



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Développement d'un test in vitro de méthylation de la coiffe de l'ARN messenger

Cassart, Jean-Pol

Award date:
1987

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

1987



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

DEVELOPPEMENT D'UN TEST in vitro DE
METHYLATION DE LA COIFFE DE
L'ARN MESSAGER.

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

CASSART Jean Pol.

J'exprime ma reconnaissance au Professeur J. Delcour qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire et qui a su, durant cette année, orienter mon travail et me donner des conseils judicieux.

Au Docteur J. Vandenhoute, qui m'a aidé par ses discussions enrichissantes et ses suggestions fort utiles, j'exprime ma gratitude.

Je remercie spécialement Mademoiselle G. Renauld et Madame C. Feron-Verhaege pour leur accueil, leur aide et l'ambiance amicale qu'elles ont su créer.

J'adresse également mes remerciements à Mesdames R.M Wilmet-Génicot, M. Dewez-Jadin, C. Dernoncourt-Sterpin, J. Libion ainsi qu'à Monsieur B. Delcour et Madame M.M. Gonze pour leur précieuse assistance technique.

A Messieurs Depiereux, ^{LOCHT}~~Mahillon~~, Mainferme et Trausch, qui ont bien voulu lire ce mémoire, je témoigne ma reconnaissance.

Je remercie Messieurs J. Gilliard, P. Hols, O. Laloux et V. Marchant pour leur disponibilité ainsi que pour l'excellente ambiance de travail qu'ils ont partagée.

Je voudrais également remercier Véronique et mon frère pour l'aide qu'ils ont apportée à la réalisation de ce travail ainsi que mes parents qui m'ont permis d'entreprendre ces études.

Dinant, août 1987.

LISTE DES ABREVIATIONS.

A	: adénine
Abs	: absorbance
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADN-c	: ADN complémentaire
Ad 2	: adénovirus de type 2
ARN	: acide ribonucléique
hnARN	: acide ribonucléique hétérogène nucléaire
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ARNr	: acide ribonucléique ribosomal
ARNt	: acide ribonucléique de transfert
BET	: bromure d'ethidium
C	: cytosine
CBP	: "cap binding protein" ou protéine fixatrice de coiffe
CH ₃	: méthyle
cpm	: coup par minute
CPV	: virus de la polyhédrose cytoplasmique
D	: Dalton
DO	: densité optique
DTT	: dithiothréitol
EDTA	: éthylènediamine-tétraacétate
eIF	: facteur d'initiation eucaryotique
g	: gramme
G	: guanine
GMP	: guanosine monophosphate
GDP	: guanosine diphosphate
GTP	: guanosine triphosphate
ITP	: inosine triphosphate
NaAc	: acétate de sodium

kD	: kilodaltons
M	: molaire
μ Ci	: microcurie
μ g	: microgramme
μ l	: microlitre
ml	: millilitre
mM	: millimole
ng	: nanogramme
nM	: nanomole
P	: poids
PM	: poids moléculaire
SAH	: S-adénosylhomocystéine
SAM	: S-adénosylméthionine
SDS	: sodium dodécyl sulfate
T	: thymine
TCA	: acide trichloracétique
Temed	: tétraméthyléthylène diamine
tpm	: tour par minute
U	: uridine
V	: volume
VSV	: virus de la stomatite vésiculeuse

INTRODUCTION

I.- L'ARNm EUCARYOTIQUE.

I. 1- Caractéristiques structurales de l'ARNm

I.1.1- Structure primaire

- a. la coiffe
- b. le leader
- c. la partie codante du messenger
- d. le trailer
- e. la queue de poly (A)

I.1.2- Structure secondaire

I. 2- Biosynthèse de l'ARNm

I.2.1- l'ARN polymérase

I.2.2- les promoteurs

I.2.3- l'initiation

I.2.4- l'élongation et la terminaison

I.2.5- la transcription chez les bactériophages

- a- les ARN polymérases
- b- les promoteurs
- c- les étapes de la transcription

I.2.6- la transcription in vitro

- a- les systèmes eucaryotiques
- b- les systèmes bactériens
- c- les systèmes de bactériophage

I. 3- Modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm

I.3.1- Le coiffage

I.3.2- La polyadénylation

I.3.3- Les méthylations internes

I.3.4- L'épissage

II.- LA COIFFE.

II. 1-Définitions, types, distributions

II. 2-Enzymes et mécanismes de coiffage

II.2.1- Les virus

a- Le virus de la vaccine et son enzyme de coiffage

- purification des enzymes
- mécanismes

b- Les autres virus

II.2.2- Les eucaryotes

a- L'ARNm 5' triphosphatase

b- L'ARNm guanylyltransférase

c- L'ARNm (guanine -7-) -méthyltransférase

d- L'ARNm (nucléotide -2'-)-méthyltransférase

e- L'ARNm (2'-O-méthyladénosine-N6-)méthyltransférase

II. 3-Rôles fonctionnels de la coiffe de l'ARNm

II.3.1- La transcription

II.3.2- La stabilité de l'ARNm

II.3.3- Les modifications de l'ARNm

II.3.4- La synthèse protéique

a- l'importance du méthyle

b- l'importance de la coiffe

c- effet inhibiteur des analogues de coiffe

II.4 - La coiffe et l'initiation de la synthèse protéique

a- la formation du complexe ternaire

b- les facteurs d'initiation

c- l'association de la sous-unité 40 S avec l'ARNm

III.- LA METHYLATION.

III. 1-La méthylation dans la cellule

III.1.1- Méthylation des protéines

III.1.2- Méthylation de l'ADN

III.1.3- Méthylation des ARN

III. 2-La méthylation in vitro

III.2.1- Substrat l'ARNm (guanine-7-)-méthyl-
transférase du virus de la vaccine

III.2.2- Méthylation in vitro de l'ARNm
sous-méthylé de levure par l'ARNm
(guanine-7-)-méthyltransférase purifiée

- a- construction d'une souche strictement
auxotrophe pour la SAM
- b- méthylation in vitro de l'ARNm
sous-méthylé

III. 3-But du travail

MATERIEL ET METHODES

I.- PURIFICATION PARTIELLE DE L'ARNm (guanine-7-)

-METHYLTRANSFERASE DE *Saccharomyces cerevisiae*.

- I. 1- Souche de levure
- I. 2- Milieu de culture
- I. 3- Culture des cellules de levure
- I. 4- Lyse des cellules
- I. 5- Dosage des protéines
- I. 6- Test d'activité de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase
- I. 7- Purification de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase
- I. 8- Analyse des protéines par électrophorèse verticale

II.- CLONAGE DE L'ADN-c DU LYSOZYME DE POULE .

- II.1- Plasmide et ADN-c
- II.2- Souche bactérienne
- II.3- Transformation des bactéries
 - II.3.1-La transformation proprement dite
 - II.3.2-Sélection et identification des transformants
 - a- composition des milieux de culture
 - b- sélection des transformants
 - c- identification des recombinants
- II.4- Préparation d'ADN plasmidique
 - II.4.1-Préparation rapide d'ADN plasmidique
 - II.4.2-Extraction au phénol/chloroforme
 - II.4.3-Préparation d'ADN plasmidique par lyse claire
 - a- lyse claire
 - b- isolement du plasmide par gradient de chlorure de césium
 - c- purification et concentration du plasmide
- II.5- Manipulations de l'ADN plasmidique
 - II.5.1-Réactions de restriction
 - II.5.2-Réaction de ligation
- II.6- Analyse de l'ADN plasmidique
- II.7- Extraction d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose

III.- SYNTHÈSE in vitro D'ARNm

III.1- Préliminaire

III.2- Plasmides

III.3- Transcription in vitro

III.4- Purification de l'ARNm

IV.- COIFFAGE in vitro

V.- METHYLATION in vitro DE L'ARNm

RESULTATS ET DISCUSSION

I.- PURIFICATION PARTIELLE DE L'ARNm (guanine-7-)

-METHYLTRANSFERASE DE Saccharomyces cerevisiae.

- I. 1- Activité d'un extrait brut de levure
- I. 2- Chromatographie sur QAE-cellulose
 - I. 2.1-Détermination de la force ionique d'élution
 - I. 2.2-Elution de l'activité
- I. 3- Chromatographie sur CM-sépharose
- I. 4- Chromatographie sur DNA-agarose
- I. 5- Analyse des protéines par électrophorèse

II.- CLONAGE DE L'ADN-c DU LYSOZYME DE POULE .

- II.1- Purification et clonage de l'ADN-c lys
- II.2- Taille et carte de restriction de l'ADN-c lys
- II.3- Orientation de l'ADN-c lys

III.- SYNTHÈSE in vitro d'ARNm

- III.1- Principe de la méthode
 - III. 1.1-Rappel
 - III. 1.2-Choix de l'enzyme linéarisante
 - a) Position du site de coupure
 - b) Type de coupure
 - III. 1.3-Remarques.

III.2- Mise au point expérimentale

III. 2.1-Synthèse d'ARN_m à partir de plasmides
circulaires

III. 2.2-Synthèse d'ARN_m à partir de plasmides
linéarisés

III. 2.3-Problème lié à la synthèse d'ARN_m ciffé

III.3- Synthèse d'ARN_m à partir du plasmide pGem-7

III.4- Purification de l'ARN_m synthétisé in-vitro

IV.- METHYLATION in vitro DE L'ARN_m

IV.1- Conditions expérimentales

IV.2- Résultats obtenus

IV. 2.1-l'ARN_m est-il dégradé durant la méthylation ?

IV. 2.2-la méthyltransférase est-elle inhibée ?

IV. 2.3-le nombre de molécules d'ARN_m est-il
suffisant ?

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

INTRODUCTION

I. L'ARN messenger EUKARYOTIQUE.

La structure tridimensionnelle d'une protéine, ses caractéristiques physiques et, éventuellement son rôle fonctionnel, reposent sur la séquence en acides aminés dont cette protéine est constituée. Cette séquence est génétiquement déterminée par la séquence en nucléotides au niveau de l'ADN.

L'information génétique est perpétuée par la réplication. Ce processus implique la duplication de l'ADN qui aboutit à la synthèse de deux copies identiques à la matrice nucléaire mère.

L'information doit également se transmettre. Or, l'ADN des eucaryotes est presque totalement contenu dans le noyau alors que la synthèse protéique s'effectue surtout dans le cytoplasme. Une molécule, autre que l'ADN, doit transporter l'information : l'ARN est un candidat logique. On la trouve à la fois dans le noyau et le cytoplasme. De plus, la synthèse protéique est accompagnée d'une augmentation de l'ARN cytoplasmique et de sa vitesse de renouvellement (Lehninger, 1985).

L'ARN était l'élément manquant du dogme de la biologie moléculaire selon lequel l'information génétique passe de l'ADN vers l'ARN puis vers les protéines grâce aux réactions de transcription et de traduction. Jacob et Monod appelèrent cet ARN le messenger. A côté de celui-ci, d'autres ARN sont synthétisés.

Les ARN ribosomiques (ARNr) s'associent avec plus de 70 protéines pour former un complexe hautement structuré : le ribosome (Vandenhoute, 1982). (fig. 1).

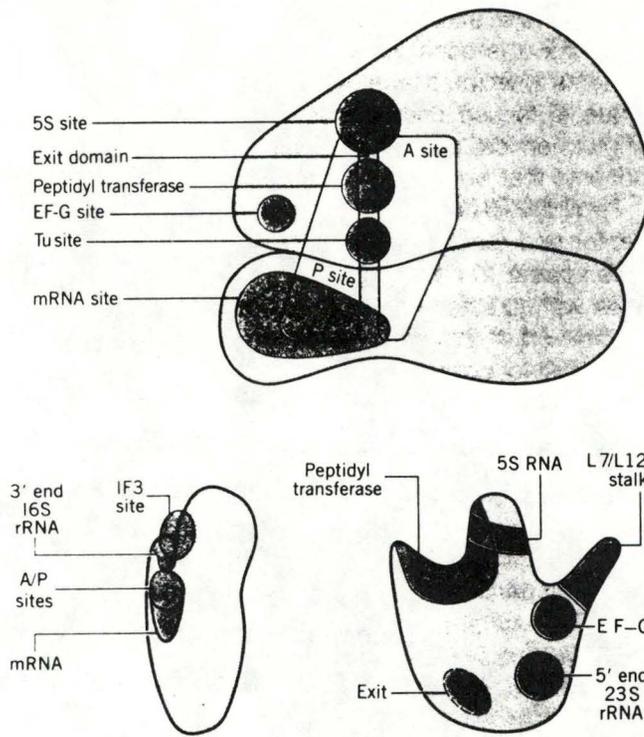


Fig.1.-Répartitions des différents ARNr dans les deux sous-unités du ribosome procaryotique.

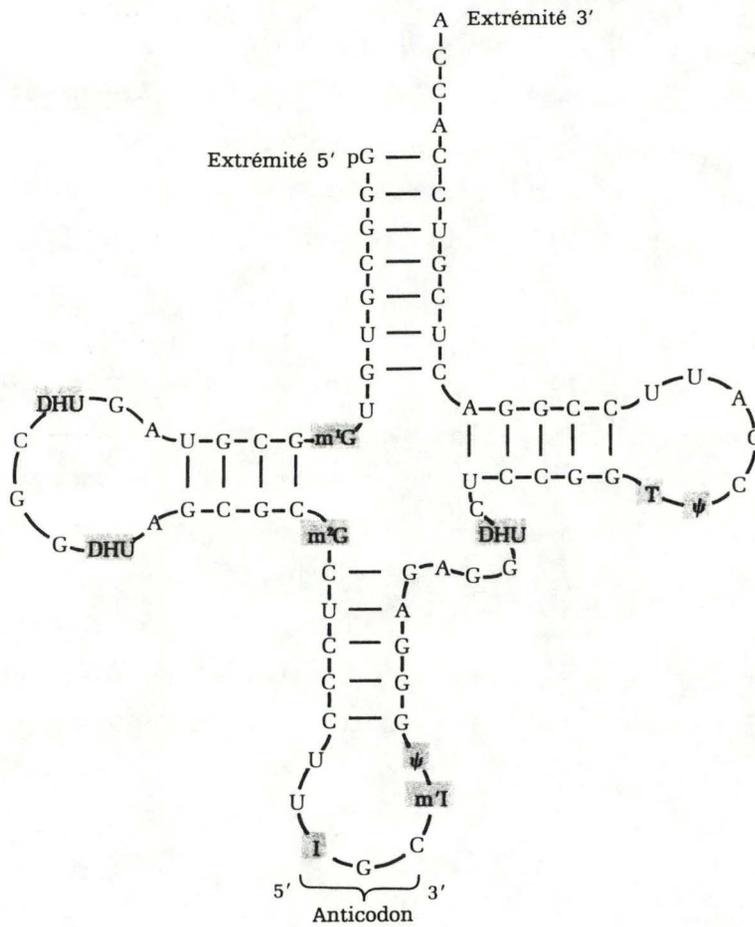


Fig.2.-La séquence nucléotidique du tRNA de l'alanine de levure représentée sous sa conformation en "feuille de trèfle".

Les ARN de transfert (ARnt) sont de petits polyribonucléotides formés d'une seule chaîne continue d'environ 80 nucléotides et dont la conformation bidimensionnelle présente la forme d'une "feuille de trèfle" (Vandenhoute, 1981). Ils assurent le transfert d'acides aminés du cytoplasme vers le peptide naissant dans l'ordre dicté par la séquence nucléotidique de l'ARN messager (fig. 2).

Contrairement à l'ARNm bactérien polycistronique, l'ARNm eucaryotique est invariablement traduit en une seule chaîne polypeptidique (Lewin, 1985). De plus, ce dernier n'est pas directement traductible, comme l'est son analogue bactérien, mais fait l'objet d'une série de modifications covalentes dans sa séquence et à ses extrémités 5' et 3', au cours de son exportation nucléocytoplasmique. C'est la maturation post-transcriptionnelle de l'ARNm eucaryotique.

Une de ces modifications attirera plus particulièrement notre attention : la coiffe méthylée de l'extrémité 5'.

I.1. Caractéristiques structurales de l'ARNm.

I.1.1. Structure primaire (Vandenhoute, 1980).

La figure 3 résume les régions identifiées dans la séquence de l'ARNm.

a. La coiffe

A son extrémité 5' terminale, l'ARNm des eucaryotes comporte très généralement une guanine méthylée en N7 . Celle-ci est liée par un pont 5'-5'triphosphate à l'avant dernier résidu de la chaîne polynucléotidique. L'anté - et le pénultième nucléotide peuvent être méthylés en position 2'-O du ribose.

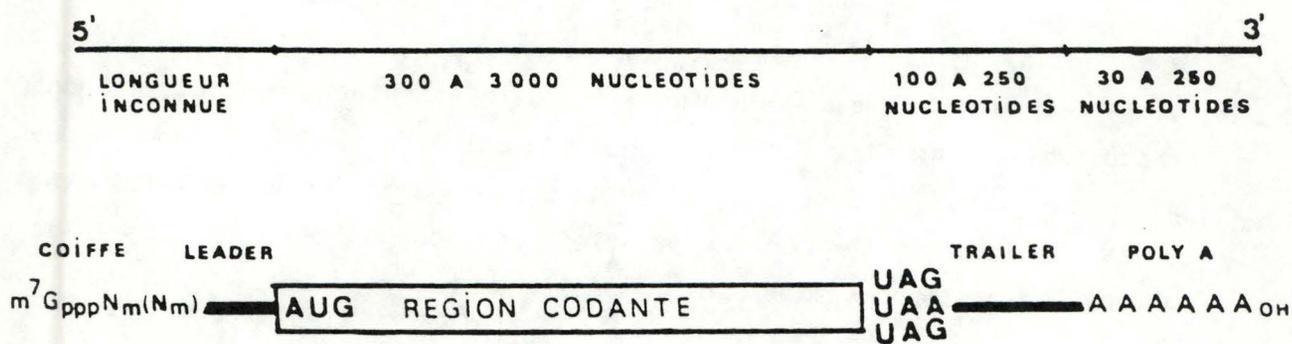


Fig.3.- Représentation schématique du mRNA d'eucaryote.

b. Le leader.

Cette séquence de nucléotides de longueur variable, comprise entre la coiffe et le codon initiateur AUG, ne code pas pour des protéines.

c. La partie codante du messenger.

Le premier codon du messenger est toujours AUG, le codon initiateur, tandis que le dernier est un codon stop ou non-sens (UGA, UAA, UAG).

Les autres bases de cette séquence constitue une suite ininterrompue de triplets qui déterminent la succession des acides aminés de la chaîne polypeptidique complète.

d. Le trailer.

Le trailer est une région non-codante. Elle est caractérisée par la présence d'une séquence AAUAAA qui se trouve du côté 3' de la plupart des ARNm étudiés. Cette séquence est très conservée, tout comme celle de 10 à 20 nucléotides qui la sépare de la queue de poly (A).

e. La queue de poly (A).

Le poly (A) est une séquence monotone de A liés de façon covalente à l'extrémité 3' OH des messagers et comprenant de 50 à 200 résidus. Elle serait présente dans la majorité des ARNm eucaryotiques sauf chez les ARNm d'histones.

I.1.2. Structure secondaire.

Après sa transcription, l'ARNm monocaténaire peut se replier localement pour former des structures bicaténaires similaires à celles

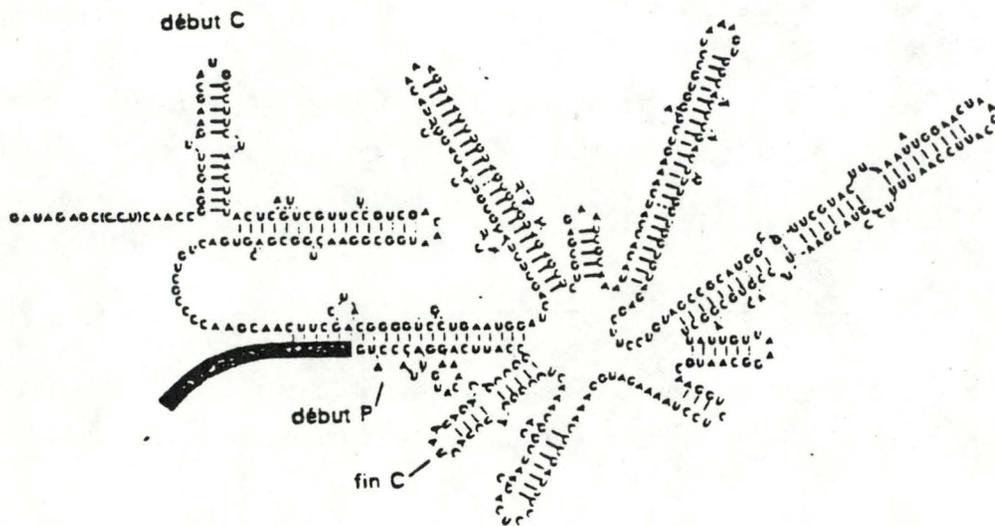


Fig. 4. Exemple de structure secondaire dans le gène C du génome du bactériophage MS2

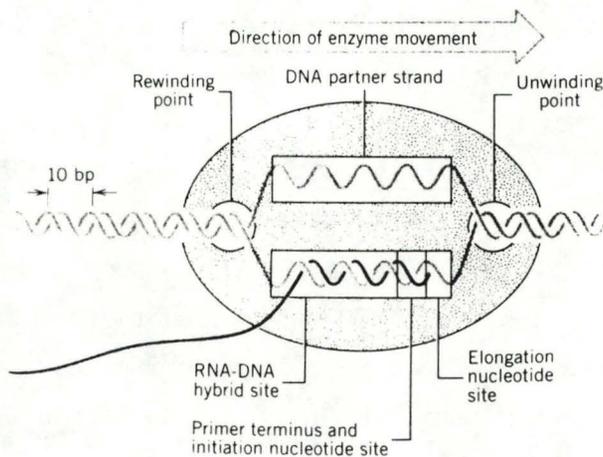


Fig. 5 .- L'ARN polymérase bactérienne couvre environ 60 pb et contient plusieurs centres actifs. La longueur de la région de déroulement a été exagérée (d'après Lewin, , 1985)

de l'ADN (Kafatos et Gelinas, 1974). Ces structures peuvent augmenter la stabilité de la molécule en lui conférant une protection locale vis à vis de l'attaque des ribonucléases (fig. 4).

I.2. Biosynthèse de l'ARNm.

La transcription est l'étape principale durant laquelle l'expression d'un gène est contrôlée (Lewin, 1985).

L'appareil de transcription des eucaryotes est plus complexe et moins connu que celui des bactéries. C'est pourquoi nous nous référerons de temps à autre aux mécanismes de transcription procaryotiques.

I.2.1. L'ARN - polymérase.

Les noyaux eucaryotes possèdent 3 types d'ARN-polymérase. L'ARN polymérase I, localisée dans le nucléole est impliquée dans la biosynthèse de l'ARN - ribosomal. Les deux autres se retrouvent dans le nucléoplasme. L'ARN polymérase II est spécialisée dans la biosynthèse de l'ARN messager, la III dans la biosynthèse des ARN de transfert, l'ARN5S et d'autres petits ARN à fonctions inconnues. On ne connaît que très peu de choses de ces enzymes (Lewin, 1985).

Par contre, l'ARN polymérase de E.coli est bien connue (fig. 5). Elle peut synthétiser non seulement l'ARNm mais aussi l'ARNr et l'ARNt.

L'holoenzyme (d'un PM de l'ordre de 500.000) est constituée de 5 sous-unités polypeptidiques : α_2 , β , β' , σ . Le core enzyme ($\alpha_2\beta\beta'$) est la composante catalytique. σ est un effecteur allostérique qui augmente l'affinité de l'enzyme pour des sites spécifiques d'initiation, les promoteurs, et qui réduit l'affinité pour les sites non-spécifiques. (Lewin, 1985).

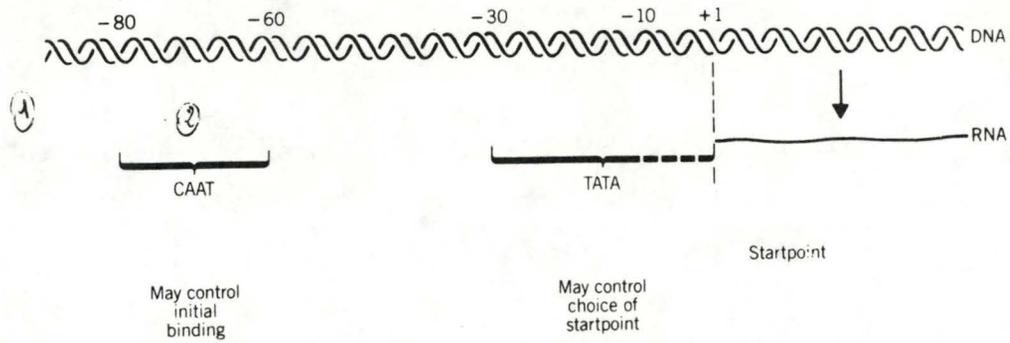


Fig.6.- Les promoteurs pour l'ARN polymérase II contiennent des séquences séparées, ayant différents rôles. Les séquences comprises entre ces dernières ne sont pas importantes

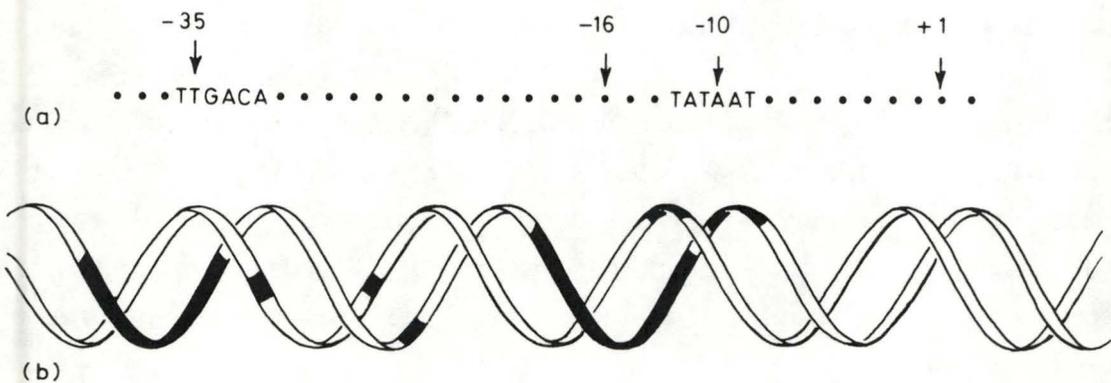


Fig. 7.-Points de contacts pour l'ARN polymérase d'E.coli sur le promoteur du gène de la β -galactosidase.
 (a).séquence des promoteurs sur le brin codant.
 (b).les points de contacts sont renseignées par des régions plus foncées.

I.2.2. Les promoteurs (Lewin, 1985).

Un promoteur est une séquence de l'ADN contrôlant l'initiation de la transcription. Le premier nucléotide intégré dans l'ARNm correspond au nucléotide +1, c'est le "startpoint" (fig. 6).

Le promoteur pour l'ARN polymérase II est réparti en 3 régions.

- Le "startpoint" ne présente pas de véritable homologie mais il existe une tendance à ce que la première base de l'ARN soit une adénine bordée de deux pyrimidines.

- Trente paires de bases (pb) en amont du "startpoint" se trouve la TATA box. Sa fonction est de renseigner l'ARN polymérase sur la position du "startpoint. Cette séquence correspond et a la même fonction que la séquence en -10 d'E.coli.

- Une troisième séquence hautement conservée est localisée entre -40 et -110 (fig. 6). Elle promeut une initiation efficiente mais sans précision.

Une séquence à fonction semblable se retrouve autour du nucléotide -35 chez E. coli.

Chez les bactéries, des mutations ont permis de montrer que l'ARN polymérase aborde l'ADN par une seule face. La plupart des points de contact se concentrent au niveau des positions -10 et -35 sur un des deux brins (fig. 7).

I.2.3. L'initiation. (Lewin, 1985)

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II nécessiterait des facteurs protéiques ancillaires.

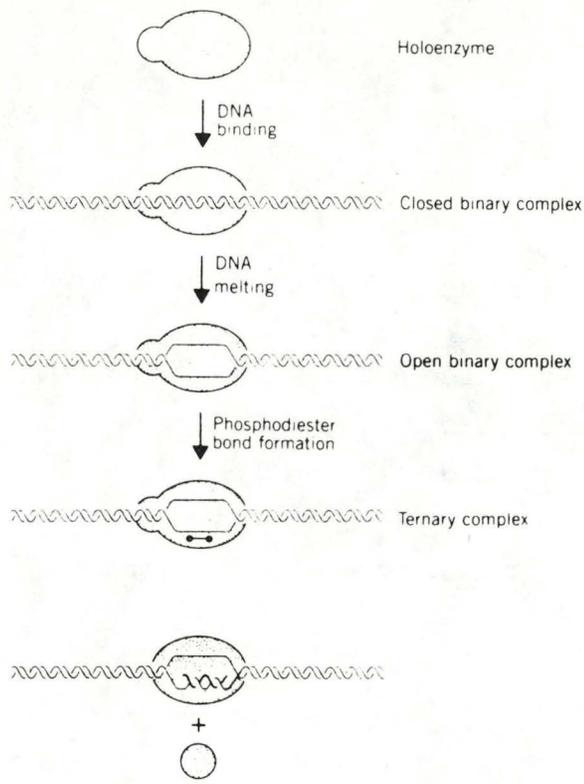


Fig.8.- L'initiation de la transcription chez les procaryotes nécessite divers étapes, durant laquelle le complexe binaire fermé est converti en une forme ouverte et alors en un complexe ternaire. Le facteur sigma est relâché après la formation du premier lien; le core enzyme continue la synthèse du RNA.

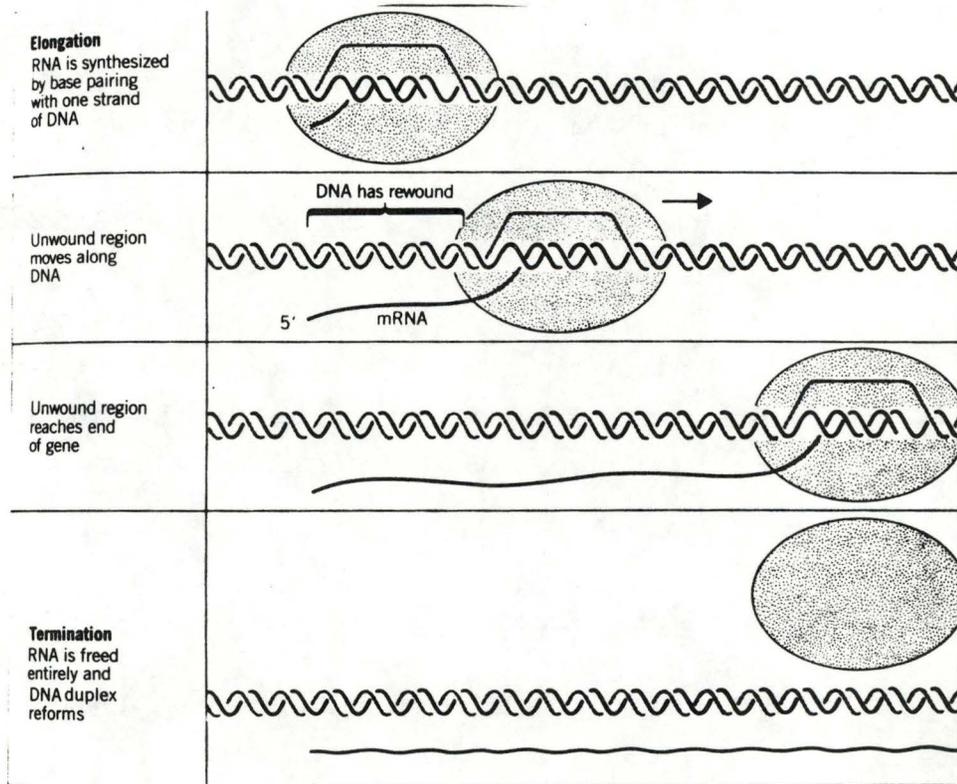


Fig.9.- Représentation schématique de l'étape d'élongation et de terminaison de la transcription.

Chez les bactéries, l'holoenzyme se fixe sur le promoteur. L'ADN se déroule localement, une courte séquence à simple brin est libérée.

Lors de la formation du lien phosphodiester entre les deux premiers nucléotides de l'ARN, le facteur est libéré (fig. 8).

I.2.4. L'élongation et la terminaison.

L'ARNm nouvellement synthétisé s'hybride localement avec l'ADN monocaténaire. Au fur et à mesure que l'ARN polymérase progresse, l'ADN se déroule en aval afin d'exposer de nouvelles séquences. L'ARN est déplacé de son site d'hybridation avec le brin codant. Celui-ci va dès lors pouvoir se rehybrider avec le brin partenaire et reformer la double hélice (fig. 9).

On ignore comment se termine la transcription chez les eucaryotes. Le messager subit une série de modifications post-transcriptionnelles empêchant la mise en évidence de séquence(s) responsable(s) de la terminaison (Lewin, 1985).

Le phénomène est bien connu chez les bactéries.

La présence de séquences palindrome entraîne la formation d'une boucle sur l'ARNm. Celle-ci conduit à un arrêt momentané ou définitif de la transcription. L'ARNm est complètement déplacé, de son site de synthèse, l'enzyme quitte l'ADN et la double hélice de celui-ci se reforme (fig. 9).

Remarque

Bien que notre étude se situe au niveau des phénomènes eucaryotiques, il nous paraît important d'aborder, ici, plus précisément, les mécanismes de transcription chez les bactériophages ainsi que la transcription in vitro.

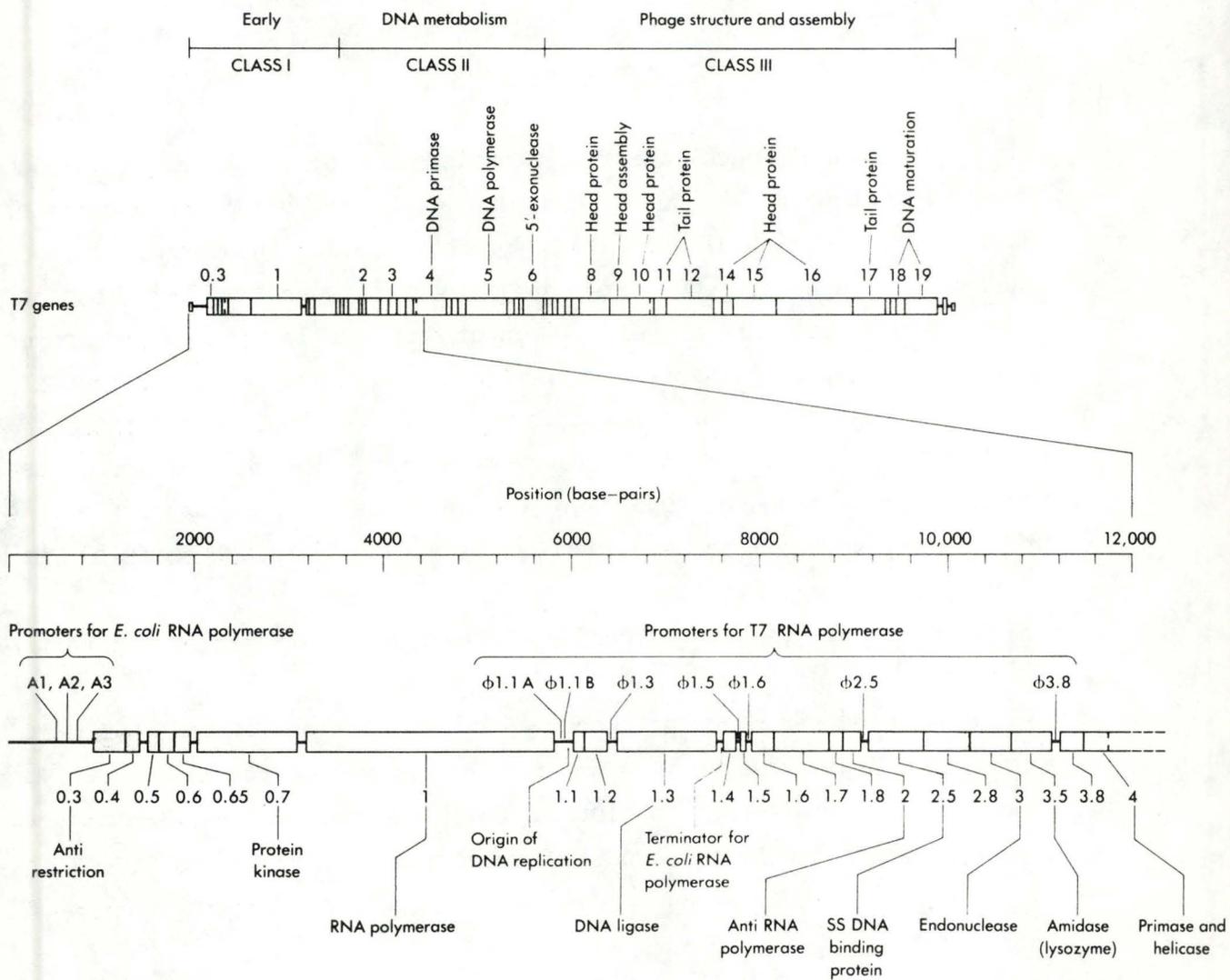


Fig. 11.- Carte de l'ADN du bactériophage T7; avec un agrandissement du premier tiers.

Les ARN polymérases d'*E. coli* initient la transcription des premiers gènes à partir des 3 promoteurs de l'extrémité gauche de l'ADN de T7.

Les ARN m synthétisés codent pour les protéines de classe I dont la T7 ARN polymérase.

Cette dernière s'initiera d'abord sur les promoteurs de classe II puis sur les promoteurs de classe III.

En effet, l'ARN messager eucaryotique qui sera utilisé dans ce travail est produit dans un système de transcription "in vitro" sous la dépendance de promoteurs de bactériophage.

I.2.5. La transcription chez les bactériophages.

Lors de l'infection d'E. coli par le bactériophage T7, la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte est d'abord détournée vers la transcription des gènes phagiens (early gene). La transcription des gènes tardifs (late gene) est assurée soit par l'ARN polymérase de l'hôte, soit par l'ARN polymérase codée par le génome du bactériophage. La disposition des gènes long de l'ADN T et donc l'ordre avec lequel ils sont exprimés permet la synthèse des protéines aux moments adéquats de l'infection : une T7 ARN polymérase, les protéines de la réplication, les protéines de structure et d'assemblage des nouvelles particules virales .

a) Les ARN polymérases (Chamberlin et Ryan, 1982)

Des bactériophages T3 et SP6 partagent de nombreuses caractéristiques avec le T7 :

Leurs ARN polymérases sont désignées comme semblables (T7 like RNA polymérases).

Contrairement aux ARN polymérases bactériennes, ce sont de simples chaînes polypeptidiques (d'un poids moléculaire de l'ordre de 100.000) dont l'activité enzymatique ne nécessite aucun facteur complémentaire.

Auparavant, la T7 ARN polymérase était isolée, en faible quantité à partir des extraits d'E. coli infecté par la phage T7. Le gène a maintenant été cloné dans un plasmide sous la dépendance d'un promoteur fort. (Davanloo, 1984).

La SP6 ARN polymérase est isolée en grande quantité à partir de Salmonella thyphimurium LT2 infectées par la phage SP6 (Butler, 1982).

Phage and promoter		Nucleotide sequence					
		-15	-10	-5	+1	+5	bp
T7 class III consensus	Map location	T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A					
T7 class II							
ϕ1.1A	14.6	C	-	-	-	-	A - A - -
ϕ1.1B	14.8	-	-	-	-	-	- A G A -
ϕ1.3	15.9	-	-	-	G	-	- - - C -
ϕ1.5	19.3	-	-	-	-	A - -	- A G - T
ϕ1.6	19.6	-	-	-	-	A - -	- A G A C
ϕ2.5	22.6	-	-	-	-	-	- T A - G A -
ϕ3.8	27.9	-	-	T G A	-	-	- A - - - - -
ϕ4.3	33.3	-	-	-	-	A - -	- A G A C
ϕ4.7	34.7	C T	-	T	-	-	- - - A G A C
T3							
	1.2	-	-	T - T A C C	-	-	- A - - - - A T
	22.5	-	-	- T A C C	-	-	- A - - - - A C
	44.5	A - T	-	- A C C	-	-	- A - - - - A G
	51.5	A - T	-	- A C C	-	-	- A - - - - -
	16.1	-	-	- A C C	-	-	- A G A - - - - -
SP6 class III							
		A T T - - G - T G A - - - - - A A T A G					

Fig.12.- Séquence nucléotidique des promoteurs de classe II et de classe III de T₇, de T₃ et de classe II de SP6. La lettre ϕ suivie de chiffres désigne le promoteur d'un gène. La position du promoteur sur l'ADN est donnée en pourcent. Les bases identiques à celles de la séquence consensus (promoteur de classe III de T₇) sont désignées par un trait ; les bases différentes sont renseignées. (selon Boyer)

Ces enzymes présentent une très grande spécificité pour leur promoteur.

b) Les promoteurs (Chamberlin et Ryan, 1982).

Il existe 3 classes de promoteurs sur l'ADN de T7. Les promoteurs de classe I sont spécifiques à l'ARN polymérase bactérienne. Les promoteurs de classe II et III sont spécifiques à la T7 ARN polymérase (fig. 11). Les promoteurs de classe II sont très faibles ; les gènes de classe II ne sont exprimés que durant les premiers instants de l'infection. Treize promoteurs de classe II ont été identifiés sur l'ADN de T7.

Le génome de T7 contient également 5 promoteurs de classe III. Ils sont responsables de la synthèse tardive de plus de 90% des transcrits.

Les promoteurs de la T3 ARN polymérase sont très semblables à ceux trouvés chez T7. Ici, aussi, il existe des promoteurs forts (classe III) et faibles (classe II). L'analyse de séquences des différents promoteurs sur l'ADN de T7 dévoile de nombreuses homologues à la hauteur du "start point" (fig. 12).

Tous les promoteurs de classe III partagent une même séquence de 23 paires de bases. Elle commence 17 pb en amont du "start point" (-17) et continue 6 pb en aval de ce site (+6).

Les promoteurs de classe II sont quasiment similaires. La SP6 ARN polymérase ne s'annonce pas sur les promoteurs de T7 ou T3. La spécificité du promoteur SP6 repose donc sur les séquences de -8 à -17 (fig. 12).

c) Les étapes de la transcription (Chamberlin et Ryan, 1982).

Les mécanismes de la transcription chez les bactériophages sont peu connus. Ceci est dû au fait que d'une part les polymérases phagiennes ne forment pas de complexes stables avec les promoteurs et que d'autre part le temps de l'élongation sur l'ADN phagien est très court (de 3 à 60 secondes sur l'ADN de T7).

Malgré ces difficultés expérimentales, quelques caractéristiques peuvent se dégager.

- La fixation de la polymérase sur son promoteur conduit à un déroulement local de l'ADN dans la région -5 à +1. L'enzyme, comme chez E. coli, forme un complexe ouvert avec cette région où les bases du brin transcrit sont disponibles pour un appariement avec les substrats nucléotidiques.

- Chez T3, dès que les nucléotides sont ajoutés, le complexe T3 polymérase promoteur est stabilisé.

- La vitesse d'élongation de l'ARN par la T7 ou T3 ARN polymérase est de 200 à 300 nucléotides par seconde à 37°C. C'est 10 fois plus rapide que les enzymes bactériennes dans les mêmes conditions.

- Les cinétiques de synthèse du T7 ARN présentent malgré cela un retard. Ce retard n'est pas aboli par une augmentation de la concentration en ADN ou en nucléotides. Il résulterait de l'instabilité du complexe polymérase - promoteur. La polymérase devrait rencontrer de nombreux promoteurs avant que la liaison avec les nucléotides et l'initiation de la synthèse de l'ARN ne stabilisent pas le complexe.

- On connaît peu de choses sur l'étape de terminaison de la transcription, sur la libération de l'ARN - polymérase phagienne.

Comme nous le verrons ultérieurement, cette étape doit être efficace de façon à permettre plusieurs recyclages de l'ARN polymérase phagienne.

I.2.6. La transcription in vitro.

La transcription in vitro consiste en la production d'une population homogène d'ARN transcrits à partir d'une séquence d'ADN adjacente à un promoteur spécifique. L'ARN ainsi synthétisé est le point de départ de nombreuses études et est à la base de nouvelles techniques : la régulation de la transcription et ses facteurs, l'étude des mécanismes d'épissage et de la traduction in vitro et in vivo, la production de sondes radioactives.

Les systèmes envisagés diffèrent selon l'origine de l'ARN polymérase utilisée.

a) Les systèmes eucaryotiques (Rao , 1982)

Ces systèmes font intervenir les ARN polymérases eucaryotiques et sont employés dans l'étude des mécanismes de la régulation de la transcription chez les eucaryotes.

Les premières études ont concerné les gènes spécifiques de l'ARN polymérase III eucaryotique. Les différents facteurs indispensables à la réaction ont été partiellement purifiés et un système de transcription in vitro eucaryotique a pu être reconstitué.

Ultérieurement, il a été montré qu'un promoteur tardif de l'adénovirus de type 2 peut initier une transcription catalysée par l'ARN polymérase II lorsqu'elle est supplée par des extraits cellulaires.

Manley et col (1980) ont développé un système de transcription acellulaire pour l'étude de la synthèse de l'ARN messager dans les cellules de mammifères. Il consiste en un extrait concentré de cellules Hela présentant une activité ARN polymérase II endogène et pouvant initier la transcription sur un ADN exogène. Ce système a été testé avec l'ADN de l'adénovirus et a été utilisé pour la transcription spécifique des gènes de la conalbumine et de l'ovalbumine de poule, et de la globine humaine.

b) Les systèmes bactériens (Chamberlin et col., 1983).

Les ARN polymérases bactériennes font l'objet de nombreuses études biochimiques. L'holoenzyme purifiée présente une grande spécificité in vitro : elle transcrit à partir des promoteurs spécifiques et répond efficacement aux signaux de terminaison codés de l'ADN.

Néanmoins ces systèmes ne permettent pas d'obtenir de grande quantité d'ARNm. L'enzyme s'inactive rapidement et ne peut assurer plusieurs cycles de transcription.

Le complexe d'élongation est très stable, l'inactivation survient donc soit lors de l'étape de fixation sur le promoteur, soit après la terminaison et avant la nouvelle fixation.

Différents facteurs peuvent conduire à l'inactivation :

1. Une perte d'activité est observée lorsque de faibles concentrations en enzyme sont utilisées suite à la libération asynchrone des polymérases à partir des terminateurs. Dans ce cas, les enzymes pourraient jouer un rôle de protection.

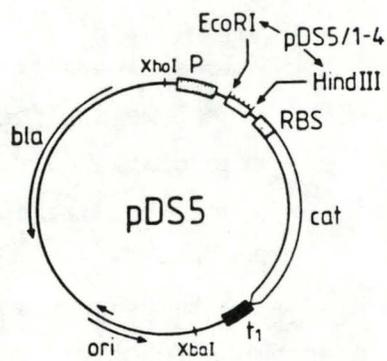


Fig.13.- Schéma du plasmide pDS5.

2. La polymérase peut se lier au niveau de cassures ou des extrémités libres de l'ADN ou l'ARN. Ces régions entrent en compétition avec les promoteurs spécifiques et diminuent la concentration.

3. L'ARN polymérase est sujette à l'inactivation thermique : son temps de demi-vie est de 20 minutes à 30°C. Ce facteur devient principal lors de réactions faisant intervenir des promoteurs faibles où plusieurs minutes sont nécessaires avant la formation du complexe ADN - enzyme. Dans certains cas, avec promoteur faible, il est impossible d'obtenir plus de 0,1 ARN par polymérase active ajoutée.

Deux procédures alternatives sont envisageables pour augmenter l'efficacité de la transcription in vitro :

Grâce aux techniques de clonage, il est possible d'insérer la séquence à transcrire sous la dépendance d'un promoteur fort.

L'autre approche vise à employer les ARN polymérases de bactériophage et leur promoteur. Nous aborderons cette alternative dans le paragraphe c.

Les manipulations des séquences en vue de leur transcription se pratiquent au niveau de plasmides. Le plasmide de Stueber et col (1984) contient un promoteur fort dérivé du coliphage T5. Un gène étranger inséré en aval de ce promoteur, peut être exprimé in vitro avec une haute efficacité en utilisant l'ARN polymérase d'E. Coli pour sa transcription et éventuellement des extraits cellulaires pro- ou eucaryotiques pour la traduction de l'ARNm produit (fig. 13).

c) Les systèmes de bactériophage

- L'avantage (Chamberlin et col., 1983).

Tandis que l'ARN polymérase bactérienne est rapidement ina-

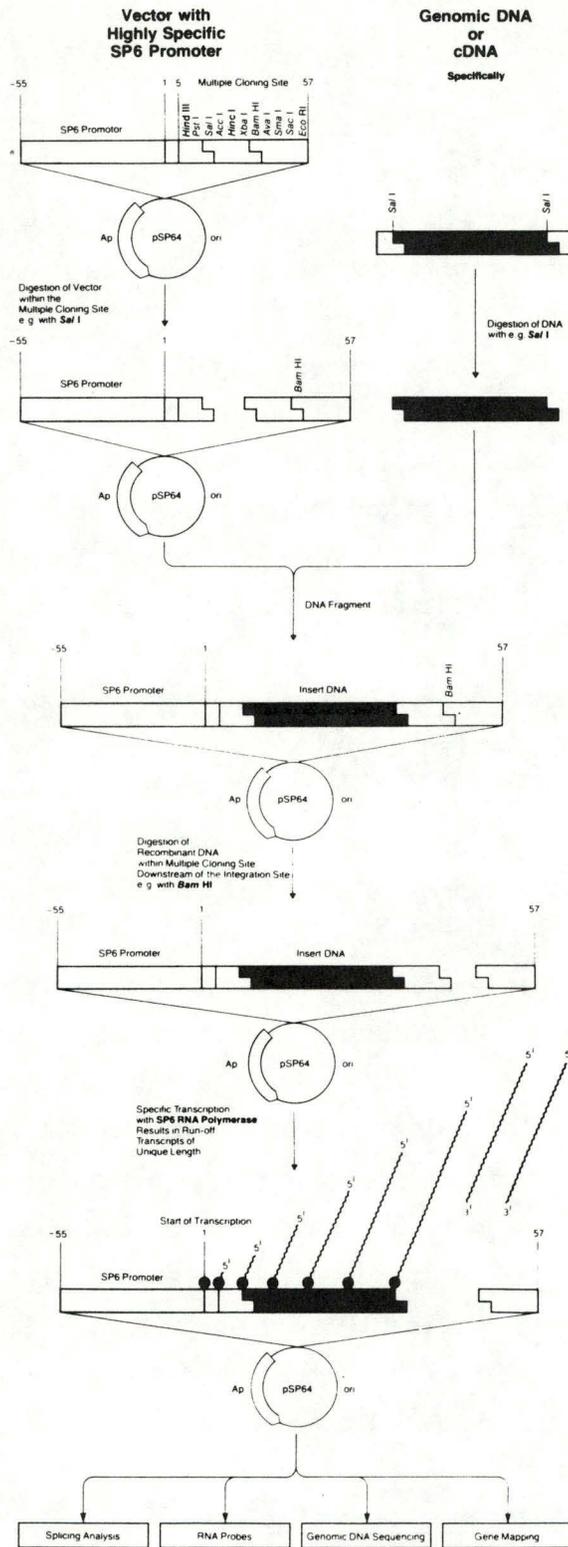


Fig. 14 : Description des différentes étapes de préparation d'un vecteur type de transcription en vue de synthétiser un ARNm à partir du fragment inséré en aval du promoteur.

ctivée, l'ARN polymérase des bactériophages peut catalyser une synthèse prolongée d'ARN. Cette synthèse implique un recyclage important vu la vitesse d'élongation rapide et la présence de courtes unités de transcription sur l'ADN phagien normal : durant 60 minutes de réaction avec l'ADN de T7, la T7 ARN polymérase doit se recycler au moins 180 fois.

Il ne peut donc pas y avoir de perte d'enzyme à chaque cycle. Contrairement à la polymérase bactérienne, l'enzyme phagienne se lie faiblement à d'autres sites non-spécifiques : L'ARN produit, les cassures dans l'ADN, les extrémités libres de l'ADN. La capacité de ces enzymes phagiennes de synthétiser de très grandes quantités d'ARN in vitro n'est possible que si l'ADN contient les promoteurs spécifiques.

- le principe

De nombreux vecteurs de clonage pour la transcription ont été construits. Ils contiennent un promoteur fort de bactériophage en amont d'un site multiple de clonage. Une endonucléase de restriction clive le plasmide au niveau d'une séquence spécifique et unique de ce site. Un gène étranger dont les extrémités 5' et 3' sont compatibles avec les extrémités libres du plasmide, est inséré et recircularise le vecteur (fig. 14).

Afin d'obtenir une population homogène de transcrits, le plasmide est linéarisé au niveau d'un site unique de restriction situé à proximité de l'extrémité 3' du gène inséré.

La polymérase se fixe sur le promoteur, catalyse l'élongation de l'ARN et est "relâchée" après la formation du dernier lien phosphodiester de l'extrémité.

Il s'agit de la synthèse in vitro d'ARNm par "run off" de l'ARN polymérase.

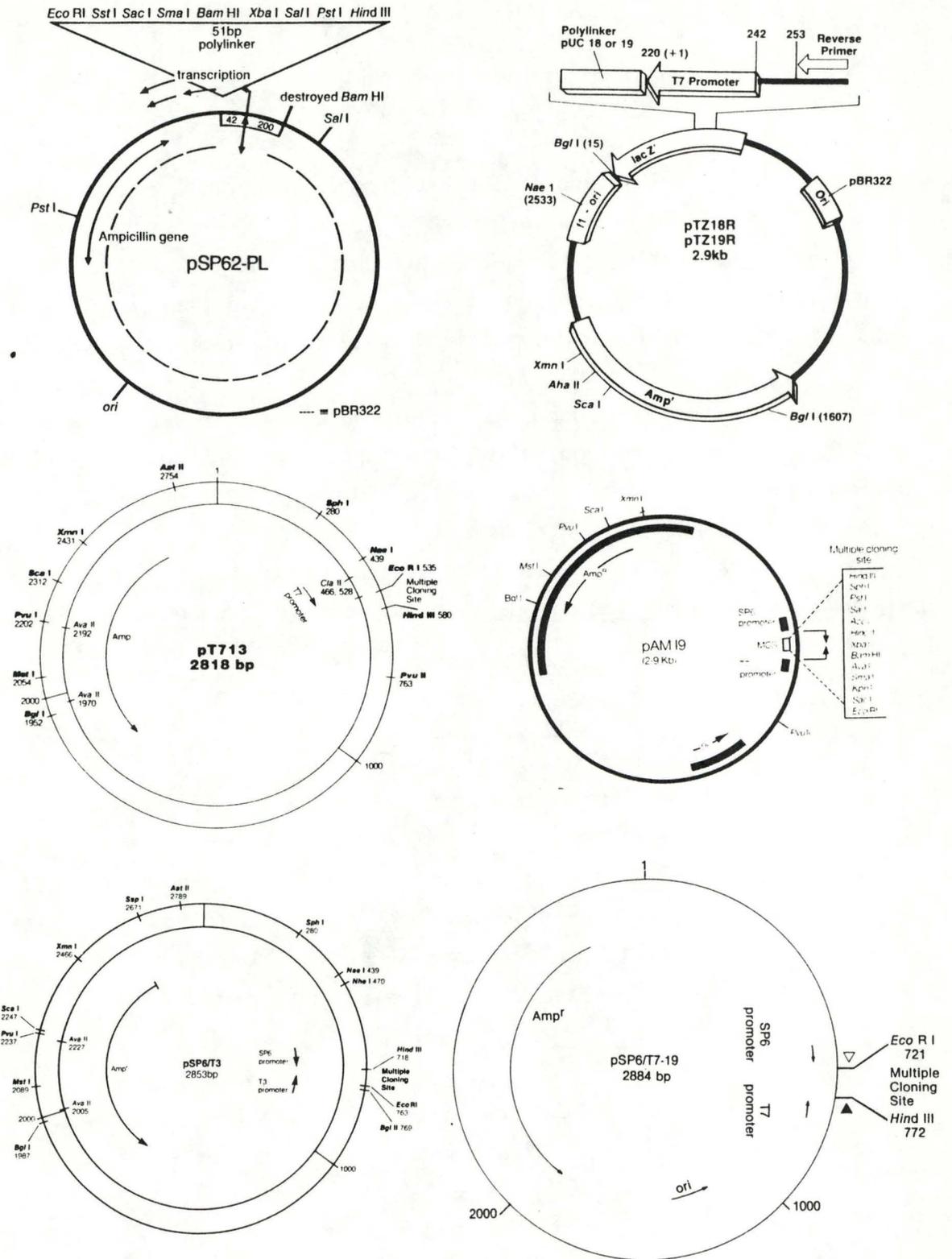


Fig.15.- Schéma de quelques vecteurs de transcription compatibles avec des ARN polymérasés de bactériophage spécifiques.

- Les vecteurs

Quelques vecteurs disponibles dans le commerce sont décrits à la fig. 15.

Ils présentent des caractéristiques communes : un gène de résistance à un antibiotique, une origine de répllication et un ou deux promoteurs forts de bactériophage jouxtant un site multiple de clonage.

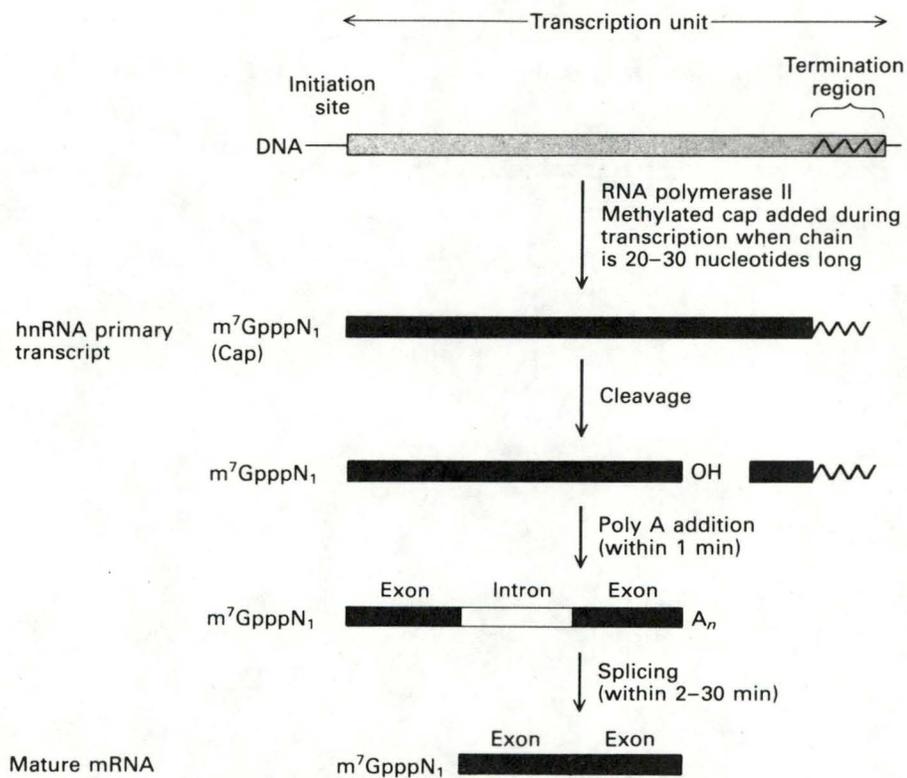


Fig.16 : Présentation générale des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm eucaryotique.

1. L'ARN polymérase II catalyse la synthèse de l'ARNm. Le premier nucléotide du pré-ARNm correspond aussi au premier nucléotide de l'ARNm mature.
2. Une coiffe méthylée est ajoutée à l'extrémité 5' de chaque pré-ARNm lorsque sa taille est de 20 à 30 nucléotides.
3. Un clivage par une endonucléase expose une extrémité 3' hydroxyle à partir de laquelle la poly (A) polymérase catalyse la formation de la queue de poly (A).
4. Le pré-ARNm est épissé dans le noyau.

I.3. Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm

Les produits primaires de la transcription ne sont pas directement traductibles : ils doivent d'abord subir une maturation post-transcriptionnelle au cours de leur exportation nucléo-cytoplasmique. Le processus de transformation des pré-ARN en ARNm est très complexe ; il comprend l'ajoute d'une coiffe à l'extrémité 5', la polyadénylation 3' terminale, des méthylations internes et le phénomène d'épissage (Vandenhoute , 1980).

I.3.1. La coiffe.

Les mécanismes de la réaction seront décrits dans le paragraphe II.2 ; nous nous limiterons ici à une description du contexte de coiffage.

L'addition d'une guanosine dans une position inverse à l'extrémité 5' du pré-ARN et la méthylation de son azote 7 représentent, sans doute, les premières modifications affectant le messager. Ceci laisse supposer que les enzymes de coiffage sont physiquement associées entre elles et avec l'ARN polymérase, au moins durant l'étape d'initiation de la transcription (Jove et Manley , 1982).

Lors de la purification de l'ARN polymérase du virus de la vaccine, Shuman et col (1980) ont repéré une activité de coiffage dans la fraction . Ceci suggère l'existence d'une association intime entre les enzymes de coiffage et l'ARN polymérase dans le "core" du virus.

D'autres arguments renforçant l'idée d'une interaction fonctionnelle ont été révélés par les travaux de Furuichi sur le virus de la polyhédrose cytoplasmique du ver à soie (CPV). Dès 1978, Furuichi a observé que la synthèse, in vitro, de l'ARNm du CPV était considérablement stimulée par la présence du donneur de méthyle, la S - adénosyl-

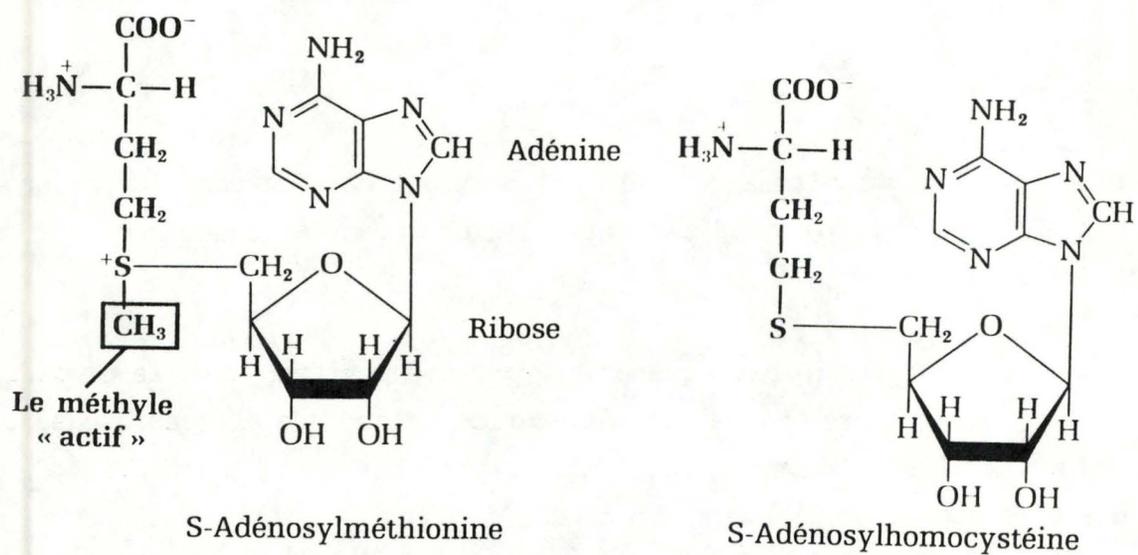


Fig.17.-La S-adénosylméthionine (SAM) et son produit déméthylé la S-adénosylhomocystéine (SAH).

méthionine (fig. 17). Ces ARNm présentaient tous une extrémité 5' coiffée et méthylée.

Mais la stimulation de la transcription n'était pas due à la méthylation de la coiffe : un effet similaire était obtenu en présence de la S - adénylosylhomocystéine (SAH) qui est un inhibiteur de la méthylation de la coiffe.

Furuichi proposa un mécanisme. La SAM, le SAH ou d'autres analogues adénylés interagissent avec le site actif de la méthyltransférase (voir paragraphe II.2). Cette interaction induirait un changement de conformation au niveau de l'ARN polymérase associée qui initierait, alors, la synthèse de l'ARNm.

I.3.2. La polyadénylation.

La polyadénylation s'effectue essentiellement dans le noyau à une phase terminale de la maturation des messagers (Vandenhoute , 1980).

La réaction apparaît comme un processus en trois étapes : l'ARN polymérase II termine la transcription au niveau d'une séquence de l'extrémité 3', le terminateur. Une endonucléase clive le pré-ARNm environ 15 nucléotides en aval d'une séquence AAUAAA. L'extrémité 3' nouvellement formée est polyadénylée par une poly (A) polymérase. Cette enzyme semble reconnaître la même séquence consensus (Grandfoot ; 1982 ; 1984).

La fonction de la queue de poly (A) n'est pas connue avec certitude.

Elle jouerait un rôle dans la stabilité et lors de l'exportation de l'ARNm nature du noyau vers le cytoplasme (Arendes , 1980).

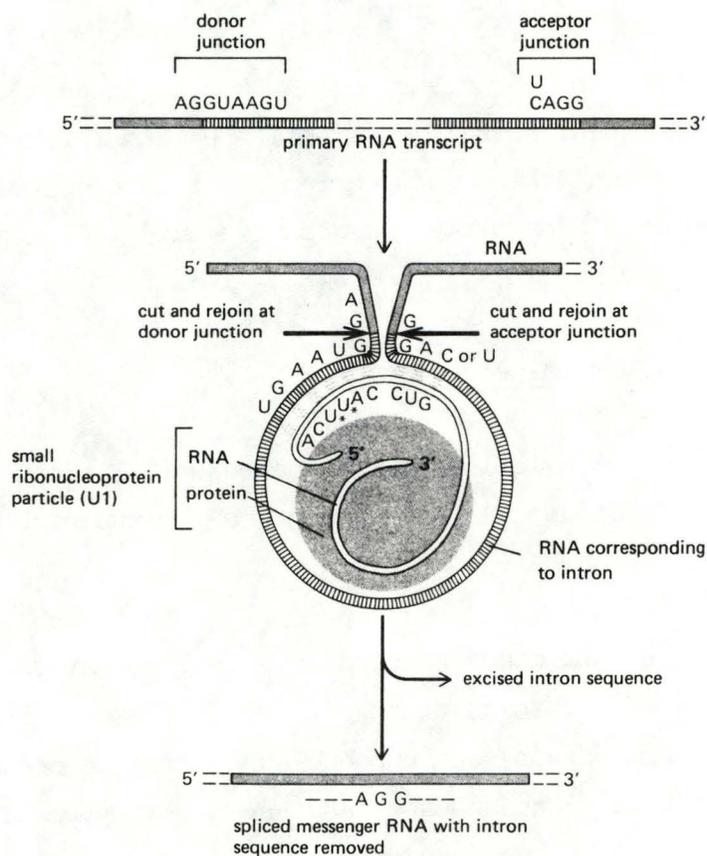


Fig.18.-Représentation schématique de la participation de la petite ribonucléoprotéine nucléaire, l' U_1 snRNA, dans la réaction d'épissage du pré-ARNm.

I.3.3. Les méthylations internes.

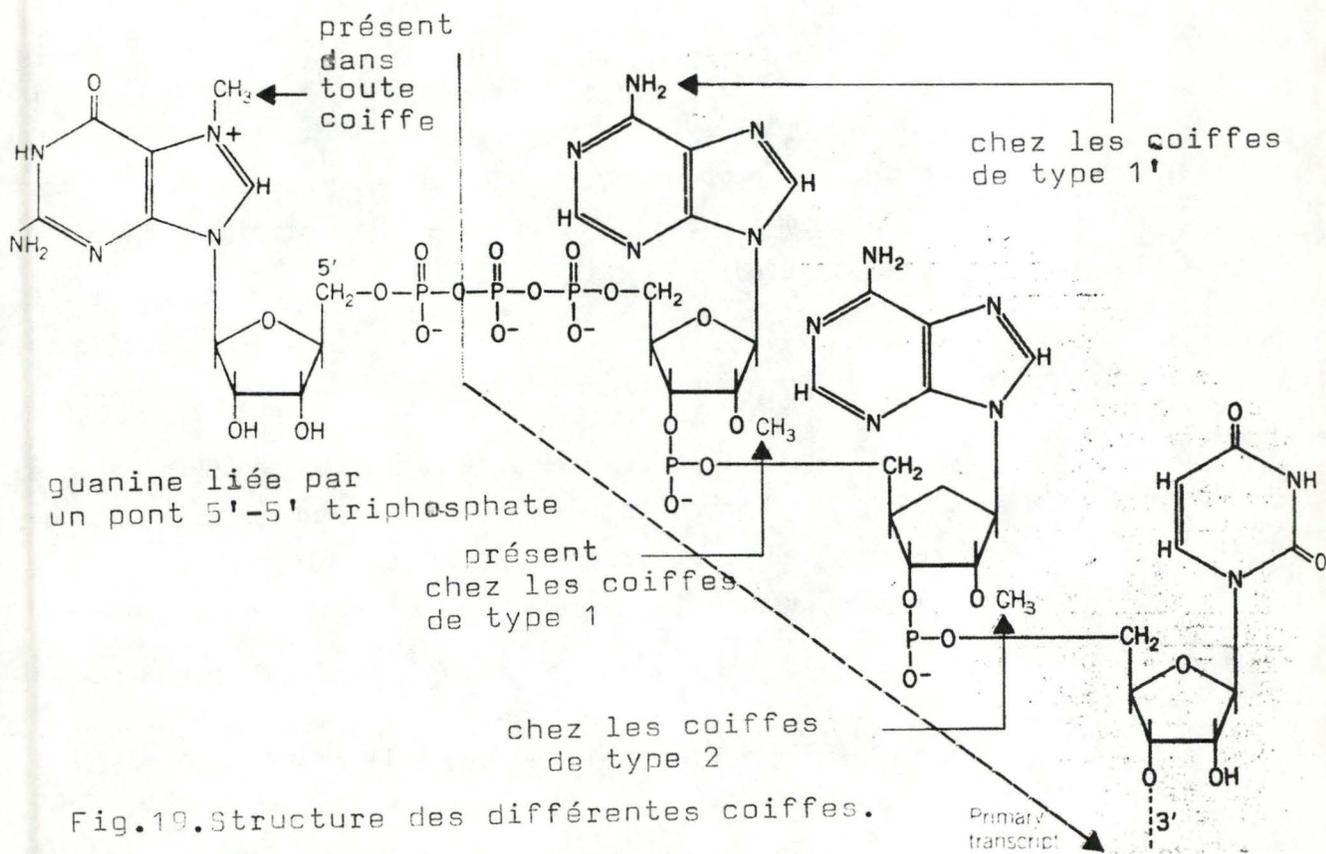
Certains ARNm peuvent subir des méthylations internes, souvent en position N - 6 d'adénines, rarement en position 5 d'une cytosine. Ces méthylations internes sont plus ou moins fréquentes suivant l'espèce d'ARNm. Elles s'effectueraient dans le noyau (Vandenhoute, 1980). Le rôle de ces groupements méthyles n'est pas encore déterminé avec certitude.

Chez l'adénovirus, les méthyles sont ajoutés à l'ARNm qui n'ont pas encore été épissés (voir paragraphe suivant), comme chez les pré-ARNm, ces méthyles pourraient jouer un rôle de protection des portions du transcrit primaire qui ne doivent pas être éliminées lors de l'épissage (Darnell, 1986).

I.3.4. L'épissage (ou splicing).

Le splicing est le processus de formation des ARNm en "mosaïque" par excision de différentes séquences du pré-ARNm (les introns) suivie de la ressoudure des fragments initialement éloignés (les exons). Ce phénomène se produit dans le noyau des eucaryotes (Vandenhoute, 1980).

La présence d'une courte séquence consensus 5' GT... intron...AG 3', très conservée a pu être mise en évidence dans la majorité des gènes structuraux des eucaryotes. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme commun pour l'excision des introns. Ce mécanisme fait intervenir une petite particule nucléaire ribonucléoprotéique dont la séquence est complémentaire aux séquences des frontières intron-exon et exon-intron du pré-ARNm (fig.18). Via un appariement des bases, cette particule pourrait amener les jonctions dans une juxtaposition correcte permettant dès lors, l'épissage enzymatique des exons et l'élimination des introns (Lehninger, 1985).



II. LA COIFFE.

II.1. Définitions, types, distributions.

Les ARN messagers de la majorité des eucaryotes et de la plupart de leur virus sont caractérisés par une extrémité 5' coiffée par une 7-méthylguanosine. La guanosine est liée par un pont triphosphate 5' - 5' au pénultième nucléotide et est méthylée au niveau de l'azote 7.

C'est la coiffe de "type 0", ${}^{m7}G(5') ppp(5') Xp$ --- (fig.19).

Une méthylation supplémentaire se retrouve sur d'autres ARNm en position 2' - O du ribose du pénultième nucléotide. Cette coiffe avec deux groupements méthyles est de "type 1", ${}^{m7}G(5') ppp(5') Xp$ m7 ---.

Lorsque le pénultième nucléotide des coiffes de "type 1" est une adénine, un autre méthyle est parfois présent en position N6 de la base. Cette coiffe est de "type 1'", ${}^{m7}G(5') ppp(5')$ ${}^{mN6m}Ap$ ---.

Enfin, une seconde méthylation en position 2'- O du ribose de l'antépénultième nucléotide se rencontre fréquemment chez les mammifères, y compris l'homme. C'est la coiffe de "type 2", ${}^{m7}G(5') ppp(5') Xp$ ${}^{m7}Yp$ m7 --- (Moss, 1984)

Chez les ARNm viraux, la pénultième base est toujours une purine. Les virus végétaux présentent généralement une coiffe de "type 0" tandis que la plupart des virus animaux contiennent une coiffe de "type 1".

Chez les ARNm cellulaires, la pénultième base est soit une purine, soit une pyrimidine. Les ARNm des eucaryotes inférieurs présen-

tent exclusivement des coiffes où cette avant dernière base est une purine, les pyrimidines apparaissent progressivement au cours de l'évolution. Au fur et à mesure de celle-ci, la complexité des coiffes augmente.

Les coiffes de certains organismes unicellulaires tel que *Saccharomyces cerevisiae* sont de "type 0". La larve d'*Artemia salina* et l'oursin de mer contiennent une coiffe de "type 1". Les insectes et les mammifères présentent à la fois des coiffes de "type 1" et de "type 2".

Les ARNm des végétaux arborent préférentiellement des coiffes de "type 0".

Certains ARNm font exceptions : l'ARNm mitochondrial des cellules Hela, l'ARNm du virus de la nécrose du tabac, du virus de la polyomélite et de l'encéphalomyocardite ne contiennent pas de coiffe (Locht, 1984).

II.2. Les enzymes et les mécanismes de coiffage

II.2.1. Les virus

a) Le virus de la vaccine et son enzyme de coiffage

Certains virus, comme celui de la vaccine, possèdent les enzymes de synthèse et de modification de l'ARNm dans leur particule infectieuse. Ils offrent un système idéal pour l'étude in vitro de la maturation de l'ARNm eucaryotique.

- La purification des enzymes.

Les enzymes de coiffage de ce virus ont été purifiées par Martin et col. dès 1975(a). Dans la procédure initiale de purification, les enzymes étaient solubilisées à partir de cores viraux et purifiées sur des colonnes échangeuses d'ions et d'affinité. Ces premières études montrèrent que le complexe enzymatique purifié est multifonctionnel. Il contient à la fois une activité guanylyltransférase et 7 - méthyltransférase. Son poids moléculaire est de 127.000. Il est composé de deux sous-unités de 95.000 et 31.400 (Martin et col., 1975 b). De nouvelles techniques chromatographiques ont permis de démontrer que ce complexe purifié contient également une activité ARN triphosphatase (S. Venkatesan et col, 1980). Selon Martin et col., ces trois activités sont inséparables durant la purification.

Par contre Monroy et col. (1978) ont purifié un complexe de 120.000 daltons. Par une électrophorèse non-dénaturante, la guanylyltransférase d'un poids moléculaire de 59.000 a pu être séparée des autres activités. Ses propriétés sont différentes de celles décrites par Martin et col.

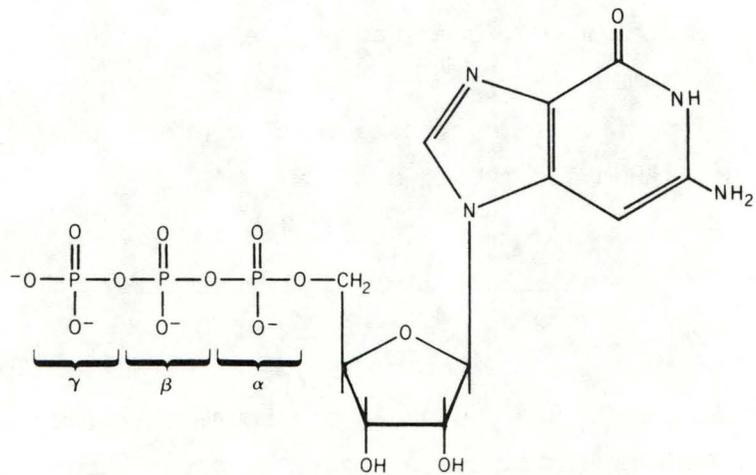


Fig. 20.- La guanosine triphosphate : GTP

- Les mécanismes.

Lorsque l'enveloppe du virus de la vaccine est détruite, le core devient perméable aux ribonucléotides et à la S - adénosylméthionine, donneuse de groupement méthyle. Des ARNm contenant :

${}^m G(5')ppp(5')A^m$ ou ${}^m G(5')ppp(5')G^m$ sont synthétisés dans ces conditions.

De plus, l'utilisation de ribonucléotides triphosphates marqués au ${}^{32}P$ au niveau des positions α, β, γ permet de retracer la chronologie des évènements (fig.20).

Le complexe purifié catalyse les réactions suivantes :

- (1) $ppp \underset{\gamma\beta\alpha}{XpYp} \xrightarrow{\text{ARNm triphosphatase}} pp \underset{\beta\alpha}{XpYp} + Pi \underset{\gamma}$
- (2) $pp \underset{\beta\alpha}{XpYp} + GTP \xrightarrow{\text{ARNm guanylyltransférase}} G(5')ppp XpYp + PPi$
- (3) $G(5')pppXpYp + SAM \xrightarrow{\text{ARNm (G-7-) méthyltransférase}} {}^m G(5')pppXpYp + SAH$

Lors de la réaction (1), le phosphate terminal est clivé par l'ARNm 5' triphosphatase. Sur une base molaire, la triphosphatase est 100 fois plus active que la guanylyltransférase qui lui est associée. Son activité semble être stimulée par la présence de GTP bien qu'il ne soit pas indispensable (Venkatesan et col, 198).

Dans une seconde étape, l'ARN guanylyltransférase catalyse le transfert de GMP à partir de GTP sur l'extrémité 5' diphosphate de l'ARNm.

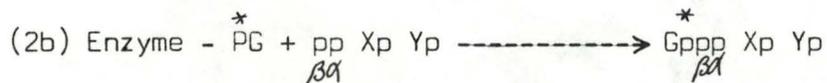
Le 7-méthyl GTP ainsi que l'ATP, CTP, UTP, GDP ou GMP ne peuvent jouer le rôle de donneur de coiffe. L'inactivité en présence 7 méthyl GTP confirme bien que la méthylation de la guanosine survient après le coiffage de l'ARNm (Martin et Moss, 1976). Des concentrations élevées en ppi inhibent la réaction inverse.

En 1981, Shuman et Hurwitz ont proposé un mécanisme catalytique. La guanylyltransférase du virus catalyse cette réaction d'échange GTP - PPI, en l'absence d'ARNm accepteur de coiffe. Ceci suppose que la transguanylation passe par un état intermédiaire :



L'enzyme réagit avec un GTP pour former l'intermédiaire enzyme-guanylate : le résidu GMP est lié de manière covalente à la sous-unité de 95.000 daltons de l'enzyme ; un pyrophosphate ppi est libéré concomitamment.

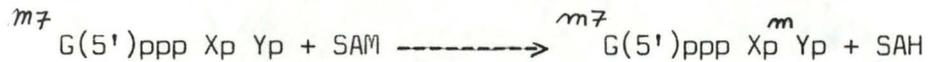
L'enzyme guanylée transfère alors son GMP sur le diphosphate terminal de l'ARNm.



Lorsque la guanylyltransférase est séparée des autres constituants du complexe enzymatique selon la technique de Monroy et col, une activité spécifique de coiffage des extrémités 5'ppp peut être également mise en évidence.

Lors de la réaction (3), la coiffe de l'ARNm est méthylée par l'ARN (guanine -7-)-méthyltransférase qui transfère un groupement méthyle provenant de la SAM vers la position de la guanine terminale. L'addition rapide du méthyle protège la coiffe de la réaction inverse et améliore donc l'efficacité des modifications 5' (Martin et Moss, 1975). Nous décrirons cette enzyme de façon détaillée dans le chapitre III.

Une dernière réaction :



Consiste en la méthylation du pénultième nucléotide. L'enzyme, l'ARNm (nucléotide -2-)-méthyltransférase catalyse le transfert d'un méthyle provenant de la SAM vers la position 2' - O du ribose (Ensinger et col, 1975). Elle semble indépendante du complexe guanylyl-7-méthyltransférase : elle en est d'ailleurs séparée lors de la purification. Il s'agit d'un simple polypeptide d'un poids moléculaire de 38.000 (Barbara et Moss, 1978).

Seuls les ARNm se terminant pour ${}^{m7}Gppp-A$ et par ${}^{m7}GpppG$ - sont les accepteurs de méthyle.

Par contre, les ARNm se terminant par pX - ou ppX ou G(5')pppX - ne sont pas accepteurs. Cette spécificité suggère que la méthylation en position 2' est la dernière étape de formation de la coiffe de "type 1", après la guanylation et la 7-méthylation.

Les dinucléotides triphosphates tels que ${}^{m7}G(5')ppp(5')G$ ou ${}^{m7}G(5')ppp(5')A$ sont de pauvres substrats pour cette méthylase ; cette activité nécessite donc une séquence polyribonucléotidique adjacente à la coiffe. La méthylation de cet avant dernier nucléotide (guanine ou adénine) est assurée par la même enzyme ; l'adénine semble être méthyliée plus rapidement.

2.1.2. Les autres virus.

Les mécanismes de coiffage chez les autres virus sont sensiblement différents de ceux du virus de la vaccine exception faite des réovirus qui présentent des modifications 5' post-transcriptionnelles fort semblables.

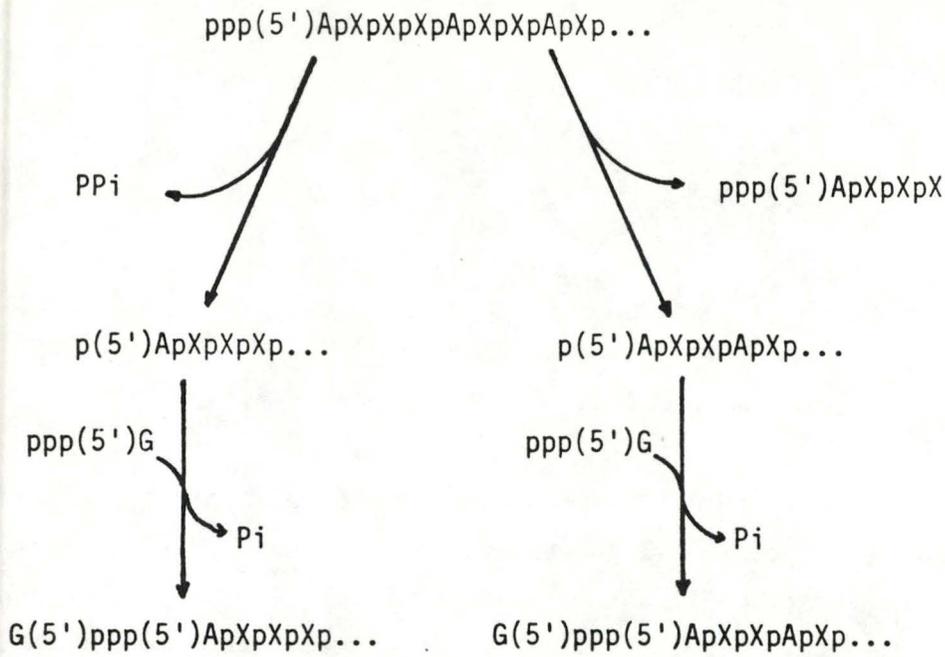


Fig.21.-Mécanisme de la formation de la coiffe chez le virus de la stomatite vésiculeuse.

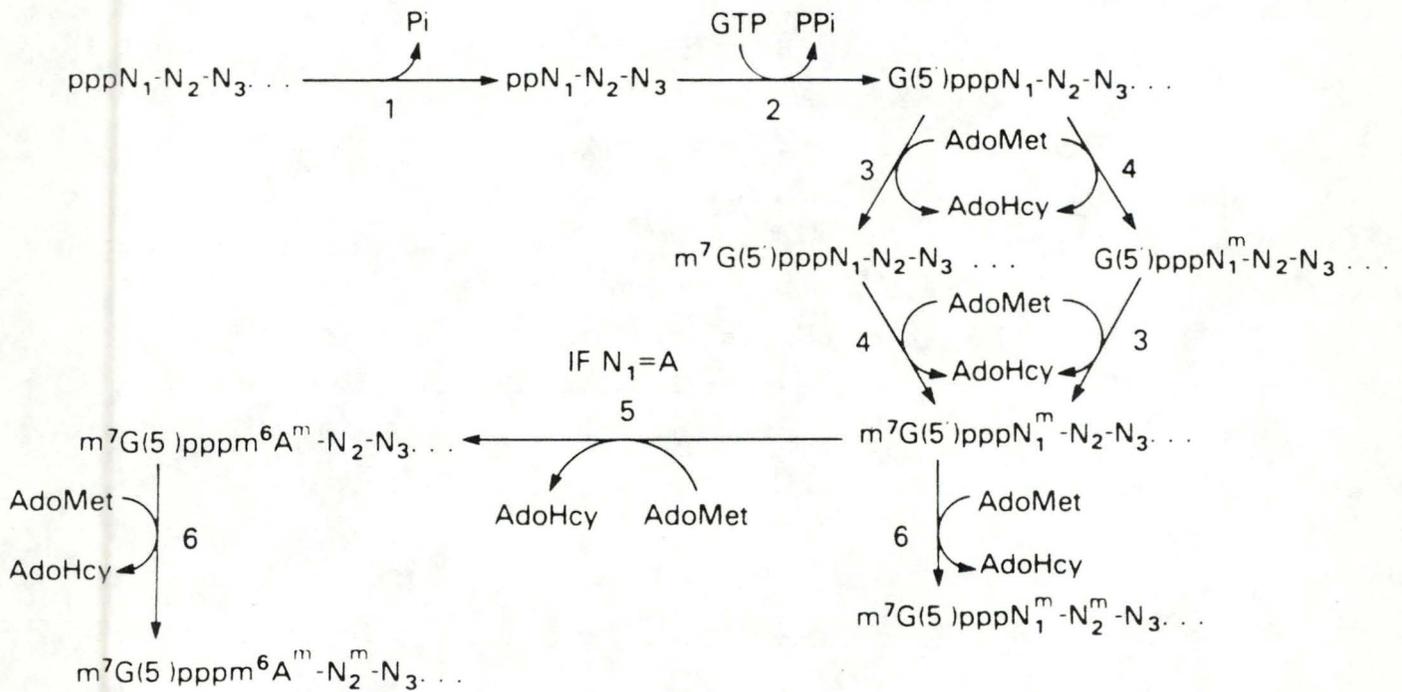


Fig.22.-Etapes enzymatiques survenant dans les modifications de l'extrémité 5' de l'ARNm eucaryotique. Les enzymes qui catalysent les réactions sont:

- 1 ARNm triphosphatase
- 2 ARNm guanylyltransférase
- 3 ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase
- 4 coiffe 1 ARNm (nucléotide-2'-)méthyltransférase
- 5 ARNm (2'-O-méthyladénosine-N⁶-)méthyltransférase
- 6 coiffe 2 ARNm (nucléotide-2'-)méthyltransférase

Par contre, chez le virus de la polyhédrose cytoplasmique, le coiffage serait un évènement pré-transcriptionnel obligatoire. Il implique également le transfert d'un GMP à partir de GTP vers l'ARN accepteur.

Les mécanismes de coiffage du virus de la stomatite vésiculeuse diffèrent des autres systèmes. La réaction implique le transfert d'un résidu GDP à partir de GTP sur le monophosphate de l'extrémité 5' de l'ARNm. Ce dernier peut provenir soit du clivage interne d'un pré-curseur, soit du clivage des phosphates β et γ (fig.21).

En présence de faibles concentrations en SAM, une coiffe de type G(5')pppA^m est formée. Seules des concentrations supérieures en SAM permettent la méthylation de la guanine.

La 2' - O méthylation précéderait ici, la 7-méthylation. (Moss, 1980)

II.2.2. Les eucaryotes

La figure 22 résume les mécanismes de coiffage de l'ARN eucaryotique.

a) L'ARNm 5' triphosphatase

Cette enzyme est étroitement associée à la guanylyltransférase chez *Artenia salina*, *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules de foie de rat.

Par contre, l'activité triphosphatase est écartée lors de la purification de la guanylyltransférase des cellules Hela (Venkatesan et Moss, 1980).

b) L'ARN guanylyltransférase

L'activité guanylyltransférase a été isolée à partir de noyaux de foie de rat par Mizumoto et Lipman (1979). L'enzyme est séparée de la guanine-7-méthyltransférase après une filtration chromatographique sur séphadex G-150. Des poids moléculaires de 65.000 Daltons pour l'enzyme de coiffage et de 130.000 Daltons pour la méthylase en ont été déduits.

La guanylyltransférase, purifiée 350 fois, catalyse la réaction d'échange GTP - PPi en l'absence d'ARNm accepteur de coiffe. La réaction évolue vers un intermédiaire covalent enzyme \sim GMP, comme dans le cas de l'enzyme de coiffage du virus de la vaccine (Mizumoto et col., 1982).

La guanylyltransférase de noyaux de cellules HeLa a été purifiée 1000 fois par Venkatesen et col. (1980). Les activités de triphosphatase et de 7 - méthyltransférase sont éliminées lors de la purification. GTP et ITP sont les seuls donneurs de coiffes effectifs. L'incapacité d'utiliser le 7-méthyl GTP comme donneur indique que la méthylation est subséquente au coiffage. L'ARN-5'-diphosphate est le seul accepteur de coiffe ; les mono et triphosphates ne sont pas coiffés. Un intermédiaire covalent guanylyltransférase \sim GMP a été également mis en évidence. Le poids moléculaire de l'enzyme est estimé à 48.500 par centrifugation sur gradient de sucrose.

Les caractéristiques de la guanylyltransférase de germes de blé (65.000 D.) ressemblent à celles des cellules Hela.

Les résultats récents de purifications et caractérisations de la guanylyltransférase concernent l'enzyme de *Saccharomyces cerevisiae*. Itoh et col (1983) ont purifié 800 fois l'activité guanylyltransférase de la levure de bière. Après une colonne de séphadex G-200, les activités de coiffage et de méthylation sont éluées ensembles mais sont rapidement séparées lors de la purification.

Ceci diffère des enzymes de foie de rat où la guanylyltransférase (65.000 D) et la 7-méthyltransférase (130.000 D) sont séparées après une chromatographie sur G-150.

Une activité 5' triphosphatase est associée à l'enzyme partiellement purifiée. Le poids moléculaire du complexe enzyme \sim GMP est estimé à 45.000.

Quelques mois plus tard, la même équipe est parvenue à purifier la guanylyltransférase de la levure jusqu'à une homogénéité apparente. L'enzyme, d'un poids moléculaire de 140.000, est composée de deux polypeptides de 45.000 D (α) et 39.000 D (β). Leur ratio molaire est proche de l'unité. La protéine oligomérique serait composée de deux chaînes α et β . Or, chez *Artenia salina* l'enzyme de coiffage partiellement purifiée subit une légère protéolyse et est ensuite clivée en deux domaines structuraux de 44.000 D et 20.000 D correspondant aux activités natives de guanylyltransférase et 5' triphosphatase. La comparaison de ces poids moléculaires avec ceux de *Saccharomyces cerevisiae* laisse supposer que la guanylyltransférase et la 5' triphosphatase existent sous forme de deux sous-unités différentes α et β .

La découverte du complexe intermédiaire confirme que la sous-unité α est bien le centre catalytique de la transguanylation, même en l'absence de β (Itoh et col., 1984.a).

La 5' triphosphatase peut hydrolyser le phosphate de pppGp ; mais un ARNm avec une chaîne plus longue sera un meilleur substrat.

La guanylyltransférase utilise le GTP comme donneur de coiffe et ppGpCpCp(Np)_n comme accepteur. Les ARNm se terminant par un di ou triphosphate sont coiffés tandis que les mononucléotides tels que GDP ou ppGp sont inertes. Cependant, l'enzyme peut utiliser ppGpC et ppGpCpC comme accepteur : la présence d'au moins un lien phosphodiester semble

donc être suffisant pour cette activité de transquanylation qui va intervenir très tôt lors de la transcription (Itoh et col., 1984.b).

c) L'ARNm (guanine-7-) méthyltransférase

Cette enzyme est facilement séparée des activités de triphosphatase et guanylyltransférase chez la levure, le germe de blé, la cellule Hela, la cellule de foie de rat. La dissociation des trois activités est plus difficile chez le virus de la vaccine.

En 1976, Ensinger et Moss ont isolé et caractérisé la 7-méthyltransférase des cellules Hela. Ils ont purifié l'enzyme 165 fois après chromatographie sur DEAE cellulose, DNA-agarose et CM-séphadex et ont estimé son poids moléculaire à 56.000. Les coiffes synthétiques G(5')ppp(5')G sont de bons accepteurs de méthyles ; GTP, GDP et G(5')pppp(5')G ne sont pas méthylées tandis que G(5')pp(5')G l'est faiblement.

C. Locht (1984) a purifié l'enzyme à partir de germes de blé et de *Saccharomyces cerevisiae*. Chez la levure, l'activité a été purifiée plus de 700 fois après chromatographie sur DEAE-cellulose, DNA-agarose et poly(V)-sépharose. Le poids moléculaire de l'enzyme est estimé à 49.000.

- L'enzyme purifiée est très stable : l'incorporation de méthyles sur l'analogue de coiffe G(5')ppp(5')G augmente linéairement pendant au moins 6 heures à 30°C.

- Contrairement à l'enzyme de germes de blé, celle de levure semble préférer l'analogue G(5')ppp(5')A à l'analogue G(5')ppp(5')G. G(5')ppp(5')U et G(5')ppp(5')C sont de faibles substrats. L'enzyme reconnaît donc de préférence les coiffes dont le penultième nucléotide est une purine ; ceci reflète la situation in vivo où 75% des coiffes sont de type G(5')ppp(5')Ap - et 25% de type G(5')ppp(5')Gp -. L'enzyme ne méthyle pas le GMP, le GDP ou le GTP.

- L'augmentation d'incorporation de groupement méthyle est linéaire en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée.
- La cinétique de la réaction révèle une valeur apparente de K_M de $2 \mu M$ pour la SAM.
- La SAH inhibe fortement la méthylation.
Une température de 30° et un PH de 7 sont les conditions optimales de méthylation.
- Les cations divalents sont fortement inhibiteurs. Contrairement aux 7-méthyltransférases des cellules Hela et de germes de blé, le NaCl et le KCl n'ont pas d'effet de stimulation sur l'enzyme de la levure.

d) L'ARN (nucléotide-2'-) méthyltransférase.

Deux nucléotides -2'-méthyltransférases ont été identifiées dans les cellules Hela. L'une, nucléaire, est responsable de la formation des coiffes de type 1 ; l'autre, nucléaire et cytoplasmique, des coiffes de types 2.

Les affinités de la coiffe 1 méthyltransférase pour les ARNm se terminant par $G(5')ppp(5')Xp$ ou $G(5')ppp(5')Xp$ sont identiques. Il est dès lors impossible de préciser si la méthylation sur le G-terminal par la 7-guanyltransférase est antérieure ou ultérieure à celle-ci.

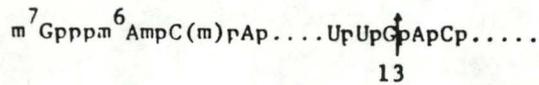
La compartimentation différente des deux enzymes laisse supposer que la coiffe de type 2 soit formée après la coiffe de type 1 (Langberg et Moss, 1981).

e) L'ARNm (2'-O-méthyladénosine-N-6)-méthyltransférase.

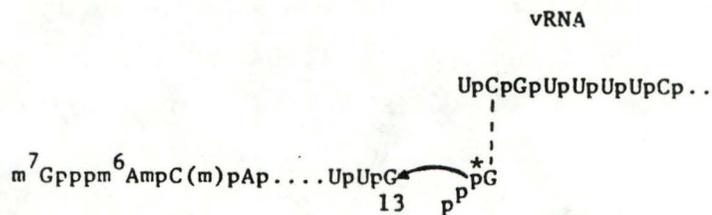
Cette enzyme a été purifiée à partir du cytoplasme de cellules Hela.

Elle catalyse la formation de coiffe de type 1' à partir de coiffe de type 1 et de SAM (Keith et col, 1978).

CLEAVAGE



INITIATION



ELONGATION

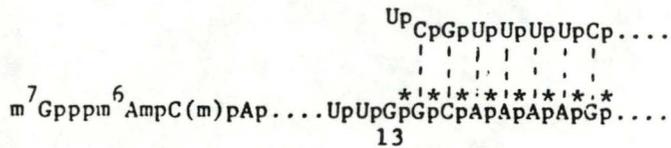


Fig.23.-Mécanisme postulé pour l'amorçage de la transcription chez le virus de la grippe sur l'ARNm de la β -globine. Les fragments coiffés de 13 nucléotides servent d'amorce à l'initiation de la transcription: sous la direction de la 3' pénultième cytosine, une guanine est incorporée dans la séquence avant l'étape d'élongation.

II.3. Les rôles fonctionnels de la coiffe de l'ARNm.

II.3.1. La transcription.

Comme il a été décrit dans le paragraphe I.2.1, les modifications de l'extrémité 5' surviennent extrêmement tôt dans la synthèse de l'ARNm par l'ARN polymérase II.

Nous avons vu que, chez l'adénovirus de type 2, la formation de la coiffe, et entre autre sa méthylation, sont couplées avec l'étape d'initiation de la transcription.

Ce modèle est en accord avec la possibilité d'une association intime entre les enzymes de coiffage et l'ARN polymérase II au moment de l'initiation de la transcription (Jove et Manley, 1982).

Quelques mois plus tard, Coppola et col. (1983), dans des conditions de transcription in vitro limitantes en UTP, ont produit à partir du promoteur de l'Ad2 des ARNm abortifs ayant au plus 20 nucléotides de long.

Aucun de ces petits ARNm n'était coiffé. Par contre, des ARNm de 75 bases étaient complètement coiffés et méthylés.

Ils en conclurent que le coiffage est un évènement survenant tôt durant la transcription mais qui n'est pas couplé intimement à l'initiation au sens strict.

Les ARNm plus petits que 20 nucléotides, enfouis dans l'ARN polymérase, ne seraient pas accessibles aux enzymes de coiffage. On ignore donc, à l'heure actuelle, si la formation de la coiffe est impliquée ou même nécessaire dans l'initiation de la transcription.

Une exception tout de même. En 1981, Plotch et col. ont proposé un mécanisme unique où la présence d'une "amorce" coiffée est nécessaire à l'initiation de la transcription de l'ARN⁺ du virus de la grippe.

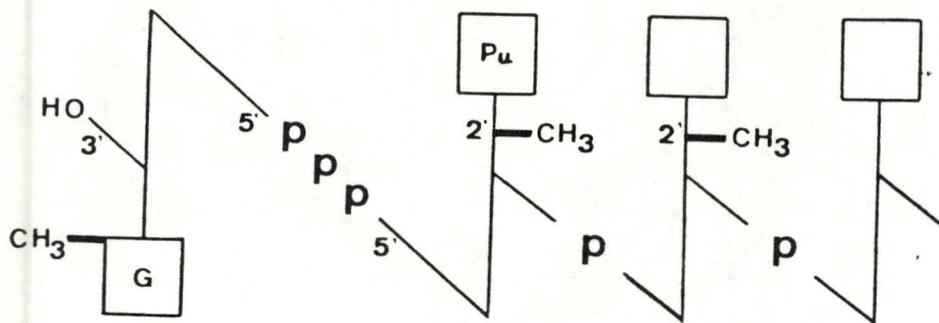


Fig.25.- La coiffe bloque l'extrémité 5' de l'ARNm: la position inversée de la guanosine par le pont 5'-5' triphosphate a pour conséquence de présenter une extrémité 3' OH au lieu de 5'. Cette structure rend inefficace toute attaque exonucléotique 5'.

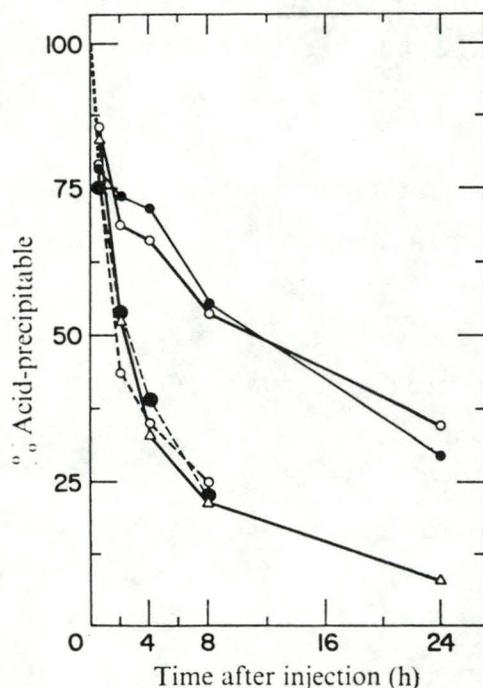


Fig.24. Dégradation de différents ARNm de réovirus injectés dans des oocytes de *X. laevis*.

ARNm terminés par

- (●) = m⁷ GpppG
- (○) = GpppG
- (Δ) = ppG
- (●- - ●) = pppG^m
- (○- - ○) = pppG

Ils ont mis en évidence, dans le core viral, une endonucléase qui clive les ARNm coiffés de l'hôte, une dizaine de nucléotides en aval de l'extrémité 5'. Chez les messagers de la β -globine, cette digestion génère des fragments coiffés de 13 nucléotides. Ceux-ci servent à l'initiation de la transcription virale (fig.23).

II.3.2. La stabilité de l'ARNm.

Contrairement aux ARNm des procaryotes, les ARNm eucaryotiques sont particulièrement stables (Lewin, 1966). La modification de l'extrémité 5' n'est pas étrangère à la stabilité accrue.

Furuichi et col. (1977) ont injecté des ARNm du réovirus coiffés ou non-coiffés dans des cocytes de *Xenopus laevis*. Après 8 heures d'incubation, ils récupèrent 55% des messagers coiffés (m^7 GpppG ou GpppG) et 25% des messagers lorsqu'ils n'étaient pas coiffés (ppG ; pppG^m ou pppG) (fig.24).

Les cinétiques de dégradation des ARNm avec une coiffe méthylée ou non-méthylée sont identiques. Donc, la protection de l'ARNm ne résulte pas d'une interaction avec la machinerie de synthèse protéique puisque les ARNm terminés par GpppG ne sont pas traduits (voir paragraphe II.3.4) et restent stables.

Une équipe japonaise (Shimotohno et col., 1977) a obtenu des résultats semblables avec les ARNm du virus de la polyhédrose cytoplasmique (CPV). Après quelques minutes d'incubation des messagers dans un système acellulaire de germes de blé, l'ARN n'est dégradé qu'après l'élimination de la 7-méthylguanosine terminale. Ils conclurent que la structure particulière de la coiffe est résistante à l'activité exonucléotidique 5' \longrightarrow 3' (fig.25).

II.3.3. Les modifications de l'ARNm.

Konarska et col. (1984) ont montré que la structure de la coiffe joue un rôle important lors de l'épissage des pré-ARNm d'ad2 dans un extrait acellulaire de cellules Hela.

L'épissage est fortement inhibé par des analogues de coiffes tels que : m^7 GpppG ou m^7 GTP lorsqu'ils sont ajoutés au début de la réaction.

Ils n'ont pas d'effets semblables lorsqu'ils sont ajoutés au cours de l'incubation.

Ceci suggère que la reconnaissance de la coiffe est une étape indispensable dans la formation du complexe ribonucléoprotéique actif et spécifique à la réaction de "Splicing".

Très récemment, Patzelt et col. (1987) ont confirmé le rôle inhibiteur des analogues de la coiffe lors de l'assemblage de ce complexe. Ils montrent également que sa formation est fortement réduite lorsque l'ARNm n'est pas coiffé.

D'autres études (Choi et col. 1986) suggèrent que des protéines (de type hnRNPC) sont impliquées dans l'assemblage du complexe d'épissage. L'isolement de ces protéines par des anticorps monoclonaux conduit à une diminution du nombre de complexes actifs formés. Ces protéines joueraient le rôle de facteur de reconnaissance de la coiffe.

Elles sont désignées par Patzelt (1983) comme protéines fixatrices de coiffe nucléaires.

Le rôle de la coiffe dans la maturation de l'ARN est hautement spécifique et, ne se limite donc pas à une protection contre la dégradation exonucléotidique.

II.3.4. La synthèse protéique.

De nombreuses études démontrent que la structure de la coiffe est impliquée dans les mécanismes d'initiation de la synthèse protéique.

a. L'importance du méthyle.

Dès 1975, Both et col. ont montré que les ARNm du réovirus et du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) synthétisés in vitro en présence de SAM stimulent la synthèse protéique dans une plus grande mesure que l'ARNm non-méthylé. De plus, la SAH, un inhibiteur de la méthylation, bloque la traduction des ARNm non-méthylés et n'influence pas la synthèse protéique à partir des ARNm méthylés. Ils concluent que la méthylation de l'extrémité 5' de l'ARNm viral est nécessaire à sa traduction.

L'année suivante, Rose et Lodish (1976), ont nuancé les idées de Both. La β -élimination de la 7-méthylguanosine réduit le taux de synthèse protéique d'un facteur 3 mais ne l'annule pas complètement. La structure de la coiffe semble donc avoir un effet médiateur plutôt qu'obligatoire pendant les premiers instants de la liaison ARNm - ribosome.

Lors de la synthèse in vitro d'ARNm du réovirus, Furuichi et col. (1979) ont remplacé la S - adénosylméthionine par la S - adénosyléthionine. Ils ont obtenu des ARNm (70%) présentant une extrémité 5' de type ²⁷GpppG et ²⁷GpppA.

Les ARNm éthylés, et pas les non-alkylés, sont traduits dans les lysats de germes de blé ou de réticulocytes avec une efficacité comparable à celle des ARNm méthylés. La 7-alkylation, de la guanosine terminale, plutôt que sa 7-méthylation, semble donc influencer positivement la traduction.

b. L'importance de la coiffe.

Après le retrait de leur coiffe, les ARNm du virus de la vaccine perdent toute leur capacité de se lier aux ribosomes dans un système de traduction acellulaire (S. Muthurishman et col ; 1978). Le rajoute d'un 7-méthylguanosine par le complexe guanylyltransférase : guanine-7-méthyltransférase du virus restaure les potentialités de traduction du messageur.

Paterson et Rosenberg (1979) ont remarqué que les ARNm procaryotiques étaient traduits avec une efficacité équivalente à celle des ARNm eucaryotiques sans coiffe. Ils ont alors coiffé des ARNm procaryotiques avec le complexe enzymatique de la vaccine (cité plus haut). Dans un système de traduction acellulaire de germes de blé, ces nouveaux messageurs présentent un taux de traduction comparable (et même supérieur) à celui des ARNm eucaryotiques.

L'ARNm circularisé (par une T4-ARN-ligase) de M. Kozak (1979) ne permet pas la fixation des ribosomes eucaryotiques. Par contre, les ribosomes d'E. coli s'y associent sans difficultés.

Ces nombreux arguments expérimentaux suggèrent clairement que la présence d'une coiffe méthylée en position 7 de G est indispensable

pour la promotion de l'extrémité 5' de l'ARNm durant l'étape d'initiation de la traduction.

c. Les effets des analogues de coiffe.

Des expériences alternatives utilisant des analogues de coiffe ont également pu démontrer de manière indirecte le rôle de la coiffe au niveau de l'initiation de la traduction.

Hickley et col (1976) ont démontré que la traduction de l'ARNm de la globine de lapin dans un système de traduction acellulaire de germes de blé, est inhibé par le nucléotide 7-méthylguanosine-5'-monophosphate ($m^7G(5')p$). Toute autre guanosine sans groupement méthylé, ou avec un phosphate dans une position différente ne permet pas cette inhibition. Ils proposent que le $m^7G(5')p$ empêche l'association de l'ARNm avec le ribosome : le nucléotide interagit avec le site du ribosome ou d'un facteur d'initiation qui se lie normalement avec l'extrémité $m^7G(5)pppA\dots$ de l'ARNm.

Des effets inhibiteurs semblables ont été observés avec $m^7G(5')pp$ et $m^7G(5')ppp(5')X^m$.

Ces analogues de coiffe n'inhibent pas la traduction de poly(U) et de l'ARNm du virus de la nécrose du tabac qui ne sont naturellement pas coiffés (Hickley et col ; 1976).

La présence d'un méthyle en position 7 de la guanosine et d'une liaison phosphate en 5' seraient les conditions minimales d'inhibition de la traduction. Ces caractéristiques stéréochimiques sont à la base des mécanismes moléculaires de reconnaissance de l'extrémité 5' par les nombreux facteurs d'initiation protéique.

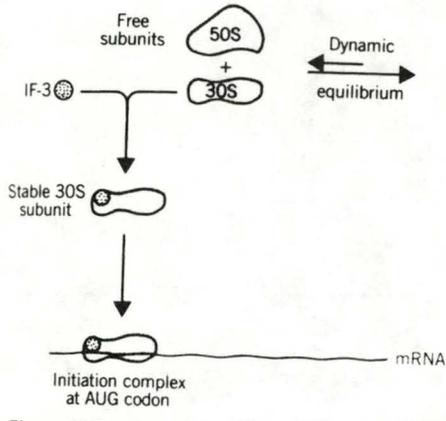


Fig. 26.- Initiation de la synthèse protéique chez les procaryotes.

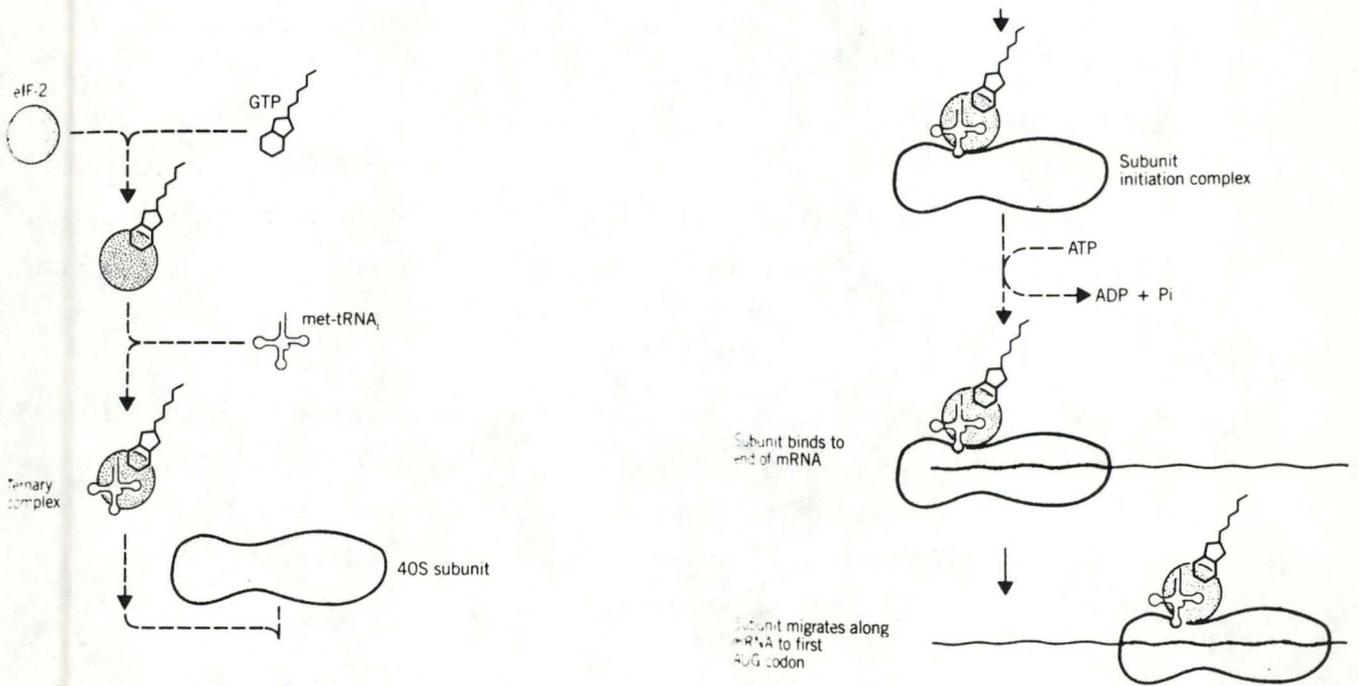


Fig.27.- Lors de l'initiation eucaryotique, eIF-2 forme un complexe avec le Met-RNA-tf. Le complexe ternaire se lie à une sous-unité 40 S libre, qui s'attache à l'extrémité 5 ' de l'ARNm et qui migre jusqu'au site d'initiation.

II.4. La coiffe et l'initiation de la traduction.

L'initiation de la traduction chez les procaryotes et chez les eucaryotes diffère par de nombreux aspects (Lewin, 1985). Chez les bactéries, les deux sous-unités ribosomales (30 S et 50 S) s'associent directement au niveau de la séquence entourant le codon d'initiation AUG (fig.26).

Chez les eucaryotes, par contre, la petite sous-unité 40 S doit d'abord reconnaître l'extrémité 5' de l'ARNm, s'enfiler autour de celle-ci et migrer jusqu'au premier codon d'initiation où elle s'associe avec la grande sous-unité 60 S (Kozak ; 1983).

La petite sous-unité ne se fixe pas directement sur l'extrémité 5' du messager : elle s'associe puis interagit préalablement avec différents facteurs d'initiation.

II.4.1. Formation du complexe ternaire (Lewin, 1985)

Dans un premier temps, un GTP se lie au facteur eIF2 (fig.27). Cette association augmente l'affinité de ce facteur pour le Met-ARN-tF, qui est alors lié. Cet ARN de transfert particulier diffère du Met-ARN-t élongateur par sa structure.

Il en résulte que le ARN-t-F est capable d'interagir avec les facteurs d'initiation, avec la petite sous-unité mais est capable de participer à l'élongation.

eIF-2, GTP et le ARN-t-F forment le complexe ternaire.

Subséquentement, le complexe ternaire s'associe avec une sous-unité 40S libre, dans une réaction indépendante de la présence du messager.

<i>Designation</i>	<i>Synonyms</i>	<i>Molecular mass</i> $\times 10^3$ <i>(daltons)</i>	<i>Subunits and their molecular masses</i> $\times 10^3$ <i>(daltons)</i>	<i>Affinity to 40S subunit</i>	<i>Affinity to mRNA</i>	<i>Stimulation of Met-tRNA binding to 40S subunits</i>	<i>Stimulation of mRNA binding to 40S subunits</i>
eIF-1		12		±	+	+	+
eIF-2		ca. 120	32(α), 35(β), 55(γ)	+?	+	+ -	+
eIF-2A		65	—	+?	?	+	—
eIF-2B	antiHCl, eRF, ESP, GEF, RF, SRF	ca. 300	30, 40, 55, 65, and 80	-	?	+	-
eIF-3		ca. 600	about 10 subunits, from 30 to 150	++	+	+	+
eIF-4A		50	—	-	-	-	+
eIF-4B		80	—	-	+	-	+
eIF-4C		17	—	+	+	+	+
eIF-4D		16	—	-	-	-	-
eIF-4E	CBP-I	24	—	-	+	-	+
eIF-4F	CBP-II	300	24, 50, 220	-	+	-	+
(includes eIF-4A, eIF-4E, and a 220,000-dalton protein)							
eIF-5		160	—	-	+	-	-
eIF-6		25	—	-	?	-	-

Fig. 28 .- Description des propriétés physiques et fonctionnelles des facteurs d'initiation eucaryotiques (d'après Spirin, 344 ; 198)

II.4.2. Facteurs d'initiation. (fig.28).

De nombreuses études, dont celles menées par Sonenberg, ont montré que le facteur de reconnaissance de la coiffe, lors de l'initiation de la traduction, existe en tant que complexe. Celui-ci présente à la fois les fonctions de reconnaissance de la coiffe et de déroulement de la structure secondaire du messager.

Dès 1978, Sonenberg et col ont détecté un polypeptide de 24.000 daltons qui interagit spécifiquement avec l'ARNm. Cette interaction est inhibée par des analogues de la coiffe de type Gp et Gpp.

Le polypeptide a été identifié comme étant la protéine fixatrice de coiffe ou cap binding protein (CBP) (Traschel, 1980).

Des anticorps monoclonaux, dirigés contre cet 24-CBP, se sont révélés capables d'inhiber l'interaction de ce polypeptide avec l'ARNm du réo-virus (Sonenberg et col, 1981).

En fait, cette CBP ou eIF-4E existe et fonctionne comme sous-unité d'une CBp plus importante, le complexe multiprotéique CBpII ou eIF-4F. Ce dernier contient eIF-4A, eIF-4E et une sous-unité de 220.000 daltons (Spirin, 345 ; 1984).

Nous l'avons vu, le facteur eIF-2 intervient durant les premiers instants de l'initiation de la traduction.

Le facteur eIF-3 joue un rôle dans la reconnaissance et même la discrimination des ARNm.

Le facteur eIF-1 et eIF-4C assistent également la liaison ARNm-sous-unité 40S (Spirin, 345, 1984).

Sonenberg (1981) a identifié, en plus de la 24-CBP, d'autres polypeptides ayant un poids moléculaire de 28.000, 50.000 et 80.000 qui

peuvent reconnaître et, subséquemment, interagir spécifiquement avec la coiffe de l'ARNm du réovirus.

L'interaction de ces derniers polypeptides est complètement dépendante de la présence d'ATP, par opposition à la 24-CBP qui en est indépendante.

Les polypeptides de 50 et 80 kD ont été reconnus par Grifo et col (1982) comme étant, respectivement, les facteurs d'initiation eIF-4A et eIF-4B.

II.4.3. Association de la sous-unité 40S avec l'ARNm.

De plus en plus d'arguments renforcent l'idée qu'une des fonctions des protéines fixatrices de la coiffe serait de déstabiliser ou de réarranger la structure secondaire de l'ARNm de manière à permettre l'approche puis la fixation de la sous-unité 40S (Spirin, 1984).

Dans un environnement de force ionique élevée, la structure secondaire de l'ARN est augmentée. Celle-ci empêche certains facteurs de la dérouler et d'initier la traduction (Lee et col, 1983).

Lorsque la structure secondaire de l'ARNm est réduite, les polypeptides de 50 et 80 kD peuvent interagir avec la structure de la coiffe sans ATP, mais en présence de la 24-CBP.

Ces observations suggèrent que la structure secondaire de l'ARNm détermine l'accessibilité de la coiffe pour certains facteurs de reconnaissance.

Le complexe 24-CBP-50kD-80kD pourrait interagir avec la coiffe ^{selon} la séquence suivante : la 24-CBP reconnaît la coiffe, la structure secondaire de l'ARNm est déroulée selon un mécanisme ATP-dépendant, les

polypeptides de 50 et 80 kD ont accès et interagissent avec la structure de la coiffe.

Cette interaction faciliterait la liaison de la sous-unité 40S avec l'extrémité 5' de l'ARNm (Lee et col, 1983).

III. LA METHYLATION.

III.1. La méthylation dans la cellule.

La source de groupement méthyle est une méthionine sous la forme d'un intermédiaire présentant une forte énergie libre d'hydrolyse, la S - adénosyl - L - méthionine (Adams et col, 1986. Casellas, 1978).

III.1.1. Méthylation des protéines.

Les enzymes responsables de la méthylation des protéines sont de trois types (casellas, 1978) :

- La protéine méthylase I méthyle les groupements guanidino des résidus arginine.
- La protéine méthylase II méthyle certains groupements carboxyles libres des résidus glutamyl et aspartyl.
- La protéine méthylase III méthyle le groupement - NH₂ des résidus lysine.

III.1.2. Méthylation de l'ADN (Adams et col, 1986 ; 108-111)

Les bases méthylées de l'ADN sont de deux types : celles qui sont incorporées telles quelles dans la séquence par l'ADN polymérase et celles qui sont méthylées après la synthèse de l'ADN.

Chez les eucaryotes, la séquence d'ADN reconnue et méthylée par les méthyltransférases est :

5' - C G - 3' chez les animaux	et 5' - CNG - 3'
- G C	- GNC -

chez les plantes.

Tous les sites de reconnaissance ne sont pas méthylés : la méthylation est spécifique d'un tissu.

La corrélation qui existe entre le degré de méthylation d'un gène et expression suggère que les gènes actifs sont hypo-méthylés.

III.1.3. Méthylation des ARN.

Les ARN méthyltransférase catalysent les modifications post-transcriptionnelles des ARN. Les résidus méthylés sont présents chez l'ARNr, l'ARNt et l'ARNm (Söll et Kline, 1982).

La majorité des méthylations affectant l'ARNr se situe en 2' - O - ribose des nucléotides.

La double paire de méthyles sur les deux adénines de l'extrémité 3' de l'ARNr de la petite sous-unité (procaryotique et eucaryotique) semble jouer un rôle dans l'initiation de la synthèse protéique. L'inhibition des méthylases, qui catalysent ces modifications, stoppe l'initiation de la traduction chez les procaryotes.

Chez les eucaryotes, ces modifications surviennent dans le cytoplasme tandis que la conversion d'une base en une autre (uridine en pseudouridine) est un phénomène nucléaire. (Adams et col 1986).

43 nucléotides rares résultant d'une modification post-transcriptionnelle ont été identifiés chez les ARNt (Adams et col, 1986).

Par contre, seulement 5 enzymes modifiant l'ARNt ont été purifiées avec au moins 50% de pureté.

Le rôle de ces modifications n'est pas clair.

La présence de nucléotides odifiés dans l'ARNt des mitochondries et des chloroplastes a également été remarquée. (Söll et Kline, 1982).

Les méthylations internes de l'ARNm ont été moins étudiées que les modifications 5' terminales. Les ARNm sont méthylés, en N-6 d'une ou de quelques adénines, rarement en position 5 d'une cytosine. Ces méthylations internes sont plus ou moins fréquentes suivant l'espèce d'ARNm. Leur rôle est inconnu.

III.2. La méthylation in vitro.

II.2.1. Substrats de l'ARNm (guanine-7-) méthyltransférase du virus de la vaccine.

Un ARNm non méthylé peut être facilement obtenu, avec le virus de la vaccine, par une transcription in vitro utilisant l'ARN polymérase du virion en l'absence de SAM. En présence de tels ARN (coiffé et non-méthylé), l'enzyme du virus méthyle seulement la guanosine de la coiffe et ce, exclusivement en position N-7.

L'enzyme méthyle aussi GpppX, GTP, dGTP, GDP, GMP, la guanosine et ITP. Les méthylations de ces substrats nécessitent de hautes concentrations en accepteur (K_m pour GTP = 0,53mM, pour GpppG = 0,12mM) par rapport aux méthylations d'ARN coif-

fés (K_m pour $Gppp(A)_n = 0,21 \mu m$). L'effet de la longueur de l'ARN sur la méthylation de sa coiffe n'a jamais été étudié (Schuman et Hurwitz, 1982).

II.2.2. Méthylation in vitro de A l'ARNm sous-méthylé de levure par l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase purifiée.

a. Construction d'une souche strictement auxotrophe pour la SAM.

Chez *S. cerevisiae*, la dernière étape dans la biosynthèse de la SAM et catalysée par la SAM synthétase ou L-méthionine-S-adenosyl-transférase. Cette activité existe sous forme de deux isoenzymes : la SAM synthétase I et II, codées par deux gènes non-liés SAM1 et SAM2.

C. Locht (1985) a construit une souche double mutante en croisant deux souches de levure présentant chacune une mutation en SAM1 ou en SAM2 : une auxotrophie stricte pour la SAM nécessite des mutations au niveau des deux gènes.

Cette souche K1000, est alors utilisée pour la production d'ARNm sous-méthylé.

b. Méthylation in vitro de l'ARNm sous-méthylé.

(C. Locht, 1985)

L'ARNm poly(A), isolé à partir de la souche K1000 après 90 minutes de privation de SAM, a été méthylé significativement avec les ARNm (guanine-7-) méthyltransférase partiellement purifiée de germes de blé et de la levure.

Par contre, l'ARNm poly(A) extrait à partir de la même souche mais sans privation de SAM ou à partir d'une souche sauvage ne montre pas une telle incorporation.

L'analyse des ARNm méthylés in vitro montre que la sous-méthylation a lieu au niveau de la coiffe de l'extrémité 5'.

La sous-méthylation affecte, plus précisément, des messagers contenant des extrémités 5' de type GpppG et GpppA car la méthylation in vitro génère des rapports GpppG sur GpppA de 1/2 par la réaction avec la méthyltransférase de germe de blé, et 1/3 pour celle avec les enzymes de levure. Le rapport de 1/3 correspond à ce que est décrit in vivo ; ceci pour suggérer que la transcription par l'ARN polymérase II commence préférentiellement avec ATP chez *S. cerevisiae*.

Aucune pyrimidine dans la coiffe n'a pu être détecté par méthylation de celle-ci in vitro ou in vivo.

La transcription commence donc exclusivement par une purine. Aucune méthylation sur les riboses, ni de méthylation interne n'a été décelée, ce qui correspond à la situation in vivo chez la levure.

III.3. But du travail

Jusqu'à présent, l'étude in vitro de la méthylation de la coiffe par l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase utilisait comme substrat des ARNm viraux ou de levure sous-méthylés.

Il nous paraît intéressant d'ouvrir la voie à un nouveau type d'expériences de méthylation, basées sur l'utilisation d'un substrat nouveau : un ARNm eucaryotique synthétisé in vitro, coiffé et dépourvu de toute méthylation.

Ce mémoire aura donc comme but, d'abord d'isoler, en grande quantité, l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cet organisme présente l'avantage que ses ARNm ne contiennent pas de méthylations internes, ni de méthylations terminales autre que la 7-méthylguanosine. Ceci élimine les risques de contamination par des ARNm-méthyltransférases autre que la 7-méthyltransférase.

De plus la levure est un organisme facilement manipulable en laboratoire et dont la souche peut être choisie en fonction de l'étude biochimique envisagée.

Nous nous proposons, ensuite, de tester cette enzyme in vitro sur un ARNm coiffé, synthétisé in vitro à partir d'un ADN-c eucaryotique (l'ADN-c du lysozyme de poule) cloné dans un vecteur compatible avec le système de transcription des bactériophages SP6 et T7.

MATERIEL
ET
METHODES

MARQUEURS CHROMOSOMIQUES.	SIGNIFICATION DES SYMBOLES.
α	le signe de la souche
mal ⁻	la souche ne pousse pas sur un milieu au maltose
gal ²	la souche ne pousse pas sur un milieu au galactose
ade ¹	la souche est auxotrophe pour l'adénine
trp ⁻	la souche est auxotrophe pour le tryptophane
leu ⁻	la souche est auxotrophe pour la leucine
thr ⁻	la souche est auxotrophe pour la thréonine
rho ⁻	la souche ne pousse pas sur glycérol
os ^s	une mutation dans le gène sorb entraîne l'osmosensibilité de la souche
rif ^s	la souche est sensible à la rifampicine
t ^s	la souche est thermosensible

Tableau I.- Signification des marqueurs chromosomiques de la souche VY1160 selon Venkov.

I. PURIFICATION PARTIELLE DE L'ARN-m (GUANINE-7-)-METHYLTRANSFERASE
DE Saccharomyces cerevisiae.

I.1. Souche de levure.

La souche Saccharomyces cerevisiae VY 1160 (Dr. P.V. Venkov, Bulgarian Academy of Sciences) est osmosensible : elle nécessite un milieu de culture enrichi en Sorbitol (10%). Dans l'eau, les cellules libèrent 50 à 90% de leur contenu (Venkov, 1974).

En plus de son osmosensibilité, ce mutant est sensible à la rifampicine et à une augmentation de température. Son génotype est α , mal, gal 2, ade 1, trp $\bar{}$, leu $\bar{}$, thr $\bar{}$, rho $\bar{}$, osm s , rif s et t s (tableau I).

I.2. Milieux de culture.

Le milieu de culture solide est un milieu riche, YPD + sorbitol 10%, qui contient en poids par volume d'eau distillée (P/V),

yeast-extract (Difco)	1%
peptone de caséïne (Merck)	2%
glucose monohydraté (Merck)	2%
agar (oxoid)	2%
Sorbitol (UCB)	10%

Le PH est ajusté à 4,8 avec l'HCl concentré.

Le milieu de culture liquide YMS + sorbitol 10% contient :

1. yeast extract (Difco)	0,1%
peptone de caséïne (Merck)	0,2%
adénine (Merck)	0,002%
Succinate de sodium (UCB)	1%

Le PH est ajusté à 5,8 avec l'HCL concentré.

2. Sorbitol (UCB) 10%

Le PH est ajusté à 5,8 avec NaOH.

3. yeast nitrogen base (Difco) 0,67%
glucose monohydraté (Merck) 1%

Les solutions 1 et 2 sont stérilisées séparément dans l'auto-clave à 120°C pendant 20 minutes tandis que la solution 3 est stérilisée par filtration tangentielle sur Stérivex-GS 0,22 μ m.

I.3. Culture des cellules de levure.

Une préculture de 20 ml de milieu YM5 + sorbitol 10% est réalisée à partir d'une colonie isolée. Lorsque cette préculture atteint une densité optique de 3-4 à 420 nm, 6ml de celle-ci servent à inoculer 2 litres de milieu YM5 + sorbitol 10%. Les cultures croissent sous agitation constante (125 tpm) à une température de 30°C.

I.4. Lyse des cellules.

Le mode opératoire est décrit par C. Locht (1984).

Durant la phase exponentielle de croissance (D.O. de 0,72 à 420 nm), les cultures sont refroidies dans la glace fondante. Les cellules de levure sont centrifugées à 5000 tpm (rotor GSA, centrifugeuse Sorvall) dans des bouteilles de 250 ml pendant 5 minutes à 0°C. Le milieu de culture est décanté, les cellules sont resuspendues et lavées deux fois dans du sorbitol 10% froid.

Par gramme de cellules recueillies, 2 ml d'eau stérile froide sont ajoutés. Les cellules osmosensibles sont resuspendues, transvasées dans un potter Eljehjem et lysées au vortex avec une agitation maximale durant 5 fois 90 secondes. La suspension est refroidie dans la glace fondante entre chaque agitation.

Dans une seconde étape, la suspension est homogénéisée par un traitement de 30 coups de piston (1500 tpm) dans un potter.

L'homogénat est ajusté à Tris-HCl 50 mM PH 7,9, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM et éthylène glycol 35% (V/V). Le mélange est centrifugé dans un tube corex de 15 ml à 10.000 tpm (rotor HB-4, centrifugeuse Sorvall) pendant 10 minutes à 0°C. Le surnageant est, ensuite, réparti dans des tubes Eppendorf et centrifugé dans une centrifugeuse de table (12.000 tpm) pendant 20 minutes.

Les surnageants constituent la fraction enzymatique.

I.5. Dosage des protéines.

La teneur en protéines des fractions recueillies est mesurée à 595 nm selon la méthode de Bradford (1976).

Une courbe standard est établie au moyen de la sérualbumine bovine.

I.6. Test d'activité de l'ARN-m(guanine-7-)méthyltransférase

L'activité de méthylation est testée sur un analogue de la coiffe : la diguanosine triphosphate, G(5')ppp(5')G, disponible dans le commerce (Pharmacia). Ce test est décrit par C. Locht (1984).

Le mélange réactionnel de 7,5 μ l contient Tris-HCl 25 mM PH 7,5, DTT 2 mM, S-Adénosyl-(méthyl- H) méthionine 3 Ci (15 Ci/mmoles, Amersham), GpppG 1 mM et 2,5 μ l de fraction enzymatique. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 3 ou 4 heures.

Par gramme de cellules recueillies, 2 ml d'eau stérile froide sont ajoutés. Les cellules osmosensibles sont resuspendues, transvasées dans un potter Eljehjem et lysées au vortex avec une agitation maximale durant 5 fois 90 secondes. La suspension est refroidie dans la glace fondante entre chaque agitation.

Dans une seconde étape, la suspension est homogénéisée par un traitement de 30 coups de piston (1500 tpm) dans un potter.

L'homogénat est ajusté à Tris-HCl 50 mM PH 7,9, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM et éthylène glycol 35% (V/V). Le mélange est centrifugé dans un tube corex de 15 ml à 10.000 tpm (rotor HB-4, centrifugeuse Sorvall) pendant 10 minutes à 0°C. Le surnageant est, ensuite, réparti dans des tubes Eppendorf et centrifugé dans une centrifugeuse de table (12.000 tpm) pendant 20 minutes.

Les surnageants constituent la fraction enzymatique.

I.5. Dosage des protéines.

La teneur en protéines des fractions recueillies est mesurée à 595 nm selon la méthode de Bradford (1976).

Une courbe standard est établie au moyen de la sérualbumine bovine.

I.6. Test d'activité de l'ARM-m(guanine-7-)méthyltransférase

L'activité de méthylation est testée sur un analogue de la coiffe : la diguanosine triphosphate, G(5')ppp(5')G, disponible dans le commerce (Pharmacia). Ce test est décrit par C. Lochter (1984).

Le mélange réactionnel de 7,5 μ l contient Tris-HCl 25 mM PH 7,5, DTT 2 mM, S-Adénosyl-(méthyl-³H) méthionine 3 μ Ci (15 Ci/mmole, Amersham), GpppG 1 mM et 2,5 μ l de fraction enzymatique. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 3 ou 4 heures.

6 μ l du mélange sont déposés sur un filtre de DEAE-cellulose (DE-81, 2,3 cm ; Whatman). Après séchage à température ambiante, le filtre est lavé 5 fois 10 minutes dans du formiate d'ammonium 25 mM PH8, immergé brièvement dans l'eau distillée puis plongé dans l'alcool-éther.

Le filtre est séché sous vide, les coiffes (GpppG) sont éluées avec 0,5 ml de chlorure de lithium 1M. La radioactivité est comptée dans 5 ml d'aqualuma dans un compteur Beckman LS-3150 T.

I.7. Purification de l'ARN-m (guanine-7-)-méthyltransférase.

Toutes les étapes de la purification sont réalisées à 4°C.

Le tampon d'éluion et de stockage des protéines est le TEDG :

Tris HCl	50 mM	PH 7,9
EDTA	0,1 mM	PH 7,9
DTT	1 mM	
éthylène glycol	35% (V/V)	
triton X-100	0,1% (V/V)	

Le surnageant est appliqué sur une matrice échangeuse d'anions QAE-Zetaprep (une amino-éthyle quaternaire modifiée de LKB) équilibrée avec le tampon TEDG sans NaCl avec un débit de 270 ml/heure.

Une expérience préliminaire a été réalisée afin de déterminer la force ionique d'éluion de l'activité de méthylation : le matériel retenu est élué par un gradient discontinu avec le tampon TEDG contenant 0 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 1 M NaCl.

Au vu des résultats, la colonne Zetaprep est lavée le tampon TEDG contenant 20 mM NaCl ; l'activité est éluée avec du TEDG 100 mM NaCl.

Les protéines actives sont déposées sur une colonne (1,5 x 25 cm) échangeuse de cations, une carboxy-méthyle sépharose CL-6B de Pharmacia préalablement équilibrée avec le tampon TEDG 100 mM NaCl avec un débit de 24 ml par heure. Les protéines non-fixées sont éliminées après un lavage avec le tampon TEDG 100 mM NaCl tandis que l'activité de méthylation est éluée avec le TEDG 350 mM NaCl.

Les fractions actives sont groupées et désalées sur une Pd 10 (1,5 x 5 cm), une colonne G-25 de Pharmacia.

Les protéines sont déposées sur une colonne (1,0 x 6 cm) de DNA-agarose (P-L Biochemicals) équilibrée avec le tampon TEDG contenant 100 mM NaCl avec un débit de 4 ml par heure.

Les fractions contenant l'activité d'ARN-m (guanine-7-)-méthyltransférase sont aliquotées et stockées à -20°C.

I.8. Analyse des protéines par électrophorèse verticale,

L'électrophorèse est réalisée dans un gel SDS-polyacrylamide (10%) surmonté par un gel de concentration (3%).

Le gel de séparation contient :

6,65 ml d'une solution acrylamide-bisacrylamide (30%/0,8% ; P/V).

5,3 ml de Tris-HCl 1,5 M (PH 8,8)

7,75 ml d'eau distillée

8,75 μ l de Temed

52,5 μ l de persulfate d'ammonium 10%

0,2 ml de SDS 10%

Le gel de concentration est préparé à partir de :

3 ml de la solution acryl-bisacrylamide (30%/0,8% ; P/V)
 7,5 ml de Tris-HCl 0,5 M (PH 6,8)
 18,9 ml d'eau distillée
 15 μ l de Temed
 0,3 ml de persulfate d'ammonium 10%
 0,3 ml de SDS 10%

Le tampon d'électrophorèse (PH 8,3) est composé de :

Tris	25 mM
glycine	192 mM
SDS	0,1% (P/V)

Le tampon d'échantillon (concentré 2 fois) PH 6,8 est composé de :

Tris	125 mM
SDS	4% (P/V)
bleu de bromophénol	0,002% (P/V)
mercaptoéthanol	10% (V/V)
glycérol	20% (V/V)

Les fractions protéiques à analyser sont diluées 2 fois dans le tampon d'échantillon. Les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 minutes. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 12 volts/cm pendant 4 heures.

Les protéines sont visualisées après coloration au bleu de Coomassie ou à l'argent.

- Coloration au bleu de Coomassie. (Hayes et col. 1969)

Après migration, les protéines sont fixées dans du TCA 12% pendant 30 minutes puis sont colorées pendant 1 heure dans une solution contenant 500 mg de bleu de Coomassie, 115 ml de méthanol, 115 ml d'eau distillée et 20 ml d'acide acétique. Le gel est décoloré dans un mélange de méthanol/eau/acide acétique (45/45/10) et est immergé 90 minutes dans du méthanol 30% - glycérol 3% avant d'être séché sous-vide.

- Coloration à l'argent.

Cette technique est inspirée de la méthode de Merril (1979). Après migration, les protéines sont fixées en immergeant le gel dans une solution méthanol 50% - acide acétique 12% pendant 30 minutes. Afin d'éliminer l'excès de SDS et de permettre au gel de se décontracter avant la coloration, il est rincé trois fois 10 minutes dans des bains contenant de l'éthanol 10% - acide acétique 5%.

Ensuite, les protéines sont oxydées dans une solution de bichromate de potassium 3,4 mM - acide nitrique 3,2 mM pendant 15 minutes. Le gel est lavé 3 fois 30 minutes dans l'eau distillée, plongé dans le nitrate d'argent 20 mM pendant 30 minutes puis lavé dans l'eau distillée. Après quelques minutes d'immersion dans la solution réductrice de développement (carbonate de sodium 0,28 M - formaldéhyde 9 mM), les bandes protéiques brunes apparaissent. La réaction est arrêtée dans l'acide acétique 3%. Le gel est stocké dans le méthanol 30% - glycérol 3% avant d'être séché sous vide.

La taille des protéines (en daltons) est estimée d'après leur mobilité électrophorétique (Shapiro et col ; 1968). La courbe d'étalonnage est construite à partir de protéines de poids moléculaire connus.

- Ces protéines marqueurs (Sigma) sont :

l'albumine bovine	66.000 D.
l'ovalbumine	45.000 D.
la glycéraldéhyde-3-P-déshydrogénase	36.000 D.
l'anhydrase carbonique	29.000 D.
le trypsinogène	24.000 D.
l'inhibiteur de la trypsine	20.000 D.
l' α -lactalbumine	14.200 D.

- Des marqueurs de la firme Pharmacia ont également été utilisés.

la phosphorylase B	94.000 D
la bovine sérum albumine	67.000 D
l'ovalbumine	43.000 D
l'anhydrase carbonique	30.000 D
l'inhibiteur de la trypsine	
de Soja	20.100 D
l' α -lactalbumine	14.400 D

insertion of *Hae* II fragment

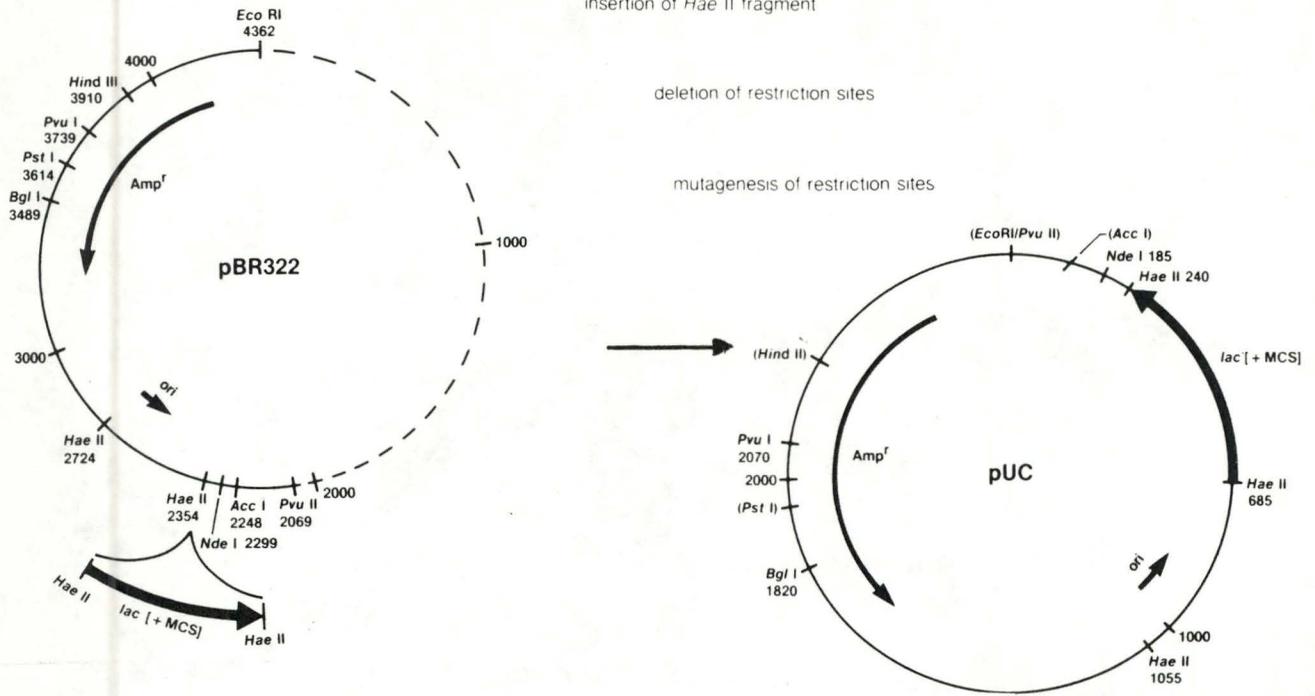


Fig.2.-Résumé de la construction des vecteurs pUC.

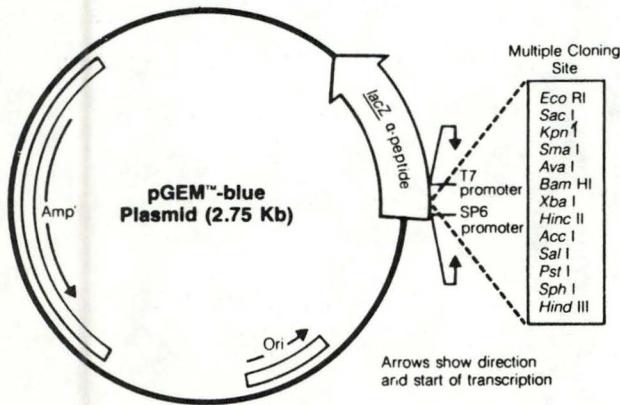


Fig.1.-Schéma du plasmide pGem-blue.
.4.

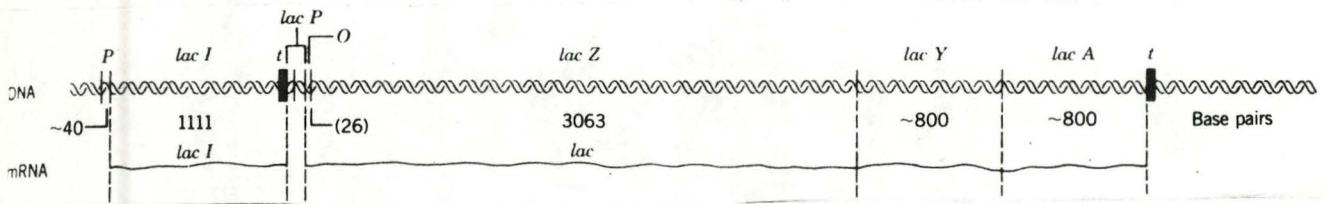


Fig. 3.- L'opéron lactose contient :

- un gène *lac* I, ayant son propre promoteur et terminateur et codant pour le répresseur de l'opéron
- un promoteur et un opérateur sur lequel se fixe le répresseur actif
- un groupe de 3 gènes *Lac* Z, *Lac* Y, *Lac* A codant respectivement pour la β galactosidase, la perméase et la transacétylase de l'opéron.

II. CLONAGE DE L'ADN-c DU LYSOZYME DE POULET.

II.1. plasmide et ADN-c.

Le vecteur utilisé est le pGem-blue, commercialisé par Promega. C'est un petit plasmide de 2,75 kilobases dont la matrice provient du pUC 19 (fig.1).

Les plasmides pUC, construits par Messing (1984), sont dérivés du pBR 322. Une portion du gène lac Z (β -galactosidase) du phage M 13 mp a été introduite dans le fragment Pvu II / Eco RI de pBR 322 portant le gène de résistance de l'ampicilline (β -lactamase) et l'origine de réplication pour E.coli. (fig.2).

Certains sites de restriction du fragment de pBR 322 ont été détruits par délétion ou par mutagenèse de manière à ce qu'ils soient présents uniquement dans le site multiple de clonage inséré au début de la séquence codant par le peptide de la β -galactosidase. L'introduction de cette batterie de sites uniques ne modifie pas la phase de lecture du gène.

La portion du gène lac Z contient également le promoteur, l'opérateur et le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose (fig.3).

En plus de ces caractéristiques, le plasmide pGem-blue possède deux promoteurs très spécifiques (de bactériophage) bordant le site multiple de clonage. Le premier promoteur, sur le brin interne, est reconnu par la SP6 ARN polymérase ; le second, sur le brin externe, est reconnu par la T7 ARN polymérase (fig.4).

La séquence de l'ADN-c du lysozyme de poulet est décrite par J. Oberto (1985) (fig.5). Les simulations de restriction avec plus de 50 endonucléases, disponibles dans le commerce, ont été réalisées avec le programme DNA-inspector II sur Mac-Intosh. La figure 6 résume la construction et le clonage d'un ADN-c type.

																	MET	ARG	SER	LEU	LEU	ILE	LEU	VAL	LEU															
GTGTGTACGACACTGGCAAC																	ATG	AGG	TCT	TTG	CTA	ATC	TTG	GTG	CTT															
																	+1									20														
CYS	PHE	LEU	PRO	LEU	ALA	ALA	LEU	GLY	LYS	VAL	PHE	GLY	ARG	CYS	GLU	LEU	ALA	ALA	ALA																					
TGC	TTC	CTG	CCC	CTG	GCT	GCT	CTG	GGG	AAA	GTC	TTT	GGA	CGA	TGT	GAG	CTG	GCA	CCG	GCT																					
																	40									60							80							
MET	LYS	ARG	HIS	GLY	LEU	ASP	ASN	TYR	ARG	GLY	TYR	SER	LEU	GLY	ASN	TRP	VAL	CYS	ALA																					
ATG	AAG	CGT	CAC	GGA	CTT	GAT	AAC	TAT	CGG	GGA	TAC	AGC	CTG	GGA	AAC	TGG	GTG	TGT	GCC																					
																	100									120							140							
ALA	LYS	PHE	GLU	SER	ASN	PHE	ASN	THR	GLN	ALA	THR	ASN	ARG	ASN	THR	ASP	GLY	SER	THR																					
GCA	AAA	TTC	GAG	AGT	AAC	TTC	AAC	ACC	CAG	GCT	ACA	AAC	CGT	AAC	ACC	GAT	GGG	AGT	ACC																					
																	160									180							200							
ASP	TYR	GLY	ILE	LEU	GLN	ILE	ASN	SER	ARG	TRP	TRP	CYS	ASN	ASP	GLY	ARG	THR	PRO	GLY																					
GAC	TAC	GGA	ATC	CTA	CAG	ATC	AAC	AGC	CGC	TGG	TGG	TGC	AAC	GAT	GGC	AGG	ACC	CCA	GGC																					
																	220									240							260							
SFR	ARG	ASN	LEU	CYS	ASN	ILE	PRO	CYS	SER	ALA	LEU	LEU	SER	SER	ASP	ILE	THR	ALA	SER																					
TCC	AGG	AAC	CTG	TGC	AAC	ATC	CCG	TGC	TCA	GCC	CTG	CTG	AGC	TCA	GAC	ATA	ACA	GCG	AGC																					
																	280									300							320							
VAL	ASN	CYS	ALA	LYS	LYS	ILE	VAL	SER	ASP	GLY	ASN	GLY	MET	ASN	ALA	TRP	VAL	ALA	TRP																					
GTG	AAC	TGC	GCG	AAG	AAG	ATC	GTC	AGC	GAT	GGA	AAC	GGC	ATG	AAC	GCG	TGG	GTC	GCC	TGG																					
																	340									360							380							
ARG	ASN	ARG	CYS	LYS	GLY	THR	ASP	VAL	GLN	ALA	TRP	ILE	ARG	GLY	CYS	ARG	LEU	ààà	GGA																					
CGC	AAC	CGC	TGC	AAG	GGT	ACC	GAC	GTC	CAG	GCG	TGG	ATC	AGA	GCC	TGC	CGG	CTG	TGA																						
																	400									420							440							
GCTGCCGACCCCGGCCCGCCCGCTGCACAGCCGGCCGCTTTGCGAGCGGACGCTACCCGCTTGGCAGTTTTAAACGCA																	460									480							500							520
TCCCTCATTTAAACGACTATACGGAAACGC																	540									556														

Fig. 5.-Séquence nucléotidique de l'ADN-c du lysozyme de poulet et des régions adjacentes (décrite par J. Oberto, 1985). La partie codante est contenue entre les coordonnées +1 et 444. La séquence en acides aminés correspondante est indiquée conjointement.

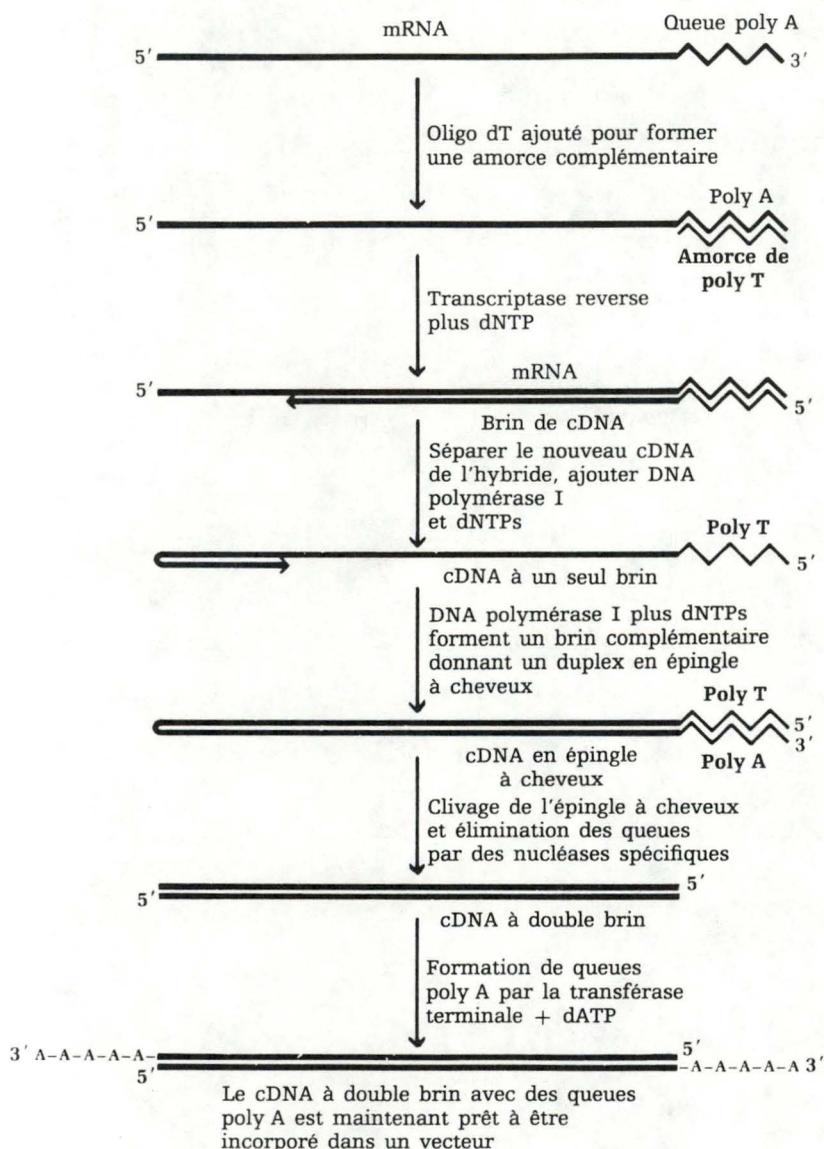


Fig.6.- Qu'est-ce qu'un ADN-c ?

Un ADN-c double brin est construit à partir d'un ARNm. Une fois que l'ARNm d'un gène donné a été isolé, il peut être transcrit en ADN complémentaire par la transcriptase réverse. Cette enzyme nécessite un ADN amorce fourni par un polydT complémentaire de la queue de polyA en 3' de l'ARNm. Le nouveau brin ADN-c est séparé et utilisé à la fois comme amorce et comme matrice par l'ADN polymérase I pour former un duplex d'ADN-c. L'épingle à cheveux est clivée, taillée. Les extrémités sont modifiées de manière à permettre l'incorporation de la séquence dans un vecteur. (d'après Lheninger 1985).

MARQUEURS CHROMOSOMIQUES.	SIGNIFICATION DES SYMBOLES.
Δ lac pro	le chromosome de la bactérie est délété au niveau de l'opéron proline
hsd R ⁻	une mutation inactive le système de restriction propre à la souche. Cette mutation est indispensable lorsque la bactérie contient un ADN étranger qui risquerait d'être clivé chez la souche sauvage.
F'	le facteur F' se trouve sur un épisome et code pour les pili sexuels de la surface bactérienne.
tra D 36	une mutation dans ce gène empêche toute conjugaison avec une souche naturelle.
pro AB	l'épisome F porte l'allèle sauvage de l'opéron proline
lac I ^q	une mutation dans le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose entraîne la surproduction de ce répresseur et facilite l'inductibilité.
lac Z	la souche contient un gène lac Z délété dans la région α de la β -galactosidase.

Tableau II.- Signification des marqueurs chromosomiques de la souche TG 1 selon Bachman (1983)

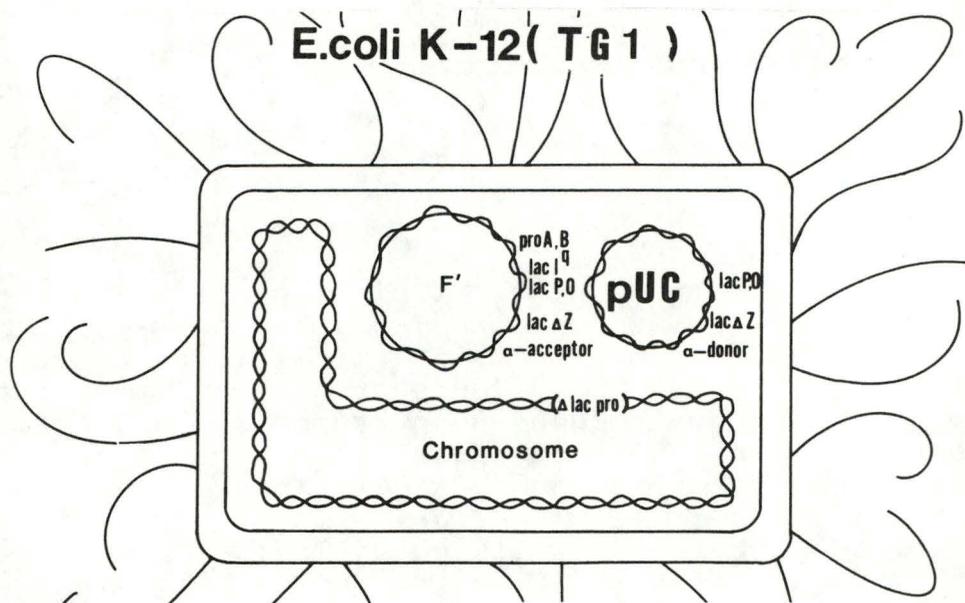


Fig. 7.- Localisation des marqueurs présents chez une bactérie de la souche TG1 d'E.coli hébergeant un plasmide pUC.

Afin de tirer parti des propriétés du pGem-blue et de restituer une β -galactosidase fonctionnelle, le plasmide est cloné dans une souche appropriée.

II.2. Souche bactérienne.

La souche bactérienne hôte utilisée dans les expériences de clonage est la souche TG 1 d'Escherichia coli (Amersham). Elle est caractérisée par les marqueurs chromosomiques suivants : Δ lac pro, sup E, thi F', hsd R⁻, tra D 36, pro AB, lac I^q, Z Δ M 15 (tableau II).

Chaque bactérie de la souche TG 1 héberge quelques copies de l'épisome F' (de 5 à 10) sur lequel se trouve le gène lac I muté, le promoteur, l'opérateur et le gène lac Z délété partiellement (fig.7).

Afin de garantir la présence de F', 2 gènes de l'opéron proline du chromosome bactérien sont délétés. L'auxotrophie qui en résulte est corrigée par l'insertion des 2 gènes sauvages sur F'. L'épisome est maintenu dans la cellule, en propageant la bactérie sur milieu minimum.

Le gène lac I muté de F' est responsable de la production de répresseur en quantité 10 fois supérieure à la normale. Les répresseurs bloquent les opérateurs (lac O) des l'épisomes F'. Lorsqu'un plasmide exogène de type pUC, par exemple, est présent dans la cellule, quelques opérateurs restent libres. En effet, le nombre de répresseurs produits par le gène lac I normal est trop faible pour réprimer complètement tous les opérateurs plasmidiques étant donné que le nombre de copies du plasmide est de plusieurs centaines par cellules.

Le gène lac Z de F' est délété dans la région codant pour le peptide α de l'extrémité amino-terminale de la β -galactosidase. L'enzyme produite est inactive.

Par contre, si la cellule héberge des plasmides pUC ou pGem Blue, une β -galactosidase active est restituée par complémentation intragénique entre les peptides de la séquence intacte du plasmide et de la séquence délétée de l'épisome F'.

La présence du site multiple de clonage dans la séquence du peptide du plasmide n'affecte pas la complémentation intragénique et permet la restitution d'une β -galactosidase fonctionnelle. Ce phénomène est à la base de la détection des clones où le p Gem-blue contient l'ADN-c du lysozyme en son site multiple de clonage (voir plus loin).

II.3. Transformation des bactéries.

II.3.1. La transformation proprement dite.

L'ADN plasmidique est introduit dans la bactérie hôte (E. coli) selon la méthode artificielle de Cohen et col. (1973).

Le chlorure de calcium et l'ADN forment un complexe qui résiste aux désoxyribonucléases et qui adhère à la surface bactérienne. Le complexe migre dans la cellule lors d'un bref choc thermique.

Les cellules sont d'abord rendues "compétentes" par un traitement dans une solution hypotonique de Ca Cl_2 . Elles sont conservées en suspension de Ca Cl_2 50 mM - glycérol 50% à -70 C.

Un stock de ces cellules était disponible au laboratoire.

0,2 ml de cellules compétentes sont exposées, à environ, 0,1 μg d'ADN plasmidique. Le mélange est incubé dans la glace pendant 40 minutes puis à 42°C pendant 2 minutes. La suspension est diluée dans 1 ml de milieu de culture 2 x YT (voir plus loin) et est incubée à 37°C pendant 1 heure.

Cette incubation permet aux cellules de "récupérer" après le choc osmotique et aux gènes transformants de s'exprimer avant l'étalement des cellules sur milieu solide sélectif.

II.3.2. Sélection et identification des transformants.

La présence du plasmide dans la cellule, l'insertion d'une séquence étrangère dans celui-ci peuvent être révélés macroscopiquement en ajoutant certains composés aux milieux de culture.

a. Composition des milieux de culture.

Le milieu de culture est le LB (Luria - Bertani).

Il contient en poids par volume d'eau distillée (P/V),

bacto - tryptone	(OXOID)	1%
bacto - yeast extract	(OXOID)	0,5%
chlorure de sodium	(UCB)	0,5%

Le milieu riche en 2 x YT est également utilisé.

Il est composé en P/V de :

bacto - tryptone	(OXOID)	1,6%
bacto - yeast extract	(OXOID)	0,5%
chlorure de sodium	(UCB)	0,5%
Na OH 1N		0,9% (V/V)

Si les milieux sont solides, 1,5% de bacto-agar (OXOID) sont ajoutés.

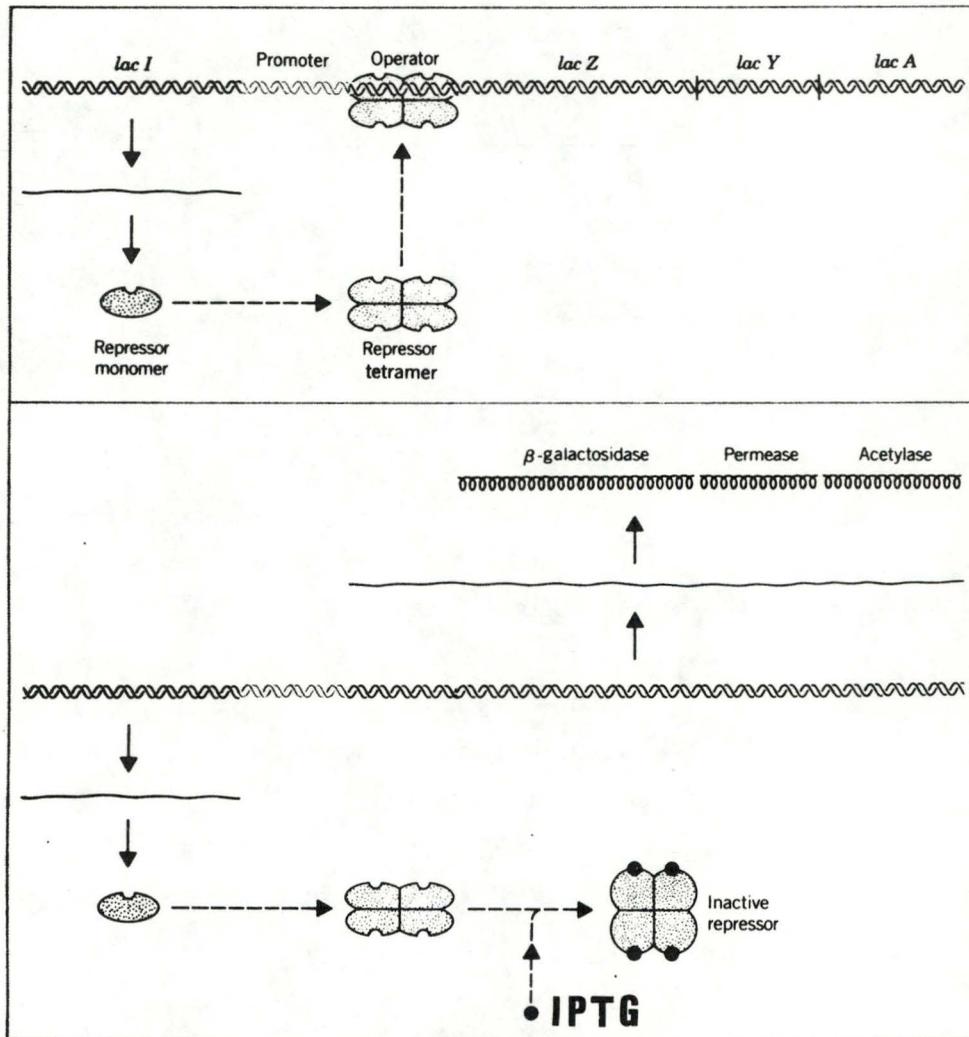


Fig.3a.- Au-dessus : le gène Lac I de l'opéron lactose code pour un répresseur dont la forme tétramérique se lie à l'opérateur et empêche la transcription des 3 gènes de structure.
 Au-dessous : l'addition d'un inducteur convertit le répres-
 seur dans une forme inactive ne pouvant se lier
 à l'opérateur ; la transcription s'initie au
 promoteur et les 3 enzymes sont synthétisées.

b. Sélection des transformants.

La sélection des bactéries transformées par un plasmide porteur de résistance à un antibiotique se fait à l'aide de milieux sélectifs. Ils sont liquides ou solides. Dans les 2 cas, l'antibiotique est ajouté au milieu de culture, après stérilisation (par autoclave) et refroidissement de celui-ci.

La quantité d'antibiotique varie selon divers facteurs :

- la résistance propre de la souche
- le nombre de copies du plasmide
- le taux de synthèse du produit du gène de résistance
- le mécanisme d'action de ce produit,...

La sélection des bactéries transformées par le p Gem-blue se fait sur un milieu contenant $50 \mu\text{g}$ d'ampicilline par ml.

c. Identification des recombinants.

Nous l'avons vu précédemment, les bactéries transformées, par un plasmide de type pUC ou pGem-blue contiennent une β -galactosidase fonctionnelle.

L'insertion d'un gène étranger dans le site multiple de clonage du plasmide interrompt la séquence du peptide : la complémentation ne peut se faire et la β -galactosidase n'est pas reconstituée.

L'identification de ces clones se fait sur un milieu indicateur contenant de l'X-gal et de l'IPTG. Le premier, le 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β - D - galactoside est un substrat chromogénique pour la β -galactosidase. Le second, l'isopropyl β - D - thiogalactopyranoside, est un analogue chimique du galactose : il ne peut être clivé par la β -galactosidase. Il facilitera l'activité du gène lac Z en

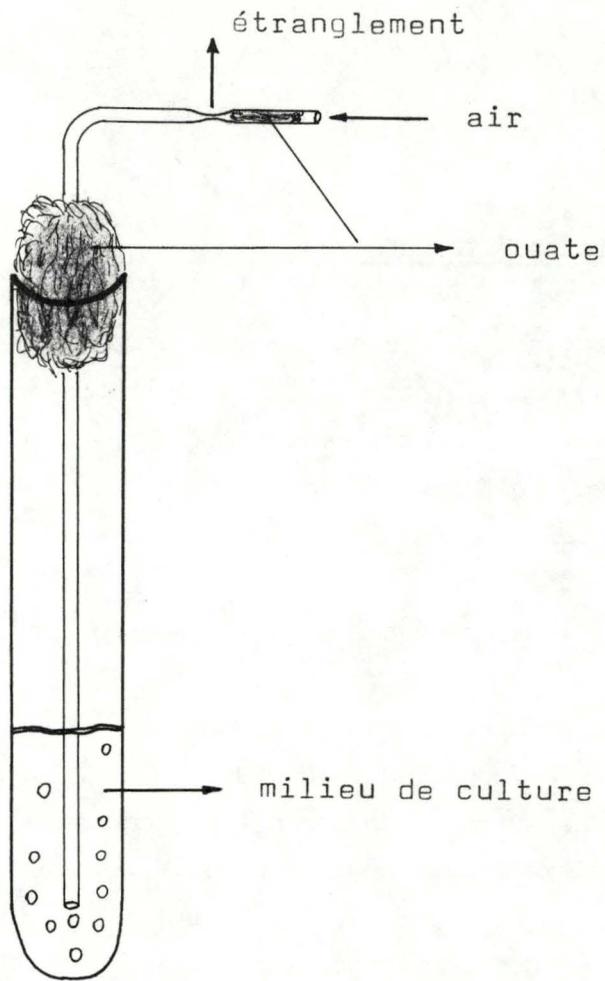


Fig. 8.- Schéma d'un "barboteur-éprouvette" ou "bubbler".

se liant et en inactivant le répresseur de l'opéron (fig. 3a). Les colonies où les cellules contiennent le p Gem-blue intact apparaîtront bleues. Par contre, si le plasmide est recombinant, la β -galactosidase n'est pas restituée et les colonies apparaîtront blanches.

II.4. Préparation d'ADN plasmidique.

II.4.1. Préparation rapide d'ADN plasmidique.

La méthode est celle décrite par Holnes et Quickley (1985) ; elle n'est utilisée dans ce travail que dans un but analytique.

Les précultures (cultures en petites quantités) se font dans 10 ml de milieu LB en présence d'ampicilline ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$). Un système de barboteur - éprouvette, relié à une pompe à air, permet d'obtenir une bonne oxygénation des précultures : après 16 heures d'incubation à 37°C , on observe une concentration bactérienne très élevée (5 - 6 D.O. à $550\text{nm} / \text{ml}$) (fig. 8)

La préculture est arrêtée en phase stationnaire de croissance. 1,5 ml de la suspension sont centrifugés dans une centrifugeuse à Eppendorf pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon TELT :

Tris-HCl	50 mM	PH 8
EDTA	62,5 mM	PH 8
Triton X-100	0,4% (V/V)	
LiCl	2,5 M	

0,2 mg de lysozyme est ajouté à la suspension. Elle est portée à 100°C (au bain marie) pendant, exactement, une minute puis est refroidie dans la glace pendant 5 minutes.

La température élevée et, secondairement, le lysozyme et le triton X - 100 provoquent la lyse des cellules.

Le mélange est ensuite centrifugé dans une centrifugeuse à Eppendorf à température ambiante pendant 15 minutes. Le chlorure de lithium permet de garder l'ADN plasmidique en solution, alors que les protéines, l'ARN de haut poids moléculaire et l'ADN chromosomique sont dénaturés et précipitent avec les débris membranaires. Vu sa petite taille et sa forme circulaire, l'ADN plasmidique résiste aux conditions dénaturantes.

Le culot est éliminé et les macromolécules de la solution surnageante sont précipitées avec 2 volumes d'éthanol froid à -80°C pendant 1 heure ou à -20°C pendant 15 heures.

La solution est centrifugée dans une centrifugeuse à Eppendorf pendant 30 minutes à 4°C . Le culot est séché sous vide et est suspendu dans le tampon TE contenant :

Tris - HCl 10 mM PH8
EDTA 1mM PH8

Cette solution est stockée à -20°C .

II.4.2. Extraction au phénol / chloroforme.

L'extraction au phénol / chloroforme permet de dénaturer et d'éliminer les protéines de la solution d'acides nucléiques. La présence d'enzymes protéolytiques, de désoxyribo-, de ribonucléases est à proscrire lors des réactions de restriction, de ligation, de transcription et de méthylation.

La méthode est décrite par Maniatis et col (p. 458 ; 1984). La solution dénaturante est composée de 49% (V/V) de phénol distillé sous vide, 49% (V/V) de chloroforme et 2% (V/V) d'alcool isoamylique réduit la formation de mousse et facilite la séparation des deux phases.

La solution d'ADN ou d'ARN est combinée avec un volume égal de la solution dénaturante. Elles sont homogénéisées au vortex jusqu'à la formation d'une émulsion. Les deux phases sont séparées après une centrifugation de 4 minutes dans une centrifugeuse à Eppendorf. La phase aqueuse supérieure est prélevée en évitant tout contact avec l'interface. Afin de récupérer le maximum du matériel, la phase organique est extraite avec un volume égal de tampon TE. Après l'homogénéisation et la séparation des deux phases, la seconde solution aqueuse est ajoutée la première. Une troisième extraction peut-être envisagée en opérant comme précédemment.

Les traces de phénol et de chloroforme qui persistent dans la phase aqueuse sont éliminées par une extraction à l'éther. 4 volumes d'éther (saturée en eau) sont ajoutés à la solution. Les phases sont homogénéisées au vortex jusqu'à émulsion et sont séparées par une brève centrifugation. La phase étherée supérieure est écartée et l'opération est répétée.

Les macromolécules nucléiques sont précipitées avec 2,5 volumes d'éthanol 100% et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M PH4,6 à -70°C pendant 1 heure. La solution est centrifugée à 4°C pendant 30 minutes puis décantée. Le culot est séché sous vide puis redissout dans du tampon TE.

II.4.3. Préparation d'ADN plasmidique par lyse claire.

La méthode a été décrite par Katz et col (1973). Elle permet de préparer de l'ADN plus pur et en grande quantité, nécessaire aux expériences de transcription ultérieures.

a. Lyse claire.

1 ml de préculture (10 ml) est utilisé pour inoculer 100 ml de milieu LB en présence d'ampicilline ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$). La culture est centrifugée à 4000 tpm pendant 10 minutes à 4°C (rotor JA-20 ; centrifugeuse Beckman J-21B). Le culot cellulaire est lavé avec 20 ml d'une solution glacée de :

NaCl	0,1 M
Tris	10mM PH8
EDTA	1mM

Le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans 1,6 ml d'une solution froide de :

glucose	50mM
Tris	25mM PH8
EDTA	10mM

$400 \mu\text{l}$ de cette solution glucosée contenant 80 mgr de lysozyme y sont ajoutés. Le mélange est incubé 30 minutes dans la glace.

On y ajoute 4 ml d'une solution de NaOH 0,2 N, SDS 1% et on agite par inversion. Après 10 minutes d'incubation à 0°C, 3ml de KAc 3M PH4,8 sont ajoutés au mélange. Celui-ci est homogénéisé par inversion et incubé 10 minutes à 0°C.

Une centrifugation à 14.000 tpm pendant 30 minutes à 4°C (rotor JA-20 ; centrifugeuse Beckman J - 21 B) permet de séparer le surnageant contenant l'ADN plasmidique, d'un culot de débris cellulaires insolubles.

On ajoute, au surnageant, 0,6 volume d'isopropanol et on laisse incuber 15 minutes à température ambiante.

Le mélange est centrifugé à 11.000 tpm pendant 30 minutes à température ambiante (rotor JA 14 ; centrifugeuse Beckman J - 21 B). Le culot est lavé une fois avec l'éthanol 70% et resuspendu dans du tampon TE.

b. Isolement du plasmide par gradient de chlorure de césium.

0,95 gr de CsCl et 0,1 mg de bromure d'éthidium sont ajoutés par ml de la solution d'acides nucléiques. L'indice de réfraction de la solution est mesuré au réfractomètre (Zeiss) et ajusté à $1,394 \pm 0,001$. L'indice de réfraction augmente par addition de CsCl et diminue par dilution de la solution avec du TE.

La préparation est centrifugée, dans des tubes Beckman Quick Seal, à 40.000 tpm pendant 72 heures à 16°C (rotor 60-Ti ; ultracentrifugeuse Beckman L5 - 65).

Au cours de la centrifugation, les molécules d'ADN migrent au sein du gradient et s'immobilisent où leur densité s'équilibre avec

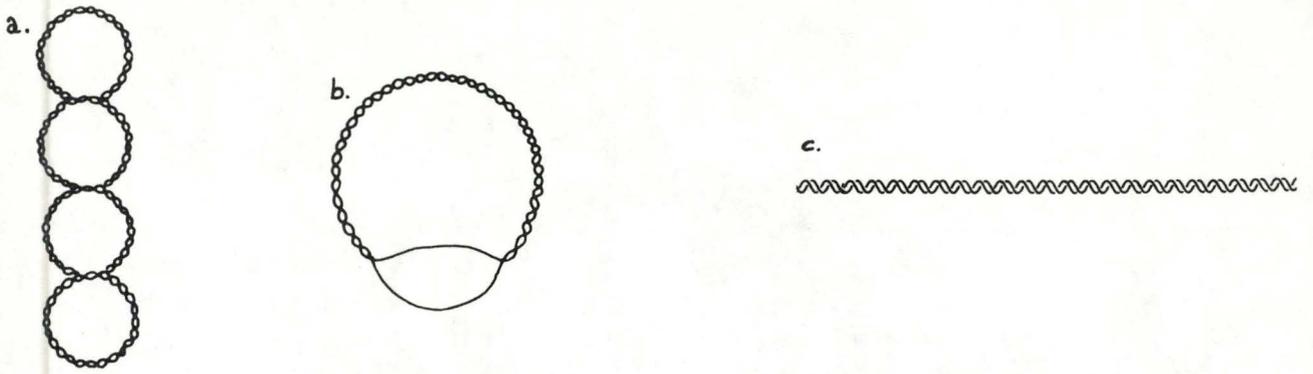


Fig.9.- L'ADN plasmidique se présente sous 3 conformations différentes

- a) la forme ccc ou closed circular est la forme superenroulée.
- b) un nick dans un des deux brins relâche la structure et produit une forme circulaire.
- c) lorsque deux nicks se produisent l'un en face de l'autre, c'est la forme linéaire.

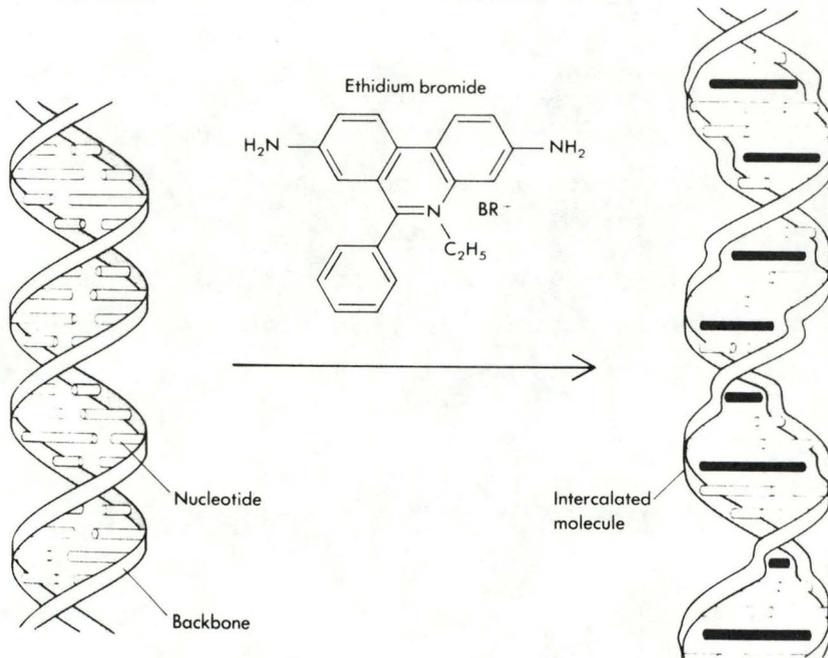


Fig.10.- Schéma de l'intercalation du bromure d'éthidium dans la molécule d'ADN. La molécule de bromure d'éthidium augmente l'espace entre les bases successives et distord le squelette régulier sucre-phosphate.

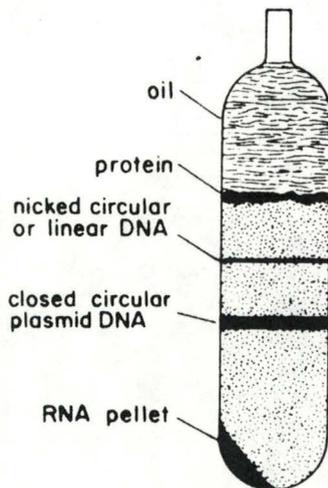


Fig.11.- Répartitions des différentes formes de l'ADN plasmidique dans un gradient de chlorure de césium.

celle du CsCl. Par leurs conformations différentes, l'ADN chromosomique et l'ADN plasmidique OC et CCC fixent des quantités différentes de bromure d'éthidium (BET) (fig. 9-10).

L'état superenroulé de l'ADN plasmidique CCC limite l'incorporation des molécules de BET tandis que la forme OC et l'ADN chromosomique, les accumulent plus facilement. Etant donné que le BET allège l'ADN, l'ADN plasmidique CCC migrera plus loin, au cours de la centrifugation isopycniqne, par rapport aux autres conformations.

L'ADN est visualisé sous les U.V. à 366 nm. Le complexe résultant de l'association ADN-BET émet sous cette lumière une fluorescence supérieure par rapport aux molécules de bromure d'éthidium de la solution. La bande d'ADN plasmidique CCC est extraite au moyen d'une seringue en évitant une contamination par la bande supérieure représentant l'ADN chromosomique et par l'ARN bactérien au fond du tube (fig. 11).

c. Purification et concentration du plasmide.

Le bromure d'éthidium est éliminé par extractions répétées à l'alcool isoamylique saturé en CsCl jusqu'à ce que la phase aqueuse inférieure soit complètement incolore (de 3-4 fois).

L'élimination du CsCl se fait par dialyse de la préparation contre 2 litres de TE durant 24 heures à 4°C. Le TE est renouvelé toutes les 8 heures.

La préparation de plasmide est concentrée au Ficoll 400. Celui-ci est renouvelé jusqu'à ce que le volume de l'échantillon soit réduit à 2 ml environ.

L'ADN plasmidique est précipité à l'éthanol. Après

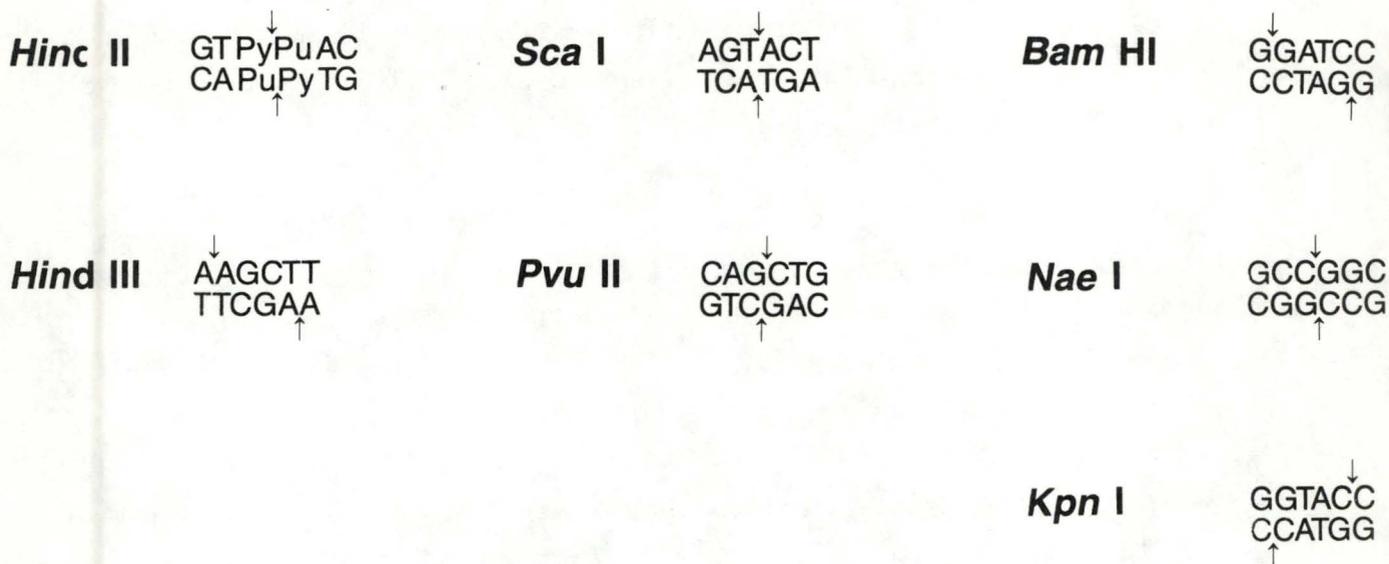


Fig.12.-Séquences reconnues par les enzymes de restriction utilisées lors des expériences de clonage et de transcription in vitro.

<u>Force ionique</u>	<u>enzyme</u>	<u>Tris-HCl</u> mM	<u>PH</u>	<u>MgCl₂</u> mM	<u>DTT</u> mM	<u>NaCl</u> mM	<u>Références.</u>
élevée	Hinc II	50	7,5	10	1	100	(1)
	Sca I	50	7,5	10	1	100	(1)
moyenne	Bam H I	10	7,5	10	1	50	(1)
	Hind III	10	7,5	10	1	50	(1)
	Pvu II	10	7,5	10	1	50	(1)
	Nae I	6	8,2	6	10	50	(2)
faible	Kpn I	6	7,6	6	10	6 ⁽³⁾	(2)
intermédiaire	Nae I Kpn I	6	7,9	6	10	6	

Tableau III.- Composition des tampons de restriction.

(1) Maniatis, 104, 1984

(2) Boehringer review

(3) ainsi que Triton X-100 0,01 % (V/V)

centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70%, puis à l'éthanol 90% ; il est séché sous vide avant d'être resuspendu dans un volume déterminé de TE ($1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$). La concentration de la solution est mesurée par spectrophotométrie.

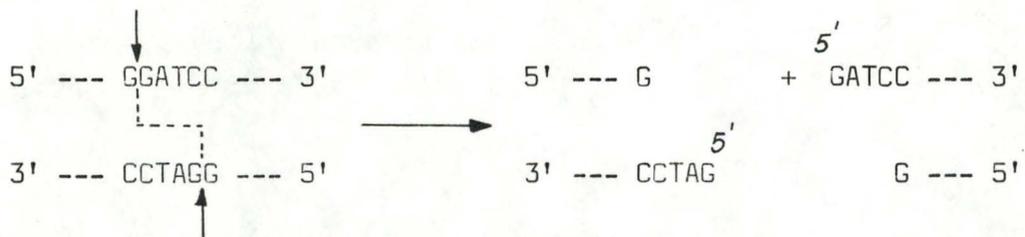
II.5. Manipulations de l'ADN plasmidique.

II.5.1. Réactions de restriction.

Une endonucléase de restriction reconnaît et clive l'ADN au niveau d'une courte séquence spécifique. A l'endroit de la coupure, l'enzyme génère :

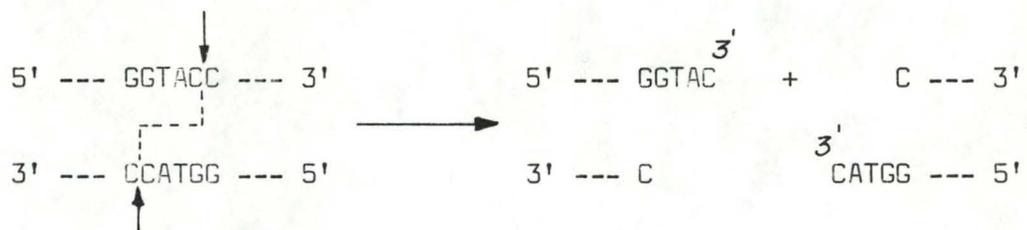
- soit des protubérance monocaténaire 5', par exemple

Bam H1 :



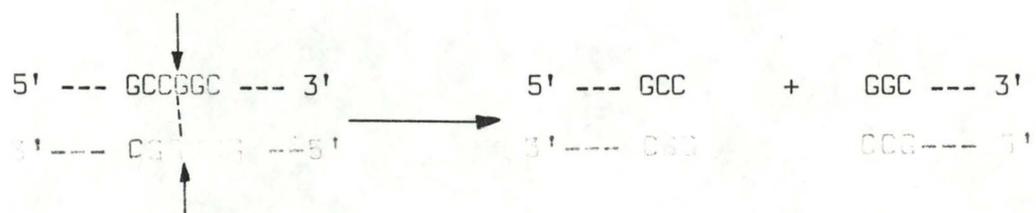
- soit des protubérance monocaténaire 3', par exemple

Kpn I :



- soit des bouts francs, par exemple

Nae I :



Activity

Ligation of cohesive ends

Reaction

For example:

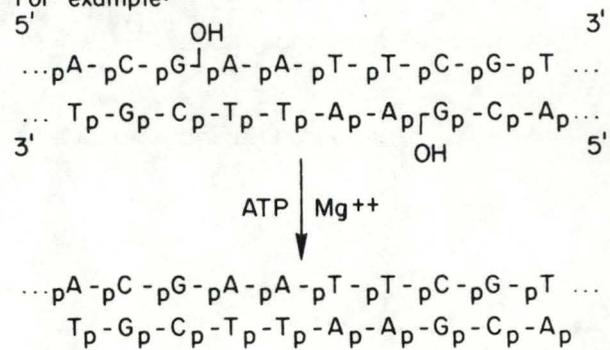


fig.13.-Exemple de réaction de ligation à bouts collants catalysée par la T4 ADN ligase.

Les réactions se pratiquent dans un volume total de 10 ou de 50 μ l à une température et dans un tampon de restriction caractéristique de l'enzyme utilisée. Ces tampons de restriction sont décrits dans le tableau III. Lors de la double restriction Kpn I - Nae I, un tampon intermédiaire est préparé.

Le mélange d'incubation est composé de 1 ou de 5 μ l de tampon de restriction (10 fois concentré), de 1 à 5 unité enzymatique par μ g d'ADN plasmidique ; le volume est porté à 10 ou 50 μ l avec de l'eau stérile. L'incubation est menée à 37°C pendant 1 à 3 heures puis les enzymes sont dénaturées à 70°C durant 5 minutes.

Les protéines peuvent être éventuellement éliminées par une extraction au phénol / chloroforme (50/50) avant de mettre en évidence les produits de la restriction par une électrophorèse horizontale dans un gel d'agarose (voir paragraphe II.6).

II.5.2. Réaction de ligation.

L'insertion de l'ADN-~~z~~ du lysozyme dans le pGem-blue clivé est rendue possible par la T4 ADN ligase. Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiesters entre les groupements 3'-hydroxyles et 5'-phosphate de deux nucléotides adjacents (fig. 13).

Le tampon de ligation est composé de :

Tris HCl	20mM	PH7,4
MgCl	10mM	
DTT	10mM	
ATP	1mM	

Le mélange de la réaction est composé de

- 1 μ l de pGem-blue (\pm 100 ng)
- 2,5 μ l de l'ADN-C du lysozyme (\pm 100 ng)
- 2 μ l de tampon de ligation (10 fois concentré)
- 1 μ l de T4 ADN ligase (1 unité enzymatique).

Le volume est porté à 20 μ l avec de l'eau stérile. Le mélange est incubé une nuit à 15°C.

II.6. Analyse de l'ADN plasmidique.

Chacune des étapes du clonage est suivie par un gel d'agarose, de type minigel (75 x 105 mm), qui permet d'estimer rapidement la qualité et la quantité de l'ADN cloné. La méthode est décrite par Sharp et col (1973).

0,8% d'agarose (P/V) sont dissous à chaud dans le tampon d'électrophorèse TBE :

Tris-base	89mM
acide borique	89mM
EDTA	2mM PH8

La solution est refroidie à 50°C et est coulée dans un support horizontal. Le gel est déposé dans une cuve à électrophorèse de type Pharmacia et est légèrement submergé dans du tampon TBE. L'échantillon est préparé dans une solution (6 fois concentrée) contenant du glucose 40% (P/V) et du bleu de bromophénol 0,025% (P/V). Le glucose alourdit l'échantillon et facilite ainsi le dépôt dans le puits. Le bleu de bromophénol permet de suivre la migration électrophorétique. Celle-ci s'effectue sous une tension de 8 volts/cm.

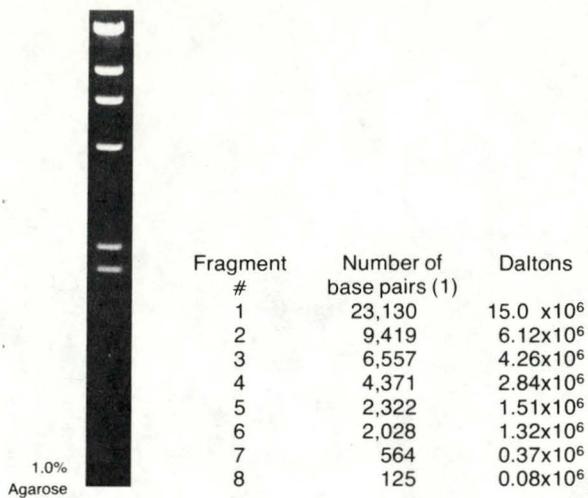


Fig.14.- Description des différents fragments obtenus après digestion de l'ADN du phage λ par l'enzyme de restriction Hind III.

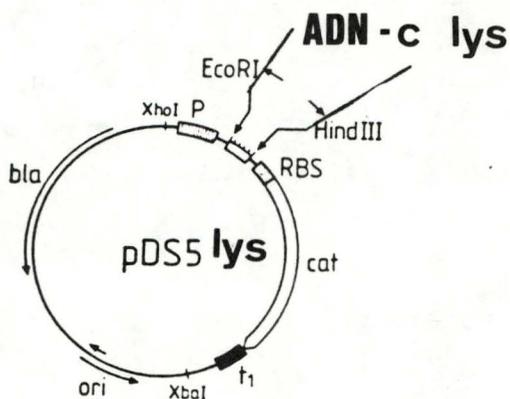


Fig.15.- Description du plasmide pDS5 lys7.

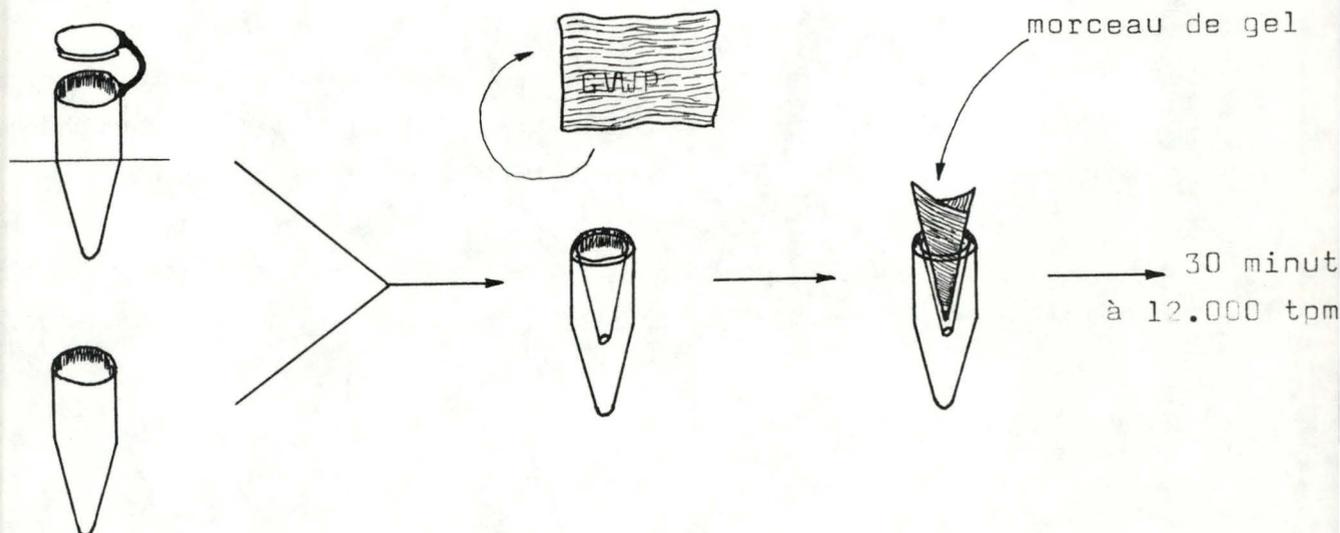


Fig.16.- Disposition des 2 tubes et du filtre lors de l'extraction d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose.

Afin de visualiser les fragments d'ADN, le gel est plongé pendant 30 minutes dans une solution de bromure d'éthidium ($0,5 \mu\text{g} / \mu\text{ml}$ d'eau) ; les bandes sont révélées sous une lumière ultra-violette (302 nm).

La taille des fragments (en kilobases) est estimée à partir de leur mobilité électrophorétique (en mm). La courbe d'étalonnage est construite à partir des fragments générés par le clivage de l'ADN linéaire du phage λ par l'enzyme de restriction Hind III (fig. 14).

II.7. Extraction d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose.

Cette méthode est décrite par ZHU (1985). Elle est utilisée dans ce travail afin d'isoler rapidement l'ADN- ϕ du lysozyme de poulet à partir du plasmide pDS5 lys 7 (fig. 15).

Sous la lumière U.V, la portion de gel contenant le fragment désiré est découpée à l'aide d'un scalpel. Le morceau de gel est placé sur un filtre millipore GVWp 04700 humecté d'eau distillée et disposée en "cornet" dans un tube Eppendorf. Celui-ci est percé d'un trou à l'extrémité de sa partie conique et est déposé dans un second Eppendorf (fig. 16).

L'ensemble est centrifugé dans une centrifugeuse à Eppendorf pendant 10 minutes à température ambiante. La matrice d'agarose est retenue par la membrane tandis que la phase aqueuse contenant l'ADN plasmidique passe à travers le filtre et se retrouve dans l'Eppendorf inférieur.

L'ADN est ensuite nettoyé par une extraction au phénol / chloroforme, à l'éther, suivie d'une précipitation à l'éthanol (voir paragraphe II.4.2).

III. Synthèse in vitro d'ARNm.

La méthode de transcription in vitro est celle décrite par E. Capieaux (1987).

III.1. Préliminaire.

L'ARNm synthétisé se dégrade très rapidement sous l'action des ribonucléases. Certaines précautions seront donc prises automatiquement lors de ces expériences.

Les manipulations s'effectuent toujours dans la glace, avec des gants et le plus rapidement possible.

Le matériel (tubes Eppendorf, pointes ...) est stérilisé le jour même à l'autoclave (121°C pendant 20 minutes).

Toutes les solutions, ainsi que l'eau, sont aliquotées par volumes adéquats et sont stockées à -20°C. Chaque fraction aliquotée n'est utilisée qu'une seule fois.

Le DTT (Sigma) est fraîchement préparé.

- Le coiffage co-transcriptionnel

Auparavant l'addition de la coiffe était obtenue en utilisant les enzymes de coiffage du virus de la vaccine (cfr paragraphe II.2.1.) (Green et col. 1985).

Cette procédure nécessite de l'ARN et, le rendement de la réaction est limité à 20 - 60% (Pelletier et Sonenberg ; 1985). Contreras et col (1983) ont proposé une réaction (transcription - coiffage) en une seule étape où il est possible de synthétiser plusieurs μ g d'ARNm coiffé en amorçant une ARN polymérase bactérienne sur des coiffes présynthétisées, disponibles dans le commerce.

Cette analogue de coiffe GpppX est choisi de façon à ce que le X corresponde à celui du premier nucléotide incorporé dans l'ARNm.

La concentration de ce ribonucléotide est réduite d'un facteur 5 à 25 tandis que la concentration en analogue de coiffe est ajusté à celle des 3 autres ribonucléotides.

Dans ces conditions limitantes en XTP, le taux de transcription est plus faible mais la plupart des ARN synthétisés sont coiffés (au moins de 90%).

Cette procédure a été adaptée pour les ARN polymérases de bactériophage par Pelletier et Sonenberg (1985).

Ici aussi, l'enzyme s'initie sur l'analogue de coiffe. Selon leur mode expérimental, au moins 95% des transcripts sont coiffés par la structure GpppG lorsque la transcription est catalysée par SP6 ARN polymérase.

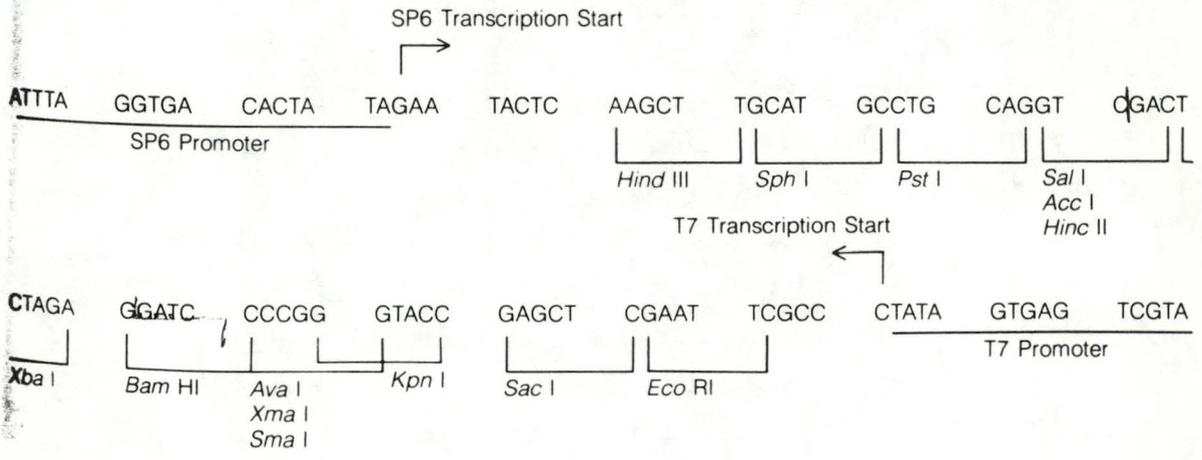
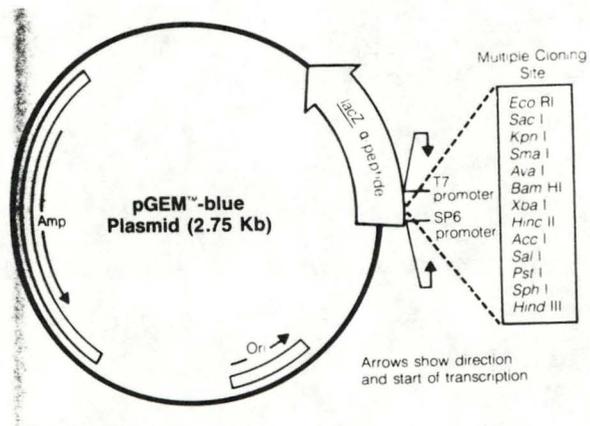


Fig. 17 : Séquence interne (3' 5') de la région inter promoteur ou site multiple de clonage.

III.2. Transcription in vitro.

Deux types d'ARNm peuvent être produits.

- Protocole 1 : Synthèse d'ARNm non-coiffé .

Le mélange de réaction contient	Tris-HCL	40mM	PH7,5
	DTT	10mM	
	Mg Cl	15mM	
	ATP	0,5mM	
	CTP	0,5mM	
	UTP	0,5mM	
	GTP	0,5mM	
	RNasine	50 unités	
	ADN	1 μ g	
	ARN polymérase	15 unités.	

- Protocole 2 : Synthèse d'ARNm coiffé.

GpppX est choisi de façon à ce que le X corresponde au premier nucléotide qui initie la transcription. Que ce soit pour le SP6 ou pour la T7 ARN polymérase, il s'agit de GTP (fig. 17). La concentration de l'analogue de coiffe GpppG est de 0,25mM. De manière à forcer l'initiation de la transcription sur cet analogue, la concentration du nucléotide GTP est réduite d'un facteur 5 (0,1 mM).

Les autres concentrations sont identiques à celles décrites dans le protocole 1.

Le volume total de la solution de transcription est de 50 μ l. Les composants doivent être ajoutés impérativement dans l'ordre énoncé dans le protocole 1.

L'analogue de coiffe est ajouté avant l'ADN.

Le mélange est homogénéisé à la pipette. 7 μ l de celui-ci sont prélevés avant l'incubation et stockés à 0°C. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, 7 μ l du mélange sont à nouveau prélevés.

Les deux échantillons sont alourdis par 3 μ l de glycérol 50% stérile et déposés dans les puits d'un gel d'agarose 1% contenant 3 μ g de bromure d'éthidium par ml. Le tampon d'électrophorèse est du Tris-acétate (TEA),

Tris-base	40ml
acétate	40ml
EDTA	2ml

Etant donné que le bleu de bromophénol migre avec la même vitesse que l'ARNm, le colorant, permettant de suivre la migration, est déposé dans un puits voisin. Pendant les 5 à 8 minutes de migration électrophorétique, l'ARNm est purifié.

III.3. Purification de l'ARNm.

De manière à éliminer les coiffes non intégrées dans l'ARNm et les ions inhibiteurs de la méthylation, la solution de transcription est filtrée sur un tamis moléculaire (Séphadex G-50).

10 μ l de bleu dextran stérile (10mg/ml) sont ajoutés au mélange. Le bleu dextran et les acides nucléiques migrent avec la fraction exclue. La ou les gouttes les plus bleues sont recueillies dans des tubes Eppendorf préalablement refroidis à -20°C.

Le matériel est utilisé immédiatement ou stocké à -20°C.

IV. Coiffage in vitro.

Les ARN issus du protocole 2 (paragraphe III.3) peuvent être coiffés in vitro par la guanylyltransférase du virus de la vaccine disponible chez BRL.

Les conditions de réaction de coiffage et de transcription n'étant pas identiques, l'ARNm subit une étape de purification par précipitation et lavage à l'éthanol (voir paragraphe II.4.3.e).

La réaction de coiffage se pratique dans un volume total de 30 μ l. La solution contient :

Tris-HCl	50ml ^l	PH 7,9
MgCl	1,25ml ^l	
KCl	6ml ^l	
DTT	2,5ml ^l	
BSA	3 μ g	
RNasine	30 unités	
GTP	0,04ml ^l	

Après 45 minutes d'incubation à 37°C, l'ARNm est à nouveau purifié par précipitation et lavé à l'éthanol.

V. Méthylation in vitro de l'ARNm.

La méthode utilisée est inspirée de celle décrite par C. Locht (1984).

Le mélange de méthylation in vitro contient :

Tris-HCl	20ml ^l	PH 7,5
DTT	1ml ^l	

S - adénosyl (méthyl - ^3H) méthionine $0,6 \mu\text{ci} / 10 \mu\text{l}$.
et $0,3$ volume de fraction enzymatique.

Après 30 à 180 minutes d'incubation à 30°C , la réaction est arrêté par l'ajout de $0,2$ ml de tampon TEN :

Tris-HCl	$0,1\text{M}$	PH9
EDTA	1mM	
NaCl	$0,1\text{M}$.	

L'ARN est précipité, en présence de $50 \mu\text{g}$ d'ARN "carrier", avec 10 ml de TCA 10% pendant 30 minutes dans la glace fondante. Le précipité est récupéré sur des filtres en fibres de verre ($2,5$ cm, Whatman - GF/C).

Les filtres sont lavés avec 20 ml de TCA 5% froid puis avec 10 ml d'alcool-éther avant d'être séché sous vide.

La radioactivité est comptée dans 5 ml d'aqualuma dans un compteur Beckman ls-3150T.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

VY1160
+ H₂O

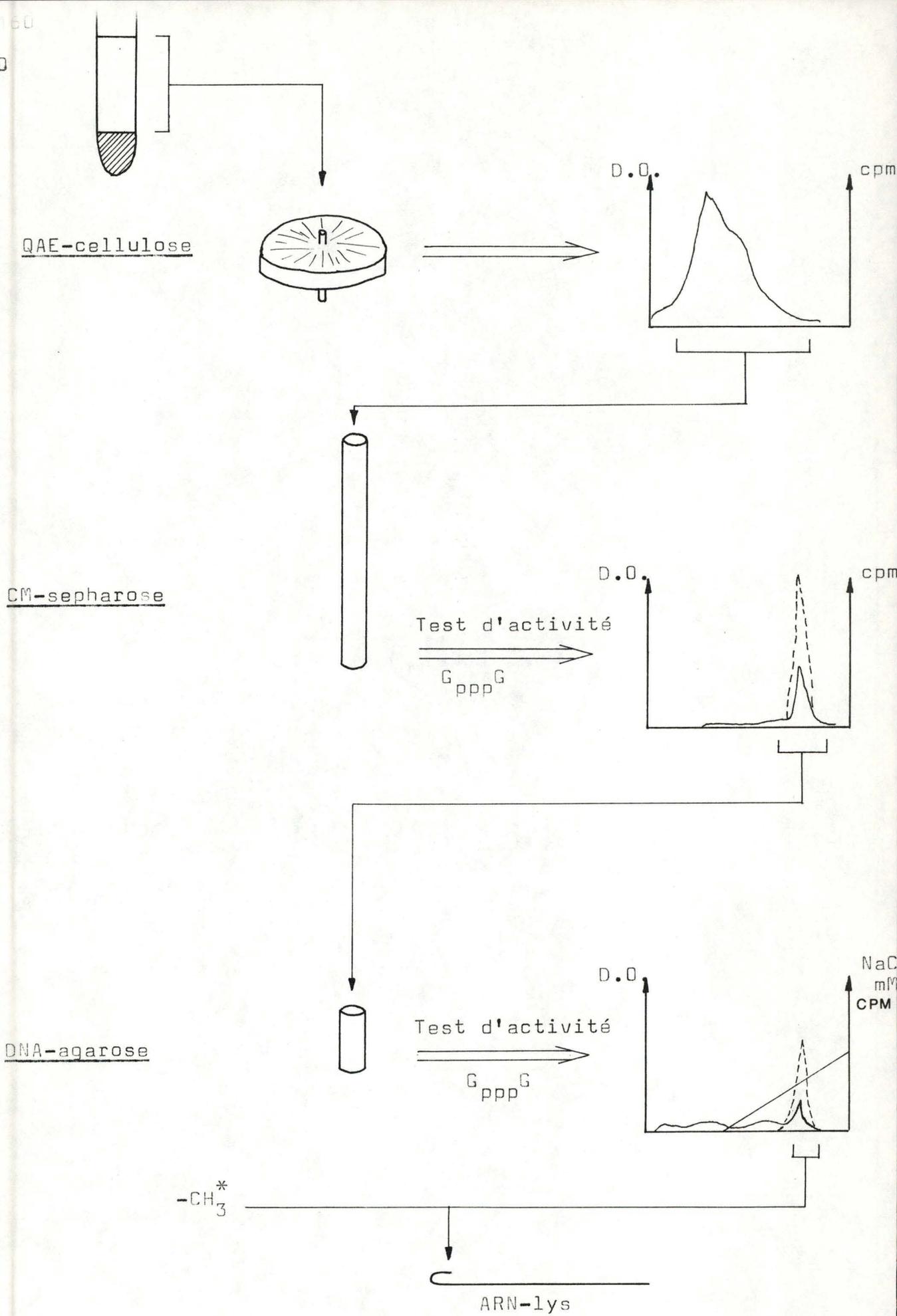


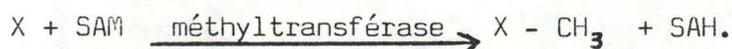
Fig. 0.-Résumé des étapes de la purification de l'ARNm (guanine-7)-méthyltransférase de la levure.

I. PURIFICATION PARTIELLE DE L'ARNm (guanine-7-)-METHYL- TRANSFERASE DE Saccharomyces cerevisiae.

I.1. Activité enzymatique d'un extrait brut de levure

L'incubation d'un extrait brut de levure en présence de G(5')ppp(5')G comme substrat accepteur révèle une activité totale anormalement faible (Tableau I). La réaction de transméthylation, est en fait, inhibée.

L'inhibiteur, une molécule de petite taille, a été mis en évidence par C. Locht (1984). Il pourrait s'agir de la S-adénosyl-homocystéine (PM = 384), le produit de la réaction.



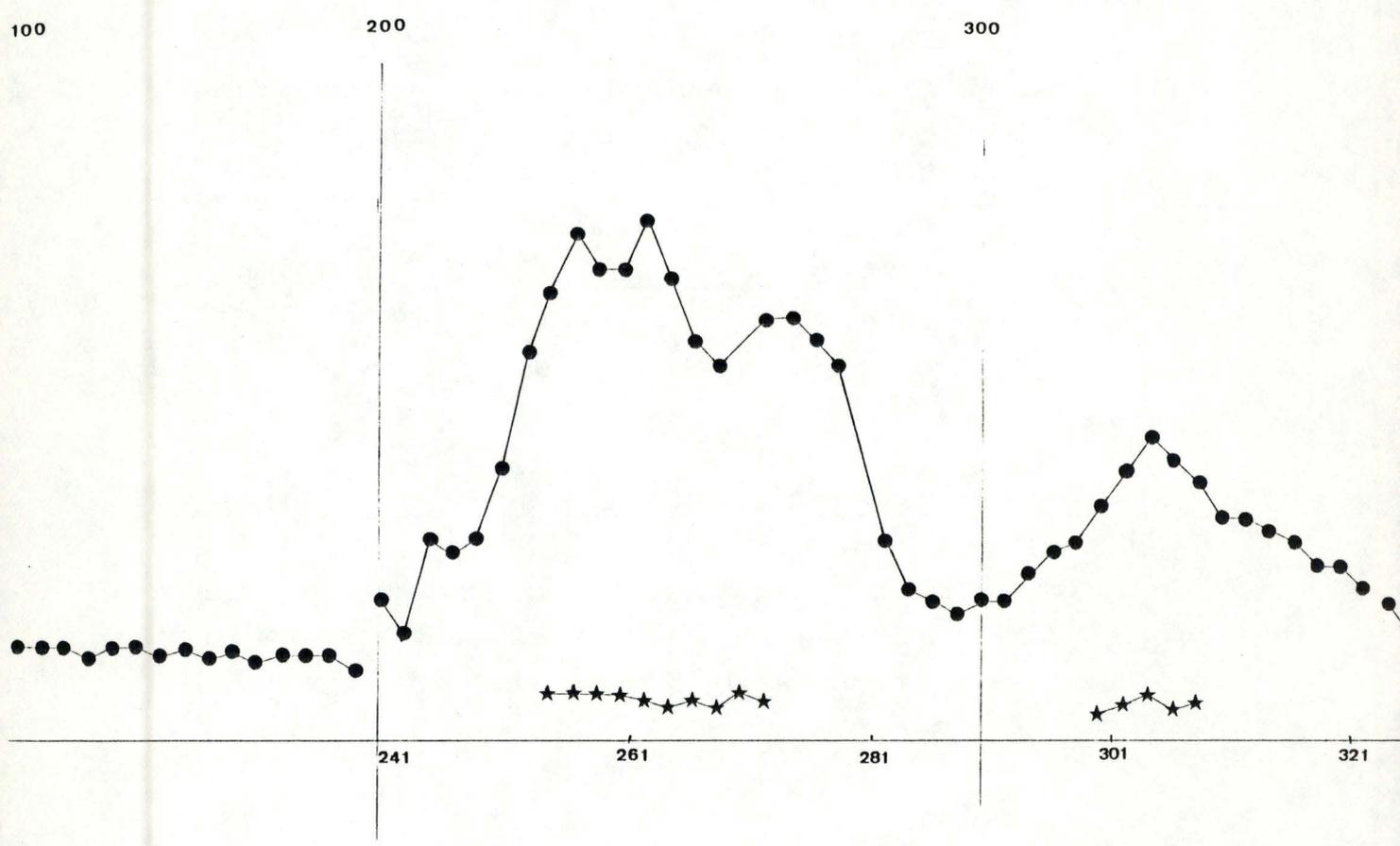
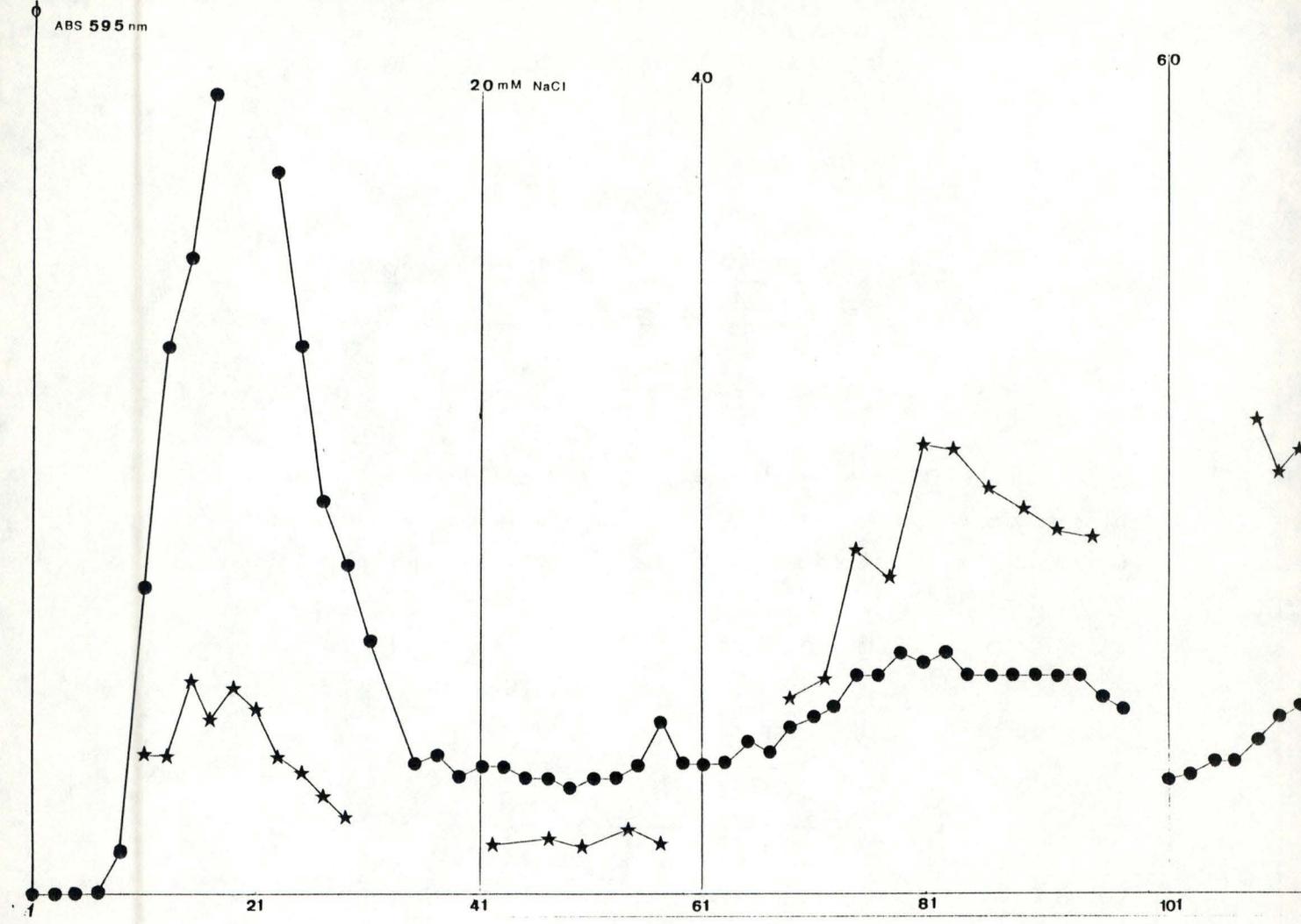
Cette molécule est un inhibiteur très puissant qui n'est pas spécifique à l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase mais qui inhibe également la plupart des méthyltransférases décrites (C. Locht ; 1984).

Comme le suggère l'évolution des activités totales du tableau I, l'inhibiteur est éliminé lors de la première étape de la purification de l'enzyme.

I.2. Chromatographie sur QAE - cellulose (Zetaprep).

I.2.1. Détermination de la force ionique d'élution.

Les profils de concentration en protéines et d'activité enzymatique lors d'un gradient discontinu en NaCl nous permettent de faire deux observations dont nous tirerons parti (fig. 1).



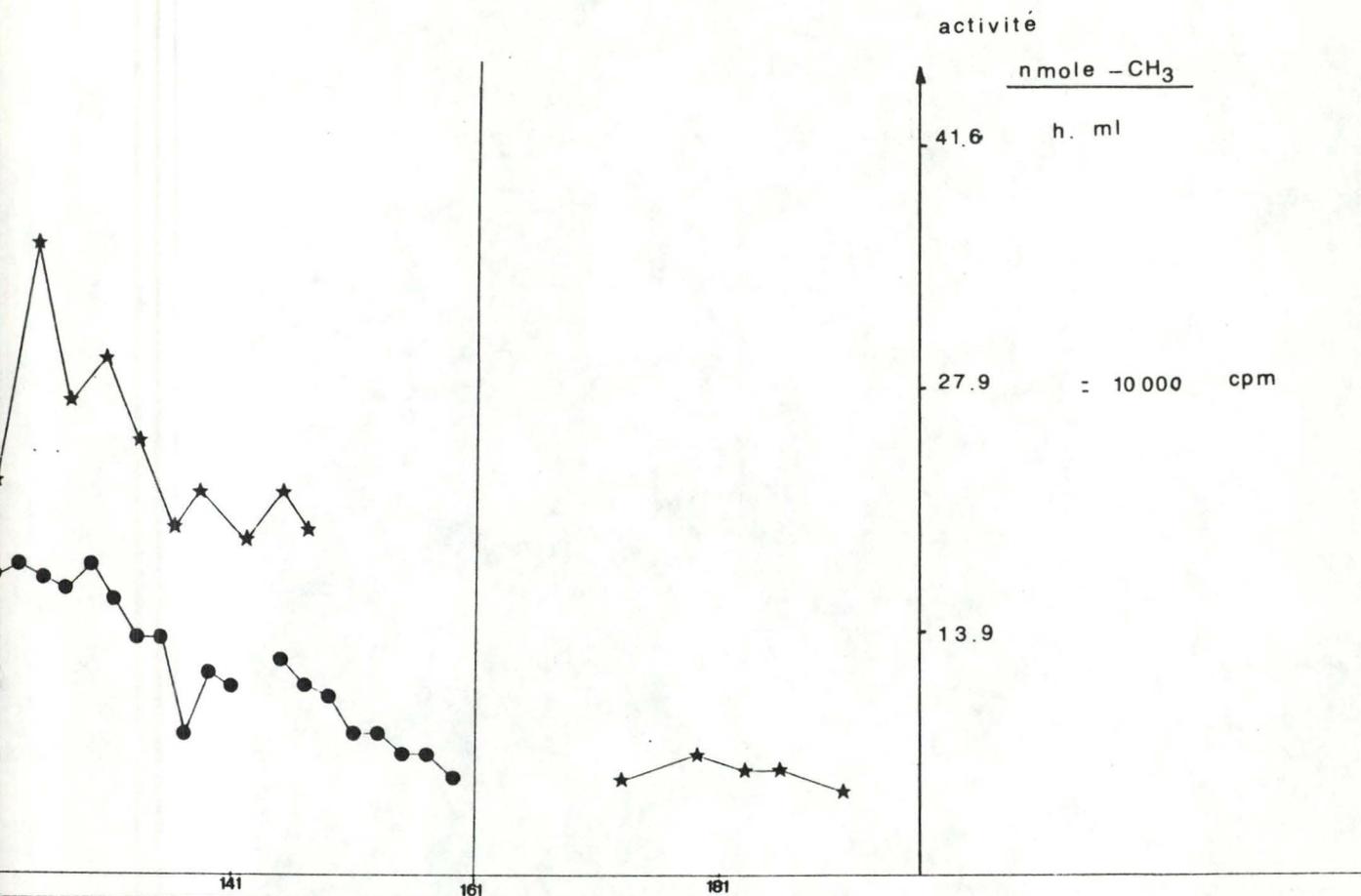
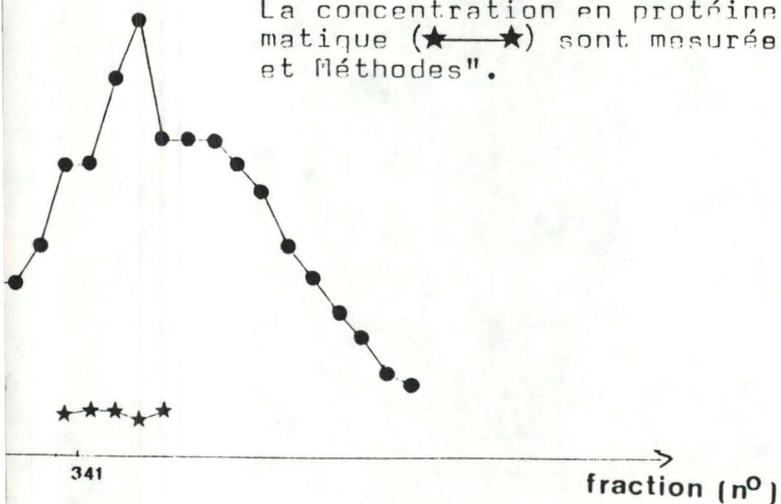


Fig. 1.- Chromatographie de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase de levure sur QAE-cellulose en vue de déterminer la force ionique d'éluion. Le surnageant d'un lysat brut de la souche de levure osmosensible VY 1160 est appliqué sur une colonne de QAE-cellulose. L'éluion est réalisée avec un gradient discontinu en NaCl dans le tampon TEDG contenant 0, 20, 40, 80, 100, 200, 300, 1000 mM NaCl. La concentration en protéines (●—●) et l'activité enzymatique (★—★) sont mesurées comme décrit dans "Matériel et Méthodes".



1. La majorité des protéines de levure autre que l'enzyme ne s'accrochent pas sur la QAE-Zetaprep ; elles sont dès lors éliminées au premier lavage avec le tampon TEDG sans NaCl.

La plupart des protéines accrochées sur la matrice sont elles, éluées à des concentrations en NaCl supérieures à 200mM.

Ces protéines présentent une activité spécifique très faible.

2. L'activité en ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase est décrochée à des forces ioniques de 40 et 60mM NaCl avec une activité spécifique élevée.

Au cours des expériences préparatives de l'enzyme, nous avons adapté la force ionique de décrochage à 100mM en NaCl, après avoir lavé la matrice avec du tampon contenant 20mM NaCl (fig.2).

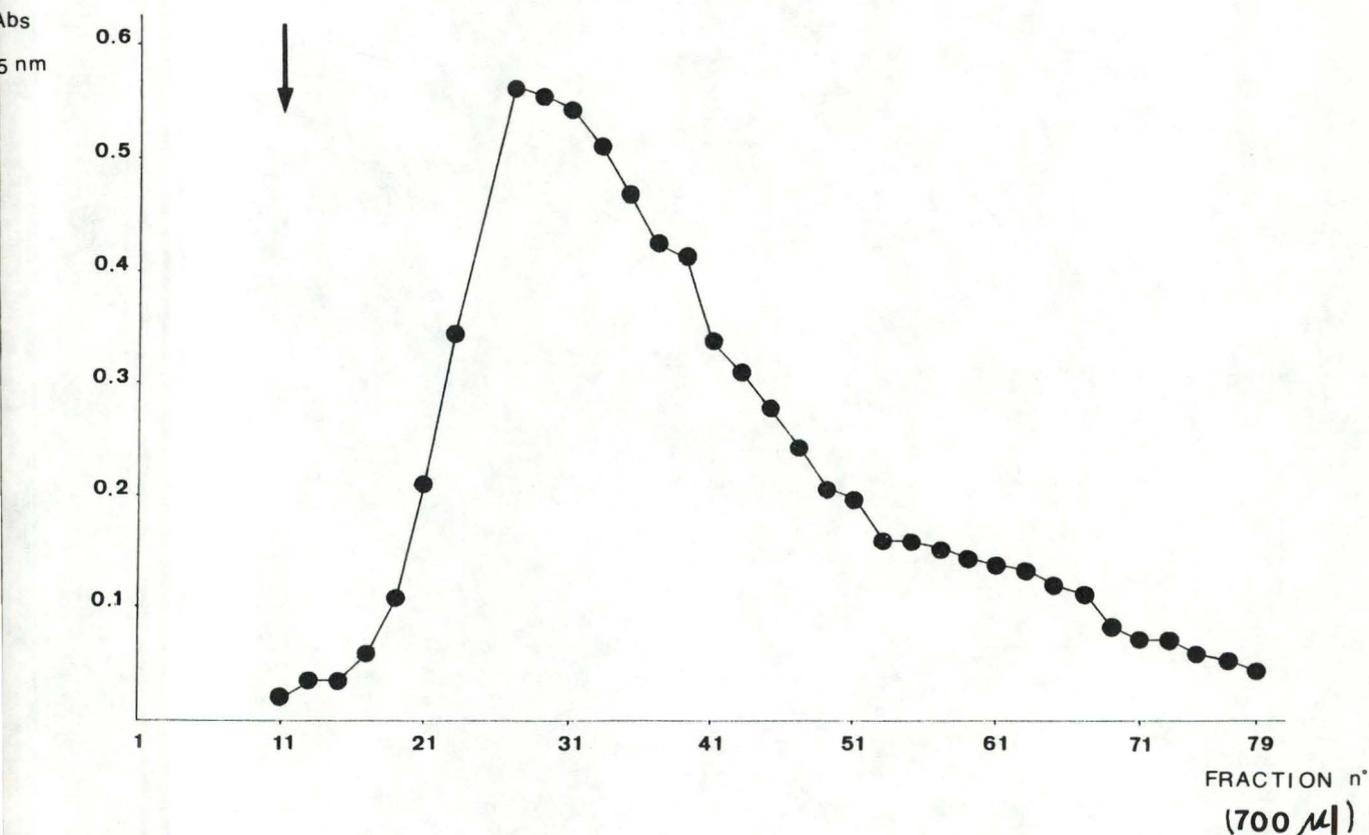


Fig. 2.- Chromatographie de l'ARN m (guanine-7-)-méthyltransférase de levure sur QAE - cellulose. Le surnageant d'un lysat brut de la souche de levure osmosensible VY 1160 est appliqué sur une colonne de QAE-cellulose. L'élution est réalisée avec le tampon TEDG contenant 100 mM NaCl au moment indiqué par la flèche. La concentration en protéines (●—●) est mesurée comme décrit dans "Matériel et Méthodes"

Abs
595 nm

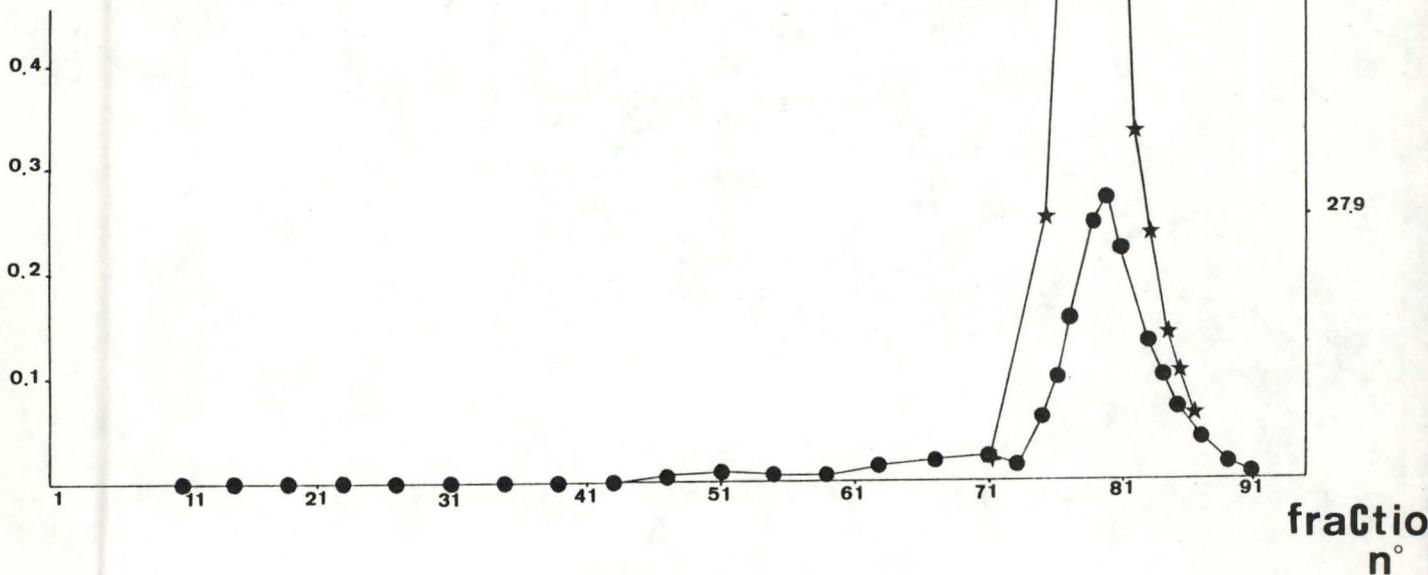


Fig. 3.- Chromatographie de l'ARN m (guanine-7)-méthyltransférase de levure sur CM-Sépharose. La solution qui contient les protéines éluant à 100 mM de la figure 2 est appliquée sur une colonne de CM-Sépharose. L'éluion est réalisée avec le tampon TEDG contenant 350 mM NaCl au moment indiqué par la flèche. La concentration en protéines (●—●) et l'activité enzymatique (★—★) sont mesurées comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

I.2.2. Elution de l'activité.

Cette première étape de chromatographie augmente l'activité spécifique d'environ 29 fois. Plus de 1400% de l'activité totale sont récupérés. L'activité en ARNm (G-7)-méthyltransférase purifiée avec cette matrice est appelée fraction QAE-cellulose.

I.3. Chromatographie sur CM-Sépharose CL-6B.

La fraction QAE-cellulose est appliquée sur une CM-Sépharose (fig. 3).

La plupart des protéines contaminantes de la QAE-cellulose sont éliminées dans le lavage tandis que l'activité de méthylation est éluée en un seul pic, centré sur le pic protéique. L'activité spécifique à l'ARNm(G-7)-méthyltransférase augmente de 482 fois après cette seconde colonne.

I.4. Chromatographie sur DNA-agarose.

Les fractions actives 74 à 86, appelées fraction CM-Sépharose, sont groupées et désalées sur une PD10. Aucune perte protéique n'est observée lors de l'élimination des sels. Cette opération a pour conséquence de diluer, environ 1,5 fois, la fraction CM-Sépharose. Celle-ci est alors chromatographiée par affinité sur une colonne de DNA-agarose (fig. 4) où l'ARNm(G-7) méthyltransférase est éluée en un seul pic vers 400mM NaCl.

Cette étape de purification permet de se débarrasser de la protéine contaminante principale qui se co-purifiait jusqu'alors avec l'enzyme.

Après cette troisième chromatographie, l'activité enzymatique spécifique est purifiée de plus de 700 fois avec une récupération de 700% par rapport au lysat brut.

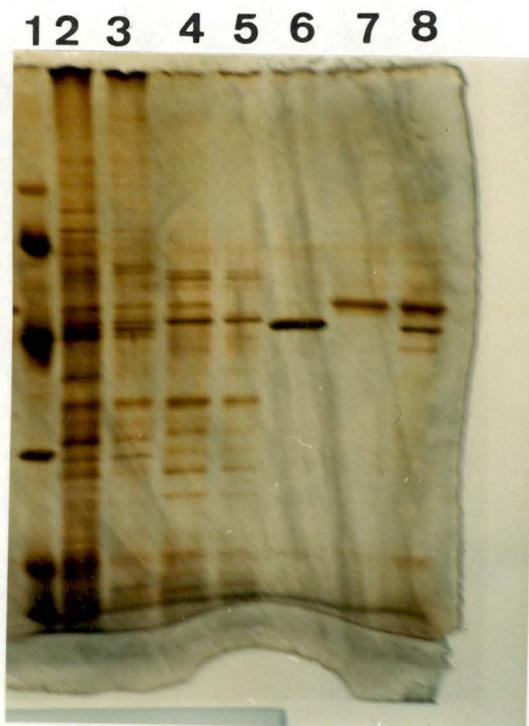


Fig. 5. : Analyse des fractions protéiques recueillies au cours des différentes étapes de purification de l'ARNm (G-7) méthyltransférase par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide 10 %, coloré à l'argent.

1 μ g de protéines est déposé sur chaque piste.

- Piste 1 = standard Pharmacia
- Piste 2 = lysat brut de VY1160
- Piste 3 = fraction protéique du lavage de la QAE-zetaprep
- Piste 4 = fraction active du décrochage de la QAE-zetaprep
- Piste 5 = fraction protéique du lavage de la CM-sépharose CL-6B
- Piste 8 = fraction active du décrochage de la CM-sépharose CL-6B
- Piste 6 = fraction protéique du lavage de la DNA-agarose
- Piste 7 = fraction active du décrochage de la DNA-agarose.

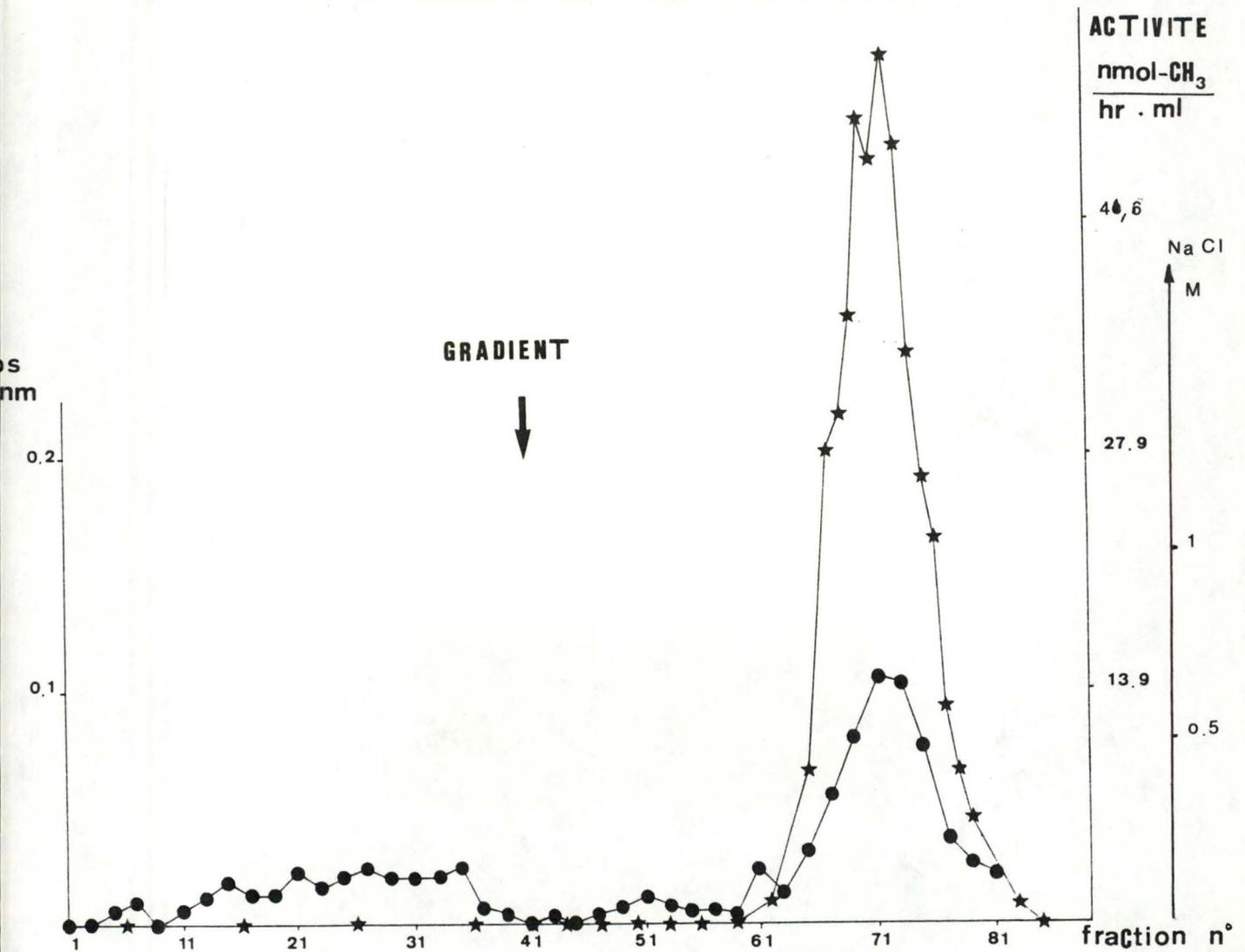


Fig. 4.- Chromatographie de l'ARN m (guanine-7)-méthyltransférase de levure sur DNA agarose. Les fractions 74 à 86 de la figure 3 sont regroupées, désalées sur une colonne PD10 et appliquées sur une colonne de DNA agarose. L'éluion est réalisée avec un gradient linéaire 100 mM - 800 mM NaCl dans le tampon TEDG. La concentration en protéines (●—●) et l'activité enzymatique (★—★) sont mesurées comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

1.5. Analyse des protéines par électrophorèse.

La figure 5 met en évidence la purification progressive de l'ARNm (guanine-7)-méthyltransférase. La seconde colonne, échangeuse de cations se révèle fortement purificatrice (piste 8) ; la colonne d'affinité permet de séparer les 2 protéines majeures retrouvées après CM-séparation (piste 7).

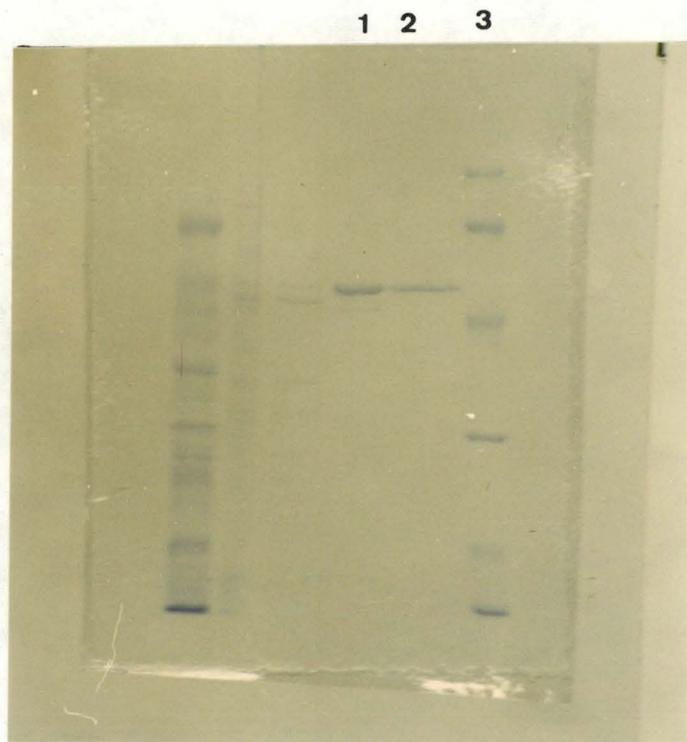


Fig. 6. : Analyse des fractions actives en ARNm (G-7)-méthyltransférase, recueillies après purification, par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide 10 %, coloré au bleu de Coomassie.

- iste 1 = 12 μ g de fraction CM-sepharose active
- 2 = 4 μ g de fraction DNA-agarose active
- 3 = standard Pharmacia

LYS QAE CM DNA R



Fig. 7 : Analyse des fractions actives en ARNm (G-7)-méthyltransférase par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide 10 %, coloré au nitrate d'argent.
0,5 μ g de protéine sont déposés sur chaque piste.

Les figures 6 et 7 confirment la purification de l'enzyme après DNA-agarose. Les colorations au bleu de Co masie et à l'argent révèlent une bande unique correspondant à une protéine dont le poids moléculaire estimé entre 49.500 et 55.000 Daltons (fig.8).

Le poids moléculaire de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase de *S. cerevisiae* est à rapprocher de celui de l'enzyme monomérique correspondante, découverte dans les cellules HeLa (PM = 56.000 D) d'après Ensinger et col. 1976).

Toutefois, nous sommes conscients que la bande de 49.500 Daltons visualisée sur gel SDS-polycrylamide peut correspondre à une sous-unité de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase.

En effet, d'après les résultats obtenus par Itoh et col. (1983), l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase serait oligomérique, puisqu'elle est co-éluée avec l'ARNm guanylyltransférase (d'un PM de 140.000) quand un lysat de *Saccharomyces cerevisiae* est chromatographié sur Séphadex G-200.

Pour rappel, l'ARNm méthyltransférase des cellules de foie de rat a un PM de 130.000.

L'association des activités triphosphatase, de coiffage et de méthylation n'a pu être mis en évidence que chez le virus de la vaccine où le PM du complexe enzymatique est de l'ordre de 127.000.

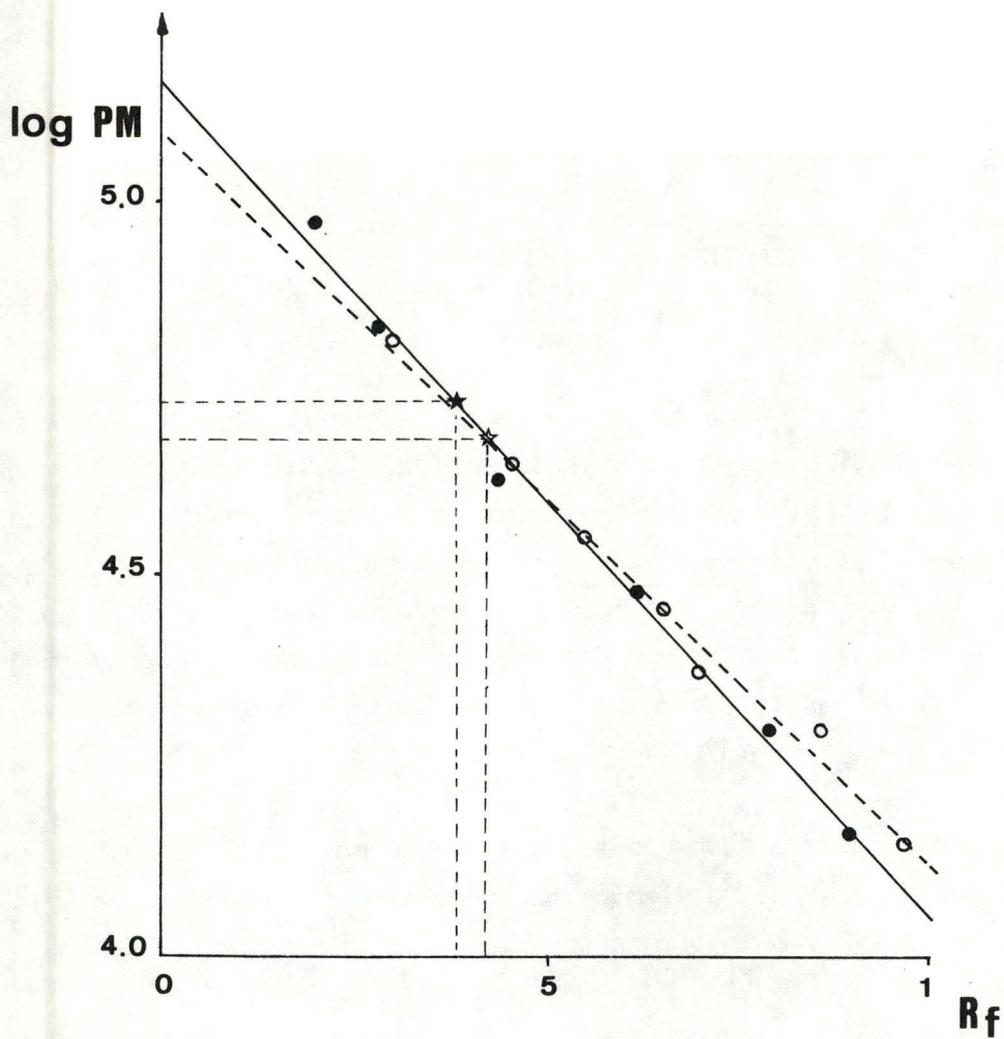
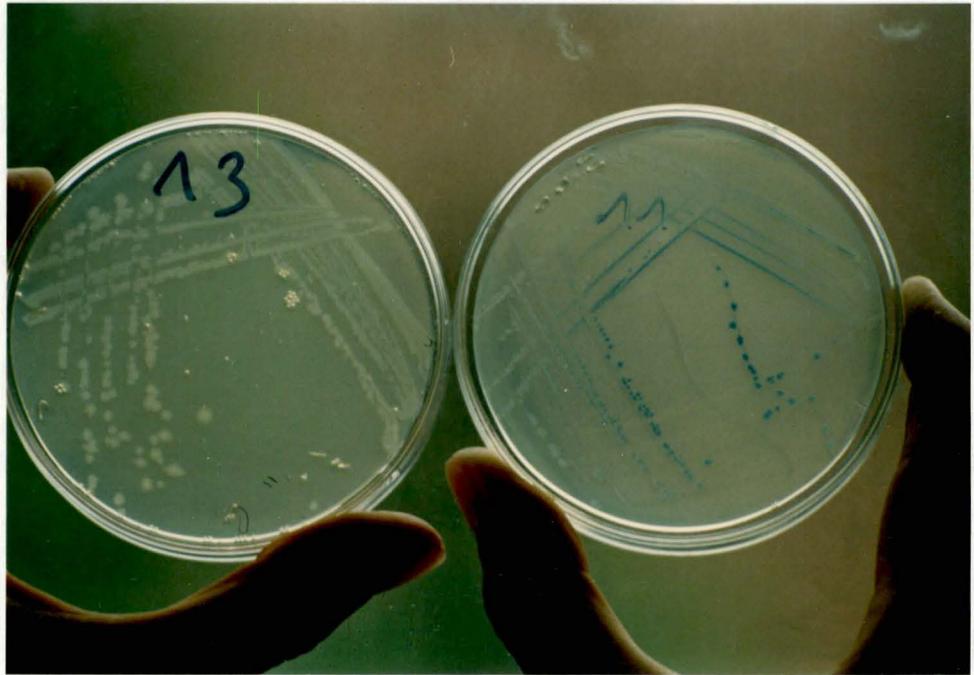


Fig. 8 : Courbe d'étalonnage établie à partir des standards Pharmacia (●—●) et Sigma (○—○) décrits dans "Matériel et Méthodes".

Fraction	Volume	Quantité en protéines	Activité dans 2,5 l	Activité totale	Activité spécifique	Purification	Récupération
	ml	mg	nM/h/ml	nM/h	nM/h/mg protéine	fois	%
Lysat brut	16,4	48,50	1,5	24,1	0,5	1	100
QAE	59	25,40	6	355,2	14	28,6	1470
CM	8	1,28	37,75	302	236	481,6	1250
DNA-agarose	2	0,49	86,40	171	346	707	710

Tableau récapitulatif de la purification de l'ARNm(guanine-7-)-méthyltransférase de la levure.



Détection par la couleur des clones hébergeant le plasmide pGem-blue recombinant sur milieu indicateur contenant de l'X-gal et de l'IPTG.

II. CLONAGE DE L'ADN-c DU LYSOZYME DE POULE.

A ce stade du travail, nous possédons une ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase de levure partiellement purifiée. Son activité enzymatique a été testée, au cours de la purification, en utilisant un analogue de coiffe synthétique comme substrat.

Lors d'études antérieures, cette enzyme s'est avérée également capable de méthyliser in vitro l'ARNm de levure, sous méthylé in vivo au niveau de la coiffe 5' terminale (Locht ; 1985).

Nous nous proposons, dans la suite de ce travail, de synthétiser in vitro un nouveau substrat méthylable : un ARNm coiffé mais non-méthylé, homologue à l'ARNm naturel du lysozyme de poulet.

La synthèse d'un tel ARNm, en grande quantité, implique le clonage de l'ADN-c du lysozyme (ADN-c lys) dans un vecteur faisant partie d'un système de transcription fonctionnel et précis. L'ADN-c lys sera purifié, inséré dans le plasmide pGem-blue et amplifié chez *E. coli*. Les clones recombinants seront identifiés de façon à permettre leur utilisation lors des expériences de transcription in vitro (fig. 10).

II.1. Purification et clonage de l'ADN-c lys.

Le fragment d'ADN-c lys est isolé du plasmide pDS5 lys7 par restriction avec l'enzyme BamH I.

Le fragment est ensuite purifié lors d'une électrophorèse en gel d'agarose (fig. 11).

L'ADN-c lys récupéré par la méthode de Zhu (voir "Matériel et Méthodes") est introduit dans une réaction de ligation en présence du plasmide pGem-blue linéarisé en son site BamH I.

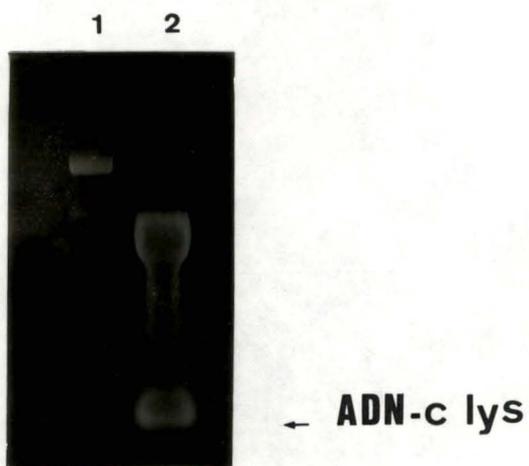


Fig. 11.- piste 1 : pDS 5 lys 7 (3833 pb)
 piste 2 : restriction Bam H I sur 10 μ g de p DS 5 lys 7.
 La bande supérieure correspond au p DS 5.
 1,6 μ g de l'ADN-c lys (610 pb) sont purifiés
 lors de la migration électrophorétique.

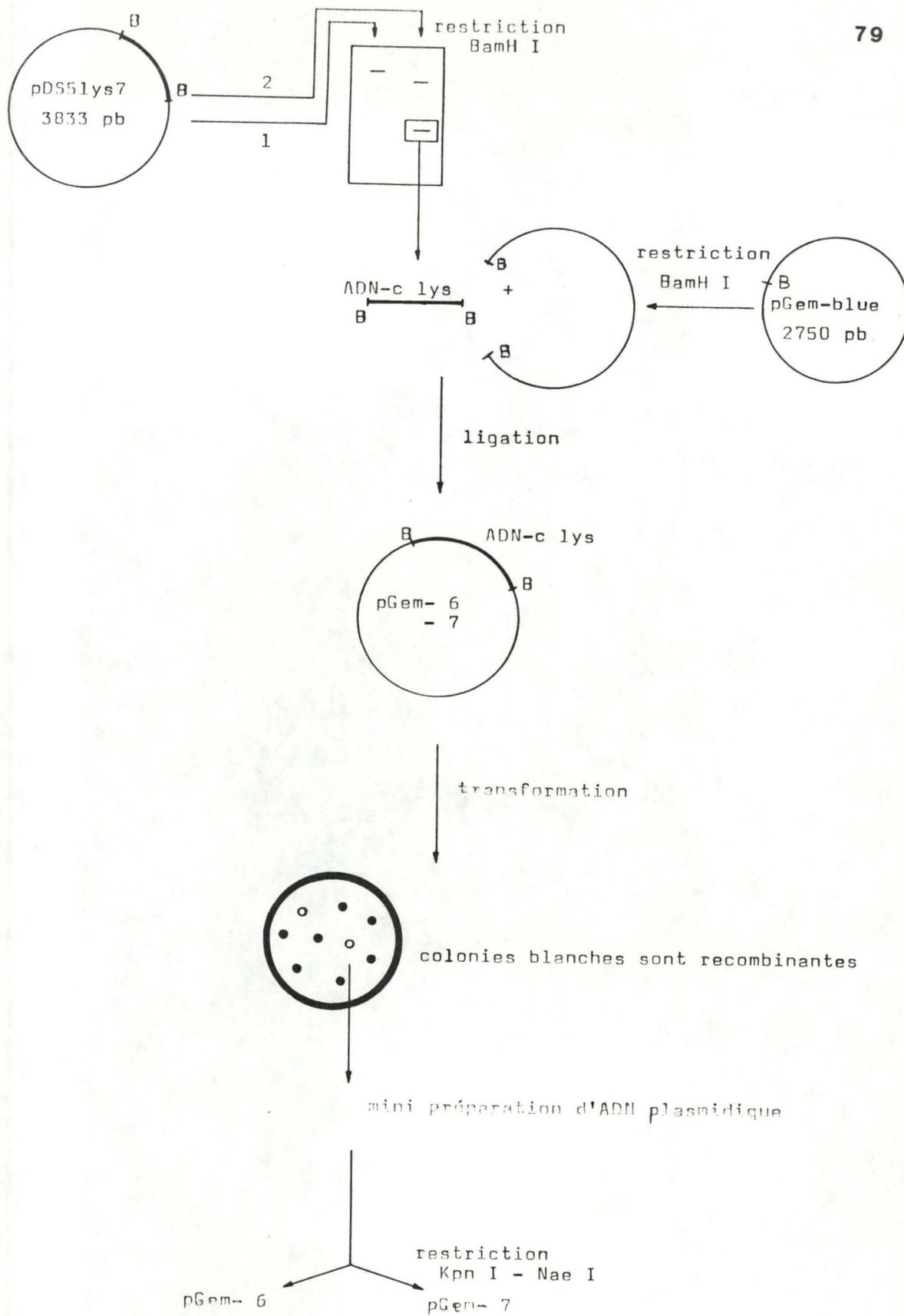


Fig.10 .- Résumé du clonage de l'ADN-c lys.

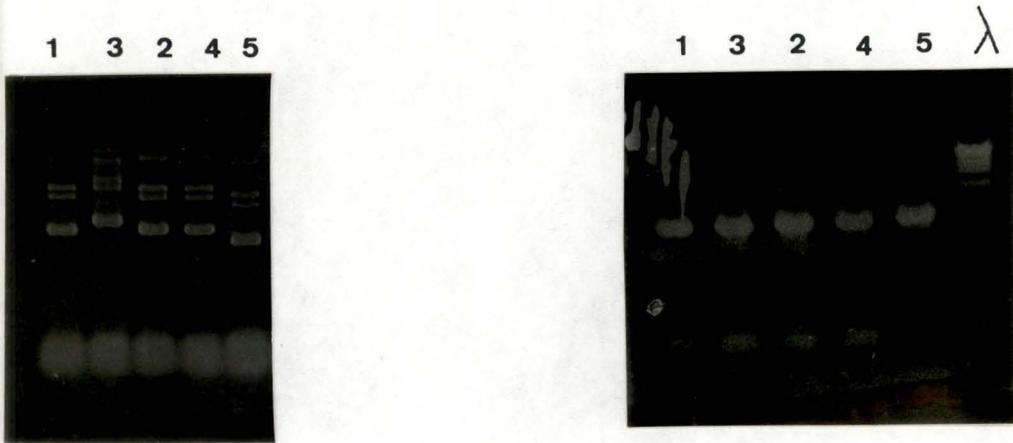


Fig. 12

13 : Analyse sur gel d'agarose des clones recombinants avant et après digestion de l'ADN plasmidique par l'enzyme de restriction Bam HI

Les clones 1, 2 et 4 proviennent de colonies blanches. Le clone 3, une colonie blanche, dont les bactéries hébergent probablement un double ADN-c lys:

- les différentes formes du plasmide sont décalées par rapport à une simple insertion
- lorsque les fragments sont libérés par une restriction Bam H I, la bande à 620 pb est plus fluorescente par rapport à une simple insertion

Le clone 5 est non-recombinant, il provient d'une colonie bleue. Les marqueurs de taille proviennent de la digestion de l'ADN du phage λ par Hind III.

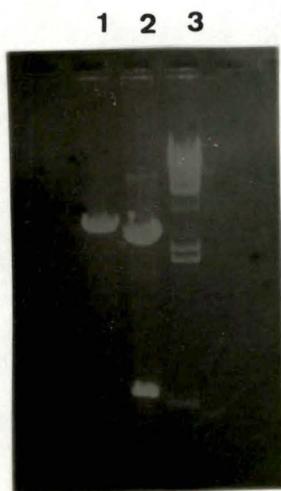


Fig. 14 : La taille de l'ADN-c lys est estimée par référence aux marqueurs de l'ADN du phage λ clivé par Hind III.

Piste 1 = plasmide pGem-blue recombinant
Piste 2 = plasmide pGem-blue recombinant digéré par l'enzyme Bam HI
Piste 3 = λ /Hind III

Les clones transformés par les produits de la ligation sont identifiés par la couleur des colonies sur le milieu solide sélectif : 15% des colonies sont blanches. Parmi ces clones se trouvent ceux qui hébergent le plasmide pGem-blue contenant l'ADN-c lys en son site BamH I.

Afin de vérifier l'état et de caractériser les nouvelles constructions, des préparations rapides d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 12 clones recombinants choisis au hasard (fig. 12). Dans chaque cas, une restriction avec l'enzyme BamH I libère le fragment d'ADN-c lys (fig. 13).

Comme le suggère les figures, le clone 3 semble héberger un plasmide contenant deux fragments d'ADN-c adjacents au niveau du site BamH I.

II.2. Taille et carte de restriction de l'ADN-c lys.

La taille du fragment d'ADN-c lys inséré dans le pGem-blue est estimée à 610 pb (fig. 14). Cette taille a été confirmée par une autre estimation utilisant les marqueurs générés par la restriction de l'ADN du phage par l'enzyme Cla I.

La recherche de l'orientation du fragment dans le pGem-blue, la linéarisation du plasmide en vue d'une transcription *in vitro*, nécessitent la présence de sites de restriction à des positions précises dans la séquence de l'ADN-c lys.

La carte de restriction partielle, établie par ordinateur à partir de la séquence de l'ADN-c lys de J. Oberto (1984), est décrite à la figure 15. Le nombre et la position des sites reconnus par les 58 enzymes de restriction testées sont renseignés dans les tableaux I et II.

La séquence analysée est de 576 nucléotides (de -20 à +556) ; elle contient l'entiereté de la séquence codant pour le lysozyme (de

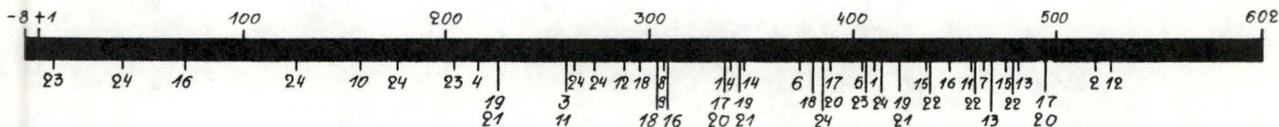


Fig. 15 : Carte de restriction de l'ADN-c lys établie sur ordinateur avec le programme DNA-inspector II. Les nombres (de 1 à 24) correspondent aux enzymes décrites dans le tableau II.

Apa I	Asu II	Ava I	BaI I	Bam H I	Bcl I	Bgl I
Bgl II	Bst E II	Bst I	Eco RI	Eco R V	Hae II	Hinc II
Hind II	Hind III	Hpa I	Nar I	Nco I	Nde I	Nru I
Pst I	Pvu I	Pvu II	Sac II	Sal I	Sca I	Sfi I
Sma I	Soh I	Stu I	Xba I	Xho I	Xho II	

Tableau I.- Liste des enzymes de restriction pour lesquels aucun site n'a été repéré par le programme DNA - inspector.

<u>No.</u>	<u>Enzyme</u>	<u>Site</u>	<u>Positions.</u>						
1	AAt II	1	409						
2	Aha III	1	517						
3	Ava II	1	257						
4	Hinf I	1	215						
5	Kpn I	1	403						
6	Mlu I	1	371						
7	Nci I	1	457						
8	Sac I	1	305						
9	Sst I	1	306						
10	Taq I	1	155						
11	Asu I	2	257	460					
12	Fok I	2	285	525					
13	Hae III	2	460	480					
14	Mbo II	2	339	342					
15	Nae I	2	434	477					
16	Alu I	3	74	307	447				
17	Cfo I	3	335	287	493				
18	Dde I	3	294	304	309				
19	Dpn I	3	225	345	423				
20	Hha I	3	335	387	493				
21	Mbo I	3	225	345	423				
22	Msp I	3	435	458	478				
23	Rsa I	3	-15	203	404				
24	Eco RII	7	39	126	174	262	269	383	414

TABLEAU II - Nombres et positions des sites de restriction identifiés sur la séquence nucléotidique de l'ADN-c du lysozyme de poulet par le programme DNA-INSPECTOR II. La position se réfère à la séquence décrite par J. OBERTO (voir "Matériel et Méthodes").

+1 à +444) (J. Oberto , 1984).

Or, l'ADN-c lys utilisé ici mesure 610 nucléotides (de -8 à 602) : nous n'avons pu recueillir aucune information quant à la séquence nucléotidique 3' terminale .

Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, c'est probablement dans cette région que se situe un site Hinc II inattendu.

II.3. Orientation de l'ADN-c lys.

L'ADN-c lys peut s'insérer au site BamH I du pGem-blue selon les 2 orientations décrites à la figure 16.

La synthèse de l'ARNm désiré à partir d'un des deux promoteurs du vecteur nécessite une disposition adéquate de l'ADN-c lys : l'extrémité 5' (côté nucléotide +1) de celui-ci doit être accolé à proximité du promoteur qui initiera la transcription in vitro.

La présence des deux promoteurs SP6 et T7, sur des brins opposés, permet donc la transcription sur les deux orientations.

L'orientation du fragment est déterminée en soumettant le plasmide recombinant à une enzyme de restriction qui reconnaît, à la fois :

- un site unique dans la matrice du pGem-blue, à proximité d'une des extrémités de l'ADN-c lys. La séquence nucléotidique du pUC19 ("Matériel et Méthodes") est prise comme référence (fig. 17).
- et un site unique très asymétrique dans l'ADN-c lys.

L'enzyme Kpn I répondait à ces conditions, mais le site unique dans la séquence de l'ADN-c lys n'a pu être révélé.

L'orientation est, dès lors, déterminée par une réaction de double restriction faisant intervenir les enzymes Kpn I et Nae I (fig. 16).

+ Kpn I reconnaît un site unique dans le site multiple de

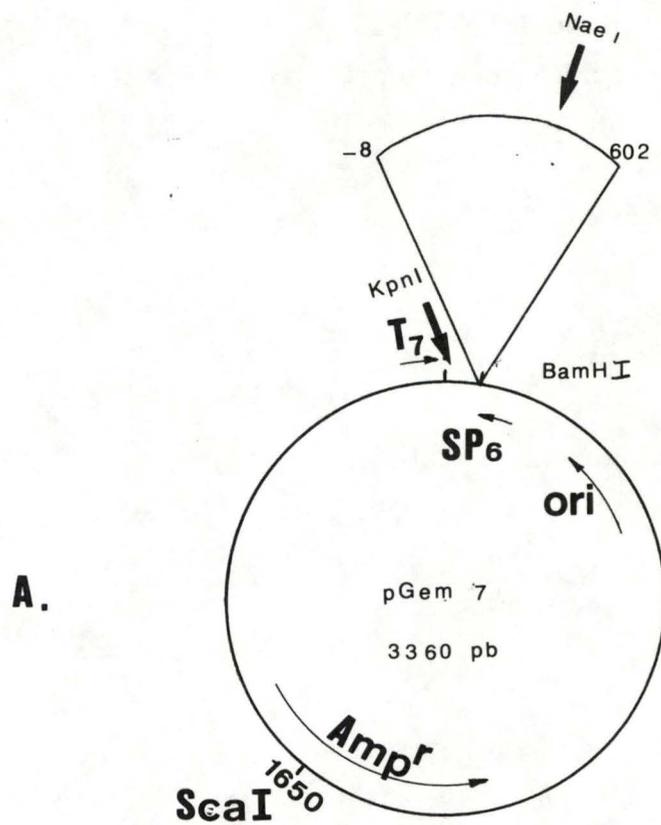
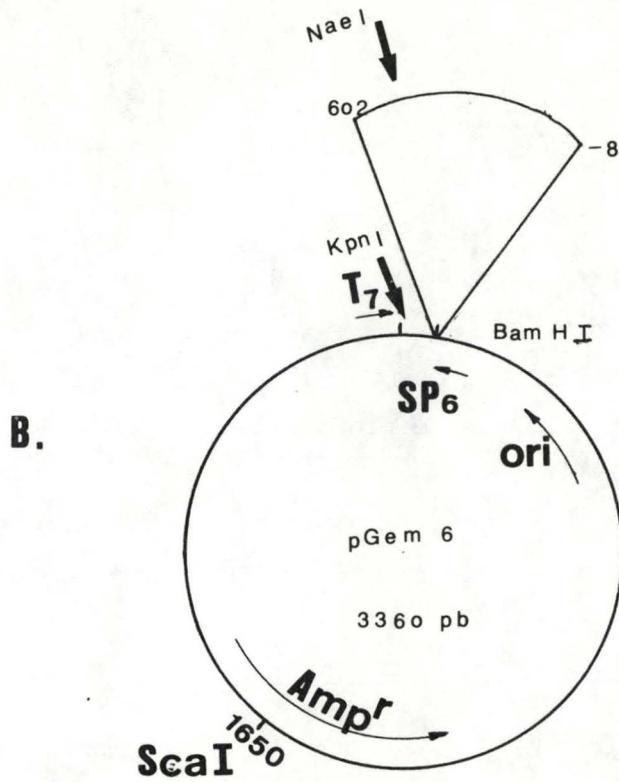


Fig. 16 : Description des 2 possibilités d'insertion de l'ADN-c lys au niveau du site de restriction Bam HI du plasmide pGem Blue

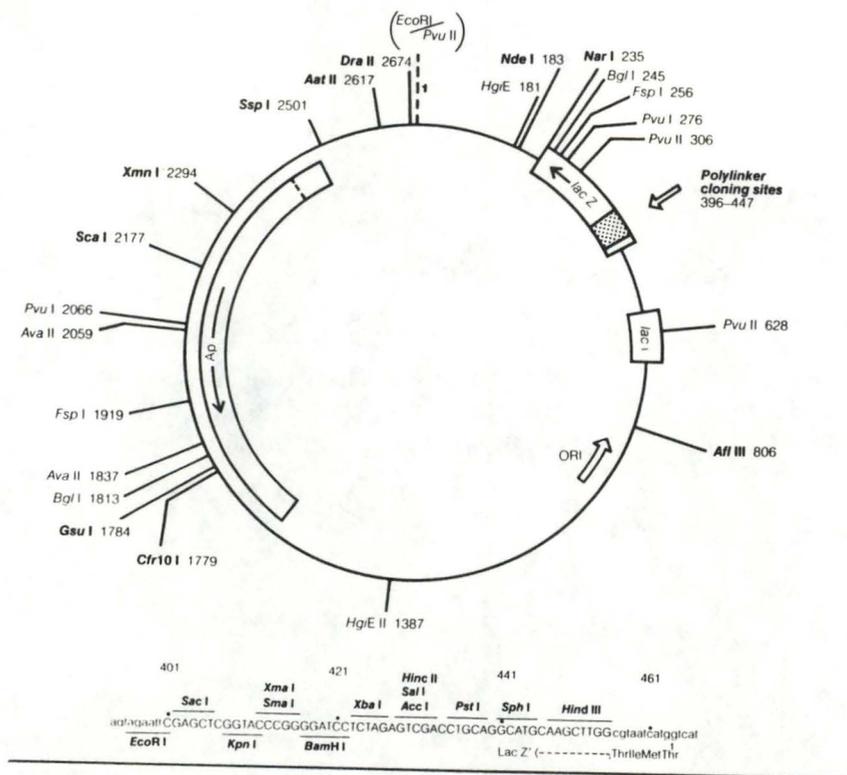


Fig. 17 : Carte de restriction du plasmide pUC 19

clones

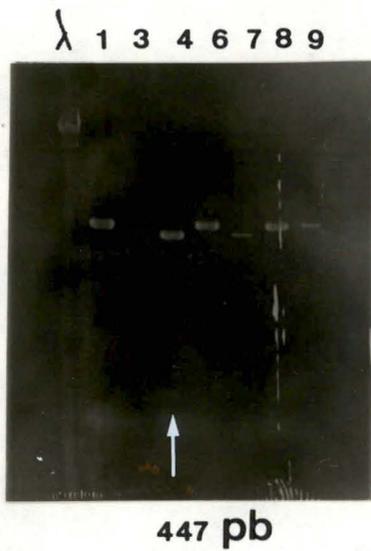


Fig.18 .- Orientation des fragments d'ADN-c lys dans le pGem-blue.

Les clones 1, 6, 8, 9, 12, 13, 14 présentent un fragment de 3187 pb. Le fragment de 132 pb est invisible (trop petit pour être décelé).

Les clones 4, 7, 15 présentent un fragment de 2870 pb et de 447 pb.

Le clone 3 présente le fragment de 3187 pb et de 567 pb (peu visible).

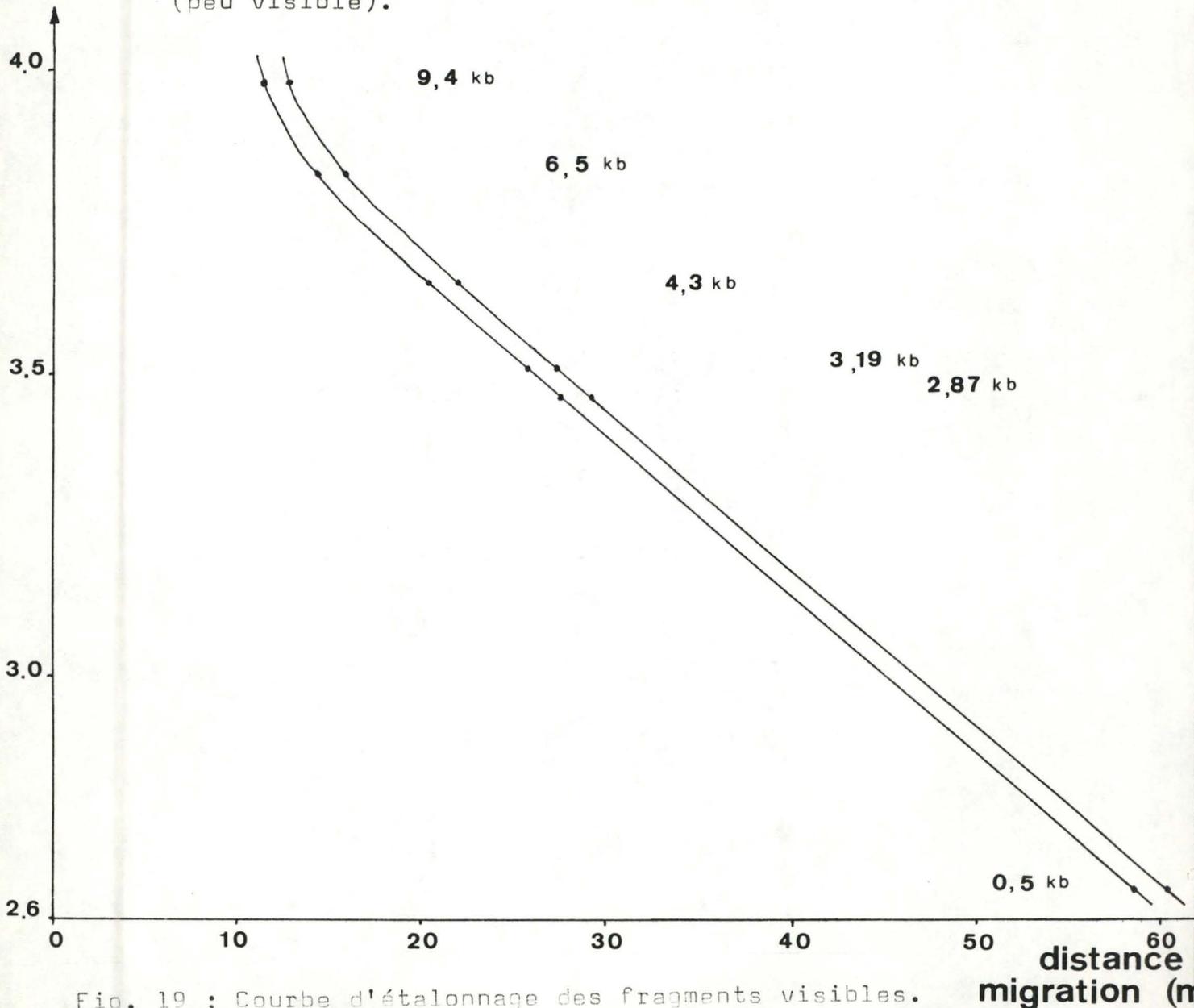


Fig. 19: Courbe d'étalonnage des fragments visibles.

distance migration (m)

clonage du plasmide à 5 pb en amont du site d'insertion BamH I.

- + Nae I-ne reconnaît aucun site dans la matrice du pGem-blue (comme dans celle du pUC 19).
- reconnaît deux sites, aux positions +434 et +477 de l'ADN-c lys. La distance entre ces deux derniers est trop faible pour interférer avec la recherche des orientations. Mais nous en tiendrons compte dans nos calculs.

L'orientation adéquate pour une transcription avec la T7 ARN polymérase se retrouve dans le vecteur A où la double restriction génère des fragments de :

447 pb (5 + 8 + 434)
et de 2870 pb (2750 - 5 + 125).

L'orientation adéquate pour une transcription avec la SP6 polymérase se retrouve dans le vecteur B où la double restriction génère des fragments de :

130 pb (5 + 125)
et de 3187 pb (2750 - 5 + 8 + 434).

La différence de 317 pb entre les fragments des vecteurs A et B est suffisante pour déterminer les orientations (fig.18) ; la taille des fragments est confirmée par une courbe d'étalonnage (fig.19).

Parmi les 12 clones recombinants analysés :

- Les clones 4, 7, 15 contiennent le vecteur A.
- Les clones 1, 6, 8, 9, 12, 13, 14, contiennent le vecteur B.
- l'orientation du clone 2 n'a pas été déterminée.
- les orientations des deux fragments d'ADN-c lys du clone 3 sont décrites à la figure 22.

Les expériences de transcriptions qui suivent seront réalisées-

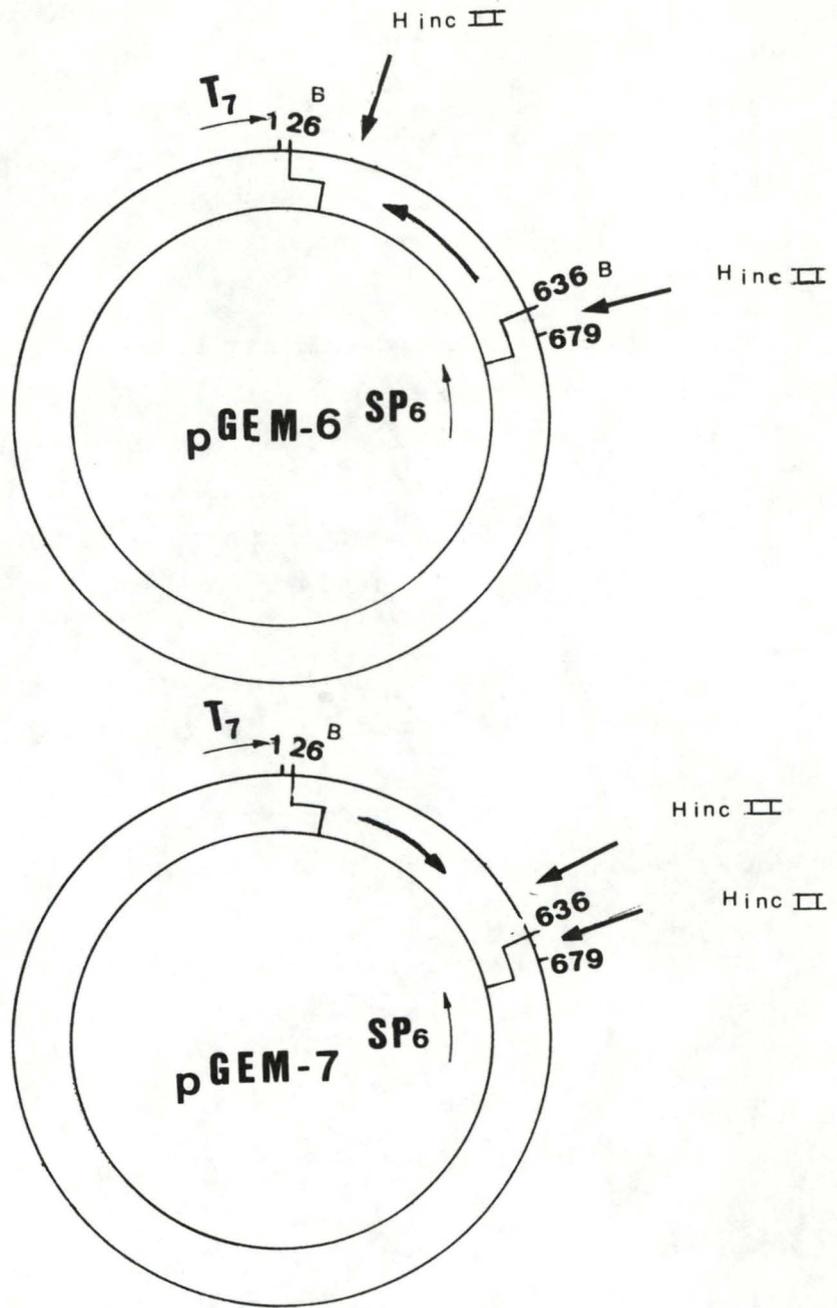


Fig. 20 : Localisation des sites de restriction Hinc II sur le pGem-6 et pGem-7.

es avec la T7 ARN polymérase, sur le plasmide du clone 7 appelé pGem-7 ; ou avec la SP6 ARN polymérase, sur le plasmide du clone 1 appelé pGem-6.

Remarque : Les expériences de linéarisation des plasmides pGem-6 et pGem-7 ont révélé la présence d'un site Hinc II inattendu dans la séquence 3' terminale de l'ADN-c lys.

Ce site ne se révèle uniquement qu'avec le pGem-6 où cette extrémité 3' terminale est à l'opposé, par rapport à l'ADN-c lys, du site Hinc II du site multiple de clonage (fig. 20). Une restriction avec l'enzyme Hinc II sur le pGem-6 aura donc pour conséquence une libération du fragment d'ADN-c lys (fig. 21).

Ces 2 sites étant peu distants dans le pGem-7, une restriction avec l'enzyme Hinc II ne fera que rapprocher de quelques nucléotides le site de linéarisation du plasmide T7.



Fig. 21 : Détermination de la présence d'un site Hinc II dans l'ADN-c lys.

- Piste 1 = pGem-7 digéré par Hinc II : les deux sites Hinc II sont très proches l'un de l'autre.
- Piste 2 = pGem-6 digéré par Hinc II : l'ADN-c est libéré par coupure au niveau du site Hinc II inattendu de l'extrémité 3' et du site Hinc II du MCS

III. Synthèse in vitro d'ARNm.

III.1. Principe de la méthode.

III.1.1. Rappel.

Le système de transcription de bactériophage est utilisé de manière à produire de grande quantité d'ARNm (plusieurs g). En plus de cet aspect quantitatif, les conditions expérimentales sont adaptées pour initier la transcription sur une coiffe, dont le second nucléotide est complémentaire au premier nucléotide de la séquence à transcrire. La convergence de ces deux principes devrait nous fournir de grande quantité d'ARNm coiffé, substrat indispensable aux réactions de méthylation qui suivront.

Ce système de transcription contient une option supplémentaire qui permet de choisir la longueur des ARNm à synthétiser, en linéarisant le plasmide en des sites plus ou moins éloignés du promoteur impliqué.

III.1.2. Choix de l'enzyme de restriction linéarisante.

La linéarisation du plasmide ne peut se faire n'importe où ni, avec n'importe quelle enzyme de restriction.

a. Position du site de coupure.

La synthèse d'ARNm homologue à l'ARNm du lysozyme de poule impose que le plasmide soit linéarisé à proximité de l'extrémité 3' de l'ADN-c lys au niveau d'un site absent ailleurs dans l'ADN-c lys.

Comme nous l'avons déjà annoncé, la séquence nucléotidique 3' terminale est inconnue.

Notre choix s'est alors porté sur les sites multiples de clonage jouxtant le fragment inséré (et absents de la séquence de l'ADN-c lys). Les sites EcoRI et Hinc II ont été choisis pour des transcriptions catalysées, respectivement, par la SP6 ARN polymérase (pGem-6) et T7 ARN polymérase (pGem-7). De plus, ces enzymes répondent à la condition décrite en b.

La présence du site Hinc II inattendu dans la séquence de l'ADN-c lys est à ce niveau un avantage. En effet, il va permettre la linéarisation du pGem-7, par restriction à hauteur de l'extrémité 3' de l'ADN-c lys (fig. 20).

b. Type de coupure.

Toutes les enzymes de restriction ne peuvent être utilisées pour linéariser le plasmide en vue d'une transcription in vitro par "run off" de l'ARN polymérase.

Lorsque le plasmide est linéarisé par une enzyme générant une protubérance 3' (voir "Matériel et Méthodes"), la SP6 ou T7 ARN polymérase produit de grande quantité d'ARNm "anormaux" qui, dans certaines conditions, peuvent représenter plus de 90% des transcripts (Mierendorf et Jendrisak, 1985).

Selon, Schenborn et Mierendorf (1985), ces ARNm proviennent en majorité d'une transcription sur le brin d'ADN opposé non-codant.

Certains modèles peuvent expliquer ces observations :

1. Le promoteur pourrait attirer les polymérases, mais certaines de ces polymérases peuvent initier la transcription à l'extrémité 3', juste en aval du promoteur.

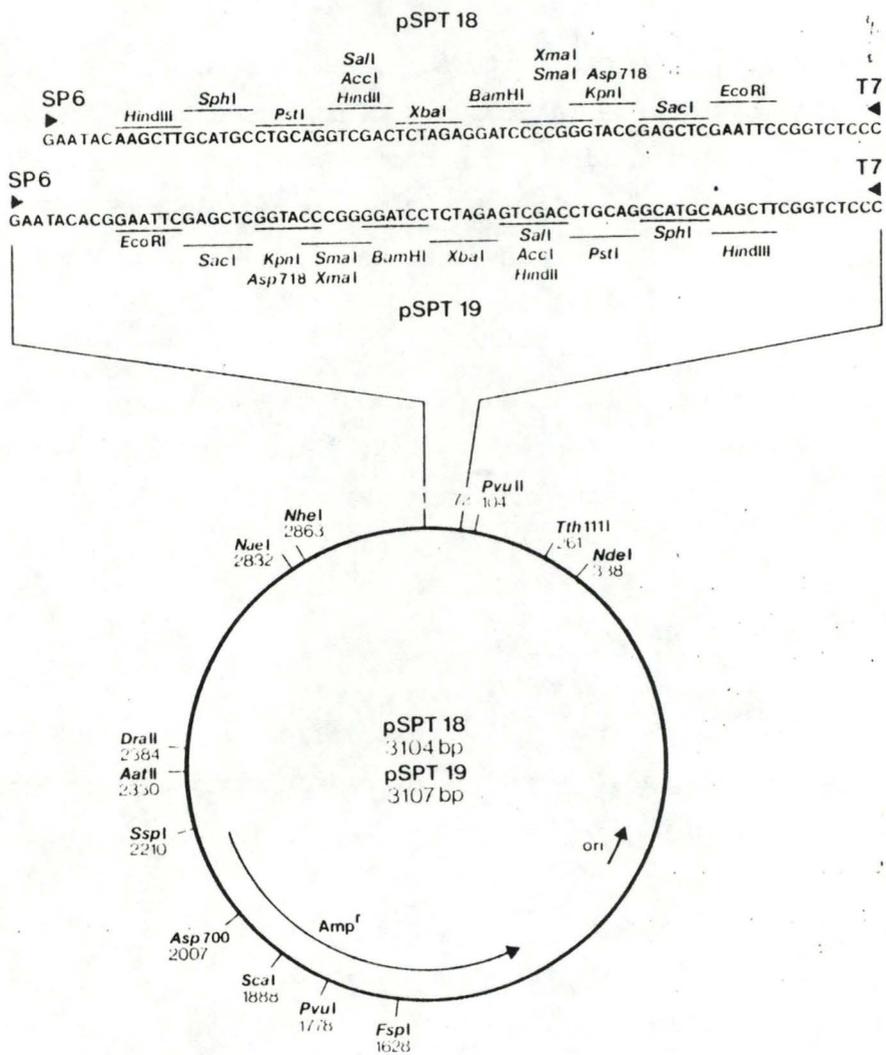


Fig. 23 : Schéma des plasmides pSPT 18 et 19.

2. La protubérance monocaténaire de l'extrémité 3' pourrait être un site préféré par l'ARN polymérase pour initier la transcription.

3. Certaines ARN polymérases pourraient initier la transcription normalement mais, plutôt que d'être relâchée à hauteur de l'extrémité 3', elles la contourneraient et continueraient la transcription sur le brin opposé non-codant.

Par contre, lorsque le plasmide est linéarisé avec une enzyme générant des protubérances 5' ou des bouts francs, la quantité d'ARNm "anormaux" produite est inférieure à 1% (Schenborn et Mirendorf, 1985). Les enzymes choisies lors de nos linéarisations génèreront donc soit des bouts francs, (Hinc II ; Sca I), soit des protubérances 5' (Pvu II ; EcoR I).

III.1.3. Remarques.

1. Toutes les réactions de restriction sur les différents plasmides utilisés lors de ces expériences de transcription se sont révélées complètes.

2. L'ARNm désiré peut-être synthétisé soit à partir du pGem-6, soit à partir du pGem-7. Nous avons choisi une synthèse d'ARNm catalysée par le T7 ARN polymérase sur le pGem-7 : l'enzyme est plus stable et ne requiert pas les adjuvants nécessaires à l'activité de la SP6 ARN polymérase.

III.2. Mise au point des conditions expérimentales

La synthèse d'ARNm à partir de la construction pGem-7 n'a pu être réalisée qu'après certaines expériences préliminaires qui sont retracées dans ce paragraphe.

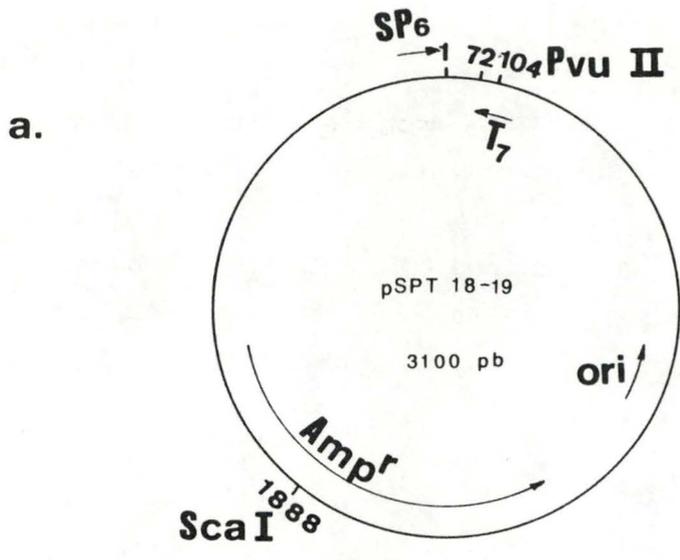


Fig. 24 : Plasmides pSPT 18 et pSPT 19 à l'état circulaire (a) et après linéarisation au niveau du site de restriction Pvu II ou ScaI (b)
 La taille de l'ADN (en paires de bases), du promoteur T 7 jusqu'au site de coupure en aval, correspond à la taille de l'ARNm synthétisé.
 1 cm = 150 pb.

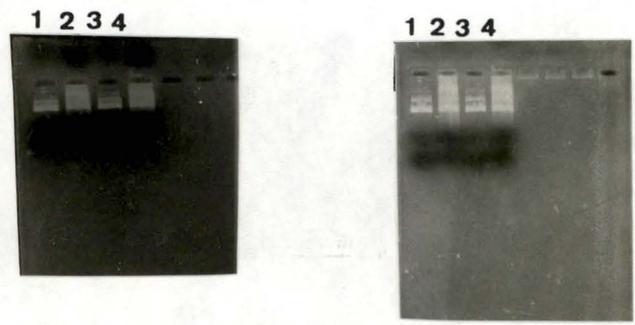


Fig. 25 : Analyse, sur gel d'agarose 1 % en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir des plasmides décrits ci-dessous.
 Un échantillon de 7 l est prélevé du mélange de transcription

- Piste 1 = pSPT 18 circulaire avant transcription (0')
- 2 = " " " " après transcription (10')
- 3 = pSPT 19 circulaire avant transcription (0')
- 4 = " " " " après transcription (10')

Les premières expériences de transcription in vitro sont pratiquées sur les plasmides pSPT18 et pSPT19 fournis par Boehringer (fig. 23). Ces deux plasmides diffèrent seulement par l'orientation du site multiple de clonage entre les promoteurs SP6 et T7. Ces plasmides sont adaptés et ont été éprouvés pour la transcription in vitro ; ils sont utilisés, dans ce travail, pour la mise au point de la méthode.

Les expériences de transcription in vitro ultérieures sont pratiquées sur le pGem-blue et sur nos propres constructions.

L'utilisation de ces plasmides à l'état circulaire va nous permettre, dans un premier temps, d'éprouver le système de transcription (ARN polymérase, promoteur, ribonucléotides, ...).

De plus, afin de recueillir une grande quantité d'ARNm, ceux-ci seront synthétisés selon le protocole 1 (voir "Matériel et Méthodes") où les 4 ribonucléotides sont en concentration égale dans le mélange.

Dans une seconde étape de la démarche, les ARNm seront synthétisés à partir de ces mêmes plasmides linéarisés, en l'absence de coiffe.

Ensuite, nous étudierons l'effet des coiffes analogues GpppG et de la concentration limitante en GTP sur la synthèse d'ARNm à partir de plasmides circulaires et linéaires.

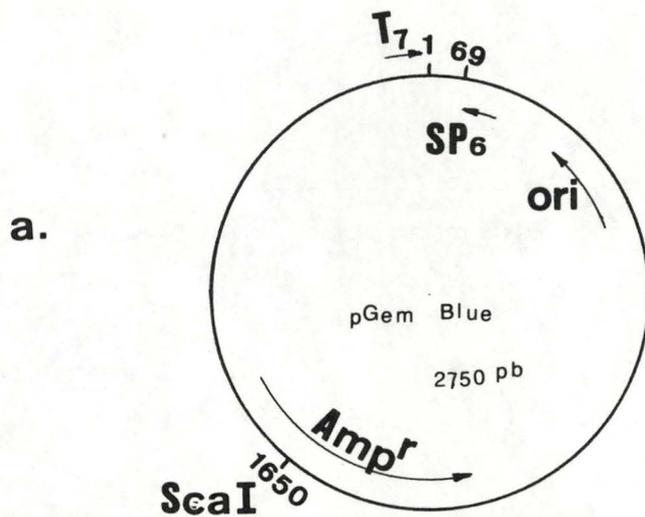
Les ARNm synthétisés à partir de ces plasmides auront donc, une séquence quelconque, ce qui importe peu à ce stade de la mise au point.

III.2.1. Synthèse d'ARNm à partir de plasmide circulaire

Dans ce cas, la T7 ARN polymérase se fixe sur le promoteur et synthétise une population hétérogène d'ARNm dont la taille minimum (en bases) correspond à la taille du plasmide (en paires de bases).

Les premières transcriptions ont été réalisées sur les plasmides pSPT 18 et 19 circulaires (fig. 24 et 25).

Quelques observations peuvent être faites :



b.

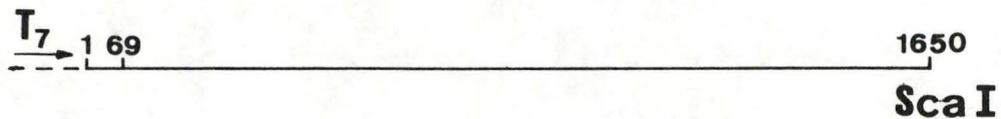


Fig. 26 : Plasmides pGem-blue à l'état circulaire (a) et après linéarisation au niveau du site de restriction Sca I (b). La taille de l'ADN (en paires de bases), du promoteur T 7 jusqu'au site de coupure en aval, correspond à la taille de l'ARNm synthétisé.
1 cm = 150 pb.



Fig. 27. : Analyse, sur gel d'agarose 1 % en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir du plasmide pGem-blue circulaire.
Un échantillon de 7 l est prélevé du mélange de transcription.
Piste 1 = avant transcription (0')
2 = après transcription (10')

- Les ARNm synthétisés à partir des différentes formes des plasmides circulaires (CCC et OC) se répartissent entre la forme "superenroulée" et le puits de dépôt des échantillons.
- Les ARNm les plus longs ne migrent que peu ou pas, même lorsque le temps de migration électrophorétique est doublé.
- La traînée fluorescente se détachant de l'ARNm indique que l'ARNm se dégrade durant la migration dans le gel d'agarose non-stérile.

De manière à tester l'efficacité des promoteurs des plasmides pGem, la transcription, qui a suivi, a été réalisée sur le pGem-blue circulaire (fig. 26 et 27).

III.2.2. Synthèse d'ARNm à partir de plasmides linéarisés.

La linéarisation du plasmide implique la synthèse d'une population homogène d'ARNm de taille unique et connue.

Nos premières expériences de transcription sur plasmide linéaire ne nous permettraient pas de mettre en évidence l'ARNm synthétisé.

Comme nous l'avons décrit dans "Matériel et méthodes" l'ARNm est révélé dans le gel d'agarose par la coloration au bromure d'éthidium. Cette molécule s'intercale entre les bases complémentaires au niveau des structures secondaires des ARNm (et de la double hélice de l'ADN).

La visualisation du matériel fluorescent dépendra donc en partie de la quantité de structure secondaire, elle même fonction de la taille et de la séquence ribonucléotidique.

Le seul paramètre sur lequel nous pouvons jouer en vue d'améliorer la visualisation, est la longueur des transcrits : plus l'ARNm est long, plus les possibilités de structure secondaires sont nombreuses.

De manière à synthétiser des ARNm de grande taille, le plasmide pSPT 18 est linéarisé en son site unique Sca I (+ 1888) ou en son site unique Pvu II (+104) (fig.24).

Les ARNm synthétisés par la T7 ARN polymérase auront donc une taille de 1288 bases (avec Sca I) ou de 3072 bases (avec Pvu II), longueur maximale autorisée avec le pSPT 18 linéaire (fig.24).

Différentes quantités d'ARNm sont synthétisés à partir des deux types de linéarisation : contrairement à ce que nous attendions, l'ARNm produit à partir du pSPT 18/pVu II est peu visible malgré sa grande taille (piste 6). La faible quantité de transcripts synthétisés pourrait résulter de la position du site de coupure du plasmide : le site pVu II n'est qu'à une trentaine de paires de bases du nucléotide "startpoint" (position +72) de la T7 ARN polymérase, ce qui correspond plus ou moins à la taille du promoteur T7 (fig.29)

La T7 ARN polymérase aurait des difficultés de se fixer sur une séquence promoteur tronquée au niveau de l'extrémité juxtée par le site pVu II. Par contre, l'ARNm synthétisé à partir de pSPT 18/Sca I est beaucoup plus visible (piste 4).



Fig. 30 : Analyse, sur gel d'agarose 1 % en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir du plasmide pGem-blue linéarisé en Sca I. Un échantillon de 7 μ l est prélevé du mélange de transcription.

Piste 1 = avant transcription (0')
 2 = après transcription (10')



Fig. 31 : Analyse, sur gel d'agarose 1 % en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir du plasmide pSPT 19 circulaire, selon le protocole 1 ou le protocole 2. Un échantillon de 7 μ l est prélevé du mélange de transcription.

Piste 1 = avant transcription (0') - protocole 1
 2 = - protocole 2
 3 = après transcription (10') - protocole 1
 4 = - protocole 2



Fig. 32 : Analyse, sur gel d'agarose 1 % en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir du plasmide pSPT 18 linéarisé en Sca I selon le protocole 1 ou le protocole 2. Un échantillon de 7 μ l est prélevé du mélange de transcription.

Piste 1 = avant transcription (0') - protocole 1
 2 = après transcription (10') - protocole 1
 3 = avant transcription (0') - protocole 2
 4 = après transcription (10') - protocole 2

Il semble, également, que la quantité d'ARNm très longs synthétisés à partir du plasmide pSPT 18 circulaire soit plus importante que la quantité d'ARNm produite à partir des formes linéaires du plasmide (piste 2). L'étape d'initiation de la transcription serait une étape limitante lors des recyclages de la T7 ARN polymérase en présence du substrat linéaire.

Afin de tester la possibilité d'être transcrit à l'état linéaire, le pGem-blue est linéarisé en son site unique Sca I (+1650) (fig.27). L'ARNm synthétisé à partir de celui-ci (1650 bases) est également peu visible (fig.30).

III.2.3. Problème lié à la synthèse d'ARNm coiffé.

Jusqu'à présent les ARNm ont été produits selon le protocole (voir "Matériel et Méthodes") où les 4 ribonucléotides ont la même concentration.

L'étape suivante de notre démarche consiste à produire des ARNm coiffés selon le protocole 2.

Les effets de la présence d'un analogue synthétique de coiffe GpppG et surtout, de la concentration réduite en GTP, ont été testés sur le pSPT 18 circulaire, d'abord (fig.31) et sur le même plasmide linéarisé avec Sca I ensuite (fig.32).

L'utilisation du protocole 2 ne semble pas affecter négativement le taux de synthèse d'ARNm à partir du plasmide circulaire. Par contre, lorsque la forme linéaire du plasmide est utilisée comme substrat, l'ARNm est synthétisé en plus faible quantité.

Ces résultats suggèrent une nouvelle fois que, les modifications apportées par le protocole 2 en vue de synthétiser des ARNm coiffés ont pour conséquence de renforcer l'aspect limitant de

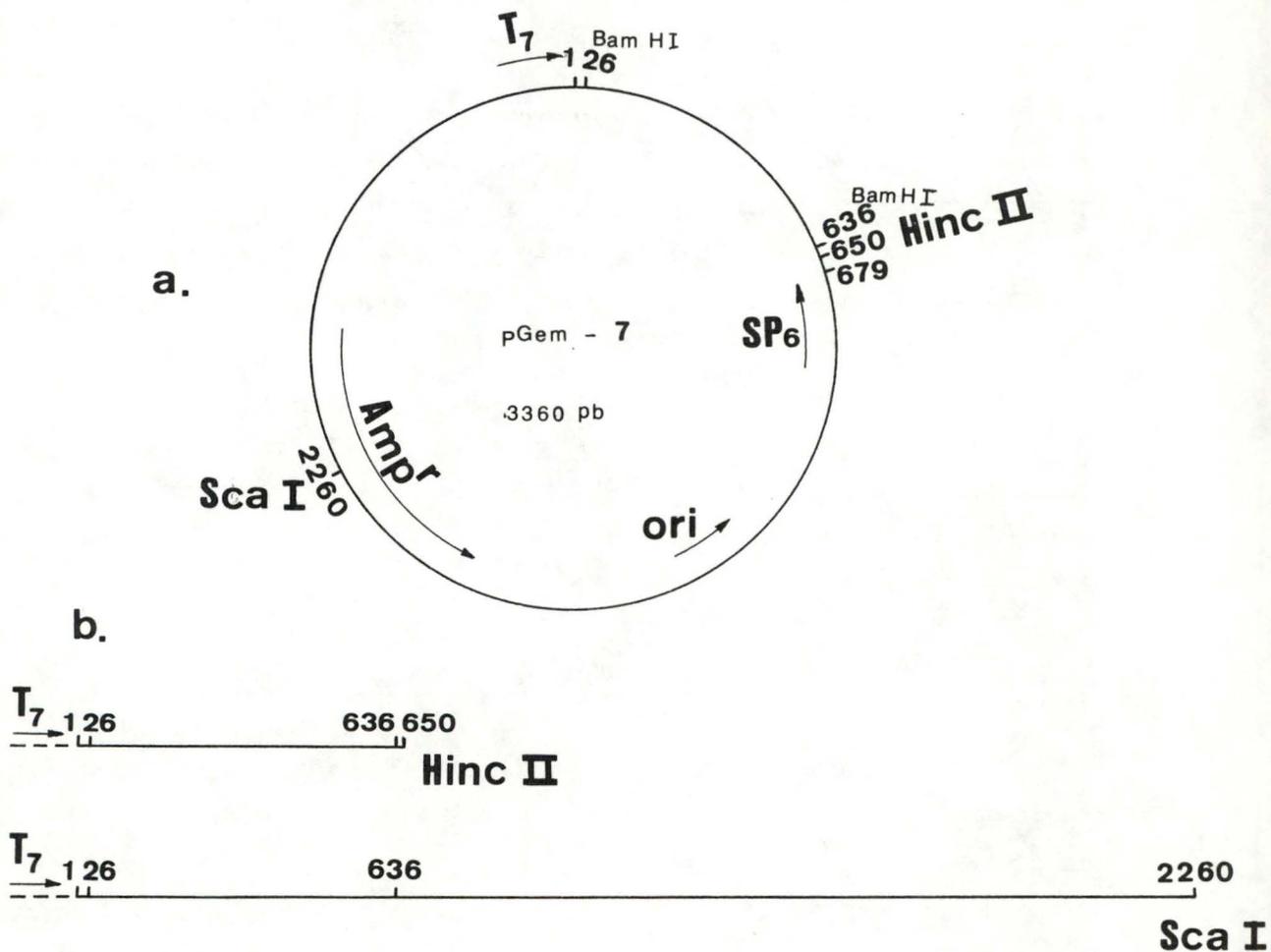


Fig. 34 : Plasmides pGem-7 à l'état circulaire (a) et après linéarisation au niveau du site de restriction Hinc II Sca I (b). La taille de l'ADN (en paires de bases), du promoteur T 7 jusqu'au site de coupure en aval, correspond à la taille de l'ARNm synthétisé. 1 cm = 150 pb.



Fig. 33 : Analyse, sur gel d'agarose 1 % en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir du plasmide pGem-7 circulaire. Un échantillon de 7 μ l est prélevé du mélange de transcription.

Piste 1 = avant transcription (0')

2 = après transcription (10')

l'étape d'initiation de la transcription.

Ceci se remarque seulement dans le cas d'une synthèse d'ARNm à partir du plasmide linéaire où les étapes de ré-initiation et de recyclage de la T7 ARN polymérase sont multiples par rapport à l'élongation continue de l'enzyme sur le plasmide circulaire.

Le but de ces transcriptions étant de fournir un ARNm coiffé, le protocole 2 sera utilisé ultérieurement. Le protocole 1 est tout de même utilisé sur le pSPT 18/ScaI ; les ARNm ainsi synthétisés seront coiffés post-transcriptionnellement par la guanylyltransférase du virus de la vaccine en l'absence de SAM.

III.3. Synthèse d'ARNm à partir du plasmide pGem-7

Le test de transcription sur le plasmide pGem-7 circulaire s'est révélé positif (fig.33).

De manière à synthétiser une population homogène d'ARN-lys (environ 600 bases), nous avons convenu de linéariser le pGem-7 au niveau du site Hinc II, en aval de l'ADN-c lys.

Compte tenu des problèmes de visualisation rencontrés auparavant 2 types d'ARNm de longueurs différentes sont à nouveau synthétisés :

les premiers, à partir du pGem-7 linéarisé en Hinc II, ont une taille de 650 bases au moins, en raison de la présence du site Hinc II inattendu dans la séquence 3' terminale de l'ADN-c lys (fig.34).

Les seconds, de 2260 bases, sont synthétisés à partir du pGem-7 linéarisé en Sca I. Ces ARNm "hybrides" contiennent donc une séquence d'environ 650 bases (correspondant à l'ADN-c lys) prolongée par une séquence d'environ 1600 bases codées par la matrice du plasmide pGem (fig.34).

Seuls ces ARNm sont visibles (fig.35).



Fig. 35 : Analyse, sur gel d'agarose 1 % en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir des plasmides décrits ci-dessous.
 Un échantillon de 7 μ l est prélevé du mélange de transcription.

Piste 1 = pGem-7 linéarisé en Sca I avant transcription (0')
 2 = après transcription (10')
 3 = en Hinc II avant transcription (0')
 4 = après transcription (0')



Fig. 36 : Analyse, sur gel d'agarose 1 % en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir du plasmide pSP 18 linéarisé en Sca I
 Un échantillon de 7 ou 14 μ l, (piste 3) est prélevé du mélange de transcription.

Piste 1 = avant transcription (0')
 2 = après transcription (10')
 3 = après transcription (10') et purification

Les premières ARNm (600 bases), s'ils sont synthétisés, sont indécélabes. Ceci résulterait donc, d'une taille trop petite (peu de structure secondaire) et/ou d'une trop faible quantité d'ARNm synthétisé (conséquence des difficultés de ré-initiation).

Nous utiliserons ces deux types d'ARNm lors des expériences de méthylation.

III.4. Purification de l'ARNm

L'élimination des coiffes GpppG contaminantes et des ions inhibiteurs de la méthylation est assurée par la filtration du mélange de transcription sur une Séphadex G-50.

La figure 36 confirme la co-élution du bleu dextran et de l'ARNm (piste 3).

L'absence d'ARNm sur la piste 2 résulte de sa dégradation dans le gel non-stérile durant l'étape de purification de la solution. Les ARNm purifiés sont directement utilisés dans les expériences de méthylation.

	cpm
enzyme + GpppG	11372
H ₂ O + GpppG	164
enzyme + H ₂ O	530
enzyme + ARNm pSPT 18/Sca I	800
enzyme + ARNm pSPT 18/Sca I coiffé cotranscriptionnellement	260
enzyme + ARNm pSPT 18/Sca I coiffé post-transcriptionnellement	120
enzyme + 2,5 μ g d'ARNm sousméthylé de levure	10670
enzyme + H ₂ O	190
H ₂ O + 2,5 μ g d'ARNm sousméthylé de levure	220
H ₂ O + H ₂ O	470

Tableau IV.- Test de méthylation in vitro sur différents substrats avec la fraction CM-sépharose.
L'activité est mesurée comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

IV. METHYLATION in vitro DE L'ARNm

A ce stade final du travail, nous avons rassemblé l'enzyme de méthylation et le substrat méthytable.

L'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase a été purifiée partiellement à partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

Les ARNm coiffés de longueurs et de séquences différentes ont, quant à eux, été synthétisés in vitro, dans un système de transcription à partir de promoteurs de bactériophage.

D'autres ARNm, non coiffés lors de la transcription, l'ont été subséquentement par utilisation de l'enzyme multifonctionnelle du virus de la vaccine.

IV.1. Conditions expérimentales.

Les quelques expériences de méthylation ont fait intervenir différents ARNm comme substrat : les ARNm synthétisés à partir des plasmides :

- pSPT 18 linéarisé en ScaI
- pGem-7 linéarisé en Hinc II
- pGem-7 linéarisé en Sca I.

L'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase provient soit de la fraction purifiée, soit de la fraction CM-Sépharose.

Les premières expériences de méthylation, réalisées selon le protocole de C. Locht (1984), ne nous ayant pas permis de déceler une incorporation significative de radioactivité dans le matériel TCA-insoluble, nous avons été amenés à modifier le protocole de méthylation (TABLEAU IV).

Tableau V.- Méthylation de l'ARNm sous-méthylé de levure avant et après la modification expérimentale.

	<u>cpm/heure</u>
avant	3533
après	2760



Fig. 37 : Analyse, sur gel d'agarose 1% en présence de BET, de l'ARNm synthétisé à partir du plasmide pGem-blue circulaire.

- Piste 1- avant transcription (0')
2- après transcription (10')
3- et 45 minutes d'incubation dans le mélange de méthylation.

Afin de réduire les possibilités de dégradation et d'éviter les pertes de ARNm néo-synthétisés, une étape d'extraction au phénol-chloroforme a été omise. Cette modification ne semble pas influencer significativement le rendement de la méthylation de l'ARNm sous-méthylé de levure (Tableau V).

IV.2. Résultats obtenus

A nouveau, aucune incorporation de radioactivité reproductible n'a pu être décelée dans le matériel TCA-insoluble

Afin de déterminer les causes de la non-méthylation, différentes questions se sont posées.

IV.2.1. L'ARNm est-il dégradé durant la méthylation ?

Après 45 minutes d'incubation dans le mélange de méthylation en l'absence de SAM, aucune dégradation de l'ARNm n'a été mise en évidence (fig.37).

Ce résultat confirme ceux de C. Locht (1984). Il a montré que moins de 2% de l'ARNm d'*E. coli* uniformément marqué au tritium, est converti en matériel TCA-soluble lors d'une incubation dans le mélange de méthylation.

De même aucun clivage endonucléolytique de l'ARNm n'est détectable par analyse sur gradient de sucrose des polysomes de souris préalablement incubés en présence d'une fraction enzymatique purifiée (C. Locht , 1984).

L'absence d'activité RNAsique dans la fraction purifiée est une conséquence de l'utilisation de la souche de levure osmosensible VY 1160 dont la lyse osmotique douce préserve la structure des vacuoles et empêche ainsi, la libération des nucléases et des protéases (Venkov ,

	sur GpppG *	sur GpppG *	sur ARNm sous- méthylé **
enzyme seule	20876	14126	1381
+ pGem-7 Sca I	11016	10584	1049
+ pGem-7 Hinc II	9379	7069	656
pSPT 18 circul.	8775	--	--

Tableau VI .- Démonstration de l'effet inhibiteur de l'ADN dans les réactions de méthylation de l'analogue de la coiffe ou de l'ARNm sous-méthylé de levure. L'activité est mesurée comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

- * deux fractions enzymatiques différentes ont été testées
- ** après 45 minutes d'incubation.

1979).

IV.2.2. La méthylation est-elle inhibée ?

L'utilisation d'une colonne de DNA-agarose comme dernière étape chromatographique lors de la purification de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase, suggère que l'enzyme est capable d'interagir avec les molécules d'ADN plasmidique persistant dans le mélange de méthylation.

Afin de vérifier cette hypothèse, 1 g de différents ADN plasmidique a été ajouté à des mélanges de méthylation faisant intervenir divers substrats méthylables.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence, une inhibition de la méthylation de l'ordre de 50% (Tableau VI).

IV.2.3. Le nombre de molécules d'ARNm est-il suffisant ?

Au cours des expériences de transcription in vitro, l'ARNm synthétisé a été détecté par une électrophorèse dans un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Cette analyse n'est que qualitative, elle ne permet pas d'obtenir des données précises quant à la quantité d'ARNm transcrit.

Par contre, il est possible, par un raisonnement inverse, d'estimer le nombre minimum de molécules d'ARNm coiffé requis pour permettre une incorporation significative de radio-activité au niveau de la structure de la coiffe.

Une radioactivité de 10.000 cpm détectée dans le matériel TCA-insoluble nécessite que $1,3 \cdot 10^6$ molécules d'ARNm coiffé soient méthylées. La taille moyennes des ARNm au cours de nos différentes expériences de transcription étant de 1000 nucléotides, ce nombre de molécules correspond à 0,75 g d'ARNm.

Il semblerait donc que cette quantité minimale, compte tenu de

l'inhibition de l'enzyme, n'ait pu être obtenue dans notre système de transcription.

**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

La plupart des plantes et des champignons inférieurs présentent une coiffe de "type 0" (7-méthylguanosine terminale) à l'extrémité 5' de l'ARNm.

Nous avons isolé l'enzyme responsable de cette méthylation unique chez *Saccharomyces cerevisiae* selon un protocole permettant d'en obtenir de grande quantité (0,5 à 1 mg).

L'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase, purifiée plus de 700 fois, a été analysée par électrophorèse dans un gel SDS-polycrylamide. Une coloration très sensible au nitrate d'argent ne révèle qu'une seule protéine de 49.500 à 55.000 Daltons. Ce PM est à rapprocher de celui qui a été déterminé pour l'enzyme correspondante dans les cellules HeLa (PM = 56.000 ; Ensinger et col. ; 1976).

Pour éprouver, l'activité de méthylation de l'enzyme purifiée dans un test in vitro sur un substrat autre que ceux utilisés antérieurement (nucléotides, analogue de la coiffe et ARNm sous-méthylé de levure) nous avons synthétisé in vitro, un ARNm coiffé, non-méthylé à partir de l'ADN-c du lyozyme de poule.

Cet ADN-c avait été préalablement cloné dans un vecteur de transcription, le plasmide pGem-blue comportant les promoteurs du bactériophage SP6 et T7.

Dans un premier temps nous nous sommes attachés à définir les conditions expérimentales permettant de mener à bien les expériences de transcription in vitro.

Nous avons ensuite synthétisé des ARNm coiffés homologues à l'ARN-lys de poulet à partir de notre plasmide recombinant pGem-7. Cet ARNm, analysable qualitativement par électrophorèse n'a, malheureusement, pu être caractérisé quantitativement.

Ce manque d'information quant à la quantité d'ARNm obtenu est, partiellement, à la base des difficultés rencontrées lors des expériences de méthylation "in vitro" faisant intervenir notre enzyme purifiée.

De plus, l'ADN plasmidique, co-purifiée avec l'ARNm s'est avéré être un puissant inhibiteur de la méthylation.

Afin d'optimiser, les conditions expérimentales du test de méthylation in vitro, quelques modifications devraient être apportées.

D'abord, l'enzyme doit être préservée de toute inhibition par l'ADN en traitant le mélange de transcription de la DNA ase I (libre de toute activité RNasique) ou encore par filtration sur une colonne d'hydroxyl-apatite.

Ensuite, il est impératif de quantifier l'ARNm synthétisé in vitro. Sa quantité est estimable lorsqu'il est synthétisé à partir de ribonucléotides radioactifs.

Nos ARNm n'étant pas radioactifs, une quantification serait possible par l'absorbance au spectrophotomètre à 256 nm. Ceci suppose, évidemment que la quantité d'ARNm transcrit soit décelable (de l'ordre de 5 g ou 0,1 D.O. 256 nm).

Une autre méthode consisterait à analyser l'ARNm synthétisé in vitro par électrophorèse en gel d'agarose dans des conditions dénaturantes (formaldéhyde, glyoxal) et à comparer sa fluorescence à celle des marqueurs ribonucléiques de taille et de quantité connues.

D'autres méthodes quantitatives tel que la coloration à l'orcinol en milieu acide ou l'hybridation avec des sondes radioactives peuvent être également envisagées.

Ces mises au point expérimentales terminées, une caractérisation fonctionnelle de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase sera envisageable.

La possibilité de choisir la taille de l'ARNm synthétisé in vitro permet d'étudier l'effet de la longueur du transcrit sur les mécanismes catalytiques de la méthylation de la coiffe.

L'ARNm synthétisé in vitro et/ou méthylé co-transcriptionnellement (en amorçant le ARN polymérase sur une coiffée méthylée) ou post-transcriptionnellement par notre enzyme pourrait servir de substrat à d'autres enzymes de méthylation animales ou virale pour la transformation de coiffe de type 0 en coiffe de type 1 ou 2. Le rôle fonctionnel de ces méthylations pourrait être déterminé par traduction des messagers dans des lysats acellulaires de germes de blé ou de réticulocytes de lapin.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS R., KNOWLER J.T., LEADER D.P. (1986)
The biochemistry of nucleic acids
Chapman and Hall
- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. (1983)
Molecular biology of the cell
éd. Garland
- ARENDS J., ZAHN R., MULLER W. (1980)
Size determination of poly (A) after in vitro
methylation with radioactive diméthyl sulfate
Analytical biochemistry, 101, 488-493
- BABISH A., NEVINS J.R., DARNELL Jr. J.E. (1980)
Early Capping of transcripts from the adenovirus major
late transcription unit.
Nature, 287, 246-248.
- BACHMAN B.J., (1983)
Linkage map of Escherichia Coli K-12
édition 7.
Microbiol. Rev., 47, 180-230
- BARBOSA E., MOSS B. (1978) a
mRNA (nucleoside -2'-) methyltransferase from
vaccinia virus.
J. Biol. Chem., 253, 7692-7697
- BARBOSA E., MOSS B. (1978) b
mRNA (nucleoside -2'-) methyltransferase from
vaccinia virus
J. Biol. Chem., 253, 7698-7702
- BOTH G.W., BANERJEE A.K., SHATKIN A.J. (1975)
methylation - dependant translation of viral
messenger RNA_s in vitro.
Proc. Natl Acad. Sci USA, 72, 1189-1193.
- BRADFORD M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quanttation of
 μ g quantities of protein utilizing the principle of
protein-dye binding.
Analytical biochemistry, 72, 248-254.
- CASELLAS P., JEANTEUR P. (1978)
Protein methylation in animal cells.
Biochimica et Biophysica Acta, 519, 243-254

- BUTTLER E.T., CHAMBERLIN M.J. (1982)
Bacteriophage SP₆ -specific RNA polymerase
J. Biol. Chem., 257, 5772-5778.
- CHAMBERLIN M., RYAN T. (1982)
Bacteriophage DNA Dependant RNA polymerases
dans : The enzymes XV part B
Boyer P., Academic Press.
- CHAMBERLIN M., KINGSTON R., GILMAN M., WIGGS J., DEVERA A. (1983)
Bacterial and bacteriophage RNA polymerases
dans : Methods in enzymology, 101,
Academic press. 540-568.
- COHEN S.N., CHANG A. G. Y., HSU L. (1973)
Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria,
genetic transformation of Escherichia Coli by R factor
DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110
- CONTRERAS R., CHEROUTRE H., DEGRAVE W., FIERS W. (1982)
Simple, efficient in vitro synthesis of capped RNA
useful for direct expression of cloned eukaryotic.
Nucl. Acids res., 10, 6353-6362.
- COPPOLA J., FIELDS, A.S., LUSE, D.S. (1983)
Promoter - proximal pausing by RNA polymerase II in vitro
transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1251-1255.
- DARNELL J., LODISH H., BALTIMORE D. (1986)
Molecular cell biology.
Scientific American Books, Inc.
- DAVANLOO P., ROSENBERG A.H., DUNN J.J., STUDIER F.W. (1984)
Cloning and expression of the gene for bacteriophage T₇
RNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2035-2039.
- ENSINGER M.J., MARTIN S., PAOLETTI E. MOSS B. (1975)
modification of the 5' terminus of mRNA by soluble
guanylyl and methyltransferase from vaccinia virus.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 72, 2525-2529.
- ENSINGER M.J., MOSS B. (1976)
modification of the 5' terminus of mRNA by an RNA
(guanine-7-) methyltransferase from HeLa cells.
J. Biol. Chem., 251, 5283-5291.

- FURUICHI Y., LAFIANDRA A., SHATKIN A.J. (1977)
5' terminal structure and mRNA stability
Nature, 266, 235-239.
- FURUICHI Y., (1978)
"Pretranscriptional Capping" in the biosynthesis of
cytoplasmic polyhedris virus mRNA.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 75, 1086-1090.
- FURUICHI Y., MORGAN M.A., SHATKIN A.J. (1979)
Synthesis and translation of mRNA containing 5'-
terminal 7-methylguanosine cap
J. Biol. Chem. 254, 6732-6738.
- GREEN M.R., MANIATIS T., MELTON D.A. (1983)
Human β -globin Pre-mRNA synthesized in vitro is
accurately spliced in xenopus oocyte nuclei.
Cell, 32, 681-694.
- GRIFO J.A., TAHARA M.S., LEIS J.P., MORGAN M.A., SHATKIN A.J.
MERRICK W.C. (1982)
Characterization of eukaryotic initiation factor 4 A,
a protein involved in ATP dependant binding of globin
mRNA
J. Biol. Chem., 257, 5246-5252.
- HAYES et COL. (1969)
J. Biol. Chem., 244, 6636-6644.
- HICKEY E.D., WEBER L.A., BAGLIONI C. (1976)
Inhibition of initiation of protein synthesis by
7-methylguanosine-5'-monophosphate.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 73, 19-23.
- HOLMES, QUIGLEY, (WILIMZIG M.) (1985)
LiCl-boiling method for plasmid mini-preps
Trends genet., 1, 158

- ITOH N., MIZUMOTO K., KASIRO (1983)
Partial purification and characterization of mRNA
guanylyltransferase from *sac-charomyces cerevisiae*.
FEBS letters, 155, 161-166.
- ITOH N., MIZUMOTO K., KASIRO Y. (1984) a
messenger RNA guanylyltransferase from *saccharomyces
cerevisiae*.
J. Biol. Chem., 259, 13923-13929.
- ITOH N., MIZUMOTO K., KASIRO Y., (1984) b
messenger RNA guanylyltransferase from *saccharomyces
cerevisiae*
J. Biol. Chem., 259, 13930-13936.
- ITOH N., YAMADA Y., KAZIRO Y., MIZUMOTO K. (1987)
Messenger RNA guanylyltransferase from *Saccharomyces
cerevisiae*.
J. Biol. Chem., 262, 1989-1995.
- JOVE R., MANLEY J.L. (1982)
transcription initiation by RNA polymerase II is
inhibited by S-adenosylhomocysteine.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 79, 5842-5846
- JUNG A., SIPPEL E.A., GREZ M., SCHUTZ G. (1980)
Exons encode functional and structural units of
chicken lysozyme.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77, 5759-5763.
- KAFATOS F.C., GELINAS R. (1974)
mRNA stability and the control of specific proteins
synthesis in highly differentiated cell.
Biochemistry of cell differentiation II, 45,
Butterworths, London, 223-264, Ed Paul J.
- KASSAVETIS G.A. et COL (1982)
Bacteriophage SP₆ specific RNA polymerase
J. Biol. Chem. 257, 5779-5788.
- KATZ et COL (1973)
J. Bacteriology, 114, 577.
- KEITH J.M., ENSINGER M.J., MOSS B. (1978)
J. Biol. Chem., 253, 5033-5041.
- KONARSKA M.M., PADGETT R.A., SHARP P.A. (1984)
Recognition of cap structure in splicing in vitro
of mRNA Precursors.
Cell, 38, 731-736.

- KOZAK M. (1979)
Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes.
Nature, 280, 82-85.
- KOZAK M. (1983)
comparaison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles
microbiol. rev. 47, 1-45.
- KOZAK M. (1986)
Point mutation defines sequences flanking the AUG initiation codon that modulated translation by eukaryotic ribosomes.
Cell, 44, 283-292.
- LANGBERG S.R., MOSS B. (1981)
J. Biol. Chem., 256, 10054-10060.
- LEE K.A.W., GUERTIN D., SONENBERG N. (1983)
mRNA secondary structure as a determinant in cap recognition and initiation complex formation.
J. Biol. Chem., 258, 707-710.
- LEHNINGER A.L. (1985)
Principes de biochimie.
Flammarion médecine-Sciences, Paris.
- LEWIN B. (1985)
Genes II
John Wiley et Sons. Inc. New-York.
- LOCHT C., BEAUDART J.L., DELCOUR J. (1983)
Partial purification and characterization of mRNA (guanine-7-) methyltransferase from *saccharomyces cerevisiae*
Eur. J. Biochem., 134, 117-121.
- LOCHT C. (1984)
methylation *in vitro* de la coiffe 5' terminale de l'ARN de la levure *saccharomyces cerevisiae* au moyen d'enzyme extraite du germe de blé et de levure.
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de docteur en Sciences.
- LOCHT C., DELCOUR J. (1985)
In vitro methylation of undermethylated yeast poly(A)-rich RNA using mRNA(guanine-7-)-methyltransferase purified from wheat germ or yeast.
Eur. J. Biochem., 152, 247-251.

- LOWARY P., SAMPSON J., MILLIGAN J., GROEBE D., UHLENBECK O.C.
A better way to make RNA for physical studies.
dans structure and dynamics of RNA.
Van Knippenberg, Hilbers - Plenum Press.
- MARTIN S., PAOLETTI E., MOSS B. (1975)
Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA
(guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions
J. Biol. Chem., 250, 9322-9329.
- MARTIN S., MOSS B. (1975)
Modification of RNA guanylyltransferase and mRNA
(guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions
J. Biol. Chem., 250, 9330-9335.
- MARTIN S., MOSS B. (1976)

J. Biol. Chem. 251, 7313-7321.
- MAINWARING, PARISH J., PICKERING J.D., MANN N.H. (1982)
Nucleic acid biochemistry and molecular
biology blackwell scientific publications
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1984)
molecular cloning : a laboratory manual
cold spring Harbor Laboratory, New-York.
- MANLEY J.L., FIRE A., CANO A., SHARP P.A., MALCOHU G.L. (1980)
DNA- dependant transcription of adenovirus gene in a
soluble whole-cell extract.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77, 3855-3859.
- MERRIL R.C., SWITZER R.C., VAN KEUREN M.L. (1979)
trace polypeptides in cellular extracts and human body
fluids detected by two-dimensional electrophoresis and
a highly sensitive silver stain.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 76, 4335-4339.
- MERRIL R.C., GOLDMAN D., SEDMAN S.A., ERERT M.H. (1981)
Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide
gels shows regional variation in cerebrospinal fluid
proteins.
Sciences, 211, 14

- MESSING J., VIEIRA J. (1982)
The pUC plasmids and M13mp 7- derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene, 19, 259-268.
- MIERENDORF R., JENDRISAK J. (1985)
optimizing transcription performances of riboprobe SP₆ and T₇ RNA polymerase.
Promega notes, 1
- MIZUMOTO K., KASIRO Y., LIPMAN F. (1979)
Transmethylation and transguanylation in 5'-RNA capping system isolated from rat liver nucleic.
Proc. Natl. Acad. Sci, 76, 4961-4965.
- MIZUMOTO K., KASIRO Y., LIPMAN F. (1982)
Reaction mechanism of mRNA guanylyltransferase from rat liver : Isolation and characterization of a guanylyl-enzyme intermediate.
Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 79, 1693-1697.
- MONROY G., SPENCER E., HURWITZ J. (1978)
Purification of mRNA guanylyltransferase from vaccinia virions.
J. Biol. Chem., 253, 4481-4489.
- MOSS B., (1984)
5' structural cap structures of eukariotic and viral mRNA₅ dans : Processing of RNA
Apirion D., C.R.C. Press.
- MUTHUKRISHNAN S., MOSS B., COOPER J.A., MAXWELL E.S. (1978)
Influence of 5' terminal cap structure on the initiation of translation of vaccinia virus mRNA
J. Biol. Chem., 253, 1710-1715.
- OBERTO J., (1985)
Clonage d'un promoteur de *saccharomyces cerevisiae* et expression dans la levure du gene de lysozyme de poule .
Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences agronomiques.

- PATERSON B.M., ROSENBERG M. (1979)
Efficient translation of prokaryotic mRNAs in an eukaryotic cell-free system requires addition of cap structure.
Nature, 279, 692-696.
- PATZEIT E., THALMANN E., HARTMUTH K., BLAAS D., KUECHLER E. (1987)
Assembly of pre-mRNA splicing complex is cap dependant.
Nucl. Acids Res., 15, 1387-1399.
- PELLETIER J., SONENBERG N. (1985)
Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency
Cell, 40, 515-526.
- PLOTCH S.J., BOULOY M., ULMANEN I. KRUG R.M. (1981)
A unique cap ($m_7 G_{ppp} X_m$) Dependant influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription
Cell, 23, 847-858.
- RAO P. (1982)
In vitro transcription of eukaryotic m RNA genes
Focus, 4, 1.
- ROSE J.K., LODISH H.F. (1976)
Translation in vitro of vesicular stomatitis virus mRNA lacking 5' terminal 7 methylguanosine
Nature, 262, 32-37.
- ROSENBERG M., PATERSON B.M. (1979)
Efficient cap dependant translation of polycistronic prokaryotic mRNAs is restrited to the first gene in the operon.
Nature, 279, 696-701.
- SALDITT M., GEORGIEFF M., HARPOLD M., CHEN-KIANY S., DARNELL J.R. (1980)
The addition of 5' cap structures occurs early in hnRNA synthesis and prematurely terminated molecules are capped.
Cell, 19, 69-78.

- SEKENBORN E.T.,MIERENDORF R. (1985)
A novel transcription property of SP₆ and T₇ RNA
polymérases:dependance on template structure.
Nucl. acids res.,13, 6223-6226.
- SHAPIROL A.L.,et Col. (1967).
M.W.estimation of polypeptide chains by electrophoresis
in S.O.S.polyacrylamide gels.
Biochemical and Biophysical research communications,20, 5
- SHARP P.A.,SUDGEN B.,SAMBROOK J. (1973)
Detection of two restrictions endonuclease activities in
Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose
ethidium bromide eletrophoresis.
Biochemistry,12,3055-3063.
- SHIMOTOHNO K.,KODAMA Y.,HASHIMOTO J.,MIURAK.I. (1977)
Importance of 5' terminal blocking structure to stabilize
mRNA in eukaryotic protein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. ,74,2734-2738.
- SHUMAN S.,SURKS M.,FURNEAUX H.,HURWITZ J. (1980)
Purification and characterization of a GTP-pyrophosphate
exchange activity from Vaccinia virions.
J.Biol.Chem. ,255, 11588-11598.
- SHUMAN S.,HURWITZ J. (1981) .
Mechanism of mRNA capping by Vaccinia virus guanylyl-
-transferase:characterization of an enzyme guanylate
intermediate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA,78,187-191.
- SHUMAN S., HURWITZ J. (1982).
Capping enzyme.
dans:The enzyme XV part B
BOYER P.,Academic Press .
- SÖLL D., KLINE K.D. (1982).
RNA methylation.
dans:The enzyme XV part B.
BOYER P., Academic Press.
- SONENBERG N.,MORGAN M.A.,MERRICK W.C.,SHATKIN A.J. (1978)
A polypeptide in eukaryotic initiation factors that
crosslinks specifically to the 5'terminal cap.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA,75, 4843-4847.

- SONENBERG N. (1981)
ATP/Mg⁺⁺-dependant cross-linking of cap binding proteins to the 5' end of aukaryotic mRNA.
Nucl. Acids Res., 9, 1643-1656.
- SONENBERG N., GUERTIN D., CLEVELAND D. (1981)
Probing the function of the eukaryotic 5' cap structure by using a monoclonal antibody directed against
Cap binding Proteins.
Cell, 27, 5636572.
- SPIRIN S.A. (1986)
Ribosome structure and protein biosynthesis
The Benjamin/Cumming Publishing
Company, Inc.
- STUEBER D., IBRAHIMI I., CUTLER D., DOBBERSTEIN B., BUJARD H. (1984)
A noval in vitro transcription-translation system :
accurate and efficient synthesis of single proteins
from cloned DNA sequences.
The Embo Journal, 3, 3143-3148.
- TRACHSEL H., SONENBERG N., SHATKIN A.J., ROSE J.K., LEONG K.,
BERGMAN J.E., GORDON J., BALTIMORE D. (1980)
Purification of a factor that restores translation of
vesicular stomatitis virus mRNA in extracts from poli-
ovirus infected Hela-cells
Proc. Nat. Acad. Sci USA, 77, 770-774.
- VANDENHAUTE J. (1980)
Biologie moléculaire de la machinerie de synthèse pro-
téique
1. structure du RNA messenger.
Rev. Quest. Sci., 151, 145-181.
- VANDENHAUTE J. (1981)
3. Le tRNA : structure, biogenèse et rôle
Rev. Quest. Sci., 152, 76-110.
- VANDENHAUTE J., DELCOUR J. (1982)
2. structure du ribosome.
Rev. Quest. Sci., 153, 527-534.

- VENKATESAN S., GERSHOWITZ A., MOSS B. (1980)
Modification of the 5' end of mRNA
J. Biol. Chem., 255, 903-908.
- VENKATESAN S., GERSHOWITZ A., MOSS B. (1980)
Purification and characterization of mRNA guanylyl-
transferase from HeLa cells Nuclei.
J. Biol. Chem., 255, 2829-2834.
- VENKOV P.V., HADJIOLOV A.A., BATTANER E., SCHLESSINGER D. (1974)
Saccharomyces cerevisiae : sorbitol-dependant fragile
mutants.
Biochemical and Biophysical research communications
56, 599-604.
- WATSON J.D., HOPKINS N.H., ROBERTS J.W. (1987)
Molecular biology of gene.
The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc.
- ZHU J., KEMPENAERS W., VAN DER STRAETEN D., CONTRERAS R., VIERS W.
(1985)
A method for fast and pure DNA elution from agarose
gels by centrifugal filtration.
Biotechnology, 3, 1014-1016.

ERRATA

- page 1, ligne 14, lire le à la place de la
ligne 18, lire élément à la place de élèment
- page 3, ligne 8, lire déterminent à la place de déterminent
ligne 17, lire covalente à la place de convalente
- page 4b, figure 6, lire dernières à la place de dernières
- page 6, figure 8, lire synthèse à la place de synthèse
- page 7, ligne 3, lire bactériophage à la place de bactériophage
ligne 5, lire bactériophage à la place de bactériophage
ligne 23, lire infectée à la place de infecté
dernière ligne, lire le phage à la place de la phage
- page 10, ligne 23, lire supplée à la place de suplée
- page 12, ligne 2, lire extrémités à la place de extremités
ligne 8, lire avec un à la place de avec
- page 15, ligne 6, lire ajout à la place de ajoute
- page 16, dernière ligne, lire mature à la place de nature
- page 17, ligne 8, lire aux ARNm à la place de à l'ARNm
- page 28, ligne 9, lire méthyltransférases à la place de méthyltransférase
- page 29, ligne 24, lire ou à la place de où
- page 30, ligne 11, lire oocytes à la place de cocytes
ligne 12, lire récupérèrent à la place de récupèrèrent
- page 31, ligne 2, lire ribonucléoprotéique à la place de ribonucléoproteique
- page 32, ligne 8, lire S-adénosyl- à la place de S-adénolsyl-
ligne 20, lire guanylyltransférase- à la place de guanylyltransférase :
ligne 29, lire T4-ARN-ligase à la place de T4-ARN-ligose
- page 33, ligne 9, lire inhibée à la place de inhibé
- page 38, ligne 9, lire Casellas à la place de casellas
- page 41, ligne 24, lire méthyltransférases à la place de méthyltransférase
ligne 25, lire purifiées à la place de purifiée
- page 42, ligne 9, lire qui à la place de que
ligne 12, lire détectée à la place de détecté
- page 46, ligne 3, lire potter à la place de patter
ligne 6, lire homogénéisée à la place de homogénisée
- page 46, ligne 24, lire 0,469 μ Ci à la place de Ci

- page 49, ligne 3, lire Pharmacia à la place de pharmacia
 ligne 15, lire polyacrylamide à la place de polyocrylamide
- page 51, ligne 21, lire arrêtée à la place de arrêté
- page 52, ligne 16, lire l' α -lactalbumine
- page 53, ligne 12, lire la séquence codant pour le peptide α de
 ligne 15, lire la portion du gène lac Z est précédée par
 le promoteur
 ligne 19, lire le premier promoteur est reconnu par la SP6 ARM
 polymérase; le second est reconnu par la T7 ARM polymérase
- page 53b, tableau II, lire le facteur est un épisode qui code pour
 tableau II, lire lac Z Δ M15
- page 54, ligne 7, lire sup E, Hri, hsDR⁻, F', Fra D36,
 ligne 20, lire les opérateurs du F' et du plasmide pUC restent
 libres
 ligne 21, lire par le gène lac I^q normal
- page 55, ligne 20, lire - 70°C à la place de - 70 C
- page 60, ligne 15, lire éthérée à la place de étherée
- page 64, lire la séquence reconnue par l'enzyme Mac est décrite
 à la figure 12
- page 67, ligne 17, lire disposé à la place de disposée
- page 73, ligne 15, lire suggère à la place de suugère
- page 73a, l'échelle d'absorbance en ordonnée est de 0,1 par 3,5 cm
- page 74b, figure 3, ligne 3, lire éluées à la place de éluant
- page 77, ligne 4, lire moléculaire est estimé à la place de moléculaire estimé
 ligne 13, lire oligomérique à la place de oligométrique
- page 77c, tableau I, lire activité dans 2,5 μ l à la place de activité dans 2,5 l
- page 79, figure 10, lire résumé du clonage de l'ARM-C lys.
- page 80, dernière ligne, lire entières à la place de entiereté
- page 81a, figure 18, la piste b1 correspond à l'analyse d'un clone
 non-recombinant, d'une colonie bleue
 figure 19, en ordonnée, il s'agit du log. de paires de bases.
- page 85, ligne 5, lire choisis à la place de choisi
- page 86b, figure 25, ligne 4, lire 7 μ l à la place de 7 l
- page 87b, figure 27, ligne 4, lire 7 μ l à la place de 7 l
- page 89, ligne 7, lire elle-même à la place de elle même
 ligne 11, lire structures à la place de structure
 ligne 18, lire testés à la place de testé
- page 91, ligne 13., lire révélé à la place de révèlé
- page 95, ligne 21, lire radioactivité à la place de radio-activité
 ligne 25, lire moyenne à la place de moyennes
- page 97, ligne 18, lire lysozyme à la place de lyozyme

page 98, ligne 5, lire co-purifié à la place de co-purifiée

ligne 24, lire telle que à la place de tel que

ligne 25, lire radioactives à la place de radioactivés

page 99, ligne 8, lire l'ARN polymérase à la place de le ARN polymérase

De manière à faciliter le repérage des figures, leur numéro est à faire

- précéder :
- dans la partie Introduction de l'indice 1
 - dans la partie Matériel et Méthode de l'indice 2
 - dans la partie Résultats de l'indice 3

Annexe.

Détail du calcul du nombre de coiffes méthylées permettant une incorporation de 10.000 cpm.

1.- Un mélange de méthylation standard de 7,5 μ l contient
0,469 μ ci 3 H ou 31,2 pmoles de SAM tritiée (PM=399)
ou $1,89 \cdot 10^{13}$ molécules

or, 1 μ ci 3 H = $2,2 \cdot 10^6$ dpm

0,469 μ ci 3 H = $1,03 \cdot 10^6$ dpm

L'efficacité de comptage du tritium étant de 15 %,

$1,89 \cdot 10^{13}$ molécules porteuses de $-CH_3$ tritié correspond
à une radioactivité de 155.000 cpm.

2.- donc, 10.000 cpm correspondent à $1,3 \cdot 10^{12}$ molécules tritiées.

La longueur moyenne des ARNm synthétisés in vitro est de
1000 nucléotides ce qui correspond à un PM de 330.000

$6,024 \cdot 10^{23}$ molécules = 330.000 gr

$1,03 \cdot 10^{12}$ molécules = 0,75 μ gr d'ARNm tritié .

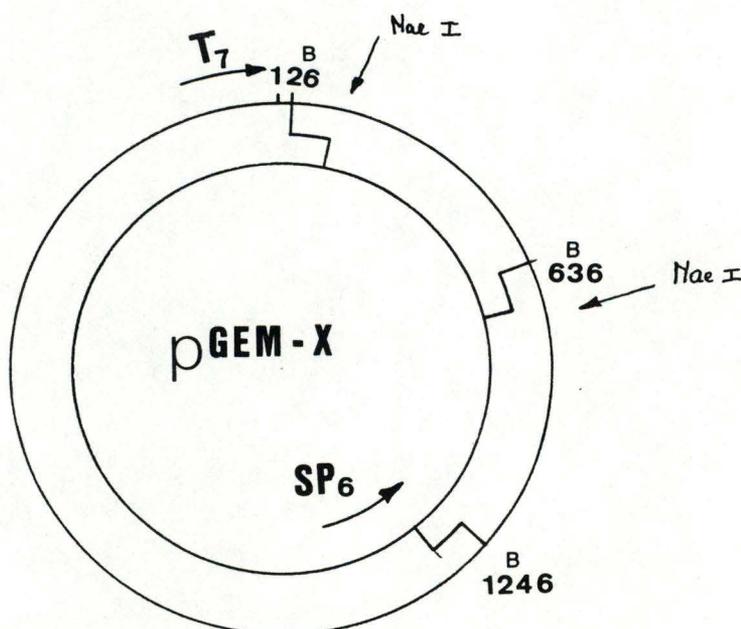


Fig. 22. Description du plasmide contenant un double c-DNA lys.