



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Production d'anticorps contre la diméthylase (Dim1p) de l'ARNr 18S de *Saccharomyces cerevisiae*

Herland, Damien

Award date:
1994

Awarding institution:
Université 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.



158019 201

FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

Production d'anticorps contre la diméthylase (Dim1p)
de l' ARNr 18S de *Saccharomyces cerevisiae*.

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

Damien HERMAND
1995

**Production d'anticorps contre la diméthylase (Dim1p)
de l' ARNr 18S de *Saccharomyces cerevisiae***

Hermand Damien

Résumé.

Des études récentes du laboratoire ont permis d' assigner deux rôles distincts à la protéine Dim-1p; d' une part, elle réalise chez la levure *S. cerevisiae* la double diméthylation réputée cytoplasmique de l' ARNr 18S, d' autre part, elle intervient dans le "processing" nucléolaire des ARNr au stade A1 et A2. Tant la localisation cellulaire que la caractérisation des partenaires de Dim-1p requiert que cette protéine puisse être détectée aisément. Dans ce but, nous avons cherché à produire des anticorps spécifiques contre Dim-1p via l' injection de la protéine surexprimée ou d' ADN nu dans la souris.

La surexpression, dite hétérologue, a d' abord été tentée en utilisant le système d' induction par choc thermique chez *E. coli*. L' échec rencontré ne semble du ni à l' instabilité plasmidique, ni à la protéolyse inhérente au choc thermique. Par contre, nous avons pu déterminer que l' induction du gène *DIMI* chez *E. coli* se manifestait par un retard de croissance par rapport à la souche contrôle, soulevant l' hypothèse d' un fardeau engendré chez l' hôte par la présence de Dim-1p.

Pour contourner ces difficultés, nous nous sommes adressé à un hôte homologue pour l' expression de Dim-1p, à savoir le système levurien *Pichia pastoris*.

Les essais de surexpression avec ou sans sécrétion de la protéine, dans des transformants possédant une, ou un grand nombre de copies du gène *DIMI*, n' ont pas permis d' obtenir une expression détectable.

Parallèlement aux essais de surexpression, nous avons testé une immunisation par ADN nu chez cinq souris. Trois techniques ont été utilisées pour mettre en évidence une production d' anticorps: l' immunoblot, la radioimmunoprécipitation sur billes magnétiques et la détection en fluorescence sur des cellules *COS* transfectées. Aucune n' a permis de détecter un enrichissement post-immun des sérums en anticorps anti-Dim-1p.

"Cette histoire est entièrement vraie puisque je l' ai imaginée d' un bout à l' autre."

Voilà la recherche scientifique brillamment résumée par Boris Vian.

Pour m' avoir permis de réaliser ce travail, pour les nombreuses heures, parfois tardives, qu'il m' a consacrées, ainsi que pour l' ouverture que ses cours m' ont apportée, je remercie le professeur Jean Vandenhoute.

Je remercie également les membres du jury: Isabelle Housen, Pascal Mertens, Vincent Weynants et Michel Jadot pour avoir accepté de critiquer ce travail.

"Remerciement" est un bien faible mot à l' adresse d' Isabelle, Pascal et Vincent qui n' ont pas été trop de trois pour me suivre tout au long de ce mémoire.

Mais avant de passer aux choses sérieuses, il est important de resituer le cadre de ce travail depuis les origines jusqu' à aujourd' hui, en donnant ici un exemple de ce que l' on appelle communément la "Démarche Scientifique":

14-02-1995: Premier jour au labo: Monique nous montre comment faire un gel d' agarose, une miniprep..., j' ai l' impression d' avoir été parachuté en plein Vietnam.

12-04-1995: Bienvenue à Adrien Tellier.

17-05-1995: Jean-Marc "Internet" Ladrière est anobli.

12-06-1995: "Dieu" a 33 ans (ceux qui doivent comprendre comprendront...).

23-06-1995: Je bois du lait (ça aussi ceux qui doivent comprendre...).

27-06-1995: Apéro sur la "Place du vieux" avec Tatamo, Rose-Ma, Véro, Gena et Poos. Et bon anniversaire Véronique!

29-06-1995: Petit Campari-orange sur les hauteurs de Lustin, merci à Véronique et Jean-Pol.

05-07-1995: Journée URC et soirée: merci à Monsieur Letesson et à sa Dame.

12-09-1995: Denis Lafontaine entre dans l' Olympe.

27-10-1995: Dominique Demonté est promu "Messagers des Dieux".

Pour avoir permis tout ceci, j' adresse mes remerciements à Monique et Rose-Marie qui sont un peu au labo ce que Thelma et Louise sont au cinéma.

Je veux également remercier:

Jean-Pol Cassart, Dominique Demonté, Denis Lafontaine, Philippe Denoël, Xavier Debolle, Anne Tibor, Guy Houbeau, Jean-Jacques Letesson, Jean-Marc Ladrière, Olivier Laloux, Francis Descy, Jeanine Libion, Véronique Evrard, Isabelle Georis, Isabelle Danese, Françoise Gouronc, Jean-Christophe Calcut et tous les autres membres de l' URC.

Merci à mes proches pour leur soutien, à André Cheval sans qui je n' aurais jamais entamé ces études et à tous mes collaborateurs et amis de "Musica Sul Velluto".

Et puisque cette page est la seule où je puisse vraiment parler à la première personne, qu' il me soit également permis de citer ceux qui, par leur talent, ont toujours su dissiper l' extrême frustration (quasi malade) que j' éprouve quand une manip; "foire":

Frédéric Chopin, Félix Mendelssohn, Frans Shubert, Serge Rachmaninov, George Gershwin, Toru Takemitsu, Ennio Morricone, Nino Rota, Michaël Nyman, Nicola Piovani, Julien Green, Fiodor Dostoïevski, Edgar Poe, Terrence Malick, Sergio Leone, Rainer Werner Fassbinder, Woody Allen, Werner Herzog, Paolo et Vittorio Taviani, Luis Bunuel, Iqmar Bergman, Akira Kurosawa, Giuseppe Tornatore, Elio Petri, Alain Resnais et quelques autres...

qui m' ont rappelé que tout ce qui suit ne mérite pas toujours l' importance que je lui accorde quelque fois...

DAMIEN HERMAND

Abréviations.

A: adénosine
ADN: Acide Désoxyribonucléique
ADNr: ADN ribosomal
Amp: ampicilline
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ARNr: ARN ribosomal
ARNt: ARN de transfert
AUGi: AUG initiateur
SAB: serum albumine bovine
DO: densité optique
DEPC: diéthylpyrocarbonate
DTT: dithiotréitol
EDTA: éthylènediamine-tétraacétate
ETS: External Transcribed Spacer
G: guanosine
ITS: Internal Transcribed Spacer
kb: 1000 pb
kd: KiloDalton
M: Molaire
mg: milligramme
ml: millilitre
ORF: Open Reading Frame
pb: paire de base
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PCR: Polymerase Chain Reaction
PM: poids moléculaire
PMSF: Phénylméthylsulfonyl Fluoride
PolI, PolII, PolIII: ARN polymérase I, II ou III
r-protéine: protéine ribosomale
RNase: ribonucléase
RNasin: inhibiteur de RNase
rpm: rotation par minute
SAM: S-adénosyl-méthionine
SDS: sodium dodécyl sulfate
snoRNA: small nucleolar RNA
snoRNP: small nucleolar RiboNucléoParticle
Tris: tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UAS: Upstream Activating Sequence
UV: ultra-violet
µg: microgramme
µl: microlitre

I. CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DE LA PROTEINE DIM-1P.

I.1 Généralités.

I.2 Dim-1p réalise la double diméthylation universelle m⁶₂A m⁶₂A.

- A) Les méthylations de maturation post-transcriptionnelle des ARNr.
- B) Localisation de la double diméthylation.
 - B1) Rôle de la double diméthylation chez E. coli.
 - B2) Rôle de la double diméthylation chez les eucaryotes.

I.3 Dim-1p est impliquée dans le "processing" ribosomal.

- A) Les différentes étapes du "processing" du pré-ARNr 35S.
- B) Création du mutant *trans GAL::dim1*.
- C) Création d' un mutant *cis*.

II. POURQUOI PRODUIRE DES ANTICORPS CONTRE DIM-1P.

II.1 Les anticorps comme outils en biologie.

II.2 Les anticorps permettront de répondre aux questions actuelles liées à Dim-1p

- A) La localisation cellulaire de Dim-1p.
- B) L' étude des partenaires de Dim-1p par immunoprécipitation .

III.COMMENT PRODUIRE DES ANTICORPS CONTRE DIM-1P.

III.1 Généralités.

III.2 La surexpression de la protéine.

- A) L' expression chez les procaryotes.
- B) L' expression chez la levure.

III.3 L' immunisation par ADN nu.

- A) Principe.
- B) Réponses humorales et cellulaires suite à l' injection d' 'ADN nu.

III.4 L' immunisation par peptides synthétiques.

I.1. SUREXPRESSON DANS UN SYSTEME HETEROLOGUE.

Choix du système d'expression et principe.

I.1 Expression dans la souche AR 58.

A) Construction des vecteurs d'expression.

B) Induction de l'expression dans la souche AR 58.

C) Examen des diverses hypothèses pour expliquer l'absence de surexpression de Dim-1p chez *E. coli*.

C.1. L'instabilité du plasmide pGIIH500*.

C.2. Test d'intégrité fonctionnelle de la construction du pGIIH500*.

C.3. Intolérance de *E. coli* à l'accumulation de Dim-1p.

I.2 Expression dans la souche M5219.

A) La réponse au choc thermique.

B) Réduction de la protéolyse après choc thermique;

C) Applications.

Conclusion.

I.3 Expression dans la souche AR 68.

Conclusion.

I.4 Expression avec une protéine tronquée.

A) Construction du vecteur pGIDH1.

B) Expression dans AR 58.

I.5 Conclusions générales sur l'expression dans un système hétérologue.

II. SUREXPRESSON DANS UN SYSTEME HOMOLOGUE.

Choix du système d'expression.

II.1 Présentation du système d'expression.

A) Description d'un plasmide type.

B) Les types d'intégration et les phénotypes associés.

Premier cas: remplacement par double c.o. au locus *AOX-1*.

Deuxième cas: insertion par simple c.o. au locus *AOX-1*.

Troisième cas: insertion par simple c.o. au locus *HIS4*.

Cas particulier: insertions multiples.

C) Vue générale du système d'expression.

II.2 Expression par sécrétion avec le pGIDH9.

A) Processing de la séquence signal du facteur sexuel α .

B) Construction du vecteur d'expression par sécrétion pGIDH9.

C) Test fonctionnel et séquençage de la jonction avec la séquence de sécrétion.

D) Transformation et sélection des phénotypes.

E) Premier essai d'induction de l'expression.

F) Deuxième essai d'induction de l'expression;

Conclusion.

II.3 Expression intracellulaire avec le pGIDH11.

- A) Construction du vecteur d'expression intracellulaire pGIDH11.
- B) Transformation, sélection des phénotypes et expression.
- C) Recherche d'intégrants multiples par dot blot quantitatif.
- D) Induction de l'expression des clones retenus.

II.4 Conclusions générales sur l' expression dans un système homologue.

III. IMMUNISATION PAR ADN NU.

Généralités.

III.1. Préparation du vecteur et inoculations.

- A) Construction du pGIDH2.
- B) Vérification de la construction.
- C) Inoculations.

III.2. Mise en évidence de la réaction.

- A) Détection par Western blot.
- B) Western blot sur la protéine produite en transcription-traduction acellulaire.
- C) Radio-immunoprécipitation sur billes magnétiques.
- D) Infection de cellules COS par le pGIDH2 et détection de Dim-1p en fluorescence.

III.3. Conclusions.

1. SOLUTIONS ET TAMPONS.

- 1.1. Solutions stocks d' antibiotiques.
- 1.2. Solution stock de bromure d' éthydiu.
- 1.3. Solution stock de RNase A.
- 1.4. Tampon de restriction.

- 1.4.1. Tampons Gibco-BRL.
- 1.4.2. Tampons Boehringer.
- 1.4.3. Tampons Biolabs.
- 1.4.4. Liste des enzymes de restriction utilisées au cours de ce travail.

2. SOUCHES ET PLASMIDES.

2.1. Souches bactériennes utilisées.

- 2.1.1. Les souches utilisées pour la surexpression.
- 2.1.2. La souche DL101.
- 2.1.3. La souche XL1 Blue.

2.2. Souches de levures utilisées.

- 2.2.1. La souche *Pichia pastoris* GS115.
- 2.2.2. La souche *Saccharomyces cerevisiae* YPH 274.
- 2.2.3. La souche YVE 274-11.

2.3. Plasmides utilisés chez *E. coli*.

2.4. Plasmides utilisés chez *Pichia pastoris*.

3. MILIEUX DE CULTURE.

3.1. Milieux de culture pour bactéries.

- 3.1.1. Milieu riche LB.
- 3.1.2. Milieu CAS.
- 3.1.3. Milieu MINA.
- 3.1.4. Milieu MINK.

3.2. Milieux de culture pour levures.

- 3.2.1. Milieu de maintenance YPD.
- 3.2.2. Milieu de culture de *P. pastoris*.
 - 3.2.2.A. Milieu de croissance.
 - MD.
 - MGY.
 - BMGY.
 - 3.2.2.B. Milieu d' induction.
 - MM.
 - BMMY.

4. METHODES RELATIVES AUX PROTEINES.

4.1. Extrait de protéines solubles de *E. coli*.

4.2. Extrait de protéines solubles de *P. pastoris*.

4.3. Dosage des protéines.

4.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).

4.4.1. Principe.

4.4.2. Réactifs.

4.4.3. Appareillage.

4.4.4. Préparation des échantillons.

4.4.5. Mise en oeuvre de l' électrophorèse.

4.5. Détection des protéines sur gel SDS-PAGE.

4.6. Transfert des protéines sur filtre (Western blot).

4.6.1. La préparation et la séparation des protéines par électrophorèse.

4.6.2. Le transfert des protéines sur une membrane.

4.6.3. L' élimination des sites de liaison non-spécifique sur la membrane.

4.6.4. L' addition du sérum.

4.6.5. La détection.

4.6.6. Epuisement d' un polysérum.

4.7. Transcription-traduction acellulaire.

4.8. Radio-immunoprécipitation sur billes magnétiques.

4.8.1. Principe.

4.8.2. Capture des anticorps du sérum sur les billes.

4.8.3. Production de la protéine marquée.

4.8.4. Capture de la protéine marquée sur les billes.

4.8.5. Mesure de la radioactivité précipitable au compteur à scintillation.

4.8.6. Séparation des protéines sur gel SDS-PAGE.

4.8.7. Autoradiographie.

5. METHODES RELATIVES A L' ADN.

5.1. Quantification de l' ADN.

5.1.1. Quantification spectrophotométrique.

5.1.2. Quantification au bromure d' éthidium et électrophorèse analytique.

5.2. L' extraction au phénol.

5.3. La précipitation à l' éthanol.

5.4. La réaction de restriction.

5.5. L' électrophorèse préparative de l' ADN.

5.6. La déphosphorylation d' une matrice linéarisée.

5.7. La réaction de ligation.

5.8. La transformation.

5.8.1. L' électroporation.

5.8.1.A. Electroporation de *E. coli*.

5.8.1.B. Electroporation de *P. pastoris*.

5.8.2. La transformation au chlorure de calcium.

5.9. La minipréparation d' ADN plasmidique.

5.10. La midipréparation d' ADN plasmidique.

5.11. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

5.11.1. Protocole d' utilisation de la Taq DNA polymérase.

5.11.2. Protocole d' utilisation de la Pwo polymérase.

5.12. Dot blot quantitatif.

5.12.1. Le transfert sur filtre de nitrocellulose.

5.12.2. La synthèse de la sonde radiomarquée.

5.12.3. L' hybridation.

5.12.4. La révélation.

5.13. Le séquençage de l' ADN.

5.13.1. Dénaturation et précipitation.

5.13.2. Hybridation de l' amorce (annealing)

5.13.3. Marquage (labelling).

5.13.4. Terminaison.

5.13.5. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

5.13.6. Après la migration.

INTRODUCTION

A) Le ribosome de *E. coli* contient trois molécules d' ARNr et 52 protéines.

	Ribosome.	Petite sous-unité.	Grande sous-unité.
Vitesse de sédimentation. Masse (daltons).	70S 2 520 000	30S 930 000	70S 1 590 000
ARN majeurs. ARN mineur. Masse d' ARN. Proportion d' ARN.	1 664 000 66%	16S = 1 541 bases 560 000 60%	23S = 2 904 bases 5S = 120 bases 1 104 000 70%
Nombre de protéines. Masse de protéines. Proportion de protéines.	857 000 34%	21 polypeptides 370 000 40%	31 polypeptides 487 000 30%

B) Le ribosome cytoplasmique eucaryote (foie de rat) contient quatre molécules d' ARNr et 82 protéines.

	Ribosome.	Petite sous-unité.	Grande sous-unité.
Vitesse de sédimentation. Masse (daltons).	80S 4 220 000	40S 1 400 000	60S 2 820 000
ARN majeurs. ARN mineurs. Masse d' ARN. Proportion d' ARN.	2 520 000 60%	18S = 1 874 bases 700 000 50%	28S = 4 718 bases 5,8S = 160 bases 5S = 120 bases 1 820 000 65%
Nombre de protéines. Masse de protéines. Proportion de protéines.	1 700 000 40%	33 polypeptides 700 000 50%	49 polypeptides 1 000 000 35%

Table 1: Constitution ribonucléique et protéique du ribosome (Lewin, 1994).
A) chez *E. coli*.
B) chez les eucaryotes (foie de rat).

I. CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DE LA PROTEINE DIM-1P.

I.1 Généralités.

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique comportant deux sous-unités et contenant, selon son origine pro- ou eucaryotique, entre 60 et 80 protéines ainsi que 3 ou 4 ARNr. Il est une des espèces catalytiques parmi les plus complexes connues, ceci reflétant le rôle central qu'il joue dans la synthèse protéique de tous les organismes vivants. Il est par ailleurs un modèle remarquable pour l'étude des relations entre structure et fonction.

La constitution protéique du ribosome est bien connue (voir Table 1). On regroupe sous le terme "protéines ribosomales", celles qui sont constitutives et qui se retrouvent dans la structure finale, et celles dites non-constitutives qui interviennent seulement transitoirement au cours de la biogénèse de l'organite.

Du point de vue nucléique, le ribosome est constitué de quelques espèces d'ARNr réparties entre les sous-unités (voir Table 1). L'ARNr 18S qui nous occupe dans ce travail est le seul constituant nucléique de la petite sous-unité 40S du ribosome eucaryote. L'ARN 16S est son équivalent pour la sous-unité 30S des procaryotes. La grande sous-unité 60S eucaryotique comporte trois autres espèces (5,8S, 25S et 5S) alors que la 50S des procaryotes n'en contient que deux (23S et 5S).

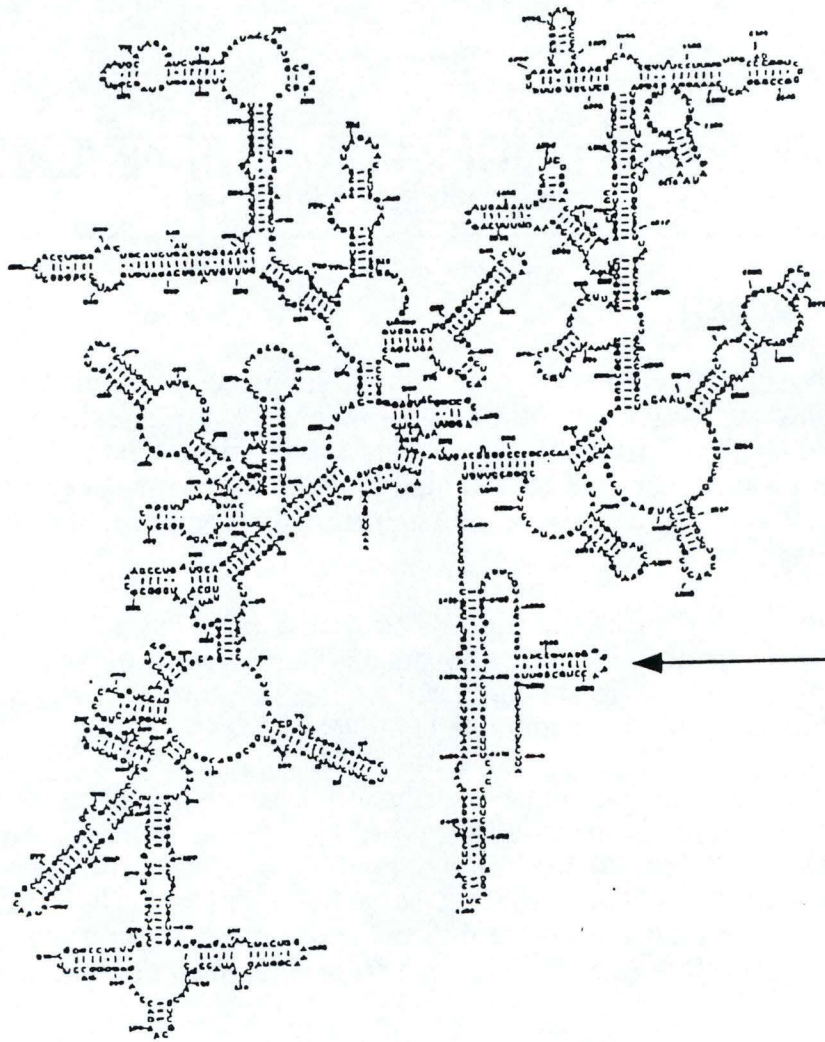
Au cours de leur **maturation**, les ARNr subissent des modifications chimiques de deux types: des méthylations et des pseudouridylation. La seule de ces modifications qui soit conservée entre les pro- et eucaryotes est la double diméthylation $m^6_2Am^6_2A$ des deux adénines situées sur "l'hairpin" terminale à l'extrémité 3' de l'ARNr de la petite sous-unité (Figure 1).

Par ailleurs, vu l'organisation génomique de l'ADN qui les encode, le transcrit initial de certains ARNr doit subir les étapes du "**processing**". On entend par là une série de clivages, apparaissant dans un ordre défini, et qui mènent aux espèces finales.

Enfin, toutes les étapes de la biogénèse doivent parfaitement s'agencer: tous les composants voient leur synthèse parfaitement coordonnée, en d'autres termes, aucun ne peut s'accumuler pour former un pool de réserve. Les mécanismes qui assurent cette équimolarité seront brièvement évoqués plus loin. La biogénèse ribosomale, chez les eucaryotes, est associée à des variations de compartiment cellulaire puisque le "processing", tout comme la maturation des ARNr, se déroule à la fois dans le nucléole et dans le cytoplasme pour les étapes terminales. Les ARNr étant toujours associés à des protéines ribosomales constitutives ou non, celles-ci devront dans certains cas retourner dans le noyau après leur traduction.

Dans ce réseau complexe, la protéine Dim-1p dont le gène a été cloné au laboratoire (Lafontaine *et al.*, 1994) réalise chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* la double diméthylation $m^6_2Am^6_2A$ de l'ARN 18S, précisément celle qui est universellement conservée. On sait maintenant que Dim-1p joue au moins un rôle additionnel dans la biogénèse puisqu'elle intervient aussi au niveau du "processing"

A.



B.

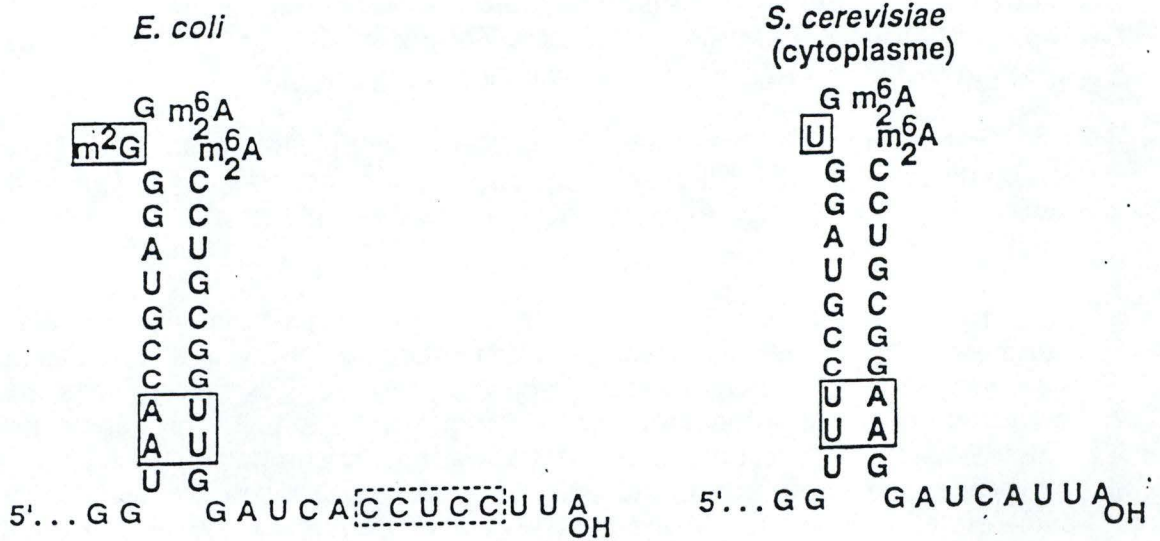
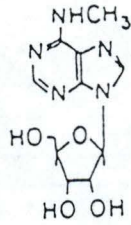


Figure 1: A) Structure secondaire de l'ARNr 18S de *S. cerevisiae*.

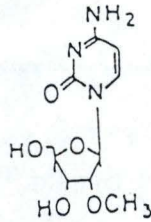
L'hairpin portant la double diméthylation est indiquée par une flèche.

B) Conservation de la séquence de l'hairpin entre les pro- et les eucaryotes.

Les régions encadrées ne sont pas conservées. La région encadrée en pointillé représente le séquence "Shine-Dalgarno".



N^6 -Methyladenosine
(m^6A)



$2'$ -O-Methylcytidine
(Cm)

Figure 2: Représentation des deux types de méthylation.
 m^6A : méthylation en position 6 de l' adénine.
 Cm: méthylation en position 2 du ribose.

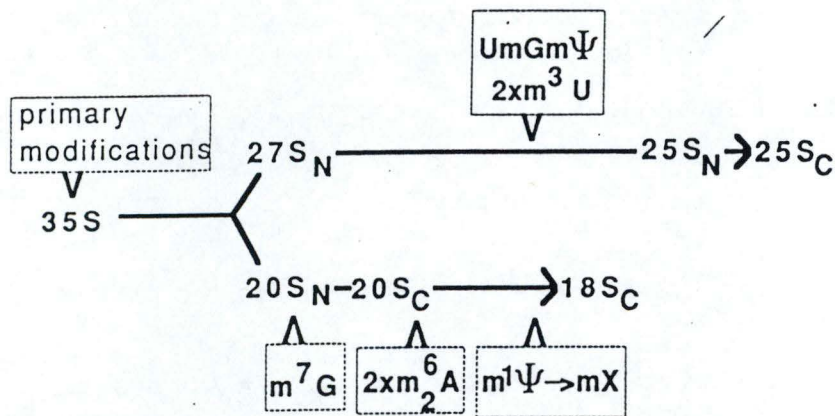


Figure 3: Chronologie des modifications pendant la maturation des ARNr.

Les "primary modifications" impliquent la quasi-totalité des pseudouridylations, beaucoup de 2'-O méthylation, l' introduction de 4 méthyles sur l' ARNr 25S et la formation du résidu hypermodifié m^1Y . Les indices N et C spécifient la localisation, nucléolaire ou cytoplasmique, des précurseurs. (Klootwijk et al., 1989).

5'

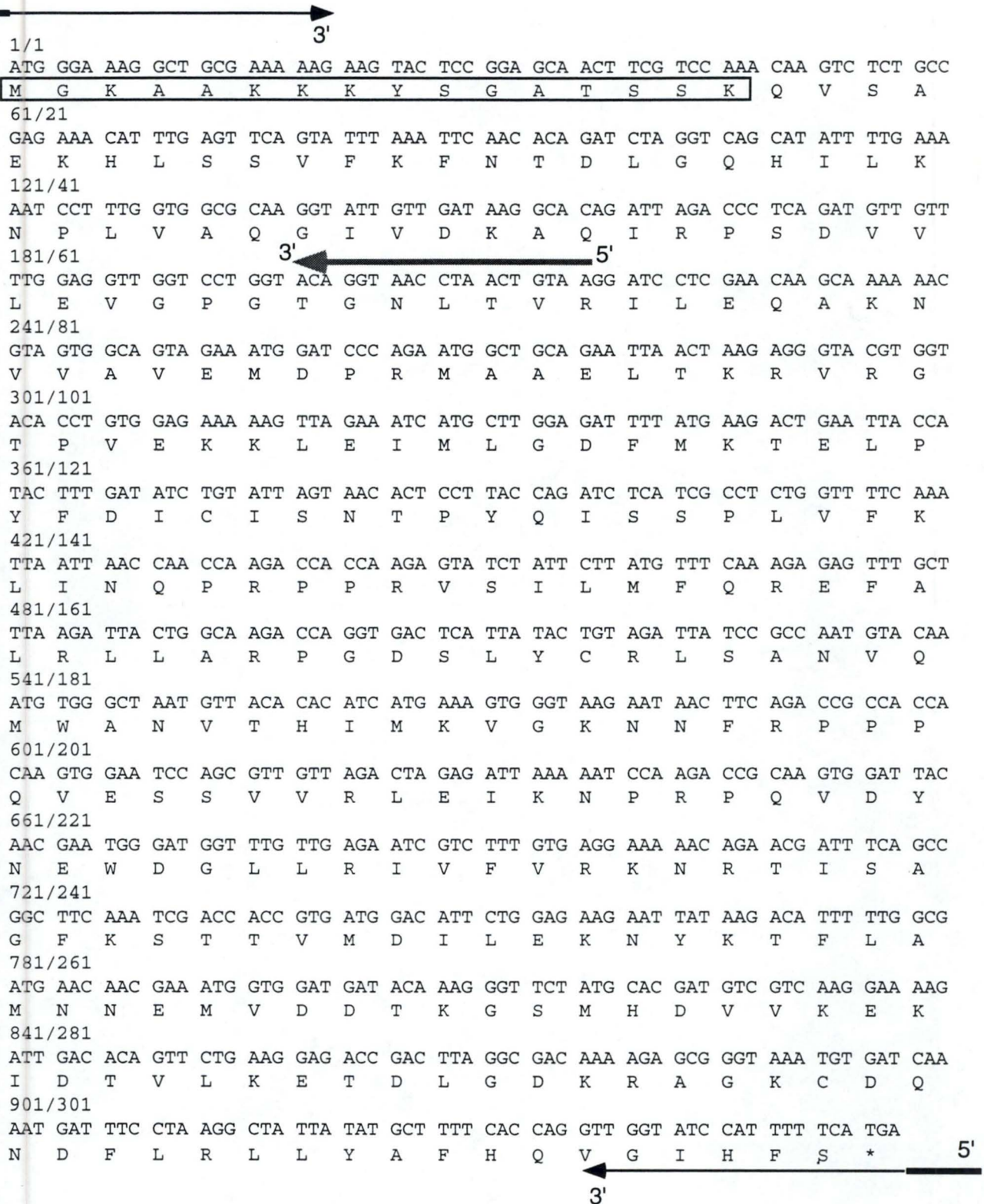


Figure 4: Séquence de la protéine Dim-1p.

Le domaine N-terminale riche en lysine est encadré. Les flèches foncées représentent les primers PCR *Pichia-DIM5'* et *Pichia-DIM3'* (voir "Résultats" point II.2B). La partie des flèches représentée en trait gras correspond au site *Eco RI* ajouté pour le clonage (séquence: 5' GGGGAATTC 3'). La flèche grisée correspond au primer de séquençage utilisé (voir "Résultats" point II.2C).

(Lafontaine *et al.*, 1995). Cette récente constatation pose bien évidemment des questions quant à sa localisation dans la cellule, le moment où elle entre en scène, ou encore la présence d'éventuels partenaires. Nous allons revenir en détail sur les principaux éléments évoqués ici.

I.2 Dim-1p réalise la double diméthylation universelle m⁶₂A m⁶₂A

A) Les méthylation de maturation post-transcriptionnelle des ARNr.

Chez les eucaryotes, les ARNr 18S, 5,8S et 25S sont transcrits en un long précurseur 35S qui subira, comme nous le décrirons au point I.3, les étapes du "processing" pour donner les espèces matures. Dans le nucléole, alors qu'il est en cours de transcription, ce précurseur commence à être méthylé, le processus se poursuivant jusqu'aux étapes cytoplasmiques finales de maturation. Les ARNr 18S et 25S contiennent alors respectivement 24 et 43 méthylation (Klootwijk *et al.*, 1973). Les groupes méthyles sont ajoutés, dans 90% des cas, en position 2'-O des riboses, les autres groupes méthyles étant attachés aux bases (Figure 2).

Les autres modifications sont des pseudouridinations (Ψ); on détecte aussi un résidu hyper modifié méthylé (mX). Les ARNr 5S et 5,8S, quant à eux, ne sont pas méthylés. La chronologie des modifications est détaillée à la Figure 3. Selon ce schéma, la double diméthylation m⁶₂A m⁶₂A de l'ARN 18S est un processus cytoplasmique et donc tardif (Klootwijk *et al.*, 1972).

B) Localisation et fonction de la double diméthylation.

La modification m⁶₂A₁₅₁₈m⁶₂A₁₅₁₉ / m⁶₂A₁₇₇₉m⁶₂A₁₇₈₀ (nomenclature de *E. coli* et *S. cerevisiae* respectivement) consiste en la diméthylation des deux adénines adjacentes présentes sur l'hairpin à l'extrémité 3'-terminale de l'ARNr de la petite sous-unité. La Figure 1 montre cette position sur la structure de l'ARN 18S. Elle montre également la conservation de la structure entre les procaryotes et les eucaryotes.

Comme nous l'avons signalé, c'est Dim-1p qui réalise cette double diméthylation chez la levure. Son homologue bactérien est KsgA, les deux protéines présentant 27% d'identité et 50% d'homologie. La conservation remarquable de la modification que ces enzymes introduisent a bien sûr posé la question de son rôle. Celui-ci a été mis en rapport, chez les bactéries, avec l'action d'un antibiotique du groupe des aminoglycosides: la kasugamycine (Van Gemen *et al.*, 1990); (Van Knippenberg, 1986); (Poldermans *et al.*, 1979).

B.1) Rôle de la double diméthylation chez *E. coli*.

L'existence d'un mutant ksgA- viable démontre que la diméthylation n'est pas indispensable chez les procaryotes, et a permis d'étudier en détail la fonction des groupements méthyles placés sur les deux adénines. Des mutations spécifiques des deux adénines ont par ailleurs permis d'étudier finement le processus de méthylation (Cunningham *et al.*, 1990), mais nous ne rentrerons pas dans ces détails ici.

unité ADNr (9,1kb)

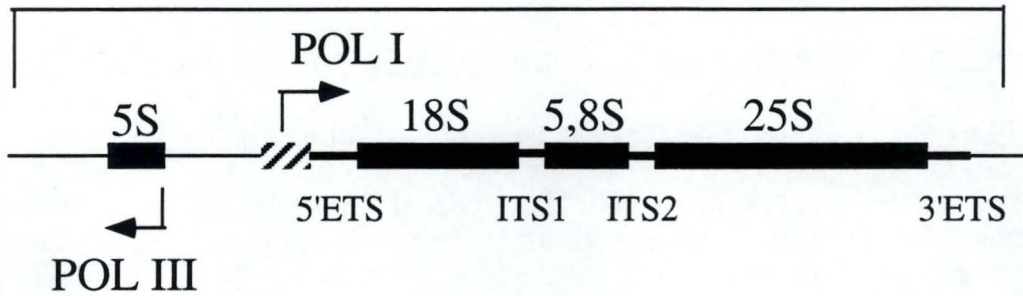


Figure 5: Organisation d'une unité ADNr chez *S. cerevisiae*.

Les séquences codantes sont représentées par des rectangles noirs.
Les séquences transcrites non-codantes externes (5'ETS et 3'ETS) et internes (ITS1 et ITS2) sont en traits épais. Les séquences non-transcrites en traits fins.
Les sites d'initiation de la transcription par POL I et Pol III sont indiqués par des flèches coudées.

Le promoteur reconnu par Pol I est en hachuré.

Le mutant *ksgA-* est incapable d'effectuer la double diméthylation, avec pour conséquence l'apparition de la résistance à la kasugamycine. Cet antibiotique empêche la fixation correcte de l'ARNt initiateur sur le complexe formé par le messager et la petite sous-unité.

C'est au niveau de ce dernier complexe que la double diméthylation semble jouer un rôle. On sait que le codon initiateur du messager est correctement aligné sur la sous-unité 30S par interaction entre son extrémité 5' et la séquence "Shine-Dalgarno" (voir Figure 1) présente à l'extrémité 3' de l'ARN 16S. Or, cette interaction entre séquences nucléiques serait favorisée par la présence des méthyles qui créent un environnement hydrophobe à l'interface des deux sous-unités où l'ajustement doit s'opérer.

Rappelons que la présence des méthyles n'est pas indispensable puisque le mutant *ksgA-* croît très bien et que les particules ribosomales non-diméthylées ne sont que très faiblement affectées dans la synthèse protéique *in vitro* (Poldrermans *et al.*, 1979).

B.2) Rôle de la double diméthylation chez les eucaryotes.

C'est Dim-1p (Figure 4) qui effectue la réaction de diméthylation chez la levure; le gène *DIMI* qui encode la protéine s'est révélé être essentiel (Lafontaine *et al.*, 1994). On ne peut pas extrapoler les fonctions des méthyles chez les bactéries aux eucaryotes puisque le processus d'initiation est fortement différent. En effet, c'est ici le modèle de Kozak qui est applicable: la coiffe de l'extrémité 5' du messager permet, via des "protéines fixatrices de coiffe", la liaison à la sous-unité 40S qui parcourt alors le messager jusqu'à trouver un AUG dans un contexte correct.

La conservation de structure de l'hairpin et la présence de la double diméthylation ne semblent donc pas être liées à la même fonction entre pro- et eucaryotes. Cette étonnante conservation peut donc se justifier de deux façons différentes: soit, la protéine Dim-1p a acquis, au cours de l'évolution, une deuxième fonction qui justifie son maintien, soit c'est la diméthylation qui joue un autre rôle chez les eucaryotes. La réponse à cette question éclairera du même coup les questions que pose la surprenante essentialité du gène *DIMI* chez la levure.

Pour solutionner le problème, un mutant *trans* a été créé, ce qui ne peut se faire en travaillant dans une souche sans Dim-1p puisque le gène est essentiel; on a donc supprimé progressivement la présence de la protéine en plaçant le gène *DIMI* sous le contrôle d'un promoteur régulable, et en observant l'évolution concomitante du "processing" ribosomal. Les résultats obtenus sont détaillés dans la section suivante.

I.3 Dim-1p est impliquée dans le "processing" ribosomal.

A) Les différentes étapes du "processing" du pré-ARNr 35S.

Les ADNr eucaryotes sont regroupés en un cluster d'environ 200 unités répétées en tandem. Une de ces unités est décrite en détail à la Figure 5. Comme le montre la figure, la polymérase I engendre un long transcrit, le pré-ARNr 35S, qui regroupe les séquences codantes des ARNr 18S, 5,8S et 25S. Le "processing" est constitué par toutes les étapes de clivage qui mènent à ces espèces matures. La Figure 6 décrit succinctement cette suite de réactions.

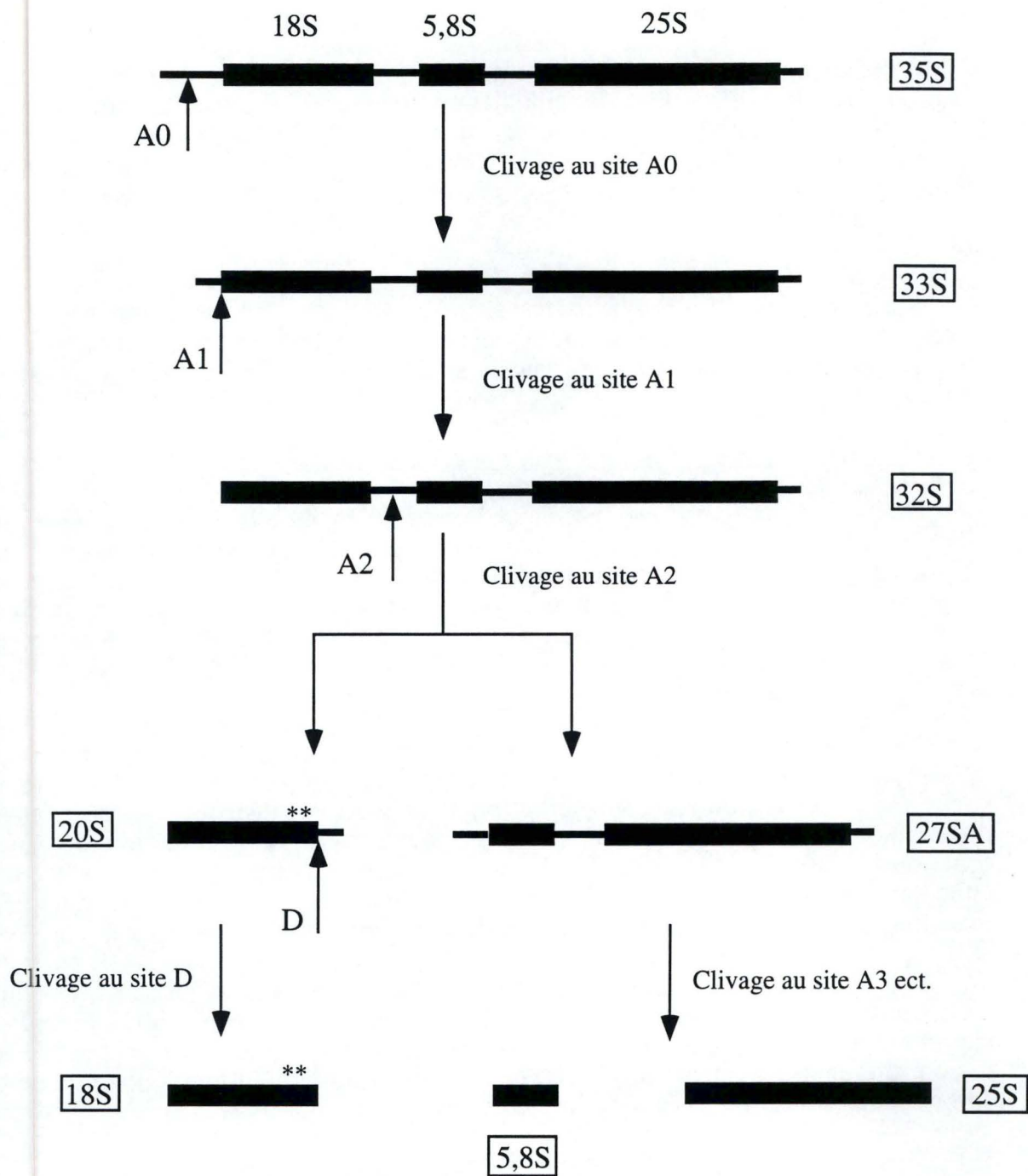


Figure 6: "Processing" du pré-ARNr 35S.

La polymérase I engendre un transcrit pré-ARN 35S qui comprend les séquences codantes des ARNr 18S, 5,8S et 25S. Le pré-ARN 35S est clivé dans la région 5'ETS au site A0, 89 nucléotides en amont de l'extrémité 5' mature de l'ARNr 18S où se situe le clivage A1. Le clivage A2 qui se situe dans l'ITS1 génère 2 groupes qui correspondent aux 2 sous-unité ribosomales. Une série de clivages subséquents mènent aux ARNr 5,8S et 25S. L'ARNr 18S est le produit du clivage D sur le précurseur 20S. La double diméthylation est représentée par le symbole **.

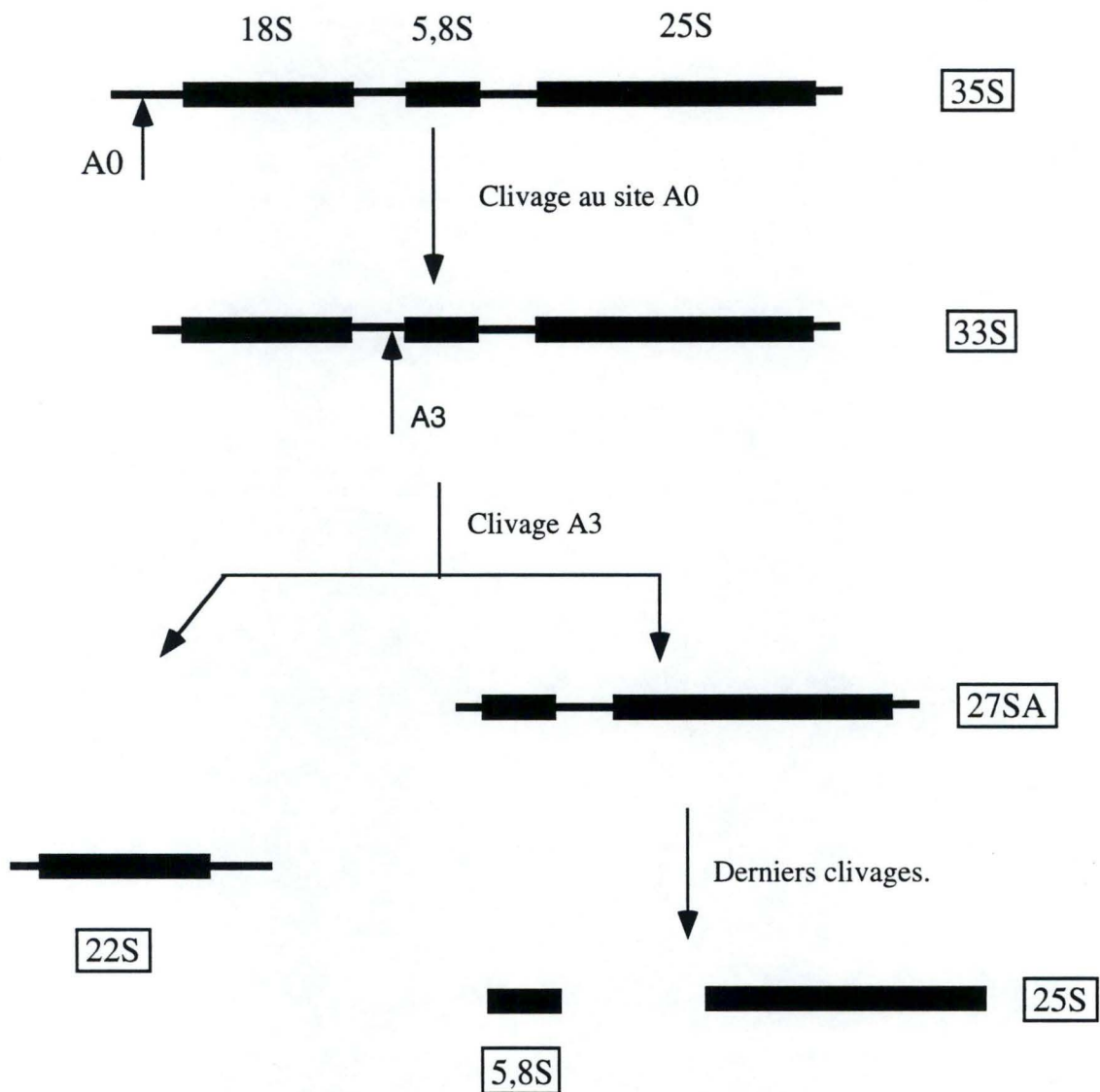


Figure 7: "Processing" du pré-ARNr 35S dans la souche *GAL::dim1*.
 Les clivages A1 et A2 ne sont plus réalisés suite à l'absence de Dim-1p. Le précurseur 33S s'accumule et est clivé au site A3, engendrant l'espèce aberrante 22S et la poursuite des clivages qui donneront les ARNr 5,8S et 25S.

B) Création du mutant *trans GAL::dim1*.

Dans ce mutant conditionnel d'expression, l'unique copie du gène *DIM1* est sous le contrôle du promoteur *GAL10*, ceci signifiant qu'en passant d'un milieu galactose vers un milieu glucose, on "éteint" le promoteur et l'expression de Dim-1p. La disparition progressive de l'enzyme mène à une inhibition de clivage aux sites A1 et A2 qui permettent de libérer le pré-ARNr 20S en situation normale (voir Figure 6). On voit alors une accumulation des pré-ARNr 22S et 33S, alors que les étapes antérieures (clivage A0) et postérieures (clivage A3) ne sont pas affectées, les ARNr de la grande sous-unité sont donc présents comme le montre la Figure 7.

Par ailleurs, aucun ARNr 18S non diméthylé n'est accumulé, le "processing" requiert donc la présence de la double diméthylation ou/et la fixation de l'enzyme Dim-1p. Pour trancher cette question, un mutant *cis* a été créé.

C) Création d' un mutant *cis*.

La démarche qui a été suivie pour aborder ce problème consistait à introduire une modification au niveau du substrat et non de la diméthylase. Les deux adénosines ont été "échangées" par mutagénèse dirigée contre deux guanines (Lafontaine *et al.*, 1995). Cette manipulation posait le problème pratique suivant: seul le transcrit 35S (qui regroupe les séquences des ARNr 18S, 5,8S et 25S) portant les mutations devait être exprimé, alors que, comme nous l'avons vu, les gènes d'ADNr sont multiples et qu'il faudrait donc les muter tous. Cet objectif fut atteint en introduisant la mutation G₁₇₇₉ G₁₇₈₀ sur un plasmide qui contient la région codante complète du pré-ARN 35S sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'ARN polymérase II, et en transformant ce dernier dans une souche de levure thermosensible pour l'ARN polymérase I qui dirige la transcription du 35S *in vivo*. A la température non permissive, le seul transcrit présent contiendra donc les deux guanines non-diméthylables.

L'analyse des résultats ne montre aucun défaut de processing détectable. Par contre, le maintien à la température non-permissive ne permet pas la poursuite de la croissance cellulaire.

Dès lors, ce n'est pas l'activité diméthylase comme telle qui est impliquée dans le "processing" nucléolaire, mais une autre fonction de Dim-1p. Quant à la non-viabilité du mutant, seule la création d'une protéine sans activité diméthylase pourrait permettre de décider si ce sont les deux adénines ou la présence des méthyles qui sont indispensables à la croissance.

Le cadre général que nous venons d'évoquer amène une série de questions d'ordre biologique. La localisation de l'enzyme, jusqu'ici considérée comme cytoplasmique, pourrait aussi être nucléolaire puisque c'est là que le "processing" mis en cause s'effectue. Par ailleurs, le mode d'action au niveau du "processing" et les partenaires de Dim-1p dans ce mécanisme sont ignorés. Des anticorps dirigés contre la protéine permettraient de réaliser les expériences nécessaires pour éclairer ces problèmes.

II. POURQUOI PRODUIRE DES ANTICORPS CONTRE DIM-1P.

II.1 Les anticorps comme outils en biologie (Anderson et al., 1980).

Le particularité des anticorps parmi les autres protéines est qu'ils sont représentés sous des millions de formes possédant chacune un site de liaison différent reconnaissant spécifiquement l'antigène qui a induit sa production. La spécificité antigénique de l'anticorps en fait un outil puissant en biologie. Marqués (couplage à des particules d'or colloïdal, fluorochromes, ...), ils permettent la localisation subcellulaire précise de molécules spécifiques.

Leurs possibilités dépassent largement le rôle de sondes que nous venons d'évoquer. Par microinjection, on peut les introduire dans la cellule où ils vont interagir avec leur cible. Par exemple, des anticorps anti-myosine injectés dans un oeuf d'oursin empêchent l'ovule de se diviser alors que la division nucléaire a lieu normalement, ceci a permis d'indiquer que la myosine n'intervient pas dans cette dernière (Mabuchi *et al.*, 1979).

On peut également montrer que la région 3' de l'ARNr 16S qui porte la double diméthylation conservée est bien située à l'interface entre les deux sous-unités ribosomale: des anticorps contre une protéine diméthylée reconnaissent la sous-unité 30S mais pas le ribosome complet 70S. De plus, ces mêmes anticorps inhibent la liaison du facteur d'initiation IF-3 à la sous-unité 30S (Van Knippenberg, 1986).

L'utilité des anticorps en biochimie est tout aussi manifeste: quantifier des molécules dans des extraits cellulaires, identifier des protéines séparées sur gel de polyacrylamide, purifier des molécules sur colonne d'affinité après couplage sur une matrice...

Les anticorps permettent aussi d'amplifier un signal. Le marqueur (fluorochrome, peroxydase...) peut être lié directement à l'anticorps de reconnaissance spécifique de la molécule d'intérêt (anticorps primaire), ou à un deuxième anticorps qui reconnaîtra celui-ci (anticorps secondaire). Cette seconde technique est la plus fréquemment utilisée puisque le marquage des anticorps secondaires ne doit être effectué qu'une fois. D'autres systèmes d'amplification exploite, par exemple, l'affinité de liaison remarquable de la biotine et de la streptavidine.

Enfin, toutes les utilisations impliquent de choisir entre trois grandes possibilités: l'utilisation d'anticorps polyclonaux, monoclonaux, ou d'un mélange de monoclonaux (Dunbar *et al.*, 1990). Les premiers ont l'avantage d'être relativement faciles à produire, ils permettent en plus de reconnaître des déterminants multiples aussi bien linéaires que conformationnels ce qui les rend attrayants dans des expériences impliquant la reconnaissance globale d'une protéine. Leurs désavantages sont bien sûr complémentaires des avantages cités: les déterminants multiples reconnus empêchent l'étude de domaines individuels ou d'épitopes uniques et la production d'anticorps est liée à la vie de l'animal qui les produit. De plus, le "background" qu'ils engendrent est souvent important. Les monoclonaux présentent des caractéristiques exactement inverses: en effet leur extrême spécificité

permet l'étude de domaines protéiques déterminés et leur synthèse continue est assurée en lignées immortalisées; par contre leur production est plus complexe et leur reconnaissance de la protéine dénaturée (par exemple en immunoblot) souvent mauvaise. Le mélange de monoclonaux est une alternative optimale mais difficile et longue à mettre en place.

II.2 Les anticorps permettront de répondre aux questions actuelles liées à la protéine Dim-1p.

Comme nous l'avons décrit au point I, Dim-1p réalise la double diméthylation de l'ARN 18S chez *S. cerevisiae*. Aucune fonction précise n'a pu être assignée à cette modification universellement conservée et le gène *DIM1* est essentiel. La création de la souche *GAL::dim1* a permis de montrer que Dim-1p intervenait dans le processing ribosomal aux stades A1 et A2; le mutant *cis*, chez lequel les deux adénines sont substituées par des guanines, montrant quant à lui que c'est la protéine et non son activité diméthylase qui assure la fonction liée au "processing".

Si on se rappelle que la diméthylation serait, selon des travaux déjà anciens (Klootwijk *et al.*, 1972; Salim *et al.*, 1973; Brand *et al.*, 1977), un phénomène tardif cytoplasmique, alors que le processing au stades A1 et A2 est nucléolaire, la première question qui se pose est de savoir où se situe Dim-1p dans la cellule. La localisation cellulaire de l'enzyme répondra à cette question. Par ailleurs, que la protéine rentre dans un "modèle cytoplasmique" ou un "modèle nucléaire", il est hautement probable (cfr plus loin) qu'elle appartienne à un complexe. L'identification des partenaires de ce complexe est actuellement développée au laboratoire et fait appel, entre autres, à des techniques d'immunoprécipitations. On voit que l'aboutissement des deux objectifs fixés à court terme passe par la production d'anticorps anti-Dim-1p. Nous allons maintenant développer ces deux objectifs.

A) La localisation cellulaire de Dim-1p.

L'hypothèse d'une localisation exclusivement cytoplasmique de la diméthylase a longtemps prévalu puisque la diméthylation est réalisée sur le pré-ARNr 20S juste avant le clivage D qui est cytoplasmique. Les choses sont beaucoup moins claires depuis qu'il a été démontré que Dim-1p intervenait aussi dans le processing des pré-ARNr aux stades A1 et A2 (Lafontaine *et al.*, 1995). Toutefois, ceci n'implique pas nécessairement une localisation nucléolaire puisqu'il a été montré qu'un défaut d'assemblage du ribosome dans le cytoplasme, pouvait se répercuter sur les étapes de "processing" (Moritz *et al.*, 1991). Ainsi, l'absence d'une protéine ribosomale constitutive entraîne un déficit d'assemblage de la sous-unité 60S, celui-ci étant couplé à une accumulation des précurseurs 27S, 35S et 32S qui reflète un "processing" incorrect.

Un autre exemple de pareille coordination entre des défauts d'assemblage et de "processing" est donné par les mutants *drs* ("deficiency of ribosomal subunit") qui forment 7 groupes de complémentation correspondant à autant de gènes (Ripmaster *et al.*, 1993). Rien n'interdit donc penser que Dim-1p pourrait exercer ses 2 fonctions à partir du cytoplasme.

L'hypothèse d'une localisation nucléolaire de Dim-1p peut être envisagée. En effet, lors de l'inhibition du clivage A2, la diméthylation est observée sur le pré-ARNr 32S. Cette espèce est sans aucun doute nucléolaire, ce qui démontre que la réaction de diméthylation peut avoir lieu dans le nucléole. L'hypothèse d'une localisation

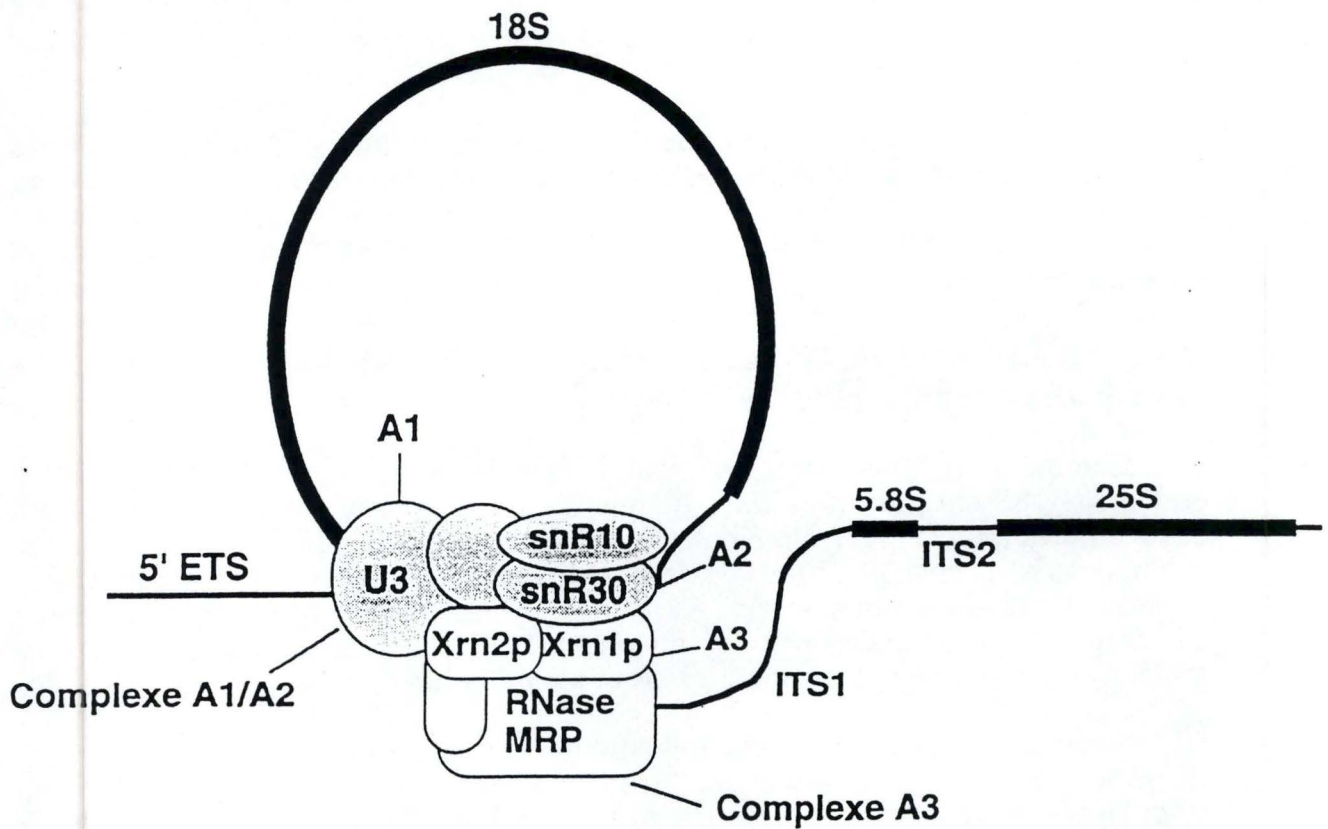


Figure 8: Modèle spéculatif du "processing" de l' ITS1. (Morrissey *et al.*, 1995).
 Le repliement de l' ARnr 18S place les sites de clivage A1 et A2 dans un voisinage qui permettrait leur processing commun. Le complexe A1-A2 est représenté en grisé, le complexe A3 en blanc. Les éléments présents (U3...) sont décrits comme participant aux réactions de clivage.

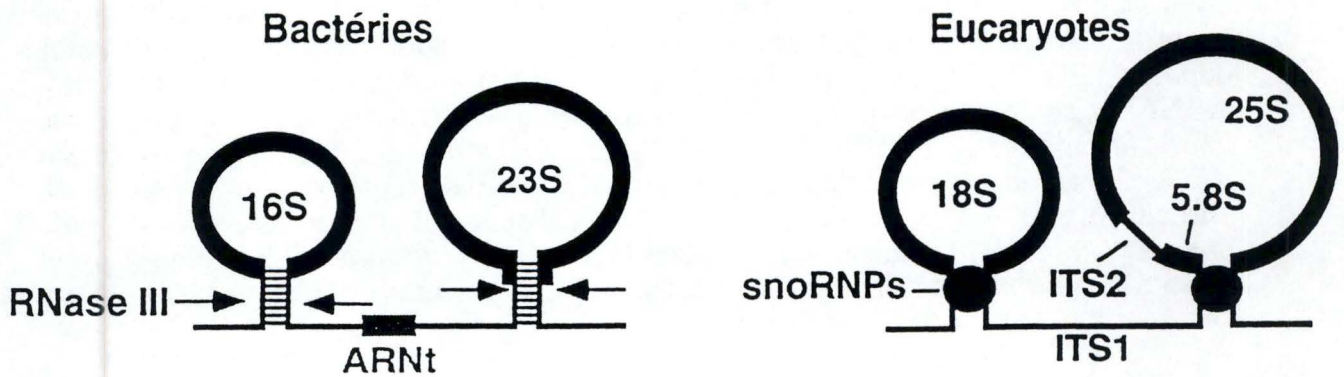


Figure 9: Modèle de l' évolution du "processing" ribosomal.
 Le même genre de structures sont produites, mais l' appariement des bases qui permet la formation de la structure chez les bactéries est remplacé chez la levure par l' action de facteurs *trans*: les snoRNPs.

nucléolaire permet, en outre, de comprendre l'implication de Dim-1p dans le "processing" aux stades A1 et A2. L'enzyme pourrait prendre part au complexe de clivage A1A2 que nous décrirons au point suivant. Par ailleurs, l'importation de la protéine vers le noyau pourrait être due à son extrémité aminée riche en lysines. Ce type de séquence terminale est en effet reconnu à ce titre (Garcia-Bustos *et al.*, 1991).

Pour rendre compte à la fois des diméthylations survenant, dans les souches sauvages, dans le cytoplasme, du "processing" nucléolaire et de certains cas de diméthylation nucléolaire, on est amené à supposer que Dim-1p pourrait faire la navette entre les compartiments cytoplasmique et nucléolaire. Ce rôle de navette a déjà été décrit pour la protéine ribosomale L5 et le facteur de transcription TFIIIA dans le cas de l'ARNr 5S (Guddat *et al.*, 1990). Le cas de la protéine RNA14p, qui exerce des rôles différents dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique, est également décrit (Bonneaud *et al.*, 1994). Le groupe de Borer a proposé quant à lui que le passage transitoire d'une protéine du noyau au cytoplasme pourrait représenter un important mécanisme d'intégration des activités de ces 2 compartiments cellulaires (Borer *et al.*, 1989).

La localisation cellulaire de Dim-1p est donc d'un intérêt primordial pour comprendre pleinement son rôle et les anticorps constituent à cette fin un outil adéquat.

B) L' étude des partenaires de Dim-1p par immunoprécipitation.

Le modèle de processing de l'ITS1, décrit à la Figure 8, postule notamment que le repliement de la séquence de l'ARNr 18S place les sites A1 et A2 dans un voisinage qui permettrait la synchronisation de ces clivages observée chez le sauvage et toujours perdue chez les mutants, notamment celui où Dim-1p n'est plus synthétisé (Morrisey *et al.*, 1995). Dim-1p pourrait donc interagir d'une façon ou d'une autre avec ce complexe.

La conformation du complexe n'est pas sans rappeler celle qui permet la libération de l'ARN 16S chez les bactéries (Figure 9). La différence majeure est que la structure procarotique est créée par appariement de bases, le clivage étant réalisé par la RNAaseIII; tandis que chez les eucaryotes, c'est aux protéines, associées quelquefois à des snRNAs (snoRNPs) que revient le rôle principal dans le "processing". Remarquons que la présence chez Dim-1p d'une extrémité aminée riche en lysine pourrait assurer sa fixation, par interactions électrostatiques, comme cela est montré pour d'autres protéines (Mirande *et al.*, 1991).

Le complexe évoqué ci-dessus est un exemple de ceux avec lesquels pourrait interagir Dim-1p. La co-immunoprécipitation de Dim-1p avec toutes molécules qui lui sont liées se présente comme un premier pas dans l'isolement des partenaires. Cette technique, couplée à la séparation sur gel de polyacrylamide, permet en effet de déterminer un certain nombre de caractéristiques comme la quantité d'antigène, le poids moléculaire des chaînes peptidiques ... Ici aussi, la production d'anticorps spécifiques de Dim-1p est requise.

Après avoir insisté sur l'intérêt de posséder des anticorps anti-Dim-1p, nous allons décrire les moyens couramment utilisés pour produire ceux-ci et développer davantage ceux qui ont été retenus dans le cadre de ce travail. Un sérum polyclonal

étant suffisant pour réaliser les travaux décrits ci-dessus, nous n'envisagerons pas la production des anticorps monoclonaux.

III. COMMENT PRODUIRE DES ANTICORPS POLYCLONAUX CONTRE DIM-1P.

III.1 Généralités.

Le terme "anticorps polyclonaux" d'un antigène donné est défini comme la population totale des anticorps présents dans le sérum d'un animal reconnaissant cet antigène. Ce mélange complexe contient les différentes sous-classes d'anticorps IgG, IgM, IgE, IgA et IgD. Chaque anticorps représente le produit sécrété d'un lymphocyte stimulé et de sa descendance clonale. Un antigène complexe, comme une protéine, peut contenir de nombreux déterminants antigéniques (ou épitopes) distincts; chacun d'entre eux étant spécifiquement reconnu par les anticorps issus d'un clone lymphocitaire. Un épitope peut se composer d'une séquence d'acides aminés linéaire, d'une conformation particulière ou d'une structure dérivée de modifications post-traductionnelles comme les glycosilations, les phosphorylations ou les acétylations.

La première technique qui fut mise en place pour produire des anticorps contre une protéine d'intérêt consiste à inoculer celle-ci à un animal-hôte qui la considérera comme étrangère. La protéine doit être disponible en quantité et on a souvent recours à un système d'expression pour la produire. Cette technique est décrite au point III.2.

La production d'une protéine dans un système d'expression pose des problèmes spécifiques qui ne sont pas toujours solubles. La synthèse de protéines hétérologues reste largement empirique et il n'existe pas de protocole "clé en main". Il faut adapter les méthodes déjà établies en fonction de la structure particulière du gène et de la protéine pour laquelle il code. Aussi, il arrive que la protéine ne puisse être produite quel que soient les systèmes utilisés (vecteurs, hôtes, fusion...). Il faut alors se tourner vers d'autres techniques de production d'anticorps. Parmi celles-ci, l'immunisation par ADN nu se présente comme une alternative en principe facile à développer. La technique, que nous développerons au point III.3, a d'ailleurs connu un essor prodigieux dans le domaine bio-médical et la fabrication des vaccins.

La production de peptides antigéniques, synthétisés sur base de l'étude de la séquence primaire de la protéine d'intérêt, a également été tentée pour produire des anticorps. Nous verrons les principes de cette méthode plus lourde au point III.4.

III.2 L' expression de la protéine.

La grande division du monde vivant entre pro- et eucaryotes se retrouve au niveau des systèmes d'expression. Ce sont d'abord les systèmes bactériens qui ont été développés en parallèle à l'étude de la génétique et de la biochimie de ces organismes. Ensuite, les connaissances acquises chez les eucaryotes ont permis de mettre au point des systèmes de plus en plus élaborés chez la levure et même chez les cellules supérieures.

La diversité des systèmes disponibles reflète bien la complexité du problème; en effet, l'expression d'une protéine dépend de nombreuses caractéristiques qu'il est souvent difficile de maîtriser. Nous allons décrire ci-après les facteurs essentiels qui interviennent dans ce genre de manipulation, en distinguant les systèmes d'expression pro- et eucaryotiques.

A) L'expression chez les procaryotes (Das *et al.*, 1990).

Un système efficace nécessite de disposer d'un vecteur et d'une souche compatible. Le vecteur doit comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription; il doit en outre pouvoir être maintenu de façon stable dans la cellule. La protéine synthétisée ne doit pas être sensible aux protéases de l'hôte et elle doit pouvoir subir toutes les modifications qui mènent à sa conformation fonctionnelle. De plus, l'hôte ne doit pas être sensible à l'expression de la protéine produite (toxicité). Tous les points évoqués, depuis la transcription jusqu'aux modifications finales, diffèrent entre les pro- et les eucaryotes, ceci constitue une limite des systèmes bactériens pour l'expression de protéines eucaryotes.

Au niveau du vecteur, les problèmes d'instabilité liée à la croissance ont été résolus en grande partie en incorporant des marqueurs de sélection de type résistance à un antibiotique. L'instabilité liée aux réarrangements (due aux séquences répétées, inversées et hautement palindromiques) est souvent plus difficile à maîtriser. Cependant, il est possible d'éviter ces problèmes en travaillant dans des souches recA-.

Le promoteur utilisé doit de préférence être fort et inductible. Le niveau de transcription dépend de la fréquence à laquelle la polymérase initie la transcription, ceci étant fonction de la séquence du promoteur. Le mode d'induction permet de lancer la transcription de la protéine d'intérêt au moment où la culture a atteint une biomasse suffisante. Ainsi, malgré une éventuelle toxicité liée à la présence de la protéine d'intérêt, une production considérable de celle-ci peut être atteinte.

Des problèmes de terminaison précoce de la transcription et d'instabilité du messenger sont assez fréquents. L'ADN inséré peut contenir une séquence "terminateur-like" pour *E. coli* intragénique qui va empêcher la transcription complète du gène d'intérêt. D'une manière générale, ce problème potentiel est éliminé en utilisant l'antitermineur λ qui est intégré au vecteur et permet de franchir les signaux d'arrêt. Pour ce qui est de la stabilité du messenger, la séquence "5' leader" peut influencer fortement les structures secondaires qui régissent en partie sa demi-vie dans la cellule. La jonction entre un linker et la séquence codante ainsi que la présence d'un terminateur fort à la fin du gène cloné augmente la stabilité de l'ARNm.

L'initiation de la traduction est une étape cruciale. Elle requiert une séquence "Shine-Dalgarno" optimale pour assurer la liaison à la petite sous-unité ribosomale via une interaction avec l'ARNr 16S. Cette séquence ne peut pas être séquestrée dans des structures secondaires ou se situer dans le voisinage de séquences reconnues par des "RNA binding proteins". L'environnement du codon d'initiation AUG est capital pour une traduction optimale: un A en position -3; les séquences GCAU ou AAAA à la suite du codon d'initiation; et la séquence UUAA dans le quatrième ou le cinquième codon se sont révélées favorables à l'initiation.

La stabilité de la protéine produite constitue un autre point critique. L'activation des protéases dépend de la demi-vie naturelle de la protéine, autant que de sa conformation correcte. Pour réduire la protéolyse de la protéine d'intérêt, 3 grands groupes de souches déficientes en protéases sont utilisés :

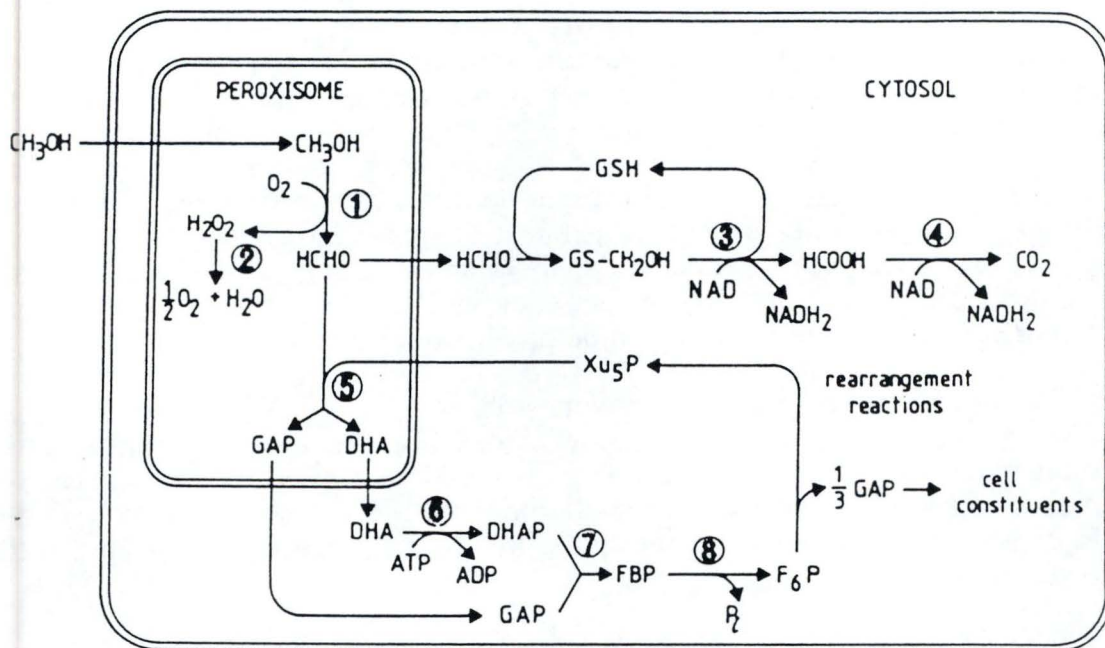


Figure 10: "Pathway" métabolique du méthanol chez les levures méthylotrophes (Gleeson *et al.*, 1988).

Enzymes: 1 alcool oxydase; 2 catalase; 3 formaldéhyde déshydrogénase; 4 formate déshydrogénase; 5 dihydroxyacétone synthétase; 6 dihydroxyacétone kinase; 7 fructose 1,6-bisphosphate aldolase; 8 fructose 1,6-bisphosphate phosphatase

GAP: glyceraldehyde 3-phosphate; DHA: dihydroxyacétone; DHAP: dihydroxyacétone phosphate; FBP: fructose 1,6-bisphosphate; F6P: fructose 6-phosphate; XU5P: xylulose 5-phosphate; GSH: reduced glutathione.

Il existe quatre genres de levures méthylotrophes (*Candida*, *Hansenula*, *Pichia* et *Torulopsis*). Le "pathway" métabolique du méthanol est similaire dans les quatre genres, il débute par l'oxydation du méthanol en formaldéhyde par l'alcool oxydase (AOX-1, parfois dénommée MOX, pour méthanol oxydase) dans le peroxysome. Le formaldéhyde peut alors s'engager dans deux voies pour participer aux synthèses cellulaires ou pour fournir de l'énergie.

Note: A ce jour, *Pichia pastoris* est la seule de ces levures à posséder un second gène d'alcool oxydase (AOX-2). Les séquences codantes de AOX-1 et AOX-2 présentent 97% d'homologie, par contre, les régions régulatrices diffèrent fortement et AOX-2 est faiblement exprimée. Aucune raison physiologique ne permet, à ce jour, de justifier la présence de ce second gène.

- les souches "*lon* mutant" ne possèdent pas la protéase majeure impliquée dans la dégradation des protéines à courte durée de vie ou mal repliées.
- les souches "*htpR* mutant" ne possèdent pas le facteur σ_{32} requis pour l'induction de la réponse aux chocs thermiques et des protéases associées.
- les souches "*degP* mutant" ne possèdent pas la protéase de l'espace périplasmique qui peut réduire fortement l'efficacité du système d'expression en cas de sécrétion de la protéine d'intérêt.

Dans un ensemble si complexe, les protéines eucaryotes sont souvent peu ou pas exprimées parce qu'une ou plusieurs des exigences citées ci-dessus ne sont pas remplies. Ce sont les problèmes de difficulté d'expression et le fait que les modifications post-traductionnelles propres aux protéines eucaryotes ne sont pas réalisées chez *E. coli* qui ont conduit au développement des systèmes eucaryotes.

B) L'expression chez la levure (Romanos *et al.*, 1992).

Parmi les systèmes d'expression eucaryotes, la levure demeure le modèle de choix puisqu'elle conjugue des avantages inhérents au procaryotes (principalement la facilité d'utilisation) et aux cellules supérieures (comme les modifications post-traductionnelles). Si *S. cerevisiae* s'est présentée comme le premier hôte développé, les études menées sur d'autres types de levures ont permis la mise au point de nouveaux systèmes à certains égards plus performants chez *Kluveromyces lactis* et *Pichia pastoris* principalement. Comme nous l'avons fait pour les procaryotes, nous allons maintenant passer en revue les caractéristiques essentielles de l'expression chez la levure.

Chez la levure, la sélection des transformants se base le plus souvent sur des marqueurs d'auxotrophie. Les plus communément utilisés sont *LEU2*, *TRP1*, *URA3* et *HIS3*. Ils sont utilisés dans des souches mutantes qui sont auxotrophes pour la leucine, le tryptophane, l'uracile et l'histidine respectivement.

Les promoteurs de levure contiennent au moins trois types d'éléments qui dirigent l'efficacité de l'initiation de la transcription: les UAS (upstream activation sequences), les éléments TATA et les autres éléments d'initiation. Beaucoup contiennent également des éléments de régulation. Les UAS déterminent l'activité du promoteur par la liaison d'activateurs transcriptionnels (*GAL4*...) et agissent à des distances variables en 5' du site +1. Les éléments TATA, situés entre 40 et 120 paires de bases du site +1 fournissent une "fenêtre" dans laquelle l'initiation de la transcription peut avoir lieu. Les promoteurs les plus forts, chez *S. cerevisiae*, sont ceux des "glycolytic enzymes" comme l'alcool déshydrogénase, mais ils sont souvent mal régulés. Les gènes impliqués dans le métabolisme du galactose (*GAL1*, *GAL7* et *GAL10*) sont les mieux régulés grâce à des interactions complexes entre transactivateur (*GAL4*), répresseur (*GAL80*) et UAS. La régulation s'opère grâce à un métabolite, le gène d'intérêt étant exprimé sur galactose et réprimé sur glucose.

Cependant, ce sont les levures méthylotrophes (*P. pastoris* ...) qui ont fourni le "promoteur idéal". C'est celui de l'alcool oxydase qui intervient dans le métabolisme du méthanol (Figure 10), et qui présente le double avantage d'une régulation stricte (induction sur méthanol et répression sur glucose), et d'une force remarquable puisqu'il amène l'alcool oxydase à des concentrations qui dépassent le tiers des protéines solubles. De très nombreux autres promoteurs sont utilisés, mais aucun ne présente les qualités de ceux que nous venons d'évoquer.

- les souches "*lon* mutant" ne possèdent pas la protéase majeure impliquée dans la dégradation des protéines à courte durée de vie ou mal repliées.
- les souches "*htpR* mutant" ne possèdent pas le facteur σ_{32} requis pour l'induction de la réponse aux chocs thermiques et des protéases associées.
- les souches "*degP* mutant" ne possèdent pas la protéase de l'espace périplasmique qui peut réduire fortement l'efficacité du système d'expression en cas de sécrétion de la protéine d'intérêt.

Dans un ensemble si complexe, les protéines eucaryotes sont souvent peu ou pas exprimées parce qu'une ou plusieurs des exigences citées ci-dessus ne sont pas remplies. Ce sont les problèmes de difficulté d'expression et le fait que les modifications post-traductionnelles propres aux protéines eucaryotes ne sont pas réalisées chez *E. coli* qui ont conduit au développement des systèmes eucaryotes.

B) L'expression chez la levure (Romanos *et al.*, 1992).

Parmi les systèmes d'expression eucaryotes, la levure demeure le modèle de choix puisqu'elle conjugue des avantages inhérents au procaryotes (principalement la facilité d'utilisation) et aux cellules supérieures (comme les modifications post-traductionnelles). Si *S. cerevisiae* s'est présentée comme le premier hôte développé, les études menées sur d'autres types de levures ont permis la mise au point de nouveaux systèmes à certains égards plus performants chez *Kluveromyces lactis* et *Pichia pastoris* principalement. Comme nous l'avons fait pour les procaryotes, nous allons maintenant passer en revue les caractéristiques essentielles de l'expression chez la levure.

Chez la levure, la sélection des transformants se base le plus souvent sur des marqueurs d'auxotrophie. Les plus communément utilisés sont *LEU2*, *TRP1*, *URA3* et *HIS3*. Ils sont utilisés dans des souches mutantes qui sont auxotrophes pour la leucine, le tryptophane, l'uracile et l'histidine respectivement.

Les promoteurs de levure contiennent au moins trois types d'éléments qui dirigent l'efficacité de l'initiation de la transcription: les UAS (upstream activation sequences), les éléments TATA et les autres éléments d'initiation. Beaucoup contiennent également des éléments de régulation. Les UAS déterminent l'activité du promoteur par la liaison d'activateurs transcriptionnels (*GAL4*...) et agissent à des distances variables en 5' du site +1. Les éléments TATA, situés entre 40 et 120 paires de bases du site +1 fournissent une "fenêtre" dans laquelle l'initiation de la transcription peut avoir lieu. Les promoteurs les plus forts, chez *S. cerevisiae*, sont ceux des "glycolytic enzymes" comme l'alcool déshydrogénase, mais ils sont souvent mal régulés. Les gènes impliqués dans le métabolisme du galactose (*GAL1*, *GAL7* et *GAL10*) sont les mieux régulés grâce à des interactions complexes entre transactivateur (*GAL4*), répresseur (*GAL80*) et UAS. La régulation s'opère grâce à un métabolite, le gène d'intérêt étant exprimé sur galactose et réprimé sur glucose.

Cependant, ce sont les levures méthylotrophes (*P. pastoris* ...) qui ont fourni le "promoteur idéal". C'est celui de l'alcool oxydase qui intervient dans le métabolisme du méthanol (Figure 10), et qui présente le double avantage d'une régulation stricte (induction sur méthanol et répression sur glucose), et d'une force remarquable puisqu'il amène l'alcool oxydase à des concentrations qui dépassent le tiers des protéines solubles. De très nombreux autres promoteurs sont utilisés, mais aucun ne présente les qualités de ceux que nous venons d'évoquer.

Fréquence des nucléotides autour du codon d'initiation.											
		-6	-5	-4	-3	-2	-1			+4	+5
FREQUENCE.	A	35	35	43	66	46	43			26	23
	G	18	12	10	18	9	15			28	12
	C	17	22	26	7	22	20			12	43
	U	30	30	21	8	23	21			34	22
CONSENSUS		A	A	A	A	A	A	AUG	U	C	

Table 2: Fréquence des nucléotides et séquence consensus autour de l' AUG d'initiation chez la levure.

	Acide aminé N-terminal	Demi-vie
Acides aminés stabilisants	Mét	>20 heures
	Sér	>20 heures
	Ala	>20 heures
	Thr	>20 heures
	Val	>20 heures
	Gly	>20 heures
	Cys	>20 heures
Acides aminés déstabilisants	Ile	+/-30 minutes
	Glu	+/-30 minutes
	Tyr	+/-10 minutes
	Gln	+/-10 minutes
	His	+/-10 minutes
Acides aminés fortement déstabilisants	Phé	+/-3 minutes
	Leu	+/-3 minutes
	Asp	+/-3 minutes
	Lys	+/-3 minutes
	Asn	+/-3 minutes
	Trp	+/-3 minutes
	Arg	+/-2 minutes

Table 3: "N-end rule" (adapté de Bachmair *et al.*, 1989).
La demi-vie d'une protéine mature est déterminée, au moins partiellement, par le résidu d'acide aminé N-terminal de la protéine.

La terminaison précoce des transcrits est un problème des systèmes d'expression. Ainsi, des régions riches en A-T dans l'ADN affectent l'élongation des messagers, au point d'induire la terminaison. L'utilisation de polymérase qui utilisent d'autres signaux de terminaison (comme la T7) est une solution souvent appliquée en pareil cas.

La stabilité du messenger est évidemment un paramètre important. Certains messagers contiennent des "éléments déstabilisants" mal caractérisés. Notons que messagers des protéines ribosomales sont souvent particulièrement instables (Romanos *et al.*, 1992).

L' initiation de la traduction suit, chez les eucaryotes, le mécanisme décrit par Kozak: celui-ci consiste en la liaison de la sous-unité 40S garnie de ces cofacteurs à l'extrémité 5' de la coiffe du messenger. Le complexe migre alors jusqu'au premier AUG: le codon d'initiation. Toutes les étapes de ce processus peuvent être affectées par la structure du leader non traduit et le contexte de l'AUG (voir Table 2).

La protéine une fois traduite et correctement repliée peut être dégradée par différents "pathways" de protéases: les protéases vacuolaires, activées par Pep4, qui dirigent le "turn-over" cellulaire des protéines à longue durée de vie et le système ubiquitine (une protéine de 76 aa très conservée chez les eucaryotes) qui est cytosolique et dégrade les protéines à courte durée de vie et celles dont la conformation est incorrecte. Une protéine cible n'est dégradée que si plusieurs molécules d'ubiquitine sont attachées à au moins un de ses résidus lysine. Après la liaison à l'ubiquitine, la protéine cible devient le substrat d'un vaste protéasome: complexe de dégradation ATP-dépendent. Le signal d'ubiquitination est connu sous le nom de "N-end rule", il repose apparemment sur deux conditions: un acide aminé N-terminal déstabilisant (voir Table 3) et la présence d'au moins un résidu lysine assez proche.

La sécrétion: une alternative intéressante mais complexe.

La dernière caractéristique de l'expression en levure que nous aborderons, c'est la possibilité de sécréter la protéine. Elle n'est pas typique de la levure, mais les tentatives effectuées chez *E. coli* restent très largement minoritaires. C'est avant tout pour exprimer des protéines naturellement sécrétées que les systèmes ont été mis au point, mais ils se sont révélés très efficaces quand des protéines, exprimées en intracellulaire, sont particulièrement instables ou toxiques.

La sécrétion de protéines chez la levure est dirigée par une séquence signal amino-terminale qui permet la translocation co-translationnelle dans le réticulum endoplasmique où les glycosylations "N-linked" sur asparagine et plus rarement "O-linked" sur sérine ou thréonine ont lieu. Il y a ensuite transport par vésicules vers le Golgi où les sucres sont éventuellement modifiés. La sécrétion elle-même est un processus encore mal connu qui fait intervenir des vésicules de bourgeonnement contenant le matériel à sécréter; le mécanisme est particulièrement demandeur en énergie. Des cas de "processing" (dans le cadre de la sécrétion, ce terme fait référence aux différents clivages qui permettent de séparer la protéine et la séquence signal) incorrect de la séquence signal sont décrits. Par ailleurs, les protéines sécrétées par *S. cerevisiae* présentent la plupart du temps des hyperglycosylations.

La sécrétion se présente comme une alternative intéressante puisqu'elle élimine les problèmes de toxicité et dégradation cytoplasmique et qu'elle permet en outre de faciliter les étapes de purification. Cependant, la complexité du pathway amène des

problèmes à différentes étapes, depuis les glycosilations jusqu'au clivage de la séquence signal. De plus, des protéases sont également sécrétées dans le milieu de culture. Aucune règle ne permet d'établir à priori si la sécrétion sera efficace.

III.3 L'immunisation par ADN nu.

A) Principe.

L'immunisation par ADN nu se base sur la constatation que l'ADN plasmidique peut être capté par les cellules du muscle squelettique *in vivo* sans aucune technique de transformation particulière. Il y persiste à long terme sous une forme extrachromosomique et non répliquative, permettant l'expression de protéines hétérologues qui peuvent éliciter des réponses immunitaires de type humorale et cytotoxique.

La démonstration de l'expression a été faite suite à l'injection d'un plasmide portant le gène de la chloramphénicol acétyl transférase dans le quadriceps de souris Balb/c. (Danko *et al.*, 1994). Le niveau d'expression était comparable à celui obtenu dans des fibroblastes transfectés avec le même plasmide dans des conditions optimales utilisant la lipofectine.

Le site d'expression a été déterminé en utilisant un vecteur portant le gène de la β -galactosidase de *E. coli*. Sept jours après l'injection de 100 μ g d'ADN dans le quadriceps de souris, 60 des 4000 fibres comprises dans le muscle montraient des évidences histochimiques de l'activité β -galactosidase.

Pour quantifier l'efficacité de l'expression à long terme, une construction contenant le gène de la luciférase fut injectée dans les mêmes conditions. Des quantités substantielles de luciférase étaient toujours présentes après 60 jours. La demi-vie de la protéine et du messager ne dépassant pas 24 heures dans le muscle, on doit conclure que c'est bien le maintien de l'ADN qui explique cette activité persistante.

Les études réalisées par la suite ont démontré que l'ADN était maintenu sous forme extrachromosomique, circulaire et non-répliquative. Les injections dans d'autres organes n'ont pas révélé d'expression, sauf dans le cas du muscle cardiaque qui peut également capter l'ADN plasmidique. Cependant, l'expression y est stable pour seulement 2 semaines. Le phénomène de capture a été mis en rapport avec la présence de tubules T qui constituent une caractéristique spécifique des muscles striés. Il s'agit d'invaginations de la membrane plasmique qui permettent au potentiel de dépolarisation de pénétrer à l'intérieur du muscle (Davis *et al.*, 1994).

Le transfert de gène apparaît 10 fois plus efficace dans un muscle en régénération. Ceci est probablement dû à la transfection d'un plus grand nombre de fibres plutôt qu'à un niveau d'expression plus élevé par fibre transfectée. On explique ceci notamment par le fait que la pénétration de la solution d'ADN plasmidique est facilitée puisque les fibres nouvellement formées laissent des espaces interstitiels plus conséquents. La réponse immune d'un muscle en régénération est également amplifiée suite à une meilleure transfection qui amènera une expression globalement augmentée, mais d'autres facteurs peuvent intervenir. Par exemple, le muscle en régénération contient un plus grand nombre de cellules mononuclées (parmi lesquelles on peut trouver des cellules présentatrices de l'antigène très

efficaces comme les macrophages ou les cellules dendritiques). En plus, le niveau d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité classe I est plus élevé sur le muscle immature (Davis *et al.*, 1994).

Les injections en sous-cutané sont aussi pratiquées; ce sont sans doute les cellules de Langerhans qui permettent la présentation de l'antigène puisque les kératinocytes eux-mêmes ne sont pas connus comme cellules présentatrices efficaces (Ramirez, 1994).

B) Réponses humorale et cellulaire suite à l'injection d'ADN nu.

Les travaux du groupe de Katsumi montrent que l'injection d'un plasmide portant le gène du facteur IX humain à des souris a amené une réponse humorale pour 3 des 4 animaux injectés en intramusculaire, et 5 des 9 animaux injectés en sous-cutané. De plus, les cellules extraites de la rate des souris inoculées développaient une réponse cytotoxique significative envers des cellules cibles exprimant l'antigène en membrane (Katsumi *et al.*, 1994).

Suite à l'immunisation par ADN nu (en sous-cutané) réalisée avec des constructions contenant des gènes de HIV-1, des études cinétiques ont montré que la réponse cytotoxique apparaissait après une première immunisation pour ensuite décliner au profit d'une réponse humorale (Haynes *et al.*, 1994). Les niveaux d'interféron γ et d'interleukine 4 suivaient le même schéma, confirmant le "shift" qui s'opère entre les deux réponses au fur et à mesure que les injections sont réalisées. Ceci pourra donc amener une orientation des réponses, notamment par contrôle cytokinique.

L'immunisation par ADN nu, utilisée dans le cadre de la vaccination, présente de nombreux avantages que nous ne détaillerons pas ici. Pour ce qui est de la production d'anticorps d'intérêt, elle se révèle aussi particulièrement intéressante, notamment pour obtenir des anticorps contre une protéine difficile à exprimer ou à purifier. Elle peut fournir le seul moyen pour produire un sérum polyclonal ou même des anticorps monoclonaux (Barry *et al.*, 1994) contre une protéine d'intérêt.

III.4 L'immunisation par peptides synthétiques (Van Regenmortel *et al.*, 1988).

Cette technique a été développée pour résoudre les problèmes posés par la vaccination avec des pathogènes complets ou inactivés. Le but étant d'injecter à l'animal à immuniser, uniquement les peptides portant les épitopes qui assureront la reconnaissance. On synthétise donc des peptides issus de la séquence de la protéine, et dont on a prédit qu'ils sont antigéniques. Le problème principal est précisément de prédire correctement cette antigénicité.

Pour la majorité des protéines connues, la seule information disponible est la séquence en acides aminés, souvent déduite de la séquence nucléique. La connaissance de la position de déterminants antigéniques de protéines dont la structure est bien connue a permis d'élaborer des règles empiriques pour la prédiction de la position des épitopes continus (les seuls utilisables pour l'immunisation par peptides) d'après la séquence primaire d'une protéine. Il existe une corrélation entre l'antigénicité et les caractéristiques décrites ci-dessous.

- L'hydrophobicité. On sait depuis longtemps que les acides aminés hydrophobes tendent à se localiser à l'intérieur de la structure spatiale des protéines. L'évaluation de l'hydrophobicité d'un segment permet donc de faire un pronostic sur son degré d'exposition au solvant. Cette approche a permis à Hopp et Woods (1981) de montrer que les segments les plus hydrophiles d'une protéine correspondent le plus souvent à des épitopes continus. Il existe de nombreuses échelles de prédiction d'hydrophobicité basées sur la distribution de chaque acide aminé entre une phase aqueuse et une phase organique.

- La mobilité segmentaire. On sait que les protéines ne sont pas des structures statiques et que leur activité est souvent liée à des modifications conformationnelles. Les régions de haute mobilité correspondent à des segments accessibles à la surface de la protéine. Une corrélation existe entre les pics du "plot" de mobilité et la position des épitopes d'une longueur de 6 à 10 résidus. La mobilité segmentaire n'est cependant pas une exigence absolue pour l'antigénicité.

- L'accessibilité de surface. Puisque les anticorps se lient à la surface des protéines, on peut s'attendre à ce que les épitopes consistent en des résidus "protrudant" à la surface des protéines. L'accessibilité ne constitue cependant pas une condition suffisante d'antigénicité.

- La terminaison de chaîne. Dans une majorité de protéines, les régions N-terminale et C-terminale sont localisées à la surface de la protéine et assez proches l'une de l'autre. Elles constituent souvent des épitopes continus, et des peptides de synthèse correspondant aux 10 ou 15 résidus terminaux sont très susceptibles, après immunisation, d'amener la production d'anticorps spécifiques de la protéine intacte.

- La variabilité de séquence. Dans les familles de protéines homologues, il est assez commun d'observer que les régions qui présentent une haute variabilité de séquence correspondent à des épitopes. En effet, les régions d'une protéine dans laquelle des changements locaux de conformation (suite à une mutation ponctuelle) peuvent être tolérés, ont plus de chance d'être localisées en surface. Dans ce cas, ces régions ne sont pas engagées dans les interactions majeures qui assurent le repliement de la protéine.

Le choix des peptides à synthétiser doit ressortir d'un compromis entre toutes ces variables. En pratique, ce sont la mobilité segmentaire et l'hydrophobicité qui sont les caractéristiques auxquelles on porte le plus d'attention. Des peptides correspondant aux extrémités de la protéine sont également le plus souvent synthétisés. Nous terminerons en citant 3 exemples différents où la technique a porté ses fruits.

L'immunisation par un peptide synthétique recouvrant l'extrémité aminée (15 aa) de la protéine majeure de capsid du parvovirus canin (CPV) a amené une activité humorale neutralisante (Langeveld *et al.*, 1994).

Des anticorps IgG contre un peptide C-terminal de l'allergène majeure du pollen d'herbe (*Lol pI*) inhibent le relargage d'histamine par les basophiles mis en présence de l'antigène naturel (Van Ree *et al.*, 1995).

On a décrit également l'induction d'une réponse humorale contre les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* suite à l'immunisation par peptide

synthétique mimotope. Ce peptide montrait 50% d'homologie avec l'épitope natif, d'où son nom de mimotope (Stoute *et al.*, 1995).

BUT DU TRAVAIL.

La maturation des ARNr implique des modifications de différents types. La double diméthylation $m^6_2Am^6_2A$ située sur l'"hairpin" de la partie terminale 3' de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale est la seule de ces modifications qui soit conservée entre pro- et eucaryotes.

C'est l'enzyme KsgA qui réalise cette double diméthylation chez *E. coli*. La diméthylase de la levure *S. cerevisiae* (Dim-1p) a été clonée grâce à sa capacité de compléter le phénotype *ksgA-* d'une souche d'*E. coli* mutée et non diméthylée. Des études récentes ont permis d'établir que la double diméthylation est essentielle chez la levure, contrairement à la situation procaryotique. La fonction des quatre groupes méthyles, associée chez *E. coli* à l'initiation de la traduction, ne peut être extrapolée aux eucaryotes qui utilisent, à ce niveau, des mécanismes différents.

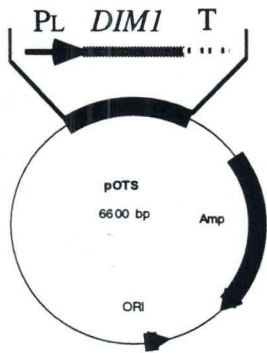
D'autre part, on a pu impliquer Dim-1p dans les étapes nucléolaires de "processing" des pré-ARNr aux stades A1 et A2, ce qui suggère pour cette protéine une fonction "processase" en plus de son activité diméthylase.

Ainsi donc, les deux fonctions de la protéine justifieraient sa présence dans deux compartiments cellulaires différents, à savoir le noyau pour son activité "processase" et le cytoplasme pour son activité diméthylase. La fonction "processase" de Dim-1p pourrait résulter de l'association de la protéine au "complexe de processing A1-A2" dont il existe un modèle. Les partenaires de la protéine pourraient, dans ce cas, être caractérisés par immunoprécipitation. Quant au problème de la localisation subcellulaire de Dim-1p, nucléolaire et/ou cytoplasmique, il devrait être éclairé par l'immunodétection in situ.

Le but de ce travail est d'obtenir un sérum enrichi en anticorps polyclonaux anti-Dim-1p pour pouvoir réaliser ces expériences.

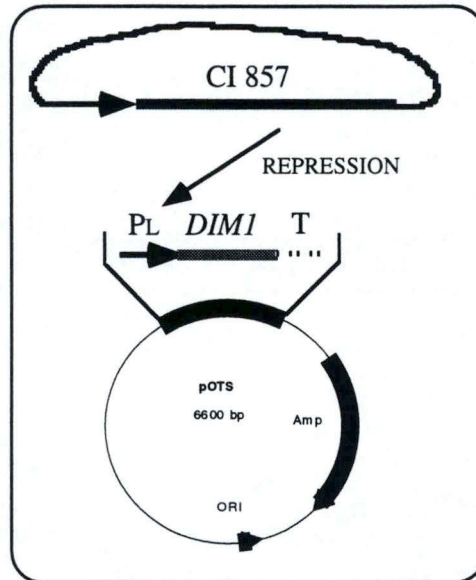
Dans cette optique, deux approches ont été suivies: la surexpression de la protéine, qui doit permettre une production suffisante pour immuniser un animal, et l'immunisation par ADN nu. Une double approche se justifie vu les hypothèses inhérentes à chacune d'elles.

RESULTS



1 Cloner le gène d'intérêt dans le vecteur pOTS

2 Transformer AR58
Le promoteur Pl ne s'exprime pas suite à la présence de CI857



3 Un choc thermique détruit le répresseur. Le promoteur Pl peut s'exprimer.

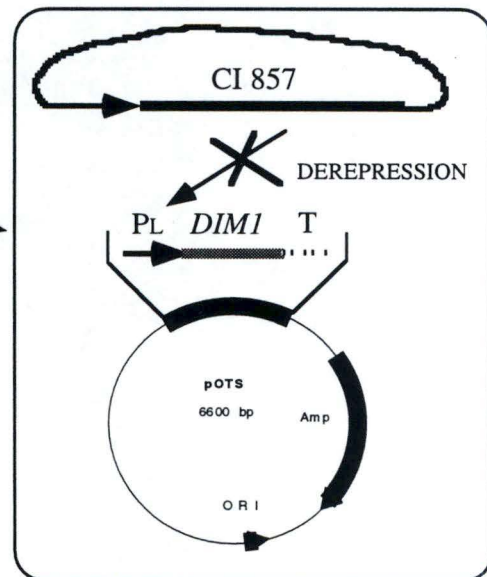


FIGURE I.1: Le système d'expression par choc thermique.
Pl: promoteur contrôlé par CI857. T: terminateur de transcription.

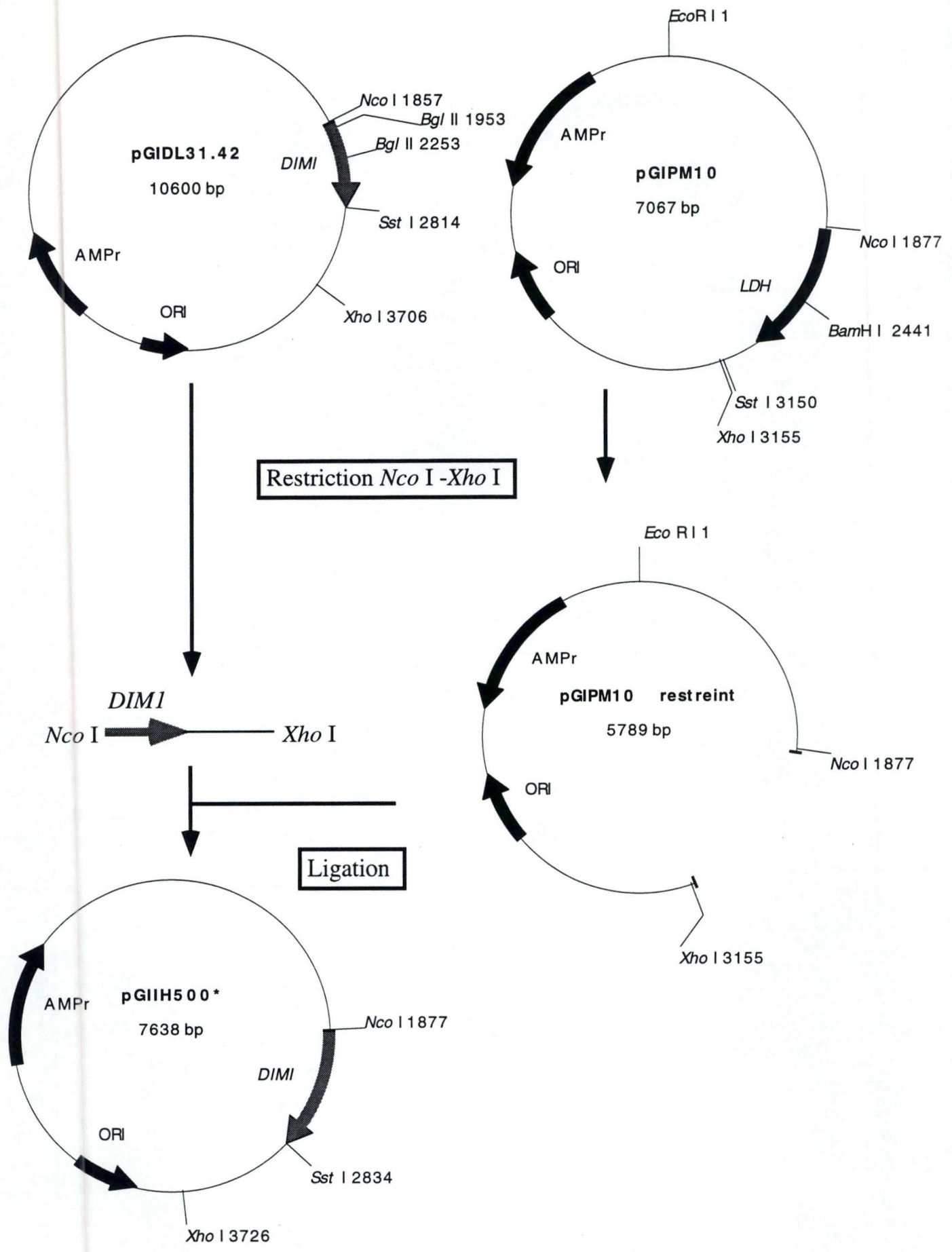


FIGURE I.2: Schéma de la construction du pGIIH500* (voir texte).

I. SUREXPRESSION DE DIM-1P DANS UN SYSTEME HETEROLOGUE.

Choix du système d'expression et principe.

La très bonne connaissance de la génétique de *E. coli* et sa grande souplesse d'utilisation en ont fait un hôte de choix pour l'expression de protéines hétérologues. C'est donc très naturellement que nous nous sommes tourné vers elle pour produire la protéine Dim-1p. Nous avons choisi d'utiliser le système d'induction par choc thermique basé sur le vecteur pOTS_{Nco12} (voir "Matériel et Méthodes" point 2.3) suite au succès obtenu au laboratoire lors de son utilisation pour surexprimer la Lactate Déshydrogénase (LDH) de muscle de lapin. Le vecteur contenant le gène de la LDH nous a par ailleurs servi de contrôle positif lors des manipulations.


Le système d'expression, décrit à la Figure I.1, repose sur le promoteur phagique P_I connu pour les très hauts niveaux de transcription qu'il permet d'atteindre. Le problème de l'instabilité inhérent à une telle "force" de promoteur est résolu en travaillant dans une souche bactérienne qui contient une portion intégrée du génome du phage λ (lysogène bactérien), codant pour le répresseur c_I du promoteur P_I. En pratique, on utilise un répresseur thermosensible (cI857), si bien que la transcription au départ de P_I peut être contrôlée par la température de la culture. A la température permissive (32°C), les cellules peuvent croître à haute densité sans expression du gène d'intérêt et donc sans un éventuel fardeau correspondant; par la suite, le promoteur est induit par passage à haute température (42°C) qui détruit le répresseur.

I.1 Expression dans la souche AR 58.

A) Construction des vecteurs d'expression.

Une carte de restriction sommaire du pGIPM10 est donnée dans la partie "Matériel et Méthodes". Pour créer le plasmide de surexpression pGIIH500*, le pGIPM10 a été restreint par les enzymes *Nco* I et *Xho* I, libérant ainsi la matrice de surexpression pOTS (5789pb) et un insert portant la LDH (1278pb). Le pGIDL31.42 qui porte l'ORF de *DIMI* (voir Matériel et Méthodes) a été restreint de la même façon pour libérer un fragment de 1849pb, celui-ci a été "ligué" dans la matrice pOTS pour générer le pGIIH500*. La Figure I.2 résume cette construction.

Des cellules compétentes à la transformation au chlorure de calcium sont préparées et le mélange de ligation est "transformé" dans la souche de surexpression AR58. La croissance s'effectue sur milieu LB amp puisque la matrice pOTS porte le marqueur de sélection de résistance à l'ampicilline. Après minipréparation, une restriction diagnostique du pGIIH500* est réalisée par les enzymes *Sst* I et *Xho* I; elle doit donner les fragments suivants:

	<i>Sst</i> I <i>Xho</i> I
pGIIH500*	892pb 6746pb

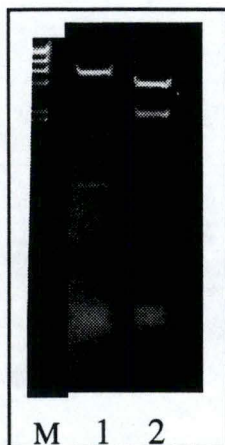


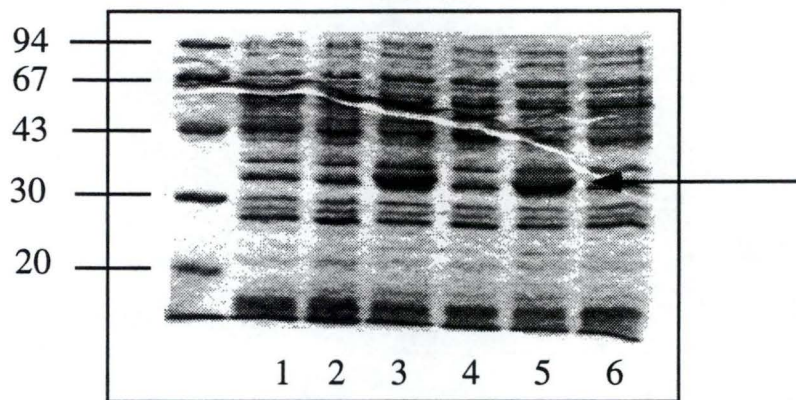
FIGURE I.3: Electrophorèse analytique des restrictions diagnostiques des plasmides pGIPM10 et pGIIH500*.

pGIIH500* restreint par *Sst* I -*Xho* I (piste 1).

pGIPM10 restreint par *Bam* H I -*Eco* R I (piste 2).

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

(A)



(B)

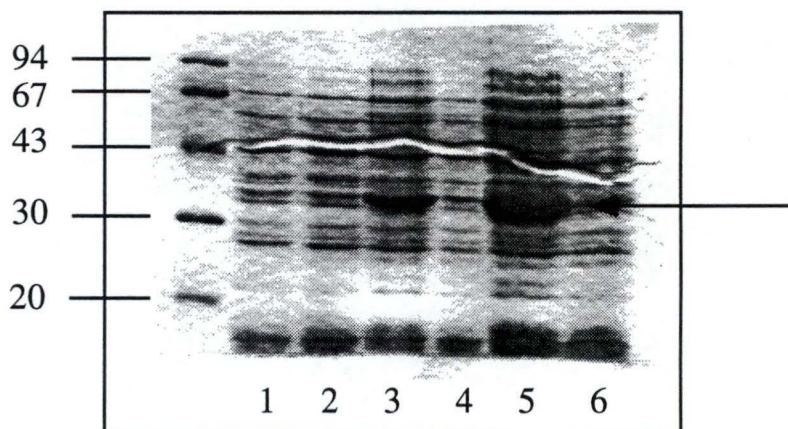


FIGURE I.4: Electrophorèse analytique des protéines solubles et totales extraites de la souche AR58 transformée par les plasmides pGIPM10 et pGIIH500*

A) Gel des protéines solubles.

pGIPM10 (pistes 1,3,5); pGIIH500* (pistes 2,4,6).


T0 (pistes 1,2); T1 (pistes 3,4); T2 (pistes 5,6).

B) Gel des protéines totales.

Disposition identique au point A.

La présence de la LDH est indiquée par les flèches.

La photo de la Figure I.3 montre qu'on trouve bien ces fragments, elle présente aussi une restriction diagnostique *Bam*H I-*Eco*RI du pGIPM10 également transformé dans AR58; les fragments attendus sont:

	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI
pGIPM10	2441pb 4626pb

B) Induction de l'expression dans la souche AR58.

Deux précultures sont inoculées à partir des clones portant les plasmides d'intérêt. Après une croissance d'une nuit sur milieu LB amp à 30°C, deux cultures de 200 ml sont inoculées avec 1 ml de préculture et placées à 30°C. La densité optique est suivie à 540nm et lorsque les cultures sont en phase de croissance exponentielle (DO de 0,3), elles sont placées dans un bain à 42°C, température d'induction des promoteurs Pl. Le "shift" à haute température constitue le temps 0 et un premier prélèvement de 25 ml de culture est alors effectué. Les autres prélèvements sont réalisés après induction de 2 heures (temps 1), 4 heures (temps 2), 5 heures 30 (temps 3) et 20 heures (temps 4). Après centrifugation, les culots sont stockés à -80°C.

Les protéines solubles et totales, correspondant à chaque temps, sont préparées et dosées (voir "Matériel et Méthodes" point 4.1 et 4.3). Une trentaine de microgrammes sont déposés dans un volume de 35 µl dans chaque puits d'un gel SDS-PAGE 12%. Après migration, les gels sont colorés et fixés puis séchés.

La Figure I.4 montre les patterns d'électrophorèses des protéines solubles et totales pour les temps 0,1 et 2. Au temps 1, c'est à dire 2 heures après l'induction, on voit apparaître une bande plus intense à la taille attendue de la LDH (PM=36kd), cette bande se maintient au cours de l'induction jusqu'au dernier prélèvement, c'est-à-dire 20 heures après l'induction (données non montrées). Par contre (pistes 2,4,6), à la taille attendue de Dim-1p (PM=35kd) qui se situe dans la même zone, aucune différence n'apparaît par rapport au temps 0. Ceci étant vérifié jusqu'au temps 4. Le gel des protéines totales confirme ce résultat et permet d'écarter l'hypothèse de la formation de corps d'inclusion insolubles. Nous concluons qu'il n'y a pas d'expression détectable du gène d'intérêt.

Ce résultat pourrait tirer son explication de diverses causes que nous avons examinées.

C) Examen des diverses hypothèses pour expliquer l'absence de surexpression de Dim-1p chez *E. coli*.

Trois hypothèses ont été élaborées et testées: d'une part, l'instabilité plasmidique, d'autre part la non-fonctionnalité du gène *DIMI* cloné dans le pGIIH500*; enfin, nous avons envisagé une intolérance de l'hôte liée à la présence et aux caractéristiques de la protéine Dim-1p.

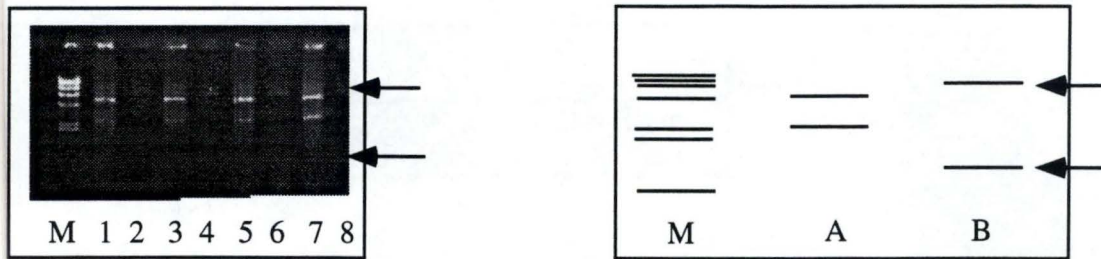


FIGURE I.5: Electrophorèse analytique du maintien des plasmides en cours d'induction.

pGIPM10 restreint par *Bam* H I-*Eco* RI (pistes 1,3,5,7).

pGIIH500* restreint par *Sst* I-*Xho* I (pistes 2,4,6,8).

T0 (pistes 1,2); T1 (pistes 3,4); T2 (pistes 5,6); T3 (pistes 7,8).

Vu la mauvaise qualité du document, les profils sont schématisés sur la partie droite de la figure: A= pGIPM10, B=pGIIH500*.

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

C.1. L'instabilité du plasmide pGIIH500*.

La perte du plasmide en cours d'induction doit être envisagée malgré la présence d'ampicilline dans le milieu de culture. En effet, ce mode de sélection n'est pas très drastique car l'antibiotique est dégradé par la β -lactamase sécrétée par les bactéries porteuses du plasmide. En conséquence, la concentration en ampicilline diminue au cours de l'induction, ceci pourrait favoriser la perte du plasmide. Nous avons cherché à savoir si le plasmide était maintenu.

Pour chaque prélèvement de 25ml, un aliquot de 3ml est centrifugé et stocké à -80°C . L'ADN plasmidique des dix culots est alors récolté en minipréparation et soumis aux mêmes restrictions diagnostiques que celles décrites au point A. Le résultat est présenté à la figure I.5. On voit que les plasmides sont présents constamment. La non-expression du gène *DIMI* résulte donc d'autres raisons. La stabilité plasmidique n'étant pas en cause, l'absence d'expression de Dim-1p pourrait résulter d'une mutation introduite dans la séquence du gène en cours de clonage comme par exemple l'apparition d'un codon "STOP". Il ne faut en effet pas oublier que l'ADN est soumis à une exposition intense au rayonnement ultra-violet lors des manipulations relatives à la construction du vecteur. Nous avons donc utilisé un test fonctionnel pour juger de l'intégrité fonctionnelle de la construction pGIIH500*.

C2: Test d'intégrité fonctionnelle de la construction du pGIIH500*.

Ce test repose sur la propriété qu'a DIM-1p d'exercer son activité sur l'ARNr 16S de *E.coli*. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, la diméthylation des adénosines 1518 et 1519 de cet ARNr est associée à la sensibilité à un antibiotique: la kasugamycine. En transformant la souche DL101 ksgA- résistante à l'action de l'antibiotique (voir "Matériel et Méthodes" point 2.1.2.) par le plasmide pGIIH500*, on peut donc tester la restauration du phénotype de sensibilité indiquant du même coup la production d'une enzyme fonctionnelle et l'intégrité de l'insert cloné.

Nous avons préparé des cellules DL101 compétentes à la transformation au chlorure de calcium. Celles-ci ont été transformées par le plasmide, le mélange étant étalé sur milieu MINA (voir "Matériel et Méthodes" point 3.1.3.) additionné d'uracile (50mg/ml) pour compléter le caractère *pyrF*- de DL101. Deux contrôles sont effectués:

- Un contrôle négatif avec DL101 transformée par le pFL44S seul qui ne peut restaurer la sensibilité à la kasugamycine.
- Un contrôle positif avec DL101 transformée par le pGIDL31.42 qui porte le gène *DIMI* et qui restaure le phénotype de sensibilité par l'activité diméthylase de l'enzyme.

Les transformants sont resuspendus dans 100 μ l d'eau stérile, et des gouttes de 5 μ l sont déposées sur milieux MINA qui servira de contrôle de croissance et MINK qui permet le test phénotypique. Les résultats sont présentés à la Figure I.6 et résumés dans le tableau ci-dessous. Un + signifie croissance et donc résistance, un - non-croissance et donc sensibilité.

Plasmides transformés.	MINA	MINK
pFL44S.	+	+
pGIDL31.42.	+	-
pGIIH500*.	+	-

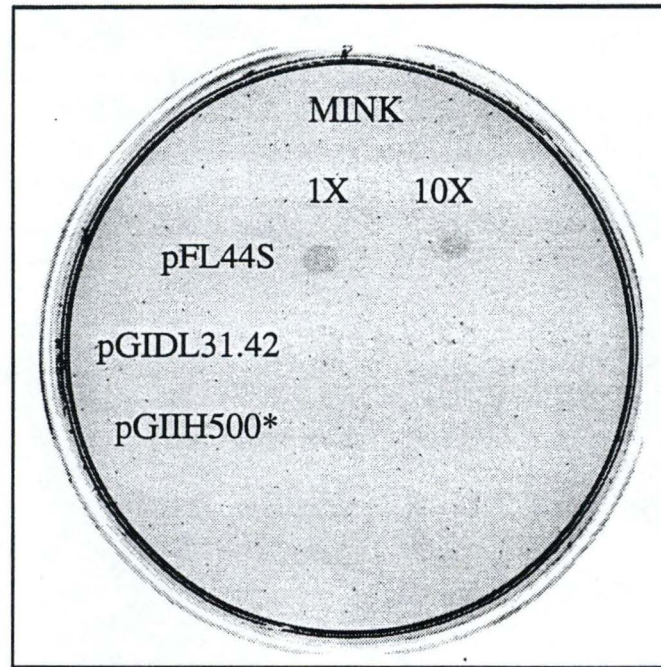


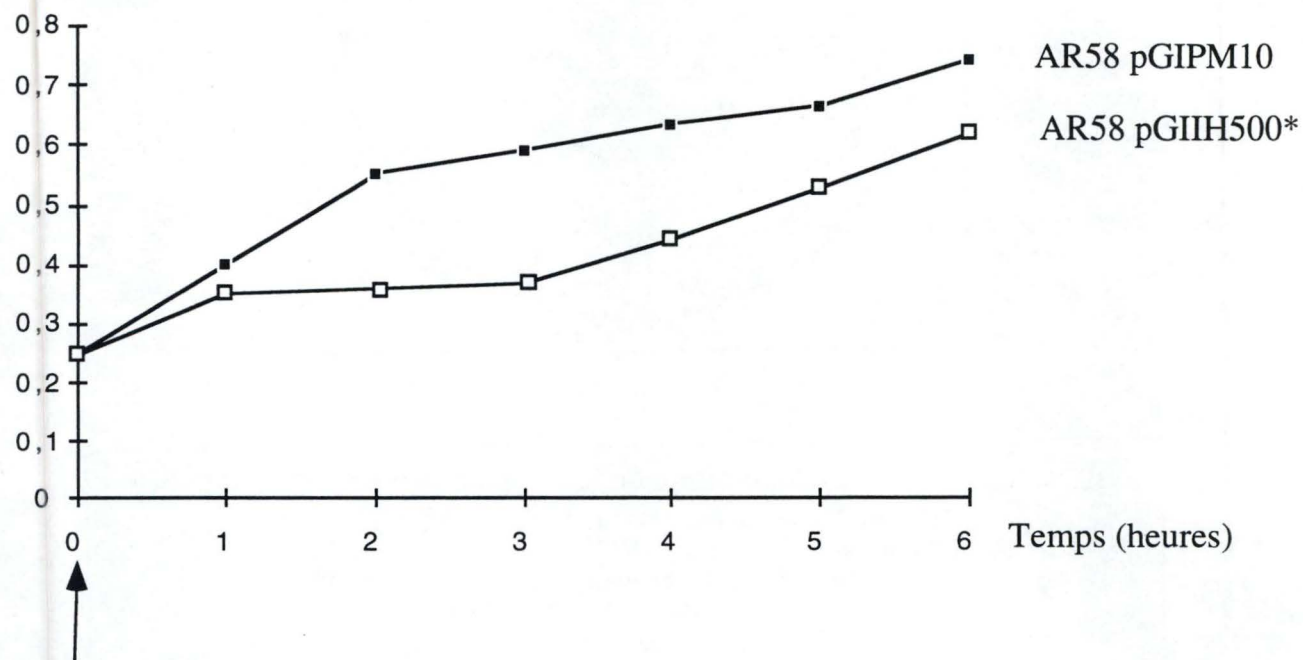
FIGURE I.6: Test phénotypique de la capacité de restauration de la sensibilité à la kasugamycine par le pGIIH500*.

Le pGIDL 31.42 qui contient le gène *DIM 1* sert de contrôle positif, il restaure bien la sensibilité à la kasugamycine chez sur MINK.

Le pFL44S sert de contrôle négatif.

Une dilution 10X des gouttes déposées est également présentée.

Densité optique (540nm)



Induction

FIGURE I.7.: Evolution de la densité optique (à 540nm) des cultures AR58 transformées par le pGIIH500* et par le pGIPM10. Les temps sont donnés en heures après l'induction (voir texte).

On doit donc conclure de ceci que le pGIIH500* porte un gène capable de s'exprimer pour donner une protéine fonctionnelle.

C.3. Intolérance de *E. coli* à l'accumulation de Dim-1p.

La présence de la protéine DIM-1p pourrait constituer un fardeau pour l'hôte. Une surexpression pourrait par exemple mener à des méthylations aspécifiques mal tolérées par la bactérie; alternativement, la présence de la protéine elle-même exercerait un effet indésirable. On sait que les protéines ribosomales ont une expression particulièrement régulée, et qu'elles ne constituent pas de "pool" libre. La présence de Dim-1p en excès pourrait donc perturber l'équilibre de la biogénèse ribosomale. La mesure de l'évolution de la densité optique et la mise en évidence d'un éventuel retard de croissance de la souche transformée par le pGIIH500* en serait un bon indicateur. Nous avons donc réalisé une lecture de DO, à 540nm, toutes les heures. La Figure I.7 présente une moyenne des résultats obtenus lors de deux inductions différentes pour les cultures AR58 pGIPM10 et AR58 pGIIH500*. La culture "pGIIH500*" marque un retard assez sensible. Ce retard apparaissant après l'induction, l'hypothèse d'un fardeau engendré par la présence de DIM-1p n'est pas à exclure.

Cependant, une intolérance d'un autre type pourrait entraîner la dégradation de la protéine. On sait que *E. coli* réagit rapidement à la présence de protéines instables ou mal conformées par l'activation de systèmes de protéolyse (Goff *et al.*, 1985). Nous n'avons d'indications ni sur la stabilité, ni sur la conformation de Dim-1p à 42°C. Une mauvaise conformation de la protéine à la température d'induction pourrait l'engager dans une protéolyse abondante. Nous avons tenté de réduire la protéolyse en travaillant dans des conditions d'induction qui la minimisent (point I.2) ou avec la souche AR 68 déficiente en protéases (point I.3).

I.2 Expression dans la souche M5219.

Nous avons utilisé la souche M5219 (voir "Matériel et Méthodes" point 2.1.1.) dans le but de réduire la protéolyse engendrée par le choc thermique d'induction du promoteur Pl. Comme nous allons le voir, on joue ici sur une privation en tryptophane au cours de la croissance de la souche auxotrophe pour cet acide aminé. Resituons dans un premier temps les acteurs de la réponse au choc thermique chez *E. coli*.

A) La réponse au choc thermique .

Les bactéries soumises à un choc thermique induisent la synthèse d'un lot de protéines nommées "heat shock proteins" ou hsps. Les gènes qui codent pour ces protéines sont sous le contrôle d'un promoteur de choc thermique (Strauss *et al.*, 1987) reconnu par une ARN-polymérase qui a lié le facteur σ_{32} au lieu du facteur σ_{70} , habituellement associé à la polymérase. A 30°C, le facteur σ_{32} est présent en très faible quantité (moins de 50 molécules par cellule), sa synthèse augmente de 11 fois dans les premières minutes du choc. Quant à la demi-vie de la protéine, très courte à 30°C (moins d'une minute), elle augmente de 8 fois au même moment. Ce changement de stabilité est en accord avec le modèle qui suggère que les cellules détectent un stress par l'apparition de protéines instables (Munro *et al.*, 1985); en

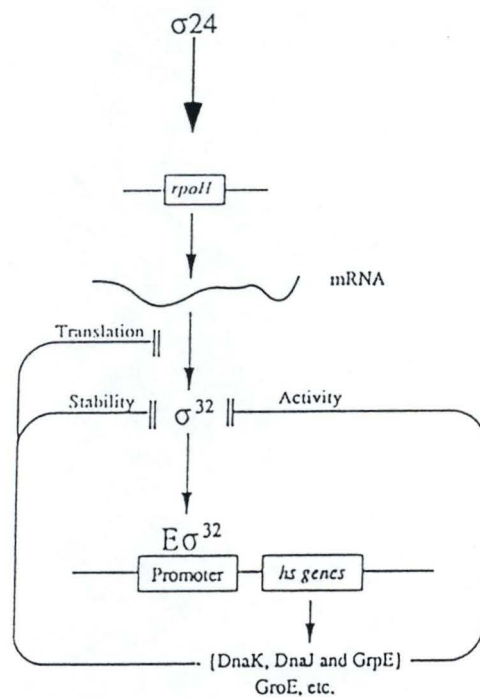


FIGURE I.8: Modèle spéculatif du rôle de la DNA K dans le contrôle de l' expression des hsp 70 (Craig et al., 1991). Après un choc thermique, il y a déplétion du pool de hsp70 (DNA K) libre, éliminant son effet régulateur négatif sur la stabilité et la traduction du facteur σ_{32} . Celui-ci peut alors activer les promoteurs de choc thermique en se liant à l' ARN polymérase. σ_{32} est encodé par le gène *rpoH*.

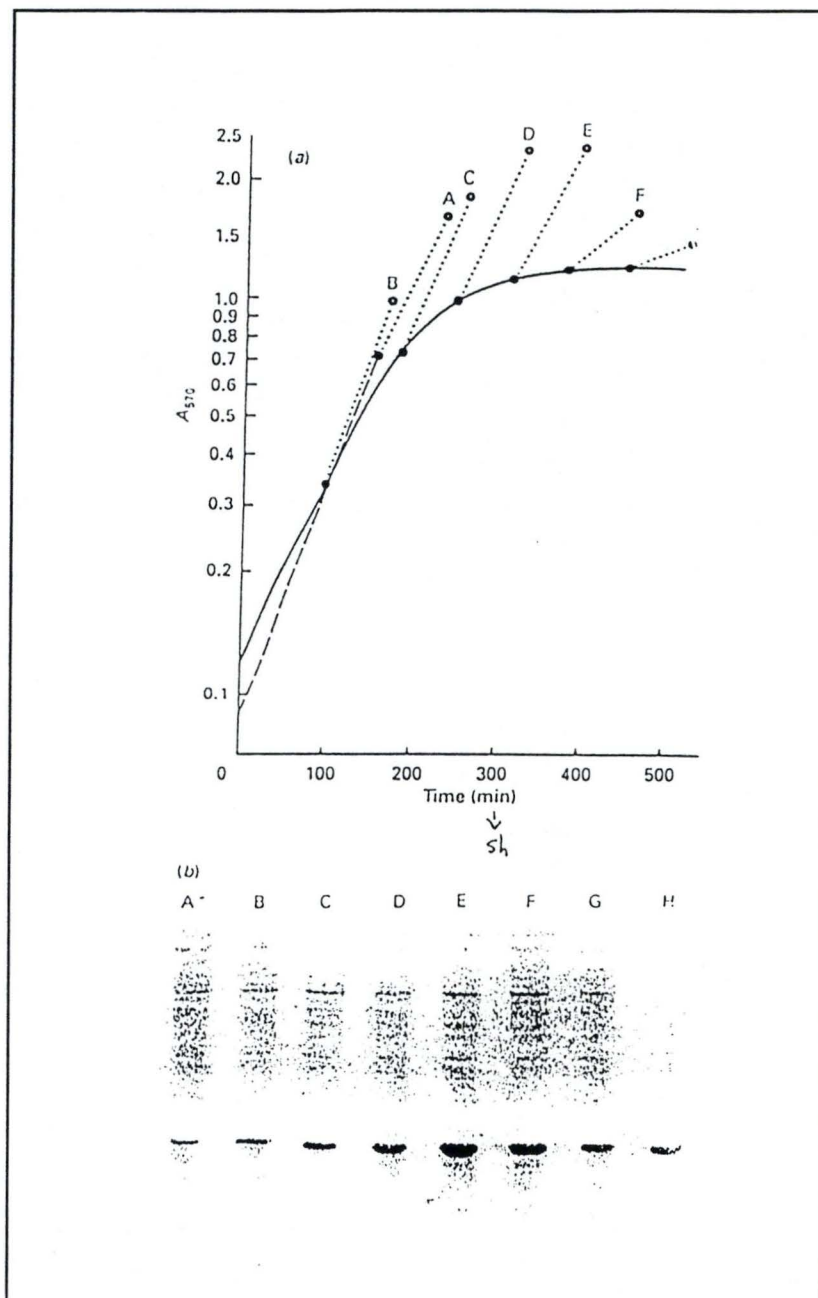


FIGURE I.9: Expression de λL après privation en tryptophane.

(Soumillion *et al.*, 1992)

a) Courbe de croissance de la culture M5219 en milieu CAS.

Les lignes pointillées représentent le choc thermique et l'adjonction de tryptophane. Pour chacun des temps indiqués (A-G), le choc a été réalisé et les protéines préparées 75 minutes plus tard.

b) Gel SDS-PAGE 15%.

Les différentes pistes correspondent aux différents moments d'induction décrits au point a.

La piste H montre le λL purifié.

effet σ_{32} serait stabilisé quand la protéase hsp70, responsable de sa dégradation, est saturée par des polypeptides instables, c'est-à-dire suite au choc thermique.

Comme nous venons de le voir, le facteur σ_{32} est contrôlé à deux niveaux: la traduction de l'ARNm et la stabilité. Ces deux modes de régulation, apparemment sans rapport s'intègrent en fait dans un même schéma résumé à la Figure I.8. Dans un tel modèle (Craig *et al.*, 1991), une augmentation de température génère l'apparition de certains "substrats" qui vont dépléter le pool de hsp 70 (produit du gène *DnaK*), alors qu'une diminution de température va éliminer progressivement ces molécules. Ces "substrats" incluent les protéines instables et celles dont la conformation s'est altérée suite au choc thermique. Le choc thermique va donc temporairement interférer avec la capacité de la cellule à réprimer la synthèse et dégrader le facteur σ_{32} . Cette situation est de courte durée puisque hsp70 est aussi une protéine de choc thermique dont la présence est fortement induite par σ_{32} . Le pool sera alors reconstitué et σ_{32} ramené à son niveau basal. On a donc affaire à une boucle qui a valu à hsp70 le nom de "thermomètre cellulaire".

Dans le cas qui nous occupe, il est intéressant de noter que le répresseur cI857 est une cible de hsp70 (Gaitanariis *et al.*, 1990). Il participe donc activement à la saturation de la protéase, engendrant ainsi l'apparition de la réponse "heat shock" et du lot de protéases associées. La protéine d'intérêt (ici Dim-1p) se trouve donc dans un environnement hostile, et pour peu qu'elle soit elle-même instable, ou de conformation impropre, on peut concevoir qu'elle soit abondamment protéolysée.

B) Réduction de la protéolyse après choc thermique (Soumillion *et al.*, 1992).

Le groupe de P. Soumillion a observé une forte diminution de la protéolyse induite après un choc thermique par privation en tryptophane, menant à une expression accrue du lysozyme du phage λ cloné sous le contrôle d'un promoteur Pl.

On peut expliquer le rapport entre la privation en tryptophane et la réduction de la protéolyse comme suit: le manque de tryptophane induit une réponse stringente chez la bactérie qui mène à une augmentation de la protéolyse, beaucoup de protéines instables sont dégradées pour relarguer les acides aminés indispensables à la survie. Lors de l'induction par choc thermique, le "pathway réponse stringente" réduit donc le taux de protéines instables disponibles avec pour conséquence une protéolyse continuelle de σ_{32} qui ne pourra déclencher la réponse "heat shock".

Les auteurs décrivent aussi une inhibition transcriptionnelle de σ_{32} . En effet, le facteur σ_{24} responsable de l'augmentation de transcription du gène *rpoH* (voir Figure I.8) disparaîtrait suite à la réponse stringente (Wang *et al.*, 1989). La Figure I.9 présente les résultats obtenus par ces auteurs en utilisant ce système.

La souche M5219, auxotrophe pour le tryptophane, transformée par le plasmide de surexpression est cultivée dans un milieu CAS (voir "Matériel et Méthodes" point 3.1.2). A différents temps avant et pendant la phase stationnaire, les cultures sont placées à 42°C et du L-tryptophane est ajouté à la concentration de 50mg/ml. Les prélèvements sont réalisés 75 minutes plus tard.

Quand l'expression est induite en phase stationnaire en plaçant la culture à 42°C et en lui ajoutant du tryptophane, une augmentation significative de

Densité optique (540nm)

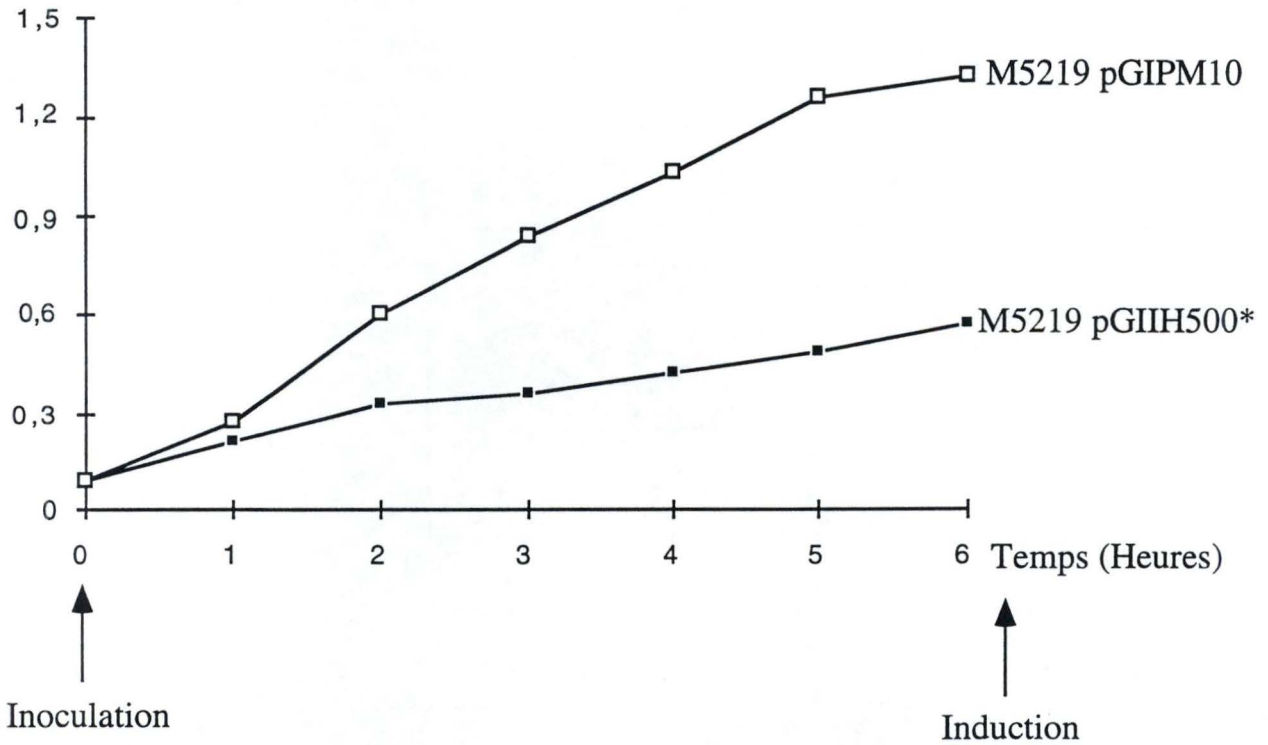
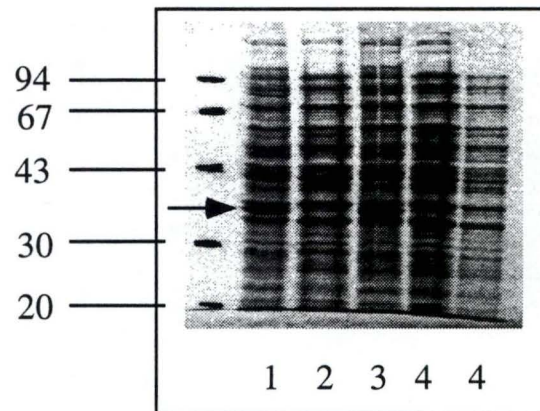


FIGURE I.10: Evolution de la densité optique (à 540nm) des cultures M5219 transformées par le pGIIH500* et par le pGIPM10.

Les temps sont donnés en heures à partir de l' inoculation.

L' induction est réalisée en phase plateau, c' est à dire à une DO de 1,5 pour M5219 pGIPM10 et 0,6 pour M5219 pGIIH500*.

(A)



(B)

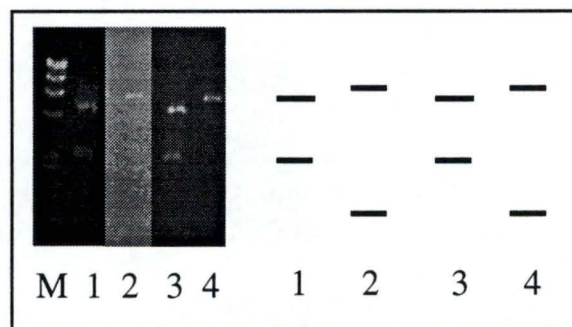


FIGURE I.11: (A) Electrophorèse analytique des protéines solubles extraites de la souche M5219 transformée par les plasmides pGIPM10 et pGIIH500*. pGIPM10 (pistes 1,3); pGIIH500* (pistes 2,4).

T0 (pistes 1,2); T1 (pistes 3,4), la flèche indique la position de la LDH

(B) Electrophorèse analytique du maintien des plasmides au cours de l'induction. pGIPM10 restreint par *Bam* H I-*Eco* R I (pistes 1,3); pGIIH500* restreint par *Sst* I-*Xho* I(2,4) T0 (pistes 1,2); T1 (pistes 3,4).

Vu la mauvaise qualité du document, les bandes sont schématisées sur la partie droite de la figure.

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

l'expression est observée. L' hypothèse selon laquelle une diminution de la protéolyse était responsable de l'augmentation d'expression a été vérifiée par "pulse-chase" (Soumillion *et al.*, 1992).

Nous avons donc appliqué ces conditions au plasmide pGIIH500* portant *DIM1* et au plasmide contrôle pGIPM10.

C) Applications.

Nous avons "transformé" les plasmides pGIIH500* et pGIPM10 par la méthode au chlorure de calcium dans la souche M5219 rendue compétente. A partir des boîtes LBamp., des précultures ont été inoculées et placées à 37°C pendant une nuit. Des cultures de 200ml ont été lancées en milieu CASamp. avec 1 ml des précultures.

Nous avons relancé des cultures de 200ml par trois fois pour déterminer la DO à laquelle la phase plateau est atteinte. C'est en effet à ce moment que l'induction doit être réalisée ainsi que l'ajout de tryptophane. A chaque fois, nous avons constaté un très net retard de croissance de la souche transformée par le pGIIH500*. La Figure I.10 montre l' évolution de la DO à 540nm des cultures jusqu'en phase plateau. Les valeurs constituent une moyenne réalisée sur les trois expériences. Suite à ces résultats, nous avons considéré que la culture transformée par le pGIIH500* entrainé en phase plateau à une DO de 0,6, et celle transformée par le pGIPM10 à une DO de 1,3. Les "shifts" à 42°C et l'adjonction de tryptophane (50mg/ml) ont été réalisés à ces mêmes DO.

Au temps d'induction (temps 0) et 75 minutes plus tard (temps 1), un prélèvement de 25ml a été effectué dans les deux cultures. Les protéines ont été préparées et dosées puis déposées sur gels SDS-PAGE 12%, des minipréparations d'ADN plasmidique ont été réalisées pour les temps 0 et temps 1 des deux cultures. Tous ces résultats sont présentés à la Figure I.11.

Conclusion:

Nous pouvons affirmer deux choses: d'une part, les plasmides sont bien maintenus au cours de l'induction et, d'autre part, la culture qui porte le plasmide pGIIH500* montre un retard de croissance systématique qui se manifeste avant l'induction, contrairement à ce qui était observé dans AR58.

Pour ce qui est de l'analyse des gels protéiques, si on compare les pistes relatives au pGIPM10, on n'aperçoit pas de différence entre les temps 0 (piste 1) et 1 (piste 3), ce qui indiquerait qu'il n'y a pas d'expression de la LDH. Toutefois, en comparant ces mêmes pistes avec celles relatives aux pGIIH500*, on voit une bande intense (à la hauteur attendue de la LDH) qui se retrouve dans les pistes "pGIPM10" (pistes 1 et 3) et pas dans celles du "pGIIH500*" (pistes 2 et 4). Si cette bande correspond bien à la LDH, ceci signifie que le promoteur *P1* est actif bien avant le choc thermique, et que le répresseur *cI857* n'est pas efficace. Cette activation du promoteur pourrait expliquer le retard de croissance de la culture "pGIIH500*" manifesté également bien avant l'induction. Reste alors à expliquer l'inactivation du répresseur. Celle-ci pourrait être engendrée par les conditions de culture qui induisent une réponse stringente et la protéolyse associée. Rien ne nous permet cependant de conclure que cette hypothèse est correcte. Il aurait fallu également transformer la souche par un plasmide sans insert et suivre d'une part l'évolution de la DO, et d'autre part celle de la bande attribuée, sur gel, à la LDH.

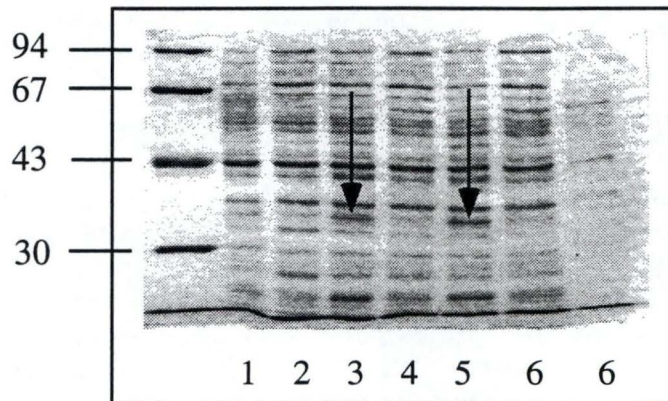


FIGURE I.12 : Electrophorèse analytique des protéines solubles
 extraites de la souche AR68 transformée
 par les plasmides pGIPM10 et pGIIH500*.
 pGIPM10 (pistes 1,3,5); pGIIH500* (pistes 2,4,6).
 T0 (pistes 1,2); T1 (pistes 3,4); T2 (pistes 5,6).
 Les flèches indiquent la position de la LDH

Nous avons encore lancé une culture de M5219 pGIIH500* et réalisé l'induction à 3 temps différents (phase exponentielle, fin de phase exp; et phase plateau) au cours de la croissance, mais les gels protéiques réalisés n'étaient en rien différents de celui présenté à la Figure I.11.

Le changement des conditions de culture n'ayant pas permis de mettre en évidence Dim-1p, nous avons travaillé avec une souche déficiente en protéases de choc thermique: AR68.

I.3 Expression dans la souche AR68.

Les plasmides pGIIH500* et pGIPM10 ont été transformés par la méthode au chlorure de calcium dans la souche AR68 rendue compétente. L'expression a été réalisée dans des conditions identiques à celles pratiquées dans AR58; le gel SDS-PAGE 12% des protéines solubles est présenté à la Figure I.12.

Nous avons vérifié par restriction diagnostique réalisée sur les prélèvements que les plasmides étaient maintenus et nous avons suivi l'évolution de la DO. Un retard de croissance similaire à celui décrit dans AR58 a été observé pour la culture "pGIIH500*". Le gel des protéines solubles permet de détecter une apparition faible de la LDH après l'induction; par contre, pour les pistes relatives au pGIIH500*, aucune différence n'est visible avant et après l'induction. Le gel des protéines totales (données non montrées) ne montre pas non plus de bande de surexpression, ce qui indique que la présence de corps d'inclusion n'est pas à invoquer.

Nous ne pouvons donc que constater une expression nettement plus faible de la LDH dans la souche AR68 et aucune expression détectable du gène *DIM1*.

Conclusion:

Le taux d'expression de la LDH est réduit par rapport à celui obtenu dans AR58. A ce sujet, on sait que les tests de surexpression réalisés dans différentes souches (Shatzman *et al.*, 1983) montrent une très grande hétérogénéité de résultats avec un même gène. Si le "background" de l'hôte semble jouer un rôle important dans la production du produit, les raisons précises de telles différences ne sont pas expliquées.

Par ailleurs, l'utilisation des souches M5219 et AR68 susceptibles de réduire la protéolyse intracellulaire n'a pas permis d'améliorer la production de la protéine Dim-1p. On ne peut cependant exclure que la protéine soit protéolysée car les conditions utilisées ne neutralisent pas tous les systèmes de protéolyse bactériens. Par exemple, la principale protéase cytoplasmique codée par le gène *LON*, est toujours active (Gottesman *et al.*, 1990). Dans la suite, nous avons voulu traiter l'autre possibilité évoquée plus haut pour expliquer l'intolérance de *E. coli* face à la surexpression de Dim-1p, à savoir le fardeau que la protéine pourrait représenter pour l'hôte. Comme nous allons le voir, cette approche a été développée par ingénierie du gène.

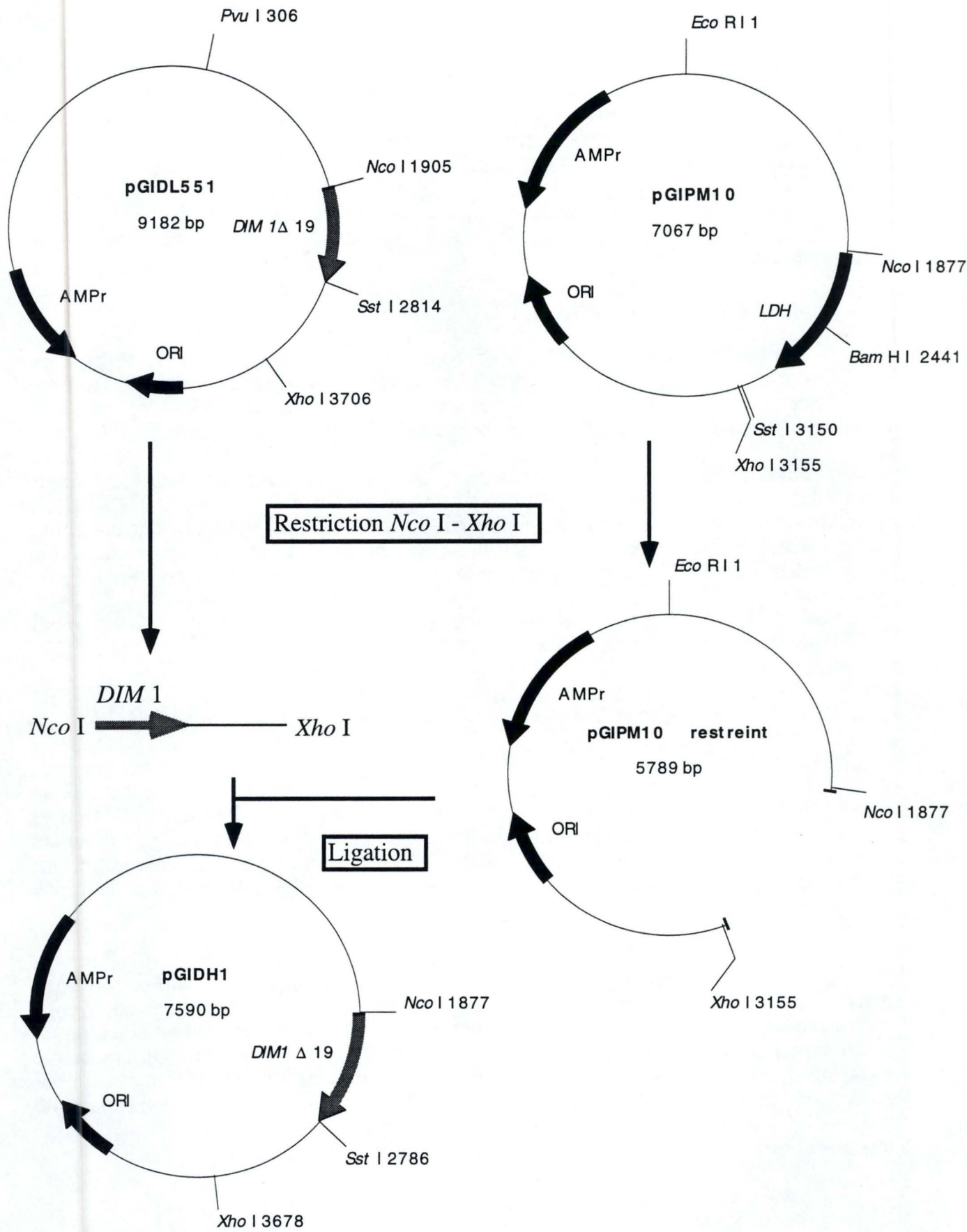


FIGURE I.13: Schéma de la construction du pGIDH1 (voir texte).

I.4 Expression avec une protéine tronquée.


Dim-1p possède une extrémité aminée chargée positivement (voir Figure 4 de l'introduction) suite à la présence de cinq résidus lysines. On pense que cette charge positive pourrait promouvoir la fixation de la protéine, via des interactions électrostatiques à la petite sous-unité ribosomale, l'attachant peut-être directement au pré-ARNr. En cas de surexpression, la fixation aspécifique de la protéine pourrait engendrer des méthylations incorrectes des ARNr, constituant un fardeau pour l'hôte. Nous avons donc décidé d'enlever l'extrémité aminée de la protéine pour tenter la surexpression. D'autre part, on sait que les facteurs d'élongation de levure ainsi que les amino-acyl ARNt synthétases portent des extensions amino-terminales riches en lysines et la suggestion a été faite qu'elles pourraient promouvoir des interactions ioniques avec les polyribosomes et les ARNt (Mirande, 1991). La délétion de la partie 5' du gène élimine donc du même coup les problèmes qui pourraient surgir de la fixation de Dim-1p à ces structures.


Nous disposons au laboratoire d'un vecteur (le pGIDL551) contenant *DIMI* amputé de ces 57 premiers nucléotides. Cette courte séquence code pour 19 acides aminés comprenant les 5 lysines. Nous avons donc extrait de ce vecteur le gène *DIMI* tronqué et placé celui-ci dans la matrice de surexpression pour créer le pGIDH1.

A) Construction du vecteur pGIDH1.

La construction du plasmide d'expression contenant le gène amputé (pGIDH1) est détaillée à la Figure I.13.

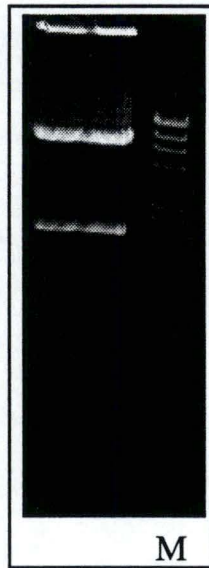
Nous avons restreint le pGIDL551 (qui contient *DIMI* tronqué) et le pGIPM10 avec les endonucléases de restrictions *Nco* I et *Xho* I pour libérer le gène d'intérêt et la matrice de surexpression respectivement. Les tailles attendues après ces deux restrictions sont données dans le tableau suivant:

	<i>Nco</i> I
	<i>Xho</i> I
pGIDL551	7381pb
	1801pb

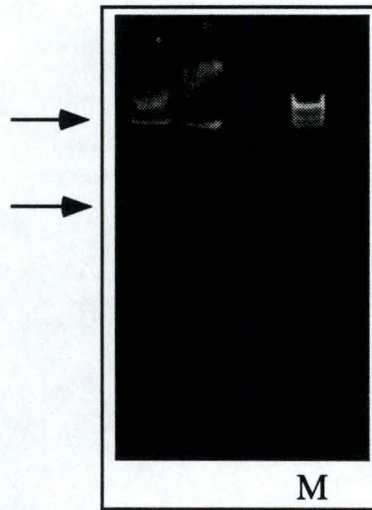
	<i>Nco</i> I
	<i>Xho</i> I
pGIPM10	5789pb
	1278pb

Les restrictions et les bandes récupérées sont présentées à la Figure I.14, on a bien les tailles attendues. Après récupération des bandes et ligation, nous avons transformé AR58 par la méthode au chlorure de calcium. Le pGIDH1 a été recherché par minipréparation et restriction diagnostique *Sst* I - *Xho* I. Les tailles attendues sont données dans le tableau suivant:

(A)



(B)



(C)

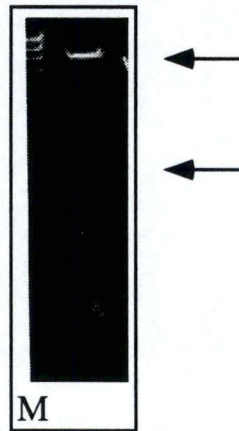


FIGURE I.14: Electrophorèses analytiques relatives à la construction du pGIDH1.

A) pGIDL551 restreint par *Nco* I-*Xho* I.

B) pGIPM10 restreint par *Nco* I-*Xho* I.

C) pGIDH1 restreint par *Sst* I-*Xho* I.

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

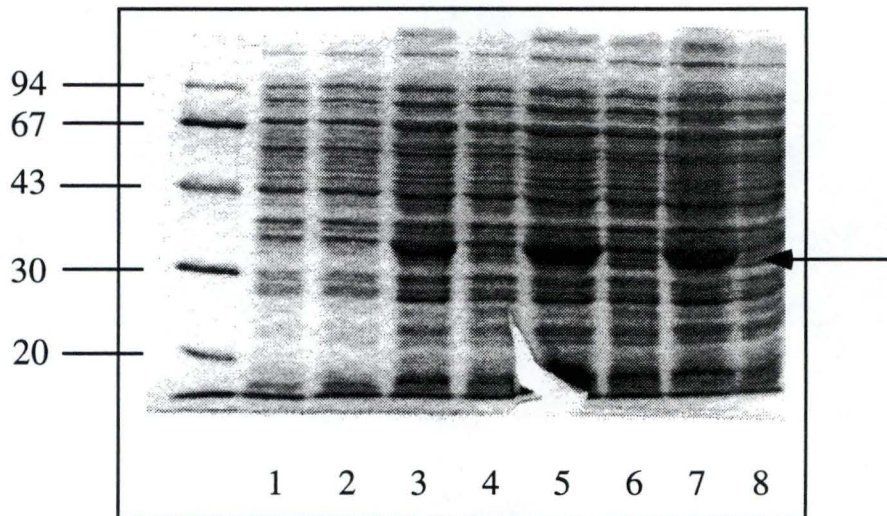
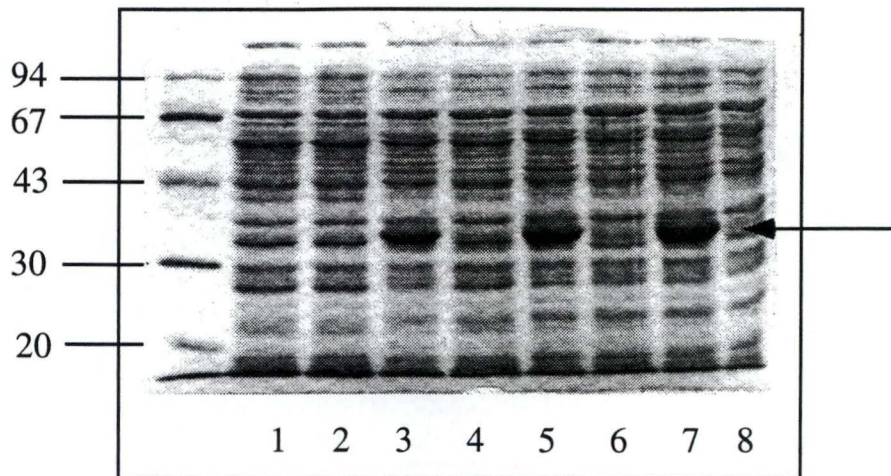


FIGURE I.15: Elctrophorèse analytique des protéines solubles et totales extraites de la souche AR58 transformée par les plasmides pGIPM10 et pGIDH1.

A) Gel des protéines solubles.


pGIPM10 (pistes 1,3,5,7); pGIDH1 (pistes 2,4,6,8).

T0 (pistes 1,2); T1 (pistes 3,4); T2 (pistes 5,6); T3 (pistes 7,8).

B) Gel des protéines totales.

Disposition identique au point A.

La position de la LDH est indiquée par les flèches.

	Sst I
	Xho I
pGIDH1	6698pb 892pb

Ce profil de restriction est également présenté à la Figure I.14.

B) Expression dans AR58.

Nous avons procédé de la même manière que pour les autres tentatives d'expression (voir point I.1). Les gels SDS-PAGE des protéines solubles et totales sont présentés à la Figure I.15. La situation est totalement similaire à celle observée avec le plasmide pGIIH500*. En effet, le contrôle positif (pistes 3,5,7) révèle l'apparition de la LDH après l'induction, alors qu'au même moment, aucune présence de Dim-1p ne peut être mise en évidence (pistes 4,6,8). Nous avons vérifié la maintenance des plasmides (données non montrées) et suivi l'évolution de la DO. Celle-ci révèle un retard de croissance similaire à celui décrit pour l'expression avec le gène complet, si ce n'est qu'il se manifeste plus tard au cours de l'induction comme le montre la Figure I.16.

Nous devons conclure que l'extrémité amino-terminale de DIM-1p n'est pas responsable de l'échec de la surexpression.

I.5 Conclusions générales de l'expression dans un système hétérologue.

Dans aucun des cas décrits, la protéine Dim-1p n' a pu être mise en évidence après induction de l'expression, alors que le contrôle positif se révélait correct.

Nous savons que la perte du plasmide n'est pas à mettre en cause pour expliquer le manque d'expression et que la construction génétique est correcte puisqu'elle restaure la sensibilité à la kasugamycine.

Nous n'avons pas pu montrer d'influence d'une protéolyse de la protéine, mais nous savons qu'il n'y a pas formation de corps d'inclusion.

Toutes les tentatives décrites ci-dessus montrent un retard de croissance significatif de la culture test par rapport au contrôle, suggérant que l'expression de Dim-1p serait mal tolérée par l'hôte bactérien. Nous avons posé l'hypothèse que l'extrémité aminée de la protéine pourrait être responsable de cette intolérance de l'hôte soit en permettant à la diméthylase surproduite de diméthyliser aspécifiquement les ARNr, soit en interagissant avec d'autres structures cellulaires. La surexpression avec une protéine amputée de cette extrémité n'a cependant pas amélioré l'expression.

Nous devons donc envisager d'autres causes en relation avec le choix d'un système bactérien pour exprimer le gène levurien *DIM1*. Par exemple, la stabilité du messager produit et son abondance, ce qui devrait être testé en "Northern blot". Il se pourrait qu'un mauvais contexte soit créé pour l'initiation de la traduction qui diffère chez les pro- et les eucaryotes. D'autre part, certaines protéines eucaryotes nécessitent un environnement défini pour prendre une conformation correcte lors de la traduction (la présence de "chaperones"). On rentre ici dans des considérations qui concernent *DIM1* lui-même en tant que gène de levure et la protéine pour

Densité optique (540nm)

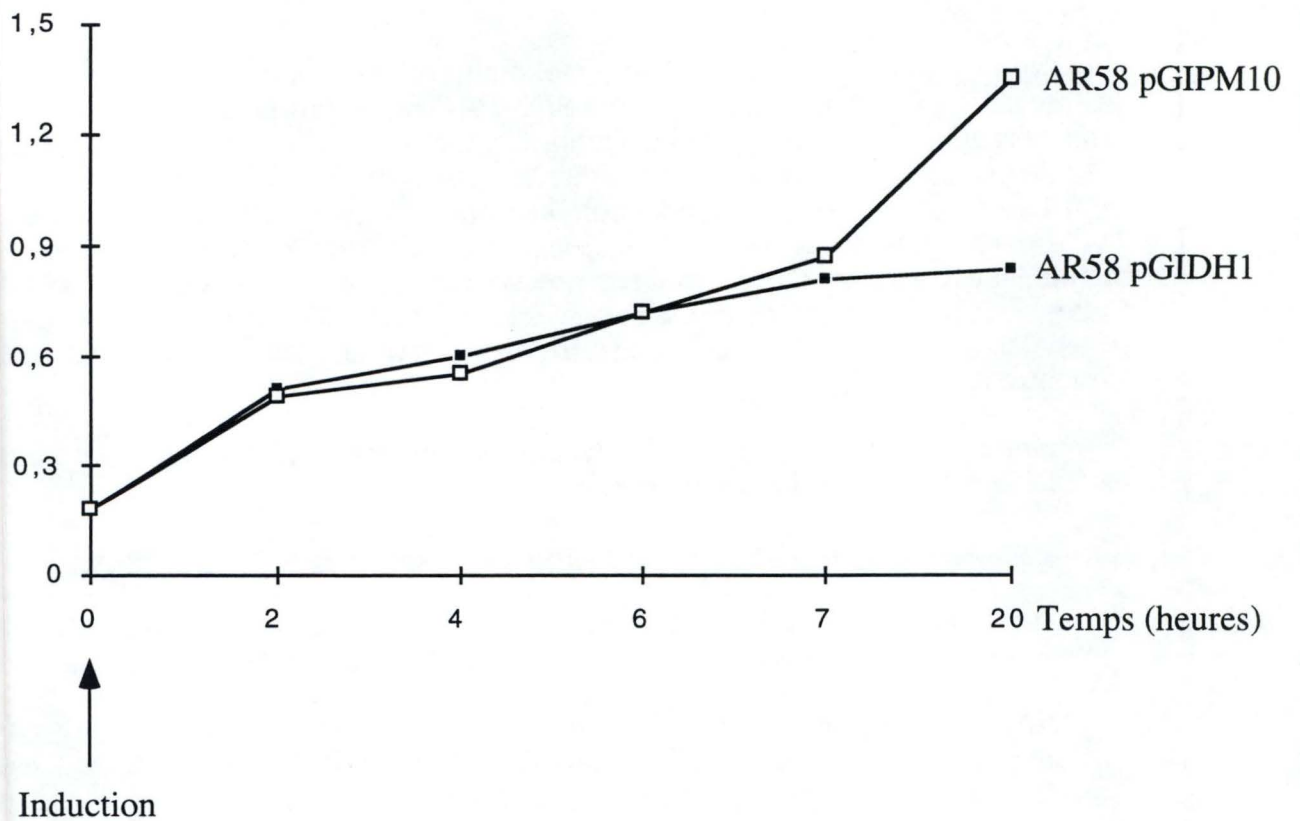


FIGURE I.16: Evolution de la densité optique (à 540nm) des cultures AR58 transformée par le pGIPM10 et par le pGIDH1. Les temps sont donnés en heures après l'induction.

laquelle il code, touchant aux limites même de l'expression dans un système hétérologue.

Nous avons décidé à ce stade du travail de nous tourner vers les eucaryotes en choisissant un système d'expression proche de *Saccharomyces cerevisiae* dont provient *DIM1*.

II. SUREXPRESSION DE DIM-1P DANS UN SYSTEME HOMOLOGUE.

Choix du système d'expression.

Pour exprimer Dim-1p chez un eucaryote, le système d'expression qui paraît s'imposer à priori est *S. cerevisiae* lui-même. En effet, des marqueurs auxotrophes sont caractérisés, des promoteurs forts ont été isolés et il existe des plasmides à haut nombre de copies stables (Romanos *et al.*, 1992). Cependant *S. cerevisiae* présente certaines limitations importantes comme hôte pour l'expression de protéines. Sa production de produit est le plus souvent faible, atteignant 1 à 5% des protéines solubles même avec un promoteur fort; la levure atteint difficilement de bons niveaux de croissance en culture, elle secrète mal et les protéines produites sont hyperglycosylées. A cela on peut encore ajouter l'absence de promoteurs strictement régulés, ce qui s'avère très ennuyeux quand la protéine d'intérêt est mal tolérée.

C'est à cause de ces caractéristiques que *S. cerevisiae* est de plus en plus abandonnée au profit d'autres systèmes plus performants déjà évoqués dans l'introduction. Parmi ceux-ci, le groupe des levures méthylotrophes et spécialement *Pichia pastoris* se distingue par une série d'atouts. Ceux-ci, décrits ci-après, nous ont amené à choisir cette dernière levure pour exprimer Dim-1p.

II.1 Présentation du système d'expression (Cregg *et al.*, 1993).

Tout en étant aussi facile d'utilisation que *E. coli*, *P. pastoris* présente tous les avantages d'un système d'expression eucaryote quant au processing protéique, au "folding" et aux modifications post-transcriptionnelles. Elle partage de nombreuses caractéristiques avec *S. cerevisiae*, notamment la facilité de la transformation ou de la disruption génique. De plus la nomenclature génétique est identique et de nombreux gènes sauvages de *S. cerevisiae* complètent les mutants comparables chez *P. pastoris*, parmi ceux-ci, notons *HIS4*, *LEU2*, *ARG4*, *TRP1* et *URA3*.

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, *P. pastoris* est une levure capable d'utiliser le méthanol comme seule source de carbone et d'énergie. La première réaction du "pathway" d'oxydation est catalysée par l'alcool oxydase (AOX1) dont la faible affinité pour l'oxygène (un des cofacteurs de la réaction qu'elle catalyse) est compensée par une expression intense dirigée par un promoteur fort. Ce dernier, induit par le méthanol et réprimé par le glucose, est le promoteur idéal recherché pour diriger l'expression de protéines hétérologues.

La possibilité d'une sécrétion très efficace (Paifer *et al.*, 1994; Barr *et al.*, 1992; Digan *et al.*, 1989) de la protéine d'intérêt ne s'accompagne pas d'une hyperglycosylation comme chez *S. cerevisiae*. En effet, si les deux levures réalisent principalement des glycosylations "N-linked" du type "High mannose", la longueur des chaînes oligosaccharidiques ajoutées post-traductionnellement chez *P. pastoris* (en moyenne 8 à 14 résidus mannose) est beaucoup plus courte que chez *S. cerevisiae* (50 à 150 résidus mannose). Les protéines sécrétées par *P. pastoris* ne contiennent pas le α 1-3mannose terminal typiquement retrouvé chez *S. cerevisiae*. L'hyperglycosylation peut s'avérer très gênante, pouvant empêcher la réactivité avec des anticorps comme ce fut décrit pour la protéine gp350 du virus Epstein-Barr sécrétée chez *S. cerevisiae* (Romanos *et al.*, 1992).

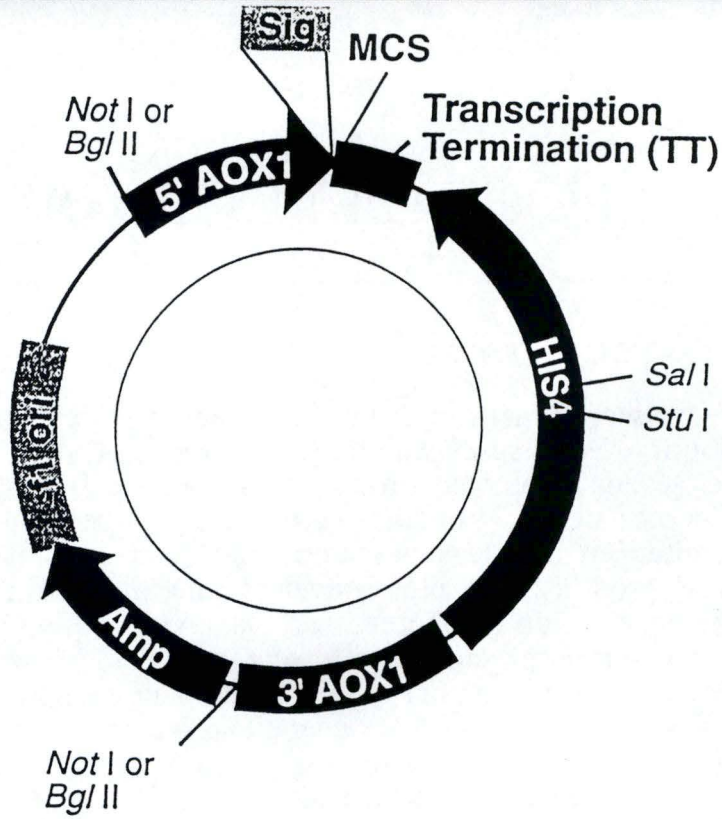


FIGURE II.1: Description d'un plasmide type pour l'expression dans *Pichia pastoris* (voir texte).

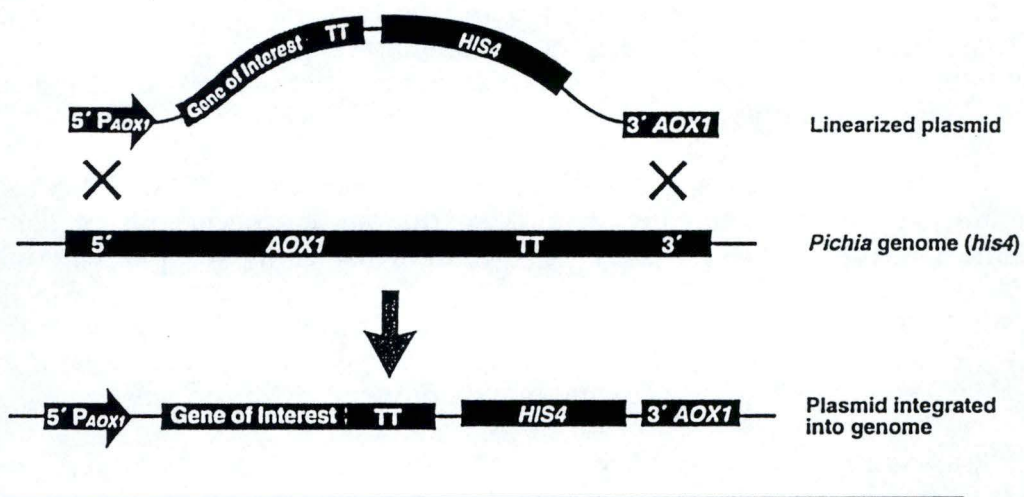


FIGURE II.2: Insertion par double crossing-over au locus *AOX-1*. (Transplacement)

P. pastoris ne possédant pas de matériel génétique extrachromosomique connu, le système d'expression doit reposer sur une intégration dans le génome de la levure. Ceci appelle un certain nombre de remarques:

- On cherche à intégrer par double recombinaison le gène d'intérêt à la place du gène de l'alcool oxydase (AOX1) de *P. pastoris* sous le contrôle du promoteur résident. Nous verrons que d'autres recombinaisons sont possibles.

- Il faut pouvoir sélectionner les transformants; la cassette d'expression doit donc posséder un marqueur, on utilise le gène HIS4 (histidinol déshydrogénase) en travaillant dans une souche HIS4 - .

- Le promoteur de AOX1 étant très strictement régulé, on a la possibilité de faire croître la levure transformée à haute densité sur un milieu non inducteur du gène d'intérêt comme le glycérol, (celui-ci est préférable au glucose car ce dernier a un effet tellement répresser que l'induction qui suit n'est pas toujours optimale), puis de lancer l'expression en passant dans un milieu méthanol.

- On peut sécréter la protéine en travaillant avec des plasmides contenant la séquence signal adéquate, la protéine d'intérêt sera alors glycosylée si elle possède le site cible: Asn-X-Ser/Thr.

- On distingue deux grands types de phénotypes suivant le mode d'intégration: MUTs ("methanol utilisation slow") si l'intégration bien substitué le gène AOX-1 par le gène d'intérêt, et MUT+ ("methanol utilisation +") si elle s'est réalisée ailleurs dans le génome. Dans le premier cas, les levures ne peuvent plus avoir une croissance importante après l'induction puisqu'elles ont perdu le gène AOX-1 et que la production d'AOX-2 (voir introduction) n'est pas capable d'y suppléer pleinement dans le second cas la croissance se poursuit après l'induction. Dans tous les cas, les transformants sont HIS4+.

A) Description d'un plasmide type.

La Figure II. 1 décrit un plasmide-type du système d'expression. Toutes les étapes de clonage et d'amplification sont réalisées dans *E. coli*. Après une restriction libérant l'insert à intégrer, le plasmide est transformé dans *P. pastoris* pour engendrer les intégrants stables. Les caractéristiques décrites ci-dessous se retrouvent dans tous les plasmides du système, elles font référence à la Figure II.1.

- 5' AOX1: un fragment de 1000pb qui contient le promoteur AOX1.
- Sig: une séquence qui code pour un signal de sécrétion N-terminal; deux séquences sont a priori disponibles: celle de la phosphatase acide (plasmide pHIL-S1), et celle du facteur α de *S. cerevisiae* (plasmide pPIC-9).
- MCS: le site multiple de clonage.
- TT: le terminateur de transcription du gène AOX1 et le signal de polyadénylation qui permettent d'avoir un m-RNA correct.
- HIS4: le gène "wild-type" de l'histidinol-déshydrogénase qui complète la souche HIS4-. Sa présence permet la sélection des transformants.
- 3'AOX1: 650pb du gène AOX1 qui se trouvent au-delà du terminateur de transcription.
- AMP: le gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection et la maintenance dans *E. coli* où tout le clonage doit s'effectuer.
- Not I et Bgl II qui sont des sites uniques situés aux extrémités de la cassette d'expression; ils permettent de linéariser le plasmide avant de transformer *Pichia*. Si le gène d'intérêt possède ces 2 sites dans sa séquence, il est possible de linéariser avec d'autres sites contenus dans 5' AOX1 et 3' AOX. Cette linéarisation va diriger l'intégration au locus AOX-1.

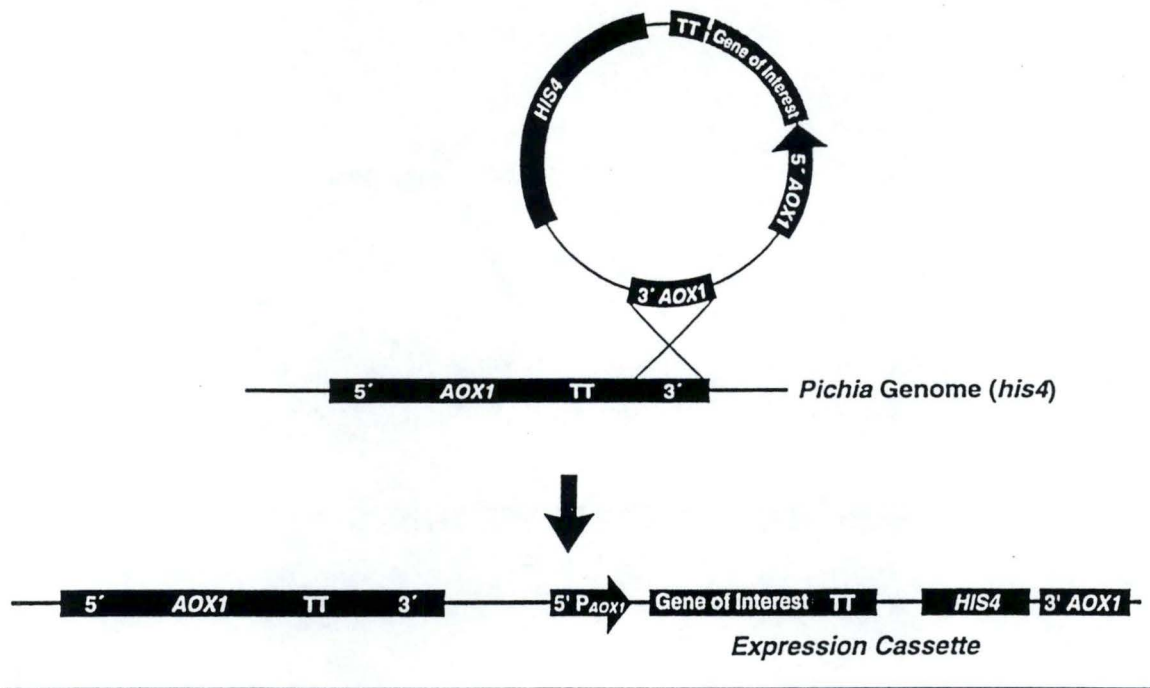


FIGURE II.3: Insertion par simple crossing-over au locus *AOX-1*.

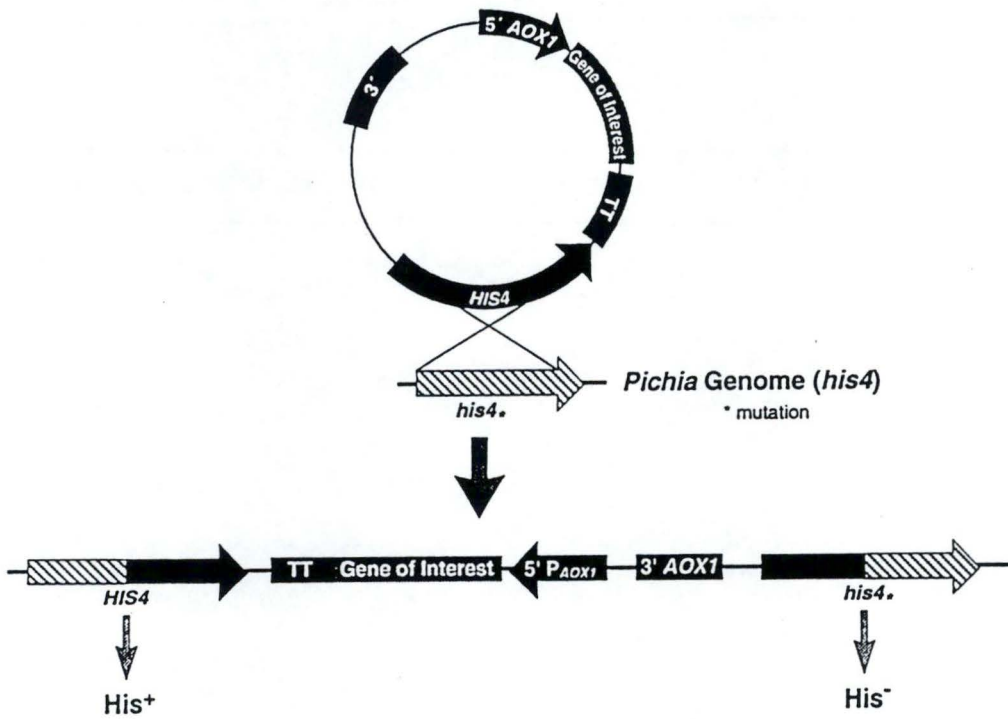


FIGURE II.4: Insertion par simple crossing-over au locus *HIS4*.

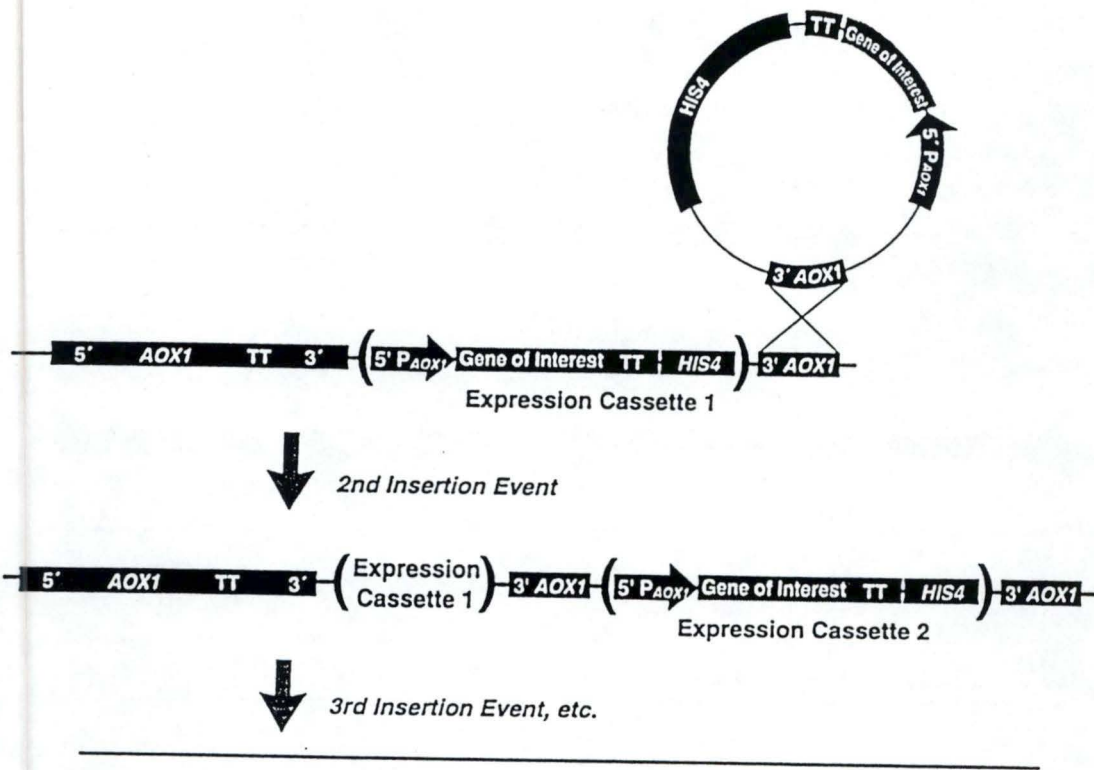


FIGURE II.5: Mécanisme hypothétique pour expliquer les insertions multiples.

- *Sal I* et *Stu I* qui sont situés dans le gène *His4*, la linéarisation subséquente à l'utilisation de ces enzymes dirigera l'intégration au locu *his4*.

B) Les types d'intégration et les phénotypes associés.

Chez *P. pastoris* comme chez *S. cerevisiae*, l'intégration stable pourra résulter d'un simple crossing-over (cas le plus fréquent survenant avec un ADN circulaire ou linéaire) donnant lieu à une insertion; ou d'un double crossing-over (avec un ADN linéaire) donnant lieu à un transplacement. Les extrémités libre de l'ADN au(x) site(s) de clivage(s) ciblent préférentiellement l'intégration au(x) site(s) homologue(s), mais des intégrations ectopiques peuvent également se produire, de même qu'on peut observer des cas d'insertions multiples. Remarquons que des phénomènes de conversion peuvent en principe également rendre compte de certains résultats d'intégration à des sites homologues. Les différentes situations concrètes auxquelles on peut s'attendre dans le cas de transformants dans *P. pastoris* (souche GS115) sont examinés ci-dessous.

Premier cas: remplacement par double c.o. au locus *AOX-1*.

La Figure II.2 présente cette situation. Ceci résulte en une délétion complète du gène de l'alcool oxydase. Elle crée un phénotype MUTs (Méthanol Utilization slow), la levure ne peut plus assurer une croissance correcte sur milieu méthanol.

Deuxième cas: insertion par simple c.o. au locus *AOX-1*.

Comme le montre la Figure II.3, ce type d'intégration est subséquent à une recombinaison entre le locus *AOX-1* du chromosome et n'importe laquelle des régions d'homologie du vecteur: le promoteur, le terminateur de transcription ou la séquence 3' *AOX-1*, c'est cette dernière possibilité qui est représentée sur la figure. Ceci résulte en un phénotype MUT+ (Méthanol Utilization plus), c'est-à-dire que la levure maintient une croissance normale après l'induction.

Troisième cas: insertion par simple c.o. au locus *his4*.

La Figure II.4 détaille cette situation. Il y a restauration d'un gène *HIS4* fonctionnel, et le phénotype est évidemment MUT+.

Cas particulier: insertions multiples.

Lors de la transformation d'un fragment d'ADN, on voit apparaître dans 1 à 10% des cas des intégrants multiples. Or le niveau d'expression s'est révélé être le plus souvent en corrélation avec le dosage génique (Romanos *et al.*, 1992). La recherche de pareils intégrants est donc souhaitable dans le contexte de la surexpression (voir point II.2,E). L'analyse chromosomique des intégrants multiples suggère un mécanisme faisant appel à une circularisation *in vivo* du fragment d'ADN transformé suivie d'insertions multiples par des simples "crossing-over" répétés (Clare *et al.*, 1991). La Figure II.5 présente un modèle spéculatif d'explication du phénomène. Le phénotype associé à ce genre d'événement dépend du locus où il a lieu.

1. Clone your gene of interest into one of the supplied *Pichia* expression vectors.

2. Linearize the resulting construct to allow efficient integration into the *Pichia* genome.

3. Prepare spheroplasts of the *his4 Pichia pastoris* strain, GS115. Transform the spheroplasts with the linearized construct.

4. A recombination event occurs *in vivo* between the 5' and 3' *AOX1* sequences in the *Pichia* vector and those in the *Pichia* genome. The result is replacement of *AOX1* with the gene of interest.

5. Plate transformants on histidine-deficient (-his) medium. Cells in which recombination has occurred will grow, others will not produce histidine and will grow very slowly.

6. Screen for integration at the correct locus. Select colonies from the -his plate and patch onto a -his, +glucose and a -his, +MeOH plate. Colonies which exhibit slow growth on MeOH no longer contain the *AOX1* gene and have a His⁺, Mut^S (MeOH utilization-slow) phenotype.

7. Select 10 to 20 His⁺, Mut^S colonies and grow in medium containing the carbon source glycerol.

8. Pellet cells and remove medium.

9. Resuspend pellet in medium containing methanol as the sole carbon source. Grow cells for 2-6 days taking time points every day.

10. Analyze for optimal protein expression by SDS-PAGE and western blot.

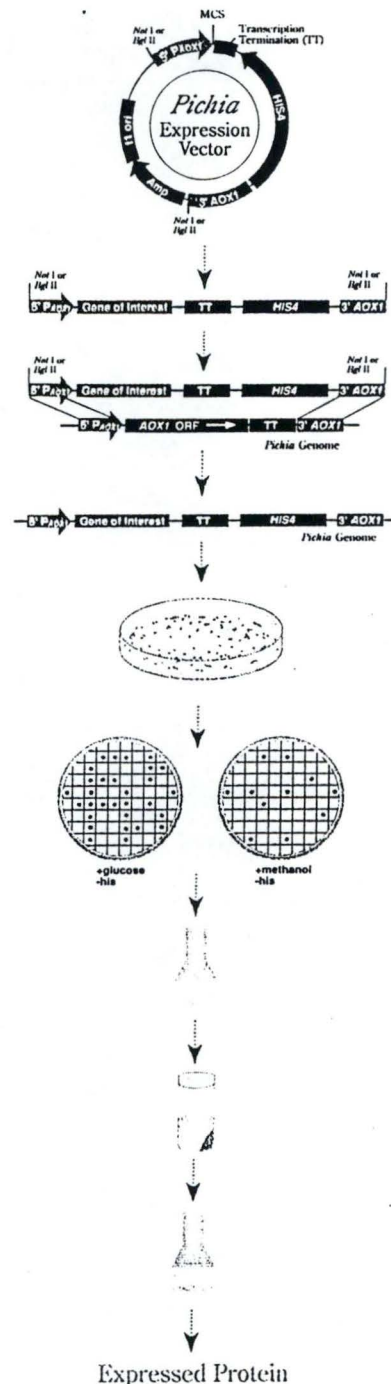
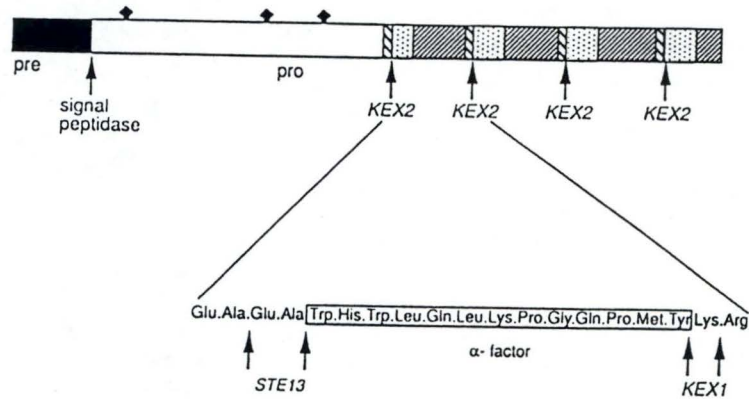


FIGURE II.6: Vue générale du système d'expression dans le cas de l'utilisation d'un phénotype MUTs.

(A)



(B)

mRNA AOX1
5' end (773)

773 ACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTT

845 TCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTTAACGACTTTTAAACGACAACCTGAGAAGATCA

αF start

917 AAAAACAATAATTATTTCGAAGGATCCAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT
 ▶ Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val

979 TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT
 ▶ Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp

1033 GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG
 ▶ Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly

1087 GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG
 ▶ Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

Xho I'

1141 TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
 ▶ Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

Signal Cleavage

1195 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT TAC GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG AAT TAA
 ▶ Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala Asn ...

1249 TTCGCCTTAGACATGACTGTTTCCTCAGTTC AAGTTGGGCAC TTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAA

1321 TCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGC TTCATTTTTGATACTTTTTTATTGTAAAC

mRNA AOX1
3' end (1418)

1393 TATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTCA

FIGURE II.7: (A) Structure de la séquence signal et de la séquence codante du facteur sexuel α de *S. cerevisiae* (Romanos *et al.*; 1992). (B) La séquence signal et son site de clivage avec le site multiple de clonage du pPIC9. (Invitrogen Corporation).

C) Vue générale du système d'expression.

La Figure II.6 présente les différentes étapes de l'utilisation du système d'expression dans le cas d'une insertion au locus *AOX-1* et d'un phénotype qui est donc MUTs.

II.2 Expression par sécrétion avec le pGIDH9.

La possibilité de sécréter Dim-1p dans le milieu de culture nous est apparue très intéressante. En effet, le but du travail étant de produire des anticorps, on éliminait ainsi une étape de purification puisque le milieu de culture est pauvre en protéines, *P. pastoris* sécrétant très peu naturellement. Nous disposions pour ce faire du plasmide pPIC9 (voir "Matériel et Méthodes") pourvu de la séquence de sécrétion du facteur sexuel α de *S. cerevisiae*. Cette séquence s'est révélée très efficace pour la sécrétion de protéines hétérologues (Cregg *et al.*, 1993; Scorer *et al.*, 1993). Les avantages et inconvénients de la sécrétion ont été décrits dans l'introduction, nous allons développer plus particulièrement ici les étapes du "processing" de la séquence signal.

A) Processing de la séquence signal du facteur sexuel α .

Chez *S. cerevisiae*, le gène *Mfal* encode une protéine de 165 acides aminés, le préfacteur α , la séquence du facteur lui-même est répétée 4 fois derrière une pré-région et une pro-région (Romanos *et al.*, 1992). La Figure II.7 décrit cette structure et identifie les différents sites d'action des protéases qui permettront le clivage de la séquence signal avant l'exportation de la protéine à l'extérieur de la cellule. Elle montre également la séquence signal une fois intégrée au vecteur pPIC9. Le premier clivage est réalisé par la protéase KEX2 entre l'arginine et la glutamine de la séquence Glu-Lys-Arg*Glu-Ala-Glu-Ala avec * qui donne le site de clivage. Ensuite, c'est la protéase STE13 qui élimine les deux répétitions Glu-Ala. L'efficacité de ce dernier clivage dépend en grande partie de la séquence de la protéine qui suit.

B) Construction du vecteur d'expression par sécrétion pGIDH9.

La construction réalisée consistait à introduire la séquence codante de *DIM1* dans le site multiple de clonage du pPIC9. Comme aucun site ne permettait de réaliser cette étape, nous avons opté pour un clonage par PCR en ajoutant aux oligonucléotides un site de restriction (*Eco* R1) qui permette le clonage en phase. La position des oligonucléotides est détaillée à la Figure 4 de l'introduction. Nous avons choisi le site de restriction *Eco* R1 parce qu'il permettra, le cas échéant, le clonage aisé dans le plasmide d'expression intracellulaire PHIL-D1 (voir plus loin). La Figure II.8 détaille la construction du pGIDH9.

Le clonage par PCR comporte le risque d'entraîner l'apparition de mutations dans les amplicons. C'est précisément pour remédier à cela que des polymérases dotées de correcteur d'épreuve (le système "proof-reading") ou activité exonucléase 3'-5' ont été isolées. Nous avons travaillé avec la polymérase "Pwo" de Boehringer (voir "Matériel et Méthodes" point 5.11.) qui est pourvue d'une telle activité. Les produits PCR sont alors purifiés sur colonne biospin (voir "Matériel et Méthodes" point 5.5.) puis restreints par *Eco*R1. Après migration sur gel d'agarose, la bande qui les contient est excisée et l'ADN en est extrait.

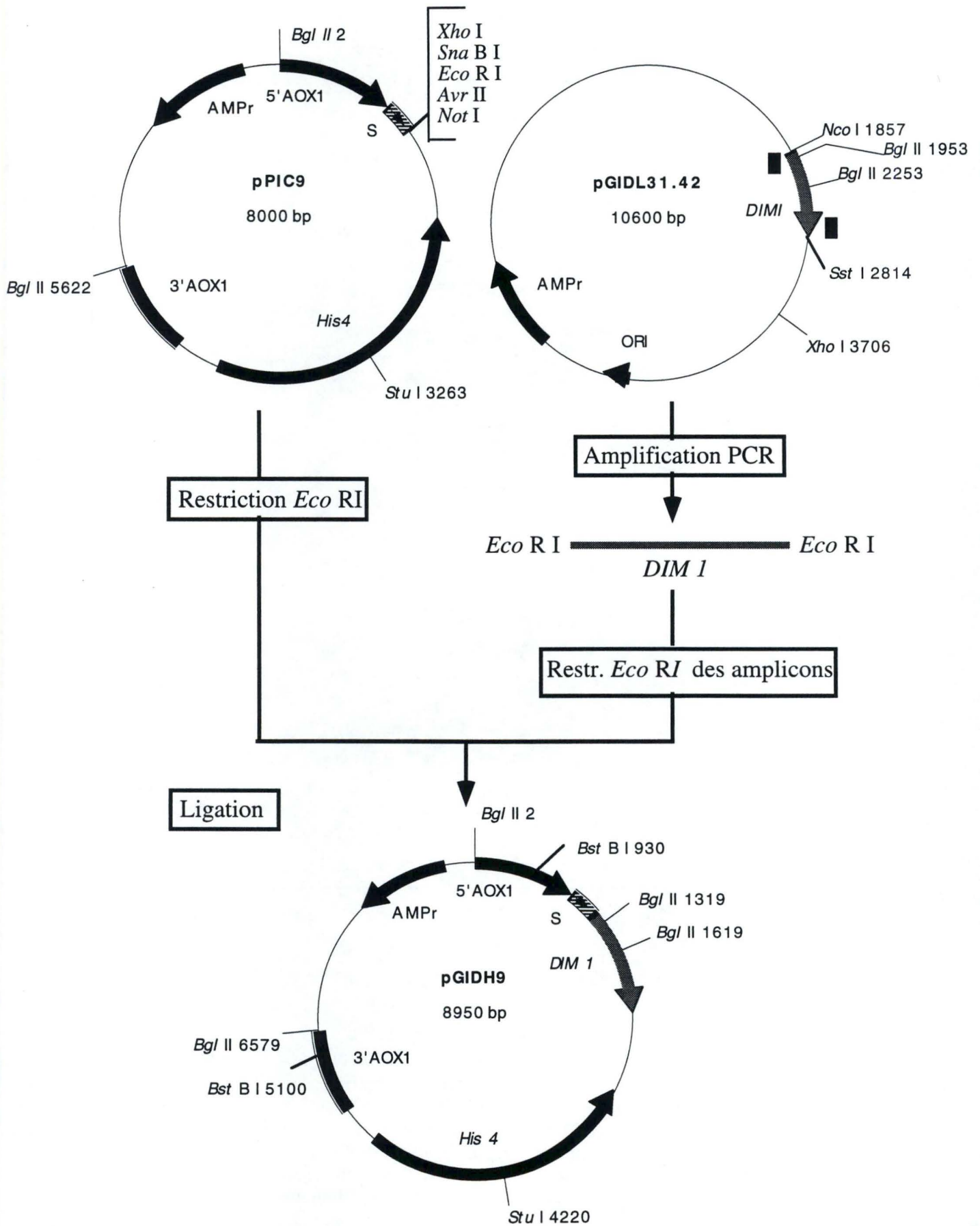


FIGURE II.8: Schéma de la construction du pGIDH9 (voir texte).
 Les rectangles noirs indiquent la position des "primers" de PCR.
 "S" indique la position de la séquence de sécrétion.

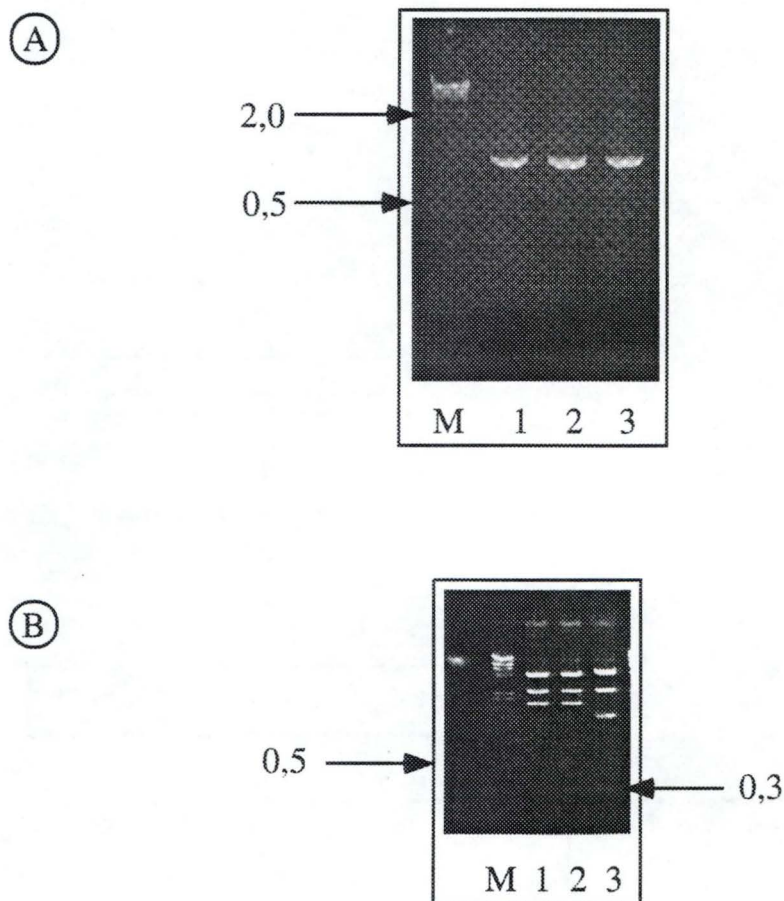


FIGURE II.9 :Electrophorèses analytiques des Produits PCR et restrictions diagnostiques.

(A) Résultats de 3 amplifications PCR réalisées sur le pGIDL31.42 avec les primers "Pichia DIM5" et "Pichia DIM3" (voir figure 4 de l'introduction et figure II.8).

(B) Restrictions diagnostiques *Bgl* II de la congruence de l' ORF de *DIM1* et de la séquence de sécrétion

Le pGIHD9 correspond à l' insertion de *DIM1* à l' envers (1 et 2). Le pGIDH9 correspond à l' insertion de *DIM1* dans le bon sens (3).

Les flèches de gauche indiquent la taille des bandes moins visibles du marqueur. Les flèches de droite indiquent la taille des bandes moins visibles dans les profils.

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes").

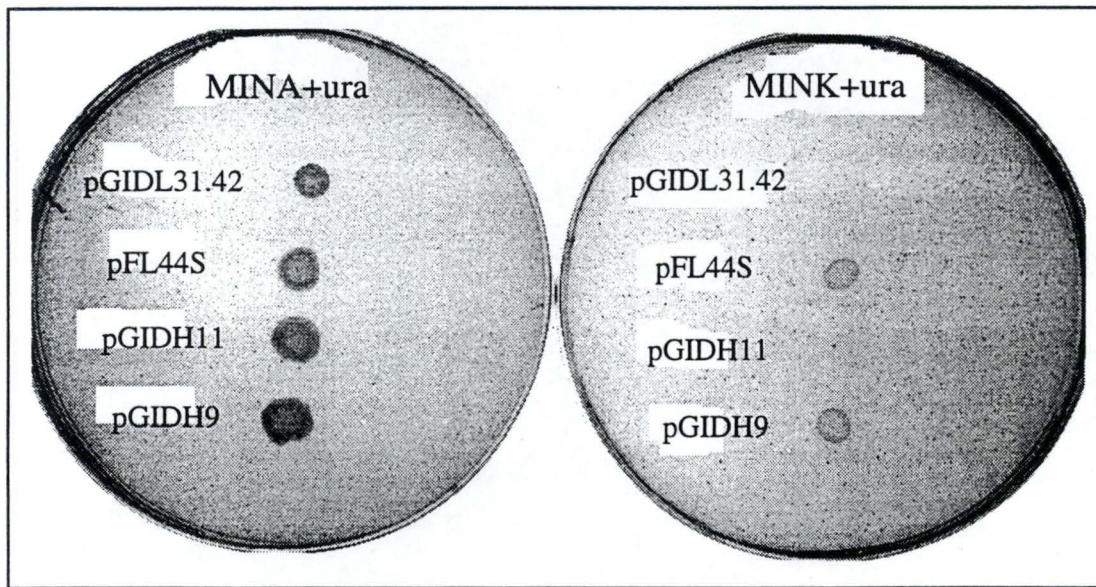


FIGURE II.10: Test phénotypique de la capacité de restauration de la sensibilité à la kasugamycine par les pGIDH9 et pGIDH11. Le pGIDL31.42 qui contient *DIMI*, sert de contrôle positif, il restaure bien la sensibilité à la kasugamycine sur MINK. Le pFL44S sert de contrôle négatif. Le pGIDH9 ne restaure pas la sensibilité à l'antibiotique, contrairement au pGIDH11 (voir point II.3).

Le plasmide pPIC9 est linéarisé également par *EcoRI*. Après une extraction au phénol, il est déphosphorylé et une nouvelle extraction au phénol est pratiquée. La matrice ainsi ouverte est soumise à la ligation avec le produit PCR. Après une nuit à 14°C, le mélange est transformé par la méthode au chlorure de calcium dans la souche XL1blue et étalé sur milieu LBamp..

Des minipréparations sont réalisées pour identifier la bonne construction, c'est-à-dire avec *DIMI* inséré de manière congruante avec la séquence signal. La Figure II.9 détaille les électrophorèses analytiques des produits PCR et des restrictions diagnostiques. La restriction diagnostique choisie est réalisée par l'enzyme *Bgl II* qui permet de déterminer le sens de l'insert comme l'indique le tableau suivant:

✂	<i>Bgl II</i>	✂	<i>Bgl II</i>
pGIDH9	300pb 1319pb 2378pb 4960pb	pGIHD9	300pb 1784pb 2378pb 4495pb

Le pGIDH9 contient l'insert dans le sens correct, le pGIHD9 dans le sens inverse. Toutes les tailles se vérifient sur la photo B de la Figure II.9. Le plasmide pGIDH9 a été préparée par midipréparation.

C) Test fonctionnel et séquençage de la jonction avec la séquence de sécrétion

La construction a été testée quant à sa capacité de restauration du phénotype de sensibilité à la kasugamycine dans la souche DL101 *ksgA*-. Comme la Figure II.10 le montre, le pGIDH9 transformé dans DL101 ne restaure pas la sensibilité à la kasugamycine, ce qui peut signifier 2 choses: soit le produit PCR est "mauvais" et la protéine est inactive ou non produite, soit, c'est la séquence signal fusionnée en amino-terminal qui empêche l'activité de Dim-1p. La première hypothèse a été écartée puisque le pGIDH 11, qui résulte, comme on le verra plus loin (point II.3 et Figure II.15) de l'introduction du produit PCR du pGIDH9 dans le vecteur d'expression intracellulaire PHIL-D1, restaure bien la sensibilité.

Nous savons que le produit PCR est correct, mais nous ne pouvons toujours pas dire si c'est la présence de la séquence signal comme telle, ou un défaut de clonage comme un déphasage qui explique l'absence de restauration de la sensibilité dans la cas du pGIDH9. Nous avons donc séquencé la jonction entre la séquence signal et l'ORF de *DIMI*. La position du primer de séquençage est montrée à la Figure 4 de l'introduction. Aucune erreur n'a été détectée à ce niveau, ce qui suggère que chez *E. coli*, la présence d'un peptide de 89 acides aminés du côté N-terminal fait perdre la capacité de compléter le phénotype *ksgA*-

Fort de ces contrôles qui montrent que la construction est correcte, nous avons pu commencer le travail d'expression dans *P. pastoris*.

D) Transformation et sélection des phénotypes.

Comme nous le signalons au point II.1A, c'est la séquence où la restriction de linéarisation survient qui cible le lieu d'intégration de la cassette d'expression. Une restriction *Bgl II* (site 2 et 5622 sur la Figure II.8) favorisant l'intégration du fragment linéaire au locus *AOX-1*(transplacement) et une linéarisation *Stu I* (site

3263 sur la Figure II.8) la dirigeant en *HIS4*(insertion). Comme le gène *DIM1* compte deux sites de restriction *Bgl* II, nous avons dû chercher un autre site. Nous avons choisi le site *Bst*BI situé une première fois dans la région 5' *AOX-1* et une seconde fois dans la région 3' *AOX-1*, et par ailleurs absent de la séquence de *DIM1*. Le tableau suivant décrit les positions des sites et la taille des régions d'homologies qu'ils engendrent par rapport à une linéarisation *Bgl* II dans le cas du pPIC9.

ENZYME UTILISEE	5' <i>AOX-1</i> 14-953 pb	3' <i>AOX-1</i> 4526-5282 pb	Séquences d'homologie aux extrémités (pb)
<i>Bgl</i> II	2	5622	939 + 756
<i>Bst</i> BI	934	5137	16 + 145

Comme le montre le tableau ci-dessus, la restriction *Bst* BI diminue très fortement, aux extrémités du fragment, la longueur des régions d'homologies avec le locus *AOX-1* du chromosome, diminuant d'autant les chances de trouver l'événement recherché. Néanmoins, cette restriction a déjà été testée (donnée Invitrogen Corporation) avec succès, nous y reviendrons plus loin.

Nous avons restreint le pGIDH9, qui servira de test, et le pPIC9, qui servira de contrôle, par les enzymes *Bst* BI et *Stu* I. Après avoir vérifié que les restrictions étaient totales (données non montrées), nous avons réalisé une extraction au phénol et deux lavages à l'éthanol. Nous avons alors transformé par électroporation la souche GS115 de *P. pastoris* préalablement rendue électrocompétente.

Après 2 jours de croissance à 30°C sur milieu minimum MD, 200 clones ont été repiqués sur milieu MM et MD (voir "Matériel et Méthodes" point 3.2.). Ces repiquages doivent permettre de discriminer les phénotypes MUTs poussant sur milieu glucose mais pas sur méthanol. Aucun transformant de ce type n'a pu être isolé. Ceci n'est pas étonnant puisque on sait qu'avec l'homologie maximale (qui est engendrée par une restriction *Bgl* II), on ne sélectionne que 5 à 30% de MUTs (Invitrogen Corporation), si on ajoute à ceci que nous avons été obligés de travailler avec des régions d'homologie beaucoup plus restreintes, on comprend que nous n'ayons pas sélectionné de MUTs.

Nous avons décidé de travailler avec le phénotype MUT+. On sait en effet que les niveaux d'expression sont le plus souvent indépendants du lieu d'intégration (Romanos *et al.*, 1992) et on rapporte même que le phénotype MUT+ est à conseiller parce qu'il permet de poursuivre la croissance après l'induction. Ceci est préférable comme l'efficacité de sécrétion est proportionnelle à l'activité cellulaire (Clare *et al.*, 1991). Enfin, dans le cas d'un MUT+, le méthanol, ajouté toutes les 24 heures pour maintenir l'induction, ne peut atteindre son niveau de toxicité puisqu'il est métabolisé par la cellule.

E) Premier essai d'induction de l'expression:

Deux cultures de 25ml de BMGY (voir "Matériel et Méthodes" point 3.2.) sont lancées en Erlen de 250ml avec contre-pale. Une culture contient le contrôle pPIC9, l'autre le test: ici un clone MUT+ originaire de la transformation après linéarisation par *Stu* I. Le volume de l'Erlen (10 fois supérieur à celui de la culture) ainsi que l'agitation et la température de 30°C sont décrits comme étant des paramètres essentiels pour un bon déroulement des opérations (Barr *et al.*, 1992).

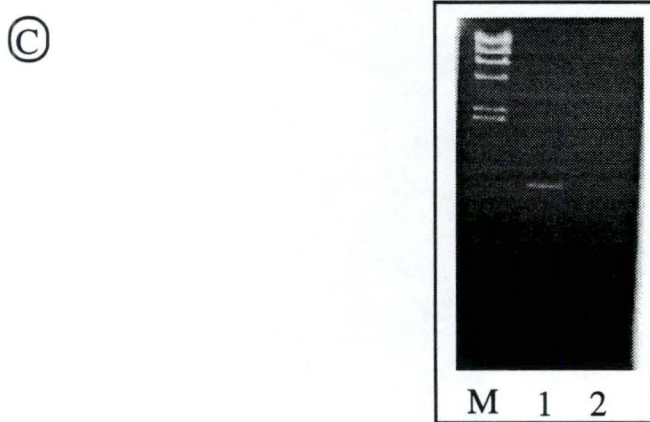
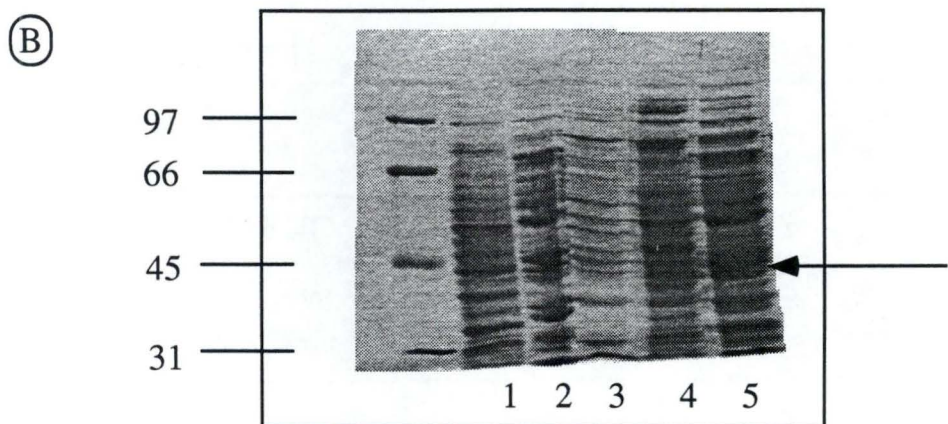
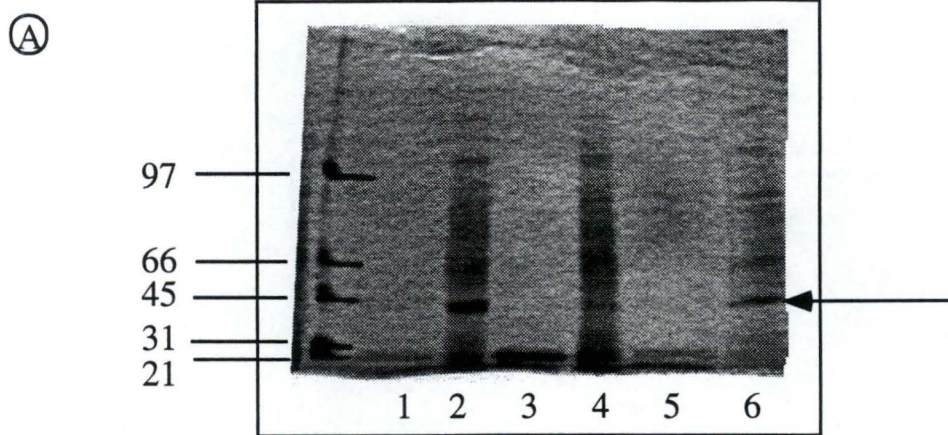


FIGURE II.11: A) Electr. anal. des protéines solubles (2,4,6) et sécrétées (1,3,5) extraites de la souche GS115 transformée par le pPIC9 et pGIDH9 pGIDH9 (pistes 1,2,5,6); pPIC9 (pistes 3,4). Temps 3 (pistes 1,2,3,4); Temps 4 (pistes 5,6).
 B) Electr. anal. des protéines solubles. pGIDH9 (pistes 2,3,5); pPIC9 (pistes 1,4). Temps 0 (pistes 1,2,3); temps 1 (pistes 4,5).
 Les flèches indiquent la position présumée de Dim-1p avec la séquence de sécrétion.
 C) Electr. anal. des amplifications PCR contrôles sur colonies. pGIDH9 (piste 1); pPIC9 (piste 2).
 M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

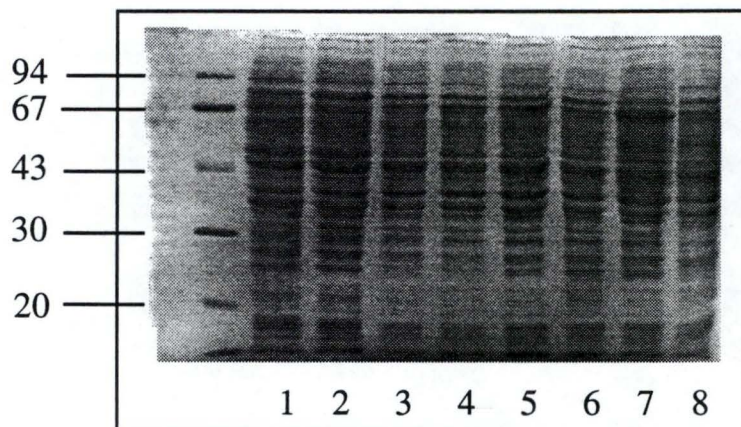


FIGURE II.12 : Electr. anal. des protéines solubles du pGIDH9 et du pPIC9 transformés dans GS115.
pPIC9 (pistes 1,3,5,7); pGIDH9 (pistes 2,4,6,8).
Temps 0 (pistes 1,2); temps 1 (pistes 3,4); temps 2 (pistes 5,6); temps 3 (pistes 7,8).

Lorsque les cultures ont atteint une DO de plus ou moins 2 (après une trentaine d'heures de croissance), elles sont centrifugées stérilement à température ambiante à 3000rpm. Le culot est resuspendu dans un volume de plus ou moins 150ml de milieu BMMY pour arriver à une DO de 1. Toutes les 24 heures, du méthanol 100% stérile est ajouté aux cultures à une concentration finale de 0,5%.

Les prélèvements sont réalisés aux temps suivants (en heures après l'induction):

Heures après l'induction.	0	6	12	24	36	48	60
Notation des temps	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6

A chacun des ces temps, un prélèvement d'un millilitre de culture est effectué stérilement et centrifugé. Culots et surnageants sont stockés à -80°C. Les échantillons prélevés à chaque temps sont alors préparés, dosés et déposés sur gels SDS-PAGE 12% comme décrit dans la partie "Matériel et Méthodes" au point 4.4. La Figure II.11 montre les gels protéiques obtenus. Trois observations sont faites:

- une bande apparaît dans le test à la taille attendue de Dim-1p (pistes 2,6 du gel A; pistes 5 du gel B) y compris la séquence de sécrétion (35 kd + 9 kd = 44 kd). Cette bande ne se retrouve ni au T0 du test, ni à aucun temps du contrôle comme le confirme la partie B de la figure qui montre un autre gel protéique réalisé avec les mêmes échantillons.

- L'alcool oxydase qui doit apparaître sur gel, puisque les clones testés poussent sur méthanol, n'est pas visible après l'induction (sa taille attendue est environ 80000 Daltons).

- Dans les pistes relatives à l'analyse des protéines sécrétées (pistes 1,3,5 du gel A), aucune bande n'apparaît à aucun temps.

Nous avons reproduit cette expérience dans des conditions identiques en s'assurant que le clone test possédait bien l'ORF du gène *DIMI* et pas le contrôle. Ceci fut réalisé par PCR sur colonie au départ des clones sur boîtes. La Figure II.11C montre qu'une amplification réalisée avec les primers utilisés pour le clonage (voir point II.2B) produit une bande de taille attendue (957pb la taille de l'ORF de *DIMI*) alors qu'aucune bande n'apparaît dans le contrôle. De manière très inattendue, les gels protéiques pour la fraction test de cette deuxième expérience (Figure II.12) ne montrent plus la bande apparue à la taille de 44 kd dans le test. Une troisième tentative réalisée avec les mêmes clones a confirmé ce résultat (donnée non montrée).

Nous avons alors testé une série d'autres clones: 3 issus de la restriction par *Stu* I et 3 par *Bst* BI avec les contrôles correspondants. Tous ces transformants sont phénotypiquement MUT+ comme nous l'avons signalé. L'analyse des extraits des protéines solubles et sécrétées n'a pas permis d'observer de bandes à la taille attendue de Dim-1p (données non montrées).

F) Deuxième essai d'induction de l'expression.

La manipulation a été reprise dès le départ, c'est-à-dire de nouvelles restrictions *Stu* I, de nouvelles transformations de *P. pastoris*, de nouveaux repiquages. Un clone test et un clone contrôle ont été choisis pour relancer une induction (30 heures en BMGY puis passage en BMMY). Nous avons cette fois effectué des PCR sur chaque culot aux différents temps pour s'assurer que *DIMI* était maintenue en

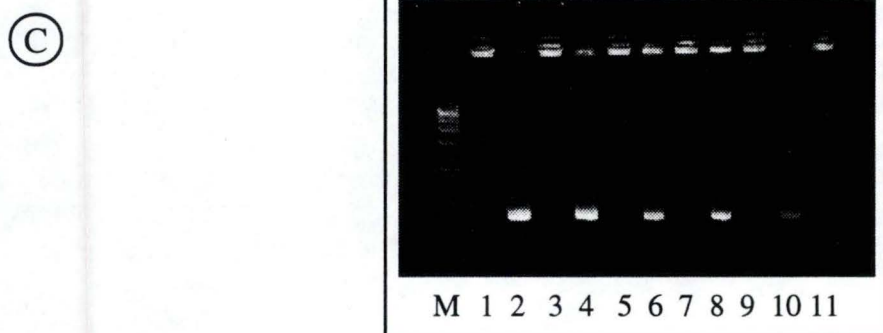
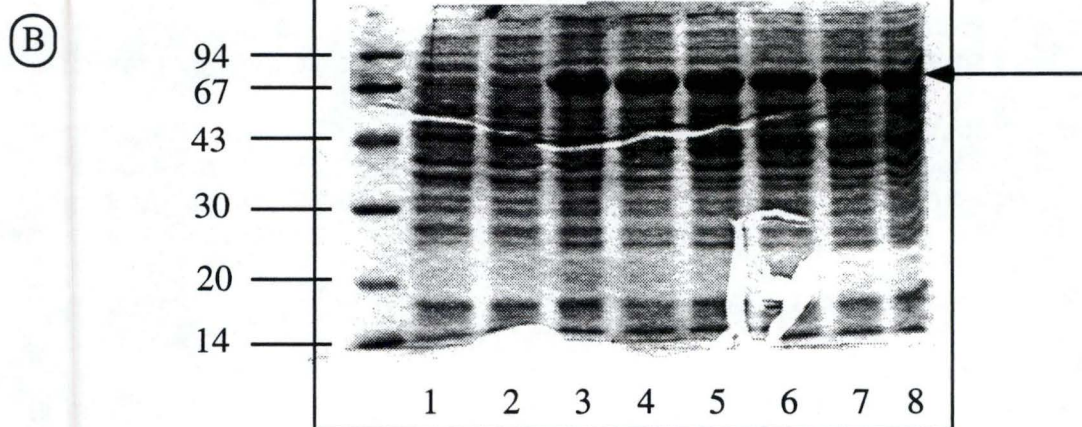
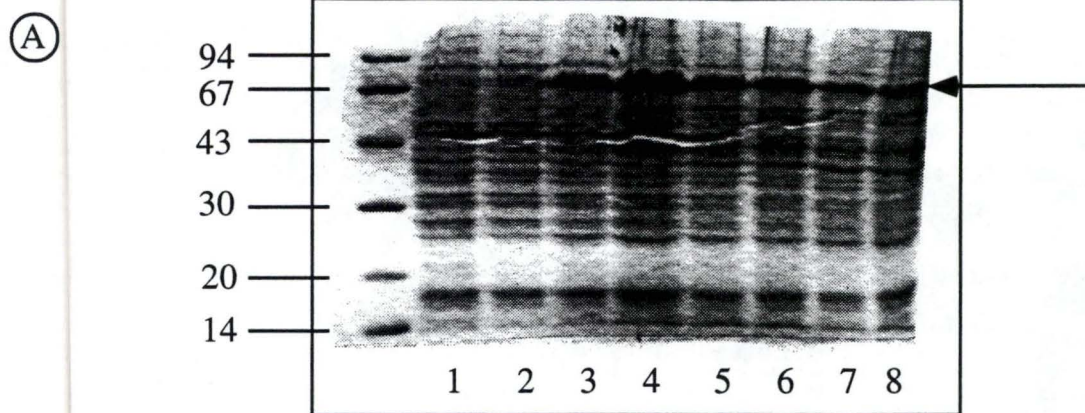


FIGURE II.13: Electr. anal. des protéines solubles et totales extraites de la souche GS 115 transformée par les plasmides pPIC9 et pGIDH9

A) Gel des protéines totales.

pPIC9 (pistes 1,3,5,7); pGIDH9 (pistes 2,4,6,8).

Temps 0 (pistes 1,2); temps 1 (pistes 3,4); temps 2 (pistes 5,6); temps 3 (pistes 7,8).

B) Gel des protéines solubles.

Même disposition qu' au point A.

Les flèches indiquent la position de l' alcool oxydase.

C) Electr. anal. des amplifications PCR contrôles sur colonies.

pPIC9 (pistes 1,3,5,7,9); pGIDH9 (pistes 2,4,6,8,10); Cont. négatif (piste 11).

Clones sur boîtes (pistes 1,2); T0 (pistes 3,4); T1 (pistes 5,6); T2 (pistes 7,8);

T3 (pistes 9,10).(voir texte)

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

cours d'induction. Les échantillons ont été préparés, dosés et déposés sur gel SDS-PAGE 12%. Nous avons réalisé 3 gels respectivement pour l'analyse des protéines totales, des protéines solubles et du surnageant (protéines sécrétées). Les gels relatifs aux protéines totales et sécrétées, ainsi que les amplifications PCR sont présentés à la Figure II.13. Trois conclusions peuvent être tirées:

- L'alcool oxydase est visible à sa taille attendue (80000 Daltons) après l'induction à la fois pour le test et pour le contrôle. Ce qui est attendu puisque tous deux poussent sur méthanol.

- Aucune bande n'apparaît dans les tests après l'induction à la taille attendue de Dim-1p que ce soit lors de l'analyse des protéines solubles, totales ou sécrétées.

- La PCR confirme que le gène *DIMI* est présent dans le test tout au long de la manipulation et absent du le contrôle.

Conclusion:

La sécrétion de la protéine Dim-1p dans le milieu de culture n'a pas pu être mise en évidence et la présence d'une bande, à la taille attendue de la protéine de fusion (Dim-1p - séquence signal), sur les profil d'électrophorèse du premier clone testé, suggère que la séquence signal n'est pas processée. Pour expliquer ce défaut de clivage, il faut rappeler que la sécrétion d'une protéine dépend d'un grand nombre de paramètres. A titre d'exemple, citons le cas de la phosphatase acide, qui entre dans le "pathway" de sécrétion même sans signal d'exportation, indiquant que la séquence de la protéine peut aussi contenir des informations relatives à sa sécrétion (Silve *et al.*, 1987). Par ailleurs, les tentatives de sécrétion de protéines naturellement intracellulaires (comme Dim-1p) sont largement moins fructueuses que celles relatives à des protéines exportées de façon constitutive.

Une mauvaise conformation de la protéine de fusion peut aboutir à la rétention dans le Golgi ou à la dégradation, la rétention dans la paroi cellulaire constituant aussi un problème. La non-sécrétion peut également résulter d'un clivage aberrant dans la protéine elle-même: le cas s'est présenté pour l'hormone parathyroïdienne humaine (Reppe *et al.*, 1991). Cette protéine était clivée par la protéase Kex2 après deux de ses résidus basiques lors du processing de sécrétion, une forme mutante à laquelle il manquait un de ces résidus n'était plus sujette à une telle protéolyse.

Si la protéine d'intérêt parvient dans le milieu de culture, elle peut encore être la cible de nombreuses protéases; on joue alors sur des variations de pH ou sur l'adjonction de casamino acides ou de peptone qui peuvent protéger la protéine de sa dégradation en agissant comme "carrier" (Cregg *et al.*, 1993). La sécrétion est donc un processus complexe qui a toutefois rencontré de nombreux succès.



Dans le cas qui nous occupe, plusieurs interprétations sont possibles. En effet les premiers essais réalisés indiquaient un défaut de sécrétion puisqu'une bande était visible en intracellulaire. Par la suite, nous n'avons plus observé cette bande. Le premier clone testé présentait peut-être une situation optimale pour l'expression (intégration dans un contexte qui favorise la transcription, insertions multiples...), ce qui explique la présence de la bande à 44kd. Ensuite un "événement" (réarrangement...) a pu se produire avant que nous retestions le clone. Nous n'avons pas trouvé d'explication simple pour justifier l'absence de l'alcool oxydase dans les premiers gels.

L'impossibilité de sécréter la protéine d'intérêt dans le milieu de culture élimine la possibilité de réaliser ainsi une étape de purification simple. Nous avons donc décidé de tester l'expression intracellulaire de Dim-1p.

II.3 Expression intracellulaire avec le pGIDH11.

A) Construction du vecteur d'expression intracellulaire de Dim-1p (pGIDH11).

Nous avons inséré au seul site de clonage (*EcoR*I) du pPHIL-D1 (voir "Matériel et Méthodes") le fragment PCR utilisé pour la réalisation de pGIDH9. Le nouveau plasmide d'expression se nomme pGIDH11, le schéma de sa construction est présenté à la Figure II.14. Après ligation entre la matrice pPHIL-D1 et l'insert récupéré, des cellules XL1blue sont transformées par la méthode au chlorure de calcium. La sélection s'opère sur milieu LBamp. Par minipréparations, on recherche le pGIDH11. Le profil de restriction du pGIDH11 (*DIM1* congruant avec le promoteur AOX-1) et celui du pGIHD11 (*DIM1* en sens inverse) est donné dans le tableau suivant:

	<i>Bgl</i> II		<i>Bgl</i> II
pGIDH11	300pb 1050pb 2368pb 4939pb	pGIHD11	300pb 1515pb 2368pb 4474pb

Les résultats montrés à la Figure II.15 confirment les valeurs attendues pour le pGIDH11, lequel est préparé par midipréparation.

Rappel: Comme le montre la Figure II.10, ce plasmide restaure la sensibilité à la kasugamycine dans la souche DL101, ceci montrant que la construction est correcte, c'est-à-dire qu'une protéine intègre est produite.

B) Transformation, sélection des phénotypes et expression.

Nous avons procédé exactement de la même manière que pour le pGIDH9. Le plasmide pPHIL-D1 et le pGIDH11 ont été restreints par *Bst*B I et *Stu* I. Après vérification des restrictions, une extraction au phénol et deux lavages à l'éthanol ont été effectués. Après préparation de cellules électrocompétentes, la souche *P. pastoris* GS 115 a été transformée par les ADN linéaires, étalée sur milieu sélectif MD et incubée deux jours à 30°C.

200 transformants ont été repiqués sur milieu MD et MM et aucun phénotype MUTs n'a été isolé pour les mêmes raisons invoquées au point II.2.D. Des cultures de 25ml de BMGY ont été inoculées avec les clones adéquats (test et contrôle). A une DO d'environ 2, les cultures ont été centrifugées et resuspendues jusqu'à une DO de 1 en BMMY. Les prélèvements ont été réalisés dans les conditions déjà décrites, les échantillons préparés et déposés sur gels SDS-PAGE 12%. En outre, des PCR ont permis de vérifier que le gène *DIM1* était bien maintenu dans le test au cours de l'induction dans tous les cas à l'exception d'un seul où le signal PCR a disparu en cours d'expérience. Ceci provient probablement d'une recombinaison facilitée par l'apport de régions d'homologie lors de la transformation. Un tel phénomène laisse de faux-positifs puisque le gène *HIS4* fonctionnel est maintenu, les cellules qui ont perdu le gène d'intérêt comportant alors un avantage sélectif sur les autres. Le phénomène est évoqué par Romanos. (Romanos *et al.*, 1992).

la Figure II.16 présente le gel protéique et les PCR. Aucune trace de Dim-1p n'est visible à aucun temps dans la région correspondant à 35 kd, par contre l'alcool oxydase apparaît bien après passage sur milieu méthanol.

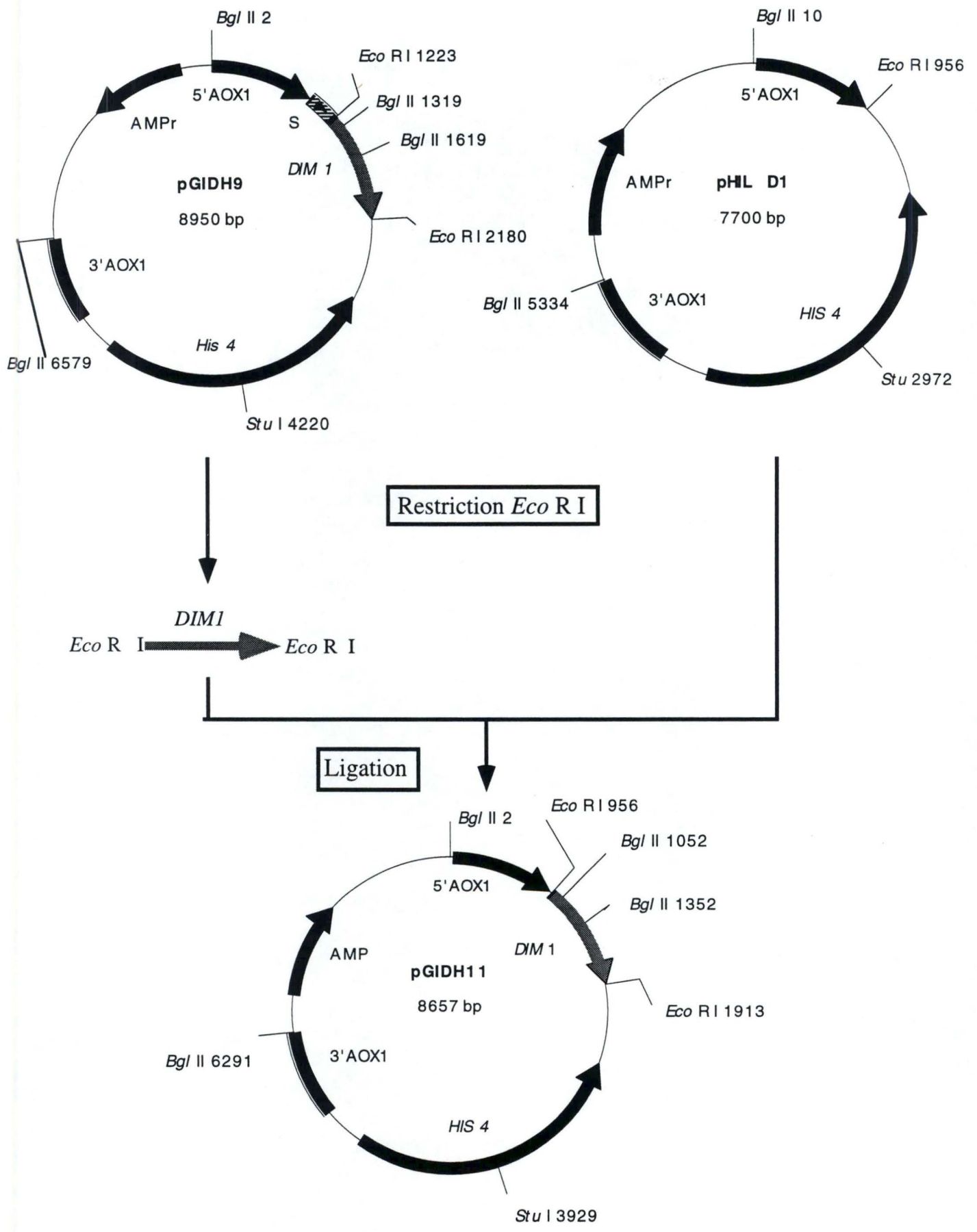


FIGURE II.14: Schéma de la construction du pGIDH11. (voir texte).

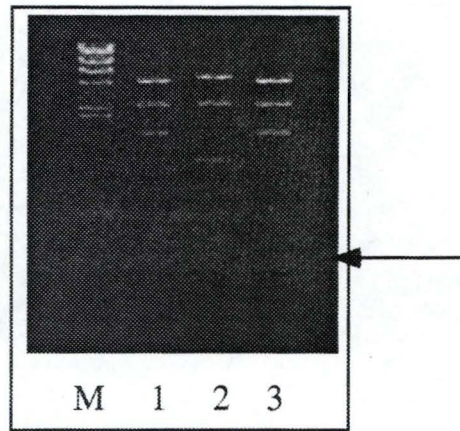


FIGURE II.15: Electr. anal. des restr. diagnostiques du sens du clonage de l' ORF du gène *DIM1* dans le pHIL-D1. Restriction *Bgl* II. pGIHD11 (pistes 1,3); pGIDH11 (piste 2). (voir texte). La flèche indique la position de la bande de 300pb qui apparaît dans les trois pistes mais n' est pas visible sur le document. M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

Une des méthodes employées pour augmenter la production de la protéine d'intérêt consiste à rechercher des intégrants multiples chez *P. pastoris*. De très nombreuses publications permettent en effet d'établir une corrélation nette entre le dosage génique et la productivité du système (Romanos *et al.*, 1991; Clare *et al.*, 1991...). Par ailleurs, le rendement atteint par ces intégrants est tel que de nouveaux vecteurs ont été développés qui permettent leur sélection directe. Ces vecteurs contiennent le gène de résistance à la kanamycine (G418), les levures qui ont intégré la cassette d'expression ne pousseront sur un milieu à concentration élevée en antibiotique que si elles possèdent des intégrants multiples (Scorer *et al.*, 1994). Ne pouvant disposer de ce type de vecteur, nous avons tenté d'isoler des intégrants multiples par la méthode du "dot blot" quantitatif.

C) Recherche d'intégrants multiples par dot blot quantitatif.

Nous avons utilisé le protocole décrit par Romanos (Romanos *et al.*, 1991). Il se base sur un principe simple: si des clones sont lysés sur filtre, une hybridation avec une sonde nucléique correspondant au gène d'intérêt donnera un signal d'autant plus fort que le nombre de cassettes d'expression est élevé (voir "Matériel et Méthodes" point 5.12.).

Nous avons inoculé 176 puits de milieu YPD sur plaques ELISA stériles. A chaque plaque, nous avons ajouté un blanc (YPD seul), quatre contrôles négatifs (la souche GS115 transformée par le pHIL-D1), et trois contrôles positifs. Sur ces trois derniers, deux font figure de contrôle d'"intégration multiple", il s'agit en fait de la souche YPH 274 disruptée pour *DIM1* par le marqueur *TRP1* et transformée par un plasmide multi-copie portant *DIM1* sauvage, le troisième correspondait à la souche YPH 274 sauvage.

Après 2 jours de croissance, les DO des 190 cultures sont relevées. Il s'agit en effet de ne pas confondre un clone présentant une intégration multiple avec un clone normal qui aurait atteint une DO plus élevée. Le protocole de lyse sur filtre est appliqué et la détection réalisée avec une sonde marquée par la technique du "multi-primer labelling" (voir "Matériel et Méthodes"). la figure II.17 montre la position des clones sur les plaques avec leur DO et l'autoradiographie du "dot blot".

Nous avons retenu les clones n° 55 (Figure II.17A) et n° 128 (Figure II.17B) qui montrent un signal plus élevé tout en ayant une DO plus faible que la moyenne. On peut donc penser qu'il s'agit d'intégrants multiples. Remarquons que la proportion citée de 1 à 10% pour de tels événements est respectée.

Les contrôles négatifs sont corrects mais les signaux relatifs aux contrôles positifs d'intégrations multiples sont très faibles, ceci résultant probablement de la DO particulièrement faible des cultures auxquelles ils correspondent (voir Figure II.17).

D) Induction de l'expression des clones retenus.

Les deux clones retenus ont été testés quant à leur expression de Dim-1p selon le protocole déjà décrit. Les PCR contrôles ont été réalisées parallèlement. La Figure II.18 présente les électrophorèses analytiques des protéines et des produits d'amplification PCR relatives au clone n° 55, les résultats du clone n° 128 sont identiques. Aucune différence n'apparaît par rapport aux gels précédents, nous

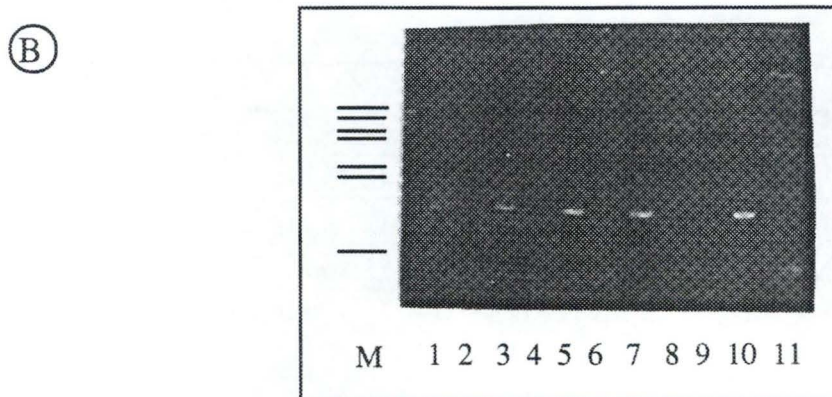
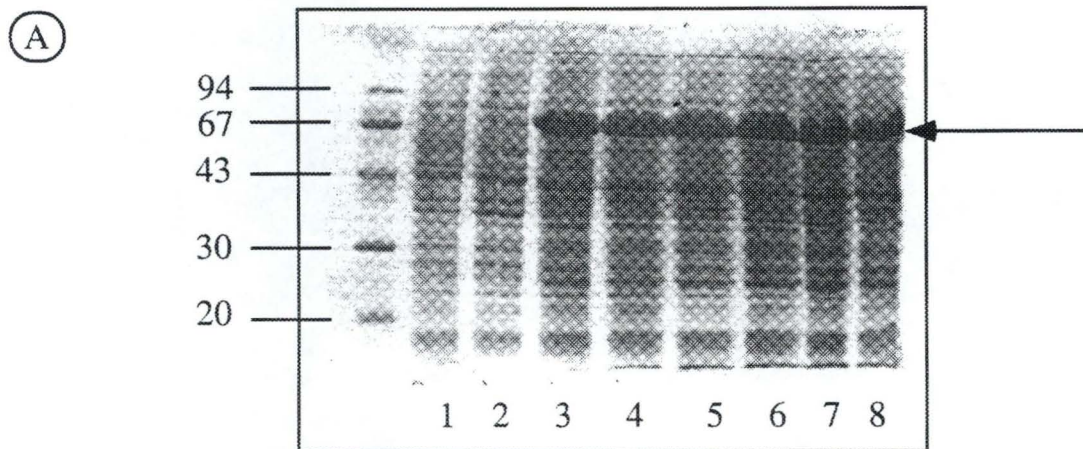
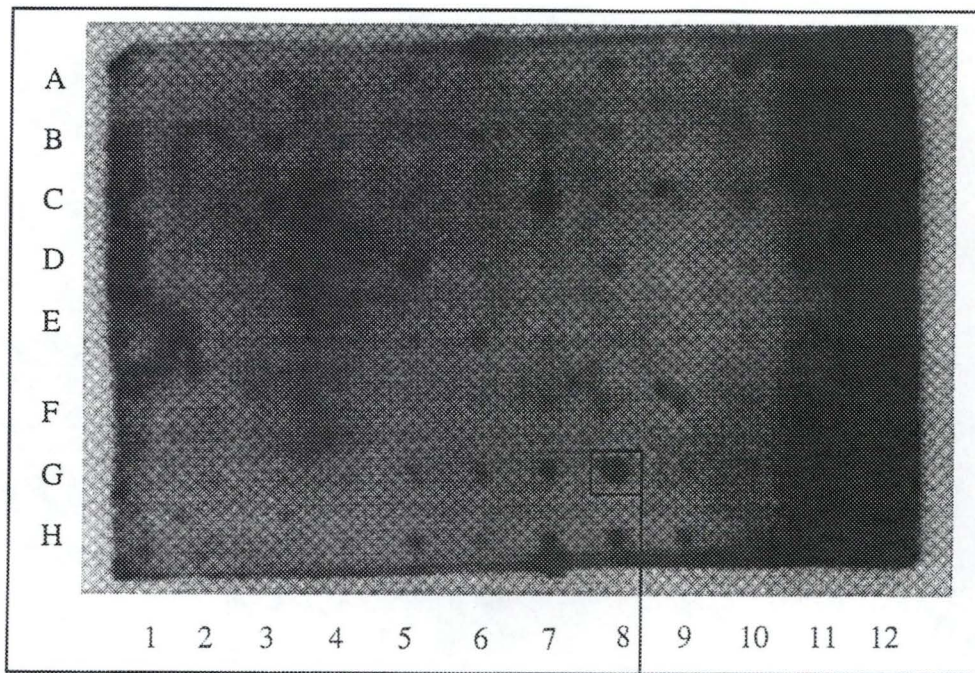


FIGURE II.16: A) Electr. anal. des protéines solubles extraites de la souche GS115 transformée par le pGIDH11 et le pPHIL-D1. pPHIL-D1 (pistes 1,3,5,7); pGIDH11 (pistes 2,4,6,8). Temps 0 (pistes 1,2); temps 1 (pistes 3,4); temps 2 (pistes 5,6); temps 3 (pistes 7,8). La flèche montre la position de l' alcool oxydase.

B) Electr. anal. des amplifications PCR contrôles sur colonies. pPIC9 (pistes 1,2); pGIDH9 (pistes 3,4,5,6,7,8,9,10); Cont. négatif (piste11). Clones sur boîtes (pistes 1,2); T0 (pistes 3,4); T1 (pistes 5,6); T2 (pistes 7,8); T3 (pistes9,10).

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

(A)



Clone n° 55.

(B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,33	0,32	0,35	0,26	0,37	0,41	0,40	0,38	0,33	0,45	0,36	0,44
B	0,44	0,36	0,28	0,30	0,28	0,36	0,37	0,33	0,31	0,29	0,29	0,39
C	0,32	0,29	0,36	0,33	0,32	0,17	0,35	0,35	0,28	0,33	0,30	0,42
D	0,38	0,35	0,31	0,27	0,30	0,24	0,30	0,50	0,28	0,30	0,28	0,38
E	0,39	0,14	0,33	0,29	0,33	0,32	0,34	0,30	0,30	0,27	0,34	0,39
F	0,41	0,15	0,29	0,39	0,27	0,26	0,25	0,29	0,38	0,26	0,27	0,35
G	0,40	0,14	0,31	0,28	0,35	0,27	0,32	0,28	0,29	0,28	0,26	0,35
H	0,48	0,00	0,30	0,42	0,32	0,28	0,32	0,33	0,37	0,33	0,67	,039

FIGURE II.17 A : "Dot blot" quantitatif.

A) Autoradiographie du dot blot;

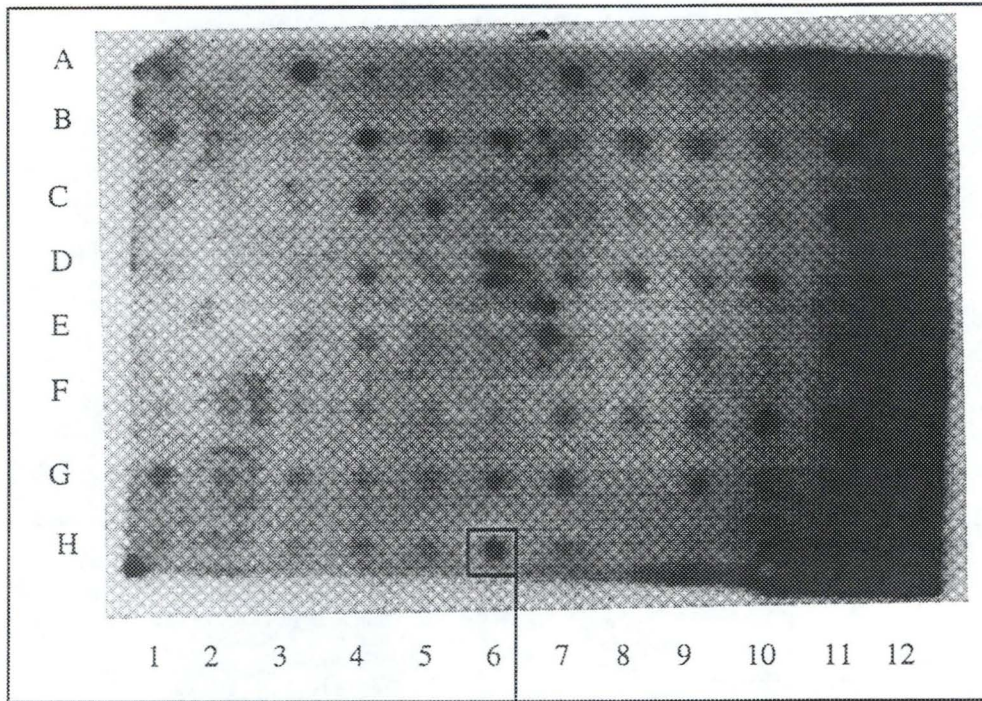
B) Densités optiques (630 nm) respectives.

A2,B2,C2,D2: contrôles négatifs (GS115).

E2,F2,G2: contrôles positifs (YPH274).

H2: blanc (YPD).

(A)



Clone n° 128

(B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,61	0,23	0,31	0,25	0,31	0,34	0,47	0,35	0,35	0,37	0,41	0,49
B	0,30	0,44	0,19	0,58	0,32	0,44	0,39	0,34	0,44	0,32	0,39	0,39
C	0,30	0,23	0,31	0,37	0,38	0,29	0,50	0,32	0,30	0,33	0,38	0,40
D	0,32	0,31	0,31	0,29	0,28	0,32	0,30	0,38	0,32	0,39	0,38	0,44
E	0,00	0,12	0,29	0,38	0,26	0,30	0,31	0,33	0,34	0,32	0,32	0,41
F	0,34	0,09	0,26	0,31	0,34	0,32	0,35	0,35	0,31	0,35	0,34	0,45
G	0,21	0,17	0,22	0,35	0,37	0,33	0,36	0,31	0,39	0,33	0,40	0,58
H	0,27	0,00	0,32	0,30	0,26	0,21	0,23	0,27	0,37	0,28	0,32	0,44

FIGURE II.17 B: Dot blot quantitatif.

A) Autoradiographie du dot blot;
B). Densités optiques (630 nm) respectives
A2,B2,C2,D2: contrôles négatifs (GS115).
E2,F2,G2: contrôles positifs (YPH274).
H2: blanc (YPD).

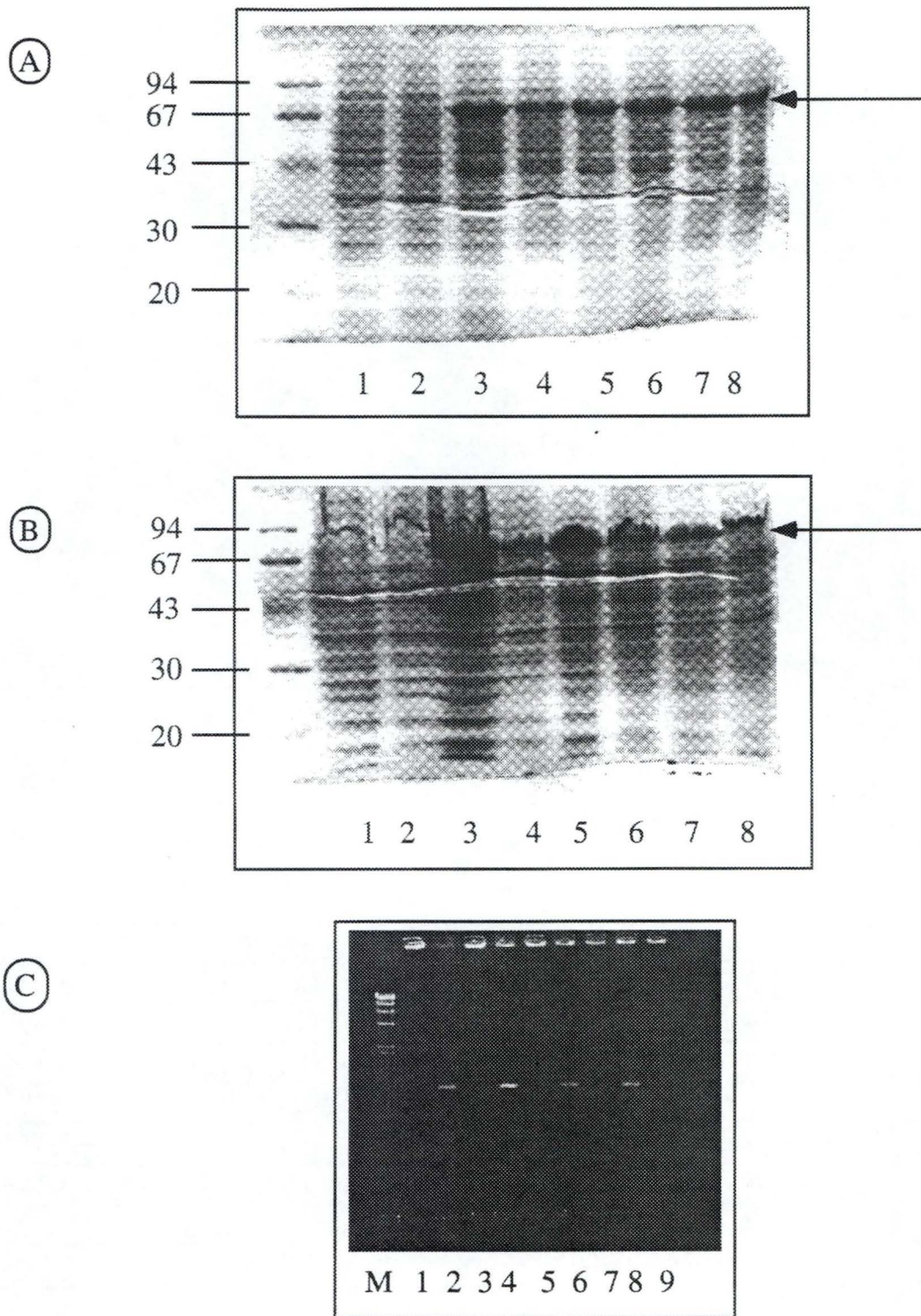


FIGURE II.18 : Electr. anal. des protéines solubles et totales du pGIDH11 (clone n°55) et du pHIL-D1 transformés dans GS115.

A) Gel des protéines solubles.

pHIL-D1 (pistes 1,3,5,7); pGIDH11 (pistes 2,4,6,8).

Temps 0 (pistes 1,2); temps 1 (pistes 3,4); temps 2 (pistes 5,6); temps 3 (pistes 7,8).

B) Gel des protéines totales.

Même disposition qu' au point A.

Les flèches indiquent la position de l' alcool oxydase.

C) Electr. anal. des amplifications PCR contrôles sur colonies.

pHIL-D1 (pistes 1,3,5,7); pGIDH11 (pistes 2,4,6,8); Cont. négatif (piste9).

Clones sur boîtes (pistes 1,2); T0 (pistes 3,4); T1 (pistes 5,6); T2 (pistes 7,8).

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

amenant une nouvelle fois à poser la responsabilité du gène *DIMI* lui-même et de la protéine qu'il encode dans l'échec de la surexpression chez *P. pastoris*.

II.4 Conclusions générales sur l'expression en système homologue.

La surexpression de Dim-1p a été tentée dans le système homologue, entendu par là "eucaryote levurien" *Pichia pastoris*. Un seul essai d'expression avec le pGIDH9 (Dim-1p en fusion avec une séquence de sécrétion) a permis d'observer, lors de l'examen du pattern des protéines intracellulaires, la surexpression d'une protéine correspondant au poids moléculaire de la protéine de fusion Dim-1p - séquence de sécrétion. Cependant, le gel d'électrophorèse des protéines extraites ne présentait pas le spot attendu correspondant à l'alcool oxydase (AOX).

Les essais ultérieurs réalisés avec le même clone, ou avec d'autres issus de la même transformation, n'ont pas permis de reproduire ce résultat. Enfin, l'expression induite sur un clone provenant d'une autre transformation a permis de mettre en évidence la présence de l'alcool oxydase après passage sur méthanol, la présence de Dim-1p n'étant pas détectée.

En relation avec ces résultats, nous pouvons avancer une série de commentaires explicatifs.

- La construction utilisée comporte Dim-1p en fusion avec une séquence de sécrétion. Celle-ci modifie vraisemblablement la conformation protéique, ce qui pourrait effectivement rendre compte de la non restauration du phénotype de sensibilité à la kasugamycine suite à la transformation de la souche mutante ksgA- par le plasmide d'expression pGIDH9. La présence d'une séquence de sécrétion à l'extrémité aminée de Dim-1p pourrait également permettre une résistance accrue aux protéases cellulaires, la protéine pouvant par exemple échapper de ce fait au système ubiquitine, d'où l'apparition de la bande correspondante en "SDS-PAGE".
- L'expression exceptionnelle, obtenue à une seule reprise, pourrait refléter la présence d'un grand nombre de copies de l'insert portant Dim-1p. Le fait que d'autres tentatives d'expression réalisées à partir du clone isolé, conservé sur boîte, ne reproduisent plus ces résultats pourrait signifier une instabilité de cette situation exceptionnelle. La raison de l'absence de l'activité AOX, alors que la croissance s'effectue bien sur méthanol demeure obscure.

Toutes les tentatives ultérieures réalisées avec le mode d'expression intracellulaire se sont soldées par une absence totale d'expression détectable de Dim-1p dans les patterns électrophorétiques, la bande correspondant à l'AOX étant, dans ces cas, toujours présente. Par ailleurs, l'induction de clones possédant une insertion multiple de la cassette contenant le gène d'intérêt n'a pas permis d'améliorer l'expression de Dim-1p.

L'hypothèse du fardeau, déjà évoquée au chapitre précédent, semble pouvoir être extrapolable ici. En effet, l'activité méthylase de Dim-1p pourrait s'avérer néfaste en cas d'expression non régulée. Par ailleurs, la stabilité de la protéine, et donc sa durée de vie, peuvent aussi être mise en cause pour expliquer l'insuccès rencontré ici.

III. IMMUNISATION PAR ADN NU.

Généralités.

La description de la technique ainsi que des exemples d'application concrets ont été présentés dans l'introduction. Nous reviendrons ici sur la partie pratique, à savoir: la construction du vecteur, l'inoculation et la mise en évidence de l'apparition d'anticorps anti-Dim-1p. Ceci exige de pouvoir disposer d'un témoin négatif pour l'analyse des sérums. Idéalement, ce témoin consiste en une souche dim-, mais l'essentialité du gène *DIM1* empêche, chez la levure, la création d'une souche qui n'exprime pas la diméthylase. Comme nous allons le voir, ceci nous a obligé à développer des voies contournant cette difficulté.

III.1 Préparation du vecteur et inoculation.

A) Construction du vecteur pGIDH2 (Figure III.1).

Le vecteur pcDNAI Amp (Invitrogen Corporation) permet l'expression dans les cellules supérieures (voir "Matériel et Méthodes" point 2.3.). Nous avons restreint ce vecteur par les enzymes *EcoRI* et *HindIII* dont les sites respectifs sont présents dans le site multiple de clonage du plasmide. Une double restriction identique a été pratiquée sur le pGIDL400 (voir "Matériel et Méthodes" point 2.3.) pour libérer un insert de 1015pb contenant *DIM1*. La matrice du pcDNA et l'insert du pGIDL400 ont été récupérés d'un gel d'agarose et purifiés. Les fragments ont été soumis à la ligation et le mélange transformé par électroporation dans la souche XL1blue de *E. coli* électrocompétente. Après croissance sur LBamp, des minipréparations ont permis d'isoler la construction pGIDH2 dans laquelle *Dim1* est placé en aval du promoteur CMV. La Figure III.1 détaille le schéma de la construction. La Figure III.2 montre les électrophorèses analytiques des restrictions diagnostiques réalisées sur les minipréparations de douzes clones issus de la transformation. Le tableau suivant présente les tailles attendues.

✂	<i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>	✂	<i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>	✂	<i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>
pcDNAI	4800pb	pGIDL400	509pb 1015pb 2686pb	pGIDH2	4800pb 1015pb

L'ADN plasmidique à injecter aux souris (pGIDH2) a été préparé par "midipréparation" et passage sur colonnes Nucléobond AX500 et AX2000 (voir "Matériel et Méthodes" point 5.10.).

B) Vérification de la construction.

La matrice pcDNAI étant pourvue d'un promoteur T7 pour la transcription de l'insert cloné, nous avons réalisé une transcription-traduction acellulaire avec le kit TNT de Promega (voir "Matériel et Méthodes" point 4.7.). Celle-ci consiste à produire la protéine Dim-1p en marquant ses méthionines par du soufre radioactif, la détection ultérieure se faisant par autoradiographie d'un gel SDS-PAGE. Le vecteur pcDNA seul a été utilisé comme contrôle négatif. Le résultat est montré à la Figure III.3. Il confirme que la construction est correcte puisque une protéine marquée

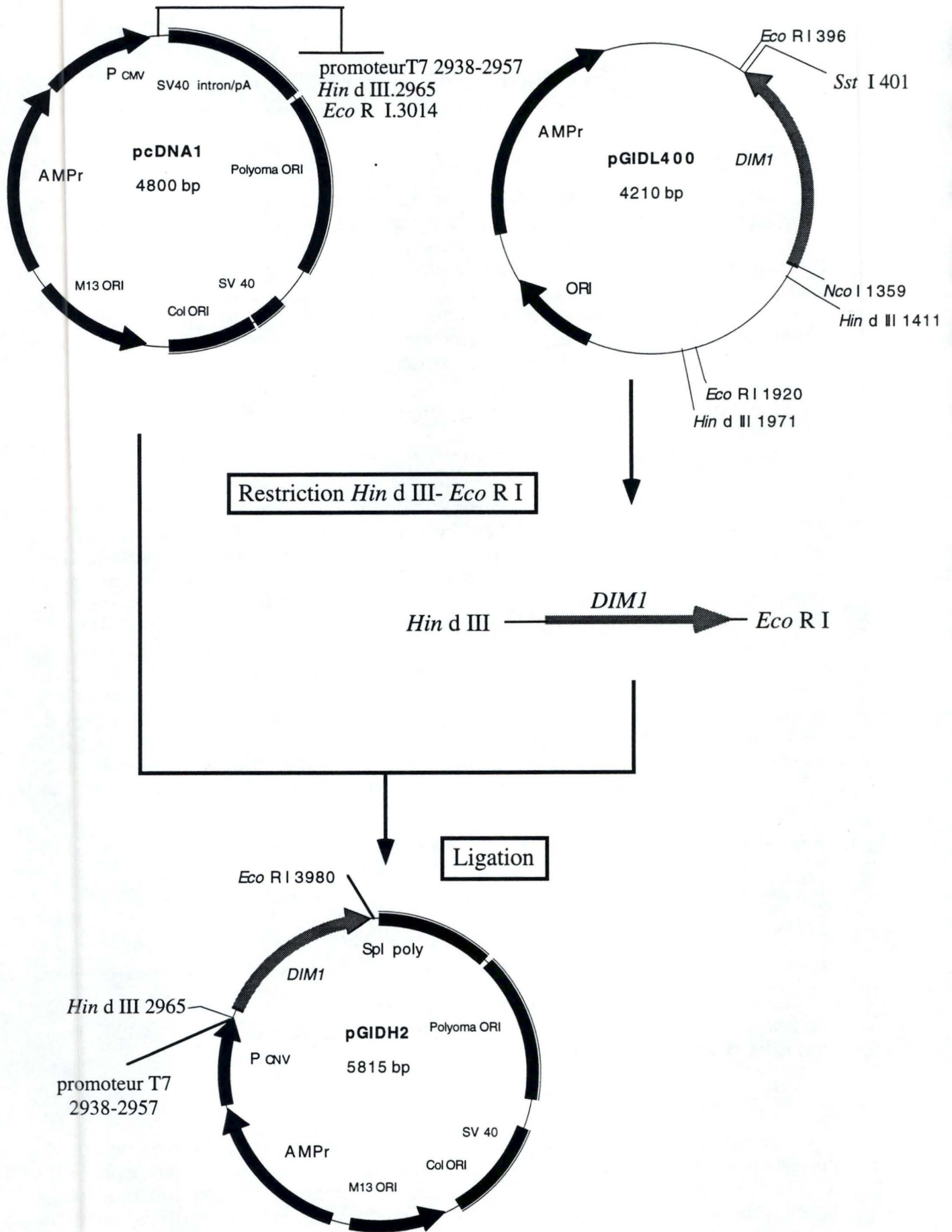


Figure III.1: Schéma de la construction du pGIDH2. Les éléments constituant le vecteur pcDNA1 sont décrits en détail dans la partie "Matériel et Méthodes".

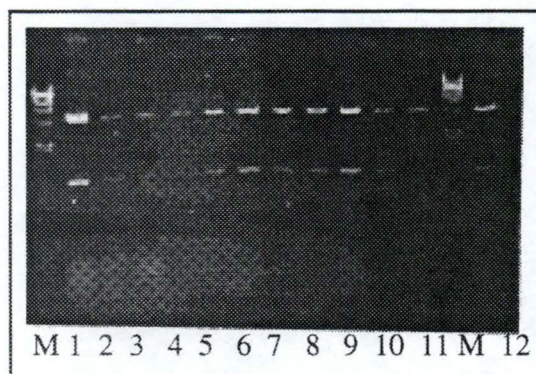


Figure III.2: Electr. anal. des restrictions diagnostiques réalisées sur les minipréparations de 12 clones issus de la transformation en vue d' isoler le pGIDH2.

M: marqueur de taille ("Matériel et Méthodes" point 5.1.2.).

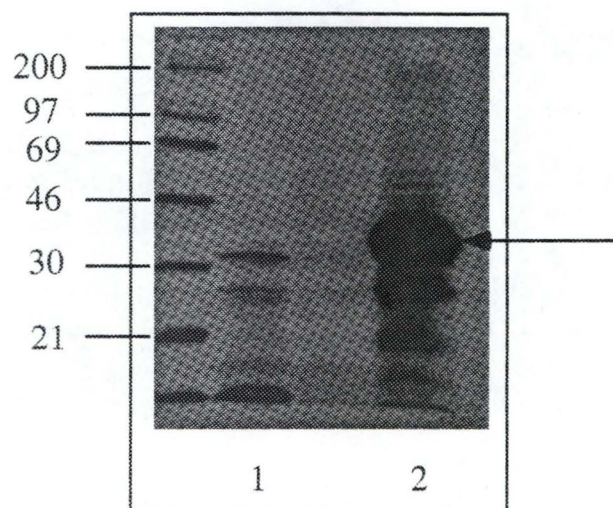


Figure III.3: Transcription-traduction acellulaire.

La transcription-traduction s'effectue dans un lysat de réticulocytes (Matériel et Méthodes point 4.7.)

Les protéines synthétisées y sont marquées (méthionine 35S).

Le lysat est alors déposé sur gel SDS-PAGE révélé en autoradiographie.

Le marqueur de taille est marqué au ^{14}C .

Piste 1: contrôle négatif pcDNA I.

Piste 2: test pGIDH2.

La flèche indique la position de Dim-1p à la taille attendue de 35 kd.

apparaît dans le test à la taille attendue de Dim-1p, c'est-à-dire 35kd. Une série d'autres bandes apparaissent, dont certaines se retrouvent au niveau du contrôle négatif. Elles peuvent résulter de la transcription-traduction d'autres gènes (pour celles qui sont communes au contrôle et au test), ou de produits de dégradation de Dim-1p (pour celles qui n'apparaissent que dans le test).

C) Inoculation.

Le plasmide a été inoculé à 5 souris BALc femelles. Les injections sont réalisées en solution NaCl 0,9% et pratiquées dans le muscle tibialis de la patte arrière droite, ou en sous-cutané. Le volume injecté est d'environ 100µl. Le tableau suivant décrit les quantités d'ADN inoculé, les types d'inoculation et les dates auxquelles elles ont été pratiquées:

Date de l'inoculation	Quantité d'ADN injectée (µg)	Types d'injection
21-04-1995	50	Tibialis
09-05-1995	45	Tibialis
23-05-1995	60	Tibialis
	60	sous-cutané
08-06-1995	50	Tibialis
	65	sous-cutané
22-06-1995	60	Tibialis
	60	sous-cutané
12-07-1995	60	Tibialis
	60	sous-cutané
04-08-1995	50	sous-cutané
29-08-1995	60	sous-cutané
12-10-1995	45	Tibialis
	45	sous-cutané

En même temps que les injections, des prélèvements de sang effectués en rétro-orbitale ont été réalisés le 21-04-1995, le 12-07-1995 et le 26-10-1995. Le sérum est préparé en laissant le sang coaguler sur table 4 à 5 heures. Ensuite, on récupère la phase liquide que l'on centrifuge 5 minutes à 10000rpm. Le surnageant qui est ensuite récupéré constitue le sérum, celui-ci est stocké à -20°C.

III.2 Mise en évidence de la réaction contre Dim-1p.

A) Détection par Western-blot.

Un lysat cellulaire contenant Dim-1p et un lysat dépourvu de Dim-1p sont requis pour le test de réactivité en immunoblot. Du fait du caractère essentiel de Dim-1p chez la levure, il faut obligatoirement se tourner vers une souche d' *E. coli* dépourvue de la protéine KsgA, l'homologue bactérien de Dim-1p. La souche DL101 (voir "Matériel et Méthodes") mutée dans le gène KsgA, mais non délétée, est choisie comme hôte de transformation par le pGIDL31.42 (Contrôle positif) et par le pFL44S (contrôle négatif). L'hypothèse est que KsgA ne présente pas d'antigène naturel détectable par des anticorps anti-Dim-1p. Cette hypothèse paraît raisonnable eu égard à la faible similarité entre les deux protéines et au fait que, en outre, la

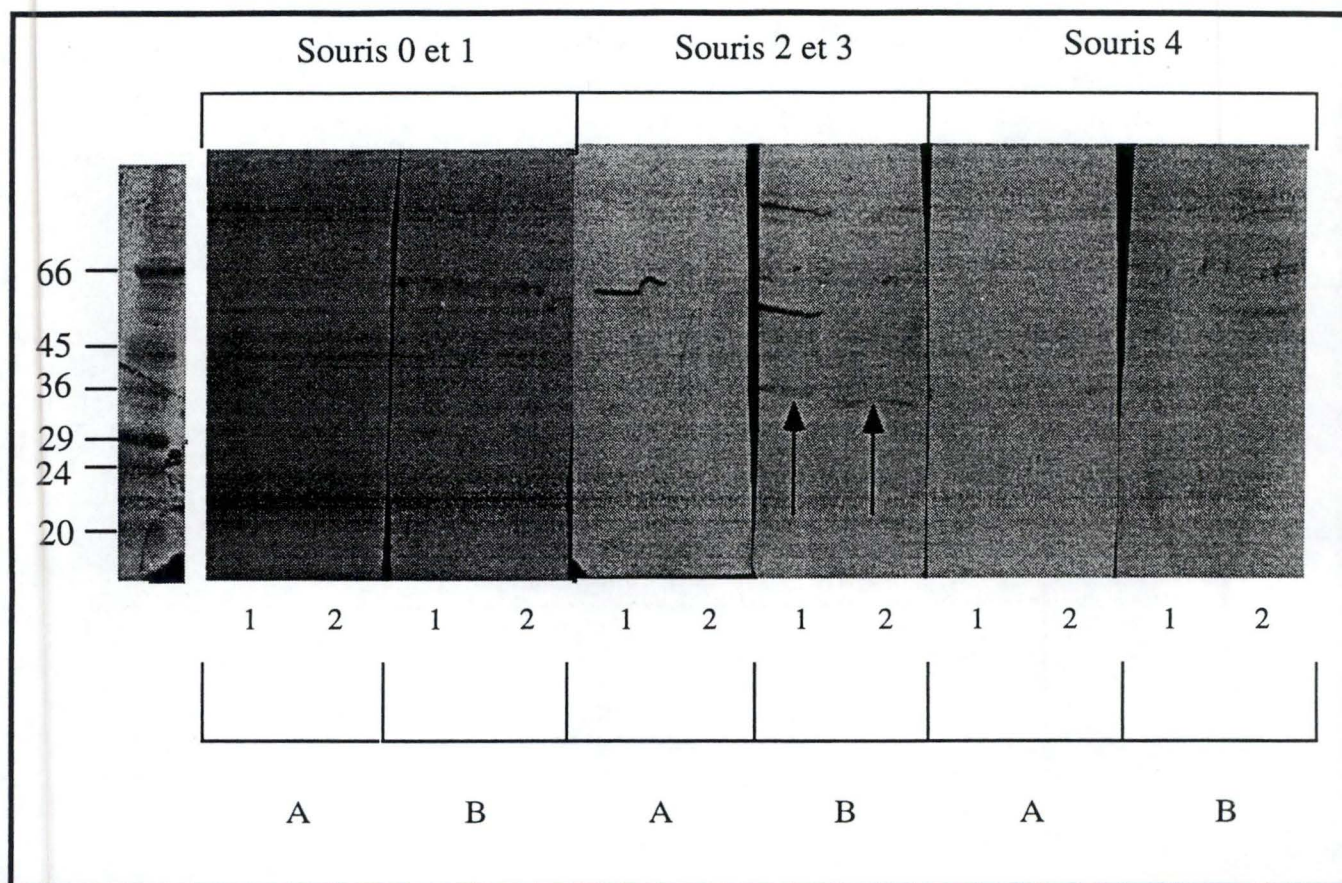


Figure III.4: Immunoblot test de la présence d' anticorps anti Dim-1p.

Pistes 1: migrations des protéines solubles de la souche DL101 transformée par le pFL44S.
 Pistes 2: migrations des protéines solubles de la souche DL101 transformée par le pGIDL31.42.

Pistes A: incubations avec les sérum pré-immuns.

Pistes B: incubations avec les sérums post-immuns.

Les sérums des souris 0 et 1, et des souris 2 et 3 respectivement ont été poolés.

(Voir texte et "Matériel et Méthodes").

Les flèches indiquent les signaux décrits dans le texte.

mutation, non définie, peut se trouver être une mutation "stop" ou "frame shift" amenant la production d'une protéine amputée.

Pour tester les sérums sur ces souches en Western blot (voir "Matériel et Méthodes"), nous avons constitué 3 pools de sérum: le premier correspond aux souris 0 et 1; le second aux souris 2 et 3; et le troisième à la souris 4. La manipulation est réalisée avec les sérums du 21-04-1995 (sérums pré-immuns) et avec ceux du 12-07-1995 (sérums post-immun). Les pools sont dilués 50 fois pour l'utilisation. Chacun de ces pools a été testé sur 2 échantillons protéiques:

- DL101 transformée par le pFL44S.
- DL101 transformée par le pGIDL31.42 (Dim-1p).

La Figure III.4 présente les résultats obtenus. Il faut noter que les sérums ont dû être épuisés contre la souche DL101 transformée par le pFL44S. En effet, sur un premier blot réalisé sans épuisement (donnée non montrée), les polysérums allumaient énormément de bandes de bruit de fond. Ces épuisements ont été réalisés dans un volume de 0,1ml contenant environ 1mg de protéines préparées par sonication.

Conclusion:

Une bande apparaît pour les souris 2-3, avec les sérums post-immuns et non avec les sérums pré-immuns. Cette bande se situe à la taille attendue de Dim-1p mais elle se retrouve également dans la piste qui correspond à la souche transformée par le pFL44S (et qui n'exprime donc pas Dim-1p).

La présence d'un signal dans la souche qui n'exprime pas Dim-1p pourrait résulter, comme nous l'avons dit, d'une reconnaissance croisée de ksgA par les anticorps produits contre Dim-1p. Cependant, la protéine KsgA a une taille inférieure à Dim-1p (respectivement 273 aa contre 318 aa). Les éventuels anticorps "cros-réactifs" devraient donc allumer des bandes à des tailles différentes selon les pistes: une simple bande (à 30 kd) sur le profil correspondant au lysat "pFL44S", et une double bande (à 30 et 35 kd) sur le profil correspondant au lysat "pGIDL31.42".

Le contrôle n'est donc pas fiable et nous devons nous tourner vers d'autres méthodes pour tester les sérums.

B) Western-blot réalisé sur la protéine produite en transcription-traduction acellulaire.

La Figure III.3 montre que le système TNT permet de synthétiser Dim-1p à partir du pGIDH2. Le système garantit une production moyenne de 250ng de protéines dans un volume de 50µl. Ceci devrait permettre de tenter un immunoblot. Cependant, nous avons dû constater l'impossibilité de la manipulation pour différentes raisons:

- le lysat de réticulocytes, utilisé pour produire la protéine, présente une concentration en protéines très importante, ce qui rend impossible la mise en évidence de Dim-1p par une coloration au bleu de Coomassie sur gel.
- la détection par un anticorps "anti-souris" révèle énormément de bandes, ce qui signifie que les polysérums contiennent des anticorps qui reconnaissent les protéines du lysat. L'épuisement des sérums n'est pas envisageable étant donné la très faible quantité de lysat disponible.

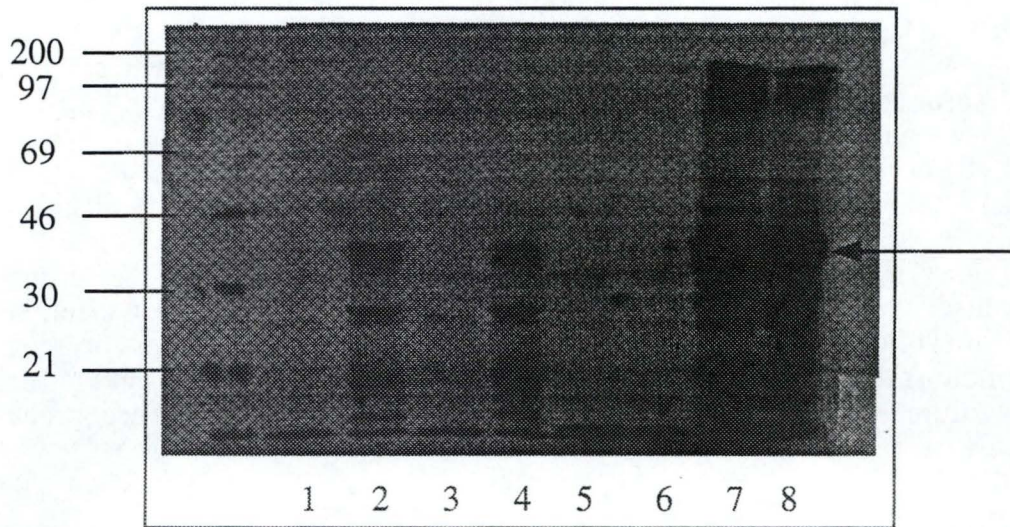


Figure III.5: Radio-immunoprécipitation de Dim-1p sur billes magnétiques. Dim-1p a été produite et marquée (méthionine 35S) en transcription-traduction acellulaire. Les extraits ont été immunoprécipités par les sérums pré- et postimmuns. Les protéines liées ont été relarguées et déposée sur gel SDS-PAGE 12%. Celui-ci a été révélé en autoradiographie.

Piste 1: sérum préimmun et contrôle négatif de TNT.
 Piste 2: sérum préimmun et Dim-1p.
 Piste 3: sérum postimmun et contrôle négatif TNT.
 Piste 4: sérum postimmun et Dim-1p
 Pistes 5 et 6: contrôle négatif de TNT.
 Pistes 7 et 8: TNT test (Dim-1p).

Le marqueur de taille est marqué au 14C, la flèche indique la position de Dim-1p. (voir texte).

Nous devons donc chercher une autre voie pour tester les sérums.

C) Radio-immuno-précipitation de Dim-1p sur billes magnétiques.

La technique est décrite en détail dans la partie "Matériel et Méthodes" au point 4.8. Elle comporte deux grandes parties: dans un premier temps, les billes "coatées" avec des IgG anti-souris sont mises en présence des sérums à tester pour capter les IgG que ceux-ci contiennent. On ajoute ensuite aux complexes "billes-IgG fixés" formés, la protéine d'intérêt radiomarquée. Après lavages, les billes sont bouillies et le produit surnageant est déposé sur gel SDS-PAGE. Après migration et autoradiographie, on détectera un signal si les sérums contiennent des anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt.

Nous n'avons pu réaliser le test qu'avec un mélange des sérums relatifs aux souris 2 et 3 (celles qui donnaient une bande en Western blot) préparés le 26-10-1995 (cfr tableau). Une série de contrôles sont réalisés: les billes sont incubées avec les sérums pré- et post-immun. Chacun des deux lots ainsi constitués est divisé en deux parties, la première est mise en présence de la protéine radiomarquée, et la seconde en présence d'un contrôle négatif ne contenant pas la protéine marquée. Le marquage étant réalisé lors de la transcription-traduction acellulaire "TNT" (voir "Matériel et Méthodes" point 4.7.), ce dernier contrôle négatif consiste en un lysat de réticulocytes auquel on a ajouté un plasmide ne portant pas d'insert. On a donc quatre lots comme décrit ci-après:

- 1) Billes *plus* sérums préimmuns *plus* cont; négatif de TNT.
- 2) Billes *plus* sérums préimmuns *plus* Dim-1p marquée.
- 3) Billes *plus* sérums post-immuns *plus* cont; négatif de TNT.
- 4) Billes *plus* sérums post-immuns *plus* Dim-1p marquée.

Seul le dernier lot devrait donner un signal significatif.

Les résultats sont présentés à la Figure III.5. Cette figure montre que les contrôles de TNT sont corrects puisque une bande intense apparaît à la taille attendue de Dim-1p dans les pistes qui correspondent aux TNT réalisées avec le pGIDH2 (*DIM1*). Cette bande ne se retrouve pas dans les pistes qui correspondent aux TNT réalisées avec le pcDNA I (sans insert). On ne note toutefois aucune différence visible entre les pistes 2 et 4, ce qui tend à montrer qu'aucun anticorps spécifique n'a été produit dans la période qui a suivi l'immunisation par ADN nu.

Pour confirmer ce résultat, un dernier test a été réalisé par le laboratoire d'Immunologie.

D) Infection de cellules COS par le pGIDH2 et détection de Dim-1p en fluorescence.

Des cellules *COS* sont des cellules supérieures (cellules de rein de singe) utilisées pour obtenir des quantités élevées de protéines à partir d'un gène cloné. Le génome des cellules *COS* contient une portion, intégrée de manière stable, du génome du virus SV40. Celle-ci code pour l'antigène viral "T" qui déclenche la réplication de l'ADN du virus en se fixant à son origine de réplication. Le gène étranger à exprimer est cloné dans un plasmide qui porte l'origine de réplication de SV40. Après transfection dans les cellules *COS*, ce plasmide est répliqué en un

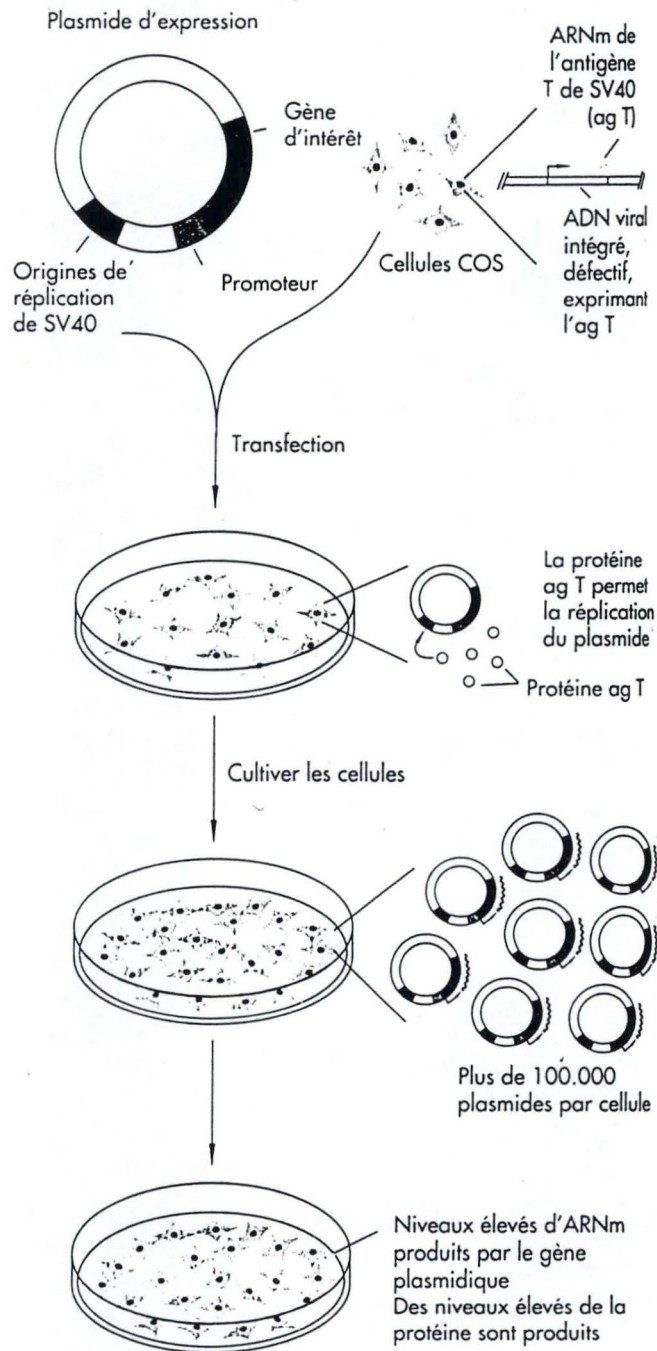


Figure III.6: Utilisation de cellules *COS* pour obtenir un taux élevé d'expression de protéines (Watson, 1994).

Le gène à exprimer est cloné dans un plasmide qui porte l'origine de répllication du virus SV40. Le plasmide est transfecté dans une lignée cellulaire *COS*, qui contient une intégration d'un génome SV40 déficient exprimant l'antigène viral "T" (agT), nécessaire à la répllication de l'ADN viral. Comme il contient l'origine virale de répllication, le plasmide est reconnu par l'agT et répliqué massivement. Avant que les cellules ne meurent quelques jours plus tard, les protéines exprimées à partir du gène d'intérêt porté sur le plasmide s'accumulent en très grande quantités.

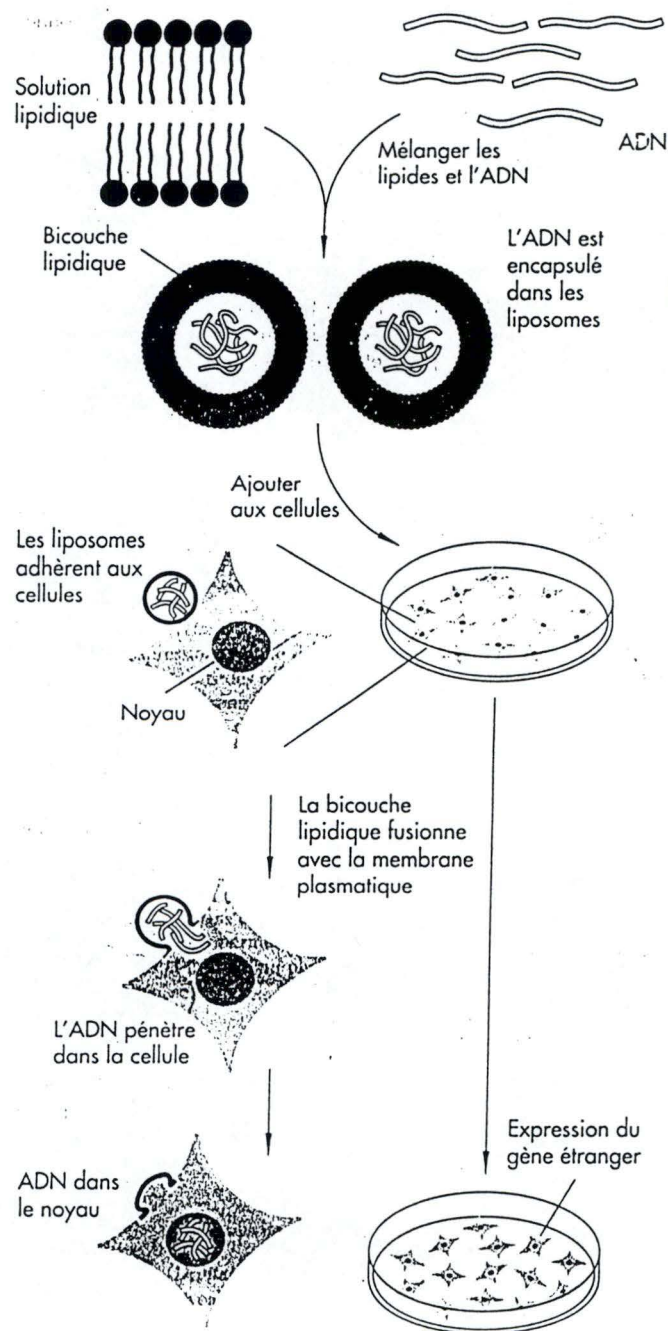


Figure III.7: Transfert de gène par lipofection (Watson, 1994). De nombreuses méthodes ont été développées afin d'encapsuler l'ADN dans des bicouches lipidiques synthétiques. Ces liposomes sont des sphères de membrane synthétique remplies d'ADN. Elles fusionnent spontanément avec les membranes des cellules, libérant leur contenu dans le cytoplasme.

nombre très élevé d'exemplaires, ce qui accroît d'autant le niveau d'expression du gène étranger (Figure III.6).

Le pGIDH2 permet l'expression de Dim-1p dans les cellules *COS* puisque le gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur CMV (actif dans les cellules supérieures), et que le plasmide possède l'origine de réplication de SV40. Le plasmide a été transfecté dans les cellules *COS* par lipofection (Figure III.7). Les lysats cellulaires et les surnageants ont été mis en présence des sérums pré- et post-immuns, et la détection réalisée en immunofluorescence. Aucun signal spécifique n'a pu être mis en évidence, indiquant que les sérums post-immuns ne sont pas enrichis en anticorps anti-Dim-1p.

III.3. Conclusions.

Les trois types de mise en évidence de la production d'anticorps anti-Dim-1p tendent à montrer qu'il n'y a pas eu d'immunisation contre la protéine. Nous pouvons envisager trois causes qui pourraient expliquer cette non-réaction.

On peut d'abord considérer que la protéine est suffisamment conservée au cours de l'évolution pour ne pas éliciter de réaction immunitaire suite à une inoculation. Cette conservation de structure pourrait être associée à une conservation de substrat, à savoir ici "l'hairpin" de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S du ribosome eucaryote. Ceci paraît peu probable au vue de la distance évolutive entre la levure et la souris.

Ensuite, il faut rappeler que l'immunisation n'aura lieu que si la protéine est présentée en membrane. Or nous avons déjà évoqué la possibilité d'une localisation nucléaire de Dim-1p, ce qui réduirait considérablement les chances d'exposition en membrane, et donc d'immunisation. Par ailleurs, le groupe de Kris Huygen rapporte l'exemple de la protéine "Antigen 85 complex" de *M. Tuberculosis* qui a permis l'immunisation par ADN nu uniquement quand le vecteur utilisé possédait une séquence de sécrétion (en l' occurrence, celle de la protéine native) de la protéine, ce qui montre encore que l'exportation en membrane, ou hors de la cellule est de première importance pour assurer la réaction (Vincent Weynants, communication personnelle). Ceci peut expliquer la non-efficacité de l'immunisation contre Dim-1p après inoculation du pGIDH2.

Enfin, la protéine doit être exprimée dans le cytoplasme de la cellule hôte. Nous avons vérifié l'intégrité de la construction utilisée en transcription-traduction acellulaire (point III.1.B), mais ce test, réalisé sous le contrôle du promoteur T7, ne montre en rien que la construction est exprimée à partir du promoteur CMV qui conduit l'expression dans les cellules supérieures. Une comparaison des profils d'électrophorèse SDS-PAGE de cellules *COS* infectées ou non par le pGIDH2 permettrait sans doute de trancher cette question, et de valider du même coup le test de détection en fluorescence qui nécessite l' expression de la protéine (point III.2.D).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.

Pour produire des anticorps contre Dim-1p, deux stratégies ont été développées au cours de ce travail: la surexpression de la protéine et l'immunisation par ADN nu.

La surexpression a d'abord été tentée dans un système hétérologue, à savoir le système classique d'induction par choc thermique chez *E. coli*. Suite à l'insucces rencontré, nous avons éprouvé différentes hypothèses nous permettant de montrer que ni l'instabilité plasmidique, ni l'intégrité de la construction n'était à mettre en cause pour expliquer l'absence d'expression. Par ailleurs, nous n'avons pas pu montrer d'influence de la protéolyse liée au choc thermique.

Toutes les expériences d'expression ont révélé un retard de croissance significatif de la souche transformée par le plasmide d'expression portant le gène *DIMI*, l'hypothèse est donc posée que la surexpression de Dim-1p constitue un fardeau pour l'hôte bactérien.

En effet, l'activité diméthylase de Dim-1p, démontrée chez *E. coli* par la restauration de la résistance à la kasugamycine, pourrait entraîner des méthylations aspécifiques en cas d'expression non-réglée de l'enzyme.

D'autre part, la présence, à l'extrémité aminée de Dim-1p, de cinq résidus lysines pourrait promouvoir sa fixation, par interactions électrostatiques, à d'autres molécules bactériennes de première importance.

Le manque de stabilité du messenger peut également être à l'origine de l'absence d'expression détectable. Une hybridation en Northern blot permettrait de quantifier la production d'ARN messenger pour déceler un éventuel problème à ce niveau.

La stabilité de la protéine, une fois produite chez l'hôte, est également capitale. On sait par exemple que les protéines eucaryotes peuvent être stabilisées *in vivo* par leur intégration dans un complexe ou par leur localisation cellulaire dans un organite qui limite leur protéolyse. L'expression chez les procaryotes ne permet pas de créer ce "cadre stabilisateur", et une protéolyse abondante de la protéine d'intérêt peut s'en suivre. Pour contourner ce genre de problèmes, on pourrait tester l'expression de Dim-1p en fusion avec une protéine bactérienne (par exemple la β -galactosidase) susceptible, comme cela est décrit (Germino *et al.*, 1983), de favoriser sa stabilisation.

Comme c'est le cas ici, l'expression d'une protéine eucaryote en système bactérien est souvent faible, voir nulle. Les différences majeures existant entre pro- et eucaryotes sont les causes les plus souvent invoquées pour expliquer le manque d'expression. Pour éviter ce genre de problèmes, nous avons tenté une expression de Dim-1p dans un système homologue: *Pichia pastoris*.

En dehors d'une seule expérience, qui n'a pu être reproduite, aucune surexpression n'a pu être détectée sur les patterns "SDS-PAGE" des protéines, même en sélectionnant les clones transformants présentant des intégrations multiples (détectés par "dot blot").

Les hypothèses avancées pour rendre compte de l'échec observé chez *E. coli* peuvent être invoquées à nouveau. Pour tenter de réussir l'expression, plusieurs pistes devraient être explorées. L'inactivation de Dim-1p par mutation "missense" par exemple dans une boîte SAM (site putatif de fixation de la S-adénosyl-méthionine, le "donneur de méthyle") permettrait d'empêcher les éventuelles méthylations

aspécifiques délétères associées à une surexpression de Dim-1p. Par ailleurs, chez *Pichia pastoris*, l'utilisation d'une souche *Pep4-*, déficiente en protéases, la sélection systématique (par "Dot blot" quantitatif) des clones où l'intégration multiple de la cassette s'est réalisée sont autant de voies intéressantes. Dans la mesure où la sécrétion de certaines protéines présente, pour des raisons inhérentes à celle-ci et mal comprises, des difficultés parfois insurmontables, la surexpression sera toujours tentée en l'absence de toute séquence signal.

Ajoutons qu'on ne peut exclure que la concentration de la diméthylase libre soit, au titre de protéine liée transitoirement au ribosome, nécessairement faible dans la cellule, comme c'est le cas pour toutes les protéines ribosomales. Tout déséquilibre important à ce niveau serait interdit et pourrait retentir sur le processus d'assemblage du ribosome. On suspecte d'ailleurs que la production de la protéine est très régulée *in vivo*. En effet, on relève dans le promoteur natif du gène *DIMI* la présence de motifs UASrpg (Upstream Activating Sequence ribosomal protein gene) qui contiennent l'élément *cis* crucial de la régulation, au niveau transcriptionnel, de la synthèse coordonnée des différentes r-protéines chez la levure. D'autre part, on trouve en amont de l'AUG initiateur de traduction de la protéine Dim-1p une structure en "hairpin" qui n'est pas sans rappeler le substrat de l'enzyme elle-même. C'est une situation équivalente pour le gène *KsgA* de *E. coli*, qui a amené le groupe de Van knippenberg à proposer une régulation autogène de la protéine au niveau traductionnel (Van Gemen *et al.*, 1989). Dans ces conditions de régulation stricte, une surexpression pourrait sans aucun doute constituer un fardeau et être néfaste à l'hôte.

La seconde méthode utilisée pour produire des anticorps anti-Dim-1p est celle de l'immunisation par ADN nu. Elle a été tentée sur cinq souris. Les trois techniques utilisées pour mettre en évidence une éventuelle réponse ne nous ont pas permis de montrer un enrichissement des sérums de souris en anticorps anti-Dim-1p après l'injection. L'intégrité de la construction ayant servi à l'injection étant vérifiée, nous avons émis deux sources principales d'insucces pour expliquer la non-immunisation:

- d'une part, la protéine d'intérêt pourrait ne pas être exposée en membrane, et par conséquent ne jamais rentrer en contact avec le système immunitaire de l'hôte. Dans un exemple précis, comme nous l'avons vu, on a montré que la présence d'une séquence de sécrétion est parfois indispensable pour obtenir une réaction immunitaire.

- d'autre part, l'expression correcte de la protéine en cellules supérieures demande à être vérifiée en analysant les profils SDS-PAGE des protéines extraites de cellules *COS* transfectées ou non avec le plasmide d'expression.

Quoi qu'il en soit, la détection de Dim-1p par des anticorps reste une étape obligée dans les études menées actuellement au laboratoire: la localisation subcellulaire et la caractérisation des partenaires de Dim-1p. Les problèmes rencontrés lors de la surexpression et l'inefficacité actuelle de l'immunisation par ADN nu nous obligent à envisager d'autres approches à ces questions:

Ainsi, la production d'anticorps anti-Dim-1p peut être tentée par l'immunisation au moyen de peptides antigéniques synthétisés sur base de l'étude de la séquence de la protéine, sur des prédictions d'épitopes et profils d'hydrophobicité; il s'agit d'une alternative coûteuse et assez lourde.

Alternativement, la protéine Dim-1p pourra être fusionnée à des "tags" contre lesquels des anticorps sont disponibles. A ce jour, la localisation cellulaire a déjà été tentée par fusion traductionnelle de l'extrémité carboxy-terminale de Dim-1p au nonapeptide FLU, un épitope de l'hémagglutinine du virus influenza reconnue par un anticorps monoclonal. Les résultats sont en cours d'analyse.

Quant à l'étude des partenaires de Dim-1p, les expériences d'immunoprécipitation seront tentées prochainement en travaillant avec une protéine de fusion entre Dim-1p et le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 contre lequel des anticorps sont disponibles. Cette construction va être réalisée dans le cadre de l'utilisation du système "double hybride" comme seconde approche développée au laboratoire pour identifier des partenaires de Dim-1p.

MATERIELS
ET
METHODES

1.SOLUTIONS ET TAMPONS.

1.1. Solutions stock d' antibiotiques.

- Ampicilline 10%: 100 mg/ml dans de l' eau distillée. Filtrer sur millipore 0,22 um. Stocker à -20°C. A diluer 1000X.

- Tétracycline 12,5%: 12,5 mg/ml dans un mélange 50:50 eau distillée-éthanol. Stocker à -20°C. A diluer 1000X.

- Kasugamycine: 50 µg/ml final, à ajouter directement au milieu encore liquide.

1.2. Solution stock de bromure d' éthidium.

10 mg/ml dans de l' eau distillée. Stocker à l' abri de la lumière.

1.3. Solution stock de RNAaseA.

Concentration finale: 10 mg/ml.

Incuber 15 minutes à 100°C.

Aliquoter et stocker à -20°C.

1.4. Tampons de restriction (Stocker à -20°C).

1.4.1. Tampons Gibco BRL:

N° du tampon	Concentration des composants en mM			
	Tris-HCl	MgCl ₂	NaCl	KCl
1	50, pH 8.0	10	-	-
2	50, pH 8.0	10	50	-
3	50, pH 8.0	10	100	-
4	20, pH 7.4	5	-	50
5	10, pH 8.2	8	-	-
6	50, pH 7.4	6	50	50
7	50, pH 8.0	10	50	50
8	20, pH 7.4	10	-	-
9	50, pH 8.5	5	-	-
10	100, pH 7.6	10	150	-
11	10, pH 9.0	12	-	100

1.4.2. Tampons BOEHRINGER:

Composants	Concentration en mM				
	A	B	L	M	H
N° du tampon					
Tris acétate	33	-	-	-	-
Tris-HCl	-	10	10	10	50
Mg-acétate	10	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10
K-acétate	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
Dithioérythritol	-	1	1	1	1
Dithiothréitol	0,5	-	-	-	-
2-Mercaptoéthanol	-	1	-	-	-
pH à 37°C	7.9	8.0	7.5	7.5	7.5

1.4.3. Tampons BIOLABS:

Composants	Concentration en mM								
	1	2	3	4	B	G	O	R	Y
N° du tampon									
Tris-propane-HCl	10	-	-	-	-	-	-	-	-
MgCl ₂	10	10	10	-	10	10	10	10	-
Dithiothréitol	1	1	1	1	-	-	-	-	-
Tris-HCl	-	10	50	-	10	10	50	10	-
NaCl	-	50	100	-	-	50	100	-	-
Tris-acétate	-	-	-	20	-	-	-	-	33
Mg-acétate	-	-	-	10	-	-	-	-	10
K-acétate	-	-	-	50	-	-	-	-	66
KCl	-	-	-	-	-	-	-	100	-
pH à 37°C	7.0	7.9	7.9	7.9	7.5	7.5	7.5	8.5	7.9

1.4.4. Liste des enzymes de restriction utilisées au cours de ce travail.

Bam H I.

5'...G/GATCC...3'
3'...CCTAG/G...5'

Bgl II.

5'...A/GATCT...3'
3'...TCTAG/A...5'

Bst B I.

5'...TT/CGAA...3'
3'...AAGC/TT...5'

Eco R I.

5'...G/AATTC...3'
3'...CTTAA/G...5'

Hin d III.

5'...A/AGCTT...3'
3'...TTCGA/A...5'

Nco I.

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

Sst I

5'...GAGCT/C...3'
3'...C/TCGAG...5'

Stu I

5'...AGG/CCT...3'
3'...TCC/GGA...5'

Xho I

5'...C/TCGAG...3'
3'...GAGCT/C...5'

2. SOUCHES ET PLASMIDES.

2.1. Souches bactériennes utilisées.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé 5 souches d' *E. coli* que nous classerons en 3 groupes: les souches de surexpression (AR 58, AR 68 et M5219), la souche utilisée pour tester la restauration de la sensibilité à la kasugamycine (DL 101) et la souche d'usage courant (XL1 Blue) utilisée pour les étapes de clonage et d' amplification d' ADN.

2.1.1. Les souches utilisées pour la surexpression.

- AR 58 (Shatzman A.R.): *galE::TN10, tet^r, λ cI⁸⁵⁷ ΔHI, gal⁻, bio⁻, uvrB⁻*. Cette souche possède une copie intégrée d' une portion du génome du phage λ comprenant, entre autre, le gène qui code pour le répresseur de la voie lytique en agissant sur le promoteur PL. Dans AR 58, il s' agit du répresseur cI⁸⁵⁷ thermosensible qui est détruit par un passage à 42°C. La température de croissance de la souche est 32°C.

- AR 68 (Shatzman A.R.): cette souche est entièrement équivalente à la précédente, ci se n' est qu' elle est déficiente en protéases de choc thermique suite à une mutation dans le gène codant pour le facteur σ₃₂. Cette caractéristique permettant d' augmenter la demi-vie des protéines qui sont normalement dégradées dans d' autres souches.

- M 5219 (Soumillion P.): *λ cI⁸⁵⁷ ΔHI, trp^{am}*. Cette souche possède également le répresseur cI⁸⁵⁷, et est auxotrophe pour le tryptophane.

2.1.2. La souche DL 101.

Cette souche a été créée dans le cadre du clonage du gène *DIMI* (Lafontaine *et al.*, 1994). Elle est dérivée de JM 101 (Van Knippenberg): *supE thi Δ(lac-pro AB) F' (traD36 proAB+ lacI lacZM15) ksgA-*; dont elle diffère par son phénotype *pyr F-*. Mutante pour *KsgA*, elle ne porte pas de diméthylation sur les adénosines 1518 et 1519 de son ARNr 16S, ce qui la rend résistante à la kasugamycine. Elle est également *pyrF-*, ce qui lui confère une auxotrophie pour l' uracile permettant de sélectionner la souche transformée par un plasmide porteur du gène *URA3* sur milieu minimum.

2.1.3. La souche XL1 Blue.

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsd R17, SupE44, relA1, Δlac, (F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10). Certaines de ces caractéristiques sont décrites ci-dessous.

RecA1: locus encodant une ATPase "DNA Dependent" essentielle à la recombinaison, les souches mutantes présente un taux de recombinaison 1000 fois inférieur par rapport au wild type. Ceci permet d' une part de minimiser

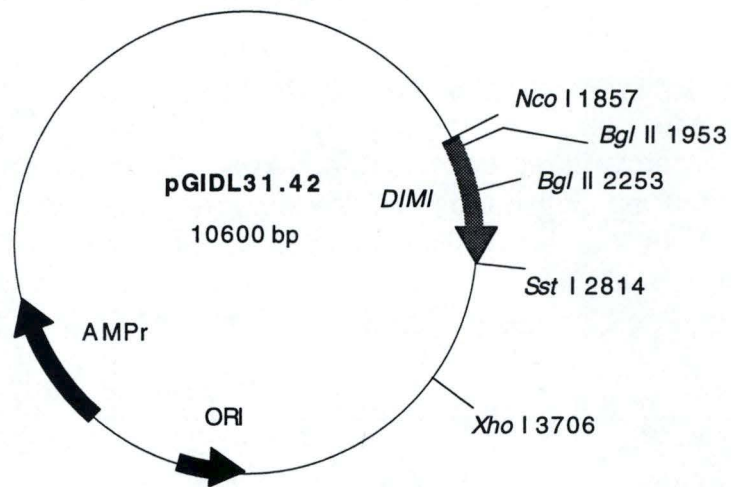


Figure 1: Le pGIDL31.42.

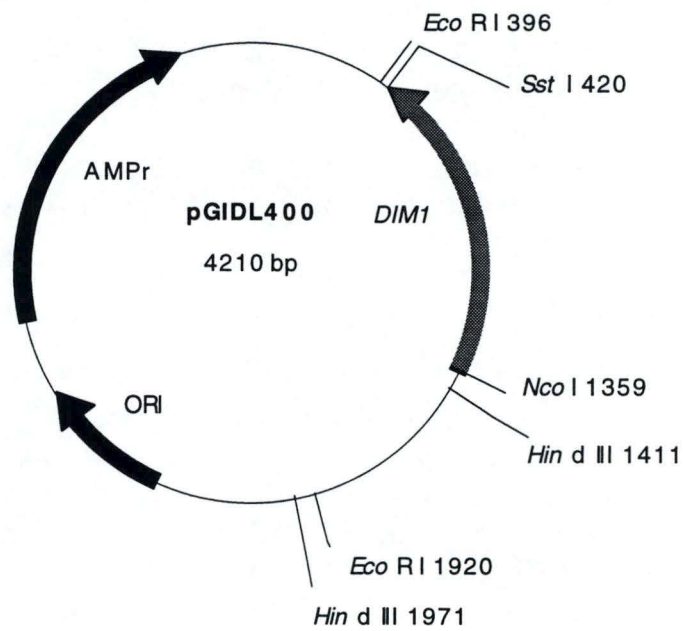


Figure 2: Le pGIDL400.

les recombinaisons entre ADN exogène et endogène, et d' autre part de propager les plasmides à l' état monomérique.

endA1: mutation entraînant une diminution du taux d' endonucléase, ce qui améliore le rendement et la qualité de l' ADN plasmidique.

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

XL 1 Blue porte également un plasmide naturel de 93kb présent une à deux fois par cellule et codant pour les protéines responsables de la formation des pili sexuels nécessaires au phénomène de conjugaison. Cette épisode est un des éléments indispensables à la sélection des bactéries porteuses d' un plasmide recombinant par le test colorimétrique (test blanc/bleu). Ce test n' ayant pas été utilisé au cours de ce travail, nous ne décrirons pas plus en détail l' épisode F.

2.2. Souches de levures utilisées.

2.2.1. La souche *Pichia pastoris* GS115.

Dans le cadre de l' expression dans *Pichia pastoris*, nous avons travaillé avec la souche GS 115 (Phillips Petroleum Company). La souche et les plasmides de surexpression ont été fournis par Mr P. Coppe (Centre d' Economie Rurale, Division d' Immunologie Animale, Marloie).

Cette souche, déficiente pour la synthèse de l' histidine, a été obtenue par "nitrosoguanidine mutagenesis" de la souche sauvage NRRL Y-11430. Elle possède une mutation dans le gène *HIS4* codant pour l' histidinol déshydrogénase. Tous les plasmides d' expression portent le gène *HIS4* qui complète le phénotype His- de l' hôte, la sélection s' opérant sur milieu minimum sans histidine. La réversion spontanée de GS115 vers le phénotype His+ est de moins de 10⁻⁸.

2.2.2. La souche *S. cerevisiae* YPH274.

Le génotype de cette souche est *a / α ura 3-52 / - lys2 -801amber / - ade2 -101ochre / - trp-Δ1 / -his3-Δ200 / - leu2-Δ1 / -*

Nous l' avons utilisée comme contrôle positif lors des "dot blot" (voir Résultats).

2.2.3. La souche *S. cerevisiae* YVE274-11.

Le génotype de cette souche est identique à la précédente, mais *dim1Δ::TRP1 /DIM1*. Un des allèles *DIM1* est disrupté par le marqueur *TRP1*.

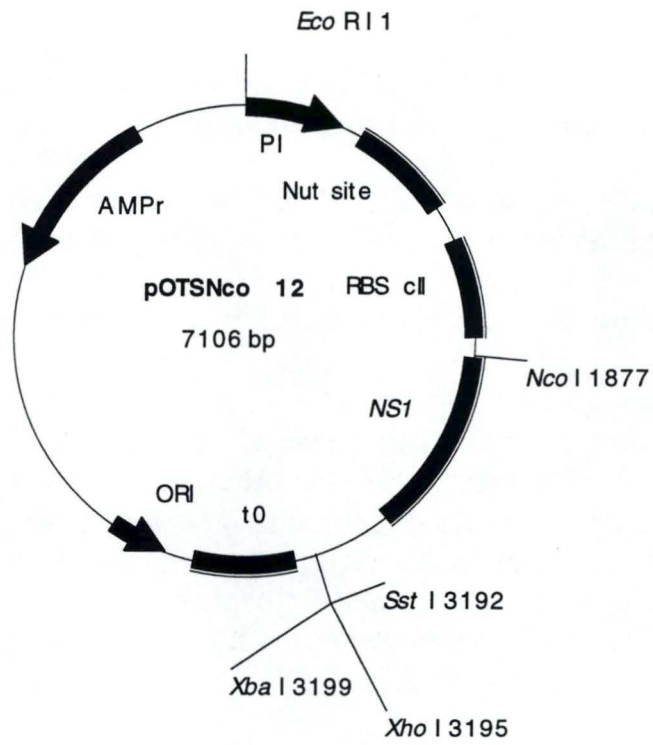


Figure 3: Le pOTSNco12.

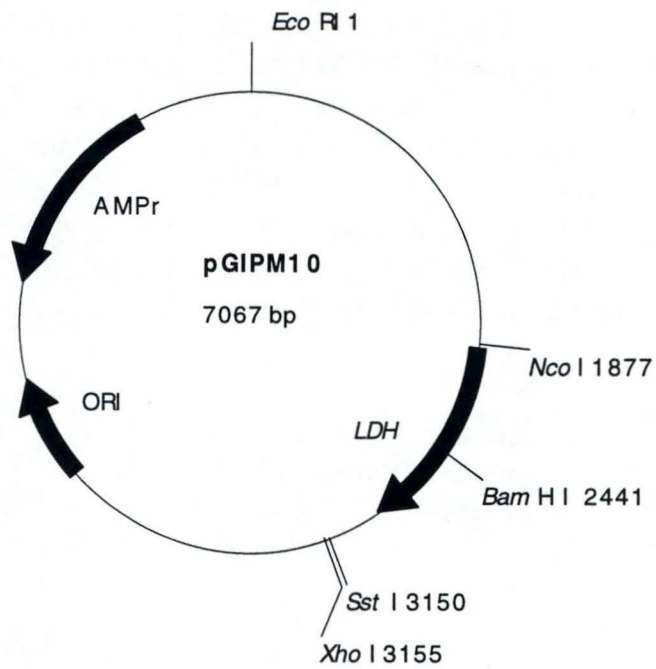


Figure 4: Le pGIPM10

2.3. Plasmides utilisés chez *E. coli*.

Le pGIDL31.42 (Figure 1).

Ce vecteur est issu d'une banque pFL44S créée par insertion, au site *BamH* I, de fragments génomiques de levure dont la taille est comprise entre 2 et 10kb. Ce vecteur a été retenu comme candidat pour porter le gène *DIMI*, car il est le seul vecteur de la banque à avoir assuré à la fois la restauration du phénotype de sensibilité à la kasugamycine de la souche DL101, et la double diméthylation de l'ARNr 16S de cette même souche.

Ce plasmide porte un insert d'environ 5kb, contenant le gène *DIMI*.

Le pGIDL400 (Figure 2).

Pour créer ce plasmide, le pGIDL31.42 (figure1) a été restreint par *Sst* I pour libérer un fragment de 2400pb contenant l'ORF de *DIMI*. Ce fragment a été ligué dans le pFL44S (Figure 5) restreint par *Sst* I. Le nouveau plasmide obtenu a été restreint en *EcoR* I pour libérer un fragment de 1523pb. Celui-ci a été ligué dans une matrice pUC19 restreinte en *EcoR* I pour donner le pGIDL400.

Le pOTS Nco12 (figure3).

C'est le vecteur de surexpression dans *E. coli*, certaines de ses caractéristiques sont détaillées ci-après:

- Promoteur P_I du phage λ utilisé pour conduire la transcription à haute efficacité.
- Antiterminaison: ceci est réalisé grâce à la présence de la fonction antiterminaison du phage λ (N) qui agit sur un site d'antiterminaison présent dans l'unité de transcription (Nut site). L'expression de N est réalisée à partir de la portion du génome phagien intégrée dans l'hôte. Ce système permet de réduire la polarité de la transcription, assurant ainsi une transcription complète du gène d'intérêt même en présence de signaux de terminaison.
- Le "ribosome binding site" du gène CII du phage λ .
- Un site Nco I qui permet la fusion directe d'une région codante à l'ATG initiateur.
- NS1: une région d'un peu plus de 1000pb qui sera enlevée si le clonage s'effectue entre le site *Nco* I et un des sites *Sst* I, *Xho* I ou *Xba* I.
- t₀: un terminateur de transcription.
- AMPr: gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection.
- ColE1: une origine de répllication chez *E. coli*.

Le pGIPM10 (Figure 4).

C'est le vecteur de surexpression de la LDH. Le pOTS Nco12 a été restreint en *Nco* I - *Xho* I pour libérer la matrice de surexpression dans laquelle un

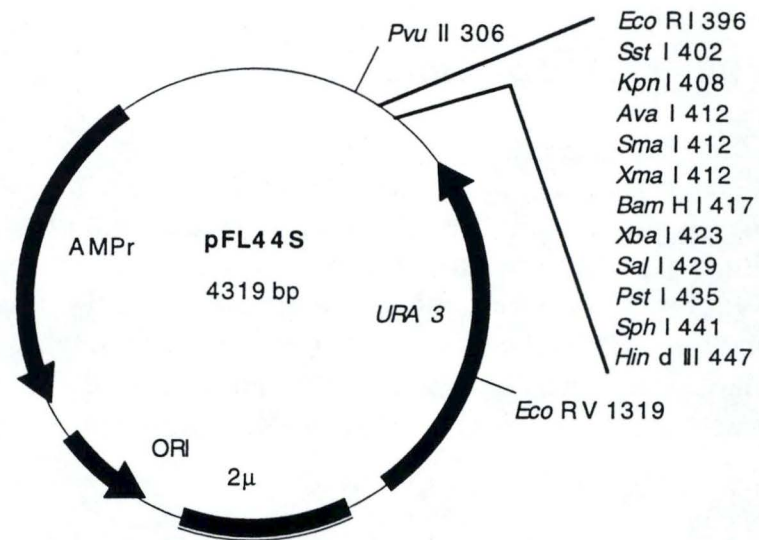


Figure 5: Le pFL44S.

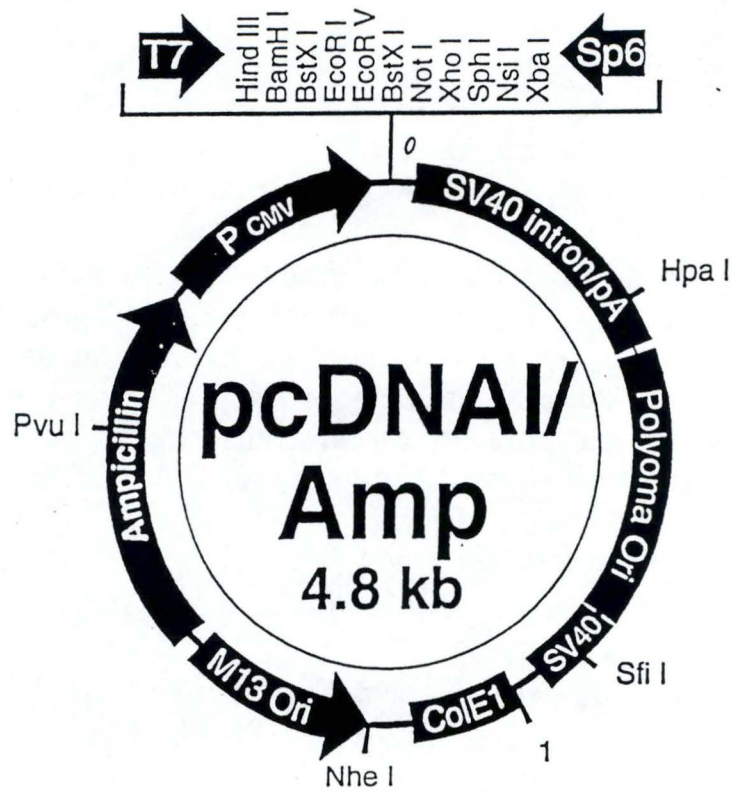


Figure 6: Le pcDNA1 Amp.

insert de 1273pb contenant l' ORF du gène de la Lactate Déshydrogénase a été ligué.

Le pFL44S (Lacroute) (Figure 5).

Dérivé du pUC19, la matrice pFL44S est un vecteur navette entre *E. coli* (grâce à ORI et AMPr) et la levure (grâce à 2 μ et URA3).

Le pcDNA1 AMP (Figure 6).

C' est un vecteur navette entre *E. coli* et les cellules supérieures. Il possède les caractéristiques suivantes:

- PCMV: Enhancer-promoteur des "immediate early gene" du cytomégalovirus humain (CMV). Ceci permet de conduire de hauts niveaux d' expression.
- SV40 intron/pa: Termineur de transcription et signaux de processing des ARN du SV40. Ceci permet d' augmenter la stabilité du messager.
- Polyoma ORI et SV40: origines de réplication du polyoma virus et de SV40 assurant la réplication transitoire à haut nombre de copies dans les cellules de primates (SV40) ou de souris (polyoma) qui expriment le "largeT antigen" du virus.
- ColE1: origine de réplication chez *E. coli*.
- M13 ORI: pour la récupération d' ADN simple brin.
- Ampicillin: gène de résistance à l' ampicilline pour la sélection dans *E. coli*.

2.4. Plasmides utilisés chez *Pichia pastoris*.

Les plasmides pPIC9 et pHIL-D1 que nous avons utilisés repose sur un modèle décrit en détail à la Figure II.1 de la partie "Résultats"). Les plasmides proprement dits sont présentés aux Figures II.8 et II.14 (voir Résultats).

3.MILIEUX DE CULTURE.

Les cultures liquides sont réalisées dans trois types de récipients. Les "tubes universels" d'une capacité de 20 ml sont utilisés pour les cultures de quelques ml, par exemple les mini-préparations d' ADN plasmidique. Pour lancer des précultures de 10 à 30 ml, on utilise les fioles de Wiame qui permettent en outre de suivre l' évolution de la densité optique de la culture, leur capacité est au maximum de 100 ml. Enfin, les cultures de grands volumes sont réalisées dans des Erlenmeyers dont la capacité varie entre 25 à 2000 ml.

Les cultures solides sont effectuées sur boîtes de Petri de volume adéquat. Les milieux sont coulés à une température d' environ 55-60°C et brièvement séchés. Leur durée de conservation à 4°C dépend de la présence d' éléments labiles comme par exemple les antibiotiques.

Tous les milieux sont autoclavés 20 minutes à 120°C, les éléments thermolabiles sont par ailleurs stérilisés par filtration et rajoutés quand le milieu a atteint une température d' une soixantaine de degrés.

3.1. Milieux de culture pour bactéries.

3.1.1. Milieu riche LB (Luria-Bertani).

Bactotryptone.	1%	10 g
Extrait de levure.	0,5%	5 g
NaCl.	0,5%	5 g
Agar (milieux solides).	2%	20 g
Eau distillée.		<i>ad</i> 1 L

Ce milieu complet peut être additionné d' un antibiotique de sélection:

Ampicilline 10% : 1 ml/Litre.

Tétracycline 12,5% : 1 ml/Litre.

3.1.2 Milieu CAS.

Na ₂ HPO ₄ .	0,048 M	8,5 g
KH ₂ PO ₄ .	0,022 M	3 g
NaCl.	0,009 M	0,52 g
NH ₄ Cl.	0,019 M	1,01 g
CaCl ₂ .	0,1 mM	0,014 g
MgCl ₂ .	1 mM	0,203 g
Casamino acids		12 g
L-tryptophane		2 mg
Eau distillée.		<i>ad</i> 1 L

Ce milieu minimum peut être additionné d' un antibiotique de sélection:

Ampicilline 10% : 1 ml/Litre

3.1.3 Milieu MINA.

Agar.	10 g
Eau distillée.	360 ml

Autoclaver la solution d' agar, laisser refroidir à 60°C et ajouter les composants suivants :

Solution M9.	40 ml
MgSO ₄ 1M.	400 µl
CaCl ₂ 0,1M.	400 µl
Thiamine HCl 1M.	800 µl
Glucose 20%.	8 ml
Casamino acids 20%.	4 ml
Ampicilline 1000X.	200 µl

Composition de la solution M9 10x:

Na ₂ HPO ₄ .	6 %
KH ₂ PO ₄ .	3 %
NH ₄ Cl.	1 %
NaCl.	0,5 %
Eau distillée.	100 ml

3.1.4 Milieu MINK.

Ce milieu est identique au précédent, à la différence qu'on ajoute 20 mg de Kasugamycine (concentration de 50 µg/ml) à la place de l'ampicilline.

3.2 Milieux de culture pour levures.

3.2.1. Milieu de maintenance : YPD (Yeast Peptone Dextrose).

Glucose.	2%	20 g
Extrait de levures.	1%	10 g
Bacto-peptone.	2%	20 g
Eau distillée.		ad 1 L

Le pH de ce milieu complet peut être ajusté à 4,8 avec de l' HCl 37%, mais ceci n' est pas indispensable.

3.2.2 Milieux de culture de *Pichia pastoris* .

Nous commencerons par décrire les solutions stock nécessaires à la réalisation des différents milieux.

10x YNB (13,4% Yeast Nitrogen Base avec Sulfate d' Ammonium et sans acide aminé).

Dissoudre 134 g de YNB dans 1L d' eau distillée et filtrer stérilement, la solution peut alors être stockée à 4°C pour environ un an.

500x B (Biotine 0,02%).

Dissoudre 20 mg de biotine dans 100ml d' eau distillée et filtrer stérilement, la solution peut être stockée à 4°C pour environ un an.

10x D (Dextrose 20%).

Dissoudre 200g de D-glucose dans 1L d' eau distillée et filtrer stérilement, la solution se conserve sur table environ un an.

10x M (Méthanol 5%).

Mélanger 5 ml de Méthanol et 95 ml d' eau distillée, filtrer stérilement. La solution se conserve environ 2 mois à 4°C.

10x GY (Glycérol 10%).

Mélanger 100 ml de Glycérol et 900 ml d' eau distillée, autoclaver; La solution se conserve sur table pendant plus d' un an.

3.2.2.A. Milieux de croissance de *Pichia pastoris*:

MD : Minimal Dextrose Medium.

Eau dist. autoclavée.	800 ml
10X YNB.	100 ml
500X B.	2 ml
10X D.	100 ml

Milieu solide : ajouter de l' agar (15% final) à l' eau avant autoclave.
Stocker à 4°C pour plusieurs mois.

MGY : Minimal Glycérol Medium.

Eau dist. autoclavée.	800 ml
10X YNB.	100 ml
500X B.	2 ml
10X GY.	100 ml

Stocker à 4°C pour environ 2 mois.

BMGY : Buffered Glycerol-complex Medium.

Extrait de levures.	10 g
Peptone.	20 g
Eau distillée.	700 ml

Après autoclave, ajouter stérilement:

Tampon phosphate de Potassium 1M pH6.	100 ml
10X YNB.	100 ml
500X B.	2 ml
10X GY.	100 ml

Stocker à 4°C pour environ 2 mois.

3.2.2B. Milieux d' induction de *Pichia pastoris*.

MM : Minimal Methanol Medium.

Eau distillée.	800 ml
10X YNB.	100 ml
500X B.	2 ml
10X M.	100 ml

Milieu solide : ajouter 15 g d' agar à l' eau avant autoclave;
Stocker à 4°C pour plusieurs mois.

BMMY : Buffered Methanol-complex Medium;

Extrait de levures.	10 g
Peptone.	20 g
Eau distillée.	700 ml

Après autoclave, ajouter stérilement:

Tampon phosphate de Potassium 1M pH6.	100 ml
10X YNB.	100 ml
500X B.	2 ml
10X M.	100 ml

Stocker à 4°C pour environ 2 mois.

4.METHODES RELATIVES AUX PROTEINES.

La démarche classique de l'étude des protéines impose le plus souvent leur séparation sur gel de polyacrylamide. Les protéines solubles doivent dans un premier temps être préparées à partir de prélèvements cellulaires et les méthodes diffèrent quelque peu entre les bactéries et les levures.

4.1. Extrait de protéines solubles de *E. coli*.

- prélever un aliquot de culture (25 ml).
- centrifuger 5' à 5000 rpm à 4°C (Rotor Sorvall SS34).
- éliminer le surnageant et stocker éventuellement le culot à - 80°C.
- resuspendre le culot dans 1 ml de tampon TED.
- centrifuger 5' à 5000 rpm à 4°C (Rotor Sorvall SS34).
- éliminer le surnageant et resuspendre dans 1 ml de tampon TED.
- soniquer chaque suspension 6x 30 secondes en laissant refroidir dans la glace entre chaque passage.
- centrifuger 30' à 13000 rpm à 4°C (Rotor Sorvall SS34).
- récupérer le surnageant dans un eppendorf.

Composition du tampon TED:

Tris pH 7,3.	50 mM
EDTA.	1 mM
DTT.	1 mM
PMSF.	1 mM

Le PMSF et le DTT sont rajoutés juste avant l'emploi à partir d'une solution stock M.

4.2.Extrait de protéines solubles de *Pichia pastoris*.

- centrifuger 1 ml de culture pendant 3 minutes (Janetzki).
- transvaser le surnageant dans un eppendorf pour l'étude des protéines sécrétées. Culots et surnageants peuvent être stockés à - 80°C.
- Resuspendre le culot dans 100 µl de Breaking Buffer.
- ajouter un volume égal de billes de verres traitées à l'acide (0,5 mm).
- vortexer 30 secondes et placer dans la glace 30 secondes.
- répéter l'opération 8 fois.
- centrifuger 15 minutes à 4°C (Janetzki).
- récupérer le surnageant dans un eppendorf.

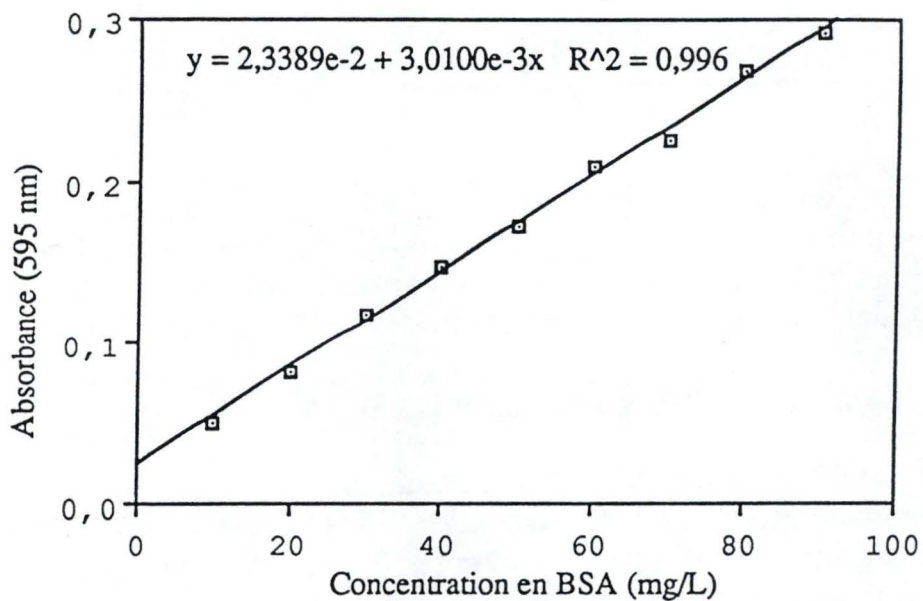


Figure 7: Droite étalon pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

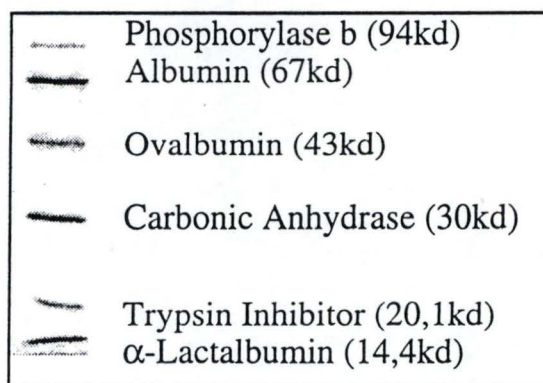


Figure 8: Marqueur de taille des gels protéiques de polyacrylamide. Pharmacia "Low molecular Weight Calibration Kit".

Composition du Breaking Buffer:

NaH ₂ PO ₄ .	50 mM	3g
EDTA.	1 mM	186 g
Glycérol.	5 %	25 ml
PMSF.	1 mM	(**)
Eau bidistillée.		ad 500 ml

Mettre à pH 7,4 avec du NaOH, et porter le volume à 500 ml, stocker à 4°C.

(**) Le PMSF est rajouté juste avant l'emploi à partir d'une solution stock 100x.

4.3 Dosage des protéines.

La méthode de choix pour le dosage des protéines est celle de Bradford (Bradford, M.M., 1976) pour sa rapidité et sa facilité. Elle repose sur la quantification de la liaison du bleu de Coomassie à un échantillon de protéine par rapport à cette même liaison à différente concentration d'un standard, habituellement la SAB (sérum albumine bovine). Cette méthode sensible permet la détection de concentration variant entre 1 et 10 µg/ml.

En pratique, on procède comme suit:

- placer 1 ml de réactif de Bradford dans une cuvette de 1 cm.
- ajouter 20 µl d'une dilution adéquate (10 ou 20x) de l'échantillon.
- mélanger et laisser 15 minutes à température ambiante.
- lire l'absorbance à 595 nm.
- la concentration en protéines est déduite de la droite étalon (Figure7).

On réalise toutes les mesures d'absorbance en double, et on calcule une moyenne pour augmenter la précision du dosage.

Composition d'une solution stock (5x) du réactif de Bradford:

Coomassie Brillant Blue G-250.	0,1 g
Ethanol 95%.	50 ml
H ₃ PO ₄ 85%.	100 ml
Eau distillée.	50 ml

La solution est conservée à 4°C. Pour l' utilisation, on la dilue 5 fois dans de l' eau distillée et on la filtre sur Whatman N°1.

4.4 Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).

4.4.1.Principe

La grande majorité des électrophorèses analytiques de protéines sont réalisées sur gel de polyacrylamide. Habituellement, le détergent anionique dodécyl sulfate de sodium (SDS) est utilisé en combinaison avec un agent réducteur et un chauffage pour dissocier les protéines avant leur chargement sur le gel. Les polypeptides dénaturés lient le SDS qui les charge négativement. Comme la quantité de SDS lié est proportionnelle au poids moléculaire du polypeptide et indépendant de sa séquence, la séparation des complexes protéine-SDS tient compte de leur seul poids moléculaire. Des modifications du squelette protéique comme les glycosilations peuvent avoir un impact significatif sur le poids moléculaire apparent.

La migration s' opère d' abord sur un gel de tassement (le "stacking gel") de haute porosité qui va condenser les échantillons en une bande très fine avant leur passage sur le gel de séparation (le "running gel").

Les gels de polyacrylamide sont composés de chaînes d' acrylamide polymérisé, liées entre elles par un agent bifonctionnel comme le *N,N'*-méthylènebisacrylamide. Le degré de séparation des protéines dépend de la concentration en polyacrylamide dans le gel. Pour un rapport molaire de bisacrylamide-acrylamide de 1:29, le tableau suivant présente la concentration optimale en acrylamide à utiliser selon la taille des protéines à séparer.

Concentration en Acrylamide. (%)	Echelle linéaire de séparation. (KD)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-212

4.4.2. Réactifs.

•*Acrylamide et bisacrylamide*: préparer une solution stock de polyacrylamide 30%. Cette solution doit être conservée à l' abri de la lumière qui catalyse la conversion des composants en acide acrylique et bisacrylique. la solution est conservée quelques mois à 4°C.

Composition de la solution polyacrylamide 30%.

Acrylamide.	30 g
Bisacrylamide.	0,8g
Eau bidistillée.	ad 100 ml

Filter la solution sur Whatman 0,45 um.

•**Dodécyl sulfate de sodium** : préparer une solution stock 10% dans de l' eau distillée.

•**Tampon TRIS-SDS** : ce tampon diffère quelque peu pour le stacking et le running. Les solutions sont filtrées avant l' addition de SDS et stockées à 4°C.

Composition du tampon de stacking gel : TRIS 0,5M-SDS 0,4% pH 6,8.

Composition du tampon de running gel : TRIS 1,5M-SDS 0,4% pH 8,8.

•**TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylethylenediamine)**: il accélère la polymérisation du gel en catalysant la production de radicaux libres à partir du persulfate d' ammonium.

•**Persulfate d' ammonium (PAS)**: il fournit les radicaux libres indispensables à la réaction. On réalise une solution stock 1% dans de l' eau distillée, elle est stockée à 4°C. Toutefois, il faut idéalement préparer la solution juste avant utilisation.

4.4.3. Appareillage.

Nous avons utilisé le kit MINI-PROTEAN™ II de Bio-Rad.

4.4.4. Préparation des échantillons.

La quantité de protéines (x) déposées est identique pour tous les échantillons. Le volume déposé sur gel ne doit pas excéder une trentaine de microlitres.

- placer x µg de protéines dans un eppendorf.
- ajouter 1/5 du volume final de tampon de chargement (5x).
- mettre à volume avec de l' eau distillée.

Composition du tampon de chargement (5x) :

Glycérol.	50 %
β-mercaptoéthanol.	25 %
SDS.	10 %
Tris HCl ph 6,8.	100 mM
Bleu de bromophénol.	0,005 %

4.4.5 Mise en oeuvre de l' électrophorèse.

Les plaques de verre doivent être particulièrement propre pour assurer une polymérisation uniforme des gels, elles sont donc lavées à l' eau et à l' alcool avant utilisation.

- assembler le dispositif en assurant au maximum son étanchéité.
- couler le running gel entre les plaques à une hauteur égale au peigne plus 1 cm.

Composition du running gel (quantité pour 2 gels 10%) :

Polyacrylamide 30%.	3,75 ml
Eau stérile.	3 ml
Tris 1,5M SDS 0,4% pH 8,8.	2,5 ml
PAS*.	0,5 ml
TEMED*.	10 µl

* Rajouter juste avant de couler les gels.

- couvrir la surface du gel avec de l' alcool isoamylique pour assurer une polymérisation correcte de la surface.
- laisser polymériser une trentaine de minutes.
- enlever l' alcool avec du papier buvard et déposer les peignes.
- couler le stacking gel en évitant de créer des bulles d' air.

Composition du stacking gel (quantité pour 2 gels 5%)

Polyacrylamide 30%.	500 µl
Eau stérile.	2,75 ml
Tris 0,5M SDS 0,4% pH 6,8.	1,25 ml
PAS*.	500 µl
TEMED*.	5 µl

*Rajouter juste avant de couler les gels.

- laisser polymériser une trentaine de minutes.
- enlever délicatement les peignes et placer le support dans la cuve.
- remplir la cuve et le support de tampon d'électrophorèse.

Composition du tampon d'électrophorèse TRIS-Glycine (5x).

Glycine.	1,25 M	72 g
Tris.	125 mM	15,1 g
SDS.	0,5 %	5 g
Eau distillée.		ad 1L

- chauffer les échantillons à 100°C pendant 5 minutes.
- charger les gels.
- réaliser la migration à 60 mA, 200V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas des plaques.
- démouler les gels et marquer l'orientation par une entaille dans un coin.
- Le marqueur de taille utilisé est le "Low Molecular Weight Calibration Kit" de la firme Pharmacia (Figure 8).

4.5. Détection des protéines sur gels SDS-PAGE.

Il existe 2 grands modes de coloration des gels SDS-PAGE: le Bleu de Coomassie et la coloration par les sels d'argent. Nous avons utilisé la première méthode qui est plus simple et plus rapide mais aussi beaucoup moins sensible que la seconde. On procède comme suit:

- après démoulage, placer les gels dans le bleu 40 minutes à 37°C.
- remplacer la solution de bleu par la solution de décolorant.
- changer 2 à 3 fois la solution jusqu'à ce que les gels soient correctement décolorés.
- placer les gels 30 minutes dans le fixateur.
- sécher sous vide à 80°C pendant une heure après avoir placé les gels sur Whatman 3 MM et les avoir recouvert de Saran Wrap.

Composition du Bleu de Coomassie.

Bleu de Coomassie (Brillant blue R250).	0,05%	0,05 g
Méthanol.	50 %	50 ml
Acide acétique.	10 %	10 ml
Eau distillée.	40 %	40 ml

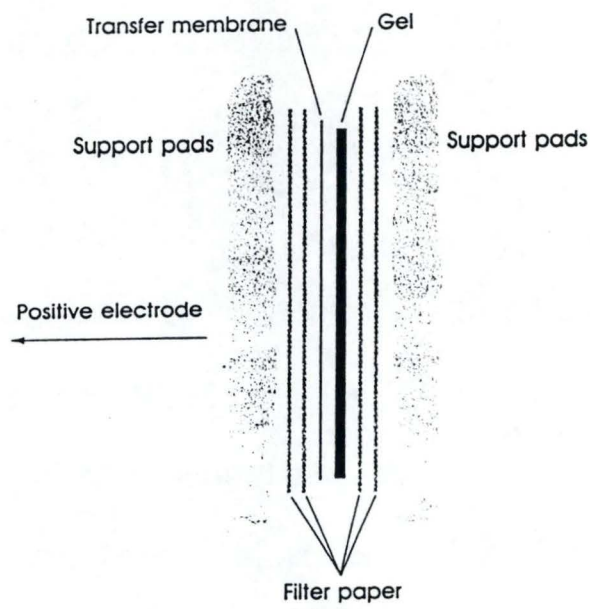


Figure 9: Dispositif de transfert de protéines sur filtre (Western blot). Les protéines séparées sur le gel de polyacrylamide sont transférées sur le filtre de nitrocellulose. Elles migrent vers l'électrode positive puisque le SDS leur donne une charge globale négative.

Dissoudre le bleu dans le méthanol avant d'ajouter l'acide acétique et l'eau. La solution se conserve 6 mois.

Composition du décolorant.

Eau distillée.	45%	450 ml
Méthanol.	45%	450 ml
Acide acétique.	10%	100 ml

Composition du fixateur.

Méthanol.	30%	150 ml
Glycérol.	3%	15 ml
Eau bidistillée.	67%	335 ml

4.6. Transfert de protéines sur filtre (Western blot).

La technique du Western blot combine le haut degré de résolution de l'électrophorèse avec la spécificité d'une détection immunochimique. La procédure se divise en 5 étapes:

- la préparation et la séparation des protéines par électrophorèse.
- le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.
- l'élimination des sites de liaison non-spécifiques sur la membrane.
- l'addition du sérum.
- la détection.

La contrainte majeure de la technique est la nature des épitopes reconnus par les anticorps. Comme les gels SDS-PAGE impliquent la dénaturation de l'antigène, seuls les anticorps qui reconnaissent des épitopes linéaires pourront se lier. La plupart des polyséras contiennent au moins quelques anticorps de ce type, alors que beaucoup de monoclonaux ne peuvent réagir avec des antigènes dénaturés.

4.6.1. La préparation et la séparation des protéines par électrophorèse.

Ces étapes sont identiques à celles décrites aux points 4.1; 4.2 et 4.4.

4.6.2. Le transfert des protéines sur une membrane.

Une fois l'électrophorèse terminée, les gels sont démoulés et placés dans le dispositif de transfert. On trouve la succession suivante depuis la cathode vers l'anode (Figure 9):

- un support en mousse.
- deux couches de papier filtre Whatman 3MM.

- le gel.
- le filtre de nitrocellulose.
- deux couches de papier filtre Whatman 3MM.
- un support en mousse.

Il est important que la membrane ait la même taille que le gel. On peut aussi marquer les différentes pistes sur la membrane (elles sont visibles grâce au front de migration sur le gel). Enfin, il est essentiel d'éliminer les bulles d'air présentes entre le gel et la membrane.

- immerger le dispositif dans la cuvette remplie de tampon de transfert.
- placer la cuvette dans la glace.
- effectuer le transfert une heure à 100V (pour 2 petits gels).
- remplacer la glace tous les quarts d'heure pour éviter l'échauffement.
- démonter le système et colorer les gels au bleu de Coomassie.
- découper la nitrocellulose en bandelettes pour isoler le marqueur de taille et différentes pistes si on veut tester plusieurs antisera.
- colorer le marqueur de taille à l'amidoschwartz.

Composition du tampon de transfert (protéines de taille < 80000 Daltons).

Tris.	50mM	3,03g
Glycine.	190mM	14,4g
Méthanol.	20%	200ml
Eau distillée.		ad 1L

Composition de l'amidoschwartz.

Amidoschwartz.	0,1%	0,1g
Méthanol.	45%	45ml
Acide acétique.	10%	10ml
Eau distillée.	45%	45ml

On utilise ensuite le même décolorant que pour la coloration au bleu de Coomassie. Les gels sont également décolorés pour s'assurer que le transfert est correct.

4.6.3. L'élimination des sites de liaison non spécifique sur la membrane.

Avant d'utiliser le blot pour la détection, il faut saturer la membrane pour prévenir l'adsorption non spécifique du réactif immunologique. On incube la nitrocellulose dans une solution de TBS-SAB 3% pendant une heure sous légère agitation.

Composition de la solution TBS-SAB 3%.

Tris.	20mM	2,42g
NaCl.	500mM	29,22g
Eau distillée.		ad 1L.

Mettre à pH 7,5.

Ajouter 3% de SAB (100ml de TBS-SAB suffisent pour 2 petits gels).

4.6.4. L' addition du sérum.

Nous avons utilisé une détection indirecte: après une première incubation avec le sérum, un second anticorps marqué permettra la détection.

On incube les bandelettes de membrane avec l' antisérum adéquat dilué dans du TBS pendant une heure sous agitation à température ambiante, ou une nuit à 4°C. Idéalement, on doit arriver à une concentration finale en anticorps de 1 à 50 µg par ml. Quand la concentration est inconnue, différentes dilutions doivent être testées.

Il faut ensuite laver la membrane et placer l' anticorps secondaire, on procède comme suit:

- récupérer le sérum à la pipette.
- laver la membrane 4 fois 5 minutes avec du TTBS.
- ajouter l' anticorps secondaire dilué 250 fois dans du TTBS.
- incuber une heure sous agitation.
- laver la membrane 3 fois 5 minutes avec du TTBS.
- rincer avec du TBS.

Composition de la solution de TTBS.

Il s' agit d' une solution de TBS pH 7,5 à laquelle on ajoute du Tween 20 et de la SAB à raison de 0,05% et 1% respectivement.

4.6.5. La détection.

L' anticorps secondaire que nous avons utilisé est couplé à la HRP (Horseradish peroxydase). Pour la détection, 2 solutions doivent être préparées, elles sont conservées à l' abri de la lumière et mélangées juste avant la révélation.

- solution de Chloronaphthol:
Dissoudre 15 mg de Chloronaphthol dans 5 ml de méthanol.
- solution de TBS-peroxyde d' hydrogène:
Mélanger 25 ml de TBS et 15 µl de H₂O₂ 30%.

- incuber les solutions mélangées avec les bandelettes sous agitation et à l'obscurité jusqu'à ce que des bandes sombres soient visibles sur la membrane. Pour arrêter la réaction, rincer abondamment à l'eau.

4.6.6. Epuisement des polysérums.

Les polysérums contiennent le répertoire complet des anticorps de l'animal immunisé au moment où le sérum a été collecté. Ceci est particulièrement gênant dans l'étude d'antigènes microbiens puisque le sérum peut contenir des anticorps spécifiques de bactéries qui ont infecté l'hôte récemment. Si la préparation protéique contient des antigènes similaires ou identiques à ceux de ces bactéries, ils seront détectés générant ainsi des bandes additionnelles sur le blot. Il est donc judicieux de réaliser un épauement du sérum contre une préparation protéique qui ne contient pas l'antigène d'intérêt.

En pratique on incube une dilution 50X du sérum dans un mélange TTBS-préparation protéique 10%.

4.7. Transcription - Traduction *in vitro* (Kit TNT de Promega).

Le kit TNT repose sur l'utilisation d'un lysat de réticulocytes pour réaliser la transcription et la traduction d'un fragment d'ADN. Il permet d'obtenir en 5 à 6 heures environ 250ng de protéines dont les méthionines sont radiomarquées. Dans le cas de notre travail, le gène *DIM1* a été placé sous le contrôle du promoteur T7 dans le pcDNA-1 (voir "Souches et Plasmides"). La réaction doit être réalisée dans des conditions "RNAase-free", tous les eppendorfs et tips ainsi que l'eau distillée sont donc traités préalablement au DEPC. Par ailleurs, le lysat de réticulocyte ne peut être décongelé que 2 fois. En pratique, on place dans un eppendorf les composants suivants:

- 25 µl de TNT Rabbit Reticulocyte Lysate.
- 2 µl de TNT Reaction Buffer.
- 1 µl de T7 RNA polymérase.
- 1 µl de Amino Acid mixture minus methionine, 1mM.
- 4 µl de ³⁵S-méthionine (1,000Ci/mmol) à 10mCi/ml.
- 1 µl de RNasin Ribonuclease inhibitor, 40u/µl .
- 1 µg de matrice ADN.
- eau distillée "nuclease-free" pour arriver à un volume de 50 µl .
- incuber 3 heures à 30°C
- déposer 5 µl du mélange réactionnel sur gel SDS-PAGE (point 4.4).
- après démoulage, placer le gel dans le fixateur 30 minutes.
- placer le gel 15 minutes dans une solution "AMPLIFY".
- déposer le gel sur du papier Whatman 3 MM et recouvrir d'un saran .
- sécher 30 minutes sous vide.
- placer 6 heures dans une cassette d'autoradiographie avec un film.
- révéler 5 minutes et fixer 10 minutes puis laver le film à l'eau.

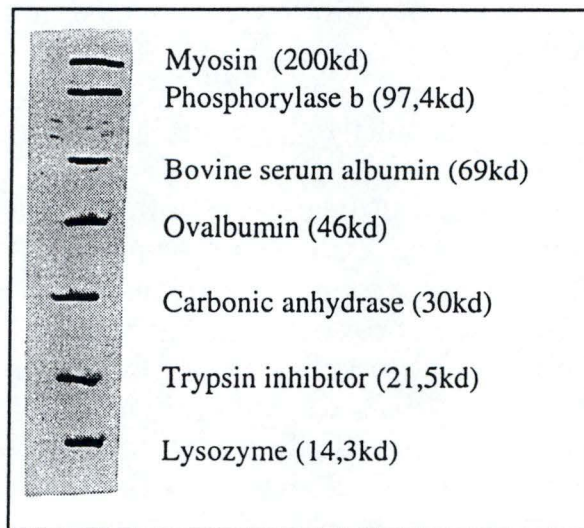


Figure 10: Marqueur de taille radiomarqué.
"14C methylated protein molecular weight markers."

Composition de la solution de fixateur:

Isopropanol.	25%
Eau distillée.	65%
Acide acétique.	10%

N.B. Le marqueur de taille doit être marqué au ^{14}C pour être visible en autoradiographie, nous avons utilisé le "Rainbow" de Amersham (Figure 10).

4.8 Radio-immuno-précipitation sur billes magnétiques.

4.8.1. Principe:

Nous avons utilisé cette technique pour tester les sérums de souris et savoir si ils contenaient des anticorps spécifiques contre Dim-1p. Cette manipulation permet de coupler les très grandes sensibilités du marquage radioactif et de l'interaction anticorps / antigène. Nous avons utilisé des billes magnétiques de polystyrène (Dynabeads M-280 de Dynal) coatées avec des IgG "anti-souris". Ces billes sont mises en présence d'un sérum de souris dont elles vont lier les anticorps. Dans un deuxième temps, on ajoute la protéine d'intérêt produite par le système TNT (voir point 4.7) et donc marquée au niveau de ses méthionines. Après plusieurs lavages, les billes sont bouillies dans l'alourdisseur de gel SDS-PAGE et, après récupération des billes, l'échantillon est déposé sur gel SDS-PAGE 12%. Une fois la migration terminée, il est placé dans une cassette d'autoradiographie en présence d'un film. Si le sérum a testé contient des anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt, un signal spécifique doit apparaître sur le film autoradio. A chaque étape, des contrôles doivent bien entendu être effectués.

4.8.2. Capture des anticorps du sérum sur les billes.

Dans le cas d'une détection directe, c'est d'abord la liaison des anticorps du sérum aux billes qui est réalisée. On procède comme suit:

- resuspendre les billes en vortexant légèrement.
- ajouter 500 μl de billes à 5 μl de sérum à 10mgr d'anticorps par ml.
- incuber sous agitation une nuit à 4°C.
- culoter les billes avec un aimant et éliminer le surnageant.
- resuspendre dans 0,8ml de PBS/SAB 2% pH7,4;
- placer sous légère agitation pendant 30 minutes.
- répéter le lavage 4 fois.
- culoter les billes avec un aimant.

Composition du PBS-SAB 2%.

KH ₂ PO ₄ .	0,02%
Na ₂ HPO ₄ .	0,144%
NaCl.	0,8%
KCl.	0,02%

Mettre à pH 7,4.
Ajouter 2% de SAB.

4.8.3. Production de la protéine marquée.

Cette étape est décrite au point 4.7.

4.8.4. Capture de la protéine marquée par les billes.

Les billes ont, à ce stade, fixé les anticorps du sérum. On peut donc ajouter la protéine d'intérêt marquée qui se liera aux billes si le sérum contient des anticorps spécifiques contre la protéine.

- resuspendre les billes dans 45µl de la réaction de TNT.
- placer la nuit à 4°C sous légère agitation.
- culoter les billes avec un aimant et éliminer le surnageant.
- resuspendre dans 800µl de PBS-Tween 0,001%-BSA 1%.
- répéter le lavage 3 fois.
- effectuer un dernier lavage avec du PBS-Tween 0,001%.
- culoter les billes avec un aimant.

4.8.5. Mesure de la radioactivité précipitable au compteur à scintillation.

Cette étape permet de suivre l'évolution du signal radioactif des protéines marquées au cours des lavages. Les protéines présentes dans les solutions de lavages sont précipitées au TCA, et la radioactivité émise mesurée avec un compteur à scintillation. L'émission doit être plus faible dans le test puisque la protéine marquée reste attachée aux billes, en tout cas si le sérum utilisé contient des anticorps spécifiques. Pratiquement, on procède comme suit:

- déposer 100µl de solution de lavage sur filtre et laisser sécher.
- plonger dans une solution TCA 15% et incuber 15 minutes.
- placer le filtre dans un support pour seringue;
- laver avec 20ml d'eau distillée.
- laver avec 20ml de méthanol 100%.
- laver avec 20ml d'acétone.
- placer le filtre dans une cuvette.
- ajouter 5ml de scintillant.

- dissoudre le filtre en vortexant quelques minutes.
- lire les cpm au compteur calibré sur le ^{35}S .
- soustraire aux valeurs obtenues celle du blanc qui correspond à une solution identique mais dépourvue de protéines marquées.

4.8.6. Séparation des protéines sur gel SDS-PAGE 12%.

- resuspendre le culot de billes dans 28 μl d' eau et 7 μl d' alourdisseur.
- bouillir 3 minutes et déposer sur gel.

Toutes les opérations spécifiques de cette section ont été détaillées au point 4.4.

4.8.7. Autoradiographie.

Après la migration, le gel est placé 15 minutes dans une solution d' "AMPLIFY". On l' incube alors dans une solution de fixateur pendant 30 minutes puis il est séché sous vide à 80°C. On le place alors dans une cassette d' autoradiographie, en présence d' un film, pendant quelques heures. Le film est révélé et fixé comme décrit au point 4.7.

5. METHODES RELATIVES A L' ADN.

Les techniques d' ADN recombinants ont pour but de réaliser des constructions génétiques qui, une fois introduites dans un hôte, pourront être testées quant aux phénotypes qu' elles engendrent. Ces constructions reposent sur l' existence de plasmides, petites molécules d' ADN bicaténaire qui constituent un "vecteur" idéal pour le gène d' intérêt.

Ces techniques suivent presque toujours le même schéma général: l' ADN est d' abord restreint par une endonucléase, les fragments intéressants ainsi générés pouvant être assemblés dans une réaction de ligation. Le vecteur recombiné est alors introduit dans l' hôte par une technique de transformation.

Au cours de toutes ces opérations, il est toujours important de connaître la quantité de matériel avec laquelle on travaille; nous commencerons donc par expliciter les méthodes de quantification de l' ADN. Ensuite, nous détaillerons dans l' ordre cité ci-avant chacune des étapes nécessaires à la création et l' utilisation d' une construction génétique.

5.1. Quantification de l' ADN.

Il existe 2 techniques d' usage extrêmement courant. Lorsque l' échantillon est faiblement contaminé par des protéines ou de l' ARN, on peut utiliser un spectrophotomètre puisque l' ADN absorbe à 260 nanomètres. Dans le cas contraire, ou quand la concentration est faible, on se base sur l' intensité de la fluorescence qu' une coloration préalable au bromure d' éthidium confère à l' ADN.

5.1.1. Quantification spectrophotométrique.

En pratique, on réalise un blanc en plaçant 500 μ l d' eau dans une cuvette de quartz. On ajoute alors 1 μ l d' ADN à doser et après mélange on lit la densité optique à 260 nm.

En tenant compte de la dilution 500x et en sachant qu' une unité de DO correspond à une concentration de 50 μ g par ml (pour de l' ADN double brin), il est facile de calculer la concentration de l' échantillon. On peut réaliser une estimation de la pureté en calculant le rapport des densités optiques mesurées à 260 nm et 280 nm (longueur d' onde d' absorption des protéines). Idéalement, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. Quand il est significativement inférieur à 1,8 , on considère que la préparation n' est pas pure.

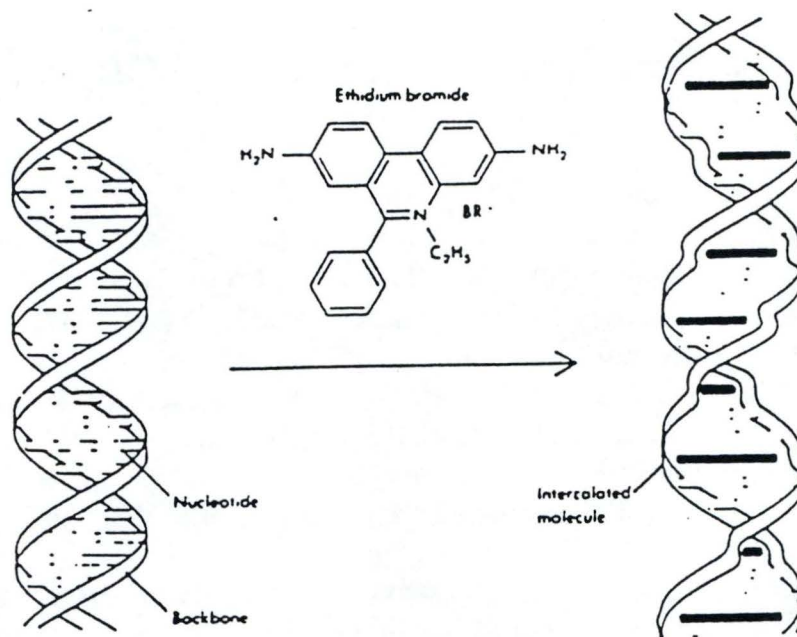


Figure 11: Visualisation de l'ADN grâce au bromure d'éthidium. Les molécules de bromure d'éthidium s'intercalent entre les bases de la double hélice.

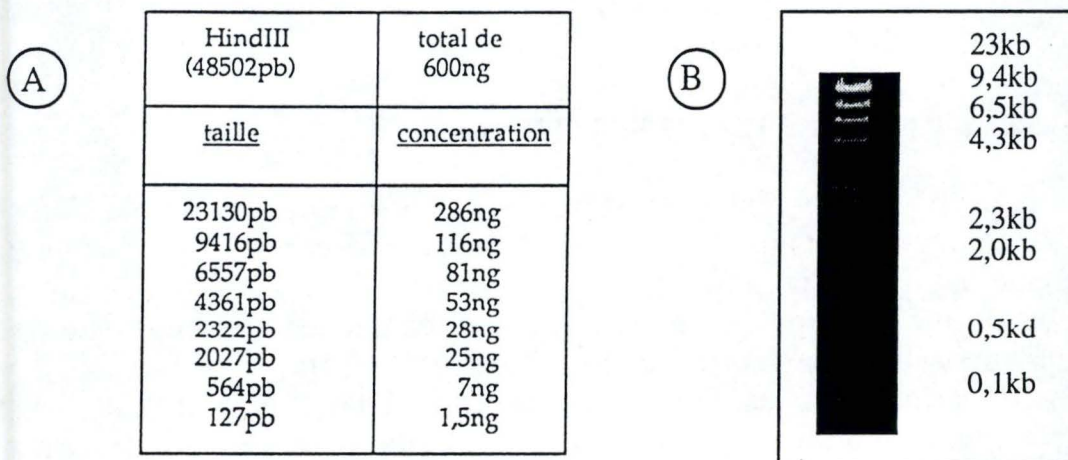


Figure 12: Marqueur de taille obtenu par restriction du génome du phage λ .

- A) Taille et concentration des fragments.
B) Profil de migration sur gel 1%.

5.1.2. Quantification au bromure d'éthidium et électrophorèse analytique.

On peut détecter grâce à cette méthode des quantités aussi faibles que 1 à 5 ng. Le bromure d'éthidium s'intercale entre les bases de l'ADN (Figure 11). Une fois excité par un rayonnement ultraviolet de 302 nm il devient fluorescent. Cette quantification est réalisée dans le cadre d'une électrophorèse analytique de l'ADN sur gel d'agarose. Celle-ci permet également de séparer, d'estimer la taille et l'état de pureté de fragments d'ADN.

A) Séparer:

L'ADN étant chargé négativement par ses groupements phosphates, il migre vers l'anode. La migration s'effectue de manière inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire. La concentration en agarose (0,4% à 2%) du gel est également un facteur déterminant pour la séparation: plus elle augmente, plus on sépare efficacement les fragments de petite taille comme le résume le tableau suivant:

Agarose (%)	Tailles séparées de façon optimale (kb)
0,5	30 à 1
0,7	12 à 0,8
1,0	10 à 0,5
1,2	7 à 0,4
1,5	3 à 0,2

B) Estimer la taille:

Ceci peut être réalisé grâce à un marqueur de taille: le génome du phage lambda digéré par *Hin* dIII (Figure 12). La mesure des distances de migration des fragments permet de tracer une courbe d'étalonnage exprimant le logarithme du poids moléculaire en fonction de la distance de migration.

C) Estimer la concentration:

La concentration des bandes du marqueur étant connue (Figure 11), il suffit de comparer visuellement l'intensité de la bande d'intérêt avec une bande de taille apparentée dans le marqueur.

D) Mise en oeuvre:

- dissoudre la quantité adéquate d'agarose dans le tampon TBE.
- chauffer à ébullition.
- couler le gel dans une cuve en plexiglas et placer le peigne.
- ajouter le bromure d'éthidium à une concentration de 0,5 µg/ml.
- laisser polymériser puis enlever le peigne.
- immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de TBE.

- déposer les échantillons après leur avoir ajouté la dilution correcte de solution d'alourdisseur.

Composition du tampon TBE (10x).

Tris HCL	108g
Acide borique	55g
EDTA 0,5 M	40 ml
Eau distillée	ad 10L

Composition de la solution d'alourdisseur (10x)

Bleu de bromophénol	0,25%	25 mgr
EDTA	25 mM	
Glycérol	50%	5 ml
Eau distillée		ad 10 ml

5.2. L' extraction au phénol.

L' extraction de l' ADN au phénol-chloroforme a pour but d' éliminer les sels et les protéines. C' est donc une étape de purification utilisée par exemple entre deux restrictions qui nécessitent des tampons différents ou avant une électroporation. L' emploi conjoint de phénol et de chloroforme permet la dénaturation de toutes les protéines même les RNAases.

En pratique, on procède comme suit:

- porter le volume de la solution contenant l' ADN à 100 μ l.
- ajouter 10 μ l de NaAc 3M pH 5,2.
- ajouter 110 μ l de solution de phénol-chloroforme.
- agiter au vortex 30 secondes.
- centrifuger 5 minutes (Janetzki) pour séparer les phases organique et aqueuse.
- récupérer la phase aqueuse (phase supérieure).

On élimine alors le phénol par de l' éther saturé en eau distillée stérile:

- ajouter un triple volume d' éther saturé en eau.
- agiter au vortex pendant 20 secondes.
- centrifuger 1 minute (Janetzki) pour séparer les 2 phases.
- éliminer la phase supérieure contenant l' éther.
- répéter ces opérations 3 à 4 fois.

Pour récupérer l' ADN, on procède alors à une précipitation à l' éthanol.

Composition de la solution de phénol.

Phénol.		50 ml	
8-hydroxyquinoline.		0,05 g	

La 8-hydroxyquinoline est un anti-oxydant, inhibiteur de RNAase, et donne une coloration jaune qui permettra d' identifier les deux phases.

Composition de la solution de chloroforme.

Chloroforme.		48 ml	
Alcool isoamylique.		2 ml	

L' alcool isoamylique facilite la séparation du chloroforme et de la phase aqueuse.

Préparation de la solution de phénol-chloroforme.

- mélanger les solutions décrites ci-dessus vol. par vol..
- saturer avec 100 ml de TE pH8.
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm (Rotor GSA Sorvall).
- éliminer le TE.
- recommencer la saturation jusqu' à ce que le pH du phénol ait atteint la valeur 8.

5.3. La précipitation à l' éthanol.

Cette opération consiste à concentrer une solution d' ADN, elle est classiquement réalisée après une extraction au phénol.

En pratique, on ajoute à la solution à concentrer:

- 2,5 volumes d' éthanol 100% froid.
- 0,1 volume de NaAC 3M pH 5,2(*).
- mélanger et incuber 20 minutes à -80°C.
- centrifuger 20 minutes à 4°C pour culoter l' ADN.
- laver le culot à l' éthanol 70%.
- éliminer le surnageant, sécher brièvement sous vide et resuspendre dans le volume désiré d' eau stérile.

(*) : cette opération n' est pas réalisée quand la précipitation suit une extraction au phénol-chloroforme.

5.4 La réaction de restriction.

Après avoir reconnu la courte séquence d' ADN qui leur est spécifique, les endonucléases de restriction clivent ce dernier. Les extrémités des fragments ainsi générés peuvent être de deux types:

- on parle d' extrémités cohésives (monocaténares et complémentaires) quand l' ADN a été coupé de façon asymétrique.
- on parle de bouts francs (bicaténares) quand l' ADN a été coupé de façon symétrique.

Quoiqu' il en soit, l' ADN possède toujours après restriction un groupement phosphate du côté 5' terminal et un groupement hydroxyle du côté 3' terminal.

La réaction s' effectue dans un Eppendorf avec un volume de 20 à 50 μ l contenant:

- ADN à restreindre.
- 1/10 du volume final de tampon de restriction 10X.
- enzyme de restriction: 1 à 5 unités par μ g d' ADN à restreindre.
- porter à volume avec de l' eau stérile.
- incuber une heure à la température optimale de l' endonucléase.

Les enzymes sont stockées dans une solution contenant 50 % de glycérol. A une concentration en glycérol supérieur à 5 %, l' enzyme peut voir son activité fortement diminuée entraînant ainsi des restrictions partielles. Elle peut aussi présenter une activité "star", c' est-à-dire cliver l' ADN en des sites qui ne lui sont pas spécifiques.

Enfin, la réaction de restriction peut être stoppée en

- chauffant 10 minutes à 65°C pour les enzymes thermosensibles.
- en ajoutant un agent chélatant des ions Mg^{++} indispensables à la réaction (EDTA).
- par une extraction au phénol-chloroforme.

5.5. L' électrophorèse préparative de l' ADN.

Après restriction, on cherche à récupérer les fragments d' ADN qu' on pourra alors recombinaison dans une réaction de ligation. Ces fragments sont d' abord séparés par électrophorèse dans des conditions identiques à celles décrites au point 5.1.2. Il existe différents procédés de récupération et purification d' une bande d' ADN séparé sur gel depuis la récupération sur papier filtre jusqu' à la purification sur matrice. C' est cette dernière

technique que nous avons principalement utilisée durant ce travail, elle sera donc la seule à être décrite ici.

Nous avons utilisé le kit Macherey-Nagel Nucléo Spin Extract 2 in 1.

Une fois l' électrophorèse réalisée, on procède comme suit:

- sous rayonnements ultra-violet, exiser la bande d' intérêt en veillant à minimiser la quantité d' agarose prélevée.
- pour chaque centaine de milligramme de gel, ajouter 300 μ l de tampon NT1.
- incuber l' échantillon 10 minutes à 50°C pour dissoudre l' agarose; agiter toutes les 2 minutes.
- déposer l' échantillon sur une colonne NucléoSpin et placer celle-ci sur un tube de 2 ml.
- centrifuger 60 secondes (Janetzki).
- éliminer l' éluat et placer à nouveau la colonne sur le tube de 2 ml.
- ajouter 750 μ l de tampon NT3.
- centrifuger 60 secondes (Janetzki).
- éliminer l' éluat et recentrifuger 60 secondes.
- placer la colonne sur un Eppendorf et déposer 50 μ l d' eau stérile.
- centrifuger 60 secondes: l' ADN est alors élué dans l' Eppendorf.

NOTE:

Le kit Nucléo Spin permet également une purification rapide des produits PCR avant clonage. Nous l' avons utilisé au cours de ce travail selon le protocole suivant:

- éliminer la phase organique qui surmonte le mélange de réaction.
- ajouter 400 μ l de tampon NT2 et mélanger.
- déposer l' échantillon sur une colonne NucléoSpin et placer celle-ci sur un tube de 2 ml.
- centrifuger 60 secondes (Janetzki).
- éliminer l' éluat et placer à nouveau la colonne sur le tube de 2 ml.
- ajouter 750 μ l de tampon NT3.
- centrifuger 60 secondes (Janetzki).
- éliminer l' éluat et recentrifuger 60 secondes.
- placer la colonne sur un Eppendorf et ajouter 50 μ l d' eau stérile.
- centrifuger 60 secondes pour éluer le produit PCR qui est alors prêt pour le clonage dans un vecteur.

5.6. La déphosphorylation d' une matrice linéarisée.

Une matrice linéarisée possède à ses extrémités des groupements 5' phosphate et 3' hydroxyle qui pourront très facilement en présence d' une ligase reformer les liens phosphodiesters que la linéarisation avait rompu. L' hydrolyse des groupements phosphates interdit cette réaction. La seule possibilité de recirculariser le plasmide linéaire est alors l' insertion d' un

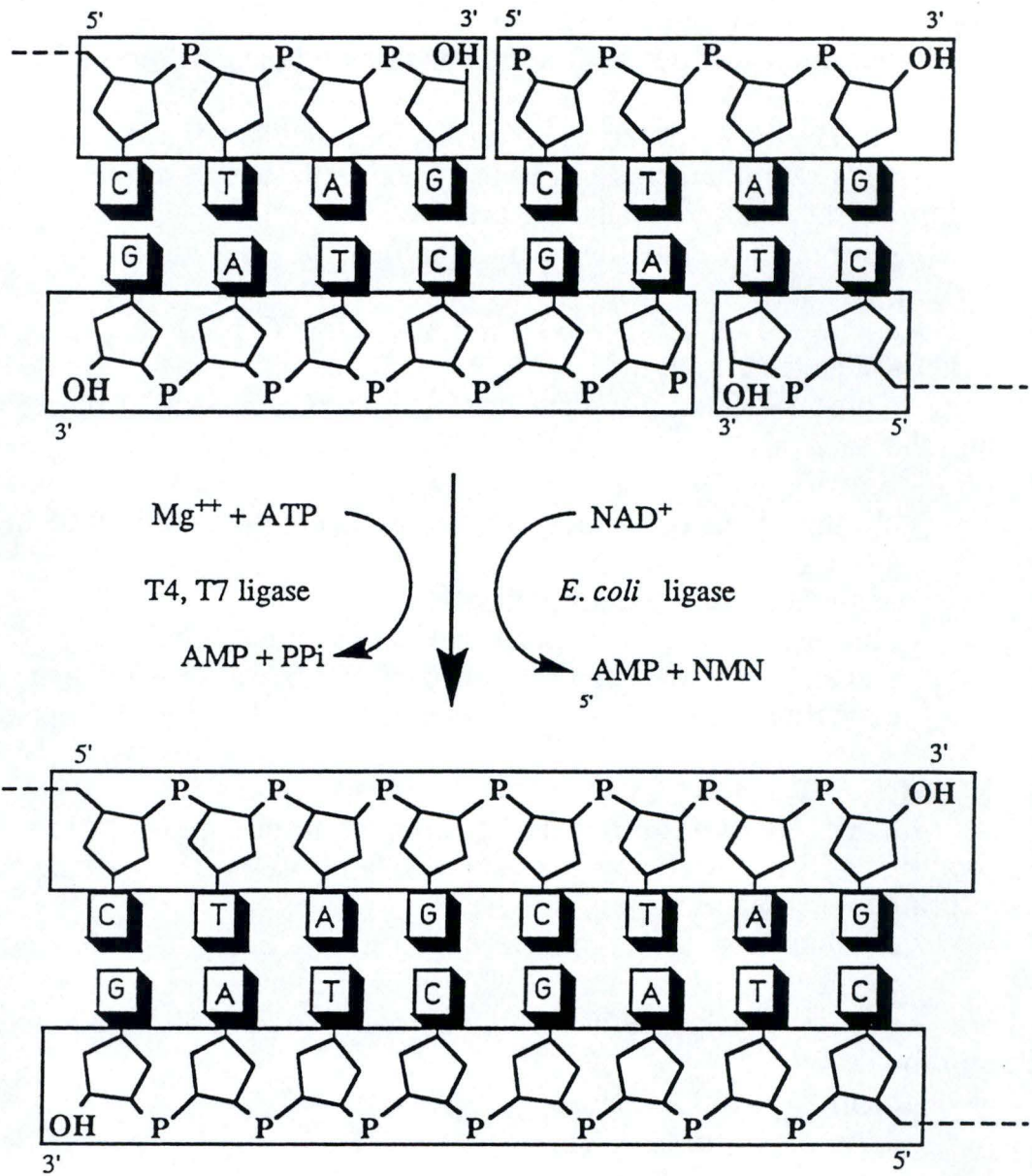


Figure 13: Activité des ligases sur des extrémités cohésives.

fragment non déphosphorylé. Après la réaction de ligation, on trouve cependant deux cassures de part et d'autre de l'insert, c'est la bactérie hôte qui après transformation va reconstituer un double-brin intact.

Nous avons utilisé la CIP (Calf intestine Phosphatase). Pratiquement, dans un volume de 20 à 50 μ l on place:

- ADN à déphosphoryler: 10 μ l (100 ng/ μ l).
- 1/10 du volume de tampon 10X.
- 1 unité de phosphatase.
- de l'eau distillée pour mettre à volume.

On incube 1 heure à 37°C et on stoppe la réaction sur glace. L'enzyme est alors inactivée par 2 μ l d'EGTA 200 mM et par un chauffage de 10 minutes à 65°C. On réalise ensuite une extraction au phénol pour purifier la préparation.

Composition du tampon de déphosphorylation.

Tris pH8.	200mM
MgCl ₂ .	10mM
ZnCl ₂ .	10mM

5.7. La réaction de ligation.

La construction des molécules d'ADN recombinantes nécessite de lier de manière covalente les extrémités des fragments d'intérêt. La T4 DNA ligase permet cette réaction en catalysant la formation d'un lien phosphodiester entre l'hydroxyle 3' et le phosphate 5' des extrémités de l'ADN bicaténaire (Figure 13).

Dans un volume de 20 à 50 μ l, on place:

- le vecteur linéarisé.
- le fragment à insérer.
- une unité de ligase par μ g d'ADN à liquer.
- 1/5 du volume final de tampon de ligation.
- de l'eau distillée pour porter à volume si nécessaire.

Composition du tampon de ligation (BRL).

Tris pH 7,6.	250 mM
MgCl ₂ .	50 mM
DTT .	5 mM
ATP.	5 mM
PEG-8000.	25%

La stoechiométrie vecteur/insert est de 1:1 si le clonage est "forcé" (si une seule insertion est possible), et de 1:3 ou 1:4 dans les autres cas.

L'incubation est réalisée dans des conditions variables suivant le type d'extrémités à liguer:

- à 14°C pendant 10 à 15 heures pour la ligation de deux molécules à "bouts collants". La faible température favorisant la formation de ponts hydrogène.

- à 25°C pendant 3 à 4 heures pour la ligation de deux molécules à bouts francs: les ponts hydrogène n'étant pas requis ici, on optimise alors l'activité de l'enzyme. Pour une efficacité égale, il faudra également compter 10 à 100 fois plus de ligase que pour la ligation des "bouts collants".

5.8. La transformation.

C'est l'étape qui permet l'introduction de molécules d'ADN dans les microorganismes. Il existe de nombreuses techniques de transformation, nous avons utilisé l'électroporation pour les levures et les bactéries et la transformation par le chlorure de calcium qui n'est efficace que pour les bactéries.

5.8.1. L'électroporation.

La compression qu'engendre un champ électrique appliqué à une membrane biologique favorise la perméabilisation momentanée de celle-ci, permettant ainsi le passage d'un plasmide si le voltage et la durée du choc sont suffisants. Il est très important de réduire la force ionique de la suspension cellulaire soumise à l'électroporation. On doit donc procéder à des lavages successifs de la culture avec un tampon de faible salinité ou simplement avec de l'eau. Après cette étape préliminaire les cellules sont dites "compétentes". La phase de croissance à laquelle les cellules sont récoltées et la concentration cellulaire finale sont également en rapport avec la compétence à l'électroporation. L'électroporation permet d'obtenir de 10^9 à 10^{10} transformants par μg d'ADN.

Nous avons utilisé l'électroporateur "Gene Pulser" couplé au "Pulse Controller" de Bio-Rad.

5.8.1.A Electroporation de *E. coli*.

Pour préparer des cellules compétentes, on procède comme suit:

- inoculer une préculture de 5 ml de LB.
- laisser pousser une nuit à température optimale.
- inoculer 200 ml avec 2 ml de préculture.
- incuber jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,5 à 0,8 à 540 nm.
- refroidir la culture 15 minutes sur glace.

- centrifuger la culture 5 minutes à 4°C à 5000rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 200 ml d'eau froide stérile
- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 100 ml d' eau froide stérile.
- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre dans 4 ml de glycérol 10%.
- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre dans 400 µl de glycérol 10%.
- les aliquots de 100 µl se conservent environ 6 mois à -80°C.

Pour l' électroporation, décongeler un aliquot sur glace et procéder comme suit:

- placer la cuvette d' électroporation (0,2 cm) dans la glace;
- ajouter à 50 µl de cellules compétentes 1 à 2 µl d' ADN plasmidique.
- laisser le mélange 1 minute sur glace.
- transférer le mélange dans la cuvette.
- électroporer à 25 µF, 200 Ohms, 2,5 Kv.
- ajouter rapidement 1 ml de milieu de régénération (SOC).
- transférer dans un eppendorf et laisser 1 heure à 37°C.
- étaler sur milieu sélectif et placer la nuit à 37 °C.

Composition du milieu SOC

Extrait de levures.	0,5%	5g
Bactotryptone.	2%	20g
NaCl.	10mM	0,585g
KCl.	2,5mM	0,187g
MgCl ₂ .	10mM	2,032g
MgSO ₄ .	10mM	2,46g
Glucose.	20mM	3,965g
Eau distillée.		ad 1 L

5.8.1.B Electroporation de *Pichia pastoris*.

Pour préparer de cellules compétentes, on procède comme suit:

- inoculer une préculture de 5 ml de YPD.
- laisser pousser une nuit à 30°C.
- inoculer une culture de 200 ml YPD avec 50 µl de préculture.
- incuber jusqu'à l' obtention d' une DO de 0,3 à 0,4 à 600 nm.
- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 200 ml d' eau froide stérile.
- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 100 ml d' eau froide stérile.
- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 10 ml de sorbitol 1M froid.

- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 500 µl de sorbitol 1M froid.

Pour l' électroporation, utiliser des aliquots préparés *de novo* et procéder comme suit:

- mélanger 100 µl de cellules à 0,25 à 1 µg d' ADN linéarisé (1 à 5 µl).
- transvaser dans une cuvette d' électroporation (0,2 cm) préalablement refroidie.
- laisser 5 minutes dans la glace.
- électroporer à 2500V, 25µF, 400 Ohms.
- ajouter rapidement 1 ml de sorbitol 1M froid.
- étaler sur milieu sélectif MD et incubé à 30°C pendant au moins 2 jours.

NB: l' ADN doit être très propre, on le lave 2 fois à l' éthanol 70% avant électroporation.

5.8.2. La transformation par le chlorure de calcium (CaCl₂).

La transformation au chlorure de calcium consiste à introduire l' ADN plasmidique sous forme d' un précipité d' ADN-calcium-phosphate qui adhère à la surface cellulaire. Un choc thermique permet à ce précipité de pénétrer dans la cellule.

Pour préparer des cellules compétentes, procéder comme suit:

- inoculer une préculture de 5 ml de LB.
- laisser pousser une nuit à température optimale.
- inoculer une culture de 100 ml de LB.
- incubé jusqu' à l' obtention d' une DO d' environ 0,3 à 540 nm.
- refroidir 10 minutes sur glace.
- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 50 ml de CaCl₂ 50mM stérile.
- laisser 20 minutes dans la glace.
- centrifuger 5 minutes à 4°C à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 8 ml de CaCl₂ 50mM et 2 ml de glycérol stérile.
- réaliser des aliquots de 200 µl et placer à -80°C.

Pour la transformation, décongeler un aliquot sur glace et procéder comme suit:

- ajouter à 200 µl de cellules compétentes 1 à 100 ng d' ADN plasmidique
- laisser 40 minutes sur glace.
- réaliser le choc thermique à 42°C pendant 1 minute.
- ajouter 1 ml de LB.
- incubé 30 minutes à 37°C.

- étaler sur milieu sélectif.

5.9. La minipréparation d' ADN plasmidique.

Il s' agit d' une préparation rapide de vecteur pour une restriction diagnostic; Elle permet de récupérer de 1 à 5 µg d' ADN plasmidique et se divise en 4 étapes:

Lyse alcaline des cellules.

Précipitation de l' ADN chromosomique, des protéines et débris cellulaires.

Précipitation de l' ADN plasmidique.

Lavage et resuspension.

- inoculer une culture de 5 ml de LB + ampicilline.
- incuber une nuit à température optimale sous agitation.
- centrifuger 1,5 ml de culture (Janetzki) pendant 5 minutes.
- décanter le surnageant et resuspendre dans 300 µl de tampon S1.
- ajouter 300 µl de tampon de lyse alcaline S2.
- mélanger doucement et incuber 5 minutes à température ambiante.
- ajouter 300 µl de tampon S3 et agiter doucement.
- centrifuger 15 minutes (Janetzki) à 4°C.
- récupérer le surnageant;
- ajouter 0,8 volume d' isopropanol pour précipiter l' ADN plasmidique
- centrifuger 15 minutes (Janetzki) et éliminer délicatement le surnageant
- laver le culot avec 500 µl d' éthanol 70%;
- centrifuger 5 minutes;
- éliminer le surnageant et sécher brièvement au speedvack.
- resuspendre dans 20 µl d' eau distillée.
- utiliser 5 µl pour la restriction diagnostic.

Composition des tampon utilisés.

Tampon S1:

Tris-HCl.		50 mM	
EDTA pH8.		10 mM	

Avant utilisation, ajouter de la RNAase (100 µg/ml final)

Tampon S2:

NaOH.		200mM	
SDS.		1%	

Tampon S3:

Acétate de potassium.		2,55mM	
-----------------------	--	--------	--

A mettre à pH 5,5 avec de l' acide acétique.

5.10. La midipréparation d' ADN plasmidique.

Il s' agit d' une technique de préparation rapide d' ADN plasmidique en quantité importante, le rendement dépendant du type de plasmide, du volume de culture et du type de purification. Nous avons utilisé le kit Nucléobond AX 500. Mis à part le passage sur colonne, la technique est identique à la mini préparation.

- inoculer une culture de 200 ml LB + ampicilline.
- incuber une nuit à température optimale sous agitation.
- récupérer la culture dans une bouteille Sorval de 250 ml.
- centrifuger 5 minutes à 5000rpm (rotor Sorvall GSA).
- décanter le surnageant et resuspendre le culot dans 12 ml de S1.
- ajouter 12 ml de S2, mélanger doucement et laisser 5 minutes sur table.
- ajouter 12 ml de S3.
- centrifuger 45 minutes à 5000rpm (rotor Sorvall SS34).
- récupérer le surnageant et recentrifuger si il n' est pas clair.
- équilibrer la colonne avec 5 ml de N2.
- charger le surnageant sur la colonne.
- laver la colonne avec 2 fois 12 ml de N3.
- éluer l' ADN avec 6 ml de N5.
- ajouter 4,2 ml d' isopropanol pour précipiter l' ADN.
- centrifuger 30 minutes à 13000rpm (rotor Sorvall SS34).
- décanter le surnageant et ajouter 1 ml d' éthanol 70%.
- centrifuger 5 minutes à 13000rpm (rotor Sorvall SS34).
- éliminer l' éthanol et sécher brièvement au speevack.
- resuspendre dans 100 µl d' eau
- utiliser 2 µl pour une restriction diagnostic.

Composition des tampons utilisés.

Les tampons S1, S2 et S3 sont identiques à ceux de la minipréparation.

Tampon N2 (Nucléobond):

Tris/ H ₃ PO ₄ ,	100mM
Ethanol.	15%
KCl.	900mM
pH	6,3

Tampon N3 (Nucléobond):

Tris/ H ₃ PO ₄ .	100mM
Ethanol.	15%
KCl.	1150mM
pH	6,3

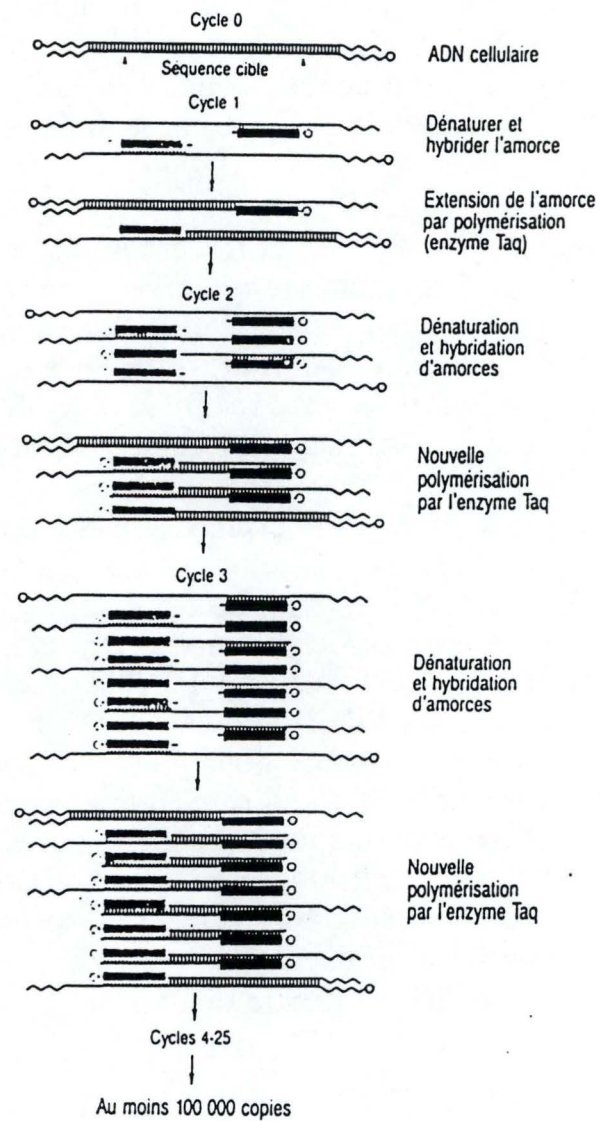


Figure 14: Schéma d'une amplification PCR.

Tampon N5 (Nucléobond):

Tris/ H ₃ PO ₄ .	100mM
Ethanol.	15%
KCl.	1000mM
pH	8,5

5.11. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

La PCR est une méthode de synthèse d'acides nucléiques in vitro par laquelle un segment particulier d'ADN situé entre deux régions de séquence connue peut être spécifiquement amplifié. La réaction implique deux amorces (primer) oligonucléotidiques synthétiques dont la séquence est déduite des deux régions en question. En s'hybridant chacune à un des brins de l'ADN cible, les amorces vont permettre à une polymérase de synthétiser un grand nombre de copies du segment qu'elles bordent.

La réaction implique un certain nombre de cycles qui se définissent en 3 étapes (Figure 14):

- la matrice d'ADN est dénaturée thermiquement (choc à 92°C) en présence d'un large excès de chacun des 2 oligonucléotides et des 4 dNTPs, c'est l'étape de dénaturation;

- le mélange est alors refroidi à une température déterminée pour permettre aux amorces de s'hybrider à leur séquences cibles, c'est l'étape d'hybridation.

- la température est alors amenée à 72°C qui permet une extension rapide des amorces par la polymérase, c'est l'étape d'élongation.

Le cycle ainsi défini est répété une trentaine de fois. Comme les produits d'un cycle servent de matrice pour le cycle suivant, on obtient une accumulation exponentielle du seul fragment cible sous forme d'ADN bicaténaire dont les extrémités sont définies par le côté 5' des amorces et dont la longueur égale la distance qui sépare celles-ci.

La première polymérase utilisée a été purifiée d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*), cette enzyme (Taq DNA Polymérase) qui peut supporter des incubations prolongées à 95°C est introduite dès le début de la réaction et ne doit pas être remplacée après chaque cycle. Elle assure en plus un appariement des amorces à température élevée, diminuant ainsi les risques d'hybridation non spécifique.

La PCR est principalement une technique de diagnostic, on se soucie alors peu de la fidélité de l'enzyme puisque les produits PCR ne sont pas utilisés dans d'autres réactions. Cependant on peut aussi utiliser la PCR comme outils de clonage, on désire alors une fidélité optimale puisque les segments amplifiés devront être traduits en protéines, on cherche alors à utiliser une polymérase qui tout en gardant les avantages de la "Taq Polymérase" possède un système de "correction d'épreuve" (Proof reading): il s'agit d'une activité 3'-5' exonucléase qui s'ajoute à l'activité classique de polymérisation 5'-3'. Nous avons utilisé dans le cadre de ce travail la Pwo

DNA Polymérase isolée de *Pyrococcus woesei* qui permet une augmentation de fidélité de plus de dix fois par rapport à la Taq Polymérase. Cette enzyme fournit en outre des produits aux extrémités franches.

5.11.1 Protocole d' utilisation de la Taq DNA Polymérase.

Placer dans un tube PCR:

Composants	Volume	Concentration finale
MgCl ₂ 50 mM.	4 µl	2 mM
Tampon PCR 10X.	10 µl	1X
Mix dNTPs 10 mM.	2 µl	0,2 mM chacun
Détergent W-1 1%.	5 µl	0,05 %
Amorce "amont".	x µl	0,5µM
Amorce "aval".	x µl	0,5µM
ADN matrice.	x µl	1 µg
Taq polymérase.	0,4 µl	1 U

Ajouter de l' eau stérile pour avoir un volume final de 100 µl.

Placer environ 100 µl d' huile dans le tube et 20 µl au fond des puits.

Le tableau suivant donne les variations de température exécutée au cours d' un cycle. La température d' hybridation varie en fonction de la séquence des amorces.

Dénaturation 3 minutes à 94°C.	
Dénaturation 1,5 minutes à 94°C.	Réaliser 35 cycles
Hybridation 2 minutes (50 à 65°C).	
Elongation 3 minutes à 72°C.	
Terminaison 10 minutes à 72°C.	

5.11.2 Protocole d' utilisation de la Pwo Polymérase.

Placer dans un tube PCR:

Composants	Volume	Concentration finale
Tampon PCR 10X.	10 µl	1x (avec 2mM MgSO ₄)
Mix dNTPs.	8 µl	200 µM
Amorce "amont".	x µl	300 nM
Amorce "aval".	x µl	300 nM
ADN matrice.	x µl	0,1 à 1 µg
Pwo polymérase.	0,5 µl	2,5 U

Placer de l' eau stérile pour avoir un volume final de 100 µl.

Placer environ 100 µl d' huile dans le tube et 20 µl au fond des puits.

Les températures successives du cycle sont identiques à celles de la Taq Polymérase.

5.12. Dot Blot quantitatif (Romanos, *et al.*, 1991).

Dans le cadre de ce travail, la technique du Dot Blot quantitatif a été utilisée pour la détection d'intégrants multiples chez *Pichia pastoris*. Il s'agit de transférer des microcultures de levure sur un filtre de nitrocellulose et d'isoler celles qui montrent un signal d'hybridation particulièrement élevé avec une sonde radioactive correspondant au gène d'intérêt. En pratique, la manipulation comporte 4 étapes: le transfert sur filtre, la synthèse de la sonde, l'hybridation et la révélation.

5.12.1. Le transfert sur filtre de nitrocellulose.

- Inoculer des microcultures de 200 µl de YPD dans des plaques Nuclon de 96 puits.
- Placer les plaques 2 jours à 30°C.
- Transférer 50 µl des cultures sur un filtre de nitrocellulose (dispositif Dot Blot de Bio-Rad).
- Sècher les filtres à l'air et appliquer un traitement de lyse en plaçant le filtre face vers le haut sur 2 couches de papier Whatman 3MM imbibé avec les différentes solutions, changer les papiers filtres pour chaque solution.
 - > 15 minutes avec la solution n°1.
 - > 4 heures avec la solution n° 2.
 - > 5 minutes avec la solution n°3.
 - > 2 fois 5 minutes avec la solution n°4.
- Sècher les filtres à 80°C pendant une heure.

Composition de la solution n°1:

EDTA.		50 mM	
β-mercaptoéthanol.		2,5%	

La solution est mise à pH9.

Composition de la solution n°2:

Zymolyase 100T: 1 mgr par ml dans de l'eau distillée.

Composition de la solution n°3:

NaOH.		0,1 N	
NaCl.		1,5 M	
Citrate de Sodium.		0,015 M	

La solution est mise à pH7.

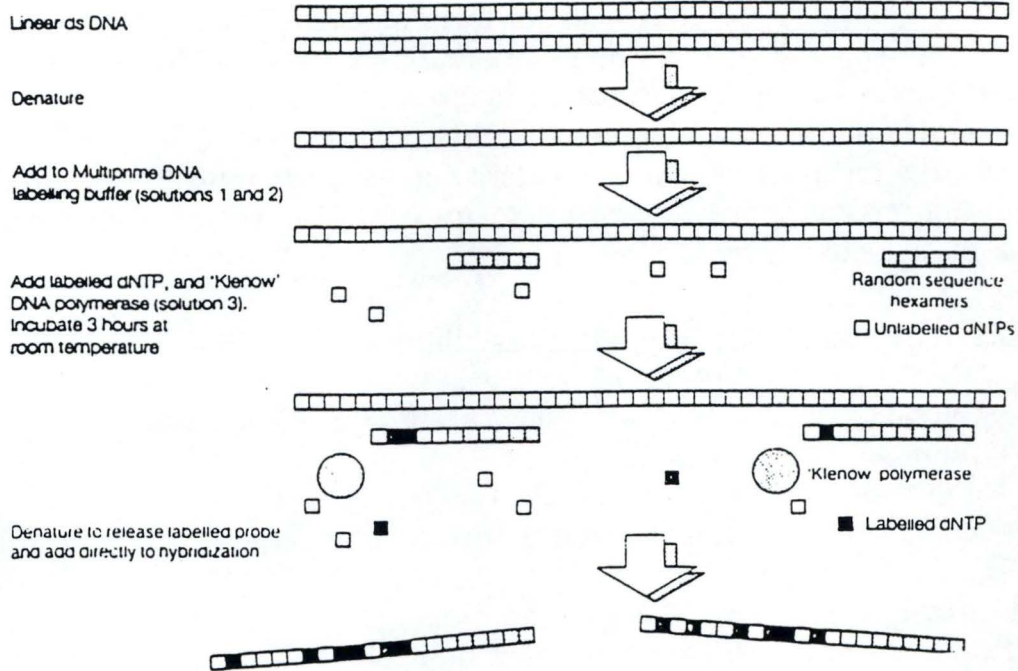


Figure 15: Préparation des sondes radiomarquées par le "Multiprime DNA labelling system".

Composition de la solution n°4:

NaCl.		0,15 M	
Citrate de Sodium.		0,015 M	

La solution est mise à pH7.

5.12.2. La synthèse de la sonde radiomarquée.

Nous avons utilisé le kit "Random primed DNA labelling" de BRL. Ce type de synthèse repose sur une élongation d' hexanucléotides aléatoires, la matrice correspondant à l' ADN que l' on cherche à détecter. Le marquage est réalisé grâce à la présence d' un dnTP possédant un groupement phosphate substitué par un phosphore radioactif (Figure 15).

- Dénaturer 25 ng d' ADN en solution dans un volume de 5 à 20 µl en chauffant 5 minutes à 100°C.
- Placer sur glace pour empêcher la renaturation.
- Ajouter au mélange:
 - > 2 µl de dATP.
 - > 2 µl de dTTP.
 - > 2 µl de dGTP.
 - > 15 µl de random primer buffer mixture.
 - > 5 µl de $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP, 3000 Ci/mMol, 10 µCi/ul.
- Porter le volume à 49 µl avec de l' eau distillée.
- Ajouter 1 µl de Klenow.
- Incuber une heure à 25°C.

5.12.3. L' hybridation.

L' hybridation consiste en l' appariement d' une sonde nucléique simple brin et d' un ADN dénaturé immobilisé sur un filtre.

Le filtre doit être préhybrider pour réduire le bruit de fond engendré par la liaison non-spécifique de la sonde à sa surface. On utilise une solution de Denhart et de l' ADN de thymus de veau. cette étape s' effectue dans une solution contenant:

- 10 ml de Denhart's 50X.
- 10 ml de SSC 20X.
- 10 ml d' ADN de thymus de veaux (2,3 mg/ml).
- 0,5 ml de SDS 10%.
- Porter le volume à 50 ml avec de l' eau distillée.
- Incuber 2 heures à 68°C.

Composition de la solution de Denhart 50X:

Ficoll.	1%
Polyvinylpyrolidone.	1%
BSA (fraction V).	1%

La solution est filtrée sur 0,22 µm et stockée à -20°C.

Composition de la solution de SSC 20X/

NaCl.	3M
Citrate de Sodium.	0,3M

Le mélange de préhybridation-hybridation doit posséder un volume de 1 ml de solution par 10 cm² de filtre;

L' hybridation peut alors être réalisée comme suit:

- Dénaturer la sonde 10 minutes à 100°C.
- Ajouter la sonde au récipient contenant le filtre.
- Sceller le récipient.
- Incuber une nuit à 68°C.

5.12.4. La révélation.

Avant de révéler par autoradiographie, le filtre doit être lavé. la stringence augmente graduellement sous l' effet de la diminution de concentration en SSC et de l' augmentation de la température.

LAVAGE.	SSC.	SDS.	Température.	Durée.
1	5X	0.1%	25°C	10'
2	2X	0,1%	25°C	10'
3	0,5X	0,1%	25°C	15'
4	0,1X	0,1%	25°C	15'
5	0,1X	1%	68°C	5'

Il est prudent de suivre l' émission radioactive avec un compteur pour éviter d' imposer des conditions trop stringentes et par là, de "décoller" toute la sonde. Après une première autoradiographie, il est possible de continuer les lavages si le filtre est resté humide (ceci peut se faire en le placant entre 2 saran wrap).

On place alors le filtre dans une cassette d' autoradiographie en présence d' un film. Celle-ci est déposée au moins 4 heures à -80°C. Le film est alors révéler 5 minutes et fixé 10 minutes. on le rince alors abondamment à l' eau.

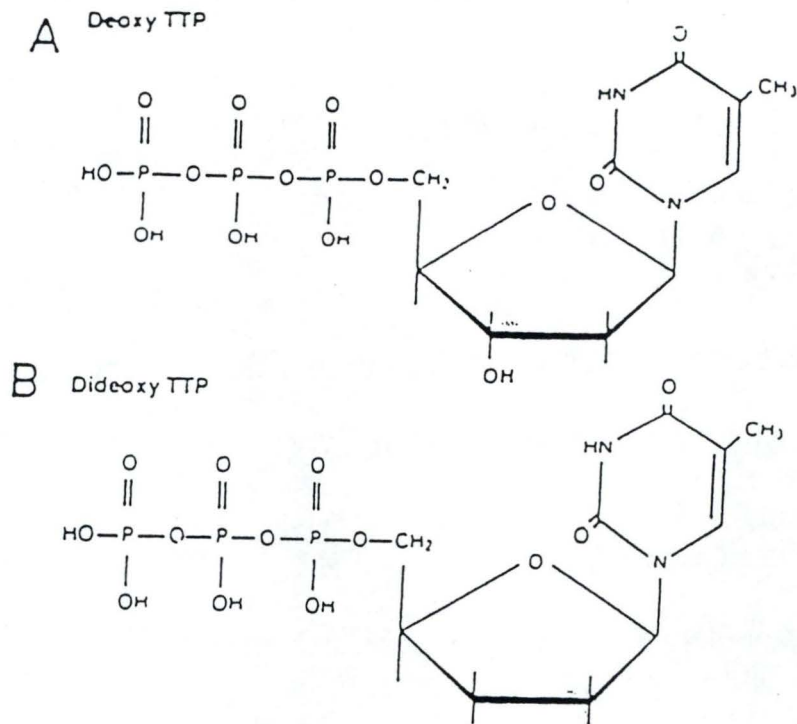


Figure 16: A: Structure d'un déoxyribonucléotide.
B: Structure d'un didéoxyribonucléotide.

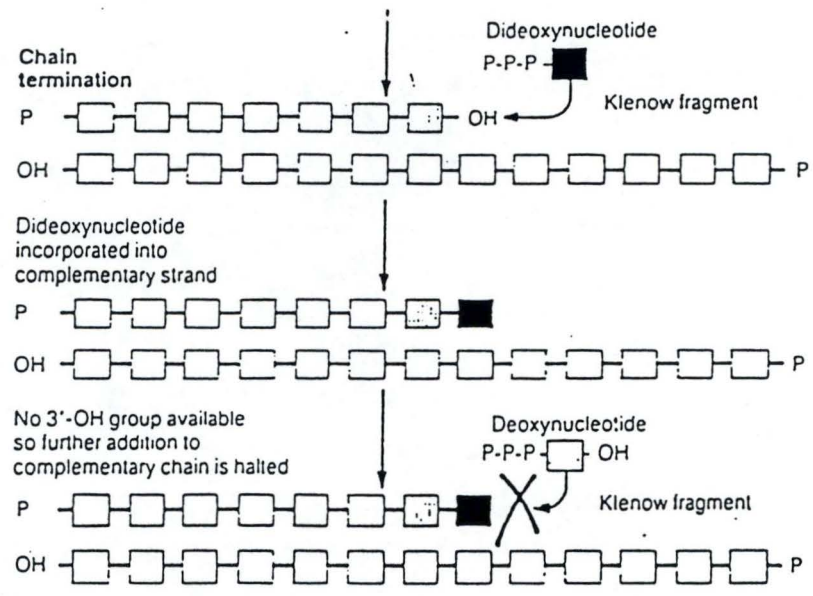


Figure 17: Terminaison de la synthèse d'ADN par incorporation d'un didéoxynucléotide.

5.13 Le séquençage de l' ADN.

Nous avons utilisé la méthode des terminateurs de chaînes décrite par Sanger (Sanger et al., 1977). Elle repose sur l' utilisation de 2'-3' didéoxyribonucléosides triphosphates ou ddNTP (Figure 16). Comme leur nom l' indique, ceux-ci se distinguent des précurseurs désoxynucléotidiques classiques de la synthèse de l' ADN par la substitution du groupe 3' hydroxyle par un hydrogène. Si ces ddNTP sont parfaitement reconnus par l' ADN polymérase et incorporés dans la chaîne en croissance, ils agissent comme terminateurs de chaînes puisque l' absence d' hydroxyle empêche la création d' un nouveau lien phosphodiester d' être créé et donc l' élongation de se poursuivre (Figure 17). En incorporant de tels monomères à la réaction, la terminaison se produira statistiquement au moins une fois à chaque nucléotide de la séquence.

Quatre tampons d' élongation sont utilisés, ils contiennent les quatre dNTP usuels dont un est marqué radioactivement ($\alpha^{35}\text{S}$ dATP). Par contre, ils ne contiennent qu' un des quatre ddNTP. Chacun des tubes réactionnels contient en fin de compte une population de fragments variables, leur taille permettant de déterminer la position à laquelle le ddNTP a été incorporé. Les quatre réactions étant effectuées séparément, on sait de quel nucléotide il s' agit (Figure 18).

5.13.1. Dénaturation et précipitation.

- ajouter 2 μl de NaOH 2N à 2 à 4 μg de plasmide contenus dans un volume de 8 μl .
- incuber 10 minutes à température ambiante.
- ajouter 3 μl de NaAc 3M pH 4,5.
- ajouter 7 μl d' eau distillée.
- ajouter 60 μl d' éthanol absolu froid.
- incuber 15 minutes à -80°C .
- centrifuger 15 minutes à 4°C (Janetzki).
- laver le culot à l' éthanol 70% froid.
- centrifuger 10 minutes à 4°C .
- éliminer le surnageant et sécher sous vide. Le culot peut être conservé à -20°C .

5.13.2. Hybridation de l' amorce (annealing).

- resuspendre l' ADN dans 10 μl d' eau distillée.
 - ajouter rapidement 2 μl d' oligonucléotides (50 ng/ μl) et 2 μl d' annealing buffer.
 - placer 20 minutes à 37°C puis 10 minutes à température ambiante.
- L' échantillon peut alors être stocké à -20°C .

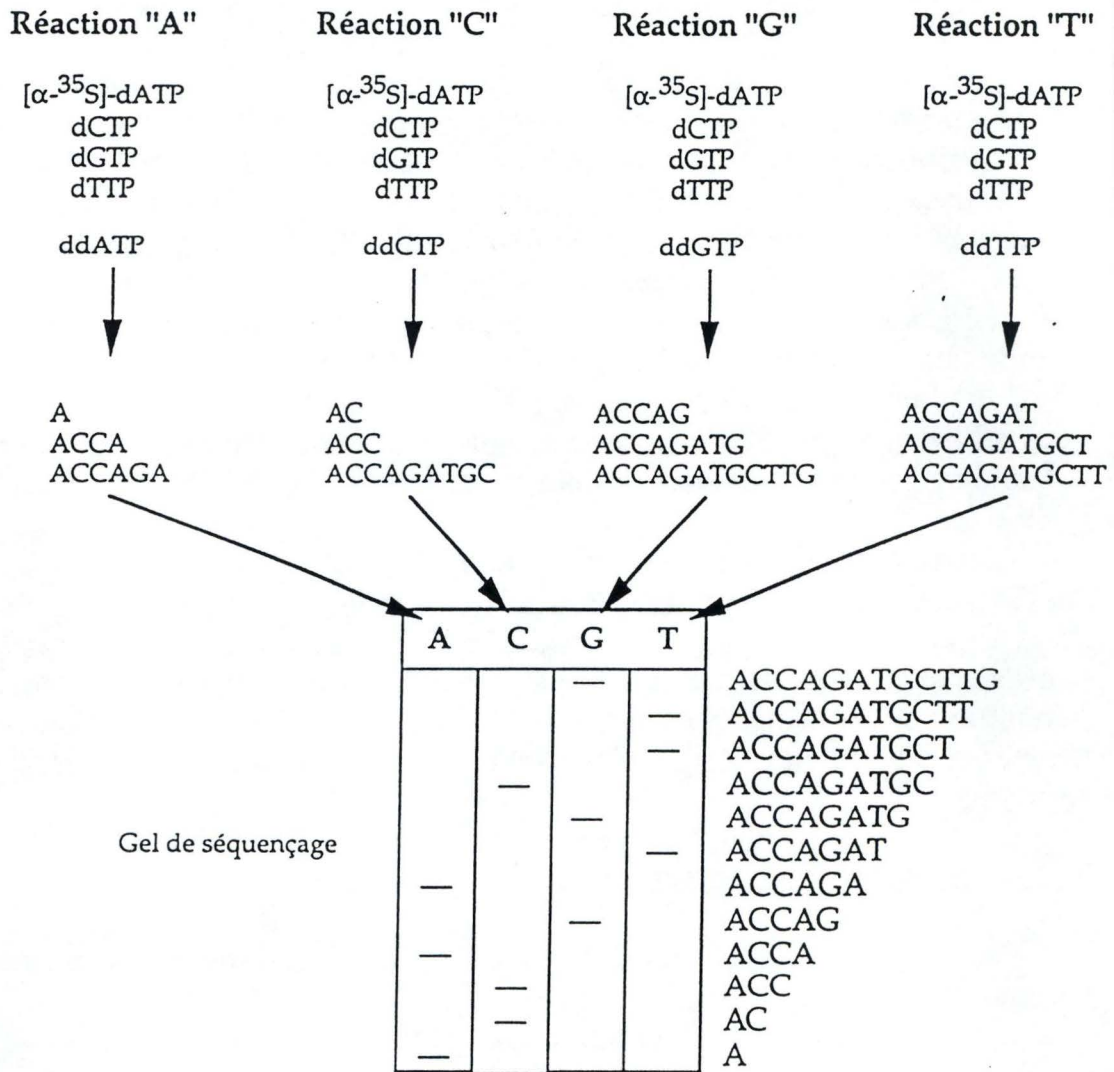


Figure 18: Stratégie générale du séquençage.

Pour séquencer un fragment d'ADN, un set d'oligonucléotides simple brin marqués radioactivement est généré dans quatre réactions distinctes. Dans chacune des quatre réactions, les oligonucléotides ont une extrémité fixe et l'autre qui se termine de façon séquentielle à respectivement chaque A,C,G,T. Les produits de chaque réaction sont séparés sur gel de polyacrylamide. Après autoradiographie, la séquence peut être lue directement.

5.13.3. Marquage (labelling).

La polymérisation commence en absence de ddNTP pour synthétiser un brin marqué d' une trentaine de nucléotides qui permettra la détection.

Ajouter au mélange:

- 3 µl de labelling buffer.
- 1 µl de $\alpha^{35}\text{S}$ dATP à 10 mCi par ml.
- 2 µl de T7 polymérase dilué dans son tampon à 1,5 unité par ml.
- incuber 5 minutes à température ambiante.

5.13.4. Terminaison.

- déposer 2,5 µl de chacun des quatre ddNTP dans 4 eppendorfs de couleur différentes préchauffés 5' à 37°C et notés A,C,G,T.
- déposer sur la paroi de chaque tube 4,3 µl du mélange de marquage.
- centrifuger brièvement les tubes afin que les 4 ddNTP commencent à être incorporés simultanément.
- incuber 5 minutes à 37°C.
- déposer 5 µl de solution stop sur la paroi des tubes et centrifuger brièvement pour arrêter simultanément les 4 réactions; Stocker à -20°C si nécessaire.

5.13.5. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les plaques doivent être lavées à l' eau de ville, à l'eau distillée et à l' alcool pour assurer une polymérisation optimale du gel. La plus grande plaque est coater avec 10ml de diméthyl dichloro silane pour éviter une adhérence du gel au démoulage. On place ensuite les spacers, le montage est alors scellé par de l' adhésif et fixé par des pinces. On prépare le gel dans un berlin:

- 42g d' urée.
- 10 ml de TBE 10X.
- 15 ml de solution polyacrylamide 40%
- 45 ml d' eau distillée.
- après dissolution, filtrer sous vide avec filtre Gelman GN6.
- ajouter 600 µl de persulfate d' ammonium 10% et 30 µl de TEMED.
- couler rapidement le gel à la seringue en plaçant les plaques en oblique.
- placer les peignes à l' envers pour délimiter la ligne de base.
- laisser polymériser environ une heure.

Composition de la solution de polyacrilamide 40%.

Acrylamide.	40%
Bisacrylamide.	0,8%
Eau distillée.	ad 100ml

Le gel est alors placé dans le séquenceur rempli de tampon TBE1X. Il est préchauffé 30 minutes à 60W et 2000V.

- placer les dents du peigne contre la ligne de base.
- éliminer l'urée des puits à la pissette.
- dénaturer les échantillons 3 minutes à 85°C.
- charger 2,5 µl de chaque tube.

Trois temps de migration sont effectués: 1,5 heures, 3 heures et 4,5 heures. A chaque fois, les échantillons sont dénaturés et l'urée éliminée des puits.

5.13.6. Après la migration

- démouler le gel;
- fixer le gel en l'aspergeant d'une solution de fixateur.
- déposer le gel sur papier Whatman 3MM et le sécher une heure à 80°C.

Composition de la solution de fixateur:

Acide acétique.		10%	
Méthanol.		10%	

On place alors le filtre dans une cassette d'autoradiographie en présence d'un film pendant 12 heures. Le film est alors révéler 5 minutes et fixé 10 minutes. on le rince alors abondamment à l'eau. Les premières bases lues sur la migration de 2 heures sont situées à une trentaine de nucléotides de l'endroit où l'oligonucléotide s'est hybridé. Avec les temps de migration préconisé plus haut, une séquence d'environ 350 nucléotides peut être lue.

BIBLIOGRAPHIE

Amann E. and Brosius J. (1985).

ATG Vectors for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*.

Gene 40, 183-190.

Ananthan J., Goldberg A.L. and Voellmy R. (1986).

Abnormal Proteins Serve as Eukaryotic Stress Signals and Trigger the Activation of Heat Shock Genes.

Science 232, 522-524.

Anderson B.H and Thorpe R.C. (1980).

New methods of analysing for antigens and glycoproteins in complex mixtures.

Immunol. Today, 2, 122-127.

Ausubel F., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (1987).

Current Protocols in Molecular Biology.

Greene Publishing Associates and Wiley Inter Science, New York.

Bachmair A. and Varshavsky A. (1989).

The Degradation Signal in Short-Lived Protein.

Cell 56, 1019-1032.

Baker T.A., Grossman A.D. and Gross C.A. (1984).

A gene regulating the heat shock response in *Escherichia coli* also affects proteolysis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6779-6783.

Barr K.A., Hopkins S.A. and Treekrishna K. (1992).

Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*.

Pharmaceutical Engineering 12 N°2, 48-53.

Barstow D.A., Black G.W., Sharman A.F., Scawen M.D., Atkinson T., Li S.S., Chia W.N., Clarke .R. and Holbrook J.J. (1990).

Expression of the copy DNA for human A4 and B4 L-lactate dehydrogenase in *Escherichia coli*.

Bioch. and Biophys. Acta 1087, 73-79.

Benvenisty N. and Reshef L. (1986).

Direct introduction of genes into rats and expression of the genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9551-9555.

Bernard P., Gabant P., Bahassi El. M., Couturier M. (1994).

Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene.

Gene 148, 71-74.

Bonneaud N., Minvielle-Sebastia L., Cullin C. et Lacroute F. (1994).

Cellular localization of RNA14p and RNA15p, two yeast proteins involved in mRNA stability.

Journal of Cell Science 107, 913-921.

Borer R.A., Lehner C.F., Eppenberger H.M. and Nigg E.A. (1989).
Major Nucleolar Proteins Shuttle between Nucleus and Cytoplasm.
Cell 56, 379-390.

Bradley M.K. (1990).
Overexpression of proteins in Eucaryotes.
Methods in Enzymology 182, 112-120.

Brand R.C., Klootwijk J., Van Steenbergen T.J., De Kok J. and Planta R.J. (1977).
Secondary Methylation of Yeast Ribosomal Precursor RNA.
Eur.J.Biochem. 75, 311-318.

Buckholz R.G., Gleeson M.A. (1991).
Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins.
Bio/technology 9, 1067-1071.

Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine S.P., Sreekrishna K. and Romanos M.A. (1991).
High-level expression of Tetanus Toxin fragments C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene.
Bio/technology 9, 455-460.

Cohen J. (1993).
Naked DNA Points Way to Vaccines.
Science 259, 1691-1692.

Craig E.A., Gross C.A. (1991).
Is hsp70 the cellular thermometer?
TIBS 16, 135-139.

Cregg J.M., Vedvick T.S. and Raschke W.C. (1993).
Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*.
Bio/technology 11, 905-910.

Cregg J.M., Madden K.R. (1989).
Use of specific recombination to generate selectable markers.
Mol. Gen. Genet. 219, 320-323.

Cregg J.M., Madden K.R., Barringer K.J., Thill G.P. and Stillman C.A. (1989).
Functional Characterisation of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*.
Molecular and Cellular Biology 9, 1316-1323.

Cregg J.M., Madden K.R. (1988).
Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host system for the production of foreign proteins.
Dev. in ind. Microbiology 29, (Journal of Industrial Microbiology, Suppl. N°3), 33-41.

Cunningham P.R., Weitzmann C.J., Nurse K., Masurel R., Van Knippenberg P.H. and Ofengang J. (1990).

Site-specific mutation of the conserved mAmA residues of *E. coli* 16S ribosomal RNA. Effects on ribosome function and activity of the ksgA methyltransferase. *Biochem. and Biophys. Acta* 1050, 18-26.

Danko I. and Wolff J.A. (1994).

Direct gene transfert into muscle. *Vaccine* 12, 1499-1502.

Das A. (1990).

Overproduction of Proteins in Escherichia coli: Vectors, Hosts, and Strategies. *Methods in Enzymology* 182, 93-112.

Davis H.L., Michel M.L., Mancini M., Schleef M. and Whalen R.G. (1994).

Direct gene transfert in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen.

Vaccine 12, 1503-1509.

Devoret R. (1993).

Mécanismes de la mutagenèse SOS chez les bactéries. *Med./Sci. N°3 9*, II-VII.

Digan M.E., Lair S.V., Brierley R.A., Siegel R.S., Willams M.E., (...) and Thill G.P. (1989).

Continuous Production of a Novel Lysozyme via Secretion from the Yeast *Pichia pastoris*.

Bio/Technology 7, 160-164.

Dunbar B.S. and Schwoebel E.D. (1990).

Preparation of Polyclonal Antibodies.

Methods in Enzymology 182, 663-670.

Dunbar B.S. and Skinner S.M. (1990).

Preparation of Monoclonal Antibodies.

Methods in Enzymology 182, 670-679.

Faber K. F., Harder W., Ab G. and Veenhuis M. (1995).

Methylotrophic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins.

Yeast, 11, 1331-1344.

Firestone G.L. and Winguth S.D. (1990).

Immunoprecipitation of Proteins.

Methods in Enzymology 182, 688-700.

Fleer R. (1992).

Engineering yeast for high level expression.

Current Opinion in Biotechnology 3, 486-496.

Fuller D.H. and Haynes J.R. (1994).

A Qualitative Progression in HIV Type 1 Glycoprotein 120-Specific Cytotoxic Cellular and Humoral Immune Responses in Mice Receiving a DNA-Based Glycoprotein 120 Vaccine.

AIDS Research and Human Retroviruses 10, 1433-1441.

Fynan E., Webster R.G., Fuller D.H., Haynes J.R., Santoro J.C. and Robinson H.L. (1993).

DNA vaccines: Protective immunizations by parental, mucosal, and gene-gun inoculations.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.90, 11478-11482.

Gaitanaris G.A., Papavassiliou A.G., Rubock P., Silverstein S.J. and Gottesman M.E. (1990).

Renaturation of Denatured λ Repressor Requires Heat shock Proteins.

Cell 61, 1013-1020.

Garcia-Bustos J., Heitman J. and Hall M.N. (1991).

Nuclear protein localization.

Biochim. and Biophys. Acta 1071, 83-101.

Gerace L. (1995).

Nuclear Export Signals and the Fast Track to the Cytoplasm.

Cell 82, 341-344.

Germino J., Gray J.G., Charbonneau H., Vanaman T. and Bastia D. (1983).

Use of gene fusions and protein-protein interaction in the isolation of a biologically active regulatory protein: The replication initiator protein of plasmid R6K.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6848-6852.

Gleeson M.A., Sudbery P.E. (1988).

The Methylotrophic Yeast.

Yeast 4, 1-15.

Goff S.A. and Goldberg A.L. (1985).

Production of Abnormal Proteins in *E. coli* Stimulates Transcription of *Lon* and Other Heat Shock Genes.

Cell 41, 587-595.

Görlich D., Prehn S., Laskey R.A. and Hartmann E. (1994).

Isolation of a Protein That Is Essential for the First Step of Nuclear Protein Import.

Cell 79, 767-778.

Gottesman S. (1990).

Minimizing Proteolysis in *Escherichia coli*: Genetic Solutions.

Methods in Enzymology 185, 119-129.

Guddat U., Bakken A.H. and Pieler T. (1990).

Protein-Mediated Nuclear Export of RNA: 5S rRNA Containing Small RNPs in *Xenopus* Oocytes.

Cell 60, 619-628.

Guttel R.R., Larsen N. and Woese C.R. (1994).

Lessons from an Evolving rRNA: 16S and 23S rRNA Structures from Comparative Perspective.

Microbiological Reviews 58 n°1, 10-26.

Gyuris J., Golemis E., Chertkov H. and Brent R. (1993).

Cdi1, a human G1 and S Phase Protein Phosphatase that associates with Cdk2.

Cell 75, 791-803.

Harlow E. and Lane D. (1988).

Antibodies, a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory.

Haynes J.R., Fuller D., Eisenbraun M.D., Ford M.J. and Pertmer T.M. (1994).

Accell Particule-Mediated DNA Immunization Elicits Humoral, Cytotoxic, and Protective Immune Responses.

AIDS Research and Human Retroviruses 10, S43-S45.

Hill W.E., Dahlberg A., Garret R.A., Moore P.B., Schlessinger D. and Warner J.R. (1990).

The Ribosome: Structure, Fonction and Evolution.

American Society for Microbiology, Washington.

Hodgson J. (1993).

Expression System: A User's Guide.

Bio/Technology 11, 887-893.

Hoyt M.A., Knight D.M., Das A., Miller H.I. and Echols H. (1982).

Control of phage λ Development by stability and Synthesis of cII Protein: Role of the Viral *cIII* and Host *hflA*, *himA* and *himD* Genes.

Cell 31, 565-573.

Katsumi A., Emi N., Abe A., Hasegawa Y., Ito M. and Saito H. (1994).

Humoral and Cellular Immunity to an Encoded Protein Induced by Direct DNA Injection.

Human Gene Therapy 5, 1335-1339.

Klootwijk J. and Planta R.J. (1989).

Isolation and Characterization of Yeast Ribosomal RNA Precursors and Preribosomes.

Methods in Enzymology, 180, 96-109.

Klootwijk J. and Planta R.J. (1973).

Analysis of the Methylation Sites in Yeast Ribosomal RNA.

Eur.J.Biochem. 39, 325-333.

Klootwijk J., Van Den Bos R.C. and Planta R.J. (1972).

Secondary Methylation of Yeast Ribosomal RNA.

FEBS 27 n°1, 102-106.

Ladenheim R. (1995).

Les vaccins à ADN nu.

Biofutur Mai 1995, 15-21.

Lafontaine D., Vandehaute J. and Tollervey D. (1995).

The 18S rRNA dimethylase *DIM-1p* is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast.

Genes Dev., sous presse.

Lafontaine D., Delcour J., Glasser A.L., Desgres J. and Vandehaute J. (1994).

The *DIM1* Gene Responsible for the Conserved m⁶₂Am⁶₂A Dimethylation in the 3'-Terminal Loop of the 18S rRNA is Essential in Yeast.

J. Mol. Biol. 241, 492-497.

Langeveld J.P., (...), and Muelen R.H. (1994).

Effective induction of neutralizing antibodies with the amino terminus of VP2 of canine parvovirus as a synthetic peptide.

Vaccine 12, 1473-1480.

LaVallie E.R., DiBlasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F. and McCoy J.M. (1993).

A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in The *E. coli* Cytoplasm.

Bio/Technology 11, 187-193.

Lewin B. (1994).

Genes V.

Oxford University Press. New York.

Li J.M., Hopper A.K. and Martin N.C. (1989).

N²N²-Dimethylguanosine-specific tRNA Methyltransferase Contains Both Nuclear and Mitochondrial Targeting Signals in *S. cerevisiae*.

The Journal of Cell Biology 109, 1411-1419.

Little J.W. and Mount D.W. (1982).

The SOS Regulatory System of *E. coli*.

Cell 29, 11-22.

Liu M.A., Ulmer J.B., Shiver J.W., McClements W.L. and Donnelly J.J. (1995).

Nouvelle approche potentielle de la vaccination: les vaccins à base d'ADN.

Colloques Internationaux de l'Année Pasteur, Résumés des Communications.

Institut Pasteur, Paris, France.

Mabuchi I. and Okuno M. (1977).

The effect of myosin antibody on the division and starfish blastomeres.

J. Cell. Biol., 74, 251-263.

Matheise J.P., Walvarens K., Collard A., Coppe P. and Letesson J.J. (1995).

Antigenic analysis of the F protein of the bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition.

Arch. Virol., 140, 000-000.

Mirande M. (1991).

Aminoacyl-tRNA Synthetase family from Prokaryotes and Eucaryotes: Structural Domains and Their Implications.

Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 40, 95-142.

Morelle C. (1993).

Expression de protéines hétérologues: les systèmes eucaryotes.
Biofutur N° 125 Cahier N°60, 3-13.

Moritz M., Pulasky B.A. and Woolford J.L. (1991).

Assembly of 60S Ribosomal Subunits Is Perturbed in Temperature-Sensitive Yeast Mutants Defective in Ribosomal Protein L16.
Molecular and Cellular Biology 11, 5681-5692.

Morrissey J.P. and Tollervey D. (1995).

Birth of the snoRNPs: the evolution of RNase MRP and the eukaryotic pre-rRNA-processing system.
TIBS 20, 78-82.

Munro S. and Pelham H. (1985).

What turns on heat shock genes?
Nature 317, 477-478.

Orfanoudakis G. et Egly J.M. (1993).

Expression de protéines hétérologues : les systèmes procaryotes.
Biofutur N°124 Cahier N°59, 3-13.

Paddock S., DeVries P., Buth E. and Carroll S. (1994).

Production of Monoclonal Antibodies by Genetic Immunization.
BioTechniques 16, 616-620.

Paifer E., Margolles E., Montesino C., Herrera L. and Delgado J.M. (1994).

Efficient Expression and Secretion of Recombinant Alpha Amylase in *Pichia pastoris* using two different Signal Sequences.
Yeast 10, 1415-1419.

Plessis A. and Dujon B. (1993).

Multiple tandem integrations of transforming DNA sequences in yeast chromosomes suggest a mechanism for integrative transformation by homologous recombination.
Gene 134, 41-50.

Pogge von Strandmann E.P., Zoidl C., Nakhei H., Holewa P., Pogge von Strandmann R., Lorenz P., Klein-Hitpab L. and Ryffel G.U. (1995).

A highly specific and sensitive monoclonal antibody detecting histidine-tagged recombinant protein.
Protein Engineering 8, 733-735.

Poldermans B., Goosen N. and Van Knippenberg P.H. (1979).

Studies on the Function of Two Adjacent *N*⁶,*N*⁶-Dimethyladenosines Near the 3' End of 16S Ribosomal RNA of *E. coli*. The Effect of Kasugamycin on Initiation of Protein synthesis.
The Journal of Biochemical Chemistry 254, 9085-9089.

Poldermans B., Van Buul C.P. and Van Knippenberg P.H. (1979).

Studies on the Function of Two Adjacent N^6,N^6 -Dimethyladenosines Near the 3' End of 16S Ribosomal RNA of *E. coli*. The Effect of The Absence of Methyl Groups on Initiation of Protein Biosynthesis.

The Journal of Biochemical Chemistry 254, 9090-9094.

Poldermans B., Roza L. and Van Knippenberg P.H. (1979).

Studies on the Function of Two Adjacent N^6,N^6 -Dimethyladenosines Near the 3' End of 16S Ribosomal RNA of *E. coli*. Purification and Properties of the Methylating Enzyme and Methylase-30S Interactions.

The Journal of Biochemical Chemistry 254, 9094-9100.

Powers M.A. and Forbes D.J. (1994).

Cytosolic Factors in Nuclear Transport: What's Importin?

Cell 79, 931-934.

Ramirez J.L. (1994).

Report of the Meeting on Genetic Vaccines (Naked DNA/RNA) WHO Geneva, May 17-18, 1994.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 89(2), 297-298.

Raw J.D. (1990).

Traité de Biochimie.

Be Boeck Université.

Reddy R., Li W., Henning D., Choi Y.C., Nohga K. and Busch H. (1981).

Characterization and Subcellular Localization of 7-8S RNAs of Novikoff Hepatoma.

The Journal of Biological Chemistry 256 n°16, 8452-8457.

Remaut E., Stanssens P. and Fiers W. (1981).

Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the P1 promoter of coliphage lambda.

Gene 15, 81-93.

Reppe S., (...), and Gautvik K.M. (1991).

Characterization of a K26Q Site-directed Mutant of Human Parathyroid Hormone Expressed in Yeast.

The Journal of Biological Chemistry 266, 14198-14201.

Ripmaster T.L., Vaughn G.P. and Woolford J.L. (1993).

DRS1 to *DRS7*, Novel Genes Required for Ribosome Assembly and Function in *S. cerevisiae*.

Molecular and Cellular Biology 13, 7901-7912.

Romanos M.A., Scorer C.A. and Clare J.J. (1992).

Foreign Gene Expression in Yeast: a Review.

Yeast 8, 423-488.

Romanos M.A., Clare J.J., Beesley K.M., Rayment F.B., Ballantine S.P., Makoff A.J., Dougan G., Fairweather N.F. and Charles I.G. (1991).

Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties.

Vaccine 9, 901-906.

Rosenberg M., Ho Y. and Shatzman A. (1983).

The Use of pKC30 and Its Derivatives for Controlled Expression of Genes.
Methods In Enzymology 101, 123-138.

Rossolini G.M., Riccio M.L., Gallo E. and Galeotti C.L. (1992).

Kluyveromyces lactis rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination.
Gene 119, 75-81.

Rost B., Sander C. and Schneider R. (1994).

PHD: an automatic mail server for protein secondary structure prediction.
Cabios 10 N°1, 53-60.

Sachs A.B. and Davis R.W. (1989).

The Poly(A) Binding Protein Is Required for Poly(A) Shortening and 60S Ribosomal Subunit-Dependent Translation Initiation.
Cell 58, 857-867.

Salim M. and Maden B.E. (1973).

Early and Late Methylations in HeLa Cell Ribosome Maturation.
Nature 244, 394-396.

Sambrook J., Fritsh E.F. and Maniatis T. (1989).

Laboratory Manual. Second Edition.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Scorer C.A., Clare J.J., McCombie W.R., Romanos M.A. and Sreekrishna K. (1994).

Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression.
Bio/Technology 12, 181-184.

Scorer C.A., Buckholz R.G., Clare J.J. and Romanos M.A. (1993).

The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.
Gene 136, 111-119.

Shatzman A.R. and Rosenberg M. (1987).

Expression, Identification and Characterization of Recombinant Gene Products in *Escherichia coli*.
Methods in Enzymology 152, 661-673.

Shatzman A.R. and Rosenberg M. (1983).

The pAS Vector System and Its Applications.
Annals of The New-York Academy of Sciences 478, 233-248.

Shen W., Selvakumar D., Stanford D.R. and Hopper A.K. (1993).

The *S. cerevisiae* *LOS1* Gene Involved in Pre-tRNA Splicing Encodes a Nuclear Protein That Behaves as a Component of the Nuclear Matrix.
The Journal Of Biological Chemistry 268 N°26, 19436-19444.

Soumillion P. et Fastrez J. (1992).

A large decrease in heat-shock-induced proteolysis after tryptophan starvation leads to increased expression of phage λ lysozyme cloned in *Escherichia coli*
Biochem. J. 286, 187-191.

Stoute J.A., Ballou W.R., Kolodny N., Deal C.D., Wirtz R.A. and Lindler L.E. (1995).

Infection and Immunity 63, 934-939.

Strauch K. and Beckwith J. (1988).

An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1576-1580.

Straus D.B., Walter W.A. and Gross C.A. (1987).

The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} .

Nature 329, 348-351.

Szostak J.W., Orr-Weaver T.L. and Rothstein R.J. (1983).

The Double-Strand-Break Repair Model for Recombination.

Cell 33, 25-35.

Tang D., DeVit M. and Johnston S.A. (1992).

Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response.

Nature 356, 152-154.

Talmadge K. and Gilbert W. (1982).

Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.79, 1830-1833.

Thompson D., Van Oosbree T. (1992).

TNT Lysate coupled transcription/translation: Comparison of the T3, T7 and SP6 Systems.

Promega Notes 38, 15.

Tschopp J.F., Brust P.F., Cregg J.M., Stillman C.A. and Gingeras T.R. (1987).

Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*.

Nucleic Acids Research 15 N°9, 3859-3876.

Ulmer J.B., (...) and Liu M.A. (1993).

Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA encoding a Viral Protein.

Science 259, 1745-1749.

Van Gemen B. and Van Knippenberg P.H. (1990).

On the evolutionary relationships between adenosine dimethylation in 16S and 23S ribosomal RNA.

Nucleic Acid Methylation, Alan R. Liss, Inc., 19-36.

Van Gemen B., Koets H.J., Plooy C.A.M., Bodlaender J. and Van Knippenberg P.H. (1987).

Characterization of the *KsgA* gene of *Escherichia coli* determining kasugamycin sensitivity.

Biochimie 69, 841-848.

Van Knippenberg P.H. (1986).

Structural and Functional Aspects of the *N*⁶,*N*⁶-Dimethyladenosines in 16S Ribosomal RNA.

In *Structure, function and genetic of ribosomes* (ed. Hardesty B. and Kramer G.), 412-424. Springer-Verlag New York Inc., New York.

Van Ree R. and Aalberse R.C. (1995).

Rabbit IgG Directed to a Synthetic C-Terminal Peptide of the Major Grass Pollen Allergen *Lol p I* Inhibits Human Basophil Histamine Release Induced by Natural *Lol p I*.

Int. Arch. Allergy Immunol. 106, 250-257.

Van Regenmortel M.H.V., Briand J.P., Muller S., Plaué S. (1988).

Synthetic polypeptides as antigens.

Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology.

Ed. R.H. Burdon and P.H. Van Knippenberg.

Venema J., Henry Y. and Tollervey D. (1995).

Two distinct recognition signals define the site of endonucleolytic cleavage at the 5'-end of yeast 18S rRNA.

EMBO journal 14, 4883-4892.

Watson, Gilman, Witkowski, Zoller. (1994).

ADN Recombinant.

De Boeck Université.

Watson J.D. (1986).

Biologie Moléculaire de la Cellule.

Flammarion Médecine-Science.

Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Ascadi G., Jani A. and Felgner P.L. (1990).

Direct DNA Transfert into Mouse Muscle in Vivo.

Science 247, 1465-1468.

Wu Y., Zhang D.Y. and Kramer F. (1992).

Amplifiable messenger RNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11769-11773.

Yamamori T. and Yura T. (1982).

Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *Escherichia coli* K-12.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 860-864.