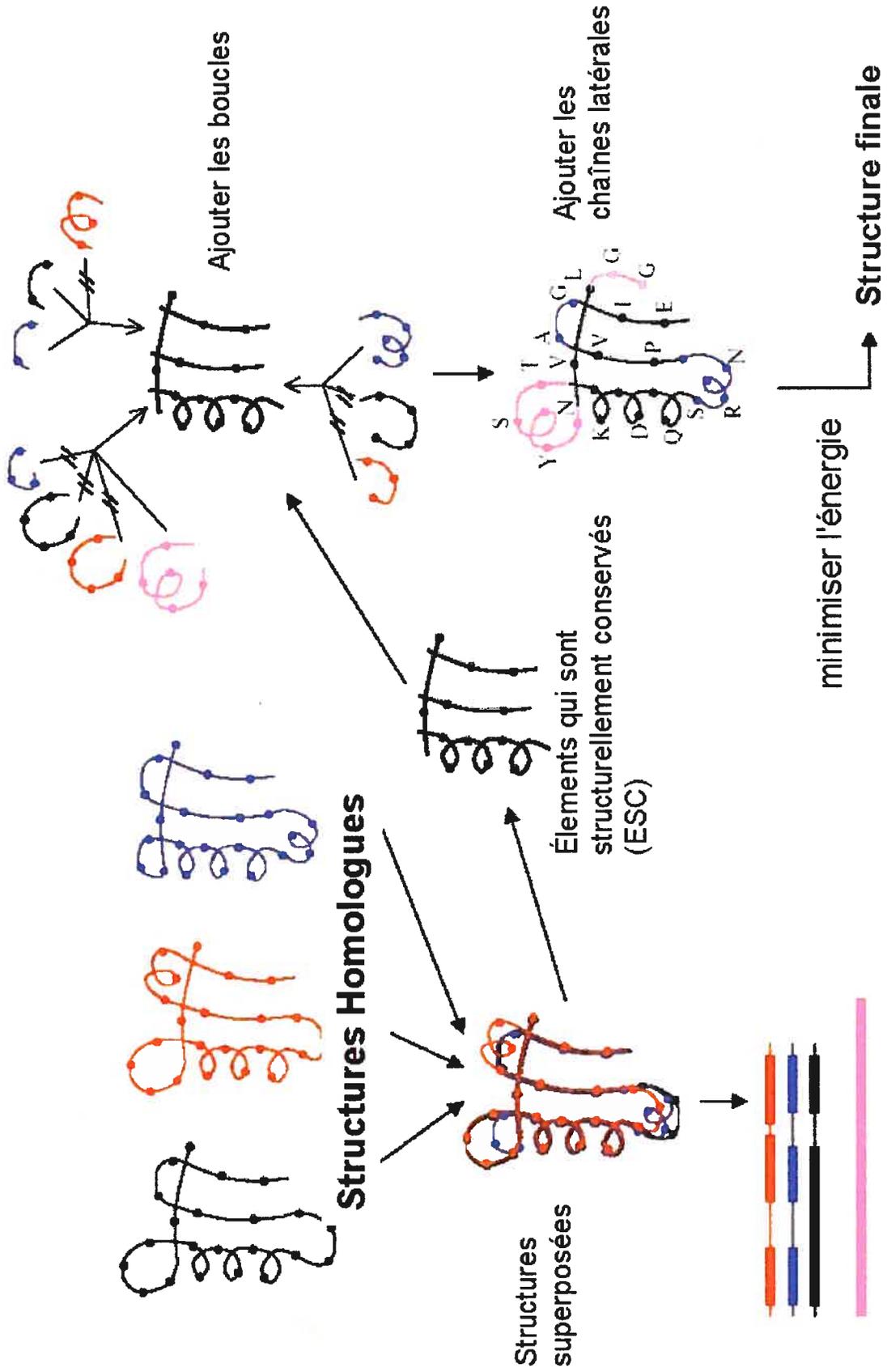


Figure 5 : Représentation de la structure tertiaire modélisée de la Renilla luciférase.



La voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez *S. cerevisiae*

La biosynthèse des acides aminés aromatiques (Tryptophane, Phénylalanine, et Tyrosine), particulièrement la branche du tryptophane, est un des exemples les mieux étudiés des voies biosynthétiques (32). Ces études sur la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, surtout concentrées chez les procaryotes, ne peuvent pas être transposées directement chez les eucaryotes (32). Certains organismes, telles les archæobactéries, les eubactéries, les plantes et les moisissures, peuvent synthétiser *de novo* le Tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine (32). Les animaux, quant à eux, ne sont généralement capables de synthétiser la tyrosine que par hydroxylation de la phénylalanine et exigent un autre acide aminé aromatique dans leur diète (32). Il a été aussi utilisé comme modèle pour appliquer de nouveaux outils bioinformatiques et des stratégies expérimentales dans le but d'étudier les réseaux des protéines sur une grande échelle (33,34). Pour ces raisons, nous avons choisi d'étudier cette voie dans la levure comme un essai de notre nouvelle méthode.

Des études, tel que Marcotte et al. et King et al. ont tenté d'établir les interactions entre les protéines et leur fonction de façon toute particulière (33,34). C'est en 1999 que Marcotte et al. ont publié une étude proposant qu'il soit possible de prédire les interactions physiques à partir de la séquence des gènes (33). C'est-à-dire que lorsqu'il y a deux séquences codant pour deux gènes séparés dans un génome, mais fusionnés dans un autre, il est possible de prédire que les protéines codées par ces deux gènes seraient amenées à interagir physiquement (33). Trois tests indépendants ont permis de confirmer leur hypothèse concernant les événements de fusion protéique qui seraient un moyen d'optimiser l'interaction entre deux domaines (33). Ils ont ensuite reconstruit la voie du shikimate de chez *Escherichia coli* selon leur théorie (33). Dimitri Sans a alors confirmé 5 des 6 genres d'interactions prédit par Marcotte et al. à l'aide du PCA DHFR (33,35).

En 2004, King et al. ont décrit un nouveau système permettant le prolongement du niveau d'intégration des découvertes scientifiques actuel à la robotique (34). Dans plusieurs champs scientifiques, les données sont générées plus rapidement que ce qu'il est possible d'analyser (34). L'automatisation du processus scientifique suscite alors un grand intérêt théorique et une importance pratique (34). Le système développé par King et al., qu'ils ont nommé le Robot Scientifique, permet donc de générer des hypothèses pour expliquer des observations, d'imaginer les expériences nécessaires pour évaluer ces hypothèses, de réaliser ces expériences en utilisant un robot de laboratoire, d'analyser les résultats pour éliminer les hypothèses inconsistantes avec les résultats et d'effectuer le processus sous forme de boucle jusqu'à ce que tout concorde (34). Leur modèle a prédit correctement 98,5% de leurs expériences et leurs hypothèses se sont avérées véridiques à 80,1% après cinq répétitions pour une des stratégies expérimentales qu'ils ont utilisées (34). La validation de leur méthode a été faite en utilisant la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques de *Saccharomyces cerevisiae* (34).

Chez la levure *S. cerevisiae*, les sept réactions enzymatiques de la voie du shikimate (du érythrose-4-phosphate (E4P) et phosphoenol pyruvate (PEP) au chorismate) sont communes pour tous les acides aminés aromatiques (32,36). Les enzymes ARO3 et ARO4, des 3-deoxy-D-heptulosonate-7-phosphate (DHAP) synthases, catalysent la première réaction en utilisant le E4P et le PEP pour former le DHAP tandis que les réactions 2 à 7 sont catalysées par l'enzyme pentafonctionnelle ARO1 (32,36). Le chorismate, dernier intermédiaire commun entre les trois acides aminés aromatiques, est distribué entre l'embranchement Tyr/Phe, l'embranchement Trp et ses dérivés comme la vitamine K, l'ubiquinone et le *p*-aminobenzoate (32,36). À partir du chorismate, la biosynthèse du Trp est composée de 5 réactions. La première est réalisée par l'hétérodimère TRP2/TRP3 qui, à partir du chorismate, permet la formation de l'antranilate. La TRP2 a une activité antranilate synthase tandis que TRP3, une enzyme bifonctionnelle, utilise son activité glutamine aminotransférase pour faciliter la réaction de TRP2 (32,36). Ensuite, la TRP4, une antranilate

Figure 6 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez la levure *S. cerevisiae* (image modifiée de King). Les intermédiaires réactionnels sont indiqués en noir. Les enzymes catalysant la section commune à la synthèse de la Phe, Tyr, et du Trp sont en violet, celles permettant la synthèse du Trp sont en vert et celles impliquées dans la synthèse de la Phe et de la Tyr sont en magenta. Les enzymes permettant la formation du Phosphoenolpyruvate à partir du Glycerate-2-phosphate sont représentées en jaune.

phosphoribosyltransferase, va transférer un groupement 5-phosphoribosyl à l'antranilate pour donner le N-5'-phospho- β -D-ribosylanthranilate (32,36). Ce dernier est alors transformé en 1-(2-Carboxyl-phenylamino)-1'-deoxy-D-ribulose-5'-phosphate sous l'action de la TRP1, une phosphoribosylanthranilate isomérase (32,36). Par la suite, l'activité indole-3-phosphate synthase de TRP3 vient catalyser la formation du (3-indolyl)-glycerol phosphate (32,36). Finalement, cette dernière molécule est transformée en tryptophane par la tryptophane synthétase TRP5 (32,36). Dans l'embranchement du Trp, la TRP1 est l'enzyme qui est la plus active avec une activité 2 à 3 fois plus élevée que le niveau basal d'activité (32,36). En ce qui concerne la biosynthèse de la Tyr et de la Phe, la chorismate mutase ARO7 transforme le chorismate en prephenate, intermédiaire commun à leur synthèse (32,36). Le prephenate est le substrat de la prephenate déshydrogénase et de la prephenate déshydratase qui produisent le 4-hydroxyphénylpyruvate et le phénylpyruvate respectivement (32,36). Les aminotransférases ARO8 et ARO9 vont alors transformer le 4-hydroxyphénylpyruvate et le phénylpyruvate en tyrosine pour le premier et en phénylalanine pour le second (32,36). L'activité de la chorismate mutase peut être modulée à la hausse (augmentation jusqu'à 10 fois en présence de Trp) ou à la baisse (diminution jusqu'à 10 fois en présence de Tyr) (32,36). Il en résulte une variation de la régulation d'un facteur 100 (32,36). La voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques est présentée à la figure 6 et la fonction ainsi que le niveau d'expression des enzymes de cette voie sont présentés dans le Tableau I.

Chez *S. cerevisiae*, l'organisation de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques n'est pas bien connue. À ce jour, seuls les interactions entre TRP2 et TRP3 et la formation de l'homodimère ARO7 ont été identifiées. La plupart des enzymes ont été caractérisées (37), mais l'ensemble des interactions qu'elles ont entre elles n'a pas été montré.

Buts et objectifs

La technique de PCA a fait ses preuves quant à l'identification des interactions protéine-protéine chez les cellules mammifères (38,39,40,41,42,43,44), chez *E.coli* (17,45,46), chez les cellules végétales (47) et chez *S. cerevisiae* (travaux en cours). Puisque aucun essai PCA ne permet facilement l'étude de la dynamique des interactions dans un système d'expression endogène, mon projet de maîtrise consistera, dans un premier temps, à mettre au point un essai PCA basé sur la luminescence chez *S. cerevisiae*. Cet essai sera développé en utilisant un système d'expression artificiel permettant d'amplifier le signal du PCA par la sur-expression des protéines. Par la suite, le PCA sera validé pour son utilisation lors de l'expression endogène des protéines. Ensuite, la seconde partie de mon projet consistera à étudier la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez *S. cerevisiae* à l'aide du PCA Renilla. Cela se fera tout d'abord par le criblage des interactions de la voie.

Tableau I : Fonction(s) des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez *S. cerevisiae* et leur niveau d'expression en milieu riche (Données tirées de Ghaemmaghami S. et al, 2003 (48)).

Norm systématique	Norm standard	Fonction	Nb acides aminés	Masse (kDa)	Expression (nb molécule/cellule)
YGR254W	ENO1	Enolase I	437	46,816	7,67E+04
YHR174W	ENO2	Enolase II	437	46,914	2,61E+03
YMR323W	—	Phosphopyruvate hydratase activity	437	47,312	Aucune expression détectée
YBR249C	ARO4	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHPh) synthase,	370	39,749	2,63E+04
YDR035W	ARO3	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHPh) synthase	370	41,07	8,97E+03
YDR127W	ARO1	Pentafonctional arom protein: -3-dehydroquinate hydratase activity -3-dehydroquinate synthase activity -3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase activity -shikimate 5-dehydrogenase activity -shikimate kinase activity	1588	174,754	6,42E+03
YGL148W	ARO2	Bifonctional chorismate synthase flavin reductase	376	40,838	2,31E+03
YPR060C	ARO7	Chorismate mutase	256	29,747	<50
YBR166C	TYR1	Prephenate dehydrogenase	452	50,923	2,18E+03
YNL316C	PHA2	prephenate hydratase	334	38,225	2,02E+03
YHR137W	ARO9	Aromatic aminotransferase	513	58,527	7,70E+03
YGL202W	ARO8	Aromatic aminotransferase	500	56,177	1,77E+03
YER090W	TRP2	Anthranilate synthase Component I	507	56,767	6,51E+03
YDR354W	TRP4	Anthranilate phosphoribosyl transferase	380	41,374	1,76E+03
YDR007W	TRP1	Phosphoribosylanthranilate isomerase	224	24,144	1,85E+03
YKL211C	TRP3	Anthranilate synthase Component II indole-3-phosphate synthase	484	53,489	1,34E+04
YGL026C	TRP5	Tryptophan synthetase	707	76,626	1,55E+04

Matériel et Méthodes

Recombinaison homologue des cassettes de résistance pour l'hygromycine B (hph) et la nourseothricine (sat) dans les vecteurs p413ADH et p416ADH respectivement.

Les cassettes de résistances hph et sat ont été amplifiées par PCR avec l'appareil MJ research PTC-150 Thermocycler à partir des vecteurs pAG32 (P30106, Euroscarf) et pSAT (p4339, fourni par le laboratoire du Dr Pierre Belhumeur) respectivement. Cette réaction permet d'ajouter les séquences homologues au vecteur p413ADH (de part et d'autre de la cassette hph) et au vecteur p416ADH (de part et d'autre de la cassette sat) (voir Tableau II). Le mélange réactionnel était composé de tampon thermopol 1X (NEB, Beverley, MA), 10ng de vecteur, 0,2 μ M de l'oligo 5', 0,2 μ M de l'oligo 3', 0,2 mM de dNTPs (Fermentas, Hanover, MD), 2u de Vent DNA Polymerase (NEB, Beverley, MA) et 1M betaine (Sigma, Oakville, Ontario). Les conditions de la réaction étaient les suivantes : 5min à 95°C pour la séparation initiale des brins, suivit de 30 cycles (1min à 94°C pour la séparation des brins, 45sec à 61°C pour l'appariement et 1min30sec à 72°C pour l'élongation) et 10min à 72°C pour l'élongation finale. Les produits PCR ont été chargés sur un gel d'agarose 1,5% contenant 2ng/ml de bromure d'éthidium (EtBr). Les bandes ayant le poids moléculaire attendue ont été extraites et purifiées par QIAEX (QIAGEN, Mississauga, Ontario).

Les vecteurs p413ADH et p416ADH ont été digérés avec l'enzyme Nsil (NEB, Beverley, MA) pendant 3 heures à 37°C pour linéariser les vecteurs. Ces derniers ont été chargés sur gel d'agarose 1% contenant 2ng/ml d'EtBr, l'ADN linéaire a été extrait et purifié par QIAEX (QIAGEN, Mississauga, Ontario).

La recombinaison homologue a été réalisée en co-transformant 200ng de vecteur linéaire et 200ng de produit PCR dans les types sexuels mat a (souche BY4741 : *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*) (pour p413ADH et la cassette hph) et mat α (souche BY4742 : *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*) (pour p416ADH et la cassette sat) de *Saccharomyces cerevisiae*. Le protocole de transformation haute efficacité, *Saccharomyces cerevisiae* est une adaptation de Gietz et Schiestl (1995) *Methods in Molecular and Celular Biology* 5 : 255-269 (49). Les

Tableau II: Amorces permettant d'amplifier les cassettes de résistance sat et hph, et d'ajouter les séquences de recombinaison homologue pour les vecteurs p413ADH et p416ADH respectivement. Les séquences de recombinaison homologue (nucléotides 1-34 de chaque amorce) se situent de part et d'autre du site Nsil de chacun des vecteurs (position 5423 pour p413ADH et 5390 pour p416ADH). Les nucléotides 41-65 des amorces correspondent aux 25 premiers nucléotides du promoteur de la cassette de résistance pour les amorces sens et aux 25 derniers nucléotides du terminateur de la cassette de résistance pour les amorces anti-sens. Les nucléotides 35-40 de chaque amorce correspondent à un site de restriction Nsil. L'amorce 5'diagnostique permet la vérification de l'insertion de la cassette sat ou hph dans p413ADH et p416ADH de 5312-5338.

Nom	Séquence (5' → 3')
5' p413-hph	5' - GAAAGCGGCCCTCGTTTCAGAAATGACACGGTATAGAAtgcaatTGTTTAGCTTGGCCTTGTCCCCGCCCG-3'
3' p413-hph	5' - ATGTATACGAACAGTATGATACTGGAAGATGACAAAtgcaatGAGCTCGTTTTTCGACACTGGATGGC-3'
5' p416-sat	5' - TAAAATTGAAAGCTCTAAATTGTGTGAGTTTAGTATACAtgcaatACATGGAGGCCCCAGAAATACCCCTCCT-3'
3' p416-sat	5' - GGCCAGCAAAAACATAAAAAAAGTAAAtgcaatCAGTATAGCCAGCCAGCATTCACATA-3'
5' diagnostique	5' - ATCTGTGCGGTATTTTCACACCCGCATAG-3'

cellules mat a et mat α transformées ont été étalées sur milieu YPD_{agar} contenant 250 μ g/ml d'hygromycine B (Wisent, Saint-Jean-Baptiste de Rouville, Quebec) et YPD_{agar} contenant 100 μ g/ml de nourseothricine (WERNER BioAgents, Jena, Allemagne) respectivement. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 48 heures. La cassette hph code pour la hygromycine B phosphotransférase et la cassette sat code pour la strepto-thricine acetyl transférase.

Diagnostic des clones de la recombinaison homologue

Les vecteurs p413ADH-hph et p416ADH-sat qui se trouvent dans les cellules haploïdes de levures ont été extraits grâce au protocole d'extraction d'ADN génomique de levure qui est disponible sur <http://www.bio.uva.nl/pombe/-handbook/section5/section5-1.html> (50). L'ADN ainsi extrait a été électroporé dans la souche DH5 α de la bactérie *Escherichia Coli* pour pouvoir isoler les plasmides. Ces derniers ont ensuite été extraits de la bactérie à l'aide d'un système de mini-préparation d'ADN plasmidique (QIAGEN, Mississauga, Ontario) et une réaction PCR a été effectuée pour s'assurer que les vecteurs contiennent la cassette de résistance introduite par recombinaison homologue. Le mélange réactionnel était composé de tampon thermopol 1X (NEB, Beverley, MA), 10ng de vecteur (p413ADH-hph ou p416ADH-sat), 0,2 μ M de l'oligo 5'diagnostique, 0,2 μ M de l'oligo 3' (p413hph ou p416sat), 0,2mM de dNTPs (Fermentas, Hanover, MD), 2u de Vent DNA Polymerase (NEB, Beverley, MA) et 1M betaine (Sigma, Oakville, Ontario) (voir tableau II pour les séquences des oligos). Les conditions de la réaction étaient les suivantes : 5 min à 95°C pour la séparation initiale des brins, suivit de 30 cycles (1min à 94°C pour la séparation des brins, 45 sec à 58°C pour l'appariement et 1min30sec à 72°C pour l'élongation) et 10min à 72°C pour l'élongation finale. L'appareil MJ research PTC-150 Thermocycler a été utilisé pour cette réaction. Les produits PCR ont été chargés sur gel d'agarose 1% contenant 2ng/ml d'EtBr pour identifier les échantillons positifs. Ceux, dont le produit PCR correspondait au nombre de

paires de bases du produit diagnostique attendu, ont été envoyés au service de séquençage de l'Université Laval.

Clonage de la Renilla luciférase (hRluc)

La Renilla luciférase (hRluc) qui a été utilisée provient du vecteur phRluc-cmv (Promega, Madison, WI). Les fragments de la hRluc ont été obtenus par amplification par PCR de la région d'intérêt du gène hRluc. L'oligonucléotide en 5' qui est commun à tous les fragments 1 ajoute un site de restriction ClaI (5' fragment_1_ClaI) en amont de la séquence. Les oligonucléotides en 3', qui sont différents selon la longueur du fragment 1, ajoute un site de restriction Sall (3' fragment_1(x)_Sall) en aval de la séquence. Pour ce qui est du fragment 2, les oligonucléotides en 5', qui varient selon la position de départ du fragment 2, ajoute un site HindIII (5' fragment_2(x)_HindIII) en amont de la séquence. L'oligonucléotide en 3' est commun et ajoute un site Sall (3' fragment_2_Sall) à la fin de la séquence des fragments 2 (*voir Tableau III*). Le gène complet de hRluc est obtenu en utilisant l'amorce 5' du fragment 1 et l'amorce 3' du fragment 2. Le mélange réactionnel des réactions PCRs est composé de tampon thermopol 1X (NEB, Beverley, MA), 10ng de vecteur phRluc-CMV, 0,2µM de chacune des amorces, 0,2mM de dNTPs (Fermentas, Hanover, MD), 2u de Vent DNA Polymerase (NEB, Beverley, MA) et 1M betaine (Sigma, Oakville, Ontario). Les conditions de la réaction étaient les suivantes : 5min à 95°C pour la séparation initiale des brins, suivit de 30 cycles (1min à 94°C pour la séparation des brins, 45sec à 61°C pour l'appariement et 1min30sec à 72°C pour l'élongation) et 10min à 72°C pour l'élongation finale. L'appareil MJ research PTC-150 Thermocycler a été utilisé pour cette réaction. Les produits PCR ont été chargés sur un gel d'agarose 1,5% contenant 2ng/ml d'EtBr. Les bandes qui se situent au bon poids moléculaire ont été extraites et purifiées à l'aide du système de billes QIAEX (QIAGEN, Mississauga, Ontario). Les vecteurs p413ADH-hph et p416ADH-sat ainsi que les fragments de hRluc ont été digérés avec les enzymes Bsu15I (Fermentas, Hanover, MD) et HindIII

Tableau III : Amorces utilisées pour amplifier les différents fragments de la Renilla luciférase. Les nucléotides 7-12 correspondent à un site de restriction (ClaI pour le fragment 1 sens; HindIII pour les fragments 2 sens; Sall pour les fragments 1 et 2 anti sens) et les nucléotides.

Nom	Séquence (5' → 3')
5' fragment_1_Cla I	5'-TTTTAAAatcgatATGGGCTTCCAAGGTGTACGACCCCGAGCAAACGCCATGATC-3'
3' fragment_1b_Sal I	5'-ATATAATgtcgacttaAAGGTTcAGCAGCTCGAACCAAGCGGTGAGGTACTTTGTAGTATC-3'
3' fragment_1d_Sal I	5'-ATATAATgtcgacttaCTTTGGAAAGGTTcAGCAGCTCGAACCAAGCGGTGAGGTACTTTGTA-3'
3' fragment_1h_Sal I	5'-ATATAATgtcgacttaAAAAGATGATTTTCTTTGGAAAGGTTcAGCAGCTCGAACCAAGCGGT-3'
3' fragment_1q_Sal I	5'-ATATAATgtcgacttaGATGTcAGGCCACtCGTCCCAGGACTCGATcACGTCCcACGACACT-3'
3' fragment_1r_Sal I	5'-ATATAATgtcgacttaCTCGATGTcAGGCCACtCGTCCCAGGACTCGATcACGTCCcACGAC-3'
3' fragment_1v_Sal I	5'-ATATAATgtcgacttaGGCGATATcCTCCTCGATGTcAGGCCACtCGTCCCAGGACTCGAT-3'
5' fragment_2b_Hind III	5'-TTTTAAAaagcttCCAAAAGAAAATcATCTTTGTGGGCCACGACTGGGGGGCTTTGTCTTG-3'
5' fragment_2d_Hind III	5'-TTTTAAAaagcttAAAAATcATCTTTGTGGGCCACGACTGGGGGGCTTTGTCTGGCCCTTT-3'
5' fragment_2h_Hind III	5'-TTTTAAAaagcttGTGGGCCACGACTGGGGGGCTTTGTCTGGCCCTTTcACTACTCTCTAC-3'
5' fragment_2q_Hind III	5'-TTTTAAAaagcttGAGGAGGATATCGCCCTGATcAAGAGCGGAAGAGGGCCGAGAAAATG-3'
5' fragment_2r_Hind III	5'-TTTTAAAaagcttGAGGATATCGCCCTGATcAAGAGCGGAAGAGGGCCGAGAAAATGGTG-3'
5' fragment_2v_Hind III	5'-TTTTAAAaagcttCTGATcAAGAGCGGAAGAGGGCCGAGAAAATGGTGTGAGAAATAAC-3'
3' fragment_2_Sal I	5'-ATATAATgtcgacttTACTGCTCGTCTCTcAGCACGGCCCTCCACGAAAGCTCTTTGATGTA-3'

(Fermentas, Hanover, MD) respectivement suivi d'une seconde digestion avec l'enzyme Sall (Fermentas, Hanover, MD). Chaque digestion a été réalisée avec 5u d'enzyme pendant 3 heures à 37°C. Les vecteurs ont été chargés sur gel d'agarose 1% (2ng/ml d'EtBr), l'ADN linéaire a été extrait et purifié par QIAEX (QIAGEN, Mississauga, Ontario) entre chaque digestion. La ligation de chaque insert avec son vecteur a été réalisée avec 100ng de vecteur linéaire et 25ng d'insert (rapport 5 vecteurs :1 insert) dans du tampon T4 DNA ligase 1X (Invitrogen, Burlington, Ontario) contenant 10u de T4 DNA ligase (Invitrogen, Burlington, Ontario) pendant 12h à 16°C. La réaction a été inactivée à 85°C pendant 20min. Chaque ligation a été précipitée à l'éthanol, resuspendue dans 10µl d'eau et la moitié a été électroporé dans 50 µl de E.coli (DH5α) électrocompétentes. Les transformants ont été étalés sur milieu LB_{agar} contenant 100µg/ml d'ampicilline (BioShop, Burlington, Ontario) et incubés à 37°C pendant 24h. Les plasmides ont ensuite été extraits à l'aide du système de mini-préparation d'ADN (QIAGEN, Mississauga, Ontario) et envoyés au service de séquençage de l'Université Laval.

Recombinaison homologue de zipper-linker, Ras-linker et Raf-linker

La séquence du zipper de leucine de la protéine GCN4 a été amplifiée par PCR pour ajouter une séquence charnière. Le mélange réactionnel de la réaction PCR était composé de tampon thermopol 1X (NEB, Beverley, MA), 10ng du vecteur pcDNA3.1/Zeo-zipper-YFP(1) (construction de Ingrid Remy), 0,2µM de l'amorce 5' ADH_XbaI_Zipper, 0,2µM de l'amorce 3' Zipper_linker, 0,2 mM de dNTPs (Fermentas, Hanover, MD), 2u de Vent DNA Polymerase (NEB, Beverley, MA) et 1M betaine (Sigma, Oakville, Ontario). Les conditions de la réaction étaient les suivantes : 5min à 95°C pour la séparation initiale des brins, suivit de 30 cycles (1min à 94°C pour la séparation des brins, 45sec à 63°C pour l'appariement et 1min30sec à 72°C pour l'élongation) et 10min à 72°C pour l'élongation finale. L'appareil MJ research PTC-150 Thermocycler a été utilisé pour cette réaction. Le fragment Zipper-linker ainsi obtenu a ensuite servi

de matrice pour un second PCR qui visait l'ajout de séquences de recombinaison homologue pour le promoteur ADH et les différents fragments de la hRluc. Le mélange réactionnel est le même que celui présenté pour le PCR de zipper, sauf pour les amorces et l'ADN utilisés. La seule différence au niveau des conditions de la réaction se situe pour l'appariement qui a eu lieu à 65°C au lieu de 63°C. Le tableau IV, présente les amorces utilisés pour ces deux réactions PCR.

Le protocole de transformation haute efficacité, adapté de Gietz et Schiest (1995), a été utilisé. Un rapport des copies de produit PCR/Vecteur de 5 pour 1 a été choisi (60ng de produit PCR:200ng de vecteur). Les vecteurs p413ADH-hph et p416ADH-sat contenant les fragments hRluc et la hRluc pleine longueur (hRluc_PL) ont été préalablement digéré avec XbaI (Fermentas, Hanover, MD) afin de favoriser la recombinaison homologue *in vivo*. Les vecteurs p413ADH-hRluc_(f1 ou PL)-hph et le produit PCR (Zipper-linker ou Ras-linker) ont été co-transformés dans le type sexuel mat a de *Saccharomyces cerevisiae* (souche BY4741) et les vecteurs p416ADH-hRluc_(f2 ou PL)-sat et le produit PCR (Zipper-linker ou Raf-linker) ont été co-transformés dans le type sexuel mat α de *Saccharomyces cerevisiae* (souche BY4742). Les transformants ont ensuite été étalés sur milieu YPD_{agar}+250 μ g/ml hygromycine B (mat a) et YPD_{agar}+100 μ g/ml nourseothricine (mat α), et les cultures furent incubées à 30°C pendant 48h. L'ADN plasmidique des levures a été récupérée comme décrit dans la section recombinaison homologue des cassettes de résistance (50) pour fin de séquençage par la méthode des didésoxynucléotides au service de séquençage de l'Université Laval. Une représentation schématique de la stratégie est montrée à la figure 7.

Accouplement de mat a et mat α

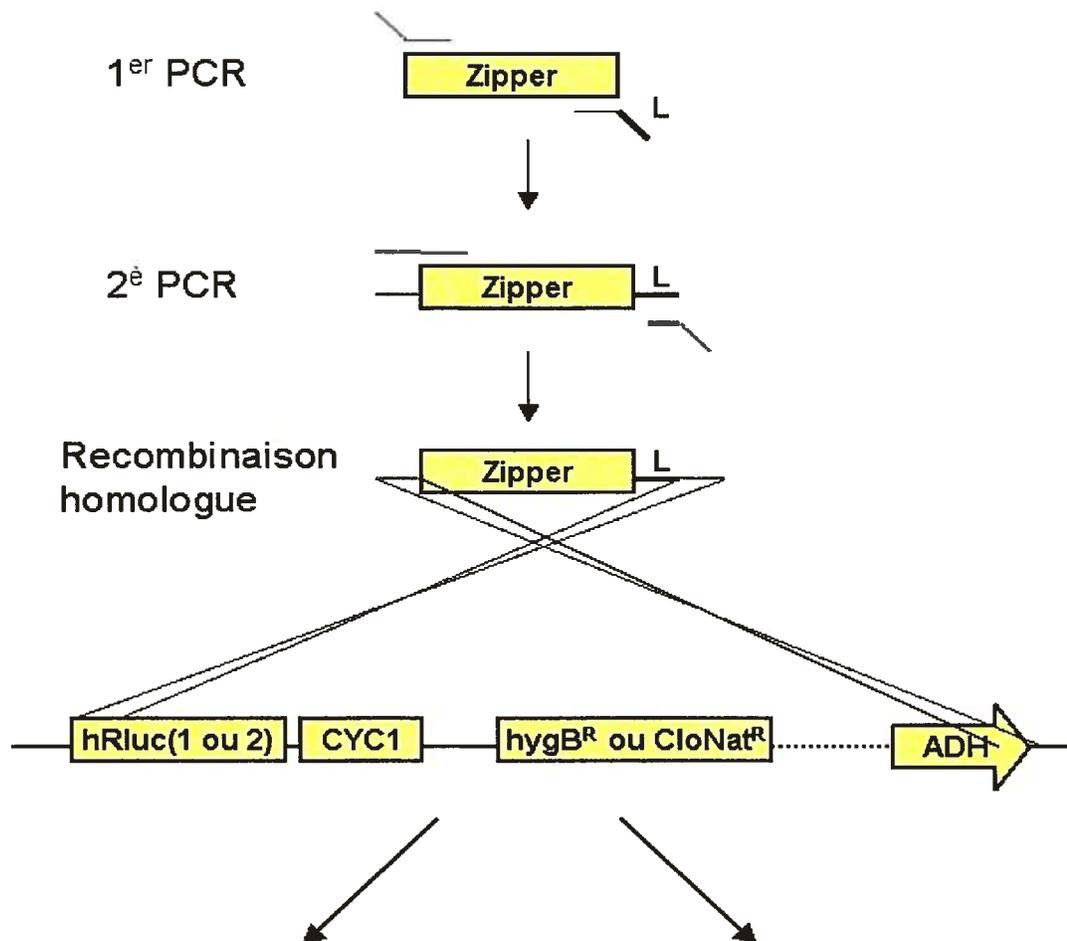
Les cellules haploïdes mat a contenant les constructions Zipper-linker-hRluc_(f1 ou PL) et Ras-linker-hRluc_(f1 ou PL) ont été accouplées avec les cellules haploïdes mat α contenant les constructions Zipper-linker-hRluc_(f2 ou PL) et Raf-linker-hRluc_(f2 ou PL)(rapport 1:1) dans du milieu YPD pendant 4h à 30°C.

Tableau IV : Amorces permettant **A)** d'ajouter la séquence charnière en 3' de Ras, Raf(RBD) et du zipper de leucine de la protéine GCN4 et **B)** d'ajouter les séquences de recombinaison homologue pour le promoteur ADH et les fragment de la Renilla luciférase sur Ras-linker, Raf(RBD)-linker et zipper-linker.

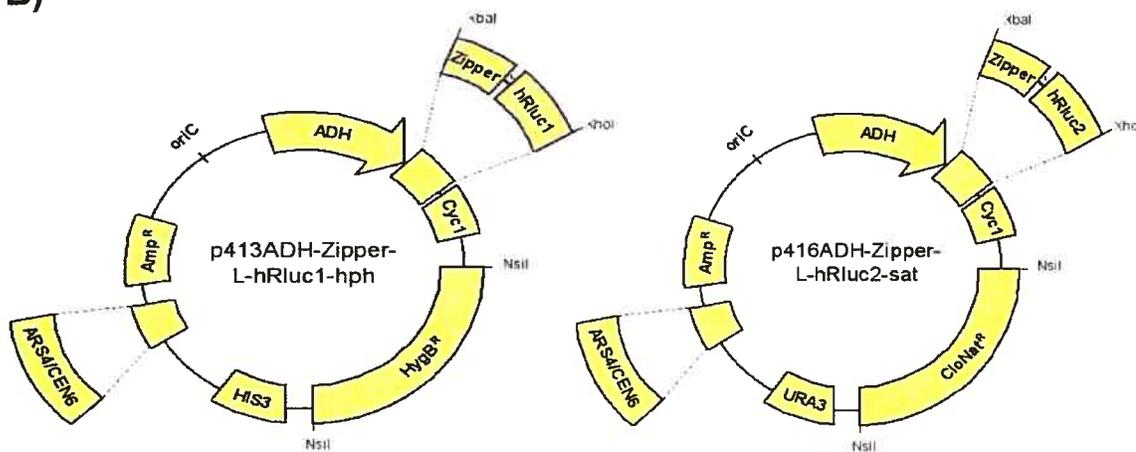
Séquence (5' → 3')	
Nom	
A) 5'ADH_XbaI_Zipper	5'-TCAAGCTATACCAAGCATACAATCAACTCTCTAGAAATGAACACTGAAGCCCGCAGGCGTT-3'
3' Zipper_linker	5'-AGAGCCACCGCC'TCCGGATCCGCCACCCGCCGTTCCGCCAACTAATTTCTTTAAT-3'
B) 5'ADH_XbaI_Zipper	5'-TCAAGCTATACCAAGCATACAATCAACTCTCTAGAAATGAACACTGAAGCCCGCAGGCGTT-3'
3' linker_hRluc_f1	5'-CCTCCGGATCCGCCACCCGCTTGGCTTGGGGTCTGTTACACCTTGGAAAGCCAT-3'
3' linker_f2b-hRluc	5'-CCCCAGTCTGGTGGCCCCACAAAGATGATTTTCTTTTGGAGAGCCACCCGCC'TCCGGATC-3'
3' linker_f2d-hRluc	5'-CAAGCCCCCAGTCTGGCCCCACAAGATGATTTTAGAGCCACCCGCC'TCCGGATC-3'
3' linker_f2h-hRluc	5'-TGAAGGCCAGACAAGCCCCCAGTCTGGCCCCACAGAGCCACCCGCC'TCCGGATC-3'
3' linker_f2q-hRluc	5'-CCCTCTTCGCTCTTGATCAGGGCGATATCCCTCCTCAGAGCCACCCGCC'TCCGGATC-3'
3' linker_f2r-hRluc	5'-TCGCCCTCTTTCGCTCTTGATCAGGGCGATATCCCTCAGAGCCACCCGCC'TCCGGATC-3'
3' linker_f2v-hRluc	5'-AGCACCAATTTTCTTCGCCCTCTTCGCTCTTGATCAGAGCCACCCGCC'TCCGGATC-3'

Figure 7 : Représentation schématique de la stratégie de recombinaison homologue sur plasmides. **A)** Tout d'abord, un premier PCR est effectué pour ajouter le linker. Le produit PCR zipper-linker sert ensuite de matrice pour un second PCR qui permet l'ajout de séquences de recombinaison homologue pour le promoteur ADH et pour le fragment hRluc. L'insert zipper-linker, ayant de part et d'autre les séquences de recombinaison homologue, est utilisé pour la recombinaison homologue. **B)** Vecteurs finaux obtenus suite à la recombinaison homologue de zipper-linker dans p413ADH-hRluc1-hph et p416ADH-hRluc2-sat. Pour les constructions avec ras et raf, celles-ci remplacent zipper dans les vecteurs p413ADH-hRluc1-hph et p416ADH-hRluc2-sat respectivement.

A)



B)



Les cellules ont ensuite été centrifugées quelques secondes et resuspendues dans 50µl d'eau. Dix µl de chaque accouplement ont alors été étalés sur milieu solide YPD_{agar} contenant 250µg/ml hygromycine B et 100µg/ml nourseothricine et incubées à 30°C pendant 48h. L'agencement des cellules haploïdes est présenté dans le tableau V.

Essai de luminescence en milieu liquide

Les levures diploïdes ont été inoculées dans du milieu liquide SD-HIS-URA-MET-LYS + 2% glucose et incubées à 30°C jusqu'à ce qu'elles atteignent une concentration de 10^6 cellules/ml (DO=1). Les cellules ont ensuite été lavées à deux reprises avec du PBS et resuspendues dans du SD pour obtenir une DO de 1. Quarante-vingt-dix µl de cellules ont été transférées dans une plaque Microfluor® 2 White 96 puits (DYNEZ Technologies, Chantilly, VA) et 10 µl de coenlenterazine 0,1mM (Biotium, Hayward, CA) a été ajouté par injection. La luminescence a été enregistrée immédiatement et ce, pendant 30 secondes avec le luminomètre Lmax II³⁸⁰ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Chaque échantillon a été lu en triplicata.

Tableau V: Accouplement des deux types sexuels de la levure (mat a et mat α) pour avoir des cellules diploïdes contenant **A)** les deux fragments de hRluc, **B)** un seul fragment de hRluc, **C)** la hRluc pleine longueur et **D)** aucun fragment de la hRluc. Les vecteurs p413ADH-hph contenant les différentes constructions avec les fragments 1 de hRluc sont dans mat a et les vecteurs p416ADH-sat contenant les différentes constructions avec les fragments 2 de hRluc sont dans mat α .

	mat a	mat α
A)	p413ADH-Zipper-L-hRluc_1b-hph	p416ADH-Zipper-L-hRluc_2b-hph
	p413ADH-Zipper-L-hRluc_1d-hph	p416ADH-Zipper-L-hRluc_2d-hph
	p413ADH-Zipper-L-hRluc_1h-hph	p416ADH-Zipper-L-hRluc_2h-hph
	p413ADH-Zipper-L-hRluc_1q-hph	p416ADH-Zipper-L-hRluc_2q-hph
	p413ADH-Zipper-L-hRluc_1r-hph	p416ADH-Zipper-L-hRluc_2r-hph
	p413ADH-Zipper-L-hRluc_1v-hph	p416ADH-Zipper-L-hRluc_2v-hph
B)	p413ADH-Ras-L-hRluc_1b-hph	p416ADH-Raf-L-hRluc_2b-hph
	p413ADH-Zipper-L-hRluc1b-hph	p416ADH-sat
	p413ADH-Ras-L-hRluc_1b-hph	p416ADH-sat
	p413ADH-hph	p416ADH-Zipper-L-hRluc_2b-hph
C)	p413ADH-Zipper-L-hRluc_PL-hph	p416ADH-Raf-L-hRluc_2b-hph
	p413ADH-hph	p416ADH-sat
D)	p413ADH-hph	p416ADH-Zipper-L-hRluc_PL-hph
	p413ADH-hph	p416ADH-sat

Extraction de protéines et immunobuvardage

Pour extraire les protéines de levure, un protocole de lyse enzymatique a été utilisé (51). Une culture de 1ml de levure a été lavé avec du PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) froid et le culot a été resuspendu dans du tampon de stabilisation A (1M sorbitol, 10mM MgCl₂, 2mM DTT, 50mM phosphate de potassium pH7,8, 100 µg/ml PMSF). Les échantillons ont été incubés pendant 10min à 30°C. Ils ont ensuite été centrifugés à 10000rpm pendant 1min. Les culots ont ensuite été resuspendus dans le tampon de stabilisation B (1M sorbitol, 10mM MgCl₂, 2mM DTT, 25mM phosphate de potassium pH7,8, 25mM succinate de sodium pH5,5, 100 µg/ml PMSF) et incubés 2min à 30°C. Vingt unités de lyticase (Sigma, Oakville, Ontario) ont été ajoutés et la suspension a été incubée à 30°C pendant 1h. Les protoplastes ont ensuite été récupérés et resuspendus dans un tampon de lyse (50mM HEPES, 1% NP-40) contenant des inhibiteurs de protéases (100 µg/ml PMSF, 2µg/ml leupeptine, 1 µg/ml pepstatine, 0,5mM EDTA, 3mg/ml 1,10 phenanthroline). Ils ont été incubés sur glace pendant 30min. Le culot et le surnageant ont ensuite été séparés et congelés à -80°C.

Les protéines ont été dosées avec le « DC Protein Assay » (Bio-Rad, Hercules, CA) et 30 µg de protéines de chacun des échantillons a été chargés sur un gel de polyacrylamide 12%, 0,1% SDS. La migration a eu lieu à 60V pendant 1h et à 120V pour les 2h30 suivantes. Après la migration, les protéines ont été transférées sur membrane PVDF pendant 1h30 à 90mA. La membrane a ensuite été incubée toute la nuit dans une solution de blocage composé de TBS (50mM Tris pH7,5, 150mM NaCl) contenant 5% lait. La solution de TBS 5% lait a été remplacée par une solution de TBS 5% lait contenant une dilution de 1/5000 de l'anticorps monoclonal primaire dirigé contre la hRluc (MAB4410 (fragment 1) ou MAB4400 (fragment 2)) (Chemicon, Temecula, California)). La membrane a été incubée pendant 1h avec agitation à température de la pièce. Elle a ensuite été lavée avec du TBS pour 3 périodes de 10min et incubée dans une solution de TBS 5% lait contenant une dilution de 1/5000 d'un anticorps

secondaire chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (M15345) (BD Biosciences, San Jose, CA) pendant 1h avec agitation et à la température de la pièce. La membrane a ensuite été lavée avec du TBS pendant 3 périodes de 10min, égouttée et la solution de révélation (PerkinElmer, Boston, MA) a été déposée sur la membrane pour 1min. La membrane a ensuite été asséchée et une photo a été prise.

Recombinaison homologue des fragments de hRluc dans le génome de *S. cerevisiae*

Les constructions linker-hRluc_f1b-Terminateur_CYC1-hph et linker-hRluc_f2b-Terminateur_CYC1-sat ont été amplifiées par PCR pour ajouter les séquences de recombinaison homologue pour chacun des gènes cibles. Le mélange réactionnel de la réaction PCR était composé de tampon Accuprime 1X (Invitrogen, Burlington, Ontario), 10ng du vecteur p413ADH-zipper-linker-hRluc_f1b-hph ou p416ADH-zipper-linker-hRluc_f2b-sat, 0,2 μ M de l'amorce 5' dont les 40 premiers nucléotides sont homologues au 40 nucléotides avant le codon d'arrêt des gènes ciblés et les 21 derniers au linker, 0,2 μ M de l'amorce 3' dont les 40 premiers nucléotides sont homologues aux 40 nucléotides après le codon d'arrêt des gènes ciblés et les 24 autres à la fin du terminateur de la cassette de résistance et 1u de pfx Accuprime (Invitrogen, Burlington, Ontario) (*voir tableau VIA et VII pour les oligos*). Les conditions de la réaction étaient les suivantes : 5min à 95°C pour la séparation initiale des brins, suivit de 5 cycles (30sec à 95°C pour la séparation des brins, 30sec à 58°C pour l'appariement et 2min à 68°C pour l'élongation) 30 cycles (30sec à 95°C pour la séparation des brins, 30sec à 65°C pour l'appariement et 2min à 68°C pour l'élongation) et 10min à 68°C pour l'élongation finale. Les réactions ont été réalisées avec l'appareil Tpersonal (Biometra, Goettingen, Allemagne). Les produits PCR ont été chargés sur un gel d'agarose 1% contenant 2ng/ml d'EtBr et les bandes qui se situaient à la bonne hauteur ont été extraites et purifiées à l'aide du système de billes QIAEX (QIAGEN, Mississauga, Ontario).

Tableau VI : **A)** Amorces utilisées pour ajouter de part et d'autre des cassettes linker-hRluc1_110-CYC1-hph et linker-hRluc2_110-CYC1-sat les séquences de recombinaison homologue pour CDC24 et BEM1. Les 40 premiers correspondent aux séquences de recombinaison homologues pour chacun des gènes et 24 derniers nucléotides sont spécifiques aux cassettes. **B)** Amorces utilisées pour vérifier l'incorporation des cassettes linker-hRluc1_110-CYC1-hph et linker-hRluc2_110-CYC1-sat en aval de CDC24 et BEM1 dans le génome de mat a et mat α respectivement.

NOM	Séquence	Produit PCR
A) 5' RH_CDC24_linker	5' -GGCGGAAAACAATGAGAAATTCCTTGAACATTCGGTCTGTATggtggcgggtggctctggaggtggtg-3'	269
5' RH_BEM1_linker	5' -CATAATCCAAGCCAAACTGAAAATTCGTTACGATATTggtggcgggtggctctggaggtggtg-3'	
3' hph_RH_CDC24	5' -CTTGAATTATTAGTATTTGCTGTATACTAGTTTTAATTTAGagctcgttttggacactggatggc-3'	
3' sat_RH_BEM1	5' -CAAGTAAAGAAGAAAATGCTTCGTCCTTAACTAGATcagtatagcgaccagcattcacata-3'	
B) 3' diag_CDC24	5' -TCCTTACTTCCTCTAGTCAC-3'	169
3' diag_BEM1	5' -GGAGAACTTTATTACTCTCGC-3'	

Tableau VII : Amorces utilisées pour ajouter de part et d'autre des cassettes linker-hRluc1_110-CYC1-hph et linker-hRluc2_110-CYC1-sat les séquences de recombinaison homologue pour les 17 gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques. Les 40 premiers nucléotides correspondent aux séquences de recombinaison homologues pour chacun des gènes et les 25 derniers sont spécifiques aux cassettes. **A)** Amorces sens pour les deux cassettes, **B)** Amorces anti-sens pour la cassette linker-hRluc1_110-CYC1-hph et **C)** amorce anti-sens pour la cassette linker-hRluc2_110-CYC1-sat.

Nom	Séquence
A) 5' RH_YGR254W_linker	TGTTTTCGCTGGTAAAACTTCCACCACGGTGACAAATTAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YHR174W_linker	TGTCTACGCCGGTAAAACTTCCACCACGGTGACAAAGTTGGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YMR323W_linker	TATATATGCTGGTCATAGGTTTCATGATGGAACAAACTAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YBR249C_linker	GGCTGCTGCTGTCAGACAAAGAGAGAAAGTTAACAAGAAAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YDR035W_linker	GGCAGAAAGGTGTAGAAACAGAAAGAGGCCTTGAAGAAAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YDR157W_linker	GGGCCCTTCAAGGCCATTTTTGATGCCGTTACGAAAGAGGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YGL148W_linker	GATCCAAAAGGCAAGAGATTTCTCCAGATCCGTGGTTCATGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YPR060C_linker	GGAAGTTGAGGTGGAATACTTGCTAAGAAGGTGGAAAGAGGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YBR166C_linker	TCATTCATAGTGACCGTTCGGCCGCTGAAAAAAGAAATACAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YNL316C_linker	GTGGGGTACATTTCCCGAAGATGAGAGATATTATCACAAAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YHR137W_linker	CGGTAGTGGCATAAAGAAATTTTTGACAACATATAAAGTGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YGL202W_linker	ATTAGGTGATACTTTATACGAAGAATTTGGTATTTCCAAAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YER090W_linker	GCAAGCAGAAGAATGTGGGCCGATATCGTAGGATCAGCTGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YDR354W_linker	ACGTTCCTTAGAACACTTTATAGATAGTGTGAGCTCCTTGGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YDR007W_linker	CTCTAACAAAATAGCAAATTTCTGCAAAAATGCTAAGAAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YKL211C_linker	ATCAACCGATGTGAAGAAGTTCATTCATGAATATGCGAAGGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
5' RH_YGL026C_linker	GATAGGTTGGGATTTGAGATTCGAAGAAGCCCATCTGCCGCGGTGGCGGATCAGGAGGC
B) 3' hph_RH_YGR254W	AAAAACGTGTTTTTTGGACTAGAAGGCTTAATCAAAGCTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YHR174W	AATAAGCAGAAAAGACTAATAATCTTAGTTAAAAGCACTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YMR323W	TAAAAAACAAAAAAGAAAGCAAGACAATCCTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YBR249C	GAGGAAAGAATGTACGTTACATATATCATTAATAAACATTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YDR035W	TATCATTCAAGATTATTTGCATTTTTCCCTCATTTACAGGTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YDR157W	AAGCATTGTAAAATATAAAAAGGATAGATATATTATTGTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YGL148W	TATAAATATACATAACTCTTGAGGGGTTTTGTTTCTATCTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YPR060C	ACTCGGCAATGTGGAATTTGTTACCGTGATAGCCTTCATGCTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YBR166C	AAAGAAGGCCTAATATTATAGGAAATCAGCATTAAAAACATTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YNL316C	GAGATTTTAGGATACATAAATAAAGACTATATAACATATTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YHR137W	ATATGATATGCAAATAACACATAGGTTTAATCTTCACTGTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YGL202W	TTTTTCACCTTATATATATCTTCCAACGTATTTACCTCTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YER090W	AAAATGTCGTCTAAGGGGAAAAAACAGAGAATGCCCTTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YDR354W	ACGTCTCTATCTAGTTTAAAGTATAACATATGAAATAATGTTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YDR007W	TGCACAAACAATACTTAATAAATACTACTCAGTAATAACTTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YKL211C	ACGTTAAGTTTTTTCCCTATTTGTACCGTGAAGTTTCAATTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
3' hph_RH_YGL026C	AAAAAGCTAAATAAAGCGTTCCTTATCAGATATTACTCATTCGACACTGGATGGCGCGGTTAG
C) 3' sat_RH_YGR254W	AAAAACGTGTTTTTTGGACTAGAAGGCTTAATCAAAGCTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YHR174W	AATAAGCAGAAAAGACTAATAATCTTAGTTAAAAGCACTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YMR323W	TAAAAAACAAAAAAGAAACAGACAATCCTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YBR249C	GAGGAAAGAATGTACGTTACATATATCATTAATAAACATCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YDR035W	TATCATTCAAGATTATTTGCATTTTTCCCTCATTTACAGGCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YDR127W	AAGCATTGTAAAATATAAAAAGGATAGATATATTATTGTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YGL148W	TATAAATATACATAACTCTTGAGGGGTTTTGTTTCTATCTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YPR060C	ACTCGGCAATGTGGAATTTGTTACCGTGATAGCCTTCATGCCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YBR166C	AAAGAAGGCCTAATATTATAGGAAATCAGCATTAAAAACAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YNL316C	GAGATTTTAGGATACATAAATAAAGACTATATAACATACAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YHR137W	ATATGATATGCAAATAACACATAGGTTTAATCTTCACTGTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YGL202W	TTTTTCACCTTATATATATCTTCCAACGTATTTACCTCTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YER090W	AAAATGTCGTCTAAGGGGAAAAAACAGAGAATGCCCTTTTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YDR354W	ACGTCTCTATCTAGTTTAAAGTATAACATATGAAATAATGTCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YDR007W	TGCACAAACAATACTTAATAAATACTACTCAGTAATAACCAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YKL211C	ACGTTAAGTTTTTTCCCTATTTGTACCGTGAAGTTTCAACAGTATAGCGACCAGCATTACAT
3' sat_RH_YGL026C	AAAAAGCTAAATAAAGCGTTCCTTATCAGATATTACTCACAGTATAGCGACCAGCATTACAT

Le protocole de levures compétentes provient de Knob et al. (52). À 10 μ l de cellules compétentes ont été ajoutées 1 μ g de produit PCR obtenu précédemment et 72 μ l de solution PLATE (40%PEG, 100mM LiOAc, 10mM Tris pH7.5, 0.4mM EDTA). Les échantillons ont été incubés à 30°C pendant 30min, 9 μ l de DMSO ont été ajoutés et cela a été suivi d'un choc thermique de 15min à 42°C. Les cellules ont été centrifugées à 2000rpm pendant 3min, les culots resuspendus dans 140 μ l de YPD et incubés à 30°C pendant 4h. Vingt μ l de chacun de ces échantillons ont été inoculés dans 1ml de YPD contenant 250 μ g/ml (mat a) ou 100 μ g de nourseothricine (mat α) et incubés à 30°C pendant 18h. Cinq μ l de chacune de ces cultures ont été étalés sur YPD_{agar} contenant 250 μ g/ml d'hygromycine B (mat a) ou 100 μ g de nourseothricine (mat α) et incubés à 30°C pendant 48h. La stratégie de recombinaison homologue dans le génome est présentée à la figure 8.

Les colonies obtenues ont été diagnostiquées par PCR. Pour ce faire, une partie de chaque colonie a été transférée dans un tube contenant 20 μ l d'eau et incubées à 95°C pendant 15min. Pour préparer la réaction de PCR, 2 μ l de la suspension cellulaire a été utilisé, tampon Thermopol (NEB, Beverley, MA), 0,4 μ M de 5'Tef_term, 0,4 μ M de 3'diag (spécifique pour chaque gène cible (*voir tableau VIB et VIII*)), 0,2mM dNTPs (Fermentas, Hanover, MD), et 2,5 unités de Taq polymérase (NEB, Beverley, MA). Les conditions de la réaction étaient 5min à 95°C pour la séparation des brins, suivi de 35 cycles de 30sec à 95°C pour la séparation, 30sec à 55°C pour l'appariement et 1min30 à 68°C pour l'élongation, et, pour terminer, 10min à 68°C pour l'élongation finale. Les produits PCR ont été chargés sur un gel d'agarose 1,5% contenant 2ng/ml d'EtBr.

Pour chaque gène étiqueté, une colonie positive a été isolée. Nous avons utilisé ces colonies positives isolées pour effectuer l'accouplement entre CDC24 et BEM1 étiquetés et les 289 possibilités d'accouplement entre les gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques. Une proportion 1 :1 de cellules mat a : mat α ont été inoculées dans 1ml de YPD.

Figure 8 : Représentation schématique de la recombinaison homologue dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae*. Tout d'abord, un premier PCR est effectué pour extraire les constructions linker-hRluc(1 ou 2)-CYC1-(hph ou sat) et ajouter les séquences de recombinaison homologue. Les produits PCR sont purifiés et utilisés pour la recombinaison homologue dans le génome.

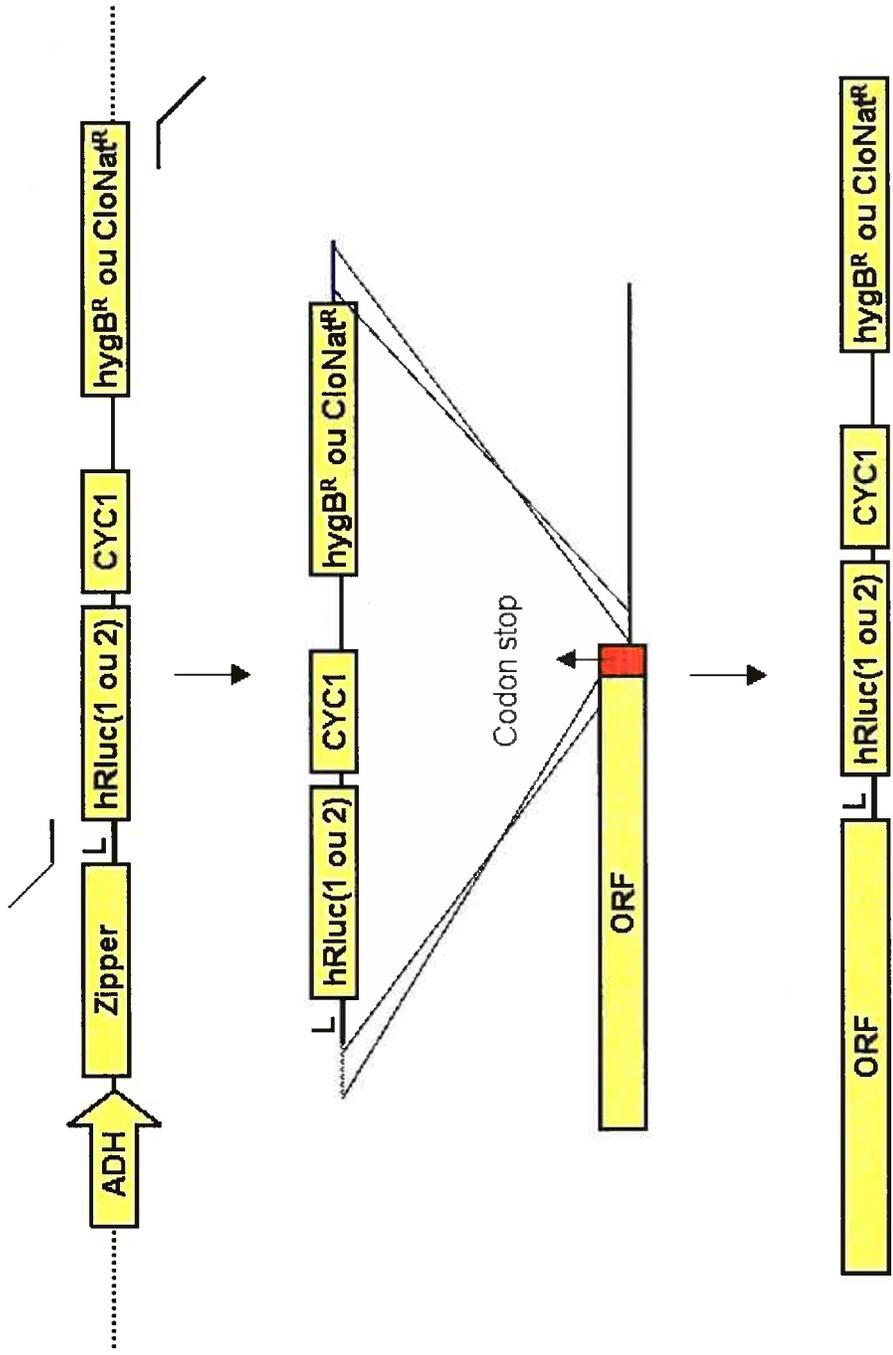


Tableau VIII : Amorces utilisées pour vérifier l'incorporation des cassettes linker-hRluc1_110-CYC1-hph et linker-hRluc2_110-CYC1-sat dans le génome de mat a et mat α respectivement.

Nom	Séquence (5'→3')	Produit PCR	
		hph	sat
3' diag_YGR254W	GCAGCACATACGACACATC	700	660
3' diag_YHR174W	AAGCCACGCGTGTGCACC	300	260
3' diag_YMR323W	CGCCTAGTGGATTCGCTG	771	731
3' diag_YBR249C	CGTGAACGACCGGCATTC	533	493
3' diag_YDR035W	GAATGATGACACTGGCGCC	542	502
3' diag_YDR127W	AGACCTTGCCGACTGGCC	539	499
3' diag_YGL148W	ATGAGATACGTCTACGCGC	633	593
3' diag_YPR060C	GCATTGTCTGGCACTGCC	533	493
3' diag_YBR166C	GCGGTAGTGAGCATTACAC	294	254
3' diag_YNL316C	CGCCACCACCAGCTACAC	289	249
3' diag_YHR137W	CTCCATGGCACAGGCATC	509	469
3' diag_YGL202W	CGTCCAGGTACAAGCGAG	771	731
3' diag_YER090W	CCGCCAAGTACTTCCGTG	527	487
3' diag_YDR354W	TGACCTTGACTAGGCGG	600	560
3' diag_YDR007W	GCGTATGCGCCTGTGAAC	342	302
3' diag_YKL211C	CGTCGATTGTCTTGGCGC	576	536
3' diag_YGL026C	GGCAGATGCCAGGAGAAC	441	401

pour 4h à 30°C avec une agitation à 200rpm. Les cultures ont été lavées avec 1ml d'eau distillée stérile et les cellules ont été suspendues dans 500 µl d'eau distillée stérile. De ces suspensions, 20 µl ont été étalés sur du YPD_{agar} contenant 250 µg/ml d'hygromycine B et 100 µg de nourseothricine, et incubés à 30°C pendant 48h.

Chaque accouplement a été inoculé dans du SD –Met-Lys contenant 250 µg/ml d'hyg B et 100 µg de CloNat et incubé à 30°C pendant 24h pour effectuer une sélection des cellules diploïdes. Ces cellules ont ensuite été transférées dans du SD complet-2% glucose et incubées à 30°C pendant 24h. La densité optique a été prise et du nouveau milieu SD complet-2% glucose a été inoculé avec ces cellules pour avoir une DO de 0,2. Les cellules ont été incubées à 30°C jusqu'à ce que la densité optique du milieu de croissance atteigne 0,6. Elles ont ensuite été lavées à deux reprises avec SD complet-2% glucose et resuspendues à une DO de 1 dans ce même milieu. Quatre-vingt-dix µl de cellules ont été transférées dans chaque puit d'une plaque blanche (DYNEZ Technologies, Chantilly, VA) et 10 µl de coenlenterazine 0,1mM (Biotium, Hayward, CA) a été ajouté par injection à chaque échantillon. Les acquisitions de signal ont été prises immédiatement et pendant 30sec.

Résultats

I-Développement d'un essai PCA avec la Renilla luciférase

Clonage des cassettes de résistance pour l'hygromycine B (hph) dans le vecteur p413ADH et pour la nourseothricine (nat1) dans le vecteur p416ADH

Avant de pouvoir entreprendre les clonages nécessaires à la réalisation d'un essai PCA, il faut préparer les plasmides qui seront utilisés ont été préparés. Les vecteurs p413ADH et p416ADH sont des vecteurs centromériques qui proviennent de la série pRS (53). Ils possèdent un promoteur constitutif ADH, un terminateur Cyc1, une résistance à l'ampicilline, et un marqueur auxotrophique HIS3 pour p413ADH et URA3 pour p416ADH (53). Sur chacun des deux vecteurs, il y a un site de restriction Nsil (ATGCA/T) qui se situe entre le terminateur et le marqueur auxotrophique. Ce site a été utilisé pour linéariser les vecteurs afin de favoriser la recombinaison homologue. Les séquences de recombinaison homologue qui ont été ajoutées de part et d'autre des cassettes de résistance à l'hygromycine B et à la nourseothricine correspondent aux séquences qui se trouvent de part et d'autre du site de coupure. De plus, un site Nsil a été ajouté au début et à la fin de la cassette de résistance permettant ainsi d'identifier les clones positifs par digestion. Un PCR diagnostique a été réalisé et les clones qui étaient positifs selon la digestion et le PCR diagnostique ont été envoyés au séquençage pour s'assurer qu'aucune mutation ne s'était introduite dans les cassettes de résistance.

Modélisation de la structure de la Renilla luciférase

Pour développer un PCA, il faut, dans un premier temps, diviser l'enzyme qu'on veut utiliser en deux parties. On ne peut cependant pas diviser l'enzyme n'importe où puisqu'il faut que la coupure affecte le moins possible le repliement de la protéine. Dans cette optique, il faut connaître la structure de l'enzyme pour minimiser les effets de la scission. La modélisation par homologie a été utilisée pour prédire la structure tertiaire de la Renilla luciférase. Pour commencer, la

séquence en acides aminés de la Renilla luciférase a été comparée à une base de données ExNRL contenant 34009 séquences pour déterminer s'il y avait des protéines avec lesquelles elle avait un pourcentage d'identité élevé. Nous avons alors obtenu une valeur de 40% d'identité pour le meilleur alignement.

La modélisation par homologie a été réalisée grâce à Modeller (28,29,30). Ce système permet de modéliser une structure de protéine en trois dimensions à partir de la séquence ou de la structure secondaire (28,29,30) Modeller effectue donc une comparaison de la séquence fournie avec celles dont la structure est connue (28,29,30). La prédiction de la structure secondaire de la Renilla luciférase a été réalisée avec PHD (31) qui a permis de situer les hélices α et les feuillets β dans la séquence de la Renilla luciférase. Cette structure a ensuite été fournie à Modeller pour effectuer une comparaison contre une base de données de structures secondaires. Modeller calcule alors un modèle de structure secondaire auquel il va appliquer des restrictions spatiales, ajouter des boucles et optimiser la structure tertiaire (28,29,30). Le résultat de l'alignement obtenu avec Modeller est présenté à la figure 9. Les trois séquences ayant la probabilité (z-score) la plus élevée sont représentées. Deux des enzymes, à lesquelles correspondent les alignements, proviennent de *Shangomonas paucimibilis* (1CV2A et 1G5FA) tandis que la troisième (1BN7A) provient d'une espèce *Rhodococcus*. Les différentes couleurs servent à mettre en évidence les régions identiques entre la séquence protéique de la Renilla luciférase et celle des autres enzymes.

Le premier résultat obtenu, qui présentait le meilleur alignement, est montré à la figure 10. Il a lieu entre la Renilla luciférase et 1EDE, une haloalcane dehalogenase qui provient de *Xanthobacter autotrophicus*. Le degré d'homologie est présenté par un trait, un double-point ou un point simple selon qu'il s'agisse d'une forte, moyenne ou faible homologie, et ce, basé sur la séquence en acides aminés et sur la structure secondaire.

Figure 9 : Représentation schématique d'un alignement de séquences protéiques obtenu avec Modeller (28, 29, 30). Les différentes couleurs servent à mettre en évidence les régions identiques entre la séquence protéique de Renilla luciférase et celle des autres enzymes. Rluc: Renilla luciférase de *Renilla reniformis*; 1CV2A: Hydrolytic haloalkane dehalogenase linb de *Sphangomonas paucimibilis*; 1G5FA: 1,3,4,6-Tetrachloro-1,4-cyclohexadiene hydrolase chaîne A de *Sphangomonas paucimibilis*; 1BN7A: Haloalkane dehalogenase d'une espèce *Rhodococcus*.

Rluc : 30 MNVLDSEFINNYLSEKHAENA 49
 1CV2A: 29 ----- 29
 1G5FA: 30 ----- 30
 1BN7A: 12 VEVIGERMHVVVGPRDGTG 31

Rluc : 50 VIFLHGNAASSYLWRHVPHIEFVARLIEIDLIXXXXXXXXXXX---YRLLSHYKYLTA 106
 1CV2A: 29 ILFQHGNTSSYLWRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYAYAEHRDYLDA 88
 1G5FA: 30 ILFQHGNTSSYLWRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYAYAEHRDYLDA 89
 1BN7A: 32 VLFHGNTSSYLWRNIIPHVAESHRGIAFDLIGMGKSDKPDLD---YFFDGHVRYLDA 87

Rluc : 107 WFELNLNPKKIIIFVGHWDGACLAFLHYSYEQDKIQAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDI 166
 1CV2A: 89 LW EALDLGDRVVLVVDHWDGSA LGFDWARRRHRERVQGIAYMEAIAMPIE-WADFPEQDRDL 147
 1G5FA: 90 LW EALDLGDRVVLVVDHWDGSA LGFDWARRRHRRVQGIAYMEAIAMPIE-WADFPEQDRDL 148
 1BN7A: 88 FIEALGL-EEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVGIACME-FIRIPTWDEWPEFARET 145

Rluc : 167 --ELIKSEEGEKMLIENNFVETMLPSKIMRKLPEEFAAYLEPFKEKGVRRPTLSWPEE 225
 1CV2A: 148 -FQAFRSQAGEELVLQDNVFEQVLPGLILRPLSEAEMAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPEE 207
 1G5FA: 149 -FQAFRSQAGEELVLQDNVFEQVLPGLILRPLSEAEMAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPEE 208
 1BN7A: 146 FQAFRTADVGRELIIDQNAFIEGVLPKCVVRPLTEVEMDHYREPFLKPVDR-REPLWRFPEE 205

Rluc : 226 IPLVKGGKPDVQIYNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFF--SNA-IVEGKKFPNTEFKM 284
 1CV2A: 208 IP-IAGTPADVVAIAADYAGWLSSES-PIPKLFINAEPGAL--TTGRMRDFCRTWPNQTEITV 265
 1G5FA: 209 IP-IAGTPADVVAIAADYAGWLSSES-PIPKLFINAEPGAL--TTGRMRDFCRTWPNQTEITV 266
 1BN7A: 206 IP-IAGEPANIVALAEAYMNWLHQSS-PVPKLLFWGTPGVLIPPAAE-AARLESPLNCKTVDI 264

Rluc : 285 -KGLHFSQEDAPDEMCKYIKSTVEIV 309
 1CV2A: 266 -AGAHFIQEDSPDEIGAAIAAFVRL 290
 1G5FA: 267 -AGAHFIQEDSPDEIGAAIAAFV 288
 1BN7A: 265 GPGHYLQEDNPD LIGSEI 283

Figure 10 : Représentation d'un alignement de structure secondaire entre le Renilla luciférase et 1EDE, une haloalcane dehalogenase de *Xanthobacter autotrophicus*. Seq: séquence de Renilla luciférase; phd: prédiction de la structure secondaire de la Renilla luciférase; pdb: séquence de 1EDE; dssp: structure secondaire de 1EDE.

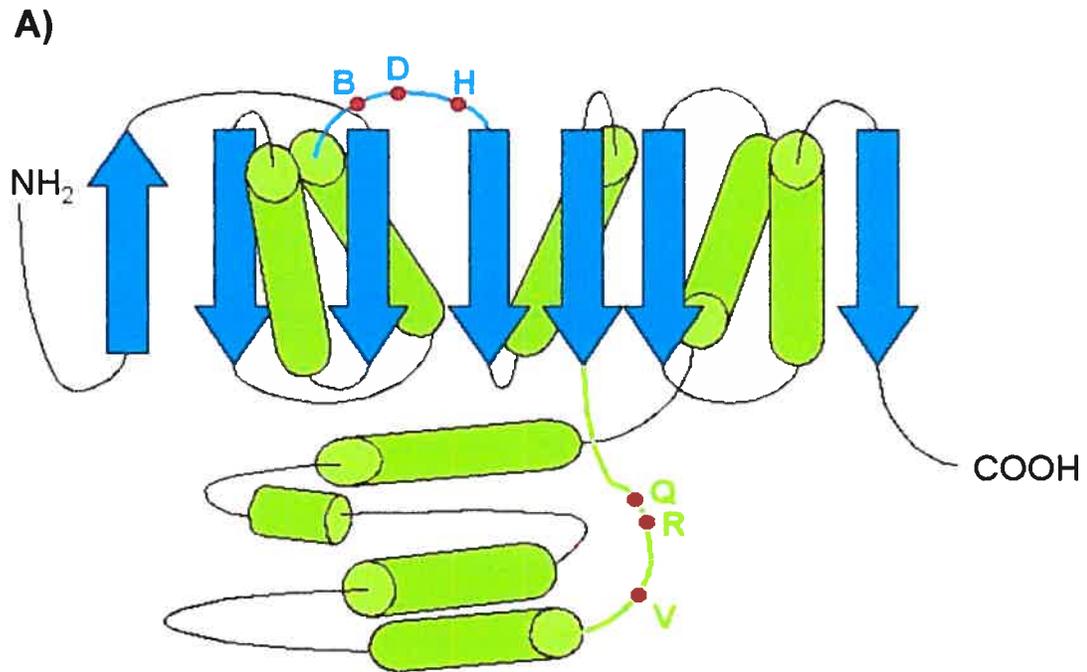
Clonage des fragments de la Renilla luciférase et de sa forme pleine longueur dans les vecteurs p413ADH-hph et p416ADH-sat.

Grâce à la structure modélisée de la Renilla luciférase que nous avons élaborée, nous avons pu déterminer des régions propices pour séparer l'enzyme. Nous avons choisi deux boucles extérieures qui se situent entre les acides aminés 109 et 120 pour la première et entre les acides aminés 155 et 169 pour la seconde. Il y avait donc une possibilité de 27 sites de coupures. Parmi ceux-ci, 6 ont été choisis: L110, K112, F116, I159, E160 et A164 soit trois dans la première boucle et trois dans la seconde (Figure 11).

Pour identifier les sites de coupures qui permettraient la reconstitution de l'activité enzymatique de la Renilla luciférase, il faut utiliser des protéines qui interagissent fortement entre elles. Nous avons choisi d'utiliser l'interaction entre la protéine GCN4 (zippers de leucine homodimères). Cependant, lors du développement d'une stratégie d'identification des interactions protéine-protéine, il faut s'assurer que le signal observé provient de l'interaction spécifique entre les zippers et non causé par la reconstitution spontanée des fragments de l'enzyme. Pour ce faire, des contrôles positifs et négatifs doivent être effectués (Figure 12). Pour réaliser ces contrôles, nous avons utilisé deux paires d'interactions connues. Tout d'abord, le zipper de leucine de la protéine GCN4 a été utilisé pour développer l'essai PCA. Par la suite, nous avons vérifié avec la paire de protéines Ras (résidus 1-166) et Raf(RBD) (« Ras Binding Domain of Raf », résidus 55-186) si l'essai fonctionnait toujours. Par la suite nous avons interchangé les paires de protéines interagissantes pour s'assurer que l'interaction était perdue.

Les constructions p413ADH-zipper-linker-hRluc1_(x)-hph, p413ADH-ras-linker-hRluc1_(x)-hph, p413ADH-zipper-linker-hRluc-hph, p416ADH-zipper-linker-hRluc2_(x)-sat, p416ADH-raf-linker-hRluc2_(x)-sat et p416ADH-zipper-linker-hRluc-sat ont alors été réalisées.

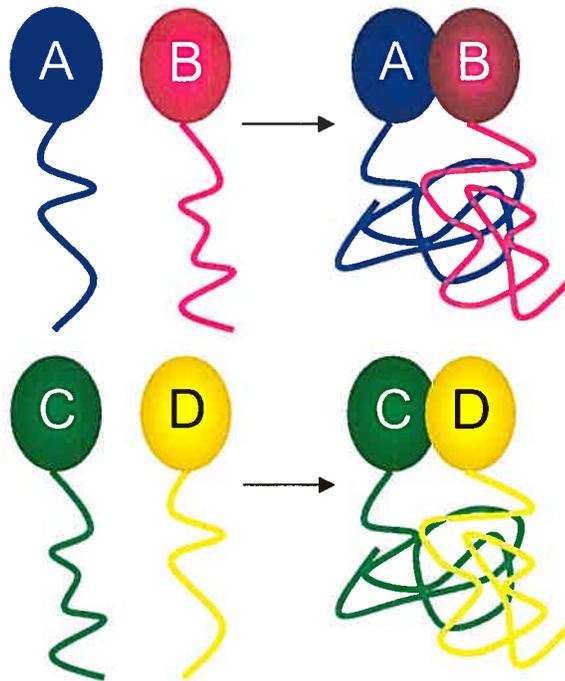
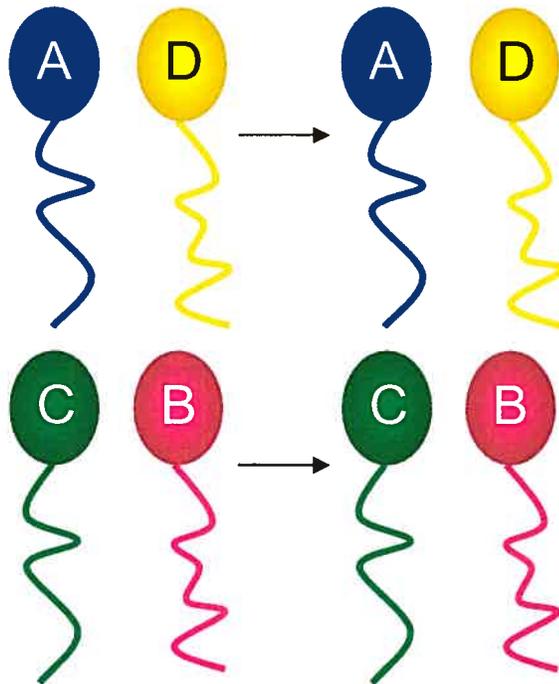
Figure 11 : Représentation schématique des sites de coupures choisis sur la *Renilla luciférase*. **A)** Un modèle simplifié permet de localiser les deux boucles ciblées pour les sites de coupure. **B)** Les flèches indiquent les sites de coupure dans la séquence en acides aminés. **B**→L110, **D**→K112, **H**→F116, **Q**→I159, **R**→E160 et **V**→A164



B)

MASKVYDPEQRKRMITGPQWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAV
 IFLHGNAASSYLWRHVVPPIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRL
 LDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFVGHDWGACLAFHYSYEHQDKIKAIV
 HAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEKGMVLENNFFVETMLPS
 KIMRKLPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVQ
 VRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKG
 LHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQ

Figure 12 : Représentation schématique des contrôles positifs et négatifs. **A)** Deux paires de protéines qui sont connues pour leur interaction sont choisies comme contrôle positif. Donc, lors de l'interaction, il y a reconstitution de l'activité enzymatique et émission de signal. **B)** Par contre, si on effectue des croisements entre ces deux paires de protéines, il n'y aura pas de signal puisque les nouvelles paires de protéines n'interagissent pas entre elles.

A) Contrôle positif**B) Contrôle négatif**

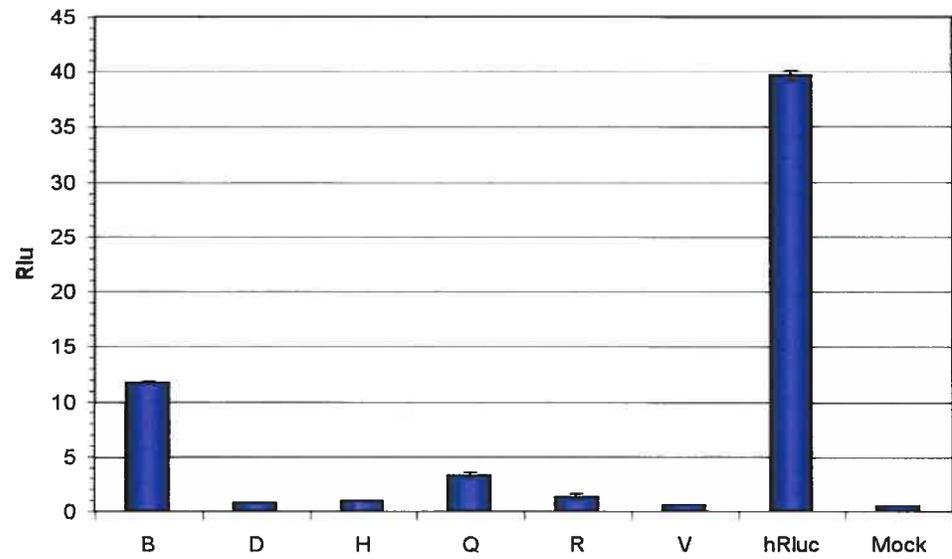
Essai PCA avec les différentes paires de fragments de la hRluc en milieu liquide

Les vecteurs contenant le fragment 1 et ceux contenant le fragment 2 de la hRluc ont été transformés dans mat a et mat α respectivement. Les cellules mat a et mat α ont été accouplées pour obtenir les fragments 1 et 2 de hRluc désirés dans une même cellule diploïde. Pour réaliser les essais PCA en milieu liquide, des cultures de cellules diploïdes ayant atteint une densité optique de 1 ont été utilisées. Parmi les six sites de coupure utilisés, trois nous ont donnés un signal de luminescence (Figure 13A). Tout d'abord, les signaux de luminescence ont été mesurés lors de l'interaction entre les zipper de leucine de la protéine GCN4 fusionnés à chacun des fragments de la Renilla luciférase. Les sites de coupure B (L110), Q (I159) et R (E160) ont émis 11,7 unités relatives de luminescence (Rlu), 3,3 Rlu et 1,4 Rlu respectivement. Les trois autres sites de coupure, D (K112), H (F116) et V (A164), n'ont pas émis de signal de luminescence et la Renilla luciférase pleine longueur a émis 39,7 Rlu. Le MOCK, qui a été utilisé pour mesurer le bruit de fond, était composé des vecteurs p413ADH-hph et p416ADH-sat ne contenant pas d'insert. Puisque le site de coupure B (L110) a fourni la valeur de Rlu la plus élevée, il a été utilisé pour s'assurer de la spécificité du signal. Le signal de différentes paires d'interactions a été évalué (Figure 13B). Le signal provenant de l'interaction entre les protéines Ras et Raf a été mesuré et nous avons obtenu une valeur de 10,0 Rlu. Les paires de protéines Zipper/Zipper et Ras/Raf ont été interchangées. Aucun signal n'a été détecté en provenance des cellules diploïdes co-exprimant les protéines de fusion Zipper et Raf, tandis qu'un signal de 1,9 Rlu a été observé pour les cellules diploïdes co-exprimant les protéines de fusion Ras et Zipper. Par ailleurs, aucun signal n'a été détecté lorsque chacune des protéines de fusion était exprimée seule.

Les protéines contenues dans les cellules diploïdes qui ont été utilisées pour réaliser les essais PCA ont été extraites. Nous avons chargé sur gel de polyacryamide 12%, 0,1% SDS des extraits protéiques contenant les fragments pour les différentes coupures. Ce sont les mêmes échantillons et dans les mêmes positions qui ont été chargés (Figure 14). Parmi les sites de coupure qui donnaient

Figure 13 : Histogramme de la luminescence obtenue **A)** pour les essais PCA avec les six sites de coupure de la hRluc et **B)** pour le PCA avec la coupure 110 et ses fragments seuls, et pour les contrôles positifs et négatifs avec le PCA coupure 110.

A)



B)

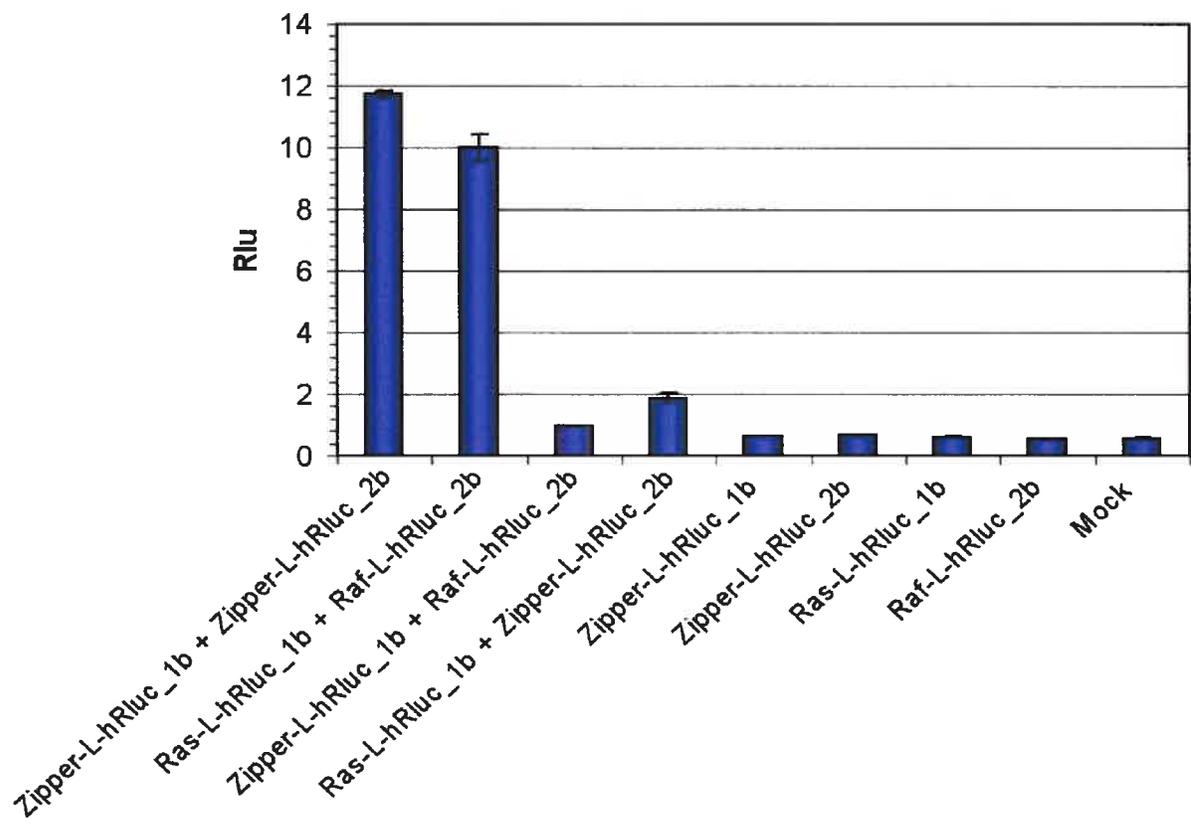
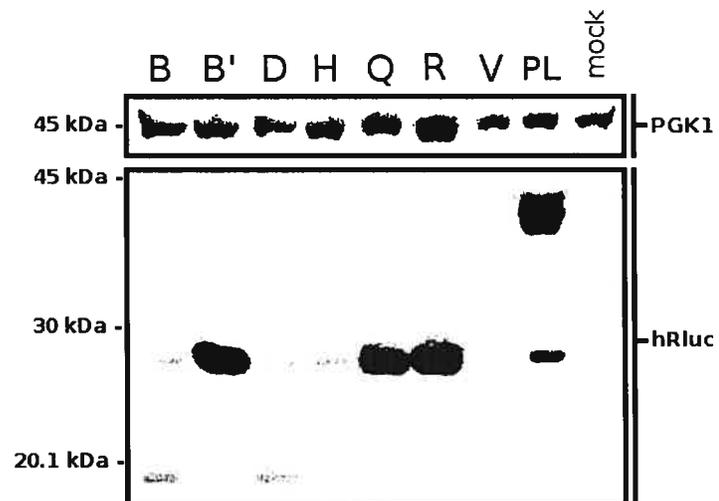
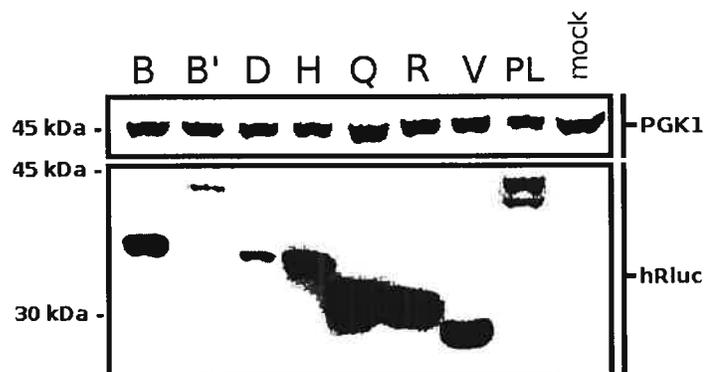


Figure 14 : Expression des protéines de fusion pour chaque site de coupure de l'essai PCA présenté à la figure 11. **A)** Les protéines de fusion ont été révélées à l'aide d'un anticorps dirigé contre le fragment 1 de la Renilla tandis qu'en **B)**, les protéines de fusion ont été révélées à l'aide d'un anticorps dirigé contre le fragment 2 de la Renilla luciférase. Les membranes ont aussi été révélées avec un anticorps dirigé contre PGK1 (45 kDa) pour effectuer un contrôle du chargement des protéines. Les lettres utilisées pour identifier les puits correspondent aux différents sites de coupure de la Renilla luciférase. Tous les fragments de la Renilla luciférase sont fusionnés à zipper-linker sauf pour B' où le hRluc_1b est fusionné à Ras-linker et hRluc_2b à Raf(RBD)-linker.

A) Révélation des fragments 1 de la Renilla luciférase avec l'anticorps MAB4410.



B) Révélation des fragments 2 de la Renilla luciférase avec l'anticorps MAB4400.



un signal de luminescence, seul la fusion Zipper-L-hRluc1_110 montrait une expression plus faible. Malgré l'absence de signal de luminescence en provenance de la coupure D (112), nous observons une expression des fusions Zipper-L-hRluc1_112 et Zipper-L-hRluc2_112. Cependant, aucune expression des fusions Zipper-L-hRluc1_116 et Zipper-L-hRluc1_164 n'a été détectée par immunobuvardage. La fusion Zipper-L-hRluc_PL au poids moléculaire attendu. De plus, aucun signal autre que le non spécifique n'apparaît dans le puits contenant l'extrait protéique des diploïdes n'exprimant pas de fusion.

Pour s'assurer que la même quantité de protéines a été chargée sur gel, les membranes ont été révélées avec un anticorps primaire de souris anti-PGK1. Des bandes d'égale intensité sont apparues à une hauteur de 45kDa pour chacun des échantillons.

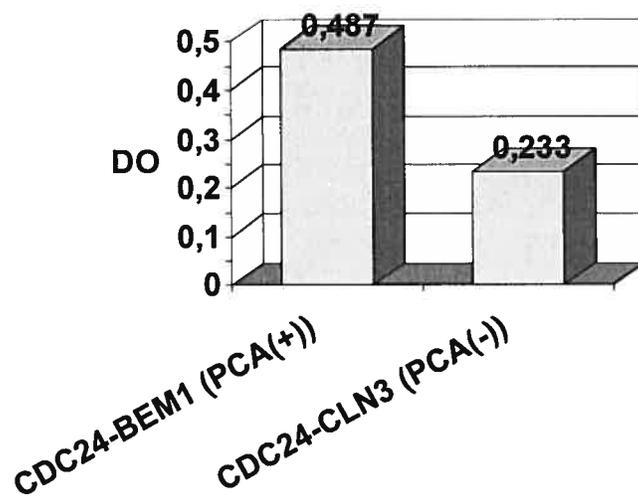
II-Étude de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques avec le PCA Renilla

Validation du PCA Renilla lorsqu'il est étiqueté dans le génome de *S. cerevisiae*

Avant d'étiqueter les gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, il fallait valider le fonctionnement de l'essai PCA lorsque les fragments de la Renilla sont fusionnés à des protéines qui sont sous le contrôle d'un promoteur endogène dans le génome. Pour cela, nous avons choisi l'interaction entre les protéines CDC24 et BEM1. Comme il a été montré par notre laboratoire, cette interaction est détectable lorsque les protéines CDC24 et BEM1 sont étiquetées dans le génome avec les fragments [1,2] et [3] de la dihydrofolate réductase (DHFR). Nous avons donc étiqueté CDC24 et BEM1 avec les fragments 1 et 2 de la Renilla et mesuré le signal de luminescence tel que présenté à la *figure 15*. Nous avons obtenu un signal de $1,73 \pm 0,03$ pour l'interaction entre CDC24 et BEM 1 en comparaison avec $0,138 \pm 0,006$ pour les cellules diploïdes de type sauvage.

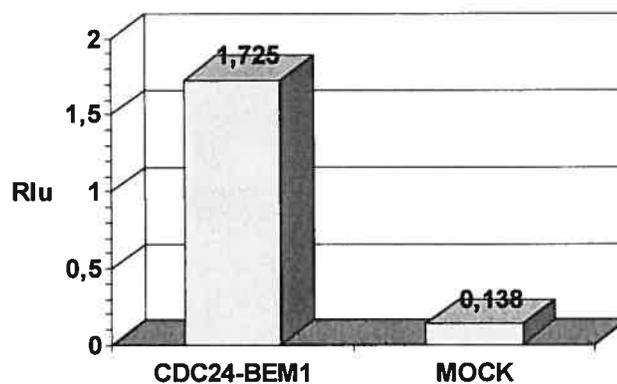
Figure 15 : Interaction entre CDC24 et BEM1 détectée avec le PCA DHFR et le PCA Renilla. **A)** Le contrôle négatif CDC24-CLN3 donne une valeur similaire à celle du MOCK. L'interaction positive avec le PCA DHFR correspond à deux fois la valeur du bruit de fond tandis que **B)** l'interaction positive avec le PCA Renilla correspond à 12,5 fois la valeur du bruit de fond.

A) Interaction entre CDC24 et BEM1 détectée avec le PCA DHFR.



CDC24-BEM1	CDC24-CLN3
0,49 ± 0,04	0,23 ± 0,06

B) Interaction entre CDC24 et BEM1 détectée avec le PCA Renilla.



CDC24-BEM1	MOCK
1,73 ± 0,03	0,138 ± 0,006

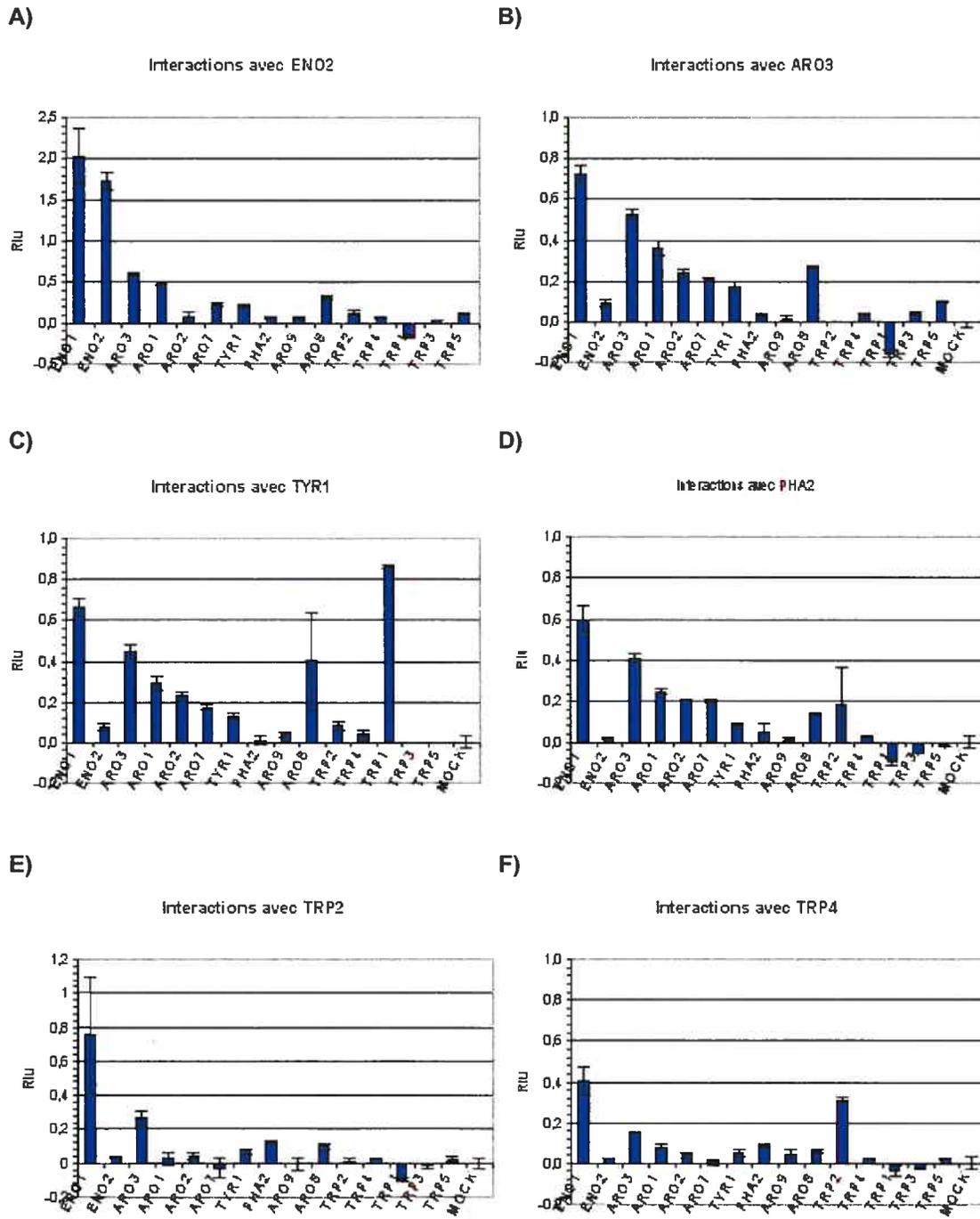
Criblage des interactions de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques de *S. cerevisiae*

En utilisant le PCA Renilla coupure 110, nous avons étiqueté les gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques. Nous avons 15 gènes sur 17 qui sont étiquetés avec hRluc1_110² et 6 gènes sur 17 qui sont étiquetés avec hRluc2_110². Toutes les possibilités d'accouplement ont été réalisées entre eux soit 90 possibilités. Un criblage des interactions a été réalisé sur les 90 échantillons diploïdes. Parmi ceux-ci, plusieurs signaux ont été détectés (Figure 16).

Les signaux obtenus ont été divisés en six graphiques. Ils correspondent aux six protéines fusionnées au fragment 2 de hRluc chacune criblé contre les protéines fusionnées au fragment1 de hRluc. La figure 16A montre les signaux de luminescence observés pour le criblage de ENO2-L-hRluc2. Ce crible a permis d'identifier sept interactions dont les signaux sont de différentes intensités. Les signaux les plus élevés ont été détectés contre ENO1-L-hRluc1 et ENO2-L-hRluc1. D'autres signaux, qualifiés d'intermédiaire ou de faible, en comparaison aux signaux les plus élevés parmi tous ceux observés, ont aussi été identifiés. Il s'agit d'ARO3-L-hRluc1 et ARO1-L-hRluc1 pour les signaux intermédiaires et de ARO7-L-hRluc1, TYR1-L-hRluc1 et ARO8-L-hRluc1 pour les signaux faibles. La figure 16B montre, pour sa part, les signaux de luminescence observés pour le criblage de ARO3-L-hRluc2. Sept interactions ont été détectées avec cette enzyme qui se situe au début de la chaîne de réactions menant à la synthèse du chorismate. Celles-ci se répartissent comme suit : ENO1-L-hRluc1 (signal fort), ARO3-L-hRluc1 (signal intermédiaire), ARO1-L-hRluc1 (signal intermédiaire), ARO2-L-hRluc1 (signal faible), ARO7-L-hRluc1 (signal faible), TYR1-L-hRluc1 (signal faible) et PHA2-L-hRluc1 (signal faible). À la figure 16C, nous observons aussi 7 interactions. Ces interactions, qui impliquent toutes TYR1-L-hRluc2, ont aussi été réparties en trois groupes selon l'intensité du signal de luminescence.

² À partir de ce point, hRluc1_110 et hRluc2_110 seront notés hRluc1 et hRluc2 respectivement.

Figure 16 : Criblage des interactions de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez *S. cerevisiae*. Les résultats obtenus sont présentés de la façon suivante : criblage de protéine fusionnée à hRluc2 contre les différentes protéines de la voie fusionnées à hRluc1. **A)** Interactions avec ENO2, **B)** Interactions avec ARO3, **C)** Interactions avec TYR1, **D)** Interactions avec PHA2, **E)** Interactions avec TRP2, **F)** Interactions avec TRP4.



TYR1-L-hRluc2 a donné un signal fort lors de son interaction avec TRP1-L-hRluc1, un signal intermédiaire lors de son interaction avec ENO1-L-hRluc1, ARO3-L-hRluc1 et ARO8-L-hRluc1, et un signal faible lors de son interaction avec ARO1-L-hRluc1, ARO2-L-hRluc1 et ARO7-L-hRluc1. Par ailleurs, les signaux de luminescence montrés à la figure 16D correspondent au criblage effectué avec PHA2-L-hRluc2, une enzyme impliquée au niveau de biosynthèse de la phénylalanine. Six interactions provenant de signaux intermédiaires (ENO1-L-hRluc1 et ARO3-L-hRluc1) et de signaux faibles (ARO1-L-hRluc1, ARO2-L-hRluc1, ARO7-L-hRluc1 et TRP2-L-hRluc1) ont été identifiées. Finalement, les figures 16E et 16F montrent les signaux obtenus lors des criblages avec TRP2-L-hRluc2 et TRP4-L-hRluc2 respectivement. Pour chacun de ces deux criblages, 2 interactions ont été décelées. Une interaction dont le signal est fort (ENO1-L-hRluc1) et une dont le signal est faible (ARO3-L-hRluc1) pour TRP2-L-hRluc2, et 2 interactions dont le signal est intermédiaire (ENO1-L-hRluc1 et TRP2-L-hRluc1) pour TRP4-L-hRluc2.

Une matrice des interactions et de leur niveau de signal est présenté à la figure 17. Chacune des colonnes de la matrice correspond à une protéine de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques étiquetée avec le L-linker-hRluc1 tandis que chacune des rangées correspond à une protéine de cette même voie étiquetée avec le linker-hRluc2. L'intensité du signal d'une interaction a été déterminée en comparaison avec le signal l'interaction la plus élevée. De cette façon, le gradient va des cases blanches pour les interactions fortes, vers les cases noires pour l'absence d'interaction.

De plus, ces interactions ont été représentées en réseaux (figure 18), où les différentes couleurs utilisées correspondent à celles de la figure 6.

Figure 17 : Matrice des interactions de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez *S. cerevisiae*. Le noir correspond à une absence d'interaction et le blanc aux interactions les plus fortes.

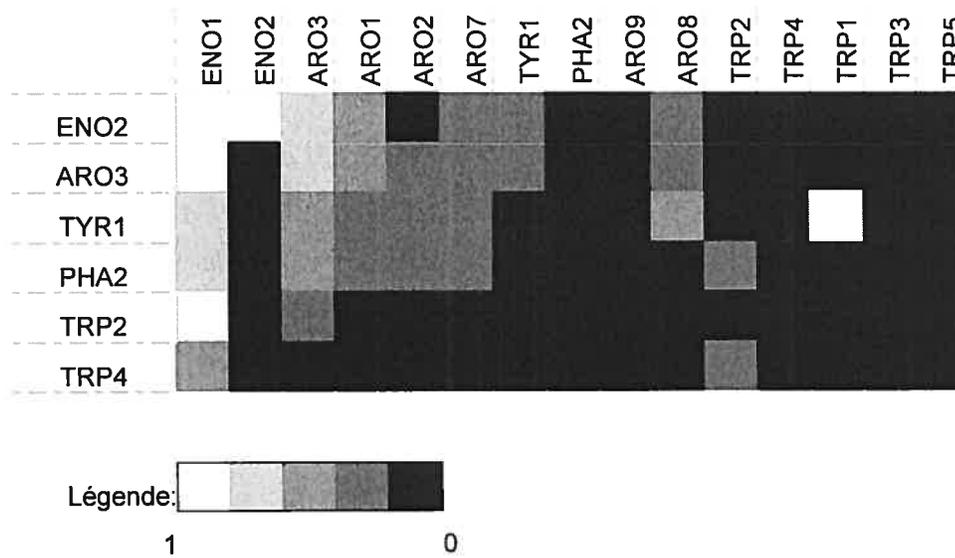
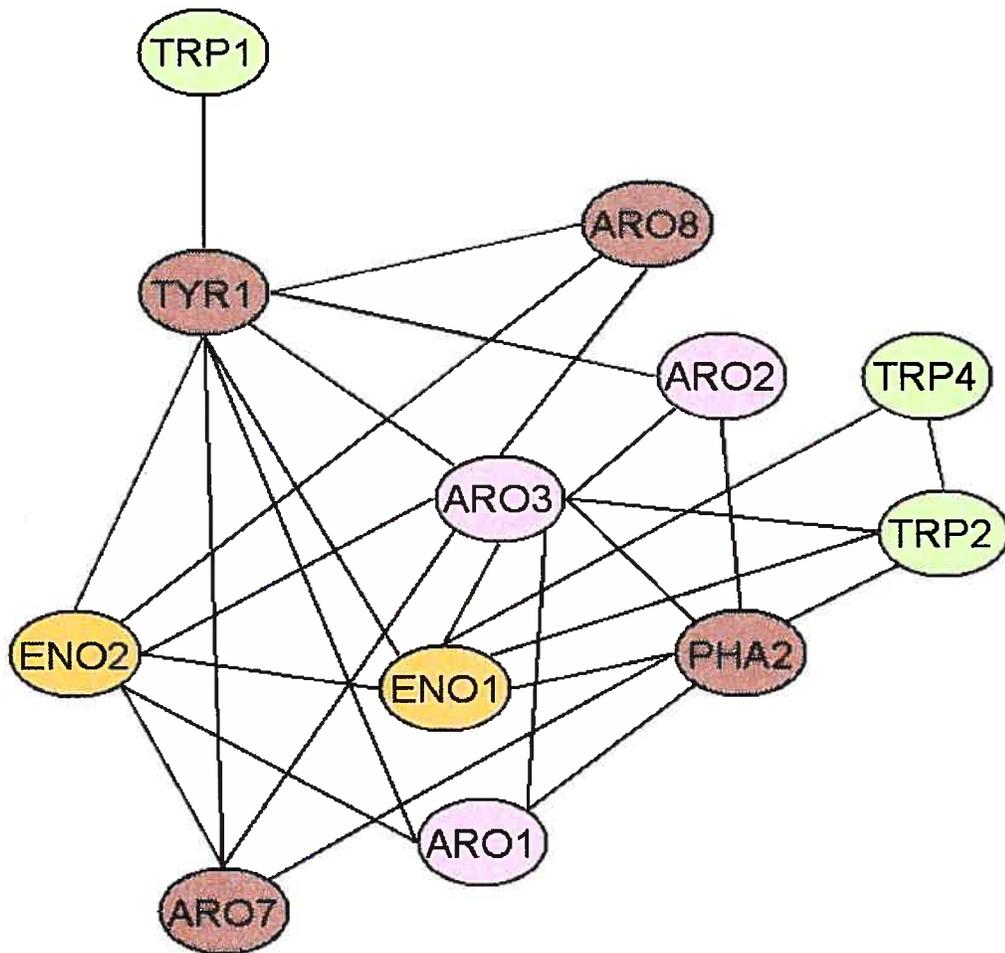


Figure 18 : Réseau des interactions de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez *S. cerevisiae*. Les différentes couleurs font référence à la figure 6 où est représentée la voie de biosynthèse. La formation d'un homodimère avec ENO2 et d'un avec ARO3 ne sont pas montrées dans ce réseau.



Discussion

I-Développement d'un essai PCA avec la Renilla luciférase

L'étude des interactions protéine-protéine *in vivo* nécessite l'utilisation de techniques efficaces et sensibles. Lorsque aucune méthode d'étude ne semble appropriée à notre cas, il devient essentiel de développer une approche favorisant l'atteinte de notre objectif. Dans cette optique, nous avons mis au point un essai de complémentation protéique (PCA), avec la Renilla luciférase de *Renilla reniformis*. Nous avons commencé par réaliser un modèle hypothétique de la Renilla luciférase en utilisant les méthodes de modélisation par homologie et par filetage.

Une fois la structure tertiaire de la Renilla luciférase modélisée, nous l'avons analysée afin d'identifier des régions propices pour séparer l'enzyme en deux parties. Tout d'abord, il fallait identifier les régions où l'on risquait le moins d'affecter l'intégrité de la structure. Les régions qui se trouvent à l'intérieure de la structure tertiaire devaient être évitées puisque cela pouvait affecter les contacts entre les acides aminés qui maintiennent la structure tertiaire. De plus, nous ne voulions pas altérer le site actif. Nous avons donc choisi deux boucles qui se situent à l'extérieure de la structure tertiaire. De cette façon, nous risquions moins d'affecter son repliement. Par la suite, il fallait identifier des sites spécifiques de coupure à l'intérieur de ces boucles. Nous avons identifié une possibilité de 27 sites de coupure à l'intérieur de ces deux boucles et nous avons choisi de prendre trois sites de coupure par boucle. Ces sites de coupure, que nous avons nommés B, D, H, Q, R et V, se situent après les acides aminés L110, K112, F116, I159, E160 et A164 respectivement. Les fragments de hRluc générés ont été fusionnés en 5' au zipper de leucine de la protéine GCN4 et à une séquence charnière de 10 acides aminés. Le choix de la paire de protéines interagissante zipper-zipper a été fait en se basant sur les études antérieures de notre laboratoire. Les zippers de leucine sont des protéines qui interagissent fortement entre elles et qui n'ont pas besoin de

modifications post-traductionnelles pour leur interaction. En ce qui concerne la séquence charnière, nous l'avons choisi d'une longueur de 10 acides aminés puisque à cette longueur, elle permettait une certaine flexibilité entre le zipper et le fragment hRluc sans toutefois permettre le repliement spontané de la Renilla luciférase en absence d'interaction. Pour s'en assurer, nous avons élaboré une stratégie de contrôles positifs et négatifs. Pour ce faire, nous avons choisi une deuxième paire de protéines interagissantes bien connue soit Ras et Raf(RBD). Ces deux paires d'interaction, Zipper-Zipper et Ras-Raf(RBD), ont servi de contrôles positifs. Pour réaliser les contrôles négatifs, nous avons effectué des échanges entre ces deux paires de protéines. Nous avons donc utilisé Ras-Zipper et Zipper-Raf(RBD). De cette façon, nous devons perdre le signal de luminescence. Ce système permet de s'assurer de la spécificité de notre signal puisqu'il démontre qu'il n'y a pas de repliement spontané de l'enzyme en absence d'interaction spécifique.

La mesure des signaux émis lors de l'interaction entre les zipper de leucine de la protéine GCN4 a permis d'identifier trois sites de coupure potentiels. Ces trois sites de coupure ont donné des intensités de signal différentes. Tout d'abord, le site B, qui se situe après L110, a donné le signal le plus intense et qui correspond à 29,6% du signal obtenu avec la Renilla pleine longueur. Les signaux des sites Q et R correspondent respectivement, pour leur part, à 8.4% du signal de hRluc, et 3,3% du signal de la Renilla luciférase native. De plus, ces trois sites de coupure, B, Q et R, se situaient à 20.7X, 5.9X et 2.4X respectivement du bruit de fond des cellules diploïdes contenant le vecteur vide. Lors du développement d'un essai PCA, la valeur attendue pour le signal correspond à 10% du signal de l'enzyme pleine longueur et l'enzyme reconstituée doit aussi émettre un signal au moins dix fois supérieur au bruit de fond. Par ailleurs, lorsqu'il n'y a qu'un seul des deux fragments qui est exprimé, il ne doit pas y avoir de signal détecté. En se basant sur ces critères pour la sélection du site de coupure, il s'est avéré que le site de coupure B (L110) était le meilleur choix. Son signal est élevé, il se démarque du bruit de fond et ses fragments, lorsqu'il sont exprimés seuls, ont un signal au niveau du bruit de

fond. Pour s'assurer que les différentes amplitudes du signal n'étaient pas causés par une variation du niveau d'expression, nous avons effectué des immunobuvardages avec les cellules diploïdes provenant de la même culture que celles ayant servi pour l'essai. De cette façon, nous avons observé que le niveau de protéines de fusion était variable d'un site de coupure à l'autre. Les fragments hRluc1 et hRluc2 des coupures Q et R étaient bien exprimés et se situaient au poids moléculaire attendu. Leur signal de luminescence plus faible n'était donc pas causé par un manque d'expression de leur protéine de fusion respective. Cependant, l'expression des protéines fusionnées aux fragments hRluc_1b et hRluc_2b est plus faible que celle détectée pour les coupures Q et R, et ce, malgré le niveau de signal supérieur en provenance des PCAs utilisant ces fragments. Nous pouvons donc penser que lorsque le site de coupure est adéquat, un faible niveau d'expression est suffisant pour détecter l'interaction entre deux protéines d'intérêt.

II-Étude de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques avec le PCA Renilla

Jusqu'à présent, nous avons montré qu'il est possible d'utiliser le PCA Renilla pour détecter des interactions protéine-protéine en utilisant des vecteurs pour surexprimer les protéines de fusion. Nous avons donc voulu savoir s'il est possible de détecter les interactions entre les protéines lorsque leur niveau d'expression est endogène. Nous avons ainsi choisi d'utiliser une interaction connue qui avait aussi été détectée à son niveau d'expression endogène par PCA DHFR. Les protéines CDC24 et BEM1 sont impliquées dans la voie des phéromones chez *S. cerevisiae* et ont été identifiées dans les études à grande échelle de Gavin et al parut en 2002 (11). Dans notre laboratoire, CDC24 et BEM1 ont été étiquetées en C-terminale avec L-DHFR[1,2] et L-DHFR[3] respectivement et l'interaction a été observée par essai de survie. Nous avons donc réalisé le même étiquetage avec, cette fois, L-hRluc_1b et L-hRluc_2b

pour s'assurer de la sensibilité de notre essai. Nous avons alors obtenu un signal 12.5X supérieur au bruit de fond. Nous avons aussi étiqueté la Renilla pleine longueur à la protéine BEM1 (données non montrées) et l'interaction CDC24-BEM1 nous a donné un signal qui correspondait à 9.3% de celui de cette fusion. Nous avons donc la confirmation que notre PCA Renilla était suffisamment sensible pour l'étude des interactions protéine-protéine à leur niveau endogène.

Nous avons alors entrepris l'étude de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques chez *S. cerevisiae* avec le PCA Renilla. Parmi les voies de biosynthèse d'acides aminés, celle des acides aminés aromatique est la plus coûteuse en énergie (32). De plus, la Tyr, la Phe et le Trp sont parmi les acides aminés ayant la plus faible concentration avec 0.6mM, 0.5mM, et 0.02mM respectivement (32). La voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques est composée de 17 enzymes dont certaines ont plusieurs fonctions (32). Nous avons donc une possibilité de 289 combinaisons. Parmi celles-ci, 96 ont été effectuées et 31 interactions ont été identifiées avec le PCA Renilla.

Tout d'abord, l'enolase ENO2 qui permet la synthèse du phosphoenol pyruvate à partir du glycerate-2-phosphate, est impliquée dans sept interactions. ENO2 interagit avec lui-même pour former un homodimère. De plus, il hétérodimérise avec ENO1, une enzyme qui catalyse la même réaction qu'ENO2. Ces résultats s'apparentent à des données obtenues par des analyses immunologiques et électrophorétiques chez des tissus humains (54, 55). Ces données montraient que ENO1 et ENO2 formaient les trois arrangements possible de dimères et que ceux-ci étaient actifs (54, 55).

Lorsque l'on observe l'intensité des signaux détectés par le PCA Renilla, on constate qu'il y a une correspondance avec le niveau d'expression des protéines. Les signaux les plus forts sont obtenus avec les dimères ENO1-ENO2 et ENO2-ENO2. L'expression de ARO3 est presque 10 fois inférieur à celui de ENO1, tandis que le signal ENO2-ARO3 est d'environ 4 fois inférieur à ENO1-ENO2. Si on analyse ENO2-ARO1, on constate que le signal est

légèrement inférieur à celui de ENO2-ARO3 tout comme l'est le niveau d'expression de ARO1 par rapport à ARO3. On observe le même phénomène pour ENO2-TYR1. Cette interaction donne un signal deux fois plus faible que celle impliquant ENO2-ARO1, tout en ayant une expression de TYR1 trois fois plus faible que ARO1. À la lumière de ces résultats, nous pensons que les interactions qui fournissent un signal plus faible doivent être analysées de façon à s'assurer que cela n'est pas causé par une expression faible de l'un des deux partenaires. En effet, lorsque l'on analyse des interactions où les protéines sont à leur niveau endogène, il faut s'attendre à avoir une panoplie d'intensité de signal représentant des interactions positives. Il faudrait alors établir un barème basé sur des interactions connues et comparer leur signal du PCA Renilla avec leur niveau d'expression. De cette façon, il sera plus aisé de départager entre la présence ou l'absence d'interaction.

Par ailleurs, le phosphoenolpyruvate produit par ENO1, ENO2 et YMR323W est impliqué dans plusieurs voies biochimiques (37). Il y a donc une forte compétition pour ce produit. Nous avons détecté une interaction entre ENO2 et ARO3, l'enzyme qui utilise le phosphoenol pyruvate comme substrat. Cette interaction pourrait peut-être favoriser le transfert du phosphoenol pyruvate d'une enzyme à l'autre et ainsi permettre son utilisation par la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques. Par ailleurs, ENO2 interagit aussi avec l'enzyme en aval de ARO3, soit ARO1 qui est une enzyme pentafonctionnelle de 174.8 kDa. Le PCA Renilla a aussi montré à quel point il était sensible lorsqu'il a été en mesure de détecter des interactions entre ENO2-ARO7, ARO3-ARO7, TYR1-ARO7 et PHA2-ARO7. En effet, ARO7, qui forme un homodimère, possède moins de 50 copies de protéines par cellule (32, 46) Lorsque l'on établit le réseau des interactions obtenus avec le PCA Renilla, on constate qu'il y a un enchevêtrement d'interactions laissant croire à un complexe multi-protéiques. La voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques nécessite une dépense énergétique très importante pour la cellule (32). La formation d'un complexe pourrait favoriser leur synthèse en facilitant la proximité des substrats. La formation d'un complexe serait aussi favorable pour

la régulation de cette voie de biosynthèse. En effet, ARO3 interagit avec ARO8 et Tyr1, les deux dernières enzymes impliquées dans la biosynthèse de la tyrosine. Par ailleurs, le chorismate doit être acheminé au deux embranchements de la voie en plus de son utilisation pour la synthèse de la vitamine K, de l'ubiquinone et du *p*-aminobenzoate (30, 34). Plusieurs interactions ont été détectées entre les protéines en aval du chorismate ainsi qu'avec l'enzyme responsable de sa synthèse, ARO2.

Plusieurs des gènes qui codent pour des enzymes dans les voies de biosynthèse des acides aminés chez *S. cerevisiae* sont régulés par un contrôle commun (32, 56). L'expression de ces gènes augmente donc lorsqu'il y a une diminution ou une carence de un ou plusieurs acides aminés (32, 56). C'est le cas, entre autre, de ARO3, ARO4 et des enzymes impliquées dans la biosynthèse du Trp (32, 56). Chez *S. cerevisiae*, l'étape de formation de 3-deoxy-D-heptulosonate-7-phosphate, par les DHAP synthase ARO3 et ARO4, est inhibée par la Tyr et la Phe (32, 57). De plus, la chorismate mutase ARO7 est aussi inhibée en présence d'une concentration élevée en Tyr (32). Dans notre étude, nous avons observé des interactions entre ARO3-TYR1, ARO3-PHA2, ARO7-TYR1 et ARO7-PHA2. Il serait alors possible que l'inhibition de ARO3 par la tyrosine qui a été observée dépende de l'interaction entre ARO3-TYR1 et ARO3-PHA2. Dans le même ordre d'idée, les interactions ARO7-TYR1 et ARO7-PHA2 pourraient aussi contribuer à l'inhibition de la chorismate mutase par la tyrosine. Nous avons aussi identifié une interaction entre ARO3 et ARO7. Cette interaction facilite probablement la régulation de leur activité enzymatique.

Cette étude de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques a été réalisée en milieu riche. Comme mentionné précédemment, cette voie est très coûteuse en énergie (32). Il s'ensuit donc que la cellule maintient un niveau significatif d'expression de ces gènes de biosynthèse des acides aminés aromatiques malgré une grande concentration de tyrosine, de phénylalanine et de tryptophane (32). Les interactions alors observées entre les enzymes du début de la voie de biosynthèse et celles de la fin permettent-elles de l'inactiver

ou de la rendre plus efficace? Il serait intéressant de vérifier si ces interactions sont toujours présentes lorsque les cellules sont mises en croissance dans un milieu minimale. De nouvelles interactions pourrait alors être nécessaire pour pallier au nouveau milieu de culture. La dynamique des interactions pourrait aussi être mise en relief par des études d'évolution temporelle en milieu minimale sélectif. En effet, en retirant un ou plusieurs acides aminés aromatiques, nous pourrions être en mesure d'identifier les enzymes clés de cette voie de biosynthèse et de mieux comprendre son fonctionnement.

Ce projet de maîtrise a permis de mettre au point un essai de complémentation protéique chez *S. cerevisiae* basé sur la luminescence à partir de la Renilla luciférase de *Renilla reniformis*. Cette méthode permet, à la fois de détecter des interactions lorsqu'il y a une sur-expression des protéines de fusion, mais elle est suffisamment sensible pour détecter aussi des interactions lorsque le niveau de protéines est endogène. Le PCA Renilla a été utilisé pour étudier la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques dont il a permis d'identifier 31 interactions. Seulement le tiers des combinaisons possibles ont été effectuées. Les études de Dimitri Sans (35), effectuées chez la bactérie *E. coli*, ont montré plusieurs interactions entre les enzymes impliquées dans la voie du chorismate. Ces enzymes sont fusionnées en ARO1 chez *S. cerevisiae*. Il serait donc intéressant de voir si ARO1 peut interagir avec lui-même par ses différents domaines, reproduisant ainsi le patron d'interaction obtenu chez *E. coli*. Par ailleurs, une analyse approfondie des résultats de King et al. (32) en comparaison avec une carte des interactions de la voie biosynthèse des acides aminés aromatiques obtenue par PC Renilla permettrait sans doute d'avoir une meilleure compréhension du fonctionnement de cette voie.

Références

- (1) Goffeau, A. et al. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, **274**: 546-567.
- (2) Uetz, P. (2000). A Comprehensive Analysis of Protein-Protein Interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**: 423-427.
- (3) Rost B., Liu J., Nair R., Wrzeszczynski KO, Ofran Y. (2003). Automatic Prediction of Protein Function. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**(12): 2637-2650.
- (4) Serebriiskii, I.G. et E. Kotova (2004). Analysis of Protein-Protein Interactions Utilizing Dual Bait Yeast Two-Hybrid System. *Methods in Molecular Biology*, **261**: 263-296.
- (5) Schwikowski, Benno, Peter Uetz et Stanley Fields. (2000). A Network of Protein-Protein Interactions in Yeast. *Nature Biotechnology*, **18**: 1257-1261.
- (6) Wilkinson, Keith D. (2004). Quantitative Analysis of Protein-Protein Interactions. *Methods in Molecular Biology*, **261**: 15-32.
- (7) Thaminy, Safia et al. (2004). The Split-Ubiquitin Membrane-Based Yeast Two-Hybrid System. *Methods in Molecular Biology*, **261**: 297-312.
- (8) Chan, Franci Ka-Ming (2004). Monitoring Molecular Interactions in Living Cells Using Flow Cytometric Analysis of Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Methods in Molecular Biology*, **261**: 371-382.
- (9) Phizicky, E.M. et S. Fields (1995). Protein-Protein Interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.*, **59**(1): 94-123.
- (10) Williams, NE. (2000). Immunoprecipitations Procedures. *Methods Cell Biol.*, **62**: 442-453.
- (11) Gavin, AC. Et al. (2002). Functional Organization of the Yeast Proteome by Systematic Analysis of Proteins Complexes. *Nature*, **415**: 141-147.
- (12) Caperelli, CA. Et al. (1980). Purification of a Complex Catalysing Folate Cofactor Synthesis and Transformylation in de novo Purine Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **255**(5): 1885-1890.
- (13) Agou, F. Et al. (2004). In Vivo Protein Cross-Linking. *Methods in Molecular Biology*, **261**: 427-442.
- (14) Phizicky, E. et al. (2003). Protein Analysis on a Proteomic Scale. *Nature*, **422**: 208-215.

- (15) Boute N. et al. (2002). The Use of Resonance Energy Transfer in High-Throughput Screening: BRET vs FRET. *TRENDS in Pharmaceutical Sciences*, **23**(8): 351-354.
- (16) Pflieger, K.D.G et Karin A. Eidne (2003). New Technologies: Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) for the Detection of Real Time Interactions Involving G-Protein Coupled Receptors. *Pituitary*, **6**: 141-151.
- (17) Pelletier JN, Campbell-Valois FX, Michnick SW. (1998). Oligomerization Domain-Directed Reassembly of Active Dihydrofolate Reductase from Rationally Designed Fragments. *PNAS*, **95**(21): 12141-12146.
- (18) Causier, Barry (2004). Studying the Interactome with the Yeast Two-hybrid System and Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **23**: 350-367.
- (19) Fashena, S.J., Serebriiskii, I. et EA. Golemis (2000). The Continued Evolution of Two-Hybrid Screening Approaches in Yeast: How to Outwit Different Preys with Different Baits. *Gene*, **250**(1-2): 1-14.
- (20) Michnick, Stephen W. (2004). Proteomics in Living Cells. *DDT*, **9**: 262-267.
- (21) Stephen W. Michnick et al. (2000). Detection of Protein-Protein Interactions by Protein Fragment Complementation Strategies. *Methods in enzymology*, **328**: 208-251.
- (22) Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ. (1991). Isolation and Expression of a cDNA Encoding Renilla reniformis Luciferase. *PNAS*, **88**(10): 4438-4442.
- (23) Rees, JF. Et al. (1998). The Origins of Marine Bioluminescence: Turning Oxygen Defence Mechanism into Deep-Sea Communications Tools. *J. Exp. Biol.*, **201**: 1211-1221.
- (24) Karkhanis YD. et MJ. Cormier (1971). Isolation and properties of Renilla reniformis luciferase, a low molecular weight energy conversion enzyme. *Biochemistry*, **10**(2): 317-326
- (25) DeLuca, Marlène et al. (1971). Mechanism of Oxidative Carbon Dioxide Production During Renilla reniformis Bioluminescence. *PNAS*, **68**(7): 1658-1660.

- (26) Lee F. Greer III et Aladar A. Szalay (2002). Imaging of Light Emission from the Expression of Luciferases in Living Cells and Organisms: A Review. *Luminescence*, **17**: 43-74.
- (27) Satoshi, Inouye et Osamu Shimomura. (1997). The Use of Renilla Luciferase, Oplophorus Luciferase, and Apoaequorin as Bioluminescent Reporter Protein in the Presence of coelenterazine Analogues as Substrate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **233**: 349-353.
- (28) Sali, A. Et T.L. Blundell (1993). Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.*, **234**: 779-815.
- (29) M.A. Marti-Renom et al. (2000). Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**: 291-325.
- (30) A. Fiser, R.K. Do, et A. Sali (2000). Modeling of Loops in Protein Structures, *Protein Science*, **9**: 1753-1773.
- (31) Fisher, D. et D. Eisenberg (1996). Fold Recognition Using Sequence-Derived Predictions. *Protein Science*, **5**: 947-955.
- (32) Braus, Gerhard H. (1991). Aromatic Amino Acid Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Model System for the Regulation of a Eucaryotic Biosynthetic Pathway. *Microbiological Review*, **55**: 349-370.
- (33) Marcotte, E.M. et al. (1999). Detecting Protein Function and Protein-Protein Interactions from Genome Sequences. *Science*, **285**: 751-753.
- (34) King D. Ross et al. (2004). Functional Genomic Hypothesis Generation and Experimentation by a Robot Scientist. *Nature*, **427**: 247-252.
- (35) Dimitri Sans (2002). Les séquences Pierre de Rosette et les interactions protéine-protéine à l'échelle d'un organisme: confrontation avec une approche expérimentale fondée sur la complémentation de fragments protéiques (PCA). Mémoire de maîtrise, Département de biochimie, Université de Montréal.
- (36) http://www.genome.jp/dbget-bin/get_linkdb_all?0+N+0+23+PATHWAY:map00400+PATHWAY+map00400+/tmp/get_linkdb.19912+SC
- (37) <http://www.yeastgenome.org/>

- (38) Remy I, Wilson IA, Michnick SW. (1999). Erythropoietin Receptor Activation by a Ligand-Induced Conformation Change. *Science*, **283**(5404): 990-993.
- (39) Remy, Ingrid et Stephen W. Michnick (2001). Visualization of Biochemical Networks in Living Cells. *PNAS*, **98**(14): 7678-7683.
- (40) Galarneau A, Primeau M, Trudeau LE, Michnick SW. (2002). Beta-Lactamase Protein Fragment Complementation Assays as *in vivo* and *in vitro* Sensors of Protein Protein Interactions. *Nat. Biotechnol.*, **20**(6): 619-622.
- (41) Remy, Ingrid et Stephen W. Michnick (2004). Regulation of Apoptosis by the Ft1 Protein, a New Modulator of Protein Kinase B/Akt. *Mol Cell Biol.*, **24**(4): 1493-1504.
- (42) Remy, Ingrid et Stephen W. Michnick (2004). A cDNA Library Functional Screening Strategy Based on Fluorescent Protein Complementation Assays to Identify Novel Components of Signaling Pathways. *Methods*, **32**(4): 381-388.
- (43) Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. (2004). PKB/Akt Modulates TGF-beta Signalling Through a Direct Interaction with Smad3. *Nat. Cell Biol.* **6**(4): 358-365.
- (44) Nyfeler B., Michnick SW. et Hauri HP. (2005). Capturing Protein Interactions in the Secretory Pathway of Living Cells. *PNAS*, **102**(18): 6350-6355.
- (45) Pelletier JN, Arndt KM, Pluckthun A, Michnick SW. (1999). An *in vivo* Library-Versus-Library Selection of Optimized Protein-Protein Interactions. *Nat. Biotechnol.*, **17**(7): 683-690.
- (46) Arndt KM, Pelletier JN, Muller KM, Alber T, Michnick SW, Pluckthun A. (2000). A Heterodimeric Coiled-Coil Peptide Pair Selected *in vivo* from a Designed Library-Versus-Library Ensemble. *J Mol Biol.*, **295**(3): 627-639.
- (47) Subramaniam R, Desveaux D, Spickler C, Michnick SW, Brisson N. (2001). Direct Visualization of Protein Interactions in Plant Cells. *Nat. Biotechnol.*, **19**(8): 769-772.
- (48) Ghaemmaghami, S. et al. (2003). Global Analysis of Protein Expression in Yeast. *Nature*, **425**: 737-741.
- (49) Gietz, R.D. and R.H. Schiestl (1995) Transforming Yeast with DNA. (Invited chapter) *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **5**, 255-269.

- (50) <http://www.bio.uva.nl/pombe/-handbook/section5/section5-1.html>
- (51) Sambrook J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2nd Edition) CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, chapitre 18.
- (52) Knop, M. et al. (1999). Epitope Tagging of Yeast Genes using PCR-based Strategy: More Tags and Improved Practical Routines. *Yeast*, **15**(10B), 963-972.
- (53) Mumberg D., Müller R. Et M. Funk (1995). Yeast Vectors for the Controlled Expression of Heterologous Proteins in Different Genetic Backgrounds. *Gene*, **156**, 119-122.
- (54) Chen SH, Giblett ER (1976). Enolase: Human Tissue Distribution and Evidence for Three Different Loci. *Ann Hum Genet*, **39**(3): 277-280.
- (55) McAlister L and Holland MJ (1982) Targeted Deletion of a Yeast Enolase Structural Gene. Identification and Isolation of Yeast Enolase Isozymes. *J Biol Chem*, **257**(12):7181-8
- (56) Hinnebusch, AG (1988). Mechanism of Gene Regulation in the General Control of Amino Acid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Review*, **52**(2): 248-273.
- (57) Niederberger P, Miozzari G, Hutter R. (1981) Biological Role of the General Control of Amino Acid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, **1**(7): 584-93.

