

C.H.U.S. 037
Université de Sherbrooke

**Le clonage et l'expression du cytochrome P450c17 humain dans le but
d'étudier le rôle de la phosphorylation dans son activation**

Par

Mireille Picard

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

Juin 2003

© Mireille Picard, 2003

**À mes parents
et à mon frère
qui m'ont
encouragée et
soutenue tout
au long de mes
études.**

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	i
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ.....	xii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. La glande surrénale.....	1
1.1.1. Historique.....	1
1.1.2. Histologie.....	1
1.2. Le précurseur.....	5
1.2.1. Le cholestérol.....	5
1.2.2. Le transport du cholestérol.....	7
1.3. La stéroïdogénèse de la glande surrénale.....	9
1.3.1. Le cytochrome P450 _{scc}	11
1.3.2. Le P450 _{c17} : une enzyme, deux activités.....	12
1.3.3. Le 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase / Δ^5 - Δ^4 - isomérase.....	17
1.3.4. Le cytochrome P450 _{c21}	18
1.3.5. Les cytochromes P450 _{c11} et P450 _{aldo}	18
1.3.6. Le cytochrome P450 _{aldo}	19
1.4. Autre enzyme.....	19
1.4.1. Le cytochrome P450 _{arom}	20

1.5. Les systèmes de transfert d'électrons.....	21
1.5.1. Le système de transfert d'électrons des enzymes P450 mitochondriales.....	21
1.5.2. Le système de transfert d'électrons des enzymes P450 microsomiques.....	22
1.6. Le rôle des stéroïdes dans le métabolisme chez l'humain.....	23
1.6.1. L'aldostérone.....	23
1.6.2. Le cortisol.....	25
1.6.3. Les androgènes.....	25
1.7. La régulation de la sécrétion des stéroïdes surrénaliens.....	27
1.7.1. Contrôle de la sécrétion des glucocorticoïdes et des androgènes.....	27
1.7.2. Rôle du système rénine-angiotensine (SRA).....	27
1.8. Conclusion de l'introduction.....	28
1.9. Objectifs des travaux de recherches.....	31
2. MATERIEL ET METHODES.....	32
2.1. Préparation du clone P450c17.....	32
2.1.1. Extraction d'ARN.....	32
2.1.2. Dosage de l'ADN et l'ARN.....	33
2.1.3. Préparation de gel d'agarose.....	33
2.1.4. Réaction de transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).....	34
2.1.5. Modification aux extrémités de l'insert.....	35
2.1.6. Insertion de l'insert P450c17 dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His [®] TOPO [®]	36
2.1.7 Préparation de l'ADN.....	36

2.1.8. Contrôle de la positivité des clones P450c17.....	37
2.1.9. Séquençage du clone P450c17 à double brin.....	37
2.2. Correction de mutations du clone P450c17.....	45
2.2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	45
2.2.2. Élu­tion d’une bande d’ADN d’un gel d’agarose.....	47
2.2.3. Purification de produits de PCR.....	47
2.2.4. Digestion d’ADN.....	47
2.2.5. Ligation de l’insert dans le vecteur.....	48
2.2.6. Préparation des cellules compétentes <i>E. coli</i> XL-1.....	48
2.2.7. Transformation dans les cellules compétentes <i>E. coli</i> XL-1.....	48
2.2.8. Correction de la quatrième mutation par clonage de digestion.....	49
2.2.9. Traitement du vecteur à la phosphatase alcaline.....	50
2.2.10. PCR sur colonies.....	50
2.3. Expression <i>in vivo</i> dans les cellules eucaryotes COS-1.....	51
2.3.1. Mise en culture des cellules eucaryotes en culture.....	51
2.3.2. Préparation des milieux.....	52
2.3.3. Passage des cellules.....	53
2.3.4. Transfections transitoires des cellules par lipofectAMINE ou fuGENE 6.....	53
2.3.5. Cellules traitées au 8-Bromo.....	54
2.3.6. Cellules incubées avec différents stéroïdes.....	54
2.4. Test d’optimisation du taux de transfection.....	55

2.4.1. Transfection à diverses conditions.....	55
2.4.2. Essais à la luciférase.....	55
2.5. Purification de la protéine P450c17.....	56
2.5.1. Résine de <i>Sepharose</i>	56
2.5.2. Colonne Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid).....	56
2.5.3. Colonne <i>Pro-Bond</i>	57
2.5.4. Colonne de <i>Sephacryl</i>	57
2.5.5. Immunoprécipitation.....	58
2.6. Dosage.....	59
2.6.1. Méthode <i>Bio-Rad Protein Assay</i>	59
2.6.2. Méthode par <i>microassay</i>	59
2.6.3. Méthode <i>Bio-Rad DC Protein Assay</i>	60
2.6.4. Dosage par RIA des stéroïdes.....	60
2.7. Buvardage de type Western.....	60
2.7.1. Préparation des échantillons.....	60
2.7.2. Électrophorèse.....	61
2.7.3. Coloration au bleu de Comassie.....	61
2.7.4. Transfert sur membrane.....	61
2.7.5. Hybridation des membranes.....	62
2.7.6. Révélation.....	63
2.7.7. Désybridation des membranes.....	64

2.7.8. Évaluation des résultats (M± SEM).....	64
2. RÉSULTATS.....	65
3.1. RT-PCR.....	65
3.1.1. RT-PCR sur l'ARN des cellules H295R	65
3.2. Correction de mutations du clone P450c17.....	65
3.2.1. Séquençages partiels des trois mutations.....	65
3.2.2. Séquençage du clone <i>Mut3-4</i>	68
3.2.3. Correction de la quatrième mutation.....	68
3.3. Test d'optimisation du taux de transfection dans les cellules COS-1..	70
3.3.1. Transfection des cellules COS-1 sous diverses conditions.....	70
3.4. Traitements des cellules COS-1 transfectées avec le P450c17.....	71
3.4.1. Analyse des deux activités du P450c17.....	71
3.4.2. Analyse par <i>western-blot</i> du P450c17 suite aux traitements.....	73
3.5. Techniques d'isolation et de purification du P450c17.....	75
3.5.1. Purification par colonne de résine sépharose + NiSO ₄ , avec différentes concentrations d'imidazole.....	75
3.5.2. Purification avec la colonne Ni-NTA du P450c17 avec des solutions à différents pH.....	76
3.5.3. Purification du P450c17 avec la résine <i>Pro-Bond</i> (Invitrogen).....	77
3.5.4. Technique d'immunoprécipitation employée pour l'isolement de la P450c17 humain.....	79
4. DISCUSSION.....	82
4.1. Construction d'un clone contenant la séquence P450c17 humaine.....	83
4.2. Test d'optimisation du taux de transfusions dans les cellules COS-1.....	85

4.3. Traitements des cellules COS-1 transfectées avec le P450c17.....	86
4.3.1. Dosage des stéroïdes réalisé par RIA.....	86
4.3.2. <i>Western-blot</i> sur les cellules COS-1 traitées.....	89
4.4. Isolation et purification du P450c17.....	90
4.4.1. Purification avec la résine de sépharose + NiSO ₄ avec différentes concentrations d'imidazole.....	90
4.4.2. Purification du P450c17 avec la colonne Ni-NTA avec des solutions à différents pH.....	91
4.4.3. Immunoprécipitation réalisée sur le P450c17 afin de l'isoler.....	92
4.4.4. Purification du P450c17 avec la résine <i>Pro-Bond</i> avec des solutions à différents pH.....	94
5. CONCLUSION.....	97
6. REMERCIEMENTS.....	99
7. RÉFÉRENCES.....	101

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Table 1	Liste de tous les oligonucléotides employés pour la construction du clone P450c17.....	40
Table 2	Représentation d'une partie de la séquence du clone P450c17 et du vecteur.....	42
Figure 1	Anatomie de la glande surrénale.....	2
Figure 2	Structure histologique de la glande surrénale.....	4
Figure 3	Les zones de la glande surrénale.....	4
Figure 4	Le cyclopentanoperhydrophénanthrène.....	5
Figure 5	La structure du cholestérol.....	5
Figure 6	Schéma global de toutes les sources de cholestérol utilisables lors de la stéroïdogénèse.....	6
Figure 7	Transport du cholestérol.....	8
Figure 8	Structure de l'hème des cytochromes P450.....	9
Figure 9	Mécanisme de transport des électrons vers les P450 des mitochondries et ceux du réticulum endoplasmique.....	10
Figure 10	La stéroïdogénèse.....	14
Figure 11	Système de transport des électrons dans les mitochondries.....	22
Figure 12	Système de transport des électrons dans le réticulum endoplasmique.....	23
Figure 13	Variations de la concentration du DHEAS dans le plasma humain.....	26
Figure 14	Le système rénine-angiotensine.....	28
Figure 15	Plasmide pCDNA3.1/V5-His-TOPO.....	41
Figure 16	Stratégie de clonage élaborée afin de réaliser les trois corrections de mutation.....	46
Figure 17	Séquençage manuel à double brin avec un seul nucléotide soit le T.....	67
Figure 18	Séquençage manuel à double brin avec les 4 nucléotides.....	68
Figure 19	Séquençage manuel à double brin du clone #10.....	69
Figure 20	Test d'optimisation du taux de transfection chez les cellules COS-1 au moyen du vecteur de la luciférase.....	71

Figure 21	Dosage des stéroïdes produits par le cytochrome P450c17 d'humain et d'hamster.....	73
Figure 22	Différents traitements appliqués sur des cellules exprimant ou non le P450c17 d'humain ou d'hamster.....	74
Figure 23	Isolement du P450c17 d'hamster avec la résine sépharose + NiSO ₄ à différentes concentrations d'imadazole.....	76
Figure 24	Applications des colonnes Ni-NTA pour la purification du P450c17 avec des solutions de différents pH.....	77
Figure 25	Purification du P450c17 humain avec les colonnes de nickel <i>Pro-Bond</i>	78
Figure 26	Essais avec divers tampons afin de solubiliser le P450c17 humain.....	79
Figure 27	Immunoprécipitation du P450c17 humain avec l'anticorps anti-V5 et l'anti-souris IGg.....	81

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

3 β -HSD	3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase / Δ^5 - Δ^4 isomérase
8-Bromo-cAMP	<i>8-bromoadenosine 3' :5'-cyclic monophosphate</i>
ACTH	adrénocorticotropine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADX	adrénodoxine
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANCP	<i>adénine nucléotide carrier protein</i>
AR	adrénotoxine réductase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
β -ME	β -mercaptoéthanol
BSA	albumine bovine sérique
CAH	hyperplasie congénitale de la surrénale
CBG	<i>corticosteroid binding globulin</i>
COS-1	lignée cellulaire de rein de singe vert de l'Afrique
CRH	hormone corticotropine
dATP	2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
DBI	<i>diazepan binding inhibitor</i>
ddATP	2',3'-didéoxysadénosine 5'-triphosphate
ddCTP	2',3'-didésoxycytidine 5'-triphosphate
ddGTP	2',3'-didésoxyguanosine 5'-triphosphate
ddTTP	2',3'-didésoxythymidine 5'-triphosphate
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DHEA	déhydroépiandrostérone (androst-5-ène-3 β -ol-17-one)
DHEAS	DHEA sulfate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNAase	désoxyribonucléase
dNTPs	désoxyribonucléoside triphosphates
DOC	désoxycorticostérone (21-hydroxy- Δ^4 -prégène-3,20-dione)
DTT	dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	éthylènediamine tétraacétate de sodium
FBS	sérum foetal de veau
FSH	hormone folliculo-stimulante
H295R	lignée cellulaire de glande surrénale humaine
HPA	<i>hypothalamus-pituitary-adrenal axis</i>
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
LB	milieu de Luria-Bertani
LDL	lipoprotéines de basse densité
MEOH	méthanol
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotique
NADH	forme réduite du NAD ⁺
Na Doc	désoxycholate de sodium
NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH	forme réduite de NADP ⁺
NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
P450arom	Cytochrome P450 aromatasase
P450c21	cytochrome P450 21-hydroxylase
P450c11	cytochrome P450 11 β -hydroxylase
P450c17	cytochrome P450 17 α -hydroxylase / 17,20 lyase
P450c11	Cytochrome P450 11 β -hydroxylase
P450OR	cytochrome P450 oxydo-réductase
P450scc	cytochrome P450 de clivage de la chaîne latérale du cholestérol
PBS	phosphate buffer saline
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
POMC	pro-opiomélanocortine
PTBR	<i>peripherial type benzodiazepine receptor</i>
RE	réticulum endoplasmique
RIA	radio-immuno essai
RNAse	ribonucléase
RT	transcription inverse
RT-PCR	transcription inverse suivie d'une PCR
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SRA	système rénine-angiotensine
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
TLC	chromatographie sur couche mince
TeBg	<i>testosterone Binding Globulin</i>
Tris	tris hydroxyméthyl aminométhane
VDAC	<i>voltage dependant anion carrier</i>
VLDL	lipoprotéines de très basse densité

Divers

A	adénosine
°C	degré Celcius
a.a.	acide aminé
C	cytidine
Da	dalton
DO	densité optique
g	gramme
g	symbole de l'accélération de la pesanteur
G	guanosine
h	heure
kb	kilobase
kDa	kilodalton
L	litre
M	molaire
mA	milliampère
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre

mM	millimolaire
N	normal
ng	nanogramme
nm	nanomètre
pmol	picomole
pb	paire de bases
RLU	<i>Relative Light Units</i>
rpm	Le nombre de révolution par minute
sec	seconde
T	thymidine
U	unité
μ Ci	microcurie
μ g	microgramme
μ l	microlitre
μ m	micromètre
V	volts

Résumé:

Université de Sherbrooke

Le clonage et l'expression du cytochrome P450c17 humain dans le but d'étudier le rôle de la phosphorylation dans son activation

Par

Mireille Picard

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue du grade de maître ès sciences (M.Sc) en biochimie

Le 23 décembre 2002

La stéroïdogénèse est un élément très complexe et essentiel à la vie chez les mammifères tels que l'humain, l'hamster, le boeuf... La glande surrénale est le site de la stéroïdogénèse principalement des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. Plusieurs enzymes dont des cytochromes sont requis pour synthétiser les corticostéroïdes. Le cytochrome P450c17 (P450c17) un produit du gène *CYP17* situé sur le chromosome 10q24-q25 est essentiel à la synthèse des glucocorticoïdes et des androgènes. L'enzyme P450c17 possède deux activités soit la 17 α -hydroxylase et la 17, 20-lyase. On retrouve ces deux activités dans deux des trois zones composant le cortex surrénalien. Soit les zones fasciculée et réticulée qui sécrètent les hormones glucocorticoïdes (cortisol, corticostérone...). Par contre, les hormones androgènes (DHEA ou sa forme sulfatée DHEAS) sont élaborées préférentiellement par la zone réticulée et en moindre quantité par la zone fasciculée. On retrouve une présence de l'activité du P450c17 dans la voie Δ^4 qui est celle produisant l'androstènedione et dans la voie Δ^5 conduisant à la synthèse de la déhydroépiandrostérone (DHEA).

Le P450c17 possède un seul site de liaison aux substrats et un seul site de liaison au cytochrome oxydo-réductase qui permet le transfert des électrons. Les deux activités du P450c17, soit la 17 α -hydroxylase et la 17, 20-lyase, sont régulées différemment selon

le tissu (la glande surrénale ou les testicules) et aussi selon l'âge de l'individu. Contrairement à la 17α -hydroxylase, la 17,20-lyase est dépendante d'une phosphorylation et possède une relation importante avec le donneur d'électrons. Il a été établi qu'il y a phosphorylation sur des sérines et des thréonines du P450c17 et que cette réaction est dépendante de protéines kinases. Par ailleurs, la recherche de ce qui produit et stimule la phosphorylation sur le P450c17, aidera à comprendre l'adrénarchie, une période de la vie humaine où l'activité 17, 20-lyase est fortement stimulée. On sait que le P450c17 est activé par l'ACTH qui déclenche la production de l'AMPC et de là, une phosphorylation sur le P450c17. Mais dans le cas de l'adrénarchie, aucune augmentation d'ACTH n'est remarquée. Pourtant une augmentation de la phosphorylation est présente car l'activité de la 17, 20-lyase est de surcroît très élevée.

Ainsi, le but de ce projet est d'étudier la phosphorylation sur le P450c17 humain. Un clone a donc été construit à partir de l'ARN extrait de glandes surrénales fœtales et de cellules H295R. Une RT-PCR a été réalisée afin d'amplifier la séquence codante du P450c17, soit 1725 pb. Une fois l'ADNc humain cloné, séquencé et corrigé, son expression a été étudiée dans les cellules COS-1 (ces cellules ont été choisies car elles n'expriment pas le P450c17) à l'aide du vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®]. Des tests d'optimisation de la transfection ont montré qu'une incubation de 24 heures avec comme réactif le fuGENE 6 (6 μ l) et 2 μ g d'ADN, était la meilleure condition pour obtenir le taux le plus élevé de transfection. Afin de savoir si le clone possédait l'activité 17α -hydroxylase et l'activité 17,20-lyase, des incubations avec divers substrats stéroïdiens et avec ou sans stimulation au *8-bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate* furent réalisés. Une stimulation au 8-bromo permet d'apporter une phosphorylation de certains

acides aminés qui sont nécessaires pour déclencher l'activité 17,20-lyase. Nous avons trouvé que le clone obtenu à partir de l'ARN des cellules H295R possède les deux activités. Par la suite, la mise au point de diverses techniques d'isolation et de purification a été faite. L'emploi des colonnes de nickel *Pro-bond* (Invitrogen) suivi par l'application des fractions concentrées sur une résine de *Sephacryl S-100 HR* (Amersham Pharmacia Biotech) est celle qui démontre la meilleure purification. Par la suite, les fractions sont de nouveau concentrées. Si toutes les étapes subséquentes auraient fonctionnées, une digestion à la trypsine et une identification des sites de phosphorylation afin de déterminer quels acides aminés influencent l'activité 17,20-lyase par la spectroscopie de masse, auraient été réalisées.

INTRODUCTION:

1.1. La glande surrénale:

1.1.1 Historique:

Les glandes surrénales ont été découvertes en 1543 par Eustachi et appelées capsules surrénales. En 1855, Addison décrit le syndrome d'insuffisance surrénalienne (par tuberculose de la glande) auquel on a donné son nom (Idelman et Verdeti, 2000).

L'interprétation d'Addison est confirmée par les expériences de Brown-Séquard en 1856: la surrénalectomie s'avère mortelle chez l'animal. Leurs travaux portaient plutôt sur la sécrétion du principe hypertenseur, isolé en 1901: l'adrénaline. Puis les écoles de Kendall et Reichstein, autour des années 1930, font connaître les stéroïdes du cortex surrénalien (Idelman et Verdeti, 2000).

1.1.2 Histologie:

Les glandes surrénales humaines (chacune pesant 6 à 10 g) sont situées au-dessus des reins et sont enveloppées d'une capsule conjonctive, faite de fibroblastes et de fibres de collagène, ainsi qu'une couche de graisse (Fig. 1.) (Idelman et Verdeti, 2000).

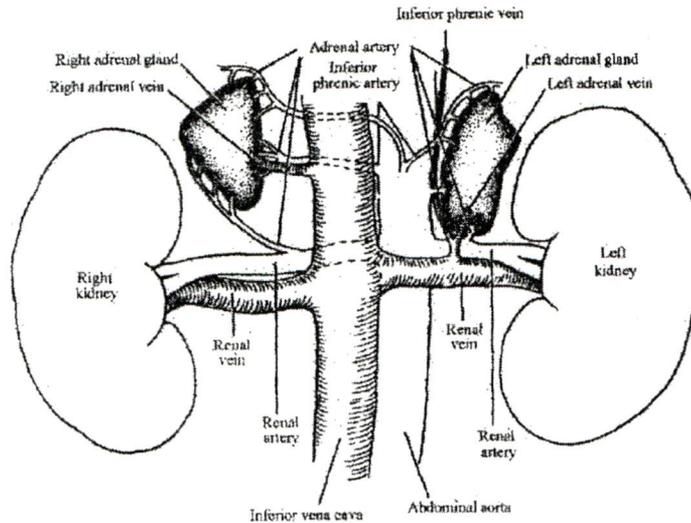


Fig.1. Anatomie de la glande surrénale: Chaque glande surrénale est bien approvisionnée par le sang. Chaque glande est directement reliée à une veine principale; la veine de la glande surrénale droite se vide dans la veine cave inférieure et la veine de la glande surrénale gauche se vide dans la veine rénale (Greenspan, 1991).

Chez l'humain, la glande surrénale est différente entre le fœtus et l'adulte quand à la morphologie et au fonctionnement de celle-ci. La partie corticale des surrénales provient du mésoderme, alors que la médullaire est d'origine ectodermique. Entre la 5^e et la 6^e semaine du développement de l'embryon humain, il y a apparition du cortex surrénalien fœtal près du mésonéphros. Ce dernier est, peu de temps après, enveloppé par les cellules du cortex définitif. À la fin de la 8^e semaine, la glande vient s'individualiser au pôle supérieur du rein qu'elle dépasse d'ailleurs en taille (Baulieu, 1978). La glande est composée de deux zones spécifiques, nommées la zone foetale et la zone définitive. La zone foetale représente 85% de la glande et produit une très large quantité de DHEA et de DHEAS. Cette zone est entourée par une couche de cellules prolifératives, appelée zone définitive. Cette dernière est dépourvue d'activité sécrétrice durant les 15 premières semaines de gestation. La troisième zone, la zone transitoire, est visible entre la zone foetale et la zone définitive. Il a été proposé que la zone transitoire se différencie éventuellement en zone glomérulée et en zone

fasciculée. Ces changements sont accompagnés d'une diminution de la taille de la glande, largement causée par la disparition de la zone foetale (Chamoux et *al.*, 1999). À la naissance, le cortex foetal représente la majeure partie de la masse surrénale. Il y aura régression du cortex foetal qui disparaîtra au cours de la première année de vie. La différenciation en trois zones du cortex sera observée vers la troisième année de vie où on retrouvera alors le cortex adulte.

La glande surrénale humaine adulte est composée de deux portions qui diffèrent tant au point de vue structural que du point de vue fonctionnel. Le cortex surrénalien (portion externe), est la portion la plus volumineuse et il recouvre la *medulla*; il provient du mésoderme embryonnaire (Marieb, 1993). La corticosurrénale peut être considérée comme une glande endocrine distincte. Elle n'est pas contrôlée directement par l'innervation, mais par l'action des hormones et par des variations dans le plasma des concentrations de certaines substances chimiques (Laycock et Wise, 1983). Le cortex comprend trois zones, où sont sécrétées les hormones entrant dans la famille des corticostéroïdes. La couche de cellules la plus externe est appelée la zone glomérulée, origine des minéralocorticoïdes dont le plus sérologiquement actif est l'aldostérone (Idelman et Verdeti, 2000). Ces stéroïdes ont un rôle très important à jouer pour maintenir l'équilibre hydro-électrolyte au niveau du sang. La zone fasciculée est composée de travées de cellules très riches en lipides alors que la zone la plus interne, soit la réticulée, est composée de cellules organisées en travées autour des capillaires plexiformes (Fig.2b). Les zones fasciculée et réticulée sécrètent les hormones glucocorticoïdes (cortisol, corticostérone...). Les hormones androgènes (DHEA ou la forme sulfatée DHEAS) seraient élaborées surtout par la zone réticulée et aussi en quantité moindre par la zone fasciculée (Idelman et Verdeti, 2000) (Fig.2c). Les trois zones du cortex composent environ 80 à 90% du poids de la glande surrénale et le reste est formé par la

medulla (portion interne) (Griffin et Ojeda, 1992) (Fig.3). La *medulla* est constituée de cordons richement vascularisés, au sein desquels on observe deux types de cellules: cellules à noradrénaline et cellules à adrénaline (Idelman et Verdeti, 2000).

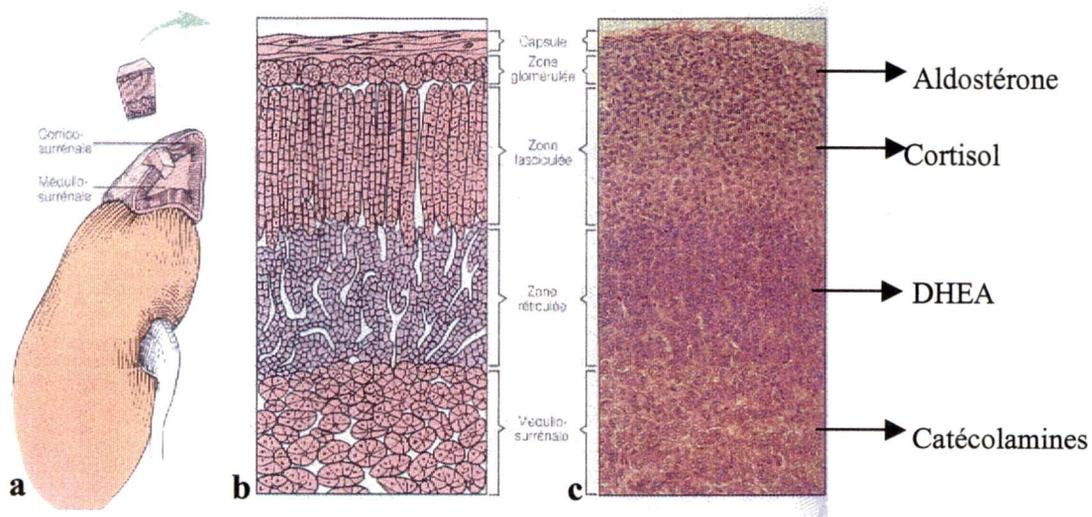


Fig. 2. Structure histologique de la glande surrénale: a) Localisation de la glande surrénale b) Diagramme des divers types de cellules formant la glande. c) Photomicrographie des trois zones du cortex et de la *medulla* ainsi que les composés produits (Marieb, 1993).

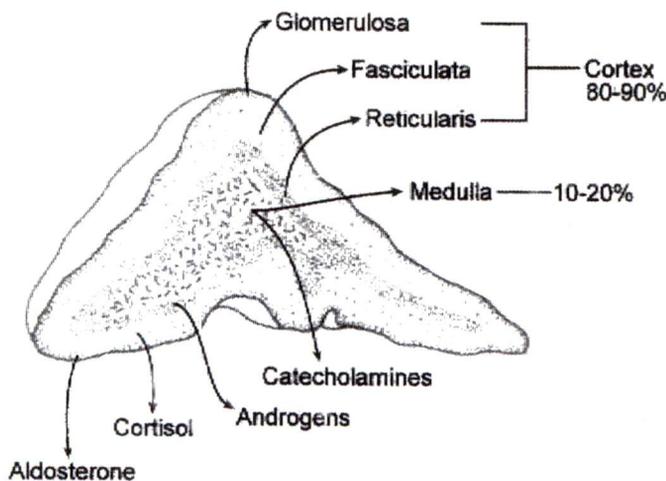


Fig. 3. Les zones de la glande surrénale: La glande surrénale est formée de deux portions, le cortex qui contribue à 80-90% du poids de la glande et la *medulla* qui forme seulement 10-20% du poids (Griffin et Ojeda, 1992).

1.2. Le précurseur:

1.2.1. Le cholestérol:

La stéroïdogénèse de la glande surrénale implique un grand nombre de processus métaboliques qui ont comme précurseur commun le cholestérol. Toutes les hormones du cortex surrénalien au même titre que les autres hormones stéroïdes ont une structure de base commune, soit un noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène (Fig.4). Le substrat commun des stéroïdes est le cholestérol (Fig. 5).

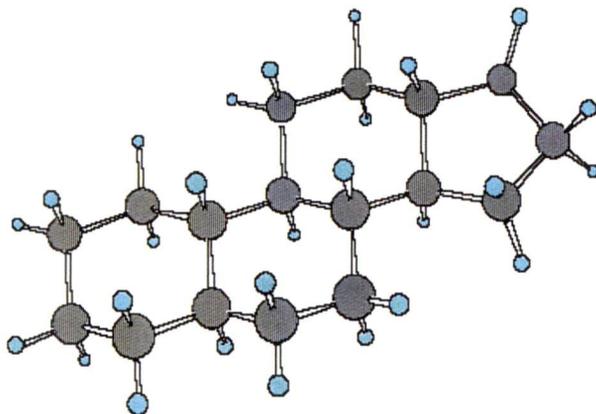


Fig. 4. Le cyclopentanoperhydrophénanthrène:
La structure de base de toutes les hormones stéroïdiennes

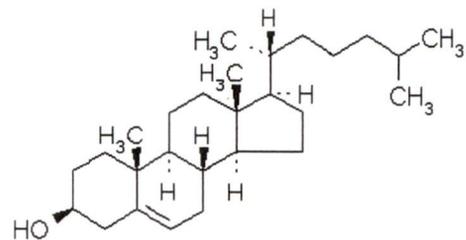


Fig. 5. La structure du cholestérol: Le cholestérol sert de précurseur pour la synthèse des stéroïdes, de la vitamine D et des sels biliaires.

Le cholestérol utilisé par la surrénale est en partie exogène (apporté par l'absorption intestinale ou synthèse hépatique) et en partie endogène (synthétisé *de novo* à partir de l'acétate). La synthèse locale a lieu au niveau du réticulum endoplasmique (Idelman et Verdeti, 2000). Le foie est la principale source de VLDL qui transporte vers les tissus périphériques, mais surtout vers les tissus adipeux, les triglycérides fabriqués ou transformés dans le foie. Lorsque tous les triglycérides sont relâchés, ce qui reste des VLDL est converti en LDL, riches en cholestérol. Le rôle des LDL consiste à transporter le cholestérol vers les

tissus périphériques, ce qui permet aux cellules de s'en servir pour l'intégrer à ses membranes ou à synthétiser des hormones, ou bien de le mettre en réserve en vue d'utilisation ultérieure (Marieb, 1993). Chez l'homme les LDL sont la source principale de cholestérol, puisqu'il contribue à 80% de la forme utilisée lors de la stéroïdogénèse (Bolté *et al.*, 1967; Borkowski *et al.*, 1967; Gwynne et Strauss, III, 1982). Pour ce qui est de la partie endogène, le cholestérol aura comme origine l'acétyl-CoA, exporté de la mitochondrie au cytosol grâce à un système transporteur de citrate. L'étape initiale de la synthèse du cholestérol est la condensation en série de trois molécules d'acétyl-CoA pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) (Horton *et al.*, 1994). Par la suite, plusieurs réactions s'enchaînent afin d'obtenir le cholestérol. L'enzyme clé contrôlant ce processus est la HMG-CoA réductase impliquée dans la conversion du HMG-CoA en acide mévalonique (Fig. 6).

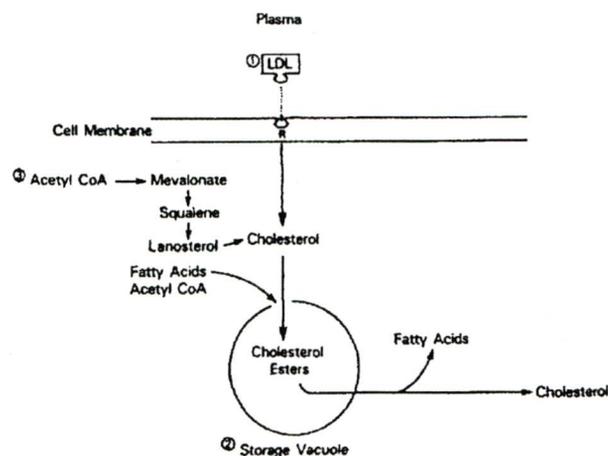


Fig.6. Schéma global de toutes les sources de cholestérol utilisables lors de la stéroïdogénèse: (1) Cholestérol sous forme LDL, (2) relâché à partir des vacuoles de réserves et (3) synthétisé à partir de l'acétate. (Becker., 1990).

1.2.2. Le transport du cholestérol:

Le cholestérol ne peut entrer seul dans les mitochondries. Il y a deux éléments qui semblent être impliqués intimement dans ce transport. La protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) et les PTBR (*peripheral type benzodiazepine receptor*). Au moment de la pénétration du cholestérol à l'intérieur de la membrane externe, le transfert de celui-ci vers la membrane interne serait facilité par la protéine appelée StAR. Des expériences ont confirmé l'implication de la protéine StAR dans la translocation du cholestérol. Par exemple, des souris ayant une mutation de la StAR dans leur génome ont développé une hyperplasie surrénalienne similaire à la pathologie nommée LCAH (*lipoid congenital adrenal hyperplasia*) (Caron et al., 1997). Les gens ayant le LCAH ne peuvent pas synthétiser une quantité suffisante de stéroïdes et on observe une accumulation de cholestérol dans les glandes surrénales et les gonades. Selon des études récentes de modélisation, il semblerait que la protéine StAR posséderait une cavité hydrophobique, laquelle jouerait un rôle clé comme site de liaison avec la molécule de cholestérol (Mathieu et al., 2002). Le transport du cholestérol à l'intérieur des mitochondries est l'étape cruciale de la stéroïdogénèse. La StAR est composée de 285 a.a. et est exprimée chez l'humain dans les glandes surrénales, le cerveau et les gonades (Sugawara, et al., 1995). La séquence protéique serait possiblement composée de deux domaines fonctionnels: 1) l'un responsable de l'importation de la protéine StAR dans la mitochondrie, et 2) l'autre formerait le domaine de transfert lipidique StAR (START) qui est responsable du transfert du cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie (Mathieu et al., 2003). La StAR semble être localisée sur la face interne et dans la matrice des mitochondries (Warteman, 1998; Miller et Strauss, 1999; Stocco, 1999).

Il a été postulé qu'au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, le transfert du cholestérol pourrait être assuré par une protéine (canal-transporteur?) appelée PTBR (Zilz et al., 1999). Lorsque les PTBR sont absents ou déficients, il n'y a pas d'entrée du cholestérol dans les mitochondries. Il semble que le PTBR est présent dans un complexe comprenant VDAC (*voltage dependant anion carrier*) et l'adénine nucléotide carrier protein (ANCP) (Idelman et Verdeti, 2000). La protéine appelée diazepam binding inhibitor (DBI) serait le ligand endogène qui va se lier au PTBR. La distribution du complexe PTBR pourrait être bouleversée lors d'une stimulation de l'AMPc en augmentant les sites de liaisons PTBR/StAR ; cet éventuel contact aurait pour effet d'augmenter le transport de cholestérol et ainsi la synthèse de stéroïdes (Fig.7).

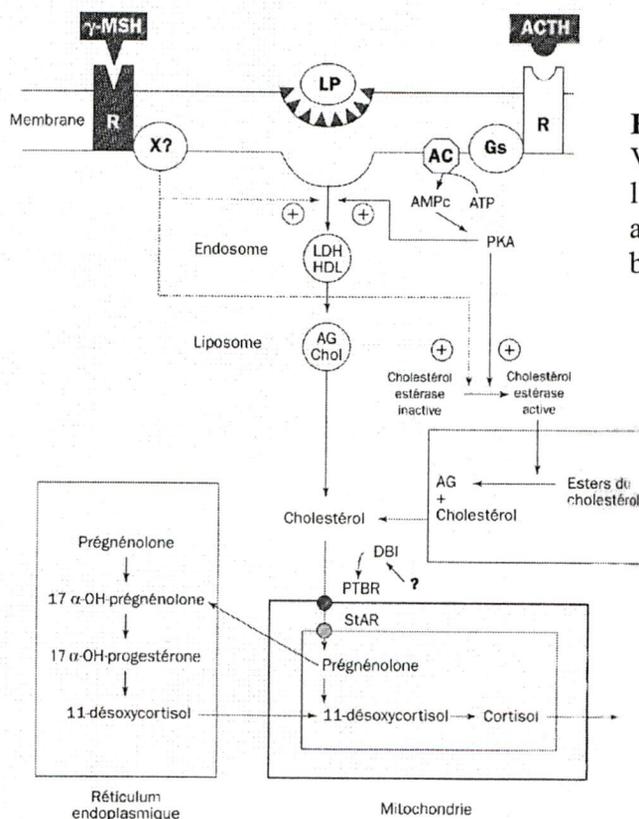


Fig.7. Transport du cholestérol: Vision globale des sources de cholestérol, l'entrée de celui-ci dans les mitochondries, ainsi que sa transformation lors de la biosynthèse (Idelman et Verdeti, 2000).

1.3. La stéroïdogénèse de la glande surrénale:

Plusieurs enzymes interviennent dans la synthèse des stéroïdes surrénaliens. On retrouve des déshydrogénases, des sulfatases, des sulfotransférases, mais la plupart de ces enzymes font partie de la grande famille des cytochromes P450 (Fig.10). Les cytochromes P450 possèdent tous un groupement prosthétique soit un hème ayant à son centre une molécule de fer (Fig.8). Les cytochromes P450 absorbent la lumière à 450 nm lorsqu'ils sont réduits et liés au monoxyde de carbone (Nebert et Gonzalez, 1987).

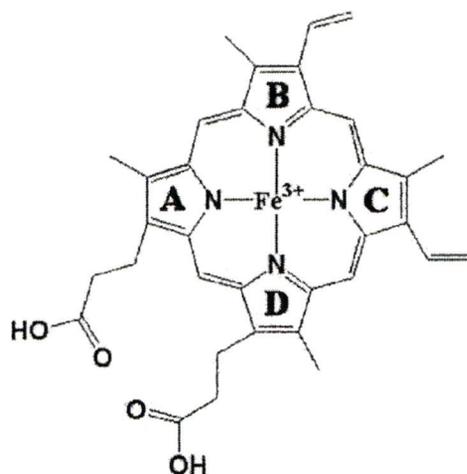
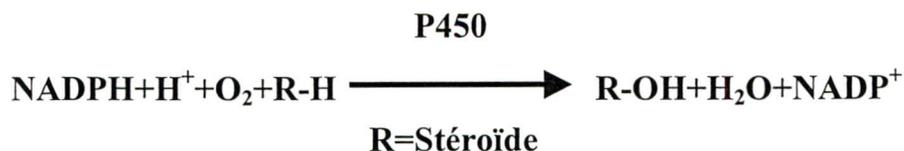


Fig.8. Structure de l'hème des cytochromes P450: L'hème du groupe b est caractérisé par un propionate et un groupe méthyle sur l'anneau A et sur les anneaux B et C un méthyle et un groupe d'éthène.

Les cytochromes sont formés d'environ 500 a.a. et leur source réductrice est le NADPH.

Ces molécules interagissent avec l'oxygène et le substrat est hydroxylé de cette façon:



Il existe différents types de cytochromes ayant chacun un rôle précis à jouer dans la biosynthèse des stéroïdes. La majorité des cytochromes sont des enzymes stéroïdogéniques

surréaliennes et gonadiennes. Au niveau des glandes surrénales, il existe deux types de P450, selon qu'ils soient situés dans les mitochondries ou le réticulum endoplasmique. Ils sont donc caractérisés par leur localisation cellulaire mais aussi selon le type d'accepteur d'électrons. Le complexe servant au transport d'électrons, retrouvés dans les mitochondries, est localisé dans la membrane interne et dirigé vers la matrice. C'est l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase qui servent de navette aux électrons. Tout d'abord, l'adrénodoxine réductase oxyde le NADPH et réduit l'adrénodoxine. L'électron passera de l'adrénodoxine vers l'accepteur d'électrons le P450 qui a pour fonction d'être l'oxydase terminale dans la chaîne de transport des électrons au niveau des mitochondries. (Miller, 1988; Hum et Miller, 1993). Les autres P450s microsomaux obtiennent directement les électrons d'une façon séquentielle à partir de la NADPH réductase qui est située sur le côté cytoplasmique du RE (Fig.9).

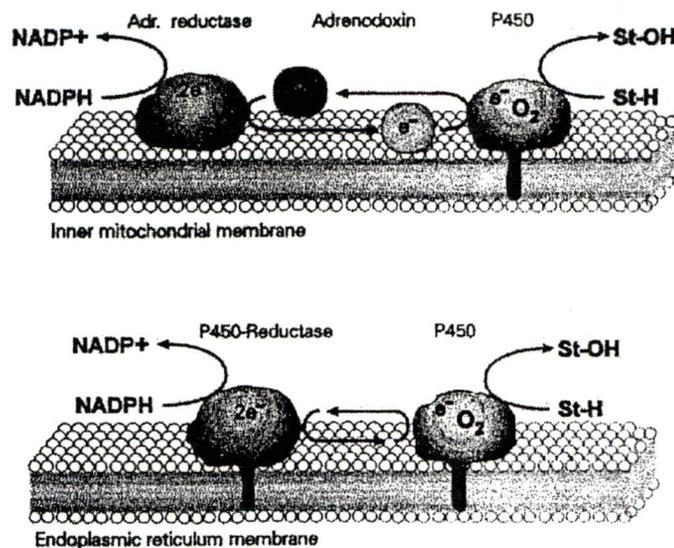


Fig. 9. Mécanisme de transport des électrons vers les P450 des mitochondries et ceux du réticulum endoplasmique. (Hanukoglu, 1992).

Les hormones provenant de cette biosynthèse peuvent être classées en trois groupes selon leurs effets principaux : minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes et les hormones sexuelles. Les deux premiers groupes d'hormones possèdent 21 atomes de carbone et ils sont souvent appelés les stéroïdes C21. Les stéroïdes C21 qui proviennent de la glande surrénale ont une activité minéralo- et glucocorticoïdes. Les hormones sexuelles actives qui proviennent du cortex surrénalien sont normalement synthétisées en quantité relativement petite, comparée à celle des gonades chez l'adulte. Cependant la DHEA, un androgène peu actif, est sécrété en très grande quantité par les surrénales. La structure chimique des androgènes contient 19 atomes de carbone et sont appelées les stéroïdes C19 (Laycock et Wise, 1983).

1.3.1. Le cytochrome P450_{scc}:

L'étape initiale et limitante de la biosynthèse des stéroïdes est la modification du cholestérol qui possède une structure de 27 carbones; le cholestérol est entreposé sous forme estérifiée dans les vésicules lipidiques. Lors de la pénétration du cholestérol dans les mitochondries, une enzyme, le cytochrome P450_{scc} (*side chain cleavage*) circonscrit au niveau de la membrane interne de l'organelle, sera responsable de sa catalyse en prégnénolone (Fig. 10) (Yanase et al., 1991). Le cytochrome P450_{scc} (P450_{scc}) est aussi connu sous le nom 20,22-desmolase, car il peut réaliser les trois monooxygénations suivantes: 20 α -hydroxylation et 22-hydroxylation qui vont transformer le cholestérol en 20 α ,22-dihydrocholestérol, et l'intervention de la cholestérol-desmolase qui provoquera une coupure oxydative du carbone en position C20-C22 sur la chaîne latérale du cholestérol, résultant en une formation de la Δ^5 -prégnénolone et l'aldéhyde isocaproïque. La synthèse de la prégnénolone constitue la plaque tournante de la formation de tous les stéroïdes hormonaux. Cette étape, qui est dans la surrénale sous le contrôle entre autres de l'ACTH,

est fondamentale, car le reste de l'hormonogénèse est régulé selon la quantité de prégnénolone présente. Celle-ci va se dissocier du P450scc facilement, due à sa haute constante de dissociation comparativement aux intermédiaires (Linquette, 1975 et Hanukoglu, 1992). Dans la zone glomérulée en l'absence de P450c17, la prégnénolone servira à la biosynthèse des minéralocorticoïdes.

Le gène et l'ADNc humain du P450scc ont été clonés (Chung et *al.*, 1986; Morohashi et *al.*, 1987). Le chromosome où se retrouve le P450scc fut identifié, soit 15q23-q24 (Sparkes et *al.*, 1991). Le gène *CYP11A* encodant le P450scc humain est présenté en une copie unique dans le génome; il est d'une longueur de 20 kb et divisé par neuf exons (Miller, 1988). Dans le cortex surrénalien, le P450scc est exprimé dans toutes les zones. (Hanukoglu, 1992). Le P450scc est exprimé dans plusieurs tissus tels que : le cerveau, les ovaires, les testicules. Peu importe l'espèce, le bœuf (John et *al.*, 1984), le rat (Oonk et *al.*, 1989) ou l'humain (Chung et *al.*, 1986), les études démontrent qu'il a un haut niveau de conservation dans l'évolution basée sur l'analyse de chacune des séquences du P450scc.

1.3.2. Le P450c17: une enzyme, deux activités:

La biosynthèse des glucocorticoïdes et des androgènes surrénaliens comporte l'intervention du cytochrome P450c17 (P450c17). Le P450c17 est encodé par un seul gène le *CYP17* (Nebert et *al.*, 1991) localisé sur le chromosome 10q24-q25 (Sparkes et *al.*, 1991). Chez l'humain, un seul ARNm fut identifié dans les gonades et dans les glandes surrénales, il provient de la transcription du gène *CYP17* et cet ARNm n'encode qu'une seule séquence d'a.a. (Miller et *al.*, 1997). La longueur totale de l'ADNc du P450c17 est de 1527pb et encode une protéine de 508 a.a. (Bradshaw et *al.*, 1987). C'est une enzyme exprimée dans la zone fasciculée et dans la zone réticulée du RE. Jamais on ne retrouve son activité dans la zone glomérulée. L'extrémité N-terminale qui est hydrophobe est localisée dans la

membrane du réticulum endoplasmique (RE). Cette enzyme a la particularité d'avoir deux activités, l'activité 17 α -hydroxylase et l'activité 17, 20-lyase qui ont été confirmées par des expériences de transfection et d'expression de l'ADNc du P450c17 dans les COS-1 (Zuber et al., 1986). Cette enzyme possède un site unique actif pour la liaison de quatre substrats soit la prégnénolone, la progestérone, la 17 α -hydroxyprégnénolone et la 17 α -hydroxyprogestérone (Nakajin et al., 1981; Zuber et al., 1986). De plus, l'activation de la P450c17 est réalisée par l'ACTH. Lorsque ACTH se lie à son récepteur membranaire des cellules surrénaliennes, l'adénylate cyclase est activée via la protéine Gs. Cette liaison provoquera une augmentation de l'AMPc qui est le second messenger et activera à son tour les protéines kinases A (PKA) (AMPc-dépendantes) qui agiront sur les sites de phosphorylations de la P450c17 (Zuber et al., 1986; DiBlasio et al., 1987). De plus, l'AMPc provoque une hausse de la transcription des gènes qui encodent pour le P450c17. Au niveau du développement fœtal l'AMPc stimule la croissance des glandes surrénales (Lin et al., 1991). L'ADNc du gène *CYP17* a été cloné à partir de la glande surrénale de porc (Nakajin et al., 1984), de testicules de porc (Nakajin et al., 1981; Katagiri et al., 1982; Suhara et al., 1984), de glandes surrénales de cochon d'Inde (Kominami et al., 1982), des testicules de veau (Perrin et al., 1991) et des glandes surrénales d'hamster (Cloutier et al., 1997).

La première activité soit la 17 α -hydroxylase permettra l'addition d'un groupe hydroxyle sur le carbone 17 du noyau cyclopentanoperhydrophenanthrène. Les deux substrats, la prégnénolone et la progestérone subiront une hydroxylation en C17, les produits obtenus seront la 17 α -hydroxyprégnénolone et la 17 α -hydroxyprogestérone, au niveau de la zone fasciculée du cortex surrénalien. La deuxième activité du P450c17 est la 17, 20-lyase qui permettra la conversion de la 17-hydroxyprégnénolone en DHEA un stéroïde à 19 atomes de carbones; c'est la voie Δ^5 . La conversion du 17-hydroxyprogestérone en

androstènedione est aussi possible ; c'est la voie Δ^4 . Au niveau de la glande surrénale, ce ne sont pas tous les 17α -hydroxystéroïdes qui sont convertis en stéroïdes C19, comparativement aux gonades où tous sont convertis en stéroïdes C19 (Fig.10). Dans les surrénales les produits 17α -hydroxylés peuvent servir de substrats aux glucocorticoïdes. Dans les gonades la P450c17 est une enzyme clé de la stéroïdogénèse car la présence de l'activité 17α -hydroxylation et de l'activité 17, 20-lyase permettra la formation de la testostérone.

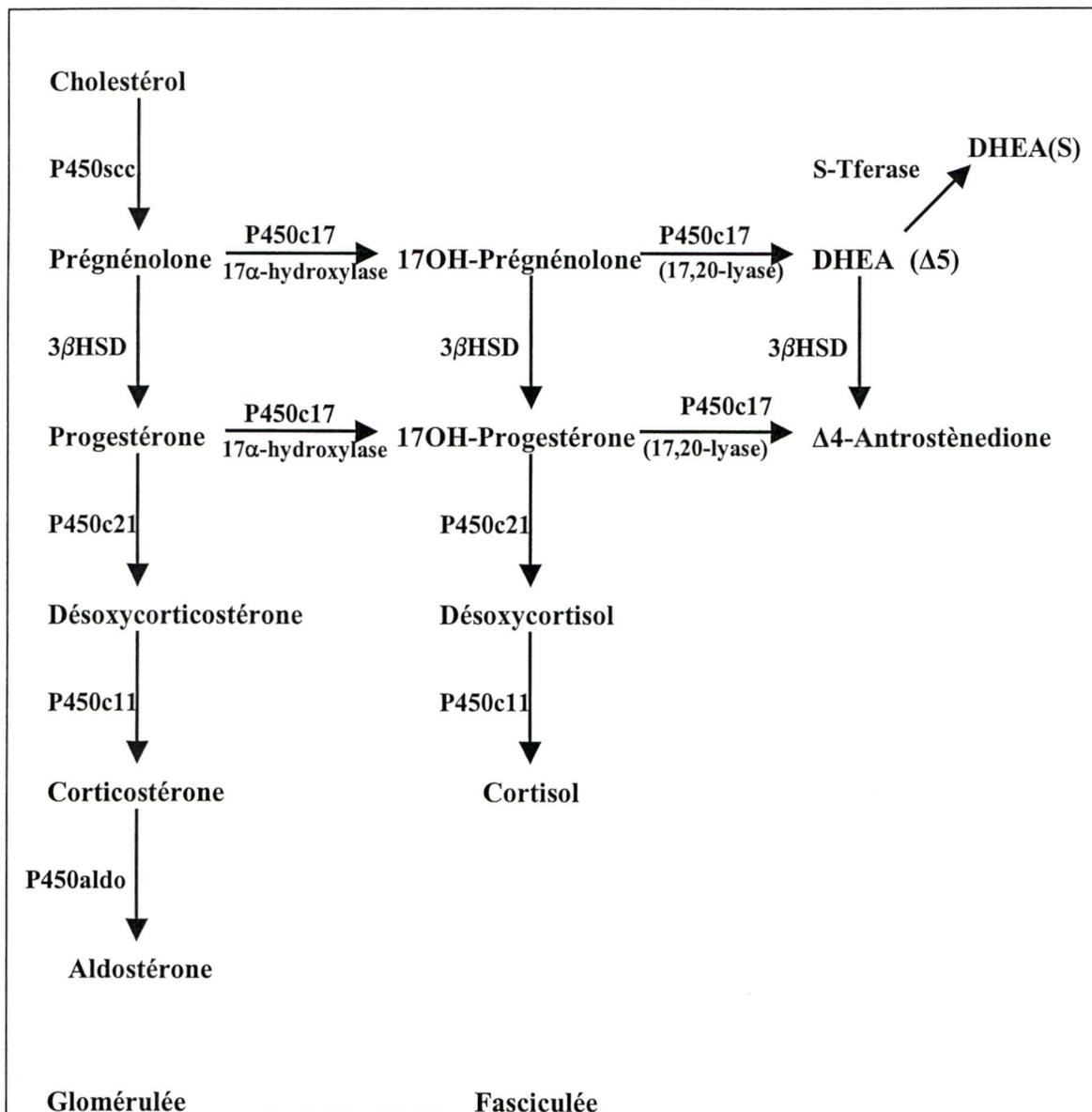


Fig.10. La stéroïdogénèse: Présentation globale de tous les substrats et produits formés en présence des cytochromes P450 et des autres enzymes faisant partie de la stéroïdogénèse.

L'humain, le bœuf et le porc expriment le P450c17 surrénalien; ces enzymes ont une homologie entre elles de 75% sur la séquence primaire a.a.. Cependant, il existe certaines différences enzymatiques entre les espèces. Par exemple, chez le bœuf et l'humain, l'activité 17, 20-lyase du P450c17 est très faible dans la voie Δ^4 car le substrat 17α -hydroxyprégnénolone a une plus forte affinité que le substrat 17α -hydroxyprogesterone et on retrouve donc une plus grande quantité de DHEA produit. Alors que chez les testicules du rat, seul le substrat 17α -hydroxyprogesterone est utilisé, faisant place à une production unique d'androstènedione (Fevold et *al.*, 1989). De plus, chez le rat et la souris, il n'y a aucune expression du P450c17 dans la glande surrénale et le principal glucocorticoïde formé est la corticostérone (Van Weerden et *al.*, 1992).

Le P450c17 nécessite quatre éléments afin d'être fonctionnel. Tout d'abord, le P450c17 a une liaison en N-terminale avec la membrane du RE. Il contient un site de liaison aux substrats qui est un espace défini comprenant un groupement prosthétique soit un hème ayant à son centre une molécule de fer. Il doit posséder un domaine situé à l'opposé du domaine de liaison des substrats, où le partenaire rédox (P450OR) va se fixer. Le P450OR, est une flavoprotéine réductase qui recevra les électrons du NADPH et les donnera par la suite au P450c17 (Auchus et Walter, 1999). Si l'un de ces quatre éléments est absent, on se retrouvera alors avec un ou plusieurs désordres qui amèneront une disfonctionnalité du P450c17. Les désordres cliniques rapportés vont de l'hypertension à un manque de développement de la femme à l'âge de la puberté et une ambiguïté au niveau de la formation génitale chez l'homme (Auchus, 2001). De plus, une mutation sur le gène *CYP17* peut détruire toute l'activité 17α -hydroxylase et 17, 20-lyase, les symptômes seront l'hypogonadisme et l'hypertension. (Lin et *al.*, 1991, Yanase et *al.*, 1991, and Monno et *al.* 1993). Si l'activité 17, 20-lyase est déficiente, on retrouvera l'hypogonadisme et une

insuffisance surrénaliene. S'il y a uniquement déficience de la 17α -hydroxylase, cela va mener à une hyperplasie congénitale de la surrénale (CAH).

Le P450c17 est très complexe, plusieurs éléments semblent influencer ses activités par exemple, selon l'espèce où il est étudié, l'organe étudié, l'âge de l'individu. Ainsi au niveau des testicules chez l'humain, tous les précurseurs des stéroïdes sont transformés en stéroïdes sexuels, ainsi l'activité 17, 20-lyase est très élevée. Cependant, dans le cortex surrénalien, le ratio est régulé durant le développement et les deux activités semblent plus équilibrées. Les glandes surrénales d'un enfant âgé entre 1 et 8 ans produisent du cortisol (stéroïdes C_{21}) mais pratiquement pas de stéroïdes C_{19} . Entre l'âge de 7 et 9 ans, les glandes surrénales commencent la production de DHEA en association avec une augmentation de l'activité 17, 20-lyase, mais sans aucun changement dans la sécrétion du cortisol ou des hormones adrénocorticotropiques (Cutler et *al*, 1978; Parker et Odell, 1980). Les questions que l'on peut se poser sont: comment les deux activités d'une seule enzyme peuvent se différencier selon les cellules, comment le ratio des activités peut changer lors du développement et comment la régulation des deux activités peut se faire d'une façon indépendante? L'une des particularités qui est en soit énigmatique, c'est le fait que les deux activités provenant du P450c17 n'ont pas la même régulation. Ainsi, des expériences ont prouvé que l'activité 17, 20-lyase est préférentiellement augmentée par une élévation de l'abondance des partenaires redox P450OR, par une phosphorylation sérine/thréonine sur le P450c17 et la présence de cytochrome b_5 . Ce dernier est un facilitateur allostérique et non un donneur d'électrons (Auchus et Miller, 1999) et il n'aurait aucun effet sur l'activité 17α -hydroxylase. L'utilisation de certains inhibiteurs va bloquer l'activité 17, 20-lyase ce qui va résulter en une diminution non seulement de la production de DHEA, mais aussi de la synthèse de la testostérone au niveau des testicules. Cependant, il ne semble pas y avoir de

diminution dans la circulation de 17α -hydroxyprégnénone et de 17α -hydroxyprogestérone qui sont régulées par l'activité 17α -hydroxylase (Barrie et Jarman, 1996). En effet, encore bien des éléments inconnus demandent à être élucidés dans ce domaine.

1.3.3. Le 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase / Δ^5 - Δ^4 -isomérase:

Une fois le cholestérol transformé en prégnénone, celle-ci est transportée dans le RE. Alors, la prégnénone est prise en charge par le P450c17 et transformée en 17OH -hydroxyprégnénone. Cependant, la prégnénone peut aussi être transformée en progestérone par l'enzyme 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase / Δ^5 - Δ^4 -isomérase (3β -HSD). La prégnénone sera oxydée en C3, donnant une fonction cétonique. Une isomérisation de la double liaison de la position 5 en position 4 se produit de façon à donner une liaison conjuguée avec la cétone de la position 3 (Fig.10) (Baulieu, 1978). On obtient ainsi, la progestérone. L'enzyme 3β -HSD qui n'est pas une P450, ne fait pas que la conversion de la prégnénone en progestérone, on l'a retrouvée impliquée dans 2 autres biosynthèses. En effet, elle peut convertir les stéroïdes 3β -hydroxy-5-ène en stéroïdes 3-céto-4-ène, ainsi les substrats 17 -hydroxyprégnénone et DHEA seront transformés en 17 -hydroxyprogestérone ou en androsténone (Fig.10). De plus, l'accepteur d'électrons employé par cette enzyme afin d'exécuter ces conversions, est la NAD^+ qui est une coenzyme. Cependant, s'il y a utilisation du donneur d'électron NADH ceci renversera les réactions médiées par l'enzyme 3β -HSD. La 3β -HSD est retrouvée dans les trois zones du cortex surrénalien et a un poids moléculaire de 42 kDa (Dupont et al., 1990). L'ADNc qui encode la protéine 3β -HSD, a été synthétisé chez diverses espèces, soit le boeuf, le rat et la souris (Labrie et al., 1992). Cependant, on retrouve chez le rat et la souris trois isoenzymes 3β -HSD, alors que chez l'humain, on retrouve deux isoenzymes 3β -HSD. Le premier type de 3β -HSD encode 372 a.a, il est exprimé dans le placenta, la peau et les cellules adipeuses et son gène possède 4

exons (Labrie et *al.*, 1992). Le second type de 3β -HSD possède une homologie de 94% avec le premier mais il dispose d'une grande activité comparativement au type I.

1.3.4. Le cytochrome P450c21:

Le cytochrome P450c21 (P450c21) est localisé dans le RE, il est présent dans les trois zones du cortex surrénalien (Sasano et *al.*, 1988). Il est impliqué dans la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. Le P450c21 est responsable de l'hydroxylation sur le carbone 21 du groupe alkyle sur les prégnanes. Ainsi le P450c21 fait la conversion du stéroïde 17-hydroxyprogestérone en 11-désoxycortisol et la conversion de la progestérone en désoxycorticostérone (DOC) (Fig.10). L'enzyme P450c21 utilise le même système de transport d'électrons que sa consœur l'enzyme P450c17. On a retrouvé chez l'humain deux gènes codant la protéine 21-hydroxylase (*CYP21*), mais seulement un des deux gènes s'est avéré fonctionnel alors que l'autre est un pseudogène (White et *al.*, 1985; Carroll et *al.*, 1985). La localisation de ces deux gènes est située sur le chromosome 6p21.3 qui est contenu dans le complexe majeur d'histocompatibilité (HLA).

1.3.5. Les cytochromes P450c11 et P450aldo:

Le cytochrome P450c11 (P450c11) est situé dans la membrane interne des mitochondries, du côté faisant face à la matrice. Chez l'humain, on retrouve deux isoenzymes, la première qui est responsable de la synthèse du cortisol, soit la 11β -hydroxylase et la deuxième le cytochrome P450 aldostérone synthase (P450aldo) est responsable de la synthèse de l'aldostérone. Dans cette section, il ne sera discuté que du cytochrome P450c11 qui est produit par le gène *CYP11B1*. Le P450c11 est exprimé dans les mitochondries de la zone fasciculée; il est responsable de la formation des glucocorticoïdes et est régulée par l'ACTH. Le système de transport d'électrons, est le même que celui utilisé

par le cytochrome P450_{scc}. Il y a une grande similarité entre le P450_{c11} et le P450_{aldo}, leur homologie est supérieure à 90% chez l'espèce humaine. Chez certaines espèces animales, c'est le même gène qui encode les deux protéines. Le gène *CYP11B1*, situé sur le chromosome 8q21-q22 (Mornet et al., 1989), encode la protéine P450_{c11} qui, une fois mature aura 470 a.a et un poids moléculaire de 51 kDa (Curnow et al., 1991). La réaction produite par le P450_{c11} est la conversion du 11-désoxycortisol en cortisol (Fig.10).

1.3.6. Le cytochrome P450_{aldo}:

Comme mentionné précédemment, dans la biosynthèse du cortisol et de l'aldostérone, on retrouve deux isoenzymes. Dans cette section, il sera question de la P450_{aldo} produit par le gène *CYP11B2*. Le *CYP11B2* est localisé sur le chromosome 8q21-q22 et possède 9 exons espacés de 7 kb (Mornet et al., 1989). La protéine encodée par *CYP11B2* possède le même nombre d'a.a. que la protéine encodée par *CYP11B1*, cependant le poids moléculaire est de 49 kDa (Curnow et al., 1991). La P450_{aldo} est l'enzyme finale dans la synthèse des minéralocorticoïdes. Contrairement au P450_{c11}, le P450_{aldo} est localisé dans les mitochondries de la zone glomérulée et est sous le contrôle du système rénine-angiotensine. L'enzyme P450_{aldo} est exprimée chez l'homme, le rat, la souris et l'hamster. Le P450_{aldo} possède une activité 18-hydroxylase et 18-oxydase et une très forte activité 11 β -hydroxylase. Ce cytochrome exécute une 18-hydroxylation sur la corticostérone afin de la convertir en 18-hydroxycorticostérone. Par la suite, une 18-oxydation transformera le 18-hydroxycorticostérone en aldostérone (Fig.10).

1.4. Autre enzyme:

On retrouve un cytochrome P450 qui est impliqué dans la stéroïdogénèse, mais contrairement aux autres cytochromes P450, il n'est pas localisé dans les glandes surrénales.

Il joue un rôle extrêmement important pour la formation de diverses hormones et de plus, il est essentiel au développement de l'être humain.

1.4.1. Le cytochrome P450arom:

Le cytochrome P450arom (P450arom) est encodé par le gène *CYP19* situé sur le chromosome 15q21.1 (White, 1994), ce gène est l'un des plus grands gènes P450 caractérisé jusqu'à maintenant. La protéine P450arom est formée de 503 a.a.. Le rôle de l'enzyme microsomale P450aromatique (P450arom) produite par le gène *CYP19*, est de catalyser la formation des estrogènes (Simpson et al., 1994). En effet, le P450arom convertit la testostérone et l'androstènedione en oestradiol. Trois conversions successives sont requises afin de transformer les androgènes en oestrogènes. 1) hydroxylation du C19 du groupe méthyle, 2) oxydation sur le même carbone en aldéhyde, et 3) oxydation du C19 et libération de l'acide formique (White, 1994). Tout ceci mène à une aromatisation de l'anneau A. Pour chaque C19 métabolisé, il y aura utilisation pour cette réaction de 3 molécules d'oxygène et de 3 molécules de NADPH (Thompson et Siiteri., 1974). Les cellules de la *granulosa* au niveau des ovaires sont dépourvues de 17 α -hydroxylase et de 17, 20-lyase, mais elles possèdent l'équipement enzymatique nécessaire à l'aromatisation des androgènes dans la thèque interne, qu'elles convertissent en oestrogènes sous l'action de la FSH (Idelman et Verdeti., 2000). Le gène *CYP19* n'est pas exprimé dans le cortex surrénalien, mais on le retrouve dans les ovaires et le placenta.

1.5. Les systèmes de transfert d'électrons:

1.5.1. Le système de transfert d'électrons des enzymes P450 mitochondriales:

Les enzymes P450 situées au niveau des mitochondries telles que P450_{scc}, P450_{c11} et P450_{aldo} utilisent un système de transfert d'électrons différent des enzymes P450, localisé dans les microsomes. Tout d'abord, il y a présence de diverses protéines qui auront un rôle très important dans le passage de l'électron. La flavoprotéine adrénodoxine réductase (AR) est exprimée dans tous les tissus humains et possède une molécule de fer. Elle est liée à la membrane interne des mitochondries, son gène est localisé sur le chromosome 17q24-q25 (Sparkes et *al.*, 1991) et son poids moléculaire est de 51 kDa. L'AR accepte deux électrons à partir du NADPH, qu'elle convertit en NADP⁺ (Kimura et *al.*, 1965). Par la suite, il y aura transfert d'électrons de l'AR vers l'adrénodoxine (ADX) (Kimura et Suzuki, 1965). L'ADX sert de navette pour livrer les électrons aux P450s liés à la membrane (Fig.11). Le gène de l'ADX est situé sur le chromosome 11q22 (Sparkes et *al.*, 1991), elle est très petite ayant poids moléculaire de 12 kDa et elle est exprimée dans les glandes surrénales, le placenta et les gonades (Chang et *al.*, 1988 ; Kagimoto et *al.*, 1988). L'ADX n'est pas une protéine ayant une molécule d'hème. Elle est composée d'une ferredoxine-[2Fe-2S] qui permet le transfert d'électrons de l'AR vers elle (Müller et *al.*, 1998). L'ADX existe à l'état soluble dans la matrice des mitochondries.

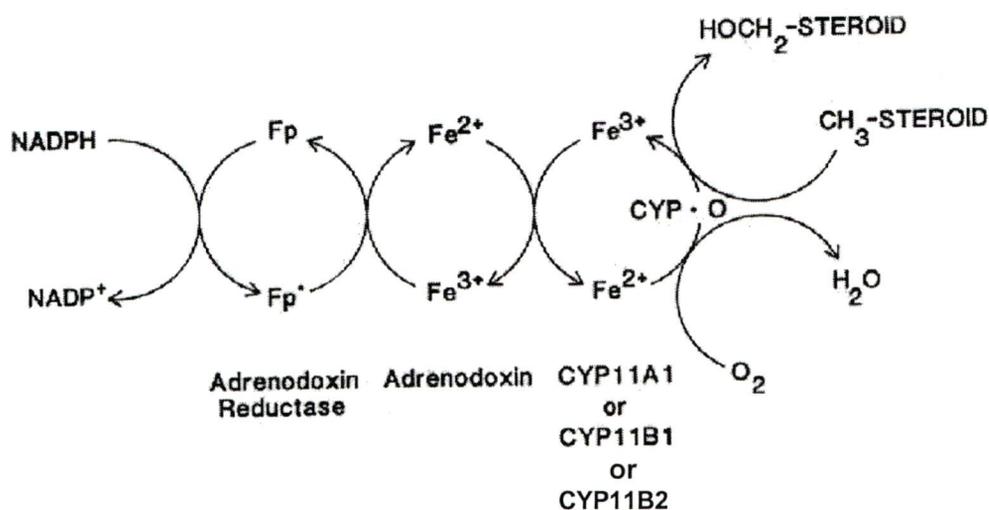


Fig. 11. Système de transport des électrons dans les mitochondries: L'AD reçoit les électrons provenant du NADPH et réduit l'ADX laquelle va les transférer aux enzymes CYPs. Les CYPs transfèrent l'électron par la voie de l'oxygène vers les stéroïdes (Wilson et *al.*, 1998).

1.5.2. Le système de transfert d'électrons des enzymes P450 microsomiques:

Les P450c17 et P450c21 sont dépendants des électrons pour réaliser l'hydroxylation de leurs substrats. Ils sont réduits via un système de transport d'électrons impliquant le cytochrome P450 réductase (P450-NADPH réductase). Dans un premier temps, le P450-NADPH réductase va transférer deux électrons d'une façon séquentielle du NADPH vers le P450c17 ou P450c21. Le cytochrome b₅ peut aussi donner le second électron (Fig.12). Pour réaliser un transfert des électrons d'une façon plus efficace, il a été observé que la présence de certains phospholipides pourrait associer le complexe cytochrome b₅ et P450-NADPH réductase (Van der Hoeven and Coon, 1974; French et *al.*, 1980; Müller-Enoch et *al.*, 1984). De plus, il semblerait que selon la présence des phospholipides, il y aurait un rôle à jouer dans le choix entre une hydroxylation en position 17 α ou en position 21.

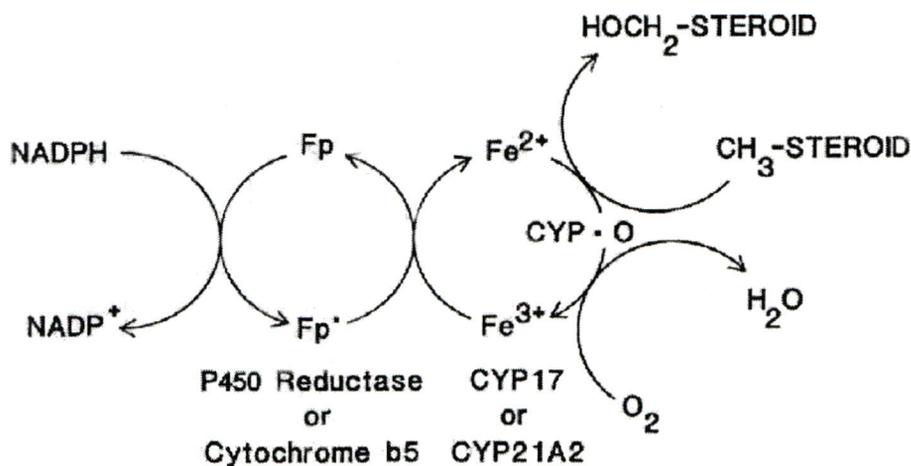


Fig.12. Système de transport des électrons dans le réticulum endoplasmique: P450 réductase (Flavoprotéine) reçoit les électrons du NADPH et les transfère à l'enzyme P450c17 ou P450c21. L'enzyme va transférer les électrons par la voie de l'oxygène vers le stéroïde. Une seconde réduction peut être réalisée avec le cytochrome b₅ (Wilson et *al.*, 1998).

1.6. Le rôle des stéroïdes dans le métabolisme humain:

Les stéroïdes produits lors de la stéroïdogénèse sont très importants au niveau de l'homéostasie du corps humain. Les minéralocorticoïdes ont un effet sur la rétention du sodium, les glucocorticoïdes ont un rôle à jouer dans la mobilisation des carbohydrates, alors que les stéroïdes de la zone réticulée agissent sur le développement des caractéristiques sexuelles ainsi que sur la reproduction. La quantité sécrétée dans le sang est finement contrôlée car une hausse d'un des stéroïdes ou l'absence de l'un des ceux-ci peut occasionner des maladies et même la mort.

1.6.1. L'aldostérone:

L'aldostérone est synthétisée dans la zone glomérulée et est le principal minéralocorticoïde retrouvé (elle représente 95% des minéralocorticoïdes) (Marieb, 1993).

La régulation de l'aldostérone est contrôlée par le système rénine-angiotensine (voir plus loin), les concentrations d'ions K^+ et Na^+ , la sécrétion d'ACTH (voir plus loin) et la concentration plasmatique du facteur natriurétique. Mais certains travaux (Gallo-Payet, 1993) permettent de penser que le contrôle se ferait aussi par voies autocrine et paracrine. Les effets de l'aldostérone portent sur le métabolisme hydro-ionique. Elle stimule la réabsorption des ions Na^+ dans l'urine en formation et leur retour dans le sang, particulièrement au niveau de la partie distale des tubules rénaux. Elle augmente aussi la réabsorption des ions Na^+ dans les glandes sudoripores, les glandes salivaires et dans les glandes gastriques. Étant donné qu'une réabsorption des ions de Na^+ influence une réabsorption de l'eau, ceci influencera le volume sanguin et par le fait même la pression artérielle.

L'aldostérone pénètre facilement dans la membrane cellulaire et ira se fixer à un récepteur cytoplasmique localisé sur la membrane interne de la cellule. Une fois le complexe hormone-récepteur formé, il pénètre dans le noyau afin d'initier l'augmentation de la synthèse d'ARNm. Les protéines qui seront synthétisées permettront l'augmentation de la perméabilité de la membrane luminale aux ions de Na^+ et stimuleront l'échange sodium-potassium au niveau de la pompe située à travers la membrane. Ainsi, l'aldostérone a comme fonction de réguler les concentrations d'électrolytes dans le sang et les liquides extracellulaires, surtout le Na^+ et le K^+ . Sa sécrétion est influencée par plusieurs éléments, l'élévation d'ions K^+ dans le sang, une diminution d'ions Na^+ dans le sang, une diminution du volume sanguin et de la pression artérielle. Lors du vieillissement de l'être humain, on remarque une diminution de la sécrétion d'aldostérone plasmatique, qui semble être attribuée à une diminution de l'activité de la rénine (Cugini et *al.*, 1982; Haus et *al.*, 1989).

1.6.2. Le cortisol:

Chez l'homme, le cortisol est le principal glucocorticoïde. Le cortisol est formé principalement dans la zone fasciculée de la glande surrénale. La régulation de la sécrétion du cortisol se fait par un mécanisme de rétro-inhibition négatif sur la synthèse de l'ACTH via le système hypothalamo-hypophysaire. Ainsi, les variations de la concentration plasmatique du cortisol influenceront la régulation de sa production. Cependant, il ne faut pas oublier l'influence du rythme alternatif veille-sommeil. Dans le sang, le cortisol voyage en se liant à une protéine, la CBG (*cortisosteroid binding globulin*) (Liquette, 1975).

Tout comme l'aldostérone, le cortisol va pénétrer dans la cellule jusqu'au noyau, de là il va stimuler la synthèse de protéines notamment enzymatiques, en modifiant la transcription de gènes spécifiques. Le cortisol contribue à la résistance aux cellules face à des facteurs de stress. Le cortisol est une hormone essentielle au métabolisme humain car il permet à l'organisme de s'adapter aux changements environnementaux et à la stabilisation du niveau de glycémie dans le sang lors d'ingestion de nourriture. De plus, il empêche l'eau de pénétrer dans les cellules ce qui amène un équilibre du volume sanguin. Dans le tissu hépatique, le cortisol va stimuler l'expression des enzymes qui interviennent dans la néoglucogénèse et dans le tissu adipeux, le cortisol mobilise les acides gras. Le cortisol influence aussi le système immunitaire puisqu'une augmentation de sa sécrétion par la zone fasciculée provoquera une lymphopénie. Au cours du vieillissement, les productions d'ACTH et du cortisol ne sont pas modifiées. Toutefois, chez les personnes âgées, la réponse du cortisol à l'ACTH serait augmentée (Touitou et *al.*, 1982).

1.6.3. Les androgènes:

Les principaux androgènes synthétisés dans la surrénale sont le DHEA et son dérivé sulfaté DHEAS et l'androstènedione. Chez l'homme, il n'y a que 5% de la testostérone qui

provient de la surrénale. La production de la DHEA est substantielle pendant la vie prénatale et au début de la puberté, après quoi elle diminue très rapidement (Fig. 13).

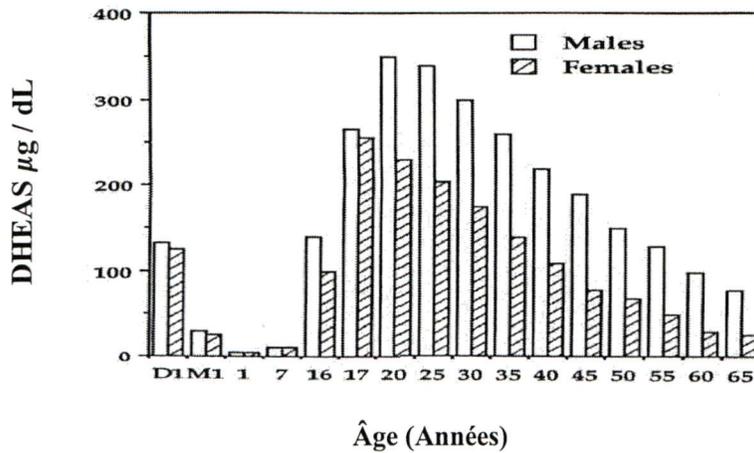


Fig.13. Variations de la concentration du DHEAS dans le plasma humain: Comparaison entre le sexe et l'âge des individus. D1, jour 1; M1, premier mois (Nafziger *et al.*, 1991).

La quantité d'androgènes, produite par la glande surrénale est très faible comparativement à celle produite par les gonades à la fin de la puberté et à l'âge adulte. Les androgènes permettent le développement des caractères sexuels et aussi ils jouent un rôle au niveau de la libido chez la femme adulte.

La régulation de la sécrétion du DHEA est contrôlée par l'ACTH mais contrairement au cortisol, les androgènes n'exercent pas de rétro-inhibition sur la synthèse d'ACTH. Les androgènes vont voyager dans le sang liés avec des protéines plasmatiques, soit l'albumine et le TeBg (*Testosterone Binding Globulin*). Le DHEA est en équilibre réversible avec le DHEAS par la présence des enzymes sulfatotransférases et sulfatases et est produit dans les surrénales ou dans les tissus hépatiques. Le DHEAS est excrété des reins, alors que le DHEA est oxydé d'une façon irréversible en androstènedione au niveau des surrénales et surtout au niveau du foie. Chez l'humain, 99% du DHEA circulant dans le sang est sulfaté et moins de 1 % du DHEA circule librement (Zumoff *et al.*, 1980).

1.7. La régulation de la sécrétion des stéroïdes surrénaliens:

1.7.1. Contrôle de la sécrétion des glucocorticoïdes et des androgènes:

Le contrôle de la sécrétion des glucocorticoïdes et des androgènes au niveau de la glande surrénale est réalisé par l'hormone adrénocorticotropine qui est sécrétée par l'hypophyse, elle-même, régulée par l'hormone corticotropine (CRH) sécrétée par l'hypothalamus. Ainsi, on peut affirmer qu'il y a une association entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales, le terme employé pour exprimer ce regroupement est *hypothalamus-pituitary-adrenal axis* (HPA). L'ACTH provient du clivage spécifique d'un peptide précurseur, soit le pro-opiomélanocortine (POMC). La liaison de l'ACTH à son récepteur membranaire des cellules de la glande surrénale amène la formation d'AMPc par l'enzyme adénylate cyclase. L'AMPc activera la protéine kinase A ce qui produira la phosphorylation de protéines telle que la phosphorylase qui est essentielle à la stéroïdogénèse et il provoque l'augmentation de la transcription des gènes qui encodent le P450c17. Lors de nos manipulations, le 8-bromo adenosine 3':5'-cyclic monophosphate sera employé afin de stimuler nos cellules au même titre que l'AMPc. Le 8-Bomo-cAMP permettra en outre d'activer l'activité 17,20-lyase dans nos cellules COS-1. L'ACTH permet la régulation de la sécrétion de l'aldostérone et des androgènes en agissant de façon tonique (Michel et *al.*, 1992).

1.7.2. Rôle du système rénine-angiotensine (SRA):

Ce système permet le contrôle de la libération de l'aldostérone au niveau de la zone glomérulée. L'aldostérone influence la pression artérielle et l'équilibre hydro-électrique du sang. Ainsi, lorsque la pression artérielle ou la concentration des solutés diminuent, causée par une déshydratation, une carence en Na^+ ou une hémorragie, les cellules rénales juxtaglomérulaires présentes dans l'artériole afférente rénale et dans la portion qui lui est

contiguë du tubule distal, vont libérer dans le sang une enzyme (protéase) nommée rénine. Cette enzyme a un poids moléculaire de 40 kDa, elle va produire une coupure dans l'angiotensinogène qui est une globuline α -plasmatique de 57 kDa produite dans le foie. Cette réaction produira un décapeptide qui est une pro-hormone inactive soit l'angiotensine I qui est présente dans les poumons, les reins et le plasma. L'angiotensine I voyage dans le sang jusqu'aux capillaires pulmonaires, où elle subira une conversion en angiotensine II. Celle-ci étant active, va permettre la libération de l'aldostérone en agissant sur les cellules glomérulées de la corticosurrénale de même que sur les autres enzymes de la stéroïdogénèse (Fig.14).

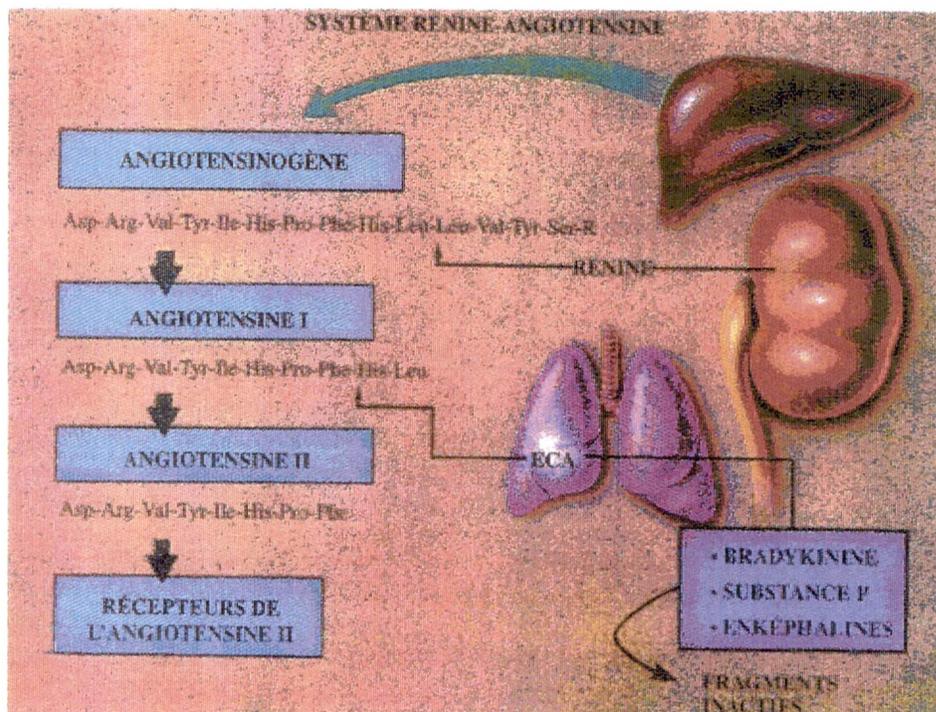


Fig.14. Le système rénine-angiotensine: Les étapes démontrant toutes les composantes nécessaires à la sécrétion de l'aldostérone .

1.8. Conclusion de l'introduction:

L'enzyme P450c17 joue un rôle très important et même vital au niveau de la stéroïdogénèse. Cependant, il est encore aujourd'hui très difficile de cibler tous les éléments entrant en jeu afin de réaliser sa régulation. On sait que l'activité 17, 20-lyase est régulée de façon extrêmement différente de l'activité 17 α -hydroxylase. Il semblerait que des événements intra-surrénaux influenceraient au plus haut niveau les activités du P450c17. Par exemple, des cellules COS-1 transfectées par une coexpression des vecteurs encodants, le P450OR (donneurs d'électrons) humain et le P450c17 humain, résultent en une augmentation de l'activité 17, 20-lyase comparativement à la 17 α -hydroxylase qui demeure semblable (Lin et *al.*, 1993). Alors qu'une cotransfection d'un vecteur qui exprime le cytochrome b₅ n'aurait aucun effet détectable sur l'activité 17, 20-lyase (Miller et *al.*, 1997). Cependant, d'autres expériences ont démontré qu'il y aurait autre chose qui influencerait les activités de la P450c17. Lors de la période de l'adrénarchie (se réfère par une augmentation à la pré-puberté du DHEA, DHEAS et androstènedione, non associés à une augmentation d'ACTH (Miller, 1998)), il a été observé qu'il y avait une augmentation de l'activité 17, 20-lyase. Mais cela ne peut être justifié par une augmentation des donneurs d'électrons car sinon on remarquerait une élévation de l'activité de l'enzyme P450c21, laquelle utilise le même donneur d'électrons pendant l'adrénarchie (Zhang et *al.*, 1995) Alors qu'est-ce qui amènerait une augmentation de l'activité lyase? Plusieurs mutations sur la P450c17 provoquées ou retrouvées naturellement chez certains sujets ont démontré que selon l'a.a. touché, ceci influençait l'une ou l'autre des activités et parfois même les deux. Par exemple, chez l'humain une mutation R347A détruit complètement l'activité 17, 20-lyase alors que l'activité 17 α -hydroxylase ne semble pas être affectée (Lin et *al.*, 1994). Comme lors de l'adrénarchie, il est impossible que la séquence en a.a. puisse changer, il faut donc supposer

qu'il y a des modifications post-traductionnelles sur le P450c17 qui influencerait le ratio 17, 20-lyase/17 α -hydroxylase. Il a été démontré que la régulation de l'activité 17, 20-lyase est dépendante d'une maturation. Cette maturation survient lors de modifications post-traductionnelles qui exécutent une phosphorylation des sérines (et partiellement des thréonines) sur le P450c17 (Zhang et al., 1995). Selon le groupe Zhang et al. (1995) la phosphorylation serait régulée dans le cortex surrénalien en réponse à un stimuli non identifié, ce mécanisme débiterait au début de l'adrénarchie. L'activité 17 α -hydroxylase demeure constante tout au long de la vie et ne demande pas de modifications post-traductionnelles pour être active.

De plus, il semble que des facteurs qui sont impliqués dans le contrôle de la sécrétion des androgènes, fonctionneraient via une régulation de protéine kinase dépendante de l'AMPc qui enverrait un signal permettant d'activer le promoteur *CYP17* à travers un mécanisme moléculaire inconnu (Löhr et Kühn-Velten, 1997). Il a été observé que des cellules traitées avec l'AMPc ont en général environ quatre fois plus de phosphorylation que les cellules non-traitées (Miller et al., 1997). Bien que le phénomène de phosphorylation provienne d'une protéine kinase dépendante de l'AMPc, il ne semble pas que ce soit par l'intermédiaire de PKC, car une incubation avec de l'ester de phorbol n'a aucun effet sur l'activité 17, 20-lyase, alors qu'une cotransfection avec le vecteur contenant la sous-unité PKA, augmente de 2 fois l'activité de la 17, 20-lyase (Miller et al., 1997). De plus, un traitement du P450c17 à la phosphatase alcaline démontre que les microsomes perdent l'activité 17, 20-lyase mais non l'activité 17 α -hydroxylase. Ceci n'a aucun effet sur l'activité du P450OR et ce traitement ne détruit pas le P450c17 et ne diminue pas l'affinité pour ses substrats (Miller et al., 1997). Par ailleurs, le rôle de la phosphorylation ne serait pas seulement au niveau de la stimulation de la stéroïdogénèse, de l'efficacité du P450c17 à se lier avec ses ligands, mais aussi elle aurait un rôle secondaire dans l'inactivation et la dégradation du P450c17. Par

conséquent, une phosphorylation sur les sérines et thréonines du P450c17, augmenterait l'affinité du P450c17 pour le P450OR ainsi que pour les substrats et la 17, 20-lyase serait plus efficace.

On sait que les activités de l'enzyme P450c17 sont contrôlées par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. Chez l'humain, le P450c17 est phosphorylé sur des sérines et des thréonines et, cette phosphorylation serait obtenue par l'action des PKC alpha et zêta. De plus, l'expression de l'enzyme P450c17 est étroitement régulée par l'ATCH.

1.9. Objectifs des travaux de recherche:

Les objectifs de départ des travaux de recherche sont 1) réaliser le clonage de l'enzyme P450c17 humaine à partir de l'ARNm de surrénales fœtales humaines et de cellules H295R; 2) trouver une méthode afin de réaliser la purification de la protéine avec le plus haut niveau de pureté; 3) identifier les sites de phosphorylation sur la séquence protéique de l'enzyme P450c17 humaine; 4) vérifier si les isoformes de PKC peuvent activer la phosphorylation dépendante des enzymes P450c17.

Par l'entremise des résultats obtenus, il sera possible de poursuivre les travaux afin de réaliser les objectifs 3 et 4. Afin de connaître les a.a. jouant un rôle primordial dans l'activation de la P450c17, de savoir quel type de protéine kinase joue un rôle significatif et à long terme, d'arriver à comprendre le phénomène de l'adrénarchie et de faire un lien avec le syndrome polykystique ovarien.

MATÉRIEL ET MÉTHODES:

2.1. Préparation du clone P450c17:

2.1.1. Extraction d'ARN:

L'ARN a été extrait de glandes surrénales foetales, obtenues à partir d'avortements thérapeutiques. Le poids des glandes surrénales était de 100 mg et le foetus âgé de 18 semaines. Tout d'abord, les glandes surrénales ont été pulvérisées à l'aide d'un marteau et, par la suite, il y a ajout de 2100 μ l de tampon RLT (Qiagen). Le lysat est déposé sur des colonnes *QIAshredder* (Qiagen) (700 μ l/colonne) afin de subir une deuxième homogénéisation. Dans chaque lysat obtenu, il y a addition de β -mercaptoéthanol (β -ME) à 14.5 M (10 μ l β -ME pour 1 ml de tampon RLT), puis le lysat est passé 5 fois à travers une seringue de 20-G. Par la suite, le protocole accompagnant les *Rneasy spin column (Rneasy® Mini handbook)* (Qiagen) a été suivi. Une modification a été amenée à l'étape #6, le volume du tampon RW1 est de 350 μ l au lieu de 700 μ l, suivi d'une centrifugation de 15 sec à vitesse maximale. Cette modification est réalisée car il y aura un traitement à la DNase, soit l'ajout de 40 μ l de DNase I et de 240 μ l de tampon RDD, avec incubation de 15 min sur la colonne. Puis, il y a addition de 350 μ l de tampon RW1 suivi d'une centrifugation de 15 sec à 15000 x g. Après le traitement, le protocole fut suivi de nouveau, soit l'étape #7. Pour plus d'informations sur le traitement, se référer au protocole *Rnase-Free DNase Set Protocol* (Qiagen). L'élution de l'ARN fut réalisée avec un volume de 50 μ l d'eau *RNase-free*. Les échantillons ont été dosés à l'aide du spectrophotomètre et visualisés sur un gel d'agarose (section 2.1.2.). Pour ce qui est de l'extraction de l'ARN des cellules H295R, les cellules ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits, chaque puits ayant 800 000 cellules. Par la suite, elles ont été traitées avec 1 mM de *8-bromo adenosine 3':5'-cyclic monophosphate* (Sigma) (8-Bomo-cAMP) pendant 16 heures. Ce traitement permet une augmentation de la

transcription des gènes qui encodent le P450c17 et stimulent l'activité 17,20-lyase. Chaque puits a été gratté avec 350 μl de tampon RLT et passé sur une colonne *QIAshredder* (Qiagen), voir le protocole (*Rneasy*[®] *Mini handbook*) (Qiagen) pour la suite des étapes. Le lysat des cellules H295R a été traité à la DNase, les quantités étaient de 10 μl de DNase I et 70 μl de tampon RDD, voir ci-haut pour la suite des étapes.

2.1.2. Dosage de l'ADN et de l'ARN:

Le dosage de l'ARN et de l'ADN est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour ce qui est de l'ARN, un facteur de dilution de 50 est appliqué et 1 ml de cette dilution est utilisé afin de prendre la lecture. Pour l'ADN, le facteur de dilution est de 200 et 1 ml est utilisé. Deux lectures sont prises, une DO de 260 nm et une DO à 280 nm. Le rapport utilisé afin de connaître le nombre de ng compris dans l'échantillon est $1\text{DO}_{260\text{ nm}} = 40\text{ ng}/\mu\text{l}$ pour ce qui est de l'ARN et de $1\text{DO}_{260\text{ nm}} = 50\text{ ng}/\mu\text{l}$ pour ce qui est de l'ADN.

Le dosage peut aussi être réalisé sur gel d'agarose pour les échantillons d'ADN en déposant des volumes différents, soit 2 μl et 4 μl . De plus, on applique 4 μl de différentes concentrations de *Lambda DNA-Hind III digest* (Amersham Pharmacia Biotech), soit 0.5 μg , 1 μg , 2 μg . En comparant les bandes de nos échantillons avec une bande de même intensité et avec le même nombre de pb; il est possible en se référant au document obtenu à l'achat de *Lambda DNA-Hind III digest*, de calculer le pourcentage correspondant à chacune des bandes et de déterminer le nombre de ng contenu dans l'échantillon.

2.1.3. Préparation de gel d'agarose :

Un gel 0.8% agarose est utilisé pour l'ARN. L'agarose est dissoute dans une solution TAE 1X (40 mM Tris-acétate, 2 mM EDTA) traitée avec 1% de DEPC (Diéthyl pyrocarbonate). Le gel subit une agitation pendant 8 heures, et, par la suite, il est autoclavé

pendant 15 min. Après, il y a ajout de 1.5 μ l de bromure d'éthidium [10 mg/ml]/ 35 ml de volume de gel. Le gel est coulé dans un appareil d'électrophorèse préalablement lavé dans une solution de détergent de 0.5% SDS. L'appareil est rincé à l'eau et séché à l'éthanol 95%, puis il est trempé dans 3% de peroxyde pendant 10 min.

La préparation des échantillons consiste à prendre 0.5 μ g d'ARN et d'ajouter 4 μ l d'une solution colorante autoclavée (50% de glycérol, 1 mM EDTA et 0.25% de bleu de bromophénol) et 2 μ l de TAE 1X. Les échantillons sont déposés sur le gel et il y a migration à 40 V pendant 1½ heure dans un tampon d'électrophorèse autoclavé, fait de TAE 1X.

Pour les échantillons d'ADN selon le nombre de pb, le pourcentage du gel d'agarose sera variable, soit 1%, 2% ou 3%. On dissout l'agarose dans le tampon TAE 1X et il y a ajout de 1.5 μ l ou 5 μ l de bromure d'éthidium [10 mg/ml]/ 35 ml ou 110 ml de volume de gel. Le gel est coulé dans un appareil d'électrophorèse non traité et la migration est réalisée à 125 V, à des temps variables entre ½ -1 heure, dans un tampon TAE 1X. La solution colorante utilisée est constituée de 50% glycérol, TAE 1X et 0.4% de bleu de bromophénol et, elle est diluée 50 fois. Environ 2 μ l est ajouté aux échantillons. Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont le *1kb ladder* (Invitrogen) et le *100 pb ladder* (New England Biolabs).

2.1.4. Réaction de transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR):

Sur l'ARNm extrait, une RT-PCR fut obtenue à l'aide de la trousse *C.ther.Polymerase One-Step RT-PCR System* (Roche). Le protocole de la compagnie a été suivi, le volume des réactions a été divisé en deux afin d'avoir plus de réactifs pour des expériences subséquentes. La concentration d'ARN utilisée est de 0.296 μ g/ μ l (pour l'ARN foetal) et 0.467 μ g/ μ l (l'ARN des H295R). Le nom des oligos est RT-PCRC17Hum5'(4) et RT-PCRC17Humrev3'(5) et l'inhibiteur de la *Rnase* est le *RNAguardTM Rnase Inhibitor*

(Amersham Pharmacia Biotech) Les deux oligos (4) et (5) amplifieront la séquence complète du P450c17, soit 1527pb. Les conditions employées sont une RT de 72°C afin d'éliminer les structures secondaires, suivie d'une PCR. Le cycle thermique est de 94°C 2 min (dénaturation). Par la suite, 30 cycles sont exécutés comme suit: 30 sec à 94°C, 30 sec à 66°C (hybridation) et 1min 45 sec à 72°C (polymérisation), finalement, 7 min à 72°C. La RT-PCR fut visualisée par gel d'agarose. La RT-PCR a été passée sur une colonne provenant de la trousse *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen). Le protocole de la compagnie a été suivi.

Par la suite, une PCR sur l'éluat de la RT-PCR, a été exécutée afin d'amplifier l'ADN obtenu et éliminer le codon stop de la séquence. Les oligos sont PCRHumC17 5'(1) et PCRHumC17(3)3'Rev. Le mélange pour la réalisation de la PCR est: 1 µl d'ADN élué, 0.15 mM de chacun des dNTPs, 30 pmol d'oligo, 5 µl de tampon PCR 10X contenant MgSO₄, le volume est complété à 50 µl avec H₂O. Le cycle thermique est de 94°C, 5 min (dénaturation), après il y a ajout de 2.5 U (5 U/µl) d'enzyme PWO (Roche). Par la suite, 30 cycles sont exécutés comme suit: 30 sec à 94°C, 30 sec à 70°C (hybridation) et 1 min 45 sec à 72°C (polymérisation). Finalement, 10 min à 72°C. Le produit de la PCR fut visualisé par gel d'agarose.

N.B. Pour connaître la séquence des oligos, voir la liste des oligos à la Table. 1 ainsi que la séquence complète du clone P450c17 Table.2.

2.1.5. Modification aux extrémités de l'insert:

Une fois la PCR amplifiée, prendre 25 µl, additionner 0.7-1 U de Taq (Amersham Pharmacia Biotech) et incuber à 72°C de 8-10 min. Ceci permettra de faire l'ajout d'un nucléotide A à chacune des extrémités de la séquence afin de la liguer dans son vecteur. Ce protocole est basé sur l'appendice décrite dans le catalogue d'Invitrogen section *Addition of 3'-A overhangs following PCR amplification*.

2.1.6. Insertion de l'insert P450c17 dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®]:

L'ADN P450c17, ayant subi le traitement à la Taq, est maintenant prêt à être ligué dans le vecteur. Le protocole (Invitrogen) a été suivi à la lettre; il est à spécifier que 3 μ l de produit de PCR a été employé. Par la suite, une transformation dans les cellules rendues compétentes TOP10 a été faite. Le tout fut étalé sur des boîtes de Pétri LB ampicilline [100 mg/ml de LB].

N.B. Voir en Fig.15 le site d'insertion de l'insert dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®].

2.1.7. Préparation de l'ADN:

Les colonies piquées sur une boîte de Pétri sont incubées dans 5 ml de LB ampicilline [100 mg/ml] toute la nuit, avec agitation à 37°C. Par la suite, il y a eu utilisation de la trousse *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* (Qiagen), aucun changement au protocole. Pour les grandes quantités d'ADN à préparer, une colonie est piquée le matin et incubée dans 5 ml LB ampicilline [100 mg/ml] toute la journée, aux mêmes conditions vues ci-haut. Vers la fin de l'après-midi, le tout est versé dans 100 ml de LB ampicilline [100 mg/ml] pendant toute la nuit. Le lendemain, il y a utilisation de *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). Modifications aux protocoles: le culot obtenu suite à la précipitation avec l'isopropanol (étape #13) est resuspendu dans 300 μ l de TE (1 mM EDTA pH 8.0 et 0.01 M Tris-HCl pH 8.0) et centrifugé 5 min à 15000 x g. Le surnageant est transféré dans un autre tube à centrifugation où l'ADN est précipité à l'éthanol. La précipitation constitue en l'ajout de 5 M NaCl pour obtenir une concentration finale de 0.2 M NaCl et de 2.5, le volume en éthanol 95%. L'ADN est placé à -80°C pendant 30 min et le tube est centrifugé à 15000 g pendant 20 min. Le surnageant est retiré et il y a ajout d'éthanol 70% (1 ml) et recentrifugation. Le surnageant est enlevé et le culot est resuspendu dans du TE. Le dosage de l'ADN se fait à l'aide du spectrophotomètre.

2.1.8. Contrôle de la positivité des clones P450c17:

Des digestions sont réalisées sur l'ADN avec l'enzyme *Acc* III (Promega), soit 4 U/ μg d'ADN, afin de déterminer la présence ou non de l'insert (séquence de 1527 pb de P450c17) dans les clones. De plus, une fois les clones positifs observés, une deuxième digestion s'impose cette fois-ci, avec l'enzyme *Xba* I (Amersham Pharmacia Biotech). Ceci donnera le sens de l'insert selon le nombre de pb de la bande, soit dans le bon sens 1262 pb et le mauvais sens 343 pb. Toutes les digestions sont visualisées sur gel d'agarose.

2.1.9. Séquençage du clone P450c17 à double brin:

Toutes les différentes méthodes de séquençages utilisées s'appuient sur le principe décrit par Sanger et ses collaborateurs. Le séquençage manuel fut réalisé avec la trousse *T7 DNA polymerase sequencing kit* (USB). Le protocole ne provient pas de la trousse: l'ADN (2 μl [3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]) est tout d'abord dénaturé avec 2 μl de NaOH (2 N) et 6 μl H₂O. Ceci est incubé 5 min à la température de la pièce. Il y a ajout de 2 μl d'oligo (20 ng/ μl), de 9 μl de KOAc (1.0 M, pH 4.5), et de 60 μl d'éthanol 95% et le tout est vortexé. La précipitation se fait à -80°C pendant 10 min et le tout est centrifugé 15 min à 15 000 rpm. Le culot est lavé avec 70% d'éthanol (1 ml). Par la suite, le culot est séché 5 min au *speed vacuum* à la température de la pièce et resuspendu dans 14 μl tampon d'appariement dilué (2:12) avec H₂O. La réaction de marquage est constituée du mélange suivant, pour une réaction: 1 μl d'H₂O, 3 μl d'un mélange de marquage dATP, 1 μl de [α -³⁵S]dATP [10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$] (Amersham Pharmacia Biotech) et 2 μl d'enzyme diluée dans son tampon (1.5 U/ μl). À ce mélange, est ajouté 7 μl d'une solution d'appariement et ceci est gardé à la température de la pièce 5 min. L'étape de la terminaison constitue en l'addition de 4.5 μl du mélange incubé précédemment à 2.5 μl de chacun des mélanges des didésoxynucléotides (court) ddGTP, ddATP, ddTTP et ddCTP. Cette réaction est incubée 10 min à 37°C. Les réactions sont arrêtées par l'addition

de 5 μl d'un tampon d'arrêt. Le séquençage (partiel) d'un seul didésoxynucléotide, soit le A ou le T est aussi réalisé lors de corrections de mutations (voir la section s'y rapportant), ceci permet d'analyser un grand nombre de clones. Le protocole demeure le même sauf que les éléments sont diminués de moitié et, au moment de la terminaison il y a addition de 7 μl du mélange contenant la solution de marquage et la solution d'appariement dans 5 μl didésoxynucléotide ddTTP ou ddATP.

Lors de problèmes de compression avec les nucléotides C ou G, la trousse *T7 sequenase 7-deaza-dGTP sequencing kit* (USB) est employée. Les étapes demeurent semblables à celles du séquençage conventionnel, sauf que l'oligo n'est pas ajoutée dès le départ et elle est remplacée par 2 μl H₂O. Une fois la précipitation réalisée, le culot est resuspendu dans 5.0 μl H₂O + 2 μl DMSO, 0.5 μl d'oligo (20 ng/ μl), 2 μl de *sequenase reaction buffer*, le tout est placé 2 min à 65°C et après, le mélange est refroidi lentement de 15 à 30 min ou jusqu'à ce que la température atteigne environ 37°C. La réaction de marquage est toutefois différente de celle de l'autre protocole. Il y a 1 μl de 0.1 M DTT, 2 μl de solution de marquage dATP (dilué 1/5 avec H₂O), 0.5 μl de [α -³⁵S]dATP [10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$] (Amersham Pharmacia Biotech) et 2 μl de *Sequenase version 2.0* dilué avec son tampon 1/8. Le tout est ajouté à 10 μl d'*annealing* et gardé 5 min à la température de la pièce. L'étape de terminaison est la même, excepté que 3.5 μl au lieu de 4.5 μl sont additionnés aux déazadidésoxynucléotides (court). Pour la dernière étape, il y a addition de 4 μl de tampon d'arrêt.

Quand les échantillons sont prêts, ils sont chauffés à 80°C pendant 2 min et placés sur la glace. Quatre μl de chacun des didésoxynucléotides sont déposés sur le gel (5% acrylamide /7 M urée) où les puits ont été préalablement lavés avec du tampon TBE 0.6X (54 mM Tris-Borate, 1.2 mM EDTA, pH 8.0). La migration du gel s'effectue à 2000 V, pendant 2 à 6 heures selon que ce soit une longue ou courte migration. Le gel est déposé sur un papier

Whatman 3MM, recouvert d'une pellicule de chlorure de polyvinyle et séché sous-vide à 80°C pendant environ une heure.

Le séquençage automatique a aussi été employé; la trousse *ALF expressTM autoreadTM sequencing kit* (Amersham Pharmacia Biotech) a été utilisée. La procédure C du protocole a été appliquée, celui-ci est retrouvé sur le site internet suivant: <http://autodna.apbiotech.com/method/plseq/plseq-03.htm>. Le ratio d'ADN 8 µg /300 pM d'oligo est employé. Le *ALF expressTM dATP labelling mix* (Amersham Pharmacia Biotech) est le réactif de marquage utilisé. L'appareil employé est le ALFwinTM Sequence Analyser 2.00 de la compagnie (Amersham Pharmacia Biotech). Le gel d'électrophorèse est de 6% acrylamide et 7 M urée. Le tampon de migration est le TBE 0.6X et la migration est réalisée pendant 1000 min à une température de 55°C.

D'autres séquençages ont été réalisés par le service de séquençage de l'IPS (LI-COR®) situé à la faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke, les oligos utilisées étaient BGH reverse (oligo commerciale) et T7 (oligo commerciale). Au laboratoire d'analyse et de synthèse d'acides nucléiques de l'Université Laval à Québec, les oligos utilisées sont T7 (oligo commerciale) et Seq.Humc17(1r) (+50 pb).

N.B. Pour ce qui concerne les oligos utilisées lors des séquençages manuels et automatiques, se référer à la liste en Table.1 les oligos portent toutes le même nom, Seq.Humc17. Pour connaître leur localisation sur le plasmide voir Table.2.

Nom de l'oligos:	Séquence:	TM (°C)
PCRHumc17 5'(1)	ATG TGG GAG CTC GTG GCT C	62
RT-PCRC17Hum5'(4)	ATG TGG GAG CTC GTG GCT CTC TTG	76
RT-PCRC17Humrev3'(5)	TTA GGT GCT ACC CTC AGC CCT GGG C	78
PCRHumc17(3)3'Rev	GGT GCT ACC CTC AGC CTG G	64
Seq.Humc17(1) (-50pb)	GCT TGG TAC CGA GCT C	52
Seq.Humc17(2) (400pb)	CTG TTC AAG GAT GGC G	50
Seq.Humc17(3) (800pb)	TGC AAG CCA AGA TGA AC	50
Seq.Humc17(4) (1200pb)	TCA CAA TGA GAA GGA GTG	52
Seq.Humc17(1r) (+50pb)	TCT AGA CTC GAG CGG C	52
Seq.Humc17(2r) (1200pb)	CAC TCC TTC TCA TTG TGA	52
Seq.Humc17(3r) (800pb)	GTT CAT CTT GGC TTG CA	50
Seq.Humc17(4r) (400pb)	CGC CAT CCT TGA ACA G	50
Seq.Humc17(5) (521pb)	CGG TAA CCA ATG TCA TC	50
Seq.Humc17(6) (771pb)	CTC TAT CAC CAA CAT GC	50
Seq.Humc17(7) (1018pb)	CGC ACA CCA ACT ATC AG	52
Seq.Humc17(8) (1268pb)	CCC AGC TCA TCT CAC C	52
Seq.Humc17(9) (228pb)	CGG CCA CCA CCA GC	50
Seq.Humc17(10) (557pb)	CCT CCT ACA AGA ATG GG	52
Seq.Humc17(11) (369pb)	GCA TCG AAG GCT GGC	50
Seq.Humc17(12) (801pb)	GCA AGC CAA GAT GAA CTC	54
Seq.Humc17(13) (356pb)	CAC ACT GGC AGC TGC	50
Seq.Humc17(14) (2626pb)	GGC TGA TCA GCG GG	48
Seq.Humc17(1842pb)	GGG GAC ATC TTT GGG G	52
Seq.Humc17rev (2110pb)	GCC CTT GTC CAC AGC	52
PCRmut(1)	CCC TGG TTG AAG ATT TTC CC	60
PCR1Mut(2)rev	GCC CCA AAG ATG TCC CC	56
PCR1Mut(3)	GGG GAC ATC TTT GGG GC	56
PCR2Mut(5)rev	GGC CAG GGT CCA TTT AAC C	60
PCR2Mut(6)	GGT TAA ATG GAC CCT GGC C	60
PCR3Mut(7)rev	GGA GCG AGG TCC TGC TCC	62
PCR3Mut(8)	GGA GCA GGA CCT CGC TCC	62
PCRmut(4)rev	CCG AGG AGA GGG TTA GGG	60

Table 1. Liste de tous les oligonucléotides employés pour la construction du clone P450c17: Les oligonucléotides dont leur nom commence par RT-PCR, ont servi à l'élaboration de la RT-PCR et ceux ayant PCR ont servi à la réalisation de la PCR avec l'enzyme PWO. Tous ceux ayant au début de leur nom SEQ, ont été utilisés pour le séquençage. Le numéro de pb indique l'endroit retrouvé sur la séquence. Pour la correction des mutations, les oligos portent tous le nom PCRmut et les nucléotides soulignés représentent ceux qui sont à réintégrer ou à modifier dans le clone P450c17. Les oligonucléotides sont lus de 5' vers 3'. Ils sont fabriqués chez Gilco BRL Custom Primers.

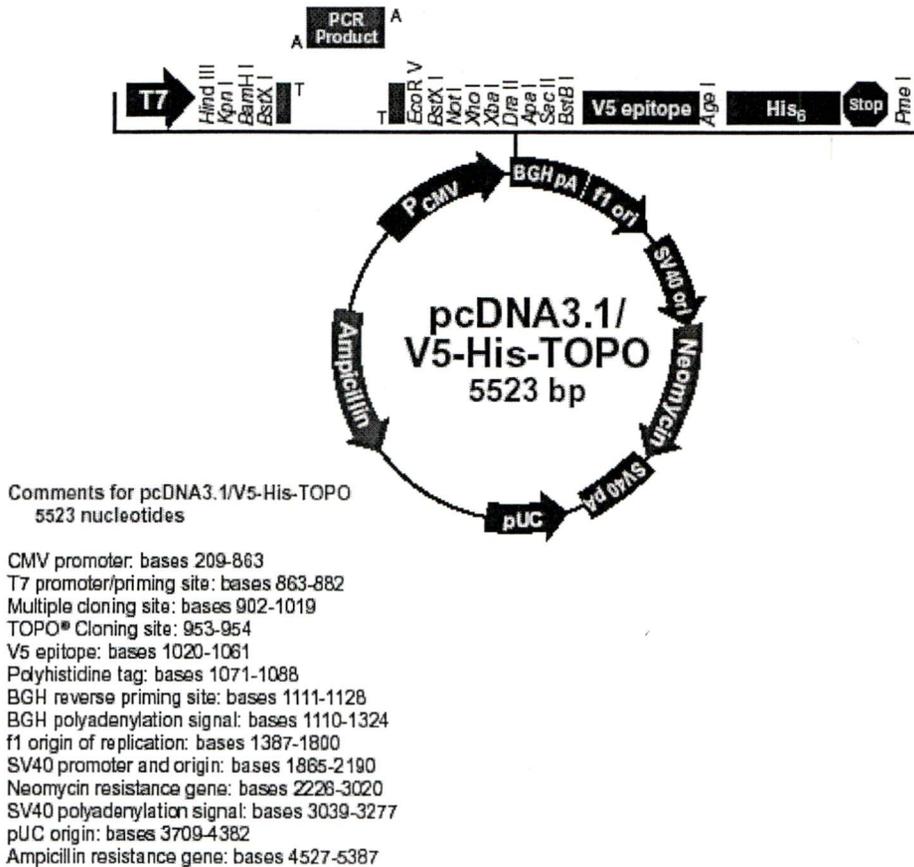


Fig.15. Plasmide pCDNA3.1/V5-His-TOPO: Ce plasmide est utilisé pour les transfections transitoires dans les cellules eucaryotes. Il possède deux épitotes pouvant être employés à l'isolation et à la purification de la protéine. Ce vecteur est linéarisé entre 953 pb et 954 pb pour permettre l'insertion du produit de PCR.

pcDNA3.1/V5-His-TOPO-humP450c17

```

1   GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCGACTCT CAGTACAATC
   CTGCCTAGCC CTCTAGAGGG CTAGGGGATA CCAGCTGAGA GTCATGTTAG
51  TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT
   ACGAGACTAC GGCATATCAA TTCGGTCATA GACGAGGGAC GAACACACAA
101 GGAGGTCGCT GAGTAGTGGC CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG
   CCTCCAGCGA CTCATCACGC GCTCGTTTMA AATTCGATGT TGTTCCGTTT
151 GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG
   CGAACTGGCT GTTAACGTAC TTCTTAGACG AATCCCAATC CGCAAAACGC
201 CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT GATTATTGAC
   GACGAAGCGC TACATGCCCG GTCTATATGC GCAACTGTAA CTAATAACTG
251 TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
   ATCAATAATT ATCATTAGTT AATGCCCCAG TAATCAAGTA TCGGGTATAT
301 TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG
   ACCTCAAGGC GCAATGTATF GAATGCCATT TACCGGGCGG ACCGACTGGC
351 CCCAACGACC CCCGCCCATF GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
   GGGTTGCTGG GGGCGGGTAA CTGCAGTTAT TACTGCATAC AAGGGTATCA
401 AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAC TATTTACGGT
   TTGCGGTTAT CCCTGAAAGG TAACTGCAGT TACCCACCTG ATAAATGCCA
451 AAAGTGCCCA CTGCGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCCC
   TTTGACGGGT GAACCGTCAT GTAGTTCACA TAGTATACGG TTCATGCGGG
501 CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
   GGATAACTGC AGTTACTGCC ATTTACCGGG CGGACCGTAA TACGGGTCAT
551 CATGACCTTA TGGGACTTTC CTAATTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
   GTACTGGAAT ACCCTGAAAG GATGAACCGT CATGTAGATG CATAATCAGT
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
   AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG TCATGTAGTT ACCCGCACCT
651 TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
   ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTTCA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT
701 TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGAATTTCCA AAATGTCGTA
   ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC CCTGAAAGGT TTTACAGCAT
751 ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
   TGTGAGGCG GGGTAACTGC GTTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC
801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
   CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC
                                     T7 100.0%
851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGT
   CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCA
   Seq.Humc17(1) (-50pb)
901 TAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCACTAG TCCAGTGTGG TGGAATTGCC
   ATTGCAACCA TGGCTCGAGC CTAGGTGATC AGGTCACACC ACCTTAACGG
   RT-PCRC17Hum5'(4) 100.0%
951 CTTATGTGGG AGCTCGTGCC TCTCTTGCTG CTTACCCTAG CTTATTTGTT
   GAATACACCC TCGAGCACCG AGAGAACGAC GAATGGGATC GAATAAACAA
1001 TTGGCCCAAG AGAAGGTGCC CTGGTGCCAA GTACCCCAAG AGCCTCCTGT
   AACCGGGTTC TCTTCCACGG GACCACGGTT CATGGGGTTC TCGGAGGACA
1051 CCCTGCCCTT GGTGGGCAGC CTGCCATTCC TCCCAGACA TGGCCATATG
   GGGACGGGGA CCACCCGTCG GACGGTAAGG AGGGTCTGT ACCGGTATAC
1101 CATAACAAC TCTTCAAGCT GCAGAAAAA TATGGCCCA TCTATTCTGT
   GTATTGTTGA AGAAGTTCGA CGTCTTTTTT ATACCGGGGT AGATAAGACA

```

pcDNA3.1/V5-His-TOPO-hump450c17

Seq.Humc17(9) (228pb)

1151 TCGTATGGGC ACCAAGACTA CAGTGATTGT CGGCCACCAC CAGCTGGCCA
AGCATACCCG TGGTCTGAT GTCAC TAACA GCCGGTGGTG GTCGACCGGT

1201 AGGAGGTGCT TATTAAGAAG GGCAAGGACT TCTCTGGGCG GCCTCAAATG
TCCTCCACGA ATAATCTTC CCGTTCCTGA AGAGACCCGC CGGAGTTTAC

1251 GCAACTCTAG ACATCGCGTC CAACAACCGT AAGGGTATCG CCTTCGCTGA
CGTTGAGATC TGTAGCGCAG GTTGTGGCA TTCCCATAGC GGAAGCGACT

Seq.Humc17(13) (356pb)

Seq.Humc17(11) (369pb):

1301 CTCTGGCGCA CACTGGCAGC TGCATCGAAG GCTGGCGATG GCCACCTTTG
GAGACCGCGT GTGACCGTCG ACGTAGCTTC CGACCGCTAC CGGTGGAAAC

Seq.Humc17(2) (400pb)

1351 CCCTGTTCAA GGATGGCGAT CAGAAGCTGG AGAAGATCAT TTGTCAGGAA
GGGACAAGTT CCTACCGCTA GTCTTCGACC TCTTCTAGTA AACAGTCCTT

Seq.Humc17(4r) (400pb)

1401 ATCAGTACAT TGTGTGATAT GCTGGCCACC CACAACGGAC AGTCCATAGA
TAGTCATGTA ACACACTATA CGACCGGTGG GTGTTGCCTG TCAGGTATCT

Seq.Humc17(5) (521pb) 10f

1451 CATCTCCTTT CCTGTCTTCG TGGCGGTAAC CAATGTCATC TCCTTGATCT
GTAGAGGAAA GGACAGAAGC ACCGCCATTG GTTACAGTAG AGGAACTAGA

Seq.Humc17(10) (557pb) 1f

1501 GCTTCAATAC CTCCTACAAG AATGGGGACC CTGAGTTGAA TGTCATACAG
CGAAGTTATG GAGGATGTTT TTACCCCTGG GACTCAACTT ACAGTATGTC

1551 AATTACAATG AAGGCATCAT AGACAACCTG AGCAAAGACA GCCTGGTGGAA
TTAATGTTAC TTCCGTAGTA TCTGTTGGAC TCGTTTCTGT CGGACCACCT

PCRmut(1) 100.0%

1601 CCTAGTCCCC TGGTTGAAGA TTTTCCCCAA CAAAACCCTG GAAAAATTAA
GGATCAGGGG ACCAACTTCT AAAAGGGGTT GTTTTGGGAC CTTTTTAATT

1651 AGAGCCATGT TAAAATACGA AATGATCTGC TGAATAAAAT ACTTGAAAAT
TCTCGGTACA ATTTTATGCT TTAAGGACG ACTTATTTTA TGAACCTTTA

Seq.Humc17(6) (771pb) 10f

1701 TACAAGGAGA AATCCGGAG TGACTCTATC ACCAACATGC TGGACACACT
ATGTTCCCTCT TTAAGGCCTC ACTGAGATAG TGGTTGTACG ACCTGTGTGA

Seq.Humc17(12) (801pb) 10f

Seq.Humc17(3) (800pb) 1

1751 GATGCAAGCC AAGATGAACT CAGATAATGG CAATGCTGGC CCAGATCAAG
CTACGTTCCG TTCTACTTGA GTCTATTACC GTTACGACCG GGTCTAGTTC

Seq.Humc17(3r) (800pb)

Seq.Humc17 (1842pb)

PCR1Mut(3) 10f

1801 ATTCAGAGCT GCTTTCAGAT AACCACATTC TCACCACCAT AGGGGACATC
TAAGTCTCGA CGAAAGTCTA TTGGTGTAAG AGTGGTGGTA TCCCCTGTAG

PCR1Mut(2) rev 1C

Seq.Humc17 (1842pb)

PCR1Mut(3) 10f

PCR2Mut(6) 100.0%

1851 TTTGGGGCTG GCGTGGAGAC CACCACCTCT GTGGTTAAAT GGACCCTGGC
AAACCCCGAC CGCACCTCTG GTGGTGGAGA CACCAATTTA CCTGGGACCG

PCR1Mut(2) rev 1C

PCR2Mut(5) rev 100.0%

pcDNA3.1/V5-His-TOPO-humP450c17

	<u>PCR2Mut(6) 10C</u>			
1901	CTTCCTGCTG	CACAATCCTC	AGGTGAAGAA	GAAGCTCTAC
	GAAGGACGAC	GTGTTAGGAG	TCCACTTCTT	CTTCGAGATG
				CTCCTCTAAC
	PCR2Mut(5) rev 1C			
			<u>Seq. Humc17(7) (1081pb)</u>	
1951	ACCAGAATGT	GGGTTTCAGC	CGCACACCAA	CTATCAGTGA
	TGGTCTTACA	CCCAAAGTCG	GCGTGTGGTT	GATAGTCACT
				GGCATTGGCA
2001	CTCCTCCTGC	TGGAGGCCAC	CATCCGAGAG	GTGCTTCGCC
	GAGGAGGACG	ACCTCCGGTG	GTAGGCTCTC	CACGAAGCGG
				AGTCCGGGCA
2051	GGCCCTATG	CTCATCCCC	ACAAGGCCAA	CGTTGACTCC
	CCGGGGATAC	GAGTAGGGGG	TGTTCCGGTT	GCAACTGAGG
				TCGTAGCCAC
2101	AGTTTGCTGT	GGACAAGGGC	ACAGAAGTTA	TCATCAATCT
	TCAAACGACA	CCTGTTCCCG	TGTCTTCAAT	AGTAGTTAGA
				CACCCGCGAC
	Seq. Humc17rev(2110pb)			
	<u>Seq. Humc17(4) (1200pb) 10C</u>			
2151	CATCACAATG	AGAAGGAGTG	GCACCAGCCG	GATCAGTTCA
	GTAGTGTAC	TCTTCCTCAC	CGTGGTCCGC	CTAGTCAAGT
				ACGGACTCGC
	Seq. Humc17(2r) (1200pb) 1			
			<u>Seq. Humc17(8) (1268pb)</u>	
2201	TTTCTTGAAT	CCAGCGGGGA	CCCAGCTCAT	CTCACCGTCA
	AAAGAACTTA	GGTCGCCCCCT	GGGTCGAGTA	GAGTGGCAGT
				CATTCGATAA
	PCR3Mut(8) 100.0%			
2251	TGCCCTTCGG	AGCAGGACCT	CGCTCCTGTA	TAGGTGAGAT
	ACGGGAAGCC	TCGTCTGGA	GCGAGGACAT	ATCCACTCTA
				GGACCGGGCG
	PCR3Mut(7)rev 100.0%			
2301	CAGGAGCTCT	TCCTCATCAT	GGCCTGGCTG	CTGCAGAGGT
	GTCCCTGAGA	AGGAGTAGTA	CCGGACCGAC	GACGTCTCCA
				AGCTGGACCT
2351	GGTGCCAGAT	GATGGGCAGC	TGCCCTCCCT	GGAAGGCATC
	CCACGGTCTA	CTACCCGTCG	ACGGGAGGGA	CCTTCCGTAG
				GGGTTCACC
2401	TCTTTCTGAT	CGACTCTTTC	AAAGTGAAGA	TCAAGGTGCG
	AGAAAGACTA	GCTGAGAAAG	TTTCACTTCT	AGTTCCACGC
				GGTCCGGACC
2451	AGGGAAGCCC	AGGCTGAGGG	TAGCACCAAG	GGCAATTCTG
	TCCCTTCGGG	TCCGACTCCC	ATCGTGGTTC	CCGTTAAGAC
				GTCTATAGGT
	RT-PCRcl7Humrev3'(5) 76.0%			
2501	GCACAGTGGC	GGCCGCTCGA	GTCTAGAGGG	CCC GCGGTTTC
	CGTGTCACCG	CCGGCGAGCT	CAGATCTCCC	GGGCGCCAAG
				CTTCCATTCG
	Seq. Humc17(1r) (+50pb)			
2551	CTATCCCTAA	CCCTCTCCTC	GGTCTCGATT	CTACGCGTAC
	GATAGGGATT	GGGAGAGGAG	CCAGAGCTAA	GATGCGCATG
				GCCAGTAGTA
	PCRMut(4)rev 100.0%			
2601	CACCATCACC	ATTGAGTTTA	AACCCGCTGA	TCAGCCTCGA
	GTGGTAGTGG	TAACTCAAAT	TTGGGCGACT	AGTCGGAGCT
				GACACGGAAG
	Seq. Humc17(14) (2626pb)			
2651	TAGTTGCCAG	CCATCTGTTG	TTTGCCCTC	CCCCGTGCCCT
	ATCAACGGTC	GGTAGACAAC	AAACGGGGAG	GGGGCACGGA
				AGGAACTGGG
2701	TGGAAGGTGC	CACTCCCACT	GTCTTTTCCT	AATAAAATGA
	ACCTTCCACG	GTGAGGGTGA	CAGGAAAGGA	TTATTTTACT
				CCTTTAACGT
2751	TCGCATTGTC	TGAGTAGGTG	TCATTCATAT	CTGGGGGGTG
	AGCGTAACAG	ACTCATCCAC	AGTAAGATAA	GACCCCCCAC
				CCCACCCCGT

Table 2. Représentation d'une partie de la séquence du clone P450c17 et du vecteur: Les oligonucléotides sont localisés sur la séquence double brin.

2.2. Correction de mutations du clone P450c17:

2.2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR):

Faire une PCR en deux étapes afin qu'il y ait présence de la même oligo (sauf dans un cas en sens inverse) dans les deux réactions. Cette oligo contient le nucléotide qui doit être modifié ou incorporé. Le mélange pour la réalisation de la PCR est: 1 μ g d'ADN séquencé ayant les mutations ou ayant subi la première ou deuxième série de correction de mutation, 0.15 mM de chacun des dNTPs, 30 pmoles d'oligo, 10 μ l de tampon PCR 10X contenant du $MgSO_4$ et le volume est complété à 100 μ l avec H_2O . Le cycle thermique est de 94°C, 5 min (dénaturation), après il y a ajout de 2.5 U (5 U/ μ l) d'enzyme PWO (Roche). Par la suite, 30 cycles sont effectués comme suit: 30 sec à 94°C, 30sec à 51°C (hybridation) et 1 min 45 sec 72°C (polymérisation), finalement, 10 min à 72°C. La PCR est visualisée sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Les oligos sont celles portant au début de leur nom PCRmut voir la Table 2. Pour prendre connaissance de la stratégie élaborée pour la correction des 3 premières mutations voir Fig.16.

La première mutation où le nucléotide (T) manquait à la position 1853 pb, a généré deux bandes, l'une à 249 pb (oligos #1 et #2) et l'autre 733 pb (oligos #3 et #4). La deuxième mutation qui permettait de modifier le nucléotide C pour un T a donné une bande de 293 pb (oligos #1 et #5) et une bande de 692 pb (oligos #6 et #4). La dernière mutation a donné une bande de 668 pb (oligos #1 et #5) et une bande de 316 pb, (oligos #8 et #4; cette correction avait pour but de changer le nucléotide T pour un nucléotide C. Les bandes ont été éluées, voir la section 2.2.2.

Une fois l'éluion faite, une autre PCR est réalisée sur les 2 bandes d'une même série afin de les réunir en une seule bande avec la mutation corrigée. Le seul changement pour la PCR c'est au niveau du mélange. Les 2 bandes éluées seront mises dans la réaction, soit 2 μ l

chacune. Une bande d'environ 967 pb sera obtenue. Les prochaines étapes seront retrouvées à la section 2.2.3 et aux sections suivantes.

N.B. Une seule série de correction de mutation est réalisée à la fois et on doit s'assurer que la correction est réalisée à l'aide du séquençage manuel partiel avant de poursuivre l'autre série de mutation avec le clone positif.

Stratégie pour la correction des mutations:

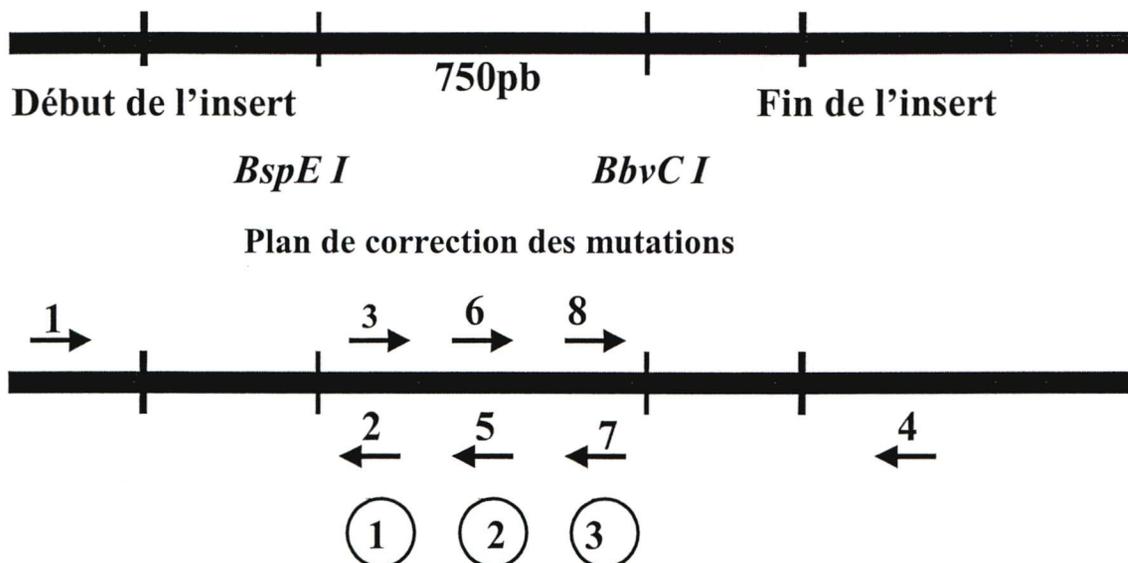


Fig.16. Stratégie de clonage élaborée afin de réaliser les trois corrections de mutation: les oligos sont: PCRmut(1), PCRmut(2)rev, PCRmut(3), PCRmut(4)rev, PCRmut(5)rev, PCRmut(6), PCRmut(7)rev et PCRmut(8). La série #1 (incorporation d'un nucléotide T) les oligos sont 1 et 2; 3 et 4. La série #2 (remplacer le nucléotide C par un T) les oligos sont 1 et 5; 6 et 4. La série #3 (remplacer le nucléotide T par G) les oligos sont 1 et 7; 8 et 4. Chacune des trois séries nécessite une PCR afin de réunir les deux bandes en utilisant les oligos 1 et 4.

2.2.2. Élué d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose:

Les bandes d'ADN produites sont éluées par gel d'agarose 2%. Les colonnes utilisées sont celles contenues dans la trousse *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen) et le protocole n'a pas subi de modifications.

2.2.3. Purification de produits de PCR:

L'ADN obtenu par PCR est purifié à l'aide de la trousse *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen). Le protocole de la compagnie a été suivi.

2.2.4. Digestion d'ADN:

Une digestion est réalisée sur l'ADN élué de la section 2.2.3. avec l'enzyme *BbvC I* (New England Biolabs), soit 15 μ l de l'ADN élué dans un volume final de 30 μ l, de même que sur le plasmide initial ayant les trois mutations (clone #7) (1 μ l d'ADN dans un volume de 30 μ l). Les produits digérés sont mis sur une colonne de purification de PCR (section 2.2.3). L'éluat obtenu, soit un volume de 20 μ l d'ADN pour les deux, sera digéré de nouveau avec l'enzyme *BspE I* (New England Biolabs). Un gel d'agarose de 1% est réalisé afin d'identifier si les produits de PCR et le plasmide ayant le vecteur ont été digérés par les deux enzymes. Par la suite, les deux bandes seront mises sur gel d'agarose. L'ADN ayant subi une correction de mutation aura une bande de 750 pb après double digestion et le plasmide (ayant les trois mutations) une bande d'environ 6897 pb. Ces deux bandes seront alors éluées voir section 2.2.2. Pour les trois mutations à réaliser, la double digestion sera faite et, l'utilisation du plasmide avec les trois mutations est employée à chaque fois. Après l'élué des bandes, un dosage sur gel d'agarose est exécuté voir la section 2.1.2.

2.2.5. Ligation de l'insert dans le vecteur:

La quantité totale d'ADN (insert et vecteur) utilisée, est entre 50 ng à 100 ng. Le ratio moléculaire est variable selon la grosseur de l'insert et du vecteur et, il doit être calculé ainsi que la quantité de vecteur et d'insert que l'on possède qui est déterminée par dosage sur gel d'agarose. L'insert et le vecteur ayant les mêmes sites de coupures sont mis ensemble à 48°C pendant 5 min et placés sur la glace à la fin de l'incubation. Il y a ajout du tampon *T4 DNA Ligase* 1X avec ATP et de la ligase soit 2000 U de *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs). La réaction se déroule à 16°C pendant environ 16 heures.

2.2.6. Préparation des cellules compétentes *E.coli* XL-1:

La première journée, une colonie est inoculée dans 5 ml de milieu LB sans antibiotique toute la nuit à 37°C avec agitation. La deuxième journée, le 5 ml de LB inoculé est déposé dans 250 ml de LB sans antibiotique. Le milieu est incubé à 37°C avec agitation jusqu'à ce qu'il atteigne une $DO_{560\text{ nm}}$ de 0.6. Le milieu est séparé en quatre volumes égaux et centrifugé 5 min à 3500 rpm à 4°C. La suite des étapes est réalisée dans une pièce où la température est de 4°C. Chacun des culots est resuspendu dans 25 ml de 0.1 M CaCl_2 froid. Le tout est incubé pendant 4 heures. Par la suite, les cellules sont centrifugées à 3500 rpm pendant 5 min. Les culots sont de nouveau resuspendus dans 10 ml d'une solution de 0.1 M CaCl_2 et 15% glycérol. Les cellules sont incubées dans la chambre froide pendant toute la nuit. Le lendemain, elles sont aliquotées dans un volume de 500 μl et congelées à -80°C.

2.2.7. Transformation dans les cellules compétentes *E.coli* XL-1:

Dans un tube stérile, mettre 100 μl de cellules compétentes et environ 3 μl de la solution de ligation (ou 1 μl d'ADN purifiée). Ceci est gardé 30 min sur glace, puis incubé 1 min dans l'eau à une température de 42°C. Par la suite, la transformation est gardée 2 min

sur glace, puis 700 μ l de milieu LB tempéré à 37°C est ajouté et les cellules transformées sont agitées pendant 1 heure à 37°C. Des volumes variant entre 50 μ l et 200 μ l sont étalés sur des boîtes de Pétri LB, contenant de l'ampicilline [100 mg/ml]. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant toute la nuit. Le lendemain, les colonies sont piquées et pour la suite des étapes se référer à la section 2.1.7. et 2.1.8.

Il y aura séquençage manuel (partiel) (section 2.1.19.), des clones possédant l'insert dans le bon sens. Pour la première et la deuxième série de mutations, les oligos de séquençages utilisées sont: (Seq.Humc17(12) (801pb) et Seq.Humc17(2r) (1200pb). Une fois la correction des mutations effectuée, on recommence toutes les étapes à partir de la section 2.2.1 avec les oligos de la deuxième série et ainsi de suite jusqu'à l'obtention du dernier clone ayant les trois mutations corrigées. Les oligos pour son séquençage (partiel) seront Seq.Humc17(4) (1200pb) et Seq.Humc17 (14) (1842pb) et avec le clone positif (Mut3-4) un séquençage automatique complet sera réalisé couvrant la section ayant subi les coupures par les enzymes de restrictions avec les oligos: Seq.Humc17(10) (557pb), Seq.Humc17(12) (801pb), Seq.Humc17(4) (1200pb), Seq.Humc17(2r) (1200pb), Seq.Humc17 (1r) (50pb) et Seq.Humc17 (3r) (800pb).

2.2.8. Correction de la quatrième mutation par clonage de digestion:

Une quatrième mutation, s'étant incorporée lors de la correction des trois autres, une nouvelle stratégie fut élaborée. La mutation est située à 1993 pb et 1999 pb, aux deux endroits, le nucléotide G a été muté en C. Le clone (Mut3-4) ayant les trois corrections corrigées, sera digéré avec l'enzyme *Bsu36 I* (New England Biolabs), cette enzyme nécessite du BSA dans le milieu de réaction. De plus, le clone (clone #7) qui possédait les trois mutations sera lui aussi digéré avec la même enzyme car il n'a pas la quatrième mutation. Étant donné, le petit fragment que l'on doit obtenir dans un cas, il faut procéder à une

digestion d'une grande quantité d'ADN, soit dans les deux cas, environ (2.55 μg), dans un volume de 100 μl et en duplicata.

Les deux clones digérés sont mis sur gel d'agarose, le clone ayant (Mut3-4) la bande de 6928 pb sera éluée alors que pour le clone (clone #7) la bande à 120 pb sera éluée voir la section 2.2.2.

2.2.9. Traitement du vecteur à la phosphatase alcaline:

La bande de 6928 pb éluée (vecteur) sera traitée à la phosphatase alcaline, *Calf Intestinal (CIP)* (New England Biolabs) et pour la réaction 2 μl (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) d'ADN élué, 17.5 μl *NE buffer 1X #3* et 0.5 μl (0.5 U/ μg) *CIP* dans un volume total de 20 μl . Le mélange est incubé à 37°C pendant 60 min. Par la suite, le tout est placé 10 min à 75°C, afin de désactiver l'enzyme. Après la désactivation, le mélange est déposé sur gel d'agarose et la bande est éluée (6928 pb) section 2.2.2. Le dosage de l'insert et du vecteur est accompli sur gel d'agarose (section 2.1.2), une ligation est faite (section 2.2.5.) suivie d'une transformation (section 2.2.7).

2.2.10. PCR sur colonies:

Une PCR sera réalisée sur les colonies obtenues suite à la transformation, afin de déterminer celles ne possédant qu'un seul insert. Faire le mélange suivant: 0.15 mM de chacun des dNTPs, 30 pmoles d'oligo (PCRMut(3) et PCRMut(7)rev), 10 μl de tampon PCR 10X contenant du MgSO_4 , le volume est complété à 100 μl avec H_2O . Mettre 20 μl par tube et à l'aide d'un embout, piquer une colonie et tremper l'embout dans le tube contenant le mélange. Après, déposer l'embout dans 5 ml de LB ampicilline, pour entreprendre s'il y a lieu une miniprep avec ce clone. Le cycle thermique a les mêmes conditions que celui de la section 2.2.1.; après le départ à 94°C, 5 min, il y a ajout de 2 μl d'enzyme *PWO* (Roche)

diluée 1/20 dans H₂O. Les produits de PCR sont déposés sur gel et les clones n'ayant qu'un seul insert, auront une bande de 434 pb et ceux ayant deux inserts, une bande de 554 pb. Avec les clones positifs, réaliser une miniprep (section 2.1.7.). Les clones ont été digérés avec l'enzyme *BsmB I* (55°C) (New England Biolabs), cette enzyme coupe si la mutation est corrigée selon la reconnaissance ou non de son site de restriction. L'autre étape est de réaliser un séquençage manuel avec les oligos Seq.Humc17rev (2111pb) et Seq.Humc17 (1842pb) (section 2.1.9); le clone positif a aussi été séquencé à l'Université Laval avec les oligos mentionnées à la section 2.1.9.

2.3. Expression *in vivo* dans les cellules eucaryotes COS-1:

2.3.1. Mise en culture des cellules eucaryotes en culture:

Les cellules utilisées pour l'expression de la protéine P450c17 sont les cellules COS-1. Ce sont des cellules de reins de singes verts d'Afrique, elles sont obtenues de *L'American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD). Les cellules sont entreposées à -80°C. La première étape consiste à démarrer les cellules en les décongelant dans de l'eau à 37°C. Par la suite, elles sont cultivées dans une boîte de 25 cm² de surface et placées à l'incubateur à 37°C, à une atmosphère contrôlée de 10% CO₂, 95% d'humidité pendant 3 heures, dans 7 ml de milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) complet (Gibco BRL). Après, changer le milieu pour du frais et attendre une confluence de 80% avant de décoller les cellules, le milieu doit être changé toutes les 48 heures. Une fois la confluence obtenue, les cellules sont rincées avec du PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ et 1.4mM KH₂PO₄), puis décollées avec 4 ml de pancréatine tempérée à 37°C, pendant 4 min et 15 sec dans l'incubateur; la pancréatine est alors retirée et la bouteille est remise dans l'incubateur pendant 30 sec. Les cellules sont décollées de la surface de la boîte à l'aide de

10 ml de DMEM complet par un mouvement de va et vient avec une pipette. Le 10 ml de DMEM complet contenant les cellules décollées, sera séparé en trois et déposé dans des boîtes de 75 cm² dans un volume de 15 ml de DMEM complet.

2.3.2. Préparation des milieux:

Le milieu complet est formé en ajoutant un sachet de DMEM dans 880 ml H₂O, contenant 0.37% de bicarbonate de sodium et 0.596% d'HEPES. Le pH est ajusté à 7.2, le milieu est filtré sous la hotte avec un filtre de 0.22 µm. À la première portion de 500 ml sont ajoutées 100 U/ml de pénicilline G (ICN Biomedicals Inc.), 100 U/ml de sulfate de streptomycine (Sigma), 1X L-glutamine (100X solution mère) (ICN Biomedicals Inc.) et 10% de sérum de foetal de veau (FBS) (ICN Biomedicals Inc.). L'autre portion est conservée et sera une solution de DMEM incomplète.

Un autre milieu est employé contenant du FBS traité au charbon. La préparation du FBS demande 500 ml de sérum, 5 g de charbon activé (Sigma) et 0.5 g de DextranT70 (Amersham Pharmacia Biotech) dissout dans 20 ml H₂O. Les trois produits sont mélangés et placés à 4°C avec agitation toute la nuit. Le mélange est centrifugé à 10000 x g pendant 30 min à 4°C. Le sérum est décanté et la même quantité initiale de charbon activé et de DextranT70 est remise. Incuber 3 heures à la température de la pièce avec agitation. Le mélange est centrifugé à 10000 x g pendant 30 min à 4°C. Le sérum est décanté, il est désactivé en l'incubant pendant 20 min à 56°C. Il est filtré sur un filtre de 0.45 µm et sous la hotte avec un filtre de 0.22 µm. Des fractions aliquotées de 50 ml dans des tubes stériles sont conservées à -20°C. L'ajout de FBS traité au charbon est fait dans un milieu DMEM sans phénol (ICN Biomedicals Inc.), mais les antibiotiques demeurent présents.

2.3.3. Passage des cellules:

Lorsque les cellules atteignent une confluence de 80%, elles sont décollées voir section 2.3.1. Le volume de 10 ml de DMEM employé, est déposé dans un tube conique de 15 ml et selon les besoins des dilutions seront réalisées. Chaque semaine, les cellules subissent un passage. Vingt-quatre heures avant une transfection, un passage de cellules est réalisé et elles sont dénombrées, 300 000 cellules sont déposées par puits de 35 mm. Pour les gros puits de 100 mm mettre 5.5 fois plus de cellules.

2.3.4. Transfections transitoires des cellules par lipofectAMINE ou fuGENE 6:

Après le passage des cellules, soit 24 heures plus tard, il y a eu réalisation d'une transfection transitoire; deux produits ont été employés, selon la période à laquelle les expériences ont été réalisées. Le mélange pour les transfections à la lipofectAMINE (Gibco-BRL) est le suivant, pour chaque puits 1 ml de DMEM incomplet sera utilisé. Ce 1 ml doit contenir 5 μ l de lipofectAMINE et 1 μ g d'ADN et le tout est incubé 45 min à la température de la pièce. Pendant cette incubation, les puits sont lavés au PBS 1X et 1 ml de milieu DMEM incomplet est ajouté, les cellules sont remises à l'incubateur jusqu'à ce que l'incubation des éléments de la transfection soit terminée. Un ml de milieu de transfection est ajouté à chacun des puits préalablement vidés de leur contenu et le tout est incubé 24 heures. Pour les grosses boîtes de Pétri le volume est de 5,5 ml au lieu de 1 ml.

Un autre type de transfection a été employé avec comme élément le fuGENE 6 (Roche). La préparation du complexe est la suivante : dans 100 μ l de DMEM incomplet, mettre 6 μ l de fuGENE 6 et 2 μ g d'ADN. Le complexe est incubé pendant 45 min à la température de la pièce. Par la suite, le mélange est déposé goutte par goutte (100 μ l) dans les puits contenant déjà 1 ml de DMEM complet et incubé 24 heures. Pour les grosses boîtes de Pétri de 100

mm le complexe est préparé dans 3.5 ml et avant de le déposer dans les puits, 2.0 ml de DMEM complet est retiré.

Une fois la transfection de 24 heures réalisée, le milieu retiré, du DMEM complet est ajouté pour une incubation de 24 heures; divers traitements peuvent être exécutés pendant cette dernière incubation.

2.3.5. Cellules traitées au 8-Bomo-cAMP:

Avant la fin de la dernière incubation de 24 heures dans le milieu frais DMEM complet, il y aura traitement avec le 8-Bomo-cAMP. Pour un traitement de 6 heures, il y aura ajout de 8-Bomo-cAMP 18 heures avant la fin de cette incubation. Pour 4 heures de traitement au 8-Bomo-cAMP, il y aura ajout de 8-Bomo-cAMP 20 heures avant la fin de cette incubation et ainsi de suite. La concentration finale désirée de *8-Bromo-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (8-Bomo-cAMP)* (Sigma) est de 200 μM dans 1 ml de milieu; la concentration est la même qu'employée dans l'article de Biason-Lauber et *al.* 2000. Le milieu ne doit pas dépasser 1 ml de volume total suite à ce traitement.

2.3.6. Cellules incubées avec différents stéroïdes:

Avant la fin de la dernière incubation de 24 heures dans le milieu frais DMEM complet, il y aura ajout de différents stéroïdes. Ceux-ci sont ajoutés après 18 heures d'incubation et resteront en contact avec les cellules pendant 6 heures. Trois stéroïdes sont utilisés, la progestérone (4-prégnén-3,20-dione) (Sigma), la prégnénolone (5-prégnén-3 β -ol-20-one) (Sigma) et la 17-OH-prégnénolone (17 α -hydroxy-prégnénolone) (Sigma). Les puits doivent être lavés au PBS 1X car le milieu sera changé. En effet, le DMEM complet sans phénol rouge et avec du FBS traité au charbon sera employé. Pour chaque puits (35 mm), 1 ml de DMEM est employé et la concentration des stéroïdes est de 1 $\mu\text{M/l}$. Celle-ci est la

même qu'utilisée dans l'article de Biason-Lauber, et *al.* 2000. Le tout est placé à l'incubateur, jusqu'à ce que les 24 heures d'incubation soient atteintes.

2.4. Test d'optimisation du taux de transfection:

2.4.1. Transfection à diverses conditions:

Le passage des cellules est exécuté comme mentionné à la section 2.3.3. Pour ce qui est de la transfection, diverses conditions ont été réalisées et l'ADN employé fut un vecteur de la luciférase *basic* (provient du labo Dr. Guylain Boissenneault). Les conditions pour la lipofecAMINE (Gibco-BRL) sont 5 μ l de lipo pour 1 μ g d'ADN et 10 μ l de lipo pour 2 μ g d'ADN avec une incubation de 5 heures et de 24 heures pour les deux rapports respectivement. Pour le fuGENE 6 (Roche), les conditions sont 3 μ l de fuGENE 6 pour 1 μ g d'ADN et 6 μ l fuGENE 6 pour 2 μ g d'ADN. Dans les deux cas il y a une incubation de 24 heures. Pour plus de détails sur la transfection voir la section 2.3.4.

2.4.2. Essais à la luciférase:

À la fin de la dernière incubation de 24 heures dans du milieu frais DMEM complet; les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X. Elles sont grattées dans un volume de 300 μ l/puits (35mm) avec du tampon de lyse (25 mM Gly-Gly, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2 mM DTT, pH 7.8). Le lysat vortexé est centrifugé à 15 000 x g pendant 3 min. Une dilution 1/100 est réalisée et 5 μ l de cette dilution est employée pour le dosage. Le tampon d'essai est constitué de (25 mM Gly-Gly, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 15 mM K₂HPO₄, pH 7.6). Avant la lecture, il y addition d'ATP et DTT à une concentration finale de 6 mM et de 3 mM respectivement. Le dosage est réalisé avec la *D-Luciférine* (Molecular Probes). Tous les essais sont faits en triplicata.

2.5. Purification de la protéine P450c17:

2.5.1. Résine de *Sepharose*:

À la fin d'une transfection, les cellules sont lysées afin de récupérer la protéine d'intérêt, soit le P450c17 qui possède l'épitote 6-His. La résine *Sepharose 6B Fast Flow* (Amersham Pharmacia Biotech) est employée et elle est chargée au nickel. Ainsi, l'épitote 6-His va s'associer avec les éléments de nickel et permettre une purification du P450c17. Le protocole *pET System* (Novagen) a été suivi pour l'isolation de la protéine, le volume de cellules employé est de 500 μl au total et elles sont soniquées 4X10 sec à 50 Watts. Le volume de la résine non compactée employée est de 200 μl et les volumes pour toutes les étapes du protocole sont de 500 μl . Cependant, à partir de l'étape des lavages jusqu'à la fin, les volumes sont de 200 μl .

2.5.2. Colonne Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid):

Les cellules sont grattées dans le tampon B, le volume est de 500 μl au total et les cellules sont soniquées 4X10 sec à 50 Watts. La trousse employée pour l'isolation est le *NI-NTA spin kit* (Qiagen) et le protocole a été suivi à partir de l'étape #2. Pour certaines expériences, les cellules sont traitées dans une solution de 5% (w/v) désoxycholate de sodium (Na-Doc), passées sur colonne microcon YM-30 (Millipore) et par la suite passées sur la colonne Ni-NTA. Cette colonne a aussi une résine chargée au nickel.

L'utilisation du tampon contenant du Na-Doc est de permettre la solubilisation du P450c17, le protocole employé provient de *Short Protocols in Molecular Biology*, (1997) unité 10.10.

2.5.3. Colonne *Pro-Bond*:

Ces expériences sont seulement réalisées avec des boîtes de Pétri de 100 mm. En effet, quatre boîtes de Pétri sont employées à la fois et les cellules sont grattées dans un volume total de 8 ml de lyse, 6 M Guanidine + 0.2% Sarkosyl. La résine Pro-BondTM (Invitrogen) est employée avec les colonnes (Invitrogen). Le protocole a été suivi, les manipulations sont réalisées sous des conditions dénaturantes. Les seules modifications consistent à faire des demi réactions en divisant tous les volumes de moitié, toujours en maintenant 4 boîtes de Pétri. De plus, une autre modification fut apportée, celle de réaliser quatre lavages à pH 6.0 et à pH 5.8. Une fois les fractions dosées et révélées, parfois, par western-blot et, sachant lesquelles possèdent la protéine P450c17, elles sont alors concentrées par un passage sur les colonnes Microcon YM-30 (Millipore) ou sur colonnes Centricon YM-30 (Millipore).

2.5.4. Colonne de *Sephacryl*:

Après avoir obtenu et concentré les fractions, celles-ci subissent une deuxième purification. Une quantité d'environ 18.5 cm de résine de *Sephacryl S-100 HR* (Amersham Pharmacia Biotech) est placée dans une burette de 25 ml; ayant préalablement placé un bouchon d'ouate au fond de celle-ci. Par la suite, la résine est lavée avec 20 ml de tampon de phosphate de sodium 0.05 M et de NaCl 0.15M, pH 7.0. Puis, le tampon est écoulé et il y a ajout de moins de 10 % du volume de résine, soit 500 μ l à 1 ml des fractions concentrées. Lorsque la fraction a pénétré dans la résine et qu'il reste moins de 1 cm à entrer, il faut ajouter environ 2 ml de tampon. Lorsque celui-ci est presque tout entré dans la résine, il faut verser environ 20 ml de tampon et recueillir les fractions, 1 ml chacune. Pour poursuivre, un électrophorèse et une hybridation sont réalisés afin de détecter les fractions contenant le P450c17 et les fractions positives sont concentrées à l'aide de Centricon YM-30 (Millipore).

2.5.5. Immunoprécipitation:

Afin de déterminer le tampon à employer qui permettra une meilleure solubilisation du P50c17, un test de solubilisation est réalisé. Les trois tampons suivants sont employés, le tampon BIASON (provenant de l'article BIASON-Laubert et *al.*, 2000.) composé de 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycérol dans du PBS 1X. Le tampon NEB dénaturant formé de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,5% SDS, 70 mM β -ME. Finalement, le troisième tampon RIPA V5 constitué de 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% ou 1% DOC, 0,1% SDS et 50 mM Tris pH 7.5. Ainsi, les cellules provenant de boîtes de Pétri 100 mm sont lavées au PBS 1X. Par la suite, elles sont grattées avec le tampon NEB dénaturant bouillant (500 μ l/ boîte de Pétri), puis chauffées 10 min à 100°C, passées à la seringue 26G ½, centrifugées 20 min à 15000 x g, ajout de 4 volumes de RIPA correction (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% ou 1.0% DOC, 1% Nonidet P-40 et 150 mM NaCl) et pour compléter 1/3 du volume en tampon Laemmli 4X (*Laemmli's sample buffer*: 125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% glycérol et 20% β -ME, pH 6.8) est ajouté. Le deuxième test consiste en la solubilisation des cellules avec le tampon BIASON, 1 ml/puits de ce tampon, ¼ de comprimé *CompleteTM Mini, EDTA free* (Roche) est ajouté avant utilisation, le mélange subi une agitation de 30 min à 4°C, puis il est vortexé et la moitié passée à la seringue 26G ½ et l'autre non, centrifugé 20 min à 15000 x g. Aux deux surnageants, 1/3 du volume de tampon Laemmli est ajouté et aux culots du tampon Laemmli 1X (*Laemmli's sample buffer*) (0,0625 M Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycérol et 5% β -ME, pH 6.8) est ajouté. Le dernier tampon dans lequel les cellules sont grattées, c'est le RIPA (1ml, avant utilisation mettre ¼ de comprimé *CompleteTM Mini, EDTA free* (Roche)), les cellules dans le tampon subissent une agitation de 30 min à 4°C, elles sont vortexées 10 sec et par la suite les mêmes étapes que le tampon précédent sont appliquées.

L'expérimentation avec l'immunoprécipitation est réalisée avec deux tampons, soit le tampon RIPA et celui de BIASON, voir les étapes dans le paragraphe ultérieur. Le protocole *anti-V5-HRP Antibody* (Invitrogen) a été suivi à partir du #3. Deux résines sont employées, soit la *Protein G Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham Pharmacia Biotech) et *Protein A-Agarose* (Santa Cruz Biotechnology), le volume de résine employé est de 25 μl pour 500 μl de surnageant. Pour l'immunoprécipitation 1 μg de l'anticorps anti-V5 (Invitrogen) est utilisé après une heure à 4°C, une modification au protocole est introduite, 1 μg d'anticorps anti-souris IgG formé chez le lapin (Upstate Biotechnology) est incorporé au mélange et l'incubation avec agitation à 4°C est poursuivie. À l'étape #10, la centrifugation est de 15 min à 1 x g à une température de 4°C. Les culots sont lavés trois fois avec le tampon de lyse (BIASON ou RIPA) et centrifugés à 10 000 x g 5 sec. Il y a ajout de 25 μl de tampon Laemmli 1X et le protocole du *Short Protocols in Molecular Biology* (1997) unité 10.15, étape #5, a été appliqué.

2.6. Dosage:

2.6.1. Méthode *Bio-Rad Protein Assay*:

La trousse employée est *Bio-Rad Protein Assay* (BIO-Rad), le protocole a été suivi, sauf que 5 μl d'échantillon est analysé dû à la forte concentration de tampon Laemmli.

2.6.2: Méthode par *microassay*:

La trousse utilisée est *Bio-Rad Protein Assay* (BIO-Rad) et le protocole a été suivi. Cependant, les échantillons sont dilués 1/200 et le volume est complété à 800 μl avec H_2O .

2.6.3. Méthode Bio-Rad *DC Protein Assay*:

Ce dosage de protéine n'est pas compatible avec le β -ME. L'équipement employé pour exécuter le dosage est le *DC Protein Assay* (Bio-Rad) et le protocole a été modifié. Les échantillons sont dilués, $\frac{1}{4}$ dans un volume total de 200 μ l. Pour la solution A le volume employé est de 100 μ l et pour la solution B, 750 μ l. Une fois les deux solutions ajoutées, il y a incubation pendant 15 min à la température de la pièce et il y a prise de lecture à 700 nm.

N.B. Toutes les courbes standards sont réalisées à partir de *Bio-Rad Protein Assay Standard II* (Bio-Rad), la solution mère a une concentration de 150 μ g/100 μ l.

2.6.4. Dosage par RIA des stéroïdes:

Les trois dosages RIA sont réalisés avec les trousse DHEA, androstènedione et 17α -OH progestérone de la compagnie *Diagnostic Systems Laboratoires, Inc.* Aucune modification n'est apportée au protocole. Pour les dosages réalisés sur l'hamster et l'humain, des dilutions de 1:20 et de 1:40 sont effectuées.

2.7. Buvardage de type Western:

2.7.1. Préparation des échantillons:

Les cellules peuvent être grattées dans du tampon Laemmli 1X chaud, passées dans une seringue 26G $\frac{1}{2}$, chauffées dans l'eau bouillante pendant 10 min puis centrifugées à 15 000 x g pendant 10 min. Le surnageant est par la suite transféré dans un autre tube propre. Les protéines sont dosées selon la méthode section 2.6.1 ou 2.6.2., suite à une immunoprécipitation (voir section 2.5.4.) ou une purification sur colonne (section 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3 et 2.5.4). Il y a ajout de tampon de Laemmli 1X ou 4X afin d'obtenir une concentration finale d'une fois. Les protéines sont dosées selon les premières méthodes

nommées ci-haut. Pour les fractions obtenues lors de l'élution de la résine de nickel, elles sont dosées selon la section 2.6.3.

2.7.2. Électrophorèse:

Les gels employés sont composés de polyacrylamide et sont dénaturants. La partie supérieure concentratrice est de 5% polyacrylamide (0.5 M Tris et 0.4% SDS, pH 6.8) et la partie inférieure séparatrice possède un pourcentage de 7.5% ou 10% (1.5 M Tris et 0.45% SDS, pH 8.8) selon le poids moléculaire des protéines. Le tampon d'électrophorèse est composé de: 50 mM Tris, 285 mM glycine et 0.1% SDS et a un pH d'environ 8.3. Une quantité variable de protéines est appliquée entre 25 μg à 50 μg , lesquelles ont été chauffées préalablement 5 min dans l'eau bouillante. Si un gros système d'électrophorèse est employé, la migration est effectuée à 30 mA/gel, pendant environ 5 heures accompagnée d'un système réfrigérant. Pour un système d'électrophorèse plus petit, la migration est à 200 V pendant 30-45 min. Un marqueur de poids moléculaire est aussi appliqué sur le gel, c'est le *Full Range Rainbow Molecular Weight RPN800* (Amersham Pharmacia Biotech).

2.7.3. Coloration au bleu de Comassie:

Après la migration, les gels peuvent être colorés au bleu de Comassie. La méthode appliquée provient de *Antibodies a laboratory manuel*, (1998), page 650. Après l'étape #8, deux autres étapes sont ajoutées et, le gel est placé dans une solution de 1% glycérol, 10% acide acétique pendant 30 min. Puis, il est séché pendant 1 heure à une température de 80°C.

2.7.4. Transfert sur membrane:

Le gel peut être transféré sur membrane PVDF (Roche). Les étapes sont les suivantes: tout d'abord, la membrane ayant les dimensions du gel est trempée dans du

méthanol pendant 5 min puis dans le tampon de transfert (20 mM Tris, 150 mM glycine et 20% MEOH). Le système de transfert comprend 2 éponges, un support et 4 papiers Whatman 3MM (Bio-Rad). Lorsque tous les éléments ont trempé dans le tampon de transfert, le tout est assemblé comme suit: le support ouvert, où l'on dépose une éponge et 2 papiers Whatman 3MM, puis le gel à l'envers, la membrane, deux papiers Whatman 3MM et une éponge. Le transfert s'effectue dans le tampon de transfert pendant toute la nuit à 250 mA/boîte. Un mini-système de transfert est employé à la suite de la migration d'un petit gel. Le montage est le même, sauf que la migration se fait à 100 V pendant 1 heure sur glace à 4°C.

Une fois le transfert réalisé, la membrane peut être colorée au Rouge de Ponceau (0.1% Ponceau S dans du TCA 20%) pendant 5 min. Auparavant, le surplus de méthanol doit être éliminé par 3 lavages de 5 min dans de l'eau, la même étape est répétée après coloration.

2.7.5. Hybridation des membranes:

Différents anticorps sont employés avec chacun leurs conditions spécifiques. La membrane est toujours hydratée par un trempage dans le MEOH, suivi de trois lavages dans le tampon correspondant à l'anticorps employé. Pour tous les anticorps, il y a toujours trois lavages entre chaque étape importante (avant le blocage, après le blocage, après le premier anticorps, après le deuxième anticorps) dont deux de 5 min et un de 10 min. On retrouve l'anticorps anti-His (Qiagen) qui détecte les protéines ayant l'épitope 6xHis. Les lavages sont exécutés dans du TBST (20 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.4 et l'ajout de 0.5% Tween-20). Le tampon de blocage est fait dans du TBST+10% de lait écrémé. Le premier anticorps anti-His est dilué 1/2000 dans un tampon TBST+2% BSA (albumine de sérum de bovin) (Sigma) pendant 1 heure. Le second anticorps employé est l'anticorps *Goat anti-mouse Ig: HRPO*

(Transduction Laboratories) dilué 1/2000 dans du TBST+BSA 2%. Tous les lavages sont réalisés dans du TBST.

L'autre anticorps employé est l'anti-V5 qui reconnaît les protéines ayant l'épitope V5. Le tampon utilisé est le PBST (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4, additionné de 0.05% Tween-20). Le blocage est fait dans du PBST+5% lait écrémé pendant une heure. Le premier anticorps anti-V5 est dilué 1/5000 dans du tampon de blocage pendant 1-2 heures. Le second anticorps est le *Goat anti-mouse Ig: HRPO* (Transduction Laboratories) dilué 1/2000 dans du tampon de blocage pendant une heure. Tous les lavages sont réalisés dans du PBST.

Le dernier anticorps qui peut être utilisé est l'anticorps non commercial anti-P450c17 (#690, première saignée). Celui-ci nous a été donné par le Dr. Alain Bélanger de l'Université Laval. Tous les lavages sont réalisés dans le TBST. Le tampon de blocage est formé de TBST+1% gélatine, le blocage est réalisé pendant une heure. L'anticorps P450c17 est dilué 1/5000 dans du tampon de blocage pendant 1-2 heures. Le second anticorps, *l'anti-rabbit IG Horseradish Peroxydase linked whole antibody* (Amersham Pharmacia Biotech) est dilué 1/2000 dans du tampon de blocage, pendant une heure.

N.B: Toutes les incubations sont réalisées à la température de la pièce.

Pour les hybridations réalisées sur les membranes provenant de l'expérimentation d'immunoprécipitation, parfois, seul le second anticorps est utilisé car il y avait déjà présence sur la membrane du premier anticorps avec lequel l'immunoprécipitation avait été réalisée.

2.7.6. Révélation:

La révélation se fait avec la trousse ECLTM *Western blotting detection reagents* (Amersham Pharmacia Biotech). Les instructions retrouvées avec la trousse sont suivies. La

membrane est ensuite soumise à une autoradiographie sur film Kodak X-Omat RP, le temps d'exposition est variable. La membrane peut être conservée à 4°C jusqu'à la déshybridation.

2.7.7. Déshybridation des membranes:

La membrane est déshybridée dans 500 ml de tampon de déshybridation (62.5 mM Tris, SDS 2%, 100 mM de β -ME, pH 6.7, tempéré à 55°C). Pendant 30 min, la membrane est déshybridée avec agitation, dans un plat ayant un couvercle. Cette opération est répétée avec du tampon frais. Puis la membrane est lavée dans du TBST.

2.7.8. Évaluation des résultats ($M \pm SEM$):

Le programme excel fut employé pour l'évaluation des résultats de la figure 21. Pour les trois stéroïdes, le même principe fut employé. Premièrement, différentes dilutions ont été réalisées et dosées en triplicata. Ainsi, pour chacun des résultats, on a divisé dans chaque puits par le nombre de ug de protéines dosées. Puis, une moyenne pour chacune des dilutions en triplicata ainsi que l'écart moyen fut calculé. Par la suite, un calcul pour trouver la moyenne des moyennes de chaque dilution a été fait ainsi que le calcul de l'écart moyen global pour chacun des écarts moyens correspondants aux dilutions. Les valeurs retrouvées sont celles qu'on peut observer sur le graphique.

Résultats:

3.1. RT-PCR:

3.1.1. RT-PCR sur l'ARN des cellules H295R:

Trois RT-PCR furent réalisées en employant 1.64 µg d'ARN provenant des cellules H295R. La paire d'oligos (4) et (5), ainsi que les paires d'oligos (4) ; RT-PCR Hum17 3'c (GCT CTG AAT CTT GAT CTG GGC CAG C; TM 78 °C) et (5); RT-PCR HUM17 5'c (AAC AAA ACC CTG GAA AAA TTA AAG A; TM 64 °C). Les oligos contenant la lettre 'c' ne sont pas présents dans la table 1, il s'agit d'oligos localisés dans le centre de la séquence codante.. Une bande de 1527 pb contenant la séquence complète du P450c17 a été obtenue avec la première paire d'oligos. Une autre bande d'environ 1000 pb fut obtenue avec l'utilisation de la dernière paire d'oligos mais aucune avec la seconde paire d'oligos. De plus, deux températures pour la RT ont été employées soit 72 °C et 66 °C. Les oligos centraux étaient une alternative au cas où une amplification de 1527pb était impossible à réaliser. Les meilleurs résultats ont été ceux utilisant la première paire d'amorce (4) et (5) et une température de 72 °C.

3.2. Correction de mutations du clone P450c17:

3.2.1. Séquençage partiel des trois mutations:

Le clone #7 fut obtenu à la suite d'une RT-PCR sur l'ARN extrait des cellules H295R. Ensuite, une PCR avec l'enzyme PWO a été réalisée afin d'enlever le codon stop de la séquence codante P450c17, car celui-ci empêcherait la production de protéines de fusions contenues dans le vecteur. Par la suite, un traitement avec la polymérase Taq pour ajouter un nucléotide A aux deux extrémités de la séquence P450c17. L'insert a été cloné dans le

vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®]. Les clones furent amplifiés et l'orientation a été déterminée par digestion. Le clone #7 a été séquencé manuellement et automatiquement en entier afin de s'assurer qu'il n'y avait aucune mutation.

Plusieurs mutations ont été retrouvées dont trois silencieuses, la première à 1091 pb un T a été modifié pour un C, l'acide aminé reste inchangé, soit une histidine. La deuxième mutation silencieuse, le nucléotide T a été remplacé pour un nucléotide G à la position 1148 pb, la sérine demeure intacte. Finalement à 1802 pb le nucléotide T a été changé pour un nucléotide C, tout en gardant l'acide aspartate comme a.a.

Cependant, trois autres mutations ont été retrouvées causant dans un premier cas une modification du cadre de lecture à la position 1853 pb car le nucléotide T était manquant. Une correction par PCR a permis l'insertion de ce nucléotide et l'amplification d'une bande de 969 pb. Cette bande fut digérée avec l'enzyme *BspE I*, puis par l'enzyme *BbvC I*, la même chose avec le clone #7, dans les deux cas une bande de 750 pb fut obtenue. Après, il y a eu lieu une ligation de l'insert avec la mutation corrigée par PCR (bande de 750 pb) dans le clone #7 digéré (6897 pb). Les clones amplifiés ont subi un séquençage manuel avec l'emploi du nucléotide T uniquement et de l'oligo Seq.Humc17(12) (801pb). Un clone fut choisi parmi ceux ayant la correction corrigée, il s'agit du clone *Mut1-1*(Fig.17a). La seconde mutation qui a été trouvée, est à la position 1890 pb où un nucléotide T fut changé pour un nucléotide C, donnant une arginine au lieu d'un tryptophane. Le clone *Mut1-1* fut utilisé pour entreprendre une seconde PCR afin de faire la correction du nucléotide fautif et par la suite, les mêmes étapes que celles citées ci-haut furent réalisées. Le clone choisi est le *Mut2-1* (Fig.17b). Finalement la dernière mutation qui a été retrouvée dans le clone #7, est située à la position 2269 pb où un nucléotide T était présent au lieu d'un nucléotide C. Ceci donnant une leucine au lieu d'une proline. Toutes les étapes sont les mêmes, le clone *Mut2-1*

fut employé pour subir la PCR correctrice. Cette fois-ci, l'oligo employée est la Seq.Humc17(2r) (1200pb). Le clone positif choisi fut le *Mut3-4* (Fig.17c).

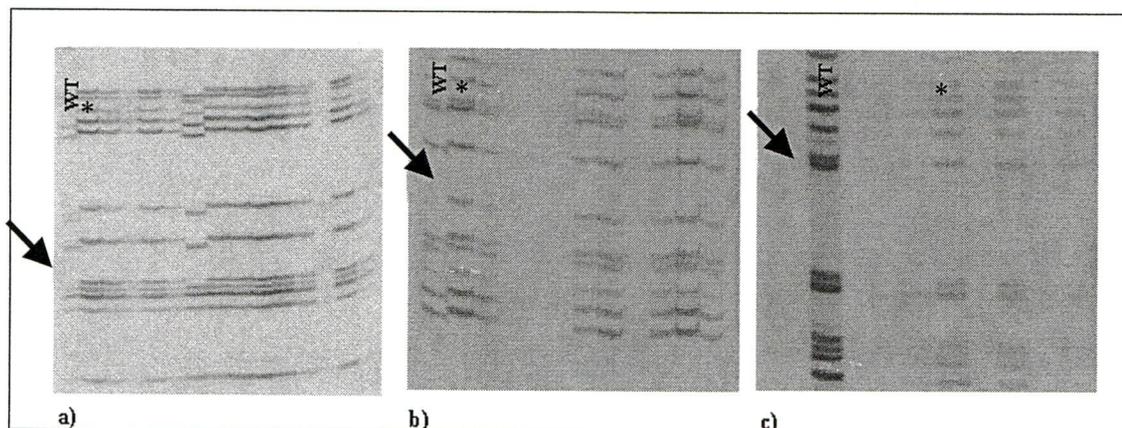


Fig. 17. Séquençage manuel à double brin avec un seul nucléotide soit le T: Correction des trois mutations sur le clone #7. a) Incorporation du nucléotide T, passant d'une modification du cadre de lecture à une leucine, avec l'emploi de l'oligo Seq.Humc17(12) (801pb). b) Remplacement du nucléotide C par le nucléotide T, passant d'une arginine à un tryptophane avec l'utilisation de l'oligo Seq.Humc17(12) (801pb). c) Changement du nucléotide T par le nucléotide C donnant une proline au lieu d'une leucine avec l'oligo Seq.Humc17(2r) (1200pb). La flèche indique l'emplacement du nucléotide absent ou à modifier dans la séquence nucléique du clone #7 (WT). Les autres colonnes désignent les clones obtenus et séquencés. N.B. WT: Le clone #7 sauvage contient les trois mutations. L'astérisque en a) montre la position du clone *Mut1-1*, en b) du clone *Mut1-2* et en c) du clone *Mut3-4*.

Un clone a aussi été obtenu à la suite d'une extraction d'ARN au niveau des glandes surrénales fœtales humaines. Les mêmes étapes qu'au premier paragraphe de cette section ont été réalisées. Lors du séquençage, on n'a retrouvé que deux mutations soit deux C au lieu de deux G. Ces mutations se retrouvent à 1993 pb et à 1999 pb changeant l'a.a. arginine à une proline dans les deux cas. La stratégie de correction de ces mutations est celle proposée à la section 3.2.2. Cependant, ce nouveau clone fut obtenu trop tard et les tests d'activités avaient déjà été réalisés avec le clone #10 provenant des H295R. Il faut préciser que la séquence codante du P450c17 humain adulte (H295R) et fœtale est la même et que les résultats obtenus par spectroscopie de masse devraient donc être identiques.

3.2.2. Séquençage du clone *Mut3-4*:

Une fois les trois corrections réalisées, le clone *Mut3-4* est séquencé avec une réaction de séquençage complète à double brin. Le séquençage va couvrir les 2 sites de restrictions employés, soit *BsmB I* et *BbvC I* (environ 750 pb). Cet endroit correspond à l'insertion des inserts dans le clone #7 lequel avait déjà été séquencé en entier. Ceci afin de vérifier s'il n'y a pas eu incorporation de nouvelles mutations lors de la correction des trois précédentes. En comparant la figure 18a) qui est celle du clone #7 (type sauvage ayant les trois mutations) avec la figure 18b), on constate qu'il y a eu une nouvelle mutation. Ainsi, la séquence devrait être A CCG TAA CCG et la séquence retrouvée chez le clone *Mut3-4* est A CCC TAA CCC. Deux C se sont retrouvés à la position 1993 pb et 1999 pb changeant l'a.a. arginine à une proline. Étant donné que la proline possède une conformation stérique différente de celle de l'arginine ceci va grandement modifier le repliement de la protéine et la disposition de ses sites liaisons.

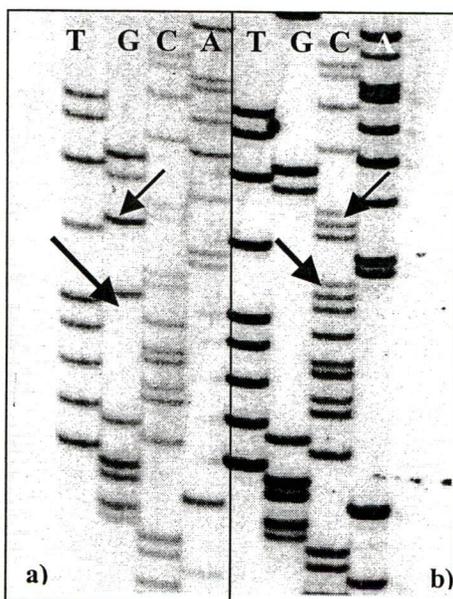


Fig. 18. Séquençage manuel à double brin avec les 4 nucléotides. Ce séquençage est fait avec l'oligo Seq.Humc17(2r) (1200pb), la trousse *T7 sequenase 7-deaza-dGTP sequencing kit* (USB) est employée. a) Le clone #7 avec les trois mutations. b) Le clone *Mut3-4* ayant les trois mutations corrigées. Les flèches indiquent une différence dans la séquence entre les deux clones. Deux nucléotides G modifiés en nucléotide C.

3.2.3. Correction de la quatrième mutation:

Après confirmation qu'une quatrième mutation se soit incorporée à la position 1993 pb et 1999 pb ce qui amène un changement des deux arginines en deux prolines dues à la

modification dans les deux cas du nucléotide G pour un nucléotide C. Le clone *Mut3-4* a subi une correction afin de réimplanter les deux arginines perdues. Cette fois-ci, étant donné que le clone #7 possède déjà la bonne séquence d'ADN (Fig.18a), il a suffi de le couper avec l'enzyme *Bsu36 I* et d'en faire autant avec le clone *Mut3-4*. La bande obtenue suite à la digestion est de 120 pb. Le clone *Mut3-4* agit en tant que vecteur et doit donc être déphosphorylé, et, la bande de 120 pb obtenue provenant du clone #7 est liguée dans le clone *Mut3-4*. Les clones provenant de la transformation ont subi une PCR sur colonie afin de déterminer ceux étant positifs. Tous ceux ayant une bande amplifiée de 434 pb possèdent un seul insert et ceux ayant 554 pb deux inserts. Tous les clones ayant un seul insert sont séquencés afin de déterminer le sens de celui-ci. Le séquençage est fait avec un seul nucléotide (T) et le clone #10 qui possède un insert dans le bon sens a été choisi pour être séquencé avec les quatre nucléotides (Fig. 19).

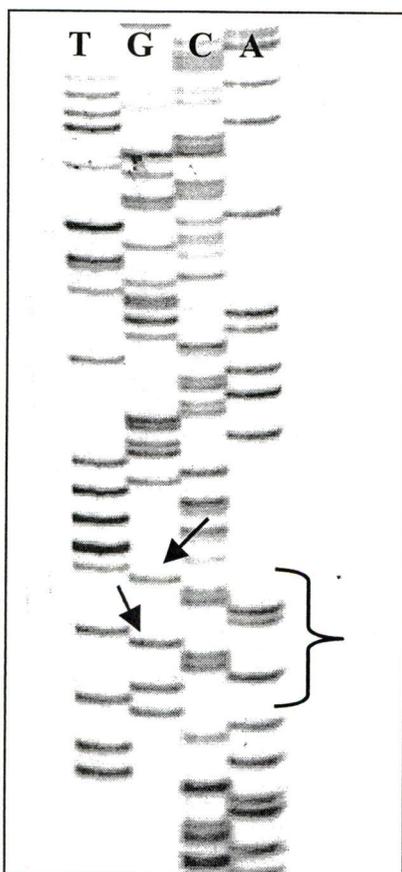


Fig. 19. Séquençage manuel à double brin du clone #10. Le séquençage est réalisé avec l'oligo Seq.Humc17 (1842pb). Au niveau de l'accolade, on retrouve la séquence A CCG TAA CCG. Les flèches indiquent les deux mutations corrigées, soit la réintégration des nucléotides G dans la séquence.

3.3. Test d'optimisation du taux de transfection dans les cellules COS-1:

3.3.1. Transfection des cellules COS-1 sous diverses conditions:

Un bon niveau d'expression de la protéine P450c17 est très important car une purification doit être exécutée par la suite. Il faut donc trouver les meilleures conditions de transfections possibles de cette protéine dans les cellules COS-1 ce qui signifie une plus grande quantité de matériel produite et une plus grande quantité pouvant être isolée. Une comparaison entre deux réactifs est réalisée, en appliquant deux temps d'incubation soit 24 heures et 5 heures. Les ratios d'ADN et de réactifs appliqués sont ceux suggérés par les deux compagnies le premier chiffre correspond à la quantité en μl de réactifs utilisés et la seconde valeur est celle de la quantité en μg d'ADN employée. Les conditions établies pour la lipofectAMINE (Gibco-BRL) sont les suivantes: 10.2, 24 heures; 10.2, 5 heures; 5.1, 24 heures et 5.1, 5 heures. Les conditions pour le FuGENE 6 (Roche) sont: 6.2, 24 heures et 3.1, 24 heures. D'autres conditions ont été étudiées, mais il semble que celles mentionnées plus haut soient les plus avantageuses, au point de vue du temps d'incubation et quantité de produits employés. L'ADN utilisé pour ces transfections est un vecteur de la luciférase *basic*; l'analyse de l'activité luciférase est un moyen rapide et efficace de connaître les meilleures conditions de transfections. Étant donné que le vecteur a un promoteur très puissant, une dilution de 1/100 est faite sur les cellules et 5 μl de cette dilution est utilisée pour analyse. Les lectures sont prises en *triplicata* et la moyenne des trois valeurs est utilisée pour la construction du graphique (Fig.20). Ainsi le réactif qui donne le meilleur résultat est le fuGENE 6 avec 527.5 RLU et avec les conditions suivantes soit 6 μl de réactif et 2 μg d'ADN pendant 24 heures d'incubation.

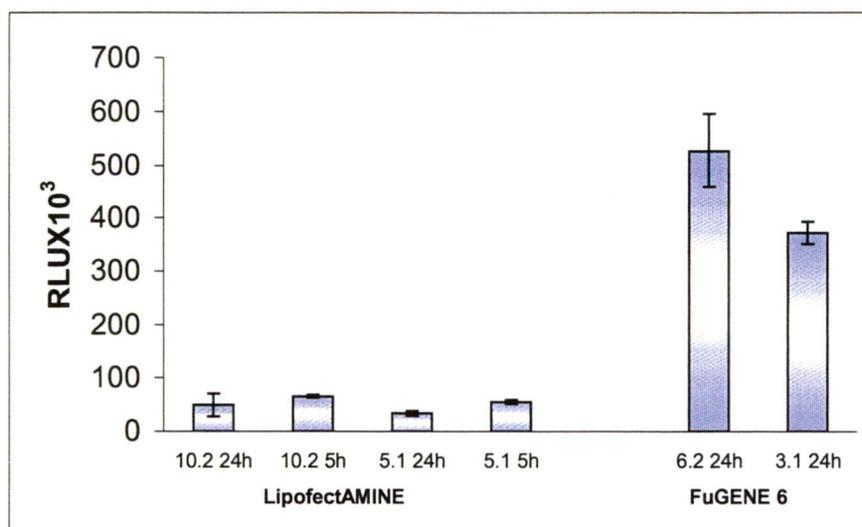


Fig. 20. Test d'optimisation du taux de transfection chez les cellules COS-1 au moyen du vecteur de la luciférase. Deux réactifs employés, soit lipofectAMINE (Gibco-BRL) et fuGENE 6 (Roche). L'abscisse contient les diverses conditions, des incubations de 24 h et de 5 h ainsi que le ratio entre la quantité de réactifs (μl) et la quantité (μg) de vecteur employé. L'ordonnée exprime la valeur moyenne des *triplicata* obtenue en RLU (*Relative Light Units*).

3.4. Traitements des cellules COS-1 transfectées avec le P450c17:

3.4.1. Analyse des deux activités du P450c17:

Cette section des résultats est très importante car elle va nous permettre de connaître si le clone #10 n'ayant plus aucune mutation est actif. Ce clone possède la séquence codante du P450c17 et on doit donc retrouver la présence de l'activité 17α -hydroxylase et 17,20-lyase. Pour ce faire, les cellules COS-1 sont transfectées de façon transitoire avec l'ADNc de ce clone. Deux autres éléments sont aussi transfectés comme contrôle, soit le vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®] et le clone possédant la séquence P450c17 d'hamster, inséré dans le vecteur pSV-SPORT 1. Le clone de l'hamster a déjà été analysé dans le passé par chromatographie (TLC) et les résultats ont indiqué qu'il possédait les deux activités. Les conditions d'incubation sont celles retenues comme étant les meilleures conditions à la section 3.3.1. Les cellules sont incubées ou non avec différents stéroïdes voir section 2.3.6.

Les trois stéroïdes utilisés sont: la progestérone (Sigma), la prégnénolone (Sigma) et le 17-OH-prégnénolone (Sigma) à une concentration de 1 $\mu\text{M/l}$. De plus, il y a eu dans certains cas un traitement avec le 8-Bromo-cAMP (se référer à la section 2.3.5.). Le surnageant de chaque traitement est récupéré et des dilutions de 1/20 et de 1/40 sauf pour le vecteur sont réalisées. Le tout fut dosé par RIA en *triplicata* au département de biochimie clinique sous la supervision du Dr Lepage. Une moyenne et un écart moyen sont calculés à partir des valeurs obtenues en prenant en considération le nombre de μg de protéines dosées par puits (Fig.21). Cependant, le métabolite 17-OH-prégnénolone n'a pas été analysé car ce type de dosage n'est pas appliqué en clinique étant donné qu'aucune trousse n'est disponible sur le marché. Il est remplacé par un dosage du DHEA, second produit élaboré dans la voie $\Delta 5$. En effet, le premier substrat utilisé est la prégnénolone qui sera converti par l'activité 17α -hydroxylase en 17-OH-prégnénolone et par la suite celui-ci sera à son tour transformé en DHEA par l'activité 17,20-lyase. De plus, une seconde confirmation de la présence de l'activité 17α -hydroxylase, c'est l'utilisation du substrat progestérone et le dosage du produit 17-OH-progestérone. On sait que l'hydroxylation de la progestérone provient de l'activité 17α -hydroxylase. Le cortisol quant à lui n'a pas été choisi comme stéroïde pouvant être dosé étant donné que les cellules COS-1 ne possèdent pas toutes les infrastructures permettant la transformation du 17-OH-progestérone en cortisol. Afin d'obtenir le cortisol, il aurait fallu faire une double transfection avec les cytochromes P450c17 et P450c11 dans les cellules COS-1.

Lorsqu'on analyse les résultats obtenus, notre clone possède bel et bien les deux activités car sans la présence de 17α -hydroxylase, le stéroïde 17-OH-prégnénolone n'aurait pas pu être transformé en DHEA. De plus, la prégnénolone n'aurait pas pu être convertie en DHEA sans la présence des deux activités telle que la 17,20-lyase. Un autre résultat prouvant la

présence de l'activité 17,20-lyase c'est la réaction d'hydroxylation sur le substrat progestérone donnant lieu au produit 17-OH-progestérone.

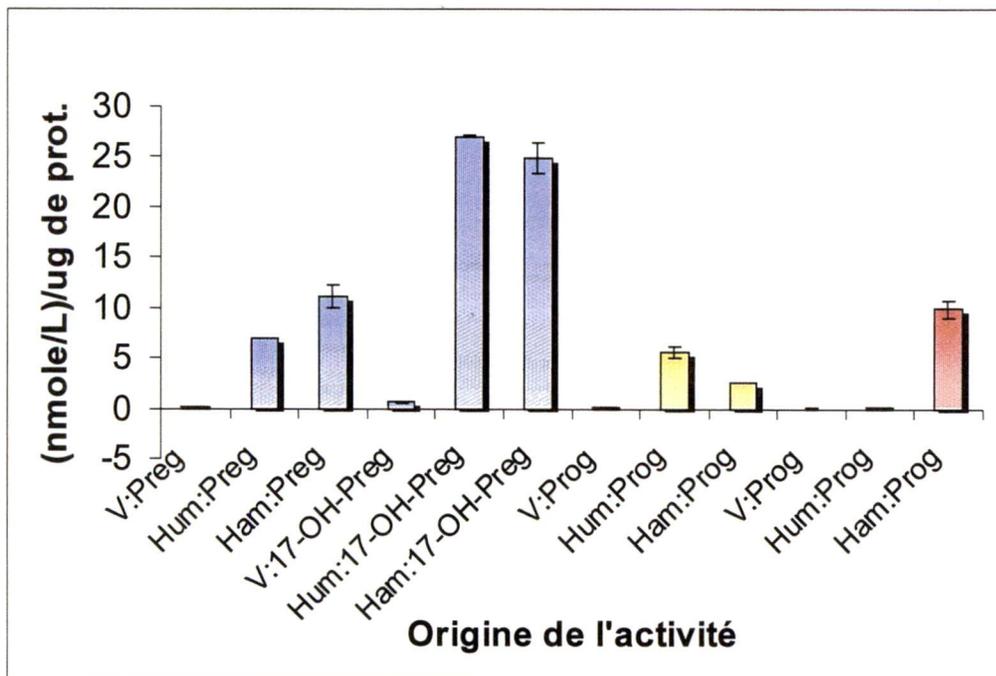


Fig.21. Dosage des stéroïdes produits par le cytochrome P450c17 d'humain et d'hamster. Les colonnes en bleues représentent le dosage du DHEA en jaunes 17-OH-Prog et en rouges androstènedione. Des cellules COS 1 sont transfectées transitoirement pendant 24 heures avec le plasmide P450c17 humain ou d'hamster (6 μ l fuGENE 6: 2 μ g ADN). Le milieu DMEM complet est remplacé par du frais, 18 heures plus tard les cellules sont traitées en présence de progestérone (1 μ M/l), de prégnénolone (1 μ M/l) ou en présence de 17-OH-prégnénolone (1 μ M/l) pendant 6 heures. Pour les traitements, un milieu DMEM complet (sans phénol et avec du FBS traité au charbon) est employé. Le surnageant est recueilli et les métabolites sont dosés par techniques radioimmunologiques. V: Vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®], Hum: Clonage P450c17 humain; Ham: Clonage P450c17 hamster dans le vecteur pSV-SPORT.1; 17-OH-Pro: 17-hydroxyprogestérone; Prog: progestérone; Peg: prégnénolone et DHEA: déhydroépiandrostérone.

3.4.2. Analyse par western-blot du P450c17 suite aux traitements:

Lorsque le surnageant est récupéré des puits pour fin de dosage. Les cellules sont grattées dans 100 μ l de tampon Laemmli (voir début section 2.7.1.). L'expérimentation est réalisée en *triplicata*, alors les cellules grattées des trois puits (35 mm) du même traitement sont combinées. Les protéines sont dosées par la méthode de *Bio-Rad Protein Assay*, et un

3.5. Techniques d'isolation et de purification du P450c17:

3.5.1. Purification par colonne de résine sépharose + NiSO₄, avec différentes concentrations d'imidazole:

Le premier essai réalisé afin de faire la purification du P450c17 est celui fait avec la colonne contenant une résine de *Sepharose 6B Fast Flow* (Amersham Pharmacia Biotech). La résine est chargée avec NiSO₄ et diverses concentrations d'imidazole sont appliquées. Un volume de 500 µl (puits de 100 mm) de cellules lysées est employé sur les colonnes. Toutes les fractions sont conservées entre chaque étape et un gel 12% acrylamide est réalisé. Chacun des puits contient 100 µl (tampon Laemmli 4X compris) de chacune des fractions. Sur la membrane, une hybridation avec l'anticorps anti-tétra-His est réalisée (Fig.23). Étant donné que le clone P450c17 humain n'était pas encore disponible, cette expérimentation est réalisée avec le clone P450c17 d'hamster, obtenu du Dr Mathieu et les conditions de transfection dans les cellules COS-1 sont 5 µl de lipofectAMINE et 1 µg d'ADN pendant 24 heures.

On ne trouve pas la présence de la P450c17 d'hamster dans la fraction d'élution mais dans les deux dernières fractions une faible bande nous indique qu'une petite partie de la protéine a été isolée.

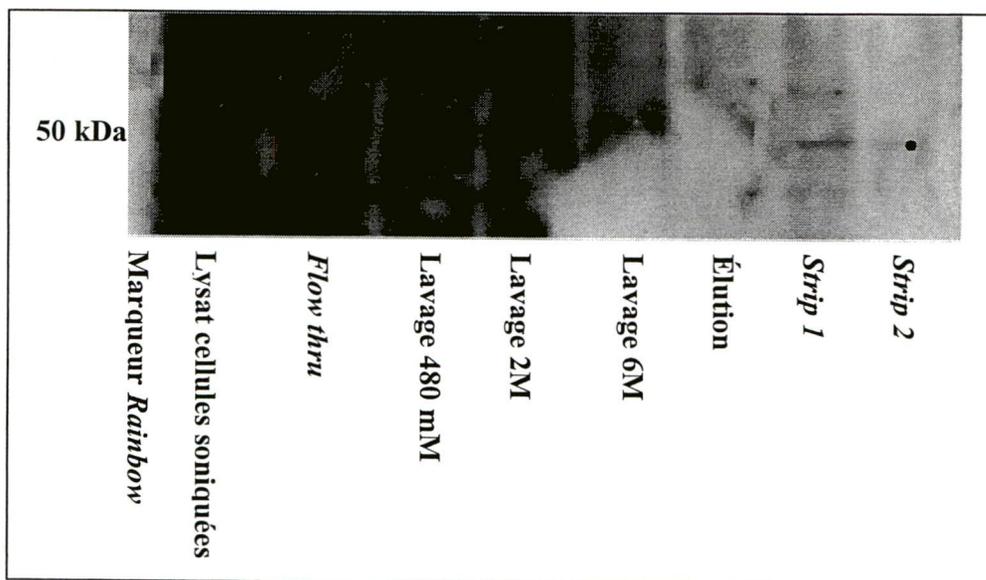


Fig.23. Isolement du P450c17 d'hamster avec la résine sépharose + NiSO₄ à différents concentrations d'imadazole. L'hybridation est réalisée avec l'anticorps anti-His (dilution; 1:2000) sur la protéine de fusion P450c17-His. Un volume de 100 µl est déposé dans chaque puits. Les cellules sont soniquées 4X10 sec à 50 Watts, transfection transitoire dans les COS-1 lipo 5 µl:1 µg d'ADN, 24 heures Le point représente l'emplacement du P450c17 d'hamster dans les deux derniers puits.

3.5.2. Purification avec la colonne Ni-NTA du P450c17 avec des solutions à différents pH:

Une autre colonne de type commercial est employée. Selon les commentaires de la compagnie Qiagen, la résine employée (NTA) est un chélateur de métal ayant une interaction plus forte puisqu'elle possède 4 sites de liaisons avec l'ion de nickel comparativement aux autres types de résine qui n'en possèdent que trois. Des solutions à différents pH sont utilisées afin de réaliser la purification du P450c17 d'hamster. Au moment de faire ces expériences le clone humain est en voie de correction de ses mutations, il ne peut pas être utilisé. L'une des techniques de lyse cellulaire employée, est celle faisant appel à une solution de 5% Na-Doc (voir la section 2.5.2.). La figure 24 démontre une expérimentation

où une solution de Na-Doc est employée, deux boîtes de Pétri de 100 mm sont grattées dans un volume total de 250 μ l de tampon TSA et 250 μ l de *buffer B*. Des fractions de chaque étape sont conservées et par la suite 50 μ l (tampon Laemmli 4X inclus dans ce volume) de chacune des fractions est mise sur un gel de polyacrylamide 7.5%. Les conditions de transfection dans les cellules COS-1 sont les mêmes que celle de la section 3.5.1.

Les résultats sont assez particuliers, on retrouve plusieurs bandes, environ 3 ou 4 qui possèdent un poids moléculaire d'environ 50kDa. Il est donc difficile de certifier qu'on a bel et bien isolé la P450c17. L'anticorps employé n'est pas très spécifique et on peut retrouver une séquence de 6 His chez plusieurs types de protéines.

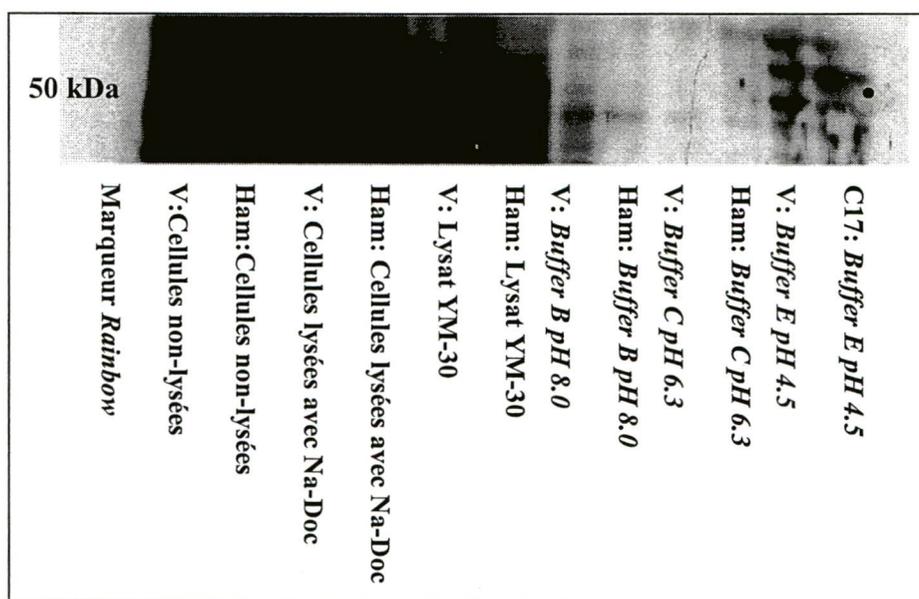


Fig. 24. Application des colonnes Ni-NTA pour la purification du P450c17 avec des solutions de différents pH. La protéine de fusion P450c17-His est révélée par hybridation avec l'anticorps anti-His (dilution; 1:2000). Un volume de 50 μ l de chaque fraction est déposé dans les puits. Le point marque l'emplacement du P450c17 d'hamster. YM-30: colonne qui élimine les protéines de 30 kDa et moins et concentre les protéines de plus 30 kDa. Les COS-1 sont transfectées avec lipo 5 μ l:1 μ g d'ADN, 24 heures. V: Vecteur pSV-SPORT 1; Ham: Séquence P450c17 d'hamster dans le vecteur pSV-SPORT 1.

3.5.3. Purification du P450c17 avec la résine *Pro-Bond* (Invitrogen):

Contrairement à la section 2.5.3. une boîte de Pétri a été grattée dans un volume de 8 ml de résine. Le volume de lysat (avant passage sur colonne) déposé sur gel est de 50 μ l (5

μl de lysat + 66.6 μl tampon Laemmli 4X + 195 μl H_2O). Cependant, pour les surnageants de tous les lavages, c'est un volume de 100 μl (96 μl de surnageants + 32 μl de tampon Laemmli 4X). Finalement, deux fractions contenant le P450c17 sont concentrées (voir section 2.5.3.) et un volume de 50 μl (les deux fractions ensemble) fut déposé sur gel. Une électrophorèse est réalisée, suivie d'une hybridation avec l'anticorps anti-V5. Le P450c17 exprimé dans les cellules COS-1 est celui provenant du clone humain, les conditions de transfections dans les cellules COS-1 sont celles mentionnées comme étant optimale à la section 3.3.1.

Les essais entrepris avec les colonnes de nickel *Pro-bond* semblent être satisfaisants car on observe une bande unique à la hauteur de 50kDa.

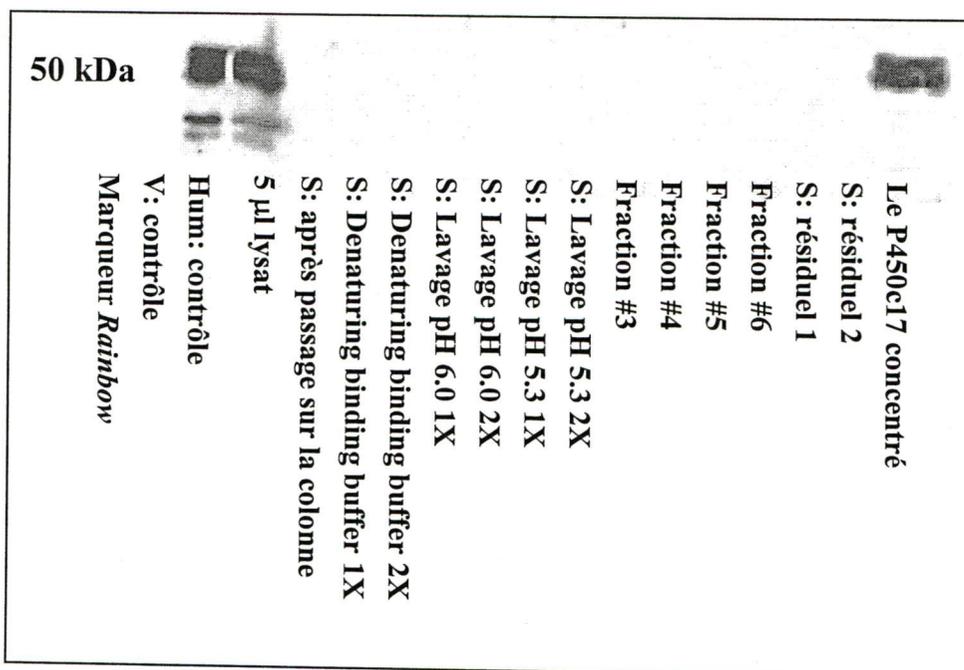


Fig. 25. Purification du P450c17 humain avec les colonnes de nickel *Pro-Bond*. La protéine de fusion P450c17-V5-His est révélée par hybridation avec l'anticorps anti-V5 (dilution; 1:5000). Les contrôles représentent les protéines totales des cellules COS-1 transfectées transitoirement. Le lysat provient de la lyse des cellules COS-1 (une boîte de Pétri de 100 mm) avec un tampon Guanidine + 0.2 % sarcosine. Les surnageants (S) de toutes les étapes sont récupérés. Les fractions sont celles obtenues lors de l'éluion de la colonne avec un tampon de pH 4.0. Les fractions 1 et 2 sont passées sur colonne YM-30 et le surnageant résiduel est conservé. Les cellules COS-1 sont transfectées avec fuGENE 6 μl : 2 μg ADN, 24 heures. V: Vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®], Hum: Clone

3.5.4. Technique d'immunoprécipitation employée pour l'isolement du P450c17

humain:

Plusieurs essais sont réalisés afin de savoir quels types de tampons de solubilisation sont les plus adaptés à la solubilisation du P450c17 et lesquels seraient les plus compatibles avec la technique d'immunoprécipitation. Trois tampons sont employés: le tampon Biason(voir 2.5.5), le NEB dénaturant et le RIPA. Les cellules COS-1 sont transfectées (voir section 3.5.3.pour les conditions) avec l'ADN du P450c17 humain et les puits de 100 mm sont grattés en présence de l'un des trois tampons. Une fois les manipulations de solubilisation effectuées, une électrophorèse sur gel polyacrylamide 10% est réalisée. Les puits sont remplis avec un volume de 50 µl par chacun des éléments. Par la suite, la membrane est hybridée avec l'anticorps anti-His (Fig.26).

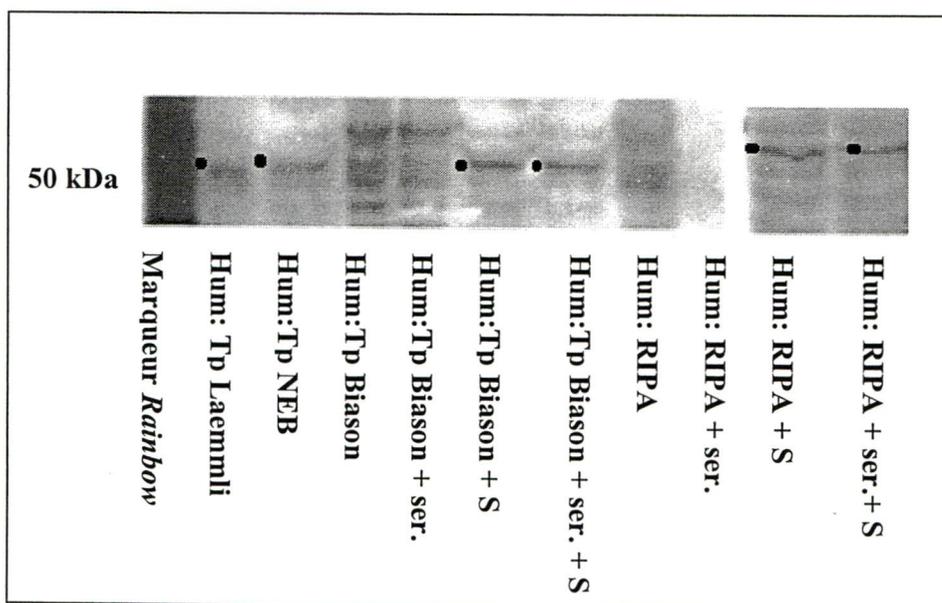


Fig. 26. Essais avec divers tampons afin de solubiliser le P450c17 d'humain. Les cellules COS-1 sont transfectées transitoirement avec du fuGENE 6 µl: 2 µg d'ADN, 24 heures. La protéine de fusion P450c17-V5-His est hybridée avec l'anticorps anti-His (dilution; 1:2000). Le tampon Laemmli représente un contrôle car il contient les protéines totales présentes dans les cellules COS-1. Les colonnes n'ayant que le nom du tampon uniquement, représentent des protéines qui sont solubilisées sans aucun autre traitement. Ser: Indique que le tampon est passé après solubilisation à la seringue; S: Signifie que suite à une centrifugation c'est le surnageant qui est employé; Hum: Représente le P450c17 humain cloné dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®].

Les meilleurs tampons de solubilisation sont RIPA et BIASON car une bande mieux définie à la hauteur de 50 kDa est perceptible dans le surnageant contrairement au tampon NEB. De plus, l'étape du passage à la seringue sera conservée afin de s'assurer de bien briser l'ADN des cellules lysées. On peut voir à la figure 26 que les deux dernières bandes sont un peu plus hautes que les autres. Ceci s'explique par le fait que ces deux résultats ont été faits sur une autre membrane que j'ai placée à côté de l'autre afin de former la figure 21.

Par la suite, une immunoprécipitation est réalisée avec les deux tampons choisis. Les cellules sont transfectées comme mentionné précédemment. Deux résines sont utilisées afin de comparer leur efficacité. Pour connaître la suite des étapes, se référer à la section 2.5.5.. Les culots et les surnageants sont dosés avec la méthode de *Bio-Rad*. Le volume déposé sur gel est de 15 µl pour le surnageant qui est l'éluat et 0.75 µl du culot sans la résine. Un gel d'électrophorèse est réalisé. (Fig.26) et ceci est suivi d'une hybridation avec l'anticorps anti-V5 sur la protéine de fusion P450c17-V5-His.

Une bande plus épaisse dans les quatre puits contenant le surnageant nous indique qu'il y a présence de la P450c17 mais aussi de d'autres protéines comme le démontrent les nombreuses autres bandes.

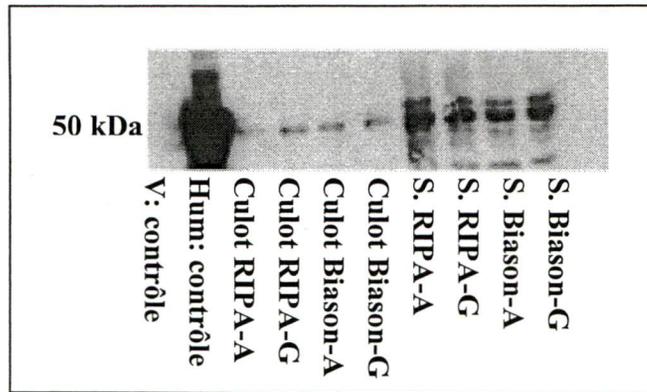


Fig.27. Immunoprécipitation du P450c17 humain avec l'anticorps anti-V5 et l'anti-souris IGg. Deux tampons de solubilisation sont employés celui de Biason et de RIPA. La protéine de fusion P450c17-V5-His est révélée par hybridation avec l'anticorps anti-V5 (dilution; 1:5000). Les cellules COS-1 sont transfectées transitoirement avec du fuGENE 6 6 μ l et 2 μ g d'ADN, 24 heures. Deux types de résine sont employés A: *Protein A-Agarose* et G: *Protein G Sepharose 4 Fast Flow*. Le culot est sans résine et le surnageant est l'éluat final de l'immunoprécipitation. Les contrôles représentent les protéines totales des cellules COS-1 transfectées. V: Vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®], Hum: Clone P450c17 humain

Discussion:

Les études sur la phosphorylation du P450c17 humain sont jusqu'à ce jour très peu avancées. Les équipes du Dr Miller et du Dr Auchus ont permis d'apporter de nouveaux éléments de compréhension sur les deux activités, les substrats et les transporteurs d'électrons nécessaires au P450c17. Depuis peu, de nouveaux résultats furent publiés qui aident à la compréhension du mécanisme d'action régissant l'activation de la 17, 20-lyase. On sait que la phosphorylation des sérines augmente l'activité de la 17, 20-lyase mais les facteurs physiologiques qui régulent cette phosphorylation sont encore inconnus. Selon le Dr Miller (Pandey *et al.*, 2002), lorsque des cellules H295A sont traitées avec des inhibiteurs de la phosphatase tels que l'acide *okadaic*, le *fostriccin* et le cantharidine, il y a une augmentation de l'activité 17, 20-lyase, ce qui suggère l'implication de la protéine phosphatase 2A (PP2A) hydrolyserait les groupement phosphate. Par ailleurs, il semble que la phosphoprotéine SET découverte dans les glandes surrénales, inhiberait PP2A et stimulerait l'activité 17, 20-lyase (Pandey *et al.*, 2002). Ces nouveaux éléments pourraient nous conduire vers une meilleure compréhension des mécanismes qui déclenchent le début de la période de l'adrénarchie et aussi des désordres hyperandrogéniques tels que PCOS.

La plupart des études de phosphorylation rapportées ont été réalisées avec un clone ayant la séquence codante humaine du P450c17 étudié dans des cellules procaryotes transformées telles que des *E.coli*. Ce n'est peut-être pas très représentatif à ce qui se passe dans les cellules de mammifères. Ainsi, notre objectif était de construire un clone contenant la séquence codante humaine du P450c17, de l'exprimer dans les cellules eucaryotes COS-1 où normalement on ne retrouve pas le P450c17. En effet, le modèle cellulaire employé (COS-1) est très semblable au modèle cellulaire humain où l'on retrouve le P450c17 exprimé. Notre second objectif était de faire l'isolation de ce P450c17. Cependant, le but final n'a

malheureusement pas été obtenu car un grand nombre de facteurs incontrôlables ont empêché le passage à l'étape suivante du projet tel que l'analyse par spectroscopie de masse ainsi que l'identification de la ou des position(s) des acides aminés phosphorylés. Dans cette section, il y aura l'analyse des démarches et des résultats obtenus afin d'arriver le plus près possible à l'étape finale. Plusieurs mises au point ont dû être faites en cours de route, ce qui a contribué à ralentir les travaux.

4.1. Construction d'un clone contenant la séquence P450c17 humaine:

Tout d'abord, le clone humain a été réalisé à partir de l'ARN provenant des cellules H295R, qui sont des lignées cellulaires de glandes surrénales humaines, ce type de cellules produit d'une façon naturelle le P450c17. De plus, les H295R ont subi un traitement au 8-Bromo-cAMP. Il est reconnu qu'il y a une augmentation de 1/3 de fois du niveau de l'ARNm codant le P450c17 suite à la présence de 8-Bromo-cAMP dans le milieu de culture de ces cellules et pour sa part, la phosphorylation du P450c17 est de quatre fois plus élevée (Miller *et al.*, 1997). Il faut dire qu'un clonage a aussi été réalisé en utilisant de l'ARN provenant de glandes surrénales humaines fœtales. Un premier essai a été fait mais aucun clone potable n'a été obtenu, nous indiquant qu'il était aussi possible que l'enzyme *C.ther.Polymerase* contenue dans la trousse de RT-PCR étant périmée, ait causé plusieurs erreurs au niveau de la séquence. Il est peu probable que la cause de ces premiers résultats soit attribuable aux glandes surrénales fœtales. Car il est mentionné que la glande surrénale fœtale joue un rôle clé dans la communication entre la mère et son fœtus. À partir de la sixième semaine, il y a déjà synthèse de stéroïdes en particulier du DHEA (Chamoux *et al.* 2002). Donc, les glandes surrénales fœtales sont fonctionnelles très tôt dans le développement du fœtus. Le grand nombre de mutations retrouvées après la réalisation de la RT-PCR ne serait pas attribuable aux glandes surrénales fœtales. Une nouvelle trousse a été achetée et l'expérience répétée;

le clone a été séquencé et deux mutations seulement ont été observées, ce qui prouve que l'ADNc était adéquat. Ces deux mutations sont situées à 1993 pb et 1999 pb. Aux deux endroits, le nucléotide G a été muté en C changeant l'a.a. d'arginine à une proline. Malheureusement, le manque de temps ne m'a pas permis de réaliser la correction de ces mutations bien que la stratégie serait la même que celle employée pour la quatrième mutation chez le clone *Mut3-4*. Il faut aussi préciser qu'au commencement du projet, deux plasmides nous ont été donnés par le Dr Rainey, soit le PLW et CDE. Un grand nombre de PCRs et de séquençages ont été réalisés avec des oligos spécifiques à la séquence codante du P450c17 humain. Par contre, aucun résultat positif n'a été obtenu et aucun renseignement sur la nature du plasmide nous a été communiqué, ce qui nous a fait malheureusement perdre du temps précieux.

Tous les efforts ont donc été subséquentement concentrés sur le clone obtenu à partir de l'ARN des cellules H295R. Lors du séquençage de l'ADNc de ce clone, quelques mutations sont observées silencieuses ou non. Les trois premières mutations sont corrigées par la même stratégie, soit la mutagenèse dirigée. Ce qui consiste à employer des oligos ayant le nucléotide corrigé et de réaliser une PCR. Les trois mutations ayant une certaine proximité entre elles nous a obligé à trouver deux sites de restrictions qui engloberaient les trois mutations sans pour autant que les enzymes de restrictions coupent dans le reste du plasmide. Les enzymes *BspE I* et *BbvC I* ont été choisies, le fragment obtenu possède 969 pb. Pour les deux dernières mutations à 1993 pb et 1999 pb, une autre stratégie a été employée. Étant donné le fait que le premier clone (clone #7) obtenu ne possède pas ces mutations dans cette région, il a suffi de couper un fragment dans celui-ci avec les enzymes *BsmB I* et *BbvC I* et de pratiquer les mêmes digestions avec le clone *Mut3-4* qui possède les trois premières mutations corrigées. Finalement, un clone (clone #10) possédant la séquence complète humaine du cytochrome P450c17, a été obtenu et confirmé par des séquençages manuels et

automatiques. Je tiens à mentionner que la plupart des expériences sont exécutées avec le P450c17 humain provenant des cellules H295R. Il faut préciser que la séquence nucléotique du P450c17 des cellules H295R est identique à celle provenant des glandes surrénales fœtales. C'est pour cela que nous avons décidé de poursuivre avec le clone #10 provenant des cellules H295R.

4.2. Test d'optimisation du taux de transfections dans les cellules COS-1:

Différentes techniques de transfections ont été mises au point dans le laboratoire. Celle qui est utilisée pour la transfection des cellules COS-1, emploie la lipofectAMINE comme réactif avec les conditions suivantes, soit 5 μ l de réactif et 1 μ g d'ADN pendant 24 heures. Étant donné que le but de mon projet est de purifier le cytochrome P450c17 activé et non activé; il faut dès le départ s'assurer de transférer le plus grand nombre de cellules COS-1 possible afin d'obtenir le plus grand nombre de P450c17 exprimé. Donc, des tests de transfections sont réalisés à l'aide d'un vecteur *basic* de la luciférase. Ce vecteur permet une lecture efficace et rapide du nombre de cellules transférées. Ainsi, deux types de réactifs sont comparés, le fuGENE 6 et la lipofectAMINE à diverses conditions et à différents temps d'incubation. On peut voir que le fuGENE 6, donne de meilleurs résultats, peu importe les conditions et le temps d'incubation (Fig. 20). Le ratio 6 μ l de fuGENE 6 pour 2 μ g d'ADN pendant 24 heures d'incubation, semble être les conditions optimales avec un RLU 5 fois plus grand que la condition employée présentement dans le laboratoire, soit 5 μ l lipofectAMINE et 1 μ g d'ADN avec 24 heures d'incubation. De plus, la différence entre le fuGENE 6 avec un ratio 6 μ l et 2 μ g et le ratio 3 μ l et 1 μ g est assez différent, il vaut donc la peine de doubler le ratio et d'augmenter la taux de transfections de $371,8 \times 10^3$ RLU à $527,5 \times 10^3$ RLU.

4.3. Traitements des cellules COS-1 transfectées avec le P450c17:

4.3.1. Dosage des stéroïdes réalisé par RIA:

Après avoir obtenu un clone (clone #10) ayant la séquence codante du P450c17 humain, il faut savoir s'il possède les deux activités, soit la 17α -hydroxylase et la $17, 20$ -lyase. Donc, des incubations avec divers stéroïdes sont réalisées avec ou sans traitement au 8-Bromo-cAMP, les traitements sont les mêmes que ceux mentionnés dans l'article Biason-Lauber et al. 2000. Deux types de contrôle sont employés, un plasmide ne possédant que le vecteur pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®], n'ayant pas les deux activités enzymatiques et un clone ayant la séquence codante du P450c17 d'hamster, inséré dans le vecteur pSV-SPORT 1. On sait que le P450c17 d'hamster possède les deux activités car des expériences sur la caractérisation du cytochrome P450c17 dans les glandes surrénales de l'hamster ont été réalisées dans le laboratoire. Pour ce faire, il y a eu isolation de l'ADNc de la P450c17 à partir d'une librairie de glandes surrénales d'hamster. Cette séquence a été clonée dans le vecteur pSV-SPORT 1 et des incubations avec divers stéroïdes tels que la prégnénolone [14C] et la progestérone[14C] ont été réalisées. Les deux voies sont activées car les produits de la voie Δ^4 (Androstènedione) et les produits de la voie Δ^5 (DHEA) y ont été retrouvés (Cloutier, M. et al., (1997).

Les résultats obtenus sont très encourageants. Premièrement, comme le démontre la figure 21, on ne retrouve qu'une très faible activité avec l'emploi du vecteur seul en présence des trois stéroïdes. Le clone #10 (P450c17) possède effectivement l'activité 17α -hydroxylase. En présence de progestérone, il y a eu transformation en 17-OH-progestérone soit 5.597 (nmol/L)/ μ g de protéines qui sont mesurées par RIA. De plus, en présence de prégnénolone, le stéroïde DHEA est dosé et on retrouve 6.932 (nmol/L)/ μ g. Étant donné qu'il est impossible de doser le 17-OH-prégnénolone car les réactifs nécessaires ne sont pas

disponibles, c'est le dernier produit de la voie Δ^5 qui est dosé afin de déterminer la présence de l'activité. S'il n'y avait pas eu présence de DHEA cela aurait signifié qu'il n'y avait pas eu présence du substrat produit par l'activité 17α -hydroxylase, soit le stéroïde 17-OH-prégnénolone. En effet, on remarque que le clone #10 P450c17 possède aussi l'activité $17,20$ -lyase. L'incubation avec le stéroïde 17-OH-prégnénolone démontre une très forte activité puisqu'on retrouve 27.066 (nmol/L)/ μ g de DHEA dans le milieu. On a aussi dosé l'androstènedione avec une valeur de 0.0794 (nmol/L)/ μ g, ce produit est obtenu lors de la transformation du 17-OH-progestérone par l'activité $17, 20$ -lyase. Ainsi, notre clone possède les deux activités catalytiques du cytochrome P450c17 dans les deux voies soit Δ^4 et Δ^5 .

De plus à cette même figure, on remarque que l'hamster produit une plus grande quantité d'androstènedione (9.920 9nmol/L)/ μ g) que l'humain (0.0794 (nmol/L)/ μ g). Ceci peut s'expliquer par le fait que la voie Δ^4 est plus active chez l'hamster que chez l'humain. Cette affirmation est basée sur les résultats obtenus en 1997 dans le laboratoire du Dr Jean-Guy LeHoux où il avait été démontré que l'hamster possédait une plus grande activité de la voie Δ^4 que celle du bovin (Cloutier, M. et al., (1997). Le bovin est très près de l'humain car tous les deux expriment le CYP17 dans les glandes surrénales, c'était donc l'une des raisons de l'emploi du bovin comme élément de comparaison dans l'expérience menée en 1997. Cependant, il est difficile de faire une comparaison avec le clone humain et d'hamster, étant donné que les deux sont clonés dans des vecteurs différents.

La figure ne comprend pas les traitements réalisés avec le 8-Bromo-cAMP car les valeurs obtenues sont semblables à celles n'ayant pas eu de traitement au 8-Bromo-cAMP. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il est fort possible que la quantité de stéroïdes appliquée n'ait pas été suffisante. Par conséquent, lors de l'addition du 8-Bromo-cAMP aux deux dernières heures d'incubation n'ayant plus de substrats dans le milieu, ceci n'a donné aucune

augmentation significative des produits. C'est pourquoi, il aurait fallu procéder à une courbe de linéarité cinétique avec les substrats à différents temps d'incubation afin de savoir à quel moment et avec quelle quantité de substrats la réaction est épuisée. Mais le manque de temps ne nous a pas permis de réaliser cette expérience.

Par ailleurs, il a été prouvé par certains travaux que les cellules COS-1 possèdent une PKA active et que celle-ci peut apporter une phosphorylation. Par exemple, l'équipe du Dr LeHoux a prouvé qu'il y avait une phosphorylation partielle de la protéine StAR sur les résidus de sérines lorsque celle-ci est transfectée dans les cellules COS-1 sans qu'il n'y ait application d'une stimulation (Lehoux, G.C. et al. 2003). Ceci pourrait donc expliquer la présence d'une phosphorylation de base du P450c17, apportée par les PKAs et la stimulation de l'activité 17,20-lyase. On sait que cette activité n'est présente que s'il y a une phosphorylation et ce point m'amène donc à conclure qu'il y a présence d'une phosphorylation dans les cellules COS-1. De plus, cette phosphorylation basale a été prouvée dans des travaux réalisés par les Drs Miller et Auchus où ils ont démontré très clairement la présence de phosphorylation dans les COS-1. Leurs expériences consistaient en l'ajout de partenaires redox qui se doivent d'être phosphorylés pour apporter une stimulation et une augmentation de l'activité 17,20-lyase. Leurs résultats ont démontré la présence d'une phosphorylation puisqu'il y a eu une augmentation de l'activité 17,20-lyase lorsque les cellules COS-1 étaient transfectées avec les partenaires redox. (Walter, L. et al. 1997). Je crois que le choix de notre modèle cellulaire n'est pas en cause puisque plusieurs chercheurs dans ce domaine, utilisent ce type de cellules.

Au cours de ma maîtrise, j'ai fait l'essai de *westerns-blot* utilisant des anticorps anti-phosphosérines. Cependant, il a été impossible de voir la présence de sérines phosphorylées sur le P450c17 puisque la quantité de protéines employées était trop faible. Une autre solution qui aurait pu être retenue c'est l'emploi d'inhibiteurs pour les protéines kinases afin

de constater si les cellules COS-1 suite à cette incubation possédaient toujours une phosphorylation basale.

4.3.2. *Western-blot* sur les cellules COS-1 traitées:

Suite au traitement avec les différents stéroïdes avec ou non le 8-Bomo-cAMP, les cellules sont grattées et analysées par *western-blot*. Aucune différence n'est remarquée entre les cellules traitées ou non avec le 8-Bomo-cAMP, comme nous le représente la figure 22. L'explication émise est la même que celle retrouvée au point 4.3.1. Un extrait de la zone fasciculée d'hamster est utilisé en tant que contrôle, puisqu'on sait que le cytochrome P450c17 est fortement présent dans cette zone de la glande surrénale. Ce contrôle permet de s'assurer que la bande retrouvée dans les autres puits représente bel et bien le P450c17. On peut remarquer que tous les puits contenant le vecteur seul ne contiennent pas le P450c17. On peut aussi constater que la présence ou non de substrats n'influence pas le cytochrome P450c17. Toutes les bandes visualisées pour le clone #10 P450c17 sont semblables, peu importe le substrat ou le traitement reçu. Cependant, les bandes sont plus prononcées et plus hautes (migrant plus lentement) que celles du clone de l'hamster. L'une des raisons de cette différence serait peut être le fait que le clone #10 humain possède deux épitopes V5 et 6-His qui totalisent 1941 Da alors que le clone hamster possède qu'un seul épitope le 6-His de 840.86 Da. Je ne pense pas que la phosphorylation ait influencée le poids des protéines. Selon une analyse sur le site internet <http://ca.expasy.org/>, la prédiction des résultats pour ce qui est des sites phosphorylés est de 19 pour l'hamster et 18 pour l'humain en prenant compte des sérines, thréonines et des tyrosines. De plus, la glycosylation ne semble pas influencer ces deux cytochromes car dans les deux cas, on ne retrouve qu'un seul site possible. Lorsqu'on compare par analyse *Western* (Fig. 22) la migration de la bande du clone humain à celle obtenue avec une préparation de P450c17 de fasciculée d'hamster, les

deux bandes sont très semblables. Alors, peut-être s'est-il produit une coupure au niveau du cytochrome P450c17 d'hamster. De plus, les puits 19 et 20 (Fig.22) donnent des bandes qui semblent être incorrectes avec l'échantillon, le vecteur ne doit pas donner de bande comme on peut le constater dans les autres puits et l'hamster ne doit pas donner ce profil. Il est possible qu'une erreur de manipulations des échantillons ait pu occasionner ces bandes.

4.4. Isolation et purification du P450c17:

4.4.1. Purification avec la résine de sépharose + NiSO₄ avec différentes concentrations d'imidazole:

Le premier essai entrepris afin de purifier le P450c17, est effectué avec la résine sépharose utilisant l'ion NiSO₄ qui possède la capacité de se lier à une série de 6-His. L'imidazole est employé car il possède une structure très semblable à l'histidine. Ainsi, en augmentant sa concentration, il entre en compétition avec les histidines jusqu'au moment où la protéine décroche de la résine. Cette technique a été réalisée avec le clone P450c17 d'hamster qui possède l'épitope 6-His en 3', celui humain possédait des mutations qui étaient en cours de correction. Les résultats obtenus à la figure 23 ne sont pas très bons bien qu'on puisse observer qu'il y ait un grand nombre de protéines éliminées lors des lavages. On se retrouve avec une très faible quantité de P450c17 dans l'étape d'élution et ou des *Strips*. Divers essais ont été réalisés, par exemple, de modifier la concentration d'imidazole employée, de changer le tampon de lyse utilisé au départ. Aucune des modifications n'a permis d'obtenir le P450c17 en grande quantité. De plus, le protocole de la compagnie Novagen suggérait des volumes pour toutes les étapes de 500 µl sauf à partir des lavages, probablement que ce volume était trop élevé et a contribué à la dilution de notre protéine et à la perte de celle-ci. De plus, le protocole n'était pas adapté aux cellules eucaryotes mais

simplement aux cellules procaryotes. Il est connu que les bactéries transformées, produisent en plus grande quantité et avec une plus grande rapidité des protéines que les cellules eucaryotes. Ce qui pourrait expliquer la raison d'un si grand volume utilisé dans leur protocole.

4.4.2. Purification du P450c17 avec la colonne Ni-NTA avec des solutions à différents pH:

Étant donné les résultats obtenus suite à l'utilisation de colonne fabriquée «maison», on s'est tourné vers des colonnes ne demandant pas de préparations. La compagnie Qiagen offre une colonne Ni-NTA qui possède la caractéristique d'avoir un chélateur (NTA) qui a une forte interaction avec l'ion de nickel. Les résines conventionnelles ont 3 sites de liaisons avec l'ions de nickel, alors que celle-ci possède 4 sites de liaisons ce qui a pour objectif d'augmenter la liaison avec la protéine contenant l'épitope 6-His. Cette colonne a la particularité d'être très peu difficile à utiliser et très rapide. Les solutions employées possèdent des pH différents de basiques à très acides afin de permettre de décrocher les protéines de faibles interactions avec l'ion jusqu'à ce que la protéine ayant une série de 6-His soit décrochée tel que le P450c17 hamster. Pour les mêmes raisons énoncées ci-haut, le clone d'hamster fut employé. À la figure 24, on peut voir que l'application des tampons, B et C, permet d'éliminer une très grande quantité de protéines si on les compare avec les puits contenant les cellules lysées avec le Na-Doc. De plus, si on porte attention, nous pouvons voir une très grande quantité de P450c17 dans le puits portant le nom Ham:Lysat YM-30. Cependant, au cours du passage sur la colonne NTA, il semble que le P450c17 ne se soit pas accroché à la colonne. Dans le dernier puits, on retrouve un signal très faible comparativement au puits Ham:Lysat YM-30. Par ailleurs, la purification ne semble pas très performante, puisqu'on retrouve plusieurs bandes de protéines en bas et en haut de 57 kDa.

D'autres essais ont été réalisés avec différents tampons de lyse mais la purification finale donnait toujours un motif assez semblable à celui représenté à la figure 24.

4.4.3. Immunoprécipitation réalisée sur le P450c17 afin de l'isoler:

Après avoir complété les corrections de mutations sur le clone P450c17 humain qui possède un vecteur ayant les épitopes V5 et 6-His et considérant le fait que les purifications à l'aide de colonnes ne répondent pas à nos attentes, on a cru bon de se tourner vers une purification par technique d'immunoprécipitation. Sachant que l'anticorps monoclonal de souris anti-V5 IgG_{2a} est commercialisé par la compagnie Invitrogen et non retrouvé dans les cellules eucaryotes, c'est celui-ci qui a été employé. En effet, la protéine V5 n'est pas exprimée dans les cellules eucaryotes d'une façon naturelle car elle provient du virus simian 5 (SV5). L'identification de l'épitote V5 fut réalisée en isolant le virus simian d'une espèce canine en 1991 (Southern, J.A., et *al.*, 1991). D'abord, nous avons noté que dans la littérature et dans divers protocoles, les gens emploient des tampons très différents pour la réalisation de l'immunoprécipitation. On a donc entrepris de faire l'essai de trois types de tampons: le NEB, le Bion et le RIPA afin de vérifier lequel est le plus approprié pour lyser les cellules COS-1. La figure 26 démontre les résultats obtenus à la suite de la lyse cellulaire provoquée par les divers tampons. Étant donné que c'est la première fois qu'il y a emploi de ces tampons, on se doit d'observer où se situe le P450c17 humain. Ainsi le culot et le surnageant, avec ou sans passage dans la seringue, ont été mis sur gel pour analyse. Il s'est avéré que les tampons RIPA et Bion donnent des résultats très semblables et que la portion surnageant avec ou sans seringue démontre la présence du P450c17.

L'immunoprécipitation est entreprise avec le tampon Bion et le tampon RIPA en utilisant la seringue. Deux types de résines sont employés soit *Protein-A-Agarose* et la *Protein G Sepharose 4 Fast Flow*. La compagnie Invitrogen suggère l'emploi de la *protein-G*

Sepharose pour la réalisation de l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-V5. Cependant, ceci contredit les informations présentes dans le catalogue de la compagnie Santa Cruz Biotechnology. Celle-ci affirme que la *protein-A-Agarose* a une haute spécificité pour les anticorps de souris IgG_{2A}. Ainsi, nous avons utilisé les deux types de résines afin de comparer leur efficacité. De plus, des problèmes d'immunoprécipitation avec un anticorps de souris nous ont amenés à penser que ceux-ci étaient peut être dus à une affinité plus faible des résines pour ce type d'anticorps. Étant donné que les résines ont une plus grande affinité pour le IgG de lapins, nous avons employé un anticorps polyclonal anti-souris IgG fait chez le lapin en complémentarité avec l'anti-V5. Par la suite, on a solubilisé les culots avec du SDS sans présence de β -ME. Sous ces conditions non réductrices, on peut solubiliser les protéines sans pour autant solubiliser les antigènes liés à la résine. La membrane est hybridée avec l'anti-V5 et on observe dans les quatre derniers puits la présence de plusieurs bandes (Fig.27) dont l'une de celles-ci pourrait représenter le P450c17 ou le P450c17 lié à l'anticorps anti-V5 qui a été employé pour l'exécution de sa précipitation. Afin de confirmer qu'on n'a pas la présence des anticorps qui ont permis l'immunoprécipitation, on a entrepris la déshybridation de la membrane. Celle-ci a été hybridée seulement avec l'anticorps anti-lapin ou l'anti-souris couplé à la peroxidase. On a observé des bandes à la même hauteur que celles précédemment mentionnées, ceci signifie que notre protéine est demeurée liée aux anticorps qui ont servi à sa précipitation. Donc, on se retrouve en présence dans nos fractions d'une grande quantité de protéines, ce qui augmente la difficulté par la suite d'isoler le P450c17, puisqu'il serait difficile d'employer une étape de purification successive à celle-ci, vu la grande contamination apportée par les anticorps demeurés liés. Par exemple, si les anticorps possèdent une série de 6-His, il est difficile d'employer une colonne de nickel car ils peuvent saturer celle-ci et empêcher le P450c17 de se lier.

4.4.4. Purification du P450c17 avec la résine *Pro-Bond* avec des solutions à différents pH:

Étant donnée les résultats insatisfaisants obtenus au moyen de la technique d'immunoprécipitation, on s'est tourné de nouveau vers les colonnes de purification. La séquence codante du P450c17 humain est clonée dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®]. Ce vecteur provient de la compagnie Invitrogen. On a cru bon employer la résine et la colonne suggérées par la compagnie afin d'isoler le cytochrome cloné dans ce type de vecteur. Le premier essai est très convainquant comme le démontre la figure 25. Nous avons obtenu une bande unique à 57 kDa et aucune perte n'a été remarquée dans les lavages. Ainsi la technique est excellente au premier abord bien qu'il faille comme le suggère le protocole, dialyser les fractions avant de les mettre sur gel. Au cours d'expériences subséquentes, on a remarqué que le pH des solutions varie beaucoup avec le temps. Donc, il est primordial de préparer des solutions à usage unique à partir d'une solution stock. De plus, la dialyse s'est avérée non nécessaire, même si l'urée précipite pendant la migration du gel, cela n'affecte pas la migration du matériel. Lorsqu'on colore la membrane PVDF au rouge de Ponceau, on peut observer une très grande quantité de protéines dans les quatre fractions de lavages. Afin d'éliminer le plus grand nombre de protéines, quatre lavages au lieu de deux sont réalisés à chacun des pH et un lavage au pH 4.6 est utilisé afin de s'assurer que toutes les protéines liées faiblement soient décrochées. Cependant, ce dernier lavage à pH 4.6 a été abandonné car il ne semble pas éliminer plus de protéines. Le dosage à 280 nm n'est pas une étape utile car ceci ne me permet pas d'identifier la fraction contenant le P450c17. Ainsi, la visualisation d'une portion de chacune des fractions par hybridation est la seule façon d'identifier la présence du P450c17. Par ailleurs, au cours de discussion avec le Dr Klarskov, il s'est avéré qu'il ne faut en aucun cas isoler la protéine à l'aide d'une migration sur *PAGE*. La technique de spectroscopie de

masse est très sensible (Barker, G. et al., 2003). Le fait de faire migrer la protéine, peut apporter des modifications et affecter la détermination des a.a. phosphorylés. Ainsi, il faut utiliser une autre méthode de purification afin d'éliminer le plus grand nombre de protéines qui peuvent s'être éluées en même temps que le P450c17. On a décidé d'employer la résine *Sephacryl*, celle-ci retient plus ou moins les protéines selon le poids moléculaire et les grosses protéines étant moins retenues sont éluées en premier. Encore là, il faut mettre au point cette technique et déterminer approximativement à quelle fraction le P450c17 sera élué. Un premier essai n'ayant rien donné, nous avons conclu qu'il est préférable de concentrer l'échantillon avant de l'appliquer sur la colonne de *Sephacryl*. Ceci permet une meilleure résolution de la protéine. De plus, l'emploi de la protéine BSA qui possède un poids moléculaire de 67 kDa, nous a permis d'estimer où le P450c17 devrait sortir.

Un gel d'électrophorèse est réalisé sur les 20 premières fractions de 1 ml. L'anticorps anti-P450c17 a révélé une bande plus haute que d'habitude dans différentes fractions. Ces fractions ont été concentrées par centrifuges YM-30. Le vingtième des fractions est mis sur gel d'électrophorèse, malheureusement aucune bande n'a été observée.

Étant la première fois qu'on exécute toutes ces étapes, on devra faire de nouveaux ajustements pour atteindre l'étape ultime soit une digestion à la trypsine et une analyse par spectroscopie de masse. Le problème majeur à la réalisation de ce projet, c'est la quantité de protéines exprimées au départ. Si on possédait une plus grande quantité de P450c17, il serait plus facile d'en faire sa purification. Il est certain que l'on peut retrouver une grande quantité de P450c17 dans certains tissus tels que les glandes surrénales fœtales. Cependant, comment faire pour en réaliser son isolation et sa purification. Cette protéine ne contient aucun épitope donc impossible de réaliser des colonnes de purification. De plus, l'immunoprécipitation ne pourrait être réalisée car le seul anticorps pour la P450c17 est l'anti-P450c17 polyclonale fabriqué chez le lapin et celui-ci contient beaucoup d'impuretés.

Plusieurs efforts ont été faits, tout d'abord le clonage de la séquence P450c17 humaine a été réalisé dans le pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®] qui possède un promoteur CMV et pouvant être employé dans les cellules eucaryotes. Une fois le clone #10 obtenu, des comparaisons du niveau de l'expression du P450c17 ont été réalisées sur électrophorèse. En effet, le clone d'hamster contenu dans le vecteur pSV-SPORT 1 ayant le promoteur SV40, exprime d'une façon moindre le P450c17 que le clone humain contenu dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®], en appliquant les conditions de transfection optimisées (vous référer à la section 4.2.). Finalement, afin de déterminer la localisation du P450c17 dans les cellules, on a procédé à une étude de centrifugation différentielle. Les fractions 800 x g, 8000 x g, 15000 x g, 100000 x g et le surnageant de 100 000 x g contiennent tous une quantité semblable de P450c17. Ainsi, nous n'avons pas trouvé une fraction enrichie de P450c17. Plusieurs ajustements sont à faire mais le manque de temps ne m'a pas permis de finaliser ce projet.

Conclusion:

Le projet proposé était très laborieux, le but était d'identifier les sites de phosphorylation sur le P450c17 humain exprimé dans des cellules eucaryotes. D'abord, il fallait commencer par la construction d'un clone dans son entier, réaliser des tests d'activités sur celui-ci, trouver les meilleures conditions de transfections afin d'atteindre un niveau optimal expression du P450c17. L'emploi des cellules eucaryotes COS-1, était nécessaire car elles n'expriment pas la P450c17. Cependant, comme les cellules eucaryotes ne se reproduisent pas aussi rapidement que les bactéries, nous obtenons une moins grande quantité de matériel. Ce fut l'un des premiers obstacles avec lequel il fallait faire face. Par contre, il y a des solutions à ce problème qui pourraient être apportées. L'emploi d'un système comme le *ViraPowerTM Lentiviral Expression System* de la compagnie Invitrogen qui permet de cloner la séquence désirée dans un vecteur précis et de le cotransfecter avec une ligne cellulaire particulière. Le surnageant est alors mélangé aux cellules COS-1, on a une lignée stable de cellules COS-1 exprimant le P450c17 avec un taux très élevé du niveau d'expression. De plus, l'utilisation d'adénovirus recombinant pourrait s'avérer une solution envisageable. Toutefois, le manque de temps ne m'a pas permis de développer cette avenue. De plus, les techniques d'isolation et de purification n'étaient pas mises au point et la plupart n'avaient jamais été élaborées dans ce laboratoire. Il fallait donc faire plusieurs ajustements tout au long des différentes purifications employées et établir celles convenant le plus à nos attentes. Plusieurs de ces techniques se sont avérées très décevantes et on a vite conclu qu'une deuxième étape de purification serait nécessaire, puisqu'il est extrêmement important d'avoir un matériel pur à plus de 75% lors de la spectroscopie de masse. Toutefois, cette seconde purification n'a fait qu'amplifier la perte de matériel déjà faiblement présente dans les fractions éluées provenant de la résine *Pro-Bond* (Invitrogen).

Finalement, au cours de ce projet on a réalisé qu'il était primordial d'augmenter le niveau d'expression du P450c17 dans les cellules COS-1. Il faudra donc penser à insérer la séquence codante du P450c17 humain dans un autre vecteur et employer une technique telle que les adénovirus qui augmentent de beaucoup la quantité de protéines exprimées. La technique de purification avec la résine *Pro-Bond* (Invitrogen) semble être celle étant la plus efficace et la plupart des ajustements ont été complétés, si bien que les dernières isolations entreprises étaient encourageantes. L'identification des sites de phosphorylations pourra nous mener à comprendre la relation entre l'activité 17, 20-lyase, la phosphorylation et l'adrénarchie.

Remerciements:

Je tiens à remercier les Drs Nicole Gallo-Payet et Jean-Guy LeHoux de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires. Ils m'ont donné la chance de réaliser ma maîtrise et de m'amener à avoir confiance en mes capacités. Grâce à vous, j'ai réussi à dépasser mes limites et à connaître les facettes du monde de la recherche.

J'aimerais aussi, remercier d'une façon exceptionnelle Andrée Lebfèvre qui m'a tendu la main et qui a su par la suite me guider dans mes recherches et dans l'exécution de mes expériences. Tu m'as démontré que la recherche peut être passionnante même si cela demande beaucoup d'énergie. Tu as été présente et patiente. Tu m'as permis d'avoir espoir en la réalisation de mon projet quand je n'y croyais plus. Tu m'as rendu de très grands services et tu m'as été d'un très grand secours. Je te remercie beaucoup.

De plus, je voudrais remercier Lyne Ducharme qui m'a souvent aidée à retrouver mes tubes que j'oubliais un peu partout. Merci de m'avoir transmis ton savoir et de m'avoir accordé du temps afin de m'aider dans mes manipulations. Tu as su porter une oreille attentive, me suggérer des idées et me donner des conseils qui m'aideront dans la vie de tous les jours. Je tiens à te remercier de ton aide et de ta présence attachante.

Je voudrais remercier tous les gens du département de Biochimie qui, de près et de loin, à leur façon, m'ont aidée dans mon cheminement.

Je tiens particulièrement à remercier Dr Alain Bélanger de nous avoir donné l'anticorps de lapin anti-P450C17, cela nous a été d'un grand service. Je voudrais remercier le Dr Klaus Klarskov pour ses judicieux conseils sur la préparation des échantillons afin de réaliser par la suite une spectroscopie de masse. Puis, Dr Raymond Lepage car il a pris le temps de me montrer comment exécuter le dosage RIA et aussi pour le prêt des locaux et des appareils.

J'aimerais remercier deux personnes qui m'ont souvent donné des suggestions et de l'information sur les différentes techniques : le Dr Martin Bisailon ainsi que Dominique Lévesque.

J'aimerais remercier mes parents qui ont su me supporter tout au long de mes études par leur encouragements, leur persévérance et par leur soutien monétaire. Je te remercie maman pour le temps que tu as passé à lire mes travaux qui te semblaient parfois incompréhensibles, de m'avoir soutenue et poussée à poursuivre mes études à la fin de mon secondaire. Aujourd'hui je suis fière et je me dis que tu avais grandement raison. Je veux aussi remercier mon grand frère Sébastien, c'est grâce à toi que j'ai décidé d'aller à l'Université de Sherbrooke. Tu m'as donné plusieurs bons conseils à mes problèmes reliés à l'informatique. Pour terminer, je tiens à remercier RP qui était présent tout au long de mes journées grâce à internet et qui, en quelques coups de touches me donnait des conseils afin de régler mes problèmes d'ordinateur. De plus, tu as su prêter une oreille attentive quand j'en avais besoin. Par ton humour tu as égayé mes journées.

A vous tous, mille fois merci.

Références:

- Auchus, R.J. (2001). The genetics, pathophysiology, and management of human deficiencies of P450c17. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **30**: 101-119.
- Auchus, R.J. et Miller, W.R. (1999). Molecular modeling of human P450c17 (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase): Insights into reaction mechanisms and effects of mutations. *Mol. Endo.* **13**: 1169-1182.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. et Struhl, K. (1997). Short protocols in molecular biology. Troisième édition, Wiley; U.S.A.
- Barker, G., Want, E., Boydston, J., et Siuzdak, G. (2003). Mass spectrometry. *Science of Synthesis/ Houbenn-Weyl.* **7.6**: 680-695.
- Barrie, S.E. et Jarman, M. (1996). Inhibitors of cytochrome P450_{17 α} (17- α -hydroxylase/C17,20 lyase). *Endocr. Relat. Cancer.* **3**: 25-39.
- Baulieu, E.E. (1978). Hormones, aspects fondamentaux et physio-pathologiques. Hermann éditeurs des sciences et des arts; Paris, 549p.
- Becker, K.L. (1990). Principles and practice of endocrinology and metabolism. Philadelphia: J.B. Lippincott Compagny, 1909p.
- Biason-Lauber, A., Kempken, B., Werder, E., Forest, M.G., Einaudi, S., Ranke, M.B., Matsuo, N., Brunelli, V., Schönle, E.J. et Zachmann, M. (2000). 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase deficiency as a model to study enzymatic activity regulation: Role of phosphorylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**: 1226-1231.
- Bolté, E., Coudert, S. et Lefebvre, Y. (1967). Steroid production from plasma cholesterol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **38**: 394-400.
- Borkowski, A.J., Levin, S., Delcroix, C., Mahler, A. et Verhas, V. (1967). Blood cholesterol and hydrocortisone production in man: Quantitative aspects of the utilization of

circulating cholesterol by the adrenals at rest and under adrenocorticotropin stimulation. *J. Clin. Invest.* **46**: 797-811.

Bradshaw, K.D., Waterman, M.R., Couch, R.T., Simpson, E.R. et Zuberr, M.X. (1987). Characterization of complementary deoxyribonucleic acid for human adrenacortical 17 alpha-hydroxylase: a probe for analysis of 17 alpha-hydroxylase deficiency. *Mol. Endocrinol.* **1**: 348-354.

Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J. et Parker, K.L. (1997). Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **21**: 11540-11545.

Carroll, M., Campbell, R.D. et Porter, R.R. (1985). Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 521-525.

Chamoux, E., Breault, L., LeHoux, J.G. et Gallo-Payet, N. (1999). Involvement of the angiotensin II type 2 receptor in apoptosis during human fetal adrenal gland development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 4722-4730.

Chamoux, E., Narcy, A., LeHoux, J.G. et Gallo-Payet, N. (2002). Fibronectin, laminin, and collagen IV as modulators of cell behavior during adrenal gland development in the human fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 1819-28

Chang, C., Wu, D.A., Lai, C.C, Miller, W.L. et Chung, B.C. (1988). Cloning and structure of the human adrenodoxin gene. *DNA.* **7**: 609-615.

Chung, B., Matterson, K.J., Voutilainen, R., Mohandas, T.K. et Miller, W.L. (1986). Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 8962-8966.

- Cloutier, M., Fleury, A., Courtemanche, J., Ducharme, L., Masson J.I. et LeHoux, J.G. (1997). Characterization of the adrenal cytochrome P450C17 in the hamster, a small animal model for the study of adrenal dehydroepiandrosterone biosynthesis. *DNA Cell Biol.* **16**: 357-368.
- Cugini, P., Scavod, D., Halberg, F., Schramma, A., Push, A.J. et Franke, H. (1982). Methodologically critical interaction of circadian rhythms: sex and aging characterize serum aldosterone of female andropause. *J. Gerontol.* **37**: 403-411.
- Curnow, K.M., Tusie-Luna, M.T., Pascoe, L., Natarajan, R., Gu, J.L., Nadler, J.L. et White, P.C. (1991). The product of the *CYP11B2* gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol. Endocrinol.* **5**: 1513-1522.
- Cutler, G.B., Glenn, M., Bush, M., Hodgen, G.D., Graham, C.E. et Loriaux, D.L. (1978). Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocr. Rev.* **1**: 397-410.
- DiBlasio, A., Voutilainen, R., Jaffe, R.B. et Miller, W.L. (1987). Hormonal regulation of messenger ribonucleic acids for P450_{sc} (cholesterol side-chain cleavage) and P450_{c17} (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase) in cultured human fetal adrenal cells. *J. Endocrinol. Metab.* **65**: 170-175.
- Dupont, E., Zhao, H.F., Rheume, E., Simard, J., Luu-The, V., Labrie, F. et Pelletier, G. (1991). Localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase in rat gonads and adrenal glands by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology.* **127**: 1394-1403.
- Fevold, H.R., Lorence, M.C., McCarthy, J.L., Trant, J.M., Kagimoto, M., Waterman, M.R. et Mason, J.I. (1989). Rat P450 (17 α) from testis characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17, 20-lyase reactions. *Mol. Endocrinol.* **3**: 968-975.

- French, J., Guengerich, F.P. et Coon, M.J. (1980). Interactions of cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase, phospholipid, and substrate in the reconstituted liver microsomal enzyme system. *J. Biol. Chem.* **255**: 4112-4119.
- Gallo-Payet, N. (1993). Nouveaux concepts sur la régulation de la sécrétion d'aldostérone ; interactions endocrines, paracrines, autocrines et neurocrines. *Médecine/Sciences.* **9**: 943-951.
- Greenspan, F.S. (1991). Basic and clinical endocrinology. Appleton & Lange Pub., Norwalk; Connecticut, 786p.
- Griffin, J.E. et Ojeda, S.R. (1992). Textbook of endocrine physiology. Oxford University Press; New York, 351p.
- Gwynne, J.T. et Strauss, J.F. 3rd. (1982). The role of lipoprotein in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* **3**: 299-329.
- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**: 779-804.
- Harlow, E. et Lane, D. (1988). Antibodies A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory; U.S.A., 756p.
- Haus, E., Nicolau, G., Lakatua, D.J., Sackett-Lundeen, L. et Petrescu, E. (1989). Circadian rhythm parameters of endocrine functions in elderly subjects during the seventh to the ninth decade of life. *Chronobiologia.* **16**: 331-352.
- Horton, R.H., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, D.J. et Scrimgeour, G.K. (1994). Principes de biochimie. De Boeck Université; Bruxelles, 720p.
- Hum, D. et Miller, W.L. (1993). Transcriptional regulation of human genes for steroidogenic enzymes. *Clin. Chem.* **39**: 333-340.
- Idelamn, S. et Verdetti, J. (2000). Endocrinologie et communications cellulaires. EDP Sciences; France, 584p

- John, M., John, M.C., Asley, P., MacDonald, R.J., Simpson, E.R. et Waterman, M.R. (1984). Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 5628-5632.
- Kagimoto, M., Kagimoto, K., Simpson, E.R. et Waterman, M.R. (1984). Transcription of bovine adrenotoxin gene produces two species of mRNA of which only one is translated into adrenodoxin. *J. Biol. Chem.* **263**: 8925-8928.
- Katagiri, M., Suhara, K., Shiroo, M. et Fujimura, Y. (1982). Role of cytochrome b5 in the cytochrome P-450-mediated C21-steroid 17, 20-lyase reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**: 379-384.
- Kimuara, K. et Suzuki, K. (1965). Enzymatic reduction of non-heme iron protein (adrenodoxin) by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Biochem. Res. Commun.* **20**: 373-379.
- Kominami, S., Shinzawa, K. et Takemori, S. (1982). Purification and some properties of cytochrome P-450 specific for steroid 17 alpha-hydroxylation and C17-C20 bond cleavage from guinea pig adrenal microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**: 916-21.
- Labrie, F., Simard, J., Luu-The, V., Bélanger, A. et 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. Mol. Biol.* **43**: 805-826.
- Laycock, J.F. et Wise, P.H. (1983). *Essential endocrinology*. Second Edition, Oxford Medical Publications; Oxford, 371p.
- LeHoux, J.G., Mathieu, A., Lavigne, P. et Fleury, A. (2003). Adrenocorticotropin regulation of steroidogenic acute regulatory protein. *Microsc Res Tech.* **61**: 288-99.

- Lin, D., Harikrishna, J.A., Moore, C.C.D., Jones, K.L. et Miller, W.L. (1991). Missense mutation serine106----proline causes 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J. Biol. Chem.* **266**: 15992-15998.
- Lin, D., Black, S.M., Nagahama, Y. et Miller, W.L. (1993). Steroid 17 alpha-hydroxylase and 17, 20-lyase activities of P450c17: contributions of serine 106 and P450 reductase. *Endocrinology.* **132**: 2498-2506.
- Lin, D., Zhang, L., Chiao, E. et Miller, W.L. (1994). Modeling and mutagenesis of the active site of human P450c17. *Mol. Endocrinol.* **58**: 392-402.
- Linquette, M. (1975). *Endocrinologie*. Éditions J.-B. Baillière; Paris, 352p.
- Löhr, J.B. et Kühn-Velten, N. (1997). Protein phosphorylation changes ligand-binding efficiency of cytochrome P450c17 (*CYP17*) and accelerates its proteolytic degradation: Putative relevance for hormonal regulation of *CYP17* activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**: 403-408.
- Marieb, E. (1993). *Anatomie et physiologie humaines*. Les Éditions du Renouveau Pédagogique Inc; Québec, 1078p.
- Mathieu, A.P., Fleury, A., Ducharme, L., Lavigne, P. et LeHoux J-G. (2002). Insights into steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-dependent cholesterol transfer in mitochondria: evidence from molecular modeling and structure-based thermodynamics supporting the existence of partially unfolded states of StAR. *J. Mol Endocrinol.* **29**: 327-345.
- Michel, J-B., Amal, J.F., Cohen-Solal, A., Denolle, T. et Drouin, P. (1992). *Médecine cardiovasculaire du système rénine-angiotensine*. Éditions Pradel; Paris, 415p.
- Miller, W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* **9**: 295-318.

- Miller, W.L., Auchus, R. J., and Geller, D. H. (1997). The regulation of 17, 20-lyase activity. *Steroids*. **62**: 133-142.
- Miller, W.L. et Strauss, J.F. (1999). Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **69**: 131-141.
- Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A. et White, P.C. (1989). Characterization of two genes encoding human steroid 11-béta-hydroxylase (P45011b). *J. Biol. Chem.* **264**: 20961-20967.
- Morohashi, K., Sogowa, K. Omura, T. et Fujii-Kuriyama, Y. (1987) Gene structure of human cytochrome P450(scc), cholesterol desmolase. *J. Biochem.* **101**: 819-887.
- Monno, S., Ogawa, H., Date, T., Fujioka, M. et Miller, W.L. (1993). Mutation of histidine 373 to leucine in cytochrome P450c17 causes 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J. Biol. Chem.* **268**: 25811-25817.
- Müller, A., Müller, J.J., Muller, Y.A, Uhlmann, H., Bernhardt, R. et Heinemann, U. (1998). New aspects of electron transfert revealed by the crystal structure of truncated bovine adrenodoxin, Adx (4-108). *Structure*. **6**: 269-280.
- Müller-Enonch, D., Churchill, P., Fleisher, S. et Guengerich, F.P. (1984). Interaction of liver microsomal cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase in the presence and adsence of lipid. *J. Biol. Chem.* **259**: 8174-8182.
- Nafziger, A., Herrington, D.M. et Bush, T.L. (1991). Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfates: their relation to cardiovascular disease. *Epidemiologic. Rev.* **13**: 267-293.
- Nakajin, S., Hall, P.F. et Onoda, M. (1981). Testicular microsomal cytochrome P-450 for C21 steroid side chain cleavage. Spectral and binding studies. *J. Biol. Chem.* **256**: 6134-6139.

- Nakajin, S., Shinoda, M., Haniu, M., Shively, J.E. et Hall, P.F. (1984). C21 steroid side chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsomes. Purification and characterization of the 17 alpha-hydroxylase/17, 20 lyase cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **259**: 3971-3976.
- Nebert, D.W. et Gonzalez, F.J., (1987). P450 genes : structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem* **56**:945-993.
- Neber, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii, K.Y, Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Lopur, J.C., Sato, R., Waterman, M.R. et Waxman D.J. (1991). The P450 superfamily update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **10**: 1-14.
- Oonk, R., Krasnow, J.S., Beatie, W.G. et Richards, J.S. (1989). Cyclic AMP-dependant and independent regulation of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450_{sc}) in rat ovarian granulosa cells and corpora lutea: cDNA and amino acid sequence of rat P450_{sc}. *J. Biol. Chem.* **264**: 21934-21942.
- Paker, L.N. et Odell, W.D. (1980). Control of adrenal androgen secretion. *Endocr. Rev.* **1**: 397-410.
- Pandey, A.V., Mellon, S.H. et Miller, W.L. (2002). Protein phosphatase 2A and phosphoprotein SET regulate androgen production by P450_{c17}. *J. Bio. Chem.* Manuscript M209527200
- Perrin, A., Defaye, G., Guidicelli, C. et Chambaz, E.M. (1991). Purification and properties 17 alpha-hydroxylase from calf testis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**: 431-435.
- Sasano, H., White, P.C., New, M.I. et Sasano, N. (1988). Immunohistochemistry of cytochrome P450 21-hydroxylase: Microscopic examination of the enzyme in the bovine adrenal cortex and kidney. *Endocrinology.* **122**: 291-295.

Shuara, K., Fujimura, Y., Shiroo, M. et Katagiri, M. (1984). Multiple catalytic properties of the purified and reconstituted cytochrome P-450 (P-450sccII) system of pig testis microsomes. *J. Biol. Chem.* **259**: 8729-8736.

Simpson, E., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Micheal, M.D., Mendelson, C.R. et Bulun, S.E. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* **15**: 342-355.

Southern, J.A., Young, D.F., Heaney, F., Baumgartner, W.R. et Randall, R.E. (1991). Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J. Gen. Virol.* **72**: 1551-7.

Sparkes, R., Klisak, I. et Miller, W.L. (1991). Regional mapping of genes encoding human steroidogenic enzymes: 450scc to 15q23-q24, adrenodoxin to 11q22; adrenodoxin reductase to 17q24-q25; and P450c17 to 10q24-q25. *DNA Cell Biol.* **10**: 359-365.

Stocco, D.M. (1999). An update on the mechanism of action of the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein. *Exp. Clin. Endocr. Diab.* **107**: 229-235.

Thompson, J.E. et Siiteri, P.K. (1974). The involvement of human placental microsomal cytochrome P450 in aromatization. *J. Biol. Chem.* **249**: 5373-5378.

Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss, J.F., III, Lin, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, K.P., Hart, I.M. et Clark, B.J. (1995). Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **11**: 4778-4782.

Touitou, Y., Sulon, J., Bogdan, A., Touitou, C., Reinberg, A., Beck, H. et Sodeyoz, J.C. (1982). Adrenal circadian system in young and elderly humans subjects: a comparative study. *J. Endocrinol.* **93**: 201-210.

- Van Der Hoeven, T. et Coon, M.J. (1974). Preparation and properties of partially purified cytochrome P450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **249**: 6302-6310.
- Van Weerden, W., Bierings, H.G., Van Steenbrugge, G.J., De Jong, F.H. et Schröder, F.H. (1992). Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sciences.* **50**: 857-861.
- Waterman, M.R. (1998). Steroidogenesis, StAR and PBR: is there light at the end of the tunnel? *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**: 121-122.
- White, P. (1994). Genetic diseases of steroids metabolism. *Vitamines & Hormones.* **49**: 131-195.
- White, P., Grossenberg, D., Onufer, B.J., Chaplin, D.D., New, M.I., Dupont, B. et Strominger, J.L. (1985). Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 1089-1093.
- Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M. et Larsen, P.R. (1998) Williams textbook of endocrinology, 9th edition. Saunders Company; U.S.A., 1819p.
- Yanase, T., Simpson, E.R. et Waterman, M.R. (1991). 17 α -hydroxylase / 17, 20-lyase deficiency: From clinical investigation to molecular definition. *Endocr. Rev.* **12**: 91-108.
- Zhang, L.H., Rodriguez, H., Ohno, S. et Miller, W.L. (1995). Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17, 20-lyase activity: Implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10619-10623.
- Zilz, A., Li, H., Castello, R., Papadopoulos, V. et Widmaier, E.P. (1999). Developmental expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the advent of steroidogenesis in rat adrenal glands. *Endocrinology.* **140**: 859-864

Zuber, M.X., Simpson, E.R. et Waterman, M.R. (1986). Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS-1) cells. *Science*. **234**: 1258-1261.

Zumoff, B., Rosenfeld, R.S., Strain, G.W., Levin, J. et Fukushima, P.K. (1980). Sex differences in the twenty-four hour mean plasma concentrations of dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and the DHEA to DHEAS ratio in normal adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**: 330-333.