

Université de Sherbrooke

Clonage de l'ADNc du cytochrome P450aldo de hamster.
Caractérisation enzymatique des cytochromes P450c11 et P450aldo.

par

Steeve Véronneau

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)

© Droits réservés de Steeve Véronneau, 1995



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Voire référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-612-15494-7

Canada

Nom _____

Dissertation Abstracts International est organisée en catégories de sujets. Veuillez s.v.p. choisir le sujet qui décrit le mieux votre thèse et inscrire le code numérique approprié dans l'espace réservé ci-dessous.

SCIENCE BIOLOGIQUES (Biologie moléculaire)

SUJET

0307

U·M·I

CODE DE SUJET

Catégories par sujets

HUMANITÉS ET SCIENCES SOCIALES

COMMUNICATIONS ET LES ARTS

Architecture	0729
Beaux-arts	0357
Bibliothéconomie	0399
Cinéma	0900
Communication verbale	0459
Communications	0708
Danse	0378
Histoire de l'art	0377
Journalisme	0391
Musique	0413
Sciences de l'information	0723
Théâtre	0465

ÉDUCATION

Généralités	0515
Administration	0514
Art	0273
Collèges communautaires	0275
Commerce	0688
Économie domestique	0278
Éducation permanente	0516
Éducation préscolaire	0518
Éducation sanitaire	0680
Enseignement agricole	0517
Enseignement bilingue et multiculturel	0282
Enseignement industriel	0521
Enseignement primaire	0524
Enseignement professionnel	0747
Enseignement religieux	0527
Enseignement secondaire	0533
Enseignement spécial	0529
Enseignement supérieur	0745
Évaluation	0288
Finances	0277
Formation des enseignants	0530
Histoire de l'éducation	0520
Langues et littérature	0279

Lecture	0535
Mathématiques	0280
Musique	0522
Orientation et consultation	0519
Philosophie de l'éducation	0998
Physique	0523
Programmes d'études et enseignement	0727
Psychologie	0525
Sciences	0714
Sciences sociales	0534
Sociologie de l'éducation	0340
Technologie	0710

LANGUE, LITTÉRATURE ET LINGUISTIQUE

Langues	
Généralités	0679
Anciennes	0289
Linguistique	0290
Moderne	0291
Littérature	
Généralités	0401
Anciennes	0294
Comparée	0295
Médiévale	0297
Moderne	0298
Africaine	0316
Américaine	0591
Anglaise	0593
Asiatique	0305
Canadienne (Anglaise)	0352
Canadienne (Française)	0355
Germanique	0311
Latino-américaine	0312
Moyen-orientale	0315
Romane	0313
Slave et est-européenne	0314

PHILOSOPHIE, RELIGION ET THÉOLOGIE

Philosophie	0422
Religion	
Généralités	0318
Clergé	0319
Études bibliques	0321
Histoire des religions	0320
Philosophie de la religion	0322
Théologie	0469

SCIENCES SOCIALES

Anthropologie	
Archéologie	0324
Culturelle	0326
Physique	0327
Droit	0398
Économie	
Généralités	0501
Commerce-Affaires	0505
Économie agricole	0503
Économie du travail	0510
Finances	0508
Histoire	0509
Théorie	0511
Études américaines	0323
Études canadiennes	0385
Études féministes	0453
Folklore	0358
Géographie	0366
Gerontologie	0351
Gestion des affaires	
Généralités	0310
Administration	0454
Banques	0770
Comptabilité	0272
Marketing	0338
Histoire	
Histoire générale	0578

Ancienne	0579
Médiévale	0581
Moderne	0582
Histoire des noirs	0328
Africaine	0331
Canadienne	0334
États-Unis	0337
Européenne	0335
Moyen-orientale	0333
Latino-américaine	0336
Asie, Australie et Océanie	0332
Histoire des sciences	0585
Loisirs	0814
Planification urbaine et régionale	0999
Science politique	
Généralités	0615
Administration publique	0617
Droit et relations internationales	0616
Sociologie	
Généralités	0626
Aide et bien-être social	0630
Criminologie et établissements pénitentiaires	0627
Démographie	0938
Études de l'individu et de la famille	0628
Études des relations interethniques et des relations raciales	0631
Structure et développement social	0700
Théorie et méthodes	0344
Travail et relations industrielles	0629
Transports	0709
Travail social	0452

SCIENCES ET INGÉNIERIE

SCIENCES BIOLOGIQUES

Agriculture	
Généralités	0473
Agronomie	0285
Alimentation et technologie alimentaire	0359
Culture	0479
Élevage et alimentation	0475
Exploitation des pâturages	0773
Pathologie animale	0476
Pathologie végétale	0480
Physiologie végétale	0817
Sylviculture et faune	0478
Technologie du bois	0746
Biologie	
Généralités	0306
Anatomie	0287
Biologie (Statistiques)	0308
Biologie moléculaire	0307
Botanique	0309
Cellule	0379
Écologie	0329
Entomologie	0353
Génétique	0369
Limnologie	0793
Microbiologie	0410
Neurologie	0317
Océanographie	0416
Physiologie	0433
Radiation	0821
Science vétérinaire	0778
Zoologie	0472
Biophysique	
Généralités	0786
Médicale	0760
SCIENCES DE LA TERRE	
Biogéochimie	0425
Géochimie	0996
Géodésie	0370
Géographie physique	0368

Géologie	0372
Géophysique	0373
Hydrologie	0388
Minéralogie	0411
Océanographie physique	0415
Paléobotanique	0345
Paléocologie	0426
Paléontologie	0418
Paléozoologie	0985
Palynologie	0427

SCIENCES DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT

Économie domestique	0386
Sciences de l'environnement	0768
Sciences de la santé	
Généralités	0566
Administration des hôpitaux	0769
Alimentation et nutrition	0570
Audiologie	0300
Chimiothérapie	0992
Dentisterie	0567
Développement humain	0758
Enseignement	0350
Immunologie	0982
Loisirs	0575
Médecine du travail et thérapie	0354
Médecine et chirurgie	0564
Obstétrique et gynécologie	0380
Ophthalmologie	0381
Orthophonie	0460
Pathologie	0571
Pharmacie	0572
Pharmacologie	0419
Physiothérapie	0382
Radiologie	0574
Santé mentale	0347
Santé publique	0573
Soins infirmiers	0569
Toxicologie	0383

SCIENCES PHYSIQUES

Sciences Pures	
Chimie	
Généralités	0485
Biochimie	0487
Chimie agricole	0749
Chimie analytique	0486
Chimie minérale	0488
Chimie nucléaire	0738
Chimie organique	0490
Chimie pharmaceutique	0491
Physique	0494
Polymères	0495
Radiation	0754
Mathématiques	0405
Physique	
Généralités	0605
Acoustique	0986
Astronomie et astrophysique	0606
Électronique et électricité	0607
Fluides et plasma	0759
Météorologie	0608
Optique	0752
Particules (Physique nucléaire)	0798
Physique atomique	0748
Physique de l'état solide	0611
Physique moléculaire	0609
Physique nucléaire	0610
Radiation	0756
Statistiques	0463
Sciences Appliquées Et Technologie	
Informatique	0984
Ingénierie	
Généralités	0537
Agricole	0539
Automobile	0540

Biomédicale	0541
Chaleur et thermodynamique	0348
Conditionnement (Emballage)	0549
Génie aérospatial	0538
Génie chimique	0542
Génie civil	0543
Génie électronique et électrique	0544
Génie industriel	0546
Génie mécanique	0548
Génie nucléaire	0552
Ingénierie des systèmes	0790
Mécanique navale	0547
Métallurgie	0743
Science des matériaux	0794
Technique du pétrole	0765
Technique minière	0551
Techniques sanitaires et municipales	0554
Technologie hydraulique	0545
Mécanique appliquée	0346
Géotechnologie	0428
Matériaux plastiques (Technologie)	0795
Recherche opérationnelle	0796
Textiles et tissus (Technologie)	0794

PSYCHOLOGIE

Généralités	0621
Personnalité	0625
Psychobiologie	0349
Psychologie clinique	0622
Psychologie du comportement	0384
Psychologie du développement	0620
Psychologie expérimentale	0623
Psychologie industrielle	0624
Psychologie physiologique	0989
Psychologie sociale	0451
Psychométrie	0632



Name _____

Dissertation Abstracts International is arranged by broad, general subject categories. Please select the one subject which most nearly describes the content of your dissertation. Enter the corresponding four-digit code in the spaces provided.

--	--	--	--

U·M·I

SUBJECT TERM

SUBJECT CODE

Subject Categories

THE HUMANITIES AND SOCIAL SCIENCES

COMMUNICATIONS AND THE ARTS

Architecture	0729
Art History	0377
Cinema	0900
Dance	0378
Fine Arts	0357
Information Science	0723
Journalism	0391
Library Science	0399
Mass Communications	0708
Music	0413
Speech Communication	0459
Theater	0465

EDUCATION

General	0515
Administration	0514
Adult and Continuing	0516
Agricultural	0517
Art	0273
Bilingual and Multicultural	0282
Business	0688
Community College	0275
Curriculum and Instruction	0727
Early Childhood	0518
Elementary	0524
Finance	0277
Guidance and Counseling	0519
Health	0680
Higher	0745
History of	0520
Home Economics	0278
Industrial	0521
Language and Literature	0279
Mathematics	0280
Music	0522
Philosophy of	0998
Physical	0523

Psychology	0525
Reading	0535
Religious	0527
Sciences	0714
Secondary	0533
Social Sciences	0534
Sociology of	0340
Special	0529
Teacher Training	0530
Technology	0710
Tests and Measurements	0288
Vocational	0747

LANGUAGE, LITERATURE AND LINGUISTICS

Language	
General	0679
Ancient	0289
Linguistics	0290
Modern	0291
Literature	
General	0401
Classical	0294
Comparative	0295
Medieval	0297
Modern	0298
African	0316
American	0591
Asian	0305
Canadian (English)	0352
Canadian (French)	0355
English	0593
Germanic	0311
Latin American	0312
Middle Eastern	0315
Romance	0313
Slavic and East European	0314

PHILOSOPHY, RELIGION AND THEOLOGY

Philosophy	0422
Religion	
General	0308
Biblical Studies	0321
Clergy	0319
History of	0320
Philosophy of	0322
Theology	0469

SOCIAL SCIENCES

American Studies	0323
Anthropology	
Archaeology	0324
Cultural	0326
Physical	0327
Business Administration	
General	0310
Accounting	0272
Banking	0770
Management	0454
Marketing	0338
Canadian Studies	0385
Economics	
General	0501
Agricultural	0503
Commerce Business	0505
Finance	0508
History	0509
Labor	0510
Theory	0511
Folklore	0358
Geography	0366
Gerontology	0351
History	
General	0578

Ancient	0579
Medieval	0581
Modern	0582
Black	0328
African	0331
Asia, Australia and Oceania	0332
Canadian	0334
European	0335
Latin American	0336
Middle Eastern	0333
United States	0337
History of Science	0585
Law	0398
Political Science	
General	0615
International Law and Relations	0616
Public Administration	0617
Recreation	0814
Social Work	0452
Sociology	
General	0626
Criminology and Penology	0627
Demography	0938
Ethnic and Racial Studies	0631
Individual and Family Studies	0628
Industrial and Labor Relations	0629
Public and Social Welfare	0631
Social Structure and Development	0700
Theory and Methods	0344
Transportation	0719
Urban and Regional Planning	0999
Women's Studies	0453

THE SCIENCES AND ENGINEERING

BIOLOGICAL SCIENCES

Agriculture	
General	0473
Agronomy	0285
Animal Culture and Nutrition	0475
Animal Pathology	0476
Food Science and Technology	0359
Forestry and Wildlife	0478
Plant Culture	0479
Plant Pathology	0480
Plant Physiology	0817
Range Management	0777
Wood Technology	0746
Biology	
General	0306
Anatomy	0287
Biostatistics	0308
Botany	0309
Cell	0379
Ecology	0329
Entomology	0353
Genetics	0369
Limnology	0793
Microbiology	0410
Molecular	0307
Neuroscience	0317
Oceanography	0416
Physiology	0433
Radiation	0821
Veterinary Science	0778
Zoology	0472
Biophysics	
General	0786
Medical	0760

Geodesy	0370
Geology	0372
Geophysics	0373
Hydrology	0388
Mineralogy	0411
Paleobotany	0345
Paleoecology	0426
Paleontology	0418
Paleozoology	0985
Palynology	0427
Physical Geography	0368
Physical Oceanography	0415

HEALTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Environmental Sciences	0768
Health Sciences	
General	0566
Audiology	0300
Chemotherapy	0992
Dentistry	0567
Education	0350
Hospital Management	0769
Human Development	0758
Immunology	0982
Medicine and Surgery	0564
Mental Health	0347
Nursing	0569
Nutrition	0570
Obstetrics and Gynecology	0380
Occupational Health and Therapy	0354
Ophthalmology	0381
Pathology	0571
Pharmacology	0419
Pharmacy	0572
Physical Therapy	0382
Public Health	0573
Radiology	0574
Recreation	0575

Speech Pathology	0460
Toxicology	0383
Home Economics	0386

PHYSICAL SCIENCES

Pure Sciences	
Chemistry	
General	0485
Agricultural	0749
Analytical	0486
Biochemistry	0487
Inorganic	0488
Nuclear	0738
Organic	0490
Pharmaceutical	0491
Physical	0494
Polymer	0495
Radiation	0754
Mathematics	0405
Physics	
General	0605
Acoustics	0986
Astronomy and Astrophysics	0606
Atmospheric Science	0608
Atomic	0748
Electronics and Electricity	0607
Elementary Particles and High Energy	0798
Fluid and Plasma	0759
Molecular	0609
Nuclear	0610
Optics	0752
Radiation	0756
Solid State	0611
Statistics	0463
Applied Sciences	
Applied Mechanics	0346
Computer Science	0984

Engineering	
General	0537
Aerospace	0538
Agriculture	0539
Automotive	0541
Biomedical	0541
Chemical	0542
Civil	0543
Electronics and Electrical	0544
Heat and Thermodynamics	0348
Hydraulic	0545
Industrial	0546
Marine	0547
Materials Science	0794
Mechanics	0548
Metallurgy	0743
Mining	0551
Nuclear	0552
Packaging	0549
Petroleum	0765
Sanitary and Municipal	0554
System Science	0790
Geotechnology	0428
Operations Research	0796
Plastics Technology	0795
Textile Technology	0994

PSYCHOLOGY

General	0621
Behavioral	0384
Clinical	0622
Developmental	0620
Experimental	0623
Industrial	0624
Personality	0625
Physiological	0989
Psychobiology	0349
Psychometrics	0632
Social	0451

EARTH SCIENCES

Biogeochemistry	0425
Geochemistry	0996



à

Catherine

et

Marie-France,

Et nunc reges, intelligite;
erudimini, qui iudicatis terram

Psalmiste (ps. II, 10)

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES ILLUSTRATIONS	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
1. UNITÉS DE MESURE	xii
2. ACIDES AMINÉS	xii
3. AUTRES ABRÉVIATIONS	xiii
SOMMAIRE	xiv

INTRODUCTION 1

1. LES HORMONES STÉROÏDIENNES	1
2. LA GLANDE SURRÉNALE	1
2.1 Morphologie de la glande surrénale	1
2.2 Morphologie du cortex surrénalien	1
3. STÉROÏDOGÉNÈSE DE LA GLANDE SURRÉNALE	3
3.1 Les hormones du cortex surrénalien	3
3.2 Le cholestérol	3
3.3 Les cytochromes P450 stéroïdiens	4
3.4 L'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase	9
4. SYNTHÈSE DES STÉROÏDES DANS LE CORTEX SURRÉNALIEN	10
4.1 Synthèse du cortisol	10
4.2 Synthèse de l'aldostérone	10
4.3 Synthèse des stéroïdes sexuels	11
5. FACTEURS AFFECTANT LA SYNTHÈSE DES HORMONES STÉROÏDIENNES.....	11
6. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES ENZYMES STÉROÏDOGÉNIQUES	11
6.1 Régulation de la synthèse du cortisol	13
6.2 Régulation de la synthèse de l'aldostérone	16
7. LA 19-HYDROXYLATION PAR LE CYTOCHROME P450c11	19

8. EXPRESSION HÉTÉROLOGUE	22
8.1 Expression dans les bactéries <i>E.coli</i>	22
8.2 L'emploi de vecteurs d'expression	23
9. INTÉRÊT DES TRAVAUX PRÉSENTÉS DANS CE MÉMOIRE	23
 MATÉRIEL ET MÉTHODES	
25	
1. VECTEURS DE CLONAGE ET D'EXPRESSION	25
1.1 Vecteur dérivé de bactériophage	25
1.2 Vecteurs plasmidiques procaryotes	26
1.3 Vecteurs plasmidiques eucaryotes	28
1.4 Caractéristiques générales des vecteurs utilisés	30
2. ANIMAUX	32
2.1 Diètes	32
2.2 Décapitation	32
3. VECTEURS VIRAUX, BACTÉRIENS & CELLULAIRES	32
3.1 Phage lambda (λ)	32
3.2 <i>Escherichia coli</i>	32
3.3 Cellules COS	33
4. CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADN GÉNOMIQUE	34
4.1 Détermination du titre	34
4.2 Criblage de la banque (ordre I)	34
4.3 Criblage d'ordre II, III et IV	35
5. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE L'ADN	36
5.1 Isolation de l'ADN de phages λ	36
5.2 Isolation de l'ADN de tissu eucaryote	37
6. DIGESTION DE L'ADN PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION	38
6.1 Emploi d'enzymes de restriction	38
7. SÉPARATION DE BRINS D'ADN PAR ÉLECTROPHORÈSE	38
7.1 Gel d'agarose	38
7.2 Gel de polyacrylamide	38
8. SOUTHERN	39
8.1 Transfert par capillarité	39
8.2 Analyses de l'ADN par hybridation de sondes radioactives	39

9. MARQUAGES DES SONDÉS NUCLÉIQUES	40
9.1 ADNc	40
9.2 Oligonucléotides	41
10. RÉCUPÉRATION DES FRAGMENTS D'ADN	41
10.1 D'un gel polyacrylamide	41
10.2 D'un gel d'agarose	41
11. MODIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN À BOUTS COHÉSIFS	43
11.1 3' sortant	43
11.2 5' sortant	44
12. LIGATION	44
12.1 À extrémités cohésives	44
12.2 À extrémités franches	45
13. PROPAGATION DES MOLÉCULES D'ADN RECOMBINANT	45
13.1 Transformation de cellules compétentes XL1-Blue	45
14. CARACTÉRISATION DES CLONES RECOMBINANTS	45
14.1 Transfert sur filtres de nitrocelluloses	46
14.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique	46
14.3 Maxi-préparation d'ADN plasmidique	47
14.4 Transfert en dépôts circulaires (<i>Dot-Blot</i>)	47
15. SÉQUENÇAGE DE L'ADN	48
15.1 Dénaturation de l'ADN et hybridation avec l'amorce	48
15.2 Réactions de séquençage	48
15.3 Électrophorèse, séchage du gel et autoradiographie	48
16. CULTURE DE CELLULES EUCARYOTES	49
16.1 Préparation des milieux	49
16.2 Préparation des cellules	49
16.3 Passage	50
16.4 Transfection des cellules	50
17. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE L'ARN	51
17.1 Isolation de l'ARN de <i>E. coli</i>	51
17.2 Isolation de l'ARN de tissus	51
17.3 Isolation de l'ARN de cellules COS	52
17.4 Analyse par <i>Northern blots</i>	53

18. CLONAGE DES ADNc	53
18.1 Transcription inverse de l'ARNm du P450aldo	54
18.2 Amplification d'un ADNc par PCR	56
19. EXPRESSION <i>IN VITRO</i> DES SÉQUENCES D'ADN CLONÉS	58
19.1 Transcription <i>in vitro</i>	58
19.2 Traduction <i>in vitro</i>	59
19.3 Expression en système procaryote	60
19.4 Expression en cellules COS	62
20. ANALYSE DES PRODUITS D'EXPRESSION	62
20.1 Produits de traduction <i>in vitro</i>	62
20.2 <i>Western blot</i> (Immunotransfert)	63
20.3 Activités <i>in vitro</i>	63
 RÉSULTATS	
67	
1. CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADN GÉNOMIQUE DE HAMSTER	67
1.1 Construction d'une banque d'ADN génomique de hamster	67
1.2 Détermination du titre de la banque d'ADN génomique	68
1.3 Criblage de la banque d'ADN génomique	69
1.4 Caractérisation des clones positifs	71
1.5 Stratégie de séquençage du clone #66	72
2. ISOLATION DE L'ADNc DU P450ALDO DE HAMSTER	72
2.1 Stratégie d'isolation de l'ADNc par RT-PCR	72
2.2 Isolation de l'ARN _{total} de surrénales de hamsters	74
2.3 Détermination de la spécificité de l'amorce anti-sens	75
2.4 Transcription inverse de l'ARNm du cytochrome P450aldo	75
2.5 Sous-clonage des produits d'amplification PCR	83
2.6 Sélection des colonies positives	83
2.7 Séquençage des clones positifs	84
2.8 Substitutions de la région mutée du clone 7a ⁻	84
3. EXPRESSION DE P450ALDO DANS <i>E. Coli</i>	89
3.1 Choix du vecteur d'expression	89
3.2 Choix de la souche bactérienne	89
3.3 Induction par l'IPTG	89
3.4 Isolation de la protéine P450aldo	89
3.5 Études de l'expression par immunobuvardage	91
3.6 pKK223.3 avec un RBS à 8pb de l'ATG	93

4. EXPRESSION DANS LES CELLULES COS	95
4.1 Choix du vecteur d'expression	95
4.2 Analyse par <i>Northern blots</i>	95
4.3 Analyse de l'expression des P450s	95
4.4 Perfectionnement des techniques	97
4.5 Analyse par <i>Western blots</i>	97
4.6 Utilisation de vecteurs plus efficaces	98
4.7 Essais de traduction <i>in vitro</i>	99
4.8 Études de l'expression par immunobuvardage	100
4.9 Immunoprécipitation des produits de traduction <i>in vitro</i>	103
4.10 Reprise des essais d'expression en cellules COS	103
4.11 Analyses de type <i>Northern</i>	103
4.12 Analyse de l'expression des P450 dans COS	104
4.13 Immunoprécipitation des produits d'expression des P450s	111
DISCUSSION	113
1. CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADN GÉNOMIQUE DE HAMSTER	113
2. TRANSCRIPTION INVERSE De l'ARNm DU P450aldo DE HAMSTER	113
3. EXPRESSION DE P450aldo DE HAMSTER DANS <i>E. COLI</i>	116
4. EXPRESSION DES PROTÉINES P450aldo et P450c11 DANS COS	119
4.1 Expression de P450aldo et P450c11 dans COS-7	119
4.2 Modification des conditions lors de l'expression	121
4.3 Traduction <i>in vitro</i> des protéines P450aldo et P450c11	122
4.4 Expression de P450aldo et P450c11 dans COS-1	122
CONCLUSION	126
REMERCIEMENTS	128
RÉFÉRENCES	130
APPENDICES	148

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Tableau I.	Caractéristiques générales des vecteurs utilisés	31
Tableau II.	Composition des milieux de croissance bactérienne	35
Tableau III.	Spécifications techniques pour le criblage d'ordre I	36
Tableau IV.	Procédure d'amplification par PCR	57
Tableau V.	Pré-sélection des clones positifs en fonction de leur reconnaissance par des sondes spécifiques	71
Tableau VI.	Amorces pour l'amplification de l'ADNc de P450aldo.	75
Tableau VII.	Activités enzymatiques des cellules COS-1 transfectées	106
Figure 1.	Localisation des glandes surrénales chez l'humain	2
Figure 2.	Structure du cholestérol et du noyau cyclopentenophénanthrène	3
Figure 3.	Stéroïdogénèse de la glande surrénale chez l'humain	5
Figure 4.	Schéma de la 19-hydroxylation du composé DOC par le cytochrome P450c11	21
Figure 5.	Schéma du vecteur phagique Lambda DASH®II	25
Figure 6.	Schéma descriptif des vecteurs pBluescript KS et SK	26
Figure 7.	Schéma descriptif du vecteur pKK223.3	27
Figure 8.	Schéma descriptif du vecteur pSVL	28
Figure 9.	Schéma descriptif du vecteur pRc/CMV	29
Figure 10.	Schéma descriptif du vecteur pCMV5	30
Figure 11.	Schéma simplifié de l'appareil à électroélution (IBI)	43
Figure 12.	Stratégie de construction de la banque d'ADN génomique de hamster dans lambda DASH®II	68
Figure 13.	Reconnaissance de fragments, générés par digestion enzymatique, par la sonde P450c11 de souris	70
Figure 14.	Sélection, par <i>dot blot</i> , des clones positifs après hybridation de sondes spécifiques	71
Figure 15.	Situation du clone #66	73
Figure 16.	Stratégie d'amplification de l'ADNc du cytochrome P450aldo	74
Figure 17.	Analyse <i>Northern</i> des ARNm encodant le P450aldo de hamster	76

Figure 18.	Essais de 4 systèmes RT-PCR	77
Figure 19.	Influences de l'amorce anti-sens et de la longueur du fragment amplifié sur la spécificité d'amplification par PCR	78
Figure 20.	Effet de la présence de DMSO dans la réaction de transcription inverse ainsi que dans le milieu de PCR	79
Figure 21.	Effet de la concentration de DMSO dans la réaction de PCR	80
Figure 22.	Effet du choix de l'enzyme thermostable sur l'amplification PCR	81
Figure 23.	Effet du nombre de cycles sur l'amplification PCR	82
Figure 24.	Effet de l'efficacité du transfert de chaleur entre le bloc thermique et le contenu du milieu réactionnel sur l'amplification PCR	82
Figure 25.	Stratégie de séquençage des clones 4a ⁺ et 7a-	85
Figure 26.	Séquences d'ADN et des acides aminés correspondants de la partie codante du clone 4a ⁺ (P450aldo) et du clone λ 1 (P450c11)	86-87
Figure 27.	Homologies de séquences entre les cytochromes P450 du hamster et de certaines espèces animales	88
Figure 28.	Études, par <i>Northern</i> , de l'induction de la transcription de l'ARNm de P450aldo dans les bactéries <i>E.coli</i> JM105 par l'IPTG et ce, selon des temps pré-déterminés	90
Figure 29.	Spectres d'absorption d'extraits membranaires solubilisés avec les différents détergents indiqués	92
Figure 30.	Analyse d'immunodétection de P450aldo dans différentes fractions lors de la purification de la protéine exprimée chez <i>E.coli</i>	94
Figure 31.	Études <i>Northern</i> de l'expression des protéines P450aldo et P450c11 chez COS	96
Figure 32.	Essais de traduction <i>in vitro</i>	101
Figure 33.	Analyse d'immunodétection de P450aldo et P450c11 dans les milieux de traduction <i>in vitro</i>	102
Figure 34.	Immunoprécipitation des produits de traduction <i>in vitro</i>	104
Figure 35.	Études <i>Northern</i> de l'expression des protéines P450aldo et P450c11 chez COS	105
Figure 36.	Études dans le temps de la formation de [¹⁴ C]métabolites dans les cellules COS-1 arborant le plasmide pCMV5 sans insert	107

Figure 37.	Études dans le temps de la formation de [¹⁴ C]métabolites dans les cellules COS-1 arborant le plasmide pCMV5 _{aldo}	108
Figure 38.	Études dans le temps de la formation de [¹⁴ C]métabolites dans les cellules COS-1 arborant le plasmide pCMV5 _{c11}	109
Figure 39.	Métabolisme de la [¹⁴ C]DOC dans les cellules COS	110
Figure 40.	Immunoprécipitation des produits d'expression dans les cellules COS ainsi que des produits de traduction <i>in vitro</i>	111
Figure 41.	Aperçu de la structure secondaire de la partie 5' de l'ARNm du P450aldo, telle que proposée par le logiciel RNASE [©]	120
Figure 42.	Comparaison des séquences d'acides aminés déduites du P450aldo de hamster avec les séquences similaires d'espèces animales indiquées	II
Figure 43.	Comparaison des séquences déduites d'acides aminés du P450c11 de hamster avec les séquences similaires d'espèces animales indiquées	III
Figure 44.	Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5 en présence du composé [¹⁴ C]DOC pendant une période de 36 h	IV
Figure 45.	Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5 _{aldo} en présence du composé [¹⁴ C]DOC pendant une période de 36 h	V
Figure 46.	Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5 _{c11} en présence du composé [¹⁴ C]DOC pour une période de 36 h	VI
Figure 47.	Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5 en présence du composé [¹⁴ C]DOC pendant une période de 60 h	VII
Figure 48.	Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5 _{aldo} en présence du composé [¹⁴ C]DOC pendant une période de 60 h	VIII
Figure 49.	Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5 _{c11} en présence du composé [¹⁴ C]DOC pendant une période de 60 h	IX

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1. UNITÉS DE MESURE

cpm	comptes par minute
g	gramme
kb	kilobase
kDa	kilodalton
mA	milliampère
min	minute
M	mole/litre ou molaire
pb	paire de bases
pfu	<i>plaque forming units</i>
pmol	picomole
rpm	révolutions par minute
s	seconde

2. ACIDES AMINÉS

Ala	A	Alanine
Arg	R	Arginine
Asn	N	Asparagine
Asp	D	Aspartate
Cys	C	Cystéine
Gln	Q	Glutamine
Glu	E	Glutamate
Gly	G	Glycine
His	H	Histidine
Ile	I	Isoleucine
Leu	L	Leucine
Lys	K	Lysine
Met	M	Méthionine
Phe	F	Phénylalanine
Pro	P	Proline
Ser	S	Sérine
Thr	T	Thréonine
Trp	W	Tryptophane
Tyr	Y	Tyrosine
Val	V	Valine

3. AUTRES ABRÉVIATIONS

3 β -HSD	3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase/ Δ^4 - Δ^5 isomérase
18OH-B	18-hydroxycorticostérone
18OH-DOC	18-hydroxy-11-désoxycorticostérone
A	11-déshydrocorticostérone
ACTH	Adrénocorticotropine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Aldo	Aldostérone synthase
ALDO	Aldostérone
AMPc	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
B	Corticostérone
Bluo-Gal	Un analogue commercial du X-gal (Gibco BRL)
BSA	Albumine de sérum bovin
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propane-sulfonate
CO	Monoxyde de carbone
CRH	<i>Corticotropin releasing hormone</i>
<i>CYP11A1</i>	Gène du cytochrome P450sc
<i>CYP11B1</i>	Gène du cytochrome P450c11
<i>CYP11B2</i>	Gène du cytochrome P450aldo
DHEA	Déshydroépiandrostérone
DOC	11-Désoxycorticostérone
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
IP ₃	Inositol triphosphate
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
LDL	Lipoprotéine à faible densité
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
O/N	<i>Over night</i> (pendant toute une nuit / ~ 16 h)
PEG	Polyéthylène glycol
PIPES	Acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
SDS	Sulfate de dodécyl sodique
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
Tris	Tris hydroxyméthyl aminométhane
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside

SOMMAIRE

La stéroïdogénèse, ou la synthèse de stéroïdes hormonaux, est un processus qui débute par la transformation du cholestérol et qui se termine par la formation de nombreux produits comme l'aldostérone, le cortisol ou certains composés impliqués dans la différenciation sexuelle. Dépendant des espèces animales, les dernières étapes de la synthèse de l'aldostérone sont effectuées soit par un seul cytochrome, soit par deux cytochromes P450 différents. La présente étude démontre que chez le hamster, les dernières étapes menant à la synthèse de l'aldostérone à partir de la 11-désoxycorticostérone (DOC) sont catalysées par deux cytochromes P450 différents qui sont le P450c11 et le P450aldo. L'étude de la spécificité fonctionnelle de ces deux protéines s'est réalisée par la production de chacun des cytochromes dans des systèmes d'expression hétérologues afin d'écartier l'interférence de l'apport d'une enzyme sur l'activité de l'autre.

L'ADNc du cytochrome P450c11 a été isolé d'une banque d'ADNc de surrénales de hamsters auquel ont été greffées les bases manquantes en extrémité 5' pour l'obtention de la partie codante complète. L'ADNc du cytochrome P450aldo a été amplifié à partir de l'ARN_{total} isolé de surrénales de hamsters maintenues sous diète restreinte en sodium. Cette diète a pour effet d'activer *in vivo* l'expression de la protéine dans la *zona glomerulosa* du cortex surrénalien. Des amorces spécifiques ont permis l'amplification directe d'un ADNc complet par la méthode de RT-PCR.

Des bactéries *E. coli* transformées avec le plasmide d'expression pKK223.3 contenant l'ADNc de P450aldo ont été capables de transcrire l'insert en ARN messenger, mais l'apparition de la protéine dans les bactéries n'a pas pu être mise en évidence.

Des essais similaires ont été repris en utilisant un système d'expression eucaryote. Des cellules COS-1 transfectées avec un plasmide arborant le cytochrome P450c11 ont transformé la [¹⁴C]DOC en [¹⁴C]corticostérone, [¹⁴C]19OH-désoxycorticostérone et [¹⁴C]18OH-désoxycorticostérone selon des proportions de 14:16:1 après 2 h d'incubation. Aucune synthèse d' [¹⁴C]aldostérone n'a été détectée dans le milieu de culture. Après des temps d'incubation plus élevés, la [¹⁴C]18OH-corticostérone et la [¹⁴C]11-déshydrocorticostérone s'accumulaient graduellement dans le milieu pour atteindre des proportions significativement moindres que les autres produits.

Les cellules COS-1 transfectées de façon à exprimer le cytochrome P450aldo ont transformé la [¹⁴C]DOC en [¹⁴C]corticostérone, [¹⁴C]aldostérone, [¹⁴C]18OH-corticostérone, [¹⁴C]18OH-désoxycorticostérone, [¹⁴C]19OH-désoxycorticostérone et [¹⁴C]11-déshydrocorticostérone selon des proportions de 25:6:11:1:1:1 après 12 h d'incubation.

Ces résultats indiquent qu'un P450 catalyse les dernières réactions de la formation des glucocorticoïdes alors qu'un autre P450 est impliqué dans les étapes finales menant à la synthèse de l'aldostérone dans les surrénales de hamster.

La capacité que possède le P450c11 de hamster d'hydroxyler à la position C-11 et C-19 en proportion égale fait de cet animal un excellent modèle pour l'étude des mécanismes de synthèse et d'inhibition de la 19OH-désoxycorticostérone, le précurseur de la 19nor-DOC, un minéralocorticoïde potentiellement impliqué dans le développement de l'hypertension essentielle.

INTRODUCTION

1. LES HORMONES STÉROÏDIENNES

Chez les mammifères, il existe trois organes qui se spécialisent dans la production d'hormones stéroïdiennes; le cortex surrénalien, les testicules et les ovaires. Toutefois, la majorité des hormones stéroïdiennes sont synthétisées par les glandes surrénales. Le placenta, pendant la grossesse, se développe comme une source additionnelle et importante d'hormones stéroïdiennes. Dans ces organes, la production d'hormones est elle-même sous le contrôle d'hormones extracellulaires.

2. LA GLANDE SURRÉNALE

2.1 Morphologie de la glande surrénale

La glande surrénale est un organe endocrinien multifonctionnel qui sécrète une multitude d'hormones. Des observations expérimentales et cliniques au milieu des années 1800 ont démontré que cette glande était essentielle à la survie de l'espèce (Addison, 1855; Brown-Sequard, 1856). Les surrénales sont situées juste au-dessus des reins et pèsent de 6 à 10 g chez l'humain (fig. 1). Elles sont en fait une combinaison de deux entités fonctionnelles séparées. Le cortex, zone externe, couvre environ 80-90% du poids de la glande. Elle est dérivée du mésoderme et est source des corticostéroïdes. La *medulla*, interne, est dérivée des cellules neuroectodermiques de ganglions sympathiques et est source des hormones catécholamines. La glande surrénale est une glande très innervée. Elle possède le plus haut niveau d'apport sanguin par poids de tissu. Le sang artériel arrivant en périphérie est rapidement dirigé vers des capillaires internes et est drainé jusqu'aux veines au centre de la glande, permettant ainsi aux hormones nouvellement synthétisées d'être acheminées rapidement dans la circulation sanguine.

2.2 Morphologie du cortex surrénalien

Le cortex surrénalien se divise en trois sections morphologiquement et physiologiquement distinctes. La zone la plus externe, la *zona glomerulosa* n'est constituée que de quelques cellules d'épaisseur. La zone centrale du cortex, la *zona*

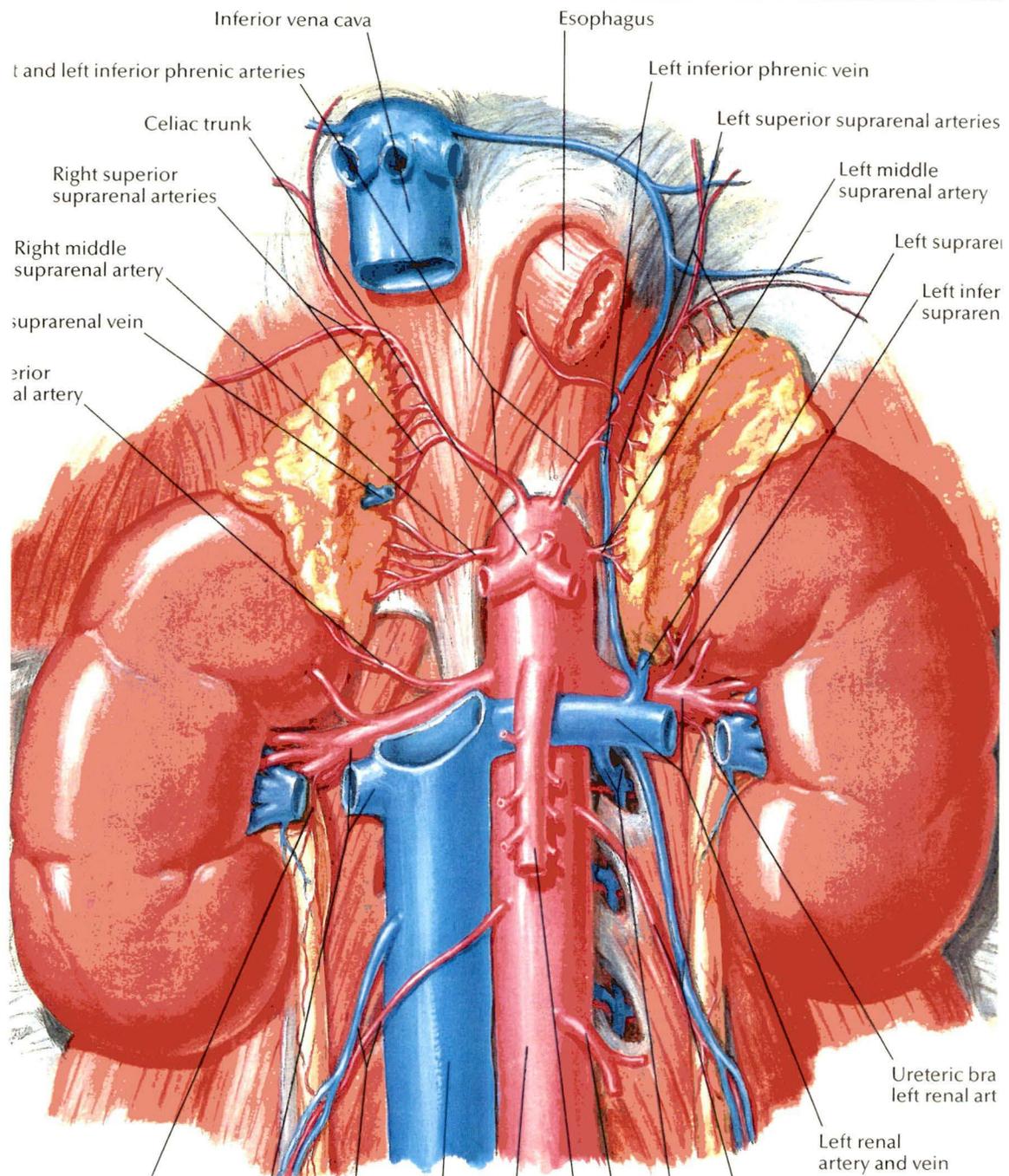


Figure 2. Localisation des glandes surrénales chez l'humain. Il est important de remarquer que trois artères supradrénales originant de l'aorte (rouge) se partagent la fonction de fournir un apport sanguin adéquat à la fonction endocrine pour chacune des glandes (jaune). Les hormones sécrétées prennent le chemin de la circulation sanguine via la veine cave inférieure (bleue)

fasciculata est la plus épaisse et consiste en longs cordons de cellules allongées. La zone la plus interne du cortex, la *zona reticularis*, contient un réseau de cellules entrecroisées. Les cellules sécrétrices de stéroïdes sont généralement riches en gouttelettes lipidiques, contiennent un grand nombre de grosses mitochondries avec des vésicules dans leurs membranes.

3. STÉROÏDOGÉNÈSE DE LA GLANDE SURRÉNALE

3.1 Les hormones du cortex surrénalien

Les hormones surrénaliennes participent à une variété de fonctions biologiques, incluant la régulation du glucose sanguin, le métabolisme sodique et potassique, la survie face à un stress, la modulation de la réponse des tissus face à une infection ou un accident.

Les principales hormones du cortex surrénalien sont 1) les glucocorticoïdes, dont le cortisol, indispensable à la vie par ses effets sur le métabolisme des sucres et des protéines et son rôle dans l'adaptation en état de stress, 2) les minéralocorticoïdes, dont l'aldostérone qui est vitale au maintien du volume de fluide extracellulaire ainsi qu'au niveau du K^+ et 3) les précurseurs des hormones sexuelles, qui contribuent au développement des caractéristiques sexuelles.

3.2 Le cholestérol

Le précurseur commun des corticostéroïdes est le cholestérol. Comme ce dernier, ces hormones possèdent une structure chimique semblable comportant toutes un noyau perhydrocyclopentenophénanthrène (fig. 2). Les cellules de la glande s'approvisionnent en

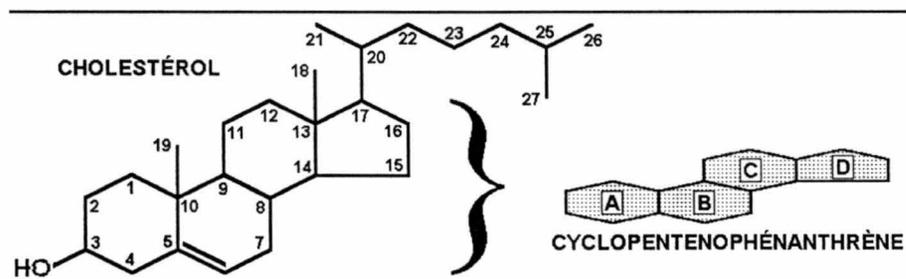


Figure 2. Structure du cholestérol et du noyau cyclopentenophénanthrène. La numérotation réfère à celles des carbones impliqués dans la structure du cholestérol. Les cyclohexanes et cyclopentanes sont identifiés par des lettres

cholestérol de trois façons différentes. D'abord, ce dernier est prélevé *via* les lipoprotéines LDL retenues du plasma par des récepteurs spécifiques situés en surface sur la membrane cellulaire (Brown *et al.*, 1979). Après son internalisation massive, le cholestérol est en grande partie estérifié et stocké dans des vacuoles cytoplasmiques (vésicules lipidiques intracellulaires), ce qui en fait une source importante de réserve. Sous des conditions basales, une portion du cholestérol directement soutiré du plasma est rapidement pris en charge et converti en hormone (Hadley, 1988). Cependant, lors d'une stimulation de synthèse d'hormones, le cholestérol emmagasiné devient extrêmement important. Ce dernier peut aussi être produit *de novo* à partir d'acétate (Hechter *et al.*, 1953). Cette voie de biosynthèse, comme dernière source de cholestérol, est très importante chez le hamster, mais elle l'est moins chez le rat et l'homme.

Les deux premières étapes de la biosynthèse des stéroïdes sont communs à tous les organes stéroïdogéniques: 1) la conversion du cholestérol en prégnénolone par le cytochrome P450_{scc} dans les mitochondries; et 2) la conversion de la prégnénolone en progestérone par la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) dans le réticulum endoplasmique (fig. 3).

3.3 Les cytochromes P450 stéroïdiens

Plusieurs enzymes stéroïdogéniques font partie de la famille des cytochromes P450, terme générique désignant une classe d'enzymes oxydatifs d'environ 500 acides aminés renfermant un groupement prosthétique, l'hème (Nebert, 1987). La désignation P450 (pigment 450) leur est attribuée puisqu'ils exhibent une différence d'absorbance maximale passant de 420 à 450 nm lorsque réduits et mis en présence de monoxyde de carbone.

La plupart des réactions menant du cholestérol aux corticostéroïdes sont catalysées par des cytochromes P450. Les gènes qui conduisent à leur synthèse sont très similaires, bien qu'ils soient localisés sur différents chromosomes. Un seul cytochrome peut catalyser plus d'une réaction, dépendant de sa localisation ou de la disponibilité du substrat. Ils catalysent des réactions d'hydroxylation du noyau stéroïdien, en présence de l'oxygène moléculaire, de NADPH, une flavoprotéine et d'une protéine fer-soufre appelée adrénodoxine.

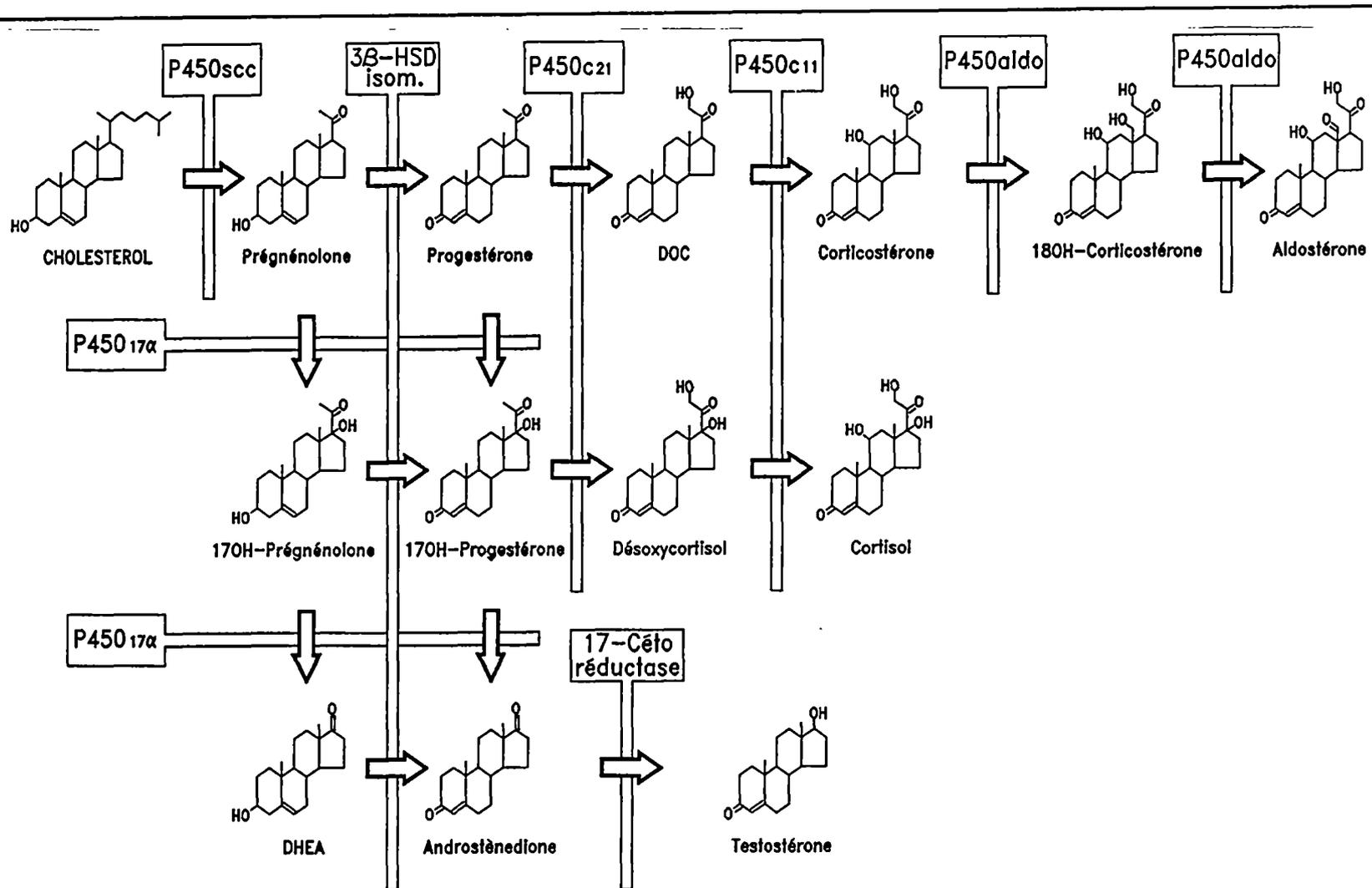


Figure 3. Stéroïdogénèse de la glande surrénale chez l'humain. Voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes. À noter que seules les réactions impliquant les cytochromes P450scc, P450c11 et P450aldo se produisent dans les mitochondries

Les réactions catalysées par les cytochromes P450 stéroïdogéniques sont soit l'hydroxylation d'un groupement spécifique sur le stéroïde (mono-oxygénation) ou soit une série de mono-oxygénations consécutives qui provoquent le clivage d'un lien C-C ou l'aromatisation du cycle A du stéroïde. Les cytochromes P450 peuvent réduire l'oxygène moléculaire (O₂) en transférant des électrons provenant du NADPH au substrat tel que:



Les cytochromes P450 sont des enzymes importantes impliquées dans le métabolisme oxydatif de plusieurs substrats physiologiques tels que les stéroïdes, les acides gras, les prostaglandines, les leukotriènes, les cytokines, les acides biliaires et les amines biogéniques. Plusieurs de ces enzymes métabolisent aussi une grande variété de produits chimiques exogènes comme des polluants environnementaux, des drogues, des alcools et des produits de plantes naturelles (Black & Coon, 1987). Par contre, le métabolisme de ces divers produits peut occasionner l'apparition de métabolites toxiques; certains d'entre eux pouvant initier la formation de tumeurs (Nebert *et al.*, 1991).

L'étendue et la complexité de ces protéines a été mise en évidence surtout depuis 10-25 ans alors que les techniques d'ADN recombinant ont fait leur apparition. On estime que chez l'humain, près de 200 gènes de P450 seront découverts sous peu (Miller, 1988), puisque les recherches actuelles se concentrent sur des tissus-cibles particuliers comme le foie, les poumons, les reins et les tissus endocriniens.

Tous les cytochromes P450 stéroïdogéniques sont associés aux membranes mitochondriales ou microsomales. Les P450s mitochondriaux (P450_{scc}, P450_{c11} et P450_{aldo}) sont situés dans la membrane interne du côté de la matrice (Mitani *et al.*, 1982). Bien que ces protéines se comportent comme étant hautement hydrophobes, la région d'attachement à la membrane demeure toutefois inconnue (Morohashi *et al.*, 1987). Les cytochromes P450 mitochondriaux, l'adrénodoxine ainsi que l'adrénodoxine réductase sont synthétisés sous forme de précurseur possédant en leur extrémité amino-terminale une extension de 20 à 60 résidus absents chez la protéine mature. Cette extension est nécessaire pour diriger la protéine dans la mitochondrie (Furuya *et al.*, 1987) et sont clivées par des protéases spécifiques une fois l'entrée de la protéine dans la mitochondrie (Matocha &

Waterman, 1985; Sagara *et al.*, 1984). Chez le bovin, la reconnaissance de l'extension des P450s mitochondriaux ne peut se réaliser que par des mitochondries de tissus stéroïdogéniques, ce qui n'est pas le cas de l'adrénodoxine (Matocha & Waterman, 1984)

Les seules données structurales des cytochromes P450 eucaryotes découlent de la récolte des informations basées sur les séquences des ARNm et des acides aminés correspondants. Puisque ces enzymes évoluent dans un environnement lipidique membranaire, ils ne peuvent être cristallisés et par conséquent, leur structure tridimensionnelle ne peut être élucidée. Toutefois, la structure du cytochrome P450cam de *Pseudomonas putida* a été déterminée à une résolution de 2.6Å (Poulos *et al.*, 1987). Ce P450 possède une structure en tunnel, où le ligand se présente à une extrémité et en ressort à une autre. Une telle processivité directionnelle, si elle est vraie chez les P450s stéroïdogéniques, pourrait avoir une implication importante pour diriger le flot de stéroïdes au travers des membranes mitochondriales et celles du réticulum endoplasmique, alors que des membranes intactes sont requises pour la stéroïdogénèse (Sybert *et al.*, 1979).

3.3.1 Les cytochrome P450c11 et P450aldo

Ces deux enzymes ne sont exprimées que dans le cortex surrénalien (Okamoto, 1992; John *et al.*, 1985). Chez l'humain et le rat, le cytochrome P450c11 est exprimé dans la *zona fasciculata* et se spécialise dans la synthèse des glucocorticoïdes, lesquels sont sous la régulation principale de l'ACTH tandis que le P450aldo n'est exprimé que dans la *zona glomerulosa* et est régulé surtout par le système rénine-angiotensine (Okamoto & Nonaka, 1992; Shizuta *et al.*, 1992; White *et al.*, 1992; LeHoux & Tremblay, 1992; Shibata *et al.*, 1991; Rainey *et al.*, 1992).

Des préparations mitochondriales de surrénales de porcs et de boeufs ont été testées pour leur capacité à synthétiser de l'aldostérone à partir du précurseur DOC. Or, seulement celles de la *zona glomerulosa* étaient en mesure d'en produire et ce, en quantité importante (Yanagibashi *et al.*, 1986; Ohnishi *et al.*, 1988). Par contre, la solubilisation des mitochondries de la *zona fasciculata-reticularis* par des détergents rétablissait l'activité aldostérone synthase du cytochrome P450c11 à des niveaux comparables à ceux des

mitochondries de la *zona glomerulosa* ayant subi le même traitement, et parfois même à des niveaux supérieurs lors de l'ajout dans le milieu de certains phospholipides (Ohnishi *et al.*, 1984). Ces résultats laissent croire que les cytochromes P450c11 de chacune des zones possédaient la même activité aldostérone synthase intrinsèque, mais que la présence d'un inhibiteur spécifique dans la *zona fasciculata* des deux espèces en bloquait l'activité. Chez le rat, des préparations mitochondriales similaires n'ont pas réussi à mettre en évidence la moindre activité aldostérone synthase dans la *zona fasciculata-reticularis* à partir de la DOC ou de la corticostérone (Ohnishi *et al.*, 1988; Lauber & Müller, 1989; Ogishima *et al.*, 1989). L'activité aldostérone synthase était strictement limitée à la *zona glomerulosa* et clairement associée à la présence d'une seconde forme de cytochrome P450c11. Cette seconde forme, le cytochrome P450aldo, possède la capacité de transformer la DOC en corticostérone, mais aussi de convertir cette dernière en 18OH-corticostérone et en aldostérone chez le rat, l'humain, la souris et le hamster (Lauber & Müller, 1989; Ogishima *et al.*, 1989; Okamoto & Nonaka, 1992; Shizuta *et al.*, 1992; White *et al.*, 1992; Kawamoto *et al.*, 1990; Ogishima *et al.*, 1991; Curnow *et al.*, 1991). Malgré la forte homologie existant entre les cytochromes P450c11 et P450aldo de rat (83%), ces deux protéines originent toutefois de gènes différents (Nonaka *et al.*, 1989; Imai *et al.*, 1990; Matsukawa *et al.*, 1990). Chez l'humain, les cytochromes P450c11 et P450aldo sont respectivement encodés par les gènes *CYP11B1* et *CYP11B2* (Mornet *et al.*, 1989) et sont localisés dans la région q22 sur le chromosome 8 (Chua *et al.*, 1987).

Chez le boeuf, deux formes distinctes du cytochrome P450c11 avec des poids moléculaires apparents de 48.5 et 49.5 kDa ont été isolées de mitochondries corticosurrénales (Ogishima *et al.*, 1989; Kirita *et al.*, 1988). Chaque protéine est associée à son propre ARNm, donc à son propre gène. Les deux formes sont capables de synthétiser de l'aldostérone autant que d'hydroxyler la DOC en position C-11 ou C-18. Par contre une des deux formes est trois fois plus active pour synthétiser de l'aldostérone et de la 18-hydroxycorticostérone que l'autre qui est toutefois plus active dans la production de corticostérone et de 18OH-DOC. Les deux formes d'enzymes sont pourtant distribuées également dans les trois zones du cortex surrénalien bovin.

3.4 L'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase

Les cytochromes P450 mitochondriaux, tels que les cytochromes P450_{scc}, P450_{c11} et P450_{aldo}, agissent comme les derniers éléments d'une chaîne de transport d'électrons dans laquelle sont impliquées les protéines adrénodoxine et adrénodoxine réductase. Les électrons du NADPH sont acceptés par une flavoprotéine, l'adrénodoxine réductase, qui est faiblement associée à la membrane interne du côté matrice dans la mitochondrie (Kimura & Suzuki, 1965; Hanukoglu *et al.*, 1990). À son tour, l'adrénodoxine réductase transfère ses électrons à une protéine fer-soufre appelée adrénodoxine, protéine soluble dans la matrice mitochondriale (Kimura & Suzuki, 1967). Pour terminer, l'adrénodoxine s'associe au P450 impliqué pour lui fournir les électrons nécessaires aux réactions de monooxygénation avec l'oxygène moléculaire.

L'adrénodoxine bovine est une petite protéine de 12kDa qui contient 114 acides aminés, incluant 4 résidus cystéine disposés de façon à permettre l'incorporation de deux atomes de fer et deux atomes de soufre (Tanaka *et al.*, 1973). La même organisation est aussi retrouvée chez la protéine humaine (Picado-Leonard *et al.*, 1988). L'adrénodoxine forme un complexe 1:1 avec l'adrénodoxine réductase, se dissocie, puis se réassocie dans les mêmes proportions avec le cytochrome P450. L'adrénodoxine joue ainsi le rôle de navette entre les divers composants de la chaîne (Lambeth & Pember, 1983). La sélectivité de la réaction serait établie en fonction de la présence du substrat lié au cytochrome, puisque l'adrénodoxine se lierait avec beaucoup plus d'affinité au P450_{scc} lié au cholestérol qu'au P450_{scc} seul (Lambeth & Pember, 1983).

Le clonage de l'adrénodoxine réductase bovine (Hanukoglu *et al.*, 1987; Nonaka *et al.*, 1987; Sagara *et al.*, 1987) et humaine (Solish *et al.*, 1988) a permis d'établir la présence d'un seul gène codant pour cette protéine. Cette protéine de 51kDa (Lin *et al.*, 1990) contient 459 acides aminés (Hanukoglu, 1992) n'est exprimée qu'au niveau des tissus stéroïdogéniques chez le boeuf (Hanukoglu *et al.*, 1987) mais est largement exprimée dans plusieurs tissus humains. Par contre, en dehors des tissus stéroïdogéniques chez ce dernier, l'ACTH n'a que peu d'effets (Solish *et al.*, 1988).

4. SYNTHÈSE DES STÉROÏDES DANS LE CORTEX SURRÉNALIEN

4.1 Synthèse du cortisol

La synthèse du cortisol se produit surtout dans la *zona fasciculata* et la *zona reticularis*. La DOC est transférée aux mitochondries et est hydroxylée en position C-11 par le cytochrome P450c11, l'étape critique de la synthèse des glucocorticoïdes. Outre le cholestérol, aucun sous-produit ni produit final n'est emmagasiné dans la cellule. Une demande rapide pour une production de cortisol signifie une activation rapide de la réaction initiale limitante, celle de la scission de la chaîne latérale du cholestérol par le cytochrome P450scc dans les mitochondries.

Le cortisol circule à 90% lié à une globuline spécifique aux corticostéroïdes, la transcortine. Cependant, le cortisol lié est biologiquement inactif. La demi-vie du cortisol est d'environ 70 min. Libre, le cortisol est filtré par le rein, mais moins de 1% de la sécrétion journalière s'y retrouve. Quoi qu'il en soit, l'excrétion urinaire du cortisol est un bon signe de sa sécrétion. Le cortisol est en équilibre avec son analogue 11-céto, la cortisone, qui ne possède aucune activité biologique intrinsèque. Cependant, l'interconversion est catalysée par une enzyme présente dans plusieurs tissus, rendant la cortisone exogène une source de cortisol pleinement actif. Presque tout le cortisol est métabolisé dans le foie, les métabolites se conjuguent et sont excrétés dans l'urine sous forme de glucuronides.

4.2 Synthèse de l'aldostérone

Les dernières étapes de la synthèse de l'aldostérone, le minéralocorticoïde principal chez l'humain, ont lieu exclusivement dans les mitochondries du cortex surrénalien, dans la *zona glomerulosa*. La corticostérone est hydroxylée en position C-18 pour la former de la 18OH-corticostérone qui est oxydée par la suite au même site. La désoxycorticostérone et ses dérivés C-18hydroxylés sont d'autres stéroïdes à caractère minéralocorticoïde qui sont synthétisés en faibles quantités dans la *zona fasciculata*. L'aldostérone circule sous forme libre et par conséquent, sa demi-vie n'est que de 20 min. L'aldostérone et ses métabolites générés par le foie sont excrétés eux aussi par l'urine sous forme de glucuronides.

4.3 Synthèse des stéroïdes sexuels

La synthèse des stéroïdes sexuels se produit principalement dans les gonades et aussi dans la *zona reticularis*. L'androgène testostérone est généralement sécrété à l'état de trace par le cortex surrénalien. Cependant, une quantité substantielle de précurseurs stéroïdiens ayant des activités androgéniques plus faibles sont sécrétés et convertis en androgènes et estrogènes par les tissus périphériques. Ces précurseurs, l'androstenedione et la déshydroépiandrostérone (DHEA) sont synthétisés à partir de la 17-OH-progestérone ou la 17-OH-prégnénolone, respectivement. Chez la femme pré-ménopausée, les précurseurs surrénaliens fournissent 50% des besoins en hormones androgéniques. Chez l'homme, cette tâche revient aux testicules. Chez les femmes post-ménopausées, les surrénales sont responsables de 100% des précurseurs des androgènes et estrogènes.

5. FACTEURS AFFECTANT LA SYNTHÈSE DES HORMONES STÉROÏDIENNES

La synthèse et la sécrétion des hormones stéroïdiennes sont principalement régulées par des événements qui affectent, selon certains paramètres, la production de stéroïdes.

1. Le niveau des enzymes stéroïdogéniques est déterminé par la transcription, la stabilité des transcrits et la traduction des ARNm codant pour ces enzymes
2. l'activité des enzymes stéroïdogéniques est déterminée par les conditions du milieu intracellulaire, la disponibilité des cofacteurs ou les modifications post-et traductionnelles des enzymes
3. la disponibilité des substrats est généralement déterminée par la mobilisation du cholestérol et son transport au cytochrome P450_{scc} dans les mitochondries
4. la croissance du tissu ou son degré de maturation est déterminés par la division cellulaire et sa multiplication, comme dans la formation du *corpus luteum*

6. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES ENZYMES STÉROÏDOGÉNIQUES

Le niveau sanguin des stéroïdes produits dans les trois zones du cortex surrénalien varie selon un patron circadien en réponse à une stimulation hormonale spécifique à chacun

des tissus (Cauter, 1990). Cette diversité ne peut dépendre de changements dans le niveau des enzymes stéroïdogéniques, mais est plutôt due à une stimulation hormonale de ces enzymes permettant un apport accru de cholestérol aux mitochondries chez le rat (Young & Walker, 1978).

La première étape de synthèse des hormones stéroïdiennes, soit le transport du cholestérol aux mitochondries et sa transformation en prégnénolone par le cytochrome P450_{scc}, est complexe et limitante. Il existe aussi une étape limitante au niveau de la 17 α -hydroxylase lors de la synthèse des glucocorticoïdes dans la *zona fasciculata-reticularis*, ainsi que dans la *zona glomerulosa* au niveau de l'aldostérone synthase pour la synthèse de l'aldostérone. Les autres étapes de biosynthèse se déroulent suivant la quantité des substrats disponibles aux systèmes enzymatiques situés dans le réticulum endoplasmique et dans les mitochondries. Les hormones stéroïdiennes sont des molécules hydrophobes qui peuvent traverser les membranes biologiques, et se diriger directement dans le sang sans avoir été emmagasinées dans des vésicules intracellulaires. Une augmentation du niveau de ces hormones dans le sang dépend essentiellement de leur synthèse et de leur sécrétion continue. Le niveau tissulaire des stéroïdes augmente de façon transitoire après une stimulation hormonale, mais cette augmentation ne suffit guère à modifier la concentration urinaire de ces stéroïdes (Henry & Basset, 1985; Belanger *et al.*, 1990). Ce mode de sécrétion diffère de celui des hormones peptidiques et des neurotransmetteurs qui s'accumulent dans des vésicules intracellulaires et qui sont sécrétés en réponse à un stimulus spécifique.

Le niveau sanguin des stéroïdes surrénaliens augmente rapidement suite à une épisode qui provoque une stimulation de la sécrétion d'ACTH (Munck *et al.*, 1984). Chez l'humain, le niveau de cortisol et d'aldostérone plasmatiques augmente drastiquement moins d'une heure après une injection d'ACTH (Lashansky *et al.*, 1991; Bahr *et al.*, 1991). Le niveau de cortisol augmente parallèlement à celui de l'ACTH sanguin, mais il en est autrement pour l'aldostérone, indiquant que la sécrétion de cortisol est régulée principalement par l'ACTH et que des mécanismes secondaires affectent la sécrétion de l'aldostérone (Bahr *et al.*, 1991).

La régulation de l'expression des gènes stéroïdogéniques est un phénomène comportant plusieurs facettes. Les connaissances actuelles permettent de déterminer qu'elle se fait selon trois niveaux distincts. Le plus caractéristique est la régulation AMPc-dépendante, qui agit de façon à maintenir un niveau optimal de capacité stéroïdogénique dans le cortex surrénalien, les ovaires et les testicules toute la vie durant (Simpson & Waterman, 1988). La régulation tissu-spécifique des gènes stéroïdiens est le second niveau de régulation, ce dernier permettant la réalisation des multiples voies de biosynthèse dans les différents tissus. De plus, il est clair que ces gènes sont exprimés dans la vie foetale de façon AMPc-dépendante, ce qui représente le troisième niveau d'expression, qualifié ici de *imprinting* foetal (Simpson & Waterman, 1988).

Il doit être mentionné que l'action de l'AMPc à réguler l'expression des gènes stéroïdogéniques dans le cortex surrénalien est relativement spécifique pour les enzymes directement impliquées dans la voie stéroïdogénique, comme pour celles responsables de l'apport continu de cholestérol à l'appareillage stéroïdogénique, comme le HMGCoA réductase et les récepteurs de LDL (Simpson *et al.*, 1987).

6.1 Régulation de la synthèse du cortisol

L'ACTH ou hormone adrénocortropique est le stimulateur immédiat de la sécrétion des corticostéroïdes, alors que le plus important stimulateur immédiat de la sécrétion d'ACTH est la CRH (*corticotropin-releasing hormone*) de l'hypothalamus. Il existe donc un axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien qui forme un mécanisme de rétro-inhibition. Le cortisol agit 1) en quelques minutes au niveau de l'hypophyse pour inhiber le relâchement d'ACTH en bloquant l'action stimulatrice du CRH sur les cellules corticotrophes, 2) plus lentement (quelques heures) pour inhiber la synthèse de l'ACTH en bloquant l'activité transcriptionnelle au niveau de son gène, 3) au niveau de l'hypothalamus pour bloquer le relâchement et probablement la synthèse de CRH.

L'ACTH est un peptide de 39 acides aminés qui augmente la synthèse et le relâchement immédiat du cortisol, d'androgènes surrénaliens, de leurs précurseurs et d'aldostérone. Cependant, seul le cortisol peut agir par rétro-inhibition sur l'hypothalamus

ou l'hypophyse. L'ACTH est synthétisée *via* un large précurseur appelé propiomélanocortine (POMC), qui donne lieu à de nombreux produits co-sécrétés, incluant la β -endorphine. Après s'être liée à son récepteur sur la membrane plasmique surrénalienne, l'ACTH stimule la génération d'AMPc, qui est le second messenger majeur de cette action. L'ultime effet de l'ACTH découle d'une cascade de phosphorylations d'enzymes catalysées par des protéines kinases A ou C. L'action immédiate de l'ACTH est la mobilisation du cholestérol par les cellules, l'hydrolyse des esters de cholestérol et leur transfert aux mitochondries; le cytochrome P450_{scc} entre alors en jeu suivi de l'action des autres enzymes stéroïdogéniques et la cascade s'achève par la 11 β -hydroxylation du 11-désoxycortisol (Jefcoate, 1987). L'ACTH modifie aussi l'aspect des cellules corticosurrénales en affectant leur cytosquelette de façon à mettre en contact les vacuoles de cholestérol avec les mitochondries (Berne & Levy, 1990).

6.1.1 Régulation par l'ACTH

Le cortex surrénalien manifeste deux réponses à l'ACTH, pouvant être séparées sur une base temporelle. Dans la voie de synthèse des glucocorticoïdes dans les cellules corticosurrénales, une réponse aiguë à l'ACTH se produit rapidement, en quelques secondes ou minutes, et résulte en une production élevée de glucocorticoïdes. Cette action de l'ACTH est provoquée par l'AMPc et implique la mobilisation du cholestérol de ses sites de stockage (gouttelettes lipidiques, vésicules lipidiques) à la membrane interne mitochondriale au profit du P450_{scc}, suivi par les réactions subséquentes d'hydroxylation du cholestérol par les différents P450s (Privalle *et al.*, 1983). Cette réponse aiguë serait sensible à la cycloheximide (Garren *et al.*, 1965; Pederson & Brownie, 1983). L'action chronique de l'ACTH (réponse lente) se produit selon un épisode de plusieurs heures et est requise pour le maintien optimum des capacités stéroïdogéniques du cortex (Simpson & Waterman, 1988). Cette action chronique est aussi médiée par l'AMPc et résulterait en une augmentation de la concentration des ARNm codants pour les différentes enzymes stéroïdogéniques ainsi qu'une augmentation de la synthèse protéique (Kramer *et al.*, 1982, 1983, 1984; Matocha & Waterman, 1984; Funkenstein *et al.*, 1983; Zuber *et al.*, 1985)

Les premières évidences de l'effet chronique de l'ACTH proviennent des études de Kimura (1969) et Purvis (1973). Celles-ci portaient sur des rats hypophysectomisés. Suivant l'ablation de l'hypophyse, l'activité des enzymes diminuait, mais pouvait être restaurée par administration d'ACTH. L'établissement subséquent de cultures de cellules corticosurréaliennes ainsi que l'avènement d'anticorps spécifiques à ces enzymes ont permis d'élucider davantage le mécanisme d'action de l'ACTH. Lorsque des cellules corticosurréaliennes bovines sont placées en cultures jusqu'à l'obtention d'une pleine confluence, le niveau d'activité chute à son niveau basal. Après addition d'ACTH, le niveau de synthèse et d'activité des enzymes hydroxylases et protéines reliées augmentent drastiquement de 5 à 10 fois. Bien qu'*in vivo*, la montée n'est certes pas aussi évidente, l'ACTH permet toutefois de maintenir un niveau élevé d'activité, maintenant aussi une capacité stéroïdogénique optimale (Simpson & Waterman, 1988). Dans ces mêmes lignées, l'ACTH ou un analogue synthétique, le dibutyryl AMPc, augmente la concentration de transcrits du cytochrome P450c11. Cette augmentation serait médiée par l'action directe de l'ACTH qui consisterait à induire la synthèse d'une protéine requise pour l'activation de l'expression du gène de P450c11 (Maliyakal *et al.*, 1985)

Des études portant sur la régulation des hydroxylases stéroïdiennes en réponse à un traitement à l'ACTH ou à l'AMPc révèlent que les niveaux de synthèse du P450scc, P45017 α , P450c21, P450c11, ADX et NADPH-cytochrome P450 réductase étaient augmentés plusieurs fois par de tels traitements. De plus, ces niveaux étaient corroborés par une augmentation du niveau des transcrits de ces protéines. À cet égard, l'action de l'AMPc pourrait se situer soit au niveau de l'augmentation de la transcription ou au niveau de la stabilité des ARNm.

Des études par *Northern* ont permis de détecter des niveaux de synthèse accrue des ARNm codants pour le P450scc, P45017 α , P450c21, P450c11, ADX. Ces résultats confirment que l'action de l'AMPc se situe au niveau de l'accroissement du niveau d'ARNm, et non au niveau de l'efficacité de traduction. Des études par *RUN-ON* et de marquage de l'ARN *in vivo* ont déterminé que le niveau de transcription des ARNm de chacune des protéines impliquées était augmenté alors que la demi-vie des transcrits n'était pas affectée, excepté dans le cas de l'ARNm du P450scc, où la demi-vie était augmentée de 4-5 fois.

Mais l'action de l'AMPc est-elle directe, ou est-elle médiée par des facteurs cellulaires. L'emploi de la cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, en conjonction avec celui de l'ACTH a permis de déterminer que l'action de l'AMPc était bloquée au niveau de l'augmentation de l'activité enzymatique et qu'elle était donc indirecte et médiée par certaines protéines labiles (Picado-Leonard *et al.*, 1988).

6.2 Régulation de la synthèse de l'aldostérone

La sécrétion de l'aldostérone dans la *zona glomerulosa* est régulée principalement par le système rénine-angiotensine ainsi que par les niveaux de sodium et de potassium sanguins (Okamoto & Nonaka, 1992; Shizuta *et al.*, 1992; White *et al.*, 1992; LeHoux & Tremblay, 1992; Shibata *et al.*, 1991; Rainey *et al.*, 1992). L'angiotensine II peut rapidement stimuler la sécrétion d'aldostérone en augmentant la mobilisation du cholestérol dans la *zona glomerulosa* de façon similaire à l'action de l'ACTH dans la *zona fasciculata* (Jefcoate *et al.*, 1992). Par contre, le système de transduction de signaux intracellulaires est différent de celui de l'ACTH (Rainey *et al.*, 1992; Kapas *et al.*, 1992). Chez des rats nourris avec une diète spéciale faible en sodium ou élevée en potassium, l'aldostérone plasmatique augmente de façon à maintenir un niveau normal d'électrolytes dans le sang (Shibata *et al.*, 1991). Une telle diète maintenue pendant plusieurs jours provoque une élévation de la quantité en cytochromes P450_{scc} et P450_{aldo} avec très peu de changement pour ce qui est du cytochrome P450_{c11}. Ces résultats suggèrent qu'une stimulation constante de l'activité au niveau de la *zona glomerulosa* provoque une augmentation significative de la capacité stéroïdogénique en augmentant le niveau des enzymes de la *zona glomerulosa*, et non de celles de la *zona fasciculata* (LeHoux & Tremblay, 1992; Shibata *et al.*, 1991).

6.2.1 Le système rénine-angiotensine-aldostérone

Les cellules situées dans les artérioles afférentes et efférentes (cellules juxtaglomérulaires du rein) sont les sites de synthèse et de relâchement de la rénine. Trois facteurs ont été identifiées comme régulateurs importants de la sécrétion de rénine. 1) L'artériole afférente agit comme barorécepteur. Quand la pression rénale de perfusion est réduite, la sécrétion de rénine est stimulée. 2) L'activité augmentée des fibres nerveuses

sympathiques qui innervent les artéριοles afférentes et efférentes stimulent le relâchement de rénine. 3) La *macula densa*, qui aide à réguler le niveau de filtration glomérulaire, contrôle probablement le niveau de rénine. Par exemple, si le niveau de NaCl délivré à la *macula densa* est diminué, la sécrétion de rénine augmente.

La rénine seule ne possède pas de rôle physiologique, elle fonctionne principalement comme enzyme protéolytique. Son substrat est une protéine circulante, l'angiotensinogène, produite par le foie. Celle-ci est clivée par la rénine pour donner un peptide de 10 a.a., l'angiotensine I. Celle-ci à son tour est clivée en un peptide acide de 8 a.a., l'angiotensine II, par une enzyme de conversion (vasoconstricteur puissant) trouvée en forte concentration dans les poumons. Ses rôles physiologiques importants sont: 1) La stimulation de sécrétion d'aldostérone par le cortex surrénalien, 2) la vasoconstriction artériolaire, 3) la stimulation de la sécrétion d'ADH et de la soif et 4) l'augmentation de la réabsorption du NaCl par les tubules proximaux. L'aldostérone est une hormone stéroïdienne possédant plusieurs actions importantes au niveau du rein. En regard à la régulation du volume extracellulaire (EC), l'aldostérone agit à réduire l'excrétion de NaCl en stimulant sa réabsorption par les tubes collecteurs et l'anse de Henlé.

L'aldostérone pénètre dans la cellule de la *zona glomerulosa* et se lie à son récepteur. Ce complexe interagit avec des sites de liaison spécifiques sur l'ADN pour stimuler la transcription et donc la synthèse de certaines protéines. Certaines de ces protéines nouvellement synthétisées pourraient être des canaux sodiques apicaux, des enzymes nécessaires à la synthèse d'ATP et de Na⁺-K⁺-ATPase. Par ces actions, l'entrée de sodium *via* la membrane apicale est augmentée autant que l'exclusion de sodium *via* la membrane basolatérale au travers de la cellule.

Lors d'une hypovolémie causée par une hémorragie par exemple, la concentration d'aldostérone augmente de près de 4 fois chez l'homme. Les cellules juxtaglomérulaires et la *zona glomerulosa* forment un système de rétro-inhibition pour défendre le volume de fluide EC. D'autres facteurs, comme ceux qui affectent la production de rénine, affectent de façon indirecte la production d'aldostérone. Les stimulations β -adrénergiques du rein, en réponse à une hypovolémie, augmentent la sécrétion de rénine, donc d'aldostérone. Certaines

prostaglandines produites à même le rein augmentent le relâchement de rénine. L'ANP diminue la sécrétion de l'aldostérone.

Les myocytes de l'atrium cardiaque produisent une hormone peptidique qui induit l'excrétion de l'eau et du sel par le rein. Cette hormone composée de 28 a.a. est appelée peptide natriurétique atriale (ANP). L'ANP est produite en réponse à un stress, celui qui se produit lorsque le volume EC est augmenté. En général, l'ANP est un peu l'antagoniste des effets provoqués par le système rénine-angiotensine. L'action de l'ANP incluent ceux-ci: 1) L'ANP augmente l'excrétion rénale et extrarénale de l'eau et du sel, 2) l'ANP dilate les artérioles afférentes et efférentes et par le fait même augmente le niveau de filtration glomérulaire et donc le niveau de filtrat en sels, 3) l'ANP inhibe directement la réabsorption du NaCl par le tube collecteur et indirectement inhibe la réabsorption du NaCl par le tube collecteur par son action sur le système rénine-angiotensine, 4) l'ANP réduit le niveau d'aldostérone sanguin en inhibant le relâchement de rénine et en inhibant de façon directe la sécrétion d'aldostérone au niveau du cortex surrénalien et 5) l'ANP augmente l'excrétion de l'eau, parce qu'il inhibe la sécrétion de l'ADH.

L'aldostérone participe aussi par rétro-contrôle à l'équilibre du potassium. L'aldostérone facilite le passage du potassium du liquide EC et de façon concordante, le potassium est un important stimulateur de la sécrétion d'aldostérone. Le potassium joue un rôle direct sur la *zona glomerulosa* en dépolarisant les membranes cellulaires. Cette action permet un influx de calcium et permet l'activation de la biosynthèse de l'aldostérone.

La sécrétion d'aldostérone est aussi stimulée par l'ACTH, mais cet effet n'est efficace qu'après quelques jours de stimulation. La réponse modérée est probablement attribuable à la diminution appropriée compensatoire dans le niveau de rénine et à l'augmentation dans le relâchement de l'ANP, puisque le sodium est retenu et il y a augmentation du volume de fluide EC. Le rôle physiologique de l'ACTH dans la régulation du taux d'aldostérone apparaît comme étant restreint à un rôle tonique; lorsque l'ACTH est déficient, la réponse au stimulus primaire de diminution de sodium est diminuée.

7. LA 19-HYDROXYLATION PAR LE CYTOCHROME P450c11

Il est connu déjà que l'élimination du groupement méthyle en position 19 d'un noyau stéroïdien affecte ses propriétés biologiques et chimiques comparativement au composé parent (Kagawa *et al.*, 1957; Wynne *et al.*, 1980). Cette élimination se produit selon une série d'oxydations successives, passant du composé 19-méthyl à celui de 19-alcool, 19-aldéhyde et 19-acide. Ce dernier est finalement décarboxylé pour donner le composé 19-nor-stéroïde (Wiseman *et al.*, 1992). La DOC est métabolisée de cette façon pour former le composé 19-nor-désoxycorticostérone (19-nor-DOC), un minéralocorticoïde potentiellement impliqué chez certains types d'hypertension (Melby *et al.*, 1984-1985; Gomez-Sanchez *et al.*, 1979). Chez les rats SHR (rats spontanément hypertensifs), l'excrétion urinaire de 19-nor-DOC augmente rapidement peu avant le développement de l'hypertension vers l'âge de 8 semaines (Dale *et al.*, 1982).

La corticostérone, l'aldostérone et la 19OH-DOC (le précurseur de la 19-nor-DOC) ont un précurseur commun, la DOC. Les étapes déterminantes de la biosynthèse de ces trois stéroïdes se situent en position C-11 β , C-18 et C-19 respectivement. Ces réactions se produisent sur des carbonés qui, dans l'espace, sont très rapprochés les uns des autres sur la molécule de DOC. Ce rapprochement fait qu'il est possible qu'une seule enzyme soit responsable de ces trois hydroxylations (Rapp & Dahl, 1976).

La 19OH-DOC a d'abord été isolée de glandes surrénales de boeuf et de porc (Mattox, 1955; Neher & Wettstein, 1956; Levy & Kushinsky, 1955). Ce même composé a aussi été retrouvé dans le milieu d'incubation de capsules de surrénales de rats en régénération 3-4 jours après l'énucléation (Dale *et al.*, 1980) et de la 19-nor-DOC a été identifiée dans l'urine de rats avec des glandes surrénales en régénération (Gomez-Sanchez *et al.*, 1979). Une telle énucléation des glandes surrénales de rats provoque une hypertension liée à une régénération de la glande (Skelton, 1959; Melby *et al.*, 1983) et la possibilité qu'un minéralocorticoïde autre que l'aldostérone, peut-être la 19-nor-DOC, soit à l'origine de cette hypertension a été suggérée. Il a été démontré que la 19-nor-DOC pouvait être un minéralocorticoïde puissant dans des essais de rétention de sodium chez le rat (Kagawa &

Van Arman, 1957). Ces auteurs ont aussi remarqué la présence de sous-produits de DOC comme la 19OH-DOC, la 19-oxo-DOC et la 19-oic-DOC dans les surrénales de rats intactes et sous régénération. Puisque la 19-nor-DOC n'a pas été retrouvée comme telle dans les surrénales, il a été proposé que sa synthèse pourrait se faire aux sites d'actions du stéroïdes *via* l'un de ses précurseurs mentionnés (Melby *et al.*, 1983).

Le métabolisme de la 11-désoxycorticostérone (DOC) dans les mitochondries de surrénales de hamster produit la 19OH-DOC et la corticostérone (fig. 4) dans des proportions quasi-identiques (Wiseman *et al.*, 1992). Comme ce ratio de 19-hydroxylation sur 11-hydroxylation demeure inchangé malgré la présence d'un surplus de substrat ou d'un inhibiteur compétitif, les auteurs concluent qu'une seule enzyme catalyse les deux réactions. Depuis la purification de la 11 β -hydroxylase (P450c11) bovine, il a été démontré que ces trois activités hydroxylases se retrouvent sur la même enzyme dans la *zona fasciculata* (Momi *et al.*, 1983). Le cytochrome P450c11 de surrénales bovines peut hydroxyler la DOC à la position C-19, mais cette voie est de moindre importance. Drummond *et al.* (1988) ont démontré récemment que la 11- et la 19-hydroxylation de la DOC est accomplie en proportion similaire par une seule enzyme surrénalienne chez la gerboise.

En présence de mitochondries de surrénales de hamster, la 19-OH-DOC est oxydée pour donner la 19-oxo-DOC. Cette oxydation serait médiée par un cytochrome P450 puisqu'elle requiert la présence de NADPH. Ce même type de réaction est réalisée par le cytochrome P450c11 bovin et porcin au niveau de la 18OH-corticostérone pour former le composé 18-oxo-corticostérone, soit l'aldostérone (Yanagibashi *et al.*, 1986). La 19-oxo-DOC est métabolisée par la suite pour donner la 19-oic-DOC. La décarboxylation de ce dernier semble se produire en dehors de la glande, puisque la 19-nor-DOC n'est pas retrouvée dans les surrénales de rats (Gomez-Sanchez *et al.*, 1982). La présence d'un produit supplémentaire dans les surrénales de hamsters, la 19-nor-corticostérone, a été décelée par Dale *et al.* (1985). Il est possible alors que la 19-nor-corticostérone soit issue de la 19-oic-DOC *via* sa décarboxylation (19-nor-DOC) et son hydroxylation subséquente en position C-11, mais sa cinétique de formation suggère plutôt qu'elle est directement formée de la 19-oxo-DOC sans intermédiaire (Wiseman *et al.*, 1992). Il serait probable alors que le système de

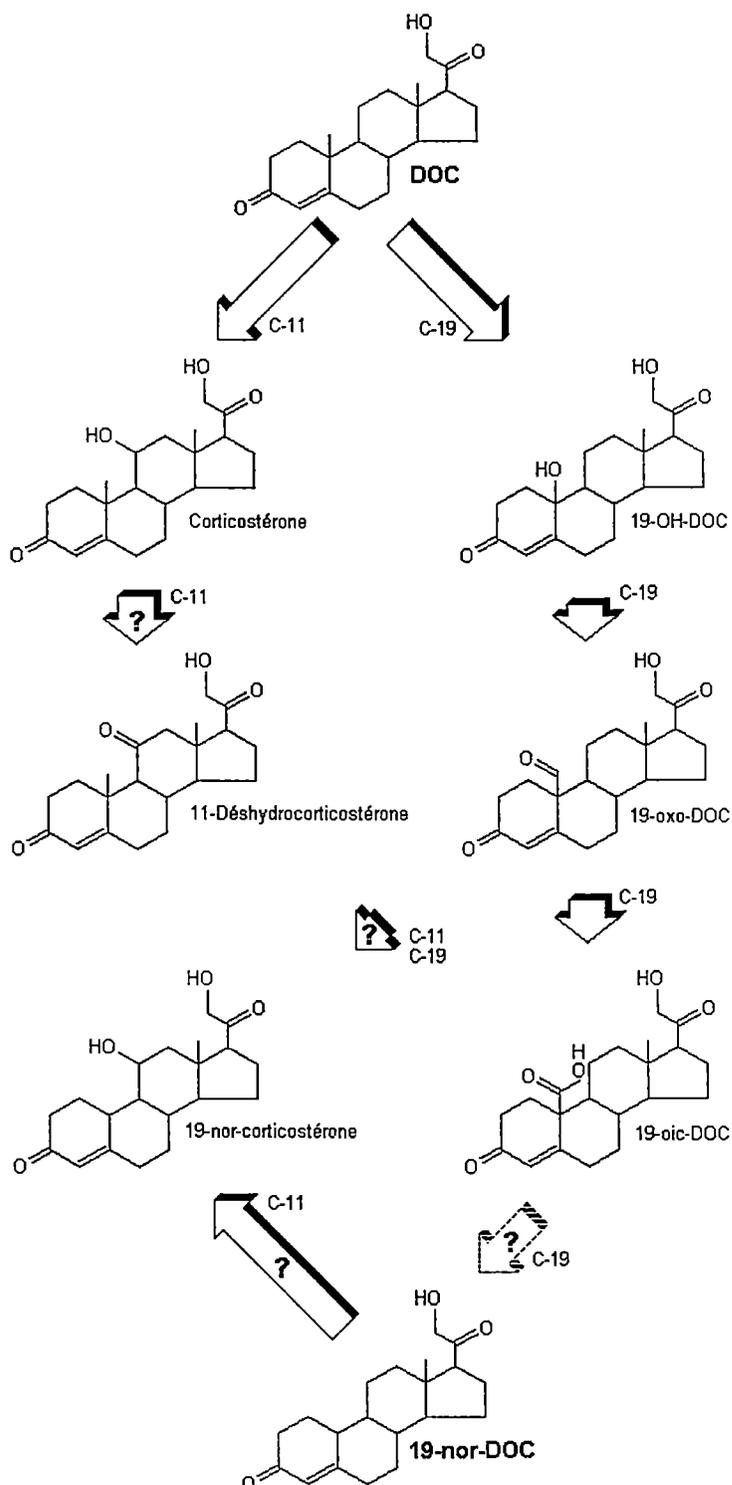


Figure 4. Schéma de l'activité 11- et 19-hydroxylase du cytochrome P450c11 de hamster. La longueur des flèches représente le taux de conversion. Les "?" signifient que l'enzyme responsable de la réaction n'est pas identifiée. Les carbones impliqués sont indiqués. (adapté de Wiseman *et al.*, 1992)

19-hydroxylase de la surrénale de hamster soit conçu pour produire la 19-nor-corticostérone plutôt que la 19-nor-DOC. Cela n'aurait rien d'étonnant car il a été démontré que la 19-nor-corticostérone possède aussi des effets minéralocorticoïdes (Wynne *et al.*, 1980; Schiff, 1984).

La 19-nor-DOC a été synthétisée il y a déjà 25 ans, mais ses applications physiologiques n'ont été découvertes que récemment. Kagawa & Van Arman (1957) ont démontré que l'activité de rétention du sodium de la 19-nor-DOC était de 2 à 5 fois celle de la DOC elle-même et possède plus d'affinité que l'aldostérone pour les récepteurs rénaux à minéralocorticoïdes (Funder *et al.*, 1978).

8. EXPRESSION HÉTÉROLOGUE

L'utilisation d'un système d'expression hétérologue pour étudier les aspects structuraux et fonctionnels de différentes formes de P450 a été très exploitée ces dernières années. Un aspect important à considérer est la faible interférence de P450 endogène. Les levures, cellules d'insectes et la bactérie *E.coli* rencontrent ces exigences. De plus, différents systèmes de cellules eucaryotes ont été trouvés efficaces pour ces besoins, et la transformation et infections virales de ces cellules est devenue technique courante dans l'étude des P450s.

8.1 Expression dans les bactéries *E.coli*

E.coli est un organisme désirable pour l'expression hétérologue de protéines en rapport avec sa facilité de manipulation, la disponibilité de multiples vecteurs d'expression et de clonage, sa génétique plus que connue et le coût associé à sa culture est des plus faibles. L'expression de protéines membranaires dans les bactéries n'a pas connu d'aussi bon rendements que l'expression de protéines cytosoliques, ceci étant probablement dû au déficit de membranes intracellulaires dans lesquelles ces protéines hydrophobes peuvent s'accumuler. Alors qu'une protéine soluble peut représenter à elle seule plus de 30% des protéines totales, des protéines membranaires ne constituent pas plus de 1% des protéines totales. Le seul avantage à en tirer est que la ségrégation de ces protéines au niveau de la membrane interne constitue un moyen efficace au niveau des premières étapes de purification de la protéine, lors de la fractionnement subcellulaire.

8.2 L'emploi de vecteurs d'expression

Un des points importants à souligner au moment d'exprimer une protéine dans les bactéries est la recherche d'un vecteur approprié. Ce dernier sera recherché en fonction d'y retrouver un promoteur fort ainsi qu'un plasmide à haut rendement de réplifications. Une bonne combinaison se retrouve chez un vecteur qui possède un promoteur de fusion *trp-lac* comme *trc* ainsi qu'une origine de répllication comme pUC. Un facteur important à considérer est la possibilité d'induction *via* un promoteur qui se retrouve réprimé de façon constitutive, mais qui peut être induit lorsqu'approprié.

9. INTÉRÊT DES TRAVAUX PRÉSENTÉS DANS CE MÉMOIRE

Afin d'étudier les facteurs de contrôles impliqués dans la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes, ce projet avait comme mission primaire d'identifier des régions spécifiques du promoteur des gènes *CYP11B1* et *CYP11B2* du hamster responsables de la régulation de ces gènes. Or, un dérèglement au niveau des mécanismes de régulation qui entrent en jeu lors de la synthèse des hormones stéroïdiennes peut entraîner différents problèmes graves. C'est en effet le cas de certaines pathologies chroniques, comme le syndrome de Conn ou celui de Cushing, qui originent d'une surproduction d'aldostérone et de cortisol, respectivement. Or, comment ne pas orienter nos études au niveau des enzymes responsables des dernières étapes de formation de ces différents composés ?

Malheureusement, il a été impossible d'isoler un clone d'ADN génomique d'une librairie commerciale possédant les séquences caractéristiques du gène *CYP11B1*. Puisque beaucoup d'efforts et de temps avaient été investis à tenter d'isoler ces deux gènes dans leur entité, l'accent a plutôt été orienté vers la surexpression des deux cytochromes du hamster. La surexpression de ces deux protéines dans un système bactérien avait été tentée par plusieurs équipes, mais aucune n'avait vraiment réussi à en produire de grosses quantités sous une forme stable et active. Le défi tient toujours.

Il a été nécessaire de se tourner vers un système d'expression plus conventionnel, soit l'expression dans les cellules COS. Ce système est beaucoup mieux adapté pour l'expression

de P450s eucaryotes puisque les cofacteurs que nécessitent les deux cytochromes sont compatibles avec ceux des cellules COS, de source rénales. De cette façon, il était possible d'étudier la spécificité fonctionnelle de chacune des protéines, mais d'abord, cela confirmerait que les ADNc isolés correspondaient bien à ceux des cytochromes P450c11 et P450aldo du hamster. Pourquoi étudier la stéroïdogénèse chez le hamster? Parce que ce dernier est en fait un modèle animal qui se compare avantageusement, plus que le rat ou le boeuf, à l'humain. Comme ce dernier, le hamster synthétise le cortisol comme principal glucocorticoïde, contrairement au rat ou à la souris qui utilisent la corticostérone comme glucocorticoïde majeur. D'après certaines études préliminaires qui tendent à être confirmées par cette présente étude, le hamster semble pouvoir exprimer les cytochromes P450c11 et P450aldo. Un facteur important qui rapproche le hamster de l'humain est la présence de l'activité de 19-hydroxylase, associée au cytochrome P450c11, qui se ferait à des niveaux semblables à l'activité 11 β -hydroxylase. Comme mentionné précédemment, il semble que cette activité soit responsable de la présence des produits 19-OH-DOC et ses dérivés, reconnus pour leur implication au niveau de certains types d'hypertension chez l'humain.

En résumé, les résultats obtenus nous ont permis de dissocier de façon très nette l'activité enzymatique de chacune des protéines chez le hamster. La 19-hydroxylation est vraiment le fruit du cytochrome P450c11 à des niveaux comparables à l'activité 11 β -hydroxylase tandis que l'aldostérone n'est synthétisée que par le cytochrome P450aldo.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. VECTEURS DE CLONAGE ET D'EXPRESSION

1.1 Vecteur dérivé de bactériophage

1.1.1 Lambda DASH®II

Conçu pour permettre la cartographie de restriction et le *chromosome walking* sans sous-clonage, le vecteur Lambda DASH®II (Stratagène, La Jolla, CA) accepte des inserts d'ADN génomique de 9 à 23 kb (fig. 5). La région d'insertion est délimitée par le site de restriction *NotI* et est flanquée des promoteurs T3 / T7.

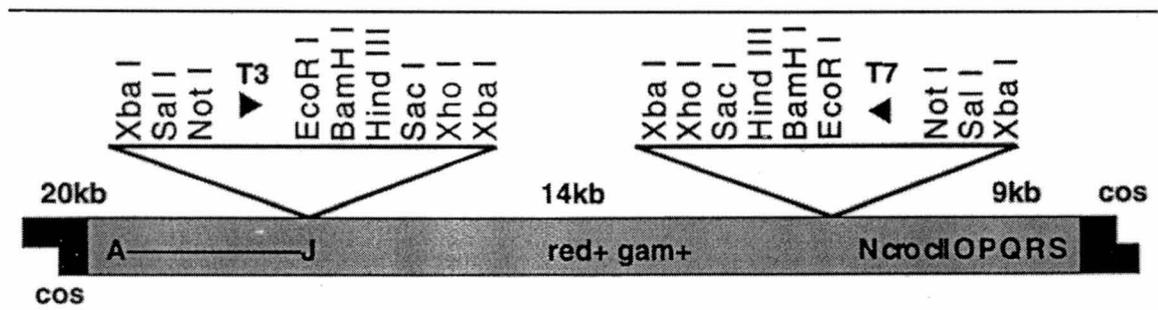


Figure 5. Schéma du vecteur phagique Lambda DASH®II

1.2 Vecteurs plasmidiques procaryotes

1.2.1 pBluescript II KS⁺/SK⁺

Le phagemide pBluescript II (Statagene) est dérivé du plasmide pUC et du phage filamenteux M13 (fig. 6). Plusieurs sites de restriction créent le site de clonage multiple et son origine de réplication lui procure un très haut niveau de réplication.

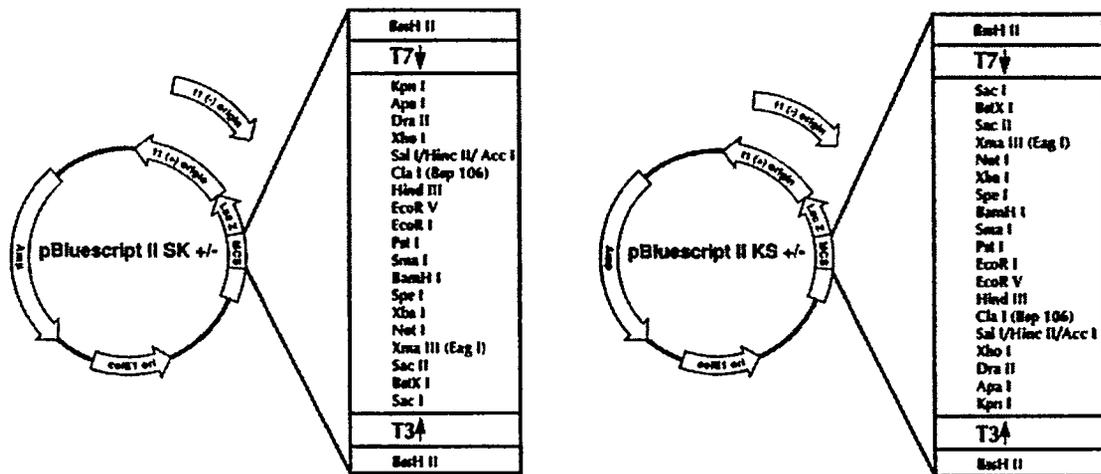


Figure 6. Schéma descriptif des vecteurs pBluescript KS et SK. La signification des attributions SK ou KS se trouve dans l'orientation du site de sous-clonage multiple, délimitée par les séquences T3 et T7. Les signes (+) et (-) indiquent l'orientation de l'origine de réplication *f1*.

1.3 Vecteurs plasmidiques eucaryotes

1.3.1 pSVL

Le plasmide pSVL (Pharmacia) est conçu pour une expression transitoire de haut niveau dans les cellules eucaryotes (fig. 8). Les gènes insérés sont exprimés dès le premier ATG grâce au promoteur tardif de SV40. Les transcrits sont épissés et polyadénylés par l'utilisation des signaux VP1 de SV40. Ainsi, le plus haut niveau d'expression sera retrouvé chez les cellules pouvant exprimer l'antigène grand T de SV40.

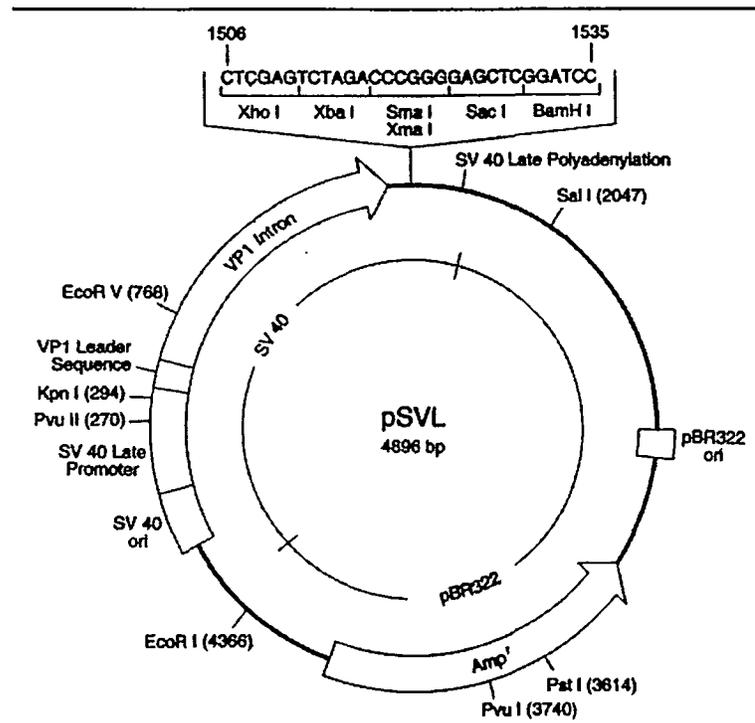


Figure 8. Schéma descriptif du vecteur pSVL

1.3.2 pRc/CMV

Le vecteur pRc/CMV (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) est conçu pour des hauts niveaux d'expression transitoire ou stable de protéines recombinantes dans des cellules eucaryotes (fig. 9). Il permet des hauts niveaux de transcription grâce aux séquences promotrices du gène précoce du cytomégalo virus humain (CMV). Il possède des signaux de polyadénylation et des séquences de terminaison de la transcription provenant du gène de l'hormone de croissance bovine (bGH). Un gène de résistance à la néomycine permet la sélection de lignées stables résistantes au G418.

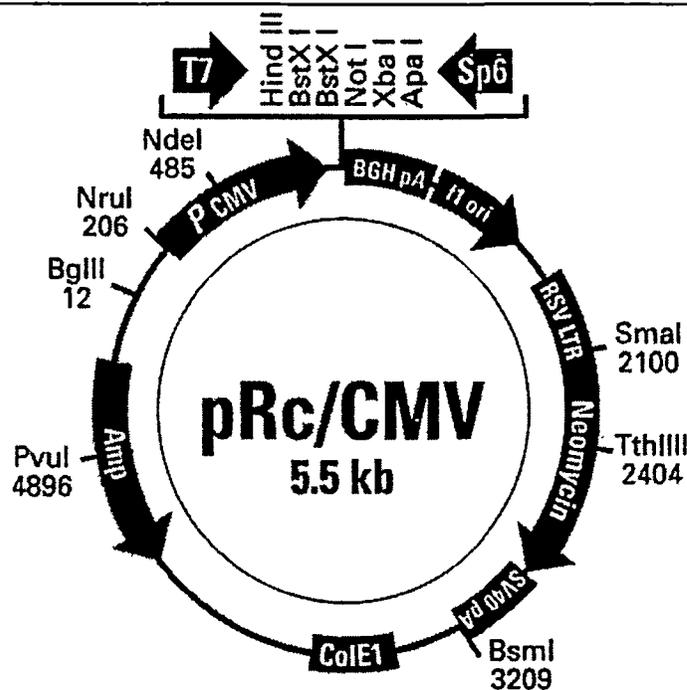


Figure 9. Schéma descriptif du vecteur pRc/CMV. À remarquer la présence du gène de résistance à la néomycine ainsi que la présence de séquences promotrices procaryotes (T7 et Sp6) et eucaryotes (CMV)

1.3.3 pCMV5

Le vecteur pCMV5 (Dr Mark Stinski, Dept of Microbiology, Univ. of Iowa, IA) partage quelques particularités intéressantes avec le vecteur pRc/CMV, mais la sélection des lignées stables ne peut tirer profit du gène *NEO*, absent chez pCMV5 (fig. 10).

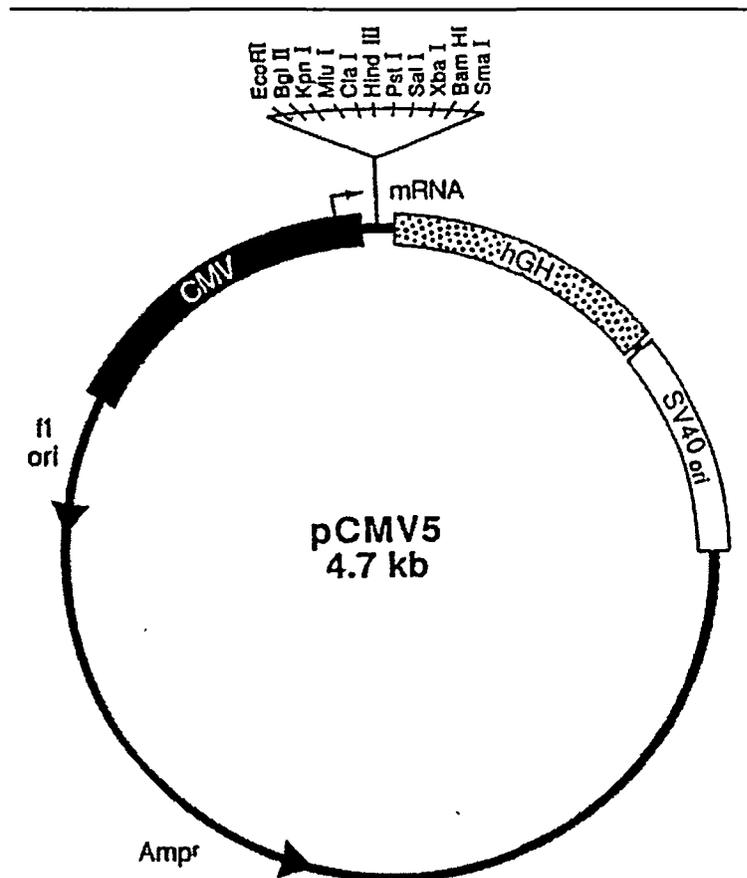


Figure 10. Schéma descriptif du vecteur pCMV5. Simple, mais efficace, ce vecteur possède un promoteur eucaryote CMV, mais ne contient pas de séquences T3, T7 ou Sp6 ni de gène de résistance pour la transfection stable.

1.4 Caractéristiques générales des vecteurs utilisés

Voir le tableau I à la page suivante.

TABLEAU I: Caractéristiques générales des vecteurs utilisés

Caractéristiques		Vecteurs					
		λ DASH II	pBluescript	pKK223.3	pSVL	pRc/CMV	pCMV5
Vecteur de remplacement procaryote		✓					
Plasmide d'insertion/d'expression procaryote				✓			
Phagemide d'insertion/d'expression procaryote			✓				
Plasmide d'insertion/d'expression eucaryote					✓	✓	✓
Criblage d'ADN		✓					
Cartographie de restriction/ <i>genomic walking</i>		✓	✓				
Promoteurs de transcription	T3 / T7	✓	✓				
	T7 / SP6					✓	
	<i>tac</i>			✓			
	CMV					✓	✓
	SV40 tardif				✓		
Marqueur de sélection procaryote: Ampicilline			✓	✓	✓	✓	✓
Marqueur de sélection eucaryote: Néomycine						✓	
Production d'ADN simple-brin			✓			✓	
Sélection de colonies recombinantes "bleu/blanc"			✓				
Expression (régulation): (C)onstitutive/(I)nductible			C	I	C	C	C
Expression (réplication): transitoire/intégration					✓	✓	✓
Signaux d'épissage/polyadénylation de l'ARN					✓	✓	✓

2. ANIMAUX

Des hamsters Golden Syriens mâles d'environ 8 semaines et pesant environ 150 g chacun sont utilisés. Les animaux provenant d'une colonie commerciale (5 par cage) sont maintenus dans des conditions fixes de température (26°C) et de lumière-noirceur (12 h) et sont nourris *ad libitum*. Le protocole expérimental utilisant les animaux a été approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de médecine.

2.1 Diètes

Les animaux sont maintenus sur une diète commerciale restreinte en sodium (<0.01 mEq Na⁺/g; ICN Biochemicals, Cleveland, OH) avec de l'eau déminéralisée comme boire pendant une période de 5 jours dès leur acquisition.

2.2 Décapitation

A la fin de la durée des traitements, 10 hamsters sont sacrifiés par décapitation le matin et les glandes surrénales sont rapidement retirées, libérées de tout tissu adipeux et recueillies pour l'isolation de l'ARN_{total}. Des morceaux de foie sont aussi recueillis pour la construction d'une banque d'ADN génomique.

3. VECTEURS VIRAUX, BACTÉRIENS & CELLULAIRES

3.1 Phage lambda (λ)

L'utilisation du phage λ comme vecteur d'insertion découle de la possibilité de remplacer la portion centrale de son génome par de l'ADN exogène sans que cela n'affecte sa croissance lytique. Campbell (1971) a démontré que la région située entre les gènes J et N pouvait être remplacée par des segments du génome de *E. coli* sans affecter la progression lytique du phage. De plus, grâce au génie génétique, il a été possible de sélectionner des mutants actifs de λ dont certains sites de restrictions avaient été modifiés pour en diminuer le nombre et rendre ainsi possible le sous-clonage en des endroits précis de fragments d'ADN compatibles (Frischauf *et al.*, 1983; Karn *et al.*, 1984).

3.2 *Escherichia coli*

La souche bactérienne JM105 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) est utilisée pour ses caractéristiques suivantes. JM105 (Pharmacia) possède la délétion $\Delta(lac-proAB)$ qui affecte

le segment chromosomique couvrant l'opéron *lac* ainsi que des gènes voisins codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la proline. JM105 est donc incapable d'utiliser le lactose comme source de carbone et requiert la proline pour sa croissance. L'épisome F' de JM105 porte la mutation *lacZ*ΔM15, une délétion impliquant les séquences du gène *lacZ* codant pour la portion NH₂-terminale de l'enzyme β-galactosidase. Cet épisome porte aussi la mutation *lacI*^q, un mutant du gène *lacI* qui synthétise environ 10× plus du répresseur que le gène non altéré. Cette surproduction de répresseur abaisse encore plus le déjà faible niveau de transcription de l'opéron *lac* en absence d'inducteur. L'épisome F' porte aussi les séquences *proAB* codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la proline, présentes pour contrer la délétion chromosomique Δ(*lac-proAB*). De cette façon, le maintien de l'épisome F' dans la souche est garantie. Le promoteur *tac* (de Boer, 1983) présent sur le vecteur inséré chez JM105 est un hybride entre les promoteurs *lac* et *trp* et est régulé par le répresseur *lac*. Ce promoteur *tac* peut être induit par l'ajout d'IPTG 1mM final.

3.3 Cellules COS

Les cellules COS-1 (Gluzman, 1981) sont des cellules de reins de singes verts africains immortalisées par un mutant du virus SV40 dont l'origine de réplication avait été rendue inutilisable. Cette transformation a permis l'intégration d'une seule copie de la région précoce de l'ADN de SV40 dans le génome cellulaire. Les cellules COS expriment donc l'antigène grand T de SV40 requis pour la réplication virale. Ainsi, n'importe quel plasmide transfecté de façon transitoire et qui contient l'origine de réplication de SV40 sera capable de se répliquer dans la cellule (Clark & Waterman, 1991). L'expression avec un tel vecteur est transitoire puisqu'une cellule peut accumuler jusqu'à 10⁵ copies du plasmide avec l'origine de réplication SV40 (Mellon *et al.*, 1981) après quoi la cellule meurt. Peut-être parce qu'elle ne peut plus tolérer la présence d'un aussi grand nombre d'ADN extrachromosomique se répliquant constamment.

Le système NADPH-cytochrome P450 réductase, l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase sont tous exprimés de façon constitutive chez les cellules COS et peuvent interagir fonctionnellement avec des cytochrome P450 exprimés de façon transitoire, qu'ils soient

d'origine microsomaux ou mitochondriaux (Zuber *et al.*, 1986).

4. CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADN GÉNOMIQUE

Une banque d'ADN génomique a été utilisée pour isoler les gènes *CYP11B1* et *CYP11B2* chez le hamster. Cette librairie a été réalisée par la compagnie Stratagene par insertion de fragments d'ADN génomique de hamster digérés partiellement avec *EcoRI*, dans le vecteur phagique Lambda DASH™II. La taille des inserts d'ADN varie de 19 à 23 kb.

4.1 Détermination du titre

Le titre, ou nombre d'unités générant la lyse bactérienne (pfu) par unité de volume de suspension de phage se détermine approximativement par dilutions multiples des phages dans du tampon SM¹. Des concentrations croissantes (10^{-8} à 10^{-1} max) de phages sont ajoutées à 200 µl de cellules hôtes *E.coli* (souche SRB, Stratagene) diluées à $DO_{600} = 0.5$ dans du $MgSO_4$ 10mM. Ces bactéries sont issues d'une culture O/N dans un milieu enrichi NZY-MM (tableau II). Une fois infectées, les bactéries sont étalées sur pétri (NZY/agar 1.5%) en présence de 3 ml de top agar (NZY/agarose 0.7%) pré-chauffé à 48°C. Après une période de 16 h à 37°C, le nombre de plaques de lyses apparues permet de rendre compte du titre de la solution originale.

4.2 Criblage de la banque (ordre I)

L'utilisation de 4 pétris carrés de 530 cm² de surface chacun permet le criblage d'environ 6×10^5 pfu (voir tableau III). Suite à l'apparition de plaques de lyse confluentes, les pétris sont refroidis 2 h à 4°C.

L'identification des plaques de lyse positives nécessite d'abord leur transfert par capillarité sur membranes de nylon HyBond N⁺ (Amersham, UK). Deux membranes sont d'abord appliquées successivement sur l'agar pendant 3 et 5 min pour la première et la deuxième membrane, respectivement. La position exacte des membranes sur l'agar est notée en transperçant membrane et agar à l'aide d'une aiguille (21G) imbibée d'encre de Chine.

¹ Tampon SM: NaCl 0.1M, $MgSO_4$ 8mM, Tris-Cl 50mM (pH 7.5) et gélatine 0.01%

TABLEAU II. Composition des milieux de croissances bactériens

Milieu	Composition (1 litre)
LB	Bacto-Tryptone 10g, extrait de levure 5 g et NaCl 171mM
NZY	NZ Amine (ICN) 10g, extrait de levure 5 g et NaCl 86mM
NZCYM	NZY + acides casaminés 1 g et MgSO ₄ 10mM (pH 7.0)
SOC	Bacto-Tryptone 20g, extrait de levure 5g, NaCl 9mM, KCl 2.5mM, MgCl ₂ 10mM et glucose 20mM (pH 7.0)
DYT	Bacto-Tryptone 16g, extrait de levure 10 g et NaCl 86mM
TB	Bacto-Tryptone 12g, extrait de levure 24g, glycérol 0.4% (v/v), 17mM KH ₂ PO ₄ et 72mM K ₂ HPO ₄ (Tartof & Hobbs, 1987)
+ MM	Additionné de maltose 0.2% et MgSO ₄ 10mM.
+ Amp	Additionné d'ampicilline (liquide, 50 µg/ml; pétri, 100 µg/ml)

L'ADN encapsidé est libéré en déposant les membranes, la surface de contact vers le haut, sur une solution dénaturante² pendant 7 min. Une seconde solution neutralise ensuite les membranes pendant 3 min alors qu'un rinçage dans la dernière solution conditionne la membrane pour les étapes ultérieures d'hybridation. L'ADN ainsi libéré est ensuite lié de façon covalente sous l'effet des radiations *UV* dans un appareil Stratalinker (Stratagene).

4.3 Criblage d'ordre II, III et IV

Suites aux étapes d'hybridation, de lavages et d'exposition des membranes, les autoradiogrammes d'un même pétri sont superposés et comparés. Un signal apparaît positif s'il se manifeste au même endroit sur chacun des films.

Les signaux positifs sont rapportés sur le pétri de lyse correspondant et une région de

² Solutions dénaturante (NaCl 1.5M/NaOH 0.5M), neutralisante (NaCl 1.5M/Tris-Cl 0.5M à pH 8.0) et de rinçage (SSC 2×/Tris-Cl 0.2M à pH 7.5)

20 mm² d'agar (*clug*) est retirée et resuspendue dans 0.5 ml de SM + 20 µl de CHCl₃. Le criblage d'ordre II consiste à cribler les phages libérés du *clug* du criblage d'ordre I suivant les mêmes procédures. Il est réalisé en utilisant un pétri de 10 cm par *clug* retenu. Au criblage d'ordre II, le rapport pfu/surface est restreint suffisamment pour permettre une meilleure isolation des plaques de lyse (3000-5000 pfu/pétri de 10 cm). Une région de seulement 5 mm² d'agar peut suffire à isoler une dizaine de populations de phages différents. Le criblage d'ordre III se poursuit en diminuant le rapport pfu/surface à environ 250-500 pfu/pétri et au besoin, un criblage d'ordre IV sera nécessaire pour l'obtention de pétris de lyse à population homogène de phages, suffisamment répartis pour permettre l'isolation d'une seule plaque positive, soit une surface de seulement 1-2 mm².

TABLEAU III. Spécifications techniques pour le criblage d'ordre I

Pétri	Diamètre	Surface	<i>E.coli</i> à DO ₆₀₀ = 0.5	Top agar	Pfu à confluence
Rond	10 cm	60 cm ²	0.2 ml	3 ml	17 500
Carré	23 cm × 23 cm	530 cm ²	1.8 ml	30 ml	150 000

5. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE L'ADN

5.1 Isolation de l'ADN de phages λ

L'extraction de l'ADN encapsidé débute par une étape de pré-amplification du phage λ (Sambrook *et al.*, 1989). Cette étape nécessite la préparation d'un tapis de lyse cellulaire sur pétri, soit environ 25 000 pfu par pétri de 10 cm. L'ajout dans le pétri de 6 ml de solution SM additionné de 1.7% CHCl₃ permet au phage de s'y accumuler pendant 16 h avec agitation rotative horizontale.

L'étape d'amplification en milieu liquide est basée sur la méthode de Yamamoto *et al.* (1970). Des quantités pré-déterminées de phages sont ajoutées à 35 ml d'une culture de cellules SRB (milieu NZCYM) au moment où la DO₆₀₀ atteint 0.5. L'incubation se poursuit à 37°C avec agitation jusqu'à la lyse totale des bactéries. La limpidité du milieu de

croissance fournit un indice fiable du niveau de lyse. Celle-ci doit survenir entre 3 et 5 h après l'ajout des phages pour un meilleur rendement. La lyse est complétée par ajout de 0.7 ml de CHCl_3 avec agitation de 15 min. Le CHCl_3 est retiré par décantation et remplacé par 35 μg de DNase I et 35 μg de RNase A pour 30 min à température de la pièce ($T^\circ\text{P}$). La concentration en NaCl est ensuite ajustée à 1M et le milieu est placé sur glace pendant 15 min. Une fois la solution débarrassée de ses débris cellulaires par centrifugation à 11 000 \times g pendant 10 min, l'addition de 7 ml d'une solution de PEG 8000 60% permettra au phage de précipiter à 4°C pendant 16 h. Le culot de phage sédimenté par centrifugation dans des conditions similaires est resuspendu dans 0.8 ml de SM. Le matériel génétique est libéré de la capsidie par addition d'une solution de protéinase K³. L'enzyme agit alors 1 h à 56°C après quoi l'ADN est purifié par extractions successives au phénol, au phénol: CHCl_3 1:1 et au CHCl_3 . L'ADN forme un flocculent visible aussitôt après l'addition de 2 volumes d'EtOH absolu à -20°C. L'ADN est retiré et transféré dans une solution d'éthanol 70%. De cette façon, il est possible de recueillir plus de 1 mg d'ADN de haut poids moléculaire.

5.2 Isolation de l'ADN de tissu eucaryote

La technique utilisée s'apparente de celle de Blin & Stafford (1976). Un gramme de foie de hamster est broyé avec un pilon dans un mortier rempli d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Une suspension, composée du broyat saupoudré sur 15 volumes de tampon de lyse⁴ est incubée à 37°C pendant 1 h avec agitation très lente. La protéinase K, ajoutée à une concentration finale de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et laissée 16 h à 50°C sur plaque rotative lente, libère l'ADN des nucléoprotéines. Plusieurs extractions successives au phénol/ CHCl_3 seront nécessaires à l'élimination des protéines du milieu. L'ajout de 2 volumes d'EtOH provoque la précipitation de l'ADN dans la solution additionnée de NaOAc 0.15M. La resuspension de l'ADN dans du TE (Tris-Cl 10mM à pH 8.0 et EDTA 1mM) nécessite tout près de deux jours avec agitation continue à 37°C.

³ SDS 7.5%, EDTA 0.3M (pH 8) et protéinase K 0.75 mg/ml

⁴ Tampon de lyse: NaCl 0.1M, Tris-Cl 10mM (pH 8), EDTA 0.1M (pH 8), SDS 0.5% et 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase pancréatique

6. DIGESTION DE L'ADN PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION

6.1 Emploi d'enzymes de restriction

Certaines règles s'appliquent lors de l'emploi d'enzymes de restriction.

- a) En général, environ 3 unités d'enzymes suffisent par μg d'ADN.
- b) Dans le milieu réactionnel, une concentration en glycérol excédant 5% risque de nuire au rendement de l'enzyme ou à sa spécificité à reconnaître sa séquence consensus.
- c) Généralement, des temps de digestions de 1½ h environ pour de l'ADN plasmidique ou plus long pour de l'ADN génomique permettent une digestion complète.

7. SÉPARATION DE BRINS D'ADN PAR ÉLECTROPHORÈSE

7.1 Gel d'agarose

L'ADN génomique de haut poids moléculaire non digéré nécessite une concentration de gel et un voltage appliqué très faible, soit agarose 0.3% et une tension de 40V (Sambrook *et al.*, 1989). Pour l'ADN plasmidique ou des fragments d'ADN digérés, la migration se fait ordinairement dans un gel d'agarose 0.7% à 1% avec une tension de 90 à 120 V à température pièce dans du tampon TAE 1× (Tris-OAc 40mM et EDTA 1mM) ou TBE 0.5× (Tris-borate 45mM et EDTA 1mM). Pour permettre la visualisation de l'ADN, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromure d'éthidium est ajouté au gel juste avant sa polymérisation.

7.2 Gel de polyacrylamide

Utilisé en particulier pour la purification des oligonucléotides de synthèse, un gel uniforme de polyacrylamide 18%/urée 7M tamponné avec TBE 1× permet une discrimination des ADN de petites tailles. Les oligonucléotides reçus lyophilisés sont resuspendus dans 100 μl de tampon TE dans lequel 100 μl de formamide déionisé sur résine Dowex XG-8 (BioRad, Richmond, CA) sont ajoutés. L'échantillon chauffé à 100°C pendant 2 min est divisé à l'intérieur de 7 puits d'un gel polyacrylamide sur montage Mini-Protean de BioRad (peigne de 1mm et 10 puits). La migration s'effectue pendant 2 h à une tension de 200V.

8. SOUTHERN

8.1 Transfert par capillarité

8.1.1 Nitrocellulose

Pour des transferts d'ADN plasmidiques, le transfert de l'ADN sur membrane de nitrocellulose Zeta-Probe (BioRad) s'effectue par capillarité dans une solution de NaOH 0.4M. La membrane est ensuite rincée dans une solution SSC 2× (SSC 1×: 0.15M NaCl, 0.015M Na-citrate). Cet l'ADN est fixé de façon covalente par cuisson *in vacuo* à 80°C pendant 90 min.

8.1.2 Nylon

Pour des transferts d'ADN génomiques pré- ou post-digestions, le gel d'agarose subit d'abord un traitement par trempage de 15 min dans une solution de HCl 0.25M pour fragmenter l'ADN de haut poids moléculaire (> 10kb) et faciliter ainsi sa mobilité dans le gel. Ce dernier est alors transféré dans une solution de NaOH 0.5M/NaCl 1.5M pendant 30 min pour dénaturer les duplex d'ADN. Enfin, le gel subit une étape finale de neutralisation dans une solution NaCl 1.5M/Tris-Cl 0.5M (pH 7.5) pendant 15 min. Le transfert de l'ADN sur membrane de nylon Hybond N (Amersham) s'accomplit O/N par capillarité dans une solution SSC 10×. La membrane est ensuite rincée dans une solution SSC 2× et l'ADN se fixe à la membrane de façon covalente sous l'effet des radiations *UV* dans un appareil Stratalinker (Stratagene).

8.2 Analyses de l'ADN par hybridation de sondes radioactives

8.2.1 Préhybridation: sondes d'ADN double-brin (> 200pb)

La préhybridation (>4h) des membranes (nylon/nitrocellulose) s'effectue à 42°C dans une solution contenant Denhart's 5×, SSC 4×, sulfate de dextran 10%, SDS 1%, formamide déionisée 50% et 0.2 mg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé, le tout à raison de 0.25 ml de solution par cm² de membrane.

Lors du criblage d'une banque d'ADN génomique, les conditions de préhybridation varient en ce qui a trait à la solution qui contient PIPES 20mM (pH 6.5), NaCl 0.8M, SDS 0.5%, formamide et ADN dénaturé comme décrit précédemment.

8.2.2 Pré-hybridation: sondes oligonucléotidiques (< 50 bases)

La pré-hybridation (>4h) des membranes s'effectue à 50°C dans une solution contenant Denhart's 10×, SSC 5×, sulfate de dextran 10%, SDS 3.5%, PO₄ 20mM (pH 7.0) et 0.5 mg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé, le tout à raison de 0.25 ml de solution par cm² de membrane.

8.2.3 Hybridation: toutes sondes

L'hybridation (>16 h) est réalisée dans une solution fraîche, identique à la solution de pré-hybridation, avec en plus 2 ng de sonde marquée et dénaturée par ml de solution.

8.2.4 Lavage des membranes et autoradiographie

Les membranes sont lavées à moyenne astringence successivement dans SSC 2× à 25°C, dans SSC 2×/SDS 0.1% à 50°C et dans SSC 0.1×/SDS 0.1% à 50°C.

De façon générale, un signal de moins de 10cps (coups par secondes) nécessite plus d'une journée d'exposition à -80°C sur film X-OMAT RP (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) à l'aide d'écrans intensifiants, alors que moins d'une heure d'exposition suffit lorsque le signal excède 100 cps.

8.2.5 Réhybridation des membranes

La réutilisation des membranes est possible si la sonde radioactive est déshybridée dans une solution SSC 0.01×/SDS 1% à 100°C pendant 2 périodes de 20 min. Dès lors, la membrane est rincée dans une solution SSC 2× et peut alors être réutilisée. Une méthode alternative pour les membranes d'ADN consiste à tremper la membrane dans une solution de NaOH 0.4M à 45°C pendant 2 périodes de 15 min. La membrane est ensuite neutralisée dans une solution SSC 0.1×, SDS 0.1% et Tris-Cl 0.2M (pH 7.5) pendant 15 min à la même température.

9. MARQUAGES DES SONDES NUCLÉIQUES

9.1 ADNc

Le marquage de sondes d'ADN double-brin, réalisé à l'aide de la trousse *Multiprime DNA Labelling System* (Amersham) + [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) se fait selon le protocole de la compagnie. L'incorporation de dCTP radio-marqué est mesurée par

précipitation des acides nucléiques avec l'acide trichloracétique (TCA) 10% sur membranes de fibres de verres Whatman GF/C. La sonde marquée est ensuite débarrassée des nucléotides non incorporés par un passage sur une mini-colonne d'exclusion formée de Séphadex G-50 fin (Pharmacia) et équilibrée dans un tampon STE (Tris-Cl 10mM à pH 8, EDTA 1mM et NaCl 1M).

9.2 Oligonucléotides

Le marquage d'oligonucléotides simple-brin est réalisé selon le protocole de la compagnie Pharmacia. L'enzyme polynucléotide kinase du phage T4 catalyse le transfert du groupement γ -phosphate de l'ATP à l'extrémité 5'-OH de l'ADN. Ainsi, la réaction procède dans le tampon de Pharmacia, le One Phor All⁺ 1 \times (10mM Tris-OAc, Mg(OAc)₂ 10mM et KOAc 50mM) contenant de 15 à 20 pmoles d'un oligonucléotide, 20pmoles de [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, Amersham) et 10 unités de polynucléotide kinase de T4 (Pharmacia) à 37°C pendant 45 min. Le rendement étant généralement supérieur à 50%, la sonde est utilisée telle quelle sans autre forme de purification.

10. RÉCUPÉRATION DES FRAGMENTS D'ADN

10.1 D'un gel polyacrylamide

Après la migration, la fluorescence des bandes d'ADN est révélée sous ultra-violets (254nm) et la bande d'intérêt est excisée du gel et finement broyée dans un tampon d'élution⁵ (Sambrook *et al.*, 1989). La diffusion s'exerce pendant 16 h à 4°C sur plaque rotative. Une centrifugation sédimente l'acrylamide et l'ADN est précipité par l'ajout d'un volume de NH₄OAc 7.5M et de 4 volumes d'éthanol.

10.2 D'un gel d'agarose

10.2.1 Par interception sur DEAE-cellulose

Cette méthode de récupération est une adaptation de la technique décrite par Lisardi (1989) dans un article publié par la compagnie Schleicher & Schuell (Keene, NH, USA). Un morceau de membrane de DEAE-cellulose NA-45 (Schleicher & Schuell) est inséré en aval

⁵ Tampon d'élution: SDS 0.1%, NH₄OAc 0.5M et Mg(OAc)₂ 10mM

de la bande d'intérêt et l'électrophorèse est alors poursuivie à 100V jusqu'à ce que la bande soit adsorbée sur la membrane. Cette dernière est retirée et rincée vigoureusement dans un tampon NET⁶ de faible force ionique et l'ADN est élué en immergeant la membrane dans 150 µl d'un tampon SET à force ionique élevée à 68°C pendant 45 min. Le liquide est prélevé et l'élué est répétée 2 autres fois. Deux volumes d'éthanol permettent la précipitation de l'ADN des trois fractions liquides combinées.

10.2.2 Par électro-élution

Cette technique, dont l'appareil a été mis au point par la compagnie IBI (International Biotechnologies Inc, New-Haven, CO), démontre son efficacité lors de tentatives de récupération de faibles quantités d'ADN en agarose. En résumé, une bandelette d'agarose contenant l'ADN d'intérêt est placée dans un réceptacle en forme de fer à cheval. Un courant électrique de 80V est appliqué à l'appareil rempli de tampon TBE 0.5× et l'ADN migre vers l'extrémité du réceptacle jusque dans un tunnel vertical en forme de V remplie d'un faible volume de tampon à force ionique élevée (NH₄OAc 7.5M) pour venir s'y trapper et arrêter sa progression (fig. 11). Après cette migration, le tampon est soigneusement retiré du canal en V et 2 volumes d'éthanol permettent la précipitation de l'ADN.

10.2.3 Par adsorption sur micro-billes de verre

Cette technique, commercialisée par la compagnie Bio101 (LaJolla, CA) et dont les réactifs sont vendus sous le nom *GENECLEAN II[®] Kit*, ne nécessite aucune précipitation à l'éthanol et requiert peu de temps (< de 30 min). Sa seule contrainte se limite à son faible degré de rendement quant aux fragments d'ADN < 500pb. En résumé, une bande d'agarose/TAE est plongée à 55°C dans 3 volumes de solution NaI jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Une suspension de micro-billes de verre (GLASSMILK[®]) ajoutée à cette solution trappe les molécules d'ADN par adsorption. Les billes sont sédimentées par centrifugation et lavées 3 fois avec une solution ionique à base d'éthanol et de NaCl (NEW WASH[®]) puis finalement élué dans un faible volume d'eau ou TE à 55°C.

⁶ Tampons NET et SET: NaCl (0.15M chez NET ou 1M pour SET), EDTA 0.1mM et Tris 20mM à pH 8

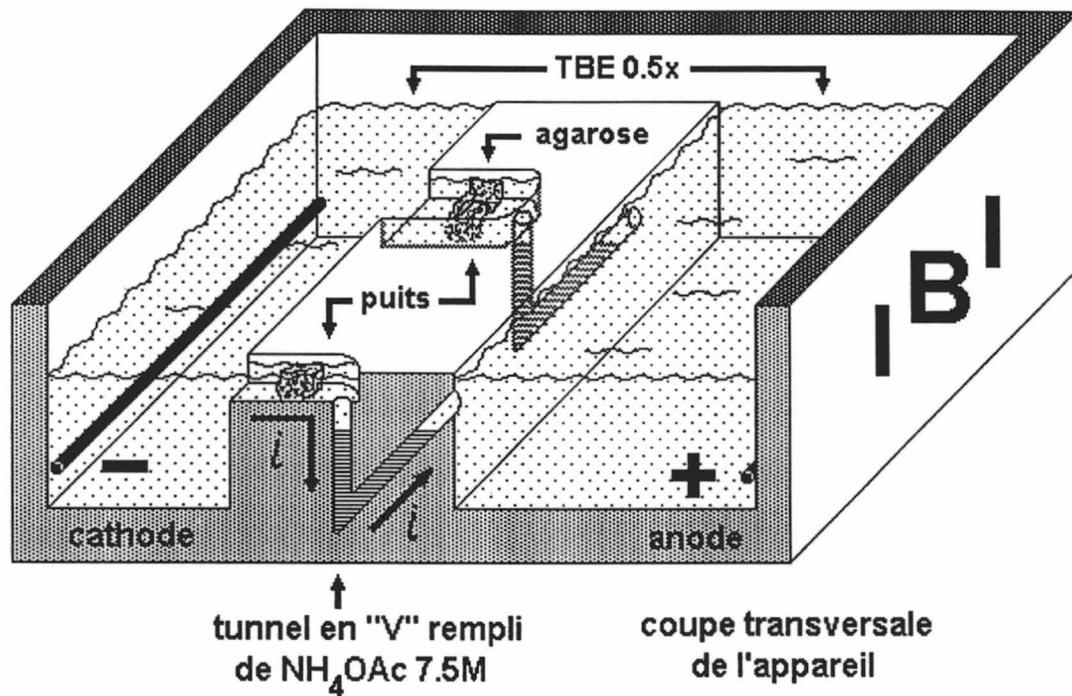


Figure 11. Schéma simplifié de l'appareil à électroélution (IBI). Coupe transversale démontrant l'ouverture en "V" dans lequel l'ADN vient se trapper. i: sens du courant réel

11. MODIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN À BOUTS COHÉSIFS

Lorsque nécessaire, les extrémités cohésives d'un fragment d'ADN doivent être transformées en extrémités franches. Selon le type d'extrémité et l'exigence des besoins, plusieurs méthodes sont utilisées.

11.1 3' sortant

Pour les extrémités 5' récessives (3' sortantes), le brin monocaténaire doit être supprimé. La polymérase d'ADN du phage T4 possède une forte activité de dégradation exonucléasique 3'-5' sur de l'ADN simple et double brin. Ainsi, en présence d'ADN double brin possédant une extrémité 3' sortante, l'enzyme peut alors dégrader les nucléotides sortants. La présence d'un excès de dNTPs et un temps de réaction très court sont nécessaires pour conserver l'intégrité du duplex d'ADN. La dégradation de l'extrémité 3' sortant est réalisée dans un tampon One Phor All⁺ 1× (Pharmacia) en présence de dNTPs 0.5mM, DTT 0.5mM, BSA 0.1mg/ml, ADN (0.2 à 1 µg) et 10U de polymérase T4 dans un volume total de 40 µl

pendant 5 min à 37°C. La réaction est stoppée par extraction au phénol/CHCl₃ et l'ADN est précipité à l'éthanol.

11.2 5' sortant

Les extrémités 3' récessives (5' sortantes) peuvent être soit comblées par une polymérase, ou soit dégradées.

11.1.1 Remplissage

Environ 1 µg d'ADN digéré (environ 0.3 pmole) est ajouté dans un tampon de remplissage⁷ additionné de 0.7mM de chacun des nucléotides nécessaires ainsi que d'environ 5U de l'enzyme Klenow (Stratagene). La réaction procède à 37°C pendant 30 min.

11.1.2 Dégradation

Lorsqu'il s'agit d'enlever sélectivement des régions monocaténares d'un duplex d'ADN, l'emploi de la nucléase de germes de fèves *Mung* (*Mung Bean Nuclease*) est particulièrement efficace. Il faut cependant noter certains aspects à savoir que la concentration d'enzyme ne devrait pas excéder 3U par µg d'ADN et qu'elle devrait être d'environ 5 à 10U par ml de milieu réactionnel. Ainsi 6U de Mung Bean Nuclease (Pharmacia) sont ajoutées à 2 µg d'ADN digéré (0.6 pmole) dans 500 µl de milieu réactionnel⁸. La réaction procède ainsi pendant 10 min à 37°C et rapidement, le milieu est soumis à une extraction au phénol/CHCl₃ puis l'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol.

12. LIGATION

12.1 À extrémités cohésives

La ligation de fragments d'ADN à extrémités cohésives s'effectue en général avec un rapport molaire insert:vecteur de 3:1 à 10:1 selon le rapport des longueurs des fragments. Ainsi, plus la longueur de l'insert se rapproche de la longueur du vecteur, plus le rapport se rapproche de l'unité. La ligation s'effectue dans un volume de 20 µl à 16°C durant 10 à 16

⁷ Remplissage: NaCl 6mM, MgCl₂ 6mM, DTT 1mM, gélatine 0.05% et Tris-Cl 6mM (pH 7.5)

⁸ Réaction *Mung Bean nuclease*: NaCl 50mM, NaOAc 30mM (pH 5.0), ZnCl₂ 1mM et 5% glycérol

h. De 30 à 50 ng de vecteurs linéarisés sont utilisés avec une quantité adéquate d'insert respectant les rapports décrits dans un tampon One Phor All⁺ 1× (Pharmacia) comprenant 1mM d'ATP (Pharmacia) et de 5U Weiss de ligase T4 (Pharmacia).

12.2 À extrémités franches

Les conditions expérimentales employées lors d'une ligation de fragments d'ADN à bouts francs varient en 3 points (Sambrook *et al.*, 1989). D'abord, le rapport molaire insert:vecteur est augmenté, passant à 10:1 jusqu'à 15:1 dépendant des fragments employés. La concentration d'ATP diminue de moitié (Ferretti & Sgaramella, 1981) alors que la quantité d'enzyme augmente du double au triple.

13. PROPAGATION DES MOLÉCULES D'ADN RECOMBINANT

13.1 Transformation de cellules compétentes XL1-Blue

Environ 3 ng d'ADN suffisent à transformer 100 µl de cellules *Epicurian Coli*[®]XL1-Blue MRF' (Stratagene) compétentes. L'efficacité de transformation est évaluée en transformant un même volume de cellules compétentes avec une quantité équivalente de vecteur commercial non digéré.

Les cellules, lentement décongelées sur glace, sont rapidement réparties dans des tubes à bouchon (Falcon 2059) de 15 ml en portions de 100 µl. L'ADN est alors ajouté (3 ng) aux cellules qui demeurent sur la glace pendant 45 min, permettant l'entrée du matériel génétique à l'intérieur des cellules traitées. Un choc thermique à 42°C pendant 1 min perméabilise les cellules. Les tubes sont alors refroidis à nouveau sur glace quelques minutes. 900 µl d'un milieu riche SOC (BRL) et pré-chauffé à 37°C sont ajoutés aux cellules. Les tubes sont alors placés à 37°C avec agitation modérée (225 rpm) pendant 90 min.

Des quantités croissantes (de 10 à 300 µl) de milieu sont étalées sur pétris LB-agar contenant de l'ampicilline 100 µg/ml et, au besoin, du Bluo-Gal[®] 80 µg/ml et de l'IPTG 20mM. L'apparition de colonies nécessite environ 16 h d'incubation à 37°C et le développement de la couleur bleue est rehaussée par une incubation à 4°C pendant quelques heures.

14. CARACTÉRISATION DES CLONES RECOMBINANTS

14.1 Transfert sur filtres de nitrocelluloses

Suite à la transformation de bactéries compétentes, lorsque le bruit de fond est extrêmement élevé (colonies bleues/colonies totales), on peut recourir à une technique de sélection qui s'inspire de celle de Grunstein & Hogness (1975). Cette technique permet la reconnaissance des colonies positives par hybridation d'une sonde spécifique à l'ADN bactérien suite à sa libération des cellules et sa fixation sur membrane.

Une membrane de nylon Hybond N⁺ (Amersham) de 82 mm de diamètre est déposée sur les colonies et sa position est notée alors avec de l'encre de Chine. La membrane est alors déposée, face vers le haut, sur une goutte (0.75 ml) de solution dénaturante NaOH 0.5M immobilisée sur pellicule *Saran Wrap*[®]. Après 2-3 min, la membrane est retirée et appliquée sur papier Whatman 3M pour drainer l'excès de liquide. L'étape de dénaturation/séchage est répétée une seconde fois. Par la suite, la membrane est appliquée sur une quantité identique de solution neutralisante Tris-Cl 1M (pH 7.4) pendant 5 min. Une fois de plus, la membrane est asséchée et retrempée dans une solution fraîche. Pour finir, la membrane est déposée sur une solution de trempage NaCl 1.5M/Tris-Cl 0.5M (pH 7.4) pendant 5 min avec répétition du procédé trempage/séchage. L'ADN est finalement fixé de façon covalente à la membrane par l'effet des radiations *UV* dans un appareil Stratalinker (Stratagene)

14.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique

Une méthode rapide de sélection des colonies, mise au point par Holmes & Quigley (1981) et adaptée par Stratagene (Stratagene Instruction Manual, 1991), permet d'isoler les plasmides des colonies de façon très rapide et avec un minimum de pureté.

Une colonie obtenue après transformation est piquée et mise en culture dans 3 ml de milieu DYT+Amp O/N à 37°C. Le milieu est divisé en deux; 1.5 ml de la culture sont conservés à 4°C alors que les cellules de l'autre moitié sont sédimentées par centrifugation à 6 000 rpm pendant 3 min à 4°C. Le culot bactérien est resuspendu dans 150 µl de solution STETL⁹ et les micro-tubes sont plongés dans un bain d'eau bouillante pendant 1 min et centrifugés à 4°C à 13 000 rpm pendant 15 min. Le culot visqueux, formé de débris

⁹ STETL: Sucrose 8%, Triton X-100 0.5%, EDTA 50mM, Tris-Cl 50mM (pH 8) et lysozyme 2mg/ml

cellulaires, est ainsi retiré à l'aide d'un cure-dent stérile. L'ajout de 50 μ l de RNase pancréatique bovine (40 μ g/ml) permet la dégradation de l'ARN pendant 15 min à 37°C. L'ADN précipité par l'addition d'un volume égal d'isopropanol est alors concentré suite à une centrifugation de 15min.

14.3 Maxi-préparation d'ADN plasmidique

La méthode utilisée est basée sur celle de Ish-Horowicz & Burke (1981) modifiée par Treisman (Sambrook *et al.*, 1989). Elle consiste d'abord à resuspendre les bactéries *E.coli* transformées dans un tampon GET¹⁰ après élimination du milieu de culture. Les membranes sont fragilisées avec du lysozyme 1mg/ml et les bactéries sont lysées par méthode alcaline avec un mélange NaOH 0.2N/SDS 1%. Après neutralisation de la solution par l'acétate de potassium acide, l'ADN plasmidique est concentré puis débarrassé de l'ARN par précipitation sélective de l'ARN de haut poids moléculaire en présence de LiCl 2.5M. L'ajout de RNase pancréatique 20 μ g/ml complète la dégradation de l'ARN restant. Les nucléotides issus de cette digestion sont séparés de l'ADN plasmidique par précipitation sélective de l'ADN en présence de NaCl 0.8M/PEG 8000 6.5%. Une extraction au phénol/CHCl₃ ainsi que la précipitation de l'ADN à l'éthanol en présence de sels d'ammonium permet l'élimination des protéines ainsi que du PEG 8000 résiduel. Le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ est en général supérieur à 1.8 lorsque l'ADN plasmidique est analysé par spectrophotométrie.

14.4 Transfert en dépôts circulaires (*Dot-Blot*)

Près de 5 μ g d'ADN sont dénaturés dans une solution NaOH 0.4N/EDTA 1mM à 100°C pendant 10 min puis immédiatement déposés dans les puits d'un appareil *dot-blot* (Schleicher & Schuell). Le vide y est alors appliqué laissant alors le liquide traverser une membrane de nitrocellulose Zeta-Probe (BioRad) au rythme de 100 μ l par minute. Les puits sont rincés avec 1 ml de la solution dénaturante chaude tout en maintenant le vide dans l'appareil. La membrane est alors retirée et rincée dans une solution SSC 2 \times . L'ADN est fixé de façon covalente sous l'effet des radiations UV dans un appareil Stratalinker (Stratagene).

¹⁰ GET: Glucose 50mM, EDTA 10mM et Tris-Cl 25mM (pH 8)

15. SÉQUENÇAGE DE L'ADN

La technique employée est adaptée selon celle décrite par Sanger *et al.* (1977).

15.1 Dénaturation de l'ADN et hybridation avec l'amorce

Une réaction de séquence typique nécessite 5 µg d'ADN double-brin. L'ADN plasmidique est dénaturé pendant 30 min à 37°C dans un volume de 20 µl en présence de NaOH 0.2N et d'EDTA 0.2mM. L'ADN est par la suite précipité par addition de 2 µl de NaOAc 3M (pH 5.2) et 88 µl d'éthanol absolu pendant 1 h à -80°C. L'ADN est recueilli par centrifugation et débarrassé des sels dans l'éthanol 70%.

L'hybridation avec l'amorce spécifique se fait en diluant le culot d'ADN séché à la toute dernière minute dans 10 µl d'eau et en ajoutant 2 µl de tampon d'hybridation (Pharmacia) et 2 µl de l'amorce (2 pmoles). Le tube est déposé à la surface d'un litre d'eau à 68°C jusqu'au rétablissement de la température de l'eau avec la température ambiante. L'ADN peut être conservé intact à -20°C O/N ou utilisé immédiatement.

15.2 Réactions de séquençage

Les réactions de séquençage sont réalisées en utilisant les réactifs de la trousse *Deaza G/A ³⁵S Sequencing™ Mixes* (Pharmacia), la polymérase à ADN du phage T7 dans sa version modifiée *Sequenase® II* (USB) et le radio-isotope [α -³⁵S]dATP (Amersham). Le protocole utilisé est fourni avec les réactifs de la trousse. Une particularité intéressante de cette trousse est que les nucléotides dGTP et dATP sont remplacés par leur équivalent déaza, soient 7-déaza-dGTP et 7-déaza-dATP. L'utilisation de ces deux analogues préviennent efficacement la formation de structures secondaires de l'ADN pendant la réaction de séquençage ainsi que pendant l'électrophorèse, prévenant ainsi l'arrêt prématuré de l'élongation de chaîne et la formation de compressions de bandes dans les gels de séquençage.

15.3 Électrophorèse, séchage du gel et autoradiographie

Une partie des milieux réactionnels est déposée sur un gel d'acrylamide 5%/urée 7M dans TBE 1×. L'électrophorèse se déroule à 2 000 V (\approx 35 mA) pendant 2, 4 ou 6 h dans un appareil de séquençage d'ADN 20×50 cm (BioRad). Le gel est fixé pendant 30 min dans une solution acide acétique 10%/méthanol 12%, déposé sur un papier Whatman 3M puis séché

sous vide pendant 1 h à 80°C. L'exposition est faite O/N ou plus par contact direct du gel séché sur film RP-X-OMAT (Kodak).

16. CULTURE DE CELLULES EUCARYOTES

Des cellules de reins de singes verts d'Afrique transformées par SV40, COS-1 (généreusement fournies par le laboratoire du Dr Marcel Bastin, Dép. de Biochimie, Univ. de Sherbrooke, Qc) ou COS-7 (American Type Culture Collection, Rockville, ML) sont utilisées pour étudier l'expression des protéines matures P450c11 et P450aldo par essai d'expression transitoire.

16.1 Préparation des milieux

Le milieu de culture de cellules COS est le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM)(Dulbecco & Freeman, 1959) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF). La reconstitution du DMEM lyophilisé (Sigma Chemical, Co.) se fait par l'ajout d'eau purifiée par osmose inverse et stérile (Millipore-Milla). Le pH de la solution est ajusté à 7.0 après dissolution de 3.7 g de bicarbonate de sodium. La solution est ensuite filtrée par un filtre 0.22 µm (Sterivex-GS) et se conserve pendant 1 mois à 4°C à l'abri de la lumière.

Le sérum de veau foetal (Gold, Flow Laboratories) est d'abord décongelé à température de la pièce puis décomplémenté (inactivation du complément) à 56°C pendant 45 min avec agitations occasionnelles. Ce dernier est lentement refroidi jusqu'à 25°C puis congelé à -20°C par portion de 100 ml pour utilisations ultérieures.

À moins d'indications contraires, les antifongiques et antibiotiques suivants sont toujours additionnés au milieu de culture: 2.5 µg/ml d'amphotéricine B (Fongizone), 100 U/ml de pénicilline G (Sigma) et 100 µg/ml de sulfate de streptomycine (Sigma). Le milieu est désigné "complet" s'il contient ces trois agents en plus du SVF 10%.

16.2 Préparation des cellules

Dès leur arrivée à -80°C, la survie des cellules COS dépend de la rapidité d'exécution, la fiole est décongelée dans un bain à 37°C avec agitation rapide. Les cellules sont transférées dans un tube à bouchon de 50 ml (Falcon F-2047) puis centrifugées à 1 800 rpm pendant 5 min. 5 ml de milieu complet sont ajoutés aux cellules qui sont rapidement

transférées dans un flacon de 25 cm² de surface (Falcon F-0240) puis placées en incubateur à 5% CO₂ à humidité contrôlée.

16.3 Passage

Les cellules COS étant de type épithéliales, celles-ci adhèrent à la surface interne d'un flacon de culture en formant une monocouche cellulaire. Or, lorsque les cellules atteignent la pleine confluence, il se produit alors une inhibition de contact. Les cellules qui se touchent cessent de se diviser et ralentissent ainsi leur métabolisme. Afin de maintenir les cellules dans un état métaboliquement actif, donc en constante division, les cellules sont dispersées en nombre moins élevé dans de nouveaux flacons.

Pour ce faire, le milieu est retiré et les cellules sont rincées deux fois avec un volume minimal de solution de versène¹¹. À la monocouche de cellules, 40 µl/cm² d'une solution de trypsine 0.6‰ sont ajoutés. Au bout de 3 à 5 min, les cellules se détachent rapidement par plaques. La solution est alors passée quelques fois dans une pipette de 5 ml puis diluée rapidement 1:5 dans du DMEM complet. Les cellules en suspension sont ensuite redivisées dans des proportions de 1:10 à 1:20 de ce qu'elles étaient initialement dans le flacon de départ.

16.4 Transfection des cellules

La technique de transfection s'appuie sur la méthode de Kawai & Nishizawha (1984). Les valeurs sont rapportées pour des pétris de 10 cm de diamètre. Au premier jour, des cellules sont passées et étalées sur pétri à raison de 5x10⁵ cellules/pétri dans 5 ml de milieu DMEM complet. Les cellules sont incubées à 37°C pendant environ 24 h, soit à environ 35% de confluence.

Au deuxième jour, le milieu est aspiré et les cellules rincées au DMEM complet (≠ Fongizone). À 2 ml de DMEM complet sont ajoutés, dans l'ordre, 10 µg d'ADN plasmidique et 30 µl d'une solution de polybrène 1× (solution-mère 10× diluée au moment de l'utilisation

¹¹ Versène: NaCl 0.14M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1mM, KH₂PO₄ 1.5mM, EDTA 7mM et rouge de phénol 0.015‰

dans du PBSA¹²). Ce mélange est ensuite ajouté dans le pétri de cellules. Ces dernières sont alors incubées pendant 6 h avec agitation occasionnelle (h⁻¹). Le milieu est par la suite aspiré et 4 ml d'une solution 25% DMSO dans du DMEM sont ajoutés aux cellules pendant seulement 90 secondes. Le milieu est alors rapidement aspiré et les cellules rincées 2 fois avec 2×10 ml de DMEM. Les cellules sont ensuite replacées en culture dans 10 ml de DMEM complet pour une période de 2 à 60 h à 37°C/CO₂ 5%.

17. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE L'ARN

17.1 Isolation de l'ARN de *E. coli*

La technique employée repose exclusivement sur la méthode de Chomczynski & Sacchi (1987), une adaptation de la méthode de Chirgwin *et al.* (1979), qui utilise le puissant pouvoir dénaturant du thiocyanate de guanidinium. Au culot bactérien provenant d'un volume de 25 ml issu d'une culture de *E. coli* est homogénéisé dans 1 ml d'une solution de dénaturation à la guanidine¹³. 0.5 ml de NaOAc 2M (pH 4), 5 ml de phénol-H₂O (pH 4-5) et 1 ml de CHCl₃ sont ajoutés et mélangés successivement. Après une centrifugation de 20 min à 10 000×g, les acides nucléiques de la phase aqueuse sont précipités par addition de 5 ml d'isopropanol à -20°C durant 1 h. L'ARN est sédimenté par centrifugation puis resuspendu dans 200 µl d'une solution LiCl 4M. Sous ces conditions, l'ARN de haut poids moléculaire précipite alors qu'une centrifugation de 10 min à 3 000×g permet à l'ARN de sédimenter. Au culot d'ARN, 0.6 ml de TE/SDS 0.5% et 0.6 ml de CHCl₃ éliminent toutes traces de LiCl après une centrifugation de 10 min à 3 000×g. L'ARN est à nouveau précipité, mais cette fois par addition de 60 µl de NaOAc 2.2M (pH 5) et 0.7 ml d'isopropanol.

17.2 Isolation de l'ARN de tissus

Décrite par Cox (1968) et modifiée par Kahn (1981), cette méthode d'isolation de l'ARN par le chlorure de guanidinium est très efficace pour les tissus riches en RNases et tissus conjonctifs.

¹² PBSA: NaCl 0.2M, KCl 3.4mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂HPO₄ 2mM à pH 6.8

¹³ Sol. guanidine: Thiocyanate de guanidine 4M, Na-citrate 25mM (pH 7), sarcosyl 0.5% et 2-mercaptoéthanol 0.1M

Les glandes surrénales de hamsters sont homogénéisées dans 15 ml/g d'une solution (I) refroidie à -20°C de chlorure de guanidinium¹⁴ avec un piston de téflon et un cylindre de pyrex. La lyse des cellules est assurée par des passages répétés du milieu au travers d'une aiguille 21G. Les noyaux, mitochondries et autres débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à -10°C (10min, 10 000×g).

Les acides ribonucléiques sont précipités par addition de 0.1 ml/g de NH₄OAc 2.4M (pH 5.0) et 0.55 volume d'EtOH absolu refroidi à -20°C. La précipitation est achevée par une incubation de 90min à -20°C et 10min à -70°C. Le culot obtenu par centrifugation (15 000×g, 20 min) est purifié par resuspension dans 0.1 ml/g d'une seconde solution (II) de chlorure de guanidinium¹⁵ et reprécipitation avec 0.05 ml/g de NH₄OAc 2.4M (pH 5) et 0.55vol. d'EtOH absolu (45 min à -20°C).

L'ARN est précipité (5 000×g, 15 min) et lavé trois fois dans 0.1 ml/g d'une solution de lauroyl sarcosine 0.1%. Le lavage s'effectue en vortexant la solution pendant 3 min et en précipitant l'ARN par l'addition de 0.55 vol d'EtOH (30 min à -20°C) suivie d'une centrifugation (10 min à 6 000 rpm). À la fin des 3 lavages, le culot résultant est débarrassé de toutes traces de sels par double lavage à l'éthanol 80%. L'ARN est utilisé dissout dans l'eau ou conservé précipité à -70°C en présence de NH₄OAc 2.5M et de 2.5 volumes d'EtOH.

17.3 Isolation de l'ARN de cellules COS

La technique employée repose elle aussi sur la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987). Les cellules de trois pétris (10 cm) à confluence 90% sont recueillies par raclage dans 10 ml de DMEM. Les cellules sont sédimentées par centrifugation à 1 800 rpm pendant 5 min. Le culot de cellules est homogénéisé dans 1 ml de *TRI Reagent*TM (un mélange commercial à base de thiocyanate de guanidinium et de phénol, Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH) par passages répétés dans une pointe bleue de micro-pipette (1 ml). 0.2

¹⁴ Sol. guanidine (I): chlorure de guanidinium 7M, ac. iodoacétique 22mM, lauroyl sarcosine 1% et 1mM EDTA à pH 4.5-5 à -20°C

¹⁵ Sol. guanidinium (II): chlorure de guanidinium 7M, ac. iodoacétique 22mM, lauroyl sarcosine 1% et 1mM EDTA à pH 7 à T° pièce

ml de CHCl_3 est ensuite ajouté et vortexé jusqu'à formation d'une émulsion homogène. La solution est ensuite centrifugée et l'ARN est précipité par addition d'un volume d'isopropanol à la phase aqueuse. Le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché, resuspendu dans un minimum d'eau et conservé à -80°C .

La quantité d'ARN est vérifiée par spectrophotométrie à 260nm ($1 \text{ DO}_{260} \approx 40 \mu\text{g/ml}$ d'ARN) alors qu'un rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ situé entre 1.8 et 2.0 indique une absence de protéines. La qualité de l'extraction est vérifiée par séparation de l'ARN sur un gel d'agarose 1% traité au DEPC 1% pendant 2 h, autoclavé 15 min puis coloré au bromure d'éthidium. De 0.5 à 2 μg d'ARN_{total} sont déposés et soumis à une tension de 40 volts pendant environ 1 h. L'intégrité de l'ARN est vérifiée par la présence des ARN ribosomaux 18S et 28S (17S et 25S pour les bactéries) dans un rapport d'environ 2:1 (28S:18S).

17.4 Analyse par Northern blots

Les structures secondaires de l'ARN sont parfois si fortes qu'il importe de bien les dénaturer avant la migration. La technique décrite ici est une adaptation de la méthode de McMaster & Carmichael (1977) qui utilisent le glyoxal et le DMSO comme agents dénaturants. 10 μg d'ARN sont dénaturés pendant 1 h à 50°C dans un tampon phosphate de sodium 10mM (pH 6.5) contenant 4M de glyoxal déionisé et 50% de DMSO.

L'ARN est alors déposé sur gel d'agarose 1% tamponné dans une solution phosphate de sodium 10mM (pH 6.5) à 4°C avec recirculation du tampon de la cathode à l'anode pour éviter la formation d'un gradient de pH, ce qui provoquerait une déstabilisation du glyoxal. L'ARN est alors soumis à une tension de 80V pendant 5 h dans un gel horizontal sur appareil H5 (BRL).

17.4.1 Transfert par capillarité

Le transfert par capillarité sur une membrane de nylon GeneScreenPlus® (Dupont, Lachine, Qc) s'effectue dans une solution SSC $10\times$ O/N. La membrane est ensuite rincée dans du SSC $2\times$ puis l'ARN est fixé de façon covalente par incubation *in vacuo* à 80°C pendant 90min et soumis à une illumination UV (ondes courtes) pendant 15 min.

18. CLONAGE DES ADNc

18.1 Transcription inverse de l'ARNm du P450aldo

Afin d'établir des conditions de réactions adéquates, la première étape de transcription inverse et PCR (RT-PCR) s'est effectuée en utilisant 4 systèmes différents composés de 3 types de transcriptase inverse et 3 types de polymérase thermostable.

18.1.1 Méthode #1

La première méthode s'appuie sur la technique proposée dans le protocole de la trousse distribuée par la compagnie Amersham (RPN 1607). La transcriptase inverse d'*Avian myeloblastosis virus* (AMV) est utilisée pour la synthèse du premier brin d'ADNc amorcée par l'oligonucléotide spécifique (+/-) et la synthèse du second brin d'ADNc est effectuée selon les détails du protocole accompagnant la trousse. Ainsi, le milieu réactionnel se compose d'un tampon 1× de synthèse du premier brin, de pyrophosphate de sodium, de 20U de RNAGuard® (un inhibiteur de RNase, Pharmacia), de dNTPs 0.5mM, de 36 pmoles d'amorce (+/-) anti-sens, de 10 µg d'ARN_{total} et de 170U d'AMV-RT (Pharmacia) dans un volume total de 120 µl. Le milieu est incubé à 42°C pendant 1 h. L'étape de synthèse du second brin est effectuée par addition de tampon de synthèse du second brin (Amersham), de 10U de RNase H (Promega) et de 250U de polymérase I (Promega) dans un volume total de 600 µl. Le milieu est incubé successivement à 12°C pendant 30 min, à 37°C pendant 1 h et à 60°C pendant 15 min. Une extraction au phénol/CHCl₃ est ensuite réalisée pour débarrasser le milieu des enzymes présentes.

L'amplification PCR s'effectue en présence des réactifs suivants: dans le tampon 1 de synthèse accompagnant l'enzyme thermostable Pfu (Stratagene) se trouvent 82.5 µl de la phase aqueuse restante après l'extraction organique, 0.25mM de dNTPs additionnels, 23 pmoles d'amorce sens (+) et 23 pmoles d'amorce anti-sens (+/-) additionnels. La réaction procède après l'addition de 10U de l'enzyme Pfu lorsque soumise à un cycle d'amplification selon le programme PCR-1 (tableau IV).

18.1.2 Méthode #2

La seconde méthode consiste d'abord à dénaturer l'ARN_{total} et à procéder à la réaction de transcription inverse dans le même tampon que pour l'amplification. Ainsi, dans un tampon de PCR 1× (KCl 50mM, Tris-Cl 10mM à pH 8.4, MgCl₂ 1mM et gélatine 0.1 mg/ml, A. Larochelle, comm. pers.) se trouvent 10 µg d'ARN_{total}, 0.25mM de dNTPs, 30 pmoles d'amorce anti-sens (+/-), 10U de RNAGuard® (Pharmacia) et 4mM de DTT dans un volume total de 95 µl. Le mélange est incubé pendant 3 min à 50°C et 1 min à 30°C avant d'y ajouter 20U d'AMV-RT (Pharmacia). Le milieu est alors incubé à 42°C pendant 1 h et à 37°C pendant une même période.

La réaction de polymérisation en chaîne est amorcée par l'addition d'un supplément d'amorce anti-sens (15 pmoles), de 15 pmoles d'amorce sens (+) et de 3U de polymérase Taq (Promega), le tout soumis à une ronde de PCR selon le programme PCR-1.

18.1.3 Méthode #3

La troisième méthode résulte de la capacité de l'enzyme Tet-z (Amersham) à agir comme transcriptase inverse et comme polymérase thermostable. Dans un tampon de réaction accompagnant l'enzyme se trouvent 0.5mM de dNTPs, 15pmoles d'amorce anti-sens (+/-), 1.5 µg d'ARN_{total} et 5U de l'enzyme Tet-z (Amersham) dans un volume total de 20 µl. La réaction procède à 60°C pendant 20 min.

La réaction de PCR est amorcée par addition de tampon d'amplification fourni avec l'enzyme, de 15 pmoles de chacune des amorces (+/- et +), de 0.15mM dNTPs additionnels et de 5U de Tet-z. La réaction de PCR procède selon le même programme que celui décrit à la section précédente.

18.1.4 Méthode #4

La réaction de transcription inverse de la dernière méthode utilise la transcriptase inverse de *Moloney murine leukemia virus* (MMuLV) (Pharmacia). La possibilité de déstabilisation des structures secondaires de l'ARN ainsi que la processivité de l'enzyme ont été des facteurs déterminants dans le choix de cette enzyme.

La réaction procède dans le tampon de synthèse du premier brin de la trousse

d'Amersham par addition de 1.5 µg d'ARN_{total}, de 5U de RNAGuard® (Pharmacia), de 1mM dNTPs, de 30 pmoles d'amorce anti-sens (+/-) et de 38U de MMuLV-RT (Pharmacia) dans un volume total de 19.5 µl à 37°C pendant 2 h.

L'amplification PCR nécessite l'ajout de tampon de réaction de PCR (Promega), de 15 pmoles de chacune des amorces (+/- et +), de 1.5mM MgCl₂ et de 3U de polymérase Taq (Promega) dans un volume total de 100 µl selon le programme PCR-1.

18.1.5 Méthode typique

La dénaturation de l'ARN s'accomplit par incubation de 26 µg d'ARN_{total} à 95°C pendant 1 min puis ½ min sur glace dans un mélange comprenant le tampon de transcription inverse, 15U de RNAGuard® (Pharmacia) ainsi que 180 pmoles d'amorces anti-sens (+/-) dans un volume total de 139 µl. Par la suite, on ajoute 0.18 µg de BSA (Sigma), 60U de RNAGuard® et 0.17mM dNTPs pour augmenter le volume à 163 µl. Le milieu est à nouveau chauffé à 65°C pendant 3 min puis déposé sur glace pendant ½ min. La transcription inverse débute par l'addition de 300U de MMuLV-RT (Pharmacia) et par l'incubation à 42°C pendant 90min ainsi qu'à 37°C pendant un temps équivalent.

18.2 Amplification d'un ADNc par PCR

18.2.1 Méthode typique

Dans un volume réactionnel de 100 µl on retrouve un tampon d'amplification Taq 1×¹⁶ (Pharmacia), 5 µl du milieu de transcription inverse, 0.3mM dNTPs (Promega), 30pmoles d'amorce sens (+ ou -), 30pmoles d'amorce anti-sens (+/-), 8% (v/v) DMSO et 5U de polymérase Taq (Pharmacia) complètent la solution d'amplification. Les réactifs sont ajoutés dans un micro-tube à paroi mince d'une capacité de 0.5 ml (Perkin-Elmer Cetus). Environ 70 µl d'huile minérale recouvrent la surface du mélange, prévenant ainsi l'évaporation d'eau. La réaction d'amplification procède selon le programme PCR-2 (tableau IV).

18.2.2 Automatisation

Les réactifs sont incubés dans un cycleur thermique (Hypercell Biologicals, Chalk

¹⁶ Tampon Taq 1×: KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM et Tris-Cl 10mM à pH 9.0 à 25°C

River, On) selon la procédure programmée par l'utilisateur.

TABLEAU IV. Procédure d'amplification par PCR

Programme	Cycles	Durée	Température	
PCR-1	1	2:00	94°C	
	Addition de polymérase thermostable			
	2 à 11		1:00	94°C
			1:30	68°C
			3:00	72°C
	12 à 46		1:00	94°C
			3:00	72°C
	47		5:00	25°C
			O/N	4°C
	PCR-2	1	2:00	94°C
Ajout de la polymérase thermostable				
2			1:00	94°C
			1:30	55°C
			30:00	72°C
3 à 52			1:00	94°C
			1:30	55°C
			4:00	72°C
53			10:00	72°C
			5:00	25°C
		O/N	10°C	

18.2.3 Caractérisation des produits d'amplification PCR

Les produits d'amplification sont caractérisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Une fraction (10 µl) du mélange réactionnel est chargée sur gel d'agarose 1% (tampon TAE

1×) coloré au bromure d'éthidium. La taille des fragments d'ADN est évaluée par comparaison avec les bandes du marqueur de poids moléculaire *1 kb ladder* (Gibco-BRL)

18.2.4 Particularité de l'enzyme thermostable Taq

Pendant la réaction d'amplification en chaîne, l'enzyme thermostable Taq possède la capacité d'ajouter un résidu d(A) supplémentaire à l'extrémité 3' de la chaîne d'ADN nouvellement synthétisée. Cette addition d'un seul résidu non apparié peut être nuisible lors d'une ligation d'ADN à bouts francs, ce résidu doit donc être supprimé et ceci peut être fait en utilisant la polymérase à ADN du phage T4.

19. EXPRESSION *IN VITRO* DES SÉQUENCES D'ADN CLONÉS

19.1 Transcription *in vitro*

19.1.1 Transcription à partir du promoteur T7

La compagnie Promega (Madison, WI) a mis au point une trousse de transcription *in vitro* (*RiboMAX™ system*) basée sur la méthode de Gurevich *et al.* (1991), une méthode qui utilise les propriétés d'un tampon HEPES à pH 7.5, ainsi qu'une forte concentration de rNTPs, de Mg²⁺ et jusqu'à trois fois moins d'ADN linéarisé que les méthodes traditionnelles. Cunningham & Ofengand (1990) ont de plus remarqué que l'addition de pyrophosphatase inorganique améliorerait le rendement de la réaction en favorisant la synthèse de pyrophosphate, donc l'utilisation de nucléotides dans l'élongation de la chaîne d'ARN. Les effets combinés d'un tampon à haute capacité ainsi que la réaction unidirectionnelle produite par hydrolyse du pyrophosphate font en sorte qu'il est possible de synthétiser de 10 à 20 fois la quantité d'ARN couramment obtenue par d'autres méthodes, soit jusqu'à 6 mg/ml d'ARN.

Avant d'initier la réaction de transcription, l'ADN plasmidique est d'abord linéarisé en extrémité 3' de l'ADNc de façon à stopper la synthèse du brin d'ARN. L'enzyme de restriction (*Xba*I) doit préférentiellement produire une extrémité franche ou 5' sortante. L'ADN est par la suite purifié par extraction au phénol/CHCl₃ et précipité à l'éthanol en présence de NH₄OAc 2.5M.

La réaction procède dans un tampon de transcription¹⁷ supplémenté de rNTPs 7.5mM, de 2 µg d'ADN linéarisé, de 30U de RNAsin (un inhibiteur de RNases), de 0.4U de pyrophosphatase inorganique de levure (Sigma Chemical Co.) et de 60U de polymérase à ARN du phage T7 dans un volume total de 20 µl et ce, pendant 4 h à 37°C.

La possibilité de synthétiser des ARNm avec un extrémité m⁷G(5')ppp(5')G (coiffe) n'a pas été retenue compte tenu de l'utilisation restreinte de l'ARN lors de cette expérience. En effet, bien que la présence d'une telle coiffe ait prouvé son efficacité en augmentant la synthèse protéique dans un extrait de germe de blé (Paterson & Rosenberg, 1979) et en augmentant la stabilité des transcrits naturels (Furuichi *et al.*, 1977) ou des ARNm injectés dans des cellules vivantes (Drummond *et al.*, 1985), les résultats obtenus lors des essais de traduction *in vitro* n'ont pas justifié l'utilisation d'ARN coiffé.

19.1.2 Purification de l'ARN messager

Lorsque la réaction est terminée, on ajoute au milieu réactionnel 2U de DNase RQ1 (dépourvue d'activité RNase) et on incube pendant 15 min à 37°C. L'ARN est ensuite purifié par extraction au phénol-TE(pH 4.5)/CHCl₃/alcool isoamyl 25:24:1 et précipité avec un volume d'isopropanol en présence de NaOAc 0.27M (pH 5.2).

19.2 Traduction *in vitro*

Cette technique de synthèse de protéine à partir d'un lysat de réticulocyte de lapin a connu beaucoup de popularité depuis ses débuts avec le groupe de Pelham & Jackson (1976). Depuis, plusieurs compagnies fournissent leur propre trousse de réactifs pour la traduction. Celle de la compagnie Gibco BRL (Burlington, Ontario) comprend les réactifs nécessaires à la réalisation de 50 réactions typiques de 30 µl chacune.

L'ARN (600 ng) est d'abord dénaturé à 70°C pendant 10 min de façon à éliminer toutes structures secondaires importantes. Les réactifs suivants sont ensuite ajoutés dans l'ordre et à température pièce. À la solution aqueuse de 11.5 µl d'ARN, 3 µl du tampon de

¹⁷ Tpn de transcription: MgCl₂ 12mM, spermidine 2mM, DTT 40mM et HEPES-KOH 80mM à pH 7.5

réaction 10×10^{18} , 3 μ l de KOAc 0.2M, 2.5 μ l de [35 S]-méthionine (>1000 Ci/mmol, Amersham) et 10 μ l de lysat de réticulocytes de lapin traités à la nucléase S_1 sont ajoutés et le milieu réactionnel est incubé à 30°C pendant 90 min.

À la fin de la réaction, l'ARN est dégradé par addition de 3 μ l de RNase pancréatique 1mg/ml et la réaction procède ainsi pendant 15 min à 30°C.

L'efficacité de la réaction de traduction *in vitro* est démontrée en mesurant l'incorporation de la [35 S]-méthionine dans les produits précipitables (protéines) à l'acide trichloracétique. Pour ce faire, 8 μ l du milieu réactionnel sont déposés sur une membrane de fibre de verre GF/C (Whatman) et placée dans un volume de 10 ml de TCA 10% pendant 10 min avec agitation. La membrane est lavée deux fois dans un volume égal de TCA 5% pendant 10 min. Finalement, la membrane est rincée à l'éthanol, séchée et placée dans un compteur à scintillations en présence de 10 ml de cocktail à scintillations Ready Safe (Amersham). L'incorporation est suivie par comparaison avec un milieu de traduction *in vitro* ne contenant pas d'ARN exogène.

19.3 Expression en système procaryote

Des constructions plasmidiques comprenant l'ADNc de P450c11 ou P450aldo sans leur signal peptidique dans pKK223.3 (Pharmacia) ont été réalisées pour l'expression dans *Escherichia coli*. La souche bactérienne JM105 (Pharmacia) a été transformée par ces constructions et utilisées pour ces essais.

Une culture bactérienne de 500 ml dans du milieu TB est d'abord réalisée avec les souches de cellules décrites jusqu'à obtention d'une $DO_{600}=0.7$ à 1.0. Dès lors, 1mM de l'inducteur IPTG (Gibco BRL) et 42 mg du précurseur du groupement protoporphyrrique, l'acide δ -aminolevulinique (Sigma Chemical Co.) et 0.1mM DOC sont ajoutés et l'incubation se poursuit à 30°C avec agitation pendant des temps pré-déterminés.

¹⁸ Tpn 10x: KCl 0.4M, créatinine phosphate 0.1M, tRNA de foie de veau 0.5 mg/ml, acides aminés (sauf méthionine) 0.5mM chacun et HEPES 0.25M à pH 7.2

Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation et lavées avec le tampon A¹⁹ additionné de 0.1mM DOC, ce qui permet de stabiliser la protéine par fixation du substrat. Le culot bactérien est ensuite resuspendu dans 2 ml de tampon A par gramme de cellules. Du lysozyme (Sigma Chemical Co.) 0.6 mg par gramme initial est ensuite ajouté aux cellules qui sont incubées 1 h à 4°C avec agitations périodiques. Les cellules sont ensuite lysées par sonication après l'addition de 0.5mM final de PMSF (un inhibiteur de protéases). La sonication des cellules se fait dans des tubes de 15 ml (7.5 ml par Falcon 2037) à 60% de la puissance maximale à raison de 4 impulsions de 20 secondes entrecoupées d'une minute d'attente dans un bain de glace salée (-7°C). Les cellules non lysées et les débris bactériens sont enlevés par centrifugation à basse vitesse (1 200×g, 20 min). Les membranes en suspension sont récoltées par ultracentrifugation à 4°C (225 000×g, 30 min). Un culot rougeâtre confirme l'agrégation de membranes cellulaires. Ces membranes sont recueillies et resuspendues dans du tampon A additionné de 0.25M sucrose, et les protéines totales sont dosées selon la méthode de Bradford suivant les directives de la trousse *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) en utilisant le BSA comme standard.

Différents détergents à différentes concentrations ont été testés 1) 1% n-Octyl β -D-glucopyranoside, 2) 1% Cholate, 3) 7.5 mM CHAPS, 4) 2% Tween 20, 5) 2% Emulgen 913 et 6) 22mM Sarcosyl. Les membranes ainsi recueillies sont solubilisées dans ces différents détergents pendant 1½ h à 4°C. À la fin de cette période, les protéines solubilisées sont isolées des membranes par ultracentrifugation à 225 000×g pendant 30 min.

La présence de cytochrome dans le surnageant est déterminée par spectrophotométrie. Un volume identique de surnageant est déposé dans deux cuvettes de quartz auxquelles on ajoute quelques grains de dithionite de sodium pour la réduction des cytochromes. L'étalonnage des cuvettes se fait en annulant la différence de densité optique des deux échantillons par un balayage entre les longueurs d'onde 400 à 500nm. La formation du complexe CO/cytochromes P450 réduits est réalisée en faisant barboter un courant de CO

¹⁹ Tampon A: Tris-OAc 25mM (pH 7.6), MgOAc 10mM, glutamate de potassium monopotassique 0.1M, DTT 0.1M et 10% glycérol

dans une des deux cuvettes pendant environ 20 sec. Un second balayage de 400 à 500nm permet de rendre compte de la présence et de l'intégrité de cytochromes P450.

19.4 Expression en cellules COS

L'activité des enzymes P450c11 et P450aldo dans les cellules COS est déterminée en présence du substrat radiomarqué [¹⁴C]DOC selon la méthode employée par Curnow *et al.* (1991). Ainsi, 30 h post-transfection, le milieu DMEM est retiré des plaques de 3.5 cm de diamètre et est immédiatement remplacé par 1 ml de DMEM complet contenant 1.2 µm de [¹⁴C]DOC (70 nCi) (New England Nuclear, Boston, MA). Les cellules sont replacées à 37°C/5% CO₂ et les produits de réactions sont extraits suivant des temps d'incubation s'étalant sur une période de 2 à 72 h après l'addition du substrat radiomarqué. Au moment de l'extraction, le milieu est recueilli et centrifugé pendant 10 min à 2 000 rpm pour se débarrasser des cellules et débris cellulaires. Les milieux sont transférés dans des tubes de borosilicate auxquels on ajoute 10 nmoles de précurseur froid. La solution est alors extraite au chlorure de méthylène (2.5 ml) et la phase organique est recueillie et séchée à 37°C sous un courant d'azote gazeux. Les stéroïdes sont dissous dans 20 µl de méthanol et soumis à une chromatographie sur couche mince en présence de marqueurs froids.

20. ANALYSE DES PRODUITS D'EXPRESSION

20.1 Produits de traduction *in vitro*

Les produits de traduction *in vitro* sont séparés sur gel polyacrylamide 10% vertical en conditions dénaturantes. Une fraction du milieu de traduction *in vitro* (15 µl de lysat) est ajoutée à un volume égal de tampon d'échantillon 2×²⁰. La solution est chauffée à 100°C pendant 5 min et appliquée sur un gel concentrateur polyacrylamide 5% surplombant le gel séparateur 10%. La tension est réglée à 200V pendant 1 h. À la fin de la migration, le gel est fixé dans une solution d'acide acétique 10%/éthanol 50% pendant 30 min avec agitation faible. Le gel est par la suite trempé pendant 30 min dans la solution fluorographique Amplify® (Amersham) pour augmenter l'intensité du signal sur autoradiogramme. Le gel est

²⁰ Tampon 2×: SDS 3.6%, glycérol 18%, 2-mercaptoéthanol 1.44M, bleu de bromophénol 0.01% et Tris-Cl 112mM à pH 6.8

ensuite séché sous vide à 80°C sur papier Whatman 3M et exposé dans un appareil Phosphorimager modèle 400E (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

20.2 *Western blot* (Immunotransfert)

Après la migration, le gel est transféré par électro-transfert sur membrane de nitrocellulose 0.2 µm (Bio-Rad) aux dimensions du gel dans un tampon de transfert²¹ pendant 1 h à 4°C sous un courant constant de 170 mA. Le transfert complété, la membrane est trempée dans un tampon TBS (NaCl 0.5M et Tris-Cl 20mM à pH 7.5). La membrane est bloquée dans du TBS-T (TBS + Tween 20 0.5%) contenant 10% de lait écrémé en poudre (IGA) pendant 1 h avec agitation. L'excédant de lait est ensuite débarrassé par lavages multiples dans du TBS-T avec agitation forte (3× 20 min). L'anticorps primaire est ensuite incubé pendant 1 h dans un minimum de volume de tampon TBS-T (0.25 ml/cm²) additionné de BSA 1% à raison de 2 µg/ml d'IgG polyclonal ou d'une dilution appropriée d'un anti-sérum immun (1:500 à 1:1000). La membrane est à nouveau lavée trois fois dans du TBS-T. L'anticorps est ensuite reconnu par la protéine A couplée à la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*, HRP, Amersham NÀ 9120) par une incubation de 30 min dans un minimum de TBS-T additionné de 3% de lait écrémé en poudre à raison d'une dilution de 1:500 à 1:1000 de la protéine A. À nouveau, la membrane est lavée trois fois comme décrit précédemment.

La détection de l'anticorps primaire profite de l'activité peroxydase de l'enzyme couplée à la protéine A. La trousse de détection (Amersham) inclut 2 solutions qui, une fois mélangées 1:1, fournissent à l'enzyme le substrat nécessaire à son activité. La longueur d'onde émise peut imprégner un film RP X-OMAT (Kodak) et un signal adéquat peut apparaître après seulement quelques secondes d'exposition ou jusqu'à une heure selon les cas.

20.3 Activités *in vitro*

20.3.1 Chromatographie sur couche mince

Les stéroïdes sont appliqués sur plaque de verre recouverte de silice (Aldrich

²¹ Tris 20mM, glycine 0.15M et méthanol 20%

Chemical Co., Milwaukee, WI). 20 µg de stéroïdes non radioactifs correspondant chacun aux stéroïdes radioactifs attendus par la réaction sont aussi appliqués dans des couloirs voisins. La migration des produits est réalisée dans un mélange de trois solvants (système I) dans les proportions suivantes; chlorure de méthylène:méthanol:eau 300:20:1 (v/v)(Curnow *et al.*, 1991) jusqu'à ce que le liquide atteigne le haut de la plaque (environ 1 h). Dans le premier système, les composés 18OH-DOC et 19OH-DOC co-migrent sur la plaque. Pour arriver à les séparer, la silice correspondant à la région de migration des deux stéroïdes est aspirée de la plaque et récoltée dans des cupules de cellulose (Whatman International Ltd, Maidstone, Engl.). Les métabolites sont élués dans de l'éthanol et soumis à une nouvelle migration sur une plaque déposée dans un mélange de deux solvants (système II) dans les proportions suivantes; chloroforme:éthanol 24:1 (v/v). Un système de migration en deux dimensions sur la même plaque a aussi été exploité dans certains cas en utilisant les deux systèmes mentionnés pour chacune des dimensions. La plaque est retirée, séchée sous courant d'air et la position des stéroïdes standards est notée sous illumination ultra-violette à 254nm. La plaque est ensuite assujettie à une autoradiographie en utilisant un appareil Phosphorimager modèle 400E (Molecular Dynamics).

20.3.2 Immunoprécipitation

20.3.2.1 Produits de traduction *in vitro*

À 5 ou 20 µl d'un milieu de traduction *in vitro*, 1 ou 5 µl d'un sérum immun anti-aldo ont été ajoutés et le volume complété à 400 µl par addition d'une solution RIPA²². La réaction antigène-anticorps se poursuit pendant 16 h à 4°C avec agitation lente. Quarante µl d'une solution à 50% de protéine A couplée à la sépharose CL-4B (Pharmacia) contenant 0.3% de BSA ont été ajoutés pour spécifiquement immunoprécipiter tous les anticorps IgG présents. Cette réaction s'est déroulée pendant 6 h à 4°C. La protéine-A/sépharose est ensuite précipitée par centrifugation à 2 000 rpm pendant 1 min et lavée 6 fois par addition de 400 µl de RIPA, incubation de 10min avec agitation et centrifugation subséquente pour

²² RIPA: NP40 1%, désoxycholate de sodium 0.5%, SDS 0.1% dans du PBS (+ inhibiteurs de protéases: PMSF 10mg/ml, aprotinine 30 µl/ml)

n'obtenir à la fin, qu'un culot de protéine-A/sépharose. Ce dernier est resuspendu dans un volume égal de tampon d'échantillon 2× puis placé à 100°C pendant 5 min. Le surnageant est déposé sur gel SDS-PAGE et soumis à une fluorographie.

20.3.2.2 Produits de synthèse des cellules COS-1

À 30 h post-transfection ou lorsque les cellules ont atteint une confluence d'environ 80%, le milieu de culture est retiré des pétris de 6 cm de diamètre et remplacé par un milieu DMEM (sans méthionine, Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau fœtal dialysé contre 500 vol. de PBS²³ stérile. L'incubation se poursuit pendant environ 1 h, dans le but d'épuiser toutes réserves internes de méthionine. Le milieu est retiré puis remplacé par 2 ml de milieu identique mais contenant de 50 µCi/ml de [³⁵S]-méthionine (>1000 Ci/mmol, Amersham). Le marquage des protéines se poursuit pendant une période de 10 h. Les protéines radio-marquées sont extraites de la façon suivante. Le milieu radioactif est soigneusement retiré du pétri et la monocouche cellulaire est lavée avec du PBS. 3 ml de solution RIPA (+ inhibiteurs de protéases) sont ajoutés aux cellules et incubés avec agitation horizontale rotative pendant 10 min. La solution est soigneusement retirée et conservée alors que le pétri est lavé avec 1 ml de RIPA additionnel. La lyse des cellules est assurée par passages répétés au travers d'une aiguille 21G. Les noyaux, mitochondries et autres débris cellulaires sont éliminés par centrifugations successives à 4°C d'abord pendant 15 min à 500 rpm puis pendant 20 min à 40 000 rpm. Le surnageant clair est conservé puis soumis à une immunoprécipitation.

L'immunoprécipitation s'est déroulée dans des conditions similaires à celles déjà exposées. Cette fois, l'anticorps a été ajouté directement aux lysats cellulaires, lesquels ont été incubés avec rotation à 4°C pendant la nuit. Aux lysats correspondants au P450aldo, 15 µl de sérum immun anti-aldo (8 µl pour les contrôles négatifs) ont été ajoutés alors que pour les lysats attribuables au P450c11, 20 µg d'anticorps polyclonal anti-11β bovin (10 µg pour les contrôles négatifs) ont été ajoutés. L'immunoprécipitation est réalisée avec 150 µl d'une solution 50% protéine-A couplée au sépharose CL4-B et ce, pendant 16 h. Le lavage du culot

²³ PBS: NaCl 0.14M, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1.5mM

de sépharose a nécessité 6 lavages de 4 ml chacun avec RIPA et au culot de sépharose, 100 μ l de solution d'échantillon 2 \times ont été ajoutés alors que seulement la moitié de l'échantillon a été séparé sur gel.

RÉSULTATS

L'objectif majeur de cette recherche étant la caractérisation enzymatique des cytochromes P450ald0 et P450c11 de surrénales de hamster, le point de départ du projet consistait à isoler l'ADNc associé à chacune de ces enzymes afin d'étudier leur mécanisme de réaction dans des systèmes d'expression hétérologues.

Dans notre laboratoire, deux banques d'ADNc de surrénales de hamsters (Stratagene & Clontech) ont été criblées de façon à mettre en évidence les séquences codantes des cytochromes P450ald0 et P450c11. Au total, 7 ADNc pour l'enzyme P450c11 et seulement 1 pour P450ald0 ont été isolés (Bernard, 1994). Aucun ADNc ne détenait toutefois la séquence codante entière. Tous possédaient le codon de terminaison TAG, mais aucun ne comprenait celui d'initiation ATG. Le plus long était amputé d'au moins 6 bases dont l'ATG initial lorsque cette séquence était comparée avec les séquences publiées du rat ou de la souris. Malgré le caractère dissuasif de ces inconvénients, un des objectifs poursuivis était l'étude des séquences promotrices des gènes *CYP11B1* et *CYP11B2*. Isoler et caractériser ces gènes dans leur ensemble signifierait aussi combler les informations manquantes au niveau de la séquence des ADNc, un aspect limitant pour l'expression de ces deux protéines.

Une étude comparative portant sur les activités spécifiques de chacune de ces protéines apporterait certaines précisions sur le rôle de cette dualité de fonctions que se partagent les deux isozymes chez certains mammifères, alors que chez le porc ou le boeuf, une seule enzyme semble responsable de la synthèse de l'aldostérone à partir de la DOC.

1. CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADN GÉNOMIQUE DE HAMSTER

1.1 Construction d'une banque d'ADN génomique de hamster

À partir de foies de hamsters expédiés à la compagnie Stratagene (La Jolla, CA), celle-ci s'est engagée à produire une banque d'ADN génomique selon les directives du laboratoire. Cette librairie a été réalisée en substituant la région centrale du vecteur de remplacement Lambda DASH® II (Stratagene) par ligation de fragments d'ADN digérés partiellement *EcoRI* de 9 à 23 kb de longueur (fig. 12). Ces constructions d'ADN ont ensuite été ajoutées à des lysats de bactéries lysogéniques pour permettre l'encapsidation de l'ADN dans des phages. Cette

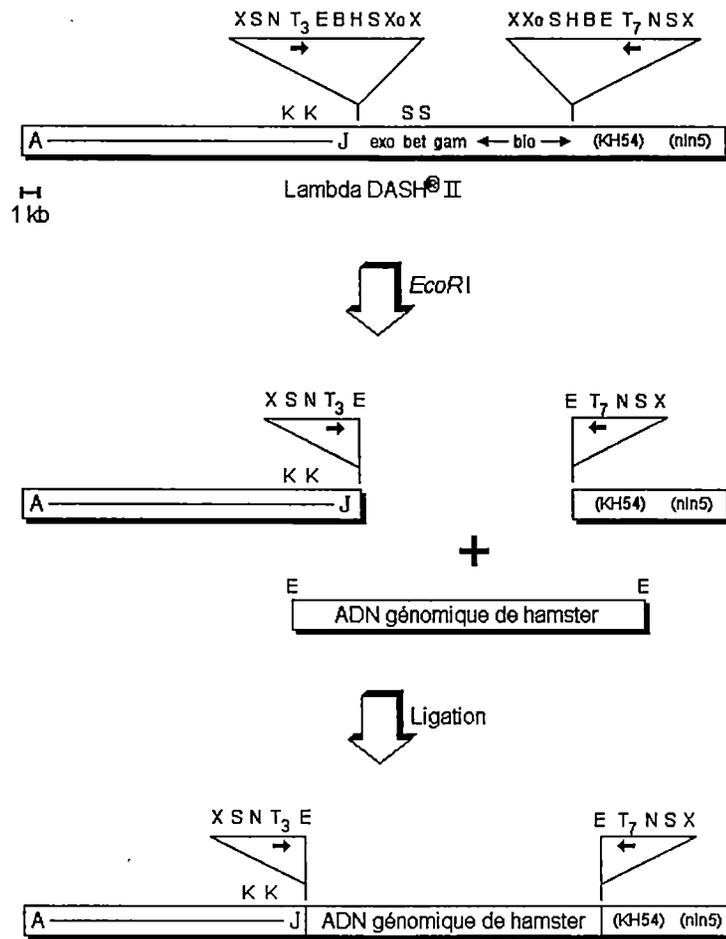


Figure 12. Stratégie de construction de la banque d'ADN génomique de hamster dans lambda DASH[®]II. La portion centrale du vecteur est retirée par digestion *EcoRI* puis remplacée par un fragment d'ADN génomique digéré avec la même enzyme. *EcoRI*, *XbaI*, *XhoI*, *SmaI*, *NotI*, *BamHI*, *HindIII*, *KpnI*

banque d'ADN génomique nous a été livrée sous formes de particules virales en suspension dans un volume <300 μ l à l'intérieur d'un micro-tube conservé dans la glace sèche.

1.2 Détermination du titre de la banque d'ADN génomique

La concentration de phages dans la suspension étant très élevée (indication: 2×10^6 pfu/ μ l) et de plus, le pouvoir infectieux des particules diminuant avec le temps, il était

important de connaître le titre au moment de l'utilisation de la banque. Par dilutions successives, selon nos mesures, cette valeur s'établissait plutôt à 1.6×10^6 pfu/ μ l. Les solutions de phages dilués ont été utilisées préférablement à la solution originale puisque la détermination du titre s'effectuait à partir de ces dilutions.

1.3 Criblage de la banque d'ADN génomique

Une plaque de lyse prenait l'apparence d'une région circulaire semi-transparente de 1-2 mm de diamètre entourée d'un tapis bactérien opaque. La formation d'une plaque de lyse est issue de l'infection d'une seule bactérie qui finit par lyser et répandre autour d'elle d'autres particules virulentes qui peuvent infecter les bactéries avoisinantes. Par contre, ce processus ralentit et s'arrête lorsque les bactéries dépassent le stade logarithmique de croissance. C'est en estimant la taille approximative des plaques de lyses générées après une incubation d'une nuit que l'on peut extrapoler et calculer le nombre nécessaire de plaques de lyse pour recouvrir totalement un tapis bactérien de surface donnée. Pour estimer le nombre total N de phages à cribler, considérons la formule de Clarke & Carbon (1976),

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

où P représente la probabilité de retrouver un phage contenant le gène recherché et f, la fraction du fragment d'ADN inséré dans le vecteur par rapport au génome total. Théoriquement, chacun des phages contient un insert d'ADN d'environ 20 kb sur un génome total de 3×10^6 kb de longueur (estimé d'après le génome humain, $f = 6.67 \times 10^{-6}$). D'après cette formule, un nombre N de 6.9×10^5 plaques de lyse devront être criblées pour assurer à 99% la probabilité d'obtenir au moins un clone possédant le gène ciblé. Ce nombre théorique a toutefois été réduit à environ 6×10^5 plaques de lyse réparties dans 4 pétris de 23×23 cm², ceci ayant pour effet d'abaisser le facteur de probabilité à 98.2%.

Lors du premier criblage avec la sonde murine, l'application d'une seule membrane de nylon sur les pétris a permis de détecter plus d'une trentaine de points positifs (série 1) pour un seul pétri. Or, un tel nombre ne correspondait pas à ce qui avait été estimé et il n'était pas faux de croire que la plupart des points étaient de faux-positifs. C'est pourquoi le criblage

a été repris en duplicata. Au second criblage ce nombre a chuté à 23 points au total (série 2). De ces 23, 13 clones ont continué à démontrer une reconnaissance par la sonde utilisée jusqu'au criblage d'ordre III.

Comme il existait la possibilité que 2 clones ou plus soient identiques, des regroupements de clones ont été établis en fonction de leur patron de restriction (fig. 13). Les enzymes *XbaI* et *BamHI* permettaient très clairement d'identifier les clones #46 et #52 comme faisant partie d'une même famille, donc potentiellement identiques. Afin de statuer rapidement sur la nature de ces 13 clones positifs, l'utilisation de 3 sondes spécifiques a permis d'identifier des candidats potentiels (fig. 14). La sonde HAM-11BN dérivé des ADNc initiaux reconnaît les dernières bases qui codent pour le peptide signal des deux protéines et la sonde 1346-EXON9 s'hybride à la fin du dernier exon. La sonde HAM-ALDO tant qu'à elle, reconnaît spécifiquement la forme P450aldo.

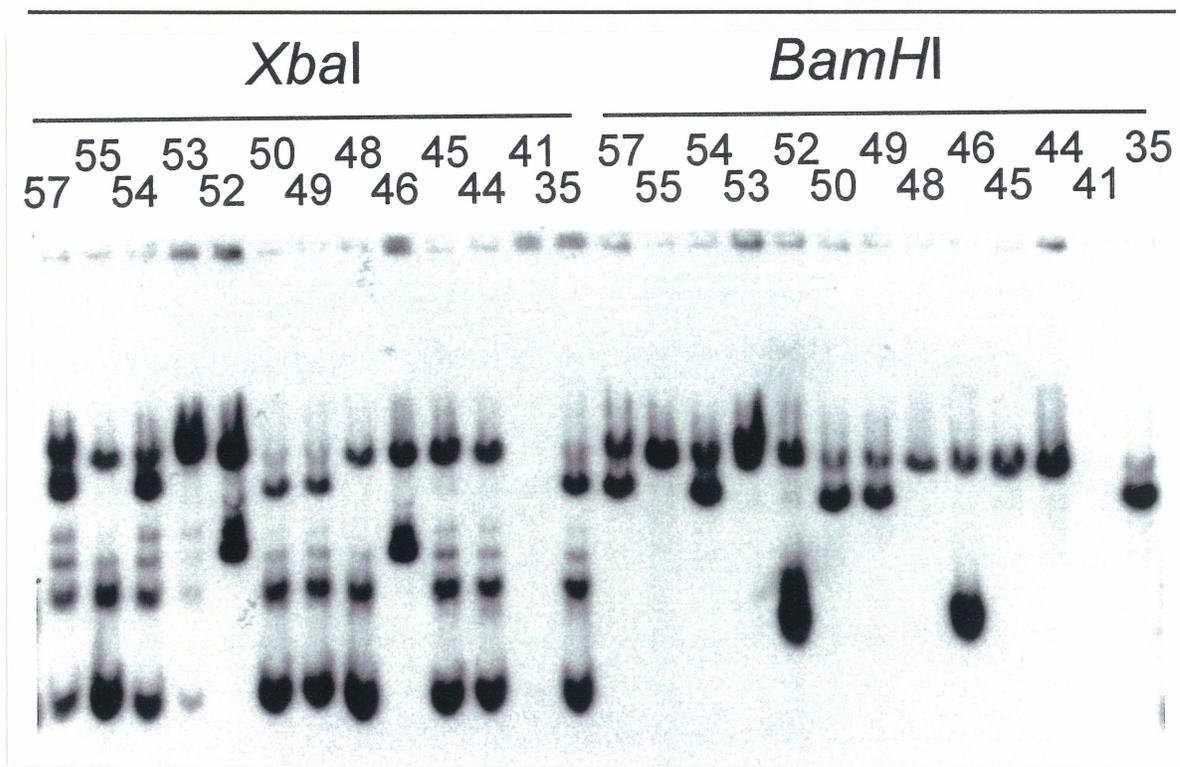


Figure 13. Reconnaissance de fragments, générés par digestion enzymatique, par la sonde P450c11 de souris. Les clones sont issus de la seconde série de criblage. Les chiffres réfèrent aux numéros des clones isolés. Les enzymes employées sont identifiées.

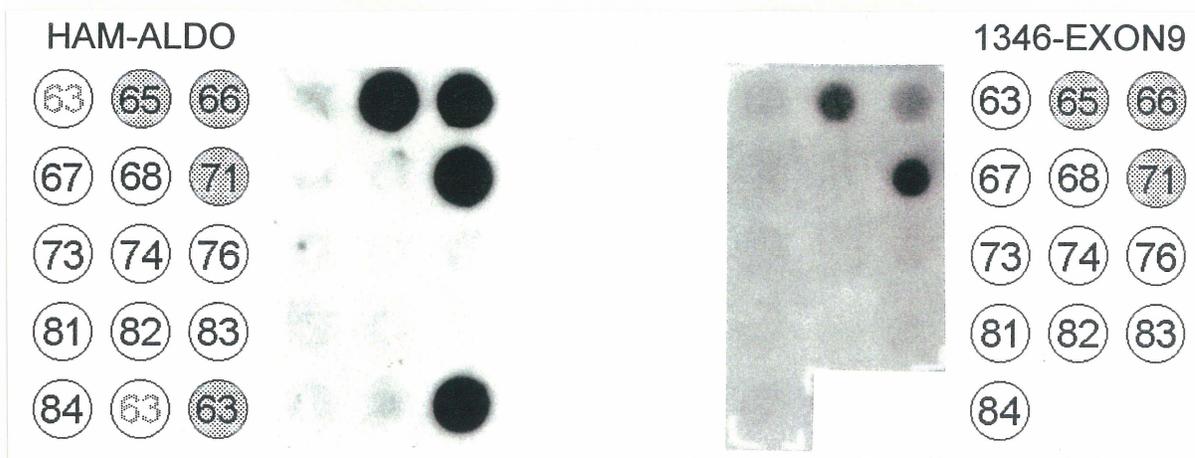


Figure 14. Sélection, par dot blot, des clones positifs après hybridation de sondes spécifiques. Les clones sont issus de la troisième série de criblage. La numérotation des clones, la sonde utilisée ainsi qu'un aperçu de la distribution des clones sur la membrane sont schématisés près de l'autoradiogramme correspondant

Dans la deuxième série, seulement 2 clones semblaient "complets" et ces mêmes clones étaient d'origine P450aldo. Un troisième criblage n'a pas permis d'isoler le gène du cytochrome P450c11 (série 3) d'après le patron d'hybridation avec la sonde HAM-11BN. Par contre, 3 nouveaux clones comprenaient toutefois le gène *CYP11B2* (Tableau V).

TABLEAU V. Pré-sélection des clones positifs en fonction de leur reconnaissance par des sondes spécifiques

(SÉRIE) CLONES	CONSERVER JUSQU'AU CRIBLAGE D'ORDRE III	HAM- 11BN	HAM- ALDO	1346- EXON9
(1) 1 à 34	---	?	?	?
(2) 35 à 57	35, 41, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 57	tous	46,52	46,52
(3) 58 à 84	63, 65, 66, 67, 68, 71, 73, 74, 76, 81, 82, 83, 84	tous	63, 65, 66, 71	65, 66, 71

1.4 Caractérisation des clones positifs

L'identification des clones P450aldo a débuté par des études de *Southern*. Plusieurs

digestions enzymatiques de l'ADN de phages suivies par une hybridation avec la sonde d'ADNc du P450c11 de souris (Wong *et al.*, 1989) ont permis d'établir une carte de restriction sommaire des clones retenus. La présence d'un fragment de restriction *EcoRI* (0.7 kb) particulier au clone #66 lui conférait l'exclusivité d'utilisation étant donné que ce fragment supplémentaire faisait du #66 le clone le plus long.

1.5 Stratégie de séquençage du clone #66

Afin de confirmer que le clone #66 représente le gène *CYP11B2*, le séquençage d'une portion de l'insert a été entrepris. Arbitrairement, une section de l'insert délimitée par les enzymes *SacI* et *EcoRI* de 8.2kb a été choisie pour être séquencée. Par le fait même, près de 4 kb de la région promotrice du gène *CYP11B2* seront séquencés. Les fragments de restriction du clone #66 reconnus par la sonde de souris ont été récupérés et sous-clonés dans le vecteur pBluescript KS⁺ (Stratagene). Au total, trois fragments *EcoRI/EcoRI* de 0.7, 1.7 et 2.4 kb ainsi qu'un fragment *SacI/ApaI* de 4.0 kb ont été séquencés au complet dans les deux orientations. L'extrémité 3' de l'insert du clone #66 correspond au site *EcoRI* se trouvant dans le 7^{ième} exon du gène (fig. 15). Par contre, en combinant ces informations avec les séquences du clone λ 6 de Bernard (1994), une séquence sommaire de l'ADNc du cytochrome P450aldo a été élaborée. Ce n'est que plus tard que la détermination de la séquence de la portion 3' du gène a été entreprise par amplification PCR à partir d'ADN génomique de hamster (fig. 16).

2. ISOLATION DE L'ADNc DU P450ALDO DE HAMSTER

2.1 Stratégie d'isolation de l'ADNc par RT-PCR

À défaut de pouvoir isoler un clone d'ADNc comprenant la séquence codante complète du cytochrome P450aldo, une autre approche a été envisagée. Proposée par Chelly *et al.* (1989), cette technique appelée initialement cDNA-PCR inclue une procédure d'isolation de l'ARN_{total}, une transcription inverse de cet ARN en ADNc et une amplification PCR de l'ADN complémentaire par des amorces spécifiques.

En comparant les séquences d'ADNc des clones λ 1 (P450c11) et λ 6 (P450aldo) ainsi que la séquence du clone #66 (*CYP11B2*), trois amorces oligonucléotidiques ont été conçues

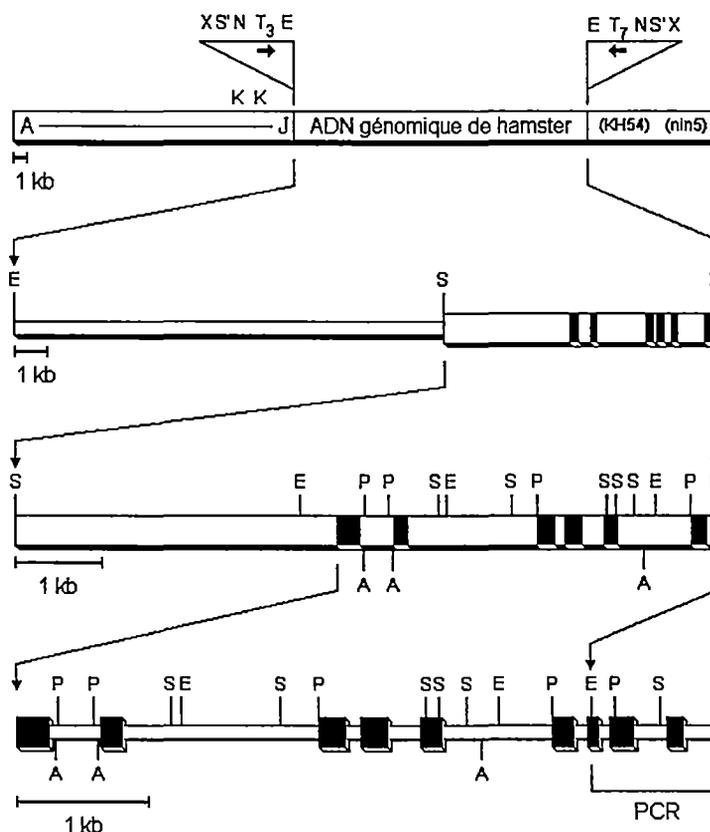


Figure 15. Situation du clone #66. Le fragment *SacI/EcoRI* de 8.2 kb indiqué par une boîte a été excisé de l'insert et séquencé au complet. Les exons I à IX sont identifiés en foncés. PCR indique une section du gène déterminée par amplification PCR. *EcoRI, XbaI, S'mal, NotI, SacI, PstI, ApaI*

de façon à permettre l'amplification spécifique de l'ADNc du cytochrome P450aldo avec et sans les séquences codantes pour le peptide signal (fig. 16).

La stratégie de départ étant de pouvoir exprimer la protéine P450aldo autant chez les bactéries que chez les cellules eucaryotes, un détail important concernant la composition de l'enzyme mature allait modifier la stratégie de l'amplification. Dans les cellules glomérulées du cortex surrénalien, l'enzyme P450aldo est d'abord traduite en tant que pré-protéine. Elle possède une séquence peptide signal de 24 acides aminés du coté NH₂ terminal qui dirige la protéine vers la mitochondrie où elle est transportée dans la matrice interne. Or, chez les cellules COS, ce signal peptide est reconnu par le système cellulaire, mais dans un système

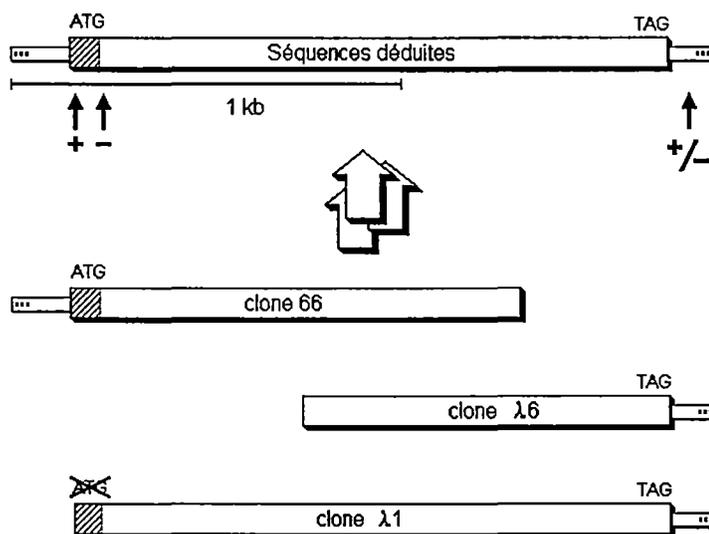


Figure 16. Stratégie d'amplification de l'ADNc du cytochrome P450ald. À partir des séquences déduites, certaines régions particulières ont servi de matrice pour la sélection d'amorces PCR (+, - et +/-). Les séquences codantes sont indiquées en relief. La région hachurée représente les séquences codant pour le peptide signal

bactérien où une telle séquence risque de ne pas être reconnue, il est préférable qu'elle ne s'y retrouve pas.

Dans un premier cas, là où le peptide signal doit demeurer présent, l'amorce est conçue pour pouvoir amplifier dès le codon d'initiation au début du peptide signal. Dans le second cas, l'amorce est conçue pour reconnaître la séquence codant pour les premiers acides aminés de la protéine mature. Un codon d'initiation artificiel est ajouté en amont afin de permettre le début de la synthèse protéique à cet endroit précis (tableau VI).

2.2 Isolation de l'ARN_{total} de surrénales de hamsters

Les hamsters soumis à une diète restreinte en Na⁺ étaient nourris *ad libitum*, mais une telle variation dans leur alimentation risquait de ne pas convenir à certains individus. L'utilisation de 10 hamsters permettait d'équilibrer les risques de jeûne, réduisait la possibilité d'amplifier un transcrite aberrant et augmentait la masse totale de tissu frais. À partir de 20

TABLEAU VI. Amorces pour l'amplification de l'ADNc de P450aldo

Amorce	5' – Séquence – 3'	Site (5' à 3')	T _m
(+)	<u>ATC</u> (ATG) GCA CTC AGG GCA AAG GCA GAT	1 à 24	68°C
(-)	<u>ATC</u> (ATG) GGC ACC ACA GCA GCA CTG GCC	74 à 96	73°C
(+/-)	<u>ATC</u> CCC AAA ACA ACA TCC TGC TGG CAA	1582 à 1605	68°C
HAM-ALDO	TCCCTGGGACATTAGTTCTGCCACGATGCCACTGT	860 à 894	76°C

- La nomenclature des amorces dépend de la possibilité d'obtenir (+) ou non (-) l'amplification du peptide signal lorsqu'en présence de l'amorce anti-sens (+/-)

- Les séquences soulignées représentent des bases supplémentaires qui ont été ajoutées en fonction du sous-clonage. Les séquences entre parenthèses représentent le codon d'initiation de la traduction.

glandes surrénales (290 mg au total), une quantité de 660 µg d'ARN_{total} a pu être purifiée. L'isolation d'ARNm sur colonne d'oligo(dT) a été envisagée à cette étape-ci. Or, en tenant compte des facteurs suivants tels que des risques de contamination de l'échantillon d'ARN_{total}, des possibilités de dégradation induites par des manipulations nombreuses et étendues dans le temps ainsi que l'avantage de la sensibilité du PCR, une telle pratique n'a pas été retenue.

2.3 Détermination de la spécificité de l'amorce anti-sens

Le patron d'expression du gène *CYP11B2* a été caractérisé par buvardage de type *Northern* avec de l'ARN_{total} de surrénales de hamsters sous diètes restreintes en Na⁺. Telle qu'illustrée à la fig. 17, la sonde (+/-) s'hybride à deux ARNm de 2.0 et 3.3 kb. Un patron d'hybridation identique est obtenu en substituant l'amorce (+/-) par la sonde d'ADNc du clone λ6 (non illustré). Une telle spécificité de reconnaissance suggère qu'utilisée en tant qu'amorce à la réaction de transcription inverse, l'amorce (+/-) ne devrait s'hybrider qu'au niveau seulement des ARNm de P450aldo.

2.4 Transcription inverse de l'ARNm du cytochrome P450aldo

Quatre systèmes de transcription inverse différents ont été appliqués à l'ARN_{total} de surrénales de hamsters. Les résultats de ces essais n'étaient révélés qu'une fois la réaction PCR complétée et les produits d'amplification analysés. Aucun *monitoring* de la réaction de

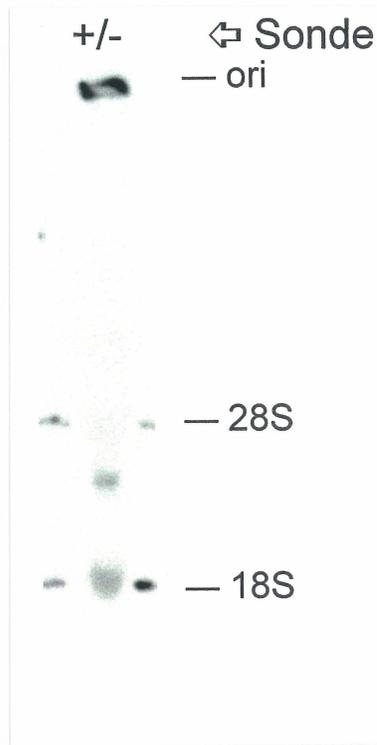


Figure 17. Analyse *Northern* des ARNm encodant le cytochrome P450aldo de hamster. Des traits indiquent la position de migration des ARNs ribosomiaux 18 et 28S. ori, site du dépôt de l'échantillon

transcription inverse n'a toutefois été réalisé. Diverses possibilités de contrôler cette étape déterminante existaient toutefois. Une de ces méthodes aurait consisté à séparer les produits de réactions radiomarqués sur gel et visualiser les bandes par autoradiographie.

L'homologie existante entre les ADNc des deux cytochromes dans leur région 5' étant de 100%, les réactions de transcription inverse ont été amorcées avec l'oligonucléotide spécifique au cytochrome P450aldo. Amorcer cette réaction avec des amorces d'oligo(dT) qui iraient s'hybrider à la queue poly(A) de tous les ARNm signifierait la transcription inverse des ARNm_{totaux}. Étant donné que l'amorce sens reconnaît l'ARNm des deux protéines, il fallait préconiser au départ l'élimination des séquences de P450c11.

Des quatre systèmes, seul le système combinant la transcriptase inverse MMuLV (Pharmacia) ainsi que l'enzyme thermostable Taq (Promega) a démontré une capacité à amplifier une bande de 350pb et une autre de 700pb (fig. 18). Aucune bande n'était visible pour les trois autres systèmes. Ces résultats préliminaires laissaient entrevoir la possibilité d'améliorer les conditions de réactions du système MMuLV/Taq.

Les modifications apportées sont les suivantes; un tampon de transcription inverse adapté à l'enzyme MMuLV-RT (\neq d'AMV-RT), l'optimisation des concentrations d'enzymes ainsi que de l'ARN, l'ajout d'une étape de dénaturation de l'ARN précédant l'hybridation de l'amorce (+/-) et l'optimisation des conditions de PCR (tampon/enzyme).

Des essais de transcription inverse en présence d'une autre amorce aussi spécifique,

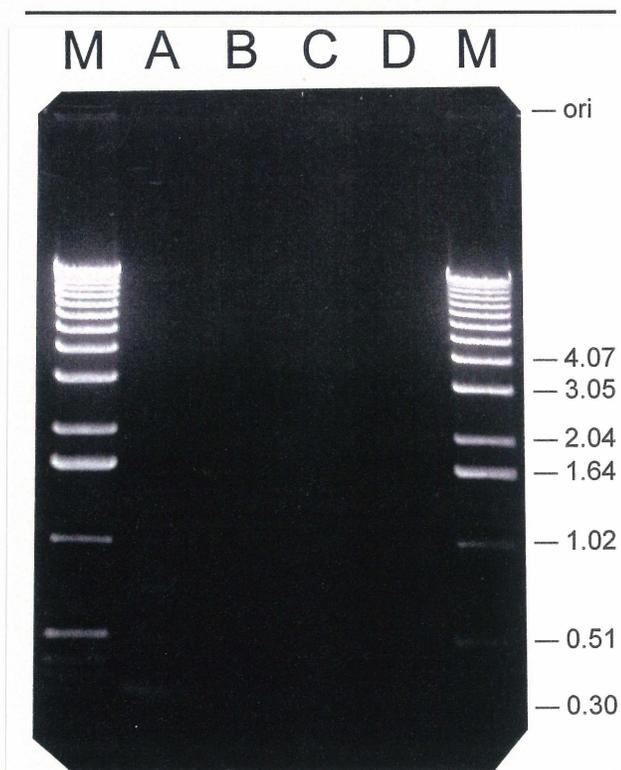


Figure 18. Essai de 4 systèmes RT-PCR. A) Combiné MMuLV-RT/Taq; B) Combiné Tet-z/Tet-z; C) combiné AMV-RT/Taq; D) combiné AMV-RT/pfu. Une bande de très faible intensité sur la photo est visible en A près du marqueur de 0.30 kb; (M) marqueur 1kb ladder (Gibco BRL)

l'amorce HAM-ALDO avait pour effet de déterminer si la taille du produit amplifié pouvait être un élément défavorable à la réaction d'amplification. Or, il semble que la taille du fragment amplifié ne soit pas responsable du non fonctionnement de la réaction. En effet, ni le fragment attendu d'environ 900pb avec l'amorce HAM-ALDO, ni le fragment attendu de 1.6kb avec l'amorce (+/-) ne sont perceptibles sur gel après migration des fragments de PCR (fig. 19). Les bandes présentes sur le gel dont les longueurs varient de 50 à 350pb ne correspondent pas aux fragments souhaités. Par contre, leur intensité confirme qu'il y a eu amplification non spécifique d'un fragment d'ADNc de P450aldo puisque les bandes obtenues par amplification avec l'amorce (+) sont toujours de plus haut poids que les bandes équivalentes obtenues avec l'amorce (-).

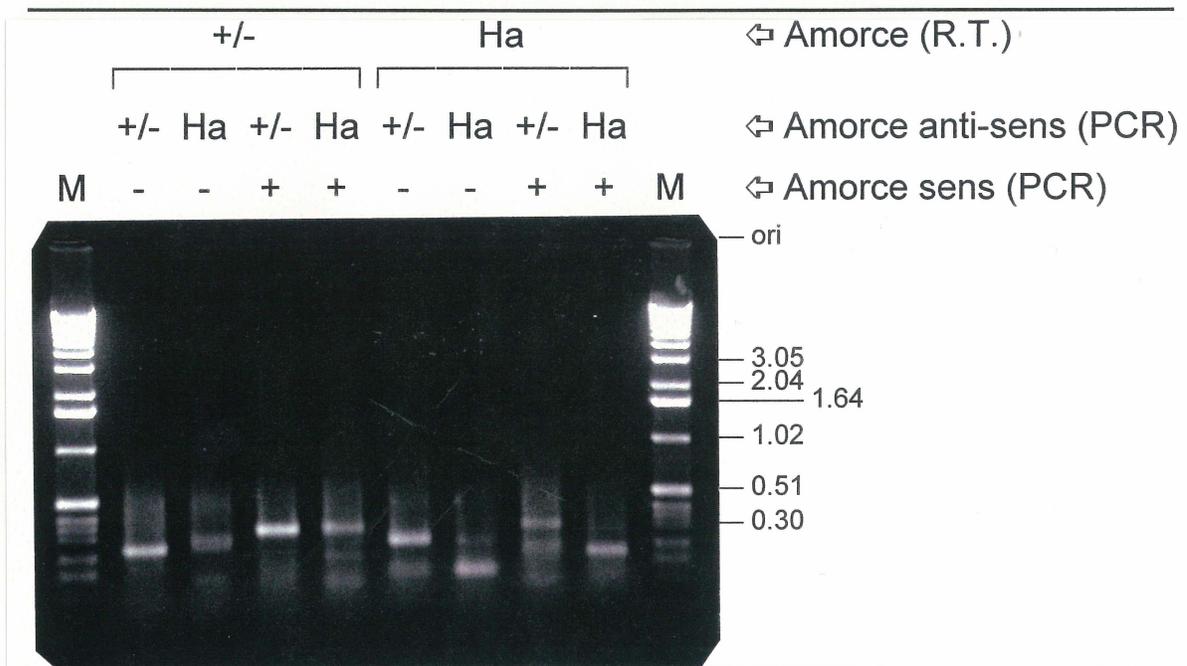


Figure 19. Influences de l'amorce anti-sens et de la longueur du fragment amplifié sur la spécificité d'amplification par PCR. (Ha) amorce HAM-ALDO; (M) marqueur 1 kb ladder

Puisque la taille des fragments générés après amplification PCR n'excédait jamais 400pb, il existait sûrement des facteurs qui freinaient la progression de l'une ou l'autre des enzymes lors de la transcription inverse ou de l'élongation des brins d'ADN. L'ARN est souvent impliqué dans de fortes structures secondaires qui provoquent un repliement du brin

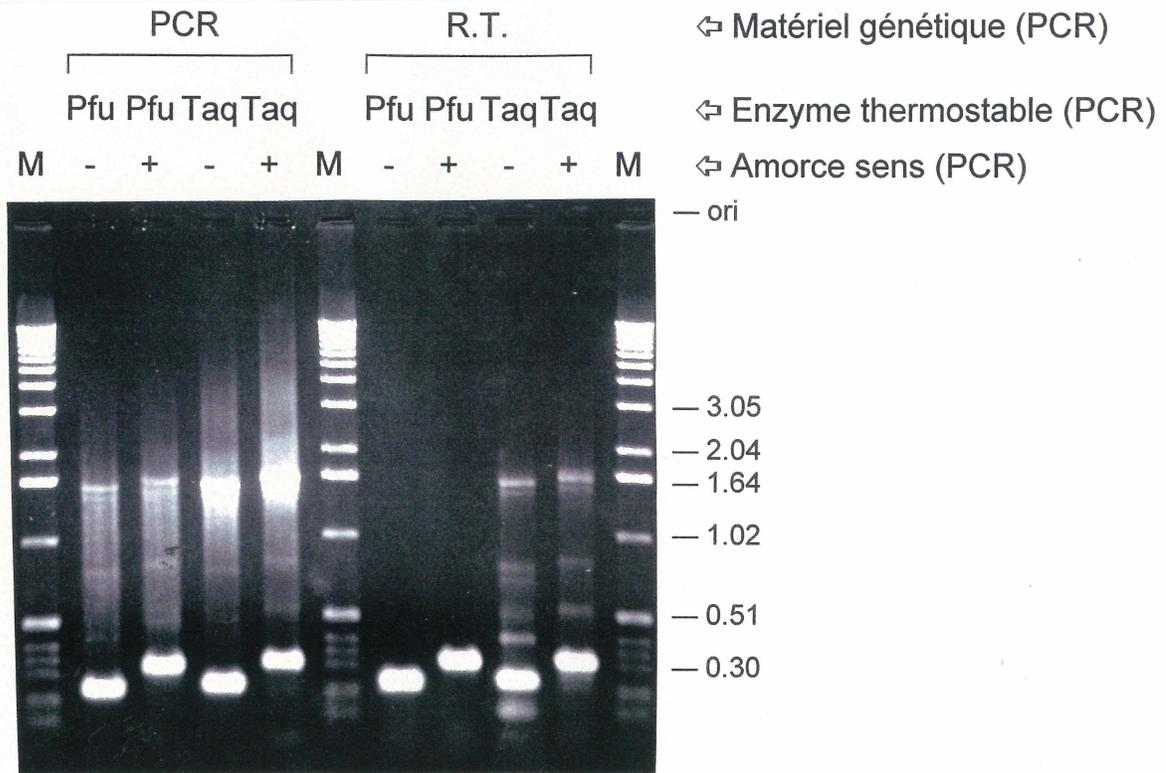


Figure 22. Effet du choix de l'enzyme thermostable sur l'amplification PCR. L'ADN de départ provient d'un aliquote de milieu de transcription inverse (R.T.) ou d'une amplification PCR (PCR). Chacune des enzymes est testée dans son propre tampon d'amplification. (M) marqueur 1 kb ladder

L'enzyme thermostable Pfu (de *Pyrococcus furiosus*, Stratagene) possède une activité de lecture d'épreuve 3'-5'; cette caractéristique lui permet une fidélité 12× supérieure à la Taq. Toutefois, ses piètres performances lors d'amplification d'un aliquote de milieu de transcription inverse ne lui ont pas valu d'être utilisé davantage (fig. 22).

Ainsi, l'utilisation de l'amorce sens (+) permet d'obtenir une bande de 1.6 kb alors qu'avec l'amorce sens (-), une bande à 1.5 kb est obtenue. D'autres tentatives permettant d'éliminer les bandes majeures indésirables lors des amplifications par PCR n'ont pas été entreprises. Ces bandes de fortes intensités apparaissent simultanément avec la bande de 1.6kb (fig. 21), mais étant donné leur longueur, l'amplification de ces petits fragments est favorisée et l'accroissement logarithmique du nombre de ces fragments séquestre des amorces pouvant contribuer à l'amplification du fragment de 1.6 kb.

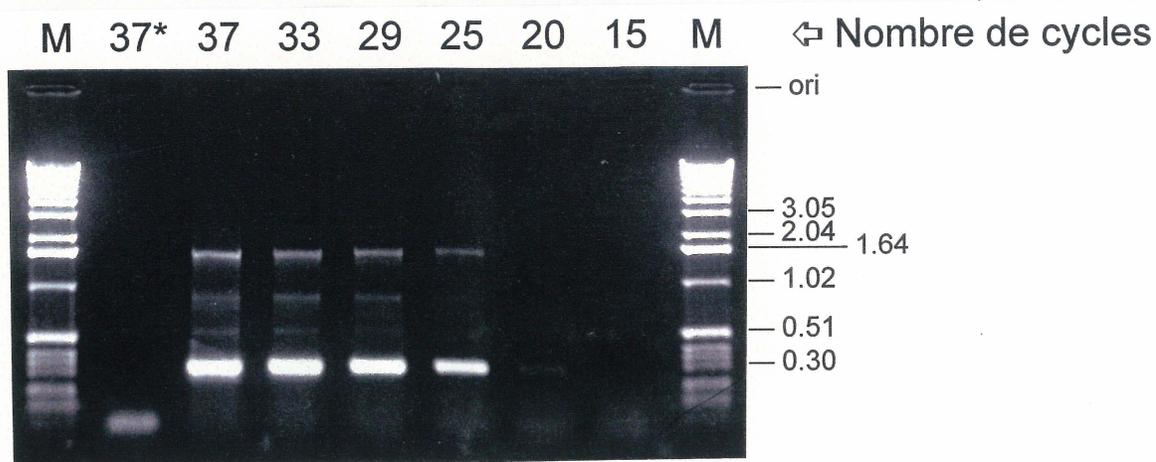


Figure 23. Effet du nombre de cycles sur l'amplification PCR. (*) contrôle négatif, tube sans ADN; (M) marqueur 1 kb ladder

Malgré un rendement d'amplification très faible, plusieurs réactions d'amplifications ont été combinées ensemble afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel pour les étapes subséquentes. Des tubes de 500 μ l à paroi ordinaire ont été utilisés pour certaines amplifications après épuisement du stock de tubes à parois minces (Cetus Corporation) conçus pour le PCR. Le transfert de chaleur entre le bloc thermique et le contenu du tube est d'autant meilleur que la paroi est mince (fig. 24). Ce qui au départ peut paraître anodin, devient soudainement déterminant dans le rendement d'une amplification.

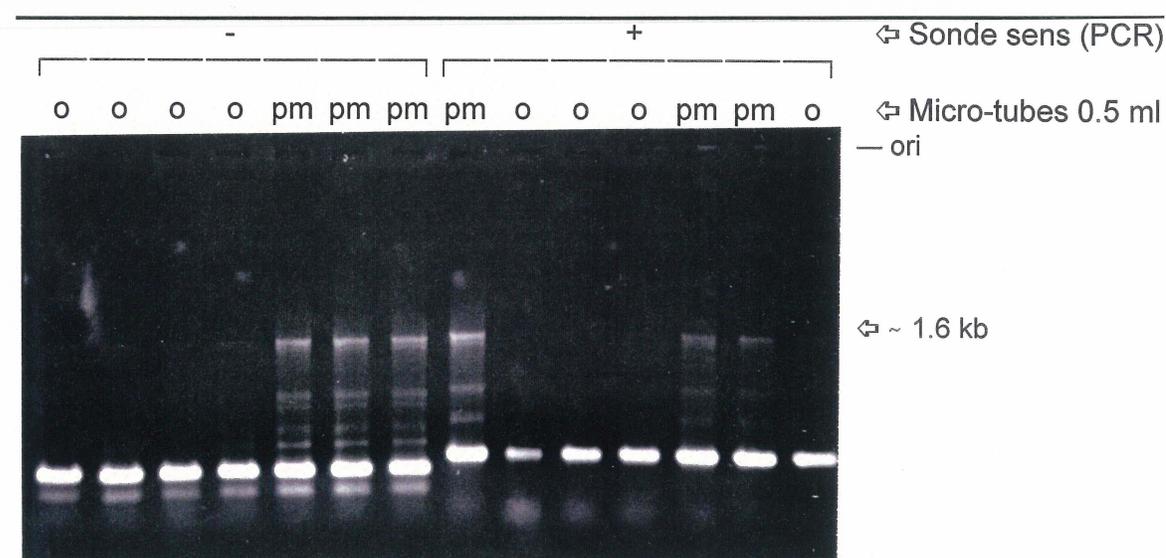


Figure 24. Effet de l'efficacité du transfert de chaleur entre le bloc thermique et le contenu du milieu réactionnel sur l'amplification PCR. Parois standards; parois minces

2.5 Sous-clonage des produits d'amplification PCR

Les contenus de 6 réactions de PCR identiques ont été séparés sur gel à l'intérieur d'un même puits afin de récolter la bande d'intérêt. Le traitement des fragments de PCR à la polymérase d'ADN du phage T₄ (Pharmacia) a permis de dégrader le résidu dA non apparié en extrémité 3' des fragments afin de rendre ces extrémités franches. Ces inserts ont été d'abord sous-clonés dans le site *EcoRV* du phagemide pBluescript KS⁺ pour les séquencer afin de constater si effectivement les combinés MMuLV/Taq ont apporté des mutations chez les fragments amplifiés.

Le traitement à la phosphatase alcaline aux extrémités *EcoRV* du vecteur pBluescript KS⁺ aurait empêché que le vecteur ne se religue sur lui-même. Mais, une telle étape n'aurait pas permis le clonage des inserts puisque les extrémités 5' des fragments de PCR sont composés des oligonucléotides de synthèse. Or, comme ces amorces sont synthétiques, elles ne possèdent pas de groupement phosphate en leur extrémités 5'. Le lien phospho-diester 5'-3' lors de la ligation n'aurait pas été possible, à moins de phosphoryler préalablement les oligonucléotides avant de procéder à la réaction de PCR. Étant donné la possibilité d'un rendement faible, ce genre de traitement n'a pas été retenu.

2.6 Sélection des colonies positives

Après transformation de bactéries compétentes XL-1 Blue (Stratagene), une sélection par transfert de colonies sur membranes de nylon suivi d'une hybridation avec une sonde d'ADNc du cytochrome P450c11 de souris a permis d'isoler 8 colonies positives pour le fragment avec le peptide signal (+) et 4 pour le fragment sans le signal (-). Un étalement de ces colonies sur pétri Bluo-Gal/IPTG permettait d'observer une certaine apparence de couleur bleu-pourpre au centre des colonies, couleur qui devait s'amplifier avec le temps (>4 h à 4°C). Une mini-préparation de l'ADN plasmidique des colonies teintées est venu confirmer la présence des fragments de PCR sous-clonés dans le site *EcoRV* de pBluescript et pouvant être excisés du vecteur avec la même enzyme. En revanche, chez les colonies complètement blanches, lorsque l'insert était présent, il n'était plus possible de le ressortir du vecteur avec *EcoRV* et si l'insert n'y était pas, le vecteur ne pouvait plus être linéarisé avec l'enzyme. Une

forme d'altération des sites GATATC impliqués empêchait leur reconnaissance par l'enzyme. De plus, étant donné que la longueur des inserts est divisible par 3 (1608 et 1536pb), le cadre de lecture ouvert pour la protéine β -galactosidase n'est pas affecté; celle-ci devient une protéine de fusion capable de conserver une partie de son activité, rendant possible la dégradation du composé Bluo-Gal (Gibco BRL) après α -complémentation.

2.7 Séquençage des clones positifs

Pour chacune des deux constructions, trois clones différents ont été conservés. Afin de déterminer la présence possible de mutations à l'intérieur des inserts, chacun d'eux a été séquençé jusqu'au moment où la présence de mutations s'avérait trop importante pour l'utilisation de l'insert. Une première surprise lors du séquençage a été de constater que tous les inserts étaient orientés de la même façon dans le vecteur alors que l'insertion dans les deux sens d'un fragment aux extrémités franches était théoriquement possible. Le codon d'initiation était du côté T7 alors que le codon de terminaison était du côté T3. Comme si l'orientation inverse aurait provoqué l'apparition d'une protéine de fusion létale pour *E.coli*. Des six clones de départ (# 3b⁺, 4a⁺, 6a⁻, 7a⁻, 8b⁺ et 11c⁻) seul le clone #4a⁺ était exempt de mutations lorsque sa séquence était comparée à la séquence génomique. Ce clone possède les séquences codant pour le peptide signal en son extrémité 5'.

2.8 Substitutions de la région mutée du clone 7a⁻

Étant donné que les mutations du clone 7a⁻ sont regroupées dans la région 3', la portion *Sfi I/Hind III* (*Sfi I* dans le 1^{er} exon; *Hind III* en aval du site de sous-clonage 3', dans le vecteur pBluescript) du clone 7a⁻ a été substituée par le fragment identique du clone 4a⁺ de façon à créer un clone sans peptide signal et exempt de mutations. Afin de s'assurer que chacune des deux constructions était vraiment dépourvue de mutations, le séquençage complet a été entrepris pour chacune des deux constructions, tel que schématisé à la figure 25. Le résultat du séquençage du clone 4a⁺ (P450aldo) est présenté à la figure 26 en comparant sa séquence à celle du clone λ 1 (P450c11) dont les 6 premières bases ont été déduites selon celles du clone 4a⁺, étant donné la forte homologie existant dans cette région. De plus, les séquences des cytochromes P450 de hamster ont été comparées à celles d'autres

espèces animales. L'homologie existant entre ces séquences est représentée graphiquement à la figure 27 ou de façon plus détaillée aux figures 43 et 44 retrouvées en appendice. D'après la figure 27, il semble que le hamster s'apparente plus aux rongeurs qu'à l'homme ou le bovin. Par contre, l'activité du cytochrome P450c11 de hamster se rapproche davantage de celle de l'homme que des autres rongeurs (des explications se retrouvent plus loin dans ce document).

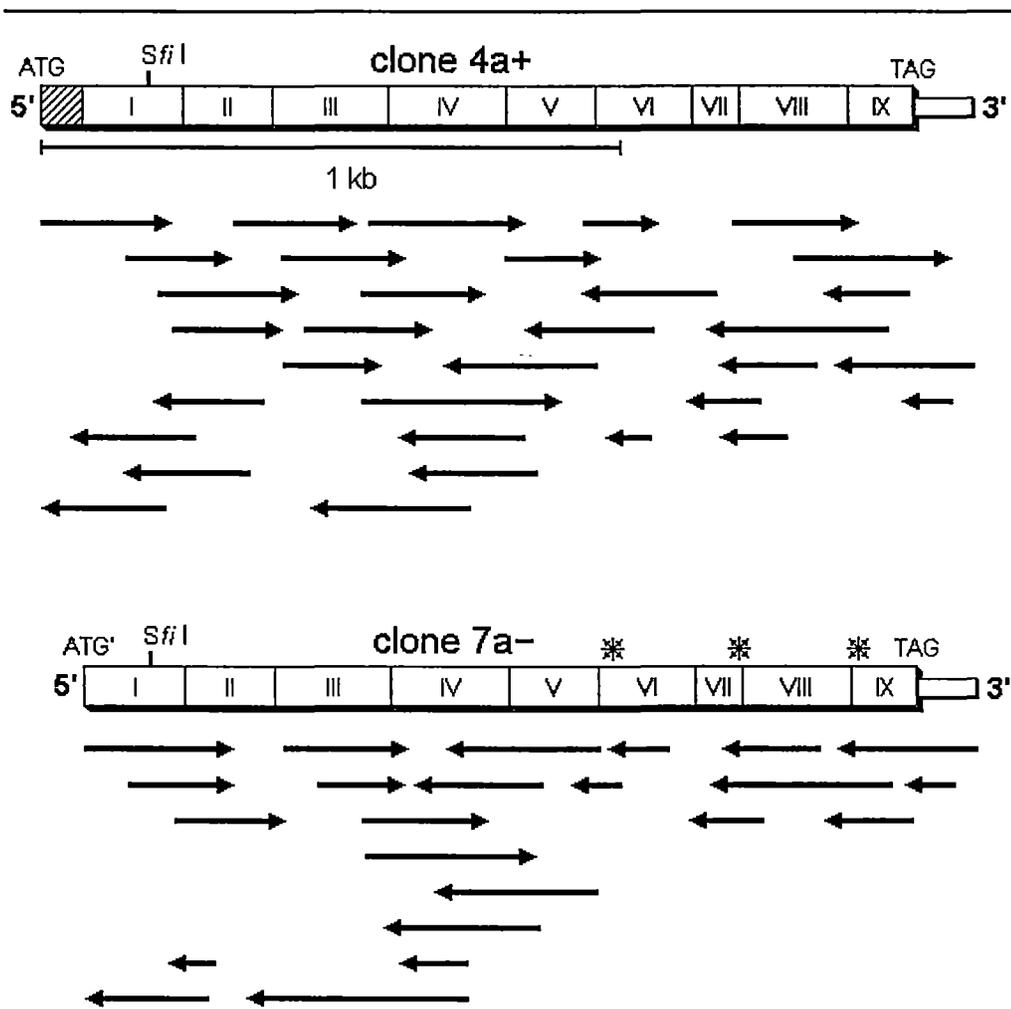


Figure 25. Stratégie de séquençage des clones 4a⁺ et 7a⁻. Les flèches représentent l'orientation du séquençage alors que la longueur est représentative du nombre de bases séquencées. Les étoiles indiquent la localisation des sites mutés dans le clone 7a⁻. La région hachurée représente le peptide signal dans le premier exon. ATG', site d'initiation de traduction artificiel provenant de l'oligo (-). Le site *Sfi*I est indiqué dans l'exon 1 au niveau des séquences codantes en relief. Le site *Hind*III fait partie du vecteur (non illustré)

Figure 26. Séquences d'ADN et des acides aminés correspondants de la partie codante du clone 4a⁺ (P450aldo) et du clone λ1 (P450c11). La pointe de flèche représente le site cryptique de clivage du peptide signal; (-) représente une homologie; (□) signifie une absence de résidus

c11/aldo	M	A	L	R	A	K	A	D	V	W	L	A	R	P	W	15
	ATG	GCA	CTC	AGG	GCA	AAG	GCA	GAT	GTG	TGG	CTG	GCA	AGA	CCC	TGG	45
c11/aldo	Q	C	L	P	R	T	R	A	L	G	T	T	A	A	L	30
	CAG	TGC	CTG	CCC	AGG	ACG	AGG	GCA	CTG	GGC	ACC	ACA	GCA	GCA	CTG	90
c11/aldo	A	P	N	T	L	R	P	F	E	A	I	P	Q	Y	S	45
	GCC	CCC	AAC	ACA	CTG	CGG	CCC	TTT	GAA	GCC	ATA	CCG	CAG	TAC	TCC	135
c11/aldo	R	N	R	W	L	K	M	L	Q	I	L	R	E	E	G	60
	AGA	AAC	AGG	TGG	CTG	AAG	ATG	CTA	CAG	ATC	CTG	AGG	GAG	GAG	GGC	180
c11/aldo	Q	E	G	L	H	L	E	M	H	E	A	F	R	E	L	75
	CAA	GAG	GGC	CTG	CAC	CTG	GAG	ATG	CAT	GAG	GCC	TTC	CGG	GAG	CTG	225
c11/aldo	G	P	I	F	R	Y	S	M	G	R	T	Q	V	V	Y/S	90
c11	GGG	CCC	ATT	TTC	AGG	TAC	AGC	ATG	GGA	AGA	ACA	CAG	GTT	GTG	TAT	270
aldo	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	270
c11/aldo	V	M	L	P	E	V/D	A	E	K	V/L	F/H	Q	A/V	D/E	S	105
c11	GTG	ATG	TTG	CCA	GAG	GTT	GCC	GAG	AAG	GTA	TTC	CAG	GCA	GAC	AGT	315
aldo	---	---	---	---	---	-A-	---	---	---	C-G	CA-	---	-TG	--G	---	315
c11/aldo	T/M	Q/H	P	S/R	R	T/M	L/H	L	E	P	W	V	A	H	R	120
c11	ACA	CAG	CCC	AGC	CGC	ACG	CTC	TTG	GAA	CCT	TGG	GTA	GCC	CAC	AGA	360
aldo	-TG	--C	--T	C-T	--G	-T-	-A-	C--	---	---	---	---	---	---	---	360
c11/aldo	E	H	R	G	L	S	R	G	V	F	L	L	N	G	P	135
	GAA	CAC	CGT	GGC	CTG	AGT	CGT	GGA	GTG	TTC	TTG	CTA	AAT	GGG	CCT	405
c11/aldo	E	W	R	F	N	R	L	R	I/L	N	P	H	M/V	L	S	150
c11	GAA	TGG	CGC	TTC	AAC	CGA	CTG	AGG	ATC	AAC	CCA	CAC	ATG	CTG	TCC	450
aldo	---	---	---	---	---	---	---	---	C--	---	---	---	G--	---	---	450
c11/aldo	P	K	A	V	Q	K	F	V	P	M	V	D	M	V	A	165
	CCA	AAG	GCC	GTT	CAG	AAG	TTT	GTC	CCC	ATG	GTG	GAC	ATG	GTA	GCA	495
c11/aldo	R	D	F	L	E	F/S	L	K	K	K	V	L/F	A/Q	N	A	180
c11	CGG	GAC	TTC	TTG	GAG	TTC	CTG	AAG	AAG	AAG	GTG	CTG	GCG	AAT	GCC	540
aldo	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	T-T	CA-	---	--T	540
c11/aldo	H/R	G	S	L	S/T	M	N/D	F/V	Y/Q	S/Q	S	M/L	F	N	Y	195
c11	CAT	GGA	AGC	TTG	TCA	ATG	AAC	TTC	TAT	TCC	AGT	ATG	TTC	AAC	TAT	585
aldo	-G-	--G	---	C-C	A-C	---	G-T	G-G	C-G	CAA	--C	C-T	--T	---	--C	585
c11/aldo	T/D	I	E	A	S	H/N	F	V	L	F	G	E	R	L	G	210
c11	ACC	ATA	GAA	GCC	AGC	CAC	TTT	GTT	CTT	TTT	GGG	GAG	CGG	CTG	GGC	630
aldo	-GT	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	630
c11/aldo	L	L	G	D/H	D	L	N/D	S/P	G/S	S	L	K/T	F	V/I	N/H	225
c11	CTC	CTT	GGT	GAT	GAC	CTG	AAT	TCT	GGC	AGC	CTG	AAG	TTC	GTC	AAT	675
aldo	---	---	--C	C--	---	---	-GC	C--	-C-	---	---	-C-	---	A--	C--	675
c11/aldo	A	L	N/H	S	I/V	M/F	K	T	T	P	Q	L	M	L/F	L	240
c11	GCC	TTG	AAT	TCC	ATA	ATG	AAG	ACG	ACT	CCA	CAG	CTC	ATG	CTT	TTG	720
aldo	---	---	C--	---	G-G	T-C	---	---	--C	---	---	---	---	T-C	---	720

c11/aldo	P	S/R	G/S	L	T	R	W	I/T	S	T	R	V	W	K	E	255
c11	CCT	AGT	GGT	CTG	ACT	CGC	TGG	ATA	AGC	ACC	CGG	GTG	TGG	AAA	GAG	765
aldo	--C	--G	A-C	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	765
c11/aldo	N/H	F	D/E	S/A	W	D	F/V	V/I	S	E	Y	V	T/N	K/R	N/C	270
c11	AAC	TTT	GAT	TCC	TGG	GAT	TTC	GTC	TCT	GAG	TAC	GTC	ACA	AAA	AAT	810
aldo	C-T	---	--G	G--	---	---	G--	A--	---	---	--T	---	-AC	-G-	TG-	810
c11/aldo	V/I	K/R	N/K	V	Y/H	Q	E	V/L	Q/R	S/L	G	G/S	P	Q/H	S/T	285
c11	GTC	AAG	AAT	GTG	TAT	CAA	GAG	GTG	CAA	AGT	GGT	GGC	CCA	CAG	TCC	855
aldo	A--	CG-	--G	---	C-C	--G	---	C-C	AG-	CT-	--C	A--	--T	--C	A--	855
c11/aldo	W/Y	S	V/G	I	Π/V	S/A	Q/E	L	V/M	A/S	E/Q	G	A	L	T/P	299/300
c11	TGG	AGT	GTC	ATA	ΠΠΠ	TCA	CAG	CTG	GTA	GCA	GAG	GGT	GCT	CTG	ACA	897
aldo	-AC	---	-G-	--C	GTG	G--	G-A	--A	A-G	T-C	C--	--A	---	T--	C-T	900
c11/aldo	M/L	D	A	I	L/R	A	N	S	L/I	E	L	T	A	G	S	314/5
c11	ATG	GAT	GCC	ATT	CTG	GCC	AAC	TCT	CTG	GAA	CTC	ACT	GCT	GGG	AGT	942
aldo	C-C	--C	---	--C	AGA	---	---	--A	A-T	--G	---	--C	---	---	---	945
c11/aldo	V	D	T	T	S/T	V/F	P	L	V	M	T/A	L	F	E	L	329/30
c11	GTG	GAC	ACG	ACA	TCA	GTG	CCC	CTG	GTC	ATG	ACC	CTC	TTT	GAG	CTG	987
aldo	--A	---	---	---	A-C	T-C	---	---	---	---	G-T	---	---	---	---	990
c11/aldo	A	R	N	P	D	V	Q	Q	A	V	R	Q	E	S	L	344/5
c11	GCT	CGG	AAC	CCA	GAT	GTT	CAA	CAG	GCT	GTG	CGG	CAG	GAG	AGC	CTG	1032
aldo	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	1035
c11/aldo	A	A	E	A	S	V	A	A	N	P	Q	R	A	M	S	359/60
	GCA	GCT	GAG	GCC	AGC	GTG	GCT	GCA	AAT	CCC	CAG	AGG	GCT	ATG	TCG	1077/80
c11/aldo	D	L	P	L	L	R	A	V	L	K	E	T	L	R	L	374/5
	GAT	CTG	CCC	CTG	CTG	CGG	GCT	GTC	CTT	AAA	GAG	ACC	TTG	AGG	CTC	1122/5
c11/aldo	Y	P	V	A/G	V/G	F	L	E	R	I	L	S	S	D	L	389/90
c11	TAT	CCT	GTT	GCT	GTC	TTT	TTG	GAG	AGA	ATT	CTA	AGC	TCG	GAC	TTG	1167
aldo	---	---	---	-G-	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1170
c11/aldo	V	L	Q	N	Y	H	V	P	A	G	T	I/L	L/V	H/L	M/L	404/5
c11	GTG	CTT	CAG	AAC	TAC	CAC	GTC	CCT	GCT	GGG	ACG	ATC	CTC	CAC	ATG	1212
aldo	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	T-G	G--	-TA	1215
c11/aldo	S/Y	L	Y	S	M	G	R	N	P	A	V	F	P	R	P	419/20
c11	AGT	CTC	TAC	TCC	ATG	GGC	CGA	AAC	CCT	GCA	GTA	TTT	CCG	AGG	CCC	1257
aldo	TA-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1260
c11/aldo	E	H	Y	L	P	Q	R	W	L	E	R	N	G	S	F	434/5
	GAG	CAC	TAC	TTG	CCC	CAG	CGC	TGG	CTG	GAG	AGG	AAT	GGG	AGT	TTC	1302/5
c11/aldo	Q	H	L	T	F	G	F	G	V	R	Q	C	L	G	K	449/50
	CAG	CAC	CTG	ACC	TTC	GGC	TTT	GGG	GTG	CGC	CAG	TGC	CTG	GGG	AAG	1347/50
c11/aldo	R	L	A	Q	V	E	M	L	L	L	L	H	H	V	L	464/5
	CGC	CTG	GCT	CAG	GTG	GAG	ATG	CTC	CTC	CTG	CTG	CAC	CAT	GTG	CTG	1392/5
c11/aldo	K	S	F	R	V	E	T	Q	E	R	E	D	V	R	M	479/80
	AAA	TCC	TTC	AGG	GTG	GAG	ACG	CAG	GAG	CGA	GAG	GAT	GTG	CGG	ATG	1437/40
c11/aldo	V	Y	R	F	V	L	A	P	S	S	S	P	L	L	T	494/5
	GTG	TAC	CGC	TTT	GTT	CTG	GCG	CCC	AGC	TCC	AGC	CCC	CTG	CTC	ACT	1482/5
c11/aldo	F	R	P	V	S	*										499 aa (c11) / 500 aa (aldo)
	TTC	CGG	CCT	GTC	AGC	TAG										1500 pb (c11) / 1503 pb (aldo)

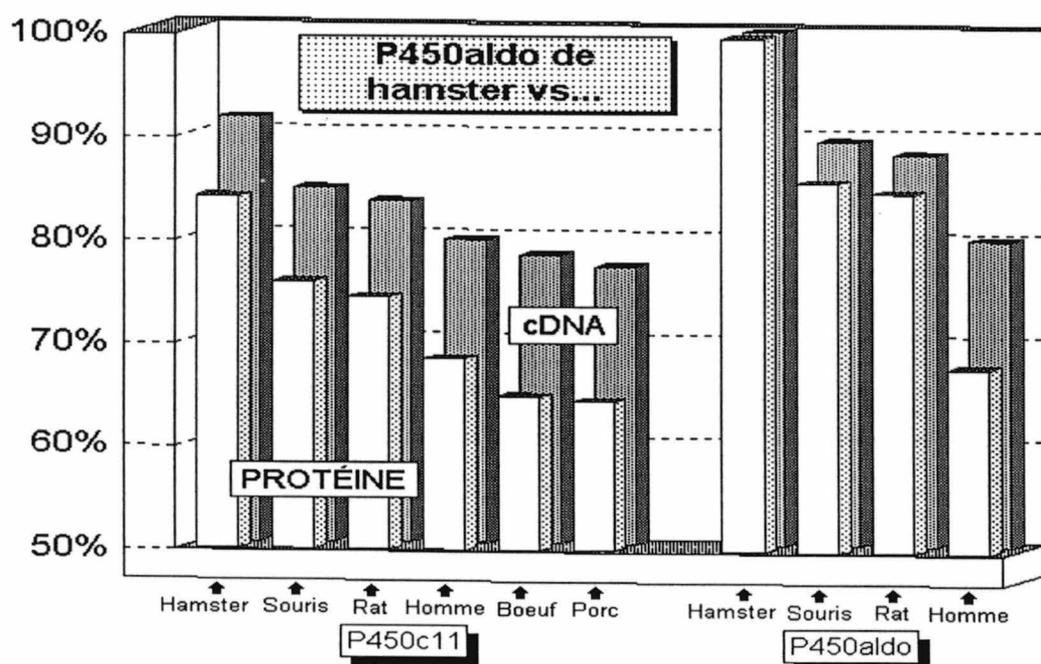
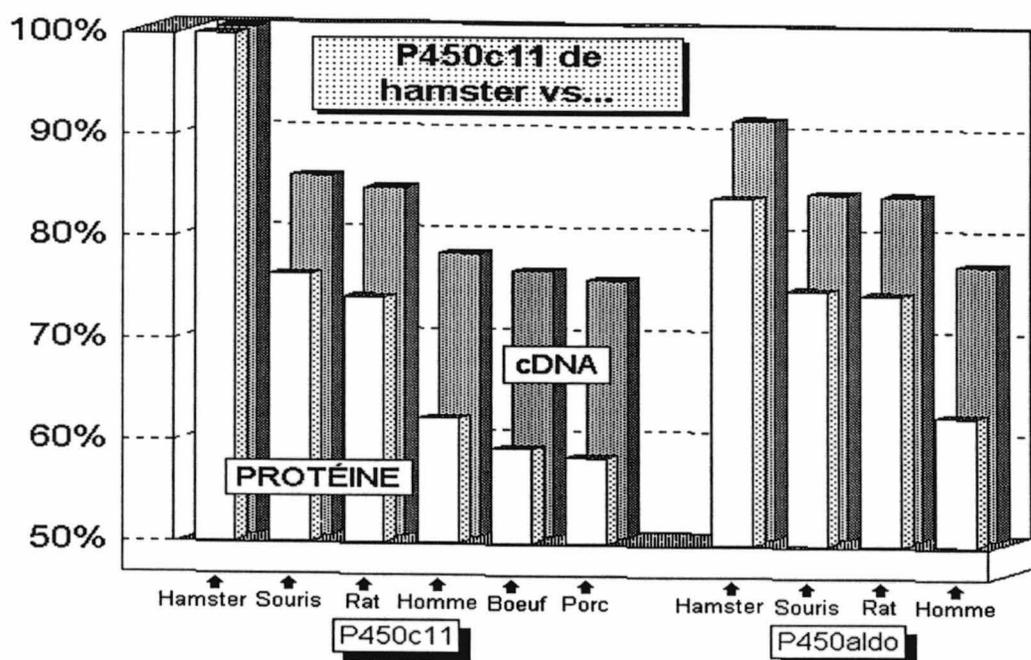


Figure 27. Homologies de séquences entre les cytochromes P450 du hamster et des espèces animales suivantes: P450aldo de souris (Domalik *et al.*, 1991), de rat (Matsukawa *et al.*, 1990; Imai *et al.*, 1990), humain (Kawamoto *et al.*, 1990) et P450c11 de souris (Domalik *et al.*, 1991), de rat (Mukai *et al.*, 1993; Nonaka *et al.*, 1989), humain (Mornet *et al.*, 1989), bovin (Chua *et al.*, 1987) et de porc (Sun *et al.*, 1995)

3. EXPRESSION DE P450ALDO DANS *E. Coli*

3.1 Choix du vecteur d'expression

Le vecteur utilisé pour l'expression du cytochrome P450aldo chez *E. coli* est le vecteur plasmidique pKK223.3 (Pharmacia). Pour ce vecteur, le respect de la distance entre le site de liaison des ribosomes (RBS) et le codon d'initiation est très important pour l'efficacité de traduction. En sous-clonant l'insert aux extrémités franches du clone 7.5⁺ dans le site *Sma*I du vecteur, cette distance était de 15 bases, soit la limite supérieure indiquée par le fournisseur (entre 10 et 15 bases). Pour demeurer entre ces limites, le vecteur a été coupé par *Eco*RI ainsi que par l'enzyme *Hind*III et les extrémités cohésives ont été transformées en extrémités franches par remplissage avec l'enzyme Klenow, faisant passer la distance à 12pb.

3.2 Choix de la souche bactérienne

Après avoir sélectionné un clone positif possédant la bonne orientation de l'insert dans pKK223.3 chez *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene), l'ADN plasmidique a été isolé par micro-préparation puis réintroduit par transformation dans la souche inductible JM105 (Pharmacia). La transformation de bactéries JM105 avec pKK223.3 sans insert a servi comme contrôle négatif.

3.3 Induction par l'IPTG

L'induction de la transcription par l'IPTG a été mise en évidence par des études de *Northern* suivant des intervalles de temps pré-déterminés (fig. 28). La très faible présence de transcrits du cytochrome P450aldo chez les bactéries non induites indique une certaine forme de transcription basale, malgré la présence du répresseur *lac*^R. L'IPTG provoque toutefois une augmentation très rapide du niveau de transcription moins de 20 min après l'induction. Cette induction, transitoire, ne peut se maintenir très longtemps et la transcription retourne à un niveau basal pour se stabiliser 8 h après l'addition d'IPTG.

3.4 Isolation de la protéine P450aldo

Le caractère membranaire de la protéine P450aldo lui confère la particularité d'être une protéine hydrophobe. Une telle localisation de l'enzyme présuppose une première étape d'isolation de la fraction membranaire de *E. coli*. Une fois isolées par ultracentrifugation, les

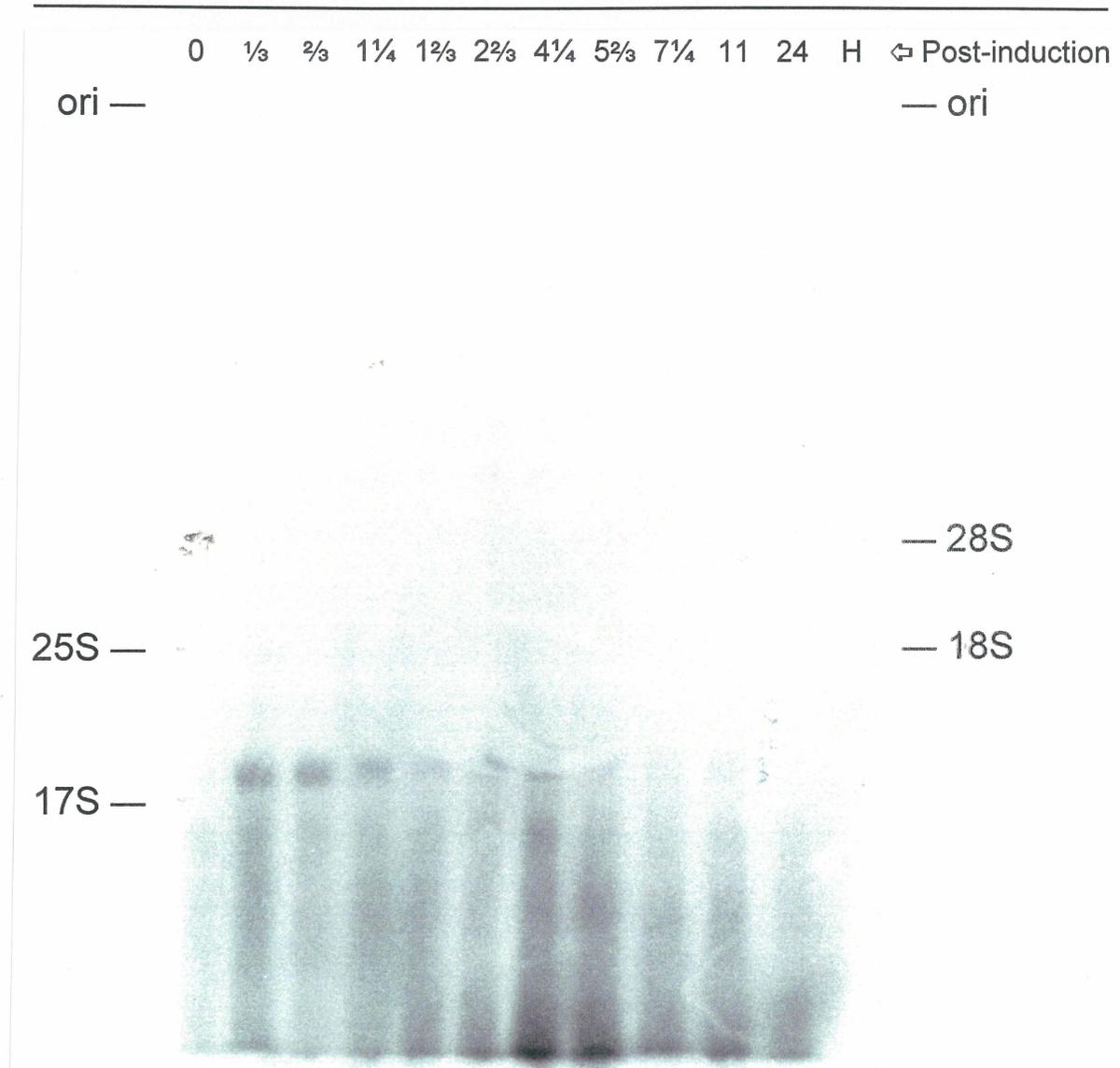


Figure 28. Études, par *Northern*, de l'induction de la transcription de l'ARNm de P450aldo dans les bactéries *E.coli* JM105 par l'IPTG et ce, selon des temps pré-déterminés. La bande d'intérêt apparaît juste au-dessus du repère d'ARN ribosomal 17S de *E.coli*. Le temps post-induction est indiqué en heures; (H) ARN_{total} de surrénales de hamster (18S et 28S).

membranes étaient resuspendues et la concentration des protéines de la suspension membranaire était ajustée en fonction du détergent utilisé.

L'intégrité structurale du cytochrome P450aldo dans le surnageant est détectée par spectrophotométrie. En présence de dithionure, un agent réducteur, le cytochrome P450aldo est réduit et lorsque complexé au monoxyde de carbone, le cytochrome possède la propriété

d'absorber la lumière à une longueur d'onde de 450nm. Mais pour former un complexe, il y a nécessité d'intégrité structurale parfaite du P450. Ainsi, dans sa forme dénaturée, l'absorption de lumière passe plutôt à 420nm.

Plusieurs détergents ont ainsi été testés pour leur capacité à solubiliser le cytochrome P450_{ald}. Malgré différents essais de solubilisation avec une gamme étendue de différents détergents (CHAPS, cholate, Tween-20, Emulgen 913 et n-octyl- β -D-glucopyranoside), il semble qu'en aucun cas il n'ait été possible d'apercevoir un signal caractéristique à 450nm lors des essais de spectrophotométrie. Dans le meilleur des cas, soit lors de l'utilisation du n-octyl- β -D-glucopyranoside (fig. 29), il est possible de constater la solubilisation des cytochrome *d* et cytochrome *o* de la membrane cellulaire interne de *E.coli* qui causent des minima d'absorbance à 444nm (*d*) et à 430nm (*d* et *o*) et un maximum d'absorbance à 416nm (*o*) (Kita *et al.*, 1984; Miller & Gennis, 1983). Toutefois, aucune inflexion ne semble perceptible dans le spectre d'absorption au alentours de 450nm.

Si la protéine est réellement exprimée, soit qu'elle l'est dans des proportions si faibles qu'il soit impossible de retracer sa présence avec cette technique ou soit qu'elle est rapidement dénaturée dans un milieu hostile à sa conservation.

3.5 Études de l'expression par immunobuvardage

Malgré le fait que les essais spectrophotométriques ne permettaient pas de déceler la présence de la protéine active ou en concentration suffisante, des études d'immunodétection ont été entreprises avec un anticorps spécifique à la protéine P450_{ald} de hamster. Ainsi, des aliquotes de différentes fractions lors de la purification de la protéine ont été analysés sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes puis transférés sur membrane de nitrocellulose afin de détecter la présence de la protéine, même dénaturée.

Que ce soit sur un gel polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie ou suite à l'utilisation d'un anticorps (IgG) polyclonal de lapin dirigé contre un peptide spécifique contenu dans la séquence d'acides aminés du cytochrome P450_{ald} de hamster, il n'est pas possible de situer la présence de la protéine dans aucune des fractions solubles étudiées (fig. 30). Même si on peut observer la présence de bandes lors de l'immunodétection, le fait d'en

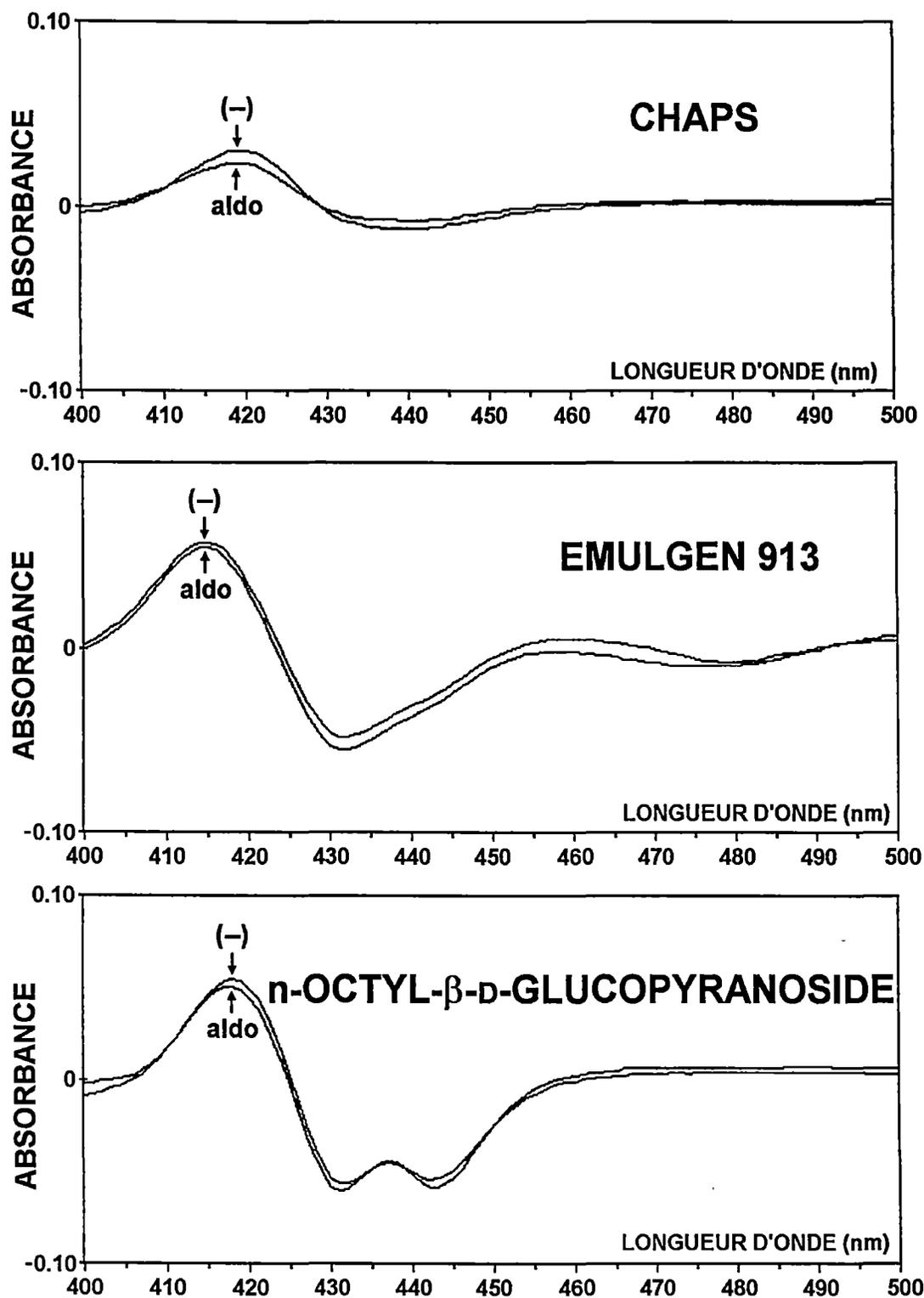


Figure 29. Spectres d'absorption d'extraits membranaires solubilisés avec les différents détergents indiqués. Les spectres d'absorption sont obtenus avec des extraits de cellules arborant la construction pKK_{aldo} (aldo) ou pKK223.3 sans insert (-)

retrouver aussi dans les puits contrôles signifie que l'anticorps n'est pas en mesure de reconnaître une protéine particulière dans les puits où les cellules arborent le plasmide pKK_{aldo}.

3.6 pKK223.3 avec un RBS à 8pb de l'ATG

Dans le plus récent catalogue de la compagnie Pharmacia, celle-ci se rétractait et informait le consommateur que la distance limite entre le signal d'attachement des ribosomes (RBS) et le premier ATG devrait se situer entre 6 et 10 pb. Afin d'augmenter nos chances d'exprimer la protéine, une nouvelle construction a ainsi été élaborée en rapprochant l'ATG à 8 pb du RBS. Cette fois, l'extrémité simple-brin *EcoRI* du site de sous-clonage multiple a été dégradée par l'enzyme *Mung Bean Nuclease* (Pharmacia), ce qui a soustrait 4 pb et a rapproché ainsi l'ATG à 8pb du RBS. Cette construction demeurera sans essais puisque l'expression dans *E.coli* n'a pas connu de suite.

Figure 30 (page suivante). Analyse d'immunodétection de P450aldo dans différentes fractions lors de la purification de la protéine exprimée chez *E.coli*. A. Gel polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie et B. Analyse Western et immunodétection par un anticorps spécifique au P450aldo. Les différentes fractions sont (S₁) surnageant récolté suivant l'ultracentrifugation des membranes soniquées, (P₂) culot de membranes récolté suivant l'ultracentrifugation des membranes solubilisées avec les détergents indiqués et (S₂) surnageant correspondant à P₂. Les cultures cellulaires exprimaient (A) ou n'exprimaient pas (-) la protéine P450aldo. (M) marqueur de poids moléculaires exprimés en kDa

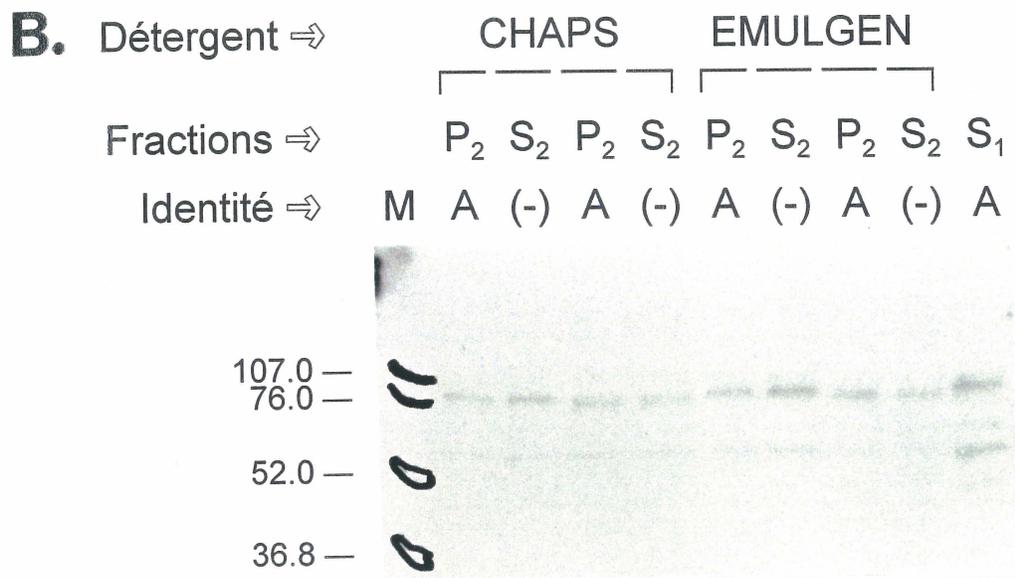
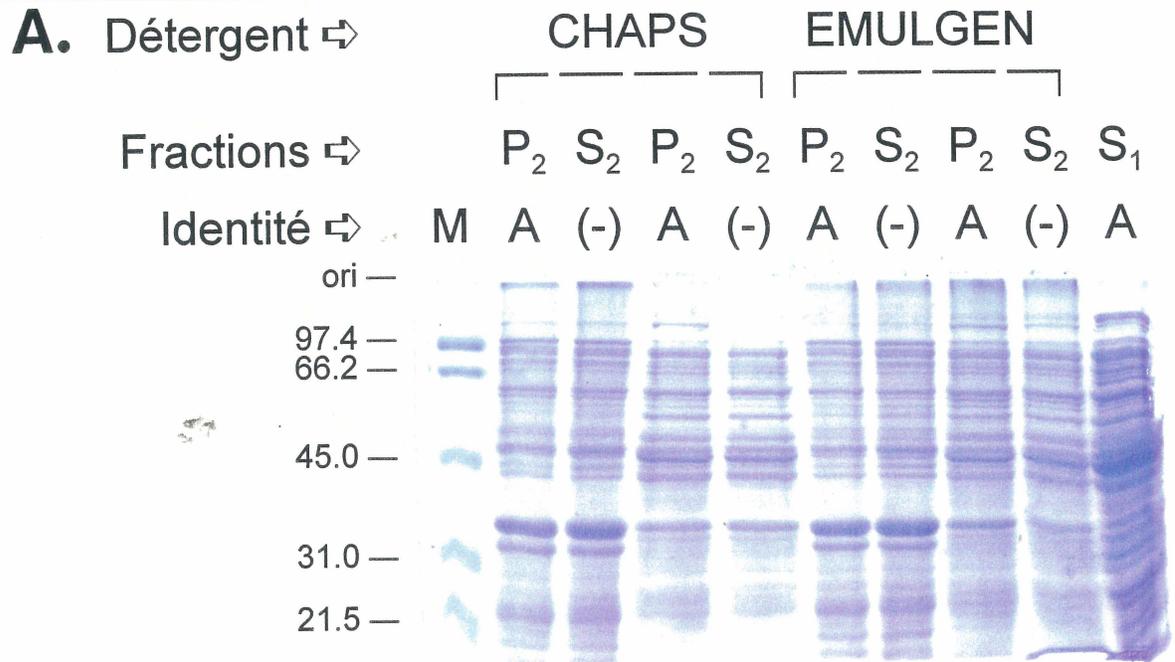


Figure 30.

4. EXPRESSION DANS LES CELLULES COS

Afin de déterminer si l'ADNc amplifié par PCR codait bien pour le cytochrome P450aldo et si le clone $\lambda 1$ (Bernard, 1994) isolé d'une banque d'ADNc de surrénale de hamster et modifié par l'ajout d'un codon ATG codait effectivement pour le cytochrome P450c11, l'expression dans les cellules COS a été envisagée.

4.1 Choix du vecteur d'expression

Pour le vecteur pSVL (Pharmacia), le site d'insertion *Sma*I est bien approprié puisque ses extrémités franches sont compatibles avec les extrémités *Eco*RV de l'insert du clone 4a⁺. Une simple vérification de l'orientation de l'insert a été suffisante pour la sélection de clones positifs.

L'utilisation du vecteur pSVL (Pharmacia) permet une expression transitoire suffisante pour déterminer la spécificité réactionnelle de l'enzyme par l'ajout de substrats radiomarqués. pSVL contient l'origine de réplication de SV40 et utilise le promoteur tardif de SV40 pour la transcription de l'ADNc cloné. Une caractéristique intéressante de ce vecteur est la présence de séquences introniques VP1 de SV40 en amont de l'ADNc cloné, ceci permettant à l'ARNm d'être épissé et par conséquent, d'être plus rapidement dirigé vers le cytoplasme de la cellule COS. Afin que la protéine soit dirigée vers les mitochondries des cellules COS, les séquences du peptide signal sont conservées.

4.2 Analyse par *Northern blots*

Étant donné l'absence de contrôles de transfection - ce qui aurait permis de savoir dans quelle mesure les cellules ont assimilé les plasmides - l'étape préliminaire était de savoir si l'ADN était bien transcrit en ARNm. Des études de *Northern* ont permis d'identifier un ARNm spécifique au P450c11 et au P450aldo chez des cellules transfectées avec les constructions pSVL_{c11} et pSVL_{aldo} (fig. 31).

4.3 Analyse de l'expression des P450s

La synthèse de l'aldostérone par les cytochromes P450c11 et P450aldo débute *via* le

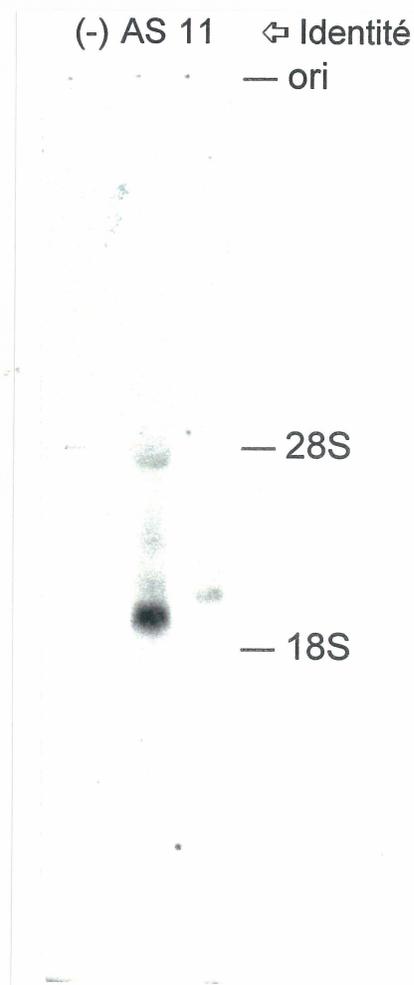


Figure 31. Études *Northern* de l'expression des protéines P450ald et P450c11 chez COS. (-) contrôle négatif sans insert, (AS) pSVL_{ald} et (11) pSVL_{c11}

composé 11-désoxycorticostérone. Afin d'établir la spécificité fonctionnelle de chacun des cytochromes P450 exprimés dans les cellules COS, un substrat radiomarqué, le [¹⁴C]DOC a été ajouté directement dans le milieu de culture recouvrant la monocouche cellulaire. Outre la méthode de transfection et l'utilisation de cellules COS-7, les conditions expérimentales s'apparentaient à celles de Curnow *et al.* (1991) qui exprimaient les cytochromes P450c11 et P450ald humains dans les cellules COS-1. Dans des pétris de 10 cm, les COS-7 ont été transfectées avec les constructions suivantes; pSVL_{ald}/pCD-Adx, pSVL_{c11}/pCD-Adx, pCD-

Adx et aucun plasmide. Le plasmide pCD-Adx (Okamura *et al.*, 1985) est un vecteur d'expression qui contient l'ADNc de l'adrénodoxine bovine. Ce plasmide a été utilisé suite à une étude antérieure qui démontrait que les cellules COS n'exprimaient pas suffisamment d'adrénodoxine lorsque le cytochrome P450_{scc} était exprimé de façon transitoire (Zuber *et al.*, 1988). P450_{scc}, P450_{aldo} et P450_{c11} sont toutes des enzymes mitochondriales qui nécessitent la participation de l'adrénodoxine et de l'adrénodoxine réductase pour le transfert des électrons à partir du NADPH.

Trente-cinq heures post-transfection, le milieu était remplacé par du milieu frais contenant 0.8 μm de [¹⁴C]DOC (0.01 μCi). 24 h plus tard, les stéroïdes sont extraits du milieu de culture puis séparés sur plaque de silice par TLC. Lors du dépôt des échantillons, la silice a été détériorée et les échantillons n'ont pas migré de façon homogène et à la même vitesse d'un puits à l'autre. Un examen attentif de la plaque suggérait que les échantillons étaient surchargés de stéroïdes et/ou de lipides membranaires (non illustré). Les produits de synthèse étaient toutefois différents pour les deux cytochromes.

4.4 Perfectionnement des techniques

Pascoe *et al.* (1992) redéfinissent de nouveaux paramètres pour l'expression du cytochrome P450_{c11} humain dans les cellules COS-1. La concentration de DOC ajoutée est doublée et n'est strictement composée que de [¹⁴C]DOC. Ce qui signifie qu'il utilise 30× plus de [¹⁴C]DOC pour ses derniers essais. L'expérience est donc répétée en utilisant des pétris de 3.5 cm et des conditions améliorées, tel que proposé par Pascoe. Bien que les taches soient d'intensité plus fortes, la migration demeure toutefois défailante. Le composé majoritaire représentant la [¹⁴C]DOC non métabolisée ne migre pas à la même hauteur dans chacun des puits. Même s'il est difficile d'identifier chacun des produits, ces résultats préliminaires nous permettent de croire que les deux protéines ne sont pas identiques puisqu'elles donnent deux patrons de migration différents (non illustré).

4.5 Analyse par *Western blots*

Des études d'immunodétection avec des homogénats de cellules COS transfectées ne permettent pas d'identifier des bandes spécifiques à l'apparition des protéines exprimées.

Pourtant, l'anticorps anti_{aldo} a prouvé son efficacité en analysant des homogénats de glandes surrénales de hamsters (non illustré).

4.6 Utilisation de vecteurs plus efficaces

Il fallait entrevoir la possibilité que les protéines soient bien exprimées, mais en quantité très faible. Il fallait chercher à augmenter la quantité de protéines exprimées. Augmenter la quantité des transcrits, augmenter la stabilité des ARNm et augmenter le rendement de traduction étaient tous des voies à explorer. Afin d'augmenter la quantité d'ARN produit, le vecteur pSVL a été remplacé par un vecteur possédant la région régulatrice et promotrice du gène précoce majeur de cytomégalo virus humain CMV (Thomsen *et al.*, 1984; Andersson *et al.*, 1989). Comparé aux promoteur SV40, le promoteur CMV peut fournir un rendement transcriptionnel 10 fois supérieur (Kronbach *et al.*, 1989; Johnson, 1990). Deux vecteurs différents, pCMV5 (Dr Mark Stinski, University of Iowa, IA) et pRc/CMV (InvitroGen) ont été utilisés. Pour ce qui est d'augmenter le rendement de traduction, il fallait trouver un moyen de permettre aux ribosomes de mieux se lier à l'extrémité 5' des ARNm en éliminant les possibilités de repliement de l'ARN à cet endroit tout en procurant une longueur adéquate à cette extrémité pour l'attachement du ribosome. À une certaine limite, arriver à séquestrer la majorité des ribosomes à ne traduire que les ARNm des P450s introduits. L'efficacité de traduction peut varier si le codon d'initiation est trop près ou trop éloigné de l'extrémité 5' du transcrit, si le codon d'initiation se trouve dans un contexte moins favorable (Kozak, 1986), si le codon d'initiation est non accessible parce qu'impliqué dans une forte structure secondaire (Pelletier & Sonenberg, 1985) ou s'il existe une nécessité de facteurs d'initiation de traduction (Browning *et al.*, 1988). De tels inconvénients peuvent être contournés par l'utilisation d'une séquence d'ARNm présente sur le transcrit d'une protéine traduite avec un haut taux d'efficacité. Une telle séquence a été choisie chez l'ARNm codant pour la protéine du capsid du virus de la mosaïque d'Alfalfa (AMV). Jobling & Gehrke (1987) ont montré que de remplacer la séquence 5' non traduite native d'un gène normal avec cette séquence pouvait augmenter l'efficacité de traduction de 35 fois. Cette séquence, riche en AT, n'est guère impliquée dans une structure secondaire.

Bien que cette séquence soit d'abord conçue pour les essais de traduction *in vitro*, une telle séquence ne pouvait pas nuire lors des essais dans les cellules eucaryotes. Le corps de cette séquence, composé de 32 bases, a été synthétisé sous forme d'oligonucléotide, ainsi que son brin complémentaire, de façon à former un fragment d'ADN double-brin une fois hybridé ensemble. 4 bases supplémentaires ont été ajoutées au premier oligo pour former une extrémité cohésive *HindIII*.

Placées en amont des ADNc de P450c11 et P450aldo, ces constructions ont été introduites dans pBluescript et pRc/CMV pour des essais de traduction *in vitro* et dans pCMV5 et pRc/CMV pour des essais d'expression dans les cellules COS.

4.7 Essais de traduction *in vitro*

Afin de s'assurer avec certitude de la nature des protéines dérivées des ADNc sous-clonés, des essais de traduction *in vitro* ont été entrepris. La première étape de ces essais consistait donc à synthétiser l'ARN complémentaire à l'ADN inséré dans les vecteurs possédant le promoteur de la polymérase à ARN du phage T7. L'arrêt de la transcription en extrémité 3' de l'ADNc s'accomplit artificiellement au moment où la polymérase atteint l'extrémité coupée par l'enzyme de restriction *XbaI*. Une telle linéarisation du vecteur est nécessaire puisqu'aucune séquence terminatrice n'est présente chez aucun des vecteurs utilisés. Ainsi, à partir de 10 µg de plasmide linéarisé et purifié (environ 30% du plasmide est transcrit), un peu plus de 400 µg d'ARN ont été ainsi synthétisés. Ce qui signifie qu'un seul insert peut être transcrit un peu plus de 100 fois pendant une réaction de 4 h. La trousse de Promega fournit un ADN déjà coupé et dosé, prêt à être introduit dans une réaction de transcription selon les spécifications de la compagnie. Cet ADN code pour la luciférase de luciole. Afin de déterminer si l'ARN ainsi formé était de la longueur désirée, environ 8 µg d'ARN de chacun des clones ont été dénaturés au glyoxal puis séparés sur gel d'agarose 1% en présence d'un marqueur d'ADN radiomarqué au ³⁵S. L'ARN a ensuite été transféré sur membrane de nylon et la position des bandes d'ARN visualisée à l'ultraviolet. Afin de déterminer la longueur des transcrits, la membrane a été exposée sur PhosphorImager et la position des bandes radiomarquées a été marquée sur la membrane. Étant donné que la taille

des transcrits correspondait à celle attendue, aucune autre étape de vérification n'a été entreprise.

Dans une réaction de traduction *in vitro*, un aspect important à tester est la concentration des ions K^+ et Mg^{2+} . En général, la concentration en ions K^+ doit être plus élevée pour les ARNs dont l'extrémité 5' est coiffée (130 mM), alors que la concentration diminue de moitié pour les ARNs sans coiffe.

La concentration en ions Mg^{2+} est réglée à 1mM, mais peut être augmentée si le rendement est insuffisant. Pour une réaction typique de 30 μ l, le besoin en ARN n'est seulement que de 0.6 μ g. La compagnie Gibco BRL fournit un ARN codant pour l'enzyme chloramphénicol acétyl transférase comme contrôle. À la fin de la réaction de traduction, une partie du milieu réactionnel est prélevée pour vérifier l'incorporation de la [35 S]-méthionine dans les protéines alors que 20 μ l sont utilisés pour migration sur 2 gels de polyacrylamide. Un premier gel est coloré au bleu de Coomassie et séché sur papier 3M alors que le second gel, identique au premier, est transféré sur membrane de nitrocellulose et exposé sur PhosphorImager. Cette membrane sera alors utilisée pour des essais d'immunodétection avec un anticorps anti_{aldo} spécifique et un autre dirigé vers le cytochrome P450c11 bovin. Le résultat de ces essais (fig. 32) démontre que la protéine P450aldo (56.5 kDa) semble avoir un poids moléculaire apparent plus élevé que P450c11 (52.5 kDa). Il est nécessaire de rappeler que les protéines contiennent le peptide signal et que les poids moléculaires apparents ne correspondent pas à ceux des protéines matures retrouvées dans les surrénales du hamster. En revanche, la même différence de migration a été observée dans notre laboratoire par immunodétection des protéines d'un homogénat de glandes surrénales de hamsters sous diète à teneur faible en sodium (non démontré). Lorsque le poids moléculaire apparent est calculé en fonction de la séquence d'acides aminés des deux protéines, le cytochrome P450aldo ne surpasse le cytochrome P450c11 que de 0.5 kDa.

4.8 Études de l'expression par immunobuvardage

L'anticorps anti_{aldo} spécifique ainsi que l'anticorps anti_{c11} bovin ne semblent pas reconnaître les protéines traduites *in vitro* (fig. 33). Pourtant, la quantité de protéines

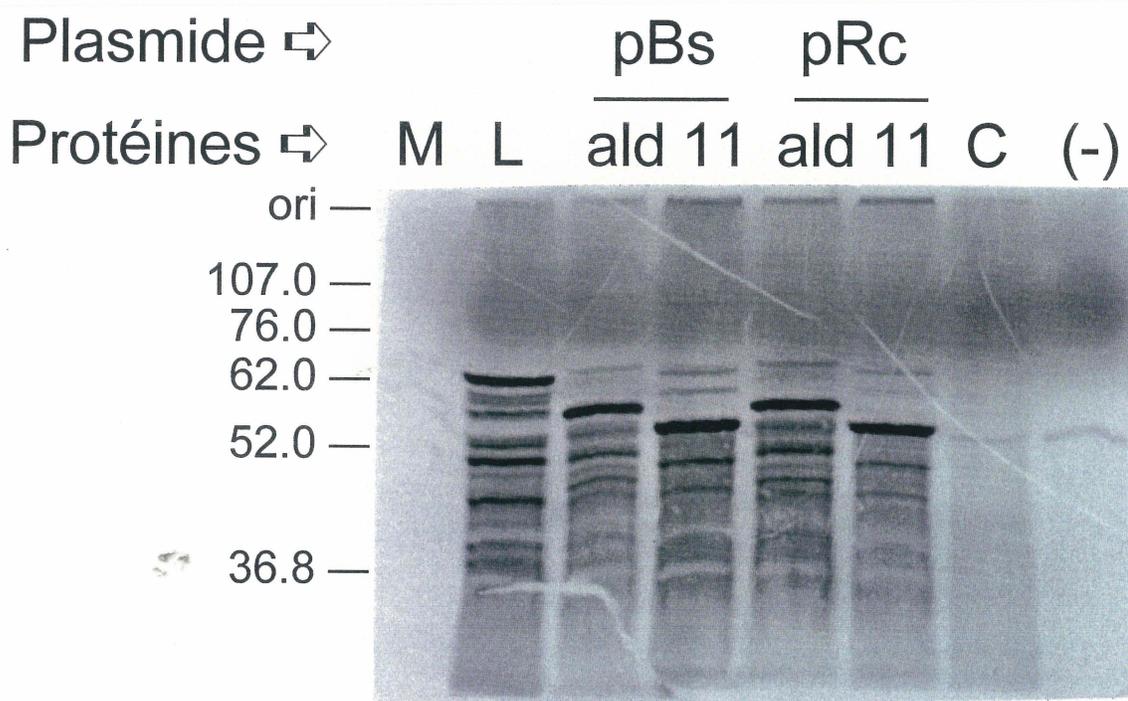


Figure 32. Essais de traduction *in vitro*. Les essais sont répétés avec le plasmide pBluescript (pBs) ou le vecteur pRc/CMV (pRc). Les puits contiennent les produits de traduction *in vitro* d'ARN codant pour la luciférase (L), la chloramphénicol acétyl transférase (C), les protéines P450aldo (ald) et P450c11 (11) ou les produits de traduction sans ARN exogène (-). (M) marqueur de poids moléculaires en kDa

transférée sur la membrane devrait permettre de visualiser un signal très intense sur les immunoblots. Les faibles bandes représentent probablement une impression du film par la ^{35}S -méthionine des protéines qui, au bout de presque une heure, parviennent à exposer le film et à confondre le signal avec celui de la réaction avec la protéine A couplée à la peroxydase de raifort HRP.

Figure 33 (page suivante). Analyse d'immunodétection de P450aldo et P450c11 dans les milieux de traduction *in vitro*. A. Gel polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie; B. Analyse Western et immunodétection par un anticorps spécifique au P450aldo et C. par un anticorps polyclonal anti_{c11} bovin. Les essais sont répétés avec le plasmide pBluescript (pBs) ou le vecteur pRc/CMV (pRc). Les puits contiennent les produits de traduction *in vitro* d'ARN codant pour la luciférase (L), la chloramphénicol acétyl transférase (C), les protéines P450aldo (ald) et P450c11 (11) ou les produits de traduction sans ARN exogène (-). (M) marqueur de poids moléculaires exprimés en kDa

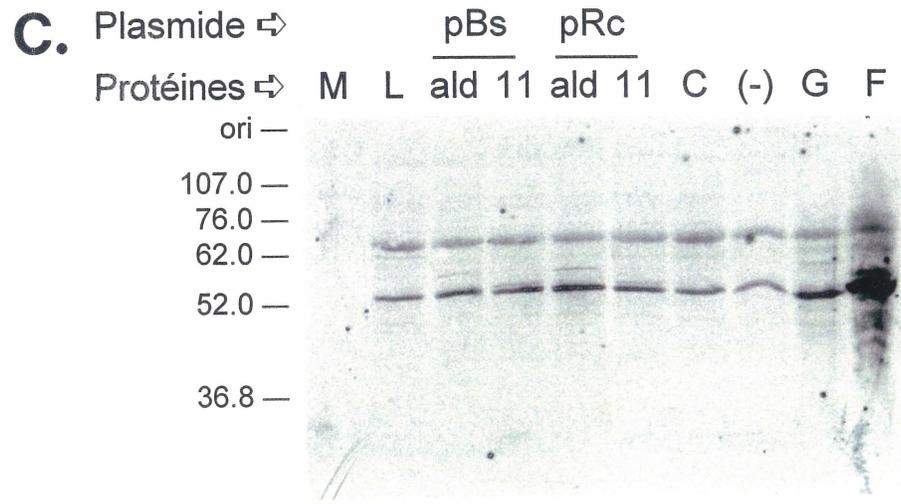
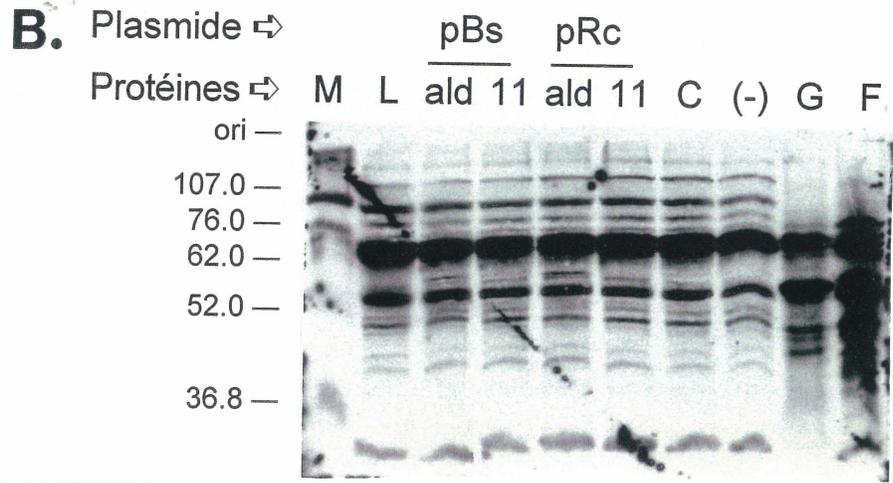
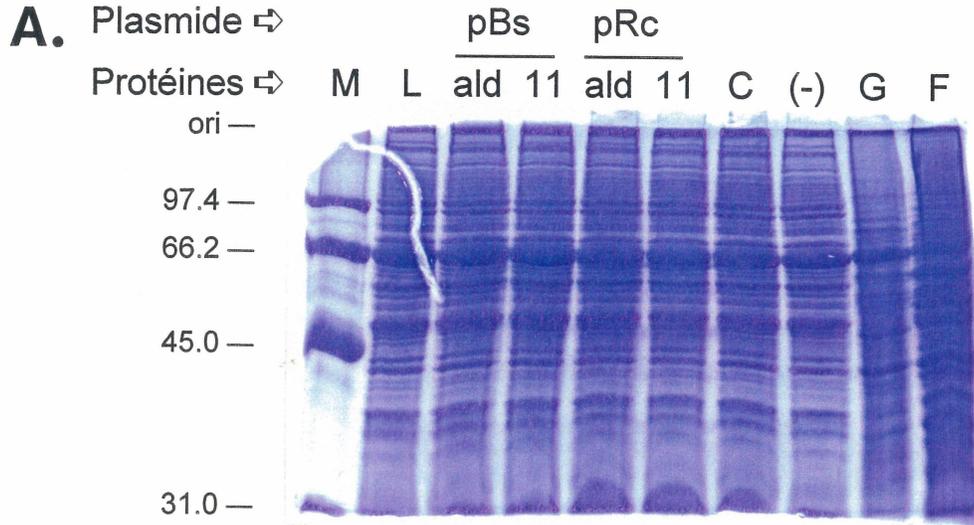


Figure 33.

4.9 Immunoprécipitation des produits de traduction *in vitro*

Afin de déterminer si la reconnaissance de l'anticorps anti_{aldo} pour le cytochrome P450_{aldo} traduit *in vitro* est possible, une expérience d'immunoprécipitation a été réalisée. La formation du complexe anticorps-protéine est effectuée en milieu liquide et ce dernier est sélectivement précipité par l'ajout de protéine A couplée à des billes de sépharose. La spécificité de cet anticorps est ainsi prouvée puisque seul le cytochrome P450_{aldo} a été sélectivement immunoprécipité (fig. 34). Aucune réaction croisée n'a eu lieu avec le cytochrome P450_{c11}.

4.10 Reprise des essais d'expression en cellules COS

Les essais d'expressions en cellules COS sont repris cette fois avec les nouvelles constructions dans les vecteurs pCMV5 et pRc/CMV. Étant donné l'aspect granuleux des cellules COS-7 (ATCC) en culture, celles-ci sont remplacées par les cellules COS-1 (Dr Marcel Bastin, Université de Sherbrooke, Qc) d'apparence plus saine. Les cellules sont incubées cette fois dans des plaques de 6 puits de 3.5 cm de diamètre pour les essais d'activité ou dans des pétris de 6 cm de diamètre pour les essais d'immunoprécipitation et les études de type *Northern*.

Tout en conservant les conditions de Pascoe *et al.* (1992), quelques modifications importantes sont apportées tout au long de ces essais. 24 h post-transfection, le milieu était remplacé par du milieu frais contenant 1.2 μm de [¹⁴C]DOC (70 nCi). De 2 à 60 h plus tard, les milieux de cultures sont débarrassés des cellules en suspension puis les stéroïdes sont extraits, dissous dans du méthanol (s'évapore moins rapidement) et séparés sur plaque de silice par TLC. Cette fois, le dépôt des échantillons s'est effectué dans des conditions où la silice n'a pas été endommagée. Les lipides cellulaires n'encombrent pas les puits et, à l'examen du chromatogramme, on peut remarquer que les aires de migration de la [¹⁴C]DOC sont presque toutes à la même hauteur. Cette fois, des patrons distinctement différents permettent de caractériser davantage la spécificité réactionnelle de chacune des enzymes.

4.11 Analyses de type *Northern*

Des études de *Northern* similaires aux précédentes ont permis d'identifier un ARNm

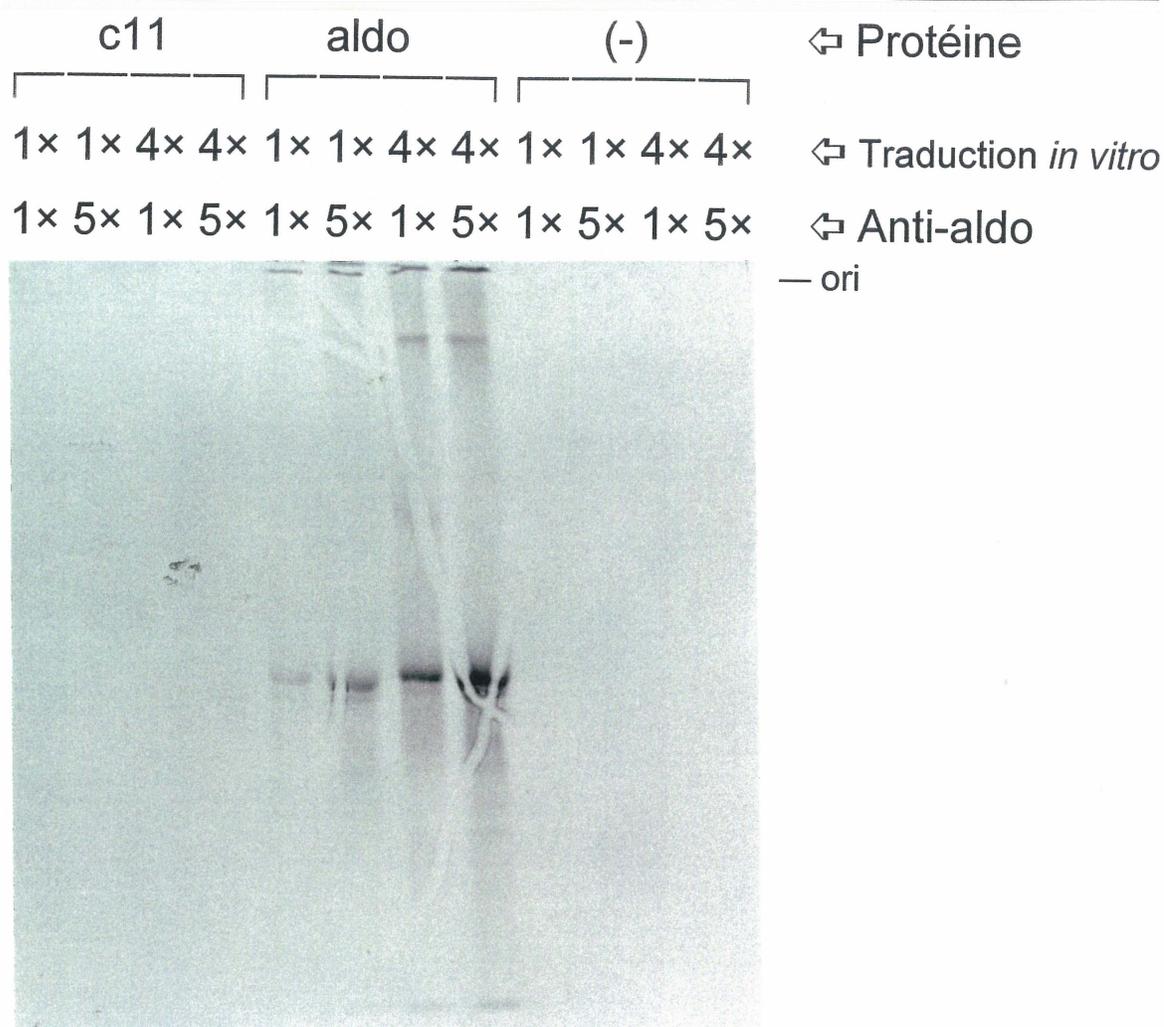


Figure 34. Immunoprécipitation des produits de traduction *in vitro*. Deux quantités de milieu de traduction *in vitro* où sont exprimées les protéines P450c11, P450aldo ou un milieu de traduction sans ARN exogène (-) sont mis en présence de deux quantités différentes de l'anticorps spécifique anti_{aldo}. Les produits d'immunoprécipitation sont séparés sur gel polyacrylamide et ce dernier est séché sur papier 3M. Le séchage a provoqué la rupture du gel aux endroits où les bandes radioactives semblent interrompues

spécifique au P450c11 et au P450aldo chez des cellules transfectées avec les constructions pRc/CMV_{c11/aldo} et pCMV_{c11/aldo} (fig. 35).

4.12 Analyse de l'expression des P450 dans COS

Des essais dans le temps permettent de constater l'évolution de la transformation de la [¹⁴C]DOC pendant une période qui s'étend de 2 h post-addition du substrat à 60 h. Les

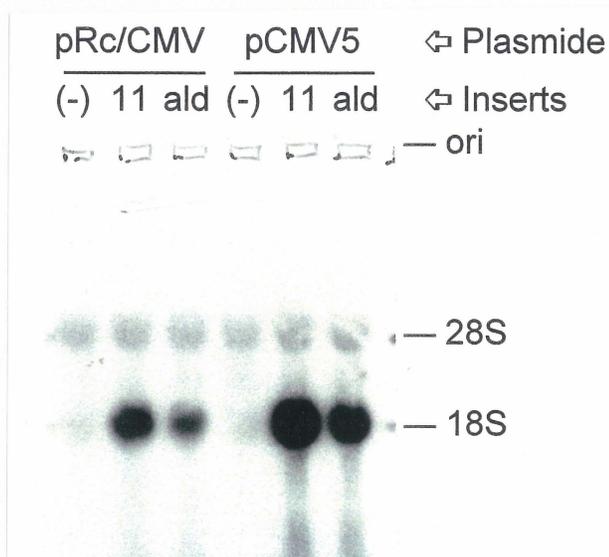


Figure 35. Études Northern de l'expression des protéines P450aldo et P450c11 chez COS. Cette fois, les essais sont repris suite à l'ajout de la séquence AMV-UTL en amont des inserts. (-) contrôle négatif sans insert, (ald) insert P450aldo et (11) insert P450c11

produits de synthèse sont extraits et séparés par TLC sur plaque de silice. Dans un premier temps, les stéroïdes extraits après 48 h sont appliqués sur plaque de TLC pour ne subir qu'une seule ronde de séparation en une dimension. Les cellules transfectées avec le plasmide arborant le P450c11 transforment la [^{14}C]DOC principalement en [^{14}C]corticostérone et [^{14}C]19OH-DOC et dans des proportions plus faibles, en [^{14}C]18OH-DOC, [^{14}C]18OH-corticostérone et en [^{14}C]11-déshydrocorticostérone (tableau VII). L' [^{14}C]aldostérone n'a pas été détectée dans le milieu d'incubation de ces cellules. Les cellules transfectées avec le plasmide arborant le P450aldo métabolisent la [^{14}C]DOC en [^{14}C]corticostérone, [^{14}C]18OH-corticostérone et en [^{14}C]aldostérone et dans des proportions plus faibles, en [^{14}C]19OH-DOC, [^{14}C]18OH-DOC et en [^{14}C]11-déshydrocorticostérone. Dans cette première série d'expériences, 92% et 93% de la [^{14}C]DOC ont été métabolisés par les cellules transfectées avec pCMV_{c11} et pRc/CMV_{c11} respectivement, alors que 83% et 75% du substrat ont été métabolisés par les cellules transfectées avec pCMV_{aldo} et pRc/CMV_{aldo}, respectivement. Dû à ce haut niveau de conversion, une seconde série d'expériences a été entreprise afin de

déterminer l'action dans le temps de la formation des [^{14}C]métabolites. Alors que les constructions découlant de pCMV5 semblaient plus efficaces, seules ces dernières ont été utilisées pour des études dans le temps.

TABLEAU VII. Activités enzymatiques des cellules COS-1 transfectées

Produits formés	Activités enzymatique			
	pCMV _{c11}	pRc/CMV _{c11}	pCMV _{aldo}	pRc/CMV _{aldo}
	pmol/48 h/ml de milieu (% de transformation)			
B	422 (35%)	436 (36%)	373 (31%)	324 (27%)
18OH-DOC	?	?	?	?
18OH-B	14.4 (1.2%)	6.03 (0.5%)	178 (15%)	139 (12%)
19OH-DOC	331 (28%)	383 (32%)	-	-
ALDO	-	-	81.6 (6.8%)	76.8 (6.4%)

Les cellules sont co-transfectées avec les plasmides indiqués et pCD-Adx. Le temps d'incubation est de 48 h à 37°C avec le substrat [^{14}C]DOC. (?) signifie que la présence du produit est détectée, mais dans des proportions trop faibles pour être quantifiée. (B) corticostéroïde.

Les cellules transfectées avec pCD-Adx et pCMV_{c11/aldo} ont été incubées en présence de [^{14}C]DOC pendant 2, 4, 12, 24, 36 et 60 h. Les cellules transfectées avec pCD-Adx et pCMV5 sans insert ont servi comme contrôle négatif. Les fig. 36 à 38 montrent les [^{14}C]métabolites produits et analysés par TLC dans un système de séparation à une seule dimension (système I).

Une seconde chromatographie utilisant le second système de solvants (système II) a été nécessaire dans le but de séparer la [^{14}C]18OH-DOC de la [^{14}C]19OH-DOC, puisque ces deux métabolites co-migrent à la même position dans le premier système de solvants. L'identité de la [^{14}C]18OH-B a aussi été confirmée par un autre TLC utilisant le second

système de solvants. La quantification des données provenant des analyses des milieux incubés pour 2, 4, 12, 24, 36 and 60 h est montrée à la fig. 39.

Les cellules transfectées avec pCMV_{c11} ont transformé 54%, 82% and 89% de [¹⁴C]DOC pendant les premières 2, 4 et 12 h d'incubation. Le métabolite majeur étant le [¹⁴C]corticostérone (14% à 2 h, 28% à 4 h et 36% à 12 h) et [¹⁴C]19OH-DOC (16% à 2 h, 27% à 4 h et 21% à 12 h). Un plateau dans le niveau de [¹⁴C]corticostérone a été atteint après 12 h d'incubation. Par opposition, l'accumulation de la [¹⁴C]19OH-DOC a atteint un maximum à 4 h et a progressivement diminué alors à 1.3% après 60h d'incubation, indiquant que ce composé a été métabolisé ultérieurement. De plus, l'apparition de métabolites

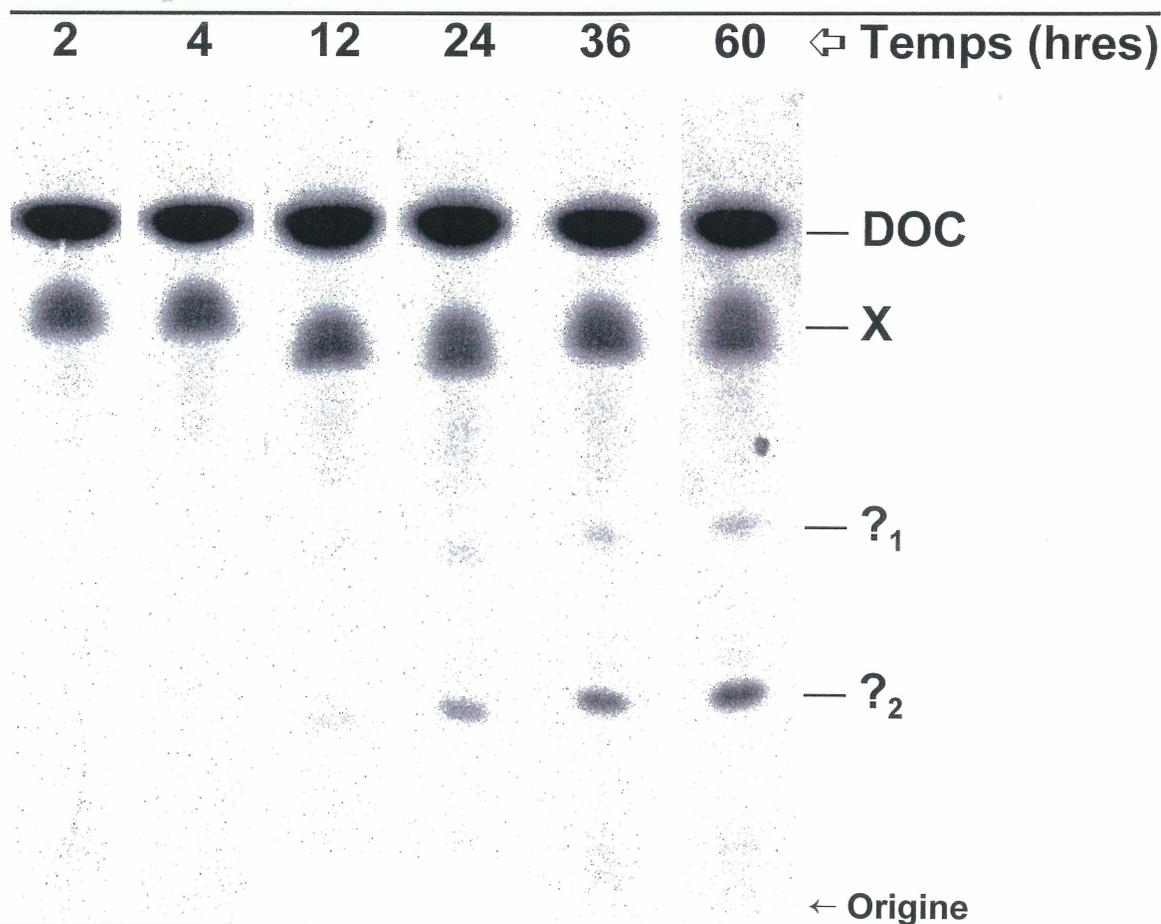


Figure 36. Études dans le temps de la formation de [¹⁴C]métabolites dans les cellules COS-1 arborant le plasmide pCMV5 sans insert. La migration s'est réalisée de bas en haut sur plaque de silice. Seul le système de solvant I a été utilisé pour la séparation des métabolites. (?_x) produits inconnus

inconnus, désignés ?_x, a été observée dans le milieu, spécialement après 60 h d'incubation des cellules transfectées avec pCMV_{c11} (fig. 38). Ces inconnus ne sont pas présents dans les contrôles et chez les cellules transfectées avec pCMV_{aldo} (fig. 37).

Les cellules transfectées avec pCMV_{c11} ont aussi transformé dans des proportions plus faibles la [¹⁴C]DOC en [¹⁴C]18OH-DOC (2.8%), [¹⁴C]18OH-corticostérone (0.2‰) et [¹⁴C]11-déshydrocorticostérone (0.2%) respectivement, après 4 h d'incubation, alors qu'aucune [¹⁴C]aldostérone n'a été formée. De plus, une substance [¹⁴C]-marquée est présente dans tous les milieux incluant le contrôle (désignée X). La formation de ce produit est probablement attribuée à l'action des cellules COS-1 seules ou à la méthode d'extraction en

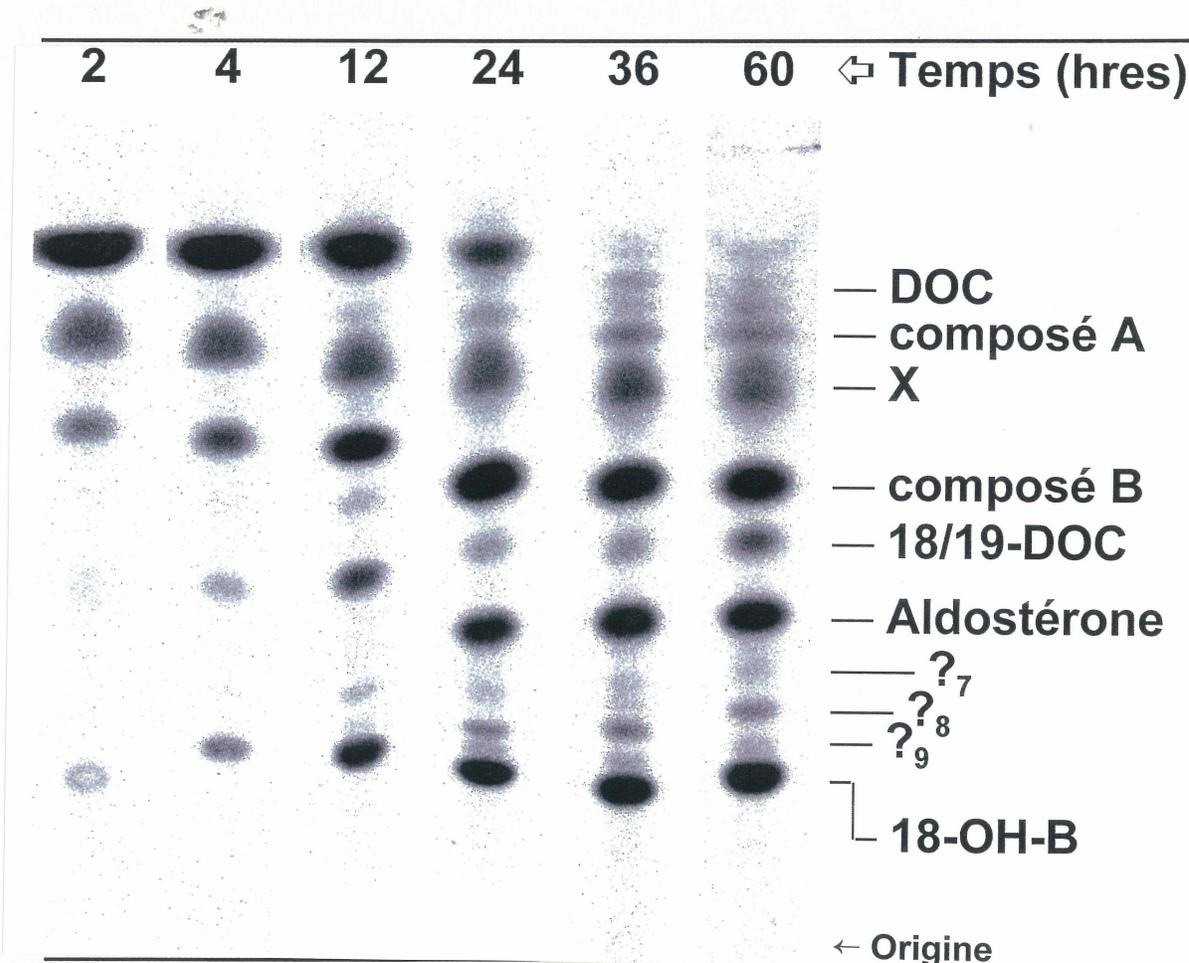


Figure 37. Études dans le temps de la formation de [¹⁴C]métabolites dans les cellules COS-1 arborant le plasmide pCMV_{aldo}. La migration s'est réalisée de bas en haut sur plaque de silice. Seul le système de solvant I a été utilisé pour la séparation des métabolites. 18/19-DOC, 18OH-DOC et 19OH-DOC; B, corticostérone; A, désydrocorticostérone; (?_x) produits inconnus

tant que telle. L'extraction d'un milieu de culture contenant de la $[^{14}\text{C}]\text{DOC}$ incubé à 37°C et au autre conservé à 4°C , tous en absence de cellules, aurait peut-être permis de mettre en évidence l'action des cellules dans la formation du composé X.

La figure 39 démontre que le métabolisme de la $[^{14}\text{C}]\text{DOC}$ est plus lent dans les cellules transfectées avec P450aldo que P450c11. En fait, 72%, 67%, 41% et 11% de $[^{14}\text{C}]\text{DOC}$ demeuraient encore dans le milieu d'incubation après 2 h, 4 h, 12 h et 24 h d'incubation, respectivement. Contrairement aux cellules transfectées avec pCMV_{c11}, de l' $[^{14}\text{C}]\text{aldostérone}$ a été trouvée dans de fortes proportions dans les milieux d'incubation des

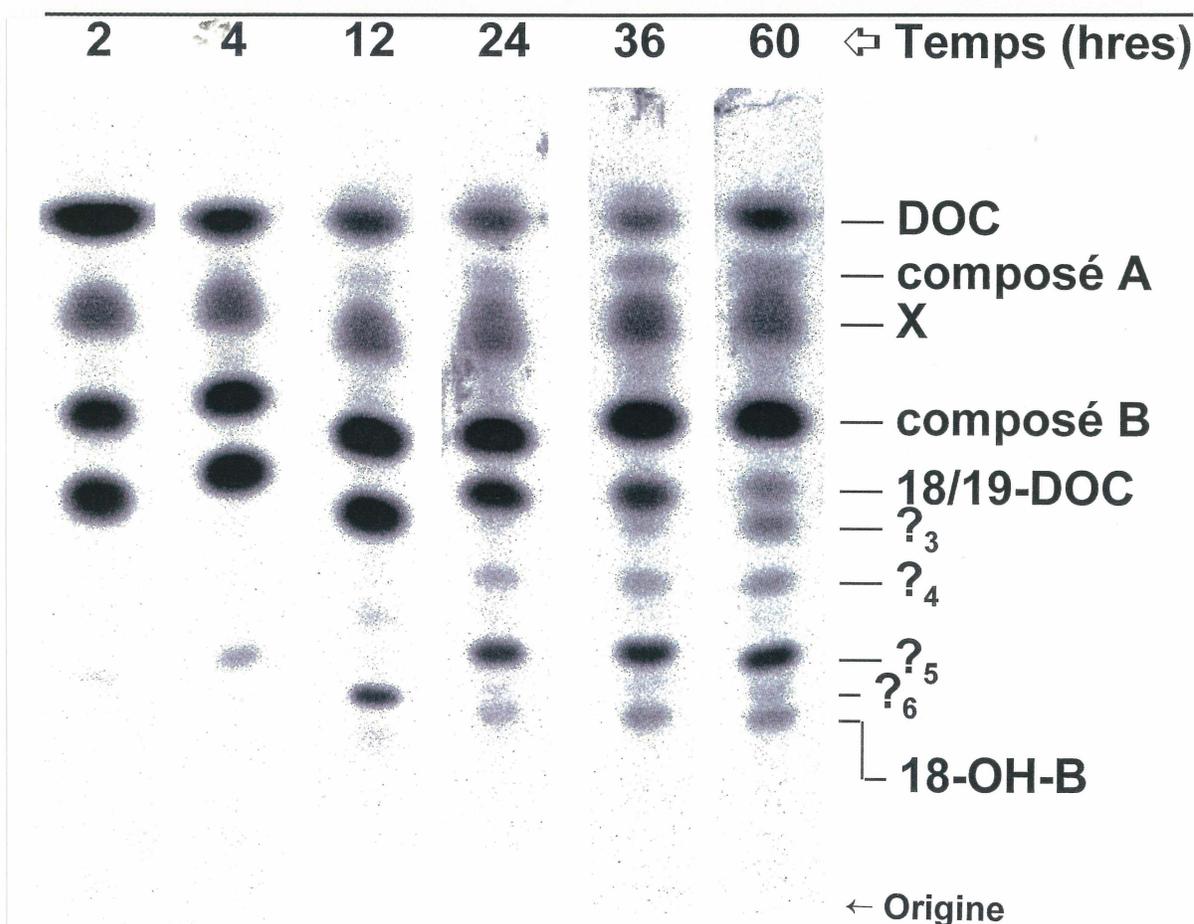


Figure 38. Études dans le temps de la formation de $[^{14}\text{C}]\text{métabolites}$ dans les cellules COS-1 arborant le plasmide pCMV5_{c11}. La migration s'est réalisée de bas en haut sur plaque de silice. Seul le système de solvant I a été utilisé pour la séparation des métabolites. 18/19-DOC, 18OH-DOC et 19OH-DOC; B, corticostérone; A, déshydrocorticostérone; ($?_x$) produits inconnus

cellules transfectées avec pCMV_{aldo}. En fait, après 24 h d'incubation, la [¹⁴C]DOC a été principalement transformée en [¹⁴C]aldostérone (11%), corticostérone (28%) et 18OH-corticostérone (18%). Le substrat [¹⁴C]-marqué a aussi été métabolisé dans des proportions plus faibles en [¹⁴C]18OH-DOC (0.7%), 19OH-DOC (0.8%), et [¹⁴C]11-déshydrocorticostérone (1.4%).

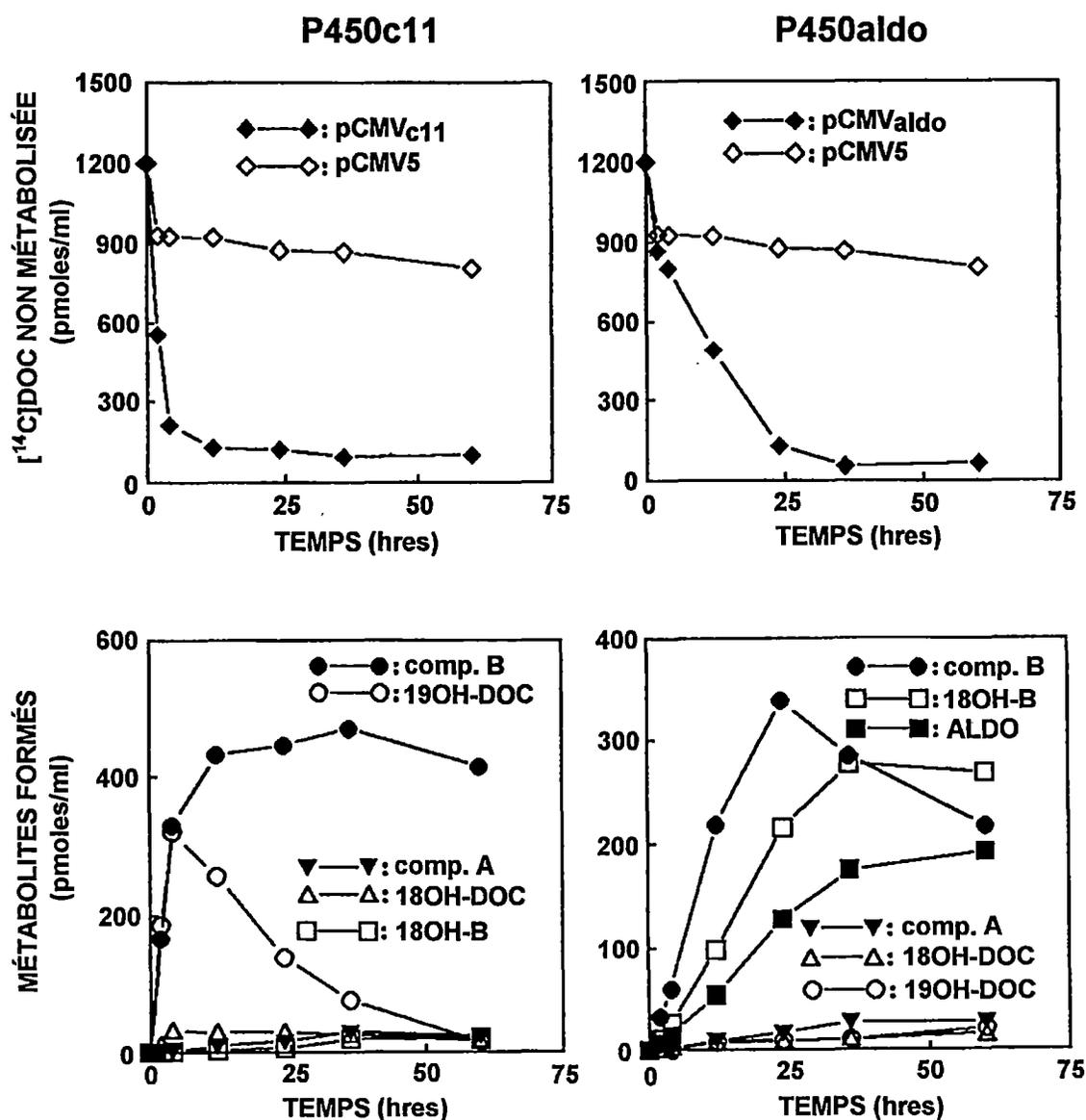


Figure 39. Métabolisme de la [¹⁴C]DOC dans les cellules COS. À partir des études chromatographiques, la quantité de DOC non métabolisée (haut) ainsi que l'apparition de métabolites nouvellement formés (bas) ont été quantifiées puis rapportées en graphiques

La présence de ces métabolites formés dans des proportions minimales a été bien mise en évidence par les résultats des TLC en deux dimensions établis sur le milieu de culture de ces cellules incubées pendant des périodes de 36 et 60 h (fig. 44 à 49, aux appendices III à VIII).

4.13 Immunoprécipitation des produits d'expression des P450s

Afin de déterminer la présence des protéines exprimées dans les cellules COS, des études d'immunoprécipitation ont été entreprises. L'utilisation de l'anticorps anti_{aldo} spécifique à la protéine de hamster ainsi que l'anticorps anti_{c11} spécifique à la protéine bovine ont permis de mettre en évidence la synthèse du cytochrome P450_{aldo} particulièrement dans les cellules COS arborant le plasmide pCMV5_{aldo} (fig. 40). Les produits de traduction *in vitro* ont aussi été précipités de façon à comparer la migration des protéines radio-marquées natives

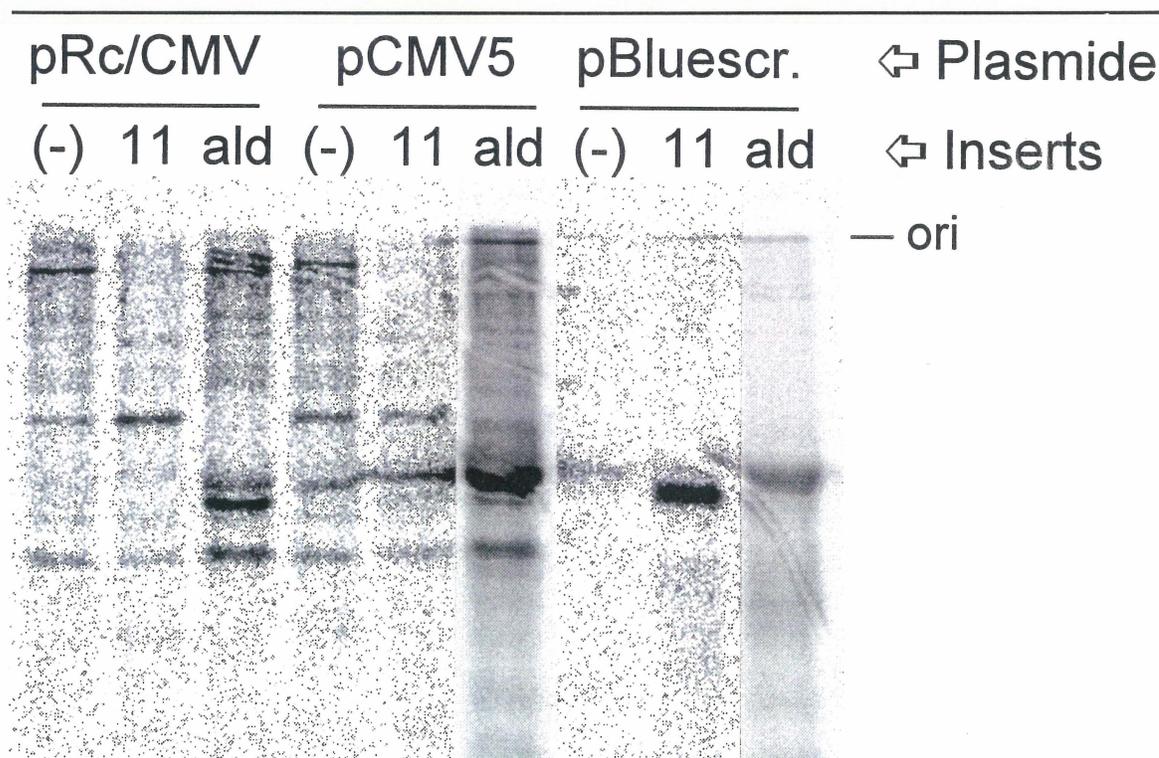


Figure 40. Immunoprécipitation des produits d'expression dans les cellules COS ainsi que des produits de traduction *in vitro*. (-) contrôle négatif; 11, plasmides arborant la construction P450c11; ald, plasmides arborant la construction P450_{aldo}. Aucun standard de poids moléculaire n'a été utilisé pour cette expérience qualitative

(*in vitro*) et matures (cellules COS). Étant donné la spécificité de l'anticorps anti_{aldo} pour la protéine de hamster, les signaux obtenus lors de l'utilisation des constructions plasmidiques pCMV5_{aldo} et pBluescript_{aldo} sont particulièrement plus intenses et de ce fait, l'exposition de ces deux puits sur l'appareil PhosphorImager a été réduite. L'efficacité du plasmide pCMV5 par rapport au plasmide pRc/CMV est démontré ici puisque le signal obtenu pour la construction pCMV5_{aldo} est beaucoup plus intense. Un détail majeur concerne toutefois la standardisation des transfections effectuées. L'efficacité des transfections d'un pétri à l'autre n'a pas été mesurée. Par contre, tous ont été effectuées selon les mêmes procédures et dans les mêmes conditions. Pour ce qui est des contrôles négatifs, un mélange des deux anticorps a été utilisé pour l'immunoprécipitation de ces milieux.

Étant donné le caractère qualitatif de cette expérience, qui a été réalisée d'ailleurs sans marqueurs de poids moléculaires et dans des conditions arbitraires, la description des bandes obtenues n'ira pas plus loin. De plus, les signaux obtenus étant très faibles (sauf pour pCMV5_{aldo} et pBluescript_{aldo}) l'exposition prolongée a provoqué l'apparition d'un bruit de fond intense, ce qui a pour effet de confondre les bandes correspondantes aux P450s avec celles de protéines non spécifiques.

DISCUSSION

1. CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADN GÉNOMIQUE DE HAMSTER

Malgré le criblage de plus de 1.8×10^6 plaques de lyses, aucun clone comprenant le gène *CYP11B1* n'a été isolé. De plus, malgré le grand nombre de clones possédant le gène *CYP11B2*, aucun n'était complet. Chez la souris (Domalik *et al.*, 1991) et chez l'humain (Chua *et al.*, 1987), ces deux gènes sont réunis en tandem sur le même chromosome avec le gène *CYP11B2* en amont du gène *CYP11B1*. Chez la souris, une distance d'environ 13 kb sépare ces deux gènes. Il est possible qu'un arrangement similaire se retrouve chez le hamster avec cette fois, une inversion dans l'ordre des deux gènes. C'est que l'hybridation de la sonde 1346EXON9 sur le clone #66 qui ne contient toutefois pas le dernier exon, est peut-être le résultat d'une hybridation à la toute fin du gène *CYP11B1* situé en amont du gène *CYP11B2* et dont le dernier exon serait présent dans l'insert d'environ 20kb du clone #66. Cette hypothèse n'a toutefois pas été vérifiée. Le nombre élevé de sites *EcoRI* (trois) entre le premier et le dernier exons du clone #66 n'aura pas permis d'éviter une coupure de l'ADN à un de ces endroits, éliminant ainsi la possibilité de trouver un clone possédant les neufs exons complets. De plus, la présence de trois sites *EcoRI* dans l'ADNc (partie codante) du cytochrome P450c11 - comparativement à un seul pour P450aldo - additionnés aux sites potentiels présents dans les introns diminue fortement les chances de trouver un clone *CYP11B1* avec tous les exons présents.

2. TRANSCRIPTION INVERSE De l'ARNm DU P450aldo DE HAMSTER

Le clone #66, malgré qu'il soit incomplet, nous apporte l'information qu'il nous manquait concernant la séquence du gène *CYP11B2*. Pour ce projet, l'intérêt était porté sur la séquence de l'ADNc de P450aldo. Or, la séquence du clone $\lambda 6$ (Bernard, 1995) est amputée d'environ 600 bases dans sa partie 5'. Les séquences codantes déduites du clone #66 ont permis de tracer un portrait global de ce qu'il serait convenu d'appeler l'ADNc de P450aldo, partie codante. C'est cette information qu'il fallait pour concevoir des amorces spécifiques pour l'amplification par PCR de l'ARNm du P450aldo. L'amorce (+/-) a été conçue pour reconnaître spécifiquement l'ARNm de P450aldo et ce, même si cet amorce

s'hybride à près de 100 bases après le codon de terminaison. C'est que l'homologie qui existe entre P450c11 et P450aldo est de près de 100% dans sa partie 3'. La transcription inverse de l'ARNm de P450aldo se voulant des plus spécifique, il fallait éliminer la possibilité d'amplifier la forme P450c11. Le clone $\lambda 6$ comportait près de 400 bases dans sa partie 3' non traduite, donc l'hybridation de l'amorce était toujours possible. En revanche, une telle exploitation de la spécificité d'hybridation de l'amorce sens n'a pas été possible puisqu'aucun clone ne possédant la partie 5' complète n'a été isolé. Puisque l'homologie du côté 5' codant est de 100%, aucune amorce spécifique n'a pu être utilisée. L'amorce (+) permet l'amplification d'un ADNc à partir du codon d'initiation de la traduction alors que l'amorce (-) est conçue pour reconnaître les premiers codons de la protéine mature.

Les hamsters Golden Syriens ont été maintenus pendant 5 jours sur une diète à teneur faible en sodium. Les mécanismes responsables de l'homéostasie des électrolytes répondent face à une carence en sodium. Une telle réponse se caractérise essentiellement par une hausse très significative des taux plasmatiques du minéralocorticoïde actif aldostérone. Le même traitement appliqué chez des rats Long Evans provoque une élévation du taux sanguin en aldostérone passant d'un taux basal de 20 ng/dl à 100 ng/dl (Tremblay, 1991).

La restriction en Na^+ provoque des augmentations significatives des quantités en P450s en fonction de la durée des traitements. Au niveau de la *zona glomerulosa*, ces augmentations sont beaucoup plus importantes pour les cytochromes P450scc et P450aldo que pour les autres cytochromes P450 surrénaliens. Les enzymes impliquées directement dans la conversion du cholestérol en aldostérone sont donc directement impliquées. Marusic & Mulrow (1967) ont en effet démontré qu'un effet d'une telle diète chez le rat était principalement dirigé vers l'augmentation de la conversion de la corticostérone en 18OH-corticostérone et en aldostérone dans la *zona glomerulosa*.

Dans la *zona glomerulosa*, le niveau en protéines de l'adrénodoxine, le transporteur d'électrons commun aux deux enzymes, est lui aussi augmenté significativement par suite d'une restriction en sodium (Tremblay, 1991). La demande en aldostérone étant alors soutenue, la disponibilité en électrons se doit d'être importante elle aussi. La réponse à long terme passe donc par une étape d'augmentation de la quantité de protéines disponibles, donc

par une étape initiale d'augmentation de la transcription. Dans notre laboratoire, des études de *Northern* effectuées chez des hamsters maintenus dans des conditions de restriction en Na⁺ et dans des conditions de diètes normales ont démontré une augmentation prononcée des transcrits du cytochrome P450ald0 lors des traitements. Les transcrits de P450ald0 sont plus difficilement détectables chez les hamsters sous diète normale.

Malgré la sensibilité des amplifications par la méthode de PCR, un tel traitement appliqué aux hamsters n'était peut-être pas nécessaire puisque une transcription basale aurait sans doute été suffisante pour l'amplification (Kawamoto *et al.*, 1990). L'assurance de travailler avec une source enrichie d'ARNm de P450ald0 devait primer.

Malgré un rendement de réaction très faible, une bande d'amplification à 1.6kb est finalement apparue lorsque le combiné MMuLVRT/polymérase Taq en présence de 8% DMSO a été utilisé. Le point important lors de cette amplification était d'éliminer au maximum la possibilité de repliement interne de l'ARN dans le milieu réactionnel. Ceci a été possible en augmentant la température à 42°C et en utilisant la transcriptase inverse murine, cette dernière possède une activité RNase H beaucoup plus faible (Gerard, 1983) que celle de la transcriptase AMV, ce qui lui permet d'être plus processive parce qu'il existe moins de compétition entre l'activité transcriptionnelle et l'activité de dégradation (Berger *et al.*, 1983). L'importance de la présence du DMSO dans le milieu réactionnel, pour ce cas en particulier, a été très bien démontrée. Sa présence semble importante puisqu'aucune amplification n'est possible sans cet agent. Un excès de DMSO inhibe toutefois la polymérase Taq.

Un des paramètres importants qui n'ont pas été exploités dans ce travail est la température d'hybridation des amorces dans la réaction PCR. Puisque les T_m calculés sont très élevés, la température de 55°C du cycle d'hybridation des amorces aurait pu être augmentée à 60°C, ce qui aurait peut-être évité une série d'hybridations non spécifiques. L'amorce (+/-) a été conçue sans algorithme permettant de calculer les possibilités d'hybridation non spécifique avec l'autre amorce ou avec des séquences autres que la séquence visée. Dans l'ADNc de P450ald0, il existe une séquence qui s'apparente à celle ciblée par l'amorce (+/-) et qui se situe à 277 bases de l'ATG. Or, les 14 dernières bases de l'amorce possèdent une homologie de 93% avec la séquence non spécifique. Si, dès le départ

de la réaction PCR, une amplification procède à partir de cette séquence, le brin amplifié va servir de matrice à d'éventuelles amplifications, si bien que les fragments plus courts vont être favorisés et c'est ce qui explique l'apparition si soudaine et si massive d'ADN d'environ 0.3 kb dans les réactions de PCR. Si l'amorce avait été conçue à 20 bases de sa localisation actuelle, les rendements de réaction auraient été beaucoup plus élevés qu'actuellement, compte tenu de la séquestration des nucléotides au niveau de la bande de 0.3kb. Une température d'hybridation plus élevée aurait peut-être évité un tel appariement non spécifique au profit de l'amplification spécifique.



Afin d'éviter que des mutations n'affectent le cadre de lecture de la protéine ou provoquent une incorporation d'un acide aminé différent dans la protéine, les fragments de chacune des deux amplifications ont été séquencés dans leur quasi-totalité. Pour cinq des six clones séquencés, il se trouvait en moyenne 3-4 mutations réparties au hasard dans la séquence de 1.6 kb. La détermination de la nature mutante des séquences s'appuyait par comparaison avec les autres clones ainsi qu'avec les séquences du clone #66 et du clone λ6. Aucune mutation décelée ne trouvait d'équivalent chez les autres clones. Ce type de mutations ponctuelles a pu survenir au niveau de la transcription inverse ou pendant l'étape d'amplification PCR puisqu'aucune des deux enzymes ne possède l'activité 3'-5' exonucléase qui permet la reconnaissance et le retrait d'une base non appariée.

3. EXPRESSION DE P450aldo DE HAMSTER DANS *E. COLI*

Des essais de surexpression de la protéine P450aldo dans *E. coli* n'ont pas permis de mettre en évidence l'apparition de cette protéine sous une forme stable et active. En tout premier lieu, des études de *Northern* ont permis d'établir que l'ADNc de P450aldo dans le vecteur pKK223.3 était bel et bien transcrit une fois l'addition de 1mM d'IPTG dans le milieu de culture. L'apparition des transcrits était déjà observée 20 min après le début de l'induction.

Par contre, sous la bande représentative du transcrit, on peut observer la présence d'une traînée radioactive, signe évident d'une dégradation rapide des transcrits de P450ald0 (fig. 28). Le phénomène de transcription/traduction dans les bactéries, en l'absence d'une paroi nucléaire, est un phénomène très rapide et l'accumulation de protéines se fait donc très rapidement après l'induction. Or, les cultures étaient prélevées 12 h post-induction. L'erreur ici découle du fait qu'une surexpression incontrôlée de cytochrome P450 est toxique pour *E.coli* et peut provoquer la perte du plasmide ou son instabilité. Il est alors nécessaire de réguler l'expression de P450 et de maintenir un stock adéquat de cellules (Porter & Larson, 1991). Avec le promoteur *lac* (ou ses dérivés, comme P_{rc} sur pKK223.3) il est nécessaire de faire pousser les bactéries en présence d'un excès du répresseur *lacI^r*. Les temps de croissance de *E.coli* sont trop longs. Il est suggéré de commencer la purification 1-2 h à 4-6 h post-induction (Porter & Larson, 1991).

L'influence du temps de croissance trop long est aussi révélée si on considère que P450c11 est sensible au phénomène d'oxydation, ce qui rend la protéine inactive. En effet, chez des cellules du cortex surrénalien de boeuf en culture (Hornsby, 1980), la production de cortisol, donc de produits 11 β -hydroxylés pouvait provoquer une perte d'activité ou une destruction de l'enzyme responsable de sa production. Le produit de l'enzyme, qui agirait comme *pseudo*-substrat au niveau de l'enzyme, impliquerait une peroxydation de lipides initiée par les radicaux libres dérivés de l'oxygène gazeux relâchés par le complexe P450-*pseudo*-substrat-oxygène, due à l'incapacité du *pseudo*-substrat à être à nouveau oxygéné. La présence d'antioxydants comme le DMSO ou l'acide ascorbique prévenait cette *pseudo*-inactivation en milieu cellulaire. Par contre, pour nos essais d'expression, aucun de ces additifs n'a été ajouté. Peut-être même que l'addition de DOC dans le milieu bactérien aurait accéléré le processus de déstabilisation de l'enzyme en lui permettant de synthétiser plus de produits 11 β -hydroxylés. Il n'est donc pas surprenant de ne pas retrouver la présence de ces enzymes après un traitement aussi long et dans des conditions aussi peu avantageuses. Une étude dans le temps aurait probablement permis de mettre en évidence la production de la protéine dans des délais plus raisonnables (< 2 h post-induction).

Un des contrôles qui aurait dû être fait est la détermination de la distribution cellulaire

de l'enzyme. Est-ce que la majorité de l'enzyme se retrouve dans les fractions de membranes internes ou externes, dans le cytosol ou le périplasme. Basée sur les méthode de fractionnement de Neu & Heppel (1965) et de Ito *et al.* (1977) la fraction périplasmique s'obtient par choc osmotique dans l'eau. Les fractions membranaires et le cytosol sont isolés par centrifugation sur gradient de sucrose 70%/53%/15% et le contenu de chacune des fractions est ainsi analysé sur gel de polyacrylamide, suivi par un transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et immunodétection avec un anticorps spécifique. Une telle pratique aurait permis de mettre en évidence l'expression de P450ald.

La présence des cytochromes *d* et *o* de la chaîne respiratoire de *E.coli* compromet la quantification des P450 exprimés lorsqu'analysés par spectrophotométrie. De telles préparations exhibent un pic d'absorbance à 444 nm (cytochrome *d*), un autre plus prononcé à 430 nm (cytochrome *d* et *o*)(Kita *et al.*, 1984; Miller & Gennis, 1983) et un maximum très évident à 416 (cytochrome *o*). Les effets de ces pics sont de diminuer l'influence d'un pic à 450 nm tout en masquant la présence de protéines dénaturées à 420 nm. Le cytochrome *d* est exprimé dans *E.coli* lorsque les conditions d'oxygène sont déficientes.

Il n'est pas non plus exclus que la présence de structures secondaires impliquant les premières bases du transcrit soit à l'origine d'une expression aussi peu importante (fig. 41). Dans son article publié en 1982, Gheysen *et al.* mesurent le taux d'expression de différentes constructions plasmidiques où l'ADNc de la protéine petit T de SV40 est inséré en aval de séquences différentes contenant tous la région d'attachement aux ribosomes, Shine-Delgarno, ainsi que le codon d'initiation de la traduction ATG. Il est en mesure d'établir que les plus hauts taux d'expression sont obtenus lorsque la distance entre le Shine-Delgarno et l'ATG se rapproche de 9 bases et que l'ATG n'est pas impliqué dans une structure secondaire. Une conclusion semblable sur l'accessibilité du codon d'initiation avait déjà été établie par la même équipe (Iserentant & Fiers, 1980). Wood *et al.* (1984) est passé d'un taux d'expression arbitraire de 0.6 à 107 en déstabilisant une structure secondaire forte qui impliquait l'ATG de la chaîne lourde de l'immunoglobuline μ de souris. De plus, il s'avérait que la distance optimum entre le site Shine Delgarno et l'ATG était de 9-10 bases. Kozak (1983) a publié les séquences consensus de plusieurs sites d'attachement de ribosomes et celle de *E.coli*

ressemble à celle-ci...

... AACCUGCGGUUGGAUCACCUCCUUA ...

... où de doublet de G serait très conservé et la séquence CUCC participerait fréquemment à une sorte d'appariement avec l'ARN ribosomal 16S. Or, si une telle séquence est vraie, elle est loin de ressembler à la séquence incluse sur le plasmide pKK223.3 (fig. 41). Est-ce qu'une telle disparité contribuerait défavorablement à l'expression de la protéine dans *E.coli* ?

Morohashi *et al.* (1990) ont exprimé le cytochrome P450c11 de boeuf dans les cellules COS-7 en isolant les mitochondries de ces cellules pour étudier l'expression du cytochrome par spectrophotométrie, mais il n'a obtenu qu'un faible pic à 450nm avec beaucoup de bruit de fond. Il n'était pas en mesure d'évaluer la quantité de protéines exprimées par le spectre d'absorbance. Des études antérieures ont démontré (Hornsby, 1980) que l'induction par l'ACTH de P450c11 pouvait être inhibée par le produit de l'enzyme, le cortisol. L'accumulation de cortisol dans le milieu peut causer la dégradation du P450c11. Ce processus peut être inhibé par des agents anti-oxydants dans le milieu. Cette dégradation serait médiée *via* l'apparition de radicaux libres. Aucun agent anti-oxydant n'a toutefois été utilisé dans ces essais.

4. EXPRESSION DES PROTÉINES P450aldo et P450c11 DANS COS

4.1 Expression de P450aldo et P450c11 dans COS-7

Afin d'étudier la spécificité réactionnelle des deux protéines P450, l'utilisation du clone $\lambda 1$ (Bernard, 1995) a été rendue nécessaire. Étant donné l'homologie de 100% existant dans les régions 5' et 3' du clone $\lambda 1$ avec l'ADNc de P450aldo, il a été postulé que les 6 bases manquantes de ce clone étaient identiques à celles de P450aldo. Cette hypothèse a récemment été confirmée par des études de PCR-RACE à partir d'ARN_{total} de glandes surrénales de hamsters (Véronneau *et al.*, 1995). En substituant la portion centrale de l'ADNc de P450aldo (délimitée par *Sfi*I et *Pst*I) par la portion similaire de P450c11, il était possible de reconstituer un ADNc de P450c11 putatif.

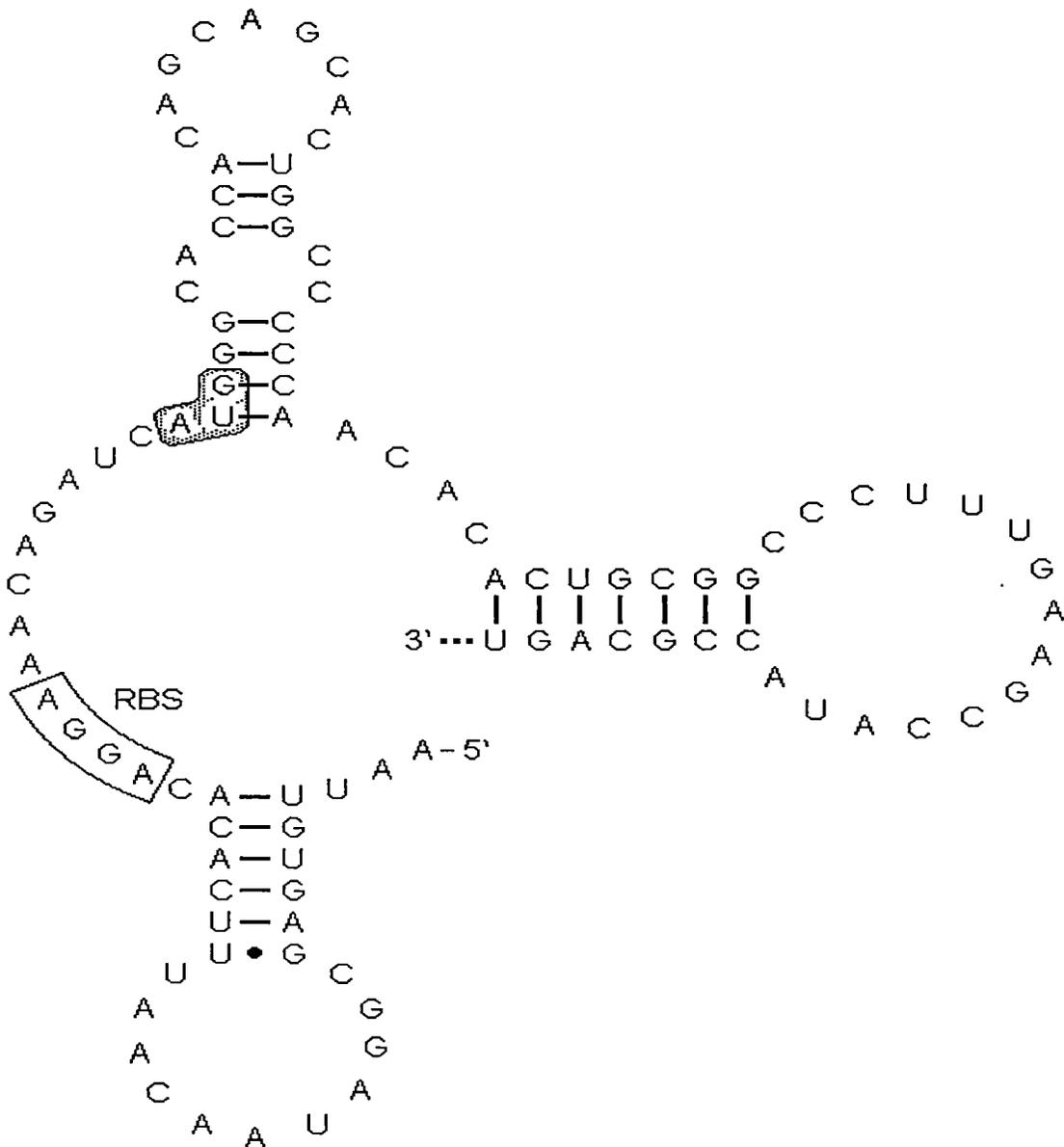


Figure 41. Aperçu de la structure secondaire de la partie 5' de l'ARNm du P450ald0, telle que proposée par le logiciel RNASE^o. La distance entre la séquence Shine Delgarno (RBS) et l'ATG est de 8 bases. L'énergie de la structure secondaire impliquant le codon d'initiation (ombré) est de -7.6 kcal

Le P450c11 de hamster comprend 499 a.a. incluant un peptide signal putatif de 24 a.a. à l'extrémité NH₂-terminale pour l'insertion dans les mitochondries. Le P450c11 de hamster est très comparable aux P450s murin (Domalik *et al.*, 1991), de rat (Nonaka *et al.*, 1989;

Mukai *et al.*, 1993), humain (Mornet *et al.*, 1989; Kawamoto *et al.*, 1990), bovin (Chua *et al.*, 1987; Kirita *et al.*, 1990) et porc (Sun *et al.*, 1995) comme représenté par le graphique des homologues entre le P450c11 de hamster et celui de différentes espèces animales (fig. 27). On peut remarquer, toutefois, que le P450c11 de hamster ressemble plus à celui de la souris et du rat, qu'aux plus gros mammifères comme le porc, le bovin et même l'humain.

Les premiers essais d'expression avec le vecteur pSVL ont été concluants quant à la capacité des cytochromes à métaboliser I et ce, de façon particulière pour chacune des deux protéines. Malgré leur pertinence, ces premiers résultats ne permettaient pas de spécifier clairement la nature des produits formés. Lors des premiers essais, certaines conditions d'expérimentation n'étaient pas totalement maîtrisées. D'abord, la concentration en [¹⁴C]DOC était trop faible, l'extraction des stéroïdes se déroulait selon des conditions arbitraires, l'application des échantillons sur la silice endommageait grandement celle-ci et enfin, la présence de granulations à l'intérieur des cellules COS-7 faisait douter de leur intégrité.

4.2 Modification des conditions lors de l'expression

Plusieurs changements ont été apportés afin de corriger la migration des stéroïdes sur plaque de TLC. D'abord, l'apparence granuleuse et le peu d'étalement des cellules COS-7 laissait présager une croissance difficile, malgré un cycle de division normal. La souche COS-1 a préférentiellement été utilisée pour ses caractéristiques morphologiques normales ainsi que la présence d'un personnel qualifié pouvant dispenser les conseils nécessaires au moment opportun.

Puisque l'immunodétection des protéines P450aldo et P450c11 n'avait pas permis de révéler leur présence dans des homogénats de cellules transfectées, l'hypothèse d'un faible niveau d'expression a permis de rectifier certains critères de départ. L'expression est liée au niveau de transcription, à la stabilité de l'ARNm, à l'efficacité de traduction et à la stabilité de la protéine. Certains de ces facteurs avaient l'avantage d'être modifiables.

Pour augmenter l'efficacité d'expression des protéines, outre l'utilisation d'un promoteur de transcription plus puissant en celui de CMV, une séquence virale de 32 bases a été ajoutée aux plasmides pCMV5 et pRc/CMV en amont des ADNc insérés. Cette

séquence d'ADN viral, AMV-UTL (Jobling & Gehrke, 1987), a été rapportée comme favorisant l'attachement des ribosomes aux ARNm et par conséquent, augmente le taux de traduction des ARNm. Ces versions modifiées n'ont pas été testées en parallèle avec des constructions non modifiées, et par conséquent, l'effet de cette séquence n'a pas été mesurée. Par contre, en comparant l'effet de pCMV_{aldo/c11} et pRc/CMV_{aldo/c11}, il semble que l'insertion des ADNc dans le plasmide pCMV5 favorise l'expression de la protéine.

4.3 Traduction *in vitro* des protéines P450aldo et P450c11

Des essais de traduction *in vitro* et d'immunoprécipitation ont montré que les ADNc de P450c11 et P450aldo sont traduits en protéines qui migrent légèrement différemment sur gel SDS-PAGE. La différence d'environ 4kDa, comme poids moléculaire apparent, entre les deux protéines est aussi présente lors d'études d'immunodétection d'homogénats de glandes surrénales totales de hamster. Le poids moléculaire apparent de la protéine mature, calculé selon la séquence d'ADNc, est de 57.3 kDa pour P450aldo et de 56.8 kDa pour P450c11. Cette différence de 0.5 kDa ne peut expliquer à elle seule la migration observée sur gel. Certaines modifications post-traductionnelles de nature inconnue pourraient induire une différence de mobilité, mais la raison exacte de cet écart demeure inconnue.

4.4 Expression de P450aldo et P450c11 dans COS-1

Dans les cellules COS-1, les deux protéines ont hydroxylé la 11-désoxycorticostérone en position C-11 et C-18, mais seulement P450aldo a formé de l'aldostérone. Après 12 h d'incubation, dans la portion linéaire de la courbe (fig. 39), les cellules transfectées avec P450aldo ont métabolisé de la 11-désoxycorticostérone exogène en corticostérone, 18OH-corticostérone, aldostérone, 18OH-DOC, et 11-déshydrocorticostérone dans des proportions de 25 à 11 à 6 à 1 à 1, respectivement. En comparaison, dans des études similaires de transfection, la P450aldo de surrénale humaine métabolise la DOC en corticostérone, 18OH-corticostérone; aldostérone et 18OH-DOC dans des proportions de 25, 0.025, 5.5 et 2.8 respectivement (Kawamoto *et al.*, 1990).

Okamoto & Nonaka (1992) ont trouvé que P450aldo chez le rat peut transformer la DOC en corticostérone, 18OH-corticostérone, aldostérone et 18OH-DOC dans des

proportions de 25, 16, 5.3 et 1.5. Sous des conditions similaires, le P450aldo de souris a transformé la DOC en corticostérone et aldostérone dans des proportions de 25 pour 1 (Domalik *et al.*, 1991).

Dans des essais de reconstitution avec le cytochrome P450c11 bovin en présence de DOC, Ohta *et al.* (1987) ont observé l'apparition de corticostérone et de 18OH-DOC ainsi que d'un nouveau composé. Le temps de rétention de ce produit est identique à celui de la 19OH-DOC sur HPLC. Si la réaction était laissée plus longtemps avec un excès de cytochrome, ce produit disparaissait et parallèlement à cette diminution, d'autres produits apparaissaient. Ces résultats suggéraient que la 19OH-DOC était métabolisée par la suite en d'autres sous-produits. En commençant la réaction directement en présence de 19OH-DOC, ces mêmes sous-produits apparaissaient à nouveau. Un des sous-produits correspondait au 19-oxo-DOC.

La construction de P450aldo montre une petite activité 19-hydroxylase et est capable de transformer la DOC en corticostérone et 19OH-DOC dans des proportions de 25 pour 1. De façon similaire, un ADNc isolé d'une tumeur surrénalienne humaine retirée d'un sujet souffrant d'aldostéronisme primaire a été rapporté comme pouvant transformer la DOC en corticostérone et 19OH-DOC selon des rapports de 25 à 1.8. Les protéines analogues chez d'autres espèces ne semblent posséder cette propriété de 19-hydroxylation. Une faible activité 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase a aussi été constatée chez des cellules transfectées avec pCMV_{aldo} ainsi qu'avec pCMV_{c11}. Une activité similaire déshydrogénase a aussi été rapportée des P450aldo et P450c11 humains (Curnow *et al.*, 1991), mais cette activité est probablement constitutive chez les cellules COS (Stewart *et al.*, 1994).

L'incubation de DOC en présence de cellules transfectées avec les constructions P450c11 a entraîné sa transformation en corticostérone, 11-déshydrocorticostérone, 18OH-DOC, 18OH-corticostérone et en 19OH-DOC, mais non en aldostérone. Par ces caractéristiques, le P450c11 de surrénale de hamster démontre des similitudes avec les P450c11 de plusieurs mammifères dont l'humain (Kawamoto *et al.*, 1990), le rat (Okamoto & Nonaka, 1992) et la souris (Domalik *et al.*, 1991). Par opposition, les transfections d'ADNc bovins (Kirita *et al.*, 1990) et porcins (Sun *et al.*, 1995) de P450c11 démontrent une capacité de synthèse de l'aldostérone à partir de DOC.

Comme chez d'autres espèces, le P450c11 de hamster possède une forte activité 11 β -hydroxylase, mais contrairement aux autres, le P450c11 démontre aussi une forte activité 19-hydroxylase. En fait, un rapport quasi-identique de 10:11 existe entre l'activité 11 β -hydroxylation et 19-hydroxylation chez les cellules COS-1 transfectées avec P450c11 après 2 h d'incubation. Chez les rats (Okamoto & Nonaka, 1992), l'humain (Kawamoto *et al.*, 1990) et les bovins (Kirita *et al.*, 1990) des plus petits rapports de 25:0.6, 25:0.18 et 25:1.8 ont été trouvés. Collectivement, ces résultats suggèrent que le P450 surrénalien de hamster possède la plus forte activité 19-hydroxylase. Ceci est compatible avec les résultats des incubations d'homogénats de surrénales d'espèces variées indiquant que le hamster a une plus grande activité 19-hydroxylase que le mouton, le crapaud et le bovin (Griffiths *et al.*, 1963). Pourtant, une forte activité de 19-hydroxylation a aussi été démontrée dans les mitochondries cortico-surréaliennes d'autres espèces dont la gerboise (Drummond *et al.*, 1988). Nos résultats sont aussi en conformité avec de plus récents résultats démontrant que la mitochondrie surrénalienne de hamster était capable de transformer la DOC en corticostérone et 19OH-DOC selon des rendements approximativement égaux (Wiseman *et al.*, 1992). Les mêmes auteurs ont aussi rapporté que l'activité 19-hydroxylase n'était pas changée chez les hamsters gardés sous diète restreinte en sodium pendant 8 semaines. Notre laboratoire a aussi trouvé que le P450c11 restait inchangé dans les surrénales de hamster gardés sous diète restreinte en sodium, alors que P450aldo augmentait sous ce régime, indiquant que les deux protéines sont régulées différemment. De plus, un stimulus soutenu d'ACTH *in vivo* a résulté en une diminution de 48% dans la transformation de corticostérone en aldostérone dans les préparations de mitochondries de surrénales de hamster, mais aucun changement dans la transformation de DOC en corticostérone n'a été observé (LeHoux *et al.*, 1992). Cela est aussi en accord avec des résultats antérieurs démontrant que P450aldo et P450c11 sont régulées de façon séparée dans les surrénales de rats (Tremblay & LeHoux, 1989; Tremblay *et al.*, 1991; LeHoux & Tremblay, 1992; Tremblay *et al.*, 1992; Tremblay *et al.*, 1993; Tremblay & LeHoux, 1992; LeHoux & Ducharme, 1992) et de souris (Domalik *et al.*, 1991).

La 19OH-DOC est le précurseur d'un minéralocorticoïde très puissant, la 19-nor-désoxycorticostérone (19-nor-DOC) (Gomez-Sanchez *et al.*, 1982). Le groupement 19-

hydroxyle est successivement oxydé dans la glande surrénale en 19-aldéhyde et 19-acide. L'ultime étape de la synthèse de la 19-nor-DOC est sa décarboxylation en position C-19 qui a lieu dans le rein (Schackleton *et al.*, 1984). Étant donné l'origine rénale des cellules COS, il n'est pas surprenant de trouver que la 19OH-DOC formée par l'action de P450c11 est métabolisée ultérieurement avec le temps. La 19-nor-DOC pourrait aussi être produite par les surrénales; de fait, Wiseman *et al.* (1992) suggèrent que les mitochondries de surrénales de hamster transformeraient la DOC en 19-nor-DOC. Azar & Melby (1992) rapportent que la 19-nor-DOC pourrait ainsi être produite par les surrénales ipsilatérales de patients avec des adénomes produisant de l'aldostérone. La production étant comparable à celle de l'aldostérone, ils suggèrent que la 19-nor-DOC pourrait contribuer à l'hypertension et l'hypocalcémie de cette maladie.

La 19-nor-DOC a été identifiée pour la première fois par Gomez-Sanchez *et al.* (1979; 1982) comme un métabolite naturel présent dans les urines de rats hypertensifs en régénérescence surrénalienne. Cette substance a aussi été trouvée dans l'urine de rats hypertensifs SHR (Dale *et al.*, 1982) et chez les rats dont l'hypertension est sensible aux sels, les rats Dahl (Dale *et al.*, 1985; Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez, 1986). Chez l'humain, la 19OH-DOC a été trouvée dans l'urine de patients hypertensifs et chez des patients avec une certaine forme d'hypertension secondaire comme celle trouvée dans la déficience en 17 α -hydroxylase, un syndrome associé avec l'hypogonadisme, l'hypertension et l'hypocalcémie (Melby *et al.*, 1984-85).

Funder *et al.* (1978) rapportent aussi que la 19-nor-DOC possède une plus grande affinité pour les récepteurs des minéralocorticoïdes que l'aldostérone et que ce stéroïde est par conséquent un agoniste puissant sans activité antagoniste. De plus, Perrone *et al.* (1981), qui ont travaillé sur la vessie de grenouille, ont remarqué que la 19-nor-DOC pouvait augmenter le transport du sodium à des degrés comparables aux effets de l'aldostérone à des concentrations identiques. Cette spécificité d'action, combinée à la durée de l'activité et l'inhibition de l'effet de 19-nor-DOC par le spironolactone, ne diffère pas des effets de l'aldostérone, démontrant ainsi le pouvoir minéralocorticoïde de ce composé.

CONCLUSION

Au moment d'aborder l'étude de la spécificité fonctionnelle des cytochromes P450c11 et P450aldo chez le hamster, il fallait être en mesure de produire ces protéines dans des systèmes d'expression hétérologues afin de générer des quantités suffisantes pour les différents essais. Pour ce faire, l'ADNc spécifique à la forme aldostérone synthase de la protéine a été amplifié par la méthode de PCR. Cette méthode permettait de parer à l'incontournable problème de ne trouver que des ADNc incomplets dans les différentes banques d'ADNc de surrénales de hamster mises à notre disposition. Par contre, il a fallu séquencer jusqu'à six ADNc différents avant d'en trouver un sans mutations. Il faut rappeler que la combinaison de l'enzyme Taq et de la transcriptase inverse MMuLV provoque une mauvaise incorporation d'une base sur 500 en moyenne. En comparant la séquence de l'ADNc du cytochrome P450aldo avec celle du cytochrome P450c11 incomplet de Bernard (1995), l'ajout des bases manquantes a permis d'obtenir un ADNc complet. L'homologie de séquences d'ADN existant entre les deux ADNc de hamsters et les ADNc d'espèces animales différentes a confirmé la nature des transcrits isolés.

Plusieurs équipes de chercheurs se sont intéressées à l'expression du cytochrome P450c11 dans des systèmes d'expression hétérologues, principalement dans les bactéries *E. coli*. Il semble toutefois qu'aucune équipe n'ait réussi à surexprimer cette protéine, qu'elle soit de source bovine ou murine, dans des systèmes bactériens. C'est ce qui a été tenté dans cette étude, mais rien de concluant n'a pu être mis en évidence. Bien sûr, avant de conclure à l'impossibilité de surexprimer les cytochromes P450c11 ou P450aldo, bien des aspects du protocole de surexpression devront faire l'objet de révisions et de contrôles très sévères. Certains paramètres, comme la présence de composés anti-oxydants, les temps de croissance bactérienne ou l'utilisation de vecteurs plasmidiques efficaces seront particulièrement importants à considérer pour d'éventuelles tentatives de surexpression.

Le fait que le P450c11 de hamster possède une forte activité 19-hydroxylase confère à cet animal la propriété d'être un excellent modèle pour l'étude des caractéristiques de cette enzyme cruciale impliquée dans la formation du précurseur de 19-nor-DOC, une substance associée à certains types d'hypertensions essentielles. Par l'utilisation d'un système de transfection appliqué à cette étude, les prochains travaux se concentreront à l'étude de la cinétique de la 19-hydroxylation et la cinétique de son inhibition par des antagonistes spécifiques. Ce système devrait permettre de développer des inhibiteurs spécifiques de l'activité 19-hydroxylase qui n'influenceraient pas l'activité 11 β -hydroxylase. Le développement de tels inhibiteurs est essentiel pour le traitement de certains types d'hypertensions. De plus, par la mutagenèse dirigée, l'étude tentera de localiser les acides aminés qui procurent la spécificité de 19-hydroxylation au P450c11 de hamster comparé aux P450c11 des autres espèces animales étudiées. Nous espérons ainsi être capables de cibler des mutations putatives qui seraient à l'origine de cette forte activité 19-hydroxylase impliquée dans le développement de l'hypertension.

REMERCIEMENTS

J'ignorais qu'autant d'années s'écouleraient depuis le début de cette maîtrise, mais cette période a sans doute été la plus enrichissante de ma vie. Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à mon directeur de recherche, Dr Jean-Guy LeHoux, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a donné carte blanche pour l'élaboration de mon travail.

Oserais-je passer sous silence le soutien financier que m'ont apporté Dr LeHoux, le fonds FCAR ainsi que la Faculté de Médecine? Leur apport a permis à ce projet de surpasser nos attentes quant aux questions auxquelles il nous a permis de répondre.

S'entourer de personnel compétent comme Lyne Ducharme et Andrée Lefebvre est un atout et je tiens à leur exprimer toute ma gratitude. À André J., André L., Hugues et Jean, je vous dis merci pour cette franche amitié et cet entraide dans le laboratoire. Un gros merci aussi à Mado, Claudette et Sylvie, les trois meilleures secrétaires d u CHUS.

Evidemment, à ma fille Catherine et à Marie-France, je tiens à les remercier de tout mon coeur pour leur patience, leur écoute et leur amour. Sans elles, il n'est pas sûr que ce document aurait vu le jour. À mes parents, Suzanne & André, qui m'ont toujours supporté, m'ont écouté et m'ont soutenu dans les moments les plus lourds, à eux je leur dis mille mercis et je tiens à les assurer de toute ma reconnaissance. Je ne peux passer sous silence la contribution remarquable de mes amis Éric Turcotte, Ing. et Alain Veilleux, M.Sc., deux personnes avec qui je totalise plus de 30 années d'amitiés sincères.

En terminant, je tiens à remercier mes supporteurs:

- Agriculture & Agro-alimentaire Canada et la gang du 211 de la ferme expérimentale de Lennoxville (support technique)
- Les missionnaires de Marian Hill à Rock-Forest ☞ Pères Jean-Claude, Daniel, Gervais, Jean-Marc et Patrice, ces chers Kidus, Frédéric, Alain etc. ☞ (accueil, support)
- Michel St-Laurent, Yvon, Jonathan, Nathalie, Guy et Louis à Sherbrooke (accueil chaleureux, soutien technique et financier)

RÉFÉRENCES

- Addison T (1855) On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules. Highley, Londres.
- Andersson S Davis DS Dahlback H Jornvall H & Russer DW (1989) Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* **264**:8222-9
- Azar ST & Melby JC (1992) 19-Nor-deoxycorticosterone production from aldosterone-producing adenomas. *Hypertension* **19**:362-4
- Bahr V Hense J Hader O Bolke T & Oelkers W (1991) Stimulation of steroid secretion by adrenocorticotropin injections and by arginine vasopressin infusions: no evidence for a direct stimulation of the human adrenal by arginine vasopressin. *Acta Endocr.* **125**:348-53
- Belanger B Couture J Caron S Bodou P Fiet J & Belanger A (1990) Production and secretion of C19 steroids by rat and guinea pig adrenals. *Steroids.* **55**:360-5
- Berger SL Wallace DM Puskas RS & Eschenfeldt WH (1983) Reverse transcriptase and its associated ribonuclease H: Interplay of two enzyme activities controls the yield of single-stranded complementary deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **22**:2365-72
- Black SD & Coon MJ (1987) P-450 cytochrome: structure and function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **60**:35
- Blin N & Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **3**:2303-8
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**:248-54
- Browning KS Lax SR Humphreys J Ravel JM Jobling SA & Gehrke L (1988) Evidence that the 5'-untranslated leader of mRNA affects the requirement for wheat germ initiation factors 4A, 4F, and 4G. *J. Biol. Chem.* **263**:9630-4
- Brown MS Kovanen PT & Goldstein JL (1979) Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog. Horm. Res.* **35**:215

- Brown-Sequard CE (1856) Compt Rend Soc Biol **43**:422
- Campbell A (1971) Genetic structure Dans The bacteriophage lambda ed AD Hershey p.13 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Cauter EV (1990) Endocrine rhythms. Dans *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism* (Édité par Becker KL). JB Lippincott, Philadelphie, PA pp.45-52
- Chelly J Concordet JP Kaplan JC Kahn A (1989) Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:2617-21
- Chirgwin JM Przybyla AE MacDonald RJ & Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**:5294-9
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* **162**:156-9
- Chua SC Szabo P Vitek A Grzeschik KH John M White PC (1987) Cloning of cDNA encoding steroid 11 β -hydroxylase (P450c11) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:7193-7
- Clark BJ & Waterman MR (1991) Heterologous expression of mammalian P450 in COS-1 cells. *Meth. Enzymol.* **206**:100-8
- Clarke L & Carbon J (1976) A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plamids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**:91-9
- Cohen P (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem. Sci.* **17**:408-14
- Cox RA (1968) The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **XII(B)**:120-9
- Cunningham PR & Ofengand J (1990) Use of inorganic pyrophosphatase to improve the yield of *in vitro* transcription reactions catalyzed by T7 RNA polymerase. *BioTechniques* **9**:713-4
- Curnow KM Tusie-Luna MT Pascoe L Natarajan R Gu JL Nadler JL White PC (1991) The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol. Endo.* **5(10)**:1513-22

- Dale SL Holbrook MM Arison BH & Melby JC (1985) 19-Nor-deoxycorticosterone metabolism by rat adrenal glands: evidence for the formation of 19-nor-corticosterone and 19-nor-18-hydroxydeoxycorticosterone. *Endocrinology* **116**:118-23
- Dale SL Holbrook MM Komanicky P & Melby JC (1982) Urinary 19-nor-deoxycorticosterone excretion in the spontaneously hypertensive rat. *Endocrinology* **110**:1989-93
- Dale SL Holbrook MM & Melby JC (1985) 19-Nordeoxycorticosterone excretion in rats bred for susceptibility and resistance to the hypertensive effects of salt. *Endocrinology* **117**:2424-7
- Dale SL Holbrook MM & Melby JC (1981) 19-Nor-deoxycorticosterone in the neutral fraction of urine. *Steroids* **37**:103-9
- Dale SL Holbrook MM & Melby JC (1980) Identification of 19-hydroxydeoxycorticosterone in regenerating rat adrenal incubations. *Steroids* **36**:601-9
- de Boer HA Comstock LJ Vasser M (1983) The tac promoter: A functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**:21-5
- Domalik LJ Chaplin DD Kirman MS Wu RC Liu W Howard TA Seldin MF & Parker KL (1991) Different isoenzymes of mouse 11 β -hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol. Endo.* **5**:1853-61
- Drummond DR Armstrong J & Colman A (1985) The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **13**:7375-94
- Drummond TD Mason JI & McCarthy JL (1988) Gerbil adrenal 11 β - and 19-hydroxylating activities respond similarly to inhibitory or stimulatory agents: two activities of a single enzyme. *J. Steroid Biochem.* **29**:641-8
- Dulbecco R & Freeman G (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**:396-7
- Ehlers ME Griffing GT Wilson TE & Melby JC (1987) Elevated urinary 19-nor-DOC glucuronide in Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **64**:926-30
- Ferretti L & Sgaramella V (1981) Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase *Nucleic Acids Res.* **9**:3695-705

- Frischauf AM Lehrach H Poustka A Murray N (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**:827-42
- Frohman MA Dush MK Marcin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:8998-9002
- Funder JW Mercer J Ingram B Feldman D Wynne K & Adam WR (1978) 19-Nor deoxycorticosterone (19-nor DOC): Mineralocorticoid receptor affinity higher than aldosterone, electrolyte activity lower. *Endocrinology* **103**:1514-7
- Funkenstein B McCarthy JL Dus KM Simpson ER & Waterman MR (1983) Effect of adrenocorticotropin on steroid 21-hydroxylase synthesis and activity in cultured bovine adrenocortical cells. Increased synthesis in the absence of increased activity. *J. Biol. Chem.* **258**:9398-405
- Furuichi Y LaFiandra A & Shatkin AJ (1977) 5'-terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266**:235-9
- Furuya S Okada M Ito A Aoyagi H Kanmera T Kato T Sagara Y Horiuchi T & Omura T (1987) Synthetic partial extension peptides of P-450(SCC) and adrenodoxin precursors: Effects on the import of mitochondrial enzyme precursors. *J. Biochem.* **102**:821-32
- Garren LD Ney RL & Davis WW (1965) Studies of the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by adrenocorticotropic hormone *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**:1443-50
- Gelfand DH (1989) Taq DNA polymerase. Dans PCR Technology ed HA Erlich pp. 17-30 Mac Millan Publishers Ltd, U.K.
- Gerard GF (1983) Reverse transcriptase. *Enzymes of nucleic acid synthesis and modification: DNA enzymes* (ed. S.T. Jacob), vol. 1, p. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Geuze HJ Slot JW Yanagibashi K McCracken JA Schwartz AL Hall PF (1987) Immunogold cytochemistry of cytochromes P-450 in porcine adrenal cortex. *Histochemistry* **86**:551-7
- Gheysen D Iserentant D Derom C & Fiers W (1982) Systematic alteration of the nucleotide sequence preceding the translation initiation codon and the effects on bacterial expression of the cloned SV40 small-t antigen gene. *Gene* **17**:55-63

- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. **23**:175-82
- Gomez-Sanchez EP & Gomez-Sanchez CE (1986) 19-Nordeoxycorticosterone excretion in Dalh's S/Jr rats. *J. Steroid Biochem.* **37**:103-9
- Gomez-Sanchez CE Gomez-Sanchez EP Schackleton CHL & Milewich L (1982) Identification of 19-hydroxydeoxycorticosterone, 19-oxo-deoxycorticosterone and 19-oic-deoxycorticosterone as products of deoxycorticosterone metabolism by rat adrenals. *Endocrinology* **110**:384-89
- Gomez-Sanchez CE Holland OB Murray BA Loyd HA & Milewich L (1979) 19-Nordeoxycorticosterone: a potent mineralocorticoid isolated from the urine of rats with regenerating adrenals. *Endocrinology* **105**:708-11
- Griffing GT Dale SL Holbrook MM & Melby JC (1983) Nordeoxycorticosterone in primary aldosteronism and low renin hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **56**:218-21
- Griffing GT Wilson TE Alexander EA Bengel HH Perrone RD & Melby JC (1987) Biphasic 19-nordeoxycorticosterone excretion after adrenal denucleation is associated with altered hydroxylase activities. *Endocrinology* **121**:645-9
- Griffing GT Wilson TE Holbrook MM Dale SL Jackson TK Ullrich I & Melby JC (1984) Plasma and urinary 19-nor-deoxycorticosterone in 17 α -hydroxylase deficiency syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**:1011-5
- Griffing GT Wilson TE & Melby JC (1985) Unconjugated and conjugated 19-nor-DOC glucosiduronate in essential hypertension. **7(suppl 1)**:I12-I17
- Griffiths K (1963) Hydroxylation of 11-deoxycorticosterone by adrenals of various animal species. *J. Endo.* **26**:437-44
- Grunstein M & Hogness DS (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNA that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**:3961-5
- Gurevich VV Pokrovskaya ID Obukhova TA & Zozulya SA (1991) Preparative *in vitro* mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases. *Anal. Biochem.* **195**:207-13
- Hadley ME (1988) *Endocrinology*, 2nd ed. Prentice Hall.

- Hanukoglu I (1992) Reductases of the bacterial, mitochondrial and microsomal cytochrome P450 systems: structural comparisons. Dans *Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics* (édité par Archakov AI & Bachmanova GI). INCO-TNC, Moscou, pp. 339-344
- Hanukoglu I Feuchtwanger R & Hanukoglu A (1990) Mechanism of ACTH and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells. *J. Biol. Chem.* **265**:20602-8
- Hanukoglu I Gutfinger T Haniu M & Shively JE (1987) Isolation of a cDNA for adrenodoxin reductase (ferredoxin-NADP⁺ reductase): implications for mitochondrial cytochrome P450 systems. *Eur. J. Biochem.* **169**:449
- Hanukoglu I Suh BS Himmelhoch S & Amsterdam A (1990) Induction and mitochondrial localisation of cytochrome P450_{scc} system enzymes in normal and transformed ovarian granulosa cells. *J. Cell Biol.* **111**:1373-81
- Hechter O Solomon MM Zaffaroni A & Pincus G (1953) Transformation of cholesterol and acetate to adrenal cortical hormones. *Arch. Biochem. Biophys.* **46**:201
- Henry FJ & Bassett JR (1985) Corticosterone storage within the adrenal cortex: Evidence for a sulphate conjugate. *J. Endocr.* **104**:381-6
- Holmes DS & Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193-7
- Hornsby PJ (1980) Regulation of cytochrome P-450-supported 11 β -hydroxylation of deoxycortisol by steroids, oxygen, and antioxidants in adrenocortical cell cultures. *J. Biol. Chem.* **255**:4020-7
- Iserentant D & Fiers W (1980) Secondary structure of mRNA and efficiency of translation initiation. *Gene* **9**:1-12
- Ish-Horowicz D & Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**:2989-98
- Ito K Sato T & Yura T (1977) Synthesis and assembly of the membrane proteins in *E. coli*. *Cell* **11**:551-9
- Jefcoate CR DiBartolomeis MJ Williams CA McNamara BC (1987) ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. *J. Steroid. Biochem.* **27**:721

- Jefcoate CR McNamara BC Artemenko I Yamazaki T (1992) Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450_{scc} in steroid hormone synthesis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**:751-67
- Jobling SA & Gehrke L (1987) Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature* **325**:622-5
- John ME John MC Simpson ER Waterman MR (1985) Regulation of cytochrome P-450_{11 β} gene expression by adrenocorticotropin. *J. Biol. Chem.* **260**:5760-7
- Johnson EF Walker DL Griffin KJ Clark JE Ofita RT Muerhoff AS & Masters BS (1990) Cloning and expression of three rabbit kidney cDNAs encoding lauric acid Ω -hydroxylases. *Biochemistry* **29**:873-9
- Kagawa CM & Van Arman CG (1957) Sodium retaining activity of 19-nor-steroids in adrenalectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**:444-7
- Kahn A Cottreau D Daegelen D & Dreyfus JC (1981) Cell-free translation of messenger RNAs from adult and fetal human muscle. Characterization of neosynthesized glycogen phosphorylase, phosphofructokinase and glucose phosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* **116**:7-12
- Kain KC Orlandi PA & Lanar DE (1991) Universal promoter for gene expression without cloning: Expression-PCR. *BioTechniques* **10**:366-74
- Kapas S Orford CD Barker S Vinson GP & Hinson JP (1992) Studies on the intracellular mechanism of action of α -melanocyte-stimulating hormone on rat adrenal *zona glomerulosa*. *J. Molec. Endocr.* **9**:47-54
- Karn J Matthes HWD Gait MJ Brenner S (1984) A new selective phage cloning vector, λ 2001, with sites for XbaI, BamHI, HindIII, EcoRI, SstI and XhoI. *Gene*. **32**:217-24
- Kawai S & Nishizawa M (1984) New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1172-4
- Kawamoto T Mitsuuchi Y Ohnishi T Ichikawa Y Yokoyama Y Sumimoto H Toda K Miyahara K Kuribayashi I Nakao K Hosoda K Yamamoto Y Imura H Shizuta Y (1990) Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450_{aldo} as related to primary aldosteronism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**:309-16
- Kawamoto T Mitsuuchi Y Toda K Miyahara K Yokoyama Y Nakao K Hosoda K Yamamoto Y Imura H & Shizuta Y (1990) Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P450_{11 β} . *FEBS Letters* **269**:345-9

- Kerlavage AR (1991) G-protein-coupled receptor family. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1**:394-401
- Kimura T & Suzuki K (1965) Enzymatic reduction of non-heme iron protein (adrenodoxin) by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**:373
- Kimura T & Suzuki K (1967) Components of the electron transport system in adrenal steroid hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **242**:485
- Kirita S Hashimoto T Kitajima M Honda S Morohashi K & Omura T (1990) Structural analysis of multiple bovine P-450 $_{11\beta}$ genes and their promoter activities. *J. Biochem.* **108**:1030-41
- Kirita S Morohashi K Hashimoto T Yoshioka H Fujii-Kuritama Y & Omura T (1988) Expression of two kinds of cytochrome P-450(11 β) mRNA in bovine adrenal cortex. *J. Biochem.* **104**:683-6
- Kita K Konishi K & Anraku Y (1984) Terminal oxydases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **259**:3368-75
- Kozak M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**:283-92
- Kozak M (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. *Microbiological Reviews* **47**:1-45
- Kramer RE Dubois RN Simpson ER Anderson CM Kashiwagi K Lambeth JD Jefcoate CR & Waterman MR (1982) Cell-free synthesis of precursor forms of mitochondrial steroid hydroxylase enzymes of the bovine adrenal cortex. *Arch. Biochem. Biophys.* **215**:478-85
- Kramer RE Rainey WE Funkenstein B Dee A Simpson ER & Waterman MR (1984) Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* **259**:707-13
- Kramer RE Simpson ER & Waterman MR (1983) Induction of 11 β -hydroxylase by corticotropin in primary cultures of bovine adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* **258**:3000-5
- Kronbach T Larabee TM Johnson EF (1989) Hybrid cytochromes P-450 identify a substrate binding domain in P-450 $_{IIC5}$ and P-450 $_{IIC4}$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:8262-5

- Labrie F Simard J Luu-The V Bélanger A Pelletier G (1992) Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**:805-26
- Lambeth JD & Pember SO (1983) Cytochrome P-450_{scc}-adrenodoxin complex: reduction properties of the substrate-associated cytochrome and relation of the reduction states of heme and iron-sulfur centers to association of the proteins. *J. Biol. Chem.* **258**:5596
- Lambeth JD Stevens VL (1985) Cytochrome P-450_{scc}: Enzymology, and the regulation of intra-mitochondrial delivery to the enzyme. *Endocrine Res.* **10**:283-309
- Lashansky G Saenger P Fishman K Gautier T Mayes D Berg G Di Martino-Nardi J & Reiter E (1991) Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: Age- and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation. *J. Clin. Endocr. Metab.* **73**:674-86
- LeHoux JG & Ducharme L (1992) The differential regulation of aldosterone output in hamster adrenal by angiotensin_{II} and adrenocorticotropin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**:809-14
- LeHoux JG Lefebvre A Bélisle S & Bellabarba D (1990) Effect of ACTH suppression on adrenal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA in 4-aminopyrazolopyrimidine-treated rats. *Mol. Cell. Endo.* **69**:41-9
- LeHoux JG Mason JI Bernard H Ducharme L LeHoux J Véronneau S & Lefebvre A (1994) The presence of two cytochrome P450 aldosterone synthase mRNAs in the hamster adrenal. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **49**:131-7
- LeHoux JG Mason JI & Ducharme L (1992) *In vivo* effects of adrenocorticotropin on hamster adrenal steroidogenic enzymes. *Endocrinology* **131**:1874-82
- LeHoux JG & Tremblay A (1992) *In vivo* regulation of gene expression of enzymes controlling aldosterone synthesis in rat adrenal. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**:837-46
- Levy H & Kushinsky S (1955) The isolation of 19-hydroxy-11-deoxycorticosterone and an unknown, active mineralocorticoid from bovine adrenal perfusions of progesterone. *Archs Biochem. Biophys.* **59**:290-3
- Lin D Shi Y & Miller WL (1990) Cloning and sequence of the human adrenodoxin reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:8516-20

- Lisardi PM (1989) Binding and recovery of DNA and RNA using S&S NA45 DEAE membrane. *Application update* Schleicher & Schuell New York USA
- Maliyakal EJ Manorame CJ Simpson ER & Waterman MR (1985) Regulation of cytochrome P-450_{11 β} gene expression by adrenocorticotropin. *J. Biol. Chem.* **260**:5760-7
- Matocha MF & Waterman MR (1984) Discriminatory processing of the precursor forms of cytochrome P450_{scc} and adrenodoxin by adrenocortical and heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**:8672-8
- Matocha MF & Waterman MR (1985) Synthesis and processing of mitochondrial steroid hydroxylases. *In vivo* maturation of the precursor forms of cytochrome P-450_{scc}, cytochrome P-450_{11 β} , and adrenodoxin. *J. Biol. Chem.* **260**:12259-65
- Matsukawa N Nonaka Y Ying Z Higaki J Ogihara T Okamoto M (1990) Molecular cloning and expression of cDNAs encoding rat aldosterone synthase: variants of cytochrome P-450(11 β). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:245-52
- Mattox VR (1955) Isolation of 19-hydroxy-11-deoxycorticosterone from beef adrenal extract. *Proc. Staff. Mtg Mayo Clin.* **30**:180-2
- McMaster GK & Carmichael GG (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:4835-8
- Melby JC Dale SL & Griffing GT (1983) Dans *Hypertension* (McGraw-Hill Book Company), New York pp. 349-59
- Melby JC Dale SL Holbrook M Wilson TE Griffing GT & Arison BH (1984-85) 19-nor-corticosteroids in health, in hypertensive states in humans including 17 α -hydroxylase deficiency and in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Endocrine Res.* **10**:591-607
- Mellon P Parker V Gluzman Y Maniatis T (1981) Identification of DNA sequences required for transcription of the human 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell.* **27**:279-88
- Miller MJ & Gennis RB (1983) The purification and characterization of the cytochrome *d* oxydase complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **258**:9159-65

- Miller WL (1988) Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocrine Reviews*. **9**:295-318
- Mitani F Shimizu T Ueno R Ishimura Y Izumi S Komatsu N Watanabe K (1982) Cytochrome P-450₁₁ and P-450_{SCC} in adrenal cortex: Zonal distribution and intramitochondrial localization by the horseradish peroxidase-labeled antibody method. *J. Histochem. Cytochem.* **30**:1066-74
- Momoi K Okamoto M Fujii S Kim CY Miyake Y & Yamano T (1983) 19-Hydroxylation of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone catalyzed by cytochrome P-450_{11 β} of bovine adrenocortex. *J. Biol. Chem.* **258**:8855-60
- Mooibroek M & Wang JH (1988) Integration of signal-transduction processes. *Biochem. Cell Biol.* **66**:557-66
- Mornet E Dupont J Vitek A White PC (1989) Characterization of two genes encoding human steroid 11 β -hydroxylase (P-450(11) β). *J. Biol. Chem.* **264**:20961-7
- Morohashi KI Nonaka Y Kirita S Hatano O Takakusu A Okamoto M & Omura T (1990) Enzymatic activities of P-450(11 β)s expressed by two cDNAs in COS-7 cells. *J. Biochem.* **107**:635-40
- Morohashi KI Yoshioka H Gotoh O Okada T Yamamoto K Miyata T Sogawa K Fujii-Kuriyama Y & Omura T (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA of mitochondrial cytochrome P-450(11 β) of bovine adrenal cortex. *J. Biochem.* **102**:559-68
- Mukai K Imai M Shimada H & Ishimura Y (1993) Isolation and characterization of rat CYP11 β genes involved in late steps of mineralo- and glucocorticoid syntheses. *J. Biol. Chem.* **268**:9130-7
- Munck A Guyre PM & Holbrook NJ (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* **5**:25-44
- Naseeruddin SA & Hornsby PJ (1990) Regulation of 11 β - and 17 α -hydroxylases in cultured bovine adrenocortical cells: 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, insulin like growth factor-I, and activators of protein kinase C. *Endocrinology.* **127**:1673-81
- Nebert DW Ganzales FJ (1987) P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **56**:945-93

- Nebert DW Nelson DR Coon MJ Estabrook RW Feyereisen R Fujii-Kuriyama Y Gonzalez FJ Guengerich FP Gunsalus IC Johnson EF Loper JC Sato R Waterman MR & Waxman DJ (1991) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature *DNA & Cell Biology*. **10**:1-14
- Neher R & Wettstein A (1956) Isolierung and konstitutionsermittlung weiterer pregnanverbindungen aus nebennieren. *Helv. chim. Acta* **39**:2062-88
- Netter Frank M.D. (1989) Atlas of Human Anatomy. CIBA-GEIGY Corporation Summit, New Jersey, USA plate 318
- Neu HC & Heppel LA (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* **240**:3685-92
- Nishizuka Y (1992) Signal transduction: crosstalk. *Trends Biochem. Sci.* **17**:367
- Nonaka Y Matsukawa N Morohashi KI Omura T Ogihara T Teraoka M & Okamoto M (1989) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding rat adrenal cytochrome P450_{11β}. *FEBS Letters* **255**:21-6
- Nonaka Y Murakami H Tabusaki Y Kuramitsu S Dagamiyama H Yamano T & Okamoto M (1987) Molecular cloning and sequence analysis of full-length cDNA for mRNA of adrenodoxin oxydo-reductase from bovine adrenal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**:1239
- Nonaka Y & Okamoto M (1991) Functional expression of the cDNAs encoding rat 11β-hydroxylase [cytochrome P450(11β)] and aldosterone synthase [cytochrome P450(11β, aldo)]. *Eur. J. Biochem.* **202**:897-902
- Ogishima T Mitani F Ishimura Y (1989) Isolation of aldosterone synthase cytochrome P-450 from *zona glomerulosa* mitochondria of rat adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* **264**:10935-8
- Ogishima T Mitani F & Ishimura Y (1989) Isolation of two distinct cytochromes P-450_{11β} with aldosterone synthase activity from bovine adrenocortical mitochondria. *J. Biochem.* **105**:497-9
- Ogishima T Shibata H Shimada H Mitani F Suzuki H Saruta T Ishimura Y (1991) Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism. *J. Biol. Chem.* **266**:10731-4
- Ohnishi T Wada A Lauber M Yamano T & Okamoto M (1988) Aldosterone biosynthesis in mitochondria of isolated zones of adrenal cortex. *J. Steroid Biochem.* **31**:73-81

- Ohnishi T Wada A Nonaka Y Okamoto M & Yamano T (1984) Effect of phospholipid on aldosterone biosynthesis by a cytochrome P-450_{11 β} -reconstituted system. *Biochem. Int.* **9**:715-23
- Ohnishi T Wada A Nonaka Y Sugiyama T Yamano T & Okamoto M (1986) Effect of calmodulin on aldosterone synthesis by a cytochrome P-450_{11 β} -reconstituted system from bovine adrenocortical mitochondria. *J. Biochem.* **100**:1065-76
- Ohta M Fujii S Wada A Ohnishi T Yamano T & Okamoto M (1987) Production of 19-hydroxy-11-deoxycorticosterone and 19-oxo-11-deoxycorticosterone from 11-deoxycorticosterone by cytochrome P-450_{11 β} . *J. Steroid Biochem.* **26**:73-81
- Okamoto M Nonaka Y (1992) Molecular biology of rat steroid 11 β -hydroxylase [P450(11 β)] and aldosterone synthase [P450(11 β , ALDO)]. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **41**:415-9
- Okamura T John ME Zuber MX Simpson ER Waterman MR (1985) Molecular cloning and amino acid sequence of the precursor form of bovine adrenodoxin; evidence for a previously unidentified COOH-terminal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:5705-9
- Orme-Johnson NR (1990) Distinctive properties of adrenal cortex mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**:213-31
- Pascoe L Curnow KM Slutsker L Rösler A White PC (1992) Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyl oxidase II deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:4996-5000
- Paterson BM & Rosenberg M (1979) Efficient translation of prokaryotic mRNAs in a eukaryotic cell-free system requires addition of a cap structure. *Nature* **279**:692-6
- Payne AH (1990) Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol. Reprod.* **42**:399-404
- Pedersen RC & Brownie AC (1983) Cholesterol side-chain cleavage in the rat adrenal cortex: isolation of a cycloheximide-sensitive activator peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1882-6
- Pelham HRB & Jackson RJ (1976) An efficient mRNA-dependant translation for reticulocyte lysate. *Eur. J. of Biochem.* **67**:247-56

- Pelletier J & Sonenberg N (1985) Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell* **40**:515-26
- Perrone RD Schwartz JH Bengel HH Dale SL Melby JC & Alexander EA (1981) Mineralocorticoid activity of 19-nor-DOC and 19-OH-DOC in toad bladder. *Am. J. Physiol.* **241** (*Endocrinol. Metab.* **4**):E406-E409
- Picado-Leonard J Voutilainen R Kao L Chung B Strauss III JR & Miller WL (1988) Human adrenodoxin: cloning of three cDNAs and cycloheximide enhancement in JEG-3 cells. *J. Biol. Chem.* **263**:3240; corrigé p. 11016
- Poulos TL Finzel BC & Howard AJ (1987) High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J. Molec. Biol.* **195**:687-700
- Porter TD & Larson JR (1991) [11] Expression of mammalian P450s in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **206**:108-16
- Privalle CT Crivello JF & Jefcoate CR (1983) Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:702-6
- Promega (1993) RiboMAX™ Large scale RNA Production Systems, SP6, T3, T7. *Technical Bulletin*. **166**:1-11
- Rainey WE Bird IM & Mason JI (1992) Angiotensin I directed *glomerulosa* cell function in fetal adrenal cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**:847-54
- Rapp JR & Dahl LK (1976) Mutant forms of cytochrome P450 controlling both 18- and 11 β -steroid hydroxylation in the rat. *Biochemistry*. **15**:1235-42
- Sagara Y Ito T & Omura T (1984) Partial purification of a metalloprotease catalyzing the processing of adrenodoxin precursor in bovine adrenal cortex mitochondria. *J. Biochem.* **96**:1743-52
- Sagara Y Takata Y Miyata T Hara T & Horiuchi T (1987) Cloning and sequence analysis of adrenodoxin reductase cDNA from bovine adrenal cortex. *J. Biochem.* **102**:1333
- Saiki RK Gelfand DH Stoffel S Scharf SJ Higuchi R Horn GT Mullis KB Erlich HA (1988) Primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**:487-91

- Sambrook J Fritsh EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sanger F Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **12**:5436-67
- Schackleton CH Winter J Biglieri EG & Gomez-Sanchez C (1984) Evidence supporting renal synthesis of 19-nor-deoxycorticosterone. *Clin. Exp. Hypertens. [A]* **6**:939-49
- Schiff MJ Schwartz JH Bengel HH Dale SL Melby JC & Alexander EA (1984) Mineralocorticoid activity of 19-nor-corticosterone and 19-nor-progesterone in the toad bladder. *Endocrinology* **115**:1235-8
- Shibata H Ogishima T Mitani F Suzuki H Murakami M Saruta T & Ishimura Y (1991) Regulation of aldosterone synthase cytochrome P-450 in rat adrenals by angiotensin II and potassium. *Endocrinology* **128**:2534-9
- Shizuta Y Kawamoto T Mitsuuchi Y Toda K Miyahara K Ichidawa Y Imura H & Ulick S (1992) Molecular genetic studies on the biosynthesis of aldosterone in humans. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**:981-7
- Simpson ER Mason JI John ME Zuber MX Rodgers RJ & Waterman MR (1987) Regulation of the biosynthesis of steroidogenic enzymes. *J. Steroid Biochem.* **27**:801-5
- Simpson ER Waterman MR (1988) Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu. Rev. Physiol.* **50**:427
- Skelton FR (1959) Adrenal regeneration and adrenal-regeneration hypertension. *Physiol. Review* **39**:162-82
- Solish SB Picado-Leonard J Morel Y Kuhn RW Mohandas TK Hanukoglu I & Miller WL (1988) Human adrenodoxin reductase: Two mRNAs encoded by a single gene on chromosome 17cen-q25 are expressed in steroidogenic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:7104-8
- Stewart PM Murry BA & Mason JI (1994) Human kidney 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity NAD-dependent enzyme and differs from the cloned "type I" enzyme. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**:480-4
- Stratagene Company (1991) *Instruction manual: pBluescript II Exo/Mung DNA sequencing system*. La Jolla, California, USA

- Sun T Nonaka Y & Okamoto M (1995) Cloning and expression of cytochrome P450(11 β) of porcine adrenal cortex. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* in press
- Sybert DW Lancaster Jr JR Lambeth JD & Kamin H (1979) Participation of the membrane in the side-chain cleavage of cholesterol. *J. Biol. Chem.* **254**:12088
- Tanaka M Haniu M Yasunobu KY & Kimura T (1973) The amino acid sequence of bovine adrenodoxin. *J. Biol. Chem.* **248**:1141
- Tartof KD & Hobbs CA (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**:12
- Thomsen DR Stenberg RM Goins WF & Stinski MF (1984) Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:659-63
- Towbin H Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **76**:4350-4
- Tremblay A (1995) Thèse de Doctorat, Université de Sherbrooke, Qc, CANADA
- Tremblay A Waterman MR Parker KL & LeHoux JG (1991) Regulation of rat adrenal messenger RNA and protein levels for cytochrome P-450s and adrenodoxin by dietary sodium depletion of potassium intake. *J. Biol. Chem.* **266**:2245-51
- Tremblay A Parker KL & LeHoux JG (1992) Dietary potassium supplementation and sodium restriction stimulate aldosterone synthase but not 11 β -hydroxylase P-450 messenger ribonucleic acid accumulation in rat adrenals and require angiotensin II production. *Endocrinology* **130**:3152-8
- Tremblay A & LeHoux JG (1993) Transcriptional activation of adrenocortical steroidogenic genes by high potassium or low sodium intake. *FEBS Letters* **317**:211-5
- Tremblay A & LeHoux JG (1992) Influence of captopril on adrenal cytochrome P-450s and adrenodoxin expression in high potassium or low sodium intake. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**:799-802
- Véronneau S Bernard H Cloutier M Courtemanche J Ducharme L Lefebvre A Mason JI & LeHoux JG (1996) The hamster adrenal cytochrome P450c11 has equipotent 11 β -hydroxylase and 19-hydroxylase activities, but no aldosterone synthase activity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **57**:125-39

- Wada A Ohnishi T Nonaka Y Okamoto M & Yamano T (1985) Synthesis of aldosterone by a reconstituted system of cytochrome P-450_{11 β} from bovine adrenocortical mitochondria. *J. Biochem.* **98**:245-56
- Wada A Okamoto M Nonaka Y & Yamano T (1984) Aldosterone biosynthesis by a reconstituted cytochrome P-450_{11 β} system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**:365-71
- White PC Pascoe L Curnow KM Tannin G & Rösler A (1992) Molecular biology of 11 β -hydroxylase and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**:827-35
- Widmaier EP & Hall PF (1985) Protein kinase C in adrenal cells: possible role in regulation of steroid synthesis. *Molec. Cell. Endocr.* **43**:181-8
- Wiseman JS Nichols JS Wright CL Chen TM & Johnston JO (1992) Metabolism of 11-deoxycorticosterone by hamster adrenal mitochondria *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **42**:375-81
- Wong M Rice DA Parker KL Schimmer BP (1989) The roles of cAMP and cAMP-dependant protein kinase in the expression of cholesterol side-chain cleavage and steroid 11 β -hydroxylase genes in mouse adrenocortical tumor cells. *J. Biol. Chem.* **264**:12867-7
- Wood CR Boss MA Patel TP & Emtage JS (1984) The influence of messenger RNA secondary structure on expression of an immunoglobulin heavy chain in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **12**:3937-50
- Wynne KN Mercer J Stockigt JR & Funder JW (1980) 19-Nor analogs of adrenal steroids: mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activity. *Endocrinology* **107**:1278-80
- Yamamoto KR Alberts BM Benzinger R Lawhorne L & Treiber G (1970) Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* **40**:734-44
- Yanagibashi K Haviu M Shively JE Shen WH & Hall P (1986) The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and *glomerulosa*) possess one enzyme for 11 β -, 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J. Biol. Chem.* **261**:3556-62

-
- Yanisch-Perron C Vieira J & Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-19
- Young AK & Walker BL (1978) The circadian cycles of plasma corticosterone and adrenal cholesteryl esters in normal and EFA-deficient female rat. *Lipids*. **13**:181-6
- Zuber MX Mason JI Simpson ER Waterman MR (1988) Simultaneous transfection of COS-1 cells with mitochondrial and microsomal steroid hydroxylases: incorporation of a steroidogenic pathway into nonsteroidogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**:699-703
- Zuber MX Simpson ER Hall PF & Waterman MR (1985) Effects of adrenocorticotropin on 17 α -hydroxylase activity and cytochrome P-450(17 α) synthesis in bovine adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* **260**:1842-8
- Zuber MX Simpson ER & Waterman MR (1986) Expression of bovine 17 α -hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science* **234**:1258-61

APPENDICES

LeHoux JG Mason IJ Bernard H Ducharme L Lehoux J Véronneau S & Lefebvre A (1994) On the presence of two cytochrome P450 aldosterone synthase mRNAs in hamster adrenal. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **49**:131-7

LeHoux JG Bernard H Ducharme L Lefebvre A Shapcott D Tremblay A & Véronneau S. Advances in Molecular and Cell Biology: Physiological Functions of Cytochrome P450 in Relation to Structure and Regulation. Chapter 6. The regulation of the formation of glucocorticoids and mineralocorticoids *in vivo*. Colin R. Jefcoate ed. Jai Press Inc (presse)

LeHoux JG Bernard H Ducharme L Lefebvre A Lehoux J & Véronneau S (1994) Two cytochrome P450 aldosterone synthase mRNAs are present in the hamster adrenal. *Biochem. Biophys. Molec. Biol.* Lisbon, PORTUGAL

Véronneau S Bernard H Cloutier M Courtemanche J Ducharme L Lefebvre A Mason IJ & LeHoux JG (1996) The hamster adrenal cytochrome P450c11 has equipotent 11 β -hydroxylase and 19-hydroxylase activities, but no aldosterone synthase activity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **57**:125-39

LeHoux JG Bernard H Ducharme L Véronneau S Mason IJ & Lefebvre A (1994) On the presence of two cytochrome P450 aldosterone synthase mRNAs in hamster adrenal. 11th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology "Recent Advances in Steroid Biochemistry and Molecular Biology", Seefeld, Tyrol, AUSTRIA May 30-June 2nd. Abstracts of lectures and posters p.79

LeHoux JG Véronneau S Bernard H Courtemanche J Ducharme L Lefebvre A & Mason IJ (1995) The hamster adrenal cytochrome P450c11 has equipotent 11 β -hydroxylase and 19-hydroxylase activities, but no aldosterone synthase activity. 12th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology "Recent Advances in Steroid Biochemistry and Molecular Biology", Berlin, GERMANY May 21st-May 24th. Abstracts of lectures and poster presentations.

Ald-HAMSTER	MALRAKADVWLARPWQCLPRTRALGTTAALAPNTLRPFPAIPQYSRRRWLKMLQILREEG	60
Ald-RAT	----VT-----H-----T---K--K-----K---I---Q-	60
Ald-SOURIS	----VT-----H-----T---K--Q-----K---I---Q-	60
Ald-HOMME	-----E-CV-A--L--Q-A---R--R--R-VL---M--HPG---RL--MW--Q-	60
c11-BOEUF	---W---RVRM-G--LS-HEA-L---RG-A--KAVL---M-RCPG-K-MR---WK-Q-	60
c11-PORC	--IW---EA--G--LA-N-A-T---R-V---KGVL-----FPGKK-MRV--LW--Q-	60
Ald-HAMSTER	QEGHLHEMHEAFRELGP IFRYSMGRTOVVSVMLEDAEKLHQVESMHPRRMHLEFPWVAHR	120
Ald-RAT	--N-----Q--Q-----H-A-GA-I-----IL-----	120
Ald-SOURIS	--N-----QV-----H-V-K--I-----L-----	120
Ald-HOMME	Y-H-----QT-Q-----NL-GPRM-C-----V--Q--D-L--C--I-----I-	120
c11-BOEUF	S-NM--D--QT-Q-----DV-GRHM-F-----V-R-Q-AD-H--Q--I---L-Y-	120
c11-PORC	F-NN-----QT-Q-----FDV-GRNM-L-----V-RCQK--GL--Q-DVPG--L-Y-	120
Ald-HAMSTER	EHRGLSRGVFLNNGPEWRFNRLRLNPHVLSPKAVQKQFVPMVDMVARDFLES LKKKVFQNA	180
Ald-RAT	-L--R-----A-----K--N-----N-----E-----A-----R---	180
Ald-SOURIS	-L--R-----L-----RN-----T-----E--L---	180
Ald-HOMME	Q--HKC-----D-----R-L---A---SQA-R--L---	180
c11-BOEUF	QA--HKC-----Q--LD-----D--LP-L--YT-L--G---SQT--AR-L---	180
c11-PORC	HL--HKC-----T--LD--Q--G--LQ-M---T-L-G---SQA-RAR-M---	180
Ald-HAMSTER	RGSLTMDVQQSLFNYSIEASNFVLFGERLGLLGHDLSPASLTFIHALHSVFKTTPQLMFL	240
Ald-RAT	-----T-----A-----N-G--K-----M--S--T--L---	240
Ald-SOURIS	-----T-----A-----M--S--S--L---	240
Ald-HOMME	-----L--P-I-H-T---LA-----V--SP-S--N-L---EVM--S-V---M	240
c11-BOEUF	-----L-IAP-V-R-T---TL--Y-----TQQPN-D--N---EAML-S-V---V	240
c11-PORC	-----L-IKP-I-R-T---L-----A-QPN-E--D---EVM--S-V---M	240
Ald-HAMSTER	PRSLTRWTSTRVWKEHFEAWDVISEYVNR CIRKVHQLRLGSPHTYSGIVAELMSQGALP	300
Ald-RAT	-----Q-----D-----A--W-----SQ-----A-IT---	300
Ald-SOURIS	-K-----D-----A--W-----SQ-----I---S---	300
Ald-HOMME	---S--I-PK-----C-FQ-GDN--Q-IY---AFNR-QH-T---LLKAE-S	300
c11-BOEUF	--R-S--M--NM-R-----Y-FQ-A--A-QRIY---A--H-WH-----LMRADMT	300
c11-PORC	---S-----GT-----C-FQ-A-KA-QRLY---T--H-WH---V---LTHANMT	300
Ald-HAMSTER	LDAIRANSIELTAGSVDTTTFPLVMALFELARNPDVQQAVRQESLAAEASVAANPQRAMS	360
Ald-RAT	---K--M-----AI---T-----L--T-----I---K---	360
Ald-SOURIS	---K--M-----AI---T-----K-L-----I---K---	360
Ald-HOMME	-E--K--M-----A--L-T-----IL-K---A--ISEH--K-TT	360
c11-BOEUF	--T-K--T-D-----A--L-T-----E-----V--RISE-----IT	360
c11-PORC	V--K--D-----AY--L-T-----E---L-----A-RISE---K-IT	360
Ald-HAMSTER	DLPLLRVLKETLRLYPVGGFLERILSSDLVLQNYHVPAGTLVLLYLYSMGRNPAVFRP	420
Ald-RAT	-----A-----N-----	420
Ald-SOURIS	-----A-----	420
Ald-HOMME	E-----A-----L--VV-----I---QVF--L--A-L---	420
c11-BOEUF	E-----A-----IT--EV-----I---KVL--L---A---	420
c11-PORC	E-----A-----I--D-CVT-----I---KVL--L---A---	420
Ald-HAMSTER	EHYLPQRWLERN□□□GSFQHLTFGFGVRQCLGKRLAQVEMLLLLHHV LKSFRVETQERED	477
Ald-RAT	-R-M-----K□□□R---A-----R--E-----M--T-Q---LRQ--	477
Ald-SOURIS	-R-M-----K□□□R---A-----R--E--M---I--T-Q---LRQ--	477
Ald-HOMME	-R-N-----DIRGSGRNLH-VP---M---R--EA-----R-L--LTQ--	480
c11-BOEUF	-S-H-----D-QGSGSR-P--A-----R-V-E-----N-L--L-Q--	480
c11-PORC	-R-H-----DNQSGSTR-P--A---M---R-----N-L--LVQ--	480
Ald-HAMSTER	VRMVYRFVLAPSSPLLTFRPVS	500
Ald-RAT	-Q-A-----M---V---I-	500
Ald-SOURIS	-Q-A-----M---E-V-----	500
Ald-HOMME	IK---S-I-R-GT-----AIN	503
c11-BOEUF	IK---I-M--TL--F--AIQ	503
c11-PORC	IK-I---IMT--TL-----AI-	503

Figure 42. Comparaison des séquences d'acides aminés déduites du P450aldo de hamster avec les séquences similaires d'espèces animales indiquées. Seuls les acides aminés différents du P450aldo de hamster sont indiqués. Ald, P450aldo; c11, P450c11

c11-HAMSTER	MALRAKADVWLARPWQCLPRTRALGTTAALAPNTLRPF EAIPOYSRRNWLKMLQILREEG	60
c11-RAT	----VT-----H-----KV--K--K-----K---I-----Q-	60
c11-SOURIS	----VTT-----H-----T--K--Q-----K---I-----Q-	60
c11-BOEUF	---W---R-RM-G--LS-HEA-L---RG-A--KAVL---M-RCPG-K-MR---WK-Q-	60
c11-PORC	--IW---EA---G--LA-N-A-T---R-V---KGVL-----FPGKK-MRV--LW--Q-	60
c11-HOMME	-----E-CM-V--LS-Q-AQ---R--RV-R-VL---M-RRPG---RL---W--Q-	60
c11-HAMSTER	QEGLHLEMHEAFRELGPIFRYSMGRTOVVYVMLPEVAEKVFQADSTQPSRTLLEPWVAHR	120
c11-RAT	--N-----Q--Q-----H-A-GA-I-S-----D---LH-VE-IL-H-MP-----	120
c11-SOURIS	--N-----QV-----H-V-K--I-F-T---DV--LY-VE--H-C-MP--S-IV--	120
c11-BOEUF	S-NM--D--QT-Q-----DV-GRHM-F-----DV-RLQ---HH-Q-MI---L-Y-	120
c11-PORC	F-NN-----QT-Q-----FDV-GRNM-L-----DV-RCQKVEGLH-Q-DVPG--L-Y-	120
c11-HOMME	Y-D---V-QT-Q-----DL-GAGM-C-----DV--LQ-V--LH-H-MS-----Y-	120
c11-HAMSTER	EHRGLSRGVFLNGPEWRFNRLRINPHMLSPKAVQKFPVPMVDMVARDFLEFLKKKVLANA	180
c11-RAT	-L---R-----AD-----QL--N-----I-S---F--V-----V-N---RM-E-V	180
c11-SOURIS	-L---G-----Y-D--QL--NV-----L--GI---VDN---M-ESV	180
c11-BOEUF	QA--HKC-----Q--LD--L--DV--LP-L--YT-L--G---SQT--AR--Q--	180
c11-PORC	HL--HKC-----T--LD--QL--GV--LQ-M---T-L--G---SQA-RAR-MQ--	180
c11-HOMME	Q---HKC-----L--EV--N---R-L---A---SQA-----Q--	180
c11-HAMSTER	HGSLSMNFYSSMFNYTIEASHFVLFGERLGLLGGDDLNSGSLKVFNALNSIMKTTPLMLL	240
c11-RAT	---M-I-IQ-N---M-----IS-----T-H--KPE-VT-TH--H-MF-S-T---F-	240
c11-SOURIS	---F--D-Q--V-----I-R---SPD---LHT-H-MF--T--LY-	240
c11-BOEUF	R---TLDIAP-V-R-----TL--Y-----TQQP-PD--N-IH--EAML-S-V---FV	240
c11-PORC	R---TLDIKP-I-R-----NL-----AHQP-PE--D-IH--EVMF-S-V---FM	240
c11-HOMME	R---TLDVQP-I-H-----NLA-----V-HSPS-A--N-LH--EVMF-S-V---FM	240
c11-HAMSTER	PSGLTRWISTRVWKENFDSWDFVSEYVTKNVKNVYQEVQSGGP#QSWSVISQLVAEGALT	300
c11-RAT	-KS---T-----H-----II-----CI---R-LAE-RQ#-----EM--QST-S	300
c11-SOURIS	-RS---T-----LE---I-----CI---R-LAE-R-#-----TAE---RT-S	300
c11-BOEUF	--RR-S--M--NM-R-H-EA--YIFQ-ANRAIQRI---LAL-H-WHYSGIVAE-LMRADM-	300
c11-PORC	--RS-S--T--GT--H-EA--CIFQ-ANKAIQRL---LTL-H-WHYSG-VAE-LTHANM-	300
c11-HOMME	--RS-S--T-PK---H-EA--CIFQ-GDNCIQKI---LAFSR-Q-YT-IVAE-LLNAE-S	300
c11-HAMSTER	MDAILANSLELTAGSVDTTSPVPLVMTLFEIARNPDVQAVRQESLAAEASVAANPQRAMS	359
c11-RAT	----H--M--I-----AIS-----L-----IV---K---	359
c11-SOURIS	----Q--M--I---T---F-----L-----I---K---	359
c11-BOEUF	L-T-K--TID-----AF--L-----E-----V---RISE---IT	360
c11-PORC	V--K---ID-----AY--L-----E---L-----A-RISE---K-IT	360
c11-HOMME	P--K---M-----VF--L-----N---L-----A--ISEH--K-TT	360
c11-HAMSTER	DLPLLRAVLKETLRLYPVAVFLERILSSDLVLQNYHVPAGTILHMSLYSMGRNPAVFRP	419
c11-RAT	-----A-----GS-V--VH-----FVIIY-----	419
c11-SOURIS	-----A-----GT-----V-NVN-----	419
c11-BOEUF	E-----A-----GIT--EV-----I---LVKVL--L-----A--	420
c11-PORC	E-----A-----GI--D-CVT-----I---LVKVL--L-----A--	420
c11-HOMME	E-----A-----GL---VA-----I---LVRVF--L-----L---	420
c11-HAMSTER	EHYLPQRWLERNOOOGSFQHLTFGFGVRQCLGKRLAQVEMLLLLHHVLSFRVETQERED	476
c11-RAT	-R-M-----K□□□R---A-----R--E-----M--T-Q---LRQ--	476
c11-SOURIS	-R-M-----K□□□R--K--A-----R--EA--M-----H---K--	476
c11-BOEUF	-S-H-----D-QSGSR-P--A-----R-V-E-----N-L---L-Q--	480
c11-PORC	-R-H-----DNQSGTR-P--A---M---R-----N-L---LVQ--	480
c11-HOMME	-R-N-----DIRGSRN-Y-VP---M---R--EA-----HLQ---LTQ--	480
c11-HAMSTER	VRMVYRFVLAPSSPLLTFRPVS	499
c11-RAT	MQ--F--L-M-----F-----	499
c11-SOURIS	---A-----M-----N	499
c11-BOEUF	IK-----I-M--TL--F---AIQ	503
c11-PORC	IK-I---IMT--TL-----AI-	503
c11-HOMME	IK---S-I-R--MC-----AIN	503

Figure 43. Comparaison des séquences déduites d'acides aminés du P450c11 de hamster avec les séquences similaires d'espèces animales indiquées. Seuls les acides aminés différents du P450c11 de hamster sont indiqués. c11, P450c11

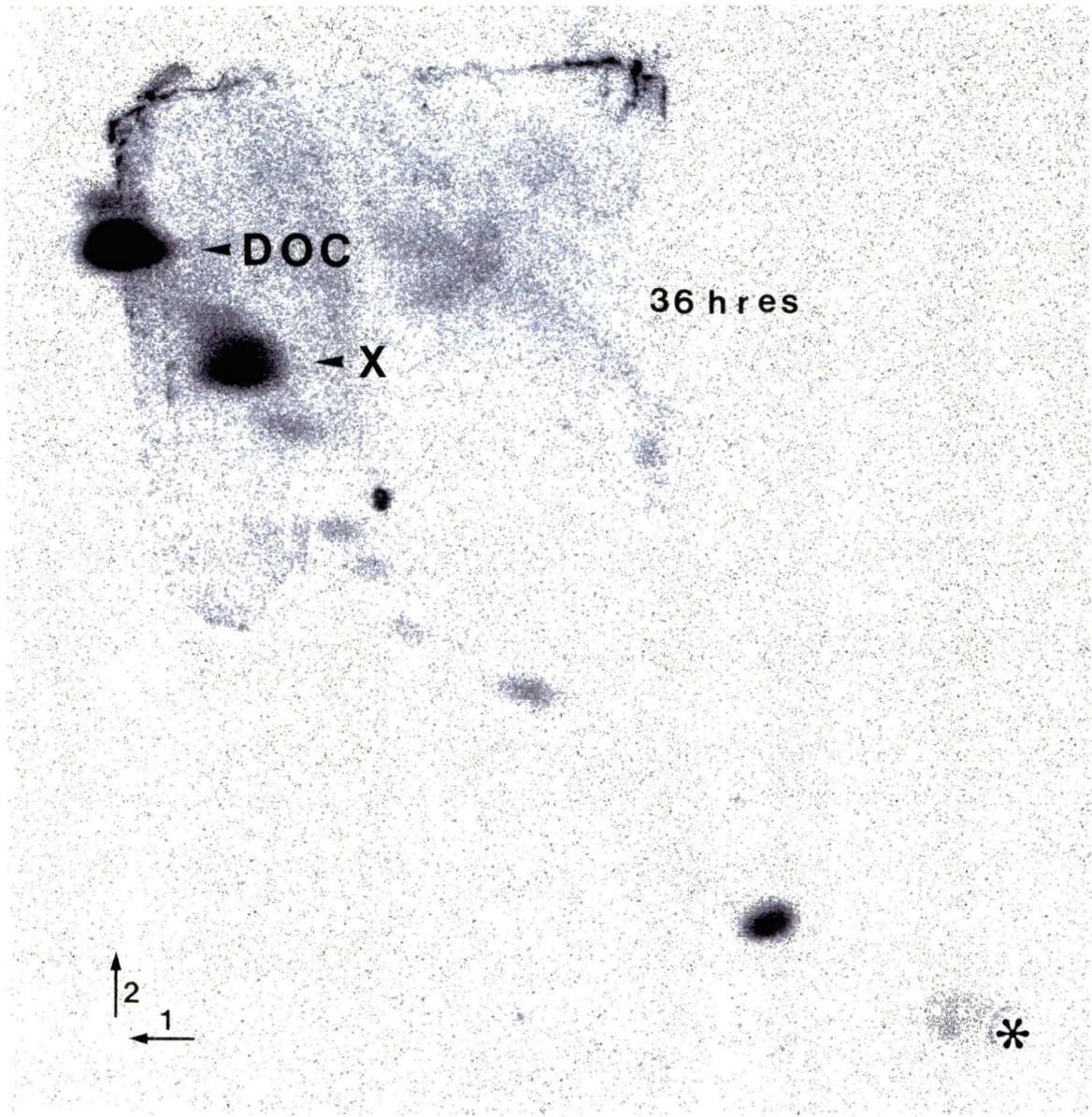


Figure 44. Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5 en présence du composé [^{14}C]DOC pendant une période de 36 h. La migration des produits de synthèse a été réalisée sur plaque de TLC dans un système à deux dimensions selon les conditions décrites précédemment. Le sens de la première et la seconde migration est indiqué au coin inférieur gauche. L'astérisque représente le point d'application des composés

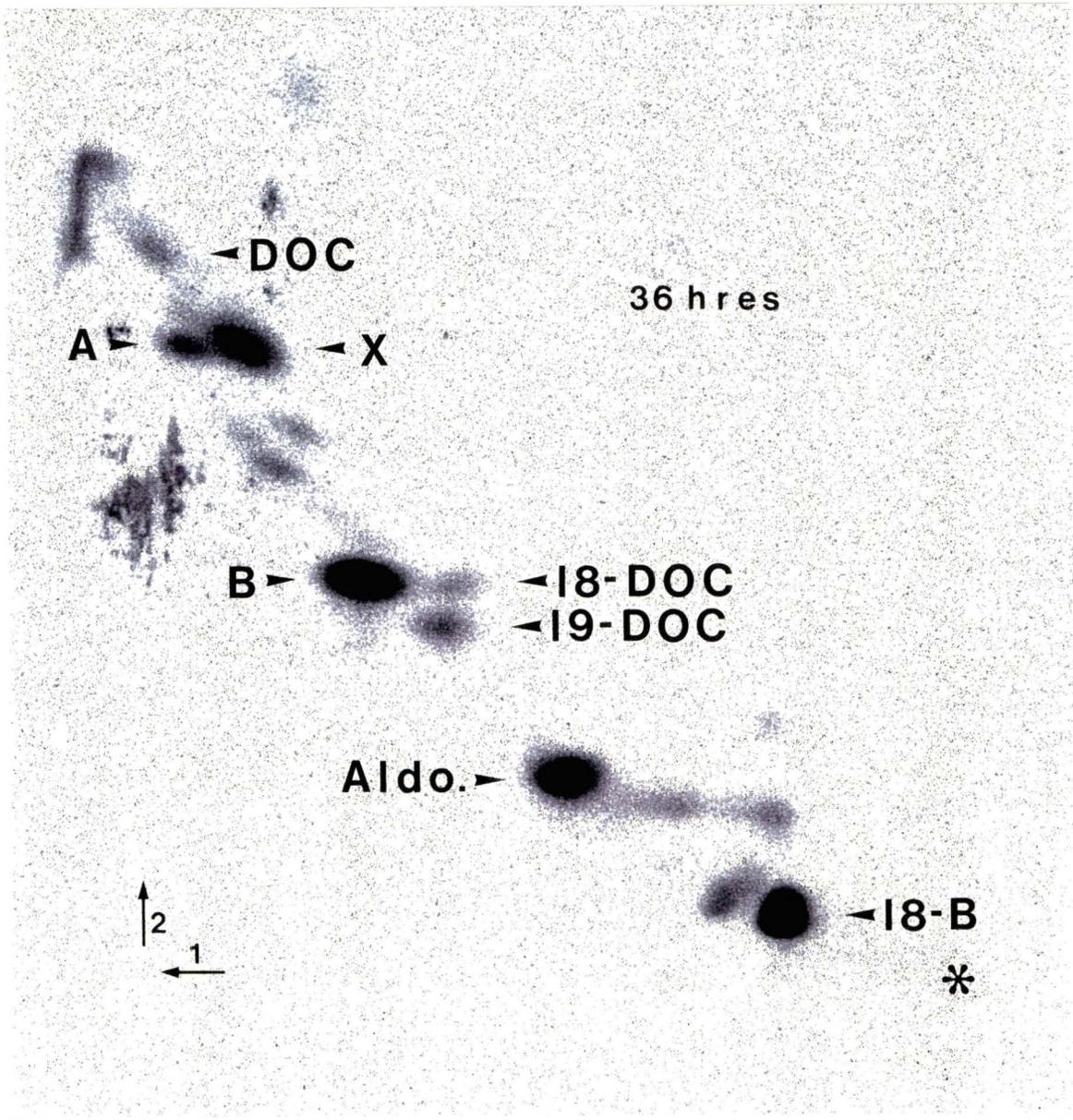


Figure 45. Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5_{aldo} en présence du composé [¹⁴C]DOC pendant une période de 36 h. La migration des produits de synthèse a été réalisée sur plaque de TLC dans un système à deux dimensions selon les conditions décrites précédemment. Le sens de la première et la seconde migration est indiqué au coin inférieur gauche. L'astérisque représente le point d'application des composés

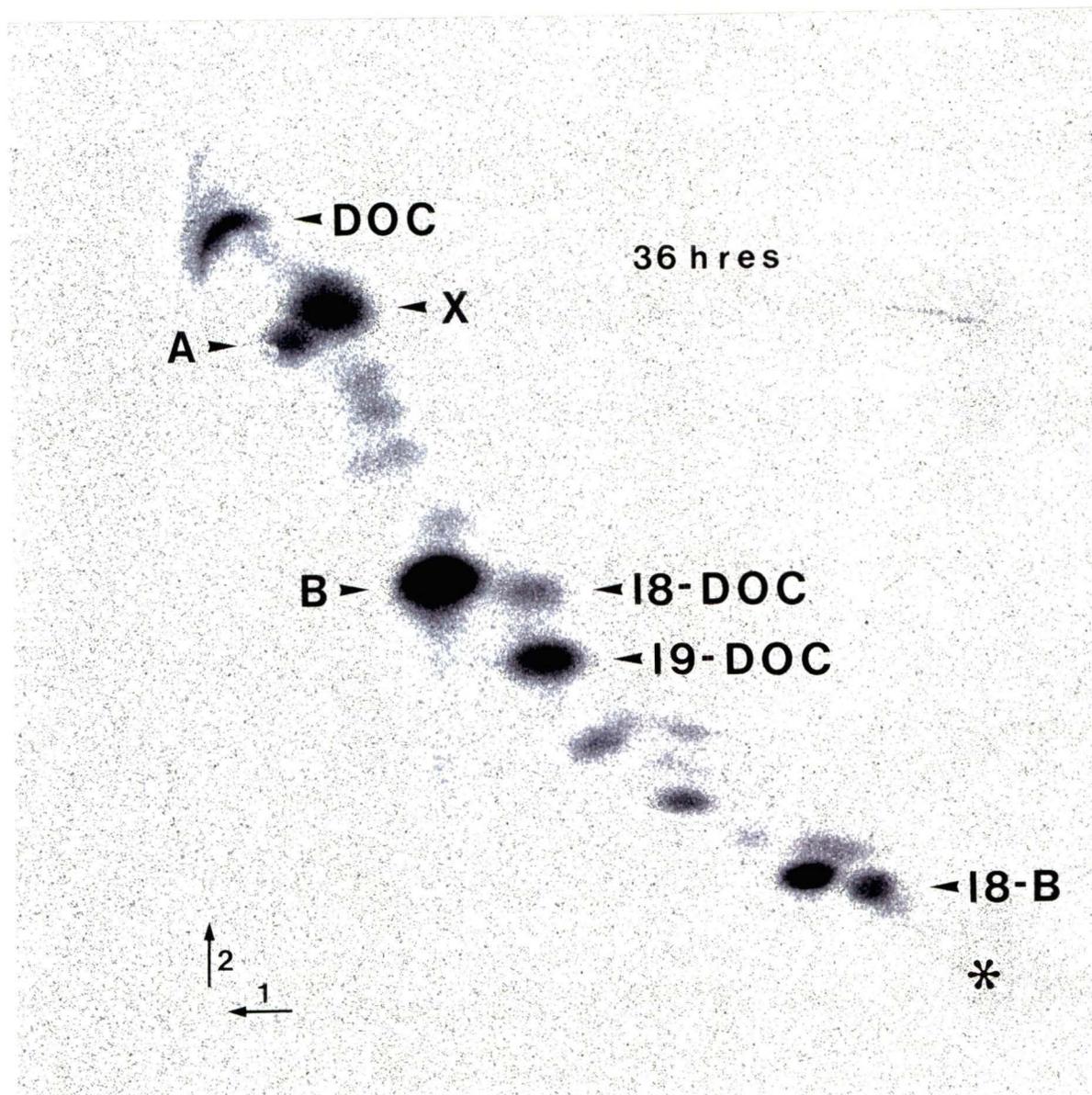


Figure 46. Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5_{c11} en présence du composé [¹⁴C]DOC pour une période de 36 h. La migration des produits de synthèse a été réalisée sur plaque de TLC dans un système à deux dimensions selon les conditions décrites précédemment. Le sens de la première et la seconde migration est indiqué au coin inférieur gauche. L'astérisque représente le point d'application des composés

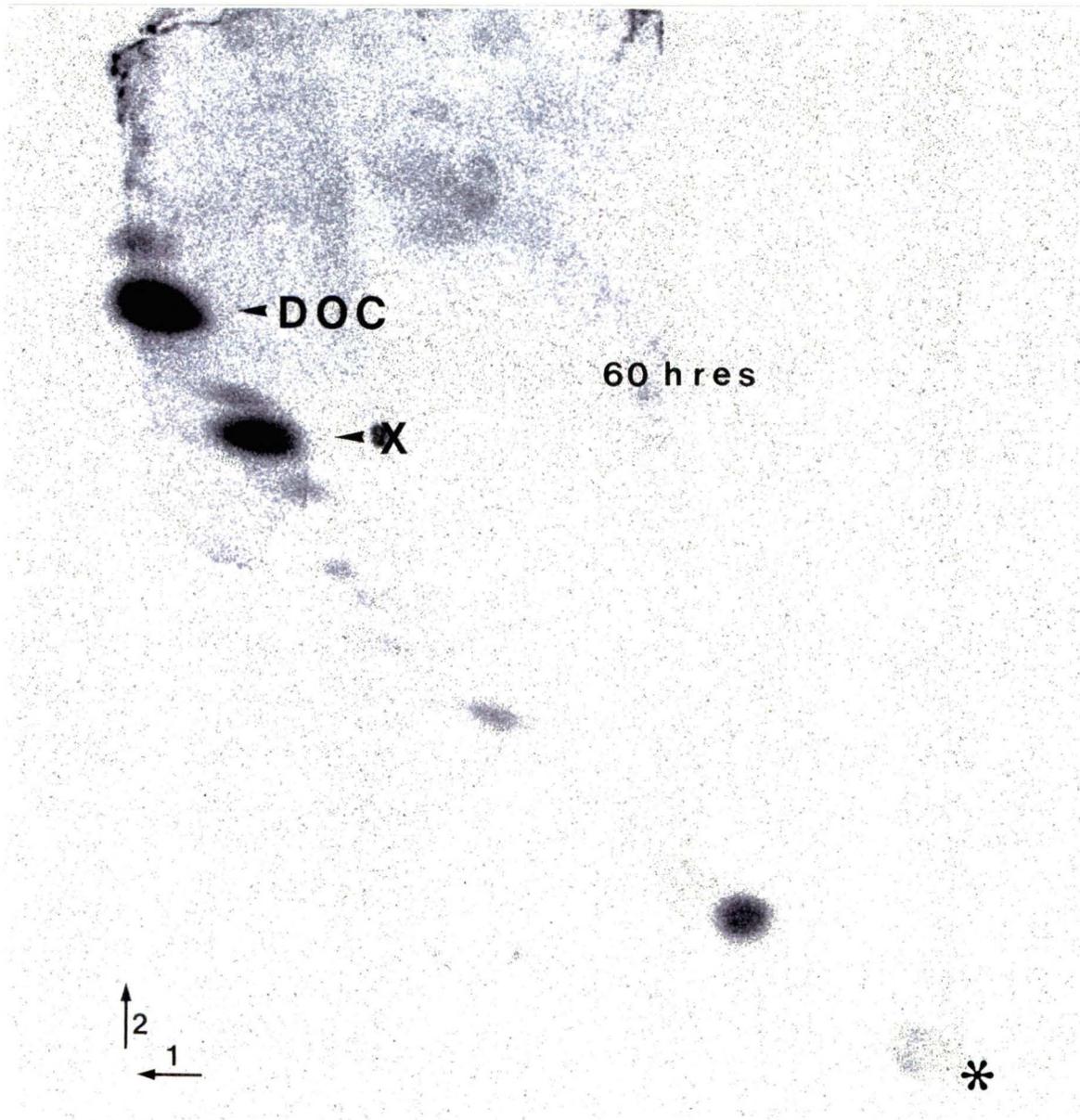


Figure 47. Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5 en présence du composé [^{14}C]DOC pendant une période de 60 h. La migration des produits de synthèse a été réalisée sur plaque de TLC dans un système à deux dimensions selon les conditions décrites précédemment. Le sens de la première et la seconde migration est indiqué au coin inférieur gauche. L'astérisque représente le point d'application des composés

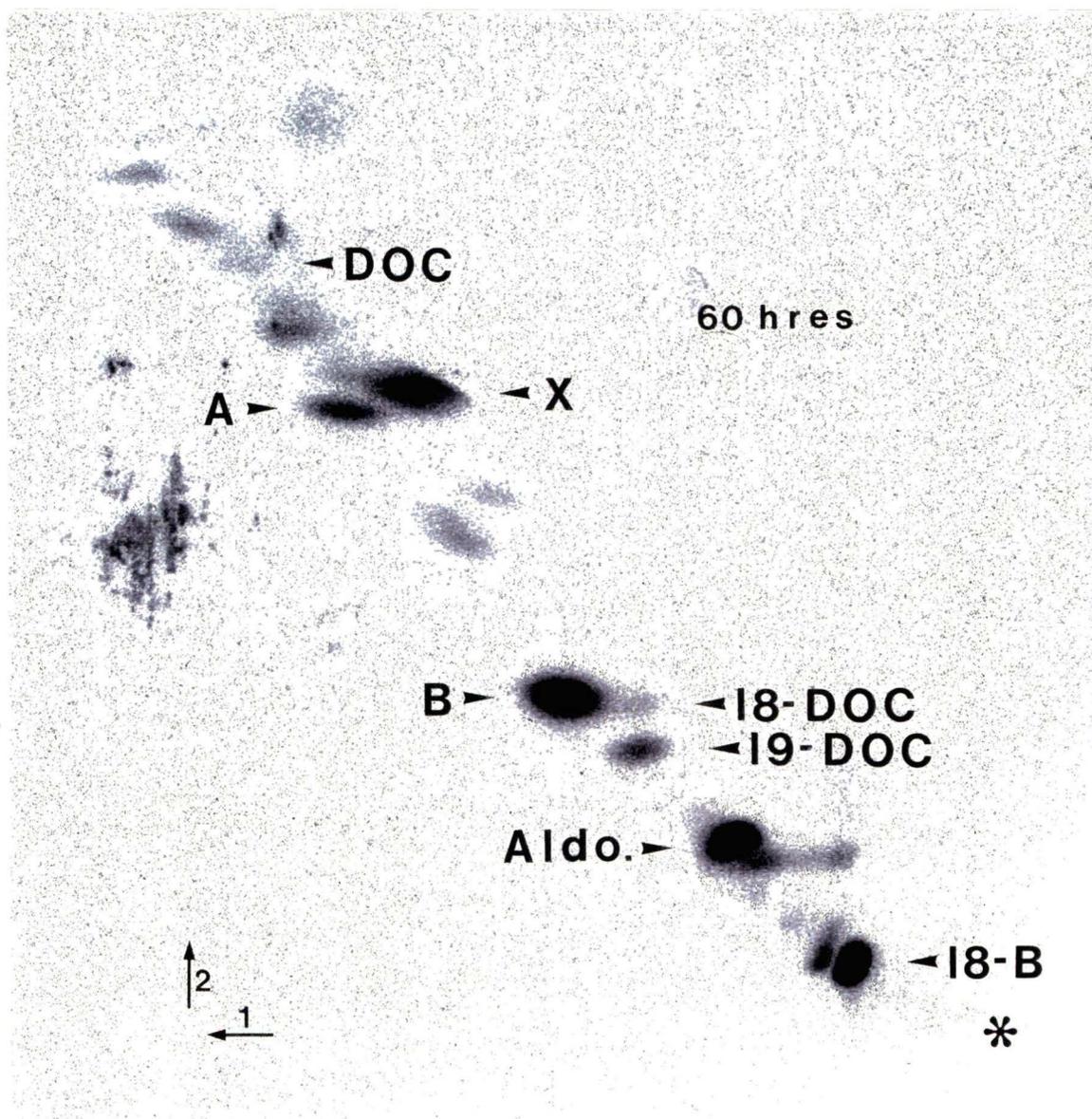


Figure 48. Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5_{aldo} en présence du composé [¹⁴C]DOC pendant une période de 60 h. La migration des produits de synthèse a été réalisée sur plaque de TLC dans un système à deux dimensions selon les conditions décrites précédemment. Le sens de la première et la seconde migration est indiqué au coin inférieur gauche. L'astérisque représente le point d'application des composés

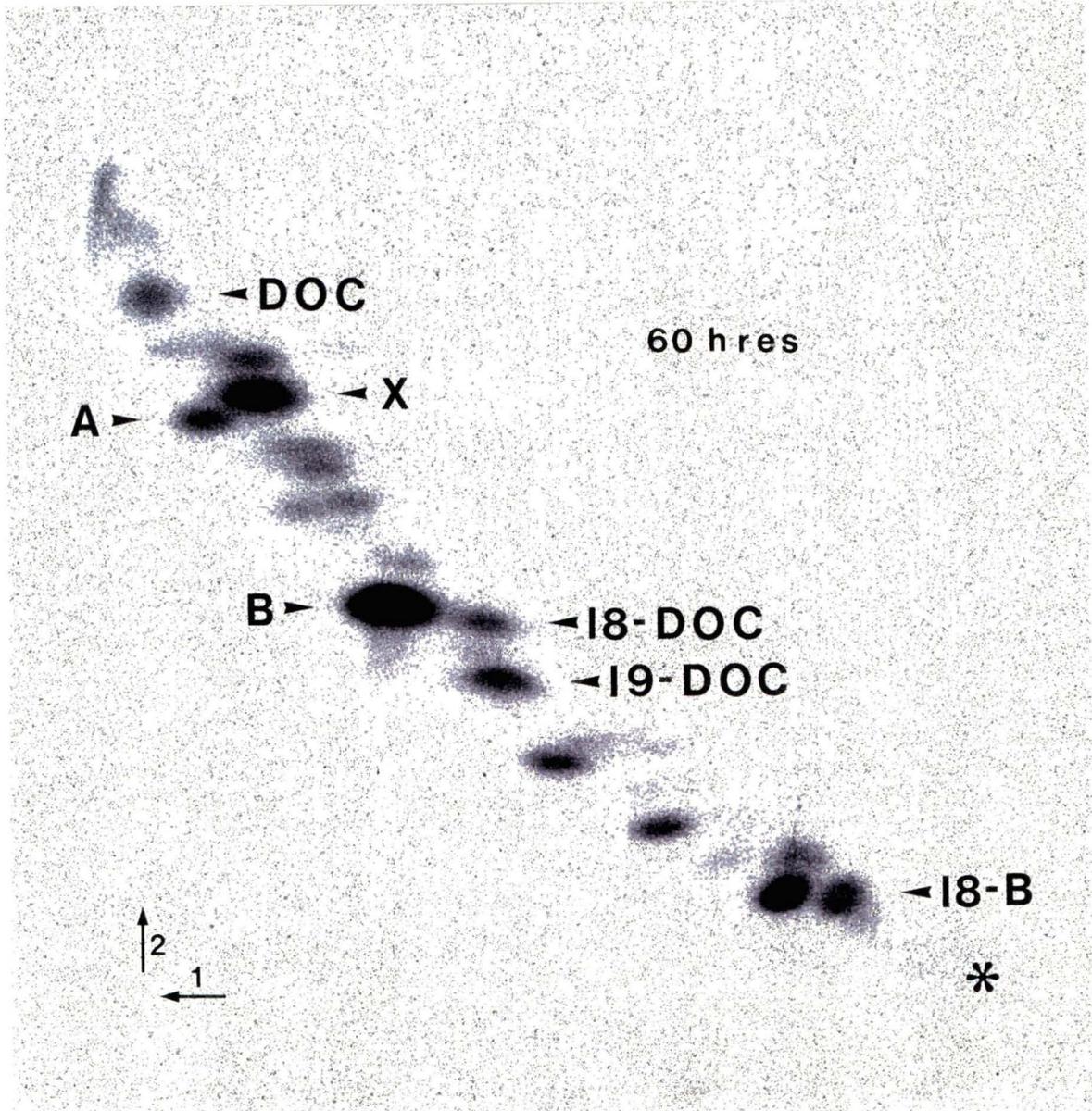


Figure 49. Détermination de l'activité enzymatique des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCMV5_{c11} en présence du composé [¹⁴C]DOC pendant une période de 60 h. La migration des produits de synthèse a été réalisée sur plaque de TLC dans un système à deux dimensions selon les conditions décrites précédemment. Le sens de la première et la seconde migration est indiqué au coin inférieur gauche. L'astérisque représente le point d'application des composés