Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation de 3 clones lgt11 porteurs d'épitopes de la méthylase de la coiffe de la levure

Monville, Marie-Christine

Award date:
1988

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.

Download date: 02. May. 2026

1988

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

CARACTERISATION DE 3 CLONES λgt11 PORTEURS D'EPITOPES DE LA METHYLASE DE LA COIFFE DE LA LEVURE.

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

MONVILLE Marie - Christine.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
rue de Bruxelles 61, B-5OOO **NAMUR**
Tél. 081-22.9O.61. Télex 59222 facnam-b Téléfax 081-23.O3.91.

CARACTERISATION DE 3 CLONES λgt11 PORTEURS D'EPITOPES DE LA METHYLASE DE LA COIFFE DE LA LEVURE.

MONVILLE Marie-Christine

Résumé.

Les ARNm eucaryotiques possèdent une coiffe méthylée en position 5'-terminale dont la fonction reste à élucider. Au laboratoire, le gène de la (guanine-7-)-méthyltransférase a été recherché dans le but de créer des organismes mutants pour cet enzyme et ainsi en comprendre le rôle. La banque de levure sauvage construite par Young & Davis (1983) dans le vecteur d'expression λgt11 a été criblée par des anticorps dressés contre la méthylase purifiée. Trois clones se sont révélés positifs.
Nous avons montré que ces clones produisaient une protéine de fusion et que celle-ci était sous la dépendance d'IPTG. Une analyse par restriction *Eco*R I a indiqué que les 3 inserts étaient identiques et avaient une taille d'environ 3,9 kb. Un sous-clonage des fragments de l'insert a été réalisé dans un vecteur de délétion et de séquençage. Ceci permettra de séquencer le morceau qui code pour les épitopes de la méthylase et de construire une sonde marquée qui servira à "pêcher" le gène entier dans une banque de levure.

Abstract.

The 5'-terminal methylated cap is a feature of eukaryotic mRNA whose fonction remains to be elucidated. At the laboratory, the gene of the (guanine-7-)-methyltransferase is researched. The purpose is to create mutants for this enzyme. The yeast libary constructed in λgt11 by Young & Davis was screened with antibodies raised against the methylase. Three clones were positives.
We have shown that those recombinant phages produced a fusion protein and that the production of this one is dependant on the induction by IPTG. The DNA of the 3 recombinant clones has been restricted with the *Eco*R I enzyme. It has shown that the 3 inserts were identical and had a size of 3,9 kb. Fragments of the insert have been subcloned in an appropriate vector with intent of sequencing the fragment that codes for the epitopes of the methylase. A labelled probe prepared with this fragment will permit to research the entire gene in a yeast libary.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Août 1988
Laboratoire de Génétique Moléculaire
Promoteur : Dr. J. VANDENHAUTE.

E R R A T A

Remerciements : ligne 8 : lire "il m'a apportés" au lieu de "il m'apportés".

Page 1 ligne 13 : lire "précurseur" au lieu de "précursseur".

Page 4 ligne 8 : lire "nucléotide" au lieu de "nuclotide".

Page 9 ligne 29 : lire "possédant" au lieu de "possèdant".

Page 18 ligne 4 : lire "s'accommoder" au lieu de "s'accomoder".

Page 29 ligne 12 : lire "de par" au lieu de "de de par".

Page 30 ligne 4 : lire "polymérase" au lieu de "polymlérase".

Page 34 ligne 19 : lire "tels" au lieu de "tel".

Page 42 ligne 7 : lire "polymérases" au lieu de "polymérase".

Page 43 ligne 16 : lire "fonctionnel" au lieu de "foctionnel".

Page 44 ligne 7 : lire "caractéristique" au lieu de "caractéritique".

Page 44 ligne 8 : lire "répresseur" au lieu de "represseur".

Page 45 ligne 14 : lire "expression" au lieu de "expresson".

Page 45 ligne 14 : lire "figure 16" au lieu de "figure 12".

Page 46 ligne 2 : lire "autoclavage" au lieu de "autoclivage".

Page 46 ligne 20 : lire "conservées" au lieu de "conservée".

Page 48 ligne 4 : lire "figure 23" au lieu de "figure 19".

Page 48 ligne 8 : lire "plasmide" au lieu de "pasmide".

Page 50 ligne 1 : lire "vérifier" au lieu de "uérifier".

Page 51 ligne 10 : lire "négative" au lieu de "positive".

Page 52 ligne 16 : lire "étalonnage" au lieu de "étalonage".

Page 55 ligne 8 : lire " $MgSO_4.7H_2O$ " au lieu de " MgSO4.7H2O ".

Page 55 ligne 16 : lire "absence" au lieu de "abscence".

Page 56 ligne 9 : lire "qu'elles" au lieu de "quelles".

Page 56 ligne 13 : lire "les boîtes" au lieu de "les boîte".

Page 56 ligne 20 : lire "corex" au lieu de "correx".

Page 57 ligne 1 : lire "préparé" au lieu de "préparée".

Page 57 ligne 5 : lire "du LB" au lieu de "de LB".

Page 57 ligne 9 : lire "lavée" au lieu de "lavéee".

Page 57 ligne 19 : lire "corex" au lieu de "correx".

Page 59 ligne 2 : lire " " .

Page 59 ligne 2 : lire "phages" au lieu de "phage".

Page 59 ligne 8 : lire "corex" au lieu de "correx".

Page 64 ligne 4 : lire "électrophorèse" au lieu de "élecrophorèse".

6 : " " .

Page 64 ligne 11 : lire "puits" au lieu de "puit".

Page 64 ligne 11 : lire "de tailles connues" au lieu de "de taille connue".

Page 64 ligne 12 : lire "de tailles inconnues" au lieu de "de taille inconnue".

Page 65 ligne 8 : ajouter (DEAE-cellulose) après papier filtre.

Page 65 ligne 12 : lire "dans" au lieu de "dand".

Page 65 ligne 23 : lire "Whatman" au lieu de "Wattman".

Page 67 ligne 1 : lire "Klenow" au lieu de "Kleenow".

Figure 5 : ajouter la référence (Min Jou et Fiers, 1978 cités dans Vandenhaute, 1980.)

Figure 6 : ajouter la référence (Shatkin et al, 1979 cité dans Vandenhaute, 1980.)

Figure 12 : lire ß-élimination au lieu de b-élimination.

Figure 16 : lire "montrée" au lieu de "montée".

Figure 22 : lire "marquage" au lieu de "maquage".

Figure 23 : ajouter la référence (Stratagène).

Figure 29 : ajouter la référence (Boehringer).

Figure 27 : 2 : "coupé par EcoRI" à supprimer.

Bibliographie :

Page 1 ligne 12 : lire "développement" au lieu de "developpement".

ligne 18 : lire "tome 1" au lieu de 1.

Page 2 ligne 23 : lire "1985" au lieu de "1895".

Page 3 RHOADS, R.E. (1985) : ajouter le titre : The cap structure of eukaryotic messenger RNA and its interaction with cap-binding protein.

Page 3 ROTHSTEIN, R.J. (1983) : ajouter le titre : One-step gene disruption in yeast.

Page 4 ligne 2 : lire "binding" au lieu de "banding".

Page 4 ligne 5 : lire "protéique" au lieu de "protèique".

Page 4 lire pour les 2 références : YOUNG, R.A. et DAVIS R.W. au lieu de JOUNG, R.A. et RONALD, W.D.

REMERCIEMENTS.

Je tiens à remercier le Professeur J. Delcour qui m'a accueillie dans son laboratoire et le Docteur J. Vandenhaute qui a accepté de diriger ce travail; Messieurs J. Delcour, C. de Schrijver, F. Mainferme et Mademoiselle F. Vernaillen qui ont bien voulu lire ce mémoire.
Je remercie toute l'équipe du laboratoire qui a su faire régner une ambiance amicale, et tout spécialement Mademoiselle G. Renauld pour ses conseils et sa disponibilité.
Un grand merci également à Brigitte pour avoir mené à bien la dactylographie de ce mémoire, et à Didier pour l'aide et le soutien qu'il m'apportés.

Namur, le 20 août 1988.

TABLE DES MATIERES

==========

INTRODUCTION

Page

I. BREF APERCU DE LA BIOGENESE DE L'ARN MESSAGER EUCARYOTIQUE. 1

1. Etapes de la biosynthèse et structure de l'ARN messager. 1
2. Enzymes et mécanismes de coiffage. 4

II. LA QUESTION DU ROLE DE LA COIFFE. 6

III. QUELLES SONT LES APPROCHES UTILISEES POUR ABORDER LA QUESTION DU ROLE DE LA 7-METHYL-GUANOSINE DE LA COIFFE ? 8

1. L'approche biochimique. 8
   1.1. Comparaison d'ARNm bloqués, coiffés ou non coiffés. 8
      1.1.1. Rôle de la coiffe dans la traduction. 8
      1.1.2. Rôle de la m^7G dans la stabilité de l'ARNm. 10
   1.2. L'utilisation d'inhibiteurs. 11
      1.2.1. Les analogues de la coiffe. 11
      1.2.2. Les drogues. 12
2. L'approche génétique. 13

IV. BUT DU TRAVAIL. 15

RESULTATS ET DISCUSSION

I. EXPLOITATION D'UNE BANQUE GENOMIQUE DE LEVURE SAUVAGE ETABLIE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION λgt11. 16

1. Qu'est-ce qu'une banque génomique d'expression ? 16
2. Comment cette banque est-elle construite ? 17
   - 2.1. Clonage de l'ADN dans λgt11. 17
   - 2.2. Choix de λgt11 comme vecteur d'**expression.** 17
   - 2.3. Choix des souches d'*E. coli* Y1088 et Y1090 pour l'amplification et l'expression du phage λgt11. 19
     - 2.3.1. Souche Y1088 d' *E. coli.* 19
     - 2.3.2. Souche Y1090 d'*E. coli.* 19
     - 2.3.3. Contrôle de la synthèse de la protéine de fusion. 19
3. Comment une banque d'expression est-elle utilisée ? 20
   - 3.1. Criblage de la banque. 20
   - 3.2. Type d'anticorps utilisé. 20
4. Résultats. 21

II. ANALYSE DES PROTEINES DE FUSION EXPRIMEES PAR LES 3 CLONES. 22

1. Introduction. 22
2. Les anticorps liés aux clones positifs reconnaissent en Western-blotting une bande de ≈ 55 kD. 23
   - 2.1. Méthode. 23
   - 2.2. Résultat. 23

3. La protéine reconnue par les anticorps est bien une protéine de fusion. 24
3.1. Méthode. 24
3.2. Résultat. 24
4. La protéine de fusion est sous la dépendance d'IPTG. 25
4.1. Méthode. 25
4.2. Résultat. 25
5. Résumé. 26

III. ANALYSE DE RESTRICTION DES INSERTS. 27

1. Introduction. 27
2. Restriction *Eco*RI. 28
2.1. Méthode. 28
2.2. Résultat. 28
2.3. Conclusion. 29
3. Marquage radioactif à la Klenow. 30
3.1. Méthode. 30
3.2. Résultat. 30
3.3. Conclusion et discussion. 30
4. Résumé. 31

IV. SOUS-CLONAGE DANS UN VECTEUR DE DELETION ET DE SEQUENCAGE. 32

1. Introduction. 32
1.1. Stratégies pour séquencer. 32
1.2. Choix du vecteur pBluescript pour le clonage et le séquençage. 33
2. Tentative d'isolement et clonage de l'insert entier dans le vecteur pBluescript. 35

3. Sous-clonage dans pBluescript des fragments obtenus par la restriction totale de l'insert par l'enzyme *Eco*RI. 37

4. Recherche d'enzymes de restriction utilisables pour les délétions. 38

5. Résumé. 39

V. CONCLUSION. 40

VI.PERSPECTIVES. 41

1. Identification et séquencage du fragment sous-cloné porteur d(es) épitope(s) de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase. 41

2. Recherche du gène entier. 42

3. Etude du caractère essentiel ou non du gène par disruption-transplacement. 42

MATERIELS ET METHODES

I. SOUCHES BACTERIENNES ET PHAGES. 44

1. Souches bactériennes. 44
1.1. Souche Y1089 d'*E. coli*. 44
1.2. Souche Y1090 d'*E. coli*. 44
1.3. Souche XL1-Blue d'*E. coli*. 4

2. Phage λgt 11. 45

II. MILIEUX DE CULTURE. 46

III. PLASMIDE. 48

IV. PREPARATION D'UN LYSAT BRUT DE LA SOUCHE Y1089 INFECTEE PAR CHACUN DES TROIS PHAGES RECOMBINANTS. 49

1. Solutions et milieux. 49
2. Manipulations. 49

V. ANALYSE DES PROTEINES DE FUSION PAR ELECTROPHORESE. 51

1. Solutions. 51
2. Manipulations. 52
3. Estimation de la taille des proteines. 52

VI. IMMUNODETECTION. 53

1. Solutions. 53
2. Manipulations. 53
   2.1. Western - blotting. 53
   2.2. Immunodétection. 54

VI. PREPARATION D'ADN PHAGIQUE. 55

1. Production de plages de lyse. 55
   1.1. Solutions. 55
   1.2. Manipulations. 55
2. Purification d'ADN phagique selon la méthode Amersham. 56
   2.1. Solutions. 56
   2.2. Manipulations. 57
3. Purification d'ADN phagique selon la méthode décrite dans Maniatis (1982). 58
   3.1. Solutions. 58
   3.2. Manipulations. 59

VIII. DIGESTION DE L'ADN PAR UN ENZYME DE RESTRICTION. 60

1. Généralités. 60
2. Solutions. 60
3. Manipulations. 62

IX. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE. 63

1. Généralités. 63
2. Solutions. 63
3. Manipulations. 64
4. Estimation de la taille des fragments d'ADN sur gel. 64

X. EXTRACTION D'UN FRAGMENT D'ADN A PARTIR D'UN GEL D'AGAROSE. 65

1. Solutions. 65
2. Manipulations. 65

XI. MARQUAGE RADIOACTIF AVEC LE FRAGMENT DE KLENOW. 67

1. Principe. 67
2. Solutions. 67
3. Manipulations. 68

XII. LIGATION D'UN INSERT DANS UN VECTEUR. 69

1. Principe. 69
2. Solutions. 69
3. Manipulations. 70

XIII. TRANSFORMATION D'*E. coli.* 71

1. Principe. 71
2. Solutions. 71
3. Manipulations. 71
4. Sélection des transformants. 72

XIV. EXTRACTION RAPIDE DE PLASMIDE D'*E. coli.* 73

1. Solutions. 73
2. Manipulations. 73

INTRODUCTION

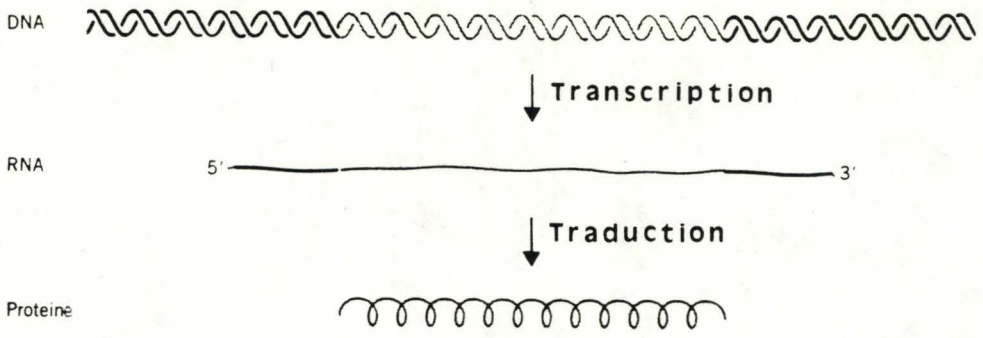


Figure 1 : L'information génétique passe de l'ADN vers l'ARNm puis vers les protéines grâce aux réactions de transcription et de traduction.
(Lewin, 1985)

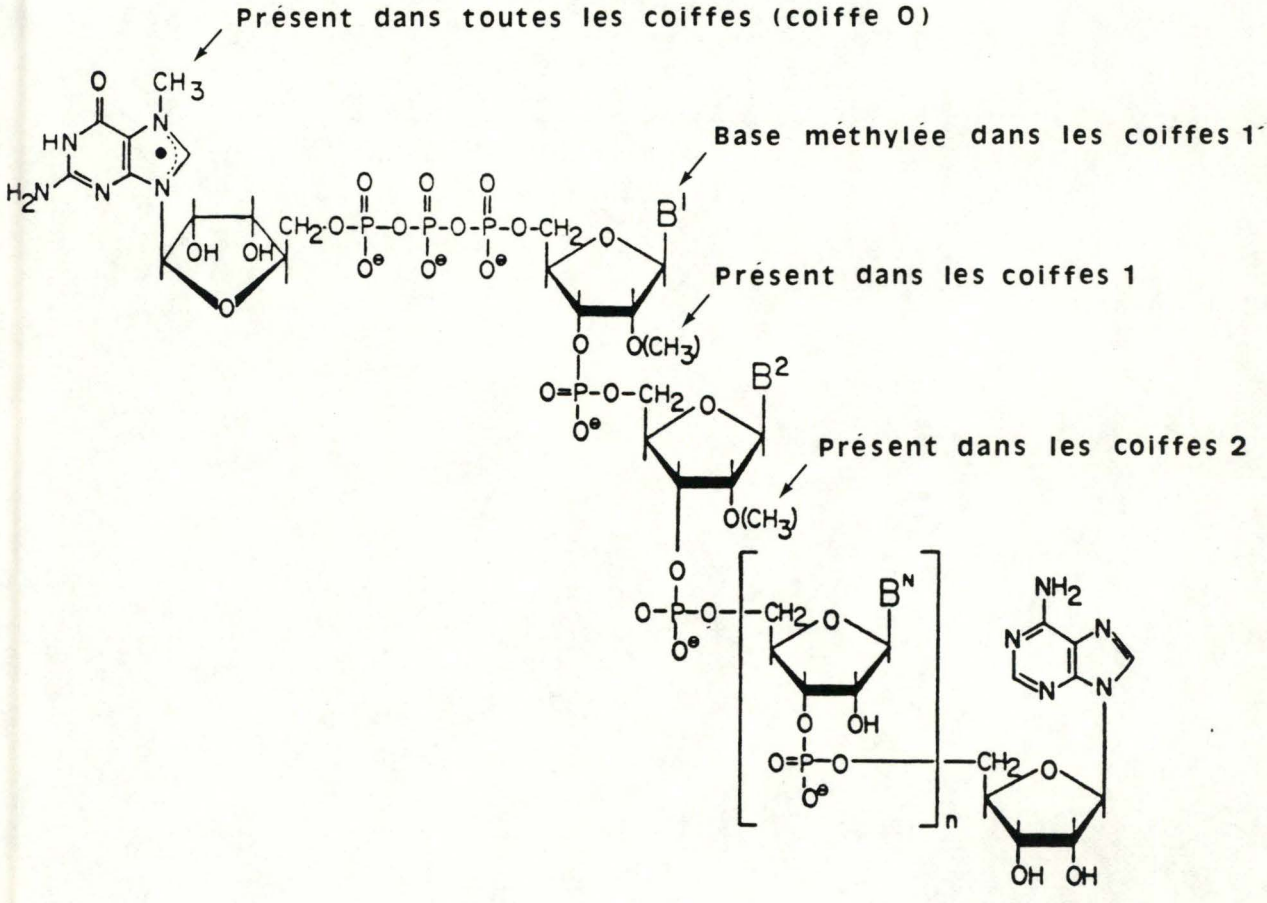


Figure 2 : Structure des différentes coiffes.
(Lewin, 1985)

I. BREF APERCU DE LA BIOGENESE DE L'ARN MESSAGER EUCARYOTIQUE.

(Banerjee 1980, Vandenhaute 1980, Locht 1984, Lewin 1985)

Les protéines sont essentielles à la constitution et au fonctionnement du métabolisme des êtres vivants. Le processus de biosynthèse protéique repose sur l'assemblage d'acides aminés dans l'ordre dicté par le programme génétique.
Les étapes de ce processus de synthèse sont résumées dans le dogme central de la biologie moléculaire (figure 1) : l'information génétique passe de l'ADN dans l'ARNm (transcription) puis vers les protéines (traduction).
L'ARNm occupe donc une place centrale dans la machinerie de synthèse protéique.

1.ETAPES DE LA BIOSYNTHESE ET DE LA STRUCTURE DE L'ARN MESSAGER.

La polymérase II présente dans le nucléoplasme des cellules eucaryotes assure la transcription de l'ADN en ARNhn (ARN hétérogène nucléaire) qui constitue en fait le précursseur de l'ARNm (pré-ARNm).
Les étapes de maturation des pré-ARNm en ARNm sont très complexes; elles comprennent l'adjonction d'une coiffe à l'extrémité 5', la polyadénylation 3'-terminale, des méthylations internes et le phénomène d'épissage.

- L'addition d'une coiffe du côté 5'-terminal.

Cette addition s'effectue dès le stade pré-ARNm et consiste au placement d'une guanosine liée par un pont 5' - 5' triphosphate au dernier nucléotide du messager. Cette guanosine est ensuite méthylée en position 7, la S-adénosyl - méthionine (SAM) jouant le rôle de donneur de méthyle.
D'autres méthylations additionnelles éventuelles fournissent des coiffes de degré de méthylation variable : coiffe 0, coiffe 1, coiffe 1' et coiffe 2 (figure 2).

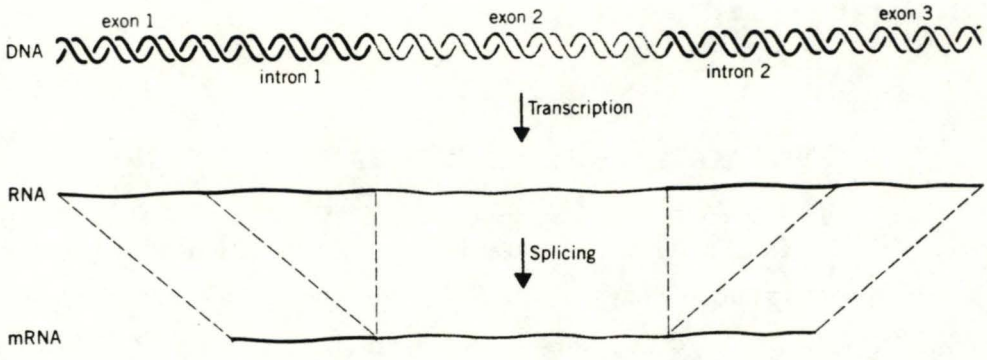


Figure 3 : Le pré-ARNm subit des excisions : les introns sont enlevés, tandis que les exons sont conservés et soudés les uns aux autres pour former l'ARNm. (Lewin, 1985)

Tous les ARN messagers eucaryotiques examinés jusqu'à ce jour possèdent une coiffe ainsi que l'ARN de beaucoup de virus.
D'une manière générale, on peut constater que la complexité des coiffes augmente au fur et à mesure que l'on monte l'échelle évolutive.
C'est ainsi que les cellules eucaryotiques les plus simples comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Neurospora crassa* contiennent des coiffes de type 0 tandis que les insectes et les mammifères contiennent à la fois des coiffes de type 1 et de type 2.

- La polyadénylation 3'-terminale.

A l'extrémité 3'-OH de la majorité des messagers mûrs, on observe une séquence monotone d'environ 200 résidus d'A.
La polyadénylation s'effectue essentiellement dans le noyau en phase terminale de la maturation des messagers.

- Les méthylations internes.

Certains ARNm peuvent subir des méthylations internes souvent en position N^6 d'une adénine, rarement en position 5 d'une cytosine.
Ces méthylations internes sont plus ou moins fréquentes suivant l'espèce d'ARNm et s'effectueraient dans le noyau.

- L'épissage (ou splicing).

Le processus de formation des ARNm comporte des étapes d'excision de morceaux de pré-ARNm (les introns) suivies de ressoudures (épissage) des fragments (les exons) conservés dans la molécule mature (figure 3).
Ce phénomène se produit dans le noyau des cellules eucaryotes.

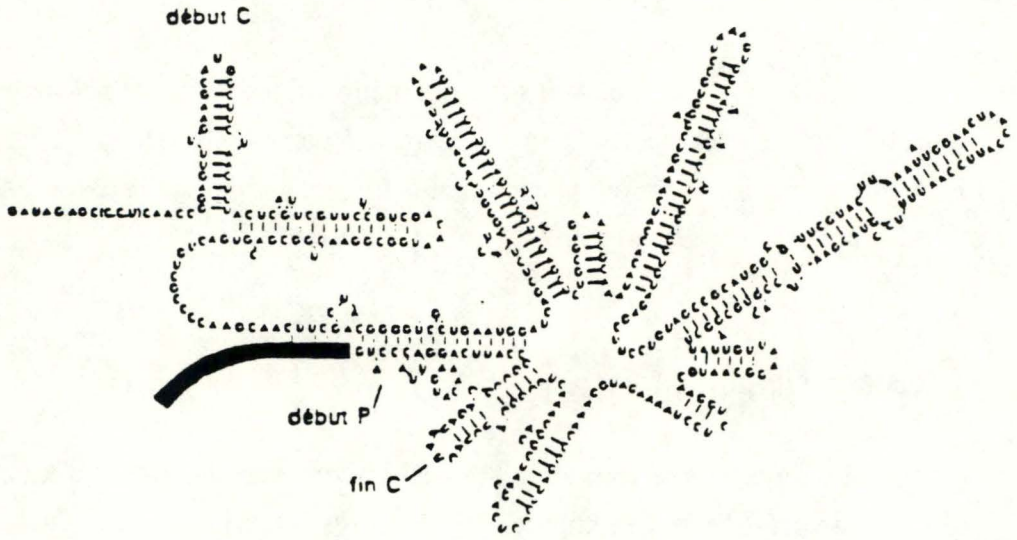


Figure 5 : Exemple de structure secondaire de l'ARNm au niveau du gène de la protéine de manteau du virus MS2.

La structure primaire des ARNm obtenue est résumée dans le schéma suivant :

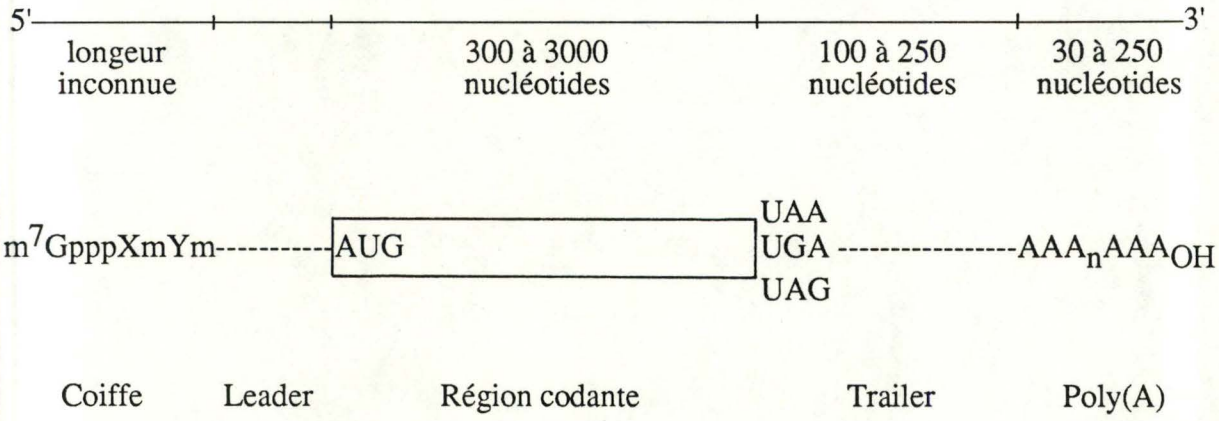


Figure 4 : Représentation schématique de l'ARNm eucaryotique.

- la coiffe se trouve en position 5'-terminale et est de la forme $m^7G^{5'}ppp^{5'}XmYm$-.

- le leader est une région non codante de longueur variable.

- la région codante débute par un codon AUG et se termine par un codon "stop" : UAA, UAG ou UGA.

- le trailer est une région non codante.

- la queue de poly(A) se situe à l'extrémité 3'-OH.

Il apparaît que l'ARNm possède également une structure secondaire et d'ordre supérieur. L'ARNm monocaténaire se replie localement pour former des structures bicaténaires (figure 5).
A cette structure secondaire potentielle, il faut ajouter l'existence possible de reploiements entre diverses régions éloignées dans le messager et enfin, l'interaction de celui-ci avec d'autres molécules : protéines, ARN de petite taille,... conférant ainsi à l'ensemble une structure tertiaire et quaternaire complexe.

2. ENZYMES ET MECANISMES DE COIFFAGE.

Le mécanisme de coiffage a été étudié chez les réovirus, virus de la vaccine, influenza virus,...
Les réactions assurant la synthèse de la coiffe de l'ARNm du réovirus sont reprises dans le schéma suivant :

ARN polymérase II

(1) pppG + pppC ----------> pppGpC + PPi

Nuclotide phosphohydrolase

(2) pppGpC ----------> ppGpC + Pi

Guanylyltransférase

(3) pppG + ppGpC ----------> GpppGpC + PPi

Méthyltransférase I

(4) GpppGpC + SAM ----------> m^7GpppGpC + SAH

Méthyltransférase II

(5) m^7GpppGpC + SAM ----------> m^7GpppGmpC + SAH

Figure 6 : Séquence des réactions de coiffage de l'ARNm chez le réovirus.

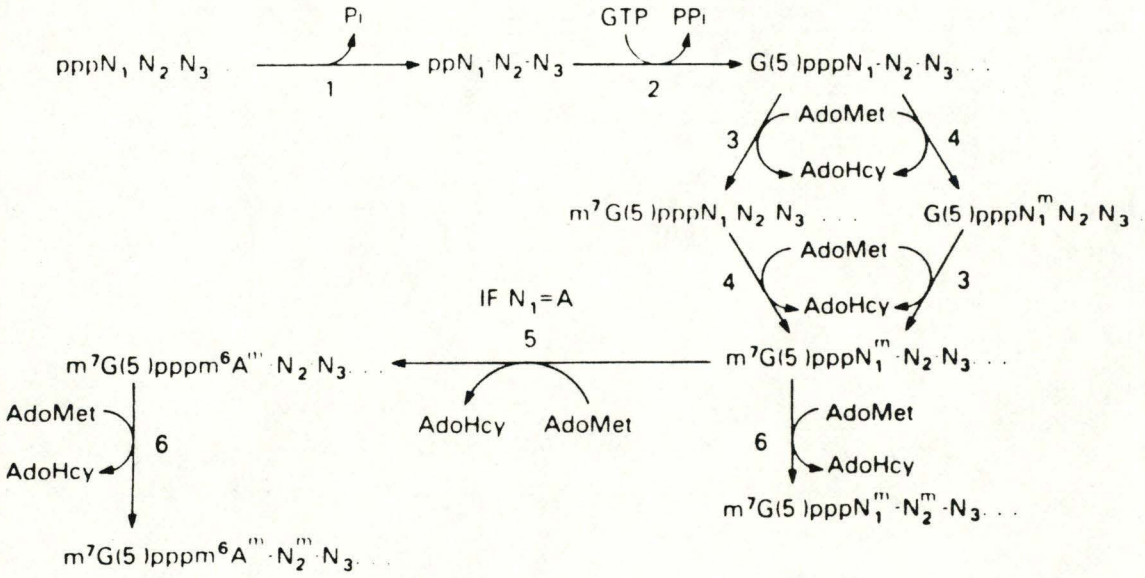


Figure 7 : Séquence des enzymes impliqués dans la modification de l'extrémité 5'-terminale des ARNm des cellules HeLa.
(J.M. Keith cité dans C. Locht, 1983)

Les enzymes impliqués dans le coiffage et la méthylation de l'ARNm eucaryotique (figure 7) ont les fonctions suivantes :

1. Une ARN 5'- triphosphatase enlève le ß-phosphate de l'ARNhn pour former un ARN 5' - diphosphate.

2. Une ARN guanylyltransférase catalyse le transfert de GMP à partir de GTP sur l'ARN 5' - diphosphate. C'est la réaction de coiffage proprement dite.

3. Une ARN (guanine-7-)-méthyltransférase est responsable du transfert du groupement méthyle de la SAM vers la position 7 de la guanine placée dans l'étape précédente (coiffe 0).

4. Une ARN (nucléotide-2'-)-méthyltransférase méthyle la position 2' du pénultième nucléotide pour former une coiffe de type 1.

5. Une ARN (2'-O-méthyladénosine-N^6-)-méthyltransférase catalyse le transfert d'un groupement méthyle en position N^6 si le pénultième résidu est une adénine (coiffe 1').

6. Une ARN (nucléoside-2'-)-méthyltransférase peut catalyser - cette fois dans le cytoplasme - le transfert d'un groupement méthyle supplémentaire en position 2'-O de l'antépénultième nucléoside pour former une coiffe de type 2.

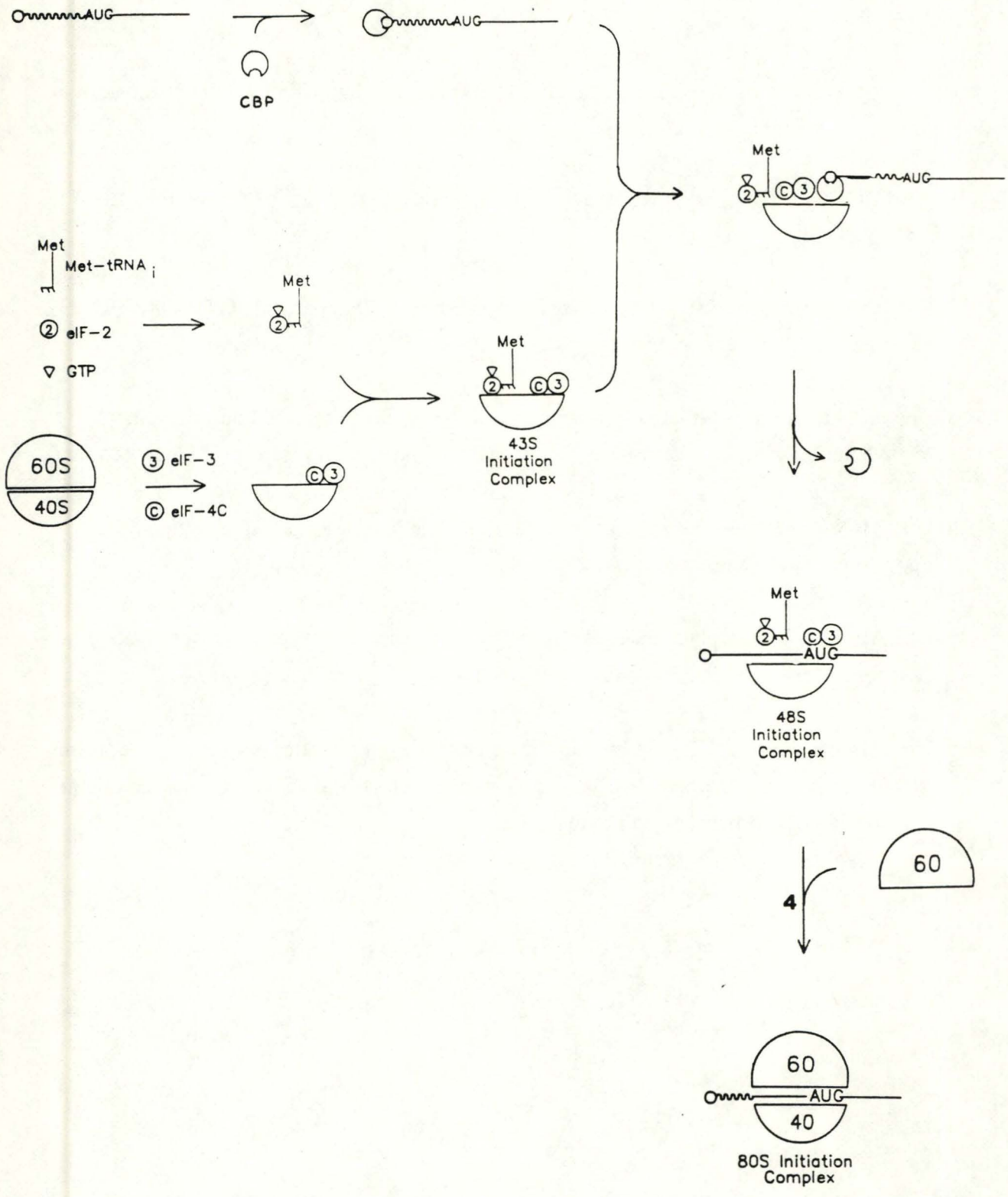


Figure 8 : Modèle du balayage décrivant l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.

II. LA QUESTION DU ROLE DE LA COIFFE.

(Banerjee 1980)

La présence de la coiffe sur l'ARNm eucaryotique a rapidement amené les scientifiques à rechercher les rôles fonctionnels de cette structure particulière.

Il est rapidement apparu que la coiffe avec sa partie m^7G polaire pouvait jouer un rôle significatif dans l'interaction de l'ARNm avec le ribosome pendant l'initiation de la synthèse protéique.

Plusieurs types d'expériences relatives à l'attachement des extrémités 5' de divers ARNm aux complexes d'initiation 43 S et 80 S ont amené Kozak (1983) à postuler le modèle du balayage ("scanning model") pour décrire l'initiation de la traduction.
Selon ce modèle, la sous-unité 40 S du ribosome s'attache à l'extrémité 5' du messager, migre vers le côté 3' jusqu'au moment où elle rencontre le premier codon AUG et s'arrête à ce niveau.
La sous-unité 60 S du ribosome s'associe alors à la sous-unité 40 S et elles démarrent ensemble la synthèse du polypeptide.

Ce processus de traduction des eucaryotes débutant exclusivement à partir de l'extrémité 5' de l'ARNm est très différent du système procaryotique polycistronique dans lequel les ribosomes peuvent initier la traduction à partir de codons AUG internes.
La fonction précise de la coiffe dans ce processus n'est pas encore claire étant donné que des ARNm non coiffés peuvent quand même s'attacher au ribosome et sont traduits bien qu'avec une moindre efficacité.

De nombreuses études ont montré que la petite sous-unité 40 S ne se fixe pas directement sur l'extrémité 5' du messager et qu'il était possible que le complexe d'initiation comporte une protéine capable de se fixer au niveau de la coiffe (Cap Banding Protein : CBP).
Un modèle expliquant le rôle de ces CBP dans la traduction des ARNm a été proposé (figure 8).
La première étape de la synthèse protéique est la formation d'un complexe de pré-initiation entre l'extrémité 5' de l'ARNm coiffé et la CBP.

La phase suivante est l'interaction de ce complexe de pré-initiation avec la sous-unité 40 S du ribosome associée notamment aux facteurs eIF3 et eIF4 et au Met-tRNA initiateur.
Après la formation de ce complexe d'initiation au niveau de la coiffe, la CBP pourraît se détacher et être recyclée dans un nouveau complexe de pré-initiation.
Le complexe d'initiation sans la CBP se déplacerait alors vers le codon initiateur AUG.

Une des caractéristiques qui distingue les ARNm eucaryotiques des ARNm procaryotiques est leur plus longue demi-vie. La structure de la coiffe à l'extrémité 5' conférerait aux ARNm des eucaryotes une résistance aux exonucléases et assurerait ainsi une plus grande stabilité à ces ARNm.

Les résultats des différentes études visant à montrer le rôle de la coiffe semblent donc indiquer que cette structure 5'- terminale pourrait jouer un rôle important en conférant une plus grande stabilité et une meilleure capacité de traduction aux ARNm.
La coiffe pourrait également être impliquée dans le processus de transcription ainsi que le suggère l'étude de certains virus chez lesquels on a observé que le coiffage était étroitement lié à l'initiation de la synthèse de l'ARNm.

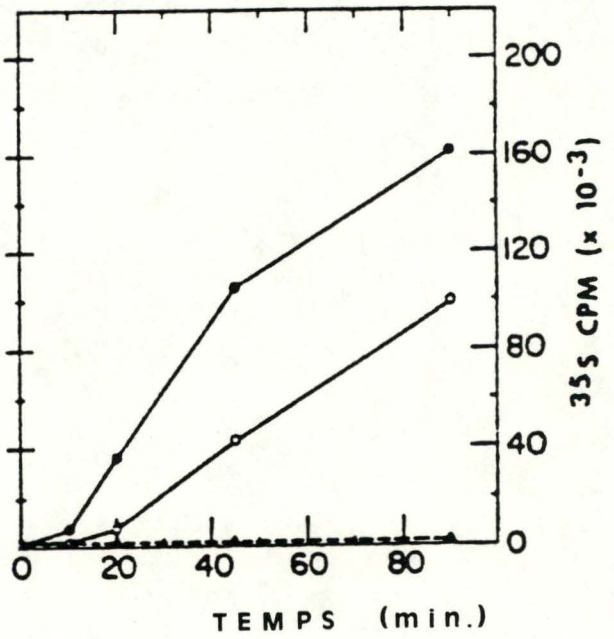


Figure 9 : Quantité de [^{35}S]méthionine incorporée dans les polypeptides, en fonction de la durée d'incubation, dans le système de traduction acellulaire, d'ARNm méthylés ou non méthylés.

○—○: ARNm synthétisés *in vitro* en absence de SAM,
●—●: ARNm synthétisés *in vitro* en présence de SAM,
▲—▲: (contrôle) pas d'ARNm dans le système de traduction acellulaire.

(Both *et al.*, 1975)

III. QUELLES SONT LES APPROCHES UTILISEES POUR ABORDER LA QUESTION DU ROLE DE LA 7-METHYL-GUANOSINE DE LA COIFFE ?

Deux grands types d'approches sont utilisés pour étudier le rôle de la coiffe : biochimique et génétique.

1. L'APPROCHE BIOCHIMIQUE.

Différentes techniques biochimiques peuvent être utilisées. On peut produire *in vitro* des ARNm coiffés ou à coiffe absente ou imcomplète et comparer leur activité *in vitro* dans des systèmes de traduction acellulaires.
D'autre part, on peut utiliser *in vitro* ou *in vivo* des inhibiteurs de la coiffe et observer leur effet fonctionnel sur le mécanisme de coiffage.

1.1. Comparaison d'ARNm bloqués, coiffés ou non coiffés.

1.1.1. Rôle de la coiffe dans la traduction.

Both *et al.* (1975) ont produit *in vitro* des ARNm de réovirus et de VSV grâce à la polymérase associée au virion.
Les ARNm synthétisés en présence du donneur de méthyle S-adénosylméthionine (SAM) sont spécifiquement méthylés au niveau de l'extrémité 5', ce qui fournit des ARNm ayant une structure de type $m^7G^{5'}ppp^{5'}G$ (A/G)m tandis que les ARNm produits en absence de SAM ne sont pas méthylés.
Les ARNm méthylés et non méthylés ainsi obtenus ont ensuite été placés dans un système acellulaire de traduction constitué de lysat de germes de blé et contenant la [^{35}S]méthionine. Le taux de radioactivité dans les polypeptides précipités à l'acide trichloroacétique a été mesuré après différentes durées d'incubation.
Les résultats obtenus sont repris à la figure 9.
On observe qu'au temps 20 par exemple, le nombre de cpm mesurés suite à l'incubation avec des ARNm produits en présence de SAM (●-●) est cinq fois supérieur à celui mesuré lorsque des ARNm produits en absence de SAM (○-○) sont incubés dans le système acellulaire de traduction.
On en conclut que les ARNm méthylés sont plus "actifs" que les ARNm non méthylés.

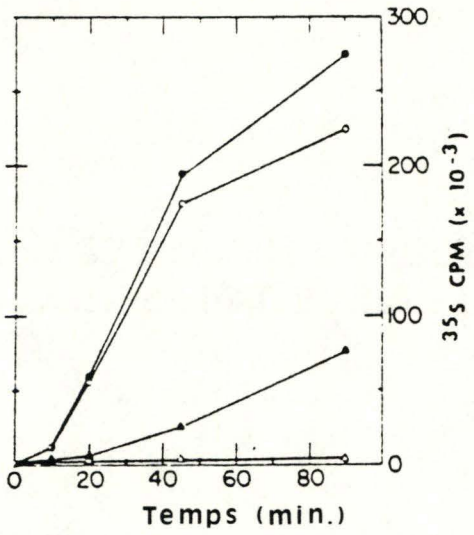


Figure 10 : Quantité de [^{35}S]méthionine incorporée dans les polypeptides, en fonction de la durée d'incubation d'ARNm synthétisés *in vitro* en présence de SAM. Le milieu de traduction acellulaire contient :

●—● : de la SAH,
○—○ : pas de SAH,
△—△ : (contrôle) traduction réalisée sans ARNm,
▲—▲ : (contrôle) traduction réalisée avec des ARNm non méthylés.

(Both *et al.*, 1975)

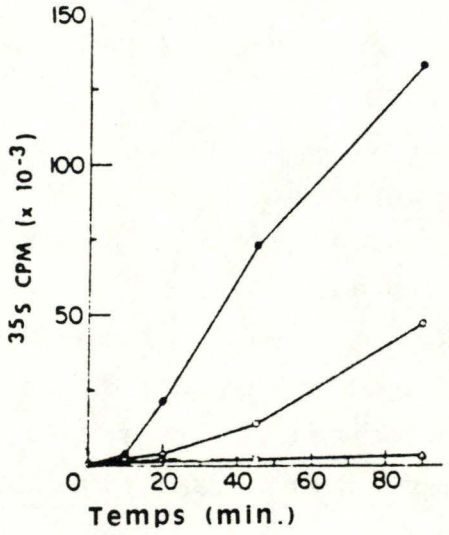


Figure 11 : Quantité de [^{35}S]méthionine incorporée dans les polypeptides, en fonction de la durée d'incubation d'ARNm synthétisés *in vitro* en absence de SAM. Le milieu de traduction acellulaire contient :

●—●: de la SAM,
○—○: pas de SAM,
△—△: (contrôle) traduction réalisée sans ARNm.

(Both *et al.*, 1975)

Le fait que les ARNm viraux synthétisés en absence de SAM sont aussi capables - mais à un moindre taux - de promouvoir la synthèse de polypeptides est dû à la capacité des lysats de germes de blé à méthyler les ARNm viraux.

La SAH (S-adénosylhomocystéine) inhibe *in vitro* la méthylation des ARNm.
Si, dans le système acellulaire de traduction contenant des ARNm non méthylés, de la SAH est ajoutée à une concentration 80 fois plus élevée que la SAM, 95 % de la synthèse protéique est inhibée.
Ceci suggère que la traduction est dépendante de la méthylation.
Pour éliminer la possibilité selon laquelle l'inhibition
serait due à un effet non spécifique de la SAH, on a comparé l'activité d'ARNm méthylés en absence et en présence de SAH.
Les auteurs ont observé (figure 10) que la traduction d'ARNm méthylés de VSV n'était pas diminuée par la SAH.

Il était intéressant de déterminer si l'activité des ARNm non méthylés était effectivement augmentée en présence d'un groupement donneur de méthyle.
Dans ce but, des ARNm ont été produits en absence de SAM puis placés dans un lysat de germes de blé auquel de la SAM a été ou non ajoutée.
La figure 11 montre que dans le lysat contenant des ARNm non méthylés et de la SAM (●-●), le taux de radiactivité mesuré dans les polypeptides précipités est plus élevé que lorsque le lysat contient des ARNm non méthylés mais pas de SAM (○-○).
On en déduit que l'addition du donneur de méthyle dans le milieu d'incubation contenant des ARNm non méthylés a grandement stimulé le taux de synthèse protéique.

Il faut remarquer que, même quand la SAM est présente pendant la traduction (courbe ●-●), les ARNm méthylés dans le lysat (figure 11) sont des messagers moins effectifs que les ARNm méthylés pendant la transcription (figure 9).
La raison pourrait en être que la méthylation par les méthylases endogènes du système de traduction conduit à la formation d'ARNm ayant une extrémité 5'-terminale de type $m^7G^{5'}ppp^{5'}G$ ne possèdant pas de 2'-O-méthylation.
(Muthukrishnan *et al.*, 1975)

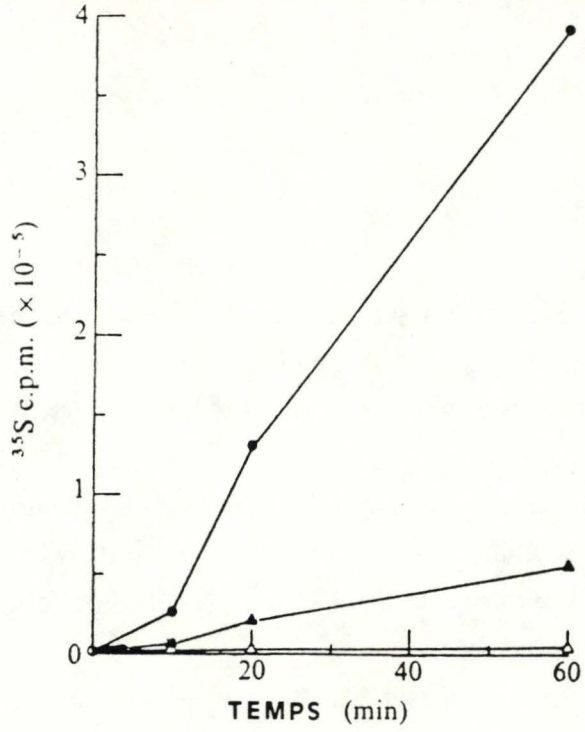


Figure 12 : Quantité de [^{35}S]méthionine incorporée dans les polypeptides, en fonction de la durée d'incubation d'ARNm synthétisés *in vitro*.

Pour montrer l'effet de la β-élimination, différents types d'ARNm ont été utilisés :

●—●: ARNm méthylés et traduits en présence de SAH,
▲—▲: ARNm ayant subit la b-élimination et traduits en présence de SAH,
△—△: (contrôle) pas d'ARNm dans le milieu de traduction acellulaire.

(Muthukrishnan *et al.*, 1975)

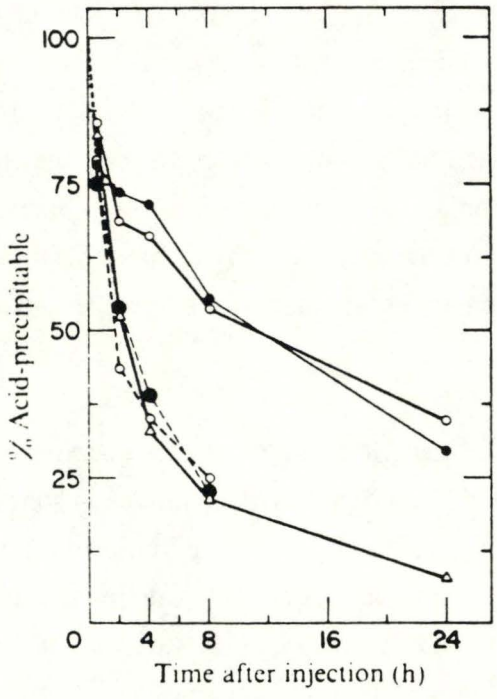


Figure 13 : Radioactivité mesurée dans les ARNm précipités, exprimée en % de la radioactivité totale présente dans les oocytes, en fonction de la durée d'incubation des ARNm marqués injectés dans les oocytes de *X. laevis*. Les ARNm injectés ont différents types d'extrémité 5' :

●—●: m^{7}GpppGm,
○—○: GpppG,
△—△: ppG,
●—●: pppGm,
○—○: pppG.

(Furuchi *et al.*, 1977)

Muthukrishnan *et al.* (1975) ont pu montrer que la m^7G était essentielle pour la traduction des ARNm viraux.
Pour cela, une autre technique a été utilisée qui consiste à enlever par β-élimination la coiffe d'ARNm produits *in vitro* en présence de SAM.
L'activité des messagers obtenus suite à ce traitement a été comparée à celle des ARNm non traités placés dans un lysat de germes de blé (figure 12).
On peut observer que la β-élimination d'ARNm pré-méthylés conduit à la perte d'environ 85 % de l'activité des ARNm.
Les auteurs ont démontré que cette perte d'activité n'était pas due à une dégradation chimique de l'ARNm.

En conclusion, la m^7G 5'-terminale est essentielle pour la traduction *in vitro*.
Les ARNm non méthylés de réovirus et VSV sont inactifs dans un système de traduction de lysat de germes de blé mais deviennent actifs quand ils sont méthylés.
La méthylation a lieu spécifiquement sur la guanine 5'- terminale en position N^7.
Le retrait de la m^7G par β-élimination conduit à la perte d'activité de la synthèse des protéines.

1.1.2. Rôle de la m^7G dans la stabilité de l'ARNm.

Furuichi *et al.* (1977) ont également utilisé cette méthode de production d'ARNm *in vitro* et de β-élimination pour étudier la stabilité de l'ARNm.
Ils ont utilisé des conditions de synthèse donnant trois types d'ARNm : non bloqués (ppG), bloqués (GpppG) et coiffés (m^7GpppG). La ß-élimination d'ARNm bloqués et coiffés donne également des ARNm avec une terminaison 5'pppG et pppGm respectivement.
Ces différents types d'ARNm ont été marqués au ^{32}P et injectés dans des oocytes de *Xenopus laevis*.
La radioactivité a été mesurée à différents temps.
La figure 13 montre que les ARNm avec une terminaison 5' bloquée sont apparemment plus stables que ceux qui sont non bloqués.
Ceci suggère que la présence de la guanine terminale protège les ARNm ainsi bloqués de la dégradation par une exonucléase agissant à l'extrémité 5'.

Il nous faut ici remarquer que lorsque les expériences de β-élimination ont été réalisées pour tester l'influence de la m^7G sur la traduction *in vitro*, la déstabilisation des ARNm non bloqués n'était pas connue.
Pour mieux comprendre le rôle de la coiffe, il faudrait donc réaliser des expériences tenant compte des exonucléases présentes dans les systèmes acellulaires de traduction.

1.2. L'utilisation d'inhibiteurs.

(Banerjee 1980, Rhoads 1984)

Pour élucider le rôle de la coiffe, un autre outil biochimique peut être utilisé : les analogues de la coiffe et les drogues ayant un effet inhibiteur.

1.2.1. Les analogues de la coiffe.

Dans des conditions appropriées, les analogues comme la m^7GMP, m^7GDP, m^7GTP, $m^7GpppXm$ inhibent l'attachement de la sous-unité 40 S sur les ARNm coiffés.
Les analogues bloqueraient de manière compétitive un site sur la protéine responsable de la reconnaissance de la coiffe (CBP).
Si on augmente la concentration de cette protéine, l'inhibition est levée.

Les 7-éthyl- et 7-benzyl-GDP inhibent la synthèse protéique de la même manière que la m^7GDP. Ceci indique que c'est le maintien d'une charge positive (mais pas nécessairement un groupement méthyle en position 7) qui est essentiel pour l'effet inhibiteur.

Cette constatation est en accord avec l'observation qu'un ARNm, dont la coiffe méthylée est substituée par une coiffe éthylée, est traduit avec la même efficacité qu'un ARNm normalement coiffé et méthylé. (Furuichi *et al.*, 1979 cité dans Rhoads, 1984)

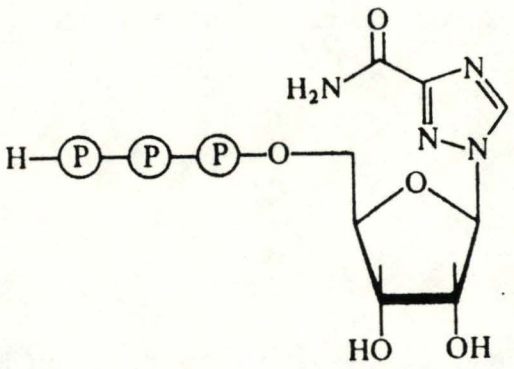


Figure 14 : Structure de la ribavirine.
(Goswami *et al.*, 1983)

1.2.2. Les drogues.

La SAH (produit de dégradation de la SAM), la S-adénosyléthionine et la ribavirine sont des drogues qui inhibent les réactions de méthylation *in vivo*.

La ribavirine (figure 14) est un agent anti-viral à large spectre.
Goswami *et al.* (1983) ont étudié l'effet de cette drogue sur l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase.
Ils ont voulu voir si les ARNm synthétisés en présence de ribavirine étaient méthylés.
Des cellules L ont été infectées par des virus de la vaccine et les ARN produits *in vivo* marqués par incorporation de ^{32}Phosphate.
Les ARNm ont été isolés. Les ARNm viraux ont été séparés des ARNm cellulaires et leur radioactivité mesurée.
Les auteurs ont observé que 33 à 42 % des ARNm viraux n'étaient pas méthylés et que la synthèse protéique était fortement diminuée.
Ils en ont déduit que la ribavirine inhibait la méthylation des ARNm viraux.

D'une manière générale, l'inconvénient de l'utilisation d'inhibiteurs réside en la difficulté de déterminer leur cible exacte.
Il est en effet souvent difficile d'affirmer que la substance utilisée n'a pas un effet non spécifique et qu'elle agit directement au niveau de la coiffe ou des enzymes de coiffage et non pas via l'altération d'une autre fonction.

L'approche biochimique *in vitro* a permis de mieux comprendre le rôle et la structure de la coiffe. Cependant, il faut être prudent au moment de l'interprétation des résultats et de leur extrapolation au fonctionnement *in vivo*.
L'étude biochimique fournit donc plutôt des indications, suggère des mécanismes, sans donner de véritables preuves.

2. L'APPROCHE GENETIQUE.

La seconde approche consiste à produire des mutants déficients pour la fonction que l'on désire étudier et à caractériser la lésion phénotypique correspondante par comparaison avec la souche sauvage.
L'avantage est que l'on travaille ici *in vivo* et que l'on compare deux organismes qui ne diffèrent que par une mutation au niveau du gène que l'on étudie.

C'est cette approche qui a été choisie au loboratoire pour étudier le rôle fonctionnel de la méthylation en position 7 de la guanine dans la coiffe de l'ARNm eucaryotique.
Dans cette optique, il est intéressant de travailler avec un organisme eucaryote simple ne contenant pas de méthylations internes ni de méthylations terminales autres que la m^7G sur son messager. *Saccharomyces cerevisiae* répond à cette exigence.
De plus, c'est un organisme particulièrement adapté à une étude génétique : la levure est un eucaryote unicellulaire facile à cultiver et à manipuler, son temps de génération est relativement court (2 à 4 h) et sa génétique est une des mieux connue.

Classiquement, on procède par mutagenèse aveugle qui permet de récupérer une quantité plus ou moins élevée de mutants qui constitueront ce qu'on appelle une "banque de mutants".
Un criblage de la banque est alors réalisé pour rechercher le mutant que l'on désire étudier.
Un des problèmes qui se pose ici est celui des mutations létales.
En effet, une mutation touchant un gène essentiel, c'est-à-dire un gène qui code pour une fonction essentielle pour la survie et la multiplication de l'organisme, en empêchant la fonction de se réaliser, va provoquer la mort du mutant interdisant ainsi l'étude de celui-ci. Ce problème important diminuant considérablement la puissance de l'approche génétique, est contourné par les mutants létaux conditionnels c'est-à-dire les organismes qui survivent dans des conditions permissives mais meurent ou ont une croissance ralentie ou nulle dans des conditions restrictives.
Un autre problème est de posséder un test phénotypique permettant de détecter plus ou moins rapidement le mutant recherché.

Un mutant pour l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase a été ainsi recherché dans une banque de 883 clones mutants thermosensibles pour la croissance.
Le principe de détection d'un mutant de méthylation est le suivant: l'ARN des organismes mutés est extrait et méthylé *in vitro* par l'enzyme purifié de levure.

L'incorporation de groupements méthyles montre quels sont les clones testés qui contiennent des ARN méthylables et donc des ARN non méthylés dans la cellule.
Malheureusement, aucun mutant du type recherché n'a pu être détecté au laboratoire (G.Renauld, rapport IRSIA 1984-1985).

Une autre stratégie a donc été adoptée consistant à cloner le gène de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase puis à créer des mutants par mutagenèse dirigée.
Le gène ainsi muté est ensuite inséré à la place du gène sauvage fournissant une levure mutante pour la seule fonction étudiée.

Pour isoler le gène, il faut tout d'abord purifier la protéine, produit de ce gène. Une alternative s'offre ensuite :

- soit déterminer la séquence en acides aminés de la partie N-terminale de la protéine et en déduire la séquence en nucléotides correspondante. Etant donné la dégénérescence du code génétique, plusieurs sondes d'oligonucléotides sont synthétisées et utilisées après marquage radioactif pour le criblage d'une banque génomique.

  Une banque de levure est un ensemble de fragments génomiques, générés par l'action d'un enzyme de restriction ou par cassure mécanique, et insérés dans un vecteur. L'hybridation de la sonde désigne le(s) clone(s) porteur(s) du gène recherché.

- soit produire des anticorps contre la protéine et les utiliser pour le criblage d'une banque d'expression. (cf. Résultats et discussion, Chap. I)

C'est cette dernière approche qui a été choisie au laboratoire.

IV. BUT DU TRAVAIL.

Ce travail s'intègre dans le cadre de l'étude du rôle fonctionnel de la méthylation de la coiffe de l'ARNm eucaryotique et plus précisément de l'ARNm de *Saccharomyces cerevisiae*.

Au laboratoire, l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase a été purifiée à partir d'une souche osmosensible de *S. cerevisiae* selon une procédure adaptée de C. Locht *et al.* (1984).

Des anticorps ont été dressés contre cette méthylase par immunisation de lapins avec l'enzyme purifié.

La banque d'expression construite par Young et Davis (1983) (cf. Résultats et discussion, Chap. I) a été criblée avec ces anticorps anti-méthylase et trois clones se sont avérés positifs. (G. Renauld *et al.*, 1988)

La caractérisation de ces clones positifs constitue l'objet principal de ce mémoire.

Dans un premier temps, nous vérifierons la production par ces trois clones d'une protéine de fusion portant le(s) épitope(s) reconnu(s) par les anticorps dressés contre la méthylase purifiée.

Dans un second temps, les inserts seront caractérisés par restriction, et des sous-clonages seront effectués dans un vecteur approprié afin de délimiter un sous-fragment suffisant pour répondre positivement aux anticorps et puis de le séquencer.
La production d'une sonde marquée réalisée au départ de l'insert minimal permettra de "pêcher" le gène complet dans une banque génomique de levure et d'aborder l'étude de son rôle fonctionnel.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

I. EXPLOITATION D'UNE BANQUE GENOMIQUE DE LEVURE SAUVAGE ETABLIE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION λgt11.

(Young et Davis 1983, Glover 1985)

1. QU'EST-CE QU'UNE BANQUE GENOMIQUE D'EXPRESSION ?

Une banque génomique est une collection de fragments clonés qui, ensemble, représentent le génome entier. (Lewin, 1984)

Young et Davis (1983) ont construit une banque de levure sauvage de 2×10^6 phages recombinants en utilisant un vecteur d'expression phagique : λgt11.

L'ADN de levure est inséré dans ce vecteur au niveau du gène *lac*Z codant pour la ß-galactosidase d'*Escherichia coli*.
Il peut y avoir ainsi production d'une protéine de fusion, c'est-à-dire une ß-galactosidase fusionnée avec la protéine spécifiée par l'ADN de levure.

La souche bactérienne utilisée pour l'infection par les phages recombinants permet l'accumulation en grande quantité de la protéine hybride produite.

Des anticorps, dressés contre la protéine codée par le gène que l'on cherche, vont reconnaître la protéine de fusion qui lui est antigénique et désigner ainsi les clones porteurs d'un fragment, au moins, du gène recherché.

Une banque génomique ainsi construite avec un vecteur d'expression permettant la production de protéines de fusion est appelée banque génomique d'expression.

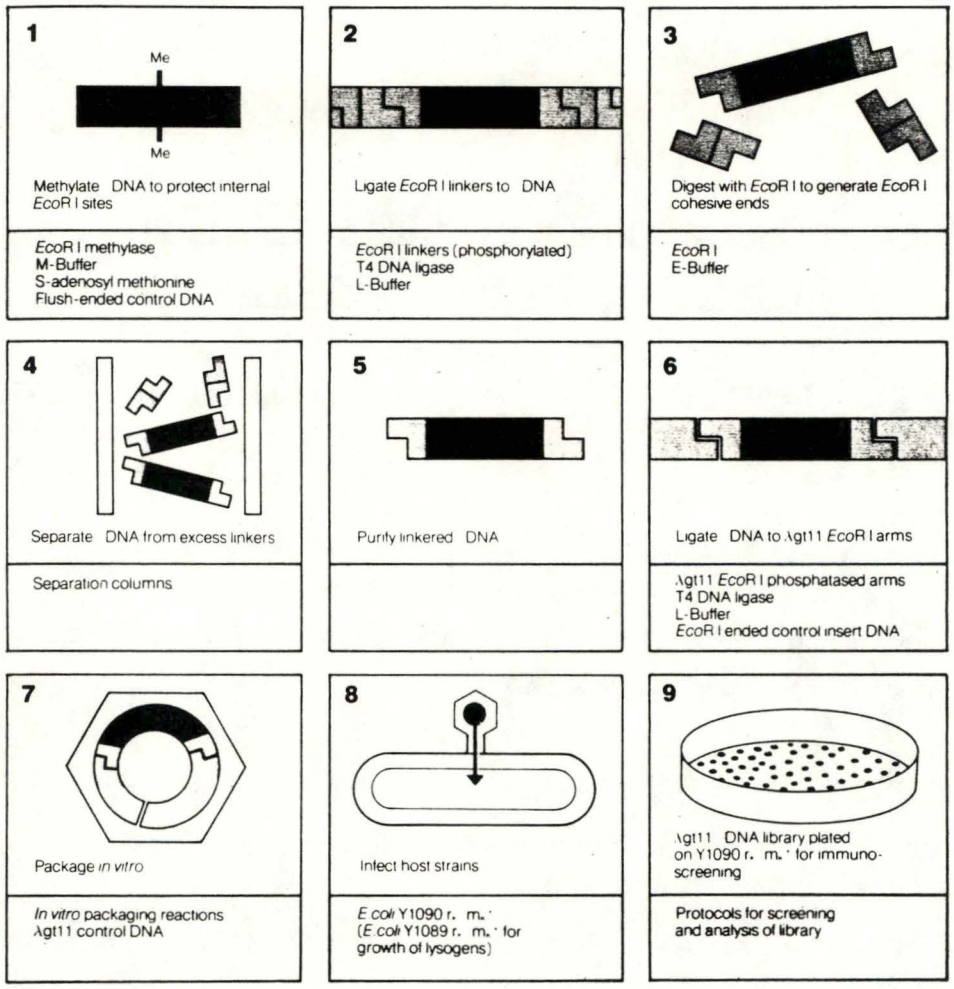


Figure 15 : Clonage dans λgt11.
(Amersham)

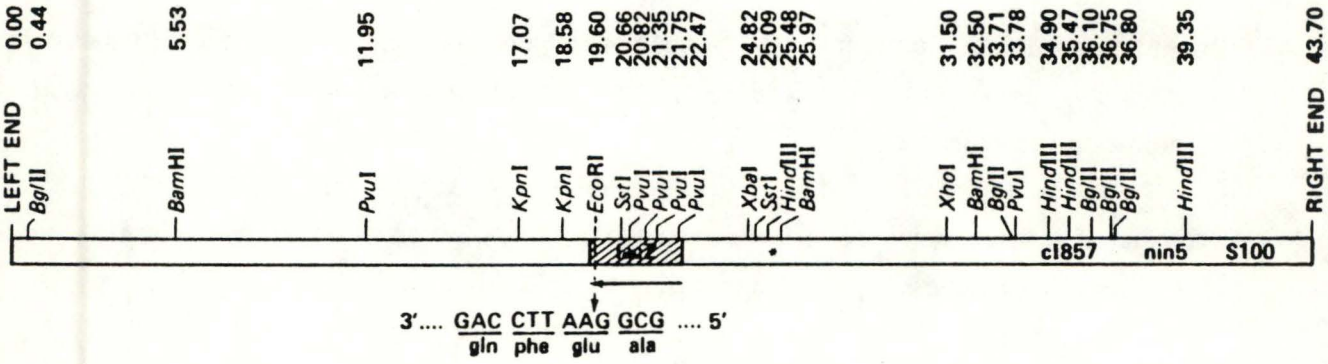


Figure 16 : Carte de λgt11. Les sites de restriction sont exprimés en kb à partir de l'extrémité gauche. L'orientation de lacZ est montée par la flèche horizontale. La séquence du site *Eco*R I est écrite en dessous de la carte du phage. (Glover, 1985)

2. COMMENT CETTE BANQUE EST-ELLE CONSTRUITE ?

2.1. Clonage de l'ADN dans λgt11.

L'ADN d'une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae* a été fragmenté mécaniquement en morceaux d'une taille moyenne de 5 kb (kilobases).

Cet ADN a été traité à la T4 DNA polymérase pour augmenter le nombre de molécules d'ADN à bouts francs, et à l'*Eco*R I méthylase et SAM, pour méthyler et ainsi protéger les sites internes de clivage de l'enzyme *Eco*R I (figure 15).

Des linkers *Eco*R I sont ligués aux ADN à bouts francs puis restreints par *Eco*R I afin de fournir des extrémités cohésives.

La mixture de réaction est déposée sur une colonne qui permettra d'une part de séparer les fragments d'ADN des linkers et d'autre part de fractionner les ADN selon leur taille.

Les fragments de 2,5 à 10 kb sont insérés au niveau du site *Eco*R I de λgt11 préalablement déphosphorylé pour empêcher la formation de phages non-recombinants.

Les phages sont ensuite "empaquetés" (packaging) *in vitro* et amplifiés dans la souche *Escherichia coli* Y1088.

2.2. Choix de λgt11 comme vecteur d'expression.

La carte de restriction du vecteur d'expression λgt11 (*lac*5 *c*I857 *nin*5 *S*100) est montrée à la figure 16.
Le site utilisé pour l'insertion de l'ADN de levure est un site de clivage *Eco*R I localisé dans le gène *lac*Z à 53 pb (paires de bases) du codon de terminaison.

L'expression de l'ADN de levure va dépendre de l'orientation et de la phase de lecture de l'insert par rapport à *lac*Z. Il y a une chance sur six qu'un recombinant contenant un fragment d'ADN spécifique produise une protéine de fusion.

Le vecteur peut s'accomoder d'un insert d'ADN de levure allant jusque 8,3 kb, ce qui donne une longueur maximale d'ADN de phage à "empaqueter" de 52 kb.

Ce vecteur phagique produit un répresseur de lyse thermosensible (*c*I857) qui est inactif à 42°C; il y a donc induction de la lyse à cette température. Il contient une mutation ambre (*S*100) qui rend la lyse défective dans un hôte qui ne possède pas le suppresseur (*sup*F) de la mutation ambre.

L'insertion du fragment d'ADN dans le gène de la ß-gal présente plusieurs avantages.

La position choisie pour insérer l'ADN de levure correspond à une région proche de la terminaison carboxyle de la ß-galactosidase.
Ceci semble augmenter la stabilité de la protéine de fusion.

Un problème rencontré lorsqu'on veut produire une protéine étrangère dans *Escherichia coli* est d'atteindre un taux adéquat d'expression de la séquence d'ADN étranger.
Le fait que cette séquence soit fusionnée avec le gène de la ß-gal assure une expression efficiente de l'ADN étranger dans *E. coli*, la séquence insérée se trouvant sous le contrôle du promoteur de la ß-gal.

De plus, l'insertion dans le gène *lac*Z supprime l'activité enzymatique de la ß-gal. Ceci permet une discrimination des recombinants (plaques non colorées) et des non-recombinants (plaques bleues) en présence d'IPTG et de X-gal, le substrat chromogénique de la ß-gal.

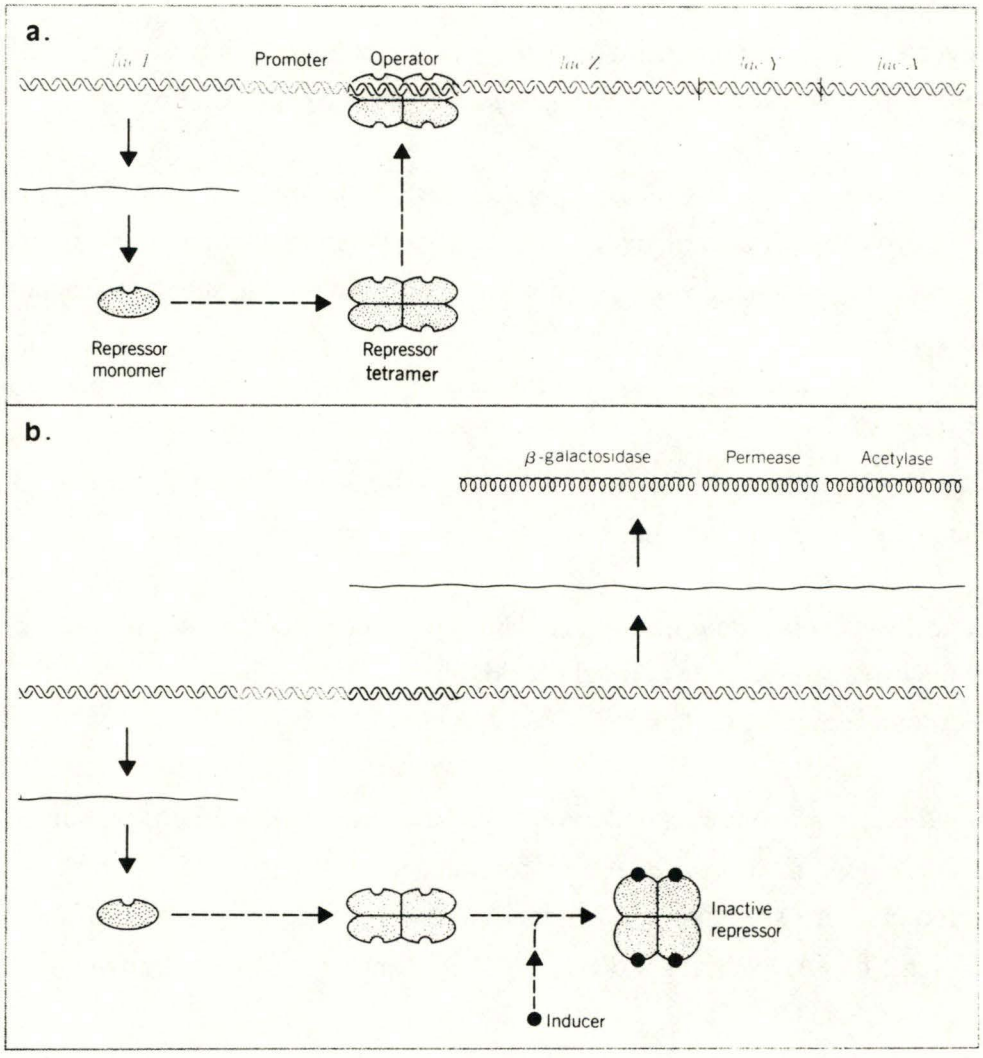


Figure 17 : a. Le gène lacI code pour un répresseur qui se lie à l'opérateur et prévient la transcription du gène lacZ.

b. L'addition d'un inducteur (IPTG) rend le répresseur inactif. La transcription peut donc avoir lieu.

(Lewin, 1985)

2.3. Choix des souches d'*E. coli* Y1088 et Y1090 pour l'amplification et l'expression du phage λgt11.

2.3.1. Souche Y1088 d'*E. coli*.

La banque de phages recombinants est amplifiée en infectant la souche Y1088 d'*E. coli* et en produisant des plaques de lyse à 42°C. En effet, à cette température, le répresseur de λgt11 est inactif, ce qui assure la lyse.

L'intérêt de la souche Y1088 est qu'elle est notamment *sup*F (suppression de la mutation *S*100 du phage), *hsd*R$^-$ *hsd*M$^+$ (prévient la restriction de l'ADN étranger) et contient pMC9 qui est un plasmide dérivé de pBR322 portant le gène *lac*I.

2.3.2. Souche Y1090 d'*E. coli*.

Pour l'expression des phages recombinants, on utilise la souche Y1090 d'*E. coli*. Cette souche est *sup*F et *lon*$^-$, c'est-à-dire déficiente en protéase *lon*. Cette protéase est responsable de la faible stabilité des protéines étrangères dans *E. coli* et de la difficulté d'accumulation de l'antigène en quantité suffisante dans une cellule hôte sauvage.
L'utilisation d'un mutant *lon*$^-$ va augmenter la stabilité de la protéine de fusion. Cette souche possède également le plasmide pMC9 porteur du gène *lac*I.

2.3.3. Contrôle de la synthèse de la protéine de fusion.

Il est intéressant de pouvoir contrôler la production de la protéine codée par l'ADN inséré.
Ceci est important quand la protéine étrangère est toxique pour la cellule hôte. Cette cellule peut être tuée avant qu'une quantité suffisante d'antigène ne soit produite. C'est pourquoi, on utilise une souche bactérienne produisant une grande quantité du répresseur (codé par le gène *lac*I, figure 17) de l'opéron lac.
L'expression du gène *lac*Z, et donc la production de la protéine de fusion, est ainsi contrôlée (contrôle négatif).

Quand le nombre de cellules infectées est suffisant, on induit l'expression de *lacZ* en inactivant le répresseur par addition d'isopropyl ß-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (contrôle positif).
De cette façon, une quantité suffisante de protéines de fusion peut être produite, même si elle est toxique pour la cellule.

3. COMMENT UNE BANQUE D'EXPRESSION EST-ELLE UTILISEE ?

3.1. Criblage de la banque.

Le criblage de la banque génomique établie dans λgt11 est réalisé par l'utilisation d'anticorps comme sonde.

Les boîtes couvertes d'un tapis de bactéries Y1090 infectées par les phages dans un rapport 1 pour 1, sont laissées à 42°C jusqu'à ce que les plaques de lyse apparaissent.
Un filtre de nitrocellulose imprégné d'IPTG est déposé sur les boîtes; l'expression du gène *lacZ* est ainsi induite.
Après quelques heures d'incubation, le filtre de nitrocellulose sur lequel se sont accrochées les protéines provenant des cellules lysées, est retiré, lavé, puis incubé en présence de l'anticorps.
Les plages correspondant aux signaux positifs sur le filtre de nitrocellulose sont prélevées, remises chacunes sur une boîte différente et criblées avec l'anticorps.
On réalise des purifications successives jusqu'à ce que toutes les plages d'une boîte produisent un signal positif.

3.2. Type d'anticorps utilisé.

La qualité de l'anticorps joue un rôle important ainsi que le type d'anticorps utilisé.

Un anticorps monoclonal reconnaît spécifiquement un épitope.
Etant donné qu'un épitope déterminé peut être porté par plusieurs protéines différentes, un anticorps monoclonal pourra reconnaître d'autres protéines de fusion que celle codée par l'insert auquel on s'intéresse.

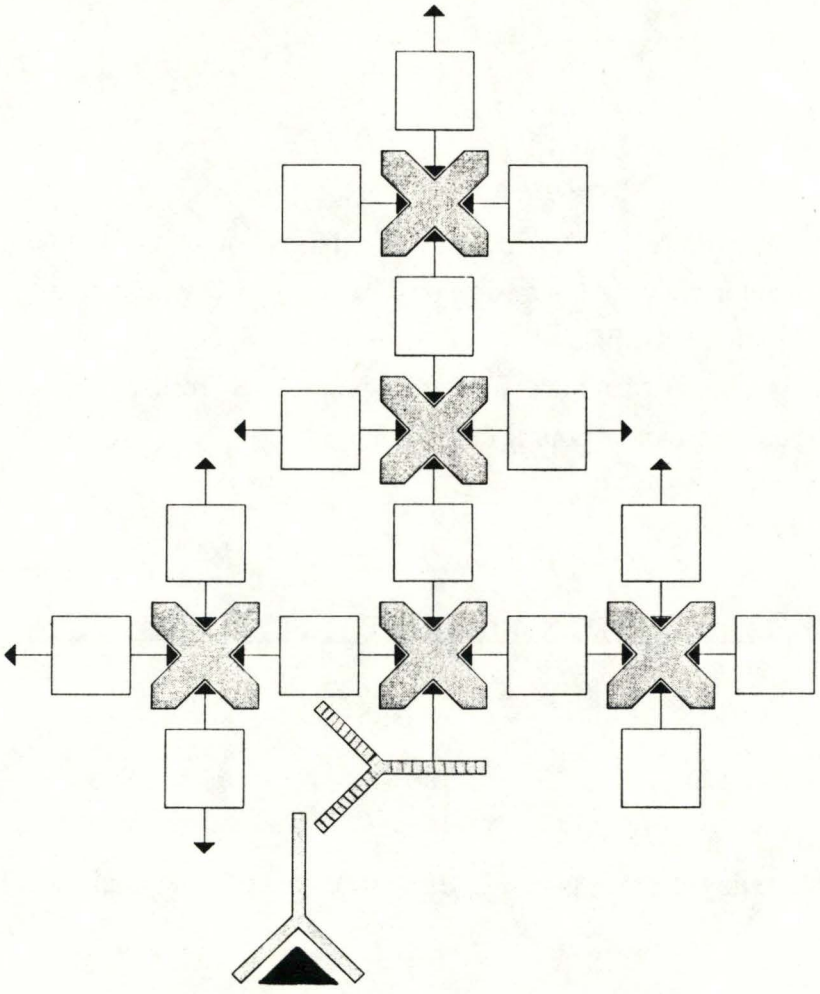
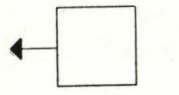
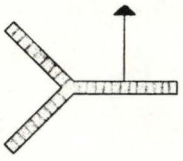


Figure 18 : Le système de détection biotine - streptavidine. (Amersham)

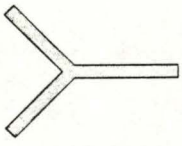


peroxydase biotinylée,

streptavidine,



anticorps d'âne anti - lapin biotinylés,



anticorps de lapin "anti - méthylase",

"méthylase".

Par contre, les anticorps polyclonaux sont rarement restreints à la reconnaissance d'un seul épitope. C'est pourquoi ils ont été choisis : il est en effet peu probable qu'ils reconnaissent une autre protéine que celle contre laquelle ils ont été dirigés. Mais ils peuvent contenir des composants qui vont reconnaître des antigènes normalement produits par *E. coli*. Pour éviter ce bruit de fond, les anticorps sont passés sur une colonne sur laquelle un lysat d'*E. coli* est immobilisé.
On élimine ainsi les anticorps anti-*E. coli* du sérum.

4. RESULTATS.

G. Renauld (1988) a réalisé le criblage de la banque de Young et Davis en vue d'isoler le gène (ou partie du gène) de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase de *S. cerevisiae*.

2×10^6 plages ont été transférées sur filtre de nitrocellulose et mises en présence d'anticorps polyclonaux dressés contre la méthylase obtenus en immunisant des lapins avec l'enzyme purifié.

Les anticorps ont été révélés par le système biotine-streptavidine (figure 18).
Dans un premier temps, les anticorps dressés contre la méthylase, sont reconnus par les anticorps d'âne anti-lapin biotinylés c'est-à-dire auxquels la biotine a été fixée.
Un complexe streptavidine-peroxydase biotinylée est ensuite ajouté.
La streptavidine, grâce à ses 4 sites de fixation de la biotine, va fixer plusieurs peroxydases biotinylées et les anticorps biotinylés.
Il se forme ainsi un large réseau amplificateur de la liaison anticorps-antigène.
L'addition du substrat de la peroxydase conduit à la formation d'un précipité brun qui permet la visualisation de ces réactions.

De cette manière, 12 clones se sont révélés positifs au premier criblage.
De ces 12 clones, trois montraient encore un signal positif après 4 cycles de purification.
Ce sont ces trois clones que nous nous proposons de caractériser.
Nous analyserons tout d'abord les protéines de fusion produites par ces trois clones, puis nous caractériserons les inserts par restriction.

II. ANALYSE DES PROTEINES DE FUSION EXPRIMEES PAR LES TROIS CLONES.

1. INTRODUCTION.

Le criblage de la banque d'expression établie dans le vecteur λgt11 a été réalisé avec des anticorps dressés contre la protéine (guanine-7-)-méthyltransférase purifiée et a fourni trois clones positifs.

Ces clones ont été dénommés λgt1, λgt2 et λgt3.

Il a tout d'abord été vérifié que les anticorps qui se sont fixés sur les trois clones reconnaissent l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase.

Si de l'ADN de levure s'est inséré dans le gène *lac*Z, une protéine fusionnée avec la ß-gal est exprimée.
Nous nous proposons de montrer que les trois clones positifs produisent bien une protéine de fusion.

Le promoteur de la ß-galactosidase est inactivé par la fixation du répresseur (cf. figure 17). L'IPTG, en se fixant sur le répresseur l'inactive et induit par là l'expression de la ß-gal.
Nous comparerons la production de protéines de fusion lorsque l'expression du gène *lac*Z est ou non induite à l'IPTG.
Ceci nous permettra de vérifier si la protéine de fusion est sous la dépendance d'IPTG et utilise le même promoteur que la ß-gal.

2. LES ANTICORPS LIES AUX CLONES POSITIFS RECONNAISSENT EN WESTERN-BLOTTING UNE BANDE DE ~ 55 kD.

2.1. Méthode.

Les anticorps dressés contre l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase reconnaissent une bande de ~ 55 kD (correspondant au PM de la méthylase) d'un lysat de protéines de levure dans une expérience de Western-blotting utilisant la méthode de détection de la biotine-streptavidine.

Les plaques correspondant aux clones positifs ont été transférées sur filtre de nitrocellulose et incubées en présence de l'anticorps "anti-méthylase".
Les anticorps fixés ont été décrochés et réutilisés dans un Western-blotting. (G. Renauld *et al.*, 1988)

2.2. Résultat.

Les anticorps, élués des plages de lyse des clones positifs, reconnaissent la bande de 55 kD après immunoblotting.
Les épitopes reconnus par les anticorps sont donc bien ceux communs à l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase et non ceux d'une autre protéine de levure.

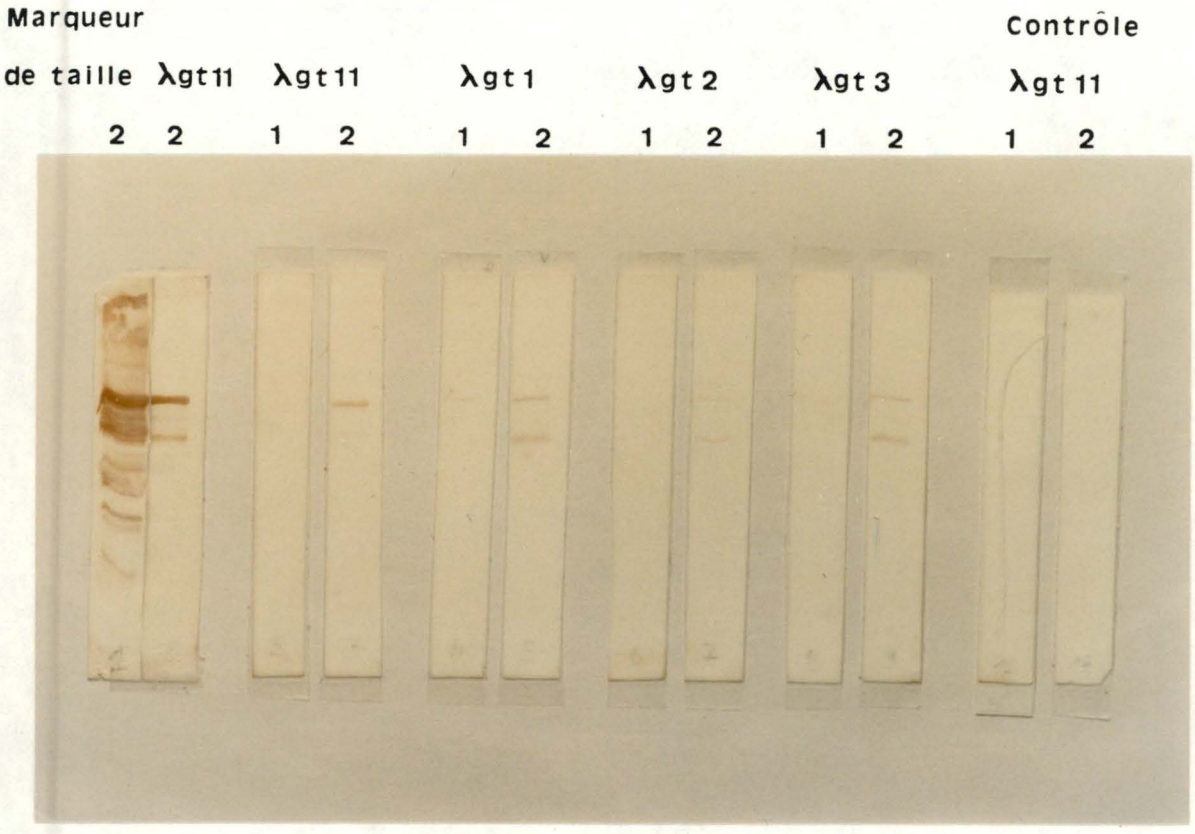


Figure 19 : Immunoblot d'un lysat brut de la souche Y1089 rendue lysogène pour chaque clone. 10 µg de protéines ont été déposés sur chaque piste.

1 : Incubation en présence d'anticorps dressés contre la (guanine-7-)-méthyltransférase et révélés par le système biotine- streptavidine-peroxydase.

2 : Incubation en présence d'anticorps monoclonaux de souris anti - β-gal et révélés par des anticorps de lapins anti - souris couplés à la peroxydase.

Contrôles : 1 : Non incubé en présence d'anticorps dressés contre la (guanine-7-)-méthyltransférase.

2 : Non incubé en présence d'anticorps monoclonaux de souris anti - β-gal.

3. LA PROTEINE RECONNUE PAR LES ANTICORPS EST BIEN UNE PROTEINE DE FUSION.

3.1. Méthode.

Un lysat brut contenant la protéine à laquelle on s'intéresse est préparé suite à l'infection d'*E.coli* Y1089 par les phages λgt11 recombinants.
Cette souche contient le lac répresseur, elle est *lon*⁻ et *hflA* (high frequency lysogeny). Cette dernière mutation augmente la fréquence d'intégration du phage dans le génome bactérien.

Les bactéries lysogènes sont mises à croître et lorsque leur densité est suffisante, la production des protéines de fusion est induite par l'addition d'IPTG.
Après une heure de culture, les cellules sont centrifugées et resuspendues dans un tampon approprié pour les protéines.
La lyse est provoquée par congélation-décongélation dans l'azote liquide. Puis, la solution est soniquée afin d'en diminuer la viscosité.
Les protéines de fusion exprimées par les trois clones positifs ont été ainsi produites et un immunoblot est réalisé avec ces trois lysats bruts de protéines.

3.2. Résultat.

L'analyse de la figure 19 nous montre que le phage λgt11 non-recombinant ne possède que des épitopes de la ß-galactosidase et non de la "méthylase".

Les clones recombinants λgt1, λgt2 et λgt3 possèdent des épitopes de la ß-gal et également de l'ARNm (guanine-7)-méthyltransférase.
On observe que les anticorps dressés contre la "méthylase" reconnaissent la même bande que les anticorps anti- ß-gal.
Cette bande correspond à une protéine de fusion puisqu'elle porte à la fois des épitopes de la ß-gal et de la "méthylase".

Cette observation nous permet de conclure que les clones λgt1, λgt2 et λgt3 expriment bien une protéine de fusion constituée de la ß-gal et au moins un fragment porteur d'un épitope (ou plusieurs) de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase.

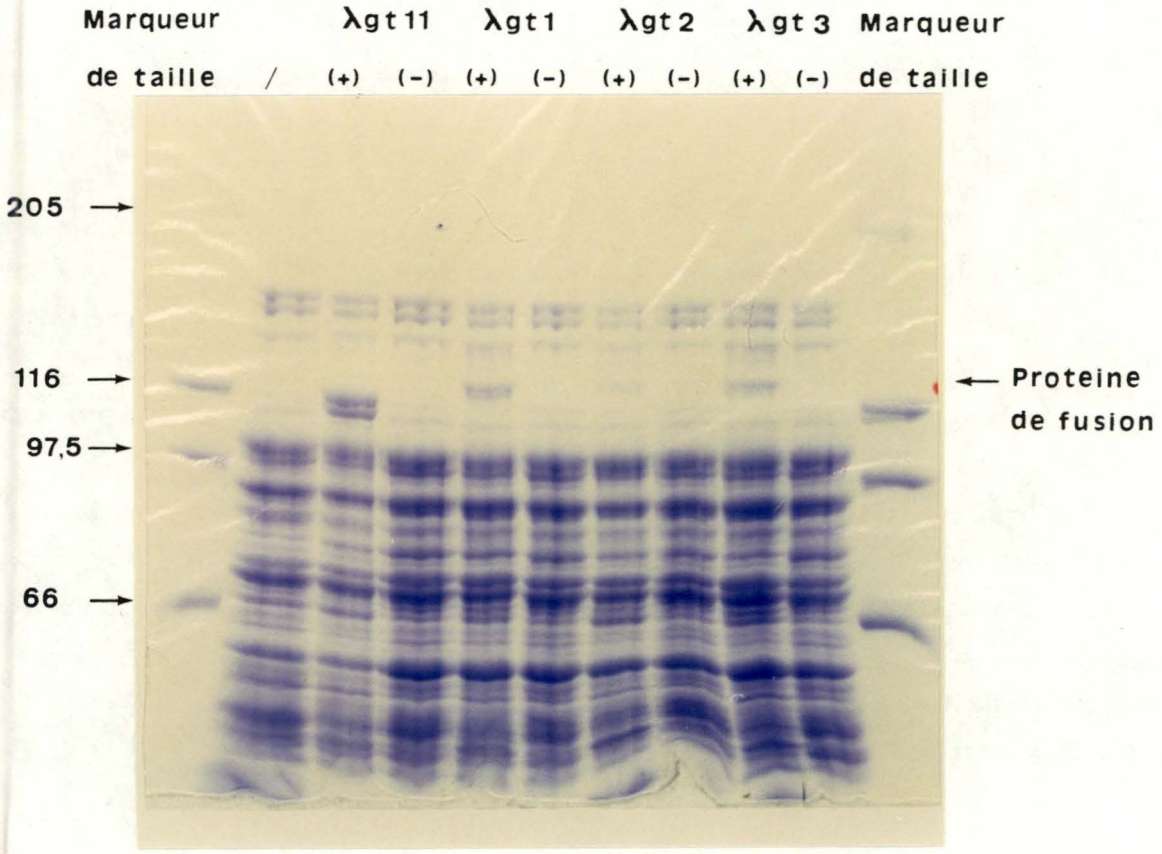


Figure 20 : Gel SDS - polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie. Chaque piste contient 100 µg de protéines d'un lysat brut de la souche Y1089 rendue lysogène pour chaque clone. La culture a été réalisée avec addition d'IPTG (+) ou sans IPTG (-).

4. LA PROTEINE DE FUSION EST SOUS LA DEPENDANCE D'IPTG.

4.1. Méthode.

Comme pour l'expérience précédente, nous avons préparé trois lysats bruts de protéines à partir de la souche Y1089 rendue lysogène pour chaque clone. Cependant, nous n'avons pas, cette fois, utilisé d'IPTG pour induire l'expression du gène *lac*Z.
Avec les lysats de protéines obtenus ou non en présence d'IPTG, nous avons réalisé une électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide 7,5 %.

4.2. Résultat.

La figure 20 nous montre le gel coloré au bleu de Coomassie. Lorsque le lysat brut de la souche Y1089 infectée par λgt11 est comparé avec les lysats des bactéries rendues lysogènes pour chacun des trois phages recombinants, on observe l'apparition dans ces derniers, d'une bande correspondant à une protéine de taille supérieure à la ß-gal native. L'existence d'une protéine de fusion exprimée par les phages recombinants nous est donc confirmée.
Nous pouvons également observer que lorsque la culture a été réalisée sans addition d'IPTG, les protéines de fusion ne sont pas (ou très peu) exprimées.

Cette expérience nous montre que la production des protéines de fusion est sous la dépendance d'IPTG et suggère que le promoteur utilisé pour l'expression du gène recombinant est celui du gène *lac*Z.

Nous pouvons en conclure que les fragments d'ADN insérés dans λgt11 sont dans les mêmes orientation et phase de lecture que le gène *lac*Z.

D'autre part, on peut observer que, vu leur taille, les protéines de fusion semblent identiques.

La taille des protéines de fusion a été estimée à 125,5 kD. La contribution de la ß-gal est de 116 kD. Le polypeptide codé par l'ADN de levure a donc une taille de 9,5 kD, ce qui correspond à environ 88 acides aminés.
On peut en déduire que la partie codante de l'insert a une taille de ± 0,26 kb.

5. RESUME.

Il a tout d'abord été vérifié que les clones λgt1, λgt2 et λgt3 ont été reconnus par des anticorps reconnaissant l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase.

Ensuite, nous avons montré qu'une protéine de fusion est exprimée par ces trois clones et que l'expression de cette protéine est sous la dépendance d'IPTG.

Ceci nous indique que le promoteur de la ß-galactosidase est utilisé pour exprimer le gène recombinant et que les inserts sont dans les mêmes orientation et phase de lecture que le gène *lac*Z.

La taille des protéines de fusion de chacun des trois clones semble identique et a permis d'estimer la taille de la partie codante de l'ADN de levure à 0,26 kb.

Nous nous proposons de vérifier cette observation par analyse de restriction des inserts.

III. ANALYSE DE RESTRICTION DES INSERTS.

1. INTRODUCTION.

Etant donné que les protéines de fusion produites par les trois clones semblent avoir la même taille, ces trois clones devraient être identiques.

Il se peut cependant, que les phages λgt1, λgt2 et λgt3 contiennent un insert de taille différente.
Nous avons vu (page 17) que la banque a été construite avec des fragments d'ADN de levure d'une taille comprise entre 2,5 et 10 kb. La partie de l'insert exprimée dans la protéine de fusion, et identique semble-t-il dans les trois clones, se trouve nécessairement en position 5' de l'insert. Cette région codante est suivie d'une séquence d'ADN non exprimée d'une longueur qui peut varier dans les trois inserts.

Nous nous proposons de comparer maintenant la taille des inserts portés par λgt1, λgt2 et λgt3 pour pouvoir ainsi confirmer l'identité des trois clones.

Pour isoler l'insert de l'ADN phagique, nous soumettrons les trois phages recombinants à une restriction par l'enzyme *Eco*R I.
C'est en effet au niveau du site de clivage de cet enzyme que le fragment d'ADN a été inséré dans le phage λgt11. (cf. Résultats et discussion, Chap. I § 2.1.)

Le produit de cette restriction sera déposé sur gel d'agarose et soumis à une électrophorèse afin de comparer et déterminer la taille des trois inserts.

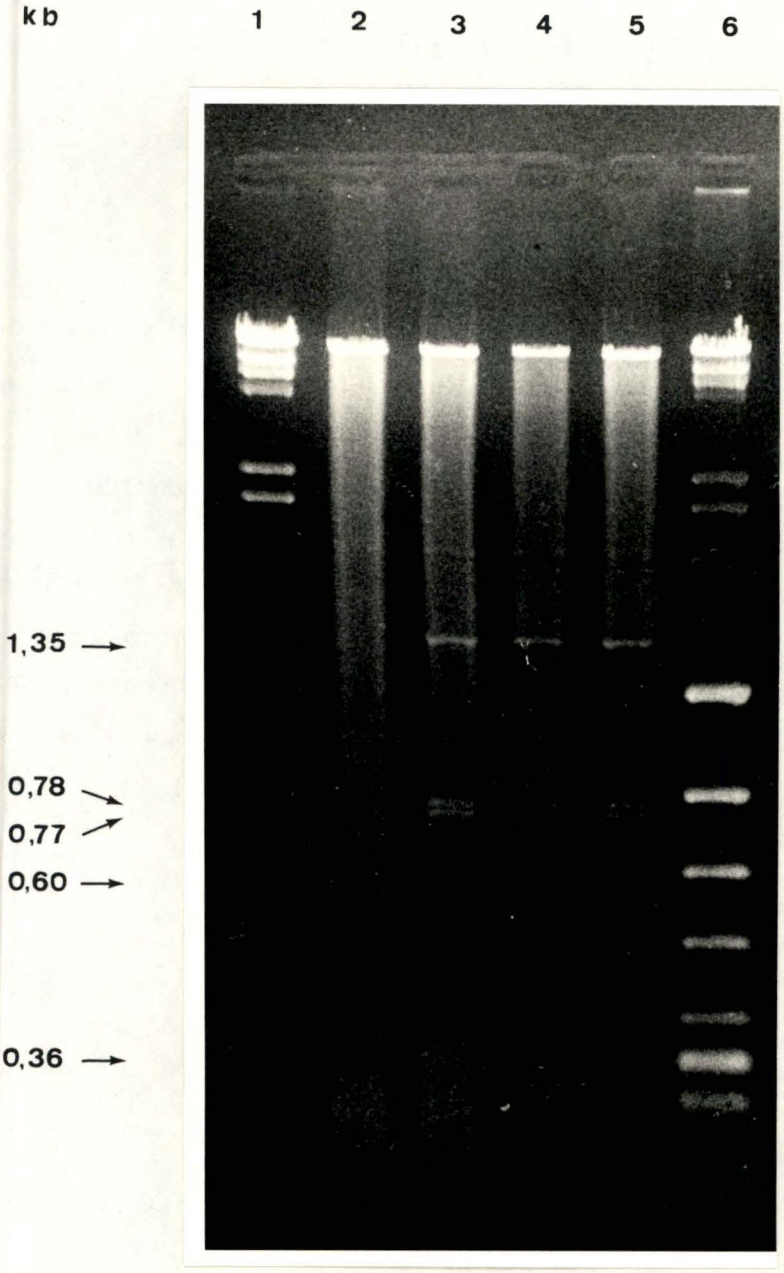


Figure 21 : Analyse après électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % de 15 µl d'ADN phagique restreint par 13,5 U d'*Eco*R I.

1 : λ coupé par *Hin*d III.

2 : λgt11 coupé par *Eco*R I.

3 : λgt1 coupé par *Eco*R I.

4 : λgt2 coupé par *Eco*R I.

5 : λgt3 coupé par *Eco*R I.

6 : λ coupé par *Hin*d III + ΦX-174RF coupé par *Hin*c II.

2. RESTRICTION *Eco*R I.

2.1. Méthode.

L'ADN des trois clones a été isolé et purifié à partir de plages de lyse selon le procédé décrit par Amersham (cf. Matériels et méthodes, page 56).

Une restriction par l'enzyme *Eco*R I a été réalisée en utilisant, comme le conseille la firme Amersham, 18 Unités d'enzyme pour 20 µl d'ADN (préparé selon cette méthode).

Le produit de ce clivage a été déposé sur gel d'agarose et soumis à une électrophorèse afin de séparer l'insert des "bras" d'ADN appartenant au phage.

2.2. Résultat.

La figure 21 nous montre que plusieurs fragments ont été générés par la restriction *Eco*R I.

Cet enzyme ne clive qu'une seule fois dans le phage λgt11 et fournit deux brins de 19,6 et 24,1 kb.
La bande supérieure des pistes 2 à 5 correspond à ces deux morceaux qui ne sont pas résolus dans les conditions de migration utilisées ici. En effet, un gel d'agarose concentré (1,5%) ne permet pas de séparer les fragments d'une taille élevée.

Les cinq autres fragments proviennent de la digestion de l'insert qui présente donc quatre sites de clivage pour l'enzyme *Eco*R I.
La taille de ces cinq fragments est d'environ:

- 1,35 kb
- 0,78 kb
- 0,77 kb
- 0,60 kb
- 0,36 kb

La taille totale de l'insert est estimée à 3,8 kb.

On observe que les trois clones présentent le même profil de restriction !

2.3. Conclusion.

La restriction des trois clones par l'enzyme *Eco*R I fournit cinq fragments pour chacun des trois phages recombinants.

La somme de la taille de ces fragments donne une valeur de 3,8 kb.
Seule une petite portion d'insert est donc responsable de la production d'une protéine de fusion reconnue par les anticorps.

Le fait que le profil de restriction est le même pour les trois clones, tend à confirmer l'identité des trois phages recombinants.
Cependant, il se peut que les trois clones diffèrent par un petit fragment supplémentaire généré par la restriction mais non visible sur le gel. En effet, l'intensité des bandes est proportionnelle à la taille et à la quantité d'ADN correspondant.
C'est pourquoi le morceau de 0,3 kb est déjà très peu visible de part sa petite taille.

Nous allons utiliser une méthode plus sensible par marquage radioactif afin de s'assurer de l'identité effective des trois clones.

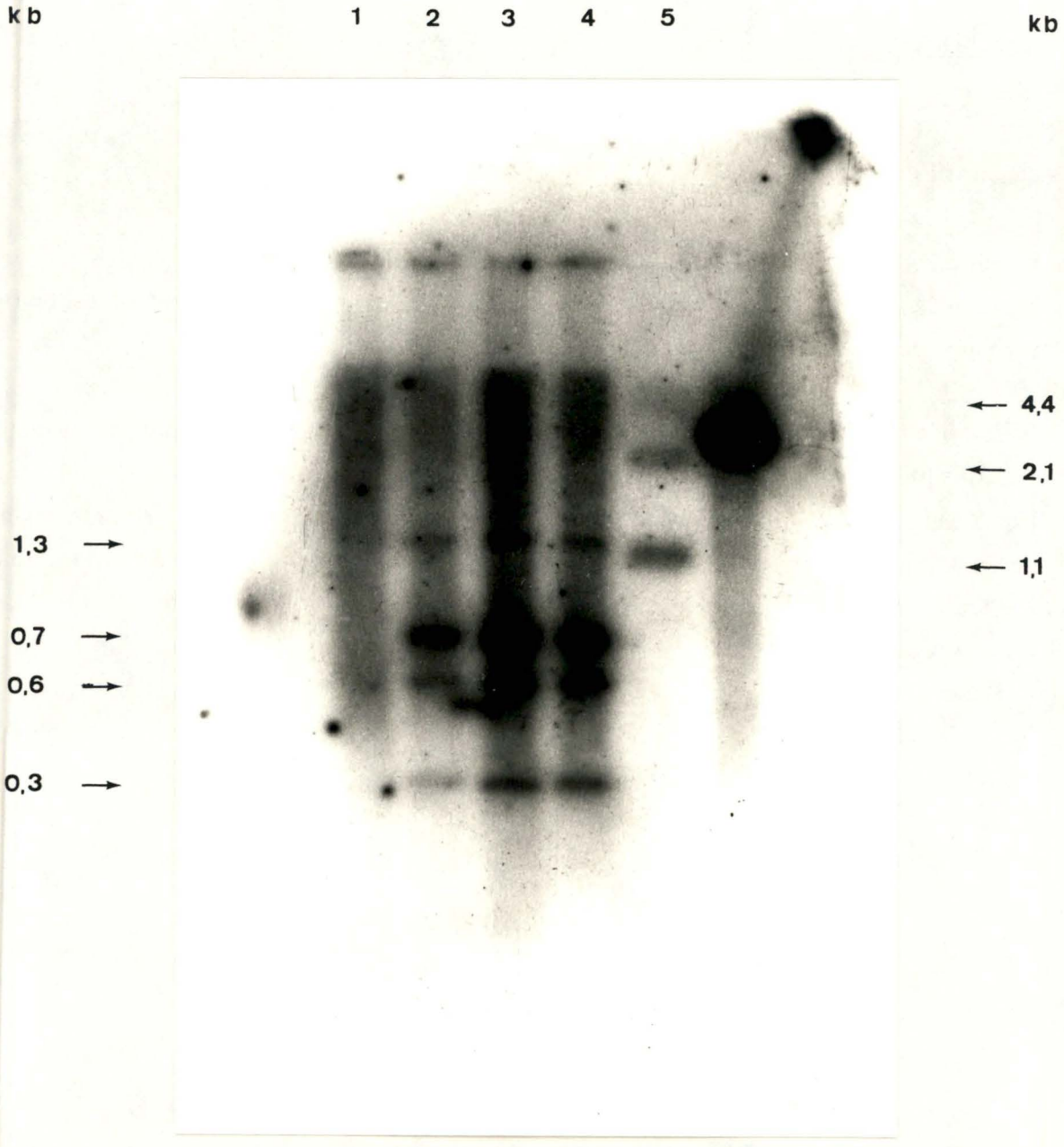


Figure 22 : Autoradiographie après maquage au [^{32}P]dATP des extrémités des fragments générés par restriction *Eco* R I et séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 %.

1 : λgt11 coupé par *Eco*R I.

2 : λgt1 coupé par *Eco*R I.

3 : λgt2 coupé par *Eco*R I.

4 : λgt3 coupé par *Eco*R I.

5 : pFl1 coupé par *Hin*d III.

3. MARQUAGE A LA KLENOW.

3.1. Méthode.

Le fragment de Klenow est la plus grande partie issue de la digestion trypsique de la DNA polymlérase I. "La Klenow" a une activité 5'-3' polymérasique, 5'-exonucléasique mais non 3'-exonucléasique.
La restriction par l'enzyme *Eco*R I génère des extrémités 5' protrudantes formées des nucléotides 5'AATT--.
L'utilisation de [^{32}P]dATP et du fragment de Klenow permet de marquer les bouts des fragments libérés par la digestion *Eco*R I et de visualiser tous les fragments, même ceux de petite taille qui ne seraient pas apparus sur le gel d'agarose de la figure 21.

Suite à ce marquage, le produit de la réaction est déposé sur un gel d'agarose. Après électrophorèse, le gel est fixé, séché et autoradiographié.

3.2. Résultat.

L'autoradiographie obtenue est montrée à la figure 22.
On peut observer que les trois clones ont le même profil de restriction et qu'aucun nouveau fragment n'apparaît malgré la sensibilité de l'analyse.

Les morceaux de 0,77 et 0,78 kb ne sont pas résolus mais la forte intensité de la bande correspondante nous indique leur présence.

3.3. Conclusion et discussion.

Les trois phages recombinants λgt1, λgt2 et λgt3 sont identiques et possèdent quatre sites de clivage de l'enzyme *Eco*R I.

Il est intéressant de remarquer ici que, étant donné la manière dont la banque a été construite (par fragmentation mécanique et donc aléatoire), on s'attendrait à ce que les inserts des trois clones ne soient pas totalement identiques mais se recouvrent plus ou moins partiellement, la partie commune exprimant des épitopes de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase.
Or, ce n'est pas le cas.

L'identité des trois clones peut s'expliquer par l'amplification de la banque : ces clones sont certainement issus d'un même recombinant initial.

Nous avons déjà soulevé la question de l'orientation et de la phase de lecture des inserts. D'une part, l'ADN de levure peut s'insérer dans les deux orientations, d'autre part, une séquence de nucléotides peut être lue selon trois phases différentes.
Il y a donc une chance sur six que l'insert se trouve dans les mêmes orientation et phase que le gène *lac*Z et puisse conduire à l'expression d'une protéine de fusion.

De plus, la structure secondaire de la protéine recombinante peut être telle que, selon la longueur de la partie non ß-galactosidase, les épitopes de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase soient masqués.
De tels clones ne seraient pas reconnus par les anticorps "anti-méthylase" et échapperaient au criblage.
La stabilité de la protéine de fusion entre également en ligne de compte. Une grande protéine hybride est plus instable et plus vite dénaturée.

Ces différentes raisons restreignent le nombre de recombinants pouvant donner des clones positifs.

4. RESUME.

La restriction par l'enzyme *Eco*R I suivie du marquage radioactif à l'aide du fragment de Klenow, nous montre que les phages λgt1, λgt2 et λgt3 sont identiques.
L'insert possède 4 sites de clivage *Eco*R I déterminant 5 fragments de 1,3 ; 0,78 ; 0,77 ; 0,6 et 0,3 kb.
La taille de l'insert a été évaluée à 3,8 kb.

IV. SOUS-CLONAGE DANS UN VECTEUR DE DELETION ET DE SEQUENCAGE.

1. INTRODUCTION.

Rappelons ici que la recherche du gène codant pour l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase est menée avec l'intention de créer des mutants pour cet enzyme. (cf. Introduction, Chap. III §2 : L'approche génétique).

Si la séquence du gène est connue, une disruption peut être réalisée au niveau d'un site connu pour voir si le gène est essentiel.
Si le gène n'est pas essentiel, on a un mutant que l'on peut comparer au type sauvage.
Si le gène est essentiel, le mutant créé par disruption est létal et donc impossible à étudier.
Dans ce cas, des mutants thermosensibles pour la croissance seront créés par mutagenèse dirigée.

1.1. Statégies pour séquencer.

Dans le but de séquencer la partie de l'insert étudié codant pour l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase, deux stratégies peuvent être adoptées.

D'une part, l'insert entier peut être cloné dans un vecteur approprié puis des délétions progressives, qui vont fournir des fragments de taille décroissante, peuvent être réalisées.

Le plus petit fragment d'ADN qui porte encore des épitopes de l'enzyme étudié sera déterminé et c'est ce morceau qui sera séquencé.
De cette manière, la taille de l'insert à séquencer a été minimisée à la seule partie qui nous intéresse.

D'autre part, on peut sous-cloner l'insert, c'est-à-dire le fragmenter et cloner chaque fragment dans un vecteur de délétion et de séquençage. Après avoir identifié le sous-clone qui exprime une protéine de fusion portant les épitopes de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase, des délétions progressives et le séquençage du fragment d'intérêt seront réalisés comme décrits précédemment.

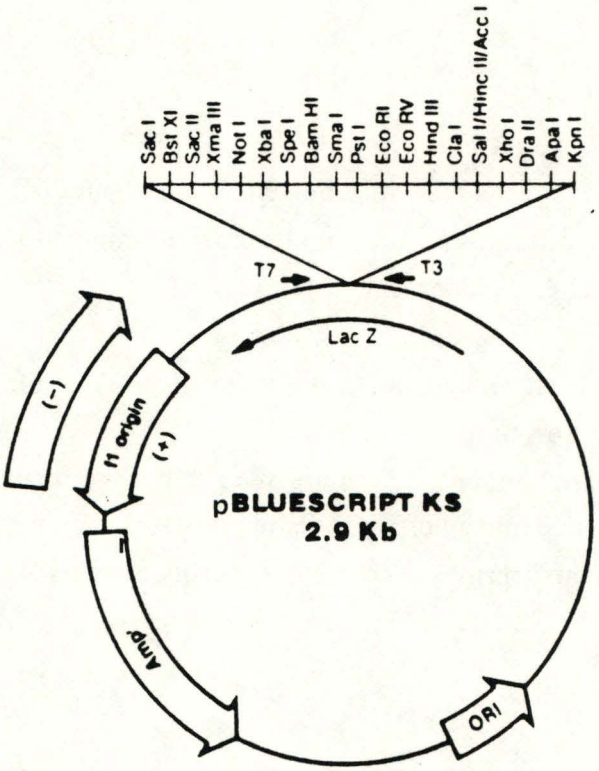


Figure 23 : Vecteur pBluescript KS.

1.2. Choix du vecteur pBluescript pour le clonage et le séquençage.

La prochaine étape de notre travail va donc être le clonage de l'insert entier et de ses sous-fragments dans un vecteur.
Nous utiliserons le vecteur pBluescript décrit à la figure 23 car il possède des caractéristiques qui nous seront utiles pour le clonage mais aussi pour la formation de délétants et pour le séquençage. Parmi ces caractéristiques citons :

- le vecteur pBluescript est un phagemide de 2,95 kb portant l'origine phagique de réplication f1 de sorte qu'il peut être secrété sous forme d'ADN simple brin en présence d'un phage "helper".
  L'orientation (+) ou (-) de cette région f1 détermine lequel des deux brins d'ADN est "empaqueté" dans la particule phagique. pBluescript (+) est répliqué de sorte que le brin codant du gène de la ß-gal soit sécrété.
  Cet ADN simple brin servira de matrice pour le séquençage par la méthode de Sanger;

- la figure 23 montre que pBluescript possède un fragment du gène *lac*Z avec dans la partie N-terminale un polylinker contenant 21 sites uniques de restriction.

  Selon l'orientation du polylinker dans le gène *lac*Z, 2 types de vecteur sont distingués: KS et SK.KS est un vecteur tel que la transcription de la ß-gal se déroule de *Kpn* I vers *Sac* I et vice-versa pour le vecteur SK.

  C'est au niveau du site unique *Eco*R I du polylinker que l'insert sera introduit.
  Cette insertion disrupte le gène de la ß-galactosidase et permet une sélection rapide des clones recombinants.
  Pour réaliser cette sélection, il faut utiliser une souche bactérienne (XL1-Blue par exemple) qui possède la partie du gène *lac*Z qui est absente dans le vecteur pBluescript. Cette complémentation intragénique permet la production de la ß-gal active.

  Les bactéries contenant un vecteur non-recombinant à gène de ß-gal non disrupté seront bleues. Les bactéries recombinantes contenant un insert dans le site multiple de clonage et qui disrupte le gène de la ß-gal vont donner des colonies blanches sur un milieu contenant de l'IPTG et X-gal;

- pBluescript permet également de réaliser des délétions de l'insert.

Pour cela, nous utiliserons le système Exo III / Mung Bean nucléase.
L'exonucléase III digère les extrémités 3' protrudantes, lorsque celles-ci sont à bouts francs, et les extrémités 5' protrudantes.
Pour créer des délétions dans l'insert, mais pas dans le vecteur, on réalise une restriction dans le site multiple de clonage (à gauche ou à droite de l'insert) fournissant une extrémité 3' protrudante du côté du vecteur et protégeant ainsi celui-ci de l'action de l'exonucléase III.
Une seconde restriction est réalisée entre l'insert et le site de clivage du premier enzyme utilisé afin de donner une extrémité 5' protrudante ou un bout franc du côté de l'insert.
Le vecteur ainsi coupé est traité avec l'exonucléase III qui dégrade le brin d'ADN à partir de l'extrémité 3'. La longueur d'ADN convertie de double brin en simple brin par l'exonucléase III peut être contrôlée par la température de réaction et le temps d'incubation. En jouant sur ces deux facteurs, une gamme de délétants peut être obtenue avec une taille d'insert de plus en plus petite.

La région d'ADN simple brin ainsi produite sera ensuite rognée par la Mung Bean nucléase qui fournira au terme de l'opération un insert raccourci limité par un bout franc.

Les extrémités de l'insert et de la matrice du vecteur sont alors liguées afin de recirculariser le vecteur.

De tel délétants sont utilisés pour le séquençage. La formation de délétants permet de raccourcir la longueur de l'ADN de levure. Dans notre cas, seule la partie codante (c'est-à-dire les ~ 260 premières bases) est intéressante à séquencer. C'est donc le fragment du délétant porteur de cette extrémité 5' de l'insert qui sera séquencé;

- comme on peut le voir sur la figure 23, le vecteur pBluescript possède les promoteurs des T3 et T7 RNA polymérases.
Une sonde marquée, réalisée grâce à l'une ou l'autre de ces polymérases, servira à "pêcher" le gène entier dans une banque génomique de levure construite avec des plus grands fragments du génome.

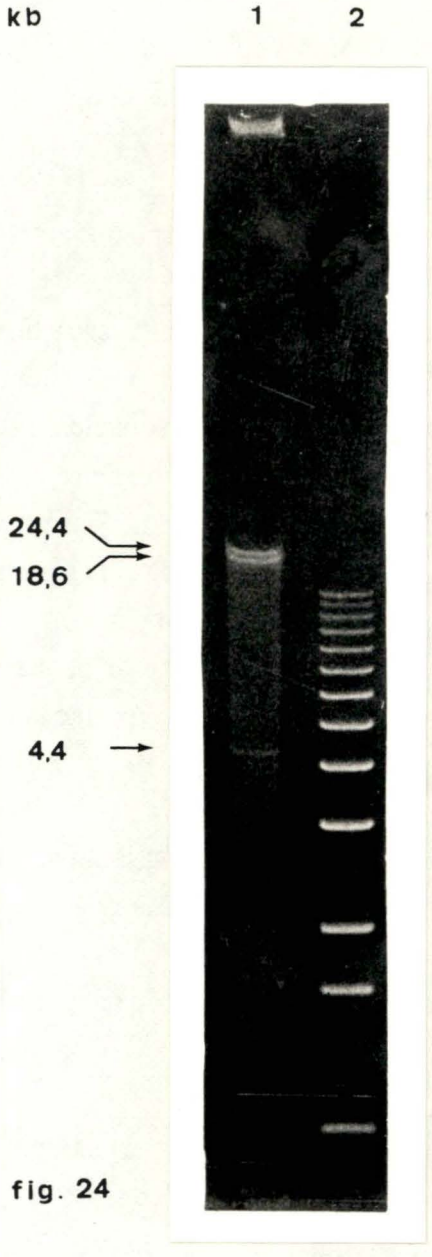


fig. 24

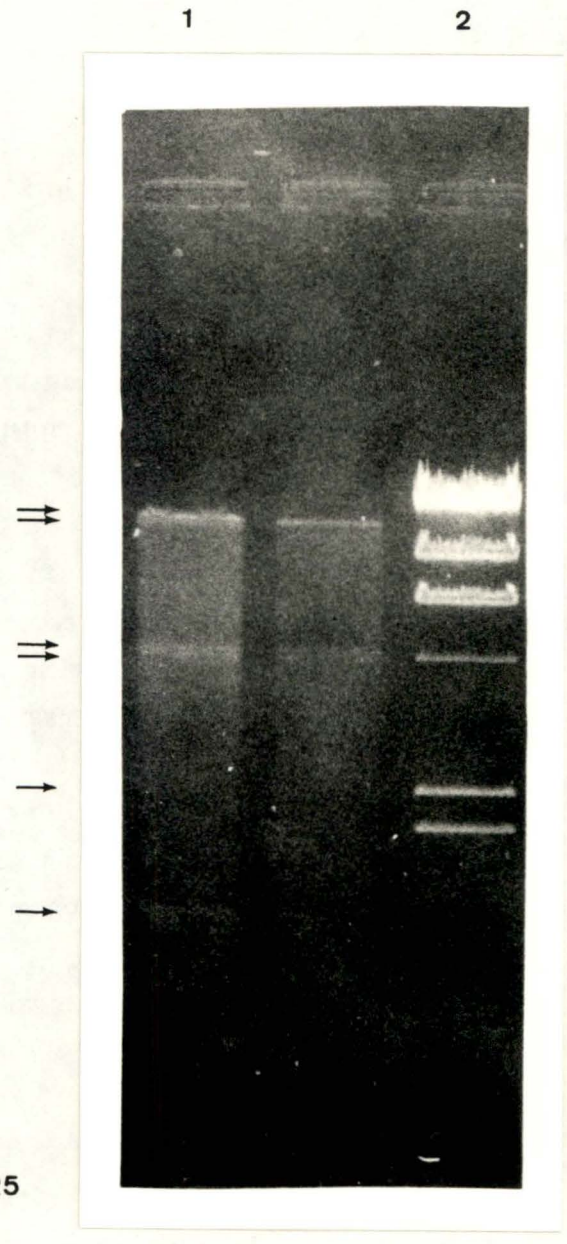


fig. 25

Figure 24 : Analyse après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % de 20 µl d'ADN de phage recombinant restreint par 10 U de *Sac* I.

1 : λgt recombinant coupé par *Sac* I.
2 : Echelle de 1 kb (BRL).

Figure 25 : Analyse après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % de 20 µl d'ADN de phage recombinant restreint par 10 U de *Sac* I et 10 U de *Kpn* I.

1 : λgt recombinant coupé par *Sac* I et *Kpn* I.

2 : λ coupé par *Hin*d III.

2. TENTATIVE D'ISOLEMENT ET CLONAGE DE L'INSERT ENTIER DANS LE VECTEUR pBLUESCRIPT.

Comme nous l'avons vu au Chapitre III (§2 : Restriction *Eco*R I), l'enzyme de restriction *Eco*R I ne permet pas d'isoler l'insert entier du phage λgt11, étant donné qu'il possède des sites de clivage dans l'insert.

Nous avons recherché dans la carte de restriction du phage (cf. figure 16) des sites de clivage qui bordent l'insert et permettent de l'isoler.
Trois possibilités se sont présentées : une double restriction par les enzymes *Sac* I-*Kpn* I; *Pvu* I - *Kpn* I et *Xba* I-*Kpn* I.
Pour pouvoir isoler l'insert de cette manière, il nous faut vérifier qu'aucun de ces enzymes ne clivent à l'intérieur de celui-ci.

Nous avons tout d'abord testé l'enzyme *Sac* I. Si cet enzyme ne possède pas de site de restriction dans l'insert, le clivage par *Sac* I fournit 3 fragments dont la taille est de

24,46 kb (= 20,66 + 3,8 (insert) kb)
18,61 kb
4,43 kb

La figure 24 nous montre que le résultat de la restriction par *Sac* I du clone recombinant est bien celui attendu.
L'enzyme *Sac* I ne clive donc pas l'insert.

Nous avons ensuite réalisé une double restriction *Sac* I-*Kpn* I.
Le produit de ce clivage doit être formé de 5 fragments :

18,61 kb
17,07 kb
4,43 kb
5,88 kb (=2,08 + 3,8 (insert) kb)
1,51 kb

Malheureusement, nous voyons à la figure 25 que la double restriction *Sac* I-*Kpn* I fournit six fragments au lieu de cinq, ce qui signifie que l'enzyme *Kpn* I possède un site de clivage dans l'insert.
Les autres doubles restrictions envisagées pour isoler l'ADN de levure ne pourront être réalisées puisque chacune met en jeu l'enzyme *Kpn* I.

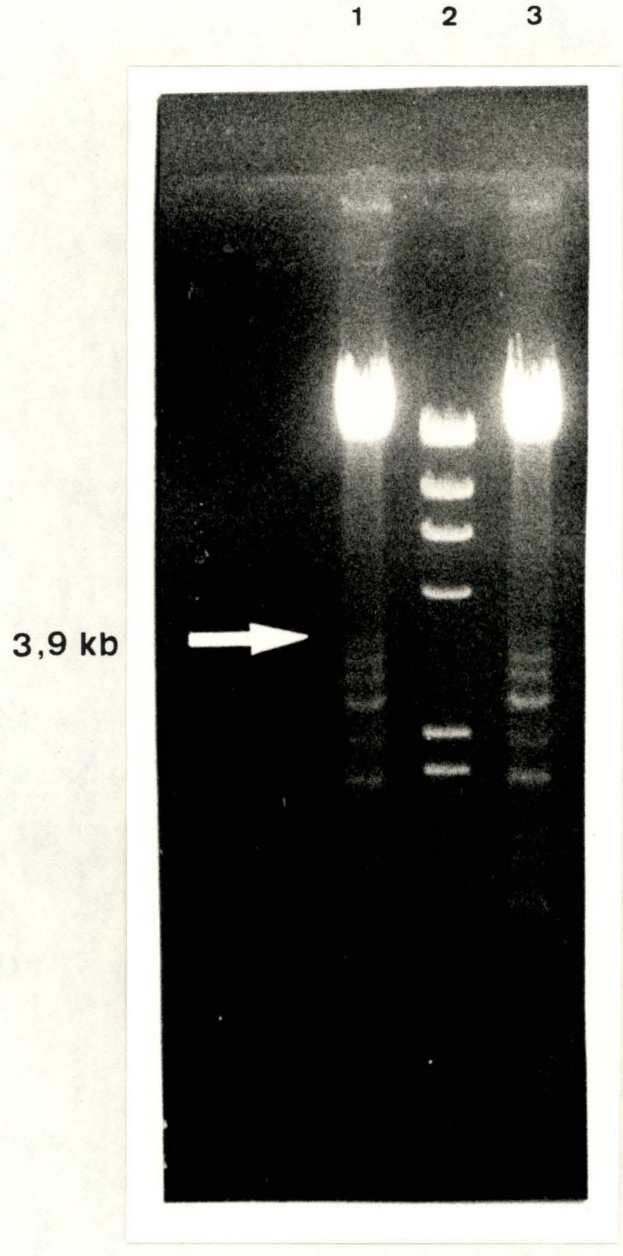


Figure 26 : Analyse après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % de 20 µl d'ADN de phage recombinant restreint par 22 U d'*Eco*R I.

1 : λgt recombinant coupé par *Eco*R I après une heure d'incubation.

2 : λ coupé par *Hin*d III.

3 : λgt recombinant coupé par *Eco*R I après deux heures d'incubation.

Nous avons alors réalisé des digestions partielles par *Eco*R I afin d'obtenir un profil de restriction où l'insert entier apparaît ce qui permettrait son isolement.
Pour cela, nous avons utilisé de l'ADN de phage préparé selon une méthode rapide décrite par Maniatis. (cf. Matériels et méthodes,page 58)
Différentes quantités d'enzyme ont été testées à plusieurs durées d'incubation.

C'est en utilisant 22 Unités d'enzyme *Eco*R I pour 20 µl de solution d'ADN (environ 4500 ng) et après une à deux heures d'incubation, que le profil de restriction montré à la figure 26 a été obtenu.
La bande indiquée par la flèche représente de l'ADN dont la taille est estimée à 3,9 kb, ce qui correspond à l'insert entier.

Nous avons extrait cette bande du gel, mais la quantité d'ADN ainsi récupérée est très faible et s'est révélée insuffisante pour une expérience de ligation-transformation dans le vecteur pBluescript.
La forte intensité de la bande supérieure correspondant à l'ADN phagique indique que la quantité d'ADN utilisée pour la restriction est pourtant importante.
Il semblerait que la digestion, même ménagée, ne fournisse qu'une proportion infime d'inserts entiers.
Nous constatons ici que les sites *Eco*R I internes de l'insert paraissent plus facilement restreints par l'enzyme que les sites de clonage.

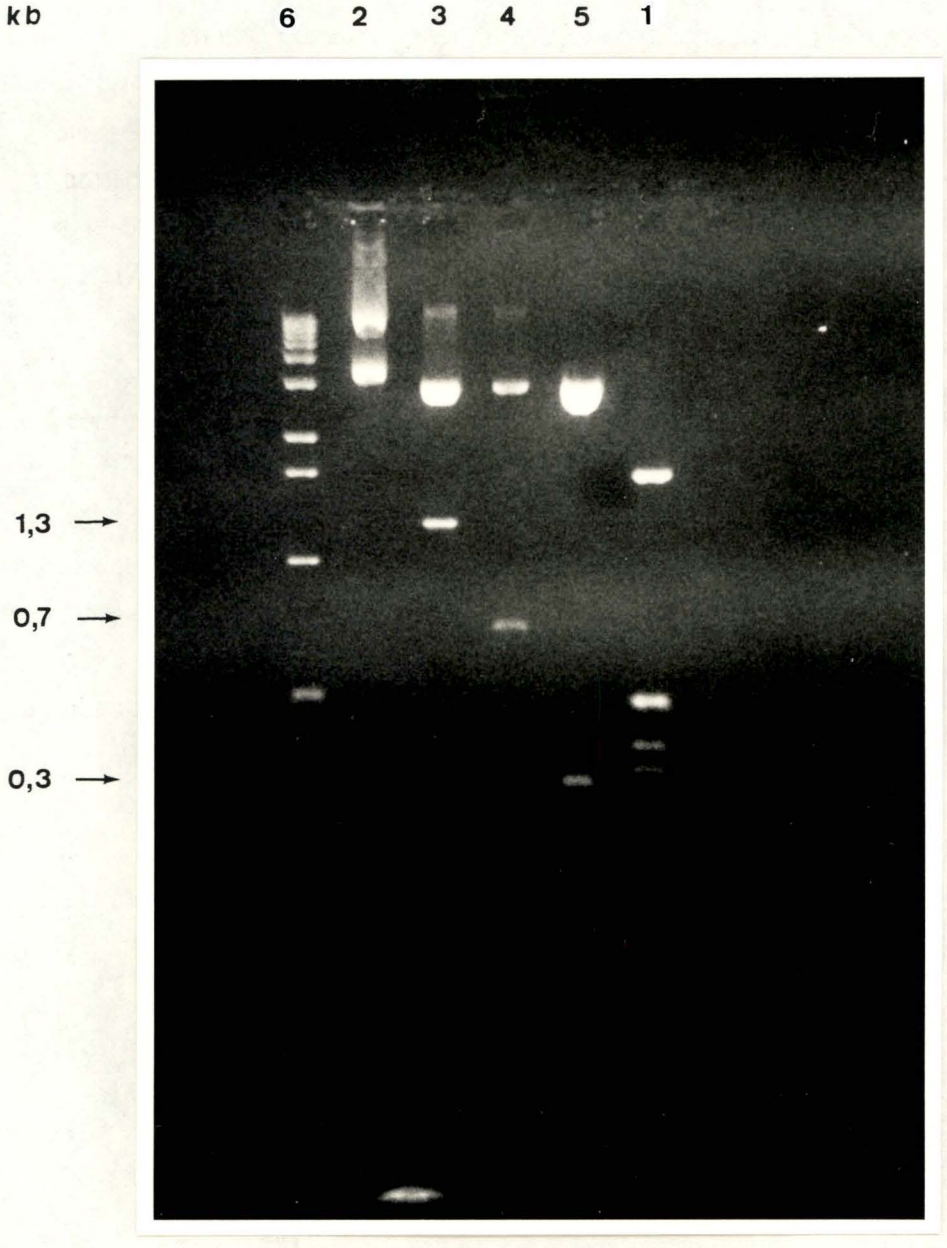


Figure 27 : Analyse après électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % des vecteurs pBluescripts recombinants restreints par *Eco*R I.

1 : pBR322 coupé par *Hinf* I.
2 : pBluescript coupé par *Eco* R I
3 : pBluescript coupé par *Eco*R I et contenant le fragment de 1,3 kb.
4 : pBluescript coupé par *Eco*R I et contenant le fragment de 0,7 kb.
5 : pBluescript coupé par *Eco*R I et contenant le fragment de 0,3 kb.
6 : Echelle de 1 kb (BRL).

3. SOUS-CLONAGE DANS pBLUESCRIPT DES FRAGMENTS OBTENUS PAR LA RESTRICTION TOTALE DE L'INSERT PAR L'ENZYME *Eco*R I.

Etant donné l'échec de la tentative d'isolement de l'insert entier après digestion partielle, nous avons opté pour la seconde stratégie consistant à sous-cloner des morceaux de l'insert puis à réaliser des délétions du fragment d'intérêt et à le séquencer.
De cette manière, la taille de l'ADN à déléter à été réduite.

L'ADN phagique a été restreint totalement par l'enzyme *Eco*R I ce qui fournit, comme nous l'avons vu page 28, cinq fragments.
Le produit de cette restriction a été utilisé pour une ligation dans le vecteur pBluescript également soumis à un clivage par *Eco*R I.

Une transformation de la souche XL1-Blue a ensuite été réalisée. Les bactéries ont été étalées sur boîte contenant de l'IPTG et X-gal afin de pouvoir sélectionner par la couleur les transformants ayant le gène *lac*Z disrupté.

L'ADN des bactéries formant des colonies blanches a été extrait par une méthode rapide (cf. Matériels et méthodes, page 73) et restreint par *Eco*R I.

Le ou les fragments qui se sont ligués au vecteur peuvent ainsi être visualisés sur un gel d'agarose .

Suite à cet essai de sous-clonage, trois vecteurs ayant inséré un fragment différent ont été obtenus (figure 27). Ces fragments sont ceux de 1,3; 0,3 et 0,77 ou 0,78 kb.
Cette opération de sous-clonage devra être répétée pour obtenir les deux autres fragments dans le vecteur pBluescript.

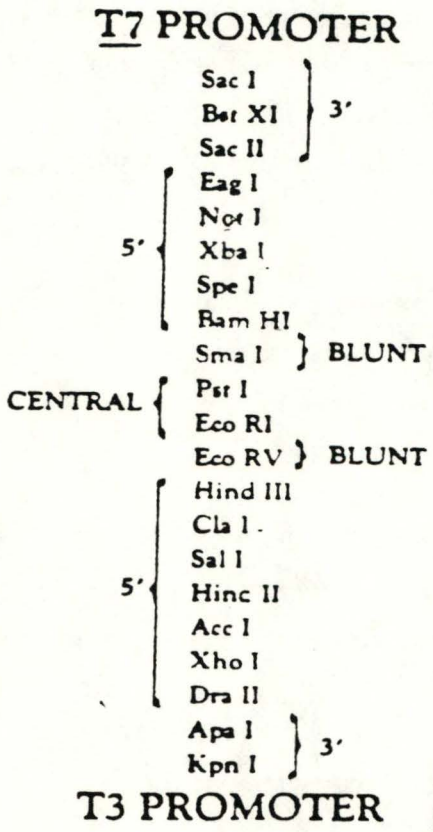


Figure 28 : Sites de clivage des enzymes du polylinker de pBluescript KS.

4. RECHERCHE D'ENZYMES DE RESTRICTION UTILISABLES POUR LES DELETIONS.

On se rappelera (page 35) que l'obtention de délétants progressifs nécessite l'utilisation préalable de deux enzymes de restriction qui vont cliver le vecteur afin de permettre l'action de l'exonucléase III.
Il faut choisir des enzymes qui ne vont pas également restreindre le fragment à déléter. Aussi est-il requis de vérifier que les enzymes pouvant être utilisés (figure 28) ne clivent pas les fragments sous-clonés.

Nous avons testé plusieurs enzymes de restriction et le tableau suivant résume les résultats obtenus :

	Type d'extrémité protrudante fournie	Fragments 1,3 kb	0,7 kb	0,3 kb
ApaI	3'	0	0	0
Xho I	5'	0	0	0
Sal I	5'	x	x	0
*Hin*d III	5'	x	0	0
Pst I	3'	0	0	0
Not I	5'	0	0	0
Eag I	5'	0	0	0
Xba I	5'	0	x	0
Sac I	3'	0	0	0

0 : ne clive pas
x : clive

Tableau 1 : Liste des enzymes de restriction ayant un site au moins dans un fragment sous-cloné.

Nous voyons que lorsque des délétions seront réalisées par la droite de l'insert, on pourra utiliser pour les 3 fragments les enzymes *Apa* I, donnant une extrémité 3' protrudante, et *Xho* I, donnant une extrémité 5' protrudante, car aucun de ces enzymes ne clive les fragments sous-clonés.
La délétion par la gauche du vecteur pourra se faire dans les trois cas en utilisant l'enzyme *Not* I ou *Eag* I, pour former l'extrémité 5' protrudante, et l'enzyme *Sac* I pour protéger le vecteur de l'action de l'Exo III.

5. RESUME.

Dans le but du séquençage de la partie de l'insert codant pour l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase, nous avons tenté d'isoler l'insert entier du phage λgt11 et de le cloner dans le vecteur pBluescript.
La restriction partielle par *Eco*R I ne nous a pas fourni une quantité suffisante de l'insert entier pour pouvoir le liguer.

Nous avons alors opté pour le sous-clonage dans pBluescript des fragments issus de la restriction totale par *Eco*R I. Les fragments de 1,3; 0,7 et 0,3 kb ont été sous-clonés.

Des enzymes ont été testés sur ces morceaux pour rechercher des enzymes ne clivant pas les fragments et qui pourront dès lors être utilisés pour créer des délétants.

V. CONCLUSION.

Au terme de ce travail, nous avons montré qu'une protéine de fusion était produite par les trois clones qui ont répondu positivement au criblage d'une banque d'expression par des anticorps dressés contre l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase de *S. cerevisiae.*

Cette protéine de fusion est sous la dépendance d'IPTG et a une taille estimée à 125,5 kD. La partie non ß-galactosidase représente 9,5 kD, ce qui correspond à une séquence nucléotidique de 0,26 kb.

Une analyse par restriction des trois inserts et une expérience de marquage radioactif des fragments issus du clivage par *Eco*R I, nous ont permis d'affirmer que ces trois clones sont identiques.

La taille totale de l'insert a été estimée à 3,8 kb.

Trois des cinq fragments provenant de la digestion totale de l'insert par l'enzyme *Eco*R I ont été sous-clonés dans le vecteur pBluescript. Deux fragments restent à sous-cloner.

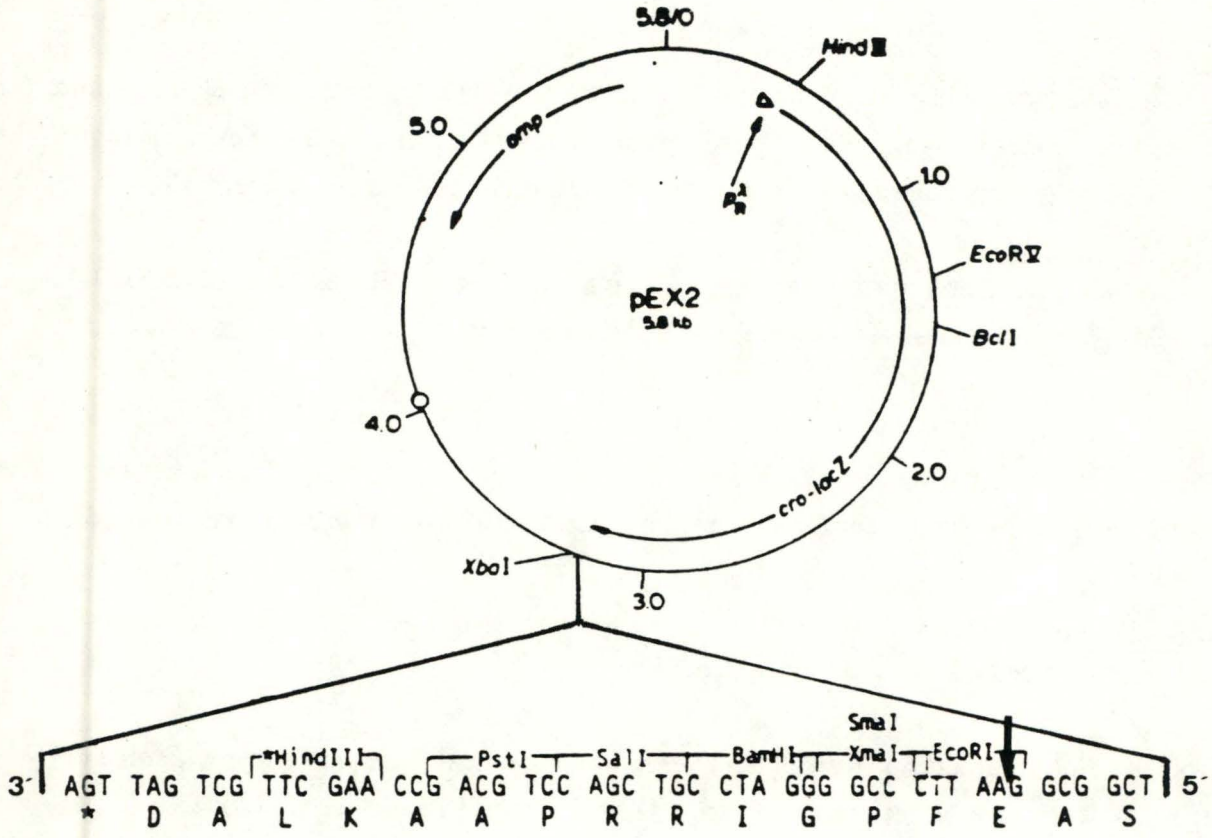


Figure 29 : Vecteur pEX.

VI. PERSPECTIVES.

1. IDENTIFICATION ET SEQUENCAGE DU FRAGMENT SOUS-CLONE PORTEUR D(ES) EPITOPE(S) DE L'ARNm (GUANINE-7-)-METHYLTRANSFERASE.

Le sous-clonage a été réalisé dans le but de diminuer la taille d'ADN de levure à séquencer. En effet, la partie codante qui nous intéresse ne représente que 0,26 kb des 3,8 kb de l'insert.

La restriction *Eco*R I fournit des morceaux de taille supérieure à 0,26 kb. C'est le fragment correspondant à l'extrémité 5' de l'insert qui est porteur de la partie codante.

Pour identifier ce fragment, les morceaux générés par la digestion *Eco*R I seront sous-clonés dans le vecteur d'expression pEX (figure 29). Ce vecteur possède un gène *lac*Z sous la dépendance d'un promoteur fort. Un polylinker a été inséré à l'extrémité 3' du gène de la ß-gal. La séquence nucléotidique du polylinker nous montre que l'enzyme *Eco*R I clive après le deuxième nucléotide d'un codon. La figure 16 nous indique qu'il en est de même au niveau du site de clivage *Eco*R I de λgt11 dans lequel, rappelons-le, l'ADN de levure a été inséré.
Le fragment de l'extrémité 5', introduit dans la bonne orientation dans le site *Eco*R I de pEX, se trouvera en phase comme il l'était dans le vecteur phagique λgt11.
Une protéine de fusion pourra ainsi être produite.

Les anticorps dressés contre l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase permettront d'identifier le fragment, sous-cloné dans le vecteur pEX, qui code pour une protéine de fusion porteuse des épitopes de la méthylase étudiée.

Si le fragment d'intérêt ainsi identifié a une taille de plus de 0,3 kb, des délétions seront réalisées afin d'obtenir un morceau d'ADN correspondant à la taille de la partie codante et portant toujours les épitopes déterminés.
C'est ce morceau qui sera alors séquencé selon la méthode de Sanger (1980).

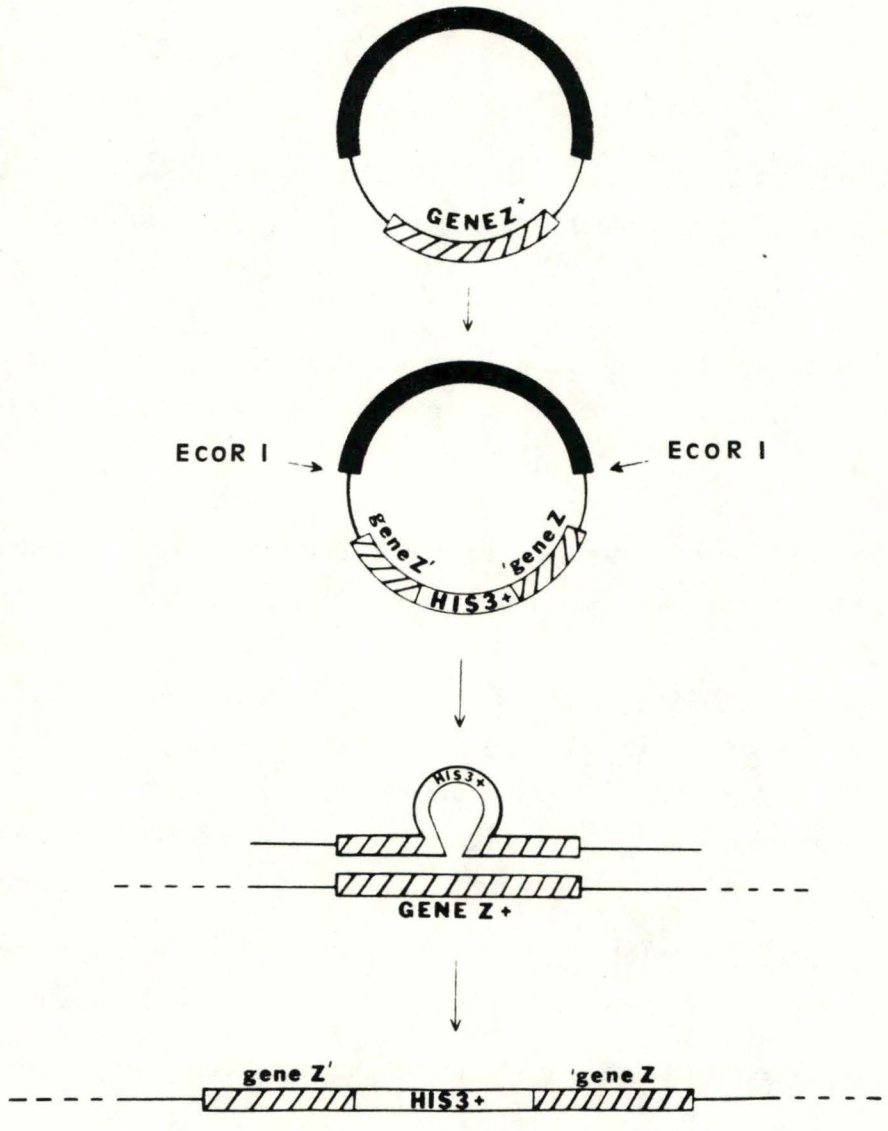


Figure 30 : Disruption d'un gène par insertion du marqueur de sélection His 3.
(Rothstein R.J., 1983)

2. RECHERCHE DU GENE ENTIER.

Nous avons vu, à la figure 23, que le vecteur pBluescript possède les promoteurs des T3 et T7 ARN polymérases de part et d'autre du polylinker (et donc de l'insert).
Les T3 et T7 polymérases ont une grande spécificité pour leur promoteur. Etant donné que ceux-ci se trouvent, l'un sur le brin codant, et l'autre sur le brin non-codant, le choix de l'une ou l'autre polymérase déterminera lequel des deux brins sera transcrit.
L'utilisation d'une de ces polymérase permettra de réaliser une sonde marquée qui servira à "pêcher" le gène entier dans une banque génomique de levure sauvage construite avec des fragments de 10 à 30 kb dans un vecteur Ycp50-CEN. (Rose *et al.*, 1987)

3. ETUDE DU CARACTERE ESSENTIEL OU NON DU GENE PAR DISRUPTION - TRANSPLACEMENT.

Pour étudier le caractère essentiel ou non de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase, le fragment séquencé sera disrupté en y insérant un marqueur de sélection de levure (ura3 ou his3 par exemple) au niveau d'un site de restriction unique observé à l'intérieur de la séquence (figure 30).
Une restriction *Eco*R I va libérer le fragment disrupté hors du vecteur pBluescript.
Une levure sauvage diploïde sera rendue hétérozygote par transplacement du fragment linéaire dans le gène de la méthylase sauvage. (Rothstein, 1983)
Si, après méiose, l'analyse des tétrades révèle que deux spores seulement sur quatre sont viables,le gène pourra être qualifié d'essentiel.

Si le gène est essentiel, des mutants conditionnels thermosensibles de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase seront alors produits par la méthode développée par Mann *et al.* (1987). Le principe de cette méthode est le suivant :

> Le gène cloné est mutagénéisé *in vitro* avec du bisulfite de soude de telle sorte qu'une banque de plasmides autoréplicatifs portant chacun une mutation particulière soit obtenue.

Préalablement, dans une souche de levure haploïde dont le gène de la méthylase a été disrupté dans le chromosome, un plasmide autoréplicatif contenant le gène sauvage de la méthylase est introduit. Cette levure est viable puisque le gène sauvage de la méthylase, situé sur le plasmide, complémente le gène disrupté sur le chromosome (létal si le gène est essentiel).

Une telle levure est transformée avec la banque de plasmides contenant le gène muté. Les levures qui contiennent le plasmide avec le gène muté et qui ont perdu le plasmide avec le gène sauvage sont sélectionnées sur un milieu à basse température.

Ces mêmes transformants sont ensuite repiqués sur un milieu de sélection à 25°C d'une part, et à 37°C d'autre part. Les mutants thermosensibles pour la méthylase sont ceux qui poussent à température permissive et ont leur croissance nulle ou ralentie à 37°C parce que la mutation dans le gène altère la fonction de celui-ci. Si la mutation créée dans le gène de la méthylase n'a pas d'effet sur le bon fonctionnement de l'enzyme, le mutant aura une aussi bonne croissance à 25°C qu'à 37°C.

A ce stade, la question du rôle foctionnel de la méthylation de la coiffe peut être posée. Les mutants conditionnels obtenus pourront être comparés à l'organisme sauvage. La stabilité et la traductibilité des ARNm pourra être testée *in vitro* et *in vivo*.

MATERIELS

ET

METHODES

I. SOUCHES BACTERIENNES ET PHAGE.

1. SOUCHES BACTERIENNES.

1.1. Souche Y1089 d'*E.coli.*

Son génotype : Δ*lacU*169 *proA*$^{+}$ Δ*lon* *araD*139 *strA* *hflA*150 [Chr::Tn*10*] (pMC9)

Pour produire des protéines de fusion, la souche Y1089 d'*E.coli* rendue lysogène pour les phages recombinants a été utilisée.
Cette souche possède les caractéritiques intéressantes suivantes:

- elle contient le represseur *lac* (produit du gène *lac*I se trouvant sur le plasmide pMC9) qui empêche l'expression du gène *lac*Z tant que ce dernier n'est pas déréprimé par addition d'IPTG dans le milieu de culture;
- elle est déficiente en protéine *lon* ce qui augmente la stabilité de la protéine de fusion;
- elle est *hflA*150. Cette mutation augmente la fréquence d'insertion de l'ADN phagique dans le génome bactérien.

1.2. Souche Y1090 d'*E. coli.*

Son génotype : Δ*lacU*169 *proA*+ Δ*lon* *araD*139 *strA* *supF* [*trpC*22 :: Tn*10*] (pMC9)

Cette souche, utilisée pour l'expression des phages, possède des caractéristiques importantes.
Citons :

- elle contient le répresseur *lac*;
- elle est déficiente en protéase *lon*;
- elle est *supF* et supprime donc la mutation *S*100 du phage empêchant la lyse.

1.3. Souche XL1-Blue d'*E.coli.*

Son génotype : *rec*A1 *lac*$^-$ *end*A1 *gyr*A96 *thi hsd*R17 supE44 *rel*A1 (F' proAB *lac*I^q *lac*ZΔM15 Tn10)

Cette souche, commercialisée par la firme Stratagène, est utilisée comme hôte du vecteur pBluescript et permet une sélection par la couleur (bleu-blanc) des transformants.
Cette sélection n'est possible que si l'épisome F', porteur du gène *lac*ZΔM15, est présent.
Ceci permet une complémentation intragénique avec le vecteur pBluescript et la production d'une ß-gal active (si le vecteur n'a pas un gène *lac*Z disrupté).
Les bactéries transformantes contenant le facteur F' et le vecteur pBluescript sont sélectionnées sur un milieu contenant de la tétracycline 12,5 µg/ml (sélection de l'épisome) et de l'ampicilline 100 µg/ml (sélection du vecteur) et auquel de l'IPTG et du X-gal ont été ajoutés.

2. PHAGE λgt11.

Son génotype : *lac*5 *c*I857 *nin*5 *S*100.
La carte de restriction de ce vecteur d'expresson est montrée à la figure 12.
Ce vecteur phagique produit un répresseur de lyse thermosensible (cI857) qui est inactif à 42°C. La lyse est donc induite à cette température.
Cette lyse est effective uniquement dans une souche bactérienne contenant la mutation *supF* qui supprime la mutation ambre (*S*100) portée par le phage.

II. MILIEUX DE CULTURE.

Tous les milieux sont stérilisés avant usage par autoclivage pendant 20 minutes à 120°C.

- MILIEU RICHE LIQUIDE (LB).

  Pour un litre d'eau bidistillée : Bacto-tryptone 10 g
  Extrait de levure 5 g
  NaCl 10 g

  Le pH est ajusté à 7,5 uniquement pour la culture de bactéries infectées par les phages.

- MILIEU RICHE SOLIDE (LB).

  Pour un litre d'eau bidistillée :
  même composition que le LB liquide auquel on ajoute 16 g d'agar.

  Le milieu est coulé dans des boîtes de pétri après autoclavage.
  Lorsque le milieu est solidifié, les boîtes sont séchées 45 minutes dans une étuve à 65°C puis conservées en chambre froide.

- MILIEU LB + ANTIBIOTIQUE.

  Ce type de milieu est utilisé pour sélectionner les bactéries transformées par un vecteur porteur des gènes de résistance aux antibiotiques. Ces derniers sont thermolabiles et sont ajoutés au milieu après autoclavage et refroidissement à 55°C.
  L'ampicilline est ajoutée pour une concentration finale de 100 µg par ml.
  La tétracycline est ajoutée pour une concentration finale de 12,5 µg par ml.
  Les solutions stocks d'antibiotique sont filtrées sur filtre 0,22 µm, aliquotées et conservée à -20°C.

- MILIEU NZCYM.

Pour un litre d'eau bidistillée :	Hydrolysat de caséine	10 g
	NaCl	5 g
	Casamino acids	1 g
	Bacto-yeast extract	5 g
	$MgSO_4.7H_2O$	2 g

Ajuster le pH à 7,5.

III. PLASMIDE.

Le vecteur utilisé pour le clonage est pBluescript (commercialisé par la firme Stratagène). pBluescript est un phagemide de 2,95 kb dérivé de pUC19.
Ce vecteur (cf. figure 19) possède :

- l' origine de réplication du phage f1 de sorte qu'il peut être répliqué en ADN simple brin. L'orientation de cette région détermine lequel des deux brins est répliqué (vecteur (+) ou vecteur (-)).

- l'origine de réplication du pasmide ColE1 (ADN double brin).

- un polylinker de 21 sites uniques de restriction insérés dans la partie N-terminale du gène de la ß-gal. On distingue deux types de plasmides (KS et SK) selon l'orientation du polylinker.

- les promoteurs T3 et T7 de part et d'autre du polylinker.

- le gène de résistance à l'ampicilline.

IV. PREPARATION D'UN LYSAT BRUT DE LA SOUCHE Y1089 INFECTEE PAR CHACUN DES TROIS PHAGES RECOMBINANTS.

1. SOLUTIONS ET MILIEUX.

- 10 ml de LB pH 7,5 0,2% maltose
- Quelques ml de LB $MgCl_2$ 10 mM
- 100 ml de LB pH 7,5
- IPTG 1 M
- Tampon TE pour protéines : Tris HCl pH 7,5 10 mM
  EDTA 1 mM
- Boîtes LB pH 7,5

2. MANIPULATIONS.

Jour 1.

1. Strier la souche Y1089 d'*E. coli* sur boîte LB pH 7,5 Amp_{50} pour avoir des colonies isolées.
2. Incuber à 37°C.

Jour 2.

1. Le soir, inoculer 10 ml de LB pH 7,5 0,2% maltose avec une colonie isolée de la souche Y1089.
2. Incuber à 37°C jusqu'à ce que la phase stationnaire de la culture soit atteinte.

Jour 3.

1. Mesurer la DO de la culture à 600 nm et déterminer le nombre de cellules par ml. (1 $DO_{600\ nm} = 8.10^8$ cellules par ml.)
2. Infecter les cellules avec le phage recombinant à une multiplicité de 5 dans du LB pH 7,5 $MgCl_2$.
3. Laisser 20 minutes à 32°C.
4. Etaler environ 200 cellules par boîte LB pH 7,5.
5. Incuber à 32°C.
   (A cette température, le répresseur de lyse du phage (mutation *c*I857) est inactif.)

Jour 3. Uérifier que les bactéries sont lysogènes. Pour cela :

1. Diluer les colonies isolées chacune dans 10 µl d'eau stérile.
2. Déposer 3 µl des colonies diluées sur 2 boîtes LB pH 7,5.
3. Incuber une boîte à 32°C et l'autre à 42°C.
   (Les colonies qui poussent à 32°C mais pas à 42°C sont lysogènes.)

Jour 4.

1. Inoculer 100 ml de LB pH 7,5 avec une colonie lysogène isolée de la souche Y1089.
2. Incuber à 32°C avec une bonne aération jusqu'à ce que la culture atteigne une DO à 600 nm de 0,5.
3. Incuber rapidement à 42-45°C pendant 20 minutes avec une bonne aération.
   (Les phages s'accumulent mais ne lysent pas car la souche ne supprime pas la mutation *S*100 du phage.)
4. Ajouter de l'IPTG 10 mM.
5. Incuber la culture à 37°C pendant 1 heure.
   (La protéine de fusion est produite grâce à l'addition de l'inducteur.)
6. Centrifuger les cellules à 5000 rpm (rotor GSA Sorval) pendant 5 minutes à 24-37°C.
7. Resuspendre les cellules dans un volume de TE de 1/20 à 1/50 du volume de la culture originale.
8. Congeler-décongeler 3-4 fois dans de l'azote liquide.
   (Les cellules sont alors lysées.)
9. Soniquer les cellules pendant 5 fois 15 secondes.
   (La solution devient moins visqueuse.)
10. Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm.
11. Aliquoter le surnageant contenant les protéines et conserver à -20°C.

V. ANALYSE DES PROTEINES DE FUSION PAR ELECTROPHORESE.

1. SOLUTIONS.

- Tampon de solubilisation (concentré 2 ×) composé de :

  Tris 125 mM
  SDS 4%
  Bleu de bromophénol 0,002% (P/V)
  Mercaptoéthanol 10% (P/V)
  Glycérol 20% (P/V)

  Le bleu de bromophénol permet de visualiser le niveau de la migration. Le SDS dénature les protéines et leur confère une charge positive.

- Gel SDS - polyacrylamide 7,5% formé :

  - d'un gel de séparation contenant (pour un petit gel) :

Polyacrylamide 30%	1,875 ml
Tris 1,5 M SDS 0,4% pH 8,8	1,875 ml
H_2O	3,375 ml
Temed	7,5 µl
PAS 1%	0,375 ml

  - surmonté d'un gel de concentration contenant (pour un petit gel) :

Polyacrylamide 30%	0,5 ml
Tris 0,5 M SDS 0,4% pH 6,8	1,25 ml
H_2O	2,75 ml
Temed	5,0 µl
PAS 1%	0,5 ml

- Tampon d'électrophorèse :

  Pour un litre d'eau bidistillée : Glycine 192 mM
  Tris 25 mM
  SDS 0,1%

- Fixateur : TCA 12%
- Colorant : solution de bleu de Coomassie
- Décolorant : Méthanol 45%
  Eau 45%
  Acide acétique 10%

2. MANIPULATIONS.

1 . Les protéines, quantifiées selon la méthode de Bradford (1976), sont diluées dans H_2O pour obtenir la concentration désirée puis diluées 2 fois dans le tampon de solubilisation.
2 . Les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 minutes.
3 . Les échantillons sont déposés dans les puits du gel SDS - polyacrylamide 7,5% et l'électrophorèse est réalisée sous une tension de 200 Volts pendant 45 minutes.
4 . Après migration, le gel contenant les protéines est fixé 5 minutes, coloré 1 heure, décoloré, immergé 30 minutes dans du méthanol 50% et enfin séché sous vide.

3. ESTIMATION DE LA TAILLE DES PROTEINES.

La taille des protéines (exprimée en Dalton) est estimée d'après leur mobilité électrophorétique. La courbe d'étalonage est construite à partir de protéines de poids moléculaire connu (Sigma) :

Myosine	205 kD
ß - gal	116 kD
Phosphorylase	97,5 kD
Albumine bovine	66 kD
Ovalbumine	45 kD
Anhydrase carbonique	29 kD

VI . IMMUNODETECTION.

1. SOLUTIONS.

- Tampon de blotting :
  Pour 1 litre d'eau bidistillée : Glycine 192 mM
  Tris 25 mM
  Méthanol 20%

- Solution de lavage : PBS + Tween 1‰

  Pour 1 litre d'eau bidistillée (PBS concentré 10 ×) :

KH_2PO_4	2 g
Na_2HPO_4	11,49 g
NaCl	80 g
KCl	2 g

  Ajuster le pH à 7,4.

- Solution de saturation des pores du filtre de nitrocellulose : PBS + BSA 3%
- Solution de dilution des anticorps : PBS + BSA 1%
- Solution de neutralisation : HCl 1 N
- Substrat de révélation de la peroxydase : Diaminobenzidine (DAB) 0,5 mg/ml
  H_2O_2 1µl/ml
  Tris 0,1 M pH 7,4

2 . MANIPULATIONS.

2.1. Western - blotting.

1. Après électrophorèse sur gel SDS - polyacrylamide 7,5%, les protéines sont transférées sur un filtre de nitrocellulose par application d'une différence de potentiel de 100 Volts pendant 1 heure.
   (Les protéines, chargées négativement, migrent vers la borne positive et sont arrêtées sur le filtre de nitrocellulose.)

2. Laisser le filtre pendant 1 h 30 dans la solution de PBS + BSA 3% .
   (Les pores du filtre sont saturés par la BSA.)
3. Laver par 3 bains de 10 minutes dans la solution de PBS + Tween 1‰ .
4. Laisser sécher le filtre à l'air.

2.2. Immunodétection.

1. Découper le filtre de nitrocellulose en bandes correspondant aux puits du gel, les numéroter et les placer chacune dans une petite éprouvette.
   Selon la protéine que l'on désire révéler, différents anticorps sont utilisés.

Révélation de la ß-galactosidase.	Révélation des épitopes de l'ARNm (guanine-7-)-méthyl-transférase.
1. ajouter par éprouvette 2 ml d'anticorps monoclonaux de souris anti-β-gal (commercialisés par la firme Promega) dilués à 1/50 000.	1. ajouter par éprouvette 2 ml d'anticorps polyclonaux de lapin anti- ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase dilués à 1/100.
2. Laisser incuber 1 heure.	
3. Laver les bandes par 3 bains successifs.	
4. Ajouter 2 ml d'anticorps de lapin anti - souris couplés à la peroxydase (commercialisés par Amersham) dilués à 1/500.	4. Ajouter 2 ml d'anticorps d'âne anti - lapin biotinylés (commercialisés par Amersham) dilués à 1/500.
5. Laisser incuber 1 heure.	
6. Laver.	
	7. Ajouter 2 ml de la solution streptavidine - peroxydase biotinylée (commercialisée par Amersham) diluée à 1/400
	8. Laisser incuber 25 minutes.
	9. Laver.
10. Ajouter 2 ml du substrat de la peroxydase.	
11. Laisser 15 minutes.	
12. Neutraliser dans HCl 1N	
13. Sécher.	

VI. PREPARATION D'ADN PHAGIQUE.

1. PRODUCTION DE PLAGES DE LYSE.

(Maniatis, 1982)

1.1. Solutions.

- LB + agar 0,7%
- Boîtes NZCYM
- Tampon de phage (SM) :

  Pour 1 litre : NaCl 5,8 g
  MgSO4.7H2O 2,0 g
  Tris 6,05 g

  Ajuster le pH à 7,5.

1.2. Manipulations.

Jours 1 et 2 . Préparation de cellules Y1090 compétentes pour l'infection.

1 . Inoculer une colonie isolée dans 50 ml de LB 0,2% maltose et laisser pousser pour la nuit.

(Les bactéries mises à coître en présence de maltose absorbent les bactériophages λ plus efficacement qu'en abscence de maltose; le sucre induit l'opéron maltose qui contient le gène (*lamb*) codant pour le récepteur de λ.)

2 . Centrifuger les cellules à 5000 rpm (rotor GSA) pendant 10 minutes à température ambiante.

3 . Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans du $MgSO_4$ 0,01 M de manière à obtenir une $DO_{600} = 2$ (± 1,5 10^9 cellules/ml).

4 . Conserver à 4°C.

Jour 2. Infection.

1 . Chauffer la solution de LB + agar 0,7% (four à micro -ondes) pour la liquéfier et la maintenir dans un bain à 55°C.
2 . Dans des greiners, mélanger 10 µl de solution de phage (± 10^5 pfu) à 200 µl de bactéries Y1090 compétentes pour l'infection.
Un greiner ne reçoit pas de phages et sert de témoin de la viabilité des bactéries.
3 . Laisser incuber 20 minutes à 37°C.
(Les phages vont infecter les bactéries.)
4 . En même temps, incuber les boîtes NZCYM à 55°C pendant 20 minutes afin quelles soient à même température que le LB + agar liquide.
6 . Ajouter 2,5 ml de LB + agar 0,7% dans chaque greiner, agiter vigoureusement puis déposer sur une boîte NZCYM préchauffée.
7 . Quand la solution est solidifiée, laisser les boîte pour la nuit à 42°C.
(La lyse est induite.)

Jour 3. Des plages de lyse confluentes sont observées. La boîte témoin, elle, est couverte d'un tapis bactérien intact.

1 . Ajouter 5 ml de SM dans chaque boîte et laisser agiter doucement pendant 2-3 heures à 4°C.
(Les phages diffusent vers le tampon SM.)
2 . Transférer le SM dans un tube stérile pour centrifugeuse (correx 30).
3 . Rincer les boîtes avec 1 ml de SM que l'on ajoute aux 5 ml déjà prélevés et ajouter quelques gouttes de chloroforme au SM contenant les phages.
4 . Centrifuger à 4000 rpm (rotor SS34 Sorval) pendant 10 minutes à 4°C.
5 . Récupérer le surnageant qui peut être conservé à 4°C sur quelques gouttes de chloroforme.

2. PURIFICATION D'ADN PHAGIQUE SELON LA METHODE AMERSHAM.

(Benson et al.,1982 et Zagursky et al., 1985 cités dans Amersham)

2.1. Solutions.

- LB pH 7,5 liquide
- Solution de polyéthylène glycol (PEG) 20% NaCl 2M dans du SM :
dans 75 ml de SM, ajouter 20 g de PEG 6000 et 11,69 g de NaCl.
Après dissolution, ajuster le volume à 100 ml.

- DEAE - cellulose DE52 dans du LB liquide préparé de la manière suivante :
    - dans un berlin, déposer 100 g de DEAE - cellulose DE52 et ajouter lentement plusieurs volumes d'HCl 0,05 N;
    - ajouter, en homogénéisant doucement, du NaOH concentré jusqu'à ce que le pH approche le pH de LB (7,5);
    - laisser la résine se déposer et enlever le surnageant;
    - laver la résine plusieurs fois avec du LB liquide. Pour cela, resuspendre lentement la résine dans 2 volumes de LB, la laisser reposer et enlever le surnageant. La résine doit être lavéee jusqu'à ce que le pH soit de 7,5.
    - resuspendre la résine dans du LB pour obtenir un rapport de 75% de résine et 25% de LB;
    - ajouter de l'azide de sodium (bactéricide).

- Protéinase K 0,1 mg/ml
- SDS 10%
- Acétate de potassium 3 M
- Isopropanol froid
- Tampon TE pH 8,0 (cf. page 49)

2.2. Manipulations.

1. Ajouter, dans un correx 15,4 ml de la solution de PEG 20% NaCl 2 M à 4ml de solution de phages préparée selon la méthode des plages de lyse.
2. Mélanger par inversions et laisser incuber 1 heure dans la glace.
3. Centrifuger à 3000rpm (rotor SS34 Sorval) pendant 20 minutes.
   (Les phages précipitent.)
4. Enlever le surnageant et sécher avec précaution l'intérieur du tube avec un kleenex pour retirer toute trace de PEG.
5. Resuspendre le culot dans 750 µl de LB pH 7,5.
6. Transférer le culot resuspendu dans un eppendorf et ajouter 750 µlde DE52 LB. Mélanger doucement par inversions.
7. Centrifuger 5 minutes (centrifugeuse à eppendorfs) puis transférer le surnageant dans un nouvel eppendorf. Réaliser cette opération deux fois.
8. Ajouter 17,5 µl de protéinase K 0,1 mg/ml et
   42,5 µl de SDS 10%.
   Mélanger et laisser à température ambiante pendant 5 minutes.

9. Ajouter 173 µl d'acétate de potassium 3 M.
   (Un précipité se forme.)
10. Incuber à 88°C pendant 20 minutes.
    (Le précipité disparaît.)
11. Refroidir sur la glace pendant 10 minutes.
    (Le précipité se reforme.)
12. Centrifuger 10 minutes.
13. Transférer le surnageant dans deux nouveaux eppendorfs et ajouter un même volume d'isopropanol froid.
14. Placer à -70°C pendant 10 minutes.
15. Laisser réchauffer à température ambiante.
16. Centrifuger 10 minutes.
17. Enlever le surnageant et sécher le culot sous vide.
18. Resuspendre le culot d'ADN dans 20 µl de TE pH 8,0.

3. PURIFICATION D'ADN PHAGIQUE SELON LA METHODE DECRITE DANS MANIATIS (1982).

3.1. Solutions.

- RNAse
- DNAse
- PEG 20% NaCl 2 M dans du SM
- Tampon de phage (SM)
- SDS 10%
- EDTA 0,5 M pH 8,0
- Phénol
- Phénol/chloroforme
- Chloroforme
- Isopropanol
- Ethanol
- Tampon TE pH 8,0

3.2. Manipulations.

1. Ajouter, à un correx 30 contenant 5 ml de solution de phage préparé selon la méthode des plages de lyse, de la RNAse et de la DNAse chacune pour une concentration de 1 µg/ml.
2. Incuber 30 minutes à 37°C.
3. Ajouter un même volume de PEG 20% NaCl 2 M et incuber 1 heure à 0°C.
4. Centrifuger à 9500 rpm (rotor SS34 Sorval) pendant 20 minutes à 4°C.
   (Les phages précipitent.)
5. Enlever le surnageant et laisser le correx 30 incliné pour égoutter tout le liquide.
6. Ajouter 0,5 ml de SM et resuspendre le culot en vortexant.
7. Centrifuger à 8500 rpm pendant 2 minutes à 4°C.
   (Les débris précipitent.)
8. Transférer le surnageant dans un nouvel eppendorf et ajouter 5 µl de SDS 10% et 5 µl d'EDTA 0,5 M pH 8,0.
9. Incuber à 68°C pendant 15 minutes.
10. Ajouter un même volume de phénol, vortexer 30 secondes, centrifuger 5 minutes et transférer le surnageant dans un nouvel eppendorf.
    Réaliser la même opération avec du phénol - chloroforme puis du chloroforme.
11. Ajouter le double de volume d'éther, vortexer 30 secondes, centrifuger 1 minute pour séparer les phases, éliminer la phase supérieure contenant l'éther.
    (Ceci permet d'enlever les traces de phénol - chloroforme.)
    Réaliser cette opération 3 fois.
12. Ajouter un même volume d'isopropanol et laisser à -70°C pendant 20 minutes.
    (L'ADN précipite.)
13. Laisser dégeler et centrifuger 15 minutes à 4°C.
14. Laver le culot avec 20 µl d'éthanol 70%.
15. Sécher sous vide et resuspendre le culot dans 50 µl de TE pH 8,0.

VIII. DIGESTION DE L'ADN PAR UN ENZYME DE RESTRICTION.

1. GENERALITES.

Les endonucléases de restriction sont des enzymes principalement isolés de procaryotes et qui, après avoir reconnu une séquence spécifique de nucléotides (généralement de 4 à 6 pb), clivent le double brin d'ADN. La plupart des enzymes coupent en libérant une extrémité 5' protrudante; d'autres génèrent des fragments avec une extrémité 3' protrudante; d'autres encore clivent selon l'axe de symétrie et fournissent des bouts francs.
L'enzyme *Eco*R I par exemple fournit une extrémité 5' protrudante et son site de reconnaissance est :

```
5'---GAATTC---3'                    5'---G3'      5'AATTC---3'
                        ⟶
3'---CTTAAG---5'                    3'---CTTAA5'          G---5'
```

Chaque enzyme de restriction possède des conditions optimales de réaction. Ces indications sont fournies par la firme qui livre les enzymes. Les principales variables sont la température d'incubation et la composition du tampon.

2. SOLUTIONS.

- Tampon de restriction. Les trois plus courants sont :
  - tampon low : NaCl 0 mM
    Tris pH 7,5 10 mM
    $MgCl_2$ 10 mM
    Dithiothreitol (DTT) 1 mM

- tampon medium : NaCl 50 mM
  Tris pH 7,5 10 mM
  $MgCl_2$ 10 mM
  DTT 1 mM
- tampon high : NaCl 100 mM
  Tris pH 7,5 10 mM
  $MgCl_2$ 10 mM
  DTT 1 mM

- H_2O stérile.
- Enzymes de restriction utilisés et leurs caractéristiques :

enzyme	température d'incubation	tampon	site de reconnaissance
Apa I	30°C	high	GGGCCC CCCGGG
*Eco*R I	37°C	high	GAATCC CTTAAG
*Hin*d III	37°C	medium	AAGCTT TTCGAA
Kpn I	37°C	low	GGTACC CCATGG
Not I	37°C	high	GCGGCCGC CGCCGGCG
Pst I	37°C	medium	CTGCAG GACGTC
Sac I (*Sst* I)	37°C	low	GAGCTC CTCGAG
Sal I	37°C	high	GTCGAC CAGCTG
Xba I	37°C	high	TCTAGA AGATCT
Xho I	37°C	high	CTCGAG GAGCTC

3. MANIPULATIONS.

1. Généralement, la réaction de restriction s'effectue dans un volume final de 25 µl :

ADN à couper :	20 µl
tampon de restriction 10 × :	2,5 µl
enzyme :	1 à 10 Unités par µg d'ADN
eau stérile :	x µl
	25 µl

2. Incuber 2 heures à 37°C.
3. Arrêter la réaction en plaçant les eppendorfs à 65°C pendant 10 minutes.

IX. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE.

1. GENERALITES.

Cette méthode est la plus utilisée pour séparer et identifier les fragments d'ADN. La localisation de l'ADN dans le gel est déterminée par coloration des bandes d'ADN avec du bromure d'éthidium. Cette substance s'intercale entre les bases nucléiques et permet de visualiser les fragments d'ADN sous une lumière U.V.. L'étalonnage se fait par la migration simultanée de fragments de longueur connue.

La migration électrophorétique de l'ADN à travers un gel d'agarose dépend de plusieurs paramètres. Citons :

- le poids moléculaire de l'ADN : les fragments d'ADN migrent à une distance inversément proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire;
- la concentration en agarose : un gel concentré permet de séparer des fragments d'ADN plus petits. Par exemple un gel de 0,7% sera utilisé pour séparer des fragments de 10 à 0,8 kb, tandis qu'un gel 1,5% permet de séparer des fragments de 4 à 0,2 kb.

2. SOLUTIONS.

- Tampon TBE : Tris borate 89 mM
  Acide borique 89 mM
  EDTA 2 mM
- Solution d'agarose : x% d'agarose en poids par volume de TBE.
- Solution alourdisseur - colorant : Bleu de bromophénol 0,25%
  Glucose 40% (P/V)

  Le bleu de bromophénol permet de suivre la migration. Le glucose alourdit l'échantillon et facilite ainsi le dépôt dans le puit.

3. MANIPULATIONS.

1. Chauffer la solution d'agarose jusqu'à ébullition puis laisser refroidir à 55°C.
2. Ajouter 0,5 µl/ml de bromure d'éthidium.
3. Couler la solution dans un moule à élecrophorèse à l'extrémité duquel est placé un peigne formant des puits dans le gel où seront déposés les échantillons.
4. Immerger le gel dans un bac à élecrophorèse rempli de tampon TBE.
5. Ajouter aux échantillons la solution alourdisseur - colorant et les déposer dans les puits du gel.

La migration s'effectue pendant ± 2 heures sous 70 à 100 Volts.

4. ESTIMATION SUR GEL DE LA TAILLE DES FRAGMENTS D'ADN.

Dans un puit laissé libre, un standard constitué d'ADN coupé en morceaux de taille connue, est mis à migrer en même temps que les fragments d'ADN de taille inconnue. Après électrophorèse, les distances de migration des morceaux du standard sont mesurées. Les couples de valeur distance - log du PM permettent de définir une droite de régression. Celle-ci servira à déterminer, à partir de sa distance de migration mesurée sur le gel, le PM d'une bande d'ADN. Différents standards ont été utilisés :

1.(kb)	2.(kb)	3.(kb)	4.(kb)
23,130	23,130	12,216	1,632
9,416	9,416	11,198	0,517/0,506
6,557	6,557	10,180	0,396
4,361	4,361	9,162	0,344
2,322	2,322	8,144	0,298
2,027	2,027	7,126	0,221/0,220
0,564	1,057	6,108	0,154
0,127	0,770	5,090	
	0,609	4,072	
	0,564	3,054	
	0,495	2,036	
	0,392	1,635	
	0,345	1,018	
	0,341	0,516/0,506	
	0,335	0,394	
	0,297	0,344	
	0,291	0,298	
	0,210	0,211/0,210	
	0,162		

1 : λ coupé par *Hin*d III.

2 : λ coupé par *Hin*d III + ΦX-174RF coupé par *Hin*c II.

3 : Echelle de 1 kb (BRL).

4 : pBR322 coupé par *Hin*f I.

X. EXTRACTION D'UN FRAGMENT D'ADN A PARTIR D'UN GEL D'AGAROSE.

Cette technique permet d'isoler un fragment d'ADN après électrophorèse sur gel d'agarose.

1. SOLUTIONS.

- Tampon à haute concentration en sel : Tris 20 mM pH 7,5
  EDTA 1 mM
  NaCl 1,5 M
- Papier filtre préparé de la manière suivante :
  1. placer le papier filtre, découpé en carrés de ± 1 cm de côté, dans du NaCl 2,5 M pendant 2 heures.
  2. laver dans de l'eau stérile (3 ×).
  3. stocker dand de l'EDTA 1 mM à 4°C.
- N-butanol saturé avec H_2O
- Ethanol froid
- Ethanol 70%
- Tampon TE pH 8,0

2. MANIPULATIONS.

1. Sous U.V., couper le gel devant et derrière la bande à prélever. Placer dans les fentes ainsi obtenues un morceau de papier filtre.
2. Laisser migrer 15 minutes à 100 Volts.
3. Vérifier sous U.V. que la fluorescence se trouve sur le papier. Retirer alors ce papier sur lequel la bande désirée a migré, le rincer 2 fois à l'eau stérile et le sécher entre filtres Wattman.

4. Placer le papier dans un eppendorf contenant 300-400 µl du tampon à haute concentration en sel.
5. Vortexer jusqu'à obtention d'une pâte homogène.
6. Incuber 2 heures à 37°C.
7. Avec une épingle chauffée, percer le fond de l'eppendorf d'un trou fin et placer celui-ci dans un second eppendorf.
8. Centrifuger les deux eppendorfs fixés l'un à l'autre dans une centrifugeuse de table pendant 5 minutes.
9. Ajouter 3 volumes de N-butanol.
10. Centrifuger 5 minutes.
11. Enlever le N-butanol (phase supérieure).
12. Ajouter deux volumes d'éthanol froid.
    (L'ADN précipite.)
13. Laisser 10 minutes à 4°C puis 10 minutes à -70°C.
14. Centrifuger 30 minutes à 4°C.
15. Enlever l'éthanol.
16. Laver avec 20 µl d'éthanol 70%.
17. Centrifuger 5 minutes.
18. Sécher sous vide et resuspendre dans du TE pH 8,0.

XI. MARQUAGE RADIOACTIF AVEC LE FRAGMENT DE KLEENOW.

1.PRINCIPE.

La restriction par l'enzyme *Eco*R I libère des extrémités 5' protrudantes de type :

5'AATTC----
3'G----

Le fragment de Klenow a une activité 5'-3' polymérasique, 5' exonucléasique mais non 3' exonucléasique. En présence de [^{32}P]dATP, il va ajouter une A marquée en face des T des extrémités de chaque fragment libéré par la restriction *Eco*R I. Tous les morceaux seront donc marqués de la même manière quelle que soit leur taille.

2. SOLUTIONS.

- Cocktail de restriction constitué de (pour une réaction) :

[α-^{32}P]dATP 3000 Ci/mmol	0,1 µl
fragment de Klenow	1 Unité
eau	x µl
	2,5 µl

- Fixateur du gel : TCA 7%

3. MANIPULATIONS.

1. Réaliser une réaction de restriction comme décrit page 62.
2. Ajouter 2,5 µl du cocktail de réaction au produit de la restriction.
3. Incuber 30 minutes à 30°C.
4. Déposer les échantillons sur un gel d'agarose 1,5% et séparer les fragments par électrophorèse.
5. Fixer le gel pendant 30 minutes.
6. Sécher et autoradiographier.

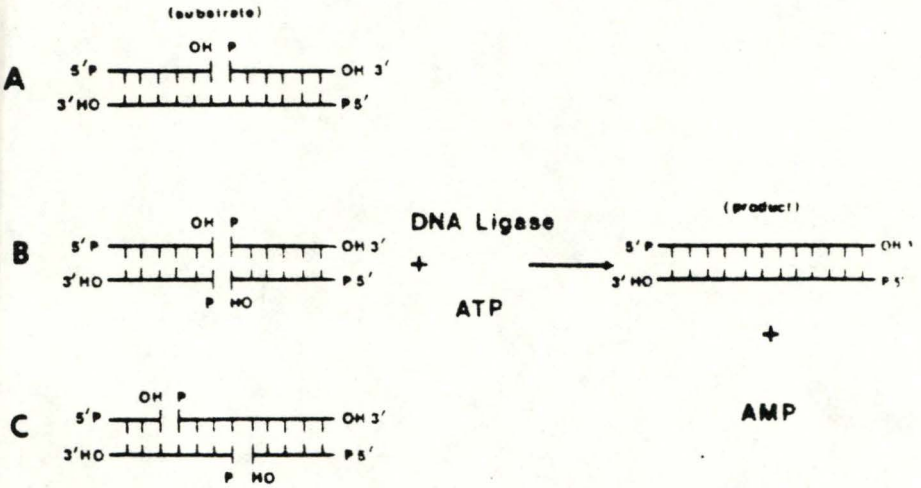


fig.31 : action de la DNA ligase sur du DNA (a)ayant 1 brin coupé, (b)coupé à bouts francs, (c)coupé à bouts collants.

XII. LIGATION D'UN INSERT DANS UN VECTEUR.

1. PRINCIPE.

La réaction de ligation est réalisée par un enzyme - la T4 DNA ligase - qui soude deux brins d'ADN préalablement coupés par un enzyme de restriction.
La ligase peut aussi lier deux fragments d'ADN d'origine différente et restreints par le même enzyme. Elle catalyse la formation d'un lien phosphodiester entre les groupements 3'-hydroxyle et 5'-phosphate de deux nucléotides adjacents.
La ligase agit sur des ADN coupés à bouts francs ainsi que sur les ADN coupés à bouts collants (figure 31).

2. SOLUTIONS.

- Tampon de ligation : Tris HCl 20 mM pH 7,6
  $MgCl_2$ 10 mM
  DTT 10 mM
  ATP 1 mM

- T4 DNA ligase

- H_2O stérile

3. MANIPULATIONS.

1. La réaction de ligation s'effectue généralement dans un volume final de 15 µl :

vecteur linéarisé	x ng	
ADN à insérer	y ng	x/y = 2 à 3
T4 DNA ligase	1 Unité	
tampon de ligation 5 ×	3 µl	
H_2O stérile	n µl	
	15 µl	

Comme témoin de ligation, une réaction est réalisée sans ajouter d'insert.

2. Incuber une nuit à 14°C.

XIII. TRANSFORMATION D'*E. coli*.

1. PRINCIPE.

La transformation consiste à introduire de l'ADN plasmidique dans une bactérie hôte. Pour que des cellules soient capables d'accepter de l'ADN étranger, il faut qu'elles soient rendues "compétentes". Pour ce faire, elles sont traitées avec une solution hypotonique de $CaCl_2$. L'ADN ajouté aux cellules compétentes forme un complexe résistant aux DNAses et qui adhère à la surface bactérienne. Ce complexe entre dans la cellule lors d'un bref choc thermique.

2. SOLUTIONS.

- LB préchauffé à 37°C
- Cellules compétentes : souche XL1-Blue d'*E. coli* (un stock était disponible au laboratoire)
- IPTG 100 mM
- X-gal 2% (préparé dans du diméthyle formamide)

3. MANIPULATIONS.

1. Ajouter l'ADN à 50 µl de cellules compétentes.
2. Incuber pendant 30 minutes dans la glace.
3. Choc thermique : 2 minutes à 37°C.
4. Ajouter 1 ml de LB préchauffé.

C'est la réaction de transformation proprement dite.

4. SELECTION DES TRANSFORMANTS.

Nous l'avons vu precédemment, les bactéries transformées par un vecteur pBluescript produisent une ß-galactosidase fonctionnelle. L'insertion d'une séquence étrangère dans le site multiple de clonage du plasmide interrompt le gène *lac*Z. La complémentation ne peut se faire et la ß-gal n'est pas reconstituée.
L'identification de tels clones se fait sur un milieu contenant de la tétracycline, de l'ampicilline, de l'IPTG et de l'X-gal. L'IPTG induit l'activité du gène *lac*Z en inactivant le répresseur (cf. figure 17), l'X-gal est un substrat chromogénique de la ß-gal.

L'addition d'IPTG et de X-gal peut se faire 30 minutes avant d'étaler les cellules ayant subi la transformation. Pour cela, ajouter par boîte contenant déjà les deux antibiotiques :

100 µl d'IPTG 100 mM
40 µl d'X-gal 2%

Laisser pousser les colonies pendant 12 à 18 heures à 37°C puis 2 heures à 4°C (pour accentuer la coloration bleue des bactéries non-recombinantes). Les colonies dont les cellules contiennent un vecteur disrupté apparaissent blanches.

XIV. EXTRACTION RAPIDE DE PLASMIDE D'*E. coli*.

1. SOLUTIONS.

- Tampon TES constitué de Tris 50 mM pH 8,0
  EDTA 50 mM pH 8,0
  Sucrose 15%
- Lysozyme 10 mg/ml
- H_2O froide
- $NaClO_4$ 5 M
- Isopropanol
- Ethanol 90%
- Tampon TE

2. MANIPULATIONS.

1. La veille, ensemencer 10 ml de milieu LB + Amp_{100} avec une colonie de transformants dans un flacon universel. Laisser incuber la nuit à 37°C en agitant.
2. Prélever 1 à 1,5 ml de chaque culture.
3. Centrifuger 5 minutes (centrifugeuse à eppendorfs)
4. Eliminer le surnageant.
5. Ajouter 100 µl de TES et vortexer.
6. Ajouter 25 µl de lysozyme et vortexer légèrement.
   (Le lysozyme détruit la paroi bactérienne.)
7. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante.

8. Ajouter 400 µl d'H_2O froide.
9. Laisser incuber 5 minutes à 0°C puis 15 minutes à 72°C.
   (Le passage à 72°C permet de poursuivre la lyse et de dénaturer les protéines.)
10. Centrifuger 10 minutes (centrifugeuse à eppendorfs).
11. Centrifuger 10 minutes dans une centrifugeuse Beckman de table.
    (Le culot contenant les débris bactériens se tasse.)
12. Enlever le culot avec un cure-dent stérile.
13. Ajouter 70 µl de $NaClO_4$ 5 M et homogénéiser par retournement.
14. Ajouter 400 µl d'isopropanol et vortexer légèrement.
    (L'ADN plasmidique précipite.)
15. Centrifuger 15 minutes (centrifugeuse à eppendorfs).
16. Eliminer le surnageant, ajouter 400 µl d'éthanol 90%.
17. Centrifuger 5 minutes (centrifugeuse à eppendorfs).
18. Eliminer le surnageant, sécher le culot sous vide et resuspendre dans 20 µl de TE.

BIBLIOGRAPHIE

BANERJEE, A. K. (1980)

5'-Terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids.
Microbiol. Rev., 44, 175-205.

BOTH, G. W., BANERJEE, A. K. & SHATKIN, A.J. (1975)

Methylation-dependent translation of viral messenger RNAs *in vitro*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1189-1193.

BRADFORD, M. M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical biochemistry, 72, 248-254.

CASSART, J. P. (1987)

Developpement d'un test *in vitro* de méthylation de la coiffe de l'ARN messager.
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques.

FURUCHI, Y., LAFIANDRA, A. & SHATKIN, A. J. (1977)

5'-Terminal structure and mRNA stability.
Nature, 266, 235-239.

GLOVER, D.M. (1985)

DNA cloning, 1, 49-78.

GOSWAMI, B.B., SHARMA, O.K. & BOREK, E. (1983)

An approach to inhibition of viral replication : inhibition of mRNA methylation.
Recent results in cancer research, 84, 275-282.

LEWIN, B. (1985)

Genes II
John Wiley et Sons, Inc. New-York.

LOCHT, C., BEAUDART, J.L. & DELCOUR, J. (1983)
Partial purification and caracterization of mRNA (guanine-7-)-methyltransferase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Eur. J. Biochem., 134, 117-121.

LOCHT, C. (1984)
Méthylation in vitro de la coiffe 5'-terminale de l'ARN de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au moyen d'enzyme extrait du germe de blé et de levure.
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de docteur en Sciences.

LOCHT, C. & DELCOUR, J. (1985)
In vitro methylation of undermethylated yeast poly(A)-rich RNA using mRNA (guanine-7-)-methyltransferase purified from wheat germ or yeast.
Eur. J. Biochem., 152, 247-251.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. (1984)
Molecular cloning : A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New- York.

MANN, C., BUHLER, J.M., TREICH, I. & SENTENAC, A. (1987)
RPC40, a unique gene for a subunit shared between yeast RNA polymerases A and C.
Cell, 48, 627-637.

MUTHUKRISHNAN, S., BOTH, G.W., FURUCHI, Y. & SHATKIN, A.J. (1975)
5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation.
Nature, 255, 33-37.

RENAULD, G. (1984-1895)
Rapport IRSIA.

RENAULD, G., CASSART, J.P., VANDENHAUTE, J. & DELCOUR, J. (1988)

Isolation by immunoscreening of three recombinant λgt11 phages bearing sequences of the mRNA (guanine-7-)-methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*.
Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 96, B180.

RENAULD, G., CASSART J.P., MONVILLE, M.C., VANDENHAUTE, J. & DELCOUR, J. (1988)
Cloning of a yeast gene coding for mRNA (G-7-)methyltransferase.
Yeast, 4, S355.

RHOADS, R.E. (1985)
in "Progress in molecular and subcellular biology", Springer-Verlag, Berlin, 105-155.

ROSE, M.D.,NOVICK, P., THOMAS, J.H., BOTSTEIN, D. & FINK, G.R. (1987)
A *Sacchromyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector.
Gene, 60, 237-243.

ROTHSTEIN, R.J. (1983)
in "Methods in Enzymology".
Academic Press, 101, 202-211.

SANGER, F., COULSON,A.R., BARELL,B.G., SMITH, A.J.H. & ROE, B.A. (1980)
Cloning in single stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing.
J. Mol. Bio., 143, 161-178.

SHATKIN, A.L. (1985)

mRNA cap banding proteins : essential factors for initiating translation.
Cell, 40, 223-224.

VANDENHAUTE,J. & DELCOUR, J. (1980)

Biologie moléculaire de la machinerie de synthèse protèique.
1e partie : structure du RNA messager.
Rev. Quest. Sci., 151, 145-181.

YOUNG, R.A. & RONALD, W.D. (1983)

Efficient isolation of genes using antibody probes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1194-1198.

YOUNG, R.A. & RONALD, W.D. (1983)

Yeast RNA polymerase II genes : isolation with antibody probes.
Science, 222, 778-782.

Fascicules de firme :

- AMERSHAM "cDNA cloning system - λgt11."
- AMERSHAM "The biotin - streptavidin system."

ABREVIATIONS UTILISEES

==========

A : Adénine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARNhn : Acide ribonucléique hétérogène nucléaire
BSA : Bovin serum albumine
C : Cytosine
CBP : Cap banding protein
Ci : Curie
cpm : coups par minute
DO : Densité optique
DTT : Dithiotheitol
Exo III : Exonucléase III
g : gramme
G : Guanine
GMP : Guanosine monophosphate
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
IPTG : Isopropyl ß-D-thiogalactopyranoside
kb : kilobase
kD : kiloDalton
M : Molaire
ml : millilitre
mM : millimole
µg : microgramme
µl : microlitre
ng : nanogramme

P : Phosphate
pb : paire de bases
PM : Poids moléculaire
rpm : tours par minute
SAH : S-adénosylhomocystéine
SAM : S-adénosylméthionine
SDS : Sodium dodécyl sulfate
T : Thymine
TCA : Acide trichloroacétique
Temed : Tétraméthyléthyline diamine
U : Unité
VSV : Virus de la stomatite vésiculeuse