



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Clonage et séquençage d'ADNc codant pour des peptides porteurs d'épitopes de la cathepsine C

Bouche, Fabienne

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Clonage et séquençage d'ADNc codant pour des peptides porteurs d'épitopes de la cathepsine C.

BOUCHE Fabienne

Résumé

Deux fragments d'ADNc codant pour des épitopes de la cathepsine C ont été isolés à partir de clones du bactériophage λ gt11, préalablement sélectionnés par criblage immunologique d'une banque d'ADNc de foie de rat. Ces deux fragments dénommés cDAP0.5 et cDAP1.1 sont constitués de 500 et 1100 pb respectivement. Ils ont été sous-clonés dans le vecteur pGEM-3Zf(+) et leur caractérisation entreprise par analyse au moyen d'enzymes de restriction et par séquençage. A partir des données dont nous disposons actuellement, nous pouvons conclure: soit ces deux fragments sont indépendants et proviennent de deux messagers différents et codent pour deux sous-unités de la cathepsine C (18 et 6 KD), soit ils se recouvrent partiellement; cDAP0.5 devra se trouver à l'extrémité distale de cDAP1.1, par rapport au site d'insertion dans le plasmide. Aucune homologie n'a été observée avec les fragments séquencés de la cathepsine B, D, H, L, ni avec la dipeptidylpeptidase IV. Cependant, une forte similarité a été observée entre un segment de cDAP0.5 et un segment de la sous-unité C1s, constituant, avec C1q et C1r, le premier élément de la cascade d'activation du complément.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1991

Promoteur: Professeur S. Wattiaux-De Coninck

Remerciements

J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur R. Wattiaux, pour m'avoir accueillie dans son département, et au Professeur S. Wattiaux-De Coninck pour ses remarques pertinentes et ses encouragements.

J'exprime ma plus profonde gratitude au Docteur F. Mainferme pour la patience et la fermeté avec lesquelles il a su me guider dans mon travail et me faire partager ses connaissances.

Je remercie le Professeur J. Martial et le Docteur F. Rentier pour l'aide précieuse apportée lors de la réalisation de ce travail; le Professeur A. Goffinet et Monsieur I. Becsei qui m'ont permis de réaliser les séquençages.

Mes remerciements vont aussi à O. Laloux pour la disponibilité et l'aide apportée pour l'utilisation du VAX.

Je m'en voudrais d'oublier M. Savels que je remercie pour sa bonne humeur et son aide précieuse dans la réalisation des figures.

C'est du fond du coeur que je remercie mes Parents, Hughes, Hansy, Yohanne et Luc pour leur présence et leur soutien moral; sans eux je n'aurais pu réaliser ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

Table des Matières	1
1. Introduction.....	1
I. Les Lysosomes	1
1. Définition - Aspect général.....	1
2. Fonction biologique.....	2
<i>Fonction hétérophagique, endocytose.....</i>	<i>2</i>
<i>Fonction autophagique, turn-over des constituants cellulaires.....</i>	<i>3</i>
II. Biosynthèse des enzymes de la matrice lysosomale.....	4
1. Synthèse et modification dans le réticulum endoplasmique.....	4
2. Modification dans le Golgi.....	5
3. Récepteurs au mannose-6-phosphate.....	6
III. Voies alternes du transport des enzymes lysosomales.....	7
IV. Aspect génétique et but du travail.....	9
1. Structure de la cathepsine C.....	10
2. Ciblage de la cathepsine C.....	10
3. Expression de la cathepsine C.....	10
4. Criblage immunologique d'une banque d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc).....	11
5. But du travail	13
2. Matériel et Méthodes	14
I. Electrophorèse en gel d'agarose	14
II. Isolement des inserts	15
1. Infection de la souche Y1090 par le bactériophage λ gt11 recombinant pour l'ADNc de foie de rat.....	15
2. Purification du bactériophage λ gt11 par centrifugation en gradient de chlorure de césium (CsCl).....	16
3. Extraction de l'ADN du bactériophage λ gt11 recombinant.....	17
4. Digestion de l'ADN phagique par l'enzyme de restriction Eco RI	17
5. Isolement et purification des inserts d'ADNc.....	17
<i>Membrane de DEAE-cellulose.....</i>	<i>17</i>
<i>Prep-A-Gene®.....</i>	<i>18</i>
III. Sous-clonage des inserts dans le vecteur pGEM-3Zf(+).	19
1. Extraction et purification du plasmide pGEM-3Zf(+).	19
<i>Multiplication de la souche Hb101 d'E.coli.....</i>	<i>19</i>
<i>Extraction par lyse alcaline.....</i>	<i>19</i>
<i>Purification du plasmide par précipitation différentielle au PEG.....</i>	<i>20</i>

2.	Préparation de plasmides pGEM-3Zf(+) pour la ligation	20
	<i>Linéarisation du plasmide par Eco RI</i>	20
	<i>Déphosphorylation du pGEM-3Zf(+)</i>	21
3.	Réactions de ligation.....	21
4.	Transformation des bactéries rr1ΔM15 d'E.coli.....	21
	<i>Préparation des bactéries rr1ΔM15 compétentes</i>	22
	<i>Transformation proprement dite</i>	22
5.	Miniprep de plasmides recombinants	22
IV.	Cartes de restriction.....	23
VI.	Séquençage par la méthode de Sanger.....	23
1.	Préparation de la matrice d'ADN.....	24
	<i>Préparation de la matrice</i>	24
	<i>Annealing reaction</i>	25
2.	Synthèse des oligonucléotides par l'ADN polymérase T7	25
3.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 5%.....	26
VI.	Milieux de culture, tampons et solutions diverses.....	27
1.	Solutions pour les cultures de bactéries.....	27
2.	Tampons et solutions diverses pour la purification du phage et du plasmide.....	28
	<i>Purification du phage et extraction de l'ADN phagique</i>	28
	<i>Purification de l'insert</i>	30
	1. <i>Membrane de DEAE-cellulose (Wathman)</i>	30
	2. <i>Prep-A-Gene® (BioRAD)</i>	30
	<i>Extraction et purification de plasmide</i>	30
3.	Purification d'ADN sur résine Quiagen	31
4.	Tampons d'incubation des enzymes.....	32
	<i>Enzymes de restriction (Boehringer)</i>	32
	<i>Divers</i>	32
5.	Electrophorèse.....	32
6.	Transformation des bactéries.....	33
7.	Séquençage T7 Sequencing Kit (Pharmacia).....	34
8.	Nucléotide triphosphate marqué.....	34
3.	Résultats.....	35
I.	Isolement des inserts	35
1.	Introduction	35
2.	Titre des suspensions de phage et contrôle des clones positifs	35
3.	Miniprep d'ADN des phages λgt11 [multipliés par infection de bactéries Y1090 d'E.coli en boîtes de Pétri (clones A et B)].....	36
	<i>Infection de la souche Y1090 d'E.coli</i>	36

	<i>Purification des phages λgt11 recombinants</i>	36
4.	Purification par centrifugation en gradient de chlorure de césium [des phages λ gt11 multipliés par infection de bactéries Y1090 d'E.coli en milieu liquide (clones A, B, C, D, E)].....	37
	<i>Purification du phage au PEG et CsCl (clones A, B, C, D et E)</i>	37
	<i>Purification du phage λgt11 sur LambdaSorb (clone F)</i>	38
4.	Digestion de l'ADN de phage par Eco RI.....	38
5.	Isolement et purification de cDAP0.5 et cDAP1.1	39
II.	Sous-clonage de cDAP0.5 et cDAP1.1 dans le plasmide pGEM-3Zf(+)	40
1.	Extraction, purification et préparation du plasmide pGEM-3Zf(+) <i>Extraction du plasmide</i>	40
	<i>Linéarisation et déphosphorylation du plasmide</i>	41
2.	Réaction de ligation: plasmide pGEM-3Zf(+)-cDAP0.5 et plasmide-cDAP1.1.	41
3.	Transformation des bactéries rr1 Δ m15 d'E.coli.....	42
4.	Recherche des colonies blanches d'E.coli rr1 Δ M15 dues à une délétion du gène lac Z Δ M15	44
III.	Analyse par restriction des fragments cDAP0.5 et cDAP1.1	45
1.	cDAP0.5.....	46
2.	cDAP1.1	47
IV.	Séquençage des fragments d'ADN	48
1.	cDAP0.5.....	49
2.	cDAP1.1	49
3.	Analyse des séquences en acides aminés	50
IV.	Discussion générale et perspectives.....	50
	Bibliographie.....	53

1. INTRODUCTION

I. Les Lysosomes

1. Définition - Aspect général

Les lysosomes, découverts en 1955 par de Duve & al., constituent une population hétérogène de vacuoles. Celles-ci sont entourées d'une membrane de nature lipoprotéique et imperméable aux substrats intra- ou extra-cellulaires d'un poids moléculaire supérieur à environ 300 Daltons. Les lysosomes sont doués de propriétés osmotiques et contiennent, au sein de leur matrice interne, un assortiment d'hydrolases actives en milieu acide, des protéases, nucléases, glycosidases, lipases, phosphatases et sulfatases, pouvant dégrader un très large éventail de substances biologiques. Le gradient de pH, de part et d'autre de la membrane des lysosomes, ne pouvant être maintenu exclusivement par l'effet Donnan, l'acidité du compartiment lysosomal est assurée par l'activité d'une pompe électrogénique - ATPase localisée dans la membrane lysosomale- qui, par hydrolyse de l'ATP, permet un transport net de protons vers l'intérieur du lysosome.

Morphologiquement les lysosomes sont très hétérogènes. Ainsi, en fonction de leur état et de la nature du matériel internalisé, ils peuvent apparaître sous la forme de vacuoles allant d'environ 0,5 μm de diamètre à une taille supérieure à 1 μm (cas des maladies de surcharge lysosomale où les cellules possèdent des lysosomes engorgés de substrats non digérés s'accumulant suite à une déficience d'activité d'une ou de plusieurs enzymes). Toutefois, au microscope électronique, il est possible de distinguer les lysosomes primaires, secondaires et les corps résiduels.

Les **lysosomes primaires** sont des vésicules d'environ 50 à 100 nm de diamètre, formés par le bourgeonnement de la face trans de l'appareil de Golgi. Les enzymes nouvellement synthétisées qui peuplent ce type de lysosome n'ont encore jamais exercé leur action de digestion.

Les **lysosomes secondaires** proviennent de la fusion de lysosomes primaires soit avec des vacuoles hétérophagiques soit avec des vacuoles autophagiques. Dès lors, les enzymes lysosomales peuvent participer à la digestion en dégradant le contenu de ces vacuoles. Dans ce type de lysosome se trouve donc du matériel à dégrader, en train d'être dégradé ou déjà dégradé.

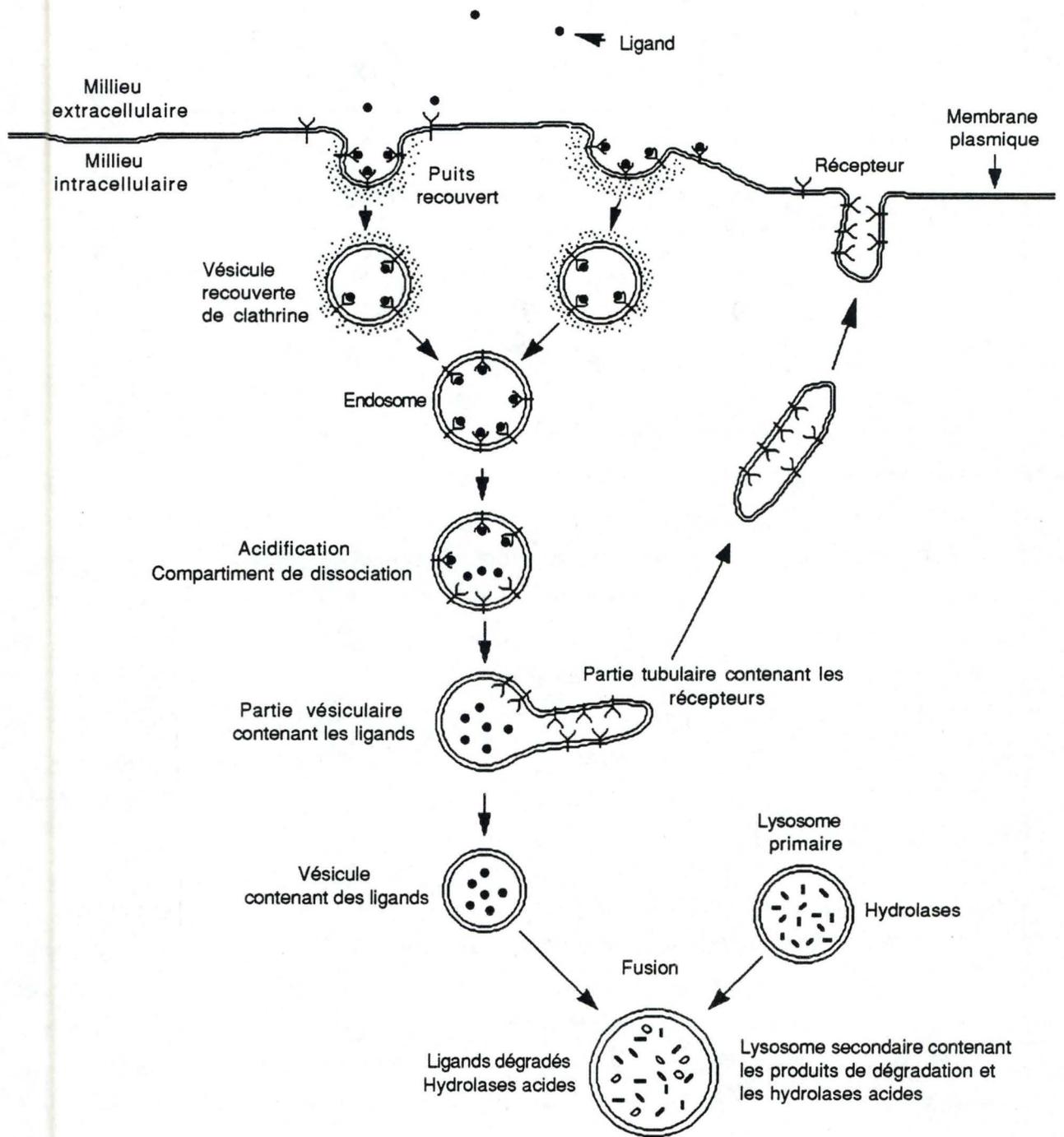


Figure 1. Schéma de l'endocytose médiée par récepteur d'après Dautry-Varsat et Lodish (1984).

Les **corps résiduels**, à contenu souvent hétérogène et apparaissant denses aux électrons, sont des lysosomes se trouvant dans un stade très avancé de digestion. Au sein de ceux-ci on trouve du matériel résistant à la dégradation et des produits de dégradation qui ne peuvent les quitter rapidement. Ces corps résiduels peuvent finalement fusionner avec la membrane plasmique et déverser leur contenu dans le milieu extracellulaire; ce phénomène est cependant assez rare pour les cellules animales [Holtzman E., 1989].

2. Fonction biologique

Les lysosomes constituent le compartiment digestif principal des cellules d'eucaryotes et sont, à ce titre, responsables de la dégradation de matériel extracellulaire internalisé par endocytose (fonction hétérophagique) et de matériel intracellulaire sélectionné par autophagie (fonction autophagique).

Fonction hétérophagique. endocytose

L'endocytose est un phénomène permettant aux cellules d'internaliser à partir du milieu extérieur différents types de composés solubles, des particules de dimensions variables et des gouttelettes de milieu extracellulaire.

Suivant la nature du matériel endocyté, on distingue deux types d'endocytoses :

- la **phagocytose** est un terme réservé à des cellules spécialisées telles que les macrophages et les PMN. Elle consiste en l'ingestion de particules de grandes dimensions telles que bactéries, virus, etc.
- la **pinocytose** est soit fluide soit adsorptive. L'**endocytose fluide** est un processus non sélectif. Des gouttelettes du milieu extracellulaire sont ingurgitées; par conséquent la concentration de substance endocytée est directement proportionnelle à sa concentration dans le milieu.

L'**endocytose adsorptive** peut ou non être médiée par récepteurs. L'**endocytose médiée par récepteurs** est un mécanisme permettant à la cellule de capter et de concentrer les molécules biologiques spécifiques comme par exemple la transferrine ou les lipoprotéines de faible densité (LDL). Ce type d'endocytose joue un rôle important dans la régulation et la nutrition.

Le phénomène d'endocytose (figure 1) débute par l'invagination, à hauteur des diverses substances à ingérer, de régions spécialisées de la membrane plasmique : les *coated pits*. Ceux-ci possèdent du côté cytoplasmique une couche de clathrine - une structure dense aux

électrons - qui par la suite va permettre la formation de *coated vesicles*. Ces dernières se détachent de la membrane plasmique. Sous l'action d'une ATPase, les *coated vesicles* perdent leur manteau (*coat*) de clathrine. Ces vésicules, alors appelées **endosomes**, vont fusionner soit entre elles, soit avec un lysosome. Cependant, dans le cas de l'endocytose adsorptive par récepteur, l'acidification progressive du contenu endosomal provoque la dissociation du récepteur et du ligand. Dès ce moment, les endosomes, constituant ce que l'on appelle alors *Compartment of Uncoupling of Receptors and Ligands* (CURL), forment un prolongement au niveau duquel se rassemblent les récepteurs. Cette fraction de la membrane endosomale est alors renvoyée vers la membrane plasmique, ce qui permet de recycler les récepteurs, tandis que l'endosome fusionne avec un lysosome et y déverse son contenu. Ce dernier, en contact avec les hydrolases acides, est dégradé. Après digestion, le lysosome peut recommencer un cycle de digestion par fusion avec d'autres endosomes. Il peut également évoluer en corps résiduel. Quoi qu'il en soit, les particules de petite taille (acides aminés, sucres et autres monomères) apparues au cours de la digestion et capables de traverser la membrane lysosomale par diffusion passive, facilitée, ou par transport actif, interviendront à nouveau dans le métabolisme cellulaire.

Fonction autophagique. turn-over des constituants cellulaires

L'**autophagie** est le phénomène par lequel une portion de cytoplasme pouvant contenir des organites (mitochondries, ribosomes, RER) est dégradée dans les lysosomes. Par ce phénomène, les lysosomes sont responsables d'une auto-digestion cellulaire, non létale, dans le but de dégrader, selon un turn-over normal, les macromolécules constitutives de la cellule pour les renouveler. Ce phénomène débute par l'invagination d'une membrane non lysosomale (comme par exemple celle du RER ou celle du Golgi) autour d'une région cytoplasmique cible. Une vacuole autophagique ainsi formée peut ensuite fusionner avec un lysosome. La microphagie est le processus par lequel le lysosome s'allonge en s'enroulant autour de fragments d'organite à renouveler.

De par ces deux fonctions biologiques, les lysosomes assurent de nombreux rôles au niveau cellulaire, comme par exemple:

- la nutrition;
- l'ajustement du taux d'hormones circulantes (EGF et facteurs de croissance) et la *down regulation* du taux de récepteurs;
- la lyse cellulaire pendant la différenciation et la métamorphose;
- la destruction des globules rouges âgés et des cellules mortes;
- la kératinisation de la peau;
- la sécrétion d'hydrolase par les spermatozoïdes pour permettre la pénétration de l'ovule lors de la fécondation;
- la résorption de l'os par les ostéoclastes;

II. Biosynthèse des enzymes de la matrice lysosomale

1. Synthèse et modification dans le réticulum endoplasmique

Chez les eucaryotes, la synthèse des protéines de sécrétion, de la membrane plasmique et des lysosomes est amorcée sur les ribosomes du cytoplasme. **Les ribosomes synthétisant ces protéines se lient très rapidement à la membrane du RER.** En effet, la *Signal Recognition Particle* (SRP), une ribonucléoprotéine, se fixe sélectivement sur la séquence hydrophobe de 15 à 30 acides aminés, appelée séquence signal, dès sa sortie du ribosome [Walter & Blobel, 1982].

Non seulement la formation du complexe (ribosome-ARNm-peptide en formation-SRP) bloque la traduction, mais ce complexe se stabilise dans une conformation adéquate et se fixe sur le récepteur-SRP appelé *Docking protein* [Gilmore & al., 1982b] inséré dans la membrane du RER. L'inhibition de la traduction est alors levée. La protéine en formation traverse la double couche lipidique du RER, à travers un canal protéique [Simon & Blobel, 1991] et peut ainsi atteindre la lumière du RER. Le peptide "signal" de la protéine est clivé co-traductionnellement.

La **glycosylation** est une des fonctions biosynthétiques du RER. Aussi, la plupart des protéines séquestrées dans la lumière du RER sont-elles N-glycosylées cotraductionnellement, qu'elles soient destinées au RER même ou transportées vers l'appareil de Golgi, les lysosomes ou la membrane plasmique. Cette étape de glycosylation implique le transfert, en bloc d'un oligosaccharide à haut-mannose préformé, sur

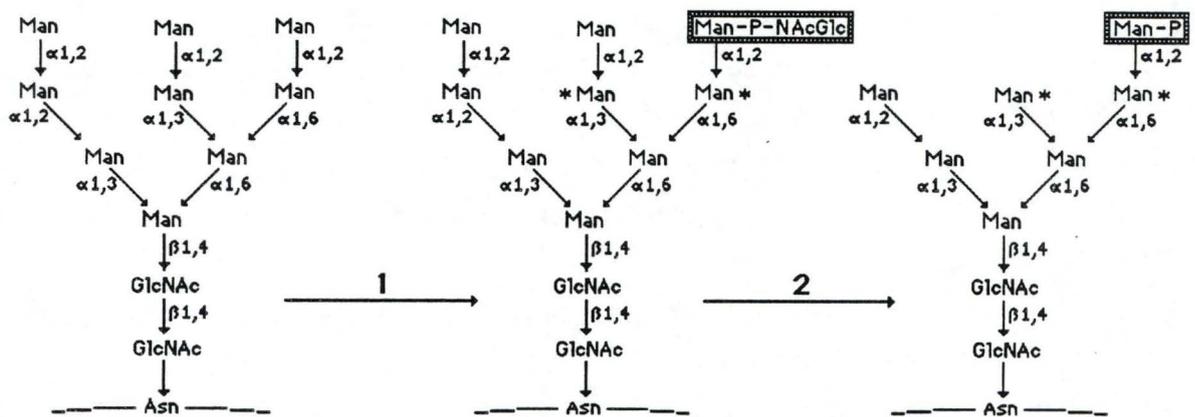


Figure 2. Formation du marqueur mannose-6-phosphate sur les chaînes oligosaccharidiques des précurseurs d'enzymes lysosomales d'après Varki et Kornfeld (1983).

l'asparagine d'une séquence consensus Asn-x-Ser ou Asn-x-Thr. Cet oligosaccharide, composé de 2 résidus N-acétylglucosamine, 9 résidus mannose et 3 résidus glucose, est porté par un intermédiaire lipidique, le dolichol pyrophosphate. Ces chaînes oligosaccharidiques N-liées subissent de profonds remodelages durant leur transit à travers le RER.

Des vésicules formées par bourgeonnement du RER et chargées des produits de biosynthèse fusionnent ensuite avec la face cis du Golgi.

2. Modification dans le Golgi

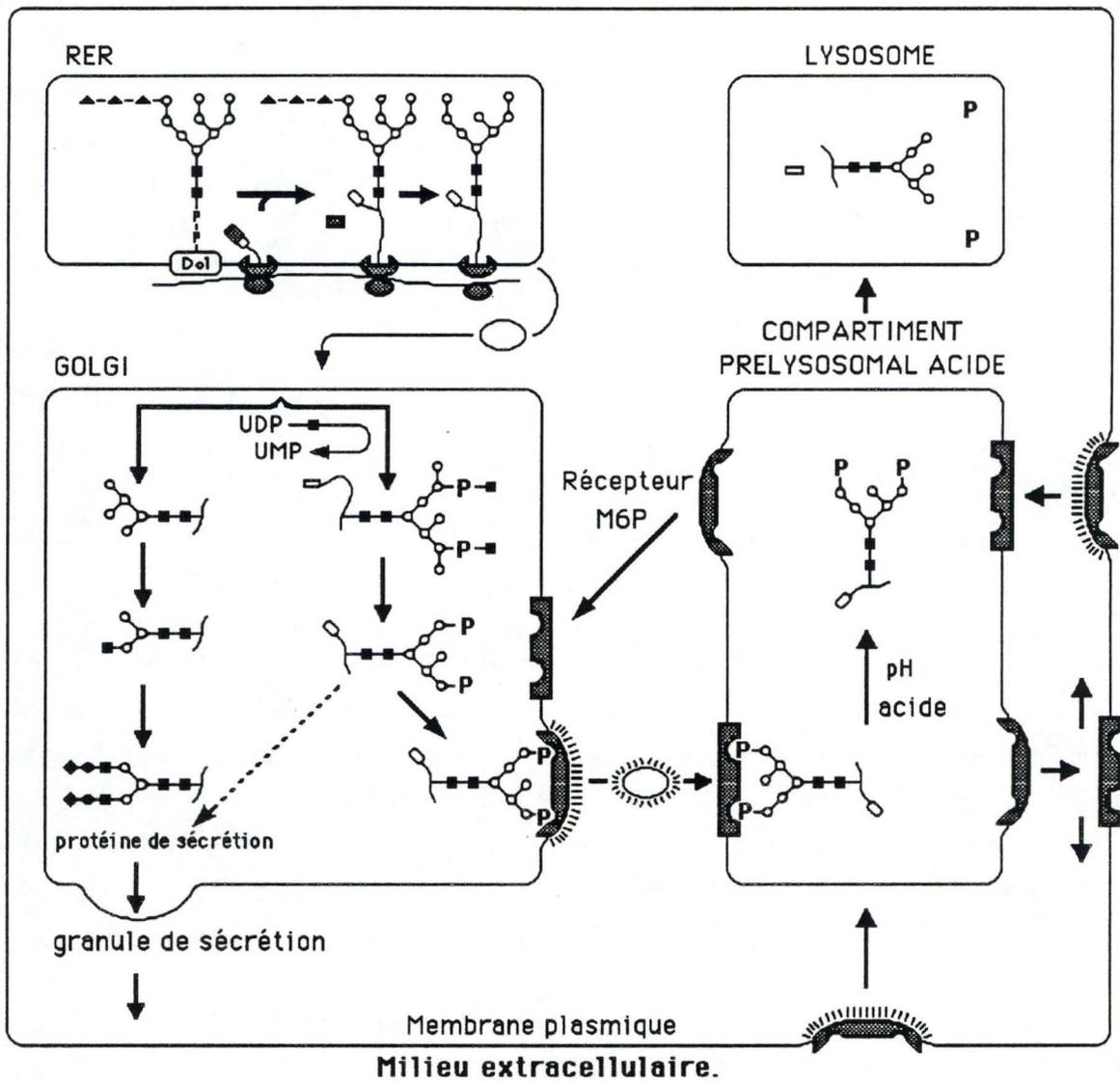
L'appareil de Golgi est un système membranaire élaboré, au sein duquel un certain nombre de modifications des chaînes oligosaccharidiques ont lieu [Farquhar & Palade, 1981]. Tout au long du cheminement à travers l'appareil de Golgi, les oligosaccharides des protéines de sécrétion et de la membrane plasmique sont transformés en oligosaccharides complexes par addition de galactose, d'acide sialique etc. Les précurseurs des enzymes lysosomales acquièrent spécifiquement des **résidus mannose-6-phosphate (M6P)** sous l'action concertée de deux enzymes [von Figura & Hasilik, 1986] (figure 2).

La première, l'UDP-N-acétylglucosamine-enzyme lysosomale transférase fixe une N-acétylglucosamine 1-phosphate sur l'hydroxyle du carbone-6 d'un résidu mannose à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine, formant ainsi un intermédiaire phosphodiester (réaction 1, figure 2).

La reconnaissance spécifique des précurseurs des enzymes lysosomales par la transférase pourrait dépendre plus de leur structure tertiaire que de leur structure primaire. En effet, les enzymes lysosomales dénaturées par une élévation de température, par du SDS, ou clivées par la trypsine, ne servent plus de substrat à la transférase, [Kornfeld & Mellman, 1989].

La seconde enzyme, la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester-N-acétylglucosaminidase hydrolyse le résidu N-acétylglucosamine découvrant ainsi le phosphate. Le marqueur M6P de reconnaissance spécifique des enzymes lysosomales est ainsi formé (réaction 2, figure 2).

L'addition de résidus M6P sur les précurseurs d'enzymes lysosomales revêt une importance capitale puisque **l'interaction entre le M6P et les récepteurs spécifiques du M6P est à l'origine du tri des enzymes lysosomales** parmi les protéines de sécrétion et les protéines destinées à la membrane plasmique, suivant le mécanisme classique proposé par Kornfeld et Mellman (1989) et illustré à la figure 3.



- N-acétyl-glucosamine
- mannose
- ▲ glucose
- galactose
- ◆ acide sialique
- P phosphate
- ⎓ récepteur du M-6-P

Figure 3. Schéma général de la voie de synthèse et de transport des enzymes lysosomales, dépendant du système de reconnaissance au mannose-6-phosphate, vers les lysosomes et des protéines de sécrétion d'après Kornfeld (1987).

3. Récepteurs au mannose-6-phosphate

Actuellement, deux types de récepteurs des résidus M6P sont connus : un récepteur de 215 KD, cation indépendant (MPR-CI), et un récepteur de 46 KD, cation dépendant (MPR-CD).

Les récepteurs M6P sont des glycoprotéines transmembranaires présentant une portion cytosolique d'environ 10 KD. La majeure partie du récepteur est exposée du côté luminal des organites (Golgi, endosome) et du côté externe de la membrane plasmique. Cette portion contient le site de liaison M6P.

Le récepteur de 215 KD, identique au récepteur de l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF-II), est monomérique et possède deux sites de liaison pour le M6P. Par contre le récepteur de 46 KD est dimérique et chaque sous-unité possède un site de liaison [Corvera & al., 1988, Roth & al., 1987].

Ces deux récepteurs sont présents dans le Golgi, les *coated vesicles*, les endosomes jusqu'au niveau du CURL, et sur la membrane plasmique mais non sur la membrane des lysosomes (figure 3).

Le tri et le ciblage vers les lysosomes des précurseurs d'enzymes lysosomales à M6P lié aux récepteurs M6P se font vraisemblablement à hauteur du *Trans-Golgi Network* (TGN). Ce tri se fait via des vésicules recouvertes de clathrine et un complexe de protéines dénommé *HA-I adaptor* constitué de deux polypeptides différents de 100 KD, les adaptines I (HA I), et de deux polypeptides de 47 et 19 KD respectivement [Brodsky, 1988]. Il semblerait que ces vésicules fusionnent avec un compartiment prélysosomal (structure apparentée aux endosomes), où un pH faible faciliterait la dissociation enzyme-récepteur. Les récepteurs sont recyclés soit vers le Golgi pour opérer un nouveau cycle de transfert de précurseurs vers les lysosomes, soit vers la membrane plasmique, ce qui permet de réincorporer une partie des précurseurs sécrétés ayant échappé à la voie normale de tri. Il est à remarquer cependant que bien que tous deux présents à la membrane plasmique, seul le récepteur de 215 KD est capable d'endocyter ces précurseurs. Les endosomes quant à eux poursuivent leur maturation pour finalement fusionner avec les lysosomes. C'est au niveau des endosomes [Brown & al., 1986] que convergent la voie biosynthétique des enzymes lysosomales et la voie d'endocytose.

Les précurseurs des enzymes lysosomales, après avoir atteint les lysosomes, subissent encore des remaniements: élimination du groupement phosphate du M6P, et coupures protéolytiques nécessaires à l'activation de l'enzyme.

III. Voies alternes du transport des enzymes lysosomales

Bien que la reconnaissance du M6P soit importante dans le transport des enzymes solubles lysosomales, d'autres mécanismes de transport indépendants du M6P opèrent sans aucun doute dans certains types de cellules.

C'est le cas notamment des protéines de la membrane des lysosomes (h-Lamp-1, h-Lamp-2, Lep 100, Igp120, Limp I, II, III), constituées d'un domaine luminal, d'un domaine d'insertion transmembranaire ainsi que d'une queue cytosolique [Kornfeld & Mellman, 1989].

Ces protéines sont synthétisées sous forme de précurseurs transmembranaires et transportées vers les lysosomes via le TGN et les endosomes. La partie cytosolique joue un rôle prépondérant dans le ciblage, de par la présence, à une position spécifique, d'un résidu tyrosine. Cette queue cytosolique réagirait avec le complexe *HA-1 adaptor*, qui constitue avec la clathrine le manteau des vésicules recouvertes dérivées du Golgi [Brodsky, 1988].

L'existence de **mécanismes indépendants du M6P pour les enzymes lysosomales solubles** a été postulée pour la première fois chez des patients atteints de la maladie I-cell (mucopolidose II) par Owada et Neufeld, (1982). La phosphotransférase, enzyme clé pour la formation du signal M6P (réaction 1, figure 2), est déficiente et, par conséquent, les enzymes lysosomales dépourvues du M6P sont incapables de se lier aux récepteurs M6P. Dans certains types cellulaires de ces patients, tels que les fibroblastes, les enzymes sont sécrétées dans le milieu extracellulaire plutôt que d'être transportées aux lysosomes. Cependant, dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer, le niveau de quelques enzymes lysosomales est presque normal, alors que ces cellules sont tout aussi déficientes en phosphotransférase.

Waheed et al. (1988) ont montré que dans les cellules BHK transfectées, la **phosphatase acide** (LAP) était synthétisée sous forme d'une glycoprotéine transmembranaire. Celle-ci est munie d'une queue cytoplasmique C-terminale de 18 acides aminés comprenant une tyrosine. Cette tyrosine constitue un signal nécessaire et suffisant, indépendamment du système M6P, pour le transport de la LAP aux lysosomes, via le trans Golgi, la membrane plasmique [Braun & al., 1989] et les endosomes. Au niveau des lysosomes, la LAP est libérée par un processus protéolytique qui implique l'action séquentielle de deux protéases : la première, une thiol protéase, est responsable de l'élimination de la queue cytoplasmique et la seconde, une aspartyl protéase, scinde le domaine membranaire et la partie luminale de la LAP qui correspond à la phosphatase acide active [Gottschalk & al., 1989].

Récemment, Diment et al. (1988) ont rapporté que dans les macrophages de lapin, la **cathepsine D**, enzyme lysosomale soluble, était synthétisée sous forme d'un précurseur inactif associé à des membranes, transformée en précurseur enzymatiquement actif mais toujours associée à une structure membranaire et enfin libérée sous forme soluble et active dans les endosomes.

De même, Bush et al. (1990) ont montré que chez *Dictyostelium discoideum*, cellule eucaryote possédant une vacuole digestive analogue au lysosome, la **phosphatase acide** porte des groupements M6P et ce, en dépit de l'absence de récepteurs M6P.

Ces auteurs suggèrent donc que le transport de ces enzymes lysosomales a lieu suivant un mécanisme faisant appel à une association membranaire momentanée suivie d'un processus protéolytique qui permettrait la libération des enzymes sous forme soluble et active.

Un phénomène analogue a été mis en évidence pour la cathepsine C.

La **cathepsine C**, ou **dipeptidylpeptidase I** (DAP I), est une exopeptidase qui élimine des dipeptides à partir de l'extrémité N-terminale des peptides. L'activité de cette enzyme est maximale si le site de coupure au niveau du substrat contient une arginine. La cathepsine C possède un site catalytique à thiol et requiert des ions Cl^- pour son activité. Actuellement, on sait que cette enzyme est multimérique, et d'après McDonald et al. (1969), elle serait constituée de 8 sous-unités organisées en deux tétramères, ces derniers étant constitués de 3 polypeptides de PM de 18 KD et d'un de 6 KD. Comme on le verra plus loin ces données ne sont pas établies avec certitude.

Mainferme et al. (1985) ont étudié la biosynthèse et le transport intracellulaire de la cathepsine C dans les cellules d'hépatomes 7777 de Morris en culture. Ce type de cellule est dépourvu du récepteur M6P de 215 KD mais possède celui de 46 KD. Dans ce type cellulaire, les précurseurs de la cathepsine C sont synthétisés au niveau du RER sous la forme d'un doublet de polypeptides de 59-61 KD. Environ 30% de ces formes sont sécrétées 3 heures après leur synthèse. Les 70% restants sont transférés, dans un laps de temps de 30 minutes, au Golgi dans lequel des formes intermédiaires de 67-72 KD sont élaborées. Enfin, après 2 à 6 heures coexistent dans les lysosomes une forme intermédiaire de 50 KD ainsi que les formes matures de 18 et 6 KD. Les processus de transport et de maturation sont insensibles au NH_4Cl , ce qui semblerait indiquer que l'arrivée des précurseurs d'enzyme lysosomale aux lysosomes ne requiert **pas** la dissociation d'un **complexe récepteur-ligand** dans un compartiment acide.

Burge et al. (1991) ont pu montrer qu'après un marquage de 5 minutes, les précurseurs de la cathepsine C sont présents dans le RER sous forme de polypeptides de 59-61 KD; la

Temps

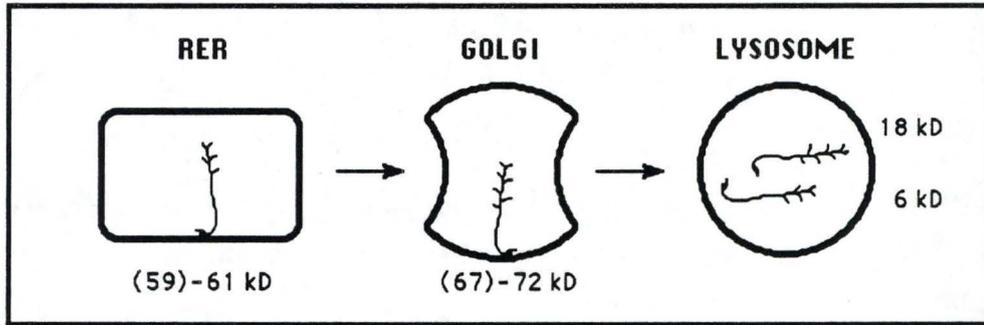
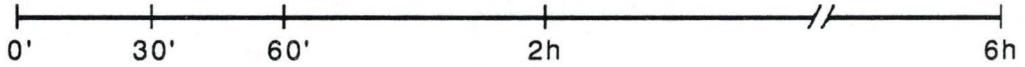


Figure 4. Modèle du transport des précurseurs de la cathepsine C. Ce transport est indépendant du M6P. Les précurseurs se trouvent à l'état membranaire dans le RER, le Golgi (et les endosomes). Les formes matures de l'enzyme sont solubilisées dans les lysosomes.

majeure partie ne sont extraits du RER qu'après traitement au Triton X-100. Ceci traduit une association étroite à la **membrane du RER**.

De 30 à 60 minutes après leur synthèse, on retrouve des intermédiaires de 67-72 KD au niveau de l'appareil de Golgi. Dans ce cas aussi, il faut avoir recours au Triton X-100 pour solubiliser le polypeptide de 72 KD qui est donc également associé à la **membrane**. Ce polypeptide pourrait dériver du 61 KD par adjonction d'oligosaccharides complexes. Ceci sous-entend que les précurseurs de la cathepsine C traversent tout l'appareil de Golgi avant de le quitter à hauteur du TGN.

Deux à six heures après leur synthèse, les polypeptides relatifs à la cathepsine C - représentés par les précurseurs de 72 et 61 KD, l'intermédiaire de 50 KD et par les formes matures de 18 KD et 6 KD - se retrouvent dans les lysosomes et sont tous totalement libérables par choc hypotonique laissant supposer que la libération des formes 59-61 KD et 67-72 KD de la membrane ne modifie que très peu leur poids moléculaire (PM).

A partir de ces données, il a été possible de proposer un mécanisme de transport de la cathepsine C dans les lysosomes des cellules de l'hépatome 7777 de Morris, ne faisant pas intervenir d'interaction entre des résidus mannose-6-phosphate et leurs récepteurs, mais impliquant une association transitoire des précurseurs à la membrane des structures subcellulaires à travers lesquelles ces précurseurs cheminent, suivie d'une libération des formes matures dans la matrice lysosomale par protéolyse (figure 4).

IV. Aspect génétique et but du travail

De plus en plus fréquemment, il est fait appel à des méthodes de génétique moléculaire dans le cadre de l'étude de la biogenèse des lysosomes. Citons, à titre d'exemple (série non exhaustive), les travaux des équipes de Kornfeld sur la structure et le transport du récepteur au M6P [Jonhson & al., 1990], de von Figura sur le transport de la phosphatase acide [Gottschalk & al., 1989], les publications sur l'expression de la cathepsine L dans les fibroblastes normaux et transformés [Stearns & al., 1990], sur la structure et la fonction de la β -glucuronidase [Li & al., 1990], sur la maturation et le transport de la cathepsine D [Horst & Hasilik, 1991] et de la β -hexosaminidase [Quon & al., 1989] et, enfin, sur la structure de polypeptides de la membrane des lysosomes (h-lamp-1, h-lamp-2) [Mattei & al., 1990].

Nous avons également choisi de recourir aux méthodes de génétique moléculaire dans l'étude de la biosynthèse et du transport de la cathepsine C pour les raisons détaillées ci-dessous.

1. Structure de la cathepsine C

A l'heure actuelle, peu de chose sont connues en ce qui concerne la structure de la cathepsine C et les signaux nécessaires à son ciblage correct.

Nous ne disposons notamment d'aucune certitude en ce qui concerne tant la structure protéique que la séquence nucléotidique de la cathepsine C. Cette protéine est décrite comme étant composée de deux tétramères identiques constitués soit de trois sous-unités de 18 KD associées à une sous-unité de 6 KD, soit de quatre sous-unités de 18 KD.

L'origine et (ou) la relation entre ces deux sous-unités n'est pas connue. Il se pourrait que la sous-unité de 6 KD dérive de la forme de 18 KD. Un seul messenger coderait alors pour cette grande sous-unité; un processus protéolytique produirait à partir d'un certain nombre d'entre elles des formes de 6 KD. Il est aussi possible que les deux sous-unités proviennent de deux messagers distincts. Chacun de ces messagers serait issu soit d'un précurseur différent, soit d'un même précurseur remanié par épissage alternatif.

Enfin, comme on ne dispose d'aucune donnée de séquence ni protéique ni nucléotidique, on ne peut établir aucune homologie éventuelle avec d'autres protéines.

2. Ciblage de la cathepsine C

Bien que phosphorylée au niveau d'un résidu mannose, la cathepsine C semble être dirigée vers les lysosomes via un mécanisme particulier, indépendant du M6P, et impliquant une association membranaire transitoire.

Des travaux de mutagenèse dirigée, de fabrication de protéines chimériques pourraient nous fournir des informations quant aux signaux indispensables permettant ce transfert particulier de la cathepsine C.

3. Expression de la cathepsine C

Les recherches dans le domaine de la régulation de l'expression des enzymes lysosomales et de la biogenèse des lysosomes sont peu avancées.

Des modifications dans l'expression d'enzymes lysosomales ont été observées dans certaines transformations malignes. Ainsi, le groupe de Rochefort [Cavailles & al., 1991], a mis en évidence dans des cellules cancéreuses du sein une surexpression et une

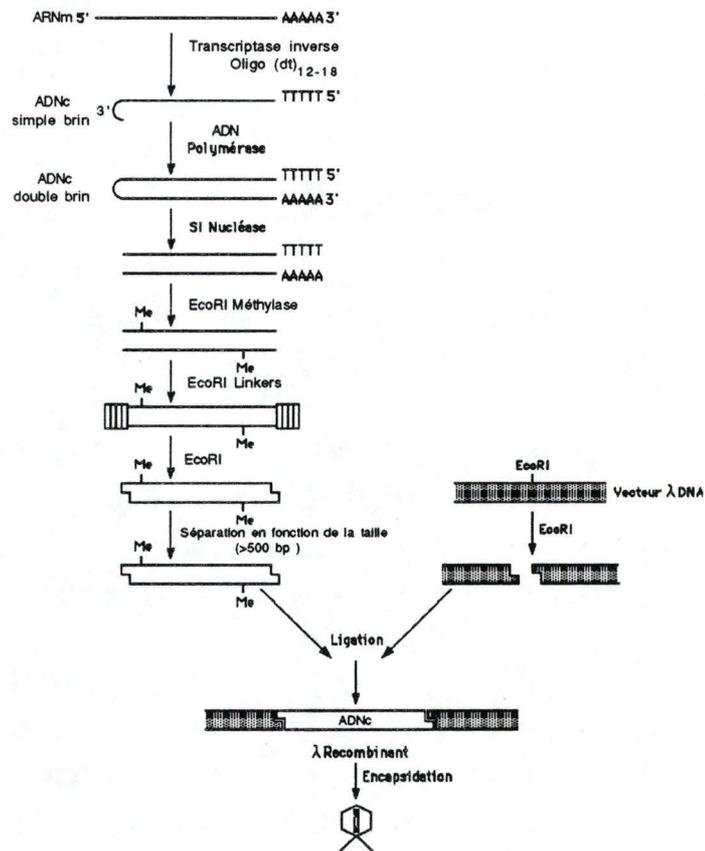


Figure 5. Schéma de la synthèse d'ADNc double brin et clonage dans λ gt11.

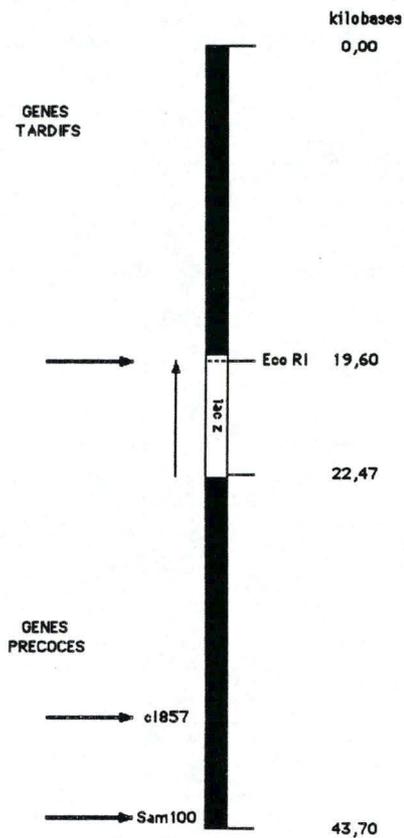


Figure 6. Représentation schématique du génome du bactériophage λ gt11, indiquant la position des mutations Sam100, cl857 et du gène *LacZ*.

hypersécrétion de la cathepsine D. Dans certaines lignées cellulaires, cette surexpression est sous l'influence d'oestrogènes, dans d'autres lignées, elle est constitutive. Dans le premier cas, on a observé un accroissement de l'initiation de la transcription.

Les stimuli physiologiques et particulièrement la phagocytose peuvent moduler la prolifération des lysosomes de macrophages. Un aspect remarquable de ce phénomène réside dans le fait que les différentes enzymes lysosomales sont influencées à des degrés divers par ces stimuli [Cohn & Benson, 1965]. Une approche intéressante dans l'étude de ces processus serait de déterminer les quantités relatives de messagers pour les protéines lysosomales avant et après stimulation.

4. Criblage immunologique d'une banque d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc)

Le point de départ indispensable tant pour l'étude de la structure de la cathepsine C que pour son ciblage ou son expression, nécessite l'isolement d'ADNc de cette protéine. Cet ADNc peut être isolé à partir d'une banque d'ADNc de foie de rat exprimé dans le bactériophage λ gt11.

Une banque d'ADNc de foie de rat dans λ gt11 est construite en utilisant l'ADNc double-brin produit par la transcription reverse des acides ribonucléiques messagers (ARNm) polyadénylés isolés à partir du foie de rat, dans notre cas, suivie de la synthèse par la polymérase des seconds brins, suivant le schéma de la figure 5. La nucléase S1 élimine la région simple-brin qui relie les deux brins synthétisés entre eux. L'ADNc double-brin est ensuite soumis à une méthylation au niveau d'éventuels sites de coupure interne reconnus par l'enzyme de restriction Eco RI, en vue de les protéger. Des Eco RI linkers sont ajoutés aux extrémités de l'ADNc, pour pouvoir insérer ce dernier dans l'unique site Eco RI du bactériophage λ gt11.

Le **vecteur λ gt11** (figure 6) est un bactériophage de 43,7 Kb [Young & Davis, 1983], possédant le gène entier de la β -galactosidase d'E.coli (*lacZ*). C'est du côté C-terminal de ce gène que se trouve l'unique site Eco RI du bactériophage, au niveau duquel seront insérés les différents fragments d'ADNc.

Les inserts présentant un cadre de lecture et une orientation corrects, pourront être exprimés sous forme d'une protéine de fusion avec la β -galactosidase.

Le bactériophage λ gt11 possède les caractéristiques génétiques suivantes: Sam100 (mutation ambre), cl857 (mutation thermosensible).

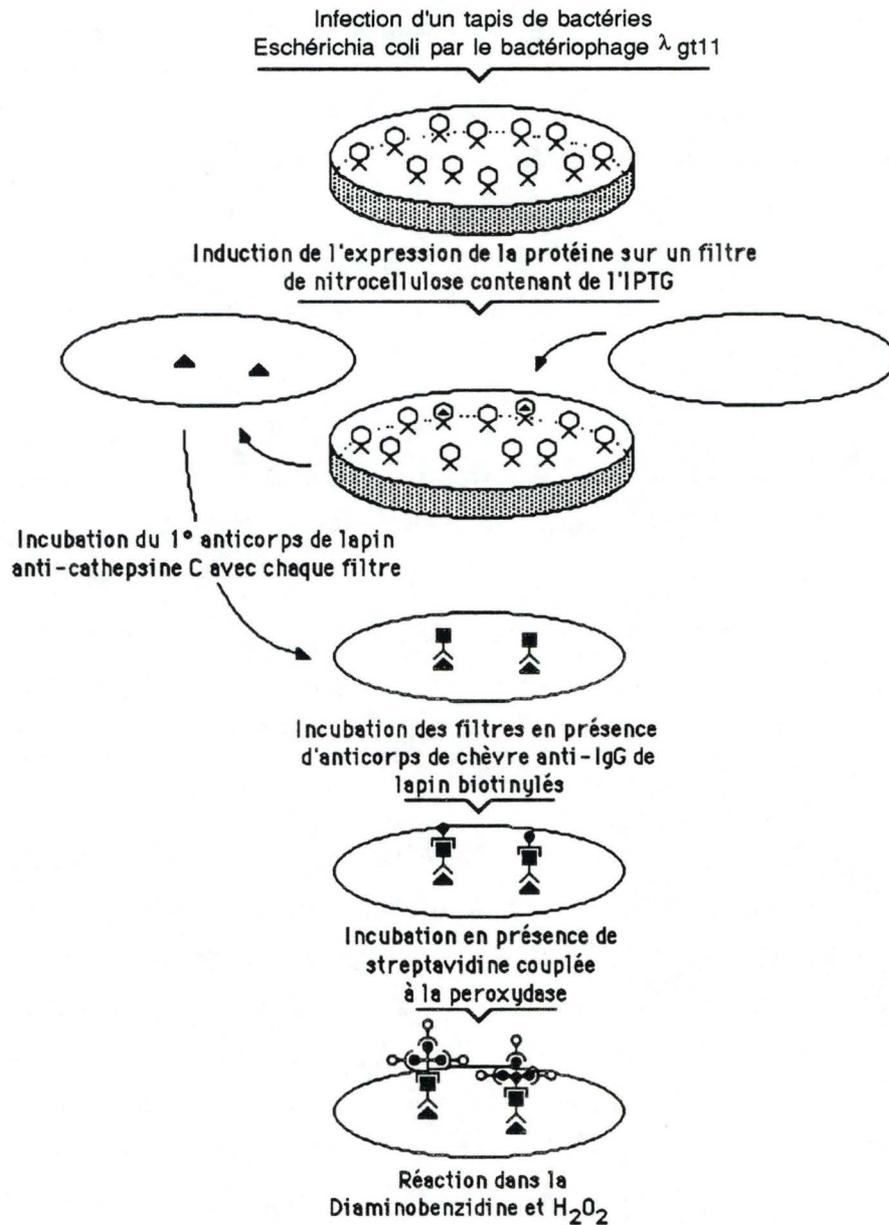


Figure 7. Criblage de la banque d'ADNc de foie de rat, λ gt11, au moyen d'anticorps. Dans notre cas, des anticorps polyclonaux dirigés contre la cathepsine C de foie de rat ont été utilisés.

La mutation *ambre* (**Sam100**) remplace, dans le gène impliqué dans la lyse de la paroi cellulaire de la bactérie (**gène S**), un codon UAU codant pour une tyrosine par le codon *ambre* UAG. L'absence du produit du gène *S* de type sauvage mène à une accumulation de particules phagiques dans les cellules hôtes dépourvues du suppresseur *ambre* *supF*.

Le bactériophage λ gt11 produit un répresseur de la lyse inactif à 42°C suite à la présence au niveau du gène correspondant (**cl**) de la mutation *cl857* thermosensible.

L'emploi de sondes immunologiques spécifiques de la protéine recherchée permet de sélectionner le(s) clone(s) possédant l'ADNc intéressant et exprimant la protéine. Pour la propagation du phage λ gt11 et pour le criblage immunologique, il est recommandé d'utiliser la souche **Y1090 d'E.coli**.

Les caractéristiques génétiques principales de cette souche sont: *supF hsdR Δ lac Δ lon* (pMC9).

Le gène **supF** codant pour un acide ribonucléique de transfert (ARNt) suppresseur de la mutation *ambre* insère une tyrosine au niveau du codon UAG. La mutation **hsdR** affecte la sous-unité *R* de l'enzyme de restriction de type I, *Eco K*. Par cette mutation *Eco K* peut toujours méthyler mais ne peut plus restreindre l'ADN étranger. Cette souche ne porte pas le gène codant pour la *b*-galactosidase (**lacZ**) et est déficiente pour la **protéase lon**, responsable de la faible stabilité des protéines étrangères. La stabilité des protéines de fusion sera donc augmentée.

L'expression d'une protéine de fusion étrangère, entre la β -galactosidase et un polypeptide étranger, est contrôlée, dans ce type de cellule, par un taux élevé du répresseur de l'opéron lactose suite à la mutation *lac^r* au niveau du gène *lac I* de ce répresseur, porté par le plasmide pMC9 de la bactérie; il faut donc un inducteur puissant, l'*isopropylthio- β -D-galactoside* (IPTG) pour induire la transcription de la protéine de fusion.

Le criblage immunologique d'une banque d'ADNc de foie de rat dans λ gt11 a été effectué à l'aide d'anticorps anti-cathepsine C, suivant le principe expérimental décrit à la figure 7.

5. But du travail

Le travail de ce mémoire consiste en la caractérisation des six clones qui se sont révélés positifs par criblage d'une banque d'ADNc de foie de rat dans λ gt11, à l'aide d'anticorps anti-cathepsine C.

Les différents inserts d'ADNc sont sous-clonés dans un vecteur, le pGEM-3Zf(+), permettant le séquençage double-brin.

A partir de là, une carte de restriction des inserts est établie, inserts dont le séquençage est entrepris.

2. MATERIEL ET METHODES

I. Electrophorèse en gel d'agarose

Au cours de ce travail, l'électrophorèse en gel d'agarose a été utilisée aux fins suivantes:

- vérification du bon déroulement de certaines étapes telles que les étapes de purification, d'extraction (qualité de l'ADN), de digestion enzymatique (identification de l'ADN), etc;
- estimation de la concentration de l'ADN obtenu après extraction et/ou purification;
- estimation de la taille de l'ADN;
- purification de fragments d'ADN nécessaires pour les étapes ultérieures.

En général, le tampon utilisé, pour la réalisation des gels d'agarose ainsi que pour la migration, est du TBE 0,5 fois concentré. Cependant, lorsqu'il s'agit de récupérer la bande d'agarose contenant de l'ADN intéressant, ce tampon est alors du TAE 1 fois concentré.

La concentration en agarose des gels d'électrophorèse, 1,2% ou 0,8%, est choisie en fonction de la taille et de la nature des fragments à séparer.

Pour la migration, le courant appliqué reste constant et est de 75 mA sauf lorsqu'il s'agit de purifier de l'ADN correspondant aux inserts, dans ce cas le courant est réglé sur 45 mA.

Après migration, le gel est placé dans un bain de tampon, TBE ou TAE suivant le cas, contenant du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml), pendant 15 minutes

Le bromure d'éthidium a comme particularité de s'intercaler entre les bases superposées de la double hélice d'ADN. Sous UV, cette molécule émet une fluorescence orange correspondant alors à l'emplacement des acides nucléiques. Une photo peut être prise par un appareil Polaroid DS-34. Le film utilisé est du type Polaroid 667, ISO 3000/36°.

La quantité d'ADN est estimée par comparaison de l'intensité de la fluorescence émise par l'échantillon avec celle émise par les échantillons d'ADN du phage λ que l'on fait migrer en parallèle et dont la concentration est connue.

La taille de l'ADN est vérifiée à partir d'étalons. Les étalons sont constitués de fragments de tailles diverses obtenus par digestion appropriée de l'ADN du phage λ ou du plasmide pB322 selon le cas. Le type d'étalon est choisi suivant la taille du fragment étudié.

Les trois étalons de taille que nous avons utilisés sont les suivants:

- étalon de taille 2 (Boehringer): ADN du phage λ digéré par l'enzyme de restriction Hind III (125 à 23 130 pb),
- étalon de taille 3 (Boehringer): ADN du phage λ digéré à la fois par Eco RI et Hind III (125 à 21 226 pb),
- étalon de taille 6 (Boehringer): pBR328 digéré par Bgl I + pBR328 digéré par Hinf I (154 à 2 176 pb).

II. Isolement des inserts

Les techniques sont inspirées du premier volume de Sambrook et al. (1989).

1. Infection de la souche Y1090 par le bactériophage λ gt11 recombinant pour l'ADNc de foie de rat

La souche bactérienne Y1090 d'E.coli infectée par le bactériophage λ gt11 est utilisée lors des criblages immunologiques de banques d'expression ainsi que pour la multiplication du bactériophage [Young & Davis, 1983].

Les six clones λ gt11 recombinants, contenant chacun un insert d'ADNc exprimant un polypeptide reconnu par l'anti-cathepsine C, sont multipliés par infection de la souche Y1090 d'E.coli.

Les bactéries de cette souche sont entretenues (en milieu solide) chaque semaine par ré-étalement de bactéries de la culture précédente sur une nouvelle boîte de Pétri (LB agar pH 7,5 contenant de l'ampicilline 50 μ g/ml de culture). La boîte est incubée durant une nuit à 37°C. Les bactéries sont ensuite conservées à 4°C durant une semaine.

Les bactéries sont rendues **compétentes** pour l'infection en ensemençant 40 ml de milieu de culture liquide, LB medium, contenant 0,2% **maltose**, avec une colonie prélevée sur milieu solide. Le maltose induit l'opéron maltose contenant le gène lamB qui code pour le récepteur du phage λ . La suspension bactérienne ainsi obtenue est ensuite incubée, sous agitation, durant une nuit à 37°C. Le lendemain, la culture est centrifugée à 3 000 rpm pendant 10 minutes (centrifugeuse Sorvall RT6000B). Le culot obtenu est resuspendu dans 10 ml de MgSO₄ 10 mM.

La **concentration en bactéries** de la suspension est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm sachant que 1 DO₆₀₀ = 5 x 10⁸ cellules/ml. Un volume de

5 ml environ de cette suspension bactérienne est placée dans un tube de façon qu'il y ait environ 480×10^8 cellules. Les phages en suspension dans SM sont ajoutés de façon à obtenir une proportion d'un phage pour 200 cellules bactériennes. Ensuite ce mélange est ajouté à 200 ml de milieu de culture liquide (LB medium) contenant du $MgSO_4$ à une concentration de 10 mM, préchauffé à 37°C. L'infection est réalisée à 42°C, température à laquelle le répresseur cl de lyse de λ gt11 est inactif. La lyse bactérienne se produit donc, et cette dernière est suivie au cours du temps par mesure de l'évolution de l'absorbance à 600 nm. Lorsque la valeur de cette dernière est proche de 0,400 DO, l'incubation est arrêtée.

2. Purification du bactériophage λ gt11 par centrifugation en gradient de chlorure de césium (CsCl).

On ajoute à la culture de bactéries lysées de la désoxyribonucléase et de la ribonucléase de pancréas de bovin (1 μ g/ml de culture) afin de digérer les ADN et ARN bactériens sans pour autant attaquer l'ADN phagique protégé par la coque protéique.

On ajoute ensuite du chlorure de sodium (NaCl) à une concentration finale de 1 M pour permettre la désorption des particules phagiques fixées sur les débris bactériens.

Par la suite, les particules phagiques sont précipitées au polyéthylène glycol 8 000 (PEG 8 000) à 10%, et sédimentées par centrifugation à 7 000 rpm au rotor JS7,5 dans la centrifugeuse Beckman J21 durant 10 minutes à 4°C.

Le culot de phages est resuspendu dans SM (8 ml/500 ml de culture). L'élimination du PEG 8 000 et des débris cellulaires résiduels se fait par extraction au chloroforme. Les phages sont ensuite sédimentés une nouvelle fois par centrifugation à 30 000 rpm pendant 1 heure à 4°C (rotor 40 Beckman).

Finalement, les phages sont purifiés par centrifugation isopycnique dans un gradient de chlorure de césium autoformé (2,97 g de CsCl/4,2 g de SM contenant la solution de phage). La centrifugation est réalisée dans le rotor VTi65 Beckman à 50 000 rpm durant 16 heures à 4°C. Les bactériophages s'équilibrent dans la zone de densité du gradient comprise entre 1,45 et 1,50 g/ml. La bande de phage bien visible peut être prélevée à l'aide d'une seringue.

3. Extraction de l'ADN du bactériophage λ gt11 recombinant

Le CsCl résiduel est éliminé, de la préparation purifiée de bactériophages, par dialyse contre du NTM pH 8,0.

La coque protéique des phages est dissociée par traitement, durant 1 heure à 56°C, à la protéinase K (50 μ g/ml), en présence d'acide éthylenediaminetrétraacétique (EDTA) 20 mM pH 8,0 et de sodium dodécyl sulfate (SDS) 0,5%. L'ADN phagique ainsi libéré est alors purifié par une suite d'extractions au phénol:chloroforme. L'ADN se retrouve dans la phase aqueuse supérieure. Celle-ci est ensuite dialysée 2 jours contre du tris-Hcl/EDTA (TE) pH 8,0.

La concentration d'ADN phagique est estimée par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2%.

4. Digestion de l'ADN phagique par l'enzyme de restriction Eco RI

Après divers essais, les conditions de restrictions suivantes ont été retenues.

De 750 à 1500 ng d'ADN phagique sont digérés par Eco RI à raison d'1 unité pour 50 ng d'ADN, en présence de 2 μ l de tampon de restriction 10 fois concentré, le volume final étant de 20 μ l. L'ensemble est ensuite incubé durant 2 heures à 37°C. Au terme de ce temps d'incubation, la réaction est arrêtée par 2 μ l de *Stop Gel Loading Buffer* (SGLB) 10 fois concentré. Une électrophorèse en gel d'agarose à 1,2%, permet, et de vérifier la libération des fragments d'ADNc, et d'estimer leur taille.

5. Isolement et purification des inserts d'ADNc

Pour isoler l'insert à partir du gel d'agarose deux techniques ont été utilisées: membrane de DEAE-cellulose et Prep-A-Gene®.

Membrane de DEAE-cellulose

Avant l'emploi, les membranes de DEAE-cellulose doivent être activées en procédant comme suit:

Les membranes sont placées successivement durant 5 minutes dans une solution d'EDTA 10 mM (pH 8,0) et ensuite dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,5 N. Les membranes sont lavées 6 fois à l'aide H₂O distillée stérile.

Après séparation, par une électrophorèse en gel d'agarose, des fragments d'ADN résultant de la digestion, une incision est pratiquée de part et d'autre de la bande correspondant à l'insert, des feuillets de membrane de DEAE-cellulose y sont insérés. L'électrophorèse se poursuit. La membrane placée en amont prévient toute contamination par de l'ADN de PM supérieur. La membrane en aval, ayant fixé l'insert, est récupérée et subit un lavage par du tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 8,0 (*low-salt wash buffer*). Une fois les contaminants éliminés, l'ADN est élué de la membrane de DEAE-cellulose en élevant la concentration en NaCl du tampon jusqu'à une concentration de 1 M (*high-salt wash buffer*). Afin d'éviter toute perte d'ADN, on vérifie sous UV que la membrane de DEAE-cellulose ne présente plus de fluorescence. La solution d'ADN ainsi éluée est alors soumise à une extraction au phénol:chloroforme. Ensuite, l'ADN est précipité par addition de 2 volumes d'éthanol à 100% à -20°C, en présence d'acétate d'ammonium (NH₄OAc) 2 M. Après centrifugation, le culot est lavé par 1 ml d'éthanol à 70% à -20°C et est finalement redissous dans TE pH 7,6.

Prep-A-Gene®

La matrice de Prep-A-Gene® se présente sous la forme de billes chargées positivement qui retiennent spécifiquement des fragments d'ADN linéaire dont la taille est comprise entre 0,2 et 20 Kb; elles permettent ainsi de purifier ces fragments d'ADN.

Après migration en gel d'agarose des fragments résultants de la digestion par Eco RI, la bande d'agarose contenant l'ADNc est découpée et resuspendue dans 3 volumes de Prep-A-Gene® *binding buffer*. Après une incubation à 50°C de façon à dissoudre l'agarose, on y additionne la matrice Prep-A-Gene® et on garde la mixture à température ambiante durant 10 minutes. Après centrifugation, la matrice de Prep-A-Gene® est rincée avec du *binding buffer* (50 volumes) et ensuite lavée 2 fois avec du Prep-A-Gene® *wash buffer* (50 volumes). Finalement, l'ADNc est élué par resuspension de la matrice Prep-A-Gene® dans du Prep-A-Gene® *elution buffer* (au moins un volume d'*elution buffer* par volume de matrice).

Après purification des inserts, et la quantité et la qualité de l'ADNc obtenu sont vérifiées par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2%.

III. Sous-clonage des inserts dans le vecteur pGEM-3Zf(+)

La préparation des plasmides destinés à recevoir les inserts est calquée sur la méthode explicitée dans le premier volume de Sambrook et al. (1989).

1. Extraction et purification du plasmide pGEM-3Zf(+)

Nous avons reçu du Professeur J. Martial de l'Université de Liège, une souche d'E.coli, Hb101, hébergeant le plasmide pGEM-3Zf(+). Cette souche est habituellement utilisée pour la production à grande échelle de plasmides. La préparation du plasmide a nécessité le passage par les trois étapes suivantes: multiplication, extraction, purification.

Multiplication de la souche Hb101 d'E.coli

Cette première étape consiste à multiplier la souche bactérienne Hb101 d'E.coli, utilisée pour la production à grande échelle du plasmide pGEM-3Zf(+). Ce plasmide présente l'avantage de posséder le marqueur de sélection à l'ampicilline, ce qui confère aux cellules qui l'abritent la résistance à cet antibiotique. De cette manière il nous est donc possible de multiplier sélectivement les bactéries de cette souche, en culture liquide de 500 ml (LB medium) contenant de l'ampicilline (20 µg/ml de culture).

Les bactéries obtenues après 16 heures d'incubation sous agitation à 37°C sont récupérées par centrifugation et le culot est resuspendu dans 100 µl de STE.

Extraction par lyse alcaline

Le culot bactérien lavé est resuspendu à 0°C dans 18 ml de Solution 1 (glucose, Tris-HCl, EDTA), on y ajoute ensuite successivement 2 ml d'une solution de lysozyme (10 mg/ml Tris-HCl 10 mM pH 8,0) fraîchement préparée ainsi que 40 ml de Solution 2 (NaOH, SDS) glaciale de façon à permettre, dans un premier temps la désagrégation par le lysozyme de la paroi et de la membrane externe des bactéries. Dans un second temps, les sphéroplastés résultants sont lysés sous l'action du SDS.

Après lyse des cellules par ce traitement, l'ADN chromosomique, l'ARN, tous deux de haut poids moléculaire, les protéines, les complexes membranaires et le SDS sont précipités par

20 ml de Solution 3. Après centrifugation, le surnageant contenant l'ADN plasmidique de faible PM, l'ARN et éventuellement de l'ADN chromosomique de faible PM est mis en présence d'isopropanol (0,6 volume), pour précipiter ses acides nucléiques.

Ce culot est ensuite lavé par de l'éthanol à 70% et resuspendu dans TE pH 8,0 (environ 3 ml pour 500 ml de culture bactérienne).

Purification du plasmide par précipitation différentielle au PEG

La solution d'acide nucléique obtenue de la sorte est traitée par du LiCl à concentration finale de 2,5 M, afin d'éliminer par précipitation l'ARN bactérien de haut poids moléculaire résiduel.

Après centrifugation, de l'isopropanol est ajouté au surnageant contenant les ADN de faible PM. Après centrifugation, ceux-ci forment un culot qui est lavé par de l'éthanol à 70% à -20°C et redissous dans TE pH 8,0 contenant de la ribonucléase (20 µg/ml de solution) débarrassée, par chauffage, de l'activité désoxyribonucléasique résiduelle [Sambrook & al., 1989]. L'ADN correspondant aux plasmides est précipité par une solution de NaCl 1,6 M contenant 13% (w/v) de PEG 8 000.

Le culot obtenu après centrifugation est redissous dans TE pH 8,0. La solution subit une série d'extractions au phénol:chloroforme. Les plasmides purifiés sont ensuite précipités à l'éthanol à 100% à -20°C.

Le culot formé après centrifugation à la microfuge est lavé avec de l'éthanol à 70% à -20°C, avant d'être redissous dans TE pH 8,0. Une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% est finalement effectuée pour déterminer la pureté et qualité de la préparation de plasmide.

2. Préparation de plasmides pGEM-3Zf(+) pour la ligation

Linéarisation du plasmide par Eco RI

10 µg de plasmide pGEM-3Zf(+) sont digérés par 12 à 24 unités d'Eco RI. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par addition de SGLB 10 fois concentré à raison d'1/10 du volume de la mixture d'incubation. Les produits de la digestion sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8%, pour vérifier l'efficacité de cette étape. Ensuite, l'ADN est extrait au phénol:chloroforme, précipité par de l'éthanol à 100% à -20°C et lavé

par de l'éthanol à 70% à -20°C. Finalement, le culot de plasmide linéarisé est redissous dans du Tris-HCl pH 8,3.

Déphosphorylation du pGEM-3Zf(+)

2 µg de plasmide pGEM-3Zf(+) linéarisés possèdent environ 2,2 pmoles de résidu 5'-terminal phosphate.

Pour éliminer les groupements phosphates des extrémités 5' des ADN linéarisés, on utilise la *Calf Intestinal alkaline Phosphatase* (CIP). Cette enzyme est ajoutée, en présence du tampon CIP 10 fois concentré, à la solution de plasmides linéarisés, à raison de 1 Unité pour 2 pmoles de résidu 5'-phosphate terminal. Le tampon CIP est fourni avec l'enzyme et contient le zinc nécessaire à son activité. Après incubation durant 15 minutes à 37°C, une même quantité de CIP est ajoutée et l'incubation est poursuivie pendant 45 minutes à 55°C. Au terme de cette incubation, la réaction de déphosphorylation est bloquée en inactivant la CIP par chauffage à 75°C en présence d'EDTA 5 mM pH 8,0 durant 10 minutes. L'ADN déphosphorylé est alors purifié par extraction au phénol:chloroforme. Il est ensuite précipité puis lavé à l'éthanol. Le culot d'ADN est finalement redissous, à raison de 50 µg d'ADN/ml de TE pH 7,6.

3. Réactions de ligation

Les mélanges de ligation sont composés comme suit :

- 1 à 2 µl de la solution de plasmide (préalablement chauffée à 45°C durant 5 minutes, dans le but de rompre les liaisons faibles qui auraient pu recirculariser les plasmides),
- 1 à 8 µl de la solution d'ADNc purifié,
- 1 µl de tampon de la ligase T4 10 fois concentré,
- 1 µl d'ATP 10 mM,
- 0,5 unité de ligase T4,

Le volume final de la mixture réactionnelle est porté à 20 µl avec H₂O distillée stérile. L'incubation, à 16°C, dure approximativement 7 heures .

4. Transformation des bactéries rr1ΔM15 d'E.coli

L'ADN recombiné sera transféré dans des bactéries rr1ΔM15 rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium (CaCl₂), en vue de le multiplier, et sélectionner grâce au

test d' α -complémentation. La souche *rr1 Δ M15* d'*E.coli*, fournie par le Professeur J. Martial de l'Université de Liège, possède un épisome *F'* qui porte un fragment C-terminal du gène de la β -galactosidase, nécessaire pour l' α -complémentation.

Préparation des bactéries *rr1 Δ M15* compétentes

On ensemence 50 ml de milieu de culture liquide, avec une suspension bactérienne de la souche *rr1 Δ M15* d'*E.coli* conservée à -70°C . L'évolution de la culture, incubée à 37°C sous agitation, est suivie au cours du temps par augmentation de l'absorbance à 600 nm. Lorsque la valeur de celle-ci est d'environ 0,300, la culture est mise à froid, pour arrêter la multiplication et éviter l'altération des bactéries en début de phase logarithmique.

Les bactéries récupérées par centrifugation sont lavées à 0°C par du CaCl_2 0,1 M. Après centrifugation, le culot de bactéries est finalement resuspendu dans du CaCl_2 0,1 M.

Transformation proprement dite

Aux 20 μl de solution de ligation (cfr. 3. Réactions de ligation), on ajoute 175 μl de *transforming buffer* et 100 μl de cellules *rr1 Δ M15* compétentes. La suspension est maintenue durant 15 minutes à 0°C , puis portée à 42°C pendant 3 minutes.

Ensuite on ajoute 700 μl de SOC et la solution est incubée à 37°C sous agitation, pour permettre aux bactéries de se multiplier. Après 1 heure, l'entièreté du volume (1 ml) de chaque suspension de bactéries est étalée, à raison de 100 μl par boîte, sur des boîtes de Pétri contenant du LB agar pH 7,5 additionné d'ampicilline à 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, et sur lequel du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) (20 mg/ml, 40 $\mu\text{l}/\text{boîte}$) et de l'IPTG (200 mg/ml, 4 $\mu\text{l}/\text{boîte}$) ont été étalés. Ces boîtes sont incubées à 37°C durant une nuit.

5. Miniprep de plasmides recombinants

Les colonies sélectionnées sur les boîtes de Pétri vont servir à ensemercer 2 ml de milieu LB medium contenant de l'ampicilline (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le lendemain, après incubation à 37°C sous agitation, 1,5 ml de la culture serviront à la réalisation des minipreps d'ADN par la méthode de la lyse alcaline décrite dans le premier volume de Sambrook et al. (1989).

Les bactéries sont dès lors sédimentées par centrifugation et le culot formé est lavé par 500 μl de STE et resuspendu dans 100 μl de Solution 1 à 0°C .

200 μ l de Solution 2 fraîchement préparée ainsi que 150 μ l de Solution 3 sont ajoutés à la suspension conservée à 0°C, .

Après 5 minutes à 0°C, la suspension est centrifugée à 4°C. Le surnageant est soumis à une extraction au phénol:chloroforme.

L'ADN double-brin est ensuite précipité par 2 volumes d'éthanol à 100% à -20°C. Après centrifugation, le maximum de liquide est éliminé et le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 70% à -20°C. Le culot est finalement redissous dans TE pH 8,0 contenant de la ribonucléase débarrassée, par chauffage, de l'activité désoxyribonucléasique résiduelle.

IV. Cartes de restriction

Pour les cartes de restriction, des colonies hébergeant des plasmides recombinants ont été multipliées. A partir de celles-ci, on a réalisé des minipreps de plasmide qui ont ensuite été purifiées sur une colonne de Quiagen. Ces dernières sont finalement soumises, durant 4 heures à 37°C à une série de digestions par les enzymes de restriction suivantes: Eco RI, Bam HI, Hind III, Pvu I, Xba I, en présence de leur tampon respectif, dans un volume final de 10 μ l. La réaction est stoppée avec 1 μ l de SGLB 10 fois concentré. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2%.

VI. Séquençage par la méthode de Sanger

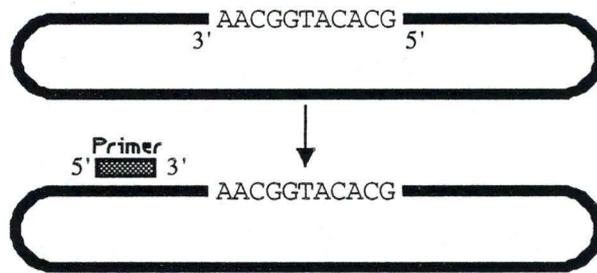
Le principe de cette technique consiste à synthétiser de façon partielle et séquentielle un fragment d'ADN complémentaire à un ADN simple-brin à partir d'une origine connue.

On met en jeu l'action de l'ADN polymérase T7 en utilisant comme matrice un brin d'ADN simple et comme amorce un *primer*, c'est-à-dire un oligonucléotide précurseur d'une région du vecteur située en amont du site d'insertion du fragment à séquencer, en présence des quatre nucléotides triphosphates normaux dont l'un est marqué radioactivement: dGTP, (α -³⁵S)dATP, dTTP, et dCTP.

On réalise en fait, quatre réactions différentes de synthèse d'ADN; chacune d'entre elles contient environ 20% d'un des quatre didéoxynucléotides triphosphates.

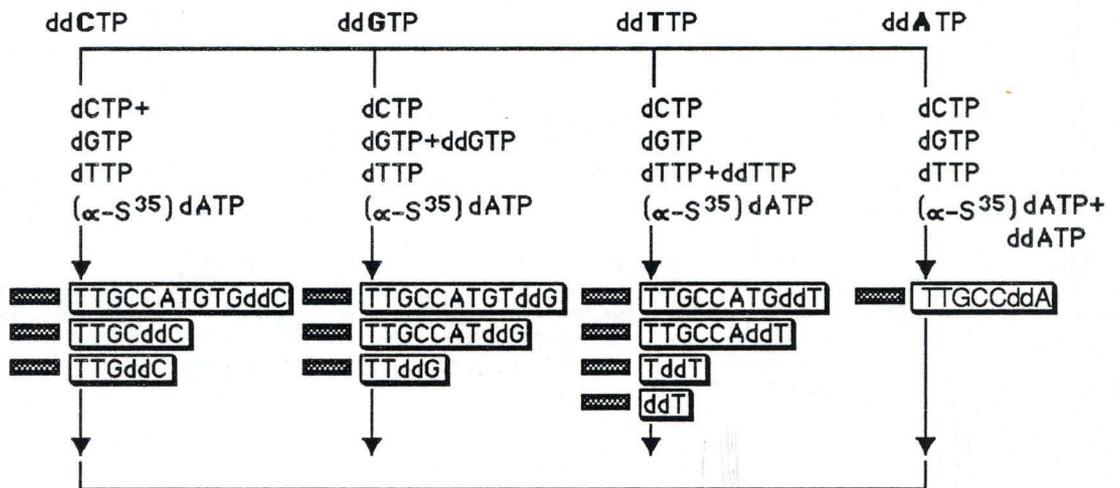
Par conséquent, une fois sur cinq, l'ADN polymérase ne pourra pas accrocher de base suite à l'insertion préalable d'un didéoxynucléotide. La duplication s'arrête puisqu'en position 3' du didéoxynucléotide il n'y a pas de groupement -OH.

Réaction d' hybridation

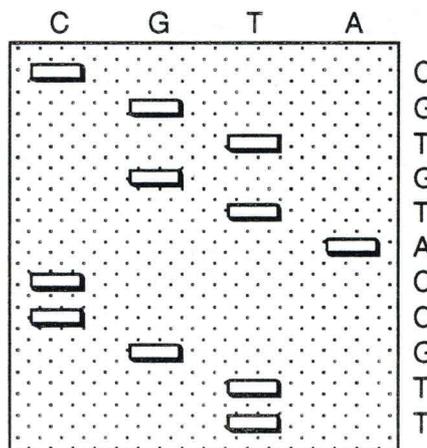


ADN polymérase T7

Réactions de séquençage.



Electrophorèse et autoradiographie.



Lecture de la séquence:
5' TTGCCATGTGC 3'

Figure 8. Principe de la technique de séquençage par la méthode enzymatique de Sanger.

L'ensemble des fragments produits par les quatre réactions est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide, suivi d'une autoradiographie. Il est ensuite facile de lire la séquence complémentaire synthétisée en commençant par le plus petit fragment en bas du gel et en changeant de ligne, si nécessaire, pour trouver le fragment suivant.

Le principe de cette méthode est illustré à la figure 8.

1. Préparation de la matrice d'ADN

Préparation de la matrice

Il faut, dans un premier temps, dénaturer l'ADN double-brin de façon à dissocier les deux brins et permettre au primer de se fixer sur l'un de ceux-ci de sorte que les réactions de séquençage puissent avoir lieu.

Nous effectuons chaque fois un séquençage à partir d'une miniprep de plasmide recombinant passée sur une colonne Quiagen-tip-5. La solution d'ADN obtenue contient au moins 2 µg d'ADN.

- Une colonne de Quiagen-tip-5 est équilibrée avec 1 ml de tampon QB, ensuite une miniprep de plasmide est appliquée sur la colonne.
- Celle-ci, ayant fixé les plasmides, est lavée 2 fois avec 1 ml de QC.
- L'ADN est finalement élué avec 1 ml de tampon QF.
- Les plasmides sont alors précipités avec 0,5 volume d'isopropanol, et sédimentés par centrifugation à 4°C durant 30 min.
- Le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 70% à -20°C. Après une seconde centrifugation, le culot de plasmide est séché à l'air et redissous dans TE pH 8,0.

Pour dénaturer la matrice double-brin, on ajoute 0,25 volume de NaOH 2 M et on incube durant 10 minutes à température ambiante.

On ajoute successivement 0,3 volume de NaOAc 3 M (pH 4,8), 0,7 volume d'H₂O distillée, 3 volumes d'éthanol à 100% à -20°C. Cette solution est mélangée et placée durant 15 minutes dans un bain d'alcool refroidi par de la carboglace. L'ADN précipité est récupéré par centrifugation à la microfuge durant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70% à -20°C, séché et resuspendu dans 10 µl d'H₂O distillée.

Annealing reaction

A 10 μ l d'ADN dénaturé, 2 μ l d' *annealing buffer* ainsi que 2 μ l contenant 0,8 μ M de *primer* universel ou de *primer reverse* (4,44 μ g/ml) sont ajoutés. La solution est incubée à 37°C durant 20 minutes de façon à permettre au *primer* de se lier à la matrice d'ADN.

La solution est ensuite placée à température ambiante durant environ 30 minutes.

2. Synthèse des oligonucléotides par l'ADN polymérase T7

Après annealing, on ajoute 3 μ l de Labelling Mix (dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ l de dATP α S³⁵ (10 μ Ci) et 2 μ l de la polymérase T7 diluée 5 fois de façon à obtenir 1,5 unité/ μ l. Cette solution est incubée durant 5 minutes à température ambiante pour permettre le prémarquage de tous les brins d'ADN en formation.

La solution est ensuite répartie à raison de 4 μ l dans une série de 4 tubes eppendorf contenant respectivement 2,5 μ l d'un des 4 Mix-Short préchauffés au moins une minute à 37°C.

'G' Mix-Short: ddGTP en solution avec dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

'A' Mix-Short: ddATP en solution avec dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

'T' Mix-Short: ddITP en solution avec dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

'C' Mix-Short: ddCTP en solution avec dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

Les mixtures sont à nouveau incubées durant 5 minutes à 37°C.

Pour terminer la réaction, 5 μ l de *stop solution* sont ajoutés à chaque tube.

3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 5%

Pour un volume final de 100 ml la composition du gel est la suivante:

Produits	Quantités
urée	43,77 g
TBE 10 fois concentré	20 ml
solution d'acrylamide 38% -2% bis-acrylamide	12,5 ml
TEMED	62 μ l
Persulfate d'ammonium (10%)	624 μ l
H ₂ O distillée. ad	100 ml

Les gels ont une dimension de 31 x 38,5 cm et sont coulés au moins une heure avant l'emploi.

Après dénaturation durant 2 minutes à 80°C, on charge côte à côte sur le gel de polyacrylamide préchauffé, 2,5 μ l de chacun des quatre échantillons. La migration est effectuée durant 2h30 à 1700 V, 37 mA, 60 W.

Un deuxième dépôt des mêmes échantillons à nouveau dénaturés de la même façon est ensuite effectué. Le *run* le plus long (premier dépôt) permet la séparation des fragments d'ADN de plus grande taille et qui par conséquent migrent à une vitesse plus lente que ceux de faible taille. Ces derniers sont séparés lors du second *run* (deuxième dépôt) pour lequel le temps de migration est de 1h30. Les fragments de taille élevée s'accumulent au début du gel ne pourront être séparés dans ces conditions.

Après migration, le gel est fixé, dans un bain de méthanol 10%-acide acétique 10%, puis séché. Dès lors, il peut être placé dans une cassette pour autoradiographie en présence d'un film Kodak X-Omat-AR, durant une nuit. Après développement du film, la séquence peut être lue par passage successif d'une piste marquée à l'autre.

VI. Milieux de culture, tampons et solutions diverses

1. Solutions pour les cultures de bactéries

LB Medium (Luria-Bertani Medium)

Par litre:

Bacto-tryptone (Difco)	10	g
Bacto-Yeast extract (Difco)	5	g
NaCl (Merck)	10	g

Le pH est ajusté à 7,5.

Stérilisation par autoclavage.

LB Agar pH 7.5

Par litre:

Bacto-tryptone	10	g
Bacto-Yeast extract	5	g
NaCl	10	g
Agar (Difco)	15	g

Le pH est ajusté à 7,5.

Stérilisation par autoclavage.

SOC Medium

Par litre:

Bacto-tryptone	20	g
Bacto-Yeast extract	5	g
NaCl	0,5	g
KCl (Merck)	0,186	g

Le pH est ajusté 7,0.

Après une stérilisation par autoclavage, on ajoute 20 ml de glucose (Merck) 1 M stérile par litre de solution.

Ampicilline (Sigma)

Solution stock à 50 mg/ml.

Stérilisation par passage sur filtre Millipore 0,22 μ .

Maltose (Merck)

Solution stock à 20 g/100 ml.

Stérilisation par passage sur filtre Millipore de 0,22 μ .

Isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) (Bachem)

Solution stock à 200 mg/ml.

Stérilisation par passage sur filtre Millipore de 0,22 μ .

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) (Sigma)

Solution stock à 20 mg/ml diméthylformamide (Janssen Chimica).

Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck)

Solution stock de 10 mM.

Stérilisation par autoclavage.

2. Tampons et solutions diverses pour la purification du phage et du plasmide

Purification du phage et extraction de l'ADN phagique

Désoxyribonucléase de pancréas de bovin (Boehringer)

Solution stock à 1 mg/10 ml.

Ribonucléase de pancréas de bovin (Boehringer)

Solution stock à 1 mg/10 ml.

Polyéthylène glycol 8 000 (PEG 8 000) (Aldrich-Chemie)

Directement ajouté en poudre aux solutions.

SM

Par litre:

NaCl	5,8	g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Merck)	2	g
Tris-HCl 1 M pH 7,5 (Janssen Chimica)	50	ml
Solution de gélatine 2% (Sigma)	5	ml

Stérilisation par autoclavage.

Chlorure de césium (CsCl) (Janssen Chimica)

2,97 g de CsCl/42 g de suspension phagique dans SM.

NTM pH 8.0

NaCl	10	mM
Tris-HCl pH 8,0	50	mM
MgCl ₂ (Merck)	10	mM

Protéinase K (Sigma)

Solution stock à 1 mg/ml.

Sodium dodécyl sulfate (SDS) (Janssen Chimica)

Solution stock à 10%.

Tris-HCl/EDTA (TE) pH 8.0 ou 7.6

Tris-HCl pH 8,0 ou 7,6	10	mM
EDTA pH 8,0 ou 7,6	10	mM

Purification de l'insert

1. Membrane de DEAE-cellulose (Whatman)

Low-salt wash buffer

Tris-HCl pH 8,0	50	mM
NaCl	0,15	M
EDTA pH 8,0 (Janssen Chimica)	10	mM

High Salt Buffer

Tris-HCl pH 8,0	50	mM
NaCl	1	M
EDTA pH 8,0	10	mM

2. Prep-A-Gene® (BioRAD)

Binding buffer

Tris pH 7,5	50	mM
EDTA pH 7,5	1	mM
NaClO ₄	6	M

Wash Buffer

Tris pH 7,4	40	mM
EDTA pH 7,4	4	mM
NaCl	0,8	M

Elution Buffer

Tris pH 8,0	10	mM
EDTA pH 8,0	1	mM

Extraction et purification de plasmide

STE

NaCl	0,1	M
Tris-HCl pH 8,0	10	mM
EDTA pH 8,0	1	mM

Solution 1

Glucose	50	mM
Tris-HCl pH 8,0	25	mM
EDTA pH 8,0	10	mM

Lysosyme (Sigma)

Solution stock à 10 mg/ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

Solution 2

NaOH (Merck)	0,2	N
SDS	1	%

Solution 3

Acétate de potassium 5 M (Merck)	60	ml
Acide acétique glacial (Fluka)	11,5	ml
H ₂ O	28,5	ml

Chlorure de lithium (LiCl) (Janssen Chimica)

Solution stock de 5 M.

Ribonucléase débarrassée de désoxyribonucléase

Cette solution est préparée en dissolvant de la ribonucléase de pancréas de bovin, à la concentration de 10 mg/ml, dans du Tris-HCl 10 mM pH 7,5 et du NaCl 15 mM. La solution est chauffée durant 15 minutes à 100°C puis refroidie à température ambiante.

3. Purification d'ADN sur résine QuiagenQB

NaCl	750	mM
Acide 4-morpholinepropane-sulfonique	50	mM
Ethanol (pH 7,0)	15	%

QC

NaCl	1,0	M
Acide 4-morpholinepropane-sulfonique	50	mM
Ethanol (pH 7,0)	15	%

QF

NaCl	1,2	M
Acide 4-morpholinepropane-sulfonique	50	mM
Ethanol (pH 8,0)	15	%

4. Tampons d'incubation des enzymes

Enzymes de restriction (Boehringer)

Tampon Enzyme	2-mercapto- éthanol (mM)	Dithio- érythritol (mM)	MgCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	pH ca	Tris-HCl (mM)	unités/μl
Bam HI	1	-	5	100	8,0 (37°C)	10	8 à 12
Eco RI	-	1	10	100	7,5 (37°C)	50	8 à 12
Hind III	1	-	5	100	8,0 (37°C)	10	8 à 12
Kpn I	-	1	10	-	7,5 (37°C)	10	8 à 12
Pvu I	-	1	10	100	7,5 (37°C)	50	1 à 20
Xba I	-	1	10	100	7,5 (37°C)	50	8 à 12

Divers

Tampon de la Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) (pH 8,5) 10 fois concentré (Boehringer)

Tris-HCl	500	mM
EDTA	1	mM

Tampon de la ligase à ADN du phage T4 10 fois concentré (Boehringer)

Tris-HCl	660	mM
MgCl ₂	50	mM
Dithioérythritol	10	mM
Adénosine triphosphate	10	mM

5. Electrophorèse

TBE: 5 fois concentré

Par litre:

Tris Base	54	g
Acide borique (Merck)	27,5	g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20	ml

TAE 50 fois concentré

Par litre

Tris Base	242	g
Acide acétique glacial	57,1	ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	100	ml

Agarose (USB)

% d'agarose	volume du gel en ml	quantité d'agarose en mg	type de solvant (0,5 fois concentré)
1,2	30	360	TBE
1,2	50	600	TAE ou TBE
0,8	30	240	TBE

Stop Gel Loading Buffer (SGLB) 10 fois concentré

Glycérol	50	% (v/v)
EDTA	0,1	M
SDS	1	% (w/v)
Bleu de bromophénol (Merck)	0,1	% (w/v)

Le pH est ajusté à 7,5.

Bromure d'éthidium (Sigma)

Solution stock à 10 ml/ml.

6. Transformation des bactériesTransforming Buffer

Tris-HCl pH 7,4	10	mM
MgCl ₂	10	mM

Chlorure de calcium (Merck)

Solution stock de 0,1 M.

Stérilisation par autoclavage.

7. Séquençage T7 Sequencing Kit (Pharmacia)

Parmi les réactifs de séquençage de ce *kit*, on utilise:

'A' Mix-Short

'C' Mix-Short

'G' Mix-Short

'T' Mix-Short

ADN polymérase du phage T7

Enzyme Dilution Buffer

Universal Primer

Annealing Buffer

Labelling Mix-dATP

Stop Solution

8. Nucléotide triphosphate marqué

(α - ^{35}S) dATP α S : > 37 TBq/mmol (Amersham)

3. RESULTATS

I. Isolement des inserts

1. Introduction

A l'aide d'un polysérum anti-cathepsine C, six clones positifs ont été sélectionnés dans une banque d'ADNc de foie de rat dans λ gt11. Les fragments d'ADN complémentaire sont insérés au sein du gène de la β -galactosidase.

En présence d'un inducteur, ces six phages ont exprimé une protéine de fusion constituée d'un fragment de la β -galactosidase et d'un polypeptide reconnu par les anticorps anti-cathepsine C. Ces six clones positifs sont appelés respectivement A, B, C, D, E et F. Le clone A et la série de clones B, C, D, E, F sont issus de deux clones indépendants positifs lors d'un premier criblage (Mainferme, 1990).

2. Titre des suspensions de phage et contrôle des clones positifs

Avant d'entamer la purification d'inserts à partir de phages positifs, il a été jugé utile, d'une part, de déterminer le titre de chaque suspension phagique, afin de calculer les dilutions adéquates à réaliser pour la propagation ultérieure des phages dans *E.coli*, et d'autre part, de vérifier que les clones positifs possédaient effectivement un ADN recombinant.

Le titre des suspensions phagiques est de 77, 158, 16, 2, 6, 4 x 10⁸ pfu (plaque forming unit) par 100 μ l, pour les clones A, B, C, D, E et F respectivement.

En second lieu, nous avons vérifié que les clones positifs étaient effectivement **recombinants**.

Si l'on infecte la souche Y1090 d'*E.coli*, *lac*⁻, au moyen du bactériophage λ gt11 en présence d'IPTG, inducteur de la β -galactosidase et du X-gal substrat de l'enzyme, les plages de lyse apparaissent bleues suite à la libération, par hydrolyse du substrat incolore, du produit X de couleur bleue.

L'insertion d'un fragment d'ADN étranger au site Eco RI situé à l'extrémité-3' du gène de la β -galactosidase, (cfr. "introduction") a pour effet d'inactiver la β -galactosidase. Les bactériophages recombinants peuvent donc être reconnus par leur incapacité à former des plages de lyse colorées. Ce contrôle consiste à infecter, en milieu solide, des bactéries de la souche Y1090 d'E.coli par les 6 clones de phage λ gt11 recombinant ainsi que par du phage λ non recombinant, en présence d'ampicilline, d'IPTG et de X-Gal. Après incubation durant une nuit à 42°C, nous avons observé que la totalité des plages de lyse sont blanches pour les boîtesensemencées de bactéries infectées par l'un des 6 clones de phages positifs et que 100% des plages de lyse sont bleues pour les boîtes avec des bactéries infectées par le phage λ non recombinant. Ceci confirme bien que les clones détectés immunologiquement par criblage sont des clones recombinants contenant un fragment d'ADN étranger.

3. Miniprep d'ADN des phages λ gt11 [multipliés par infection de bactéries Y1090 d'E.coli en boîtes de Pétri (clones A et B)]

Les premières infections bactériennes ont été réalisées sur des boîtes de Pétri d'un diamètre de 90 mm, à partir des suspensions phagiques A et B selon la méthode décrite dans le premier volume de Sambrook et al.(1989).

Infection de la souche Y1090 d'E.coli

Les bactéries ont été rendues **compétentes pour l'infection** par multiplication préalable à 37°C en milieu liquide (LB medium) contenant 0,2% de **maltose**. Ce dernier induit l'opéron maltose qui contient le gène lamB, codant pour le récepteur du phage λ .

1×10^5 particules phagiques de la suspension **A** ou **B** ont servi à infecter 1×10^{10} bactéries Y1090, étalées sur deux boîtes de Pétri. Après une nuit d'incubation à 42°C, les boîtes sur lesquelles se sont formées des plages de lyse sont lavées par du SM durant 5 heures sous agitation.

Purification des phages λ gt11 recombinants

La suspension de phage est ensuite récupérée, les bactéries présentes dans les suspensions sont lysées par addition de chloroforme. Les débris bactériens engendrés sont sédimentés par centrifugation. Les phages sont ensuite précipités par addition de polyéthylène glycol (PEG) suivant la technique détaillée dans "Matériel et Méthodes". Les phages sont traités à la

protéinase K, en présence de SDS et l'ADN est purifié par une série d'extractions au phénol:chloroforme et ensuite précipité par l'éthanol.

Dans certains cas, l'ADN ainsi obtenu a été purifié sur une colonne de Quiagen. Celle-ci, consiste à faire passer de l'ADN phagique provenant de 4 boîtes de Pétri, sur une colonne de Quiagen (Quiagen-tip-5) chargée positivement. L'ADN retenu sur la colonne est élué puis précipité à l'éthanol (cfr. "Matériel et Méthodes"). Les quantités d'ADN obtenues de la sorte ont été jugées trop faibles; de plus cet ADN s'est révélé insensible à la restriction par Eco RI. Nous avons dès lors décidé de produire le phage par culture lytique des bactéries Y1090, en milieu liquide et de le purifier par centrifugation en gradient de chlorure de césium.

4. Purification par centrifugation en gradient de chlorure de césium [des phages λ gt11 multipliés par infection de bactéries Y1090 d'E.coli en milieu liquide (clones A, B, C, D, E)]

Pour envisager le sous-clonage, il faut disposer de 100 ng environ d'inserts. La taille moyenne des fragments de la banque d'ADNc est d'environ 1,1 Kb ce qui représente à peu près 2,5% de la taille totale du phage λ gt11 (43,7 Kb selon Young et Davis 1983). Il faut par conséquent disposer d'environ $100 \text{ ng} \times (100/2,5) = 4 \text{ } \mu\text{g}$ d'ADN de phage recombinant.

Purification du phage au PEG et CsCl (clones A, B, C, D et E)

La souche Y1090 d'E.coli a été infectée par les clones positifs **A, B, C, D et E** en milieu liquide. L'infection se fait dans les proportions telles qu'il y ait 1 phage pour 200 bactéries, le nombre de cellules au départ étant de 480×10^8 dans un volume de 400 ml de milieu LB medium. La culture se fait à 37°C, sous agitation. L'évolution de la lyse est suivie, au cours du temps, par la mesure de l'absorbance à 600 nm. Tout d'abord, la valeur de la densité optique de la culture croît en parallèle avec la multiplication cellulaire jusqu'à une valeur de 1,3 environ. Ensuite, après 3 heures d'incubation, comme la lyse cellulaire prend le pas sur la multiplication, les valeurs d'absorbance diminuent progressivement. Lorsque ces dernières se situent aux environs de 0,300, la culture et la lyse sont arrêtées en abaissant la température à 0°C. Les débris bactériens sont précipités par centrifugation et le surnageant de phages (environ 400 ml) est traité au PEG ce qui provoque la précipitation des phages. Après centrifugation, les phages sont resuspendus dans SM et à nouveau sédimentés par centrifugation au rotor 40 durant une heure à 30 000 rpm, afin d'éliminer le PEG résiduel. Les phages resuspendus dans SM sont ensuite purifiés par centrifugation en

gradient de CsCl (cfr. "Matériel et Méthodes"). La bande de densité comprise entre 1,45 g/ml et 1,50 g/ml, est visible et correspond aux phages. Elle est récupérée à l'aide d'une seringue.

Purification du phage λ gt11 sur LambdaSorb (clone F)

Une purification des phages du clone F a été effectuée au moyen du LambdaSorb (Promega). Le LambdaSorb est un adsorbant spécifique du phage λ . La matrice est constituée par l'association de cellules de *Staphylococcus aureus* sur lesquelles ont été fixés des anticorps polyclonaux de lapin, dirigés contre le bactériophage λ .

L'infection s'est faite suivant le protocole énoncé en "3. Purification"; toutes les proportions étant diminuées de moitié. L'isolement du phage se fait par addition de 0,1 ml d'adsorbant par aliquot de 10 ml de surnageant de phage (200 ml au total). L'ADN phagique peut être immédiatement purifié du complexe précipité par une série d'extractions au phénol:chloroforme. Ces extractions sont suivies d'une précipitation à l'éthanol en présence d'acétate d'ammonium 2,5 M.

Grâce à la spécificité du procédé, les étapes de purification au PEG et au CsCl décrites plus haut peuvent être omises.

Clone	μ g tot. ADN
A	593
B	66
C	249
D	37
E	93
F	3

Tableau 1: Quantité (en μ g) d'ADN de bactériophage λ gt11 recombinant obtenue après purification. La purification est réalisée par précipitation au PEG et centrifugation en gradient de CsCl pour les clones A, B, C, D, E et par la méthode du Lambdasorb, pour le clone F.

4. Digestion de l'ADN de phage par Eco RI

A partir des préparations purifiées d'ADN phagique, divers essais ont été réalisés afin de déterminer les conditions optimales de restriction par Eco RI. Les variables prises en compte sont la durée d'incubation, la concentration en enzymes et la quantité d'ADN phagique.

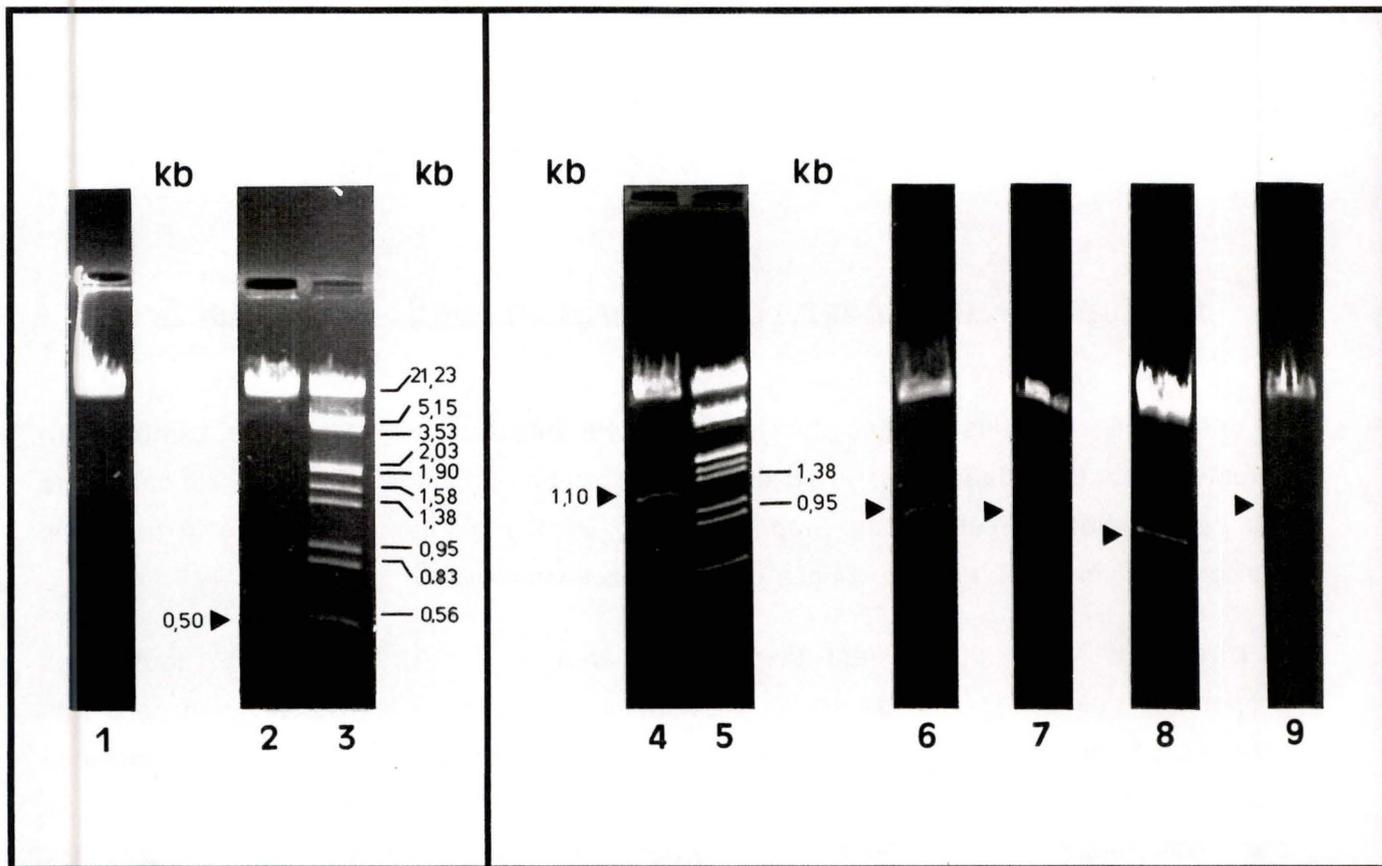


Figure 9. Electrophorèse en gel d'agarose à 1,2% de l'ADN phagique des clones A, B, C, D, E et F digéré par l'enzyme de restriction Eco RI.

Piste 1: ADN phagique du clone A non soumis à l'action digestive d'Eco RI.

Piste 2, 4, 6, 7, 8 et 9: ADN phagique des clones A, B, C, D, E et F respectivement, digéré par Eco RI.

Piste 3 et 5: ADN du phage λ digéré par Eco RI et Hind III (étalon de taille 3).

Les conditions de digestion par Eco RI les plus adéquates sont reprises ci-dessous:

- 750 ng à 1500 ng d'ADN de phage λ gt11,
- 1 unité d'enzyme Eco RI pour 50 ng d'ADN,
- 2 μ l de tampon d'incubation 10 fois concentré,
- H₂O ad 20 μ l,
- 2 heures d'incubation à 37°C.

La figure 9 reproduit les résultats de la digestion par Eco RI de l'ADN purifié à partir des 6 clones. Les pistes 2, 4, 6, 7, 8 et 9 correspondent aux fragments obtenus après digestion, par Eco RI, de l'ADN des clones phagiques A, B, C, D, E, et F respectivement. L'ADN du phage λ coupé par Eco RI et Hind III (pistes 3 et 5) a servi d'étalon de taille allant de 125 à 21 226 pb. Par comparaison avec les étalons, on constate que la restriction par Eco RI du clone A (piste 2) fournit un fragment de 0,5 Kb, et que la restriction des 5 autres clones (pistes 4, 6, 7, 8 et 9) libère un fragment de 1,1 Kb. Les bandes plus intenses observées au-dessus des gels correspondent aux deux extrémités phagiques de 19,5 Kb et 24,2 Kb. La piste 1 est chargée d'ADN phagique incubé dans les conditions de restriction mais en l'absence d'enzyme Eco RI. Une seule bande est présente, l'ADN de phage n'ayant pas été scindé.

On peut donc conclure à ce stade que le clone A et la série des clones B, C, D, E et F provenant de deux clones positifs différents à un premier criblage fournissent deux ADNc de taille différente de 0,5 Kb et 1,1 Kb respectivement.

Comme ces fragments d'ADN sont produits à partir d'une banque d'ADNc et qu'ils codent pour des peptides immunologiquement apparentés à la cathepsine C ou dipeptidylpeptidase I (DAP I), la terminologie suivante sera utilisée pour désigner ces fragments:

cDAP0.5 pour l'insert de 0,5 Kb

cDAP1.1 pour l'insert de 1,1 Kb.

5. Isolement et purification de cDAP0.5 et cDAP1.1

L'isolement et la purification des inserts cDAP0.5 et cDAP1.1 ont été entrepris en vue de leur sous-clonage ultérieur. Des réactions de restriction sur les clones A (cDAP0.5) et C (cDAP1.1) ont été réalisées sur une plus grande échelle. Le volume des mixtures ajusté à 160 μ l contient 10 et 5 μ g d'ADN phagique pour le cDAP0.5 et pour le cDAP1.1 respectivement. Cette quantité d'ADN phagique doit permettre de récupérer, après digestion par Eco RI, au moins 100 ng de cDAP0.5 ou de cDAP1.1; soit 1,1% et 2,5% de la taille des phages A et C. Après digestion, l'ADN est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 1,2% durant une heure.

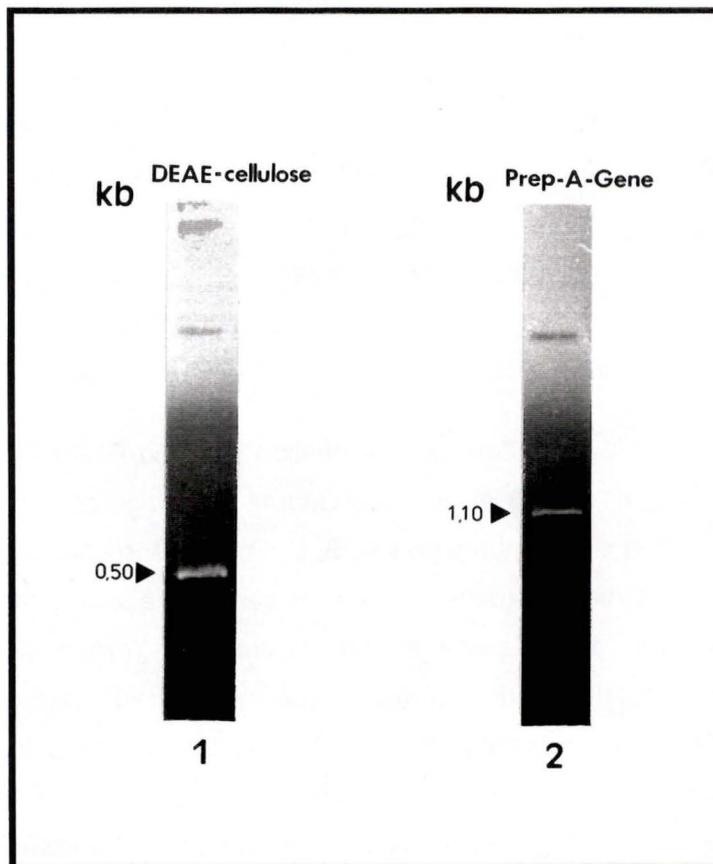


Figure 10. Electrophorèse en gel d'agarose à 1,2% du cDAP0.5, purifié par la méthode de la membrane de DEAE-cellulose et du cDAP1.1 purifié par la méthode du Prep-A-Gene®

Piste 1: cDAP0.5 issu du clone A et purifié par la méthode de la membrane de DEAE-cellulose.

Piste 2: cDAP1.1 issu du clone C et purifié par la méthode du Pre-A-Gene®.

Les inserts d'ADNc sont ensuite extraits et purifiés soit par la méthode utilisant la membrane de DEAE-cellulose (clone A) soit au moyen de la technique du Prep-A-Gene® (clone C) (cfr. "Matériel et Méthodes"). La récupération des inserts purifiés est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2%. La figure 10 montre les résultats d'un tel contrôle. La bande de la piste 1 correspond à l'insert cDAP0.5, extrait et purifié par la méthode de la membrane DEAE-cellulose; la piste 2 au cDAP1.1 extrait et purifié par la technique du Prep-A-Gene®.

Nous pouvons considérer que les deux techniques d'isolement de l'insert produisent des rendements sensiblement équivalents, mais pour des raisons pratiques, les isolements ultérieurs d'inserts ont été réalisés au moyen du Prep-A-Gene®.

II. Sous-clonage de cDAP0.5 et cDAP1.1 dans le plasmide pGEM-3Zf(+)

Nous avons choisi de sous-cloner cDAP0.5 et cDAP1.1 dans le plasmide pGEM-3Zf(+); en effet, ce plasmide permet à la fois de réaliser le séquençage double brin de l'insert qu'il contient de même que sa transcription *in vitro* par l'ARN polymérase T7 ou SP6. Ce vecteur dérive du plasmide pUC qui lui-même dérive du pBR322; ce dernier possède de part et d'autre du site multiple de clonage le promoteur dont dépendent les ARN polymérases T7 ou SP6.

Ce plasmide pGEM-3Zf(+) est un vecteur double-brin d'une taille de 3199 pb possédant le gène de résistance à l'ampicilline et un site multiple de clonage dans lacZ. Ce plasmide est hébergé dans la souche bactérienne Hb101 d'E.coli.

1. Extraction, purification et préparation du plasmide pGEM-3Zf(+)

Extraction du plasmide

En vue de produire une grande quantité de plasmides pGEM-3Zf(+), nous avons multiplié les bactéries de la souche Hb101 d'E.coli en milieu de culture liquide, d'un volume de 500 ml, contenant de l'ampicilline. Après une nuit d'incubation sous agitation à 37°C, les plasmides ont été extraits par lyse alcaline et purifiés par précipitation différentielle au PEG (cfr. "Matériel et Méthodes").

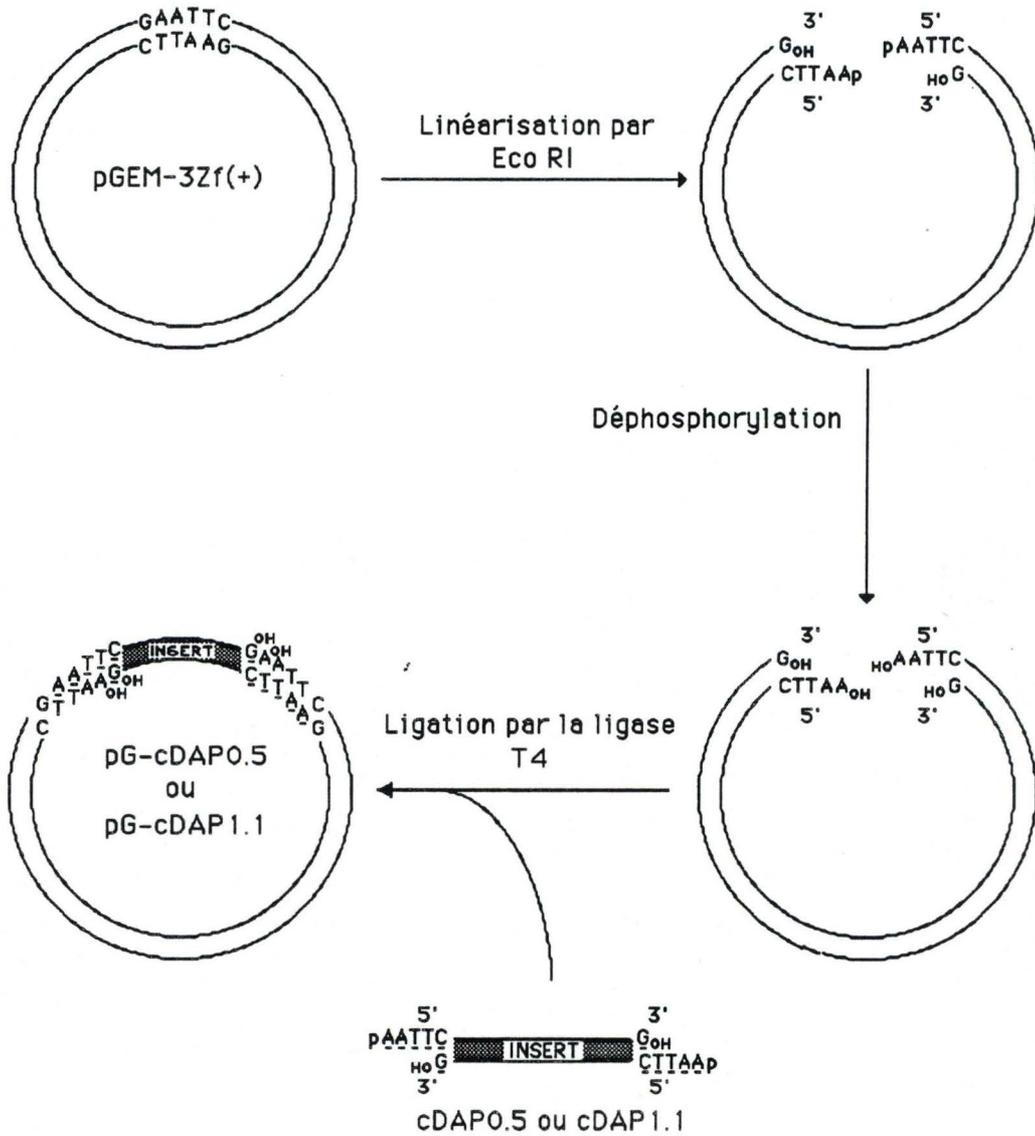


Figure 11. Schéma de principe illustrant la méthodologie employée pour sous-cloner les fragments cDAP0.5 et cDAP1.1 dans le vecteur pGEM-3Zf(+).

Lorsque les cellules de la souche Hb101 d'E.coli sont lysées par du SDS ou par chauffage, elles libèrent beaucoup d'hydrates de carbone. La présence de ces hydrates de carbone, contaminant la préparation de plasmides peut avoir un effet inhibiteur sur les enzymes utilisant l'ADN comme substrat, dont les enzymes de restriction. C'est pourquoi la méthode de lyse par chauffage est à proscrire lorsque l'on effectue des préparations à grande échelle de plasmides pGEM-3Zf(+). De plus, la souche Hb101 exprime l'endonucléase A (*end A*⁺) qui risque de ne pas être entièrement inactivée lors du chauffage; ceci aurait pour conséquence possible, la dégradation du plasmide suite à la présence d'ions Mg⁺⁺ dans les divers tampons utilisés ultérieurement. C'est pour ces raisons que la lyse alcaline a été retenue.

Linéarisation et déphosphorylation du plasmide

L'ensemble des opérations suivantes qui ont mené au sous-clonage des fragments d'ADNc est illustré à la figure 11. Une fois purifié, le plasmide a été linéarisé par Eco RI puis soumis à une déphosphorylation par la *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP) au niveau des groupements 5'-P. Cette dernière opération vise à éviter, lors de la réaction de ligation ultérieure, la recircularisation du plasmide sur lui-même avant l'intégration d'un insert.

La vérification de l'état du plasmide a été effectuée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8%, dont on voit l'illustration à la figure 12. Par comparaison de la migration du plasmide avec l'étalon de taille 3 (fragments de 125-21 226 pb) (piste 2), on constate qu'il s'agit bien d'une molécule linéaire de 3199 pb.

2. Réaction de ligation: plasmide pGEM-3Zf(+)-cDAP0.5 et plasmide-cDAP1.1.

Après purification de cDAP0.5 et cDAP1.1 et conditionnement du plasmide pGEM-3Zf(+), des réactions de ligation par la ligase à ADN du bactériophage T4 ont été réalisées. Cette enzyme catalyse la formation d'un lien phosphodiester entre l'extrémité 3'-hydroxyl du plasmide et l'extrémité 5'-phosphate de l'insert. Le plasmide résultant de cette ligation possède une coupure par brin au niveau de l'extrémité-5' déphosphorylée du plasmide.

Trois réactions de ligation ont été réalisées durant 7 heures à 16°C et leurs produits utilisés pour transformer la souche rr1ΔM15 d'E.coli.

Réaction 1: **plasmide linéarisé non déphosphorylé**; ce plasmide peut se recirculariser sans avoir intégré d'insert.

Réaction 2: **plasmide linéarisé déphosphorylé + ADNc** (cDAP0.5 ou cDAP1.1); ce plasmide ne pourra se recirculariser qu'en présence d'un insert. En effet, comme

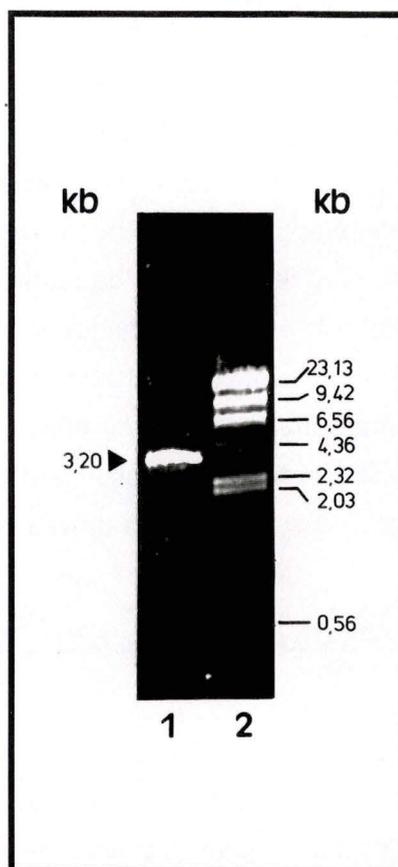


Figure 12. Electrophorèse en gel d'agarose à 0,8% du plasmide pGEM-3Zf(+) linéarisé et déphosphorylé.

Piste 1: pGEM-3Zf(+) digéré par Eco RI et dephosphorylé.

Piste 2: ADN du phage λ digéré par Hind III (étalon de taille 2).

chaque extrémité du plasmide comporte un groupement hydroxyl (5'-OH et 3'-OH), seules les extrémités 3'-OH du plasmide (une par brin) pourront former un lien phosphodiester avec les extrémités 5'-P de l'insert.

Ces deux types de plasmides produits par ces deux réactions seront capables de transformer la souche rr1ΔM15 d'E.coli et de ce fait de lui conférer la résistance à l'ampicilline.

Réaction 3: **plasmide linéarisé déphosphorylé**; ce plasmide, dont toutes les extrémités 5'-OH et 3'-OH, sont libres ne peut se recirculariser et ne peut donc ni transformer la souche bactérienne rr1ΔM15 d'E.coli, ni lui conférer la résistance à l'ampicilline. Ce test permet de contrôler l'efficacité de la déphosphorylation.

3. Transformation des bactéries rr1Δm15 d'E.coli

Le plasmide non déphosphorylé (réaction 1), le plasmide déphosphorylé contenant les inserts de 0,5 kb ou de 1,1 kb (réaction 2), le plasmide déphosphorylé sans insert (réaction 3), ont été mis chacun en présence de 200 μl de suspension de bactérie rrΔm15 d'E.coli rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium en vue de la transformation.

Une préculture est effectuée en inoculant, au moyen d'un anneau, des bactéries rrΔm15 conservées à -70°C dans 10 ml de milieu de culture liquide (LB medium). L'incubation a lieu, sous agitation, durant une nuit à 37°C. 1 ml de cette suspension bactérienne sert àensemencer 50 ml de milieu de culture liquide (LB medium). La multiplication des bactéries de la culture est arrêtée lorsque la valeur de l'absorbance de celle-ci, à 600 nm est aux environs de 0,300. Les bactéries sont ensuite sédimentées par centrifugation et le culot bactérien est resuspendu puis lavé par un solution de CaCl₂ 0,1 M (cfr. "Matériel et Méthodes").

Comme indiqué plus haut, seules les bactéries transformées par le plasmide non déphosphorylé ou le plasmide recombinant (réactions 1 et 2) seront résistants à l'ampicilline. Les bactéries transformées au moyen du plasmide issu de la réaction 3 ne pourront croître dans un milieu avec de l'ampicilline. C'est bien ce qui ressort du tableau 2, reprenant l'inventaire des colonies résultant d'une transformation où l'on compte un nombre important (>100) de colonies transformées par les produits de la réaction 1, un nombre non négligeable de colonies transformées par les produits de la réaction 2 ainsi que quelques colonies pour la réaction 3.

Type d'ADNc	pGEM-3Zf(+)	colonies bleues	colonies blanches
cDAP0.5 Réaction 2	Linéarisé Déphosphorylé	6	1
		6	1
		4	1
		6	1
		13	1
		17	2
		10	1
		11	1
		3	2
		6	1
		12	2
		11	3
cDAP1.1 Réaction 2	linéarisé déphosphorylé	4	1
		7	1
		7	2
		3	1
		4	1
		6	1
		6	3
		4	2
		12	1
?	1		
- Réaction 1	linéarisé non déphosphorylé	>100	0
- Réaction 3	linéarisé déphosphorylé	5	0

Tableau 2 : Résultats de la transformation de la souche rr1ΔM15 d'E.coli par les différentes réactions de ligation. Les deux dernières colonnes renseignent le nombre de colonies présentes sur chaque boîte. Les colonies bleues ne contiennent pas l'insert, les colonies blanches sont supposées le contenir.

Dès ce moment, il reste encore à distinguer, parmi les bactéries transformées, celles qui contiennent le plasmide non recombinant de celles qui contiennent le plasmide recombinant. On réalise pour cela un test d' α -complémentation.

Le plasmide pGEM-3Zf(+) dérive du plasmide pUC. Ce dernier exprime un peptide de 146 acides aminés (peptide α) correspondant aux 146 acides aminés situés à l'extrémité N-terminale de la β -galactosidase. Certains mutants bactériens tel qu'E.coli rr1ΔM15, produisent une β -galactosidase inactive car tronquée et dépourvue d'un fragment correspondant à ce peptide α ; ces bactéries forment des colonies blanches en présence de l'inducteur IPTG et du substrat chromogénique X-gal. Cependant, le peptide α , fourni par un vecteur peut s'associer au fragment tronqué de la β -galactosidase de la bactérie pour reconstituer une enzyme active et produire des colonies bleues en présence d'X-gal.

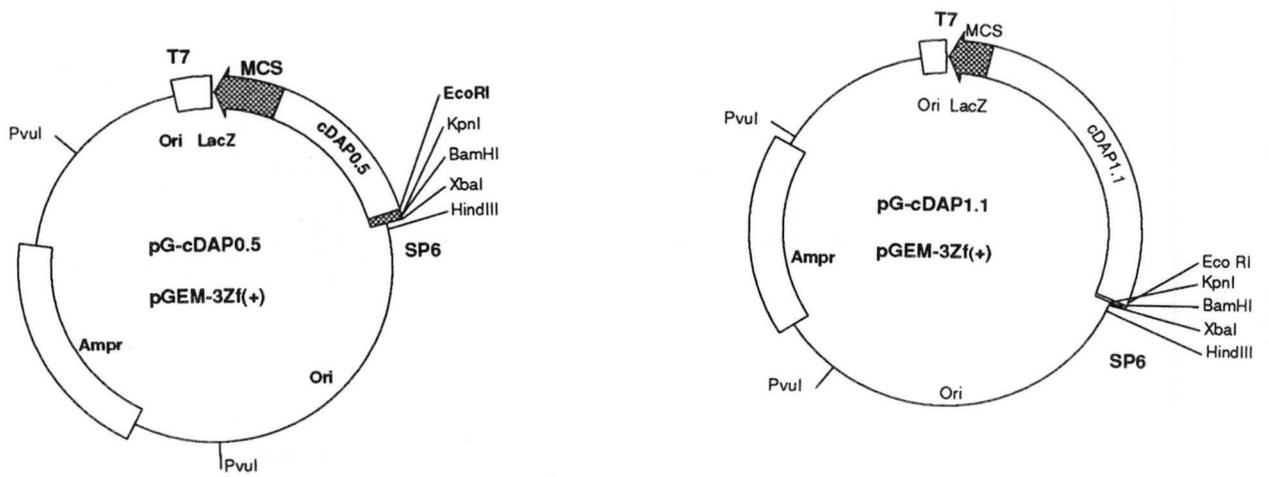


Figure 13. Représentation schématique des constructions réalisées, pG-cDAP0.5 et pG-cDAP1.1.

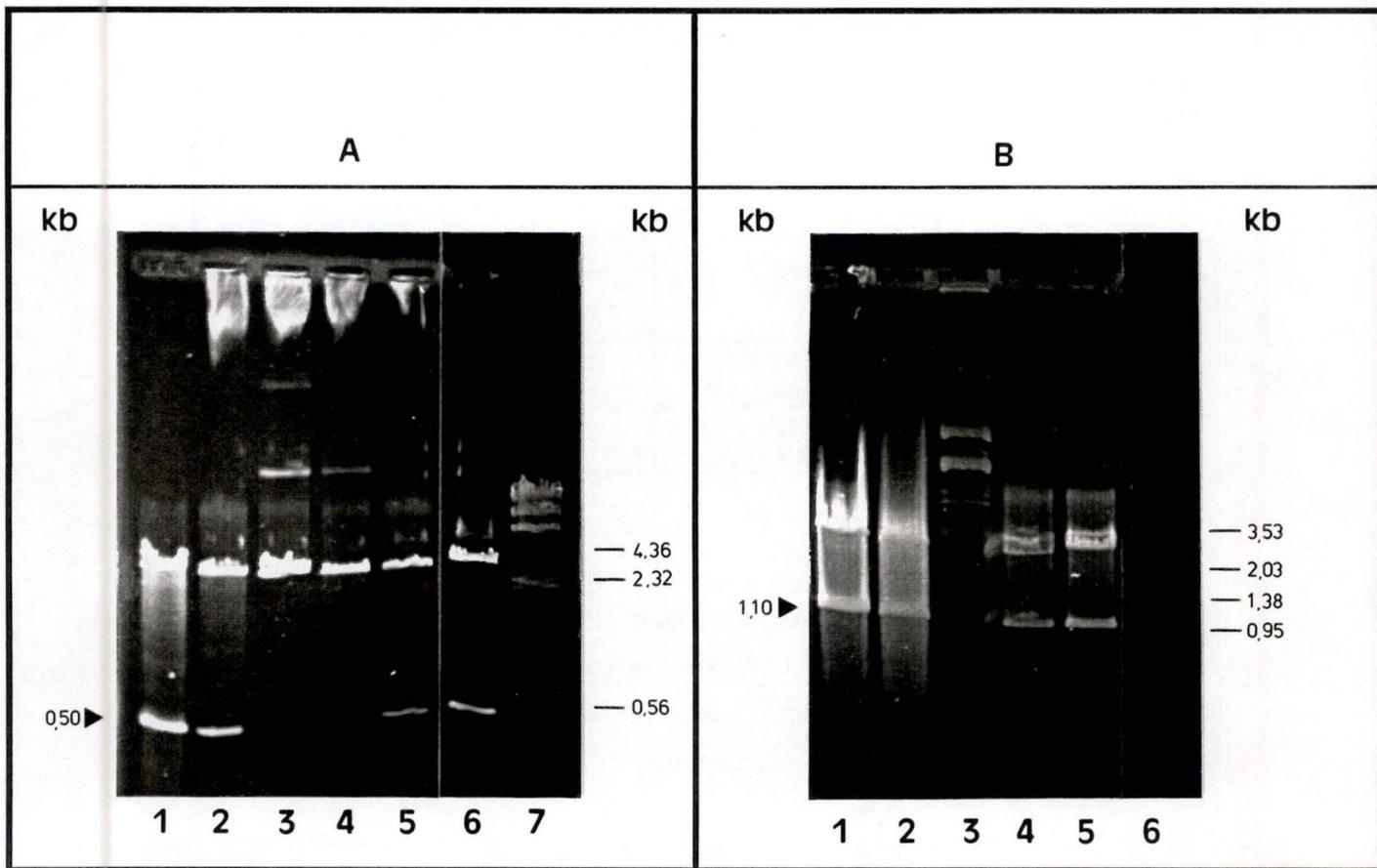


Figure 14. Electrophorèse en gel d'agarose à 0,8% de miniprep réalisées à partir de 11 colonies sur les 31 qui ont été sélectionnées.

Partie A, pistes 1 à 6: minipreps de pG-cDAP0.5 soumise à une restriction par Eco RI.

Piste 7: ADN du phage λ digéré par Hind III (étalon de taille 2).

Partie B, pistes 1 à 5: 5 minipreps de pG-cDAP1.1 soumise à une restriction par Eco RI.

Piste 6: ADN du phage λ digéré par Eco RI et Hind III (étalon de taille 3).

L'insertion d'un site de clonage multiple au sein du peptide α ne modifie pas sa capacité de compléter la protéine bactérienne tronquée, mais l'insertion au site de clonage d'un fragment plus long d'ADN détruit la faculté d' α -complémentation du peptide.

En conséquence, une bactérie transformée par un vecteur porteur d'un fragment d'ADNc, ne pourra donc pas posséder une β -galactosidase complète et active. En présence de cette dernière, le substrat chromogénique X-gal ne sera pas hydrolysé et les colonies bactériennes resteront blanches. Ce test nous permet de sélectionner parmi les colonies d'E.coli rr1 Δ M15 transformées par le plasmide, celles qui sont supposées héberger un plasmide porteur d'un fragment d'ADNc. La colonne de droite du tableau 2 indique le nombre de colonies blanches sélectionnées après transformation.

Les plasmides pGEM-3Zf(+) recombinants, hébergés par des bactéries, contenant cDAP0.5 ou cDAP1.1 sont appelés pG-c DAP0.5 ou pG-cDAP1.1. Leur structure est illustrée schématiquement à la figure 13.

4. Recherche des colonies blanches d'E.coli rr1 Δ M15 dues à une délétion du gène lac Z Δ M15

Il faut cependant signaler que des colonies d'E.coli rr1 Δ M15 transformées par un plasmide non recombinant peuvent produire des colonies blanches. Ces faux positifs sont à attribuer au fait que la bactérie peut être "délétée" au niveau du gène lac Z Δ M15.

Afin de sélectionner les bactéries transformées recombinantes, toutes les colonies blanches soit 17 et 14 possédant respectivement pG-cDAP0.5 et pG-cDAP1.1, ont été multipliées en vue de réaliser des minipreps et de les soumettre à des restrictions par Eco RI. Deux cas peuvent se présenter:

- une seule bande correspondant aux plasmides linéarisés apparaît; il s'agit d'un faux positif.
- deux bandes apparaissent, l'une correspondant au plasmide linéarisé et l'autre correspondant à l'ADNc cDAP0.5 ou cDAP1.1. suivant le cas.

La figure 14 illustre une série de ces contrôles. Aux pistes 1A, 2A, 5A et 6A, le plasmide pG-cDAP0.5 digéré par Eco RI présente deux bandes: l'une de taille égale à 3199 pb correspondant au plasmide linéarisé et l'autre d'une taille de 0,5 kb correspondant à l'insert. De même pour les puits 1B, 2B, 4B et 5B, deux bandes correspondants l'une au plasmide pG-cDAP1.1 linéarisé et l'autre au fragment de 1.1 kb apparaissent. Les plasmides correspondants aux pistes 3A et 3B ne présentent pas de bande pouvant correspondre à l'insert; toutefois il apparaît une bande de taille égale à 3199 pb après digestion. Ces

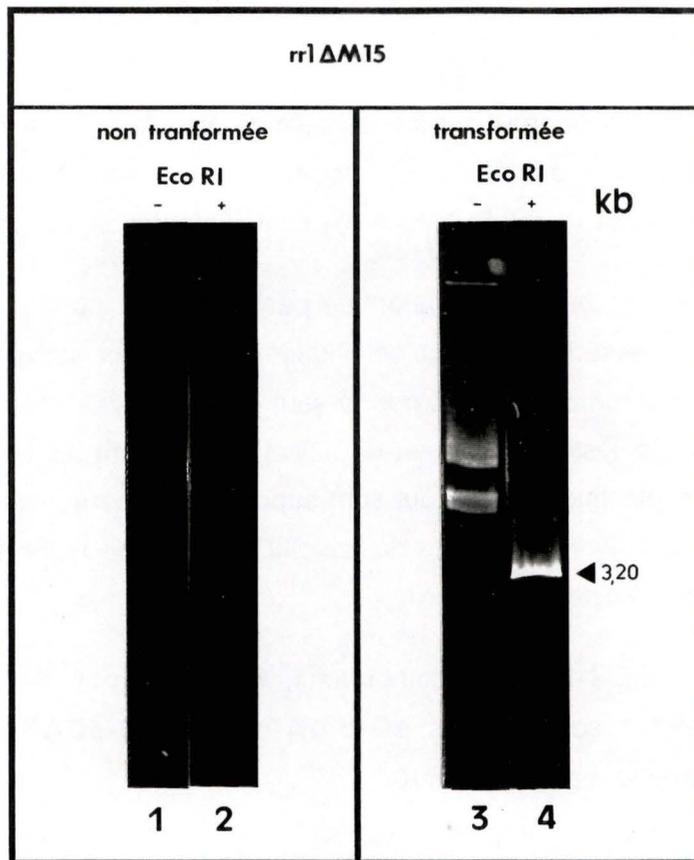


Figure 15. Electrophorèse en gel d'agarose à 0,8% des produits d'une miniprep d'ADN d'E.coli $rr1\Delta M15$ non transformée et son produit de restriction ainsi que d'une miniprep d'ADN de $rr1\Delta M15$ transformée et produisant une colonie de couleur bleue et son produit de restriction Eco RI.

Piste 1: miniprep d'ADN d'E.coli $rr1\Delta M15$ non transformée et non soumise à l'action digestive d'Eco RI.

Piste 2: miniprep d'ADN d'E.coli $rr1\Delta M15$ non transformée et digérée par Eco RI.

Piste 3: miniprep d'ADN d'E.coli transformée et non soumise à l'action digestive d'Eco RI.

Piste 4: miniprep d'ADN d'E.coli transformée et digérée par Eco RI.

colonies blanches étaient donc dues à une "délétion" de la β -galactosidase de la souche rr1 Δ M15 et constituent dès lors, de faux positifs.

Sur les 31 colonies bactériennes, 6 d'entre elles sont "délétées" au niveau du gène lacZ Δ M15.

A titre de contrôle, nous avons vérifié que la souche rr1 Δ M15 d'E.coli était dépourvue de plasmide pGEM-3Zf(+) et que les colonies bleues, après transformation contiennent bien un plasmide non recombinant. Pour ce faire des minipreps d'ADN d'E.coli rr1 Δ M15 non transformées, d'ADN de colonies bleues transformées ont été soumises à une restriction par Eco RI ensuite, les produits de la digestion ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

Aux pistes 1 et 2 de la figure 15, on constate que la minipreps d'ADN de rr1 Δ M15 présente une bande de faible intensité dont la migration n'est pas modifiée après digestion par Eco RI; aux pistes 3 et 4, on observe la présence du plasmide dans une colonie bleue. Le traitement par Eco RI fournit une seule bande à 3199 pb et ne fournit pas de fragment de plus faible taille.

Donc la souche rr1 Δ M15 non transformée ne contient pas le plasmide, et une bactérie transformée formant une colonie bleue renferme un plasmide dépourvu d'insert.

III. Analyse par restriction des fragments cDAP0.5 et cDAP1.1

Les cartes de restrictions des fragments d'ADNc que nous avons isolés ont été réalisées premièrement dans le but de rechercher rapidement une éventuelle **parenté entre ces deux fragments** et en second lieu pour rechercher le meilleur moyen de fragmenter cDAP1.1 pour les séquençages ultérieurs. Les enzymes ont été choisies en fonction de la position de leur site de coupure dans le plasmide et en fonction de la fréquence de ces sites. L'ensemble des six enzymes utilisées est repris ci-après:

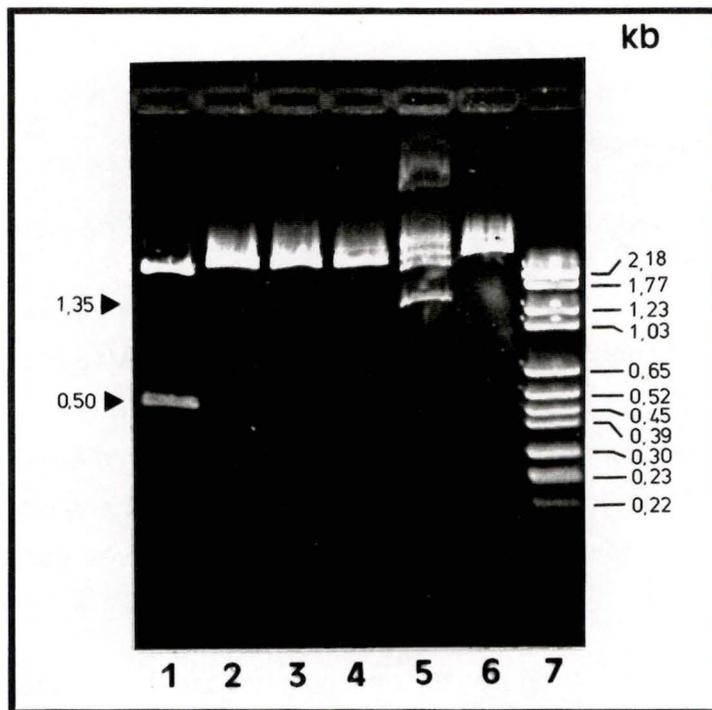


Figure 16. Analyse en gel d'agarose 1,2% de la restriction du pG-cDAP0.5 par **piste 1: Eco RI, piste 2: Bam HI, piste 3: Hind III, piste 4: Kpn I, piste 5: Pvu I, piste 6: Xba I**

Piste 7: Mixture de pBR328 digéré d'une part par Bgl I et d'autre part par Hinf I (étalon de taille 6).

La taille estimée des fragments est donnée à gauche de la figure.

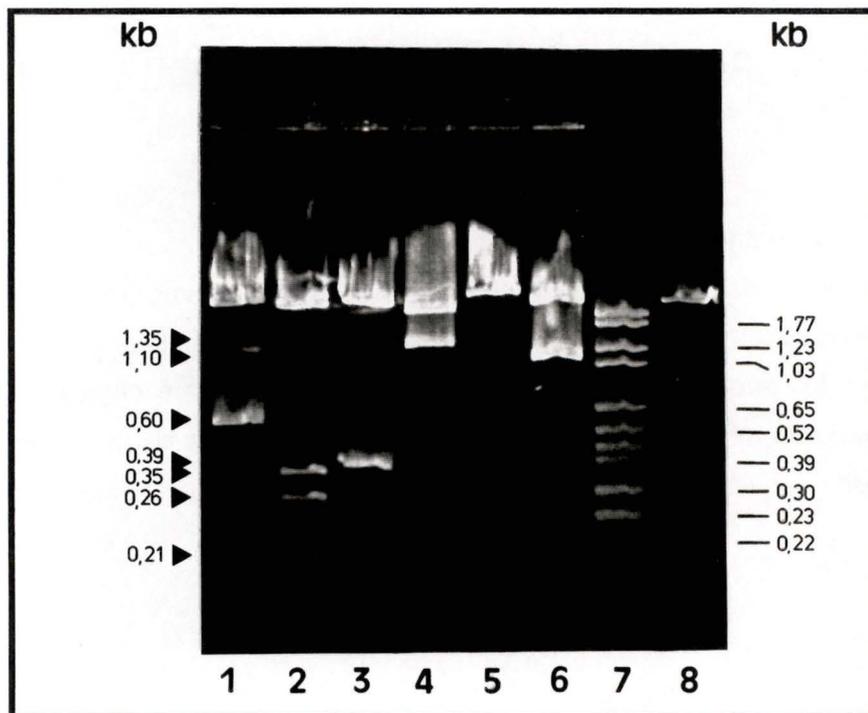


Figure 17. Analyse en gel d'agarose à 1,2% de la restriction du pG-cDAP1.1 par **piste 1: Bam HI, piste 2: Hind III, piste 3: Kpn I, piste 4: Pvu I, piste 5: Xba I, piste 6: Eco RI**

Piste 7: pBR328 digéré d'une part par Bgl I et d'autre part par Hinf I (étalon de taille 6).

Enzyme	nbre de sites dans pGEM-3Zf(+)	Séquence spécifique	Position des sites
Eco RI	1(2 avec cDAP)	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'	5
Bam HI	1	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	26
Hind III	1	5'-A AGCTT-3' 3'-TTGCA A-5'	56
Kpn I	1	5'-GGTACC-3' 3'-C CATGG-5'	21
Pvu I	2	5'-CGAT CG-3' 3'-GCT AGC-5'	1708 3060
Xba I	1	5'-T CTAGA-3' 3'-AGATC T-5'	32

Tableau 3: Nombre et position des sites de restriction présents dans le plasmide natif ainsi que la séquence de reconnaissance de ces enzymes.

Dans ces conditions, l'absence d'un site de restriction dans le fragment d'ADNc se traduira, après restriction, par la linéarisation pure et simple du plasmide et l'apparition d'une seule bande d'ADN de grande taille; excepté pour l'enzyme Pvu I, dont le plasmide natif possède deux sites. La présence de un ou plusieurs sites de restriction se traduira par l'apparition d'une ou plusieurs bandes supplémentaires.

Les digestions ont été effectuées sur des minipreps de plasmide pGEM-3Zf(+) contenant l'un ou l'autre des inserts, purifiées sur Quiagen durant quatre heures à 37°C dans les conditions décrites dans "Matériel et Méthodes".

1. cDAP0.5

A la figure 16 est reproduit un gel d'agarose à 1,2% réalisé à partir des mélanges de restriction du pG-cDAP0.5, par les différentes enzymes de restriction citées ci-dessus. Comme observé précédemment, Eco RI libère deux fragments, l'un de 3199 pb correspondant au plasmide, le second de 500 pb, correspondant au fragment d'ADNc de 500 pb (piste 1).

Les enzymes (pistes 2, 3, 4, 6) Bam HI, Hind III, Kpn I et Xba I, fournissent un seul fragment de taille estimée à 3699 pb correspondant à la somme du plasmide et de l'insert.

Pvu I (piste 5) fournit un fragment de 1350 pb et une série de fragments de très grande taille.

Nous pouvons donc conclure que cDAP0.5 ne contient aucun site de restriction correspondant à ces enzymes, sans pour autant exclure le fait que l'un ou l'autre site puisse se situer très près du site du plasmide, avec libération d'un fragment de très petite taille.

2. cDAP1.1

Les réactions de restriction par les mêmes enzymes ont été effectuées sur les minipreps du plasmide pG-cDAP1.1 purifié sur Quiagen dans les conditions décrites dans "Matériel et Méthodes".

Le résultat obtenu est reproduit à la figure 17. Eco RI (piste 6) libère deux fragments, de 3199 et de 1100 pb respectivement, ce dernier correspondant à cDAP1.1, conformément aux données obtenues précédemment.

Xba I fournit un seul fragment de taille supérieure à 3199 pb (piste 5), Pvu I (piste 4) fournit deux fragments: l'un de 1350 pb, l'autre de taille supérieure. Nous ne mettons donc aucun des sites Xba I et Pvu I en évidence dans cDAP1.1.

Kpn I fournit deux bandes, l'une de haut poids moléculaire, l'autre de 394 pb (piste 3). Hind III fournit quatre fragments dont l'un est de grande taille d'environ 3000 pb et trois fragments plus petits de 355, 263 et 209 pb indiquant par là la présence de trois sites Hind III très rapprochés (piste 2). Bam HI libère deux fragments, l'un de grande taille et l'autre de 602 pb indiquant là aussi un site dans cDAP1.1 (piste 1). Nous pouvons donc conclure que cDAP1.1 ne contient pas de site Xba I ni Pvu I. Par contre, nous avons détecté un site Kpn I, trois sites Hind III et un site Bam HI. Tenant compte de la position des sites de restriction respectifs dans le plasmide et sachant qu'il subsiste 5 bases du site Eco RI sur chaque fragment, nous pouvons situer le(s) site(s) dans cDAP1.1 aux positions suivantes (figure 18, ci-après):

Kpn I	$394-(21-5)= 378$		
Hind III	$209-(56-5)=158$	$263-(56-5)=212$	$355-(56-5)=304$
Bam HI	$602-(26-5)=581$		

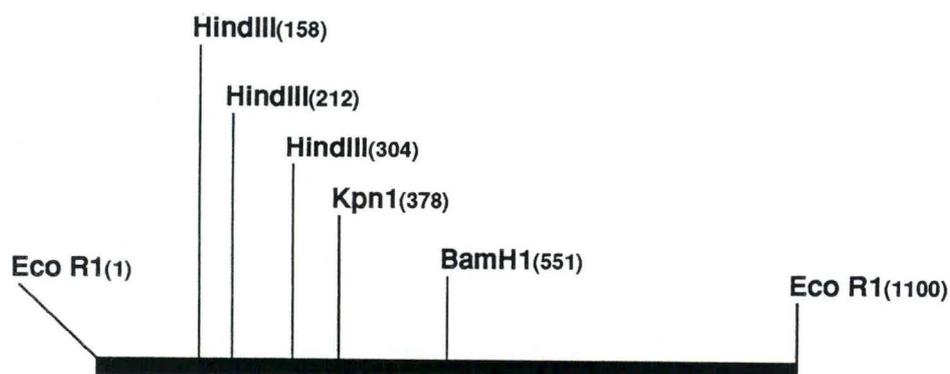


Figure 18. Analyse par restriction de cDAP1.1.

Comme aucun de ces sites ne se retrouve dans le fragment cDAP0.5, ce dernier, si une relation existe entre les deux inserts, doit se trouver à l'extrémité distale du fragment 1100 pb par rapport au site Eco RI du plasmide (figure 13).

Une double restriction du fragment cDAP1.1 par Bam HI et Eco RI nous fournirait deux fragments de taille sensiblement égale qui, après sous-clonage, pourraient être soumis au séquençage de manière à déterminer la séquence complète du fragment.

IV. Séquençage des fragments d'ADN

Le séquençage des fragments d'ADNc, obtenus à partir de minipreps et purifiés sur Quiagen a été réalisé au moyen d'un kit (Pharmacia LKB) faisant intervenir l'ADN polymérase du T7.

Chaque brin recombinant a servi de matrice pour l'enzyme; le *primer* universel amorçant le séquençage du brin codant a permis la synthèse d'une séquence qui après lecture a pu être traduite directement en acides aminés. Le *Primer* inverse a permis de séquencer le brin non codant, dont la séquence en acides aminés a du être déduite à partir du brin anti-parallèle correspondant.

A

1 31
CGG CCC GCT CAC GTT GTG GAG GGA AAC TCT GAC CCA GTG ATG TAT
ARG PRO ALA HIS VAL VAL GLU GLY ASN SER ASP PRO VAL MET TYR

46 76
GTC GCG TCC ACA CTT CTG AAA ATA GAG CGG TTG AGA AAT GCC CAG
VAL GLY SER THR LEU LEU LYS ILE GLU ARG LEU ARG ASN ALA GLN

91 121
AGG CTC ATC ACT GAA CGT GTG ATT ATT CAT CCC AGC TGG AAA CAA
ARG LEU ILE THR GLU ARG VAL ILE ILE HIS PRO SER TRP LYS GLN

136 166
GAG GAC GAC CTG AAT ACA CGG ACA AAT TTT GAC AAT GAC ATT GCC
GLU ASP ASP LEU ASN THR ARG THR ASN PHE ASP ASN ASP ILE ALA

181 211
CTG GTC GAC GTC AAA GAC CCT GTG AAA ATC CCG ACA GCG CCC ACT
LEU VAL ASP VAL LYS ASP PRO VAL LYS ILE PRO THR ALA PRO THR

226 249
CCG TCC GAG AAA CCT CCT CAG CAT.....
PRO SER GLU LYS PRO PRO GLN HIS:.....

B

1 31
.....TAC CTG GCT GAT CTC TGG TGG GCC GAA CAG AGA ATA GAA CCA ATG
.....TYR LEU ALA ASP LEU TRP TRP ALA GLU GLN ARG ILE GLU PRO MET

46 76
TTA TTC AAC TCA GAG GGC GAA GTT ACC CAT AAC ATC TTT AGA AAA
LEU PHE ASN SER GLU GLY GLU VAL THR HIS ASN ILE PHE ARG LYS

91 121
GTG CCA GCG GTG AAA GTG GAA AAC CCG AAA GCG AGG TCA AAC GAC
VAL PRO ALA VAL LYS VAL GLU ASN PRO LYS ALA ARG SER ASN ASP

136 166
TAT TTA CCG ATA ACA CGA TTC GTG TCT GGG AAA AGG GGT GTA ACG
TYR LEU PRO ILE THR ARG PHE VAL SER GLY LYS ARG GLY VAL THR

181 211
CGT GTA AGG GTA ACG CGG AGG GGC TTT TGC TCG TCC GGT CCC CAA
ARG VAL ARG VAL THR ARG ARG GLY PHE CYS SER SER GLY PRO GLN

226 237
TGT CAA GGC GGA
CYS GLN GLY GLY

Figure 19. Séquences nucléotidiques du cDAP0.5 d'une longueur de 249 pb (A) et de 237 pb (B), obtenues à partir du *primer* universel et du *primer reverse* respectivement. La séquence en acide aminé correspondante est également donnée.

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide des produits de réaction a été effectuée en deux migrations un long de 4 heures et un court de 2 heures, afin de pouvoir lire respectivement les fragments de grande taille et ceux de petite taille.

1. cDAP0.5

Le séquençage de ce fragment a été réalisé deux fois au moyen du *primer* universel: nous avons obtenu deux séquences identiques à deux bases près sur un total de 249 bases lues. Le séquençage au moyen du *primer* inverse a été réalisé une fois, et a permis la lecture de 237 bases. Les séquences sont reproduites à la figure 19.

La somme des bases séquencées est de 487, ce qui est trop peu pour permettre leur recouvrement et l'obtention de la séquence complète de ce fragment de 500 pb. Une séparation électrophorétique des produits de la réaction de séquençage en 3 migrations au lieu de 2, devrait permettre d'augmenter le nombre de bases et permettre ce recouvrement.

Chacune des deux séquences obtenues fournit une phase ininterrompue de lecture en acide aminés. Les séquences d'acides aminés sont également reproduites à la figure 19.

2. cDAP1.1

Une première tentative de séquençage direct des deux extrémités du fragment cDAP1.1, a été réalisée, principalement dans le but de poursuivre la détermination d'un éventuel lien de parenté avec le fragment de 500 pb.

Un seul séquençage a été réalisé avec chaque *primer*. La séquence établie avec le *primer* universel est donnée à la figure 20 (voir verso). Nous avons pu établir une séquence de 318 pb, fournissant une séquence interrompues d'acides aminés.

Le séquençage du fragment cDAP1.1 au moyen du *primer reverse* n'a pas permis d'établir une séquence nucléotidique pouvant être traduite en une séquence ininterrompue d'acides aminés, un très grand nombre de codons *stop* égrénant les 3 phases de traduction. Cela est à attribuer vraisemblablement à la mauvaise qualité de la séparation.

1 31
 CAG ACC CCA ATC CTG AGT CCT CAG GAG GTT GTA TCT TGT AGC CCG
 GLN THR PRO ILE LEU SER PRO GLN GLU VAL VAL SER CYS SER PRO

46 76
 TAT GCC CAA GGT TGT GAT GGT GGA TTC CCA TAC CTC ATT GCA GGA
 TYR ALA GLN GLY CYS ASP GLY GLY PHE PRO TYR LEU ILE ALA GLY

91 121
 AAG TAT GCC CAA GAT TTT GGG GTG GTG GAA GAA AAC TGC TTT CCC
 LYS TYR ALA GLN ASP PHE GLY VAL VAL GLU GLU ASN CYS PHE PRO

136 166
 TAC ACA GCC ATA GAT GCT CCA TGC AAA CCA AAG GAA AAC TGC CTC
 TYR THR ALA ILE AS ALA PRO CYS LYS PRO LYS GLU ASN CYS LEU

181 211
 CGC CAC TAT TCT TCT GAG TAC TAC TAT GTG GGT GGT TCT ATG GTG
 ARG HIS TYR SER SER GLU TYR TYR TYR VAL GLY GLY SER MET VAL

226 256
 GCT GCA ATG AGC CTG ATG AAG CTT GAG CTG GTC AAC ACG ACC ATG
 ALA ALA MET SER LEU MET LYS LEU GLU LEU VAL ASN THR THR MET

271 301
 CAG TTG AGT CCA GAT GAC GTC TGC ACT ACC AAG TGG ATC TAC ACA
 GLN LEU SER PRO ASP ASP VAL CYS THR THR LYS TRP ILE TYR THR

316
 CAC
 HIS

Figure 20. Séquences nucléotidiques du cDAP1.1 d'une longueur de 318 pb obtenues à partir du *primer* universel. La séquence en acide aminé correspondante est également donnée.

3. Analyse des séquences en acides aminés

Une séquence N-terminale de 10 acides aminés de la sous-unité de 18 KD de la cathepsine C a été établie comme suit:

ASP PRO PHE ALA TRP PHE TRP LEU LEU THR

Nous n'avons pas pu faire coïncider cette séquence avec celles que nous avons déterminées dans cDAP0.5 et cDAP1.1, soit parce que nous n'avons pas séquencé de fragment correspondant à l'extrémité N-terminale, soit en raison d'erreur de séquençage, plus probable, selon nous, au niveau de la séquence N-terminale des acides aminés.

Nous n'avons pas détecté de sites potentiels de N-glycosylation du type Asn-X-Thr ou Asn-X-Ser.

Nous avons introduit les séquences dans le GAP program (CGC, University of Wisconsin) et réalisé une série de comparaisons. Les séquences déduites pour cDAP0.5 ne se superposent pas à la séquence déduite pour cDAP1.1, nous n'avons donc **pas** jusqu'à présent de **recouvrement** entre les deux fragments.

Nous n'avons pas trouvé d'homologie entre les fragments séquencés de la cathepsine C et les séquences d'autres cathepsines B [Pohl & al., 1982] [Takio & al., 1983], D [Faust & al., 1985], H [Takio & al., 1983] ou L [Mason & al., 1986]. Nous avons comparé également les séquences à celle de la dipeptidylpeptidase IV publiée par Hong et Doyle (1987), sans trouver d'homologie également. Par contre, la comparaison avec les 7500 séquences de la banque, a mis en évidence une similarité assez importante entre le fragment de cDAP0.5 séquencé au moyen du *primer* universel et une portion de la séquence de la sous-unité C1s humaine, publiée par Carter et al. (1989); et qui constitue avec les sous-unités C1q et C1r le premier élément dans la cascade d'activation du complément (figure 21, voir verso).

IV. Discussion générale et perspectives

Deux groupes indépendants de clones (A et B, C, D, E, F) ont été sélectionnés à partir d'une banque d'ADN complémentaire de foie de rat, dans le bactériophage λ gt11, par criblage à l'aide d'un polysérum anti-cathepsine C. L'ADN de ces clones positifs a été soumis à une digestion par l'enzyme de restriction Eco RI afin de récupérer l'ADNc inséré au niveau de l'unique site Eco RI du bactériophage.

1GEFRPTHVVEGNSDPVMYV	19
	IIGGSDADIKNFPWOVFFDNPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPXMYV	
1		50
20	GSTLLKIERLRNAQRLITERVIIHPSWKQEDDLNTRTNFDNDIALVQLKD	69
	GSTSVQTSRL..AKSLTPEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNFDNDIALVRGPT	
51		98
70	PVKMDHCCP.....	78
	VSPICLPGTSSDYNDGDLGLISGWGRAEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCK	
99		148

Figure 21. Comparaison entre le fragment cDAP0.5 (lignes supérieures) et la sous unité C1s du complément (lignes inférieures). Les bandes verticales indiquent une homologie ou une similitude d'acides aminés.

Deux fragments différents ont ainsi été obtenus, cDAP0.5 et cDAP1.1, d'une taille de 500 pb et de 1100 pb respectivement; cDAP0.5 est issu de l'ADN phagique du clone A indépendant de la série des clones B, C, D, E et F renfermant cDAP1.1.

Nous avons ensuite sous-cloné cDAP0.5 et cDAP1.1 dans le plasmide pGEM-3Zf(+) d'une taille de 3199 pb, au niveau du site unique Eco RI présent dans le site de clonage multiple. Les réactions de ligation de ce sous-clonage ont servi à transformer la souche rr1ΔM15 d'E.coli. Cette souche a été rendue compétente par un traitement au CaCl₂ et la sélection des bactéries transformées recombinantes s'est faite grâce au test d'α-complémentation.

25 colonies transformées d'E.coli rr1ΔM15, hébergeant un plasmide recombinant, 13 colonies pour cDAP0.5 et 12 colonies pour cDAP1.1, ont été sélectionnées; les deux types de plasmides recombinants sont nommés respectivement pG-cDAP0.5 et pG-cDAP1.1.

Une carte de restriction des fragments cDAP0.5 et cDAP1.1 a été réalisée dans le but de rechercher d'une part, la parenté éventuelle pouvant exister entre cDAP0.5 et cDAP1.1, et d'autre part, le meilleur moyen de fragmenter cDAP1.1 pour les séquençages ultérieurs. cDAP0.5 ne contient aucun site de restriction pour les enzymes testées à savoir Bam HI, Hind III, Kpn I, Pvu I, Xba I. Par contre, cDAP1.1 contient 3 sites Hind III, 1 site Bam HI et 1 site Kpn I mais aucun site pour les enzymes Pvu I et Xba I. Ces deux fragments semblent donc être différents; nous ne pouvons cependant pas exclure leur recouvrement complet ou partiel, mais celui-ci doit se faire à l'extrémité distale de cDAP1.1, par rapport au site Eco RI du plasmide pGEM-3Zf(+), c'est-à-dire entre les bases 551 à 1100 (figure 18).

Finalement, nous avons réalisé le séquençage double-brin du cDAP0.5, ce qui a permis d'obtenir deux séquences nucléotidiques codantes de 249 et 237 pb. Malheureusement, il ne nous a pas été possible d'établir par recouvrement la séquence entière du cDAP0.5 car les deux séquences obtenues se sont révélées trop courtes.

Par séquençage à partir du *primer* universel 318 pb d'une extrémité du cDAP1.1, traductibles en séquence protéique, ont été identifiées.

Aucun recouvrement n'a pu être mis en évidence entre les séquences de cDAP0.5 et la séquence de l'extrémité de cDAP1.1. Cela confirme l'information obtenue après l'analyse par restriction indiquant que les fragments ne se recouvrent pas à hauteur de leur extrémité N-terminale. Comme aucune donnée quant à la structure primaire ni à la séquence nucléotidique de la cathepsine C n'a été publiée dans la littérature à ce jour et que d'autre part aucune homologie avec d'autres cathepsines ou avec une enzyme apparentée (telle que la dipeptidylpeptidase IV) n'a pu être décelée, il nous est impossible actuellement d'établir un lien entre ces deux fragments et (ou) de les situer l'un par rapport à l'autre.

Nous restons donc face à l'alternative suivante:

- ou bien un seul messenger est produit pour les deux polypeptides, dans ce cas il faudrait pouvoir mettre en évidence un recouvrement entre l'extrémité gauche de cDAP1.1, à partir de la position 551, et cDAP0.5.
- ou bien deux messagers de la cathepsine C sont produits, un pour chaque type de sous-unité, 18 KD et 6 KD. Dans ce cas, nous aurions isolé une partie d'ADNc de ces sous-unités.

Néanmoins, la poursuite des travaux de séquençage des deux fragments et un second criblage de la banque d'ADNc au moyen de sondes dérivées de ces deux fragments permettront de résoudre ce dilemme et de fournir un ou deux *full length cDNA*.

Le séquençage complet d'ADNc correspondant au(x) messenger(s) de la cathepsine C permettra également d'établir avec plus de précision l'importance de l'homologie entre la cathepsine C et le facteur C1s du complément.

Il est intéressant de souligner en relation avec une possible homologie, que la sous-unité C1s est la sous-unité fournissant l'activité protéolytique du premier facteur d'activation du complément; de plus cette activité protéolytique se mesure *in vitro* au moyen de l'ester méthylique d'un dérivé de l'arginine; or la cathepsine C présente une activité maximale *in vitro* également, lorsque le substrat est la glycyllarginyl-naphtylamide. Une telle homologie pourrait fournir des informations intéressantes quant à la fonction physiologique de la cathepsine C.

Finalement, grâce aux outils pG-cDAP0.5 et pG-cDAP1.1 dont nous disposons maintenant, nous pouvons envisager l'obtention rapide d'un ou de deux ADNc complet pour la ou les sous-unités de la cathepsine C. Ceci permettra d'entamer des expériences portant sur l'expression et le ciblage de la cathepsine C dans des conditions physiologiques particulières telle que la stimulation et la prolifération des macrophages ou la transformation maligne de différents types cellulaires, notamment en faisant appel à des travaux de mutagenèse dirigée, à la construction de protéines chimériques.

BIBLIOGRAPHIE

- BRAUN M., WAHEED A. AND VON FIGURA K. (1989),
Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface.
 The EMBO Journal, 8 , 3633-3640.
- BRODSKY F.M. (1988),
Living with clathrin: its role in intracellular traffic.
 Science, 242 , 1396-1402.
- BROWN W.J., GOODHOUSE J., FARQUHAR M.G. (1986),
Mannose 6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes.
 J. Cell. Biol., 103, 1235-1247.
- BURGE V., MAINFERME F. AND WATTIAUX R. (1991),
Transient membrane association of the precursors of cathepsin C during their transfer into lysosomes.
 Biochem. J., 275 , 797-800.
- BUSH J., EBERT D. AND CARDELLI J. (1990),
Alterations of N-linked oligosaccharides which affect intracellular transport rates and regulated secretion but not sorting of lysosomal acid phosphatase in Dictyostelium discoideum.
 Arch. of Biochem. and Biophys., 283 , 158-166.
- CARTER P.E., DUNBAR . AND FOTHERGILL J.E. (1983),
The serine proteinase chain of human complement component C1s. Cyanogen bromide cleavage and N-terminal sequences of the fragments.
 Biochem. J., 215, 565-571.
- CAVAILLES V. AUGEREAU P. AND ROCHEFORT H. (1991),
Cathepsin D gene of human McF7 cells contains oestrogen-responsive sequences in its 5' proximal flanking region.
 Biochem. Biophys. Res. Commun., 174 , 816-824.
- COHN Z.A. AND BENSON B. (1965),
The Differentiation of mononuclear phagocytes.
 J. Expt-Med., 121 , 153-169.
- CORVERA S., FOLANDER K., CLAIRMONT K. AND CZECH M. (1988),
A highly phosphorylated subpopulation of insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptors is concentrated in a clathrin-enriched plasma membrane fraction.
 Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 7567-7571.
- DAUTRY-VARSAT A. AND LODISH H. (1984),
Les récepteurs cellulaires.
 Pour la Science, 81, 78-85.
- DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANNETTO R. AND APPELMANS F. (1955),
Tissue fractionation studies.6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue.
 Biochem., 60, 604-617.

- DIMENT S., LEECH M. AND STAHL P. (1988),
Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes.
J. Biol. Chem., 253 , 6901-6907.
- FARQUHAR M.G. AND PALADE G.E. (1981),
The Golgi Apparatus (complex)- (1954-1981) -from Artifact to Center Stage.
J. Cell Biol., 91 , 77-103.
- FAUST P.L., KORNFELD S. AND CHIRGWIN J.N. (1985),
Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82, 4910-4914.
- GILMORE R., WALTER P. AND BLOBEL G. (1982B),
Protein translocation across the Endoplasmic Reticulum. 2. Isolation and characterization of the Signal Recognition Particle Receptor.
J. Cell Biol., 95 , 470-477.
- GOTTSCHALK S., WAHEED A., SCHMIDT B., LAIDLER P. AND VON FIGURA K. (1989),
Sequential processing of lysosomal acid phosphatase by a cytoplasmic thiol proteinase and a lysosomal aspartyl proteinase.
The EMBO Journal, 8, 3215-3219.
- GRIFFITHS G. AND SIMONS K. (1986),
The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex.
Science, 234 , 438-450.
- HOLTZMAN E. (1989),
Lysosomes.
Plenum Press.
- HONG W. AND DOYLE D. (1987),
cDNA cloning for a bile canaliculus domain specific membrane glycoprotein of rat hepatocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 7962-7966.
- HORST M. AND HASILIK A. (1991),
Expression and maturation of human cathepsin D in baby-hamster kidney cells.
Biochem. J., 273 , 355-361.
- JOHNSON K. CHAN W. AND KORNFELD S. (1990),
Cation-dependent mannose 6-phosphate receptor contains two internalization signals in its cytoplasmic domain.
Proc. Natl. Acad. Sci., 87 , 10010-10014.
- KORNFELD S. (1987),
Trafficking of lysosomal enzymes.
Faseb J. , 1, 462-468.
- KORNFELD S. AND MELLMAN I. (1989),
The Biogenesis of lysosomes.
Annu. Rev. Cell. Biol., 5 , 483-525.
- LI H. , TAKENCHI K.H. , MANLY K., CHAPMAN V. AND SWANK R. (1990),
The propeptide of β -glucuronidase.
Journal of Biological Chemistry, 265 , 14732-14735.

- MAINFERME F. (1990),
Communication personnelle.
- MAINFERME F., WATTIAUX R. AND VON FIGURA K. (1985),
Synthesis, transport and processing of cathepsin C in Morris hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes.
Eur. J. Biochem, 153 , 211-216.
- MASON R.W., WALKER J.E. AND NORTHROP F.D. (1986),
The N-terminal amino acid sequences of the heavy and light chains of human cathepsin L. Relationship to a cDNA clone for a major cysteine proteinase from a mouse macrophage cell line.
Biochem. J., 240, 373-377.
- MATTEI M-G., MATTESON J., CHEN J.W. , WILLIAMS M.A. AND FUKUDA M. (1990),
Two Human Lysosomal Membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2, are encoded by genes localized to Chromosome 13q34 and Chromosome Xq24-25, respectively.
J. Biol. Chem., 265 , 7548-7551.
- MCDONALD J. K., ZEITMAN B.B., REILLY T.J. AND ELLIS S. (1969),
Two observations on the substrate specificity of cathepsin C (dipeptidylaminopeptidase I).
J. Biol. Chem., 244 , 2693 , 2709.
- OWADA M. AND NEUFELD E. (1982),
Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose-6-phosphate recognition ? Evidence from I-cell disease.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 105 , 814-820.
- POHL J., BAUDYS M., TOMASEK V. AND KOSTKA V. (1982),
Identification of the active site cysteine and of the disulfide bonds in the N-terminal part of the molecule of bovine spleen cathepsin B.
FEBS Letters, 142, 23-26.
- QUON D.V.K., PROIA R.L., FAULER A.V., BLEIBAUM J. AND NEUFELD E.E. (1989),
Proteolytic processing of the β -subunit of the lysosomal enzyme, β -hexosaminidase, in normal human fibroblasts.
J. Biol. Chem., 264 , 3380-3384.
- RIJNBOUTT S. , AERTS H.M.F.G. , GEUZE H.J. , TAGER J.M. AND STRAUS G.J. (1991),
Mannose-6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D , glucocerebrosidase , and Sphingolipid-Activating Protein in HepG2 cells.
J. Biol. Chem., 266 , 4862-4868.
- ROTH R., STOVER C., HARI J., MORGAN D., SMITH M., SARA V. AND FRIED V. (1987),
Interactions of the receptor for insulin-like growth factor II with mannose-6-phosphate and antibodies to the mannose-6-phosphate receptor.
Biochem. and Biophys. Res. Comm., 149 , 600-606.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F. AND MANIATIS T. (1989),
Molecular cloning, a laboratory manual.
CSH, second edition, 3 volumes.
- SIMON S.M AND BLOBEL G. (1991),
A Protein-Conducting Channel in the Endoplasmic Reticulum.
Cell, 65 , 371-380.

- STEARNS N.A. , DONG J., PAN J-X., BRENNER D.A. AND SAHAGIAN G.G. (1990),
Comparison of cathepsin L synthesized by normal and transformed cells at the gene, message, protein and oligosaccharide levels.
Arch. of Biochem. and Biophys., 283 , 447-457.
- TAKIO K., TOWATARI T., KATUNUMA N., TELLER D.C. AND TITANI K. (1983),
Homology of amino acid sequences of rat liver cathepsins B and H with that of papain.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80, 3666-3670.
- VARKI A. AND KORNFELD S. (1983),
The spectrum of anionic oligosaccharides released by endo- β -N-acetylglucosaminidase H from glycoproteins. Structural studies and interactions with the phosphomannosyl receptor.
J. Biol. Chem., 258, 2808-2818.
- VON FIGURA K. AND HASILIK A. (1986),
Lysosomal enzymes and their receptors.
Ann. Rev. Biochem., 55, 167-193.
- WAHEED A., GOTTSCHALK S., HILLE A., KRENTLER C., POHLMANN R., BRAUKLE T., HAUSER H., GEUZE H. AND VON FIGURA K. (1988),
Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells.
The EMBO Journal, 7 , 2351-2358.
- WALTER P. AND BLOBEL G. (1982),
Signal Recognition contains a SRNA essential for Protein Translocation across the Endoplasmic Reticulum.
Nature, 299 , 691-698.
- YOUNG R. AND DAVIS R. (1983),
Efficient isolation of genes using antibody probes.
Proc. Nat. Acad. Sci., 80 , 1194-1198.