



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Clonage du promoteur du gène du monocyte macrophage colony stimulating factor humain

Minet, Emmanuel

Award date:
1996

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.

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**Clonage du promoteur du gène du Monocyte Macrophage
Colony Stimulating Factor humain**

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

MINET Emmanuel

Décembre 1996

Clonage du promoteur du gène du Monocyte Macrophage Colony Stimulating Factor humain

MINET Emmanuel

Résumé

L'athérosclérose est, avec le cancer, une des causes majeures de décès pathologiques dans nos sociétés occidentales. Elle est engendrée par un excès de particules lipidiques circulantes qui se logent dans l'intima artérielle faisant subir aux cellules endothéliales un stress oxydatif et hémodynamique. Ces cellules libèrent alors diverses cytokines et chémokines pro-inflammatoires dont le CSF-1, impliqué dans les événements primaires du développement de la plaque d'athérome. L'étude du mécanisme d'activation de la transcription du gène du CSF-1 présente donc un intérêt évident pour la compréhension et le traitement de la pathologie. Pour ces différentes raisons, le laboratoire de biochimie cellulaire a entrepris de cloner le promoteur du gène du CSF-1 afin de l'insérer dans un plasmide rapporteur contenant la GFP (green fluorescent protein) et par la suite de la transfecter chez des cellules endothéliales. Le travail effectué dans le cadre de ce mémoire concerne exclusivement le clonage du promoteur du gène du CSF-1 par PCR sur ADN génomique humain total. Des conditions PCR originales ont été utilisées afin de résoudre les problèmes posés par cette cible spécifique (cible unique, riche en GC). Il nous reste donc à relier les deux fragments clonés de ce promoteur pour passer aux étapes suivantes de cette étude.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Décembre 1996

Promoteur: J. Remacle

-Je remercie sincèrement le Professeur José Remacle de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Chapeau bas pour l'intérêt porté aux progrès des travaux de tous les mémorisants malgré votre emploi du temps souvent chargé.

-Mes seconds remerciements vont aux 2 personnes qui ont eu la patience de me suivre durant cette année, Philippe et Isabelle.

-Philippe (BOBO), la Rolls Royce du mémorisant serait paraît-t-il un papa poule. Tu vas donc devoir quitter les couches culottes un petit temps pour te consacrer à la suite de mes aventures au pays de la PCR.

-Isabelle, tu nageras bientôt dans un « océan » non pas d'ADN, mais de bonheur puisque tu seras dans quelques jours maman pour la seconde fois. Tu as su être disponible toute l'année, il est maintenant temps de songer à préparer la fameuse valise.

-Merci Michaël (a.s.) pour ton amitié témoignée tout au long de l'année, ta bonne humeur de chaque jour, le coup de main et le soutien précieux lors de la rédaction de ce manuscrit.

-Félicitations au schizophrène tantôt Croquette, tantôt Brutus, tantôt chef pilotequi a réussi à supporter mes délires pendant près de 5 ans, bien que parfois un doute s'installe en moi.

Merci à tous deux pour le gîte offert lors des courtes nuits de rédaction de cette brique.

-Merci aux drôles de dames, une princesse (Mumu), une sirène (Isa), et katwoman (Steph) qui ont été confrontées ces derniers jours à une de leurs plus terribles missions dont en fin de compte, elles se sont tirées brillamment.

-Merci à Pat et à notre cuisinière nationale, Nathalie qui ont tous deux aussi mis la main à la pâte.

-Merci à mes camarades mémorisants pour tous les bons moments passés ensemble.

-Merci à tous les membres du laboratoire pour leur sympathie et leur bonne humeur quotidienne, les conseils prodigués. J'aimerais bien tous pouvoir vous citer, mais il faudrait écrire un roman, c'est pourquoi je me limiterai à ces quelques lignes.

-Enfin, merci à mes parents pour leur soutien durant ces années d'études sans qui ce mémoire ne serait pas.

Abréviations

A	Adénine
a.a.	acide aminé
ACAT	acyl coA acyl transférase
ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
Amp	Ampicilline
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
AP-1	Activator Protein-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
AP-PCR	Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovin Serum Albumin
C	Cytosine
°C	Degré centigrade
C/EBP	CAAT Enhancer Binding Protein
CSF-1	Colony stimulating factor-1
CSF-1R	Colony Stimulating Factor-1 Receptor
CRE	AMPc responsive element
CREB	AMPc responsive element Binding Protein
CREM	AMPc responsive element Modulator
dNTPs	déoxinucléotide triphosphates
ddNMP	didéoxinucléotide monophosphate
DMSO	Dimethyl-Sulfoxyde
DO	Densité Optique
d.s.f.	Distillée Stérile Froide
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate de sodium
G	Guanine
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IDL	Intermediary Density Lipoprotein
IL	Interleukine
IFN- γ	Interféron-gamma
I κ B	NF κ B Inhibitor
IPTG	isopropyl-B-D-thio-galactopyranoside
IRE- α/γ	Interféron α ou γ response element
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litre
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA	Lymphocyte Function Associated Molecules
LGL	Large Granulous Lymphocytes

LPS	Lipopolysaccharides
M	Molaire
MAP-Kinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MCS	Site Multiple de Clonage
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
CSF-1	Macrophage Colony Stimulating Factor
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein-1
µg	microgramme
µl	microlitre
min	minute
µM	micromolaire
mm-LDL	Minimally modified Low Density Lipoprotein
ml	millilitre
NF-1	Nuclear Factor-1
NF-IL	Nuclear Factor-Interleukin
NF-κB	Nuclear Factor-κB
NK	Natural Killer
NLS	Nucleus Localisation Sequence
nm	nanomole
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived growth Factor
PDGFR-B	Platelet Derived growth Factor Récepteur type-B
PGE 2	Prostaglandine E 2
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PM	Poids moléculaire
PMA	PHorbol Myristate Acetate
PPi	Pyrophosphate
rRNAs	Small Ribosomal Ribonucleic Acid
Ref-1	Reduction Factor-1
RNase A	Ribonucleases A
rpm	tour par minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymérase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
sec	seconde
SP-1	Specific Transcription Factor-1
SSRE	Shear Stress Response Element
T	Thymine
TAFs	TATA Associated Factors
TBE	Tris borate electrophoresis buffer
TBS	Tris buffer saline
TBP	TATA Binding Protein
TEMED	N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylenediamine
TE	Tris EDTA
Tet	Tetracycline
Tf	Température de fusion
TFIIA,B,...	Transcription FactorIIA, B,...
Th	Température d'hybridation
Tm	Température de melting
TMB	Tétraméthyl benzidine
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha

Tris	Tris-hydroxyméthyl-aminoéthane
U	Uracyle
UV	Ultra Violet
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLA	Very late Activation Antigen
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
X-gal	5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-b-D-galactotryptone

I. INTRODUCTION	1
I.A. LE MACROPHAGE, MONOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR ET L'ATHEROSCLEROSE	2
1. <i>Le macrophage, monocyte colony stimulating factor (M-CSF ou CSF-1)</i>	2
1.1. Introduction	2
1.2. Activités biologiques du CSF-1	2
1.3. Structure du gène du colony stimulating factor 1 (CSF-1)	4
1.4. La protéine CSF-1	5
1.5. Le récepteur du CSF-1; le proto-oncogène c-fms	6
1.6. Induction de la production de CSF-1 chez quelques types cellulaires	8
1.6.1. Introduction	8
1.6.2. Production de CSF-1 par les monocytes	9
1.6.3. Induction de l'expression du CSF-1 chez les lymphocytes T	10
1.6.4. Induction de l'expression du CSF-1 chez les fibroblastes	10
1.6.5. Induction de l'expression du CSF-1 chez les cellules endothéliales et musculaires lisses	11
2. <i>Biologie du cholestérol, athérosclérose et CSF-1</i>	12
2.1. Métabolisme du cholestérol	12
2.1.1. Introduction	12
2.1.2. Transport du cholestérol vers les tissus utilisateurs	13
2.2. L'athérosclérose	14
2.2.1. Introduction	14
2.2.2. Quelques facteurs à risque dans la pathologie de l'athérosclérose	15
2.2.3. Niveau cellulaire et moléculaire de l'athérosclérose et implication du CSF-1	16
3. <i>Conclusion</i>	18
4. <i>But du travail</i>	18
I.B. PROMOTEURS EUCARYOTES ET PROMOTEUR DU GENE DU COLONY STIMULATING FACTOR-1	19
1. <i>Introduction</i>	19
2. <i>Les promoteurs eucaryotes de classe II</i>	19
2.1. Le motif TATA	19
2.2. Le complexe de prédémarrage	19
2.3. Passage d'un complexe fermé à un complexe ouvert	21
2.4. Le cycle de phosphorylation de l'ARN polymérase II	21
2.5. Autres promoteurs de classe II	22
3. <i>Le promoteur du gène du macrophage monocyte colony stimulating factor humain (CSF-1)</i>	23
3.1. Description générale	23
3.2. Le facteur de transcription SP-1	24
3.3. Le complexe transcriptionnel AP-1 (activator protein-1)	25
3.4. Le facteur trans NF- κ B	27
3.5. Le facteur C/EBP (CAAT enhancer binding protein) et les sites NF-IL6 (nuclear factor IL-6)	27
3.6. Les shear stress response elements (SSRE)	28

4. Conclusion :	29
I.C. LA PCR :	30
1. La réaction de polymérisation en chaîne :	30
1.1. Introduction :	30
1.2. Principe :	30
1.3. La polymérase Taq:	31
1.4. Description d'une PCR standard :	32
a) Dénaturation longue : (Figure I.C.2.a.)	32
b) Cycle PCR proprement dit : (Figure I.C.2.b, c, d.)	32
b.1. La dénaturation : (Figure I.C.2.d.)	32
b.2. L'hybridation : (Figure I.C.2.b.)	32
b.3. L'élongation : (Figure I.C.2.c.)	33
c) L'élongation finale :	33
1.5. Conclusion :	34
2. Quelques types de PCR et variantes du schéma PCR de base :	34
2.1. La "simplex" PCR :	34
2.2. La "nested" PCR :	34
2.3. L'"heminested" PCR :	35
2.4. Le "hot start" :	35
2.5. La "up" PCR :	36
2.6. La "touchdown" PCR :	36
2.7. La down PCR :	37
3. Les ADN polymérases :	37
3.1. Introduction :	37
3.2. L'ADN polymérase de <i>Thermus aquaticus</i> :	42
3.2.1. Origine :	42
3.2.2. Caractéristiques biochimiques :	42
a) Inhibiteurs :	42
b) Thermostabilité :	42
c) Activité nucléase :	42
d) Paramètres de réaction :	43
3.2.3. Applications :	43
3.3. L'ADN polymérase de <i>Thermococcus Litoralis</i> (Vent) :	43
3.3.1. Origine :	43
3.3.2. Caractéristiques biochimiques :	44
a) Activité nucléase :	44
b) Thermostabilité :	44
c) Paramètres de la réaction :	44
d) Remarques :	45
3.3.3. Applications :	45

3.4. Conclusion :.....	45
4. La fidélité des ADN polymérase thermostables :.....	46
4.1. Introduction :.....	46
4.2. Différents types d'erreurs qui surviennent en PCR :.....	46
4.2.1. Erreurs indépendantes de la polymérase :.....	47
4.2.2. Erreurs introduites par une défaillance de la polymérase :.....	48
4.3. Schéma de l'élongation PCR et fidélité :.....	49
4.4. Optimisation des conditions de fidélité dans la PCR :.....	50
4.4.1. Etude concernant la Taq DNA polymérase :.....	50
a) Fidélité en fonction du pH :.....	51
b) Fidélité en fonction de la concentration en dNTPs :.....	51
c) Variation de la concentration en MgCl ₂ :.....	52
d) Comment explique-t-on l'amélioration de la fidélité de la Taq sous certaines conditions :.....	52
4.4.2. Optimisation comparées des conditions de fidélité PCR pour la Taq et la Vent (native) DNA polymérase :.....	53
a) Fidélité et concentration en dNTPs :.....	53
b) Fidélité et pH :.....	53
c) Fidélité et concentration en Mg ⁺⁺ :.....	53
f) Remarques :.....	54
4.5. Conclusion :.....	54
5. Activité extensase de certaines polymérase thermostables :.....	55
5.1. Introduction :.....	55
5.2. Activité extensase de diverses polymérase :.....	55
5.2.1. La Taq DNA polymérase :.....	55
5.2.2. La Vent DNA polymérase :.....	55
5.2.3. La Pfu DNA polymérase :.....	56
5.2.5. Conclusion :.....	56
5.3. Stratégies de clonage en fonction de l'activité extensase ou 3'-5' exonucléase des polymérase thermostables :.....	57
5.3.1. Les ligations à bouts francs :.....	57
5.3.2. Ligations dans des vecteurs T :.....	58
5.3.3. Ligation d'amplicons générés par des amorces qui possèdent en 5' des sites de restriction synthétiques :.....	58
5.3.4. Remarques :.....	58
5.3.5. Amélioration de l'efficacité de clonage dans un vecteur T :.....	58
5.4. Conclusion :.....	59
6. Efficacité de la PCR :.....	59
6.1. Introduction :.....	59
6.2. Paramètres de l'efficacité :.....	59
6.2.1. La nature des amorces (primer) :.....	60
6.2.2. La température d'hybridation :.....	61
a) Calcul de la température d'hybridation optimale :.....	61

b) Conclusions :	63
6.2.3. Le temps d'hybridation :	64
6.2.4. La nature de la polymérase :	64
6.2.5. Le type de PCR que l'on effectue :	64
6.2.6. Additifs pouvant améliorer l'efficacité de la PCR :	64
a) Le DMSO (Diméthyl sulfoxyde) :	64
b) Minimisation des mutations de délétion durant les PCR via l'utilisation de SSB :	65
6.2.7. La concentration en magnésium :	65
6.2.8. La concentration en matrice et en amorces :	66
6.2.9. La concentration en polymérase :	67
6.3. Conclusions :	67
7. Conclusion générale :	68
II. MATERIEL ET METHODES :	69
1. SOUCHES BACTERIENNES ET PLASMIDES :	69
1.1. Souches bactériennes :	69
1.1.1. <i>E. coli XL-1 Blue</i> (Stratagène) :	69
1.1.2. <i>E. Coli Sure</i> (Stratagène) :	69
1.2. Plasmide bactérien et eucaryote :	70
1.2.1. pBluescript II SK +/-Phagemid (Stratagene, La Jolla, USA) :	70
1.2.2. pGEM-T (Vecteur T; Promega, Madison, USA) :	70
1.2.2. pGFP-1 promoter reporter vector (Clontech, Palo Alto, USA) :	71
2. PREPARATION DE BACTERIES ELECTROCOMPETENTES ET CaCl ₂ COMPETENTES :	71
2.1. Electroporation :	71
2.1.1. Bactéries électrocompétentes :	72
2.1.2. Méthode : Electroporation :	72
2.2. Transformation CaCl ₂ :	73
2.2.1. Bactéries CaCl ₂ compétentes :	73
2.2.2. Méthode : choc thermique (Figure II.4.) :	74
3. PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE :	74
3.1. Le milieu Luria Bertani (LB) :	74
3.2. Additifs et concentrations utilisés :	75
4. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE :	76
4.1. Minipréparation d'ADN plasmidique :	76
4.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E. Coli</i> :	77
5. RESTRICTION D'ADN :	79
6. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE :	79
7. EXTRACTION D'ADN D'UN GEL D'AGAROSE :	81
8. ELECTROPHORESE D'ADN SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE :	82
9. REACTION DE LIGATION :	84

9.1. Ligation dans un vecteur T (pGEM-T; Promega) :.....	84
9.2. Ligation franche (vecteur pBSK II) :.....	85
10. PURIFICATION DES PRODUITS PCR OU DE RESTRICTION :.....	85
11. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN GENOMIQUE EUCARYOTE :.....	87
12. EXTRACTION BRUTE D'ADN GENOMIQUE EUCARYOTE :.....	89
13. LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR) :.....	90
13.1. Principe :.....	90
13.2. Méthode :.....	90
13.2.1. Préparer le mélange réactionnel :.....	90
13.2.2. Programmation des cycles PCR :.....	91
13.2.3. Pour réaliser un "hot start" :.....	91
13.2.4. Pour réaliser une "touchdown" PCR :.....	91
13.2.4. Pour réaliser une Up PCR :.....	91
13.2.5. Composition du tampon R.HUN. :.....	92
14. LE SEQUENÇAGE :.....	92
14.1. Principe : (Figure II.8.).....	92
14.2. Méthode :.....	93
14.2.1. Préparation de la PCR :.....	93
14.2.2. Préparation des échantillons pour analyse sur gel :.....	93
14.2.3. Amorces spécifiques commerciales utilisées pour le séquençage :.....	94
15. PROGRAMMES INFORMATIQUES UTILISES :.....	94
III. RESULTATS ET DISCUSSION :.....	95
CLONAGE DU PROMOTEUR CSF-1 HUMAIN PAR PCR SUR ADN GENOMIQUE :....	95
1. INTRODUCTION :.....	95
2. ANALYSE DE LA SEQUENCE DU PROMOTEUR CSF-1 :.....	96
3. STRATEGIE GLOBALE :.....	96
4. AMPLIFICATION ET ISOLEMENT DU PROMOTEUR CSF-1 UTILISANT LA POLYMERASE DYNAZYME II :.....	98
4.1. Choix des amorces :.....	98
4.2. Choix de la polymérase :.....	98
4.3. La matrice :.....	98
4.4. PCR :.....	99
A. Conditions PCR de départ :.....	99
B. Etude des inhibitions :.....	99
C. PCR sur ADNg ayant subi de 1 à 3 extractions au phénol chloroforme et héminested PCR :.....	100
D. Changement de tampon PCR :.....	101
E. PCR sur ADN génomique restreint :.....	102
F. Héminested PCR sur ADN génomique restreint :.....	102
G. Utilisation d'amorces plus longues :.....	102

H. Utilisation du hot start :	103
I. Effet de la touchdown PCR :	104
J. Analyse de ces résultats négatifs :	105
K. Utilisation d'amorces de longueur supérieures :	105
5. ESSAIS DE PCR UTILISANT LA TAQ (BOEHRINGER, MANNHEIM, ALLEMAGNE), GOLD (PERKIN-ELMER (ROCHE), BRANCHBURG, USA), LA PWO (BOEHRINGER, MANNHEIM, ALLEMAGNE) ET LA TTH (BOEHRINGER, MANNHEIM, ALLEMAGNE) :	108
5.1. Stratégie :	108
5.1. Choix des polymérase :	108
5.2. La matrice :	109
5.3. PCR :	109
5.3.1. Conditions PCR testées :	109
5.3.2. Conclusion :	110
6. CARACTERISATION DU FRAGMENT 830 OBTENU AVEC LA TAQ:	111
6.1. Production du fragment 830 par PCR :	111
6.2. Isolement et purification du fragment 830 :	111
6.3. Caractérisation du fragment PCR 830 purifié par restrictions enzymatiques :	112
6.4. Caractérisation du fragment 830 par PCR :	112
6.5. Optimisation de l'amplification PCR du fragment 830 :	113
6.6. Vérification de la taille du fragment 830 sur gel d'acrylamide 5% :	114
6.7. Séquençage du fragment 830 :	115
6.8. Clonage du fragment 830 dans le vecteur pGEM-T :	116
6.9. Clonage du fragment 830 dans le vecteur pGEM-T et transformation de bactéries <i>Sure</i> CaCl ₂ compétentes	117
6.11. Séquençage des inserts des clones C1 830, C2 830, C3 830 :	117
7. PCR EN DEUX ETAPES UTILISANT LA VENT POLYMERASE :	118
7.1. Justification du changement de stratégie :	118
7.2. PCR :	119
7.2.1. PCR utilisant diverses combinaisons d'amorces et la Vent polymérase :	119
7.2.2. "hémimested" PCR sur les produits de "simplex" en "down" 1% DMSO :	122
7.3. Clonage et caractérisation du fragment 360 :	122
7.3.1. Purification et dosage du fragment 360 :	123
7.3.2. Clonage du fragment 360 :	123
7.3.3. Caractérisation du fragment 360 par une carte de restriction :	124
A. Restriction Xba I, Eco R 1 :	124
B. Restriction Pst I :	124
C. Restriction Nhe I :	125
7.3.4. Séquençage des inserts présents chez les clones C1 360, C2 360, C3 360 :	126
7.3.5. Conclusion :	126

8. ISOLEMENT DE LA SECONDE PARTIE DU PROMOTEUR CSF-1:	126
8.1. Paramètres :	126
8.2. PCR : Conditions PCR utilisées :	127
8.3. Clonage du fragment 420 :	128
8.3.1. Purification du fragment 420 :	128
8.3.2. Clonage du fragment 420 :	128
8.3.3. Caractérisation du fragment 420 par une carte de restriction :	129
A. Restriction Bgl I :	129
B. Résultats :	129
8.3.4. Identification d'un site Bgl I supplémentaire dans le fragment 420 :	130
8.3.5. Caractérisation du fragment 420 par séquençage :	132
8.3.6. Conclusion :	133
IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES :	134
V. ANNEXES	138
ANNEXE 1. DESCRIPTION DES ANNEXES UTILISEES :	138
<i>Annexe 1.1. KPN-1, KPO-1:</i>	<i>138</i>
Annexe 1.1.A. Carte de restriction de l'amorce KPO-1:	139
<i>Annexe 1.2. 191,19:</i>	<i>140</i>
<i>Annexe 1.3. 251,252:</i>	<i>141</i>
<i>Annexe 1.4. 301,302:</i>	<i>142</i>
<i>Annexe 1.5. 273,254:</i>	<i>143</i>
<i>Annexe 1.6. Représentation schématique des positions d'hybridation respectives de toutes les amorces utilisées sur le promoteur du gène CSF-1</i>	<i>144</i>
ANNEXE 2. SEQUENCES ET CARTES DE RESTRICTION COMPLETE DU PROMOTEUR CSF-1 :	145
<i>Annexe 2.1. Séquence du promoteur du gène CSF-1:</i>	<i>145</i>
<i>Annexe 2.2. Cartes de restriction du promoteur du gène CSF-1 :</i>	<i>146</i>
Annexe 2.2.1. Carte de restriction schématique des sites uniques du promoteur du gène CSF-1:	146
Annexe 2.2.1. Ensemble des sites de restriction sur le promoteur du gène CSF-1:	146

INTRODUCTION

I. Introduction :

Dans ce travail , nous nous sommes intéressés au promoteur biologique du gène du CSF-1 (colony stimulating factor-1). Nous avons voulu cloner ce promoteur afin de pouvoir le placer en amont d'un gène rapporteur : la green fluorescent protéin (GFP). Cette construction permettra après transfection de cellules endothéliales humaines, d'étudier les divers facteurs qui interviennent dans la régulation de l'expression du gène du CSF-1 et notamment quelle est l'importance des stress oxydatifs dans ce processus. Ce promoteur est en effet complexe et comprend de nombreux et divers éléments «cis».

Ce travail se place dans le cadre plus large de la désorganisation tissulaire apparaissant suite à la présence de LDL-oxydées dans l'intima des artères et au rôle joué par le CSF-1 dans la différenciation des monocytes en macrophages.

Dans cette introduction nous allons donc présenter d'abord les propriétés et caractéristiques du CSF-1 et son intervention dans le processus de l'athérosclérose.

Nous développerons alors rapidement la fonction des promoteurs dans les cellules eucaryotes.

Comme nous avons utilisé la PCR comme outil pour le clonage de ce promoteur et que cette séquence s'est révélée particulièrement difficile à amplifier, nous détaillerons divers aspects de cette technique. Ceux-ci seront utiles pour comprendre la démarche du travail et les difficultés particulières liées à l'amplification du promoteur du CSF-1.

Développement des granulocytes et des monocytes

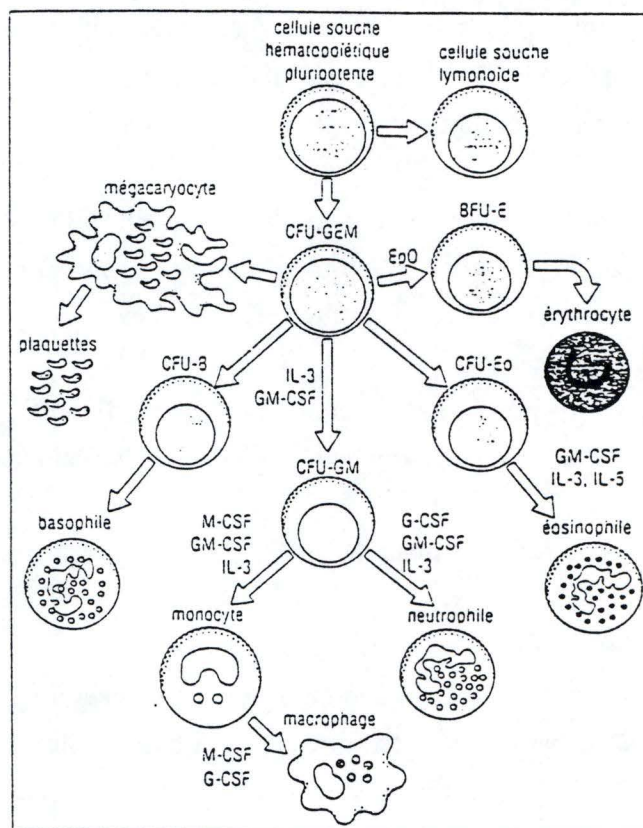


Figure I.A.1. :

Niveau d'intervention du CSF-1 dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes en monocytes et macrophages (Roit, Brostoff & Male, 1994).

Les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes évoluent au cours de leur maturation en cellules appelées CFU-GEM, GEM signifiant qu'à ce stade elles peuvent se différencier en Granulocytes, Erythrocytes, Mégacaryocytes. Sous l'action de l'IL-3 et du GM-CSF la différenciation est orientée vers la formations de monocytes ou de neutrophiles, ces cellules de stade intermédiaires sont les CFU-GM. En présence de GM-CSF, M-CSF (CSF-1), et d'IL-3 les CFU-GM se différencient en monocytes. Des monocytes stimulés par le M-CSF et le G-CSF se différencient en macrophages.

I.A. Le macrophage, monocyte colony stimulating factor et l'athérosclérose :

1. Le macrophage, monocyte colony stimulating factor (M-CSF ou CSF-1) :

1.1. Introduction :

Le facteur M-CSF aussi appelé CSF-1 est une cytokine dont le rôle majeur est le contrôle des populations de macrophages et de monocytes (Rambaldi et al., 1987; Oster et al., 1988; Praloran, 1991). Son pattern d'expression est complexe et ses effets s'étendent à d'autres souches cellulaires que celles citées ci-dessus. Cette cytokine a cependant été nettement moins étudiée que sa consœur, la granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), si bien qu'il subsiste encore de nombreuses zones d'ombre quant à son induction, son action, ses cellules cibles ou productrices.

1.2. Activités biologiques du CSF-1 :

Le CSF-1 fut à l'origine identifié parce qu'il permettait d'entretenir la croissance et la différenciation de colonies de monocytes et de macrophages issues de la moelle (Praloran, 1991). On retrouve cette cytokine dans quasiment tous les fluides corporels (sang, plasma, liquide cérébro-spinal et synovial, urine) (Praloran, 1991). Les premières études du CSF-1 étaient menées sur modèles murins, par la suite les comparaisons du CSF-1 humain et murin démontrèrent qu'ils étaient suffisamment semblables pour être actif chez une espèce comme chez l'autre (Praloran, 1991).

Le CSF-1 est produit soit de manière constitutive par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les cellules endothéliales utérines (Oster et al., 1988; Mantovani et al., 1991; Clinton et al., 1992) soit de manière induite par les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et B, les lymphocytes NK (natural killer), les cellules endothéliales thymiques et les cellules musculaires lisses (Rambaldi et al., 1987; Praloran 1991; Oster et al., 1988).

cytokine	origine dans le syst. immunit.	autres cellules	principales cibles	principaux effets
IL-1 α IL-1 β	macrophages, LGL, cell. B	endothélium, fibroblastes, astrocytes, etc...	T, B, macrophages, endothélium, autres cellules	activation lymphocytaire et macrophagique, T adhérence leucocyte/ endothélium, fièvre, protéines phase aigüe
IL-2	cell. T		cell. T	prolifération et différenciation des cell. T, activation cell. Tc et macrophages
IL-3	cell. T		cell. souches	facteur stimulant les colonies de lignées multiples
IL-4	cell. T		cell. B, cell. T, basophiles	facteur de croissance des cell. B, commutation isotypique, IgE, IgG1
IL-5	cell. T		cell. B, éosinophiles	facteur de croissance et de différenciation des cell. B, synthèse d'IgA (souris)
IL-6	cell. T, cell. B, macrophages	fibroblastes	cell. B, hépatocytes	différenciation des cell. B, protéines de la phase aigüe
IL-7		cell. stromales (moelle osseuse)	cell. pré-B, cell. T	prolifération des cell. B et T
IL-8	monocytes		neutrophiles, basophiles	chimiotactisme
IL-10	cell. T		cell. T α 1	inhibition de la synthèse des cytokines
TNF α	macrophages, lymphocytes, mastocytes		macrophages, granulocytes, autres cell.	activation macrophages, des granulocytes, des cell. cytotoxiques, T adhérence leucocyte/endothélium, cachexie, fièvre, protéines de la phase aigüe, angiogénèse, T CMH classe I
TNF β (LT)	cell. T			
IFN α IFN β	leucocytes	épithélium, fibroblastes	autres cell.	induction de CMH classe I, effet anti-viral, stimulation des cell. NK
IFN γ	cell. T, cell. NK	épithélium, fibroblastes	leucocytes, autres cell. T α 2	induction de CMH classes I et II, activation des macrophages, T adhérence lymphocyte/endothélium
M-CSF	monocytes	endothélium, fibroblastes		prolifération des précurseurs des macrophages
G-CSF	macrophages	fibroblastes	autres cell.	T division et différenciation
GM-CSF	cell. T, macrophages	endothélium, fibroblastes		prolifération des granulocytes et des précurseurs de granulocytes et macrophages, activation
MIF	cell. T		macrophages	inhibition de migration.

Les cytokines dans la liste ci-dessus ont toutes été caractérisées par clonage et séquençage de leur gène. On n'a mentionné que les principales sources, les principales cibles et les principaux effets de ces

molécules. La plupart des cytokines agissent en relation les unes avec les autres et, *in vivo*, leurs effets biologiques sont la résultante de ces interactions.

Tableau. I.A.1. :

Actions résumées de quelques cytokines dont le M-CSF (Roit, Brostoff & Male, 1994).

Ses cellules cibles sont principalement les cellules souches hématopoïétiques CFU-M qui ont pour origine les cellules souches CFU-GM. Les cellules CFU-GM stimulées par le GM-CSF se différencient en CFU-M qui sous l'action du CSF-1 deviennent des monocytes (Figure I.A.1.). Les autres cibles du CSF-1 sont les monocytes, les macrophages et leurs cellules souches hématopoïétiques, les cellules microgliales du système nerveux, les cellules musculaires souche, les cellules de l'enveloppe placentaire ainsi que toutes les cellules apparentées aux macrophages telles que les ostéoclastes. Le CSF-1 agit de manière synergique avec le GM-CSF, l'IL-6 et l'IL-3 pour la formation de colonies macrophagiques dites hautement prolifératives (Praloran, 1991).

Le CSF-1 stimule chez les monocytes et les macrophages la synthèse de GM-CSF, d'IL-1, de G-CSF, d'IFN- γ et de TNF- α (Praloran, 1991). Le CSF-1 constitutif permet le maintien des populations de monocytes et de macrophages, il active leur rôle immunitaire en augmentant leur activité phagocytaire et antibactérienne (Rambaldi et al., 1987; Praloran 1991; Oster et al., 1988). Il induit aussi chez ceux-ci une résistance accrue aux infections virales, le CSF-1 ne favoriserait pas, contrairement à ce qu'on pensait, l'infection des monocytes par le HIV. Le CSF-1 agit aussi comme chémokine sur ces cellules (Rambaldi et al., 1987; Praloran 1991; Oster et al., 1988).

Le CSF-1 induit la prolifération des cellules microgliales du système nerveux qui dérivent de lignées monocytaires (Praloran, 1991). Les récepteurs au CSF-1 sont présents chez les cellules musculaires souches, ceux-ci disparaissent au cours de la différenciation. Le CSF-1 intervient donc dans la prolifération de ces cellules (Praloran, 1991).

Les ostéoclastes dérivent de lignées hématopoïétiques monocytaires / macrophagiques, leur prolifération est aussi partiellement contrôlée par le CSF-1 (Praloran, 1991). Le CSF-1 contrôle la croissance placentaire et intervient dans la relation immunitaire foeto-maternelle qui reste floue (Praloran, 1991).

Enfin le CSF-1 intervient aussi dans la clearance et le métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol par activation des monocytes et des macrophages présents dans les couches périphériques des vaisseaux. Nous détaillerons ce point plus tard (Praloran, 1991; Clinton et al., 1992; O'Brien & Chait, 1994; Rajavashisth et al., 1995).

En conclusion, on peut dire que le CSF-1 est une cytokine qui régule la prolifération et l'activation de cellules de type monocytaires / macrophagiques ou de cellules apparentées (Tableau I.A.1.). Il intervient aussi dans le développement placentaire et musculaire.

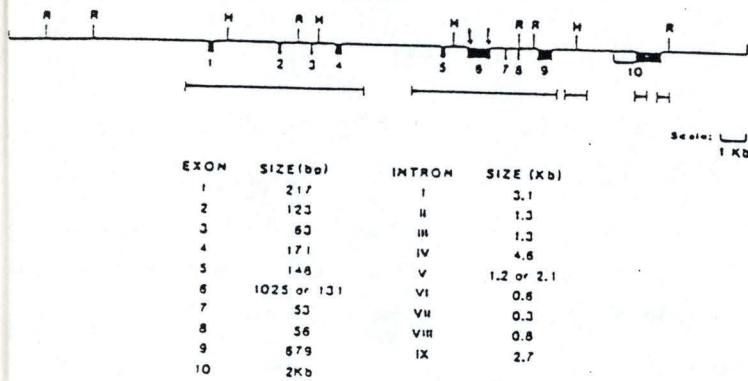


Figure I.A.2. :

Structure du gène du CSF-1 (Ladner et al., 1987).

Le gène du CSF-1 se divise en 10 exons (représentés en foncé). Au niveau de l'exon 6 on trouve deux sites alternatifs (indiqués par les flèches) accepteurs d'un fragment épissé entre l'exon 5 et 6. La taille de chaque exon et intron est également présentée.

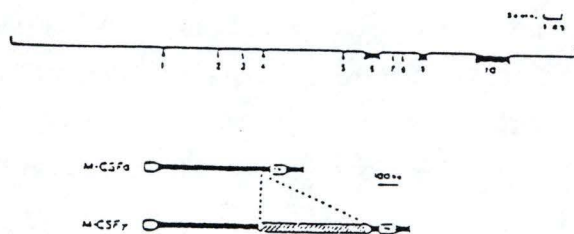


Figure I.A.3. :

Différents types de transcrits sont produits en fonction de l'épissage (Ladner et al., 1987).

Le M-CSF α plus court, est obtenu quand le site upstream de l'exon 6 est le receveur du fragment amont épissé.

Le M-CSF β plus long est obtenu quand le site downstream de l'exon 6 est le receveur du fragment amont épissé.

Table II. Sequence at the intron/exon boundaries of the human CSF-1 gene

5' donor boundary	Intron	3' acceptor boundary	Exon
1 CACG	gtagc ... I ...	[1] gtagc [c] a	ACATG 2
2 GCTG	gtagt ... II ...	[1] acag [c] u	ATTGA 3
3 GTTG	gtagt ... III ...	[1] tagc [c] s	AAAGA 4
4 CAAG	gtagg ... IV ...	[1] ccag [c] r	GCCTG 5
5 CAAG	gtagc ... V ...	[1] tagc [c] s	ATGTG 6 (upstream site)
	or	[1] gactgtagc [c] r	GCCAT 6 (downstream site)
6 GCGG	gtagt ... VI ...	[1] acctag [c] u	AGCCA 7
7 GCAG	gtagg ... VII ...	[1] gtagc [c] s	CCCCC 8
8 TAAG	gtagg ... VIII ...	[1] tagc	ACCCCT 9
Consensus:			
CAG	gtagt	[1] tagc G	
A	g	[c] a t	
Donor		Acceptor	

Capital letters indicate exon sequence and small letters indicate intron sequence. The consensus sequence is from Minium (1982).

Tableau I.A.2. :

Séquences de jonction entre les introns et les exons et séquences receveuses des fragments épissés (Ladner et al., 1987). Remarquons les 2 séquences receveuses de l'exon 6.

De nombreuses études restent cependant à réaliser sur ce facteur, ainsi on connaît mal les voies de transduction du signal qui induisent sa production, on ignore aussi si il agit de manière combinée avec telle ou telle cytokine sur tel ou tel type cellulaire et les conséquences précises de ces combinaisons.

1.3. Structure du gène du colony stimulating factor 1

(CSF-1) :

La totalité du gène du CSF-1 s'étend sur 20 kb au long desquelles on identifie 10 exons précédés par le promoteur de ce même gène (Figure I.A.2.). Ce gène est localisé sur le chromosome 1 en position 1p13-p21 (Ladner et al., 1987; Cerdan et al., 1992).

Les exons allant de 1 à 8 contiennent la séquence codante. Les exons 9 et 10 sont non codants mais interviennent dans la stabilité du messager (Ladner et al., 1987; Cerdan et al., 1992). Le premier exon contient la séquence codante des 13 premiers acides aminés du peptide signal, elle est précédée en 5' par une région non traduite riche en UT (Ladner et al., 1987; Cerdan et al., 1992).

Le second exon contient la séquence codante pour les 19 acides aminés suivants du peptide signal, elle même suivie par la séquence codante pour les 22 premiers acides aminés de la protéine mature (Ladner et al., 1987; Cerdan et al., 1992). La région codante de la protéine mature s'étend de l'exon 2 à 8. Le stop de traduction se situe donc dans l'exon 8 (Ladner et al., 1987).

Un épissage alternatif produit différentes espèces de transcrits (Figure I.A.3.). Ces différents messagers matures génèrent deux voir trois types de protéines CSF-1. L'une de 554 acides aminés, l'autre de 256 et enfin une forme encore hypothétique de 438 acides aminés (Ladner et al., 1987). Un site d'épissage est identifié entre l'exon 5 et 6, et deux sites accepteurs du fragment épissé situés sur l'exon 6 (Figure I.A.2., Tableau I.A.2.). On distingue donc l'exon 6 upstream site et downstream site (Ladner et al., 1987). Si c'est l'exon 6 downstream site qui constitue l'accepteur du fragment épissé, alors le messager obtenu génère une protéine de 256 acides aminés (Figure I.A.2.) (Ladner et al., 1987). Si c'est l'exon 6 upstream site qui constitue l'accepteur, alors le messager résultant code pour une protéine de 554 acides aminés (Figure I.A.2.) (Ladner et al., 1987).

L'exon 9 contient sur son extrémité 3' une séquence de 679 pb riche en AT (Ladner et al., 1987).

Un 10 ième exon a été également identifié, il possède une séquence riche en AT présentant des consensus ATTTA. Ces consensus sont des signaux fréquents que l'on retrouve chez les messagers à temps de demi vie courts (Ladner et al., 1987).

La présence de l'exon 9 ou 10 en 3' du messenger joue un rôle important dans la cinétique de production du CSF-1. Il y a cependant peu de données sur le type de CSF-1 (256 ou 554 a.a.) qui est produit par ce type de messagers mature (Ladner et al., 1987; Cerdan et al., 1992). La production de l'une ou l'autre forme de messagers du CSF-1 est liée à la concentration en éléments d'épissage (Ladner et al., 1987).

Il apparaît donc que l'expression du CSF-1 et sa régulation transcriptionnelle est complexe, elle fait appel à des maturations diverses du messenger permettant de produire les différentes formes de CSF-1 ainsi que des messagers à temps de demi vie plus ou moins court. Il est évident que le profil de transduction du signal et donc le type de stimulation et le type cellulaire interviennent de manière fondamentale dans l'expression de l'une ou l'autre forme du CSF-1 mais on ne dispose pas encore de données claires à ce sujet.

1.4. La protéine CSF-1 :

Les transcrits primaires des messagers CSF-1 sont maturés, puis au niveau du reticulum granuleux s'effectue la traduction. Au cours de la migration vers le golgi et dans le golgi se réalise la glycosylation et l'homodimérisation par pont disulfure de la protéine. Les CSF-1 matures se retrouvent finalement exprimés en membrane (Sherr, 1988; Praloran, 1991).

Les différentes formes de CSF-1 (256 et 554 acides aminés) présentent des éléments communs. Parmi ceux-ci 149 acides aminés N-terminaux qui comprennent 32 acides aminés du peptide signal et 42 acides aminés impliqués dans la liaison au récepteur du CSF-1 (le proto-oncogène c-fms) (Sherr, 1988; Praloran, 1991). On retrouve aussi 75 acides aminés hydrophobes qui forment une séquence qui permet la fixation en membrane de la protéine (Sherr, 1988; Praloran, 1991). Les séquences intermédiaires à ces régions communes sont générées par épissage alternatif.

Concernant le CSF-1 de 256 acides aminés, on sait qu'il est exprimé de manière stable en membrane, relargué dans le milieu extracellulaire par protéolyse de la jonction du domaine transmembranaire avec le domaine extracellulaire de la protéine. Cette forme de CSF-1 est relarguée de manière incomplète, lente et peu soluble (Sherr, 1988; Praloran, 1991). La protéine de CSF-1 256 a.a. est uniquement N-glycosylée.

Elle est exprimée de manière induite chez certains types cellulaires (monocytes, macrophages, lymphocytes,...) (Sherr, 1988; Praloran, 1991).

La forme à 554 acides aminés du CSF-1 est aussi présente de manière stable en membrane, exprimée constitutivement par certains types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes). Elle est libérée beaucoup plus rapidement et sous une forme plus soluble que le CSF-1 256 a.a., elle est N et O-glycosylée ce qui explique en partie sa meilleure solubilité (Sherr, 1988; Praloran, 1991).

L'existence de ces différentes formes de CSF-1 suggère des rôles physiologiques différents. La forme à 554 a.a. plus soluble, constitutive qui représente 85% du CSF-1 sanguin permettrait le maintien des populations monocytaires et macrophagiques dans l'organisme, une augmentation de sa synthèse permet la stimulation de ces mêmes lignées. La forme à 256 a.a. moins soluble et non constitutive aurait un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire locale et agirait comme chémokine (Sherr, 1988; Praloran, 1991). Elle constitue 15% du CSF-1 sanguin.

Enfin on aurait récemment identifié une troisième forme de CSF-1 de 438 a.a.. Cependant il n'y a que peu de données à son sujet. Il s'agirait d'une forme de CSF-1 uniquement membranaire intervenant dans des phénomènes d'adhésion.

1.5. Le récepteur du CSF-1; le proto-oncogène c-fms :

Le récepteur du CSF-1 ou CSF-1R est le proto-oncogène transmembranaire c-fms. Il s'agit d'une protéine homodimérique à activité tyrosine kinase intrinsèque (Sherr, 1988; Praloran, 1991; Till et al., 1993). Le gène qui code pour le c-fms est localisé sur le chromosome 5 en q33.3. (Sherr, 1988; Jacobs, 1989; Mareni et al., 1994). Il se compose de 22 exons, le premier étant non traduit et séparé du second par un intron de très grande taille (125kb). Les exons 2 à 22 comportent moins de 300 pb et sont séparés par des introns de taille variant entre 100 et 6000 pb.

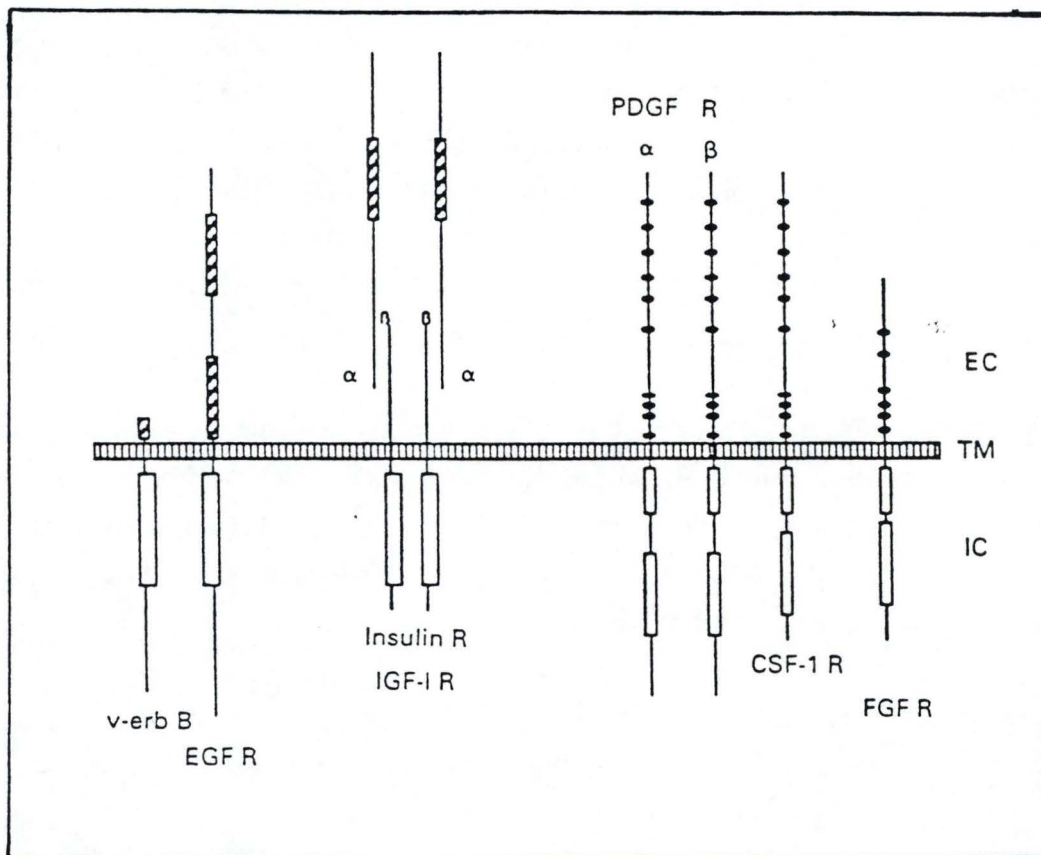


Figure I.A.4. :

Structure du récepteur au PDGF-B.

La structure de ce récepteur est très proche de celle du récepteur du CSF-1, le c-fms. En effet l'un et l'autre sont originaires d'un même gène ancestral dupliqué.

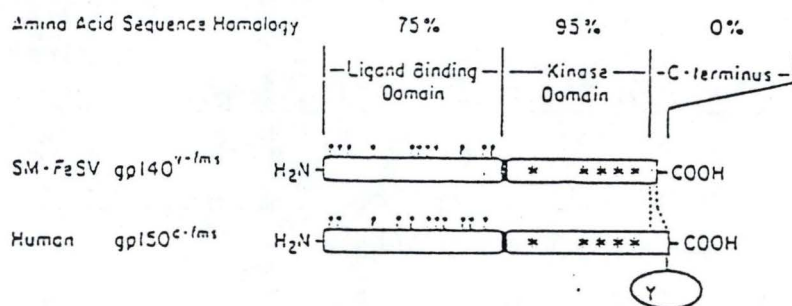


Figure I.A.5.:

Représentation schématique des 2 domaines importants pour l'activité du récepteur c-fms (Sherr, 1988).

Chez l'oncogène v-fms du virus du sarcome félin une quarantaine d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale comprenant une tyrosine à activité régulatrice ont disparu. Cette forme de protéine entraîne l'apparition de tumeurs chez les félins infectés par le FeSV (Feline Sarcoma Virus).

Le gène du c-fms est lié en tandem avec le récepteur au PDGF de type B ayant aussi une activité tyrosine kinase (Figure I.A.4.)(Praloran, 1991). Les homologies de séquence que l'on retrouve entre ceux-ci, leur position voisine sur le chromosome 5 appuie l'hypothèse d'un gène ancestral unique comme étant à l'origine du PDGFR-B et du c-fms (Sherr, 1988).

Le c-fms et le PDGFR-B font tous deux partie d'un cluster de gènes comprenant le GM-CSF, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 (Sherr, 1988; Praloran, 1991). Des délétions, cassures, inversions ou mutations dans cette région du chromosome sont souvent à l'origine de formes préleucémiques ou de formes aiguës de leucémies (Jacobs, 1989).

Le c-fms mature est une glycoprotéine homodimérique transmembranaire de 150 kd et de 512 acides aminés (par monomère). Le c-fms est une protéine N-glycosylée sur son domaine extracellulaire qui compte 52 acides aminés. Ces 52 a.a. forment le site de liaison du ligand, en l'occurrence le CSF-1 (Figure I.A.5.). Une chaîne hydrophobe de 25 a.a. constitue le domaine transmembranaire. Enfin les fonctions catalytiques tyrosine kinase et de régulation sont assurées par un domaine intracellulaire de 435 a.a. (par unité monomérique) (Figure I.A.5.) (Sherr, 1988).

Le c-fms de souris possèdent 4 tyrosines phosphorylables sur son domaine intracellulaire mais seulement une seule est indispensable pour que la protéine fonctionne normalement. La phosphorylation des 3 autres tyrosines module la réponse au CSF-1 (Bourette et al., 1995). On attend encore le résultat de telles études pour le c-fms humain pour lequel au moins une tyrosine phosphorylable a été identifiée (Figure I.A.5.).

La liaison du CSF-1 à son récepteur engendre l'activité tyrosine kinase et la transduction du signal. Les cellules ainsi stimulées accroissent leur synthèse de lipides membranaires, de protéines dont en particulier c-fos, SP-1. Finalement les cellules dupliquent leur ADN et se divisent (Sherr, 1988). La voie de transduction du signal dépendante du c-fms est similaire à celle du PDGFR-B, parmi les premiers intermédiaires suggérés on a (Saleem et al., 1995) :

- La PKC.
- La phosphatidylinositol 3-kinase.
- Le système Grb2 Sos
- p21 ras

Tous ces éléments étant étroitement liés au c-fms en membrane (Sherr, 1988; Datta, 1992).

Classification des oncoprotéines

Oncogène	Protéine	Localisation	Fonction
<i>Classe 1 - Facteurs de croissance</i>			
<i>sis</i>	PDGF (chaîne B)	extra-cellulaire	facteur de croissance
<i>hst</i>	famille FGF	extra-cellulaire	facteur de croissance
<i>int-2</i>	famille FGF	extra-cellulaire	facteur de croissance
<i>Classe 2 - Récepteurs de facteurs de croissance</i>			
<i>erb B</i>	récepteur tronqué d'EGF	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>fms</i>	récepteur muté de CSF-1	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>kil</i>	récepteur tronqué	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>met</i>	récepteur tronqué	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>ros</i>	récepteur tronqué	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>sez</i>	récepteur tronqué	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>trk</i>	récepteur tronqué	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>mas</i>	récepteur de l'angiotensine	membrane plasmique	
<i>Classe 3 - Protéines G</i>			
<i>H-ras</i>	p21 ^{H-ras}	membrane plasmique	liaison GTP/GTPase
<i>Ki-ras</i>	p21 ^{Ki-ras}	membrane plasmique	liaison GTP/GTPase
<i>N-ras</i>	p21 ^{N-ras}	membrane plasmique	liaison GTP/GTPase
<i>gsp</i>	mutant activé de G ₁₂	membrane plasmique	liaison GTP/GTPase
<i>gip</i>	mutant activé de G ₁₂	membrane plasmique	liaison GTP/GTPase
<i>Classe 4 - Tyrosine protéine-kinases</i>			
<i>src</i>	pp60 ^{src}	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>yes</i>	pp60 ^{yes}	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>lgr</i>	pp60 ^{lgr}	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>kck</i>	pp56 ^{kck}	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>abl</i>	pp150 ^{abl}	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>lps</i>	pp92 ^{lps}	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>fas</i>	pp95 ^{fas}	membrane plasmique	tyrosine PK
<i>Classe 5 - Sérine protéine-kinases cytosoliques</i>			
<i>mos</i>		cytoplasme	ser/thr PK
<i>rel/mil</i>		cytoplasme	ser/thr PK
<i>pim-1</i>		cytoplasme	ser/thr PK
<i>Classe 6 - Protéines de liaison au DNA</i>			
<i>myc</i>		noyau	facteur transcriptionnel
<i>myb</i>		noyau	facteur transcriptionnel
<i>fos</i>		noyau	facteur transcriptionnel (partie d'AP1)
<i>jun</i>		noyau	facteur transcriptionnel (partie d'AP1)
<i>ets</i>		noyau	facteur transcriptionnel
<i>trk-A</i>	mutant récepteur T3	noyau	facteur transcriptionnel
<i>rel</i>	mutant NF-κB	noyau	facteur transcriptionnel

Tableau I.A.3. :

Le c-fms est une protéine tyrosine kinase proto-oncogénique (Kaplan & Delpuch, 1993). La disparition d'une tyrosine intervenant dans la régulation de l'activité du c-fms entraîne le développement d'une pathologie préleucémique, le syndrome myéloдисplastique.

Chez l'homme l'autophosphorylation du c-fms en tyrosine 472 aurait un rôle important dans l'inactivation du complexe c-fms:CSF-1, elle provoquerait son internalisation et sa dégradation. Signalons d'ailleurs que des mutations touchant la tyrosine 472 sont à l'origine d'une pathologie préleucémique, le syndrome myéloдисplastique (Figure I.A.5.) (Tableau I.A.3.) (Sherr, 1988; Jacobs, 1989).

1.6. Induction de la production de CSF-1 chez quelques types cellulaires :

1.6.1. Introduction :

Pour rappel, les cellules productrices de CSF-1 actuellement connues sont :

- Pour une production constitutive à un taux basal :

- Les cellules endothéliales.
- Les fibroblastes.
- Les kératinocytes.
- Les cellules épithéliales utérines.

- Pour une production uniquement induite :

- Les cellules épithéliales thymiques.
- Les macrophages.
- Les monocytes.
- Les lymphocytes T et B.
- Les lymphocytes NK (natural Killer).
- Les cellules musculaires lisses.

Chez ces différents types cellulaires, l'induction d'une production de CSF-1 semble faire appel à des voies complexes où interviennent différentes cytokines, cette complexité est le reflet de notre système immunitaire dont on est loin actuellement de pouvoir cerner toutes les finesses. C'est pourquoi on abordera le phénomène de l'induction du CSF-1 dans la mesure des connaissances actuelles chez les monocytes, les lymphocytes T, les fibroblastes, les cellules endothéliales et musculaires lisses.

Monocyte activé

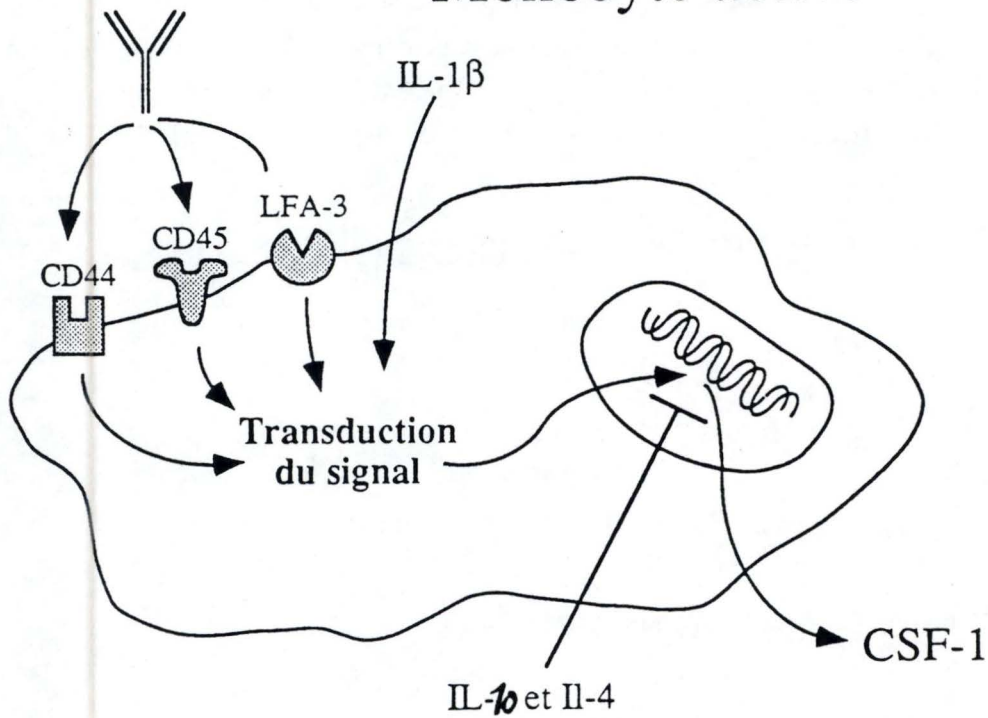


Figure I.A.6. :

Représentation schématique de l'induction ou de l'inhibition de la production de CSF-1 chez des monocytes en culture. Les récepteurs CD44, 45 et LFA-3 stimulés en présence d'IL-1 β induisent la synthèse de CSF-1 chez les monocytes. L'IL-4, l'IL-10 inhibent la production de CSF-1 chez ces mêmes monocytes.

1.6.2. Production de CSF-1 par les monocytes :

Chez les monocytes, les marqueurs de surface CD45, CD44 et LFA-3 agissent dans la voie d'activation de la production de CSF-1, en outre les monocytes ne produisent pas le CSF-1 de façon constitutive (Gruber et al., 1994).

Une stimulation simple de ces marqueurs par des anticorps n'entraîne cependant qu'une production faible de messagers CSF-1 et de très peu de protéines CSF-1 (Gruber et al., 1994). Si un cosignal d'activation sous forme d'IL-1 β est fourni, alors la production induite de CSF-1 (forme 256 a.a.) est maximale (Figure I.A.6.) (Gruber et al., 1994).

Pour rappel, l'IL-1 β est essentiellement produite par les monocytes, les lymphocytes B, les LGL (Large granulous lymphocytes) les fibroblastes et les astrocytes. Son activité augmente l'adhérence leucocytaire à l'endothélium vasculaire, elle stimule la réponse immunitaire des lymphocytes et des macrophages en induisant chez ceux-ci la production de protéines de réponse de phase aigüe.

A l'inverse l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la production de CSF-1 (Figure I.A.6.) (Gruber et al., 1994). L'IL-10 est bien connue pour son rôle anti-inflammatoire car elle inhibe la synthèse de certaines cytokines. Quant à l'IL-4, elle inhibe chez les monocytes humains l'action de l'IL-1 β et du TNF- α (Gruber et al., 1993). L'IL-4 plus l'IL-10 sont ensembles capables d'inhiber la synthèse de l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et du G-CSF chez des monocytes ou des macrophages stimulés par des LPS plus IFN- γ . La chute de transcription du gène CSF-1 est maximale pour l'IL-4 plus l'IL-10, le temps de demi vie des messagers restant inchangé (Gruber et al., 1994). La production de protéine CSF-1 baisse quant à elle de près de 60 à 90%.

Ces constatations nous amènent à penser que l'IL- β , l'IL-10 et l'IL-4 agissent au niveau transcriptionnel. Au niveau post-transcriptionnel la formation du messager dont le site accepteur d'épissage est l'exon 6 downstream est favorisée (Gruber et al., 1994).

Monocyte activé

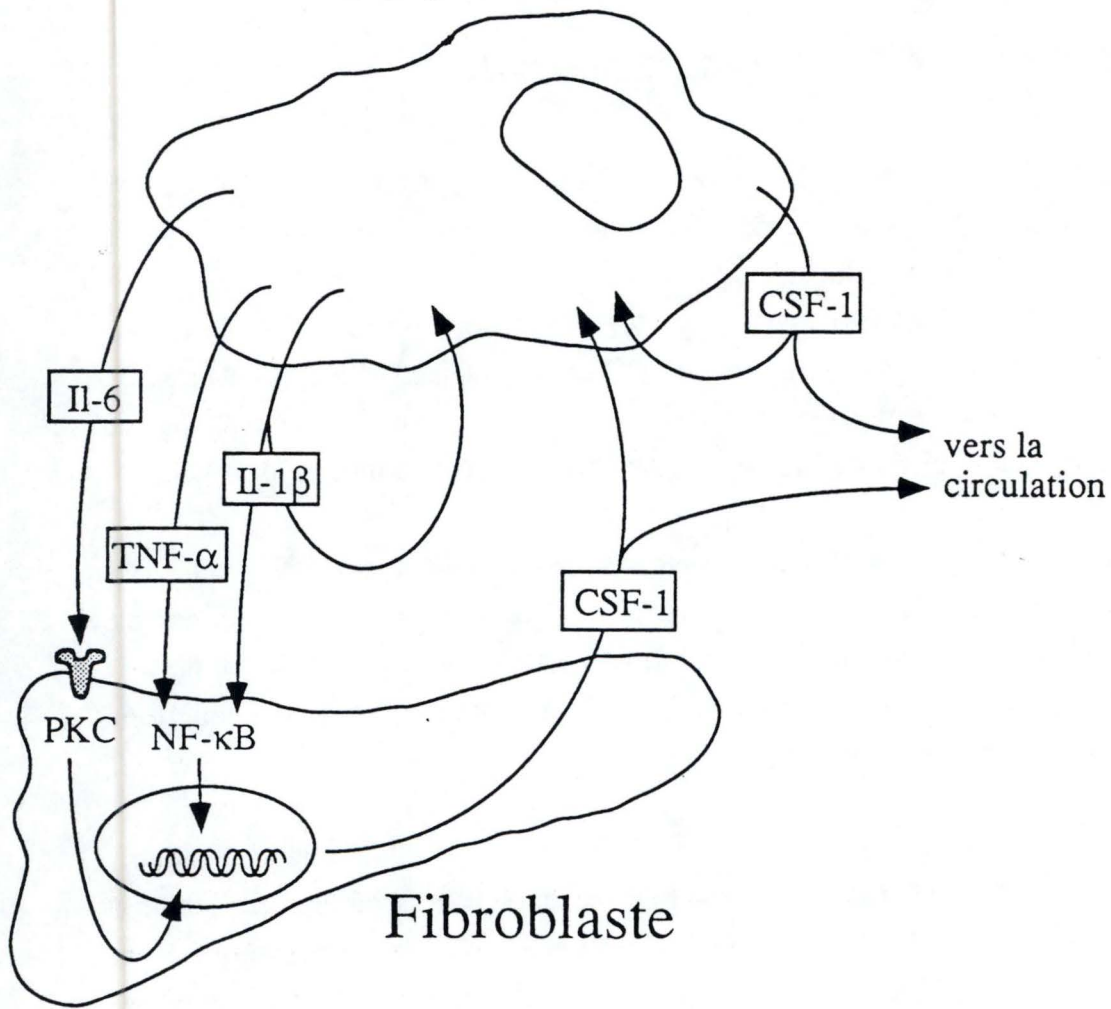


Figure I.A.7. :

Induction de la production de CSF-1 chez les fibroblastes. Des monocytes activés libèrent de l'IL-6, du TNF- α , de l'IL-1 β qui activent chez les fibroblastes la production de CSF-1.

1.6.3. Induction de l'expression du CSF-1 chez les lymphocytes T :

Les lymphocytes T portent en membrane des récepteurs CD28 et des récepteurs CD2 (récepteurs du LFA-3) qui sont des protéines intervenant dans les mécanismes d'adhésion intercellulaires entre leucocytes et d'autres cellules de façon non spécifique. On peut activer sélectivement ces récepteurs grâce à des anticorps.

Une activation du CD2 seul n'entraîne pas de production de CSF-1 (Cerdan et al., 1992). Une activation du CD28 seul provoque une augmentation transitoire des ARNm du CSF-1, mais peu de protéines sont produites (Cerdan et al., 1992).

Une costimulation des CD2 et CD28 entraîne une augmentation significative des messagers CSF-1 et des protéines produites ainsi que de leur libération sous forme soluble (Cerdan et al., 1992). Le temps de demi-vie des messagers est le même dans tous les cas (Cerdan et al., 1992).

Il semble que la faible quantité de protéines produites suite à une stimulation du CD28 seul soit liée à un phénomène d'atténuation traductionnel (Cerdan et al., 1992). Les lymphocytes T n'expriment pas le récepteur au CSF-1, ils sont donc insensibles à cette cytokine (Cerdan et al., 1992).

1.6.4. Induction de l'expression du CSF-1 chez les fibroblastes :

On détecte chez tout individu un niveau constitutif de CSF-1 sanguin, celui-ci est produit constitutivement en quantité très faible, en partie par les cellules endothéliales et par les fibroblastes (Mantovani et al., 1991; Clinton et al., 1992). Les fibroblastes activés par des cytokines ou des molécules proinflammatoires peuvent produire d'avantage de CSF-1.

Les monocytes activés libèrent au cours de la réponse inflammatoire de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-6. Or on a déjà mentionné l'action particulière de l'IL-1 β sur la production de CSF-1 chez ces monocytes (Mantovani et al., 1991).

Des fibroblastes stimulés in vitro par l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 libèrent du CSF-1 dans le surnageant de culture (Mantovani et al., 1991).

Il est démontré que le TNF- α et l'IL-6 activent la synthèse d'un facteur trans qui intervient au niveau du promoteur CSF-1, le facteur NF- κ B (Mantovani et al., 1991). D'un autre côté l'IL-6 agirait en activant la PKC favorisant la production de messagers dont le temps de demi vie est de type long. Le retour en phase post-inflammatoire suite à une activation de la PKC sera donc plus long que si c'était la PKA qui avait été activée (Mantovani et al., 1991). Il faut donc voir dans l'activation de la production de CSF-1 par l'IL-6 un élément important de la cinétique de production : avec un seul messager plus stable, on produit plus de protéines (Mantovani et al., 1991).

Le schéma de réponse inflammatoire partiel qui en découle est qu'un monocyte activé produit de l'IL-6, de l'IL-1 β et du TNF- α tout en se multipliant sous l'action mitogène du CSF-1 qu'il produit (Figure I.A.7.).

L'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α stimulent chez les fibroblastes l'activation du facteur NF- κ B et l'activation de la PKC dont il découle une production accrue de CSF-1 qui diffusera vers les cellules cibles environnantes (Figure I.A.7.) (Mantovani et al., 1991).

1.6.5. Induction de l'expression du CSF-1 chez les cellules endothéliales et musculaires lisses :

Les cellules endothéliales produisent en faible quantité et de manière constitutive du CSF-1 dont le rôle est de promouvoir la survie des macrophages et monocytes sous-endothéliaux ainsi que ceux de la moelle (Praloran, 1991). Les cellules musculaires lisses ne produisent pas constitutivement de CSF-1 (Clinton et al., 1992).

Une stimulation des cellules endothéliales ou musculaires lisses par soit l'IL-1 α , le TNF- α , ou des LPS entraîne la production chez ces cellules de messagers et de protéines CSF-1 (Clinton et al., 1992). L'IL-1 β a un effet similaire à l'IL-1 α . Le PMA bien qu'activant la production de CSF-1 ne le fait qu'à un taux relativement faible. Chez les cellules endothéliales la voie de l'AMPc serait impliquée dans l'activation de la transcription du CSF-1 (Clinton et al., 1992).

Les cellules endothéliales et musculaires lisses libèrent également du CSF-1 en présence de LDL oxydés (Low density lipoprotein, particules riches en cholestérol) (Rajavashisth et al., 1995). La présence de LDL oxydés activerait la liaison du NF- κ B au promoteur du CSF-1, NF- κ B est un facteur trans agissant au niveau du promoteur du CSF-1 pouvant être activé au cours de stress oxydatifs (O'Brien & Chait, 1994; Rajavashisth et al., 1995).

Figure I.A.8. :

Structure d'une lipoprotéine plasmatique (Hennen, 1996).

Une lipoprotéine plasmatique se compose d'une « membrane » en monocouche lipidique dont la structuration et la stabilité sont assurées par des apolipoprotéines. Du cholestérol libre s'insère dans celle-ci. Le centre de la vésicule hydrophobe contient du cholestérol estérifié et du triacylglycérol.

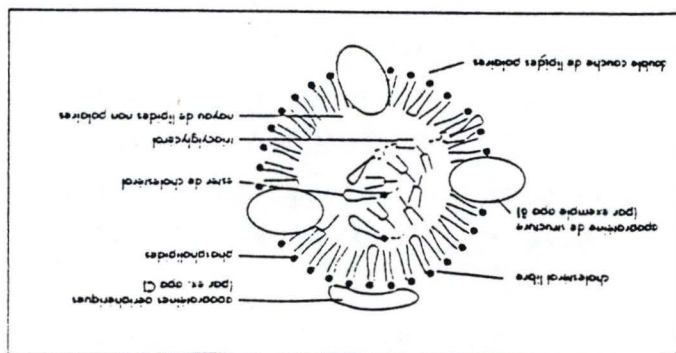


Tableau I.A.4.a. :

Caractéristiques physiques des différentes lipoprotéines.

Lipoprotéines	Densité (g/ml)	Poids moléculaire moyen	Diamètre (nm)
Chylomicrons	< 0,94	$5 \cdot 10^9$	$10^2 - 10^3$
VLDL	0,94 à 1,006	$7,5 \cdot 10^6$	30 - 70
LDL			15 - 25
LDL ₁ (IDL)*	1,006 à 1,019	$2,5 \cdot 10^6$	
LDL ₂	1,019 à 1,063		
HDL			
HDL ₁	< 1,063		
HDL ₂	1,063 à 1,125	$3,9 \cdot 10^5$	6 - 14
HDL ₃	1,125 à 1,210	$1,9 \cdot 10^5$	6 - 10

Tableau I.A.4.b. :

Composition des principales lipoprotéines.

COMPOSITION DES PRINCIPALES LIPOPROTÉINES

Fractions	lipidiques (% poids)				Apoprotéines Majeures
	TG	C	CE	PL	
Chylomicrons	86 - 94 %	0,5 - 1 %	1 - 3 %	3 - 8 %	1 - 2 % AI, AII AIV, B48
VLDL	55 - 65 %	6 - 8 %	12 - 14 %	12 - 18 %	5 - 10 % B100 CI, CII, CIII
LDL	8 - 12 %	5 - 10 %	33 - 40 %	20 - 25 %	20 - 24 % B100
HDL	3 - 6 %	3 - 5 %	14 - 18 %	20 - 30 %	45 - 50 % AI, AII CI, CII, CIII

Le CSF-1 libéré active alors la dégradation des LDL par les monocytes et les macrophages en recrutant ces cellules et en induisant chez celles-ci une expression accrue des récepteurs aux LDL (récepteurs scavengers et apo-E) et de lipoprotéines lipases (Rajavashisth et al., 1995).

En présence d'un excès de LDL, ce mécanisme peut mener à la formation de plaques d'athéromes et à des lésions artérielles, associées à l'athérosclérose (O'Brien & Chait, 1994; Rajavashisth et al., 1995).

2. Biologie du cholestérol, athérosclérose et CSF-1 :

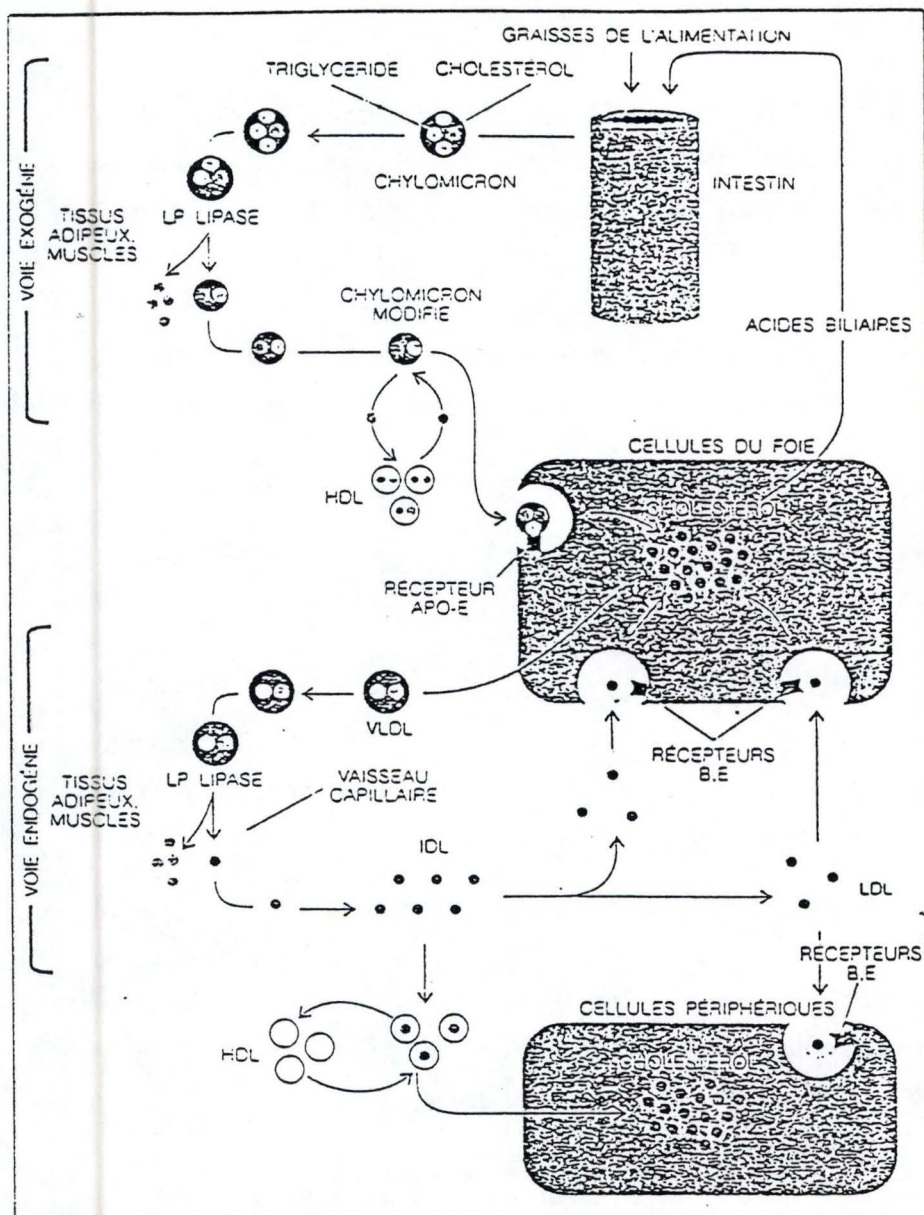
2.1. Métabolisme du cholestérol :

2.1.1. Introduction :

Le cholestérol est une molécule hydrophobe, on ne la trouve pas en tant que telle dans le flux sanguin. Il n'existe qu'associé à d'autres lipides et à des protéines, les apolipoprotéines. Cette association constitue les lipoprotéines (Fruchart, 1992). Les lipoprotéines sont classées suivant leur taille, leur densité en cholestérol (estérifié ou non), leur composition lipidique et en apolipoprotéines (Tableau I.A.4.a,b.) (Figure I.A.8.).

Les apolipoprotéines interviennent d'abord dans la structuration des diverses lipoprotéines. Certaines, comme l'apolipoprotéine B ou E permettent la reconnaissance de la lipoprotéine par des récepteurs spécifiques, les récepteurs Apo-E ou Apo-B. Enfin plusieurs d'entre elles sont capables d'activer des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines (Fruchart, 1992). Elles orientent donc le métabolisme du cholestérol. Des lipoprotéines spécifiques contenant les apolipoprotéines B véhiculent le cholestérol dans le sang (Fruchart, 1992).

L'apolipoprotéine B existe sous deux formes chez l'homme codées par le même gène. L'apolipoprotéine B 100 synthétisée par le foie, associée aux VLDL et aux LDL et l'apolipoprotéine B 48 synthétisée par les entérocytes associée aux chylomicrons (Fruchart, 1992).



VOIES MÉTABOLIQUES exogènes et endogènes de transport des graisses. Le cholestérol de l'alimentation traverse les parois de l'intestin et forme, avec les triglycérides des chylomicrons. Dans les vaisseaux capillaires des tissus musculaires et adipeux, des enzymes, la lipoprotéine lipase coupe la liaison ester des triglycérides et fait disparaître en partie ces triglycérides des chylomicrons. Quand ces derniers, enrichis en cholestérol, atteignent le foie, ils se lient à des récepteurs spécifiques et passent dans les cellules du foie : le cholestérol qu'ils contiennent est alors soit sécrété dans l'intestin (par la bile, principalement sous forme d'acide biliaire), soit placé avec des triglycérides dans des particules de très faible densité (VLDL) libérées dans le sang, au début de la voie endogène. Là encore, les triglycérides sont hydrolysés dans les tissus adipeux et musculaires, et des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), riches en cholestérol, sont formées. Une partie des IDL se lie à des récepteurs B.E. présents sur les cellules de foie ; les autres restent dans le sang et sont transformées en LDL. La plupart des LDL se fixent à des récepteurs du foie ou à d'autres cellules et sont retirées de la circulation sanguine. Le cholestérol qui sort des cellules périphériques (efflux) se lie aux lipoprotéines de haute densité (HDL) et est estérifié par l'enzyme LCAT (Lécithine-Cholestérol-Acyl-Transférase) d'origine hépatique. Le cholestérol estérifié des HDL est transféré en partie dans les lipoprotéines de basse densité qui fournissent en retour des triglycérides aux IDL.

Figure I.A.10. :

Transport du cholestérol vers les tissus : voies endogènes et exogènes du métabolisme du cholestérol.

2.1.2 Transport du cholestérol vers les tissus utilisateurs:

(Figure I.A.10.)

Le cholestérol alimentaire subit une première transformation dans les entérocytes où il est estérifié par l'acyl coA acyl transférase (ACAT), il est alors associé à des triglycérides, des phospholipides et à l'apolipoprotéine B 48 (Fruchart, 1992). Dans le sang ces particules s'enrichissent de l'apolipoprotéine E, A1 et C (Fruchart, 1992). Les particules ainsi formées de grande taille, de faible densité et pauvres en cholestérol sont appelées chylomicrons.

Les chylomicrons passent dans la circulation où la lipoprotéine lipase présente en membrane des cellules endothéliales hydrolyse les triglycérides des chylomicrons en di et monoglycérides ainsi qu'en acides gras.

Ces molécules peuvent être captées comme source énergétique par les tissus musculaires ou être stockées dans les tissus adipeux. Les chylomicrons obtenus sont appelés chylomicrons modifiés : ils sont proportionnellement enrichis en cholestérol car ils ont perdu la majeure partie de leurs triglycérides. Ils sont alors captés par les hépatocytes grâce aux récepteurs aux apolipoprotéines E et B, les récepteurs apo-E/B (Fruchart, 1992). Le cholestérol qu'ils contiennent est alors soit excrété via la bile, soit il est réintégré dans des particules de très faible densité, les VLDL qui sont libérées dans le sang (Fruchart, 1992).

Les triglycérides contenus dans les VLDL sont à nouveau hydrolysés par la lipoprotéine lipase et les molécules énergétiques résultantes sont captées par les cellules musculaires ou les adipocytes. On obtient des particules de densité intermédiaire, les IDL.

Une partie de ces IDL est captée par les récepteurs apo-E/B des hépatocytes, les autres restent dans le sang et sous l'action d'une triglycéride lipase hépatique sont transformées en LDL, particules de densité moyenne avec un contenu faible en triglycérides mais élevé en cholestérol (Fruchart, 1992).

Les LDL peuvent à leur tour être captées par les hépatocytes ou par des cellules périphériques en vue de l'utilisation du cholestérol dans le métabolisme de celles-ci. Ce cholestérol peut être introduit dans les membranes cellulaires où il intervient sur la fluidité, il peut servir de substrat dans d'autres voies métaboliques telles que la synthèse des stéroïdes (Fruchart, 1992).

Enfin un quatrième type de particule lipoprotéinique joue un rôle essentiel dans l'élimination de l'excès de cholestérol tissulaire. Les HDL sont des particules synthétisées par le foie et les entérocytes. Elles ne contiennent au départ que du cholestérol non estérifié, des phospholipides et les apolipoprotéines de type A. Dès qu'elles entrent dans la circulation elles se chargent d'apolipoprotéines de type C. Ces particules de densité élevée remplissent différentes fonctions :

- Elles servent de réservoir pour l'apolipoprotéine C, qui sera échangée avec d'autres types de lipoprotéines.
- Elles sont le siège d'une estérification intense du cholestérol. Celui-ci estérifié s'accumule au centre de la particule, tandis que la périphérie s'appauvrit en cholestérol libre. Cela permet aux HDL de capter à leur surface de nouvelles molécules de cholestérol libre présentes au niveau des tissus.
- en cédant une partie des esters de cholestérol aux VLDL, LDL et chylomicrons, ils permettent également la récupération par le foie du cholestérol excédentaire.

Les HDL sont donc des régulateurs important du transport et de l'élimination du cholestérol (Fruchart, 1992). On dit qu'elles sont anti-athérogènes, tandis que les LDL et les VLDL sont athérogènes.

Dés lors en situation non pathologique, le métabolisme du cholestérol permet un apport vers les tissus périphériques de cette molécule qui est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Il est associé également au transport de molécules énergétiques que sont les acides gras et les triglycérides (Figure I.A.9.). Le cholestérol est essentiellement éliminé au niveau du foie et par les macrophages qui expriment des récepteurs apo-E, les HDL sont particulièrement importantes dans l'élimination du cholestérol issu des tissus périphériques.

2.2. L'athérosclérose :

2.2.1. Introduction :

L'athérosclérose est une maladie qui diminue la lumière des artères et entrave la circulation sanguine. Elle est due à une accumulation de cholestérol dans les parois artérielles. Lorsque cette accumulation entraîne la réduction de la lumière artérielle et en particulier des artères coronaires, un caillot de petite dimension (thrombus) peut se former et boucher celle-ci; le tissu cardiaque qui n'est alors plus alimenté en sang dégénère et meurt, c'est l'infarctus (Fruchart, 1992).

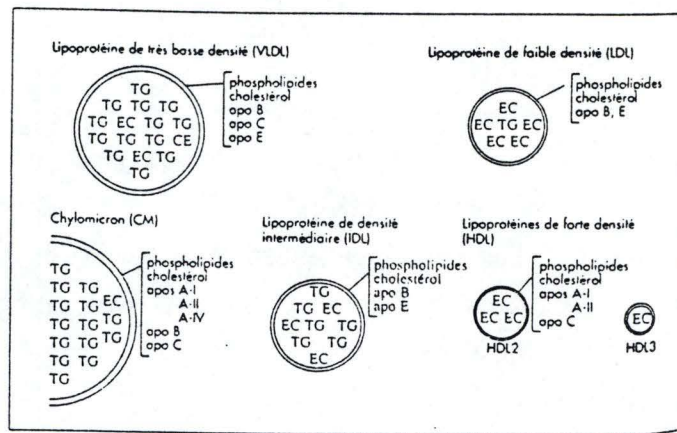


Fig 10.1 - Transport des lipides : les différentes lipoprotéines en circulation
 TG : triglycérides, EC : esters de cholestérol.

Figure I.A.9. :

Représentation schématique des différentes classes de lipoprotéines (Hennen, 1996).

Légende : TG : Triglycérides.

EC : esters de cholestérol.

apo : apolipoprotéines (aussi apellées apoprotéines).

Tableau 10.3 - Classifications génétique et métabolique des hyperlipémies primaires majeures

Maladies	Déficit	Anomalies
Hypercholestérolémie familiale	Déficit en récepteur LDL	Déficit du catabolisme des LDL Production exagérée des LDL
Hyperlipémie combinée familiale	-	Production exagérée des LDL et des VLDL
Hyperlipoprotéïnémie de type III	Apo E anormale	Déficit du catabolisme des fantômes Défaut de conversion en LDL avec ou sans production exagérée des LDL
Chylomicronémie	Déficit en LPL, en apo C-II, en inhibiteur des LPL	Déficit de clairance des chylomicrons
Hypercholestérolémie commune	-	Production exagérée des LDL
Hypertriglycéridémie familiale	-	Déficit du catabolisme des VLDL et des triglycérides avec production exagérée des VLDL et triglycérides

Tableau I.A.5. :

Classification génétique et métabolique des hyperlipémies primaires majeures (Hennen, 1996).

2.2.2. Quelques facteurs à risque dans la pathologie de l'athérosclérose :

L'athérosclérose est liée en définitive à l'accumulation de LDL dans le sang; sera un facteur à risque tout désordre qui favorisera cette accumulation (Fruchart, 1992).

Parmi ces facteurs, on trouve le facteur héréditaire (Tableau I.A.5.). Ainsi les anomalies des apolipoprotéines E suite à des mutations affectant leur domaine de liaison aux récepteurs apo-E/B entraînent une élimination beaucoup plus lente des LDL du sang et donc leur accumulation dans la circulation (Malhey, 1983; Fruchart, 1992; O'Brien & Chait, 1994). Les personnes atteintes d'hypercholestérolémie familiale ont des récepteurs aux LDL déficients, la clearance de ces LDL est donc très faible (O'Brien & Chait, 1994).

Le tabagisme est également un facteur à risque à divers niveaux. Il augmente la perméabilité vasculaire et l'adhésion plaquettaire.

Certains constituants du tabac sont mitogéniques pour les cellules musculaires lisses sous endothéliales ce qui entraîne la réduction de la section artérielle (O'Brien & Chait, 1994). On observe chez les fumeurs et chez les personnes en contact fréquent avec la fumée de tabac une baisse de la production des HDL et une oxydation plus rapide des LDL (O'Brien & Chait, 1994).

Certaines formes de diabète amènent à une baisse de production des HDL et peuvent avoir des effets pro-coagulants. Un taux élevé d'insuline stimule la mitose chez les cellules musculaires lisses, ainsi l'hyper-insulinémie serait également un facteur à risque (O'Brien & Chait, 1994).

Enfin l'hypertension est aussi une cause importante d'athérosclérose, on constate une augmentation de l'adhérence des monocytes aux endothéliums, des dysfonctionnements immunitaires avec une baisse d'activité des macrophages du tissu artériel, une augmentation de la synthèse de matrice protéique et de cytokines par les cellules musculaires lisses suite à l'action de l'angiotensine II (O'Brien & Chait, 1994).

Evidemment une alimentation riche en graisse constitue un facteur à risque seul, et si il est couplé aux éléments précédents, alors la potentialité à développer des plaques d'athérome est d'autant plus élevée (Malhey, 1983; Fruchart, 1992; O'Brien & Chait, 1994).

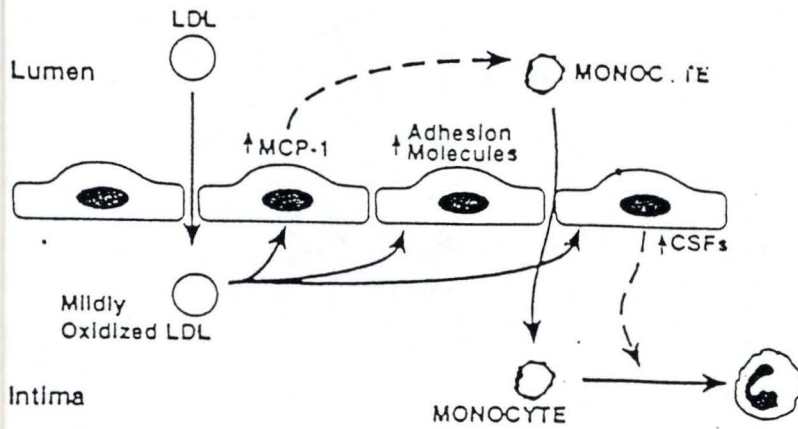


Figure I.A.11. :

Initiation du recrutement des monocytes lorsque les cellules endothéliales sont soumises à un stress hémodynamique et oxydatif en présence d'un excès de LDL (O'Brian & Chait, 1994). Les cellules endothéliales produisent une chémokine, le MCP-1, qui va induire l'expression chez les monocytes de molécules d'adhésions comme le LFA-1 ou le VLA-4 qui sont des intégrines.

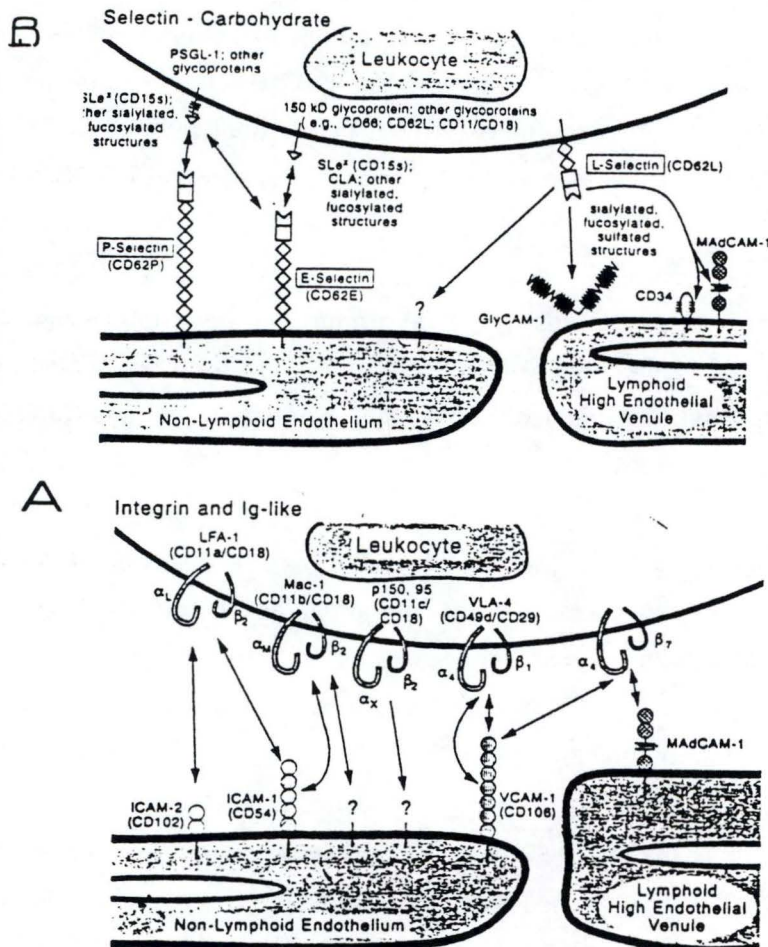


Figure I.A.12. : (Carlos & Harlan, 1994)

A : Les cellules endothéliales activées en présence de LDL oxydés expriment en surface membranaire les ligands ICAM-1 et VCAM-1 des intégrines LFA-1 et VLA-4 des monocytes. B: Elles expriment également en surface membranaire des récepteurs aux hydrates de carbone de surface des monocytes, ces récepteurs sont les sélectines E et P.

Ces molécules permettent l'adhésion et la diapédèse monocytaire. Les monocytes migrent dans l'intima vasculaire.

2.2.3. Niveau cellulaire et moléculaire de l'athérosclérose et implication du CSF-1 :

Le développement de plaques d'athérome est basé sur un excès de LDL circulantes, les raisons de cet excès ont été exposées ci-avant. Les LDL sont des particules suffisamment petites pour traverser l'endothélium et se loger dans l'intima (Fruchart, 1992; Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994). Au cours de cette traversée les LDL sont modérément oxydées (mm-LDL) par les cellules endothéliales et par les cellules musculaires lisses de l'intima (Figure I.A.11.).

Quand ces LDL sont présentes en grande quantité, elles font subir à ces cellules un stress hémodynamique et oxydatif (Jang et al., 1993; O'Brien et Chait, 1994). Ces dernières synthétisent alors du MCP-1 (Figure I.A.11.), une cytokine à effets chémotactiques sur les monocytes, de l'IL-1 et de l'IFN- γ ainsi que du CSF-1 ce qui favorise l'expression de molécules d'adhésion telles que les LFA (lymphocyte function associated molecules) et les VLA (very late activation antigen) (Figure I.A.12.A.), la multiplication et la différenciation des monocytes en macrophages (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994).

En même temps, les cellules endothéliales expriment en surface des protéines permettant l'adhésion et la diapédèse des monocytes recrutés (Figure I.A.12.A.). Ces protéines sont l'ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) qui est constitutive mais dont l'expression augmente nettement en présence d'IL-1, de TNF- α , ou de LPS; et la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) d'expression induite par stimulation à l'IL-1, l'IFN- γ , aux LPS, ou au lysophosphatidylcholine qui est un produit de l'oxydation des LDL (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994). VCAM-1 se lie aux récepteurs VLA-4 (ou intégrine $\alpha 4\beta 1$) des monocytes et ICAM-1 se lie aux récepteurs LFA-1 (ou intégrine $\alpha 2\beta 2$) de ces mêmes monocytes (Figure I.A.12.A.). On retrouve aussi VCAM-1 et ICAM-1 exprimés en surface des cellules musculaires lisses de l'intima ce qui permet la migration des monocytes à travers celle-ci (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994).

Les sélectines E et P qui sont des lectines membranaires des cellules endothéliales participent aussi à l'adhésion monocyttaire en se liant à des hydrates de carbone de surface des monocytes (Figure I.A.12.B.) (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994). La sélectine P est exprimée constitutivement chez les cellules endothéliales, mais elle reste stockée dans des vésicules jusqu'à stimulation. La sélectine E est induite. L'affinité des sélectines pour les hydrates de carbone est modérée, elles permettent d'initier l'adhésion des monocytes qui est complétée par l'intervention de VCAM-1 et ICAM-1 (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994).

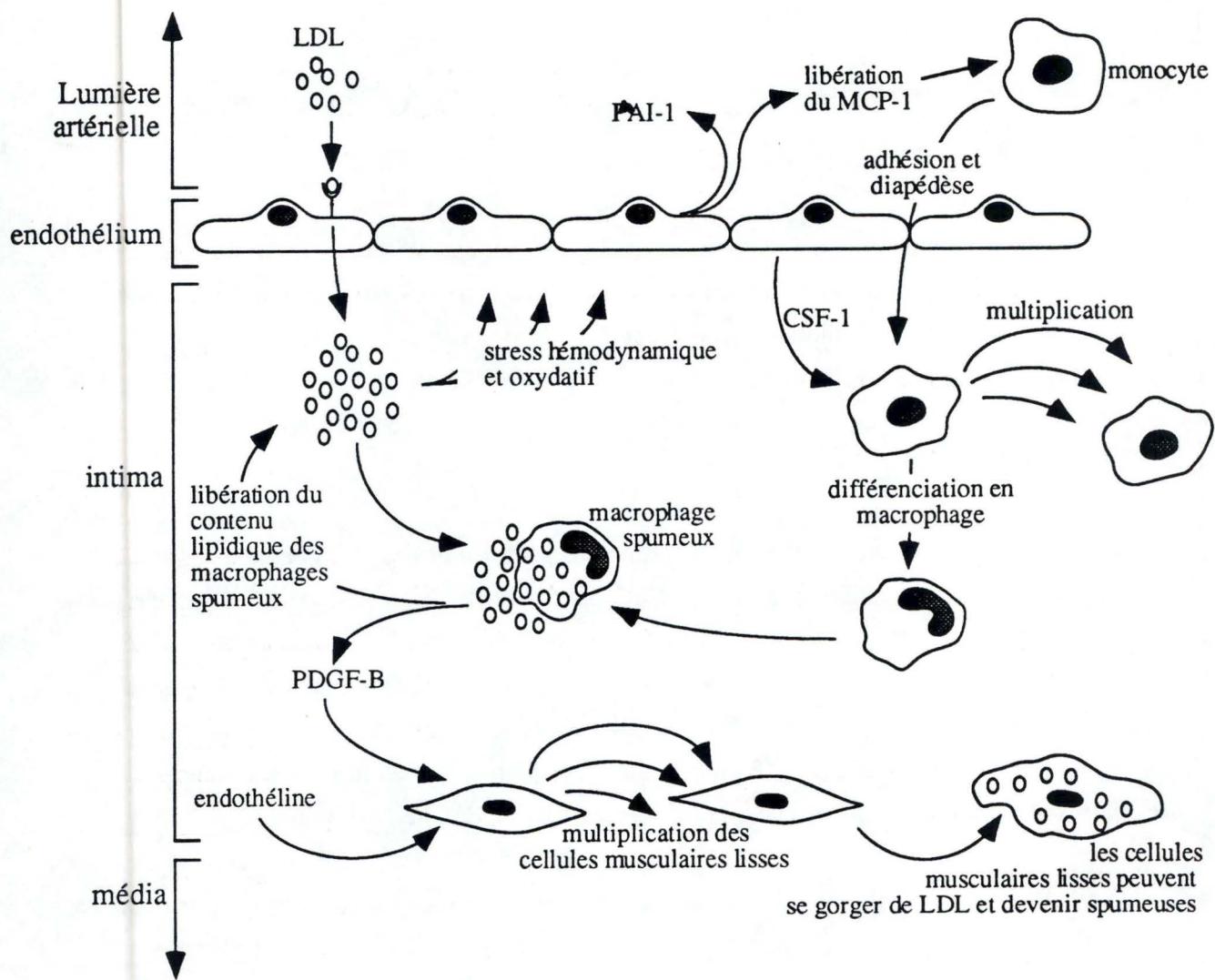


Figure I.A.13. : (O'Brian & Chait, 1994)

Sous l'action du CSF-1 les monocytes de l'intima se multiplient et se différencient en macrophages. Les macrophages ingèrent les LDL et se gorgent de lipides, ils gonflent, forment des cellules spumeuses (Foam cell), qui peuvent éclater et relarguer leur contenu. Les macrophages libèrent des facteurs de croissance (PDGF-B) qui induisent la multiplication des cellules musculaires lisses, celles-ci peuvent ingérer aussi des LDL et devenir à leur tour spumeuses.

La formation d'une couche de cellules spumeuses dans l'intima rigidifie l'artère, rétrécit sa section ce qui menant à la rupture de l'intima et de l'endothélium entraînant la libération de facteurs pro-coagulants, l'agrégation plaquettaire et le thrombus.

Suite au recrutement, à la diapédèse des monocytes initiée par le MCP-1 et le CSF-1, les LDL subissent une oxydation plus conséquente par ces derniers (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994). Les LDL fortement oxydées deviennent cytotoxiques pour les cellules endothéliales qui libèrent d'avantage de CSF-1 ainsi que du PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) ce qui active l'adhésion plaquettaire (Figure I.A.13.). Elles libèrent aussi de l'endothéline qui stimule la prolifération des cellules musculaires lisses (Figure I.A.13.) (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994).

Les monocytes activés qui se retrouvent dans l'intima se multiplient et se différencient en macrophages sous l'action du CSF-1 (Figure I.A.13.), ils captent les LDL-oxydées via des récepteurs scavengers, eux mêmes induits par le CSF-1 (Rajavashisth, 1995). La présence de LDL oxydés et de molécules chemotactiques inhibe la mobilité des monocytes et des macrophages qui se gorgent de lipides et de cholestérol, gonflent et forment des cellules bourrées de gouttelettes lipidiques que l'on appelle cellules spumeuses (Figure I.A.13.). Ceci est lié au fait que contrairement aux récepteurs Apo-E/B, liant la LDL native, le récepteur scavenger n'est pas régulé négativement par le taux de cholestérol intracellulaire. Ces cellules absorbent donc des lipides jusqu'à en mourir. Ces cellules libèrent aussi du PDGF-B qui stimule la division des cellules musculaires lisses et la libération de cytokines pro-inflammatoires (Figure I.A.13.) (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994).

Les macrophages spumeux en mourant libèrent les lipides accumulés qui peuvent alors être absorbés par les cellules musculaires lisses devenant à leur tour spumeuses (Figure I.A.13.). La présence de CSF-1 entretient cependant une certaine survie des macrophages spumeux ce qui évite la nécrose totale de la couche de cellules spumeuses (Jang et al., 1993; O'Brien & Chait, 1994).

La multiplication des cellules musculaires lisses, des macrophages, l'apparition d'une couche de cellules spumeuses réduit progressivement la section artérielle. L'intima perd de son élasticité, finalement la tension devient trop forte et l'intima se déchire. La présence de PAI-1 et la libération de facteurs pro-coagulants entraîne la formation d'un caillot, c'est le thrombus. Une fois que la formation de la plaque d'athérome est initiée, elle a tendance à s'amplifier d'elle même jusqu'à un point critique, la rupture de l'intima.

3. Conclusion :

L'athérosclérose est une des pathologies qui touche le plus nos sociétés occidentales en cette fin de siècle. Un régime alimentaire riche en graisses et en sels, le stress et l'hypertension, la diminution de l'exercice physique en sont les causes majeures. Plus fondamentalement, c'est l'accumulation de LDL au niveau de l'intima artérielle qui mène aux lésions athéromateuses.

Le stress oxydatif lié à la présence de LDL oxydés entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires comme le CSF-1 et le MCP-1. Le recrutement des monocytes, leur multiplication et leur différenciation en macrophages au niveau de l'intima, l'inhibition de leur mobilité entraîne le raccourcissement de la section artérielle qui finit par se rompre en libérant des agents pro-coagulants ce qui provoque un thrombus.

4. But du travail :

Dans le cadre de ce travail nous allons cloner le promoteur du gène du CSF-1 par PCR afin de le placer en amont d'un gène rapporteur. Ce rapporteur est le gène de la Green Fluorescent Protein (GFP).

La construction réalisée sera alors transfectée dans des cellules endothéliales en culture afin d'étudier l'activation de la transcription du gène CSF-1 lorsque ces cellules sont soumises à un stress oxydatif.

Promoters for RNA polymerase I consist of a core promoter, separated by 70 bp from the upstream control element. UBF1 binds to both regions, after which SL1 can bind. RNA polymerase I then binds to the core promoter. The nature of the interaction between the factors bound at the upstream control element and those at the core promoter is not known.

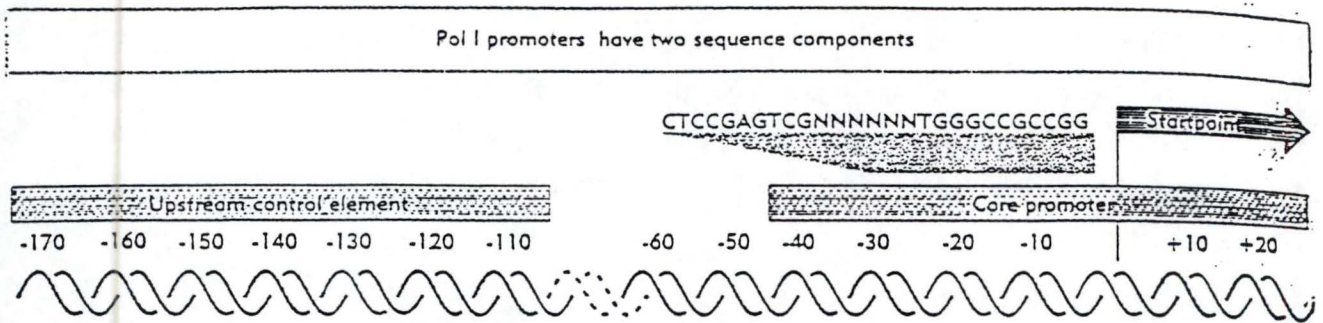


Figure I.B.1. :

Promoteur eucaryote de classe I (Lewin, 1994).

Ce type de promoteur se compose d'un élément d'initiation de la transcription en amont de l'élément promoteur principal.

Deletion analysis shows that the promoter for 5S RNA genes is internal; initiation occurs a fixed distance (55 bp) upstream of the promoter.

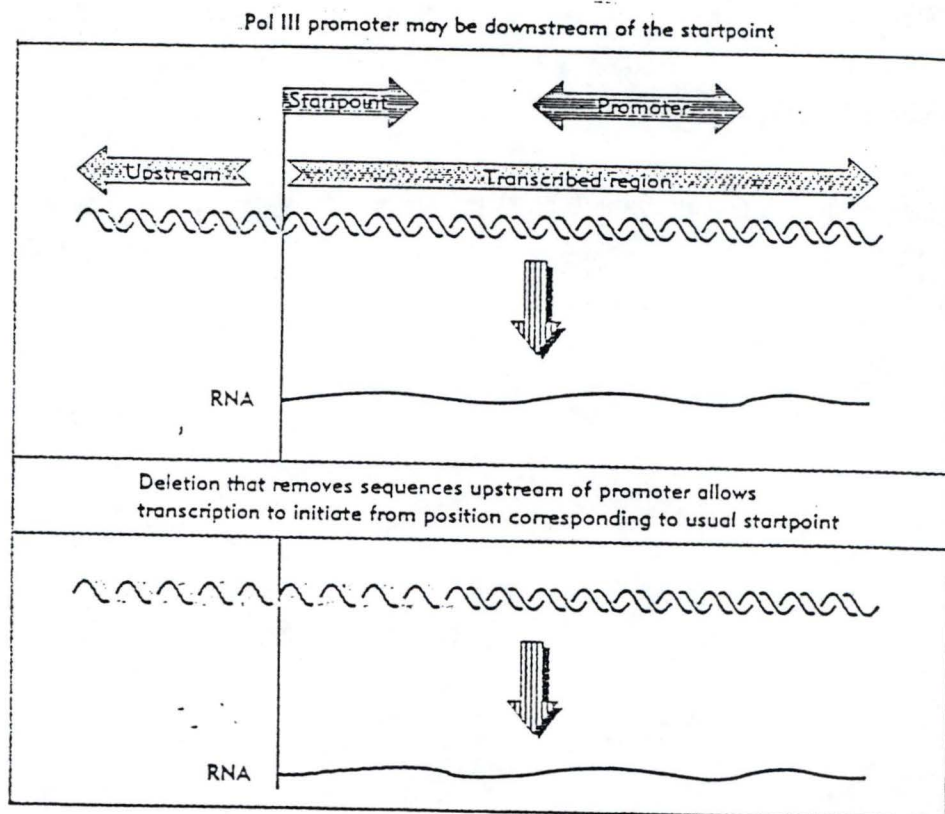


Figure I.B.2. :

Promoteur eucaryote de classe III (Lewin, 1994).

Les promoteurs eucaryotes de classe III se composent d'éléments en amont et en aval du site +1 départ de transcription.

I.B. Promoteurs eucaryotes et promoteur du gène du colony stimulating factor-1 :

1. Introduction :

Dans le cadre de ce travail nous avons cloné le promoteur du CSF-1 humain, celui-ci appartient à la classe II des promoteurs eucaryotes. Les promoteurs de classe I régulent uniquement l'expression des ARN ribosomiaux (rARNs) (Figure I.B.1.) (Darnell, Lodish & Baltimore, 1989; Herbomel, 1993; Lewin, 1994), les promoteurs de classe III contrôlent l'expression des ARN de transfert (ARNt) (Figure I.B.2.) (Darnell, Lodish & Baltimore, 1989; Herbomel, 1993; Lewin, 1994), les éléments cis de ces promoteurs se trouvant aussi bien en amont qu'en aval du site d'initiation de la transcription, enfin les promoteurs de classe II contrôlent la transcription de tous les autres gènes.

2. Les promoteurs eucaryotes de classe II :

La région promotrice d'un gène eucaryote peut se définir comme un groupe d'éléments cis à chacun desquels correspond un élément trans (Herbomel, 1993). Ces éléments trans sont des protéines qui se distinguent en 3 grands groupes :

- les facteurs de transcription généraux.
- les facteurs de transcription spécifiques.
- les éléments intervenant en tant que enhanceurs.

2.1. Le motif TATA :

Les gènes dits de classe II sont les gènes transcrits via l'intervention de l'ADN polymérase II. L'initiation de la transcription par cette enzyme est dépendante de l'organisation du promoteur et des sites que l'on y distingue en comparaison aux promoteurs de classe I et III.

Parmi ces motifs l'élément TATA est caractéristique (Herbomel, 1993). Les premières boîtes TATA identifiées le furent dans des promoteurs viraux (Herbomel, 1993). Ces motifs furent ensuite identifiés dans des gènes eucaryotes fortement exprimés tels que ceux de la globine ou de l'ovalbumine.

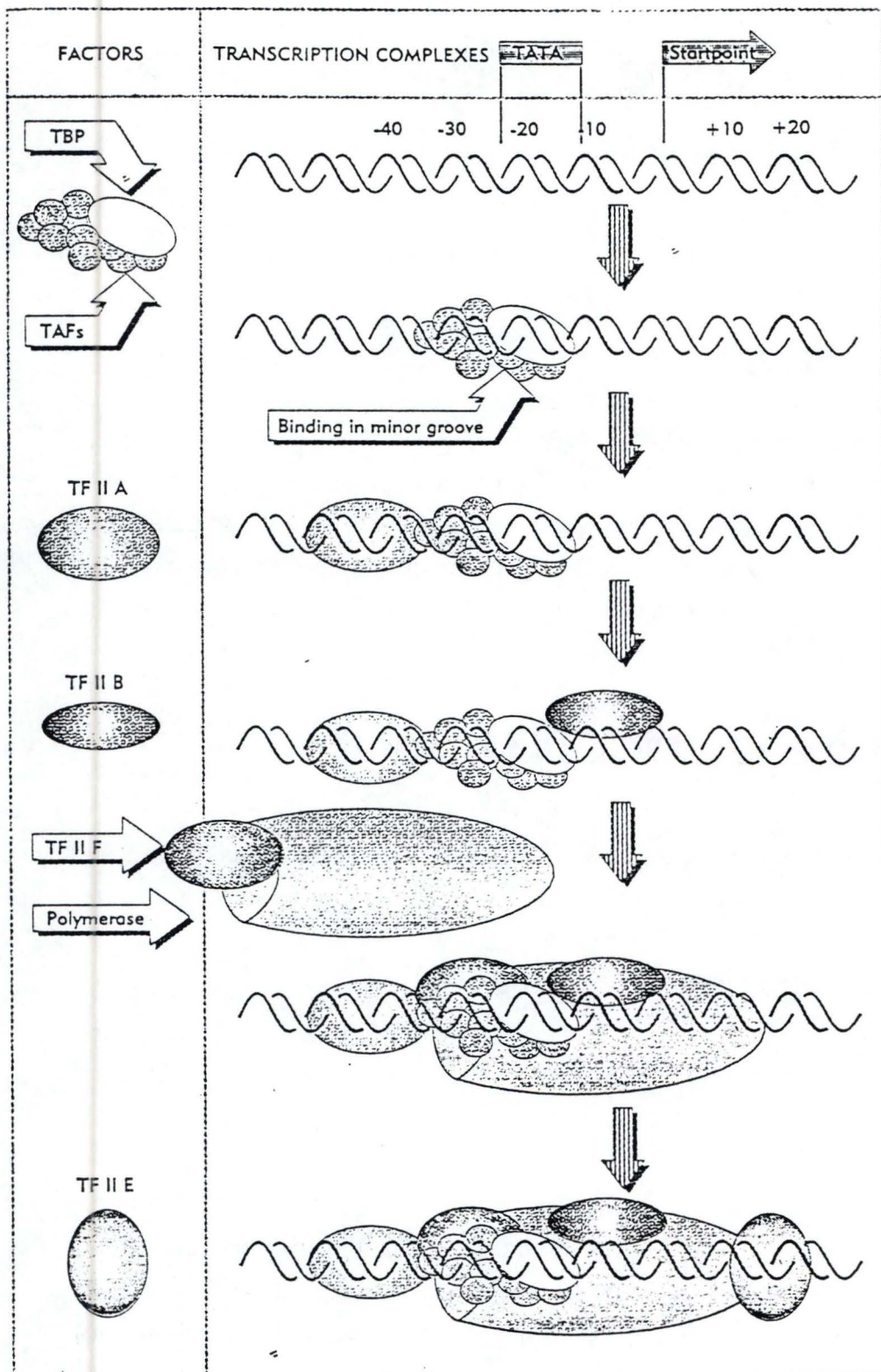


Figure I.B.3. :

Assemblage du complexe d'initiation de la transcription au niveau des promoteurs eucaryotes de classe II (Lewin, 1994).

Le complexe TAFs (TATA associated factors), TBP (TATA binding protein) est le premier à se fixer sur l'ADN au niveau de la boîte TATA du promoteur de classe II. On appelle aussi ce complexe TFIID (Transcription factor II D).

Le facteur TFIIA puis TFIIB s'associent avec TFIID au niveau du motif TATA.

TFIIF est un facteur de transcription associé à l'ARN polymérase II, le complexe TFIIF:ARN polymérase II se fixe au niveau du complexe TFIID:A:B.

Enfin un dernier facteur, TFII E s'associe au complexe pour terminer la formation du complexe d'initiation de la transcription des gènes de classe II.

Finalement la comparaison des séquences de promoteurs de classe II a permis de déduire une séquence consensus de la Boîte TATA (TATAAA) située une trentaine de nucléotides en amont du site +1 de transcription (Herbomel, 1993).

C'est par mutagenèse dirigée que le rôle du motif TATA dans les promoteurs de classe II fut étudié. La suppression du motif TATA a essentiellement deux conséquences :

- Elle diminue la fréquence de transcription ou empêche la transcription si le promoteur est pauvre en éléments cis (Herbomel, 1993).
- En absence du motif TATA le site de démarrage de la transcription devient très hétérogène. Si on délète ou l'on ajoute des nucléotides entre le site TATA et le site +1 de transcription, le site de démarrage change de sorte qu'il demeure à peu près à 30 pb en aval du motif TATA (Herbomel, 1993).

Ces observations ont permis de conclure que la région « TATA en plus du site de démarrage de la transcription » constituait le lieu d'assemblage du complexe de transcription où intervient la polymérase de type II (Herbomel, 1993; Lewin, 1994), l'efficacité de formation du complexe dépendant de régions régulatrices plus en amont.

2.2. Le complexe de prédémarrage :

L'étude du complexe d'initiation de la transcription a été réalisée sur le promoteur tardif majeur d'adénovirus à partir d'extraits cellulaires de lignées HeLa (Herbomel, 1993). Les étapes d'association du complexe de transcription au niveau de la boîte TATA sont aujourd'hui bien connues (Figure I.B.3.).

Des protéines que l'on appelle TAFs (TATA associated factors) sont les premières à se lier au niveau du site TATA (Herbomel, 1993; Lewin, 1994). Elles sont associées à une protéine TBP (TATA binding protéin) et coopèrent à la fixation sur la boîte TATA. Cette association de protéines forme le facteur TFIID (transcription factor II D) qui en se fixant sur le motif TATA devient un élément stable (engagé) (Herbomel, 1993; Lewin, 1994).

L'association du facteur TFIIA à TFIID le stabilise et stimule la suite de l'assemblage du complexe (Herbomel, 1993; Lewin, 1994). Ce complexe DA est reconnu par TFIIB; le complexe DAB formé est alors reconnu par l'ARN polymérase II (Herbomel, 1993; Lewin, 1994).

Un facteur TFIIF s'associe ensuite à la polymérase puis les facteurs TFIIE, TFIIG et TFIIH finissent la formation du complexe (Herbomel, 1993; Lewin, 1994). Ce complexe est stable et la transcription démarre alors rapidement et consomme de l'ATP (Herbomel, 1993; Lewin, 1994).

Le facteur TFIID reste associé à la boîte TATA permettant l'association d'un nouveau complexe (Herbomel, 1993; Lewin, 1994).

Cependant ce processus ne fait pas office de généralité, en effet pour un promoteur donné il n'y a pas forcément un seul complexe de prédémarrage possible. Par ailleurs il faut traiter au cas par cas les mécanismes qui stimulent l'association du complexe au site TATA et qui sont dépendants des éléments amont du promoteur.

2.3. Passage d'un complexe fermé à un complexe ouvert :

L'hydrolyse de l'ATP signalée au cours de l'initiation de la transcription interviendrait entre autre dans le passage d'un complexe fermé à un complexe ouvert. L'énergie ainsi libérée servirait à séparer les brins d'ADN complémentaires (Herbomel, 1993).

Cependant le complexe ouvert n'a pas encore été caractérisé chez les eucaryotes, chez ceux-ci, la longueur de la zone initialement désappariée autour du site de démarrage est inconnue. Chez *E.coli*, la région s'étendant du point -10 à +1 est riche en A T ce qui facilite le désappariement. Chez les promoteurs eucaryotes, on ne détecte pas une zone de ce type à proximité du site +1 si ce n'est le motif TATA qui serait le lieu où s'amorce le désappariement (Herbomel, 1993).

Bien que cette hypothèse soit envisageable, il existe aussi un grand nombre de promoteurs eucaryotes riches en G C et dépourvus de motifs TATA (Herbomel, 1993). C'est pour cela qu'un des éléments du complexe d'initiation serait une hélicase ATP dépendante, la consommation d'ATP rendrait négligeable la barrière énergétique liée à la composition en base de la région à désappariement (Herbomel, 1993).

2.4. Le cycle de phosphorylation de l'ARN polymérase II :

L'ATP interviendrait aussi dans d'autres processus au cours de l'initiation en phosphorylant un des composants du complexe d'initiation comme le domaine C-terminal de la grande sous unité de la polymérase (Herbomel, 1993).

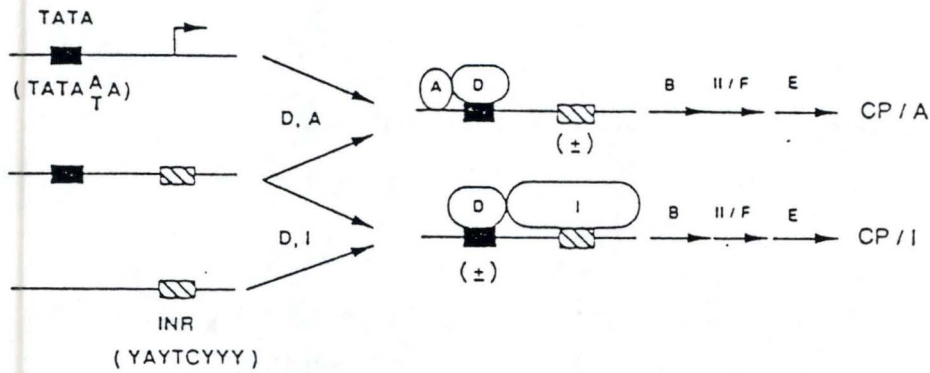


Figure I.B.4. :

Promoteurs eucaryotes de classe II dépourvus de motif TATA (Herbomel, 1993).

En haut, en un promoteur à motif TATA se forme un complexe classique initié par la fixation de TFIID sur la boîte TATA.

En bas, pour un promoteur dépourvu de motif TATA l'initiation se réalise à partir d'un site appelé INR sur lequel se fixe le facteur d'initiation de la transcription TFII-I qui permet au facteur TFIID de s'associer au promoteur, le complexe d'initiation s'assemblant ensuite de manière classique.

Sur une troisième classe de promoteurs de type II (au milieu), la formation du complexe d'initiation de la transcription serait possible aussi bien via un site INR que via un motif TATA classique. Les effets stabilisants de TFIIA et TFII-I sur le facteur TFIID ne semblent pas cumulables.

Ce domaine est très peu phosphorylé chez les polymérases qui se présentent au promoteur, mais au cours de l'association du complexe ce domaine devient hautement phosphorylé (Herbomel, 1993).

Il existe des Kinases ADN -dépendantes qui ne phosphorylent que des protéines fixées à l'ADN. Il est donc plausible que la polymérase soit phosphorylée au sein même du complexe d'initiation.

Tant qu'elles transcrivent les polymérases restent hautement phosphorylées (Herbomel, 1993). Elles sont donc déphosphorylées quand elles quittent le gène (Herbomel, 1993).

D'autres hypothèses circulent, le domaine C-terminal de la grande sous unité de la polymérase se prête à des interactions multiples avec d'éventuels cofacteurs fixés à l'ADN dont la fonction serait de capter et de positionner l'enzyme au promoteur (Herbomel, 1993). La phosphorylation de ce domaine pourrait être nécessaire pour que l'ARN polymérase puisse se dégager des interactions engagées au promoteur.

2.5. Autres promoteurs de classe II :

Il existe une certaine proportion de promoteurs de classe II qui sont totalement dépourvus de boîte TATA (Herbomel, 1993). Ce type de promoteur se rencontre chez quasi tous les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Herbomel, 1993). Il s'agit de promoteurs très riches en GC où la transcription démarre souvent en plusieurs sites disséminés sur une ou plusieurs dizaines de paires de bases et qui comportent plusieurs sites de fixation du facteur activateur SP1 (Herbomel, 1993).

Les promoteurs à TATA représenteraient la situation ancestrale puisque de tels motifs se retrouvent chez les bactéries et les *archaebactéries* (Herbomel, 1993). Les promoteurs riches en G C seraient apparus récemment dans l'évolution, à l'occasion de l'expansion de la taille du génome chez les vertébrés.

Le complexe d'initiation de la transcription impliqué dans de tels promoteurs est moins bien connu que celui des promoteurs à motif TATA. Dans ces promoteurs un nouveau facteur d'initiation de 120 kDa a été identifié, le facteur TFII-I (Herbomel, 1993). Ces promoteurs feraient intervenir les éléments TFII-B, E, F et TFII-D. Cependant dans ce cas de figure, TFII-D n'interagirait pas primordialement avec l'ADN mais avec divers facteurs trans comme TFII-I (Figure I.B.4.) (Herbomel, 1993).

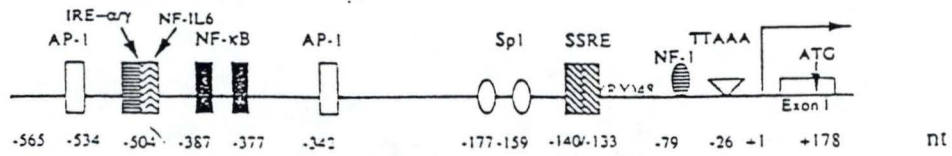


Fig 3. Schematic illustration of the M-CSF promoter and location of putative cis-acting DNA elements. nt refers to the nucleotide. Start of the transcription is indicated by +1; start of translation (ATG codon) by +178. TATA box sequence is shown at -26; positions of other putative cis-DNA elements are shown. DNA-binding proteins are activator protein-1 (AP-1), promoter specific transcription factor-1 (Sp-1), nuclear factor- κ B (NF- κ B), nuclear factor -1 (NF-1), interferon α - and γ -responsive elements (IRE- α/γ), nuclear factor -IL6 (NF-IL6), and shear stress-responsive elements (SSRE). (RY)₄₈ indicates the stretch of repeating purine-pyrimidine nucleotides.

Figure I.B.5. :

Représentation schématique du promoteur CSF-1 (Rajavashisth and al., 1995).

3. Le promoteur du gène du macrophage monocyte colony stimulating factor humain (CSF-1) :

3.1. Description générale :

La séquence connue du promoteur du CSF-1 humain s'étend sur 565 paires de bases (pb) (Figure I.B.5.). Le site d'initiation de la traduction (AUG) se situe 178 pb en aval du site d'initiation de la transcription (site +1) (Figure I.B.5.) (Rajavashisth et al., 1995). Ce promoteur présente un pourcentage de GC élevé (66%). Un tel pourcentage est caractéristique de quasiment tous les promoteurs de cytokines et de facteurs de croissance (Herbomel, 1993). Ces promoteurs sont désignés comme promoteurs évolués, en effet la boîte TATA que l'on trouve dans les promoteurs eucaryotes serait un vestige fonctionnel des promoteurs bactériens. Dans les promoteurs caractérisés par une séquence riche en GC la boîte TATA est souvent absente ou dégénérée (Herbomel, 1993).

Cependant le complexe d'initiation de la transcription change peu par rapport à ceux que l'on trouve dans les promoteurs à boîte TATA. La boîte TATA du promoteur CSF-1 fait partie de ces éléments ancestraux dégénérés, elle se situe en -26 et sa séquence est TTAAA (Rajavashisth et al., 1995) alors que le consensus habituel pour cette région d'ADN est TATAAA.

Une dizaine d'éléments cis ont été identifiés dans le reste de la séquence du promoteur (Figure I.B.5.) (Rajavashisth et al., 1995).

- Deux sites AP-1 (activator protein-1) en -534 et -342 de séquences respectives TGACTCA et TGAATCA, sur lesquels se fixent les homodimères c-Jun:c-Jun ou les hétérodimères c-Jun:c-fos (Castellazzi & Sergeant, 1993; Rajavashisth et al., 1995).
- Deux sites NF- κ B (nuclear factor- κ B), l'un de séquence GGGATTTC en -387, l'autre de séquence GGGACTTTC en -377 sur lesquels se fixent le facteur NF- κ B (Rajavashisth et al., 1995).
- Deux sites SP-1 (specific transcription factor-1) en -177 et -159, sur lesquels se fixent le facteur trans SP-1 (Ammendola et al., 1994). La séquence de l'élément cis est pour chacun des deux sites GGCGGG (Ammendola et al., 1994).

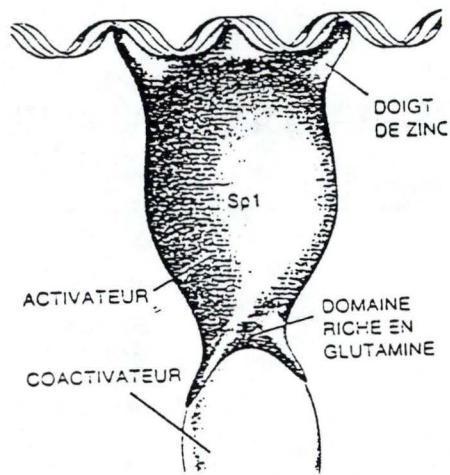


Figure I.B.6. :

Modèle de fixation de SP-1 avec l'ADN (Tjian, 1995).

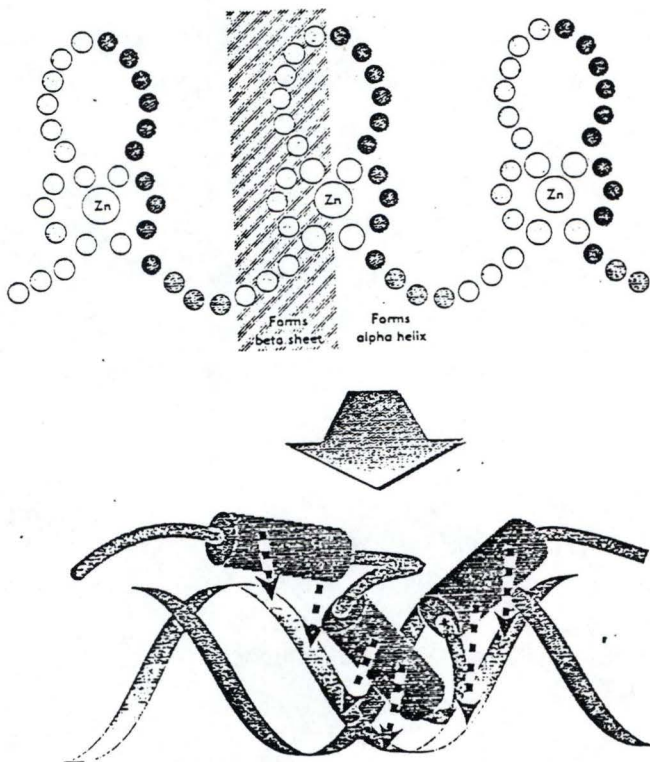


Figure I.B.7. :

L'interaction de SP-1 avec l'ADN est médiée par des motifs en doigts de zinc (Lewin, 1994).

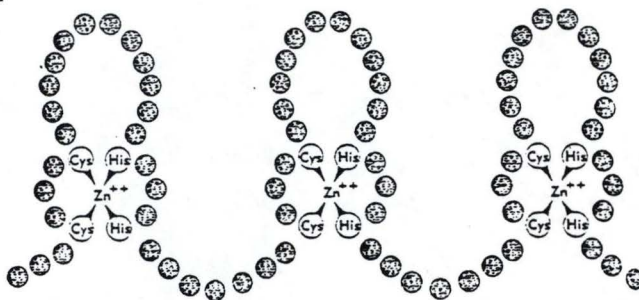


Figure I.B.8. :

Le motif d'interaction avec l'ADN du facteur SP-1 est une triade de doigts de zinc (Lewin, 1994).

- Au moins un site SSRE (shear stress response element) situé en -137 et de séquence GAGACC (Rajavashisth et al., 1995). La découverte de ces sites étant récente très peu de facteurs trans ont été identifiés comme pouvant se fixer sur ces sites. Parmi ces facteurs, on a NF- κ B.
- Un site NF-IL6 (nuclear factor IL-6) situé en -504 sur lequel se fixe un facteur de type C/EBP (CAAT enhancer binding protein) dont la séquence consensus établie est GCAAT et celle identifiée sur le promoteur GCACT.
- Juxtaposé au site NF-IL6 se trouve un site IRE- α/γ (interferon α ou γ response element) (Rajavashisth et al., 1995).
- Enfin un site NF-1 (nuclear factor-1) est localisé en -79 (Rajavashisth et al., 1995).

3.2. Le facteur de transcription SP-1 :

Le facteur SP-1 est une protéine trans activatrice de type doigt de zinc (Figure I.B.6.,7.,8.) (Ammendola et al., 1994). Ce type de protéine interagit avec des répétitions périodiques de séquences GC situées dans le sillon majeur du duplex d'ADN. Chaque unité d'interaction de chaque doigt recouvre au moins trois paires de bases et la reconnaissance est spécifique si il y a un minimum de deux doigts adjacents.

Ainsi pour le facteur TFIIIA, les 9 doigts se regroupent en triades de reconnaissance, le groupe d'interaction du facteur SP-1 se compose de trois doigts groupés ensemble (Figure I.B.8.) (Ammendola et al., 1994). Les doigts sont séparés par des linkers peptidiques plus ou moins longs. La structure secondaire des doigts de zinc présente des hélices α qui sont responsables de l'interaction spécifique avec l'ADN (Figure I.B.7.). Des feuilletts β le long de la protéine sont responsables d'interactions non spécifiques avec le squelette sucre phosphate de l'ADN (Figure I.B.7.).

SP-1 intervient dans de nombreux promoteurs, il a d'abord été identifié au niveau des sites précoces du promoteur SV40 (Ammendola et al., 1994; Tjian, 1995).

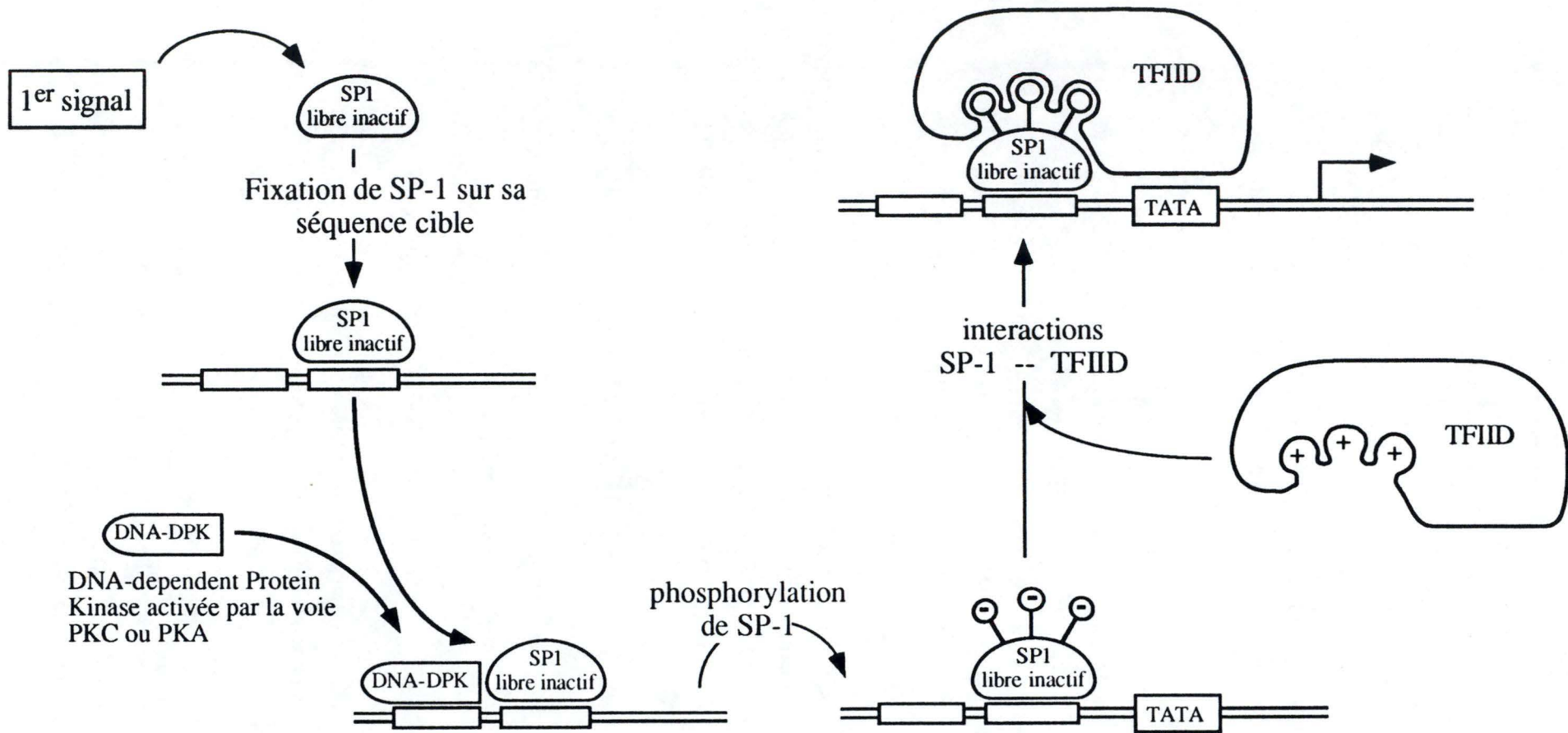


Figure I.B.9. :

Modèle de l'effet transactivateur de SP-1.

Le facteur SP-1 se fixe sur sa séquence cible sur l'ADN, une kinase ADN dépendante (DNA-dépendant protein kinase) en se fixant sur un site d'ADN proche de SP-1 est activée et phosphoryle SP-1. Le groupe de charges négatives alors présentes sont capables d'interagir avec d'autres facteurs Trans.

Pour que ce facteur soit actif une fois fixé sur l'ADN, il faut qu'il soit phosphorylé par une DNA-dependent protein kinase activée soit par la voie de la pKC soit par celle de la pKA (Figure I.B.9.). SP-1 subit une transconformation qui lui permet de se fixer à l'ADN suite à un signal de nature inconnue. Les protéines SP-1 peuvent alors se lier sur leurs éléments cis sur l'ADN (Figure I.B.9.).

SP-1 reste cependant inactif, il faut que la DNA-dependent protein kinase se lie à l'ADN sur un site proche de SP-1. Elle phosphoryle alors SP-1 (Figure I.B.9.) (Ammendola et al., 1994).

Les charges négatives associées à la phosphorylation de SP-1 génèrent une région d'interaction avec d'autres facteurs trans tels que TFIID, TAFs, ou NF- κ B (Figure I.B.9.) (Ammendola et al., 1994). SP-1 agit aussi sur la topologie de l'ADN en entraînant la formation de boucles (Ammandola et al., 1994; Tjian, 1995).

Enfin SP-1 ne se lie à l'ADN que sous forme réduite ce qui montre l'importance de l'environnement redox du noyau (Ammendola et al., 1994). La protéine nucléaire Ref-1 (reduction factor-1) intervient dans le maintien d'une forme réduite de SP-1, en effet sous forme réduite Ref-1 est capable de réduire les cystéines exposées alors que sous forme réduite comme oxydée Ref-1 possède une activité endonucléasique impliquée dans la réparation de l'ADN (Xanthoudakis & Curran, 1992).

3.3. Le complexe transcriptionnel AP-1 (activator protein-1) :

Le complexe transcriptionnel AP-1 est biochimiquement hétérogène, il est constitué par une collection de facteurs trans dimériques dont Jun:Jun et Jun:fos constitués des monomères c-Jun et c-fos (Castellazzi & Sergeant, 1993). Les domaines de liaison à l'ADN de Jun et fos sont à 95% identiques, constitués d'acides aminés basiques, la liaison à l'ADN n'est possible que pour les dimères (Castellazzi & Sergeant, 1993). L'hétérodimère Jun:fos a une affinité 10 à 20 fois supérieure pour les sites AP-1 que l'homodimère Jun:Jun (Castellazzi & Sergeant, 1993).

La dimérisation se fait par une structure très proche du type leucine zipper (Figure I.B.10.) (Castellazzi & Sergeant; Woodget et al., 1993).

Lorsque la voie de la pKC est activée, le domaine basique de c-fos et c-Jun est déphosphorylé par une phosphatase ce qui permet une augmentation de l'affinité des dimères pour l'ADN (Figure I.B.11.,12.) (Castellazzi & Sergeant, 1993).

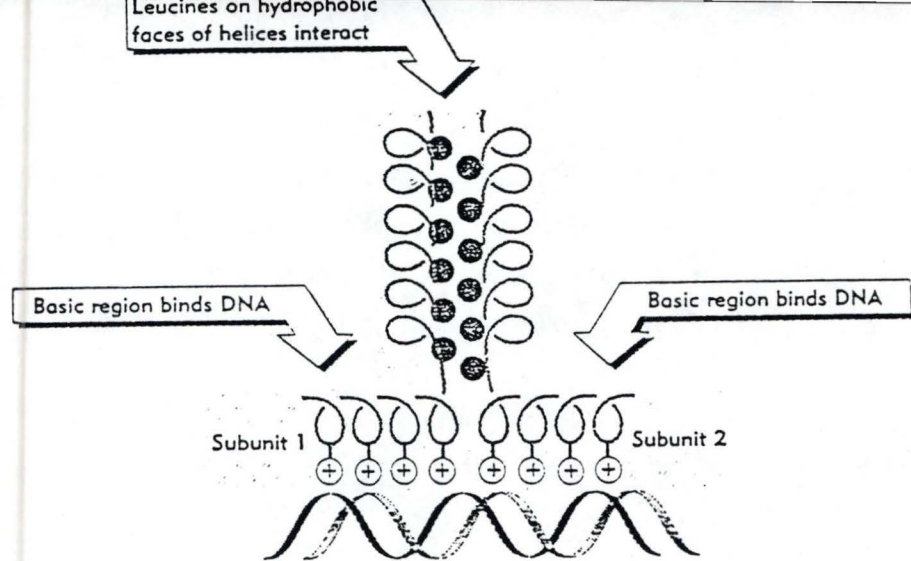


Figure I.B.10. :

Représentation schématique de protéines à domaines leucine zipper (Lewin, 1994). L'association des sous unités monomériques du complexe AP-1 se réalise par des motifs de type Leucine zipper. Les interactions avec l'ADN sont médiées par un domaine basique.

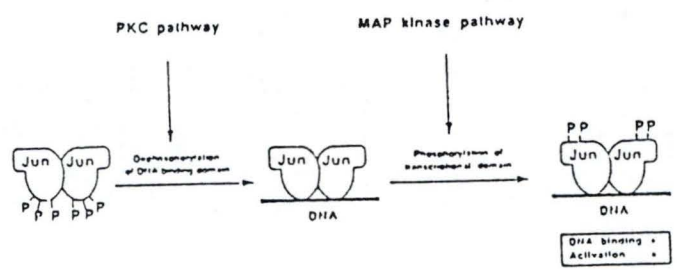


Figure I.B.11. :

Activation du complexe AP-1 (Castellazzi et al., 1993). L'activation de la voie de la PKC permet de déphosphoryler le domaine de liaison à l'ADN du complexe AP-1 qui peut alors se lier à ses séquences cibles. L'activation de la voie des MAP-kinases entraîne la phosphorylation du domaine amino-terminal du complexe AP-1. Ce domaine phosphorylé est capable d'interagir avec d'autres facteurs trans ou avec l'ARN polymérase II.

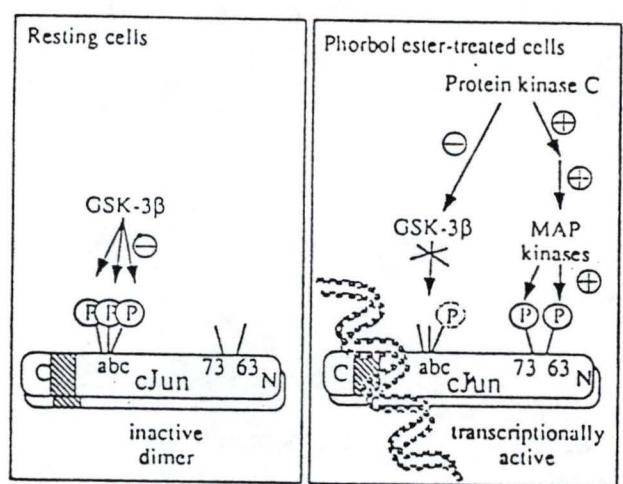


Figure I.B.12. :

Activation par phosphorylation et déphosphorylation du complexe AP-1 (Woodgett et al., 1993). Le complexe phosphorylé sur son domaine carboxy-terminal est inactif. Le complexe AP-1 actif est déphosphorylé sur son domaine carboxy-terminal et est phosphorylé sur son domaine amino-terminal.

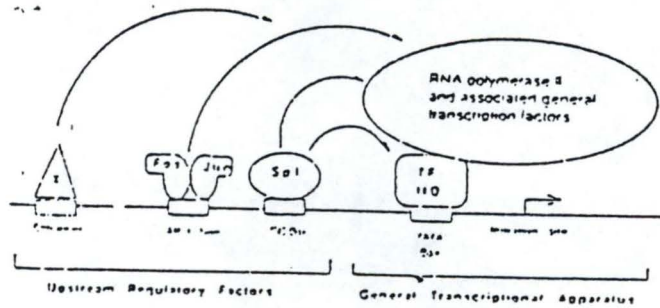


Figure I.B.13. :

Exemples d'interactions de quelques facteurs trans dont le complexe AP-1 avec le complexe d'initiation de la transcription (Jackson, 1992).
 L'efficacité de la fixation du complexe d'initiation de la transcription est affectée par la présence de facteurs transactivateurs ou transrépresseurs. Parmi les facteurs transactivateurs, il y a SP-1 et le complexe AP-1.

En situation de repos, c'est la caséine kinase II qui phosphoryle le domaine basique de Jun (Castellazzi & Sergeant, 1993).

Les MAP-kinases (mitogen activated protein kinase) phosphorylent spécifiquement l'extrémité N-terminale de Jun et fos (Figure I.B.11.,12.) (Castellazzi & Sergeant, 1993). Il en résulte un effet transactivateur qui est lié au regroupement de quelques charges négatives au niveau des dimères Jun:Jun ou Jun:fos celles-ci pouvant interagir avec d'autres facteurs trans comme NF- κ B (Figure I.B.13.) (Castellazzi & Sergeant, 1993). Cette phosphorylation empêcherait aussi la fixation d'un répresseur transcriptionnel sur AP-1.

La régulation du complexe AP-1 n'est pas indépendante du niveau d'oxydoréduction nucléaire. Le facteur Ref-1 permet à Jun de rester sous une forme réduite dans un environnement oxydant (Xanthoudakis & Curran, 1993). Sous forme réduite Jun a plus d'affinité pour ses sites de fixation sur l'ADN (Tabuchi et al.,1994).

Jun peut aussi former des hétérodimères complexes avec d'autres facteurs trans appartenant à la famille des leucine zipper (Castellazzi & Sergeant, 1993).

Jun:CREB, Jun:CREM, Jun:ATF.

CREB : AMPc responsive element binding protein.

CREM : AMPc responsive element modulator.

ATF : Activating transcription factor.

Ces facteurs trans dimériques sont activés par la voie de la pKA, AMPc souvent antagoniste de celle de la pKC.

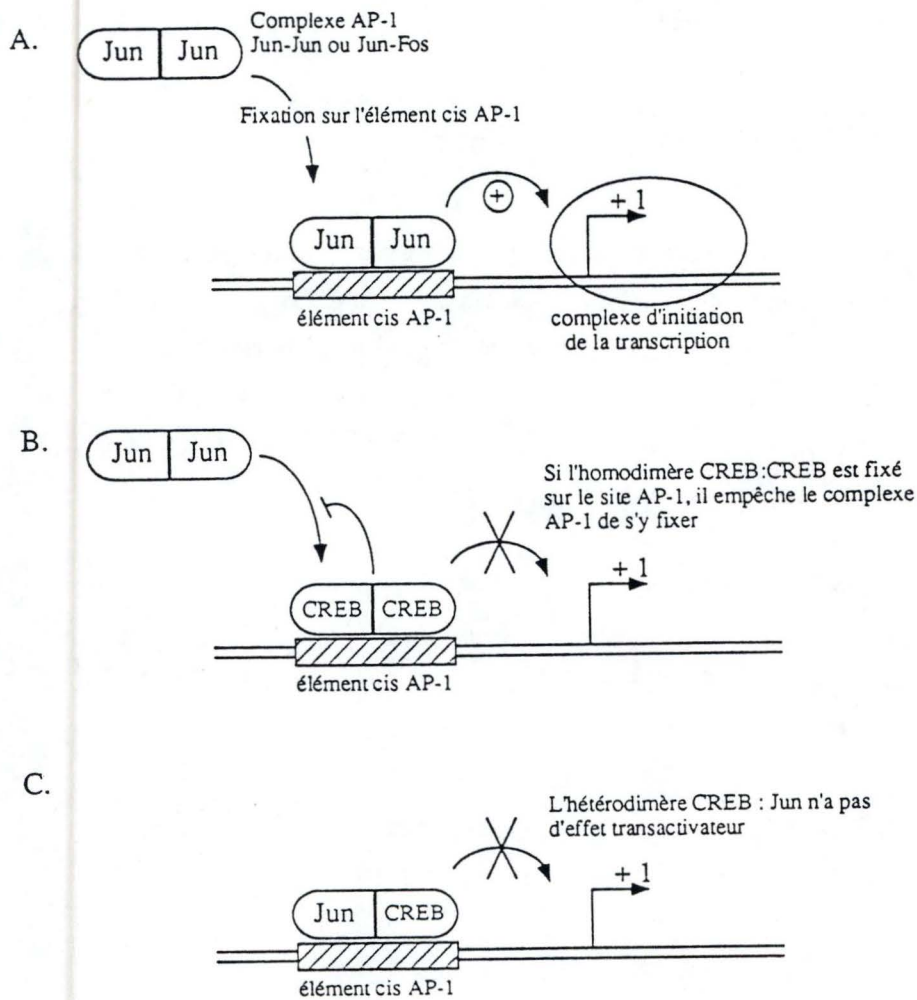


Figure I.B.14. :

A : Le complexe AP-1 a un effet transactivateur si il est activé.

B : Les homodimères CREB:CREB entrent en compétition pour les sites de fixation du complexe AP-1. En s'y fixant, ils empêchent AP-1 d'agir, quand les dimères CREB:CREB sont présents en concentration élevée dans le noyau, ce sont des répresseurs transcriptionnels des promoteurs activés par le complexe AP-1. C : Des hétérodimères Jun:CREB peuvent aussi être formés, toujours quand CREB est en concentration élevée. Jun est alors titrée et il n'y a plus d'activation sur les sites AP-1.

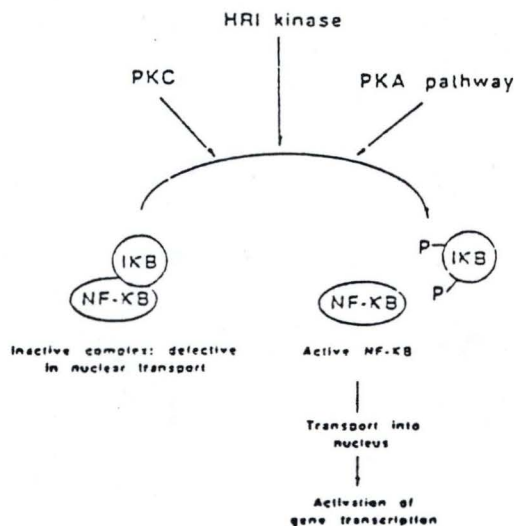


Figure I.B.15. :

Activation du facteur NF-κB (Jackson, 1992).

NF-κB est inactif lorsqu'il est associé à une sous unité inhibitrice appelée IκB. La phosphorylation de IκB suite à l'activation de diverses kinases entraîne sa dissociation de NF-κB. Les sites NLS (Nucleus localisation sequence) alors libres de NF-κB permettent sa translocation dans le noyau où il se fixe sur ses séquences cibles d'ADN.

Les éléments cis CRE et AP-1 sont assez similaires, ainsi le complexe AP-1 peut activer la transcription de gènes régulés par des sites CRE. Les dimères CREB:CREB ou CREM:CREM peuvent entrer en compétition avec Jun:Jun ou Jun:fos pour les sites AP-1 (Figure I.B.14.), ils ont alors une action inhibitrice sur la transcription de ces gènes (Castellazzi & Sergeant, 1993). Les différentes combinaisons envisageables donnent donc des schémas complexes d'interactions entre les différents systèmes.

3.4. Le facteur trans NF- κ B:

NF- κ B est un facteur trans qui contrôle l'expression de nombreux gènes. C'est une protéine hétérotétramérique composée de deux sous unités de 50 kDa (monomère p50) et de deux sous unités de 65 kDa (monomère p65) (Harrington & Winicov,).

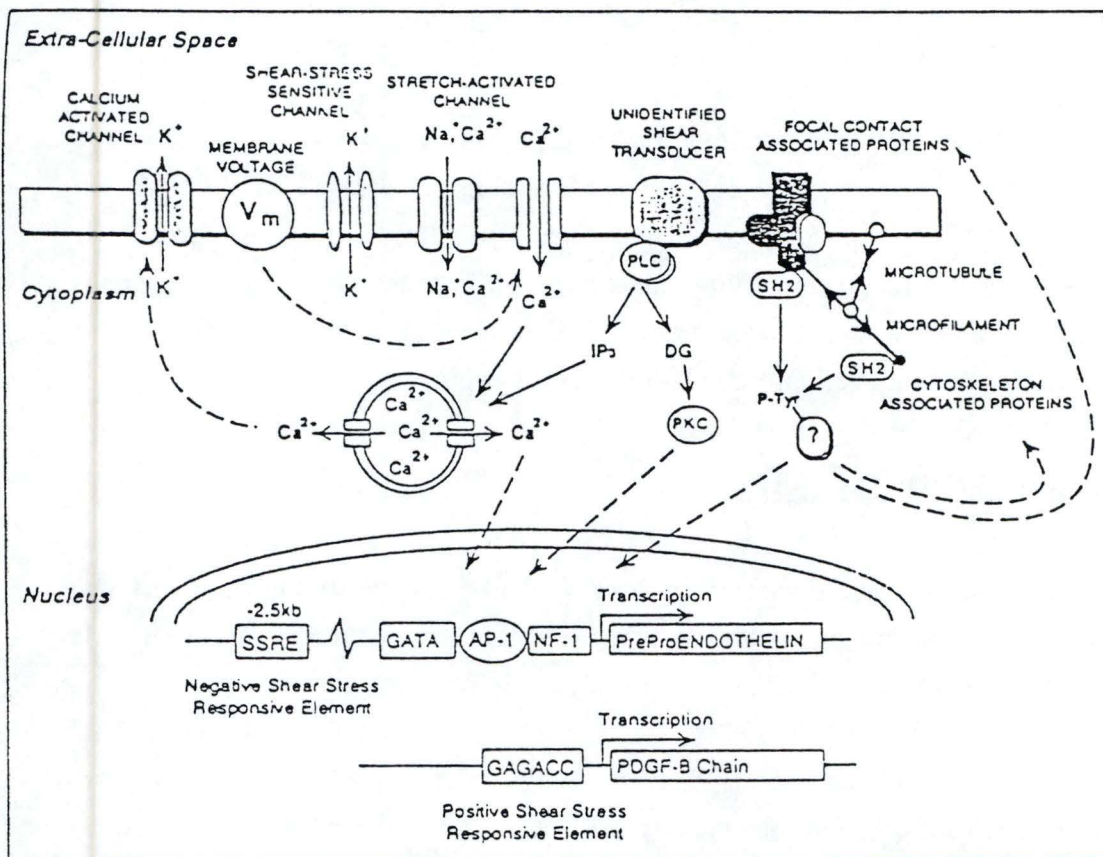
C'est la sous unité p50 qui est responsable de l'interaction avec l'ADN (Muller et al.,1995) alors que la sous unité p65 interagit avec d'autres facteurs trans ou une sous unité inhibitrice I κ B (Schmitz et al., 1995). Le NF- κ B inactif est une protéine cytoplasmique associée à I κ B (Figure I.B.). I κ B masque les sites NLS (nucleus localisation sequence) de NF- κ B ce qui l'empêche d'être transloqué vers le noyau (Harrington & Winicov,).

Les stress oxydatifs, la pKC, la pKA activée par l'IL-1, la kinase ELF-II (HRI) phosphorylent directement ou indirectement la sous unité I κ B qui se dissocie alors de NF- κ B et est dégradée par protéolyse (Figure I.B.15.) (Harrington & Winicov,1993). La séquence NLS étant découverte permet la translocation de NF- κ B vers le noyau qui se fixe sur des éléments cis de type GGGAAAGT (Figure I.B.15.) (Harrington & Winicov,1993). L'extrémité carboxy terminale de la sous unité p65 de NF- κ B est capable d'interagir directement avec de nombreux facteurs trans tels que les complexes AP-1, les facteurs SP-1, ATF, C/EBP, TFIIB et TAFs (Schmitz et al.,1995).

3.5. Le facteur C/EBP (CAAT enhancer binding protein) et les sites NF-IL6 (nuclear factor IL-6) :

Le site NF-IL6 répond à la séquence GCAAT, cette séquence est la cible du facteur C/EBP dont il existe trois isoformes, c'est l'isoforme σ qui s'y fixe (Yan et al., 1995).

La protéine C/EBP appartient à la classe des facteurs leucines zippers, elle peut former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres protéines de ce type (CREM, ATF,...) (Leclair et al., 1992; Yan et al., 1995).



Model of possible signal transduction of shear stress into altered gene transcription. Shear stress decreases the level of endothelin-1 (ET-1) mRNA [6,55] through a decrease in the gene's transcription rate without change in ET-1 mRNA stability [64]. This occurs via an as yet unidentified shear stress responsive element (SSRE) between -2.5 and -2.9 kb upstream of the transcription site, away from the GATA motif necessary for basal ET-1 expression, and the AP-1 binding site [108-111]. The process is inhibited by cycloheximide and is independent of protein kinase C and cyclic (c) AMP [64]. Downregulation of ET-1 is dependent on intracellular calcium, tyrosine kinase activity, and an intact microtubule network [91,97]. Potassium channels, possibly the shear-activated I_{K,S} [37,93] or calcium-activated I_{K,Ca} [87], and endothelial hyperpolarization are necessary for ET-1 downregulation by shear stress [91]. Shear also induces the transcription of the platelet-derived growth factor B (PDGF-B) chain gene in bovine aorta endothelium (BAE) cells by acting via a putative SSRE having the sequence GAGACC [59], probably by a pathway involving protein kinase C (PKC) in human umbilical vein endothelium (HUVE) cells [7].

Figure I.B.16. :

Voies possibles de transduction du signal dans les stress hémodynamiques (Malek & Izumo, 1994).

Le facteur trans NF-κB est activé par les stress hémodynamiques, probablement que d'autres facteurs trans sont aussi activés de cette façon, mais ils n'ont pas été identifiés à ce jour. Ceux-ci se fixent sur des éléments cis appelés SSRE (Shear stress response element), ils peuvent avoir un effet transactivateur ou transrépresseur.

Leurs voies d'activation potentielles peuvent faire intervenir des protéines du cytosquelette ou des protéines associées, des canaux à ions sensibles à la pression.

L'activation de C/EBP se fait par phosphorylation, déphosphorylation suite à une stimulation par l'IL-6, l'IL-1 ou le TNF- α et la transduction du signal par la voie de l'AMPc. C/EBP subit alors une translocation nucléaire et elle intervient dans l'activation de la transcription des gènes c-fos, IL-6, GM-CSF, IL-8, TNF- α , CSF-1 (Leclair et al., 1992; Yan et al., 1995).

Sur les promoteurs de l'IL-8, l'IL-6 et du CSF-1 les sites NF- κ B sont proches du site NF-IL6 or, sur ces promoteurs la présence de C/EBP augmente fortement la quantité de facteurs NF- κ B qui se lient à leur séquence cible (Leclair et al., 1992; Yan et al., 1995). Il existe donc une interaction entre les facteurs C/EBP et NF- κ B, c'est la sous unité p50 de NF- κ B qui participe à celle-ci (Leclair et al., 1992).

Ici aussi la forme réduite d'une cystéine de C/EBP favorise la liaison à l'ADN, Ref-1 est la protéine responsable de cette réduction (Leclair et al., 1992; Xanthoudakis & Curran, 1992).

3.6. Les shear stress response elements (SSRE) :

Il s'agit d'éléments cis récemment identifiés chez les cellules endothéliales dont la séquence est GAGACC (Malek & Izumo, 1994). Le ou les facteurs nucléaires qui se fixent sur cette séquence sont activés par les stress hémodynamiques (Malek & Izumo, 1994; Levon et al., 1995).

Un de ces facteurs nucléaire a été identifié, il s'agit de NF- κ B. Suite à un stress hémodynamique, on observe une augmentation du NF- κ B nucléaire (Levon et al., 1995). Cela s'accompagne d'ailleurs chez les cellules endothéliales de l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 et de l'inhibition de l'expression de l'endothéline, facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses (Figure I.B.16.) (Levon et al., 1995).

Le stress hémodynamique peut agir en modifiant l'expression de facteurs qui interagissent avec NF- κ B comme C/EBP, ATF, c-Jun, c-fos, SP-1 (Levon et al., 1995). Les sites SSRE sont souvent localisés à côté de sites SP-1 (Levon et al., 1995).

Comment un stress hémodynamique peut-t'il activer NF- κ B?

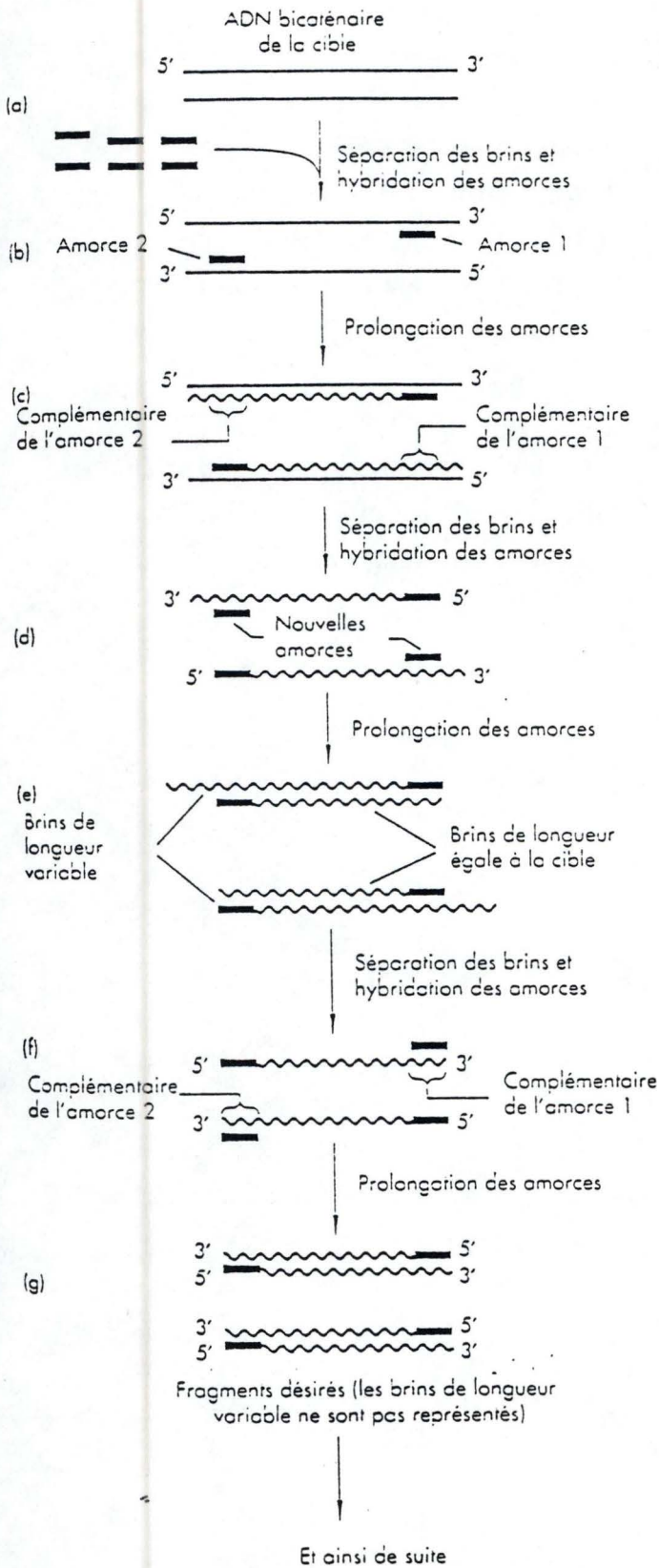
La dépolymérisation des microtubules et de l'actine-F sous les pressions sanguines élevées active la translocation nucléaire de NF- κ B (Figure I.B.16.) (Levon et al., 1995).

4. Conclusion :

La transcription du messenger CSF-1 est régulée par un ensemble de facteurs qui sont dépendants les uns des autres. Chacun d'entre eux sont interconnectés depuis leur activation par des messagers hormonaux ou physiques, en passant par la transduction du signal, jusqu'à leur fixation sur le promoteur. Il n'est donc pas étonnant de constater que NF- κ B, Jun, SP-1, TFIID, peuvent interagir les uns avec les autres. Il n'est pas plus surprenant que des compétitions pour l'activation ou l'inhibition de la transcription puissent aussi se jouer entre différents facteurs Trans comme c'est le cas pour les dimères CREB : CREB et Jun : Jun ou Jun : fos.

L'intérêt de disposer d'un promoteur complet devant une protéine rapporteur comme la green fluorescent protein permettra donc d'étudier dans les cellules, le résultat global de l'activation de ces divers facteurs trans dans des conditions particulières, notamment lors de stress oxydatifs provoqués par la présence de LDL plus ou moins oxydées.

Amplification d'une séquence recherchée



La réaction de polymérisation en chaîne. (a) Le matériel de départ est une molécule d'ADN bicaténaire. (b) Les brins sont séparés en chauffant le mélange de réaction: en le refroidissant, on permet aux amorces de s'associer à leur séquences complémentaires qui bordent la région à amplifier. (c) La polymérase *Taq* synthétise de nouveaux brins d'ADN complémentaires à la matrice, au delà de la position du site de fixation de l'amorce sur l'autre brin. (d) Le mélange de réaction est à nouveau chauffé: les brins parentaux et néosynthétisés se séparent. Il y a maintenant quatre sites de fixation pour les amorces, un sur chacun des brins parentaux et des brins néosynthétisés (pour simplifier le diagramme, les événements impliquant les brins parentaux sont à partir de maintenant volontairement ignorés). (e) La polymérase *Taq* synthétise de nouveaux brins complémentaires mais l'élongation est cette fois limitée à la séquence que l'on désire amplifier. Ces deux chaînes nouvelles représentent exactement la région spécifiée par la position des amorces. (f) Le cycle est répété est les amorces s'associent aux brins nouvellement synthétisés (ainsi qu'à ceux de longueur variable que l'on a volontairement omis dans ce schéma). (g) La polymérase *Taq* synthétise des brins complémentaires, produisant des fragments d'ADN double brin identiques à la séquence de départ. Le cycle est ensuite répété

Figure I.C.1. : (Watson, Gilman, Witkowski & Zoller , 1994)

Représentation schématique de l'amplification PCR.

I.C. La PCR :

1. La réaction de polymérisation en chaîne :

1.1. Introduction :

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été mise au point au milieu des années 80 par Kary Mullis (prix Nobel 93) (Watson, Gilman, Witkowski & Zoller; 1994). Elle permet d'amplifier de manière exponentielle une séquence spécifique d'ADN sans pour autant passer par une étape de clonage.

Nous utiliserons cette technique dans le clonage du promoteur CSF-1 à partir d'une matrice d'ADN génomique humain.

1.2. Principe :

L'ADN polymérase utilise comme matrice de l'ADN monocaténaire pour la synthèse d'un nouveau brin anticomplémentaire (Figure I.C.1.a.) (Watson, Gilman, Witkowski & Zoller; 1994). Cette ADN polymérase requiert aussi pour l'initiation de la polymérisation une petite région d'ADN double brin ou une courte région d'hétéroduplex ARN:ADN tel que cela se produit *in vivo* (Rawn, 1990).

Le point de départ de la polymérisation peut donc être spécifié par l'hybridation d'un oligonucléotide anticomplémentaire ou amorce (primer) (Figure I.C.1.b.) à une séquence déterminée de la matrice, séquence cible (Watson, Gilman, Witkowski & Zoller; Mullis, Ferrè & Gibbs, 1994). Il est dès lors possible de faire démarrer la synthèse en un point précis de la matrice (template) d'ADN.

Par ailleurs, les deux brins d'ADN d'un duplex peuvent servir de matrice pour la synthèse pour autant que l'on fournisse un oligonucléotide amorce pour chacun des brins (Figure I.C.1.b.). Les deux amorces seront choisies de manière à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. La polymérisation commencera après avoir séparé par chauffage le duplex matrice en 2 brins monocaténaires sur lesquels s'hybrideront leurs amorces anticomplémentaires respectives pour autant que l'on aie, entre temps, refroidit le mélange réactionnel (Figure I.C.1.b.). En effet les amorces étant courtes, elles ne pourront s'hybrider qu'à des températures inférieures aux températures de dénaturation de la matrice.

Après amplification (Figure I.C.1.c.), il s'est créé sur les brins néosynthétisés de nouveaux sites qui permettent la fixation des amorces (Figure I.1.d). Le mélange réactionnel est alors chauffé pour séparer les duplex d'ADN dont pour rappel, un brin est néosynthétisé et l'autre était le brin matrice puisque la polymérisation est semi-conservative. Ainsi on double le nombre de brins matrice cycle après cycle. Sur ces derniers peuvent venir s'hybrider de nouvelles amorces à l'origine de nouvelles amplifications (Figure I.C.1.d, e, f).

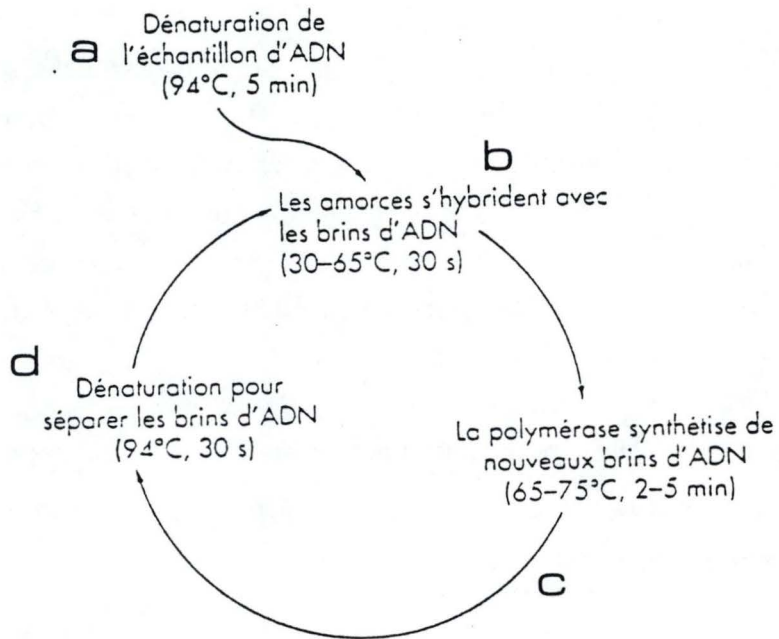
Le résultat net de la PCR est qu'à la fin de n cycles on dispose d'un nombre théorique d'amplicons de 2^n spécifiques de la séquence encadrée par les amorces (Si l'efficacité est optimale) (Watson, Gilman, Witkowski & Zoller; 1994).

1.3. La polymérase Taq:

La PCR utilisait au départ l'ADN polymérase d' *E.coli* (Watson, Gilman, Witkowski & Zoller; 1994). Cette enzyme sensible à la chaleur était dénaturée aux températures nécessaires à la séparation des brins d'ADN matrice. Il fallait donc ajouter manuellement cette enzyme après chaque étape de dénaturation de la matrice.

Par la suite des ADN polymérases thermostables issues de bactéries vivant dans des sources chaudes ont été isolées. Parmi ces polymérases thermostables l'une des premières utilisée en PCR fut la Taq polymérase de *Thermus aquaticus* (Kaledin et al., 1980). Cette polymérase possède une activité de polymérisation optimale à 72°C et la conserve après des expositions répétées à 94°C (Griffin & Griffin, 1994).

L'utilisation de telles polymérases a permis de simplifier fortement la procédure PCR et de l'automatiser. Le cycle standard de la PCR sera décrit dans le paragraphe suivant.



Un cycle de PCR. L'échantillon d'ADN est chauffé afin de séparer les deux brins d'ADN (première dénaturation). Ensuite, on répète la série des manipulations, hybridation de l'amorce, synthèse de l'ADN et dénaturation. La concentration de la séquence d'intérêt double à chaque cycle.

Figure I.C.2. : (Watson, Gilman, Witkowski & Zoller , 1994)

Représentation schématique des cycles PCR se composant de 3 étapes après dénaturation longue (en a) :

- Hybridation (en b).
- Elongation (en c).
- Dénaturation courte (en d).

1.4. Description d'une PCR standard :

Un cycle standard PCR se compose de 3 étapes (Figure I.C.2.): La dénaturation

L'hybridation (annealing)

L'élongation

Le nombre de cycles effectué varie suivant différents paramètres tel que la polymérase utilisée. En général on compte de 25 à 35 cycles bien que certaines polymérases permettent des amplifications de 60 cycles. Cette série de cycles est précédée d'une longue étape de dénaturation et se termine par une étape d'élongation plus importante.

a) Dénaturation longue : (Figure I.C.2.a.)

Cette étape qui constitue le point de départ de la PCR consiste à chauffer le mélange réactionnel contenant déjà la Taq et la matrice, ce afin de dénaturer aussi efficacement que possible cette dernière. L'incubation à haute température (94°C) se fait en général pendant 4 minutes ce qui constitue un compromis entre efficacité de la dénaturation et la perte d'activité de la Taq.

b) Cycle PCR proprement dit : (Figure I.C.2.b, c, d.)

b.1. La dénaturation : (Figure I.C.2.d.)

Cette étape plus courte de dénaturation dure en moyenne 30 à 45 secondes. Elle permet à chaque nouveau cycle de désapparier les amplicons produits au cours des cycles précédents afin que ceux ci servent eux même de matrice. La température de dénaturation communément employée est de 94°C.

b.2. L'hybridation : (Figure I.C.2.b.)

C'est au cours de cette étape que les amorces vont s'hybrider avec leur séquence anticomplémentaire. Il faut abaisser la température du mélange PCR afin que celle-ci soit compatible avec la température de fusion (melting) des amorces, c.à.d. la température à laquelle 50% des amorces sont hybridées. On considère la température d'hybridation comme étant de 5 à 10 degrés inférieure à celle de fusion afin d'avoir une hybridation stable des amorces. Souvent celle-ci est de 40 à 60°C bien qu'on puisse monter jusqu'à 72°C. Le temps d'hybridation varie en fonction de la concentration en éléments cibles dans le mélange PCR.

Cette étape est primordiale, en effet le choix d'une température d'hybridation trop basse risque de donner des amplifications non spécifiques, les amorces pouvant s'hybrider de manière partielle sur des séquences qui présentent des similarités avec celles pour lesquelles elles sont définies.

De plus il faut bien considérer qu'à tout moment au cours de l'hybridation joue un phénomène de compétition pour l'hybridation entre d'une part l'amorce et sa matrice et d'autre part, entre les deux brins matrices. Au cours des premiers cycles ce phénomène joue peu car les amorces sont en excès par rapport à la matrice.

Par la suite la concentration en amplicons augmentant, ils auront d'avantage tendance à se réhybrider entre eux vu leur meilleure complémentarité et cela tout en déplaçant d'éventuelles amorces dont la concentration n'a fait que décroître. C'est aussi au cours de cette étape que la polymérase s'accroche sur les sites formés par le duplex matrice:amorce. Cependant l'élongation ne débute pas encore ou du moins très peu cette température ne constitue pas l'optimum thermique de l'activité de polymérisation de la Taq (à l'exception d'un hybridation à 72°C).

b.3. L'élongation : (Figure I.C.2.c.)

Au cours de cette étape la température du mélange PCR est portée à une valeur où la polymérase (Taq) est dans son optimum thermique pour son activité polymérase. Cette température est fonction de la polymérase thermostable utilisée et oscille entre 65 et 75°C. En général, elle est de 72°C pour l'élongation pendant un temps qui est fonction de la taille de l'amplicon et de la vitesse de polymérisation propre à la polymérase. Moins de 1 minute suffit pour des amplicons inférieurs au kilobase.

C) L'élongation finale :

Cette dernière étape consiste à incuber le mélange PCR pendant une dizaine de minutes à 72°C afin que la Taq polymérase termine l'élongation d'éventuels amplicons incomplets.

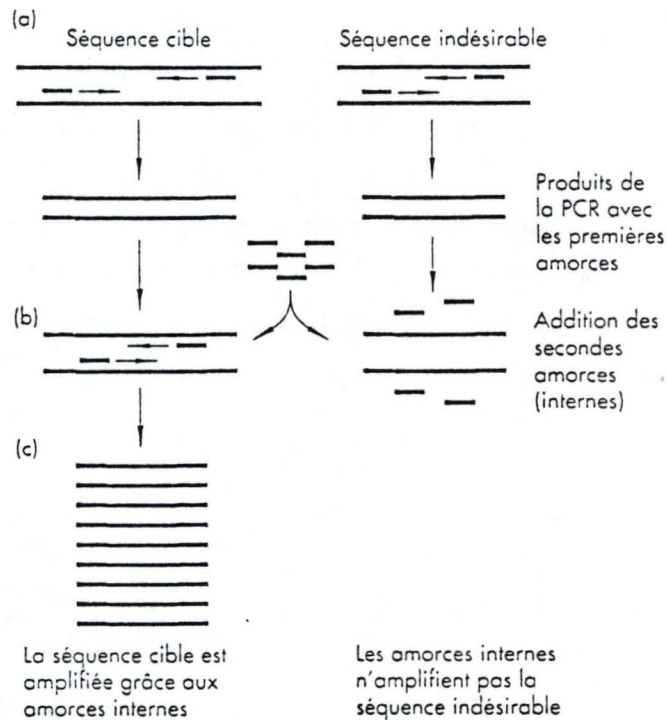


Figure I.C.3. :

La « nested » PCR (Watson, Gilman, Witkowski & Zoller , 1994):

L'utilisation d'amorces « emboîtées » permet d'augmenter la sensibilité de la PCR et d'éviter l'amplification de séquences indésirables. La « nested » PCR utilise 2 paires d'amorces, une paire d'amorces dites externes (a) pour une première amplification dont l'efficacité importe peu, et une paire d'amorces internes (b) spécifiques et internes au fragment cible de la première paire. Par ce procédé les fragments d'ADN indésirables amplifiés lors de la première PCR qui ne possèdent pas de séquences correspondantes aux secondes amorces ne seront pas amplifiés lors de la seconde PCR alors que la séquence cible spécifique le sera.

1.5. Conclusion :

La PCR est probablement l'un des outils de la biologie moléculaire le plus puissant, ses applications sont nombreuses, elles vont de l'amplification de cibles spécifiques d'ADN ou d'ARN, au séquençage, en passant par le clonage, les tests diagnostiques, les applications en médecine légale, etc....

2. Quelques types de PCR et variantes du schéma

PCR de base :

Depuis la mise au point de la PCR, de nombreuses variantes de la réaction standard sont apparues. Elles visent essentiellement à améliorer la spécificité de l'amplification sans pour autant apporter de grands changements dans la réaction PCR proprement dite.

2.1. La "simplex" PCR :

Nous avons décrit la "simplex" PCR dans le cadre de la PCR standard. Son principe est donc l'amplification d'une séquence cible d'ADN à l'aide d'une paire d'amorce (Griffin & Griffin; Mullis, Ferré & Gibbs; Watson, Gilman, Witkowski & Zoller; 1994), c'est le type de PCR le plus fréquemment utilisé.

2.2. La "nested" PCR :

La technique de "nested" PCR (Figure I.C.3.) est utilisée dans plusieurs situations comme l'amplification de cibles présentes en nombre restreint et/ou l'obtention d'amplicons les plus spécifiques possibles ce qui en fait un outil diagnostique puissant (White; Griffin & Griffin; Watson et al., 1994).

Son principe est simple, au cours d'une première PCR l'ADN cible est amplifié à l'aide de deux amorces dites externes car elles flanquent les extrémités du premier amplicon (Figure I.C.3.a.). Souvent à ce stade le produit PCR n'est pas visualisable car celui-ci est en faible quantité, cela est dû surtout à un nombre de matrices de départ lui même faible. Il peut aussi se produire une amplification peu spécifique donnant divers amplicons ou une trainée (smear).

Une fraction du premier produit d'amplification est alors prélevée et amplifiée avec des amorces dites internes (Figure I.C.3.b.). On parle d'amorces internes parce que celles-ci sont situées à l'intérieur de la séquence précédemment ciblée par les amorces externes.

Le produit obtenu après cette seconde PCR est très spécifique, souvent unique, en grande quantité et visualisable sur gel (Figure I.C.3.c.) (White; Griffin & Griffin; Watson et al., 1994).

La spécificité de l'amplification en "nested" comme en "héminested" peut être améliorée en utilisant une faible concentration en amorce dans la première PCR puis en l'augmentant dans la seconde (Igarashi et al. ,1991). Nous reparlerons de cela plus loin.

La "nested" PCR étant une double PCR, la fidélité de l'amplicon vis à vis de la matrice est moins bonne que si il s'agissait d'une simple PCR, la remarque restant valable pour toute PCR multiple.

2.3. L'"héminested" PCR :

Cette technique est basée sur le même concept que la "nested" PCR mais au cours de la deuxième PCR une seule des deux amorces est une amorce interne. Empiriquement comme conceptuellement la spécificité de l'amplification en "nested" est meilleure que celle en "héminested". Cependant dans certaines applications ou lorsque l'on est limité dans la connaissance de la séquence à amplifier et donc dans le choix des amorces, l'"héminested" constitue une bonne alternative à la "nested" PCR.

2.4. Le "hot start" :

Le "hot start" peut s'utiliser dans tous types de PCR. Il consiste en une étape de dénaturation de la matrice dans le mélange PCR ne contenant pas encore la polymérase (Don et al., 1991; Griffin & Griffin, 1994; Chou et al., 1992), celle-ci étant ajoutée par après. Deux approches du "hot start" sont envisageables :

-Soit le prémix PCR (mélange sans polymérase) est porté à 100°C pendant 4 à 5 minutes et est ensuite rapidement refroidit jusqu'à 4°C afin de figer les brins d'ADN dénaturés.

L'enzyme est alors ajoutée, les cycles PCR classiques démarrent : dénaturation 30 sec, hybridation. .. etc.

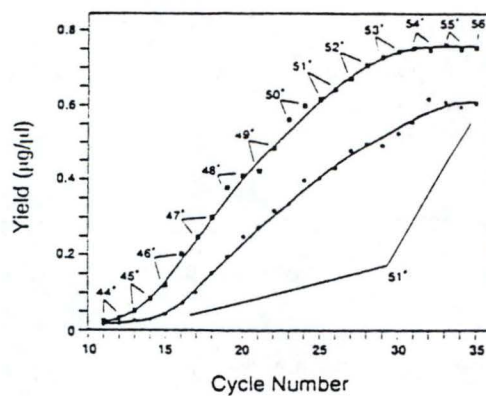


Figure I.C.4. :

La « up » PCR (Rychlick et al., 1990) :

La « up » PCR permet jusqu'à 30% d'amélioration du rendement PCR.

Sur le graphique ci-dessus le rendement (en ordonnée) d'une PCR sur ADN plasmidique utilisant une température d'hybridation constante de 51°C est comparé avec celui d'une « up » PCR sur la même matrice dont la température d'hybridation est augmentée de 1°C tous les 2 cycles en partant de 44°C et en fonction du nombre de cycles (en abscisse).

-Soit le mélange PCR est directement porté à 100°C pour le premier cycle PCR, et ensuite lorsque la température d'hybridation est atteinte, on ajoute la polymérase.

En général le temps d'incubation à 100°C n'excède pas les 4 à 5 minutes car de telles températures entraînent au niveau de la matrice des dégâts sous forme de cassures ou de mutations (Eckert & Kunkel 1991). Les "hot start" sont utilisés de manière courante dans des PCR sur matrices de grande taille et/ou riches en GC et ainsi que pour garder son enzyme sous forme active le plus longtemps possible (amélioration du rendement) (Griffin & Griffin, 1994).

Le "hot start" pose cependant des problèmes de contaminations puisqu'il faut ouvrir les tubes PCR pour ajouter la polymérase. Des tubes PCR sont actuellement commercialisés contenant la polymérase encapsulée et protégée dans une résine qui se dissout progressivement à 100°C, ce qui permet de libérer au fur et à mesure l'enzyme jusqu'à la fin du "hot start" et de lui conserver un maximum d'activité tout en évitant d'ouvrir les tubes PCR.

2.5. La "up" PCR :

La "up" PCR est opposée dans son principe à la down PCR. Elle consiste à augmenter progressivement la température d'hybridation jusqu'à atteindre la température d'hybridation optimale qui dans ce cas est déterminée expérimentalement (Rychlik et al., 1990).

La température d'hybridation de départ étant d'environ 10°C inférieure à la température d'hybridation optimale et augmentant de 1°C tous les deux cycles.

L'application de la up PCR vise essentiellement à obtenir un meilleur rendement PCR sur une amplification déjà optimisée pour une PCR "simplex" (Figure I.C.4.) (Rychlik et al., 1990).

En effet il est démontré que par cette technique le rendement de la production PCR peut être amélioré de 30%. La up PCR est parfois décrite comme pouvant améliorer la spécificité de l'amplification (Rychlik et al., 1990).

2.6. La "touchdown" PCR :

Le principe de la "touchdown" PCR fait appel à 2 étapes, l'étape "touch" qui est un "hot start" et l'étape "down" au cours de laquelle la température d'hybridation est diminuée cycles après cycles (Don et al., 1991).

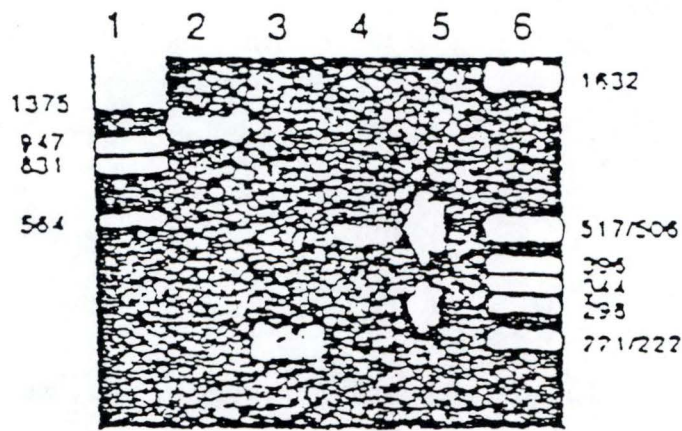


Figure I.C.5. :

La « touchdown » PCR : (Don et al., 1991)

La « touchdown » PCR permet d'améliorer la spécificité de l'hybridation sans devoir tester un grand nombre de températures d'hybridation.

Le gel ci-dessus nous montre 3 produits PCR différents obtenus avec le même couple d'amorces. La PCR est effectuée sur de l'ADN génomique de souris. La taille attendue de l'amplicon spécifique est de 540 pb. L'amplicon observé dans le premier puits est obtenu pour une hybridation à 55°C. Il est unique mais non spécifique car sa taille est de 1100 pb.

Dans le second puits des fragments de taille variant entre 100 et 200 pb sont obtenus, la PCR réalisée étant une « up » PCR partant de 45 à 55°C.

Le troisième puits montre un produit PCR en faible quantité à 540 pb. Celui-ci est obtenu en effectuant une « touchdown » PCR partant de 65°C et descendant à 55°C.

L'étape de "hot start" peut se réaliser selon les manières décrites précédemment. L'étape "down" standard consiste à diminuer de la température d'hybridation de 1°C tous les 2 cycles, cependant ce paramètre est modulable pour optimiser la PCR (2°C tous les 3 cycles, etc....) (Don et al., 1991).

L'avantage de la "touchdown" PCR est qu'elle permet de tester un nombre important de températures d'hybridation en une seule PCR. Cette technique est décrite comme permettant d'augmenter la spécificité d'une amplification dont la température d'hybridation reste à optimiser (Figure I.C.5.) (Don et al., 1991). En effet partant d'une température d'hybridation élevée diminuant progressivement on finit par atteindre une température où l'hybridation est optimum, pendant 2 ou 3 cycles la cible est amplifiée ainsi qu'aux températures d'hybridation voisines. La matrice se retrouve alors en nombre de copies supérieures ce qui lui donne un avantage compétitif vis à vis d'amplification de cibles non spécifiques à plus basse température. Il en résulte une amplification spécifique (Don et al., 1991).

Cependant la pratique ne rejoint pas toujours la théorie et en "touchdown" les résultats sont généralement de type tout ou rien, soit l'amplification est spécifique soit on obtient un mélange non spécifique (smear). L'utilisation d'une concentration plus faible en amorce ou les divers agents comme le DMSO (diméthyl-sulfoxyde), la BSA (bovine serum albumine) peuvent avoir une influence positive sur la spécificité d'une "touchdown" PCR.

2.7. La down PCR :

Bien qu'actuellement et à ma connaissance seule la "touchdown" PCR est décrite dans la littérature, plusieurs chercheurs utilisent aussi ce que l'on pourrait appeler la "down" PCR. Elle consiste en une PCR de type "touchdown" dont l'étape de "hot start" est absente.

3. Les ADN polymérases :

3.1. Introduction :

La polymérase thermostable utilisée dans la PCR est un élément clé de la réaction *in vitro*. Les premières PCR utilisaient la polymérase thermolabile Klenow qui devait être ajoutée chaque cycle. Depuis la découverte de la Taq polymérase thermostable en 1988, une série de nouvelles enzymes thermostables a été isolée.

Enzymes : (DNA pol)	firmes	Souche bactérienne d'origine :	Poids moléculaire (kDa) :	Conditions d'activité optimale :				Exonucléase 5'-3' :	Exonucléase 3'-5' : (Proofreading)
				MgCl ₂ (mM) :	KCl (mM) :	pH :	Température :		
Taq	Perkin Elmer	<i>Thermus aquaticus</i>	94	2 à 4	50 à 55	8 à 9,4	70 à 75	oui	non
Taq	B.M.	<i>Thermus aquaticus</i>	95	1,5	50	9	75	oui	non
Taq		<i>Thermus aquaticus</i>	68	10	60	7,8	70 à 75	non	non
Taq		<i>Thermus aquaticus</i>	64	10	100 à 200	8,3	70	non	non
Stoffel	Perkin Elmer	<i>Thermus aquaticus</i>	61,3	2 à 10	10	8,3	70 à 80	non	non
Tth A		<i>Thermus thermophilus</i>	110 à 120	ND	ND	ND	50	non	non
Tth B	Perkin Elmer	<i>Thermus thermophilus</i>	67	1,5 à 2,5	100	8 à 9,3	63	oui	non
Tth	B.M.	<i>Thermus thermophilus</i>	N.C.	1,5	100	9	75	oui	non
Tth C		<i>Thermus thermophilus</i>	110	ND	ND	ND	63	non	non
Vent	Biolabs	<i>Thermococcus litoralis</i>	92 à 97	2 à 8	0 à 50	8 à 9	80 à 85	non	oui
Vent (exo-)	Biolabs	<i>Thermococcus litoralis</i>	NC	2 à 8	0 à 50	8 à 9	80 à 85	non	non
Deep Vent	Biolabs	<i>Pyrococcus NC</i>	NC	NC	NC	NC	80 à 85	non	oui
Deep Vent (exo-)	Biolabs	<i>Pyrococcus NC</i>	NC	NC	NC	NC	80 à 85	non	non
pfu	Stratagene	<i>Pyrococcus furiosus</i>	92	1,5 à 8	10	8 à 9	70 à 80	oui	oui
Bst	BioRad	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	95	10 à 30	100 à 200	8 à 9	65	oui (faible)	non
Bst		<i>Bacillus stearothermophilus</i>	76	20	270	8 à 9	60	non	non
Tth	Promega	<i>Thermus flavus</i>	66	10 à 15	5 à 10	7 à 8	75	non	non
Mth		<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	72	10 à 20	100 à 300	7 à 9	65	oui	oui
Pwo	B.M.	<i>Pyrococcus woessii</i>	90	2 (MgSO ₄)	25	8,8	75	oui	oui
DynaZyme II	Finzymes Oy	<i>Thermus brockianus</i>	NC	1,5	50	8,8	72	oui	non
AmpliTaq Gold	Perkin Elmer	<i>Thermus aquaticus</i>	94	2 à 2,5	50	9	70 à 74	oui	non

Tableau I.C.1. :

Principales caractéristiques de quelques polymérase thermostables :

Légende : B.M. : Boehringer Mannheim.
NC : non communiqué.
ND : non déterminé.

Applications courantes :

PCR, séquençage, mutagenèse, clonage, ...

Pas utilisées en PCR car la forme de 94 kDa est plus efficace.

Séquençage, PCR sur matrice avec d'importantes structures secondaires ou demandant une enzyme de meilleure thermostabilité que la Taq.

RT-PCR (reverse transcriptase PCR) en présence de Mn⁺⁺, PCR sur échantillons sanguins
Monte à des températures plus élevées ce qui est intéressant car l'ARN forme de nombreuses structures secondaires.

PCR sur ADNg (ADN génomique), éléments riches en GC, permet des hybridations à haute température et une fidélité optimale, T_{1/2} vie de 2 heures à 100°C.
Permet d'amplifier de très longs fragments (15kb)
Très grande thermostabilité car T_{1/2} vie de 8 heures à 100°C, utilisée en Iso-CR.
Iso-CR sur de longues matrices.

PCR de grande fidélité, clonage à bouts francs, séquençage, mutagenèse.

Tous types de séquençage par PCR.

Amplification de longues matrices.

Amplification PCR de fragments riches en AT et bonne fidélité, séquençage.

PCR de haute fidélité, clonage à bouts francs, PCR sur ADNg.

Enzyme ne possédant pas le label Taq.

Activation à haute température, évite le hot start, grande sensibilité.

Parmi les plus connues : la Vent, la pfu et la Tth; mais il en existe encore d'autres : la sac, la tac, la Tru, la Tsp etc...(Griffin & Griffin, 1994). Dans ce chapitre nous nous attacherons à décrire les polymérases principalement utilisées dans le cadre de ce travail, nous décrirons aussi de manière plus succincte quelques autres polymérases qui couvrent le vaste champ d'application en PCR des enzymes thermostables à savoir :

- amplification de cibles spécifiques d'ADN.
- amplification de cibles spécifiques d'ARN en ADN.
- séquençage.

Remarques préliminaires :

Activité 5'-3' exonucléase : *In vitro* les polymérases réalisent l'élongation de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' à partir d'un brin matrice dans l'autre orientation (3', 5').

Les polymérases à activité 5'-3' exonucléase sont capables de déplacer des fragments d'ADN hybridé sur la matrice qui se trouve sur le chemin de l'élongation. La polymérase bute sur une extrémité 5' phosphate et est capable de déplacer cet obstacle pour continuer la polymérisation.

Activité 3'-5' exonucléase : Cette activité porte le nom de proofreading c.à.d. une activité correctrice. Si la polymérase introduit un mauvais nucléotide par rapport au patron qui lui est donné par la séquence matrice, elle arrête et retire ce mauvais nucléotide puis le remplace par un autre correct.

Les polymérases thermostables :

La PCR est une technique puissante en biologie moléculaire, elle s'est donc développée rapidement. C'est pourquoi ces dernières années on a vu apparaître sur toutes sortes de polymérases, qu'il s'agisse de polymérases originales ou de polymérases Taq modifiées. Il devient donc de plus en plus difficile de réaliser un choix judicieux parmi toutes celles-ci. C'est pourquoi dans ce paragraphe nous présentons un tableau récapitulatif des polymérases thermostables les plus courantes (Tableau I.C.1.).

La Taq fut la première polymérase thermostable utilisée en PCR, presque toutes les firmes biotechnologiques la commercialise sous des formes plus ou moins modifiées.

Les 2 premières Taq isolées avaient un poids moléculaire de 64 et 68 kDa, elles n'avaient ni activité 5'-3' exonucléase, ni activité proofreading (correstrice, exo 3'-5'), elles étaient moins thermostables que la Taq utilisée actuellement (Laywer et al., 1993; Griffin & Griffin, 1994). Cette dernière dont le poids moléculaire est de 94 à 95 kDa travaille entre 72 et 75°C et possède une activité exonucléase 5'-3'.

La Taq étant la première polymérase thermostable utilisée en PCR son champ d'application est vaste, simples PCR, séquençage, mutagenèse, clonage dans des vecteurs T (Laywer et al., 1993; Griffin & Griffin, 1994).

La Taq polymérase de 94 kDa est constituée de 832 acides aminés, Susanne Stoffel a cloné une forme tronquée cette enzyme faisant 544 acides aminés appelés « Stoffel » fragment (Laywer et al., 1993; Griffin & Griffin, 1994). Celui-ci est plus thermostable que la Taq, et réalise l'élongation PCR plus rapidement. Son avantage principal est qu'il n'est pas ou peu arrêté par les structures secondaires. Le Stoffel fragment est donc surtout utilisé en séquençage (Laywer et al., 1993; Griffin & Griffin, 1994).

La Tth est une enzyme isolée de la souche bactérienne thermophile *Thermus thermophilus*. Cette souche contient 3 isoformes (A, B, C) de cette polymérase, cependant seule l'isoforme B ou ses dérivés sont utilisés en PCR. En effet cette isoforme est plus thermostable que les deux autres et possède une activité 5'-3' exonucléase (Griffin & Griffin, 1994).

La Tth possède une activité de transcriptase inverse en présence de manganèse, elle est donc utilisée en RT-PCR au cours de laquelle une première étape consiste à passer d'une matrice ARN à une matrice ADN puis ensuite au cours de la seconde étape à amplifier cette dernière (Griffin & Griffin, 1994). Le passage de la première étape à la seconde nécessite l'élimination du manganèse du milieu réactionnel, pour cela un agent chélateur du manganèse l'EGTA est ajouté (Griffin & Griffin, 1994). L'utilisation de polymérases thermostables dans l'étape de transcription inverse permet de travailler à des températures auxquelles les structures secondaires de l'ARN sont déstabilisées (Griffin & Griffin, 1994).

La Tth réalise l'élongation PCR environ trois fois plus lentement que la Taq, elle n'est donc pas idéale pour amplifier de très longues matrices. Elle est peu sensible aux inhibiteurs de polymérases présent dans le sang, elle permet donc des PCR directes sur des extraits sanguins (Griffin & Griffin, 1994).

La Vent Rec polymérase est une enzyme de grande thermostabilité puisque son temps de demi-vie est de 2 heures à 100°C.

En outre elle possède une activité correctrice (proofreading) lui permettant une meilleure fidélité lors de l'amplification (Ling et al., 1991; Kong et al., 1992). Elle est donc utilisée dans des PCR où la température d'hybridation est élevée (80°C), sur des matrices de grande taille (ADNg) et ou riches en GC (Ling et al., 1991; Kong et al., 1992).

Il existe aussi une forme modifiée de la Vent appelée Vent Rexo ou Vent (exo-), cette forme a perdu son activité exonucléase 3'-5', elle réalise l'élongation PCR plus rapidement mais de manière moins fidèle, elle permet d'amplifier des cibles de très grande taille (15 kb).

La Deep Vent est issue d'une autre souche bactérienne que la Vent. La Deep Vent est une polymérase d'une grande thermostabilité puisque son temps de demi vie à 100°C est de 8 heures. Elle possède une activité exonucléase 3'-5' (correctrice) et est utilisée pour amplifier des cibles nécessitant des températures de dénaturation et d'hybridation très élevées. Elle permet également des PCR dont le nombre de cycle est voisin de 60. La Deep Vent est aussi utilisée en Iso-CR c.à.d. une "PCR" une seule température de 80°C est utilisée et où on ne distingue plus d'étapes de cycles.

La forme modifiée de la Deep Vent, la Deep Vent Rexo ou (exo-) a perdu son activité exonucléase 3'-5', elle est utilisée pour amplifier des cibles de grandes tailles.

La Pfu est une polymérase intéressante à divers niveaux, d'une part elle possède une bonne thermostabilité puisqu'elle conserve 95 % de son activité après 60 minutes d'incubation à 95°C (Griffin & Griffin, 1994), elle est douée d'une activité 5'-3' exonucléase et d'une très bonne activité 3'-5' exonucléase (correctrice) (Griffin & Griffin, 1994). Elle effectue l'élongation à des températures voisines de 75°C. Son avantage principal est sa capacité de réaliser des amplifications de haute fidélité (Griffin & Griffin, 1994).

Plusieurs formes de Bst ont été clonées en fonction de la souche de *Bacillus* d'origine (*Bacillus stearothermophilus* ou *caldovelox*) (Griffin & Griffin, 1994). Ces polymérases ne sont pas gênées par les structures secondaires, leur application principale recouvre le champ du séquençage dont le séquençage à fluorescence (Griffin & Griffin, 1994).

La Tfl ne possède ni activité exonucléase 5'-3', ni activité exonucléase 3'-5' elle réalise donc l'élongation de manière rapide.

Ses particularités en font une enzyme intéressante pour amplifier des fragments de grande taille (16 kb) (Griffin & Griffin, 1994). Elle est aussi utilisée en séquençage.

La Mth est une polymérase qui possède les 2 types d'activités exonucléase, cependant l'élongation se fait à température relativement basse (65°C), elle est donc utilisée pour le séquençage ou l'amplification fidèle de régions riches en AT (Griffin & Griffin, 1994).

Le Tableua I.C.I. reprend aussi les caractéristiques de quelques autres polymérases comme la Pwo, Gold, ...

Inhibitor Effects on Taq Pol I Activity

Inhibitor	Concentration	Activity (percent) ^a
Ethanol	≤3%	100
	10%	110
Urea	≤0.5 M	100
	1.0 M	118
	1.5 M	107
	2.0 M	82
DMSO	≤1%	100
	10%	53
	20%	11
DMF	≤5%	100
	10%	82
	20%	17
Formamide	≤10%	100
	15%	86
	20%	39
SDS	0.001%	105
	0.01%	10
	0.1%	0.1

^adNTP incorporated activity at 70°C with Salmon Sperm DNA/10 min.

Source: Gelfand, D. H. 1989. *Taq DNA Polymerase*. In *PCR technology: principles and applications for DNA amplification* (ed. H. A. Erlich), p. 17-22. Stockton Press, New York.

Tableau I.C. 2. :

Effets de quelques « inhibiteurs » sur l'activité de la Taq polymérase en fonction de leur concentration (Innis, Gelfand & white, 1990).

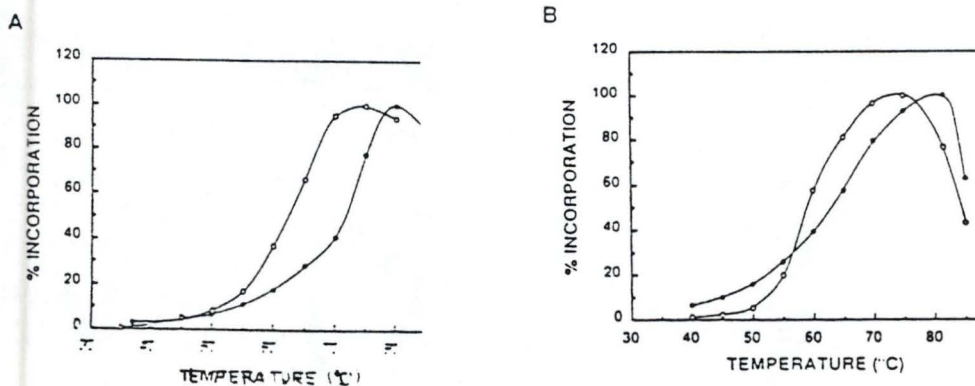


Figure I.C.6. :

Profil d'activité de la Taq polymérase (94 kDa) et du Stoffel fragment en fonction de la température (Lawyers et al., 1993).

A : pourcentage d'incorporation par la Taq polymérase de nucléotides marqués en fonction de la température: matrice activée (hot start) (●) ou non (o).

B : pourcentage d'incorporation par le Stoffel fragment de nucléotides marqués en fonction de la température: matrice activée (hot start) (●) ou non (o).

L'optimum thermique de la Taq polymérase pour son activité de polymérisation se situe entre 70 et 75°C, pour le Stoffel fragment, il se situe entre 70 et 80°C.

3.2. L'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* :

3.2.1. Origine :

La Taq polymérase a été isolée d'une souche thermophile d'eubactéries, *Thermus aquaticus*, capable de pousser à 75 °C dans les sources chaudes (Kaledin et al., 1980; Gelfand et al.; Lawyer et al., 1993)

3.2.2. Caractéristiques biochimiques :

La première Taq DNA polymérase à avoir été isolée avait un poids moléculaire de 62 à 68 Kd, il s'agit de la Taq DNA pol I. Actuellement on utilise une Taq pol de 94 Kd isolée de la même souche (Kaledin et al., 1980; Lawyer et al., 1989).

a) Inhibiteurs :

L'urée à haute concentration (2 M) diminue de 18% l'activité de la polymérase, 20% de DMSO a un effet inhibiteur de 89%; 20% de formamide inhibe à 51% la Taq; 0,1% de SDS diminue l'activité de la Taq de 99,9% (Tableau I.C.2.) (Gelfand et al., 1993; Griffin & Griffin, 1994).

b) Thermostabilité :

La Taq polymérase possède une activité optimale entre 75 et 80°C (Figure I.C.6.). Elle ajoute plus de 60 nucléotides par seconde à 70°C; 24 nucl / sec à 55°C; 1,5 nucl / sec à 37°C et 0,25 nucl / sec à 22°C, au dessus de 90°C il n'y a plus d'incorporation des nucléotides (Griffin & Griffin, 1994). (Rem : Le taux d'incorporation est aussi fonction de la matrice et de la concentration en dNTPs). L'enzyme conserve 50% de son activité après 130, 40 et 9 minutes respectivement à 92,5, 95 et 97,5°C (Figure I.C.7.), Tableau I.C.3.) (Lawyer et al., 1993).

c) Activité nucléase :

La Taq DNA polymérase ne possède pas d'activité 3'-5' exonucléase, les erreurs pouvant être de type substitution de base, frameshift (délétion, insertion) (voir paragraphes sur la fidélité), elle possède une activité exonucléase 5'-3' (Koehavong et al., 1989; Ling et al., 1991; Griffin & Griffin, 1994).

Tableau I.C.3. :

Temps de demi-vie de la Taq polymérase à différentes températures (Innis, Gelfand & white, 1990).

Half-life of *Taq* DNA Polymerase at Elevated Temperatures

Temperature (°C)	$T_{1/2}$ (min)
92.5	130
95.0	40
97.5	5-6

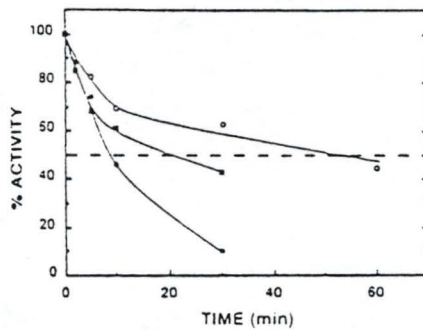


Figure I.C.7. :

Thermostabilité de la Taq polymérase (94 kDa) (Lawyer et al., 1993).

Pourcentage d'activité conservé par la Taq en fonction du temps à 97,5°C (●), 95°C (○) et par le Stoffel fragment à 97,5°C (■).

L'intersection avec la ligne pointillée centrale (50%) correspond au temps de demi-vie de la polymérase à cette température.

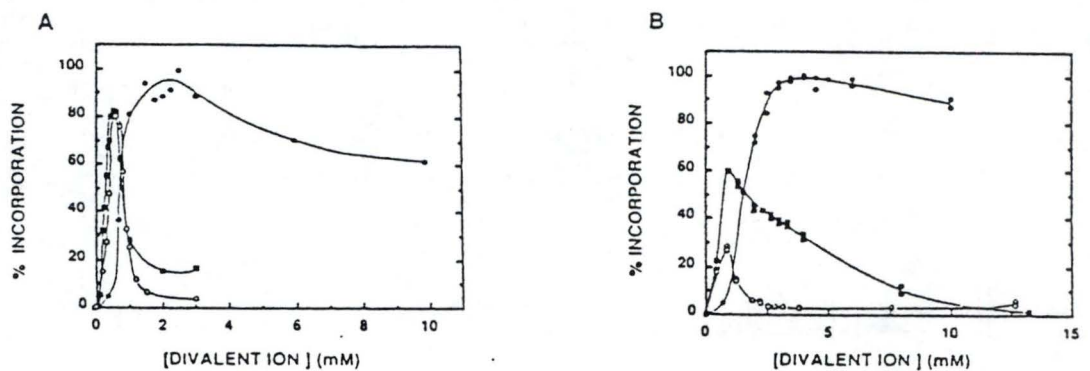


Figure I.C.8. :

Effets des cations bivalents MgCl₂ (●), MnCl₂ (■), CoCl₂ (○) sur l'activité de la Taq polymérase (A) et du Stoffel fragment (B) (Lawyers et al., 1993).

Pour la Taq polymérase l'optimum d'incorporation des nucléotides se situe à 2 mM en MgCl₂.

d) Paramètres de réaction :

Le mélange réactionnel de la PCR utilisant la Taq polymérase contient de 1 à 2 mM en $MgCl_2$, l'ion Mg^{++} est un cofacteur de la Taq, à cette concentration la fidélité est optimale; et permet une meilleure efficacité de la PCR (Figure I.C.8.). L'activité polymérase est inhibée de 40 à 50% à haute concentration en $MgCl_2$ (10 mM) (Figure I.C.8.) (Eckert & Kunkel 1990,1991; Lawyer et al., 1993; Ling et al., 1991).

La concentration totale en dNTPs utilisée est en moyenne de 0,7 à 0,8 mM (0,2 mM de chaque). Si la concentration en dNTPs est augmentée à 6 mM alors l'enzyme perd de 20 à 30% de son activité (Griffin & Griffin, 1994). La concentration en Mg^{++} est en réalité fonction de la concentration en dNTPs car ces derniers complexent une partie du Mg^{++} . On préconise donc une concentration en Mg^{++} égale à la concentration totale en dNTPs. De trop faibles ou trop hautes concentrations en dNTPs ou encore une concentration non équimolaire de chaque dNTPs abaisse fortement la fidélité de la Taq (Eckert & Kunkel 1990,1991; Lawyer et al., 1993; Ling et al., 1991).

Des concentrations en ions monovalents comme le K^+ (KCl) de 50 à 55 mM améliore aussi l'activité de polymérisation de la Taq (Griffin & Griffin, 1994). Le pH optimum de polymérisation varie quant à lui entre 7,8 et 9,4 (Eckert & Kunkel 1990,1991; Lawyer et al., 1993; Ling et al., 1991).

3.2.3. Applications :

La Taq polymérase a un champ d'action étendu, cela comprend les PCR sur ADN, le séquençage et la mutagenèse.

3.3. L'ADN polymérase de *Thermococcus Litoralis* (Vent) :

3.3.1. Origine :

La Vent polymérase a été isolée d'une souche d'archaebacterium thermophile, *Thermococcus Litoralis* qui se développe dans les cheminées hydrothermales où la température peut atteindre 98°C (Neuer et al., 1990; Kong et al., 1993).

3.3.2. Caractéristiques biochimiques :

Il existe trois formes différentes de Vent DNA polymérase. La forme primitive que l'on appelle Vent n (native), isolée telle qu'elle de *T.litoralis*, une forme recombinante similaire à la forme précédente appelée Vent R (recombinante) DNA polymérase et une troisième forme génétiquement modifiée, la Vent Rexo (exo-) (Griffin & Griffin, 1994).

a) Activité nucléase :

Les formes Vent R et Vent n possèdent une activité 3'-5' exonucléase. La Vent Rexo a été génétiquement modifiée et ne possède plus cette activité. De l'activité proofreading de la Vent, il résulte que un minimum de 95% des amplicons se retrouvent à bouts francs (Ling et al., 1991; Hu, 1993).

La Vent polymérase possède une activité 5'-3' exonucléase température dépendante qui se manifeste à partir de 55°C (Kong et al., 1993).

b) Thermostabilité :

La Vent DNA polymérase a une très grande thermostabilité puisqu'elle a un temps de demi vie de 2 heures à 100°C (Kong et al., 1993).

c) Paramètres de la réaction :

L'activité exonucléase 3'-5' de la Vent est inhibée à haute concentration en dNTPs (de l'ordre du mM) (Griffin & Griffin, 1994). Par contre, la fidélité de la Vent Rexo n'est pas affectée par les modifications de concentration en dNTPs. Entre 10 et 200 uM en dNTPs la fidélité de la Vent R ne varie pas, mais en dessous de 10 uM le produit d'amplification apparaît souvent comme une trainée (smear), probablement le produit d'extensions partielles (Griffin & Griffin, 1994).

La fidélité est également optimale à faible concentration en Mg^{++} (1mM). La meilleure fidélité est atteinte lorsque la concentration totale en dNTPs est équimolaire à la concentration en Mg^{++} (Ling et al., 1991). L'addition de 10 à 50 mM en KCl ou NaCl dans le mélange réactionnel augmente légèrement le rendement de la PCR mais ils ne sont pas nécessaires.

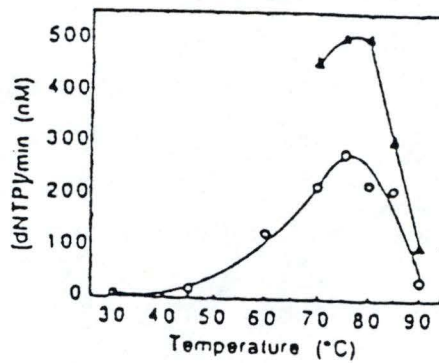


Figure I.C.9. :

Profil d'activité de la Vent polymérase comparé à celui de la Taq polymérase en fonction de la température (Kong et al., 1993).

Concentration en dNTPs marqués (nM) introduits par minutes en fonction de la température pour la Vent recombinante utilisant comme matrice d'ADN thymique activé (hot start) (▲) ou de l'ADN plasmidique simple brin (○). La Vent est à son optimum thermique pour son activité polymérase entre 75 et 85°C.

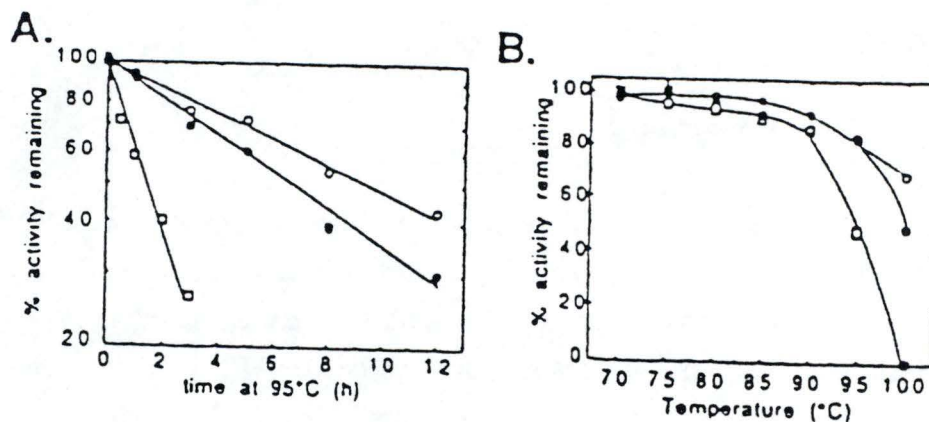


Figure I.C.10. :

Thermostabilités comparées de la Vent native (○), de la Vent recombinante (●) et de la Taq polymérase (Perkin-Elmer) (□) (Kong et al., 1993).

A : Pourcentage d'activité conservé à 95°C en fonction du temps (en heures). Le temps de demi-vie à 95°C est de 9,7 heures pour la Vent native, 6,7 heures pour la Vent recombinante et de 1,6 heures pour la Taq.

B : Les 3 polymérases sont incubées 2 heures à 70, 75, 80, 85, 90, 95 et 100°C, leur pourcentage d'activité restant est alors quantifié. On constate bien que le temps de demi-vie de la Vent est de 2 heures à 100°C.

Le pH optimum auquel travaille cette polymérase est de 8 à 9 (Ling et al., 1991; Kong et al., 1993).

d) Remarques :

La Vent polymérase produit des amplicons à bouts francs clonables dans des vecteurs linéarisés à bouts francs (Ling et al., 1991; Hu, 1993).

3.3.3. Applications :

La Vent polymérase est utilisée lorsque l'on veut effectuer des PCR à hautes températures (Figure I.C.9.) (Kong et al., 1993). Ainsi son activité à 80°C est de 125% par rapport à son activité à 75°C %.

Biolabs qui commercialise l'enzyme rapporte que pour des amorces particulièrement longues et ou riches en CG il est possible avec cette enzyme de réaliser des hybridations à 86°C. Cependant en général on se limite à une étape unique d'hybridation et d'élongation à 80°C.

Sa thermostabilité de 2 heures à 100°C (Figure I.C.10.) permet de réaliser un "pseudo-hot start", c.à.d. d'effectuer une étape de dénaturation longue à 100°C pendant 4 à 5 minutes avec l'enzyme déjà présente dans le mix réactionnel.

3.4. Conclusion :

La liste des polymérases présentée ci-dessus n'est pas exhaustive et il existe encore bien d'autres de ces enzymes. Nous avons essayé cependant de présenter les enzymes les plus courantes ou dont l'application est la plus représentative.

Le tableau I.C.1. résume les caractéristiques des principales polymérases thermostables connues. D'après ces données, il apparaît que chaque polymérase trouve une utilisation adéquate dans l'un ou l'autre des champs d'application de la PCR, par conséquent le choix de l'enzyme est aussi primordial dans une réaction PCR que le design des amorces ou que la détermination des conditions de cycle PCR.

4. La fidélité des ADN polymérases thermostables :

4.1. Introduction :

Le terme de fidélité dans l'amplification PCR se rapporte à la capacité de la polymérase à ajouter les nucléotides complémentaires corrects dans l'amplicon vis à vis de ceux de la matrice, c.à.d. à respecter au mieux la séquence utilisée comme matrice de départ. La fidélité n'est donc pas à confondre avec la spécificité de l'amplification. Ainsi un fragment amplifié non spécifiquement peut l'être de manière plus ou moins fidèle. Les polymérases thermostables utilisées en PCR sont caractérisées par leur propriété de reproduire de manière fidèle un fragment d'ADN cible.

Dés lors on distingue deux grandes catégories de polymérases :

- les polymérases à activité 3'-5' exonucléase (proofreading).
- les polymérases dépourvues d'activité proofreading.

Les premières ayant une meilleure fidélité que les secondes. Les conditions de pH, concentration en Mg^{++} et en dNTPs ont aussi une nette influence sur la fidélité de l'amplification. Ces différents aspects seront étudiés dans ce chapitre.

4.2. Différents types d'erreurs qui surviennent en PCR :

Une série de changements dans la séquence amplifiée peut se produire pendant la PCR. Quatre grands types d'erreurs peuvent se produire (Tindall et al., 1988; Eckert & Kunkel 1991):

- La substitution d'une base par une autre est de loin l'erreur la plus fréquente, on parle de mutation de substitution.
- Les délétions de fragments peuvent se produire, en particulier si la séquence cible contient des éléments répétés susceptibles de former des boucles en épingles à cheveux. Ces délétions peuvent atteindre de quelques bases à un millier.
- Les insertions bien que moins fréquentes que les délétions se produisent dans des conditions cependant similaires. Insertion et délétion appartiennent à une même classe d'erreurs : les mutations "frameshift".

Estimates of Fidelity during PCR Catalyzed by *Taq* Polymerase

Target sequence	Number of cycles	Error frequency per nucleotide	Error rate per nucleotide per cycle ^a
Apolipoprotein B	30	22/8,000	1/5,600
HLA-DP β	30	17/6,692	1/5,900
α -Antitrypsin	33	7/4,700	1/11,000
HPRT	32	16/15,000	1/15,000
HLA-A,B	30	20/21,870	1/16,000
	20	17/30,710	1/18,000
TCR V δ	25	1/1,500	1/19,000
HIV <i>gag/env</i>	30	<1/5,411	<1/83,000

^aError rate = $1/[(\text{observed error frequency}/\text{number of cycles}) \times 2]$, assuming a constant efficiency per cycle.⁽⁷⁾

Tableau I.C.4. :

Taux d'erreur de la *Taq* polymérase en fonction de la matrice (Eckert, 1991). Le nombre d'erreurs que la *Taq* polymérase commet in vitro est variable en fonction de la cible amplifiée.

4.2.2. Erreurs introduites par une défaillance de la polymérase :

Les polymérases peuvent aussi être à divers degrés à l'origine d'erreurs dans les amplicons par le simple fait que *in vitro* il arrive qu'elles ajoutent un mauvais nucléotide. Comme *in vitro* l'ensemble des complexes correcteurs que l'on retrouve *in vivo* sont absents, il en résulte l'amplification de l'erreur (Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991).

La fidélité des polymérases peut se caractériser par le taux d'erreur qu'elles engendrent (frameshift ou de substitution), il s'agit de la fréquence de 1 mutation d'un type donné pour x nucléotides introduits (Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991). Cette caractéristique reflète la capacité qu'a la polymérase de discriminer l'ajout d'un bon d'un mauvais nucléotide et de le corriger.

Cette valeur n'est pas indépendante de la séquence de la matrice (Tableau I.C.4.) et son influence est difficilement quantifiable. Elle est également fonction de différents paramètres tels que la concentration en dNTPs, en magnésium, ou le pH (Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991). Pour des polymérases à activité exonucléase 3'-5' (correctrice) la fidélité ainsi quantifiée est meilleure d'un facteur 2 à 5 par rapport aux polymérases qui en sont dépourvues.

Dans des conditions standards pour la Taq polymérase le taux de mutation de substitution varie entre 1 pour 5000 et 1 pour 20 000 (Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991). Dans les mêmes conditions le taux d'erreur de type frameshift est de l'ordre de 1 pour 20 000 à 1 pour 40 000.

Des conditions optimisées pour la fidélité peuvent être utilisées, dans ce cas le taux d'erreurs est 2 à 5 fois plus faible, notons cependant que le rendement de la PCR est aussi beaucoup plus bas (Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991).

Globalement il est possible de schématiser l'élongation PCR et d'identifier les étapes cruciales pour l'introduction d'un nucléotide correct chez l'amplicon, c'est ce qui est expliqué ci-dessous.

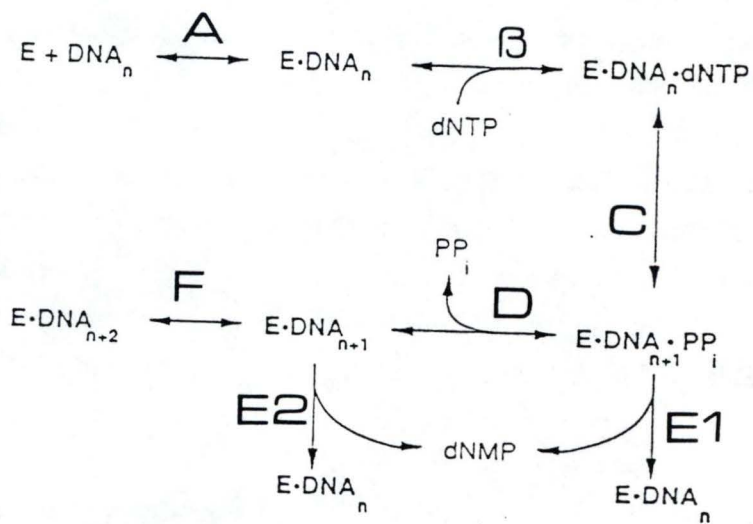


Figure I.C.11. :

Schéma d'élongation PCR et fidélité de l'élongation (Eckert et al., 1991).

4.3. Schéma de l'élongation PCR et fidélité :

Soit E: la polymérase, DNAn: l'amplicon allongé de n nucléotides, dNTPs les nucléotides, PPi: Le pyrophosphate et le sigle : qui signifie la formation d'un complexe.

Sur ce schéma (Figure I.C.11.), on distingue 6 grandes étapes dans le processus d'élongation au cours de la PCR (Eckert & Kunkel 1991) :

A: Association de l'amorce avec sa matrice, formation de duplex ADN-ADN ou ADN-ARN. Attachement de la polymérase sur ce-dernier.

B: Introduction des dNTPs dans le complexe et interaction par ponts hydrogènes avec le nucléotide en vis à vis de la matrice. Si l'interaction se produit entre nucléotides complémentaires alors le dNTP demeure plus longtemps dans le complexe, sinon il est rapidement libéré pour céder sa place à un nouveau.

Cette cinétique couplée aux effets stériques permet déjà de discriminer les bons nucléotides des mauvais puisque ceux qui restent associés plus longtemps au complexe auront une probabilité plus grande de former une liaison phosphodiester avec les nucléotides de l'amplicon.

C: la polymérase catalyse la formation du lien phosphodiester, le pyrophosphate résultant de la réaction se retrouve dans le complexe ADN-polymérase.

D: Le pyrophosphate est libéré du complexe, le site actif de l'enzyme est à nouveau accessible à un dNTP.

E: C'est à ce niveau qu'intervient l'activité "proofreading" pour les polymérases qui en sont dotées. Il existe deux hypothèses relatives à cette activité correctrice :

Soit E1 l'activité exonucléase 3'-5' est conditionnée par la cinétique de libération du pyrophosphate du complexe. Si il y a eu incorporation d'un mauvais nucléotide on constate que le PPi est libéré lentement sans doute par effet stérique. Il est alors possible que cela permette à l'enzyme d'exercer son activité exonucléase 5'-3' (Eckert & Kunkel 1991).

Soit E2 l'activité proofreading serait indépendante de la cinétique d'élimination du pyrophosphate et serait liée seule aux effets stériques (Eckert & Kunkel 1991). Le nucléotide alors éliminé se retrouve sous forme monophosphatée (dNMP).

F: Incorporation d'un nouveau nucléotide.

		Primer 3'-base			
		T	C	G	A
Template 3'-base	T	1.0	1.0	1.0	1.0
	C	1.0	≤0.01	1.0	1.0
	G	1.0	1.0	1.0	≤0.01
	A	1.0	1.0	≤0.01	0.05

Relative PCR product yield after 30 cycles.

Tableau I.C5. : (Innis, Gelfand & White, 1990)

Efficienc e de l'él ongation pour la Taq en fonction du mismatch introduit entre l'amplicon et la matrice. Quand la Taq polymérase introduit un mauvais nucléotide, elle ne corrige pas l'erreur car elle n'a pas d'activité 3'-5' exonucléase. Pour certains types de mismatch la Taq continue la polymérisation comme si de rien n'était. Pour d'autres types de mismatch la Taq se bloque et ne poursuit plus l'él ongation.

Remarques :

1-Le schéma n'est valable que si chacun des nucléotides est en concentration équimolaire. En effet si on a un excès d'un des dNTPs alors celui-ci pourra être introduit de manière anormale, amenant un taux d'erreur supérieur.

2-Si une erreur de type substitution se produit l'élongation se poursuit mais pas avec la même probabilité en fonction du couple de nucléotide formé au niveau de cette erreur (Tableau I.C.5.). Des couples T-G, G-T, C-A ou A-C n'empêchent pas la poursuite de l'élongation. Par contre si l'erreur d'appariement est de type A-A la probabilité que l'élongation se poursuive est réduite de 20 fois et pour des couples A-G, G-A ou C-C elle est réduite de 100 fois.

La fidélité des polymérases n'est pas un caractère statique, il est modifié en fonction des conditions dans lesquelles elles travaillent (Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991).

La fidélité peut se révéler être un critère primordial dans les applications PCR qui visent à l'expression d'un fragment amplifié. Dans ce genre d'application il se révèle donc important d'utiliser des conditions de fidélité optimales.

4.4. Optimisation des conditions de fidélité dans la PCR :

4.4.1. Etude concernant la Taq DNA polymérase :

Dans des conditions standards la Taq engendre un nombre d'erreurs de substitution de 1 pour 5000 voir 1 pour 20 000 nucléotides ajoutés. Quant au taux d'erreur frameshift, celui-ci est de 1 pour 20 à 35 000 nucléotides. Il est possible d'améliorer environ d'un facteur 5 à 10 la fidélité de la Taq dans certaines conditions (Tindall et al., 1988; Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991). Cependant les meilleures conditions de fidélité sont loin d'être des conditions optimales pour l'amplification.

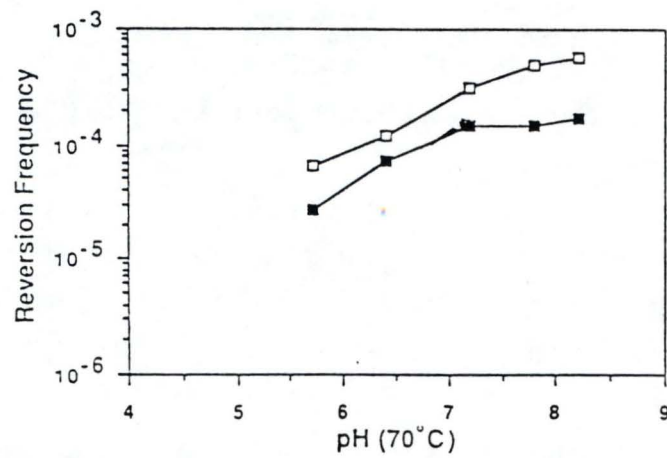


Figure I.C.12. : (Eckert & Kunkel, 1990)

Fréquence de réversion pour la Taq en fonction du pH (70°C): tampon 20mM Tris (□).
 tampon 20mM MES (×).

Le taux d'erreur augmente avec le PH.

Un test simple a été mis au point pour étudier l'amélioration de la fidélité de la Taq dans certaines conditions, ce test est appelé "test de réversion" (Eckert & Kunkel 1990). Dans un premier temps il consiste à amplifier par PCR l'élément Lac Z α de l'opéron lactose et ensuite de liguer les amplicons pour finalement compléter des bactéries délétantes pour l'élément Lac Z α . Il en résulte que si les amplicons sont mutés, alors on obtient des colonies blanches ou faiblement bleutées dans un test de l'activité de la β -galactosidase. On peut donc en conclure que l'amplicon est muté cependant il est impossible d'en déterminer la nature ou la fréquence de mutation (un amplicon pouvant être muté plusieurs fois).

Ce système est donc un moyen qualitatif d'évaluer l'amélioration de la fidélité de la Taq, la fréquence de réversion bleu-blanc étant mise en rapport avec les variations des conditions PCR. Ce test a été réalisé pour différentes concentrations en MgCl₂, dNTPs et de pH (Eckert & Kunkel 1990).

a) Fidélité en fonction du pH :

Une meilleure fidélité dans la synthèse est observée à pH plus acide (Figure I.C.12.). La fréquence de réversion diminue quand le pH diminue. Cette diminution est de l'ordre de 60 fois pour 3 unités de pH, en allant de 8 à 5 (Eckert & Kunkel 1990). Cependant à pH 5 l'activité de l'enzyme est nettement ralentie.

b) Fidélité en fonction de la concentration en dNTPs :

La fidélité diminue lorsque la concentration en dNTPs augmente. Si on passe de 1 mM total en dNTPs à 1 μ M, la fidélité est réduite de moitié sachant que la concentration en MgCl₂ est de 10 mM et le pH de 8,2 (Eckert & Kunkel 1990). Le nombre d'erreurs augmente également si les 4 dNTPs ne sont pas en concentration équimolaire.

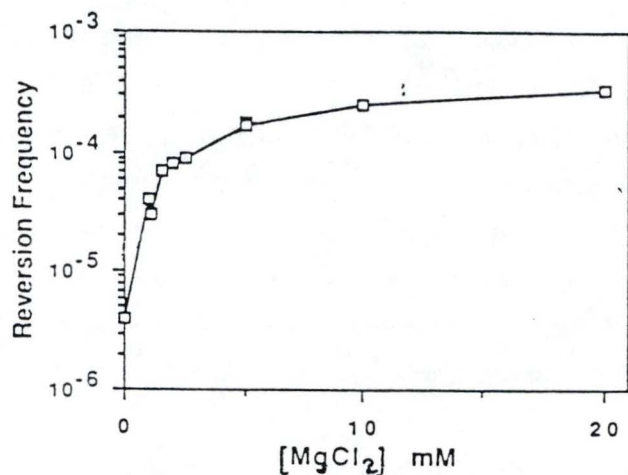


Figure I.C.13. :

Fréquence de réversion pour la Taq en fonction de la concentration en MgCl₂ (□) (Eckert & Kunkel, 1990).

Le taux d'erreur est faible entre 0 et 3 mM en MgCl₂, au delà il plafonne.

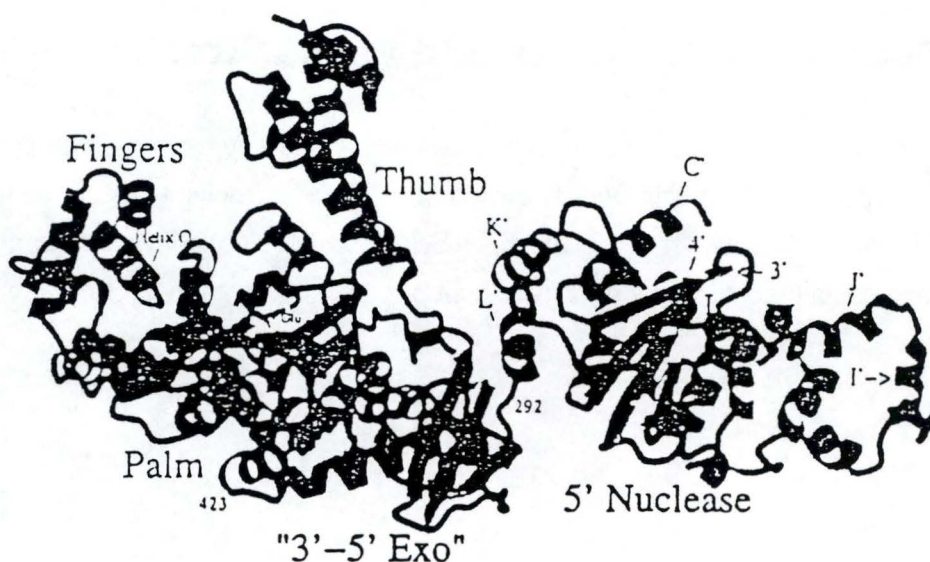


Figure I.C.14. : (Youngsoo et al., 1995)

On distingue sur la structure 3D de la Taq polymérase une région « 3'-5' Exo » qui serait un site 3'-5' exonucléase dégénéré inactif. On y distingue aussi un site 5' Nucléase qui est le centre de l'activité 5'-3' exonucléase.

c) Variation de la concentration en $MgCl_2$:

Pour des conditions fixes de pH et de concentration en dNTPs, on fait varier la concentration en $MgCl_2$ de 1 à 20 mM, la fréquence de réversion est supérieure aux concentrations élevées en $MgCl_2$ (Figure I.C.13.). La fidélité diminue donc quand la concentration en chlorure de magnésium augmente (Eckert & Kunkel 1990).

Si la concentration en $MgCl_2$ est équimolaire à la somme des concentrations respectives des 4 nucléotides alors la fidélité est également améliorée (Eckert & Kunkel 1990).

d) Comment explique-t-on l'amélioration de la fidélité de la Taq sous certaines conditions :

Les mécanismes sous-jacents à l'amélioration de la fidélité de la Taq sous certaines conditions sont peu connus. En ce qui concerne la concentration en dNTPs, il apparaît qu'une quantité plus élevée en nucléotides modifie la cinétique d'introduction ou de libération de ceux-ci du complexe ADN-polymérase:Taq. Les interactions stériques et autres dans le site actif se réalisent alors moins bien, de telle sorte que la polymérase est moins à même de discriminer l'introduction de bons ou de mauvais nucléotides (Eckert & Kunkel 1990, 1991).

En tant que cofacteur de l'enzyme, le magnésium jouerait sur la cinétique de l'élongation. A haute concentration il augmente l'activité enzymatique. Etant dépourvue d'activité exonucléase 5'-3', la polymérase commettrait plus d'erreurs (Eckert & Kunkel 1990, 1991).

Le pH et le magnésium pourraient éventuellement activer un site cryptique exonucléase 5'-3' que l'on distingue dans la structure 3D de la Taq polymérase (Figure I.C.14.) (Youngsoo et al., 1995). Il en résulterait une fidélité meilleure.

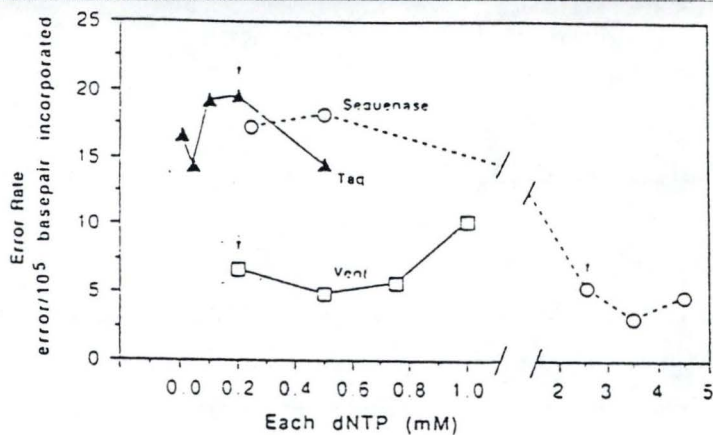


Figure I.C.15. : (Ling et al., 1991)

Fidélités comparées de la Vent native (□) et de la Taq (▲) en fonction de la concentration en dNTP.

Pour 0,2 mM en chaque dNTP la Vent native commet 3 fois moins d'erreurs que la Taq.

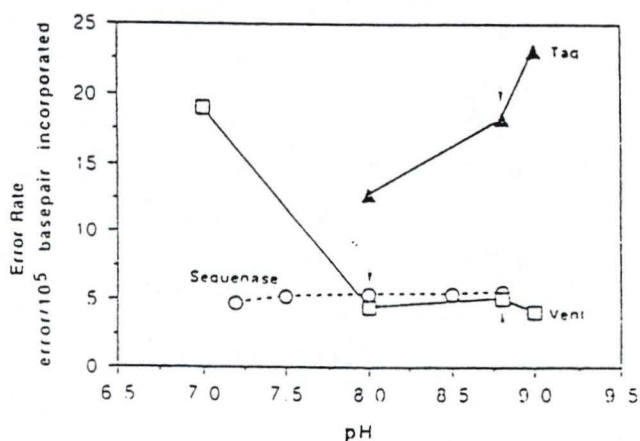


Figure I.C.16. : (Ling et al., 1991)

Fidélités comparées de la Vent native (□) et de la Taq (▲) en fonction du pH.

La fidélité de la Taq est meilleure quand le pH diminue alors que pour la Vent native c'est le contraire. A pH 9,25, la Vent commet 4 fois moins d'erreurs que la Taq.

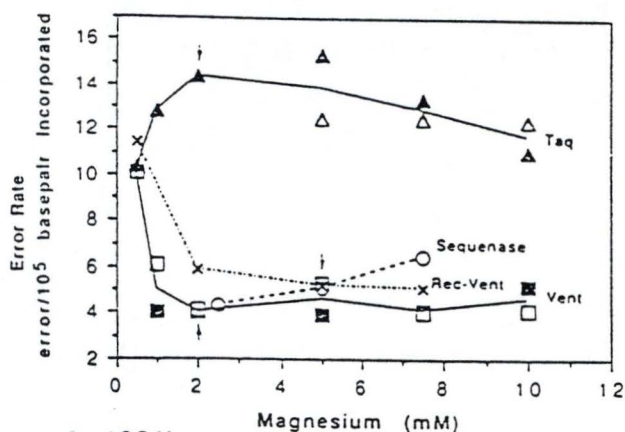


Figure I.C.17. : (Ling et al., 1991)

Fidélités comparées de la Vent native (□) de la Vent recombinante (x) et de la Taq (▲) en fonction de la concentration en MgCl2.

Pour 2 mM en MgCl2, la Vent native la Vent recombinante commettent entre 2 et 3 fois moins d'erreurs que la Taq.

4.4.2. Optimisation comparées des conditions de fidélité PCR pour la Taq et la Vent (native) DNA polymérase :

a) Fidélité et concentration en dNTPs :

Le taux d'erreur diminue pour la Taq comme pour la Vent à faible concentration en dNTPs (Figure I.C.15.). Pour une concentration de 2 mM en $MgSO_4$ et un pH de 8,8, on constate que le nombre d'erreurs introduites par la Taq varie entre 1 pour 5000 à 1 pour 7000 pour des concentrations en chaque dNTPs de 0,05 à 0,6 mM. A 0,05 mM le taux d'erreur n'est plus que de 1 pour 7000 nucléotides introduits (Ling et al., 1991). Pour la Vent, dans les mêmes conditions, le taux d'erreur est minimum aux environs de 0,5 mM en chaque dNTPs et augmente à 0,2 et 1 mM. A 0,5 mM le taux d'erreur est de 1 pour 20.000, il est de 1 pour 13.000 à 0,2 mM et de 1 pour 10.000 à 1 mM. L'efficacité de la Taq comme de la Vent est de 70% dans ces conditions (Ling et al., 1991).

b) Fidélité et pH :

La Taq a une meilleure fidélité quand le pH baisse alors que la Vent est plus fidèle à pH élevé (Figure I.C.16.). Pour la Taq avec 0,05 mM en chaque dNTPs et 2 mM en $MgSO_4$ entre un pH de 9 et 8 le taux d'erreur baisse pour atteindre 1 pour 8000 à pH 8 (Ling et al., 1991).

L'efficacité de la Taq reste bonne puisqu'elle est de 70%. Pour la Vent avec 0,5 mM en chaque dNTPs et 2 mM en $MgSO_4$ la fidélité est optimale à pH basique (Ling et al., 1991). A pH 9 le taux d'erreur de la Vent est proche de 1 pour 30.000 nucléotides mais son efficacité est faible et voisine de 45% (Ling et al., 1991).

c) Fidélité et concentration en Mg^{++} :

A pH 8 et pour une concentration de 0,05 mM en chaque dNTP la Taq montre une fidélité meilleure à faible concentration en Mg^{++} puisque à 0,5 mM le taux d'erreur est de 1 pour 10.000 nucléotides, il augmente à 2 mM puis varie peu entre 2 et 10 mM (Figure I.C.17.). Au dessus de 10 mM l'efficacité et la fidélité deviennent mauvaises. L'efficacité varie entre 40 et 63% (Ling et al., 1991).

Pour la Vent (native), toujours à pH 8 et pour une concentration en chaque dNTPs de 0,5 mM, la fidélité est optimale à 2 mM en Mg^{++} (concentration en Mg^{++} équimolaire à la concentration totale en dNTPs), et elle reste stable entre 2 et 10 mM (Ling et al., 1991). Ainsi à 2 mM en Mg^{++} le taux d'erreur est de 1 pour 25.000 nucléotides. L'efficacité de la Vent est de 70% dans ces conditions.

f) Remarques :

Le taux d'erreurs par base incorporée est calculé de la manière suivante :

$$f = HeF / b d$$

f est le taux d'erreurs.

HeF nombre total des hétéroduplexes moins le bruit de fond des hétéroduplexes. Donc c'est la fraction d'hétéroduplexe.

La fraction d'hétéroduplexes est déterminée par dénaturation puis réhybridation des amplicons marqués radioactivement suivi d'une migration sur gel dénaturant gradient.

b est la longueur de l'amplicon où l'on détecte les mutations.

d est le nombre de cycles.

L'efficacité est calculée comme suit :

$$(1 + Y)^n = \text{copies d'ADN finales spécifiques} / \text{copies matrice d'ADN initial}$$

où : Y est l'efficacité (x 100 pour obtenir un %)

n est le nombre de cycles.

4.5. Conclusion :

La fidélité d'une amplification PCR dépend de la capacité des polymérase à discriminer l'ajout de bons et de mauvais nucléotides mais aussi d'allonger l'amplicon au delà du mismatch. Certaines polymérase sont incapables de corriger une erreur suite à la formation du lien phosphodiester; alors que d'autres possédant une activité exonucléase 3'-5' (proofreading) en sont capables. Il en résulte que les enzymes a activité correctrice (proofreading) sont plus fidèles (Tindall et al.,1988; Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991).

Tableau I.C.6. : (Hu, 1993)

A : Types d'extrémités générées en 3' des amplicons en fonction de la polymérase et de la dernière base complémentaire en 3' de l'amplicon.

B : Type d'extrémités générées en 3' des amplicon pour quelques polymérases.

A

SUMMARY OF THE 3' ENDS PRODUCED BY DNA POLYMERASES *in Vitro*

Enzymes	3' end	3' ends may be produced*
Sequenase Version II	T	-T
	G	-G
	C	-C> -A
T7 DNA polymerase	A	-A>> -AA, -AAA
	T	-T
	G	-G
Taq DNA polymerase	C	-C
	A	-A
	T	-T, -A
Vent DNA polymerase	G	-G> -A> +C
	C	-A> -C
	A	(+A)
T4 DNA polymerase	T	(-A)
	G	+G, +C, +A
	C	(+A)
Pfu DNA polymerase	A	(-A)
	T	Blunt end
	G	Blunt end
Klenow fragment	C	Blunt end
	A	Blunt end
	T	Blunt end
DNA polymerase I (<i>E. coli</i>)	G	Blunt end
	C	Blunt end
	A	Blunt end

*Blunt end, The primer is extended for three nucleotides, and a blunt-ended DNA double-helix strand is formed. -A, -AA, +AAA. One, two, or three extra A residues are added at the 3' end. -A, Primer was not extended to form blunt-ended DNA and an A residue was missing at the 3' end. -C> -A, The amount of the DNA with an extra C at the 3' end is more than that with an extra A. -A>> -AA, The amount of the DNA with an extra A at the 3' end is much more than that with extra double -A. (+A), One extra A residue was added at the 3' end in very low efficiency.

B

Comparison of Thermostable DNA Polymerases.

Characteristic	Taq [‡]	Tfi	Tth	Tli (Vent ₂ [™])	Deep Vent ₂ [™]	Pfu	Pwo
Resulting DNA ends	3' A	3' A	3' A	>95% Blunt	>95% Blunt	Blunt	N.A.
5'→3' exonuclease activity	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No
3'→5' exonuclease activity	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes

‡Amp/Taq[®]

N.A.: not available

La fidélité des polymérases thermostables est aussi sensible aux conditions de la PCR : concentration en dNTPs, pH, concentration en Mg^{++} (Tindall et al., 1988; Eckert & Kunkel 1990, 1991; Paabo et al., 1990; Ling et al., 1991).

Il faut également prendre en considération la séquence de la matrice, il existe des sites préférentiels de mutation quelle que soit l'enzyme utilisée, comme les répétitions de trinuécléotides. La fidélité est donc aussi fonction de la matrice (Eckert & Kunkel 1990, 1991).

5. Activité extendase de certaines polymérases thermostables :

5.1. Introduction :

La Taq polymérase ajoute à l'extrémité 3' de ses amplicons une purine (Adénine) supplémentaire indépendamment de la matrice, cette activité est définie comme l'activité extendase de la polymérase (Hu, 1993). D'autres polymérases thermostables sont douées de cette activité extendase alors que certaines en sont totalement dépourvues (Tableau I.C.6.A et B.) (Lohff et al., 1991; Hu, 1993).

5.2. Activité extendase de diverses polymérases :

5.2.1. La Taq DNA polymérase :

La Taq polymérase ajoute de manière préférentielle une adénine à l'extrémité 3' des amplicons si la dernière base complémentaire de la matrice est une thymine ou une cytosine (Tableau I.C.6.A et B). Si l'amplicon se termine déjà par une adénine en 3' alors l'activité extendase s'en retrouve très réduite (Tableau I.C.6.A.) (Hu, 1993). Enfin si une guanine termine en 3' l'amplicon, alors l'activité extendase catalyse l'ajout préférentiellement d'une guanine supplémentaire (Tableau I.C.6.A.) (Hu, 1993).

5.2.2. La Vent DNA polymérase :

La Vent polymérase est une enzyme souvent décrite sans la moindre activité extendase, ses amplicons se terminent donc à bouts francs. Il est vrai qu'environ 95% des amplicons produits par la Vent se terminent à bouts francs (Tableau I.C.6.B.).

Dans 5% des cas, elle catalyse l'ajout d'une adénine en 3' des amplicons qui se terminent par un T, un C ou un A (Tableau III A) (Hu, 1993; Kong et al., 1993), par contre si l'amplicon se termine par une guanine alors elle catalyse l'ajout d'un G, d'un C ou d'un A (Tableau I.C.6.A.) (Hu, 1993).

Notons que la Vent est pourvue d'une bonne activité exonucléase 3'-5' (Kong et al., 1993). La Vent (exo-) a été modifiée pour perdre son activité exonucléase 3'-5', 70% de ses amplicons se terminent à bouts francs. Enfin pour la Deep Vent, environ 95% des amplicons se terminent à bouts francs.

5.2.3. La Pfu DNA polymérase :

Cette polymérase thermostable est totalement dépourvue d'activité extendase quel que soit le nucléotide en 3' des amplicons, donc tous les amplicons Pfu possèdent des extrémités franches (Tableau I.C.6. A et B.) (Hu, 1993). La Pfu est souvent utilisée dans des PCR qui nécessitent une bonne fidélité, en effet celle-ci exhibe une activité correctrice (proofreading) puissante.

5.2.5. Conclusion :

L'activité extendase est à mettre en corrélation avec l'activité exonucléase 3'-5' (proofreading) des polymérases (Hu, 1993). Comme nous le verrons, l'activité extendase peut se révéler être un avantage pour le clonage, elle est cependant souvent associée à une moins bonne fidélité.

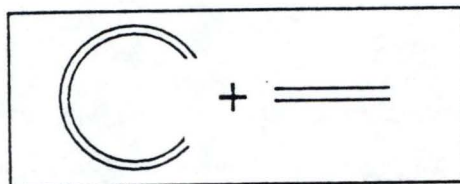
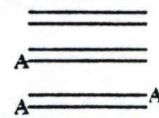
Figure I.C.18. : (Mullis, Ferré & Gibbs,1994)

Stratégies de clonage des amplicons.

A : Ligation d'amplicons à extrémités franches ou avec une adénine en extension en 3' dans un vecteur linéarisé à extrémités franches.

- Avant la PCR on peut phosphoryler les amorces en 5'. Cette opération devient obligatoire si le plasmide est déphosphorylé en 5'. On déphosphoryle les vecteurs en 5' pour limiter les chances de recircularisation du vecteur sur lui-même.
- Enlever les adénines en extension en 3' présentes si la PCR a été réalisée avec une enzyme dépourvue d'activité 3'-5' exonucléase.
- Effectuer la ligation.

After PCR, the reaction mixture contains the product in several forms:



5.3. Stratégies de clonage en fonction de l'activité extendase ou 3'-5' exonucléase des polymérases thermostables :

De manière générale 3 grandes stratégies existent pour cloner des amplicons (Mullis, Ferré & Gibbs, 1994) :

- Ligations à bouts francs.
- Ligations dans des vecteurs T.
- Produire des extrémités collantes par PCR dont les amorces génèrent des sites de restriction.

5.3.1. Les ligations à bouts francs :

Vent et Pfu DNA polymérases produisent des amplicons à bouts francs. Le clonage de tels amplicons peut se faire dans des vecteurs linéarisés à bouts francs par des endonucléases de restriction telles que Sma I ou Pvu II (Figure I.C.18.A) (Lohff et al.1991; Mullis, Ferré & Gibbs, 1994).

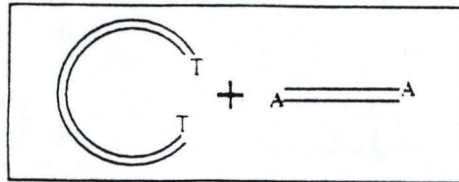
Ce type ligation peut se révéler problématique par sa faible efficacité, il existe cependant quelques moyens pour améliorer ce rendement (Lohff et al.1991; Mullis, Ferré & Gibbs, 1994).

Parmi ceux-ci, l'utilisation d'amorces phosphorylées en 5' (via la T4 Kinase) et la déphosphorylation du vecteur grâce à la phosphatase alcaline ayant pour effet de limiter les recircularisations des vecteurs sur eux-mêmes et donc de favoriser l'insertion de l'amplicon.

Il est également possible d'effectuer une ligation franche avec des produits de Taq DNA polymérase, dans ce cas il faut éliminer les nucléotides ajoutés par l'activité extendase de celle-ci. Le traitement des amplicons avec la T4 DNA polymérase (non thermostable) qui possède une bonne activité 3'-5' exonucléase permet d'ôter ces nucléotides aux extrémités 3' des amplicons (Lohff et al.1991; Mullis, Ferré & Gibbs, 1994). Les amplicons à bouts francs ainsi obtenus peuvent être ligués comme décrit ci-dessus.

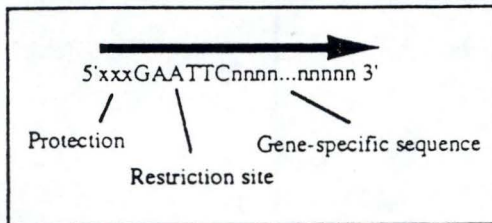
B :Ligation d'amplicons qui possèdent une adénine en extension en 3' dans un vecteur T.

-La PCR doit avoir été réalisée avec une polymérase sans activité 3'-5' exonucléase.



C :Ligation d'amplicons aux extrémités desquels on a ajouté grâce aux amorces un site de restriction.

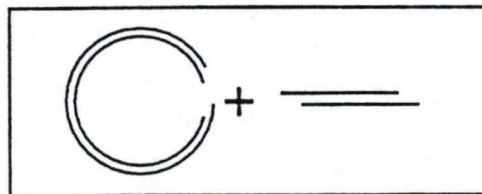
-Les amorces sont constituées de 3 segments : La séquence spécifique au gène ciblé.



Un site de restriction synthétique.

Un minimum de 3 bases additionnelles supplémentaires pour permettre à l'endonucléase de s'accrocher sur le site.

-Vecteur et amplicons sont alors digérés par des endonucléases qui génèrent des extrémités cohésives entre ceux-ci.



5.3.2. Ligations dans des vecteurs T :

La ligation dans un vecteur T est utilisée pour cloner des amplicons obtenus avec la Taq polymérase. L'activité extendase de la Taq favorise l'ajout d'une adénine supplémentaire en 3' des amplicons, ces derniers peuvent donc être clonés dans un vecteur possédant en 5' une thymine en extension (Figure I.C.18.B.). Ce type de ligation augmente nettement l'efficacité de ligation par rapport à celles obtenues avec des bouts francs. De tels vecteurs sont appelés vecteurs « T » (Saban et al., 1996).

5.3.3. Ligation d'amplicons générés par des amorces qui possèdent en 5' des sites de restriction synthétiques :

Il est possible lors de la PCR, d'utiliser des amorces qui génèrent des sites de restriction aux extrémités des amplicons. Par la suite ces sites de restriction peuvent servir pour réaliser une ligation classique entre extrémités collantes (Figure I.C.18.C.) (Mullis, Ferré & Gibbs, 1994).

5.3.4. Remarques :

La ligation d'amplicons « A » dans des vecteurs « T » n'est pas nécessairement la solution idéale. En effet, il est aujourd'hui démontré que la dernière base ajoutée à l'amplicon n'est pas toujours une adénine et les enzymes qui produisent des amplicons « A » n'ont pas d'activité correctrice (proofreading) (Hu, 1993).

L'utilisation de vecteurs T entraîne donc deux conséquences :

- Il n'y a pas de garantie de clonage dans les vecteurs T.
- La fidélité de l'amplicon est moins bonne car on utilise une polymérase sans activité correctrice.

5.3.5. Amélioration de l'efficacité de clonage dans un vecteur T :

Une augmentation du temps d'élongation final de 10 minutes à 1 heure permet d'améliorer l'efficacité de clonage dans un vecteur T. On obtient alors 75% de clones positifs supplémentaires (Saban et al., 1996). Le temps d'élongation final apparaît donc comme déterminant dans l'obtention d'une population d'amplicons sur lesquels la Taq a exercé son activité extendase.

5.4. Conclusion :

Les difficultés rencontrées au cours du clonage dans les vecteurs T sont aujourd'hui expliquées, elles reposent essentiellement sur le fait que des enzymes dépourvues d'activité proofreading n'ajoutent pas systématiquement une adénine en 3' des amplicons (Hu, 1993). Les problèmes de clonage et de fidélité ne sont donc pas indépendants. La tendance actuelle dans le milieu scientifique est à l'utilisation des polymérases les plus fidèles possibles et au clonage à extrémités franches (Lohff et al.1991; Mullis, Ferré & Gibbs, 1994).

6. Efficience de la PCR :

6.1. Introduction :

L'efficience de la PCR se rapporte à la fois à la spécificité de l'amplification, mais aussi au rendement de la réaction. Optimiser l'efficience PCR revient donc à améliorer sa spécificité mais aussi son rendement.

6.2. Paramètres de l'efficience :

Les paramètres intervenant dans l'optimisation de l'efficience PCR sont :

- La nature des amorces.
- La température et le temps d'hybridation des amorces.
- La nature de la polymérase et sa concentration.
- Le type de PCR.
- L'utilisation d'additifs tels que le DMSO, la BSA, le SSB ,.
- Les concentrations en sels, Mg^{++} , amorces, ADN matrice.

Parmi ces paramètres, nombreux sont ceux qui sont dépendants les uns des autres, par exemple le choix des amorces et la température d'hybridation, ou encore la concentration en matrice et la concentration en amorces. Reprenons systématiquement chacun de ceux-ci :

6.2.1. La nature des amorces (primer) :

Le choix des amorces les plus adéquates peut se faire relativement facilement à condition de suivre quelques règles de base (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990; Griffin & Griffin; Mullis, Ferré & Gibbs; 1994) :

- Utiliser un minimum de 18 bases par amorce car en dessous il n'y a pas de garantie de spécificité. En pratique des amorces de 20 à 30 bases sont utilisées. Les amorces les plus longues sont utilisées dans des PCR sur ADN génomique (25 à 35 bases).
- Avoir une bonne distribution des bases puriques et pyrimidiques dans l' amorce. La proportion de ces bases doit se situer entre 45 et 55%. Cela permet à la température de fusion de rester dans une fourchette acceptable.
- En effet un pourcentage important en GC entraîne une augmentation rapide de la température de fusion et un risque d'hybridation non spécifique sur certaines séquences riches en GC. Le problème des séquences riches en GC est que la région de l'amorce ainsi constituée peut se comporter en quelque sorte de manière individuelle car les ponts hydrogènes qu'elle peut former lui donnent une bonne thermostabilité.
- Eviter des régions anticcomplémentaires entre couples d'amorces afin de prévenir la formation de dimères.
- Eviter des régions anticcomplémentaires d'une amorce sur elle même responsables de la formation de boucles (loop, hairpins). Si la température d'hybridation est élevée il est rare que celles-ci posent problèmes.
- Enfin il est utile de vérifier par un alignement de séquences que les séquences des amorces sont bien spécifique sur leur matrice. Cela est particulièrement important si l'on travaille sur des matrices de grandes tailles comme de l'ADN génomique.

6.2.2. La température d'hybridation :

La température d'hybridation est primordiale pour la spécificité de l'amplification, si elle est trop basse l'amplification est non spécifique et si elle est trop élevée soit on n'a pas d'amplification, soit l'amplification est négligeable (Rychlik et al., 1990). Plusieurs méthodes mathématiques ont été développées pour calculer la température de fusion des amorces, celles-ci ont été introduites dans divers programmes plus ou moins performants. Ces programmes utilisent en général les formules classiques suivantes :

$$T_f = 2*(A+T) + 4*(G+C)$$

ou

$$T_f = 81,5 + 0,41(\%G+\%C) + 16,6 \log (\text{conc } K^+) - 675/L$$

La température d'hybridation est ensuite déterminée en retirant 5 à 10°C à la température de fusion (Griffin & Griffin; Mullis, Ferré & Gibbs; 1994). Cependant plusieurs reproches peuvent être formulés vis-à-vis de cette méthode :

- Le caractère arbitraire du retrait de 5 ou 10°C de la température de fusion.
- La concentration en amorce et la température de fusion de la matrice ne sont pas prises en compte.
- les différences obtenues selon les méthodes de calcul.

C'est pour ces différentes raisons qu'une troisième méthode est souvent conseillée, le calcul de la température d'hybridation optimale (Rychlik et al., 1990 ;Griffin & Griffin; Mullis, Ferré & Gibbs; 1994) :

a) Calcul de la température d'hybridation optimale :

La température $T_h \text{ opt}$ (Température optimale d'hybridation) est la température d'hybridation à laquelle non seulement le produit PCR est spécifique mais ou en plus le rendement est maximum. Le modèle obtenu montre une concordance frappante avec les mesures expérimentales. Ainsi les $T_h \text{ opt}$ théoriques sont proches de plus ou moins 0,7°C des $T_h \text{ opt}$ expérimentales (Rychlik et al., 1990).

1-Détermination de la température optimale d'hybridation (Rychlik et al., 1990; Griffin & Griffin ,1994) :

La formulation est la suivante :

$$T_h \text{ opt} = 0,3 T_f \text{ amorce}^* + 0,7 T_f \text{ produit} - 14,9$$

où :

- Tf amorce* est la température de fusion de l'amorce dont la Tf est la plus basse.
- Tf produit est la température de fusion du produit d'amplification.

2-Température de fusion du produit d'amplification (Rychlik et al., 1990; Griffin & Griffin ,1994) :

La température de fusion du produit se calcule comme suit :

$$T_f \text{ produit} = 81,5 + 0,41(\%G + \%C) + 16,6 \log (\text{conc } K^+) - 675 / L$$

où :

- Conc K⁺ est la concentration en cations monovalents dans le mélange PCR.
- L est le nombre de paires de bases du fragment amplifié.

Si on considère une réaction PCR standard avec 50mM en KCl, la formule se simplifie et devient :

$$T_f \text{ produit} = 59,9 + 0,41 (\%G + \%C) - 675 / L$$

3-Température de fusion de l'amorce (Rychlik et al., 1990; Griffin & Griffin ,1994) :

La température de fusion de l'amorce est calculée par la formule suivante :

$$T_f \text{ amorce}^* = (\Delta H / \Delta S + R \ln (c/4)) - 273,15 + 16,6 \log (\text{conc } K^+)$$

où :

- ΔH représente l'enthalpie pour la formation de la double hélice de l'amorce avec sa matrice.
- ΔS idem ci-dessus pour l'entropie.
- R est la constante des gaz parfaits.
- c la concentration molaire de l'amorce considérée.
- conc K⁺, la concentration en ions monovalents du mélange PCR.

L'enthalpie et l'entropie de formation du duplex ne sont cependant pas directement accessibles puisqu'il faut connaître la constante d'équilibre de l'association et de la dissociation du système. La température de fusion de l'amorce peut cependant être estimée de manière moins rébarbative par la formule qui suit et être introduite dans l'équation de la T_h opt. On note dans ce cas une erreur un peu plus importante dans la détermination de la température d'hybridation, mais l'approximation de la T_h opt reste très bonne (Rychlik et al., 1990; Griffin & Griffin, 1994).

$$T_f \text{ amorce} = 2 AT + 4 GC$$

b) Conclusions :

Dans tous les contrôles réalisés cette méthode de calcul a donné une approximation fidèle de la température d'hybridation expérimentale optimale. Les résultats sont concordants que ce soit sur ADN plasmidique ou sur ADN génomique.

Ces équations ne sont cependant pas valables dans le cas de formations de dimères d'amorces.

Comme la concentration en amorce est une variable qui entre en compte dans le calcul de T_h opt et que cette concentration diminue au cours du temps alors que celle de la matrice augmente, il a été proposé que la T_h opt se modifiait au cours de la PCR (Rychlik et al., 1990; Griffin & Griffin, 1994).

On constate en pratique que pour un ADN plasmidique si on part d'une T_h inférieure de quelques °C à la T_h opt et que l'on augmente la T_h de 1°C tous les 2 cycles alors le rendement est meilleur de 30% par rapport à un contrôle dont la T_h utilisée était la T_h opt dès le départ (up PCR) (Rychlik et al., 1990). Mais aucun phénomène de ce type ne s'observe pour une amplification directe sur ADN génomique (Rychlik et al., 1990).

La formulation mathématique qui permet de déterminer la T_h opt est d'une meilleure précision par rapport aux autres méthodes de calcul car elle tient compte d'un nombre de paramètres supérieurs :

- T_f la plus basse du couple d'amorce.
- T_f de la matrice.
- concentration en sels monovalents.

L'utilisation de ces formules est préconisée en outre par Perkin-Elmer.

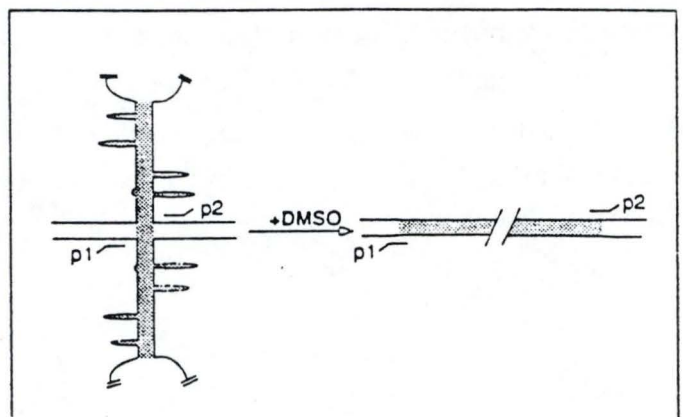


Figure I.C.19. : (Shen et al., 1992).

Le DMSO déplie les structures secondaires d'ADN.

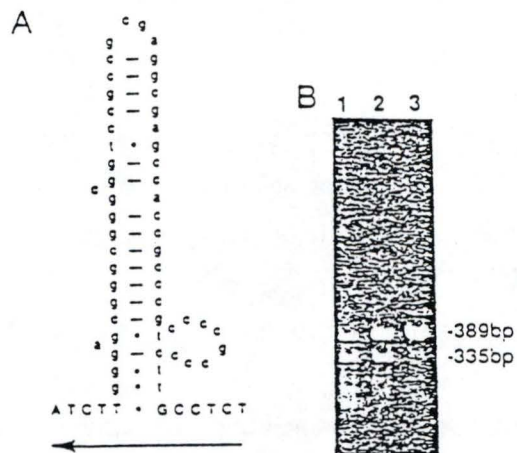


Figure I.C.20. : (Chou, 1992)

Le gène de l'ARN ribosomal 18S comporte une structure secondaire d'une cinquantaine de paires de bases (A). Une PCR avec la Taq polymérase entraîne la production de deux types d'amplicons, un amplicon complet de 389 pb et un amplicon tronqué de 335 pb (B, piste 1). Des concentrations croissantes en SSB font disparaître le fragment de 335 pb au profit du fragment 389 pb (B, piste 2). La SSB déplie les structures secondaires de l'ADN.

6.2.3. Le temps d'hybridation :

Au plus le temps d'hybridation est court au plus l'hybridation sur l'ADN matrice aura de chance d'être spécifique mais on obtiendra moins d'amorces hybridées sur l'ADN cible (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990).

Le temps d'hybridation des premiers cycles peut donc être allongé pour compenser cet effet surtout si il y a peu de matrice au départ (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990).

6.2.4. La nature de la polymérase :

Nous avons déjà précisé le rôle important du choix de la polymérase, leur thermostabilité, la concentration en sels, le pH optimum, leur activité 5'-3' exonucléase sont autant de paramètres dont il faut tenir compte pour obtenir une amplification spécifique. L'isolement du promoteur M-CSF décrite dans ce travail en est une bonne illustration.

Un des critères fondamentaux dans le choix de la polymérase est de vérifier si ses caractéristiques de thermostabilité (résistance aux T° de dénaturation, T° d'élongation et d'hybridation) sont compatibles avec la température de dénaturation de la cible et la température d'hybridation optimale calculée (Griffin & Griffin, 1994).

6.2.5. Le type de PCR que l'on effectue :

Nous avons déjà décrit quelques types de PCR, parmi celles-ci la "touchdown", la "nested" et l'"heminested" permettent d'améliorer la spécificité si celle-ci n'est pas bonne en "simplex" PCR.

6.2.6. Additifs pouvant améliorer l'efficiéce de la PCR :

a) Le DMSO (Dimethyl sulfoxyde) :

Le DMSO est une molécule capable de réduire les hybridations non spécifiques et permet de dénaturer les structures secondaires de l'ADN (Figure I.C.19.) (Shen et al., 1992). Cependant à haute concentration celui-ci inhibe l'activité de polymérase (Griffin & Griffin, 1994).

A faible concentration (0,9 à 2%) le DMSO améliore fortement l'efficacité de l'hybridation des amorces sur leur cible spécifique et en particulier si l'amorce est courte et ou riche en AT (Shen et al., 1992). Le mode d'action du DMSO est encore inconnu, mais actuellement on conseille souvent son utilisation à raison de 1%, en effet à une telle concentration, son effet se révèle souvent bénéfique.

Le DMSO agit également en diminuant la température de fusion des amorces et de la matrice. Cette dernière est donc dénaturée à plus basse température, alors que l'hybridation se fera dans des conditions plus stringentes (Chester & Marshak, 1992).

b) Minimisation des mutations de délétion durant les PCR via l'utilisation de SSB :

Nous avons mentionné la possibilité de délétions dans les amplicons PCR suite à la présence de structures secondaires en boucles dans la matrice. Ces structures secondaires se forment au cours de l'hybridation dans les matrices alors simples brins. De telles structures peuvent se maintenir au cours de la PCR quand leur énergie libre est supérieure à -14 Kcal / mol (Chou, 1992). La Taq polymérase a une faible processivité et donc elle ne surmonte pas bien de tels obstacles. Cependant l'utilisation de la protéine nucléaire d'*E.coli* Eco SSB dans le mélange PCR permet d'éliminer les mutations de délétion (Figure I.C.20.) (Chou, 1992).

La protéine SSB intervient dans la fourche de réplication en empêchant le réappariement des brins anticcomplémentaires et en maintenant ceux-ci déroulés (Rawn, 1990). Au cours de l'élongation, la polymérase déplace les SSB du simple brin.

La SSB est ajoutée en début de PCR, elle subit donc l'étape de dénaturation mais ne semble pas en être affectée, elle conserve ses propriétés.

Le rapport molaire entre Eco SSB et la concentration totale en matrice simple brin au départ doit être de 0,7 (Chou, 1992). L'utilisation de la SSB, au même titre que le DMSO, peut donc se révéler utile dans des applications de la PCR visant à amplifier des fragments présentant des structures secondaires.

6.2.7. La concentration en magnésium :

Le magnésium joue un rôle primordial dans la réaction PCR en tant que cofacteur de polymérases. Il intervient également à d'autres niveaux, il est partiellement titré par les

dNTPs et la matrice, puis par la suite par les amplicons (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990).

Son rôle au niveau de la matrice est la neutralisation des charges négatives présentes sur les phosphates du squelette de l'ADN de manière à stabiliser les doubles brins. Dès lors une faible concentration en magnésium facilite le désappariement de la matrice et rend plus stricte les conditions d'hybridation des amorces, la spécificité en est ainsi améliorée (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990).

Cependant la concentration en magnésium doit rester optimale pour l'activité de la polymérase, cela limite donc la fourchette de concentration sur laquelle on peut jouer.

Pour la plupart des polymérases la concentration optimale en Mg^{++} est de 1,5 à 2 mM et on considère que la concentration en Mg^{++} peut être abaissée entre 0,5 et 1 mM si on veut conserver une bonne activité enzymatique (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990).

6.2.8. La concentration en matrice et en amorces :

Ces deux paramètres sont dépendants l'un de l'autre, c'est pourquoi ils sont rassemblés dans ce paragraphe. De manière générale la règle qui prévaut dans le rapport des concentrations matrices-amorces est la suivante, si la concentration en matrices augmente, il faut alors diminuer la concentration en amorces. Si on a une concentration en amorces trop élevée par rapport à la concentration en matrices alors des amplicons non spécifiques apparaissent.

Un tel paramètre est surtout important à optimiser en "nested" PCR, l'amplification et la spécificité de la première PCR déterminera le succès de la seconde. Il a été démontré que l'utilisation d'une faible concentration en amorces lors de la première PCR, suivie au cours de la seconde d'une concentration plus élevée en amorces améliorerait la spécificité et le rendement de l'amplification (Igarashi et al., 1991).

Lors de la première PCR on conseille une concentration de 0,1 à 1 nM en amorces (Igarashi et al., 1991). A ce stade aucun amplicon n'est détectable puisqu'en "nested" l'amplification se fait souvent sur des séquences cibles en faible concentration. Lors de seconde PCR on utilisera une concentration en amorces de 5, 10 à 25 nM pour des dilutions respectives du produit de première PCR de 10^{-4} à 10^{-6} . On a pour ces rapports de concentration matrices-amorces la meilleure spécificité puisqu'aucun amplicon non spécifique n'est détecté (Igarashi et al., 1991).

Evidemment cette étude n'a été menée que sur 3 types de matrices avec leurs amorces correspondantes.

La concentration de matrice souvent préconisée pour des PCR simples sur ADN génomique humain est de 100 ng (plus ou moins 10.000 exemplaires) (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990), certains utilisent jusqu'à 1 µg, mais à concentration trop élevée la viscosité du milieu augmente et il y a inhibition de la réaction. La concentration en amorces utilisée dans ce type de PCR est de l'ordre de 10 nM à 50 nM (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990).

Dans les PCR sur ADN génomique le problème est le suivant, étant donné que la matrice est relativement grande, il devient difficile pour les amorces de trouver leur séquence cible spécifique, d'autant plus si elle est unique. Pour augmenter les chances que ces amorces ont de trouver leur cible, il faut augmenter leur concentration, mais celle-ci augmentant, on prend le risque d'amplifications non spécifiques. C'est pourquoi la "touchdown" PCR, dans le cas d'amplification sur ADN génomique, est un outil intéressant puisqu'elle permet de partir avec une concentration élevée en amorces en évitant des hybridations aspécifiques, du moins dans les premiers cycles (Don et al., 1991).

6.2.9. La concentration en polymérase :

Une faible concentration en polymérase aboutit soit à une amplification faible, soit nulle. Par contre à haute concentration on risque d'avoir des amplicons non spécifiques. De manière générale il est conseillé d'utiliser de 1 à 2,5 unités d'enzyme par mélange réactionnel (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990). A cette concentration, un bon rapport spécificité rendement est maintenu.

6.3. Conclusions :

Les paramètres qui interviennent dans l'efficience de l'amplification sont nombreux, il est donc difficile de les gérer tous lorsque l'on veut effectuer une optimisation de la PCR ou si l'on désire tout simplement la mettre au point.

En général la mise au point de PCR sur ADN plasmidique pose peu de problèmes, mais en ce qui concerne l'ADN génomique eucaryote il est souvent nécessaire de travailler au cas par cas. Ainsi certaines amplifications se font sans difficultés, d'autres nécessitent des mises au point plus pointues pour parfois se solder par des échecs.

7. Conclusion générale :

La PCR est une technique de biologie moléculaire puissante au principe relativement simple, celle-ci fait appel à de nombreux paramètres ce qui d'un autre côté la rend complexe. Son application s'étend à de nombreux domaines, de la recherche à la médecine en passant par la médecine légale.

Dans le cadre de ce travail sera décrit l'amplification par PCR d'une séquence promotrice d'ADN présente en faible quantité dans le génome humain et comme on le verra, particulièrement difficile à amplifier. Il y sera illustré la démarche suivie pour obtenir une amplification décente et on y retrouvera les divers paramètres explicités dans ce chapitre. On montrera que la PCR peut se révéler aussi bien aisée qu'ardue.

**MATERIEL ET
METHODES**

II. Matériel et méthodes :

1. Souches bactériennes et plasmides :

1.1. Souches bactériennes :

1.1.1. *E. coli XL-1 Blue* : (Stratagène)

Cette souche bactérienne présente quelques particularités intéressantes :

- Rec A1 : Réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène.
- End A1 : Améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléases.

La souche *XL-1 Blue* est partiellement délétée sur 93 pb au niveau de l'opéron lactose sur le gène Lac Z α codant pour la β -galactosidase et est donc incapable de métaboliser le lactose, cette particularité permet la complémentation de Lac Z α par un plasmide portant le gène Lac Z α complet. Les bactéries capables de métaboliser le lactose ont un phénotype bleu alors que les autres sont blanches. Une sélection blanc, bleu peut donc être effectuée pour repérer les bactéries transformées. L'épisome F' codant pour des pili sexuels porte entre autre le Transposon Tn 10 codant pour le marqueur sélection de la résistance à la tétracycline (Tet r).

Génotype complet : e14 (mcrA), Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 171, sbcC, recB, recJ, umuC ::
Tn5, uvrC, supE44, lac, gyrA96, relA1, thi-1, endA1, (F'proAB,
lacI Z Δ M15, Tn 10, (Tet r)).

1.1.2. *E. Coli Sure* : (Stratagène)

Comme *XL-1 Blue*, cette souche est End A1 et est résistante à la tétracycline grâce au Tn 10 présent sur l'épisome F'. Elle est aussi partiellement délétée au niveau de l'opéron lactose en Lac Z α .

Cette souche est cependant particulière pour son génotype Rec B et Rec J permettant d'avoir un taux de recombinaison quasiment nul et beaucoup plus faible que chez *XL-1 Blue*.

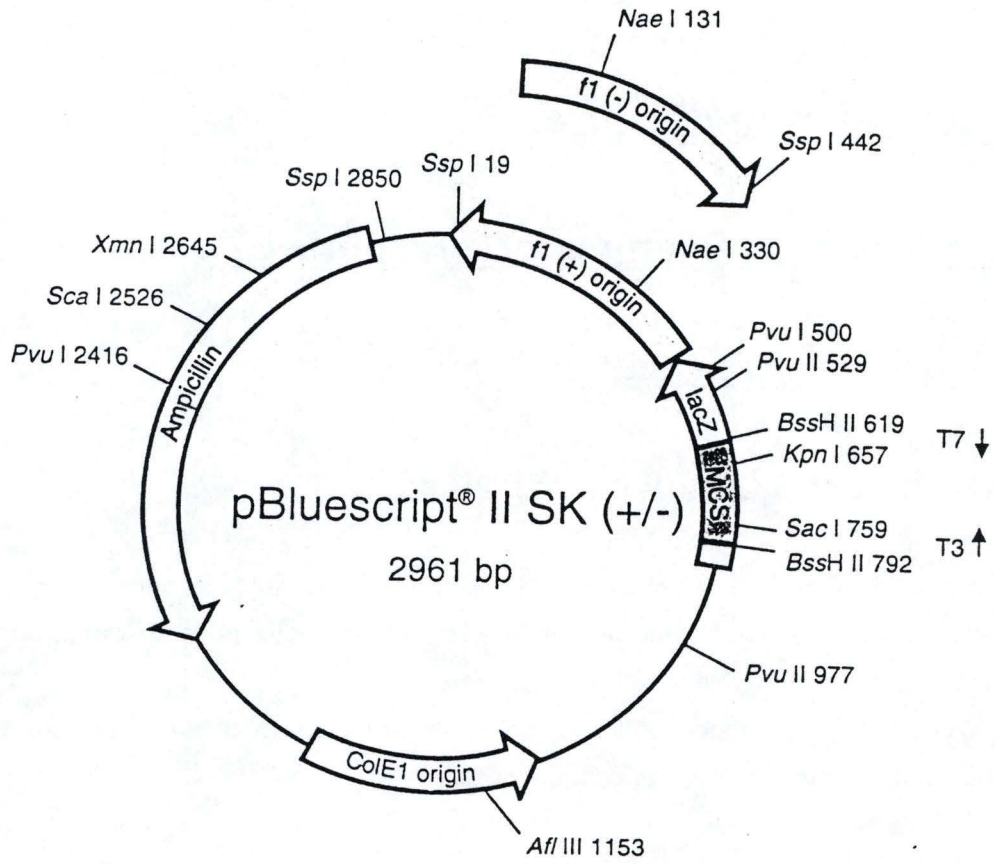


Figure II.1. :

Représentation schématique du vecteur pBSK II (Stratagène) .

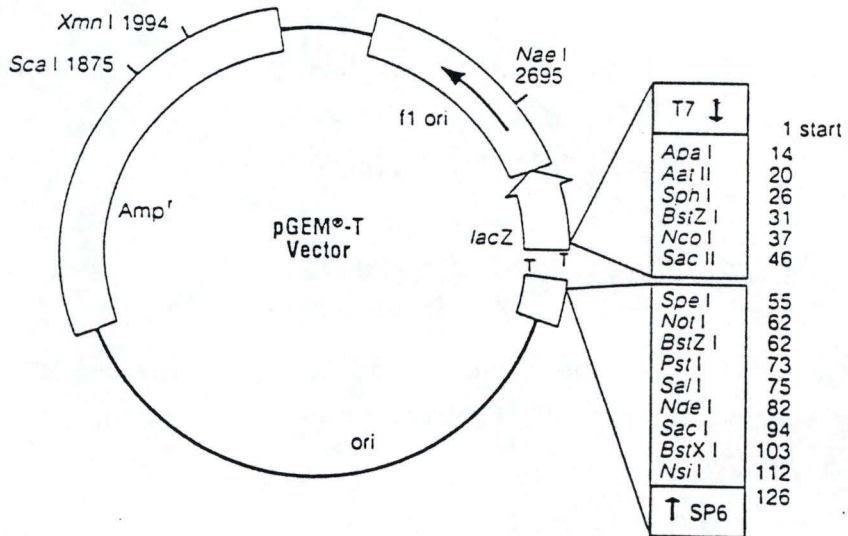


Figure II.2. :

Représentation schématique du vecteur pGEM-T (Promega) .

Cette souche est surtout utilisée pour cloner des fragments d'ADN à forte tendance recombinatoire comme ceux présentant des séquences microsatellites ou des répétitions inversées (inverted repeats).

Génotype complet : recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, (F'proAB, lacI ZDM15, Tn10 (Tet r)).

1.2. Plasmide bactérien et eucaryote :

1.2.1. pBluescript II SK +/-Phagemid (Stratagene, La Jolla, USA) :

pBluescript II (Stratagène) (Figure II.1.) est un phagemide, c.à.d. un hybride entre un plasmide et un phage. Sa taille est de 2961 pb, il porte une origine de réplication bactérienne (Col E1 ORI) et phagique (f1).

Le gène de résistance à l'ampicilline permet de sélectionner les bactéries transformées et l'élément Lac Z α permet une α -complémentation chez des souches bactériennes telles que *E. Coli Sure* ou *XL-1 Blue* utilisée pour la sélection des clones possédant un plasmide recombinant ou non (sélection blanc-bleu).

Le MCS (site multiple de clonage) est situé dans l'élément Lac Z α , il est flanqué par les séquences T7 et T3, séquences promotrices des ARN polymérase phagiques.

1.2.2. pGEM-T (Vecteur T; Promega, Madison, USA) :

Le vecteur plasmidique pGEM-T (Figure II.2.) est préparé à partir du vecteur pGEM-5zf (Promega, Madison, USA).

Il s'agit d'un vecteur de clonage classique portant un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication procaryote, un site multiple de clonage présent dans l'élément Lac Z α utilisé pour effectuer la sélection blanc-bleu. Le MCS (site multiple de clonage) est flanqué par les séquences promotrices T7 et SP6.

Le vecteur pGEM-T est utilisé pour cloner des produits PCR possédant une adénine terminale 3' en extension. La sélection des clones recombinants est de type blanc-bleu.

Pour obtenir le vecteur pGEM-T, pGEM-5zf a été linéarisé en bouts francs au niveau du site de restriction Eco RV, ensuite un T terminal est ajouté aux extrémités 3' franches, de cette manière le vecteur ne peut se recirculariser.

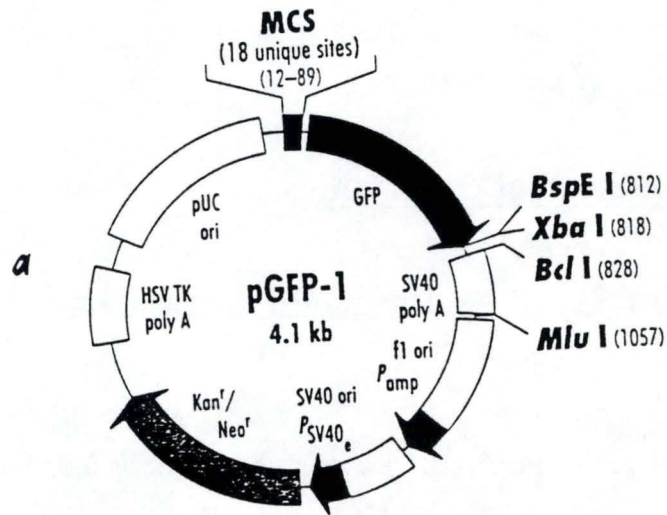
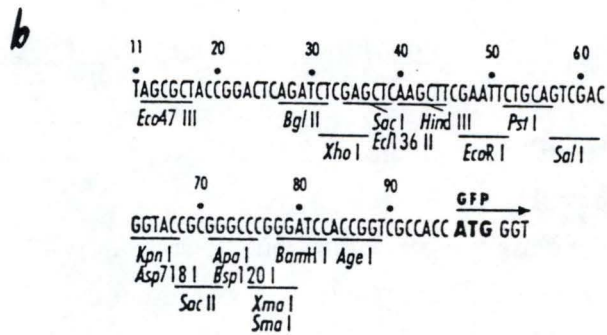


Figure II.3. :

Représentation schématique du vecteur pGFP-1 (Clontech) .

a. Carte plasmidique.

b. (Site multiple de clonage) et consensus de Kozak.



1.2.2. pGFP-1 promoter reporter vector (Clontech, Palo Alto, USA)) :

Ce plasmide est un vecteur reporter eucaryote (Figure II.3.a). Le gène reporter est celui de la Green Fluorescent Protein (GFP) isolé de méduses phosphorescentes. Sous illumination fluorescente (489 nm) la protéine réémet un rayonnement dans le visible de couleur verte. Des cellules exprimant cette protéine peuvent donc être visualisées en microscopie à fluorescence.

Au sein du plasmide, le gène GFP n'est pas précédé par un promoteur mais par le site multiple de clonage (MCS) permettant d'y insérer une séquence promotrice.

Le MCS est constitué d'un consensus de Kozak (Figure II.3.b) qui augmente l'efficacité de traduction chez les eucaryotes. La séquence codante du GFP se termine par une séquence poly A qui permet un processing correct des ARNm de GFP dans une cellule eucaryote. Le plasmide possède aussi une origine de réplication SV 40 ce qui lui permet de rester stable dans une lignée cellulaire transformée par le SV 40. Le gène de résistance à la néomycine permet une sélection des cellules eucaryotes.

Le plasmide possède une origine de réplication bactérienne (pUC 19) et un gène de résistance à la kanamycine ce qui permet de réaliser des étapes d'amplification (miniprep, midiprep) à partir de cultures bactériennes.

2. Préparation de bactéries électrocompétentes et CaCl_2 compétentes :

2.1. Electroporation :

L'électroporation est une méthode de transformation de bactéries, où un choc électrique permet l'introduction d'ADN exogène dans la bactérie.

2.1.1. Bactéries électrocompétentes :

(Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith & Struhl; 1994)

- Inoculer 1 L de LB (Luria Bertani) liquide avec ou sans antibiotique (Tet pour *XL-1 Blue* et *Sure*) avec 1 ml d'une culture fraîche de bactérie.
 - Incuber la culture à 37°C sous forte agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la culture ait atteint une densité optique (D.O.) de 0,5 à 0,8 à 590 nm (Fin de la phase croissance).
 - Placer la culture 15 à 30 minutes dans la glace afin de stopper la croissance cellulaire, puis centrifuger pendant 15 minutes à 3000 rpm (Beckman J-21, rotor JA-14), 4°C.
 - Éliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 1 litre d'eau distillée stérile froide (4°C) (d.s.f.).
 - Centrifuger comme précédemment.
 - Resuspendre dans 0,5 L d'eau d.s.f. et centrifuger de même.
 - Resuspendre dans 20 ml d'eau d.s.f. contenant 15% de glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne). Centrifuger.
 - Resuspendre dans un volume final de 2 à 3 ml d'eau d.s.f. contenant toujours 15% de glycérol.
- La concentration cellulaire est d'environ 1 à 3.10^{10} cellules / ml.
- Cette suspension doit être aliquotée sur glace et conservée à -70°C pendant environ 6 mois.

2.1.2. Méthode : Electroporation.

(Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith & Struhl; 1994)

- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
- Placer sur glace les cuvettes d'électroporation préalablement nettoyées à l'éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne) et passées sous UV 5 minutes.
- Placer la préparation d'ADN plasmidique ou de ligation sur glace.
- Prélever 100 µl de cellules compétentes et les placer dans la cuvette d'électroporation.
- Ajouter dans la cuvette de 1 à 5 µl d'ADN plasmidique ou de ligation, éliminer les bulles de la cuvette par de petites agitations puis replacer sur glace pendant 30 secondes.
- Sècher la cuvette avant de l'introduire dans l'électroporateur.(BIO RAD Gene Pulser Tf)
- Régler l'appareil sur :
 Capacitance 25 uF
 Résistance 200 Ohms
 Différence de potentiel 22,5 KV/cm

-Décharger le condensateur.

-Ajouter rapidement 1 ml de SOC.

SOC :

0,5% extraits de levures (Difco, Detroit, USA)

2% tryptone (Sigma, St Louis, USA)

10 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)

10 mM MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Allemagne)

20 mM glucose (Merck, Darmstadt, Allemagne)

-Transférer dans un eppendorf et incuber 1 heure à 37°C.

-Etaler sur milieu sélectif solide et laisser pousser une nuit à 37°C.

2.2. Transformation CaCl₂ :

Le principe de la transformation CaCl₂ fait aussi appel à la perméabilisation des parois bactériennes. La formation de pores dans la parois étant réalisée par incubations successives des cellules dans une solution de CaCl₂ de faible force ionique et par un choque thermique.

2.2.1. Bactéries CaCl₂ compétentes :

(Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith & Struhl; 1994)

-Inoculer 1 colonie de souche *E. coli* dans 50 ml de milieu de culture LB additionné ou non d'antibiotique (Tet pour *XL-1 Blue* et *Sure*). Incuber une nuit à 37°C sous agitation modérée.

-Inoculer 400 ml de LB (avec ou sans antibiotique) avec 4 ml de préculture. Laisser pousser à 37°C sous agitation modérée jusqu'à ce que la densité optique de la culture à 590 nm aie atteint 0,375 (Phase de croissance exponentielle). Au delà de 0,4 les cellules obtenues ont une compétence moindre.

-Aliquoter 100 ml dans 4 cylindres stériles et laisser sur glace pendant 10 minutes.

-Centrifuger 7 minutes à 3000 rpm (Beckman J-21B, rotor JA-14), 4°C.

-Resuspendre chacun des culots dans 20 ml d'une solution de CaCl₂ stérile froide (4°C).

Solution de CaCl₂ :

60 mM CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Allemagne)

15% glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne)

10 mM PIPES (pH=7) (Sigma, St Louis, USA)

autoclaver

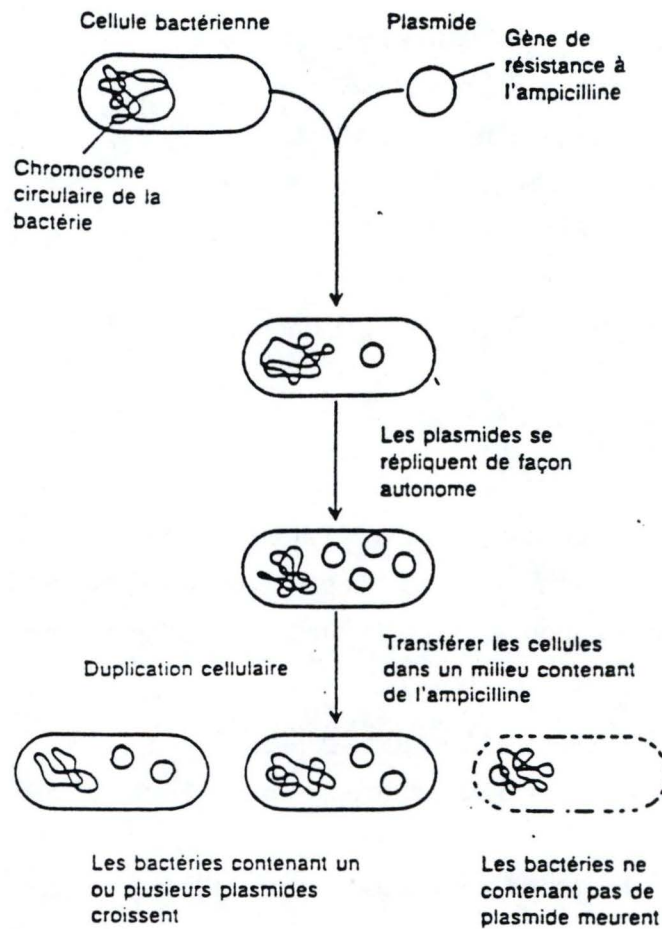


Figure II.4. :

Transformation bactérienne par choc thermique.

Un plasmide porteur d'un gène de résistance peut pénétrer suite à un choc thermique dans une bactérie dont la paroi a été perméabilisée au chlorure de calcium (cellules compétentes). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu contenant l'antibiotique dont la résistance est encodée par le plasmide.

- Centrifuger 5 minutes à 2500 rpm (Beckman J-21B, rotor JA-14), 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 20 ml d'une solution de CaCl₂ froide. Laisser sur glace 30 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à 2500 rpm (Beckman J-21B, rotor JA-14), 4°C. Enlever le surnageant et resuspendre dans 4 ml de solution de CaCl₂ froide.
- Aliquoter sur glace et conserver à -70°C et ou utiliser directement pour une transformation. Les cellules CaCl₂ directement utilisées après leur préparation montrent un taux de transformant nettement supérieur à celles stockées à -70°C.

2.2.2. Méthode : choc thermique :(Figure II.4.)

(Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith & Struhl; 1994)

- Dégeler sur glace un aliquot de 100 µl de bactéries CaCl₂ compétentes.
- Ajouter de 10 à 100 ng d'ADN exogène (plasmide, mélange de ligation) aux bactéries et mélanger.
- Laisser reposer sur glace 10 minutes.
- Placer 2 minutes dans un bain à 42°C (heat shock).
- Ajouter de 500 à 1000 µl de milieu LB à la suspension bactérienne.
- Incuber à 37°C pendant 15 à 60 minutes.
- Etaler sur milieu solide pendant une nuit à 37°C.

3. Préparation des milieux de culture :

(Sambrook, Fritsch & Maniatis; 1989)

3.1. Le milieu Luria Bertani (LB) :

Composition :

Hydrolysate de caséine (peptone) (GIBCO, Paisley, Grande-Bretagne): 1%

NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) : 0,5%

Extraits de levure (Difco, Detroit, USA) : 0,5%

- Autoclaver 15 minutes à 120°C. Si on veut y rajouter un additif (antibiotique) alors laisser refroidir.
- Le milieu LB liquide avec ou sans additif peut être stocké à 4°C.

Le milieu LB solide est de même composition mais additionné de 2% d'agar (Difco, Detroit, USA).

-Après autoclave, laisser refroidir la solution dans un bain à 55°C.

-A cette température les additifs et le(s) antibiotique(s) peuvent être ajoutés.

-Couler ensuite rapidement sur boîte de pétri et laisser solidifier.

-Quand le milieu est bien solide ouvrir les boîtes sous hotte et laisser sécher environ 30 minutes.

3.2. Additifs et concentrations utilisés:

Additif :	Abréviation :	concentration stock :	concentration finale :
Ampicilline	Amp	500mg/ml	100ug/ml
Tetracycline	Tet	5mg/ml(EtOH)	50ug/ml
5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-b-D-galactotryptone	X-gal	50mg/ml	40ug/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactoside	IPTG	200mg/ml	40ug/ml

Ampicilline (Sigma, St Louis, USA), Tetracycline (Sigma, St Louis, USA), IPTG (Promega, Madison, USA), X-gal (Promega, Madison, USA).

4. Extraction d'ADN plasmidique :

(Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith & Struhl; 1994)

4.1. Minipréparation d'ADN plasmidique :

Une minipréparation d'ADN comprend 5 étapes : La lyse alcaline des bactéries, la précipitation des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et enfin sa resuspension.

Méthode :

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie isolée issue d'une culture en milieu solide.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation (250 rpm).
- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un eppendorf, 5 minutes à 15 000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379) et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre ce culot dans 300 µl de P1 (avec RNase A).
- Ajouter 300 µl de P2 et mélanger doucement, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de P3 et mélanger doucement, incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C, 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379) et récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,8 volume d'isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne), homogénéiser en agitant lentement.
- Centrifuger 15 minutes, 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379) et éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN en ajoutant 300 µl d'éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne) 70% et recentrifuger pendant 15 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379), 4°C.
- Éliminer l'éthanol et sécher sous hote ou sous vide.
- resuspendre dans 20 µl d' H₂ O distillée stérile.

Solutions et tampons :

Solutions du Kit Nucleobond AX100.

-Tampon P1 : (stock à 4°C)

RNAse A 100 µg/ml

Tris-HCl 50 mM

EDTA 10 mM

-Tampon P2 : (Stock à température ambiante)

NaOH 200 mM

SDS 1%

-Tampon P3 : (stocké à 4°C)

Kac 3,0 M, pH 5,5

-Ethanol 70% (Merck, Darmstadt, Allemagne) : (Stock à -20°C)

4.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d'*E. Coli* :

(Kit Nucleobond AX 100)

Cette technique comprend l'utilisation du kit Nucleobond et d'une colonne échangeuse d'anions qui permet de préparer l'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN, l'ADN génomique.

Méthode :

-Préculture : Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) avec une colonie bactérienne.

-Ensemencer 100 ml de ce même milieu liquide avec 1ml de préculture.

-Incuber la culture une nuit à 37°C sous agitation forte.

-Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 15 minutes (Beckman J-21B, rotor JA-14), éliminer le surnageant.

-Resuspendre le culot dans 4 ml de P1.

-Ajouter 4 ml de P2 et mélanger doucement, laisser 5 minutes à température ambiante.

-Ajouter 4 ml de P3 et agiter doucement, laisser 15 minutes sur glace.

-Centrifuger 4 minutes à 4000 rpm (Beckman J-21B, rotor), 4°C et récupérer le surnageant.

-Equilibrer la colonne Nucleobond AX100 avec 2 ml de tampon N2.

-Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée et laisser pénétrer.

-Laver la colonne avec 2 x 4 ml de tampon N3.

- Eluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5 et aliquoter par 500 µl par eppendorf (1,5 ml).
- Précipiter l'ADN avec 0,7 volume d'isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Laisser 10 minutes à température ambiante et ensuite centrifuger 15 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379).
- Eliminer le surnageant.
- Laver à l'éthanol 70% (Merck, Darmstadt, Allemagne), c.à.d. ajouter 1 ml d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379), 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Sécher le culot sous vide.
- Resuspendre dans 50 à 100 µl d'H₂O distillée stérile.
- Stocker à -20°C.

Solutions et tampons :

Kit Nuclebond AX100.

-La composition des tampons P1, P2 et P3 est présentée au point minipréparation d'ADN plasmidique.

-Tampon d'équilibration N2 :

NaCl 50 mM

MOPS (3-N-morpholinopropan-sulfonic acid) 50mM

Ethanol 15%

Triton X-100 0, 15%

-Tampon de lavage :

NaCL 1 M

MOPS 50 mM

Ethanol 15%

-Tampon d'élution :

NaCl 1,25 M

Tris-HCl 50 mM

Ethanol 15%

Endonucléases :

Nom :	Séquence coupée :	Température d'incubation (°C) :
Bgl I	5'-GCCNNNN/NGGC-3'	37
Cla I	5'-AT / CGAT-3'	37
Dde I	5'-C / TNAG-3'	37
Eco RI	5'-G / AATTC-3'	37
Kpn I	5'-GGTAC / C-3'	37
Nco I	5'-C / CATGG-3'	37
Nde I	5'-CA / TATG-3'	37
Nhe I	5'-G / CTAGC-3'	37
Sma I	5'-CCC / GGG-3'	30
Xba I	5'-T / CTAGA-3'	37

Tableau II.1. :

Sites de restriction des principales endonucléases utilisées pendant ce travail .

5. Restriction d'ADN :

(Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith & Struhl; 1994)

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences d'ADN palindromiques (Tableau III.1.).

Mélange de restriction :

- x µl d'ADN à restreindre en suspension dans l'eau distillée.
- Tampon de restriction 10x : 1/10 du volume final du mélange de restriction.(Tampon commercial spécifique fourni avec l'enzyme).
- Ajouter l'eau stérile pour atteindre le volume final.
- Enzyme de restriction : Au maximum 1/10 du volume final.Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN.
- Incuber le mélange de restriction 1 à 2 heures à la température optimale recommandée par le fournisseur.

La réaction peut être stoppée soit par chauffage 15 à 20 minutes à 65°C soit si l'enzyme est thermostable par une extraction au phénol-chloroforme (Sigma, St Louis, USA) soit par l'ajout d'EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne).

6. Electrophorèse en gel d'agarose :

(Sambook, Fitsch & Maniatis; 1989)

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Des gels à pourcentage élevé en agarose (2%) permettront une séparation optimale des fragments de petite taille (100-500 pb) et inversement.

La taille des fragments tests est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Ce sont des marqueurs de poids moléculaire (Figure II.5.). Les fragments sont alors visualisés au moyen du bromure d'éthidium (Figure II.6.). Celui-ci s'intercale entre les bases de la double hélice. L'ADN ainsi marqué est rendu fluorescent sous illumination UV. Il faut cependant noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille ainsi qu'à sa quantité. Il existe d'ailleurs des marqueurs de poids moléculaire semi quantitatifs qui permettent d'estimer la quantité d'ADN sur gel.

Figure II.5. :

Marqueurs ADN de poids moléculaire utilisés au cours de ce travail .

A : Marqueur III : λ -DNA restreint par Ecor RI et Hind III (Boehringer) .

B : Marqueur VI : pBR328 restreint par Bgl I et pBR328 restreint par Hinf I (Boehringer) .

C : Marqueur VIII : pUCBM21 restreint par Hpa II et pUCBM21 restreint par Dra I et Hind III (Boehringer) .

D : Low DNA Mass Ladder (Gibco) .

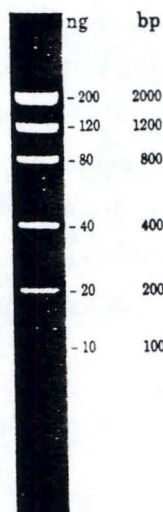
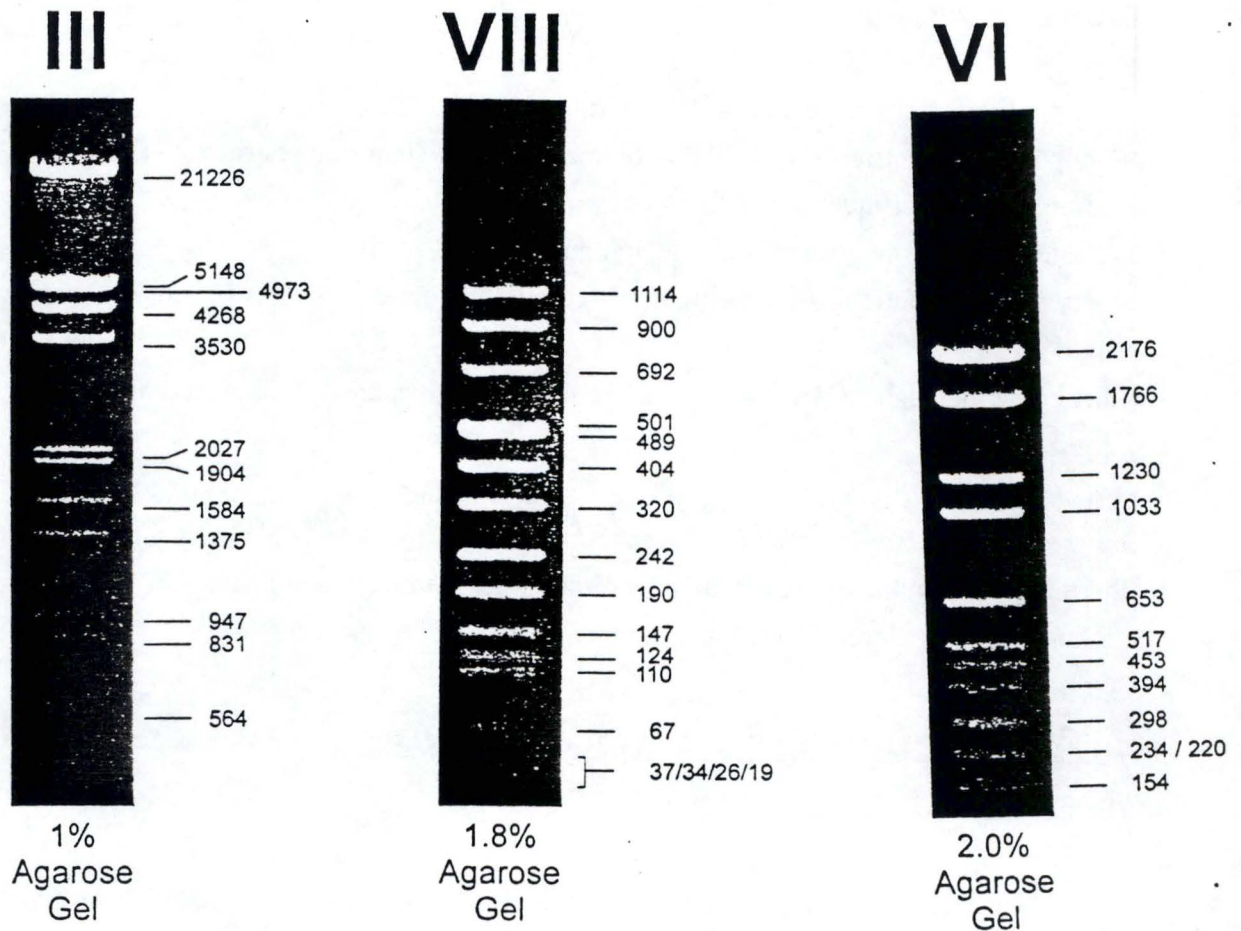
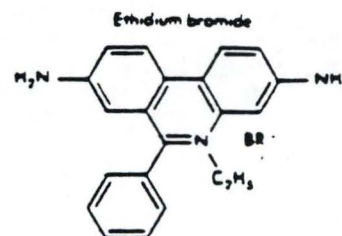


Figure II.6. :

Structure du bromure d'éthidium .



Méthode :

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TBE 1x additionné d'agarose (Bio Rad, High strenght analitical grade agarose) jusqu'à obtenir une solution limpide.
- Ajouter le bromure d'éthidium (Sigma, St Louis, USA) ou attendre que la solution soit refroidie (70°C).
- Couler sur le support *ad hoc* muni de peignes et laisser polymériser.
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse (Gibco BRL Life Technologies INC, cuve modèle Horizon 11.14) remplie de TBE 1x.
- Déposer les échantillons auxquels on a ajouté une solution d'alourdisseur (tampon d'échantillon) dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré.
- Visualiser le gel sous UV (Transilluminateur, longueur d'onde 302 nm).

Solutions, tampons et fournitures :

- Solution de bromure d'éthidium stock (Sigma, St Louis, USA) : 500 µg/ml.
Concentration finale dans le gel : 2 µg/ml.
- 1 litre TBE stock 5x : 54 g Tris base (Merck, Darmstadt, Allemagne)
27,5 g d'acide borique (Merck, Darmstadt, Allemagne)
20 ml d'EDTA 0,5 M (pH 8) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Tampon d'échantillon : Glycérol 50% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
Na₂EDTA 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
SDS 1% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
Bleu de bromophénol 0,1% (Janssen, Geel, Belgique)
- Marqueurs ADN de poids moléculaire utilisés au cours de ce travail (Figure II.5.):
Marqueur III (Boehringer, Mannheim, Allemagne) : λ-ADN restreint
par Eco R 1 et Hind 3.
Marqueur VI (Boehringer, Mannheim, Allemagne) : Mélange de
pBR 328 restreint par Bgl I, pBR 328
restreint par Hinf 1.
Marqueur VIII (Boehringer) : Mélange de pUCBM 21 restreint par
Hpa II et de pUCBM 21 restreint par
Dra 1 et Hind 3.
Low DNA Mass Ladder (GIBCO, Paisley, Grande-Bretagne) :
marqueur à 2000, 1200, 800,
400, 200 et 100 pb.

7. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose :

On peut extraire un fragment d'ADN d'un gel d'agarose préparatif et le purifier grâce au kit "Gene Clean II TM"(BIO 101). Il utilise la propriété que possède une résine (Glass-milk) formée de billes de silicate, d'adsorber spécifiquement l'ADN dans certaines conditions.

Méthode :

- Séparer les fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose haute résolution ou basse température de fusion.
- Visualiser la bande intéressante sous UV et exciser le morceau d'agarose contenant cette bande.
- Placer le morceau d'agarose dans un eppendorf et déterminer la masse de gel récupérée.
- Ajouter 3 volumes (soit 3 ml/g d'agarose) d'une solution de NaI 6 M.
- Incuber 5 minutes à 55°C pour faire fondre l'agarose et libérer l'ADN (agiter de temps en temps).
- Ajouter 5 µl de solution Glass-Milk TM (résine) et homogénéiser.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 30 secondes 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379) pour récupérer le complexe silice/ADN, à température ambiante.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 700 µl d'une solution de lavage "New wash".
- Centrifuger 30 secondes 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379) à température ambiante.
- Répéter le lavage deux fois.
- Resuspendre le dernier culot dans 10 à 40 µl de TE pH 8.0 ou dans de l'eau distillée stérile.
- Centrifuger 30 secondes 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379), à température ambiante et récupérer le surnageant qui contient l'ADN.
- Quantifier sous UV 260 nm l'ADN récupéré.

Tampon TE (pH 8.0)

1 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne) (pH 8.0)

10 mM Tris-Cl (Merck, Darmstadt, Allemagne) (pH 8.0)

8. Electrophorèse d'ADN sur gel de polyacrylamide :

(Sambook, Fitsch & Maniatis; 1989)

L'acrylamide est une molécule monomérique qui en présence de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylène-diamine) une molécule de pontage et de radicaux libres, polymérise en un réseau de mailles dont la densité est fonction de la concentration en acrylamide. Les gels de polyacrylamide sont utilisés pour séparer les protéines, les complexes ADN-protéine, l'ADN suivant leur taille. Au plus il y a d'acrylamide meilleure est la résolution, ainsi de tels gels permettent d'évaluer la taille de fragments d'ADN à la base près (gels de séquençage).

Comme pour le gel d'agarose la taille des fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer des marqueurs d'ADN de taille connue. Ce type de gel donne donc une meilleure résolution des tailles des fragments d'ADN que les gels d'agarose.

Méthode :

-Choisir le pourcentage d'acrylamide à utiliser en fonction de la taille des fragments d'ADN à faire migrer.

% acrylamide :	taille des fragments d'ADN :
3,5	100-2000 pb
5,0	80-500 pb
8,0	60-400 pb
12,0	40-200 pb
15,0	25-150 pb
20,0	6-100 pb

-Solutions à préparer :

Solution 30% acrylamide :

-acrylamide 29 g (Bio Rad, Hercules, USA).

-N,N'-methylenebisacrylamide 1g (Bio Rad, Hercules, USA).

-Porter à 100 ml avec de l'eau et dissoudre à 37°C.

TBE 1x : -89 mM Tris-borate (Merck, Darmstadt, Allemagne).

-2 mM EDTA pH : 8,0 (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Solution 10% ammonium persulfate :

- Ammonium persulfate 1g (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Porter à 10 ml avec de l'eau.
- Conserver à 4°C.

-Réaliser le montage du support du gel (support 100 ml) (notice spécifique du fournisseur : Gibco BRL Life Technologies, INC; cuve modèle V15.17).

-Pour un gel de 100 ml préparer la solution d'acrylamide en fonction de la concentration finale en acrylamide dans le gel :

Réactifs :	% final en acrylamide désiré					
	3,5	5	8	12	20	
30% Acrylamide	11,6 ml	16,6 ml	26,6 ml	40,0 ml	66,6 ml	
Eau	67,7 ml	62,7 ml	52,7 ml	39,3 ml	12,7 ml	
5x TBE (voir gel d'agarose)	20 ml	20,0 ml	20,0 ml	20,0 ml	20 ml	
10% Ammonium persulfate	0,7 ml	0,7 ml	0,7 ml	0,7 ml	0,7 ml	

- Ajouter 35 µl de TEMED (Bio Rad, Hercules, USA) à la solution d'acrylamide. A partir de ce moment la réaction de polymérisation commence, les étapes suivantes doivent donc être réalisées rapidement.
- Couler le gel dans le support avec une seringue 50 ml, éviter les bulles d'air qui empêchent la polymérisation.
- Placer alors le peigne et incliner le support à 10°. Laisser polymériser 1 heure à température ambiante.
- Retirer avec précaution le peigne. Rincer avec de l'eau la partie supérieure du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse et remplir la cuve avec du TBE 1x, éliminer les bulles d'air éventuelles dans la partie inférieure du gel à l'aide d'une seringue remplie de TBE 1x.
- Brancher les électrodes sur le support et effectuer un "pré-run" à 8V pendant 1 heure.
- Préparer les échantillons d'ADN comme pour la migration en gel d'agarose, les volumes des puits pouvant atteindre 100 µl.
- Déposer les échantillons dans les puits et faire migrer entre 1 et 8V jusqu'à ce que la solution colorée du tampon d'échantillon (voir gel d'agarose) aie quitté le gel.

- Révéler les profils de migration de l'ADN en incubant le gel 45 minutes, sous faible agitation, dans une solution de TBE 1x additionnée de bromure d'éthidium (Sigma, St Louis, USA) (concentration finale de 0,5 µg/ml).
- Visualiser les bandes sous illumination UV.

9. Réaction de ligation :

(Sambook, Fitsch & Maniatis; 1989)

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'activité ligase de l'enzyme est conditionnée par la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} .

Méthode :

- Dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à liquer. Idéalement on utilise un excès d'insert.
- Ajouter 1/10 du volume final de tampon de ligation (Boehringer, Mannheim, Allemagne). Le volume final est en général de 10 µl car dans des volumes plus grands la probabilité de rencontre des fragments diminue.
- Compléter le volume avec de l'eau distillée stérile.
- Ajouter en dernier la T4 ADN ligase (Boehringer), 1 uL pour un volume final de 10 µl à raison de 8U/µl de ligase stock fournie par Boehringer.
- Incuber à une température variant de 4 à 20°C pendant 10 à 14 heures. (On préconise 20°C pour des fragments à bouts francs).
- Conserver le mélange de ligation à -20°C.

9.1. Ligation dans un vecteur T (pGEM-T; Promega) :

Les vecteurs T permettent une efficacité de clonage supérieure pour des amplicons possédant un A terminal en 3'.

Méthode :

-Calculer la quantité adéquate d'insert à ajouter dans le mélange réactionnel.

Le ratio idéal est de 3 inserts pour 1 vecteur selon la formule suivante :

$$\frac{(\text{ng de vecteur (50ng/}\mu\text{l pour pGEM-T)} * \text{taille de l'insert en kb}) * 3/1 (\text{ratio})}{\text{taille du vecteur en kb (3kb pour pGEM-T)}} = \text{ng d'insert}$$

-Préparer 1 μl de tampon T4 DNA ligase 10 x (Promega, Madison, USA).

-Ajouter 1 μl de vecteur pGEM-T (50ng) (Promega, Madison, USA).

-Ajouter le volume adéquat d'insert pour respecter le ratio.

-Ajouter l'eau pour que le volume final atteigne 10 μl .

-Ajouter 1 μl de T4 DNA ligase (3 U/ μl) (Promega, Madison, USA).

-Incuber une nuit à 4°C puis effectuer la transformation bactérienne.

9.2. Ligation franche (vecteur pBSK II) :

Nous avons utilisé le vecteur pBSK II (Stratagène) restreint par Sma I (Boehringer) pour réaliser des ligations franches. L'amplicon est produit par une polymérase exonucléase 3'-5' qui n'ajoute pas de A terminal en 3' des amplicons.

Méthode :

-Calculer la quantité d'insert à ajouter dans le mélange réactionnel, le ratio est de 3 à 6 inserts pour 1 vecteur.

-Mettre 1 μl de tampon de ligation T4 10x (Boehringer, Mannheim, Allemagne).

-Ajouter 1 μl de pBSK II (10ng/ μl) restreint par Sma I purifié puis quantifié par spectrométrie UV.

-Mettre 2 μl de produit PCR (20 ng/ μl), insert purifié et dosé par UV.

-Ajouter l'eau pour que le volume fonal soit de 10 μl .

-Ajouter la T4 DNA ligase (Boehringer, 8 U/ μl).

-Incuber une nuit à 18°C, pas en dessous car sinon on favorise la recircularisation du vecteur sur lui même.

10. Purification des produits PCR ou de restriction :

Pour qu'une ligation soit optimale il faut éliminer du produit PCR ou de la préparation du vecteur, les enzymes (polymérases, endonucléases), les amorces (primers), les dNTPs, certains agents comme le DMSO, les sels des tampons.

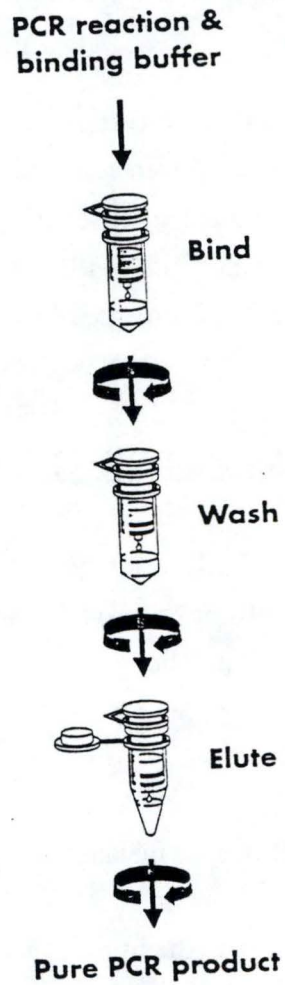


Figure II.7. :

Représentation schématique des étapes de purification d'un produit PCR par le kit « QIAquick PCR purification ». Une première étape permet la fixation de l'ADN sur une résine . Celle-ci est lavée avec une solution d'éthanol .L'ADN est ensuite élué avec de l'eau .

Pour cela on utilise le Quiaquick PCR purification kit de Quiagene. Son principe est le suivant (Figure I.7.):

L'ADN du mélange PCR ou du mélange de restriction est adsorbé sur une membrane de silica-gel retenant les fragments de 100 pb à 10 kb. L'adsorption est optimale à pH 7,5; le tampon PB permet d'équilibrer le pH du mélange PCR et contient des agents chaotropiques qui dénaturent les enzymes. Les primers, les dNTPs et une bonne partie des sels sont éliminés au cours de cette étape. La colonne est ensuite lavée avec la solution PE contenant de l'éthanol, c'est au cours de cette étape que les sels et les additifs comme le DMSO sont totalement éliminés. Finalement l'éluion de l'ADN se réalise avec une solution de faible force ionique (TE pH 8.0 ou H₂O).

Méthode :

- Ajouter 5 volumes de tampon PB pour 1 volume de mélange PCR ou de restriction. Appliquer le mélange sur la colonne de silica-gel, elle même glissée dans un tube collecteur de 2 ml.
- Centrifuger 30 à 60 secondes 13000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 13), à température ambiante.
- Eliminer le liquide présent dans le collecteur et replacer la colonne de silica-gel dans le collecteur.
- Laver la colonne avec 0,75 ml de tampon PE et centrifuger à nouveau pendant 30 à 60 secondes à 13000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 13), à température ambiante.
- Eliminer le liquide du collecteur et recentrifuger 30 secondes à 13000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 13) pour bien sécher la colonne de silica-gel.
- Placer la colonne dans un eppendorf 1,5 ml puis éluer l'ADN en ajoutant 50 µl d'eau ou de TE pH 8.0, centrifugation 60 secondes à 13000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 13).
- Doser par UV l'ADN.
- Stocker à -20°C.

11. Extraction et purification d'ADN génomique eucaryote :

(Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989)

Le protocole décrit ci-dessous permet d'obtenir de l'ADN génomique (ADNg) eucaryote ultra pur (exempt de protéines, grands fragments) afin de l'utiliser comme matrice PCR.

méthode :

La méthode se résume en trois étapes :

1. Lyse cellulaire et dégradation enzymatique de l'ARN.
2. Protéolyse des enzymes par traitement à la protéinase K.
3. Extraction de l'ADN par 3 étapes successives de phénol-chloroforme.

-Centrifugation d'une culture de cellules eucaryotes en suspension pendant 15 minutes à 4000 rpm (Beckman J-21B, rotor JA-14), 4°C.

-Éliminer le surnageant et resuspendre dans un volume égal de TBS froid (4°C).

-Tampon TBS 1x:

Pour 100 ml , ajouter 10 ml de solution A à 89 ml d'eau. Ajouter ensuite lentement 1 ml de solution B . Autoclaver et conserver à 4°C.

-Solution A :

80 g/L de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne).

3,8 g/L de KCl (Merck, Darmstadt, Allemagne).

2 g/L de Na₂HPO₄(Merck, Darmstadt, Allemagne).

30 g/L de Tris-Cl (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Porter à pH 7,5.

Autoclaver et stocker à -20°C.

-Solution B :

15 g/L de CaCl₂.

10 g/L de MgCl₂.

Autoclaver et stocker à -20°C.

- Centrifuger dans les mêmes conditions.
- Répéter le lavage encore une fois (facultatif).
- Resuspendre le culot dans du TE froid (4°C) pH 8.0 afin que la concentration en cellule soit de $5 \cdot 10^7$ cellules par ml.
- Ajouter 10 ml de tampon d'extraction pour 1 ml de suspension cellulaire.

Tampon d'extraction : 10 mM Tris-CL (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 8.0
 0,1 M EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 20 µg/ml de RNAase pancréatique (Worthington)
 0,5% de SDS (Merck, Darmstadt, Allemagne)

- Incuber 1 heure à 37°C.
- Ajouter la protéinase K (Strtagène) à une concentration finale de 100 µg/ml, agiter doucement pour homogénéiser.
- Placer la solution de lysa cellulaire dans un bain à 50°C pendant 3 heures.
- Refroidir la solution à température ambiante, placer le lysa dans un tube et ajouter 1 volume de phénol-chloroforme (Sigma, St Louis, USA) pH 8.0 (équilibré par du Tris-Cl 0,5 M pH 8.0).
- Mélanger les deux phases en retournant doucement les tubes pendant 10 minutes jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- Séparer les deux phases par centrifugation à 8000 rpm (Beckman, J-21B, rotor) pendant 15 minutes à température ambiante.
- A ce stade, la phase aqueuse (phase supérieure) est très visqueuse et sa récupération peut s'avérer difficile.
- Pour éviter que l'ADN ne soit endommagé et pour faciliter le transfert de la phase supérieure on utilise un tips de 1 ml coupé au niveau de sa pointe pour que son diamètre soit de plus ou moins 0,3 cm.
- Répéter encore au moins deux fois l'extraction.
- Après ce minimum de trois extractions ajouter 0,2 volumes d'acétate d'ammonium 10 M (NH₄Ac) (Merck, Darmstadt, Allemagne) et 2 volumes d'éthanol 100%.
- L'ADNg précipite sous forme de filaments récupérables avec une tige en verre coudé.
- Laver l'ADN récolté avec une solution d'éthanol 70% (Merck, Darmstadt, Allemagne), centrifuger 5 minutes à 8000 rpm (Beckman, J-21B, rotor), 4°C.
- Eliminer le surnageant et laisser sécher sous hotte.
- L'ADN séché sous hotte est plus facile à resuspendre que l'ADN séché sous vide.
- Resuspendre dans du TE pH 8.0 ou dans de l'eau.

-Doser l'ADN en mesurant la D.O. de la solution à 260 nm et à 280 nm.

Le rapport des 2 absorbances 260/280 donne une appréciation de la pureté de l'ADN, celui-ci doit être supérieur à 1,75.

Une D.O. de 1 à 260 nm correspond à 50 µg d'ADN/ml.

-Conserver l'ADN à 4°C.

12. Extraction brute d'ADN génomique eucaryote :

(Innis, Gelfand, Sninsky & White; 1990)

De l'ADN génomique purifié grossièrement peut servir de matrice pour des PCR. Cette technique a été testée avec succès pour l'amplification de fragments d'ADN de globines.

Méthode :

-Centrifuger pendant 10 minutes à 4000 rpm (Beckman J-21B, rotor JA-14), 4°C, une culture de cellules eucaryotes en suspension (environ 10^4 à 10^6 cellules).

-Resuspendre les cellules dans 500 µl de PBS et centrifuger.

-Tampon PBS 3x :

Solution 390 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne), 30 mM Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Solution 390 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne), 30 mM NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Mélanger les deux solutions et porter à pH 7,2.

Autoclaver .

-Répéter cette opération afin de bien laver les cellules.

-Resuspendre le culot dans 50 à 100 µl d'eau distillée.

-Incuber pendant 5 à 10 minutes à 98°C.

-Précipiter les débris cellulaires en centrifugeant 1 minute à 13000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 13), à température ambiante.

-Récupérer la phase aqueuse.

-A ce stade la phase aqueuse contient l'ADN dont la pureté est faible. On peut l'utiliser tel quel pour la PCR ou poursuivre la purification avec une extraction au phénol- chloroforme.

-Ajouter 1 volume de phénol- chloroforme (Sigma, St Louis, USA) pH 8.0 et mélanger sans vortexer.

- Centrifuger 1 minute à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379) et récupérer la phase supérieure.
- Ajouter 0,8 volume d'isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne), agiter sans vortexer et centrifuger 15 minutes à 15000rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379).
- Eliminer le surnageant et récupérer le culot que l'on lave avec une solution 70% en éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Centrifuger 15 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379), 4°C.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous hotte.
- Resuspendre dans de l'eau et conserver à 4°C.

13. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

(Innis, Gelfand, Sninsky & White ;1990)

13.1. Principe :

Le principe de la PCR a été décrit largement dans l'introduction, c'est pourquoi nous ne nous y attardons pas.

13.2. Méthode :

13.2.1. Préparer le mélange réactionnel :

- Primer sens (Eurogentec, Seraing, Belgique) 20 à 100 pm (p moles).
- Primer anti-sens (Eurogentec, Seraing, Belgique) 20 à 100 pm (p moles).
- dNTP (Boehringer, Mannheim, Allemagne) 10 ul d'un stock 80 nM contenant les 4 dNTPs.
- Tampon de la polymérase (Boehringer, Biolabs, Perkin-Elmer) concentré 10 fois, 10 µl.
- Ajouter de l'eau stérile distillée pour que le volume final soit de 100 ul.
- Additif(s) éventuel(s) par exemple DMSO (Sigma, St Louis, USA) de 0 à 10%.
- Matrice (ADN génomique humain 100 ng = 10 000 copies).
- Polymérase de 1 à 5 unités (Boehringer, Biolabs, Perkin-Elmer).

13.2.2. Programmation des cycles PCR :

L'appareil utilisé est le GENE AMP 2400 de Perkin Elmer.

Une réaction PCR standard se compose d'une :

-Dénaturation longue 5 minutes à 94 °C.

-Série de cycles (35 cycles) :

 Dénaturation 30 secondes à 94 °C.

 Hybridation 30 secondes à 55 °C.

 Elongation 45 secondes à 72 °C.

Elle se termine par une étape d'élongation de 10 minutes à 72 °C.

Conserver les produits PCR à -20 °C.

13.2.3. Pour réaliser un "hot start" :

-Préparer le mélange réactionnel sans ajouter la polymérase.

-Chauffer 5 minutes à 100 °C.

-Refroidir rapidement sur glace le mélange réactionnel.

-Ajouter la polymérase.

-Lancer les cycles PCR normaux.

13.2.4. Pour réaliser une "touchdown" PCR :

-Préprogrammer l'appareil PCR en réalisant des liens entre des programmes successifs courts de 2 ou trois cycles, d'un programme à l'autre la température d'hybridation est abaissée de quelques degrés.

-Exécuter un "hot start".

-Lancer le programme de "touchdown".

13.2.4. Pour réaliser une Up PCR :

-Pas de "hot start" nécessaire.

-Faire un programme de type "touchdown", mais dans ce cas au lieu d'abaisser la température d'hybridation on l'augmente.

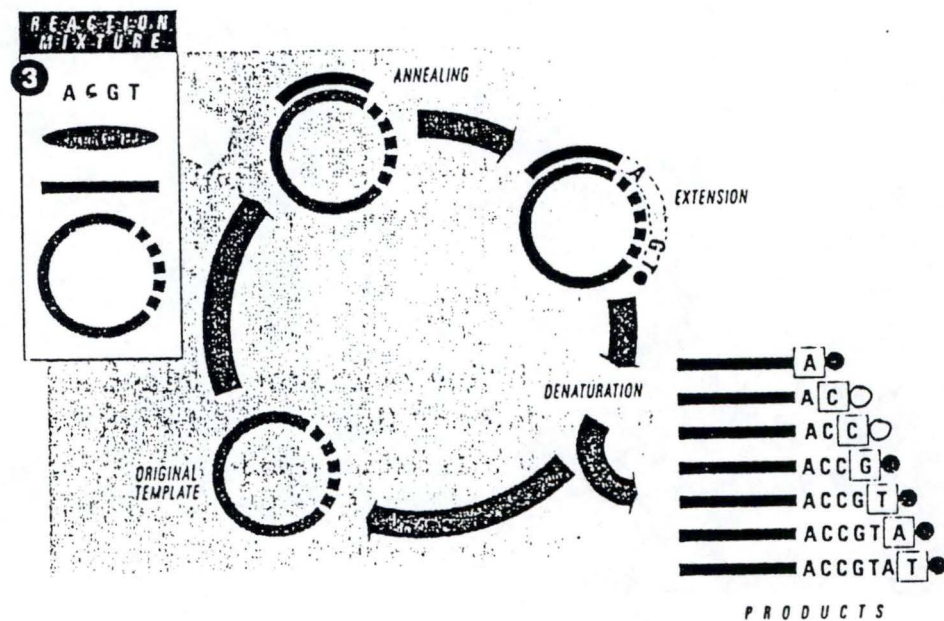


Figure II.8. :

PCR de séquençage à fluorescence .

Au cours des cycles PCR , l'élongation de fragments cibles est inhibée par l'incorporation d'un nucléotide marqué fluorescent . On obtient une population d'amplicons de tailles différentes dont le dernier incorporé est marqué . Après migration sur gel le pattern de fluorescence est analysé , c'est lui qui nous donne la séquence .

13.2.5. Composition du tampon R.HUN. :

Tampon 10x sans MgCl₂:

166 mM (NH₄)₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne).

670 mM Tris-HCl pH 8,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne).

100 mM β-mercaptoéthanol (Sigma, St Louis, USA) .

67 μM EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne).

1,7 mg BSA (Biolabs, Beverly, USA) pour 10 ml.

14. Le séquençage :

La technique de séquençage utilisée est un séquençage à fluorescence par PCR avec le système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer (Roche), Branchburg, USA).

14.1. Principe : (Figure II.8.)

Un fragment à séquencer est incubé dans des conditions PCR en présence d'une amorce. Le mix PCR contient un ratio adéquat de nucléotides marqués par un agent fluorescent (rhodamine, fluorescéine , ...) inhibant l'élongation et de nucléotides non marqués permettant l'élongation.

La réaction PCR produit une population d'amplicons de taille variable et terminés par un nucléotide marqué. Cette population d'amplicon est déposée sur un gel d'acrylamide résolutif à la base près. Les fragments migrent suivant leur taille. Sur le profil de migration passe un laser qui excite les marqueurs fluorescents réémettants sous une autre longueur d'onde qui leur est spécifique. La succession des rayonnements émis est analysée et donne la séquence du fragment.

La séquence du brin sens s'obtiendra si on met l'amorce anti-sens dans le mix PCR et inversement pour le brin anti-sens.

14.2. Méthode :

14.2.1. Préparation de la PCR :

- Mettre dans le tube PCR 1,5 à 2,5 ul de matrice (0,2 µg/µl).
- Ajouter soit l'amorce sens soit l'amorce anti-sens (3,2 p moles).
- Ajouter de l'eau pour que le volume final soit de 20 µl.
- Mettre 8 ul de terminator Ready Reaction Mix (Perkin-Elmer (Roche), Branchburg, USA) contenant la polymérase, les dNTPs, les dNTPs terminateurs fluorescents et le tampon PCR.

- L'appareil PCR utilisé est le Gene Amp PCR Systems 2400, et les conditions PCR sont les suivantes :
- Dénaturation à 96°C 10 secondes.
- Hybridation à 50°C 5 secondes.
- Elongation à 60°C pendant 4 minutes.

- Réaliser 25 cycles, conserver à 4°C à l'abri de la lumière.

14.2.2. Préparation des échantillons pour analyse sur gel :

- Pour chaque réaction de séquençage, préparer un eppendorf de 1,5 ml dans lequel on place 50 ul d'éthanol 95% (Merck, Darmstadt, Allemagne), 2µl de NaAc 3 M pH 4,6 ou 5,2 (Merck, Darmstadt, Allemagne) et les 20 µl de la réaction PCR de séquençage.
- Vortexer et placer sur glace 10 minutes.
- Centrifuger 30 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379), 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Laver avec 250 ul d'éthanol 70% (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Centrifuger 15 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379), 4°C.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous vide.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide 4%, la lecture de la séquence étant effectuée de manière automatique par l'appareil ABI.PRISM.

14.2.3. Amorces spécifiques commerciales utilisées pour le séquençage :

Le site d'introduction de l'insert dans le plasmide pGEM-T est flanqué des séquences spécifiques T7 et SP6. Les amorces SP6 et T7 (Promega, Madison, USA) peuvent donc être utilisées pour le séquençage.

Le site d'introduction de l'insert dans le plasmide pBSK II est flanqué par les séquences spécifiques T3 et T7. Les amorces T3 et T7 (Stratagène) peuvent donc être utilisées pour le séquençage.

15. Programmes informatiques utilisés :

- Oligo 4. : Permet de calculer entre autre, les températures de fusion des amorces et de prédire la présence ou non de structures secondaires ou de dimères d'amorces .
- DNA Strider 1.2. : Identifie et localise les sites de restriction sur une séquence donnée .
- DNA Fold : Permet de modéliser par minimisation d'énergie les structures secondaires d'ADN ou d'ARN simple brin .
- Blast NCBI (internet) : alignement de séquences ADN .

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

III. Résultats et discussion :

Clonage du promoteur CSF-1 humain par PCR sur ADN génomique :

1. Introduction :

Pour rappel, le but de ce travail était de cloner le promoteur du gène du CSF-1. Le CSF-1 est une cytokine qui intervient dans la pathologie de l'athérosclérose, il est donc intéressant de comprendre les mécanismes de l'activation de son expression. L'étude du promoteur du gène CSF-1 s'inscrit donc dans ce cadre. Sa séquence étant connue, la technique PCR apparaît comme la plus simple à mettre en oeuvre.

Les PCRs sur ADN génomique humain et autres sont beaucoup plus complexes que les PCRs effectuées sur échantillons plasmidiques. Un premier problème est la taille de cette matrice composée de plus ou moins 4 milliards de paires de bases. Les amorces doivent trouver leur cible dans un «océan» d'ADN.

L'ADN génomique dénaturé a tendance à former des structures secondaires importantes pouvant entraîner des délétions lors des PCRs. Dans le cas où la matrice n'est que partiellement dénaturée, même sur de très courtes régions, la renaturation est rapidement initiée. La préparation d'ADN cible doit être la plus propre possible (bien qu'il existe deux écoles à ce propos) car la présence de facteurs "trans" résiduels peut empêcher le désappariement des deux brins.

La matrice doit être la plus intègre possible, c.à.d. possédant un minimum de cassures afin d'éviter la coupure des séquences cibles favorisant le saut (jumping) de la polymérase. Le nombre de copies de la séquence à amplifier est également un élément important lors de la PCR.

Le rapport entre le nombre de matrices et d'amorces est important, en effet si la matrice est en concentration trop élevée alors la viscosité du milieu augmente et la PCR est inhibée, si les amorces sont en concentrations trop élevées, les amplifications deviennent non spécifiques. Dans le cas où matrices et amorces sont en trop faibles concentrations, les chances de succès de l'amplification diminuent.

La présence de cibles riches en GC ou en séquences répétées peut amener au décrochage ou au piétinement de la polymérase.

L'ensemble de ces facteurs rend l'optimisation de la PCR sur ADN génomique difficile. Ce genre de PCR nécessite donc souvent une mise au point au cas par cas.

Dans le cadre de ce travail, nous avons isolé par PCR sur ADNg (ADN génomique) humain, le promoteur du gène du colony stimulating factor-1. Les résultats reprennent et discutent les approches suivies pour l'amplification de cette séquence spécifique.

2. Analyse de la séquence du promoteur CSF-1 :

Une première analyse de la séquence (Annexe 2.1.), montre un certain nombre de facteurs pouvant rendre son amplification ardue.

En effet, le gène du CSF-1 est unique dans le génome haploïde humain, par conséquent son promoteur l'est aussi. La richesse en GC de ce promoteur de près de 66% est caractéristique des séquences promotrices de cytokines. De plus on y trouve des éléments répétés soit en dinucléotides GT soit en tétranucléotides GAGC susceptibles de faire piétiner voir avorter la polymérase au cours de la polymérisation.

A 55 °C les brins sens et anti-sens dénaturés du promoteur CSF-1 forment des structures secondaires importantes, d'autant plus stables qu'elles sont riches en GC. Il ne s'agit cependant que d'une modélisation informatique (DNA Fold) réalisée dans des conditions différentes de celles rencontrées dans le mélange PCR.

3. Stratégie globale :

La mise au point de la PCR sur ADNg ne répond pas à des règles précises. Elle nécessite de tester une série de conditions et de combinaisons variées de celles-ci afin d'obtenir le résultat attendu. Parmi celles-ci nous avons fait varier :

Le type de PCR : "simplex" PCR.

"héminested" et "nested" PCR.

La forme de la PCR : "touchdown".

"hot start".

La nature de la matrice : Extraits brutes d'ADN génomique.

Extraits purs d'ADN génomique.

Les amorces : 5 paires d'amorces ont été testées.

La concentration en matrice.

La concentration en amorces.

La température d'hybridation : Nous avons travaillé dans une fourchette de 45 à 80 °C.

La présence d'additifs dans le mélange réactionnel : DMSO de 0 à 10%

Le type de polymérase testée : DynaZyme II Finzyme.

Taq Boehringer.

Gold Perkin Elmer.

Pwo Boehringer.

Tth Boehringer.

Vent Biolabs.

Le type de tampon : Outre la variation de tampon inhérente à l'utilisation de polymérases différentes, nous avons en plus testé le tampon R.HUN utilisé lors de l'amplification de régions organisées en répétitions de trinuécléotides dans le cadre de la maladie de Huntington.

Tous ces paramètres ont été testés progressivement au cours de ce travail car la difficulté de l'amplification de cette séquence s'est révélée beaucoup plus grande que ce que l'on imaginait au départ. Nous allons examiner dans ces résultats les expériences les plus significatives .

4. Amplification et isolement du promoteur CSF-1 utilisant la polymérase DynaZyme II :

4.1. Choix des amorces :

Les premières amorces utilisées seront les amorces KPN-1 et KPO-1 (Annexes 1.1., 1.6.). Nous sommes limités dans le choix des amorces sur l'extrémité amont du promoteur du gène CSF-1, en effet les premiers éléments cis connus de ce promoteur apparaissent quelques 30 pb en aval de l'extrémité 5' de celui-ci. Comme les amorces ont déjà une taille minimum de plus ou moins 20 bases notre choix ne pouvait faire appel à des amorces plus internes. Par la suite cet élément restera limitant dans le choix des amorces s'hybridant en amont du promoteur. Nous avons ajouté en 5' des amorces des sites de restriction synthétiques afin de faciliter le clonage de l'amplicon dans pGFP-1.

4.2. Choix de la polymérase :

La polymérase DynaZyme est une des polymérases la plus utilisée au laboratoire, elle présente un gros avantage; son coût relativement bas ce qui est un avantage non négligeable dans le cadre d'une mise au point. Elle a déjà été employée avec succès pour des amplifications sur ADN génomique de souris.

4.3. La matrice :

Dans un premier temps la matrice sera un extrait brut d'ADN génomique obtenu par lyse osmotique d'une culture de monocytes THP-1. Cet ADN n'aura subi aucune autre étape de purification. De telles matrices ont déjà été utilisées avec succès lors de l'amplification PCR du gène de la β -globine humaine (Innis, Gelfand, Sninsky & White, 1990), cependant ce gène est en nombre de copies important dans le génome.

Par dosage en spectrophotométrie UV à 260 nm la quantité d'ADN isolée est estimée à 50 ng/ μ l, cependant le rapport des absorbances à 260 et 280 nm est de 0,36 ce qui indique la présence de nombreuses impuretés dans l'extrait. De plus le mélange contient encore de l'ARN et de ce fait notre mesure surestime la quantité d'ADN réellement présente.

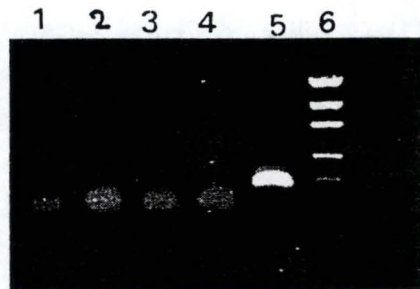


Figure III.1. :

PCR sur ADNg brut ; hybridation 50°C, amorces KPO-1, KPN-1 (100 pm). Polymérase DynaZyme II . Migration de 15 μ l des produits PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Pistes :

1 : 1 ng d'ADNg.

2 : 10 ng d'ADNg.

3 : 100 ng d'ADNg.

4 : contrôle négatif, PCR sans matrice.

5 : contrôle positif HIV.

6 : Low DNA Mass Ladder (GIBCO) 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 pb.

On sait que 100 ng d'ADNg humain équivaut plus ou moins à 10 000 exemplaires du génome haploïde humain. Par ailleurs en PCR sur ADNg on utilise entre 100 et 100 000 copies de matrices (Saiki et al.; Mullis et al, 1986; Higuchi et al., 1988) soit de 10 ng à 1 µg d'ADNg. La quantité la plus fréquemment utilisée étant 100 ng (10 000 copies). Les PCR seront donc réalisées pour trois concentrations en ADNg : 1, 10, et 100ng de manière à couvrir une zone suffisamment grande du nombre de copies de séquence cibles.

4.4. PCR :

A. Conditions PCR de départ :

Nous avons réalisé des "simplex" PCR sur les extraits bruts d'ADNg pour 1, 10 et 100 ng de matrice, à 3 températures d'hybridation 50, 55 et 60°C et pour 3 concentrations en DMSO : 0, 5 et 10%. Les amorces utilisées sont KPO-1 et KPN-1 (Annexes 1.1., 1.6.) à raison de 100 p moles (pm) chacune.

Après 35 cycles, nous n'obtenons aucun produit spécifique mais essentiellement des dimères d'amorces (Figure III.1.) .

Les séquences des amorces semblant poser problème puisqu'elles forment des dimères, nous avons supposé que d'une part les sites de restriction synthétiques ajoutés en 5' de KPO-1 et KPN-1 (Annexes 1.1.,1.6.) pouvaient engendrer des encombrements stériques et d'autre part la formation de dimères d'amorces. Nous avons donc utilisé de nouvelles amorces : 191 et 182 (Annexes 1.2., 1.6.). 191 est une amorce semblable à KPN-1 mais sans son bout flottant. 182 correspond à une nouvelle amorce située au delà de l'ATG du promoteur et qui ne devrait pas faire de dimères avec l'amorce 191. Nous décidons aussi d'effectuer un test d'inhibition pour détecter la présence d'éventuels inhibiteurs dans l'extrait d'ADNg étant donné sa faible purification.

B. Etude des inhibitions :

Ce test consiste à ajouter dans la mélange PCR un contrôle positif (ADN plasmidique HIV et ses amorces spécifiques) et de réaliser ce test dans les conditions optimisées pour ce contrôle. Pour cela nous avons préparé 4 mélanges PCR contenant un contrôle positif plasmidique HIV avec ses amorces spécifiques.

1 2 3 4 5



Figure III.2. :

Test d'inhibition de 3 concentrations en ADNg brut sur un contrôle positif HIV. Polymérase : DynaZyme II. Migration de 15 μ l des produits PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Pistes :

- 1 : contrôle positif HIV seul.
- 2 : contrôle positif HIV additionné de 100 ng d'ADNg brut.
- 3 : contrôle positif HIV additionné de 10 ng d'ADNg brut.
- 4 : contrôle positif HIV additionné de 1 ng d'ADNg brut.
- 5 : Low DNA Mass Ladder (GIBCO) 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 pb.

1 2 3 4 5 6

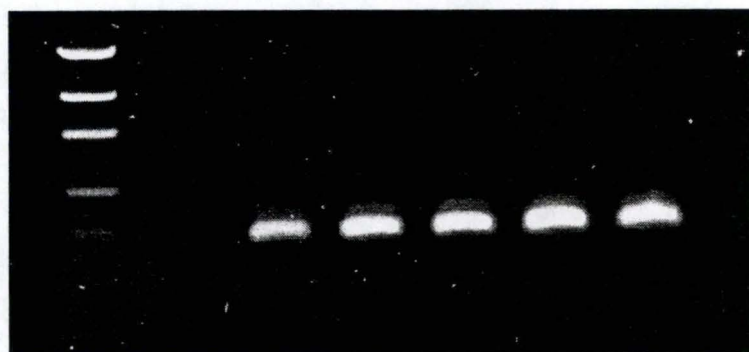


Figure III.3. :

Test d'inhibition de 3 concentrations en ADNg brut ayant subi 3 extractions au phénol-chloroforme sur un contrôle positif HIV. Polymérase : DynaZyme II. Migration de 15 μ l des produits PCR sur gel d'agarose 1,2%, bromure d'éthidium 2 μ g/ml.

Pistes :

- 1 : Low DNA Mass Ladder (GIBCO) 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 pb.
- 2 : contrôle positif HIV additionné de 100 ng d'ADNg.
- 3 : contrôle positif HIV additionné de 10 ng d'ADNg.
- 4 : contrôle positif HIV additionné de 1 ng d'ADNg.
- 5 : contrôle positif HIV seul.

Nous n'avons rien ajouté dans le premier tube. Nous avons mis 100, 10 et 1 ng d'extrait d'ADNg respectivement dans les tubes 2, 3 et 4.

La photo ci-contre (Figure III.2.) illustre bien la présence d'inhibiteurs aux concentrations élevées en extrait d'ADNg puisque l'intensité des bandes d'amplification diminue lorsque l'on passe de 1 à 100 ng d'extrait.

Comme une inhibition apparaît dans les extraits bruts d'ADNg, nous décidons de le purifier en effectuant de 1 à 3 extractions au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation en présence de sel et d'éthanol. .

Un test d'inhibition a été ensuite réalisé sur les extraits ayant subi 3 extractions au phénol-chloroforme. Quatre tests contenant respectivement 100 ng, 10 et 1 ng d'ADNg, et le contrôle positif seul sont effectués. L'inhibition est encore observée pour les concentrations de 100 ng en extrait mais de manière moindre (Figure III.3.).

C. PCR sur ADNg ayant subi de 1 à 3 extractions au phénol chloroforme et hémimétrié PCR :

De nouvelles "simplex" PCR sont réalisées pour les températures d'hybridation de 45, 50, 55 et 60 °C avec 0 ou 5% en DMSO, 3 concentrations en amorces, 20 pm, 100 pm et 1 nm des amorces 191 et 181.

Le tout étant effectué pour 1, 10, 100 ng en ADNg ayant subi 1, 2 ou 3 extractions au phénol-chloroforme.

Dans ces conditions nous observons essentiellement des dimères d'amorces ou l'une ou l'autre bande de petite taille (résultats non montrés). Comme le nombre de séquences de départ est très petit, nous pensons que l'amplicon spécifique n'est pas visible sur gel après une amplification en simplex, mais que nous pourrions le détecter après une deuxième PCR. Nous avons opté pour une hémimétrié PCR pour la raison suivante :

-Etant donné que l'amorce 191 se situe en juste amont du promoteur et est voisine d'un élément cis, nous ne pouvons pas utiliser une amorce plus interne sous peine de ne pas pouvoir isoler l'ensemble du promoteur.

Nous avons effectués des "hémimested" PCR sur les produits de la "simplex" PCR précédente dilués 10, 100 et 1000 fois. Les amorces KPO-1 et KPN-1 (Annexes 1.1., 1.6.) sont utilisées à une température d'hybridation de 50°C. Nous avons aussi testé 3 concentrations en DMSO : 0, 1 ou 5 %.

A ce stade ce sont encore des dimères d'amorces qui sont obtenus (non montré). Ce résultat négatif était surprenant puisque dans des conditions normales, une hémimested assure une meilleure spécificité de l'amplification et donne un produit PCR visualisable sur gel.

Nous avons alors supposé que la séquence à amplifier posait en elle-même problème. Celle-ci est riche en GC et possède des répétitions en dinucléotides GT et en tétranucléotides GCAG qui peuvent faire avorter la polymérase de la matrice. Le tampon R.Hun est un tampon particulièrement stringent qui a permis l'amplification de répétitions de trinucleotides impliqués dans la maladie de Huntington. Nous avons donc décidé de le tester dans nos amplifications.

D. Changement de tampon PCR :

Nous avons substitué au tampon DynaZyme le tampon R.Hun et effectué des PCRs dont les températures d'hybridation étaient de 55°C et 45°C avec les amorces 191, 182 (100 pm) (Annexes 1.2., 1.6.).

La matrice étant une préparation d'ADNg ayant subi 1, 2 ou 3 extractions au phénol-chloroforme, 3 concentrations de ces extraits sont utilisés dans la PCR : 1 ng, 10 ng, 100 ng. Un contrôle positif est aussi réalisé avec le tampon DynaZyme et le tampon R.HUN.

Le contrôle positif réalisé en présence de séquences plasmidiques HIV et d'amorces spécifiques ne montre aucune amplification dans le tampon R.HUN (résultat non montré), ce qui démontre que la DynaZyme II est totalement inhibée par ce tampon. Ceci explique que nous n'obtenons aucun amplicon pour les autres tubes PCR.

Les problèmes d'amplification étant peut-être liés à une structure particulière de la matrice d'ADN génomique. Nous décidons de la restreindre, afin d'obtenir des fragments plus courts. On sait que la taille de la matrice influence les cinétiques de dénaturation, d'hybridation et de renaturation.

E. PCR sur ADN génomique restreint :

Nous avons réalisé sur l'ADNg ayant subi 2 extractions au phénol-chloroforme soit une restriction Eco RI, soit Cla I, soit Eco RI et Cla I. Nous avons vérifié que aucun de ces enzymes ne coupait le promoteur CSF-1 (Annexe 2.2.). Nous avons donc effectué une PCR sur 100 ng de ces ADNg restreints en présence de 0, 5 ou 10% en DMSO. L'hybridation étant réalisée à 55 °C. Les amorces utilisées étaient 191 et 182 (Annexes 1.2., 1.6.) à raison de 100 pm chacune.

Seuls des dimères d'amorces sont obtenus (résultat non montré).

Nous avons décidé de réaliser une étape supplémentaire d'"héminested" car nous supposons que l'amplification en "simplex" pouvait être faible vu le petit nombre de copie de la cible dans la matrice.

F. Héminested PCR sur ADN génomique restreint :

Une "héminested" est alors réalisée sur les produits de la "simplex" PCR précédente avec les amorces KPO-1, KPN-1 (100 pm) (Annexes 1.1., 1.6.) en présence de 0, 5 ou 10% en DMSO et toujours une hybridation à 55 °C.

Aucune amplification spécifique n'est obtenue (résultat non montré).

A ce stade, il nous semble évident que nous devons nous interroger sur les séquences des amorces. En effet, elles forment des dimères et n'amplifie pas la séquence voulue. Des PCRs réalisées avec des amorces plus grandes nous permettraient d'effectuer des hybridations à températures plus élevées.

G. Utilisation d'amorces plus longues :

Des nouvelles amorces de 25 bases (251 et 252) (Annexes 1.3., 1.6.) sont donc utilisées. Leur longueur supérieure, leurs températures de fusion plus élevées permettent des hybridations plus stringentes.

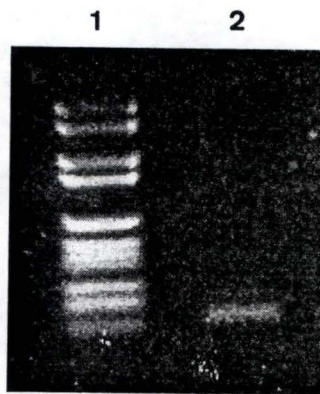


Figure III.4. :

Contrôle positif HIV amplifié avec la DynaZyme II dans les conditions suivantes :
Dénaturation longue 4 minutes à 98°C.
40 cycles : Dénaturation 30 secondes à 98°C.
Hybridation et élongation en une étape de 45 secondes à 72°C.
Terminer la PCR par 10 minutes à 72°C.

Pistes :

1 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
2 : contrôle positif HIV.

Nous appliquons aussi les conditions PCR qui ont déjà été utilisées pour l'amplification de cibles sur ADNg de souris: Dénaturation longue 4 min à 98°C.

Effectuer 40 cycles : Dénaturation 30 sec à 98°C.

Hybridation et élongation en une étape de 45 sec à 72°C.

Elongation finale 10 minutes à 72°C.

Cette PCR est réalisée sur 10, 50 et 100 ng d'ADN génomique humain purifié par traitement à la RNAase, protéinase-K, phénol-chloroforme (Promega, Madison, USA). Un contrôle positif est également effectué en présence de plasmide HIV et d'amorces spécifiques.

Le contrôle positif permet de constater que dans de telles conditions la DynaZyme perd beaucoup de son activité (Figure III.4.). Aucun produit PCR d'intérêt n'est obtenu en utilisant les amorces spécifiques du promoteur.

Il est possible que la perte d'activité de la DynaZyme soit essentiellement liée à l'étape de dénaturation longue de 4 minutes à 98°C et aux étapes de dénaturation de chaque cycle. Pour limiter cette perte d'activité tout en conservant une garantie de dénaturation complète de la matrice, nous avons décidé d'introduire une étape préalable de "hot start".

H. Utilisation du hot start :

Le mélange réactionnel PCR sans la polymérase est chauffé 10 minutes à 100°C puis refroidit sur glace afin de figer l'ADN. La polymérase est alors ajoutée et les cycles normaux de la PCR sont lancés.

Afin de limiter au maximum la perte d'activité de la DynaZyme, nous avons effectué les dénaturations à 96°C, température intermédiaire entre 94 et 98°C. La température d'hybridation est de 72°C et les amorces utilisées sont 251, 252 (Annexes 1.3., 1.6.) et 191, 182 (Annexes 1.2.,1.6.) (100 pm), une hybridation à 55°C a aussi été testée. Nous essayons ces deux couples d'amorces dans le cas où un des deux donnerait de meilleurs résultats.

Nous utilisons à nouveau l'ADNg de Promega à raison de 100 et 10 ng. Ces PCR ont été réalisées en présence de 0, 5 ou 10% en DMSO.

Figure III.5. :

Figure III.5a. :

Amplification sur ADNg humain pure (Promega) pour 3 concentrations en ADNg : 1, 10, 100 ng. Les amorces utilisées sont : 191, 192 (100 pm) ; 251, 252 (100 pm). Pour chaque condition un double est réalisé. La PCR est une "simplex" en "touchdown" avec la polymérase DynaZyme II. Migration de 15 µl des produits PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Pistes : :

1 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.

Amorces 251, 252 :

Quantité en ADNg matrice :

2 : 1 ng.

3 : 1 ng.

4 : 10 ng.

5 : 10 ng.

6 : 100 ng.

7 : 100 ng.

Amorces 191, 182 :

Quantité en ADNg matrice :

8 : 1 ng.

9 : 1 ng.

10 : 10 ng.

11 : 10 ng.

12 : 100 ng.

13 : 100 ng.

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

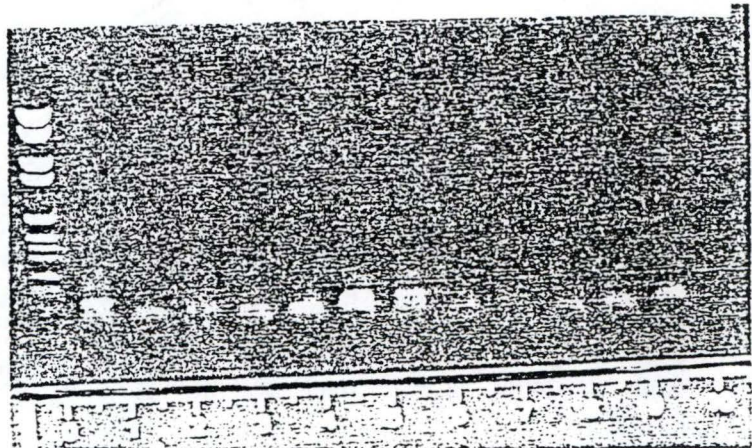


Figure III.5b. :

"Heminested" en "touchdown" réalisée sur les produits de "simplex" de III.5a.

Amorces utilisées : KPN-1, KPO-1 (100 pm). 10 µl du produit de "simplex" non dilués sont utilisés comme matrice. La polymérase utilisée est la DynaZyme II. Migration de 15 µl des produits PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Pistes :

1 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.

"Heminested" KPO-1, KPN-1 sur 10 µl des produits de "simplex" suivants :

Amorces utilisées dans la "simplex" : 251, 252 :

Quantité en ADNg matrice dans la "simplex" :

2 : 1 ng.

3 : 1 ng.

4 : 10 ng.

5 : 10 ng.

6 : 100 ng.

7 : 100 ng.

Amorces utilisées dans la "simplex" : 191, 182 :

Quantité en ADNg matrice dans la "simplex" :

8 : 1 ng.

9 : 1 ng.

10 : 10 ng.

11 : 10 ng.

12 : 100 ng.

13 : 100 ng.

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



Aucune amplification n'est observée (résultat non montré)

La température d'hybridation est peut-être à mettre en cause, en effet il existe d'importantes différences entre les températures de fusion calculées par le % de GC et par la méthode 2AT+4GC. Dès lors il est difficile de choisir, sachant que la température d'hybridation devra être de 5 à 10°C en dessous de la température de fusion. Une "touchdown" PCR peut résoudre ce problème.

I. Effet de la touchdown PCR :

Nous décidons d'essayer la "touchdown" PCR, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction celle-ci permet de tester un ensemble de températures d'hybridation tout en gardant une bonne spécificité. Par ailleurs la DynaZyme ne conserve pas son activité de manière prolongée à des températures élevées. Nous avons réalisé un "hot start" de 10 minutes à 100 °C, les conditions PCR étant :

Dénaturation de 45 sec à 96°C

Hybridation de 30 sec à 65°C en diminuant de 2°C par cycle jusqu'à 49°C et en clôturant par 4 cycles à 49°C.

Élongation à 72 °C.

Terminer la PCR par 10 minutes à 72°C.

Nous avons testé les couples d'amorces 251, 252 (Annexes 1.3., 1.6.) et 191, 182 (Annexes 1.2., 1.6.) à une concentration de 10 ou 100 pm pour 1, 10 et 100 ng d'ADNg non restreint et 50, 100 ng d'ADNg restreint par Eco RI.

Les résultats montrent des dimères d'amorces pour le couple 251, 252 alors que des traînées diffuses (peu visibles) sont obtenues pour 191, 182 (Figure III.5a.).

Une "héminested" PCR est alors réalisée en "touchdown" avec les amorces KPO-1, KPN-1 (100 pm) (Annexes 1.1., 1.6.) sur 10 ul des produits de la "simplex" dilués 1 fois ou 10 fois. Les conditions de la "touchdown" sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

La PCR donne à nouveau essentiellement des dimères d'amorces (Figure III.5b.)

J. Analyse de ces résultats négatifs :

De ces dernières expériences 3 conclusions peuvent être tirées :

- L'utilisation d'une matrice d'ADNg la plus pure possible permet d'éviter les problèmes liés à la présence d'inhibiteurs potentiels de polymérases.
- L'optimisation de l'hybridation, c.à.d. la conception et l'utilisation d'amorces plus longues sont censées rendre l'hybridation plus spécifique. Les amorces utilisées jusqu'à présent ont une forte tendance à former des dimères. Il faut augmenter la température d'hybridation afin d'éliminer ces dimères et d'augmenter la spécificité de l'hybridation; ceci d'autant plus que les températures de fusion des amorces sont élevées.
- La DynaZyme II ne semble pas être la meilleure des polymérases à utiliser dans le cadre de ce travail car sa thermostabilité ne permet pas des dénaturations prolongées à températures élevées mais aussi des hybridations à des températures supérieures à 72°C alors que nos amorces permettent de monter à des températures plus élevées garantant d'une meilleure spécificité.

K. Utilisation d'amorces de longueur supérieures :

Afin d'augmenter la spécificité de l'hybridation nous avons décidé d'utiliser une paire d'amorces encore plus longues, 301 et 302 (Annexes 1.4., 1.6.) faisant chacune 30 bases. L'amorce 302 s'hybride sur l'exon 1 du gène CSF-1. Les exons sont des séquences peu ou non redondantes dans le génome, elles constituent donc une cible de choix pour des amorces.

Ces amorces ont été testées dans un premier temps pour des amplifications avec la DynaZyme II. En effet avec celles-ci, il n'est pas exclu que la DynaZyme II puisse nous donner une amplification spécifique. 301 et 302 sont utilisées en concentration réduite (20 pm) pour la "simplex" PCR.

Ensuite une "hémimested" a été effectuée sur les produits de "simplex" obtenus avec 301, 302. Les amorces 251, 252 sont utilisées dans l'"hémimested" à raison de 100 pm chacune et par réaction PCR.

Figure III.6. :

Figure III.6a. :

"Simplex" PCR précédée d'un "hot start" sur 100, 500 ng, 1 µg d'ADNg (Promega) non restreint et 1 µg d'ADNg (Promega) restreint par Pst I. Les amorces utilisées sont 301 et 302 (20 pm). L'hybridation se réalise à 72°C, l'enzyme utilisée est la DynaZyme II. Migration de 15 µl des produits PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Pistes :

- 1 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 2 : 1 µg d'ADNg matrice non restreint.
- 3 : 500 ng d'ADNg matrice non restreint.
- 4 : 100 ng d'ADNg matrice non restreint.
- 5 : 1 µg d'ADNg matrice restreint par Pst I.

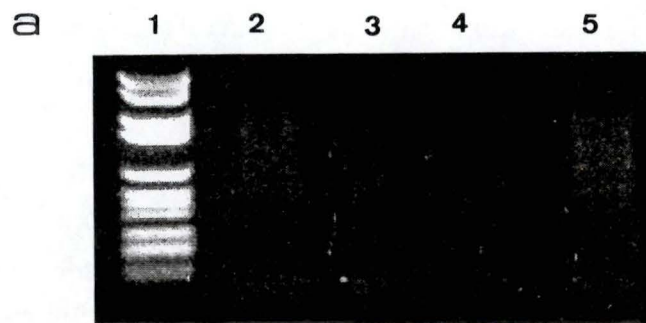
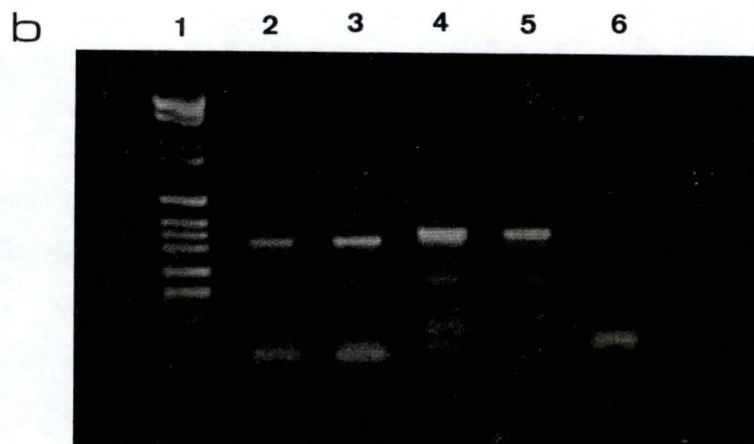


Figure III.6b :

"Héminested" précédée d'un "hot start" avec les amorces 251, 252 (100 pm) réalisée sur 10 µl des produits décrits ci-dessus. Hybridation à 72°C, l'enzyme utilisée est la DynaZyme II. Migration de 15 µl des produits PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Pistes :

- 1 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- Produits d'"héminested" sur 10 µl des produits de la "simplex" où nous avons utilisé :
- 2 : 1 µg d'ADNg matrice non restreint.
- 3 : 500 ng d'ADNg matrice non restreint.
- 4 : 100 ng d'ADNg matrice non restreint.
- 5 : 1 µg d'ADNg matrice restreint par Pst I.
- 6 : Contrôle négatif (PCR sans ADN matrice).



En effet, Igarashi et al.(1991) ont montré que l'utilisation d'une faible concentration en amorces au cours de la première PCR suivie par une "nested" où la concentration en amorces est supérieure de 4 à 5 fois donnait une plus grande spécificité et un meilleur rendement.

Nous avons utilisé 1 µg, 500 et 100 ng de matrice ADN_g non restreint et 1 µg de matrice ADN_g restreint par Pst I (site absent de notre cible). Cet ADN_g a été purifié par traitement des extraits cellulaires THP-1 à la RNAase, protéinase-K suivi de 3 extractions phénol-chloroforme.

Les conditions PCR utilisent des températures élevées car les amorces sont plus longues.

"hot start" 10 minutes à 100°C.

Refroidir à 4°C et ajouter la polymérase.

Dénaturer encore 2 minutes à 96°C.

Réaliser 40 cycles : Dénaturation 45 secondes à 96°C

Hybridation, élongation 1 minute à 72°C.

Elongation finale 10 minutes à 72°C.

Une traînée diffuse pour tous les produits PCR de "simplex" est obtenue sur gel d'agarose 1,2%, elle est surtout visible pour l'ADN_g restreint, cependant pour ce dernier, vu la quantité de matrice utilisée, il est possible que ce soit son profil de restriction que nous observons (Figure III.6a.).

Une "héminested" est alors réalisée sur ces produits, les conditions de cycles restant inchangées.

Nous obtenons alors un profil PCR intéressant (Figure III.6b.). Des bandes nettes sont obtenues. Parmi celles-ci, une retient plus particulièrement notre attention, sa taille correspond à la moitié de la bande attendue de 792 pb, mais elle a été produite en grande quantité.

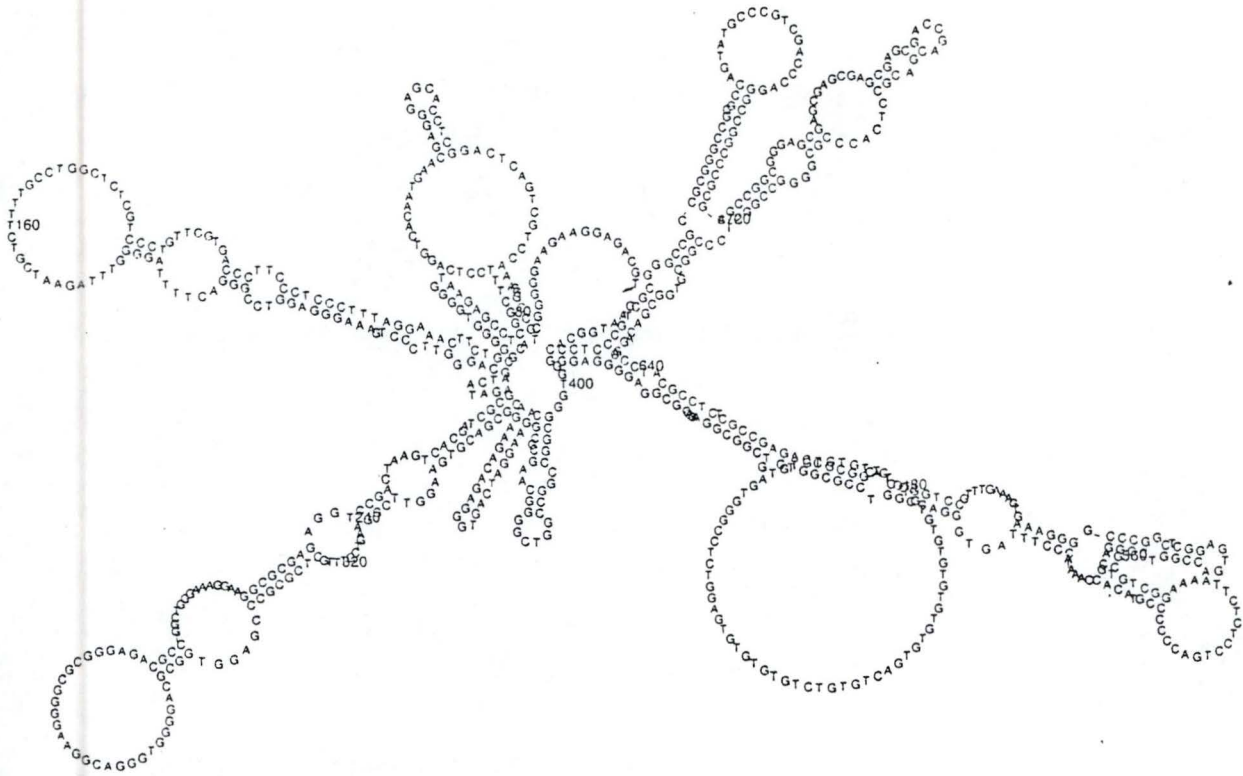
L'intensité de cette bande décroît quand la concentration en ADN_g utilisé comme matrice augmente. Soit il reste des inhibiteurs de polymérase en faible quantité, soit il s'agit là d'un effet de viscosité du mélange PCR.

Figure III.7. :

Figure III.7a :

Structures secondaires à 55°C, 1M NaCl pour le brin sens du promoteur CSF-1, si on considère que les 2 extrémités du brin ne sont pas libres.

a



ENERGY = -127.3 CSF15'

Figure III.7b. :

Structures secondaires à 55°C, 1M NaCl pour le brin antisens du promoteur CSF-1, si on considère que les 2 extrémités du brin ne sont pas libres.

b



ENERGY = -122.2 CSF15'

Cette dernière hypothèse est plus vraisemblable car pour la PCR réalisée à partir de 1 µg d'ADNg restreint par Pst I nous observons une belle bande en comparaison au produit PCR obtenu avec 1 µg d'ADNg matrice non restreint.

Comme le rendement semble meilleur pour 100 ng d'ADNg non restreint, nous décidons de fixer les concentrations en matrice autour de cette valeur. L'utilisation d'ADNg restreint ne donne pas un profil de bande différent de celui non restreint.

Par ailleurs, il n'est pas certain que l'amplicon obtenu ne soit pas un produit spécifique. En effet des délétions importantes (de quelques bases au kilobase) peuvent survenir en PCR lors d'amplification de régions cibles formant d'importantes structures secondaires.

Afin d'évaluer l'importance de ces structures secondaires, nous avons soumis la séquence du promoteur CSF-1 simple brin sens (5'-3') et anti-sens (3'-5') à un programme de modélisation de structures secondaires en fonction de la température (DNA Fold). A 55°C, nous observons encore d'importantes structures secondaires relativement stables car riches en GC (Figure III.7a, 7b.).

Il faut être prudent sur les conclusions tirées de cette modélisation. En effet des conditions différentes de salinité de celles utilisées en PCR mais aussi l'influence des séquences voisines de la matrice d'ADNg ne sont pas prises en compte. Ce modèle ne donne donc qu'une idée générale quant à la possibilité d'avoir ou non des structures secondaires gênantes.

Si il y a vraiment des structures secondaires, les possibilités suivantes s'offrent à nous :

- Augmenter les températures d'hybridation ce qui déstabiliserait les structures secondaires et permettrait une meilleure spécificité de l'hybridation. Cependant la DynaZyme II ne semble pas supporter des hybridations à 72°C. Il faut donc changer d'enzyme.
- Tester d'autres polymérases car leur comportement face aux structures secondaires risque d'être différent, certaines pouvant déplier ces structures.

5. Essais de PCR utilisant la Taq (Boehringer, Mannheim, Allemagne), Gold (Perkin-Elmer (Roche), Branchburg, USA), la Pwo (Boehringer, Mannheim, Allemagne) et la Tth (Boehringer, Mannheim, Allemagne) :

5.1. Stratégie :

5.1. Choix des polymérases :

Nous avons orienté notre choix sur les polymérases suivantes :

Taq (Boehringer, Mannheim, Allemagne)

Pwo (Boehringer, Mannheim, Allemagne)

Tth (Boehringer, Mannheim, Allemagne)

Gold (Perkin-Elmer (Roche), Branchburg, USA)

La Taq est la polymérase la plus couramment utilisée en PCR, elle paraît donc incontournable pour la suite de nos essais, d'autant plus qu'elle a déjà été utilisée pour amplifier avec succès des séquences sur ADNg total humain. Elle permet d'atteindre des températures d'hybridation supérieures (75°C). Même si il n'y a que 3°C de différence par rapport à la DynaZyme II, il n'est pas rare que l'efficacité des amplifications se jouent au degré près.

La Pwo permet également une hybridation à 75°C, en outre elle possède des activités intéressantes, exonucléase 3'-5' et 5'-3'. Elle est aussi conseillée pour les amplifications sur ADNg.

La Tth est quant à elle moins sensible aux inhibiteurs par rapport à d'autres polymérases, elle permet aussi une hybridation à 75°C. Elle possède une activité exonucléase 5'-3' et ses caractéristiques d'élongation sont différentes de celles de la Taq.

Enfin la Gold de Perkin Elmer arrivée sur le marché pendant ce mémoire permet d'effectuer jusqu'à 60 cycles PCR. Cette enzyme s'active seulement après avoir séjourné 5 minutes entre 94°C et 98°C, elle ne perd donc pas d'activité au cours de l'étape longue de dénaturation. On pourrait parler de "pseudo-hot start" puisque l'enzyme est déjà présente dans le mélange PCR.



Figure III.8. :

Vérification sur gel après restriction par Pst I de la pureté de l'ADNg extrait de cultures de monocytes THP-1 traités à la RNAase, Protéinase-K, et ayant subit 3 extractions au phénol-chloroforme. Migration 2 heures sur gel d'agarose 0,8%.

Pistes :

- 1 : Marqueur III (Boehringer) λ -DNA restreint par Eco RI et Hind III, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.
- 2 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 3 : 1 μ g d'ADNg restreint par Pst I.

5.2. La matrice :

Nous utiliserons comme matrice les extraits d'ADNg de cultures de monocytes THP-1 traités par RNAase, protéinase K et ayant subi 3 extractions au phénol-chloroforme. Les extraits sont quantifiés sous UV à 260 nm, la présence d'impuretés étant calculée par le rapport des absorbances à 260 et 280 nm.

Enfin un dernier contrôle est effectué par migration sur gel d'agarose 0,8% de 1 µg d'extrait d'ADNg restreint par Pst I (Figure III.8). L'estimation de la concentration est d'environ 100 ng/µl, le rapport des absorbances étant supérieur à 1,75.

Par la suite nous utiliserons de l'ADNg humain préparé par Boehringer. Cet ADNg est à une concentration de 200 ng/µl. Nous utiliseront des concentrations voisines de 100 ng d'ADNg dans chaque réaction PCR.

5.3. PCR :

5.3.1. Conditions PCR testées :

Les 4 polymérases énumérées précédemment seront utilisées pour des "simplex" PCRs avec les amorces 301, 302 (20 pm) (Annexes 1.4., 1.6.) et pour les "hémimested" avec les amorces 251, 252 (100 pm) (Annexes 1.3., 1.6.).

Pour la Taq, la Pwo et la Tth les conditions PCR testées sont les mêmes :

"hot start" 10 minutes à 100°C.

Refroidir à 4°C.

Ajouter la polymérase - 5 unités par réaction.

Dénaturer encore 2 minutes à 96 °C.

40 cycles : dénaturation 45 secondes à 96°C.

hybridation, élongation 1 minute à 75°C.

Elongation finale 10 minutes à 75 °C.

Figure III.9 :

Produits d'"heminested" réalisées avec les amorces 251, 252 et les polymérase Tth, Pwo, et Taq sur 10 μ l des produits de "simplex" PCR obtenus avec la Tth, la Pwo, et la Taq. La "simplex" PCR a été réalisée sur 100 ng et 200 ng d'ADNg non restreint et 1 μ g d'ADNg restreint par Pst I. L'hybridation de la "simplex" est effectuée à 75°C et à 72°C pour l'"heminested".

Migration de 15 μ l des produits d'"heminested" de la Tth, la Pwo et de la Taq (des doubles sont réalisés pour les produits de "simplex" avec 100 et 200 ng d'ADNg).
PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Pistes : produits d'"heminested".

1 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.

A PCR réalisées avec la Tth :

- 2 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 100 ng d'ADNg.
- 3 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 100 ng d'ADNg.
- 4 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 200 ng d'ADNg.
- 5 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 200 ng d'ADNg.
- 6 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 1 μ g d'ADNg restreint par Pst I.

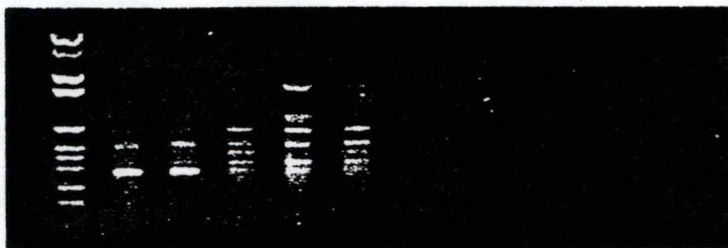
PCR réalisée avec la Pwo :

- 7 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 100 ng d'ADNg.
- 8 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 100 ng d'ADNg.
- 9 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 200 ng d'ADNg.
- 10 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 200 ng d'ADNg.
- 11 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 1 μ g d'ADNg restreint par Pst I.

B PCR réalisée avec la Taq :

- 1 : 1 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 2 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 100 ng d'ADNg.
- 3 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 100 ng d'ADNg.
- 4 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 200 ng d'ADNg.
- 5 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 200 ng d'ADNg.
- 6 : "heminested" sur les produits de "simplex" PCR 1 μ g d'ADNg restreint par Pst I.

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



B 1 2 3 4 5 6



Pour la Gold, vu ses caractéristiques différentes nous avons testé les conditions suivantes:

Pas de "hot start", 1 unité de Gold par tube.

Dénaturation 5 minutes à 95°C.

50 cycles : dénaturation 45 secondes à 95°C.

hybridation et élongation 1 minute à 74°C.

Elongation finale 10 minutes à 75 °C.

L'"héminested" est réalisée dans des conditions similaires pour les 4 polymérase avec une température d'hybridation de 72 °C.

Les tests sont réalisés en double pour 100 ng d'ADNg et 1 µg d'ADNg restreint par Pst I. 15 µl des produits PCR sont déposés sur gel d'agarose 1,2 %.

-Résultats :

La Gold nous donne essentiellement des dimères d'amorces (résultat non montré). La Pwo ne donne strictement rien pas même des dimères d'amorces que ce soit en "simplex" ou en "héminested" (Figure III.9.). La Tth donne en "simplex" un profil complexe de bandes, mais l'"héminested" ne permet pas de faire une sélection parmi celles-ci (Figure III.9.).

Enfin, la Taq ne donne rien en "simplex" (pas de dimères d'amorces), alors qu'en "héminested" nous obtenons un profil contenant de 4 à 6 bandes dont l'une située à peu près à la bonne taille (830 pb pour 792 attendues) mais de faible intensité (Figure III.9.). Une différence de migration (marqueur et bande) peut être liée à la composition du tampon PCR différente de celle du marqueur et donc influencer la migration sur le gel.

5.3.2. Conclusion :

Nous concluons donc qu'à partir de 75 °C, les amorces ne forment plus de dimères, et que parmi les polymérase testées la Taq Boehringer est sans doute la plus prometteuse, la Tth donnant un profil constitué de nombreuses bandes.

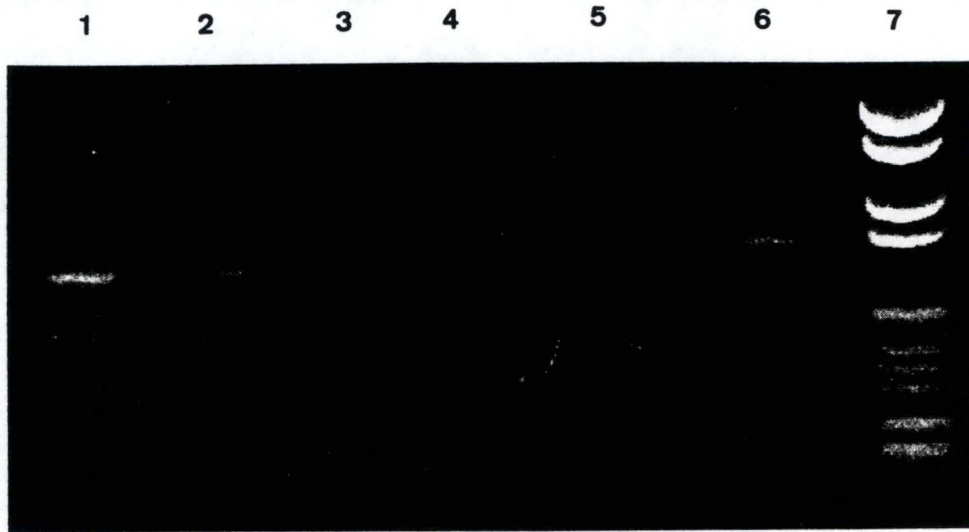


Figure III.10. :

Production du fragment 830 par "simplex" PCR suivie d'une "heminested" dans laquelle l'hybridation se fait à 75°C au lieu de 72°C. Les amorces de "simplex" sont 301, 302 (20 pm) et celles d'"heminested" sont 251, 252 (100 pm). La "simplex" PCR est réalisée sur 100, 200 ng d'ADNg pure non restreint et sur 1 µg d'ADNg restreint par Pst I. L'"heminested" PCR est réalisée en double sur 10 µl des produits de "simplex". 15 µl des produits de "simplex" et d'"heminested" sont déposés sur gel d'agarose 1,2%.

Pistes : Montré ci-dess us le pattern de migration de l'"heminested".
ADNg non restreint dans la "simplex" :

- 1 : 100 ng d'ADNg matrice.
- 2 : 100 ng d'ADNg matrice.
- 3 : 200 ng d'ADNg matrice.
- 4 : 200 ng d'ADNg matrice.

ADNg restreint dans la "simplex" :

- 5 : 1 µg d'ADNg matrice restreint par Pst I.
- 6 : 1 µg d'ADNg matrice restreint par Pst I.
- 7 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.



Figure III.11. :

2 µl du fragment 830 purifié par "Gene Clean II" sont déposés sur un gel d'agarose 1,2% afin de vérifier que le fragment est bien unique.

Pistes :

- 1 : 2 µl d'échantillon purifié du fragment 830.
- 2 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.

6. Caractérisation du fragment 830 obtenu avec la Taq:

6.1. Production du fragment 830 par PCR :

Comme la bande que nous appellerons 830 est produite en faible quantité et en présence d'autres fragments, nous avons essayé de faire des amplifications dans des conditions similaires afin d'obtenir davantage de matériel et de façon plus spécifique en vue du clonage.

Conditions PCR testées :

Nous reprenons les conditions déjà utilisées précédemment pour obtenir le fragment 830, mais nous augmentons la température d'hybridation de l'"hémimested" qui passe de 72 à 75°C.

La PCR a été réalisée sur 100 ng et 200 ng d'ADNg non restreint et sur 1 µg d'ADNg restreint par Pst I (des doubles sont réalisés pour étudier la reproductibilité de la réaction), 40 cycles sont effectués. Les amorces de "simplex" PCR sont 301 et 302 (Annexes 1.4., 1.6.), celles de l'"hémimested" sont 251, 252 (Annexes 1.3., 1.6.).

Résultats :

Comme dans le premier cas, la "simplex" ne donne pas d'amplicon visible sur gel alors que l'"hémimested" montre une, voir parfois deux bandes. Dans ces profils, la bande à 830 est amplifiée de manière unique dans 3 cas sur 6. C'est pour 100 ng (ADNg) que les amplifications semblent le mieux fonctionner, alors que pour l'ADNg restreint une bande contaminante apparaît (Figure III.10.).

6.2. Isolement et purification du fragment 830 :

La bande que nous appellerons 830 est extraite du gel et purifiée avec le Kit «Gene Clean II».

Le produit purifié est resuspendu dans 100 µl d'eau distillée stérile et dosé sous UV à 260 nm. La quantité récupérée est de 10 ng/µl. 2 µl du produit purifié sont déposés sur gel d'agarose 1,2% pour vérifier de manière visuelle le succès de l'extraction (Figure III.11.).

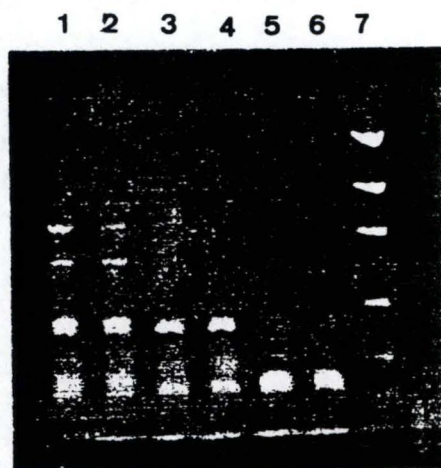


Figure III.12. :

"Heminested" PCR sur 1 μ l du produit 830 purifié et dilué 1, 10, 100, 1000, 10 000 et 50 000 fois. Les amorces utilisées sont KPO-1 et KPN-1.
15 μ l des produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose 1,2%.

Pistes :

- 1 : matrice 830 diluée 1x.
- 2 : matrice 830 diluée 10x.
- 3 : matrice 830 diluée 100x.
- 4 : matrice 830 diluée 1000x.
- 5 : matrice 830 diluée 10 000x.
- 6 : matrice 830 diluée 50 000x.
- 7 : Marqueur Low DNA Mass Ladder (Gibco), 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 pb.

6.3. Caractérisation du fragment PCR 830 purifié par restrictions enzymatiques :

Une première tentative de caractérisation est réalisée par une restriction Dde I sur 10 µl du fragment 830 (10ng/µl). Si cet amplicon est bien celui recherché, alors nous devons obtenir 3 bandes visibles sur gel d'agarose : 364 pb, 263 pb et 126 pb; et une quatrième non visible de 38 pb. Cependant la quantité de matériel étant trop faible après restriction puis migration sur un gel d'agarose 1,2%, il est impossible d'observer le profi de restriction (résultat non montré).

6.4. Caractérisation du fragment 830 par PCR :

Conditions PCR testées :

Une autre façon rapide de caractériser la bande est de réaliser une "hémimested" PCR sur le fragment 830 avec les amorces KPO-1 et KPN-1 (Annexes 1.1., 1.6.). Si c'est bien le promoteur CSF-1, alors l'amplification doit donner un fragment de 750 pb. L'"hémimested" PCR est réalisée avec un "hot start" et une hybridation à 65 °C sur le fragment 830 purifié et dilué 1, 10, 100, 1000, 10 000, 50 000 fois.

15 µl des produits PCR sont déposés sur gel d'agarose 1,2%. Pour toutes ces dilutions en matrice, une ou deux bandes de 380 pb sont obtenues (Figure III.12.). Pour les dilutions 1, 10, 100 fois, nous observons une bande à 830 et une à 700 pb (Figure III.12.).

Résultats :

Nous n'obtenons pas les bandes de taille recherchée (Figure III.12.). Cependant, il est possible que les fragments trop petits correspondent à des amplicons qui ont subi des délétions suite à la formation de structures secondaires dans la matrice.

Afin d'obtenir une réponse définitive sur la nature de ces amplicons, nous décidons de cloner le fragment 830 dans le vecteur T pGEM-T (Promega, Madison, USA) afin de réaliser une carte de restriction et le séquençage, puisque les essais précédents n'ont pas permis d'identifier le fragment 830 comme étant ou non le promoteur CSF-1.

Figure III.13. :

Optimisation de l'amplification PCR du fragment 830 :

Pistes :

"simplex" PCR avec les amorces 301 et 302 (20 pm), et 100 ng d'ADNg matrice :

- 1 : 0% DMSO.
- 2 : 5% DMSO.
- 3 : 10% DMSO.

"Heminested" PCR avec les amorces 301 et 252 (100 pm) et 0 ou 5% de DMSO effectuée sur 10 μ l des produits de "simplex".

Matrice : 10 μ l de produit PCR "simplex" avec 0% en DMSO.

- 3 : 0% DMSO dans l'"hèminested".
- 4 : 5% DMSO dans l'"hèminested".

Matrice : 10 μ l de produit PCR "simplex" avec 5% en DMSO.

- 5 : 0% DMSO dans l'"hèminested".
- 6 : 5% DMSO dans l'"hèminested".

Matrice : 10 μ l de produit PCR "simplex" avec 10% en DMSO.

- 7 : 0% DMSO dans l'"hèminested".
- 8 : 5% DMSO dans l'"hèminested".

9 : Marqueur Low DNA Mass Ladder (Gibco), 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 pb.



6.5. Optimisation de l'amplification PCR du fragment 830 :

Nous voulons d'abord optimiser nos conditions PCR afin de produire davantage et de manière spécifique le fragment 830.

Conditions PCR testées :

Nous décidons d'effectuer un "hot start" de 4 minutes à 100°C. En effet, 10 minutes de "hot start" à 100°C est sans doute trop long et la matrice s'endommage. Il n'est pas nécessaire d'utiliser 5 unités de Taq par réaction PCR; 2,5 unités suffisent d'autant plus que des concentrations plus faibles en Taq améliorent la spécificité.

Après avoir réalisé le "hot start", nous refroidissons le mélange PCR sur glace et nous ajoutons la Taq.

Nous dénaturons encore 1 minute à 96 °C puis nous effectuons 35 cycles :

Dénaturation 30 secondes à 96°C.

Hybridation et élongation 45 secondes à 75°C.

Terminer la PCR par 10 minutes à 75°C.

Une "simplex" PCR est réalisée dans ces conditions pour 100 ng d'ADNg, 20 pm des amorces 301 et 302 (Annexes 1.4., 1.6.) et 0, 5 ou 10% en DMSO.

Résultats :

Comme nous nous y attendions, la "simplex" PCR ne donne pas d'amplicons visibles sur gel. Nous réalisons alors une "hémimested" PCR sur 10 µl de ces échantillons avec les amorces 301, 252 (100 pm) (Annexes 1.3., 1.2., 1.6.). L'"hémimested" est réalisée avec 0 ou 5% en DMSO.

L'amplicon 830 est obtenu de manière importante et spécifique si nous utilisons toujours 0% en DMSO dans la "simplex" PCR puis soit 0, soit 5% en DMSO dans l'"hémimested", la seconde combinaison donnant le rendement optimum (Figure III.13.).

Par contre, toutes les combinaisons impliquant l'ajout de DMSO dans la "simplex" ne donnaient pas d'amplification (Figure III.13.). Comme nous savons que 5% en DMSO dans l'"hémimested" n'empêche pas l'amplification si 0% de DMSO est utilisé dans la "simplex", c'est que la présence de DMSO dans la "simplex" inhibe la réaction. Or,

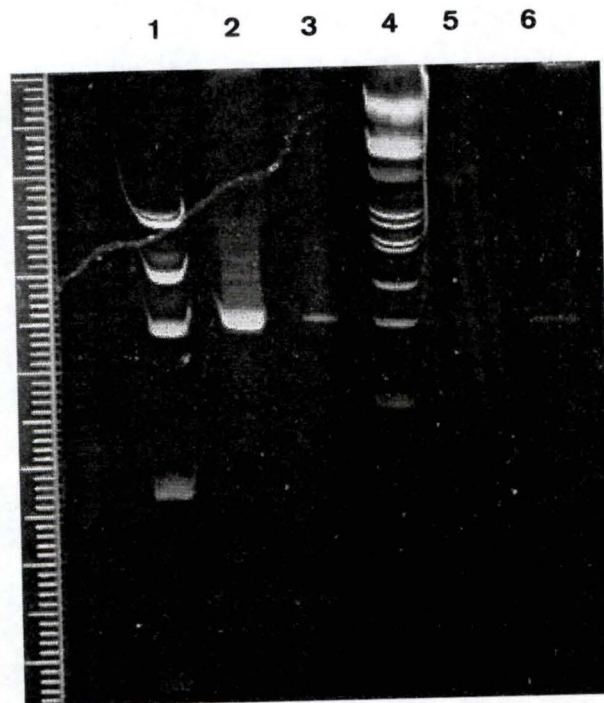


Figure III.14. :

Vérification de la taille du fragment 830 sur gel d'acrylamide 5%.

Pistes :

- 1 : Marqueur Low DNA Mass Ladder (Gibco), 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 pb.
- 2 : 30 μ l de produit PCR total contenant le fragment 830.
- 3 : 30 μ l du fragment 830 purifié par Gene Clean II.
- 4 : Marqueur III (Boehringer) λ -DNA restreint par Eco RI et Hind III, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.
- 5 : Restriction par Dde I de 30 μ l du fragment 830 purifié.
- 6 : Restriction par Bgl I de 30 μ l du fragment 830 purifié.

comme nous l'avons décrit dans l'introduction, l'inhibition ne joue pas au niveau de la polymérase pour de telles concentrations en DMSO.

Conclusion :

Le DMSO a comme effet d'abaisser la température de melting des amorces. Celles-ci s'hybrident à plus basse température, mais se dissocient aussi de la matrice à température moins élevée. La raison la plus probable pour que l'amplification ait échoué est que les amorces 301 et ou 302 n'ont pas pu s'hybrider. Or, leur température de fusion pour la séquence du promoteur est tellement élevée qu'il est peu vraisemblable que la présence de DMSO ait empêché une telle hybridation. Nous devons donc conclure que ces amorces s'étaient hybridées de manière non spécifique dans la "simplex".

Par conséquent, le fragment 830 pourrait ne pas être celui recherché. Nous décidons de continuer les PCR afin d'obtenir le promoteur CSF-1 avec la Vent polymérase. Par ailleurs, nous caractériserons par séquençage et restriction le fragment 830.

6.6. Vérification de la taille du fragment 830 sur gel d'acrylamide 5% :

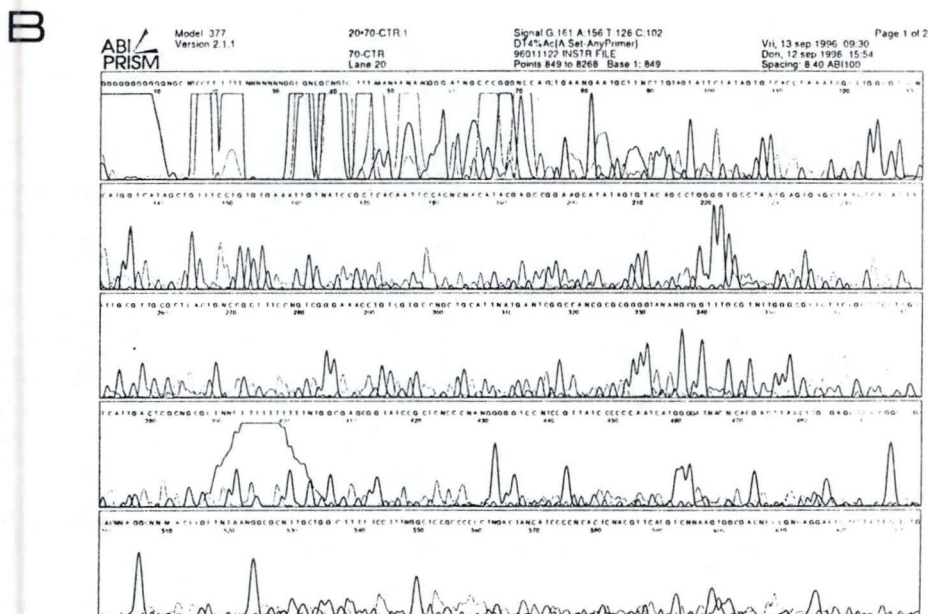
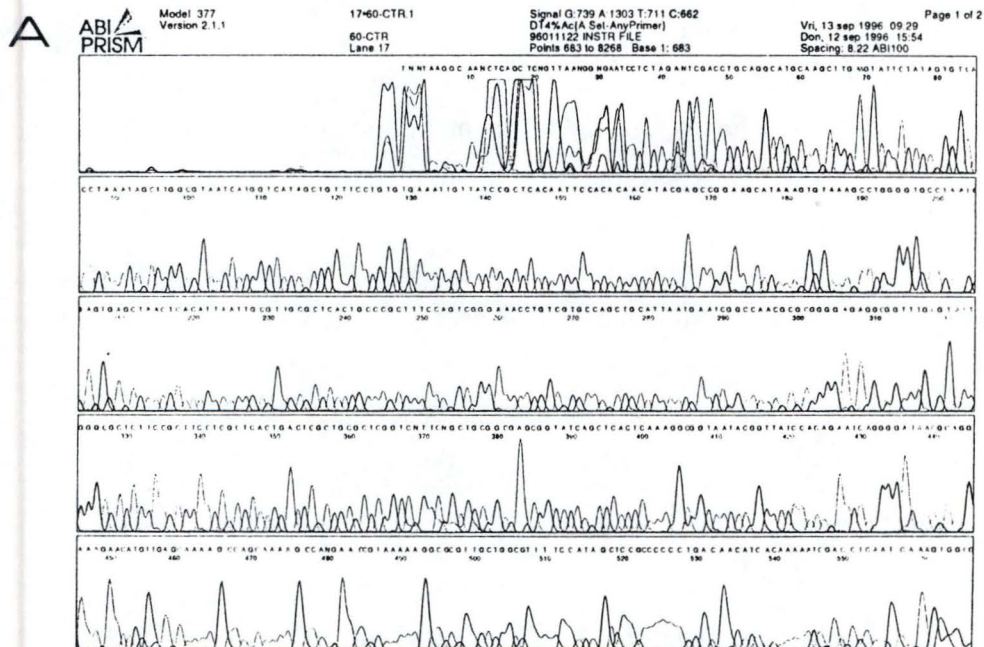
Nous ne recherchons pas exactement un amplicon de 830 pb, mais un amplicon de 792 pb. Nous avons supposé que le fragment 830 pourrait être le fragment 792 dont la taille était surestimée à cause d'interférences sur la migration dans le gel d'agarose liées à la salinité du tampon PCR.

Les gels de polyacrylamide permettent de meilleures résolutions. Nous avons donc réalisé un gel d'acrylamide 5% sur lequel nous avons fait migré le fragment 830 soit d'un produit PCR purifié par «Gene Clean II» (30 µl avec 10 ng/µl), soit 30 µl d'un produit PCR total, soit 30 µl d'un produit PCR purifié par «Gene Clean II» ayant subi une restriction Bgl I ou Dde I.

Figure III.15. :

Spectre de séquences :

A: Contrôle positif à 60 °c
 B : Contrôle positif à 70°c.



Résultats :

La taille estimée sur gel d'acrylamide pour le fragment 830 non restreint que ce soit celui d'un produit PCR total ou purifié est toujours de 830 pb (Figure III.14.).

Si l'amplicon est bien le promoteur du CSF-1 alors la restriction Bgl I complète doit donner une bande à 576 pb et à 216 pb et la restriction Dde I complète doit donner des fragments de : 366 pb, 263 pb, 125 pb, 38 pb.

Une restriction partielle Dde I peut donner des fragments de : 629 pb, 754 pb, 426 pb, 388 pb, 163 pb.

La restriction Bgl I est partielle. En effet on distingue deux bandes à 577 pb et une autre à 830 pb, la troisième plus petite n'est pas visible (Figure III.14.). La restriction Dde I est aussi partielle dans la mesure où nous obtenons des bandes peu visibles à 390 pb, 350 pb et peut être à 300 pb (Figure III.14.).

Conclusion :

Les analyses effectuées nous indiquent qu'il y a peu de chance que le fragment 830 soit celui recherché. Seul le séquençage et une carte de restriction correcte pourront le confirmer.

6.7. Séquençage du fragment 830 :

La technique de séquençage par PCR permet le séquençage direct de produit PCR à condition que celui-ci soit unique et que les nucléotides et amorces aient été éliminés. Comme nous avons réussi à optimiser la PCR pour obtenir un produit unique de 830 pb cela nous permet d'utiliser le kit de Quiagene «Quiaquick PCR purification kit» pour purifier celle-ci sans passer par une extraction sur gel.

Après extraction et resuspension dans 50 µl d'eau distillée stérile, le produit PCR purifié est dosé sous UV à 260 nm (15 ng d'ADN/µl).

Pour réaliser le séquençage sur produit PCR, nous utilisons 60 ng d'amplicon comme matrice. Le protocole standard de séquençage préconise une hybridation à 60°C maximum.

Or, si le fragment 830 est bien le promoteur CSF-1, nous risquons peut être de rencontrer des problèmes de structures secondaires à cette température. Nous décidons donc d'essayer une hybridation à 60°C et une autre à 70°C.

Le séquençage est effectué dans les deux orientations à savoir, en présence de l'amorce anti-sens 301 et de l'amorce sens 252 (Annexes 1.3., 1.4., 1.6.), la PCR étant réalisée pour une hybridation de 60°C et 70°C.

Résultats :

Les contrôles positifs à 60°C sont satisfaisants. Cependant à 70°C la séquence contrôlée obtenue est moins belle mais reste valable (Figure III.15.A et B.).

Les échantillons tests donnent un spectre de séquençage plat et donc négatif (résultat non montré). Ceci renforce l'hypothèse de présence de structures secondaires qui perturbent l'action de l'enzyme.

6.8. Clonage du fragment 830 dans le vecteur pGEM-T :

Nous avons préparé des bactéries XL-1 Blue soit électrocompétentes soit CaCl₂ compétentes. De nouvelles ligations sont réalisées dans le vecteur pGEM-T et les bactéries sont transformées puis étalées sur milieu solide sélectif ampicilline additionné de X-gal et d'IPTG.

Résultats :

Nous obtenons uniquement quelques colonies bleues (négatives). On sait que certains inserts peuvent poser des problèmes lors du clonage. En effet, si ils possèdent des séquences répétées ou des répétitions inverses, ils ont tendance à recombiner avec le génome de la bactérie, certaines séquences sont létales pour les bactéries car elles peuvent titrer des protéines bactériennes, enfin les bactéries peuvent rejeter des plasmides comportant de tels inserts.

Dans de tels cas la souche bactérienne est inadéquate et nous décidons d'utiliser la souche *E.coli Sure* qui par ses caractéristiques assure une tolérance plus grande pour ce type de séquence.

Figure III.16. :

Restriction des clones transformants pGEM-T/830 par Dde I , Bgl I , Pst I .

Pistes :

Clone 1 :

1 : Dde I

2 : Bgl I

3 : Bgl I

Clone 2 :

4 : Dde I

5 : Bgl I

6 : Pst I

Clone 3 :

7 : Dde I

8 : Bgl I

9 : Pst I

10 : Marqueur III (Boehringer) λ -DNA restreint par Eco RI et Hind III, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.

11 : contrôle pGEM-T restreint Dde I.

12 : contrôle pGEM-T restreint Bgl I.

13 : contrôle pGEM-T restreint Pst I.

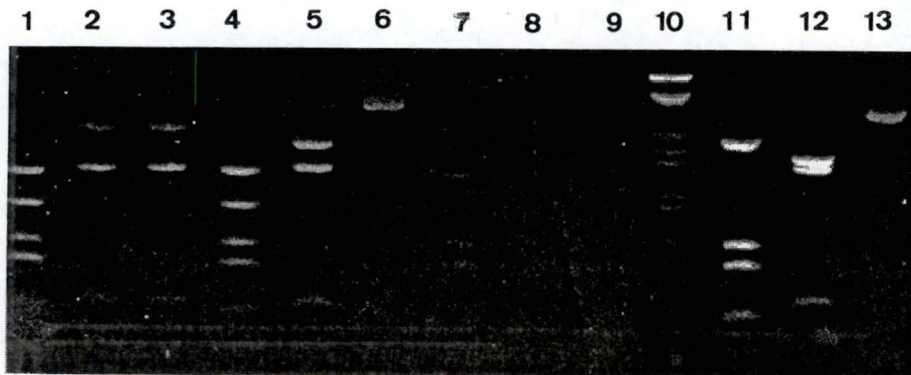
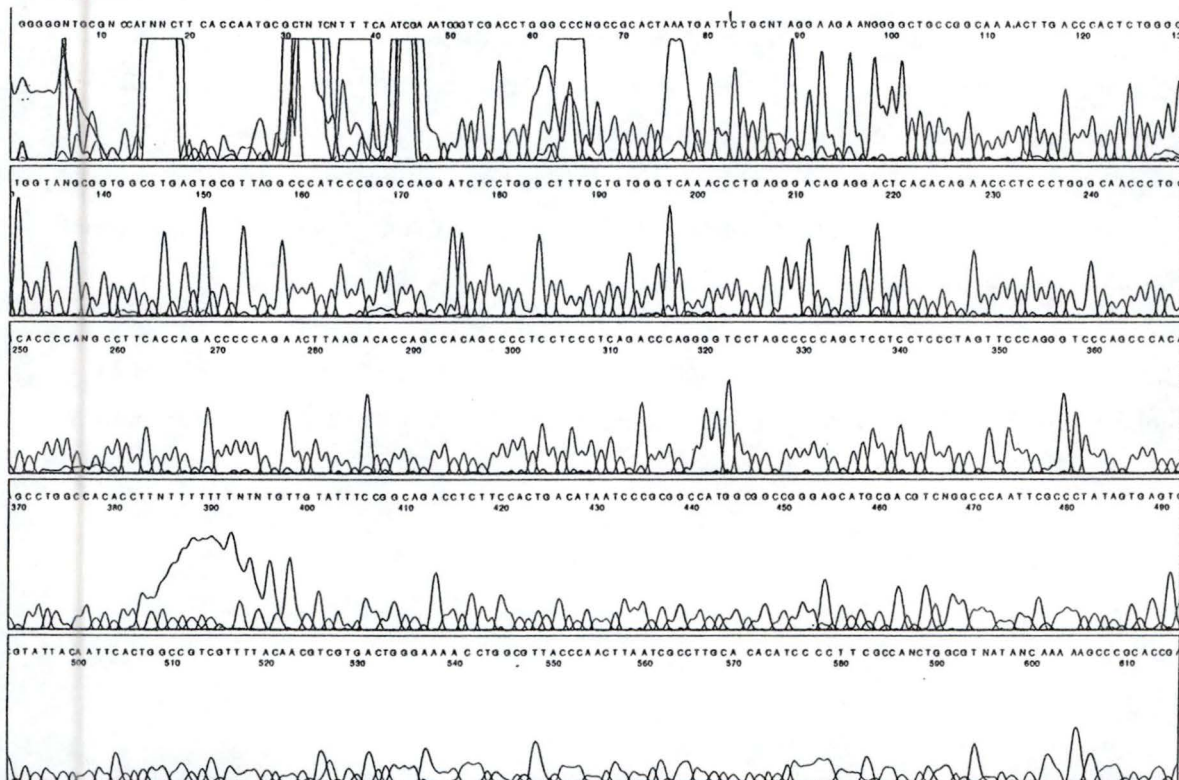


Figure III.17. :

Spectres de séquences :

Séquençage du fragment 830 cloné dans le vecteur pGEM-T :

Séquence du clone 2, amorce SP6.



6.9. Clonage du fragment 830 dans le vecteur pGEM-T et transformation de bactéries Sure CaCl₂ compétentes :

Nous avons préparé des bactéries Sure CaCl₂ compétentes que nous avons transformées avec le mélange de ligation p GEM-T:830 total (10µl) puis étalées sur milieu solide sélectif ampicilline, tétracycline additionné de X-gal et d'IPTG.

Résultats :

Seulement 3 colonies blanches sont obtenues. Une minipréparation d'ADN est réalisée pour ces trois colonies que nous appellerons C1 830, C2 830, C3 830. 2 µl du produit de miniprep sont utilisés pour réaliser une carte de restriction plasmidique permettant de caractériser notre insert. Pour chaque clone, nous avons effectué des restrictions DdeI, Bgl I et Pst I. Aucune bande de taille attendue n'est obtenue . Ainsi pour la restriction Bgl I selon l'orientation de l'insert, on s'attendait 4 fragments soit de 1733, 1321, 534, 203, soit de 1995, 1321, 272, 203 . Seulement 3 fragments de tailles différentes sont obtenus (Figure III.16.).

6.11. Séquençage des inserts des clones C1 830, C2 830, C3 830 :

L'insertion des fragments d'ADN dans le vecteur pGEM-T se situe dans un site flanqué par les séquences SP6 et T7. Nous possédons des amorces qui s'hybrident spécifiquement à ces régions (les amorces SP6 et T7), elles permettent de réaliser des PCR qui amplifient l'élément inséré entre elles. Nous les utilisons donc pour réaliser la PCR de séquençage l'amorce SP6 étant utilisée pour le séquençage du brin sens et T7 pour le brin anti-sens.

L'utilisation de ces amorces, dont la température d'hybridation est de 55°C, nous permet de contourner le problème de nos amorces spécifiques (301, 252) qui semblent avoir un comportement capricieux d'autant plus qu'en séquençage l'hybridation ne dépasse pas 60°C.

Résultats :

Les séquences obtenues (Figure III.17.) sont alignées sur une banque de séquences non redondante (BLAST). L'alignement nous donne 98% d'identité avec la séquence de l'exon 4 de la Na-K ATPase humaine, ce qui donne une réponse définitive quant à l'identité du fragment 830 .

7. PCR en deux étapes utilisant la Vent polymérase :

7.1. Justification du changement de stratégie :

Les problèmes rencontrés au cours de l'amplification semblent liés à différents paramètres :

- La stratégie d'amplification n'est peut être pas appropriée. En effet, il est possible que le promoteur CSF-1 ne soit pas amplifiable en un seul fragment pour des raisons déjà évoquées : -présence de structures secondaires.

- présence de séquences répétées en GT et en CGAG.

- richesse en GC.

Nous décidons d'opter pour une nouvelle stratégie, l'amplification du promoteur CSF-1 en deux parties. Pour cela, nous utiliseront les amorces 273 et 254 (Annexe 1.5., 1.6.) qui peuvent être utilisées dans des couples 301, 273; 251, 273; 254, 302; 254, 252 (Annexes 1.3, 1.4., 1.5., 1.6.).

- Les températures d'hybridation utilisées sont trop basses car les hybridations sont non spécifiques et les températures de fusion des amorces données par la formule $2AT + 4GC$ sont le plus souvent supérieures à $80^{\circ}C$. Pour s'assurer d'une spécificité meilleure, il faudrait donc utiliser une hybridation à température plus élevée.

- D'autres problèmes apparaissent concernant la température de fusion des amorces, il y a de grandes différences selon qu'elle est calculée suivant le %GC ou la méthode $2AT + 4GC$. De plus, on ne tient pas compte de la température de fusion de la matrice. Ainsi, pour notre fragment cible riche en GC, la température de fusion calculée par la méthode %GC (la méthode $2AT+4GC$ étant inapplicable) donne $107^{\circ}C$. Il existe une méthode de calcul qui tient compte et de la température de fusion des amorces et de celle de la matrice pour déterminer ce qu'on appelle la température d'hybridation optimale. Nous appliquons celle-ci au système amorce-matrice.

Nous obtenons des températures d'hybridation optimales voisines de $84^{\circ}C$ pour les amorces 252, 251(Annexes 1.3., 1.6.) ainsi que pour les paires 251, 273; 252, 254 (Annexes 1.3., 1.5., 1.6.).

- Les polymérases utilisées ne sont pas compatibles avec de telles températures.

La Vent polymérase est une enzyme permettant de résoudre certains de ces problèmes. Cette polymérase se caractérise par une thermostabilité supérieure à celle des autres polymérases thermostables. Comme son temps de demi vie est de 2 heures à 100°C, elle permet de réaliser des dénaturations à haute température : 99 à 96°C. Les hybridations peuvent aussi s'effectuer jusqu'à 80°C voir même au delà, ce qui est intéressant à plusieurs titres :

- Meilleure spécificité de l'hybridation, température d'hybridation (80°C) proche de la température d'hybridation optimale des amorces (84°C pour 251, 252, 273, 254).

- Déstabilisation importante des structures secondaires à des températures plus élevées.

- Permet de dénaturer la matrice en chauffant 5 minutes à 99°C alors que la polymérase est déjà dans le mélange PCR ("pseudo-hot start").

- La Vent possède une activité exonucléase 3'-5' qui permet une bonne fidélité de l'amplification même si ce problème nous concerne peu à ce stade. Il y aura peu de chance que des mutations de substitution se produisent dans les éléments cis, ces derniers devant être conservés tel quel afin de ne pas modifier les propriétés du promoteur.

7.2. PCR :

7.2.1.PCR utilisant diverses combinaisons d'amorces et la Vent polymérase :

Nous allons utiliser une batterie d'amorces et une enzyme qui permet des hybridations à haute température. Il nous faut tester toutes les combinaisons d'amorces possibles à cette température.

Nous avons utilisé les amorces suivantes : 251, 252, 301, 302, 273, 254, (Annexes 1.3., 1.4., 1.5., 1.6.) et nous avons testé presque toutes les combinaisons envisageables pour celles-ci et ce à raison de 60 pm par réaction PCR :

couples formés : 301, 302

301, 252

301, 273

251, 252

251, 273

254, 252

Deux types de "simplex" PCR sont testées : "simplex" "classique" ou en "down" (Ici, nous parlons de "down" PCR car il n'y a pas vraiment de hot start mais plutôt un "pseudo-hot start."). Pour chacune d'entre elles, nous avons testé 0 ou 1% en DMSO et nous avons effectué une étape de dénaturation longue de 5 minutes à 99°C, l'enzyme étant déjà présente dans le mélange PCR ("pseudo-hot start").

Les conditions de "simplex" "classique" étaient les suivantes :

-Dénaturation à 96°C pendant 30 secondes.

-Hybridation et élongation à 80°C pendant 45 secondes.

-40 cycles sont effectués.

La PCR se termine par une incubation de 10 minutes à 75°C.

Les conditions de "simplex" «down» étaient les suivantes :

-Dénaturation 96°C pendant 30 secondes.

-Hybridation et élongation de 45 secondes pour des températures partant de 80°C et baissant de 2°C tous les 5 cycles jusqu'à 75°C. A partir de ce moment cette température est maintenue pendant 25 cycles.

La PCR se termine par une incubation de 10 minutes à 75°C.

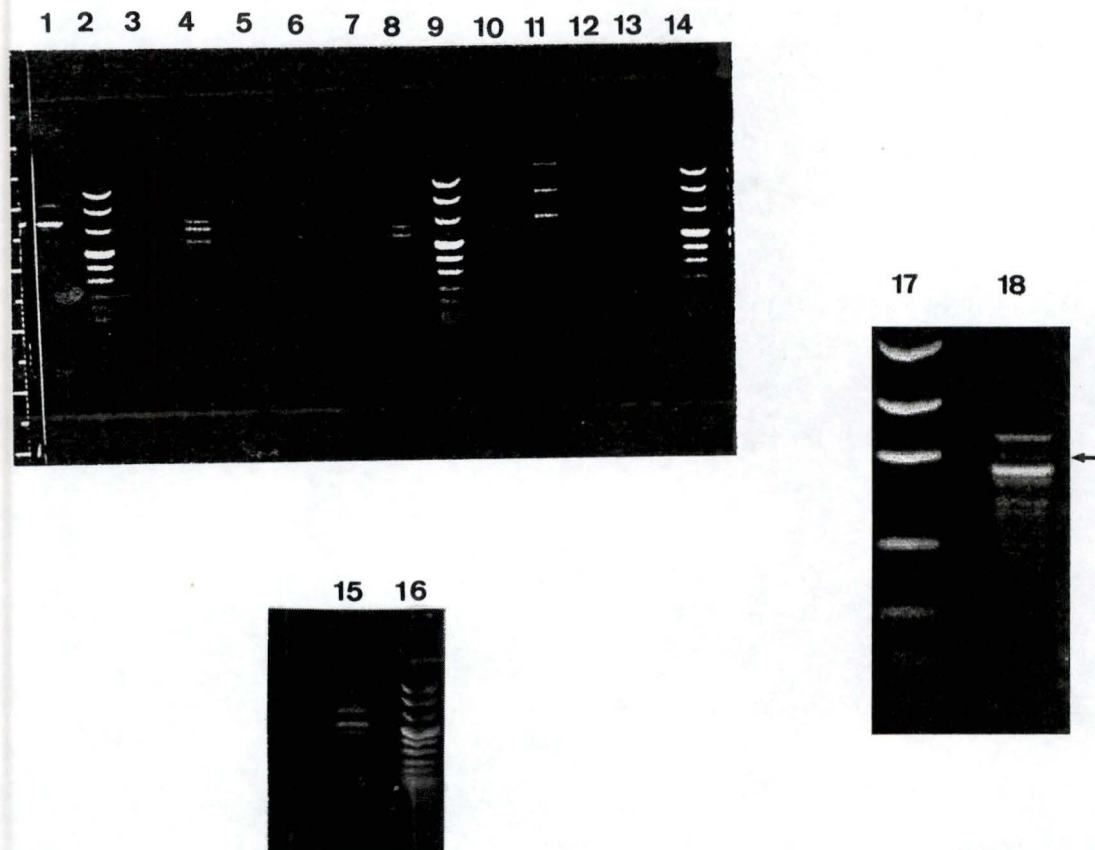
Nous utilisons 100 ng d'ADNg comme matrice.

Figure III.18. :

Amplification "simplex" en "down" sur 100 ng d'ADNg avec diverses combinaisons d'amorces 0 ou 1% en DMSO.

Pistes :

- 1 : 1% DMSO 251, 252.
- 2 : Marqueur VIII (Boehringer) pUCBM 21 restreint par Hpa II, Dra I, Hind III ,1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 ,67 pb.
- 3 : 0% DMSO 301, 302.
- 4 : 0% DMSO 301, 252.
- 5 : 0% DMSO 301, 273.
- 6 : 0% DMSO 251, 252.
- 7 : 0% DMSO 251, 273.
- 8 : 0% DMSO 254, 252.
- 9 : Marqueur VIII (Boehringer) pUCBM 21 restreint par Hpa II, Dra I, Hind III ,1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 ,67 pb.
- 10 : 1% DMSO 301, 302.
- 11 : 1% DMSO 301, 252.
- 12 : 1% DMSO 301, 273.
- 13 : 1% DMSO 251, 273.
- 14 : Marqueur VIII (Boehringer) pUCBM 21 restreint par Hpa II, Dra I, Hind III ,1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 ,67 pb.
- 15 : 0% DMSO 251, 252.
- 16 : Marqueur VIII (Boehringer) pUCBM 21 restreint par Hpa II, Dra I, Hind III ,1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 ,67 pb.
- 17 : Marqueur Low DNA Mass Ladder (Gibco), 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 pb.
- 18 : 1% DMSO 251, 252.



Résultats :

La "simplex" "classique" ne donne aucune amplification.

La "simplex" "down" donne des résultats intéressants (figure III.18.), en effet pour la première fois dans les expériences, des amplicons sont visualisables sur gel d'agarose après une "simplex". Parmi les combinaisons qui donnaient ce genre d'amplification nous avons:

-pour 0% en DMSO :

301, 252.

251, 252.

-pour 1% en DMSO :

301, 252

251, 252

Cependant, selon qu'il y avait 0 ou 1% en DMSO les profils d'amplification sont assez différents. Ainsi pour le couple 301, 252 en absence de DMSO (Figure III.18.), nous obtenons des fragments entre 500 et 700 pb et pour 1% en DMSO les fragments ont des tailles comprises entre 700 et 1300 mais aucun n'est situé à 790 (Figure III.18.).

Pour la combinaison 251, 252, 0% DMSO les bandes obtenues ont des tailles comprises entre 500 et 700 alors que pour 1% en DMSO les tailles sont situées entre 700 et 900 (Figure III.18.).

Pour la combinaison 251, 252, 1% DMSO, un amplicon de taille intéressante est obtenu bien que ce ne soit pas le fragment amplifié de manière préférentielle (montré par la flèche, Figure III.18.).

Les autres combinaisons d'amorces ne donnent pas d'amplicon visible sur gel. Il semble donc que l'amorce 302 pose réellement problème et ne permette pas l'amplification quelle que soit la situation.

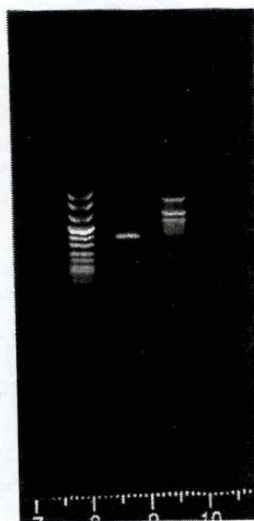


Figure III.19. :

"Heminested" PCR avec les amorces 251, 273 ; 254, 252 sur le produit 251, 252 1% DMSO de "simplex" "down".

Pistes :

- 1 : Marqueur VIII (Boehringer) pUCBM 21 restreint par Hpa II, Dra I, Hind III ,1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 ,67 pb.
- 2 : Amorces 251, 273.
- 3 : Amorces 254, 252.

7.2.2. "héminested" PCR sur les produits de "simplex" en "down" 1% DMSO :

Nous avons décidé de vérifier par "héminested" si le produit 251, 252, 1% DMSO obtenu par "simplex" "down" contenait effectivement un amplicon intéressant. Pour cela, nous avons effectué une "héminested" sur 10 µl de ce produit avec les amorces 251, 273 (Annexes 1.3., 1.5., 1.6.) et avec les amorces 254, 252 (Annexes 1.3., 1.5., 1.6.) chacune à raison de 60 pm.

La combinaison 251, 273 doit nous donner un fragment de 365 pb alors que la combinaison 254, 252 doit donner un fragment de 427 pb pour autant que dans le produit PCR utilisé comme matrice nous trouvions l'amplicon du promoteur CSF-1.

La PCR est réalisée à nouveau en "simplex" "down" dans les mêmes conditions que précédemment, toujours en présence de 1% en DMSO.

Résultats :

Le résultat obtenu est mitigé par rapport à celui espéré (Figure III.19.). La combinaison d'amorces 251, 273 nous donne bien un fragment dont la taille estimée serait de 360 pb (Figure III.19.). Mais pour la combinaison 254, 252 c'est un smear avec quelques bandes discrètes trop grandes (Figure III.19.). La PCR est effectuée une seconde fois afin de confirmer ces résultats. Ceux-ci s'avèrent reproductibles.

Si les 2 amplifications nous avaient donné les fragments attendus (366 pb et 426 pb) nous aurions pu affirmer que ces amplifications étaient spécifiques. Comme ce n'est pas le cas, nous devons absolument caractériser par restriction puis séquençage le fragment estimé à 360 pb et examiner par la suite le problème de la deuxième partie du promoteur.

7.3. Clonage et caractérisation du fragment 360 :

Le fragment 360 doit être cloné afin d'être restreint et séquencé.

7.3.1. Purification et dosage du fragment 360 :

Le fragment 360 a été purifié par le kit de Quiagene «Quiaquick PCR purification kit». Ce produit est resuspendu dans 50 µl d'eau puis dosé en spectrophotométrie UV à 260 nm. La quantité récupérée est estimée à 10 ng/µl.

7.3.2. Clonage du fragment 360 :

Comme le produit PCR est un produit de Vent, enzyme possédant une activité exonucléase 3'-5', les amplicons se terminent en bouts francs. Les ligations ne seront pas effectuées dans un vecteur-T mais dans pBSK II linéarisé à bouts francs par Sma I. 700 ng de plasmide sont digérés puis purifiés avec le kit de Quiagene «Quiaquick PCR purification kit». Le plasmide linéarisé est aussi resuspendu dans 50 µl d'eau puis dosé en spectrophotométrie UV 260 nm, nous avons 10 ng de plasmide/µl.

La ligation est réalisée avec 10 ng de plasmide pour 30 ng d'insert. La température de ligation est de 18°C. Les 10 µl du mélange de ligation sont utilisés pour transformer 100 µl d'une préparation d'*E.coli* Sure CaCl₂ compétentes.

Les bactéries sont étalées sur milieu LB solide contenant de l'ampicilline, de la tétracycline, de l'IPTG, du X-gal. Une sélection blanc-bleu permettra d'isoler les clones transformés et possédant un plasmide recombinant.

Résultats :

10 colonies blanches sont isolées. Pour chacune d'entre elles, nous réalisons une minipréparation d'ADN.

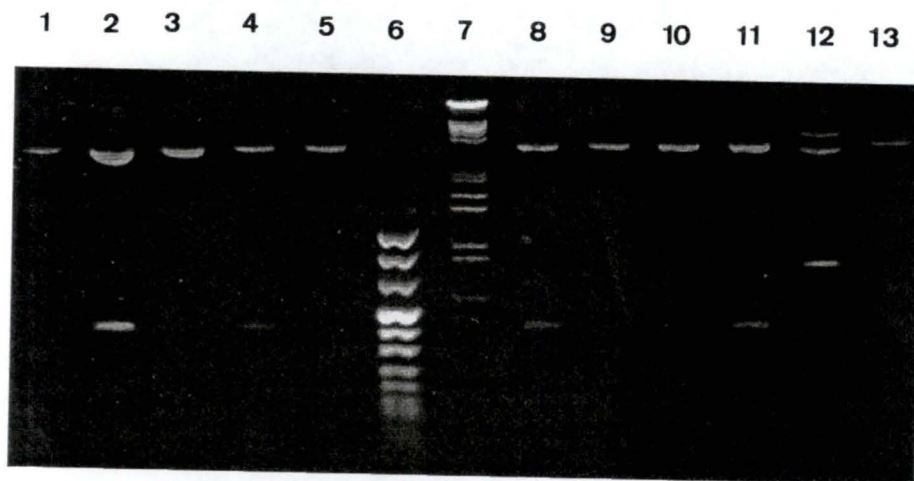
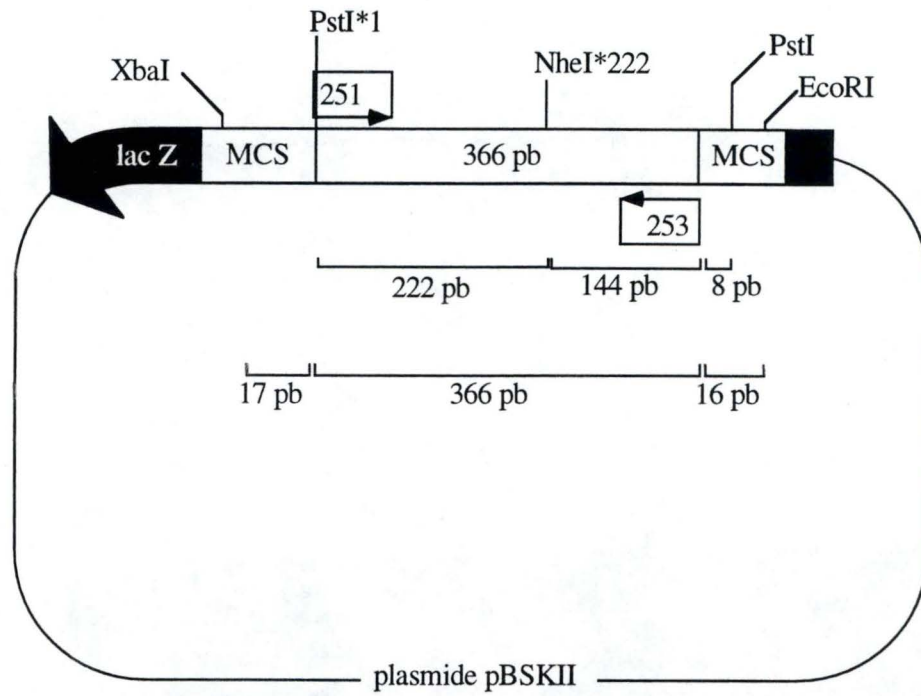


Figure III.20. :

Restriction Eco RI, Xba I des plasmides pBSK II recombinants afin de déterminer si le fragment 360 a bien été incorporé.

Pistes :

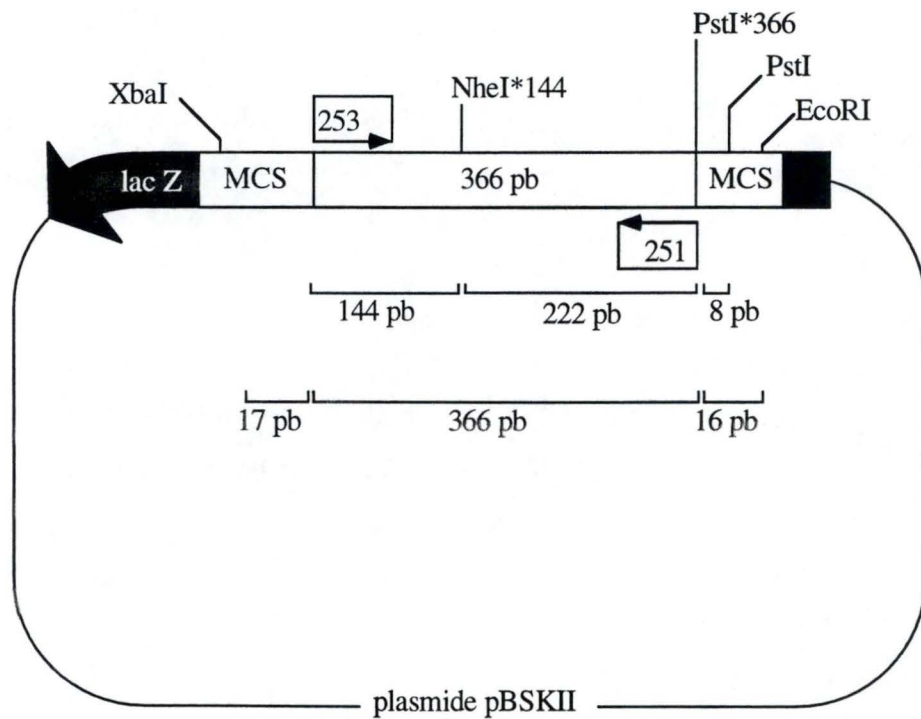
- 1 : Clone 1.
- 2 : Clone 2 ou C1 360.
- 3 : Clone 3.
- 4 : Clone 4 ou C2 360.
- 5 : Clone 5, colonie bleue contrôle.
- 6 : Marqueur VIII (Boehringer) pUCBM 21 restreint par Hpa II, Dra I, Hind III ,1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 ,67 pb.
- 7 : Marqueur III (Boehringer) λ -DNA restreint par Eco RI et Hind III, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.
- 8 : Clone 6 ou C3 360.
- 9 : Clone 7.
- 10 : Clone 8.
- 11 : Clone 9 ou C4 360.
- 12 : Clone 10
- 13 : Clone 11, colonie bleue contrôle.



restriction XbaI + EcoRI : 399 pb
 restriction PstI : 373 pb
 restriction NheI : linéaire

Figure III.21. :

Représentation schématique du premier type d'orientation du fragment 360 dans le vecteur pBSK II et quelques sites de restriction utilisés .



restriction XbaI + EcoRI : 399 pb
 restriction PstI : 8 pb
 restriction NheI : linéaire

Figure III.22. :

Représentation schématique du premier type d'orientation du fragment 360 dans le vecteur pBSK II et quelques sites de restriction utilisés .

7.3.3. Caractérisation du fragment 360 par une carte de restriction :

Différentes cartes de restriction sont réalisées :

A. Restriction Xba I, Eco R 1 :

Les enzymes Xba-I et Eco RI coupent dans le MCS du plasmide pBSK II de part et d'autre du site Sma I et donc de l'insert. Un fragment de 390 pb doit alors être libéré.

2 µl du produit de miniprep de chaque clone sont restreints par ces 2 endonucléases, le produit de restriction est déposé sur un gel d'agarose 1,2% (Figure III.20.). Un contrôle positif est également effectué par restriction de plasmides pBSK II isolés de colonies bleues.

Résultats :

Quatre clones sont nettement positifs puisque nous retrouvons la bande de 390 pb et le reste du plasmide à 2950 pb (Figure III.22, 21) au même niveau que le contrôle positif (Figure III.20.). Ces 4 clones sont appelés C1 360, C2 360, C3 360 et C4 360.

Par cette restriction, nous avons donc vérifié la présence de l'insert 360. Nous savons aussi que cet insert n'est pas restreint par Xba I ou Eco RI. Ces sites sont bien absents de la première moitié du promoteur CSF-1.

B. Restriction Pst I :

Une restriction Pst I est effectuée sur ces 10 clones. L'extrémité 5' du promoteur CSF-1 porte un site Pst I (Annexe 2.2.1.). Comme l'amorce 251 (Annexes 1.3., 1.6.) s'hybride sur cette extrémité du promoteur, elle génère de toute façon via sa séquence le site Pst I sur tous les amplicons sauf si son appariement est mauvais.

Le vecteur pBSK II porte un site Pst I unique sur son MCS en fonction de l'orientation de l'insert dans le vecteur, la restriction Pst I donnera soit 2 fragments, l'un de 370 pb (Figure III.21.), l'autre de 2953 pb. Si l'insert est dans l'autre orientation, alors la restriction ne donnera qu'un seul fragment visible de 3320 pb (Figure III.22.).

Figure III.23. :

Restriction Pst I des plasmides pBSK II recombinants afin de déterminer l'orientation du fragment 360.

Pistes :

- 1 : Clone 1.
- 2 : Clone 2 ou C1 360.
- 3 : Clone 3.
- 4 : Clone 4 ou C2 360.
- 5 : Clone 5, colonie bleue contrôle.
- 6 : Marqueur VIII (Boehringer) pUCBM 21 restreint par Hpa II, Dra I, Hind III ,1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 ,67 pb.
- 7 : Marqueur III (Boehringer) λ -DNA restreint par Eco RI et Hind III, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.
- 8 : Clone 6 ou C3 360.
- 9 : Clone 7.
- 10 : Clone 8.
- 11 : Clone 9 ou C4 360.
- 12 : Clone 10
- 13 : Clone 11, colonie bleue contrôle.

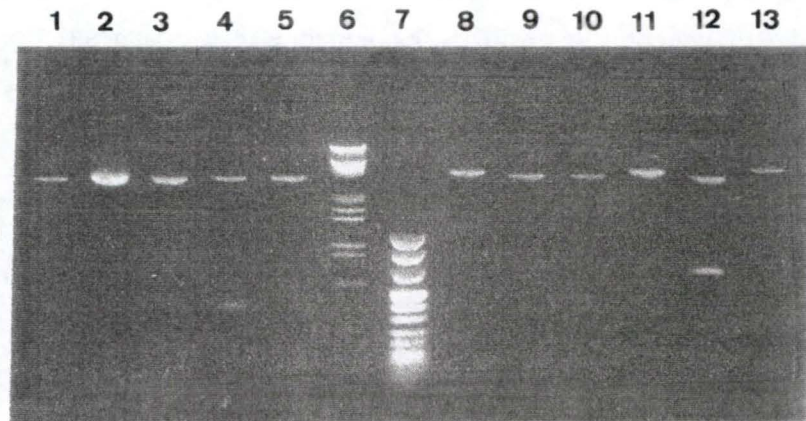
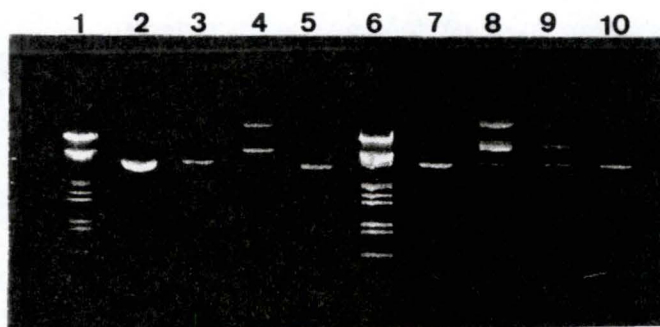


Figure III.24. :

Restriction Nhe I des clones C1 360, C2 360, C3 360, C4 360.

Pistes :

- 1 : Marqueur III (Boehringer) λ -DNA restreint par Eco RI et Hind III, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.
- 2 : C1 360 restreint Nhe I.
- 3 : C2 360 restreint Nhe I.
- 4 : Clone 5 contrôle restreint par Nhe I.
- 5 : Clone 5 contrôle restreint par Pst I.
- 6 : Marqueur III (Boehringer) λ -DNA restreint par Eco RI et Hind III, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.
- 7 : C3 360 restreint par Nhe I.
- 8 : C4 360 restreint par Nhe I.
- 9 : Clone 5 contrôle restreint par Nhe I.
- 10 : Clone 5 contrôle restreint par Pst I.



Résultats :

Sur les 4 clones précédemment identifiés comme portant l'insert d'intérêt seul le clone C2 360 est dans le premier type d'orientation (Figure III.23.), les 3 autres étant dans l'autre orientation (Figure III.23.). Cette restriction ne présente pas un grand intérêt mais est un moyen de vérifier que l'amorce 251 s'est hybridée correctement sur son extrémité 5'. Si ce n'était pas le cas, le site aurait disparu.

C. Restriction Nhe I :

La première moitié du promoteur CSF-1 est difficile à caractériser par restriction car elle comporte très peu de sites de restriction intéressants. Seul le site Nhe I présente un intérêt, les autres étant des sites soit trop nombreux, soit d'enzymes de restriction "exotiques".

Cependant le site Nhe I est unique dans la première moitié du promoteur CSF-1 (Annexe 2.2.) et est absent dans le plasmide pBSK II. Donc, le profil de restriction attendu pour les 4 clones est la linéarisation du plasmide recombinant.

Les restrictions suivantes sont effectuées :

- C1 360, C2 360, C3 360, C4 360 sont restreints par Nhe I.
- Un plasmide contrôle pBSK II est mis en présence de Nhe I. En principe comme il ne possède pas ce site plasmide doit rester circulaire (sur gel on observe les 3 formes caractéristiques d'un plasmide non restreint).
- Un plasmide contrôle pBSK II est restreint par Pst I, nous devons observer sa forme linéaire.

Résultats :

Les clones C1 360, C2 360 et C3 360 sont bien linéarisés par Nhe I (Figure III.24.), le clone C4 360 n'est pas restreint (Figure III.24.).

Nous utiliserons donc les clones C1 360, C2 360 et C3 360 pour le séquençage.

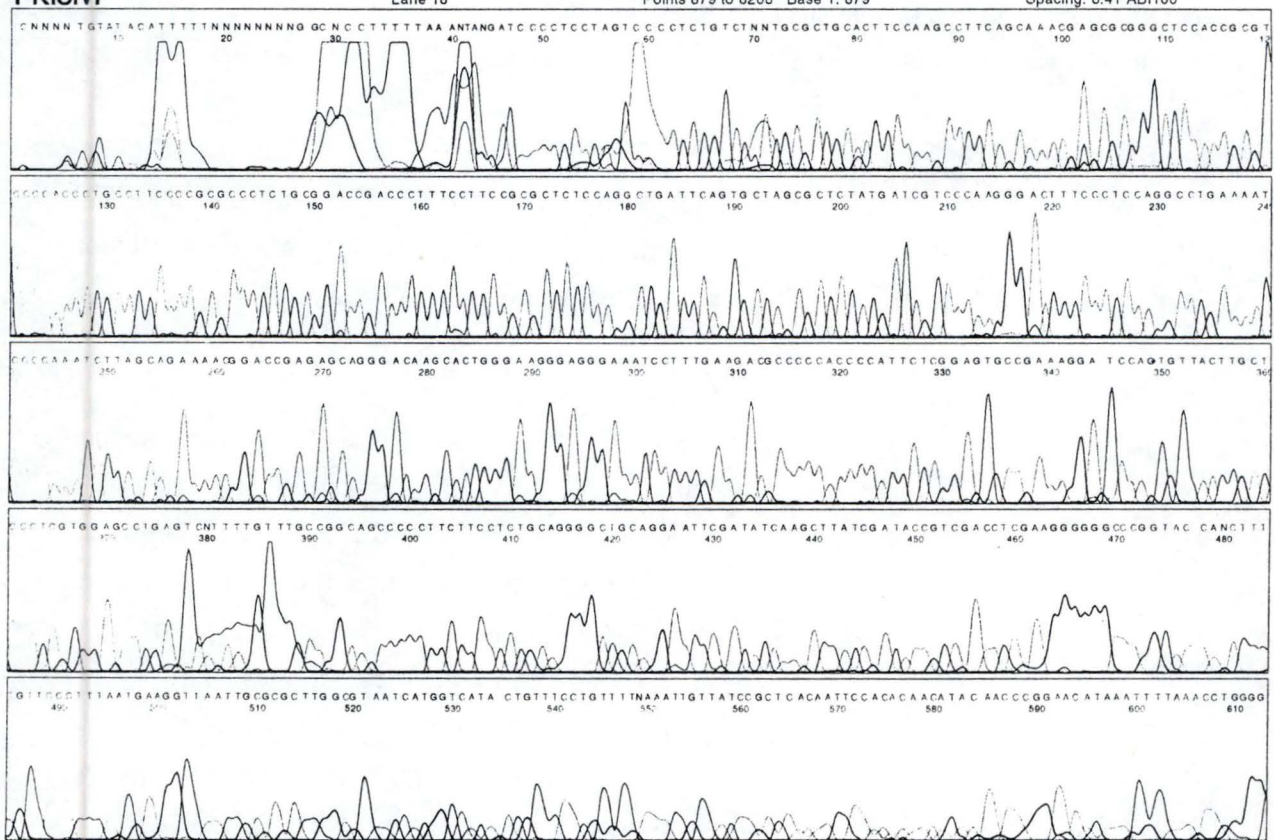


Figure III.25. :

Spectre de séquençage du clone C1 360.

7.3.4. Séquençage des inserts présents chez les clones C1 360, C2 360, C3 360 :

Le produit de miniprep est dosé en vue du séquençage.

-C1 360 : 335 ng/μl.

-C2 360 : 134 ng/μl.

-C3 360 : 424 ng/μl.

Pour le séquençage, nous utilisons 200 ng de matrice plasmidique et l'amorce T7 qui s'hybride à 55°C à la séquence du promoteur T7 présente dans le MCS plasmidique de pBSK II.

Résultats :

Les séquences obtenues (Figure III.25.) sont alignées sur une banque de séquence non redondante (BLAST). Pour les 3 clones, le pourcentage d'identité avec la séquence de la première moitié du CSF-1 est supérieur à 90%.

7.3.5. Conclusion :

Nous avons donc isolé et cloné la première moitié du promoteur CSF-1.

8. Isolement de la seconde partie du promoteur CSF-1:

8.1. Paramètres :

Puisque le fragment 360 correspond bien à la première partie du promoteur CSF-1 et qu'il a été obtenu suite à une "héminested" PCR avec les amorces 251, 273 (Annexes 1.3., 1.5., 1.6.) sur un produit de "simplex" en "down" lui même obtenu avec les amorces 251, 252 (Annexe 1.3, 1.6.) et situées de part et d'autre du promoteur, nous supposons que la totalité du promoteur CSF-1 se trouve dans ce premier produit PCR.

Cependant l'"héminested" 254, 252 sur ce produit qui devait amplifier un fragment de 426 pb n'avait rien donné.

Si on admet que la totalité du promoteur est bien présente dans le produit de "simplex" PCR en «down», alors la seule raison pour laquelle l'amplification de la seconde partie du promoteur au cours de l'"hémimested" ait échoué est que les deux amorces utilisées (254 ou 252) s'hybrident de manière aspécifique puisqu'on obtient une trainée (smear) sur le gel.

Une façon de réaliser une seconde PCR plus spécifique sur le produit de "simplex" est de changer une des deux amorces utilisées. Ne disposant pas d'amorces alternatives à 254, l'amorce 252 a été remplacée par l'amorce KPO-1 (Annexes 1.1., 1.6.) (Amorce plus interne utilisée au début de ce travail).

8.2. PCR :

8.2.1. Conditions PCR utilisées :

Une PCR en "nested" sur le produit de "simplex" en "touchdown" avec les amorces 254 et KPO-1 est donc réalisée. Cependant, KPO-1 a une température de fusion inférieure à 254 (Annexes 1.1., 1.5., 1.6.). Il n'est donc pas question de réaliser une PCR "nested" en "down" partant de 80°C et redescendant à 75°C. Il est plus raisonnable d'effectuer une seule étape d'hybridation et d'élongation à 75°C.

Les conditions PCR sont donc :

- Dénaturation 5 minutes à 99°C.
- 40 cycles : dénaturation 30 secondes à 96°C.
Hybridation et élongation à 75°C pendant 45 secondes.
- Elongation finale, 10 minutes à 75°C.
- Amorces utilisées : 254 et KPO-1 (60 pm).

La PCR est réalisée en double pour 100 ng en ADNg matrice et avec 1% en DMSO. 15 µl du produit PCR sont déposés sur gel d'agarose 1,3%.

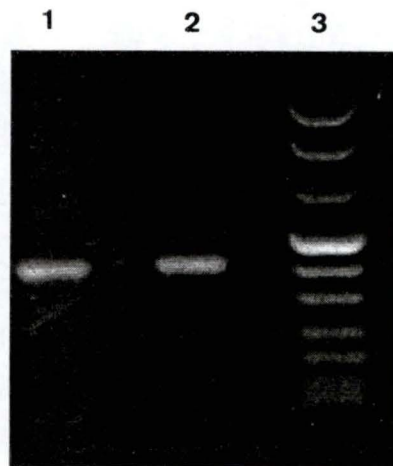


Figure III.26. :

Amplification PCR du second fragment du promoteur du gène CSF-1 .
 "Nested" PCR (hybridation simple à 75°C) avec 1% en DMSO et utilisant les amorces KPO-1, 254,
 sur 1 µl du produit de "simplex" "down" utilisant les amorces 251, 252 et 1% en DMSO .

Pistes : :

- 1 : "nested" KPO-1, 254.
- 2 : "nested" KPO-1, 254.
- 3 : Marqueur VIII (Boehringer) pUCBM 21 restreint par Hpa II, Dra I, Hind III ,1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 ,67 pb.

Résultats :

Une bande unique est obtenue, sa taille estimée de 420 pb est dans la gamme attendue de 400 pb (Figure III.26.). Nous appellerons ce fragment : 420. Ce fragment doit être caractérisé par restriction et séquençage.

8.3. Clonage du fragment 420 :

8.3.1. Purification du fragment 420 :

Le produit PCR 420 est purifié avec le kit de Quiagene «Quiaquick PCR purification kit», resuspendu dans 50 µl d'eau puis dosé par spectrophotométrie UV 260 nm à 20 ng d'ADN/µl.

8.3.2. Clonage du fragment 420 :

40 ng du fragment 420 sont utilisés pour effectuer une ligation avec 10 ng de vecteur pBSK II linéarisé à bouts francs par Sma I. La ligation est réalisée à 18°C.

Les 10 µl de mélange de ligation sont utilisés pour transformer 100 µl d'une préparation d'*E.coli* Sure CaCl₂ compétentes. les bactéries sont alors étalées sur milieu LB solide avec ampicilline, tétracycline, IPTG et X-gal.

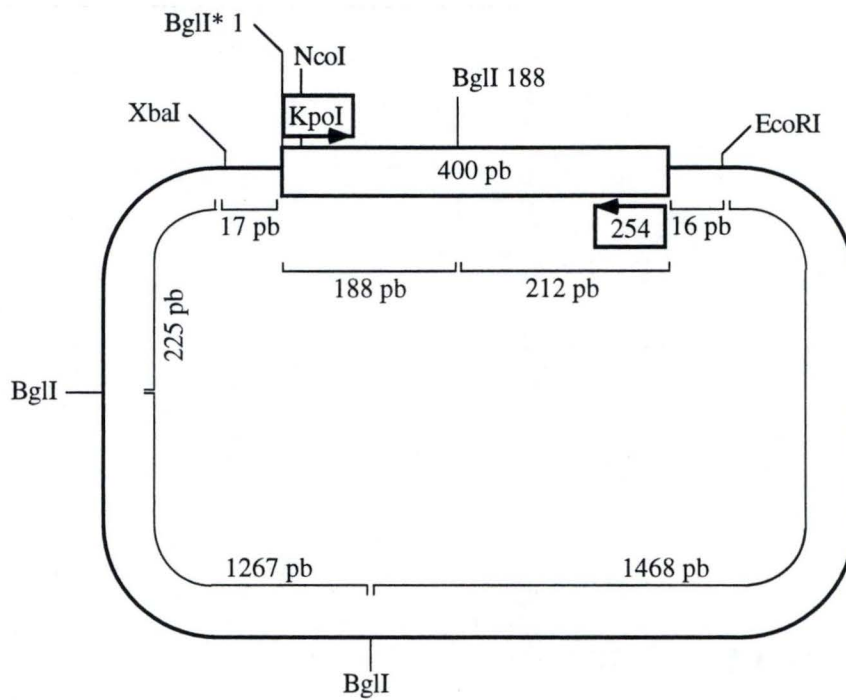
La sélection blanc-bleu permet d'isoler les colonies transformées par un plasmide recombinant.

Résultats :

16 colonies blanches sont isolées. Pour chacune d'entre elles, des minipréparations d'ADN sont réalisées.

Figure III.27. :

Représentation schématique du premier type d'orientation de l'insert 420 dans le vecteur pBSK II. Bgl I* représente un site Bgl I supplémentaire . Les deux profils de restriction avec ou sans Bgl I* sont donnés.

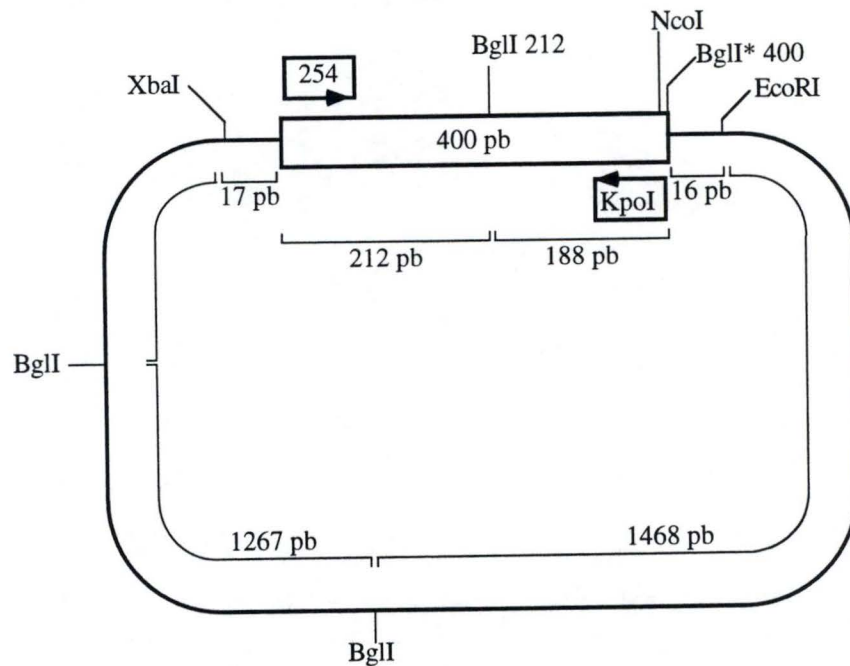


Restriction BglI supposées

si il n'y a pas de site BglI* :	1680 pb	si il y a le site BglI* :	1680 pb
	1267 pb		1267 pb
	413 pb		225 pb
			188 pb

Figure III.28. :

Représentation schématique du second type d'orientation de l'insert 420 dans le vecteur pBSK II. Bgl I* représente un site Bgl I supplémentaire . Les deux profils de restriction avec ou sans Bgl I* sont donnés.



Restriction BglI supposées

si il n'y a pas de site BglI* :	1656 pb	si il y a le site BglI* :	1468 pb
	1267 pb		1267 pb
	437 pb		437 pb
			188 pb

8.3.3. Caractérisation du fragment 420 par une carte de restriction :

2 µl d'ADN plasmidique de chaque clone est utilisé pour caractériser l'insert. Le choix des enzymes de restriction est plus large car il existe davantage de sites de restriction intéressant dans la seconde moitié du promoteur CSF-1.

A. Restriction Bgl I :

L'enzyme de restriction Bgl I coupe en un seul site le promoteur CSF-1 (Annexe 2.2.), elle libère deux fragments l'un de 187 pb, l'autre de 203 pb. Il existe 2 sites Bgl I dans le plasmide pBSK II, le premier situé en position 472, le second en 2166. Le plasmide fait 2961 pb et le site d'insertion de l'insert est en 697. La restriction Bgl I du plasmide recombinant doit donner 3 fragments dont les tailles sont :

première orientation (Figure III.27.): 1680 pb
1267 pb
413 pb

seconde orientation (Figure III.28.): 1656 pb
1267 pb
437 pb

Pour autant que l'insert soit bien la seconde moitié du promoteur CSF-1.

Un contrôle pBSK II est restreint par Bgl I, les 2 fragments produits doivent avoir les tailles suivantes : 1694 pb
1267 pb

B. Résultats :

Les produits de restriction sont déposés sur un gel d'agarose 1,2%. On distingue deux types de clones qui ressortent (Figure III.29.) : Un premier type où 3 fragments de restriction sont obtenus, leur taille estimée étant de :

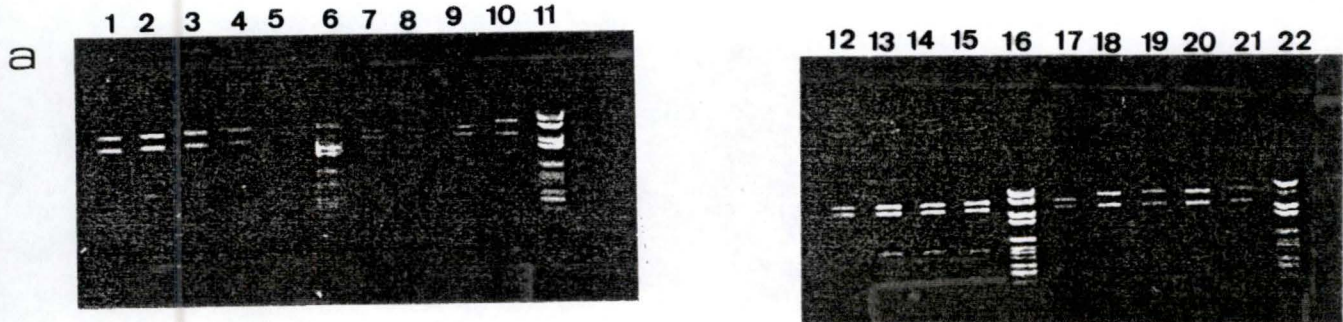
1700 pb
1250 pb
200 pb

Figure III.29. :

a Restriction Bgl I des 16 clones isolés après transformation des souches Sure par le mélange de ligation du fragment 420 / pBSK II .

Pistes : Clones :

- 1 : C1 420 type 1
- 2 : C X1 type X
- 3 : C2 420 type 1
- 4 : C3 420 type 1
- 5 : C4 420 type 2
- 6 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 7 : C5 420 type 2
- 8 : C6 420 type 2
- 9 : C7 420 type 2
- 10 : Contrôle pBSK II isolé d'une colonie bleue.
- 11 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 12 : C8 420 type 2
- 13 : C9 420 type 2
- 14 : C10 420 type 2
- 15 : C11 420 type 2
- 16 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 17 : C12 420 type 2
- 18 : C13 420 type 1
- 19 : C14 420 type 1
- 20 : C15 420 type 1
- 21 : Contrôle pBSK II isolé d'une colonie bleue.
- 22 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.

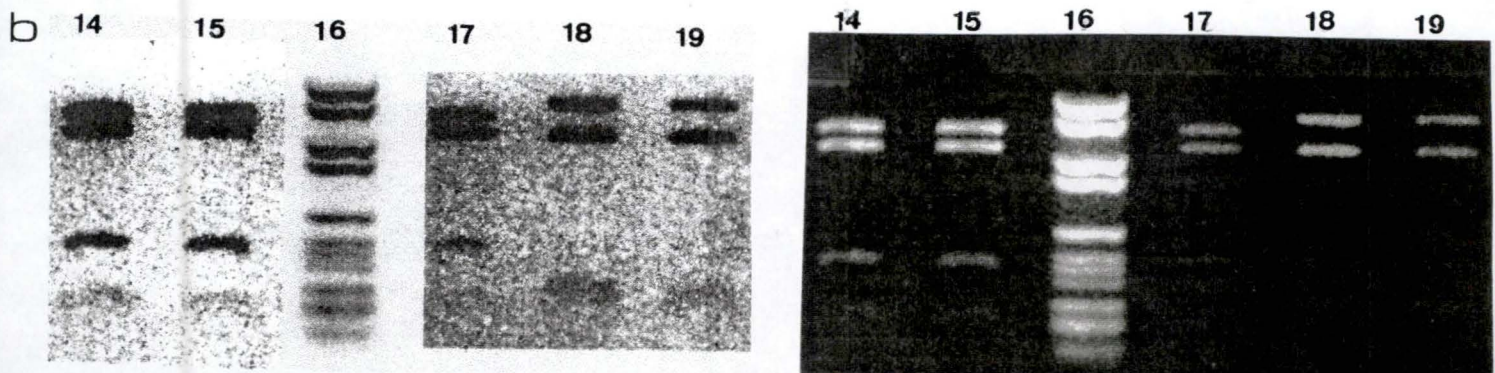


b Mise en évidence, par affinement d'image, de clones de type 1 ou 2.

Nous avons de gauche à droite soit en image négative ou positive les clones :

Pistes :

- 14 : C10 420 type 2
- 15 : C11 420 type 2
- 16 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 17 : C12 420 type 2
- 18 : C13 420 type 1
- 19 : C14 420 type 1



Pour le second type, nous observons 4 fragments dont la taille estimée est de :

1430 pb
1250 pb
450 pb
200 pb

le contrôle pBSK II restreint par Bgl I donne bien les 2 fragments attendus :

1649 pb
1267 pb

Etant donné que le profil de restriction ne correspond pas à celui attendu, il est possible que le fragment cloné ne soit pas celui recherché.

Cependant, ces valeurs nous interpellent, alors que nous attendions dans la seconde orientation des fragments de 413 pb et de 1680 pb, nous obtenons bien un fragment d'environ 413 pb et deux autres fragments de 1430 pb et 200 pb. Or, la somme de 1430 et 200 est proche de 1672 pb. Le profil de restriction dans cette orientation laisse à penser qu'un site Bgl I supplémentaire est présent et que celui-ci flanque l'insert.

8.3.4. Identification d'un site Bgl I supplémentaire dans le fragment 420 :

L'amorce KPO-1 (Annexes 1.1., 1.6.) possédait une séquence ajoutée sur son extrémité 5' destinée à produire un site de restriction Nco I dans l'amplicon. Il s'est alors avéré par analyse informatique (DNA Strider 1.2.) que la séquence ajoutée en 5' de KPO-1 en plus de contenir un site de restriction Nco I contenait bien un site Bgl I (Annexe 1.1.a.).

Sachant cela, il était normal d'obtenir un profil de restriction pour la première orientation où nous trouvions 3 fragments, un de 1680 pb, 1267 pb et deux indistincts sur gel de 188 et 225 pb formant une seule bande aux environs de 200 pb (Figure III.27.).

Il était tout aussi normal d'obtenir pour la seconde orientation 4 fragments de 1469 pb, 1267 pb, 428 pb, 188 pb (Figure III.28.).

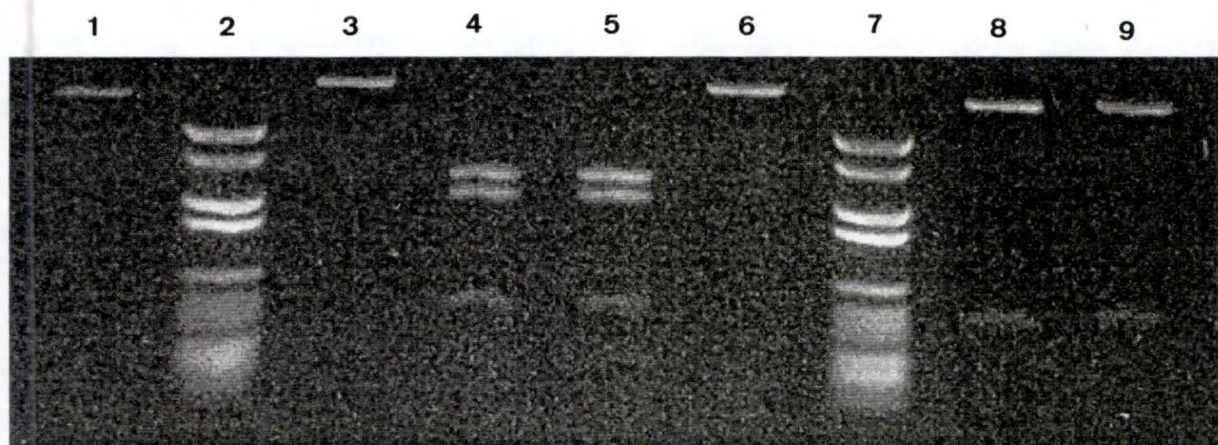


Figure III.30. :

Restriction du clone C9 420 (type 2).

Pistes :

- 1 : Sma I
- 2 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 3 : Nco I
- 4 : Bgl I
- 5 : Bgl I et Nco I
- 6 : Xba I et Eco RI
- 7 : Marqueur VI (Boehringer) pBR 328 restreint par Bgl I et pBR 328 restreint par Hinf I, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234/220, 154 pb.
- 8 : Xba I et Eco RI
- 9 : Xba I et Nco I

Pour vérifier et confirmer ces données nous effectuons d'autres restrictions sur le clone C9 420, orientation de l'insert de type 2. Les restrictions effectuées sont reprises dans le même ordre que sur gel (de gauche à droite) (Figure III.30.) (Annexes 2.2.):

Sma I : Linéarisation du plasmide en coupant dans l'insert.

Nco I : Linéarisation du plasmide en coupant l'extrémité 3' de l'insert.

Bgl I : Coupe en 4 sites du plasmide recombinant.

Bgl I et Nco I : Profil de type restriction Bgl I car Nco I coupe de manière unique sur un site proche d'un site Bgl I. Ces 2 sites se trouvant au niveau de l'insert.

Xba I et Eco RI : Sont deux sites plasmidiques qui flanquent l'insert. Cette restriction libère l'insert, soit un fragment d'environ 430 pb.

Xba I et Nco I : Xba I flanque l'extrémité 5' de l'insert et Nco I est le site de restriction produit par l'amorce KPO-1 à l'extrémité 3' de l'insert. Un fragment d'environ 430 pb doit être obtenu.

Toutes ces restrictions donnent le profil attendu. Il ne nous reste plus qu'à confirmer définitivement qu'il s'agit bien de l'insert recherché par un séquençage.

Résultats :

Parmi les 16 clones, 15 possèdent donc un insert dont le profil de restriction correspond à celui attendu si l'insert était la seconde moitié du promoteur CSF-1 (Figure III.29.). Nous appellerons ces clones :

NOMS :	ORIENTATION :
C1 420	1
C2 420	1
C3 420	1
C4 420	2
C5 420	2
C6 420	2
C7 420	2
C8 420	2
C9 420	2
C10 420	2
C11 420	2
C12 420	2
C13 420	1
C14 420	1
C15 420	1

8.3.5. Caractérisation du fragment 420 par séquençage :

4 clones de l'orientation 2 sont sélectionnés pour réaliser le séquençage : C6 420, C7 420, C8 420, C9 420, C12 420. L'ADN plasmidique est dosé par spectrométrie UV 260 nm pour chacun d'entre eux. Nous obtenons : 120 ng/μl d'ADN pour C6 420.

230 ng/μl d'ADN pour C7 420.

325 ng/μl d'ADN pour C8 420.

284 ng/μl d'ADN pour C9 420.

186 ng/μl d'ADN pour C12 420.

L'amorce de séquençage utilisée est à nouveau l'amorce T7 et 200 ng d'ADN plasmidique sont utilisés comme matrice. L'hybridation se fait à 55°C.

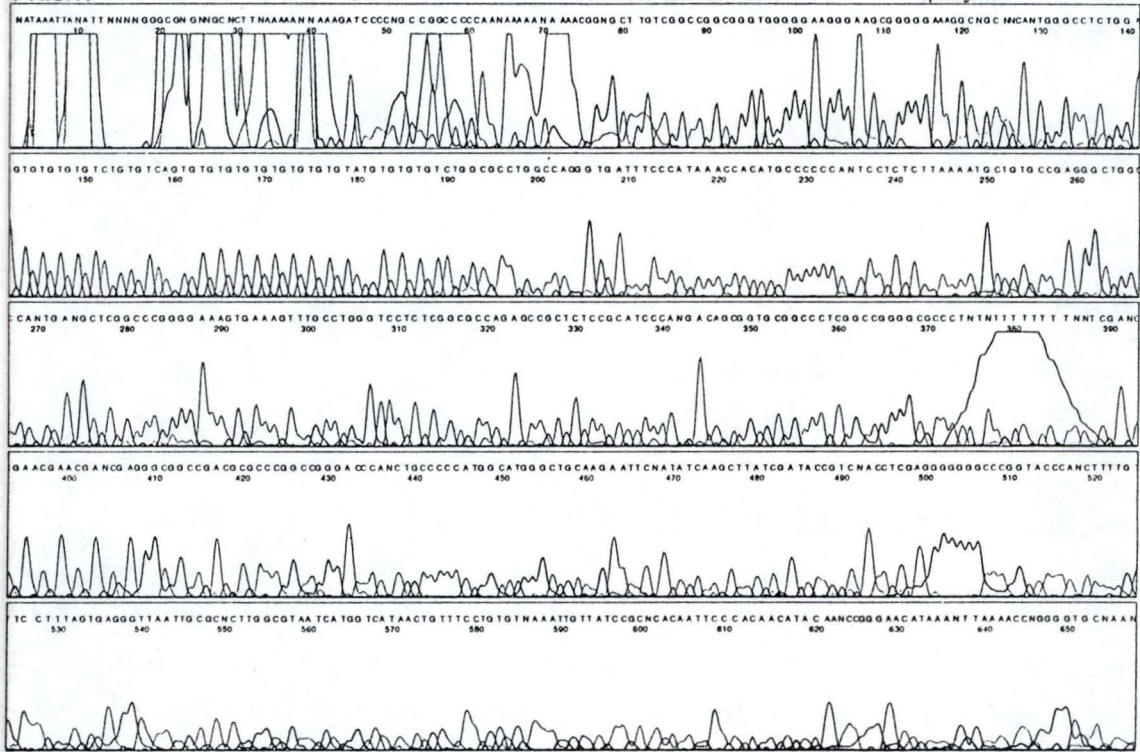


Figure III.31. :

Spectre de séquençage du fragment 420 du clone C9 420 .

Résultats :

Les séquences obtenues (Figure III.31.) sont alignées sur une banque de séquences non redondantes (BLAST). Nous obtenons des identités comprises entre 90 et 97% avec la séquence de la seconde partie du promoteur CSF-1.

8.3.6. Conclusion :

Nous avons cloné la seconde moitié du promoteur CSF-1.

**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

IV. Conclusion générale et perspectives :

L'objectif principal de ce travail était de cloner le promoteur du gène du CSF-1 humain afin de construire un plasmide recombinant pGFP-1 et de transférer cette construction chez des cellules endothéliales en culture afin d'étudier l'activation de la transcription du gène CSF-1 grâce au rapporteur GFP.

Cet objectif a été atteint en partie. Nous avons cloné en 2 morceaux le promoteur du gène du CSF-1 par PCR sur ADNg humain, pour cela nous avons eu recours à des conditions originales :

- Clonage du promoteur en 2 parties.
- "simplex" PCR sur ADNg réalisée en «down» PCR pour des températures d'hybridation élevées (80-75°C) et avec 1% en DMSO.
- Clonage du fragment aval du promoteur par "héminested" PCR en "down" avec 1% en DMSO et toujours pour des hybridations à températures élevées (80-75°C).
- Clonage du fragment amont du promoteur par une "nested" PCR avec 1% en DMSO et hybridation à une température unique de 75°C.
- Utilisation d'une polymérase hautement thermostable (Vent recombinante) permettant de travailler à des températures de dénaturation et d'hybridation élevées.

Les mises au point des conditions PCR ont constitué la majeure partie de ce travail. Les résultats obtenus sont riches en enseignement sur l'application particulière de la PCR sur ADN génomique afin d'amplifier des séquences riches en GC.

Il ressort qu'il n'y a pas de règle globale permettant une mise au point d'une PCR efficace. En effet, il est difficile de hiérarchiser les paramètres PCR les uns par rapport aux autres. Par exemple, dans le cadre de ce travail, l'utilisation de 1% en DMSO est aussi importante que le type de PCR effectué, la température de fusion ,....

La difficulté d'une approche simple est qu'aucun des paramètres PCR ne sont indépendants les uns des autres. Il n'est cependant pas possible de les tester tous pour toutes les combinaisons envisageables. Nos choix ont été orientés par divers critères. Si nous reprenons chacun de ces paramètres successivement, quelques informations ressortent de ce travail quant à la détermination de la stratégie PCR à envisager.

- La matrice : Nous avons utilisé de l'ADN génomique humain. Pour des matrices de cette nature, 2 points sont importants :
 - Utiliser une matrice pure.
 - Températures de dénaturation longues élevées ou "hot start".
- La cible : L'étude préalable de la séquence cible peut donner des informations intéressantes. Y-a-t'il des structures secondaires possibles ? Si utile intéressante, mais il faut tenir compte de l'effet de ces produits sur la température de fusion de amorces. La séquence est-t-elle riche en GC ? Si oui, il faudra veiller à utiliser des températures de dénaturation et d'hybridation élevées, donc utiliser des enzymes aux caractéristiques compatibles avec ces températures et des amorces suffisamment longues.
- Le choix des amorces : Utiliser sur ADNg des amorces d'au moins 25 pb en respectant les quelques règles générales énoncées dans l'introduction. Le choix des amorces déterminera en partie la température d'hybridation.
- La température d'hybridation : Utiliser la méthode décrite dans l'introduction permet de tenir compte de différents paramètres qui influent sur la température d'hybridation. A savoir la température de fusion des amorces, la température de fusion de la séquence cible, la concentration en amorce et en sels.
- Le type de PCR : Idéalement, on choisira les amorces en se ménageant la possibilité d'utiliser des amorces plus internes pour un possible recours à une "nested" PCR. En général, l'utilisation d'une "nested" est justifiée quand l'ADN cible est en nombre de copies restreint sur la matrice, c'est le cas du promoteur CSF-1. L'amplification PCR de séquences multiples (globines) ne nécessite pas de "nested".
- La "forme" de la PCR : Le choix du "hot start" se justifie sur des matrices comme l'ADN génomique. La "touchdown" ou "down" PCR sont des techniques que l'on utilisera pour tester en une seule PCR différentes températures d'hybridation. Dans ce travail, il apparaît que sur ADNg la "touchdown" doit partir de températures d'hybridation élevées pour ne pas que le produit PCR soit non spécifique .
- La polymérase : Le choix de la polymérase est primordial, il s'effectue en fonction des conditions de températures utilisées, ce choix est donc orienté par le type de matrice, le type d'amorces, la température d'hybridation, la longueur du fragment à amplifier, la fidélité recherchée pour l'amplification.

-La concentration en amorces et matrice : Nous avons obtenu nos amplicons cibles avec 100 ng de matrice pour la "simplex" PCR, 100 ng équivaut à 10 000 exemplaires de matrices ADNg humain. C'est une bonne concentration pour commencer la mise au point PCR car les effets de viscosité jouent peu.

Il ne faut pas utiliser un excès important d'amorce au risque d'obtenir une amplification non spécifique. Des concentrations de 20 à 100 pm sont acceptables bien que 100 pm soit déjà une valeur élevée.

-Les composants du mélange PCR : On peut faire varier la concentration en Mg^{++} . Les tampons commerciaux contiennent en général déjà la concentration optimale en Mg^{++} pour l'activité de la polymérase.

L'utilisation d'additifs tels que le DMSO à raison de 1% peut se faire de manière systématique. Les structures secondaires sont déstabilisées. La spécificité de l'hybridation est améliorée car il abaisse la température de fusion des amorces et l'inhibition de la polymérase est négligeable.

D'autres paramètres peuvent être modifiés comme les temps de dénaturation, d'hybridation, d'élongation. Cependant au cours de ce travail nous avons peu joué sur ces facteurs.

Il nous reste à présent à rassembler les 2 fragments du promoteur. Deux stratégies sont envisageables :

- Utiliser la séquence de chevauchement de 10 pb générées par les amorces 273, 254 des amplicons 360 et 420 pour effectuer une ligation par PCR utilisant les amorces 251 et KPO-1. Cependant, les premiers essais ne sont pas concluants, le fragment obtenu est de 400 pb, nous ignorons si il s'agit d'une délétion. Ceci renforce les observations précédentes, à savoir, la difficulté d'amplifier l'ensemble du promoteur par PCR.

Il est possible que la température d'hybridation de la région de chevauchement soit trop basse (34°C) par rapport à celle des amorces (75°C) et que l'utilisation de températures intermédiaires ne favorisent la formation de structures secondaires. C'est pourquoi nous envisageons ci-dessous une seconde stratégie qui évite une étape de PCR pour fusionner les deux fragments clonés.

- Utiliser une amorce de type 273 phosphorylée en 5' ne possédant pas de chevauchement avec 254 pour réamplifier le fragment 360. Ensuite effectuer une ligation avec le fragment 420 et une transformation de manière classique.

Si l'on désire utiliser ce promoteur dans le but défini au départ, c.à.d. l'associer à la green fluorescent protéin, on peut alors utiliser deux stratégies afin de placer ce promoteur devant le gène de cette protéine rapporteur.

Dans la première possibilité, le promoteur cloné peut être digéré par l'enzyme Nco I du fait de la présence de ce site de restriction dans l'amorce KPO-1 et en amont par Pst I. Les mêmes digestions seront réalisées sur le plasmide pGFP-1 qui possède au niveau de son site multiple de clonage ces sites de restriction. La ligation pourra s'effectuer entre extrémités cohésives. Cependant, le site Nco I n'est pas unique sur le plasmide (4 sites Nco I sont présents), il faudra donc réaliser une restriction partielle.

Une seconde stratégie implique une ligation par PCR. Le promoteur CSF-1 cloné est amplifié en 3' par une amorce qui possède un extrémité flottante de 25 bases anticomplémentaire de l'extrémité 5' du gène GFP. Cet amplicon sera utilisé comme amorce dans un mélange PCR contenant le plasmide pGFP-1 et une amorce s'hybridant 100 bases plus en amont de GFP. Un hybride promoteur CSF-1, extrémité 5' de GFP sera obtenu. On utilisera un site de restriction unique présent dans le fragment hybride cloné de GFP avec le site Pst I en 5' du promoteur CSF-1 pour introduire la construction.

Les transfections pourront alors être réalisées et l'étude de l'expression du gène rapporteur pourra être entreprise.

ANNEXES

V. Annexes .

Annexe 1 : Description des amorces utilisées :

Remarque :

Chaque amorce a été alignée sur une banque de séquences non redondantes afin de s'assurer que leur séquence cible est bien unique dans le génome humain . La conformité du poids moléculaire de chaque amorce a été vérifiée en électrospray .

Annexe 1.1. KPN-1,KPO-1 :

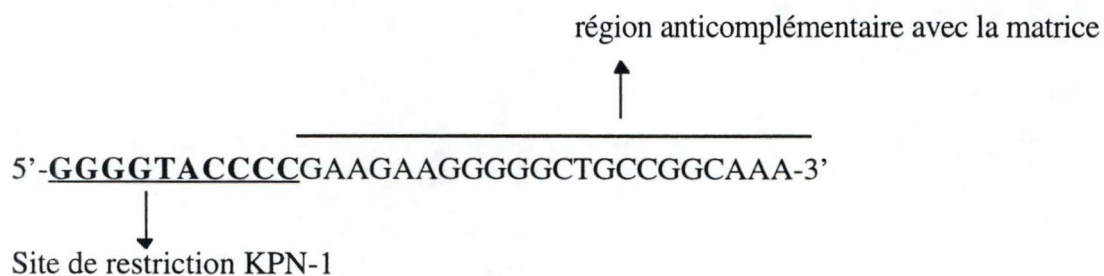
Les amorces KPN-1 et KPO-1 ont une longueur respective de 32 et 29 bases . L'amorce KPN-1 sens s'hybride au brin anti-sens du promoteur CSF-1 , sa séquence anticcomplémentaire avec la matrice est de 22 bases . Les 10 bases restantes constituent un site de restriction KPN-1 synthétique .

Sa température de melting est :

%GC : 67 °C

2AT+4GC : pas applicable car supérieur à 100°C

Sa séquence complète est :



Elle est constituée à 68.75% de GC .

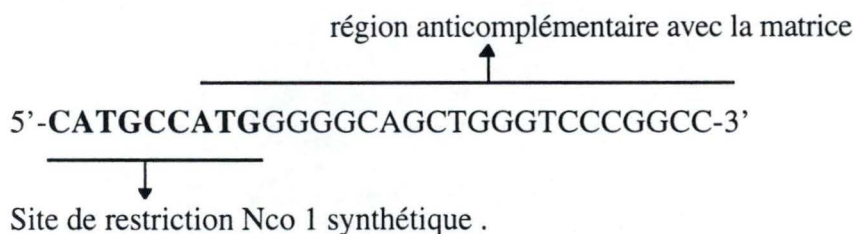
L'amorce KPO-1 anti-sens s'hybride au brin sens de la matrice au niveau du site d'initiation de la transcription du gène CSF-1 . KPO-1 s'hybride de manière anticcomplémentaire avec sa cible sur une longueur de 23 bases , 9 bases sur son extrémité 5' étants incluses dans un site de restriction synthétique Nco 1 .

Sa température de melting est :

%GC : 67,7 °c

2AT+4GC : pas applicable car supérieur à 100°C

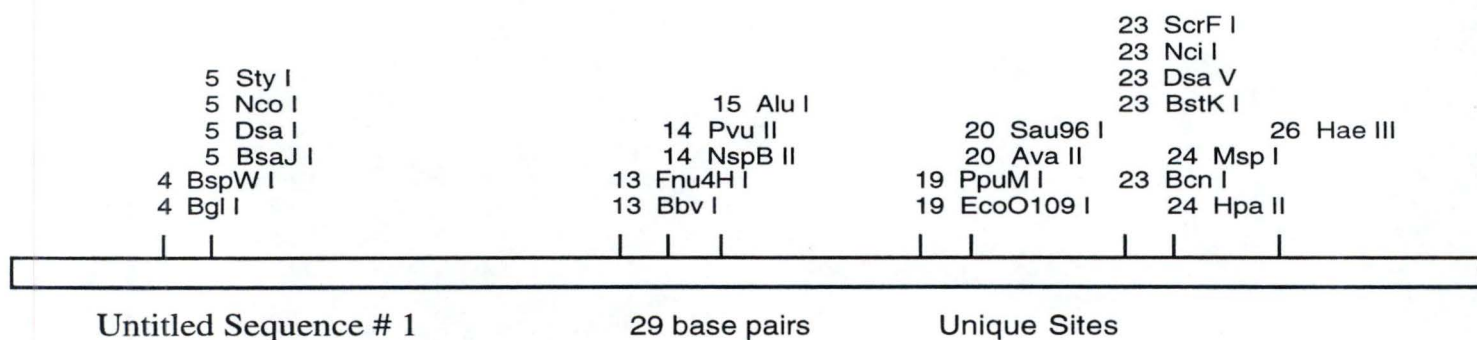
Sa séquence est :



Elle est constituée à 75,86% de GC .

Les sites de restrictions qui ont été ajouté en 5' des amorces permettront la ligation dans le vecteur pGFP-1 .

Annexe 1.1.a Carte de restriction de l'amorce KPO-1 :



5'-3' en partant de la gauche .

Remarque : Présence d'un site Bgl 1 quasiment à cheval sur le site Nco 1 .

Annexe 1.2. 191,182 :

Les amorces 191 et 182 ont une longueur respective de 19 et 18 bases , le 1 et le 2 placé en troisième position dans leur non se rapporte à leur orientation , 1 faisant référence à l'amorce sens et 2 à l'amorce anti-sens . Chacune de ces amorces est anticomplémentaire avec la matrice sur la totalité de leur longueur , elles ne possèdent donc pas de sites de restriction ajoutés de manière synthétique .

Les températures de melting de 191 sont :

%GC : 50,3°C

2AT+4GC : 62°C

Sa séquence est la suivante :

5'-GCAGAGGAAGAAGGGGGCT-3'

Elle se compose de 63,16% en GC .

191 s'hybride quelques bases en retrait par rapport à KPN-1 , 2 bases exactement .

Elle chevauche donc sur 13 bases l'amorce KPN-1 .

Les températures de melting de 182 sont de :

%GC : 60°C

2AT+4GC : 47°C

Sa séquence est la suivante :

5'-CTTACCGTGGGAGGGCAG-3'

Elle se compose à 66.67% de GC .

182 s'hybride 23 bases en aval de KPO-1 , ces deux amorces n'ont donc aucune séquences qui se chevauchent .

Annexe 1.3. 251 , 252 :

Les amorces 251 et 252 sont toutes deux d'une longueur de 25 bases , 251 étant l'amorce sens et 252 étant l'amorce anti-sens . Ces amorces sont également anticomplémentaires avec la matrice sur la totalité de leur longueur . Elles ne comptent aucun site de restriction ajouté .

Les températures de melting de 251 sont :

%GC : 60,8°C

2AT+4GC : 84 °C

Elle est composée à 68% de GC .

Sa séquence est la suivante :

5'-CTGCAGAGGAAGAAGGGGGCTGCCG-3'

Sur 17 bases sa séquence est identique à celle de KPN-1 , elles s'hybrident au même niveau du promoteur .

Les températures de melting de 252 sont :

%GC : 64,1°C

2AT+4GC : 88°C

Sa séquence est la suivante :

5'CTTACCGTGGGAGGGCAGCGCCCGG-3'

252 est composé à 76% de GC .

252 s'hybride au même niveau que 182 , leurs séquences ont en communs 18 bases .

Annexe 1.4. 301 , 302 :

Les amorces 301 et 302 font chacune 30 bases de long , 301 est l'amorce sens , elle s'hybride au même niveau que 252 sur le brin anti-sens de la matrice . 302 est l'amorce anti-sens , elle s'hybride sur le début de l'exon 1 du gène CSF-1 , ce qui garanti une spécificité meilleure .

L'amplicon produit par ces amorces aura donc une taille supérieure par rapport aux amplicons produits par les autres couples d'amorces . La taille attendue est de 948 pb .

Ces amorces s'hybrident à leur cible sur la totalité de leur longueur .

Les températures de melting de 301 sont :

%GC : 63,4°C

2AT+4GC : 98°C

Sa séquence est la suivante :

5'-CTGCAGAGGAAGAAGGGGGCTGCCGGCAAA-3'

Elle est composée à 63,3% de GC .

Les températures de melting de 302 sont :

%GC : 90°C

2AT+4GC : 58°C

Sa séquence est la suivante :

5'-TCCACTCCCAATCATGTGGCTACAGTACTC-3'

Elle est composée à 50% de GC .

Grâce à ce couple d'amorce , les amorces 251 et 252 pourront être utilisée pour réaliser des Hémimested sur les produits PCR de 301 , 302 .

Annexe 1.5. 273 , 254 :

Les amorces 273 et 254 sont longues respectivement de 27 pb et 24 pb . L'amorce 273 est une amorce anti-sens qui s'hybride au milieu du brin sens du promoteur CSF-1 . L'amorce 254 est l'amorce sens , elle s'hybride au milieu du brin anti-sens du promoteur CSF-1 . Les amorces 254 et 273 ont une séquence anticcomplémentaire d'une dizaine de paires de bases à leur extrémité 5' . Celles-ci permettent de générer des amplicons qui peuvent s'hybrider sur leurs extrémités 5' et être ligués par PCR .

273 peut être utilisée en couple avec 301 , 251 , 191 , ou KPN-1 .

254 peut être utilisée en couple avec 302 , 252 , 182 , ou KPO-1 .

Utilisée de la sorte elles permettent d'amplifier le promoteur CSF-1 en deux morceaux .

La combinaison 273-251 donne un fragment amont de 366 pb .

La combinaison 254-KPO-1 donne un fragment aval de 400 pb .

Les températures de melting de 273 sont :

%GC : 57,7°C .

2AT+4GC : 84°C .

Sa séquence est la suivante :

5'-TCCTAGTCACCCTCTGTCTTCTGCGCT-3'

Elle est composée à 55,56% en GC .

Les températures de melting de 254 sont :

%GC : 59,1°C

2AT+4GC : 82°C

Sa séquence est la suivante :

5'-GTGACTAGGAAGACGCGCGAACGGG-3'

Elle est composée à 64% de GC .

Annexe 1.6. : Représentation schématique des positions d'hybridation respectives de toutes les amorces utilisées sur le promoteur du gène CSF-1 .

rem: Feuille volante plastifiée.

Légende :

En rouge : Amorces sens.

En bleu : Amorces anti-sens.

En vert : Taille de divers fragment encadrés par les amorces.

Le premier élément cis AP-1 se trouve à 6 pb de l'extrémité 3' des amorces 301, KPN-1, 191.

Annexe 2. Séquences et carte de restriction complète du promoteur CSF-1 :

Annexe 2.1. Séquence du promoteur du gène CSF-1 :

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa/Eumycota group;
Metazoa; Eumetazoa; Bilateria; Coelomata; Deuterostomia; Chordata;
Vertebrata; Gnathostomata; Osteichthyes; Sarcopterygii; Choanata;
Tetrapoda; Amniota; Mammalia; Theria; Eutheria; Archonta; Primates;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

(Ladner,M.B., Martin,G.A., Noble,J.A., Nikoloff,D.M., Tal,R., Kawasaki,E.S. and
White,T.J. ; 1987)

promoteur : position 1 à 571 .

Origine de transcription : 571 .

Origine de traduction : 749 (Codon start) .

Composition : 66% GC .

Brin sens 5'-3' .

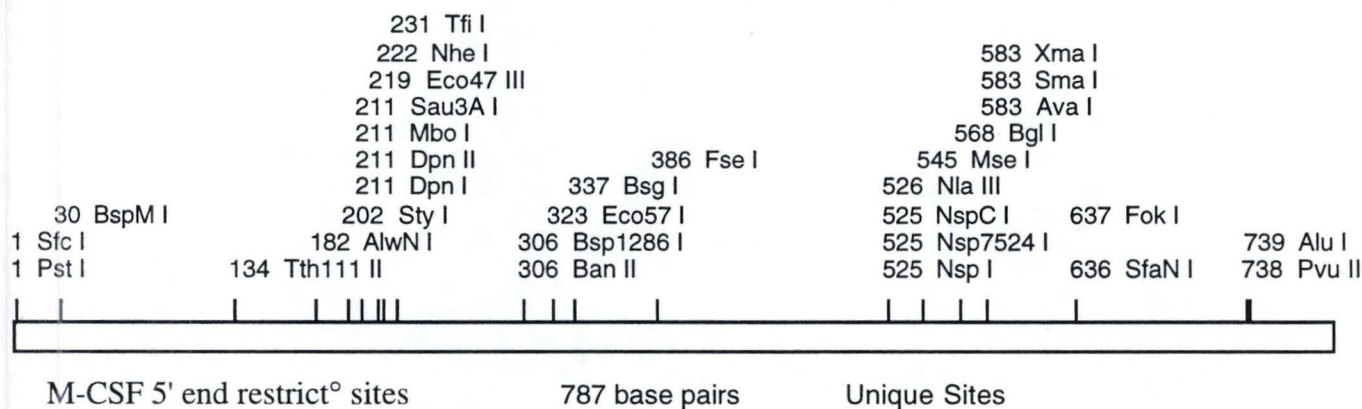
```

1 ctgcagagga agaagggggc tgccggcaaa cctgctgact caggctccac gagggagcaa
61 gtaacactgg actcctttcg gcactccgag aatgggggtgg gggcgtcttc aaaggatttc
121 cctcccttcc cagtgcttgt ccctgctctc ggtccgtttt ctgctaagat ttggggattt
181 tcagggcctg gagggaaaagt cccttgggac gatcatagag cgctagcact gaatcagcct
241 ggagagcgcg gaaggaaaagg gtcggtccgc agagggcgcg ggaaggcag ggtggggacg
301 cgggtggagcc cgcgctcgtt tgctgaaggc ttggaagtgc agcgcagaag acagaggggtg
361 actaggaaga cgcgcgaacg gggctggccg gccggcgggt gggggagggg aggcggggga
421 agggcgctga gtgggcctct ggagtgtgtg tgtctgtgtc agtgtgtgtg tgtgtgtgtg
481 tatgtgtgtg tctggcgctt ggccagggtg atttccata aaccacatgc ccccagctcc
541 tctcttaaaa ggctgtgccg agggctggcc agtgaggctc ggcccgggga aagtgaaagt
601 ttgcctgggt cctctcggcg ccagagccgc tctccgcata ccaggacagc ggtgcggccc
661 tcggccgggg cgcctactcc gcagcagcca gcgagcgagc gagcagcga gggcggccga
721 cgcgcccggc cgggaccag ctgcccgtat gaccgcggcg ggcgcccggc ggcgctgccc
781 tcccacggta ag

```

Annexe 2.2. Cartes de restriction du promoteur du gène CSF-1 :

Annexe 2.2.1. Carte de restriction schématique des sites uniques du promoteur du gène CSF-1 .



Annexe 2.2.2. Ensemble des sites de restriction sur le promoteur du gène CSF-1 :

De gauche à droite : Nom de l'endonucléase .

Séquence coupée .

Nombre de sites de ce type sur la séquence .

Entre parenthèses : tailles des fragments obtenus de 5' en 3' de la séquence.

M-CSF 5' end restrict° sites -> All Sites

DNA sequence	792 b.p.	ctgcagaggaag ... tcccacggtaag	linear
Alu I	ag/ct	1	1 (738) 1 739 (54) 2
AlwN I	cagnnn/ctg	1	1 (181) 2 182 (611) 1
Ava I	c/ycgrg	1	1 (582) 1 583 (210) 2
Ban II	grgcy/c	1	1 (305) 2 306 (487) 1
Bgl I	gccnnnn/nggc	1	1 (567) 1 568 (225) 2
Bsg I	gtgcag 16/14	1	1 (336) 2 337 (456) 1
Bsp1286 I	gdgch/c	1	1 (305) 2 306 (487) 1
BspM I	acctgc 4/8	1	1 (29) 2 30 (763) 1
Dpn I	ga/tc	1	1 (210) 2 211 (582) 1
Dpn II	/gatc	1	1 (210) 2 211 (582) 1
Dsa I	c/crygg	1	1 (782) 1 783 (10) 2
Eco47 III	agc/gct	1	1 (218) 2 219 (574) 1
Eco57 I	ctgaag 16/14	1	1 (322) 2 323 (470) 1
Fok I	ggatg 9/13	1	1 (636) 1 637 (156) 2
Fse I	ggccgg/cc	1	1 (385) 2 386 (407) 1
Mbo I	/gatc	1	1 (210) 2 211 (582) 1
Mse I	t/taa	1	1 (544) 1 545 (248) 2
Nhe I	g/ctagc	1	1 (221) 2 222 (571) 1
Nla III	catg/	1	1 (525) 1 526 (267) 2
Nsp I	rcatg/y	1	1 (524) 1 525 (268) 2
Nsp7524 I	r/catgy	1	1 (524) 1 525 (268) 2
NspC I	rcatg/y	1	1 (524) 1 525 (268) 2
Pst I	ctgca/g	1	1 (0) 2 1 (792) 1
Pvu II	cag/ctg	1	1 (737) 1 738 (55) 2
Sau3A I	/gatc	1	1 (210) 2 211 (582) 1
SfaN I	gcatac 5/9	1	1 (635) 1 636 (157) 2
Sfc I	c/tryag	1	1 (0) 2 1 (792) 1
Sma I	ccc/ggg	1	1 (582) 1 583 (210) 2
Sty I	c/cwggg	1	1 (201) 2 202 (591) 1
Tfi I	g/awtc	1	1 (230) 2 231 (562) 1
Tth111 II	caarca 11/9	1	1 (133) 2 134 (659) 1
Xma I	c/ccggg	1	1 (582) 1 583 (210) 2
Bfa I	c/tag	2	1 (222) 2 223 (139) 3 362 (431) 1
Hae I	wgg/ccw	2	1 (499) 1 500 (66) 3 566 (227) 2
Hph I	ggtga 8/7	2	1 (356) 1 357 (150) 3 507 (286) 2
Mae III	/gtnac	2	1 (60) 3 61 (297) 2 358 (435) 1
Msc I	tgg/cca	2	1 (499) 1 500 (66) 3 566 (227) 2
NspB II	cmg/ckg	2	1 (646) 1 647 (91) 2 738 (55) 3
Ple I	gagtc 4/5	2	1 (36) 2 37 (33) 3 70 (723) 1
PpuM I	rg/gwccy	2	1 (606) 1 607 (125) 2 732 (61) 3
Rsr II	cg/gwccg	2	1 (149) 2 150 (113) 3 263 (530) 1
Bbs I	gaagac 2/6	3	1 (104) 3 105 (242) 2 347 (19) 4 366 (427) 1
Bpm I	ctggag 16/14	3	1 (187) 3 188 (51) 4 239 (200) 2 439 (354) 1
BsrF I	r/ccggy	3	1 (21) 3 22 (365) 2 387 (4) 4 391 (402) 1
Dde I	c/tnag	3	1 (38) 4 39 (125) 3 164 (263) 2 427 (366) 1
EcoO109 I	rg/gnccy	3	1 (182) 2 183 (424) 1 607 (125) 3 732 (61) 4
Hinf I	g/antc	3	1 (36) 3 37 (33) 4 70 (161) 2 231 (562) 1
Nae I	gcc/ggc	3	1 (21) 3 22 (365) 2 387 (4) 4 391 (402) 1
NgoM I	g/ccggc	3	1 (21) 3 22 (365) 2 387 (4) 4 391 (402) 1
Ava II	g/gwcc	4	1 (150) 2 151 (113) 4 264 (344) 1 608 (125) 3
Ban I	g/gyrcc	4	733 (60) 5 1 (493) 1 494 (123) 2 617 (52) 4 669 (92) 3
Bbe I	ggcgc/c	4	761 (32) 5 1 (493) 1 494 (123) 2 617 (52) 4 669 (92) 3
BsiE I	cgry/cg	4	761 (32) 5 1 (388) 1 389 (273) 2 662 (52) 4 714 (13) 5
Bsr I	actgg 1/-1	4	727 (66) 3 1 (65) 3 66 (64) 4 130 (404) 1 534 (35) 5
Eag I	c/ggccg	4	569 (224) 2 1 (388) 1 389 (273) 2 662 (52) 4 714 (13) 5
Ehe I	ggc/gcc	4	727 (66) 3 1 (493) 1 494 (123) 2 617 (52) 4 669 (92) 3
Fau I	cccgc 4/6	4	761 (32) 5 1 (277) 2 278 (31) 4 309 (86) 3 395 (18) 5
Hga I	gacgc 5/10	4	413 (380) 1 1 (102) 3 103 (194) 2 297 (72) 5 369 (350) 1
Kas I	g/gcggc	4	719 (74) 4 1 (493) 1 494 (123) 2 617 (52) 4 669 (92) 3
Mbo II	gaaga 8/7	4	761 (32) 5 1 (8) 5 9 (97) 3 106 (241) 2 347 (19) 4
Mcr I	c/grycg	4	366 (427) 1 1 (388) 1 389 (273) 2 662 (52) 4 714 (13) 5
Nar I	gg/cgcc	4	727 (66) 3 1 (493) 1 494 (123) 2 617 (52) 4 669 (92) 3
			761 (32) 5

M-CSF 5' end restrict^o sites -> All Sites

Gdi II	ygccg	-5/-1	5	1 (384) 1 714 (13) 5	385 (4) 6 727 (66) 3	389 (273) 2	662 (52) 4
Bbv I	gcagc	8/12	6	1 (18) 6 684 (56) 3	19 (320) 2 740 (34) 4	339 (342) 1 774 (19) 5	681 (3) 7
BstN I	cc/wgg		6	1 (186) 2 503 (101) 4	187 (51) 5 604 (37) 6	238 (260) 1 641 (152) 3	498 (5) 7
EcoR II	/ccwgg		6	1 (186) 2 503 (101) 4	187 (51) 5 604 (37) 6	238 (260) 1 641 (152) 3	498 (5) 7
Hae II	rgcgc/y		6	1 (218) 2 669 (92) 4	219 (275) 1 761 (10) 7	494 (123) 3 771 (22) 6	617 (52) 5
Bcn I	ccs/gg		7	1 (582) 1 725 (5) 7	583 (1) 8 730 (28) 4	584 (81) 2 758 (10) 6	665 (60) 3 768 (25) 5
Eae I	y/ggccc		7	1 (384) 1 566 (96) 3	385 (4) 8 662 (52) 6	389 (111) 2 714 (13) 7	500 (66) 4 727 (66) 5
Nci I	cc/sgg		7	1 (582) 1 725 (5) 7	583 (1) 8 730 (28) 4	584 (81) 2 758 (10) 6	665 (60) 3 768 (25) 5
BstU I	cg/cg		8	1 (246) 2 311 (60) 3 754 (39) 4	247 (30) 6 371 (2) 9	277 (22) 7 373 (348) 1	299 (12) 8 721 (33) 5
Sau96 I	g/gncc		8	1 (150) 2 433 (148) 3 733 (60) 6	151 (33) 8 581 (27) 9	184 (80) 4 608 (48) 7	264 (169) 1 656 (77) 5
Bsl I	ccnnnnn/nngg		9	1 (85) 5 392 (106) 3 659 (119) 2	86 (56) 7 498 (60) 6 778 (15) 8	142 (246) 1 558 (100) 4	388 (4) 9 658 (1) 10
Hpa II	c/cgg		9	1 (22) 7 584 (81) 3 758 (10) 8	23 (365) 1 665 (61) 4 768 (25) 6	388 (4) 9 726 (4) 10	392 (192) 2 730 (28) 5
Msp I	c/cgg		9	1 (22) 7 584 (81) 3 758 (10) 8	23 (365) 1 665 (61) 4 768 (25) 6	388 (4) 9 726 (4) 10	392 (192) 2 730 (28) 5
Nla IV	ggn/ncc		9	1 (42) 6 607 (10) 9 733 (28) 8	43 (262) 1 617 (52) 5 761 (32) 7	305 (189) 2 669 (63) 4	494 (113) 3 732 (1) 10
BsaJ I	c/cnngg		10	1 (201) 2 583 (1) 11 659 (6) 10	202 (301) 1 584 (20) 7 665 (118) 3	503 (55) 4 604 (36) 5 783 (10) 9	558 (25) 6 640 (19) 8
BspW I	gcnnnnn/nngc		11	1 (236) 1 374 (52) 4 672 (35) 9	237 (32) 10 426 (142) 2 707 (6) 12	269 (9) 11 568 (52) 5 713 (42) 7	278 (96) 3 620 (52) 6 755 (38) 8
Fnu4H I	gc/ngc		11	1 (18) 10 626 (28) 5 713 (27) 7	19 (320) 1 654 (27) 6 740 (24) 8	339 (84) 3 681 (3) 12 764 (10) 11	423 (203) 2 684 (29) 4 774 (19) 9
Hae III	gg/cc		11	1 (184) 2 434 (67) 4 656 (7) 11	185 (201) 1 501 (66) 5 663 (52) 7	386 (4) 12 567 (14) 9 715 (13) 10	390 (44) 8 581 (75) 3 728 (65) 6
BstK I	c/cnngg		13	1 (186) 2 503 (80) 3 641 (24) 9 758 (10) 11	187 (51) 5 583 (1) 14 665 (60) 4 768 (25) 8	238 (260) 1 584 (20) 10 725 (5) 13	498 (5) 12 604 (37) 6 730 (28) 7
Dsa V	/cnngg		13	1 (186) 2 503 (80) 3 641 (24) 9 758 (10) 11	187 (51) 5 583 (1) 14 665 (60) 4 768 (25) 8	238 (260) 1 584 (20) 10 725 (5) 13	498 (5) 12 604 (37) 6 730 (28) 7
Hha I	gcg/c		13	1 (219) 1 312 (30) 9 618 (52) 4 762 (10) 13	220 (26) 11 342 (30) 10 670 (52) 5 772 (21) 12	246 (30) 8 372 (123) 2 722 (33) 7	276 (36) 6 495 (123) 3 755 (7) 14
HinP I	g/cgc		13	1 (219) 1 312 (30) 9 618 (52) 4 762 (10) 13	220 (26) 11 342 (30) 10 670 (52) 5 772 (21) 12	246 (30) 8 372 (123) 2 722 (33) 7	276 (36) 6 495 (123) 3 755 (7) 14
ScrF I	cc/ngg		13	1 (186) 2 503 (80) 3 641 (24) 9 758 (10) 11	187 (51) 5 583 (1) 14 665 (60) 4 768 (25) 8	238 (260) 1 584 (20) 10 725 (5) 13	498 (5) 12 604 (37) 6 730 (28) 7
Aci I	ccgc	-3/-1	16	1 (247) 1 300 (10) 14 423 (204) 2 654 (25) 7 765 (28) 6	248 (19) 9 310 (85) 3 627 (7) 16 679 (34) 5	267 (11) 13 395 (18) 10 634 (15) 11 713 (40) 4	278 (22) 8 413 (10) 15 649 (5) 17 753 (12) 12
Mnl I	cctc	7/7	16	1 (5) 16 191 (81) 3 410 (26) 12 574 (37) 11 779 (14) 15	6 (45) 10 272 (82) 2 436 (103) 1 611 (48) 9	51 (70) 4 354 (51) 7 539 (21) 13 659 (50) 8	121 (70) 5 405 (5) 17 560 (14) 14 709 (70) 6

BIBLIOGRAPHIE

- Ammendola R.**, Mesuraca M., Russo T. and Cimino F. (1994). "The DNA-binding efficiency of SP-1 is affected by redox changes." *European Journal of Biochemistry* **225**, 483-489.
- Barritt G.J.** (1992). "Communication Within Animal Cells". New York, Oxford Science Publications.
- Boeck B.** and Kolakofsky D. (1994). "Position +5 and +6 can be major determinants of the efficiency of non AUG initiation codons for protein synthesis ." *The EMBO Journal* **13**, 3608-3617.
- Bourette R.P.**, Myles G.M., Carlberg K., Chen A.R. and Rohrschneider L.R. (1995). "Uncoupling of the proliferation and differentiation signals mediated by the murine macrophage colony-stimulating factor receptor expressed in myeloid FDC-P1 cells." *Cell. Growth. Differ.* **6** (6), 631-645.
- Carlos T.M.** and Harlan J.M. (1994). "Leucocyte-Endothelial Adhesion Molecules." *Blood* **84** (7), 2068-2101.
- Castellazzi M.** and Sergeant A. (1993). "L'oncoprotéine c-Jun ." *Bull Cancer* **80**, 757-779.
- Cerdan C.**, Razanajaona D., Martin Y., Courcoul M., Pavon C., Mawas C., Olive D. and Birg F. (1992). "Contributions of the CD2 and CD28 T Lymphocyte activation pathways to the regulation of the expression of the colony-stimulating factor (CSF-1) gene." *Journal of Immunology* **149** (2), 373-379.
- Chester N.** and Marshak D.R. (1992). "Dimethyl Sulfoxide-Mediated Primer Tm Reduction : A Method for Analysing the Role of Renaturation Temperature in Polymerase Chain Reaction." *Analytical Biochemistry* **209**, 284-290.
- Chou Q.** (1992). "Minimizing deletion mutagenesis artifact during *Taq* DNA polymerase PCR by E.Coli SSB." *Nucleic Acids Research* **20** (16), 4371.
- Clinton S.K.**, Underwood R., Hayes L., Sherman M.L., Kufe D.W. and Libby P. (1992). "Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis." *American Journal of Pathology* **140** (2), 301-316.
- Darnell J.**, Lodish H. and Baltimore D. (1993). "Biologie moléculaire de la cellule". Paris,
- Datta R.**, Imamura K., Goldman S.J. and Dianoux A.C. (1992). "Functionnal expression of the macrophage colony stimulating factor receptor in human THP-1 monocytic leukemia cells ." *Blood* **79**, 904-912.
- Don R.H.**, Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K. and Mattick J.S. (1991). "'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification." *Nucleic Acids Research* **19** (14), 4008.
- Eckert K.A.** and Kunkel T.A. (1990). "High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase." *Nucleic Acids Research* **18** (13), 3739-3744.
- Eckert K.A.** and Kunkel T.A. (1991). "DNA Polymerase Fidelity and the Polymerase Chain Reaction." *PCR Methods and Applications* **1**, 17-24.
- Fruchart J.-C.** (1992). "Le transport du cholestérol et sa fixation dans les artères." *Pour la science* **175**, 40-47.

- Gelfand H.** and White T.J. (1990). "Thermostable DNA polymerases." *PCR protocol* , 129-145.
- Griffin H.G.** and Griffin A.M. (1994). "PCR Technology Current Innovations". CRC Press, INC.
- Gruber M.F.**, Williams C.C. and Gerrard T.L. (1994). "Macrophage-colony- stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 β and inhibited by IL-4 and IL-10." *Journal of Immunology* **152** , 1354-1361.
- Harrington R.E.** and Winicov I.(1993). "New concepts in protein-DNA recognition : sequence- directed DNA binding and flexibility." ,
- Herbomel P.** (1993). *L'expression du génome. Du noyau   l'organisme* . Ed. ESTEM. 156-172.
- Hu G.** (1993). "DNA polymerase-catalysed addition of nontemplated Extra Nucleotides to the 3' end of a DNA fragment ." *DNA and Cell Biology* **12** (8), 763-770.
- Igarashi, Aono, Orita and Sato (1991). "Improved two-step PCR method." *European Patent Application* , 1-17.
- Innis M.A.**, Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White T.J. (1990). "PCR Protocols".
- Jackson S.P.** (1992). "Regulating transcription factor activity by phosphorylation." *Trends in Cell. Biology* **2** , 104-108.
- Jacobs A.** (1989). "Oncogenes in the myelodysplastic syndrome ." *Blood Reviews* **3** , 105-109.
- Jang I.K.**, Lassila R. and Fuster V. (1993). "Atherogenesis and inflammation ." *European Heart Journal* **14** (supplement K), 2-6.
- Kaledin A.K.**, Slyusarenko A.G. and Gorodestkii S.I. (1980). "Isolation and properteis of DNA polymerase from extremely *Thermus aquaticus* YT1." *Biokhimiya* **45** , 644.
- Kaplan J.-C.** and Delpech M. (1989). "Biologie Moléculaire et M decine". Paris,
- Koehavong P.** and Thilly W.G. (1989). "Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification." *Biochemistry* **86** , 9253-9257.
- Kong H.**, Rebecca B., Kucera B. and William E.J. (1993). "Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile Archaea *Thermococcus litoralis* ." *The Journal of Biological Chemistry* **268** , 1965-1975.
- Ladner M.B.**, Martin G.A., Noble J.A., Nikoloff D.M., Tal R., Kawasaki E.S. and White T.J. (1987). "Human CSF-1 : gene structure and alternative splicing of mRNA precursors." *EMBO Journal* **6** (9), 2693-2698.
- Lawyer F.C.**, Stoffel S., Saiki R.K., Chang S.-Y., Landre P.A., Abramson R.D. and Gelfand D.H. (1993). "High-level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of Full-length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated Form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity." *PCR Methods and Applications* **2** , 275-287.

- Leclair K.P.**, Blonar M.A. and Sharp P.A. (1992). "The p50 subunit of NF- κ B associates with the NF-IL6 transcription factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89** , 8145-8149.
- Levon M.K.**, Resnick N., Gimbrone M.A.J. and Collins T. (1995). "Nuclear factor- κ B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress ." *Journal of Clinical Investigation* **96** , 1169-1175.
- Lewin B.** (1994). *Genes V* . Ed. O. U. Press. New York, Oxford University Press Inc., New York.
- Li Q.B.** and Guy L. (1996). "Prolonged Final Extension Time Increase Cloning Efficiency of PCR Products." *Biotechniques* **21** (2), 192-196.
- Ling L.L.**, Keohavong P., Dias C. and Thilly W.G. (1991). "Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity : Modified T7 , Taq and Vent DNA polymerase ." *PCR Methods and Applications* **1** , 63-69.
- Lohff C.J.** and Cease K.B. (1991). "PCR using a thermostable polymerase with 3' to 5' exonuclease activity generates blunt products suitable for direct cloning." *Nucleic Acids Research* **20** (n°1), 144.
- Mahley R.W.** (1983). "Development of accelerated atherosclerosis." *Archives of Pathological Laboratory Medicine* **107** , 393-399.
- Malek A.M.** and Izumo S. (1994). "Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell." *Journal of Hypertension* **12** , 989-999.
- Mantovani L.**, Henschler R., Brach M.A., Mertelsmann R.H. and Herrmann F. (1991). "Regulation of gene expression of macrophage-colony stimulating factor in human fibroblasts by the acute phase response mediators interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α and IL-6 ." *Febs Letters* **280** (1), 97-102.
- Mareni C.**, Sessarego M., Montera M., Fugazza G., Origone P., D'Amato E., Lerza R. and Pistola V. (1994). "Expression and genomic configuration of GM-CSF, IL-3, M-CSF receptor (c-fms), early growth response gene-1 (EGR-1) and M-CSF genes in primary myelodysplastic syndromes." *Leukemia and Lymphoma* **15** , 135-141.
- Mueller H.W.** and Duclos J.M. (1993). "Facile Oligomer Concentration and Tm Determination for Estimation of PCR Annealing Temperature". Ed. Perkin Elmer Corporation. 10-11.
- Mullis K.B.**, Ferré F. and Gibbs R.A. (1994). *PCR. The Polymerase Chain Reaction* . Eds. K. B. Mullis, F. Ferré and R. A. Gibbs. Boston, Birkhäuser Boston.
- Neuer A.**, Jannasch H.W., Belkin S. and Stetter K.O. (1990). "*Thermococcus litoralis* sp. nov. : A new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria." *Arch. Microbiol.* **153** , 205-207.
- O'Brien K.** and Chait A. (1994). "The biology of the artery wall in atherogenesis ." *Medical Clinics of North America* **78** (1), 41-67.
- Oster W.**, Lindermann A., Mertelsmann R. and Herrmann F. (1988). "Regulation of gene expression of M-, G-, GM-, and multi-CSF in normal and malignant hematopoietic cells ." *Blood Cells* **14** , 443-462.

- Paabo S.**, Irwin D.M. and Wilson A.C. (1990). "DNA damage promotes Jumping between templates during enzymatic amplification ." *The Journal of Biological Chemistry* **265** , 4718-4721.
- Praloran V.** (1991). "Structure, biosynthesis and biological roles of monocyte-macrophage colony stimulating factor (CSF-1 or M-CSF)." *Hemaltol.* **33** , 323-333.
- Rajavashisth T.B.**, Yamada H. and Nikhilesh K.M. (1995). "Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL." *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **15** (10), 1591-1598.
- Rambaldi A.**, Young D.C. and Griffin J.D. (1987). "Expression of the M-CSF (CSF-1) gene by human monocytes." *Blood* **69** (5), 1409-1413.
- Rawn J.D.** (1990). "Traite de biochimie".
- Roitt I.M.**, Brostoff J. and Male D. (1994). "Immunologie".
- Rychlik W.**, Spencer W.J. and Rhoads R.E. (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*." *Nucleic Acids Research* **18** (n°21), 6409-6412.
- Saban J.** and King D. (1996). "Prolonged Final Extension Time Increases Cloning Efficiency of PCR Products." *Biotechniques* **21** (n°2), 192-196.
- Saleem A.**, Kharbanda S., Yuan Z. and Kufe D. (1995). "Monocyte colony-stimulating factor stimulates binding of phosphatidylinositol 3-kinase to Grb2.Sos complexes in human monocytes." *Biology-Chemistry* **270** (18), 10380-10383.
- Schierwater B.** and Ender A. (1993). "Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products ." *Nucleic Acids Research* **21** (19), 4647-4648.
- Schmitz M.L.**, Stelzer G., Altmann H., Meisterernst M. and Baeuerle P.A. (1995).
"Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF- κ B with TATA-binding protein, transcription Factor IIB, and coactivators." *Journal of Biological Chemistry* **270** (13), 7219-7226.
- Shen W.-H.** and Hohn B. (1992). "DMSO improves PCR amplification of DNA with complex secondary structure." *biotechniques* **8** , 227.
- Sherr C.J.** (1988). "The role of the CSF-1 receptor gene (C-fms) in cell transformation ." *Leukemia* **2** (12), 132S-142S.
- Tabuchi A.**, Sano K., Oh E., Tsuchiya T. and Tsuda M. (1994). "Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) *in vitro* : NO-mediated modulation of AP-1 ." *FEBS Letters* **351** , 123-127.
- Till K.J.**, Lopez A., Slupsky J. and Cawley J.C. (1993). "C-fms protein expression by B-cells , with particular reference to the hairy cells of hairy-cell leukemia ." *British Journal of Haematology* **83** , 223-231.
- Tindall K.R.** and Kunkel A.T. (1988). "Fidelity of DNA Synthesis by the *Thermus Aquaticus* DNA polymerase ." *Biochemistry* **27** , 6008-6013.
- Tjian R.** (1995). "La transcription des gènes ." *Pour la science* **210** , 50-58.
- Watson J.D.**, Gilman M., Witkowski J. and Zoller M. (1992). "ADN recombinant". *ADN Recombinant* . Ed. D. B. Université. Freeman.

- White B.A.** (1993). "PCR protocols : Current Methods and Applications". Totowa, New Jersey, Humana Press.
- Williams J.F.** and Anderson M.S. (1996). "Understanding temperature dynamics in PCR reaction tubes". . Ed. P. E. Corporation. 14-17.
- Woodget J.R.**, Pulverer B.J., Nikolakaki E., Plyte S., Hughes K., Franklin C.C. and Kraft S.A. (1993). "Regulation of jun/AP-1 oncoprotein by protein phosphorylation ." *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. **28** , 261-269.
- Wu D.Y.**, Ugozzoli L., B.K.Pal, Qian j. and Wallace R.K. (1991). "The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction ." *DNA and Cell Biology* **10** (3), 233-238.
- Xanthoudakis S.** and Curran T. (1992). "Identification and characterisation of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity ." *EMBO Journal* **11** (2), 653-665.
- Yan S.F.**, Tritto I., Pinsky D., Liao H., Huang J., Fuller G., Brett J., May L. and Stern D. (1995). "Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells." *Journal of biological chemistry* **270** (19), 11463-11471.
- Youngsoo K.**, Soo H.E., Jimin W, Dae-Sil L., Se Won S. and Steitz T. (1995) "Crystal structure of thermus aquaticus DNA polymerase." *Nature* **376** , 612-616.