



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : Sciences du vivant
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par
Yves Tourrette ■

Sélection et analyse de remaniements chromosomiques
chez *Saccharomyces cerevisiae* en contexte diploïde :
origine des délétions et des translocations réciproques

■ Soutenue publiquement le 9 novembre 2004

■ **Membres du Jury**

Directeur de Thèse	M. Jean-Luc Souciet, Professeur à l'Université Louis Pasteur
Rapporteur Interne	M. Mario Keller, Professeur à l'Université Louis Pasteur
Rapporteur Externe	M. Claude Gaillardin, Professeur à l'INA-Paris-Grignon
Rapporteur Externe	M. Claude Jacq, Professeur à l'ENS-Paris 11
Examineur	M. Jacky de Montigny, Maître de Conférences à l'Université Louis Pasteur

À ma famille,

À Carole,

À celles et ceux qui m'accompagnent sur le chemin de la vie.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de « Dynamique, Évolution et Expression de Génomes de Microorganismes » de l'Université Louis-Pasteur de Strasbourg (FRE-2326 ULP / CNRS). Je tiens à remercier Messieurs les Professeurs Serge Potier et Jean-Luc Souciet de m'avoir accueilli dans leur équipe.

Je remercie particulièrement Jacky de Montigny, qui m'a encadré durant mon séjour dans ce laboratoire. Merci pour tes conseils, ta disponibilité malgré un emploi du temps toujours chargé, bref, en un mot, merci pour ta générosité.

Je remercie également Jean-Luc Souciet sans qui rien n'aurait été possible, pour sa confiance, ses conseils et son soutien aussi bien moral que financier, sans oublier sa disponibilité.

Je remercie vivement Messieurs les Professeurs Claude Gaillardin, Claude Jacq et Mario Keller d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci au personnel du laboratoire pour l'ambiance agréable sans laquelle aucun travail serein n'est envisageable. Remerciements particuliers à Catherine Spohner pour ses coups de mains occasionnels ainsi qu'à Anne Ertle et Leslie Marchal que j'ai eu le plaisir d'encadrer et qui ont participé à l'avancement de ce travail. Merci à Benoît Kammerer pour le temps généreusement consacré à la résolution des soucis informatiques, pour ses conseils et ses avis, sans oublier la mise à disposition de sa bibliothèque personnelle et de ses connaissances. Coucou à Marie-Laure Straub, Valérie Braun, Marie-Hélène Meyer et Émilie Fritsch et à nos autres collègues bactériophiles et levuristes. Et enfin, un grand coucou à Joseph Schacherer, cher compagnon de paillasse et de congrès avec qui j'ai passé de très bons moments.

Je tiens pour finir à remercier Jean-Luc Dortet-Bernardet (Université Louis-Pasteur, Strasbourg) pour son aide dans l'analyse statistique des révertants.

Merci à mes parents et à ma famille pour leur soutien et leur confiance indéfectibles.

Liste des abréviations

aa	acides aminés
ADN	acide désoxyribonucléique
Amp	ampicilline
ARN	acide ribonucléique
BET	bromure d'éthidium
Δ	délétion
dNTP	2'-désoxyribonucléoside-5'-triphosphate
ddNTP	2',3'-didésoxyribonucléoside-5'-triphosphate
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
kb	kilo-paire de bases
kDa	kilo Dalton
LTR	Long Terminal Repeat
min	minute(s)
ns	mutation non-sens
fs	frameshift : mutation de décalage de cadre de lecture
ORF	"Open Reading Frame " ou phase ouverte de lecture
pb	paire de basse
PCR	"Polymerase Chain Reaction" ou réaction de polymérisation en chaîne
q.s.p.	quantité suffisante pour
rpm	rotation par minute
SDS	dodécylsulfate de sodium
sec	secondes
TE	tampon Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM
Tris	tris-hydroxyméthyl-aminoéthane
UV	ultraviolet
::	interruption

Table des matières

Remerciements	2
Liste des abréviations	4
Table des Matières	5
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Introduction	16
Chapitre 1 : Matériel et Méthodes	30
1. Organismes et milieux de culture	30
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
1.1.1 Biologie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
1.1.2 Souches utilisées	30
1.1.3 Milieux de culture	33
1.2 Conditions de culture	33
1.3 Conservation des souches	34
1.4 Mesure de la croissance cellulaire	34
2. Techniques génétiques de la levure	34
2.1 Obtention de cellules diploïdes	34
2.2 Obtention de cellules haploïdes	34
2.2.1 En milieu SP1	34
2.2.2 En milieu GNA	35
2.3 Analyse de spores	35
2.4 Détermination du phénotype	35
3. Préparation d'ADN	35
3.1 Extraction au phénol-chloroforme	35
3.2 Précipitation alcoolique	36
3.3 Préparation rapide d'ADN génomique de levure	36

4. Analyse des ADN	37
4.1 Détermination de la concentration d'ADN	37
4.2 Coupure par des endonucléases de restriction	37
4.3 Électrophorèse sur gel d'agarose	37
4.3.1 Électrophorèse classique	37
4.3.2 Électrophorèse en champs alternés	38
4.4 Purification des molécules d'ADN	38
5. Vecteur	39
6. Technique de transformation de levure	39
6.1 Préparation de cellules compétentes	39
6.2 Électroporation	39
7. Hybridation ADN/ADN	41
7.1 Préparation d'une sonde froide	41
7.2 Hybridation selon la méthode de Southern	42
7.2.1 Transfert sur membrane nylon	42
7.2.1.1 Traitement du gel d'agarose	42
7.2.1.2 Méthode de transfert au 20 x SSC	42
7.2.1.3 Méthode de transfert au NaOH	43
7.2.2 Fixation de l'ADN sur la membrane nylon	43
7.2.3 Préhybridation	43
7.2.4 Hybridation	43
7.2.5 Révélation au NBT/BCIP	44
7.2.6 Déshybridation	44
8. Amplification d'un fragment d'ADN spécifique par PCR (Polymerase Chain Reaction)	45
8.1 Principe	45
8.2 Paramètres importants	45
8.2.1 Dénaturation	45
8.2.2 Hybridation	45
8.2.3 Polymérisation	46
8.3 Enzymes et milieux réactionnels	46
8.3.1 <i>Taq</i> DNA polymérase	46
8.3.2 Expand Long Template PCR System	46

8.4 Cycles particuliers utilisés lors de ce travail	48
8.4.1 Remplacement de gène en une étape	48
8.4.1.1 Synthèse du fragment de remplacement	48
8.4.1.2 Vérification du remplacement	48
8.4.2 Analyse des révertants	48
8.4.2.1 Insertion d'éléments Ty1	48
8.4.2.2 Caractérisation des événements de délétion	48
8.4.2.3 Expand Long Template PCR System	49
8.4.2.4 Amplification à l'aide d'amorces dégénérées	49
9. Détermination des séquences nucléotidiques	50
10. Système de sélection des révertants Ura ⁺	51
10.1 Principe	51
10.2 Protocole pour une seule sélection	51
11. Analyse statistique des événements de mutation	53
11.1 Taux de mutation par cellule, par allèle <i>ura2 15-30-72</i> et par génération	53
11.2 Intervalle de confiance à 95 % associé au taux de mutation	54
Chapitre 2 : Plasticité génomique et remaniements chromosomiques en contexte diploïde a/α : sélection et analyse d'événements de mutation de l'allèle <i>ura2 15-30-72</i>	55
1. Méthodologie d'analyse des révertants Ura ⁺	56
1.1 Analyse génétique : analyse des produits de la méiose	56
1.2 Analyse moléculaire	56
1.2.1 Analyse du profil de restriction <i>Bam</i> HI	56
1.2.2 Analyse et hybridations ADN/ADN des caryotypes électrophorétiques	58
1.2.3 Analyses par amplification PCR	60
2. Résultats des sélections en contexte diploïde	60
2.1 Résultats des sélections	60
2.2 Effets du contexte diploïde a/α sur la rétrotransposition de l'élément Ty1	62

3. Analyse génétique et moléculaire des révertants diploïdes spontanés sélectionnés	62
3.1 Événements viables en contexte haploïde	63
3.1.1 Analyse moléculaire des duplications et délétions	63
3.1.1.1 Duplications	63
3.1.1.2 Délétions	67
3.1.1.3 Délétion homozygote	67
3.1.2 Translocation réciproque	69
3.1.2.1 Profil de restriction <i>Bam</i> HI	69
3.1.2.2 L'analyse des caryotypes suggère la présence d'une translocation réciproque	69
3.1.2.3 Détermination des jonctions par amplification PCR	69
3.1.2.4 L'analyse de la ségrégation des caractères Ura^+/Ura^- confirme les analyses moléculaires	72
3.2 Événements non viables en contexte haploïde	74
3.2.1 Événements non viables liés à la réactivation fonctionnelle du domaine ATCase	74
3.2.1.1 Profil de restriction <i>Bam</i> HI	74
3.2.1.2 Analyse des caryotypes et hybridations ADN/ADN	75
3.2.1.3 Duplication intrachromosomique	75
3.2.1.4 Duplications interchromosomiques	78
3.2.1.5 Délétion segmentale	80
3.2.1.6 Délétion-translocation réciproque	80
(i) Translocation réciproque entre les chromosomes X et XII	80
(ii) Délétion	82
(iii) Jonction des bras transloqués	82
(iv) Révertant B152/1	85
3.2.2 Événements non viables indépendants de la réactivation fonctionnelle du domaine ATCase	85
3.2.2.1 Analyse du révertant B259/1	85
3.2.2.2 Analyse des révertants B218/1, B230/1 et B307/1	88
3.2.2.3 Analyse du révertant B247/1	88

4. Sélections et analyse moléculaire d'événements de réactivation du domaine ATCase en contexte haploïde α	89
4.1 Résultats des sélections	89
4.2 Analyse moléculaire des événements sélectionnés	91
4.2.1 Événements de duplication	91
4.2.2 Événements de délétion	91
4.2.3 Événements de transposition d'éléments Ty1	91
4.3 Conclusions	91
5. Taux de mutation	92
6. Conclusions	94
6.1 Délétion homozygote	94
6.2 Translocation réciproque	96
6.3 Délétion segmentale	96
6.4 Événement de délétion-translocation réciproque	96
6.5 Nombreuses duplications interchromosomiques	96
Chapitre 3 : Analyse moléculaire des événements de délétion : présence de différents types de jonctions	97
1. Taille et localisation des délétions obtenues en contextes haploïde α et diploïde a/α	97
1.1 Événements de délétion sélectionnés en contexte haploïde	97
1.1.1 Délétion intragénique	99
1.1.2 Délétion de la région promotrice	99
1.2 Événements de délétion sélectionnés en contexte diploïde	99
1.2.1 Délétion intragénique	101
1.2.2 Délétion de la région promotrice	101
1.2.3 Délétion segmentale	101
1.3 Conclusions	102
2. Analyse des séquences des jonctions des délétions isolées dans les deux contextes	102
2.1 Séquences des jonctions des délétions observées en contexte haploïde	102
2.2 Séquences des jonctions des délétions observées en contexte diploïde a/α : apparition d'une nouvelle classe	104

3. Caractéristiques et conséquences de la translocation réciproque et de la délétion-translocation réciproque	106
3.1 Translocation réciproque	106
3.2 Délétion-translocation réciproque	106
4. Mécanismes impliqués dans les événements de délétion	109
4.1 Délétions générées par la voie de recombinaison homologue (HR)	109
4.2 Délétions générées par la voie de recombinaison non-homologue (NHEJ)	111
5. Conclusions et perspectives	112
Chapitre 4 : Mécanismes impliqués dans la formation de délétions et de translocations : utilisation du crible <i>ura2 15-30-72</i> en contextes génétiques <i>nej1</i> et <i>rad52</i>	114
1. Sélection et analyse de remaniements chromosomiques en contexte <i>ura2 15-30-72 nej1Δ</i>	114
1.1 Le gène <i>NEJ1</i>	114
1.2 Construction des souches délétées au niveau du gène <i>NEJ1</i>	115
1.3 Analyse moléculaire de remaniements chromosomiques sélectionnés en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72 nej1Δ</i>	117
1.3.1 Événements de duplication	117
1.3.2 Événements de délétion	117
1.3.2.1 Caractéristiques des délétions	119
1.3.2.2 Caractéristiques des jonctions des délétions	119
1.3.3 Insertions d'éléments transposables Ty1	119
1.4 Analyse moléculaire de remaniements chromosomiques sélectionnés en contexte diploïde a/α <i>ura2 15-30-72 nej1Δ</i>	119
1.4.1 Événements de duplication	120
1.4.1.1 Duplications intrachromosomiques	120
1.4.1.2 Duplications interchromosomiques	122
1.4.2 Événements de délétion	122
1.4.2.1 Caractéristiques des délétions	122
1.4.2.2 Caractéristiques des jonctions des délétions	124
1.5 Taux de mutation	124
1.6 Conclusion sur l'influence du gène <i>NEJ1</i> sur les événements observés en phases haploïde et diploïde	126

2. Sélection et analyse de remaniements chromosomiques en contexte <i>ura2 15-30-72 rad52Δ</i>	126
2.1 Le gène <i>RAD52</i>	127
2.2 Construction des souches délétées au niveau du gène <i>RAD52</i>	127
2.3 Sélections en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72 rad52Δ</i>	127
2.3.1 Analyse moléculaire des événements sélectionnés	129
2.3.1.1 Événements de duplication	129
2.3.1.2 Caractéristiques des délétions	129
2.3.2 Taux de mutation en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72 rad52Δ</i>	131
2.3.3 Conclusions	131
2.4 Sélections en contexte diploïde a/α <i>ura2 15-30-72 rad52Δ</i>	132
2.4.1 Analyse moléculaire des événements sélectionnés	132
2.4.1.1 Événements de duplication	132
(i) Duplications interchromosomiques	132
(ii) Duplications intrachromosomiques	134
2.4.1.2 Caractéristiques des délétion	134
2.4.2 Taux de mutation en contexte diploïde a/α <i>ura2 15-30-72 rad52Δ</i>	137
2.4.3 Conclusions	137
3. Formation des délétions de classe I	139
Conclusion	141
Bibliographie	149
Annexes	
Annexe 1 : Liste des principaux oligonucléotides utilisés dans ce travail.	159
Annexe 2 : Schéma de la localisation des oligonucléotides situés dans et à proximité du gène <i>URA2</i> .	161
Annexe 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le remplacement des gènes <i>NEJ1</i> et <i>RAD52</i> et pour la vérification des remplacements par amplification PCR.	162
Annexe 4 : Table 4 de Lea & Coulson.	163
Annexe 5 : Table de Student.	164

Liste des figures

Introduction

- Figure 1 : Modèles de réparation des cassures d'ADN double brin dépendants du groupe d'épistasie du gène *RAD52* . 21
- Figure 2 : Le gène *URA2* et les étapes de la voie de biosynthèse *de novo* des nucléotides pyrimidiques. 24
- Figure 3 : Localisation des trois mutations ponctuelles de l'allèle *ura2 15-30-72* . 25
- Figure 4 : Schéma représentant les trois types d'événements responsables de la réactivation fonctionnelle du domaine ATCase de l'allèle *ura2 15-30-72* , décrits en contexte haploïde. 27

Chapitre 1

- Figure 5 : Cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* . 31
- Figure 6 : Carte du plasmide pFA6-kanMX4. 40
- Figure 7 : Principe de l'amplification par PCR. 47
- Figure 8 : Schéma de sélection positive de révertants spontanés prototrophes pour l'uracile. 52

Chapitre 2

- Figure 9 : Localisation des sites *Bam* HI au locus *ura2 15-30-72* . 57
- Figure 10 : Profil de restriction *Bam* HI de cellules haploïdes permettant de différencier les événements de duplication des autres événements. 57
- Figure 11 : Positions relatives des sondes spécifiques du chromosome X. 59
- Figure 12 : Position des oligonucléotides utilisés pour caractériser les événements de délétion par amplification PCR. 61
- Figure 13 : Position des oligonucléotides utilisés pour caractériser l'insertion d'un rétrotransposon Ty1 dans l'allèle *ura2 15-30-72* . 61
- Figure 14 : Analyse génétique des remaniements chromosomiques viables à l'état haploïde : (a) délétion génique, (b) duplication. 64
- Figure 15 : Exemple de profil de restriction *Bam* HI dans le cas d'un événement de duplication. 65
- Figure 16 : Analyse du caryotype des révertants ayant subi un événement de duplication viable en phase haploïde. 66
- Figure 17 : Exemple de profil de restriction *Bam* HI dans le cas d'un événement de délétion. 68

Figure 18 : Profil de restriction <i>Bam</i> HI du révertant B026/1.	68
Figure 19 : Analyse du caryotype du révertant B038/1.	70
Figure 20 : Translocation réciproque : origine du révertant B038/1.	71
Figure 21 : Analyse génétique du révertant B038/1.	73
Figure 22 : Analyse des révertants diploïdes dont le caractère létal haploïde, révélé en ségrégation, est lié à la réactivation du domaine ATCase.	76
Figure 23 : Analyse génétique des événements létaux en phase haploïde associés à la réactivation du domaine ATCase.	79
Figure 24 : Délétion segmentale : origine du révertant B283/1.	81
Figure 25 : Délétion-translocation réciproque : origine du révertant B251/1.	84
Figure 26 : Analyse génétique d'un événement létal indépendant de l'allèle <i>ura2 15-30-72</i> .	86
Figure 27 : Analyse du caryotype de la souche B259/1.	87

Chapitre 3

Figure 28 : Délétions chromosomiques au niveau de l'allèle <i>ura2 15-30-72</i> .	100
Figure 29 : Événement de délétion et séquences identiques en répétition directe.	105
Figure 30 : Séquences aux jonctions de la translocation réciproque du révertant B038/1.	107
Figure 31 : Séquences aux jonctions de la délétion-translocation réciproque du révertant B251/1.	108
Figure 32 : Mécanisme du single-strand annealing (SSA).	110

Chapitre 4

Figure 33 : Remplacement en une étape du gène <i>NEJ1</i> par le gène marqueur <i>KAN^R</i> .	116
Figure 34 : Une délétion de 20,1 kb permet la formation d'une protéine chimère : origine du révertant BR15/2.	136

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1 : Souches de <i>S. cerevisiae</i> utilisées dans ce travail.	32
--	----

Chapitre 2

Tableau 2 : Taille et position des sondes spécifiques du chromosome X.	59
Tableau 3 : Caractéristiques des 9 événements de duplication issus des révertants ne présentant pas de caractère létal à l'état haploïde.	65
Tableau 4 : Analyse du caryotype par hybridation ADN/ADN des souches diploïdes décrites à la figure 22.	77
Tableau 5 : Analyse par hybridation ADN/ADN du caryotype de la souche B283/1 à l'aide de sondes réparties le long du chromosome X.	81
Tableau 6 : Analyse par hybridation ADN/ADN du caryotype des souches B251/1 (a.) et B152/1 (b.).	83
Tableau 7 : Récapitulatif de la distribution des événements de réactivation du domaine ATCase sélectionnés en contexte haploïde α chez les seize révertants indépendants.	90
Tableau 8 : Calcul des taux de mutation observés en contextes diploïde a/α et haploïde α .	93
Tableau 9 : Distribution des événements de réarrangement chromosomique sélectionnés en contexte diploïde.	95

Chapitre 3

Tableau 10 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés.	98
Tableau 11 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions.	103
Tableau 12 : Séquence et position de la microhomologie impliquée dans la translocation réciproque du révertant B038/1.	107
Tableau 13 : Séquence et position de la microhomologie impliquée dans la délétion-translocation réciproque du révertant B251/1.	108

Chapitre 4

Tableau 14 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72 nej1</i> Δ .	118
Tableau 15 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72 nej1</i> Δ .	118
Tableau 16 : Localisation et taille des duplications sélectionnées en contexte diploïde <i>a</i> / α <i>ura2 15-30-72 nej1</i> Δ .	121
Tableau 17 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés en contexte diploïde <i>a</i> / α <i>ura2 15-30-72 nej1</i> Δ .	123
Tableau 18 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions en contexte diploïde <i>a</i> / α <i>ura2 15-30-72 nej1</i> Δ .	123
Tableau 19 : Calcul des taux de mutation observés en contextes diploïde et haploïde <i>ura2 15-30-72 nej1</i> Δ .	125
Tableau 20 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72 rad52</i> Δ .	128
Tableau 21 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72 rad52</i> Δ .	128
Tableau 22 : Calcul des taux de mutation observés en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72 rad52</i> Δ .	130
Tableau 23 : Localisation et taille des duplications sélectionnées en contexte diploïde <i>a</i> / α <i>ura2 15-30-72 rad52</i> Δ .	133
Tableau 24 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés en contexte diploïde <i>a</i> / α <i>ura2 15-30-72 rad52</i> Δ .	135
Tableau 25 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions en contexte diploïde <i>a</i> / α <i>ura2 15-30-72 rad52</i> Δ .	135
Tableau 26 : Calcul des taux de mutation observés en contexte diploïde <i>a</i> / α <i>ura2 15-30-72 rad52</i> Δ .	138

Conclusion

Tableau 27 : Distribution des réarrangements chromosomiques en contexte diploïde <i>a</i> / α <i>ura2 15-30-72</i> et en contexte haploïde α <i>ura2 15-30-72</i> .	143
---	-----

Introduction

C'est au tout début du XIXe siècle que Jean-Baptiste Lamarck énonce une première théorie de l'évolution de l'ère moderne connue sous le terme de « lamarckisme » ou « transformisme » dans sa « *Philosophie zoologique* » publiée en 1809. Selon lui, les êtres vivants, dans leur ensemble, ne sont pas apparus tels que nous les connaissons par l'intervention d'un créateur universel, mais sont au contraire le résultat d'une longue histoire où les organismes les plus simples ont pu aboutir aux organismes les plus complexes après de multiples transformations induites par les changements de l'environnement et qui seront accumulées et transmises de descendance en descendance (on parle de « gradualisme »). Cette théorie s'oppose alors au « créationnisme », conception issue de la tradition biblique de la *Genèse* et défendue par Carl von Linné avec la création unique ou Georges Cuvier avec les créations successives, mais déjà contredite par Georges-Louis de Buffon. Charles Darwin proposera à son tour dans « *L'origine des espèces* » publié en 1859 sa théorie selon laquelle les organismes évoluent suite à de constantes variations qui apparaissent indépendamment des changements de conditions environnementales. Si ces variations représentent un avantage pour la survie des descendants, la pression de sélection imposée par l'environnement conduira à fixer les modifications de la population variante. Cette nouvelle population, en transmettant ces nouveaux caractères à sa descendance, éloignera celle-ci de la population ancestrale et favorisera ainsi la spéciation. De cette façon, une espèce peut évoluer par de multiples variations discrètes et graduelles pour aboutir à une nouvelle espèce qui la remplace (anagenèse), mais peut également se scinder en deux lignées différentes suite à l'apparition d'un caractère nouveau (cladogenèse). À partir des années 1930, le « néo-darwinisme » adaptera les notions de variabilité des espèces par évolution graduelle et de pression de sélection en tenant compte notamment de la paléontologie et de la découverte de la génétique mendélienne (théorie synthétique).

En 1866, Gregor Mendel proposait les premières lois de transmission des caractères héréditaires. Tout en redécouvrant les lois de Mendel en 1900, Hugo de Vries observera l'apparition brusque d'un caractère original, changement qu'il nommera « mutation ». Walter S. Sutton (1903) et Theodor Boveri (1903, 1904) feront ensuite le lien entre l'hérédité et le « chromosome », terme donné depuis 1888 par Heinrich Wilhelm Waldeyer

aux filaments observés dans le noyau cellulaire (la « chromatine » de Walther Flemming, 1882). Tandis qu'en 1909 Wilhelm Johannsen qualifia de « gènes » les éléments responsables de l'hérédité, Thomas Morgan montrera à partir de 1910 que les gènes sont disposés de façon linéaire sur le chromosome et, tout en confirmant leur rôle dans la transmission des caractères, édifiera les premières cartes génétiques. Ces gènes, supports de l'information aboutissant à l'expression des caractères particuliers à chaque espèce et à chaque organisme, sont transmissibles et constitués d'acides nucléiques : c'est ce que démontrent les travaux de Avery, MacLeod et McCarty en 1944. La structure en double-hélice de l'ADN, molécule constituante des gènes et des chromosomes, sera finalement mise en évidence par Wilkins et Franklin en 1953 et modélisée par Watson et Crick la même année. En 1941, Beadle et Tatum avaient montré que le gène est support de l'information pour la protéine, élément responsable de la manifestation du caractère (« phénotype »). Enfin, en 1961, Monod, Jacob et Lwoff montrent que les protéines ont une action régulatrice sur l'expression des gènes. Le phénotype d'un organisme est donc dépendant à la fois de l'information portée par l'ADN et de la façon dont cette information sera exprimée sous contrôle de protéines.

Cependant, si les protéines jouent un rôle dans l'expression des gènes, elles demeurent dépendantes de l'information portée par ces gènes situés dans la double-hélice d'ADN. Ainsi, à la base de l'expression des caractères se trouve l'ADN, dont les modifications seront le moteur de l'évolution.

Les variations de l'ADN conduisant à l'évolution et à la différenciation des organismes sont dépendantes de différents paramètres dont les principaux sont le brassage des gènes et l'apparition de mutations. Le brassage génétique assuré par la reproduction sexuée entraîne une diversification consécutive à la redistribution des gènes apportés par deux individus différents qui transmettront à leur descendance un mélange de leurs caractéristiques propres. Cependant, la capacité de novation des organismes est caractérisée par des modifications géniques et chromosomiques qui peuvent intervenir au cours de la vie d'un individu donné et qui peuvent se fixer dans une descendance suite à une pression de sélection (théorie « sélectionniste ») ou non (théorie « neutraliste »). L'association de ces deux composantes que sont la sexualité et les mutations dans un processus commun de transmission héréditaire guidé par une pression de sélection conduira à l'évolution des génomes et des organismes, et dans une plus large mesure, des populations.

Pendant de longues années, le génome fut considéré comme une structure plutôt statique : la plupart des modifications étaient consécutives au brassage intervenant lors de la transmission héréditaire tandis que les événements mutationnels étaient supposés jouer un rôle très mineur dans son évolution. La nécessité de maintenir un certain nombre de fonctions essentielles ne pouvait permettre que des modifications lentes et progressives.

Cette conception commença cependant à être remise en cause avec les travaux de Barbara McClintock (1956) sur le maïs qui observa des modifications génomiques lors de la division cellulaire. Elle les interpréta en postulant l'existence d'éléments d'ADN mobiles capables de se déplacer au sein de la double-hélice. Ces éléments transposables, ou transposons, furent ensuite mis en évidence aussi bien chez les eucaryotes, et notamment la levure *Saccharomyces cerevisiae*, que chez les procaryotes. Des travaux ultérieurs ont montré l'existence d'autres modifications importantes de l'ADN par des événements tels que les insertions, les inversions, les délétions, les translocations ou encore les amplifications de séquence grâce au phénomène de duplication. La mise en évidence de ces différents événements a dès lors amené l'idée d'un génome dont l'ensemble de la structure pouvait être bien plus fluide que ce qui était envisagé auparavant.

Les levures sont utilisées depuis la haute Antiquité (Babyloniens, Egyptiens, Celtes, etc...) pour la préparation de boissons alcoolisées et de pain. Pline l'Ancien parle dans son « *Histoire naturelle* » des propriétés du « levain » et du « moût » qui interviennent dans la fermentation ou les remèdes. Cependant, ce n'est que bien plus tard que l'on commence à étudier scientifiquement leurs propriétés : Cagnard-Latour observe leur bourgeonnement en 1835 et les travaux de Louis Pasteur démontrent en 1860 que la production d'alcool est consécutive à une fermentation par la levure. Au-delà des recherches menées sur ces organismes pour leur intérêt biotechnologique, ils se sont imposés à partir des années 1970, et plus particulièrement *Saccharomyces cerevisiae*, comme modèles d'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires des organismes eucaryotes dans leur ensemble.

S. cerevisiae est un champignon microscopique unicellulaire, eucaryote comme tous les champignons, qui appartient à la classe des hémiascomycètes constituée d'environ 700 espèces (Kurtzman & Fell, 1998) dont la plupart sont des levures, malgré la présence dans quelques cas d'hyphes et de pseudohyphes. Il présente la particularité de pouvoir se maintenir de façon stable aussi bien à l'état haploïde que diploïde comme la plupart des levures. Cependant, d'autres espèces de cette classe telles celles du genre *Debaryomyces* ont une phase haploïde prédominante, c'est à dire qu'elles ne peuvent se maintenir à l'état diploïde, tandis que d'autres, telles du genre *Saccharomyces* ont une phase diploïde prédominante. La séquence nucléotidique de la souche de référence S288C de *S. cerevisiae* est entièrement connue depuis 1996 (Goffeau *et al.*, 1996 ; Dujon, 1996) ce qui confère des facilités d'investigations considérables au niveau moléculaire. Son génome est constitué de 5651 gènes codant pour des protéines (Blandin *et al.*, 2000 ; Malpertuy *et al.*, 2000) répartis sur 16 chromosomes, dont la plupart sont monocistroniques et dépourvus d'introns. Toutes ces caractéristiques en font un organisme-modèle de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires du monde eucaryote.

Observées par Muller (1936), les duplications sont considérées comme un élément majeur de l'évolution (Ohno, 1970) et sont intimement liées aux événements de délétion dans le processus des modifications génomiques.

Le séquençage du génome de *S. cerevisiae* a révélé un niveau de redondance s'élevant à 28 % des ORFs (Dujon *et al.*, 1998). Ce même constat a amené Wolfe *et al.* (1997) à avancer la théorie d'une duplication du génome de l'ancêtre de *S. cerevisiae*, qui se situe après la séparation des branches conduisant à *Kluyveromyces lactis* d'une part et *Candida glabrata* et *S. cerevisiae* d'autre part. Ce doublement complet du génome, confirmé par Kellis *et al.* (2004) aurait été suivi de réarrangements chromosomiques plus ou moins importants, et notamment des délétions, pour parvenir au génome tel que nous le connaissons aujourd'hui.

Une autre proposition avancée par Clark (1994) explique la redondance d'un génome par une succession de duplications, théorie confirmée par la sélection expérimentale aussi bien de duplications géniques (Schacherer *et al.*, 2004) que segmentales (Koszul *et al.*, 2004).

Des travaux effectués lors du programme Génolevures qui avait pour objet le séquençage et la comparaison de treize levures hémiascomycètes indiquent que des mécanismes de dynamique génomique comme de multiples duplications et délétions de segments chromosomiques plus ou moins longs représentent un élément moteur de l'évolution des génomes (Llorente *et al.*, 2000).

Enfin, de façon plus générale, Dujon *et al.* (2004) ont montré l'implication des différents mécanismes moléculaires tels que la formation de gènes en tandem, la duplication segmentale et la duplication totale du génome ainsi que la perte de gènes dans l'évolution des génomes de levures.

Les événements de duplication peuvent correspondre à des réponses adaptatives aux changements de conditions du milieu. C'est le cas pour les gènes *CUPI* dupliqués en tandem dans certaines souches. Cette amplification permet une surexpression et confère une résistance dans un milieu plus riche en cuivre (Karin *et al.*, 1984). De façon plus générale, de tels événements d'amplification génique peuvent mener à de nouvelles fonctions, l'un des deux gènes pouvant alors varier au niveau nucléotidique et assurer une fonction différente de l'originale (Zhang *et al.*, 1998). Un autre destin possible pour l'élément dupliqué est sa modification en pseudogène après accumulation de mutations ponctuelles ou perte d'une partie de sa séquence par délétion, le conduisant à une absence de fonction (Lynch *et al.*, 2000 ; Leh-Louis *et al.* 2004).

De la même façon qu'elle peut modifier un nouveau gène issu d'un événement de duplication, une délétion chromosomique peut amener d'autres régions codantes au destin de pseudogène. Mais elle peut également entraîner une restauration fonctionnelle de l'activité d'un gène ayant subi des mutations. C'est notamment ce qui a été observé pour le gène *CYC1* (Hampsey *et al.*, 1988) ou encore le gène *URA2* (Bach *et al.*, 1995 ; Roelants *et al.*, 1995 ; Welcker *et al.*, 2000).

L'influence des événements de translocation sur l'évolution des levures a été confirmée par Dunham *et al.* (2002) et leur contribution à une isolation reproductive vis-à-vis des autres espèces de levure est décrite par Delneri *et al.* (2003).

Les exemples de réarrangements que nous avons mentionnés sont une conséquence des lésions qui ont pu atteindre la molécule d'ADN en provoquant par exemple une cassure double-brin (DSB pour double-strand break). Ces cassures d'ADN surviennent suite à des incidents de différentes natures qui affectent la double hélice. Ces dommages peuvent être induits par des agents mutagènes comme les radiations ionisantes, des agents chimiques ou des radicaux libres (Friedberg *et al.*, 1995 ; Hoeijmakers, 2001), mais peuvent également survenir de façon spontanée suite aux accidents pouvant intervenir durant la transcription (Gonzalez-Barrera *et al.*, 2002).

Ces cassures double-brin peuvent également intervenir lors de la réplication de l'ADN : après avoir détecté une lésion au niveau de l'ADN, la cellule met en place des systèmes de réparation (Rouse & Jackson, 2002). Ainsi, lorsqu'une base est endommagée, elle peut être réparée par différents mécanismes comme le « mismatch repair » (MMR) (Modrich & Lahue, 1996), le « nucleotide excision repair » (NER) ou le « base excision repair » (BER). En cas de stress oxydatif ou de réparation incomplète par les processus NER et BER, l'ADN peut présenter une cassure d'ADN simple brin (SSB pour single-strand break) (Imlay & Linn, 1988). Cette cassure simple brin, présente au moment de la réplication, peut alors devenir une cassure double brin au niveau de la fourche de réplication (Galli & Schiestl, 1998 ; Galli & Schiestl, 1999 ; Bishop & Schiestl, 2000 ; Allen *et al.*, 2002). Pour assurer sa survie, la cellule doit alors réparer les DSBs. Pour ceci, deux principales voies de réparation ont été décrites qui peuvent conduire à une réparation exacte de la cassure (on parle alors de processus error-free) ou à un réarrangement chromosomique (processus error-prone) (pour une revue : Pâques & Haber, 1999 ; Haber, 2000).

La première, nommée recombinaison homologue (HR pour homologous recombination) est dépendante du groupe d'épistasie du gène *RAD52* et requiert la présence de longues séquences homologues (pour une revue : Symington, 2002).

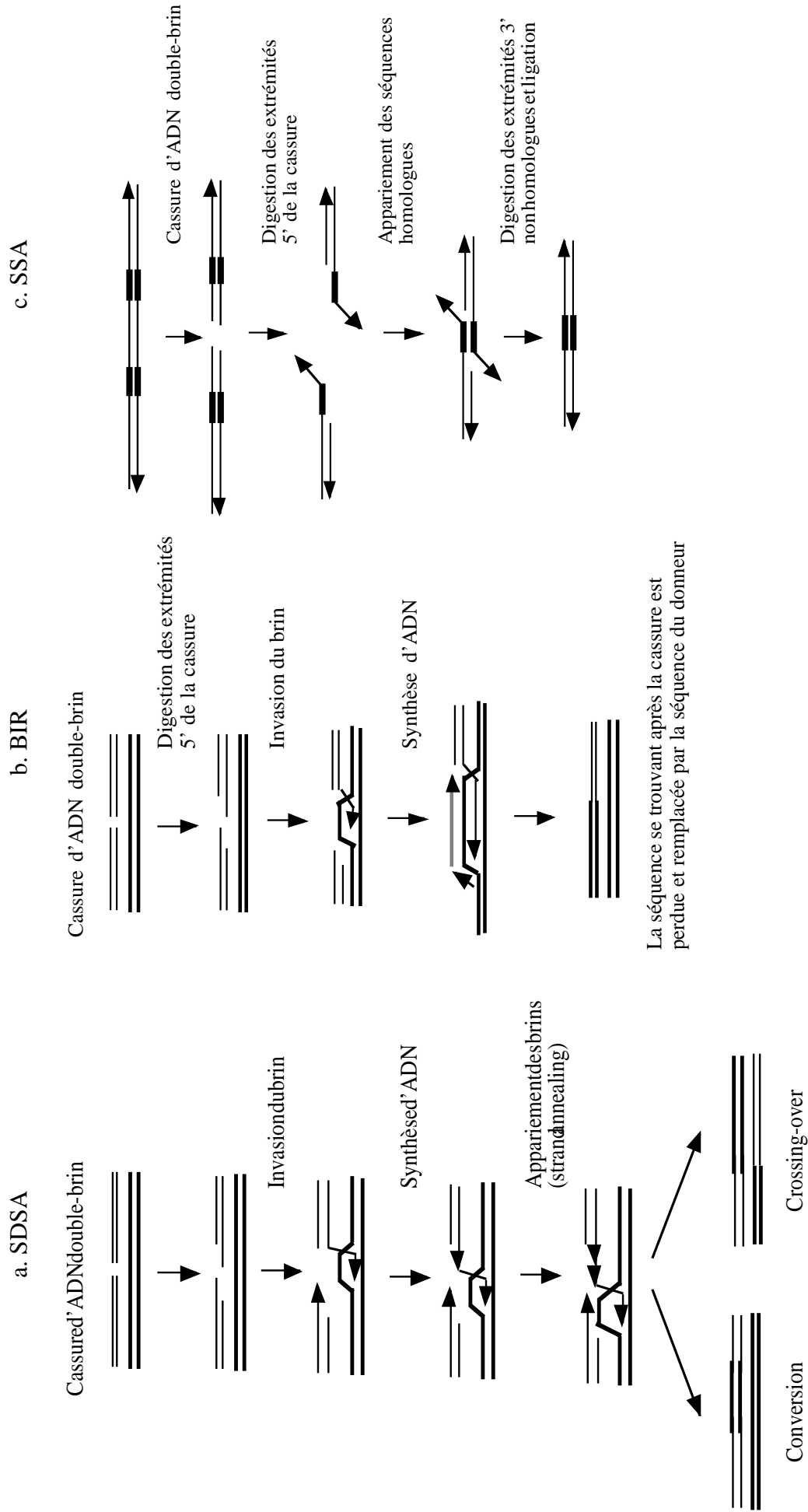


Figure 1 : Modèles de réparation des cassures d'ADN double brin dépendants du groupe d'épistasie du gène *RAD52* .

a. Synthesis-dependent strand-annealing (SDSA).

b. Break-induced replication (BIR).

c. Single-strand annealing (SSA).

(i) Lorsque le produit du gène *RAD52* est associé au produit du gène *RAD51* cette voie de réparation mène, selon le modèle de Szostack (Szostak *et al.*, 1983) ou selon le modèle du « single-strand dependent annealing » ou SDSA (Hastings, 1988 ; McGill *et al.*, 1989), à un événement de conversion génique (modèle de Szostack et SDSA) ou à un crossing-over (SDSA) (figure 1a). Le mécanisme de conversion peut conduire à une réparation à l'identique dans une souche isogénique.

(ii) Le même type d'événement peut également être obtenu par un processus *RAD52*-dépendant nommé « break induced replication » (BIR) (figure 1b) (Malkova *et al.*, 1996 ; Morrow *et al.*, 1997 ; Ira & Haber, 2002 ; Davis & Symington, 2004) ; cependant, dans ce cas, la région convertie est plus longue que selon le processus de SDSA et dans la majorité des cas, le chromosome qui a subi la cassure recopie le chromosome servant de matrice depuis la cassure jusqu'au télomère du chromosome matrice. De cette façon, le chromosome ayant subi la cassure double-brin perd le segment allant de la cassure jusqu'à son extrémité et reçoit en échange le segment de chromosome qu'il a recopié sur le chromosome matrice qui dès lors est dupliqué. Ce mécanisme peut ainsi conduire à une duplication de bras de chromosome couplé à la perte d'un bras du chromosome receveur du bras dupliqué.

(iii) Dans un autre processus *RAD51*-indépendant, l'association du produit du gène *RAD52* avec le produit du gène *RAD59* (Bai & Symington, 1996 ; Sugawara *et al.*, 2002) peut conduire à un événement de délétion selon le modèle du « single-strand annealing » ou SSA. Ce mécanisme fut tout d'abord décrit chez les mammifères par Lin *et al.* (1984 ; 1985) (figure 1c). Il peut se mettre en place lorsqu'une cassure d'ADN se produit entre deux séquences homologues en répétition directe. À ce moment, les deux séquences peuvent s'apparier et la réparation se fait au niveau de cet appariement. Si cela se produit au sein d'un même chromosome, on obtient un événement de délétion, la partie chromosomique se trouvant entre les deux séquences homologues étant perdue. Si deux cassures double-brin apparaissent sur deux chromosomes différents, le SSA peut conduire à un événement de translocation réciproque (Haber & Leung, 1996). Des études menées par Sugawara *et al.* (2000) ont montré que ces séquences homologues doivent avoir une longueur minimum de 29 bp pour que le SSA soit efficace, mais en règle générale, des séquences homologues de 60 bp à 400 bp sont le plus souvent utilisées (Sugawara & Haber, 1992).

La seconde voie de réparation, nommée NHEJ (Non-Homologous End-Joining), est dépendante des gènes *YKU70*, *YKU80*, *NEJ1*, *LIF1* et *DNL4* (Boulton & Jackson, 1996 ; Wilson *et al.*, 1997 ; Franck-Vaillant & Marcand, 2001) et requiert la présence de courtes séquences identiques pour favoriser la jonction des brins ou bien peut se mettre en place en l'absence de ces séquences (Lieber, 1999 ; pour une revue : Lewis & Resnick, 2000). Le NHEJ peut conduire à une réparation exacte ou à des réarrangements chromosomiques. Le mécanisme de délétion de cette voie nécessite généralement la présence de courtes séquences identiques, nommées microhomologies, qui se trouvent en répétition

directe de part et d'autre de la région qui sera délétée (1 à 5 bp), bien qu'il puisse également s'en passer (Kramer *et al.*, 1994 ; Moore & Haber, 1996). Il existe aussi un mécanisme générant des délétions appartenant à la voie du NHEJ mais indépendant des gènes *YKU70* et *YKU80* (Boulton & Jackson, 1996 ; Chen *et al.* 1998 ; Yu & Gabriel, 2003).

La comparaison des systèmes de réparation existant chez *S. cerevisiae* et chez les eucaryotes supérieurs a permis de montrer que les principales protéines intervenant dans ces processus étaient conservées (Kanaar & Hoeijmakers, 1997 ; Critchlow & Jackson, 1998).

Comme nous l'avons vu, les différents événements de réarrangement peuvent induire des modifications génomiques importantes et favoriser ainsi une maléabilité indispensable au processus évolutif mais peuvent également provoquer des dérèglements cellulaires aux conséquences néfastes.

Chez les organismes eucaryotes supérieurs dont l'organisation est pluricellulaire, et notamment chez l'homme, des études ont montré que les réparations des cassures d'ADN par ces mécanismes peuvent conduire à des réarrangements chromosomiques et génomiques importants, pouvant être à l'origine de développements tumoraux suite à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur ou à l'activation d'oncogènes. Ceci est notamment le cas du syndrome de Bloom caractérisé par une instabilité génomique conduisant souvent à des délétions carcinogènes (Gaymes *et al.*, 2002). Sharpless *et al.* (2001) et Difilippantonio *et al.* (2002) ont également montré l'implication des translocations et amplifications géniques dans ces phénomènes d'apparition de tumeurs.

Ainsi, les cellules doivent répondre à des contraintes importantes de viabilité, tout en gardant la souplesse nécessaire à leur évolution et à leur adaptation possible à différents milieux.

La plupart des études *in vivo* effectuées sur les remaniements chromosomiques chez *S. cerevisiae* passent par l'utilisation de conditions artificielles très éloignées des conditions standard de croissance en laboratoire. On peut ainsi utiliser des agents chimiques comme le MMS (diméthyl-sulfate), physiques comme les rayonnements UV ou encore induire des coupures enzymatiques double-brin par l'endonucléase HO. D'autres systèmes d'étude font appel à des constructions chromosomiques ou plasmidiques complexes (Kramer *et al.*, 1994 ; Moore & Haber, 1996). Ces différentes méthodes provoquent en général de nombreux remaniements avec des fréquences élevées, de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} mutation/cellule/génération, mais elles ne reflètent pas nécessairement des conditions dites « naturelles » où ce type de mutation peut intervenir de façon spontanée.

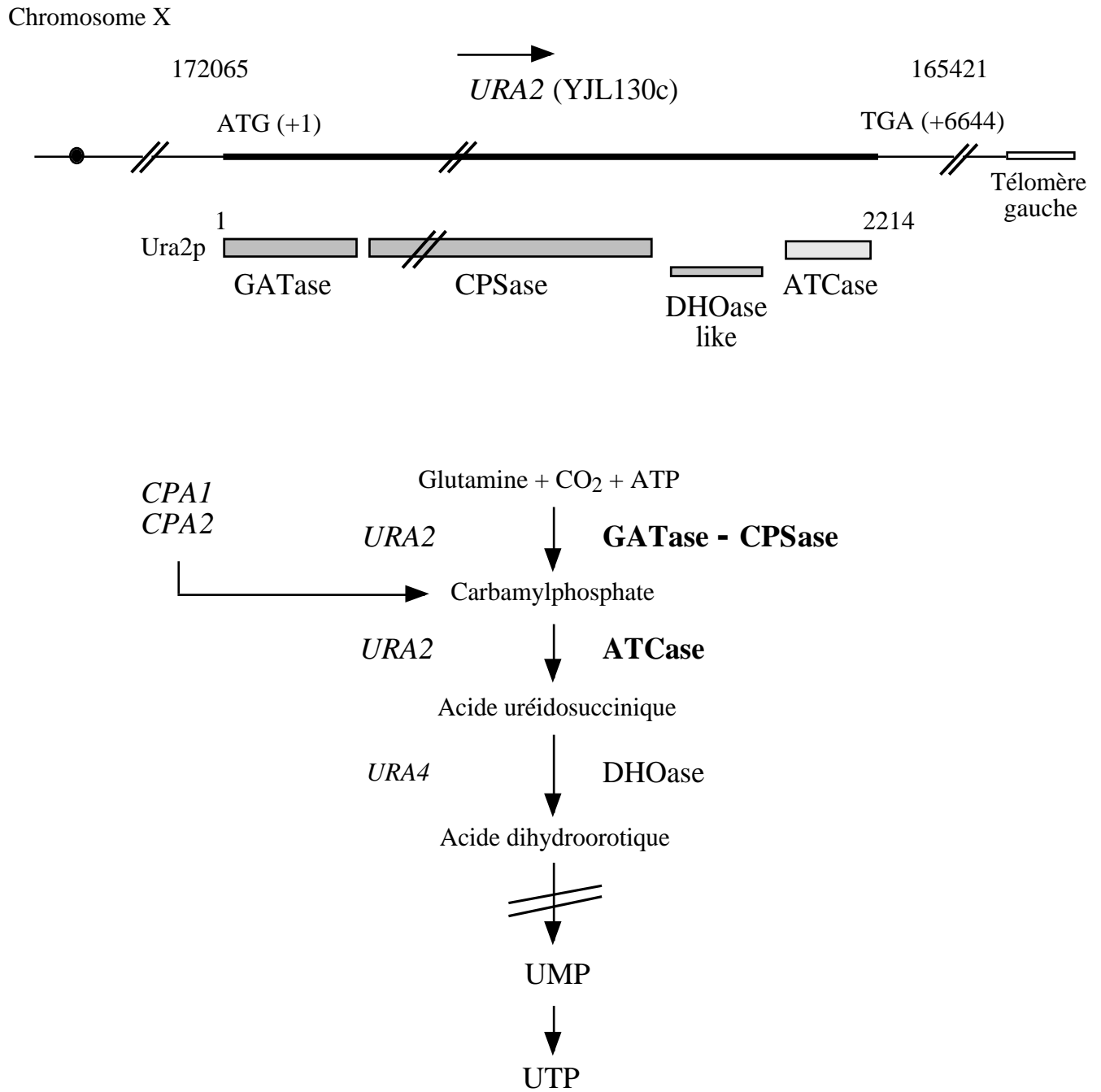


Figure 2 : Le gène *URA2* et les étapes de la voie de biosynthèse *de novo* des nucléotides pyrimidiques.

GATase : glutamine amidotransférase ; CPSase : carbamyl-phosphate synthétase;
DHOase-like : dihydroorotase-like; ATCase : aspartate transcarbamylase

Les chiffres indiquent les coordonnées du gène *URA2* (YJL130c) sur le chromosome X de la souche S288C. L'orientation du gène choisie pour cette figure est en sens opposé par rapport à l'orientation conventionnelle des ORFs sur les chromosomes de *S. cerevisiae*.

CPA1 et *CPA2* sont les deux gènes qui assurent la synthèse du carbamylphosphate dans la chaîne de biosynthèse de l'arginine. Cette molécule diffuse librement dans la cellule et peut être métabolisée dans la voie de biosynthèse de l'uracile.

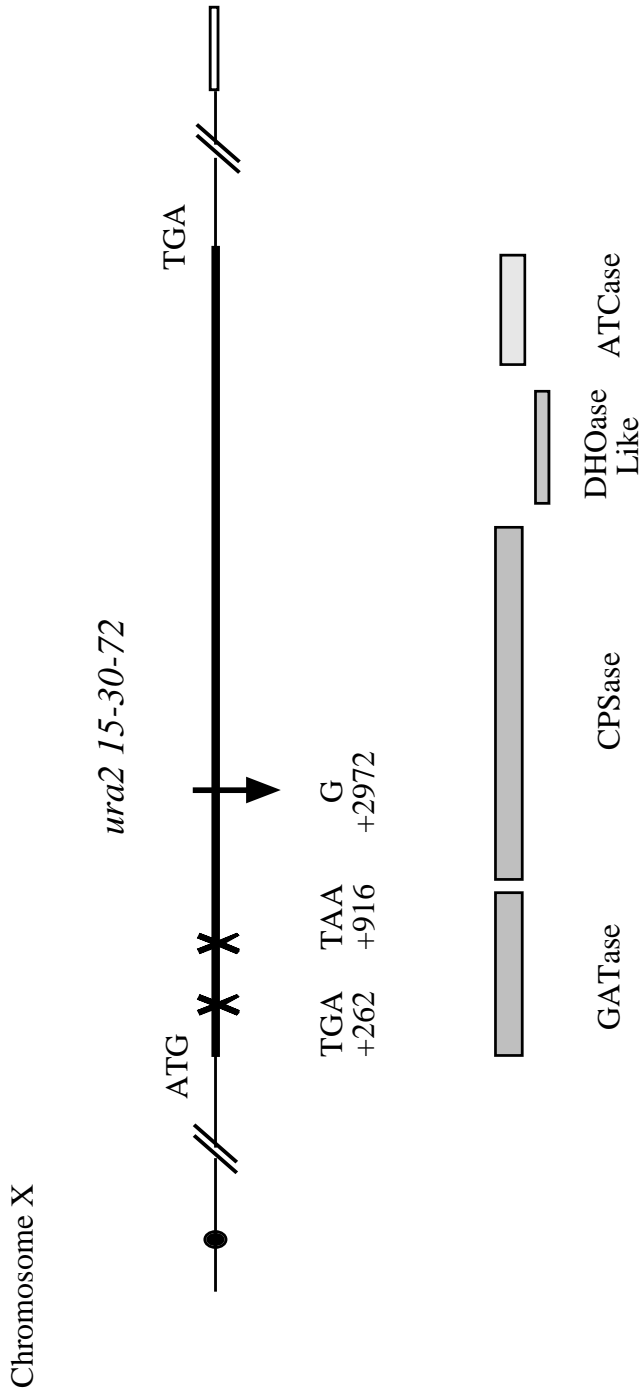


Figure 3 : Localisation des trois mutations ponctuelles de l'allèle *ura2 15-30-72* .

En position +262 et +916 se trouvent deux mutations non-sens. En position +2972 se trouve une mutation de décalage de cadre de lecture de type +1 par insertion d'une guanine.

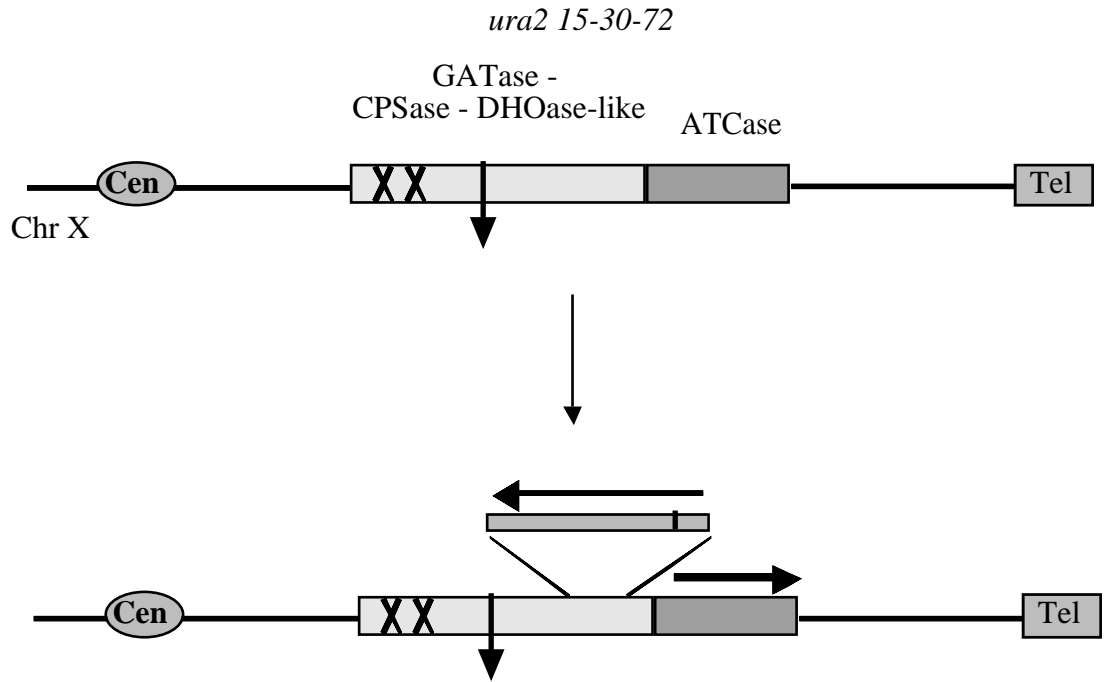
Le travail que nous présentons dans ce manuscrit a pour but d'observer la capacité de variabilité génomique d'une levure hémiascomycète, *S. cerevisiae*, ainsi que de comprendre les mécanismes impliqués dans les remaniements conduisant à cette fluidité. Pour ceci, nous utilisons un système *in vivo* permettant de sélectionner positivement des événements de réarrangement chromosomiques se produisant de façon spontanée.

Une méthode a donc été mise au point pour atteindre cet objectif utilisant un crible génétique basé sur un allèle mutant du gène *URA2* (ORF YJL130c) (Roelants *et al.*, 1995 ; Welcker *et al.*, 2000). D'une taille de 6644 nucléotides, ce gène est situé sur le bras gauche du chromosome X et code une protéine multifonctionnelle de 2215 acides aminés et de 240 kDa de poids moléculaire qui intervient dans les deux premières étapes de la voie de biosynthèse des pyrimidines (figure 2). Cette protéine est composée de trois domaines dont deux sont actifs : les domaines GATase/CPSase (glutamine amidotransférase - carbamylphosphate synthétase) situé du côté N-terminal et ATCase (aspartate transcarbamylase) du côté C-terminal séparés par le domaine inactif DHOase-like (Souciet *et al.*, 1989).

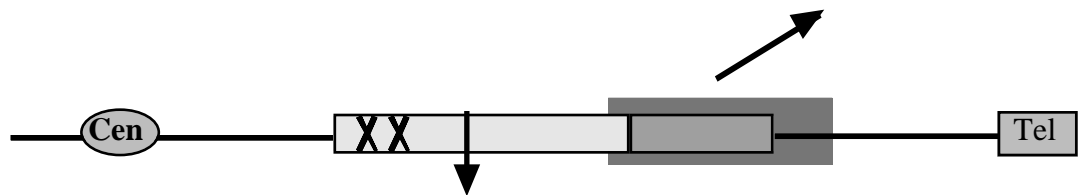
L'allèle mutant *ura2 15-30-72* (figure 3) porte deux mutations non-sens localisées dans la région codant la GATase et une mutation de décalage de cadre de lecture localisée dans la région codant la CPSase. L'arrêt de la traduction de l'ARN messager due aux mutations non-sens prive la souche de l'activité ATCase, bien que la séquence codant ce domaine reste sauvage. L'activité CPSase de cette protéine peut être naturellement complétée par le produit des gènes *CPA1* et *CPA2* de la voie de biosynthèse de l'arginine, le carbamyl phosphate produit dans cette chaîne de biosynthèse diffusant librement dans la cellule. La souche *ura2 15-30-72* est donc de phénotype $CPSase^+ ATCase^-$ et par conséquent auxotrophe pour l'uracile. Cette souche deviendra prototrophe dans le cas d'une réactivation fonctionnelle du domaine ATCase. La réversion simultanée des trois mutations ponctuelles est très peu probable avec le nombre de cellules utilisées et la restauration de la prototrophie sera alors le fait de réarrangements chromosomiques complexes.

Des travaux antérieurs effectués avec une souche portant cet allèle *ura2 15-30-72* en phase haploïde (Exinger & Lacroute, 1979), ont permis de caractériser trois types d'événements conduisant à la prototrophie pour l'uracile (figure 4) :

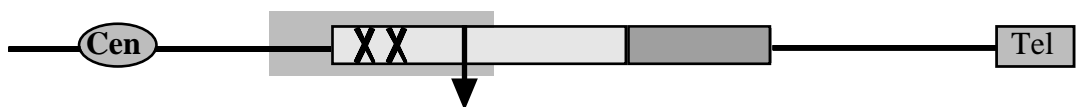
- l'insertion du rétrotransposon Ty1 dans la phase codante du gène de l'allèle *ura2 15-30-72* après les trois mutations. La séquence δ du rétrotransposon permet l'initiation de la transcription de la partie distale de cet allèle codant le domaine ATCase (Roelants *et al.*, 1995 ; 1997) ;



- Insertion d'un élément transposable Ty1 dans la région codant le domaine CPSase



- Duplication d'une région contenant la région ATCase et insertion du fragment dupliqué à proximité d'une région promotrice dans une autre région du génome.



- Délétion de la région de l'allèle contenant les trois mutations.

Figure 4 : Schéma représentant les trois types d'événements responsables de la réactivation fonctionnelle du domaine ATCase de l'allèle *ura2 15-30-72*, décrits en contexte haploïde.

- la duplication du fragment codant l'ATCase et son insertion dans une nouvelle région sur le même chromosome ou un chromosome différent, à proximité d'une séquence pouvant jouer le rôle de promoteur (Bach *et al.* , 1995 ; Schacherer *et al.* , 2004) ;

- une délétion de la région mutée, de taille variable, qui élimine systématiquement les trois mutations (Welcker *et al.* , 2000).

Comme nous l'avons mentionné plus haut, ces analyses ont été menées en phase haploïde, comme d'ailleurs la plupart des études de ce type chez *S. cerevisiae* . Il est donc nécessaire de nous intéresser maintenant au contexte diploïde a/α .

En effet, la phase diploïde est la phase la plus commune de développement de *S. cerevisiae* , même si la phase haploïde est couramment utilisée en laboratoire pour les commodités de manipulations.

En outre, la phase haploïde ne permet pas de rendre compte de la plasticité du génome de la même façon que la phase diploïde. En effet, avec chaque élément génétique présent en deux exemplaires, le contexte diploïde autorise la sélection d'événements plus variés et plus complexes, impossibles à mettre en évidence en contexte haploïde. On pense naturellement à des événements d'insertion dans un gène essentiel, mais aussi à des événements de délétion de grande taille pouvant entraîner la perte d'un gène essentiel au niveau haploïde.

D'autre part, *S. cerevisiae* est un organisme modèle pour l'étude de mécanismes cellulaires bien conservés jusqu'aux eucaryotes supérieurs, comme les mécanismes de réparation des cassures chromosomiques. La phase diploïde permet de se rapprocher des conditions trouvées chez ces organismes pluricellulaires, et notamment chez les cellules de mammifères où les anomalies génomiques somatiques issues des réparations des cassures double-brin peuvent être la cause de développements cancéreux.

Le chapitre 2 sera ainsi consacré à l'analyse des événements qui seront apparus lors de sélections effectuées en contexte diploïde a/α . Nous montrerons que le génome est un élément fluide, tolérant des remaniements importants et variés à des fréquences toutefois très faibles. Ces événements seront comparés à ceux obtenus dans des sélections témoin effectuées en phase haploïde.

Dans le chapitre 3, nous analyserons les caractéristiques des événements de délétion et de translocation et notamment les séquences des points de jonction. Nous verrons que ces jonctions contiennent des séquences nucléotidiques particulières qui semblent jouer un rôle dans la formation de ces remaniements chromosomiques. Ceci nous amènera à discuter des mécanismes impliqués dans ces types de réarrangements.

Le chapitre 4 sera consacré à la caractérisation des mécanismes mis en place pour aboutir aux observations issues des chapitres 2 et 3. Nous effectuerons des analyses en phases haploïde et diploïde avec des souches rendues inefficaces dans les voies de réparation des cassures d'ADN double-brin de la recombinaison homologue et du NHEJ.

Chapitre 1

Matériel et Méthodes

1. Organismes et milieux de culture

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.1 Biologie de *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae est un champignon hémiascomycète hétérothallique. Son cycle cellulaire est haplodiplobiontique (figure 5). Il peut se maintenir sous forme haploïde et diploïde par multiplication végétative (bourgeonnement). En conditions de croissance défavorables (carence en source de carbone ou d'azote), la cellule au stade diploïde effectue une méiose (sporulation) et génère ainsi un asque comprenant quatre spores haploïdes non ordonnées dont deux sont de signe a et deux de signe α . En conditions de croissance favorables, les spores pourront germer, devenant ainsi des cellules haploïdes. Deux cellules haploïdes de signe opposé peuvent copuler pour donner naissance à une cellule diploïde. En laboratoire, nous pouvons reproduire les conditions de culture permettant de maintenir les cellules à tous les stades ainsi que celles permettant d'induire la méiose.

1.1.2 Souches utilisées

Les souches de *S. cerevisiae* utilisées pour cette étude sont isogéniques aux souches FL100 (signe sexuel a, ATCC 28383) et FL200 (isogénique à FL100, de signe sexuel α) construites par F. Lacroute. La souche FRa (ou α) est une cellule haploïde de génotype a (ou α) *ura2 15-30-72 trp1 Δ GAL1* ; la souche FRa/ α est une cellule diploïde issue du croisement des souches FRa et FR α .

Les caractéristiques des différentes souches utilisées ou construites lors de ce travail sont répertoriées dans le tableau 1.

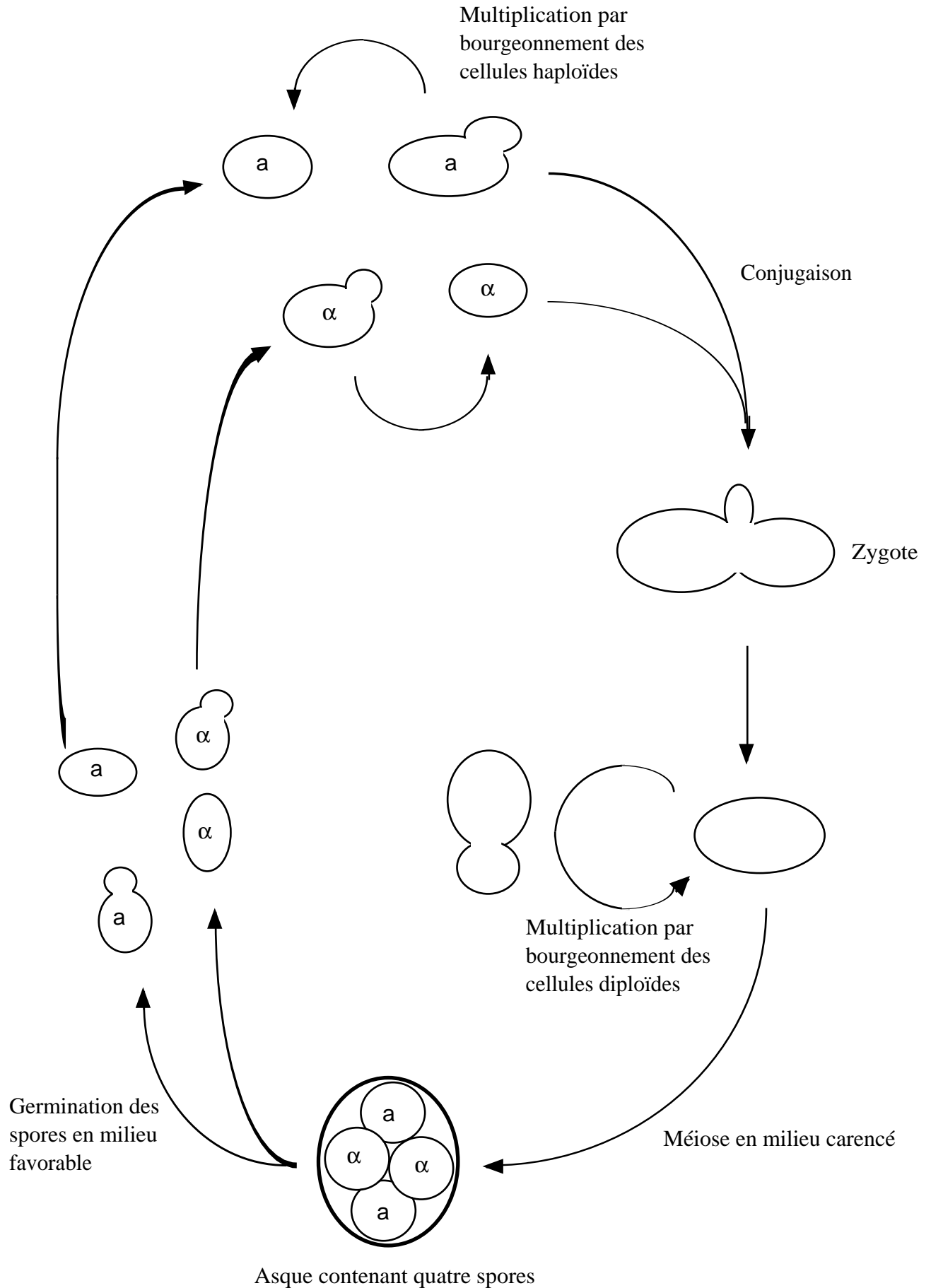


Figure 5 : Cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*.

Souches	Génotype	Phénotype	Origine
FRa	a <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺	Roelants, 1996
FRα	α <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺	Roelants, 1996
FRa/α	a <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1/α ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺	Roelants, 1996
YTaR	a <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1 rad52::kanMX4</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺ G418 ^R	ce travail
YTαR	α <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1 rad52::kanMX4</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺ G418 ^R	ce travail
YTBR	a <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1 rad52::kanMX4/α ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1 rad52::kanMX4</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺ G418 ^R	ce travail
YTaN	a <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1 nej1::kanMX4</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺ G418 ^R	ce travail
YTαN	α <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1 nej1::kanMX4</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺ G418 ^R	ce travail
YTBN	a <i>ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1 nej1::kanMX4/α ura2 15-30-72 trp1Δ GAL1 rad52::kanMX4</i>	Ura ⁻ Trp ⁻ Gal ⁺ G418 ^R	ce travail

Tableau 1 : Souches de *S. cerevisiae* utilisées dans ce travail.

1.1.3 Milieux de culture

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 110°C pendant 20 min. La composition des milieux est donnée pour 1 litre :

- Milieu complet YPG :	Yeast extract	10 g
	Bactopeptone	10 g
	Glucose	20 g
- Milieu minimum YNB :	Yeast nitrogen base	6,7 g
	Glucose	10 g
- Milieu de présporulation GNA :	Yeast extract	10 g
	Bactopeptone	15 g
	Bacto beef extract	20 g
	Glucose	50 g
- Milieu de sporulation Sp1 :	Yeast extract	2,5 g
	Glucose	1 g
	Acétate de potassium	9,8 g
- Milieu de sporulation AcK :	Acétate de potassium	10 g

Ces milieux (mis à part le milieu complet) peuvent être supplémentés en fonction des auxotrophies des souches. Ils peuvent également être solidifiés par ajout d'agar à 2 %.

1.2 Conditions de culture

Les cellules sont cultivées soit en milieu liquide sous agitation, soit sur milieu solide. La température optimale d'incubation est de 30°C pour *S. cerevisiae*. En conditions optimales de croissance, lors de la phase exponentielle, le temps de génération est de 1h30 environ sur milieu complet et de 2h30 environ sur milieu minimum.

1.3 Conservation des souches

Les souches de levure peuvent être conservées à -80°C dans 1,5 ml de milieu complet contenant 10 % de glycérol.

1.4 Mesure de la croissance cellulaire

La concentration cellulaire d'une culture donnée peut être déterminée de deux manières :

1) en milieu liquide par mesure de la turbidité de la culture à 600 nm dans un spectrophotomètre (l'appareil utilisé lors de ce travail est le Bio Photometer Eppendorf).

Une unité d'absorbance équivaut à :

- $7 \cdot 10^7$ cellules haploïdes de *S. cerevisiae* /ml

- $4 \cdot 10^7$ cellules diploïdes de *S. cerevisiae* /ml

2) en milieu solide par étalement sur milieu complet gélosé d'une concentration connue de la culture, sachant que chaque cellule viable aboutira à l'apparition d'une colonie.

2. Techniques génétiques de la levure

2.1 Obtention de cellules diploïdes

Deux souches, respectivement de signe sexuel a et α , prélevées en phase exponentielle de croissance, sont mélangées par étalement sur milieu complet solide. Les zygotes de forme caractéristique apparaissent après 3 à 4 heures et sont facilement distinguables au microscope. Ils sont prélevés à l'aide d'un micromanipulateur.

2.2 Obtention de cellules haploïdes

2.2.1 En milieu SP1

Les cellules diploïdes en phase exponentielle de croissance sont étalées sur milieu SP1 et incubées 24 heures à 30 °C avant d'être transférées sur milieu AcK. Les premiers asques apparaissent au bout de deux à trois jours d'incubation à 30 °C.

2.2.2 En milieu GNA

Cette seconde méthode est préconisée lorsque la sporulation est difficile. Les cellules diploïdes sont cultivées en milieu YPG solide jusqu'en phase exponentielle de croissance puis étalées sur un milieu GNA solide. Après 24 heures d'incubation à 30 °C, une aliquote est prélevée et placée dans 2 ml de milieu AcK liquide et placé à 25 °C sous agitation jusqu'à ce qu'apparaissent les asques.

2.3 Analyse de spores

Les asques sont prélevés et mis à incuber 20 min dans de l'eau contenant de la zymolyaze puis étalés sur un milieu complet pour être disséqués à l'aide d'un micromanipulateur. Les spores sont ainsi séparées et, après germination, donnent naissance à une colonie visible après 2 jours d'incubation à 30 °C.

2.4 Détermination du phénotype

La capacité de croissance des souches est observée sur des milieux appropriés. Lors de ce travail, nous avons utilisé le test en gouttes : une aliquote équivalente de chaque colonie est mise en suspension dans de l'eau stérile. Une goutte (5 µl) est déposée sur différents milieux sélectifs.

3. Préparation d'ADN

3.1 Extraction au phénol-chloroforme

Le but de cette extraction est l'élimination des protéines contenues dans une solution d'ADN. Pour un volume de solution d'ADN, on ajoute un volume de phénol-chloroforme (le produit utilisé est commercialisé par Q-BIOgene et constitué d'un mélange d'AquaPhenoI™, de chloroforme et d'alcool isoamylique dans les proportions respectives : 50 % / 47,5 % / 2,5 %). Le mélange est alors fortement agité à l'aide d'un vortex puis centrifugé 5 min à 12000 rpm. Il apparaît alors deux phases, une phase phénolique située au fond du tube et une phase aqueuse supérieure, les protéines se trouvant à l'interface. La phase aqueuse supérieure contenant l'ADN est récupérée par pipetage. L'extraction ainsi réalisée peut être répétée plusieurs fois afin d'augmenter la pureté de l'ADN.

3.2 Précipitation alcoolique

Cette étape se fait en général après l'extraction au phénol-chloroforme et permet de précipiter l'ADN pour le concentrer ainsi que d'en éliminer des impuretés solubles.

Pour un volume de solution d'ADN on ajoute 2 volumes d'éthanol absolu froid ainsi que 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3 M pH 7. Afin d'optimiser cette précipitation on peut incubé le milieu dans la glace (ou à -20 °C), généralement pendant 15 min. Le milieu est ensuite centrifugé pendant 15 min à 13000 rpm et le culot est rincé avec 1 ml d'éthanol 70 %, puis séché et repris dans un volume choisi de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) ou d'eau distillée.

3.3 Préparation rapide d'ADN génomique de levure (Hoffman & Winston, 1987)

L'ADN obtenu à l'aide de cette méthode n'est pas d'une pureté élevée, mais elle est néanmoins suffisante pour les analyses par hybridation ADN/ADN ainsi que pour les amplifications PCR.

Les cellules sont mises en culture dans 10 ml de milieu complet (YPG) liquide, à 30 °C sous agitation, jusqu'en début de phase stationnaire. Elles sont ensuite récoltées par centrifugation (5 min à 3000 rpm). Le culot est alors remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée puis transféré dans un tube Eppendorf et centrifugé pendant 2 min à 12000 rpm. Les cellules sont ensuite reprises dans 250 µl de tampon de broyage (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton 2 %, SDS 1 %) et l'on ajoute des billes de verre stériles (de diamètre 0,5 mm) de manière à laisser environ 1 mm de milieu au-dessus des billes. On ajoute alors 250 µl de phénol-chloroforme et le milieu est vortexé pendant 3 min, puis centrifugé pendant 5 min à 12000 rpm. La phase aqueuse supérieure, transférée dans un nouveau tube Eppendorf, est additionnée d'un volume de phénol-chloroforme. Ce mélange est vortexé pendant 30 sec puis centrifugé à 12000 rpm pendant 2 min. La phase aqueuse supérieure est à nouveau transférée dans un nouveau tube Eppendorf et additionnée de 600 µl d'éthanol absolu froid et de 20 µl d'acétate d'ammonium 3 M. Cette solution est maintenue dans la glace pendant 15 min environ puis centrifugée pendant 5 min à 12000 rpm. Après séchage, le culot est repris dans 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). On ajoute 30 µg de RNase A au milieu qu'on incube pendant 15 min à 37 °C. 1 ml d'éthanol absolu froid est alors mélangé à la solution qui est ensuite placée 15 min dans la glace, puis centrifugée pendant 10 min à 12000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot rincé avec 1 ml d'éthanol 70 %. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 50 µl de TE.

4. Analyse des ADN

4.1 Détermination de la concentration d'ADN

Elle peut être calculée par la mesure d'absorbance à 260 nm, longueur d'onde à laquelle une unité de DO correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin ou 40 µg/ml d'ADN simple brin.

4.2 Coupure par des endonucléases de restriction (Sambrook *et al.* , 1989)

Les endonucléases de restriction sont des enzymes capables de couper l'ADN double-brin au niveau de séquences spécifiques qu'elles auront reconnues. Elles sont utilisées dans les conditions décrites par le fournisseur (Boehringer Mannheim, Biolabs, Gibco) dans les tampons qui leur sont associés avec des conditions précises de température, de pH et de force ionique.

La digestion totale de 0,5 µg à 1 µg d'ADN se fait sur une durée de 3 heures avec 1 unité d'enzyme par site de coupure dans un volume final de 20 µl dont 2 µl de tampon de digestion (concentré x 10). Pour réaliser une coupure partielle, on peut interrompre la digestion par addition de bleu de dépôt (EDTA 125 mM, glycérol 25 %, sarkosyl 2 %, bleu de bromophénol 0,06 %).

4.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

Lors de ce travail, deux types d'électrophorèse ont été mis en oeuvre : l'électrophorèse classique permet de séparer des fragments d'ADN de taille inférieure à 50 kb. L'électrophorèse en champs alternés (ou « pulsés ») permet quant à elle de séparer des molécules d'ADN beaucoup plus grandes telles que des chromosomes entiers de levure allant de 200 à 1500 kb.

4.3.1 Électrophorèse classique

Les fragments d'ADN linéaires sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose pouvant varier de 0,8 à 2 %. La migration s'effectue sous une tension pouvant varier de 20 à 130 V dans un tampon d'électrophorèse, le TAE (Tris-Base 4,84 g ; acétate de sodium 0,68 g ; EDTA 0,336 g ; acide acétique 1,35 ml ; eau qsp 1 l). Ces fragments sont visibles aux UV à 300 nm grâce au BET contenu dans le gel qui s'insère entre les plateaux de base de l'ADN. On peut en estimer la taille et la concentration en comparaison avec la

comigration d'un marqueur de taille tel que de l'ADN de phage λ digéré par les enzymes de restriction *Eco* RI et *Hind* III.

4.3.2 Électrophorèse en champs alternés

Le principe de cette électrophorèse repose sur l'alternance de champs électriques dans différentes directions, permettant aux molécules d'ADN de se réorienter dans le gel d'agarose et aboutissant à leur séparation en fonction de leur taille. Le système CHEF (Camped Homogeneous Electric Field) (Chu *et al.*, 1986) possède 24 électrodes positionnées en hexagone. Lors de ce travail, nous avons utilisé l'appareil CHEF-DRIII System commercialisé par Bio-Rad. Il est accompagné d'un réfrigérateur permettant de maintenir le tampon de migration à une température de 14 °C ainsi que d'une pompe faisant circuler ce tampon pour éviter la formation de gradients de température ou de concentrations ioniques. La migration s'effectue dans un gel d'agarose pouvant varier de 0,8 à 1,2 % dans du tampon TBE X 0,5 (Tris-borate 45 mM ; EDTA 1mM). La vitesse de migration de l'ADN dépend notamment de la concentration en agarose du gel, du temps total de l'électrophorèse, ainsi que du temps pendant lequel le champ électrique suit une direction. Pour ce travail, nous avons appliqué des conditions permettant une bonne séparation globale des chromosomes. Ainsi, les migrations ont été effectuées dans un gel d'agarose 1 % sur une durée allant de 22 à 26 heures à 6 V/cm avec des pulses de 40 et 120 sec et un angle variant de 120°.

4.4 Purification des molécules d'ADN

Le séquençage de l'ADN produit par PCR ainsi que la transformation des cellules par de l'ADN produit par PCR nécessite une étape de purification éliminant les impuretés consécutives aux réactions antérieures. Dans ce but, nous avons utilisé les MicroSpin Columns commercialisées par Amersham Biosciences qui permettent de récupérer 50 à 90 % de l'ADN initialement présent avec un taux de pureté de 70 à 90 %, selon les estimations du producteur.

Ces mêmes colonnes ont été utilisées pour purifier les produits PCR préalablement séparés sur gel d'agarose après production de plusieurs fragments issus d'une même réaction PCR, notamment lors de l'utilisation des amorces dégénérées.

5. Vecteur

Lors de ce travail, nous avons utilisé le plasmide pFA6-KanMX4 (figure 6) construit par Wach *et al.* (1994) afin d'amplifier le gène marqueur KAN^R qui a été utilisé pour les remplacements des gènes *RAD52* et *NEJ1*. Ce plasmide contient le gène KAN^R du transposon Tn903 qui code une aminoglycoside phosphotransférase (Oka *et al.*, 1981) sous contrôle transcriptionnel de séquences du champignon filamenteux *Ashbya gossypii* (Steiner & Philippsen, 1994). L'activité du produit du gène KAN^R confère une résistance à la généticine G418 chez *S. cerevisiae* (Jimenez & Davies, 1980). Le plasmide ne comporte pas de séquences homologues au génome de la levure qui lui permettent de s'y insérer et ne peut donc pas se répliquer dans cet organisme.

6. Technique de transformation de levure

La technique utilisée est celle de l'électroporation (Dower *et al.*, 1988).

6.1 Préparation de cellules compétentes

Les cellules sont cultivées dans 40 ml de milieu complet jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance. Elles sont ensuite placées dans la glace pendant 10 min. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 2500 rpm pendant 5 min à 4 °C. On lave ensuite les cellules avec 5 ml de sorbitol 1 M avant de reprendre le culot dans 200 µl de sorbitol 1 M. Les cellules sont placées dans la glace.

6.2 Électroporation

50 µl de cellules compétentes sont déposées dans une cuve d'électroporation (largeur = 1 cm), elle-même posée dans la glace. On ajoute alors l'ADN (10 ng d'ADN plasmidique ou 1 µg de produit PCR) dans la cuve. Celle-ci est alors soumise à une impulsion électrique. Le voltage utilisé dans un appareil Electroporator 2510 Eppendorf est de 1250 V ; les autres paramètres ne sont pas réglables sur cet appareil. Immédiatement après électroporation, on ajoute 1 ml d'YPG. Le milieu est alors transféré dans un tube eppendorf stérile et les cellules, après régénération à 30 °C pendant 2 heures, sont concentrées dans 1 volume de 200 µl qui sera étalé sur un milieu solide approprié. Les transformants sont cultivés à 30 °C et les colonies apparaissent au bout de 2 à 3 jours.

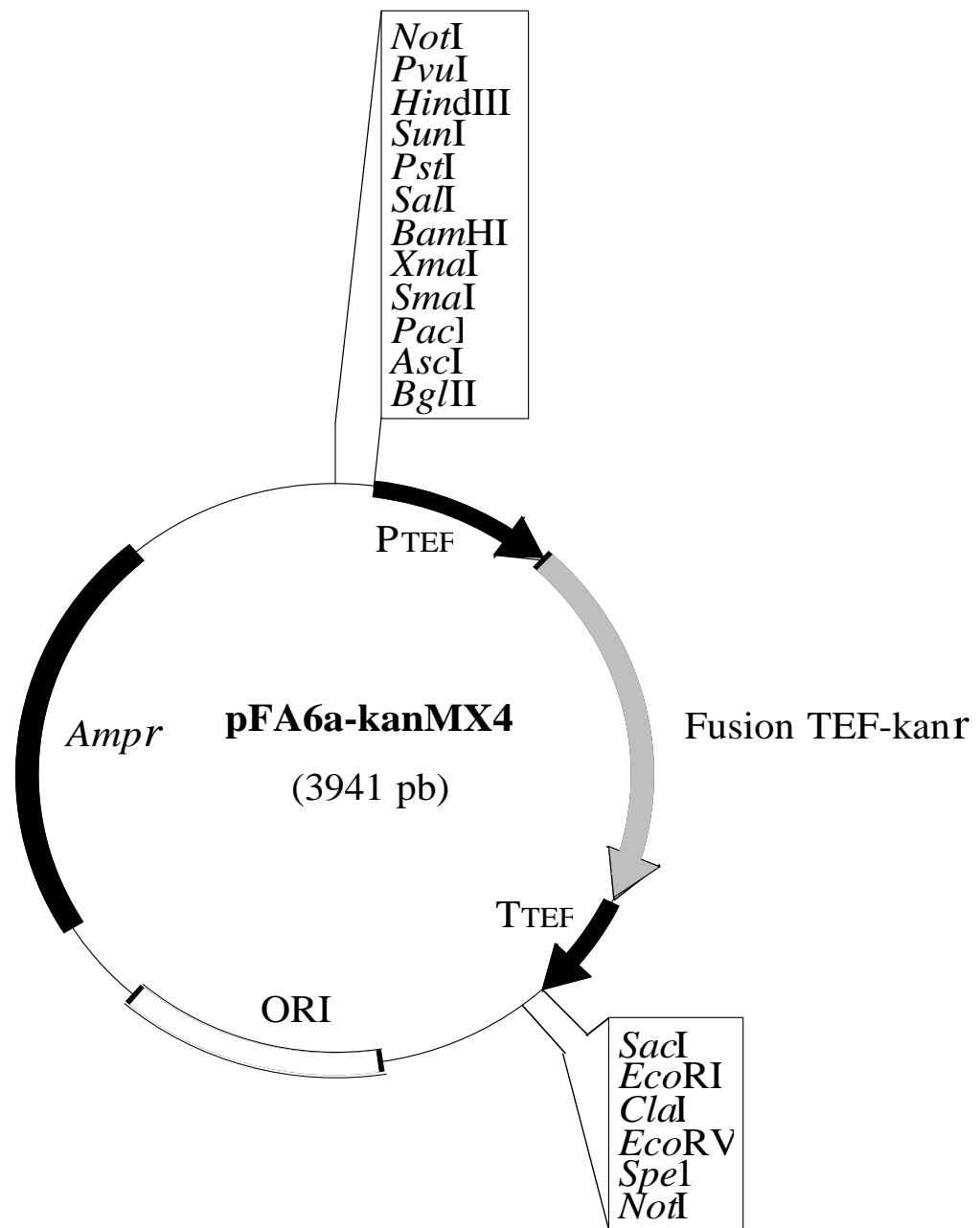


Figure 6 : Carte du plasmide pFA6-kanMX4.

7. Hybridation ADN/ADN

Cette technique permet de caractériser spécifiquement des fragments d'ADN fixés sur un support solide à l'aide d'une sonde radioactive ou d'une sonde froide, c'est-à-dire non radioactive.

Toutes les sondes utilisées dans ce travail sont des sondes froides. Bien que moins sensible qu'une sonde radioactive, ce type de sonde permet de caractériser des fragments d'ADN issus d'une digestion par enzyme de restriction ou bien de chromosomes entiers de levure. Ce marquage froid présente le grand avantage de se dispenser de l'utilisation de produits radioactifs.

La technique est celle du DIG DNA Labeling and detection Kit commercialisé par Roche. Elle est basée sur l'utilisation d'anticorps anti-digoxigénine ayant une activité phosphatase alcaline (Anti-DIG-AP) qui se fixent sur des dNTP marqués à la digoxigénine (DIG) contenus dans la sonde. La phosphatase alcaline provoque l'apparition d'un précipité coloré après réaction avec un substrat, le NBT/BCIP, révélant ainsi le fragment nucléotidique recherché. Un autre substrat, le CDP-Star entraîne l'émission de lumière à 466 nm après réaction avec la phosphatase alcaline, ce qui permettra la visualisation du fragment recherché après exposition sur un film d'autoradiographie.

7.1 Préparation d'une sonde froide

Les sondes sont obtenues par amplification PCR d'une région du génome choisie. Le fragment ainsi obtenu est ensuite purifié par extraction au phénol-chloroforme puis précipité à l'alcool pour être repris dans 20 µl de TE. 1 à 3 µg sont ensuite prélevés pour la réaction de marquage. Ce marquage s'effectue sur toute la longueur du fragment d'ADN : le fragment est d'abord dénaturé puis mis en présence, dans un volume de 20 µl, d'hexanucléotides servant d'amorce à la réaction, de dNTPs (dATP 1 mM ; dCTP 1 mM ; dGTP 1 mM ; dTTP 1 mM ; DIG-11-dUTP 0,35 mM), et de 2 unités de fragment de Kleenow, permettant la polymérisation. Les sondes ainsi obtenues sont des ADN double-brin marqués sur l'un des deux brins.

7.2 Hybridation selon la méthode de Southern (Southern *et al.*, 1975)

Cette technique permet la caractérisation de fragments d'ADN après migration sur gel d'agarose.

7.2.1 Transfert sur membrane nylon

La membrane nylon utilisée est le modèle Hybond-N⁺ commercialisé par Amersham Biosciences.

7.2.1.1 Traitement du gel d'agarose

Les molécules d'ADN sont séparées sur un gel d'agarose soit par électrophorèse classique, soit par électrophorèse en champs alternés. Une fois la migration terminée, le gel est plongé dans une solution de dépurination (HCl 0,25 M) durant 30 min, ce qui fragmente les molécules de haut poids. Il est ensuite transféré dans une solution de dénaturation (NaCl 1,5 M ; NaOH 0,5 M) pendant 45 min (1 h 15 min pour les gels contenant des chromosomes entiers) afin de séparer les deux brins, puis dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 1 M pH 7,4 ; NaCl 1,5 M) pendant 30 min. Après cela, l'ADN est prêt à être transféré du gel vers la membrane.

7.2.1.2 Méthode de transfert au 20 x SSC

Par-dessus une cuve remplie de tampon 20 x SSC (NaCl 3 M ; Tri-sodium citrate 0,3 M) est posée une feuille de papier Whatman dont les extrémités trempent dans le 20 x SSC. Sur cette première feuille en sont ajoutées trois autres de la taille du gel d'agarose, préalablement mouillées dans du 20 x SSC. Sur ces feuilles est placé le gel, sur lequel on pose la membrane découpée à la taille du gel. Par-dessus, on superpose trois nouvelles feuilles de papier Whatman sur lesquelles on ajoute une épaisseur d'environ 10 cm de papier Joseph, le tout découpé à la taille du gel. Enfin, après avoir mis une plaque de verre sur l'édifice, on y ajoute un poids. Ainsi, le tampon 20 x SSC monte par capillarité et entraîne avec lui l'ADN qui est alors transféré sur la membrane nylon.

7.2.1.3 Méthode de transfert au NaOH

Cette méthode permet un meilleur transfert des fragments de taille supérieure à 20 kb, comme les chromosomes entiers de levure. Elle a été fréquemment utilisée pour le transfert d'ADN issu d'une migration en champs alternés.

Le principe est identique à la méthode précédente. Cependant, c'est la solution de dénaturation qui sert de solution de transfert à la place du 20 x SSC. Il n'y a pas d'étape de neutralisation durant le traitement du gel d'agarose. Après le transfert, la membrane doit subir plusieurs étapes de lavage. Tout d'abord la membrane est incubée 30 min dans une solution de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M, puis deux fois 30 min dans une solution de Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, NaCl 1 M. Enfin, elle est lavée dans du 10 x SSC pendant 10 à 30 min avant d'être séchée.

7.2.2 Fixation de l'ADN sur la membrane nylon

La fixation de l'ADN est réalisée soit par exposition pendant 3 min aux UV (par trans-illuminateur ou UV à 254 nm), méthode la plus fréquemment utilisée pour les ADN provenant d'électrophorèses classiques, soit par chauffage de la membrane pendant 2 h à 80°C, méthode utilisée pour les ADN issus d'une électrophorèse en champs alternés.

7.2.3 Préhybridation

La membrane est tout d'abord humidifiée dans une solution 2 x SSC puis incubée pendant 1 h à 65 °C dans un milieu 0,2 x SSC, SDS 0,2 %. Cette première étape est importante pour diminuer le bruit de fond lors de l'hybridation. La préhybridation proprement dite se fait par incubation dans 20 ml (pour une membrane de 100 cm²) de tampon d'hybridation (5 x SSC ; N-lauroylsarcosine 0,1 % ; SDS 0,02 % ; blocking reagent 1 %) durant 2 h à 68 °C.

7.2.4 Hybridation

Environ 100 à 200 ng de sonde sont dénaturés pendant 10 min par chauffage à 95 °C puis incorporés au tampon d'hybridation (5 ml pour une membrane de 100 cm²). La membrane est mise à incuber dans ce milieu à 68 °C durant la nuit.

Le lendemain, la membrane est lavée deux fois pendant 5 min à température ambiante dans une solution peu stringente (2 x SSC ; SDS 0,1 %), permettant l'élimination de l'excès de sonde non fixée. Elle est ensuite lavée dans une solution fortement stringente (0,1 x SSC ; 0,1 % SDS) qui élimine la sonde fixée non-spécifiquement.

7.2.5 Révélation au NBT/BCIP

Toutes les étapes se déroulent à température ambiante. La membrane est équilibrée pendant 1 min dans du tampon de lavage (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM), puis incubée durant 30 min dans un tampon de saturation (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; lait en poudre 1/2 écrémé 5 %) permettant de saturer les sites aspécifiques aux anticorps anti-DIG-AP. Elle est enfin placée dans un milieu de tampon de saturation (20 ml pour une membrane de 100 cm²) additionné d'anticorps (150 mU/ml final) pendant 30 min. Elle est ensuite lavée deux fois pendant 15 min dans le tampon de lavage, puis équilibrée 2 min dans la solution de révélation (Tris-HCl 100 mM pH 9,5 ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 50 mM). Elle est finalement placée à l'obscurité dans 5 ml de cette même solution additionnée de NBT/BCIP, jusqu'à apparition de la coloration (en général de 2 à 16 heures). La révélation au CDP-Star se fait dans les mêmes conditions, le NBT/BCIP étant remplacé par ce substrat pour la révélation et la membrane étant exposée à l'obscurité contre un film d'autoradiographie.

7.2.6 Déshybridation

Il est possible de déshybrider une membrane pour pouvoir réaliser une nouvelle hybridation. Pour cela, rincer la membrane dans de l'eau, puis la laver deux fois pendant 30 à 40 min à 37 °C dans une solution de NaOH 0,2 M, SDS 0,1%. Après avoir été rincée pendant 5 min dans du 2 x SSC, elle peut être conservée dans du 2 x SSC ou du TE, à l'abri de la lumière. Après le rinçage, elle peut aussi être directement réutilisée pour une hybridation en recommençant par l'étape de préhybridation.

8. Amplification d'un fragment d'ADN spécifique par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique, décrite par Saiki *et al.* en 1985, permet l'amplification exponentielle et spécifique d'un fragment d'ADN in vitro (Figure 7).

8.1 Principe

Dans un même milieu sont mis en présence l'ADN matrice, deux oligonucléotides amorces qui s'hybrident à la matrice, les quatre dNTPs ainsi qu'une ADN polymérase thermostable qui réalisera l'amplification. Elle se déroule sur plusieurs cycles, dont le nombre varie généralement de 25 à 35, constitués de trois étapes : dénaturation de la matrice, hybridation des amorces et polymérisation de l'ADN.

8.2 Paramètres importants

8.2.1 Dénaturation

Par chauffage à 94 °C, on obtient de l'ADN simple brin à partir de la matrice double brin. La dénaturation dure en général 30 sec par cycle. Avant le départ des cycles, il est recommandé de faire une première dénaturation de 2 min.

8.2.2 Hybridation

Durant cette étape, les amorces sont hybridées à l'ADN matrice simple brin. De la température d'hybridation dépendent la spécificité et le rendement de l'amplification. Elle est calculée à partir de la température de fusion (T_m) des oligonucléotides, selon la formule approximative : $T_m = (\text{nombre de bases A} + \text{T}) + 2 \times (\text{nombre de bases C} + \text{G})$ (Sambrook *et al.*, 1989). À partir de cette T_m , on peut calculer la température d'hybridation (T_p) avec l'équation : $T_p = 22 + 1,46 (T_m)$ (Wu *et al.*, 1991). En général, on abaisse cette température de 5 °C car le rendement est trop faible à la T_p à cause de la trop forte stringence. Une autre méthode consiste à calculer la température de fusion telle que : $T_m = 2 \times (\text{nombre de bases A} + \text{T}) + 4 \times (\text{nombre de bases C} + \text{G})$; avec cette méthode de calcul, la température d'élongation est identique à la T_m . Le temps d'hybridation appliqué est en général de 30 à 40 sec.

8.2.3 Polymérisation

Elle se réalise avec une DNA polymérase thermostable telle que la *Taq* DNA polymérase de *Thermus aquaticus*. Sa processivité est importante : plus de 7600 bases pour une vitesse de polymérisation de 35 à 100 bases/sec ; son taux d'erreur est de 8.10^{-6} (16 %). Certaines polymérases plus fidèles, telle la *Pfu*, peuvent être utilisées. La durée de cette étape est fonction de la longueur du fragment d'ADN à amplifier, à savoir 1 min pour 1 kb.

À l'issue des cycles, une post-élongation peut être effectuée afin de terminer la synthèse des brins d'ADN inachevés.

8.3 Enzymes et milieux réactionnels

8.3.1 *Taq* DNA polymérase

Commercialisée par Q-BIOgene avec son tampon PCR x 10 (Tris-HCl pH 9 100 mM ; KCl 500 mM ; $MgCl_2$ 15 mM ; Triton x 100 1 % ; BSA 2 mg/ml), elle est utilisée pour les amplifications allant jusqu'à 4 kb environ.

La composition du milieu de réaction est : 5 μ l de tampon x 10 ; 0,5 μ l d'une solution des 4 dNTPs à 20 mM ; 1 μ l de chaque oligonucléotide à 20 μ M ; 10 à 100 ng d'ADN ; 0,2 unité d'enzyme ; eau bidistillée qsp 50 μ l.

8.3.2 Expand Long Template PCR System

Commercialisé par Roche, il est constitué d'un mélange de *Taq* DNA polymérase et de *Pwo* DNA polymérase. Il est fourni avec 3 tampons différents, utilisés selon la longueur de l'amplification. Ce système est utilisé pour les grandes amplifications, de 4 à plus de 15 kb.

La composition du milieu de réaction est : 5 μ l de tampon x 10 ; 1 μ l d'une solution des 4 dNTPs à 20 mM ; 1 μ l de chaque oligonucléotide à 20 μ M ; environ 100 ng d'ADN ; 2,5 unités d'enzyme ; eau bidistillée qsp 50 μ l.

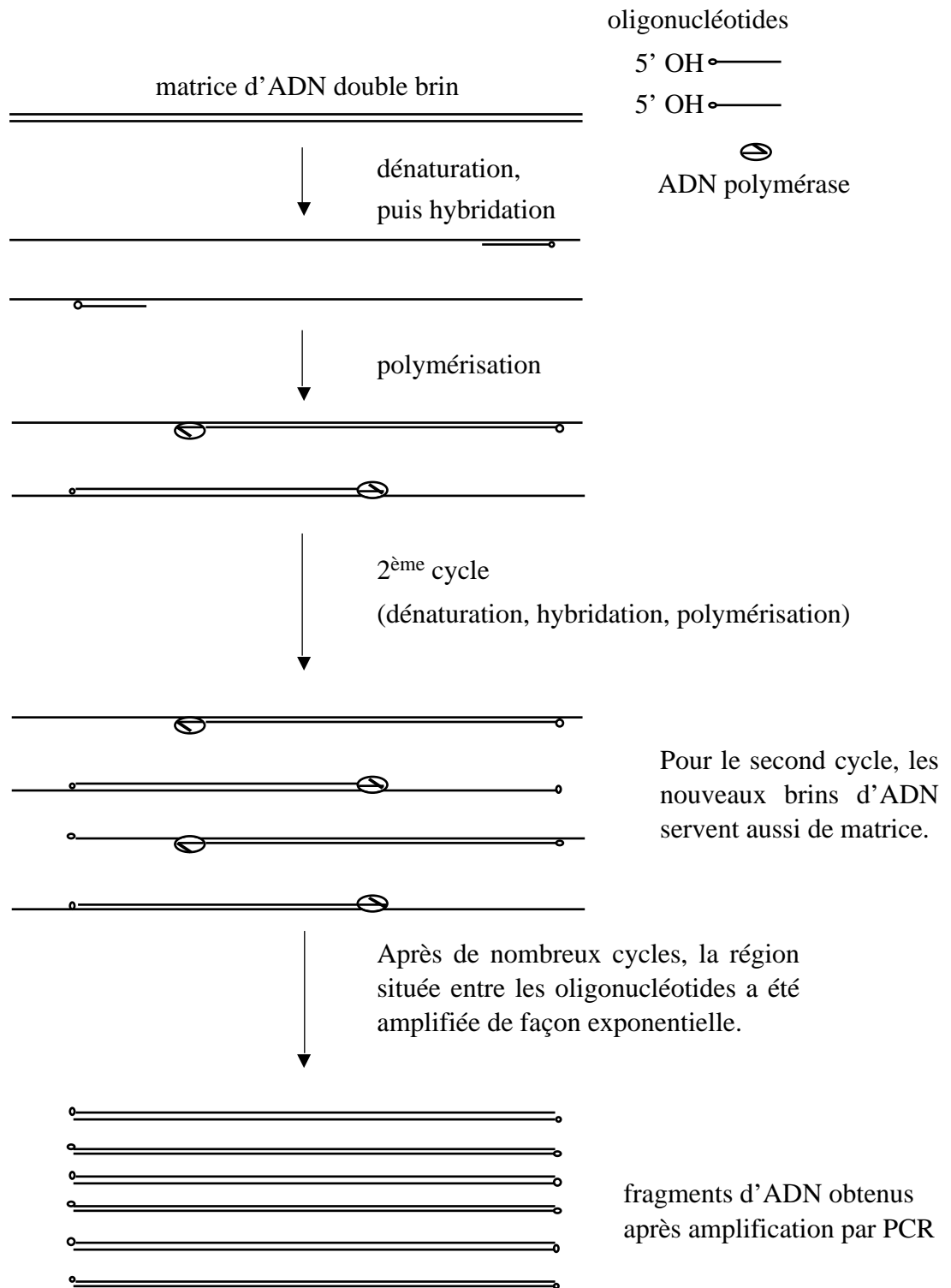


Figure 7 : Principe de l'amplification par PCR.

8.4 Cycles particuliers utilisés lors de ce travail

8.4.1 Remplacement de gène en une étape (Baudin *et al.* (1993))

8.4.1.1 Synthèse du fragment de remplacement

La technique utilisée est celle du remplacement génique en une étape. Pour ceci, nous avons utilisé le plasmide pFA6a-kanMX4 portant le gène *KAN^R* dans le module kanMX4 comme matrice afin d'amplifier ce gène. Le fragment ainsi produit sert à remplacer le gène cible. Les cycles utilisés sont les suivants : 2 min à 94°C, puis 30 cycles de 30 sec à 94 °C, 30 sec à 52 °C, 1 min 30 sec à 72 °C, et enfin une post-élongation de 5 min à 72 °C.

8.4.1.2 Vérification du remplacement

Pour ceci nous avons utilisé les couples d'amorces RAD52-1/kan1 et RAD52-4/kan2 pour le remplacement du gène *RAD52* ainsi que NEJ1-1/kan1 et NEJ1-4/kan2 pour le remplacement de *NEJ1*, avec les cycles suivants : 2 min à 94°C, puis 30 cycles de 30 sec à 94 °C, 30 sec à 50 °C, 1 min 30 sec à 72 °C, et enfin une post-élongation de 5 min à 72 °C.

Les tailles respectives attendues pour le remplacement de *RAD52* sont 606 bp et 468 bp ; 605 bp et 717 bp pour *NEJ1*.

8.4.2 Analyse des révertants

8.4.2.1 Insertion d'éléments Ty1

Afin de vérifier la présence ou l'absence d'éléments transposables Ty1, on utilise le couple d'amorces δ B41/AW1 (T_m de 50 °C) respectivement spécifique de la région LTR du rétrotransposon et de la région codant pour la CPSase du gène *URA2*. Ce couple d'oligonucléotides est utilisé dans les conditions suivantes : 2 min à 94 °C, puis 30 cycles de 30 sec à 94 °C, 45 sec à 50 °C, 2 min à 72 °C, et enfin une post-élongation de 10 min à 72 °C.

8.4.2.2 Caractérisation des événements de délétion

Pour ceci, nous utilisons des oligonucléotides répartis de part et d'autre des trois mutations de l'allèle *ura2 15-30-72* ayant des T_m allant de 48 °C à 52 °C. Les cycles sont les suivants : 2 min à 94 °C, puis 30 cycles de 30 sec à 94 °C, 30 sec à 48 °C, 2 min à 72 °C, et enfin une post-élongation de 10 min à 72 °C.

8.4.2.3 Expand Long Template PCR System

Les cycles utilisés avec ce système ont été les suivants :

- 2 min à 94 °C
- 10 cycles de 10 sec à 94 °C, 30 sec à X °C (X correspond à la température choisie en fonction du T_m des oligonucléotides utilisés), Y min à 68 °C (X étant déterminé en fonction de la taille du fragment à amplifier (10 à 30 min pour ce travail))
- 20 cycles de 10 sec à 94 °C, 30 sec à 48 °C, Y min + 20 sec/cycle à 68 °C
- post-élongation de 20 min à 68 °C

8.4.2.4 Amplification à l'aide d'amorces dégénérées

Nous avons suivi le protocole de la Tail-PCR décrit par Liu & Whittier (1995) afin de déterminer les jonctions des événements de translocation.

Pour ceci, une première PCR est effectuée avec les amorces dégénérées AD1, AD2, ou AD3 associées à une amorce déterminée spécifique de l'allèle *ura2 15-30-72* et proche du site de jonction.

Les cycles sont les suivants :

- une première dénaturation à 94 °C pendant 2 min
- 5 cycles de 30 sec à 94 °C, 1 min à X °C, 4 min à 72 °C
- 1 cycle de 30 sec à 94 °C, 1 min à 25 °C, 4 min à 72 °C
- 15 cycles de:
 - 3 cycles de 10 sec à 94 °C, 1 min à X °C, 4 min à 72 °C
 - 1 cycle de 10 sec à 94 °C, 1 min à 44 °C, 4 min à 72 °C
- une élongation terminale de 5 min à 72 °C

Une seconde PCR est effectuée sur les produits PCR de la première dilués au 1/100^e en utilisant une amorce spécifique de l'allèle *ura2 15-30-72* plus proche du point de jonction que lors de la première et les amorces AD1, AD2 ou AD3.

Les cycles sont les suivants :

- une première dénaturation à 94 °C pendant 2 min

- 12 cycles de:

- 1 cycle de 30 sec à 94 °C, 1 min à 52 °C, 4 min à 72 °C
- 1 cycle de 20 sec à 94 °C, 1 min à X °C, 4 min à 72 °C
- 1 cycle de 20 sec à 94 °C, 1 min à 44 °C, 4 min à 72 °C

- une élongation terminale de 5 min à 72 °C

La température d'hybridation X est déterminée en fonction de la T_m de l'oligonucléotide spécifique de l'allèle *ura2 15-30-72* .

9. Détermination des séquences nucléotidiques

La technique utilisée est basée sur celle de la synthèse interrompue décrite par Sanger *et al.* (1977).

Après amplification PCR d'une région chromosomique voulue, les fragments d'ADN double-brin sont purifiés à l'aide d'une MicroSpin Column (commercialisée par Amersham Biosciences). Le "Thermo Sequanase radiolabeled terminator cycle sequencing kit" (Amersham Biosciences) contient des didésoxynucléotides marqués au phosphore [α -³³P] au niveau du phosphate α et une Thermo Sequanase DNA polymérase thermostable. C'est une réaction de PCR qui permettra d'obtenir la séquence des fragments d'ADN à partir d'une quantité de matrice de 500 ng. Lors de cette réaction, l'incorporation d' [α -³³P] ddNTP provoque l'arrêt de la néosynthèse des brins d'ADN qui seront alors marqués à leur extrémité terminale. La réaction de séquençage s'opère par 4 réactions PCR en parallèle, chacune contenant les 4 dNTPs et l'un des 4 dNTPs marqué avec un rapport de 100 pour 1. La séparation des brins se fait par électrophorèse.

10. Système de sélection des révertants Ura⁺

Le système utilisé a été mis au point par Roelants *et al.* (1995) et amélioré par Welcker *et al.* (2000). Nous avons apporté très peu de modifications à cette méthode.

10.1 Principe

Afin d'obtenir des révertants spontanés rares provenant d'événements indépendants, nous partons d'une colonie isolée qui, après une étape de multiplication cellulaire en milieu riche est répartie sur un milieu sélectif permettant de révéler la présence de ces révertants.

10.2 Protocole pour une seule sélection

Cette technique est illustrée dans la figure 8. Une colonie isolée d'une souche haploïde ou diploïde FR *ura2 15-30-72* est prélevée et mise en suspension dans 300 µl de milieu complet YPG. Le milieu est mis à incuber pendant 24h à 30 °C sous agitation, puis étalé dans son intégralité sur un milieu YPG solide incubant à 30 °C pendant 4 jours afin d'augmenter la masse cellulaire. Les cellules sont ensuite récoltées et mises en suspension dans 1,5 ml d'eau distillée stérile pour atteindre un volume final de 1,8 ml lorsqu'il s'agit de cellules haploïdes et 2 ml lorsqu'il s'agit de cellules diploïdes.

100 µl de cette suspension sont prélevés et dilués d'un facteur 10⁻⁶, puis étalés sur un milieu YPG solide afin de pouvoir estimer le nombre total de cellules étalées par sélection. Le milieu restant est réparti et étalé sur 5 boîtes de milieu minimum YNB supplémenté de tryptophane. Les révertants sont généralement obtenus après 5 à 10 jours d'incubation à 30 °C. Ils sont alors prélevés et analysés. Si deux événements différents surviennent pour la même sélection, ils seront considérés comme indépendants. Au contraire, si les mêmes événements se présentent plusieurs fois pour une même sélection, ils seront considérés comme non-indépendants.

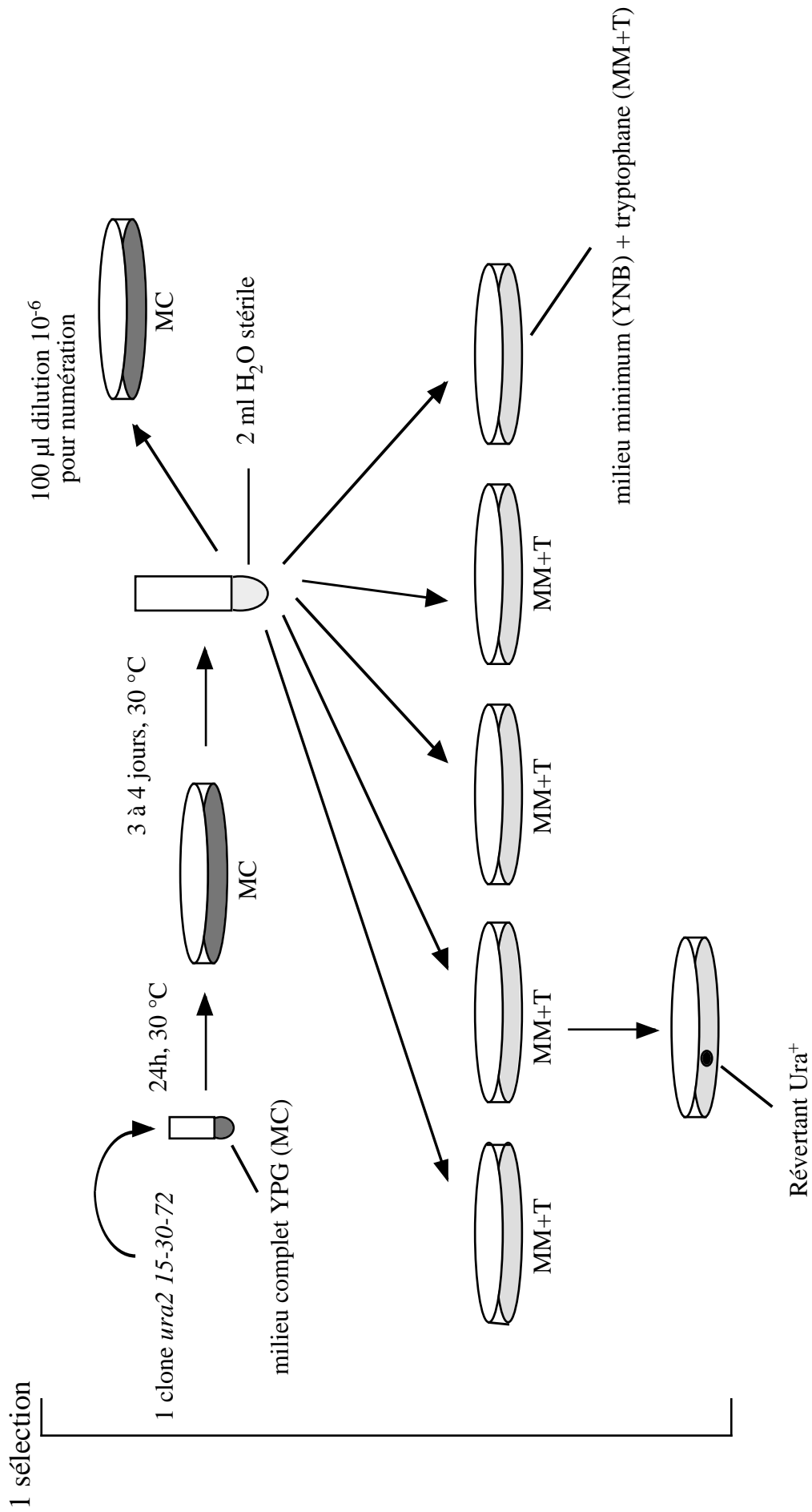


Figure 8 : Schéma de sélection positive de révertants spontanés prototrophes pour l'uracile.

11. Analyse statistique des événements de mutation

L'analyse statistique des sélections et des événements de mutation entraînant l'apparition d'un phénotype Ura⁺ a été réalisée d'après la méthode de Lea & Coulson (1949).

11.1 Taux de mutation par cellule, par allèle *ura2* 15-30-72 et par génération

La méthode appliquée permet de calculer le taux global de mutation permettant la réactivation de l'ATCase ainsi que le taux de chaque type d'événement mutationnel et est particulièrement préconisée pour les fréquences de mutation très faibles.

Afin de déterminer le taux de mutation, il est nécessaire de connaître au préalable le nombre moyen de mutations par sélection, appelé "m". Ce nombre est établi à partir d'un estimateur de m, m_e , lui-même obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance (maximal likelihood). Pour réaliser cette estimation, il faut déterminer le nombre n_c de cellules analysées pour une sélection, le nombre N de sélections réalisées, le nombre N_0 de sélections n'ayant donné aucun événement de réactivation et le nombre de sélections ayant permis l'apparition d'un, deux, etc... mutants.

Le premier estimateur de m, m_e , est calculé à partir de la proportion p_0 de sélections n'ayant abouti à aucun mutant :

$$p_0 = e^{-m}, \text{ d'où } m_e = -\ln(p_0) = -\ln(N_0/N)$$

Cet estimateur m_e est utilisé pour calculer le terme S de maximum de vraisemblance à l'aide de la table 4 de Lea & Coulson (1949) (Annexe 4), où r équivaut au nombre de mutants pour une sélection. Effectivement, on calcule la somme S avec des valeurs m de la table proches de m_e . Le meilleur estimateur de m est déterminé lorsque S tend vers 0.

La table 4 de Lea & Coulson donne également une valeur correspondant à $\sigma_m \sqrt{N/m}$ pour chaque valeur de m, permettant ainsi de calculer la valeur de l'écart-type σ_m lié à m.

Le taux de mutation μ est calculé de la manière suivante :

$$\mu = m_{S=0} / n_c * \ln 2$$

Il est exprimé en mutation/cellule/génération.

Afin de pouvoir comparer les contextes haploïde et diploïde, nous avons choisi de calculer ce taux de mutation en mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération. Ainsi, la valeur de μ est la suivante :

$$\mu = m_{S=0} / n_c * \ln 2 \quad \text{mutation/allèle } ura2 \ 15-30-72 \text{ /cellule haploïde/génération}$$

$$\mu = (m_{S=0} / n_c * \ln 2) / 2 \quad \text{mutation/allèle } ura2 \ 15-30-72 \text{ /cellule diploïde/génération}$$

L'écart-type σ_μ associé au taux de mutation μ est calculé de la manière suivante :

$$\sigma_\mu = \sigma_m / n_c * \ln 2 \quad \text{pour des cellules haploïdes}$$

$$\sigma_\mu = (\sigma_m / n_c * \ln 2) / 2 \quad \text{pour des cellules diploïdes}$$

11.2 Intervalle de confiance à 95 % associé au taux de mutation

Le calcul de l'intervalle de confiance des taux de mutation est réalisé à partir d'un test t de Student bilatéral (la table de Student se trouve en Annexe 5).

Compte tenu de l'écart-type σ_μ associé au taux de mutation μ et de la valeur critique de la loi de Student t_α pour le risque donné que nous avons fixé à 5 %, nous avons calculé l'intervalle de confiance à 95 % de la façon suivante :

$$[\mu - t_{0,05} * \sigma_\mu ; \mu + t_{0,05} * \sigma_\mu]$$

La valeur $t_{0,05}$ pour N-1 degrés de liberté est déterminée d'après la table du test de Student.

Lorsque les intervalles de confiance de deux taux de mutations ne se chevauchent pas, nous estimons que les différences observées sont significatives.

Chapitre 2

*Plasticité génomique et remaniements chromosomiques en contexte diploïde a/α : sélection et analyse d'événements de mutation de l'allèle *ura2 15-30-72**

Les réarrangements chromosomiques sont des éléments essentiels de l'évolution des êtres vivants. Au niveau des organismes pluricellulaires, ils peuvent activer des oncogènes ou bien inactiver des gènes suppresseurs de tumeur, induisant de cette façon un développement tumoral. Les mécanismes conduisant à ces réarrangements capables d'induire une cancérogenèse font appel à des acteurs moléculaires conservés entre les eucaryotes supérieurs et la levure *S. cerevisiae*.

La levure *S. cerevisiae* est un organisme de choix pour étudier les remaniements chromosomiques. Nous disposons d'un outil permettant la sélection de réarrangements spontanés basé sur l'utilisation de l'allèle mutant *ura2 15-30-72* du gène *URA2* qui possède trois mutations ponctuelles dans la partie proximale du gène, conférant à la souche un phénotype Ura^- . La souche deviendra prototrophe pour l'uracile dans le cas d'une réactivation fonctionnelle du domaine ATCase.

Des travaux précédents ont été effectués en contexte haploïde par Roelants *et al.* (1995) et Welcker *et al.* (2000). Ils ont permis de montrer trois types d'événements capables de restaurer la fonction ATCase : l'insertion d'un élément transposable Ty1 en amont de la séquence codant l'ATCase, une duplication de la région codant l'ATCase qui s'insère ailleurs dans le génome à proximité d'une région promotrice, ou bien encore la délétion de la région de l'allèle contenant les trois mutations (Introduction, figure 4).

Dans la perspective de la compréhension des mécanismes évolutifs de *S. cerevisiae*, nous avons entrepris des sélections dans le contexte diploïde, ce qui permettra d'observer les différences de nature et de fréquence des remaniements chromosomiques sélectionnés suivant le niveau de ploïdie.

Nous avons donc entrepris des sélections sur un large échantillon de $1,49.10^{12}$ cellules de la souche F α de génotype *ura2 15-30-72 trp1* Δ qui nous a permis d'isoler 39 révertants indépendants ayant acquis un phénotype Ura⁺. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec le contexte haploïde, nous avons en parallèle effectué des sélections sur un échantillon témoin de $6,93.10^{10}$ cellules avec la souche FR α qui nous a permis d'isoler 16 révertants indépendants prototrophes pour l'uracile.

1. Méthodologie d'analyse des révertants Ura⁺

Nous avons effectué ces sélections comme décrit dans le chapitre « Matériel et Méthodes » (§ 10.2) afin d'obtenir des événements indépendants de réversion spontanée restaurant la prototrophie de la souche pour l'uracile. Après isolement, les révertants sont soumis à une analyse génétique par l'étude de la ségrégation des caractères Ura⁺/Ura⁻ dans les produits de la méiose puis à une analyse moléculaire afin de déterminer les réarrangements chromosomiques intervenus dans les révertants diploïdes sélectionnés.

1.1 Analyse génétique : analyse des produits de la méiose

L'analyse de la méiose a été réalisée pour tous les révertants diploïdes. Pour chaque révertant, la méiose a conduit à l'obtention de tétrades contenant toujours quatre spores. La capacité de germination des quatre spores sur milieu complet a été testée afin de déterminer si l'événement sélectionné est viable. En effet, si les quatre spores sont capables de germer et conduisent à la formation d'une colonie, nous pouvons conclure à la sélection d'un événement viable à l'état haploïde, tandis que si deux spores seulement germent, les révertants isolés résultent d'un événement létal pour la cellule en phase haploïde. L'analyse de la ségrégation des caractères Ura⁺ et Ura⁻ nous permettra de déterminer si les événements létaux observés sont liés ou indépendants de la réactivation du domaine ATCase.

1.2 Analyse moléculaire

1.2.1 Analyse du profil de restriction *Bam* HI

Les révertants et leurs produits de méiose sont soumis à une analyse moléculaire de type hybridation ADN/ADN selon la méthode de Southern afin d'observer leur profil de restriction *Bam* HI. Le fragment de restriction *Bam* HI portant la séquence codant le domaine ATCase de l'allèle *ura2 15-30-72* a une taille de 6,8 kb (figure 9). Les hybridations sont effectuées avec une sonde spécifique de la région ATCase produite par PCR.

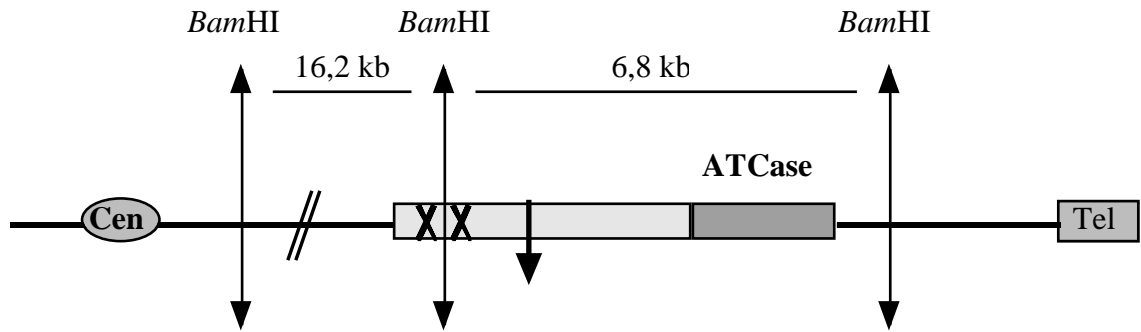


Figure 9 : Localisation des sites *Bam* HI au locus *ura2 15-30-72*.

La délétion de la région contenant les trois mutations entraîne la perte d'un site *Bam* HI. Le nouveau profil de restriction aura un fragment contenant la séquence correspondant au domaine ATCase supérieur à 6,8 kb.

L'insertion d'un rétrotransposon Ty1 entraîne un espacement des deux sites *Bam* HI autour de la région ATCase, provoquant l'apparition d'un fragment de 12,7 kb.

La duplication d'un fragment d'ADN contenant la région ATCase suivie de son insertion dans une autre région du génome entraîne l'apparition d'un second fragment *Bam* HI contenant la région ATCase, additionnel à celui d'origine de 6,8 kb.

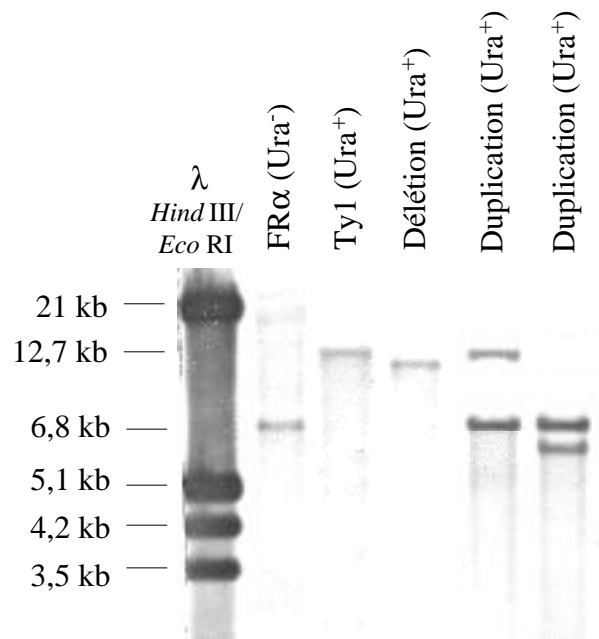


Figure 10 : Profil de restriction *Bam* HI de cellules haploïdes permettant de différencier les événements de duplication des autres événements.

FR α : témoin ; le fragment a une taille de 6,8 kb.

Ty1 : événement d'insertion de rétrotransposon Ty1 en amont du domaine ATCase : profil à 1 bande de 12,7 kb.

Délétion de la région contenant les trois mutations : profil à 1 bande de taille supérieure à 6,8 kb.

Duplications : profil à 2 bandes dont l'une est de 6,8 kb et l'autre de taille variable.

Au niveau haploïde, ce type d'expérience permet de distinguer les événements de duplication des autres événements (Roelants *et al.*, 1995) (figure 10). En effet, l'élément dupliqué se trouve généralement dans un environnement *Bam* HI différent, générant ainsi un fragment de restriction supplémentaire au fragment natif de 6,8 kb. En conséquence, la sonde ATCase révèle deux fragments lors de l'hybridation. Dans le cas d'un autre événement, qu'il s'agisse de l'insertion d'un rétrotransposon Ty1 ou d'une délétion, le fragment ATCase n'est présent qu'en un seul exemplaire avec généralement un profil de restriction différent du natif. En effet, dans le cas de l'insertion d'un rétrotransposon Ty1 d'une taille de 5,9 kb, on obtient un seul fragment de 12,7 kb tandis que la délétion de la région comprenant les trois mutations entraîne la perte d'un site *Bam* HI, ce qui conduit à un fragment de taille variant en fonction de la taille de la région délétée.

Au niveau diploïde, cette distinction ne peut se faire directement. En effet, si le remaniement touche un des deux allèles *ura2 15-30-72*, le révertant produit toujours un profil de restriction à deux bandes dont l'une correspond au fragment de restriction de 6,8 kb et l'autre au fragment de l'allèle *ura2 15-30-72* remanié. Pour chaque révertant isolé, il est donc nécessaire de caractériser le profil de restriction en parallèle avec celui des spores issues de sa méiose. Les spores de phénotype Ura⁺, porteuses du réarrangement chromosomique, sont donc utilisées pour permettre de distinguer les événements. De plus, nous devons retrouver dans le diploïde Ura⁺ la somme des profils des spores de phénotype Ura⁺ et Ura⁻. De cette façon nous nous assurons que l'événement conférant son caractère Ura⁺ à une spore haploïde correspond à celui qui s'est produit dans le révertant diploïde. La limite de cette technique d'analyse du profil de restriction *Bam* HI est atteinte lorsque nous sélectionnons un événement létal à l'état haploïde lié au rétablissement de la prototrophie pour l'uracile. Dans ce cas, seules les spores haploïdes de phénotype Ura⁻, ne portant pas le remaniement, sont capables de germer. Il nous est alors impossible de distinguer les événements de duplication des autres événements.

1.2.2 Analyse et hybridations ADN/ADN des caryotypes électrophorétiques

Les chromosomes issus des révertants diploïdes et des spores haploïdes sont soumis à une migration d'ADN en champs alternés de façon à observer le caryotype électrophorétique de ces révertants, qui est ensuite soumis à une hybridation ADN/ADN à l'aide d'une sonde spécifique de la région ATCase. Cette hybridation permet de déterminer la localisation chromosomique de cette région. Nous devons également retrouver dans le diploïde les profils des spores haploïdes Ura⁺ et Ura⁻, confirmant que l'événement observé dans les spores prototrophes pour l'uracile est identique à celui sélectionné dans le révertant diploïde.

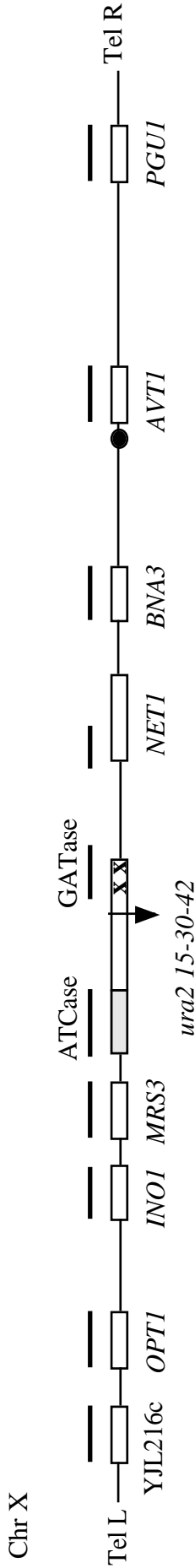


Figure 11 : Positions relatives des sondes spécifiques du chromosome X.

La figure n'est pas à l'échelle. Le chromosome est représenté dans le sens conventionnel d'après le séquençage de la souche S288C.

— Sonde.

● Centromère.

Sonde	Position chromosomique	Position relative au gène <i>URA2</i>	Taille (bp)
YJL216c	24355 à 26076	146209 à 147930	1721
OPT1	35271 à 36241	136044 à 137014	970
INO1	134575 à 135412	36873 à 37710	837
MRS3	160746 à 161393	10892 à 11539	647
ATCase	165622 à 166663	5622 à 6663	1041
GATase	171311 à 172401	-116 à 974	1090
NET1	295310 à 296201	-123916 à -123025	891
BNA3	323308 à 324631	-152346 à -151023	1323
AVT1	436731 à 437966	-265681 à -264446	1235
PGU1	722750 à 723806	-551521 à -550465	1056

Tableau 2 : Taille et position des sondes spécifiques du chromosome X.

La position chromosomique est donnée en fonction des coordonnées issues du séquençage de la souche S288C.

La position relative au gène *URA2* est donnée en fonction de la position +1 correspondant au codon d'initiation ATG. Une position négative signifie que la sonde se trouve en amont du codon d'initiation du gène *URA2* tandis qu'une position positive signifie que la sonde se trouve en aval.

Cette analyse peut être complétée par l'utilisation de sondes spécifiques réparties le long du chromosome X allant du télomère gauche jusqu'au télomère droit. Les caractéristiques des sondes sont mentionnées dans le tableau 2 et leur position sur le chromosome X dans la figure 11.

Les caryotypes permettent ainsi d'observer les modifications qui entraînent un changement de migration des chromosomes. Les hybridations réalisées avec les différentes sondes permettent de localiser la région ATCase ainsi que d'autres régions du chromosome X.

1.2.3 Analyses par amplification PCR

Les délétions sont déterminées à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de la région du chromosome X disposés de part et d'autre de l'allèle *ura2 15-30-72* (figure 12). Les caractéristiques des oligonucléotides se trouvent en Annexes 1 et 2. Le temps d'élongation programmé pour les cycles d'amplification entre deux oligonucléotides est de deux minutes. La région couvrant les trois mutations ayant une taille supérieure à 2,7 kb, une amplification n'est possible dans ces conditions (en utilisant par exemple les oligonucléotides FR4 et 38,8) que dans le cas d'une délétion de cette région.

Les événements de rétrotransposition d'éléments Ty1 sont recherchés à l'aide des amorces AW1 (spécifique de l'allèle *ura2 15-30-72*) et $\delta B41$ ou $\delta B41R$ (spécifiques de la région LTR du rétrotransposon) comme cela est représenté sur la figure 13.

2. Résultats des sélections en contexte diploïde

2.1 Résultats des sélections

Nous avons effectué 333 sélections indépendantes correspondant à $1,49.10^{12}$ cellules étalées qui ont donné lieu à l'isolement de 39 révertants indépendants. Le taux de mutation global, calculé par la méthode du maximum de vraisemblance selon Lea & Coulson (1949) décrite dans le chapitre « Matériel et Méthodes » § 11, est de $7,7.10^{-12}$ mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération.

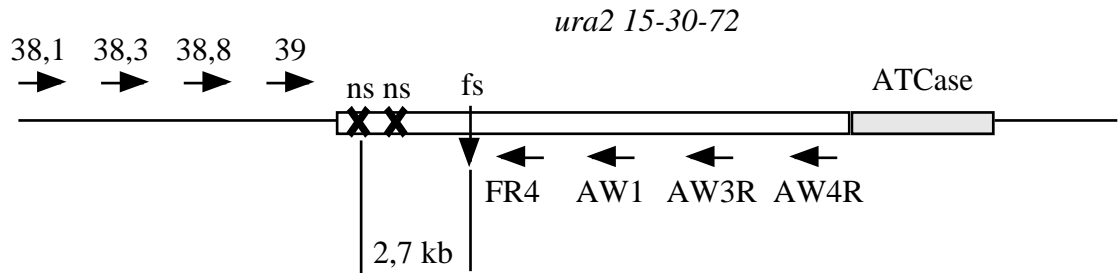


Figure 12 : Position des oligonucléotides utilisés pour caractériser les événements de délétion par amplification PCR.

La figure n'est pas à l'échelle. La taille des fragments amplifiés varie selon la taille de la délétion.

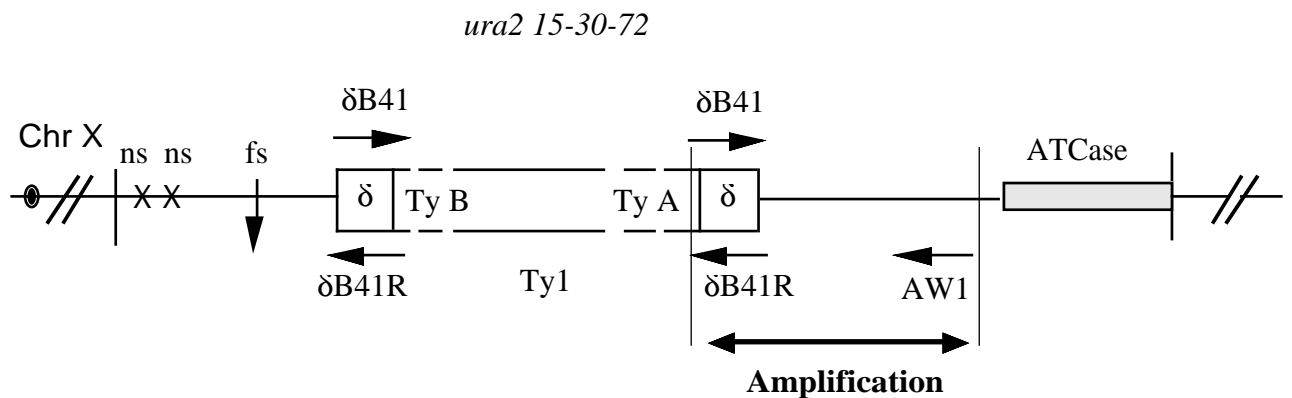


Figure 13 : Position des oligonucléotides utilisés pour caractériser l'insertion d'un rétrotransposon Ty1 dans l'allèle *ura2 15-30-72*.

L'amplification PCR est réalisée avec les oligonucléotides amorces AW1 et δ B41 (ou δ B41R selon le sens d'insertion du rétrotransposon).

2.2 Effets du contexte diploïde a/ α sur la rétrotransposition de l'élément Ty1

Les révertants diploïdes ont été analysés par PCR afin de vérifier la présence d'insertion de rétrotransposons Ty1 en amont de la région codant le domaine ATCase. Nous avons testé les révertants diploïdes isolés en incluant comme témoin une souche comportant une insertion de rétrotransposon Ty1 dans l'allèle *ura2 15-30-72*. Alors que cette souche témoin montre l'amplification d'un fragment de 0,9 kb, aucune souche diploïde ne montre d'amplification. Aux fréquences observées, nous n'observons donc pas d'insertion d'éléments transposables Ty1 dans l'allèle *ura2 15-30-72* en contexte diploïde.

Lors de travaux antérieurs effectués par Errede *et al.* (1980) et Company & Errede (1987), ceux-ci avaient démontré que l'hétérodimère Mata1/Mat α 2 présent en contexte diploïde a/ α exerce une répression de la transcription des rétrotransposons Ty1 dans *S. cerevisiae*. Cette répression explique pourquoi en contexte diploïde nous ne sommes pas en mesure d'observer d'insertion d'éléments Ty1 réactivant l'expression du domaine ATCase alors que cela était possible en contexte haploïde (Roelants *et al.*, 1995).

3. Analyse génétique et moléculaire des révertants diploïdes spontanés sélectionnés

Nous avons, dans un premier temps, analysé la viabilité en milieu complet des produits de la méiose des révertants diploïdes. Trois profils de ségrégation différents se sont distingués :

- le premier montre la possibilité d'obtenir 4 spores capables de germer, indiquant la sélection d'un événement viable en contexte haploïde ;
- dans le second, sur les 4 spores contenues dans une tétrade, 2 spores seulement germent. Ceci indique la présence d'un événement létal en phase haploïde ;
- le troisième consiste en l'obtention de trois types d'asques contenant tous 4 spores. Cependant, dans le premier 4 spores germent, dans le second 2 spores seulement germent et dans le troisième aucune spore ne germe.

Pour compléter notre analyse génétique nous avons ensuite étudié la ségrégation Ura⁺/Ura⁻ propre à chaque souche.

Afin de déterminer les événements responsables de la restauration de la prototrophie de la souche pour l'uracile, nous avons caractérisé les révertants de chacune des catégories issues de l'analyse génétique par analyse moléculaire.

3.1 Événements viables en contexte haploïde

Cette viabilité a été observée dans 17 souches révertantes dont l'analyse génétique montre une ségrégation $2 \text{Ura}^+ / 2 \text{Ura}^-$ (figures 14a et 14b).

3.1.1 Analyse moléculaire des duplications et délétions

3.1.1.1 Duplications

9 souches sur 17 portent une duplication. Le profil de restriction *Bam* HI du révertant B219/1 présenté dans la figure 15 illustre ce type d'événement. La souche diploïde montre deux fragments dont l'un a la taille de 6,8 kb propre à l'allèle *ura2 15-30-72*. Les spores de phénotype Ura^- montrent la présence uniquement du fragment de 6,8 kb tandis que les spores de phénotype Ura^+ montrent la présence des deux fragments révélés dans le profil de restriction du diploïde.

Nous avons réalisé un caryotype de ces souches suivi de différentes hybridations à l'aide de sondes spécifiques du chromosome X permettant d'estimer la taille et la localisation des régions dupliquées (tableau 3 et figure 16).

L'hybridation à l'aide de la sonde ATCase (figure 16b) révèle deux chromosomes distincts chez 8 révertants, indiquant la présence de duplications interchromosomiques. Une seule souche (B286/2) ne révèle que le chromosome X, montrant une duplication intrachromosomique.

La sonde spécifique du gène *MRS3* ne révèle que le chromosome X pour le révertant B066/2 (figure 16c), indiquant que ce gène n'est pas contenu dans le fragment dupliqué qui est par conséquent inférieur à 4 kb. En revanche, pour les 7 autres duplications interchromosomiques, l'ensemble des sondes correspondant à la région qui se trouve en aval de la séquence codant le domaine ATCase révèle le même profil que la sonde ATCase (figure 16c et tableau 3) montrant que ces 7 révertants ont subi un événement de duplication d'une taille supérieure à 140 kb.

L'analyse des spores de phénotype Ura^+ montre des résultats identiques aux souches diploïdes, ce qui confirme que l'événement observé et caractérisé à l'état haploïde est identique à l'événement de réversion sélectionné dans la souche diploïde.

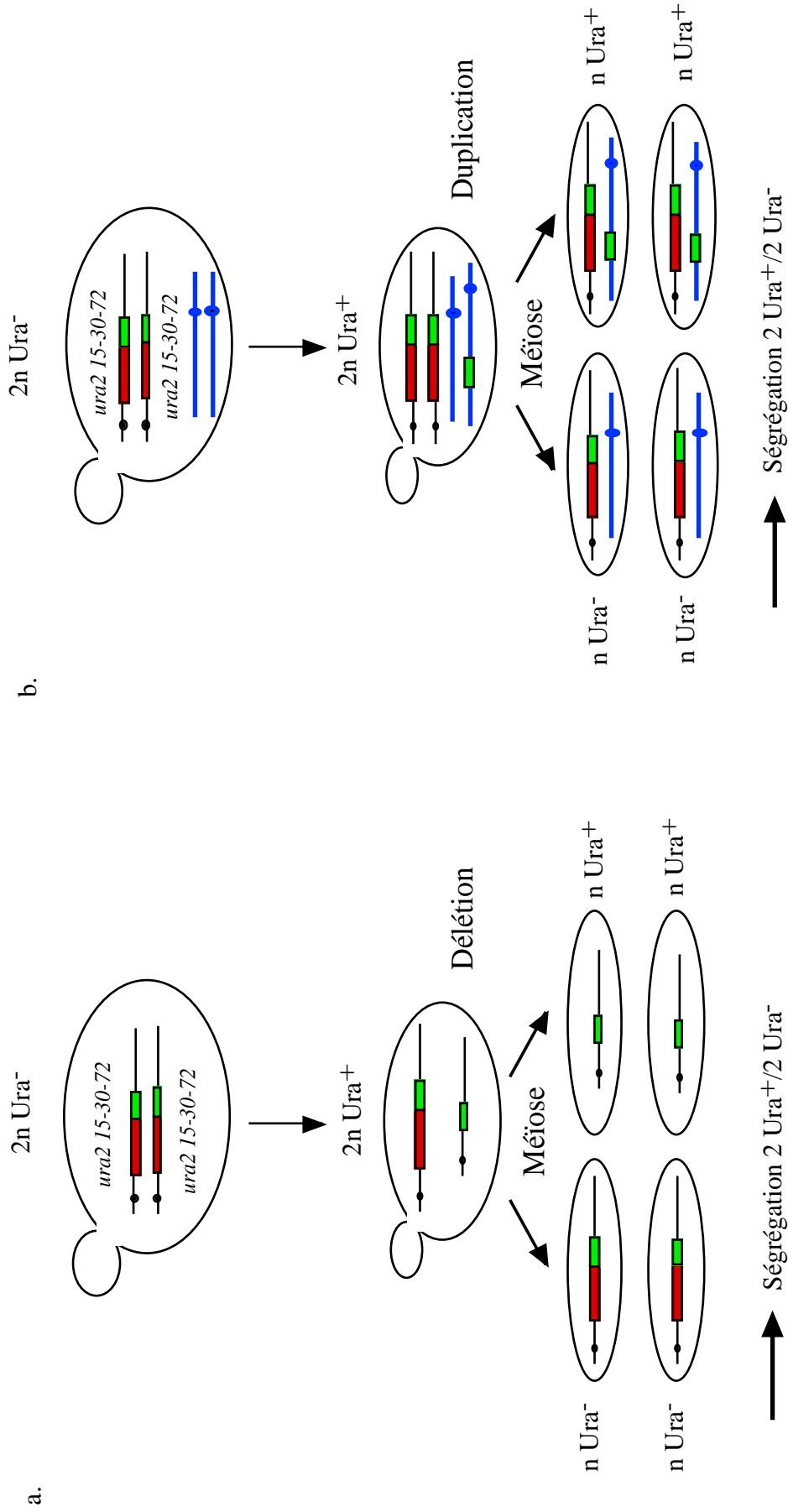


Figure 14 : Analyse génétique des remaniements chromosomiques viables à l'état haploïde : (a) délétion génique, (b) duplication.

La duplication de la région ATCase et son insertion ailleurs dans le génome ou la délétion de la région contenant les trois mutations entraîne un réactivation fonctionnelle du domaine ATCase. Le révertant diploïde devient prototrophe pour l'uracile et la méiose produit 4 spores viables avec une ségrégation $2 \text{ Ura}^+ / 2 \text{ Ura}^-$.

■ Domaine ATCase. ■ Domaine GATase-DHOase-like contenant les trois mutations. —●— Chromosome X.

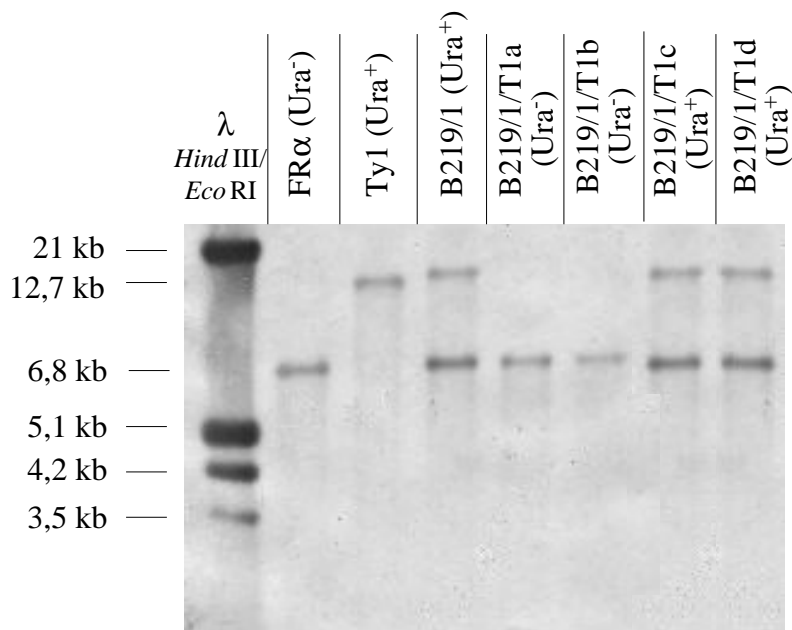


Figure 15 : Exemple de profil de restriction *Bam* HI dans le cas d'un événement de duplication.

FR α : témoin négatif (souche de référence).

Les spores de phénotype Ura⁺ portant la duplication montrent le même profil que le révertant diploïde tandis que les spores de phénotype Ura⁻ montrent le même profil que la souche FR α .

Souche	Localisation (Sonde ATCase)	Révélation du fragment dupliqué				Taille de la duplication (kb)
		Sonde				
		MRS3	INO1	OPT1	YJL216c	
B038/2	IX	+	+	+	+	> 140
B066/1	II ou XIV	+	+	+	+	> 140
B066/2	I ou VI	-	-	-	-	< 4
B116/1	XI	+	+	+	+	> 140
B199/1	V ou VIII	+	+	+	+	> 140
B219/1	IX	+	+	+	+	> 140
B282/1	IV ou XII	+	+	+	+	> 140
B284/1	IV ou XII	+	+	+	+	> 140
B286/2	X	/	/	/	/	/

Tableau 3 : Caractéristiques des 9 événements de duplication issus des révertants ne présentant pas de caractère létal à l'état haploïde.

Résultat des hybridations réalisées avec les sondes présentées dans ce tableau sur les caryotypes des révertants ayant subi un événement de duplication. La localisation chromosomique de l'élément dupliqué est déduite de l'hybridation avec la sonde ATCase. La taille de la duplication est déduite de ces hybridations.

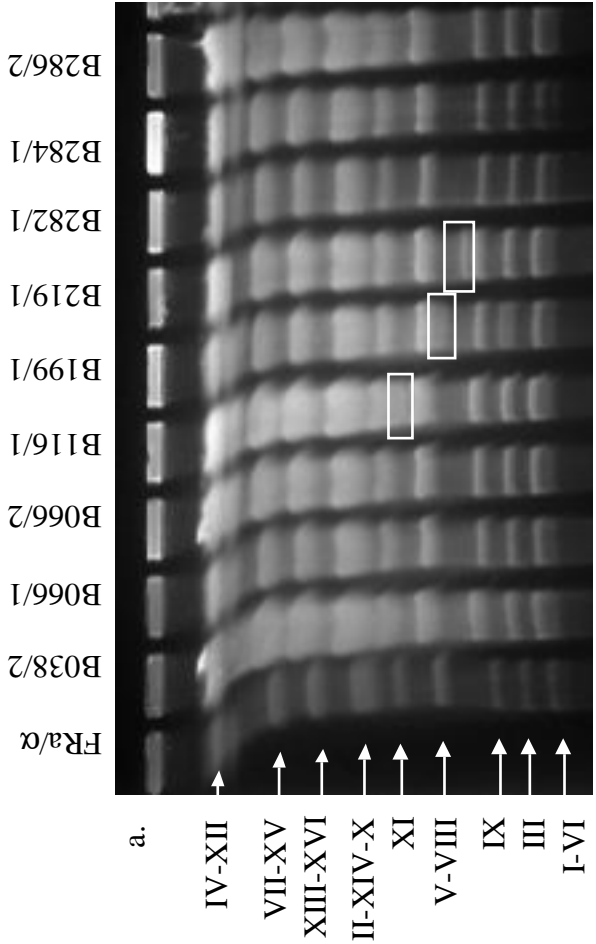
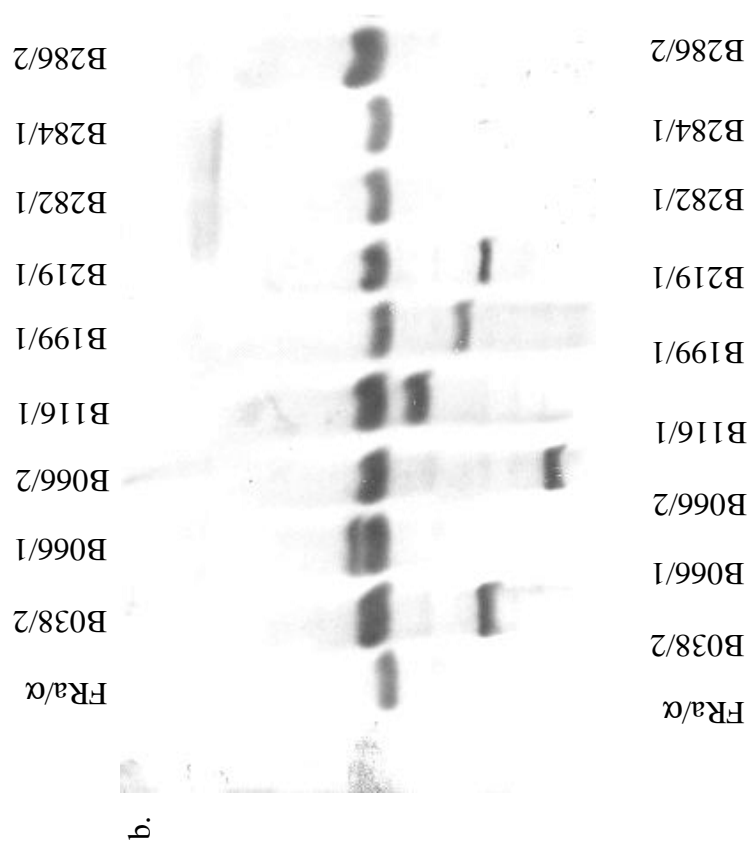


Figure 16 : Analyse du caryotype des révertants ayant subi un événement de duplication viable en phase haploïde.

a. Caryotype des révertants viables à l'état haploïde portant une duplication. La souche initiale FRa/α est la souche initiale Ura⁻ à partir de laquelle ont été sélectionnés les révertants Ura⁺.

b. Hybridation ADN/ADN avec une sonde ATCase.

c. Hybridation ADN/ADN avec une sonde MRS3. Les sondes INO1 et OPT1 révèlent le même profil.

3.1.1.2 Délétions

8 souches présentant une ségrégation de type 2 Ura⁺/2 Ura⁻ correspondent à une délétion. La souche diploïde montre deux fragments dont l'un a la taille de 6,8 kb du fragment *Bam* HI contenant l'allèle *ura2 15-30-72*. Les spores de phénotype Ura⁻ montrent la présence uniquement de ce fragment tandis que les spores de phénotype Ura⁺ montrent la présence du second fragment consécutif au réarrangement chromosomique (figure 17). Le profil du révertant diploïde correspond à la somme des profils des spores, indiquant que l'événement observé en phase haploïde est identique à celui sélectionné.

Les analyses par amplifications PCR réalisées à l'aide des oligonucléotides répartis de part et d'autre de la région contenant les trois mutations de l'allèle *ura2 15-30-72* (figure 12) selon les conditions décrites dans le § 1.3.3 ont permis l'amplification d'un fragment d'une taille inférieure à celle attendue pour une région non remaniée. Ceci confirme la perte de la partie de cet allèle contenant les trois mutations. Les caractéristiques plus précises de ces délétions concernant notamment leur taille et les séquences de leur jonction seront détaillées dans le chapitre 3.

Les caryotypes électrophorétiques de ces révertants n'ont montré aucun changement de profil de migration et une hybridation avec une sonde ATCase ne révèle que le chromosome X.

3.1.1.3 Délétion homozygote

Le révertant B026/1 a montré une ségrégation 4 Ura⁺. Ce type de ségrégation indique la présence de deux événements de réactivation du domaine ATCase au niveau de chacun des allèles *ura2 15-30-72* qui sont sans conséquences sur la viabilité de la cellule.

Le profil de restriction révélé par l'hybridation ADN/ADN fait apparaître une bande unique de taille supérieure à celle de référence de 6,8 kb aussi bien sur le révertant diploïde que sur ses quatre spores Ura⁺ (figure 18), indiquant qu'il s'agit probablement du même événement. Au niveau haploïde, ce profil de restriction correspond au profil-type d'une délétion. Les analyses PCR des quatre spores démontrent la disparition de la région contenant les trois mutations apparemment aux mêmes sites, ce que le séquençage ultérieur confirmera. Nous sommes donc en présence d'une délétion homozygote dans la souche diploïde affectant chacun des deux allèles *ura2 15-30-72*.

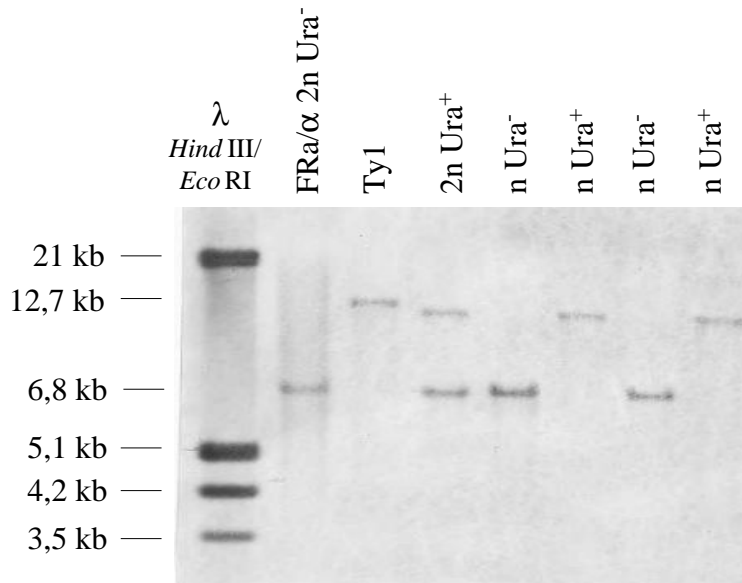


Figure 17 : Exemple de profil de restriction *Bam* HI dans le cas d'un événement de délétion.

FRa/ α : témoin.

la révertant analysé ici est le révertant B278/1 qui montre deux fragments dont celui de référence de 6,8 kb.

Les spores de phénotype Ura^- montrent le même profil que la souche FRa/ α tandis que les spores de phénotype Ura^+ ayant subi une délétion montrent le second fragment.

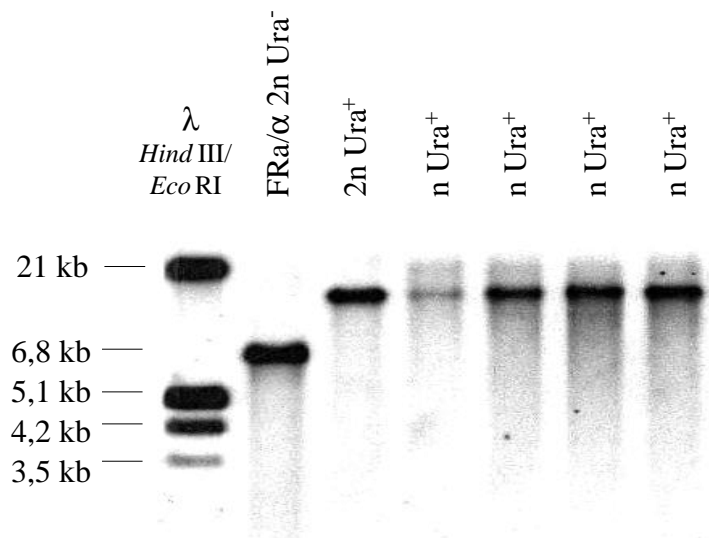


Figure 18 : Profil de restriction *Bam* HI du révertant B026/1.

FRa/ α : témoin.

Le révertant diploïde B026/1 montre un seul fragment. Celui de référence de 6,8 kb a disparu.

Les quatre spores issues de la dissection d'un asque du révertant diploïde sont de phénotype Ura^+ et montrent le même profil.

3.1.2 Translocation réciproque

3.1.2.1 Profil de restriction *Bam* HI

L'analyse du profil de restriction *Bam* HI montre un profil à deux bandes pour le révertant diploïde et à une seule bande différente de 6,8 kb pour les spores de phénotype *Ura*⁺. En outre, les amplifications PCR à l'aide des oligonucléotides répartis de part et d'autre des trois mutations de l'allèle *ura2 15-30-72* (figure 12) dans les conditions décrites pour caractériser les événements de délétion (§ 1.3.3) n'ont pas permis d'amplifier un fragment d'ADN. Ces résultats indiquent la présence d'un événement de réarrangement chromosomique qui n'est ni une duplication, ni une délétion.

3.1.2.2 L'analyse des caryotypes suggère la présence d'une translocation réciproque

Afin de déterminer la nature de cet événement, nous avons procédé à l'analyse des caryotypes électrophorétiques de cette souche et de ses spores (figure 19) de phénotype *Ura*⁺ et *Ura*⁻.

Les sondes spécifiques du bras gauche du chromosome X à partir de la région ATCase jusqu'à la région télomérique révèlent en plus du chromosome X un chromosome II modifié (figure 19b), identifié par une sonde spécifique de la région centromérique de ce chromosome. D'autre part, une sonde spécifique de la région télomérique du bras droit du chromosome II révèle un chromosome X remanié mis en évidence par des sondes spécifiques de la région GATase et des gènes centromérique *AVT1* et télomérique droit *PGUI* (figure 19c). En revanche, ce chromosome X remanié n'est pas révélé par les sondes allant de la région ATCase à la région télomérique du bras gauche du chromosome X. Ces hybridations indiquent donc une translocation réciproque entre le bras gauche du chromosome X et le bras droit du chromosome II.

3.1.2.3 Détermination des jonctions par amplification PCR

Nous avons réalisé une marche sur le chromosome II par amplification PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques du bras droit du chromosome II couplés à l'oligonucléotide AW1 (*ura2 15-30-72*). Ceci a permis de montrer l'existence d'une jonction entre le bras gauche du chromosome X au niveau de la partie terminale de l'allèle *ura2 15-30-72* contenant la région ATCase et le chromosome II au niveau du gène *TEF2*. De la même manière, nous avons ensuite mis en évidence la jonction entre le chromosome II à partir du gène *TEF2* et le chromosome X au niveau de la région CPSase de l'allèle *ura2 15-30-72*. Cette translocation réciproque est schématisée dans la figure 20.

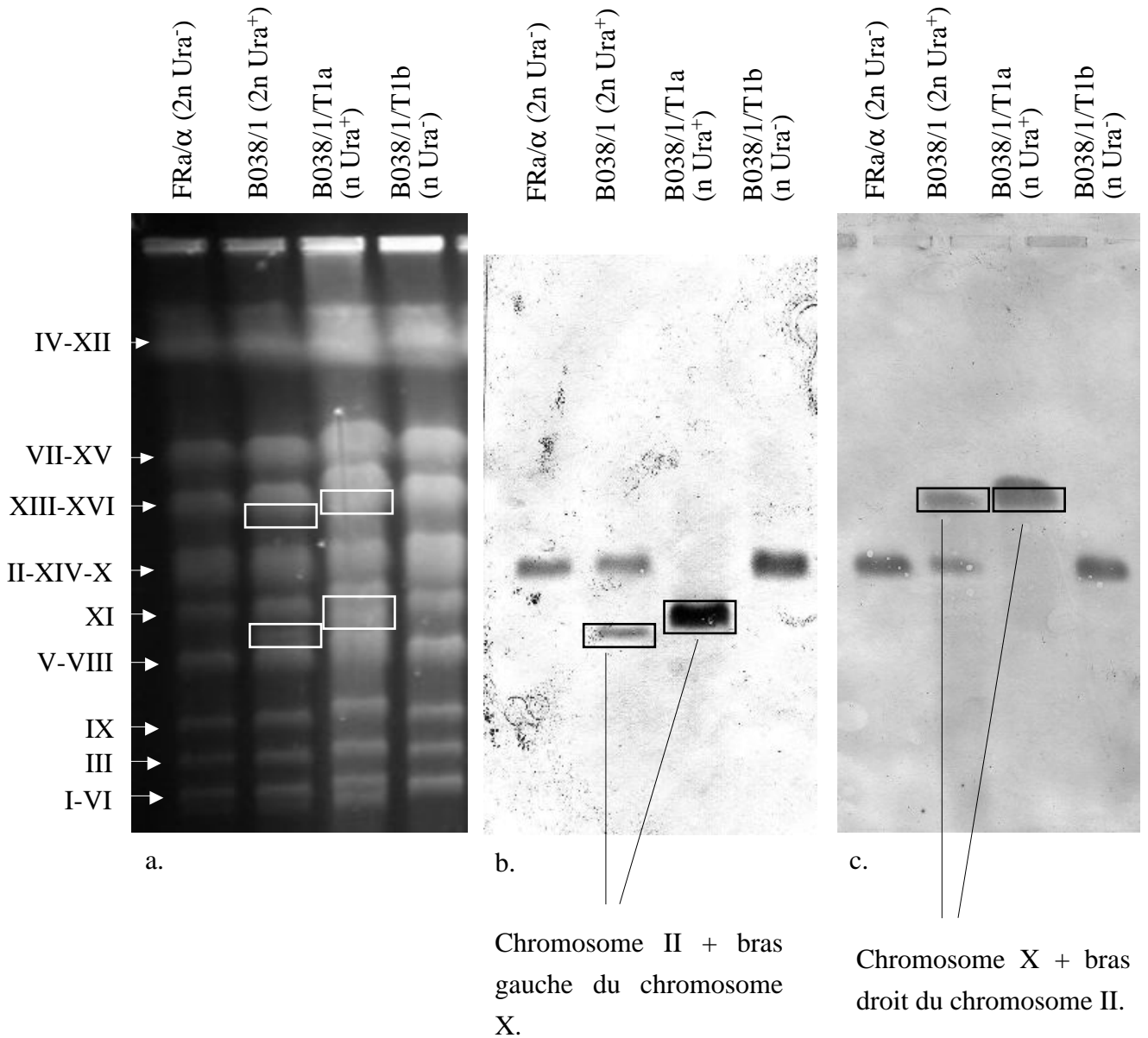


Figure 19 : Analyse du caryotype du révertant B038/1.

a. Caryotype de la souche B038/1

FRa/ α : témoin (souche mère).

b. Hybridation ADN/ADN du caryotype avec une sonde ATCase.

L'hybridation à l'aide des sondes MRS3, INO1, OPT1 et YJL216c est identique.

c. Hybridation ADN/ADN du caryotype avec une sonde GATase.

L'hybridation à l'aide des sondes AVT1 et PGU1 est identique.

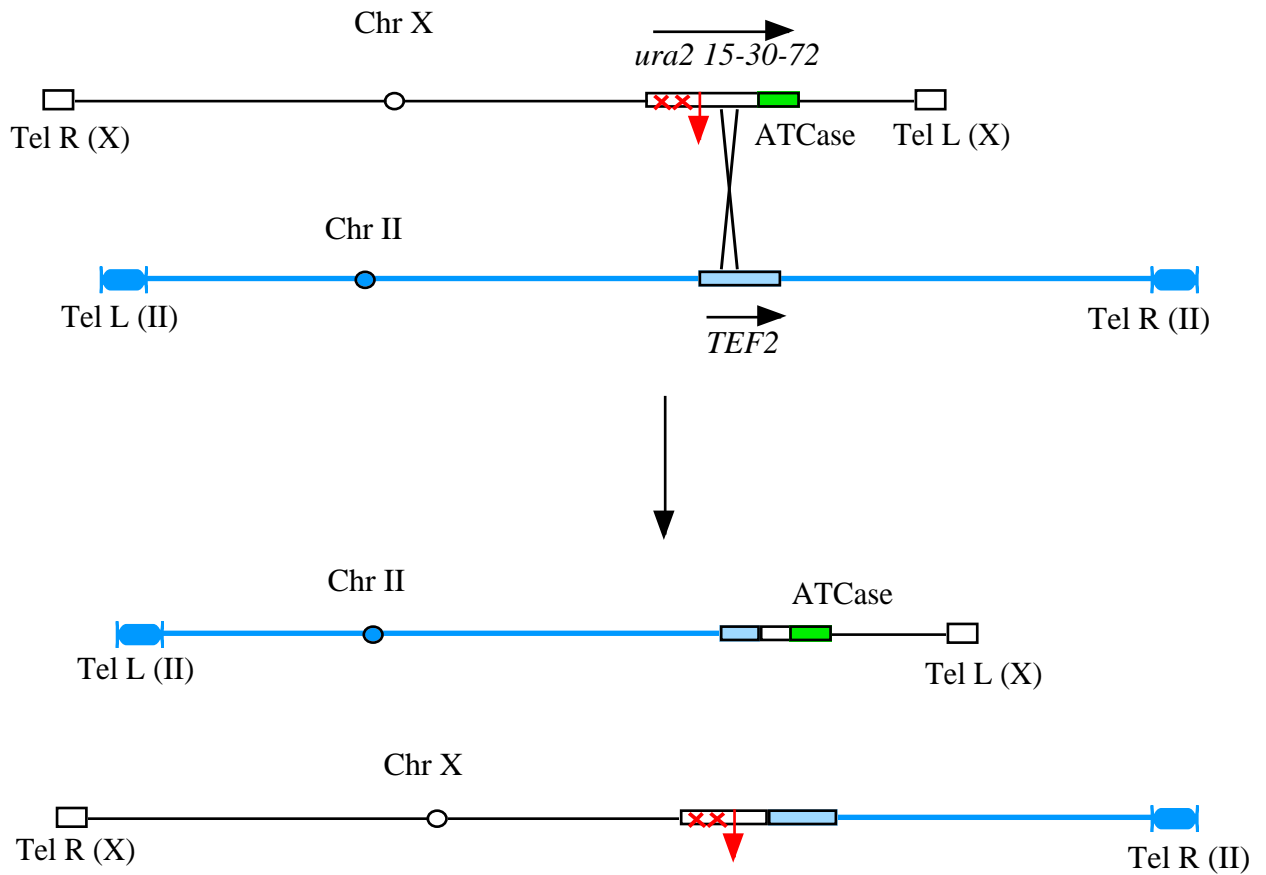


Figure 20 : Translocation réciproque : origine du révertant B038/1.

Les chromosomes ne sont pas à l'échelle. Un événement de translocation réciproque s'est produit entre le bras gauche du chromosome X au niveau de l'allèle *ura2 15-30-72* et le bras droit du chromosome II au niveau du gène *TEF2*.

La protéine de fusion permettant la réactivation du domaine ATCase déduite de cet événement, les caractéristiques plus précises de ces jonctions ainsi que leur séquence seront analysées dans le chapitre 3.

3.1.2.4 L'analyse de la ségrégation des caractères Ura^+/Ura^- confirme les analyses moléculaires

La figure 21 illustre la ségrégation obtenue qui montre la présence de trois types d'asques. Sur les segments de bras de chromosomes échangés se trouvent des gènes essentiels comme par exemple le gène *ERG20* (bras gauche du chromosome X) qui code une farnésyl pyrophosphate synthétase (Anderson *et al.*, 1989) ou le gène *MEC1* (bras droit du chromosome II) qui code une inositol/phosphatidylinositol kinase (Mallory & Petes, 2000). Suite à l'événement de translocation réciproque, le gène *ERG20* se trouve désormais sur le chromosome II tandis que le gène *MEC1* se trouve en échange sur le chromosome X remanié.

Dans les ditypes parentaux (figure 21a), les deux chromosomes réarrangés se trouvent dans les mêmes spores, qui seront de phénotype Ura^+ et contiendront ainsi tous les gènes essentiels à la survie de la cellule. Les chromosomes non remaniés sont dans les autres spores qui sont de phénotype Ura^- et qui contiennent elles aussi les gènes essentiels à la survie cellulaire. De ce fait, le premier type d'asque donne une ségrégation 2 Ura^+ /2 Ura^- .

Dans les ditypes recombinés (figure 21b), le chromosome X réarrangé se trouve avec le chromosome II non remanié et le chromosome II remanié avec le chromosome X non réarrangé. De cette façon, dans les ditypes recombinés, les gènes essentiels des deux bras de chromosomes échangés ne se trouvent jamais ensemble dans une même spore, ce qui aura pour conséquence d'empêcher les spores de germer. Ainsi, le deuxième type d'asque ne donne aucune spore viable.

Enfin, dans les tétratypes (figure 21c), nous avons quatre types de spores, 2 spores de type parentales dont l'une de phénotype Ura^+ est porteuse des remaniements et l'autre de phénotype Ura^- est porteuse des chromosomes non remaniés. Les deux autres spores de type recombinées ne sont pas viables. Ce troisième type d'asque donnera donc une ségrégation 1 Ura^+ /1 Ura^- .

La présence de ces trois types d'asques après sporulation du révertant B038/1 confirme donc un événement de translocation réciproque. De plus, le nombre de ditypes parentaux est égal au nombre de ditypes recombinés, ce qui est conforme à une translocation réciproque.

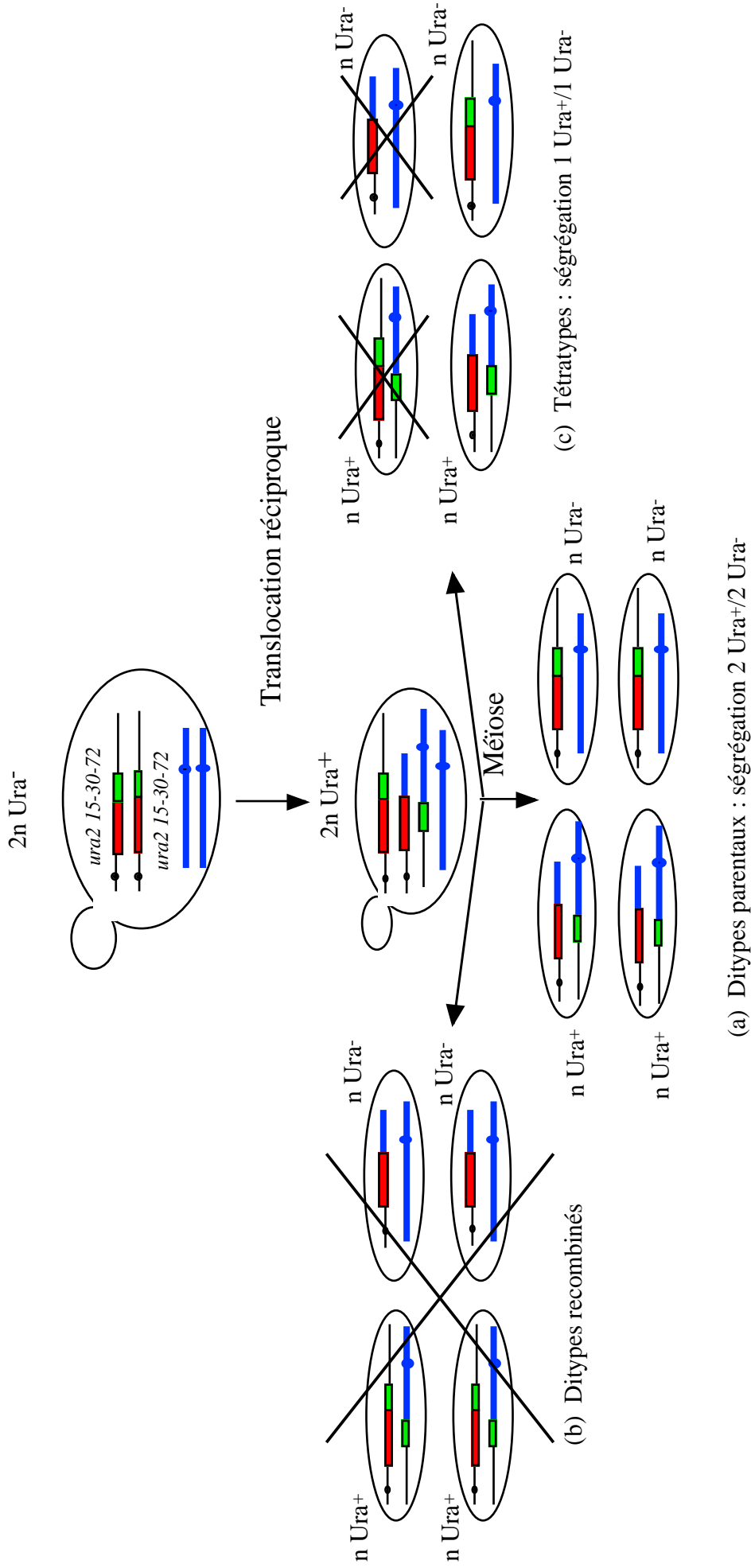


Figure 21 : Analyse génétique du révertant B038/1.

a. Asques produisant des ditypes parentaux : les chromosomes remaniés se retrouvent dans la même cellule.

b. Asques produisant des ditypes recombinés : chaque chromosome X remanié se trouve dans une cellule avec le chromosome II non remanié et vice-versa. Aucune spore n'est viable car il manque systématiquement les gènes essentiels présents sur le bras absent du chromosome remanié.

c. Asques produisant des tétratypes : combinaison de deux spores parentales et de spores recombinées.

3.2 Événements non viables en contexte haploïde

Dans le paragraphe 3.1 nous avons détaillé les réarrangements chromosomiques entraînant une réactivation du domaine ATCase qui sont viables à l'état haploïde. Nous allons à présent analyser d'autres révertants prototrophes pour l'uracile qui ne produisent que deux spores viables sur les quatre contenues dans un asque, montrant qu'ils sont porteurs d'un événement létal en phase haploïde. Comme nous allons le voir, l'événement létal qui s'est produit peut être lié à la réactivation du domaine ATCase ou en être indépendant, indiquant qu'il s'agit d'un second événement mutationnel.

3.2.1 Événements non viables liés à la réactivation fonctionnelle du domaine ATCase

Pour 15 souches révertantes, sur les quatre spores contenues dans un asque, nous pouvons observer uniquement deux spores capables de germer sur milieu complet qui sont toujours auxotrophes pour l'uracile. Nous observons en conséquence une ségrégation de type 2 Ura⁻ qui indique la sélection d'un événement létal au niveau haploïde, génétiquement lié à l'événement ayant induit la réactivation du domaine ATCase.

3.2.1.1 Profil de restriction *Bam* HI

Pour ces 15 révertants, la souche diploïde permet d'obtenir un profil à deux bandes dont l'une est de 6,8 kb, ce qui montre la présence d'un remaniement chromosomique. Comme attendu, les spores de phénotype Ura⁻ ne possèdent que la bande de 6,8 kb.

Jusqu'à présent, nous pouvons caractériser les réarrangements que nous avons sélectionnés par une analyse des spores de phénotype Ura⁺. En l'absence de ces spores, seule l'analyse du révertant diploïde permet de déterminer ces remaniements. L'analyse du profil de restriction *Bam* HI donnant un profil à deux bandes, il nous est impossible de distinguer la nature des événements. Nous atteignons donc les limites de l'analyse du profil de restriction. La caractérisation des événements reposera principalement sur l'analyse des caryotypes.

3.2.1.2 Analyse des caryotypes et hybridations ADN/ADN

Sur ces caryotypes nous avons effectué des hybridations ADN/ADN à l'aide de sondes spécifiques couvrant l'ensemble du chromosome X dont les caractéristiques sont mentionnées dans le tableau 2 et la figure 11.

Nous avons utilisé une sonde spécifique de la région ATCase qui nous permet de localiser la séquence codant ce domaine. L'identification du chromosome X est réalisée avec la sonde spécifique du gène centromérique *AVT1* de ce chromosome. Pour estimer la taille des remaniements, nous avons également utilisé les sondes spécifiques des gènes *MRS3*, *INO1*, *OPT1* et de l'ORF YJL216c. La sonde spécifique du gène *PGUI* qui se trouve au niveau du télomère droit permet de localiser le bras droit du chromosome X. L'utilisation de la sonde GATase permet quant à elle de déterminer la localisation chromosomique de cette région contenant deux des trois mutations. La limite de notre méthode d'investigation de marche sur le chromosome par hybridation ADN/ADN est due à l'absence de sonde spécifique au-delà de l'ORF YJL216c.

Les résultats obtenus avec ces sondes spécifiques sont décrits dans le tableau 4. Les caryotypes et les hybridations réalisées avec les différentes sondes sont représentés dans la figure 22.

3.2.1.3 Duplication intrachromosomique

L'observation du caryotype de la souche B210/1 ne montre aucune modification dans la migration des chromosomes et une hybridation avec la sonde ATCase ne révèle que le chromosome X. Les hybridations successives avec les différentes sondes mentionnées plus haut conduisent au même profil, montrant que l'événement ayant provoqué le rétablissement de la prototrophie pour l'uracile s'est produit sur ce chromosome.

La recherche d'une éventuelle délétion par l'utilisation d'un oligonucléotide spécifique de la région ATCase couplé à des oligonucléotides spécifiques de la région située en amont des trois mutations ne donne aucun résultat. Nous avons de cette façon exploré une région de 50 kb en amont de la séquence codant le domaine ATCase. Au-delà de cette distance, un événement de délétion devrait induire un changement de migration du chromosome.

L'événement le plus probable est donc une duplication suivie de l'insertion de la région dupliquée dans un gène essentiel du chromosome X permettant ainsi l'expression du domaine ATCase.

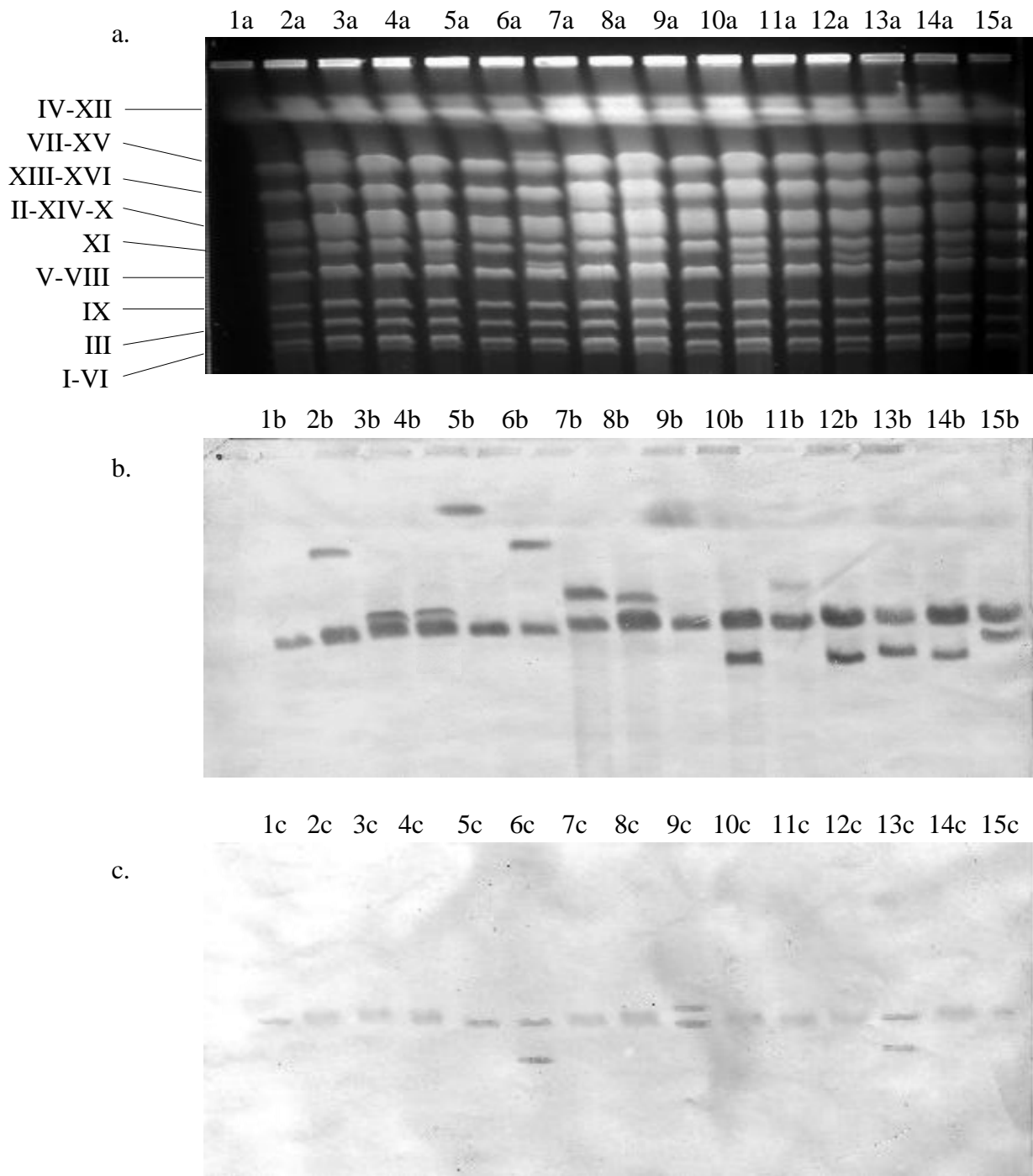


Figure 22 : Analyse des révertants diploïdes dont le caractère létal haploïde, révélé en ségrégation, est lié à la réactivation du domaine ATCase.

Dans l'ordre, piste 1 à 15 : FRa/ α , B025/1, B077/1, B132/1, B147/1, B152/1, B177/1, B186/1, B251/1, B255/1, B264/1, B267/1, B283/1, B326/1 et B328/1.

a. Caryotypes

b. Hybridation ADN/ADN avec une sonde ATCase.

Les sondes MRS3, INO1, OPT1 et YJL216c donnent le même profil.

c. Hybridation ADN/ADN avec une sonde centromérique du chromosome X AVT1.

La sonde PGU1 donne le même profil.

Souche	Sonde					Taille de la duplication (kb)
	ATCase	AVT1	MRS3	INO1	OPT1	
B025/1	X + (VII ou XV)	X	X + (VII ou XV)	X + (VII ou XV)	X + (VII ou XV)	>140
B077/1	X + (II ou XIV)	X	X + (II ou XIV)	X + (II ou XIV)	X + (II ou XIV)	>140
B132/1	X + (II ou XIV)	X	X + (II ou XIV)	X + (II ou XIV)	X + (II ou XIV)	>140
B147/1	X + IV	X	X + IV	X + IV	X + IV	>140
B177/1	X + (XIII ou XVI)	X	X + (XIII ou XVI)	X + (XIII ou XVI)	X + (XIII ou XVI)	>140
B186/1	X + (II ou XIV)	X	X + (II ou XIV)	X + (II ou XIV)	X + (II ou XIV)	>140
B210/1	X	X	X	X	X	non déterminée
B255/2	X + (V ou VIII)	X	X + (V ou VIII)	X + (V ou VIII)	X + (V ou VIII)	>140
B264/1	X + (XIII ou XVI)	X	X + (XIII ou XVI)	X + (XIII ou XVI)	X + (XIII ou XVI)	>140
B267/1	X + (V ou VIII)	X	X + (V ou VIII)	X + (V ou VIII)	X + (V ou VIII)	>140
B326/1	X + (V ou VIII)	X	X + (V ou VIII)	X + (V ou VIII)	X + (V ou VIII)	>140
B328/1	X + XI	X	X + XI	X + XI	X + XI	>140

Tableau 4 : Analyse du caryotype par hybridation ADN/ADN des souches diploïdes décrites à la figure 22.

La sonde AVT1 est spécifique du gène centromérique du chromosome XAVT1 .

Les sondes MRS3, INO1, OPT1 et YJL216c sont spécifiques des gènes MRS3 , INO1 , OPT1 et de l'ORF YJL216c situés sur le bras gauche du chromosome X en aval du domaine ATCase. La taille de la duplication est déduite de ces hybridations.

3.2.1.4 Duplications interchromosomiques

L'hybridation des caryotypes de 11 révertants (B025/1, B077/1, B132/1, B147/1, B177/1, B186/1, B255/1, B264/1, B267/1, B326/1 et B328/1) avec la sonde ATCase a montré que la séquence codant ce domaine est présente au niveau du chromosome X et au niveau d'un autre chromosome suggérant une duplication interchromosomique (figure 22 et tableau 4).

De plus, pour ces souches, les sondes spécifiques de gènes qui se trouvent en aval de l'allèle *ura2 15-30-72* ont toutes révélé un profil identique à celui révélé par la sonde ATCase (tableau 4), ce qui montre qu'un segment d'une taille minimum de 140 kb a probablement été dupliqué. L'observation des caryotypes montre souvent une différence de migration qui traduit un changement de taille du chromosome receveur (figure 22a).

En aval de l'ORF YJL216c, nous ne sommes plus en mesure de produire de sondes spécifiques, les régions télomériques étant redondantes dans le génome. Il nous est donc impossible de caractériser plus précisément le remaniement chromosomique selon cette méthode. Dans le cas d'une translocation réciproque, le changement de taille du chromosome receveur de la région ATCase observé dans de nombreux cas (figure 22) devrait impliquer un changement de taille équivalent du chromosome X donneur, ce qui n'est pas le cas. Un événement de duplication est donc plus probable.

Comme nous l'avons vu, les événements de duplication présents dans ces cellules sont létaux à l'état haploïde. Ceci peut être causé par l'insertion de l'élément dupliqué responsable du rétablissement de la prototrophie pour l'uracile dans un gène essentiel. Dans ce cas, les spores contenant l'élément dupliqué qui devraient être de phénotype Ura^+ sont incapables de germer en raison de l'interruption du gène essentiel. En revanche, les spores ne portant pas ce remaniement peuvent germer sur milieu complet, mais sont de phénotype Ura^- . Ceci nous donne donc bien une ségrégation 2 Ura^- (figure 23a).

Ces duplications pourraient également être une duplication d'une partie du bras gauche du chromosome X qui viendrait remplacer une partie du chromosome receveur. L'étude des caryotypes donne dans ce cas les mêmes résultats que pour une duplication dont la limite va au-delà de l'ORF YJL216c. De plus, si dans la région perdue par le chromosome receveur se trouve un gène essentiel, le domaine ATCase peut être réactivé en entraînant une létalité pour les spores qui devraient être de phénotype Ura^+ et la ségrégation issue de ce type d'événement sera également de type 2 Ura^- (figure 23b). Ce réarrangement pourrait se produire selon le modèle du BIR (Pâques & Haber, 2000 ; Symington, 2002 ; Davis & Symington, 2004) décrit dans la partie « Introduction » de ce travail (figure 1b).

La technique d'hybridation CGH (Comparative Genomic Hybridization) utilisant les puces à ADN (Hugues *et al.*, 2000) pourrait permettre de mieux déterminer les types de duplication que nous isolons et ainsi de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

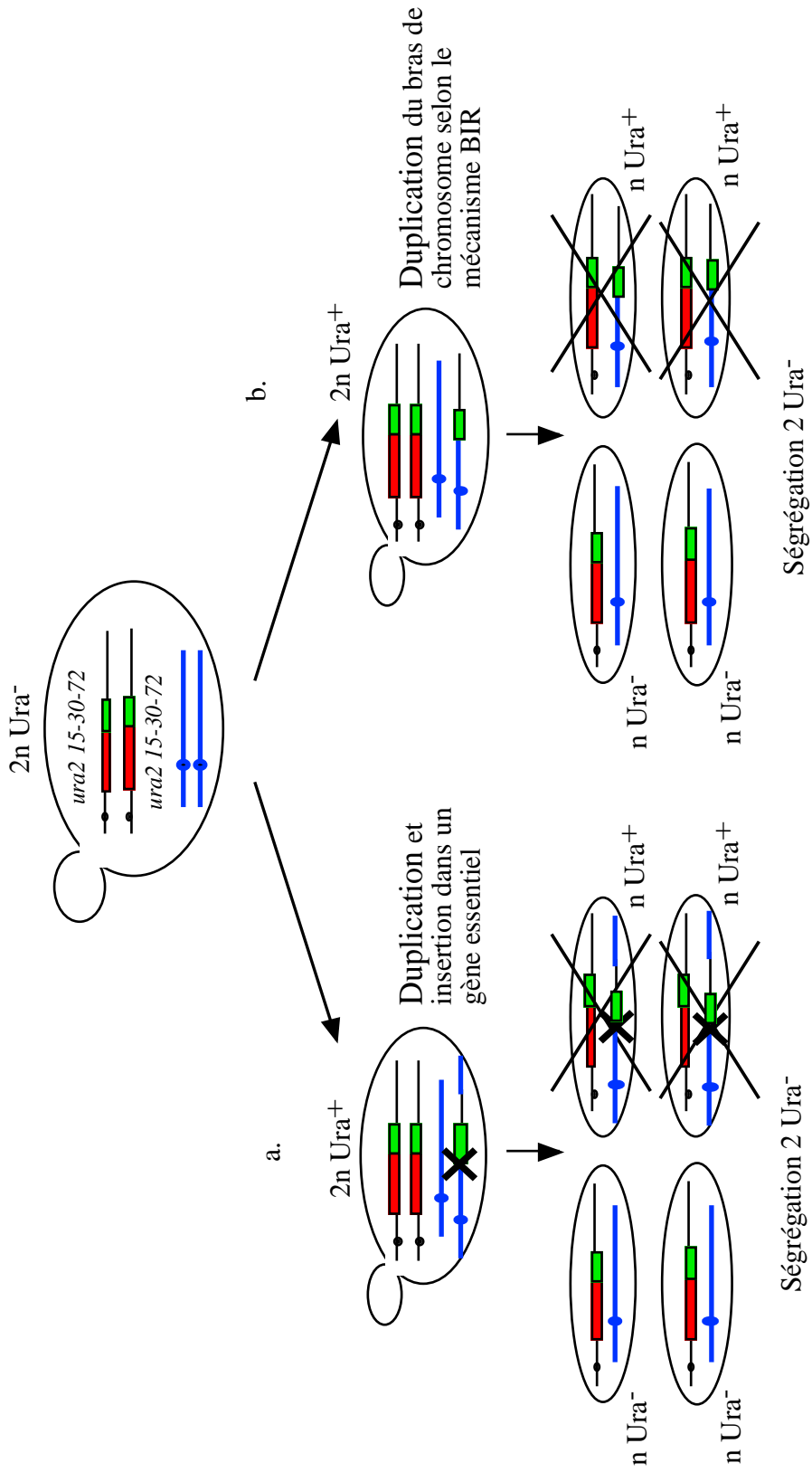


Figure 23 : Analyse génétique des événements létaux en phase haploïde associés à la réactivation du domaine ATCase.

a. Duplication segmentale et insertion de l'élément dupliqué dans un gène essentiel.

b. Duplication de bras de chromosome lié à la perte d'une partie du chromosome receveur selon le modèle du BIR.

3.2.1.5 Délétion segmentale

Le caryotype électrophorétique de la souche B283/1 (figure 22 piste 13a) et les hybridations à l'aide des sondes ATCase (figure 22, piste 13b) et AVT1 (figure 22, piste 13c) montrent qu'un chromosome X a subi une modification de taille.

Les hybridations à l'aide des sondes spécifiques de l'ORF YJL216c et des gènes *OPT1*, *INO1*, *AVT1* et *PGUI* révèlent le même profil que la sonde ATCase (tableau 5).

Afin de déterminer l'événement, nous avons réalisé une marche sur le chromosome X par hybridation ADN/ADN, de la région ATCase au centromère. Ainsi, les hybridations avec une sonde GATase et une sonde spécifique du début du gène *NET1* localisé 124 kb en amont de l'allèle *ura2 15-30-72* ne révèlent que le chromosome X non remanié (tableau 5) tandis que les sondes spécifiques des régions en amont de *NET1* donnent le même profil que la sonde spécifique de la région ATCase. Ces hybridations montrent donc la présence d'une large délétion.

Pour confirmer cette délétion, nous avons réalisé une amplification PCR entre l'oligonucléotide AW3R spécifique de l'allèle *ura2 15-30-72* et l'oligonucléotide NET1-2 (Annexe 1) spécifique de la partie centrale du gène *NET1* qui a permis d'obtenir un fragment de 0,8 kb, montrant la présence d'une délétion de 128,3 kb (figure 24). L'analyse des séquences au niveau de la jonction sera abordée dans le chapitre 3.

L'impossibilité d'obtenir des spores de phénotype Ura⁺ à partir du révertant B283/1 s'explique car le segment délété contient au moins deux gènes essentiels (Giaever *et al.*, 2002) : le gène *GCD14* qui code une tRNA méthyl-transférase (Anderson *et al.*, 2000) et le gène *NET1* qui code une protéine ribosomale (Straight *et al.*, 1999).

3.2.1.6 Délétion-translocation réciproque

Les analyses moléculaires du révertant B251/1 ont révélé la présence d'un événement de translocation réciproque entre le chromosome X et le chromosome XII associé à une délétion de 191 kb. Cet événement est schématisé dans la figure 25.

(i) Translocation réciproque entre les chromosomes X et XII

L'analyse des caryotypes (figure 22, piste 9 et tableau 6a) à l'aide de sondes spécifiques du bras gauche du chromosome X à partir de la région ATCase jusqu'à la région télomérique gauche révèle les chromosomes XII et X (figure 22, piste 9b).

D'autre part, les sondes spécifiques des gènes centromérique *AVT1* et télomérique droit *PGUI* du chromosome X révèlent un chromosome X remanié (figure 22, piste 9c). Ce chromosome est également mis en évidence par une sonde spécifique de la région télomérique du bras droit du chromosome XII.

Souche	Sondes							
	ATCase	INO1	OPT1	YJL216c	GATase	NET1	AVT1	PGU1
B283/1	X + (X)	X + (X)	X + (X)	X + (X)	X	X	X + (X)	X + (X)

Tableau 5 : Analyse par hybridation ADN/ADN du caryotype de la souche B283/1 à l'aide de sondes réparties le long du chromosome X.

Les sondes ATCase, MRS3, INO1, OPT1, YJL217w, GATase, NET1 et BNA3 sont spécifiques du bras gauche. La sonde AVT1 est centromérique et la sonde PGU1 est télomérique du bras droit. (X) : le chromosome X migre plus loin que la souche témoin.

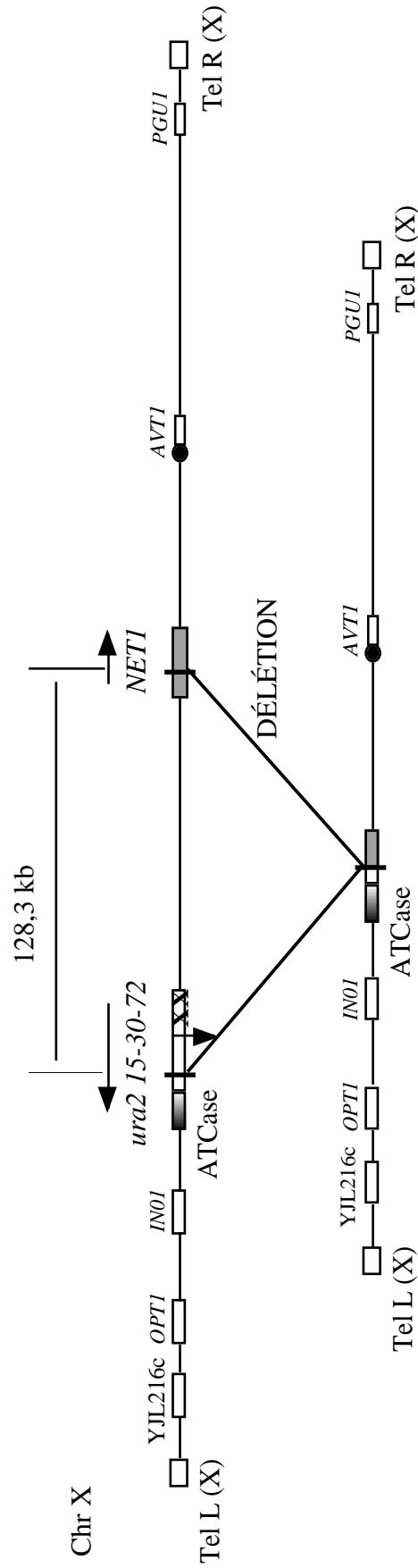


Figure 24 : Délétion segmentale : origine du révertant B283/1. Les phases codantes de l'allèle *ura2 15-30-72* et du gène *NET1* sont en sens inverse.

Ces hybridations indiquent donc une translocation réciproque entre le bras gauche du chromosome X et le bras droit du chromosome XII.

(ii) Délétion

Une marche sur le chromosome X par hybridation ADN/ADN à partir de la région GATase jusqu'à la région du gène *BNA3* situé à 151 kb en amont de l'allèle *ura2 15-30-72* ne révèlent que le chromosome X de référence et non celui qui est modifié (tableau 6a). La région chromosomique située de la région GATase au gène *BNA3* est donc absente de ce chromosome X modifié.

Ces différentes hybridations nous ont donc permis de caractériser une translocation réciproque entre le chromosome X et le chromosome XII ainsi qu'une délétion segmentale sur ce même chromosome X.

(iii) Jonction des bras transloqués

Pour confirmer ces hybridations ADN/ADN, nous avons réalisé des analyses par amplification PCR. Pour caractériser la jonction entre le bras gauche du chromosome X portant la séquence codant le domaine ATCase et le chromosome XII, nous avons utilisé la méthode de la « tail-PCR » utilisant des amorces dégénérées décrite par Liu & Whittier (1995). Après avoir déterminé la région de jonction par cette technique, nous avons réalisé une amplification PCR avec l'oligonucléotide FR4 spécifique de l'allèle *ura2 15-30-72* et un oligonucléotide spécifique du gène *YEF3* situé sur le chromosome XII. Cette amplification a permis la production d'un fragment de 1,2 kb, confirmant la jonction entre le bras gauche du chromosome X au niveau de la région CPSase et le chromosome XII à hauteur du gène *YEF3*.

De la même façon, une amplification PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques du gène *YEF3* et de l'ORF YJL043w a produit un fragment de 0,8 kb. Nous avons ainsi confirmé la jonction entre le bras droit du chromosome XII au niveau du gène *YEF3* et le chromosome X au niveau de l'ORF YJL043w.

Nous avons donc pu démontrer la présence d'une translocation réciproque entre le bras gauche d'un chromosome X et le bras droit d'un chromosome XII associé à une délétion d'une taille de 191 kb (de la région CPSase de l'allèle *ura2 15-30-72* à l'ORF YJL043w). Ce remaniement est schématisé dans la figure 25.

Sur le chromosome XII, le site de jonction se trouve à l'intérieur de la séquence codant le gène *YEF3* dont le produit est la sous-unité ribosomique qui correspond au facteur d'élongation de la traduction EF-3 (McCarthy, 1998). La délétion de ce gène est létale (Giaever *et al.*, 2002), aussi, son interruption explique l'impossibilité d'obtenir des spores prototrophes pour l'uracile.

a.

Souche	Sonde									
	Chromosome X									
	ATCase	MRS3	INO1	OPT1	YJL216c	GATase	BNA3	AVT1	PGU1	Chr XII
B251/1	X + XII	X + XII	X + XII	X + XII	X + XII	X	X	X + [X]	X + [X]	XII + [X]

b.

Souche	Sonde									
	Chromosome X									
	ATCase	MRS3	INO1	OPT1	YJL216c	GATase	BNA3	AVT1	PGU1	Chr VII
B152/1	X + [VII]	X + [VII]	X + [VII]	X + [VII]	X + [VII]	X	X	X + (X)	X + (X)	VII + (X)

Tableau 6 : Analyse par hybridation ADN/ADN du caryotype des souches B251/1 (a.) et B152/1 (b.).

Les sondes ATCase, MRS3, INO1, OPT1, YJL217w, GATase, BNA3, AVT1 et PGU1 sont spécifiques des gènes du même nom situés sur le chromosome X.

La sonde LEU3 est spécifique du gène *LEU3* situé sur le bras droit du chromosome XII.

La sonde ADH4 est spécifique du gène *ADH4* situé sur le bras gauche du chromosome VII.

[X] : le chromosome X migre plus haut que la souche témoin.

(X) : le chromosome X migre plus bas que la souche témoin.

[VII] : le chromosome VII migre plus haut que la souche témoin.

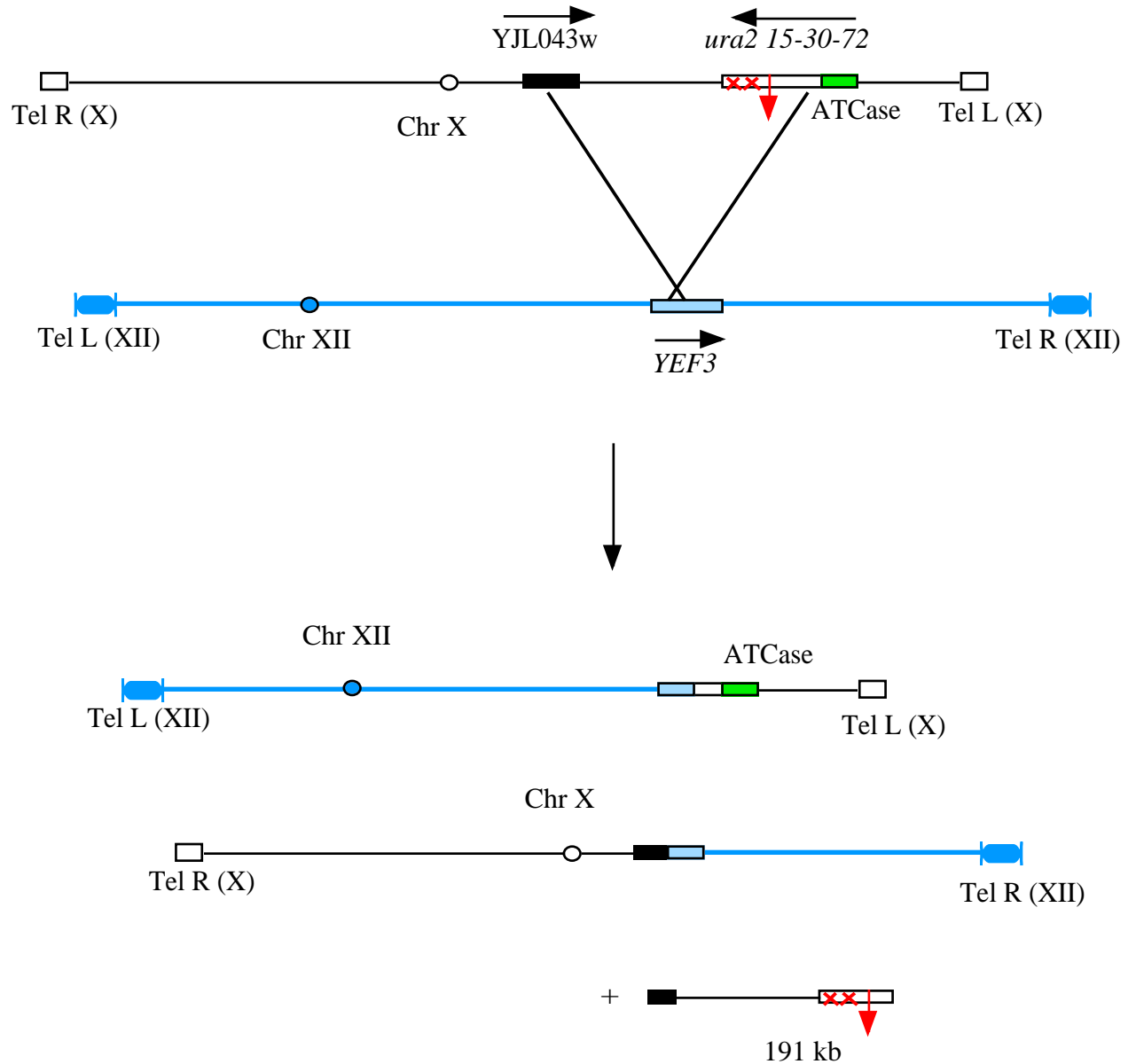


Figure 25 : Délétion-translocation réciproque : origine du révertant B251/1.

Les chromosomes ne sont pas à l'échelle. Un événement de délétion s'est produit entre l'allèle *ura2 15-30-72* et l'ORF YJL043w tandis que dans le même temps une translocation réciproque s'est produite entre le bras gauche du chromosome X au niveau de l'allèle *ura2 15-30-72* et le bras droit du chromosome XII au niveau du gène *YEF3*.

La séquence de cette jonction conduisant à une protéine de fusion entraînant la réactivation du domaine ATCase issue de l'association du gène *YEF3* avec la partie terminale de l'allèle *ura2 15-30-72* sera abordée dans le chapitre 3.

(iv) Révertant B152/1

Pour la souche B152/1, les hybridations ADN/ADN (figure 22, piste 6 et tableau 6b) nous donnent des résultats semblables à ceux observés dans le révertant B251/1 et suggèrent un événement de translocation du bras gauche du chromosome X vers le chromosome VII lié à un événement de délétion supérieur à 151 kb. Nous n'avons pas été en mesure de déterminer les jonctions de ces événements. Il sera nécessaire de poursuivre les analyses par d'autres méthodes afin de déterminer l'événement complexe qui s'est produit.

3.2.2 Événements non viables indépendants de la réactivation fonctionnelle du domaine ATCase

Pour les quatre révertants B218/1, B230/1, B259/1 et B307/1 l'analyse génétique a révélé trois types d'asques dont la ségrégation phénotypique se répartit ainsi : 1 Ura⁺/1 Ura⁻, 2 Ura⁺ et 2 Ura⁻. La capacité de ces révertants à produire des spores prototrophes pour l'uracile montre que l'événement de réversion n'est pas la cause du caractère létal observé. La létalité observée en phase haploïde est donc probablement due à un second événement indépendant de la réactivation du domaine ATCase (figure 26).

La sporulation du révertant B247/1 conduit systématiquement à la production d'un seul type d'asque contenant 4 spores dont deux seulement sont viables et de phénotype Ura⁺. Ceci montre la sélection d'un événement non viable indépendant de la réactivation fonctionnelle du domaine ATCase, mais lié au second allèle *ura2 15-30-72*.

3.2.2.1 Analyse du révertant B259/1

De la même façon que dans le § 3.1.1.1, nous avons analysé le profil de restriction *Bam* HI du diploïde et des spores Ura⁺ et Ura⁻ qui est caractéristique d'un événement de duplication.

L'hybridation ADN/ADN du caryotype (figures 27a et 27b) avec une sonde ATCase ne révèle que le chromosome X et montre donc que la duplication est intra-chromosomique.

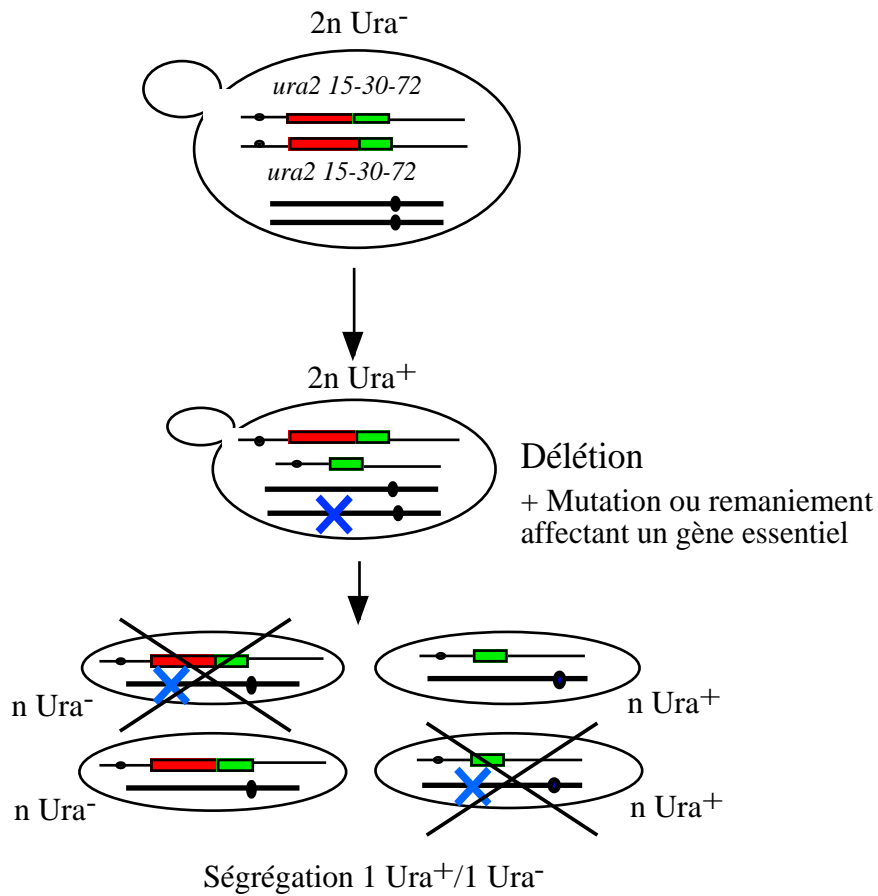


Figure 26 : Analyse génétique d'un événement létal indépendant de l'allèle *ura2 15-30-72*.

Nous représentons ici un événement de délétion accompagné d'un second événement de mutation, létal et indépendant de l'allèle *ura2 15-30-72*.

Les spores qui porteront cette mutation additionnelle ne sont pas viables. Selon la distribution des chromosomes en méiose, le révertant diploïde peut également produire des asques avec une ségrégation 2 Ura⁻ et des asques avec une ségrégation 2 Ura⁺.

Les ségrégations sont les mêmes dans le cas d'un événement de duplication de la région ATCase.

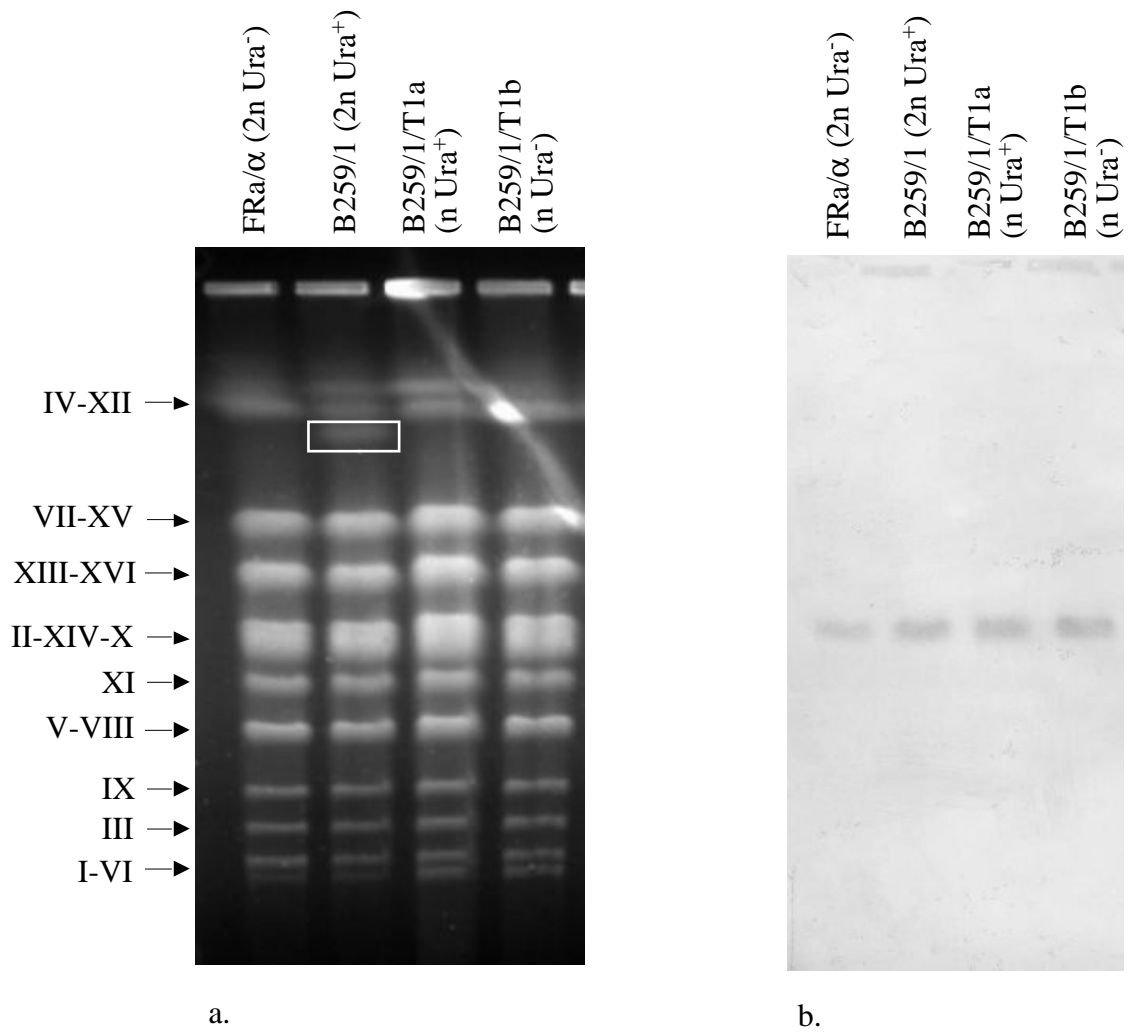


Figure 27 : Analyse du caryotype de la souche B259/1.

a. Caryotype de la souche B259/1. Dans le révertant diploïde se trouve un chromosome remanié au niveau des chromosomes IV et XII qu'on ne retrouve jamais dans les spores viables.

b. Hybridation ADN/ADN du caryotype avec un sonde ATCase.

D'autre part, on peut observer en analysant le caryotype du révertant diploïde (figure 27a) une différence de migration significative pour un chromosome migrant plus bas que les chromosomes IV et XII. Ce changement ne se retrouve pas au niveau des spores viables, ni Ura^+ , ni Ura^- . Cette observation suggère un remaniement de grande taille pour ce chromosome qui pourrait être létal en phase haploïde, expliquant la ségrégation observée et l'absence de ce remaniement dans les spores viables. Une analyse approfondie de ce chromosome pourrait permettre de confirmer notre hypothèse.

3.2.2.2 Analyse des révertants B218/1, B230/1 et B307/1

Pour ces souches, les analyses moléculaires ont montré la présence d'une délétion au niveau de l'allèle *ura2 15-30-72*. Leurs caractéristiques seront décrites de façon approfondie dans le chapitre 3.

Si l'étude des ségrégations montre qu'un second événement indépendant de la délétion est associé à la létalité, les analyses des caryotypes et les hybridations ADN/ADN réalisées n'ont pas permis de révéler de modification visible pouvant expliquer cette caractéristique.

3.2.2.3 Analyse du révertant B247/1

Les analyses moléculaires montrent que l'événement responsable du rétablissement de la prototrophie pour l'uracile est une délétion. L'analyse du caryotype électrophorétique et les hybridations ADN/ADN n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque modification de migration des chromosomes. Cependant, le profil de restriction *Bam* HI du révertant diploïde révèle l'absence du fragment de 6,8 kb spécifique de l'allèle *ura2 15-30-72*.

Sur quatre spores contenues dans les asques, deux seulement sont viables et sont systématiquement prototrophes pour l'uracile, suggérant qu'un événement létal à l'état haploïde s'est produit et que les spores Ura^- sont porteuses de cette mutation. La létalité observée est donc génétiquement liée au second allèle *ura2 15-30-72* qui n'est pas impliqué dans la réactivation de l'ATCase. L'absence de la bande de 6,8 kb montre la disparition de cet allèle.

L'ensemble de ces observations permet d'émettre deux hypothèses concernant l'événement létal :

(i) Le second chromosome X a subi un événement de délétion entraînant à la fois l'allèle *ura2 15-30-72* et un gène essentiel présent sur ce chromosome. Dans ce cas, la taille de cette délétion n'est pas suffisamment importante pour être observable sur le caryotype.

(ii) Il s'agit d'un cas d'aneuploïdie, le second chromosome X est entièrement perdu.

Ces deux hypothèses concordent avec l'absence du fragment de 6,8 kb dans le profil *Bam* HI du révertant diploïde et avec l'absence de modification observable sur le caryotype électrophorétique.

La technique de CGH permettrait de tester ces hypothèses.

4. Sélections et analyse moléculaire d'événements de réactivation du domaine ATCase en contexte haploïde α

Les précédents travaux utilisant notre crible de sélection ont été menés dans le contexte haploïde. Ils ont permis d'identifier trois types d'événements qui sont l'insertion d'un élément transposable Ty1 dans la phase codante de l'allèle *ura2 15-30-72* et en amont de la région ATCase, la délétion de la région contenant les trois mutations ou bien encore la duplication d'un fragment du chromosome X contenant la région ATCase suivie de son insertion dans une nouvelle région génomique (Bach *et al.* , 1995 ; Roelants *et al.* , 1995 ; Welcker *et al.* , 2000).

Lors de ce travail, nous avons réalisé de nouvelles sélections dans ce contexte avec la souche FR α qui nous servent de témoin. Nous pourrions ainsi comparer les résultats obtenus avec ceux du contexte diploïde.

4.1 Résultats des sélections

Nous avons effectué 29 sélections à l'aide de la souche FR α , ce qui correspond à $6,93 \cdot 10^{10}$ cellules étalées. Nous avons pu obtenir 16 révertants indépendants prototrophes pour l'uracile. Le taux de mutation est calculé selon la méthode du maximum de vraisemblance de Lea & Coulson (1949) et les intervalles de confiance sont déterminés avec un test de Student. Le taux de mutation observé à partir de ces sélections est de $1,4 \cdot 10^{-10}$ mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération avec un intervalle de confiance calculé à 95 % compris entre $5,9 \cdot 10^{-11}$ et $2,3 \cdot 10^{-10}$. Ce taux est comparable aux résultats observés dans les précédents travaux qui avaient mis en évidence un taux de mutation global de $2,3 \cdot 10^{-10}$ avec un intervalle de confiance calculé à 95 % compris entre $5,5 \cdot 10^{-11}$ et $1,1 \cdot 10^{-10}$ (Welcker *et al.* , 2000). En effet, le chevauchement des intervalles de confiance montre que la différence observée entre ces deux taux de mutation n'est pas significative.

	<i>Nombre</i>	<i>Révertants</i>
<i>Délétion</i>	7	$\alpha 1/1, \alpha 5/1, \alpha 6/1, \alpha 8/1, \alpha 17/1, \alpha 25/1, \alpha 27/1$
<i>Duplication</i>	2	$\alpha 8/2, \alpha 21/1$
<i>Insertion Ty1</i>	7	$a1/2, a \alpha 3/1, \alpha 10/1, \alpha 15/1, \alpha 26/2, \alpha 26/3, \alpha 30/1$

Tableau 7 : Récapitulatif de la distribution des événements de réactivation du domaine ATCase sélectionnés en contexte haploïde α chez les seize révertants indépendants.

4.2 Analyse moléculaire des événements sélectionnés

La méthode que nous avons appliquée pour l'analyse des révertants haploïdes est identique à celle utilisée pour les révertants diploïdes décrite dans le § 1.3 et le § 1.4 de ce chapitre. L'analyse est cependant plus simple du fait de la présence du génome en un seul exemplaire. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

4.2.1 Événements de duplication

Deux révertants indépendants proviennent d'un événement de duplication puisque le profil de restriction *Bam* HI montre un profil à deux bandes.

4.2.2 Événements de délétion

Sept révertants indépendants montrent un profil de restriction *Bam* HI à une bande de taille supérieure à 6,8 kb. Les analyses par amplification PCR selon les conditions décrites dans le § 1.3.3 ont permis de mettre en évidence un événement de délétion de la région de l'allèle *ura2 15-30-72* contenant les trois mutations. Les caractéristiques précises de ces délétions seront abordées dans le chapitre 3.

4.2.3 Événements de transposition d'éléments Ty1

L'analyse du profil de restriction *Bam* HI des sept révertants indépendants restants a montré la présence d'une bande de taille identique à celle du témoin Ty1 de 12,7 kb. L'analyse par amplification PCR à l'aide des oligonucléotides $\delta B41$ et AW1 a permis de confirmer l'insertion d'un élément Ty1 en aval de la région contenant les trois mutations et en amont de la région codant le domaine ATCase.

4.3 Conclusions

Les sélections effectuées en contexte haploïde montrent des résultats similaires aux précédentes expériences réalisées par Roelants *et al.* (1995) et Welcker *et al.* (2000) en contexte haploïde tant sur le taux de mutation que sur les événements sélectionnés.

5. Taux de mutation

Dans le § 2.1, nous avons pu voir que le taux de mutation global en contexte diploïde a/α est de $7,7 \cdot 10^{-12}$ mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération. L'intervalle de confiance à 95 % calculé pour ce taux de mutation est compris entre $3,9 \cdot 10^{-12}$ et $1,2 \cdot 10^{-11}$. Ce taux en contexte haploïde est de $1,4 \cdot 10^{-10}$ mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération avec un intervalle de confiance calculé à 95 % compris entre $5,9 \cdot 10^{-11}$ et $2,3 \cdot 10^{-10}$ (§ 4.1). Cette différence significative revient à une baisse du taux de mutation d'un facteur 18 entre la phase haploïde et la phase diploïde. Les données statistiques des événements sélectionnés en contextes haploïde et diploïde sont présentées dans le tableau 8.

Comme nous l'avons démontré par l'analyse génétique, une partie des événements sélectionnés en contexte diploïde permet d'obtenir quatre spores viables, ce qui indique que l'événement de réactivation sélectionné aurait également été sélectionnable en contexte haploïde. Par contre, certains révertants n'ont permis d'obtenir que deux spores viables, signifiant la sélection d'un événement qui n'est pas supporté en contexte haploïde. Dans 15 cas, ce caractère létal qui apparaît à l'état haploïde s'avère lié à la réactivation fonctionnelle du domaine ATCase. Par conséquent, de tels événements n'auraient pas été sélectionnables en contexte haploïde avec notre système basé sur une sélection positive de ces événements de réactivation. Dans 5 autres cas, cette létalité est indépendante de l'événement de réactivation et nous aurions donc été capables de les sélectionner en phase haploïde. Ainsi, 38,4 % des événements sélectionnés en contexte diploïde auraient été impossibles à sélectionner en contexte haploïde.

En contrepartie, les événements d'insertion de rétrotransposons Ty1 ne sont pas sélectionnables en contexte diploïde du fait de la répression transcriptionnelle qui s'exerce sur ces éléments transposables. Par conséquent 43,75 % des événements sélectionnés en contexte haploïde sont impossibles à sélectionner en contexte diploïde.

Ces taux de mutation sont comparables car les événements non sélectionnables dans chacun des deux contextes génétiques représentent sensiblement la même proportion.

La différence de taux de mutation suggère une plus grande stabilité du contexte diploïde par rapport au contexte haploïde vis-à-vis des remaniements chromosomiques tels que nous les sélectionnons avec notre système. Dans l'introduction de ce travail, nous avons abordé les mécanismes responsables des réarrangements chromosomiques : à l'origine se trouve probablement une cassure d'ADN double-brin qui peut être réparée soit par le mécanisme de recombinaison homologue, soit par le mécanisme de recombinaison non-homologue. Comme nous l'avons vu, ces deux voies de réparation peuvent mener à des remaniements chromosomiques ou bien à une réparation à l'identique. La baisse importante du taux de mutation en contexte diploïde suggère une plus grande efficacité de réparation à l'identique dans ce contexte.

Contexte génétique	N	n_c	Réactivation du domaine ATCase	r	%	Taux de mutation	Intervalle de confiance
Diploïde a/α	333	4,5.10⁹	Global	39	100	7,7.10⁻¹²	[3,9.10⁻¹² ; 1,2.10⁻¹¹]
Événements viables							
Insertion Ty1	-	-	-	-	-	-	-
Délétion	13	33,3	33,3	13	33,3	nd	nd
Duplication	10	25,7	25,7	10	25,7	nd	nd
Translocation	1	2,6	2,6	1	2,6	nd	nd
Événements létaux							
	15	38,4	38,4	15	38,4		
Haploïde α	29	2,4.10⁹	Global	16	100	1,4.10⁻¹⁰	[5,9.10⁻¹¹ ; 2,3.10⁻¹⁰]
Événements viables							
Insertion Ty1	7	43,75	43,75	7	43,75	7,2.10 ⁻¹¹	[1,4.10 ⁻¹¹ ; 1,3.10 ⁻¹⁰]
Délétion	7	43,75	43,75	7	43,75	7,2.10 ⁻¹¹	[1,4.10 ⁻¹¹ ; 1,3.10 ⁻¹⁰]
Duplication	2	12,5	12,5	2	12,5	1,7.10 ⁻¹¹	[6,5.10 ⁻¹² ; 6,5.10 ⁻¹¹]
Translocation	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 8 : Calcul des taux de mutation observés en contextes diploïde a/α et haploïde α.

N : nombre de sélections.

% : proportion des événements.

 n_c : nombre moyen de cellules par sélection.

nd : non déterminé

r : nombre de révertants indépendants issus des sélections.

Taux de mutation : mutation/allèle *ura2* 15-30 72 /cellule/génération.

En contexte diploïde, des événements de conversion génique et de recombinaison homologue sont possibles entre deux chromosomes homologues, contrairement au contexte haploïde où le génome est présent en un seul exemplaire. En conséquence, un tel événement dans notre souche homozygote entre un allèle *ura2 15-30-72* et la même région chromosomique ayant subi une cassure d'ADN peut mener à la restauration de l'allèle à l'identique. La baisse du taux de mutation d'un facteur 18 en phase diploïde par rapport à la phase haploïde pourrait donc probablement être due au moins en partie à ce phénomène de conversion génique.

6. Conclusions

L'ensemble des sélections réalisées en contexte diploïde nous ont conduit à observer des événements de réactivation du domaine ATCase (tableau 9) par duplication ou délétion. Cependant, comme attendu (Errede *et al.*, 1980 ; Company & Errede, 1987) et contrairement à ce qui est observé en phase haploïde, aucun événement d'insertion de rétrotransposon Ty1 n'a été isolé.

La nouveauté en contexte diploïde réside dans la sélection d'événements jamais observés avec notre système que nous allons récapituler.

6.1 Délétion homozygote

Il est clair que la présence en un seul exemplaire de l'allèle *ura2 15-30-72* en phase haploïde empêchait de voir ce type d'événement. Cependant, en contexte diploïde, cet événement reste rare puisqu'il n'a été observé qu'une seule fois parmi les 39 révertants sélectionnés. On peut également noter que nous n'avons jamais isolé de révertants portant 2 délétions différentes sur chacun des deux allèles d'une même souche de la région contenant les trois mutations. Comme nous l'avons vu dans le § 2.1, avec le système de sélection utilisé, le taux de mutation global est très faible, de l'ordre de 10^{-12} , rendant statistiquement possible, mais avec une faible probabilité la sélection dans une même souche de deux événements de délétion sur les deux allèles de façon simultanée. Il est donc probable que l'apparition de deux délétions identiques soit le résultat de deux événements dont le premier entraîne l'apparition du second. Ceci corrobore l'hypothèse d'un événement de délétion, immédiatement suivi d'une conversion génique prenant pour matrice l'allèle modifié et entraînant l'apparition de la même délétion au second locus.

Réactivation du domaine ATCase	Ségrégation	N	Souche
Révertants isolés		39	
Événements viables		19	
<i>Duplication intrachromosomique</i>	2 Ura ⁺ /2 Ura ⁻	1	B286/2
<i>Duplication interchromosomique</i>	2 Ura ⁺ /2 Ura ⁻	8	B038/2, B066/1, B066/2, B116/1, B199/1, B219/1, B282/1, B284/1
<i>Délétion</i>	2 Ura ⁺ /2 Ura ⁻	8	B072/1, B102/1, B247/2, B278/1, B281/1, B286/1, B295/1, B298/1
<i>Délétion homozygote</i>	4 Ura ⁺	1	B026/1
<i>Translocation réciproque</i>	2 Ura ⁺ /2 Ura ⁻ , 1 Ura ⁺ /1 Ura ⁻ , 0	1	B038/1
Événements létaux		20	
Létaux indépendants		5	
<i>Duplication intrachromosomique</i>	1 Ura ⁺ /1 Ura ⁻ , 2 Ura ⁺ , 2 Ura ⁻	1	B259/1
<i>Délétion</i>	1 Ura ⁺ /1 Ura ⁻ , 2 Ura ⁺ , 2 Ura ⁻	3	B218/1, B230/1, B307/1
<i>Délétion *</i>	2 Ura ⁺	1	B247/1
Létaux liés		15	
<i>Duplication intrachromosomique</i>	2 Ura ⁻	1	B210/1
<i>Duplication interchromosomique</i>	2 Ura ⁻	11	B025/1, B077/1, B132/1, B147/1, B177/1, B186/1, B255/1, B264/1, B267/1, B326/1, B328/1
<i>Délétion</i>	2 Ura ⁻	1	B283/1
<i>Délétion-translocation réciproque</i>	2 Ura ⁻	2	B152/1, B251/1

Tableau 9 : Distribution des événements de réarrangement chromosomique sélectionnés en contexte diploïde.

Létaux indépendants : sélection d'un événement létal indépendant de la réactivation du domaine ATCase.

* : L'événement létal est indépendant de la réactivation du domaine ATCase mais génétiquement lié au second allèle *ura2 15-30-72*.

Létaux liés : sélection d'un événement létal lié à l'événement de réactivation du domaine ATCase.

0 : l'asque contient 4 spores qui ne sont pas viables.

6.2 Translocation réciproque

Bien que viable à l'état haploïde, cet événement n'a jamais pu être mis en évidence dans ce contexte. De plus, cet événement est rare puisqu'il n'apparaît qu'une seule fois, rareté probablement consécutive au mécanisme menant à ce type d'événement. En effet, deux cassures double-brin sont nécessaires selon les modèles décrits (revue de Pâques & Haber, 2000), ce qui est forcément moins fréquent qu'une seule qui conduit aux événements de délétion par exemple. Cependant, ceci n'explique pas son absence en phase haploïde. La connaissance des points de jonction des deux bras transloqués et des séquences nucléotidiques qui s'y trouvent nous permettra de mieux comprendre la présence de cet événement dans la phase diploïde uniquement, ce que nous aborderons dans le chapitre 3.

6.3 Délétion segmentale

Une délétion segmentale de 128,3 kb a été isolée dont la conséquence est la perte de plusieurs gènes essentiels, rendant impossible sa sélection en phase haploïde. Le chromosome ainsi remanié est suffisamment stable pour être maintenu dans la cellule malgré la perte importante de matériel génétique.

6.4 Événement de délétion-translocation réciproque

Dans le révertant B251/1, un événement de délétion-translocation réciproque a été caractérisé. En effet, ce révertant a subi à la fois une délétion de 191 kb et une translocation réciproque entre le chromosome X et le chromosome XII. La létalité en phase haploïde est due à la fois à la délétion qui entraîne des gènes essentiels et à l'interruption du gène essentiel *YEF3* consécutive à l'événement de translocation réciproque.

6.5 Nombreuses duplications interchromosomiques

Sur les 22 événements de duplication sélectionnés, 19 sont des duplications interchromosomiques. 7 d'entre-elles, viables en phase haploïde sont probablement des duplications qui ont une taille supérieure à 140 kb. 11 autres, non viables à l'état haploïde, ont également une taille supérieure à 140 kb. En contexte haploïde, les duplications de courte taille sont nettement plus représentées (Joseph Schacherer, communication personnelle).

Chapitre 3

Analyse moléculaire des événements de délétion : présence de différents types de jonctions

Dans ce chapitre, nous allons décrire les caractéristiques des événements de délétion sélectionnés en phases haploïde et diploïde, notamment leur taille et la séquence nucléotidique qui se trouve à la jonction de ces délétions. Ensuite, nous comparerons les résultats obtenus dans ces deux contextes. Nous préciserons également les jonctions de la translocation réciproque et de la délétion-translocation réciproque. Cette étude nous permettra d'émettre des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la formation des délétions et des événements de translocation qui font souvent appel à de courtes séquences en répétition directe (Haber & Leung, 1996).

1. Taille et localisation des délétions obtenues en contextes haploïde α et diploïde a/α

1.1 Événements de délétion sélectionnés en contexte haploïde

Dans ce contexte, 7 événements indépendants de délétion ont pu être caractérisés. L'identification du site auquel s'est produit ce remaniement chromosomique, nous permet de définir deux types de délétion. Dans le premier, la délétion est interne à l'allèle *ura2 15-30-72* tandis que dans le second, elle comprend la région codante de l'allèle contenant les trois mutations ainsi qu'une partie de la région promotrice. Pour le gène *URA2*, le point d'initiation de la transcription se trouve à la position -63 pour les transcrits majeurs et -44 pour les transcrits mineurs et une boîte TATAT se trouve en position -123 (Souciet *et al.*, 1989). Les caractéristiques de ces délétions sont résumées dans le tableau 10a.

a.

Taille de la délétion	Bornes		position ATG init	protéine putative	Souche
	<i>ura2 15-30-72</i>	<i>chromosome X</i>			
3222 bp	+162 / +3392	172122 / 168892	+1	1140 aa	α27/1
5328 bp	+132 / +5473	172152 / 166811	+1	438 aa	α8/1
3857 bp	-522 / +3346	172807 / 168938	+3352	1097 aa	α1/1, α5/1, α6/1, α25/1
4496 bp	-635 / +3861	172922 / 168423	+3868	925 aa	α17/1

b.

Taille de la délétion	Bornes		position ATG init	protéine putative	Souche
	<i>ura2 15-30-72</i>	<i>chromosome X</i>			
3513 bp	+176 / +3692	172108 / 168592	+1	1043 aa	B307/1
3951 bp	+106 / +4059	172178 / 168225	+1	897 aa	B298/1
3161 bp	-23 / +3137	172308 / 169147	+3184	1153 aa	B026/1
3564 bp	-556 / +3009	172841 / 169277	+3052	1197 aa	B072/1
3588 bp	-582 / +3008	172867 / 169276	+3052	1197 aa	B286/1
3629 bp	-482 / +3148	172768 / 169197	+3184	1153 aa	B278/1
3809 bp	-577 / +3233	172862 / 169051	+3262	1127 aa	B102/1
3857 bp	-522 / +3346	172807 / 168938	+3352	1097 aa	B218/1, B281/1
3901 bp	-575 / +3328	172860 / 168956	+3352	1097 aa	B295/1
3974 bp	-703 / +3274	172988 / 169013	+3301	1114 aa	B247/1
4810 bp	-364 / +4448	172649 / 167836	-383	739 aa	B247/2
5917 bp	-369 / +5550	172654 / 166734	-383	370 aa	B230/1
128,3 kb	+625 (<i>NET1</i>) / +4786	295784 / 167499	+4999	548 aa	B283/1

Tableau 10 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés.

a. En contexte haploïde.

b. En contexte diploïde.

Les bornes sont déterminées en fonction de la position +1 du gène *URA2* et en fonction de la position +1 du chromosome X.

Position ATG init : position du premier ATG en phase avec la région ATCase utilisé pour déduire la protéine putative.

Délétion intragénique \mathfrak{g} : le premier ATG en phase avec la région ATCase se trouve au niveau +1 de l'allèle *ura2 15-30-72*.

Délétion génique contenant le codon d'initiation \mathfrak{g} : le premier ATG en phase avec la région ATCase se trouve au niveau du domaine CPSase et le promoteur du gène *URA2* est vraisemblablement conservé.

Délétion de la région promotrice et des trois mutations : le premier ATG en phase avec la région ATCase se trouve au niveau du domaine CPSase (\mathfrak{g}) ou en amont du +1 de l'allèle *ura2 15-30-72* (\mathfrak{g}).

Délétion segmentale \mathfrak{g} : fusion de deux séquences nucléotidiques ; le premier ATG en phase avec la région ATCase se trouve au niveau du domaine CPSase.

1.1.1 Délétion intragénique

Deux des sept délétions sélectionnées sont intragéniques. En effet, les révertants $\alpha 8/1$ et $\alpha 27/1$ montrent une séquence nucléotidique délétée allant respectivement de la position +132 à la position +5473 et de la position +162 à la position +3392, la position +1 correspondant au nucléotide A du codon d'initiation de la traduction du gène *URA2*. Les tailles respectives des régions délétées sont de 5327 bp et de 3222 bp.

Dans ces cas de délétion intragénique (figure 28a), le promoteur du gène *URA2* est conservé. Cette délétion interne permet la perte des trois mutations ponctuelles. À la suite de cet événement, nous pouvons observer une nouvelle phase de lecture partant probablement du codon initiateur et s'arrêtant au codon de terminaison du gène *URA2*. De cette façon, nous pouvons déduire de cette nouvelle phase codante une protéine de 438 aa pour le révertant $\alpha 8/1$ et de 1140 aa pour le révertant $\alpha 27/1$.

1.1.2 Délétion de la région promotrice

Cinq autres délétions ont subi la perte d'une séquence comprenant la région promotrice et les trois mutations. Deux délétions différentes de ce type ont été observées puisque les révertants $\alpha 1/1$, $\alpha 5/1$, $\alpha 6/1$ et $\alpha 25/1$ ont subi le même événement de délétion qui s'étend des positions -522 à +3346, pour une taille de 3856 bp. La souche $\alpha 17/1$ a quant à elle subi une délétion de 4496 bp allant des positions -635 à +3861.

La nouvelle protéine a été déduite à partir du premier ATG présent en phase avec la séquence codant le domaine ATCase (figure 28b1). De cette façon, la délétion qui s'est produite dans le révertant $\alpha 17/1$ entraîne l'apparition d'une protéine de 925 aa et de 1097 aa dans les révertants $\alpha 1/1$, $\alpha 5/1$, $\alpha 6/1$ et $\alpha 25/1$.

1.2 Événements de délétion sélectionnés en contexte diploïde

Dans ce contexte, 14 événements indépendants de délétion ont pu être caractérisés. Trois types de délétion ont pu être observés : des délétions intragéniques, des délétions de la région promotrice en plus des trois mutations comme nous l'avons vu précédemment ainsi qu'une délétion segmentale de 128,3 kb. Les caractéristiques de ces délétions sont récapitulées dans le tableau 10b.

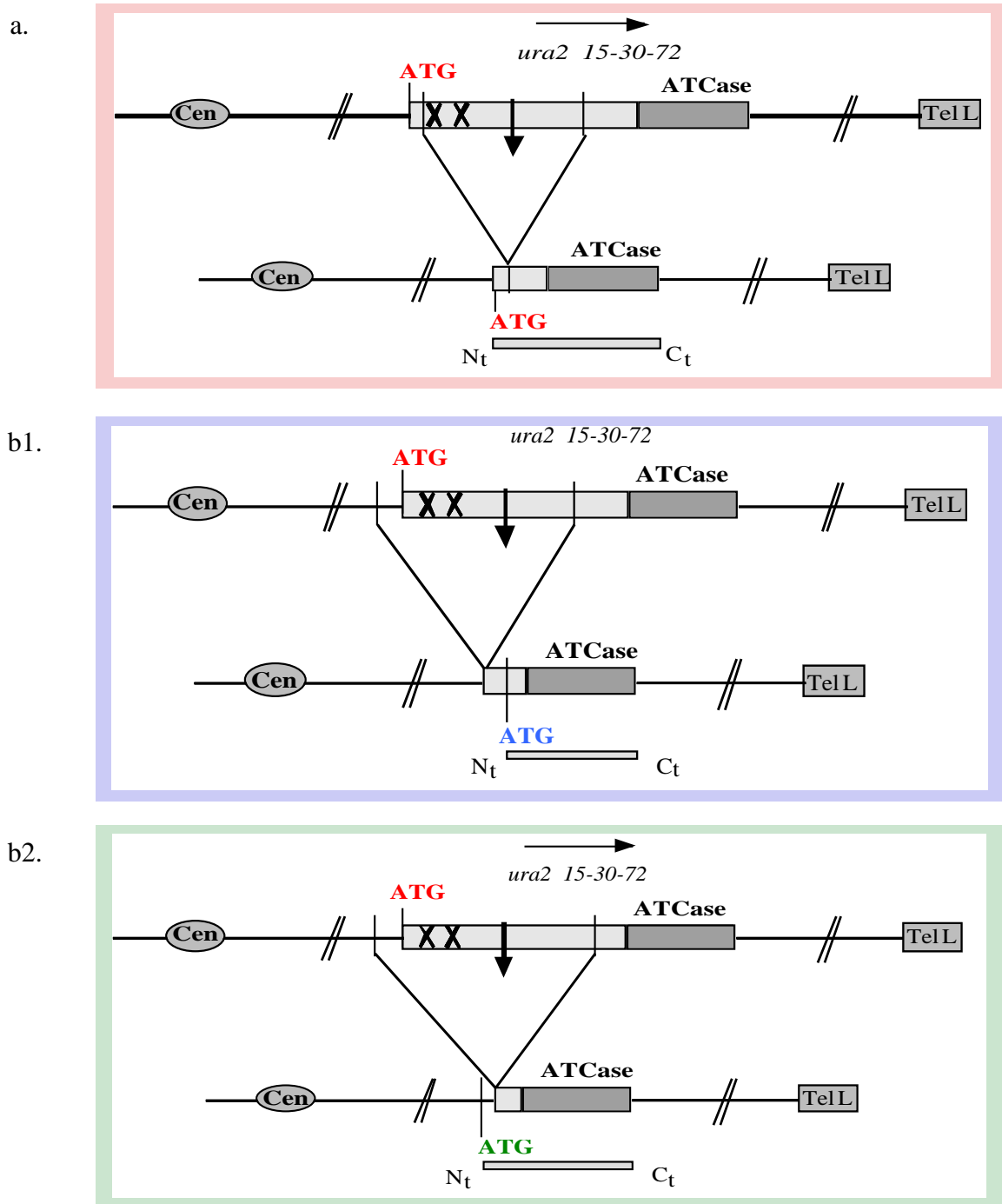


Figure 28 : Délétions chromosomiques au niveau de l'allèle *ura2 15-30-72* .

a. Délétion intragénique.

La délétion permet la perte des 3 mutations de l'allèle *ura2 15-30-72* et la remise en phase de la région codant le domaine ATCase. Le codon initiateur est conservé. La protéine issue de cet événement commence avec le codon d'initiation ATG de l'allèle.

b. Délétion de la région promotrice.

La région promotrice est perdue avec les trois mutations. Pour déterminer le codon d'initiation de la nouvelle protéine, nous avons recherché le premier codon ATG en phase avec la région ATCase soit dans la séquence restante de l'allèle *ura2 15-30-72* (b1), soit dans la région se trouvant en amont de cette séquence (b2).

1.2.1 Délétion intragénique

Les révertants B298/1 et B307/1 portent une délétion intragénique. Le premier montre une délétion s'étendant des positions +106 à +4058, pour une taille de région délétée de 3951 bp. Le second a subi une délétion de 3512 bp allant des positions +166 à +3691.

De la même façon qu'en contexte haploïde, ces délétions englobent les trois mutations ponctuelles et permettent la remise en phase de la région codant le domaine ATCase qui peut dès lors être traduit. Les protéines déduites de ces délétions utilisent vraisemblablement le codon d'initiation du gène *URA2* et ont une taille de 897 aa pour le révertant B298/1 et de 1043 aa pour le révertant B307/1.

1.2.2 Délétion de la région promotrice

Dix autres révertants isolés en contexte diploïde ont subi ce type d'événement. Le premier codon d'initiation ATG en phase avec la séquence codant le domaine ATCase se trouve dans la région CPSase pour huit de ces délétions (figure 28b1 et tableau 10b). En revanche, pour les souches B230/1 et B247/2, le premier ATG en phase avec la région ATCase pour la nouvelle protéine putative se trouve dans la région intergénique, en amont du site de délétion (figure 28b2 et tableau 10b). Toutes ces délétions sont différentes de celles précédemment observées en contexte haploïde à l'exception des révertants B218/1 et B281/1.

Dans la souche B026/1, bien que la délétion commence à la position -23 et entraîne donc la perte du codon d'initiation de la traduction, le promoteur du gène et les signaux d'initiation sont probablement conservés. Le premier codon ATG en phase avec la région ATCase se trouve donc au niveau de la région CPSase (+3184).

1.2.3 Délétion segmentale

Comme nous l'avons mis en évidence dans le chapitre 2, le révertant B283/1 est porteur d'une délétion segmentale d'une taille de 128,3 kb. Les analyses PCR et le séquençage de la jonction de cette délétion ont permis de démontrer qu'elle s'est effectuée entre la position +4786 de l'allèle *ura2 15-30-72*, dans le domaine CPSase, et la position +625 du gène *NET1*, c'est-à-dire entre les positions 167499 et 295784 du chromosome X selon les coordonnées définies dans la souche S288C. Cette délétion entraîne une interruption du gène *NET1*. Les phases codantes des deux gènes étant en sens opposé, nous ne pouvons émettre l'hypothèse d'une protéine de fusion. Une nouvelle phase ouverte de lecture potentielle longue de 1647 nucléotides, commençant dans le domaine CPSase de l'allèle *ura2 15-30-72* et conduisant à une protéine putative de 548 aa est probablement responsable de la restauration de la prototrophie pour l'uracile.

1.3 Conclusions

Dans les deux contextes, nous pouvons observer l'apparition de délétions intragéniques et de délétions comprenant la région promotrice et la région porteuse des trois mutations. De plus, la protéine issue de ces remaniements correspond à une nouvelle séquence qui commencerait en amont du domaine DHOase-like à l'exception de trois révertants ($\alpha 8/1$, B230/1 et B283/1). Roelants *et al.* (1997) ont souligné l'importance de ce domaine pour l'activité du domaine ATCase. Nos résultats montrent qu'il n'y est pas indispensable.

En contexte diploïde, sur quatorze événements, deux ont déjà été sélectionnés en contexte haploïde, les douze autres s'étant produits à des sites différents. La délétion segmentale n'est pas sélectionnable à l'état haploïde du fait de son caractère létal pour la cellule. Par contre, les onze événements de délétion restants sont viables en contexte haploïde et n'ont pourtant jamais été observés dans cette phase.

Nous pouvons remarquer la présence dans les deux contextes d'une délétion longue de 3857 bp qui apparaît plus fréquemment que les autres.

De nombreux révertants ayant subi la perte d'une partie de la région promotrice, il serait intéressant dans ces cas-là de déterminer le point d'initiation de la transcription.

2. Analyse des séquences des jonctions des délétions isolées dans les deux contextes

Dans le §1, nous avons pu observer des différences entre les événements de délétion sélectionnés dans les deux contextes au niveau de leur taille et de leur localisation. L'analyse des séquences nucléotidiques des jonctions des délétions devrait nous permettre de mieux comprendre ces différences.

2.1 Séquences des jonctions des délétions observées en contexte haploïde

Afin de déterminer la séquence nucléotidique présente à la jonction des délétions, nous avons cloné ces jonctions par PCR puis nous avons séquencé le fragment ainsi amplifié.

En phase haploïde, le séquençage des jonctions des délétions montre la présence de deux classes différentes (tableau 11a).

a.

Classe de délétion	Séquence à la jonction	Positions		Souche
		<i>ura2 15-30-72 5'</i>	<i>ura2 15-30-72 3'</i>	
I	GGTGAATTAGTTT	+132 à +144	+5461 à +5473	α8/1
	GAAAGAATTGA	-522 à -512	+3336 à +3346	α1/1, α5/1, α6/1, α25/1
	GGTTATCC	+162 à +169	+3385 à +3392	α27/1
II	-	-	-	α17/1

b.

Classe de délétion	Séquence à la jonction	Positions		Souche
		<i>ura2 15-30-72 5'</i>	<i>ura2 15-30-72 3'</i>	
I	GAAAGAATTGA	-522 à -512	+3336 à +3346	B218/1, B281/1
II	-	-	-	B102/1
III	TACT	-369 à -366	+5547 à +5550	B230/1
	TGCT	-703 à -700	+3271 à +3274	B247/1
	TTGA	-364 à -364	+4445 à +4448	B247/2
	CTGT	-582 à -579	+3005 à +3008	B286/1
	CAAC	-575 à -571	+3325 à +3328	B295/1
	GTT	-556 à -554	+3007 à +3009	B072/1
	TGT	+176 à +178	+3690 à +3692	B307/1
	CA	+106 à +107	+4058 à +4059	B298/1
	T	- 23	+ 3137	B026/1
	T	-482	+ 3148	B278/1
	C	+ 624 (<i>NET1</i>)	+ 4787	B283/1

Tableau 11 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions.

a. En contexte haploïde.

b. En contexte diploïde.

Les positions sont déterminées en fonction de la position +1 de l'allèle *ura2 15-30-72*. Les séquences sont données de 5' en 3' dans le sens de lecture de l'allèle *ura2 15-30-72*.

Les délétions de la classe I (six révertants) présentent à leur point de jonction une courte séquence nucléotidique nommée microhomologie, qui se trouvait en répétition directe de part et d'autre de la région délétée avant que ne se produise cet événement (figure 29). La taille de ces séquences est comprise entre 8 et 11 bp.

En revanche, aucune microhomologie ne se retrouve à la jonction des délétions de la classe II (un révertant).

Les travaux de Welcker *et al.* (2000) avaient également mis en évidence ces deux classes d'événements et la taille des séquences de microhomologie variait de 7 à 13 bp.

2.2 Séquences des jonctions des délétions observées en contexte diploïde a/ α : apparition d'une nouvelle classe

Les caractéristiques des séquences présentes aux jonctions des délétions isolées en contexte diploïde sont présentées dans le tableau 11b.

Nous pouvons retrouver les mêmes classes de délétion (I et II) qu'en phase haploïde. En effet, les révertants B218/1 et B281/1 dont les délétions intervenues au locus *ura2 15-30-72* présentent les mêmes caractéristiques que celles des souches haploïdes α 1/1, α 5/1, α 6/1 et α 25/1, montrant une délétion qui s'est produite aux mêmes sites. Elles présentent également les mêmes séquences de 11 bp, représentant ainsi la classe I de délétions avec des microhomologies.

Pour la souche B102/1, l'absence de microhomologie à la jonction montre que la délétion est de type classe II. Cependant, cet événement de délétion est différent de celui présent dans le révertant α 17/1 puisqu'il s'est produit à un autre site (jonction des positions -577 à +3233 contre les positions -635 à +3861 pour α 17/1).

Onze délétions isolées en contexte diploïde a/ α , parmi lesquelles la délétion segmentale, présentent des jonctions avec des microhomologies de très courte taille, allant de 1 à 4 bp. Ces délétions ne sont observées que dans ce contexte et caractérisent une nouvelle classe de délétions nommée classe III.

Dans les délétions observées en phase haploïde, les délétions de la classe I sont nettement majoritaires (86 %) alors qu'en phase diploïde elles deviennent minoritaires (14 %) au profit de la classe III (79 %). En outre, dans cette classe, les microhomologies de 4 bp sont les plus présentes (36 % de l'ensemble des délétions et 45 % des délétions de classe III). Enfin, excepté les révertants B026/1 et B278/1, les caractéristiques de toutes ces délétions sont différentes.

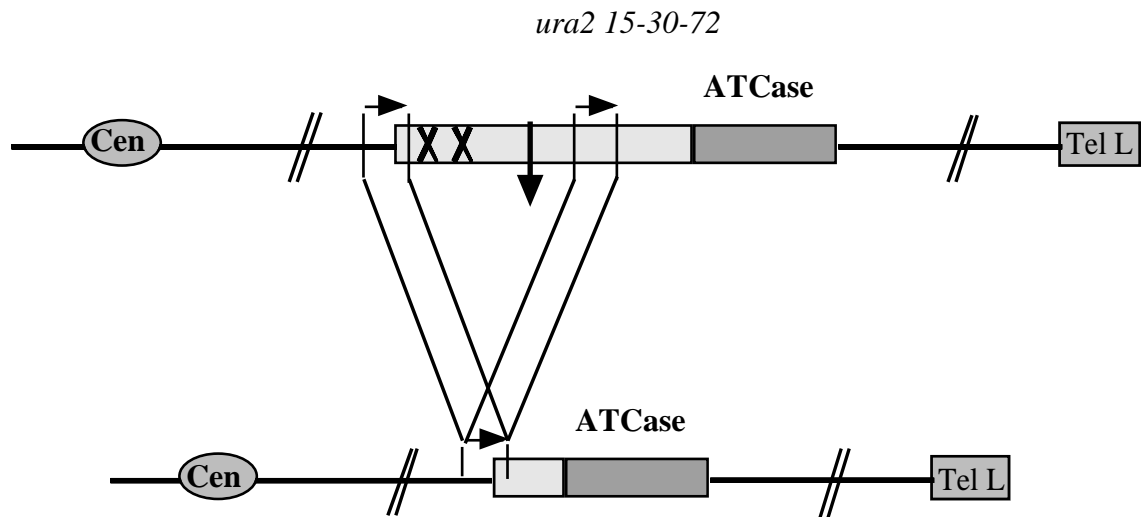


Figure 29 : Événement de délétion et séquences identiques en répétition directe.

La figure n'est pas à l'échelle. L'événement se produit entre deux séquences identiques en répétition directe se trouvant de part et d'autre des trois mutations. Un seul exemplaire de ces courtes séquences se trouve à la jonction de la délétion.

3. Caractéristiques et conséquences de la translocation réciproque et de la délétion-translocation réciproque

Dans le chapitre 2, nous avons mis en évidence une translocation réciproque et une délétion-translocation réciproque en contexte diploïde a/α . L'analyse des séquences nucléotidiques des jonctions correspondantes montre des caractéristiques similaires aux événements de délétion et nous permet de mieux comprendre les mécanismes conduisant à leur apparition.

3.1 Translocation réciproque

La souche B038/1 est porteuse d'une translocation réciproque qui s'est produite entre le chromosome II au niveau du gène *TEF2* et le chromosome X au niveau de la région codant le domaine CPSase (figure 30).

Ce transfert d'une partie du bras gauche du chromosome X sur le chromosome II a permis une fusion en phase entre le début du gène *TEF2* et la partie de l'allèle *ura2 15-30-72* contenant la région ATCase. Une nouvelle phase ouverte de lecture a ainsi été créée, composée de la région promotrice du gène *TEF2* jusqu'à la position +88 de ce gène, associée à une partie de l'allèle *ura2 15-30-72* de la position +3858 au codon terminateur. De cette nouvelle ORF longue de 2874 bp découle une protéine de 957 aa composée des 19 premiers aa du produit du gène *TEF2* et des 938 aa terminaux issus de l'allèle *ura2 15-30-72* (figure 30).

Aux points de jonction allèle *ura2 15-30-72* - gène *TEF2* sur le chromosome II et gène *TEF2* - allèle *ura2 15-30-72* sur le chromosome X se trouve une séquence de micro-homologie longue de 3 bp. Cette séquence était présente à la fois dans la région CPSase de l'allèle *ura2 15-30-72* et dans le gène *TEF2* (figure 30 et tableau 12).

3.2 Délétion-translocation réciproque

Dans la souche B251/1 un événement de délétion-translocation réciproque a conduit à un transfert d'une partie du bras droit du chromosome XII, à partir du gène *YEF3*, sur le chromosome X tandis qu'une partie du bras gauche du chromosome X, à partir de la région CPSase et contenant la région ATCase a été transloquée sur le chromosome XII. On observe également une délétion longue de 191 kb s'étendant de la région CPSase jusqu'à l'ORF YJL043w (figure 31).

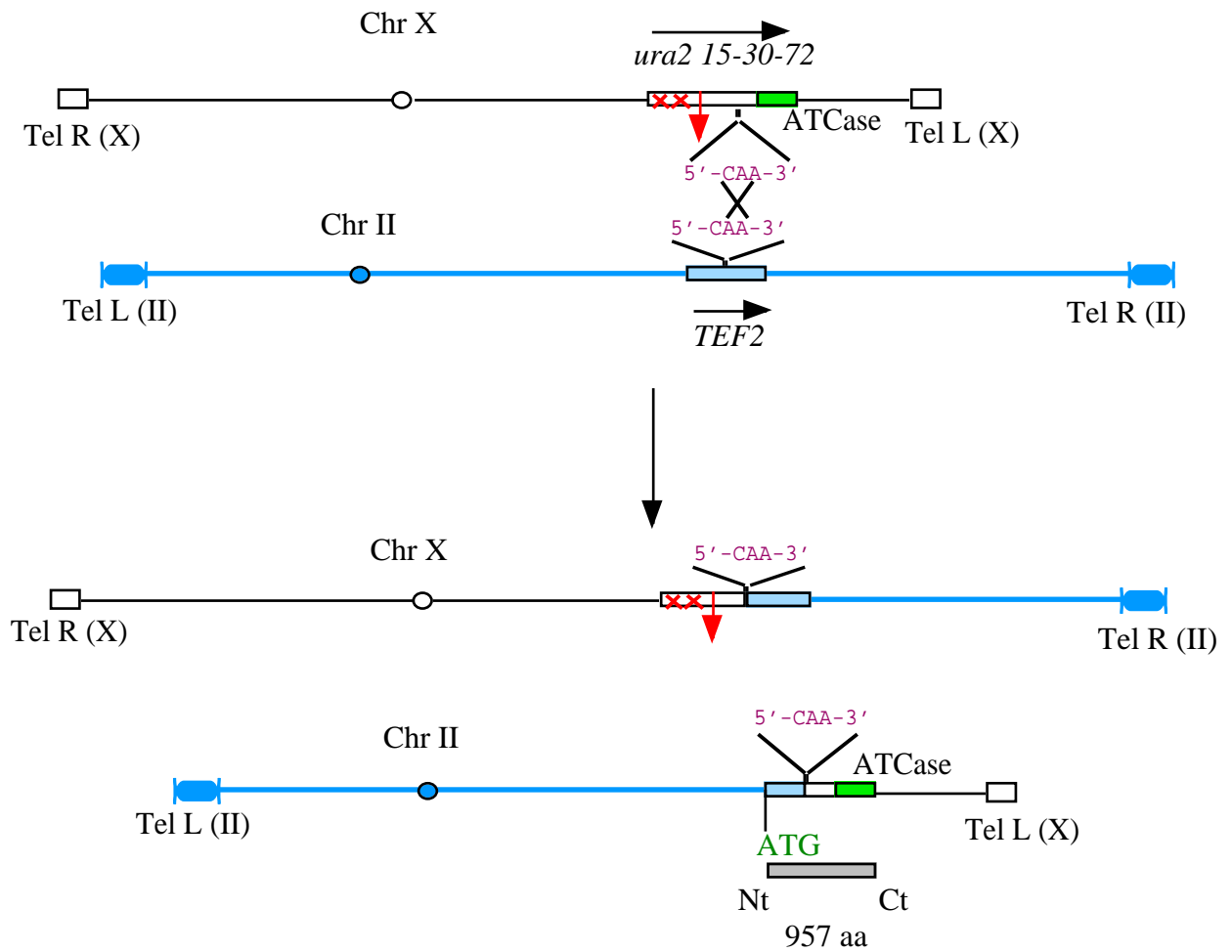


Figure 30 : Séquences aux jonctions de la translocation réciproque du révertant B038/1.

Les chromosomes ne sont pas à l'échelle.

Souche	Séquence à la jonction	Positions	
		<i>ura2 15-30-72</i>	<i>TEF2</i>
B038/1	CAA	+3858 à +3860	+88 à +90

Tableau 12 : Séquence et position de la microhomologie impliquée dans la translocation réciproque du révertant B038/1.

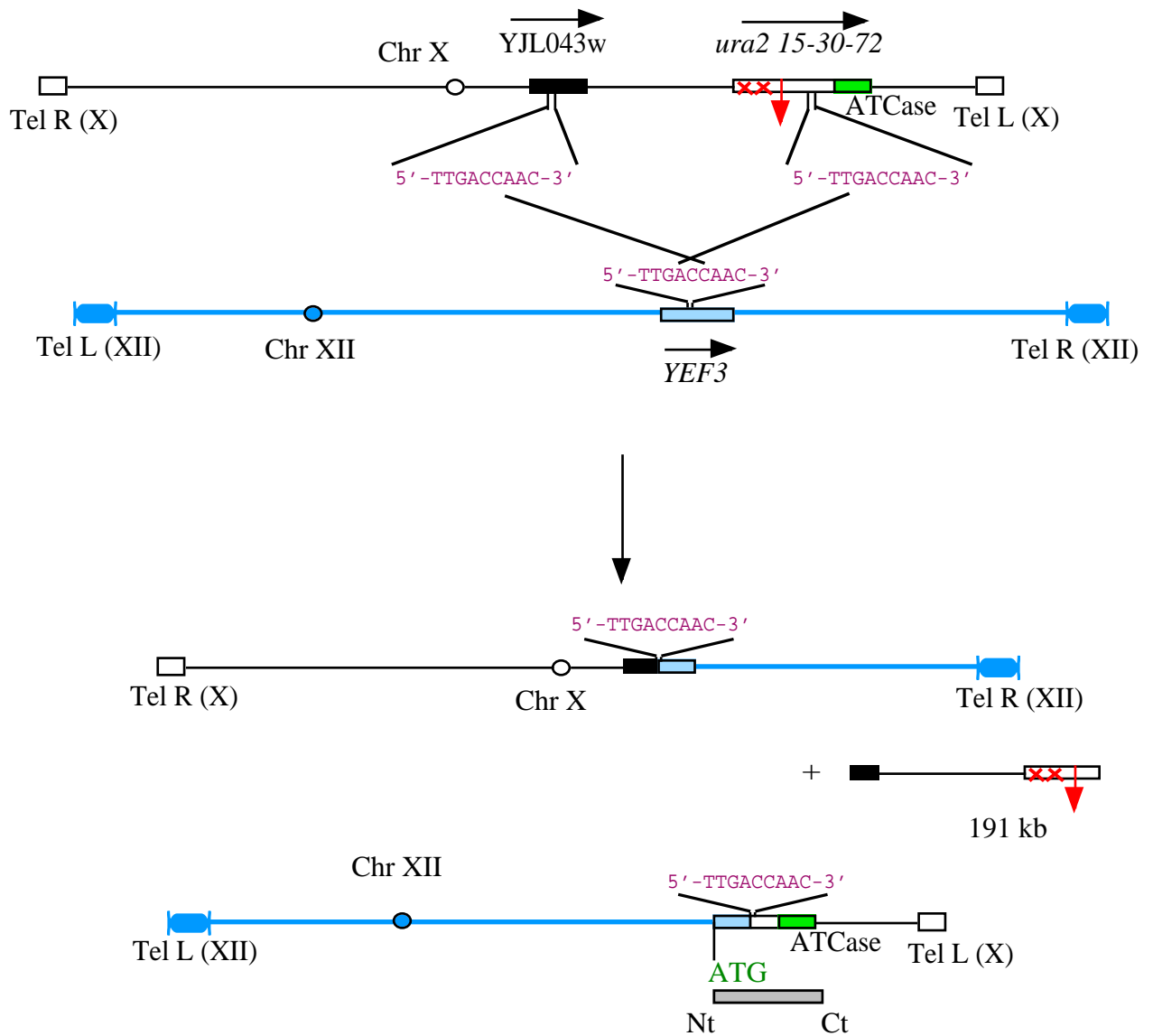


Figure 31 : Séquences aux jonctions de la délétion-translocation réciproque du révertant B251/1.

Les chromosomes ne sont pas à l'échelle.

Souche	Séquence à la jonction	Positions		
		<i>ura2 15-30-72</i>	<i>YJL043w</i>	<i>YEF3</i>
B251/1	TTGACCAAC	+3319 à +3327	+68 à +60	+1133 à +1141

Tableau 13 : Séquence et position de la microhomologie impliquée dans la délétion-translocation réciproque du révertant B251/1.

La restauration de la prototrophie pour l'uracile est consécutive au transfert de la région ATCase sur le chromosome XII. La jonction de la translocation permet une fusion du gène *YEF3* et de l'allèle *ura2 15-30-72* et place les séquences ainsi fusionnées en phase, ce qui provoque l'apparition d'une phase ouverte de lecture longue de 4458 bp. Il en découle une protéine de fusion putative de 1485 aa constituée de 380 aa issus de la partie proximale du gène *YEF3* et de 1107 aa issus de la partie terminale de l'allèle *ura2 15-30-72*.

Aux points de jonction allèle *ura2 15-30-72* - gène *YEF3* et gène *YEF3* - ORF YJL043w se trouve une séquence de microhomologie longue de 9 bp. Cette séquence était présente à la fois dans la région CPSase de l'allèle *ura2 15-30-72*, dans le gène *YEF3*, ainsi que dans l'ORF YJL043w (figure 31 et tableau 13).

4. Mécanismes impliqués dans les événements de délétion

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, des cassures d'ADN double-brin peuvent être à l'origine de réarrangements chromosomiques tels que nous pouvons les observer dans les cellules que nous avons pu sélectionner aussi bien en phase haploïde que diploïde. Ces cassures peuvent être réparées selon deux voies principales qui sont la recombinaison homologue (HR pour homologous recombination) et la recombinaison non homologue (NHEJ pour non homologous end-joining).

4.1 Délétions générées par la voie de recombinaison homologue (HR)

La voie de la recombinaison homologue est dépendante du gène *RAD52* et de son groupe d'épistasie. Dans cette voie, le mécanisme de réparation des cassures double-brin nommé « single-strand annealing » (SSA) (figure 32), peut mener à des événements de délétion ou de translocation réciproque. Ce mécanisme peut se mettre en place lorsqu'une cassure d'ADN se produit entre deux séquences identiques en répétition directe qui peuvent dès lors s'apparier. Au sein d'un même chromosome, ce système conduit à un événement de délétion, la partie chromosomique se trouvant entre les deux séquences identiques étant perdue. Entre deux chromosomes différents, ce type de mécanisme mène à un événement de translocation réciproque. Des études menées par Sugawara *et al.* (2000) ont montré que ces séquences doivent avoir une longueur minimum de 29 bp d'identité exacte pour que le SSA soit efficace.

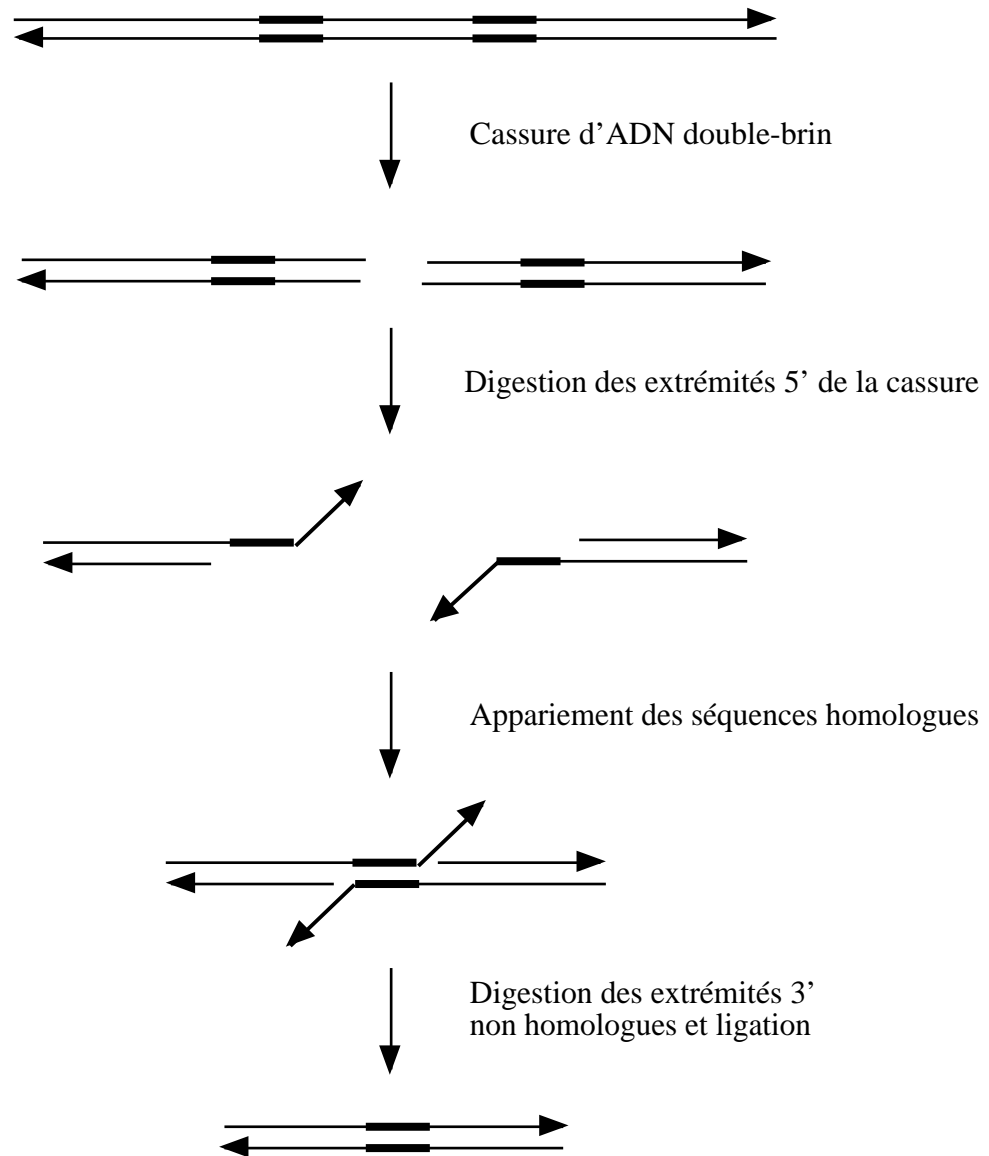


Figure 32 : Mécanisme du single-strand annealing (SSA).

En trait gras sont représentées les séquences homologues en répétition directe.

Dans les travaux que nous avons menés en phases haploïde et diploïde, de même que dans ceux menés par Welcker *et al.* (2000), nous observons une taille de séquence en répétition directe allant de 1 à 13 bp qui est à priori trop courte pour supposer qu'un mécanisme SSA soit à l'origine des événements que nous avons décrits.

4.2 Délétions générées par la voie de recombinaison non-homologue (NHEJ)

Le NHEJ est indépendant du gène *RAD52*. Il est en revanche dépendant des gènes *YKU70* et *YKU80* dont les produits reconnaissent les extrémités d'une cassure double-brin et permettent leur rapprochement ainsi que des gènes *NEJ1*, *LIF1* et *DNL4* dont les produits assurent la ligation de ces extrémités. Cette voie peut mener à une réparation exacte (Lieber, 1999). Les travaux de Boulton & Jackson (1996) et de Yu & Gabriel (2003) ont montré un mécanisme de type NHEJ nécessitant généralement la présence de courtes séquences identiques (1 à 5 bp) pouvant mener à un événement de délétion. Mais ces délétions peuvent également se produire en l'absence de ce type de séquence (Moore & Haber, 1996).

Comme nous l'avons décrit, nous pouvons observer trois types de jonctions de délétion en contexte diploïde : les classes I et III montrent la présence de séquences identiques qui se trouvaient en répétition directe de part et d'autre de la région délétée, d'une longueur de 8 à 13 bp pour la classe I et de 1 à 4 bp pour la classe III. La classe II ne présente pas ce type de séquence de microhomologie à la jonction de l'événement. En phase haploïde, nous avons pu observer des événements similaires avec des délétions de classe I et de classe II. D'autre part, les mêmes types de séquences de microhomologie ont été trouvées aux jonctions de la translocation réciproque présente dans le révertant B038/1 et de la délétion-translocation du révertant B251/1.

La présence de ces microhomologies suggère l'implication du NHEJ. Les délétions observées pourraient être expliquées par un mécanisme de type SSA (SSA-like, Göttlich *et al.*, 1998), mais fonctionnant grâce à l'appariement de séquences identiques de plus courte taille que celle décrite pour la voie de la recombinaison homologue.

Ce type de mécanisme SSA-like pourrait également être à l'origine de l'apparition des translocations réciproques. La faible proportion de ce type d'événement (1 translocation réciproque et 2 délétion-translocation réciproques sur 39 révertants) dans les réarrangements chromosomiques sélectionnés en phase diploïde et leur absence en phase haploïde pourrait s'expliquer par la nécessité d'avoir deux cassures pour permettre l'échange entre deux bras de chromosomes tandis qu'une seule est nécessaire pour un événement de délétion. De plus,

les chromosomes doivent être physiquement suffisamment proches pour que le mécanisme d'échange puisse se mettre en place. Il est plus probable que deux cassures double-brin à deux endroits différents du génome soient réparées indépendamment, ce qui n'entraînera pas de translocation réciproque.

Enfin, alors que nous n'avons jamais observé de translocation réciproque avec notre système de sélection, nous avons pu isoler en contexte diploïde a/α un événement de ce type dans le révertant B038/1. Les jonctions montrent la présence d'une séquence de 3 bp qui, selon le modèle précédemment décrit, pourrait être impliquée dans la formation de ce remaniement. Or, ce type de courte séquence semble spécifique du contexte diploïde a/α , ce qui explique que nous n'avons pu sélectionner cette translocation réciproque en phase haploïde, malgré la viabilité de ce réarrangement.

5. Conclusions et perspectives

La caractérisation moléculaire des différentes délétions a permis de montrer que la plupart d'entre-elles résultaient de la présence de séquences identiques en répétition directe aux bornes de la région délétée.

Les résultats de cette étude complètent et renforcent les observations de Welcker *et al.* (2000) et montrent l'importance de ces microhomologies pour les réarrangements chromosomiques.

La présence de ces courtes séquences dont la taille varie de 1 à 13 bp et leur absence dans un nombre très limité de cas suggère qu'un mécanisme de type NHEJ est impliqué dans ces délétions. Il reste cependant à démontrer qu'il s'agit bien d'événements générés par cette voie de réparation. En effet, si les travaux de Welcker *et al.* ont montré que le mécanisme de délétion de classe I est indépendant du gène *RAD52*, ils n'ont pas montré qu'il était effectivement dépendant du NHEJ.

La présence des délétions de classe III uniquement en contexte diploïde a/α est surprenante. En effet, Frank-Vaillant et Marcand (2001) ont montré que le NHEJ est réprimé en contexte diploïde a/α . Il est donc étonnant d'observer l'apparition d'une classe de délétion présentant des caractéristiques du NHEJ dans un tel contexte où la recombinaison homologue est justement plus efficace et le NHEJ réprimé (Valencia *et al.*, 2001). Notre hypothèse est que les délétions de classe I sont dues à un mécanisme de NHEJ dépendant de *YKU80*, *YKU70*, *NEJ1* et *DNL4*. Leur sélection en phase haploïde est fréquente tandis que dans un contexte de répression du NHEJ (contexte diploïde a/α) elles sont plus rares.

Au contraire, la classe III, absente en phase haploïde, est très présente en contexte diploïde. Les délétions de cette classe pourraient donc être générées par un mécanisme différent du NHEJ, fonctionnant quand cette voie de réparation est réprimée et incapable de fonctionner quand elle est active. Selon cette hypothèse, des sélections effectuées en phase haploïde dans une souche déficiente pour le NHEJ devrait permettre d'isoler des délétions de cette classe.

Chapitre 4
Mécanismes impliqués dans la formation de
délétions et de translocations :
*utilisation du crible *ura2 15-30-72**
*en contextes génétiques *nej1* et *rad52**

Les caractéristiques des séquences aux jonctions des délétions présentées dans le chapitre précédent et dont la plupart présentent des séquences de microhomologie suggèrent l'implication d'un mécanisme conduisant à ces événements selon la voie du NHEJ.

1. Sélection et analyse de remaniements chromosomiques en contexte *ura2 15-30-72 nej1* Δ

Pour tester l'hypothèse du rôle de la voie de réparation du NHEJ, nous avons appliqué notre système de sélection à une souche délétée au niveau du gène *NEJ1* qui est impliqué dans cette voie.

1.1 Le gène *NEJ1*

La voie de réparation des cassures d'ADN double-brin du NHEJ possède plusieurs mécanismes dont l'un conduit à une réparation exacte de la cassure (error-free) et l'autre à des réarrangements chromosomiques (error-prone) qui sont le plus souvent des délétions (Lewis & Resnick, 2000). La réparation précise des cassures est dépendante des produits des

gènes *YKU70* et *YKU80* tandis que le mécanisme error-prone jusqu'à présent décrit semble indépendant de ces deux gènes (Boulton & Jackson, 1996). L'autre groupe de gènes qui intervient dans cette voie de réparation est constitué des gènes *DNL4*, *LIF1* et *NEJ1* qui interagissent pour la ligation des deux extrémités de la cassure.

Le gène *NEJ1* (ORF YLR265c) a été mis en évidence par Franck-Vaillant & Marcand (2001) et son produit, Nej1p, possède une taille de 342 aa et intervient pour permettre à la ligase DNL4p de se présenter au site de cassure (Ooi *et al.*, 2001) et de réparer celle-ci par ligation des deux brins. Les études menées en contexte *nej1* montrent les mêmes résultats qu'en contexte *dnl4*, suggérant que la présence de Nej1p est essentielle à l'activité du produit du gène *DNL4* (Valencia *et al.*, 2001).

Dans le chapitre 3, nous avons caractérisé trois classes de délétion en fonction des séquences présentes à leur jonction. Si la formation de ces différentes délétions est dépendante du mécanisme error-prone de la voie du NHEJ, l'inactivation de l'un des gènes impliqués dans ce mécanisme devrait le modifier et le rendre inefficace. Ainsi, en contexte *nej1*, nous ne devrions plus être en mesure de sélectionner les événements relatifs à ces classes.

1.2 Construction des souches délétées au niveau du gène *NEJ1*

Cette construction consiste à un remplacement du gène *NEJ1* dans les souches FR α et FRa par un allèle *nej1* interrompu par le gène *KAN^R* qui confère une résistance à la généticine (G418).

Pour ceci, nous avons suivi la méthode du remplacement de gène en une étape mise au point par Baudin *et al.* (1993). Cette technique permet de remplacer un gène chromosomique par un gène marqueur produit par amplification PCR. Le gène marqueur *KAN^R* est porté par le plasmide pFA6-KanMX4 construit par Wach *et al.* (1994). Chacun des deux oligonucléotides (*NEJ1-S1* et *NEJ1-S2*) utilisés pour cette amplification contient deux régions distinctes : la première région est spécifique du gène marqueur à amplifier et a une longueur de 18 bp tandis que la seconde partie correspond aux séquences adjacentes du gène cible (*NEJ1*) et possède une taille de 47 bp dans notre travail. C'est par le biais de ces séquences adjacentes que le gène marqueur s'intégrera dans le chromosome en remplacement du gène cible. Les cycles utilisés sont décrits dans le chapitre 1 « Matériel et Méthodes » (§ 8.4.1) et les caractéristiques des oligonucléotides se trouvent en Annexe 3.

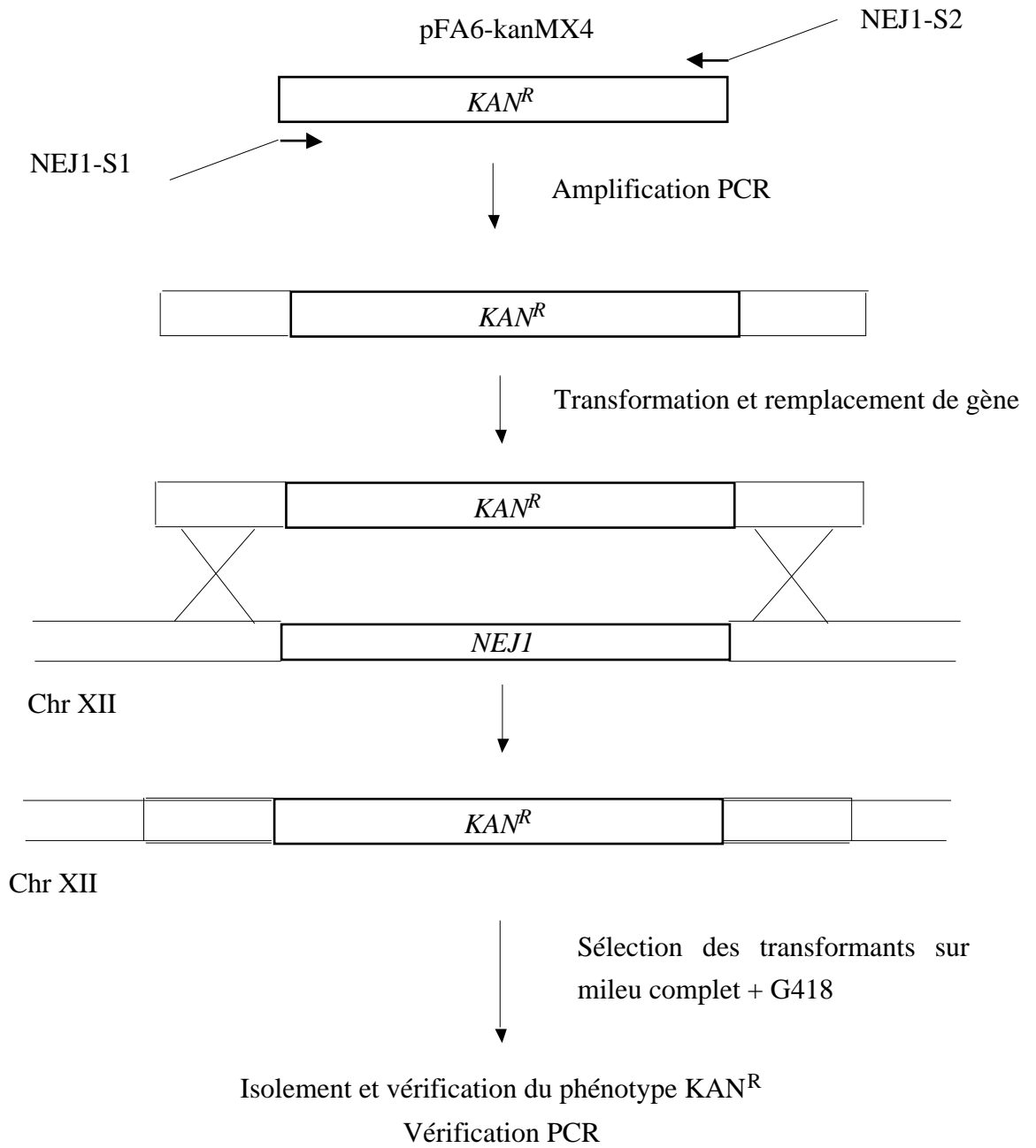


Figure 33 : Remplacement en une étape du gène *NEJ1* par le gène marqueur *KAN^R*.

Les différentes étapes nécessaires pour l'interruption sont décrites dans la figure 33. Le fragment PCR contenant le gène *KAN^R* est introduit dans la souche FR α ou FRa par électrotransformation (chapitre 1, § 6). Après transformation, les cellules sont étalées sur un milieu complet supplémenté de généticine à une concentration de 200 $\mu\text{g/l}$. Les colonies résistantes sont subclonées. Le remplacement a été vérifié par amplification PCR en testant la présence du gène *KAN^R* au locus *NEJ1*. En parallèle, nous avons vérifié l'absence de l'allèle sauvage du gène *NEJ1*. Nous avons obtenu ainsi les souches YT α N et YTaN de génotype *ura2 15-30-72 nej1::KAN^R*.

La souche diploïde homozygote YTBN délétée au niveau du gène *NEJ1* a été construite par croisement des souches YT α N et YTaN.

1.3 Analyse moléculaire de remaniements chromosomiques sélectionnés en contexte haploïde α *ura2 15-30-72 nej1* Δ

54 sélections correspondant à $1,96 \cdot 10^{11}$ cellules ont été effectuées à l'aide de la souche YT α N et ont permis d'obtenir 16 révertants indépendants prototrophes pour l'uracile. Les révertants obtenus en phase haploïde sont nommés α N.

Nous avons utilisé la même méthode que dans le chapitre 2, par analyse des profils de restriction et par amplification PCR. Ces analyses ont permis de caractériser sept événements de délétion, deux événements de duplication et sept insertions d'élément Ty1 en amont de la région ATCase.

1.3.1 Événements de duplication

Le profil de restriction *Bam* HI montre pour les révertants indépendants α N13/2, α N13/3 et α N21/1 un profil-type des événements de duplication à deux bandes.

L'analyse des caryotypes électrophorétiques ne montre aucune différence de migration et l'hybridation à l'aide d'une sonde ATCase ne révèle que le chromosome X montrant que ces duplications sont intrachromosomiques.

1.3.2 Événements de délétion

Sept révertants indépendants montrent un profil de restriction *Bam* HI à une bande de taille supérieure à 6,8 kb. L'analyse par amplification PCR de ces révertants haploïdes a permis de mettre en évidence une délétion de la région de l'allèle *ura2 15-30-72* contenant les trois mutations.

Taille de la délétion	Bornes		position ATG init	protéine putative	Souche
	<i>ura2 15-30-72</i>	<i>chromosome X</i>			
3020 bp	+260 à +3281	172025 / 169004	+1	1120 aa	α N51/1
3218 bp	+186 à +3413	172089 / 168872	+1	1141 aa	α N11/1, α N22/1
5328 bp	+132 / +5473	172152 / 166811	+1	438 aa	α N13/1
3857 bp	-522 / +3346	172807 / 168938	+3352	1097 aa	α N23/1, α N27/1, α N48/1

Tableau 14 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés en contexte haploïde α *ura2 15-30-72 nej1* Δ .

Les bornes sont déterminées par rapport à la position +1 du gène *URA2* et en fonction de la position +1 du chromosome X.

Classe de délétion	Séquence à la jonction	Positions		Souche
		<i>ura2 15-30-72 5'</i>	<i>ura2 15-30-72 3'</i>	
I	GGTGAATTAGTTT	+132 à +144	+5461 à +5473	α N13/1
	GAAAGAATTGA	-522 à -512	+3336 à +3346	α N23/1, α N27/1, α N48/1
	TCCATCTTATG	+186 à +196	+3404 à +3414	α N11/1, α N22/1
II	-	-	-	α N51/1

Tableau 15 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions en contexte haploïde α *ura2 15-30-72 nej1* Δ .

Les positions nucléotidiques sont déterminées par rapport à la position +1 de l'allèle *ura2 15-30-72*. Les séquences nucléotidiques sont données de 5' en 3' dans le sens de lecture de l'allèle *ura2 15-30-72*.

1.3.2.1 Caractéristiques des délétions

Les caractéristiques des délétions sont reportées dans le tableau 14. Nous avons mis en évidence quatre événements de délétion intragénique : le révertant α N13/1 montre une séquence nucléotidique délétée de 5327 bp allant de la position +132 à la position +5460. Les révertants α N11/1 et α N22/1 montrent la même délétion qui va de la position +196 à la position +3413, pour une taille de 3218 bp. Enfin, la souche α N51/1 a subi une délétion de 3020 bp, de la position +260 à la position +3281.

Trois autres événements sont des délétions de la région promotrice et des trois mutations. Il s'agit des révertants α N23/1, α N27/1 et α N48/1 qui ont tous les trois subi le même événement de délétion de 3856 bp qui va de la position -522 à la position +3346.

1.3.2.2 Caractéristiques des jonctions des délétions

Six délétions correspondent à la classe I. En effet, comme le montre le tableau 15, ces révertants montrent à leur jonction la présence de séquences de microhomologie allant de 11 à 13 bp. La souche α N51/1 est porteuse d'une délétion de classe II ne comportant pas de microhomologie au niveau du point de jonction.

1.3.3 Insertions d'éléments transposables Ty1

Nous avons isolé lors de ces sélections sept événements indépendants d'insertion d'élément transposable Ty1 en amont de la région codant le domaine ATCase. En effet, l'analyse du profil de restriction *Bam* HI de ces révertants permet de révéler pour tous les révertants la présence d'une bande de taille identique à celle du témoin Ty1 de 12,7 kb. L'analyse par amplification PCR à l'aide des oligonucléotides δ B41 et AW1 se révèle positive.

1.4 Analyse moléculaire de remaniements chromosomiques sélectionnés en contexte diploïde a/α *ura2 15-30-72 nej1* Δ

Nous avons effectué 83 sélections à l'aide de la souche diploïde YTBN a/α *ura2 15-30-72 nej1*, ce qui correspond à 3.10^{11} cellules. Dans ce contexte génétique, 16 révertants indépendants (nommés BN) prototrophes pour l'uracile ont été obtenus.

Les souches diploïdes délétées au niveau du gène *NEJ1* que nous avons construites sont incapables de sporuler dans les conditions utilisées habituellement en laboratoire. Ce phénotype n'avait pas été décrit jusqu'à présent avec la souche S288C. Nous n'avons donc pas pu obtenir de cellules haploïdes et conduire les analyses génétiques et moléculaires en phase haploïde. Nous avons donc suivi la même démarche que celle utilisée dans le chapitre 2 lors de la caractérisation des événements létaux à l'état haploïde associés à la réactivation du domaine ATCase (§ 3.2.1).

Chez les seize révertants, le profil de restriction *Bam* HI révèle deux bandes, indiquant un réarrangement chromosomique au niveau de l'allèle *ura2 15-30-72* dans toutes les souches.

Les amplifications PCR permettant la caractérisation de l'insertion d'un rétrotransposon Ty1 sont négatives, indiquant l'absence de ce type d'événement en contexte diploïde *nej1*.

1.4.1 Événements de duplication

1.4.1.1 Duplications intrachromosomiques

Nous avons pu caractériser six événements de duplication intrachromosomique (tableau 16).

Quatre d'entre eux (BN25/1, BN59/1, BN68/1 et BN87/1) sont accompagnés d'une augmentation de taille du chromosome X visible sur le caryotype électrophorétique. L'estimation de la taille de la duplication par marche sur le chromosome par hybridation ADN/ADN n'est pas possible car les régions correspondant aux sondes sont déjà présentes sur le chromosome X.

2 autres révertants (BN73/1 et BN76/1) ont probablement subi une duplication intrachromosomique qui n'a pas entraîné de modification du caryotype : une marche sur le chromosome par PCR sur une région de 50 kb en amont de la séquence codant le domaine ATCase n'a pas permis de mettre en évidence un éventuel événement de délétion.

<i>Duplication</i>	<i>taille</i>	<i>Localisation</i>	<i>Souche</i>
Intrachromosomique	nd	X	BN25/1, BN59/1, BN68/1, BN73/1, BN76/1, BN87/1
Interchromosomique	< 4 kb	XI	BN16/1
	< 4 kb	VII ou XV	BN24/1 (1)
	< 4 kb	V ou VIII	BN24/1 (2)
	> 140 kb	IX	BN71/1

Tableau 16 : Localisation et taille des duplications sélectionnées en contexte diploïde a/α *ura2 15-30-72 nej1* Δ .

La localisation chromosomique est déduite par l'analyse des caryotypes électrophorétiques après leur hybridation à l'aide de la sonde correspondant à la région ATCase. La taille de chaque duplication est estimée à partir des résultats d'hybridation à l'aide des sondes spécifiques du bras gauche du chromosome X.

nd : non déterminée

(1) et (2) : duplications révélées dans le révertant BN24/1.

1.4.1.2 Duplications interchromosomiques

Trois souches ont subi des duplications interchromosomiques (tableau 16).

Le révertant BN16/1 montre la présence d'une région ATCase dupliquée à hauteur du chromosome XI. Pour le révertant BN24/1, deux régions ATCase supplémentaires sont présentes respectivement à hauteur des chromosomes VII ou XV et des chromosomes V ou VIII. Pour ces deux révertants, les hybridations ADN/ADN effectuées sur leur caryotype ont montré que les fragments dupliqués étaient inférieurs à 4 kb.

D'autre part, le révertant BN71/1 est porteur d'une duplication supérieure à 140 kb qui s'est intégrée sur un autre chromosome que le X migrant à hauteur du chromosome IX.

1.4.2 Événements de délétion

Nous avons pu mettre en évidence sept événements de délétion (tableau 17) dont quatre sont des délétions intragéniques (révertants BN23/1, BN39/1, BN64/1 et BN65/1) et deux sont des délétions incluant la région promotrice et les trois mutations ponctuelles (BN77/1 et BN82/1). Enfin, le révertant BN74/1 est porteur d'une délétion segmentale.

1.4.2.1 Caractéristiques des délétions

Les révertants BN23/1 et BN39/1 ont subi respectivement une délétion de 3,3 kb et 5,3 kb allant des positions respectives +162 à +3392 et +132 à +5460. Les révertants BN64/1 et BN65/1 portent la même délétion d'une taille de 3,5 kb allant des positions +166 à +3691. Les révertants BN77/1 et BN82/1 portent une délétion identique de 4,5 kb, des positions -625 à +4562.

Enfin, la souche BN74/1 montre la présence d'une délétion de 128,3 kb identique à celle trouvée dans le révertant B283/1 isolée en contexte diploïde *NEJI*.

Taille de la délétion	Bornes		position ATG init	protéine putative	Souche
	<i>ura2 15-30-72</i>	<i>chromosome X</i>			
3322 bp	+162 / +3392	172122 / 168892	+1	1140 aa	BN23/1
3510 bp	+177 à +3692	172108 / 168593	+1	1044 aa	BN64/1, BN65/1
5328 bp	+132 / +5473	172152 / 166811	+1	438 aa	BN39/1
4562 bp	-625 à +3937	172910 / 168348	-629	903 aa	BN77/1, BN82/1
128,3 kb	+625 (<i>NET1</i>) / +4786	295784 / 167499	+4999	548 aa	BN74/1

Tableau 17 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés en contexte diploïde a/α *ura2 15-30-72 nej1Δ*.

Les bornes sont déterminées par rapport à la position +1 du gène *URA2* et en fonction de la position +1 du chromosome X.

Classe de délétion	Séquence à la jonction	Positions		Souche
		<i>ura2 15-30-72 5'</i>	<i>ura2 15-30-72 3'</i>	
I	GGTGAATTAGTTT	+132 à +144	+5461 à +5473	BN39/1
	GGTTATCC	+162 à +169	+3385 à +3392	BN23/1
II	-	-	-	BN77/1, BN82/1
III	TGT	+177 à +179	+3690 à +3692	BN64/1, BN65/1
	C	+ 624 (<i>NET1</i>)	+ 4787	BN74/1

Tableau 18 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions en contexte diploïde a/α *ura2 15-30-72 nej1Δ*.

Les positions nucléotidiques sont déterminées par rapport à la position +1 de l'allèle *ura2 15-30-72*. Les séquences nucléotidiques sont données de 5' en 3' dans le sens de lecture de l'allèle *ura2 15-30-72*.

1.4.2.2 Caractéristiques des jonctions des délétions

Le tableau 18 montre les caractéristiques des jonctions des délétions présentes dans les révertants sélectionnés en contexte *nej1* .

Les révertants BN23/1 et BN39/1, appartenant tous deux à la classe I, possèdent des séquences de microhomologie longues respectivement de 8 bp et 13 bp.

La classe II est représentée par les révertants BN77/1 et BN82/1.

Enfin, les révertants BN64/1 et BN65/1 appartiennent à la classe III avec la présence d'une séquence de microhomologie de 3 bp ; de même pour le révertant BN74/1 où celle-ci correspond à 1 bp.

Les trois classes de délétions sont donc présentes en contexte diploïde *nej1* .

1.5 Taux de mutation

Afin d'analyser l'impact de la voie du NHEJ sur les remaniements observés, nous avons étudié les taux de mutation observés en contextes haploïde *nej1* et diploïde *nej1* (tableau 19).

Le taux de mutation en contexte haploïde *ura2 15-30-72 nej1* est de 6.10^{-11} mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération. L'intervalle de confiance calculé à 95 % est compris entre $2,8.10^{-11}$ et $9,2.10^{-11}$ et chevauche celui observé en contexte *NEJ1* (de $5,9.10^{-11}$ à $2,3.10^{-10}$; chapitre 2, tableau 8). Ceci indique que la différence entre les deux contextes n'est probablement pas significative. D'autre part, les proportions entre les types d'événements sélectionnés sont les mêmes dans les deux contextes (43,75 % de délétions, 43,75 d'insertion de rétrotransposon Ty1 et 12,5 de duplication) tandis que la variation des taux de mutation spécifiques à chaque événement n'est pas significative entre les contextes *nej1* et *NEJ1* (chapitre 2, tableau 8). En conséquence, en phase haploïde la perte de fonction du gène *NEJ1* a un effet négligeable sur la nature des réarrangements sélectionnés.

En contexte diploïde *ura2 15-30-72 nej1* , le taux de mutation s'élève à 2.10^{-11} mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération avec un intervalle de confiance calculé à 95 % compris entre 1.10^{-11} et 3.10^{-11} . Ici encore, l'intervalle observé en contexte diploïde *nej1* chevauche celui observé en contexte *NEJ1* (de $3,9.10^{-12}$ et $1,2.10^{-11}$). Nous ne pouvons donc considérer les différences de taux observées comme significatives.

Que ce soit en phase haploïde ou diploïde, le contexte *nej1* n'entraîne donc pas de différence significative du taux de mutation observé par rapport au contexte *NEJ1* .

Contexte génétique	N	n _c	Réactivation du domaine ATCase	r	%	Taux de mutation	Intervalle de confiance
Haploïde α <i>nej1Δ</i>	54	3,4.10 ⁹	Global	16	100	6.10 ⁻¹¹	[2,8.10 ⁻¹¹ ; 9,2.10 ⁻¹¹]
			Insertion Ty1	7	43,75	3.10 ⁻¹¹	[7.10 ⁻¹² ; 4,7.10 ⁻¹¹]
			Délétion	7	43,75	3.10 ⁻¹¹	[7.10 ⁻¹² ; 4,7.10 ⁻¹¹]
			Duplication	2	12,5	1.10 ⁻¹¹	[0 ; 2.10 ⁻¹¹]
Diploïde α/α <i>nej1Δ</i>	83	3,6.10 ⁹	Global	16	100	2.10 ⁻¹¹	[1.10 ⁻¹¹ ; 3.10 ⁻¹¹]
			Insertion Ty1	-	-	-	-
			Délétion	7	43,75	0,9.10 ⁻¹¹	[2,3.10 ⁻¹² ; 1,6.10 ⁻¹¹]
			Duplication	9	56,25	0,9.10 ⁻¹¹	[2,3.10 ⁻¹² ; 1,6.10 ⁻¹¹]

Tableau 19 : Calcul des taux de mutation observés en contextes diploïde et haploïde *ura2 15-30-72 nej1Δ* .

N : nombre de sélections.

% : proportion des événements.

n_c : nombre moyen de cellules par sélection.

nd : non déterminé

r : nombre de révertants indépendants issus des sélections.

Taux de mutation : mutation/allèle *ura2 15-30 72* /cellule/génération.

1.6 Conclusion sur l'influence du gène *NEJ1* sur les événements observés en phases haploïde et diploïde

La nature des remaniements caractérisés (délétions, duplications, insertions de Ty1) ainsi que leur proportion sont identiques en contexte haploïde *nej1* ou *NEJ1*. De même, les événements sélectionnés sont de même nature en contexte diploïde *nej1* et *NEJ1* et les trois classes de délétions sont présentes.

La possibilité de sélectionner les délétions de classe I et II en contexte haploïde *nej1* et de classe I, II et III en contexte diploïde *nej1* suggère que la voie du NHEJ n'est pas directement impliquée dans les événements de délétion sélectionnés. Ces résultats pourront être confirmés par des sélections dans des souches délétées au niveau du gène *DNL4* dont le produit assure la ligation des extrémités des cassures d'ADN dans la voie du NHEJ.

2. Sélection et analyse de remaniements chromosomiques en contexte *ura2 15-30-72 rad52*Δ

La première partie de ce chapitre a montré que la voie de réparation du NHEJ n'est pas directement impliquée dans les mécanismes de formation des délétions chromosomiques observées.

La baisse du taux de mutation d'un facteur 18 entre le contexte haploïde α et le contexte diploïde a/α observée dans le chapitre 2 nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une meilleure efficacité de la recombinaison homologue pour une réparation à l'identique des cassures d'ADN.

Nous avons testé l'hypothèse de mécanismes dépendant de la voie de réparation de la recombinaison homologue. Notre système de sélection positive de réarrangements chromosomiques spontanés a donc été appliqué à une souche délétée au niveau du gène *RAD52*, décrit comme un acteur préalable à la mise en place des mécanismes de recombinaison homologue.

2.1 Le gène *RAD52*

La voie de réparation des cassures d'ADN double-brin de la recombinaison homologue est dépendante du groupe d'épistasie du gène *RAD52*. Comme dans le NHEJ, cette voie de réparation fait appel à plusieurs mécanismes dont certains permettent une réparation à l'identique de l'ADN alors que d'autres au contraire conduisent à des modifications. Parmi ces derniers se trouve le mécanisme de single-strand annealing (SSA) qui peut mener à des événements de délétion lorsqu'il se produit au sein d'un même chromosome ou à une translocation réciproque lorsqu'il se produit entre deux chromosomes.

Le gène *RAD52* (ORF YML032c) qui code pour une protéine de 471 aa, se fixe sur les extrémités de la cassure d'ADN et permet l'appariement de deux régions d'ADN complémentaires de grande taille (de l'ordre de 200 bp en général) pour sa réparation. Les mécanismes de réparation de la voie de la recombinaison homologue sont très fortement perturbés par la perte de fonction du gène *RAD52*.

2.2 Construction des souches délétées au niveau du gène *RAD52*

Nous avons remplacé le gène *RAD52* dans les souches haploïdes FR α et FR α par un allèle du gène *RAD52* interrompu par le gène *KAN^R* en procédant de la même façon que pour le gène *NEJ1* (§ 1.2). Les caractéristiques des oligonucléotides utilisés se trouvent en Annexe 3 et les cycles de PCR de vérification sont décrits dans le chapitre « Matériel et Méthodes » (§ 8.4.1).

Nous avons ainsi obtenu les souches haploïdes YT α R et YTaR et par croisement de ces deux souches, nous avons obtenu la souche diploïde a/ α YTBR *ura2 15-30-72 rad52::KAN^R*.

2.3 Sélections en contexte haploïde α *ura2 15-30-72 rad52* Δ

Nous avons effectué 20 sélections avec la souche YT α R, ce qui correspond à $1,17 \cdot 10^{11}$ cellules. Nous avons obtenu 25 révertants indépendants prototrophes pour l'uracile, nommés α R.

Taille de la délétion	Bornes		chromosome X	position ATG init	protéine putative	Souche
	<i>ura2 15-30-72</i>					
3218 bp	+186 à +3413	172089 / 168872		+1	1141 aa	α R1/1, α R4/2, α R5/2, α R14/2, α R19/1
3322 bp	+162 / +3392	172122 / 168892		+1	1140 aa	α R12/1
5328 bp	+132 / +5473	172152 / 166811		+1	438 aa	α R4/1, α R13/1
3857 bp	-522 / +3346	172807 / 168938		+3352	1097 aa	α R1/2, α R2/1, α R3/1, α R5/1, α R7/1, α R8/1, α R9/1, α R10/1, α R11/1, α R14/1, α R15/1, α R17/1, α R18/1

172807 / 168938

Tableau 20 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés en contexte haploïde α *ura2 15-30-72 rad52Δ* .

Les bornes sont déterminées par rapport à la position +1 du gène *URA2* et en fonction de la position +1 du chromosome X.

Classe de délétion	Séquence à la jonction	Positions		Souche
		<i>ura2 15-30-72 5'</i>	<i>ura2 15-30-72 3'</i>	
I	GGTGAAATTAGTTT	+132 à +144	+5461 à +5473	α R1/1, α R4/2, α R5/2, α R14/2, α R19/1
	TCCATCTTATG	+186 à +196	+3404 à +3414	α R12/1
	GAAAGAATTGA	-522 à -512	+3336 à +3346	α R1/2, α R2/1, α R3/1, α R5/1, α R7/1, α R8/1, α R9/1, α R10/1, α R11/1, α R14/1, α R15/1, α R17/1, α R18/1
	GGTTATCC	+162 à +169	+3385 à +3392	α R4/1, α R13/1

Tableau 21 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions en contexte haploïde α *ura2 15-30-72 rad52Δ* .

Les positions nucléotidiques sont déterminées par rapport à la position +1 de l'allèle *ura2 15-30-72* . Les séquences nucléotidiques sont données de 5' en 3' dans le sens de lecture de l'allèle *ura2 15-30-72* .

2.3.1 Analyse moléculaire des événements sélectionnés

Les analyses moléculaires n'ont montré aucune insertion de rétrotransposon Ty1 en amont de la séquence codant le domaine ATCase.

2.3.1.1 Événements de duplication

L'analyse du profil de restriction *Bam* HI des 25 révertants a montré un profil caractéristique à deux bandes des événements de duplication pour 4 révertants indépendants qui sont en cours de caractérisation.

2.3.1.2 Caractéristiques des délétions

Pour les 21 autres révertants montrant un profil de restriction de type non duplication, les analyses par amplification PCR ont permis de mettre en évidence une délétion au sein de l'allèle *ura2 15-30-72*.

8 délétions sont intragéniques (tableau 20). Les révertants α R1/1, α R4/2, α R5/2 et α R14/2 sont porteurs du même événement de délétion longue de 5,3 kb et qui s'étend de la position +132 à la position +5460. Les révertants α R4/1 et α R13/1 ont subi une délétion allant des positions +162 à +3392 pour une taille de 3,3 kb tandis que la souche α R12/1 a subi une délétion de 3,2 kb allant des positions +195 à +3413. Les 13 autres sont porteurs de la même délétion de 3,8 kb comprenant une partie de la région promotrice et les trois mutations qui s'étend de la position -522 à la position +3346 (tableau 20).

Nous pouvons observer la présence d'une séquence de microhomologie qui varie en taille de 8 à 13 bp à la jonction de chacune de ces délétions (tableau 21). Les 21 délétions sélectionnées appartiennent donc à la classe I. Aucune délétion de classe II et III n'a été isolée.

On peut noter que la forte représentation de la délétion de 3,8 kb, présente dans 13 révertants sur 21, avait déjà été mise en évidence dans les sélections effectuées en contexte haploïde *RAD52*, sans savoir s'il y a une signification biologique à cela.

Contexte génétique	N	n_c	Réactivation du domaine ATCase	r	%	Taux de mutation	Intervalle de confiance
Haploïde α rad52Δ	20	5,85.10⁹	Global	25	100	2,8.10⁻¹¹	[1,7.10⁻¹⁰ ; 3,9.10⁻¹⁰]
			Insertion Ty1	-	-	-	-
			Délétion	21	84	2,6.10 ⁻¹⁰	[1,4.10 ⁻¹⁰ ; 3,7.10 ⁻¹⁰]
			Duplication	4	16	1,8.10 ⁻¹¹	[0 ; 4.10 ⁻¹¹]

Tableau 22 : Calcul des taux de mutation observés en contexte haploïde α *ura2 15-30-72 rad52 Δ* .

N : nombre de sélections.

% : proportion des événements.

n_c : nombre moyen de cellules par sélection.

nd : non déterminé

r : nombre de révertants indépendants issus des sélections.

Taux de mutation : mutation/allèle *ura2 15-30 72* /cellule/génération.

2.3.2 Taux de mutation en contexte haploïde *ura2 15-30-72 rad52* Δ

Le taux de mutation global en contexte haploïde *rad52* (tableau 22) est de $2,8.10^{-10}$ mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre $1,7.10^{-10}$ et $3,9.10^{-10}$. Ces intervalles chevauchent ceux calculés en contexte *RAD52* (chapitre 2, tableau 8), indiquant que la différence n'est pas significative.

Le taux de délétion est de $2,6.10^{-10}$ mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération avec un intervalle de confiance compris entre $1,4.10^{-10}$ et $3,7.10^{-10}$ en contexte *rad52* tandis qu'il était de $7,2.10^{-11}$ mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération en contexte *RAD52* avec un intervalle de confiance compris entre $1,4.10^{-11}$ et $1,3.10^{-10}$ (chapitre 2, tableau 8). Ici, les intervalles des deux taux ne se chevauchent pas, indiquant que l'augmentation d'un facteur 3,6 du taux de délétion en contexte *rad52* par rapport au contexte *RAD52* est significative. Le taux de mutation et la différence entre les deux contextes sont comparables à ce qui était observé par Welcker *et al.* (2000).

La perte de fonction du gène *RAD52* n'a pas d'influence sur les mécanismes de duplication en phase haploïde puisque le taux de duplication en contexte *rad52* est très proche du taux de duplication en contexte *RAD52* et que les intervalles de confiance se chevauchent.

2.3.3 Conclusions

Les mécanismes menant aux délétions sont stimulés et seules les délétions de classe I ont été observées. L'augmentation du taux de délétions uniquement basée sur la classe I suggère que le produit du gène *RAD52* limite le mécanisme conduisant à cette classe de délétions.

Les mécanismes menant aux événements de duplication ne sont probablement pas affectés par l'absence du gène *RAD52*.

Enfin, nous n'avons pas été en mesure de sélectionner des événements de réactivation par insertion de rétrotransposon Ty1 dans notre système. Le gène *RAD52* est donc probablement impliqué dans ces événements. Cette absence de sélection d'insertion d'éléments Ty1 en contexte *rad52* a déjà été observée à l'aide d'un système plasmidique mimant le comportement des chromosomes de levure mis au point par Kunz *et al.* en 1989. Dans leur étude, le système de sélection positive est basé sur l'apparition d'une résistance à la canavanine suite à un événement d'insertion de Ty1. Ce système de sélection, proche de celui que nous utilisons, montre des résultats similaires à ceux que nous observons vis-à-vis des insertions d'éléments Ty1.

2.4 Sélections en contexte diploïde a/α *ura2 15-30-72* *rad52* Δ

Nous avons effectué 25 sélections à l'aide de la souche YTBR, ce qui correspond à 2.10^{11} cellules étalées, qui ont permis l'isolement de 17 révertants indépendants de phénotype Ura⁺ qui seront nommés BR.

2.4.1 Analyse moléculaire des événements sélectionnés

L'analyse du profil de restriction *Bam* HI révèle pour les 17 révertants diploïdes un profil à deux bandes démontrant la présence d'un réarrangement au niveau de l'un des deux allèles *ura2 15-30-72*.

Les souches diploïdes délétées au niveau du gène *RAD52* sont incapables de sporuler dans nos conditions de laboratoire, comme cela était attendu. La caractérisation des événements de réversion est faite de la même façon qu'en contexte diploïde *nej1*.

Aucun rétrotransposon intégré en amont de la région ATCase n'a été décelé.

2.4.1.1 Événements de duplication

Pour 6 révertants, (BR2/1, BR5/1, BR9/1, BR12/1, BR15/1 et BR23/1), l'événement de réactivation du domaine ATCase est une duplication. Les résultats de l'analyse des caryotypes sont donnés dans le tableau 23.

(i) Duplications interchromosomiques

Les révertants BR2/1, BR9/1, BR12/1 et BR15/1 sont porteurs d'une duplication interchromosomique : l'hybridation avec une sonde ATCase révèle le chromosome X natif ainsi qu'un autre chromosome. La seconde région ATCase est située au niveau des chromosomes II ou XIV pour le révertant BR2/1, au niveau du chromosome III pour le révertant BR9/1, au niveau d'un chromosome migrant au-dessus des chromosomes V ou VIII pour le révertant BR12/1 et au niveau du chromosome IV pour le révertant BR15/1. Les résultats d'hybridation à l'aide de sondes spécifiques des gènes situés en aval de la région ATCase révèlent que dans chaque révertant le chromosome est remanié par une région dupliquée de taille supérieure à 140 kb.

<i>Duplication</i>	<i>taille</i>	<i>Localisation</i>	<i>Souche</i>
Intrachromosomique	nd	X	BR5/1, BR23/1
Interchromosomique	> 140 kb	II ou XIV	BR2/1
	> 140 kb	III	BR9/1
	> 140 kb	V ou VIII	BR12/1
	> 140 kb	IV	BR15/1

Tableau 23 : Localisation et taille des duplications sélectionnées en contexte diploïde a/α *ura2 15-30-72 rad52 Δ* .

La localisation chromosomique est déduite par l'analyse des caryotypes électrophorétiques après leur hybridation à l'aide de la sonde correspondant à la région ATCase. La taille de chaque duplication est estimée à partir des résultats d'hybridation à l'aide des sondes spécifiques du bras gauche du chromosome X.

nd : non déterminée

(ii) Duplications intrachromosomiques

Une hybridation à l'aide d'une sonde ATCase sur le caryotype des révertants BR5/1 et BR23/1 ne permet de révéler que le chromosome X natif. Une marche sur le chromosome par PCR à l'aide d'un oligonucléotide spécifique de la région ATCase, couplé avec des oligonucléotides allant jusqu'à 50 kb de cette région (méthode décrite dans le chapitre 2, § 3.2.1.6), n'a donné aucune amplification. Ceci suggère qu'il ne s'agit pas d'un événement de délétion, mais plutôt d'un événement de duplication intrachromosomique sans modification de taille apparente du chromosome X sur un caryotype électrophorétique.

2.4.1.2 Caractéristiques des délétions (tableaux 24 et 25)

Nous avons pu mettre en évidence la présence de délétions dans onze révertants diploïdes.

Huit révertants sont porteurs de la même délétion de classe I d'une taille de 3,8 kb. Il s'agit à nouveau de la délétion la plus souvent rencontrée dans nos précédentes sélections. Elle montre la présence au point de jonction d'une microhomologie longue de 11 bp.

Deux souches (BR21/1 et BR23/2) correspondent à un même événement de délétion intragénique de classe I d'une taille de 5,3 kb déjà observée précédemment. Dans ce cas, la séquence de microhomologie est longue de 13 bp.

Pour le révertant BR15/2, nous avons réalisé une analyse par marche sur le chromosome X par amplification PCR à l'aide d'un oligonucléotide spécifique de la région ATCase (3442R) couplé à des oligonucléotides couvrant une région de 50 kb en amont de cette région. En effet, la recherche de délétion par amplification PCR selon la méthode habituelle (chapitre 2, § 1.2.3) n'a donné aucun résultat tandis que l'analyse du caryotype n'a montré aucune modification de migration de l'ensemble des chromosomes. Nous avons ainsi pu amplifier un fragment de 5 kb à l'aide des oligonucléotides 3442R et YT2A (coordonnées en Annexes 1 et 2). Une amplification à l'aide des oligonucléotides FR4 et YT2A a produit un fragment de 1 kb permettant de préciser la localisation de la région délétée.

Le révertant BR15/2 est donc porteur d'une délétion de 20,1 kb qui n'a jamais été observée auparavant et qui s'étend de la position +3091 de l'allèle *ura2 15-30-72* à la position +29 de l'ORF YJL123c. L'allèle *ura2 15-30-72* et l'ORF YJL123c se trouvent dans la même orientation sur le bras gauche du chromosome X. La délétion crée une nouvelle phase ouverte de lecture où la région ATCase est en phase avec le codon d'initiation de l'ORF YJL123c. Cette nouvelle ORF, longue de 3571 bp, est composée des 29 premiers nucléotides de l'ORF YJL123c suivis de la partie de l'allèle *ura2 15-30-72* qui se situe de la position +3101 jusqu'au codon de terminaison et code une protéine putative de 1190 aa permettant probablement la traduction du domaine ATCase. Le point d'initiation de la transcription est probablement celui de l'ORF YJL123c (figure 34).

Taille de la délétion	Bornes		chromosome X	position ATG init	protéine putative	Souche
	<i>ura2 15-30-72</i>					
5328 bp	+132 / +5473	172152 / 166811		+1	438 aa	BR21/1, BR23/2
3857 bp	-522 / +3346	172807 / 168938		+3352	1097 aa	BR1/1, BR4/1, BR5/2, BR8/1, BR10/1, BR14/1, BR16/1, BR17/1
20148 bp	-17065 (+29 YJL123c) à +3091	189250 / 169194		+1 YJL123c	1190 aa	BR15/2

Tableau 24 : Caractérisation moléculaire des événements de délétion sélectionnés en contexte diploïde a/ α *ura2 15-30-72 rad52 Δ* .

Les bornes sont déterminées par rapport à la position +1 du gène *URA2* et en fonction de la position +1 du chromosome X.

Classe de délétion	Séquence à la jonction	Positions		Souche
		<i>ura2 15-30-72 5'</i>	<i>ura2 15-30-72 3'</i>	
I	GGTGAATTAGTTT	+132 à +144	+5461 à +5473	BR21/1, BR23/2
	GAAAGAAATTGA	-522 à -512	+3336 à +3346	BR1/1, BR4/1, BR5/2, BR8/1, BR10/1, BR14/1, BR16/1, BR17/1
	TGAGGCTGA	+21 à +29 (YJL123c)	+3092 à +3101	BR15/2

Tableau 25 : Séquences trouvées aux jonctions des délétions en contexte diploïde a/ α *ura2 15-30-72 rad52 Δ* .

Les positions nucléotidiques sont déterminées par rapport à la position +1 de l'allèle *ura2 15-30-72*. Les séquences nucléotidiques sont données de 5' en 3' dans le sens de lecture de l'allèle *ura2 15-30-72*.

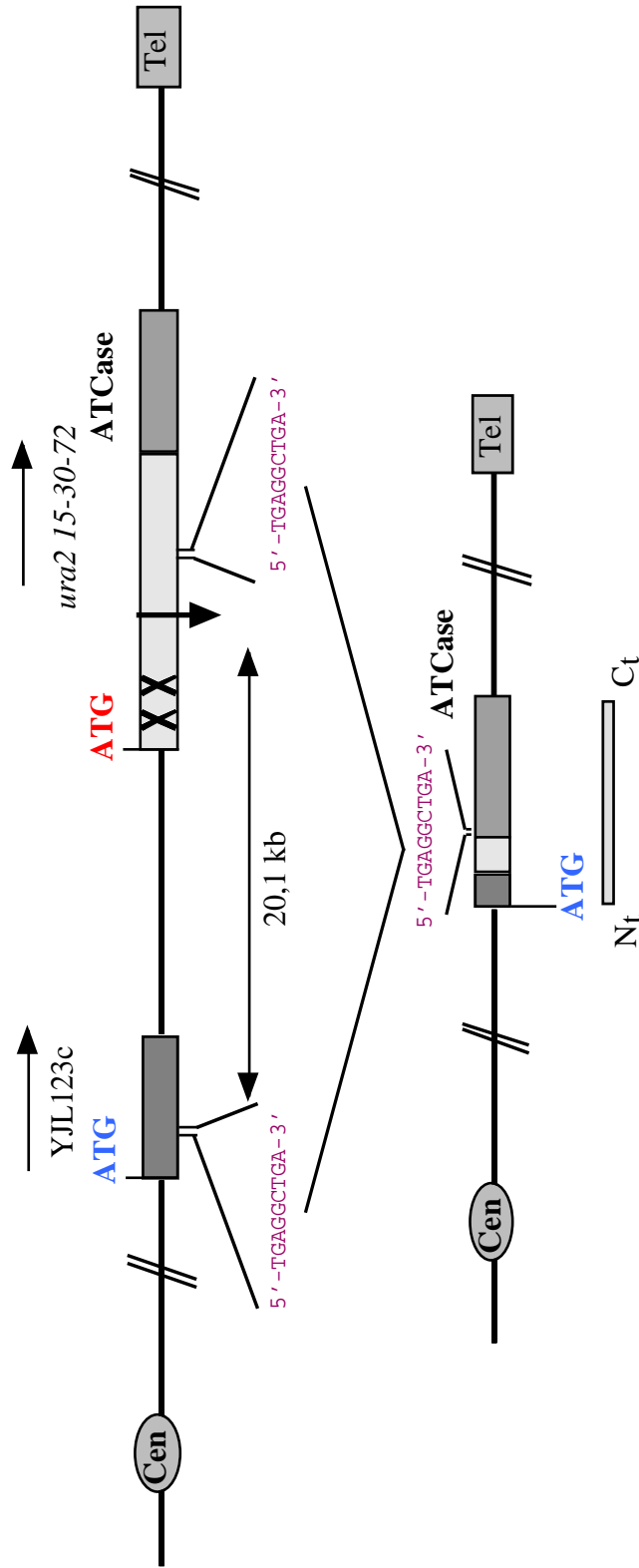


Figure 34 : Une délétion de 20,1 kb permet la formation d'une protéine chimère : origine du révertant BR15/2.

La figure n'est pas à l'échelle. L'événement se produit entre deux séquences identiques en répétition directe dont on ne trouve qu'un seul exemplaire à la jonction de la délétion.

La délétion permet la perte des trois mutations de l'allèle *ura2 15-30-72* et la remise en phase de la région codant le domaine ATCase suite à la fusion avec l'ORF YJL123c. La partie initiatrice de l'ORF YJL123c sert probablement à l'initiation pour la nouvelle ORF fusionnée et la protéine putative issue de cet événement commence avec le codon d'initiation ATG de l'ORF YJL123c.

La jonction de cette délétion montre la présence d'une microhomologie longue de 9 bp située au niveau des positions +3092 à +3101 de l'allèle *ura2 15-30-72* dans la séquence codant le domaine CPSase et +21 à +29 de l'ORF YJL123c. Cette courte séquence n'avait jamais été observée auparavant. Cette séquence de 9 bp impliquée dans la délétion n'est pas présente ailleurs entre la région ATCase et l'ORF YJL123c. Or, en contexte haploïde, les délétions excédant 14 kb ne sont pas sélectionnables car elles engloberaient le gène essentiel *GCD14*.

2.4.2 Taux de mutation en contexte diploïde *a/α ura2 15-30-72 rad52Δ*

Le taux de mutation global (tableau 26) en contexte diploïde *a/α ura2 15-30-72 rad52* s'élève à $1,2 \cdot 10^{-10}$ mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération avec un intervalle de confiance calculé à 95 % compris entre $4,8 \cdot 10^{-11}$ et $2 \cdot 10^{-10}$. Cet intervalle ne chevauche pas celui calculé en contexte diploïde *a/α ura2 15-30-72 RAD52* qui était compris entre $3,9 \cdot 10^{-12}$ et $1,2 \cdot 10^{-11}$ pour un taux de mutation de $7,7 \cdot 10^{-12}$. Nous observons donc une augmentation d'un facteur 16 entre les contextes diploïdes *RAD52* et *rad52*.

2.4.3 Conclusions

Le contexte diploïde *rad52* montre une augmentation du taux de mutation de l'allèle *ura2 15-30-72* d'un facteur 16 par rapport au contexte diploïde *RAD52* (tableau 26 et chapitre 2, tableau 8). Ainsi, le taux de mutation en contexte diploïde *rad52Δ/rad52Δ* est comparable au taux de mutation observé en contexte haploïde *RAD52*. Ceci montre que l'absence en phase diploïde du gène *RAD52*, impliqué dans les mécanismes de réparation des cassures d'ADN, permet l'apparition de remaniements chromosomiques plus fréquents. On peut proposer un modèle de conversion génique en contexte diploïde *RAD52* où les cassures chromosomiques sont plus souvent réparées sans modification de séquence grâce à la présence d'une région identique sur le chromosome homologue.

L'analyse des séquences aux jonctions des délétions nous montre que la seule classe de délétion sélectionnée en contexte diploïde *rad52* est la classe I. Les délétions de classe III qui étaient fortement majoritaires en contexte diploïde *RAD52*, puisqu'elles représentaient 78,5 % des délétions, ne sont plus sélectionnées en contexte diploïde *rad52*. La classe II est également absente. Enfin, nous pouvons également observer que la proportion des événements de délétion passe de 35,8 % en contexte diploïde *RAD52* (chapitre 2, tableau 8) à 64,7 % en contexte diploïde *rad52* (tableau 26).

Contexte génétique	N	n_c	Réactivation du domaine ATCase	r	%	Taux de mutation	Intervalle de confiance
Diploïde a/α <i>rad52Δ</i>	25	$1,7 \cdot 10^9$	<i>Global</i>	17	100	$1,2 \cdot 10^{-10}$	$[4,8 \cdot 10^{-11} ; 1,9 \cdot 10^{-10}]$
			Insertion Ty1	-	-	-	-
			Délétion	11	64,7	$9 \cdot 10^{-11}$	$[2,9 \cdot 10^{-11} ; 1,5 \cdot 10^{-10}]$
			Duplication	6	35,3	$5 \cdot 10^{-11}$	$[0 ; 1,4 \cdot 10^{-10}]$
Diploïde a/α <i>RAD52</i> (rappel)	333	$4,5 \cdot 10^9$	<i>Global</i>	39	100	$7,7 \cdot 10^{-12}$	$[3,9 \cdot 10^{-12} ; 1,2 \cdot 10^{-11}]$

Tableau 26 : Calcul des taux de mutation observés en contexte diploïde a/α *ura2 15-30-72 rad52Δ* .

N : nombre de sélections.

 n_c : nombre moyen de cellules par sélection.

r : nombre de révertants indépendants issus des sélections.

% : proportion des événements.

nd : non déterminé

Taux de mutation : mutation/allèle *ura2 15-30 72* /cellule/génération.

Seules les délétions de classe I sont observées dans les deux contextes *rad52* et *RAD52*, ce qui suggère qu'il existe au moins deux mécanismes conduisant à la formation des délétions de classe I d'une part et de classe II et III d'autre part. L'absence de ces deux classes en contexte *rad52* peut être consécutive à une dépendance vis-à-vis du gène *RAD52*. Cependant, l'augmentation de la fréquence de sélection des délétions de classe I pourrait masquer les deux autres. Dans cette hypothèse, cette absence n'impliquerait pas forcément un mécanisme *RAD52*-dépendant.

3. Formation des délétions de classe I

Les délétions de classe I sont présentes en contexte *nej1* et leur apparition ne varie pas de façon significative, indiquant que le mécanisme est indépendant du NHEJ. En outre, leur apparition est plus fréquente en contexte *rad52*, suggérant que non seulement leur formation est indépendante du gène *RAD52*, mais qu'en plus le produit de ce gène inhiberait leur formation. Ainsi, le produit du gène *RAD52* semble être en compétition avec le mécanisme de formation des délétions de classe I.

Yu & Gabriel (2003) ont montré qu'il existait un mécanisme indépendant du gène *RAD52* permettant de produire des délétions par l'intermédiaire de courtes séquences en répétition directe. D'autre part, Manthey & Bailis (2002) ont montré que les gènes *RAD1* et *RAD10*, codant des endonucléases impliquées dans le mécanisme SSA (Prado & Aguilera, 1995 ; Ivanov *et al.*, 1996) sont également nécessaires à un mécanisme de délétion impliquant de courtes séquences identiques en répétition directe. Ces microhomologies sont longues de 8 à 10 bp et le mécanisme est indépendant du gène *RAD52* (Ma *et al.*, 2003).

Nos résultats rejoignent l'ensemble de ces observations et suggèrent donc que la formation des délétions de classe I pourrait être dépendante d'un mécanisme faisant appel à la voie de la recombinaison homologue, en l'absence du produit du gène *RAD52*.

Dans cette voie de réparation, le gène *RAD59* appartient au groupe d'épistasie du gène *RAD52*. Les travaux de Sugawara *et al.* (2000) ont montré que le produit du gène *RAD59*, qui est également un homologue du gène *RAD52* (Bai *et al.*, 1996), est nécessaire pour le mécanisme SSA. Ils ont également montré que le gène *RAD59* est requis pour la reconnaissance et l'appariement des séquences identiques en répétition directe et qu'il est d'autant plus nécessaire que la taille de ces séquences diminue.

Ces observations nous conduisent à proposer l'hypothèse d'un mécanisme SSA-like, *RAD52* -indépendant mais *RAD59* -dépendant. Le produit de ce gène serait requis pour l'appariement des séquences de microhomologie longues de 8 à 13 bp et conduirait à la formation des délétions de classe I. Ceci serait en accord avec l'indépendance de ces délétions que nous avons observée vis-à-vis du NHEJ, de même qu'une compétition avec le gène *RAD52* : lorsque son produit est présent, il favorise la réparation exacte. Le SSA au niveau de l'allèle *ura2 15-30-72* est très peu probable du fait de l'absence de longues séquences identiques (de l'ordre de 200 à 300 bp) dans le chromosome X à celle qui se trouve entre les trois mutations et la région ATCase. Par contre, en l'absence de Rad52p, le SSA-like serait fonctionnel et permettrait la formation plus fréquente de ces délétions.

Afin de tester cette hypothèse d'un mécanisme SSA-like *RAD59* -dépendant *RAD52* -indépendant, il sera nécessaire d'appliquer notre système de sélection à une souche de génotype *ura2 15-30-72 rad59Δ* qui conduirait à l'abolition des délétions de classe I aussi bien en phase haploïde que diploïde.

Conclusion

Après avoir été longtemps considéré comme une structure statique, la mise en évidence des éléments transposables, des duplications, des délétions ou des translocations de séquences fait désormais apparaître le génome comme une entité dynamique. De nombreux travaux ont montré le rôle moteur de ces remaniements dans le processus évolutif des génomes. Cependant, ces événements demeurent rares, permettant ainsi de maintenir une stabilité essentielle à la survie de la cellule et des organismes. En effet, chez les eucaryotes supérieurs pluricellulaires les remaniements chromosomiques importants sont souvent responsables du phénomène de carcinogenèse, en activant par exemple des oncogènes ou en désactivant des gènes suppresseurs de tumeur. Ainsi, le génome subit une double contrainte de mobilité nécessaire à son évolution et de stabilité indispensable à la survie.

Dans ce travail, nous avons étudié la fluidité génomique de cellules eucaryotes en mitose en sélectionnant positivement des événements de réarrangements chromosomiques spontanés. Nous utilisons l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae* avec un outil génétique basé sur l'allèle mutant *ura2 15-30-72* qui ne diffère du gène *URA2* que par la présence de trois mutations ponctuelles conférant à la souche un phénotype *Ura^r*. Ainsi, la structure chromosomique du génome-cible est conservée et reste quasiment identique à la souche de référence. Afin de nous rapprocher le plus possible des conditions de vie de *S. cerevisiae*, nous avons effectué notre travail en contexte diploïde a/α , phase naturellement observable chez de nombreuses levures hémiascomycètes et chez de nombreux eucaryotes supérieurs. En effet, la phase haploïde est souvent choisie pour les commodités d'expérimentation en conditions de laboratoire.

Lors de précédents travaux effectués en phase haploïde avec notre crible de sélection, le rétablissement de la prototrophie pour l'uracile était consécutif à trois types d'événements :

- l'insertion d'un rétrotransposon Ty1 complet à l'intérieur de la phase codante du gène *URA2* (Roelants *et al.*, 1995) ;

- la duplication de la région codant le domaine ATCase puis fusion de cette région dupliquée à une séquence potentiellement promotrice. Schacherer *et al.* (2004) ont proposé un mécanisme de rétroposition pour expliquer la formation des duplications géniques ;
- la délétion de la région incluant les trois mutations. Welcker *et al.* (2000) ont plus particulièrement mis en évidence un type de délétion et proposé un modèle de type SSA dépendant de la voie de réparation du NHEJ.

Le contexte diploïde a/α de *S. cerevisiae* utilisé dans ce travail devait nous permettre d'observer la capacité de variation d'un génome eucaryote et de sélectionner les événements qui ne sont pas tolérés par une cellule au niveau haploïde. Des différences étaient également attendues car l'expression de certains gènes est différente entre les deux contextes.

Nous avons ainsi sélectionné et caractérisé 39 révertants diploïdes. L'ensemble des résultats des sélections en phase diploïde et de celles, témoins, en phase haploïde est récapitulé dans le tableau 27.

Nous avons isolé plusieurs révertants porteurs de remaniements n'ayant jamais été observés en phase haploïde.

Parmi ceux-ci, se trouve une délétion homozygote dont la formation résulte probablement d'un événement de délétion suivi d'une conversion génique entre l'allèle modifié et le second allèle *ura2 15-30-72*.

Une délétion chromosomique longue de 128,3 kb et entraînant une létalité en phase haploïde a aussi été mise en évidence. Ce type de délétion n'était pas sélectionnable au niveau haploïde du fait de la présence du gène essentiel *GCD14* localisé à environ 14 kb en amont de la région ATCase.

Nous avons également mis en évidence une translocation réciproque entre le chromosome II au niveau du gène *TEF2* et le chromosome X au niveau de l'allèle *ura2 15-30-72*. Ce type d'événement, bien que viable en contexte haploïde n'a jamais été sélectionné dans cette phase.

Enfin, un événement complexe de délétion-translocation réciproque associé à un caractère léthal en phase haploïde a été caractérisé. Une région de 191 kb contenant les trois mutations a été perdue sur le chromosome X tandis qu'une translocation réciproque s'est produite entre ce même chromosome X au niveau de l'allèle *ura2 15-30-72* et le chromosome XII au niveau du gène *YEF3*.

Les deux translocations réciproques ont en outre conduit à la formation de gènes chimères aboutissant probablement à la synthèse d'une protéine de fusion portant l'activité ATCase.

<i>Réactivation du domaine ATCase</i>	<i>Contexte</i>	<i>Contexte</i>
	<i>diploïde a/α</i>	<i>haploïde α</i>
<i>Révéralnts isolés</i>	39	16
Événements viables	19	16
<i>Duplication intrachromosomique</i>	1	2
<i>Duplication extrachromosomique</i>	8	-
<i>Délétion</i>	8	7
<i>Insertion rétrotransposon Ty1</i>	-	7
<i>Délétion homozygote</i>	1	-
<i>Translocation réciproque</i>	1	-
Événements létaux	20	-
Létaux liés	15	-
<i>Duplication intrachromosomique</i>	1	-
<i>Duplication extrachromosomique</i>	11	-
<i>Délétion</i>	1	-
<i>Délétion-translocation</i>	2	-
Létaux indépendants	5	-
<i>Duplication (intrachromosomique)</i>	1	-
<i>Délétion</i>	3	-
<i>Délétion *</i>	1	-
Taux de mutation	$7,7 \cdot 10^{-12}$	$1,4 \cdot 10^{-10}$

Tableau 27 : Distribution des réarrangements chromosomiques en contexte diploïde a/α *ura2 15-30-72* et en contexte haploïde α *ura2 15-30-72* .

Létaux indépendants : sélection d'un événement léthal indépendant de la réactivation du domaine ATCase.

* : L'événement léthal est indépendant de la réactivation du domaine ATCase mais génétiquement lié au second allèle *ura2 15-30-72* .

Létaux liés : sélection d'un événement léthal associé à l'événement de réactivation du domaine ATCase.

Taux de mutation : mutation/allèle *ura2 15-30-72* /cellule/génération.

D'autre part, comme attendu, aucune intégration d'élément transposable Ty1 n'a été isolée, ce qui s'explique par la répression transcriptionnelle exercée sur ces rétrotransposons en contexte diploïde a/α (Errede *et al.*, 1980).

Cependant, la caractérisation moléculaire de ces révertants a aussi révélé des similitudes entre les deux contextes. Nous avons en effet pu sélectionner des délétions de la région contenant les trois mutations de l'allèle *ura2 15-30-72* et des duplications comprenant la région ATCase, comme cela était observable en phase haploïde.

Nous avons aussi isolé 19 duplications extrachromosomiques et 3 intrachromosomiques. 18 duplications ont une taille supérieure à 140 kb dont 11 sont associées à un événement létal induit par le remaniement.

Il sera nécessaire de déterminer la séquence des jonctions afin d'identifier le site d'insertion de l'élément dupliqué pour comprendre le mécanisme impliqué dans ces duplications. En effet, Schacherer *et al.* (2004) ont montré l'existence en phase haploïde d'un mécanisme de rétroposition où une duplication génique se ferait par l'intermédiaire des éléments transposables Ty1. Cependant, en phase diploïde, la grande proportion de duplications de taille supérieure à 140 kb (18 sur 22) et l'absence de sélection d'insertion de rétrotransposon avec l'effectif cellulaire utilisé suggèrent l'existence d'un autre mécanisme conduisant à l'apparition de duplications. Ainsi, ces duplications de grande taille pourraient être segmentales (un mécanisme de formation a été proposé par Koszul *et al.*, 2004). Elles pourraient également se former selon le modèle du BIR (Break Induced Replication) (Symington, 2002) qui mène alors à une duplication de bras de chromosome s'insérant en remplaçant une partie de bras du chromosome receveur. La perte de cette partie de bras conduirait probablement, dans la plupart des cas, à la perte de gènes essentiels. Ceci concorderait avec la forte létalité associée aux duplications que nous observons (50 % des duplications sont à la fois supérieures à 140 kb et létales en phase haploïde). Cependant, l'insertion des éléments dupliqués dans un gène essentiel n'est pas à écarter, bien qu'elle ne soit probablement pas la règle. En effet, si les travaux de Winzeler *et al.* (1999) ont montré que sur milieu complet, seulement 17 % des gènes de la souche S288C de *S. cerevisiae* sont essentiels à la survie de la cellule, ce chiffre reste cependant éloigné des 50 % observés de létalité due à des duplications.

Une analyse par CGH utilisant les puces à ADN pourrait permettre de discerner la nature des duplications sélectionnées en phase diploïde et nous informer ainsi sur les mécanismes probables de formation de ces grandes duplications.

En contexte diploïde a/α , nous avons isolé quatorze délétions. Trois sont des délétions de la région contenant les trois mutations, mais qui conservent la région promotrice où se situent les sites d'initiation de la transcription. Les ORFs résultant de ces événements restent donc vraisemblablement sous dépendance du promoteur du gène *URA2*. Onze autres délétions ont subi une perte de la région promotrice, entraînant la perte du codon d'initiation de la traduction du gène *URA2* et les sites d'initiation de la transcription. L'expression du domaine ATCase nécessite alors la présence d'une nouvelle région promotrice qu'il reste à caractériser, notamment en déterminant les points d'initiation de la transcription. La caractérisation des délétions en phase diploïde a donc montré des similitudes avec les résultats observés par Welcker *et al.* (2000) en phase haploïde.

En revanche, la détermination des séquences des jonctions des délétions montre des différences. En effet, la plupart d'entre-elles possèdent une courte séquence, nommée microhomologie, dont deux exemplaires se trouvaient en répétition directe de part et d'autre de la région délétée avant l'apparition de la délétion. En contexte diploïde, la caractérisation moléculaire des délétions obtenues montre l'existence de trois types de jonction permettant de définir trois classes de délétions : la classe I concerne deux délétions et possède une région de microhomologie longue de 11 bp ; dans la classe II, qui concerne une délétion, aucune séquence de ce type n'est décelée ; la classe III est représentée par onze délétions et montre des séquences de microhomologie courtes de 1 à 4 bp. En phase haploïde, on n'observe que deux types de jonction : six délétions appartiennent à la classe I (microhomologies longues de 8 à 13 bp) et une délétion correspond à la classe II. La classe III est donc spécifique du contexte diploïde et est en outre nettement majoritaire (11 délétions sur 14).

Ces résultats suggèrent qu'au moins deux mécanismes différents conduisent à la formation des délétions suivant le niveau de ploïdie.

L'analyse des jonctions de la translocation réciproque et de la délétion-translocation réciproque suggère également l'implication de séquences de microhomologie dans leur formation et l'intervention de mécanismes similaires aux délétions. En effet, la première montre la présence d'une microhomologie de 3 bp rappelant la classe III, tandis que les jonctions de la seconde possèdent une microhomologie de 9 bp, rappelant la classe I.

Les cassures d'ADN sont souvent décrites pour être à l'origine de ces remaniements. En effet, elles peuvent être réparées par deux voies principales, la recombinaison homologue et la recombinaison non-homologue (NHEJ).

Selon le modèle du SSA (single-strand annealing) décrit pour la recombinaison homologue, des séquences homologues en répétition directe peuvent s'apparier et conduire à une délétion si cela intervient sur un même chromosome ou à une translocation réciproque lorsque cela se produit entre deux chromosomes différents.

Nos premières hypothèses postulaient l'existence d'un mécanisme de type SSA-like de la voie du NHEJ pour la formation des délétions de classe I. En effet, la voie de la recombinaison homologue fonctionne grâce à l'appariement de longues séquences homologues en répétition directe (+ de 200 bp) tandis que le NHEJ fonctionne grâce à l'appariement de très courtes séquences identiques ou même en l'absence de telles séquences.

Les délétions de classe III sont uniquement visibles en contexte diploïde a/α dans lequel le NHEJ est réprimé. Nous pouvons donc supposer que ces délétions sont indépendantes du NHEJ et apparaissent lorsque cette voie de réparation est réprimée.

Dans l'hypothèse d'un processus de réparation de cassures d'ADN, on peut expliquer la faible fréquence d'apparition de translocations réciproques : deux cassures sont nécessaires sur deux chromosomes différents pour ces événements tandis qu'une seule est nécessaire pour une délétion.

Nous avons testé notre hypothèse de l'intervention d'un mécanisme de type NHEJ en effectuant des sélections à l'aide d'une souche délétée au niveau du gène *NEJ1* impliqué dans la ligation des extrémités des cassures d'ADN dans le NHEJ.

En contexte haploïde *nej1*, nous n'avons observé aucune modification significative, tant du point de vue de la nature des événements isolés que du point de vue de leur séquence par rapport au contexte haploïde *NEJ1*. De plus, en phase diploïde, les trois classes de délétions sont présentes. Ces résultats indiquent que les mécanismes conduisant aux délétions que nous observons sont indépendants du NHEJ.

Pour progresser avec le modèle proposé de recombinaison entre courtes séquences en répétition directe, nous avons donc reconduit les sélections dans un contexte permettant de tester l'importance de la recombinaison homologue. Pour ceci, nous avons choisi une souche délétée au niveau du gène *RAD52*, gène décrit comme épistatique aux mécanismes propres à cette voie.

En phases haploïde et diploïde *rad52*, la proportion des délétions augmente en comparaison respectivement des mêmes phases *RAD52* tandis que seules les délétions de classe I sont présentes en contexte *rad52*, quel que soit le niveau de ploïdie. Nous en avons donc conclu que les délétions de classe I sont indépendantes du gène *RAD52*.

Cependant, en présence de ce gène, le taux de délétion est inférieur d'un facteur 4 par rapport au taux de délétion en son absence, suggérant que Rad52p a un effet inhibiteur sur le mécanisme de formation des délétions de la classe I. D'autres équipes utilisant des cribles génétiques différents ont pu isoler des délétions possédant les mêmes types de microhomologies que celles de la classe I et ont montré que leur formation est dépendante de gènes impliqués dans la recombinaison homologue (*RAD1* et *RAD10* par exemple). Nos résultats, ainsi que les autres observations, nous ont conduit à avancer l'hypothèse d'un

mécanisme dépendant de cette voie de réparation, mais indépendant du gène *RAD52*. Dans la recombinaison homologue *sensu stricto*, dépendante du groupe d'épistasie du gène *RAD52*, intervient le gène *RAD59* qui est spécifiquement impliqué dans le SSA et qui permet la reconnaissance et l'appariement de séquences homologues en répétition directe. Nous proposons donc un mécanisme de recombinaison homologue, de type SSA-like, *RAD52*-indépendant, mais dépendant du gène *RAD59*. Des sélections à l'aide d'une souche délétée au niveau du gène *RAD59* permettront de tester cette hypothèse.

En contexte *rad52*, l'absence des délétions de classes II et III nous a conduit à formuler deux hypothèses : elles peuvent être dépendantes du gène *RAD52*, mais l'absence de longue séquence homologue (+ de 200 bp) à leur jonction va à l'encontre de ce qui est généralement décrit pour les mécanismes dépendants de ce gène. Alternativement, ces deux classes peuvent également être indépendantes du gène *RAD52*, mais masquées par l'importance de la sélection des délétions de classe I.

Un groupe composé des trois gènes *XRS2*, *MRE11* et *RAD50* est connu pour intervenir aussi bien dans la recombinaison homologue que dans le NHEJ (Pâques et Haber, 2000). Considérant les analyses en contexte *nej1* qui suggèrent que le mécanisme des classes II et III est indépendant du NHEJ ainsi que l'hypothèse de leur indépendance vis-à-vis du gène *RAD52*, il est possible que le mécanisme de formation impliqué dans ces deux classes de délétion utilise ces trois gènes. En effet, les délétions de classe III pourraient être dépendantes de ce complexe, fonctionnant de façon autonome lorsque le NHEJ est réprimé et que les autres composants de cette voie sont inactifs. D'autre part, Chen & Kolodner (1999) ont montré, avec un outil génétique analysant les grands réarrangements chromosomiques, que l'absence du gène *MRE11* active un processus indépendant de la présence de séquences identiques en répétition directe. Les délétions de classe II, ne présentant pas de séquence de microhomologie à leur jonction, pourraient apparaître dans les cas où *Mre11p* est absent au niveau de la cassure d'ADN à réparer.

Nos résultats et les autres observations indiquent donc qu'il existe plusieurs mécanismes conduisant à des délétions opérant en fonction de la ploïdie et probablement générés par des voies de réparation existantes, mais fonctionnant par défaut d'activité d'une partie des protéines qui leur sont habituellement nécessaires et qui permettent les réparations fidèles dites « error-free ».

Des sélections avec des souches mutées au niveau du gène *RAD59* et des gènes *RAD1* ou *RAD10* devraient permettre de confirmer nos hypothèses sur les délétions de classe I. En effet, dans ces conditions, celles-ci ne devraient plus apparaître. De même, des sélections avec des souches mutées au niveau du gène *RAD50* ou *XRS2* ne devraient plus permettre d'observer les délétions de classe II et III. Enfin, l'absence du gène *MRE11* pourrait entraîner l'apparition plus fréquente des délétions de classe II et l'absence de celles de classe III. Ces différents contextes génétiques devraient donc nous permettre de tester nos

hypothèses et de vérifier quels sont les gènes impliqués dans la formation des différentes classes de délétion, et des translocations réciproques.

Nous avons enfin comparé les taux de mutation calculés en contextes haploïde et diploïde. Ces taux se sont avérés comparables dans la mesure où la proportion d'événements non sélectionnés dans chacun des deux contextes est équivalente. Nous avons ainsi pu observer une baisse significative d'un facteur 18 en phase diploïde par rapport à la phase haploïde.

Cette baisse du taux de mutation montre que la phase diploïde autorise quantitativement moins de remaniements, bien qu'elle permette plus de variété dans la nature des remaniements chromosomiques.

Les sélections effectuées en contexte *nej1* n'entraînent pas de différence significative des taux de mutation par rapport au contexte *NEJ1*. En revanche, le taux de mutation en contexte diploïde *rad52* augmente d'un facteur 16 comparé au contexte diploïde *RAD52*, et est dès lors proche et comparable au taux de mutation observé en contexte haploïde *RAD52*. Une réparation à l'identique plus performante, grâce à la voie de la recombinaison homologue et à la présence de la même séquence que celle à réparer sur le chromosome homologue, peut donc expliquer la sélection moins fréquente de réarrangements chromosomiques en phase diploïde.

Le contexte diploïde a/α a donc permis la sélection de réarrangements variés et souvent complexes impliqués dans la dynamique chromosomique de la levure hémiascomycète *S. cerevisiae*, parmi lesquels certains n'avaient jamais été sélectionnés avec notre système.

Ce travail a en outre montré que la phase diploïde permet à la fois une grande souplesse génomique favorisant la créativité essentielle pour le processus évolutif tout en assurant une stabilité évitant un taux de mutation trop important qui serait déstabilisant pour la pérennité de l'espèce. Ainsi, l'évolution est le résultat d'un juste équilibre entre créativité et stabilité.

Bibliographie

- Allen C., Kurimasa A., Brenneman M.A., Chen D.J. & J.A. Nickoloff (2002) DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 3758-3763.
- Anderson M.S., Yarger J.G., Burck C.L. & C.D. Poulter (1989) Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**: 19176-19184.
- Anderson J., Phan L. & A.G. Hinnebusch (2000) The Gcd10p/Gcd14p complex is the essential two-subunit tRNA(1-methyladenosine) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5173-5178.
- Avery O.T., McLeod C.M. & M. McCarthy (1944) Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III. *J. Exp. Med.* **79**: 137-158.
- Bach M.L., Roelants F., De Montigny J., Huang M., Potier S. & J.L. Souciet (1995) Recovery of gene function by gene duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**:169-77.
- Bai Y. & L.S. Symington (1996) A *RAD52* homolog is required for *RAD51* -independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 2025-2037.
- Baudin A., Ozier-Kalogeropoulos O., Denouel A., Lacroute F. & C. Cullin (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **21**: 3329-3330.
- Beadle G.W. & E.L. Tatum (1941) Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **27**: 499-506.
- Bishop A.J.R. & R.H. Schiestl (2000) Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements. *Human Molecular Genetics* **9**: 2427-2434.
- Blandin G., Durrens P., Tekaia F., Aigle M., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Casaregola S., de Montigny J., Gaillardin C., Lepingle A., Llorente B., Malpertuy A., Neuveglise C., Ozier-Kalogeropoulos O., Perrin A., Potier S., Souciet J-L., Talla E., Toffano-Nioche C., Wesolowski-Louvel M., Marck C. & B. Dujon (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 4. The genome of *Saccharomyces cerevisiae* revisited. *FEBS Lett.* **487**: 31-6.

- Boulton S.J. and S.P. Jackson (1996) *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* **15**: 5093-5103.
- Boveri T. (1903) Über die konstitution der chromatischen kernsubstanz. *Verh. D. Zool. Ges.* 13.
- Boveri T. (1904) Ergebnisse über die konstitution der chromatischen substanz des zellkerns. Gustav Fischer, Jena.
- Chen C., & R.D. Kolodner (1999) Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nature Genetics* **23**: 81-85.
- Chen C., Umezumi K. & R.D. Kolodner (1998) Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae rfa1* mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Mol Cell.* **2**: 9-22.
- Chu G., Vollrath D. & R.W. Davis (1986) Separation of large DNA molecules by contour clamped homogeneous electric fields. *Science.* **234**: 1582-1585.
- Clark A.G. (1994) Invasion and maintenance of a gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2950-2954.
- Company M. & B. Errede (1987) Cell-type-dependent gene activation by yeast transposon Ty1 involves multiple regulatory determinants. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3205-3211.
- Critchlow S.E. & S.P. Jackson (1998) DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 394-398.
- Darwin C. (1859) *L'origine des espèces*. 1^{ère} édition anglaise. Traduction de Edmond Barbier (1993). GF-Flammarion.
- Davis A.P. & L.S. Symington (2004) *RAD-51* dependent break-induced replication in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 2344-2351.
- Delneri D., Colson I., Grammenoudi S., Roberts I.N., Louis E.J. & S.G. Oliver (2003) Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature* **422**: 68-72.
- Difilippantonio M.J., Petersen S., Chen H.T., Johnson R., Jasin M., Kanaar R., Ried T. & A. Nussenzweig (2002) Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J. Exp. Med.* **196**: 469-480.
- Dower W.J., Miller J.F. & C.W. Ragsdale (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by highvoltage electroporation. *Nucleic Acid Research* **16**: 6127-6145.
- Dujon B. (1996) The yeast genome project : what did we learn? *Trends Genet.* **12**: 263-270.

- Dujon B. (1998) European Functional Analysis Network (EUROFAN) and the functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Electrophoresis* **19**: 617-624.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., De Montigny J., Marck C., Neuveglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J.M., Beyne E., Bleykasten C., Boisrame A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., De Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J.M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard G.F., Straub M.L., Suleau A., Swennen D., Tekaiia F., Wesolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P. & J.L. Souciet (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Dunham M.J., Badrane H., Ferea T., Adams J., Brown P.O., Rosenzweig F. & D. Botstein (2002) Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16144-16149.
- Errede B., Cardillo T.S., Sherman F., Dubois E., Deschamps J. & J.M. Wiame (1980) Mating signals control expression of mutations resulting from insertion of a transposable repetitive element adjacent to diverse yeast genes. *Cell*. **22**: 427-436.
- Exinger F. & F. Lacroute (1979) Genetic evidence for the creation of a reinitiation site by mutation inside the yeast *URA2* gene. *Mol. Gen. Genet.* **173**: 109-113.
- Flemming W. (1882) *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. F.C.W. Vogel, Leipzig.
- Franklin R.E. & R.G. Gosling, (1953) Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **171**: 740-741.
- Franklin R.E. & R.G. Gosling, (1953) Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* **172**: 156-157.
- Frank-Vaillant M. & S. Marcand (2001) NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway. *Genes Dev.* **15**: 3005-3012.
- Friedberg E.C., Walker G.C. & W. Siede (1995) In *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington D.C.
- Gaymes T.J., North P.S., Brady N., Hickson I.D., Mufti G.J. & F.V. Rassool (2002) Increased error-prone nonhomologous DNA end-joining: a proposed mechanism of chromosomal instability in Bloom's syndrome. *Oncogene*. **21**: 2525-2533.

- Galli A. & R.H. Schiestl (1998) Effects of DNA double-strand and single-strand breaks on intrachromosomal recombination events in cell-cycle-arrested yeast cells. *Genetics* **149**: 1235-1250.
- Galli A. & R.H. Schiestl (1999) Cell division transforms mutagenic lesions into deletion-recombinagenic lesions in yeast cells. *Mutat. Res.* **429**: 13-26.
- Giaever G., Chu A.M., Ni L., Connelly C., Riles L., Veronneau S., Dow S., Lucau-Danila A., Anderson K., Andre B., Arkin A.P., Astromoff A., El-Bakkoury M., Bangham R., Benito R., Brachat S., Campanaro S., Curtiss M., Davis K., Deutschbauer A., Entian K.D., Flaherty P., Foury F., Garfinkel D.J., Gerstein M., Gotte D., Guldener U., Hegemann J.H., Hempel S., Herman Z., Jaramillo D.F., Kelly D.E., Kelly S.L., Kotter P., LaBonte D., Lamb D.C., Lan N., Liang H., Liao H., Liu L., Luo C., Lussier M., Mao R., Menard P., Ooi S.L., Revuelta J.L., Roberts C.J., Rose M., Ross-Macdonald P., Scherens B., Schimmack G., Shafer B., Shoemaker D.D., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Strathern J.N., Valle G., Voet M., Volckaert G., Wang C.Y., Ward T.R., Wilhelmy J., Winzeler E.A., Yang Y., Yen G., Youngman E., Yu K., Bussey H., Boeke J.D., Snyder M., Philippsen P., Davis R.W. & M. Johnston (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**: 387-391.
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H. & S.G. Oliver (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**:546, 563-567.
- Gonzalez-Barrera S., Garcia-Rubio M. & A. Aguilera (2002) Transcription and double-strand breaks induce similar mitotic recombination events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**: 603-614.
- Haber J.E. & W.Y. Leung (1996) Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13949-13954.
- Hampsey D.M., Ernst J.F., Stewart J.W. & F. Sherman (1988) Multiple base-pair mutations in yeast. *J. Mol. Biol.* **201**: 471-86.
- Hastings P.J. (1988) Recombination in the eukaryotic nucleus. *Bioessays* **9**: 61-64.
- Hoeijmakers J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374.
- Hoffman C.S. & F. Winston (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.

- Hughes T.R., Roberts C.J., Dai H., Jones A.R., Meyer M.R., Slade D., Burchard J., Dow S., Ward T.R., Kidd M.J., Friend S.H. & M.J. Marton (2000) Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat. Genet.* **25**: 333-337.
- Imlay J.A. & S. Linn (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**: 1302-1309.
- Ira G. & J.E. Haber (2002) Characterization of *RAD51* -independent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 6384-6392.
- Ivanov E.L., Sugawara N., Fishman-Lobell J. & J.E. Haber (1996) Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae* . *Genetics* **142**: 693-704.
- Jacob F. & J. Monod (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**: 318-356.
- Jimenez A. & J. Davies (1980) Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces* . *Nature.* **287**: 869-871.
- Johannsen W. (1909) Elemente der exakten Erblchkeitslehre. Jena: G. Fischer.
- Kanaar R. & J.H. Hoeijmakers (1997) Recombination and joining: different means to the same ends. *Genes Funct.* **1**: 165-174.
- Karin M., Najarian R., Haslinger A., Valenzuela P., Welch J. & S. Fogel (1984) Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the *CUPI* locus of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 337-341.
- Kellis M., Birren B.W. & E.S. Lander (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* . *Nature* **428**: 617-624.
- Kozul R., Caburet S., Dujon B. & G. Fischer (2004) Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *EMBO* **23**: 234-243.
- Kramer K.M., J.A. Brock, K. Bloom, J.K. Moore and J.E. Haber (1994) Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar *RAD52* -independent, nonhomologous recombination events. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1293-1301.
- Kurtzman C.P. & J.W. Fell (1998) *The Yeasts, a taxonomic study* (fourth edition). Elsevier.
- Lamarck J.B. (1809) *Philosophie zoologique*. GF-Flammarion (Édition 1994).
- Lea D.E., & C.A. Coulson (1949) The distribution of numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genet.* **49**: 264-285.

- Leh-Louis V., Wirth B., Despons L., Wain-Hobson S., Potier S. & J.L. Souciet (2004) Differential evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* *DUP240* paralogs and implication of recombination in phylogeny. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2069-2078.
- Lewis L.K. and M.A. Resnick (2000) Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **451**: 71-89.
- Lieber M.R. (1999) The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end-joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes Cells* **4**: 77-85.
- Lin F.-L., Sperle K. & N. Sternberg (1984) Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1020-1034.
- Lin F.-L., Sperle K. & N. Sternberg (1985) Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1391-1395.
- Liu Y.G. & R.F. Whittier (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics.* **25**: 674-681.
- Llorrente B., Malpertuy A., Neuveglise C., de Montigny J., Aigle M., Artiguenave F., Blandin G., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Brottier P., Casaregola S., Durrens P., Gaillardin C., Lepingle A., Ozier-Kalogeropoulos O., Potier S., Saurin W., Tekaiia F., Toffano-Nioche C., Wesolowski-Louvel M., Wincker P., Weissenbach J., Souciet J. & B. Dujon (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 18. Comparative analysis of chromosome maps and synteny with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **487**: 101-112.
- Lynch M. & A. Force (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **154**: 459-473.
- Ma J.L., Kim E.M., Haber J.E. & S.E. Lee (2003) Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end-sequences. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 8820-8828.
- Malpertuy A., Tekaiia F., Casaregola S., Aigle M., Artiguenave F., Blandin G., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Brottier P., de Montigny J., Durrens P., Gaillardin C., Lepingle A., Llorrente B., Neuveglise C., Ozier-Kalogeropoulos O., Potier S., Saurin W., Toffano-Nioche C., Wesolowski-Louvel M., Wincker P., Weissenbach J., Souciet J. & B. Dujon (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 19. Ascomycetes-specific genes. *FEBS Lett.* **487**: 113-121.

- Malkova A., Ivanov E.L. & J.E. Haber (1996) Double-strand break repair in the absence of *RAD51* in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7131-7136.
- Mallory J.C. & T.D. Petes (2000) Protein kinase activity of Tellp and Mec1p, two *Saccharomyces cerevisiae* proteins related to the human ATM protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13749-13754.
- Manthey G.M. & A.M. Bailis (2002) Multiple pathways promote short-sequence recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 5347-5356.
- McCarthy J.E. (1998) Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1492-1553.
- McClintock B. (1956) Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **21**: 197-216.
- McGill C.B., Shafer B. & J. Strathern (1989) Coconversion of flanking sequences with homothallic switching. *Cell* **57**: 459-467.
- Mendel, G. (1866) Versuche über pflanzenhybriden. *Verh. Naturforsch. Ver. Brunn.* **4**: 3-47.
- Modrich P. & R. Lahue (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 101-33.
- Moore J.K. & J.E. Haber (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2164-2173.
- Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J. & C. Bridges (1915) *The mechanism of mendelian heredity*. New-York.
- Morrow D.M., Connelly C. & P. Hieter (1997) "Break copy" duplication: a model for chromosome fragment formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 371-382.
- Muller H.J. (1936) Bar duplication. *Science* **83**: 528-530.
- Ohno S. (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York.
- Oka A., Sugisaki H. & M. Takanami (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J. Mol. Biol.* **147**: 217-226.
- Ooi S.L., Shoemaker D.D. & J.D. Boeke (2001) A DNA microarray-based genetic screen for nonhomologous end-joining mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **294**: 2552-2556.

Pasteur L. (1860) Mémoire sur la fermentation alcoolique. Ann. Chim. Phys., 3^{ème} sér., LVIII, 323-426.

Pline l'Ancien (I^{er} siècle ap. J.C.) Histoire naturelle. Traduction de Ajasson de Grandsagne (1829-1833). Pancoucke. Livre XVIII, chapitre XXVI ; Livre XXII, chapitre LXVIII.

Paques F. & J.E. Haber. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 349-404.

Prado F. & A. Aguilera (1995) Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and single-strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the *RAD1*, *RAD10*, and *RAD52* genes. Genetics **139**: 109-123.

Roelants F., Potier S., Souciet J.L. & J. de Montigny (1995) Reactivation of the ATCase domain of the *URA2* gene complex: a positive selection method for Ty insertions and chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. **246**: 767-773.

Roelants F., Potier S., Souciet J.L. & J. de Montigny (1997) Delta sequence of Ty1 transposon can initiate transcription of the distal part of the *URA2* gene complex in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. **148**: 69-74.

Rouse J. & S.P. Jackson (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. Science **297**: 547-551.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. & N. Arnheim (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. **230**: 1350-1354.

Sambrook J., Fritsch E.F. & T. Maniatis (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger F., Nicklen S. & A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**: 5463-5467.

Schacherer J., Tourrette Y., Souciet J.L., Potier S. & J. de Montigny (2004) Recovery of a function involving gene duplication by retroposition in *Saccharomyces cerevisiae*. Genome Res. **14**: 1291-1297.

Sharpless N.E., Ferguson D.O., O'Hagan R.C., Castrillon D.H., Lee C., Farazi P.A., Alson S., Fleming J., Morton C.C., Frank K., Chin L., Alt F.W. & R.A. De Pinho (2001) Impaired nonhomologous end-joining provokes soft tissue sarcomas harboring chromosomal translocations, amplifications, and deletions. Mol. Cell. **8**:1187-1196.

- Steiner S. & P. Philippsen (1994) Sequence and promoter analysis of the highly expressed *TEF* gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 263-271.
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Straight A.F., Shou W., Dowd G.J., Turck C.W., Deshaies R.J., Johnson A.D. & D. Moazed (1999) Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* **97**: 245-256.
- Sugawara N. and J.E. Haber (1992) Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 563-575.
- Sugawara N., Ira G. and J.E. Haber (2000) DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* *RAD59* in double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* **20**: 5300-5309.
- Sutton W.S. (1903) The chromosomes in heredity. *Biol. Bull* **4**: 231-251.
- Symington L.S. (2002) Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 630-670.
- Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J. & F.W. Stahl (1983) The double-strand break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35.
- Valencia M., Bentele M., Vaze M.B., Herrmann G., Kraus E., Lee S.E., Schar P. & J.E. Haber (2001) *NEJ1* controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **414**: 666-669.
- de Vries, H. (1901-1903) *Die Mutationstheorie*. Leipzig: Veit u. Co.
- Wach A., Brachat A., Pohlmann R. & P. Philippsen (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **10**: 1793-1808.
- Waldeyer H.W. (1888) Über Karyokinese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch. Mikrosk. Anat.* **32** : 1-22.
- Watson J.D. & F.H. Crick (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-738.
- Welcker A.J., de Montigny J., Potier S. & J.L. Souciet (2000) Involvement of very short DNA tandem repeats and the influence of the *RAD52* gene on the occurrence of deletions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**: 549-557.

- Wilkins M.H.F., Stokes A.R. & H.R. Wilson (1953) Molecular structure of deoxyribose nucleic acids. *Nature* **171**: 738–740.
- Wilson T.U., Grawunder U. & M.R. Lieber (1997) *S. cerevisiae* DNA ligase IV mediates DNA end-joining. *Nature* **338**: 495-498.
- Winzeler E.A., Shoemaker D.D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., Benito R., Boeke J.D., Bussey H., Chu A.M., Connelly C., Davis K., Dietrich F., Dow S.W., El-Bakkoury M. Foury, F., Friend S.H., Gentalen E., Giaever G., Hegemann J.H., Jones T., Laub M., Liao H., Liebundguth N., Lockhart D.J., Lucau-Danila A., Lussier M., M'Rabet N., Menard P., Mittmann M., Pai C., Rebischung C., Revuelta J.L., Riles L., Roberts C.J., Ross-MacDonald P., Scherens B., Snyder M., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Véronneau S., Voet M., Volckaert G., Ward T.R., Wysocki R., Yen G.S., Yu K., Zimmermann K., Philippsen P., Johnston M. & R.W. Davis (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. **285**: 901-906.
- Wolfe K.H. & D.C. Shileds (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-713.
- Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Qian J. & R.B. Wallace (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology* **10**: 233-238.
- Yu X. & A. Gabriel (2003) Ku-dependent and Ku-independent end-joining pathways lead to chromosomal rearrangements during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae* . *Genetics*. **163**: 843-856.
- Zhang J., Rosenberg H.F. & M. Nei (1998) Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3708-3713.

Annexes

1a.

Nom	Séquence (5'-3')	Position/URA2	Tm (°C)
YT8	TTGGATCTCTTGCTACTT	- 42108 / - 42091	50
YT7	CCGAATCAAATTAGATCG	- 38027 / -38010	50
YT6	TGAGTTATTTGGTCGTTT	- 32962 / - 32945	50
YT5	GTCCATTGTATAGTTGG	- 28114 / - 28098	48
YT4	TTCTCAACGACAATAATAAG	- 24935 / - 24916	52
YT3A	CACTGATACCAGCGATTT	- 22011 / - 21994	52
YT2A	TAATGAACCACTTGACAAC	- 19532 / - 19514	52
YT1A	TGCTTCTATTTCAAACCTGG	- 16632 / - 16615	52
oli 27	AAGCGACAACAGCAGAAT	- 15234 / - 15217	52
oli 28	AAGGTTCTCGAATCAAGG	- 13331 / - 13314	52
oli 29	TAGAAACCACGAAGCACA	- 11439 / - 11422	52
oli 30	GCTACGGTAGCGTAACGA	- 9432 / - 9415	56
oli 32	TCACAAAGAATGAGTAGC	- 7418 / - 7401	50
oli 33	GATGAACCTCAGCTAGCG	- 6368 / - 6351	56
oli 33R	CGCTAGCTGAGGTTTCATC	- 6351 / - 6368	56
oli 34	TGCTACGGCCATCGACTC	- 5418 / - 5401	58
oli 34R	GAGTCGATGGCCGTAGCA	- 5401 / - 5418	58
oli 35	GAACGTCTTATCCTAGGA	- 4416 / - 4399	52
oli 35R	TCCTAGGATAAGACGTTT	- 4399 / - 4416	52
37,8	AAAAGAGTTTCAACCTTCG	-3604 / - 3586	52
38,0	ATATTGGTTGTCTACTACG	- 2608 / - 2590	52
38,1	CTATAGAGTCCTTGTCGG	- 2114 / - 2097	54
38,2	GGGACAAGATAAAGGACG	- 1647 / - 1630	54
38,2R	CGTCCTTTATCCTTGTCCT	- 1630 / - 1647	54
38,3	TGCCTACGTACATTTCTG	- 1117 / - 1100	52
38,3R	TCAGAAATGTACGTAGGC	- 1099 / - 1116	52
38,6	GGACAAATGGTATGGAC	- 799 / - 783	50
38,6R	GTCCATACCATTTGTCC	- 783 / - 799	50
38,8	GGAAACATTATAATCCGTTA	- 419 / - 400	52
38,8R	TAACGGATTATAATGTTTCC	-400 / - 419	52
39	CATCTGGCTTGAACGATC	- 116 / - 99	54
3207	CAGATCTTAGTCATCAC	201 / 217	48
3207R	TGATGACTAAGATCTGG	216 / 200	48
3212	GGGTATGAAATACAATC	701 / 717	46
3212R	GATTGTATTTTCATACCC	717 / 701	46
3213	AAACTAAAATTTGGTAA	951 / 967	40
3213R	ACCACGGTTACCAAATT	974 / 957	48
3214	GCGTTAGGAGTTAAAGT	1614 / 1630	48

Nom	Séquence (5'-3')	Position/URA2	Tm (°C)
3217	ACTGCACGATTTGGTCC	2654 / 2670	52
FR6	CCAAGAATCTTTACATT	3247 / 3231	44
3439 (FR4R)	TCGAAGTTTCACGTGAT	3484 / 3500	48
FR4	ATCACGTGAAACTTCGA	3500 / 3484	48
FR3	TGAATTGGATGTTGTAT	3750 / 3734	44
AW1	AGCAGTACCTGATGTTGC	4190 / 4173	54
AW3	GTCGCCTTGGCAAATG	5169 / 5184	50
AW3R	CATTTGCCAAGGCGAC	5184 / 5169	50
AW4	CCAGAACAGCCTTTGG	5622 / 5637	50
AW4R	CCAAAGGCTGTTCTGG	5637 / 5622	50
3442R	TCTAAGACACCTTCTCT	5833 / 5817	48
AW5	GATAAGAGACCTATCCG	6647 / 6663	50
AW5R	CGGATAGGTCTCTTATC	6663 / 6647	50

1b.

Nom	Séquence (5'-3')	Position/LTR	Tm (°C)
δB41	ATTCATTGTTGATAAAGG	302-286	50
δB41R	CCTTTATCAACAATGGAAT	286-302	50

1c.

Nom	Séquence (5'-3')	Tm (°C)
AD1	NTCGASTWTSGWGTT	43
AD2	NGTCGASWGANAWGAA	47
AD3	WGTGNAGWANCANAGA	47

1d.

Nom	Séquence (5'-3')	Chromosome	Position	Tm (°C)
NET1-2	CTGAGCAGTGACAGCA	X	296201/296186	50
TKL2	TCCGAACGATTGATGAG	II	474495/474511	50
TEF2t	GATAACACCGACAGCG	II	478934/478919	50
YEF3	CCAGCAATCCATTAAGG	XII	636793/636809	50
YEF3-M	TCGTCGAAGTTTGGACC	XII	638049/638033	52
YJL043wt	ATTGGAACAACGGGACC	X	360814/360798	52

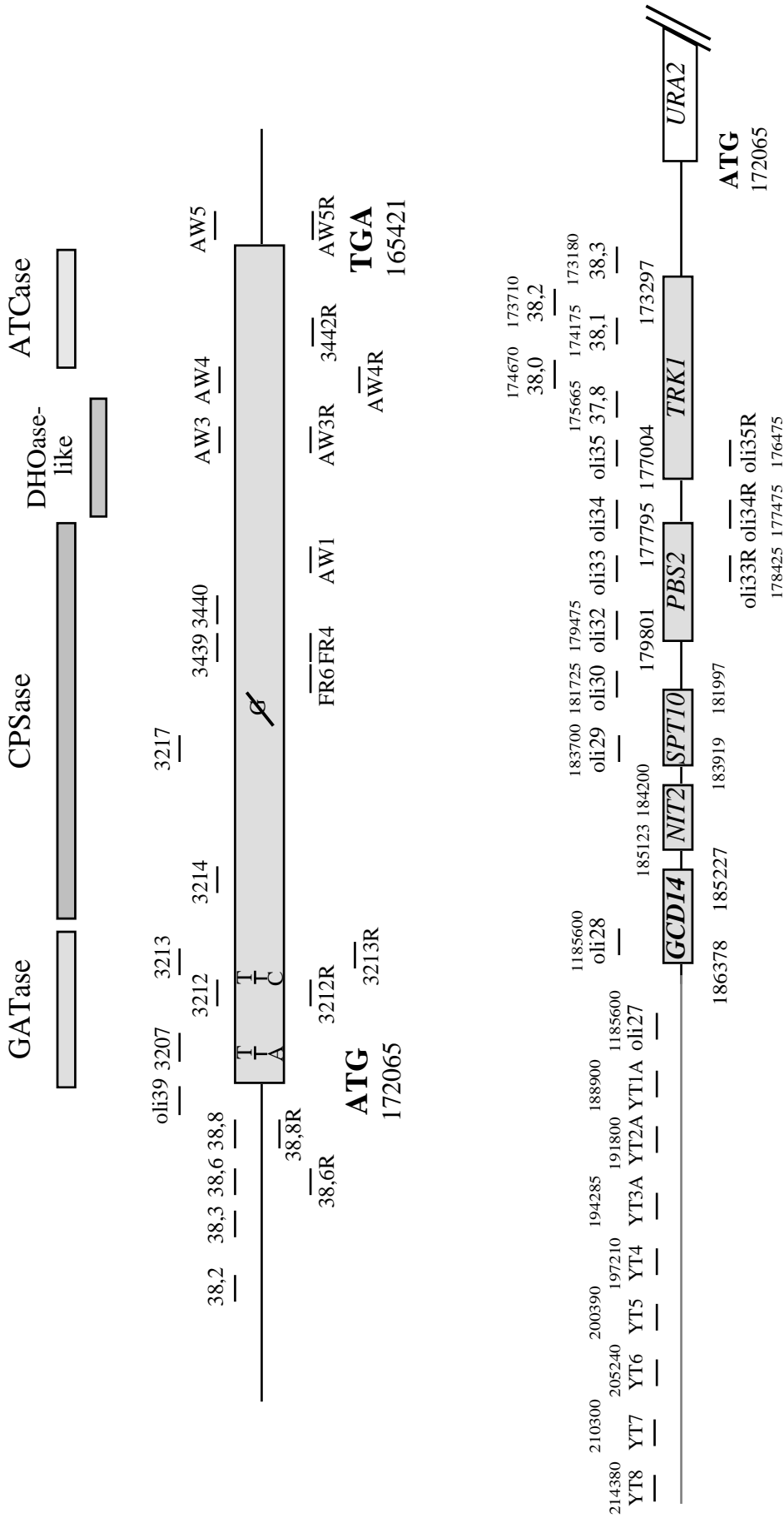
Annexe 1 : Liste des principaux oligonucléotides utilisés dans ce travail.

(a) : Oligonucléotides situés dans et à proximité du gène *URA2*. Les positions des amorces sont données par rapport à l'ATG du gène *URA2*.

(b) : Oligonucléotides spécifiques du rétrotransposon Ty1.

(c) : Amorces dégénérées.

(d) : Oligonucléotides utilisés pour caractériser les événements particuliers (délétion segmentale, translocation réciproque, délétion-translocation). Les positions correspondent aux positions chromosomiques de la souche S288C.



Annexe 2 : Schéma de la localisation des oligonucléotides situés dans et à proximité du gène *URA2* .

Ce schéma ne tient pas compte de l'orientation conventionnelle des gènes sur le chromosome X.

Les chiffres indiqués correspondent aux coordonnées sur le chromosome X issues du séquençage de la souche S288C.

Nom	Séquence (5'-3')	Taille (pb)	Localisation	Position	Tm (°C)
NEJ1-S1	CCATAACAACGGCCA TAGGAGGTTAATCT TAC ACATGTGTGATGGCGTA CGCTGCAGGTCGAC	65	<i>NEJ1</i> pFA6a-Kan MX4	-43 / +4 24-41	85
NEJ1-S2	AGACACTCAGAAGCTGC AGTGATGTAAGATACTGC TTGAAACTACCATCGA TGAATTCGAGCTCG	65	<i>NEJ1</i> pFA6a-Kan MX4	+1244 / +1199 1529-1511	82
NEJ1-1	AATAGTGTTCATATAAGTGG	19	<i>NEJ1</i>	-80 / -62	50
NEJ1-2	ACTATCCGTAAAACCTTG	18	<i>NEJ1</i>	+221 / +204	50
NEJ1-3	CAGATTTCAAGCCAAAATC	19	<i>NEJ1</i>	+862 / +880	52
NEJ1-4	ACTTCATACAATAGAAGAG	19	<i>NEJ1</i>	+1483 / +1465	50
Kan 1	CCATATAAATCAGCATCCA	19	pFA6a-Kan MX4	525 / 507	52
Kan 2	TCTCCTTCATTACAGAAAC	19	pFA6a-Kan MX4	1169 / 1187	52



Nom	Séquence (5'-3')	Taille (pb)	Localisation	Position	Tm (°C)
RAD52-S1	GACGAAAATATAGCGGC GGGCGGGTTACGCGACCG GTATCGAATGGCGTACGC TGCAGGTCGAC	65	<i>RAD52</i> pFA6a-Kan MX4	-43 / +4 24-41	91
RAD52-S2	ATAAATAATGATGCAAA TTTTTATTTGTTTCGGC CAGGAAGCGTTATCGA TGAATTCGAGCTCG	65	<i>RAD52</i> pFA6a-Kan MX4	+1560 / +1515 1529-1511	81
RAD52-1	TGCTCTTCCCGTTAGTG	17	<i>RAD52</i>	-99 / -83	52
RAD52-2	CGTAGACCAGCCATTATA	18	<i>RAD52</i>	+302 / +285	52
RAD52-3	ATGATAAAGAACTGGGGC	18	<i>RAD52</i>	+1270 / +1287	52
RAD52-4	CGATATAGGAAGAAATAC	18	<i>RAD52</i>	+1622 / +1605	48



Annexe 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le remplacement des gènes *NEJ1* et *RAD52* et pour la vérification des remplacements par amplification PCR.

Les positions des amorces sont données par rapport à l'ATG des gènes *NEJ1* et *RAD52*, et par rapport à l'origine du plasmide pFA6a-kanMX4.

Coordonnées du gène *NEJ1* (YLR265c) sur le chromosome XII : 675457 - 674429.

Coordonnées du gène *RAD52* (YML032c) sur le chromosome XIII : 214029 - 212515.

Table 4. $\frac{l_r - P_r}{P_r}$ and $\frac{\sigma_m}{m} \sqrt{N}$

This table is used in estimating mutation rate by the maximal likelihood method.

$$\frac{l_r - P_r}{P_r} = -1 \text{ for all values of } m.$$

$m \setminus r$	1	2	3-4	5-8	9-16	17-32	33-64	>64	$\frac{\sigma_m}{m} \sqrt{N}$
0-05	19-000	19-723	20-019	20-179	20-211	20-176	20-124	20-057	4-637
0-10	9-000	9-098	9-998	10-166	10-206	10-174	10-124	10-057	3-239
0-15	5-687	6-341	6-644	6-821	6-868	6-839	6-790	6-723	2-674
0-20	4-000	4-052	4-957	5-142	5-196	5-171	5-123	5-057	2-341
0-25	3-000	3-032	3-939	4-130	4-181	4-170	4-123	4-057	2-116
0-30	2-333	2-946	3-254	3-452	3-519	3-501	3-456	3-390	1-951
0-35	1-857	2-451	2-760	2-964	3-038	3-023	2-979	2-914	1-824
0-40	1-600	2-077	2-386	2-596	2-676	2-665	2-622	2-557	1-722
0-45	1-322	1-783	2-092	2-307	2-393	2-386	2-344	2-279	1-638
0-50	1-000	1-545	1-855	2-075	2-166	2-162	2-121	2-057	1-568
0-55	0-818	1-349	1-658	1-882	1-979	1-978	1-939	1-875	1-507
0-60	0-667	1-184	1-492	1-720	1-822	1-825	1-787	1-723	1-455
0-65	0-538	1-043	1-350	1-582	1-689	1-695	1-658	1-595	1-409
0-70	0-429	0-920	1-227	1-462	1-574	1-584	1-548	1-485	1-368
0-75	0-333	0-813	1-119	1-357	1-474	1-487	1-452	1-390	1-332
0-80	0-250	0-719	1-023	1-264	1-386	1-402	1-369	1-307	1-299
0-85	0-176	0-634	0-937	1-181	1-308	1-327	1-295	1-233	1-209
0-90	0-111	0-559	0-860	1-107	1-237	1-259	1-229	1-168	1-242
0-95	0-053	0-491	0-790	1-039	1-174	1-199	1-170	1-109	1-217
1-0	0-000	0-429	0-727	0-978	1-117	1-145	1-117	1-057	1-194
1-2	-0-167	0-228	0-520	0-777	0-931	0-971	0-949	0-890	1-118
1-4	-0-286	0-080	0-364	0-627	0-793	0-845	0-828	0-771	1-059
1-6	-0-375	-0-034	0-243	0-508	0-686	0-749	0-736	0-682	1-012
1-8	-0-444	-0-125	0-144	0-411	0-599	0-672	0-665	0-612	0-973
2-0	-0-500	-0-200	0-063	0-330	0-526	0-609	0-608	0-557	0-940
2-2	-0-545	-0-262	-0-007	0-250	0-454	0-536	0-530	0-511	0-913
2-4	-0-583	-0-315	-0-066	0-200	0-409	0-510	0-520	0-473	0-888
2-6	-0-615	-0-361	-0-119	0-147	0-362	0-471	0-486	0-441	0-867
2-8	-0-643	-0-401	-0-164	0-099	0-319	0-436	0-456	0-413	0-848
3-0	-0-667	-0-436	-0-205	0-057	0-280	0-404	0-430	0-390	0-831
3-2	-0-688	-0-467	-0-242	0-018	0-245	0-370	0-407	0-369	0-816
3-4	-0-706	-0-495	-0-275	-0-017	0-213	0-350	0-390	0-350	0-802
3-6	-0-722	-0-520	-0-305	-0-030	0-183	0-320	0-367	0-334	0-789
3-8	-0-737	-0-542	-0-333	-0-080	0-155	0-304	0-350	0-319	0-777
4-0	-0-750	-0-563	-0-358	-0-107	0-129	0-284	0-334	0-305	0-766
4-2	-0-762	-0-581	-0-381	-0-133	0-106	0-264	0-320	0-293	0-756
4-4	-0-773	-0-598	-0-402	-0-157	0-082	0-246	0-306	0-282	0-747
4-6	-0-783	-0-614	-0-422	-0-179	0-061	0-229	0-293	0-272	0-738
4-8	-0-792	-0-629	-0-441	-0-200	0-041	0-213	0-282	0-263	0-730
5-0	-0-800	-0-642	-0-458	-0-220	0-021	0-197	0-271	0-254	0-722
6	-0-833	-0-697	-0-530	-0-304	-0-002	0-130	0-223	0-219	0-690
7	-0-857	-0-737	-0-584	-0-369	-0-128	0-073	0-184	0-194	0-665
8	-0-875	-0-768	-0-625	-0-422	-0-184	0-025	0-151	0-174	0-644
9	-0-889	-0-792	-0-660	-0-465	-0-231	-0-010	0-121	0-157	0-627
10	-0-900	-0-812	-0-689	-0-502	-0-272	-0-053	0-095	0-143	0-613
11	-0-909	-0-828	-0-712	-0-534	-0-307	-0-080	0-071	0-131	0-600
12	-0-917	-0-842	-0-733	-0-561	-0-339	-0-110	0-048	0-120	0-589
13	-0-923	-0-853	-0-750	-0-586	-0-367	-0-143	0-028	0-110	0-580
14	-0-929	-0-863	-0-765	-0-607	-0-393	-0-167	0-008	0-101	0-571
15	-0-933	-0-872	-0-779	-0-626	-0-416	-0-190	-0-010	0-092	0-564

Annexe 4 : Table 4 de Lea & Coulson (1949).

Cette table permet d'estimer le taux de mutation par la méthode du maximum de vraisemblance.

ν \ P	0,90	0,80	0,70	0,50	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,378	1,933	3,078	6,314	12,766	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,269	0,445	0,617	0,818	1,061	1,508	1,880	2,620	4,363	6,065	9,025	31,598
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,745	0,978	1,250	1,638	2,053	3,162	4,541	5,841	12,628
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,504	8,610
5	0,132	0,267	0,408	0,560	0,727	0,920	1,167	1,476	2,016	2,571	3,365	4,032	6,880
6	0,131	0,266	0,404	0,553	0,718	0,908	1,134	1,440	1,943	2,447	3,148	3,707	5,960
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,548	0,705	0,889	1,104	1,397	1,860	2,308	2,856	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,259	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,784	3,169	4,507
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,878	1,083	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,166	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,693	0,868	1,075	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,071	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,745	2,120	2,583	2,921	4,018
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,893	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,875	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,065	1,328	1,729	2,092	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,813	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,765	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,759	3,659
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,753	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,561
60	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,043	1,298	1,671	2,000	2,390	2,563	3,460
120	0,126	0,254	0,386	0,525	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,966	2,358	2,517	3,373
∞	0,125	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,966	2,326	2,575	3,281

Annexe 5 : Table de Student.

Cette table permet de calculer les intervalles de confiance du taux de mutation.

Sélection et analyse de remaniements chromosomiques chez *Saccharomyces cerevisiae* en contexte diploïde : origine des délétions et des translocations réciproques

Les réarrangements chromosomiques de type translocation, délétion et duplication de séquences sont un moteur essentiel de l'évolution des génomes eucaryotes, mais sont également impliqués dans le phénomène d'oncogenèse chez les eucaryotes supérieurs pluricellulaires. Pour les étudier, nous utilisons un crible de sélection positive en contexte diploïde chez un organisme modèle, la levure hémiascomycète *Saccharomyces cerevisiae*.

Nous avons isolé 39 révertants diploïdes dont certains contiennent des duplications intra ou interchromosomiques ou bien des délétions, événements déjà observés en phase haploïde. Nous avons également isolé d'autres réarrangements spécifiques du contexte diploïde : une délétion segmentale de 128,3 kb, une délétion homozygote, une translocation réciproque et une délétion-translocation réciproque. L'analyse génétique a montré que 15 événements provoquent un caractère léthal à l'état haploïde. En phase diploïde nous pouvons donc observer des événements variés et complexes dont certains sont impossibles à observer en phase haploïde.

L'analyse des jonctions des délétions a permis de caractériser trois classes en fonction des séquences en répétition directe (microhomologies) qui se trouvaient aux bornes de la région délétée : la classe I présente des microhomologies de 8 à 13 bp, la classe II ne possède aucune séquence de ce type et la classe III, spécifique du contexte diploïde, montre des microhomologies de 1 à 4 bp. Les mêmes types de séquences sont trouvées aux jonctions des translocations réciproques. Ces résultats suggèrent un mécanisme de recombinaison entre courtes séquences en répétition directe dans la genèse des délétions et des translocations réciproques.

Nous avons ensuite étudié l'implication du NHEJ et de la recombinaison homologue dans l'apparition de ces événements. Ceci nous a conduit à l'hypothèse d'un mécanisme, *RAD52* - indépendant, mais dépendant de la voie de la recombinaison homologue pour les délétions de classe I.

Selection and analysis of chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* in diploid context: origin of deletions and reciprocal translocations

Genomic rearrangements such as chromosomal translocation, deletion and duplication are essential for evolution of eukaryotes genomes, but are also involved in oncogenesis phenomena in pluricellular organisms. In order to study these events, we use a positive selection screen in a diploid context with the hemiascomycet yeast model *Saccharomyces cerevisiae*.

We obtained 39 diploid revertants containing intra- or interchromosomal duplications or deletions, events ever observed in haploids. We have also selected other rearrangements that are specific to diploids: a 128,3 kb segmental deletion, a homozygous deletion, a reciprocal translocation and a deletion-reciprocal translocation. The genetic analysis has shown that 15 events induce a lethal character in haploid context. The diploid state allow us to observe different and complex events which can't be observed in haploid context.

The analysis of deletions allowed us to characterize three classes of deletions depending on short DNA direct repeats (microhomologies) that are located on the junctions of the deleted regions: the class I shares 8 to 13 bp long microhomologies, the class II doesn't have this type of sequences and the class III, that is diploid specific, shows the presence of 1 to 4 bp long microhomologies. The same types of sequences are found to the junctions of reciprocal translocations. These results suggest a recombination mechanism between short DNA direct repeats in the occurrence of deletions and reciprocal translocations.

Finally, we have tested the involvement of the NHEJ and the homologous recombination pathways in the appearance of these events. According to the results, we conclude that the class I deletions, are produced by a *RAD52* -independent mechanism, but are dependent of the homologous recombination pathway.

Discipline : Sciences de la vie (Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie)

Mots-clés : *Saccharomyces cerevisiae*, remaniements chromosomiques, diploïde, délétion, translocation réciproque

Laboratoire de Dynamique, Évolution et Expression de génomes de microorganismes
FRE-2326 ULP / CNRS
Institut de Botanique
28, rue Goethe
F 67083 STRASBOURG Cedex (Fax : 03 90 24 20 28)