



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Création d'une souche transgénique de levure exprimant la diméthylase KsgA de E. coli

Lafontaine, Denis

Award date:
1991

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.

Création d'une souche transgénique de levure exprimant la diméthylase *KsgA* de *E.coli* .

LAFONTAINE Denis

Résumé

Deux adénines adjacentes diméthylées en position N⁶ sont présentes de façon quasi-universellement conservées à l'extrémité 3' terminale de l'ARN de la petite sous-unité ribosomique. La disponibilité d'une levure mutante pour la fonction de diméthylation devrait permettre d'attribuer un rôle fonctionnel à cette modification post-transcriptionnelle chez les eucaryotes. L'objectif de ce travail consiste à réaliser la première étape de la création d'un tel mutant, à savoir d'assurer l'expression chez la levure du gène hétérologue de la diméthylase d'*E.coli* , *KsgA* . Pour mener à bien cette expression, une fusion transcriptionnelle a été réalisée entre un site de restriction *Nco* I situé en aval d'un promoteur de levure fort et régulable et un site de restriction *Bsp* HI créé, par mutagenèse dirigée, en amont du gène *KsgA* . Un vecteur-navette autorépliatif porteur de cette construction a été introduit chez la levure par transformation. L'analyse des transformants par la technique de l'"immunoblot" a montré que la protéine est exprimé chez la levure.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1991

Promoteurs : J.Vandenhoute et J. Delcour

J'exprime ma reconnaissance aux professeurs J.Vandenhoute et J.Delcour qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et orienté tout au long de cette année.

Je remercie tous les membres du laboratoire: Déborah , Isabelle , Jean-Marc , Monique , Nathalie , Olivier , Philippe , Rose-Marie , Véronique , Anne , Xavier , Fabienne et Hervé , J.Libion et tout particulièrement Jean-Pol et Pascal , pour leurs nombreux conseils et l'ambiance chaleureuse qu'ils ont su créer et maintenir.

Je remercie messieurs J.P Cassart , E. Depiereux , F. Mainferme , F. Opperdoes qui ont accepté de lire ce mémoire.

Je remercie monsieur I. Becsei pour sa grande disponibilité.

Je remercie monsieur P.H. van Knippenberg et monsieur F. Lacroute , qui nous ont respectivement fourni les anticorps et le vecteur pFL40.

A mon frère, Maxime, mes parents et mes amis, Olivier et Laurent, pour le soutien moral qu'ils m'apportent tout au long de l'année.

A Cécile, Luc et Philippe et aux autres biologistes qui ont partagé avec moi ces quatre années d'étude.

Vedrin , août 1991.

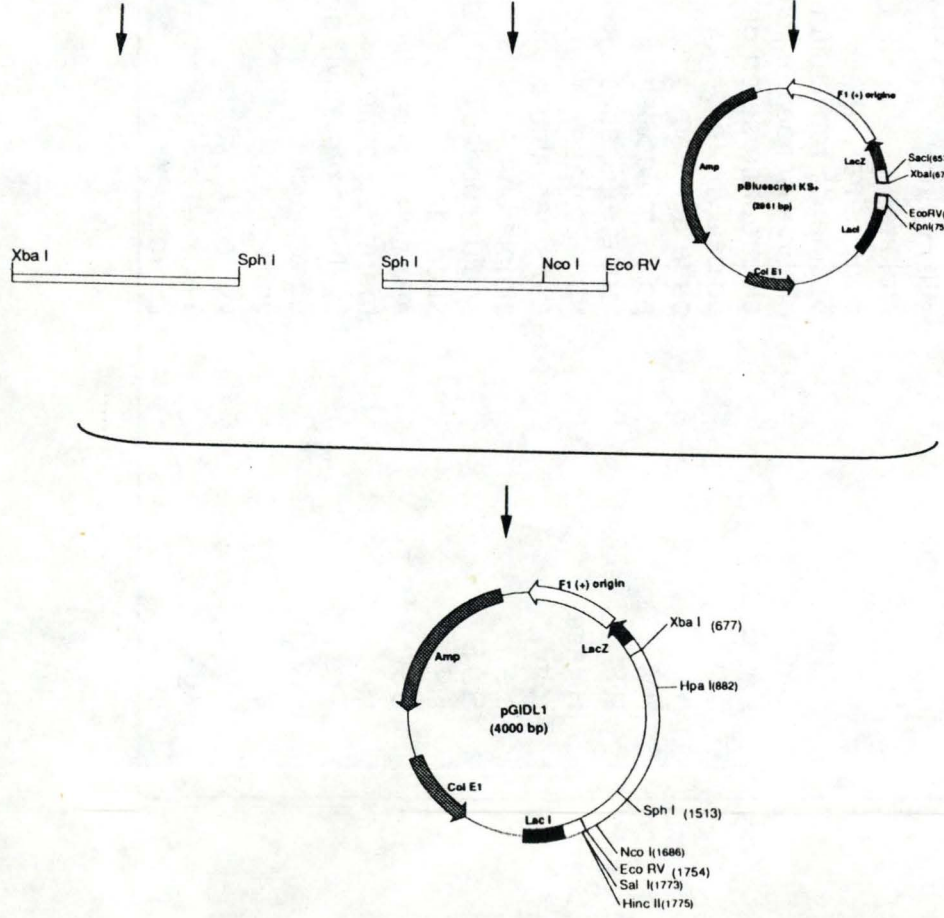
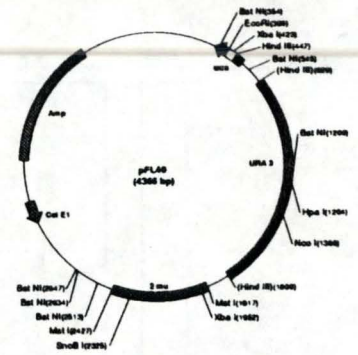
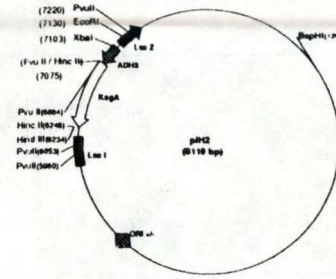
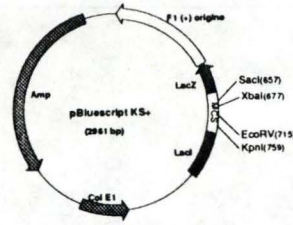
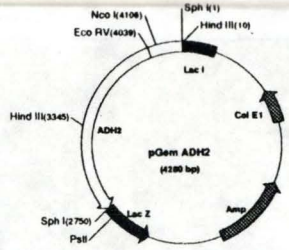
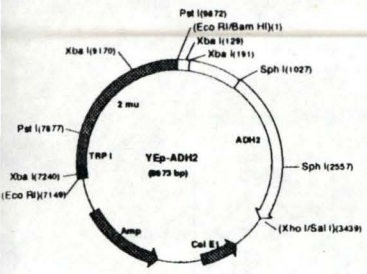
Abréviations.

5FOA	acide 5 fluoro-orotique
A	ampère
ADN	acide déoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
Br.Eth.	bromure d'éthidium
c.c	cellule compétente
conc	concentration
D.O	densité optique
d.s	double brin
DAB	3,3',4,4'-tetraaminobiphenyl
DNase	déoxyribonucléase
DTE	dithioérythritol
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylènediamine-tétraacétate
g	gramme
IPTG	isopropyl,β-D thiogalactopyranoside
kb	kilobase
l	litre
LSU-ARNr	ARN majeur de la grande sous-unité ribosomique
mA	milliampère
MCS	site multiple de clonage
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
M	molaire
nm	nanomètre
ORI	origine de réplication
OPC	oligonucléotide purification cartridge
PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide
p / v	poids / volume
pb	paire de base
PM	poids moléculaire
R.F.	forme réplivative
RNase	ribonucléase
rpm	tours par minute
s.s	simple brin
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	seconde
SSU-ARNr	ARN majeur de la petite sous-unité ribosomique
t.s	thermosensible
Tris	tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
U.V	ultra-violet
V	volt
v / v	volume / volume
Xgal	5 bromo-4chloro-3indolyl-β-Dgalactopyranoside
μl	microlitre

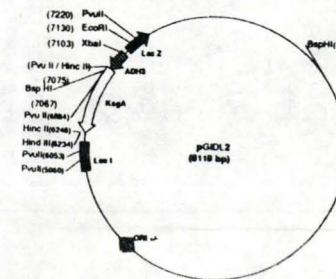
I. Reconstitution d'un promoteur de levure:

II. Aménagement de KsgA:

III. Assemblage:



Mutagenèse dirigée.



Symboles.

DIM = allèle ou locus dominant.

dim = allèle ou locus récessif.

Chapitre 1: Introduction générale.

1. Avant-propos.

..... 1

2. Le fonctionnement général du ribosome est conservé dans le mécanisme de la traduction.

..... 2

3. Le ribosome est une structure bien conservée.

..... 3

3.1. Conservation de la configuration générale du ribosome..... 3

3.2. Conservation de l'architecture moléculaire du ribosome..... 4

3.3. Conservation de la structure secondaire du ribosome..... 4

3.4. Conservation d'une modification particulière des SSU-ARNr: la double diméthylation 3'-terminale..... 5

3.4.1. La méthylation des ARNr..... 5

3.4.2. La double diméthylation $m^6_2Am^6_2A$ est extrêmement conservée..... 6

3.5. Rôle de la double diméthylation $m^6_2Am^6_2A$ 7

Chapitre 2: But du travail.

..... 10

Chapitre 3: Matériel et méthodes.

1. Matériel.

.....	12
1.1. Tampons et solutions.....	12
1.1.1. Tampons.....	12
1.1.2. Solutions.....	15
1.2. Souches, plasmides et phages.....	16
1.2.1. Souches de bactéries.....	16
1.2.2. Souche de levure.....	17
1.2.3. Plasmides.....	17
1.2.4. Stockage de l'ADN et des souches.....	19
1.3. Milieux de culture.....	19
1.3.1. Milieux de culture pour bactéries.....	19
1.3.1.1. Milieux riches.....	19
1.3.1.2. Milieu minimum: M9.....	19
1.3.2. Milieux de culture pour levures.....	20
1.3.2.1. Milieu riche.....	20
1.3.2.2. Milieu minimum.....	20
1.3.3. Milieux de transformation de bactéries par des phages.....	20

2.Méthodes.

2.1.Techniques générales relatives aux protéines.

.....	21
2.1.1.Lyse de culture de bactéries.....	21
2.1.2.Lyse de culture de levures.....	21
2.1.3.Dosage de protéines (selon Bradford).....	21
2.1.4.Electrophorèse en gel SDS polyacrylamide.....	22
2.1.4.1.Montage et préparation du gel.....	22
2.1.4.2.Préparation du marqueur de taille.....	23
2.1.4.3.Préparation des échantillons.....	23
2.1.5.Coloration au Bleu de Coomassie.....	23
2.1.6.Immunoblot.....	23
2.1.6.1.Le principe de l' "Immunoblot".....	23
2.1.6.2.Le "blotting".....	24
2.1.6.3.Réaction avec les anticorps.....	24

2.2.Techniques générales relatives à l'ADN.

2.2.1.Extraction au phénol.....	26
2.2.2.Electrophorèse analytique sur gel d'agarose.....	26
2.2.2.1.Critères de séparation des fragments d'ADN.....	26
2.2.2.2.Visualisation de l'ADN sur le gel.....	27
2.2.2.3.Estimation de la taille des fragments.....	27
2.2.2.4.Estimation de la quantité des fragments.....	27
2.2.2.5.Mise en oeuvre.....	28
2.2.3.Electrophorèse préparative et purification de fragments d'ADN.....	28

2.3. Techniques de l'ADN recombinant.

.....	30
2.3.1. Constructions génétiques.....	30
2.3.1.1. Principe général.....	30
2.3.1.2. Restriction.....	31
2.3.1.3. Ligation.....	31
2.3.1.4. Transformation.....	32
2.3.1.4.1. Transformation bactérienne.....	32
2.3.1.4.1.1. Préparation de cellules compétentes au CaCl ₂	32
2.3.1.4.1.2. Transformation par un plasmide.....	32
2.3.1.4.1.3. Contrôles de transformation.....	33
2.3.1.4.1.4. Transformation par le phage M13.....	33
2.3.1.4.2. Transformation de levure.....	33
2.3.1.4.3. Méthodes de sélection des transformants et des recombinants.....	34
2.3.2. Préparation de vecteurs d'ADN.....	35
2.3.2.1. Minipréparation d'ADN à double brin.....	35
2.3.2.2. Midipréparation d'ADN à double brin.....	36
2.3.2.3. Maxipréparation d'ADN à double brin.....	36
2.3.2.4. Minipréparation de M13 à simple brin.....	37
2.3.2.5. Maxipréparation de M13 à simple brin.....	38
2.3.2.6. Préparation de M13 à double brin.....	40
2.3.3. Mutagenèse dirigée (AMERSHAM kit).....	41
2.3.3.1. Principe.....	41
2.3.3.2. Cycle de vie du phage M13.....	41

2.3.3.3.Synthèse de l'oligonucléotide mutant.....	42
2.3.3.3.1.Principe de la synthèse de l'oligonucléotide.....	42
2.3.3.3.2.Récupération de l'oligonucléotide.....	42
2.3.2.2.1.Traitement au NH ₄ OH.....	42
2.3.2.2.2.Purification sur colonne OPC.....	43
2.3.2.2.3.Phosphorylation de l'extrémité 5'.....	43
2.3.3.4.Réaction de mutagénèse dirigée.....	43
2.3.3.4.1.Hybridation de l'oligonucléotide mutant à la matrice M13 à simple brin.....	43
2.3.3.4.2.Synthèse et ligation du brin mutant.....	44
2.3.3.4.3.Elimination du simple brin non mutant par filtration.....	44
2.3.3.4.4.Restriction du brin d'ADN non mutant par l'enzyme <i>Nci</i> I.....	44
2.3.3.4.5.Digestion du brin non mutant par l'Exonucléase III.....	45
2.3.3.4.6.Repolymérisation et ligation.....	45
<u>2.3.4.Le Séquençage.....</u>	45
2.3.4.1.Principe du séquençage.....	45
2.3.4.2.Réaction de séquençage.....	46
2.3.4.2.1.Dénaturation.....	46
2.3.4.2.2.Hybridation ("Annealing").....	46
2.3.4.2.3.Marquage radioactif ("Labelling").....	47
2.3.4.2.4.Terminaison.....	47
2.3.4.3.Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	47
2.3.4.3.1.Préparation des plaques.....	47
2.3.4.3.2.Préparation du gel.....	47
2.3.4.3.3.Migration des échantillons et autoradiographie.....	48

Chapitre 4: Résultats.

1. Constructions génétiques.

1.1. Introduction.....	49
1.2. Stratégie générale.....	49
1.3. Reconstitution du promoteur du gène <i>ADH2</i> de levure.....	50
1.3.1. Préparation des fragments.....	50
1.3.1.1. Préparation du premier fragment du promoteur du gène <i>ADH2</i> à partir du vecteur YEpADH2.....	50
1.3.1.2. Préparation du second fragment du promoteur du gène <i>ADH2</i> à partir du vecteur pGemADH2.....	51
1.3.1.3. Préparation du vecteur de clonage pBluescript KS+.....	51
1.3.2. Ligation triple.....	52
1.3.3. Transformation de la souche bactérienne XL1 blue par le mélange de ligation.....	52
1.3.4. Criblage des transformants et identification du vecteur pGIDL1.....	52
1.3.5. Vérification par séquençage de l'intégrité du promoteur du gène <i>ADH2</i>	53
1.3.6. Conclusion.....	53

1.4. Aménagement du gène de la diméthylase d' <i>E.coli</i> par mutagenèse dirigée en vue de sa fusion au promoteur du gène <i>ADH2</i>	54
1.4.1. Réaction de mutagenèse	54
1.4.1.1. Définition de l'oligonucléotide primer de la mutagenèse	54
1.4.2.2. Mutagenèse proprement dite et isolement du mutant	55
1.4.2.2.1. Préparation de pIH2 à simple brin.....	55
1.4.2.2.2. Réaction de mutagenèse.....	55
1.4.2.2.3. Identification des mutants.....	56
1.4.2. Conclusion	56
1.5. pGIDL3: Assemblage du promoteur du gène <i>ADH2</i> reconstitué et du gène <i>KsgA</i> de la diméthylase d' <i>E.coli</i>	57
1.5.1. Préparation des fragments	57
1.5.1.1. Préparation du promoteur du gène <i>ADH2</i> à partir du vecteur pGIDL1	57
1.5.1.2. Préparation du gène de la diméthylase d' <i>E.coli</i> à partir du vecteur pGIDL2	58
1.5.1.3. Préparation du vecteur de clonage pFL40	58
1.5.2. Ligation triple	59
1.5.3. Transformation de la souche bactérienne XL1-blue par le mélange de ligation	60
1.5.4. Criblage des transformants et identification du vecteur pGIDL3	60
1.5.5. Conclusion	60

2. Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par pGIDL3 et vérification de l'expression de la diméthylase chez les levures transformées.

2.1. Introduction..... 61

2.2. Stratégie générale..... 61

2.3. Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par pGIDL3..... 62

2.4. Vérification de l'expression de la diméthylase d' *E.coli* chez les levures transformées..... 62

2.4.1. Préparation des extraits protéiques..... 62

2.4.2. Mise en évidence de l'expression de la diméthylase par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS et coloration au Bleu de Coomassie..... 63

2.4.3. Mise en évidence de l'expression de la diméthylase par détection immunologique..... 64

2.5. Conclusion..... 64

Chapitre 5: Conclusions générales et perspectives.

..... 65

Chapitre 6: Bibliographie.

..... 71

1.INTRODUCTION.

Chapitre 1: Introduction générale.

1. Avant-propos.

La traduction est une étape-clé de l'expression des gènes au cours de laquelle une information contenue dans une séquence nucléotidique d'ARN est convertie en une séquence d'acides aminés de protéine responsable des caractéristiques phénotypiques des organismes vivants. Dans toute cellule, le processus de décodage est accompli par un complexe ribonucléoprotéique conservé à travers l'évolution, le ribosome.

Il est généralement admis que la régulation de l'expression des gènes, au niveau traductionnel, se réalise principalement pendant la première étape de la traduction, soit l'étape d'initiation. Chez les procaryotes, l'initiation de la traduction requiert une interaction, dite de "Shine-Dalgarno", entre une séquence de nucléotides présente sur l'extrémité 3'-terminale de la molécule d'ARNr de la petite sous-unité ribosomique et une séquence complémentaire présente sur l'ARNm. Cette interaction permet au ribosome de se positionner correctement sur l'AUG initiateur. Chez les eucaryotes, comme nous le verrons plus loin, le mécanisme d'initiation de la traduction est plus complexe et ne relève pas, dans l'extême majorité des cas, du même principe.

Deux adénines contiguës diméthylées en position N⁶, formant la séquence m⁶₂Am⁶₂A, sont présentes de manière quasi-universellement conservée sur l'extrémité 3'-terminale de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique, sur une structure secondaire en épingle à cheveux elle-même extrêmement conservée évolutivement. Un rôle fonctionnel dans l'étape d'initiation a été attribué à ces groupements méthyles chez les procaryotes. Ces résultats ne sont pas extrapolables aux eucaryotes dans la mesure où ils manifestent précisément un mécanisme d'initiation différent.

A terme, l'objectif de la recherche entreprise par le laboratoire est d'élucider le rôle fonctionnel joué par la séquence m⁶₂Am⁶₂A chez les eucaryotes. Dans ce but, nous utiliserons comme modèle la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cet ascomycète unicellulaire constitue un organisme de choix pour l'étude du mécanisme complexe qui régit l'étape d'initiation de la traduction chez les eucaryotes car il se prête bien, d'une part, à l'utilisation de techniques génétiques puissantes et d'autre part, aux diverses analyses biochimiques.

2. Le fonctionnement général du ribosome est conservé dans le mécanisme de la traduction.

Deux mécanismes sont nécessaires à l'expression de l'information génétique d'une séquence nucléotidique d'ADN en une séquence d'acides aminés: la transcription qui fournit, à partir de la molécule bicaténaire d'ADN, une matrice monocaténaire, l'ARNm, et la traduction qui utilisant cette dernière produit la protéine.

Cinq partenaires interviennent au cours de la traduction:

- 1) l'ARNm sert de matrice, sa séquence détermine celle de la protéine.
- 2) les aminoacyls-ARNt portent d'une part un anti-codon complémentaire d'un codon présent sur le messenger, d'autre part, sur leur extrémité 3', l'acide aminé correspondant.
- 3) divers facteurs protéiques solubles (d'initiation, d'élongation et de relargage).
- 4) une source énergétique (hydrolyse du GTP en GDP et Pi).
- 5) et enfin le ribosome ou le "centre de contrôle" de la synthèse protéique.

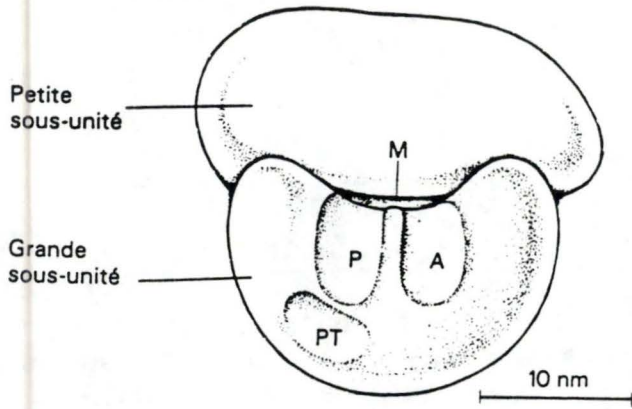
Globalement, le mécanisme de la traduction est conservé évolutivement et se déroule en trois étapes: initiation, élongation et terminaison (fig 1.1). Le rôle joué par le ribosome dans chacune de ces étapes est lui-même conservé évolutivement.

Les différences rencontrées au sein des ARNm procaryotes (fig 1.2) et eucaryotes (fig 1.3), justifient entre autres celles que ces deux types cellulaires présentent au niveau de l'étape d'initiation de la traduction.

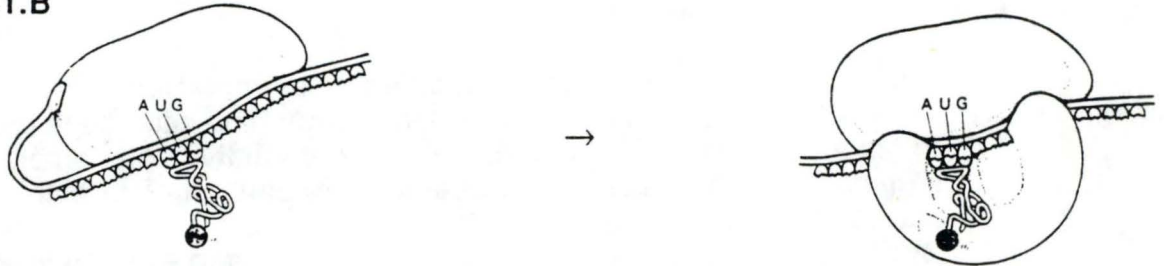
Chez les procaryotes, la mise en phase correcte du ribosome sur l'AUG initiateur repose sur une interaction dite de "Shine-Dalgarno". Celle-ci s'effectue entre une séquence-consensus présente à l'extrémité 5'-terminale de l'ARNm, à 7 à 10 nucléotides en amont de l'AUG initiateur, et une séquence complémentaire jouxtant l'"hairpin" 3'-terminale de l'ARNr 16 S de la petite sous-unité 30 S du ribosome procaryotique (fig 1.4 et 1.5). Notons dès à présent que l'appariement de ces deux séquences complémentaires requiert la déstabilisation de l'"hairpin" 3'-terminale. La figure 1.6 résume les différentes étapes de la formation du complexe d'initiation chez les procaryotes.

Chez les eucaryotes, le mécanisme d'initiation de la traduction n'implique pas une interaction de "Shine-Dalgarno". La "Cap Binding Protein" (CBP) ou facteur d'initiation eIF-4E permet à la petite sous-unité ribosomique 40 S eucaryote de reconnaître la coiffe 5'-terminale de l'ARNm, de s'y fixer et de glisser le long de celui-ci. La migration de la petite sous-unité 40 S s'arrête lorsqu'elle rencontre un codon d'initiation dans un contexte favorable. C'est le modèle de "threading-scanning" de Kozak (Kozak, 1984 et 1989). La figure 1.7 résume les différentes étapes de la formation du complexe d'initiation chez les eucaryotes.

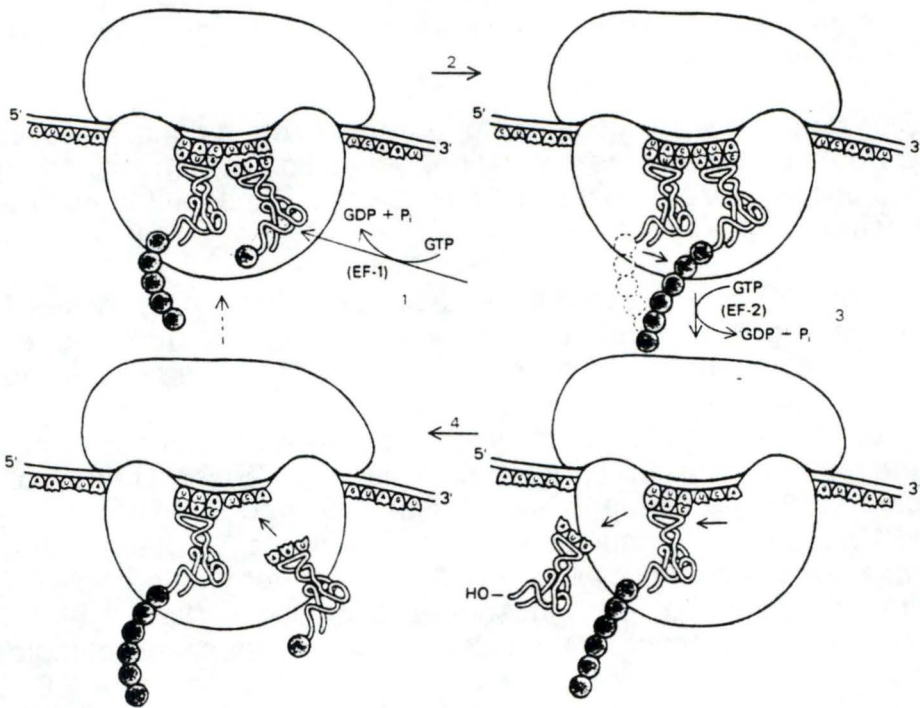
1.1.A



1.1.B



1.1.C



1.1.D

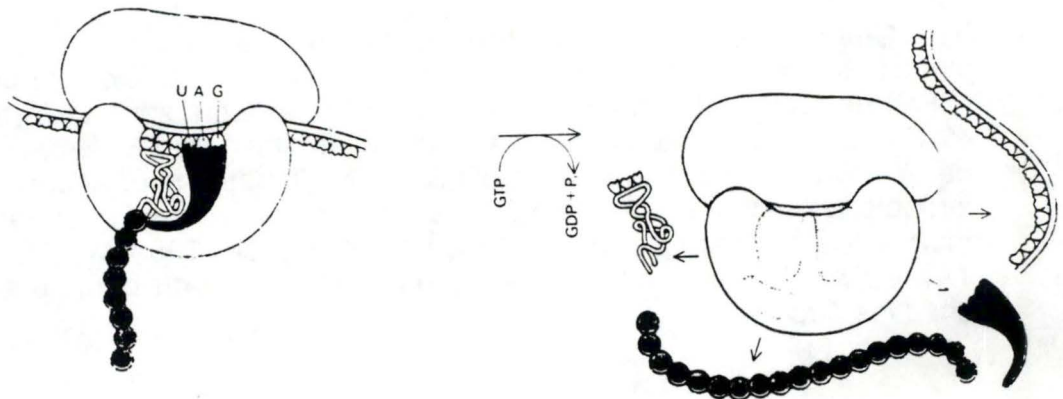


fig 1.1: Les étapes de la traduction (de Duve, 1987).

C'est dans la plus grande des deux sous-unités ribosomiques que se situe la peptidyl transférase (PT, fig 1.1.A). Dans cette grande sous-unité, le site P, pour peptidyle, porte le peptide en formation et le site A, pour aminoacyl, porte l'aminoacyl-ARNt qui va être incorporé.

1) initiation: (fig 1.1 B)

La petite sous-unité ribosomique en se fixant à l'ARNm met en évidence le codon initiateur (AUG, GUG, rarement UUG) qui est reconnu par l'ARNt initiateur. Ensuite, la grande sous-unité se fixe à la petite. Différents facteurs protéiques interviennent lors de cette étape.

2) élongation: (fig 1.1.C)

Le facteur eEF1 assure l'ajustement codon / anti-codon. Il apporte au site A les aminoacyl-ARNt dans la bonne orientation et transporte une molécule de GTP qui est hydrolysée dès que l'ajustement est réalisé.

La chaîne peptidique en formation est transférée du site P au site A par la peptidyl transférase. Cette transpeptidation se traduit par l'allongement de la chaîne d'un résidu.

Le peptidyl-ARNt en cours d'élongation subit une translocation du site A vers le site P, ce qui déplace l'ARNt libre et fait progresser le ribosome sur le messager (ceci se réalise en présence du facteur d'élongation eEF2 et au prix de l'hydrolyse d'un GTP).

3) terminaison: (fig 1.1.D)

C'est un facteur de relargage, et non un ARNt, qui reconnaît le codon stop (UAA, UAG ou UGA). Les différents éléments du complexe sont libérés suite à l'hydrolyse d'une molécule de GTP.

fig 1.2: Le messenger procaryote.

Le messenger procaryote représente, dans la majorité des cas, plusieurs gènes, il est polycistronique. Dans l'unique compartiment cellulaire, sa traduction débute alors que sa transcription, à partir d'un groupe de gènes adjacents (opéron), n'est pas encore achevée. Les extrémités 5' et 3' du messenger ainsi que les régions inter-cistroniques ne sont pas traduites. A une distance de 7, 8 nucléotides en amont des AUG initiateurs, se trouve un consensus de séquence, dit de "Shine-Dalgarno", complémentaire d'un fragment de la séquence présente à l'extrémité 3' terminale de l'ARNr 16 S de la petite sous-unité ribosomique, soit 5'...CCUCC...3'. Un seul des trois codons initiateurs (AUG, GUG et UUG) et un seul des trois codons stop (UAA, UAG et UGA) ont été représentés.

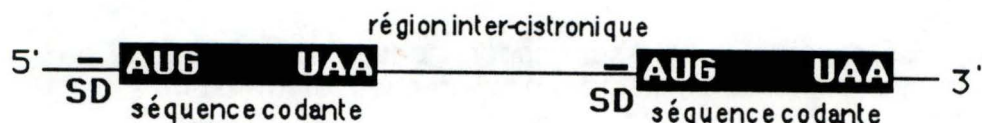


fig 1.3: Le messenger eucaryote.

Le messenger eucaryote ne représente qu'un seul gène, il est monocistronique. Sa transcription dans le noyau sous la forme d'un précurseur (ARNhn: hétérogène nucléaire) est suivie de plusieurs modifications post-transcriptionnelles. Parmi celle-ci, l'addition d'une coiffe 5'-terminale, la polyadénylation 3'-terminale, des méthylations internes et l'épissage.

L'ARNm eucaryote mature présente deux régions non traduites: la séquence leader et la séquence trailer. La région leader contient de nombreuses structures secondaires, suite à l'appariement de bases complémentaires, ayant un effet non négligeable sur l'initiation de la traduction en interagissant avec les facteurs protéiques qui y prennent part (eIF's). La fonction de la région trailer est moins bien cernée, cependant on sait que dans certains cas elle affecte la stabilité du messenger produit (Zaret *et al*, 1984).



fig 1.6: Initiation de la traduction chez les procaryotes (Lewin, 1988).

L'aminocyl-ARNt initiateur, soit le fmet ARNt^f, est le seul à pouvoir participer à la réaction d'initiation, car il forme un complexe binaire avec le facteur IF2.

Le complexe binaire s'associe avec le complexe 30 S-ARNm, ce qui introduit l'ARNt dans un site P partiel (car la sous-unité 50 S n'est pas encore présente). Le facteur IF3 est nécessaire à la dissociation des ribosomes en vue de l'obtention de sous-unités 30 S et à la liaison spécifique des sous-unités 30 S au site d'initiation de l'ARNm.

L'hydrolyse d'un GTP permet à la sous-unité 50 S de se joindre au complexe précédemment formé et les facteurs protéiques initiateurs sont libérés.

Le rôle du facteur IF1 n'est pas défini, il stabilise probablement le complexe ARNm-sous-unité 30 S.

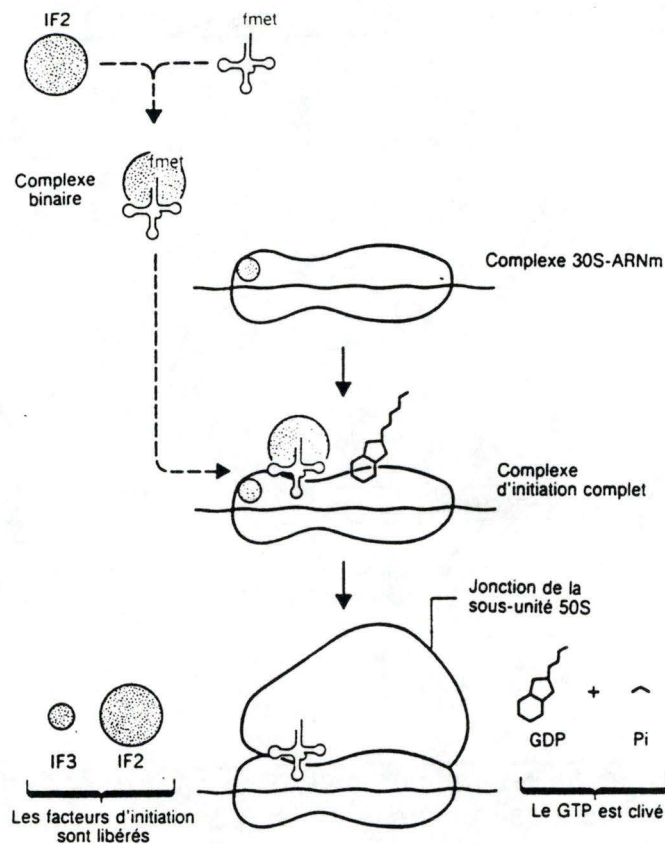


fig 1.7: Initiation de la traduction chez les eucaryotes (Linder *et al*, 1990 - Rhoads, 1988 - Pain, 1986).

L'initiation de la traduction chez les eucaryotes fait appel à un nombre plus important de facteurs protéiques, une douzaine, et la coiffe 5'-terminale, absente des ARNm procaryotes, y joue un rôle important.

1) formation du complexe 43 S:

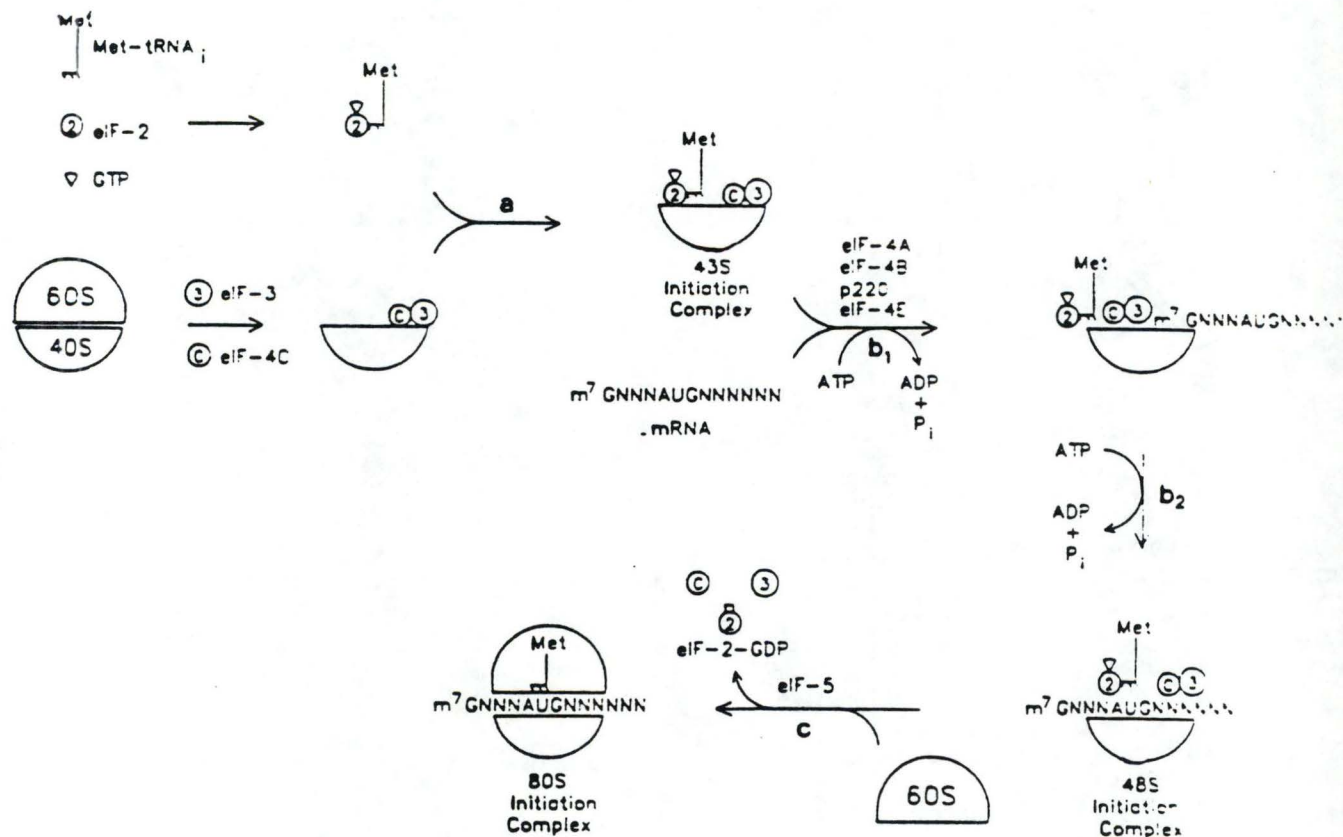
L'hydrolyse d'un GTP entraîne une augmentation de l'affinité du facteur eIF-2 pour l'ARNt méthionylé initiateur. En l'absence du messager, le complexe ternaire obtenu se fixe à la petite sous-unité ribosomique 40 S, lorsque celle-ci a contracté les facteurs eIF-3 et eIF-4C.

2) formation du complexe 48 S:

Le facteur eIF-4E ou CPB se lie spécifiquement à la coiffe (plus précisément à sa guanine méthylée en position 7). La sous-unité 40 S peut entamer le "scanning" du messager, le facteur eIF-4F (soit eIF-4E + eIF-4A + p22C) relaxant les structures secondaires présentes dans la région leader 5'-terminale du messager.

3) formation du complexe 80 S:

Lorsqu'un codon AUG est reconnu comme initiateur, la sous-unité 60 S s'adjoint au complexe précédemment formé grâce à l'intervention du facteur eIF-5. Les autres facteurs protéiques initiateurs sont libérés.



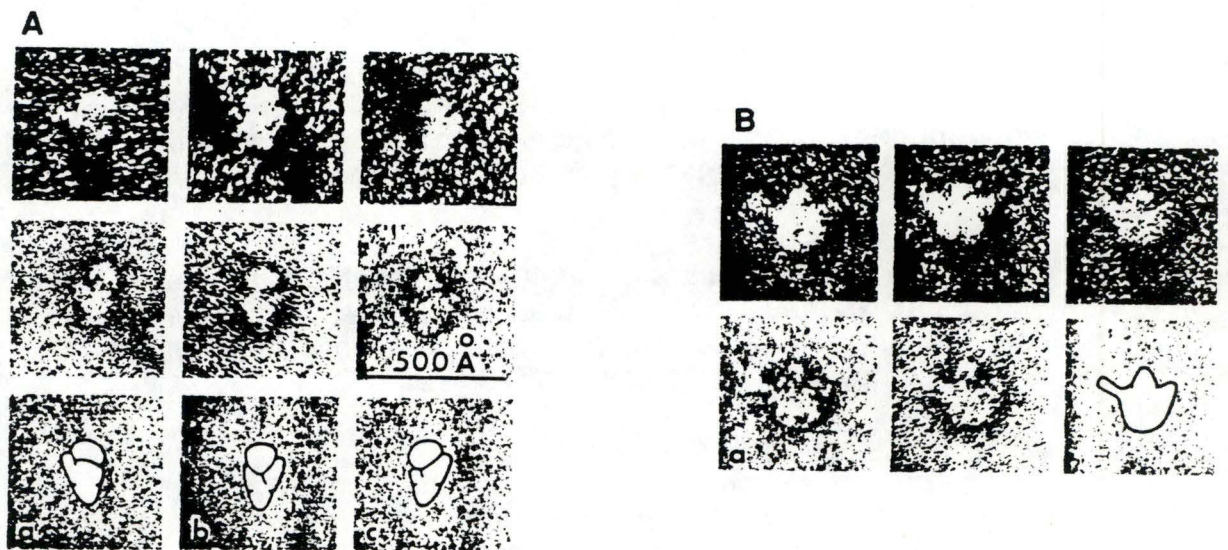


fig 1.8: Aspect du ribosome en microscopie électronique (Spirin, 1986).
A. micrographie de sous-unité 30S de ribosome de *E. coli* .
B. micrographie de sous-unité 50S de ribosome de *E. coli* .

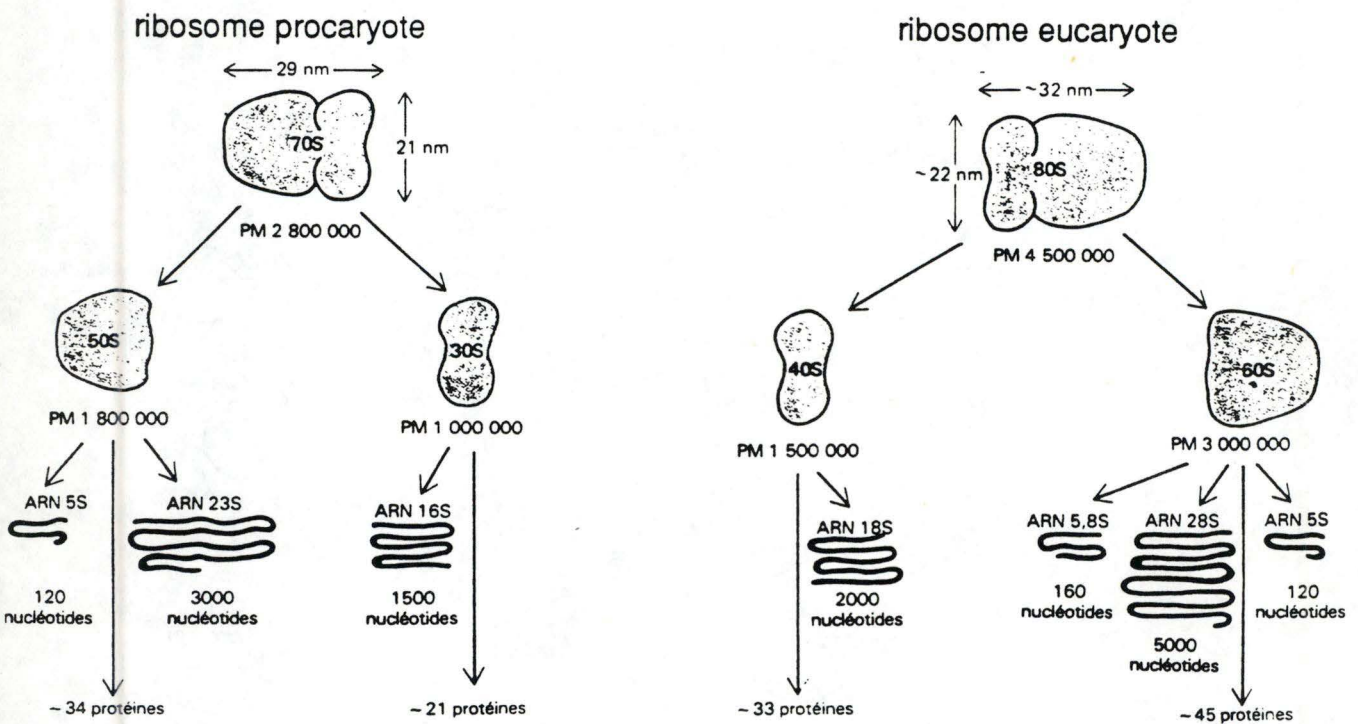


fig 1.9: Représentation schématique des constituants des ribosomes procaryotiques et eucaryotiques (Alberts *et al* , 1983).

Signalons cependant que des études ont, à l'encontre du modèle de Kozak, essayé de mettre en évidence l'existence chez les eucaryotes d'une interaction directe au site d'initiation entre l'ARN du ribosome et celui du messager, comme cela se produit chez les procaryotes par l'interaction de "Shine-Dalgarno" (Cavener et Stuart, 1991 - Sargan *et al*, 1982). Dans certains cas, très particuliers, l'hypothèse d'une telle initiation de la traduction eucaryote qui soit indépendante de la coiffe demeure intéressante (Pelletier *et al*, 1988 - Capieaux *et al*, 1989).

Malgré quelques spécificités, concernant l'étape d'initiation, on peut considérer le ribosome comme "traducteur universel", ayant comme rôle conservé de catalyser le décodage de la séquence nucléotidique du messager. Face à cette conservation de fonction, on doit s'attendre à découvrir des homologues de structure.

3.Le ribosome est une structure bien conservée.

3.1.Conservation de la configuration générale du ribosome.

En microscopie électronique, les ribosomes isolés apparaissent comme des particules rondes et compactes de forme légèrement oblongue et d'une dimension comprise entre 250 et 300 Å (Spirin, 1986) (fig 1.8). Une subdivision sépare deux sous-unités, la taille de la plus petite correspondant environ à la moitié de celle de la plus grande. Le coefficient de sédimentation, qui dépend de la masse et de la forme des particules, caractérise le ribosome et ses constituants (fig 1.9).

En fonction de leur origine, on définit cinq classes de ribosomes (Raué *et al*, 1988). Il s'agit des ribosomes 70 S de bactéries, des ribosomes 80 S du cytoplasme eucaryote, des ribosomes d'archéobactéries, des ribosomes de chloroplastes et de ceux de mitochondries. Remarquons que les ribosomes de chloroplastes de plantes supérieures ressemblent aux 70 S bactériens, et que la classe des mitoribosomes est très hétérogène (Curgy, 1985).

Bien que chaque classe de ribosomes comporte des spécificités, la configuration générale de ceux-ci est conservée.

sous-unité	ARNr	nombre de nucléotides
SSU 30 S	16 S	1500 à 1600 1542 <i>E.coli</i> 1661 mitochondrie de levure
SSU 40 S	18 S (ou 17 S)	+/- 1800 1789 pour le 17 S de levure 1874 pour le 18 S de rat
LSU 50 S	23 S	3000 2904 <i>E.coli</i>
LSU 60 S	28 S (ou 25 S)	3392-3393 pour le 25 S de levure 4700-4800 pour le 28 S de rat
LSU 50 S et LSU 60 S	5 S	120 <i>E.coli</i> 120-121 eucaryote

tableau 1.10: Les ARNr ribosomaux (Warner, 1989 - Spirin, 1986 - Brimacombe *et al*, 1985). SSU= small subunit et LSU= large subunit.

L'ARNr 5,8 S et l'ARNr 28 S (ou 25 S) sont liés par ponts hydrogènes au sein de la grande sous-unité eucaryote 60 S. A ce titre, l'ARNr 5,8 S n'est pas repris indépendamment du 28 S dans le tableau présenté ci-dessus.

origine du ribosome:	LSU	SSU
<i>E.coli</i>	34	21
chloroplastes	22-24	32-35
mitochondries de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38	33
mitochondries animales	52	33
cytoplasme de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44	32

tableau 1.11: Variations dans le nombre de protéines ribosomales (Curgy, 1985).

3.2.Conservation de l'architecture moléculaire du ribosome.

Tous les ribosomes partagent la même architecture moléculaire, ce sont des ribonucléoprotéines. Chaque sous-unité contient une molécule d'ARN de haut poids moléculaire, ARNr majeur, associé avec un nombre élevé de protéines ribosomales ("r proteins") (fig 1.9 et tableau 1.10).

La grande sous-unité contient en outre un ou deux ARNr de poids moléculaire plus faible, les ARNr mineurs. Ainsi, l'ARNr 5 S est présent chez tous les ribosomes excepté ceux de mitochondries. L'ARNr 5,8 S caractérise les ribosomes cytoplasmiques eucaryotes et le 4,5 S les ribosomes de chloroplastes de plantes supérieures. Ces deux derniers sont homologues respectivement de la région 5' et 3' terminale de l'ARN majeur de la grande sous-unité du ribosome de *E.coli*, c'est à dire l'ARNr 23 S.

Dans la suite de l'exposé, l'ARN de la petite sous-unité ribosomique sera noté SSU-ARNr, celui de la grande sous-unité ribosomique LSU-ARNr.

L'ARNr qui représente une proportion importante de la masse du ribosome y joue un rôle très important car il y détermine la plupart des caractéristiques structurales et fonctionnelles. Notons, entre autre, que l'association des deux sous-unités, en un ribosome complet, semble dépendre de l'affinité spécifique des deux ARNr majeurs. Cependant, l'ARNr, bien qu'indispensable, n'est pas suffisant à l'activité ribosomale. En effet, la configuration fonctionnelle n'est obtenue que lorsque des protéines s'y associent.

Le tableau 1.11 souligne la variation du nombre de protéines ribosomales que l'on rencontre en comparant différentes catégories évolutives.

Bien qu'une certaine variabilité relative au nombre des constituants et à leur taille soit observée, la composition globale du ribosome est effectivement conservée.

3.3.Conservation de la structure secondaire du ribosome.

Des comparaisons évolutives ont pu être réalisées entre ribosomes procaryotiques, eucaryotiques et d'organelles à l'aide des nombreuses structures primaires d'ARNr connues. Celles-ci sont déterminées soit par séquençage direct, soit par séquençage des ADNr correspondants (Brimacombe *et al*, 1985).

Des modèles de la structure secondaire d'ARNr ont été élaborés à partir de ces structures primaires. L'ARN est une molécule monocaténaire qui forme de nombreuses structures secondaires de type "hairpin", épingles à cheveux, suite à l'appariement de bases complémentaires. La structure secondaire générale d'un ARNr consiste donc en une succession d'épingles à cheveux entrecoupées de courtes séquences monocaténaires.

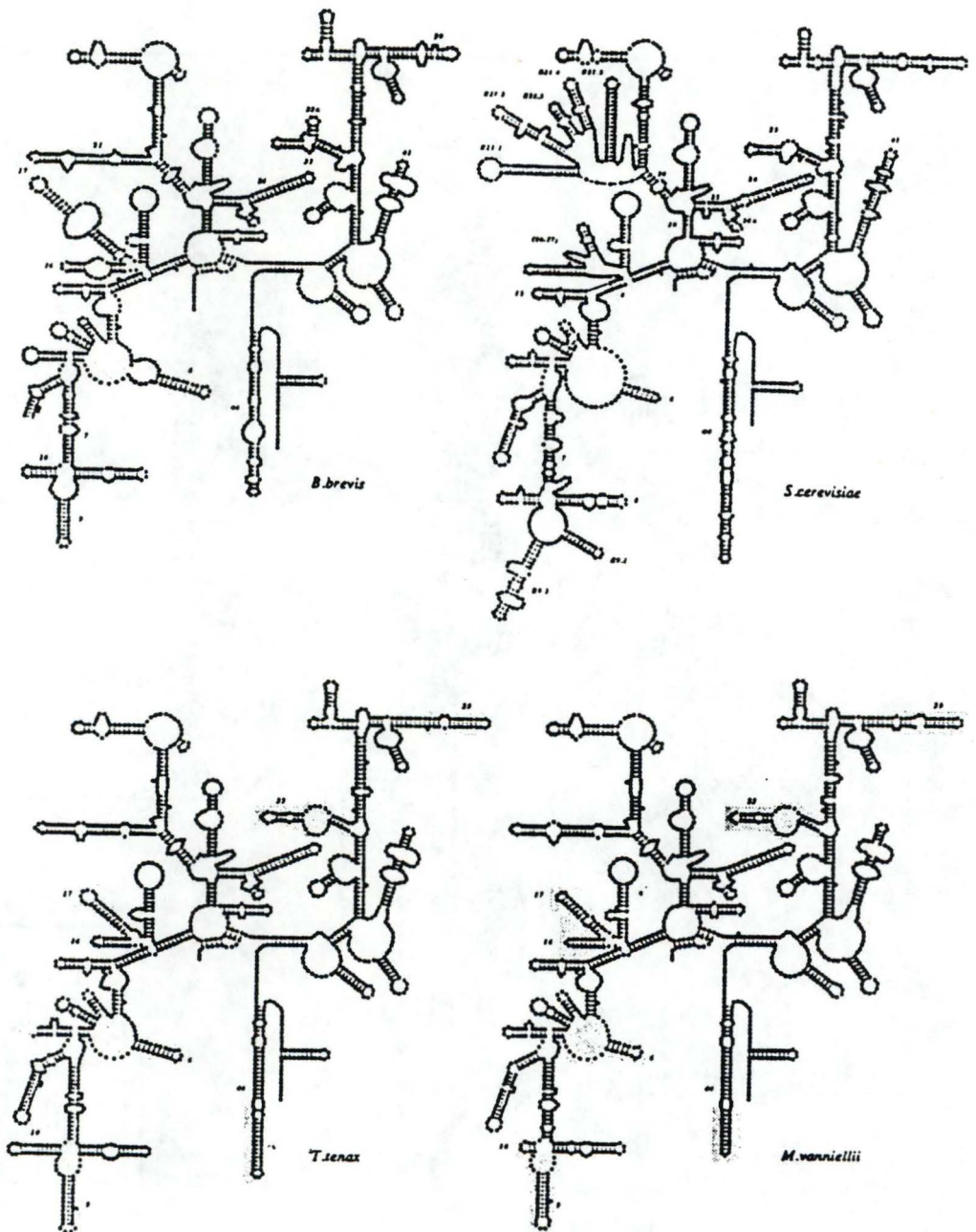


fig 1.12: Comparaison de la structure secondaire de divers SSU-ARNr (Raué et al , 1988). La figure présente le SSU-ARNr d'une eubactérie (*Bacillus brevis*), d'un eucaryote (*Saccharomyces cerevisiae*) et de deux archéobactéries (*Thermoproteus tenax* et *Methanococcus vannielii*).

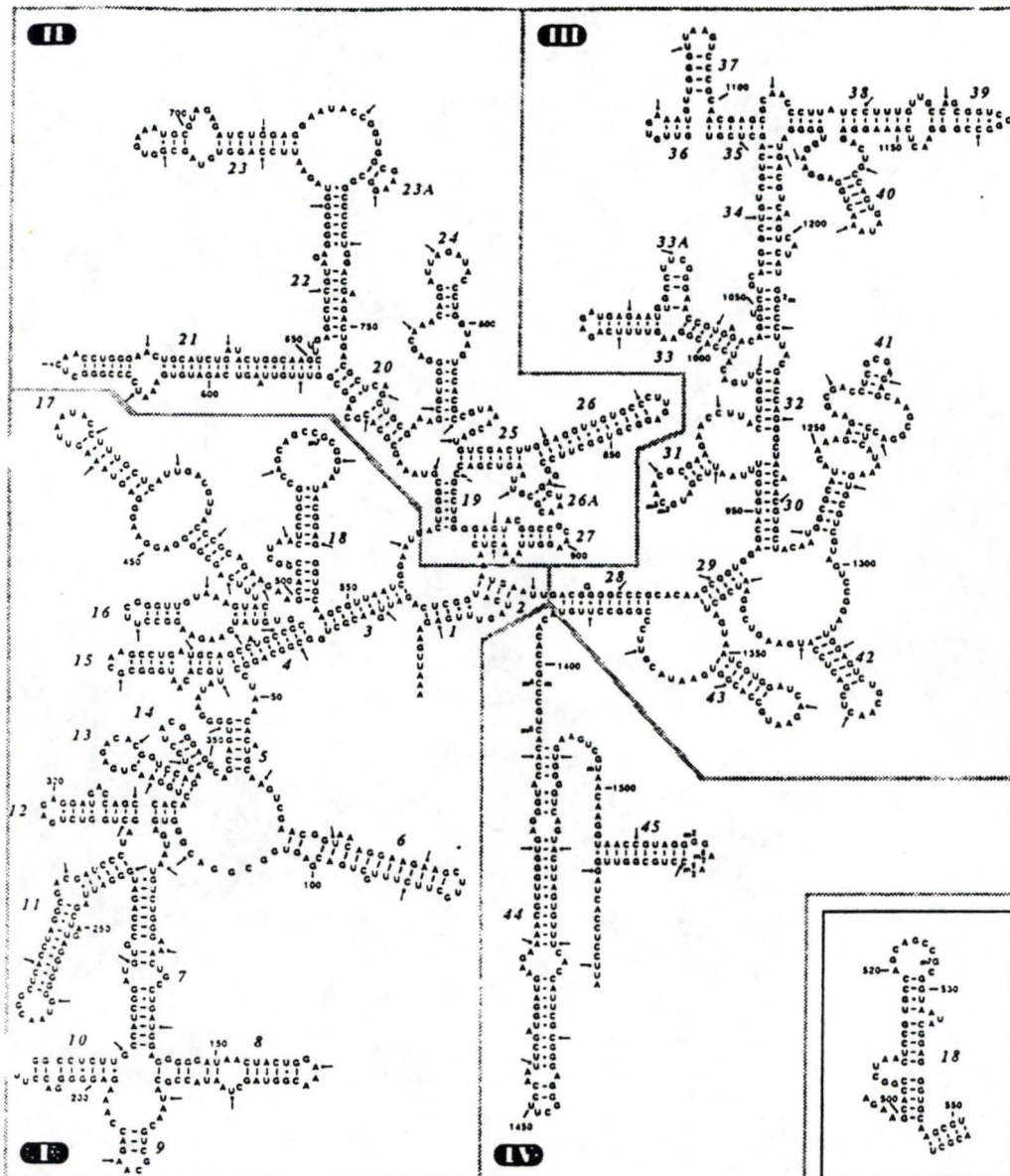


fig 1.13: Modèle de la structure secondaire de l'ARNr 16 S de *E. coli* (Noller *et al* , 1986).

Cette structure secondaire comporte trois domaines importants et un quatrième plus petit correspondant aux 150 nucléotides 3'-terminaux.

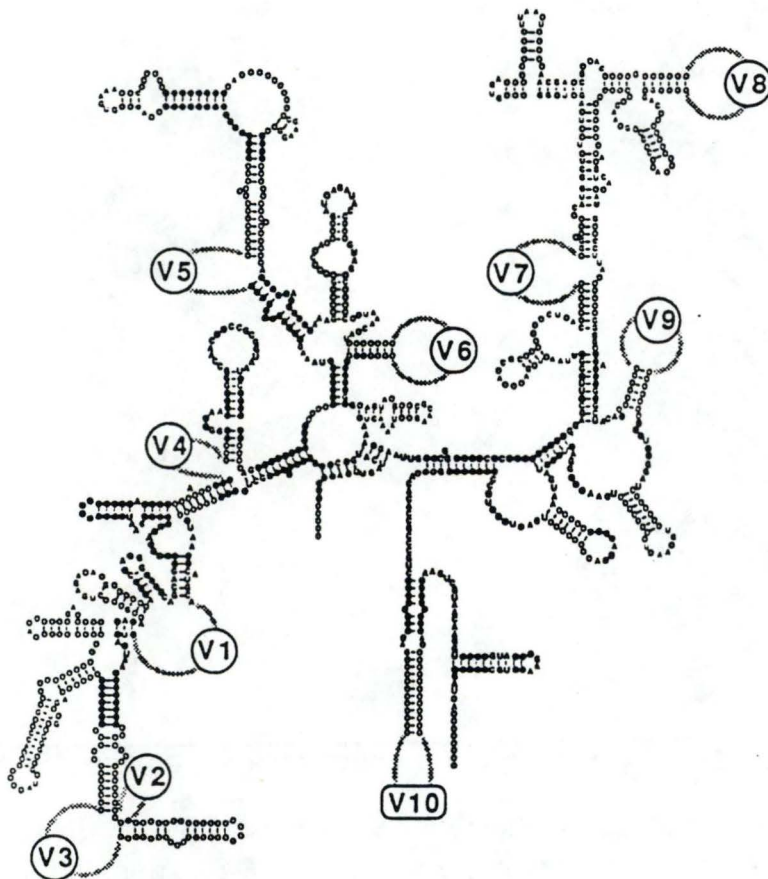
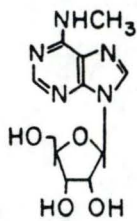


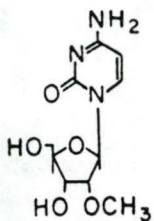
fig 1.14: Conservation de la structure secondaire des SSU-ARNr (Raué *et al*, 1988).

Le modèle se base sur la structure secondaire de l'ARNr 16 S d' *E.coli* et met en évidence un ensemble d'éléments universellement conservés correspondant probablement à un "core" minimal des SSU-ARNr autorisant encore le fonctionnement du ribosome.

Les régions conservées dans toutes les classes de ribosomes sont indiquées par des cercles noircis. Les cercles blancs représentent les régions conservées dans toutes les classes de ribosomes excepté celle des mitochondries. Dix régions présentent des différences importantes de structure, elles sont numérotées V1 à V10, à partir de l'extrémité 5'-terminale. Les nucléotides présents dans plus de 90% de toutes les séquences de SSU-ARNr connues sont spécifiquement indiqués.



N⁶-Methyladenosine
(m⁶A)



2¹-O-Methylcytidine
(Cm)

fig 1.15: Représentation de nucléotides méthylés (Spirin, 1986).

Cm= nucléotide C méthylé en position 2'-O du ribose.

m⁶A= nucléotide méthylé en position 6 de l'adénine.

<i>E. coli</i>	<i>S. carlsbergensis</i>	<i>X. laevis</i>	<i>H. sapiens</i>	Rabbit
Domain I				
(A33)	Am28	Am27	Am27	Am27
(A116)	Am100	Am99	Am99	Am99
(C132)		Um116	Um116	Um116
(C137)		Um121	Um121	Um121
(A161)		(A156)	Am159	Am159
(A167)		Am163	Am166	Am166
(U173)		(U169)	Um172	Um172
(C175)		(C171)	Cm174	Cm174
(C308)		Um393	Um428	Um417
(C316)		Gm401	Gm436	n.d.*
(C342)	Cm414	Cm427	Cm462	Cm451
(G348)	Am420	Am433	Am468	Am457
(A365)	Am436	Am449	Am484	Am473
(U390)		Gm474	Gm509	Gm498
393)		Am477	Am512	Am501
[V4]	Am555	Cm482	Cm517	Cm506
(G505)		Am541	Am576	Am566
m ⁷ G527	(G584)	Am555	Am590	n.d.*
(U531)	Um578	Gm566	Gm601	Gm591
(G548)		(G588)	(G623)	
		Um592	Um627	Um617
		Gm609	Gm644	Gm634
Domain II				
(G572)	Am619	Am633	Am668	Am658
(G587)		Gm648	Gm683	Gm673
[V5]		Cm760	Cm797	Cm793
(G783)	Am796	Um762	Um799	Um795
(C796)		(A816)		
(G902)		(G829)	Gm867	Gm863
	Am973	Am993	Am1031	Am1027
	Cm1006	(C1026)		
	Gm1123	(A1145)		
Domain III				
m ² G966	am ^ψ 1187	am ^ψ 1210	am ^ψ 1248	am ^ψ 1245
m ² C967	(C1188)	(C1211)	(C1211)	
[V7]		Um1250	Um1288	Um1285
(U1049)	Um1265	Um1288	Um1326	Um1323
(C1051)	Gm1267	Gm1290	Gm1328	Gm1325
(G1106)		Am1345	Am1383	Am1379
1115)		Cm1353	Cm1391	Cm1387
(C1147)		Um1400	Um1442	Um1458
(A1152)		(G1405)	Gm1447	n.d.*
(A1197)	Gm1425	Gm1448	Gm1490	Gm1484
m ² G1207	(G1435)	(G1458)	(G1500)	
(G1310)	Gm1570	(G1595)		
(G1338)	m ⁷ G1573	m ⁷ G1597	m ⁷ G1639	m ⁷ G1629
(C1366)		(C1626)	Um1668	n.d.*
(A1377)		Am1636	Am1687	Am1669
Domain IV				
m ² Cm1402	Cm1637	Cm1661	Cm1703	Cm1694
m ² C1407	(C1642)	(C1666)	(C1708)	
[V10]		Um1761	Um1804	Um1793
mU1498	(U1759)	(U1787)	(U1830)	
(A1497)		m ² A1789	m ² A1832	n.d.*
m ² G1516	(U1777)	(U1805)	(U1848)	
m ² A1518	m ² A1779	m ² A1807	m ² A1850	m ² A1839
m ² A1519	m ² A1780	m ² A1808	m ² A1851	m ² A1840

fig 1.16: Conservation des nucléotides modifiés de SSU-ARNr d'origines diverses (Raué *et al*, 1988).

Le tableau présente la répartition des nucléotides méthylés à travers les quatre domaines de SSU-ARNr de bactéries (*E.coli*), de levures (*Saccharomyces carlsbergensis*), de batraciens (*Xenopus laevis*), d'*Homo sapiens* et de lapin. Les nucléotides méthylés sont indiqués en gras. Par convention, un "m" qui précède le nucléotide signifie que celui-ci est méthylé au niveau de la base et un "m" qui suit le nucléotide signifie qu'il est méthylé en 2' O- du ribose (voir également fig 1.15). Lorsqu'un nucléotide n'est pas modifié dans une des espèces présentées, alors qu'il l'est dans une ou plusieurs autres, sa position est indiquée entre parenthèses. Si il se trouve dans un des dix domaines variables, sa position n'est pas mentionnée mais le domaine est renseigné entre crochets. Le symbole ψ représente un nucléotide hyper-modifié. La flèche souligne la présence conservée dans le domaine IV de deux adénines diméthylées.

Pour étayer l'existence d'une "hairpin", on a recours à une approche phylogénétique. Lorsque l'on compare deux séquences d'ARNr similaires mais non identiques, le changement d'une base sur un des deux brins dans une région supposée en double hélice doit être compensé par le changement de la base complémentaire sur le brin opposé, de telle sorte que l'appariement soit conservé (Raué *et al*, 1988).

La figure 1.12 illustre l'étonnante conservation que l'on rencontre dans la structure secondaire de SSU-ARNr d'origines très variées, malgré des séquences nucléotidiques parfois fort différentes par endroits.

Les quatre domaines présents au sein de la structure secondaire de l'ARNr 16 S d' *E.coli*, un des ARNr les plus étudiés, sont détaillés à la figure 1.13. Ce modèle a servi de base à la comparaison de nombreuses structures secondaires de SSU-ARNr. Les résultats obtenus par Raué *et al.* (1988) et présentés à la figure 1.14 mettent clairement en évidence une extraordinaire conservation de la structure secondaire des SSU-ARNr au cours de l'évolution. Ceci est particulièrement vrai dans le cas du domaine IV qui va plus spécifiquement nous intéresser. Le "core" du ribosome est défini par l'ensemble des régions de l'ARNr qui présentent une grande conservation de leurs structures secondaires à travers l'évolution et qui à ce titre paraissent essentielles au fonctionnement normal du ribosome.

La conservation du fonctionnement général du ribosome à travers le mécanisme de la traduction a, comme attendu, des répercussions au niveau structural.

Non seulement sa configuration générale et son architecture moléculaire sont conservées, mais la structure secondaire de ses ARNr est également maintenue à travers l'évolution. Ceci laisse supposer que ces ARNr ont un rôle important à jouer dans le fonctionnement et / ou l'assemblage du ribosome.

3.4. Conservation d'une modification particulière des SSU-ARNr: la double diméthylation 3'-terminale.

3.4.1. La méthylation des ARNr.

Les ARNr sont sujets à une modification post-transcriptionnelle fréquente, la méthylation (Alix *et al*, 1983). Celle-ci affecte les nucléotides, soit au niveau de leurs bases, soit en position 2'-O du ribose (fig 1.15).

La figure 1.16 illustre la répartition de ces modifications dans les quatre domaines de SSU-ARNr d'origines diverses. On constate que la méthylation est un processus hautement spécifique (Klootwijk et Planta, 1973), sa localisation est confinée, selon l'espèce, à une ou l'autre extrémité de l'ARNr (Klagsbrun, 1973).

E. coli

Saccharomyces cerevisiae (cytoplasme) *Saccharomyces cerevisiae* (mitochondrie)

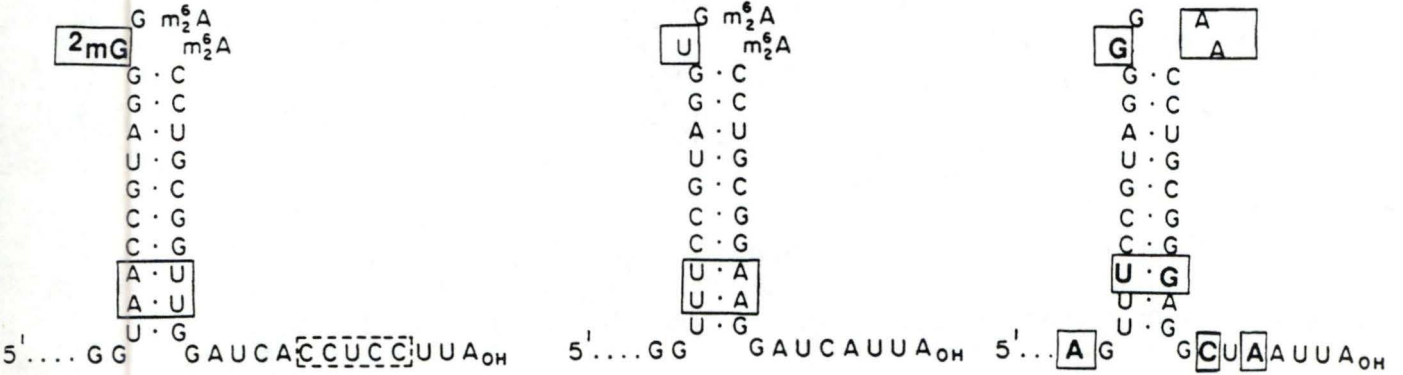


fig 1.17: Comparaison de la séquence nucléotidique et de la structure secondaire de la région 3'-terminale du SSU-ARNr procaryotique et des SSU-ARNr eucaryotique (Spirin, 1986 - van Knippenberg *et al*, 1984 - van Charldorp *et al*, 1982).
 Les rares régions non conservées sont encadrées. Remarquons que les eucaryotes ne présentent pas la séquence consensus "anti-Shine-Dalgarno" (CCUCC).

PAAUUGAAGAGUUGAUCUUGGUCAGAUUGAACGCGUGGGCAGGCCUAACACAUGCAAGUCGAACGGUAACAGGAAGAAGCUUGCUGCUUUGCUGACG
 50 100
 AGUGGGCGGACGGGUGAGUAAUUGUCUGGGAACUGCCUGAUGGAGGGGUAUACUUCUGGAAACGGUAGCUAAUACCGCAUAAACGUCGAAGACCAAAGAG
 150 200
 GGGGACCUUCGGCCUCUUGCCAUCCGGAUGUGCCAGAUUGGGAUUGAGUAGUAGGUGGGUAACGGCCUACCUAGGGCAGCAUCCUAGCUGGUCUGAGA
 250 300
 GGAUGACCAGCCACACUGGAACUGAGACACGGUCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUGGGGAUUAUUGCACAAGGGCCGAAGCCUGAUGCAGCCAUUGC
 350 400
 CGCGUGUAUGAAGAAGCCUUCGGGUUGUAAAGUACUUCAGCGGGAGGAAGGGAGUAAAGUUAUACCUUUGCUCAUUGACGUUACCCGAGAAAGAG
 450 500
 CACCGGCUAACUCCUGCCAGCAGCCm⁷GCGUAAUACGGAGGUGCAAGCGUUAUACGGAAUUAUCUGGGCGUAAAGCGCAAGCAGGCGGUUUGUUAAGUCA
 550 600
 GAUGUGAAAUCCCGGGCUCAACCUUGGAACUGCAUCUGAUACUGGCAAGCUUGAGUCUCGUAGAGGGGGUAGAAUUCAGGUGUAGCGGUGAAUUGCG
 650 700
 UAGAGAUCUGGAGGAUACCGGUGGCGAAGCGGCCCCUUGGACGAAGACUGAGCCUAGGUGCGAAAGCGUGGGGAGCAACAGGAUUGAUUACCCUGG
 750 800
 UAGUCCACGCGUAACGAUGUCGACUUGGAGGUUGUGCCUUGAGGCGUUGGCCUUCGGAGCUAACCGCUAAGUCGACCGCCUGGGGAGUACGGCCGCA
 850 900
 AGGUUAAAACUCAAUUGAUGAGCGGGGCCGCAAGCGGUGGAGCAUGUGGUUUAUUCGALm²Gm⁵CAAGCGAAGAACCUCUACCGGUCUUGACAUCA
 950 1000
 CGGAAGUUUCAGAGAUGAAGUUGCCUUCGGGAACCGUGAGACAGGUGCUGCAUGGUCUGCUCAGCUCUGUUGUGAAUUGGGUUAAGUCCGm⁵C
 1050 1100
 AACGAGCGCAACCUUUAUCUUGUUGCCAGCGGUCGGCCGGAACUCAAAGAGACUGCCAGUGAUAAACUGGAGGAAGGUGGGGAGUACGUCAAGUC
 1150 1200
 AUCALm²GCCUUAACGACAGGGUACACACGUGCUACAUUGCGCAUCAAAGAGAAGCGACCUCCGAGAGCAAGCGGACCUCAUAAAGUGCGUCUAG
 1250 1300
 UCCGGAUUGGAGUCUGCAACUUGACUCCAUGAAGUCGGAUUCGCUAGUUAUUGGUAUCAGAAUGCCAGGUGAAUACGUUCCCGGCCUUGUACACACC
 1350 1400
 Gm⁴Cm⁵CGUm⁵CACACCAUGGGAGUGGGUUGCAAAGAAGUAGGUAGCUAACCUUCGGGAGGGCGCUUACCAUUGUGAUUCAUGACUGGGUGAAGUCGm⁵UAA
 1450 1500
 CAAGGUAACCGUAGGGGm⁵Am⁵ACCUUGCGGUUGGAUCACCUCCUUA OH

fig 1.18: Séquence de l'ARNr 16 S de *E. coli* (Spirin, 1986).

De plus, les méthylations sont principalement présentes parmi les structures secondaires extrêmement conservées du ribosome, le "core", ce qui laisse supposer qu'elles jouent un rôle central dans la structure et la fonction des ARNr (Edwards *et al*, 1990).

Chez *E.coli*, sur les dix nucléotides méthylés, neuf le sont au niveau de leur base et la majorité d'entre elles se situent dans le domaine IV correspondant à l'extrémité 3'-terminale du SSU-ARNr.

Les modifications, plus nombreuses, chez les eucaryotes concernent à raison de 90 % la position 2'-O du ribose et se répartissent majoritairement dans le domaine I, soit l'extrémité 5'-terminale du SSU-ARNr. Le "pattern" de méthylation est bien conservé à travers les quatre eucaryotes présentés.

Un grand degré de conservation du type et de la répartition des modifications des ARNr est observé dans un même groupe évolutif. Dans chaque catégorie, les modifications sont localisées dans des régions hautement conservées ce qui laisse supposer qu'elles jouent un rôle important dans le fonctionnement du ribosome.

3.4.2. La double diméthylation $m^6_2Am^6_2A$ est extrêmement conservée.

Une seule modification est à la fois présente chez les procaryotes et les eucaryotes (Van Knippenberg *et al*, 1984 et Van Charldorp *et al*, 1982). Il s'agit de deux adénines adjacentes diméthylées formant la séquence $m^6_2Am^6_2A$, présente au sommet de l'hélice 45 du domaine IV (fig 1.13 et fig 1.17), c'est à dire en position 1518 et 1519 sur la séquence de l'ARNr 16 S de *E.coli* (Spirin, 1986) (fig 1.18).

Remarquons toutefois que le SSU-ARNr des ribosomes de chloroplastes d'*Euglena gracilis* ne présente qu'une seule des deux diméthylations et que celui des mitoribosomes de levures n'en présente aucune (fig 1.17) (Klootwijk *et al*, 1975).

Un rôle biologique important doit pouvoir être attribué à la présence quasi-universelle de cette double diméthylation. Sa position, à l'interface des deux sous-unités ribosomiques, à proximité du site de liaison de l'ARNm, de l'ARNt et de facteurs protéiques ancillaires, suggère qu'elle intervienne au niveau de la synthèse protéique et plus précisément lors de l'étape d'initiation de celle-ci.

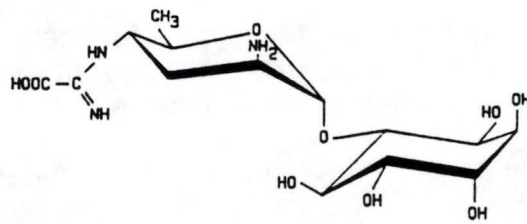


fig 1.19: L'antibiotique kasugamycine (Van Gemen, 1989).

La kasugamycine est un antibiotique qui appartient au groupe des aminoglycosides. Cet antibiotique, isolé de *Streptomyces kasugaensis*, a initialement été découvert de par sa capacité d'inhiber la croissance d'un champignon (*Pericularia oryzae*). Son effet, qui demeure bactériostatique (Helser *et al*, 1972), ne s'exerce qu'à des concentrations relativement élevées ($> 100 \mu\text{g} / \text{ml}$).

3.5.Rôle de la double diméthylation m⁶₂A m⁶₂A.

La disponibilité d'un mutant d'*E.coli* ne présentant pas de méthyle sur les deux adénines adjacentes 1518 et 1519, a permis à l'équipe de P.H. van Knippenberg d'étudier en détail le rôle de cette double diméthylation chez les procaryotes.

L'absence des groupements méthyles chez le mutant est la conséquence d'une mutation dans le gène *KsgA* codant pour la diméthylase responsable de leur mise en place (Helser *et al*, 1972). Cette mutation se manifeste par la résistance à un antibiotique, la kasugamycine (fig 1.19) (Helser *et al*, 1971 et Sparling, 1968). Alors que le gène de la diméthylase d'*E.coli* a été cloné (Van Buul *et al*, 1985), aucun gène équivalent ne l'a été jusqu'à présent chez les eucaryotes.

La méthyl-transférase codée par le gène *KsgA* est spécifique des deux adénosines précitées et utilise comme donneur de méthyles la S-adénosylméthionine (SAM). L'enzyme fixe une sous-unité ribosomique 30 S au cours de la phase finale de l'assemblage de celle-ci en particule ribonucléoprotéique (Thammana *et al*, 1974). Ceci signifie que la méthylation des bases est un événement qui se produit tardivement lors de la maturation du ribosome. D'ailleurs la fixation de l'enzyme aux petites sous-unités ribosomiques requiert la présence d'un certain nombre de protéines ribosomales. Lorsque la méthylation est effectuée, l'affinité de l'enzyme pour son substrat méthylé diminue ce qui lui permet de fixer une nouvelle sous-unité non méthylée (Poldermans *et al*, 1979 III).

Remarquons que chez les eucaryotes, la plupart des étapes d'assemblage et de maturation du ribosome ont lieu dans le nucléole. Cependant, chez la levure, la méthylation des bases est également un événement tardif (Klootwijk et Planta, 1973), si bien que la méthylation des deux adénines qui nous concerne s'effectue dans le cytoplasme, lorsque le précurseur du SSU-ARNr y a été transporté (Brand *et al*, 1975).

Dans le but d'élucider le rôle de la double diméthylation 3'-terminale chez les procaryotes, le mode d'action de la kasugamycine a été partiellement élucidé (Poldermans *et al*, 1979 I). Cet antibiotique inhibe la synthèse protéique en interférant avec la fixation de l'ARNt initiateur sur le complexe ARNm-sous-unité 30 S (fig 1.6). La résistance à la kasugamycine des sous-unités 30 S isolées à partir des mutants *KsgA*⁻ n'apparaît qu'en présence de sous-unités 50 S, qu'elles proviennent de souche sauvage ou de souche mutante *KsgA*⁻. Cette constatation laisse supposer que le site de fixation de la kasugamycine est composé d'éléments appartenant aux deux sous-unités. Quoi qu'il en soit, bien que les mutants *KsgA*⁻ soient résistants à la kasugamycine, on ignore toujours si la séquence m⁶₂Am⁶₂A est directement impliquée dans la fixation de l'antibiotique au ribosome (Van Knippenberg, 1986 et Van Gemen *et al*, 1990).

Des comparaisons phénotypiques ont montré *in vivo* que la résistance à la kasugamycine s'accompagne d'une augmentation du temps de génération. *In vitro*, le mutant requiert une concentration plus élevée du facteur d'initiation IF3 (en l'absence du facteur IF1) (Poldermans *et al*, 1979 II) et voit l'affinité de ses sous-unités ribosomiques amoindrie (Poldermans *et al*, 1980 IV).

Rappelons que chez les procaryotes, le positionnement correct du ribosome sur l'AUG initiateur nécessite l'interaction de "Shine-Dalgarno" entre une séquence consensus présente à l'extrémité 5'-terminale de l'ARNm et une séquence complémentaire présente sur l'extrémité 3'-terminale de l'ARNr 16 S (fig 1.5).

Des études physiques (résonance magnétique nucléaire) ont été réalisées sur des fragments comprenant les cinquante nucléotides terminaux de l'extrémité 3' du SSU-ARNr 16 S. Ces fragments sont obtenus suite au clivage de l'ARNr par des bactériocines (colicine E3 et cloacine DF13). Ces études ont révélé que les diméthyles en déstabilisant la structure secondaire (Van Charldorp *et al*, 1981 a) en épingle à cheveux facilitaient l'interaction de "Shine-Dalgarno" et donc la mise en phase correcte du ribosome lors de l'étape d'initiation de la traduction (Heus, 1987).

Il a également été suggéré que la séquence m⁶₂Am⁶₂A pourrait contribuer à la formation d'un environnement hydrophobe nécessaire aux ajustements du mécanisme traductionnel (Van Knippenberg, 1986).

La présence quasi-universelle, sur une structure secondaire très conservée, de deux adénines diméthylées, à l'interface des deux sous-unités ribosomiques, c'est-à-dire à proximité du site d'interaction codon / anti-codon, nous autorise à nous interroger sur son implication dans la traduction.

Il a été démontré chez les procaryotes que ces groupements méthyles étaient favorables à l'initiation de la traduction. Ces résultats ne sont cependant pas extrapolables aux eucaryotes qui présentent un mécanisme d'initiation tout à fait différent n'impliquant nullement une interaction de type "Shine-Dalgarno".

La disponibilité d'un mutant eucaryote pour cette fonction de diméthylation nous permettrait d'élucider le rôle fonctionnel qu'elle joue chez ceux-ci.

2. BUT DU TRAVAIL.

Chapitre 2: But du travail.

A l'extrémité 3'-terminale de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique est présente de manière quasi-universellement conservée une diméthylation de deux adénines adjacentes formant la séquence $m^6_2Am^6_2A$.

Dans le cas d' *E.coli* , l'obtention d'un mutant *KsgA* - déficient pour cette diméthylation a ouvert la voie aux études qui ont démontré son rôle fonctionnel dans l'étape de mise en phase du ribosome sur l'AUG initiateur.

Aucun rôle n'a cependant encore été attribué à ces groupements diméthyles chez les eucaryotes où le mécanisme d'initiation de la traduction est différent.

Afin d'élucider cette question, nous nous proposons de suivre la voie génétique qui consiste à créer un mutant de la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour le gène de la diméthylase (*DIM*). L' utilisation de cet ascomycète unicellulaire se justifie par le fait qu'il est un modèle eucaryote usuel et que de plus il se prête à toutes les pratiques génétiques tant classiques que modernes. La levure étant insensible à la kasugamucine, l'identification du mutant recherché ne pourra pas se faire par sélection sur cet antibiotique.

Le procédé choisi consistera à isoler parmi des levures transformées au moyen d'un vecteur autorépliatif instable porteur du gène *KsgA* de *E.coli* , les survivants d'une mutagénèse aléatoire qui requièrent le maintien du plasmide pour leur survie. Cette situation s'observe en principe pour tout mutant touché dans un gène essentiel dont le gène porté par le plasmide assure la complémentation.

Cette stratégie déjà exploitée avec succès dans notre laboratoire (Renauld, 1990), nécessite en l'occurrence que trois conditions soient satisfaites:

- (1) Le gène *KsgA* de *E.coli* s'exprime chez la levure.
- (2) la diméthylase *KsgA* de *E.coli* est active sur le SSU-ARNr de levure (substrat hétérologue).
- (3) le gène *DIM* est essentiel à la survie de la levure.

Nous pouvons vérifier la première condition. En effet, nous disposons aujourd'hui des outils génétiques permettant de placer un gène hétérologue sous le contrôle de signaux de transcription et de traduction permettant d'assurer son expression régulée chez la levure. C'est à cette tâche que sera précisément consacré notre travail.

Quant aux hypothèques inhérentes, elles seront prises en considération à la fin du mémoire, dans le chapitre "conclusions générales et perspectives".

3. MATERIEL ET METHODES.

Chapitre 3: Matériel et méthodes.

1. Matériel.

1.1. Tampons et solutions.

Toutes les solutions et milieux ne contenant pas d'éléments thermolabiles sont stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 120°C). Les solutions non mentionnées sont celles dont la composition n'est pas détaillée dans les kits commerciaux.

1.1.1. Tampons.

High salt buffer:

-TrisHCl pH 7,5	20 mM
-EDTA (Merck)	1 mM
-NaCl (Merck)	1,5 M

PBS 10X:

-KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,2%
-Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (Merck)	1,44%
-NaCl (Merck)	8%
-KCl (UCB)	0,2%

Ajuster à pH 7,4 avec NaOH ou KOH.

Sample buffer 5X (SDS-PAGE):

-TrisHCl	312,5 mM
-SDS	10%
-Bleu de bromophénol	0,005%
-β-Mercaptoéthanol	25%
-Glycérol	50%

Tampon de blotting:

Pour 1 litre:	3 g de Tris (Sigma)
	14,4 g de glycine (Merck)
	200 ml de Méthanol (UCB)

Tampon d'électrophorèse (5X) (SDS-PAGE):

-TrisHCl pH 8,3	125 mM
-Glycine	960 mM
-SDS	0,5%

Tampon kinase 10x:

-TrisHCl pH 8,0	1M
-MgCl ₂	100mM
-DTT	70mM
-ATP	10mM

	A	B	L	M	H	2
TrisAcétate	33	-	-	-	-	-
TrisHCl	-	10	10	10	50	50
MgAcétate	10	-	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10	10
KAcétate	66	-	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100	50
DTE	-	-	1	1	1	-
DTT	0,5	-	-	-	-	-
2-Mercaptoéthanol	-	1	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	-	-

	3	4	6	8	NEB4	NEB2+BSA
TrisAcétate	-	-	-	-	20	-
TrisHCl	50	20	50	20	-	10
MgAcétate	-	-	-	-	10	-
MgCl ₂	10	5	6	10	-	10
KAcétate	-	-	-	-	50	-
NaCl	100	-	50	-	-	50
DTE	-	-	-	-	-	-
DTT	-	-	-	-	1	1
2-Mercaptoéthanol	-	-	-	-	-	-
KCl	-	50	50	-	-	-

Tableau 3.1: Tampons d'incubation de restriction (concentration en mM)

Tampon de ligation 5 x (BRL):

-TrisHCl pH 7,4	20 mM
-MgCl ₂	10 mM
-DTT	10 mM
-ATP	1 mM

Tampon P1 (QIAGEN):

-TrisHCl	50 mM
-EDTA	10mM

Mise à pH8.

Autoclaver.

Ajouter extemporanément une solution de RNaseA à une concentration finale de 400 µg/ml.

Tampon P2 (QIAGEN):

-NaOH	200mM
-SDS	1 %

Ne pas autoclaver.

Tampon P3 (QIAGEN):

-KAc pH4,8	2,55 M
------------	--------

Ne pas autoclaver.

Tampon QBT (QIAGEN):

-NaCl	750 mM
-MOPS (acide 3-(N-Morpholinol)propane-sulfonique	50mM
-Ethanol	15 %
-Triton X-100	0,15%

Ajuster à pH 7,0 avec du NaOH.

Tampon QC (QIAGEN):

-NaCl	1M
-MOPS	50mM
-Ethanol	15%

Ajuster à pH 7,0 avec du NaOH.

Tampon QF (QIAGEN):

-NaCl	1,25M
-MOPS	50mM
-Ethanol	15%

Ajuster à pH 8,2 avec du NaOH.

Tampons d'incubation de restriction: voir tableau 3.1

Tampon SSC 20 x:

-NaCl	3M
-Citrate de sodium	0,3M

Ajuster à pH 7,0 avec de l'HCl

Tampon STD:

-Sorbitol (UCB)	1M
-TrisHCl pH 7,9	50mM
-DTT	30mM

Tampon TE:

-TrisHCl pH 8/7,6 ou 7,4	10 mM
-EDTA pH 8/7,6 ou 7,4	1 mM

Tampon TBE:

-TrisHCl	108g
-acide borique	55g
-EDTA 0,5M	40ml

Porter à 1l pour TBE 10X.

Porter à 10l pour TBE 1X.

Tampon TEN:

-TrisHCl pH 7,0	10mM
-EDTA	1mM
-NaCl	100mM

Ajouter extemporanément 10 mg / ml de lysozyme.

Tampon TED:

-TrisHCl pH 7,9	50mM
-EDTA	0,1mM
-DTT	1mM

Tampon TEDG:

-TrisHCl pH 7,5	1M
-Triton	10%
-EDTA	500mM
-Ethylène glycol	35%
-DTT	1mM

Tampon TMN:

-TrisHCl pH 7,5	10mM
-MgAc	10mM
-NH ₄ Cl	60mM
2-Mercaptoéthanol	6mM

1.1.2.Solutions.

Agarose (BRL): 0,8%; 1 ou encore 2% dans du TBE 1X.

Antibiotiques: stocker à -20°C

-Ampicilline 10%(Boehringer) 100 mg/ml dans de l'eau distillée, à diluer 1000 X.

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm.

-Tétracycline (Boehringer) 12,5mg/ml dans 50:50 eau distillée: éthanol, à diluer 1000 X.

-Chloramphénicol (Boehringer) 50mg/ml dans de l'éthanol.

Ne pas ajouter les antibiotiques à des températures supérieures à 50-60°C.

Solution stock de bromure d'éthidium: 1, 2 ou 10 mg/ml dans de l'eau.

Solution d'alourdisseur / colorant pour gel d'agarose:

-Bleu de bromophénol 0,25%

-EDTA 25mM

-Glycérol 50%

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Solution de Bradford (5X):

-Dissoudre 100 mg de Bleu de Coomassie G250 dans 50 ml d'éthanol 95%.

-Ajouter 100 ml d'acide phosphorique 85%.

-Porter à 200 ml avec de l'eau distillée.

-Stocker à 4°C.

-Filtrer sur filtre avant emploi.

Solution de coloration (1X) (Bleu de Coomassie) (SDS-PAGE):

-Bleu R250 0,1%

-Acide Acétique 10%

-Méthanol 40%

-H₂O 50%

Solution de décoloration (1X) (SDS-PAGE):

-Acide Acétique 10%

-Méthanol 40%

-H₂O 50%

Solution d'arrêt de décoloration (1X) (SDS-PAGE):

-Glycérol 3%

-Méthanol 30%

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Solution de fixateur (pour gel de séquençage):

-Acide acétique 10%

-Méthanol 10%

Souche	Génotype	Firme
<i>E.coli</i> XL1-blue	<i>sup E 44 hsd R17 rec A1</i> <i>end A1 gyr A46 thi</i> <i>rel A1 lac -</i> F' [<i>pro AB+ lac I^q lac ZΔM15</i> <i>Tn 10 (tet^r)</i>]	Stratagène Bullock (1987)
<i>E.coli</i> TG1	<i>sup E hsd Δ5 thi Δ(lac-pro AB)</i> F' [<i>tra D36 pro AB+ lac I^q</i> <i>lac ZΔM15</i>]	Amersham Gibson (1984)
<i>E.coli</i> JM101	<i>sup E thi Δ(lac-pro AB)</i> F' [<i>tra D36 pro AB+ lac I^q</i> <i>lac ZΔM15</i>]	Messing (1979)

Tableau 3.2: Souches bactériennes utilisées.

Nom	Caractéristiques	Taille	Origine/Firme
YE _p ADH2	plasmide "multicopy" TRP 1 navette <i>E.coli</i> / <i>S.cerevisiae</i> ori: pMB1 et 2 μ marqueur: Amp ^r , TRP 1 <i>Lac Zα</i> , MCS	9,8 kb	T.Young (University of Washington, Seattle,USA)
pGemADH2	plasmide de <i>E.coli</i> ori: pMB1 marqueur: Amp ^r <i>Lac Zα</i> , MCS	4,0 kb	N. De Schrevel (GEMO, FNDP)
pBluescript KS+	phagemide de <i>E.coli</i> ori: pMB1 et f1 marqueur: Amp ^r <i>Lac Zα</i> , MCS	2,9 kb	STRATAGENE
pUC8-KsgA7	plasmide de <i>E.coli</i> ori: pMB1 marqueur: Amp ^r <i>Lac Zα</i> , MCS	3,5 kb	P.H.Van Knippenberg (RijksUniversiteit, Leiden,Pays-Bas)
M13mp19	phage filamenteux de <i>E.coli</i> ori: f1 <i>Lac Zα</i> , MCS	7,2 kb	J.Messing (University of Minnesota, St.Paul,USA) BIOLABS
pIH2	phage filamenteux de <i>E.coli</i> ori: f1 <i>Lac Zα</i> , MCS	8,1 kb	I. Housen (GEMO, FNDP)
pFL40	plasmide "multicopy" URA3 navette <i>E.coli</i> / <i>S.cerevisiae</i> ori: pMB1 et 2 μ marqueur: Amp ^r , URA3 <i>Lac Zα</i> , MCS	4,3 kb	F. Lacroute (Centre Gen.Mol., Gif-s-Yvette, France)

Tableau 3.3: Plasmides utilisés.

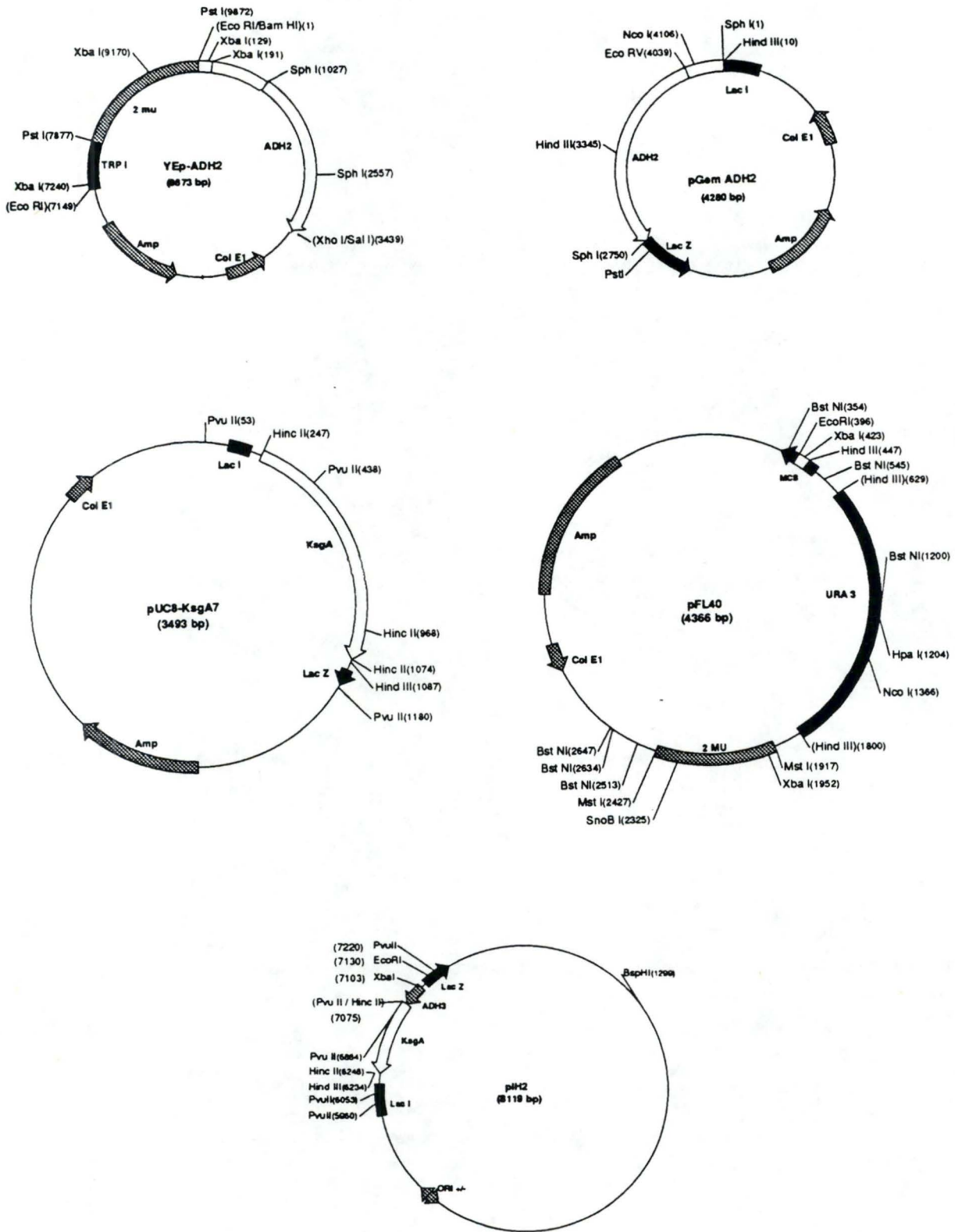
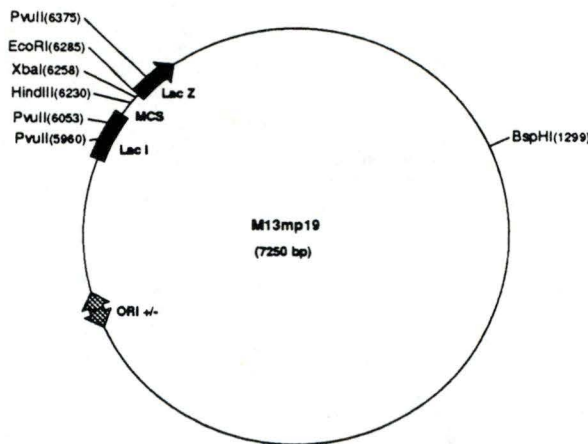
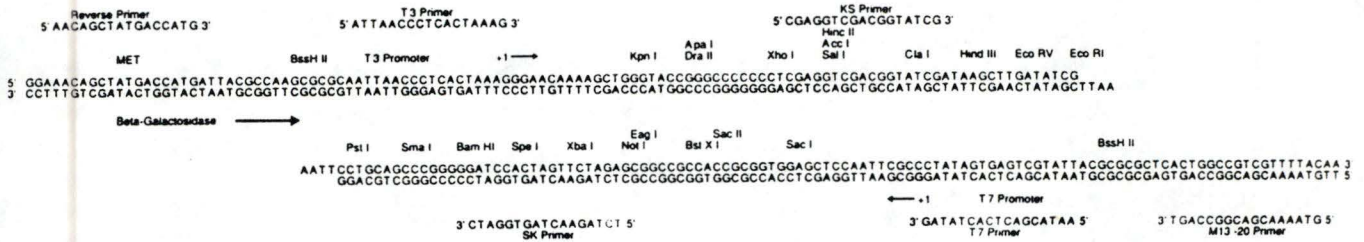
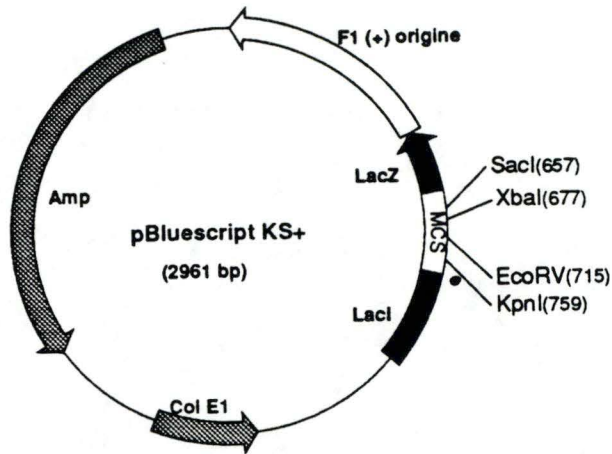
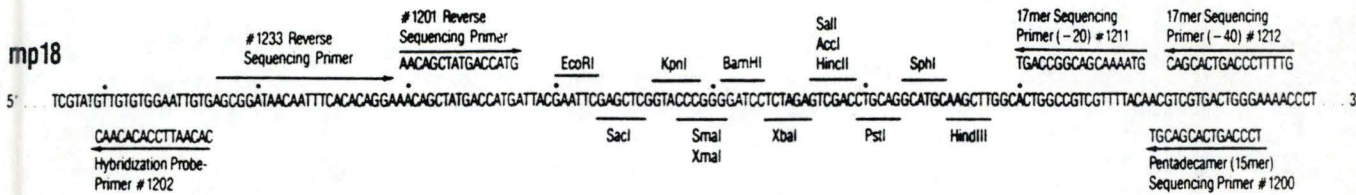


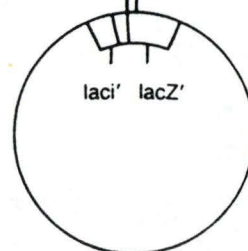
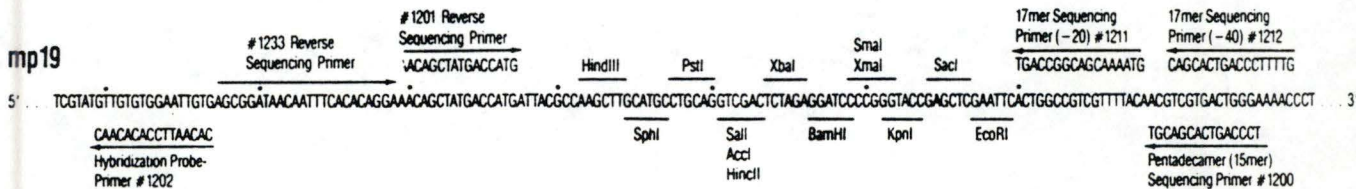
fig 3.4: Représentation des plasmides utilisés et MCS.



mp18



mp19



end A1: mutation entraînant une diminution du taux d'endonucléase, ce qui améliore le rendement et la qualité de l'ADN plasmidique.

$\Delta(\text{lac-proAB})$: délétion de l'opéron lactose et des gènes voisins encodant les protéines nécessaires à la biosynthèse de la proline.

traD36: mutation supprimant le transfert du facteur F' lors de la conjugaison bactérienne.

Les caractéristiques suivantes sont présentes sur l'épisome F', plasmide naturel de 93 kb présent 1 à 2 fois par cellule et codant pour les protéines responsables de la formation des pilis sexuels nécessaires au phénomène parasexuel de conjugaison.

Notons que la présence de cet épisome est un des éléments indispensables à la sélection des bactéries porteuses d'un plasmide recombinant par le test colorimétrique (blanc/bleu) (voir 2.3.1.4.3).

Tn10: marqueur de résistance à la tétracycline permettant de sélectionner les bactéries possédant F'.

proAB: la région du chromosome bactérien qui code pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la proline est souvent portée par l'épisome F'. Il peut alors compléter l'auxotrophie pour la proline des souches portant la délétion chromosomique $\Delta(\text{lac-proAB})$, de cette façon son maintien est assuré sur milieu dépourvu de proline.

lacZ Δ M15: le gène *lac Z* est délété dans la portion N-terminale de la β -galactosidase (voir 2.3.1.4.3).

lac I^q: mutation pour le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose, ce qui entraîne sa surproduction d'un facteur dix.

1.2.2. Souche de levure.

La souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* présente le génotype suivant: *MATa/MAT α ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 leu2-3, 112/leu2-3, 112 his3-11, 15/his3-11, 15 ura3-1/ura3-1*. La souche diploïde provient de F. Lacroute tandis que la souche haploïde, W303-1B (α), a été isolée par R. Rothstein, New-York.

1.2.3. Plasmides.

Trois caractéristiques fondamentales se retrouvent chez la plupart des vecteurs utilisés: une origine de répllication (*ori*), un ou plusieurs marqueurs de sélection et un site multiple de clonage (MCS) (tableau 3.3 et figure 3.4).

L'origine de répllication contrôle le nombre de copies d'un plasmide.

Chez *E.coli*, la plupart des plasmides "multicopy" portent le réplicon du plasmide pMB1 ou col E1, assurant un nombre de copies minimal de 15 à 20 par cellule. Remarquons que ces deux origines de réplication sont compatibles avec celle du plasmide naturel F' (voir à ce propos 1.2.1).

Ces plasmides ne nécessitent aucunement l'expression de gènes plasmidiques pour se répliquer. Ils utilisent les différentes polymérases, enzymes à vie longue fournie par la cellule hôte. Ainsi, même si la protéosynthèse est inhibée par l'utilisation d'antibiotiques comme le chloramphénicol ou la spectinomycine, entraînant un arrêt de la multiplication cellulaire, la réplication plasmidique se poursuit. Chaque bactérie porte alors un nombre beaucoup plus élevé de plasmides. Ce phénomène est utilisé pour amplifier la production plasmidique de la souche.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, c'est l'origine de réplication du plasmide de levure 2 μ qui assure la présence en "multicopy" d'un plasmide.

La plupart du temps, chez *E.coli*, les marqueurs de sélection sont des gènes conférant la résistance à un antibiotique.

Dans le cas des levures, on dispose de nombreuses souches mutantes qui présentent différentes auxotrophies. Les marqueurs de sélection utilisés sont des gènes qui rétablissent une voie métabolique interrompue par une de ces auxotrophies.

Enfin, le MCS est un polylinker contenant une série de sites uniques de restriction permettant l'insertion aisée d'ADN exogène.

Quelques caractéristiques supplémentaires peuvent être assignées à certains plasmides utilisés:

YepADH2: Ce vecteur porte le fragment *Bam* HI / *Xho* I (3439 bp) du gène *ADH 2* inséré aux sites *Eco* RI et *Sal* I d'une matrice pBR322 à laquelle avait été préalablement inclus le marqueur *TRP 1* et l'origine de réplication du plasmide de levure 2 μ .

pGemADH2: Ce vecteur porte le fragment *Sph* I / *Sph* I (1530 bp) du gène *ADH 2* inséré au site *Sph* I d'une matrice pGemblue (Promega). Signalons dès à présent qu'un site *Nco* I chevauchant l'ATG initiateur du gène *ADH 2* a été aménagé par mutagenèse dirigée lors d'un précédent travail (De Schrevel, 1990).

pBluescript KS+: Le signe (+) caractérise le sens d'orientation de l'origine de réplication du phage f1 alors que le KS concerne le sens d'orientation du site multiple de clonage (ici du site *Kpn* I vers le site *Sac* I).

pUC8-KsgA7: Ce vecteur porte le fragment *Hpa* I / *Hpa* I (827 bp) du gène de la diméthylase de *E.coli* inséré au site unique *Hinc* II d'une matrice pUC8. De par cette insertion, deux sites *Hinc* II sont générés de part et d'autre de l'insert.

M13mp19: Les phages M13mp18 et 19 sont identiques à l'exception du sens d'orientation de leur MCS. Le cycle de vie de ce phage est décrit au point 2.3.3.2.

pIH2: Le plasmide pIH2 est un phage M13 dans lequel a été inséré un fragment *Xba* I / *Hind* III (889 bp) comportant une portion du gène *ADH 3*, encodant un signal d'importation mitochondrial, et le gène *KsgA*, encodant la diméthylase de *E.coli* (Housen, 1990).

1.2.4. Stockage de l'ADN et des souches.

L'ADN est stocké à -20°C. Le surnageant isolé à partir d'une culture d'*E.coli* infectée par M13 est stocké à 4°C. Il contient des particules virales qui restent infectieuses plusieurs mois. Les souches sauvages ou transformées sont conservées sur boîte à 4°C pendant un mois. Les souches sauvages ou transformées et les cellules compétentes sont stockées dans du glycérol à -80°C.

1.3. Milieux de culture.

1.3.1. Milieux de culture pour bactéries.

1.3.1.1. Milieux riches.

2 xTY:

-Tryptone (Oxoïd)	1,6%
-Yeast Extract (Oxoïd)	2,5%
-NaCl (Merck)	1,25%

LB (Luria-Bertani) liquide:

-Tryptone (Oxoïd)	1%
-Yeast Extract (Oxoïd)	0,5%
-NaCl (Merck)	0,5%

LB (Luria-Bertani) solide:

Ajouter 2% d'agar (Oxoïd).

1.3.1.2. Milieu minimum: M9.

Ce milieu étant dépourvu de proline, il assure le maintien de l'épisome F' chez des souches d'*E.coli* telles que TG1 (voir 1.2.1: pro AB).

Solution M9 (10x):

-Na ₂ HPO ₄ (Merck)	6%
-KH ₂ PO ₄ (Merck)	3%
-NH ₄ Cl	1%
-NaCl (Merck)	0,5%

Pour une solution stock 20X:

Pour 400 ml:

Adénine	216,0 mg
Uracile	179,2 mg
Arginine	252,8 mg
Acide aspartique	798,4 mg
Histidine	167,2 mg
Isoleucine	157,6 mg
Leucine	315,2 mg
Lysine	292,0 mg
Méthione	179,2 mg
Phénylalanine	396,8 mg
Tyrosine	144,8 mg
Valine	515,2 mg
Tryptophane *	244,8 mg
Thréonine *	619,2 mg

Tableau 3.5: Composition du milieu synthétique complet.

(*) Ces deux acides aminés sont filtrés sur filtre 0,22 μ et ajoutés après autoclave.

Milieu M9 liquide:

-H ₂ O	360ml
-Solution M9 (10x)	40ml
-MgSO ₄ 1M	0,4ml
-CaCl ₂ 0,1M	0,4ml
-Glucose 20%	4ml

Milieu M9 solide:

Ajouter 2% d'agar (Oxoïd).

Ajouter au besoin: 1ml / l de thiamine HCl 1M (stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm).

1.3.2.Milieus de culture pour levures.1.3.2.1.Milieu riche.YPGA:

-Adénine (Sigma)	0,005%
-Glucose (Merck)	2%
-Yeast Extract (Oxoïd)	1%
-Peptone de caseïne (Merck)	1%

Mise à pH 8,0 avec HCl 37%.

YPGA solide:

Ajouter 2% d'agar (Oxoïd).

1.3.2.2.Milieu minimum.Milieu minimum WQ:

-Yeast nitrogen base w/o AA (Difco)	0,67%
-Glucose (Merck)	2%

Après autoclave, on ajoute le milieu synthétique complet (solution stock 20X) (tableau 3.5).

1.3.3.Milieus de transformation de bactéries par des phages.H plates:

-Tryptone (Oxoïd)	1%
-Yeast Extract (Oxoïd)	0,8%
-NaCl (Merck)	1,5%
-Agar (Oxoïd)	1,5%

H top agar:

-Tryptone (Oxoïd)	1%
-Yeast Extract (Oxoïd)	0,8%
-NaCl (Merck)	0,8%
-Agar (Oxoïd)	0,8%

2.Méthodes.

2.1.Techniques générales relatives aux protéines.

2.1.1.Lyse de culture de bactéries.

- Centrifuger 5 minutes à 10000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Décanter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 2,5 ml de TMN, placer sur glace.
- Réaliser 7 cycles de sonication.
- Un cycle = 15" de sonication puis 30" de pose.
- Centrifuger une heure à 13000 rpm et 4°C (rotor SS34).
- Stocker le surnageant à 4°C.

2.1.2.Lyse de culture de levures.

- Peser les bouteilles de centrifugation.
- Centrifuger 10 minutes à 5000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Peser les cellules.
- Resuspendre dans 20 ml de tampon STD.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm et 4°C.
- Decanter le surnageant;
- Resuspendre dans 5,5 ml de TED auquel on ajoute extemporanément:
 - 2,4 mg / g de cellule de lyticase (Sigma).
 - 40 µl / g de cellule de glucuronidase (Boehringer).
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm et 4°C.
- Le surnageant issu de la lyse est rapidement chargé sur une colonne PD-10 (une Séphadex® G-25) (Pharmacia), préalablement équilibrée avec 3 X 3,5 ml de tampon TEDG.
- Cette colonne permet de soustraire du lysat la S-adénosylhomocystéine (SAH). La SAH est un puissant inhibiteur des méthyltransférases *in vitro*
- Le premier éluat n'est pas conservé.
- Faire passer sur la colonne 3,5 ml de tampon TEDG et stocker l'éluat à 4°C.
- Régénérer la colonne avec 3,5 ml de TEDG 1M.

2.1.3.Dosage de protéines (selon Bradford).

La teneur en protéine des fractions recueillies est mesurée à 595 nm selon la méthode de Bradford, 1976. L'estimation de la concentration en protéine par fraction s'effectue par référence à une courbe standard établie au moyen de la sérum albumine bovine. Afin d'établir la courbe standard et les tests, les protéines doivent être amenée à un volume de 100 µl à l'aide de NaCl 0,15 M.

- Ajouter 1 ml de la solution de Bradford au 100µl de protéine.
- Incuber 10 minutes et lire à 595 nm.

2.1.4. Electrophorèse en gel SDS polyacrylamide.

En présence de SDS les protéines prennent une charge négative et sont séparées selon leur taille.

La migration s'effectue successivement dans deux gels différents: le "stacking gel" qui concentre les protéines et le "running gel" qui les sépare.

Les marqueurs de tailles utilisés sont les suivants:

Protéine	Poids des sous unités
Phosphorylase b	94000
Bovine Serum Albumin	67000
Ovalbumin	43000
Carbonic Anhydrase	30000
Trypsin inhibitor	20100
α -Lactalbumin	14400

2.1.4.1. Montage et préparation du gel.

(système MINI PROTEAN™ II de BIORAD)

- Laver les plaques et les spacers (eau de ville, distillée puis éthanol).
- Placer les plaques dans leurs supports.

-Préparer le "running gel" 10%:

- 2,5 ml d'acrylamide 30%-bisacrylamide 0,8%.
- 1,875 ml de TrisHCl 1,5 M-SDS 0,4% pH 8,8.
- 2,75 ml d'eau distillée.

Immédiatement avant de couler le gel ajouter:

- 0,375 ml de PAS (persulfate d'ammonium) 1%.
- 7,5 μ l de Temed (Biorad).

- Placer de l'isoamylalcool en surface du "running gel" polymérisé, afin d'y déterminer une interface nette.
- Laisser polymériser 30 minutes.
- Buvarder l'isoamylalcool à l'aide de languettes de papier Whattman.
- Laisser évaporer correctement pendant 5 minutes.
- Laver les peignes (eau de ville, distillée puis éthanol) et les mettre en place.

-Préparer le "stacking gel":

- 0,5 ml d'acrylamide 30%-bisacrylamide 0,8%.
- 1,25 ml de TrisHCl 0,5 M-SDS 0,4% pH 6,8.
- 2,75 ml d'eau distillée.

Immédiatement avant de couler le gel ajouter:

- 0,5 ml de PAS (persulfate d'ammonium) 1%.
- 5 μ l de Temed (Biorad).

- Couler le "stacking gel" jusqu'au sommet des dents du peigne.
- Laisser polymériser 5 minutes.
- Immerger la cuve à l'aide de tampon d'électrophorèse 5X.

2.1.4.2. Préparation du marqueur de taille.

Ajouter à 1 μ l de la solution stock du marqueur de taille:

- 1,6 μ l de Sample Buffer 5X.
- 3 μ l de TrisHCl 0,5 M, SDS 4%, pH 6.8.
- 2,4 μ l d'eau.

2.1.4.3. Préparation des échantillons.

- Des quantités équivalentes de protéines sont portées à volume (10 à 20 μ l) à l'aide de Sample Buffer 5X et d'eau.
- Incuber les échantillons 3 minutes à 100°C (dénaturation).
- Centrifuger quelques secondes.
- Procéder aux dépôts et faire migrer à 100 Volts.

2.1.5. Coloration au Bleu de Coomassie.

- Démouler et enlever le "stacking gel" à l'aide d'un spacer.
- Laisser colorer dans un bain de Bleu de Coomassie pendant un heure.
- Immerger le gel dans un bain contenant la solution de décoloration.
- Remplacer la solution de décoloration toutes les cinq minutes.
- Lorsque la décoloration est suffisante, immerger le gel dans un bain contenant la solution d'arrêt de décoloration.
- Récupérer le gel à l'aide d'un papier Whatman, le recouvrir d'un film plastique transparent et le sécher 1/2 heure sous vide.

2.1.6. Immunoblot.

2.1.6.1. Le principe de l' "Immunoblot".

La procédure "immunoblot" peut être divisée en différentes étapes:

- 1) résolution des échantillons protéiques à l'aide d'un gel SDS-PAGE (voir 2.1.4 de ce chapitre).
- 2) transfert, des polypeptides séparés, du gel vers une membrane qui les accroche de façon aspécifique.
- 3) saturation des sites de fixation de la membrane.
- 4) addition des anticorps.
- 5) détection.

Après le transfert du contenu protéique du gel sur un filtre de nitrocellulose, au cours d'une opération de "blotting", celui-ci est saturé avec de la BSA puis incubés succesivement avec:

- 1) des anticorps polyclonaux de lapin anti-diméthylase de *E.coli*.
- 2) des anticorps d'âne biotinylés anti-anticorps de lapin.
- 3) de la peroxydase-streptavidine.
- 4) de l'H₂O₂ et de la DAB (diaminobenzidine).

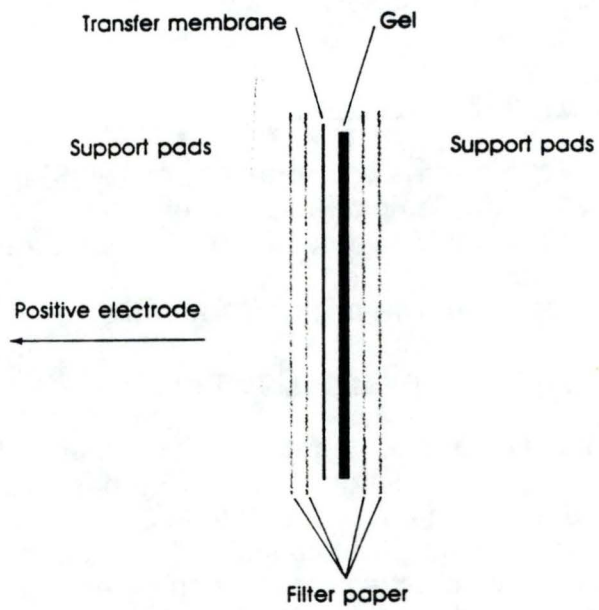


fig 3.6: Disposition des différents éléments lors du "blotting" (Harlow *et al* , 1988).

La biotine, une vitamine, a une grande affinité pour la streptavidine, une protéine bactérienne. Le DAB est transformé par la peroxydase en un composé brunâtre qui atteste la présence de la protéine ciblée par les anticorps.

2.1.6.2. Le "blotting".

- Couper un filtre de nitrocellulose (0,45 μ m) (Schleicher & Schwell) à la dimension du gel (càd: 5,5 cm X 8,4 cm).
- Couper quatre papiers Whatman à la même dimension.
- Rincer les mousses avec de l'eau puis du tampon de blotting.
- Humidifier le filtre de nitrocellulose et les papiers Whatman à l'aide de tampon de blotting.
- Sur le gel, marquer à l'encre de chine le centre des pistes de migration. Ces marques doivent se retrouver sur le filtre de nitrocellulose si le transfert s'est correctement réalisé.
- Placer le gel dans un bain de tampon de blotting pendant quelques minutes.
- Placer tous les éléments ci-dessus dans le boîtier de blotting en respectant l'ordre suivant (fig 3.6):

coté noir / 1 mousse / 2 papiers Whatman / le gel / le filtre de nitrocellulose / 2 papiers Whatman / 1 mousse / coté clair.

- Placer le boîtier de blotting dans une cuve à électrophorèse placée dans un récipient contenant de la glace.
- Immerger la cuve de tampon de blotting.
- La migration s'effectue à 300 mA pendant 1 heure 30.

2.1.6.3. Réaction avec les anticorps.

- Le filtre est récupéré et incubé pendant 12 heures à 4°C dans du:

PBS	1X
NP40	3%
NaNO ₃	0,02%

- Le filtre est incubé 5 fois 5 minutes à température ambiante dans du:

PBS	1X
Tween	1‰

- Incuber le filtres pendant 1 heure et demi à 37°C dans du:

PBS	1X
BSA (Sigma)	3%
NaNO ₃	0,02%

- Le filtre est incubé 5 fois 5 minutes dans du:

PBS	1X
Tween	1‰

-Incuber le filtre pendant une heure dans 50 ml de:

PBS 1X
BSA 1%

auquel on ajoute une dilution 1 / 500 des anticorps polyclonaux anti-diméthylase de lapin.

-Le filtre est incubé 5 fois 5 minutes dans du:

PBS 1X
Tween 1%

-Incuber le filtre pendant une heure dans 50 ml de:

PBS 1X
BSA 1%

auquel on ajoute une dilution 1 / 500 des anticorps d'âne biotinylés anticorps de lapin.

-Le filtre est incubé 5 fois 5 minutes dans du:

PBS 1X
Tween 1%

-Incuber le filtre pendant 25 minutes dans 50 ml de:

PBS 1X
BSA 1%

auquel on ajoute une dilution 1 / 400 de peroxydase-streptavidine.

-Le filtre est incubé 3 fois 5 minutes dans du:

PBS 1X
Tween 1%

-Placer dans un bain:

TrisHCl 0,1 M pH 7,6	50 ml
DAB (3,3',4,4'-tetraaminobiphényl)	25 mg
H ₂ O ₂ (100%)	50 µl

-Ajouter le filtre dans ce bain, la réaction débute endéans la minute.

-Arrêter la réaction avec de l'HCl 0,1 M.

-Sécher le filtre à l'air.

2.2. Techniques générales relatives à l'ADN.

2.2.1. Extraction au phénol.

Cette opération a pour but d'enlever les sels et les protéines. On l'utilise notamment entre deux restrictions pour lesquelles les tampons d'incubation des enzymes sont différents.

- Porter le volume à 100 µl avec de l'eau.
- Ajouter un volume de phénol / TE ou phénol / chloroforme.
- Vortexer.
- Centrifuger 2 à 3 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Prendre la phase aqueuse supérieure et la placer dans un nouvel Eppendorf.
- Ajouter 500 µl d'éther saturé en eau.
- Centrifuger quelques secondes.
- Éliminer la phase supérieure.

Récupération de l'ADN:

- Ajouter: -2,5 volumes d'éthanol 100% froid.
 -0,1 volume de NaAc 3M pH 5,2.
 - Incuber 15 minutes à -80°C.
 - Culoter l'ADN en centrifugeant 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
 - Décantier.
 - Laver le culot à l'éthanol 90%.
 - Sécher 10 minutes sous vide puis resuspendre dans un volume approprié d'eau stérile.
- Si le volume d'ADN à précipiter est trop important, une précipitation à l'isopropanol peut être réalisée (voir 2.3.2.1).

2.2.2. Electrophorèse analytique sur gel d'agarose.

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée pour séparer des fragments d'ADN, estimer leur taille, leur concentration et l'état de pureté d'une préparation (absence de protéines et d'ARN).

2.2.2.1. Critères de séparation des fragments d'ADN.

Une molécule chargée, placée dans un champ électrophorétique, migre vers l'électrode de signe opposé à sa charge. L'ADN étant chargé négativement (groupements phosphates), il se déplace vers l'anode.

Différents paramètres influencent la migration de l'ADN dans le champ. Il s'agit de la conformation, du poids moléculaire (PM), de la concentration en agarose du gel et de l'ampérage appliqué à la cuve d'électrophorèse.

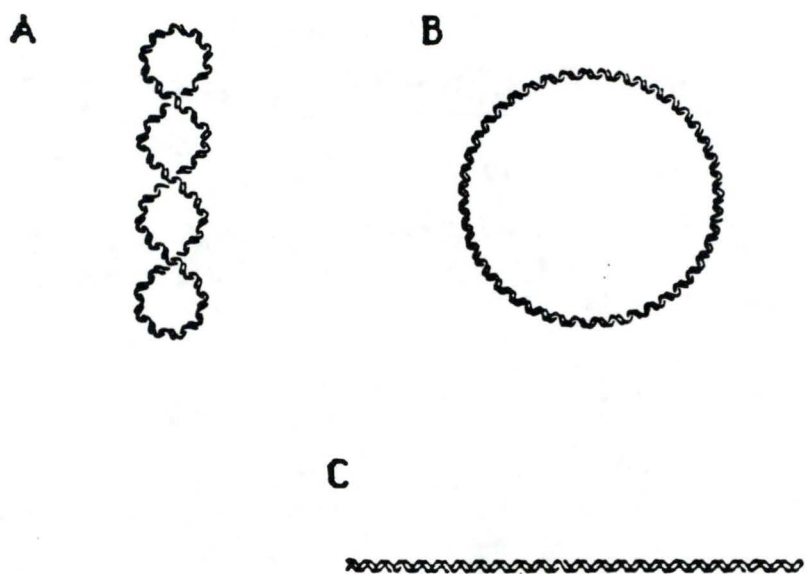


fig 3.7: Les trois conformations de l'ADN: (A) CCC, (B) OC, (C) OL.

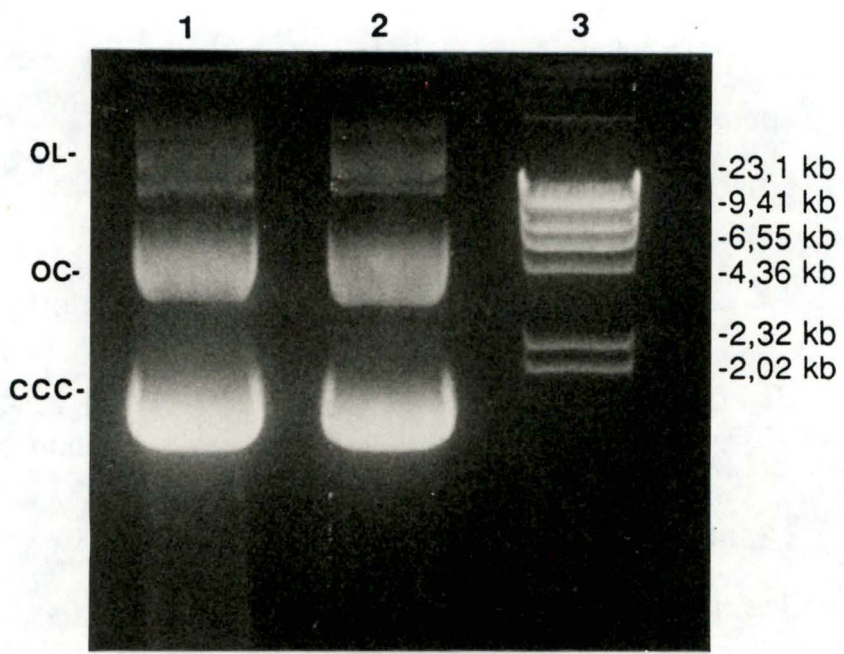


fig 3.8: piste 1 et 2: illustration de la migration des trois conformations (sur gel d'agarose 1%).
 piste 3: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* dIII.

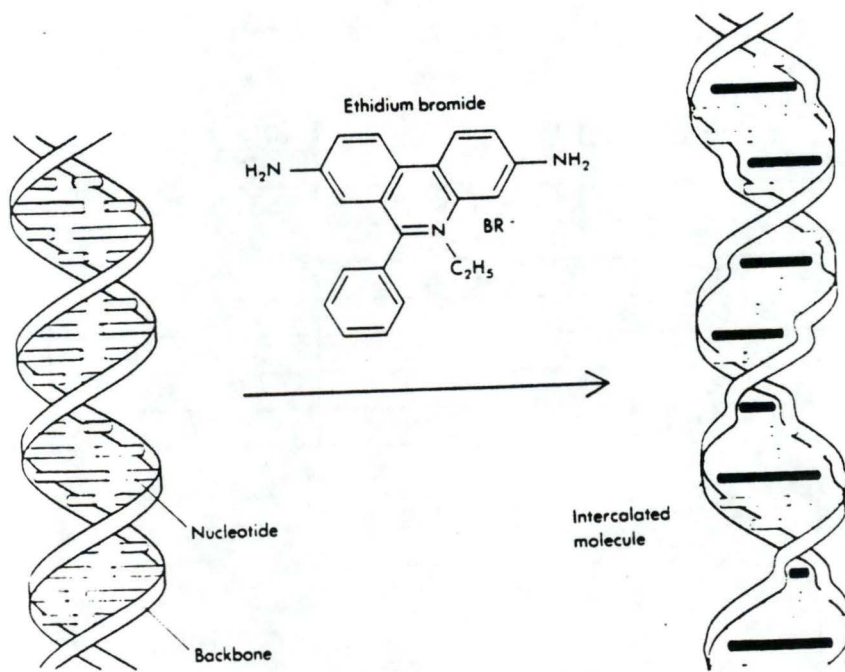


fig 3.9: Schéma de l'intercalation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN.

λ <i>Hin</i> d III (48502 bp)	Total de 600ng	pBR322 <i>Hin</i> f I (4363 bp)	Total de 1 μ g
Taille	Concentration	Taille	Concentration
23130 bp	286 ng	1632 bp	374 ng
9416 bp	116 ng	517+506 bp	118+113 ng
6557 bp	81 ng	396 bp	90 ng
4361 bp	53 ng	344 bp	78 ng
2322 bp	28 ng	298 bp	68 ng
2027 bp	25 ng	221+220 bp	50+50 ng
564 bp	7 ng	154 bp	35 ng
(125 bp)	(1,5 ng)	(75 bp)	(17 ng)

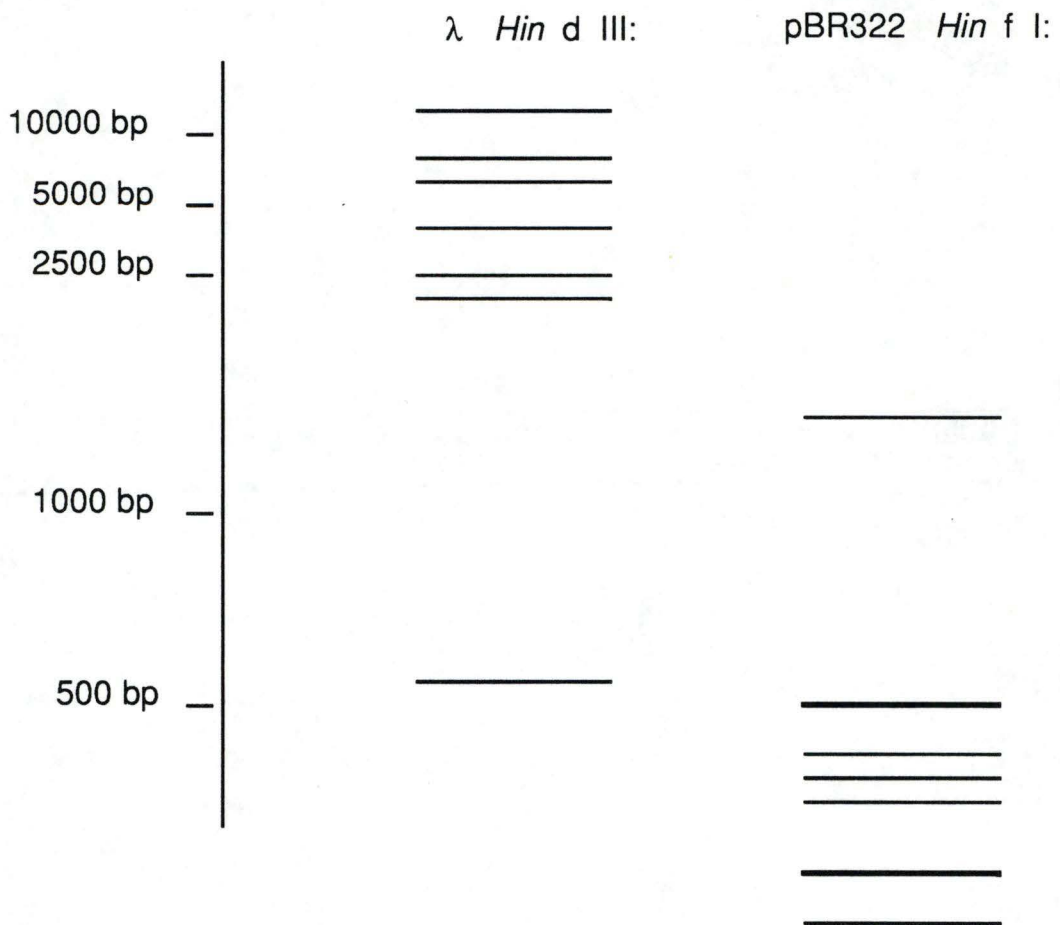


fig 3.10: Marqueurs de taille.

Les molécules d'ADN existent sous trois conformations différentes (fig 3.7). La conformation la plus abondante est la forme CCC (Covalently Closed Circular). Si cette forme présente un nick (absence de lien phosphodiester) sur un des deux brins, on obtient la conformation OC (Open Circular). Enfin, la forme linéaire présente un nick sur chacun des deux brins.

La forme CCC migre plus vite que la forme OL qui migre elle-même plus vite que la forme OC (fig 3.8).

Les molécules d'ADN migrent à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur PM.

La concentration en agarose (par ex: 0,8-1-2%) est également déterminante pour la mobilité de l'ADN. On peut augmenter cette concentration afin de séparer plus efficacement des fragments de petite taille.

Quand le voltage appliqué à la cuve est faible, la vitesse de migration est linéaire. Elle augmente proportionnellement en fonction du voltage appliqué.

2.2.2.2. Visualisation de l'ADN sur le gel.

L'ajout de bromure d'éthidium (BrEth) dans le polymère d'agarose, permet à ce celui-ci de s'insérer entre les bases de l'ADN (fig 3.9). Lorsque ce composé est excité par des U.V (302 nm), il devient fluorescent.

2.2.2.3. Estimation de la taille des fragments.

Pour estimer la taille des fragments, on utilise un marqueur de référence. Le génome du phage Lambda (50 kb total), digéré par l'enzyme *Hind* III est utilisé dans le cas des gels 0,8% et le plasmide pBR322 (4,5 kb total) digéré par l'enzyme *Hinf* I dans celui des gels 2% (fig 3.10).

La migration du marqueur de taille permet d'établir une abaque exprimant le logarithme de la taille des fragments en fonction de leur distance de migration. On peut alors dans un second temps reporter la distance de migration des fragments de l'échantillon et estimer leur taille.

2.2.2.4. Estimation de la quantité des fragments.

Pour estimer la concentration d'un fragment donné, on se réfère à nouveau au marqueur de taille. On connaît la concentration correspondant à chacune des bandes de ce marqueur (fig 3.10).

En comparant visuellement l'intensité de la bande que l'on considère avec celles du marqueur de taille, on estime de façon approximative la concentration en ADN de celle-ci. Une estimation beaucoup plus précise peut être obtenue par un dosage spectrophotométrique (voir point 2.3.2.3).

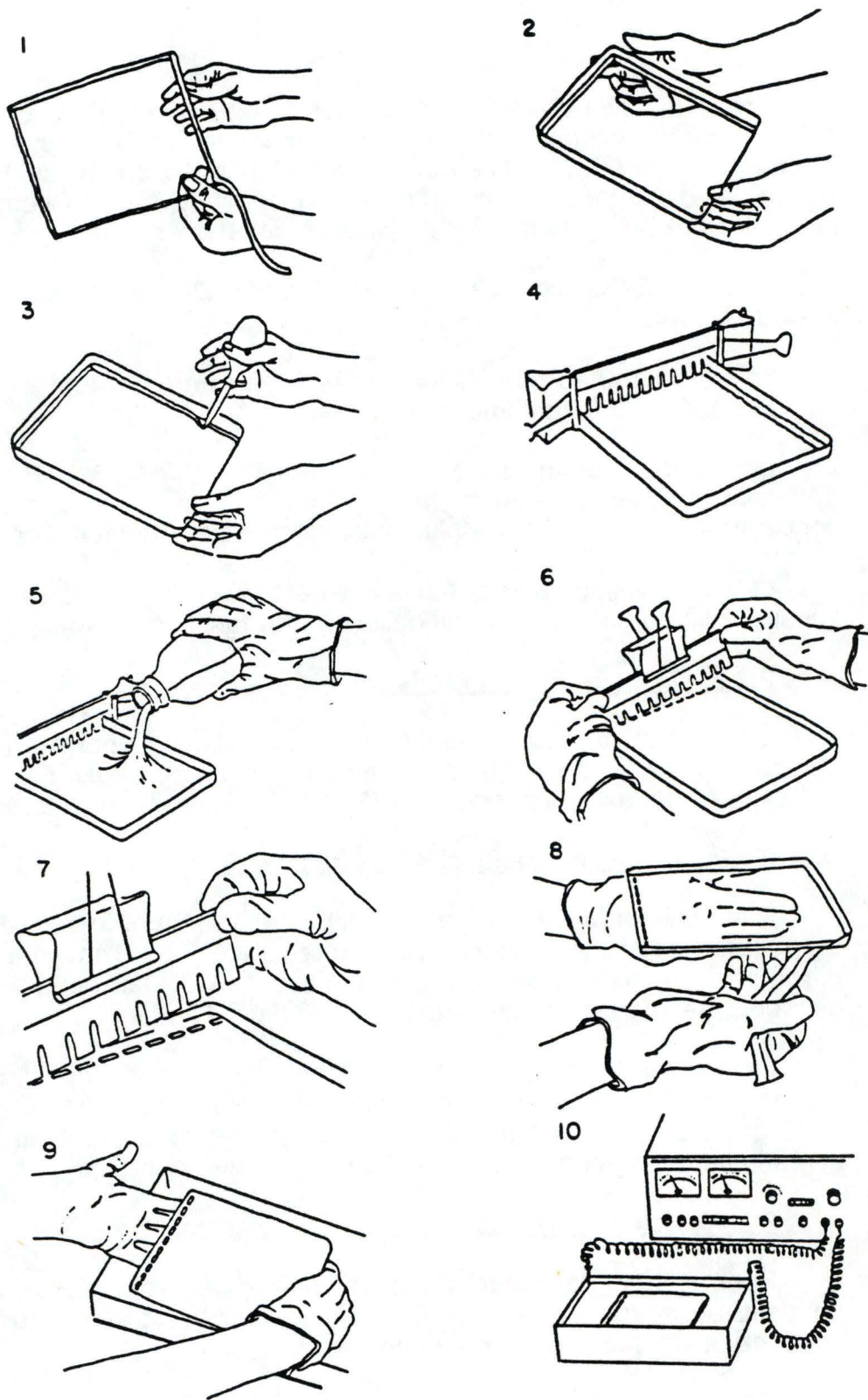


fig 3.11: Illustration du montage d'un gel d'agarose.

2.2.2.5. Mise en oeuvre.

-Dissoudre la quantité appropriée d'agarose dans du tampon TBE 1X en chauffant.

-Laisser refroidir à 50°C.

-Ajouter le BrEth (concentration finale 0,5 µg / ml), mélanger.

-Couler le gel dans un support en plexiglas et y ajouter un peigne (fig 3.11).

-Enlever le peigne lorsque le gel est polymérisé.

-Placer le gel dans une cuve à électrophorèse et immerger dans du tampon TBE 1X.

Avant le dépôt de l'échantillon d'ADN, et pour faciliter celui-ci, on ajoute aux échantillons une solution dense et colorée (bleu de bromophénol).

2.2.3.Électrophorèse préparative et purification de fragments d'ADN.

Après avoir réalisé une électrophorèse préparative, il est possible de purifier un fragment d'ADN. Le but est de ne soumettre à la ligation que les fragments que l'on désire voir s'assembler, ce qui ne fait que diminuer le nombre de constructions possibles et donc faciliter le criblage.

Trois protocoles différents ont été suivis. Deux sont basés sur l'excision, à l'aide d'une lame de scalpel, de la portion de gel contenant le fragment. Il s'agit des méthodes proposées par GeneClean® et BioRad (kit: prep-A-gene), dans lesquelles, après dissolution du morceau de gel dans un tampon approprié, on lui adjoint des billes de verre auxquelles se lie l'ADN. Les billes sont lavées, et l'ADN récupéré par élution. Se référer au kit pour les protocoles détaillés.

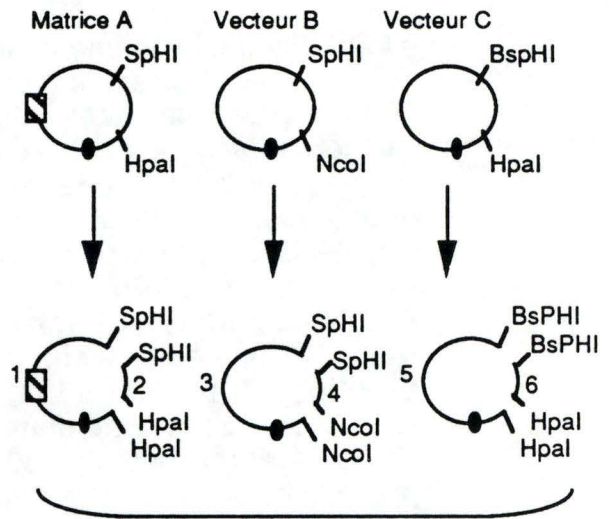
Dans la troisième méthode (Dretzen *et al*, 1981), le gel est incisé sous la bande d'intérêt afin d'y introduire un morceau de papier filtre (DEAE cellulose / Whatman DE81). Après 10 minutes de migration, le fragment d'intérêt est transféré du gel sur le papier Whatman.

Protocole détaillé:

- Préparation des filtres Whatman DE81:
 - Découper à la taille désirée.
 - Incuber 2-3 heures dans du NaCl 2,5 M.
 - Laver plusieurs fois à l'eau.
 - Conserver dans de l'EDTA 1mM à 4°C.
 - Avant emploi, rincer une fois avec du TBE 1 X.

- Couper le gel avec une lame de scalpel juste en dessous de la bande à récupérer et y glisser le papier.
- Faire migrer 10 minutes à 100 volts
- Rincer le papier avec de l'eau froide pour enlever le TBE.
- Buvarder le papier entre deux filtres.
- Placer le papier dans un Eppendorf.
- Ajouter 350 μ l de High Salt Buffer (tampon d'élution).
- Mélanger jusqu'à l'obtention d'une pâte.
- Incuber 2 heures à 37°C en agitant de temps en temps.
- A l'aide d'une épingle chauffée faire un petit trou dans le fond de l' Eppendorf.
- Enfoncer l' Eppendorf dans un second non troué.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm (Janetzski).
- Ajouter 2 volumes de N-butanol saturé en eau à la phase aqueuse récupérée (élimination du BrEth).
- Vortexer 30 secondes
- Centrifuger 5 minutes.
- Eliminer la phase supérieure (butanol).
- Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu, mélanger.
- Placer 30 minutes à -80° ou une nuit à -20°C.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décantier.
- Laver le culot avec 300 μ l d'éthanol 90% (élimination des sels).
- Recentrifuger quelques minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Sécher 10 minutes sous vide.
- Resuspendre dans 10 μ l d'eau stérile.

Vecteurs originaux



Restriction

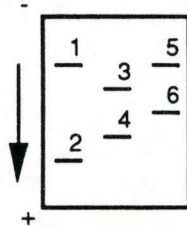
On désire assembler le fragment 1 (que l'on considère ici comme matrice) avec les fragments 4 et 6.

Population de fragments d'origine diverses.

Ligation sans purification des fragments d'ADN: de nombreuses constructions sont potentiellement possible.

- ex: 1+4+6
 1+4+5
 1+3+6
 3+2+6
 3+2+5...

Purification des fragments d'intérêt (1, 4 et 6) sur gel d'agarose:



Ligation sur un mélange très enrichi en fragments 1, 4 et 6. La probabilité d'obtenir la bonne construction est augmentée. Le screening sera plus aisé.

Transformation

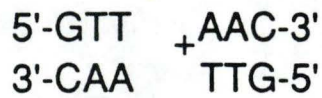


criblage

Par minipreps (2.3.2.1) suivies de restrictions diagnostiques. (un premier élagage est réalisé grâce au test blanc/bleu (2.3.1.4.3) si la matrice et l'hôte bactérien l'autorise)

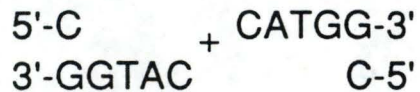
fig 3.12: Exemple d'illustration de différentes techniques de l'ADN recombinant.

Hpa I:



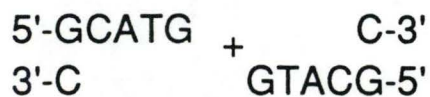
Enzyme de restriction clivant l'ADN en générant des extrémités franches.

Nco I:



Enzyme de restriction clivant l'ADN en générant des extrémités collantes 5' protrudentes.

SpH I:



Enzyme de restriction clivant l'ADN en générant des extrémités collantes 3' protrudentes.

fig 3.13: Sites de reconnaissance de différentes enzymes de restriction.

***Nco* I**

5'...C'CATGG...3'
3'...GGTAC'C...5'



5'...C
3'...GGTAC

***Bsp* HI**

5'...T'CATGA...3'
3'...AGTAC'T...5'



CATGA...3'
T...5'

+



5'...CCATGA...3'
3'...GGTACT..5'

fig 3.14: *Nco* I et *Bsp* HI sont deux enzymes générant des bouts collants compatibles.

2.3. Techniques de l'ADN recombinant.

2.3.1. Constructions génétiques.

2.3.1.1. Principe général.

La plupart des techniques utilisées en génie génétique sont basées sur l'existence de plasmides. Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire circulaires et autorépliquatives, sur lesquelles il est possible d'effectuer une série d'opérations. Il s'agit de la restriction, de la ligation et de la transformation.

Les plasmides sont restreints à l'aide d'enzymes de restriction diverses reconnaissant un site spécifique sur l'ADN (souvent une séquence palindromique de 4 à 6 bp). Le nombre de fragments générés dépend de la fréquence d'occurrence du site dans la molécule d'ADN.

Ces fragments peuvent ensuite être ligués à l'aide de la T₄ DNA ligase. Pour autant que les extrémités des morceaux que l'on désire assembler soient compatibles, on pourra construire des plasmides possédant des fragments de restriction d'origines très diverses (fig 3.12).

Deux cas peuvent se présenter: soit l'enzyme clive l'ADN en générant des extrémités à bouts francs (cas de *Hpa* I), soit en générant des bouts collants. Si il génère des bouts collants, ils seront 5' protrudents (ex: *Nco* I, *Bsp* HI), ou 3' protrudents (ex: *Sph* I) (fig 3.13).

Tous les fragments qui se terminent par des bouts francs sont compatibles entre eux. Par contre, ceux dont les extrémités sont des bouts collants doivent, pour être compatibles, présenter des extrémités protrudentes de même longueur et de séquence nucléotidique complémentaire (fig 3.14, cas de *Nco* I et *Bsp* HI).

Les constructions ainsi élaborées sont introduites par transformation dans une souche de bactérie ou de levure afin d'être amplifiées ou d'observer les phénotypes auxquels elles donnent naissance.

Enfin, on peut ajouter à ces trois opérations de base la purification de fragments d'ADN sur gel d'agarose (voir 2.2.3).

2.3.1.2. Restriction.

Après restriction, les fragments d'ADN obtenus possèdent un groupement phosphate du côté 5' terminal et un groupement -OH du côté 3' terminal.

En pratique:

La réaction de restriction s'effectue dans un volume de 20 à 50 μ l.

Placer dans un Eppendorf:

- ADN à restreindre.
- 1/10 du volume final de tampon de restriction 10X.
- Enzyme de restriction (le plus souvent une unité / μ g d'ADN).
- Porter à volume avec de l'eau stérile.
- Incuber une heure à 37°C.

Remarquons que le nombre d'unités d'enzymes de restriction à investir dans une réaction est déterminée en prenant en compte la fréquence d'occurrence du site ainsi que la quantité de matériel à digérer.

Après la réaction, les enzymes peuvent être inactivés par passage à 65°C, à -20°C ou par une extraction au phénol.

Le volume d'enzyme ne doit pas dépasser le dixième du volume final de la réaction car les enzymes sont stockés dans du glycérol susceptible à forte concentration d'inactiver ou de conférer une activité star. Un enzyme présente une activité star lorsqu'il restreint en des sites qui ne lui sont pas spécifiques.

2.3.1.3. Ligation.

La ligase du phage T₄ est utilisée pour catalyser la formation de liens phosphodiester entre un groupement hydroxyle en 3' et un groupement phosphate en 5'. Pour être active, l'enzyme requiert la présence d'ATP et de Mg²⁺ (fig 3.15).

En pratique:

Placer dans un Eppendorf:

- le vecteur linéarisé.
- le ou les fragments à insérer.
- 1 Unité de T₄ DNA ligase.
- 1/5 du volume final de tampon de ligation 5X.
- Porter à volume avec de l'eau stérile si nécessaire.

L'incubation une nuit à 14°C est idéale pour les bouts collants car cette température favorise la formation des ponts hydrogènes. Dans le cas des bouts francs, une incubation de 3 heures à température ambiante est préférable car dans ces conditions, l'activité de l'enzyme est plus importante (la formation de ponts H n'étant pas requise).

Quand les deux types d'extrémités sont présentes, les deux incubations sont successivement réalisées.

La stoechiométrie vecteur / insert est de 1:1, si le clonage est forcé (une seule possibilité d'insertion), elle est de 1:3 ou 1:4, si un ou plusieurs sites à bouts francs sont présents.

2.3.1.4.Transformation.

2.3.1.4.1.Transformation bactérienne.

Pour transformer des bactéries (y introduire de l' ADN exogène), il faut les rendre compétentes, c'est-à-dire perméabiliser leur paroi et membrane. Les bactéries soumises à une solution hypotonique de chlorure de calcium prennent l'aspect de sphéroplastes. Le calcium, en se liant à l' ADN plasmidique, forme à proximité de la paroi bactérienne un complexe résistant aux DNAses. Un choc thermique permet à ce complexe de pénétrer dans la cellule. Une incubation de une demi-heure à 37°C est nécessaire pour que les bactéries régénèrent leur paroi.

2.3.1.4.1.1.Préparation de cellules compétentes au CaCl₂.

- Réaliser une préculture dans 10 ml de LB.
- Inoculer 40 ml de LB avec 1 ml de la préculture.
- Incuber sous agitation à 37°C jusqu'au moment où la croissance atteint une D.O de 0,3 à 540 nm (phase exponentielle).
- Centrifuger à 5000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Resuspendre le culot dans 20 ml de CaCl₂ 50 mM froid.
- Incuber entre 30 minutes et une heure dans la glace.
- Centrifuger à 5000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Décanner le surnageant.
- Resuspendre dans 4 ml de CaCl₂ 50 mM / glycérol 15% froid.
- Aliquoter par 300 µl dans des Eppendorfs préalablement refroidis .
- Stocker à -80°C ou utiliser .

Bien que les cellules compétentes puissent être utilisées directement, l'efficacité de la transformation augmente si elles sont laissées quelques heures sur glace. Si la durée du stockage à -80°C se prolonge, l'efficacité des transformations peut diminuer drastiquement.

2.3.1.4.1.2.Transformation par un plasmide.

- Placer dans un Eppendorf: 200 à 300 µl de cellules compétentes et 1 à 500 ng d' ADN plasmidique.
- Incuber 40 minutes sur glace.
- Réaliser un choc thermique 2 minutes à 42°C.
- Ajouter stérilement 1 ml de LB.
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Etaler 100 à 200 µl de cellules sur boîtes contenant le milieu sélectif approprié.

2.3.1.4.1.3. Contrôles de transformation.

Généralement, on obtient 5.10^6 à 2.10^7 transformants par μg de plasmide CCC transformant.

On peut effectuer différents contrôles:

-Contrôle + (Viabilité): étaler 200 μl de cellules compétentes non transformées sur milieu non sélectif.

-Contrôle - (Sensibilité): étaler 200 μl de cellules compétentes non transformées sur milieu sélectif.

-Transformabilité: la capacité qu'ont les cellules compétentes à transformer est vérifiée en utilisant un vecteur très efficace pour la transformation (ex: un pUC, ou pKS).

2.3.1.4.1.4. Transformation par le phage M13.

Le principe de transformation est identique. Cependant, on n'obtiendra pas des colonies bactériennes mais des plaques de moindre croissance. En effet, les bactéries infectées ne sont pas lysées mais leur croissance est ralentie car le phage détourne leur machinerie de synthèse.

-Dans un Greiner ajouter: -300 μl de cellules compétentes *E. coli* TG1.
-200 ng d'ADN M13 (RF ou ss).

-Incuber 40 minutes dans la glace.

-Incuber 45 secondes à 42°C sans mélanger.

-Incuber 5 minutes dans la glace avant d'étaler.

-Ajouter: -75 μl d'IPTG 100 mM.

-70 μl d'Xgal 2%.

-200 μl de cellules TG1 non compétentes.

-3 à 4,5 ml de Htop liquide à la température de 45°C.

-Couler immédiatement le mélange de transformation sur des boîtes contenant le milieu Hplate préalablement préchauffées à 37°C.

-Incuber une nuit à 37°C.

2.3.1.4.2. Transformation de levure.

(ITO *et al*, 1983)

Dix millilitres de culture sont nécessaires par transformation.

-Ensemencer 20 ml de YPGA avec une colonie de la souche W303.

-Laisser pousser jusqu'à une D.O de 1 à 600 nm.

-Centrifuger 10 minutes à 6000 rpm et 20°C (rotor SS34).

-Décantier le surnageant.

-Resuspendre dans 5 ml d'eau stérile.

-Centrifuger 10 minutes à 6000 rpm et 20°C (rotor SS34).

-Décantier le surnageant.

-Resuspendre dans 2 ml de TE-LiOAc et répartir dans deux Eppendorfs.

-Centrifuger 10 minutes en Janetzki (13000 rpm) à température ambiante.

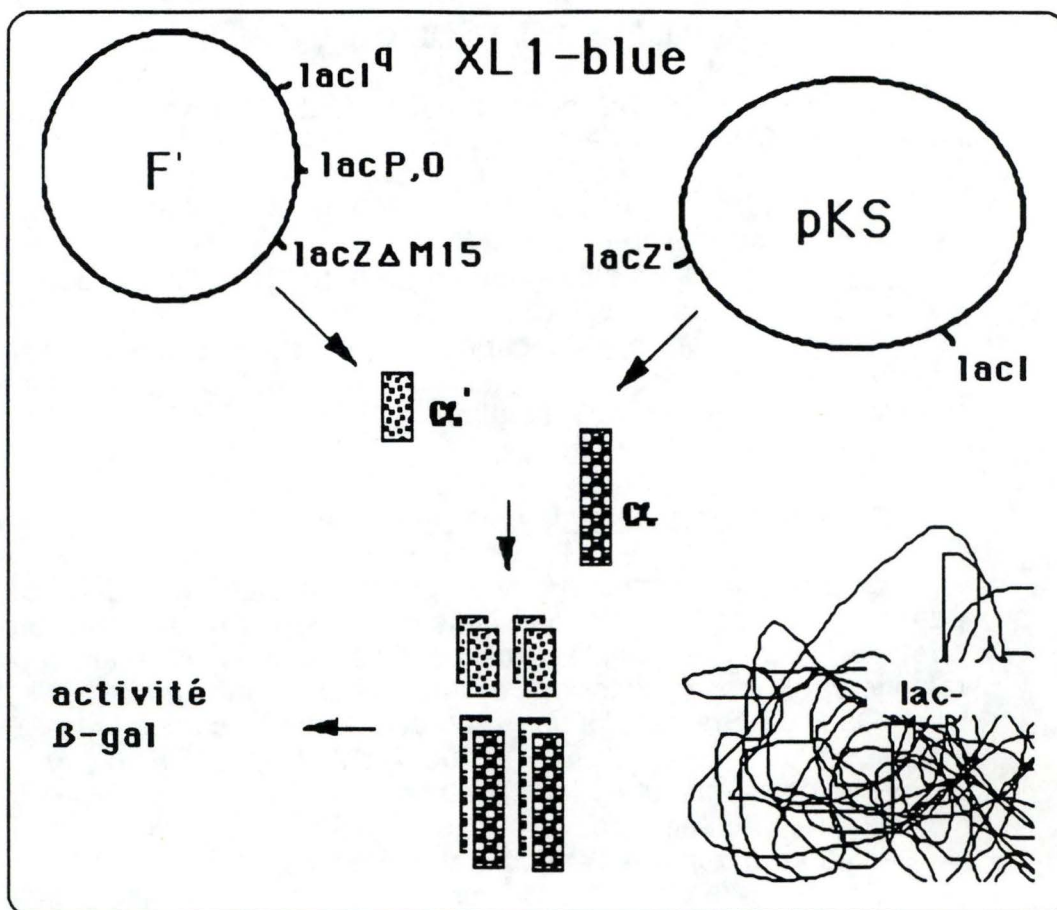


fig 3.16: XL1-blue-pKS, un système hôte-vecteur permettant la sélection des recombinants par la couleur des colonies.

- Resuspendre dans 100 μ l de TE-LiOAc.
- Incuber 60 minutes à 30°C sous agitation.
- Ajouter: 50 μ g de "DNA carrier" (ADN de thymus de veau) et l'ADN plasmidique (10 μ l contenant entre 5 et 10 μ g de matériel).
- Incuber 30 minutes à 30°C sous agitation.
- Ajouter 700 μ l de TE-LiOAc-PEG et mélanger.
- Incuber 60 minutes ou une nuit à 30°C sous agitation.
- Réaliser un choc thermique 5 minutes à 42°C.
- Centrifuger 1 minute et resuspendre dans 200 μ l d'eau stérile.
- Etaler par 100 μ l sur milieu sélectif.

Le principe des contrôles de transformation reste identique à ceux explicités au point 2.3.1.4.1.3.

2.3.1.4.3.Méthodes de sélection des transformants et des recombinants.

L'ampicilline permet de sélectionner les bactéries qui ont été transformées par un plasmide porteur du marqueur BLA (ou AMP^r). Ce gène encode la protéine β -lactamase qui, excrétée dans l'espace périplasmique, dégrade l'ampicilline.

Les bactéries de la souche XL1-blue qui portent un plasmide recombinant sont sélectionnées par un test colorimétrique (blanc / bleu).

La souche est délétée dans son chromosome pour l'opéron lactose (*lac* -), mais une partie de celui-ci est "reporté" sur l'épisome F' de ces bactéries. Il s'agit de la portion *lac* Δ M15 codant pour la partie C-terminale inactive α' de la β -galactosidase (fig 3.16 et voir 1.2.1).

Le reste de l'opéron est présent sur des vecteurs comme le pBluescriptKS. En effet, le pKS est porteur d'un fragment non opérationnel *lac* I (le gène régulateur de l'opéron) et d'un fragment *lac* Z' qui contient le promoteur de *lac*, l'opérateur et la portion du gène *lac* Z codant pour l'extrémité N-terminale de la β -galactosidase, c'est à dire le peptide α inactif.

La complémentation intragénique consiste en l'assemblage des peptides α et α' , ce qui génère une enzyme β -galactosidase fonctionnelle. Cette dernière clive le Xgal en un chromogène bleu et en galactose.

Par construction, le site multiple de clonage du pKS a été inséré en phase dans une région peu importante pour l'activité β -gal ce qui n'empêche pas la restauration de l'activité par complémentation intragénique.

Par contre, lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans ce MCS, l'ORF de la portion *lac* Z' est disruptée, et le peptide α n'est plus synthétisé.

Les bactéries transformées par de tels vecteurs (dits recombinants), donneront naissance à des colonies blanches, alors que celles transformées par des matrices qui se sont reliquées sur elles-mêmes donneront des colonies bleues.

Cette complémentation, décrite pour XL1-blue et pKS, fonctionne également dans d'autres systèmes hôte-vecteur pour autant que les caractéristiques décrites soient conservées chez ces derniers. Ainsi, elle sera également très utile dans le cas du phage M13 et de son hôte bactérien TG1.

2.3.2. Préparation de vecteurs d'ADN.

2.3.2.1. Minipréparation d'ADN à double brin.

(Birboim *et al*, 1979)

Ce protocole permet d'obtenir de l'ADN plasmidique rapidement et en quantité suffisante que pour être diagnostiqué par restriction.

- Inoculer 10 ml de LB avec une colonie.
- Ajouter des antibiotiques si nécessaire.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de culture pendant 5 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Décantier le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 300 µl de P1+RNase.
- Ajouter 300 µl de tampon P2.
- Mélanger doucement et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de tampon P3.
- Mélanger doucement.
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Récupérer le surnageant contenant l'ADN plasmidique.

Précipitation de l'ADN:

- Ajouter 0,8 volume d'isopropanol à température ambiante.
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Laver le surnageant avec 300 µl d'éthanol 70%.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décantier le surnageant.
- Sécher le culot 10 minutes sous vide.
- Resuspendre l'ADN dans 10 à 50 µl de tampon TE.

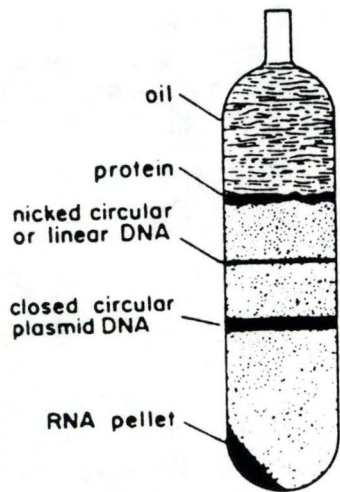


fig 3.17: Répartition des différentes formes d'ADN plasmidique dans un gradient de chlorure de césium.

2.3.2.2. Midipréparation d'ADN à double brin.

- Inoculer 100 ml de LB avec une colonie.
- Ajouter des antibiotiques si nécessaire.
- Incuber 12 heures à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm et température ambiante (rotor GSA Sorvall).
- Décantier le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de tampon P1+RNase.
- Transférer dans un corex de 30 ml.
- Ajouter 4 ml de tampon P2.
- Mélanger délicatement et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de tampon P3.
- Centrifuger 30 minutes à 12000 rpm et 4°C (rotor SS34 Sorvall).
- Récupérer le surnageant
- Déposer le surnageant au sommet d'une colonne Qiagen-pack 100 pré-équilibrée avec 2 ml de tampon QB.
- Laver la colonne avec 2 X 4 ml de tampon QC.
- Eluer l'ADN avec 2 ml de tampon QF et récupérer l'éluat dans un corex de 15 ml.
- Ajouter 0,8 volume d'isopropanol à température ambiante.
- Centrifuger 30 minutes à 12000 rpm et température ambiante (rotor SS34 Sorvall).
- Décantier.
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70% froid.
- Décantier.
- Sécher le culot sous vide.
- Resuspendre l'ADN dans 100 à 1000 µl de tampon TE.

2.3.2.3. Maxipréparation d'ADN à double brin.

Différents protocoles ont été suivis. Ils diffèrent par les méthodes de lyse et de récupération. La lyse peut se faire soit de façon alcaline, soit à l'aide de lysozyme en présence d'EDTA et d'un détergent (Triton ou SDS).

De même la récupération de l'ADN peut se faire soit par précipitation, soit par dialyse. L'étape commune à toutes ces méthodes de préparation d'ADN plasmidique à large échelle est la séparation des différentes formes de l'ADN au sein d'un gradient de chlorure de césium (fig 3.17).

Un seul de ces protocoles est détaillé:

- Réaliser une culture de 200 ml.
- Ajouter des antibiotiques si nécessaire.
- Centrifuger 10 minutes à 5000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Resuspendre le culot dans 5 ml de Tris 0,05M pH 8,0-sucrose 25%.
- Transvaser dans des tubes Sorvall.
- Adjoindre 1 ml de TEN auquel on ajoute extemporanément 10 mg / ml de lysozyme.

- Incuber 5 minutes sur glace.
- Ajouter 2 ml d'EDTA 0,25M pH 8,0.
- Mélanger.
- Incuber 5 minutes sur glace.
- Ajouter 2 ml de SDS 10%.
- Mélanger.
- Incuber 10 minutes sur glace en mélangeant de temps en temps.
- Ajouter 2,5 ml de NaCl 5M, mélanger par inversion.
- Incuber entre 2 heures et une nuit sur glace.
- Centrifuger une heure à 13000 rpm et 4°C (rotor SS34 Sorvall).
- Reprendre le surnageant.
- Ajouter 0,6 volume d'isopropanol, mélanger.
- Incuber 30 minutes à -20°C.
- Centrifuger 30 minutes à 7000 rpm et 4°C (rotor SS34 Sorvall).
- Eliminer le surnageant.
- Sécher partiellement le culot sous vide (10 minutes).
- Resuspendre dans 4 ml de TE et transférer dans un stérilin.
- Rincer le tube avec 9,7 ml de TE.
- Ajouter : 13,7 g de CsCl et 0,7 ml de Br.Eth (10 mg / ml).
- Transférer dans un crimper, équilibrer avec de l'huile de paraffine.
- Centrifuger 16 heures à 45000 rpm et 20°C (rotor TV 865 B).
- Récupérer la bande inférieure sous U.V.
- Réaliser 3 extractions à l'alcool isoamylique (élimination du BrEth).
- Dialyser 3 heures contre du tampon SSC 1/10.
- Vider le boudin de dialyse dans un Grainer et mesurer le volume.
- Ajouter un volume équivalent de phénol et mélanger.
- Centrifuger 15 minutes à 8000 rpm (rotor SS34 Sorvall).
- Effectuer une nouvelle dialyse de 12 heures en changeant le tampon toutes les quatre heures.

Pour estimer la quantité de matériel et le degré de propreté de la préparation, on effectue un dosage spectrophotométrique. Le rapport des absorbances à 260 et 280 nm doit être compris entre 1,6 et 2. Une D.O à 260 nm correspond à 50 µg / ml d' ADN double brin.

2.3.2.4.Minipréparation de M13 à simple brin.

L'ADN simple brin est obtenu par déprotéinisation d'une suspension de particules virales, le surnageant d'une culture d'*E.coli* TG1 infectée par le phage M13.

- Inoculer 10 ml de LB avec une colonie de TG1 et laisser pousser une nuit à 37°C.
- Culture de M13: inoculer 10 ml de LB avec 100 µl de la culture bactérienne de nuit et une plaque de moindre croissance, prélevée à l'aide d'un cure dent, obtenue par la transformation d'*E.coli* TG1 par le phage M13 (ou 100 µl de surnageant issu d'une culture infectée antérieure).
- Incuber 5 heures à 37°C dans un bain agitant.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 13000 rpm et 4°C (rotor SS34).
- Récupérer le surnageant et ajouter 2 ml d'une solution de PEGNaCl.
- Vortexer.

- Incuber 15 à 30 minutes à 4°C.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm et 4°C (rotor SS34).
- Décanner.
- Centrifuger 2 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Enlever toute trace de PEGNaCl.
- Ajouter au culot 200 µl de tampon TE et 200 µl de phénol équilibré avec du TE.
- Incuber 15 minutes à température ambiante.
- Vortexer.
- Centrifuger 3 minutes à 13000 rpm (Janetzki) et récupérer la phase aqueuse.
- Précipiter l'ADN à l'éthanol absolu (0,1 volume de NaAc 3M et 2,5 volumes d'éthanol 100%).
- Incuber 10 minutes à -70°C.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décanner le surnageant et laver à l'éthanol 70%.
- Décanner le surnageant.
- Sécher sous vide 10 minutes puis resuspendre dans 20 µl de TE.

2.3.2.5. Maxipréparation de M13 à simple brin.

-Inoculer 5 ml de LB avec une colonie bactérienne d'*E.coli* TG1 et laisser pousser une nuit à 37°C.

-Culture de M13: inoculer 5 ml de LB avec 50 µl de la culture bactérienne de nuit et une plaque de moindre croissance, prélevée à l'aide d'un cure dent, obtenue par la transformation d'*E.coli* TG1 par le phage M13 (ou 50 µl de surnageant issu d'une culture infectée antérieure).

Incuber 5 heures à 37°C dans un bain marie.

-Culture de *E.coli* : inoculer 100 ml de LB avec 1 ml de la culture bactérienne de nuit jusqu'à ce que la densité optique atteigne une valeur de 0,3 à 540 nm.

- Centrifuger 1,5 ml de la culture de M13 pendant 5 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Infecter les 100 ml de culture bactérienne avec le surnageant et incuber 4 heures à 37°C.
- Centrifuger 30 minutes à 5000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Ajouter au surnageant récupéré 1/5 de volume de PEGNaCl et précipiter une heure à 4°C.
- Centrifuger 20 minutes à 5000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Décanner le surnageant, le culot de phage doit être visible à ce stade.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Enlever toute trace de PEGNaCl à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Resuspendre le culot dans 250 µl de tampon TE.

- Transférer en Eppendorf.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm (Janetzki) afin d'éliminer toutes les cellules.
- Récupérer le surnageant, ajouter 100 µl de PEGNaCl et bien agiter.
- Incuber 15 minutes à température ambiante ou 12 heures à 4°C.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Éliminer le surnageant et recentrifuger 2 minutes à 13000 rpm (Janetzki) pour enlever toute trace de PEGNaCl.
- Resuspendre le culot dans 500 µl de tampon TE.

Purification du simple brin:

Réaliser deux fois les 5 étapes suivantes:

- Ajouter 200 µl de phénol saturé en TE
- Vortexer 15 à 20 secondes
- Incuber 15 minutes à température ambiante
- Vortexer 15 à 20 secondes.
- Centrifuger 3 minutes et récupérer la phase aqueuse.

Réaliser trois fois les quatre étapes suivantes:

- Ajouter 500 µl de diéthyléther froid saturé en eau.
- Vortexer 15 secondes.
- Centrifuger 2 à 3 minutes.
- Décantier l'éther.

Précipitation de l'ADN:

- Répartir l'échantillon dans deux Eppendorfs.
- Ajouter 2,5 volumes d'éthanol 100% froid et 1/10 de volume de NaAc 3M.
- Agiter.
- Incuber 15 minutes à -80°C.
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Laver le culot avec de l'éthanol 70% ou 90% froid.
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décantier l'éthanol et sécher sous vide.
- Resuspendre dans 50 µl de TE et garder à 4°C.
- Vérifier la densité optique à 260 nm (1 DO = 37 µg / ml de simple brin).

2.3.2.6. Préparation de M13 à double brin.

Les méthodes d'extraction et de récupération sont identiques à celles décrites précédemment.

Deux différences notables méritent cependant d'être signalées: des temps de culture courts et l'ajout au milieu de chloramphénicol.

Les temps de culture doivent être très courts (compris entre 2 et 8 heures) car les fragments d'ADN clonés dans les bactériophages filamenteux sont instables et sujet à de fréquentes délétions. Un insert plus petit, car délété, confère un avantage sélectif au clone qui l'héberge, celui-ci prend le dessus sur le recombinant originel.

L'utilisation de chloramphénicol ne relève pas du même principe que celui de l'amplification (c'est à dire: inhibition de la protéosynthèse entraînant un arrêt de multiplication cellulaire et une accumulation plasmidique voir 1.2.3). Ici, le chloramphénicol dérégule l'expression des gènes viraux ce qui se traduit par une production accrue de double brin. Le simple brin n'est plus excrété des cellules infectées et il sert de matrice à la synthèse de double brin supplémentaire (Maniatis *et al* , 1989)

En pratique:

- Réaliser une préculture d'*E.coli* TG1.
- Placer dans une éprouvette stérile 10 ml de LB et 100 µl d'*E.coli* TG1.
- Incuber dans un bain agitant à 37°C jusqu'à ce que la croissance atteigne une D.O comprise entre 0,8 et 1,0 à 540 nm.
- Ajouter une plaque de lyse prélevée à l'aide d'un cure dent, ou 100 µl de surnageant issu d' une culture d'*E.coli* TG1 infectée par le phage M13.
- Incuber 15 minutes à 37°C.
- Ajouter 15 µg / ml de chloramphénicol.
- Incuber 2 heures à 37°C.
- Centrifuger 10 minutes à 6000 rpm et 4°C (rotor SS 34).
- Resuspendre le culot dans 500 µl de LB.
- Transférer en Eppendorf.
- Se référer au protocole de miniprep d.s pour la suite (voir 2.3.2.1).

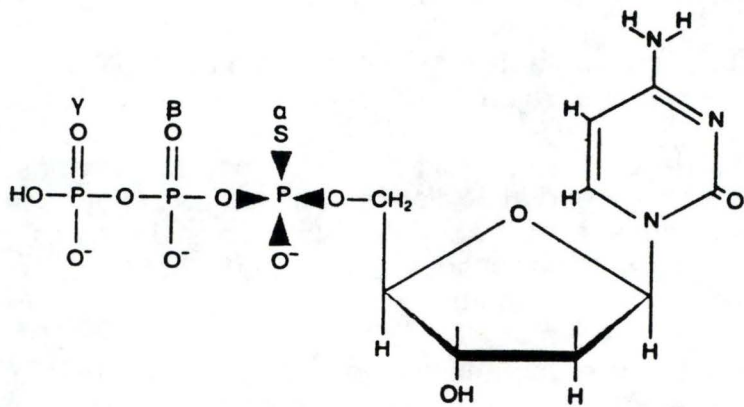


Fig 3.18: Représentation d'un thionucléotide. Cet analogue de nucléotide porte un atome de soufre sur le phosphore α . Il est incorporé normalement et n'est pas mutagène.

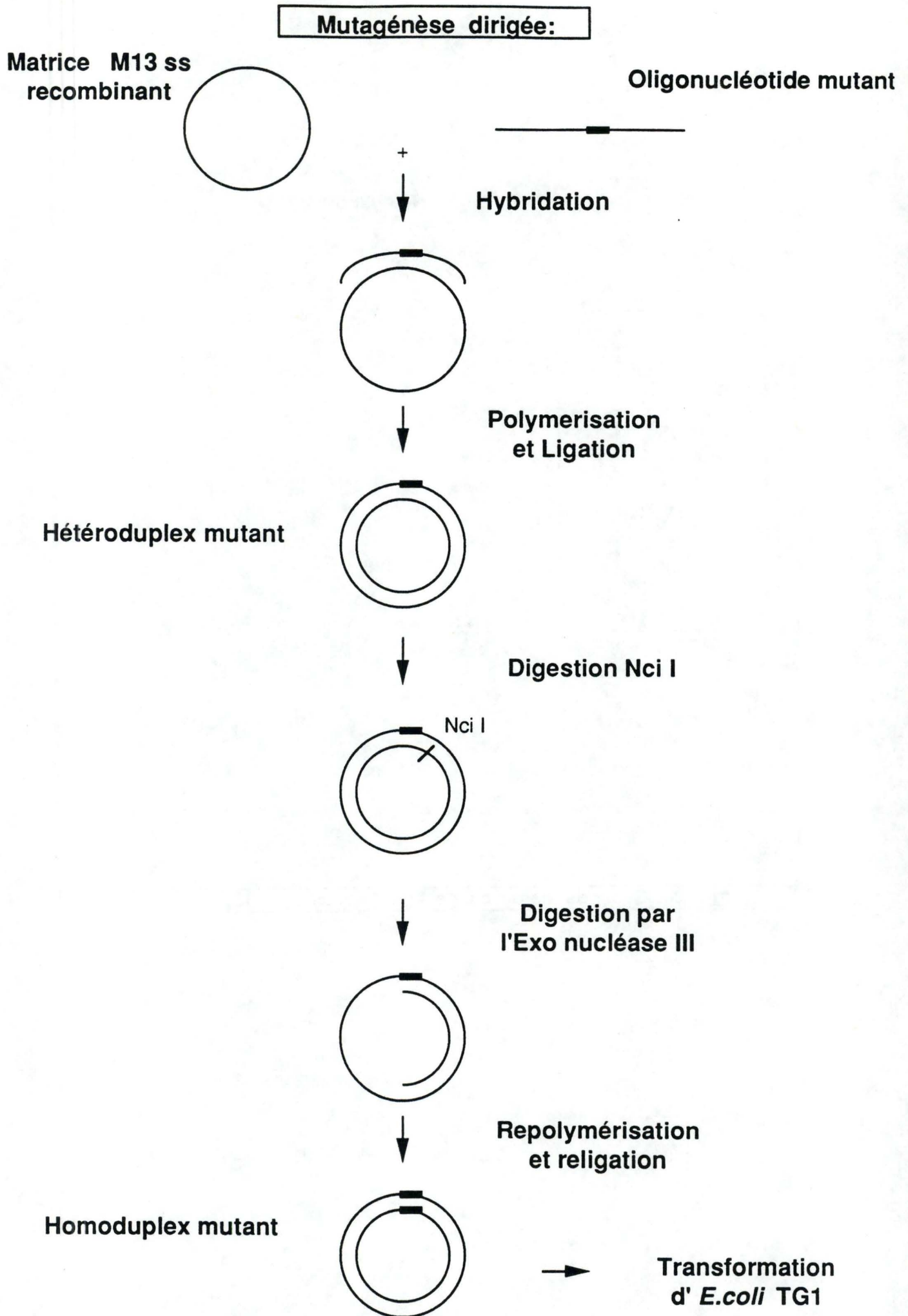


fig 3.19: Etapes de la mutagenèse dirigée.

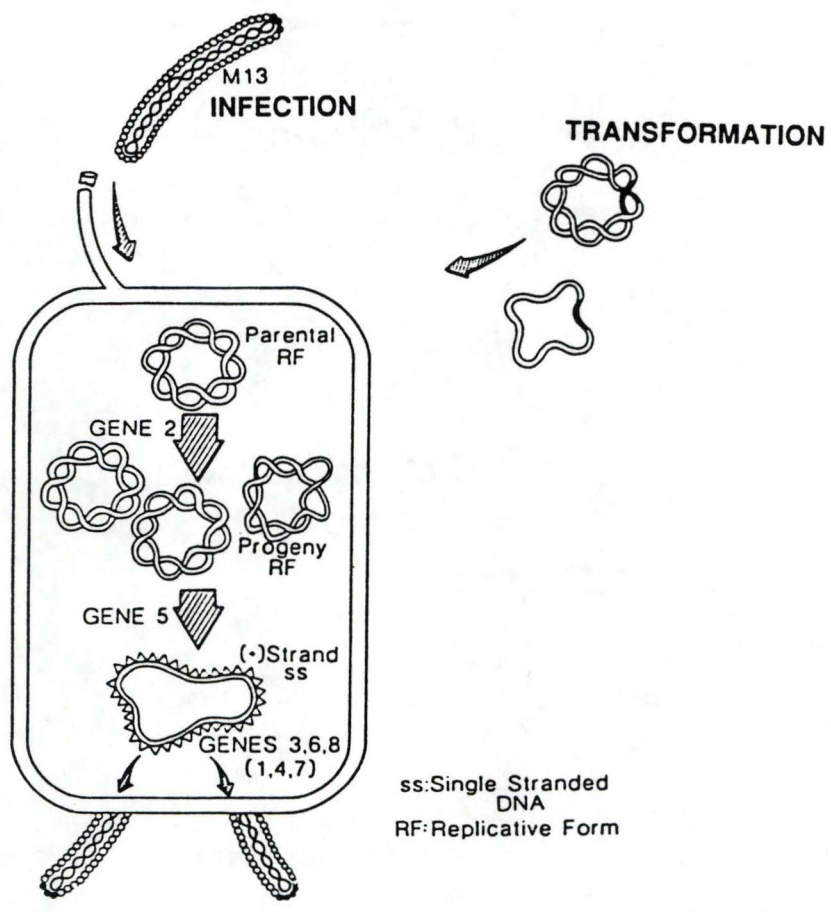


fig 3.20: Cycle de vie du phage M13 (Messing, 1983).

2.3.3. Mutagénèse dirigée (AMERSHAM kit).

2.3.3.1. Principe.

(Taylor *et al* , 1985)

L'oligonucléotide de synthèse qui contient la mutation à introduire est hybridé à la matrice simple brin (un M13 recombinant) et allongé par la Klenow polymérase. Le brin ainsi formé est ligué par la T4 DNA ligase ce qui génère un hétéroduplex mutant (un brin mutant et un non mutant).

Lors de la synthèse *in vitro* du brin mutant, on y incorpore des thionucléotides. Cet artifice permet d'enlever de façon sélective le brin non mutant car certaines enzymes de restrictions (dont *Nci* I) sont incapables de couper de l'ADN contenant de tels nucléotides souffrés (fig 3.18).

Cependant, l'action de l'enzyme sur l'hétéroduplex génère un "nick" sur le brin non mutant qui ne contient pas les thionucléotides. Cette coupure représente un site d'attaque pour l'Exonucléase III qui va "digérer" ce dernier.

Enfin la polymérisation d'un second brin mutant par la DNA polymérase (qui prend comme matrice le premier) génère l'homoduplex mutant avec lequel on transforme les cellules compétentes de la souche d'*E.coli* TG1 (fig 3.19).

2.3.3.2. Cycle de vie du phage M13.

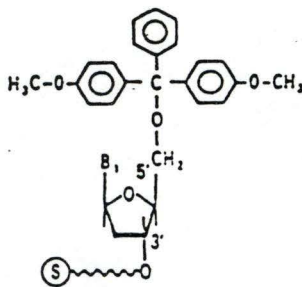
(fig 3.20)

M13 est un bactériophage filamenteux à ADN monocaténaire, spécifique des cellules mâles. L'infection se réalise via les pilis sexuels arborés en surface par ce type bactérien.

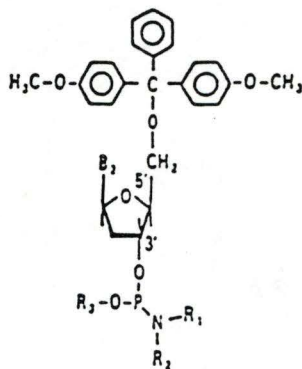
Le phage infectieux simple brin, par convention le brin (+), est entouré d'une capsidie protéique en forme de bâtonnet. Suite à l'infection, le phage perd son manteau protéique. Le brin (+) est libéré dans la cellule et sert de matrice à la synthèse du brin complémentaire (-), le brin codant. Cette synthèse est conduite par les polymérases de la cellule hôte.

D'une part on obtient la forme répliquative (RF) double brin, ce qui permet la synthèse d'un nombre élevé de brin (+) par le mécanisme de "rolling circle". D'autre part l'expression des gènes encodés par le brin (-) permet la synthèse des protéines capsidiques. De nouvelles unités virales se forment et quittent les cellules hôtes sans les lyser, leur croissance ayant simplement été ralentie au cours de l'infection.

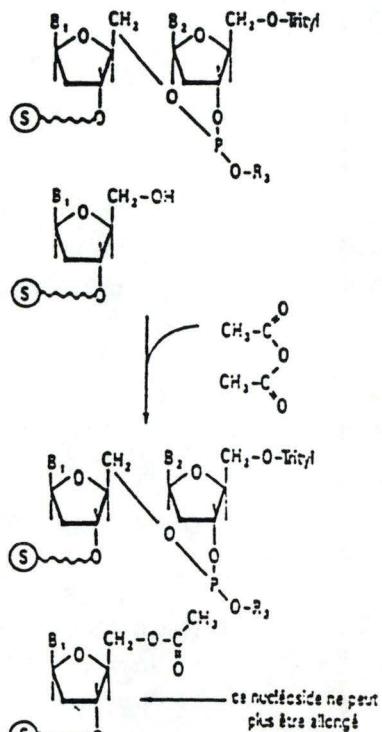
3.21.A1



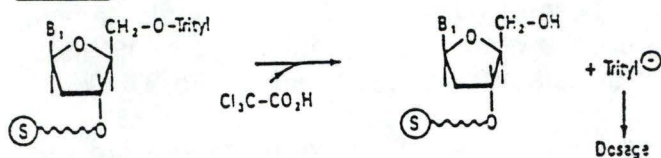
3.21.A2



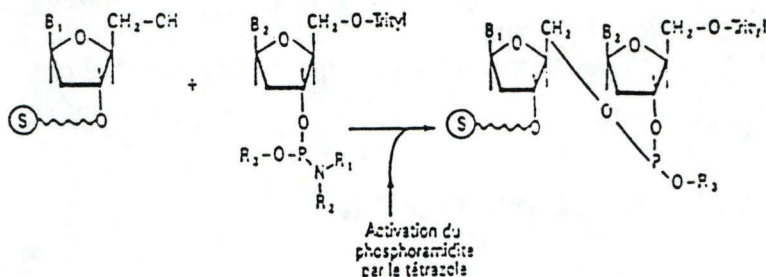
3.21.D



3.21.B



3.21.C



3.21.E

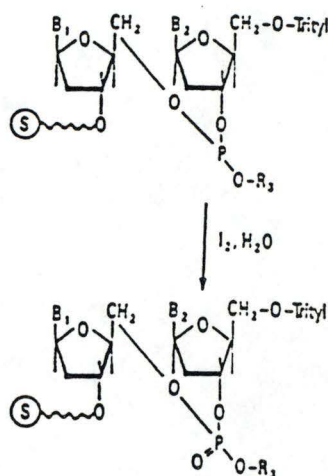


fig 3.21: Le premier nucléoside est un 5' diméthoxytrityl attaché au support par l'hydroxyle en 3' du déoxyribose (fig 3.21 A1) (Vincent, 1986).

Les nucléotides suivants sont des dérivés diméthoxytritylé en 5', dont l'hydroxyle en 3' possède un groupement phosphoramidite (fig 3.21 A2).

La présence de ces groupements est importante non seulement pour la solubilité des nucléosides dans leur solvant de nature organique, mais également pour protéger les groupements hydroxyles présents sur le nucléotide et ainsi préserver la spécificité de la réaction.

Un cycle de synthèse complet (couplage entre deux nucléotides) comprend les quatre étapes suivantes:

Détritylation (fig 3.21 B): L'ajout d'acide trichloroacétique déprotège la fonction hydroxyle en 5' du premier nucléoside, ce qui lui permet de réagir avec le groupement phosphoramidite du second.

Addition (fig 3.21 C): Le tétrazole active ce groupement phosphoramidite et il y a formation d'une liaison covalente de type phosphite avec le premier nucléotide.

Capping (fig 3.21 D): Une acétylation des hydroxyles en 5' par l'anhydride acétique permet d'éviter l'allongement des nucléosides qui n'aurait pas réagi, ceci facilite la purification.

Oxydation (fig 3.21 E): Il s'agit d'une oxydation de la liaison covalente de type phosphite en une liaison de type phosphotriester. Cette réaction s'effectue en présence d'iode.

Le phage non encapsidé est non infectieux. Qu'il soit sous forme simple ou double brin, il peut être introduit dans la cellule hôte par une manipulation *in vitro* : la transformation (voir: 2.3.1.4.1.4).

M13 est utilisé comme tout autre vecteur de clonage sous sa forme répliquative et on tire profit de son existence à l'état simple brin pour la mutagenèse dirigée et le séquençage.

2.3.3.3.Synthèse de l'oligonucléotide mutant.

2.3.3.3.1.Principe de la synthèse de l'oligonucléotide.

Le principe de synthèse de l'oligonucléotide mutant est basé sur la chimie des phosphoramidites, ce qui permet l'obtention de rendement de l'ordre de 98%. La synthèse se réalise en phase solide, au départ d'un réacteur sur lequel est fixé un des quatre nucléosides (Applied Biosystems synthétiseur automatique modèle 381 A). L'élongation de ce premier se fait dans le sens 3'->5' (fig 3.21).

La synthèse est réalisée en mode trityl ON de manière à purifier l'oligonucléotide par la méthode OPC (voir ci dessous). Ceci signifie que le trityl reste sur l'oligonucléotide lors de la dernière étape (ajout de la dernière base). Par contre, lors des étapes précédentes les trityls sont écartés. Ils sont dosable et qualifie le bon déroulement de la synthèse.

2.3.3.3.2.Récupération de l'oligonucléotide.

La colonne est démontée et les billes de verre, qui contiennent les oligonucléotides synthétisés, sont récupérées. Etant donné que ces derniers sont accochés sur les billes et que des groupements protecteurs sont présents, un traitement au NH_4OH est effectué.

Une purification sur colonne OPC permet l'élimination des oligonucléotides incomplets.

Afin que le brin mutant formé par l'allongement de l'oligonucléotide soit liguable, une phosphorylation de l'extrémité 5' de ce dernier est nécessaire.

2.3.2.2.1.Traitement au NH_4OH .

Placer les billes de verres dans un Eppendorf.

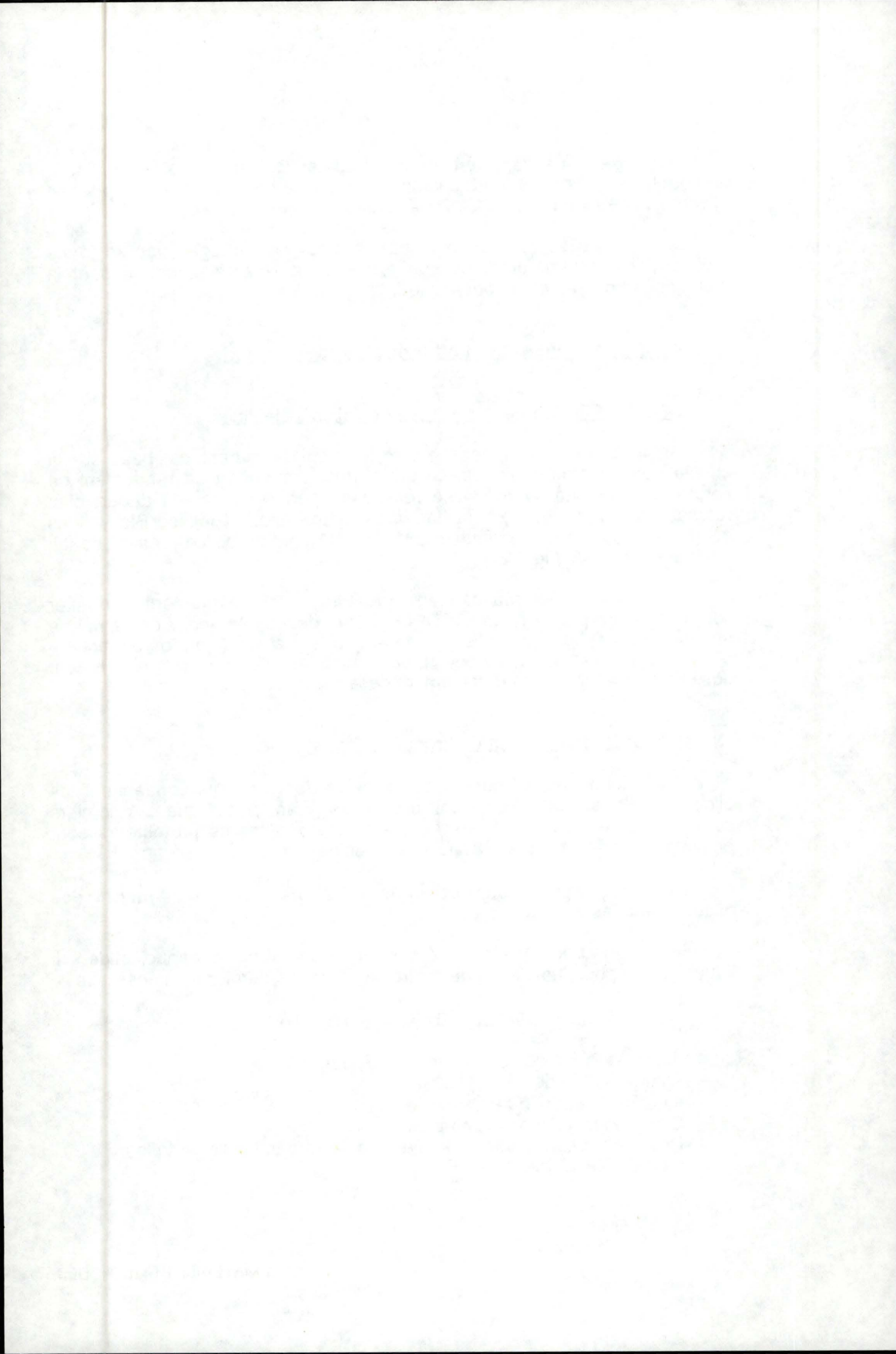
-Ajouter 500 μl de NH_4OH 32%.

-Incuber 2 heures à température ambiante.

-Centrifuger quelques secondes.

-Décantier le surnageant et le placer dans une bouteille en téflon.

-Incuber 8 à 15 heures à 55°C.



2.3.2.2.2.Purification sur colonne OPC.

Seuls les oligonucléotides de longueur désirée sont conservés, car ils possèdent le groupement trityl sur la dernière base par laquelle ils reste accrochés à la colonne.

- Déposer au sommet de la colonne 5 ml d' "HPLC grade Acétonitrile" puis 5 ml de triéthylamine acétate.
- Après avoir dilué la solution contenant l'oligonucléotide déprotégé dans 1/3 de volume d'eau désionisée, le déposer sur la colonne
- Récupérer l'éluat, le recharger et conserver l'éluat suivant à -20°C. Il pourra éventuellement être rechargé sur une autre colonne.
- Faire passer sur la colonne 3x5 ml d'hydroxide d'ammonium dilué
- Faire passer 2x5 ml d'eau désionisée
- L'ajout de 5 ml d'acide trifluoroacétique 2% libère les oligonucléotides de la colonne.
- Faire passer 2x5 ml d'eau désionisée
- Conserver ce dernier éluat contenant les oligonucléotides purifiés et détritylés.

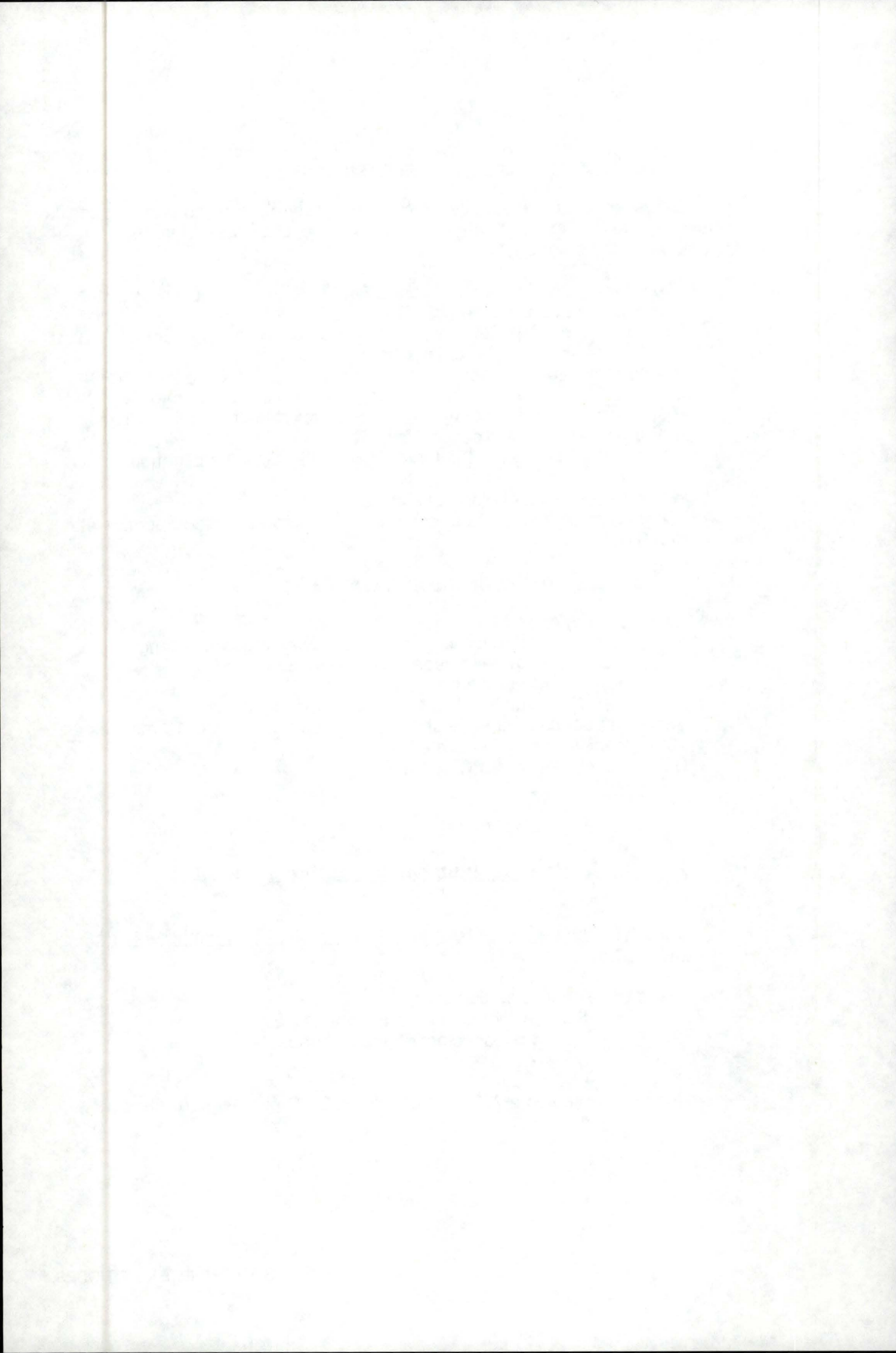
2.3.2.2.3.Phosphorylation de l'extrémité 5'.

- Dans un Eppendorf, ajouter:
 - 2,5 µl d'oligonucléotide (concentration: 300 ng / µl).
 - 3 µl de tampon kinase 10x.
 - 25 µl d'eau.
 - 2 unités de T4 polynucléotide kinase.
- Mélanger doucement et incuber 15 minutes à 37°C puis 10 minutes à 70°C (inactivation de l'enzyme).
- Utiliser ou stocker à -20°C.

2.3.3.4.Réaction de mutagénèse dirigée.

2.3.3.4.1.Hybridation de l'oligonucléotide mutant à la matrice M13 à simple brin.

- Dans un Eppendorf, ajouter:
 - 5 µl d'ADN matrice simple brin (1 µg / µl).
 - 2,5 µg oligonucléotide mutant phosphorylé.
 - 3,5 µl de tampon 1.
 - 6 µl d'eau.
- Incuber 3 minutes à 70°C, 30 minutes à 37°C et placer sur glace.



2.3.3.4.2.Synthèse et ligation du brin mutant.

- Ajouter au mélange réactionnel précédent:
 - 5 μ l de solution MgCl₂.
 - 19 μ l du mélange de nucléotides 1.
 - 6 μ l d'eau.
 - 6 unités du fragment Klenow.
 - 6 unités de T₄ DNA ligase.
- Mélanger et incuber le tube 15 heures dans un bain à 15°C.

2.3.3.4.3.Elimination du simple brin non mutant par filtration.

- Ajouter au mélange réactionnel précédent:
 - 170 μ l d'eau.
 - 30 μ l de NaCl 5M.

L'échantillon est déposé dans la chambre supérieure de l'unité de filtration. Cette unité est centrifugée pendant 10 minutes à 1500 rpm à température ambiante (rotor SS34). L'échantillon traverse une paire de membrane de nitrocellulose qui retiennent le simple brin tout en laissant passer le double brin que l'on retrouve dans le tube collecteur.

-Ajouter 100 μ l de NaCl 500 mM et centrifuger 10 minutes dans les mêmes conditions afin de récupérer l'ADN double brin qui serait resté accroché sur le filtre.

- Ajouter au filtrat:
 - 28 μ l de NaAc 3M.
 - 700 μ l d'éthanol 100% froid.
- Incuber 10 minutes à -70°C.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décantier.
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 100% froid et recentrifuger.
- Décantier.
- Sécher sous vide et resuspendre dans 25 μ l de tampon 2.

2.3.3.4.4.Restriction du brin d'ADN non mutant par l'enzyme *Nci* I.

- Prélever 10 μ l de l'échantillon filtré et ajouter:
 - 65 μ l de tampon 3.
 - 5 unités de *Nci* I.
- Incuber 90 minutes à 37°C.

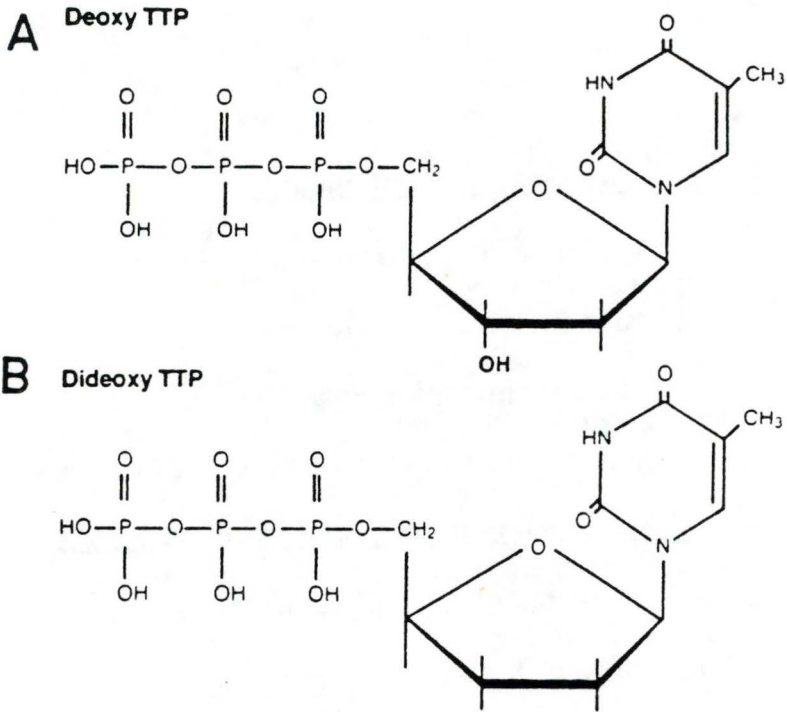


fig 3.22: A. Structure d'un déoxyribonucléotide.
B. Structure d'un didéoxyribonucléotide.

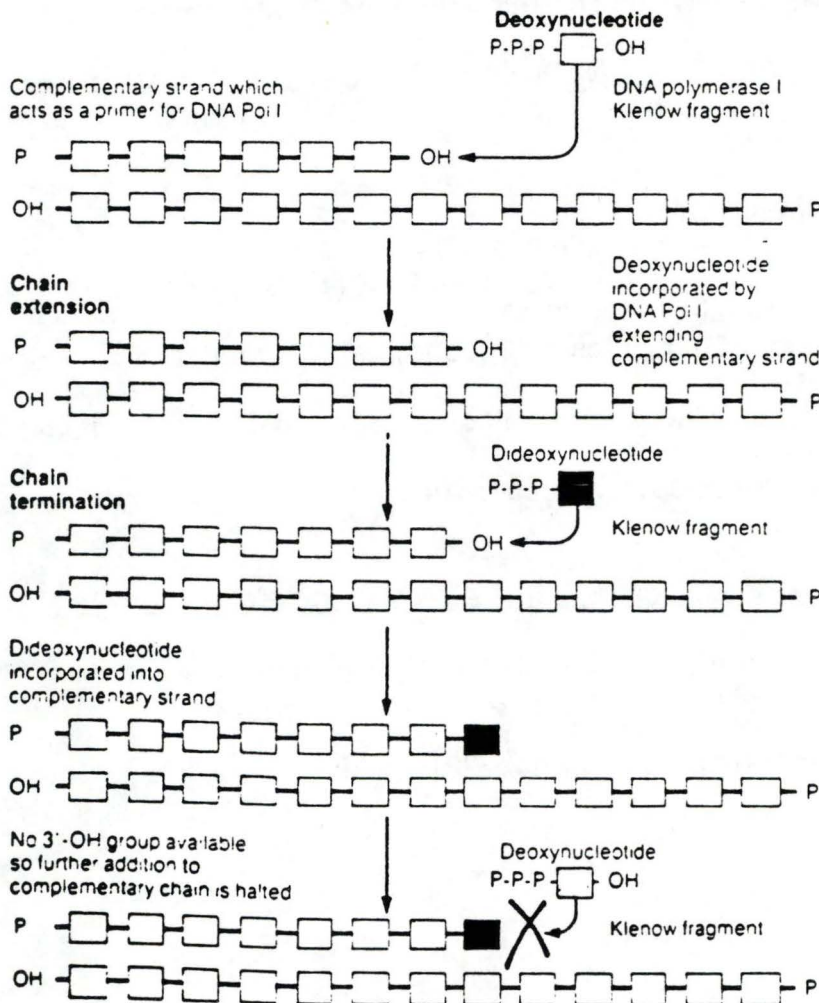


fig 3.23: Mode d'action d'un didéoxyribonucléotide.

2.3.3.4.5. Digestion du brin non mutant par l'Exonucléase III.

- Ajouter au mélange réactionnel précédent:
 - 12 μ l de NaCl 500 mM.
 - 10 μ l de tampon 4.
 - 50 unités d'Exonucléase III.
- Incuber 30 minutes à 37°C puis 15 minutes à 70°C.

2.3.3.4.6. Repolymérisation et ligation.

- Ajouter au mélange réactionnel précédent:
 - 13 μ l du mélange de nucléotides 2.
 - 5 μ l de MgCl₂.
 - 3 unités de DNA polymérase I.
 - 2 unités de T₄ DNA ligase.
- Incuber 3 heures à 16°C.
- Transformer la souche bactérienne d'*E.coli* TG1 (voir: 2.3.1.4.1.4).

2.3.4. Le Séquençage.

(T7 SequencingTM kit Pharmacia.27-1682-01)

2.3.4.1. Principe du séquençage.

(Sanger *et al* ,1977).

La méthode utilisée est celle des terminateurs de chaînes. Cette méthode consiste à faire synthétiser par une polymérase un brin complémentaire de celui que l'on désire séquencer. Cette polymérase requiert une matrice simple brin et une amorce lui fournissant un groupement 3'-OH libre.

Le fragment à séquencer est cloné dans un plasmide ou dans un phage (M13). Dans le cas d'un plasmide, une étape de dénaturation est nécessaire. Par contre, si on utilise M13, on peut aisément obtenir une matrice simple brin (voir: cycle de vie de ce phage 2.3.3.2), l'étape de dénaturation devenant alors superflue.

Dans les deux cas, le primer utilisé est un oligonucléotide synthétique dont la séquence est complémentaire de celle qui borde l'insert sur le vecteur utilisé.

L'incorporation au hasard dans la chaîne naissante d'un didésoxyribonucléotide, un analogue de désoxyribonucléotide ne possédant pas de groupements hydroxyle en 3', interrompt l'élongation. Statistiquement la terminaison se produira au moins une fois en chaque point (fig 3.22 et 3.23).

Quatre tampons d'élongation sont utilisés. Ils contiennent les quatre désoxyribonucléotides usuels (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dont un est marqué radioactivement ($[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP). Par contre, ils ne contiennent qu'un des quatre didésoxyribonucléotides.

Chacun des quatre tubes réactionnels contient en fin de réaction une population de fragments de taille variable. La taille de ces fragments permet de déterminer la position à laquelle s'est incorporé le ddNTP dans la chaîne en élongation et donc la position de la base complémentaire dans le brin que l'on a séquencé.

La migration concomitante des quatre mélanges réactionnels sur gel de polyacrylamide permet une lecture de la séquence (fig 3.24).

2.3.4.2.Réaction de séquençage.

2.3.4.2.1.Dénaturation.

- Placer dans un Eppendorf:
 - 2 μg d'ADN dans 8 μl d' eau stérile.
 - 2 μl de NaOH 2N.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Précipitation de l'ADN dénaturé:
- Ajouter:
 - 3 μl de NaAc 3M pH4,8.
 - 7 μl d'eau stérile.
 - 60 μl d'éthanol 100% froid.
- Mélanger.
- Incuber 15 minutes à -80°C .
- Centrifuger 4 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décanter.
- Laver à l'éthanol 70%.
- Sécher sous vide 10 minutes.

2.3.4.2.2.Hybridation ("Annealing").

- Resuspendre le culot sec dans 10 μl d'eau stérile.
- Ajouter:
 - 2 μl de primer.
 - 2 μl d'annealing buffer.
- Incuber 20 minutes à 37°C puis 10 minutes à température ambiante.

2.3.4.2.3. Marquage radioactif ("Labelling").

- Ajouter:
 - 3 μ l de labelling mix (dCTP, dGTP et dTTP).
 - 1 μ l de [α -S³⁵] dATP.
 - 3 unités de T7 DNA polymérase.
- Centrifuger quelques secondes.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.

2.3.4.2.4. Terminaison.

Dans quatre Eppendorfs (notés A, C, G et T), ajouter 2,5 μ l d'un mélange de nucléotides.

- Préincuber ces Eppendorfs à 37°C.
- Ajouter à chaque tube 4,3 μ l du mélange issu de la réaction de labelling.
- Incuber 5 minutes à 37°C.
- Ajouter 5 μ l de solution stop.
- Stocker à -20°C une semaine ou utiliser immédiatement.

2.3.4.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

2.3.4.3.1. Préparation des plaques.

- Laver les deux plaques de verre (eau de ville, eau distillée puis éthanol).
- Laver, sur la plus grande des deux plaques, la surface qui sera en contact avec le gel avec 10 ml de diméthyl dichloro silane (silicone).
- Placer les spacers sur cette même plaque.
- Adjoindre la petite plaque.
- A l'aide d'adhésif, sceller les deux plaques tout en les maintenant jointes à l'aide de pinces.

2.3.4.3.2. Préparation du gel.

- Placer dans un berlin:
 - 42 g d'urée.
 - 10 ml de TBE 10X.
 - 15 ml d'acrylamide 20%-bisacrylamide 0,8%.
 - 40 ml d'eau distillée.
- Après dissolution de l'urée, filtrer au Buchner (filtre Millipore SA 78 BUC).
- Ajouter rapidement:
 - 600 μ l de persulfate d'ammonium.
 - 30 μ l de TEMED (Biorad).

-Aspirer la solution à l'aide d'une seringue de 100 ml, et couler le mélange sans tarder entre les deux plaques. Placer les peignes à l'envers afin de déterminer une ligne de base. La polymérisation est terminée après une heure, le gel peut être stocké à 4°C.

2.3.4.3.3.Migration des échantillons et autoradiographie.

La migration s'effectue dans du TBE 1X.

- Préchauffer le gel une demie-heure (60 watts,1600 volts).
 - Placer les dents du peignes contre la ligne de base préalablement formée afin de déterminer l'emplacement des puits.
 - Nettoyer les puits de toute trace d'urée.
 - Placer les échantillons 5 minutes à 85°C (dénaturation de l'ADN).
 - Charger 2,5 µl d'échantillon par run.
- Généralement, on effectue plusieurs migrations (7, 5 et 2 heures).

Après la migration:

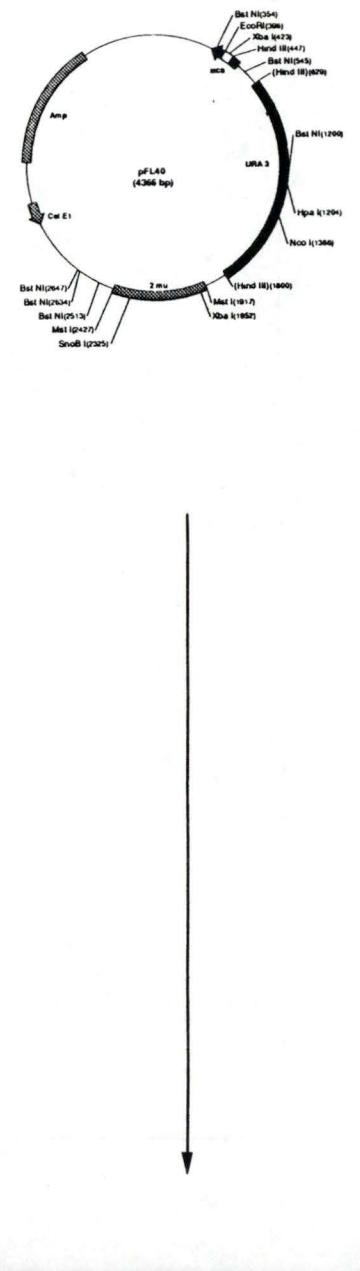
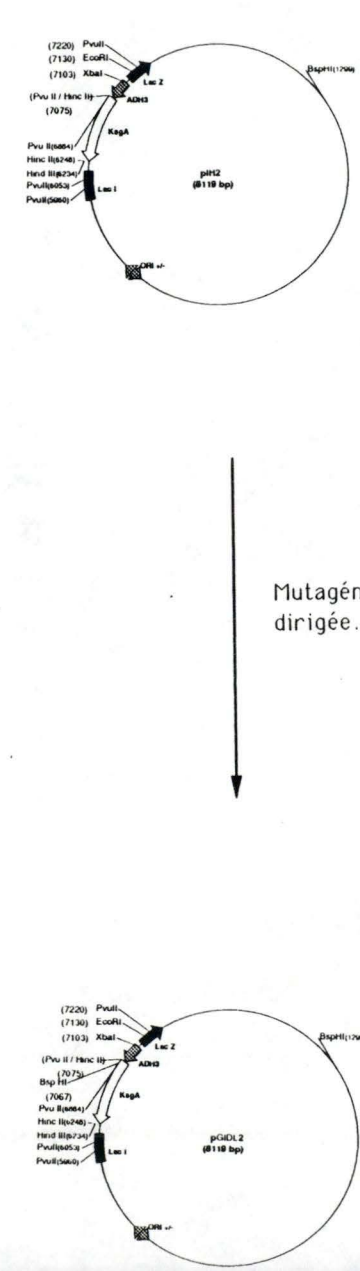
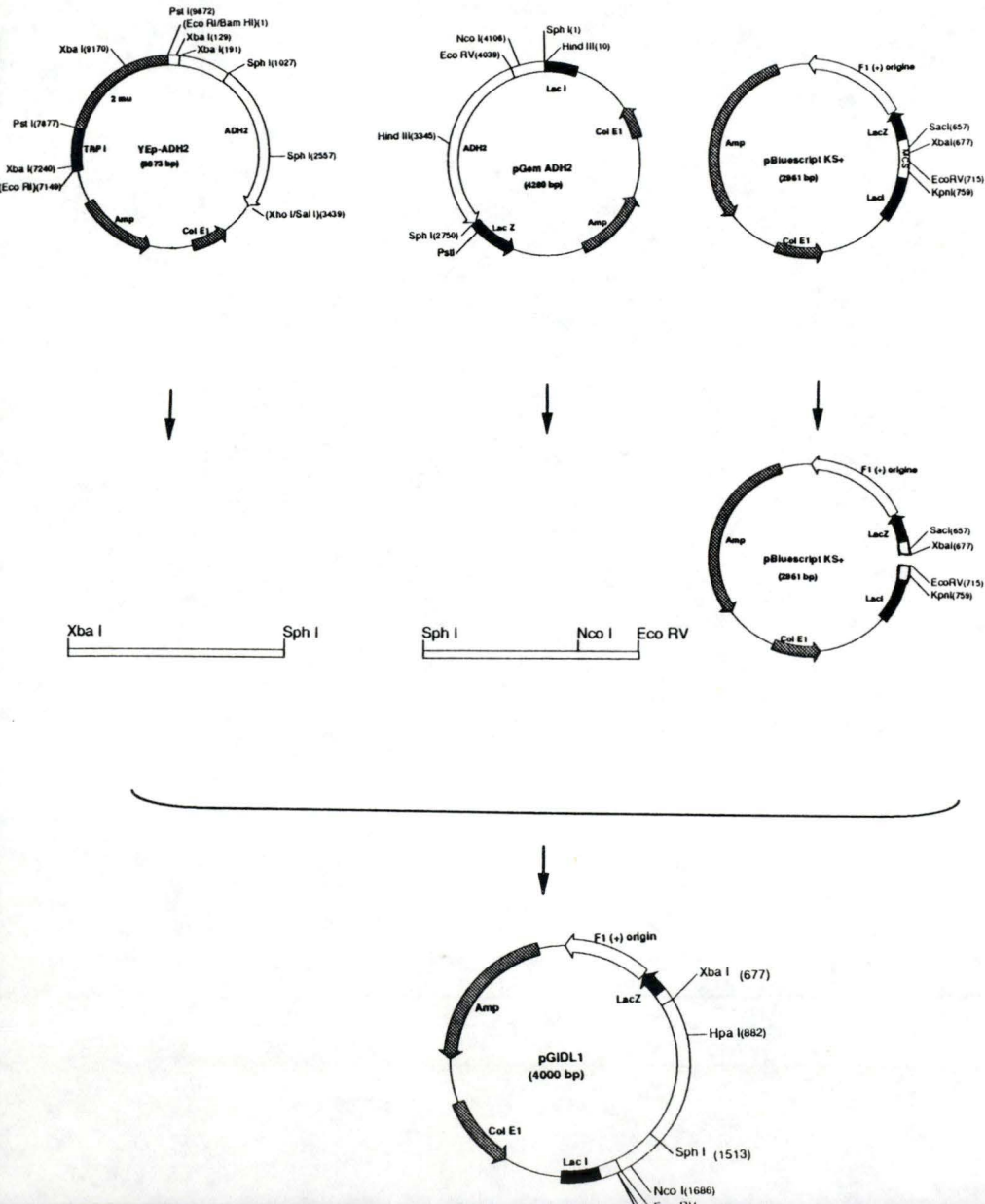
- Démouler les plaques.
- Placer la plaque sur laquelle est resté accroché le gel dans un bain de fixateur pendant 15 minutes.
- Transférer le gel sur un Buvard Whatman (3MM Chr).
- Sécher sous vide à 60°C pendant une heure.
- Placer avec un film photo dans une cassette à autoradiographie pendant 12 heures.
- Révéler le film pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau.
- Fixer le film pendant 15 minutes.
- Rincer à l'eau et sécher.

4. RESULTATS.

I. Reconstitution d'un promoteur de levure:

II. Aménagement de KsgA:

III. Assemblage:



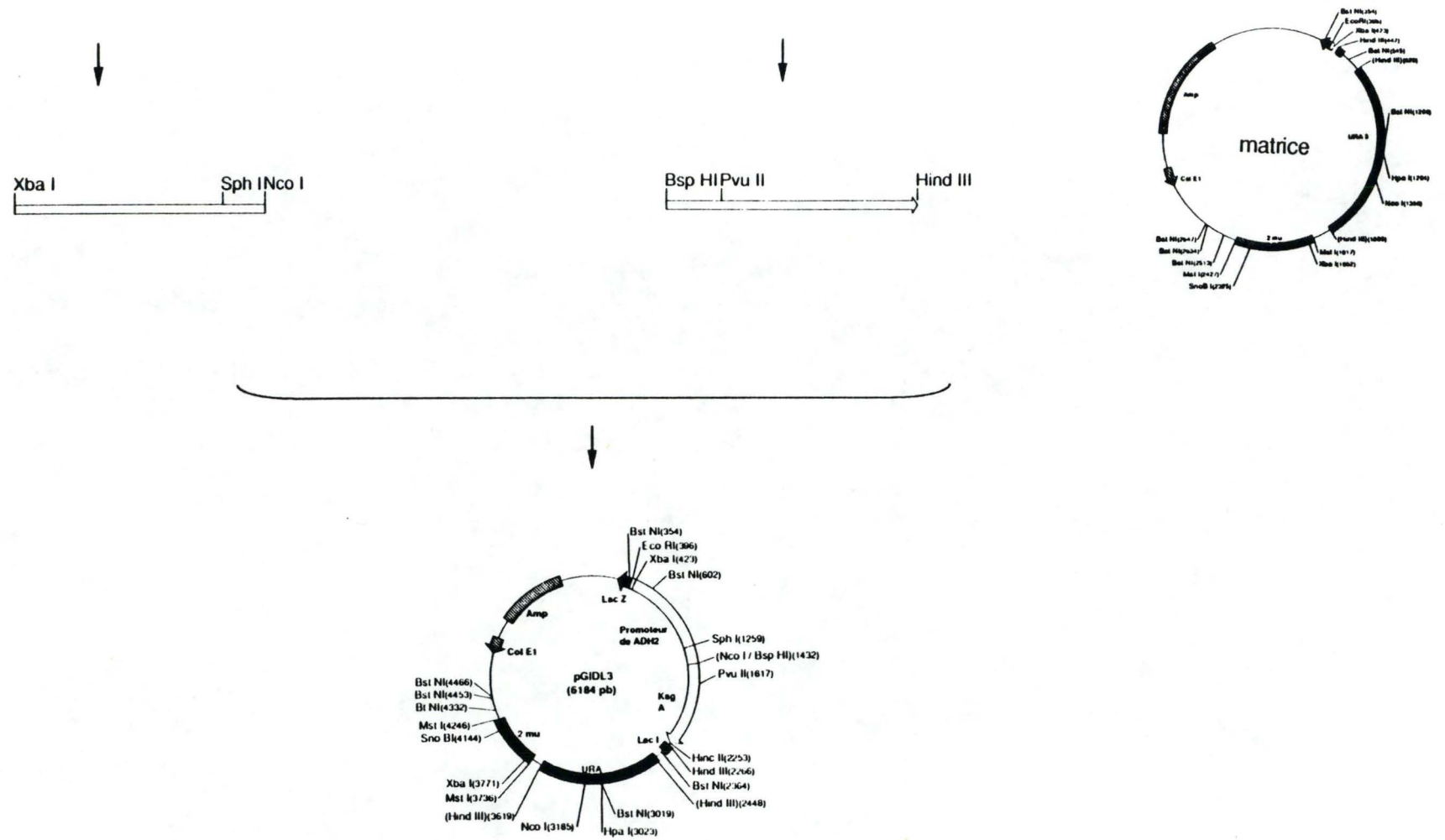


fig 4.1: Stratégie générale d'élaboration du vecteur pGIDL3.

Chapitre 4: Résultats.

1.Constructions génétiques.

1.1.Introduction.

Dans le but d'élucider le rôle fonctionnel des groupements diméthyles présents dans la boucle 3' terminale de l'ARN de la petite sous-unité ribosomique eucaryotes, nous désirons créer un mutant de levure pour cette fonction de diméthylation.

La première étape de la création de ce mutant consiste à exprimer la diméthylase d'*E.coli* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Afin de garantir l'expression du gène de la diméthylase d'*E.coli*, celui-ci est cloné en aval d'un promoteur de levure au sein d'un plasmide présent en copies multiples par cellule. Le plasmide choisi, de type YEp, porte l'origine de répllication du plasmide 2 μ , ce qui lui confère ce caractère "multicopy". Nous choisissons un promoteur de levure fort, celui du gène *ADH2*. Ce promoteur est en outre finement régulable par le glucose, ce qui nous permet de contrecarrer la nocivité éventuelle de la surexpression du gène de la diméthylase d'*E.coli* chez *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.Stratégie générale.

La fusion transcriptionnelle envisagée entre le promoteur du gène *ADH2* et le gène de la diméthylase recourt à deux sites de restriction *Nco* I et *Bsp* HI et donne donc lieu à un site de restriction hybride "*Nco* I / *Bsp* HI".

Dans le but d'apporter un site *Nco* I indispensable à la création de la fusion transcriptionnelle en aval du promoteur, il est procédé à la reconstitution dans le vecteur pKS+ du promoteur *ADH2* aux dépens de fragments issus de deux vecteurs distincts (fig 4.1.1).

Le fragment d'ADN compris entre les sites *Xba* I (position 191) et *Sph* I (position 1027) de 0,836 kb est isolé à partir du vecteur YEpADH2.

La seconde partie du promoteur, soit le fragment d'ADN compris entre les sites *Sph* I (position 4280 / 1) et *Eco* RV (position 4039) de 0,241 kb est issue du vecteur pGemADH2. Ce second fragment recouvre la jonction promoteur-gène *ADH2*, où un site *Nco* I chevauchant l'ATG initiateur a été aménagé par mutagenèse dirigée lors d'un précédent travail (De Schrevel, 1990). L'intégrité de cette portion de promoteur ayant subi une réaction de mutagenèse sera vérifiée par séquençage.

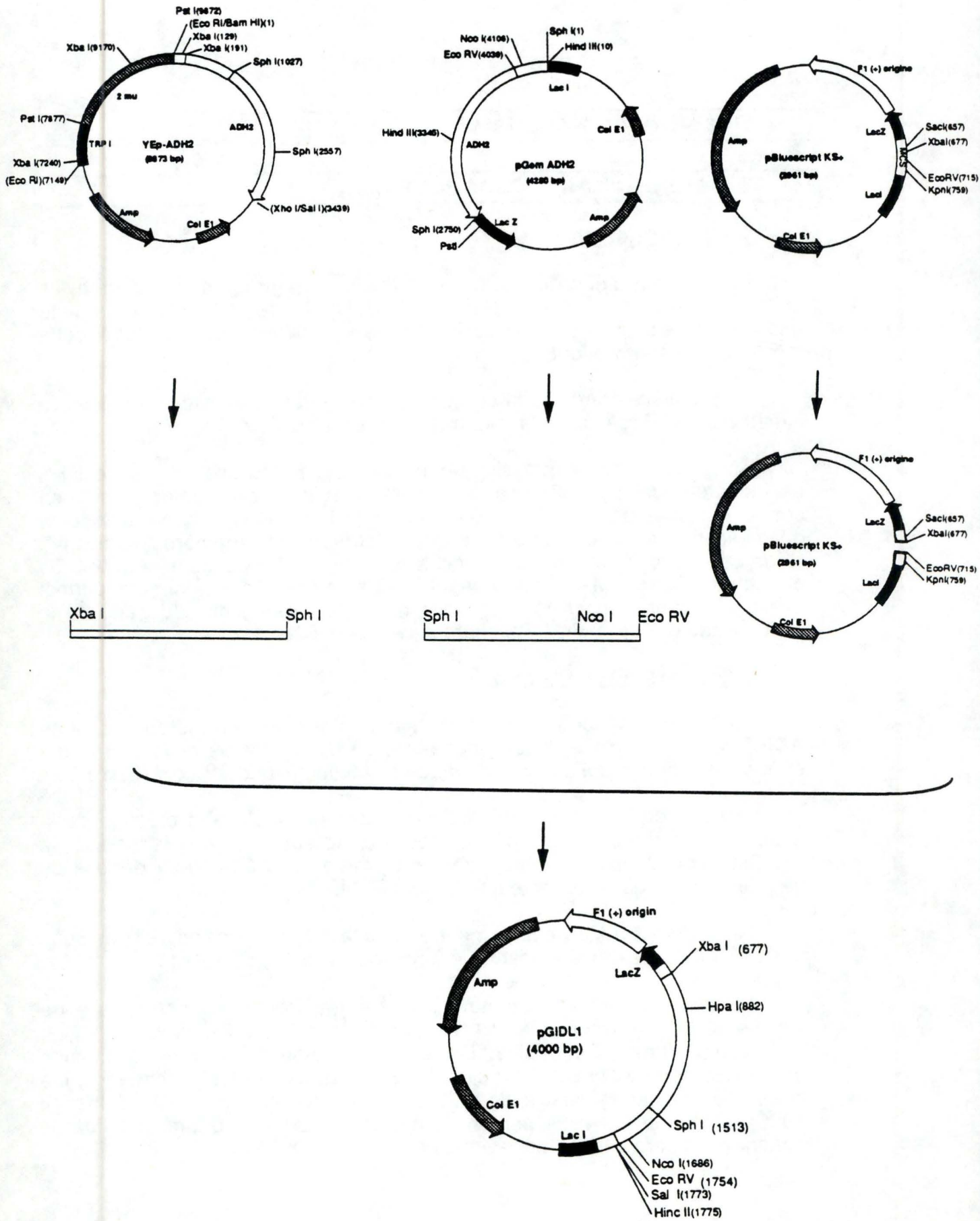


fig 4.2: Reconstitution du promoteur du gène *ADH2* de levure.

La seconde étape consiste en l'aménagement du gène de la diméthylase d'*E.coli* (fig 4.1.II) .

Un site de restriction *Bsp* HI chevauchant l'ATG initiateur du gène de la diméthylase sera installé par mutagénèse dirigée. Ce site est compatible avec le site *Nco* I situé en aval du promoteur reconstitué du gène *ADH2* . La création de ce site de restriction *Bsp* HI ne modifie en rien la séquence en acides aminés de la protéine diméthylase, ce qui n'aurait pas été le cas avec l'installation d'un site *Nco* I (fig 4.10) .

Enfin le promoteur reconstitué du gène *ADH2* et le gène de la diméthylase aménagé seront assemblés dans une matrice "multicopy" de levure (pFL40) (fig 4.1.III).

1.3.Reconstitution du promoteur du gène *ADH2* de levure.

1.3.1.Préparation des fragments.

1.3.1.1.Préparation du premier fragment du promoteur du gène *ADH2* à partir du vecteur YEpADH2.

Le premier fragment du promoteur du gène *ADH2* , 836 pb, est compris entre les sites *Xba* I (position 191) et *Sph* I (position 1027) du vecteur YEpADH2. Il est isolé à partir de ce dernier par une restriction double *Xba* I /*Sph* I (fig 4.2).

Pour ce faire 5 µg du vecteur YEpADH2 sont digérés par 100 unités d'enzyme de restriction *Xba* I. Une extraction au phénol est réalisée après une incubation de une heure à 37°C et la seconde restriction est menée à l'aide de 20 unités d'enzyme de restriction *Sph* I (voir point 2.3.1.2 et point 2.2.1 du chapitre matériel et méthodes).

Après électrophorèse (fig 4.3, piste: 3), les fragments ci-dessous sont obtenus:

<i>Xba</i> I (7240) / <i>Sph</i> I (2557)	4,683 kb
<i>Xba</i> I (9170) / <i>Xba</i> I (7240)	1,930 kb
<i>Sph</i> I (2557) / <i>Sph</i> I (1027)	1,530 kb
<i>Sph</i> I (1027) / <i>Xba</i> I (191)	0,836 kb
<i>Xba</i> I (9170) / <i>Xba</i> I (129)	0,832 kb

La bande correspondant au mélange des fragments 836 et 832 pb est extraite du gel et purifiée (voir point 2.2.3 du chapitre matériel et méthodes).

Notons que les fragments de 836 pb et 832 pb ne sont pas distinguables l'un de l'autre. La digestion par l'enzyme de restriction *Xba* I fut partielle ce qui explique l'apparition d'un fragment supplémentaire non attendu entre les tailles 1,930 kb et 1,530 kb. Sa taille correspond à la somme des trois fragments 836, 832 et 62 pb, soit 1730 pb.

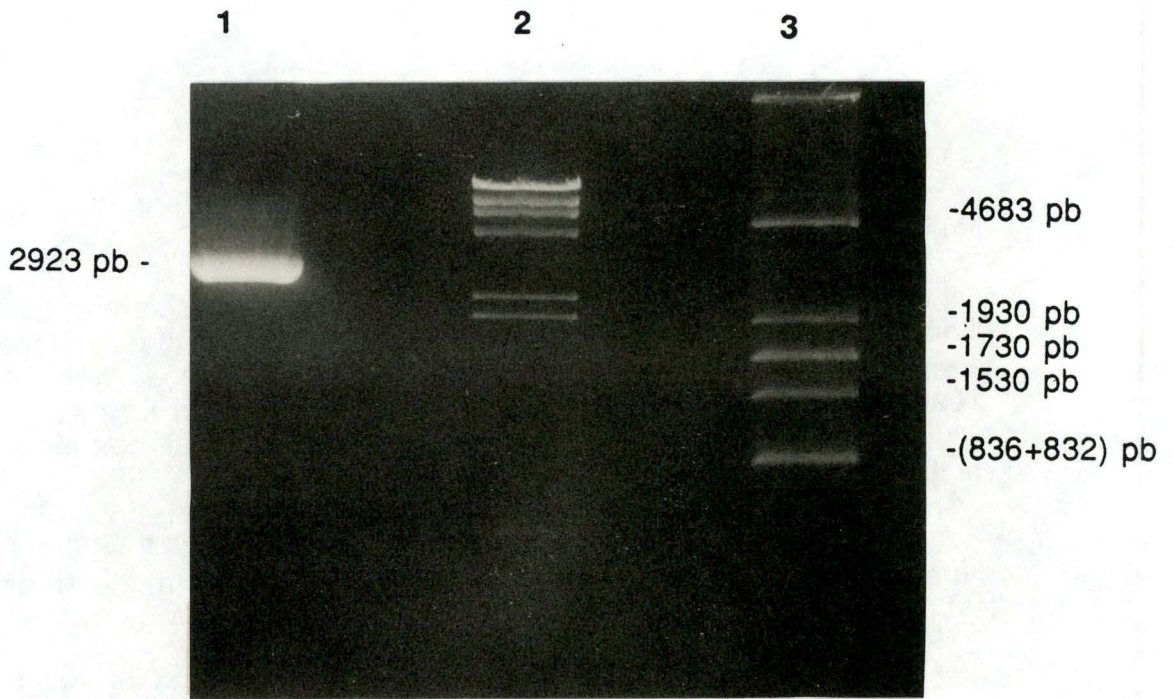


fig 4.3: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.

piste 1: vecteur pBluescriptKS+ restreint par les enzymes *Xba* I et *Eco* RV.

piste 2: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

piste 3: vecteur YEpADH2 restreint par les enzymes *Xba* I et *Sph* I.

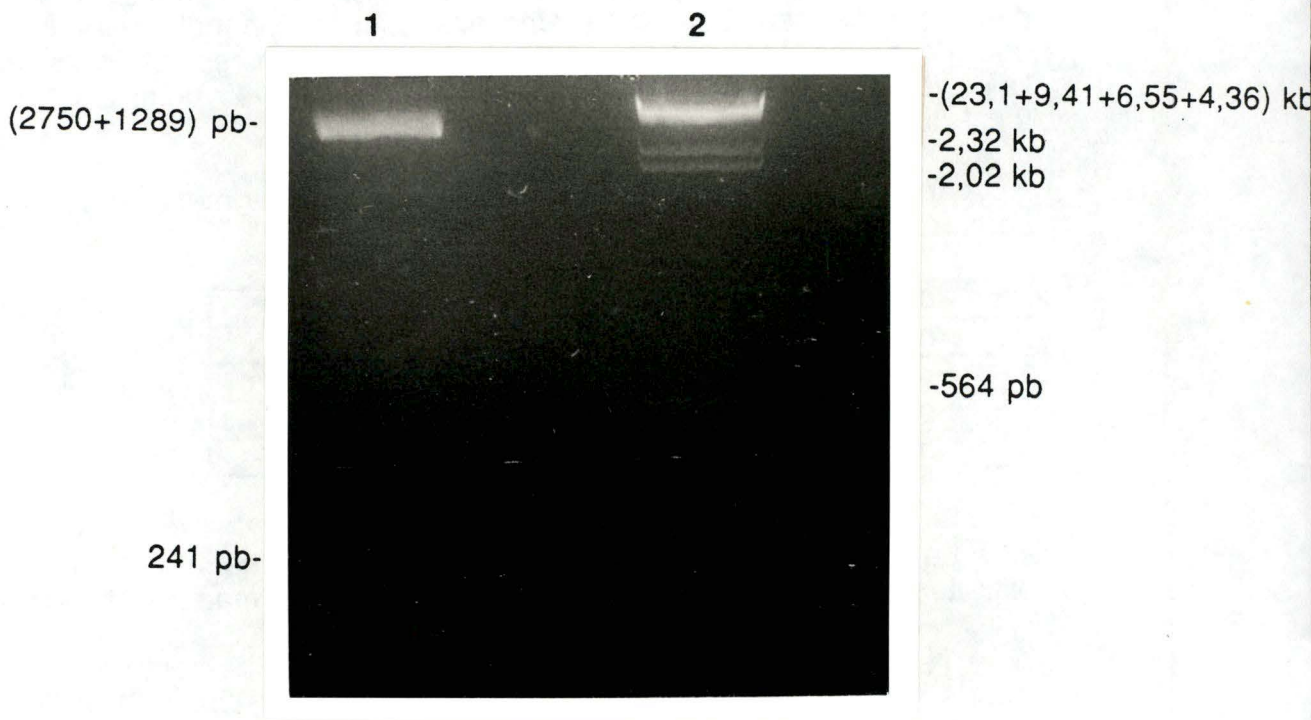


fig 4.4: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 2%.

piste 1: vecteur pGemADH2 restreint par les enzymes *Sph* I et *Eco* RV.

piste 2: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

1.3.1.2. Préparation du second fragment du promoteur du gène *ADH2* à partir du vecteur pGemADH2.

Le second fragment du promoteur du gène *ADH2*, 241 pb, s'étend du site *Sph* I (position 4280 / 1) au site *Eco* RV (position 4039) du vecteur pGemADH2. Une restriction double *Sph* I / *Eco* RV permet de l'isoler de ce dernier (fig 4.2).

Pour cela 2 µg du vecteur pGemADH2 sont digérés par 24 unités d'enzyme de restriction *Eco* RV. Après une heure d'incubation à 37°C, une extraction au phénol est réalisée et la seconde restriction effectuée à l'aide de 10 unités d'enzyme de restriction *Sph* I (voir point 2.3.1.2 et point 2.2.1 du chapitre matériel et méthodes).

Trois fragments sont attendus:

<i>Sph</i> I (1) / <i>Sph</i> I (2750)	2,750kb
<i>Sph</i> I (2750) / <i>Eco</i> RV(4039)	1,289 kb
<i>Eco</i> RV (4039) / <i>Sph</i> I (1)	0,241 kb

Après électrophorèse (fig 4.4), la bande de 241 pb est extraite du gel d'agarose 2% et purifiée (voir point 2.2.3 du chapitre matériel et méthodes).

Etant donné la concentration d'agarose de 2% utilisée pour résoudre les fragments de petite taille, les fragments de grande taille sont peu résolus.

1.3.1.3. Préparation du vecteur de clonage pBluescript KS+.

Le plasmide pBluescript KS+ est restreint au niveau de son site multiple de clonage par une restriction double *Xba* I / *Eco* RV (fig 4.2).

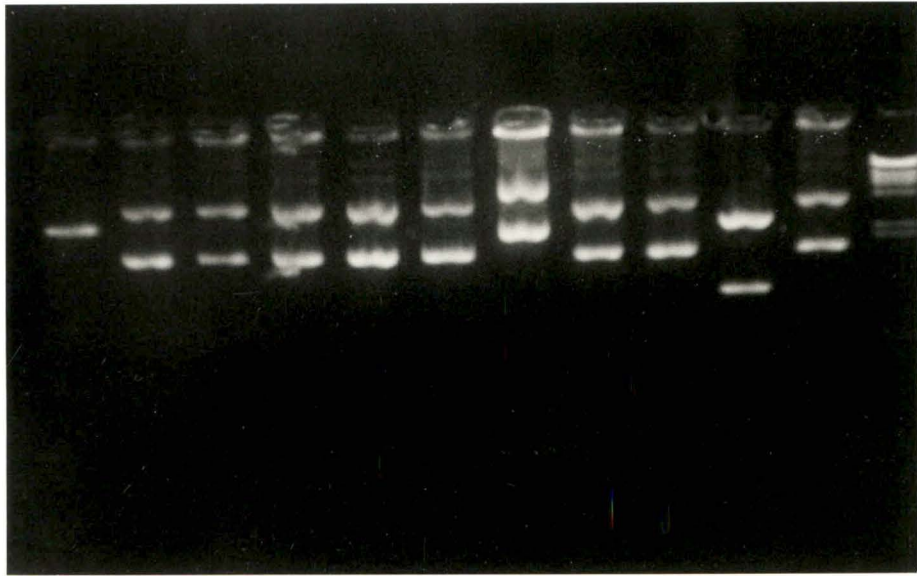
Pour ce faire 1,5 µg du vecteur pBluescript KS+ sont digérés par 25 unités d'enzyme de restriction *Xba* I et 18 unités d'enzyme de restriction *Eco* RV. Ces deux enzymes ont des exigences compatibles vis-à-vis du tampon d'incubation, de telle sorte que les deux restrictions peuvent être réalisées simultanément par une incubation d'une heure à 37°C (voir point 2.3.1.2 du chapitre matériel et méthodes).

Deux fragments sont attendus:

<i>Eco</i> RV / <i>Xba</i> I	2,923 kb
(<i>Eco</i> RV / <i>Xba</i> I	0,038 kb)

Après électrophorèse (fig 4.3, piste: 1), le fragment de 2923 pb, le seul visible, est extrait du gel d'agarose 1% et purifié (voir point 2.2.3 du chapitre matériel et méthodes).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

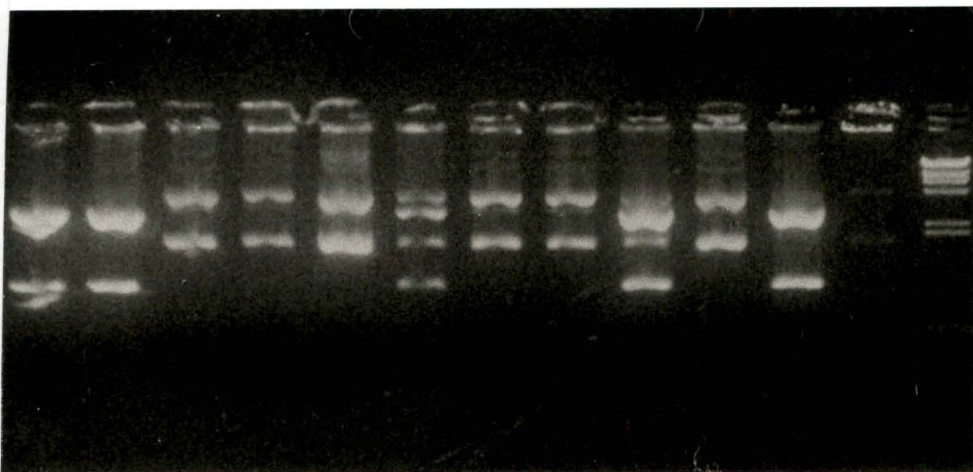


fig 4.5: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.
Criblage du clone pGIDL1 par restriction *Xba* I/*Eco* RV.

piste 1 → 11 et 13 → 24: clones 1 à 11 et 13 à 24.

piste 12 et 25: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

1.3.2.Ligation triple.

Une ligation est réalisée entre les trois fragments récupérés suivant une stoechiométrie 1:1:1. La quantité totale de matériel engagée dans la restriction est 1 µg. Une première incubation en présence de 10 unités de T4 DNA ligase est menée pendant 12 heures à 14°C. Les deux types d'extrémités étant présentes (cohésives et à bouts francs), une seconde incubation d'une heure à 37°C est également nécessaire (voir point 2.3.1.3 du chapitre matériel et méthodes).

La taille attendue du plasmide construit, dénommé pGIDL1, sera de 4,0 kb (0,836 kb +0,241 kb +2,923 kb) (fig 4.2).

1.3.3.Transformation de la souche bactérienne XL1 blue par le mélange de ligation.

La moitié du mélange de ligation est utilisée pour transformer 200 µl de cellules compétentes de la souche bactérienne XL1 blue. Différents volumes du mélange de transformation sont étalés sur milieu LB solide contenant de l'ampicilline, de la tétracycline, de l'Xgal et de l'IPTG puis incubés une nuit à 37°C. Les différents contrôles de transformation sont réalisés (voir point 2.3.1.4.1 du chapitre matériel et méthodes).

1.3.4.Criblage des transformants et identification du vecteur pGIDL1.

Vingt-quatre clones bactériens transformants sont prélevés et mis en culture dans des flacons contenant 5 ml de LB et 5 µl d'ampicilline 10%.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, 1,5 ml de chaque culture est soumis au protocole de minipréparation d'ADN plasmidique (voir point 2.3.2.1 du chapitre matériel et méthodes).

Un cinquième du matériel ainsi obtenu est restreint par 10 unités d'enzyme de restriction *Xba* I et 10 unités d'enzyme de restriction *Eco* RV. Ces deux sites ne sont présents qu'au niveau du site multiple de clonage de la matrice pBluescript KS+.

Deux fragments diagnostiques de pGIDL1 sont attendus:

<i>Eco</i> RV / <i>Xba</i> I	2,923 kb
<i>Xba</i> I / <i>Eco</i> RV	1,077 kb

Cinq profils électrophorétiques (ceux des clones 10, 13, 14, 21 et 23) présentent des fragments de taille apparente en accord avec ceux attendus (fig 4.5).

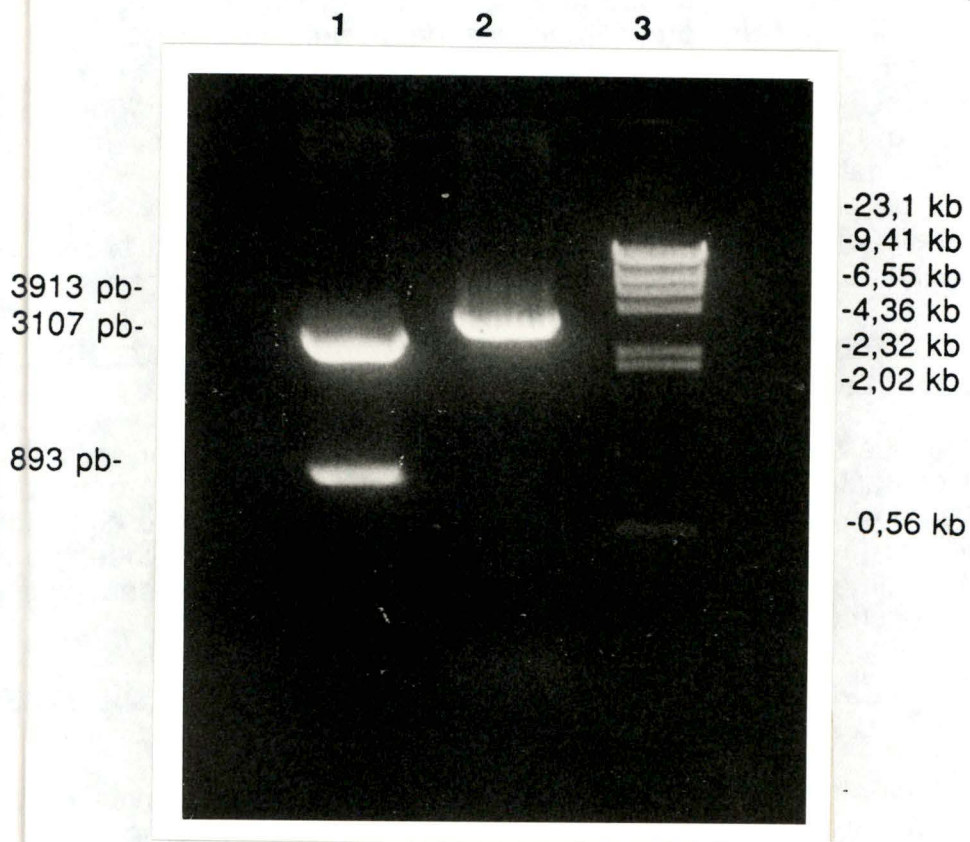
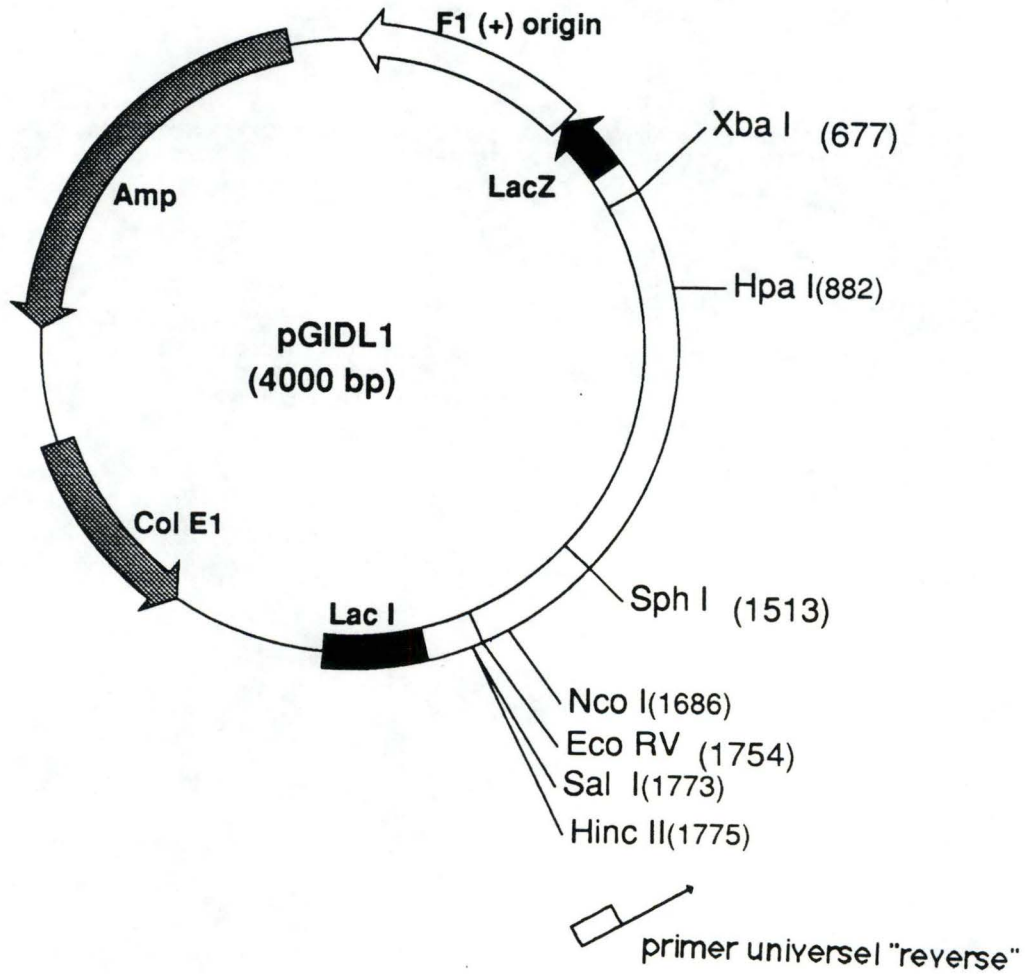


fig 4.6: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.

piste 1: clone 23 restreint par l' enzyme *Hinc* II.

piste 2: clone 23 restreint par les enzymes *Sal* I et *Nco* I.

piste 3: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.



primer universel "reverse"

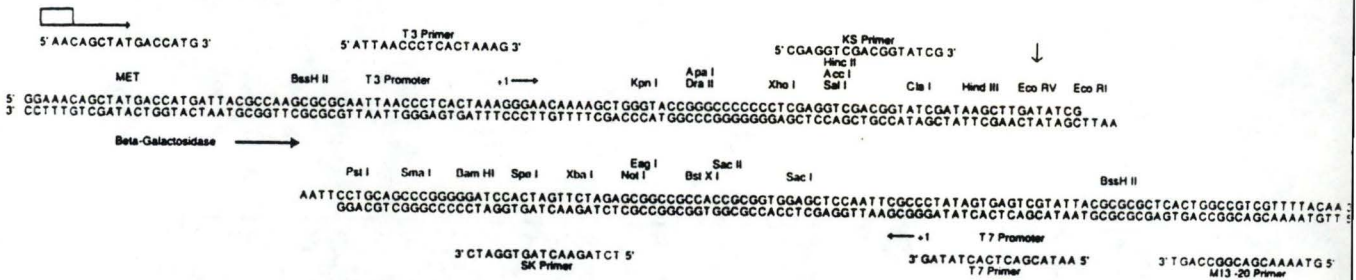


fig 4.7: Vecteur pGIDL1.

Une restriction par l'enzyme *Hinc* II (qui coupe en *Hinc* II et *Hpa* I) et une restriction double *Nco* I / *Sal* I sur le clone 23 a permis de confirmer son identification.

Les fragments diagnostiques attendus sont les suivants:

<i>Hinc</i> II / <i>Hpa</i> I	3,107 kb
<i>Hpa</i> I / <i>Hinc</i> II	0,893 kb
<i>Sal</i> I / <i>Nco</i> I	3,913 kb
<i>Nco</i> I / <i>Sal</i> I	0,087 kb

Les fragments de taille attendue sont obtenus dans chaque cas (fig 4.6), ce qui authentifie le clone 23 comme un pGIDL1 (fig 4.7).

1.3.5. Vérification par séquençage de l'intégrité du promoteur du gène *ADH2*.

Comme mentionné au point 1.2, le fragment du promoteur du gène *ADH2* compris entre le site *Eco* RV et *Sph* I, isolé à partir du vecteur pGemADH2, a subi une mutagenèse dirigée lors d'un précédent travail.

Son intégrité est donc vérifiée par séquençage sur le vecteur pGIDL1 en utilisant le primer universel "reverse" (voir point 2.3.4 du chapitre matériel et méthodes) (fig 4.7).

La séquence obtenue par la lecture de l'autoradiographie révélée du gel de séquençage est identique, comme prévu, à celle de la portion correspondante du promoteur du gène *ADH2*, à l'exception des seuls deux nucléotides correspondants au site *Nco* I introduit par la mutagenèse dirigée (fig 4.8).

La séquence obtenue permet en outre de confirmer l'identité du pGIDL1, car au-delà du point de fusion entre les deux fragments la séquence du promoteur du gène *ADH2* est conservée.

1.3.6. Conclusion.

Nous avons reconstitué un promoteur de levure fort et régulaire par le glucose dans le vecteur pKS, puis vérifié son intégrité par séquençage. La présence d'un site *Nco* I en aval de ce promoteur le rend apte à participer à la fusion transcriptionnelle indispensable à l'expression hétérologue de la diméthylase de *E.coli* dans la levure.

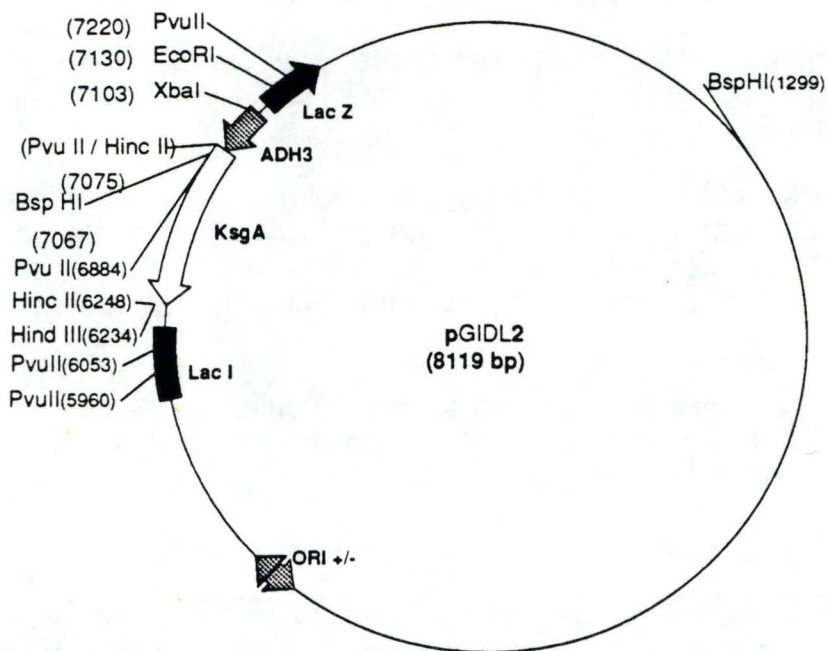
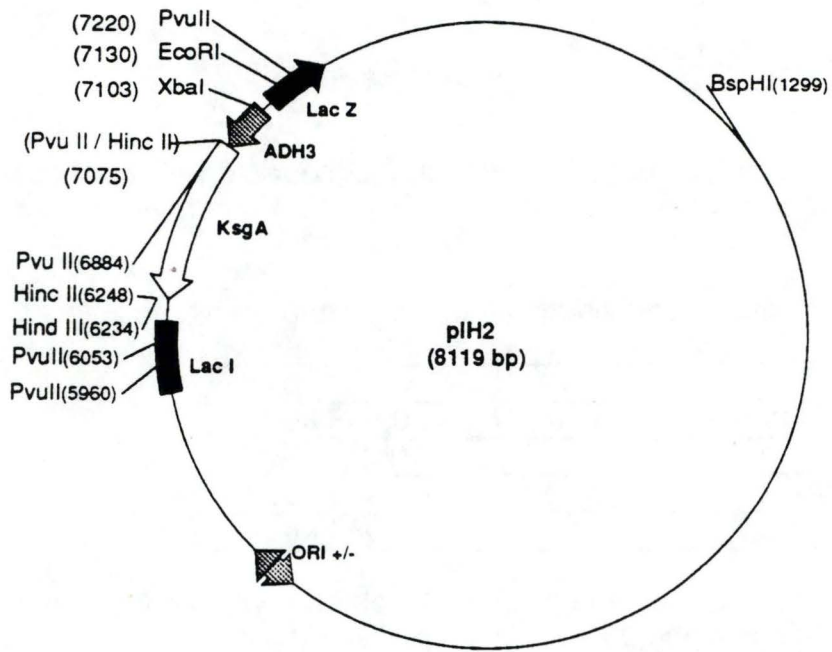


fig 4.9: Aménagement par mutagenèse dirigée du gène de la diméthylase de *E.coli*.

(1) Aménagement de l'extrémité 5' de la séquence codante du gène de la diméthylase.

séquence originelle.

Met Asn Asn
 ... CCA ATG AAT AAT CGA ...
 ... GGT TAC TTA TTA GCT ...

création d'un site de restriction chevauchant l'ATG initiateur de KsgA.

soit Nco I :

soit Bsp HI :

Met Asp*
 CC[▼]CATGGGAT
 GGGTAC[▲]CTA

Met Asn
 CT[▼]CATGA AT
 GAGTAC[▲]TA

(2) Extrémité 3' terminale Nco I de la séquence du promoteur du gène ADH 2.

C
 GGTAC

(3) Résultat attendu de la fusion Nco I / Bsp HI.

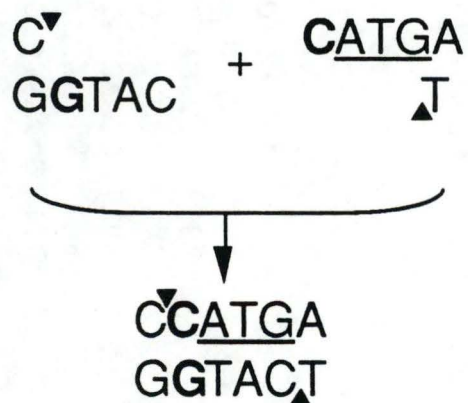


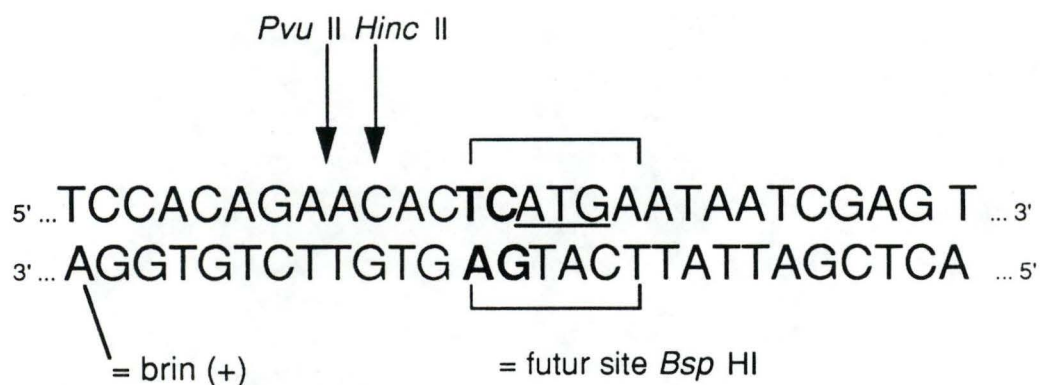
fig 4.10: Création d'un site de restriction *Bsp HI* par mutagenèse dirigée, et fusion *Nco I* / *Bsp HI* entre le promoteur *ADH2* et le gène *KsgA* aménagé.

fig 4.11 : Séquence de la diméthylase de *E. coli*.

		Hinc II											
		↓											
		10		20		30		40		50		60	
1	GTTAACACCA		ATGAATAATC		GAGTCCACCA		GGGCCACTTA		GCCCGTAAAC		GCTTCGGGCA	60	
61	AAACTTTCTC		AACGATCAGT		TCGTGATCGA		CAGTATTGTG		TCTGCCATTA		ACCCGCAAAA	120	
121	GGGCCAGGCG		ATGGTCGAAA		TCGGCCCCGG		TCTGGCGGCA		TTGACCGAAC		CGGTCGGCGA	180	
		Pvu II											
		↓											
181	ACGTCTGGAC		CAGCTGACGG		TCATCGAACT		TGACCGCGAT		CTGGCGGCAC		GTCTGCAAAC	240	
241	GCATCCATTC		TTAGGCCCGA		AACTGACGAT		TTATCAGCAG		GATGCGATGA		CCTTTAACTT	300	
301	TGGTGAAGTG		GCCGAGAAAA		TGGGTCAGCC		GCTGCGTGTT		TTCGGCAACC		TGCCTTATAA	360	
361	CATCTCCACG		CCGTTGATGT		TCCATCTGTT		TAGCTATACT		GATGCCATTG		CCGACATGCA	420	
421	CTTTATGTTG		CAAAAAGAGG		TGGTGAATCG		TCTGGTTGCA		GGACCGAACA		GCAAAGCGTA	480	
481	TGGTCGATTA		AGCGTCATGG		CGCAATACTA		TTGCAATGTG		ATCCCGGTAC		TGGAAGTACC	540	
541	GCCGTCAGCC		TTTACACCAC		CACCCAAAGT		GGATTCCGCC		GTCGTGCGCC		TGGTTCCTCA	600	
601	TGCAACGATG		CCTCACCCGG		TTAAAGATGT		TCGTGTGTTG		AGCCGCATCA		CCACCGAAGC	660	
661	CTTTAACCAG		CGTCGTAAAA		CCATTTCGTAA		CAGCCTCGGC		AACCTGTTTA		GCGTCGAGGT	720	
721	GTTAACGGGA		ATGGGGATCG		ACCCGGCGAT		GCGAGCGGAA		AATATCTCTG		TCGCGCAATA	780	
781	TTGCCAGATG		GCGAACTATC		TGGCGGAGAA		CGCGCCTTTG		CAGGAGAGTT		AAC	833	
		10		20		30		40		50		60	
									↑	Hinc II			

fin de la séquence du
peptide transit ADH3 :

début de la séquence
de KsgA :



brin (+), sortant du phage recombinant pIH2 (5'→3'):

5'... ACTCGATAATTCATGAGTGTTCTGTGGA ... 3'

oligonucléotide mutagénisant complémentaire:

3'... TGAGCTATTAAGTACTCACAAAGACACCT ... 5'

dans le sens 5' → 3':

5'... TCCACAGAACTCATGAATTATCGAGT ... 3'

fig 4.12: Séquence de la jonction peptide de transit *ADH3* et gène de la diméthylase de *E.coli* et choix de l'oligonucléotide mutagénisant.

1.4.Aménagement du gène de la diméthylase d' *E.coli* par mutagenèse dirigée en vue de sa fusion au promoteur du gène *ADH2*.

(fig 4.9)

Dans le but de surexprimer le gène de la diméthylase d' *E.coli* , nous avons choisi de le soumettre au promoteur du gène *ADH2* de *Saccharomyces cerevisiae* lequel est fort et régulable par le glucose.

Ce promoteur isolé de son contexte initial a été cloné aux sites *Xba* I (position 677) et *Eco* RV (position 1754) du plasmide pGIDL1 (fig 4.7).

La fusion transcriptionnelle de ce promoteur avec la séquence de la diméthylase dans un vecteur de type YEp (pFL40) suit la stratégie générale explicitée à la figure 4.1. Elle comporte donc la ligation de l'extrémité 3' *Nco* I (C'CATGG) du fragment *Xba* I / *Nco* I de 1009 pb, issu du vecteur pGIDL1, avec un site compatible à créer, chevauchant l'ATG initiateur du gène de la diméthylase.

La création d'un site *Nco* I introduirait à la suite de l'ATG une modification de séquence ayant pour résultat l'apparition en seconde position de la protéine diméthylase d'un acide aspartique (Asp*) au lieu d'une asparagine (Asn). On préfère donc créer un site *Bsp* HI compatible avec *Nco* I qui ne modifie pas la séquence en acides aminés de la protéine (fig 4.10 et 4.11).

1.4.1.Réaction de mutagenèse.

1.4.1.1.Définition de l'oligonucléotide primer de la mutagenèse.

La création du site *Bsp* HI par mutagenèse dirigée est réalisée sur une matrice M13 à l'aide d'un oligonucléotide de synthèse portant les mutations à introduire. Cet oligonucléotide est utilisé en tant que primer de la réplication *in vitro* . Le protocole classique décrit au point 2.3.3 du chapitre matériel et méthodes est suivi.

Nous disposons au laboratoire d'un clone M13, nommé pH2, comportant la région d'intérêt du gène *KsgA* placé, pour les besoins d'un travail antérieur (Housen, 1990), en aval d'une séquence peptide de transit ce qui sera sans incidence sur l'opération de mutagenèse visée.

La figure 4.12 résume comment l'oligonucléotide primer de synthèse a été défini.

On constate que la forme monocaténaire sortante du plasmide non muté, conventionnellement le brin (+), est hybridée à un oligonucléotide portant un fragment de la séquence codante de la diméthylase, un fragment de la séquence du peptide transit du gène *ADH3* et les deux mutations à introduire (C et T).

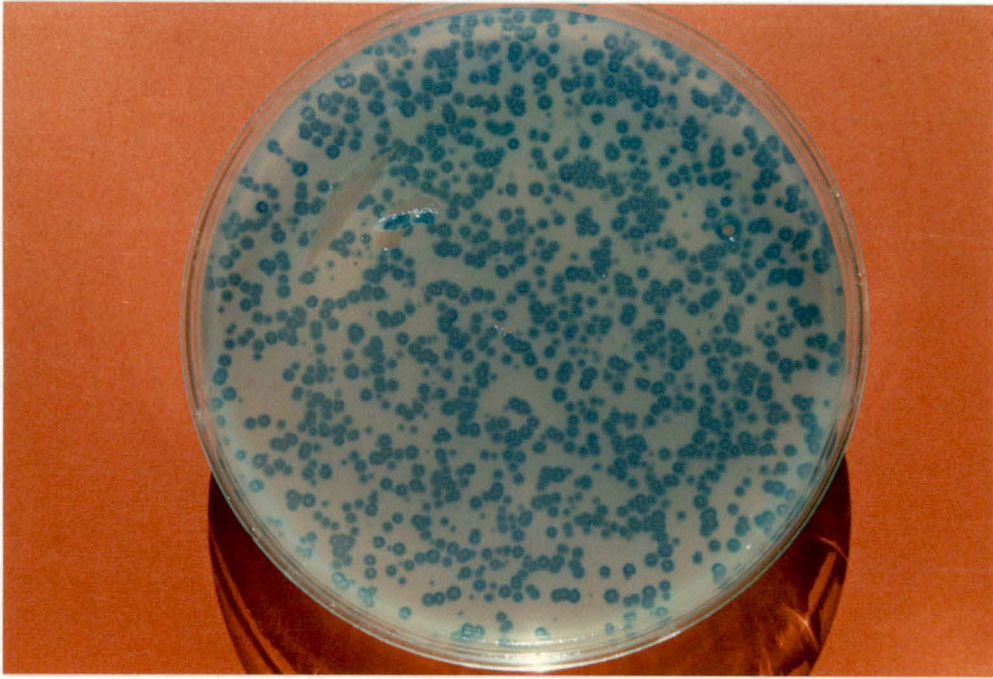


fig 4.13: Illustration des plaques de moindre croissance obtenues suite à la transformation de la souche TG1 de *E.coli* par le phage M13mp19 sauvage.

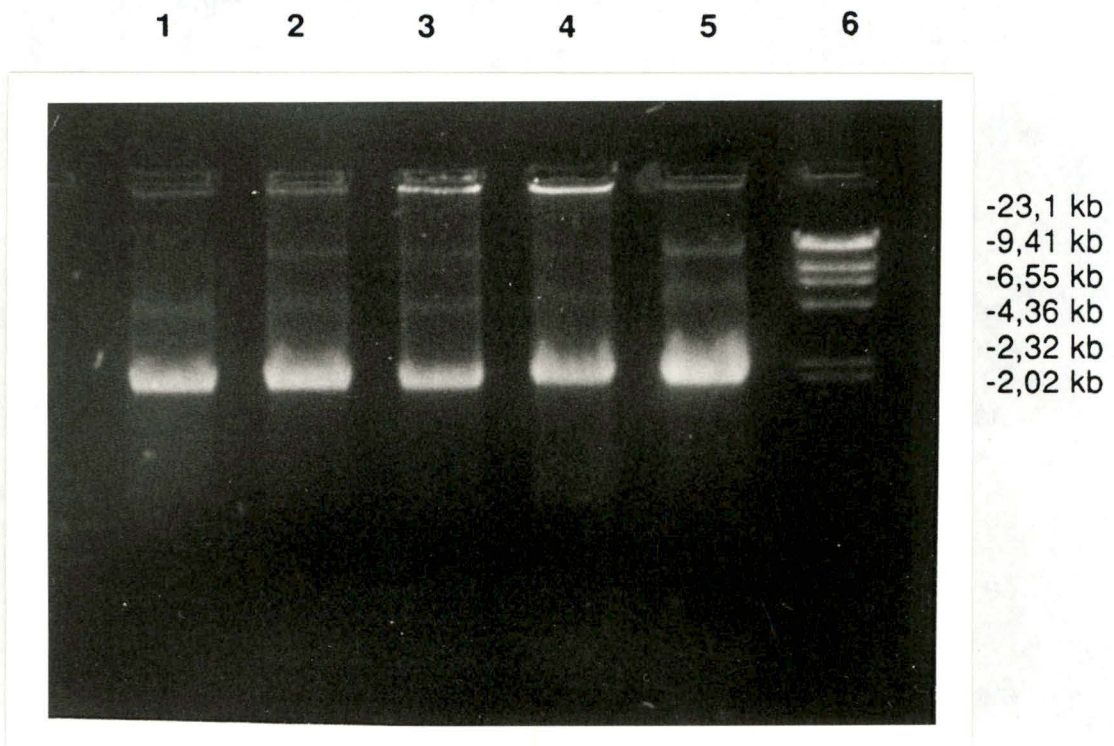


fig 4.14: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 0.8%.

piste 1→ 5: Profil électrophorétique typiquement obtenu lors de la migration de M13 s.s .

piste 6: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

Pour stabiliser l'hybridation, l'oligonucléotide a une longueur d'une vingtaine de nucléotides et s'étend symétriquement de part et d'autre de la zone mutée non appariée (Maniatis *et al*, 1989).

L'oligonucléotide est réalisé au laboratoire sur un synthétiseur automatique Applied Biosystems (voir point 2.3.3.3 du chapitre matériel et méthodes).

1.4.2.2. Mutagenèse proprement dite et isolement du mutant.

1.4.2.2.1. Préparation de pIH2 à simple brin.

Des bactéries compétentes *E.coli* de la souche TG1 sont transformées par un stock de la forme réplivative (RF) du plasmide pIH2 (voir point 2.3.1.4.1.4 du chapitre matériel et méthodes).

Le mélange de transformation obtenu est coulé sur "Hplates" contenant de l'Xgal et de l'IPTG (voir point 1.3.3 du chapitre matériel et méthodes).

Tous les transformants sont repérables par le fait qu'ils forment des "plaques", zone de moindre croissance dans le tapis de la souche hôte TG1. Ils présentent une coloration blanche témoignant de l'absence d'activité β -galactosidase suite à la disruption du gène *lac Z* des pIH2 recombinants. Dans l'expérience contrôle, les transformants par M13mp19 sauvage donnent quant à eux des plaques bleues (fig 4.13).

Le pIH2 simple brin est extrait et préparé en grande quantité comme décrit précédemment au point 2.3.2.5 du chapitre matériel et méthodes. La figure 4.14 présente le profil électrophorétique typique du bactériophage M13 sous sa forme monocaténaire (s.s).

1.4.2.2.2. Réaction de mutagenèse.

La réaction de mutagenèse est réalisée selon le protocole décrit au point 2.3.3.4 du chapitre matériel et méthodes.

Un volume de 10 μ l issu de la réaction est utilisé pour transformer des cellules compétentes *E.coli* de la souche TG1 (voir point 2.3.1.4.1.4 du chapitre matériel et méthodes).

On obtient de nombreuses plaques de moindre croissance blanches parmi lesquelles les candidats mutants se trouvent.

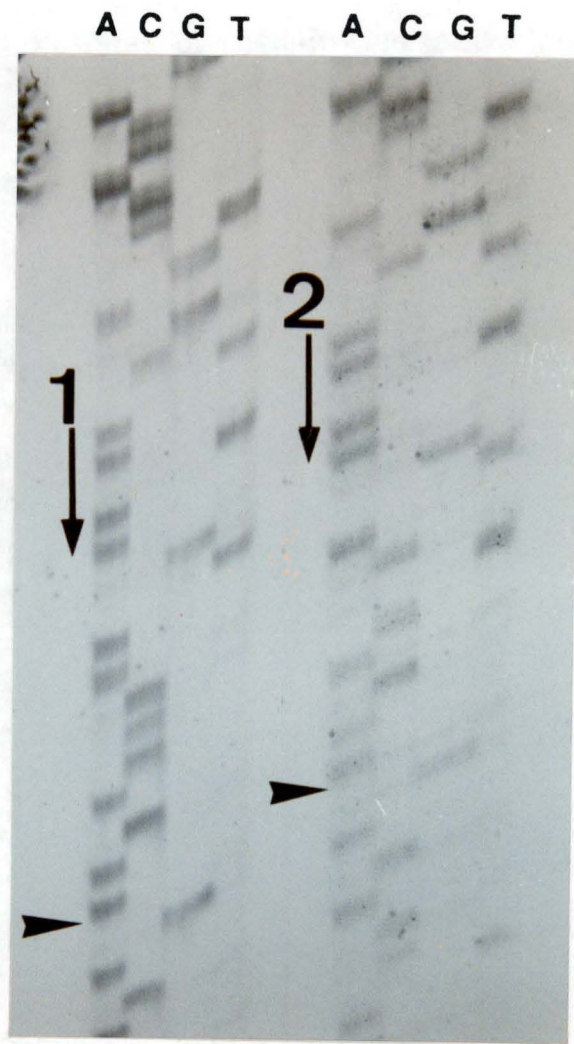


fig 4.15: Autoradiographie du gel de séquençage.

↓1: plasmide pIH2.

↓2: plasmide pGIDL2.

Séquence théorique
attendue pour le
plasmide pH2:

Séquence lue
piste 1 pour le
plasmide pH2:

Séquence lue
piste 2 pour le
plasmide pGIDL2:

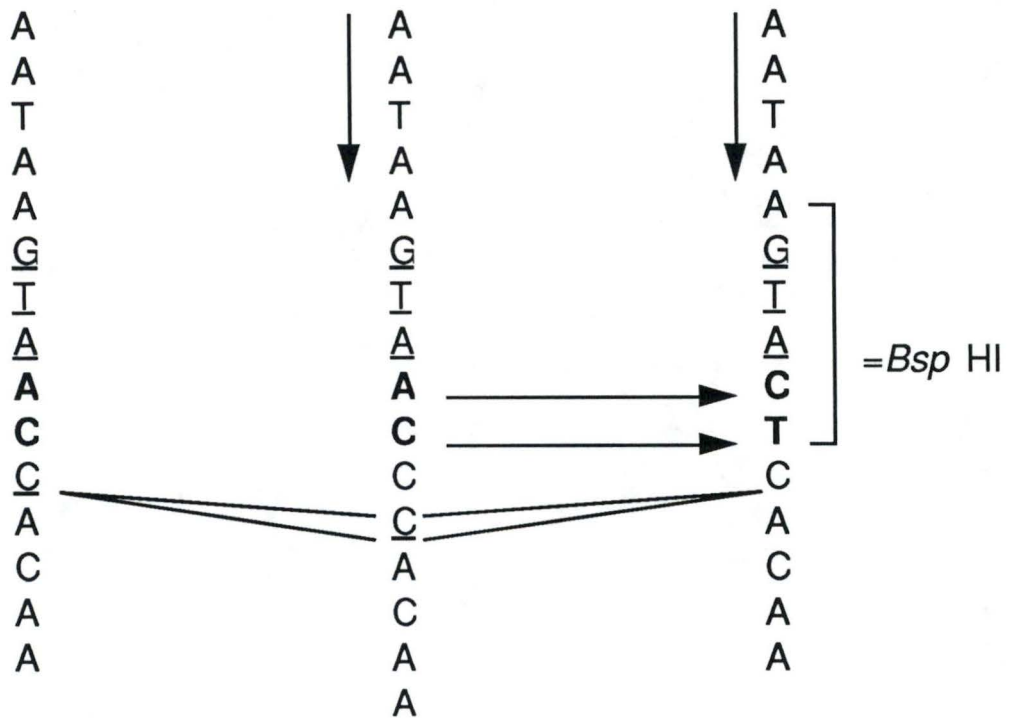


fig 4.16: Comparaison entre les séquences de la piste 1 et 2 de la figure 4.15 et la séquence théorique attendue pour le pH2.

1.4.2.2.3. Identification des mutants.

La réaction de mutagenèse vise la création d'un site de restriction nouveau (*Bsp* HI), lequel identifie donc les mutants.

Ce site étant présent une fois sur la matrice du phage M13 (fig 4.9), la digestion de l'ADN des phages mutants par l'enzyme de restriction *Bsp* HI génère deux fragments diagnostiques (5768 pb et 2351 pb). Alternativement, l'identification peut également se faire, de manière beaucoup plus fastidieuse, par la vérification de la séquence au site de mutation.

Vingt-quatre plaques blanches de moindre croissance choisies au hasard ont servi à isoler le vecteur double brin indispensable à l'essai de restriction *Bsp* HI (voir point 2.3.2.6 du chapitre matériel et méthodes).

Toutes les tentatives de restriction du vecteur par l'enzyme *Bsp* HI ont échoué, les contrôles ont pu démontrer par la suite que le lot d'enzyme reçu de la firme BIOLABS était inactif.

En parallèle, nous avons donc eu recours au séquençage pour identifier les constructions mutées, et ce selon le protocole classique décrit au point 2.3.4 du chapitre matériel et méthodes.

Le protocole de minipréparation du phage M13 simple brin est réalisé à partir de 6 plaques de moindre croissance choisies au hasard (voir 2.3.2.4 du chapitre matériel et méthodes).

Le séquençage vérifie que les six clones présentent le site *Bsp* HI désiré. Un de ceux-ci est dénommé pGIDL2 (fig 4.15 et 4.16).

L'examen de la séquence après création du site *Bsp* HI par mutagenèse révèle en outre une identité complète dans la région cible avec la construction de départ, c'est-à-dire le pIH2.

On notera cependant à la lecture de la piste 1 que le plasmide pIH2 présente une anomalie en amont de l'ATG (fig 4.15 et 4.16). Un C a été dupliqué et n'était pas attendu en référence à la séquence "théorique", déjà présentée à la figure 4.12, telle qu'elle devrait résulter de la fusion (*ADH3* / *KsgA*).

Dans notre construction, pGIDL2, ce C a été délété au cours de la réaction de mutagenèse dirigée car le primer d'extension a été défini sur la séquence "théorique" soit ACCAATG et non ACCCAATG.

Par la suite, cette délétion s'est automatiquement perpétuée au cours du cycle de réplication du phage (voir 2.3.3.2 du chapitre matériel et méthodes).

1.4.2. Conclusion.

Un site *Bsp* HI recouvrant l'ATG initiateur du gène *KsgA* a été généré par mutagenèse dirigée dans le but de réaliser une fusion transcriptionnelle entre celui-ci et le promoteur du gène *ADH2*.

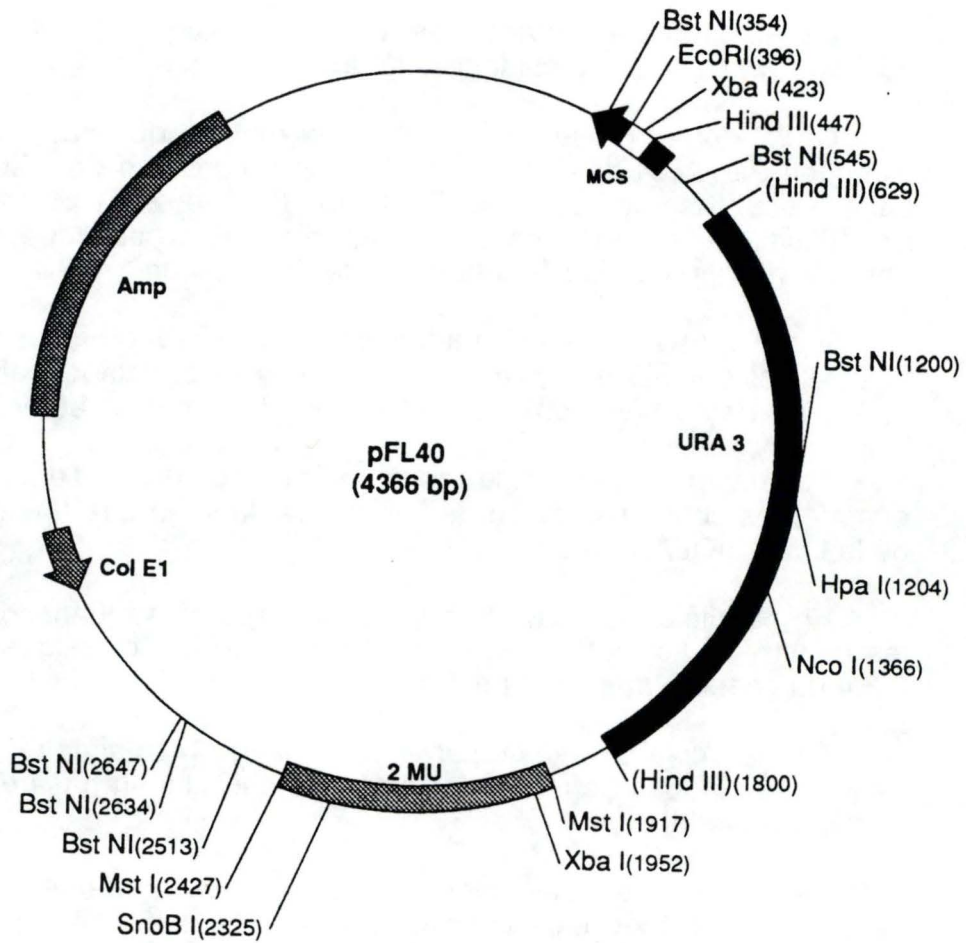


fig 4.17: Vecteur pFL40.

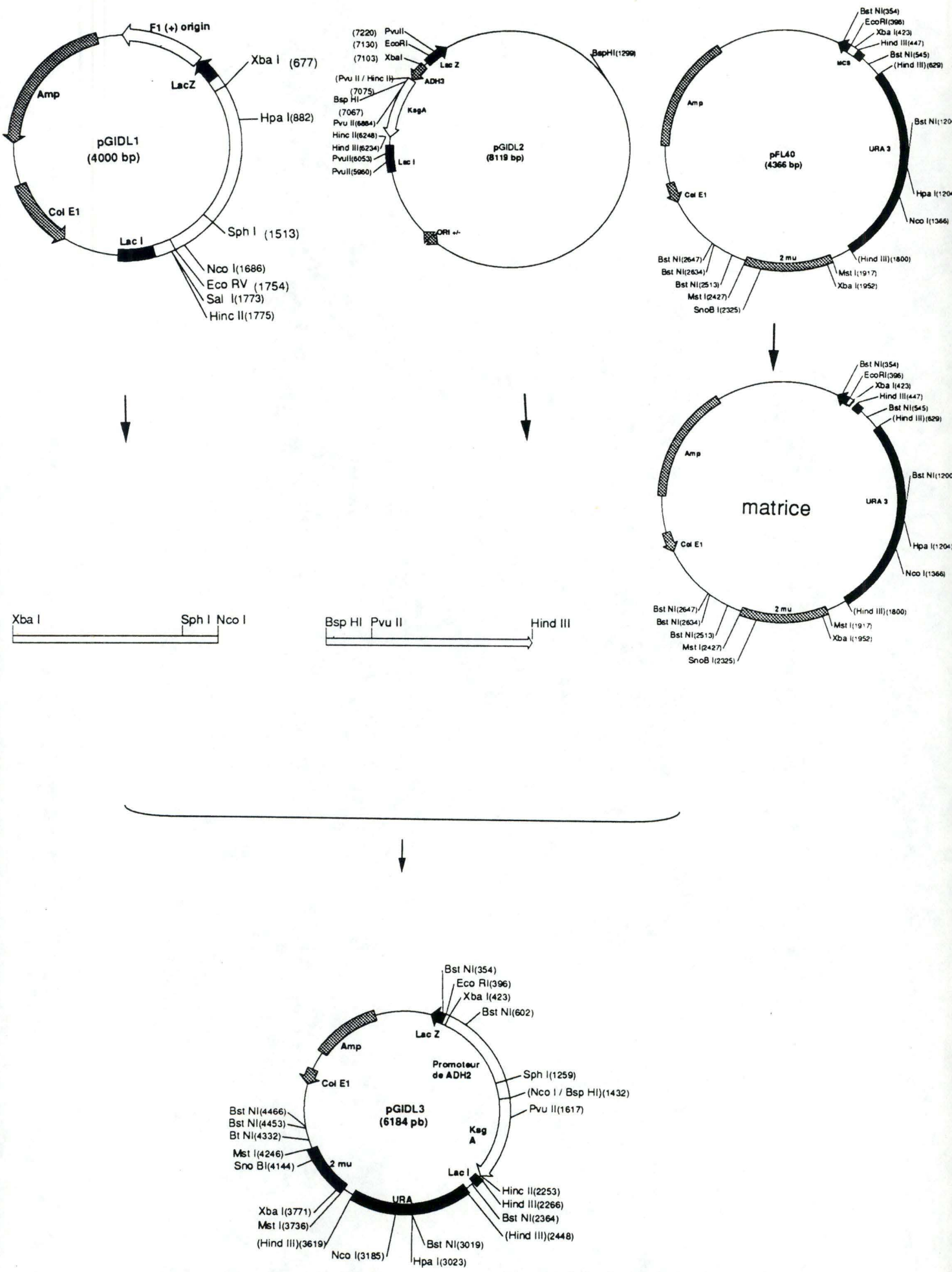


fig 4.18: Assemblage du promoteur reconstitué de levure et du gène de la diméthylase de *E.coli* aménagé.

1.5.pGIDL3: Assemblage du promoteur du gène *ADH2* reconstitué et du gène *KsgA* de la diméthylase d'*E.coli*.

Rappelons que l'expression hétérologue du gène de la diméthylase requiert la mise en place en amont de celui-ci d'un promoteur de levure. La jonction entre ce promoteur et ce gène sera réalisée par la formation d'un site de restriction hybride "*Nco* I / *Bsp* HI".

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de la présence, en aval de ce promoteur, d'un site *Nco* I.

Ensuite, nous avons créé dans la partie proximale du gène de la diméthylase un site de restriction *Bsp* HI compatible avec *Nco* I.

L'assemblage des deux éléments précités au sein d'une matrice plasmidique de levure, pFL40 (fig 4.17), présente en copies multiples par cellule, génère la construction finale, soit le vecteur pGIDL3, qui transformera la levure (fig 4.18).

Le plasmide pFL40 est un vecteur navette *E.coli* / *Saccharomyces cerevisiae* ce qui permet de réaliser les opérations nécessaires à l'obtention de la construction génétique visée dans l'hôte bactérien, avec toutes les facilités et les avantages que cela procure comparativement à l'hôte levure (voir point 1.2.3 du chapitre matériel et méthodes).

1.5.1.Préparation des fragments.

1.5.1.1.Préparation du promoteur du gène *ADH2* à partir du vecteur pGIDL1.

Le promoteur du gène *ADH2* compris entre les sites *Xba* I (position 677) et *Nco* I (position 1686), d'une longueur de 1009 pb, est isolé à partir du vecteur pGIDL1 par une double restriction (fig 4.18).

En pratique 2,4 µg du vecteur pGIDL1 sont digérés par 20 unités d'enzyme de restriction *Xba* I et 10 unités d'enzyme de restriction *Nco* I. Les deux réactions sont réalisées simultanément dans le tampon de l'enzyme de restriction *Nco* I.

Après une incubation d'une heure à 37°C les deux fragments ci-dessous sont attendus:

<i>Nco</i> I / <i>Xba</i> I	2,991 kb
<i>Xba</i> I / <i>Nco</i> I	1,009 kb

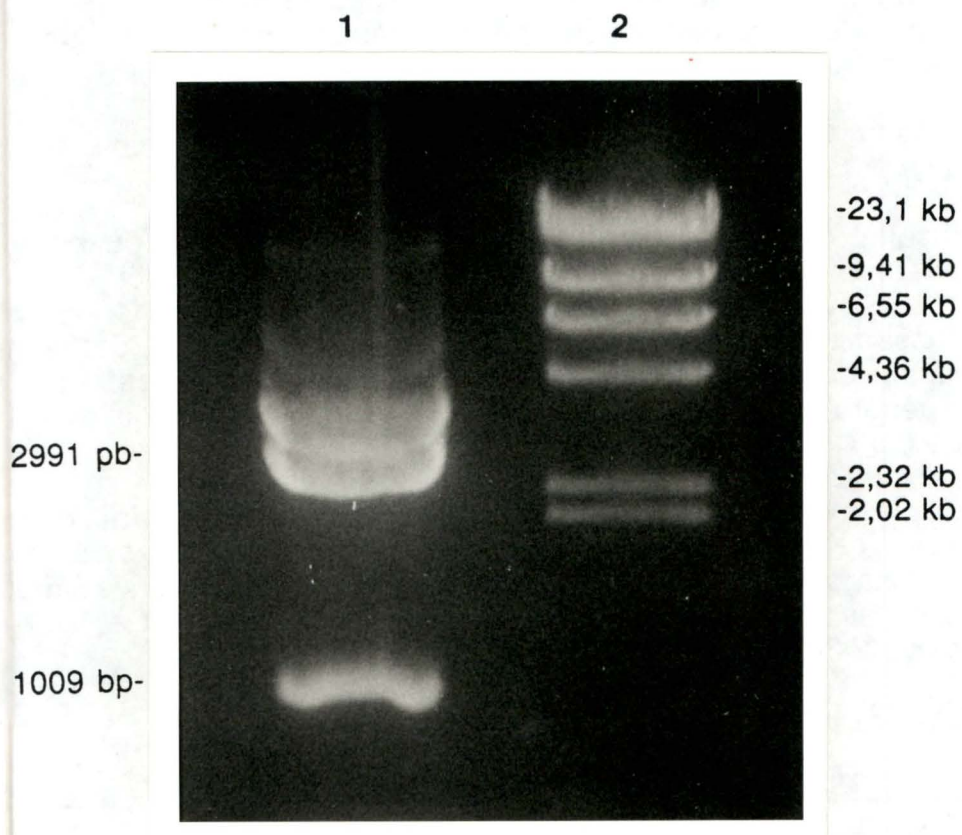


fig 4.19: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.

piste 1: vecteur pGIDL1 restreint par les enzymes *Nco* I et *Xba* I.

piste 2: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

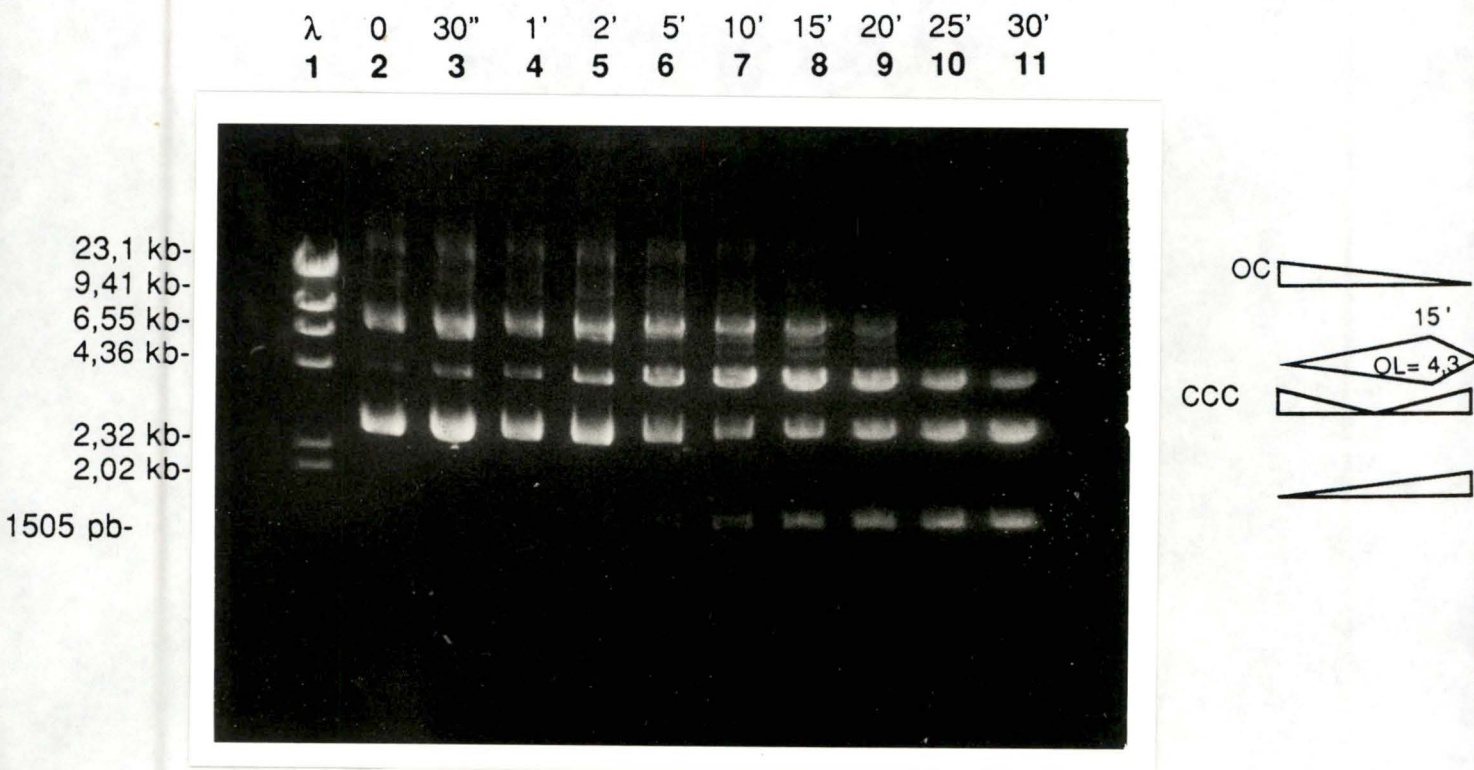


fig 4.21: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.

piste 1: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

piste 2 → 11: vecteur pFL40 restreint par l' enzyme *Xba* I pendant des temps d'incubation croissants. Des box placés à droite de la photo symbolisent l'évolution du gradient de concentration des différentes formes plasmidiques, définies au point 2.2.2.1 du chapitre matériel et méthodes (voir fig 3.8), et des différents fragments d'ADN.

Après électrophorèse (fig 4.19), la bande correspondant au fragment de 1009 pb est extraite du gel d'agarose 1% et purifiée (voir 2.2.3 du chapitre matériel et méthodes).

Les bandes correspondants aux tailles supérieures à 3 kb résultent d'une digestion partielle du vecteur (voir point 2.2.2.1 du chapitre matériel et méthodes) (NB: le tampon de *Nco* I utilisé n'est pas "optimal" pour *Xba* I).

1.5.1.2. Préparation du gène de la diméthylase d' *E.coli* à partir du vecteur pGIDL2.

Le gène de la diméthylase d'*E.coli*, d'une longueur de 833 pb, est isolé à partir du vecteur pGIDL2 par une double restriction entre les sites *Bsp* HI (position 7067) et *Hin* d III (position 6234) (fig 4.18).

En pratique 2,5 µg du vecteur pGIDL2 sont restreints par 20 unités d'enzyme de restriction *Hin* d III. Une extraction au phénol est réalisée après une incubation d'une heure à 37°C, et la seconde restriction menée à l'aide de 20 unités d'enzyme de restriction *Bsp* HI.

Trois fragments sont attendus:

<i>Bsp</i> HI (1299) / <i>Hin</i> d III (6234)	4,935 kb
<i>Bsp</i> HI (7067) / <i>Bsp</i> HI (1299)	2,351 kb
<i>Bsp</i> HI (7067) / <i>Hin</i> d III (6234)	0,833 kb

Après électrophorèse (fig 4.20), la bande correspondante à 833 pb est extraite du gel et purifiée (voir 2.2.3 du chapitre matériel et méthodes).

1.5.1.3. Préparation du vecteur de clonage pFL40.

Nous désirons linéariser le plasmide pFL40 au niveau de son MCS par un double restriction *Xba* I (position 423) et *Hin* d III (position 447) (fig 4.18).

Cependant, une double restriction totale *Xba* I / *Hin* d III génère trois fragments au lieu des deux attendus en raison de la présence d'un autre site *Xba* I dans la matrice du vecteur pFL40 en position 1952 (fig 4.17).

Nous devons donc opérer une digestion partielle de la matrice pFL40 par l'enzyme de restriction *Xba* I.

Afin de déterminer le temps d'incubation optimal nécessaire à l'enzyme de restriction *Xba* I pour ne couper qu'un seul des deux sites qui lui sont spécifiques, une expérience pilote est menée (fig 4.21).

Une quantité de 10 µg de plasmide pFL40 est digérée par 20 unités d'enzyme de restriction *Xba* I. Au temps 0, 30", 1', 2', 5', 10', 15', 20', 25' et 30' de l'incubation, un dixième de la réaction est prélevée et l'enzyme immédiatement inactivée par passage à -20°C.

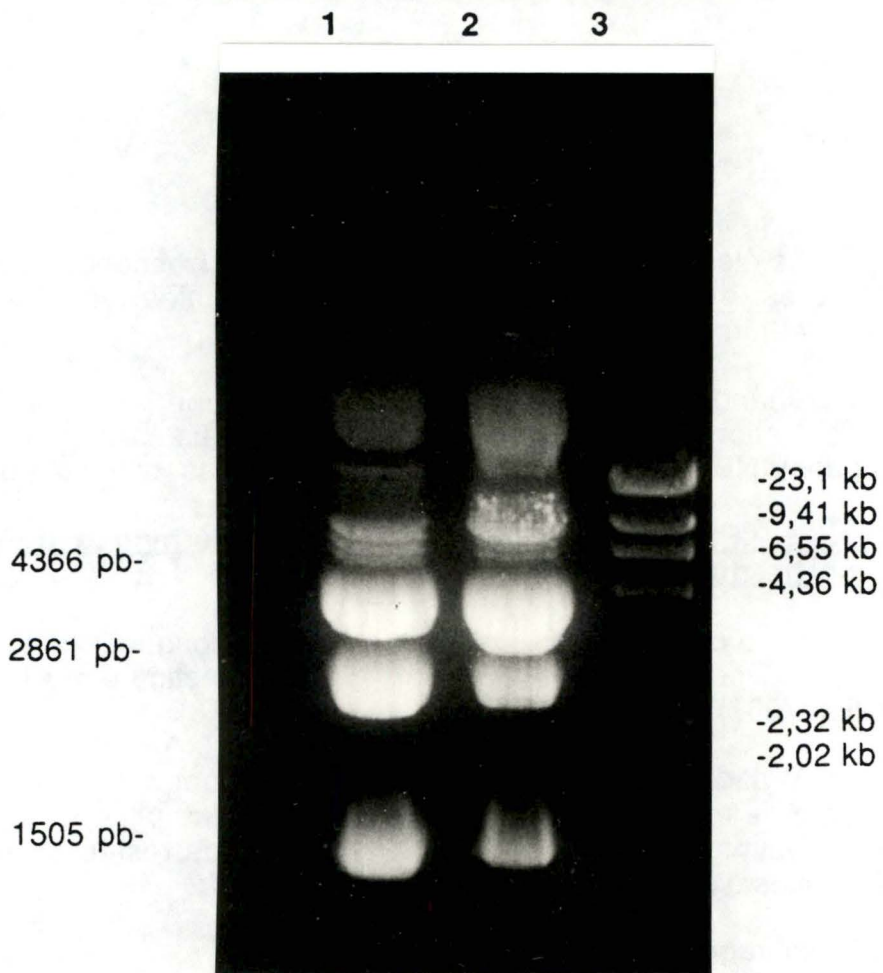


fig 4.22: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.

piste 1 et 2: vecteur pFL40 restreint par l' enzyme *Xba* I au cours d'une incubation de 15 minutes.

piste 3: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

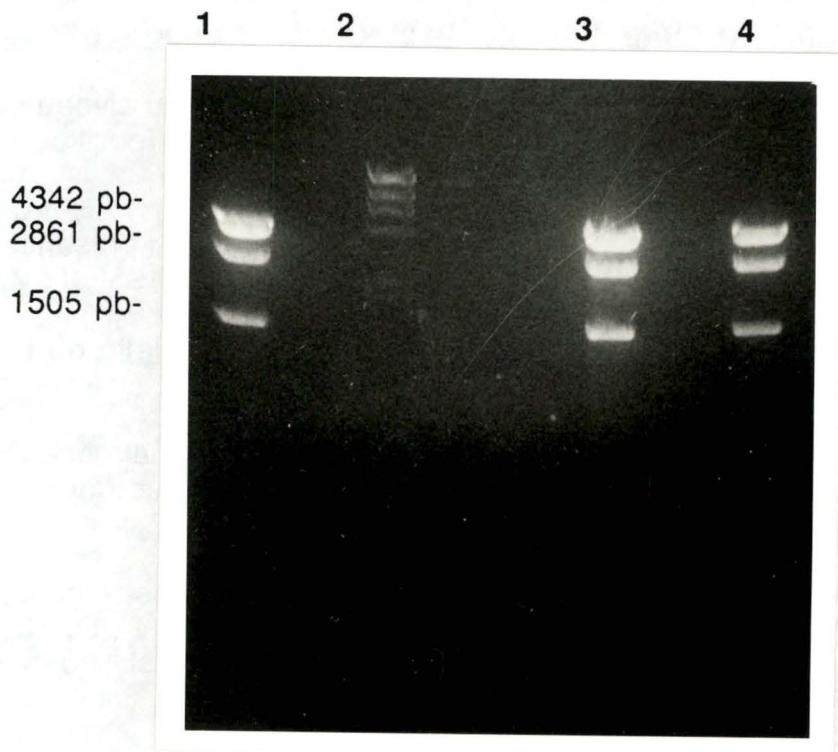


fig 4.23: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.

piste 1, 2 et 4: Restriction *Hin* d III de la bande de 4366 pb récupérée précédemment (fig 4.22).

piste 2: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

La bande de 4,3 kb, forme OL du plasmide, est la plus intense pour une durée d'incubation de 15 minutes.

Une restriction "massive" est alors réalisée dans les mêmes conditions. Une quantité de 10 µg de plasmide pFL40 est digérée pendant 15 minutes par 20 unités d'enzyme de restriction *Xba* I (fig 4.22).

Après migration électrophorétique la bande de 4366 pb, majoritaire comme attendue, est extraite du gel d'agarose 1% et purifiée (voir 2.2.3 du chapitre matériel et méthodes).

La bande de 4366 pb récupérée contient un mélange de plasmides linéarisés au site *Xba* I en position 423 et de plasmides linéarisés au site *Xba* I en position 1952 (fig 4.17). Seuls les premiers, linéarisés en position 423, nous intéressent. Une restriction "diagnostique" *Hin* d III va permettre de les distinguer des seconds. Un seul des deux fragments obtenus suite à la restriction *Hin* d III de la forme OL recherchée, linéarisée en position 423, est visible sur gel. Il s'agit du fragment de 4342 pb, celui de 24 pb n'est pas visible. La forme OL non recherchée, linéarisée en position 1952, donne quant à elle après restriction *Hin* d III deux fragments distinguables sur gel, un de 2861 pb et un de 1505 pb (fig 4.17).

En pratique la bande de 4,366 kb purifiée est digérée par 20 unités d'enzyme de restriction *Hin* d III pendant une heure à 37°C.

Les fragments attendus sont donc les suivants:

<i>Xba</i> I (423) / <i>Hin</i> d III (447)	4,342 kb
(<i>Xba</i> I (423) / <i>Hin</i> d III (447)	0,024 kb)

et

<i>Xba</i> I (1952) / <i>Hin</i> d III (447)	2,861 kb
<i>Xba</i> I (1952) / <i>Hin</i> d III (447)	1,505 kb

Après électrophorèse (fig 4.23), le fragment de 4342 pb est extrait du gel d'agarose 1% et purifié (voir 2.2.3 du chapitre matériel et méthodes).

La première purification, qui concernait la bande de 4366 pb, a été efficace puisque lorsque l'on compare la fig 4.22 et 4.23 on constate que les formes plasmidiques non coupées ont disparu.

1.5.2.Ligation triple.

Une ligation est réalisée entre les trois fragments récupérés suivant une stoechiométrie 1:1:1. La quantité totale de matériel engagée dans la restriction est 1 µg. L'incubation en présence de dix unités de T4 DNA ligase est menée pendant 12 heures à 14°C (voir point 2.3.1.3 du chapitre matériel et méthodes).

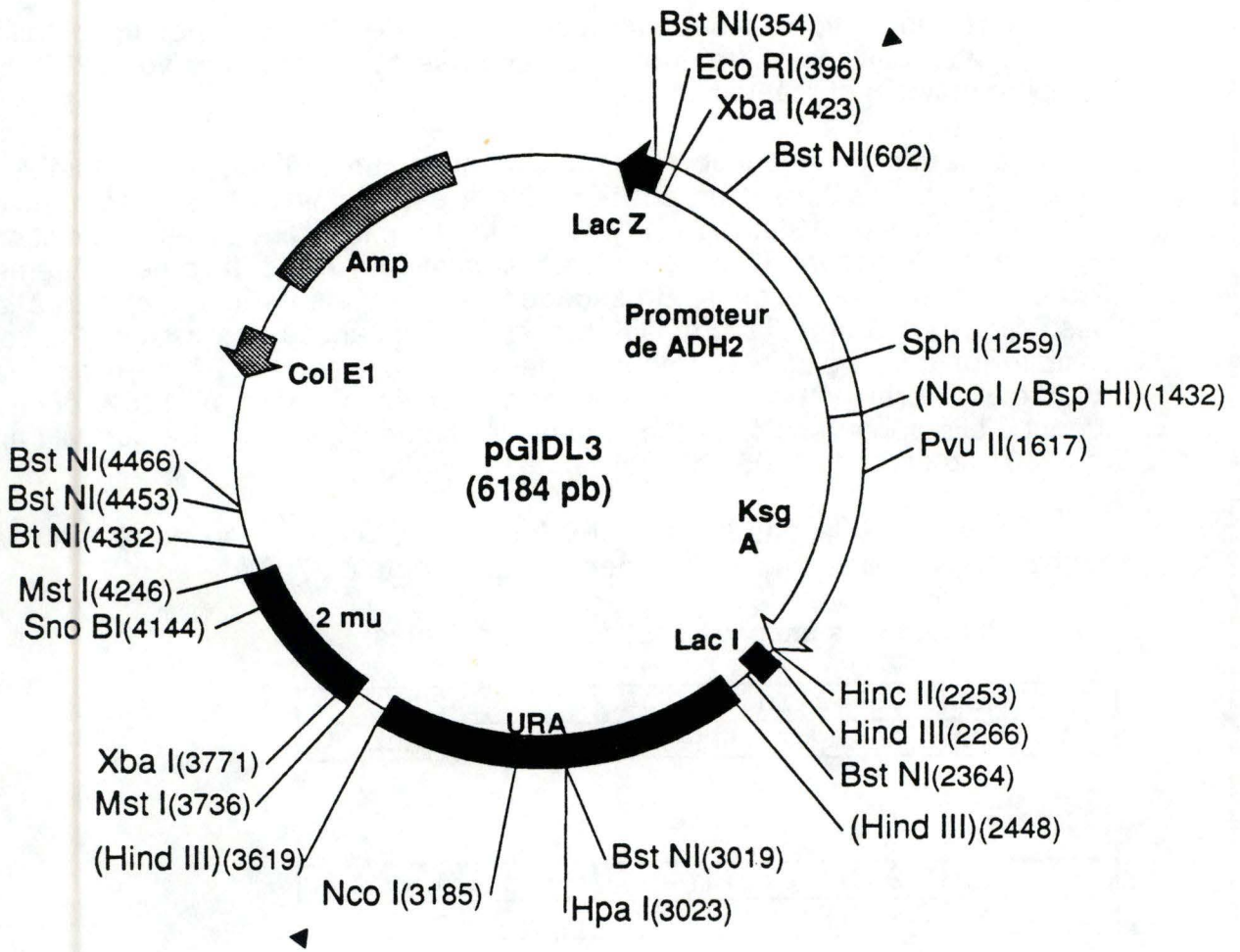


fig 4.24: Vecteur pGIDL3.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

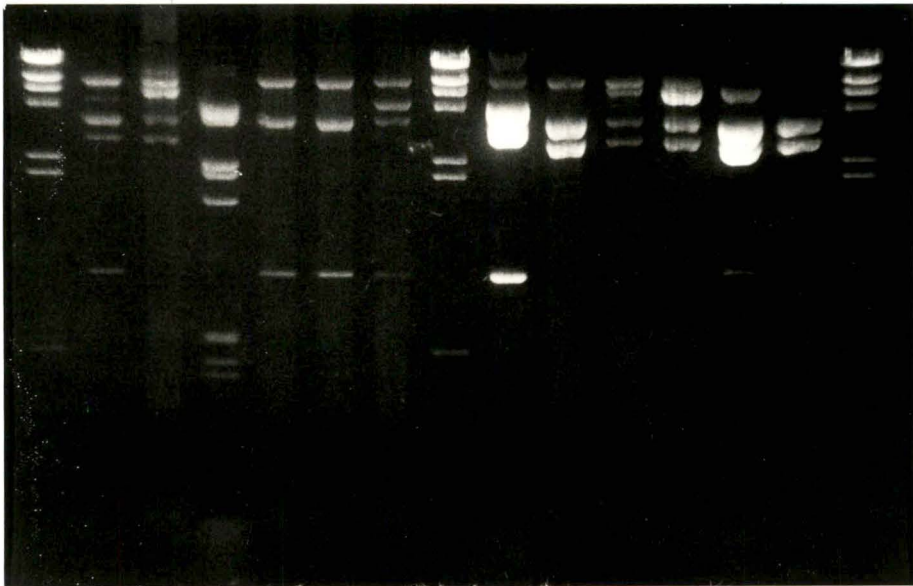


fig 4.25: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.

Criblage du clone pGIDL3 par restriction *Nco* I / *Eco* RI.

piste 1, 8 et 15: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

piste 2 \rightarrow 7 et 9 \rightarrow 14: clones 25 à 30 et 31 à 36.

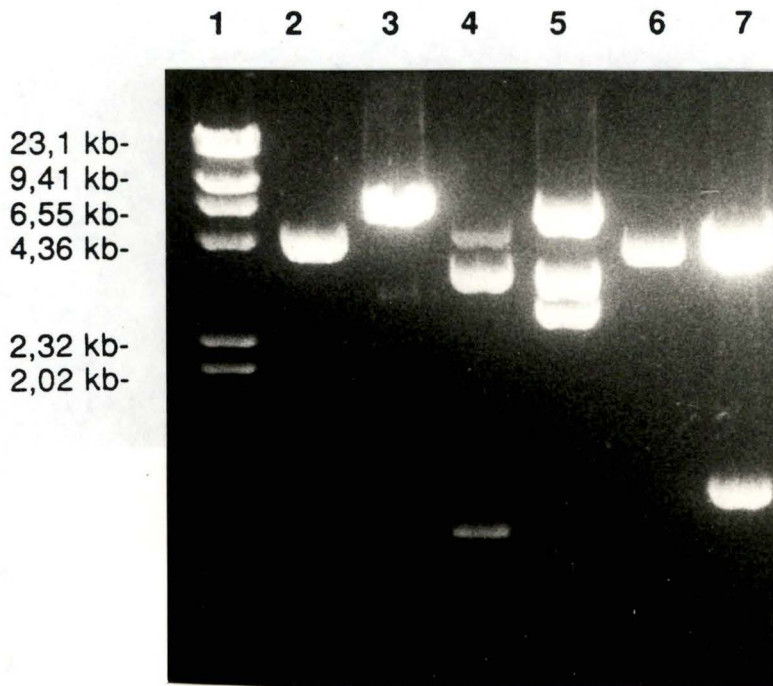


fig 4.26: Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 1%.

piste 1: marqueur de taille: λ restreint par l'enzyme *Hin* d III.

piste 2: pFL 40 linéarisé par l'enzyme de restriction *Eco* RI, taille du fragment attendu: 4366bp.

piste 3: pGIDL3 linéarisé par l'enzyme de restriction *Eco* RI, taille du fragment attendu: 6184 pb.

piste 4: pFL40 restreint *Eco* RI / *Nco* I, tailles des fragments attendus: 3396 et 970 pb.

piste 5: pGIDL3 restreint *Eco* RI / *Nco* I, tailles des fragments attendus: 3396 et 2789 pb.

piste 6: pFL40 restreint *Eco* RI / *Pvu* II, tailles du fragment attendu: 4366pb.

piste 7: pGIDL3 restreint *Eco* RI / *Pvu* II, tailles des fragments attendus: 4964 et 1221 pb.

La restriction fut partielle, ce qui explique l'apparition d'une bande non attendues dans la piste 4 et la piste 5, celles-ci correspondent respectivement au plasmide restreint une fois et observé piste 2 et 3.

Le plasmide recombinant attendu, soit le pGIDL3, a la taille de 6,184 kb (4,352 kb + 0,833 kb + 1,009 kb) (fig 4.24).

1.5.3. Transformation de la souche bactérienne XL1-blue par le mélange de ligation.

La totalité du mélange de ligation est utilisée pour transformer 400 µl de cellules compétentes de la souche bactérienne XL1 blue. Différents volumes du mélange de transformation sont étalés sur milieu LB solide contenant de l'ampicilline, de la tétracycline, de l'Xgal et de l'IPTG puis incubés une nuit à 37°C. Les différents contrôles de transformation sont réalisés (voir point 2.3.1.4.1 du chapitre matériel et méthodes).

1.5.4. Criblage des transformants et identification du vecteur pGIDL3.

Quarante-huit clones bactériens transformants sont prélevés et mis en culture dans des flacons contenant 5 ml de LB et 5 µl d'ampicilline 10%.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, 1,5 ml de chaque culture est soumis au protocole de minipréparation d'ADN plasmidique (voir point 2.3.2.1 du chapitre matériel et méthodes).

Un sixième du matériel ainsi obtenu est restreint par dix unités d'enzyme de restriction *Eco* RI et 10 unités d'enzyme de restriction *Nco* I.

Deux fragments sont attendus pour la construction pGIDL3 (fig 4.24):

<i>Nco</i> I / <i>Eco</i> RI	3,395 kb
<i>Eco</i> RI / <i>Nco</i> I	2,789 kb

Un profil électrophorétique, celui du clone 36, présente des fragments de taille apparente en accord avec ceux attendus (fig 4.25 piste: 14).

Une double restriction supplémentaire *Eco* RI / *Pvu* II est réalisée sur le clone 36 afin de l'identifier comme étant le pGIDL3.

Fragments attendus par restriction *Eco* RI / *Pvu* II:

<i>Eco</i> RI / <i>Pvu</i> II	4,963 kb
<i>Pvu</i> II / <i>Eco</i> RI	1,221 kb

Les fragments de taille attendue sont obtenus (fig 4.26 piste: 7).

1.5.5. Conclusion.

Au terme de ces étapes de construction, nous disposons d'un vecteur de levure, présent en copies multiples par cellule, sur lequel le gène de la diméthylase d'*E.coli* est sous la dépendance d'un promoteur fort et finement régulable par le glucose.

2. Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par pGIDL3 et vérification de l'expression de la diméthylase chez les levures transformées.

2.1. Introduction.

L'expression hétérologue du gène de la diméthylase de *E. coli* chez la levure est une étape préliminaire indispensable à la création d'un mutant de levure pour la fonction de diméthylation.

Afin d'assurer ce préliminaire, nous avons réalisé une série de constructions ayant comme objectif final la création d'un vecteur de levure porteur du gène de la diméthylase de *E. coli* dans un contexte favorable à son expression (cf: pGIDL3).

Dans ce but, nous avons choisi une matrice de levure présente en copies multiple par cellule (pFL40) et placé le gène *KsgA* sous la dépendance du promoteur fort et régulable par le glucose du gène *ADH2*.

Nous vérifions par les expériences qui suivent que les levures transformées par ce vecteur pGIDL3 expriment comme attendu la diméthylase de *E. coli*.

2.2. Stratégie générale.

Le vecteur pGIDL3 est introduit par transformation dans une souche *ura⁻* de *Saccharomyces cerevisiae* et des cultures liquides sont réalisées à partir des transformants obtenus.

Les trois milieux utilisés, dont la composition en glucose varie, permettent, via le promoteur du gène *ADH2*, d'obtenir trois niveaux d'expression de la diméthylase dans la levure. Le promoteur du gène *ADH2* est fortement réprimé par des concentrations en glucose élevée (10%) et moyennement réprimé par des concentrations en glucose faible (1%) (Ciriacy, 1976). Il est déréprimé par l'utilisation de glycérol (3%) (Taguchi et al., 1987).

Les cultures sont lysées et les extraits protéiques analysés en SDS-PAGE et "immunoblot".

Les contrôles utilisés sont les suivants:

Un extrait protéique issu de la lyse d'une culture de levure *ura⁻* transformée par le plasmide pFL40, c'est-à-dire la matrice sans le gène de la diméthylase et un extrait protéique issu de la lyse d'une culture d'*E. coli* transformée par un vecteur portant le gène *KsgA* et surproductrice de diméthylase.

2.3. Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par pGIDL3.

La souche W303 *ura*⁻ (voir point 1.2.2 du chapitre matériel et méthodes) de *Saccharomyces cerevisiae* est transformée par 10 µg du vecteur pGIDL3 selon le protocole classique décrit par Ito (et repris au point 2.3.1.4.2 du chapitre matériel et méthodes).

Parallèlement, une seconde transformation de la même souche est réalisée à l'aide de 10 µg du vecteur pFL40 en guise de contrôle.

Les mélanges de transformation sont étalés sur milieu minimum + synthétique complet sans uracile (voir point 1.3.2.2 du chapitre matériel et méthodes).

Les clones transformants sont obtenus après une croissance de quatre jours à 30°C.

2.4. Vérification de l'expression de la diméthylase d' *E.coli* chez les levures transformées.

2.4.1. Préparation des extraits protéiques.

On réalise des précultures de la souche de levure W303, transformée soit par le vecteur pGIDL3 soit par le vecteur pFL40, dans 15 ml de milieu minimum + synthétique complet sans uracile.

Après 48 heures de croissance, sous agitation à 30°C, ces précultures servent d'inoculum à quatre cultures de 500 ml.

(1) contrôle (pFL40): milieu minimum (contenant 2% de glucose, voir point 1.3.2.2 du chapitre matériel et méthodes) + synthétique complet sans uracile.

(2) répression forte (pGIDL3): milieu minimum (contenant 10% de glucose) + synthétique complet sans uracile.

(3) répression moyenne (pGIDL3): milieu minimum (contenant 1% de glucose) + synthétique complet sans uracile.

(4) dérépression (pGIDL3): milieu minimum (ne contenant pas de glucose mais 3% de glycérol) + synthétique complet sans uracile.

Après une croissance poursuivie pendant 60 heures, sous agitation à 30°C, ces cultures de levure sont soumises à une lyse enzymatique comme décrit au point 2.1.2 du chapitre matériel et méthodes.

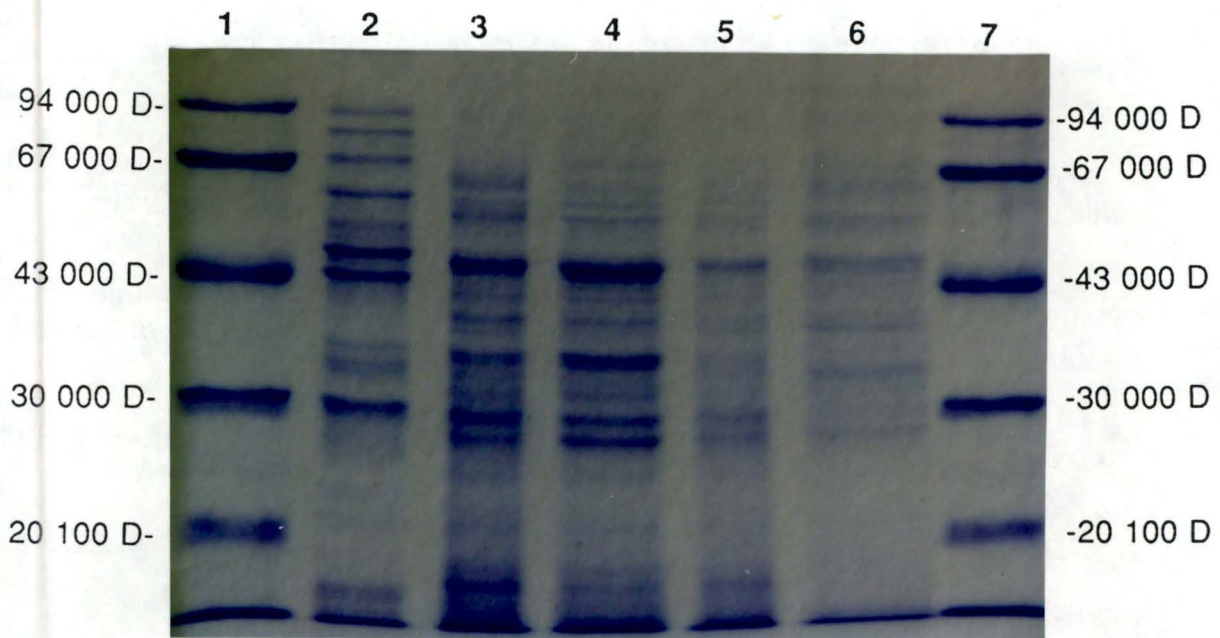


fig 4.27: Electrophorèse en gel SDS-PAGE suivie d'une coloration au Bleu de Coomassie.

piste 1 et 7: marqueur de poids moléculaire (Pharmacia).

piste 2: EXTRAIT 1, CONTROLE, lysat brut de la souche JM 101 de *E.coli* transformée par le pUC8KsgA7.

piste 3: EXTRAIT 2, CONTROLE, lysat brut de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par le pFL40.

piste 4: EXTRAIT 3, REPRESSION FORTE, lysat brut de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par le pGIDL3.

piste 5: EXTRAIT 4, REPRESSION MOYENNE, lysat brut de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par le pGIDL3.

piste 6: EXTRAIT 5, DEREPRESSION, lysat brut de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par le pGIDL3.

Parallèlement, une culture de bactéries surproductrices de diméthylase est réalisée. Nous disposons au laboratoire de la souche JM101 d'*E.coli* celle-ci est transformée par le plasmide "multicopy" pUC8-KsgA7 (voir point 1.2.1 et 1.2.3 du chapitre matériel et méthodes). Deux cents millilitres de LB + ampicilline sont inoculés avec une colonie.

Après 24 heures de croissance, sous agitation à 37°C, les cellules sont lysées par sonication selon le protocole décrit au point 2.1.1 du chapitre matériel et méthodes.

L'extrait d' *E.coli* (extrait n°1) et les quatre extraits protéiques de levures (extrait n°2 à 5) sont dosés selon la méthode de Bradford décrite au point 2.1.3 du chapitre matériel et méthodes.

2.4.2.Mise en évidence de l'expression de la diméthylase par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS et coloration au Bleu de Coomassie.

Le protocole de mise en oeuvre des gels protéiques en conditions dénaturantes est décrit au point 2.1.4 du chapitre matériel et méthodes.

Cinq dépôts, contenant des quantités équivalentes de protéines sont réalisés à partir des cinq extraits totaux.

Après migration et coloration au Bleu de Coomassie (voir point 2.1.5 du chapitre matériel et méthodes), le profil électrophorétique présenté à la figure 4.27 est obtenu.

Le lysat bactérien de la souche JM101 d'*E.coli* présente une bande très intense à 30 kD, PM apparent attendu de la diméthylase de *E.coli* (fig 4.27 piste: 2) (Poldermans *et al.* , 1979 III).

L'examen attentif des pistes 3 à 6 ne permet pas de conclure à une expression de la diméthylase de *E.coli* chez la levure. Notons qu'en absence de glucose (piste: 6), le pattern électrophorétique observé est sensiblement modifié, ce qui témoigne de l'effet régulateur du glucose sur de nombreux gènes.

Conclusions:

Les extraits protéiques obtenus, suite à la lyse de cultures de levures de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par la construction pGIDL3, ne présentent pas, en analyse SDS-PAGE, de bande détectable à la hauteur attendue pour la diméthylase, soit 30 kD.

Cependant rien ne nous permet d'exclure que la diméthylase de *E.coli* ne soit exprimée chez la levure mais à un niveau inférieur au seuil de détection.

La seconde méthode de mise en évidence de l'expression de la diméthylase, soit la détection immunologique, est plus spécifique et beaucoup plus sensible.

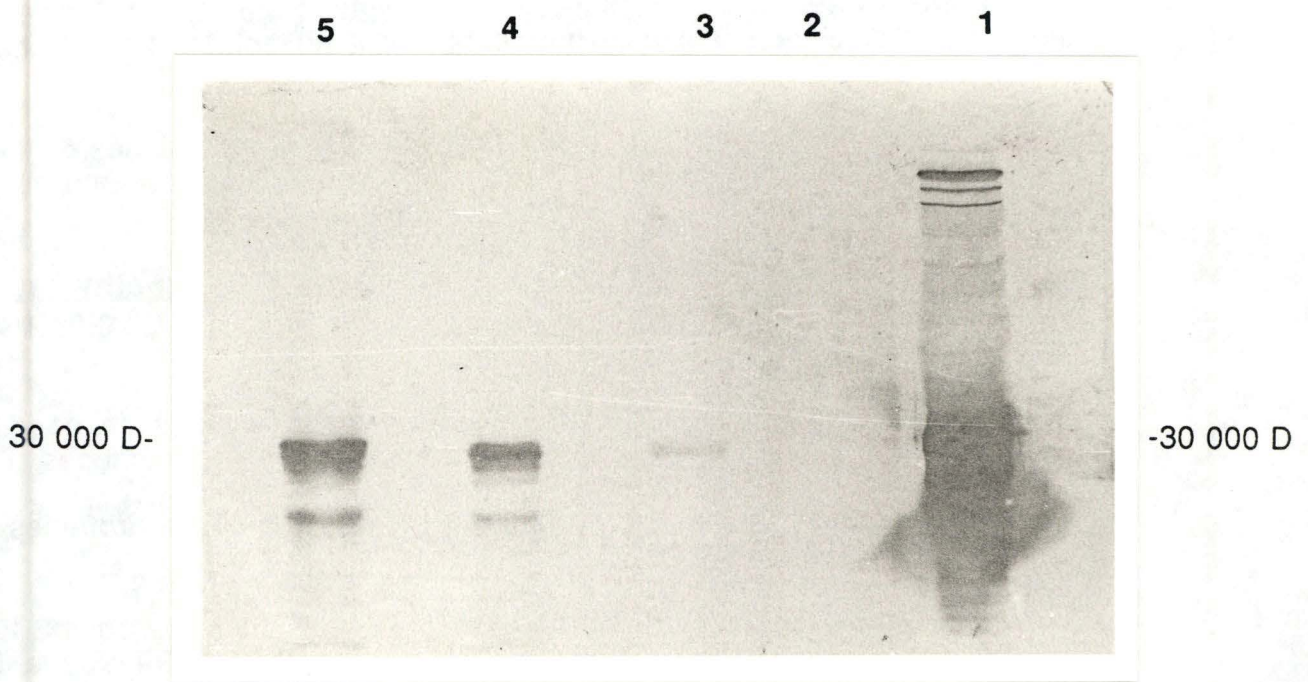


fig 4.28: Analyse par "Immunoblot".

piste 1: EXTRAIT 1, CONTROLE, lysat brut de la souche JM 101 de *E.coli* transformée par le pUC8KsgA7.

piste 2: EXTRAIT 2, CONTROLE, lysat brut de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par le pFL40.

piste 3: EXTRAIT 3, REPRESSION FORTE, lysat brut de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par le pGIDL3.

piste 4: EXTRAIT 4, REPRESSION MOYENNE, lysat brut de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par le pGIDL3.

piste 5: EXTRAIT 5, DEREPRESSION, lysat brut de la souche W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformée par le pGIDL3.

2.4.3.Mise en évidence de l'expression de la diméthylase par détection immunologique.

Des quantités équivalentes de protéines issues des cinq extraits décrits précédemment sont chargées sur un gel SDS PAGE.

Après migration électrophorétique, le contenu protéique du gel de polyacrylamide est transféré sur un filtre de nitrocellulose au cours d'une opération de "blotting".

Ce filtre est soumis au protocole "immunoblot" décrit au point 2.1.6 du chapitre matériel et méthodes. Les anticorps utilisés sont des anticorps polyclonaux de lapin anti-diméthylase de *E.coli* mis à notre disposition par le professeur P.H. van Knippenberg.

L'immunoblot présenté à la figure 4.28 révèle comme attendu dans la piste 1, correspondant au lysat bactérien de la souche JM101 de *E.coli*, la présence de la diméthylase.

Aucune bande n'est révélée dans la piste 2, correspondant au lysat de la culture de levure transformée par la matrice pFL40.

Les pistes 3, 4 et 5, correspondant respectivement à des taux de répression de moins en moins fort du promoteur du gène *ADH2*, révèlent des quantités croissantes de diméthylase.

Notons que les pistes 1, 4 et 5 présentent sous la bande de 30 kD des produits de dégradation de la diméthylase.

2.5.Conclusion.

L'électrophorèse en gel SDS polyacrylamide suivie d'une coloration au Bleu de Coomassie n'autorisant pas la mise en évidence de l'expression de la diméthylase de *E.coli* chez la levure, une expérience d' "immunoblot" plus spécifique et plus sensible a été envisagée.

Au terme de celle-ci on peut conclure que l'expression hétérologue visée est atteinte.

**5. CONCLUSIONS GENERALES ET
PERSPECTIVES.**

Chapitre 5: Conclusions générales et perspectives.

Sur l'extrémité 3' terminale de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique, deux adénines contiguës diméthylées sont présentes de manière quasi universellement conservée au sein d'une structure secondaire de type "hairpin", elle aussi conservée (fig 1.5 et 1.13).

Un rôle biologique important doit pouvoir être attribué au maintien à travers l'évolution d'une telle modification post-transcriptionnelle.

Chez les procaryotes, la mise en phase correcte du ribosome sur le messager, lors de l'étape de l'initiation de la traduction, requiert une interaction dite de "Shine-Dalgarno" entre une séquence consensus située à l'extrémité 5' de l'ARNm et une séquence complémentaire, jouxtant l' "hairpin" 3'-terminale de l'ARNr 16 S porteur de la double diméthylation.

Des études menées par l'équipe de P.H. van Knippenberg à Leiden, ont mis en évidence que les groupements diméthyles déstabilisent l' "hairpin" favorisant ainsi l'interaction de "Shine-Dalgarno".

La présence de cette diméthylation chez les eucaryotes, qui connaissent un mécanisme d'initiation de la traduction tout à fait différent, nous a amené à nous interroger sur le rôle fonctionnel qu'elle joue chez ceux-ci.

Afin d'éclaircir la problématique biologique posée, nous nous sommes proposés de suivre la voie offerte par la génétique actuelle, c'est-à-dire de comprendre le rôle fonctionnel de cette diméthylation en étudiant le phénotype d'un mutant de levure créé pour cette fonction.

La stratégie de création du mutant qui sera suivie, esquissée au chapitre 2, repose sur les trois conditions suivantes:

- (1) le gène *KsgA* de *E.coli* s'exprime chez la levure.
- (2) la "diméthylase *KsgA*" de *E.coli* est active sur le SSU-ARNr de levure (substrat hétérologue).
- (3) le gène *DIM* est essentiel à la survie de la levure.

Elle nécessite donc la construction d'une souche de levure transformée par un plasmide autorépliquatif exprimant le gène *KsgA* de *E.coli*.

Dans ce but, nous avons construit un vecteur de transformation approprié. Nous avons utilisé la matrice d'un plasmide "multicopy" de levure (pFL40), dans laquelle nous avons inséré le gène de la diméthylase de *E.coli* (*KsgA*) sous la dépendance d'un promoteur de levure (le promoteur du gène *ADH2*).

La démarche suivie a consisté en une succession d'étapes au cours desquelles nous avons d'abord isolé puis aménagé les divers fragments à assembler pour construire ce vecteur.

Dans un premier temps, nous avons reconstitué dans le vecteur pBluescript KS+ le promoteur du gène *ADH2*, lequel est fort et régulable par le glucose. Nous avons vérifié, par séquençage, l'intégrité de ce promoteur et la présence en aval de celui-ci d'un site *Nco* I se prêtant bien à sa fusion avec le gène *KsgA*.

Dans le gène *KsgA* nous avons créé par mutagénèse dirigée un site de restriction *Bsp* HI recouvrant l'ATG initiateur et compatible avec le site *Nco* I. Aucun codon du gène n'a été modifié par la création d'un tel site.

Enfin nous avons généré le vecteur pGIDL3 en assemblant, au sein de la matrice pFL40, le promoteur du gène *ADH2* et le gène *KsgA* grâce à une fusion transcriptionnelle *Nco* I / *Bsp* HI.

L'enzyme hétérologue a ensuite été recherchée dans des lysats cellulaires totaux de la souche de levure W303 transformée par le vecteur pGIDL3.

L'observation des gels SDS-PAGE colorés au Bleu de Coomassie de ces extraits de levures n'a pas permis de mettre en évidence de bande protéique correspondant à la diméthylase de *E.coli*.

Une détection immunologique, à l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin anti-diméthylase, a clairement mis en évidence l'apparition dans les seuls extraits de cellules transformées par le vecteur pGIDL3 d'une protéine de taille apparente correspondant à la diméthylase de *E.coli*.

On peut conclure que nous avons réussi à exprimer la diméthylase de *E.coli* dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* sous le contrôle du promoteur du gène *ADH2* ainsi qu'en témoigne la réponse modulée de cette expression par la concentration en glucose du milieu.

Remarquons à ce sujet que l'utilisation d'un promoteur régulable se justifiait par l'avantage qu'il offre de pouvoir éviter les inconvénients d'une expression hétérologue excessive, au cas où elle constituerait un fardeau intolérable pour la cellule-hôte. On a vu que même en conditions d'expression maximale (milieu contenant 3% de glycerol) ni la viabilité ni la croissance des transformants pGIDL3 ne semblaient affectées. Dès lors, il n'y a plus lieu dans la suite de ce projet de faire appel à cette capacité de régulation de l'expression du gène hétérologue.

Comme mentionné précédemment, une condition de base pour que la stratégie adoptée soit fructueuse, est que l'enzyme de *E.coli* produite chez la levure soit fonctionnelle, c'est-à-dire soit capable de compléter la fonction perdue suite à la mutation du gène homologue de levure. Elle doit donc être capable de diméthylater efficacement le substrat hétérologue que constitue le SSU-ARNr de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'activité de l'enzyme produite par la levure transgénique peut être évaluée à plusieurs niveaux. On peut tout d'abord tester son activité sur son substrat naturel, des petites sous-unités de *E.coli* préparées à partir de la souche mutée *KsgA*⁻, et donc non diméthylées en position 1518 et 1519.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant de tester son activité envers d'autres substrats. Dans ce but on utilisera les petites sous-unités ribosomiques de mitochondries de levure, celles-ci étant naturellement dépourvues de la diméthylation 3' terminale m⁶2Am⁶2A (Klootwijk *et al*, 1975). Il ne faut cependant pas perdre de vue que le SSU-ARNr mitochondrial manifeste quelques différences de structure primaire comme l'illustre la figure 1.17.

Alternativement nous pourrions aussi produire des sous-unités de cytoribosomes de levure (sous-unités 40 S) sous-méthylées extraites à partir d'une souche de levure S-adénosyl-méthionine dépendante (souche K1000, Locht et Delcour, 1985) après une période de croissance en privation de SAM.

Enfin, disposant d'un clone d'ARNr 17 S de levure (obtenu de Planta & Klootwijk) nous pourrions produire *in vitro* des transcrits non méthylés. Notons toutefois qu'étant donné que ceux-ci seraient dépourvus de toute protéine ribosomale, ils ne constitueraient probablement pas un substrat très efficace pour la diméthylase *KsgA*. En effet, chez la levure comme chez *E.coli*, la diméthylation 3' terminale est un événement tardif au cours de la maturation du ribosome, si bien que la présence d'un certain nombre de protéines ribosomales pourrait conditionner la reconnaissance du substrat par l'enzyme.

Signalons cependant que l'utilité de tous ces tests demeure relative car ils n'apporteraient pas la réponse à la question centrale posée, à savoir la fonctionnalité de l'enzyme en conditions hétérologues (milieu et substrat non identiques).

Le test crucial devrait donc être réalisé sur des sous-unités non diméthylées de levure. Bien entendu nous ne disposons pas de ces sous-unités puisque nous ne disposons pas du mutant de levure pour la fonction de diméthylation, l'obtention de celui-ci faisant précisément l'objet de notre projet. La réponse définitive à la question de savoir si l'enzyme de *E.coli* est fonctionnellement homologue à celle de *Saccharomyces cerevisiae*, ne sera donc apportée que lorsque l'on aura obtenu le mutant recherché.

5.CONCLUSIONS.

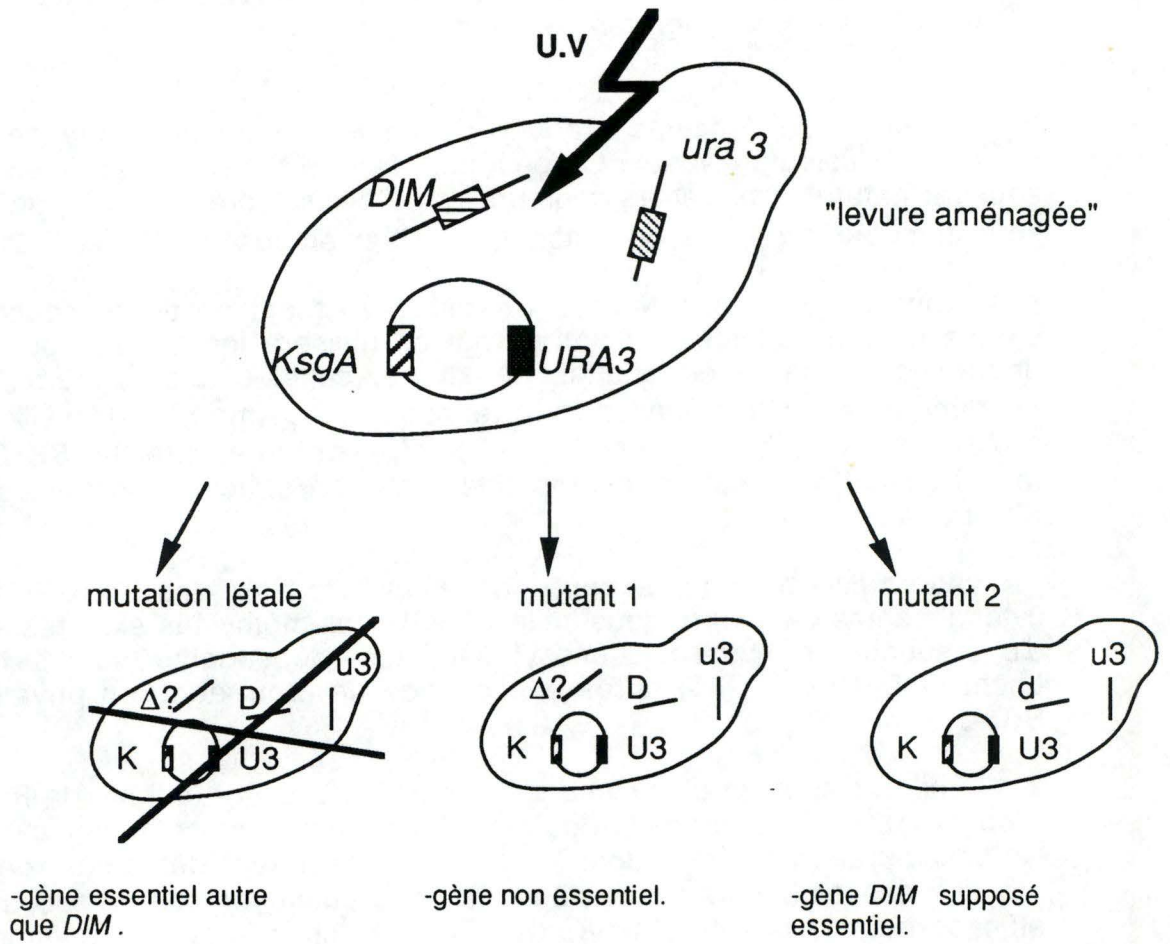


fig 5.1: Mutagénèse aléatoire aux U.V.

<i>D</i> = <i>DIM</i>	<i>U3</i> = <i>URA3</i>	<i>K</i> = <i>KsgA</i>
<i>d</i> = <i>dim</i>	<i>u3</i> = <i>ura3</i>	

L'expression du gène *KsgA* de *E.coli* ayant été obtenue chez la levure transgénique, la fonctionnalité de l'enzyme produite démontrée sur son substrat natif (sous-unités de *E.coli KsgA*⁻) et / ou sur des substrats alternatifs (sous-unités de mitochondries de levure, sous-unités 40 S de cytoplasme de levure sous-méthylées et ARNr 17 S non méthylés transcrits *in vitro*), il reste à créer le mutant de levure pour la diméthylase.

La première étape de la création de ce mutant consiste en une mutagenèse aléatoire aux U.V réalisée sur des cellules d'une souche de levure haploïde "aménagée" (fig 5.1). Celle-ci est forcément sauvage pour le gène *DIM* mais mutante pour le gène *ura3* (auxotrophe pour l'uracile) et transformée par un plasmide instable assurant l'expression du gène hétérologue *KsgA* et portant le marqueur de sélection *URA3*.

Trois types de mutants peuvent être générés dont deux seulement seront observables.

Soit la levure subit une mutation inactivant un gène essentiel autre que *DIM*. La mutation introduite étant létale, ce mutant ne sera pas observé.

Soit le gène touché est non essentiel et le mutant sera donc viable (mutant 1).

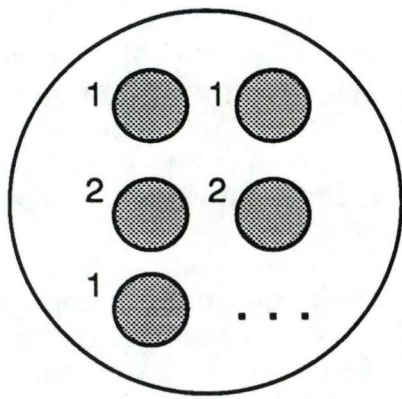
Enfin, dans un troisième cas c'est le gène *DIM*, supposé essentiel, qui est atteint (mutant 2). Bien que la mutation soit létale, le mutant demeure viable grâce à l'expression du gène hétérologue *KsgA* assurée par la présence du vecteur transformant. Ceci ne se vérifie que si la condition 2 est remplie c'est-à-dire si la diméthylase de *E.coli* après avoir été produite chez la levure est active sur un substrat hétérologue (fig 1.17), à savoir les deux adénines présentes à l'extrémité 3'-terminale du SSU-ARNr de la petite sous-unité ribosomique de levure.

La seconde étape consiste en une identification, parmi les survivants de la mutagenèse, des clones mutés dans *DIM* (fig 5.2).

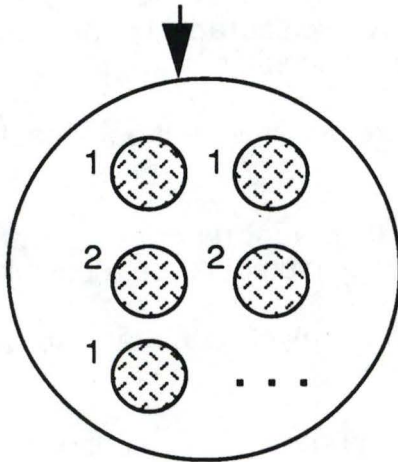
Sur milieu riche, contenant de l'uracile, la survie du mutant 1, ayant subi une altération en un gène non essentiel, ne dépend pas du maintien du plasmide qui pourra donc être "perdu", le marqueur *URA3* étant devenu inutile en présence d'uracile dans le milieu.

Le maintien du plasmide est en revanche indispensable à la survie du mutant 2 qui a subi une altération au locus *DIM*, supposé essentiel, le plasmide lui conférant, si la condition 2 est remplie, une diméthylase fonctionnelle.

La réalisation d'une empreinte de chaque colonie sur milieu riche additionné de 5FOA permet de distinguer les colonies issues des deux types de mutants. Le mécanisme biochimique de cette sélection est représenté à la figure 5.3.



colonies de survivants à la mutagénèse ayant poussé à 37°C sur milieu riche (contenant de l'uracile).



empreintes sur milieu riche additionné de 5FOA.

incubation à 37°C.

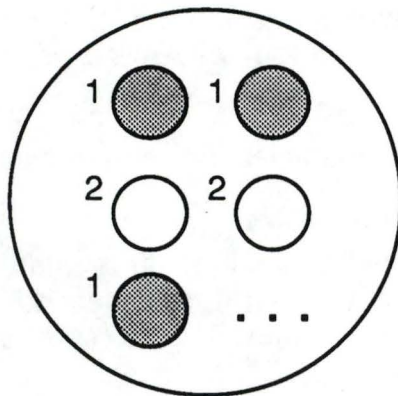





fig 5.2: Sélection des mutants au locus *DIM* (mutants 2).

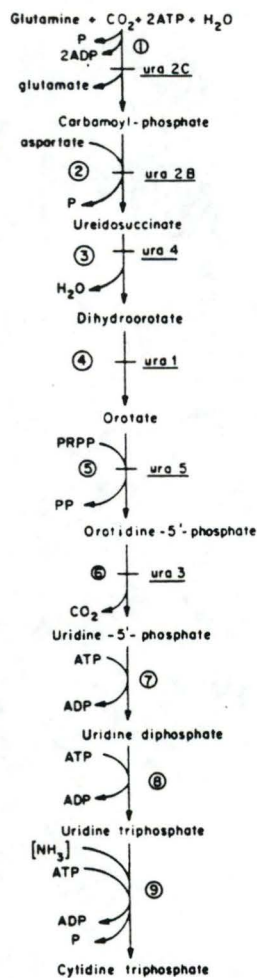
-  = croissance
-  = empreinte
-  = absence de croissance

1 = mutant 1
2 = mutant 2

fig 5.3: Voie de biosynthèse des pyrimidines (Jones *et al* , 1982).

Le gène *URA3* code pour l'orotidine 5'-P-décarboxylase (OMP-décarboxylase), celle-ci transforme l'orotidine-5'-P en uridine-5'-P.

Le 5FOA, ou acide 5-fluoro-orotique, est un analogue de pyrimidine qui est transformé en un intermédiaire toxique, le 5-fluoro-UMP, par le produit du gène *URA3* (Boeke *et al* , 1984).



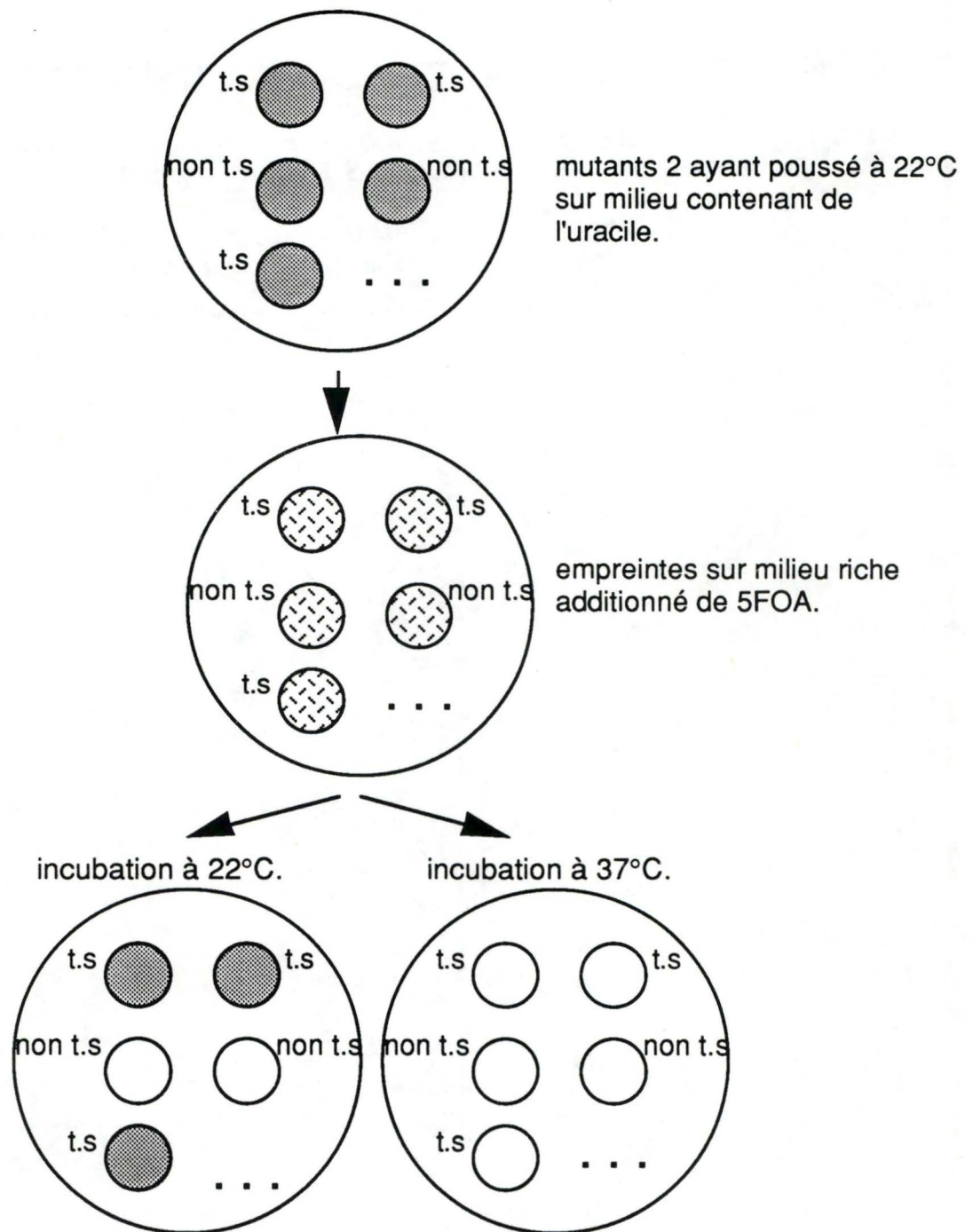





fig 5.4: Sélection de mutants *DIM* t.s.

-  = croissance
-  = empreinte
-  = absence de croissance

En effet, l'empreinte d'une colonie dérivée d'un mutant de type 1 sera positive (croissance) étant donné la résistance au 5FOA d'une fraction du clone ayant perdu le plasmide. Par contre, l'empreinte d'une colonie de type 2 sera négative (absence de croissance) le maintien du plasmide, et donc du marqueur *URA3*, étant nécessaire à la complémentation du gène *DIM* muté.

Les mutants 2 isolés, selon le protocole décrit à la figure 5.2, ne seront pas utiles, en tant que tels, à l'étude des effets de la mutation du gène *DIM*, puisqu'ils sont porteurs sur un plasmide réplicatif du gène hétérologue *KsgA* de *E.coli* suppléant cette mutation. La perte indispensable de ce plasmide est irréalisable puisque précisément le mutant 2 est obtenu et ne survit qu'à la condition stricte de son maintien.

Pour contourner ce dilemme, nous exploiterons l'existence de mutations conditionnelles. Une mutation conditionnelle, par exemple thermosensible (t.s), autorisera à température permissive, par exemple 22°C, la perte du "plasmide *KsgA*", donc la survie du mutant sur milieu 5FOA et par là même l'étude du phénotype du mutant au locus *DIM*.

Nous testerons d'abord si les mutants 2 créés ne seraient pas d'emblée t.s. A cet effet, une empreinte de chaque colonie de mutant 2 ayant poussé à 22°C sur milieu contenant de l'uracile est réalisée sur milieu riche additionné de 5FOA (fig 5.4). Après une incubation à température permissive, soit 22°C, seules les empreintes dérivant d'un mutant de type 2 thermosensible seront positives. Toutes les empreintes seront négatives à 37°C, température non permissive à laquelle aucun mutant 2 ne perd le "plasmide *KsgA*".

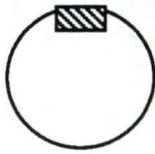
Bien que la probabilité d'obtention, par le protocole adopté, d'un mutant thermosensible soit très faible, cet examen s'impose car en cas de succès il fournirait un accès direct à l'étude du phénotype *DIM*, ce qui constitue l'intérêt de la question biologique à laquelle notre projet s'adresse. Le clonage du gène sauvage pourrait ensuite être réalisé en complétant la souche mutante t.s de levure à température non permissive en transformant celle-ci par une banque génomique sauvage. Le gène isolé sera séquencé et la séquence obtenue comparée à celles d'autres méthylases d'ARN.

Dans l'hypothèse vraisemblable où aucun mutant t.s n'est obtenu d'emblée par le protocole adopté, décrit à la figure 5.4, nous en créerons un en suivant une stratégie de "plasmid shuffling". Au cours de celle-ci, on remplacera, chez les mutants 2, le plasmide porteur du gène hétérologue *KsgA* de *E.coli* par un plasmide porteur du gène *DIM* sauvage et issu d'une banque de levure (Mann et al, 1987).

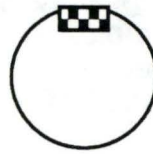
Seules les levures transformées par le gène *DIM* sauvage seront résistantes au 5FOA puisqu'elles toléreront la perte du "plasmide *KsgA*".

Les plasmides transformants seront extraits et le gène *DIM* caractérisé. Le gène isolé sera alors spécifiquement mutagénisé *in vitro* (bisulfite de sodium, Shortle et Botstein, 1983), de telle manière qu'une fois réintroduit dans la levure, il permette la sélection de souches mutantes thermosensibles.

(1) *DIM*



(2) X ?



) = plasmides de la banque génomique de levure sauvage.



E.coli *KsgA*⁻
= *ksg* Résist.



ksg Sens.



-clonage de *DIM*.
-mutagénèse *in vitro* et
sélection de mutants t.s de
levure.



ksg Résist.

fig 5.5: Complémentation chez *E.coli*.

(1) La transformation de la souche *KsgA*⁻, résistante à la kasugamycine, par un plasmide issu d'une banque génomique de levure sauvage et porteur du gène *DIM*, restaure la sensibilité à l'antibiotique (si les deux hypothèses initiales se vérifient).

(2) La transformation de la même souche par un plasmide de la banque porteur d'un fragment quelconque d'ADN, ne restaure pas le phénotype sauvage de sensibilité à la kasugamycine.

Rappelons que l'approche décrite repose sur trois conditions. L'expression de la diméthylase de *E.coli* obtenue chez la levure ne permettra toutefois de mener à bien notre travail que si les deux autres conditions se vérifient. A savoir que le gène chromosomique résident (*DIM*) de la levure est essentiel et que le gène *KsgA* de *E.coli* peut compléter *in vivo* la fonction perdue par le gène *DIM* muté. Dans le cas contraire, une seconde stratégie de création du mutant, par complémentation chez *E.coli* cette fois s'offre à nous. Cette dernière repose sur deux hypothèses:

Hypothèse 1: Le gène *DIM* s'exprime chez *E.coli* .

Hypothèse 2: La "méthylase *DIM* " de levure est active chez *E.coli* , c'est-à-dire qu'elle fonctionne *in vivo* sur le 16 S ARNr (substrat hétérologue).

La démarche est parallèle à celle de la première stratégie. Une fois le gène *DIM* cloné par complémentation, (fig 5.5), grâce à la restauration de la sensibilité à l'antibiotique kasugamycine d'une souche *KsgA*⁻ de *E.coli* , suite à sa transformation par une banque génomique de levure sauvage, celui-ci subira une mutagénèse *in vitro* afin de construire une banque de mutants de levures thermosensibles.

6. BIBLIOGRAPHIE.

Chapitre 6: Bibliographie.

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York.
- Alix J.H., Hayes D. (1983). Why Are Macromolecules Modified Post-Synthetically? *Biology of the Cell*. **47**, 139-158.
- Andrésson O.S. and Davies J.E. (1980 I). Isolation and Characterization of Lambda Transducing Phages for the *E.coli* Genes *Ksg A* and *pdx A*. *Molec.Gen. Genet.* **179**, 201-209.
- Andrésson O.S. and Davies J.E. (1980 II). Genetic Organization and Restriction Enzyme Cleavage Map of the *Ksg A-pdx A* of the *E.coli* Chromosome. *Molec.Gen. Genet.* **179**, 211-216.
- Andrésson O.S. and Davies J.E. (1980 III). Some Properties of the Ribosomal RNA Methyltransferase Encoded by *Ksg A* and the Polarity of *Ksg A* Transcription. *Molec.Gen. Genet.* **179**, 217-222.
- Ausubel F., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G (1987). in *Current protocols in molecular biology* (Greene Publishing Associates and Wiley interscience, New York, eds).
- Birboim H.C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl.Acids.Res.* **7**, 1513-1523.
- Boeke J.D., Lacroute F., Fink G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen.Genet.* **197**, 345-346.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Brand R.C., Klootwijk J., van Steenbergen J.M., Planta R.J. (1975). Secondary methylation of yeast ribosomal precursor RNA. *Eur. J.Biochem.* **311-318**.
- Brimacombe R., Stiege W. (1985). Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem.J.* **229**, 1-17.
- Bullock W.O., Fernandez J.M. and Short J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *rec A Escherichia coli* strain with β galactosidase section. *Biotechniques.* **5**, 376-379.
- Capieaux E., Vignais M-L., Sentenac A., Goffeau A. (1989). The Yeast H⁺-ATPase Gene Is Controlled by the Promoter Binding Factor TUF. *J. Biol.Chem.* **264**, 7437-7446.

Cassart J.P., Housen I., Vandenhautte J., Delcour J. (1990). Expression of the *E.coli* dimethylase fused to the ADHIII mitochondrial import signal in yeast. Arch. Int. de Physiol. et de Bioch. **99**, B4.

Cavener D.R., Ray S.C. (1991). Eukaryotic start and stop translation sites. Nucl. Acids. Res. **19**, 3185-3192.

Ciriacy M. (1976). Cis-dominant Regulatory Mutations Affecting the Formation of Glucose-repressible Alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. Gen. Genet. **145**, 327-333.

Curgy J.J. (1985). The Mitochondria. Biol. Cell. **54**, 1-38.

De Schrevel N. (1990). Production de la protéine ADH II de *Saccharomyces cerevisiae* dans la souche TG1 d'*Escherichia coli* par transformation de cette souche avec le vecteur d'expression pKK233-2. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en Sciences Biologiques (FUNDP).

de Duve C. (1987). Une visite guidée de la cellule vivante., De Boek Université, Bruxelles.

Dretzen G., Bellard M., Sassoue-Corsi P. and Chambon P. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem. **12**, 295-298.

Durand B. (1988). Séquençage de l'ADN. Biofutur, le technoscope supplément n°72.

Edward B., Maden H. (1990). Modified nucleotides in eucaryotic ribosomal RNA. in Nucleic Acid Methylation, UCLA Symposia on Molecular and Cellular biology New series, **128**, Alan R. Liss, Inc., New York, 37-44.

Gibson T.J. (1984). Studies on the Epstein-Barr virus genome. Ph.D. thesis, Cambridge University, England.

Goldfarb D., Michaud N. (1991). Pathways for the nuclear transport of proteins and RNAs. Trends in Cell Biology. **1**, 20-24.

Harlow E., Lane D. (1988). Antibody. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Helser T.L., Davies J.E. (1972). Mechanism of Kasugamycin Resistance in *Escherichia coli*. Nature New Biol. **235**, 6-9.

Helser T.L., Davies J.E. and Dahlberg J.E. (1971). Change in Methylation of 16S Ribosomal RNA Associated with Mutation to Kasugamycin Resistance in *Escherichia coli*. Nature New Biol. **233**, 12-14.

Heus H.A. (1987). The 3'-terminal colicin fragment of 16S ribosomal RNA: Biophysical and Biochemical studies. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Docteur en sciences (Université de Leiden).

Housen I. (1990). Expression dans la levure de la N⁶₂,N⁶₂ Diméthylase d'*E.coli* fusionné au signal d'importation mitochondrial d'ADHIII. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en Sciences Biologiques (FUNDP).

Ito H., Fukada Y., Murata K., Kimura A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bacteriol.* **158**, 163-168.

Jones E.W., Fink G.R. (1982). Regulation of Amino Acid and Nucleotide Biosynthesis in Yeast. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae : Metabolism and gene expression*, Cold Spring Harbor Laboratory, 181-299.

Klagsbrun M. (1973). An Evolutionary Study of the Methylation of Transfer and Ribosomal Ribonucleic Acid in Prokaryote and Eucaryote Organisms. *J.Biol.Chem.* **248**, 2612-2620.

Klootwijk J. and Planta R.J. (1973). Analysis of the Methylation Sites in Yeast Ribosomal RNA. *Eur.J.Biochem.* **39**, 325-333.

Klootwijk J., Klein I., Grivell L.A. (1975). Minimal post transcriptional modification of yeast mitochondrial ribosomal RNA. *J.Mol.Biol.* **97**, 337-350.

Kozak M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.* **12**, 857-872.

Kozak M. (1989). The scanning Model for Translation: An Update. *J.Cell Biol.* **108**, 229-241.

Lewin B. (1988). *Genes.*, Flammarion, France, 762 pp.

Linder P., Prat A. (1990). Baker's Yeast, the New Work Horse in Protein Synthesis Studies: Analyzing Eukaryotic Translation Initiation. *BioEssays*, **12**, 519-526.

Locht C., Delcour J. (1985). In vitro methylation of under methylated yeast poly(A)-rich RNA using mRNA (guanine-7-) methyl transferase purified from wheat germ or yeast. *Eur.J.Biochem.* **152**, 247-241.

Maniatis T., Sambrook J., Fritsh E.F. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual (second edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Mann C., Buhler J.M., Treich I. and Sentenac A. (1987). RPC40, a unique gene for a subunit shared between yeast RNA polymerase A and C. *Cell*, **48**, 627-637.

Messing J. (1983). New M13 Vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* **101**, 20-25.

Messing J. (1979). A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* **2**(2), 43.

Moazed D., Noller H.F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16 S ribosomal RNA. *Nature.* **327**, 389-394.

Noller H.F., Asire M., Barta A., Douthwaite S., Goldstein T., Gutell R.R., Moazed D., Normanly J., Prince J.B., Stern S., Triman K., Turner S., vanStolk B., Wheaton V., Weiser B., and Woese C.R. (1986). Studies on the Structure and Function of Ribosomal RNA. in *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes.* Harvesty B and Kramer G (eds), Springer Verlag, New York, N.Y., USA, 143-163.

Pain V.M. (1986). Initiation of protein synthesis in mammalian cells. *Biochem.J.* **235**, 625-637.

Pelletier J., Sonenberg N. (1988). Internal initiation of translation of eucaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* **334**, 320-325.

Poldermans B., Bakker H., van Knippenberg P.H. (1980 IV). Studies on the Function of Two Adjacent N⁶,N⁶-Diméthyladenosines Near the 3' End of 16S Ribosomal RNA of *Escherichia coli* : The effect of the methylgroups on ribosomal subunit interaction. *Nucl.Acids Res.* **8**, 143-151.

Poldermans B., Goosen N., van Knippenberg P.H. (1979 I). Studies on the Function of Two Adjacent N⁶,N⁶-Diméthyladenosines Near the 3' End of 16S Ribosomal RNA of *Escherichia coli* : The effect of kasugamycin on initiation of protein synthesis. *J. Biol.Chem.* **254**, 9085-9089.

Poldermans B., Roza L., van Knippenberg P.H. (1979 III). Studies on the Function of Two Adjacent N⁶,N⁶-Diméthyladenosines Near the 3' End of 16S Ribosomal RNA of *Escherichia coli* : Purification and properties of the methylating enzyme and methylase-30S interactions. *J. Biol.Chem.* **254**, 9094-9100.

Poldermans B., van Buul C.P.J.J., van Knippenberg P.H. (1979 II). Studies on the Function of Two Adjacent N⁶,N⁶-Diméthyladenosines Near the 3' End of 16S Ribosomal RNA of *Escherichia coli* : The effect of the absence of the methyl groups on initiation of protein biosynthesis. *J. Biol.Chem.* **254**, 9090-9093.

Pouwels P.H., Enger-Valk B.E., Bramman W.J (1985). Cloning vectors, A laboratory manual. Elsevier.

Raué H.A., Klootwijk J. and Musters W. (1988). Evolutionary conservation of stucture and function of molecular weight ribosomal RNA. *Prog.Biophys.molec.Biol.* **51**, 77-129.

Renauld G. (1990). Approche génétique du rôle fonctionnel de la méthylation de la coiffe de l'ARN messager chez *Saccharomyces cerevisiae*. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Docteur en sciences (FUNDP).

Rhoads R.H. (1988). Cap recognition and the entry of mRNA into the protein synthesis initiation cycle. *Tibs.* **13**, 52-56.

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

Sargan D.R., Gregory S.P., Butterworth P.H.W. (1982). A possible novel interaction between the 3'-end of 18S ribosomal RNA and the 5'-leader sequence of many eukaryotic messenger RNAs. *Febs.Letts.* **147**, 2, 133-136.

Shortle D., and Botstein D. (1983). Directed mutagenesis with sodium bisulfite. *Meth. Enzymol.***100**, 457-468.

Sparling P.F. (1968). Kasugamycin Resistance: 30S Ribosomal Mutation with an Unusual Location on the *Escherichia coli* Chromosome. *Science*, **167**, 56-58.

Sparling P.F., Ikeya Y., Elliot D. (1973). Two Genetic Loci for Resistance to Kasugamycin in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **113**, 2, 704-710.

Spirin A.S. (1986). Ribosome structure and protein Biosynthesis. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, 414 pp.

Taguchi A.K.W. and Young E.T. (1987). The identification and characterization of *ADR 6*, a Gene Required for Sporulation and for Expression of the Alcohol Dehydrogenase II Isozyme From *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **116**, 523-530.

Taylor J.W., Ott J. and Eckstein F. (1985). The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucl.Acids.Res.* **13**, 8765-8785.

Thammana P. (1974). Methylation of 16S RNA during ribosome assembly *in vitro*. *Nature.* **251**, 682-686.

van Buul C.P.J.J., Damm J.B.L., and van Knippenberg P.H. (1983). Kasugamycin Resistant Mutants of *Bacillus stearothermophilus* Lacking the Enzyme for Methylation of Two Adjacent Adenosines in 16 S Ribosomal RNA. *Molec.Gen.Genet.* **189**, 475-478.

van Buul C.P.J.J. and van Knippenberg P.H. (1985). Nucleotide sequence of the *ksgA* gene of *Escherichia coli* : comparison of methyltransferases affecting dimethylation of adenosine in ribosomal RNA. *Gene.* **38**, 65-72.

van Buul C.P.J.J., Visser W. and van Knippenberg P.H. (1984). Increased translational fidelity caused by the antibiotic kasugamycin and ribosomal ambiguity in mutants harbouring the *ksgA* gene. *FEBS Letts.* **177**, 1, 119-124.

van Charldorp R., Heus H.A, van Knippenberg P.H. (1981 a). Adenosine dimethylation of 16S ribosomal RNA: effect of the methylgroups on local conformational stability as deduced from electrophoretic mobility of RNA fragments in denaturing polyacrylamide gels. *Nucl. Acids Res.* **9**, 267-275.

van Charldorp R., van Knippenberg P.H. (1982). Sequence, modified nucleotides and secondary structures at the 3'-end of small ribosomal subunit RNA. *Nucl. Acids Res.* **10**, 4, 1149-1158.

van Gemen B. (1989). The *KsgA* methylase of *Escherichia coli* : Regulation of gene expression and similarities with *ERM* methylases. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Docteur en sciences (université de Leiden).

van Gemen B. and van Knippenberg P.H. (1990). On the evolutionary relationships between adenosine dimethylation in 16S and 23S ribosomal RNA.in *Nucleic Acid Methylation, UCLA Symposia on Molecular and Cellular biology New series*, **128**, Alan R. Liss, Inc., New York, 19-36.

van Gemen B., Koets H.J., Plooy C.A.M., Bodlaender J. and van Knippenberg P.H. (1987). Characterization of the *KsgA* gene of *Escherichia coli* determining kasugamycin sensitivity. *Biochimie*, **69**, 841-848.

van Knippenberg P.H. (1986). Structural and Functional Aspects of the N⁶,N⁶ Dimethyladenosines in 16S Ribosomal RNA.in *Structure, Function and Genetics of Ribosomes*. Harvesty B and Kramer G (eds), Springer Verlag, New York, N.Y., USA, 412-424.

van Knippenberg P.H., van Kimmenade J.M.A., Heus H.A. (1984). Phylogeny of the conserved 3' terminal structure of the RNA of small ribosomal subunits. *Nucl.Acids Res.* **12**, 6, 2595-2604.

Vincent C. (1986). Synthétiseurs et séquenceurs d'ADN. *Biofutur*, le technoscope supplément n°6.

Warner J.R. (1989). Synthesis of Ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae* . *Microbiological Reviews.* **53**, 256-271.

Zaret K.S., Sherman F. (1984). Mutationally Altered 3' Ends of Yeast *CYC 1* mRNA Affect Transcript Stability and Translational Efficiency. *J.Mol.Biol.* **176**, 107-135.

Abréviations.

5FOA	acide 5 fluoro-orotique
A	ampère
ADN	acide déoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
Br.Eth.	bromure d'éthidium
c.c	cellule compétente
conc	concentration
D.O	densité optique
d.s	double brin
DAB	3,3',4,4'-tetraaminobiphenyl
DNase	déoxyribonucléase
DTE	dithioérythritol
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylènediamine-tétraacétate
g	gramme
IPTG	isopropyl,β-D thiogalactopyranoside
kb	kilobase
l	litre
LSU-ARNr	ARN majeur de la grande sous-unité ribosomique
mA	milliampère
MCS	site multiple de clonage
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
M	molaire
nm	nanomètre
ORI	origine de réplication
OPC	oligonucleotide purification cartridge
PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide
p / v	poids / volume
pb	paire de base
PM	poids moléculaire
R.F.	forme réplivative
RNase	ribonucléase
rpm	tours par minute
S	svedberg
s.s	simple brin
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	seconde
SSU-ARNr	ARN majeur de la petite sous-unité ribosomique
t.s	thermosensible
Tris	tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
U.V	ultra-violet
V	volt
v / v	volume / volume
Xgal	5 bromo-4chloro-3indolyl-β-Dgalactopyranoside
μl	microlitre

Symboles.

DIM = allèle ou locus dominant.
dim = allèle ou locus récessif.