

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Clonage et caractérisation du gène de la diméthylase chez *Schizosaccharomyces pombe*

Demonté, Dominique

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Clonage et caractérisation du gène de la diméthylase chez
Schizosaccharomyces pombe

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

Demonté Dominique
1994-1995

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Clonage et caractérisation du gène de la diméthylase
chez *Schizosaccharomyces pombe*

DEMONTE Dominique

Résumé

Comme un premier pas dans l'élucidation du rôle fonctionnel chez les eucaryotes de la diméthylation universelle des deux adénosines situées près de l'extrémité 3' terminale de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique, le gène *DIMI* de *Saccharomyces cerevisiae* a été cloné et caractérisé au laboratoire. La comparaison de la séquence du gène *DIMI* avec le gène *KsgA*, son homologue chez *Escherichia coli* et d'autres diméthylases, a révélé l'existence de certaines caractéristiques intéressantes. Afin d'élargir la comparaison de séquences à d'autres diméthylases eucaryotes et de cette façon d'obtenir probablement de nouvelles informations sur les relations structure/fonction dans cette nouvelle famille de protéines, nous avons entrepris le clonage et la caractérisation du gène de la diméthylase chez *Schizosaccharomyces pombe*.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : J. Vandenhaute

Co-promoteur : J. Delcour

Remerciements

Je remercie le professeur Vandenhoute de m'avoir accueilli dans son laboratoire et suivi tout au cours de l'année.

Je remercie les membres du jury, I. Housen, P. Mertens, J. Strijhagen et F. Opperdoes d'avoir lu mon mémoire.

Je remercie Jean-Pol pour ses conseils judicieux, sa bonne humeur et sa disponibilité.

Je remercie Xavier pour son aide dans mes alignements de séquences et ses remarques toujours pertinentes.

Je remercie Rose-Marie, Thierry, Monique, Jean-Marc, Mme Libion, Nathalie, Matthieu et Françoise ainsi que Denis pour la bonne humeur qu'ils apportent au labo.

Je tiens à remercier tout particulièrement Isabelle qui m'a suivie avec célérité, et gentillesse tout au long de mon mémoire.

Je voudrais également remercier mes parents pour leur aide, Caroline pour sa patience pendant cette rude période et mes éternels copains Damien, Zac et Patrick avec lesquels il m'a été agréable de "déstresser".

Abreviations

ADN	Acide déoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN de transfert
Br.Eth.	Bromure d'éthidium
DO	Densité optique
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
g	Gramme
Kb	Kilobase
l	Litre
LSU	Grande sous-unité
mg	Milligramme
ml	Millilitre
μl	Microlitre
mM	Milli-molaire
M	Molaire
nm	Nanomolaire
pb	paire de bases
PM	Poids moléculaire
SAM	S-adénosyl-méthionine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SSU	Petite sous-unité
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
V	Volt
UV	Ultra-violet

I. INTRODUCTION

1. PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE DU TRAVAIL.....	5
2. LA LEVURE <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	6
3. LA TRADUCTION: ÉTAPE DANS L'EXPRESSION DES GÈNES.....	6
4. LE RIBOSOME: UNE MACHINERIE RIBONUCLÉOPROTÉIQUE BIEN CONSERVÉE	7
4.1 LES STRUCTURES SECONDAIRES DES ARNR.....	8
4.2 LA MÉTHYLATION: MODIFICATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DES ARNR.....	9
4.3 LA DOUBLE DIMÉTHYLATION $m^6_2A m^6_2A$ DE L'ARNR DE LA PETITE SOUS-UNITÉ RIBOSOMIQUE EST EXTRÊMEMENT CONSERVÉE	9
4.3.1 Rôle de la diméthylation $m^6_2A m^6_2A$ chez les procaryotes.....	10
4.3.2 Rôle de la diméthylation $m^6_2A m^6_2A$ est encore inconnu chez les eucaryotes.....	11

II. BUT DU TRAVAIL

13

III. RESULTATS

1. CHOIX DE LA STRATÉGIE DE CLONAGE PAR SONDE NUCLÉOTIDIQUE	15
2. SYNTHÈSE DE LA SONDE ET TEST PRÉLIMINAIRE EN SOUTHERN BLOT	16
2.1 PRINCIPE.....	16
2.2 SYNTHÈSE DE LA SONDE.....	16
2.3 RÉALISATION DU SOUTHERN BLOT.....	16
2.4 RÉSULTATS DU SOUTHERN BLOT	16
2.5 COMMENTAIRES.....	17
3. CLONAGE DU GÈNE.....	18
3.1 CARACTÉRISTIQUES DE LA BANQUE DE CDNA UTILISÉE.....	18
3.1.1 Vecteur utilisé.....	18
3.1.2 Validité de la banque	18

3.2 CRIBLAGE DE LA BANQUE GÉNOMIQUE.....	19
3.2.1 Transformation de la souche XLI blue par la banque de cDNA.....	19
3.2.2 Résultats des différentes étapes de criblage.....	19
3.2.3 Taille des inserts.....	20
4. TEST FONCTIONNEL DE COMPLÉMENTATION HÉTÉROLOGUE CHEZ LE MUTANT KSGA⁻.....	21
4.1 PRINCIPE.....	21
4.2 LE PGIDD 3 RESTAURE LA SENSIBILITÉ À LA KASUGAMYCINE CHEZ <i>E. COLI</i> DL101.....	21
4.3 RÉSULTATS.....	22
4.4 CONCLUSION.....	23
5. CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES DEUX INSERTS.....	24
5.1 CARTE DE RESTRICTION DU PGIDD 5 ET DU PGIDD 6.....	24
5.1.1 Préliminaires.....	24
5.1.2 Restrictions diagnostiques.....	24
5.2 SÉQUENCAGE.....	26
5.2.1 Sous-clones en vue du séquençage.....	26
5.2.2 L'ORF du gène de la diméthylase de <i>S.pombe</i> est séquencée.....	26
5.2.3 La position de l'ORF soulève deux problèmes !.....	27
6. ETUDE DE LA SÉQUENCE.....	29
6.1 COMPARAISON DU GÈNE <i>S.PDIM1</i> AVEC D'AUTRES DIMÉTHYLASES DE PROCARYOTES.....	29
6.2 COMPARAISON DU GÈNE <i>S.PDIM1</i> AVEC LE GÈNE <i>DIM1</i>	30
6.2.1 Présence du site putatif de fixation de la <i>S</i> -adénosyl-méthionine.....	30
6.2.2 Absence de lysines à l'extrémité N-terminale.....	31

IV. CONCLUSION ET DISCUSSION 32

V. PERSPECTIVES 34

VI. MATERIEL ET METHODES

1. TAMPONS ET SOLUTIONS.....	35
1.1 TAMPONS.....	35

1.2 SOLUTIONS.....	37
2. SOUCHES ET PLASMIDES.....	38
2.1 SOUCHES UTILISÉES.....	38
2.1.1 La souche DL101 est KsgA ⁻ et PyrF ⁻	38
2.2 PLASMIDES.....	38
3. MILIEUX DE CULTURE.....	39
3.1 MILIEUX DE CULTURE POUR BACTÉRIES.....	39
3.1.1 Milieux riches.....	39
3.2 MILIEUX DE CULTURE POUR LEVURES.....	39
3.2.1 Milieu riche.....	39
3.2.2 Milieu minimum.....	39
4. TECHNIQUES DE L'ADN RECOMBINANT.....	41
4.1 CONSTRUCTIONS GÉNÉTIQUES.....	41
4.1.1 Principe général.....	41
4.1.2 Restrictions.....	41
4.1.3 La ligation.....	42
4.2 ELECTROPHORÈSE ANALYTIQUE SUR GEL D'AGAROSE.....	43
4.2.1 Critères de séparation des fragments d'ADN.....	43
4.2.2 Visualisation de l'ADN sur le gel.....	44
4.2.3 Estimation de la taille des fragments.....	44
4.2.4 Estimation de la quantité des fragments.....	44
4.2.5 Mise en oeuvre.....	45
4.3 ELECTROPHORÈSE PRÉPARATRICES ET PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN.....	45
4.3.1 Récupération sur papier.....	45
4.4 TRANSFORMATION.....	46
4.4.1 Transformation bactérienne.....	46
4.4.2 Transformation de levures.....	48
4.5 PRÉPARATION DE VECTEUR D'ADN.....	50
4.5.1 Minipréparation d'ADN plasmidique.....	50
4.5.2 Midipréparation d'ADN plasmidique (Nucleobond AX100).....	51
4.6 PURIFICATION ET PRÉPARATION DE L'ADN.....	52
4.6.1 Extraction au phénol-chloroforme.....	52
4.6.2 Préparation d'ADN génomique de levure.....	52
4.7 LE SÉQUENÇAGE.....	53
4.7.1 Principe du séquençage.....	53
4.7.2 Réactions de séquençage.....	54

4.8 SOUTHERN BLOT	56
4.8.1 Préparation du gel d'agarose au transfert de l'ADN.....	56
4.8.2 Montage pour le transfert (fig.11).....	56
4.8.3 Préhybridation	56
4.8.4 Synthèse de la sonde radioactive (<i>Random primed DNA labelling Kit. BRL</i>)....	57
4.8.5 Hybridation.....	57
4.8.6 Lavages.....	57
4.8.7 Révélation	57
4.9 HYBRIDATION SUR COLONIES	58
4.9.1 Transfert des colonies sur filtre.....	58
4.9.2 Lyse des cellules	58
4.9.3 Préhybridation, hybridation, lavages et révélation	58

VII. BIBLIOGRAPHIE

59

I. INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

1. Problématique générale du travail

Notre travail s'inscrit dans le cadre général des recherches du laboratoire concernant le rôle des méthylations des ARNr dans la structure, la biogénèse et le fonctionnement du ribosome eucaryote.

L'approche suivie est génétique, elle consiste en un premier temps à cloner les gènes impliqués dans les processus de méthylations et à les séquencer. Une fois la séquence du gène connue, on peut le disrupter ou le contrôler afin de mesurer les conséquences de l'absence ou de la régulation de son expression au sein de la cellule.

Le gène *DIMI* de *S. cerevisiae* cloné au laboratoire (Lafontaine *et al.*, 1994) intervient dans la diméthylation de deux adénosines adjacentes situées sur l'hairpin se trouvant à l'extrémité 3' terminale de l'ARNr 18 S.

Le rôle de cette diméthylation universellement conservée est connu chez les procaryotes mais reste encore inconnu chez les eucaryotes.

Dans le contexte de cette problématique de recherche, notre travail entreprend chez *Schizosacharomyces pombe* le clonage du gène homologue et l'étude comparée de sa fonction et de sa structure. En effet l'obtention d'un second gène eucaryote codant pour la diméthylase devrait permettre d'affiner notre compréhension du rôle de la diméthylation dans la traduction et la biogénèse du ribosome chez les eucaryotes.

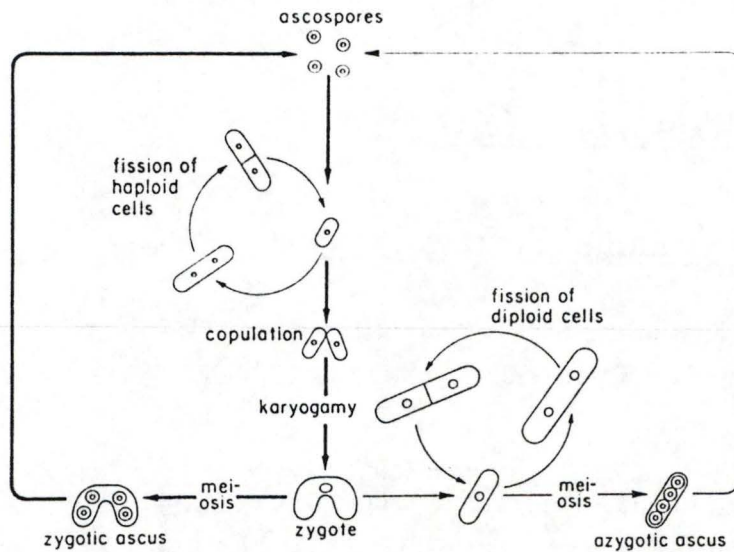


Figure 1: Cycle de vie de *S.pombe*

La partie gauche de la figure montre le cycle de vie haploïde. La partie droite montre les événements qui prennent part quand les zygotes se développent en cellules diploïdes. (Munz *et al.*, 1988).

Protein*	Sequence similarity (%)	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> versus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> versus mammals
Histone H2A	83	79
Histone H2B	82	68
Histone H4	91	91
β -Tubulin	73	75
α -Tubulin	76	74
<i>ras</i> p21	56	61
Calmodulin	63	74
<i>cdc2</i>	62	63
Cytochrome <i>c</i>	70	68
Alcohol dehydrogenase	51	25
Triose-phosphate isomerase	59	50

Figure 2: Comparaison du degré de similarité entre la séquence de protéines de *S.pombe* et leurs protéines correspondantes chez *S.cerevisiae* et chez les mammifères.

Le pourcentage de similarité entre *S.pombe* et *S.cerevisiae* est du même ordre de grandeur qu'entre *S.pombe* et les mammifères (Russel, 1989).

2. La levure *Schizosaccharomyces pombe*

L'utilisation de *S. pombe* comme outil génétique commença à se développer vers les années 1950 avec Urs Leopold. Celui-ci réalisa que les "fission yeast" (fig. 1) étaient un bon matériel pour faire de la physiologie cellulaire, mais qu'ils étaient également, de par leur position évolutive, un outil intéressant dans l'étude du cycle cellulaire dont *S. pombe* reste encore aujourd'hui l'outil de choix (Mitchison., 1990).

En effet, *S. pombe* présente les mêmes avantages que *S. cerevisiae* (Phipps *et al.*, 1985) mais se situe d'un point de vue évolutif entre *S. cerevisiae* qui représente un modèle d'eucaryotes inférieurs et les cellules animales représentant les eucaryotes supérieurs (fig. 2).

La position intermédiaire de *S. pombe* permet aussi bien le clonage de gènes humains ou de *S. cerevisiae* par complémentation hétérologue (Kanaoka & Nojima., 1994) que le clonage par complémentation dans *S. cerevisiae* de gènes de *S. pombe*.

3. La traduction: étape dans l'expression des gènes

La traduction est l'étape de l'expression des gènes durant laquelle l'information contenue dans la séquence nucléotidique de l'ARN est convertie en une séquence d'acides aminés. La traduction est, chez tous les êtres vivants, assurée par la machinerie de synthèse protéique dont le ribosome est la pièce maîtresse.

Bien que les mécanismes de traduction des gènes soient similaires chez les procaryotes et les eucaryotes, des différences importantes les séparent. La différence sans doute essentielle réside dans le fait que le ribosome eucaryotique est fonctionnellement monocistronique au contraire de la situation procaryotique où il manifeste la propriété de traduire indépendamment plusieurs cistrons (messages) sur un même messager (dit pour cela polycistronique).

Cette propriété résulte de l'initiation tout à fait particulière de la traduction eucaryotique (fig. 3 et 4) qui démarre exclusivement via une interaction du ribosome avec la coiffe et se poursuit par le scanning jusqu'au premier AUG rencontré qui ouvre la seule ORF traductible de par ce mécanisme dans tout ARNm cellulaire (Merrick., 1992).

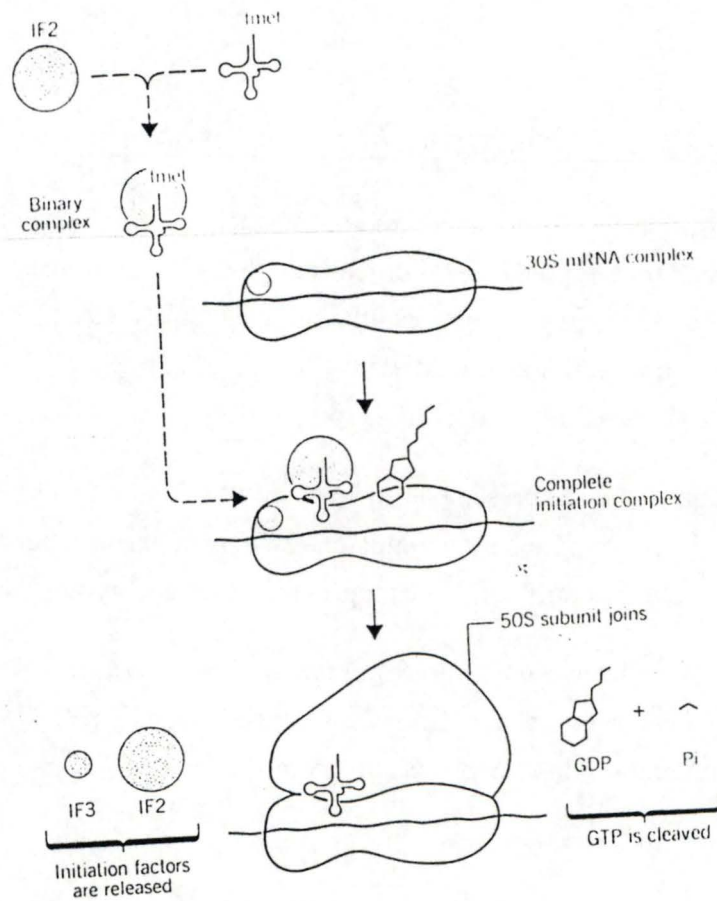


Figure 3: Initiation de la traduction chez les procaryotes (Lewin, 1990).

- L' amino-acyl-ARNt initiateur forme un complexe binaire avec le facteur IF2.
- Ce nouveau complexe s'associe à l'ARNm lui même déjà lié à la Sous-unité 30 S. Le facteur IF3 est nécessaire à la dissociation des ribosomes en vue de l'obtention de sous-unités 30 S et à la liaison des sous-unités libres au site d'initiation.
- L'hydrolyse d'un GTP permet à la sous-unité 50 S de se joindre au complexe précédemment formé et les facteurs protéiques initiateurs sont ainsi libérés.
- Le facteur IF1 pourrait quant à lui, jouer le rôle d'un facteur de recyclage.

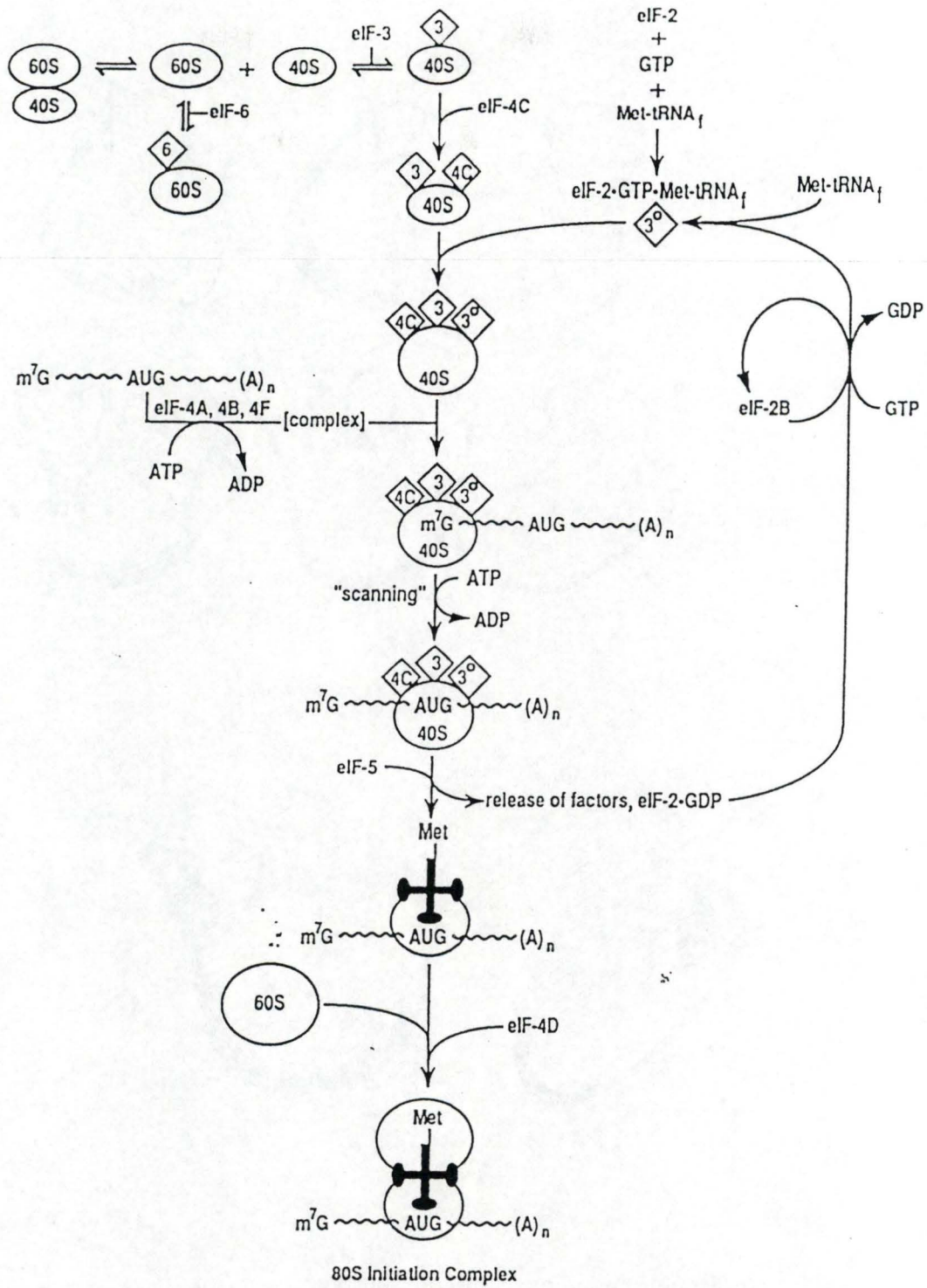


Figure 4: Initiation de la traduction chez les eucaryotes (Merrick *et al.*, 1992).
 L'initiation de la traduction débute chez les eucaryotes par le scanning de l'ARNm jusqu'au premier AUG. Elle implique l'intervention de nombreux facteurs protéiques.

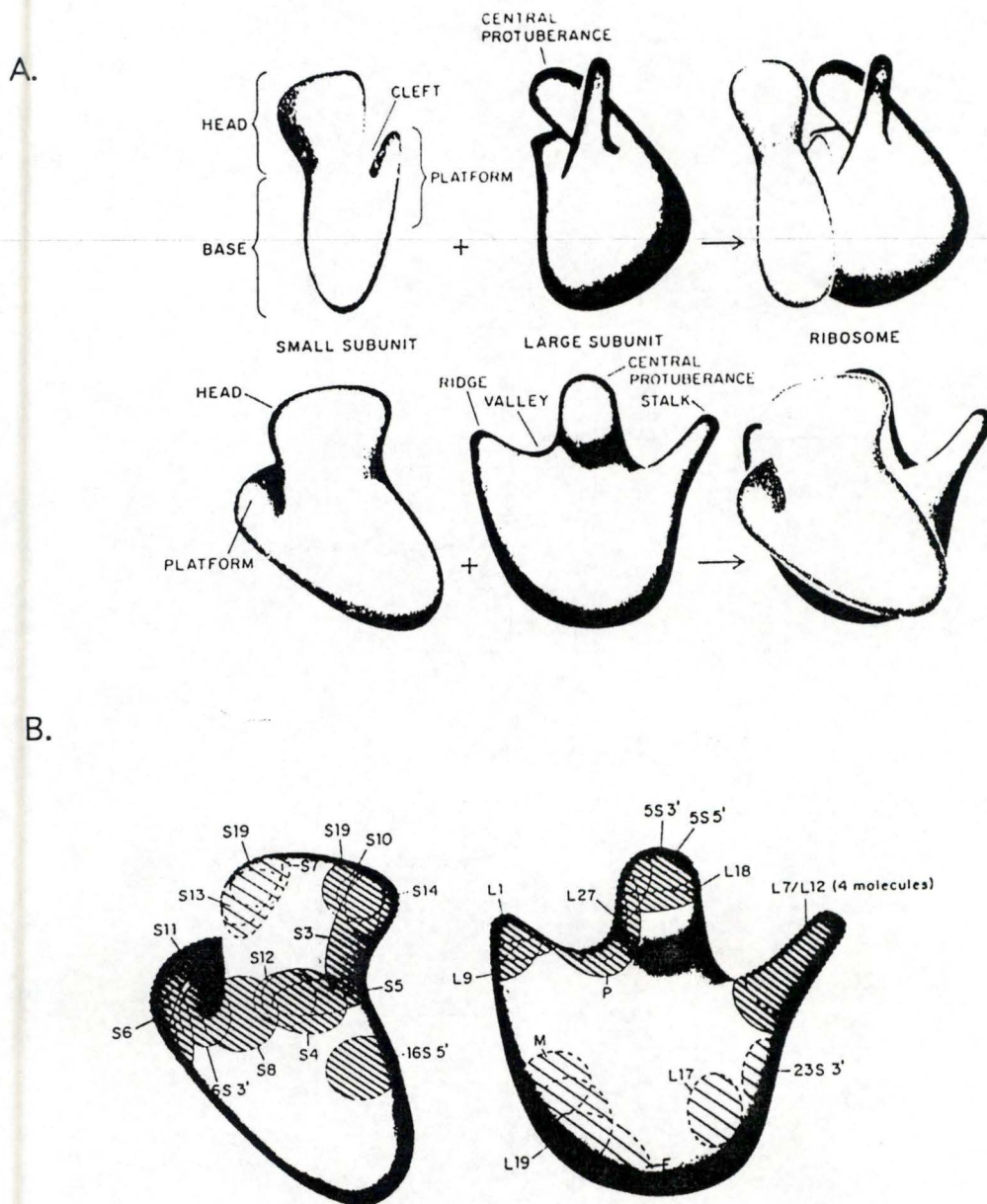


Figure 5: A. Modèle en 3 dimensions du ribosome.

Ce modèle donne une forme asymétrique aux deux sous-unités ribosomiques.

La petite SU (gauche) comprend, une tête, une base et une plate-forme.

La grande SU (seconde à partir de la gauche) comprend, une protubérance centrale flanquée par une excroissance d'un côté et une crête de l'autre. Deux orientations du modèle sont présentées.

B. Localisation des sites protéiques sur le ribosome.

Les sites légèrement ombrés sont situés sur le côté éloigné du ribosome.

P= peptidyltransférase, M= membrane binding, E= nascent protein exit sites, S= petite SU, L= grande SU, 16 S 5'= ARNr 16 S extrémité 5'

Malgré les spécificités concernant l'initiation de la traduction, le ribosome conserve, à travers les règnes procaryotes-eucaryotes, un rôle semblable, celui du traducteur universel. Aussi les bases moléculaires des caractéristiques spécifiques des ribosomes procaryotes et eucaryotes sont à rechercher, mais face à la conservation générale de fonction, on s'attend à retrouver une conservation de structure.

4. Le ribosome: une machinerie ribonucléoprotéique bien conservée

(The ribosome : structure, function, and evolution / edited by Walter E. Hill *et al.*, 1990)

Tous les ribosomes peuvent être dissociés en deux sous-unités, l'une ayant plus ou moins le double de la taille de l'autre. Chaque sous-unité est composée d'un ARNr de haut poids moléculaire, ARN majeur, auquel sont associées de nombreuses protéines ribosomiales généralement présentes en un seul exemplaire (fig.5.B).

La grande sous-unité contient en plus de sa molécule d'ARN majeur, une ou deux petites molécules d'ARNr appelées ARN mineurs. La nature des ARNr mineurs et majeurs diffère en fonction de l'organisme au sein duquel on se trouve (fig.6). Ainsi, l'ARN 5S est présent chez tous les ribosomes exceptés ceux de mitochondries. L'ARN 5.8 S caractérise les ribosomes cytosoliques eucaryotes et le 4.5 S les ribosomes de chloroplastes de plantes supérieures. On retrouve en plus dans la grande sous-unité des ribosomes cytoplasmiques eucaryotes, l'ARN 5.8 S dont la séquence est semblable à celle de l'extrémité 5' terminale de l'ARN 23 S des procaryotes.

Les protéines ribosomiales se lient aux molécules d'ARNr majeurs et mineurs à des sites particuliers et dans un ordre défini, l'assemblage successif de ces protéines se fait selon un mode coopératif. La position à laquelle se lie la protéine sur l'ARNr peut être définie en déterminant les parties de l'ARN qui sont protégées du clivage par des nucléases. De telles expériences donnent une carte linéaire des sites de liaisons sur l'ARNr. Une caractéristique commune des sites de liaisons aux protéines est la présence de structures secondaires, étant le plus souvent une hairpin.

Bien que les ribosomes eucaryotes soient plus grands que les ribosomes procaryotes, et qu'ils contiennent généralement plus de protéines ribosomiales et des ARNr de tailles plus élevées, la structure secondaire des ARNr et vraisemblablement la structure tertiaire, comme la conformation et les relations entre les deux sous-unités ribosomiales, sont généralement bien conservées entre ribosomes eucaryotes et procaryotes.

Figure 6: Ribosomes, sous-unités ribosomiques et ARNr chez les procaryotes et les eucaryotes

Groupe	Ribosome intacte	Sous-unités ribosomiques	ARNr	Nombre de nucléotides
Procaryotes	70 S	30S	16 S	1480-1540
		50 S	23 S	2900-2930
Eucaryotes	80 S	40 S	5 S	116-120
			18 S	1790-1900
		60 S	28 S	3400-4700
			5.8 S	158-163
		5 S	116-121	

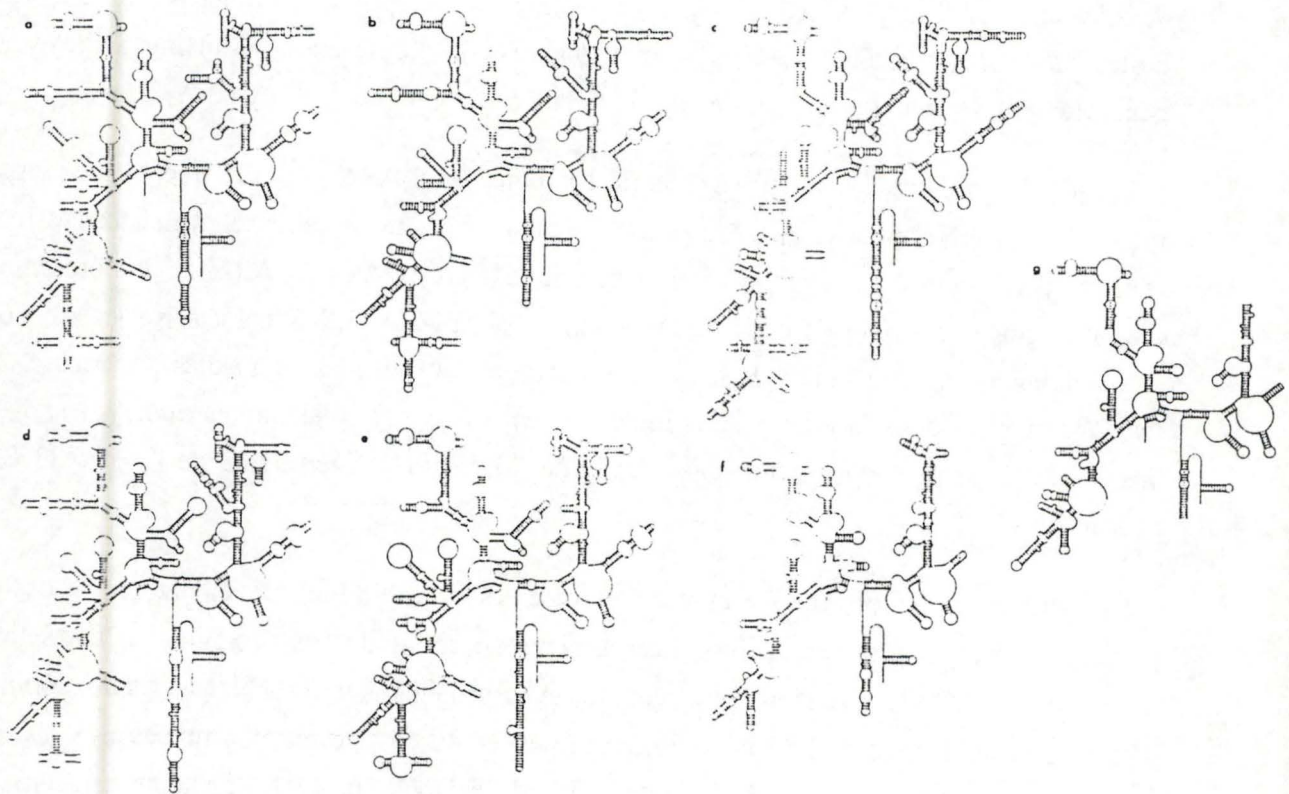


Figure 7: Comparaison phylogénétique de la structure secondaire des ARNr 16 S "like"

A. Sont présentés, (a) eubactérie (*E.coli*), (b) archéobactérie (*Halobacterium volcanii*), (c) eucaryote (levure), (d) mitochondrie de plante (maïs), (e) mitochondrie d'eucaryote inférieur (*Aspergillus*), (f) mitochondrie de mammifère (bovin).

B. Une structure minimale ou "core", montrant les éléments de la structure secondaire universellement conservés est présentée en g.

4.1 Les structures secondaires des ARNr

Les ARNr jouent un rôle majeur dans la biogenèse du ribosome en liant de façon séquentielle les protéines ribosomiales.

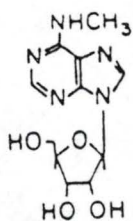
Ils interviennent également dans les processus de la traduction, en se liant comme c'est le cas chez les procaryotes, avec des séquences situées sur les ARNm (séquence Shine Dalgarno) et en permettant ainsi l'initiation de la traduction.

Comme il a déjà été dit, une caractéristique constante des sites de liaisons aux protéines ribosomiales ou aux séquences de l'ARNm est la présence de structures secondaires qui vont influencer la conformation générale du ribosome. Une preuve de l'importance de ces structures secondaires est le fait que certaines protéines ribosomiales ne se lient pas à l'ARNr libre, mais s'y fixent seulement s'il est déjà lié à d'autres protéines, démontrant le caractère coopératif de l'assemblage et l'importance de la conformation du site de liaison pour la poursuite du processus d'assemblage.

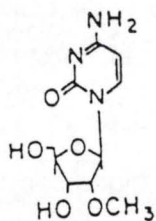
Bien que la séquence de l'ARNr puisse être utilisée pour prévoir sur une base thermodynamique la formation de régions d'appariement des bases, il existe pour des molécules de tailles aussi importantes que les ARNr plusieurs configurations possibles. Il est donc impossible, par cette méthode, de savoir quelle configuration sera adoptée par la molécule d'ARNr.

L'approche la plus productive dans la prédiction de la structure secondaire est l'approche phylogénétique c'est à dire la comparaison des séquences d'organismes apparentés. Les régions importantes dans les structures secondaires sont conservées; ainsi, si une paire de bases est importante dans la formation d'une hairpin, en comparant deux séquences d'ARNr similaires mais non identiques, le changement d'une base sur un des deux brins dans la région supposée en double hélice sera compensé par le changement de la base complémentaire sur le brin opposé (mutation compensatoire), de telle sorte que l'appariement soit conservé. A partir de telles comparaisons, des modèles de structures secondaires ont été élaborés pour les ARN 16 S et 23 S.

Fait sur la base de la comparaison de nombreux ARN majeurs de petites sous-unités ribosomiales (SSU-ARNr), le modèle de l'ARN 16 S présente quatre domaines principaux dont moins de la moitié de la séquence est constituée de bases appariées. Les résultats obtenus par Robin R. Gutell (Gutell *et al.*, 1985) mettent en évidence une conservation entre la structure secondaire des SSU-ARNr au cours de l'évolution (fig.7).



N⁶-Methyladenosine
(m⁶A)



2'-O-Methylcytidine
(Cm)

Figure 8: Représentation des nucléotides méthylés.

m⁶ = nucléotide méthylé en position 6 de l'adénine.
Cm = nucléotide méthylé en position 2' du ribose.

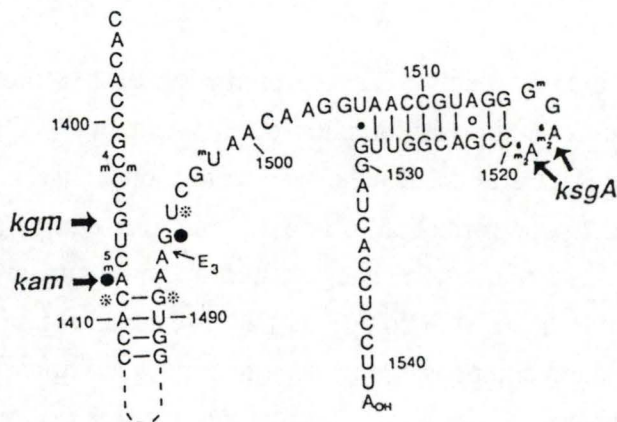


Figure 9: Sites auxquels la méthylation confère une résistance aux antibiotiques (Cundliffe, 1990).

Kgm, la Kanamycine-gentamicine résistance méthylase de *Micronospora purpea*.
Kam, Kanamycine-aprapycine résistance méthylase de *Streptomyces tenjimariensis*.
KsgA, sites auxquels l'absence de méthylation est liée à la résistance à la kasugamycine .

On définit comme le "core" du ribosome l'ensemble des régions de l'ARNr qui présentent une grande conservation de leur structures secondaires à travers l'évolution et qui à ce titre paraissent essentielles au fonctionnement normal du ribosome (fig.7.B).

4.2 La méthylation: modification post-transcriptionnelle des ARNr

Les ARNr sont souvent sujets à des modifications post-transcriptionnelles, parmi lesquelles figurent la méthylation (Shah *et al.*, 1978). La majorité des méthylations sont présentes au niveau des structures secondaires extrêmement conservées du ribosome, le "core". Cela laisse supposer qu'elles jouent un rôle central dans la structure et la fonction des ARNr.

La méthylation peut affecter les nucléotides soit au niveau de leurs riboses en position 2'-O soit au niveau de leurs bases (fig.8).

De nombreux nucléotides modifiés rencontrés sur les ribosomes procaryotiques ne sont pas conservés sur les ribosomes eucaryotiques. En effet, chez les procaryotes, la majorité des nucléotides méthylés le sont au niveau de leurs bases. Il a souvent été possible de mettre en relation la présence de la base modifiée avec la résistance ou la sensibilité du ribosome procaryote à un antibiotique inhibant de façon spécifique une ou plusieurs étapes de la synthèse protéique (fig.9). Par contre, chez les eucaryotes, la méthylation rencontrée à plus de 90 % affecte les riboses en position 2'-O. Un rôle fonctionnel a été attribué aux bases modifiées de l'ARNr eucaryote dans la maturation des précurseurs des ARNr.

4.3 La double diméthylation m^6_2A m^6_2A de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique est extrêmement conservée

L'unique modification de bases conservée entre ribosome procaryote et ribosome eucaryote est la présence de deux adénines adjacentes diméthylées en position N⁶(fig. 10), ce qui constitue la séquence m^6_2A m^6_2A , présente au sommet de l'hélice 45 du domaine IV, c'est-à-dire en position 1518 et 1519 sur l'ARNr 16 S de la petite sous-unité d'*E.coli* (Politz *et al.*, 1977).

Cette diméthylation est retrouvée de façon universelle à des sites homologues excepté chez les ribosomes de chloroplastes d'*Euglena gracilis* qui ne présentent qu'une seule des deux modifications et, chez les mitoribosomes qui eux, ne présentent aucune des deux diméthylations (fig.11).

La conservation à travers les deux règnes de cette diméthylation incite fortement à penser qu'elle est liée à un rôle biologique précis et important.

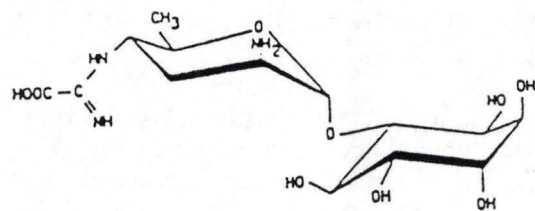


Figure 13: L'antibiotique kasugamycine (Van Gemen, 1989)

La kasugamycine est un antibiotique qui appartient au groupe des aminoglycosides. Cet antibiotique, isolé à partir de culture de *Sreptomycetes kasugaensis*, a initialement été découvert de par sa capacité d'inhiber la croissance d'un champignon (*Pericularia oryzae*). Son effet, qui demeure bactériostatique ne s'exerce qu'à des concentrations relativement élevées (50 µg/ml).

4.3.1 Rôle de la diméthylation $m^6_2A m^6_2A$ chez les procaryotes

L'existence d'un mutant bactérien non diméthylé a permis à l'équipe de feu le professeur P. H. Van Knippenberg et celle du Dr. J. Ofengand d'investiguer le rôle la diméthylation des adénines 1518 et 1519 chez *E.coli*.

L'absence des groupements méthyles chez le mutant résulte de la mutation inactivant le gène *KsgA*, gène codant pour la diméthylase responsable de cette modification post-transcriptionnelle (van Buul *et al.*, 1983). La méthyltransférase codée par le gène *KsgA* utilise la S-adénosyl-méthionine (SAM) comme donneur de méthyles et diméthyle l'ARNr 16 S de la sous-unité ribosomique 30S au cours de la phase finale de l'assemblage de celle-ci en particules ribonucléoprotéiques (van Buul *et al.*, 1985). Ceci laisse penser que la méthylation des bases est un événement qui se produit tardivement lors de la maturation du ribosome.

Rappelons que chez les procaryotes, le positionnement correcte du ribosome sur le codon initiateur nécessite une interaction entre une séquence consensus présente à l'extrémité 5' de l'ARNm et une séquence complémentaire présente sur l'extrémité 3' terminale de l'ARN 16 S.

Des expériences réalisées sur des fragments comprenant les cinquante nucléotides terminaux de l'extrémité 3' de l'ARNr 16 S (fragments obtenus par le clivage de l'ARNr par des bactériocines: colicine E 3 et cloacine DF 13) indiquent que les diméthyles facilitent l'interaction Shine Dalgarno et donc la mise en phase correcte du ribosome lors de l'initiation de la traduction. Cela, en déstabilisant la structure secondaire de l'hairpin sur laquelle ils se trouvent.

On a également suggéré que la séquence $m^6_2A m^6_2A$ pourrait contribuer à la formation d'un environnement hydrophobe nécessaire aux ajustements du mécanisme traductionnel.

L'idée actuellement admise est que la séquence $m^6_2A m^6_2A$ joue, chez les procaryotes un rôle dans l'initiation de la traduction, en facilitant l'interaction Shine Dalgarno entre le mRNA et l'ARNr 16 S (fig.12). Rôle qui n'est pas essentiel puisque le mutant *KsgA⁻* est viable.

L'absence des groupement méthyles sur les deux adénines confère un phénotype de résistance à un antibiotique de la famille des macrolides, la kasugamycine (fig.13).

Cet antibiotique inhiberait la synthèse protéique soit en empêchant la fixation de l'ARNt initiateur avec le complexe ARNm-sous-unité 30 S soit en libérant celui-ci du complexe. Ce dernier effet s'observe avec des SSU 30 S provenant aussi bien de souches mutantes que de souches sauvages. En fait la résistance ne se manifeste que si la sous-unité 50 S est présente,

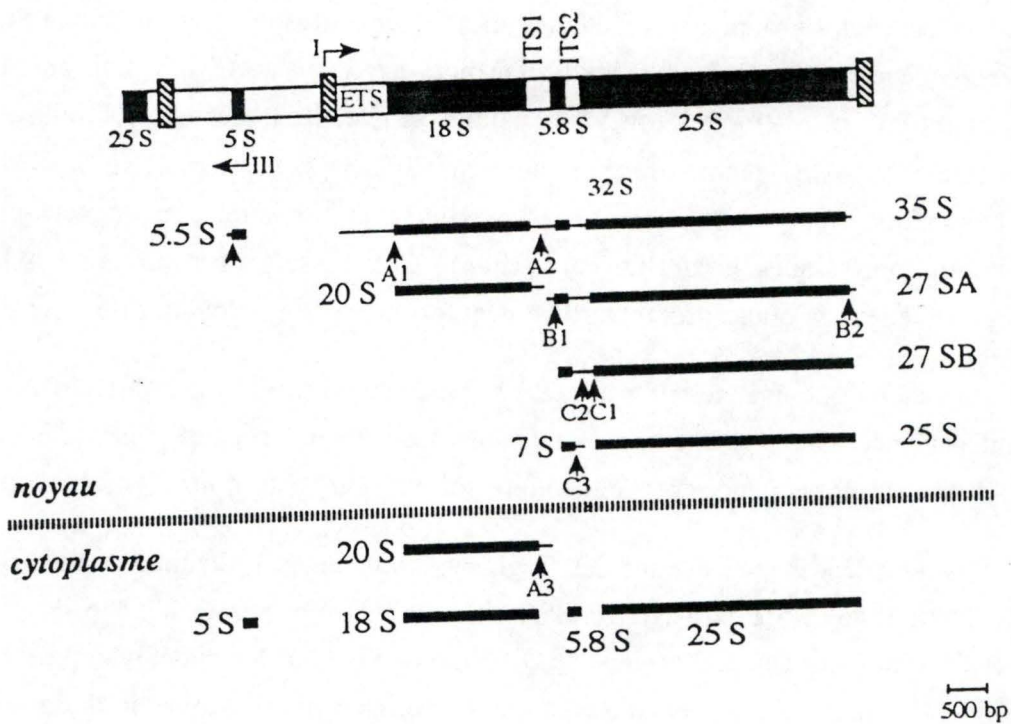


Figure 14: Structure et voie de biogénèse des précurseurs ribosomiaux chez la levure.
 La maturation des pré-ARNr passe par leur clivage en différents sites. Le clivage au site A3 Selon le modèle de Raué et Planta (1991), permettrait la production de l'ARNr 18 S à partir de son précurseur direct, le 20 S.

quelle que soit son origine. L'on sait également que la kasugamycine affecte la fidélité de la traduction.

Bien que les mutants résistants ne soient pas porteurs de la diméthylation, on ignore toujours si la diméthylation est directement impliquée dans la fixation de l'antibiotique sur le ribosome ou si cet effet s'exerce via l'interaction avec par exemple une protéine ribosomique.

4.3.2 Rôle de la diméthylation $m^6_2A m^6_2A$ est encore inconnu chez les eucaryotes

Le processus d'initiation de la traduction chez les eucaryotes n'impliquant pas d'interactions de type Shine Dalgarno mais le modèle dit de Kozak de "threading-scanning" du ribosome à partir de l'extrémité 5' terminale coiffée, la séquence $m^6_2A m^6_2A$ ne peut, chez ceux-ci, jouer le rôle décrit pour les procaryotes.

Dans le cadre des recherches du laboratoire sur le rôle chez les eucaryotes de cette diméthylation, le gène *DIMI* qui est l'homologue chez *S. cerevisiae* du gène *KsgA* d'*E. coli* a été cloné et caractérisé au laboratoire (Lafontaine *et al.*, 1994).

Ce gène est responsable de la diméthylation des deux adénines situées sur l'hairpin se trouvant à l'extrémité 3' terminale de l'ARNr 18 S de *S. cerevisiae*. *DIMI* est le premier gène eucaryote cloné impliqué dans une modification post-transcriptionnelle des ARNr.

La création d'une souche de levure mutée pour un des allèles du gène *DIMI* a démontré que chez *S. cerevisiae* *DIMI* est un gène essentiel (Lafontaine *et al.* 1994). Rappelons que chez les procaryotes, le phénotype $KsgA^-$ bien qu'il affecte la fidélité de la traduction et qu'il provoque une croissance réduite n'est pas létal pour la cellule.

La séquence $m^6_2A m^6_2A$ jouerait-elle chez les eucaryotes un rôle nouveau par rapport à celui qu'elle occupe chez les procaryotes dans le fonctionnement et la biogénèse du ribosome ou la létalité serait elle plutôt due à un autre effet du gène ?

Les défauts phénotypiques liés à la perte de la fonction du gène *DIMI* sont en cours d'étude. Un mutant conditionnel d'expression pour le gène de la diméthylase a été créé. Par ailleurs, un mutant *cis* a été obtenu où l'ARNr produit dans la cellule est modifié au site de diméthylation, les deux adénosines étant remplacées par deux guanosines.

Les observations en cours indiquent un défaut de maturation du pré-ARNr 20 S peut être causé par l'absence de clivage au site A3 (fig. 14) en l'absence de la diméthylase. Par contre, il

10	30	50
<p> MGKAAKKKYSGATSSKQVSAEKHLSSVFKFNTDLGQHILKNPLVAQGIVDKAQIRPSDVV </p>		
70	90	110
<p> LEVGPGTGNLTVRILEQAKNVVAVEMDPRMAAELTKRVRGTPVEKKLEIMLGDFMKTLP </p>		
130	150	170
<p> YFDICISNTPYQISSPLVFKLINQPRPRVSILMFQREFALRLRLARPGDSLYCRLSANVQ </p>		
190	210	230
<p> MWANVTHIMKVGKNNFRPPPQVESSVVRLEIKNPRPQVDYNEWGLLRIVFVRKNRTISA </p>		
250	270	290
<p> GFKSTTVMDILEKNYKTFLAMNNEMVDDTKGSMHDVVKEKIDTVLKETDLGDKRAGKCDQ </p>		
310		
<p> NDFLRLLYAFHQVGIHFS* </p>		

Figure 15: Séquence de la protéine DIM1p
 La région N-terminale riche en lysines est indiquée en gras sur la séquence

semble que le mutant cis fabrique des ribosomes complets, bien que non fonctionnels, ce qui suppose que Dim1p n'a pas pour seul rôle la diméthylation dans la formation et le fonctionnement du ribosome.

La présence à l'extrémité amino-terminale d'une extension riche en lysines (fig.15) sur la protéine Dim1p (Lafontaine *et al.*, 1994) pourrait jouer le rôle de signal d'importation nucléaire de la protéine (Garcia-Bustos *et al.*, 1991) et dès lors diriger l'importation de l'enzyme dans le compartiment nuclé(ol)aire (Warner., 1990).

Dim1p pourrait jouer le rôle de navette nucléo-cytoplasmique se déplaçant du cytoplasme vers le noyau puis revenant dans le cytoplasme fixé au pré-ARNr 20 S.

II. BUT DU TRAVAIL

II. BUT DU TRAVAIL

La diméthylation de deux adénosines adjacentes situées sur l'hairpin se trouvant à l'extrémité 3' terminale de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique est la seule modification d'ARNr conservée entre les procaryotes et les eucaryotes.

Le rôle de cette séquence $m^6_2A m^6_2A$ a été étudié chez *E. coli* par l'équipe du professeur P.H. van Knippenberg. Elle intervient dans l'initiation de la traduction en facilitant l'interaction de Shine Dalgarno entre l'ARNm et l'ARNr 16 S, cela en déstabilisant l'hairpin sur laquelle elle se trouve.

Le mécanisme d'initiation de la traduction étant chez les eucaryotes, indépendant d'interactions de type Shine Dalgarno, le rôle de la séquence $m^6_2A m^6_2A$ doit résider à un autre niveau.

Le gène *DIMI* de *S. cerevisiae* cloné au laboratoire (Lafontaine *et al.*, 1994) est responsable chez *S. cerevisiae* de cette double diméthylation sur l'ARNr 18 S. La disruption du gène a démontré son essentialité. D'autre part, la création d'un mutant *cis* et d'un mutant *trans* a permis de mettre en évidence un double rôle du gène *DIMI*. En effet, en absence de synthèse de diméthylase le processing des précurseurs de l'ARNr 18 S est interrompu. Si la synthèse est maintenue mais que la diméthylation authentique n'a pas lieu (mutant *cis*), le processing se produit, mais il y aurait un dysfonctionnement ribosomique dont résulterait le défaut de croissance observé chez ce mutant.

L'objectif poursuivi dans le cadre de ce mémoire est le clonage du gène de la diméthylase chez *Schizosaccharomyces pombe*.

La finalité poursuivie en clonant et en caractérisant un gène supplémentaire n'est pas de faire de la systématique moléculaire, mais bien d'augmenter le nombre de séquences disponibles afin de pouvoir y repérer les domaines et les régions conservées. Ces régions conservées jouent souvent un rôle fondamental (catalytique, domaine de liaison au substrat,...) dans l'activité de l'enzyme.

La comparaison avec des diméthylases procaryotes peut nous apporter des informations sur la présence de domaines intervenant dans la liaison de l'enzyme avec son substrat et avec la S-adénosyl-méthionine. Cependant, si comme on le pense, la diméthylase joue un ou plusieurs rôles différents et/ou supplémentaires chez les eucaryotes, ces nouvelles fonctions sont sans

doute assurées par des régions de la protéine que l'on ne retrouve pas chez les diméthylases procaryotes.

L'obtention de séquences de diméthylases provenant d'organismes eucaryotes distincts devrait donc nous permettre de définir, de localiser ces régions et dans un second temps d'en investiguer les rôles.

primer R3

ATGGGAAAGGCTGCGAAAAAGAAGTACTCCGGAGCAACTTCGTCCAAACAAGTCTCTGCCGAGAAACATTTGAGTTCAGT 80
TACCCTTCCGACGCTTTTCTTCATGAGGCCTCGTTGAAGCAGGTTTGTTCAGAGACGGCTCTTGTAAACTCAAGTCA

ATTTAAATTCAACACAGATCTAGGTCAGCATATTTTGAAAAATCCTTTGGTGGCGCAAGGTATTGTTGATAAGGCACAGA 160
TAAATTTAAGTTGTGTCTAGATCCAGTCGTATAAAACTTTTTAGGAAACCACCGGTTCCATAACAACCTATTCCGTGTCT

TTAGACCCTCAGATGTTGTTTTGGAGGTTGGTCTGGTACAGGTAACCTAACTGTAAGGATCCTCGAACAAGCAAAAAAC 240
AATCTGGGAGTCTACAACAAAACTCCAACCAGGACCATGTCCATTGGATTGACATTCCTAGGAGCTTGTTCGTTTTTTG

GTAGTGGCAGTAGAAATGGATCCCAGAATGGCTGCAGAATTAACCTAAGAGGGTACGTGGTACACCTGTGGAGAAAAAGTT 320
CATCACCGTCATCTTTACCTAGGGTCTTACCGACGTCTTAATTGATTCTCCCATGCACCATGTGGACACCTCTTTTTTCAA

AGAAATCATGCTTGGAGATTTTATGAAGACTGAATTACCATACTTTGATATCTGTATTAGTAACACTCCTTACCAGATCT 400
TCTTTAGTACGAACCTCTAAAATACTTCTGACTTAATGGTATGAACTATAGACATAATCATTGTGAGGAATGGTCTAGA

CATCGCCTCTGGTTTTCAAATTAATTAACCAACCAAGACCACCAAGAGTATCTATTCTTATGTTTTCAAAGAGAGTTTGCT 480
GTAGCGGAGACCAAAAGTTAATTAATTGGTTGGTTCTGGTGGTCTCATAGATAAGAATACAAAGTTTCTCTCAAACGA

TTAAGATTACTGGCAAGACCAGGTGACTCATTATACTGTAGATTATCCGCCAATGTACAAATGTGGGCTAATGTTACACA 560
AATTCTAATGACCGTTCTGGTCCACTGAGTAATATGACATCTAATAGGCGGTTACATGTTTACACCCGATTACAATGTGT

CATCATGAAAGTGGGTAAGAATAACTTCAGACCGCCACCACAAGTGAATCCAGCGTTGTTAGACTAGAGATTA AAAATC 640
GTAGTACTTTCACCCATTCTTATTGAAGTCTGGCGGTGGTGTTCACCTTAGGTCGCAACAATCTGATCTCTAATTTTTAG

CAAGACCGCAAGTGGATTACAACGAATGGGATGGTTTGTGAGAATCGTCTTTGTGAGGAAAAACAGAACGATTTTCAGCC 720
GTTCTGGCGTTCACCTAATGTTGCTTACCCTACCAACAACCTCTTAGCAGAAACACTCCTTTTTGTCTTGCTAAAGTCGG

GGCTTCAAATCGACCACCGTGATGGACATTCTGGAGAAGAATTATAAGACATTTTTGGCGATGAACAACGAAATGGTGGA 800
CCGAAGTTTAGCTGGTGGCACTACCTGTAAAGACCTCTTCTTAATATCTGTAAAAACCGCTACTTGTGCTTTACCACCT

primer F1

TGATACAAAGGGTTCTATGCACGATGTCGTCAAGGAAAAGATTGACACAGTTCTGAAGGAGACCGACTTAGGCGACAAAA 880
ACTATGTTTCCCAAGATACGTGCTACAGCAGTTCCTTTTCTAACTGTGTCAAGACTTCCTCTGGCTGAATCCGCTGTTTT

GAGCGGGTAAATGTGATCAAATGATTTCCCTAAGGCTATTATATGCTTTTACCAGGTTGGTATCCATTTTTTCATGA 960
CTCGCCCATTTACACTAGTTTTACTAAAGGATCCGATAATATACGAAAAGTGGTCCAACCATAGGTAAAAAGTACT

Figure 1: ORF du gène *DIM1*

Les primers F1 et R3 (séquence en italique) génèrent par PCR un fragment de 713 pb (primers compris) qui sera utilisé comme matrice pour la synthèse de la sonde DIM1

III. RESULTATS

III. RESULTATS

1. Choix de la stratégie de clonage par sonde nucléotidique

Les gènes de *Schizosaccharomyces pombe* sont généralement clonés par une des trois méthodes suivantes (Russel, 1989):

- Le clonage par hybridation avec une sonde d'ADN dite homologue, faite sur base du gène correspondant d'une autre espèce.
- La complémentation hétérologue d'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae*.
- La complémentation homologue d'un mutant de *Schizosaccharomyces pombe*.

Ne disposant pas de mutant pour le gène de la diméthylase chez ces deux levures, le clonage du gène chez *S.pombe* est envisagé par le criblage d'une banque de cDNA avec la sonde *DIMI* synthétisée à partir d'un fragment d'ADN de 713 pb de l'ORF du gène *DIMI* de *S.cerevisiae* (fig.1) précédemment cloné au laboratoire (Lafontaine *et al.*, 1994).

L'utilisation de sondes nucléiques a déjà permis le clonage de nombreux gènes chez *S.pombe* tels les gènes codant pour la calmoduline (Takeru *et al.*, 1987), les topoisomérases I et II (Uemara *et al.*, 1986) et les gènes des histones (Choel *et al.*, 1985). Son efficacité dépend grandement du degré d'homologie ou de conservation évolutive entre la sonde et le gène à cloner. Bien que *S.pombe* et *S.cerevisiae* soient deux espèces proches et que *S.cerevisiae* soit l'espèce la plus fréquemment utilisée pour le clonage par "cross-hybridation" chez *S.pombe*, il convient cependant de vérifier par Southern blot, la présence dans l'ADN de *S.pombe* de séquences répondant à la sonde que l'on veut utiliser pour le criblage.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

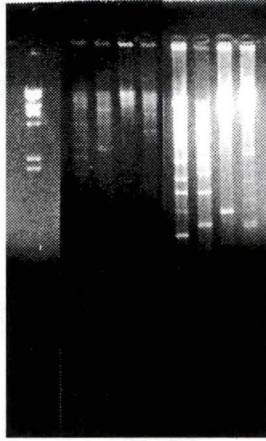


Figure 2: Validation par Southern blot de la méthode de clonage

- Piste 1: marqueur de taille λ restreint par *Hind*III
Piste 2 : génomique de FL100 restreint par *Eco*RI
Piste 3 : FL 100 restreint par *Hind*III
Piste 4 : FL 100 restreint par *Ssp*I
Piste 5 : FL 100 restreint par *Xba*I
Piste 6 : génomique de *S.pombe* restreint par *Eco*RI
Piste 7 : *S.pombe* restreint par *Hind*III
Piste 8 : *S.pombe* restreint par *Ssp*I
Piste 9 : *S.pombe* restreint par *Xba*I

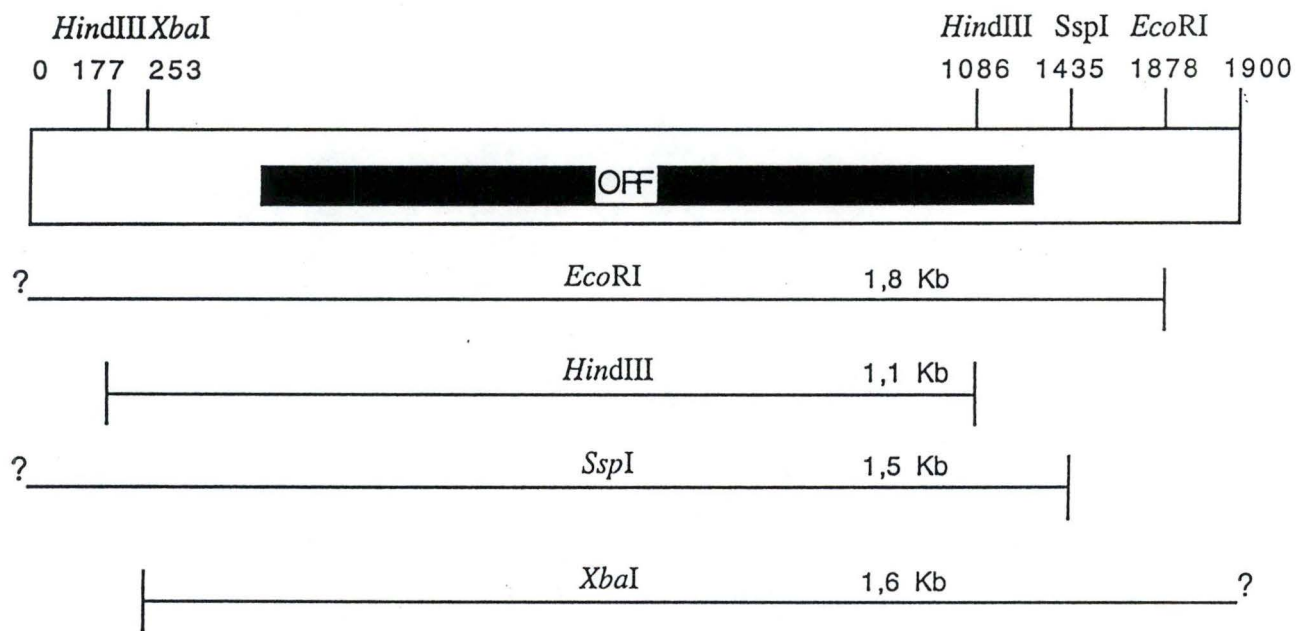


Figure 3: Carte de restriction de l'ORF et des régions génomiques avoisinant le gène *DIMI*.
 La position des sites de restrictions et la taille minimale des fragments (sur lesquels la sonde peut s'hybrider) qu'ils libèrent sont indiqués.



Figure 4 : Autoradiographie de la membrane du Southern
 Piste 1 : Génomique de FL100 restreint en *EcoRI*
 Piste 2 : FL100 restreint en *HindIII*
 Piste 3 : FL100 restreint en *Ssp I*
 Piste 4 : FL 100 restreint en *Xba I*
 Piste 5 : Génomique de *S.pombe* restreint en *EcoRI*
 Piste 6 : *S.pombe* restreint en *Hind III*
 Piste 7 : *S.pombe* restreint en *Ssp I*
 Piste 8 : *S.pombe* restreint en *Xba I*

2. Synthèse de la sonde et test préliminaire en Southern blot

2.1 Principe

La technique du Southern permet de s'assurer que la sonde *DIMI* synthétisée sur base de l'ORF du gène *DIMI* s'hybride à des fragments d'ADN génomique de *S.pombe*.

2.2 Synthèse de la sonde

La sonde utilisée est synthétisée par multiprimers labelling (matériel et méthodes) à partir d'un fragment de 713 pb (préalablement amplifié par PCR) de l'ORF du gène *DIMI* de *S.cerevisiae* (fig.1).

2.3 Réalisation du Southern blot

L'ADN génomique de *S.pombe* et de *S.cerevisiae* (souche Fl 100) restreint par les enzymes de restrictions suivants *EcoRI*, *HindIII*, *SspI* et *XbaI* est soumis à l'électrophorèse en gel d'agarose 1% (fig.2).

L'ADN est ensuite transféré sur un filtre de nylon et traité selon la procédure du Southern décrite dans le matériel et méthodes.

2.4 Résultats du Southern blot

La taille des fragments libérés par les différentes restrictions peut, chez *S.cerevisiae* (utilisé comme contrôle d'hybridation) être déduite de l'information dont nous disposons au sujet de la séquence du gène *DIMI* et de ses régions avoisinantes (fig.3). En ce qui concerne *S.pombe*, l'existence de fragments allumés par la sonde *DIMI* permet de confirmer la validité du choix d'une méthode de clonage par sonde oligonucléotidique.

Restriction *EcoRI*:

FL100: La bande attendue doit posséder une taille supérieure à 1878 pb (fig.3 et 4) et l'on peut voir que la sonde allume un fragment de l'ordre de 6.5 Kb.

S.pombe: La bande présente possède une taille d'environ 5.8 Kb.

Restriction HindIII:

FL100: La position des sites *HindIII* de part et d'autre de l'ORF permet de libérer un fragment de 1.1 Kb, fragment que l'on observe bien sur le Southern (fig.3 et 4)

S.pombe : La bande présente sur le Southern possède une taille de l'ordre de 2.6 Kb.

Restriction Ssp I:

FL100: La bande attendue doit posséder une taille supérieure à 1475 pb (fig.3 et 4) et l'on peut voir que la sonde allume un fragment de l'ordre de 12 Kb.

S.pombe : La bande présente sur le Southern possède une taille de l'ordre de 12 Kb.

Restriction XbaI:

FL100: La bande attendue doit posséder une taille supérieure à 1650 pb (fig.3 et 4) et l'on peut voir que la sonde allume un fragment de l'ordre de 9.4 Kb.

S.pombe : La bande présente sur le Southern possède une taille de l'ordre de 17 Kb.

2.5 Commentaires

Le but du Southern était de savoir si l'utilisation de la sonde hétérologue *DIMI* permettait d'allumer chez *S.pombe* des fragments correspondants au gène de la diméthylase.

Puisque l'on obtient des fragments d'ADN de *S.pombe* qui s'hybrident avec la sonde *DIMI*, l'on peut utiliser la sonde *DIMI* pour tenter le clonage par criblage d'une banque de cDNA du gène de la diméthylase chez *S.pombe*.

On observe que les patterns de restriction obtenus sont différents, ce qui est attendu pour des gènes homologues dans des organismes apparentés.

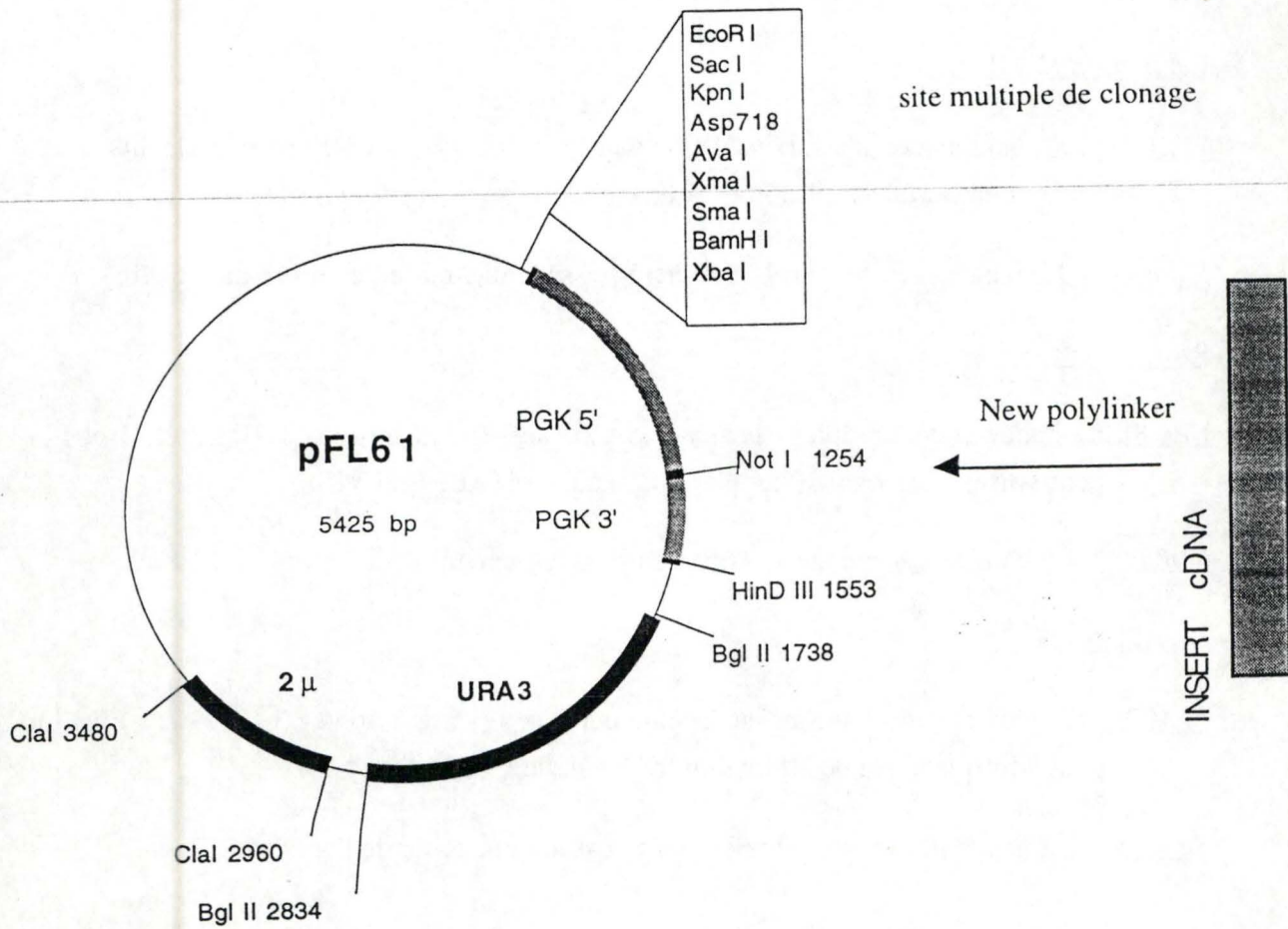


Figure 5: pFL61

Le pFL61 a été construit sur base du pUC 19 d'*E.coli*.

Il possède une cassette d'expression de cDNA constituée par le promoteur et le terminateur de la phosphoglycérate kinase séparé par le polylinker dans lequel est inséré le fragment de cDNA.

Il possède également le gène URA 3 de levure et l'origine de répliation 2μ.

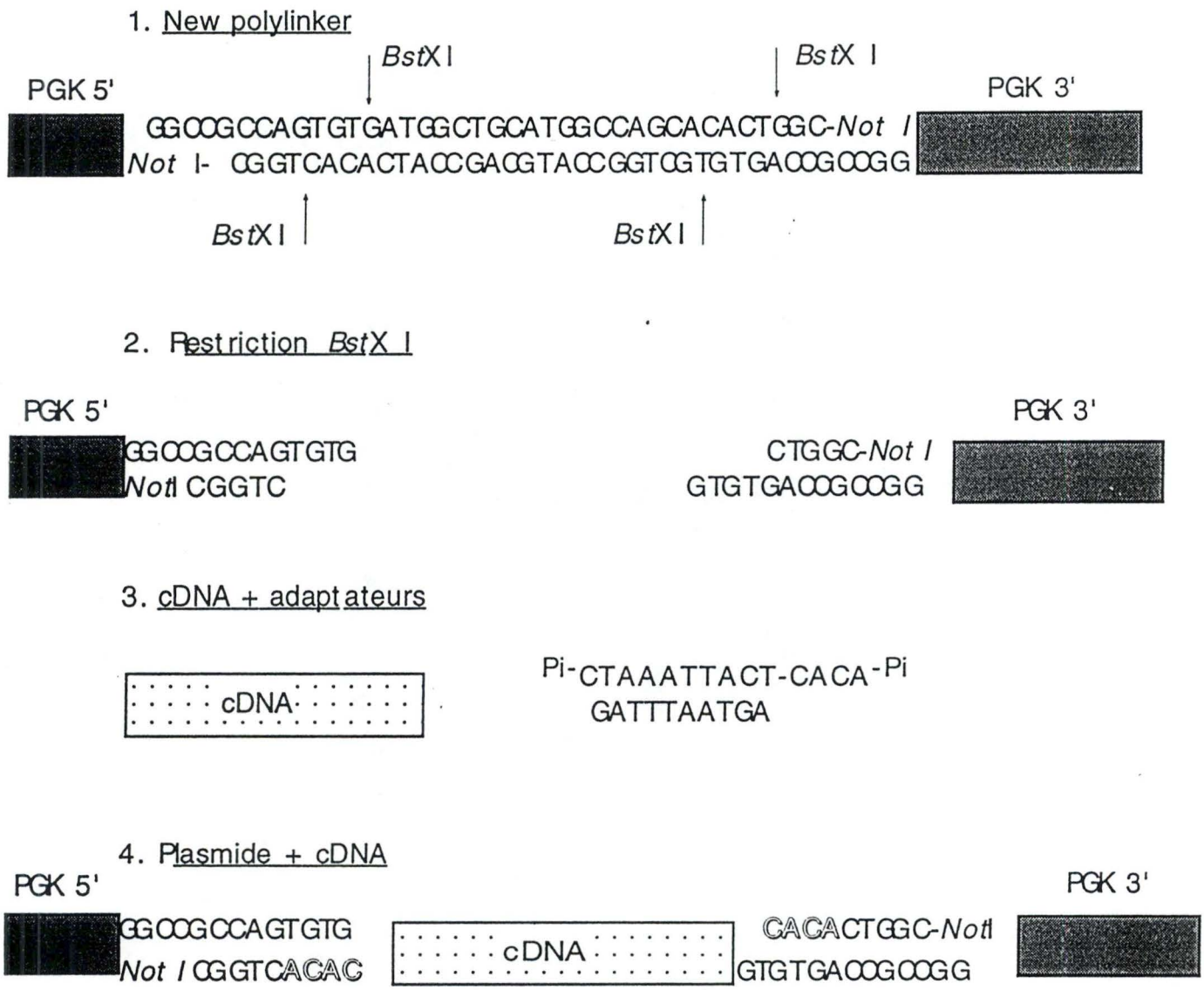


Figure 6 : Construction de la banque de cDNA

1. Un nouveau polylinker est introduit en *Not*I
2. Restriction *Bst*XI pour permettre l'insertion postérieure des cDNA
3. Les cDNA sont "ligués" avec des adaptateurs afin de permettre leur insertion dans le polylinker.
4. Le cDNA est "ligué" dans le polylinker, entre le promoteur et le terminateur de la PGK.

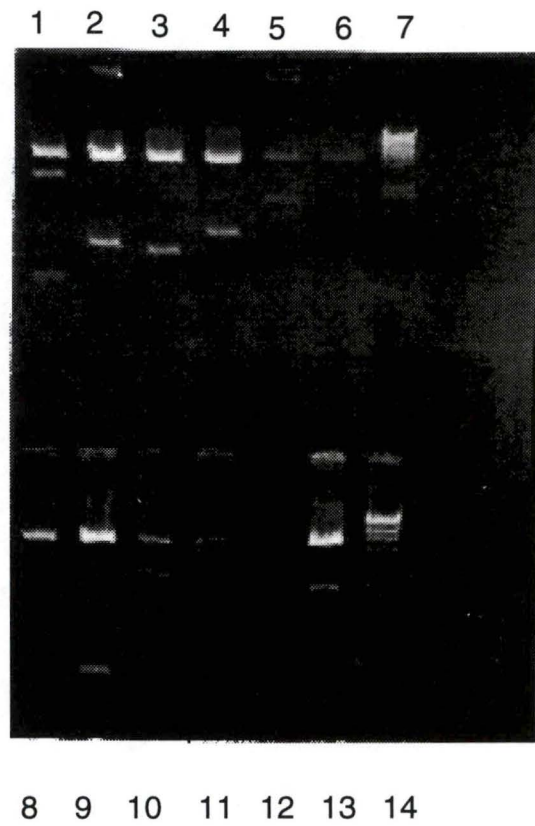


Figure 7: Vérification de la validité de la banque de cDNA
Piste 7 et 14 marqueur de taille λ restreint par l'enzyme *Hin* d III
Autres pistes: ADN plasmidique de 12 colonies prélevées au hasard restreint par l'enzyme *Not* I.

3. Clonage du gène

3.1 Caractéristiques de la banque de cDNA utilisée

3.1.1 Vecteur utilisé

Le vecteur utilisé pour la construction de la banque de cDNA est le pFL 61, dérivé du pFL 60 (Minet & Lacroute, 1992).

Ce vecteur possède le promoteur eucaryote de la Phosphoglycérate kinase (PGK) séparé de son terminateur par un polylinker, le marqueur de levure *URA3*, une partie de l'origine de réplication $2\mu\text{m}$ et la matrice du vecteur d'*E.coli* pUC 19 (fig.5).

Les cDNA auxquels des adaptateurs sont ajoutés sont introduit dans le polylinker (fig.6) (Aruffo & Seed, 1987).

3.1.2 Validité de la banque

3.1.2.1 Transformation de la souche XLI blue

La souche XLI blue d' *E. coli* est transformée par électroporation (matériel et méthodes) avec la banque de cDNA de *S.pombe*. Le résultat de la transformation est étalé sur une boîte LB + Amp à partir de laquelle sont prélevées au hasard 12 colonies.

3.1.2.2 Analyse des inserts

En vue d'apprécier la qualité de la banque, l'ADN plasmidique des 12 colonies prélevées au hasard est soumis au protocole de minipréparation (matériel et méthodes), restreint par l'enzyme *NotI* et analysé sur gel d'agarose 1% (fig.7). Les profils de restrictions de ces colonies montrent que 11 clones sur 12 contiennent un insert et que 10 de ces inserts sont différents. Cela permet aussi d'évaluer la taille des inserts qui varie de 0.7 à 2.9 Kb.

De façon plus précise:

- Deux clones contiennent un insert de taille supérieure à 2.5 Kb (pistes 1 et 10)
- Quatre clones contiennent des inserts compris entre 0.7 et 1.5 Kb (pistes 2, 3, 4, 8).

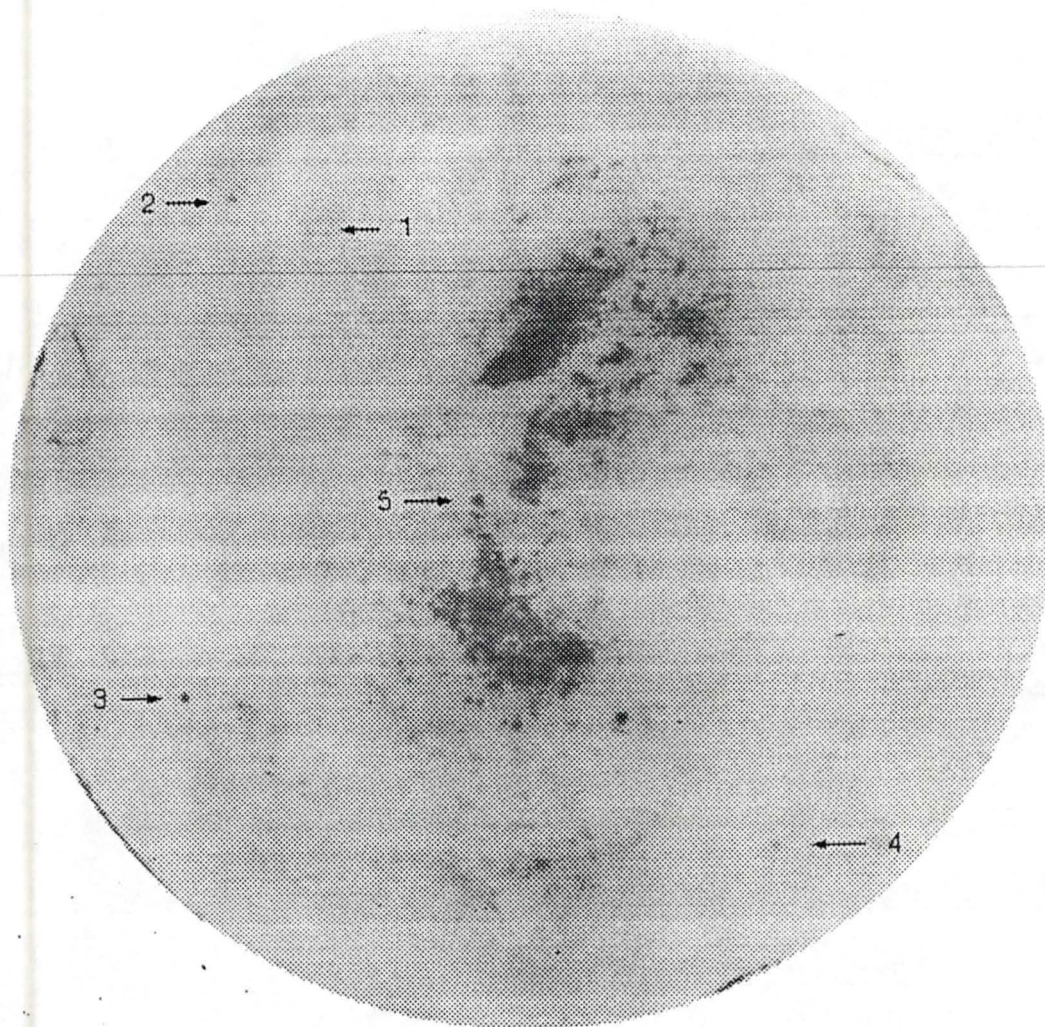


Figure 8: Autoradiographie du filtre correspondant à la boîte 2
La souche XL1blue a été transformée par la banque de cDNA de *S.pombe*.
Les colonies transformées sur filtres sont hybridées avec la sonde *DIM1*.
Sur la boîte 2 apparaissent clairement 5 régions positives qui seront repiquées sur les boîtes A et B

- Deux clones fournissent un même profil de restriction (pistes 9 et 11)
- Trois clones contiennent un insert d'environ 2 Kb (pistes 5, 6, 11)
- Un clone sans insert (piste 7)

Notre échantillon de la banque contient donc 10 clones valables et différents sur 12 ce qui représente une bonne proportion de clones transformés indépendants (80 %).

3.2 Criblage de la banque génomique

3.2.1 Transformation de la souche XLI blue par la banque de cDNA

La souche XLI blue d' *Escherichia coli* est transformée par d'électroporation avec la banque de *S. pombe*. On étale ensuite la souche transformée sur 5 boîtes LB + Amp en utilisant des dilutions donnant une densité de cellules d'environ 5.10^3 par boîte.

Les colonies sont transférées sur filtres de nylon, qui sont traités (matériel et méthodes) et hybridés avec la sonde *DIMI*. Les filtres sont ensuite lavés et autoradiographiés.

3.2.2 Résultats des différentes étapes de criblage

3.2.2.1 Première étape du criblage

Des colonies s'allument de façon plus intense sur l'autoradiographie correspondant à la boîte 2 (fig 8), les autres boîtes ne donnent aucuns résultats. Cinq spots sont repérés. On délimite une région autour du spot et, à partir de la boîte mère, on procède, pour chaque spot, à des repiquages répétés des colonies visibles et isolées sur deux boîtes que l'on nomme A et B.

boîte A: Spots provenant des régions 1 et 2 de la boîte 2

boîte B: Spots provenant des régions 3 à 5 de la boîte 2

Sur chaque boîte est ajoutée une ligne de cellules *E. coli* transformées par un plasmide sans insert, jouant le rôle de contrôle négatif, pour vérifier que le gène *KsgA* d'*E. coli* n'est pas allumé par la sonde *DIMI*.

Pour les deux boîtes, les étapes de transfert des colonies sur filtre, de lyse, d'hybridation et d'autoradiographie sont répétées.

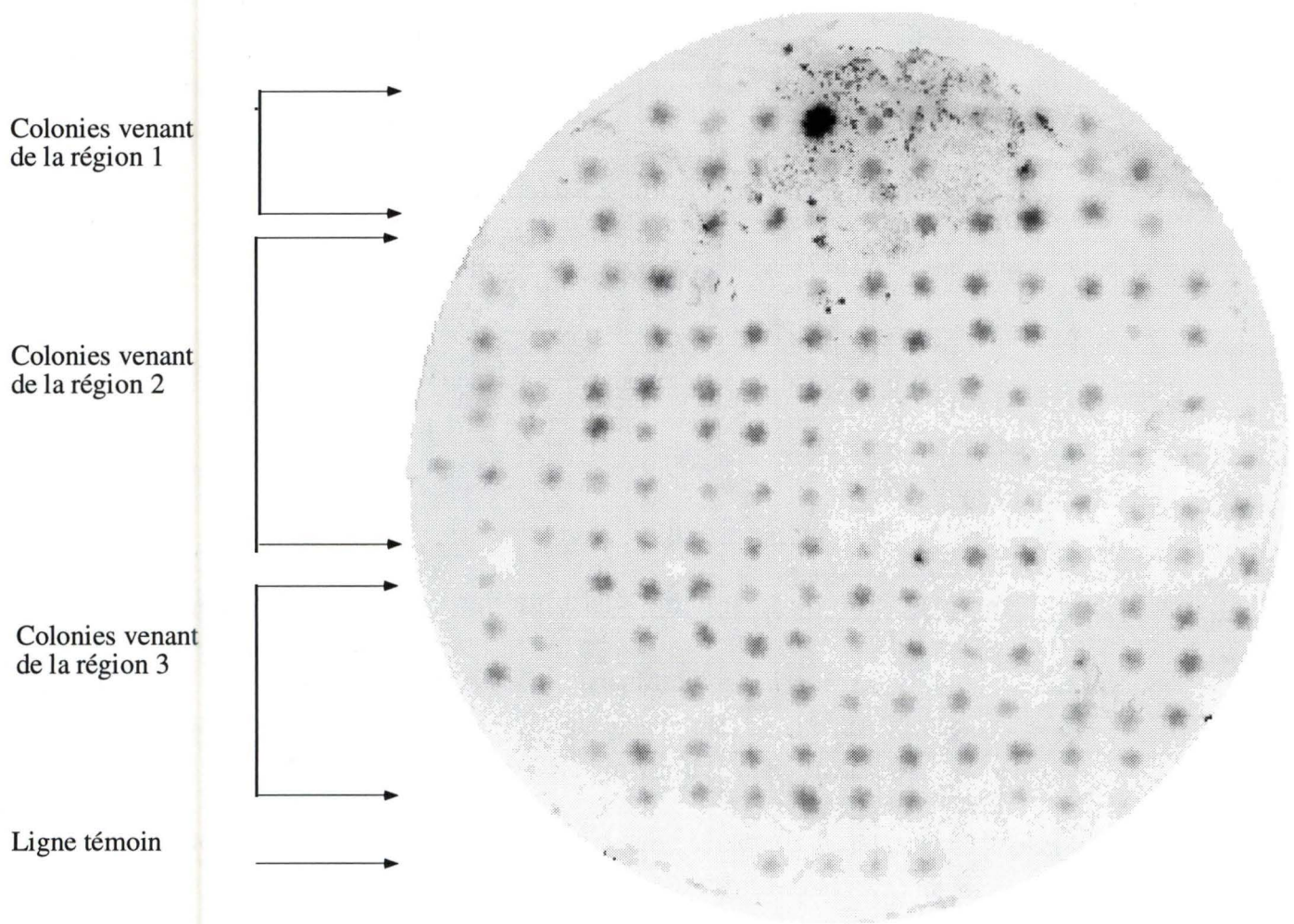


Figure 9: Autoradiographie du filtre correspondant à la boîte A

Boîte sur laquelle sont repiquées les colonies venant des régions 1, 2 et 3 de la boîte numéro 2.

La colonie la plus intense venant de la région 1 est le clone **pGIDD 1**

La dernière ligne est constituée de cellules XL1 blue transformées par un plasmide n'appartenant pas à la banque de *S.pombe*.

Elle joue le rôle de témoin négatif d'hybridation.

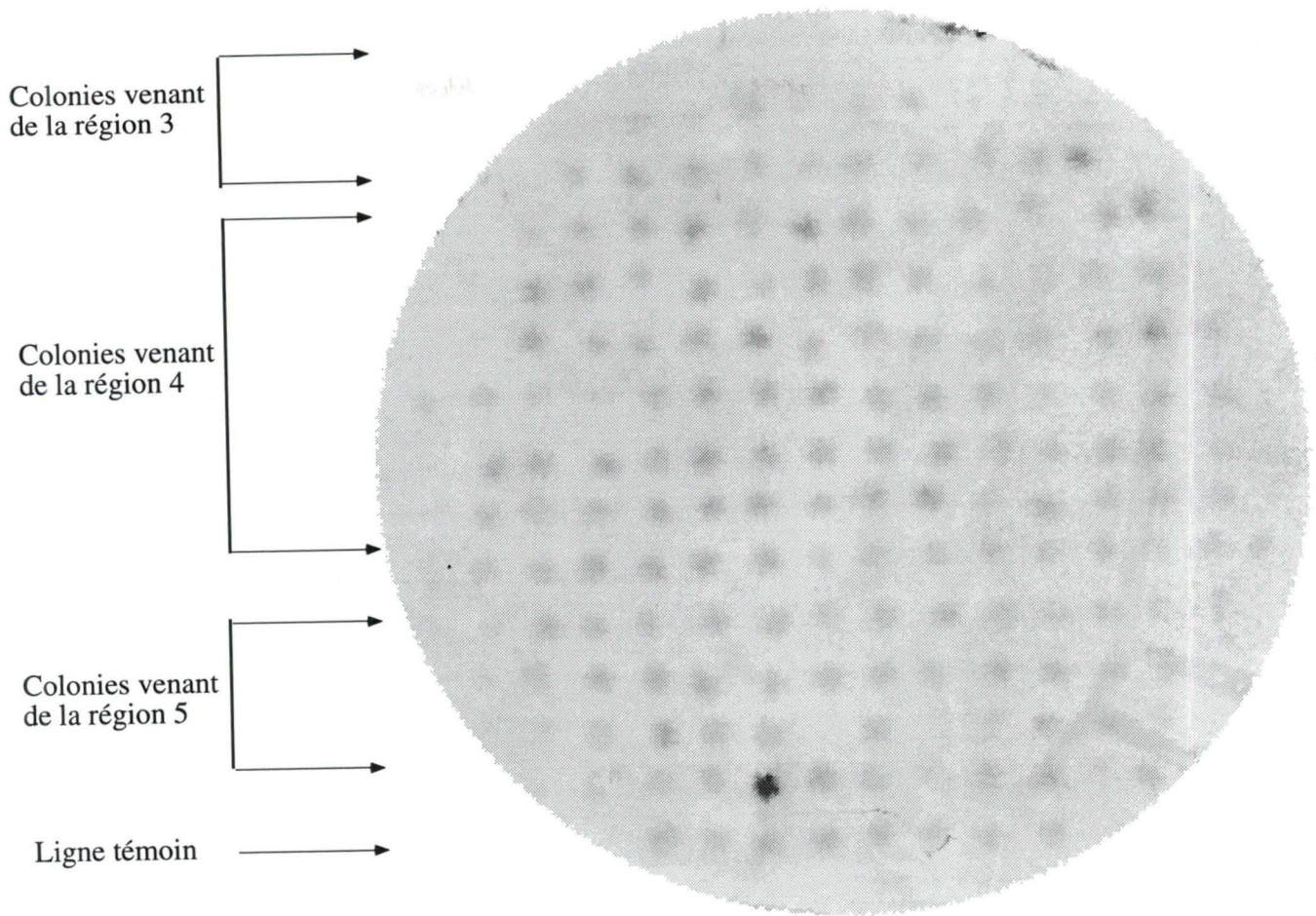


Figure 10: Autoradiographie du filtre correspondant à la boîte B

Boîte sur laquelle sont repiquées les colonies venant des régions 3, 4 et 5 de la boîte numéro 2.

La colonie la plus intense venant de la région 5 est le clone **pGIDD 3**

La dernière ligne est constituée de cellules XL1 blue transformées par un plasmide n'appartenant pas à la banque de *S.pombe*.

Elle joue le rôle de témoin négatif d'hybridation.



Figure 11 : Analyse de la taille des inserts du pGIDD 1 et du pGIDD 3

- Piste 1 : marqueur de taille λ restreint par l'enzyme *Hind* III
- Piste 2 : pGIDD 1 restreint en *Not* I
- Piste 3 : pGIDD 1 non restreint
- Piste 4 : pGIDD 3 restreint en *Not* I
- Piste 5 : pGIDD 3 non restreint

3.2.2.2 Deuxième étape de criblage sur les cellules repiquées

Deux colonies ressortent beaucoup plus que les autres sur les autoradiographies des boîtes A et B (fig.9 et 10).

- Une colonie venant de la région 1 de la boîte 2 et repiquée sur la boîte A.
- Une colonie venant de la région 5 de la boîte 2 et repiquée sur la boîte B.

Les deux colonies sont resuspendues dans 1 ml de LB liquide, la suspension est étalée sur boîte et les deux boîtes sont criblées comme *supra*. De cette dernière étape de criblage sont isolés deux clones.

Nous appellerons maintenant le clone purifié provenant de la boîte B **pGIDD 1**

le clone purifié provenant de la boîte C **pGIDD 3**

3.2.3 Taille des inserts

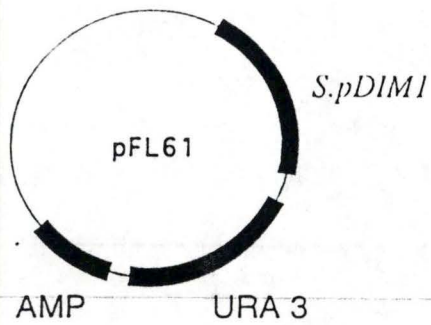
L'ADN plasmidique des deux candidats retenus par le criblage est restreint par l'enzyme *NotI*. Cet enzyme permet de ressortir l'insert complet (fig.5). Le produit de la restriction est mis sur gel d'électrophorèse, ce qui permet de voir qu'il s'agit de deux clones portant des inserts de tailles différentes.

La figure 11 nous montre que:

- Le **pGIDD 1** possède un insert de 1.2 Kb
- Le **pGIDD 3** possède un insert de 2.1 Kb

Disposant de cette information, il reste à savoir si les deux clones isolés possèdent l'activité enzymatique de la diméthylase. Une première approche de la question est le test de restauration de la sensibilité à la kasugamycine chez le mutant *KsgA⁻* d'*E.coli*.

A.

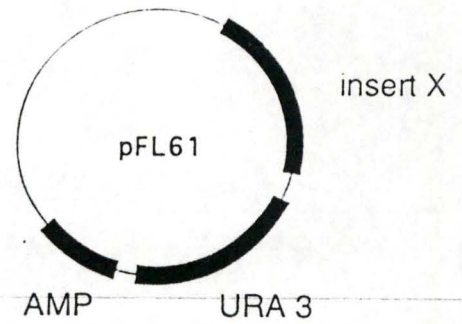


E.coli $KsgA^-$ et $pyrF^-$
 Résistante à la kasugamycine
 Auxotrophe pour l'uracile

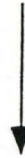


Ne pousse pas sur milieu minimum
 + kasugamycine

B.



E.coli $KsgA^-$ et $pyrF^-$
 Résistante à la kasugamycine
 Auxotrophe pour l'uracile



Pousse sur milieu minimum
 + kasugamycine

Figure 12 : Test de restauration de la sensibilité à la kasugamycine

- A. La transformation de la souche d' *E.coli* résistante à la kasugamycine par un plasmide issu de la banque génomique de *S.pombe* et porteur du gène de la diméthylase restaure la sensibilité à l'antibiotique.
- B. La transformation de la même souche par un plasmide porteur d'un insert quelconque ne restaure pas la sensibilité à la kasugamycine.

4. Test fonctionnel de complémentation hétérologue chez le mutant KsgA

4.1 Principe

La perte de la fonction non essentielle du gène *KsgA* dans le mutant DL101 d' *E. coli* entraîne chez celui-ci une résistance à la kasugamycine. Si après transformation de la souche DL101 par les deux plasmides isolés lors du criblage de la banque, on observe, par complémentation hétérologue, la restauration de la sensibilité à la kasugamycine, l'on disposera d'un argument fonctionnel solide indiquant que le gène de la diméthylase de *S.pombe* a bien été cloné (fig.12).

En effet, le fait que les 2 clones sélectionnés (pGIDD 1 et pGIDD 3) proviennent du criblage d'une banque avec une sonde faite sur base du gène *DIMI* réduit la possibilité que la restauration de la sensibilité à la kasugamycine soit médiée par un mécanisme autre que la diméthylation par complémentation hétérologue.

Le système utilisé ne se révélera valable que si et seulement si la protéine diméthylase de *S.pombe* est fonctionnellement homologue à celle de *E.coli* et active *in vivo*. La complémentation hétérologue entre *S.cerevisiae* et *E.coli* étant la stratégie qui a été utilisée pour le clonage du gène *DIMI*, il est raisonnable de penser que la complémentation entre *S.pombe* et *E.coli* fonctionne également pour ce gène.

4.2 Le pGIDD 3 restaure la sensibilité à la kasugamycine chez E.coli DL101

La souche DL101 d'*E.coli* est mutée dans le gène *KsgA* (et donc résistante à la kasugamycine) et disruptée pour le gène *PyrF*, l'homologue du gène *URA 3* de levure, ce qui la rend auxotrophe pour l'uracile.

Cette souche DL101 est transformée par les plasmides suivant:

pFL 44S: contrôle négatif (matrice seule).

pGIDL 301: contrôle positif (matrice avec insert porteur du gène *KsgA* d'*E.coli*).

pGIDD 1: plasmide portant l'insert de 1.2 Kb.

pGIDD 3: plasmide portant l'insert de 2.1 Kb.

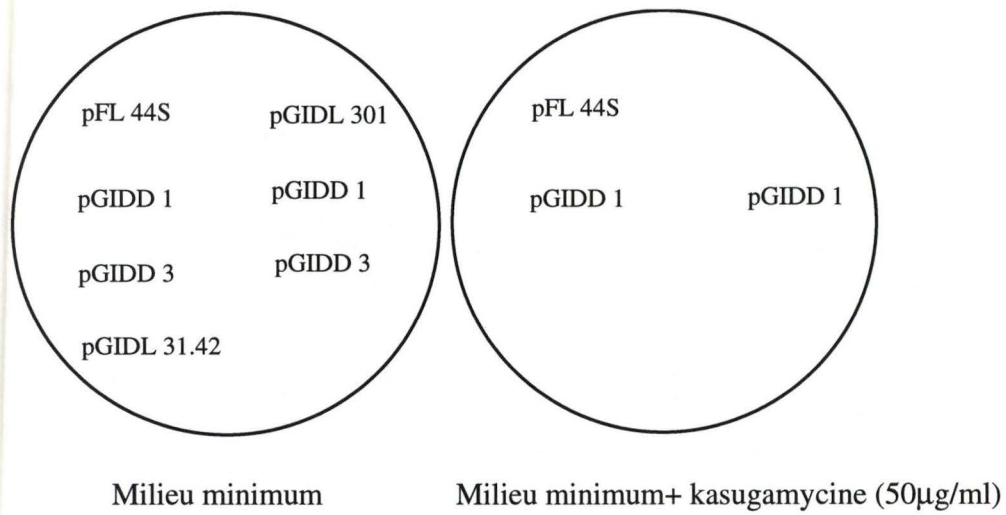


Figure 13 : Test de restauration de la sensibilité à la kasugamycine
 Sur milieu minimum, tous les transformants poussent.
 Sur milieu minimum + kasugamycine, les contrôles positifs représentés par le pGIDL 31.42 et le pGIDL 301 ne poussent pas.
 En ce qui concerne les deux plasmides candidats, seul le **pGIDD 3** restaure la sensibilité à la kasugamycine.

pGIDL 31.42: contrôle positif (matrice avec insert porteur du gène *DIMI* de *Saccharomyces cerevisiae*).

Des gouttes de suspension des différents transformants sont déposées sur deux milieux différents.

Milieu minimum: permet la sélection des transformants car la souche DL101 est auxotrophe pour l'uracile (PyrF) et tous les plasmides sont porteurs du gène *URA3*.

Milieu minimum + kasugamycine[50µg/ml]: sélectionne de façon négative les transformants à sensibilité à la kasugamycine restaurée.

Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant un ou deux jours.

Remarque: Les cellules porteuses d'un plasmide contenant un gène de la diméthylase verront leur sensibilité à la kasugamycine restaurée et ne pousseront donc pas sur le milieu contenant de la kasugamycine.

4.3 Résultats

Après deux jours de croissance sur les deux milieux, on observe les résultats suivants (fig.13):

Sur milieu minimum, tous les transformants poussent. En effet, le marqueur *URA 3* porté par le plasmide restaure la prototrophie pour l'uracile. Sur milieu minimum + kasugamycine, les résultats varient en fonction du gène porté par le plasmide transformant.

Les cellules transformées par le pFL 44S poussent sur milieu minimum + kasugamycine. En effet DL 101 étant kasugamycine résistante et le plasmide ne possédant aucun insert apte à modifier l'état de méthylation des adénosines 1518 et 1519 de l'hairpin de l'ARNr 16S d'*E.coli*, les cellules poussent sur milieu minimum + kasugamycine .

Les cellules transformées par le pGIDL 301 ne poussent pas sur milieu minimum + kasugamycine. Ce plasmide porte le gène *KsgA* d'*E.coli*, ce qui permet une diméthylation des adénosines 1518 et 1519 et donc une restauration de la sensibilité à la kasugamycine.

Les cellules transformées par le pGIDL 31.42 ne croissent pas sur milieu minimum + kasugamycine. Ce plasmide porte le gène *DIM1* de *S.cerevisiae*. Les deux adénosines sont ici diméthylées par complémentation hétérologue, cette diméthylation restaure la sensibilité à la kasugamycine.

La souche transformée par le pGIDD 1 croît aussi bien sur milieu minimum que sur milieu minimum + kasugamycine. Ceci permet donc de dire que ce clone ne restaure pas la sensibilité à la kasugamycine et ne contient donc pas de copie fonctionnelle de gène de la diméthylase.

Le pGIDD 3 pousse de façon normale sur milieu minimum mais, on n'observe pas de croissance sur milieu minimum + kasugamycine. Il est donc raisonnable de penser que ce clone possède un gène de diméthylase fonctionnel.

Tableau récapitulatif

Plasmides	Caractéristiques	Milieu minimum	Milieu minimum + kasugamycine [50µg/ml]
pFL 44S	contrôle négatif	+	+
pGIDL 301	porte le gène KsgA	+	-
pGIDD 1	insert de 1.2 Kb	+	+
pGIDD 3	insert de 2.1 Kb	+	-
pGIDL 31.42	porte le gène DIM1	+	-

4.4 conclusion

Les données qui précèdent suggèrent fortement que le clone pGIDD 3 isolé à partir d'une banque de cDNA de *S.pombe* contient une copie du gène de la diméthylase de *S.pombe*. En effet, isolé par hybridation sur colonies avec une sonde nucléotidique du gène *DIM1* de *S.cerevisiae* et d'autre part restaurant la sensibilité à la kasugamycine du mutant d' *E.coli* DL101, il répond à deux critères concordants d'homologie structurelle et fonctionnelle caractéristiques d'un plasmide portant un gène de diméthylase.

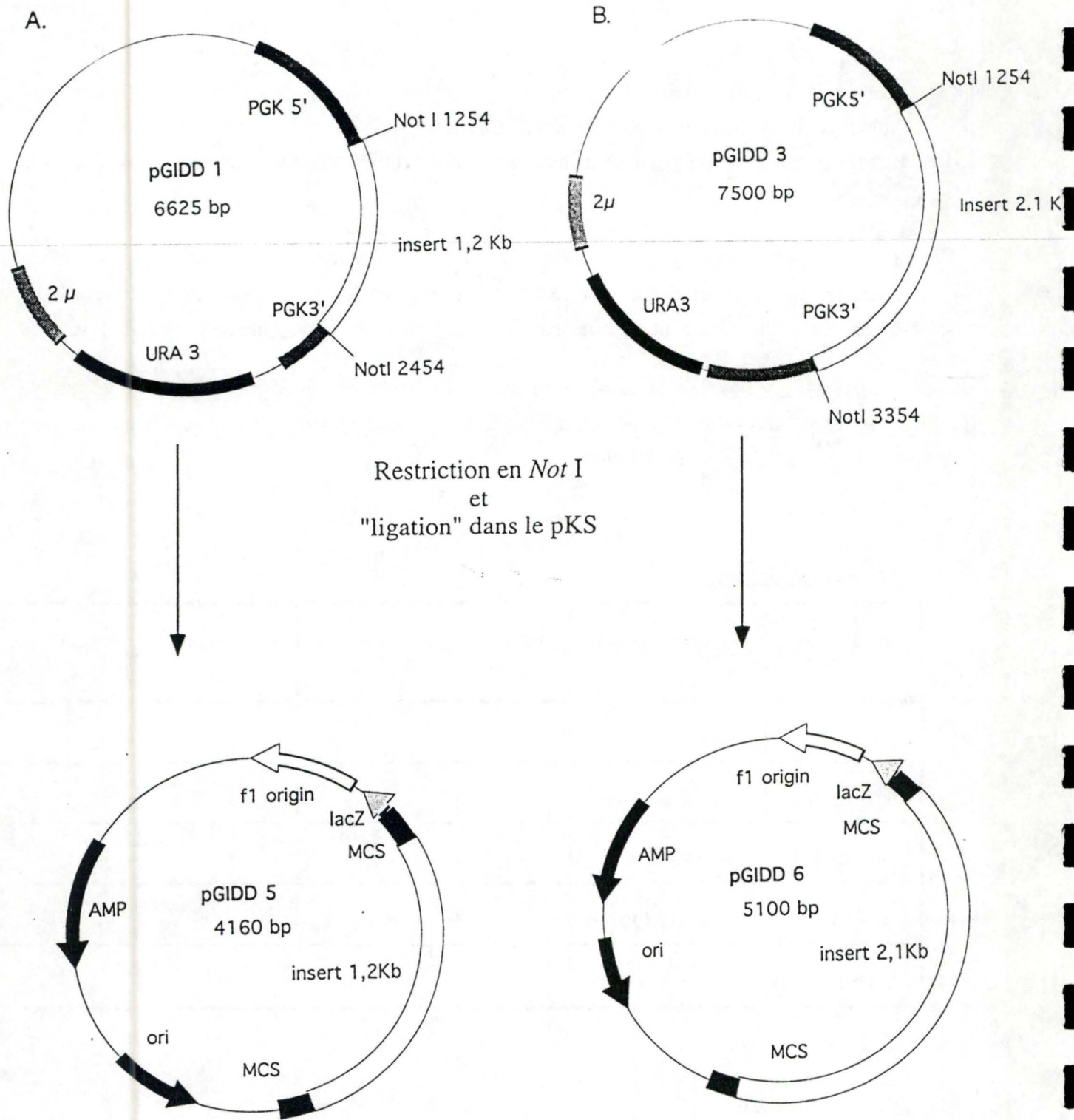


Figure 14: Construction du pGIDD 5 et du pGIDD 6

- A. Le pGIDD 1 est restreint par l'enzyme *Not* I, l'insert de 1.2 Kb libéré et "ligué" dans le pKS donne le pGIDD 5
- B. Le pGIDD 3 est restreint par l'enzyme *Not* I, l'insert de 2.1 Kb libéré et "ligué" dans le pKS donne le pGIDD 6

5. Caractérisation moléculaire des deux inserts

5.1 Carte de restriction du pGIDD 5 et du pGIDD 6

5.1.1 Préliminaires

Les deux inserts d'intérêts se trouvent dans le pFL61; de par sa construction, celui-ci est difficilement utilisable pour établir une carte de restriction des deux inserts d'intérêts. Les inserts ont en effet été "ligués" en dehors du site multiple de clonage (fig.5).

Un préliminaire à l'établissement d'une carte de restriction des deux inserts est leur transfert du pFL61 vers le vecteur pKS. Notons que ce transfert sera utile au séquençage.

5.1.2 Restrictions diagnostiques.

Les pGIDD 1 et pGIDD 3 sont restreints par l'enzyme de restriction *NotI* qui ressort complètement les deux inserts. Récupérés sur papier (matériel et méthode), ils sont ensuite "reliqués" en *NotI* du site multiple de clonage du pKS (fig. 14).

- L'insert de 1.2 Kb "reliqué" dans le pKS donne le pGIDD 5
- L'insert de 2.1 Kb "reliqué" dans le pKS donne le pGIDD 6

les pGIDD 5 et pGIDD 6 sont restreints par les divers enzymes de restrictions:

BamHI, *PstI*, *EcoRI* et *XbaI*, enzymes qui ont la caractéristique d'être présents en un seul exemplaire dans le site multiple de clonage du pKS. L'intérêt est que la taille des éventuels fragments de restriction obtenus, renseigne directement sur la position du site dans l'insert. En effet si le site est absent, le plasmide sera linéarisé, et si il est présent une seule fois, sa position sur l'insert correspondra à la taille du fragment libéré.

La restriction du pGIDD 5 ne met pas en évidence sur l'insert de 1.2 Kb la présence des sites *BamHI*, *EcoRI* et *XbaI*.

La restriction en *PstI* libère un fragment de 400 pb (fig.15 piste 4).

La restriction du pGIDD 6 ne met pas en évidence sur l'insert de 2.1 Kb la présence des sites *EcoRI* et *XbaI*.

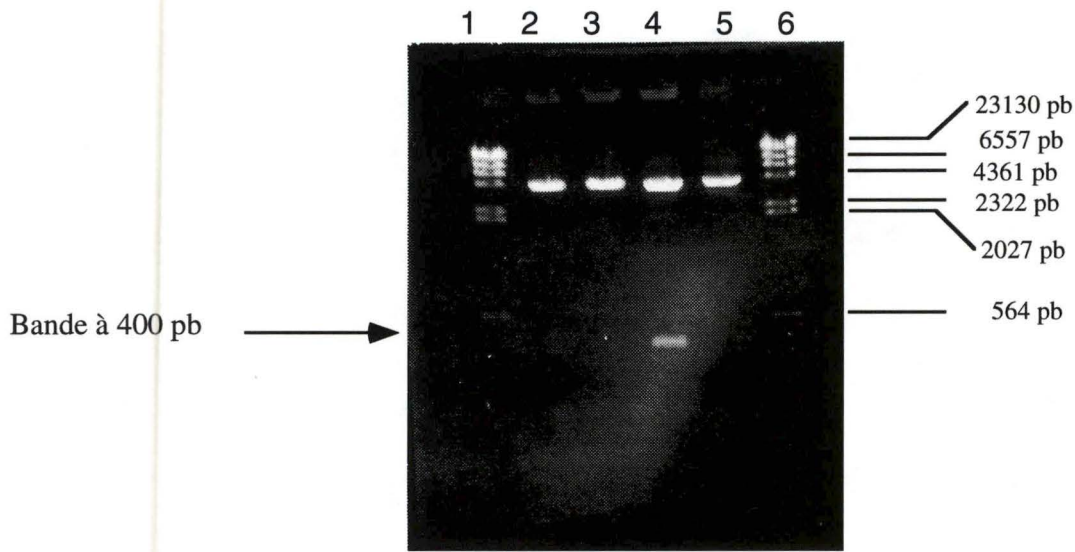


Figure 15 : Restriction du pGIDD 5

Piste 1 et 6 marqueur de taille λ restreint par l'enzyme *HindIII*
 Piste 2 : Restriction du pGIDD 5 par *BamHI*
 Piste 3 : Restriction du pGIDD 5 par *EcoRI*
 Piste 4 : Restriction du pGIDD 5 par *PstI*
 Piste 5 : Restriction du pGIDD 5 par *XbaI*

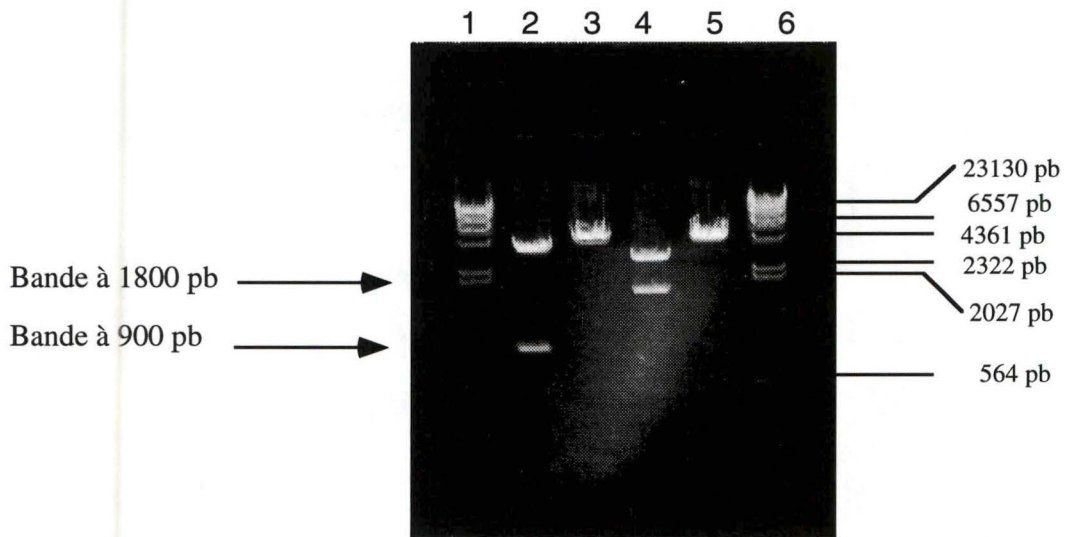


Figure 16 : Restriction du pGIDD 6

Piste 1 et 6 marqueur de taille λ restreint par l'enzyme *HindIII*
 Piste 2 : Restriction du pGIDD 6 par *BamHI*
 Piste 3 : Restriction du pGIDD 6 par *EcoRI*
 Piste 4 : Restriction du pGIDD 6 par *PstI*
 Piste 5 : Restriction du pGIDD 6 par *XbaI*

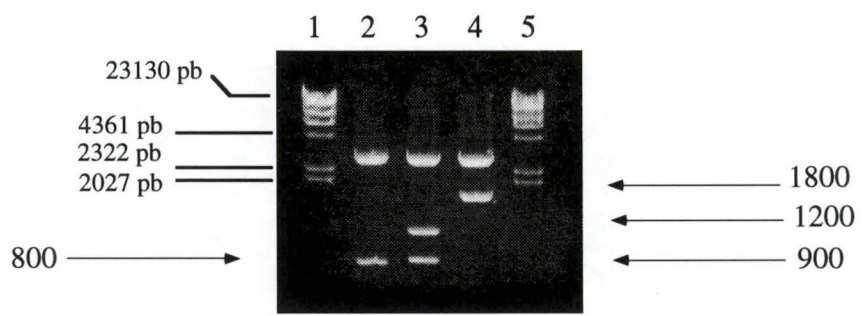


Figure 17 : Double restrictions des clones pGIDD 5 et pGIDD 6

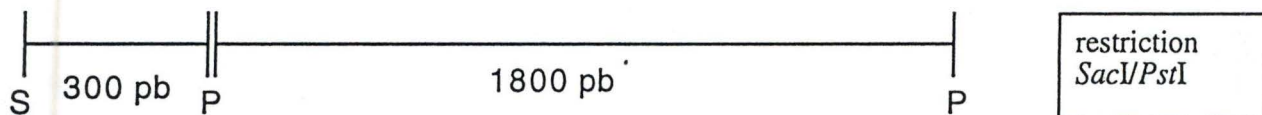
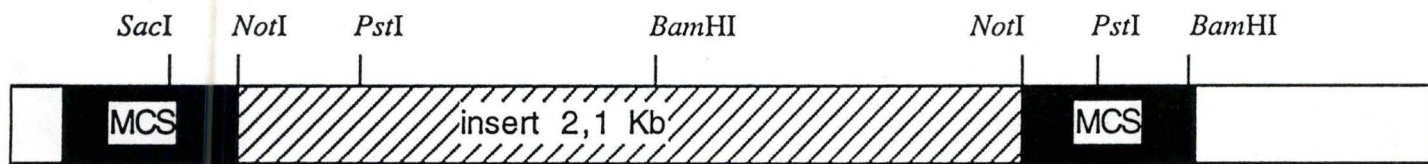
Piste 1 et 5 marqueur de taille λ restreint par l'enzyme *HindIII*

Piste 2: pGIDD 5 restreint en *PstI-SacI*

Piste 3: pGIDD 6 restreint en *BamHI-SacI*

Piste 4: pGIDD 6 restreint en *PstI-SacI*

pGDD 6

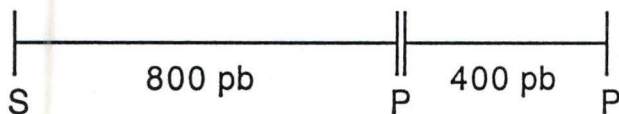
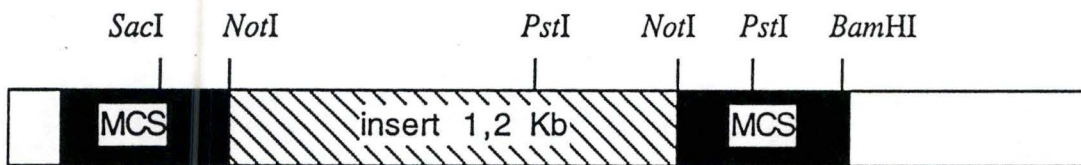


restriction
SacI/PstI



restriction
SacI/BamHI

pGDD 5



restriction
SacI/PstI

Figure 18 : Les résultats des cartes de restrictions

La comparaison des deux cartes de restrictions indique la parenté et l'orientation inverse des inserts dans les clones pGIDD 5 et pGIDD 6

La restriction *PstI* libère un fragment de 1800 pb (fig.16 piste 3).

La restriction *BamHI* libère un fragment de 900 pb (fig.16 piste 2).

La différence de taille entre les fragments *PstI* libérés par le pGIDD 5 (300 pb) et le pGIDD 6 (1800 pb) pourrait résulter d'une orientation inverse des inserts dans le site multiple de clonage du pKS.

L'utilisation du site *SacI* situé à l'opposé (par rapport à l'insert) des sites *BamHI* et *PstI* dans le site multiple de clonage permet de confirmer, grâce à la taille des fragments obtenus par double restriction, l'orientation inverse des deux inserts (fig.17 et 18).

Sur base de ces résultats, l'on peut dresser une carte de restriction sommaire des clones pGIDD 5 et pGIDD 6 (fig.18).

Comme on le vérifiera lors du séquençage, les deux clones sont bien apparentés. Le clone de 1.2 Kb est en orientation inverse dans le MCS du pKS par rapport à l'insert de 2.1 Kb et, il est écourté d'une région de plus ou moins 900 pb.

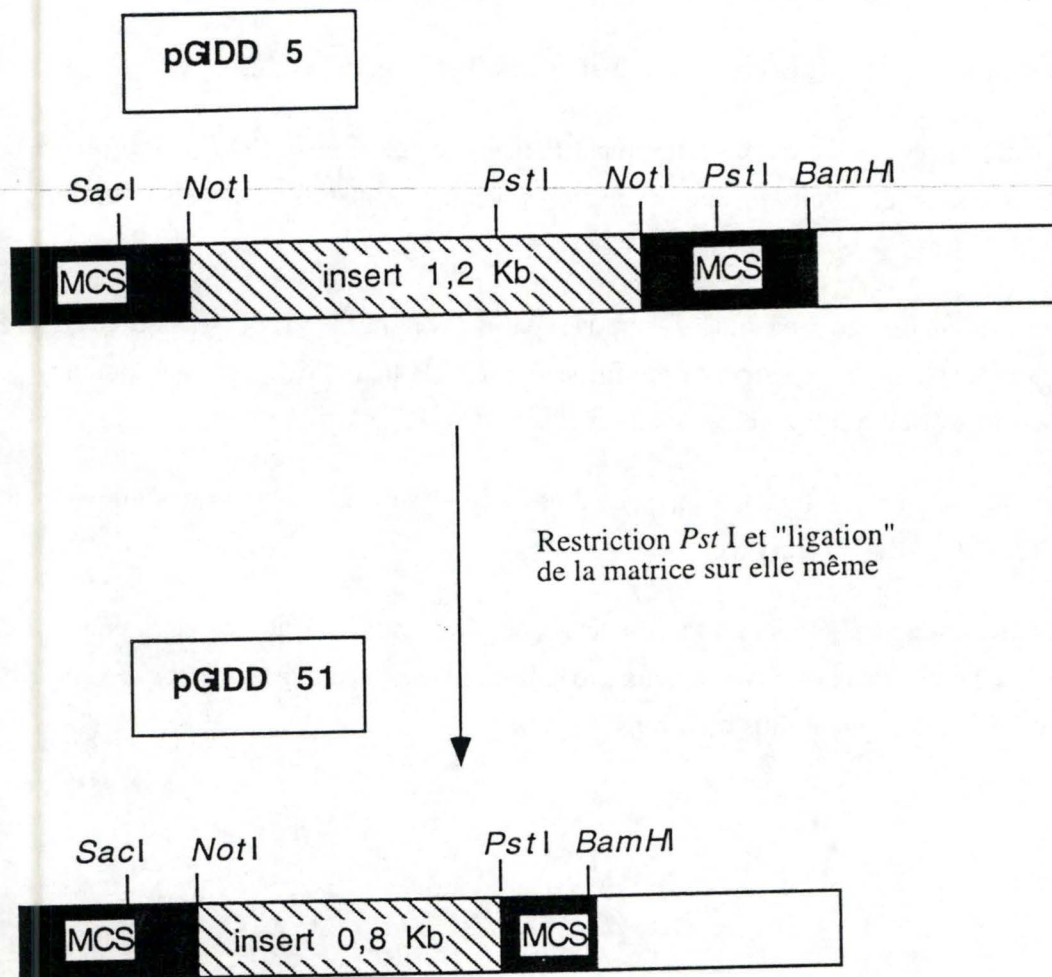


Figure 19: Construction du pGIDD 51
 Le pGIDD 5 est restreint en *Pst I*
 La matrice "liguée" sur elle même donne le pGIDD 51

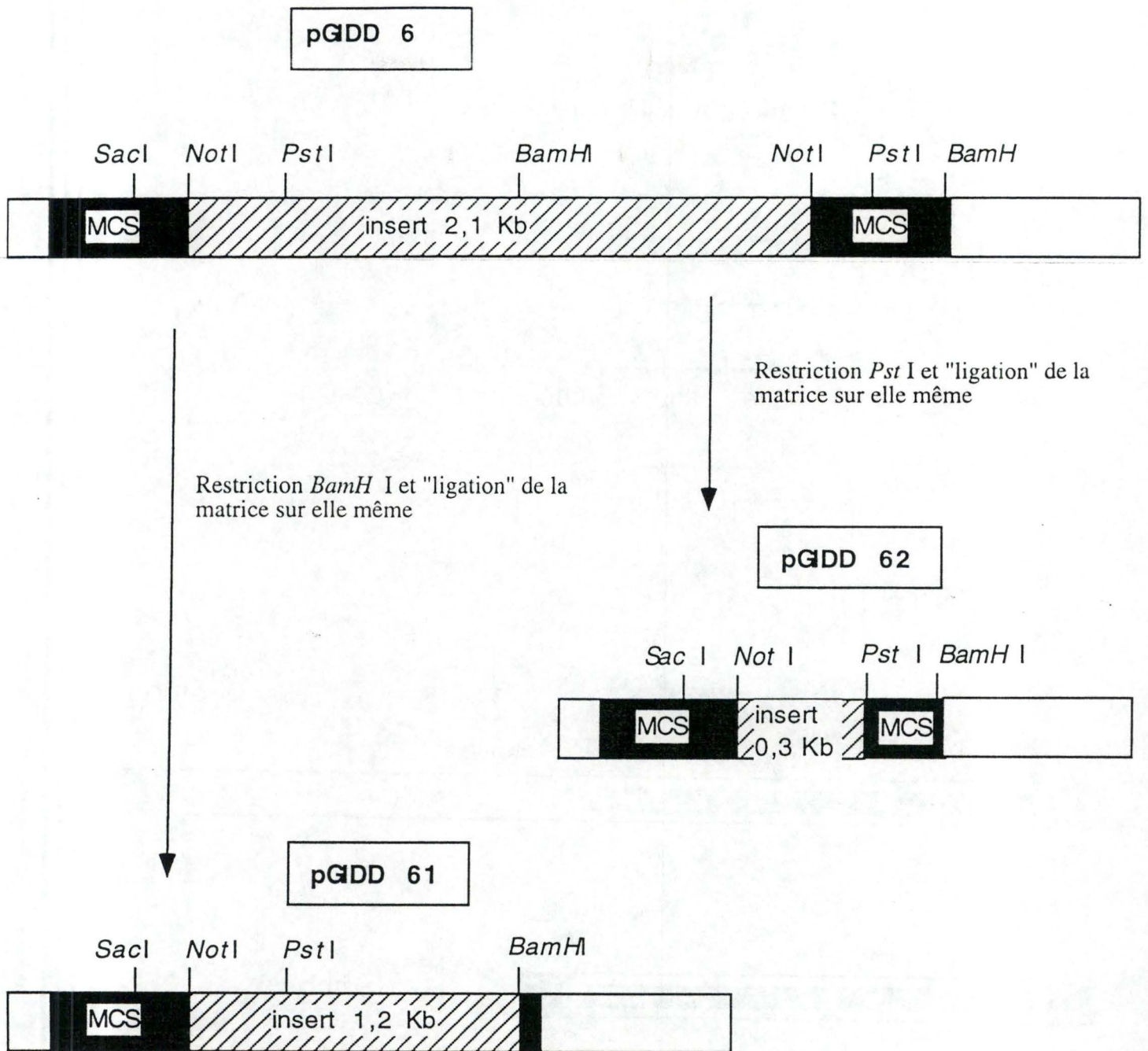


Figure 20 : Construction du pGIDD 61 et pGIDD 62

Le pGIDD 6 est restreint en *BamHI*

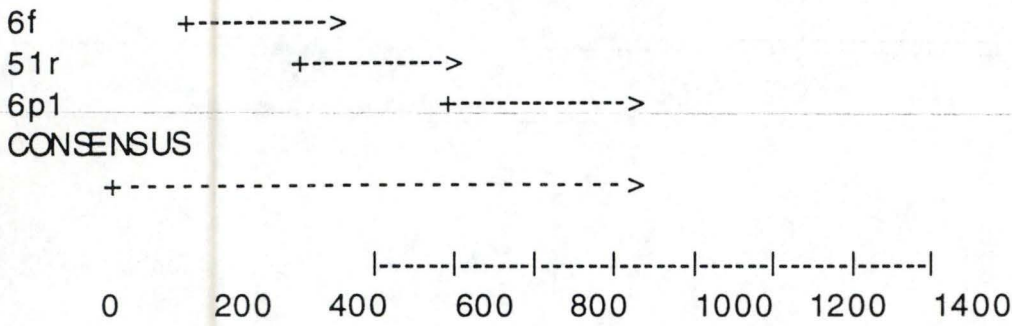
La matrice "liguée" sur elle même donne le pGIDD 61

Le pGIDD 6 est restreint en *PstI*

La matrice "liguée" sur elle même donne el pGIDD 62

A.

Fragments sorted by strand



B.

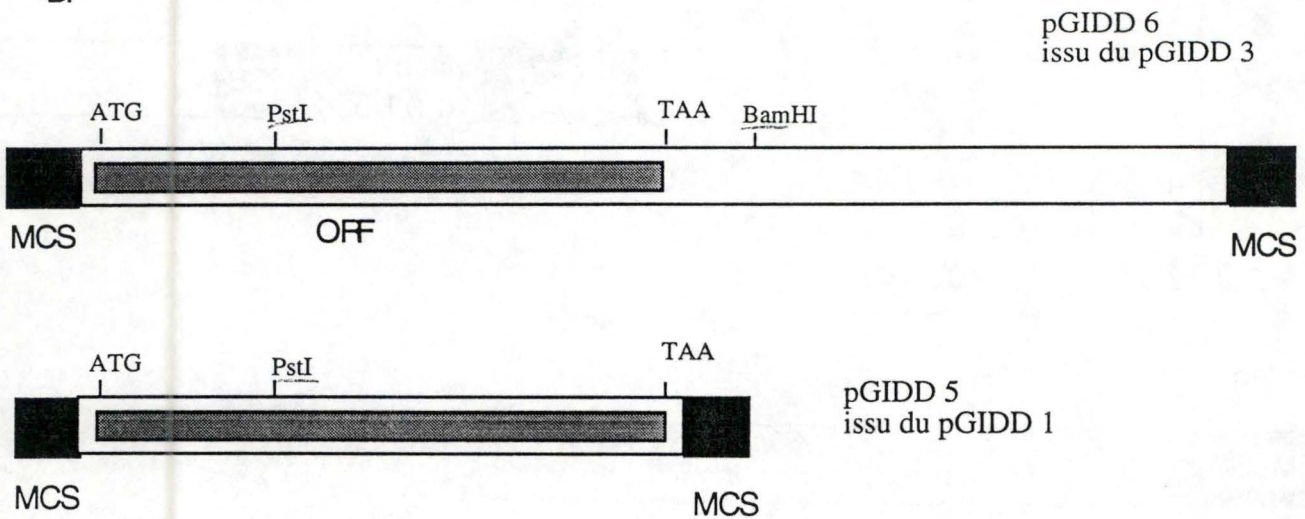


Figure 21: Séquencage du gène *S.p DIM1*.

L'utilisation de sous-clones a permis le séquencage de l'ORF du gène de la diméthylase.

La position et la partie du gène séquencée pour chaque sous-clones est indiquée sur la figure A (programme gelassemble du package GCG version 7).

La figure B indique la position de l'ORF au sein des deux plasmides pGIDD 5 et pGIDD 6.

5.2 Séquencage

5.2.1 Sous-clones en vue du séquencage

5.2.1.1 Le pFL 61 ne pouvait servir pour le Séquencage

Avant de séquencer les inserts des pGIDD 5 et pGIDD 6, il était nécessaire de les changer de matrice. En effet dans le pFL 61, l'insert est "ligué" dans un polylinker ayant été introduit en dehors du site multiple de clonage "classique", c'est pourquoi les primers du site multiple de clonage ne sont pas utilisables (fig.5).

Un préliminaire nécessaire au séquencage était donc le transfert des inserts de 1.2 Kb et de 2.1 Kb du pFL 61 vers le pKS, vecteur utilisable pour le séquencage (voir point 4.1.1).

5.2.1.2 Construction des sous-clones pGIDD 51, pGIDD 61, pGIDD 62

Comme il n'est pas possible de séquencer complètement les deux plasmides en utilisant uniquement les primers présents dans le site multiple de clonage du pKS, la carte de restriction des deux clones va permettre la construction des sous-clones utilisés pour le séquencage.

Connaissant la positions des sites *Pst* I et *Bam*H I, il est possible de construire quelques sous-clones qui faciliteront le séquencage du gène de la diméthylase.

Les sous-clones suivants sont construits (fig.19 et 20):

pGIDD 51: pGIDD 5 auquel on a retiré le fragment *Pst* I-*Pst* I.

pGIDD 61: pGIDD 6 auquel on a retiré le fragment *Bam*H I-*Bam*H I.

pGIDD 62: pGIDD 6 auquel on a retiré le fragment *Pst* I-*Pst* I.

5.2.2 L'ORF du gène de la diméthylase de *S.pombe* est séquencée

La stratégie de séquencage est schématisée à la figure 21. Elle implique l'utilisation des sous-clones pGIDD 6, pGIDD 5, pGIDD 62, pGIDD 51. Trois primers 6p1, 6p2 et 6f2 ont été synthétisés afin d'obtenir la séquence complète de l'ORF sur les deux brins du cDNA.

ATGGGAAAGATTTCGGGTTAGGAATAACAATGCAGCTTCTGATGCAGAAGTGAGGAATACA
 M G K I R V R N N N A A S D A E V R N T
 70 90 110
 GTTTTCAAATTCAACAAAGATTTTGGCCAGCATATCCTTAAAAACCCACTGGTTGCTCAG
 V F K F N K D F G Q H I L K N P L V A Q
 130 150 170
 GGAATTGTGGATAAGGCTGATTTGAAGCAATCCGATACTGTTTTGGAAGTAGGACCAGGT
 G I V D K A D L K Q S D T V L E V G P G
 190 210 230
 ACTGGTAACTTGACAGTAAGGATGCTTGAGAAGGCGCTAAAGTAATTGCTGTTGAAATG
 T G N L T V R M L E K A R K V I A V E M
 250 270 290
 GACCCCCGAATGGCTGCAGAAATCACCAAGCGTGTGCAAGGGACACCAAAGGAAAAGAAA
 D P R M A A E I T K R V Q G T P K E K K
 310 330 350
 TTGCAGGTGGTACTTGGTGATGTGATTAAGACCGACCTTCCTTACTTTGATGTATGCGTG
 L Q V V L G D V I K T D L P Y F D V C V
 370 390 410
 TCTAATACGCCTTATCAAATTTCCCTCACCATTGGTATTTAAATTATTACAGCAGAGACCG
 S N T P Y Q I S S P L V F K L L Q Q R P
 430 450 470
 GCTCCTCGTGGCGCAATTCTTATGTTCCAGAGAGAATTTGCTTTACGCTTGGTTGCAAGG
 A P R G A I L M F Q R E F A L R L V A R
 490 510 530
 CCTGGTGACCCTTTGTACTGTCGATTACCCGCCAATGTGCAAaTGTGGGCTCAGTCAaG
 P G D P L Y C R L P A N V Q M W A H V K
 550 570 590
 CATATCATGAAAGTTGGAAAGAATAACTTTTCGACCACCACCTTTGGTTGAATCAAGTGT
 H I M K V G K N N F R P P P L V E S S V
 610 630 650
 GTTCGGATAGAACCAAAAAATCCACCCCTCCATTGGCTTTTGGGAATGGGATGGTCTG
 V R I E P K N P P P P L A F E E W D G L
 670 690 710
 TTACGGATTGTGTTTTAAGGAAAAATAAAACCATTGGTGCTTGCTTTAAACCTCTTCA
 L R I V F L R K N K T I G A C F K T S S
 730 750 770
 ATTATCGAAATGGTCGAAAATAACTATCGCACGTGGTGTTTCGCAAACGAACGCATGGTT
 I I E M V E N N Y R T W C S Q N E R M V
 790 810 830
 GAGGAAGACTTTGATGTAATAATCTTTGATTGACGGAGTTTTACAACAATGCAATCTTCAA
 E E D F D V K S L I D G V L Q Q C N L Q
 850 870 890
 GATGCCCCGAGCTTCTAAGTGTGGACAACAGAGTTTGTCTCTGTTGCACCCCTTCCATCAG
 D A R A S K C G Q Q S L S L L H P F H Q
 910 930 950
 GTTGGGCGTTCATTTGGCTAATGGGGTCAGGATGGGGTTTTTCATTGAAACGTTAA
 V G R S F W L M G S G W G F P L K R *

Figure 22 : ORF du gène *S.p DIM1* et sa traduction en acides aminés

Nottions que la séquence complète n'a pas été obtenue à partir d'un seul clone, mais bien à partir du recouvrement de morceaux séquencés sur les deux clones d'origines. Bien qu'aucunes différences nucléotidiques entre les deux clones n'aie été observée, l'on ne peut avec certitude affirmer qu'il ne s'agisse pas de deux allèles du gène ne différant que par quelques nucléotides.

1300 pb sur les 2100 pb présentes sur le pGIDD 6 sont séquencées, la totalité de l'ORF du gène de la diméthylase de *S.pombe* représente 955 pb codant pour une protéine de 318 acides aminés (poids moléculaire prédit de 35.927 Da). La traduction de l'ORF en acides aminés est présentée à la figure 22.

5.2.3 La position de l'ORF soulève deux problèmes !

Le test de restauration de sensibilité à la kasugamycine et l'absence du site BamHI sur le pGIDD 5 (pGIDD 1) avait soulevé l'hypothèse que l'insert de 1.2 Kb portait un gène de la diméthylase incomplet, cependant la position de l'ORF au sein des deux inserts (fig.21) conduit à rejeter cette hypothèse et soulève deux problèmes:

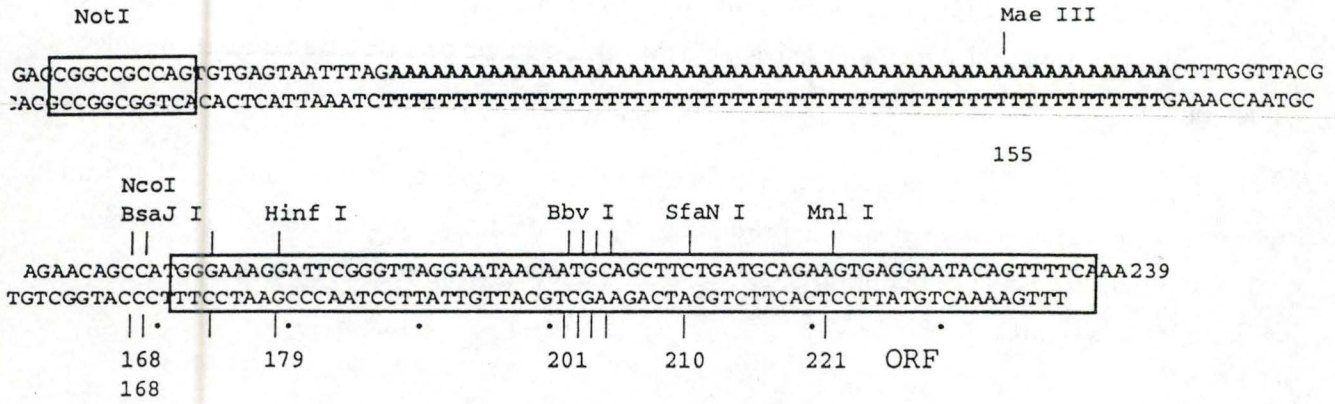
5.2.3.1 Pourquoi le pGIDD 1 alors qu'il contient toute l'ORF du gène de la diméthylase ne donne t- il pas un enzyme fonctionnel ?

La position de l'ORF au sein des inserts ne nous fournis pas d'explication quant à la différence phénotypique observée lors du test de restauration de la sensibilité à la kasugamycine pour le pGIDD 1 et le pGIDD 3 . Une étude comparée de la séquence des deux clones a montré que la seule différence existant entre les deux inserts de cDNA est la présence d'une queue de poly-A insérée quelques dizaines de nucléotides en amont de l'ATG sur l'insert du pGIDD 1 (fig.23). Cette queue de poly-A se trouve donc entre l'ATG et le promoteur eucaryote de la phosphoglycerate kinase.

L'insertion d'une queue de poly-A empêche l'expression du gène

A titre spéculatif on peut attribuer à cette séquence poly-A la non fonctionnalité du pGIDD 1 dans le test de complémentation hétérologue chez *E.coli*.

A.



B.

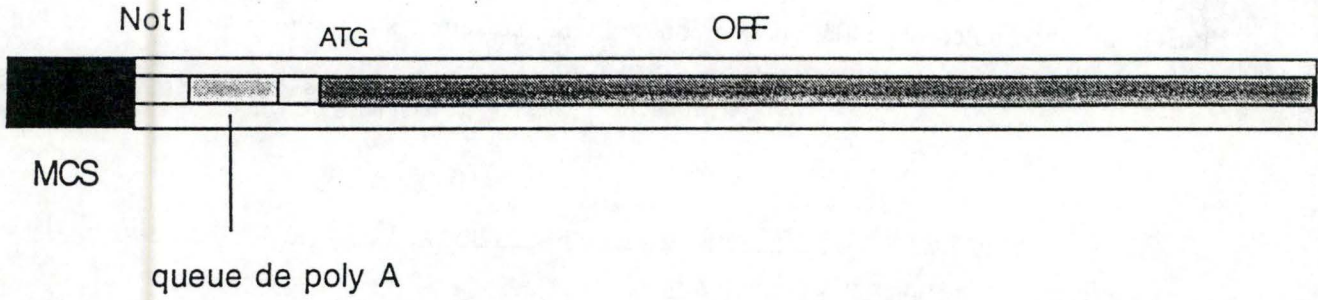


figure 23: Séquences situées en amont de l'ORF du gène porté par le pGIDD 1
L'insertion d'une queue de polyA entre le promoteur de la phosphoglycerate kinase
situé en amont du MCS et l'ORF du gène S.pDIM1 empêche l'expression de celui-ci.

Le promoteur eucaryote de la phosphoglycerate kinase contient des régions ressemblant à la séquence TATAAT appelée "pribnow box" que l'on retrouve dans les régions promotrices procaryotes. Si l'on considère que l'initiation de la transcription se fait au niveau de ces régions, l'insertion d'une queue de poly-A pourrait, pour une raison ou pour une autre perturber ce mécanisme.

D'autre part, sachant que l'initiation de la traduction se réalise chez *E. coli* via une interaction Shine Dalgarno, la présence de ce poly-A du côté 5' de l'ORF pourrait interférer avec celle-ci. Par exemple en déplaçant vers l'amont la séquence Shine Dalgarno, en l'interrompant, en constituant une ORF correcte où la traduction viendrait avorter ou encore par l'interaction inhibitrice de la traduction avec un ARN^r (riche en poly-U).

L'examen de la région 5' du clone où on s'attend à trouver les séquences Shines Dalgarno ne révèle pas de séquences particulières qui permettraient d'élaborer sur de telles spéculations.

Remarquons toute fois que l'interaction Shine Dalgarno n'est pas strictement requise pour l'initiation de la traduction (traduction de messagers poly-U *in vitro*, ARNm de protéines procaryotes débutant directement à l'ATG,...), ce qui pourrait être le cas pour le pGIDD 3 qui, complémente chez *E. coli*. Rien n'exclut dès lors que l'allongement de l'ARNm côté 5' par un poly-A puisse affecter ce mécanisme inhabituel de la traduction chez le pGIDD 1.

5.2.3.2 Le pGIDD 3 a une taille de 2.1 Kb et l'ORF est contenue dans 1 Kb

L'ORF étant de 955 pb, on peut se demander quel est la signification d'un insert de cDNA d'environ 2.1 Kb.

La taille du pGIDD 3 qui rappelons le est un cDNA ne peut s'expliquer par un défaut lors du splicing chez *S. pombe*. En effet, le pGIDD 3 complémente le mutant KsgA⁻ d' *E. coli*, ce qui signifie qu'il possède une protéine S.pDimp fonctionnelle.

On ne peut pas non plus expliquer la taille de l'insert par la présence d'une queue de poly-A de 1200 pb en effet, la taille des queues de poly-A est, chez *S. pombe* comme chez *S. cerevisiae* comprise entre une dizaine et une centaine d'adénines.

Une hypothèse expliquant la taille du pGIDD 3 est, la liaison lors de la fabrication de la banque de deux cDNA distincts (fig.24).

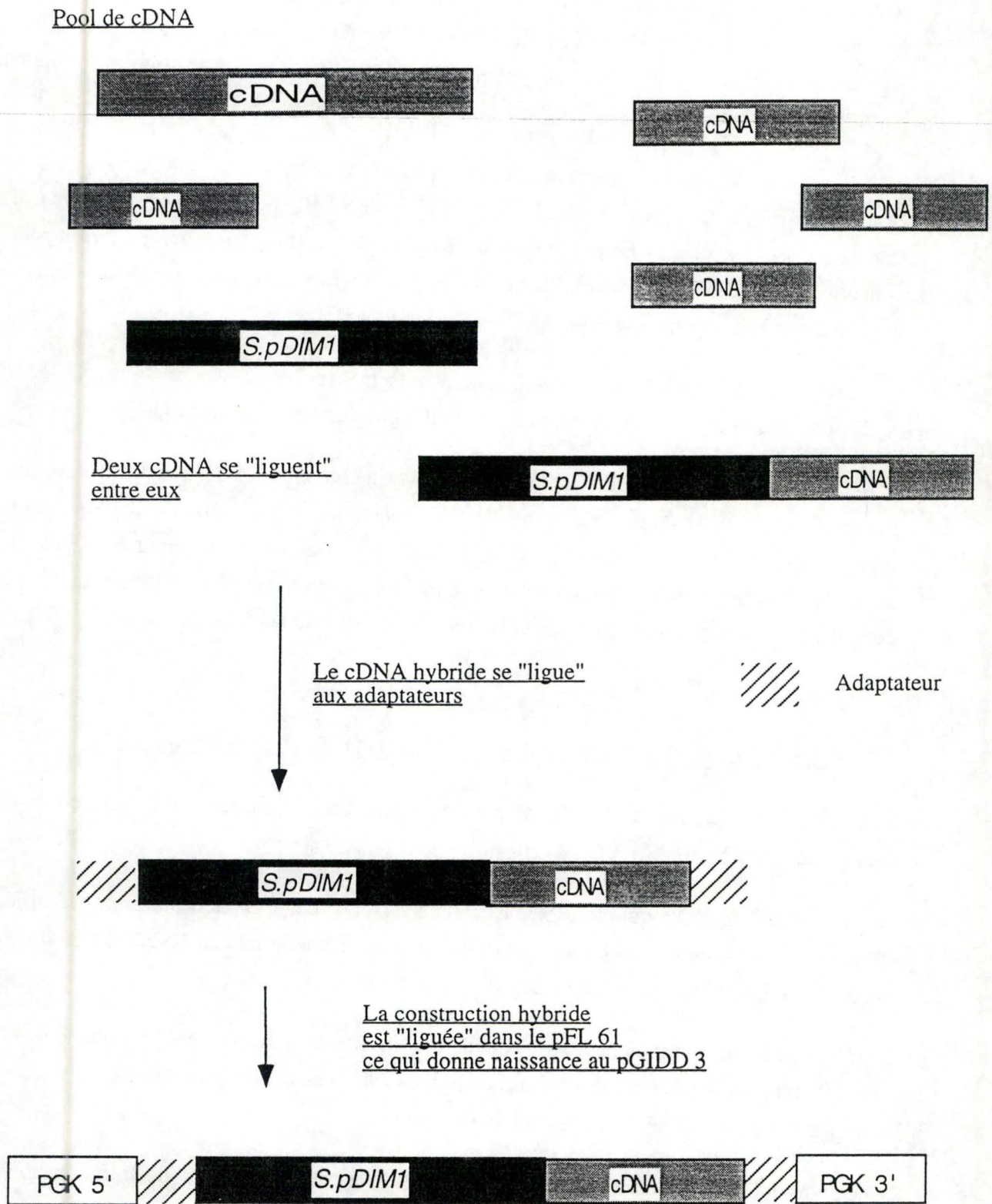


Figure 24: Hypothèse pour expliquer la taille de l'insert du pGIDD 3

En effet, si lors de la construction de la banque, deux cDNA se sont "ligués" et, qu'ensuite additionnés des adaptateurs, ils ont été "ligués" dans une matrice, l'on obtient un plasmide porteur d'un cDNA hybride formé de la fusion de deux cDNA distincts.

Un argument en faveur de la présence sur le pGIDD 3 de deux cDNA distincts est, la séquence observée du côté opposé à la position du gène *S.pDIM1*. Cette séquence est composée d'une queue de poly-A suivie d'une ORF potentielle.

La nature de cette ORF est inconnue, en introduisant le fragment de séquence dans la banque de gènes de l'EMBL, aucune homologie avec des séquences connues n'est apparue. Un séquençage complet de cette ORF potentielle donnerait sans nul doute une information plus précise sur la nature de ce second cDNA.

6. Etude de la séquence

6.1 Comparaison du gène *S.pDIM1* avec d'autres diméthylases de procaryotes

La séquence en acides aminés de la protéine *S.pDim1p* a été introduite dans la banque de gène de l'EMBL afin de voir avec quelles protéines connues *S.pDim1p* partageait le plus de caractéristiques communes.

Les protéines les plus proches de *S.pDIM1* sont, la protéine *KsgA* d' *E.coli*, la protéine *ermE* de *Saccharopolyspora erythraea* et la protéine *ermF* de *Bacteroides fragilis*. Les deux dernières protéines font partie de la famille des gènes *erm*.

En effet, la double diméthylation universelle de l'extrémité 3' de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique ne constitue pas l'unique diméthylation d'adénosine à la position N⁶. Chez certains procaryotes la modification m⁶2A a également été rapportée, en relation avec la résistance à l'érythromycine, sur la grande sous-unité ribosomique (dans le centre peptidyl-transférase, en position A 2058 chez *E.coli*). La protéine responsable de cette modification est encodée par le gène *erm*. Les gènes *erm* dont l'expression traductionnelle est induite par la présence d'érythromycine, ont été clonés chez une dizaine d'espèces procaryotes.

La comparaison des protéines *Dim1p*, *S.pDim1p*, *KsgA*, *ermE* et *ermF* avec le logiciel Match box (Depiereux & Feytmans., 1992) a permis de définir l'existence de six boîtes conservées entre les différentes espèces (fig.25).

1 S.PEP
 2 DIMORF.PEP
 3 KSGA.PEP
 4 MLSB_BACFR.PEP
 5 MLSB_SACER.PEP

1

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
-      +      +      +      +      +      +      +
1  - - - - - MGKI RVRNNAASDAEVRNTVFKFN KDFGQHI LKN PLVAQGI VDKADL KQSD TVLEV GPGT GNLTVRML
2  - - - - - MGKAAKKKYSGATSSKQVSAEKHLSSVFKFNT DLGGHILKN PLVAQGI VDKAQI RPSD VVLEV GPGT GNLTVRIL
3  - - - - - MNLRVHQHGLAR KRFGQNF LND QQFVDSI VSAI NPQKQA AMVEI GPGLAALTE PVG
4  - S - - - - - MTKKKLPV RFTGQHFTI DKVLI KDAI RQANI SNQD TVLDI GAGK GFLT VHLL
5  M S SDEQPRPRRRNQDRQHNPQNRPVLGRT ERDRNR RQFGQNF LRD DRKTI ARI AETAELRPDL PVLEA GPGEGLLTREL A

      90      100      110      120      130      140      150      160
K      +      +      +      +      +      +      +
1  EQA RKVI AVE MD PRMAAEI TKRVQGT PKEKKLQVVLGDVI KTDLPYFDVCVS - - - NTPYQISSPL VFKLLQORPAPRGA
2  ERA KNVVAVE MD PRMAAEL TKRVRGTPVEKKLEI MLGDFMKT ELPYFDI C I S - - - NTPYQISSPL VFKLINQPRPPRVS
3  EILDQLT VI EL DRDLAARLQTHPFLGPKLTI YQQDAMTFNFGELAEKMGQPLRVFG NLPYNI STPL MFHLFSYTD A I ADM
4  KRAN NVVAI EN DTALVEHLRKLFS DARNVQVVGCDFRNF AVPKFPKVVVS - - - NI PYGITS DI FKI LMFESLGNFLG
5  D A RQVTSYEI DPRLAKSLREKLSGHPNI EVVNADFLTAEPPEPFAFVG - - - AI PYGITS AI VDWCLEAPTI ETAT

      170      180      190      200      210      220      230      240
L      +      +      +      +      +      +      +
1  IL - MFQREFA LRLVARPGDPLYCRLPANVQMAHV KHI MKVGGKNNFRPP PLVESSVVRI EPKNPPPPLAFE EWDGLLRIV
2  IF - MFQREFA LRLLARPGDSL YCRLSANVQMWANVTHI MKVGGKNNFRPP PQVESSVVRL EIKNPRPQVDYNEWDGLLRIV
3  HS - MLQKEVV NRLVAGPNSKAYGRLSVMAQYYCNVI PVLEVPPSAFTPP PKVDSAVVRL VPHATMPHPVKDVRVLSRI TT
4  G - I V LQLEPT QKLFSRKL YNPYTVFYHTFFDLKLVYEVGPESFLPP - - - PTVKSALLNI KRKHLFFDFKFKAKYLAFISY
5  M - VTQLEFA RKRTGDYGRWSRLTVMTWPLFEWFEV - - - EKVDSAIMRL LRRRAEPLLEGAALERYESMVE

      250      260      270      280      290      300      310      320
L      +      +      +      +      +      +      +
1  FVRKNKTI GACFKTSSIIEMVENNYRTWCSQNERMVEEDFDVKSLI DGVLQQC NLQDARASKCGQQSL SLLHPPFHQVGRS
2  FARKNRTI SAGFKSTTVMDILEKNYKTF LAMNNEMVDDTKGSMHDVVKEKI DTVLKETDLGDKRAGKCDQNDFLRLLYAF
3  ELFNQRRKTI RNSLGNLFSVEVLTGMGIDPAMRAENI SVAQY CQMANYL AENAPLQES - - - - -
4  LCEKPDLSVKTALKSIFRKSQVRSISEKFGLNLNAQIVCLSPSQWLNCFLEMLEVVPEK F HPS - - - - -
5  L FTGVGGNI QASLLRKYPRRRVEAAFDHAGVGGGAVVAYVRPEQWLR LFERL DQKNEPRGGQPQRGRRTGGRDHGDRRT

      330      340      350      360      370      380      390      400
W      +      +      +      +      +      +      +
1  FQLMGSGWGFPLKR - - - - -
2  H - VGIHFS - - - - -
3  - - - - -
4  - G - - - - -
5  G QDRGDRRTGGRDHRDRQASGHGDRRSSGGRNRDDGRTGEREQGDQGGRRGPGSGGGRTGGRPGRRGGPGQR

```

Figure 25 : Alignement de la séquence de *S.pombe* avec d'autres diméthylases

Les résidus identiques situés au sein des boîtes sont indiqués en noir

La boîte numéro 2 (correspond au site de fixation putatif de la S-adénosyl-méthionine. On retrouve en effet les séquences GXGXGXLT chez Dim1p, S.pDim1p, KsgA, les ermA, ermG, ermY, ermD, ermE, ermF et la D^{-aspartyl} / L^{-isoaspartyl} méthyltransférases d'erythrocytes humains (Ingrosso *et al.*, 1989).

Le motif XGXG pourrait être une partie du site de liaison du cofacteur. Le premier G est le résidu le plus conservé de ce site, en effet si l'on change la glycine par un acide aspartique, on abolit la liaison de la SAM tout en conservant la structure de l'enzyme, argument en faveur d'un rôle de ce résidu dans la liaison de la SAM (Willock *et al.*, 1994).

On retrouve chez les Adénine N⁶- Methyltransferase à ADN, un second domaine impliqué dans un rôle catalytique lors du transfert du groupe méthyle. On ne retrouve pas ce motif parmi les séquences utilisées pour la comparaison.

La conservation parfaite d'une tyrosine entourée de deux résidus hydrophobes conservés PY-I (boîte 4 au environ des résidus 140) pourrait indiquer un éventuel rôle catalytique. En effet, la présence d'un résidu polaire représenté ici par la tyrosine, acide aminé aromatique légèrement polaire, entourée de deux résidus hydrophobes conservés est souvent signe d'un rôle catalytique pour le résidu polaire.

Une analyse mutationnelle des boîtes conservées pourrait nous renseigner sur leurs rôles et expliquer ainsi leur conservation à travers les règnes procaryotes et eucaryotes.

6.2 Comparaison du gène *S.pDIM1* avec le gène *DIM1*

La comparaison faite est celle des deux gènes de diméthylase eucaryotes de levure c'est à dire *DIM1* de *S.cerevisiae* et *S.pDIM1* de *S.pombe*.

L'utilisation du logiciel gap de GCG permet d'observer un pourcentage de similarité égal à 81 % et un pourcentage d'identité égal à 64 % entre les deux protéines (fig.26). On observe également la présence ou l'absence de régions, en particulier le site de liaison à la SAM.

6.2.1 Présence du site putatif de fixation de la S-adénosyl-méthionine

L'analyse de cette comparaison permet de retrouver des régions hautement conservées entre les deux protéines. Parmi ces régions, on retrouve la séquence ayant été proposée comme le site putatif de fixation de la S-adénosyl-méthionine, car partagée par une série d'enzymes dont le seul point commun est la fixation de ce ligand (les diméthyls-transférases à ARNr erm, les méthyls-transférases à adénosines et à cytosines de l'ADN bactérien, la D^{-aspartyl} / L^{-isoaspartyl}

méthyltransférases humaine, la méthyltransférase bovine de l'hydroxylindole et la S-adenosine-méthionine décarboxylase). Ce motif est détaillé au point 6.1.

6.2.2 Absence de lysines à l'extrémité N-terminale

Une différence entre les deux protéines est l'absence chez *S. pDim1p* d'une extension riche en lysines à l'extrémité amino-terminale. Il est établi que la présence de résidus basiques à l'extrémité N-terminale d'une protéine peut être un signal pour son importation nucléaire ou nucléolaire (Warner, 1990).

La diméthylase agissant sur l'ARNr 18 S, elle pourrait jouer le rôle de navette nucléocytoplasmique se déplaçant du cytoplasme vers le noyau puis revenant dans le cytoplasme fixée au pré-ARNr 20 S.

Il est possible que chez *S. pombe*, la séquence d'importation nucléaire soit différente de celle observée chez *S. cerevisiae*. En effet les résidus arginines se trouvant dans la partie terminale de *S.pDim1* pourraient intervenir dans l'importation nucléaire de la protéine.

Une hypothèse alternative est que cette séquence ne remplit pas, comme on le pense, un rôle de signal d'importation nucléaire, et qu'elle n'a donc aucune raison d'être conservée entre les deux espèces.

IV. CONCLUSION
ET
DISCUSSION

IV. CONCLUSION ET DISCUSSION

A la conservation universelle de la diméthylation des deux adénines adjacentes de l'hairpin 3' terminale de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique répond, chez les procaryotes un rôle non essentiel, au niveau de l'initiation de la traduction.

Le clonage du gène *DIMI* de *S. cerevisiae* et la création de mutants *cis* et *trans* (Lafontaine *et al.*, 1994 et Lafontaine, 1994 non publié) a permis d'éclairer son rôle chez les eucaryotes. Chez ceux-ci, le produit du gène semble assurer un double rôle. En effet, la diméthylation comme telle semble nécessaire pour un bon fonctionnement du ribosome alors que la protéine même en absence de la diméthylation au site cible, intervient dans la maturation de l'ARNr précurseur.

Dans le cadre de cette problématique, nous avons entrepris de cloner le gène de la diméthylase chez *S.pombe*.

A cette fin, nous avons criblé une banque de cDNA de *S.pombe* avec une sonde faite sur base de l'ORF du gène *DIMI* de *S.cerevisiae*. Les différentes étapes de criblages nous ont permis d'isoler deux clones, le pGIDD 1 et le pGIDD 3.

Afin de savoir si les candidats isolés possédaient l'activité du gène recherché, nous avons effectué le test de complémentation hétérologue chez le mutant *KsgA* d' *E.coli*. Le clone pGIDD 3 s'est avéré restaurer la sensibilité à la kasugamycine .

La méthode de clonage utilisée et la restauration de la sensibilité à la kasugamycine représentaient deux arguments, l'un structurel et l'autre fonctionnel nous permettant de penser que nous avons bien réussi le clonage du gène de la diméthylase chez *S.pombe*.

L'établissement d'une carte de restriction des pGIDD 1 et pGIDD 3 suggère que ces deux clones, bien que présentant une différence de taille d'environ 900 pb sont apparentés.

Au départ d'informations de portions de séquences obtenues sur ces deux clones, la séquence complète de l'ORF du gène *S.pDIM1* a été constituée. Le gène contient une ORF de 954 pb codant pour une protéine de 318 acides aminés. La comparaison de cette protéine avec les protéines codées par les gènes *DIMI*, *KsgA*, *ermE* et *ermF* a révélé l'existence de six boîtes conservées à travers les cinq séquences alignées.

L'on retrouve parmi ces boîtes, le site putatif de liaison à la S-adénosyl-méthionine, mais aussi des régions dont la fonction est encore inconnue. La conservation parfaite d'acides

aminés pouvant avoir un rôle catalytique (par exemple la tyrosine se trouvant dans la boîte 4) au sein de ces boîtes signifie peut être qu'elles jouent un rôle important dans le fonctionnement général des diméthylases. La fonction hypothétique assurée par des résidus spécifiques pourrait être investiguée par mutagenèse dirigée.

La comparaison des deux diméthylases eucaryotes *S.pDim1p* et *Dim1p* a soulevé une question intéressante au sujet de la localisation cellulaire de la diméthylase. En effet, l'on sait (Lafontaine, 1994 non publié) que l'absence de diméthylase (et non de la diméthylation) est impliquée dans l'accumulation au niveau du noyau du pré-ARNr 20 S, ceci suggérant une localisation nucléaire de l'enzyme. D'autre part, des données indiquent que la méthylation des ARNr est un événement tardif dans la maturation des ARNr, ceci impliquant une action de la diméthylase au niveau cytoplasmique.

La présence à l'extrémité N-terminale de *Dim1p* d'un "stretch" de lysines pouvant représenter un signal d'importation nucléaire vient à l'appui de l'hypothèse selon laquelle *Dim1p* agirait comme une navette, allant du cytoplasme vers le noyau et revenant fixée au pré-ARNr 20 S avant de dimétyler celui-ci.

A cet égard, l'absence chez *S.pombe* de ce "stretch" de lysines fait question et peut s'interpréter de différentes façons. Soit le mécanisme de navette n'a pas lieu chez *S.pombe*, l'enzyme restant cytoplasmique. Soit ce signal, s'il a bien le rôle qu'on lui attribue chez *S.cerevisiae*, n'est pas indispensable chez *S.pombe*. En effet, les résidus arginines retrouvés dans la région N-terminale de la protéine *S.pDim1* pourraient par exemple assurer la même fonction que les lysines de *S.cerevisiae*.

L'hypothèse alternative est que cette région N-terminale n'assure aucune fonction, et que l'enzyme a une localisation cellulaire exclusivement cytoplasmique. Il faudrait dès lors, pour expliquer l'accumulation des pré-ARNr en absence de *Dim1p* faire appel à un autre mécanisme.

La protéine pourrait -elle depuis le cytoplasme, contrôler la voie de passage des ARN en voie de maturation du noyau vers le cytoplasme ? Ceci imposerait qu'elle soit associée à la fraction nucléaire. Aucune évidence n'existe à ce propos et des expériences devraient être conduites pour éclairer directement le problème de la localisation subcellulaire de la protéine.

Par ailleurs, le rôle particulier supposé du N-terminus de *Dim1p* pourrait être abordé dans le contexte de telles expériences en créant des protéines hybrides *S.cerevisiae/S.pombe* où ce domaine aurait été changé par génie génétique.

V. PERSPECTIVES

V. PERSPECTIVES

La question à laquelle nous devons dans un premier temps répondre est la localisation cellulaire de l'enzyme. Pour identifier sa localisation cellulaire, la stratégie consisterait à isoler la protéine afin de produire des anticorps contre celle-ci, anticorps que l'on pourrait ensuite utiliser sur coupes ou dans des expériences de fractionnement. Le rôle supposé de cette séquence N-terminale pourra être testé en tronquant la protéine de quelques acides aminés dans sa région N-terminale et en regardant si cela affecte sa fonctionnalité.

Un préliminaire à ce test de fonctionnalité impliquant des protéines hybrides *S.pombe* /*S.cerevisiae* est la vérification de la complémentation hétérologue du mutant pour le gène *DIM1* de *S.cerevisiae* par le gène de *S.pombe*. Notons que si cet essai de complémentation hétérologue était négatif c-à-d que les deux protéines ne soient pas fonctionnellement interchangeables cela conduirait à rechercher les régions qui diffèrent entre les deux protéines et à étudier en détail les relations structure fonction correspondantes. Il faut signaler à cet égard que le clonage d'un gène de la famille DIM est en cours chez *Kluyveromyces lactis*. Cela affinera les comparaisons de séquences et permettra sans doute de préciser les hypothèses sur le rôle de certains domaines protéiques conservés.

Par ailleurs, nous testerons chez *S.pombe* par disruption dans un diploïde et analyse des tétrades l'essentialité du gène. Le cas échéant où celui-ci ne se révélerait pas essentiel, nous serions en présence d'un troisième mode de fonctionnement de la diméthylase, qui au cours de l'évolution aurait vu son rôle perdre son caractère essentiel.

VI. MATERIEL
ET
METHODES

VI. MATERIEL ET METHODES

1. Tampons et solutions.

Toutes les solutions et milieux ne contenant pas d'éléments thermolabiles sont autoclavés (20 minutes à 120°C). Les solutions dont la composition n'est pas mentionnées sont celles qui ne sont pas détaillées dans les kits commerciaux.

1.1 Tampons.

High salt buffer:

TrisHCl pH 7,5	20 mM
EDTA (Merck)	1 mM
NaCl (Merck)	1,5 M

PBS 10X:

KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,2%
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (Merck)	1,44%
NaCl (Merck)	8%
KCl (UCB)	0,2%

Ajuster à pH 7,4 avec du NaOH ou du KOH.

Tampon de ligation 5 x (BRL):

TrisHCl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
ATP	1 mM

Tampon N2 (Nucleobond):

Tris / H ₃ PO ₄	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	0.9 M

pH 6.3

Tampon N3 (Nucleobond):

Tris / H ₃ PO ₄	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1.15 M

pH 6.3

Tampon N5 (Nucleobond):

Tris / H ₃ PO ₄	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1 M

pH 8.5

Tampon S1 (Nucleobond):

TrisHCl pH 8.0	50 mM
EDTA pH 8.0	10 mM

Autoclaver et Ajouter une solution de RNase A à une concentration finale de 400 µg/ml.

Tampon S2 (Nucleobond):

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Ne pas autoclaver.

Tampon S3 (Nucleobond):

KAc pH 5.2	2.8 M
------------	-------

Ne pas autoclaver.

Tampon SSC 20 x:

NaCl	3M
Citrate de sodium	0,3M

Ajuster à pH 7,0 avec de l'HCl

Tampon TE:

TrisHCl pH 8/7,6 ou 7,4	10 mM
EDTA pH 8/7,6 ou 7,4	1 mM

Tampon TBE

TrisHCl	108 gr
acide borique	55 gr
EDTA 0,5M	40 ml

Porter à 1l pour TBE 10X.

Porter à 10l pour TBE 1X.

1.2 Solutions.

Agarose (BRL): 0,8%; 1 ou encore 2% dans du TBE 1X.

Antibiotiques: stocker à -20°C

Ampicilline 10%(Boehringer) 100 mg/ml dans de l'eau distillée,
à diluer 1000 X.

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm.

kasugamycine (Boehringer) 50µg/ml final

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm.

Ne pas ajouter les antibiotiques à des températures supérieures à 50-60°C.

Solution stock de bromure d'éthidium: 1, 2 ou 10 mg/ml dans de l'eau.

Solution d'alourdisseur / colorant pour gel d'agarose:

Bleu de bromophénol 0,25%

EDTA 25 mM

Glycérol 50%

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Solution de dénaturation (Southern et dénaturation des filtres)

NaOH 0.5M 8 gr pour 400 ml

NaCl 1.5M 35 gr

Solution de neutralisation (Southern et dénaturation des filtres)

NaCl 1.5M 35 gr

TRIS pH 7.5 0.5M 26 gr pour 400 ml

EDTA 0.001M 0.15 gr

Solution de fixateur (pour gel de séquençage):

Acide acétique 10%

Méthanol 10%

Solution de phénol-Chloroforme

Phénol 50 ml

Hydroxyquinoline 0,05 gr

Chloroforme 50 ml

Saturer avec 100 ml de TE pH 8, centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
(Rotor GSA Sorvall).

Éliminer le TE et recommencer jusqu'à ce que le pH du phénol soit à la valeur 8.

RNase A (Boehringer): 10 mg/ml

Incuber 15 minutes à 100°C . Aliquoter et stocker à -20°C

2. Souches et plasmides

2.1 Souches utilisées

Les souches de levures et de bactéries utilisées dans le cadre du travail sont reprises et caractérisées dans les tableaux.

Les caractéristiques génotypiques qui seront directement utilisées dans le travail vont être détaillées de façon plus complète.

2.1.1 La souche DL101 est KsgA⁻ et PyrF⁻

La souche DL101 d'*E. coli* est disruptée pour le gène *KsgA*, elle ne porte pas de groupement diméthyles sur ses adénosines 1518 et 1519, ce qui lui confère la résistance à la kasugamycine. Cette souche est également PyrF⁻. Cette auxotrophie pour l'uracile permet de sélectionner la souche transformée par un plasmide porteur du gène *URA3* sur milieu minimum.

Elle a été construite dans le cadre du clonage du gène de la diméthylase chez *S. cerevisiae* (Lafontaine *et al.*, 1994).

2.2 Plasmides.

pFL61: Dérivé du pFL60 (Minet et Lacroute, 1992), il possède:

- une cassette d'expression eucaryote pour cDNA constituée par le promoteur de la Phosphoglycérate kinase (PGK) séparé de son terminateur par un multisite polylinker.
- Le gène de levure *URA3*.
- Une partie de l'origine de répllication de levure 2 μ m.
- Un nouveau polylinker a été introduit en *Not* I du multisite afin de permettre l'insertion des cDNA en *Bst*XI (Aruffo et Seed, 1987). Voir figure 1

pKS+: Ce vecteur a été utilisé pour la caractérisation et le séquençage des inserts (fig.2). Il possède:

- Un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection du plasmide.
- Un site multiple de clonage.

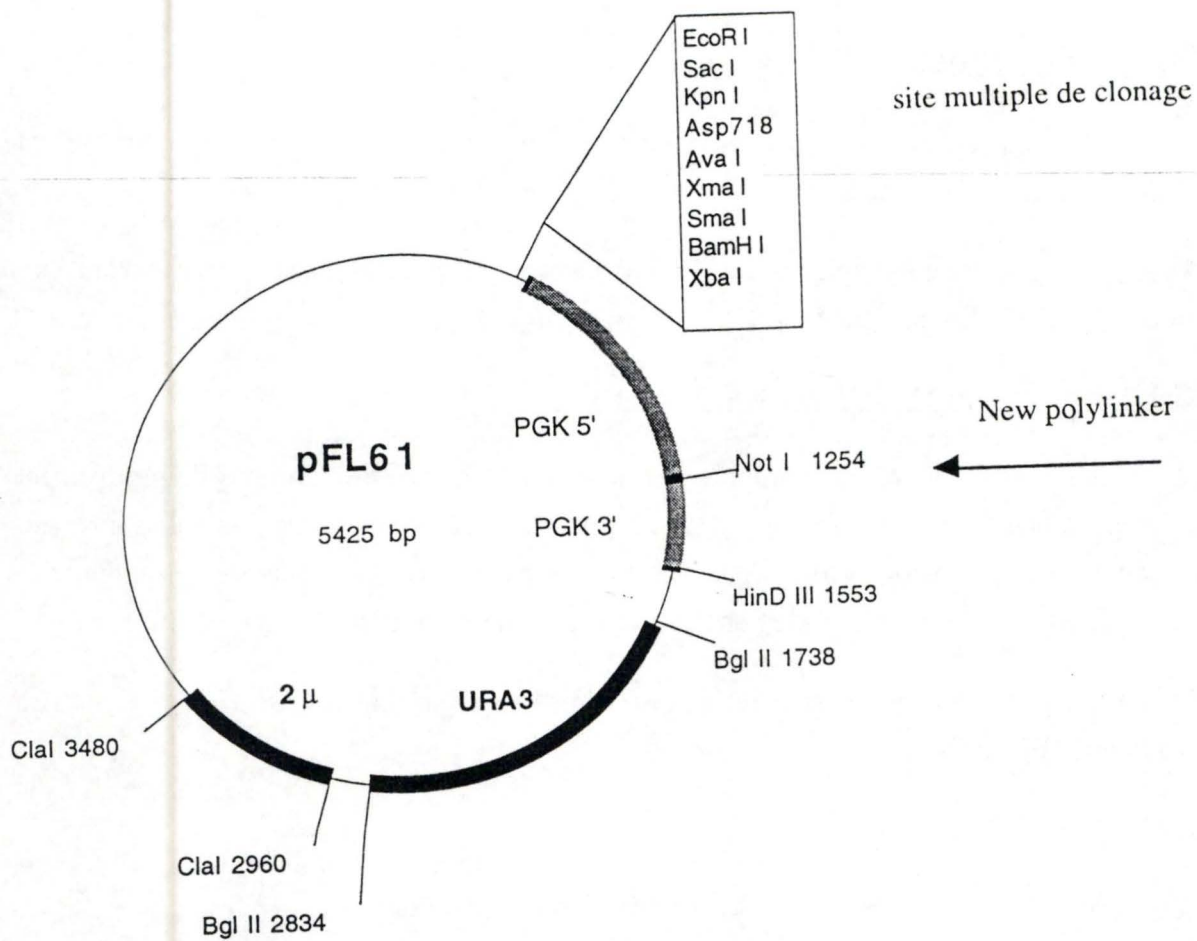


Figure 1: pFL61

Le pFL61 a été construit sur base du pUC 19 d'*E.coli*.
 Il possède une cassette d'expression de cDNA constituée par le promoteur
 et le terminateur de la phosphoglycérate kinase séparé par le polylinker
 dans lequel est inséré le fragment de cDNA.
 Il possède également le gène URA 3 de levure et l'origine de réplication 2μ.

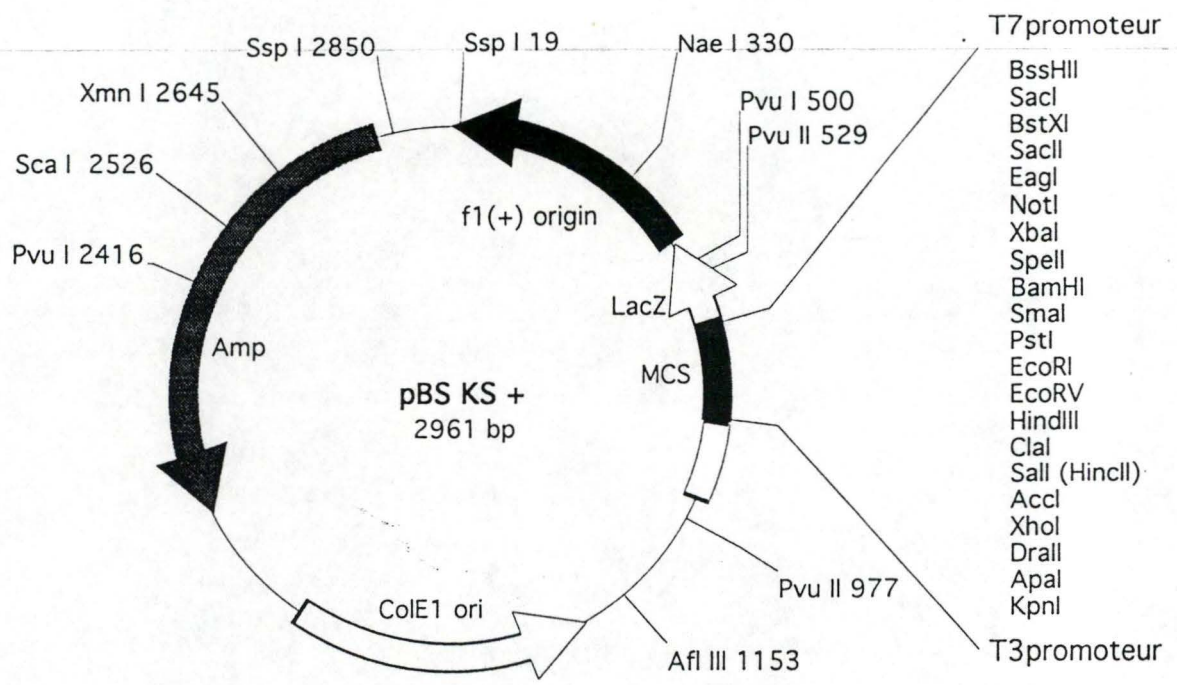


Figure 2: Le pBS KS

- Une origine de répllication chez *E.coli*.
- Une origine f1(+) de répllication de phage.

3. Milieux de culture.

3.1 Milieux de culture pour bactéries.

3.1.1 Milieux riches.

LB liquide (Luria-Bertani):

Tryptone (Oxoid)	1%
Yeast Extract (Oxoid)	0,5%
NaCl (Merck)	0,5%

LB solide (Luria-Bertani):

Ajouter 2% d'agar (Oxoid).

3.2 Milieux de culture pour levures.

3.2.1 Milieu riche.

YPGA:

Adénine (Sigma)	0,005%
Glucose (Merck)	2%
Yeast Extract (Oxoid)	1%
Peptone de caséine (Merck)	1%

Mise à pH 4.8 avec HCl 37%.

Ajouter 2% d'agar (Oxoid) si milieu solide.

3.2.2 Milieu minimum.

Milieu minimum WO:

Yeast nitrogen base w/o AA (Difco)	0,67%
Glucose (Merck)	2%

Ajouter 2% d'agar (Oxoid) si milieu solide.

Adénine	216.6 mg
Uracile	179.2 mg
Arginine	252.8 mg
Acide aspartique	798.4 mg
Histidine	167.2 mg
Isoleucine	157.6 mg
Leucine	315.2 mg
Lysine	292 mg
Méthionine	179.2 mg
Phénylalanine	396.8 mg
Tyrosine	144.8 mg
Valine	515.2 mg
Tryptophane	244.8 mg
Thréonine	619.2 mg

Figure 3: Concentration des différents acides aminés dans le synthétique complet

Milieu minimum + kasugamycine

10 gr d'agar + 360 ml d'eau
Autoclaver, laisser un peu refroidir et ajouter
40 ml de M9 salt10X
400 µl MgSO₄ 1 M
400 µl CaCl₂ 0.1 M
800 µl Thiamine HCl 1 M
8 ml glucose
4 ml de casamino acides (Difco)
200 µl d'Ampicilline (50 µl/ml final)

+ kasugamycine (50 µl/ml final) si milieu minimum + kasugamycine

Milieu synthétique complet

Yeast nitrogen base w/o AA (Difco)	0,67%
Glucose (Merck)	2%
Ajouter 2% d'agar (Oxoid) si milieu solide.	

Ajouter ensuite le mélange d'acides aminés (fig.3) suivant les besoins du milieu.

4. Techniques de l'ADN recombinant.

4.1 Constructions génétiques.

4.1.1 Principe général.

La plupart des techniques utilisées en génie génétique sont basées sur l'existence de plasmides. Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire circulaires et autorépliquatives, sur lesquelles il est possible d'effectuer une série d'opérations. Il s'agit de la restriction, de la ligation et de la transformation.

Les plasmides sont restreints à l'aide d'enzymes de restriction diverses reconnaissant un site spécifique sur l'ADN (souvent une séquence palindromique de 4 à 6 pb). Le nombre de fragments générés dépend de la fréquence d'occurrence du site dans la molécule d'ADN.

Ces fragments peuvent ensuite être ligués à l'aide de la T4 DNA ligase. Pour autant que les extrémités des morceaux que l'on désire assembler soient compatibles.

Deux cas peuvent se présenter: soit l'enzyme clive l'ADN en générant des extrémités à bouts francs (cas de *Hpa* I), soit en générant des bouts collants. S'il génère des bouts collants, ils seront 5' protrudents (ex: *Nco* I), ou 3' protrudents (ex: *Sph* I).

Tous les fragments qui se terminent par des bouts francs sont compatibles entre eux. Par contre, ceux dont les extrémités sont des bouts collants doivent, pour être compatibles, présenter des extrémités protrudentes de même longueur et de séquence nucléotidique complémentaire.

Les constructions ainsi élaborées sont introduites par transformation (point 4.4) dans une souche de bactérie ou de levure afin d'être amplifiées ou d'observer les phénotypes auxquels elles donnent naissance.

4.1.2 Restrictions.

Après restriction, les fragments obtenus possèdent un groupement phosphate du côté 5' terminal et un groupement -OH du côté 3' terminal.

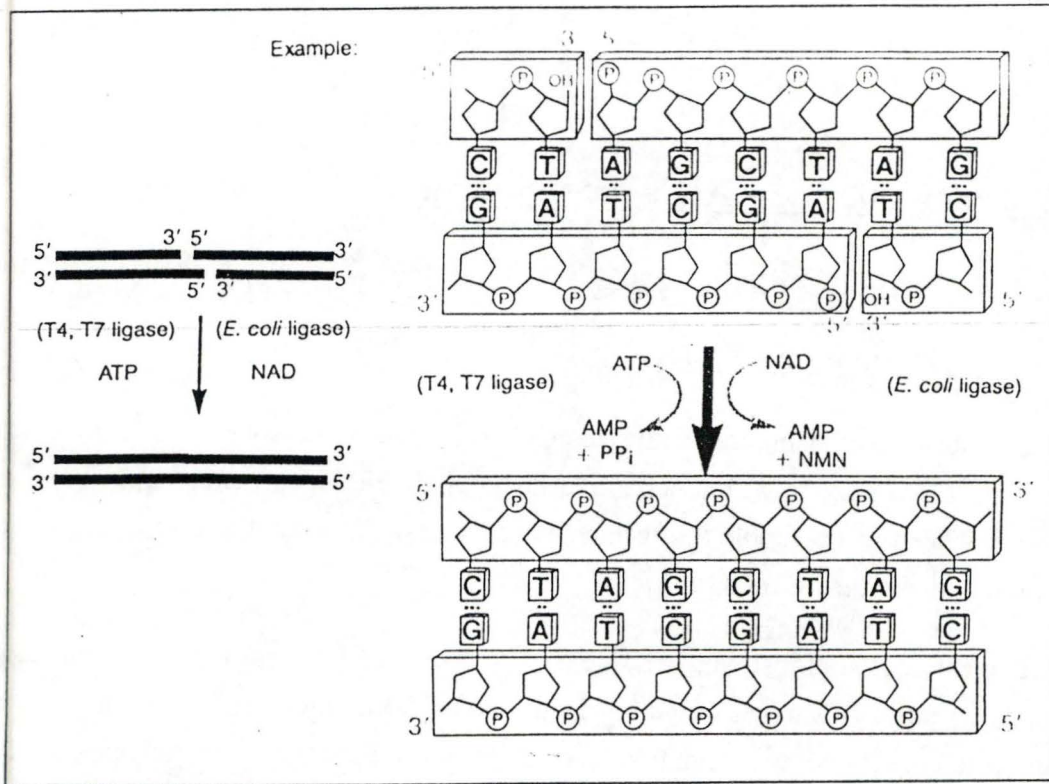
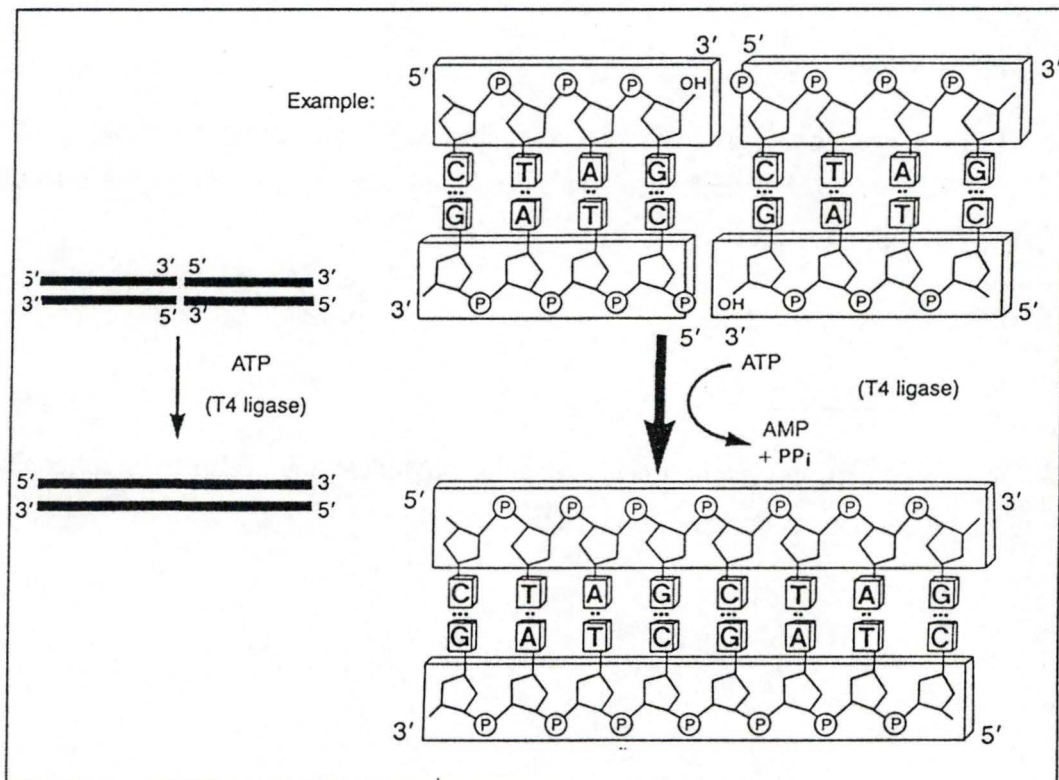


Figure 4:

- A. Activité de la T4 DNA ligase sur les bouts francs.
- B. Activité de la T4 DNA ligase sur les bouts collants.



4.1.2.1 En pratique:

La réaction de restriction s'effectue dans un volume de 20 à 50 μ l.

Placer dans un Eppendorf

- ADN à restreindre.
- 1/10 du volume final de tampon de restriction 10X.
- Enzyme de restriction (le plus souvent une unité).
- Porter à volume avec de l'eau stérile.
- Incuber une heure à 37°C.

Remarquons que le nombre d'unités d'enzymes de restriction à investir dans une réaction est déterminée en prenant en compte la fréquence d'occurrence du site ainsi que la quantité de matériel à digérer.

Après la réaction, les enzymes peuvent être inactivées par passage à 65°C, à -20°C ou par une extraction au phénol.

Le volume d'enzyme ne doit pas dépasser le dixième du volume final de la réaction car les enzymes sont stockés dans du glycérol susceptible à forte concentration d'inactiver ou de conférer une activité "star". Un enzyme présente une activité "star" lorsqu'il restreint en des sites qui ne lui sont pas spécifiques.

4.1.3 La ligation.

La ligase du phage T₄ est utilisée pour catalyser la formation de liens phosphodiester entre un groupement hydroxyle en 3' et un groupement phosphate en 5'. Pour être active, l'enzyme requiert la présence d'ATP et de Mg²⁺ (fig .4).

En pratique:

Placer dans un Eppendorf:

- le vecteur linéarisé.
- le ou les fragments à insérer.
- 1 Unité de T₄ DNA ligase.
- 1/5 du volume final de tampon de ligation 5X.
- Porter à volume avec de l'eau stérile si nécessaire.

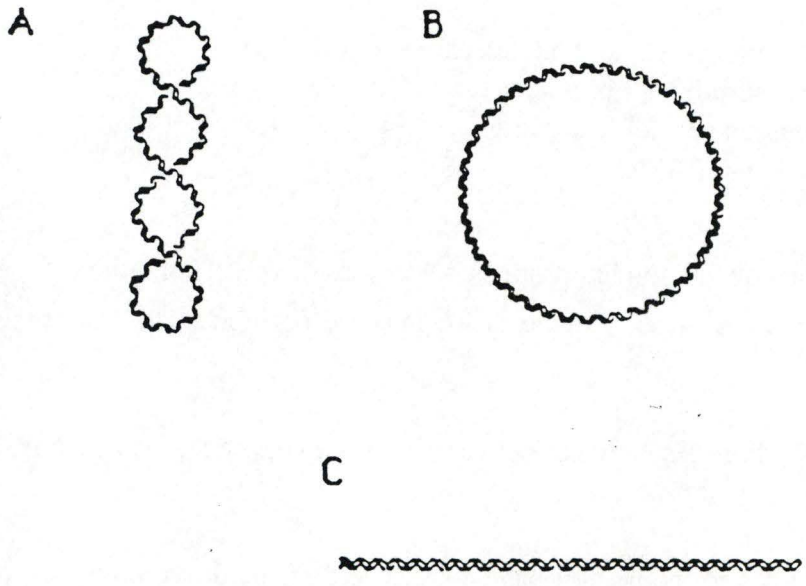


Figure 5: Les trois conformations de l'ADN.

- A. CCC
- B. OC
- C. OL

L'incubation une nuit à 14°C est idéale pour les bouts collants car à cette température on favorise la formation des ponts hydrogènes. Dans le cas des bouts francs, une incubation de 3 heures à température ambiante est préférable car dans ces conditions l'activité de l'enzyme est plus importante (la formation de ponts H n'étant pas requise).

Quand les deux types d'extrémités sont présentes, les deux incubations sont successivement réalisées.

La stoechiométrie vecteur / insert est de 1:1, si le clonage est forcé (une seule possibilité d'insertion), elle est de 1:3 ou 1:4, si un ou plusieurs sites à bouts francs sont présents.

4.2 Electrophorèse analytique sur gel d'agarose.

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée pour séparer des fragments d'ADN, estimer leur taille, leur concentration et l'état de pureté d'une préparation (absence de protéines et d'ARN).

4.2.1 Critères de séparation des fragments d'ADN.

Une molécule chargée, placée dans un champ électrophorétique, migre vers l'électrode de signe opposé à sa charge. L'ADN étant chargé négativement (groupements phosphates), il se déplace vers l'anode.

Différents paramètres influencent la migration de l'ADN dans le champ. Il s'agit de la conformation, du poids moléculaire (PM), de la concentration en agarose du gel et de l'ampérage appliqué à la cuve d'électrophorèse.

Les molécules d'ADN existent sous trois conformations différentes. La conformation la plus abondante est la forme CCC (Covalently Closed Circular). Si cette forme présente un nick (absence de lien phosphodiester) sur un des deux brins, on obtient la conformation OC (Open Circular). Enfin, la forme linéaire présente un nick sur chacun des deux brins (fig.5).

La forme CCC migre plus vite que la forme OL qui migre elle-même plus vite que la forme OC.

Les molécules d'ADN migrent à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur PM. Du haut vers le bas, on trouvera donc des fragments de PM de plus en plus petit.

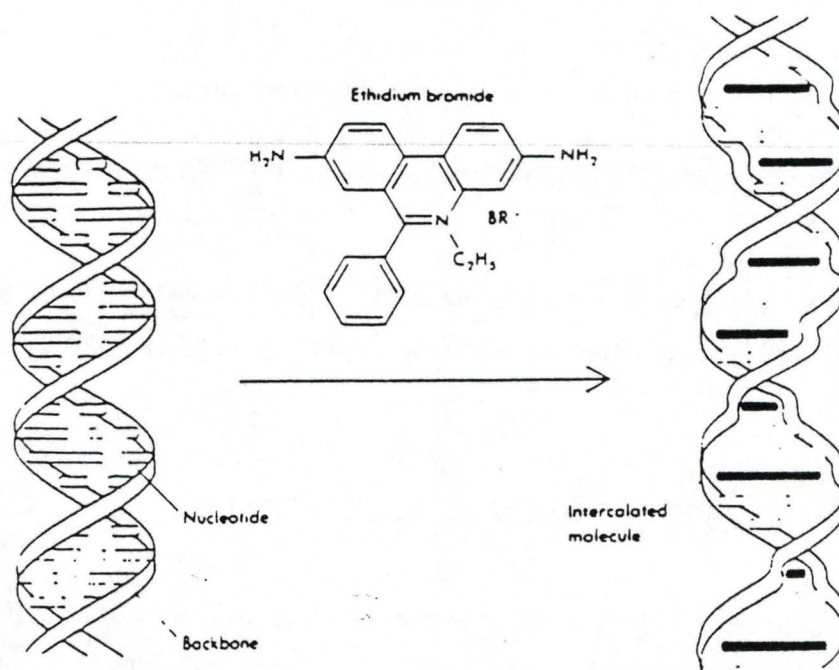


Figure 6: Schéma de l'intercalation du bromure d'éthidium dans une molécule de l'ADN.

La concentration en agarose (par ex: 0,8-1-2%) est également déterminante pour la mobilité de l'ADN. On peut augmenter cette concentration afin de séparer plus efficacement des fragments de petite taille.

Quand le voltage appliqué à la cuve est faible, la vitesse de migration est linéaire. Elle augmente proportionnellement en fonction du voltage appliqué.

4.2.2 Visualisation de l'ADN sur le gel.

L'ajout de bromure d'éthidium (BrEth) dans le polymère d'agarose, permet à ce celui-ci de s'intercaler entre les bases de l'ADN (fig.6). Lorsque ce composé est excité par des U.V (302 nm), il devient fluorescent.

4.2.3 Estimation de la taille des fragments.

Pour estimer la taille des fragments, on utilise un marqueur de référence. Le génome du phage Lambda (50 Kb total), digéré par l'enzyme *Hind* III est utilisé dans le cas des gels 0,8% et le plasmide pBR322 (4,5 Kb total) digéré par l'enzyme *Hinf* I dans celui des gels 2% (fig.7).

La migration du marqueur de taille permet d'établir une abaque exprimant le logarithme de la taille des fragments en fonction de leur distance de migration. On peut alors dans un second temps reporter la distance de migration des fragments de l'échantillon et estimer leur PM.

4.2.4 Estimation de la quantité des fragments.

Pour estimer la concentration d'un fragment donné, on se réfère de nouveau au marqueur de taille. La concentration correspondant à chacune des bandes de ce marqueur est connue (fig.7).

En comparant visuellement l'intensité de la bande que l'on considère avec celles du marqueur de taille, on estime de façon approximative la concentration en ADN de celle-ci.

λ <i>Hin</i> d III (48502 bp)	Total de 600ng	pBR322 <i>Hin</i> f I (4363 bp)	Total de 1 μ g
Taille	Concentration	Taille	Concentration
23130 bp	286 ng	1632 bp	374 ng
9416 bp	116 ng	517+506 bp	118+113 ng
6557 bp	81 ng	396 bp	90 ng
4361 bp	53 ng	344 bp	78 ng
2322 bp	28 ng	298 bp	68 ng
2027 bp	25 ng	221+220 bp	50+50 ng
564 bp	7 ng	154 bp	35 ng
(125 bp)	(1,5 ng)	(75 bp)	(17 ng)

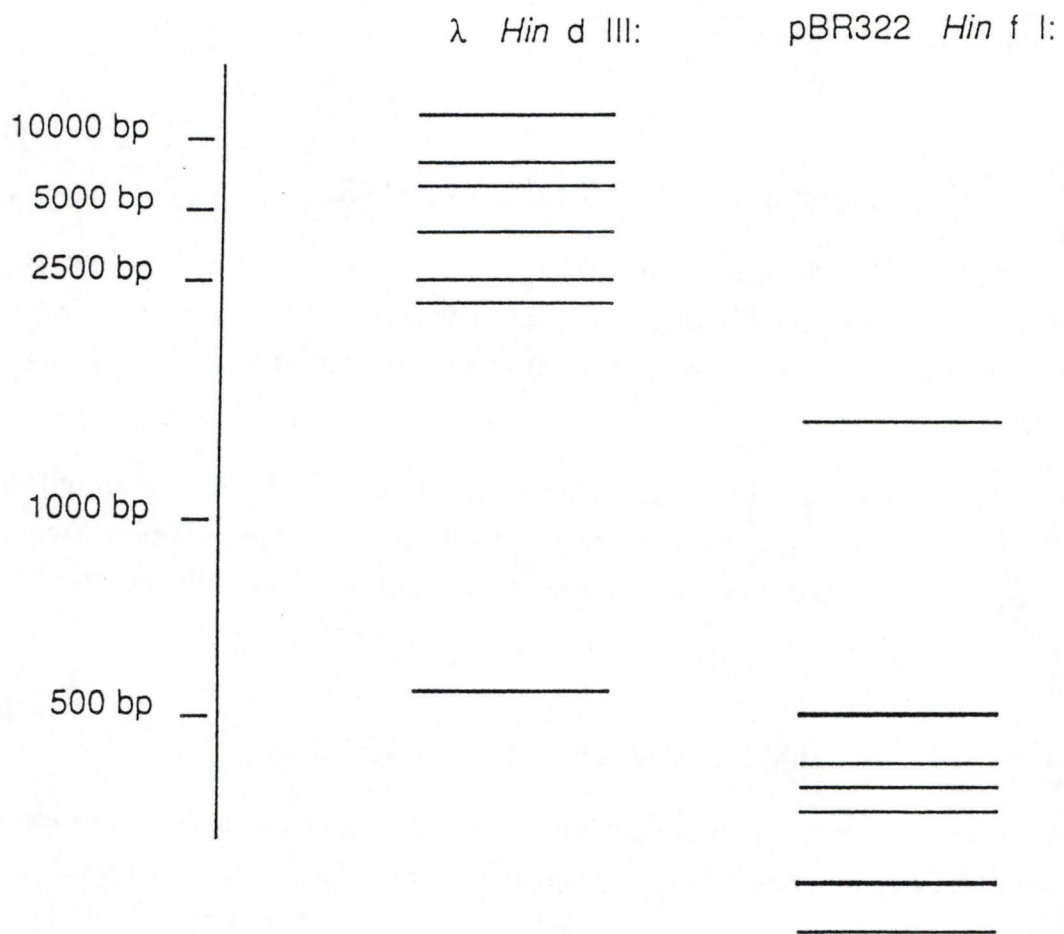


Figure 7: Les marqueurs de taille

4.2.5 Mise en oeuvre.

- Dissoudre la quantité appropriée d'agarose dans du tampon TBE 1X en chauffant.
- Laisser refroidir à 50°C.
- Ajouter le BrEth (concentration finale 0,5 µg / ml), mélanger.
- Couler le gel dans un support en plexiglas et y ajouter un peigne.
- Enlever le peigne lorsque le gel est polymérisé.
- Placer le gel dans une cuve à électrophorèse et immerger dans du tampon TBE 1X.

Avant le dépôt de l'échantillon d'ADN, et pour faciliter celui-ci, on ajoute aux échantillons une solution dense et colorée (bleu de bromophénol).

4.3 Electrophorèse préparatrices et purification de fragments d'ADN

Après avoir réalisé une électrophorèse préparatrice, il est possible de récupérer un fragment particulier sur le gel. Le but est de ne soumettre à la ligation que les fragments que l'on désire voir s'assembler, ce qui ne fait que diminuer le nombre de constructions possibles et donc faciliter le criblage.

La méthode utilisée consiste à inciser le gel sous la bande d'intérêt afin d'y introduire un morceau de papier filtre (DEAE cellulose / Whatman DE81). On remet le gel à migrer et au bout de 10 minutes, le fragment d'intérêt a été transféré du gel sur le papier Whatman.

4.3.1 Récupération sur papier

4.3.1.1 Préparation des filtres Whatman DE81:

- Découper à la taille désirée.
- Laisser tremper 30 minutes dans du NaCl 2,5 M.
- Laver plusieurs fois à l'eau froide.
- Conserver dans du tampon TBE 1X.

4.3.1.2 Récupération de la bande

- Couper le gel avec une lame de scalpel juste en dessous et au-dessus de la bande à récupérer et y glisser les papiers.
- Faire migrer 10 minutes à 100 volts.

4.3.1.3 Récupération du DNA

- Rincer le papier avec de l'eau froide pour enlever le TBE et poser le papier sur un filtre.
- Placer le papier dans un Eppendorf dans lequel se trouve 400 µl de High Salt Buffer (tampon d'élution).
- Mélanger jusqu'à l'obtention d'une pâte.
- Incuber 2 heures à 37°C ou overnight à 4°C en agitant de temps en temps.
- A l'aide d'une épingle chauffée faire un petit trou dans le fond de l'eppendorf.
- Enfoncer cet Eppendorf dans un second non troué.
- Quick spin à 13000 rpm (Janetzki).
- Ajouter 2 volumes de N-butanol saturé en eau à la phase aqueuse récupérée (élimination du BrEth).
- Vortexer 30 secondes
- Centrifuger 5 minutes.
- Eliminer la phase supérieure (butanol).
- Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu, mélanger.
- Placer 10 minutes à -80° ou une nuit à -20°C.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décanter.
- Laver le culot avec 300 µl d'éthanol 70% (élimination des sels).
- Recentrifuger quelques minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Sécher 10 minutes sous vide.
- Resuspendre dans 10 µl d'eau stérile.

4.4 Transformation.

4.4.1 Transformation bactérienne.

4.4.1.1 Electroporation

Lorsque l'on soumet une membrane biologique à un champs électrique, celle-ci subit une compression locale aboutissant à la formation de pores.

Cette lésion physique est associée à une augmentation réversible jusqu' à un certain point de la perméabilité de la membrane plasmique.

Dans le cas de chocs de haut voltage et de longues durée, la taille des pores peut être suffisante pour permettre le passage d'un plasmide. (Langridge *et al.*, 1987)

L'appareil utilisé au laboratoire pour l'électroporation est le "GENE PULSEUR" commercialisé par la firme Bio-Rad.

Il délivre, par la décharge d'un condensateur, un choc électrique à décroissance exponentielle dans une cuvette pourvue d'électrodes en contact avec le mélange cellules à transformer - plasmides.

4.4.1.1.1 Caractéristiques du choc électrique

La capacitance (C)

Nous avons vu précédemment que pour permettre le passage des plasmides, il est nécessaire de soumettre les cellules à un choc de haut voltage et de longue durée. Nous avons donc choisi d'effectuer nos chocs directement à la capacitance maximale permise par l'appareil dont nous disposons c.-à-d. 25 microfarads. En vertu de l'équation $t = RC$, nous obtenons un choc de longue durée. La valeur t est une constante qui exprime la rapidité de la décroissance exponentielle du voltage, en d'autres termes, elle se définit comme étant le temps nécessaire pour que le voltage atteigne 37% du V_0 ($V_0 = V_{\text{initial}}$).

Le voltage (V)

Lors de la détermination du voltage, il est nécessaire d'atteindre un équilibre délicat entre le besoin de créer des pores dans la membrane cellulaire et la nécessité que le phénomène soit réversible pour permettre la survie et la croissance des transformants.

La résistance (R)

La résistance du système correspond à la résistance électrique de la solution contenue dans la cuvette d'électroporation.

4.4.1.1.2 Protocole:

Un préliminaire à l'électroporation est la préparation de stocks de cellules électrocompétantes.

Préparation des cellules

- Inoculer une préculture de 5 ml de LB avec la souche bactérienne voulue
- Laisser pousser une nuit à 37°C
- Inoculer 200 ml de LB avec la préculture
- Incuber à 37°C jusqu'à une D.O de 0.5-0.8
- Refroidir la culture sur glace pendant 15 minutes
- Centrifuger la culture à 4°C pendant 15 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot dans 200 ml d'eau froide stérile
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 rpm

- Resuspendre le culot dans 100 ml d'eau stérile froide
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot dans 4 ml de glycérol 10 %
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot dans 400 µl de glycérol 10 %
- Aliquoter 100 µl par eppendorf
- Peut se conserver à -80°C pendant une période pouvant aller jusqu'à 6 mois

Electroporation

- Placer la cuvette d'électroporation dans la glace
- Placer dans un eppendorf de 40 à 100 µl de cellules compétentes et 1 à 2 µl d'ADN - plasmidique.
- Mélanger et placer la solution une minute sur glace
- Transférer dans la cuvette d'électroporation le contenu de l'eppendorf
- Placer la cuvette dans l'électroporateur
- Régler l'appareil sur : 25 µF
200 Ohms
2.2 Kv
- Faire le choc électrique
- Ajouter rapidement 1 ml de SOC
- Transférer dans un eppendorf et laisser une heure à 37°C
- Etaler sur boîte et laisser pousser une nuit à 37°C

4.4.2 Transformation de levures.

4.4.2.1 Electroporation

Bien que les levures soit des eucaryotes inférieures, de par leurs tailles et leurs conditions de croissance, elles ressemblent plus aux bactéries qu'aux cellules de mammifères. Pour cette raison, la transformation par électroporation des levures se fait dans des conditions très semblables à celles utilisées pour les procaryotes.

4.4.2.1.1 Protocole

Préparation des cellules

- Inoculer 500 ml de milieu avec une préculture ou avec une colonie venant d'une boîte.
- Laisser pousser les cellules à 30°C jusqu'à une densité optique de 1.3 à 1.4.
- Précipiter les cellules en centrifugeant 5 minutes à 4000 rpm.
- Laver les cellules en les resuspendant dans 500 ml d'eau stérile. Centrifuger 5 minutes et retirer le surnageant.

- Répéter le lavage avec 250 ml d'eau et recentrifuger dans les mêmes conditions.
- Resuspendre les cellules dans 20 ml de Sorbitol 1 M. Centrifuger et retirer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 5 μ l de Sorbitol 1 M pour un volume final de (cellules + Sorbitol) de 1 à 1.5 ml.

Electroporation

- Placer la cuvette 1 minute sur glace.
- Mélanger dans un eppendorf, 40 μ l de cellules + 5 μ l (0.1 μ g) de plasmide. Placer 5 minutes sur glace.
- Mettre le mélange dans la cuvette d'électroporation.
- Régler l'appareil sur: 25 μ F.
200 Ohms
1.5 Kv
- Faire le choc électrique.
- Ajouter rapidement 1 ml de Sorbitol 1 M dans la cuvette et transférer dans un eppendorf.
- Mettre le résultat de la transformation sur milieu sélectif contenant du sorbitol 1 M (pas besoin d'incuber).

4.4.2.2 "One step transformation"

On sait que le traitement de levures avec des composants thios modifie un complexe mannoprotéique de la paroi cellulaire de ces levures . Il semble possible que la modification de l'intégrité du complexe puisse créer des pores dans la paroi cellulaire ou affecter sa plasticité de tel façon que des molécules de hauts poids moléculaires puissent la pénétrer (Da-Chi Chen et al 1992).

Méthode

- Centrifuger les cellules de levures en phase de croissance stationnaire dans un eppendorf
- Vortex avec ONE-STEP tampon (tampon + ADN = 100 μ l)
- Ajouter une quantité d'ADN plasmidique comprise entre 50 ng-1 μ g (volume maximal = 5 μ l).
- Incuber 30 minutes à 45°C
- Mettre sur boîte contenant le milieu sélectif et incuber 3-4 jours à 30°C.

Tampon "one step":

- Acétate de lithium 0.2 N
- Polyéthylène glycol (PEG) 3350, 40 %
- Dithiothreitol (DDT), 100 mM

4.5 Préparation de vecteur d'ADN.

4.5.1 Minipréparation d'ADN plasmidique.

Ce protocole permet d'obtenir de l'ADN plasmidique rapidement et en quantité suffisante que pour être diagnostiqué par restriction.

4.5.1.1 Culture

- Universel + 5 ml de LB + 5 µl d'ampicilline + 1 colonie
- Incuber une nuit à 37° C

4.5.1.2 Récupération et lyse des cellules

- Récupérer 1.5 ml dans un eppendorf
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Décanter le surnageant
- Resuspendre le culot dans 300 µl de S1 RNase
- Ajouter 300 µl de S2 et mélanger
- Attendre 5 minutes
- Ajouter 300 µl de S3 et mélanger
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm (Janetzki)

4.5.1.3 Récupération des plasmides

- Récupérer le surnageant
- Ajouter 700 µl d'isopropanol pour précipiter le DNA plasmidique
- Centrifuger 15 minutes à 4° C ou à température ambiante à 13000 rpm
- Décanter le surnageant (le culot = l'ADN)
- Ajouter 100 µl d'éthanol 70 % froid pour laver le culot
- Centrifuger 5 minutes
- Enlever l'éthanol
- Sécher au speedvack
- Resuspendre dans 20 µl d'eau

4.5.2 Midipréparation d'ADN plasmidique (Nucleobond AX100).

4.5.2.1 Culture

- 200 ml de LB + 200 µl d'ampicilline + préculture
- Incuber une nuit à 37° C avec agitation

4.5.2.2 Récupération et lyse des cellules

- Récupérer le tout dans bouteille Sorval 250 ml
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Décantier le surnageant
- Resuspendre dans corex 30 avec 4 ml de S1 RNase
- Ajouter 4 ml de S2 et mélanger
- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 4 ml de S3 et mélanger
- Centrifuger 30 minutes à 13.000 rpm
- Récupérer le surnageant dans corex 30 et recentrifuger si le surnageant n'est pas clair

4.5.2.3 Mise sur colonne

- Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2 pour équilibrer la colonne
- Ajouter le surnageant à purifier et ajouter - 2 x 4 ml de tampon N3 pour laver
 - 2 ml de tampon N5 pour éluer
- Récupérer l'ADN élué dans un corex 15 ml
- Ajouter 0.7 volume d'isopropanol pour précipiter l'ADN plasmidique purifié
- Centrifuger 30' à 13.000 rpm
- Décantier le surnageant (le culot = l' ADN)
- Ajouter 1 ml d'ethanol 70 % froid pour laver le culot
- Centrifuger 5 minutes
- Enlever l'ethanol
- Sécher sous vide (speedvack)
- Resuspendre dans 100 µl d'eau ou de TE

4.6 Purification et préparation de l'ADN

4.6.1 Extraction au phénol-chloroforme

Cette opération a pour objet d'enlever les sels et les protéines. On l'utilise notamment entre deux restrictions pour lesquelles les tampons d'incubation des enzymes sont différents.

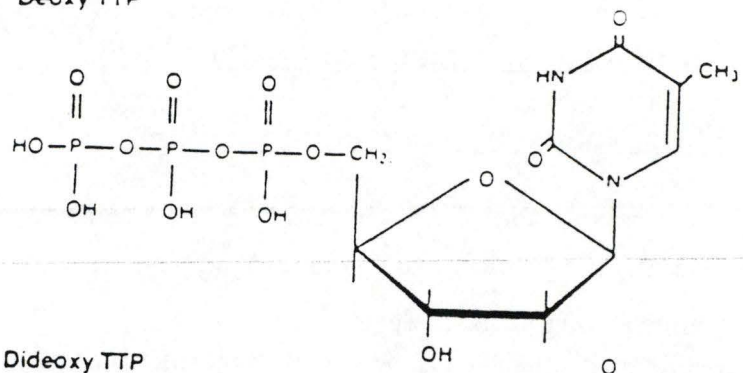
- Porter le volume à 100 µl avec de l'eau.
- Ajouter un volume de phénol / TE, ou phénol / chloroforme.
- Vortexer une minute.
- Centrifuger 2 à 3 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Prendre la phase aqueuse supérieure et la placer dans un nouvel Eppendorf.
- Ajouter 500 µl d'éther saturé en eau.
- Centrifuger quelques secondes.
- Eliminer la phase supérieure
- Ajouter: -2,5 volumes d'éthanol 100% froid.
-0,1 volume de NaAc 3M pH 5,2.
- Incuber 15 minutes à -80°C.
- Culotter l'ADN en centrifugeant 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décanter.
- Laver le culot à l'éthanol 90%
- Sécher 10 minutes sous vide puis resuspendre dans un volume approprié d'eau stérile.

4.6.2 Préparation d'ADN génomique de levure

On peut via ce protocole préparer de l'ADN génomique de levure en vue de la réalisation d'un Southern.

- Centrifuger une culture de 100 ml en phase stationnaire 5 minutes à 5000 rpm (rotor Sorvall GSA).
- Resuspendre les cellules dans 10 ml de tampon SCEb et ajouter 2 mg de Zymolyase 1000 000 dilué dans du glycérol 60 %..
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Centrifuger les sphéroblastes 5 minutes à 5000 rpm (rotor Sorvall SS34) puis les resuspendre dans 10 ml de solution de lyse.
- Placer 15 minutes à 70°C.
- Ajouter 1 ml d'acétate de potassium 5 M et placer 30 minutes sur glace.
- Centrifuger 10 minutes à 10000 rpm (rotor Sorvall SS34).
- Extraire le surnageant au phénol-Chloroforme puis centrifuger 30 minutes à 13 000 rpm à 20°C (rotor Sorvall SS34). Répéter l'opération jusqu'à ce que l'interface soit propre.
- Prélever la phase aqueuse avec précaution et ajouter 2 volumes d'éthanol absolu. Il se forme alors un écheveau d'ADN que l'on peut récupérer avec un cône de pipette.
- Rincer l'ADN à l'éthanol 70 %.
- Resuspendre l'ADN dans 1 ml de TE.

A Deoxy TTP



B Dideoxy TTP

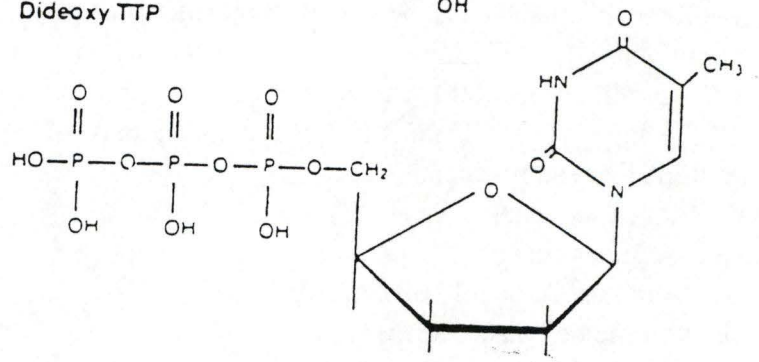


Figure 8: A. Structure d'un déoxyribonucléotide
B. Structure d'un didéoxyribonucléotide

- Ajouter 250 µl de RNase à 10 mg/ml et incubé 30 minutes à 37°C.
- Ajouter 312 µl de protéinase K à 2 mg/ml et incubé 30 minutes à 37°C.
- Extraire au phénol chloroforme puis centrifuger 15 minutes à 13000 rpm (rotor Sorvall SS 34)
- Ajouter avec précaution 2 volume d'éthanol absolu à la phase aqueuse. De nouveau il se forme un écheveau d'ADN que l'on peut récupérer avec le cône d'une pipette.
- Rincer l'ADN à l'Éthanol 70 %.
- Laisser légèrement sécher l'ADN et le resuspendre dans de l'eau ou du TE.

SCEb

Sorbitol 1.2 M
 Citrate de sodium 0.1 M
 EDTA 0.06 M
 β-Mercapto 14 mM

Solution de lyse

EDTA 50 mM pH 8.5
 SDS 0.2 %

4.7 Le Séquençage.

(T77 Sequencing™ kit Pharmacia.27-1682-01)

4.7.1 Principe du séquençage.

La méthode utilisée est celle des terminateurs de chaînes. (Sanger *et al.*, 1977).

Cette méthode consiste à faire synthétiser par une polymérase un brin complémentaire à celui que l'on désire séquencer. Cette polymérase requiert une matrice simple brin et une amorce lui fournissant un groupement 3'-OH libre. Le fragment à séquencer est cloné dans un plasmide .

Le primer utilisé est un oligonucléotide synthétique dont la séquence est complémentaire à celle qui borde l'insert sur le vecteur utilisé.

L'incorporation au hasard dans la chaîne naissante d'un didéoxyribonucléotide (ddNTP), un analogue de déoxyribonucléotide ne possédant pas de groupements hydroxyle en 3' (fig.8), interrompt l'élongation. Statistiquement la terminaison se produira au moins une fois en chaque point (fig.9).

Quatre tampons d'élongation sont utilisés. Ils contiennent les quatre déoxyribonucléotides usuels (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dont un est marqué radioactivement ([α-³⁵S] dATP). Par contre, ils ne contiennent qu'un des quatre didéoxyribonucléotides.

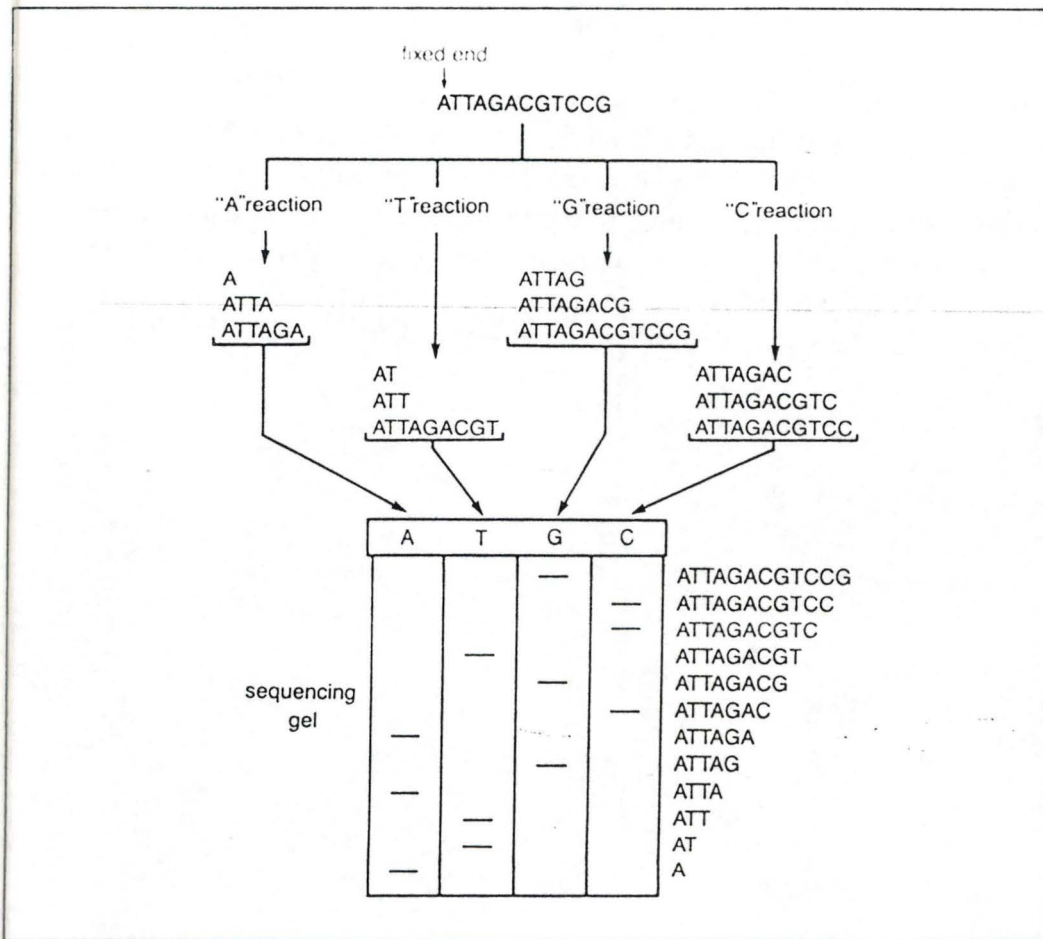


Figure 9: Stratégie générale du séquençage.

Pour séquencer un fragment d'ADN, un set d'oligonucléotides simples 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 fractionnés par électrophorèse sur les lignes adjacentes d'un gel de polyacrylamide. Après autoradiographie, la séquence de l'ADN peut être lue directement sur le gel.

Chacun des quatre tubes réactionnels contient en fin de réaction une population de fragments de taille variable. La taille de ces fragments permet de déterminer la position à laquelle s'est incorporé le ddNTP dans la chaîne en élongation et donc la position de la base complémentaire dans le brin que l'on a séquencé (figure 9 et 10).

La migration concomitante des quatre mélanges réactionnels sur gel de polyacrylamide permet une lecture de la séquence d'ADN.

4.7.2 Réactions de séquençage.

4.7.2.1 Dénaturation

- Utiliser 4 mg d'ADN
- Ajouter x ml eau de façon à ce que volume d'ADN + volume eau = 8µl.
- Ajouter 2 ml NaOH 2N
- Incuber 10 minutes température ambiante
- Ajouter 3 µl NaAc 3M PH 4.5
- Ajouter 7 µl eau
- Ajouter 60 µl EtOH 100 %
- Incuber 10 minutes à - 80° C
- Centrifuger 20 minutes à 15000 rpm
- Retirer l'éthanol 100 % et ajouter 60 µl d'EtOH 70 %
- Centrifuger 10 minutes
- Retirer l'éthanol et sécher

4.7.2.2 Annealing (Hybridation)

- Ajouter -10 µl d'eau sur l'ADN
 - 2 µl oligo (10 ng/µl) primers utilisés
 - 2 µl annealing buffer
- Incuber 20 minutes à 37° C puis 15 minutes à température ambiante
- Préparer 2.5 µl des ddNTP A, C, G, T par eppendorf

4.7.2.3 Labelling (marquage radioactif)

- Ajouter à la réaction d'annealing - 3 µl labelling buffer
 - 1 µl S 35 d'ATP
 - 2 µl T 7 (dilution 5 fois dans enzyme buffer)
- Quick spin
- Incuber 5 minutes température ambiante
- Ajouter 4 à 5 µl de la solution labelling dans chaque eppendorf contenant les différents ddNTP
- Incuber 5 minutes à 37° C
- Ajouter 5 µl de solution stop

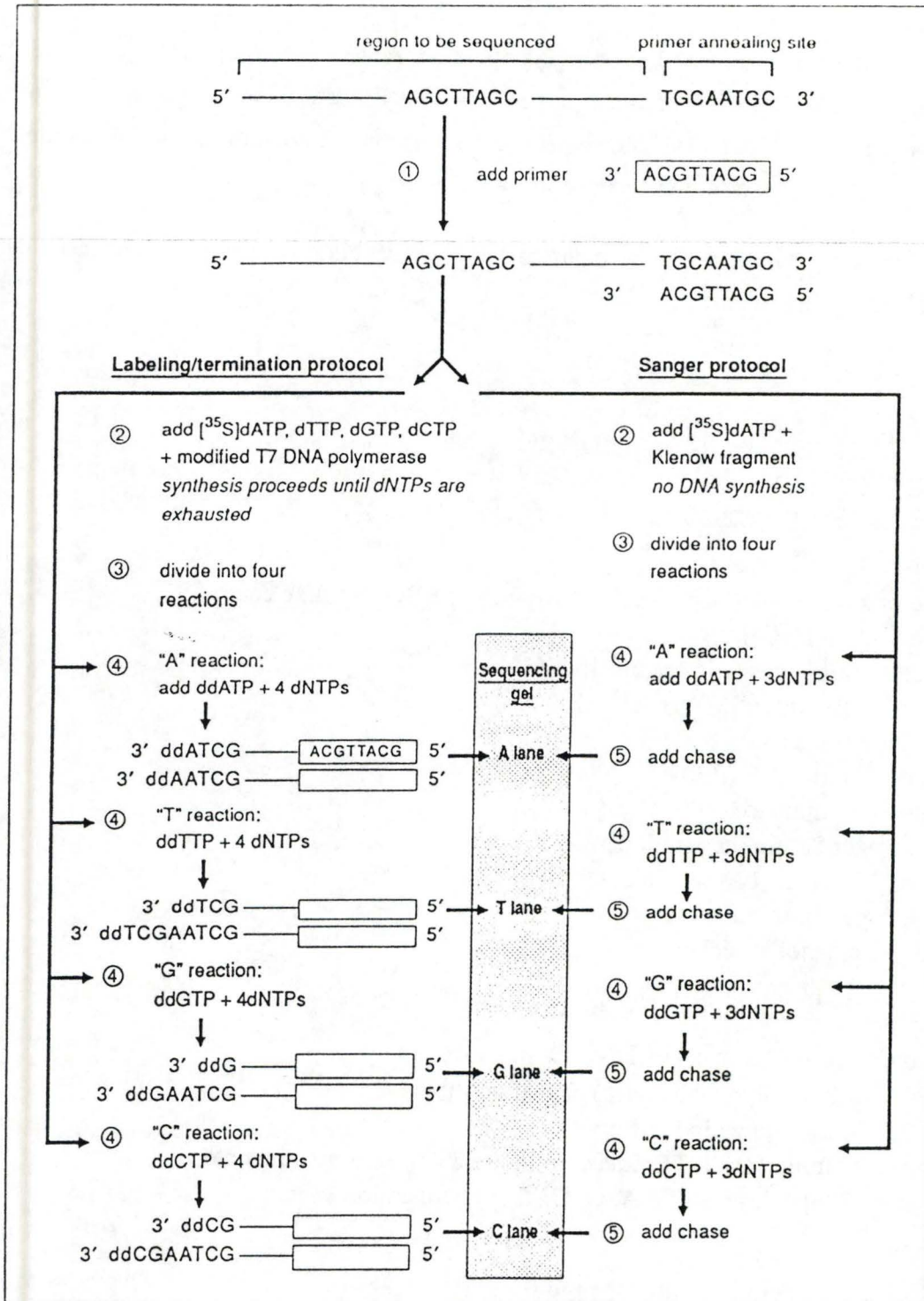


Figure 10: Méthode de séquençage par les didéoxynucléotides

Un fragment d'ADN simple brin est hybridé avec un primer oligonucléotidique pour la polymérisation (étape 1). Les fragments Klenow et les dATP marqués radioactivement sont ajoutés (étape 2). La réaction est divisée en quatre aliquots (étape 3) et les 3 autres dNTPs ainsi que soit les ddATP, ddTTP, ou les ddCTP sont ajoutés (étape 4). La synthèse de l'ADN se poursuit jusqu'à l'incorporation d'un ddNTP.

- Eventuellement stocker à - 20°

4.7.2.4 Préparation du gel

- Mélanger:
- 42 gr d'urée
 - 45 ml d'eau
 - 10 ml de TBE 10 X
 - 15 ml de solution de polyacrylamide
- Après dissolution de l'urée, filtrer au Buchner (filtre Millipore SA 78)
 - Ajouter:
 - 600 µl de persulfate de sodium
 - 30 µl de Temed

4.7.2.5 Fabrication du gel de séquençage

- Nettoyer les plaques avec eau de ville - eau distillée - ethanol
- "Coater" la petite plaque avec 10 ml de dimethyl dichloro silane (silicone)
- Placer les spacers
- Refermer les plaques sceller au tape jaune (s'aider des pinces)
- Couler le gel en oblique mais le laisser polymeriser à l'horizontal
- Faire une ligne de base avec deux peignes retournés
- Préchauffer le gel (15 minutes si utilisé tout de suite ou 30 minutes s'il a été mis à 4 ° la nuit)

4.7.2.6 Mise sur gel

- Mettre les bases 3 minutes à 90° pour les dénaturer avant de les charger sur le gel.
- Laisser migrer 3 minutes après chaque chargement de quatre bases pour laisser pénétrer
- Laisser migrer le temps voulu

4.7.2.7 Après la migration

- Retire la petite plaque de façon à ce que le gel reste sur la grande plaque.
- Mettre solution de fixateur sur le gel pendant 10 minutes
- Mettre un buvard whatman (3MM Chr) sur le gel afin que celui-ci se fixe dessus.
- Recouvrir le gel transféré sur le buvard avec un saran
- Sécher sous vide à 80°C pendant une heure et demie.
- Mettre le gel en cassette avec un film d'autoradiographie pendant 12 heures
- Révéler le film pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau.
- Fixer le film pendant 15 minutes.
- Rincer à l'eau et sécher.

4.8 Southern blot

Le Southern blot est le transfert de fragments d'ADN d'un gel d'électrophorèse ou ils ont été séparés vers un filtre de nylon sur lequel ils seront fixés.

Ces fragments pourront par la suite être hybridés avec une sonde en vue d'analyser leur nature.

4.8.1 Préparation du gel d'agarose au transfert de l'ADN

Placer le gel dans les bains suivant

- 15 minutes dans HCl 0.25 M
- 2 X 15 minutes dans :
 - du tampon de dénaturation
 - du tampon de neutralisation
 - du SSC 20 X

4.8.2 Montage pour le transfert (fig.11)

réaliser le montage suivant pour que l'ADN soit transféré du gel vers la membrane de nylon par capillarité.

- Sur une plaque de verre servant de support, déposer un papier whatman 3MM imbibé de SSC 20 X. Ce papier sert de mèche puisqu'il est trempé dans un bain contenant du SSC 20X. Placer le gel à l'envers bien à plat sur le papier.
- Déposer une feuille de nylon (Hybond-N, Amersham) au dimension du gel sur celui-ci.
- Mettre quelques feuilles de papier whatman 3MM sur la membrane ainsi que plusieurs couche de papier buvard.
- Placer sur le tout une plaque de verre sur laquelle repose un poids de 1 Kg
- Laisser transférer toute la nuit à température ambiante
- Récupérer la membrane et vérifier, sur le gel le transfert de l'ADN aux ultras violets
- Fixer l'ADN en mettant la membrane 10 minutes à 80°C

4.8.3 Préhybridation

- Placer le filtre dans un récipient contenant:
 - 10 ml de solution de Denhart's 50X
 - 10 ml de SSC 20 X
 - 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 stérile.
- Incuber pendant deux heure dans un bain à 68°C.

4.8.4 Synthèse de la sonde radioactive (Random primed DNA labelling Kit. BRL).

- Dénaturer 25 ng d'ADN dissous dans 5-20 μ l d'eau distillée en le chauffant pendant 5 minutes à 100°C.
- Placer sur glace pour éviter la renaturation.
- Ajouter successivement:
 - 2 μ l dATP solution
 - 2 μ l dGTP solution
 - 2 μ l dTTP solution
 - 15 μ l de random primer buffer mixture
 - 5 μ l de [α -32P] dCTP, 3000 Ci/mMol, 10 μ Ci/ μ l
- Porter le volume à 49 μ l avec de l'eau distillée.
- Mélanger rapidement.
- Ajouter 1 μ l de Klenow, mélanger et centrifuger brièvement.
- Incuber une heure à 25°C et ajouter 5 μ l de solution STOP

4.8.5 Hybridation

- Dénaturer la sonde en la mettant 10 minutes à 100°C.
- Ajouter la sonde au récipient contenant la membrane.
- Sceller le récipient.
- Incuber une nuit à 68°C.

4.8.6 Lavages

- Laver le filtre deux fois 10 minutes dans une solution SSC 2X et SDS 0.1% à température ambiante.
- Si la membrane est encore fortement radioactive
- Laver de nouveau deux fois 10 minutes dans une solution SSC 0.2X et SDS 0.1%.
- Si la membrane est encore fortement radioactive on peut faire de nouveaux lavage à la température de 68°C.

4.8.7 Révélation

- Placer le filtre en cassette avec un film d'autoradiographie.
- Placer 4 heures à -80°C.
- Révéler le film pendant 5 minutes.
- Fixer le film pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau et sécher.

4.9 Hybridation sur colonies

Des colonies sur boîtes sont transférées sur un filtre de nylon rond. Le filtre est ensuite traité afin de lyser les cellules et de fixer leur ADN.

Le filtre portant l'ADN des cellules est hybridé avec une sonde afin de repérer les cellules porteuses de la séquence d'intérêt.

4.9.1 Transfert des colonies sur filtre

- Etaler sur boîtes LB+ Amp les cellules d' *E.coli* transformées par les plasmides de la banque.
- Incuber une journée à 37°C.
- Transférer les colonies sur un filtre de Nylon.
- Au moyen d'une aiguille stérilisée à la flamme, faire 3 trous dans le filtre et indiquer leurs positions relatives sur la boîte afin de pouvoir orienter celui-ci.
- Poser le filtre sur une boîte LB + Amp colonies vers le dessus et incuber pendant 3-4h

4.9.2 Lyse des cellules

- Déposer le filtre sur une feuille de papier imbibée de solution de dénaturation et laisser 7 minutes.
- Transférer sur une feuille imbibée de solution de neutralisation et laisser 7 minutes.
- Transférer sur une feuille imbibée de SSC 20 % et laisser 3 minutes.
- Mettre une feuille de papier whatman sur le filtre et passer avec un rouleau pour ôter les débris cellulaires (le DNA reste fixé sur le filtre).
- Mettre le filtre 10 minutes à 80°C.

4.9.3 Préhybridation, hybridation, lavages et révélation

Toutes ces étapes sont identiques à celles décrites pour le Southern et ne sont donc plus décrites.

VII. BIBLIOGRAPHIE

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Antequera, F., Tamame, M., Villanueva, J., and Santos, T. (1984). DNA methylation in the Fungi. *J. Biol. Chem* 259, 8033-8036.
- Aruffo, A. and Seed, B. (1993). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiently expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 8573-8577.
- Chen, D-C., Yang, B-C., and Kuo, T-T. (1992). One-step transformation in stationary phase. *Curt Genet* 21, 83-84.
- Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pfugrath, J., and Roberts, R. (1993). Crystal structure of the HhaI DNA Methyltransferase Complex with S-Adenosyl-L-Methionine. *Cell* 74, 299-307.
- Chernoff, Y.O., Vincent, A., and Liebman, W.S. (1994). Mutations in eucaryotic 18 S ribosomal RNA affect translational fidelity and resistance to aminoglycoside antibiotics. *EMBO* 13, 906-913.
- Choel, J., Shuster, T., and Grunstein, M. (1982). Organisation, primary structure, and evolution of histone H2A and H2B genes of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3261-3269.
- Cundliffe, E. (1990). Recognition Sites for Antibiotics within rRNA. In *The ribosome*. E.H. Walter, A. Dahlberg, R.A. Garrett, P.B. Moore, D. Schlessinger, and J.R. Warner, eds. (Washington: American Society for Microbiology), pp. 479-490.
- Depiereux, E. and Feytmans, E. (1991). Simultaneous and multivariate alignment of Protein Sequences. Correspondence between physico-chemical profiles and structurally conserved regions (SCR's). *Protein Engeneering* 4, 603-613.
- Depiereux, E. and Feytmans, E. (1991). "MATCH BOX: a fundamentally new algorithm for the simultaneous alignment of several protein sequences". *E. CABIOS* 8,
- Gualerzi, C.O. (1990). Initiation of protein Biosytnhetis in Procaryotes: Recognition of mRNA by Ribosomes and Molecular Basis for the Function of Initiation Factors. In *The ribosome*. E.H. Warner, ed. (Washington: American Society for Microbiology), pp. 281-291.

Gutell, R., Weiser, B., Woese, C., and Noller, H. (1985). Comparative Anatomy of 16-S-like Ribosomal RNA. *Progress in Nucleic Acid Research* 156-214.

Gutell, Robin., Weiser, Bryn., Woese, Carl., and Noller, Harry. (1985). Comparative Anatomy of the 16-S-like Ribosomal RNA. *Progress in Nucleic Acid Research* 155-214.

Ingrosso, D., Fowler, A., Bleibaum, J., and Clarke, S. (1989). Sequence of the D-Aspartyl/L-Isoaspartyl Protein Methyltransferase from Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 20131-20139.

Jean-Jean, O., Cassan, M., and Rousset, J-P. (1992). L'initiation de la traduction chez les eucaryotes, source de diversification et de modulation de l'expression des gènes. *Société Française de Génétique* 1-11.

Ju, Q. and Warner, J.R. (1994). Ribosome synthesis During the Growth Cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST* 10, 151-157.

Kanoaka, Y. and Nojima, H. (1994). SCR: novel human suppressors of cdc2/cdc13 mutants of *Schizosaccharomyces pombe* harbour motifs for RNA binding proteins. *Nucleic Acids Res* 22, N°13, 2687-2693.

Keeney, J.B. and Boeke, J.D (1994). Efficient Targeted Integration at *leu-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136, 849-856.

Kooning, E. (1994). Prediction of an rRNA methyltransferase domain in human tumor-specific nuclear protein p120. *Nucleic Acids Res.* 22, 2476-2478.

Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A.L., Degrès, J., and Vandenhoute, J. (1994). The DIM1 Gene Responsible for the Conserved m²m² Dimethylation in the 3'-Terminal loop of the 18 S rRNA is Essential in Yeast. *J. Mol. Biol.* 241, 492-497.

Larson, D., Zahradka, P., and Sells, H. (1990). Control points in eucaryotic ribosome biogenesis. *Biochem. Cell Biol* 69, 5-22.

Larson, D.E., Zahradka, P., and Sells, B.H. (1990). Control points in eucaryotic ribosome biogenesis. *Biochem. Cell Biol.* 69, 5-22.

- Lee, M. and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *NATURE* 327, 31-35.
- Lewin, B. (1990). *Genes IV*. Medicine-Science
- McCarthy, J.E.G. and Brimacombe, R. (1994). Procaryotic translation: the interactive pathway leading, to initiation. *TIG* 10, 402-407.
- Merick, W. (1992). Mechanism and Regulation of the Eucaryotic Protein Synthesis. *Microbiological Reviews* 56, 291-315.
- Minet, M., Dufour, M-E., and Lacroute, F. (1992). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* 2, 417-422.
- Mitchison, J.M. (1990). The fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioessays* 12, 189-191.
- Möller, W. (1991). Functional aspects of ribosomal proteins. *Biochimie* 73, 1093-1100.
- Nazar, R.N., Lo, A.C., and Wildeman, A.G. (1983). Effect of the 2'-O-methylation on the structure of mammalian 5.8 S rRNAs and the 5,8 S-28 S rRNA junction. *Nucleic Acids Res* 11,
- Philopps, J., Nasin, A., and Miller, D.R. (1985). Recovery, Repair, and Mutagenesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Advences in Genetics* 23, 1-55.
- Planta, R.J. and Raué, H.A. (1988). Control of ribosome biogenesis in Yeast. *TIG* 4, 64-68.
- Politz, M. and Glitz, G. (1977). Ribosome structure: Localisation of N⁶, N⁶- dimethyladenosine by electron microscopy of a ribosome-antibody complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 1468-1472.
- Razin, A. and Cedar, H. (1991). DNA Methylation and Gene Expression. *Microbiological Reviews* 451-458.

- Russel, P. (1994). Gene Cloning and Expression in Fission Yeast. In Molecular Biology of the Fission Yeast. A. Nasim, P. Young, and B.F. Johnson, eds. (Academic Press), pp. 243-271.
- Rydberg, B., Spurr, N., and Karran, P. (1990). cDNA Cloning and Chromosomal Assignment of the human O⁶- Methylguanine-DNA Methyltransferase. J. Biol. Chem 265, 9563-9569.
- Segal, D. and Eichler, C. (1991). A Nuclear 2'-O-Methyltransferase. J. Biol. Chem 266, 24385-24389.
- Shah, M., Khan, N., Salim, M., and Edward, H. (1978). Extensive Homologies between the Methylated Nucleotide Sequences in Several Vertebrate Ribosomal Ribonucleic Acids. Biochem. J. 169, 531-542.
- Spirin, A. (1986). Ribosome Structure and protein Biosynthesis (Benjamin/Cummings.).
- Takeda, T. and Yamamoto, M. (1987). Analysis and *in vivo* disruption of the gene coding for calmodulin in *Schizosaccharomyces pombe*. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 3580-3584.
- Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1987). SAM1, the structural Gene for One of the S-Adenosylmethionine Synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem 262, 16704-16709.
- Trempe, M.R. and Glitz, D.G. (1981). Chloroplast Ribosome Structure. J. Biol. Chem 256, 11873-11879.
- Uemara, T., Morikawa, K., and Yanagida, M. (1986). The nucleotide sequence of the fision yeast DNA topoisomerase II structural gene: Structural and functional relationships to other DNA topoisomerases. EMBO 5, 2355-2362.
- Van Buul, C.P.J.J., Damm, J.B.L., and Van Knippenberg, P.H. (1983). Kasugamycin Resistant Mutants of *Bacillus stearothermophilus* Lacking the Enzyme for the Methylation of Two Adjacent Adenosines in 16 S Ribosomal RNA. Mol Gen Genet 189, 475-478.
- Van Buul, C.P.J.J. and Van Knippenberg, P.H. (1985). Nucleotide sequence of the *KsgA* gene of *Escherichia coli*: comparison of methyltransferases effecting dimethylation of adenosine in ribosomal RNA. Gene 38, 65-72.

Van Gemen, B., Koets, H.J., Plooy, C.A.M., Bodlaender, J., and Van Knippenberg, P.H. (1987). Characterisation of the *KsgA* gene of *Escherichia coli* determining Kasugamycin sensitivity. *Biochimie* 69, 841-848.

Warner, E.H. (1990). *The ribosome: structure, function, and evolution* (Washington: American Society for Microbiology).

Warner, J.R. (1990). The nucleolus and ribosome formation. *Current Opinion in Cell Biology* 2, 521-527.

Willcock, D.F., Dryden, D.T.F., and Murray, N.E. (1994). A mutational analysis of the two motifs common to adenine methyltransferases. *EMBO* 13, 3902-3908.