



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Expression dans la levure de la N6, N6-diméthylase d'*Escherichia coli* fusionnée au signal d'importation mitochondrial d'ADH III

HOUSEN, Isabelle

*Award date:*  
1990

*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.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur  
Tél. 081/72.41.11 - Télex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

## Expression dans la levure de la N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup> Diméthylase d'*Escherichia coli* fusionnée au signal d'importation mitochondrial d'ADH III

HOUSEN Isabelle

### Résumé

Dans le contexte de l'étude concernant le rôle fonctionnel de la conservation quasi-universelle de la diméthylation des deux adénines jumelles de l'épingle à cheveux 3'-terminale de l'ARN de la petite sous-unité ribosomique, la diméthylation *in vivo* du 15S-ARNr de mitoribosome devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle joué par cette modification.

D'abord, la séquence contenant les signaux de transcription et d'importation de la protéine d'ADH III de levure a été clonée en amont du gène de la diméthylase d'*E. coli*. De manière à instaurer une phase unique de lecture, la jonction entre les deux séquences a été aménagée par mutagenèse dirigée. La séquence de la protéine de fusion a ensuite été clonée dans deux vecteurs de levure.

Ensuite, la pré-diméthylase d'*E. coli* a pu être détectée dans le cytoplasme des levures transformées.

La question de l'importation de cette enzyme dans la matrice mitochondriale reste posée bien que des études structurales complémentaires réalisées laissent présager d'une diméthylation du 15S-ARNr mitochondrial.

Mémoire de licence en Sciences biologiques  
Septembre 1990

Promoteurs : J. Vandenhoute et J. Delcour

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier Monsieur Vandenhautte et Monsieur Delcour de m'avoir accueillie dans leur laboratoire et suivie au cours de ce travail.

Je remercie tout particulièrement Jean-Pol pour sa disponibilité, son assistance efficace et son sens de l'humour.

Merci aussi à Olivier (pour sa radio!), Anne, Geneviève, Deborah, Jean-Marc, Pascal, Rose-Marie et Monique pour leurs conseils et leur bonne humeur.

Toute ma reconnaissance à Madame C. Bille-Michiels, à Messieurs R. Wattiaux et J-J. Letesson qui ont accepté de lire ce mémoire.

Merci à mes parents, Vincent, Sophie, mes amis, Jean-François, Nathalie, Patricia, Alain et Xavier qui ont vécu avec moi cette année, qui m'ont supportée et encouragée.

A tous, Merci.

*Isabelle*

## ABBREVIATIONS.

ADH :	Alcool déshydrogénase.
ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ARN :	Acide ribonucléique.
ARNm	ARN messenger.
ARNr	ARN ribosomique.
ARNt	ARN de transfert.
Br. Eth. :	Bromure d'éthidium.
DO	Densité optique.
EDTA.	Ethylènediamine-tétraacétate.
g	Gramme.
IPTG	Isopropyl, $\beta$ -D thiogalactopyranoside.
Kb	Kilobase.
l	Litre.
LLU-ARNr	ARN majeur de la grande sous-unité ribosomique.
mg	Milligramme.
ml	Millilitre.
$\mu$ l	Microlitre.
mM	Millimolaire.
M	Molaire.
nm :	Nanomètre.
PAGE	Gel polyacrylamide.
PM	Poids moléculaire.
SDS	Sodium dodecyl sulfate.
SMC	Site multiple de clonage.
SSU-ARNr	ARN majeur de la petite sous-unité ribosomique.
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-animométhane.
V	Volt.
UV	Ultraviolet.

## INTRODUCTION.

I.PANORAMIQUE DE L INTRODUCTION.	p 1
II.CONSERVATION DE LA FONCTION ET DE LA STRUCTURE GENERALE DU RIBOSOME.	p.2
II.1.La traduction: un processus universel.	p.2
II.2.Structure générale du ribosome.	p.3
II.2.1.Configuration et constituants du ribosome.	p.3
II.2.2.Structure moléculaire des ARNr majeurs.	p.4
II.2.2.1.Détermination de la structure primaire et secondaire des ARNr majeurs.	p.4
II.2.2.2.Conservation évolutive des structures secondaires des ARNr.	p.4
II.2.3.La méthylation: une modification importante de l'ARNr.	p.5
II.2.3.1.Caractéristiques et rôles de la méthylation des ARNr	p.5
II.2.3.2.Conservation évolutive des deux adénines diméthylées du SSU-ARNr	p.6
III.ROLE DE LA SEQUENCE m <sup>6</sup> Am <sup>6</sup> A DANS LA SYNTHÈSE PROTEIQUE ET AU NIVEAU DES MECANISMES DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION.	p.7
III.1.L'initiation de la traduction.	p.7
III.1.1.Acteurs et mécanismes de l'initiation chez les procaryotes et chez les eucaryotes.	p.7
III.1.2.Acteurs et mécanismes de l'initiation chez les mitochondries	p.8
III.2.Rôle de cette diméthylation chez E. coli .	p.9
III.2.1.Effets de la kasugamycine.	p.9
III.2.2.Différences observées entre E.coli sauvage et E.coli mutant.	p.9
III.3.Hypothèse sur le rôle de la séquence m <sup>6</sup> Am <sup>6</sup> A chez d'autres organismes qu' E. coli .	p.10
IV.MECANISME DE L'IMPORTATION DE PROTEINES DANS LA MITOCHONDRIE.	p.10
IV.1.Origine mixte des protéines des compartiments mitochondriaux.	p.10
IV.2.Exemples d'études sur l'importation de protéines dans la mitochondrie.	p.11
IV.3.Modèle général du processus d'importation.	p.12
V.BUT DU TRAVAIL.	p.13

## MATERIEL ET METHODES.

I. MATERIEL	p.14
I.1. Solutions et tampons.	p.14
I.1.1. Tampons.	p.14
I.1.2. Solutions.	p.17
I.2. Les différents souches, plasmides et phages utilisés.	p.20
I.2.1. Souches bactériennes.	p.20
I.2.2. Souches de levure.	p.21
I.2.3. Plasmides.	p.21
I.2.4. Phage M13.	p.23
I.2.5. Stockage.	p.23
I.3. Milieux de culture	p.23
I.3.1. Milieux de culture bactériens.	p.23
I.3.1.1. Milieux riches.	p.23
a.LB liquide	p.23
b.LB solide	p.24
I.3.1.2. Milieu minimum	p.24
I.3.1.3. Screening	p.24
I.3.2. Milieux de culture pour levures.	p.25
I.3.2.1. Milieu riche	p.25
a.YPD liquide	p.25
b.YPD solide :	p.25
I.3.2.2. Milieu minimum	p.25
I.3.2.3. Milieu synthétique	p.25
I.3.3. Milieux de transformation de bactérien par des phages.	p.25
a.H top	p.25
b.H plate	p.25
II. METHODES	p.26
II.1. Clonage d'un gène dans un plasmide ou dans un phage.	p.26
II.1.1. Réaction de restriction.	p.26
II.1.2. Enzymes utilisées.	p.26
II.1.3. Visualisation des résultats de la restriction sur gel d'agarose.	p.26
II.1.3.1. Principe.	p.26
II.1.3.2. En pratique.	p.27
II.1.3.3. Estimation de la taille des fragments sur gel.	p.27
II.1.4. Purification des fragments d'ADN.	p.28
II.1.5. Réaction de ligation.	p.28

II.1.6. La transformation.	p.28
II.1.6.1 Bactéries	p.28
a. Préparation de bactéries compétentes	p.29
b. Transformation par un plasmide:	p.30
c. Transformation par le phage M13.	p.30
II.1.6.2. Levures	p.31
a. Préparation de levures compétentes:	p.31
b. La transformation proprement dite.	p.31
II.1.7. Extraction rapide de plasmides ou de phages chez E. Coli	p.31
II.1.7.1. Mini préparation d'ADN plasmidique.	p.32
II.1.7.2. Midi préparation d'ADN plasmidique.	p.32
II.1.8. Extraction rapide de plasmides à partir de levure.	p.33
II.2 Mutagenèse dirigée.	p.34
II.2.1 Le principe.	p.34
II.2.2 Maxi preparation de phage M13 double brin.	p.34
II.2.3. Préparation de M13 simple brin.	p.36
II.2.3.1. Mini-préparation.	p.36
II.2.3.2. Maxi-préparation de M13 simple brin.	p.37
II.2.4. Synthèse de l'oligonucléotide mutant.	p.39
II.2.4.1. Le principe.	p.39
II.2.4.2. En pratique.	p.39
II.2.4.3. Récupération de l'oligonucléotide après synthèse	p.39
II.2.5. Réaction de mutagenèse.	p.40
II.2.5.1. Phosphorylation 5' de l'oligonucléotide	p.40
II.2.5.2. Mutagenèse proprement dite	p.40
a. Lien de l'oligonucléotide mutant à la matrice d'ADN simple brin.	p.40
b. Synthèse et ligation du brin mutant.	p.41
c. Elimination du simple brin non mutant par filtration.	p.41
d. Coupure par Nci I du brin d'ADN non mutant.	p.42
e. Digestion du brin non mutant par l'exonucléase III.	p.42
f. Repolymérisation et ligation d'ADN coupé.	p.42
g. Transformation.	p.42
II.2.6. Le séquençage.	p.42
II.2.6.1. Le principe	p.42
II.2.6.2 La réaction de séquençage.	p.43

a.L'hybridation de l'amorce synthétique d'ADN.	p.43
b.Réaction de marquage	p.43
c.Réactions de terminaisons.	p.44
II.2.6.3. Analyse des produits de la réaction de séquençage sur gel PAGE.	p.44
a.La migration.	p.44
II.3 Préparation des mitoribosomes.	p.45
II.3.1. Préparation des mitochondries.(10)	p.45
II.3.2. Lyse des mitochondries au désoxycholate de Na (DOC).	p.46
II.3.3. Préparation des mitoribosomes. (28)	p.46
II.3.4. Préparation de l'ARNr .	p.46
II.3.5. Etude de la composition en nucléotides de l'ARNr par HPLC.	p.47
II.3.5.1. Hydrolyse de l'ARNr.	p.47
II.3.5.2. Injection dans l'HPLC.	p.47
a.Description de l'appareil.	p.47
b.En pratique.	p.48
II.4. Analyse de protéines	p.48
II.4.1. Electrophorese en gel SDS polyacrylamide.	p.48
II.4.1.1 Le principe	p.48
II.4.1.2. La migration.	p.48
II.4.1.3. Coloration au bleu de Coomassie.	p.48
II.4.1.4. Immunoblot.	p.49
a.Le blotting	p.49
b.Réaction avec les anticorps.	p.49

## RESULTATS

I.CONSTRUCTIONS GENETIQUES	p.51
I.1.Introduction	p.51
I.2.Construction du pIH1: clonage du peptide de transit ADH3 dans le pUC8ksgA7.	p.51
I.2.1.Préparation de la séquence du peptide de transit.	p.51
I.2.2.Préparation du vecteur de clonage à partir du pUC 8 ksgA7.	p.52
I.2.3.Ligation vecteur - insert.	p.52
I.2.4.Transformation de la souche XL1 blue par le mélange de ligation	p.53.
I.2.5.criblage de plusieurs clones de transformants pour purifier le pIH1.	p.53
I.2.6.Conclusion.	p.53
I.3.Construction du pIH2 et du pIH2Δ: aménagement de la jonction "peptide de transit d'ADHIII-diméthylase"	p.54

1.3.1.Examen de la séquence du gène de la protéine de fusion "peptide de transit ADHIII-diméthylase"	p.54
1.3.2.Mise en phase de la protéine de fusion par mutagenèse	p.54
1.3.2.1.La stratégie.	
1.3.2.2.Clonage dans M13.	p.55
a) Préparation de l'insert.	p.55
b) Préparation du vecteur de clonage M13mp19.	p.55
c) Ligation vecteur - insert.	p.55
d) Transformation de la souche TG1 par le M13mp19.	p.55
e) criblage des transformants	p.56
1.3.3.Réaction de mutagenèse.	p.56
1.3.3.1.Préparation de l'oligonucléotide mutagénéisant	p.56
1.3.3.2.Production et identification du mutant	p.57
1.4.Construction du pIH3: préparation d'un plasmide intermédiaire contenant la séquence non mutée de la protéine de fusion.	p.57
1.4.1.Rappel.	p.57
1.4.2.Stratégie.	p.58
1.4.3.Clonage de la séquence de la protéine de fusion dans le vecteur pGEMblue.	p.58
1.4.3.1.Préparation de l'insert.	p.58
1.4.3.2.Préparation du vecteur de clonage pGEM blue.	p.58
1.4.3.3.Ligation vecteur-insert.	p.59
1.4.3.4.Transformation de la souche XL1 blue par le pIH3.	p.59
1.4.3.5.Criblage de plusieurs clones de transformant pour purifier le pIH3.	p.59
1.5.Construction du pIH4: substitution du fragment XbaI - PvuII de 0,220 kb du pIH3 par le fragment homologue contenant la mutation.	p.60
1.5.1.Rappel	p.60
1.5.2.Préparation du fragment de 212 pdb, muté, au départ du pIH2Δ.	p.60
1.5.3.Préparation du pIH3.	p.60
1.5.4.Ligation vecteur insert.	p.61
1.5.5.Transformation de souche XL1 blue par le mélange de ligation	p.61
1.5.6.criblage des transformants pour identifier le pIH4.	p.61

1.6.Construction des pIH5 et pIH6: clonage de la séquence de la protéine de fusion dans deux vecteurs de levure: pRS 315 ET YEp 351	p.62
1.6.1.Introduction	p.62
1.6.2.Préparation de l'insert	p.62
1.6.3.Préparation des vecteurs	p.62
1.6.4.Ligation	p.63
1.6.5.Transformation de la souche XL1 blue par le pIH5 et pIH6.	p.63
1.6.6.criblage de transformants.	p.63
1.7.Vérification des constructions génétiques: mise en évidence de l'activité de la protéine de fusion par restauration de la sensibilité à la kasugamycine chez la souche E.coli ksgA- transformée par le pIH5 et par le pIH6.	p.64
1.8.Conclusion	p.65

## II TRANSFORMATION DE LEVURE ET ETUDE DE L'IMPORTATION DE LA DIMETHYLASE DANS LA MITOCHONDRIES DES LEVURES TRANSFORMEES. P.66

II.1.Transformation de la souche GRF 18 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> par le pIH5 et par le pIH6.	p.66
II.1.1Stratégie générale	p.66
II.1.2.transformation de la souche GRF 18 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	p.66
II.1.3.Identification des transformants	p.66
II.2.Expression et importation intramitochondriale.	p.67
II.2.1Mise en culture des transformants et préparation des mitoribosomes	p.67
II.2.2.Mise en évidence de la protéine de fusion sur gel SDS polyacrylamide coloré au bleude coomasie.p.68	
II.2.3.Vérification par "immunoblot" de la nature de la protéine observée sur gel SDS-polyacrylamide. p.68	
II.3..Recherche d'une activité de la diméthylase dans la mitochondrie par détection du nucléoside m6Am6A par HPLC	p.69

CONCLUSIONS, DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p.71
--	------

## BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION.

## I. PANORAMIQUE DE L'INTRODUCTION.

Lors de la traduction c'est-à-dire du passage de l'information génétique codée sous la forme d'une séquence nucléotidique en protéine, le ribosome détient le rôle central de traducteur universel.

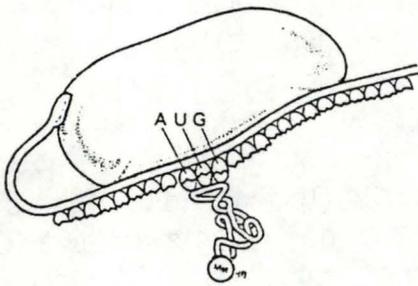
Il se caractérise par une grande conservation de sa configuration générale, de sa composition, de sa structure moléculaire et de son fonctionnement général.

Cependant des mécanismes spécifiques, en particulier ceux de l'étape d'initiation de la traduction, diffèrent chez les procaryotes et les eucaryotes. La mise en phase du ribosome sur l'ARN messager (ARNm) des procaryotes est assurée entre autres par une interaction dite de Shine-Dalgarno entre l'ARN m et une séquence consensus 3'-terminale de l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (SSU-ARNr). (16). Par contre, chez les eucaryotes, elle s'effectue selon un mécanisme d'enfilage du ribosome sur l'ARNm et sa migration jusqu'au premier codon initiateur AUG décrit par le modèle de Kozak. (17,22).

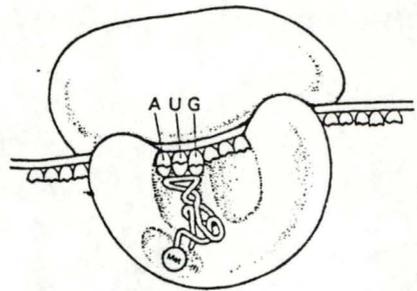
La question se pose dès lors d'identifier les caractéristiques de la structure ribosomique qui sont responsables de ces différences fonctionnelles. A priori elles peuvent être recherchées parmi les divers partenaires interagissant lors de l'étape d'initiation de la traduction à savoir: l'extrémité 5' de l'ARNm, la petite sous-unité ribosomique, l'ARN de transfert (ARNt) initiateur, les facteurs et protéines ancillaires.

Des recherches au laboratoire s'intéressent, d'une part, au rôle de la coiffe méthylée 5'-terminale présente uniquement sur l'ARNm eucaryotique, d'autre part, à une modification touchant la région 3'-terminale des SSU-ARNr: la diméthylation des 2 adénines contiguës de l'épingle à cheveux 3'-terminale. Cette dernière interviendrait dans le processus d'initiation de la traduction chez *Escherichia coli* en facilitant l'interaction dite de Shine-Dalgarno. Chez les eucaryotes le rôle de cette modification reste ignoré. Pour l'éclaircir une approche consisterait à cloner le gène de la diméthylase de levure, eucaryote se prêtant facilement aux manipulations génétiques, à créer des mutants pour ce gène et à étudier les altérations fonctionnelles qu'ils manifestent. Une approche alternative serait d'étudier in vivo l'effet de la diméthylation de l'ARNr d'une petite sous-unité ribosomique naturellement dépourvue de cette modification. C'est dans cette deuxième voie que s'inscrit ce travail.

Les ribosomes de mitochondries (mitoribosomes) de levure ne possèdent pas de diméthylation au niveau de l'épingle à cheveux 3'-terminale de leur 15S-ARNr. La grande ressemblance avec l'épingle à cheveux 3'-terminale du 16S-ARNr d'*E. coli* et la facilité de transformation



A.1.



A.2.

figure 1. Representation schématique des mécanismes de la traduction. (10).

A: étape d'initiation.

A.1: fixation de la petite sous-unité ribosomique sur l'ARNm.

A.2: fixation de la grande sous-unité ribosomique.

des levures nous permet d'envisager d'y introduire le gène de la diméthylase d'*E. coli* aménagé de telle sorte que la protéine produite soit adressée au compartiment mitochondrial. Cette approche implique de connaître les bases des mécanismes d'importation des protéines dans la mitochondrie et de s'intéresser aux mécanismes d'initiation de la traduction puisque l'on soupçonne que la diméthylation des 2 adénines agirait lors de cette étape.

## **II. CONSERVATION DE LA FONCTION ET DE LA STRUCTURE GÉNÉRALE DU RIBOSOME.**

### **II.1. La traduction: un processus universel.**

Le passage de l'information génétique, contenue sous la forme d'une séquence nucléotidique d'ADN, en protéine se déroule en deux étapes.

Dans un premier temps, la molécule d'ADN est transcrite en une molécule d'ARN simple brin, l'ARNm, par l'ARN polymérase.

Dans un deuxième temps, la séquence nucléotidique de l'ARNm est traduite en une séquence d'acides aminés formant la protéine. Différents partenaires interviennent à cette étape:

- le ribosome ou centre de contrôle de la synthèse protéique.
- l'ARNm ou intermédiaire dont la séquence spécifique détermine la séquence en acides aminés.
- les aminoacyl-ARNt ou molécules adaptatrices porteuses d'un anticodon complémentaire d'un codon de l'ARNm et, à leur extrémité 3', de l'acide aminé correspondant.
- le GTP ou source énergétique.
- différents facteurs solubles répartis en 3 classes: les facteurs d'initiation, les facteurs d'élongation et les facteurs de terminaison.

D'une manière générale, la traduction se divise en 3 étapes qui sont l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Pendant l'étape d'initiation, la petite sous-unité ribosomique se fixe sur l'ARNm et met en évidence le codon initiateur (AUG ou GUG) reconnu par l'aminoacyl ARNt initiateur. (figure 1A.1.). Cette étape nécessite l'intervention de différents facteurs. La grande sous-unité ribosomique se fixe ensuite à la petite. (figure 1.A.2.).

L'étape d'élongation commence lorsque l'un des 20 aminoacyl-ARNt sélectionné en fonction de la séquence nucléotidique codante s'insère au site A (figure 1.B.1.). La transpeptidation, c'est-à-dire le transfert de la chaîne peptidique naissante attachée à l'ARNt du site P sur l'acide aminé attaché à l'ARNt du site A, peut alors se réaliser. (figure 1.B.2.). Cette

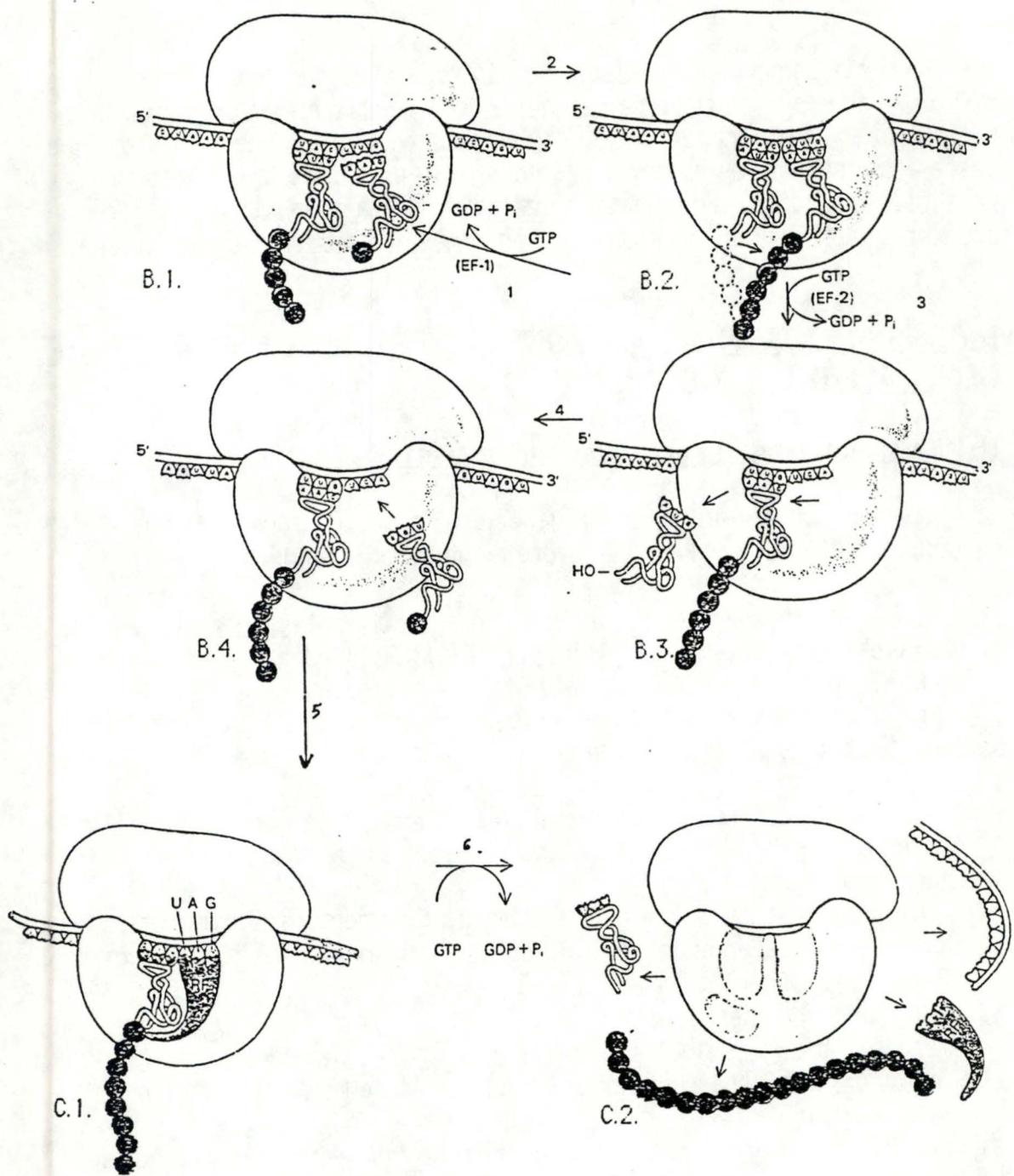


figure 1. (suite)

B: étape d'élongation.

B.1: fixation d'un aminoacylARNt au site A.

B.2: transpeptidisation.

B.3: translocation du ribosome sur l'ARNm.

B.4: exposition d'un nouveau codon au site A.

C: étape de terminaison.

C.1: reconnaissance du dernier codon par un facteur de relargage.

C.2: libération du polypeptide, du facteur de relargage, de l'ARNt déacylé et de l'ARNm.

réaction est catalysée par la peptidyl transférase. L'énergie nécessaire au relâchement de l'ARNt déacétylé et à la translocation du ribosome d'un codon au suivant est fournie par l'hydrolyse du GTP. (figure 1.B.3.). Un nouveau codon est ainsi exposé au site A (figure 1.B.4.) et le peptidyl ARNt se retrouve au site P. Le ribosome progresse ainsi jusqu' au dernier codon situé en 3' ou codon stop.

Celui-ci est reconnu par un facteur de relargage et non par un aminoacyl-ARNt. (figure 1.C.1.). L'hydrolyse d'une nouvelle molécule de GTP permet au ribosome de relâcher le polypeptide et l'ARNt déacétylé puis de se dissocier de l'ARNm. (figure 1.C.2.). C'est l' étape de terminaison.

Dans toutes les cellules vivantes, le ribosome aura donc le rôle de décoder la séquence nucléotidique de l'ARN messenger. Il peut donc être défini comme TRADUCTEUR UNIVERSEL. Une telle conservation de fonction laisse supposer qu'il possède une structure également conservée.

## **II.2. Structure générale du ribosome.**

### **II.2.1. Configuration et constituants du ribosome.**

En microscopie électronique, les ribosomes apparaissent comme des particules sub-sphériques et compactes constituées de deux sous-unités différentes. (figure 2). (29).

Selon leur origine, ils sont répartis en 5 classes (table I) où la taille et le nombre des constituants peut varier. La classe des mitoribosomes étant particulièrement hétérogène. (27).

Cependant chaque sous-unité ribosomique a une architecture de base. Elles sont constituées d'un ARN de haut poids moléculaire (ARN majeur) associé à un grand nombre de protéines (r protéines). Pour la petite sous-unité, ce nombre varie de 21 chez *E. coli* à 45 chez les mitochondries d'animaux et, pour la grande sous-unité, de 34 chez *E. coli* à 50 chez les ribosomes cytoplasmiques d'eucaryotes.

En plus de son ARN majeur, la grande sous-unité possède 1 ou 2 ARN de faible poids moléculaire (ARN mineur). L'un d'entre eux, le 5S-ARNr, est présent chez tous les ribosomes excepté ceux de mitochondries d'animaux, de champignons et de protozoaires. L'autre est soit le 5,8S-ARNr présent chez tous les ribosomes eucaryotiques, soit le 4,5 S-ARNr de la plupart des ribosomes chloroplastiques. (figure3). (6,29).

En résumé, une conservation remarquable de la configuration générale et des constituants ribosomiques s'observe chez tous les êtres vivants étudiés. Comme nous le décrivons dans les paragraphes suivants,

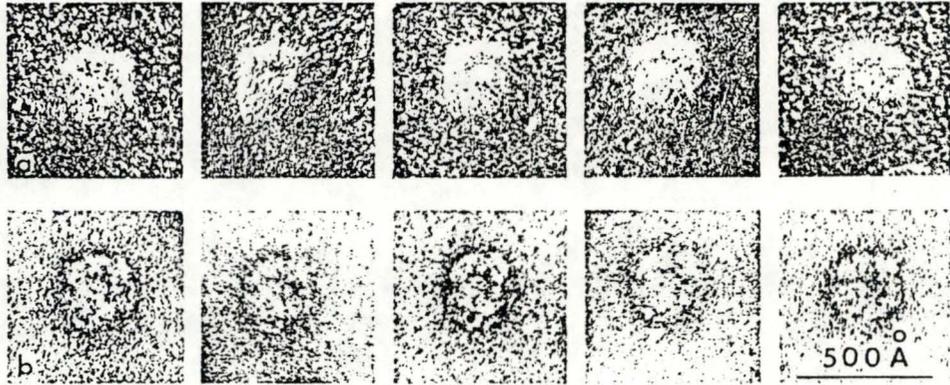


figure 2. Aspect du ribosome 70S d' *E. coli* en microscopie électronique. (31).

A: le contraste est obtenu par une vaporisation de métal sous vide et sous un angle de 75°.  
 B: microscopie du ribosome en coloration négative.

- Les ribosomes 70S d'eubactéries.
- Les ribosomes cytoplasmiques d'eucaryotes.
- Les ribosomes d'archaebactéries.
- Les ribosomes chloroplastiques.
- Les ribosomes mitochondriaux.

Table I. Les différentes classes de ribosomes.

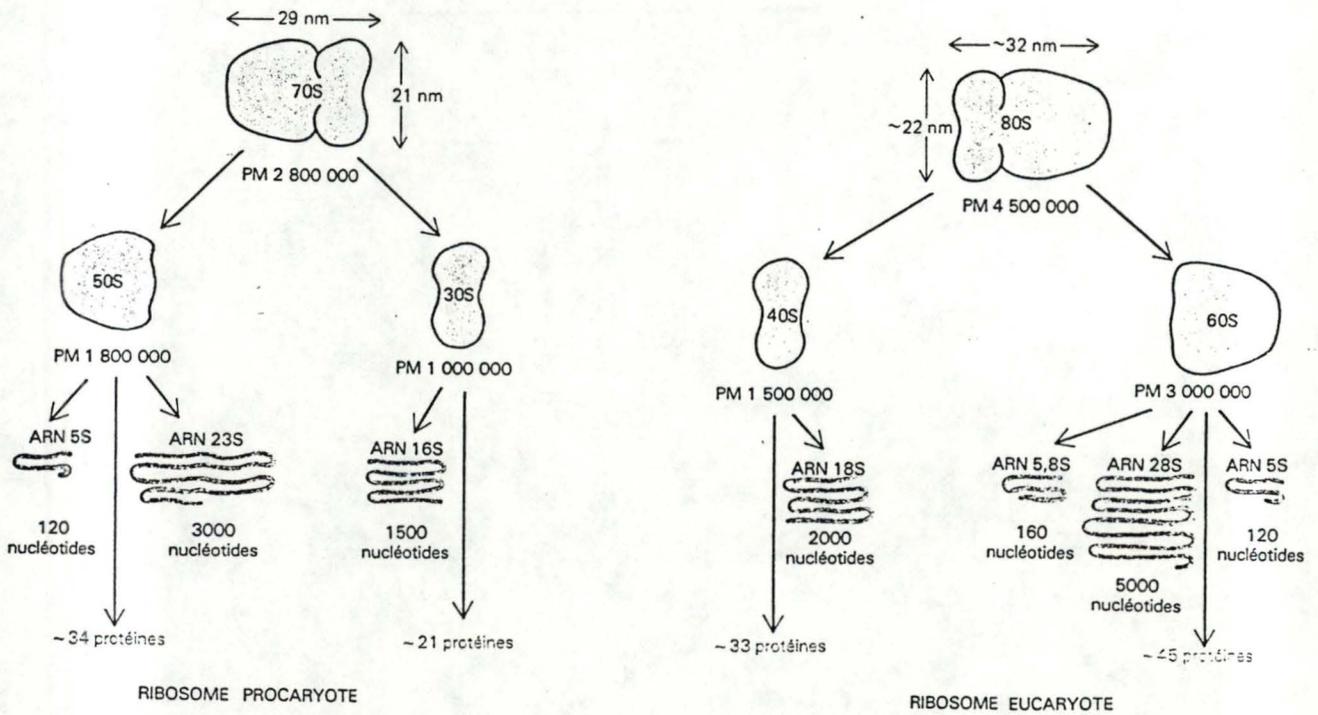


figure 3. Structure et constituants des ribosomes procaryotiques et eucaryotiques. (1).

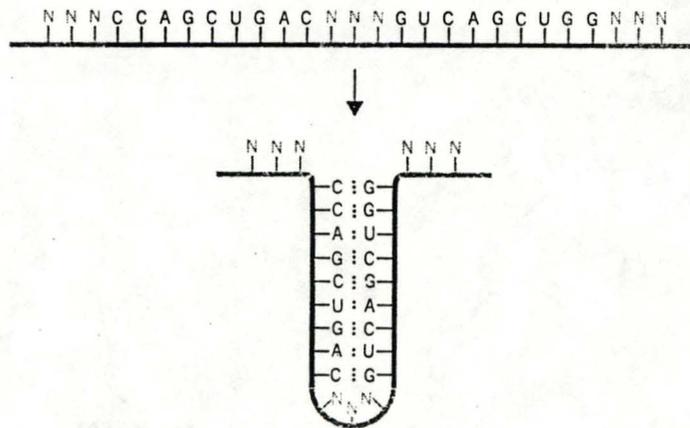


figure 4. Représentation de la structure secondaire en hélice, appelée épingle à cheveux, due à l'appariement de deux séquences complémentaires plus ou moins proches. ( 19).

cette conservation structurale se marque davantage encore au niveau des structures secondaires des ARNr majeurs.

## II.2.2. Structure moléculaire des ARNr majeurs.

### II.2.2.1. Détermination de la structure primaire et secondaire des ARNr majeurs.

Ces dernières années, la séquence nucléotidique, c'est-à-dire la structure primaire, d'ARNr d'espèces différentes a été obtenue, soit par séquençage direct des ARNr, soit à partir de la séquence connue de l'ADNr correspondant.

L'étude de ces séquences a mis en évidence des régions très conservées et d'autres qui le sont moins. Des séquences complémentaires plus ou moins distantes, susceptibles de se replier et de former des hélices bicaténaires ou épingle à cheveux, (figure 4), ont été identifiées. Leur présence a été confirmée ou rejetée par une approche phylogénétique dont le principe est de comparer deux séquences similaires. Si elles forment une épingle à cheveux, une mutation au niveau d'une base doit s'accompagner d'une mutation compensatoire au niveau de la base complémentaire. (6,27,29)

Les structures de l'ensemble de toutes les épingles à cheveux d'un ARNr donné ont ainsi été déterminées. Celles-ci, reliées par de courtes séquences monocaténaires, forment la structure secondaire de l'ARNr qui se caractérise par une importante conservation évolutive dans le monde vivant.

### II.2.2.2. Conservation évolutive des structures secondaires des ARNr.

Utilisant les ARNr d'*E. coli* comme modèle de comparaison, une remarquable conservation de la structure secondaire des ARNr au cours de l'évolution a été mise en évidence. Tous possèdent un nombre constant de subdivisions appelées domaines.

On en dénombre : - 4 pour les SSU-ARNr  
                  : - 6 pour les LSU-ARNr

L'ARNr de la petite sous-unité ribosomique, dont les structures ont été les plus étudiées, nous intéressera plus spécialement dans la suite de ce travail.

Les études, réalisées à partir de SSU-ARNr d'origine différente,

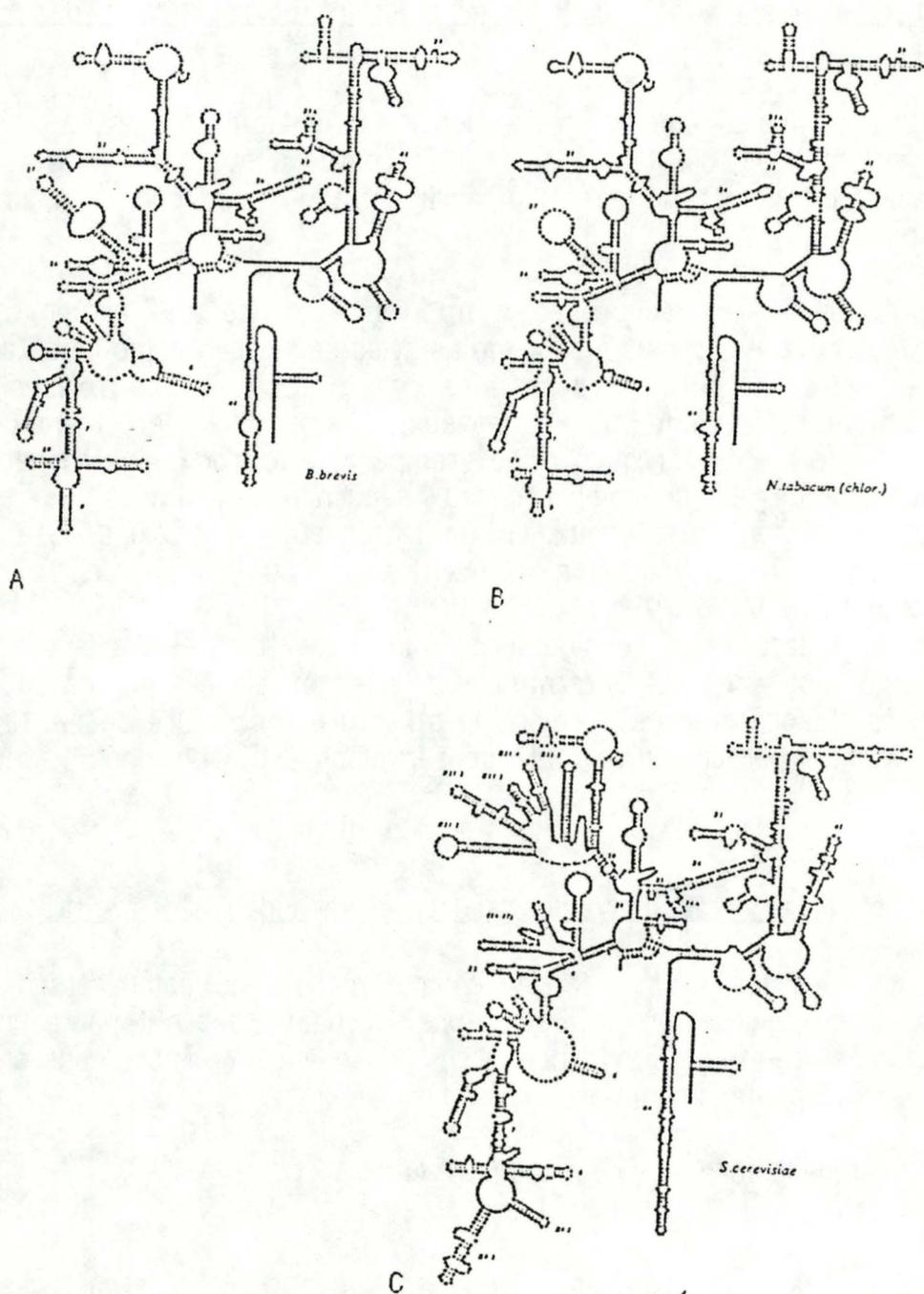


figure 5. Représentation de la structure secondaire du SSU-ARNr de bactérie (A), de chloroplaste (B), et d'eucaryotes (C). (28).

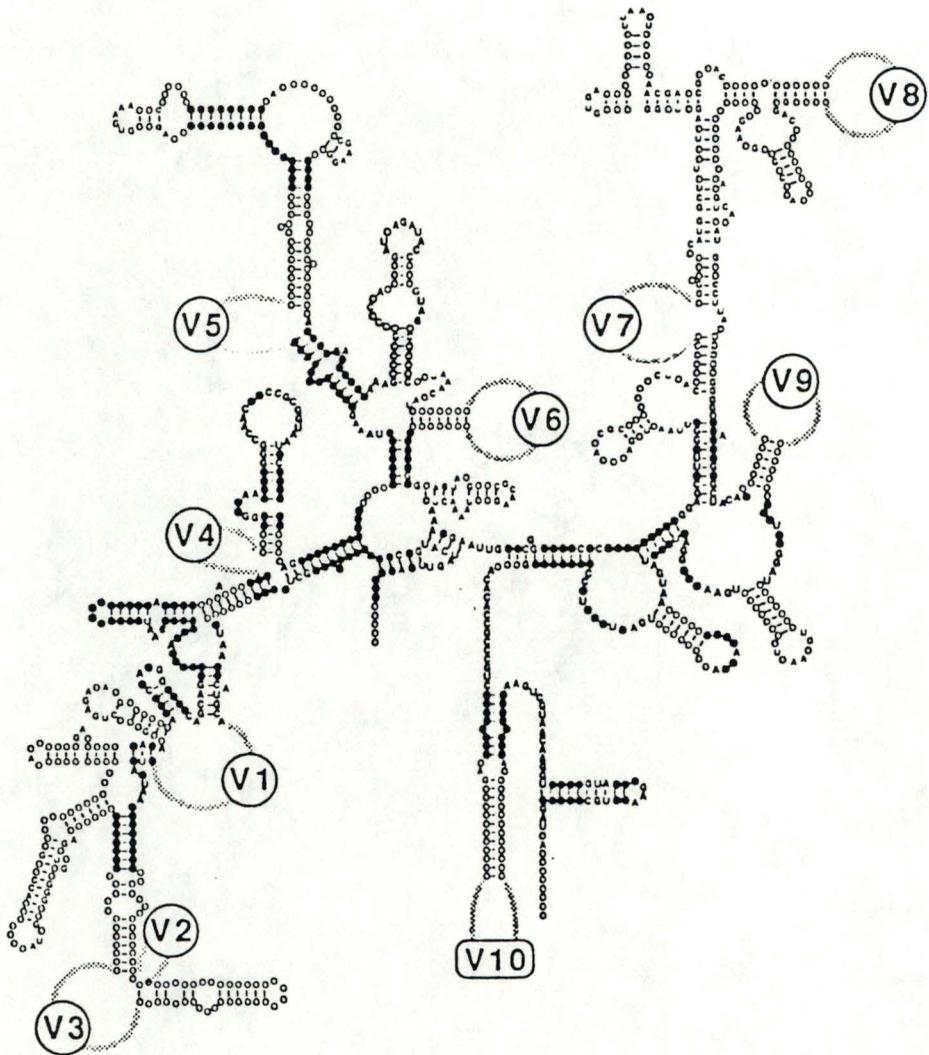


figure 6. Schema representatif de la conservation de la structure secondaire des SSU-ARNr. (28).

- Le CORE minimal, correspondant aux régions conservées du SSU-ARN de toutes les classes ribosomiques, est représenté par des cercles noirs.
- Les cercles blancs représentent les régions conservées du SSU-ARN de toutes les classes ribosomiques excepté les mitoribosomes.
- Les nucléotides hautement conservés sont indiqués par leur initiale.
- Les 10 régions variables sont représentées schématiquement par un V numéroté de 1 à 10.

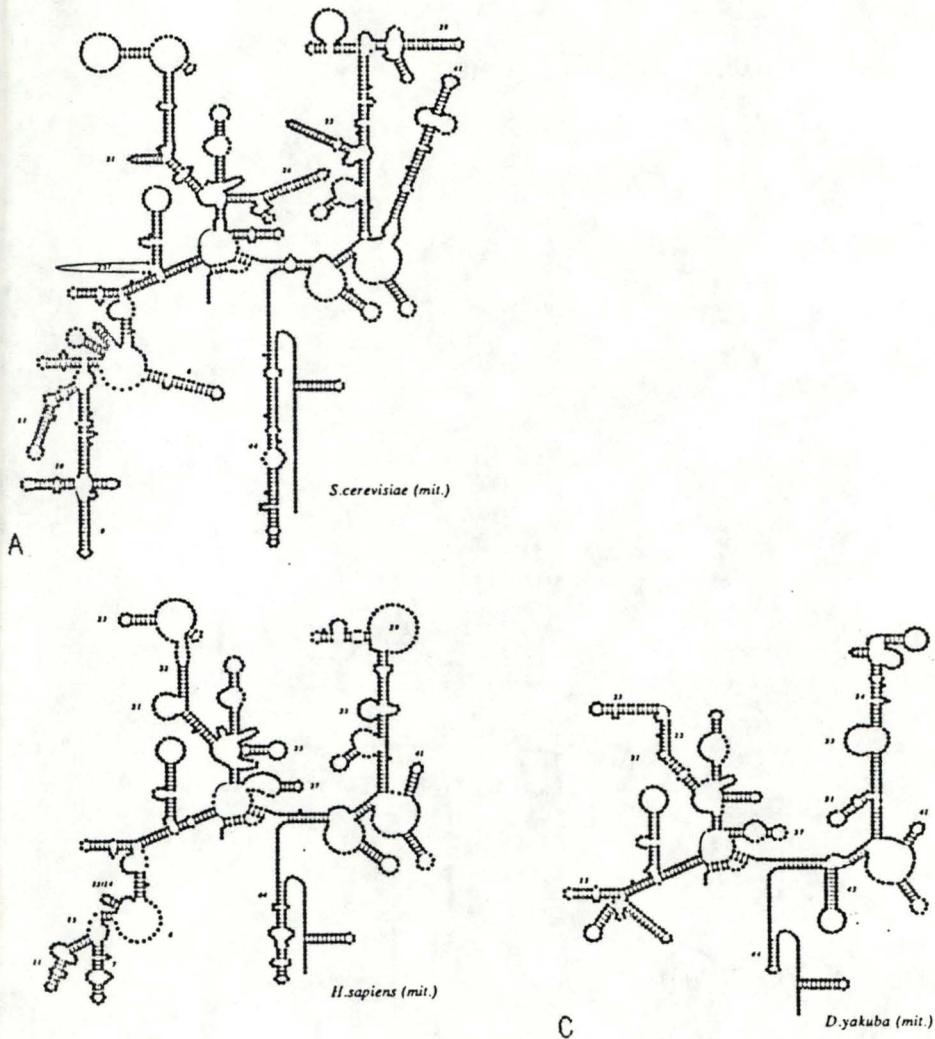


figure 7. Représentation de la structure secondaire du SSU-ARNr de mitochondries d'origine différente (28)

- A: mitochondrie de levure
- B: mitochondrie d'homme
- C: mitochondrie d'insecte

(figure 5), ont été résumées par Raué en un schéma. (figure 6). Celui-ci met en évidence une structure commune appelée CORE et propre aux SSU-ARNr de procaryotes, de chloroplastes et d'eucaryotes. Ce CORE concerne aussi bien la structure secondaire que des éléments de la structure primaire. La conservation des séquences est principalement restreinte aux régions simple brin et est très limitée au niveau des épingles à cheveux. A ce CORE s'attachent 10 régions variables dans lesquelles résident les différences principales entre l'ARNr de ribosomes d'origine différente.

Les structures secondaires de différents SSU-ARNr mitochondriaux sont représentées à la figure 7 et témoignent de l'hétérogénéité de cette classe de ribosomes. Lorsque ces ARN sont introduits dans la comparaison, la structure commune à tous les ARNr est réduite à un CORE minimal. Celui-ci correspond sans doute à la structure minimale du SSU-ARNr indispensable à l'activité du ribosome. (27).

En conclusion, le ribosome présente une grande conservation de sa configuration générale, de ses constituants et de la structure secondaire de ses ARNr majeurs. De plus, une structure commune à tous les ARNr, (CORE minimal), serait la structure minimale fonctionnellement indispensable. Un dernier point dans ce chapitre est l'étude des modifications qui affectent les ARN et plus particulièrement celle de la méthylation des ARNr.

### II.2.3. La méthylation: une modification importante de l'ARNr.

#### II.2.3.1. Caractéristiques et rôles de la méthylation des ARNr.

La méthylation, réaction catalysée par des enzymes méthylases à partir de la S-Adénosyl-Méthionine comme substrat, est une modification fréquente des macromolécules. (2). Elle affecte notamment les ARN des différentes classes. C'est ainsi que l'ARNm des eucaryotes présente en 5' une coiffe méthylée et que les ARNt possèdent des groupements méthyles au niveau de leurs bases ou en position 2'-O du ribose. (19). L'ARNr, lui, possède plus ou moins 1% de ses nucléotides méthylés. (figure 8). Ce taux de méthylation est toutefois plus faible pour les mitoribosomes. Par exemple, ceux de *Saccharomyces cerevisiae* ne possèdent que deux nucléotides méthylés. Ceux-ci appartiennent au 21S-ARNr et le 15S-ARNr est donc dépourvu de toute méthylation. (14).

Selon l'origine évolutive de l'ARNr, les méthylations s'effectuent de préférence au niveau des bases des nucléotides ou en position 2'-O du ribose. En effet, 80% des groupements méthyles de l'ARNr procaryotique sont positionnés sur les bases des nucléotides tandis que 90% des groupements méthyles de l'ARNr eucaryotique se trouve en position 2'-O du

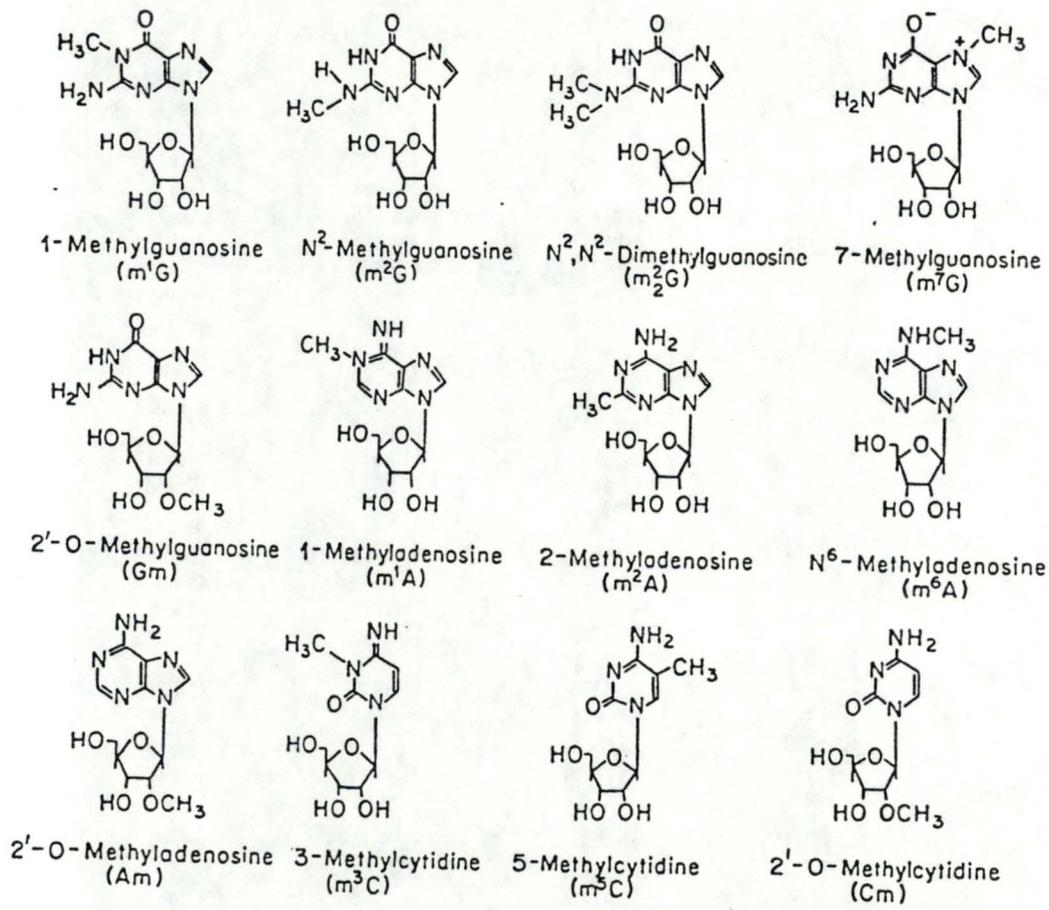


figure 8. Exemples de nucléotides méthylés présents sur les ARNr<sub>31</sub>

<i>E. coli</i>	<i>S. carlsbergensis</i>	<i>X. laevis</i>	<i>H. sapiens</i>	Rabbit
<b>Domain I</b>				
(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
(A393)		Am477	Am512	Am501
[V4] {	Am555	Cm482	Cm517	Cm506
(G505)		Am541	Am576	Am566
m <sup>7</sup> G527	(G584)	Am555	Am590	n.d.*
(U531)	Um578	Gm566	Gm601	Gm591
(G548)		(G588)	(G623)	
		Um592	Um627	Um617
		Gm609	Gm644	Gm634
<b>Domain II</b>				
(G572)	Am619	Am633	Am668	Am658
(G587)		Gm648	Gm683	Gm673
[V5] {		Cm760	Cm797	Cm793
(G783)	Am796	Um762	Um799	Um795
(C796)		(A816)		
(G902)	Am973	(G829)	Gm867	Gm863
	Cm1006	Am993	Am1031	Am1027
	Gm1123	(C1026)		
		(A1145)		
<b>Domain III</b>				
m <sup>2</sup> G966	am $\Psi$ 1187	am $\Psi$ 1210	am $\Psi$ 1248	am $\Psi$ 1245
m <sup>5</sup> C967	(C1188)	(C1211)	(C1211)	
[V7]		Um1250	Um1288	Um1285
(U1049)	Um1265	Um1288	Um1326	Um1323
(C1051)	Gm1267	Gm1290	Gm1328	Gm1325
(G1106)		Am1345	Am1383	Am1379
(U1115)		Cm1353	Cm1391	Cm1387
(C1147)		Um1400	Um1442	Um1458
(A1152)		(G1405)	Gm1447	n.d.*
(A1197)	Gm1425	Gm1448	Gm1490	Gm1484
m <sup>2</sup> G1207	(G1435)	(G1458)	(G1500)	
(G1310)	Gm1570	(G1595)		
(G1338)	m <sup>7</sup> G1573	m <sup>7</sup> G1597	m <sup>7</sup> G1639	m <sup>7</sup> G1629
(C1366)		(C1626)	Um1668	n.d.*
(A1377)		Am1636	Am1687	Am1669
<b>Domain IV</b>				
m <sup>4</sup> Cm1402	Cm1637	Cm1661	Cm1703	Cm1694
m <sup>5</sup> C1407	(C1642)	(C1666)	(C1708)	
[V10]		Um1761	Um1804	Um1793
mU1498	(U1759)	(U1787)	(U1830)	
(A1497)		m <sup>6</sup> A1789	m <sup>6</sup> A1832	n.d.*
m <sup>2</sup> G1516	(U1777)	(U1805)	(U1848)	
m <sup>2</sup> A1518	m <sup>2</sup> A1779	m <sup>2</sup> A1807	m <sup>2</sup> A1850	m <sup>2</sup> A1839
m <sup>2</sup> A1519	m <sup>2</sup> A1780	m <sup>2</sup> A1808	m <sup>2</sup> A1851	m <sup>2</sup> A1840

Table II. Répartition des modifications dans les différents domaines du SSU-ARNr d'origine différente

mG = nucléotide G méthylé au niveau de la base.  
 Gm = nucléotide G méthylé en 2'-O du ribose.  
 $\Psi$  = nucléotide hypermodifié.

ribose. C'est aussi le cas des deux nucléotides méthylés du 21S-ARNr de *Saccharomyces cerevisiae*. Malgré ces divergences, on a constaté que tous les nucléotides des eucaryotes, méthylés au niveau de la base, sont aussi présents chez les procaryotes et appartiennent à des régions très conservées. (14).

Par ailleurs, la méthylation est un phénomène spécifique, c'est-à-dire que sa localisation sur les ARNr n'est pas aléatoire mais est confinée à certaines régions déterminées. Ces régions diffèrent entre procaryotes, où les bases méthylées appartiennent principalement à la région 3', et les eucaryotes, où les riboses méthylés se situent dans la région 5' et les bases dans la région 3'.

Différents rôles sont attribués à cette modification, dont un dans la maturation du ribosome.

La méthylation du ribose, événement précoce dans la biogenèse des ARNr eucaryotiques, a comme rôle principal d'assurer le clivage de la molécule précurseur de 45S-ARNr en 3 molécules finales: le 5,8S-ARNr, le 18S-ARNr et le 28S-ARNr. Elle permet aussi de protéger les pré-ARNr contre une dégradation enzymatique.

La méthylation des bases, elle, survient plus tardivement, lors de la maturation de la petite sous-unité ribosomique tant procaryotique que eucaryotique. Elle permettrait l'assemblage du ribosome et son fonctionnement. Ce dernier point est suggéré par la modification de la réponse aux antibiotiques, interagissant avec le ribosome, en fonction de la présence ou de l'absence de certains groupements méthyles au niveau des ARNr. Par exemple, la présence des 2 adénines diméthylées de l'extrémité 3' de son 16S-ARNr d'*E. coli* rend cette bactérie sensible à la kasugamycine. (14).

#### 11.2.3.2. Conservation évolutive des 2 adénines diméthylées du SSU-ARNr.

La comparaison des modifications du SSU-ARNr d'*E. coli*, de levure, de *X. laevis*, de lapin et de cellules humaines, (table II), montre que la position de deux méthylations est conservée d'un groupe évolutif à l'autre mais que leur nature diffère entre ces groupes.

Il s'agit d'une part de la méthylation de la cytosine (1402) présente sur le ribose et la base chez *E. coli* alors que son homologue eucaryotique est méthylé uniquement au niveau de la base; d'autre part, d'une guanosine (966) méthylée sur la base chez *E. coli* et hypermodifiée chez les eucaryotes.

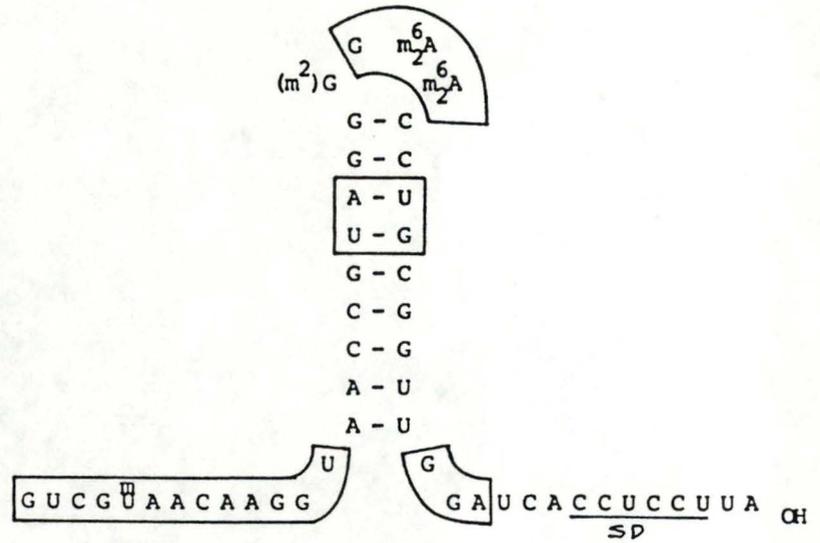


figure 9. Représentation de épingle à cheveux 3'-terminale du 16S-ARNr d' *E. coli* comprenant la séquence complémentaire (soulignée) à la séquence Shine-Dalgarno de l'ARNm (35)

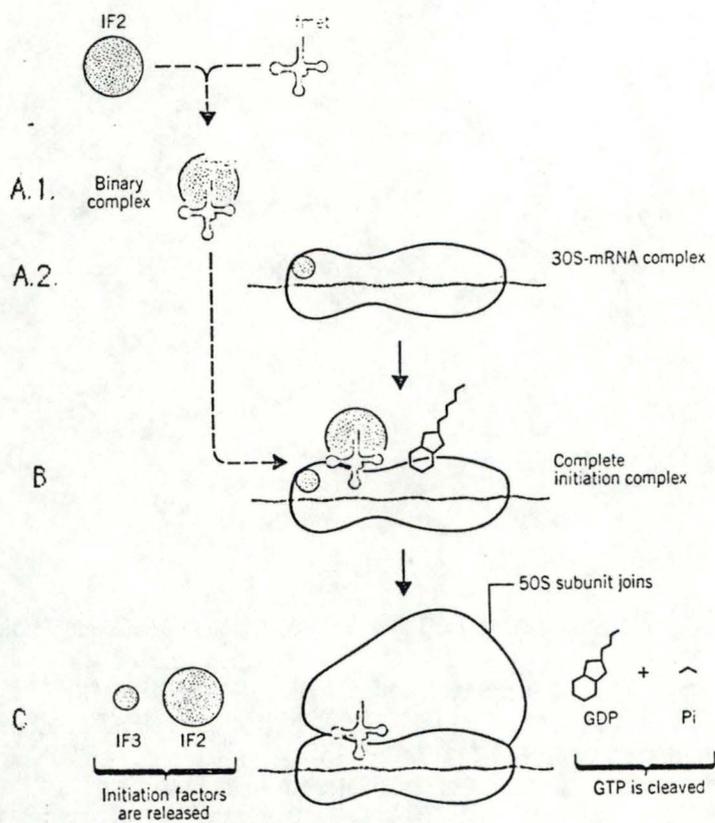


figure 10. Mécanisme d'initiation de la traduction chez les procaryotes. ( 19).

A1: formation du complexe spécifique, fMet ARNt-IF2, assurant que seul l'ARNt initiateur participe à la réaction d'initiation.

A2: formation du complexe ARNm-30S IF3

B: formation du complexe initiateur. Le complexe ARNm-30S IF3 se lie au complexe binaire ARNt-IF2. L'ARNt initiateur est situé au site P.

C: association de la sous-unité 50S au complexe d'initiation. Cette étape nécessite l'hydrolyse d'un GTP qui permet sans doute un changement de conformation du ribosome de telle sorte que les deux sous-unités soient converties en un ribosome 70S actif. Les facteurs IF2 et IF3 sont relâchés.

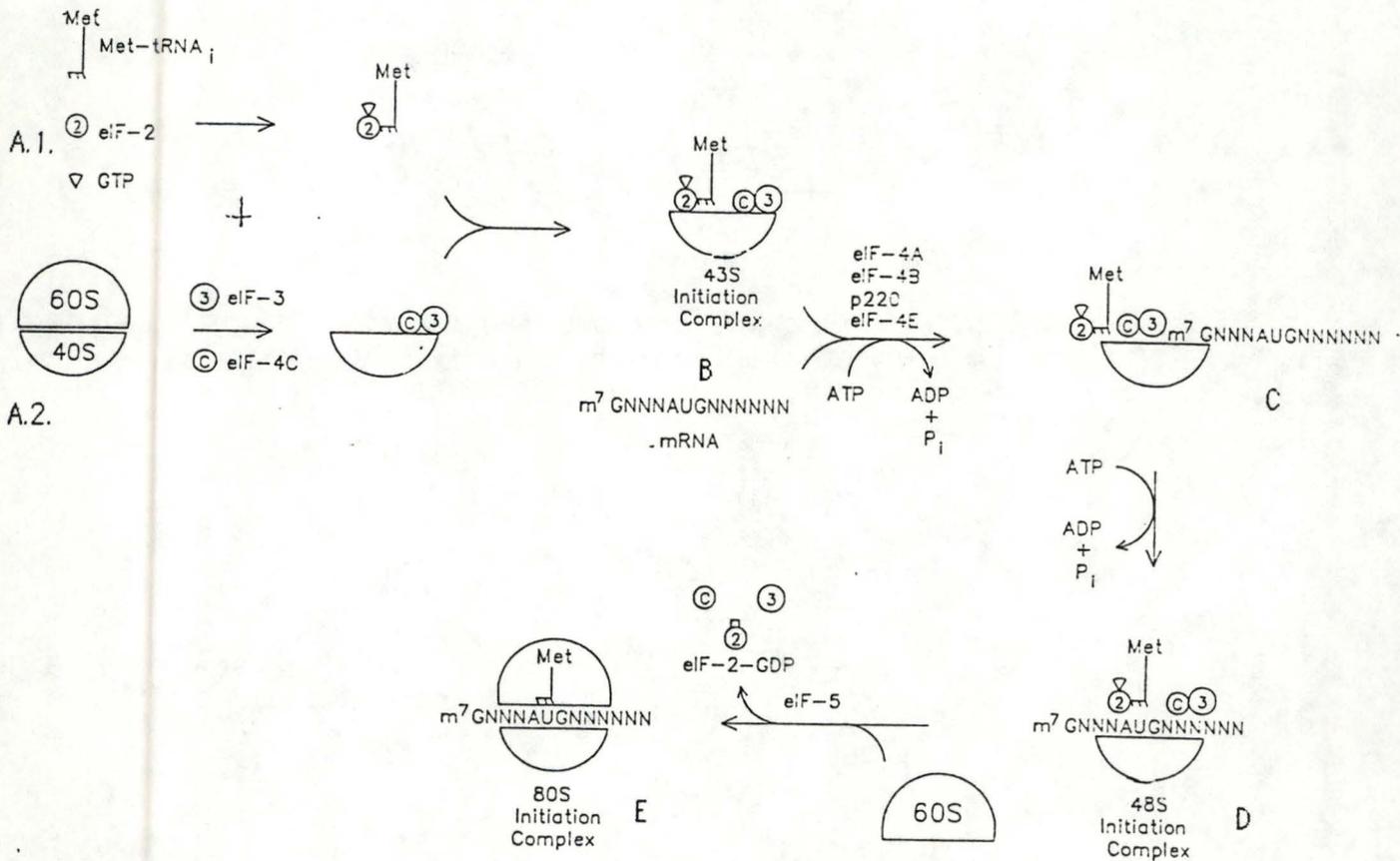


figure 11. Mécanisme d'initiation de la traduction chez les eucaryotes. (29).

- A.1: formation du complexe ternaire, eIF-2. GTP. Met-tRNA<sub>i</sub>,
- A.2: association de la sous-unité 40S avec les facteurs eIF-3 et eIF-4C.
- B: formation du complexe d'initiation 43S.
- C: reconnaissance spécifique du nucléotide m<sup>7</sup>G de la coiffe de l'ARNm grâce au facteur eIF-4E, (protéine fixatrice de la coiffe). Ce facteur associé à un polypeptide de 220000 daltons (P220) et au facteur eIF-4A forme le facteur eIF-4F
- D: le complexe eIF-4F déroule les structures secondaires 5'-terminales de l'ARNm qui est simultanément parcouru jusqu'au codon d'initiation AUG. On a dès lors le complexe d'initiation 48S.
- E: la grande sous-unité 60S est associée au complexe d'initiation 48S par l'intermédiaire du facteur eIF-5 pour former le complexe d'initiation 80S.

La seule modification présente à la fois chez les procaryotes et chez les eucaryotes est la séquence m<sup>6</sup>Am<sup>6</sup>A de l'épingle à cheveux 3'-terminale, représenté à la figure 9. (27).

Il n'existe que deux exceptions à cette règle:

- le 15S-ARNr des mitoribosomes de levure qui ne possèdent pas la séquence m<sup>6</sup>Am<sup>6</sup>A.
- le 5.8S-ARNr des chloroplastes d'*Euglena gracilis* dont une seule des deux adénines contiguës de l'épingle à cheveux 3'-terminale est diméthylée. (32).

La conservation quasi universelle de la séquence m<sup>6</sup>Am<sup>6</sup>A ainsi que sa position à l'interface des 2 sous-unités ribosomiques, près du site de liaison de l'ARNm et de l'ARNt où interagissent des facteurs ancillaires, suggèrent qu'elle joue un rôle important dans la synthèse protéique et peut-être même au stade de l'initiation de la traduction.

### III.ROLE DE LA SEQUENCE m<sup>6</sup>Am<sup>6</sup>A AU NIVEAU DES MECANISMES DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION..

#### III.1.L'initiation de la traduction.

##### III.1.1.Acteurs et mécanismes de l'initiation chez les procaryotes et chez les eucaryotes

L'ARNm procaryotique contient différents gènes séparés par des régions non codantes: il est polycistronique.

Chaque séquence codante est précédée par une séquence non codante appelée leader et commence par un AUG initiateur. Une séquence consensus de six paires de bases appelée Shine-Dalgarno est située sept à dix nucléotides en amont du codon initiateur et assure la fixation du ribosome sur l'ARNm dans la bonne phase de lecture. En effet, une séquence complémentaire à celle-ci existe du côté 3'-terminal du 16S-ARNr, au niveau de l'épingle à cheveux. (figure 9). La déstabilisation de cette épingle à cheveux est nécessaire à l'appariement des bases entre l'ARNm et l'ARNr. (19). Les étapes de formation du complexe d'initiation de la traduction sont explicitées à la figure 10.

L'ARNm eucaryotique est monocistronique, il ne représente qu'un seul gène. Il possède une coiffe méthylée 5'-terminale et une queue de polyA 3'-terminale. La sous-unité ribosomique 40S reconnaît l'extrémité 5' grâce à la cap binding protein ou eIF4E, s'y fixe et glisse le long de l'ARNm jusqu' au premier AUG initiateur rencontré. C' est le modèle de "threading-scanning" proposé par Kozak. (17). Les étapes de formation du complexe d'initiation sont explicitées à la figure 11.

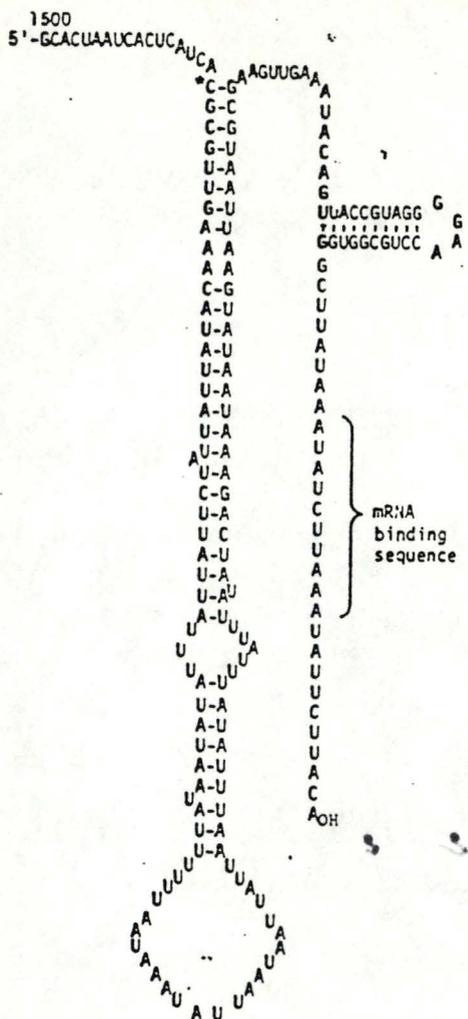


figure 12. Représentation de la partie 3'-terminale du 15S-ARNr de mitochondrie de *Saccharomyces cerevisiae*. Mise en évidence de la séquence décanucléotidique (mRNA binding sequence). (34).

3'-ACATTCTTATAAAATTCTATAAATATTCG-

sb2 cyt.ox.	3'- AAATTCTATA                 5'- GTTAAGATTT <sup>-6</sup>
sb3 cyt.ox.	3'- AAATTCTATA.                 5'- TTTGAGGATA <sup>-73</sup>
sb1 cyt.ox.	3'- AAATTCTATA                         5'- TTTAAGATAT <sup>-107</sup>
sb6 ATPase	3'- AAATTCTATA                 5'- AATAAGATAT <sup>-51</sup>
sb9 ATPase	3'- AAATTCTATA           5'- AATAAGATA <sup>-29</sup>
apocyt. b	3'- AAATTCTATA           5'- AATAAGTAT <sup>-100</sup>

figure 13. Complémentarité entre la séquence décanucléotidique du 15S-ARNr et la séquence amont de l'AUG initiateur pour 6 ARNm différents de mitochondrie de levure. (34).

### III.1.2. Acteurs et mécanismes de l'initiation chez les mitochondries.

Les mitochondries des levures se distinguent de celles des mammifères notamment sur la base de la structure des ARNm et des ARNr.

L'ARNm mitochondrial des mammifères, la plupart du temps monocistronique, se caractérise par son codon d'initiation qui est soit un AUA soit un AUU au lieu de l'AUG traditionnel. En outre, ce codon se situe très près de l'extrémité 5' de l'ARNm. Par contre, chez la levure, l'ARNm de mitochondrie possède une séquence 5' non traduite, appelée séquence leader, souvent très longue et riche en adenines et en uraciles. Le codon initiateur est un AUG et la séquence codante est parfois interrompue par des introns. Il n'est pas rare de trouver des AUG dans la séquence leader.

Le 12S-ARNr de mitoribosome de mammifères ne possède aucun vestige de la séquence Shine-Dalgarno CCUCC caractéristique des procaryotes. (16). Par contre chez *S. cerevisiae*, le 15S-ARNr des mitoribosomes possède à l'extrémité 3' une séquence AUAUCUAAA. (figure 12). La figure 13 montre différents degrés d'appariement de ce décanucléotide avec la région leader de six ARNm mitochondriaux différents. (figure 13).

Seule l'initiation de la traduction chez les mitoribosomes de levure sera considérée. La présence de plusieurs AUG dans la séquence leader 5'-terminale exclut un modèle d'initiation semblable à celui des eucaryotes. Par contre, la présence à l'extrémité 3' du 15S-ARNr de la séquence décanucléotidique d'appariement potentiel au leader de l'ARNm et le polycistronisme de certains ARNm nous permettent d'envisager un modèle d'initiation de la traduction semblable à celui des procaryotes c'est-à-dire de type Shine-Dalgarno.

Cependant ce modèle n'est pas strictement applicable car la séquence Shine-Dalgarno au niveau de l'ARNm mitochondrial se situe 6 à 107 nucléotides en amont de l'AUG initiateur alors qu'elle se situe toujours 7 à 10 nucléotides en amont de l'AUG initiateur de l'ARNm procaryotique. par ailleurs, l'absence spécifique de la diméthylation 3'-terminale du 15S-ARNr des mitoribosomes pourrait constituer une observation significative dans ce contexte.

Il est probable que les mitochondries possèdent un mécanisme d'initiation de la traduction qui leur est propre. (16).

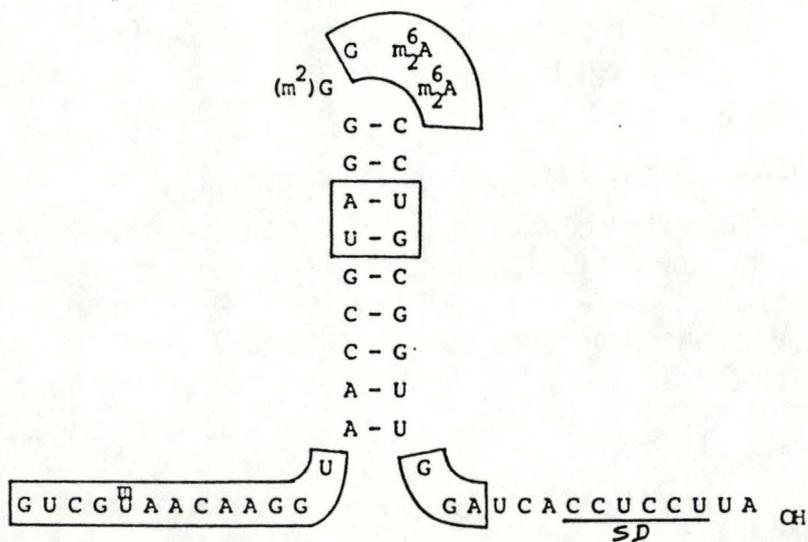


figure 14. Représentation du fragment cloacine du 16S-ARNr d'*E. coli*  
 correspondant aux 50 nucléotides 3'-terminaux. (35)

### III.2.Rôle de cette diméthylation chez *E. coli*.

Ce rôle a été étudié par l'équipe de P.H. Van Knippenberg. Cette étude a été réalisée grâce à l'obtention d'un mutant *E.coli* ne possédant pas les quatre groupements méthyles au niveau des deux adénines de l'épingle à cheveux 3'-terminale du 16S-ARNr et résistant à la kasugamycine. Dès lors, pour comprendre le rôle de la diméthylation, cette équipe a étudié d'une part les effets de la kasugamycine et d'autre part, les différences présentées par les souches sauvages et mutantes *ksgA<sup>-</sup>* d'*E.coli*.

#### III.2.1.Effets de la kasugamycine.

Des expériences réalisées, il ressort les résultats suivants :

- In vivo, l'antibiotique inhibe la croissance des bactéries à partir d'une concentration de 50 µg/ml.
- In vitro, cet antibiotique inhibe l'initiation de la traduction soit en empêchant la fixation de l'ARNt initiateur au complexe 30S-ARNm, soit en libérant celui-ci de ce complexe. Ce dernier effet s'observe que la sous-unité 30S provienne de la souche sauvage ou de la souche mutante. En fait, la résistance à l'antibiotique ne se manifeste que si la sous-unité 50S est présente, quelle que soit son origine. (36).

#### III.2.2.Différences observées entre *E.coli* sauvage et *E.coli* mutant.

L'étude thermodynamique du fragment colicin (cloacin) du 16S-ARNr correspondant au 50 nucléotides 3'-terminaux, (figure 14), originaire de ribosomes d'*E.coli* sauvage et mutant, a montré que la diméthylation des 2 adénines de l'épingle à cheveux 3'-terminale en déstabilise la structure secondaire. Le dépliement de cette épingle à cheveux et l'association de l'ARNr avec l'ARNm pour assurer la mise en phase du ribosome lors de l'initiation en seraient facilités. (32).

Par ailleurs, le mutant se caractérise in vivo par une résistance à la kasugamycine et par un taux de croissance plus faible que celui du sauvage. In vitro, la liaison de l'ARNt avec l'ARNm-30S nécessite une plus grande concentration de facteur IF3 en l'absence de facteur IF1. En outre, chez le mutant l'affinité de la sous-unité 30S pour la sous-unité 50S diminue. (36).

En conclusion, la présence des 2 adénines diméthylées de l'épingle à cheveux 3'-terminale du 16S-ARNr serait favorable aux mécanismes d'initiation de la traduction chez *E. coli*. Dans les autres groupes

évolutifs, le rôle de cette modification reste encore inconnu car aucun mutant n'est disponible.

### III.3.Hypothèse sur le rôle de la séquence $m_2^6Am_2^6A$ chez d'autres organismes qu' *E. coli*.

L'absence d'interaction dite de Shine-Dalgarno chez les eucaryotes laisse supposer que la séquence  $m_2^6Am_2^6A$  joue un rôle différent de celui de dépliement de l'épingle à cheveux 3'-terminale du 16S-ARNr d' *E. coli*.

Par ailleurs, le 15S-ARNr des mitochondries de levure, qui ne possède pas cette séquence universelle, fournit un sujet d'étude. D'un point de vue évolutif la mitochondrie est considérée comme un procaryote endosymbiotique. La présence d'une séquence consensus décanucléotidique au niveau de l'extrémité 3' de son SSU-ARNr suggère que son mécanisme d'initiation de la traduction soit semblable à celui des procaryotes. L'absence de diméthylation des 2 adénines de l'épingle à cheveux 3'-terminale est à cet égard étonnante.

La création d'une protéine hybride "peptide de transit -diméthylase d' *E. coli*" permettrait d'importer l'enzyme dans la matrice mitochondriale de levure, de dimétyler les deux adénines jumelles de l'épingle à cheveux 3'-terminale du 15S-ARNr et d'étudier les effets phénotypiques obtenus. A cette fin, il est nécessaire de s'intéresser aux mécanismes d'importation de protéines dans la mitochondrie.

## IV.MECANISME DE L'IMPORTATION DE PROTEINES DANS LA MITOCHONDRIE.

### IV.1.Origine mixte des protéines des compartiments mitochondriaux.

La mitochondrie, organe subcellulaire, se divise en 4 compartiments: la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne et la matrice. Chacun d'entre eux contient des protéines dont certaines sont synthétisées par la mitochondrie qui possède son propre ADN et sa machinerie de synthèse protéique.

Cependant, la plupart de ces protéines sont codées par l'ADN nucléaire et synthétisées dans le cytoplasme sous la forme de précurseurs contenant une séquence amino-terminale de 15 à 80 acides aminés permettant l'adressage et l'importation de la protéine dans la mitochondrie. (23).

## IV.2.Exemples d'études sur l'importation de protéines dans la mitochondrie de levure.

De nombreuses études sur l'importation dans la mitochondrie de protéines naturellement adressées à cet organite et de protéines cytoplasmiques fusionnées à un peptide de transit ont permis de préciser certains aspects du processus. Elles ont mis en évidence l'existence d'un pré-peptide et souligné l'importance de la structure de la protéine à importer et de la nature du prépeptide. En effet, certaines protéines possèdent une conformation qui s'oppose à l'importation. Steeg et ses collaborateurs ont notamment montré que l'invertase couplée au peptide de transit de la superoxyde dismutase masquait ce dernier et empêchait donc toute reconnaissance au niveau de la mitochondrie. (12).

Par ailleurs, les caractéristiques de différents peptides de transit ou pré-peptides commencent à être connues. L'équipe de Young s'est intéressée à l'isoenzyme ADHIII de *Saccharomyces cerevisiae* localisée dans la matrice mitochondriale et synthétisée sous la forme d'un précurseur dans le cytoplasme. La séquence en acides aminés d'ADHIII possède 80% d'identité avec celle des isoenzymes cytoplasmiques ADHI et ADHII. ADHIII possède une séquence supplémentaire amino terminale de 28 acides aminés par rapport à ADHI et à ADHII. Ces 28 acides aminés couplés à la dihydrofolate reductase cytoplasmique de souris en assure l'importation dans la mitochondrie de levure. Ils contiennent donc l'information nécessaire à l'adressage et à l'importation mitochondriale.

Des expériences supplémentaires de délétion d'acides aminés dans cette région ou de substitution d'un acide aminé par un autre ont mis en évidence que le peptide de transit d'ADHIII possède deux domaines fonctionnels distincts. La moitié amino terminale de ce pré-peptide est nécessaire à la reconnaissance de récepteurs situés en surface de la mitochondrie et à l'importation de la pré-protéine tandis que son extrémité carboxy-terminale en assure le clivage correct après le 25<sup>ème</sup> acide aminé, une glutamine. En particulier, le remplacement des acides aminés 26, une sérine, et 27, une thréonine, respectivement par une phénylalanine et par une isoleucine empêche le clivage de la pré-protéine en protéine mature dans la matrice mitochondriale. (20,24,38).

A partir des différentes études expérimentales réalisées sur l'importation de protéines dans la mitochondrie, les caractéristiques suivantes du processus d'importation ont été établies.

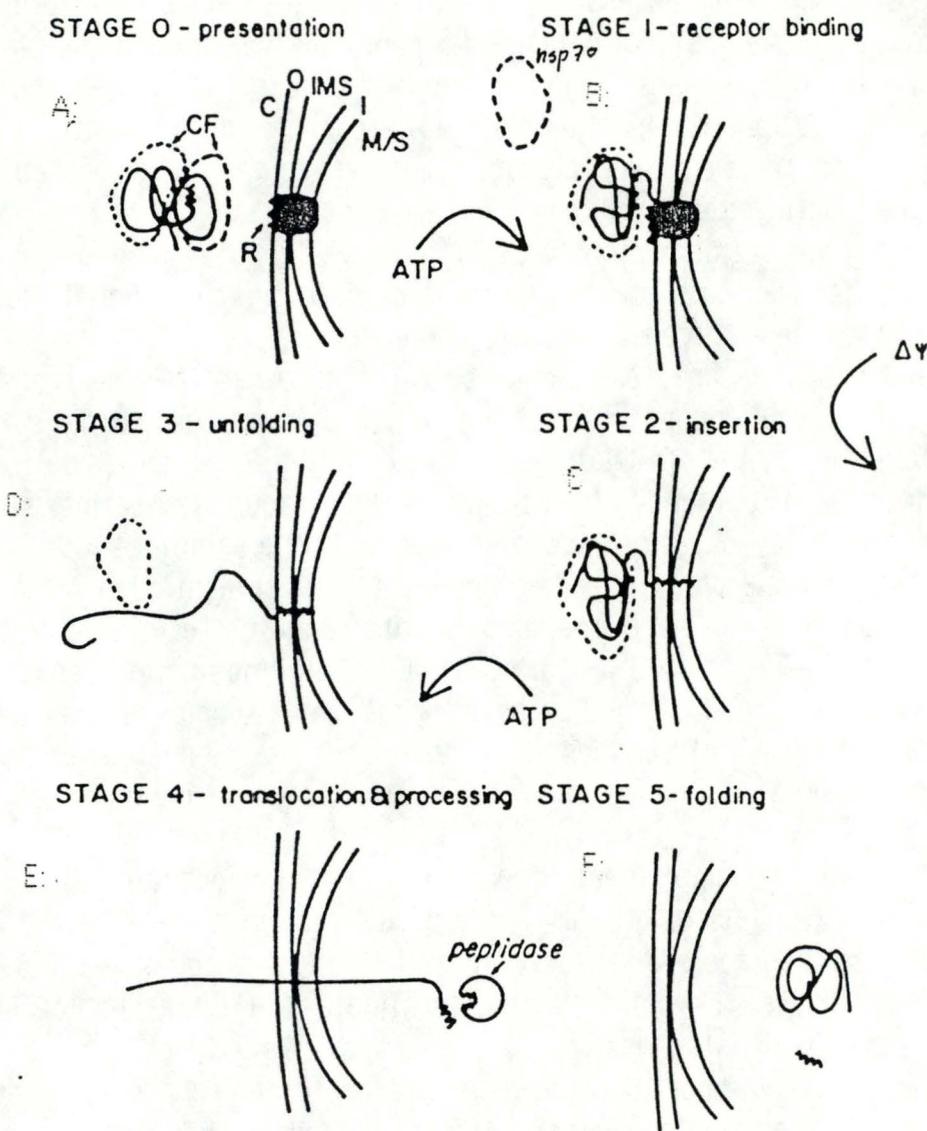


figure 15. Modèle d'importation de protéines dans la mitochondrie. ( 11 ).

- A: présentation du peptide de transit au recepteur situé à la surface de la membrane externe
- B: lien du peptide de transit au recepteur. Intervention de l'hydrolyse de l'ATP pour déplier une première partie de la protéine.
- C: passage du peptide de transit sous l'effet du potentiel transmembranaire.
- D: hydrolyse d'une deuxième molécule d'ATP pour déplier le reste de la protéine.
- E: translocation de la protéine à travers la double membrane.
- F: repliement de la protéine dans la matrice.

C.F.=facteurs cytosoliques; R.=recepteur; GI=general insertion site

### IV.3.Modèle général du processus d'importation.

Le peptide de transit se caractérise par la présence, tout au long de sa séquence, de résidus chargés positivement ( bases ) et par l'absence presque totale de résidus chargés négativement ( acides). La présence de quelques résidus hydrophobes lui permet de se replier en hélice  $\alpha$  amphiphile avec les résidus basiques répartis périodiquement sur une de ses faces. Aucune séquence consensus en acides aminés n'a été mise en évidence, ce qui sous-entend que la structure secondaire est plus importante que la primaire. (23,26).

Le précurseur protéique est adressé à la mitochondrie, importé dans celle-ci, clivé et la protéine mature est dirigée vers un des quatre sous-compartiments de la mitochondrie.

Dans une première étape, le pré-peptide reconnaît des récepteurs protéiques en surface de la mitochondrie,(figure 15A etB), il s'insère ensuite dans la membrane externe à des sites appelés GIP (Général Insertion Site), localisés au point de contact entre la membrane interne et la membrane externe.(figure 15.C).(23) La nature exacte de ces points de contact n'est pas encore connue. Van Venetië et Vertely ont proposé un modèle selon lequel les couches bilipidiques des deux membranes fusionnent en une seule. Cependant,la nature des lipides de la membrane interne et de la membrane externe est significativement différente et devrait s'opposer à une telle fusion. (26).

Ensuite,le passage des deux membranes nécessite de l'énergie qui est fournie par l'hydrolyse de l'ATP et par le potentiel électrique transmembranaire. Ces deux sources d'énergie ont des actions indépendantes.

L'hydrolyse de l'ATP est nécessaire pour déplier la protéine et la rendre apte à l'importation. Des facteurs cytosoliques tels qu'une chaperone, la "heat shock protein" 70, (hsp 70), ont aussi un rôle dans le dépliement de la protéine sur laquelle ils se fixent. Pour détacher ces facteurs, l'énergie nécessaire est également fournie par l'hydrolyse de l'ATP. (23). (figure 15 D).

Le potentiel transmembranaire exerce une force électrophorétique sur les charges du peptide de transit, ce qui facilite le passage du précurseur protéique à travers la double membrane. (figure 15.B-C). (23).

Dans la matrice, le clivage du peptide de transit est assuré par une "processing peptidase". (figure 15.E). Cette enzyme est souvent associée à une protéine de 52 Kd liée à la membrane interne et nommée "processing

enhancing protein". Cette dernière lie le précurseur protéique qu'elle présente à la peptidase. (23).

Les protéines doivent alors se replier.(figure 15.F). Cette étape nécessite l'intervention d'une nouvelle chaperone, la hsp 60. Lorsque la protéine possède sa structure quaternaire, la hsp 60 est décrochée grâce à l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP. (21,23).

Il reste à diriger la protéine vers le sous-compartiment auquel elle est destinée. Les protéines de la membrane externe s'insèrent simplement au niveau du GIP (General insertion site). Les protéines de la matrice suivent le processus d'importation décrit ci-dessus.

Les pré-protéines de la membrane interne et de l'espace intermembranaire suivent dans un premier temps le processus décrit ci-dessus. Ensuite le précurseur protéique est redirigé à travers ou dans la membrane interne. Le premier clivage a enlevé la séquence amino-terminale chargée positivement du pré-peptide. Plusieurs précurseurs possèdent alors une deuxième séquence signal dans la partie carboxy-terminale de ce même pré-peptide. Celle-ci est hydrophobe et permet l'insertion de la protéine dans la membrane interne. Si la protéine est destinée à l'espace intermembranaire, des peptidases de ce compartiment clivent ce deuxième signal et la protéine est libérée dans cet espace. (23).

## Y.BUT DU TRAVAIL.

La présence quasi universelle de la séquence  $m_2^6Am_2^6A$  à l'extrémité 3' des 5-ARNr laisse supposer que celle-ci joue un rôle important dans la biosynthèse protéique. Ce rôle a été étudié chez *E.coli* mais reste inconnu chez les autres organismes.

Pour éclaircir la situation, nous nous proposons de tirer parti du 15S-ARNr des mitoribosomes de levure qui est le seul à ne pas posséder la séquence  $m_2^6Am_2^6A$  à son extrémité 3'. Notre but est de diméthyliser in vivo ces deux adénines et d'étudier les effets fonctionnels obtenus. Nous allons exploiter la possibilité de transformer la levure avec le gène de la diméthylase d'*E.coli* en amont duquel le peptide de transit ADHIII aura été cloné de telle sorte que la protéine soit adressée à la mitochondrie.

La ressemblance entre l'extrémité 3' du 16S-ARNr d'*E.coli* et celle du 15S-ARNr mitochondrial de *S. cerevisiae* laisse supposer que la diméthylation en sera possible par l'enzyme d'*E.coli*.

MATERIEL ET METHODES.

# I. MATERIELS

## I.1. Solutions et tampons.

### I.1.1. Tampons.

#### Tampon TE.

à pH8

Tris.Cl pH8	10 mM
EDTA pH8	1 mM

à pH7,5

Tris.Cl pH7,5	10 mM
EDTA pH7,5	1 mM

#### Tampon de ligation 5 x (BRL)

Tris.Cl pH7,4	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT (dithiotréitol)	10 mM
ATP	1 mM

#### Tampon de polymérase.

Tris pH 7,8 1 M	250	µl
MgCl <sub>2</sub> 1M	25	µl
b-mercaptoéthanol 14M	3,8	µl
H <sub>2</sub> O stérile	220	µl

#### Tampon SSC 20 x.

NaCl	3 M
citrate de sodium	0,3 M

ajuster à pH7 avec de l'HCl

#### High salt buffer

Tris pH7,5	20 mM
EDTA	1 mM
NaCl	1,5 M

Tampon de restriction. (10 x).(boehringer).

tampons	low	medium	high	A	B
Tris HCl pH 7,5	10	10	50	0	10
NaCl	0	50	100	0	100
MgCl <sub>2</sub>	10	10	10	0	5
dithiotréitol(DTT)1	1	1	1	0,5	0
mercaptoéthanol	0	0	0	0	1
tris acetate	0	0	0	33	0
Mg acetate	0	0	0	10	0
K acétate	0	0	0	66	0

Tampon de restriction 4 (BRL): 20mM Tris-HCl (pH7,4)  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM KCl

Tampon d'électrophorese pour gel d'agarose : TBE.

Tris	0,089 M
acide borique	0,089 M
EDTA	0,002 M

Tampon P1(QIAGEN).

Tris HCl	50 mM
EDTA	10mM

Autoclaver.

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

Tampon P2(QIAGEN).

NaOH	200mM
SDS	1 %

Ne pas autoclaver.

Tampon P3(QIAGEN).

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

Ne pas autoclaver.

Tampon QB (QIAGEN).

NaCl	750 mM
MOPS (acide 3-(N-Morpholinol)propane-sulfonique)	50mM
éthanol	15 %

Ajuster a pH 7,0 avec du NaOH.

Tampon QC (QIAGEN)

NaCl 1 M  
MOPS 50 mM  
éthanol 15 %

Ajuster à pH 7,0 avec du NaOH.

Tampon QF pH8

NaCl 1,2 M  
MOPS 50 mM  
ethanol 15 %

Ajuster a pH 8,0 avec duNaOH.

Tampon SET

sorbitol 0,6 M  
EDTA 1 mM  
Tris HCl 10 mM

Tampon MAN

mannitol 0,6 M  
EDTA pH6,8 0,1 mM

Tampon de lyse LD.

Tris pH7,4 10 mM  
NH<sub>4</sub>Cl 50 mM  
MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
b-mercaptoéthanol 7 mM

Tampon RD

HEPES pH7,5 50 mM  
Mg(Ac)<sub>2</sub> 20 mM  
NH<sub>4</sub>Cl 100 mM  
b-mercaptoéthanol 5 mM

Tampon A 100 mM pH 5,3 (HPLC).

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,47 g/l  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 g/l

Tampon B 100 mM pH 5,1 (HPLC).

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,48 g/l  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,16 g/l

Tampon C 100 mM pH 4,9 (HPLC).

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,53 g/l  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,102 g/l

Tampon d'électrophorèse pour gel SDS-PAGE.

glycine	14,4 g/l
Tris	3 g/l
SDS	1 g/l

Tampon de blotting.

Tris	192 mM
glycine	25 mM
méthanol technique	20 %

1.1.2. Solutions.

Solution stock d'antibiotique.

-Ampicilline ( Boehringer ) 10 mg/ml  
stériliser par filtration sur millipore 0,22 µm,  
aliquoter et conservée à -20°C.

Solution stock de RNaseA

(Boehringer)  
10 mg./ml de TRISCl 10 mM (pH 7.5) 15 mM de NaCl  
Chauffer 15 minutes à 100°C  
Aliquoter et stoker à -20°C

Solution stock d'IPTG (Isopropyl, b-D thiogalactopyranoside.)

( Boehringer )  
100 mM dans l'eau distillée.  
stériliser par filtration et conserver a -20°C.

Solution stock de Xgal(5 Bromo-4 chloro-3 indolyl, b-D galactopyranoside).

(Boehringer)  
2% dans du N-M dimethylformamide.  
stériliser par filtration et conserver à -20°C.

Solution M9 (10x)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g/l
NaCl	5 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	10 g/l

ajuster le pH à 7,4 avec HCl, autoclaver.

Solution d'agarose.

0,8 % d'agarose (BRL) dans du TBE.

Solution d'alourdisseur et de colorant pour gel d'agarose.

Sucrose 80%	2,7 ml
TBE 10 x	0,3 ml
SDS 1 %	1 ml
EDTA 0,5 M	1 ml
bleu de bromophéno	1 mg

Solution de bromure d'éthidium.

1mg/ml dans de l'eau.

Solution de phénol-chloroforme.

phénol	50 ml
chloroforme	50 ml
alcool isoamylique	2 ml
hydroxyquinoline	0,05 g

saturer avec 100 ml de TE, centrifuger 5 minutes à 5000 RPM (Rotor GSA Sorvall), éliminer le TE et recommencer deux fois (ne pas éliminer le dernier volume de TE).

Solution de PEG-NaCl.

Polyéthylène glycol 8000	20 %
NaCl	2,5 M

Solution d'acrylamide 2,5 %.

uree	42 g
TBE 10 x	10 ml
acrylamide (40%)	15 ml
H <sub>2</sub> O	40 ml

Porter à un volume final de 100 ml.

Solution de persulfate d'ammonium (BRL).

10 % (p/v) dans de l'eau pour les gels de séquençage.

1% (p/v) dans de l'eau pour les gels protéique.

Solution d'alourdisseur et de colorant (pour séquençage).

formamide	98 %
bleu de bromophéno	0,1 %
EDTA	10 mM
xylène cyanol	0,1 %

Solution de fixateur (pour gel de séquençage).

acide acétique	10%
méthanol	10%

Solution "TE + LiOAc".

acetate de lithium	0,1	M
TRIS.Cl pH 7,5	10	mM
EDTA	1	mM

Solution "TE + LiOAc + PEG".

"TE + LiOAc"	1	x
PEG 4000	40	%

Solution de bleu de Coomassie.

methanol	40	%(v/v)
acide acétique	10	%(v/v)
brillant blue R (bleu de Coomassie)	0,1	%(p/v)

Solution de décoloration.

méthanol	40	%(v/v)
acide acétique	10	%(v/v)

Solution SB 5x

TrisCl	312,5	mM
SDS	10	%
bleu de bromophénol	0,005	%
b-mercaptoéthanol	25	%
glycérol	50	%

Solution pour mini-gel PAGE-SDS 10 %.

Running gel : polyacrylamide 30 %	5	ml
TRIS 1,5 M SDS 0,4 % pH 8,8	3,5	ml
H <sub>2</sub> O	5,5	ml
TEMED	15	μl
PAS 1 %	0,75	ml

Stacking gel : polyacrylamide 30 %	0,5	ml
TRIS 0,5 M SDS 0,4 % pH 6,8	1,25	ml
H <sub>2</sub> O	2,75	ml
TEMED	5	μl
PAS 1 %	0,5	ml

## I.2. Les différents souches, plasmides et phages utilisés .

### I.2.1. Souches bactériennes.

Bactéries.	Génotypes.
<i>E. Coli</i> XL1blue	SupE, lac-, hsdR17, recA1, F', proAB, lacI <sup>q</sup> , lacZDM15
<i>E. Coli</i> Tg1	SupE, D(lac- proAB), F'traD36, proAB, lacI <sup>q</sup> , lacZDM15
<i>E. Coli</i> JM101	SupE, D(lac-proAB), F', traD36, proAB+, lacI <sup>q</sup> , lacZDM15

\* Souche "wild type" .

\* Souche contenant le plasmide pUC8ksgA7.

La nomenclature utilisée pour désigner les souches est celle de DEMER et col ( 1966 ).

#### Caractéristiques de ces souches :

Rec A1: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, ce qui minimise la recombinaison entre ADN endogène et exogène.

end A1 : diminue le taux d'endonuclease ce qui améliore le rendement et la qualité de ADN plasmidique a petites échelles.

$\Delta$ (lac-proAB) :le chromosome bactérien est décelé au niveau de l'opéron proline.

traD36 :est une mutation qui supprime le transfert du facteur F.

L'épisome F', codant pour des pili sexuels présents en surface de la bactérie, porte les caractères suivants:

Tn 10 :contient un marqueur de résistance à la tétracycline permettant de sélectionner les bactéries possédant F'.

pro AB : l'épisome F' porte l'opéron proline sous sa forme intacte entraînant le caractère prototrophe pour la synthèse de la proline. Cela permet de sélectionner sur un milieu minimum les bactéries qui ont toujours le facteur F' car ce sont les seules capables de synthétiser la proline et donc de pousser.

lacZ $\Delta$ M15: la souche contient un gène lac Z déleté dans la région N terminale de la  $\beta$  galactosidase.

lac I<sup>q</sup> : mutation dans le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose ce qui entraîne sa surproduction. ( 10 X ).

### 1.2.2. Souches de levure.

<u>Levure</u>	<u>Génotype</u>
Saccharomyces cerevisiae GRF 18	leu- his-

Cette souche est auxotrophe pour ces 2 acides aminés.

### 1.2.3. Plasmides.

<u>Plasmides</u>	<u>Caractéristiques</u>	<u>Taille</u>
pGEm blue	Ampr, ORI, lac Z SMC	2,7 Kb
pUC 8 ksg A 7	Ampr, ORI, lac Z SMC, le gène ksg A 7 de 827 p.d.b.	3,5 Kb
YE <sub>p</sub> ADH 3-9	Ampr, ORI, lacZ, LEU2 SMC	9,1 Kb
pRS 315	Ampr, ORI, lac Z SMC, CEN6 ARSH4 LEU2	6,018 Kb
YE <sub>p</sub> 351	Ampr, ORI, lac Z, SMC, LEU 2	6Kb

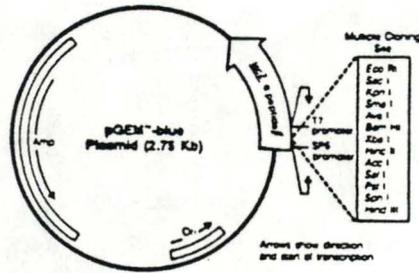


figure 16. Le plasmide pGEM blue et son site multiple de clonage (ou SMC).

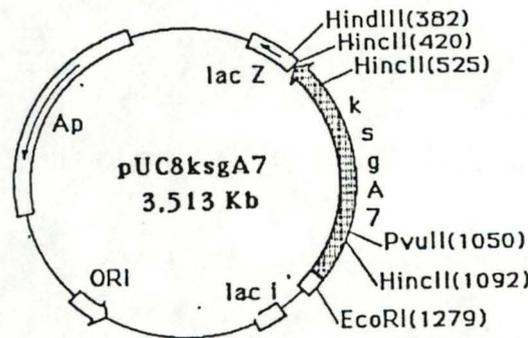


figure 17. Le plasmide pUC8ksgA7.

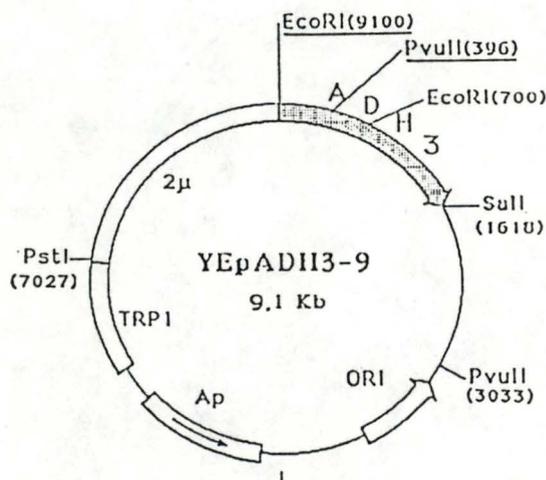


figure 18. Le plasmide YE pADH3-9

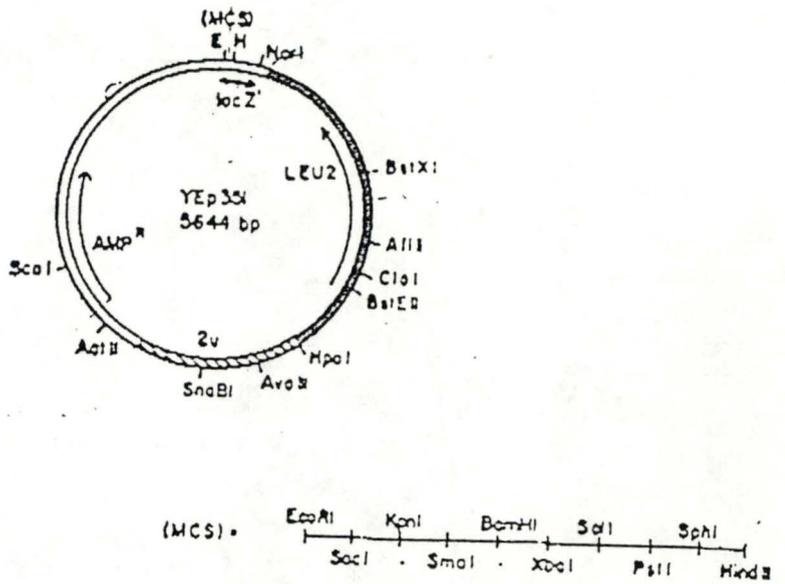


figure 19. Le plasmide YEp351 et son site multiple de clonage (ou SMC).

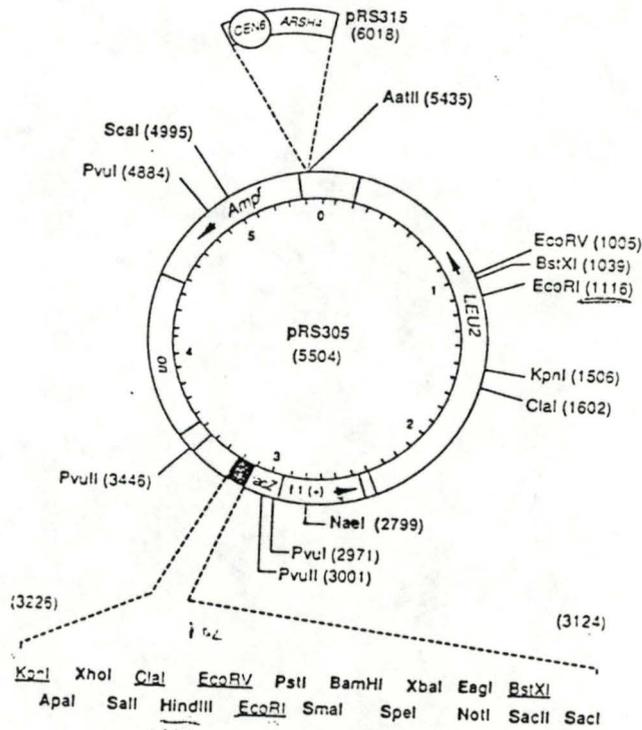


figure 20. Le plasmide pRS315 et son site multiple de clonage (ou SMC).

### -Origines et propriétés de ces plasmides.

Dérivés du pBR 322, ils comportent le gène de résistance à l'ampicilline (b lactamase) et une portion de l'opéron lactose. Celle-ci comporte le promoteur "lac", l'opérateur et l'extrémité amino-terminal de la b galactosidase ( peptide donneur). Dans la séquence codant pour le peptide donneur ( lac Z ), un nombre variable de sites de coupure unique pour différents enzymes ont été introduits : c'est le site multiple de clonage ou MCS ( multiple cloning site ). Le fragment inactif d'un tel plasmide utilisé pour transformer une souche contenant un gène lac Z déleté dans la region de la b galactosidase peut s' associer par complémentation intragénique avec la b galactosidase pour former un octamère possédant une activité enzymatique. Remarquons que la capacité de complémentation du peptide produit par le pUC n'est pas altéré malgré l'insertion du MSC.

### -Caractéristiques de ces plasmides.

#### pGEM blue .

C'est un plasmide dérivé du pUC18 contenant les promoteurs de bactériophages T7 et Sp 6. (figure 16).

#### pUC 8 ksgA 7

C'est un pUC 8 dans lequel a été cloné un fragment *Hpa*-*Hpa* de 827 pdb contenant le gène de la dimethylase d'*E. Coli*. La souche transformée par ce plasmide est capable de surproduire l'enzyme. (figure 17).

#### YEpADH3-9

Dérivé du pBR322, ce plasmide contient le gène ADH3 cloné en *Eco*RI- *Sal*I. (figure 18).

#### YEp 351

C'est un pBR 322 qui contient une origine de répllication,  $2\mu$ , reconnue par la levure permettant une répllication indépendante de l'ADN chromosomique. Il porte le facteur de sélection LEU2. C'est donc un vecteur autonome, multicopy et navette entre les bactéries et levures. Il porte le facteur de sélection LEU2. (figure 19)

#### pRS 315

Dérivé du pUC 19, ce plasmide est un vecteur navette entre levure et bactérie. C'est un vecteur centromérique c'est-à-dire qu'il contient une séquence centromérique CEN de levure centromérique CEN et une séquence de répllication autonome ARS. Ces deux éléments combinés en une cassette assurent la stabilité de répllication du plasmide qui se trouve à raison d'une seule copie par levure. Il porte le facteur de sélection LEU2. (figure20).

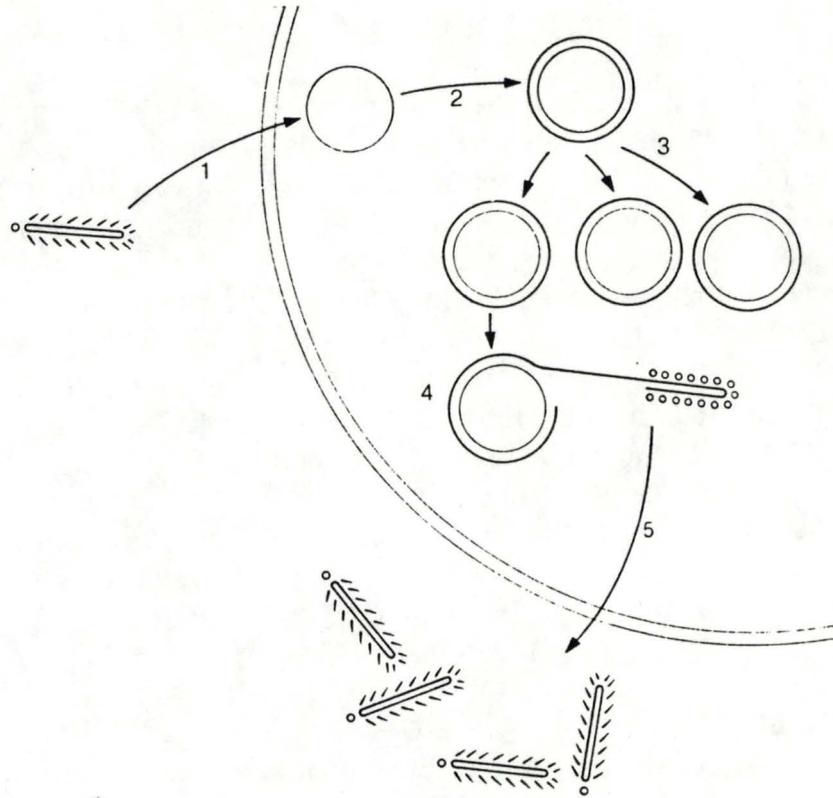
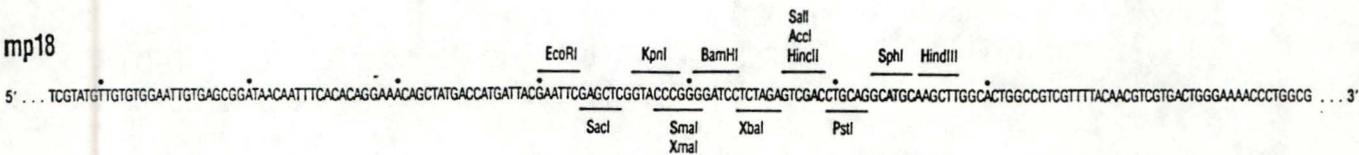


figure 21. Cycle de vie du phage M13.

mp18



mp19

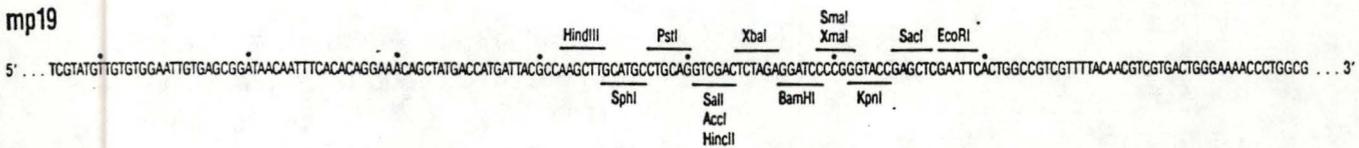


figure 22. Représentation du site multiple de clonage des phages M13mp18 et M13mp19.

### 1.2.4. Phage M13.

M13 est un bacteriophage mâle spécifique. Il infecte l'hôte par le pilif ou pili sexuel auquel il s'absorbe avant de pénétrer dans la cellule.

#### -Cycle de vie. (figure 21).

M13 infecte les bactéries sous la forme de simple brin. En entrant dans la cellule, (21.1.), il perd son manteau protéique. Il utilise la machinerie cellulaire de synthèse d'ADN pour former du double brin à partir du patron simple brin. (21.2.). Sous cette forme replicative, il se multiplie, (21.3.), ou génère du simple brin qui s'entoure d'un manteau de protéines, (21.4.), et sort de l'hôte sans le lyser. (21.5.).

#### -Caractéristiques.

SMC : selon l'orientation de ce SMC, on distingue M13 mp 18 et M13 mp 19. (figure 22).

ORI

Une partie du gene de la galactosidase d'*E. Coli*.

### 1.2.5. Stockage.

Les plasmides et phages sont stockés à -20° C dans du tampon TE .

Les souches, les cellules compétentes, les clones ( transformants ) sont stockés à - 80° C dans du milieu de culture liquide avec 15% de glycérol.

## **1.3. Milieux de culture**

Tous les milieux sont stérilisés avant usage : autoclavés 20 minutes à 120° C.

### 1.3.1. Milieux de culture bactériens.

#### 1.3.1.1. Milieux riches.

##### **a.LB liquide**

composition :	Tryptone	1 %	(oxoid)
	Yeast extract	0,5 %	(oxoid)
	NaCl	0,5 %	(merck)

Les cultures se font en général dans un volume de 10 ml à 37°C soit en universels agités

soit en bubblers c'est-à-dire dans des éprouvettes de 25 ml obturées à leur sommet par de l'ouate et avec une arrivée d'air permettant une meilleure agitation.

Dans les deux cas, une nuit d'incubation permet d'obtenir des cultures en phase stationnaire.

#### **b.LB solide**

De même composition que le LB liquide + 2 % d'agar (oxoid).

Le milieu est autoclavé, complété par les antibiotiques, refroidi à 55°C, coulé en boîte de Pétri et après solidification, séché à 65°C. Les boîtes sont conservées à 4°C.

#### 1.3.1.2. Milieu minimum

Il ne contient que des sels minéraux et une source de carbone. Il est utilisé comme milieu solide sélectif pour la souche TG1.

Il est fait à partir des solutions stériles suivantes :

M9 10X	10% v/v
glucose 20 %	1% v/v ou 15% v/v
Mg SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O 1M	0,1% v/v
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O 0,1M	0,1% v/v
thiamine HCl 0,1M	1% v/v
agar	2% p/v

#### 1.3.1.3. Screening

-Un milieu sélectif comprenant de l'ampicilline à une concentration finale de 100µg/ml.

- Un milieu contenant 0,375 M d'IPTG  
0,00375% de XGal.

XGal est substrat de la β galactosidase donnant un dérivé coloré. Dans ces conditions, les bactéries ayant l'activité galactosidase seront bleues. Les bactéries porteuses de plasmides recombinants c'est-à-dire dont le gène lac Z codant pour la β galactosidase a été disrupté par un insert étranger seront identifiable sur un tel milieu car elles apparaîtront blanches.

Enzymes	Tampons	Temperatures
Hind III	B	37°
EcoR I	H	37°
Xba I	H	37°
Pvu II	M	37°
Hinc II	M	37°

Tableau I

### 1.3.2. Milieux de culture pour levures.

#### 1.3.2.1. Milieu riche

##### **a. YPD liquide**

Composition: Yeast extract	1% (oxoid)
Peptone	2% (merck)
Dextrose	2%

Ce milieu doit être porté à un pH de 4,8 avec de l'HCl 37%.

##### **b. YPD solide :**

de même composition que le liquide + 2% d'agar (oxoid).

#### 1.3.2.2 Milieu minimum

C'est un milieu sélectif pour levures prototrophes.

Sa composition est la suivante :

Yeast nitrogen base w/o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and aa.	0,175% (difco)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5% (merck)
dextrose	2%
agar ( si solide )	2% (oxoid)

#### 1.3.2.3 Milieu synthétique

Il a la même composition que le milieu minimum auquel des a.a. et des bases azotées sont ajoutés .

### 1.3.3. Milieux de transformation de bactéries par des phages.

##### **a. H top**

Milieu ajouté à la transformation avant de la couler sur H plate.

Sa composition est la suivante :

tryptone	1% (oxoid)
NaCl	0,8% (merck)
agar	0,8% (oxoid)

Il est utilisé liquide à une température de 45°C.

##### **b. H plate**

Milieu solide coulé en boîte de pétri dont la composition est :

tryptone	1% (oxoid)
NaCl	0,8% (merck)
agar	1,5% (oxoid)

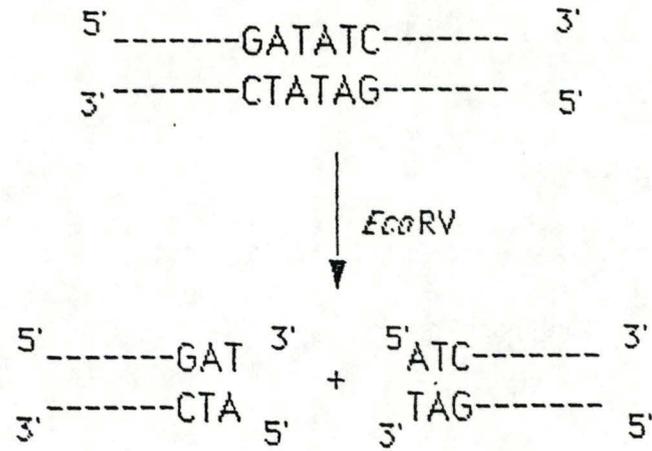


figure 23. Exemple d'enzyme de restriction clivant l'ADN à bouts francs,

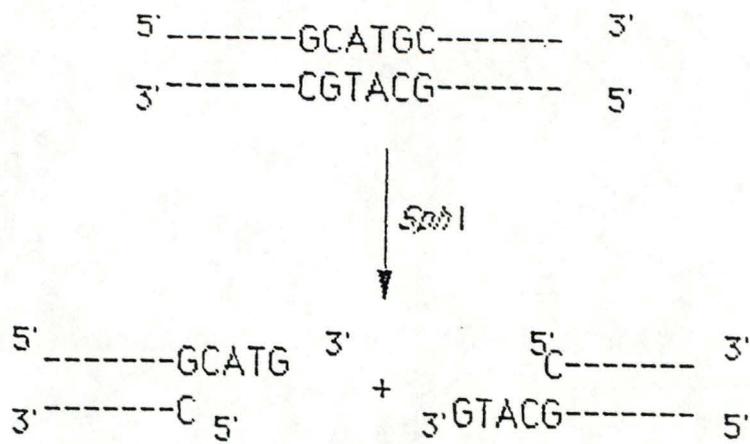


figure 24. Exemple d'enzyme de restriction clivant l'ADN à bout collants 3' protrudants.

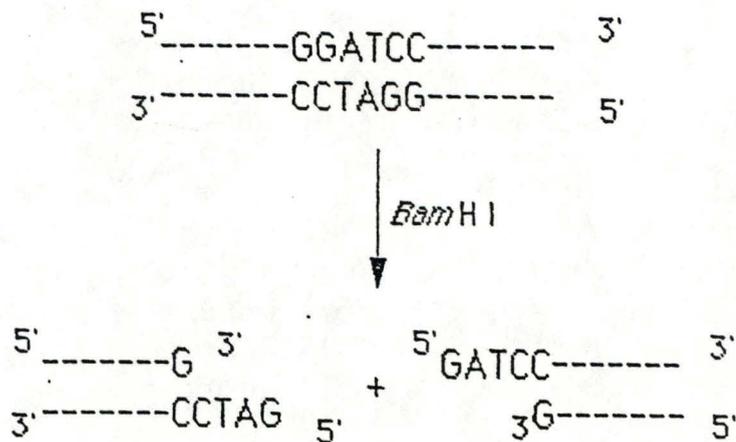


figure 25. Exemple d'enzyme de restriction clivant l'ADN en bouts collants 5' protrudants.

## II. METHODES

### II.1. Clonage d'un gène dans un plasmide ou dans un phage.

#### II.1.1. Réaction de restriction.

Les enzymes de restriction reconnaissent des séquences précises dans l'ADN. Ce sont souvent des sites de clivages palindromiques de 4 à 6 paires de bases.

Il existe deux groupes d'enzymes de restriction :

-Le premier contient des enzymes qui hydrolysent les liens phosphodiester selon l'axe de symétrie et donnent des morceaux d'ADN à bouts francs. (figure 23).

-Le deuxième contient des enzymes qui hydrolysent ces mêmes liens à deux endroits différents dans la séquence et donnent des morceaux d'ADN à bouts collants. (figure 24, 25).

La réaction de restriction s'effectue dans un volume de 20 à 50  $\mu$ l.

ADN à couper : X  $\mu$ g

Tampon : 1/10 du volume total de tampon 10X

Enzyme : une unité par  $\mu$ g

H<sub>2</sub>O : pour atteindre le volume final.

Incuber 2 heures à 37°C.

Arrêter la réaction en plaçant l'éppendorf 10 minutes à 65°C

#### II.1.2. Enzymes utilisées.

Voir tableau I

#### II.1.3. Visualisation des résultats de la restriction sur gel d'agarose.

##### II.1.3.1. Principe.

Dans un champ électrique, une molécule migre vers l'électrode de signe opposé à une vitesse (ou mobilité électrophorétique) qui est fonction du champ électrique et de la charge nette de la molécule. Si un milieu stable, non réactif est utilisé, pour réduire les courants de convection, la mobilité électrophorétique est inversement proportionnelle au coefficient de friction (fonction de la taille et de la forme de la molécule). Par électrophorèse sur gel, on sépare donc les molécules sur la base de leur taille, forme et charge.

Dans une molécule d'ADN, la charge augmente avec la taille car chaque nouveau nucléotide apporte une charge négative au niveau du groupement phosphate. La friction augmente aussi avec la taille.

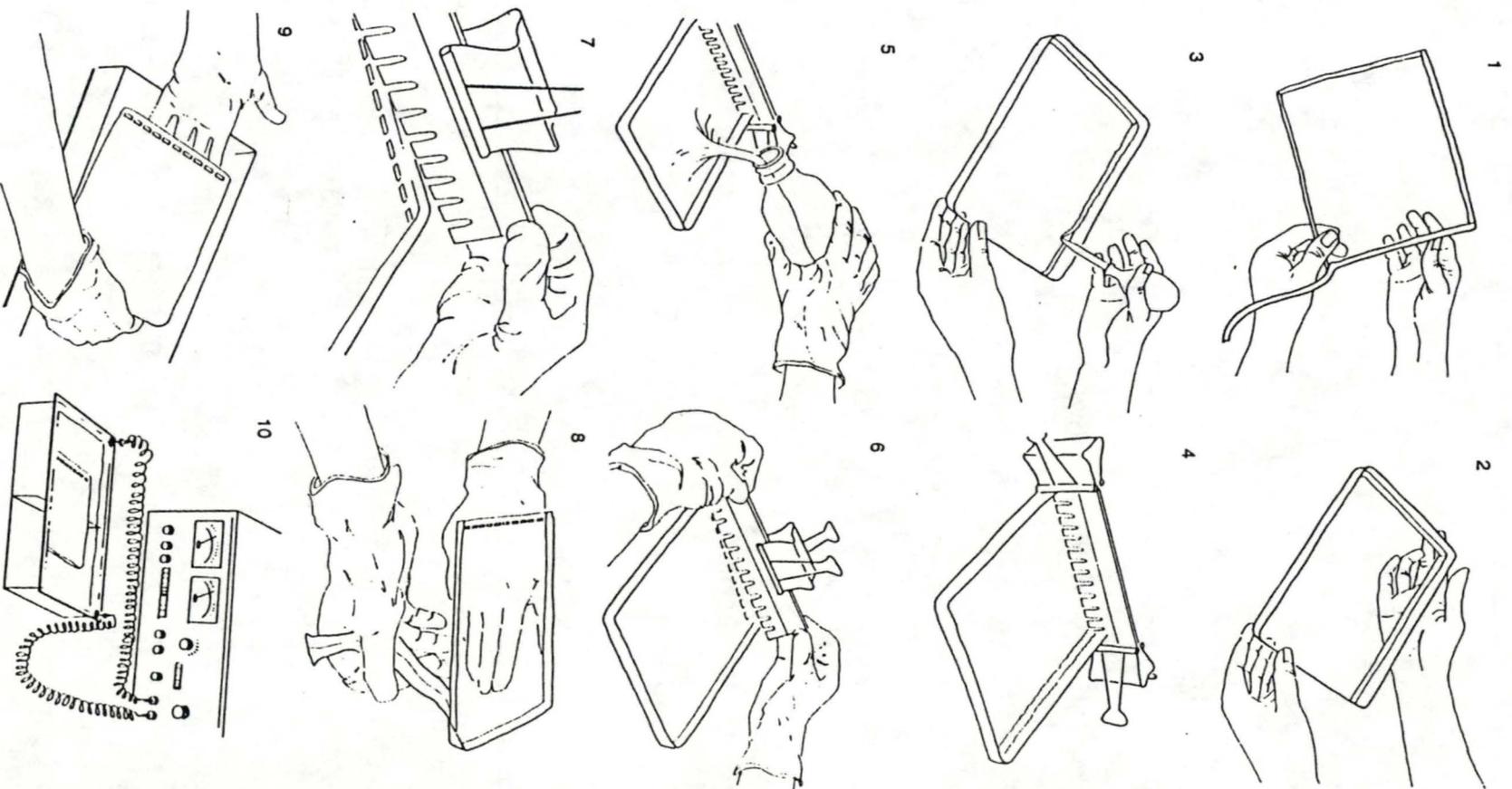


figure 26. Montage du gel d'agarose pour électrophorèse.

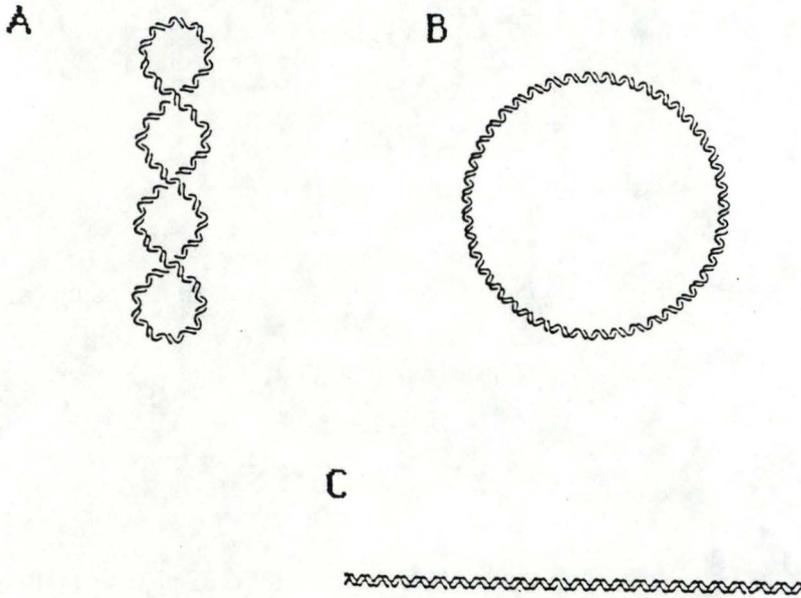


figure 27. Représentation des trois configurations différentes de l' ADN plasmidique:

- A: la forme superenroulée (CCC)
- B: la forme circulaire ouverte (OC)
- C: la forme linéaire (L)

Longueur des fragments de restriction du phage  $\lambda$  digéré par HindIII (en kb)

23.130	≡
9.416	≡
6.557	≡
4.361	
2.322	
2.027	—
0.564*	
0.125*	

figure 28. Marqueur de taille obtenu par restriction HindIII du phage  $\lambda$ .

\*: rarement ou jamais visible.

Longueurs des fragments de restriction du plasmide pBR322 digéré par HinfI.

1632	
517	
506	—
396	
344	
296	—
224	≡
220	≡
154	≡
75*	

figure 29. Marqueur de taille obtenu par restriction HinfI du plasmide pBR322.

\*: rarement ou jamais visible.

### II.1.3.2. En pratique.

-Couler la solution d'agarose dans une plaque à électrophorèse (format 75 X 105 mm ou 52 X 75 mm) à l'extrémité de laquelle on a placé un peigne pour former des puits. (figure 26).

-Ajouter aux échantillons une solution de bleu de bromophénol-sucrose. Le sucrose est un alourdisseur qui entraîne l'échantillon au fond du puit et le bleu permet de suivre leur migration.

-Déposer les échantillons dans les puits.

-Immerger le gel dans un bac électrophorétique contenant du tampon TBE.

-Faire migrer pendant plus ou moins 2 heures à 70-120 volts.

Les bandes ADN sont détectées par l'ajout de bromure d'éthidium soit dans le gel soit dans la cuve à électrophorèse à une concentration de 1µg/ml. Le complexe ADN-BrEth. a une fluorescence stimulée par illumination sous UV (254 nm).

### II.1.3.3. Estimation de la taille des fragments sur gel.

-Les plasmides non restreints existent sous 3 formes différentes:

- CCC : covalently closed circular.
- Linear : plasmide linéaire.
- OCC : open closed circular.(figure 27).

Chacun de ces trois états donnent une bande migrant à une distance propre principalement fonction de sa forme.

Lorsque les plasmides ou l'ADN ont été restreints, on utilise un standard pour évaluer la taille des morceaux obtenus.

Sur gel 0,8% qui permet de visualiser des fragments de 2 à 20 Kb, le standard habituel est le phage λ restreint par Hind III. (figure 28).

Sur gels 1,5% et 2% qui permettent de visualiser des fragments de 150 à 2000 paires de base, le standard habituel est le pBR 322 restreint par Hinf I. (figure 29).

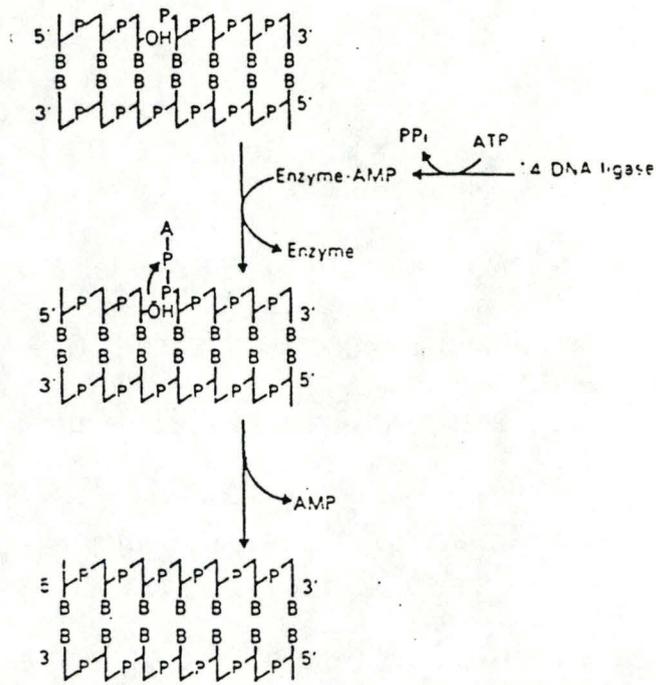
L'ADN de référence est mis à migrer parallèlement aux échantillons de taille inconnue. Les distances de migration sont mesurées et reportées dans un graphe en fonction du logarithme de taille. Les tailles des fragments sont estimées à partir de cet abaque.

#### II.1.4. Purification des fragments d'ADN.

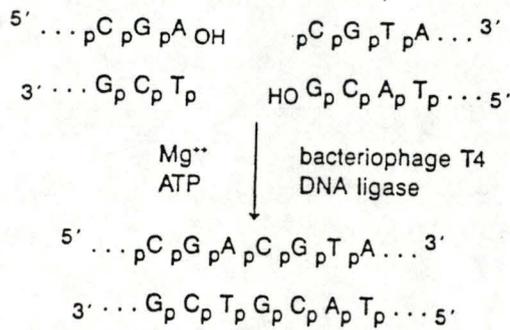
Toutes les constructions génétiques ont été réalisées à partir de fragments d'ADN purifiés. La technique utilisée est celle de la récupération sur papier Whatman DE 81.

- Découper des papiers Whatman DE 81 de la taille des puits.
- Les incuber au moins 3 heures dans du NaCl 2,5 M. Ils peuvent être stokés ensuite dans de l'EDTA 1 mM. Avant de les employer, les rincer à l'eau et les placer dans du tampon TBE de même dilution que le gel.
- Sous UV, inciser le gel au-dessus et en dessous de la bande à récupérer puis placer un morceau de papier Whatman dans chaque incision.
- Tirer le gel à 100 volts pendant 10 à 15 minutes jusqu'à ce que la bande s'adsorbe sur le papier.
- Enlever le papier avec la bande désirée du gel, le laver à l'eau froide, le sécher entre 2 filtres et le mettre dans un eppendorf contenant 400  $\mu$ l de "high salt buffer"
- Incuber les eppendorfs 2 heures à 37°C et agiter régulièrement.
- Trouer le fond de l'eppendorf avec une aiguille, le placer sur un autre eppendorf et centrifuger 2 à 3 minutes pour récupérer la phase aqueuse.
- Extraction du BrEth. avec du N butanol saturé en H<sub>2</sub>O.
  - Ajouter 2 x 2 volumes de butanol saturé en eau à la solution d'ADN
  - Centrifuger 5 minutes.
  - Decanter le butanol.
- Précipitation de l'ADN:
  - ajouter 2,5 volumes d'éthanol 100%.
  - incuber 10 minutes à -70°C
  - centrifuger 20 minutes 4°C
  - décarter le surnageant
  - ajouter 350  $\mu$ l d'éthanol 70 %
  - centrifuger 10 minutes à 4°C
  - décarter le surnageant
  - sécher

A



B



C

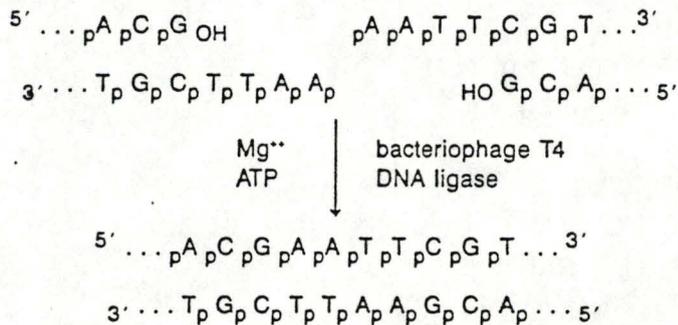


figure 30. A: action générale de la T4 DNA ligase: le complexe ligase AMP groupement phosphate. L'attaque par le 3'-OH génère un lien phosphodiester reliant les deux morceaux du brin.  
 B: exemple de ligation de fragments à bouts collants.  
 C: exemple de ligation de fragments à bouts francs.

- Le resuspendre dans 12  $\mu$ l de tampon TE:
  - 2  $\mu$ l sont mis sur gel pour quantifier la récupération
  - 10  $\mu$ l serviront pour la ligation

#### II.1.5. Réaction de ligation.

La construction de molécules d'ADN recombinantes nécessite de lier de manière covalente les extrémités d'ADN mono. ou bicaténaire. Cette réaction est catalysée en présence de l'enzyme ligase qui catalyse la formation du lien phosphodiester entre l'extrémité 3' OH et 5' phosphate de 2 nucléotides adjacents. (figure 30).

La réaction de ligation se fait dans un volume final de 25 $\mu$ l avec 1  $\mu$ g total d'ADN à liger.

- 10  $\mu$ l d'ADN étranger : soit X ng
- 10  $\mu$ l d'ADN plasmidique linéaire: soit ( 1000 ng-Xng)
- 2,5 $\mu$ l de tampon de ligation
- 1 unité de ligase
- H<sub>2</sub>O stérile pour compléter à 25  $\mu$ l

Incuber 10 heures à 4°C ou 1 heure sur table et 1 heure à 37°C

#### II.1.6. La transformation.

Lors de cette étape du clonage le plasmide ou le phage, est introduit dans un microorganisme tel que *E. Coli* ou une levure. Avant la transformation proprement dite, les microorganismes sont rendus compétents, c'est à dire capables de recevoir de l'ADN étranger.

##### II.1.6.1. Bactéries

###### **a. Préparation de bactéries compétentes**

- Ensemencer un universel contenant 10 ml de LB avec une colonie de la souche XL1blue et placer cette préculture à 37°C pendant 12 heures.
- Ensemencer une fiole de Wiame contenant 100 ml de LB avec 1 ml de la préculture .
- Incuber sous agitation à 37°C pour que la croissance se poursuive jusqu' à une DO de 0,3.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm ( rotor GSA Sorvall).  
Décanter le surnageant.  
Resuspendre le culot dans 1/2 volume de CaCl<sub>2</sub> 50 mM.

- Incuber 20 minutes dans la glace.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm ( rotor GSA Sorvall).  
Décantier le surnageant.  
Resuspendre le culot dans 1/10 de volume ( ici 10 ml ) de  
CaCl<sub>2</sub>50mM-glycerol 15%.

Les cellules rendues ainsi compétentes sont utilisées directement ou stockées à - 70°C.

#### **b.Transformation par un plasmide:**

- Ajouter 200 ul de cellules compétentes à 1 à 10 ng d'ADN étranger.  
Incuber 45 minutes dans la glace.  
Incuber 2 minutes à 42°C (choc thermique).
- Ajouter 1 ml de LB.  
Incuber 30 à 60 minutes à 37°C.
- Etaler différents volumes de la transformation (habituellement 100, 200 et 400 ul) sur un milieu solide de sélectif approprié.
- Incuber 12 heures à 37°C.

#### **c.Transformation par le phage M13.**

- Dans un graner, ajouter 300 ul de bactéries compétentes , ( souche TG1) à 200 ng de phage M13 .  
Incuber 40 minutes dans la glace.  
Incuber 45 secondes à 42°C ( choc thermique).  
Incuber 5 minutes dans la glace.
- Ajouter : 40 µl d'IPTG 100 mM.  
40 µl de XGal 2% .  
200 µl de bactéries non compétentes (souche TG1).  
3 ml de H top liquide à une température de 45°C.
- Couler immédiatement le mélange de transformation sur H plate .
- Incuber une nuit à 37°C.

### 11.1.6.2. Levures

#### **a. Préparation de levures compétentes:**

- Inoculer 10 ml d'YPD liquide avec une colonie de levures. (il faut 10ml de culture par transformation)  
Incuber à 30°C jusqu'à une DO de 1 à 600 nm.
- Centrifuger 10 minutes à 6000 rpm à 20°C ( rotor SS34 Sorvall).  
Décanter le surnageant.  
Resuspendre le culot dans 2,5 ml d'H<sub>2</sub>O stérile.
- Centrifuger 10 minutes à 6000 rpm à 20°C ( rotor SS34 Sorvall)  
Décanter le surnageant.  
Resuspendre le culot dans 1 ml de solution TE LiOAc et le mettre dans un eppendorf.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 20°C ( Janetsky ).  
Décanter le surnageant.  
Resuspendre le culot dans 100 µl de solution TE LiOAc.  
Incuber 1 heures à 37°C.

#### **b. La transformation proprement dite.**

- Ajouter aux levures compétentes:  
32 mg d'ADN carrier (ADN de thymus de veau).  
1 à 10 mg d'ADN étranger.  
Incuber 30 minutes à 30°C .
- Ajouter 700 µl de solution de TE LiOAC PEG.  
Incuber 1 heures à 30°C .  
Incuber 5 minutes à 42°C.
- Centrifuger 1 minutes à 13000 rpm à 20°C ( janetsky).  
Décanter le surnageant.  
Resuspendre les levures dans 200 µl d'H<sub>2</sub>O stérile.
- Etaler les 200 µl du mélange de ligation sur une boîte de pétri contenant un milieu sélectif ( ici milieu sans leucine ).

### 11.1.7. Extraction rapide de plasmides ou de phages chez *E. Coli*

Cette étape finale du clonage permet de vérifier par restriction si celui-ci est correct et d'utiliser ces plasmides ou phages pour de nouvelles constructions.

Les plasmides ou les phages purifiés sont obtenus à partir d'une culture de 10 ml par une méthode d'extraction rapide ( mini-préparation ).

La préparation de plus grande quantité nécessite des cultures de 100ml à 1l (midi et maxi-préparation).

#### II.1.7.1. Mini préparation d'ADN plasmidique.

- Inoculer un universel contenant 10 ml de LB et 100 µg /ml d'ampicilline avec une colonie de transformants.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation..
- Centrifuger 1,5 ml de culture pendant 5 minutes à 13000 à température ambiante.  
Décanter le surnageant.  
Resuspendre le culot dans 300 µl de tampon P1.
- Ajouter 300 µl de tampon P2.  
Mélanger doucement.  
Incuber 5 minutes sur table.
- Ajouter 300 µl de tampon P3.  
Mélanger doucement.  
Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm à 4°C
- Récupérer le surnageant contenant l'ADN plasmidique.
- Ajouter 0,8 volume d'isopropanol à la solution d'ADN plasmidique.  
Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm à température ambiante.  
Laver le surnageant avec de l'éthanol 70%.  
Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C.  
Décanter le surnageant.  
Sécher le culot sous vide.
- Resuspendre l'ADN dans 10 à 50 µl de tampon TE.

#### II.1.7.2. Midi préparation d'ADN plasmidique.

- Inoculer 100 ml de LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline avec une colonie
- Incuber 12 heures à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 30 minutes à 9000 rpm à température ambiante (rotor GSA Sorvall)  
Décanter le surnageant.  
Resuspendre le culot dans 4 ml de tampon P1.
- Mettre la solution dans un corex de 30 ml.

- Ajouter 4 ml de tampon P2.  
Mélanger délicatement.  
Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de tampon P3.  
Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm à 4°C (rotor SS34 Sorvall).  
Récupérer le surnageant
- Déposer le surnageant au sommet d'une colonne Qiagen (Stratagene) pré-équilibrée avec 2 ml de tampon QB à température ambiante.  
Laver la colonne avec 2 X 4 ml de tampon QC à température ambiante.  
Eluer l'ADN avec 2 ml de tampon QF à température ambiante et récupérer l'élution dans un corex de 15 ml.
- Ajouter 0,8 volume d'isopropanol.  
Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm à température ambiante ( rotor SS34 Sorvall).  
Décantier le surnageant.  
Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70%.  
Décantier le surnageant.  
Sécher le culot sous vide.  
Resuspendre l'ADN dans 100 à 1000 ul de tampon TE.

#### II.1.8. Extraction rapide de plasmides à partir de levure.

- Racler avec une anse de platine 4 à 5 colonies de levures et les placer dans un eppendorff.
- Les resuspendre dans 300µl de sucrose 25%  
de Tris 0,05M pH7,5  
Ajouter 12 µl de NaCl 5M  
Ajouter des billes de verre ( diamètre 320 nm).
- Vortexer 5 minutes.
- Ajouter rapidement 300 µl phénol équilibré avec du TE.  
Vortexer 3 minutes.  
Centrifuger 3 minutes.
- Extraire la phase aqueuse.
- Extraire le phénol avec de l'éther saturé en eau.
- Evaporer l'éther à 65°C.
- Précipiter à l'éthanol absolu (voir page ).

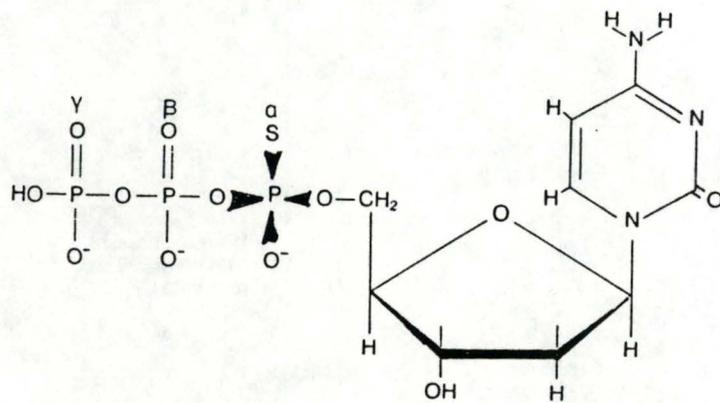


figure 31. Représentation d'un thionucléotide. Cet analogue de nucléotide contient un atome de soufre à la place de celui d'oxygène sur le phosphore  $\alpha$ . Il est incorporé normalement et n'est pas mutagène.

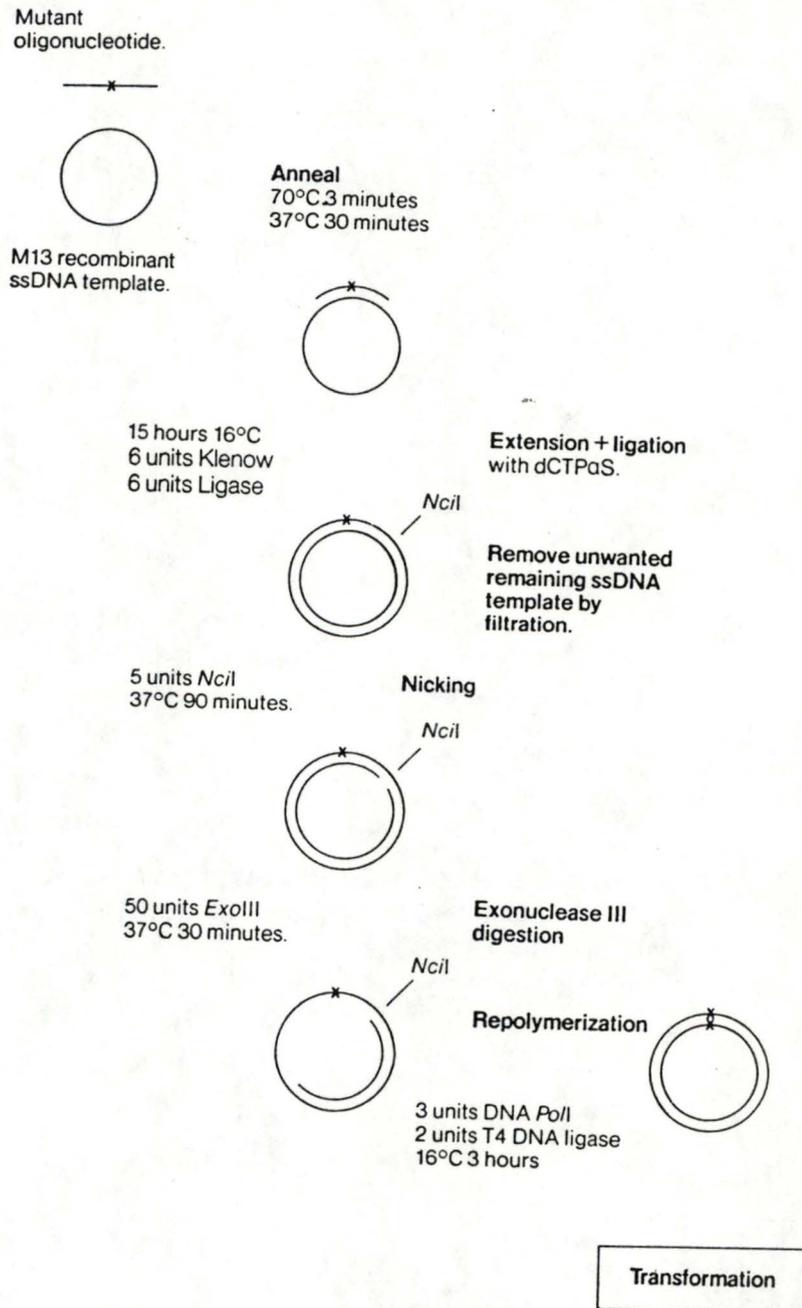


figure 32. Etapes de la mutagenèse dirigée.

- A: hybridation de l'oligonucléotide sur le phage M13 simple brin.  
 B: formation d'un mutant hétéroduplex.  
 C: clivage du brin non mutant par l'enzyme *NciI*.  
 D: digestion du brin non mutant par l'exonuclease III.  
 E: Formation d'une molécule bicaténaire mutante homoduplex.

- Sécher et resuspendre dans 200µl de TE.
- Précipiter une deuxième fois à l'éthanol.
- Resuspendre dans 50 µl de TE.
- Transformer *E. coli* avec 1, 5, 10 et 20 µl de l'ADN plasmidique ainsi obtenu.

## II.2 Mutagenèse dirigée.

Le kit de mutagenèse utilisé a la référence suivante:RPN 1523 et est commercialisé par la firme Amersham.

### II.2.1 Le principe.

L'oligonucléotide mutagénéisant est hybridé au M13 simple brin et étendu par la polymérase Klenow en présence de la T4 DNA ligase pour générer un mutant hétéroduplex. Le brin non mutant sera digéré de manière sélective, le brin mutant étant protégé contre la digestion par l'incorporation d'un thionucléotide, (figure 31), dans sa séquence. En effet, certaines enzymes de restriction telles que Ava I, Ava II, Nci I, ... ne peuvent cliver de l'ADN contenant des thionuclétides. Le brin non mutant est coupé par l'enzyme Nci I et digérée par l'exonucléase III. Le brin mutant est alors utilisé comme patron pour refaire une molécule circulaire double brin mutante homoduplex.

Ces étapes sont résumées à la figure 32.

### II.2.2 Maxi préparation de phage M13 double brin.

- Inoculer 10 ml de LB avec une colonie de *E. Coli* TG1.
- Incuber une 12 heures à 37°C.
- Faire une préculture de M13: 20 ml de LB.
  - + 1 ml de la culture de nuit de *E. Coli* TG1.
  - + 1 cure dent piqué dans une plaque de lyse de M13 obtenue par transformation.

Incuber 5 heures à 37°C.

- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm à température ambiante.  
Récupérer le surnageant.  
Inoculer 250 ml de LB avec le surnageant récupéré et 2,5 ml de la culture de nuit de *E. Coli* TG1.

- Incuber 5 heures à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de la culture pendant 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante ( rotor GSA Sorvall).  
Décanter le surnageant.
  - Resuspendre le culot dans 10 ml de tampon P1.  
Mettre la solution dans un corex de 30 ml.  
Incuber 10 minutes dans la glace.
  - Ajouter 10 ml de tampon P2.  
Mélanger délicatement.  
Incuber 10 minutes sur glace.
  - Ajouter 7,5 ml de tampon P3.  
Mélanger délicatement.  
Incuber 10 minutes dans la glace.  
Centrifuger 15 minutes à 18000 rpm à 4°C ( rotor SS34 Sorvall).  
Récupérer le surnageant.
  - Ajouter 0,8 volume d'isopropanol pour précipiter l'ADN.  
Incuber 15 minutes sur table.  
Centrifuger 30 minutes à 9000 rpm à température ambiante ( rotor SS34 Sorvall).  
Décanter le surnageant.  
Laver le culot avec de l'éthanol 70%.  
Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C.  
Décanter le surnageant.  
Sécher le culot sous vide.
  - Resuspendre dans 5 ml de tampon TE.
  - Préparer un gradient de chlorure de césium:  
ajouter: 13,7 g de CsCl.  
          0,7 ml de BrEth (conc.: 2 mg/ml).
  - Porter à un volume de 13,7 ml avec du tampon TE .  
Mettre la solution dans des tubes de Polyallomerde 18,5 ml.  
Centrifuger 20 heures à 45000 rpm à 4°C (rotor TI 60 Beckman).
  - Après centrifugation l'ADN se répartit dans le gradient de CsCl sous 2 bandes:la bande supérieure étant l'ADN chromosomique et l'inférieure, l'ADN plasmidique.
  - Tronquer l'extrémité du tube avec un scalpel.

- Récupérer sous UV la bande d'ADN plasmidique à l'aide d'une pipette pasteur dont l'extrémité est noircie à la flamme.  
Mettre la solution dans un greiner.
- Extraire le BrEth. avec de l'alcool isoamylique :  
Ajouter un volume égal d'alcool isoamylique.  
Vortexer.  
Décanter l'alcool isoamylique.
- Répéter l'opération trois fois.
- Dialyser la phase aqueuse.
- Extraire les protéines extraites au phénol.
- Redialyser.

### II.2.3. Préparation de M13 simple brin.

#### II.2.3.1. Mini-préparation.

- Culture de M13 .  
Dans un universel, ajouter  
5 ml de LB  
50 µl de cellules TG1 provenant d'une culture de nuit  
un cure-dents pique dans une plaque de lyse obtenue par  
transformation de cellules TG1 par M13.
- Incuber 5 heures à 37°C dans un bain agitant.
- Centrifuger 1,5 ml de culture pendant 5 minutes à 13000 rpm.
- Le culot cellulaire contient M13 double brin et le surnageant  
contient M13 simple brin.
- Récupérer le surnageant.
- Ajouter 200µl de solution PEG-NaCl.  
Vortexer.  
Incuber 15 à 30 minutes à 4°C.  
Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm.  
Décanter le surnageant.  
Centrifuger 2 minutes à 13000 rpm.  
Enlever toute trace de la solution PEG-NaCl.

Le culot de phage est alors visible

- Ajouter au culot : 100µl de tampon TE.  
100 µl de phénol équilibré avec du TE.  
Incuber 15 minutes à température ambiante.  
Vortexer.  
Centrifuger 3 minutes à 13000 rpm.  
Récupérer la phase aqueuse.
- Précipiter l'ADN à l'éthanol absolu :  
Ajouter 10 µl de Nacides aminés 3M  
250 µl d'éthanol 100%  
Incuber 10 minutes à -70°C  
Centrifuger 20 minutes à 4°C  
Décanter le surnageant.  
Laver à l'éthanol 70%.  
Décanter le surnageant.  
Sècher sous vide.
- Resuspendre l'ADN dans 10 à 50 µl de tampon TE.  
Stocker à -20°C.

#### II.2.3.2. Maxi-préparation de M13 simple brin.

- Préculture de M13 :  
Dans un universel, ajouter :  
5 ml de LB  
50 µl de cellules TG1 provenant d'une culture de nuit  
un cure-dents piqué dans une plaque de lyse obtenue par  
transformation de cellules TG1 par M13.
- Incuber 5 heures dans un bain agitant à 37°C.
- Inoculer 100 ml de LB avec 1 ml de culture de nuit de cellules TG1  
jusqu'à atteindre une DO = 0,3 à 540 nm.
- Mettre 1,5 ml de la préculture de M13 dans un eppendorf.  
Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm.  
Récupérer le surnageant.
- Infecter la culture de 100ml avec le surnageant de M13.
- Incuber 4 heures à 37°C sous agitation.
- Centrifuger la culture une demi-heure à 4°C à 5000 rpm ( rotor GSA  
Sorvall)  
Récupérer le surnageant.  
Ajouter 1/5 de volume de PEG-NaCl.  
Précipiter 1 heure à 4°C.

- Centrifuger 20 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor GSA Sorvall).  
Décanter le surnageant.  
Centrifuger 5 minutes dans les mêmes conditions.  
Enlever toute trace de la solution PEG-NaCl.
- Resuspendre le culot dans 250 µl de tampon TE.  
Placer dans un eppendorf.  
Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm.  
Récupérer le surnageant.
- Ajouter 100 µl de la solution de PEG-NaCl.
- Incuber 15 minutes à température ambiante ou une 12 heures à 4°C.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm.  
Enlever le surnageant.  
Centrifuger 2 minutes à 13000 rpm.  
Enlever les traces de la solution de PEG-NaCl.
- Resuspendre le culot dans 500 µl de tampon TE.
- Purification du simple brin :  
Ajouter 200 µl de phénol équilibré avec du TE.  
Vortexer 15 à 20 secondes.  
Incuber 15 minutes sur table.  
Vortexer 15 à 20 secondes.  
Centrifuger 3 minutes.  
Récupérer la phase aqueuse.  
  
Répéter l'opération 2 fois.  
  
Ajouter 500 µl de diéthylether.  
Vortexer 15 secondes.  
Centrifuger 2 à 3 minutes.  
Décanter l'éther.
- Précipiter l'ADN à l'éthanol absolu ( voir page 28).
- Resuspendre dans 50 µl de tampon TE.
- Mesurer la DO à 260 nm : 1 DO/ml = 40 µg/ml

Figure 3 — Capping.

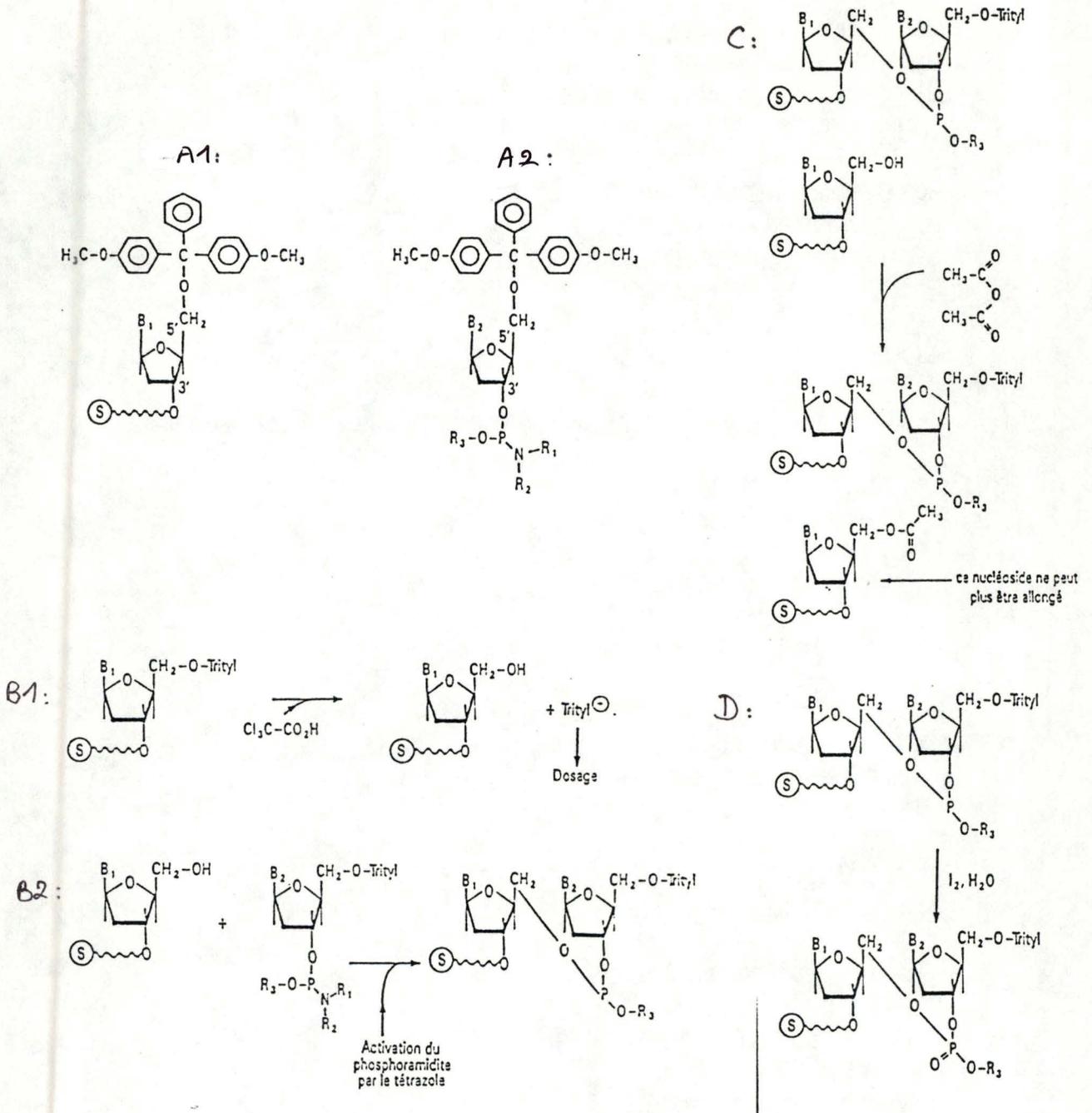


figure 33. Synthèse de l'oligonucléotide.

- Les matières premières nécessaires
  - représentation du 5' diméthoxytritylnucléoside attaché à la colonne par l'hydroxyle en 3'
  - représentation des dérivés diméthoxytritylés en 5' et dont l'hydroxyle en possède un groupement phosphoramidite.
- Détritylation et addition
  - le nucléoside attaché au support est détritylé par addition d'acide trichloroacétique. La fonction hydroxyle en 5', ainsi déprotégée, redevient suffisamment nucléophile pour réagir avec le groupement phosphoramidite du deuxième nucléotide
  - activation du groupement phosphoramidite du deuxième nucléotide par le tétrazole qui protonne l'atome d'azote. L'atome de phosphore, rendu plus électropositif, réagit avec l'hydroxyle en 5' du nucléoside fixé sur le support.
- Coiffage
 

hydroxylation en 5' des nucléosides attachés au support qui n'aurait pas réagi pour les rendre inactifs.
- Oxydation
 

la liaison covalente de type phosphite reliant les deux nucléotides est oxydée en une liaison de

#### II.2.4. Synthèse de l'oligonucléotide mutant.

Il peut contenir des nucléotides en plus, en moins, ou différent par rapport à la séquence non mutante.

##### II.2.4.1. Le principe.

La méthode de synthèse d'oligonucléotides utilisée est celle des phosphoramidites. Les réactions se déroulent en phase solide : l'oligonucléotide est synthétisé traditionnellement sur un support de billes de verre à porosité contrôlée. Le premier nucléotide de la séquence à synthétiser ne pouvant être que un A, C, G ou T, les supports sont disponibles couplés à un de ces quatre nucléotides. L'élongation de la séquence se fait dans le sens 3'-5' grâce à des réactifs de couplage. Un cycle de synthèse, c'est-à-dire de couplage entre 2 nucléotides comprend les 4 étapes suivantes :

- Détritylation.
- Addition.
- Capping
- Oxydation.

explicitées à la figure 33.

##### II.2.4.2. En pratique.

Le synthétiseur utilisé est un "DNA Synthetisor 381 A Applied Biosystem".

Pendant la synthèse de l'oligonucléotide, un collecteur de fraction adjoint au synthétiseur permet de recueillir les solutions contenant les trityls de chaque nucléotide.

##### II.2.4.3. Récupération de l'oligonucléotide après synthèse.

- Enlever la colonne du synthétiseur.
- La démonter et placer les billes de verre dans un eppendorf.
- Ajouter 500  $\mu$ l de  $\text{NH}_4\text{OH}$  32 % pour décrocher l'oligonucléotide de la colonne.
- Incuber 2 heures sur table.
- Décantier le surnageant.
- Le placer dans une bouteille fermée hermétiquement.  
Incuber 8 à 15 heures à 55°C.

- Prélever 150  $\mu$ l de la solution incubée.  
Sécher sous vide.
- Resuspendre le culot dans 300  $\mu$ l d'eau.
- Précipiter 290  $\mu$ l à l'éthanol absolu ( voir page ).
- Mesurer la quantité d'oligonucléotide à 260 et à 280 nm partir des  
10  $\mu$ l restants :
- Resuspendre les 290  $\mu$ l précipités dans 150  $\mu$ l d'eau.
- Prélever 5 $\mu$ l pour mesurer la DO à 260 et à 280 nm
- Conserver l'oligonucléotide à -20°C.

## II.2.5. Réaction de mutagenèse.

### II.2.5.1. Phosphorylation 5' de l'oligonucléotide.

- Dans un eppendorf mettre: 2,5  $\mu$ l d'oligonucléotide (conc = 0,185 $\mu$ g/ $\mu$ l).  
3  $\mu$ l de tampon kinase 10 fois  
25  $\mu$ l d'eau  
2 unités de T4 polynucléotide kinase.
- Mélanger doucement.
- Incuber 15 minutes à 37°C  
10 minutes à 70°C
- Utiliser immédiatement ou stocker à -20°C.

### II.2.5.2. Mutagenèse proprement dite

#### **a.Lien de l'oligonucléotide mutant à la matrice d'ADN simple brin.**

- Mettre dans un eppendorf :  
5  $\mu$ l d'ADN simple brin matrice (conc = 1 $\mu$ g/ $\mu$ l).  
2,5  $\mu$ l d'oligonucléotide mutant phosphorylé ( conc = 1,6pmoles/ $\mu$ l).  
3,5  $\mu$ l de tampon 1  
6  $\mu$ l d'eau.  
-----  
17  $\mu$ l
- Incuber 3 minutes à 70°C.  
30 minutes à 37°C.

-Mettre sur glace.

**b.Synthèse et ligation du brin mutant.**

-A la réaction précédente ajouter :

5  $\mu$ l de  $MgCl_2$

19  $\mu$ l de nucléotide mix 1.

6  $\mu$ l d'eau

6 unités du fragment Klenow

6 unités de T4 DNA ligase.

-Incuber 15 heures à 16°C.

-Prélever 1  $\mu$ l de la solution pour mettre sur gel d'agarose.

**c.Elimination du simple brin non mutant par filtration.**

Le filtre de nitrocellulose retient le simple brin non mutant et laisse passer le double brin hétéroduplex.

-A la réaction précédente, ajouter :

170  $\mu$ l d'eau

30  $\mu$ l de NaCl 5M

-Mélanger.

-Placer la solution au sommet d'un tube contenant un filtre de nitrocellulose.

-Centrifuger 10 minutes à 1500 rpm à température ambiante ( rotor HB4 Sorvall).

-Ajouter 100  $\mu$ l de NaCl 500mM au sommet du tube.

-Centrifuger 10 minutes dans les mêmes conditions.

-Récupérer le filtrat.

-Précipiter le filtrat :ajouter 28  $\mu$ l de Nacides aminésc 3M.

700  $\mu$ l d'éthanol 100%

incuber 10 minutes à -70°C

centrifuger 20 minutes à 4°C

décanté le surnageant

sécher sous vide

resuspendre dans 25  $\mu$ l de tampon 2.

**d.Coupure par Nci I du brin d'ADN non mutant.**

- Ajouter à 10 µl de l'échantillon filtré :
  - 65 µl de tampon 3
  - 5 unités d'enzyme Nci I
- Incuber 90 minutes à 37°C.
- Prélever 10 µl pour mettre sur gel d'agarose.

**e.Digestion du brin non mutant par l'exonucléase III.**

- A la réaction précédente ajouter :
  - 12 µl de NaCl 500mM
  - 10 µl de tampon 4
  - 2 µl d'exonucléase III.
- Incuber 30 minutes à 37°C  
15 minutes à 70°C.
- Prélever 10 µl pour mettre sur gel d'agarose.

**f.Repolymérisation et ligation d'ADN coupé.**

- A la réaction précédente, ajouter :
  - 13 µl de nucléotide mix 2
  - 5 µl de MgCl<sub>2</sub>
  - 3 unités de DNA polymerase I
  - 2 unités de T4 DNA ligase
- Incuber 3 heures à 16°C.
- Prélever 15 µl pour mettre sur gel d'agarose.

**g.Transformation.**

Voir page: 30

**II.2.6. Le séquençage.**

Le kit utilisé est le "T7 sequencing <sup>tm</sup> Kit" 27-1682-01 commercialisé par la firme Pharmacia.

**II.2.6.1. Le principe.**

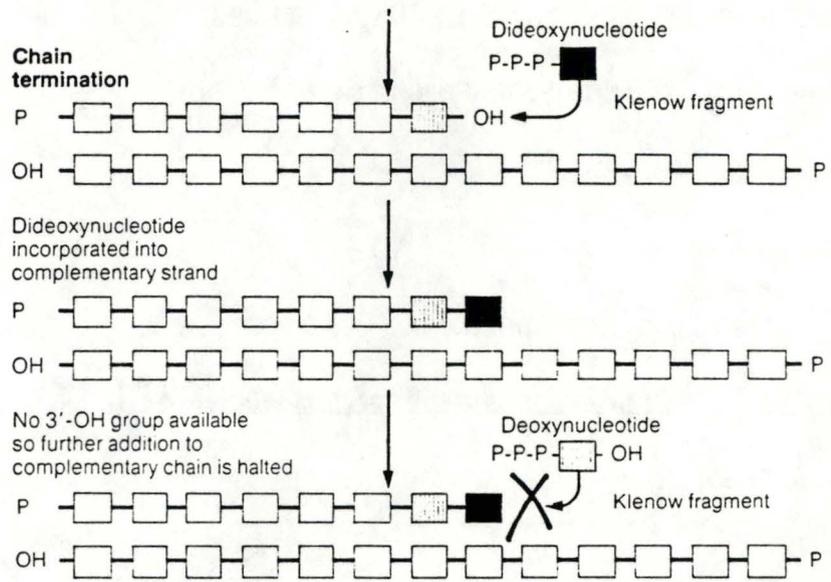


figure 34. Arrêt de la synthèse d'ADN par incorporation d'un dideoxynucléotide.

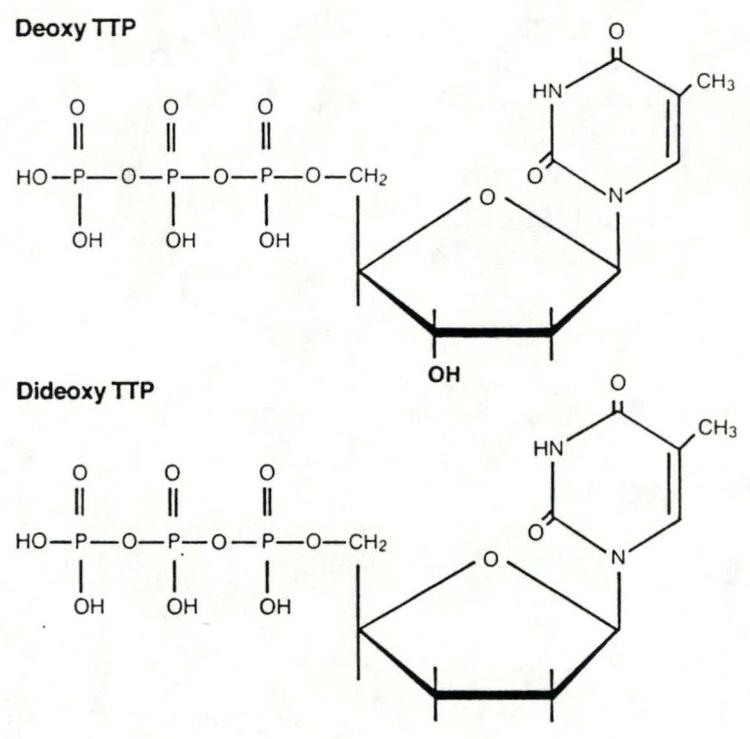


figure 35. Représentation d'un deoxynucléotide possédant un groupement 3' hydroxyle et d'un dideoxynucléotide ne possédant pas de groupement 3' hydroxyle.

La méthode de séquençage utilisée est celle de Sanger. L'ADN à séquencer est sous cloner dans un vecteur simple brin, en l'occurrence le phage M13, dans le SMC. Le recombinant obtenu est hybridé à un oligonucléotide ( primer ) qui sert d'amorce pour la synthèse du second brin par la DNA polymérase. Cette synthèse du second brin est effectuée en présence des 4 désoxyribonucléotides dont au moins un est radioactif. Nous employons l'ATP marqué au  $^{35}\text{S}$ .

Le principe de cette technique consiste à arrêter la synthèse par l'incorporation dans la séquence d'un didésoxyribonucléotide, (figure 34). Cet analogue de nucléotide ne possède pas de groupement hydroxyle 3', nécessaire à l'élongation (figure 35). Lorsque un mélange approprié des 4 désoxyribonucléotides et d'un des 4 didésoxyribonucléotides est utilisé, la polymérisation donne une population de fragments double brin arrêtés aux différents sites d'incorporation du didésoxyribonucléotides. On réalise donc 4 réactions différentes : une pour chaque didésoxyribonucléotides (figure 36).

Après migration sur gel SDS PAGE 2,5% et autoradiographie, on peut lire la séquence.

#### 11.2.6.2 La réaction de séquençage.

Elle se déroule en 3 étapes.

##### **a.L'hybridation de l'amorce synthétique d'ADN.**

- Dans un eppendorf mettre
- 2  $\mu\text{l}$  d'amorce synthétique d'ADN
- 10  $\mu\text{l}$  du recombinant M13 simple brin (conc: 0,2 $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$ )
- 2  $\mu\text{l}$  de tampon d'hybridation
- 
- 14  $\mu\text{l}$ .

- Incuber 10 minutes à 65°C.
- 10 minutes sur table.

-Dans des eppendorfs de couleur différentes mettre les di-désoxyribonucléotides correspondants:

Incuber ces eppendorfs à 37°C.

##### **b.Réaction de marquage**

- A la solution d'hybridation ajouter:
- 2  $\mu\text{l}$  de T7 polymérase (conc: 1,5 unités /  $\mu\text{l}$ )
- 3  $\mu\text{l}$  de labelling mix (dCTP,dGTP,DTTP)
- 1  $\mu\text{l}$  de  $\alpha^{35}\text{S}$  dATPaS (= 10  $\mu\text{Ci}$ )

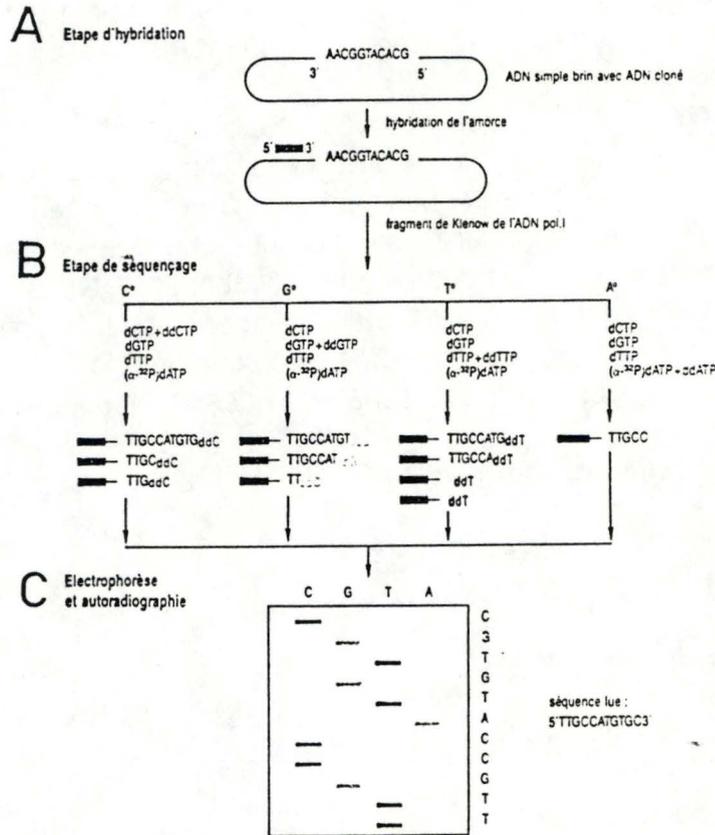


figure 36. Principe du séquençage selon la méthode de Sanger.

On distingue généralement trois grandes étapes : l'hybridation, la polymérisation (ou étape de séquençage) et la migration électrophorétique suivie d'une révélation autoradiographique.

(A) Etape d'hybridation. La molécule d'ADN à séquencer est dénaturée au NaOH. Un des deux brins monocaténaire obtenus (appelé le brin matrice) est hybridé à un oligonucléotide servant d'amorce pour le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I dans la réaction de polymérisation qui suit.

(B) Etape de polymérisation. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I commence la synthèse d'un brin complémentaire au brin matrice à partir de l'amorce et en présence d'un mélange réactionnel contenant : - les quatre désoxyribonucléotides dont un est radioactif (dATP\*, dCTP, dGTP et dTTP)

- un des quatre didésoxyribonucléotides.

Lorsque l'ADN polymérase I incorpore un didésoxyribonucléotide, la synthèse s'arrête. En effet, le didésoxyribonucléotide ne possédant pas d'hydroxyle en 3' ne peut former une liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant (fig. 2.18 et 2.19).

(C) Migration électrophorétique et autoradiographie. Les brins radioactifs de longueur variable ainsi synthétisés sont déposés sur un gel polyacrylamide et séparés selon leur taille par électrophorèse. L'analyse de l'autoradiogramme permet d'établir la séquence de 250 nucléotides situés en aval de la région complémentaire à l'amorce.

- Quick spin.
- Incuber 5 minutes sur table.

### **c. Réactions de terminaisons.**

- Dans chaque eppendorf de couleur ajouter :  
4,3  $\mu$ l de la solution de marquage.
- Quick spin.
- Incuber 5 minutes à 37°C
- Ajouter 5  $\mu$ l de solution stop
- Stocker à -20°C.

## II.2.6.3. Analyse des produits de la réaction de séquençage sur gel PAGE.

### **a. La migration.**

- Couler la solution d'acrylamide dans un support au sommet duquel des peignes sont placés pour former les puits.
- Incuber les solutions de séquençage, correspondant à chaque di désoxyribonucléotides, 3 minutes à 85°C.
- Déposer chaque échantillon dans un puit du gel PAGE.
- Faire migrer à 60 watts (1,6 kV) pendant 1 à 7 heures selon la position dans la séquence des nucléotides à séquencer.
- Enlever le gel du support à électrophorèse et le placer 10 minutes dans un bain contenant une solution de fixation.
- Déposer sur une face du gel une feuille de papier Whatman et recouvrir l'autre face avec du cellophane.
- Le faire sécher 1 à 2 heures sous vide à 80°C et réaliser l'autoradiographie à température ambiante pendant environ 16 heures.
- Lire la séquence après révélation et fixation

### 11.3 Préparation des mitoribosomes.

#### 11.3.1. Préparation des mitochondries.(10)

- Précultures de levures:  
inoculer 20 ml de MAN 0,5% glucose, 2% galactose, avec une colonie de transformants prise sur milieu SC sans leucine.  
incuber à 30 °C jusqu' à atteindre une DO =1 à 660 nm.
  
- Culture de levures:  
inoculer 2 L de milieu SC sans leucine 2% galactose avec les 20 ml de préculture  
incuber à 30°C jusqu' à atteindre une DO=1 à 660 nm.
  
- Centrifuger la culture de levures 15 à 20 minutes à 2500rpm à 4°C (rotor GSA Sorvall) (1020g).  
Décanter le surnageant.  
Resuspendre le culot dans 2 volumes par g. de levure de tampon de lyse STE froid.
  
- Placer la solution dans une bouteille SCHOLL de 500 ml.
  
- Ajouter 3 g. de billes de verre ( diamètre 0,5-0,75 mm) par ml de solution.
  
- Agiter la bouteille sur une distance de 80 à 100 cm, à une fréquence de 2 hertz, pendant 30 secondes.  
Laisser reposer sur glace.  
Recommencer l'opération 10 à 15 fois.  
Vérifier la lyse au microscope et par dosage d'enzymes de la matrice mitochondriale.
  
- Décanter le surnageant des billes de verre.  
Laver celles- ci 2 fois avec le tampon de lyse STE.
  
- Centrifuger le lysat 10 minutes à 4000 rpm à 4°C ( rotor GSA Sorvall) (2611g) pour éliminer les cellules non lysées, les débris cellulaires et les noyaux.
  
- Décanter le surnageant et centrifuger le dans les même conditions jusqu' à ce que le culot disparaisse.
  
- Centrifuger le surnageant 10 minutes à 11500 rpm à 4°C (rotor SS34 Sorvall) (15951g) pour récupérer les mitochondries.

### 11.3.2. Lyse des mitochondries au désoxycholate de Na (DOC).

- Laver le culot de mitochondries avec du tampon MAN.
- Centrifuger 20 minutes à 12500 rpm à 4°C ( rotor SS34 Sorvall) (18846g).
- Resuspendre le culot dans du tampon de lyse LD.
- Ajouter ensuite 1/10 de volume de désoxycholate 10% p/v.
- Centrifuger 20 minutes à 19000 rpm ( rotor SS34 Sorvall) (43542g) pour éliminer les débris.
- Récupérer le surnageant qui correspond au lysat de mitochondries.

### 11.3.3. Préparation des mitoribosomes. (28)

- Centrifuger le lysat de mitochondries 4 heures à 30000 rpm à 4°C ( rotor Ti60 Beckman) (90000g).
- Décanner le surnageant.
- Resuspendre le culot de ribosomes dans 1 à 1,5 ml de tampon RD.

### 11.3.4. Préparation de l'ARNr.

- Extraction des protéines au phénol:  
ajouter à 450 µl d'ARNr: 50 µl de SDS 10% w/v  
500 µl de phénol équilibré avec du tampon RD  
Vortexer 3 minutes  
récupérer la phase aqueuse  
ajouter 150 µl de tampon RD à la phase organique  
Vortexer  
récupérer la phase aqueuse et l'ajouter à la précédente
- Éliminer le phénol par 4 extractions à l'ether:  
ajouter 600 µl d'ether  
Vortexer  
centrifuger  
décanner l'ether.
- Précipiter l'ARNr à l'ethanol absolu:  
ajouter 600 µl d'ethanol 100%  
incuber 30 minutes à -20°C  
centrifuger 15 minutes à 4°C  
décanner le surnageant

resuspendre l'ARNr dans 300  $\mu$ l de tampon RD.

Répéter la précipitation et resuspendre l'ARNr dans 300  $\mu$ l d'eau.

- Précipiter l'ARNr à l'éthanol absolu:
  - ajouter 600  $\mu$ l d'éthanol 100%
  - 30  $\mu$ l de KAc 3M pH 5,5
  - incuber 30 minutes à -20°C
  - centrifuger 15 minutes à 4°C
  - décantier le surnageant
  - resuspendre l'ARNr dans 10  $\mu$ l d'eau.

### II.3.5. Etude de la composition en nucléotides de l'ARNr par HPLC.

#### II.3.5.1. Hydrolyse de l'ARNr

- Ajouter aux 10  $\mu$ l d'ARNr:
  - x  $\mu$ l de NaAc 20 mM pH 5,5
  - x  $\mu$ l de ZnSO<sub>4</sub> 0,5 mM
  - 0,01 mg / ml de nucléase P1
  - 1,7 unités / ml de BAP.

-----

50  $\mu$ l de volume total.

-Incuber 2 heures à 37°C.

-Ajouter 6,25  $\mu$ l de TRIS 0,5 M pH 8.

-Incuber 2 heures à 37°C.

-Ajouter 1,6  $\mu$ l d'acide acétique glacial 1M pour stopper la réaction.

-Stocker l'ARNr hydrolysé à -20°C ou injecter le directement dans l'HPLC.

#### II.3.5.2. Injection dans l'HPLC.

##### **a. Description de l'appareil.**

L'appareil utilisé est un HPLC Applied Biosystem.

La colonne de purification est une colonne: "spheri 5, RP 18, c 18, bille de silice de 5  $\mu$ m de diamètre. Elle retient les différents constituants en fonction de leur hydrophobicité. L'éluion des constituants se réalise au moyen d'un gradient hydrophobe à partir des tampons

ETAPE	TEMPS	ml/min.	%B
1	0.00	1.00	0.00
2	7.12	1.00	0.00
3	12.00	1.00	10.00
4	15.00	1.00	25.00
5	19.12	1.00	60.00
6	21.36	1.00	100.00
7	27.00	1.00	100.00
8	40.00	1.00	100.00
9	45.00	1.00	0.00

Profil du gradient HPLC

Tableau II

	Subunit Mol. Wt.	Source
Phosphorylase b	94.000	rabbit muscle
Albumin	67.000	bovine serum
Ovalbumin	43.000	egg white
Carbonic Anhydrase	30.000	bovine erythrocyte
Trypsin Inhibitor	20.100	soybean
- Lactalbumin	14.400	bovine milk

Faible poids moléculaire.

Tableau III

fonction de leur hydrophobicité. L'élution des constituants se réalise au moyen d'un gradient hydrophobe à partir des tampons

-A: 0,01M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 5,3/méthanol (97,5ml/2,5ml).

-B: 0,01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 5,1/méthanol.(80ml/20ml).

#### **b.En pratique.**

-Avant d'injecter l'échantillon , équilibrer la colonne 15 minutes avec du tampon A: le flow rate doit être de 1ml/min.

la pression doit être de 800 psig

-La détection se fait à 254 nm.

-Injecter 20 $\mu\text{l}$  d'échantillon.

-Le profil d'élution est présenté au tableau II.

### **II.4. Analyse de protéines**

#### **II.4.1. Electrophorese en gel SDS polyacrylamide.**

##### **II.4.1.1 Le principe**

Le gel utilisé pour séparer les protéines est un gel SDS polyacrilamide dénaturant.

Les marqueurs de taille utilisés sont représentés au tableau III.

##### **II.4.1.2. La migration.**

-Préparer les échantillons protéiques dans un volume de 20  $\mu\text{l}$ ...

-Y ajouter 5  $\mu\text{l}$  d'alourdisseur 5 fois.

-Incuber les échantillons 5 minutes à 100°C.

-Faire migrer 45 minutes à environ 200 volts.

-Démonter le gel et le colorer .

##### **II.4.1.3. Coloration au bleu de comassie.**

-Placer le gel dans un bain de bleu de comassie pendant 30 minutes.

-Le décolorer en le passant dans des bains succesifs de décoloration.

-Sécher le gel recouvert de cellophane sous vide.

#### 11.4.1.4. Immunoblot.

##### **a. Le blotting**

- Placer le gel de migration contre une feuille de nitrocellulose
- Placer de part et d'autre du gel et de la nitrocellulose, 2 papiers filtres et coincer le tout entre 2 mousses humidifiées dans le tampon d'électrophorèse.
- Placer l'ensemble dans le boîtier de blotting : la nitrocellulose doit être du côté positif et le gel du côté négatif. Ceci permet de faire passer les protéines du gel sur la nitrocellulose.
- Faire migrer 1 heure à 100 v.

##### **b. Réaction avec les anticorps.**

- Incuber la nitrocellulose 5 minutes dans du : PBS 1 X  
Tween 0,1 %  
Répéter l'opération 3 fois.
- L'incuber 60 à 90 minutes, à température ambiante, dans du PBS 1X  
BSA 3%  
NaM3 0,02%
- Incuber la nitrocellulose 5 minutes dans du : PBS 1X  
Tween 0,1 %  
Répéter l'opération 5 fois
- L'incuber 1 heure dans du : PBS 1X  
BSA 1%  
sérum ( conc = 1/500).
- La laver 5 minutes dans du : PBS 1X  
Tween 0,1%.  
Répéter l'opération 5 fois.
- L'incuber 1 heure dans du : PBS 1X  
BSA 1%  
Ac d'âne biotynilés contre les Ac de lapin ( conc = 1/500 ).
- La laver 5 minutes dans du : PBS 1X  
Tween 0,1%.
- L'incuber 25 minutes dans du : PBS 1X

BSA 1%  
peroxydase ( conc. = 1/400).

- La laver 5 minutes dans du :PBS 1X  
Tween 0,1%.
- Répéter l'opération 3 fois.
- Révéler l'immunoblot avec: 40 ml de Tris 0,1 M pH 7,6  
20 mg de DAB  
40  $\mu$ l d' $H_2O_2$
- Stopper la réaction dans de l'HCl 0,1 M.
- Sécher sous vide.

## RESULTATS

## **I.CONSTRUCTIONS GENETIQUES**

### **I.1.Introduction**

La diméthylation des deux adenines de l'extrémité 3' du 15S ARNr de mitochondries de levure implique une série de constructions génétiques nécessaires à l'expression et à l'importation dans la matrice mitochondriale de la diméthylase d'*E.coli*

Dans un premier temps, la séquence du peptide de transit d'ADH3 de *Saccharomyces cerevisiae* est cloné en amont du gène de la diméthylase. La phase de lecture entre ces deux séquences est restaurée par mutagenèse dirigée.

La séquence codant pour cette protéine de fusion est ensuite clonée, par l'intermédiaire du plasmide pGEMblue, dans deux vecteurs différents de levure, l'un centromérique, présent en une seule copie par cellule transformée, (le pRS 315), l'autre présent en copies multiples par cellule transformée, (l'YEp 351). Ces différentes étapes sont résumées par la figure 37.

### **I.2.Construction du pIH1: clonage du peptide de transit ADH3 dans le pUC8ksgA7. (figure 38)**

#### **I.2.1.Préparation de la séquence du peptide de transit.**

Le fragment d'ADN de 0.396 kb, contenant la séquence du peptide de transit ADH3, (figure 39), et les séquences promoteurs, est isolé du plasmide YEp ADH3-9, (figure 40), par une double restriction *EcoRI* - *PvuII*.

Pratiquement, 5 µg du plasmide sont clivés par 10 unités d'enzyme *PvuII* et 10 unités d'enzyme *EcoRI*.

Quatre fragments sont ainsi obtenus (Voir figure 41)

- 1 fragment *PvuII* - *EcoRI*.de 0,304 kb
- 1 fragment *EcoRI*.- *EcoRI*.de 0,396 kb
- 1 fragment *EcoRI*.- *PvuII* de 2,333 kb
- 1 fragment *PvuII* - *EcoRI*.de 5,967 kb

Après électrophorèse la bande de 0,396 kb est extraite du gel d'agarose 2 % et purifiée. ( voir Matériel et Méthodes).

Clonage du peptide de transit d' ADH3 en amont du gène de la diméthylase dans le pUC8ksgA7.

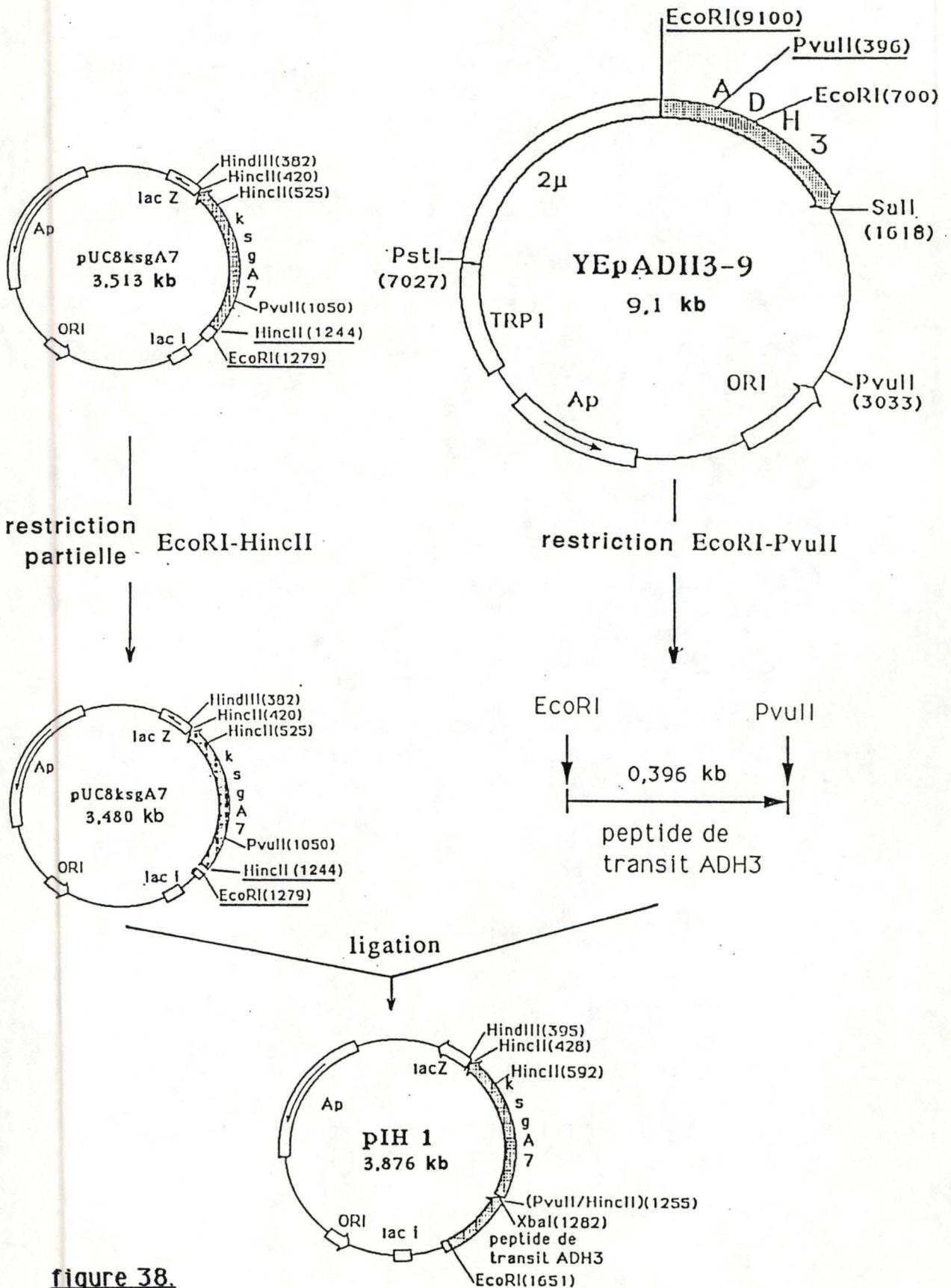
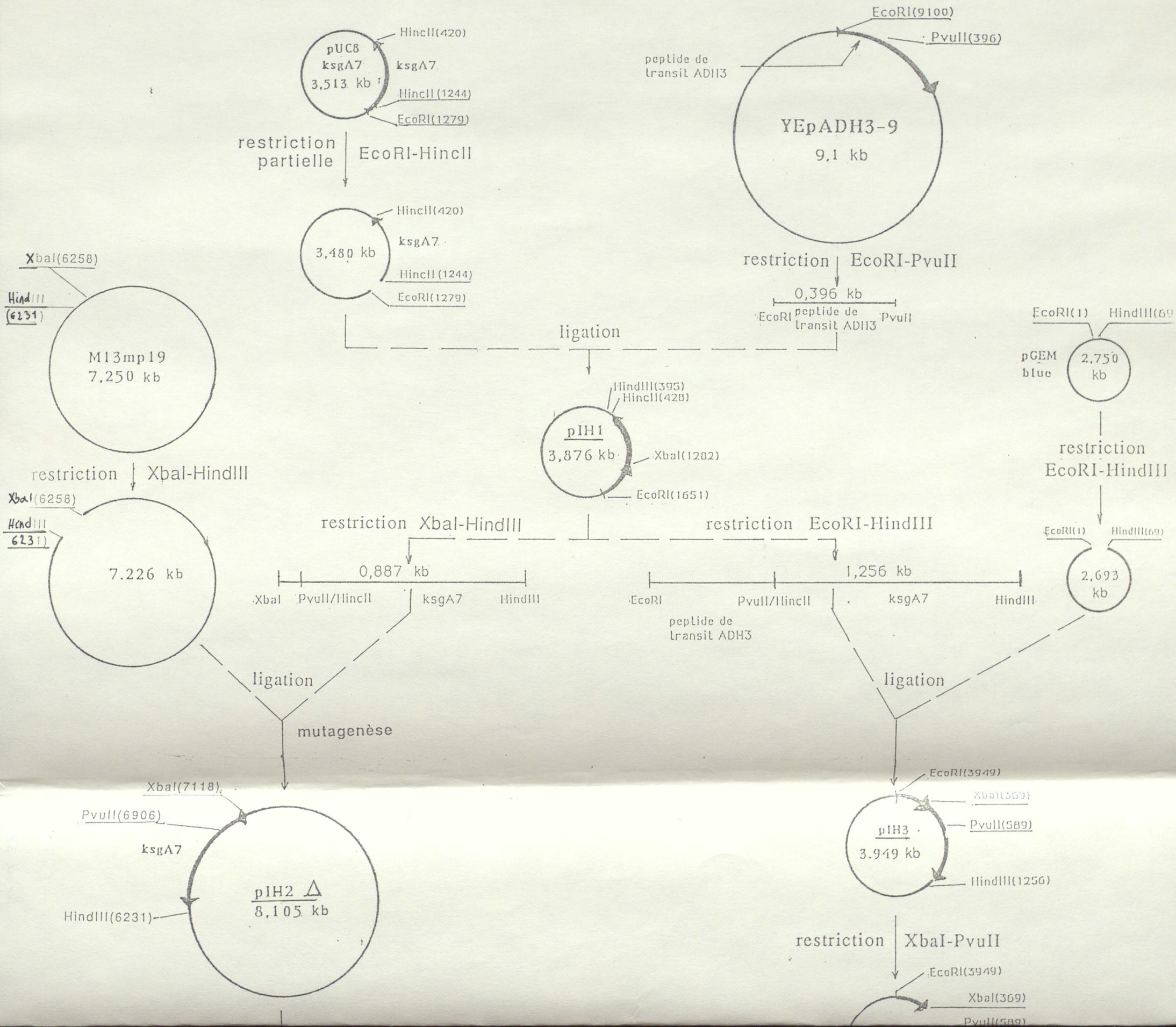


figure 38.



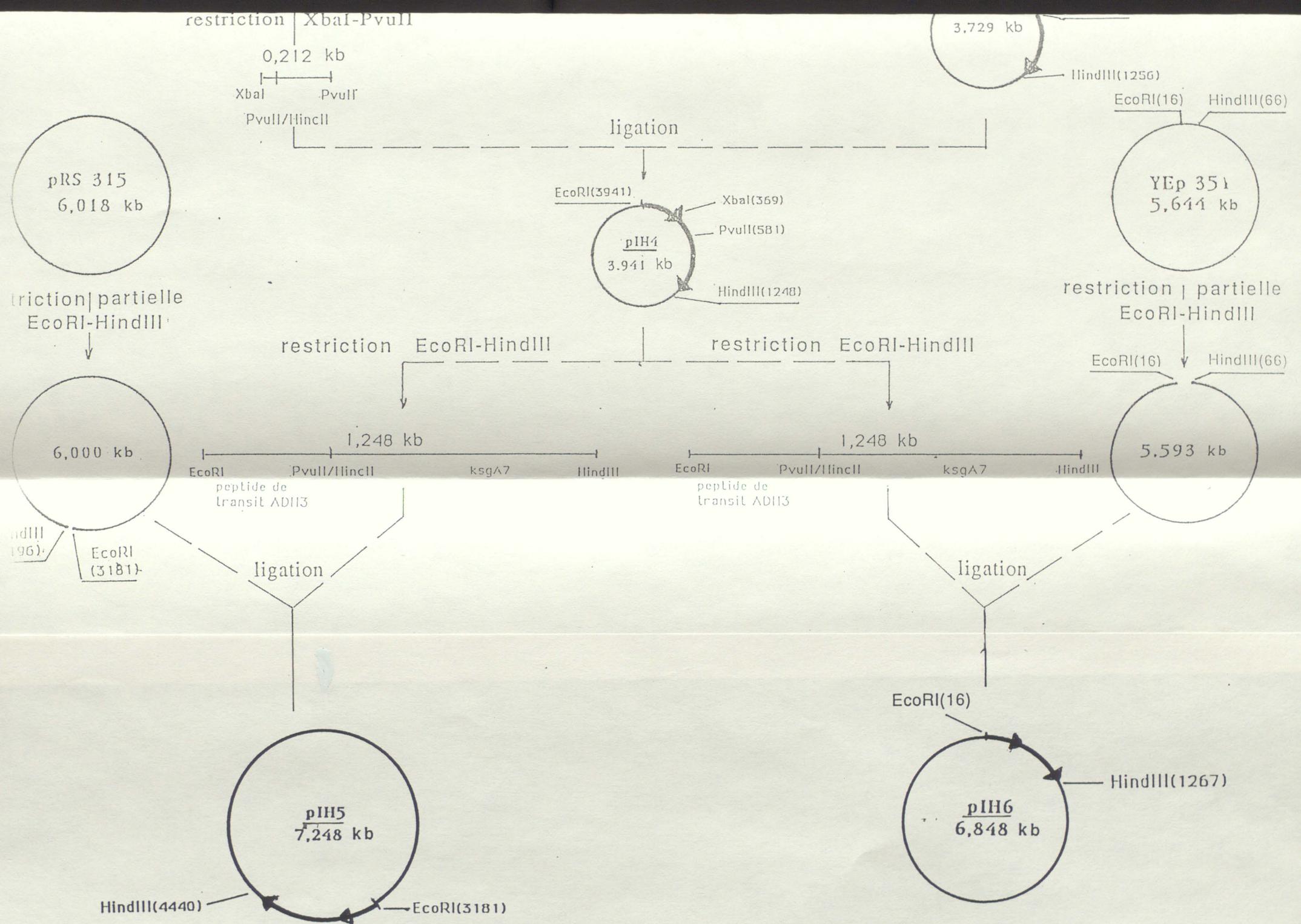


figure 37. Schéma général des différentes étapes des constructions plasmidiques .

ECOR I								
	↓	10	20	30	40	50	60	
1		GAATTCGAGA	TGCGAATGAG	CAGCAGCCAT	TTTGATGTTG	TGAGCATCGG	AACGTTTCTG	60
61		CGTCCGTACA	CTGTCCTTTT	GTTACTTAGA	TAATGGCTAA	GGCAAGCAGT	CCGGGCCACA	120
121		GGAGTCAAAG	GCTTTTCGCC	AGCTCCTAAA	CGCTGGAAGT	GTAATTTTTT	TTCTTCTTAT	180
181		AAAATTA AAC	AAACCTTTT	AGAAAGGAAC	ACTCGCTTTA	TCTCTTCGAC	CGAATTTACT	240
241		ATACATGGAT	ATATATATAT	TATCTTCTGT	TCACAGTTAA	AACTAGGAAT	AGCATAGTCA	300
301		TAAGTTAACA	CCATCATGTT	GAGAACGTCA	ACATTGTTCA	CCAAGCGTGT	CCAACCAAGC	360
								
		<b>Xba I</b>			<b>Pvu II</b>			
361		CTATTTTCTA	GAAACATTCT	TAGATTGCAA	TCCACAGCTG	CAATCCCTAA	GA CTCAAAAA	420
421		GGTGT CATCT	TTTATGAGAA	TAAGGGGAAC	CTGCATTACA	AAGATATCCC	TGTCCCCGAG	480
481		CCTAAGCCAA	ATGAAATTTT	AATCAACGTT	AAATATTCTG	GTGTATGTCA	CACCGATTTA	540
541		CATGCTTGGC	ACGGCGATTG	GCCATTACCT	GTTAAACTAC	CATTAGTAGG	TGGTCATGAA	600
601		GGTGTGGTG	TAGTTGTCAA	ACTAGGTTCC	AATGTCAAGG	GCTGGAAAGT	CGGTGATTTA	660
661		GCAGGTATCA	AATGGCTGAA	CGGTTCTTGT	ATGACATGCG	AATTCTGTGA	ATCAGGTCAT	720
721		GAATCAAATT	GTCCAGATGC	TGATTTATCT	GGTTACTACT	ATGATGGTTC	TTTCCAACAA	780
781		TTTGCGACCG	CTGATGCTAT	TCAAGCCGCC	AAAATTCAAC	AGGGTACCGA	CTTGGCCGAA	840
841		GTAGCCCCAA	TATTATGTGC	TGGTGTACT	GTATATAAAG	CACTAAAAGA	GGCAGACTTG	900
901		AAAGCTGGTG	ACTGGGTTGC	CATCTCTGGT	GCTGCAGGTG	GCTTGGGTTT	CTTGGCCGTT	960
961		CAATATGCAA	CTGCGATGGG	TTACAGAGTT	CTAGGTATTG	ATGCAGGTGA	GGAAAAGGAA	1020
1021		AAACTTTTCA	AGAAATTGGG	GGGTGAAGTA	TTCATCGACT	TACTAAAAC	AAAGAATATG	1080
1081		GTTTCTGACA	TTCAAGAAGC	TACCAAAGGT	GGCCCTCATG	GTGTCATTAA	CGTTTCCGTT	1140
1141		TCTGAAGCCG	CTATTTCTCT	ATCTACGGAA	TATGTTAGAC	CATGTGGTAC	CGTCGTTTTG	1200
1201		GTTGGTTTGC	CCGCTAACGC	CTACGTTAAA	TCAGAGGTAT	TCTCTCATGT	GGTGAAGTCC	1260
1261		ATCAATATCA	AGGGTTCTTA	TGTTGGTAAC	AGAGCTGATA	CGAGAGAAGC	CTTAGACTTC	1320
1321		TTTAGCAGAG	GTTTGATCAA	ATCACCAATC	AAAATTGTTG	GATTATCTGA	ATTACCAAAG	1380
1381		GTTTATGACT	TGATGGAAAA	GGGCAAGATT	TTGGGTAGAT	ACGTCGTCGA	TACTAGTAAA	1440
1441		TAATAGCGTG	TTACGCACCC	AACTTTTAT	GAAAGTCTTT	GTTTATAATG	ATGAGGTTTA	1500
1501		TAAATATATA	GTGGAGCAA	GATTAATCAC	TAAATCAAGA	AGCAGTACCA	GTATTTTTTC	1560
1561		TATATCAAGT	AGTGATAATG	GAATAGCCC	AAATTTGGCT	TCCGTCGAC		1609
		10	20	30	40	<b>Sal I</b>	50	60

figure 39. Séquence de la protéine ADH3.



point de clivage du peptide de transit d'ADH3.



début de la séquence du peptide de transit de la protéine ADH3.

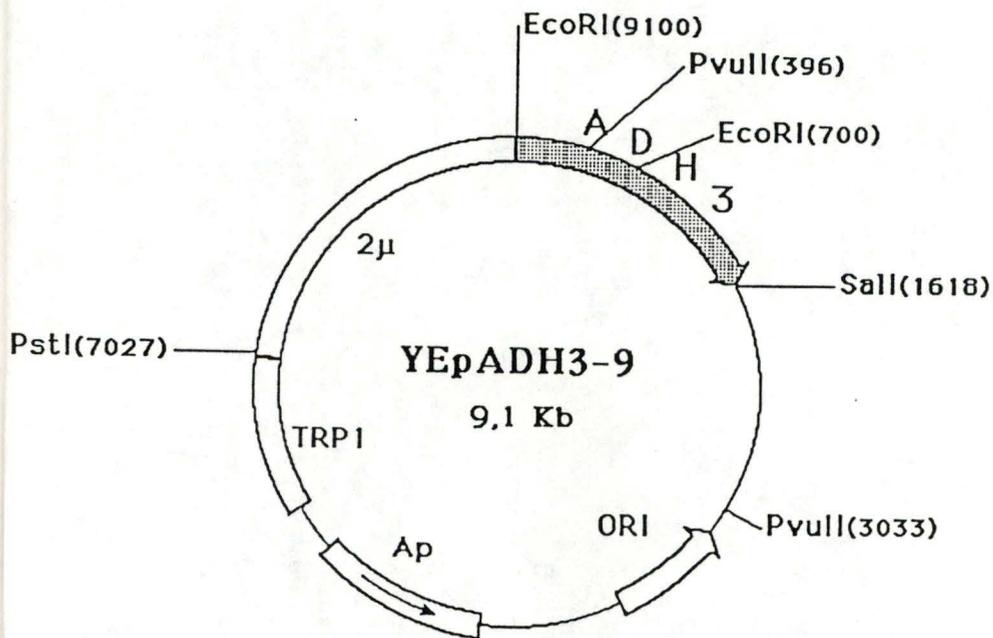


figure 40. Représentation du plasmide YEpADH3-9 et des sites de restriction enzymatique qui nous intéressent



figure 41. Profil d'électrophorese en gel d'agarose 2% du plasmide YEpADH3-9.

piste 1: YEpADH3-9 restreint par *EcoRI*+*PvuII*.  
 piste 2: marqueur de taille  $\lambda$  restreint par *HindIII*.  
 piste 3: YEpADH3-9 restreint par *EcoRI*.

DNA sequence 833 b.p. GTTAACACCAAT ... AGGAGAGTTAAC linear

**Hinc II**

↓ | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60

1 GTTAACACCA ATGAATAATC GAGTCCACCA GGGCCACTTA GCCCGTAAAC GCTTCGGGCA 60  
 61 AAACCTTCTC AACGATCAGT TCGTGATCGA CAGTATTGTG TCTGCCATTA ACCCGCAAAA 120  
 121 GGGCCAGGCG ATGGTCGAAA TCGGCCCCCG TCTGGCGGCA TTGACCGAAC CGGTTCGGCGA 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 CCATTCGTAA 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**

figure 42. Représentation de la séquence du gène de la diméthylase d' *E. coli*.

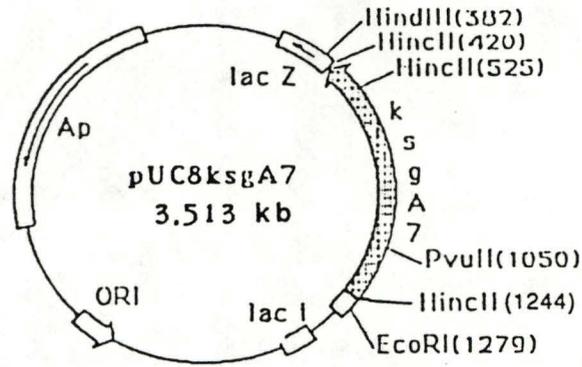
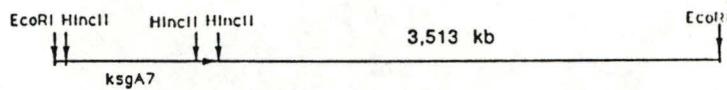


figure 43. Représentation du pUC8ksgA7 et des sites de restriction qui nous intéressent.

Carte du plasmide pUC8ksgA7 linéarisé par restriction totale *EcoRI*.



Résultat de la restriction partielle HincII sur le pUC8ksgA7 préalablement linéarisé par EcoRI. Neuf fragments de tailles différentes sont attendus

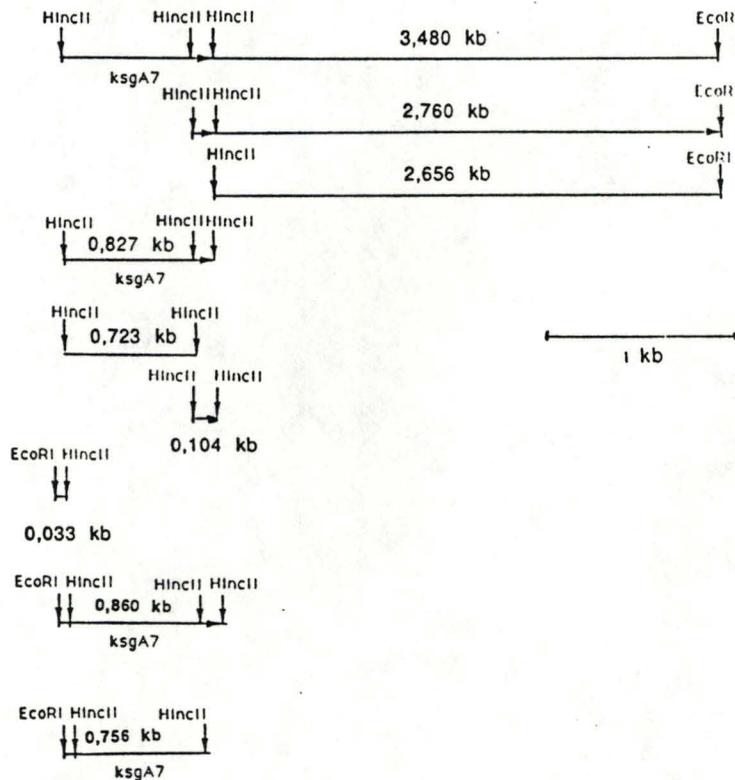


figure 44.

### 1.2.2. Préparation du vecteur de clonage à partir du pUC8ksgA7.

Le plasmide pUC8ksg A7 est linéarisé au niveau de son SMC par une restriction *EcoRI* et *HincII*.

Le site *HincII* est situé 7 nucléotides en amont du codon initiateur, ATG du gène de la diméthylase (figure 42) et est compatible avec le site *PvuII*. Deux autres sites *HincII* sont également présents sur le plasmide pUC8ksgA7. (figure 43). Le plasmide sera donc linéarisé par une restriction partielle *HincII*. Parmi les neuf fragments possibles de taille différente, celui de 3,480 kb contient le gène entier et la matrice du pUC8ksgA7, et est bordé par les sites *EcoRI*-*HincII*. (figure 44).

Pratiquement, un stock de 15 µg de pUC8ksgA7, coupé par 130 unités d'*EcoRI*, est préparé. Une seule bande de 3,513 kb est alors observée après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

Afin de déterminer le temps de restriction par *HincII*, optimal pour isoler la bande de 3,480 kb, on procède à un essai à partir de 2,5 µg de stock de plasmide linéarisé par *EcoRI*. Ils sont digérés par une unité d'*HincII*. Après 30 secondes, 2, 5, 10, 20 et 30 minutes, un aliquot de la réaction est prélevé et la réaction est stoppée par une incubation de 10' à 65°C. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%. L'examen sous U.V. du gel coloré au bromure d'ethidium montre que la bande de 3,480 kb apparaît majoritairement pour le temps de réaction de 30'. (Voir figure 45).

6 µg de matériel sont alors digérés par 2,5 unités d'*HincII*. La réaction de restriction se déroule 30 minutes à 37°C. La totalité de la réaction est soumise à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %. La bande de 3,480 kb est extraite du gel et purifiée. ( voir Matériel et Méthodes ). (Voir figure 46)

### 1.2.3. Ligation vecteur-insert

Une ligation est réalisée entre le vecteur linéarisé *EcoRI* - *HincII* et l'insert *EcoRI* - *PvuII* suivant une proportion de 3 molécules d'insert par molécule de vecteur.

800 ng du vecteur sont ajoutés à 200 ng d'insert en présence d'une unité de T4 DNA ligase et incubés 18 h à 14°C. Le plasmide recombinant attendu, soit le pIH1, doit avoir une taille de 3,876 kb (3,480 kb + 0,396 kb). (figure 38).

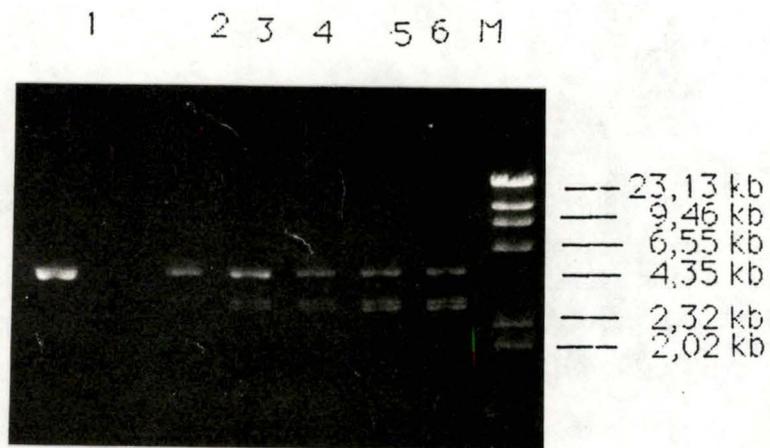


figure 45. Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% du temps optimun de restriction partielle *HindII* du pUC8ksgA7 préalablement linéarisé par *EcoRI*, pistes 1 à 6.

M= marqueur de taille: phage  $\lambda$  restreint par *HindIII*, (1) 30 sec. de restriction, (2) 2 min. de restriction, (3) 5 min. de restriction, (4) 10 min. de restriction, (5) 20 min. de restriction, (6) 30 min. de restriction.

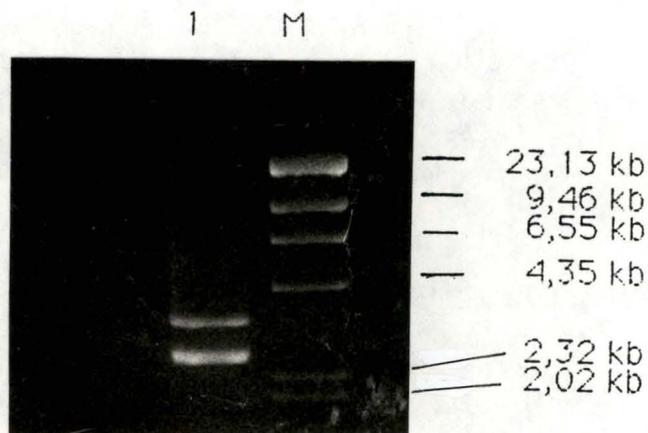


figure 46. Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 0,8% du plasmide pUC8ksgA7 restreint partiellement par *EcoRI* + *HindII* (1).

M=marqueur de taille: phage  $\lambda$  restreint par *HindIII*.

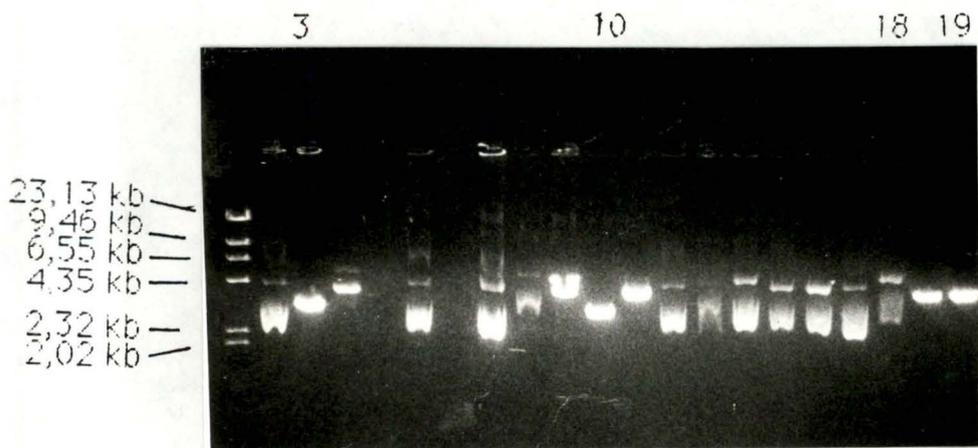


figure 47. Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% du plasmide supposé être le pIH1 restreint par *Xba*

pistes 3,10,18,19. plasmide pIH1 présentant la taille attendue de 3,876kb.



figure 48. Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 0,8% du plasmide pIH1 restreint par *Xba* + *Hind*III, (pistes 1 à 4).

M=marqueur de taille: phage  $\lambda$  restreint par *Hind*III

#### 1.2.4. Transformation de la souche XL1 blue par le mélange de ligation.

12,5 µl du mélange de ligation sont utilisés pour transformer des cellules compétentes de la souche XL1 blue. Différents volumes du mélange de transformation sont étalés sur milieu LB solide contenant de l'ampicilline et incubés une nuit à 37°C.

#### 1.2.5. Criblage de plusieurs transformants pour identifier le pIH1.

20 colonies de transformants XL1 blue sont prélevées au hasard et servent à ensemencer 20 flacons universels contenant 5 ml de LB + ampicilline. (voir Matériel et Méthodes).

Après 16 heures d'incubation à 37°C, 1,5 ml de chaque culture est soumis au protocole d'extraction rapide des plasmides (voir Matériel et Méthodes).

Un dixième du matériel obtenu par mini-préparation du plasmide est restreint par 10 unités de *Xba*I. Cette enzyme a un site de coupure unique situé dans la séquence du peptide de transit ADHIII. (figure 37 et 38).

Sur les 20 clones analysés, 4 présentent une taille apparente en accord avec les 3,786 kb attendus correspondant au pIH1. (Voir figure 47). Une vérification supplémentaire par double restriction *Xba*I-*Hind*III est réalisée sur ces 4 clones. Cinq µg de plasmides des 4 clones sont coupés par 10 unités de *Xba*I et 10 unités de *Hind*III.

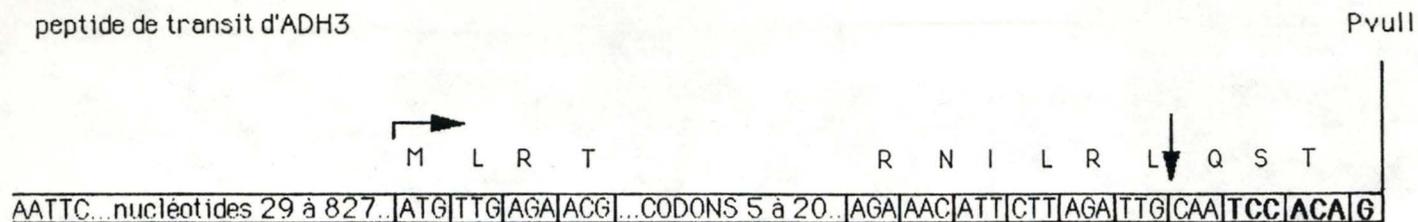
Deux fragments d'ADN de taille attendue sont obtenus dans chaque cas. (voir figure 48) :

- 1 fragment *Xba*I-*Hind*III de 0,887 kb
- 1 fragment *Hind*III-*Xba*I de 2,989 kb

#### 1.2.6. Conclusion.

Nous avons donc obtenu la construction du plasmide pIH1 dans lequel la séquence du peptide de transit ADHIII est cloné en amont du gène de la diméthylase d'*E. coli*

peptide de transit d'ADH3



HincII

gène ksgA

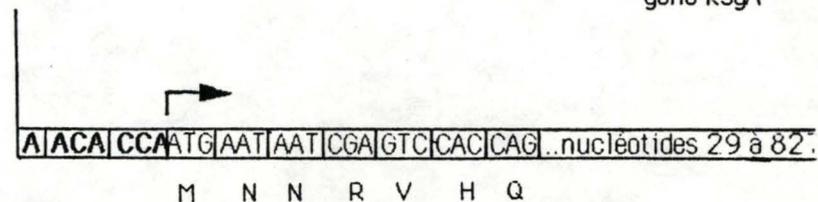


figure 49. Représentation de la jonction entre la séquence du peptide de transit d'ADH3 du côté 5' et du gène de la diméthylase du côté 3'.

En gras: région des 17 nucléotides qui s'ajoutent en amont de l'ATG d'initiation du gène de la diméthylase et où s'opère le changement de phase entre la séquence du peptide de transit d'ADH3 et le gène ksgA

↗ : initiation de la traduction

↓ : site de clivage du peptide de transit.

### 1.3.Construction du pIH2 et pIH2Δ pour aménager la jonction "peptide de transit d'ADHIII-diméthylase".

#### 1.3.1.Examen de la séquence du gène de la protéine de fusion "peptide de transit ADHIII-diméthylase".

L'examen de la séquence de la protéine de fusion (voir fig. 49) montre que la phase de lecture de la séquence du peptide de transit ADHIII n'est pas conservée dans le gène de la diméthylase. En effet, entre les acides aminés L,Q,S,T du peptide de transit ADHIII et MNN de la diméthylase, on observe 8 nucléotides.

Cet examen révèle également qu'entre le site de clivage du peptide de transit situé avant le 25<sup>ème</sup> acide aminé, une glutamine (CAA), et l'ATG du gène de la diméthylase, 17 nucléotides sont excédentaires. (figure 49) ;

De manière à rétablir une phase de lecture unique, à conserver le site de clivage du peptide de transit et à n'adjoindre qu'un minimum d'acides aminés supplémentaires à la diméthylase, nous avons décidé de déléter, par mutagenèse dirigée, les 8 nucléotides, GAACACCA, directement situés en amont de l'ATG du gène de la diméthylase. On conserve ainsi les deux acides aminés reconnus indispensables au clivage du peptide de transit: la sérine (TCC) en position 26 et la thréonine (ACA) en position 27.

#### 1.3.2.Mise en phase de la protéine de fusion par mutagenèse dirigée.

##### 1.3.2.1.La stratégie.

La réaction de mutagenèse est réalisée à partir du phage M13 simple brin.

Le fragment *Xba*I-*Hind*III de 0,887kb du gène de la protéine de fusion est cloné au niveau du site multiple de clonage du phage M13mp19. Par ailleurs, après mutagenèse, il est indispensable de s'assurer par séquençage qu'aucune autre modification que celle souhaitée n'a été apportée.

Le choix du site *Xba*I situé dans le peptide de transit permet de placer la jonction des deux séquences constituant la protéine de fusion à proximité immédiate de l'amorce de séquençage universelle du M13mp19. Ceci garantit une résolution optimale du gel de séquençage dans la région d'intérêt.

Le site *Hind*III facilite le clonage car c'est un site unique.

De par la technique de séquençage utilisée, seules les 300 premières bases situées après le site *Xba*I pourront être séquencées et donc vérifiées. Dès lors, au lieu d'extraire l'entièreté du fragment *Xba*I-*Hind*III, un fragment *Xba*I-*Pvu*II de 212 paires de bases dont la mutation et les

Clonage de la séquence XbaI-HindIII du pIH1 dans M13mp19.

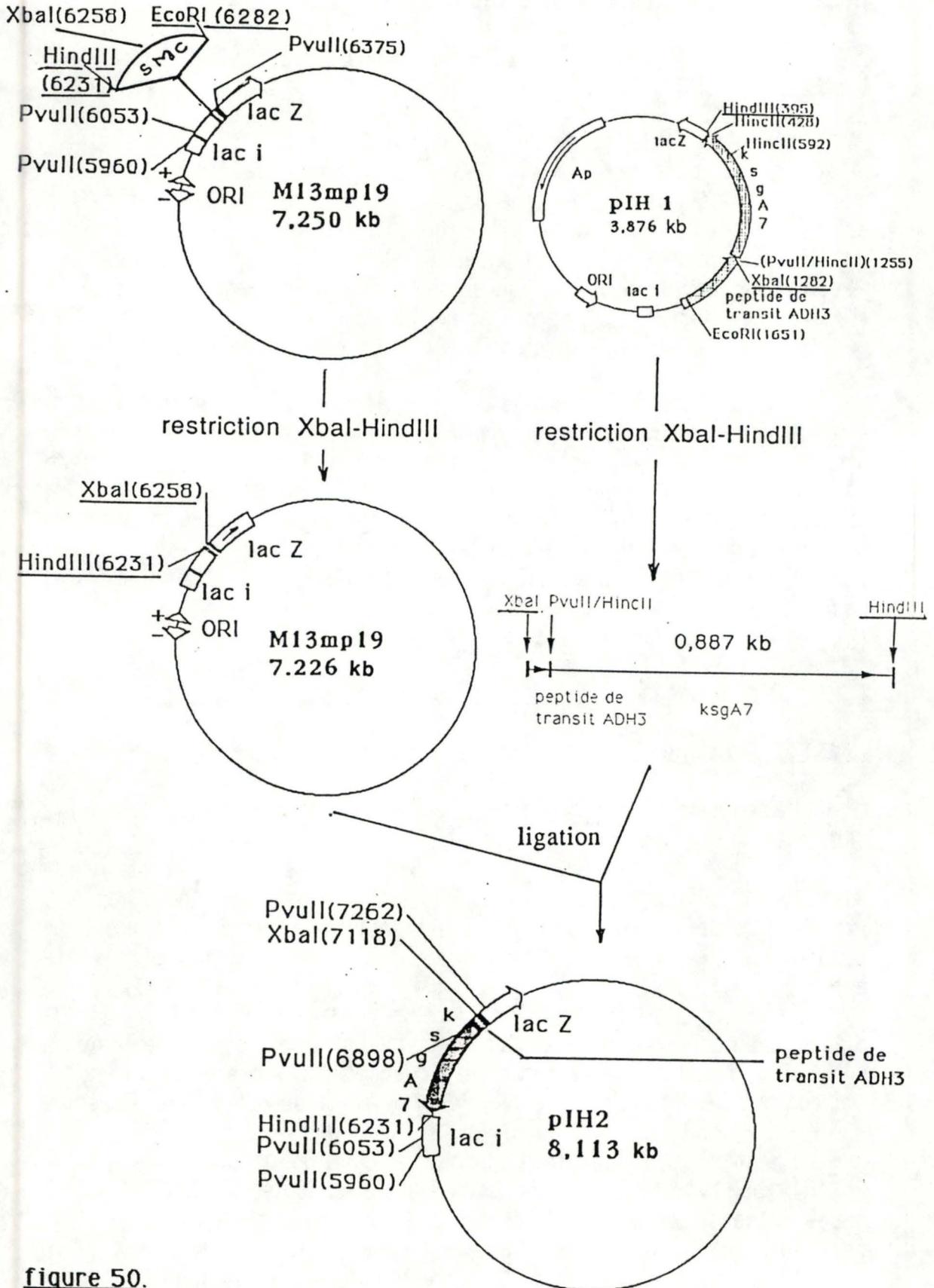


figure 50.

séquences avales ont été vérifiées par séquençage sera extrait du pIH2 et remplacera son homologue non muté, de 220 paires de bases dans la séquence entière de la protéine de fusion.

### 1.3.2.2. Clonage dans M13. (figure 50).

#### a) Préparation de l'insert.

Un fragment d'ADN de 0,887 kb contenant une partie de la séquence de la protéine de fusion est isolé du pIH1 par double restriction *Xba*I - *Hind*III.

Pratiquement 2 µg de pIH1 sont clivés par 10 unités de *Xba*I et 10 unités d'*Hind*III.

Deux fragments d'ADN sont ainsi obtenus (voir figure 51) :

- 1 fragment *Xba*I-*Hind* III de 0,887 kb
- 1 fragment *Hind*III-*Xba*I de 2,989 kb

Après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %, le fragment de 0,887 kb est extrait du gel et purifié. (voir Matériel et Méthodes).

#### b) Préparation du vecteur de clonage M13mp19.

Le phage M13mp19 est linéarisé par une double restriction *Xba*I - *Hind*III. Après électrophorèse, le fragment de 7,226 kb est extrait du gel d'agarose 0,8 % et purifié. (voir Matériel et Méthodes ).

#### c) Ligation vecteur-insert.

Une ligation est réalisée entre le vecteur linéarisé et l'insert suivant la proportion de 2 molécules d'insert par molécule de vecteur. 200 ng d'insert sont mélangés à 900 ng de M13 mp19 en présence d' 1 unité de T4 DNA ligase et incubés 18 heures à 14°C.

Le plasmide attendu que nous appelons pIH2, aura une taille de 8,113 kb.

#### d) Transformation de la souche TG1 par le mélange de ligation.

Différentes dilutions du mélange de ligation sont utilisées pour transformer des cellules compétentes de la souche TG1. (protocole voir

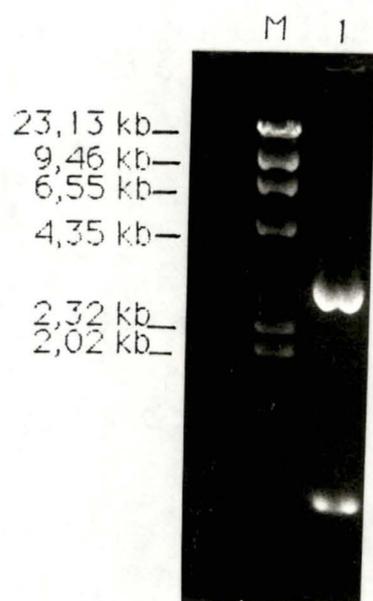


figure 51. Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 0,8% du plasmide pIH1 après double restriction par les enzymes *Xba*I + *Hind*III. 1

M=marqueur de taille: phage  $\lambda$  restreint par *Hind*III

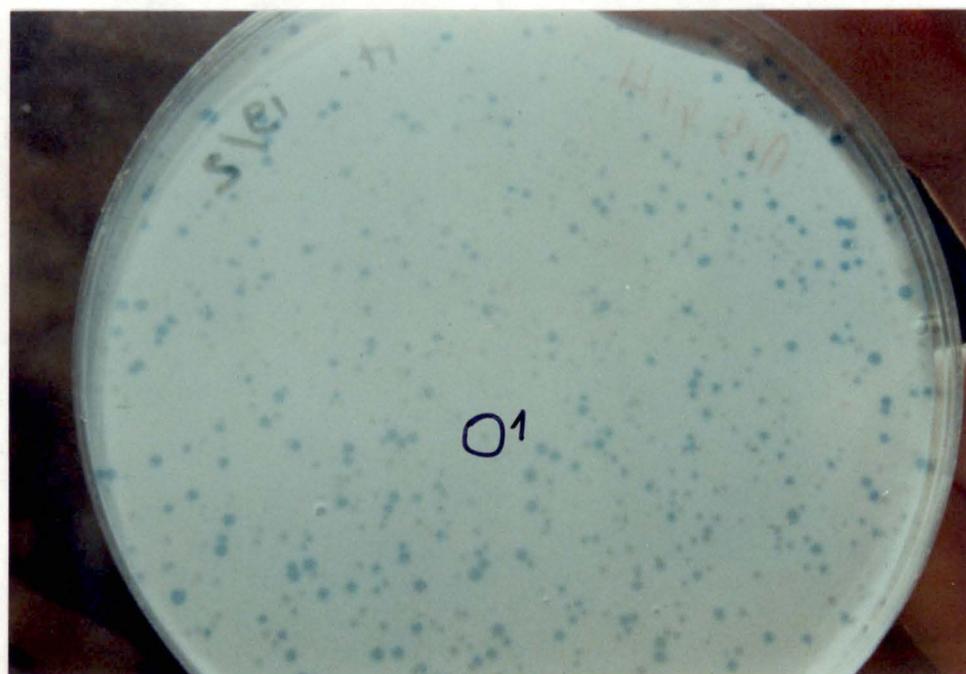


figure 52. Exemple de plaques blanches (1) correspondant à des zones de moindre croissance des bactéries infectées par le phage M13 dont le site multiple de clonage a été disrupté.

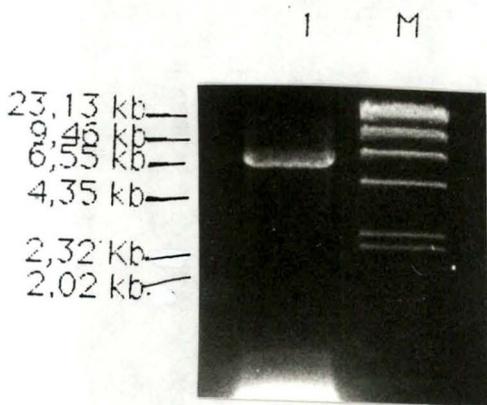
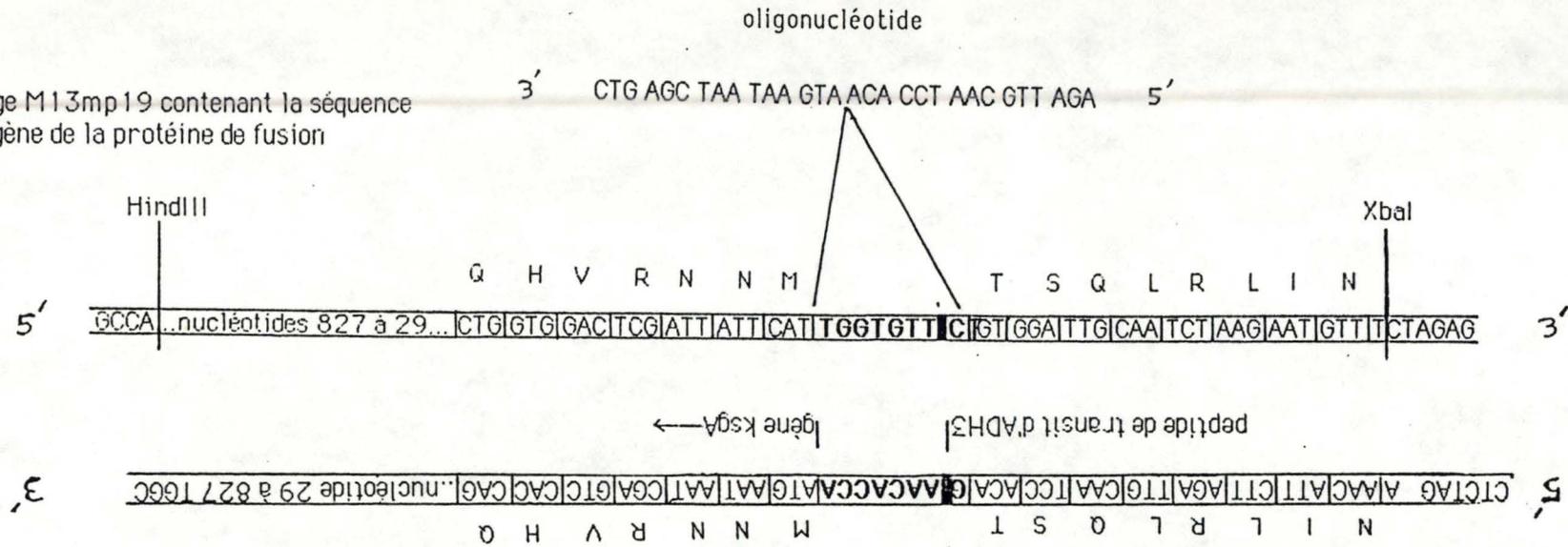


figure 53. Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 0,8% du plasmide pIH2 restreint par *Xba* + *Hind*III. (1)

M=marqueur de taille: phage  $\lambda$  restreint par *Hind*III

Brin + du phage M13mp19 contenant la séquence non codante du gène de la protéine de fusion



Brin - du phage M13mp19 contenant la séquence codante du gène de la protéine de fusion

figure 54. Séquence du brin + du pIH2 contenant le fragment *XbaI*-*HindIII* de la séquence non codante du gène de la protéine de fusion. La séquence codante se trouve sur le brin -.

■ : jonction entre la séquence du peptide de transit d'ADHIII et le gène diméthylase.

Matériel et Méthodes). Les différents mélanges de transformation sont coulés sur H plate et incubés 16 h à 37°C.

La sélection de transformants est basée sur le clonage de l'insert dans le SMC qui disrulte le gène lac Z et donne donc des plaques blanches de moindre croissance des bactéries hôtes (en présence d'IPTG et de X gal). (Voir figure 52)

#### e) Criblage de transformants pour identifier le pIH2

A partir de 20 plaques blanches, 20 éprouvettes contenant 5 ml de LB et 50 µl de culture TG1 sontensemencées.

Les cultures sont arrêtées après 5 heures d'incubation à 37°C et sont soumises au protocole d'extraction rapide de phage (voir Matériel et Méthodes).

La construction pIH2 est identifiée parmi les différentes préparations par une double restriction *Xba*I-*Hind*III qui sépare l'insert de 0,887 kb du vecteur de 7,226 kb après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %.

Un clone contient le pIH2 (figure 53).

### 1.3.3 Réaction de mutagenèse

#### 1.3.3.1 Préparation de l'oligonucléotide mutagénisant

La réaction de mutagenèse est basée sur l'appariement de l'oligonucléotide à la séquence monocaténaire entourant la séquence à déléter. L'oligonucléotide doit donc avoir une séquence complémentaire au brin + de M13mp19, sécrété hors de la cellule hôte pendant le cycle de vie du phage.

De plus, le nombre de bases situées de part et d'autre de la partie à déléter doit être suffisant pour permettre un appariement correct malgré la formation d'une boucle au niveau de la région à déléter. La délétion de 8 nucléotides nécessite l'appariement de l'oligonucléotide 15 nucléotides de part et d'autre de ceux-ci avec l'oligonucléotide.

Soulignons ici que le brin + du pIH2 correspond au brin non codant de la protéine de fusion. (figure 54)

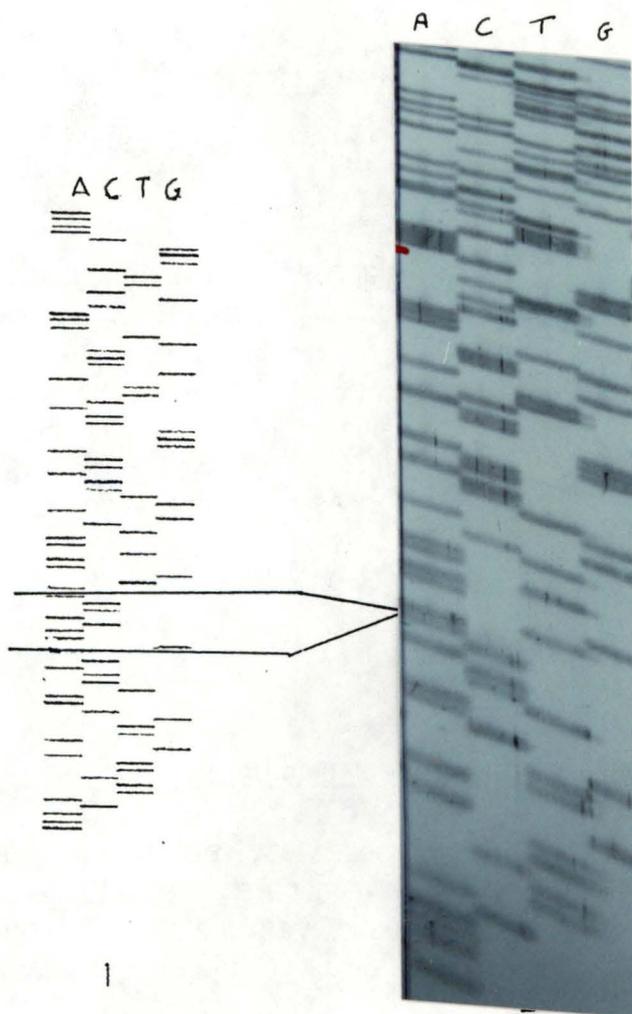


figure 55. Gel de séquence du pIH2 non muté 1 et du pIH2 $\Delta$  auquel 8 paires de bases ont été  
délétées 2

L'oligonucléotide synthétisé sera donc un tridécanucléotide, complémentaire du brin non codant de la protéine de fusion et contenant la déletion.

Sa séquence est: AGATTGCAATCCACAATGAATAATCGAGTC

### 1.3.3.2 Production et identification du mutant.

La souche TG1 est transformée à partir d'un stock pIH2. Une culture de 250 ml est ensuiteensemencée à partir d'une plaque de moindre croissance et est soumise à la méthode d'extraction en grande quantité de phages M13.

La réaction de mutagenèse est réalisée selon le protocole décrit à la page du chapitre Matériel et Méthodes.

La souche TG1 est transformée à partir du pIH2 $\Delta$  qui correspond au pIH2 ayant subi la réaction de mutagenèse. Vingt cultures sont réalisées et soumises au protocole d'extraction rapide de phages ( voir Matériel et Methodes).

Nayant introduit ou supprimé aucun site de restriction lors de la mutagenèse, la seule possibilité d'identifier le mutant est de séquencer, à partir du simple brin produit par le phage, l'insert *Xba*I - *Hind*III de la protéine de fusion.

Dans un même temps, la séquence *Xba*I - *Pvu*II, de 0,212Kb, ayant subi la mutation est comparée avec la séquence *Xba*I - *Pvu*II, de 0,220Kb, non mutée du gène de la diméthylase. Excepté les 8 nucléotides délétés, les 212 paires de base comparées sont identiques. (figure 55).

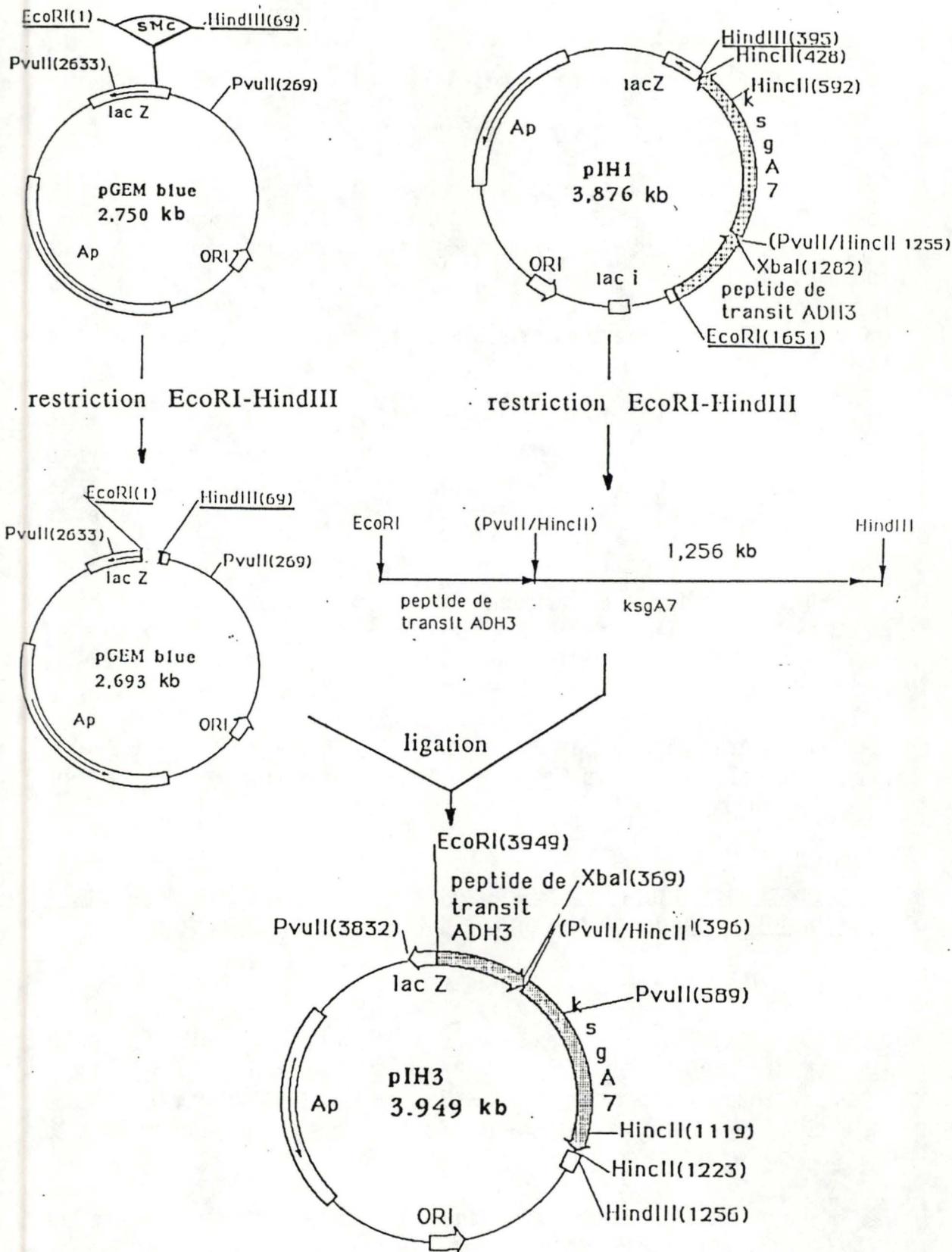
## **1.4.Construction du pIH3: préparation d'un plasmide intermédiaire contenant la séquence non mutée de la protéine de fusion.**

### 1.4.1.Rappel

Après avoir fusionné les séquences promotrices et celle du peptide de transit d'ADHIII avec le gène de la diméthylase d'*E. coli* (pIH1), nous avons aménagé la jonction entre ces 2 séquences par mutagenèse dirigée afin d'instaurer une phase ouverte de lecture unique et de maintenir le site de clivage du peptide de transit.

La mutation attendue et la séquence intacte de la diméthylase ont été confirmées par séquençage.

**Clonage de la séquence non mutée de la protéine de fusion dans le vecteur intermédiaire pGEMblue.**



**figure 56.**

Un fragment *Xba*I-*Pvu*II de 0,212 kb sera substitué au fragment homologue de 0,220 kb dans la séquence totale de la protéine de fusion.

#### 1.4.2.Stratégie.

L'opération décrite ci-dessus n'est pas réalisable directement avec le pIH1 parce que la présence d'un site *Xba*I au niveau de son SMC génère un fragment *Xba*I-*Xba*I d'une taille proche de celle du fragment *Xba*I-*Pvu*II de 0,220 kb. Ces deux fragments ne pourraient par conséquent pas être suffisamment séparés par électrophorèse.

Dès lors, le fragment *Eco*RI-*Hind*III, de 1,256kb, non muté du pIH1 est transféré dans le plasmide intermédiaire pGEMblue où ce clonage au niveau de son SMC implique automatiquement la perte du site *Xba*I gênant.

#### 1.4.3.Clonage du gene de la protéine de fusion dans le vecteur pGEMblue. (figure 56)

##### 1.4.3.1.Préparation de l'insert.

5 µg du plasmide pIH1 sont clivés par 10 unités d'enzyme *Eco*RI et 10 unités d'enzyme *Hind*III.

Deux fragments d'ADN sont ainsi obtenus :

- 1 fragment *Eco*RI-*Hind*III de 1,256 kb
- 1 fragment *Hind*III-*Eco*RI de 2,620 kb

Après électrophorèse, la bande de 1,256 kb, correspondant à l'insert, est extraite du gel d'agarose 0,8 % et purifiée. (voir Matériel et Méthodes).

##### 1.4.3.2.Préparation du vecteur de clonage pGEM blue.

2 µg de plasmide pGEM blue sont linéarisés par une double restriction *Eco*RI - *Hind*III.

Après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %, la bande de 2,693 kb est extraite du gel. Notons, dès à présent, qu'on s'est ainsi débarrassé du SMC de ce vecteur de clonage contenant le site *Xba*I.

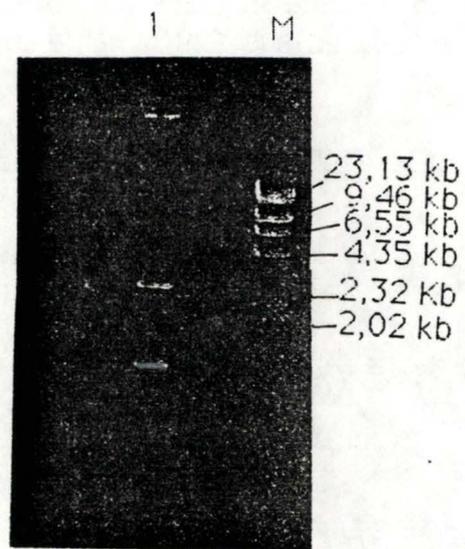


figure 57. Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 0,8% du pIH3 après double restriction par les enzymes *EcoRI* - *HindIII*. 1

#### 1.4.3.3.Ligation vecteur-insert.

Une ligation est réalisée entre le vecteur pGEM blue linéarisé *EcoRI-HindIII* et l'insert contenant la séquence de la protéine de fusion *EcoRI-HindIII* suivant une proportion de deux molécules d'insert par molécule de vecteur.

1 µg de pGEM blue est alors ajouté à 800 ng d'insert en présence d'une unité de T4 DNA ligase et incubé 18 heures à 14° C.

Le plasmide recombinant attendu, soit le pIH3, aura une taille de 3,949 kb.

#### 1.4.3.4.Transformation de la souche XL1 blue par le mélange de ligation.

12,5 µl du mélange de ligation sont utilisés pour transformer la souche XL1 blue. Différents volumes de la solution de transformation sont étalés sur milieu LB solide + ampicilline + IPTG + Xgal.

Les colonies blanches sont, dès lors, des bactéries transformées par le plasmide pGEM blue dont *lacZ* a été disrupté au SMC.

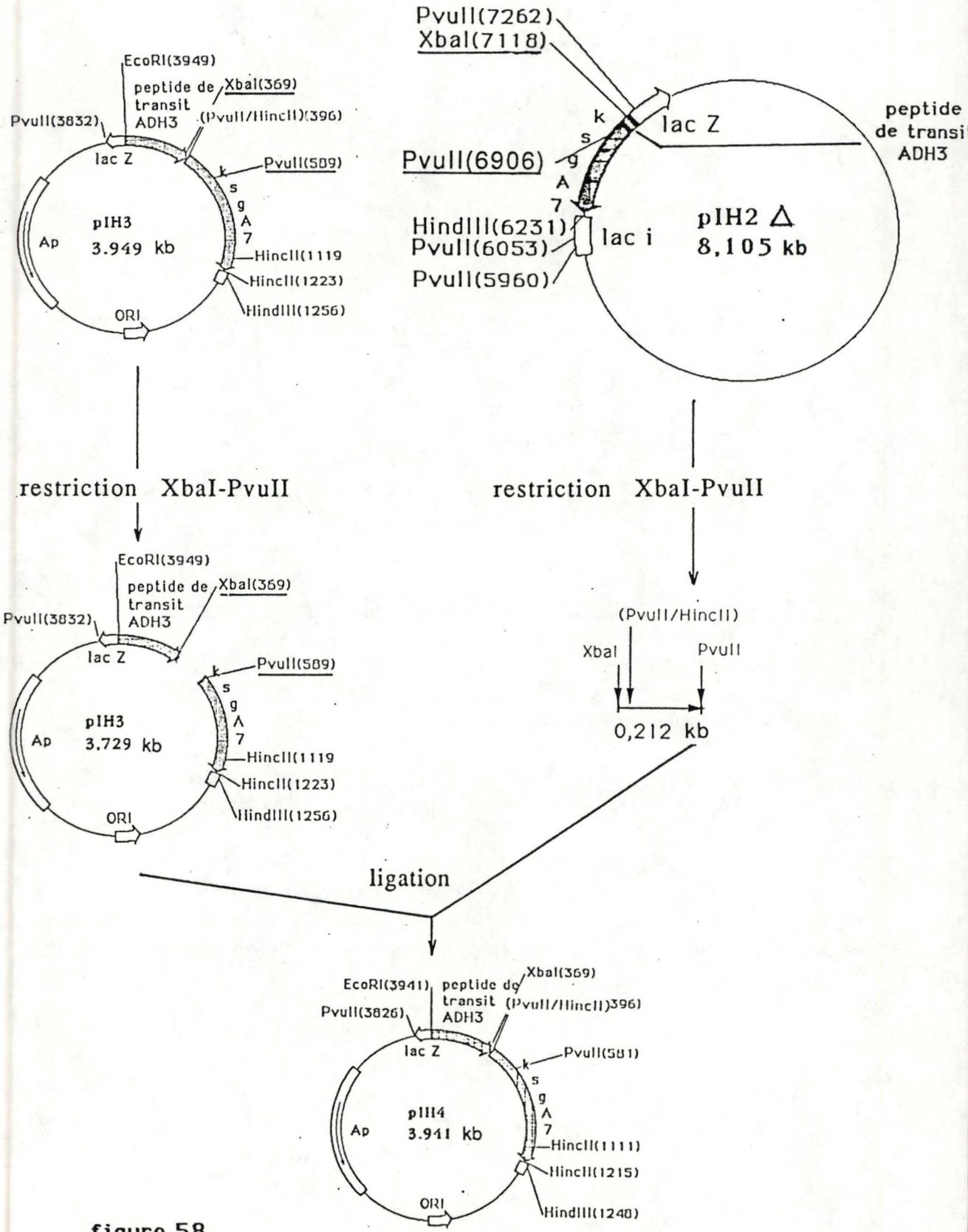
#### 1.4.3.5.Criblage de plusieurs transformant pour obtenir le pIH3.

20 flacons universels, contenant 10 ml de LB + 10 µl d'ampicilline stock, sont ensemencés à partir de 20 colonies blanches de transformants XL1 blue, prélevées au hasard.

Après 16 h d'incubation à 37°C, 1,5 ml de chaque culture est soumis au protocole d'extraction rapide de plasmides (voir Matériel et Méthodes).

Un cinquième du matériel obtenu par mini-préparation est restreint par 10 unités d'enzyme *EcoRI* et par 10 unités d'enzyme *HindIII*. Si le plasmide est celui souhaité, on s'attend à ressortir l'insert de 1,256 kb de la matrice pGEM blue de 2,693 kb. C'est ce que l'on peut observer sur le gel d'électrophorèse. (figure 57).

**Substitution du fragment XbaI-PvuII de 0,220 Kb du pIH3 par le fragment homologue de 0,212Kb contenant la mutation.**



**figure 58.**

**1.5.Construction du pIH4: substitution du fragment *Xba*I - *Pvu*II de 0,220 kb du pIH3 par le fragment homologue du pIH2Δ contenant la mutation. (figure 58).**

1.5.1.Rappel

Nous possédons donc la séquence entière de la protéine de fusion dans le plasmide pGEM blue et, par ailleurs, nous possédons dans M13 mp19 la séquence mutée dans laquelle le peptide de transit et le gène diméthylase sont en phase.

Il reste alors à remplacer, dans le pIH3, un fragment de séquence non muté par son homologue portant la mutation. Ce fragment ne devrait pas excéder les 350 paires de bases dont la séquence a été vérifiée.

1.5.2.Préparation du fragment, de 212 paires de bases, muté au départ du pIH2Δ

3µg de pIH2Δ sont clivés par 10 unités d'enzymes *Xba*I et par 10 unités d'enzyme *Pvu*II.

5 fragments d'ADN sont ainsi obtenus

- 1 fragment *Pvu*II-*Pvu*II de 0,093 kb
- 1 fragment *Pvu*II-*Xba*I de 0,093 kb
- 1 fragment *Xba*I-*Pvu*II de 0,212 kb
- 1 fragment *Pvu*II-*Pvu*II de 0,845 kb
- 1 fragment *Pvu*II-*Pvu*II de 6,862 kb

Après électrophorèse, le fragment de 0,212 kb est extrait du gel d'agarose 0,8 % et purifié. (voir Matériel et Méthodes ).

1.5.3.Préparation du pIH3

2 µg de pIH3 sont coupés par 10 unités d'enzyme *Xba*I. Comme le site *Pvu*II se retrouve trois fois dans le plasmide, on procède a une restriction partielle.

Après échantillonnage, un temps de restriction de 30 minutes est établi pour 3 unités d'enzyme *Pvu*II ajoutées.

Après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %, la bande de 3,729 kb en est extraite et purifiée.

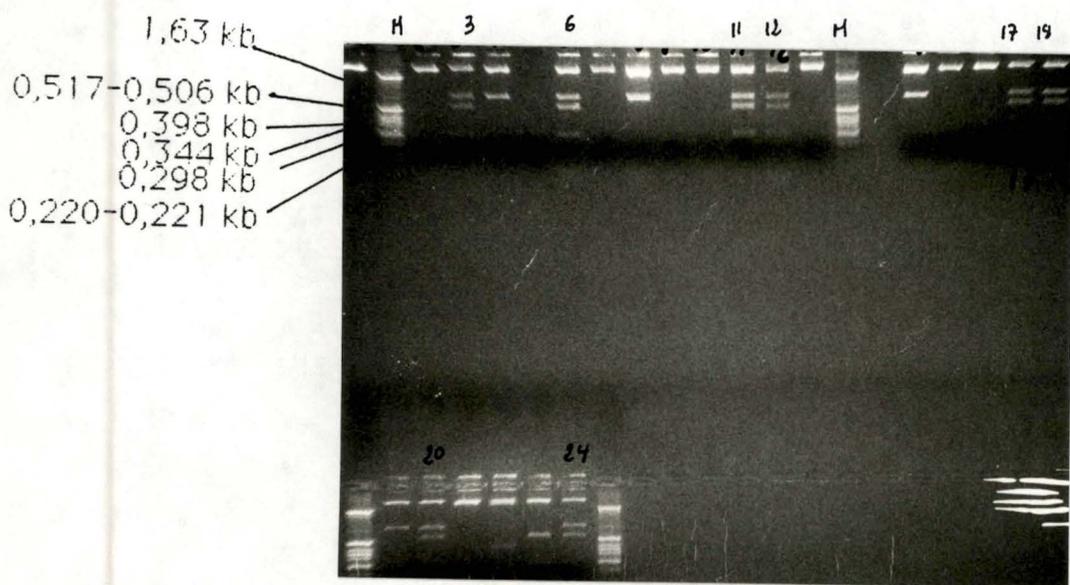


figure 59. Analyse par electrophorese en gel d'agarose, 2% du plasmide suppose être le pIH4.

M=marqueur de taille : phage  $\lambda$  restreint par *Hinf* I.

pistes 1 à 24: double restriction *Xba*I - *Pvu*II.

pistes 3,6,11,12,17,18,20,24: plasmides pIH4 presentant les 4 fragments de taille attendue

#### 1.5.4.Ligation vecteur-insert.

Une ligation est réalisée entre le vecteur pIH3 de 3,729 kb et l'insert muté de 0,212 kb suivant les proportions de deux molécules d'insert par molécule de vecteur.

100 ng d'insert sont mélangés à 950 ng de vecteur en présence d'une unité de T4 DNA ligase. La solution est alors incubée 18 h à 14°C.

Le plasmide attendu, appelé pIH4, doit contenir le gène de la protéine de fusion en phase appelée dès à présent pré-diméthylase.

#### 1.5.5.Transformation de souche XL1 blue par le mélange de ligation.

12,5 µl du mélange de ligation sont utilisés pour transformer la souche XL1 blue. Différents volumes de la solution de transformation sont étalés sur boîte LB solide + ampicilline + IPTG + Xgal.

#### 1.5.6.Criblage des transformants pour identifier le pIH4.

24 clones prélevés au hasard servent à ensemercer 20 flacons universels contenant 10 ml de LB. Après 16 heures, les cultures sont arrêtées et 1,5 ml de chaque culture est soumis au protocole d'extraction rapide de plasmides.

Un cinquième du matériel récupéré sera digéré par 10 unités d'enzyme *Hind*III et 10 unités de *Pvu*II.

Les plasmides attendus doivent donner 4 fragments d'ADN.

- 1 fragment *Pvu*II-*Hind*III de 0,200 kb
- 1 fragment *Hind*III-*Pvu*II de 0,634 kb
- 1 fragment *Pvu*II-*Pvu*II de 0,706 kb
- 1 fragment *Pvu*II-*Pvu*II de 2,409 kb

Huit clones contiennent le pIH4. (Voir figure 59).

## 1.6.Construction des pIH5 et pIH6: clonage du gène de la diméthylase dans deux vecteurs de levure: le pRS 315 et l'YEp 351. (figure 60 et 61)

### 1.6.1.Introduction

La dernière étape de ces constructions génétiques consiste à transférer le fragment codant pour la protéine de fusion du pIH4 dans un vecteur de levure.

Deux vecteurs navettes levure-*E.coli* différents ont été utilisés. Le premier est le pRS315 dont l'origine de répllication chez la levure est une séquence ARS. De plus il possède une séquence centromérique, CEN, qui assure la présence de ce plasmide à raison d'une seule copie par cellule. Le second est l'YEp351, vecteur épisomique, à copies multiples, dont l'origine de répllication chez la levure correspond à un morceau de la séquence du plasmide 2 $\mu$ . En outre, tous deux possèdent les marqueurs de sélection LEU2 et Amp<sup>r</sup> ainsi que l'origine de répllication bactérienne du pBR322.

L'utilisation d'un vecteur à copies multiples, tel l'YEp351, devrait nous permettre d'avoir un taux d'expression élevé tandis que le clonage dans un vecteur présent en un exemplaire, le pRS315, devrait prévenir les risques de surexpression d'une protéine étrangère dont on ne peut exclure qu'elle puisse être néfaste pour la levure transformée.

### 1.6.2.Préparation de l'insert

10 $\mu$ g de pIH4 sont clivés par 10 unités d'enzyme *Eco*RI et par 10 unités d'enzyme *Hind*III.

On s'attend à obtenir deux fragments d'ADN de taille différente :

- 1 fragment *Eco*RI-*Hind*III de 1,248 kb correspondant à l'insert
- 1 fragment *Eco*RI-*Hind*III de 2,693 kb correspondant à la matrice du vecteur.

Après éléctrophorèse, le fragment de 1,248 kb est extrait du gel d'agarose 0,8% et purifié. (voir Matériel et Méthodes).

### 1.6.3.Préparation des vecteurs

Le YEp 351 et le pRS 315 contiennent chacun un site de clivage *Hind*III unique et deux sites *Eco*RI. (figure 60, 61).

Clonage de la séquence de la protéine de fusion dans le vecteur pRS315.

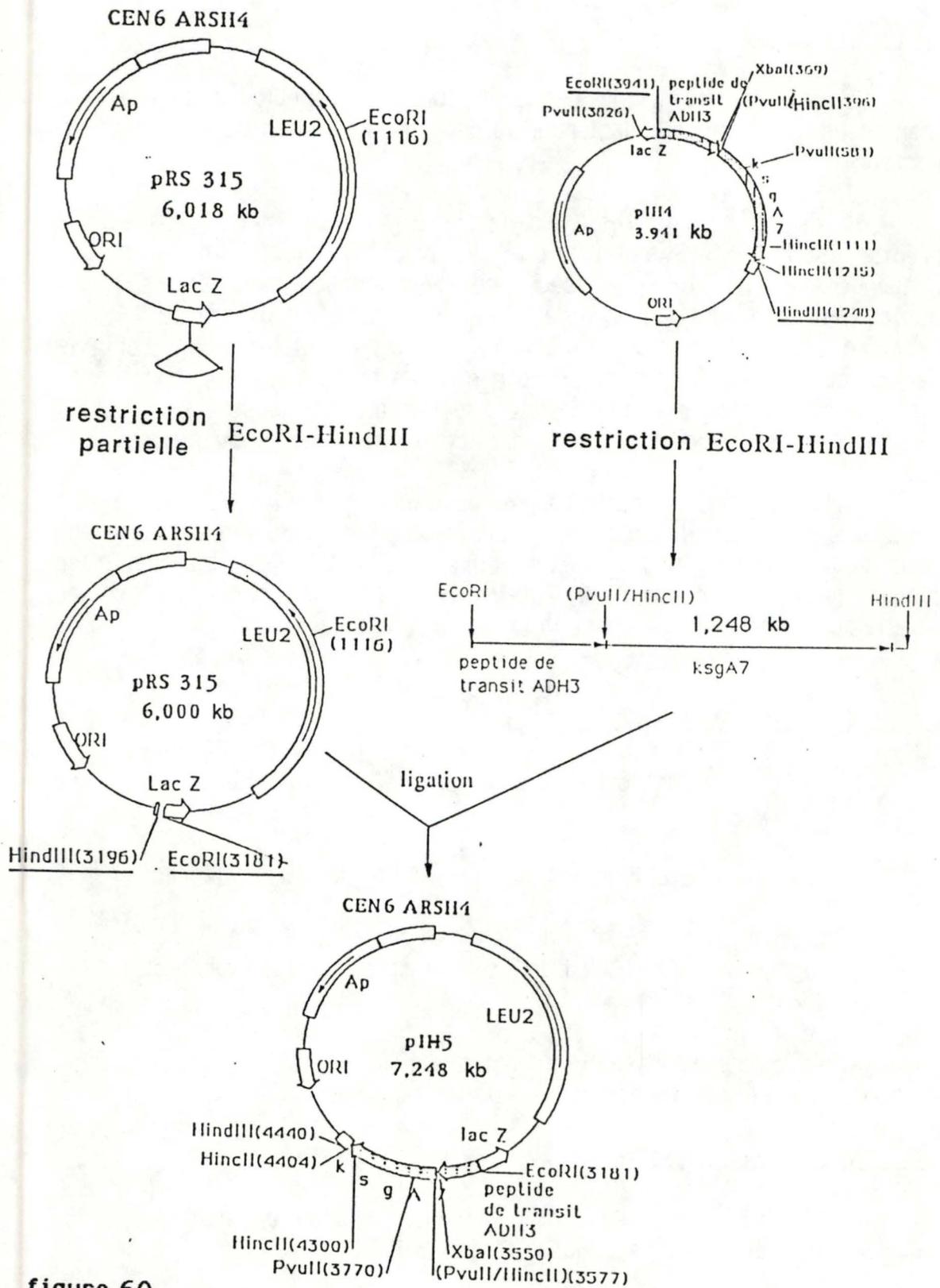
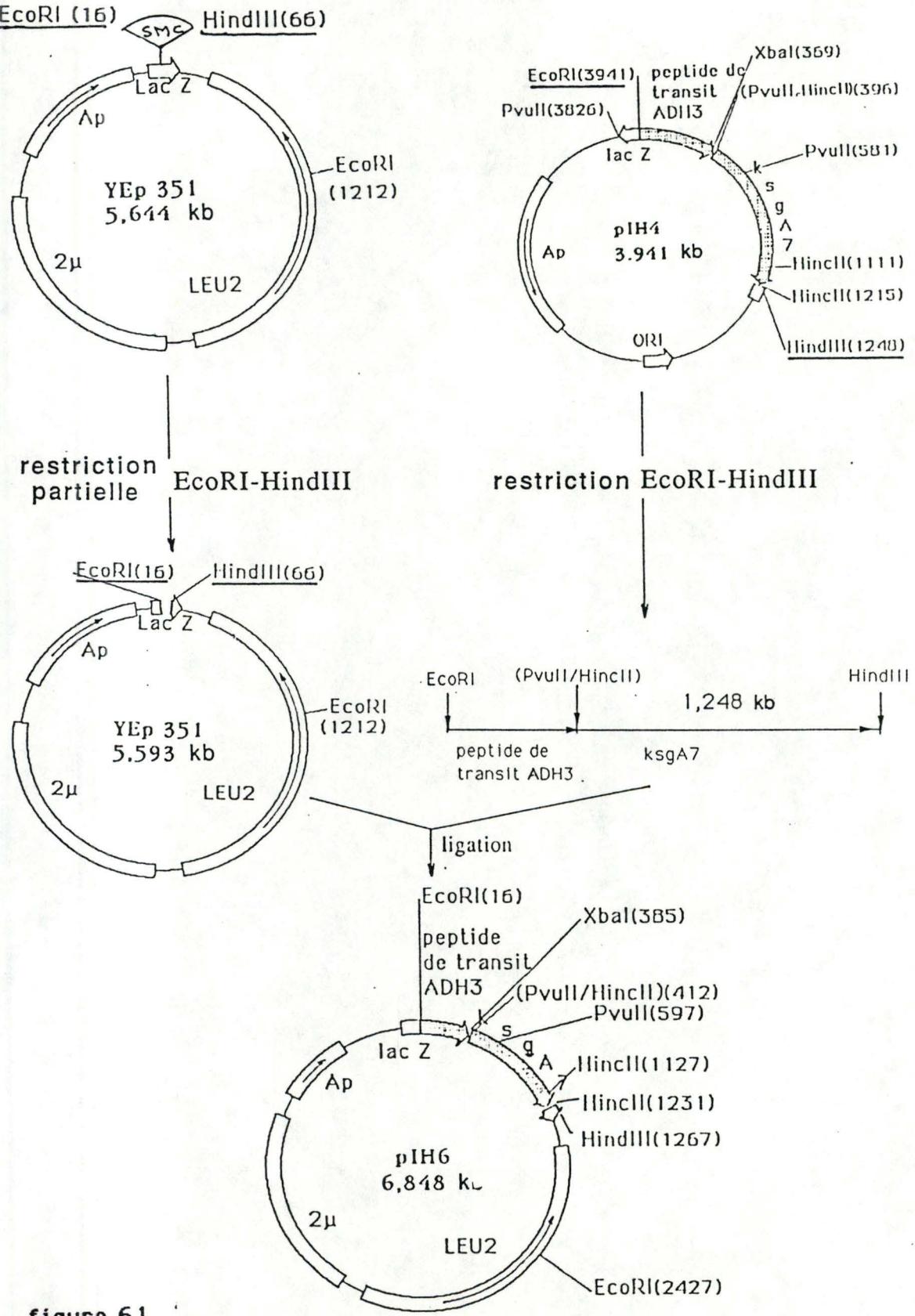


figure 60.

**Clonage de la séquence de la protéine de fusion dans le vecteur YEp351.**



**figure 61.**

5 ug de chaque plasmide sont d'abord soumis à une restriction totale *Hind*III, puis à une restriction partielle *Eco*RI 30' à 37°C.

On s'attend à obtenir 3 fragments d'ADN pour chaque plasmide :

	pRS 315	YEp 35
1 fragment <i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RI de 2,100 kb		5,593 kb
1 fragment <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI de 3,918 kb		4,498 kb
1 fragment <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III de 6,000 kb		1,197Kb

Après électrophorèse, les fragments de 6,000 kb et 5,593 kb sont extraits du gel d'agarose 0,8 % et purifiés. (voir Matériel et Méthodes ).

#### 1.6.4.Ligation vecteur-insert.

Une réaction de ligation entre l'insert et chacun des deux plasmides suivant la proportion de deux molécules d'insert par molécule de plasmide est réalisée.

400 ng d'insert sont ajoutés à 800 ng de vecteur en présence d'une unité de T4 DNA ligase et incubés une heure sur table puis une heure à 37°C.

Deux nouveaux plasmides sont ainsi attendus: le pIH5 de 7,248 kb, (figure 60), et le pIH6 de 6,841 kb, (figure 61), correspondant respectivement au matrice du pRS315 et de l'YEp351 qui contiennent le gène de la pré-diméthylase.

#### 1.6.5.Transformation de la souche XL1 blue par chaque mélange de ligation.

12,5 µl de chaque mélange de ligation sont utilisés pour transformer des cellules compétentes de la souche XL1 blue. Différents volumes de transformation sont étalés sur milieu LB solide + ampicilline + IPTG + Xgal.

#### 1.6.6.Criblage de transformants pour identifier le pIH5 et le pIH6.

20 colonies blanches de transformants issues de chaque mélange de ligation servent à inoculer 20 flacons universels contenant 5 ml de LB + ampicilline.

Après 16 heures d'incubation, 1,5 ml de chaque culture est soumis au protocole d'extraction rapide de plasmide.



figure 62. Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 0,8%.

M=marqueur de taille : phage  $\lambda$  restreint par *Hind*III.  
 piste 1: pIH5 restreint par *Eco*RI + *Hind*III.  
 piste 2: pRS315 restreint par *Eco*RI + *Hind*III.

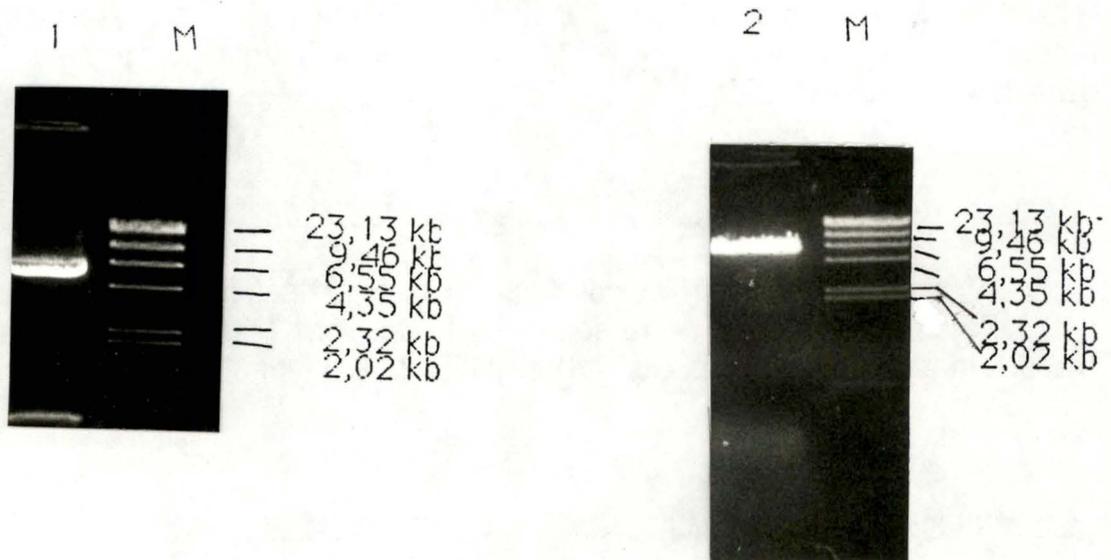


figure 63. Profil d'électrophorèse en gel d'agarose 0,8%.

M=marqueur de taille : phage  $\lambda$  restreint par *Hind*III.  
 piste 1: pIH6 restreint *Xba*I + *Hind*III.  
 piste 2: YEp351 restreint par *Xba*I + *Hind*III.

Un cinquième du matériel obtenu par mini-préparation de plasmides, pour le pIH5, est restreint par 10 unités d'*EcoRI* et 10 unités d'*HindIII*.

Le plasmide correspondant à la bonne construction doit présenter trois fragments d'ADN.

1 fragment *HindIII*-*EcoRI* de 1,248 kb

1 fragment *EcoRI*-*HindIII* de 2,100 kb

1 fragment *EcoRI*-*EcoRI* de 3,918 kb

L'analyse de l'ADN plasmidique d'un clone présente le profil de restriction correspondant au pIH5. (figure 62).

Un cinquième du matériel obtenu par mini-préparation de plasmides, pour le pIH6, est restreint par 10 unités *XbaI* et par 10 unités *HindIII*.

Le plasmide correspondant à la bonne construction doit présenter deux fragments d'ADN. C'est le cas pour un clone qui contient le pIH6. (voir figure 63):

1 morceau *XbaI*-*HindIII* de 0,875 kb

1 morceau *HindIII*-*XbaI* de 5,952 kb

#### **1.7. Vérification des constructions génétiques: mise en évidence de l'activité de la protéine de fusion par restauration de la sensibilité à la kasugamycine chez la souche *E. coli* ksgA<sup>-</sup> transformée par le pIH5 et par le pIH6.**

Cette expérience vise à contrôler l'intégrité fonctionnelle du gène *ksgA* aménagé dans les constructions pIH5 et pIH6. Son intégrité structurale ayant été vérifiée par séquençage après la réaction de mutagenèse.

La souche *E. coli* ksgA<sup>-</sup> (voir Introduction.) est résistante à la kasugamycine et se caractérise par l'absence de diméthylation au niveau des deux adénines de l'épingle à cheveux 3'-terminale du 16S-ARNr. Cette souche transformée par le pUC8ksgA7, plasmide porteur du gène de la diméthylase, redevient sensible à cet antibiotique et possède cette diméthylation. Ceci est dû à l'expression de la diméthylase.

L'expression de la protéine de fusion dans *E. coli* à partir du pIH5 et du pIH6 nécessite que les signaux de transcription et de traduction soient reconnus chez *E. coli*.

Si la diméthylase d'*E.coli* exprimée à partir du pIH5 et du pIH6 est active, elle restaurera le phénotype de la sensibilité à la kasugamycine chez le mutant d'*E.coli* JM101 ksgA<sup>-</sup> confirmera donc l'exactitude de la séquence de la protéine de fusion "peptide de transit ADH3- diméthylase".

En pratique, la souche d'*E.coli* JM101 ksgA<sup>-</sup> est transformée par les plasmides suivants: -le pUC8ksgA7  
-le pRS315  
-l'YEp351  
-le pIH5  
-le pIH6

Les mélanges de transformation sont étalés sur milieux LB contenant de l'ampicilline. Une colonie de chaque transformant sert à ensemercer une culture dont une dilution 10<sup>-4</sup> est étalée sur milieu LB contenant de l'ampicilline à une concentration de 100 µg par ml et de la kasugamycine à une concentration de 200 µg par ml ainsi que sur un milieu de contrôle LB contenant de l'ampicilline. La souche d'*E.coli* ksgA<sup>-</sup>, utilisée comme contrôle, est aussi mise en culture et une dilution 10<sup>-4</sup> de celle-ci est étalée sur milieu LB contenant de la kasugamycine.

Les résultats suivants sont obtenus:

- la souche ksgA<sup>-</sup> non transformée est résistante à la kasugamycine.
- la souche ksgA<sup>-</sup> transformée par le pRS315 est résistante à la kasugamycine.
- la souche ksgA<sup>-</sup> transformée par l'YEp351 est résistante à la kasugamycine.
- la souche ksgA<sup>-</sup> transformée par le pUC8ksgA7 est sensible à la kasugamycine.
- la souche ksgA<sup>-</sup> transformée par le pIH5 est sensible à la kasugamycine.
- la souche ksgA<sup>-</sup> transformée par le pIH6 est sensible à la kasugamycine.

En conclusion, la protéine de fusion est exprimée chez *E. coli* à partir du pIH5 et du pIH6 et est active.

## **1.8. Conclusion**

Au terme de ces constructions génétiques, nous disposons de deux vecteurs de levure, le pIH5 et le pIH6 qui correspondent respectivement au pRS315 et à l'YEp351 dans lesquels le gène de la protéine de fusion "peptide de transit d'ADHIII-diméthylase d' *E. coli*" a été cloné et remis dans une phase de lecture unique.

La construction de la pré-diméthylase a été vérifiée par séquençage. De plus des tests de restauration de la sensibilité à la kasugamycine chez la souche ksgA<sup>-</sup> d' *E. coli*, naturellement résistante à cet antibiotique, montrent sans ambiguïté que la pré-diméthylase est fonctionnelle chez *E. coli*.

Nous sommes ainsi à pied d'oeuvre pour atteindre l'objectif de ce travail. En effet, la transformation de la levure avec le pIH5 et le pIH6

devra permettre de vérifier l'expression de la diméthylase dans les transformants, son importation dans la mitochondrie et les effets moléculaires et phénotypiques éventuels.

## II. TRANSFORMATION DE LEVURE ET ETUDE DE L'IMPORTATION DE LA DIMETHYLASE DANS LA MITOCHONDRIE DES LEVURES TRANSFORMEES..

### II.1. Transformation de la souche GRF18 de *Saccharomyces cerevisiae* par le pIH5 et par le pIH6.

#### II.1.1. Stratégie générale.

La souche de levure GRF18 dont l'auxotrophie pour la leucine (Matériel et Méthodes) est complétée par le marqueur LEU2 du pIH5 et du pIH6 est choisie comme hôte de transformation pour les études qui suivent. Nous utilisons comme contrôle des levures contenant le pRS315 et l'YEp351 ainsi que des levures non transformées.

Après avoir transformé la souche de levure avec les différents plasmides, les mitochondries seront purifiées de la fraction cytoplasmique. L'expression de la diméthylase sera recherchée par gel polyacrylamide en conditions dénaturantes et par immunodétection dans le cytoplasme et la matrice mitochondriale.

Ensuite, les mitoribosomes seront isolés et la présence de la double méthylation sera recherchée au niveau du 15S-ARNr par l'analyse des produits d'hydrolyse de ces ARN injectés dans l'HPLC.

#### II.1.2. Transformation de la souche GRF18 de *Saccharomyces cerevisiae*

La souche GRF18 est transformée par 1 µg de plasmide pIH5, pIH6, pRS315 et YEp351 selon le protocole décrit à la page 33 du chapitre Matériel et Méthodes.

Les mélanges de transformation sont étalés sur milieu synthétique complet, (voir Matériel et Méthodes), sans leucine et incubés à 30 °C.

#### II.1.3. Identification des transformants.

Pour vérifier l'authenticité des transformants, un clone de levure issu de la transformation par le pIH5 et un autre provenant de la transformation par le pIH6 sont soumis à une mini-préparation de plasmides. (voir Matériel et Méthodes).

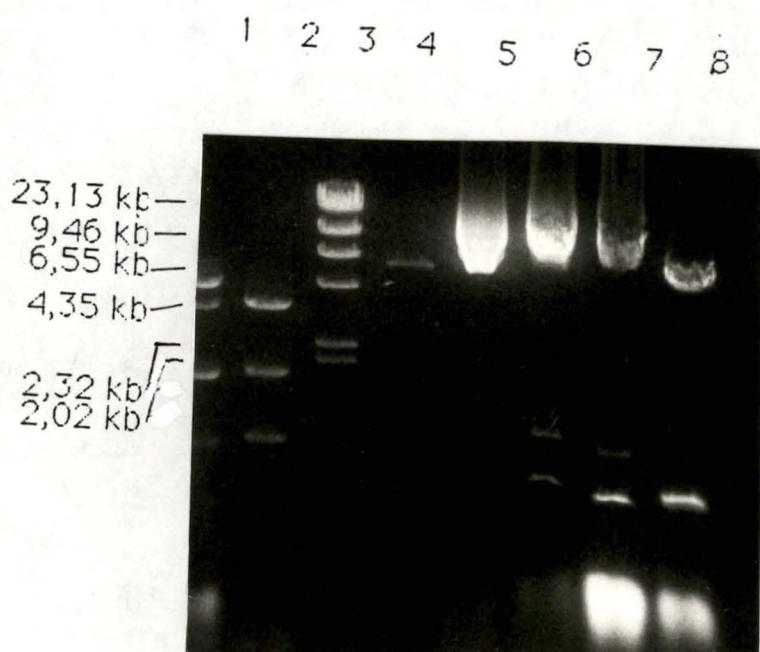


figure 64. Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 0,8%.  
 piste 1: pIH5 restreint par *EcoRI-HindIII*; la restriction est partielle  
 piste 2: restriction totale *EcoRI-HindIII* du pIH5; les 3 fragments de taille attendues apparaissent.  
 piste 3: marqueur de taille: phage  $\lambda$  restreint par *HindIII*.  
 piste 4 à 7: restriction *XbaI-HindIII* du pIH6; la restriction est partielle  
 piste 8: restriction totale *XbaI-HindIII* du pIH6; les 2 fragments de taille attendues sont obtenus.

La souche XL1blue d'*E. coli* est transformée par ces préparations plasmidiques. Les mélanges de transformation sont étalés sur milieux LB contenant de l'ampicilline.

Cinq clones obtenus pour chacune des deux transformations sont soumis au protocole d'extraction rapide de plasmides.

Un cinquième de l'ADN plasmidique obtenu pour la transformation par le pIH5 est restreint par 10 unités d'*Eco*RI et par 10 unités d'*Hind*III. Trois fragments d'ADN, de 1,248, 2,100 et 3,918 kb sont obtenus et indiquent que le plasmide est bien le pIH5. (figure 64).

Un cinquième de l'ADN plasmidique obtenu pour la transformation par le pIH6 est restreint par 10 unités de *Xba*I et par 10 unités d'*Hind*III. Deux fragments d'ADN, de 0,875 et de 5,952 kb, sont obtenus et indiquent que le plasmide est bien le pIH6. (figure 64).

## **II.2.Expression et importation intramitochondriale**

### **II.2.1.Mise en culture des transformants et préparation des mitoribosomes.**

Des levures transformées par le pIH5 et d'autres par le pIH6 sont mises en préculture dans 20 ml de milieu minimum 0,5% glucose-2% galactose contenant de l'histidine. Des cultures de 2 litres de milieu minimum 2% galactose contenant de l'histidine sontensemencées avec ces précultures

Un clone de la souche GRF18 de *Saccharomyces cerevisiae* est également mis en préculture puis en culture dans les mêmes milieux auxquels de la leucine est ajoutée.

Le galactose est utilisé comme source de carbone dans les milieux de culture car c'est un sucre dont les effets répresseurs sur les enzymes respiratoires sont moindres que ceux du glucose. On espère ainsi favoriser la respiration des levures et le développement des mitochondries qu'il s'agit ensuite d'isoler. Cependant avant de pouvoir métaboliser le galactose, les levures doivent utiliser une autre source de carbone, c'est pourquoi du glucose est ajouté au milieu de préculture.

Lorsque les cultures atteignent la fin de la phase exponentielle de croissance, elles sont soumises au protocole de préparation des mitoribosomes (voir Matériel et Méthodes). Le schéma de centrifugation est résumé à la figure 65.

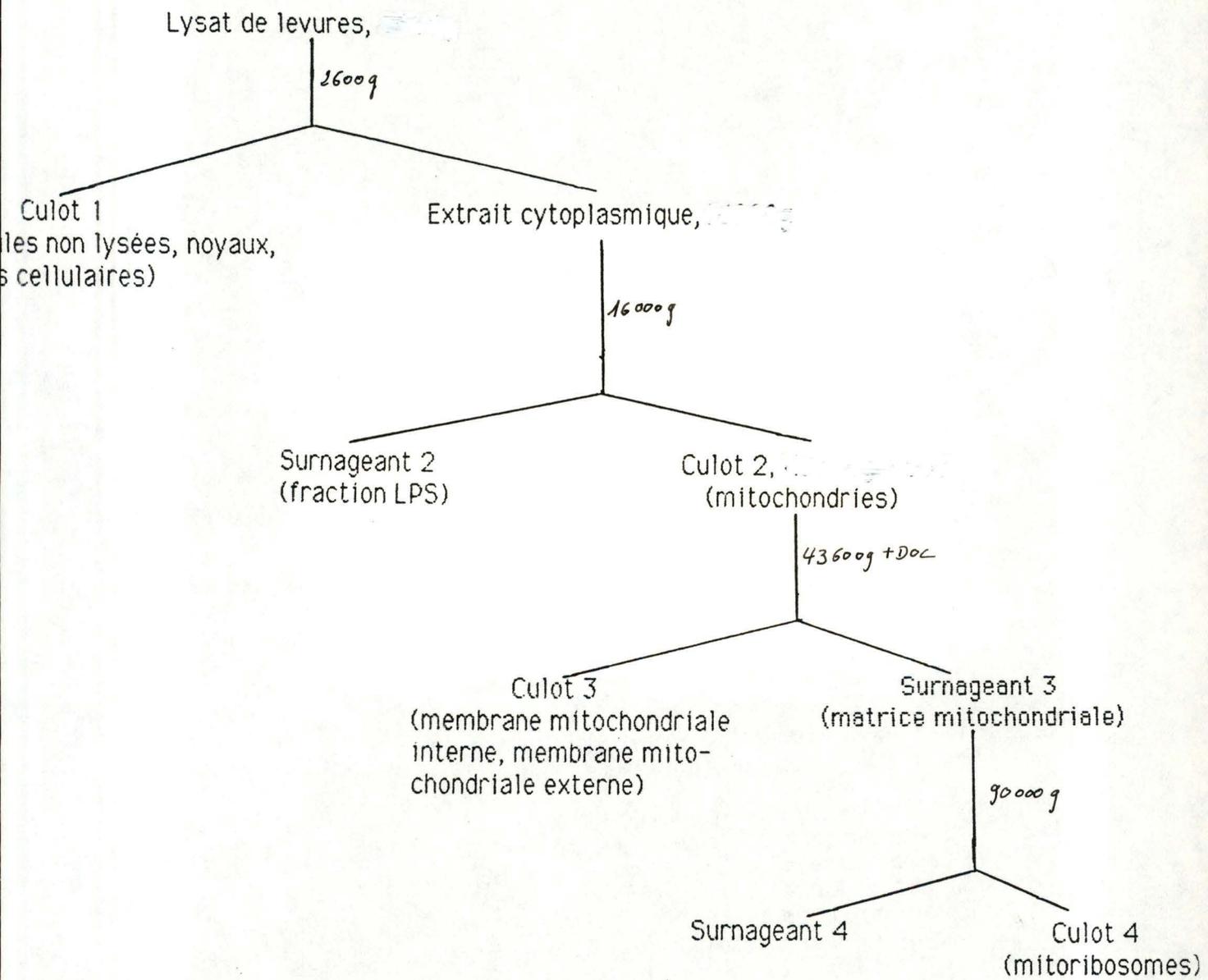


figure 65. Centrifugations successives pour isoler les mitoribosomes

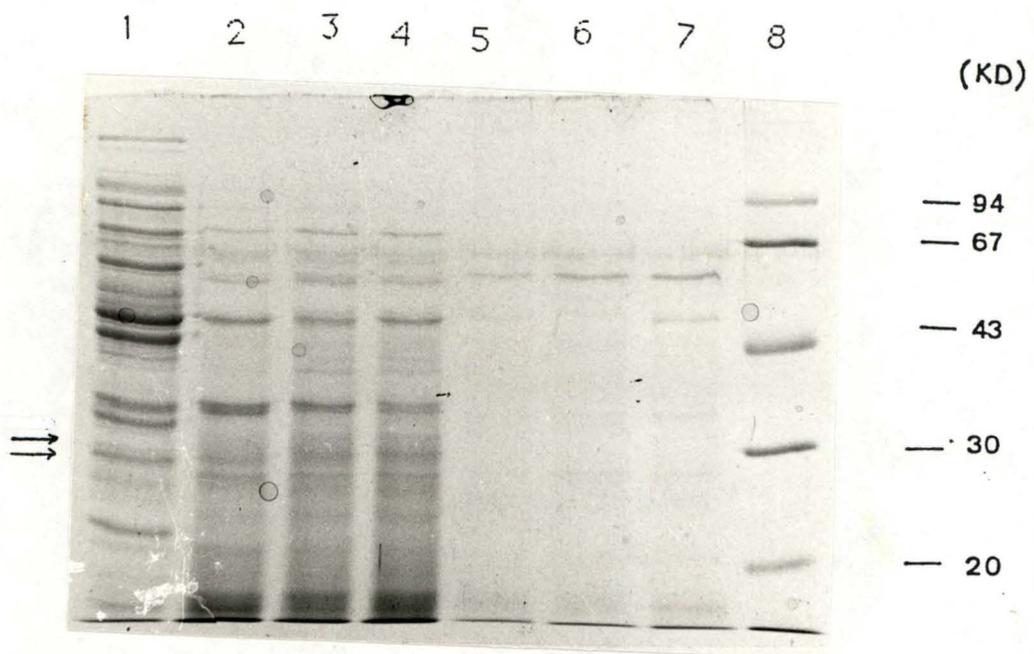


figure 66. Electrophorèse en gel protéique polyacrylamide en conditions dénaturantes des échantillons protéiques suivants.

- piste 1: lysat brut d' *E. coli* transformé par le pUC8ksgA7.
- piste 2: extrait cytoplasmique de GRF 18 transformée par le pRS315.
- piste 3: extrait cytoplasmique de GRF 18 transformée par le pIH5.
- piste 4: extrait cytoplasmique de GRF 18 transformée par le pIH5.
- piste 5: protéines de la matrice mitochondriale de GRF 18 transformée par le pRS315.
- piste 6: protéines de la matrice mitochondriale de GRF 18 transformée par le pIH5.
- piste 7: protéines de la matrice mitochondriale de GRF 18 transformée par le pIH5.
- piste 8: marqueur de poids moléculaire. (Pharmacia)

N.B. Les flèches indiquent les positions des bandes, correspondant à la diméthylase (P.M.= 29900) et de la pré-diméthylase (P.M.=32900), détectées immédiatement après coloration au bleu de Coomassie.

1 2 3 4 5 6



figure 67. " Immunoblot ".

- piste 1: lysat brut d' *E. coli* transformé par le pUC8ksgA7.
- piste 2: protéines de la fraction mitochondriale de GRF 18 transformé par le pRS315.
- piste 3: protéines de la fraction mitochondriale de GRF 18 transformé par le pIH5.
- piste 5: extrait cytoplasmique de GRF 18 transformé par le pRS315.
- piste 6: extrait cytoplasmique de GRF 18 transformé par le pIH5.

1 2 3 4 5



figure 68. " Immunoblot ".

- piste 1: lysat brut d' *E. coli* transformé par le pUC8ksgA7.
- piste 2: protéines de la fraction mitochondriale de GRF 18 transformé par le YEp351.
- piste 3: protéines de la fraction mitochondriale de GRF 18 transformé par le pIH5.
- piste 4: extrait cytoplasmique de GRF 18 transformé par le YEp351.
- piste 5: extrait cytoplasmique de GRF 18 transformé par le pIH5.

### II.2.2. Mise en évidence de la protéine de fusion après électrophorèse en gel SDS- polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie.

Les surnageants (S1) obtenus après la lyse des levures et leur centrifugation à 4000 rpm dans le rotor GSA, (figure 64), sont soumis à une électrophorèse sur un gel polyacrylamide en conditions dénaturantes. Après coloration au bleu de Coomassie, l'extrait cytoplasmique des levures transformées par le pIH5, (pistes 3 et 4 figure 66), comparé au contrôle non transformé, montre la présence d'un polypeptide supplémentaire, indiqué par la flèche. Ce polypeptide présente une taille apparente légèrement supérieure à celle de la diméthylase d'*E. coli*, (piste 1), estimée à 29900 daltons. (26). IL pourrait donc s'agir de la pré-diméthylase. La photo de ce gel n'ayant pas été prise immédiatement, les protéines ont diffusé et la bande correspondant à la pré-diméthylase n'est plus distinguable. Notons ici la différence entre la quantité de protéines déposées sur gel pour la fraction S1 et celle déposée sur gel pour la fraction S4 (correspondant au surnageant de la centrifugation destinée à isoler les mitoribosomes). La pré-diméthylase n'a pas été mise en évidence au niveau de cette fraction S4

La protéine de fusion serait donc traduite dans le cytoplasme de levure transformée par le pIH5.

### II.2.3. Vérification par "immunoblot" de la nature de la protéine observée sur gel SDS-polyacrylamide.

Pour confirmer la présence de la diméthylase d'*E. coli* dans le cytoplasme de levure transformée par le pIH5 et par le pIH6 et pour la mettre en évidence dans la mitochondrie de ces mêmes levures, des "immunoblots" sont réalisés avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-diméthylase d'*E. coli* fournis par P.H. Van Knippenberg.

Sur l'immunoblot de la figure 67, (pIH5), 2 bandes, (piste 6), apparaissent environ à la même hauteur que la diméthylase d'*E. coli*. (piste 1). Elles pourraient correspondre à la pré-diméthylase et à la diméthylase mature. Cette dernière résulterait du clivage de la pré-diméthylase par des peptidases du cytoplasme ou plus vraisemblablement proviendrait de la matrice de certaines mitochondries contaminant la fraction cytoplasmique. Celles-ci seraient altérées lors de la lyse des levures ou dénaturées par le choc thermique à 100°C avant la mise sur gel.

Sur l'immunoblot de la figure 68, (pIH6), une bande, (piste 5), apparaît nettement, plus ou moins à la même hauteur que la diméthylase d'*E. coli* indiquée par une flèche à la piste 1; la deuxième est moins visible.

La pré-diméthylase a donc bien été traduite dans le cytoplasme des levures transformées par le pIH5 et par le pIH6. Cependant aucune

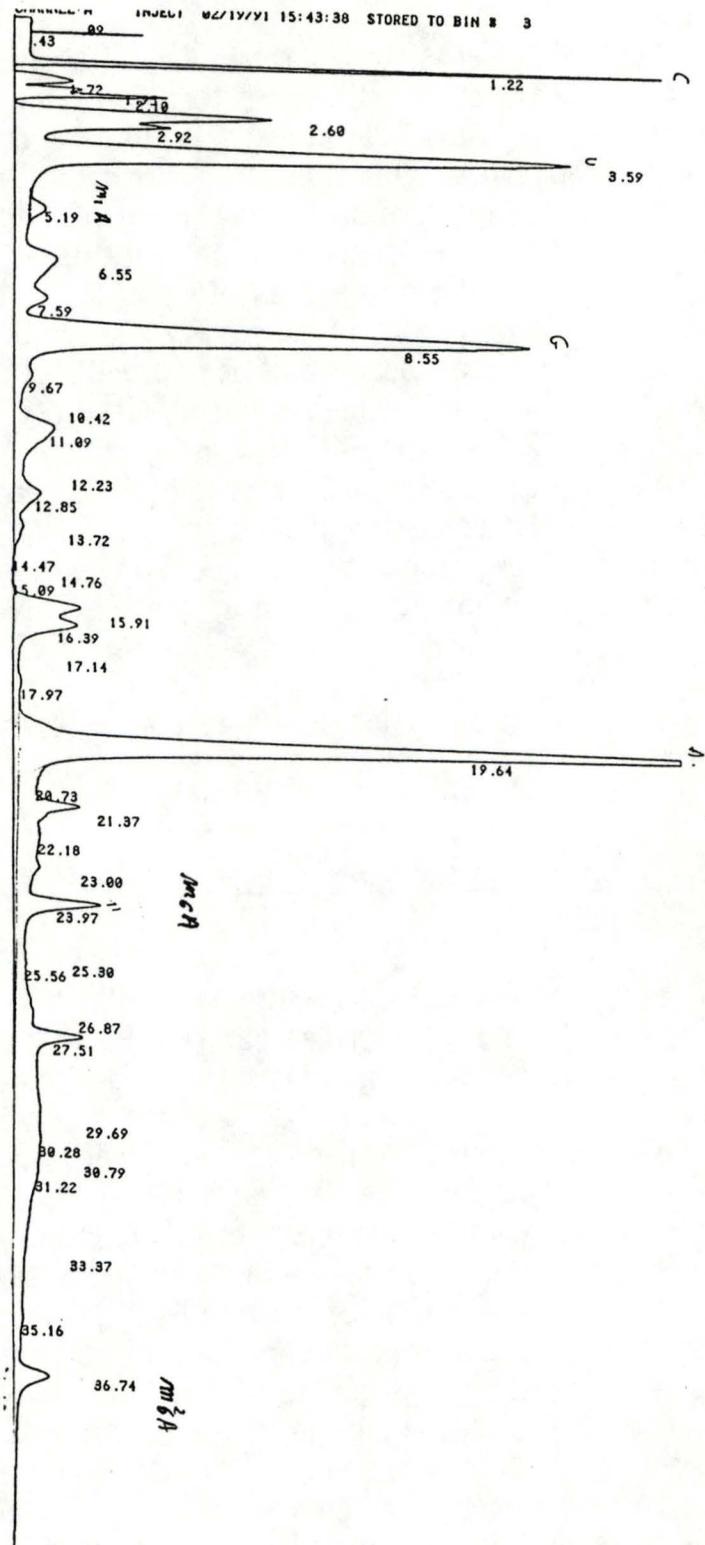


Figure 69. Profil HPLC obtenu pour l'ARNr de mitochondries de levures transformees par le PIHS.

protéine n'est mise en évidence au niveau des pistes correspondant au surnageant S4.

En conclusion, la pré-diméthylase est mise en évidence dans le cytoplasme des levures transformées par le pIH5 et par le pIH6.

Cependant, la diméthylase d'*E. coli* n'est pas détectée dans la matrice mitochondriale de ces mêmes levures ni par SDS-PAGE ni par immunoblot. Différentes hypothèses peuvent expliquer cette situation.

-Soit, l'importation de la protéine a bien eu lieu mais en quantité trop faible que pour être décelable.

-Soit encore les structures tertiaire et quaternaire de la diméthylase s'opposent à son importation dans la mitochondrie. La protéine pourrait être trop compacte ou encore, elle masquerait le peptide de transit ADH3.

La présence dans le cytoplasme d'une protéine de taille légèrement inférieure à celle de la pré-diméthylase pourrait correspondre à la diméthylase mature dont l'origine n'est pas claire.

Pour éclaircir la situation, nous avons envisagé de rechercher les traces d'une activité de la diméthylase dans la mitochondrie des levures transformées par le pIH5 et par le pIH6 par une étude analytique visant à détecter la présence du nucléoside  $m_2^6A$  au niveau de l'ARNr mitochondrial.

### 11.3. Recherche d'une activité de la diméthylase dans la mitochondrie par détection du nucléoside $m_2^6Am_2^6A$ par HPLC.

L'ARN des mitoribosomes de la souche GRF18 transformée par le pRS315 et par le pIH5 est purifié et digéré (voir Matériel et Méthodes).

50  $\mu$ g d'ARNr ainsi traités sont analysés par HPLC et les profils représentés aux figures 69 et 70 sont obtenus respectivement pour l'ARNr de mitochondries de levure transformées par le pRS315 et par le pIH5.

L'ARNr de mitochondries de levures ne possédant que deux nucléosides méthylés en position 2'-O du ribose, on s'attend à observer sur ces profils 4 pics correspondant aux nucléosides G, C, U et A, ainsi que 2 pics correspondant aux 2 nucléosides ribose-méthylés. Un pic supplémentaire  $m_2^6A$  qui sort à 37minutes est attendu pour le profil de la figure 69.

L'observation de ces profils montre une série de pics non attendus. Ceux-ci témoignent d'une digestion incomplète de l'ARNr et d'une contamination des mitoribosomes par des ARNt et par les ribosomes cytoplasmiques. Le pic  $m_2^6A$  est détecté sur les deux profils.

Pour mettre en évidence la présence de nucléosides  $m_2^6Am_2^6A$  du 15S-ARNr de mitoribosomes de levures transformées par le pIH5, une

CHANNEL A INJECT 02/19/91 12:36:28 STORED TO BIN # 2

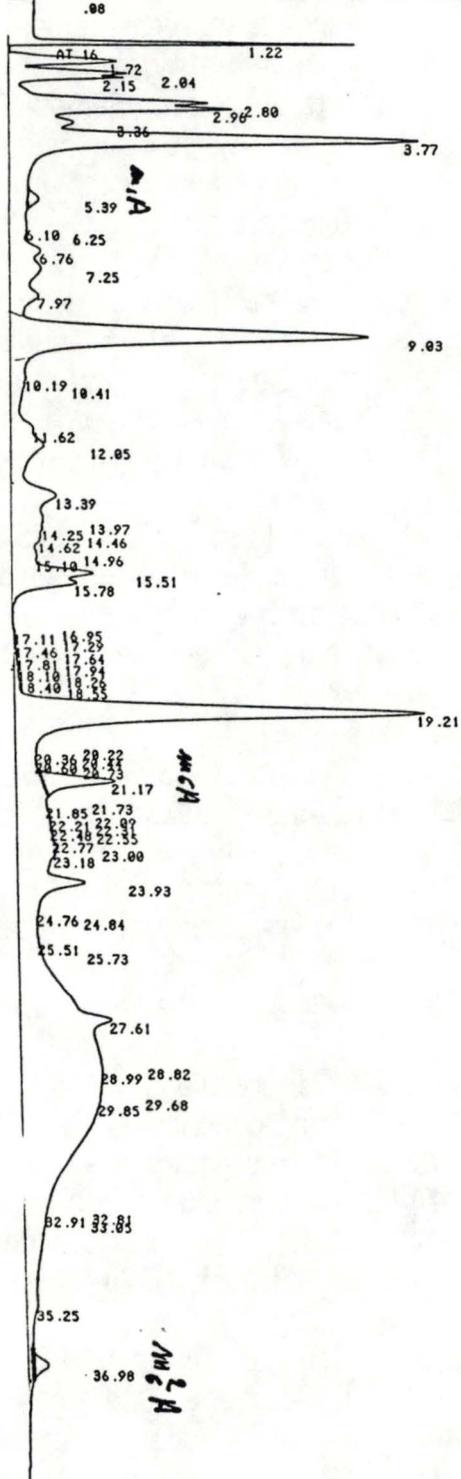


Figure 70. Profil HPLC obtenu pour l'ARNr de mitochondries de levures transformées par le PRS315.

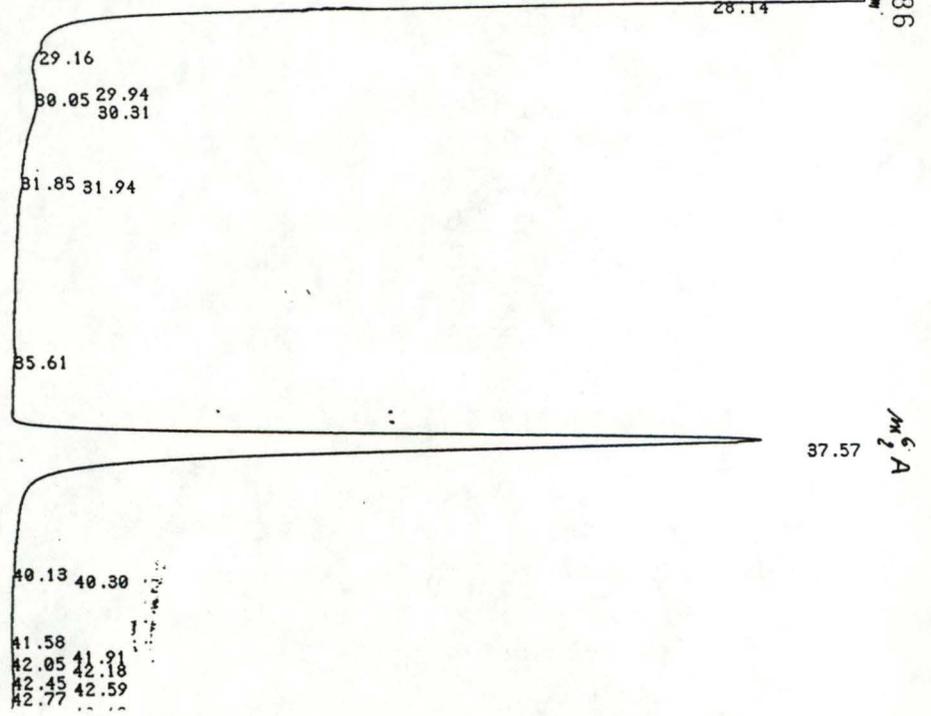
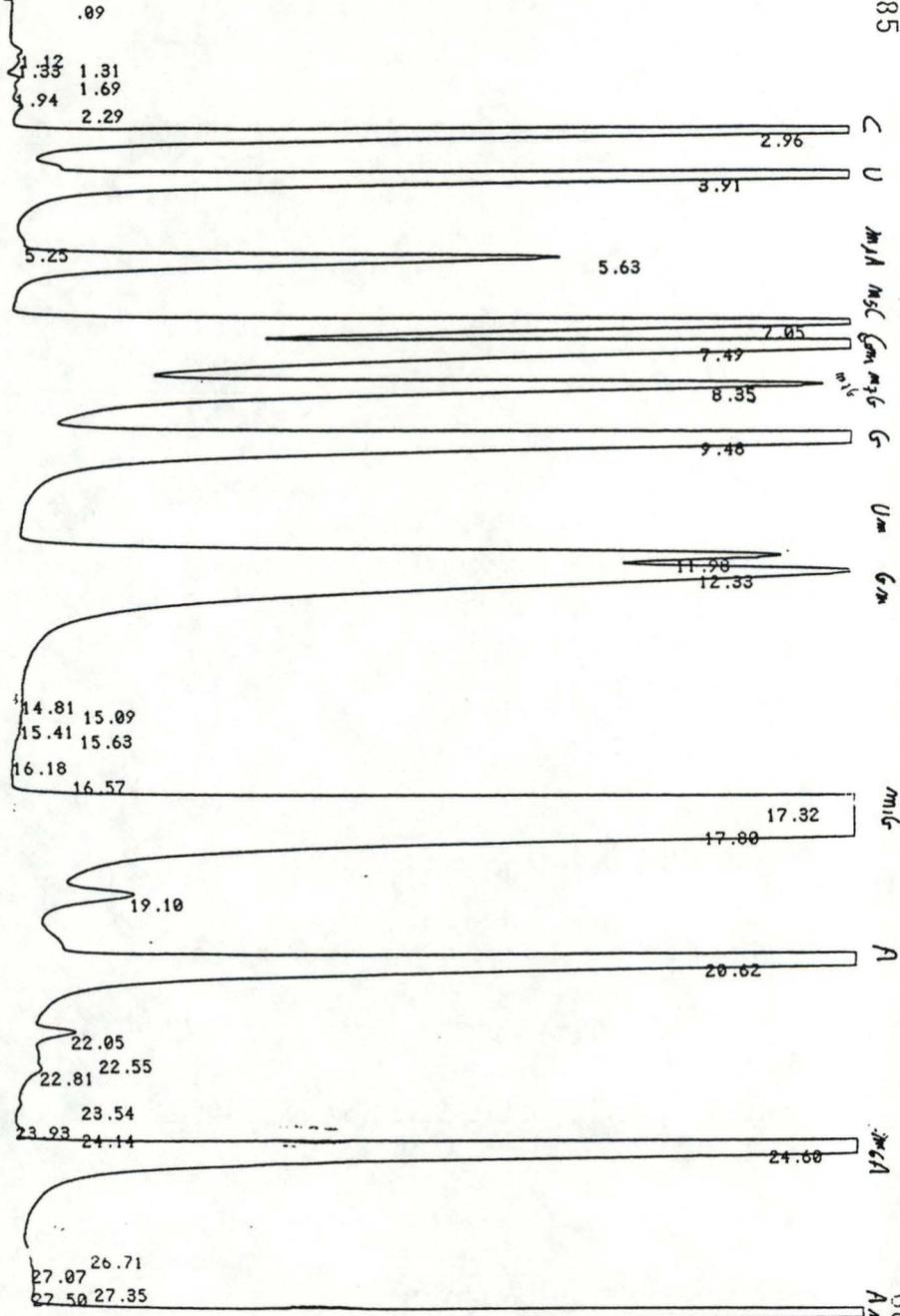


Figure 71. Profil HPLC obtenu pour l'injection des standards.

Pics du profil HPLC de l'ARNr de mitochondries de levures transformées par le pIH5, profil I; (figure 69)

m1A	m6A	$m_{\frac{6}{2}}A$	$m_{\frac{6}{2}}A/m1A$	$m_{\frac{6}{2}}A/m6A$
0,0034 g	0,0093 g	0,0061 g	1,794	0,656
0,0032 g	0,0082 g	0,0060 g	1,875	0,732
0,0032 g	0,0093 g	0,0055 g	1,719	0,591
0,0033 g	0,0091 g	0,0057 g	1,727	0,626
0,0031 g	0,0089 g	0,0050 g	1,613	0,562
0,0031 g	0,0085 g	0,0056 g	1,806	0,659
0,0029 g	0,0098 g	0,0059 g	2,034	0,602
0,0034 g	0,0093 g	0,0054 g	1,589	0,581
0,0031 g	0,0085 g	0,0053 g	1,709,	0,623
0,0029 g	0,0091g	0,0056 g	1,931	0,615

moyenne des valeurs  $m_{\frac{6}{2}}A/m1A = 1,780 (I)$

ecart type des valeurs  $m_{\frac{6}{2}}A/m1A = 0,139$

moyenne des valeurs  $m_{\frac{6}{2}}A/m6A = 0,625$

ecart type des valeurs  $m_{\frac{6}{2}}A/m6A = 0,049$

Pics du profil HPLC de l'ARNr de mitochondries de levures transformées par le pRS 315, profil II. (figure 70)

m1A	m6A	$m_{\frac{6}{2}}A$	$m_{\frac{6}{2}}A/m1A$	$m_{\frac{6}{2}}A/m6A$
0,0022 g	0,0060 g	0,0034 g	1,545	0,566
0,0021 g	0,0058 g	0,0030 g	1,428	0,517
0,0022 g	0,0058 g	0,0035 g	1,590	0,603
0,0024 g	0,0056 g	0,0032 g	1,333	0,571
0,0020 g	0,0058 g	0,0030 g	1,500	0,517
0,0024 g	0,0058 g	0,0035 g	1,428	0,603
0,0024 g	0,0056 g	0,0030 g	1,250	0,536
0,0022 g	0,0056 g	0,0035 g	1,590	0,625
0,0023 g	0,0057 g	0,0033 g	1,434	0,579
0,0021 g	0,0058 g	0,0032 g	1,524	0,552

moyenne des valeurs  $m_{\frac{6}{2}}A/m1A = 1,465$

ecart type des valeurs  $m_{\frac{6}{2}}A/m1A = 0,110$

moyenne des valeurs  $m_{\frac{6}{2}}A/m6A = 0,567$

ecart type des valeurs  $m_{\frac{6}{2}}A/m6A = 0,037$

comparaison de la surface relative de ce pic provenant de chacun des deux profils est effectuée. Si une augmentation significative de la surface de ce pic pour l'ARNr de mitochondries de levures transformées par le pIH5 par rapport à celle de levures transformées par le pRS315 est mise en évidence, elle pourra être attribuée à la diméthylation des deux adénines de l'épingle à cheveux 3'-terminale du 15S-ARNr.

Les standards internes permettant une mesure relative de la surface du pic  $m_2^6Am_2^6A$  sont les surfaces de pics correspondant aux nucléosides  $m_1A$  et  $m_2^6A$  présents sur le 26S-ARNr des cytoribosomes et sur les ARNt.

La surface de ces différents pics est estimée par pesée sur une balance dont la précision est de 0,0000 g. La découpe de ces pics est représentée sur les figures 69 et 70.

Pour chaque pic, 10 pesées sont réalisées. Les résultats sont présentés à la figure 71.

Ne possédant qu'un seul profil pour l'ARNr de mitochondries des levures transformées par le pIH5 et un seul profil pour l'ARNr des mitochondrie des levures transformées par le pRS315, nous ne pouvons procéder à une analyse statistique correcte. Cependant, la comparaison des moyennes  $m_2^6A/m_1A$  du profil I et II ainsi que la comparaison des moyennes  $m_2^6A/m_6A$  de ces mêmes profils montrent une tendance à l'augmentation de la surface relative du pic  $m_2^6A$  provenant de l'ARNr de mitochondries de levure transformées par le pIH5 par rapport à la surface relative de ce même pic provenant de l'ARNr de mitochondries de levure transformées par le pRS315. Cette augmentation serait le résultat de la diméthylation in vivo des deux adénines de l'extrémité 3'-terminale du 15S-ARNr.

CONCLUSIONS, DISCUSSION  
GENERALE ET PERSPECTIVES

## CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALE

L'universalité de la diméthylation des deux adénines jumelles de l'épingle à cheveux 3'-terminale de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique soulève une série de questions quant à son rôle fonctionnel.

L'importance de cette modification au niveau de l'initiation de la traduction chez *E. coli* est démontrée par l'équipe de P.H. Van Knippenberg. Cependant, les mécanismes de traduction eucaryotiques étant différents, le rôle possible joué par cette structure demeure inconnu chez ces derniers.

Dans le cadre de cette problématique générale, nous nous sommes proposés d'étudier les effets d'une diméthylation des deux adénines de l'épingle à cheveux 3'-terminale sur un ribosome qui en serait naturellement dépourvu. Le cas qui se présente dans la nature est celui de la petite sous-unité ribosomique de mitochondries de levure. Le mécanisme traductionnel de la mitochondrie de levure étant vraisemblablement différent de celui opéré par les cytoribosomes eucaryotes, les effets observés de l'addition de deux méthyles aux mitoribosomes de levure pourraient éclairer la question soulevée.

En raison de la grande similitude entre les structures des ARNr, en particulier de l'épingle à cheveux 3'-terminale du 16S-ARNr d'*E. coli* et celle du 15S-ARNr de mitoribosomes de levure, on peut espérer de dimétyler celle-ci in vivo en important par la voie du génie génétique l'enzyme diméthylase d'*E. coli* dans la matrice mitochondriale.

A cette fin, une série de constructions génétiques ont permis de cloner la séquence contenant les signaux de transcription et d'importation mitochondriale de la protéine ADHIII de levure, en amont du gène de la diméthylase d'*E. coli*. Une phase unique de lecture entre ces deux séquences a été aménagée par mutagenèse dirigée et la séquence en phase de la protéine de fusion a été clonée dans deux vecteurs navettes levures-*E. coli*, donnant respectivement le pIH5 et le pIH6.

Après s'être assuré de l'activité de la diméthylase ainsi aménagée chez le mutant d'*E. coli* *ksgA*<sup>-</sup>, nous avons transformé la souche GRF18 de *Saccharomyces cerevisiae* avec le pIH5 et le pIH6.

La protéine a été mise en évidence par électrophorèse en gel polyacrylamide en conditions dénaturantes et coloration au bleu de Coomassie dans l'extrait cytoplasmique de levure transformée. Elle a aussi été détectée par un "immunoblot" utilisant des anticorps anti-diméthylase d'*E. coli*.

Cependant, la diméthylase n'a pas été mise en évidence par ces techniques dans la fraction purifiée des mitochondries des transformants. Cette situation peut tirer son origine de problèmes survenant à l'une ou l'autre étape du processus d'importation.

Dans un premier temps du processus d'importation, il se pourrait que la reconnaissance des récepteurs de surface mitochondriaux par le peptide de transit soit impossible pour des raisons de conformation de la diméthylase.

Un deuxième problème relatif au transfert transmembranaire lui-même pourrait résulter de la structure de la diméthylase : en effet, la préprotéine doit être dépliable pour être importée.

Il est également possible que la pré-diméthylase ait été importée mais pas clivée en protéine mature.

Enfin, la diméthylase mature se trouve peut-être dans la matrice mitochondriale mais en raison des différences de pH par rapport au cytoplasme, elle ne serait plus active.

Ne possédant aucune donnée sur la structure tertiaire et quaternaire de la diméthylase, nous ne pouvons éclaircir les deux premiers problèmes. En revanche, lors de la construction de la pré-diméthylase, les caractéristiques du peptide de transit ADH3 ont été respectées. La partie amino-terminale responsable de l'adressage et de l'importation de la préprotéine dans la matrice mitochondriale n'a pas subi de changement. Lors de la mutagenèse dans la partie carboxy-terminale les acides aminés 26, une sérine, et 27, une threonine reconnue indispensable au clivage de la préprotéine ont été préservés. Seul l'acide aminé 28 a été délété, mais aucun rôle particulier ne lui étant attribué, on peut penser, sous réserve de confirmation formelle qu'il n'intervient pas dans le processus de clivage. Les conditions d'adressage, d'importation et de maturation de la pré-diméthylase seraient respectées si, toutefois, la structure de la diméthylase elle-même ne s'oppose pas à son importation.

La mise en évidence de deux polypeptides de taille très proche par les anticorps anti-diméthylase dans l'extrait cytoplasmique de levure transformées par le pIH5 pourrait indiquer qu'on est en présence de la préprotéine et de la protéine mature. Ceci, impliquerait que la protéine subi la maturation correcte dans la mitochondrie et contaminerait l'extrait cytoplasmique suite à la lyse.

En outre, la plus grande surface relative du pic  $m_2^6A$  provenant de l'ARNr mitochondrial de levure possédant la pré-diméthylase dans leur cytoplasme confirme l'importation supposée de celle-ci. Cette donnée laisse aussi supposer que l'enzyme est active.

## **PERSPECTIVES**

Dans le cadre expérimental de ce mémoire des précisions devront être apportées notamment quant à l'hypothèse d'une contamination entre les fractions cytoplasmiques et mitochondriales susceptibles de biaiser les conclusions. D'une part, il faudrait estimer, par microscopie électronique, la pureté du culot de mitochondries à partir duquel les mitoribosomes sont isolés; d'autre part le dosage de la fumarase, enzyme marqueuse de la matrice mitochondriale de levure, permettrait d'estimer le degré de lyse des mitochondries.

L'importation de la pré-diméthylase dans la mitochondrie pourrait aussi être éprouvée par de nouvelles expériences. Des mesures de latence de l'activité de l'enzyme en présence de son substrat d'origine, la sous-unité 30S d'*E. coli*, réalisées à partir d'un culot de mitochondries stabilisées osmotiquement et d'un culot soumis à un traitement au triton X-100 confirmerait la localisation inter-mitochondriale de l'enzyme.

La mise en évidence de deux protéines de tailles légèrement différentes entre un échantillon protéique cytoplasmique et un échantillon protéique mitochondrial, soit par "immunoblot" soit par gel "SDS-PAGE" prouverait non seulement l'importation de la pré-diméthylase mais aussi son clivage en une protéine mature.

Alors, de nouvelles injections d'ARNr mitochondrial et au besoin une analyse statistique prouverait l'activité de la diméthylase sur un substrat qui lui est étranger.

Ces études menées à terme, on cherchera à observer des effets phénotypiques nouveaux chez les levures dont l'ARNr mitochondrial aura été modifié. En effet, on doit suspecter que la diméthylation des deux adénines jumelles du 15S-ARNr affecte l'efficacité de la traduction mitochondriale ainsi que la fonction principale de cet organite à savoir, la respiration. Il serait dès lors intéressant de comparer sur milieux respiratoires au glycérol et au lactate les phénotypes de levures possédant la diméthylase d'*E. coli* et de levures sauvages.

## BIBLIOGRAPHIE

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K.,  
WATSON J.D. (1983)  
Molecular biology of the cell., Garland Publishing Inc.,  
New York, 1146 pp.
2. ALIX J.H., HAYES D. (1983)  
Why are macromolecules modified post-synthetically ?  
Biol. Cell., **47** , 139-158.
3. APIRION D. (1984)  
Processing of RNA., CRC Press Inc., Boca Raton, 352 pp.
4. BIOFUTUR. Supplément octobre 1986.  
Synthétiseurs et séquenceur d'ADN.
5. BIOFUTUR. Supplément n° 23, octobre 1988.  
Séquencage d'ADN.
6. BRIMACOMBE R., STIEGE W. (1985)  
Structure and function of ribosomal RNA.  
Biochem., **229** , 1-17.
7. CURGY J.J. (1985)  
The mitoribosomes.  
Biol. Cell., **54** , 1-38.
8. DARLEY-USMAR V.M., RICKWOOD D., WILSON M.T. (1987)  
Mitochondria. A practical approach., IRL Press, Oxford,  
322 pp.
9. DE DEKKEN R.H. (1966)  
The crabtree effect : a regulatory system in yeast.  
J. Gen. Microbiol., **44** , 149-156.

10. de DUVE C. (1987)  
Une visite guidée de la cellule vivante., De Boek Université,  
Bruxelles, 437 pp.
11. DOUGLAS M.G., McCAMMON M.T., VASSAROTTI A. (1986)  
Targeting proteins into mitochondria.  
*Microbiol. Rev.*, **50** , 166-178.
12. ELLIS S.R., HOPPER A.K., MARTIN N.C. (1989)  
Amino-terminal extension generated from an upstream AUG  
codon increases of mitochondrial import of yeast N<sup>2</sup>,  
N<sup>2</sup> - dimethylguanosine - specific tRNA methyltransferases.  
*Mol. Cell. Biol.*, **9** , 1611-1620.
13. GRIVELL L.A. (1988)  
Protein import into mitochondria.  
*Int. Rev. Cyt.*, **111** , 107-141.
14. KLOOTWIJK J., KLEIN I., GRIVELL L.A. (1975)  
Minimal post-transcriptional modification of yeast  
mitochondrial ribosomal RNA.  
*J. Mol. Biol.*, **97** ,337-350.
15. KLOOTWIJK J., PLANTA R.J. (1973)  
Analysis of the methylation sites in yeast ribosomal RNA.  
*Eur. J. Biochem.*, **39** , 325-333.
16. KOZAK M. (1983)  
Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes,  
eucaryotes and organelles.  
*Microbiol. Rev.*, **47** , 1-45.
17. KOZAK M. (1989)  
The scanning model for translation : an update.  
*J. Cell. Biol.*, **108** , 229-241.

18. LAGUNAS R. (1986)  
Misconceptions about the energy metabolism of  
*Saccharomyces cerevisiae*.  
Yeast, **2** , 221-228.
  
19. LEWIN B. (1987)  
GENES III., John Wiley & sons Inc., New York, 761 pp.
  
20. MOONEY D.T., PILGRIM D.B., YOUNG E.T. (1990)  
Mutant alcohol dehydrogenase (ADH III) presequences that  
affect both in vitro mitochondrial import and in vitro  
processing by the matrix protease.  
Mol. Cell. Biol., **10** , 2801-2808.
  
21. OSTERMANN J., HORWICH A.L., NEUPERT W., HARTL F. -U. (1989)  
Protein folding in mitochondria requires complex formation  
with hsp60 and ATP hydrolysis.  
Nature, **341** , 125-130.
  
22. PAIN. V.M. (1986)  
Initiation of protein synthesis in mammalian cells.  
Biochem. J., **235** , 625-637.
  
23. PARTALEDIS J.A., MASON T.L. (1988)  
Structure and regulation of a nuclear gene in *Saccharomyces  
cerevisiae* that specifies MRP13, a protein of the small  
subunit of the mitochondrial ribosome.  
Mol. Cell. Biol., **8** , 3647-3660.
  
24. PFANNER N., NEUPERT W. (1989)  
Transport of proteins into mitochondria.  
Cur. Op. Cell. Biol., **1** , 624-629.

25. PILGRIM D., YOUNG E.T. (1987)  
Primary structure requirements for correct sorting of the yeast mitochondrial protein ADH III to the yeast mitochondrial matrix space.  
Mol. Cell. Biol., **7** , 294-304.
26. POLDERMANS B., ROZA L., Van KNIPPENBERG P.H. (1979)  
Studies on the function of two adjacent N<sup>6</sup>,  
N<sup>6</sup> - dimethyladenosines near the 3' end of 16S ribosomal RNA of *Escherichia Coli*.  
J. Biol. Chem., **254** , 9094-9100.
27. PUGSLEY A.P. (1989)  
Protein targeting., Academic Press Inc., San Diego, 279 pp.
28. RAUE H.A., KLOOTWIJK J., MUSTERS W. (1988)  
Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight ribosomal RNA.  
Prog. Biophys. Molec. Biol., **51** ,77-129.
29. RHOADS R.E. (1988)  
Cap recognition and the entry of mRNA into the protein synthesis initiation cycle.  
T.I.B.S., **13** , 52-56.
30. SIKORSKI R.S., HIETER P. (1989)  
A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Genetics, **122** , 19-27.
31. SPIRIN A.S. (1986)  
Ribosome structure and protein biosynthesis., The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc., Menlo Park, 414 pp.

32. THAMMANA P., HELD W.A. (1974)  
Methylation of 16S RNA during ribosome assembly in vitro.  
Nature, **251** , 682-686.
33. TRAPMAN J., PLANTA R.J., RAUE H.A. (1976)  
Maturation of ribosomes in yeast.  
Bioch. Bioph. Acta, **442** , 275-284.
34. TZAGOLOFF A.  
Cellular organel. Plenum Press  
New York.
35. Van BUUL C.P.J.J. (1985)  
Functional and genetic analysis of a specific modification  
in ribosomal RNA.  
Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam, 111 pp
36. Van BUUL C.P.J.J., 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.
37. VAN CHARLDORP R., HEUS H.A., Van KNIPPENBERG P.H. (1981)  
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.
38. VAN GEMEN B., KOETS H.J., PLOOY C.A.M., BODLAENDER J.,  
Van KNIPPENBERG P.H. (1987)  
Characterization of the *ksgA* gene of *Escherichia coli*  
determining kasugamycin sensitivity.  
Biochimie, **69** , 841-848.

39. Van KNIPPENBERG P.H. (1987)  
Structural and functional aspects of the N<sup>6</sup>,  
N<sup>6</sup> - dimethyladenosines in 16S ribosomal RNA.  
in HARDESTY B., KRAMER G., Structure, function and genetics  
of ribosomes., Springer- Verlag Inc., New York.
40. WARNER J.R. (1989)  
Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Microbiol. Rev., **53** , 256-27
41. YOUNG E.T., PILGRAM D. (1985)  
Isolation and DNA sequences of ADH3, a nuclear gene encoding  
the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in  
*Saccharomyces cerevisiae*.  
Mol. Cell. Biol., **5** , 3024-3034.