



Thèse

1994

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Protéine "La" et terminaison de la transcription des gènes de classe III

Marq-Lin, Nathalie

How to cite

MARQ-LIN, Nathalie. Protéine 'La' et terminaison de la transcription des gènes de classe III. Doctoral Thesis, 1994. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:106016

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:106016>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:106016](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:106016)

UNIVERSITE DE GENÈVE

Département de Biochimie

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur M. Ballivet

Département de Génétique
et Microbiologie

FACULTÉ DE MÉDECINE

Professeur S.G. Clarkson

**PROTÉINE "LA" ET TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION
DES GÈNES DE CLASSE III**

THÈSE

présentée à la faculté des
Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de Docteur
ès Sciences
mention Biochimie

par

Nathalie LIN-MARQ

de

Paris (France)

Thèse No 2709

Genève
1994

UNIVERSITÉ



DE GENÈVE

FACULTÉ DES SCIENCES

*Doctorat ès sciences
mention biochimique*

Thèse de *Madame Nathalie Edwige LIN - MARQ*

intitulée :

"PROTEINE "LA" ET TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION DES GENES DE CLASSE III."

La Faculté des Sciences, sur le préavis de Messieurs S.G. CLARKSON, professeur titulaire et directeur de thèse (Faculté de Médecine - Département de génétique et microbiologie), M. BALLIVET, professeur ordinaire et répondant de la Faculté des Sciences (Département de biochimie), B. HALL, professeur (University of Washington, Department of genetics - Seattle) et A. SENTENAC, docteur (CEA-Saclay, Service de biochimie et génétique moléculaire - Gif-sur-Yvette), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 26 septembre 1994

Thèse - 2709 -

Le Doyen, Pierre MOESCHLER

N.B.- La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

Nombre d'exemplaires à livrer par colis séparé à la Faculté : - 10 -



à mes parents,
à Jean-Baptiste et Guillaume,

REMERCIEMENTS.....	7
ABREVIATIONS.....	8
RESUME.....	10
INTRODUCTION.....	12
A: LA TRANSCRIPTION PAR L'ARN POLYMERASE III.....	12
A.1- INITIATION DE LA TRANSCRIPTION PAR POLIII.....	13
1) Les promoteurs des gènes de classe III.....	13
a) promoteurs intragéniques.....	13
b) promoteurs extragéniques.....	14
c) promoteurs mixtes.....	14
2) L'ARN polymérase III.....	17
3) Les facteurs de transcription de l'ARN polymérase III.....	17
3.1) TFIIB, déterminant de la spécificité de Pol III.....	18
particularités de TFIIB.....	18
TBP : sous unité de TFIIB.....	18
TFIIB et la transcription à partir des promoteurs Pol III ne contenant pas de boîte TATA.....	19
TFIIB et la transcription à partir des promoteurs Pol III contenant une boîte TATA.....	23
3.2) Les facteurs d'initiation séquence-spécifiques.....	25
TFIIIA et gènes 5S.....	25
TFIIIC.....	26
Autres facteurs liant les régions 5' flanquantes.....	27
La transcription par Pol III chez le ver à soie et TFIIIR.....	27
TFIIIE.....	28
A.2- ELONGATION ET TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION PAR POL III.....	28
1) L'élongation.....	28
2) La terminaison.....	29
3) Implication de la protéine La dans la terminaison par Pol III.....	30
B: LES MECANISMES DE TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION DES GENES.....	33
B.1- QUELS SONT LES SIGNAUX DE TERMINAISON RECONNUS INTRINSEQUEMENT PAR LES ARN POLYMERASES ?.....	34
B.2-REGULATION DE LA TERMINAISON PAR DES PROTEINES LIANT L'ARN NAISSANT.....	35
1) Procaryotes.....	35
1.1)Terminaison Rho-dépendante.....	35
1.2)Antiterminaison.....	35
1.3)Atténuation.....	36
2) Virus.....	36
2.1)Terminaison par la polymérase du virus de la vaccine.....	36
2.2)Antiterminaison par la protéine Tat du virus HIV.....	37
3) Eucaryotes.....	37
3.1)Terminaison par l'ARN polymérase II.....	37
B.3- REGULATION DE LA TERMINAISON PAR DES PROTEINES LIANT L'ADN.....	38
1) Procaryotes.....	38
1.1)Terminaison du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.....	38
1.2)Antiterminaison.....	39
2) Eucaryotes.....	39

2.1) Transcription par l'ARN polymérase I.....	39
2.2) Transcription par l'ARN polymérase mitochondriale.....	40
2.3) Transcription par l'ARN polymérase II.....	40
B.4- REGULATION DE LA TERMINAISON PAR DES FACTEURS	
INTERAGISSANT AVEC L'ARN POLYMERASE.....	41
1) Procaryotes.....	41
1.1) Atténuation.....	41
1.2) Antiterminaison.....	42
2) Eucaryotes.....	42
MATERIELS ET METHODES.....	44
A: MODIFICATIONS ENZYMATIQUES DE L'ADN.....	44
A.1: Digestion par les endonucléases de restriction.....	44
A.2: Fragment Klenow de l'ADN polymérase I d' <i>E. coli</i>	44
A.3: Phosphatase alcaline (CIP).....	44
A.4: T4 polynucléotide kinase (PNK).....	45
A.5: T4 ADN ligase.....	45
A.6: Mutagénèse dirigée.....	45
B: ELECTRO-TRANSFORMATION D' <i>E. COLI</i>.....	46
B.1: Préparation des cellules électro-compétentes.....	46
B.2: Electro-transformation.....	46
C: PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE.....	47
C.1: Minipréparation de plasmides.....	47
C.2: Maxipréparation de plasmides.....	47
C.3: Purification sur colonne Biogel A-50 (Biorad).....	48
D: ELECTROPHORESE.....	48
D.1: Gel d'agarose.....	48
D.2: Gel d'acrylamide non dénaturant.....	49
D.3: Gel d'acrylamide dénaturant.....	49
D.3.1: Gel de séquence d'ADN:.....	49
D.3.2: Gel de transcription.....	49
D.4: Gel de protéines à une dimension.....	50
E: EXTRACTION D'ACIDE NUCLEIQUE D'UN GEL.....	51
E.1: Gel d'agarose.....	51
E.1.1: Extraction par électroélution.....	51
E.1.2: Extraction par élution sur feuille de DEAE.....	51
E.1.3: Extraction par liquéfaction de l'agarose.....	51
E.2: Gel d'acrylamide.....	51
F: SEQUENCAGE DES ACIDES NUCLEIQUES.....	52
F.1: Séquençage de l'ADN.....	52
F.1.1 Selon Maxam et Gilbert.....	52
F.1.2: Selon Sanger.....	53
F.2: Séquençage d'ARN.....	53
F.2.1: Hydrolyse de l'ARN par la RNase T1.....	53
F.2.2: Première dimension: électrophorèse sur acétate de	
cellulose.....	53
F.2.3: Deuxième dimension: chromatographie sur couche	
mince.....	54
G: TRANSCRIPTION IN VITRO DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES.....	54
G.1: Culture de cellules.....	54
G.2: Préparation d'extrait de cellules somatiques S-100.....	54
G.3: Préparation d'extrait de cellules oocytaires S-150.....	55
G.4: Procédure de transcription <i>in vitro</i>	55

G.5: Fractionnement des extraits oocytaires S-150 sur colonne de phosphocellulose P11	56
G.5.1: Colonne de phosphocellulose P2	56
G.5.2: Colonne de phosphocellulose P11	56
G.6: Transcription de matrice ADN immobilisée sur billes magnétiques	57
H: TRANSCRIPTION IN VITRO PAR L'ARN T7 POLYMERASE	57
I: SYNTHÈSE IN VITRO DES PROTÉINES	58
I.1: Traduction dans des extraits de germe de blé	58
I.2: Traduction dans des extraits de réticulocytes de lapin (Promega)	58
J: PRODUCTION DE LA PROTÉINE La DE XENOPE RECOMBINANTE	59
J.1: Production de la protéine recombinante	59
J.2: Extraction de la protéine recombinante	59
J.3: Purification de la protéine recombinante	59
J.4: Dosage de Bradford	60
K: PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX α -La	60
K.1: Immunisation des lapins	60
K.2: Purification des IgG α -La	60
L: APPLICATIONS EXPERIMENTALES UTILISANT LES ANTICORPS α -La	61
L.1: Western-Blot	61
L.1.1: Révélation par un substrat coloré : BCIP/NBT	61
L.1.2: Révélation par un substrat chimiluminescent AMPPD (Boehringer)	61
L.2: Immunoprécipitation	62
L.3: Immunodéplétion	62
M: PRÉPARATION D'ADN GENOMIQUE DE LEVURE	62
N: SOUTHERN-BLOT GENOMIQUE	63
N.1: Transfert des fragments d'ADN du gel d'agarose sur une membrane de nitrocellulose	63
N.2: Synthèse de la sonde ADN	63
O: TRANSFORMATION DE LEVURES	64
O.1: Préparation des levures compétentes	64
O.2: Transformation	64
P: PRODUCTION DE LA PROTÉINE La DE XENOPE DANS LA LEVURE <i>S.CEREVISIAE</i>	64
P.1: Préparation d'extraits protéique pour analyse sur gel SDS-PAGE	65
P.2: Préparation d'extrait brut	65
Q: CRIBLAGE D'UNE BANQUE GENOMIQUE lgt11 DE <i>S.CEREVISIAE</i>	66
Q.1: production des protéines par <i>E. coli</i>	66
Q.2: traitement des filtres	66
Q.3: Préparation de l'extrait bactérien	67
R: DISRUPTION DU GENE LA	67
PARTIE 1: LA PROTÉINE La DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	68
A: CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE LA PROTÉINE La DE <i>X. LAEVIS</i> PRODUITE PAR <i>E. COLI</i>	69
A.1- Une protéine de 49 kDa est synthétisée par <i>E. coli</i>	69
A.2- Purification partielle de la protéine La sur colonne d'héparine-sépharose	72
A.3- Les anticorps polyclonaux de lapin reconnaissent une protéine de 49 kDa	78
A.4- La protéine synthétisée par <i>E.coli</i> immunoprécipite les précurseurs d'ARNt possédant 4 uridines à leur extrémité 3'OH	82
A.5- La protéine La lie les précurseurs d'ARNt sous la forme d'un monomère	88
A.6- Un excès de protéine La dans les extraits S-100 inhibe l'efficacité de transcription et diminue le nombre de formes matures des ARNt	95

B: MODIFICATION DE LA TRANSCRIPTION D'UN GENE DE CLASSE III DANS UN EXTRAIT DEplete EN PROTEINE La?	98
B.1- Un ARN plus court apparaît quand le gène ARNtPhe est transcrit en présence d'un excès d'ARNt précurseurs.....	98
A.2- Un ARN plus court apparaît quand le gène d'ARNtPhe est transcrit dans un extrait immunodéplété en protéine La.....	102
C: L'APPARITION DE Px ET LA TRANSCRIPTION PAR Pol III SONT DEUX EVENEMENTS INDEPENDANTS.....	111
D: LA PROTEINE La EST-ELLE NECESSAIRE A LA SYNTHÈSE DES RESIDUS URIDINES TERMINAUX?.....	114
E: LA PROTEINE La EST-ELLE NECESSAIRE POUR RELACHER UN TRANSCRIT SYNTHETISE PAR POL III?	119
 PARTIE 2: LA PROTEINE La DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	134
A: UNE PROTEINE QUI LIE PREFERENTIELLEMENT UN TRANSCRIT DONT L'EXTREMITE 3' SE TERMINE PAR LA SEQUENCE UUUU(OH) EXISTE CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i>	135
B: CLONAGE DU GENE YLA1 CODANT LA PROTEINE La DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	139
C: CARACTERISTIQUE DE LA PROTEINE LaY CODEE PAR LE GENE YLA1.....	146
D: DISRUPTION DU GENE YLA1.....	150
E: CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE LaY	154
E.1- Le fragment génomique contenant le gène YLA1 code une protéine de poids moléculaire apparent égal à 36 kDa.	154
E.2- La protéine LaY, comme la protéine LaB1, lie préférentiellement un ARN possédant la séquence UUUUOH à son extrémité 3'.....	155
E.3- Une protéine "La-like", autre que LaY, existe t-elle chez <i>S.cerevisiae</i> ?	161
 DISCUSSION.....	165
Protéine La et terminaison de la transcription par Pol III.....	165
Production d'anticorps a-La spécifiques pour la protéine de <i>Xenopus</i>	166
Une protéine La recombinante fonctionnelle.....	166
Protéine La et synthèse des résidus U terminaux	167
Protéine La et stabilité des transcrits primaires.....	170
Protéine La et relâchement des transcrits Pol III.....	171
Protéine La et maturation des transcrits Pol III.....	177
Protéine La et traduction des ARNm.....	178
Une protéine La existe chez la levure <i>S.cerevisiae</i>	179
Perspectives	181
 REFERENCES	183

REMERCIEMENTS

Je remercie,

Stuart G. Clarkson pour m'avoir accueilli au sein de son groupe, pour m'avoir enseigné la rigueur scientifique et pour m'avoir fait confiance au cours de ces années. Je le remercie pour sa disponibilité et je rends honneur à ses qualités humaines.

Daniel Scherly pour ses précieux conseils sur ce manuscrit et sur les expériences qui y figurent, pour les séances de psychothérapie les jours de blues ainsi que pour nos discussions passionnées sur nos chérubins respectifs.

Françoise Stutz pour m'avoir appris qu'il est si simple de s'or-ga-ni-ser!

Janine Corlet pour sa personnalité incomparable et pour sa précieuse collaboration dans le séquençage du gène La de *Saccharomyces cerevisiae*.

Gilles Moreau, Thierry Nospikel et Angelos Contantinou pour leur participation à rendre des plus agréables mon séjour au sein du laboratoire.

A. Bouverat , pour son art de maîtriser les lapins.

D. Rungger et D. Bertrand, pour la préparation des oocytes de *Xenopus*.

E. Kawashima et D. Scherly pour la synthèse des oligonucléotides.

G. Paravacini pour ses différents dons de banque génomique de *Saccharomyces cerevisiae*.

M. Strubin pour sa collaboration active dans la recherche du gène YLA1 et pour son esprit inventif.

M. Collart-Belin pour la dissection des tétrades.

B. Hall, A. Sentenac et M. Ballivet pour avoir accepté d'être membre du jury de thèse.

et l'ensemble des membres du département de Génétique et Microbiologie pour avoir créé, fidèle à leur réputation, une ambiance amicale et chaleureuse.

ABREVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ARN	:	acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messenger
ARNr	:	ARN ribosomique
ARNt	:	ARN de transfert
A	:	adénine
C	:	cytosine
G	:	guanine
T	:	thymidine
U	:	uracile
d(A,C,G,T)	:	déoxy(A,C,G,T)
(A,C,G,T)TP	:	(A,C,G,T) triphosphate
ddNTP	:	didéoxynucléotide triphosphate
EtBr	:	bromure d'éthidium
CsCl	:	chlorure de césium
BSA	:	albumine sérique de boeuf
PMSF	:	polyméthylsulfone
NaOAc	:	acétate de sodium
NH ₄ OAc	:	acétate d'ammonium
kb	:	kilobase
pb	:	paire de base
nt	:	nucléotide
kDa	:	kilodalton
v/v	:	volume par volume
w/v	:	poids par volume
D.O	:	densité optique
Ci	:	curie
cpm	:	coups par minute
rpm	:	rotation par minute
UV	:	ultra-violet
RTC	:	température ambiante
pfu	:	plage formant unité
Ø	:	diamètre
l	:	largeur
S	:	Svedberg
g	:	gramme
m	:	mètre
L	:	litre
M	:	molaire
N	:	normale
s	:	seconde
mn	:	minute

h	:	heure
°C	:	degré Celcius
U	:	unité
A	:	ampère
V	:	volt
W	:	watt
F	:	farad
Ω	:	ohm
x	:	fois

préfixes des unités:

k	:	kilo (10 ³)
m	:	milli (10 ⁻³)
μ	:	micro (10 ⁻⁶)
η	:	nano (10 ⁻⁹)
p	:	pento (10 ⁻¹²)
f	:	femto (10 ⁻¹⁵)

RESUME

Le sérum de nombreux patients atteints de maladies auto-immunes telles, le lupus érythémateux ou le syndrome de Sjögren, contient des anticorps dirigés contre une protéine cellulaire de 48-50 kDa appelée la protéine La. La caractéristique principale de cette protéine résulte dans son association transitoire avec des ARNs nouvellement synthétisés par l'ARN polymérase III (Pol III). La séquence reconnue par la protéine La se situe à l'extrémité 3' du transcrit. Elle est constituée d'un minimum de quatre résidus U successifs et correspond à l'équivalent ARN du signal de terminaison de la transcription par Pol III (Tn, n°4) (11). Depuis 1989, des expériences suggèrent que la protéine La est un facteur de terminaison de la transcription par Pol III, en étant nécessaire à la fois pour compléter la synthèse des transcrits (51,52) et pour les relâcher du complexe de transcription (51,52,98).

Dans *Xenopus laevis* existent deux protéines La très conservées, d'environ 49 kDa et 62% identiques à la protéine humaine. Dans le but d'étudier la fonction de la protéine de *Xenopus* en utilisant des composants purifiés, nous avons cloné dans un vecteur d'expression bactérien l'ADNc codant la protéine de xénope majoritairement représentée. Afin d'obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine de *Xenopus*, des lapins ont été immunisés avec la protéine recombinante de grenouille. Ces anticorps ont servis à éliminer progressivement la protéine La des extraits S-100 préparés à partir de culture de cellules de rein de *X. laevis*. En accord avec les résultats de Gottlieb et Steitz (51,52), nous avons observé que des extraits ainsi immunodéplétés génèrent un nombre réduit de transcrits Pol III, certains d'entre eux étant plus courts que la normale. L'addition de protéine La recombinante restaure partiellement le nombre et la longueur des transcrits naissants. Cependant, ces changements (quantité et taille des transcrits) peuvent être dissociés des mécanismes de transcription par Pol III puisque des résultats identiques sont obtenus en incubant dans des extraits déplétés en protéine La, des précurseurs d'ARNt synthétisés préalablement par l'ARN T7 polymérase. Nos résultats

suggèrent plutôt que La protège les transcrits précurseurs d'une dégradation 3'exonucléasique.

Des extraits déplétés en protéine La et fractionnés sur colonne de phosphocellulose pour éliminer les nucléases endogènes, synthétisent des transcrits de longueur normale. De même la transcription du gène d'ARNt^{Phe} dans de tels extraits non fractionnés pendant un temps très court, permettant de visualiser les précurseurs en absence de dégradation nucléasique, génère également des précurseurs de longueur normale. Ces résultats suggèrent que la protéine La de *Xenopus* n'est pas nécessaire pour compléter la synthèse des transcrits Pol III.

Différentes approches comme l'utilisation d'héparine pour inhiber la réinitiation de la transcription ou l'immobilisation du gène d'ARNt^{Phe} sur des billes magnétiques indiquent, contrairement aux résultats de Maraia et al. (98), que des extraits immunodéplétés en protéine La sont respectivement capables d'assurer plusieurs tours de transcription et que les ARNs transcrits sont normalement libérés du complexe de transcription. Ces résultats suggèrent que la protéine La de *Xenopus* n'est pas non plus un facteur de relâchement des transcrits naissants.

Afin d'identifier de nouvelles fonctions pour la protéine La, nous avons cloné le gène YLA1 codant une protéine de *Saccharomyces cerevisiae* qui présente certaines homologies avec la protéine La des eucaryotes supérieurs. Ce gène, non essentiel à la viabilité cellulaire, code la protéine LaY composée de 274 acides aminés et capable de lier préférentiellement un précurseur d'ARNt possédant la séquence UUUUOH à son extrémité 3'. La construction de protéines LaY mutantes montre que la région comprise entre les acides aminés 136 et 185 est nécessaire à la liaison avec un tel ARN. L'analyse comparative des séquences protéiques révèle une homologie globale de 35-40% avec la protéine La des eucaryotes supérieurs pouvant atteindre 74% pour les 192 premiers acides aminés. Ni la disruption du gène LaY, ni la surexpression de la protéine de *Xenopus* dans la levure n'ont permis l'identification d'un phénotype particulier.

INTRODUCTION

A: LA TRANSCRIPTION PAR L'ARN POLYMERASE III

Trois ARN polymérase ADN dépendantes (Pol I, Pol II et Pol III) coexistent dans les cellules eucaryotes pour transcrire les gènes. Aussi distingue-t-on trois classes de gènes selon qu'ils sont transcrits par chacune de ces polymérase. Rappelons que les gènes codant pour les ARNs ribosomiques ou gènes de classe I sont transcrits par Pol I, les gènes codant pour les ARNs messagers ou gènes de classe II sont transcrits par Pol II et les gènes codant pour les petits ARNs (ARNsn) ou gènes de classe III sont transcrits par Pol III.

Auparavant, on pensait que chaque polymérase correspondait à une entité distincte des autres polymérase et que chacune possédait ses propres facteurs de transcription. Or, on sait maintenant que les ARN polymérase partagent entre elle plusieurs sous unités et que toutes utilisent au moins un facteur de transcription commun, TBP (TATA binding protein), initialement caractérisé par sa liaison sur la boîte TATA des séquences promotrices des gènes de classe II.

Au cours de ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés aussi bien dans la caractérisation des facteurs de transcription que dans les mécanismes d'assemblage des complexes transcriptionnels, notamment grâce aux études menées chez la levure. L'image qui ressort de ces investigations montre à quel point les gènes transcrits par Pol III utilisent les mêmes stratégies de formation des complexes de transcription et, occasionnellement les mêmes composants, que les gènes transcrits par Pol II.

Dans un premier temps, nous décrirons quels sont les promoteurs utilisés par Pol III ainsi que les différents facteurs impliqués dans la formation du complexe de transcription. Puis

nous verrons comment s'assemblent ces facteurs pour permettre à la polymérase de se positionner correctement sur le site d'initiation. Enfin, les processus d'élongation et particulièrement ceux de terminaison seront discutés.

A.1- INITIATION DE LA TRANSCRIPTION PAR POLIII

1) Les promoteurs des gènes de classe III

Les gènes transcrits par Pol III codent pour des ARNs de fonctionnalité très diverses puisqu'ils interviennent à la fois dans la synthèse protéique, la maturation des pré-rRNAs, des pré-ARNm et des pré-ARNt. Les gènes d'ARNt et les gènes 5S ont été les premiers à être caractérisés. Ces gènes possédant des promoteurs intragéniques, on a longtemps cru que la présence de tels promoteurs était une particularité des gènes de classe III. Cependant, d'autres gènes possédant des promoteurs extragéniques comme U6 et 7SK ont été découverts plus récemment comme étant aussi transcrits par Pol III. Le tableau 1 regroupe l'ensemble des gènes cellulaires et viraux transcrits par Pol III. Parmi ces gènes, certains combinent des promoteurs extragéniques et intragéniques, suggérant une complexité jusqu'alors insoupçonnée des promoteurs des gènes de classe III. La figure 1 résume les caractéristiques de chacun des types de promoteurs qui sont détaillés ci-dessous.

a) promoteurs intragéniques

Les gènes codant les ARNt, l'ARN 5S, les ARNs viraux VAI et VAII de l'Adénovirus et les transcrits Alu se trouvent sous le contrôle de promoteurs intragéniques(49). On distingue deux types de promoteurs :

Le promoteur intragénique de type 1 est spécifique des gènes 5S ; il est composé de 3 éléments couvrant environ 50bp de la région codante, le bloc A (+50 à +64), le bloc C (+80 à +97) et le bloc intermédiaire I (+67 à +70).

Les représentants les plus courants des gènes qui possèdent un promoteur intragénique de type 2 sont les gènes d'ARNt et les gènes VA de l'adénovirus. Seuls 2 éléments sont relativement bien conservés entre les espèces, le bloc A (+8 à +19) et le bloc B (+45 à +62).

b) promoteurs extragéniques

Certains gènes de classe III possèdent exclusivement leurs promoteurs en amont de la séquence codante. Ces promoteurs, dits de type 3, sont présents dans les gènes U6 (mais seulement chez les vertébrés) et 7SK. La région codante de ces gènes possède un bloc A inactif qui n'influence pas l'efficacité de transcription puisqu'il peut être délété sans conséquence pour l'initiation (90). Les promoteurs de type 3 sont constitués de 3 éléments: une boîte TATA à -30, une séquence proximale PSE à -60 et distale DSE à -250. Les éléments TATA et PSE constituent le promoteur de base, tandis que l'élément DSE fonctionne plutôt comme enhancer de la transcription. Il est important de noter que l'élément TATA détermine la spécificité Pol III de la transcription (90,103). En effet, le gène U6 est le seul gène codant pour un ARNsn transcrit par Pol III. Les autres ARNsn sont transcrits par Pol II et, paradoxalement, les séquences promotrices de ces gènes ne possèdent pas de boîte TATA. La transcription par Pol II constituerait un état par défaut. En effet, si la séquence TATA de U6 est transférée dans le promoteur du gène U2, ce dernier est transcrit par Pol III. Inversement, si la boîte TATA est mutée de sorte que TBP ne peut lier l'ADN, alors U6 est transcrit par Pol II. Par contre, les éléments PSE et DSE sont interchangeables entre les gènes ARNsn transcrits par Pol II ou par Pol III.

c) promoteurs mixtes

D'autres gènes transcrits par Pol III possèdent des promoteurs à la fois extragéniques et intragéniques, comme par exemple, les gènes EBER du virus Epstein-Barr, le gène U6 de levure, et les gènes codant pour l'ARNt sélénocystéine (ARNt (Ser)_{Sec}) de xénope ou l'ARN 7SL.

L'expression des gènes EBER nécessite la présence simultanée des blocs A et B, de la boîte TATA et des sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1 et ATF (60). Cette boîte TATA n'est pas interchangeable avec celle d'un gène de classe II (61).

Le promoteur du gène d'ARNt (Ser)_{Sec} de Xénope est différent de celui des autres gènes d'ARNt puisqu'il contient 2 éléments externes, PSE et boîte TATA, fonctionnellement équivalents à ceux des gènes U6 (19). En plus de ces éléments, une séquence Sph-like (fonctionnellement équivalente aux séquences DSE des promoteurs de type 3) fait office de enhancer (114) et un bloc B intragénique agit en synergie avec le promoteur extragénique pour augmenter l'efficacité de transcription. La séquence codante de ce gène contient également un bloc A, inactif dans les conditions normales, mais capable d'agir en synergie avec le bloc B seulement en absence de séquences promotrices extragéniques (19).

Contrairement au gène U6 des vertébrés, le gène U6 de levure contient une région

promotrice comparable au bloc B intragénique. Cette région se localise soit dans l'intron du gène U6 de *Schizosaccharomyces pombe* (45) ou en aval du site de terminaison du gène U6 de *Saccharomyces cerevisiae* (15). Chez *S. cerevisiae*, la délétion du bloc B est létale. Par contre, aucune évidence à ce jour n'est disponible concernant ce même élément chez *S. pombe*. Le promoteur intragénique du gène U6 de *S. cerevisiae* possède également un bloc A nécessaire à l'initiation correcte de la transcription (41).

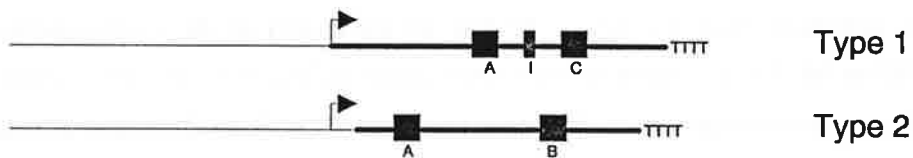
Diversité fonctionnelle des transcrits Pol III

transcrit	fonction	source	promoteur
RNAs cellulaires :			
tRNA	synthèse protéique	multi-espèces	type 2
5S RNA	sous-unité 60S du ribosome	multi-espèces	type 1
U6 snRNA	splicing des pré-mRNAs	multi-espèces	type 3 ou mixte
RNase P RNA	maturation 5' des pré-tRNAs	homme, levure	type 3 ou mixte
télomérase RNA	synthèse des télomères	tetrahymena	?
7SL RNA	translocation des protéines dans le REL	multi-espèces	mixte
U3 sn RNA	maturation des pré-rRNAs	plantes	type 3
Y scRNA	composant des Ro scRNP	homme	?
7SK RNA	?	homme	type 3
vRNA	?	rat, grenouille	type 2
G8 RNA	?	tetrahymena	type 3
Myc (1er exon)	?	homme	type 3
RNAs viraux :			
VA RNA	traduction préférentielle des mRNAs viraux	Adenovirus	type 2
EBER RNA	?	virus Epstein-Barr	mixte
HVP RNA	?	virus Herpès	?

Tableau 1: Compilation des ARNs cellulaires et viraux synthétisés par Pol III. Pour chaque gène sont indiqués le type de promoteur et la fonction cellulaire du transcrit correspondant.

Les promoteurs des gènes de classe III

a) intragéniques



b) extragéniques



c) mixtes

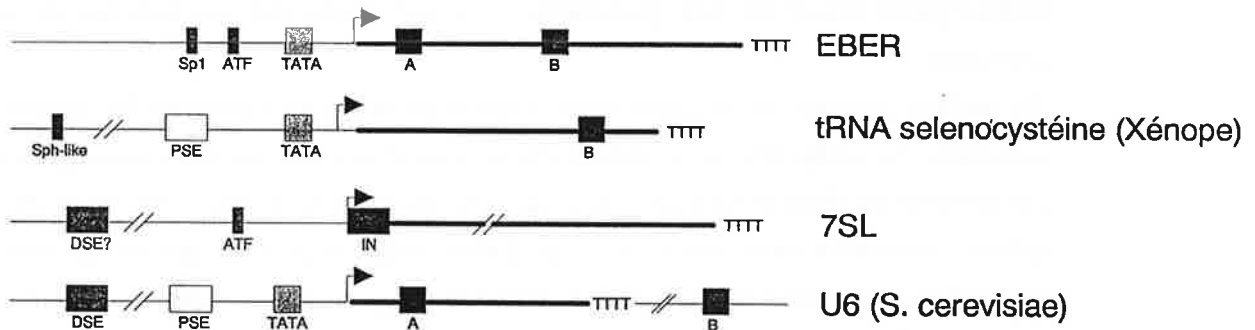


Figure 1: Représentation schématique des régions promotrices des gènes de classe III. Chaque catégorie de promoteur est représenté avec ses éléments classiques internes (blocs A, B, C et I) ou externes (TATA, PSE, DSE). IN représente le nouvel élément intragénique identifié pour le gène 7SL. Les positions approximatives des éléments qui agissent en cis (Sp1, ATF, Sph-like) sont indiquées relativement au site d'initiation de la transcription (flèche).

2) L'ARN polymérase III

Cette enzyme a été isolée à partir de plusieurs types cellulaires et identifiée comme un énorme complexe polypeptidique. La polymérase de levure contient au minimum 16 polypeptides pour une masse d'environ 650 kDa. Certaines de ces chaînes protéiques sont partagées entre les trois polymérases eucaryotes. La plupart des sous-unités de Pol III ont été clonées et séquencées et chacun de ces gènes s'est révélé unique et essentiel à la viabilité cellulaire (47). Le noyau de Pol III est constitué de 4 sous-unités : C160, C128, AC40 et AC 19. Les deux grosses sous-unités (C160 et C128) présentent de fortes homologies, respectivement avec les sous-unités ' et de la polymérase procaryotique, tandis que AC40 et AC19 présentent des homologies avec les sous-unités de cette même polymérase. A ce noyau s'ajoutent 5 sous-unités communes aux trois polymérases (ABC27, 23, 14.5, 10 et 10) et 7 polypeptides spécifiques à Pol III (C82, C53, C37, C34, C31, C25 et C11). Seules trois séquences ne sont pas encore clonées : C37, C25 et C11 (142). L'importance fonctionnelle du partage des sous-unités n'est pas encore déterminée mais on imagine facilement que ces sous-unités interagissent avec des facteurs de transcription communs aux polymérases ou permettent des mécanismes de régulation communs.

En mutant certaines de ces sous-unités chez la levure et en identifiant les supprimeurs de mutation, on comprend progressivement comment ces polypeptides interagissent. Grâce au système du double hybride (42), une interaction directe entre AC19 et AC40, ainsi qu'une interaction entre chacune de ces 2 sous-unités et ABC10 ont été déterminées(80). Par ailleurs, la région doigt à zinc de C160 interagit avec les protéines C82, C34 et C31 pour stabiliser l'association de la polymérase avec le complexe de transcription (164). D'autres part, des études génétiques (149) et biochimiques (55) montrent que certaines des sous-unités de Pol III sont soumises à des changements d'état de phosphorylation qui modifient l'activité transcriptionnelle de la polymérase. Ce mécanisme de régulation serait d'ailleurs commun aux trois polymérases.

3) Les facteurs de transcription de l'ARN polymérase III

De nombreux facteurs de transcriptions de Pol III ont été caractérisés, essentiellement grâce à deux approches complémentaires qui sont d'une part la purification chromatographique d'activités biochimiques (TFIIIA, TFIIIB, TFIIIC, TFIIIR et TFIIIE),

et d'autre part, la recherche de gènes suppresseurs de mutations (introduites sur des séquences promotrices ou dans des facteurs de transcription).

3.1) TFIIB, déterminant de la spécificité de Pol III

particularités de TFIIB

TFIIB a été partiellement purifié à partir de nombreux organismes ; il est défini comme une fraction protéique capable de reconstituer *in vitro*, en association avec d'autres fractions, la transcription des gènes de classe III.

Chez la levure, TFIIB est composé d'au moins 3 polypeptides, de 70 kDa, 90 kDa (69) et TBP (99). TFIIB, seul, est incapable de lier l'ADN (86). Pourtant, il représente le facteur d'initiation par excellence. Chez la levure, TFIIB suffit pour assurer plusieurs tours de transcription pour les gènes d'ARNt et les gènes 5S (71). Les autres facteurs de transcription tels TFIIC et TFIIIA permettent l'assemblage de TFIIB dans le complexe de transcription. La polymérase se positionne alors correctement sur le site d'initiation. Lorsque TFIIB entre dans le complexe de transcription, il établit de nombreux contacts avec l'ADN. Des expériences de protection à la digestion par la DNase I *in vitro* (72) et *in vivo* (62) ont montré que TFIIB se lie sur environ 50pbs dans les régions promotrices en amont du site d'initiation. Une fois que TFIIB a contacté l'ADN et que la transcription est initiée, TFIIB reste fortement associé à la matrice puisque l'addition d'héparine ou de sels à forte concentration dissocie du complexe des facteurs tels que TFIIC ou TFIIIA (71). Le complexe minimal de transcription, composé seulement de TFIIB et de Pol III, reste fixé de façon stable sur la matrice et l'addition de NTPs permet l'élongation de la chaîne ARN.

Récemment, les polypeptides de 70 kDa et 90 kDa ont été séparés en deux fractions, respectivement, TFIIB' et TFIIB" (70). Ce fractionnement a permis d'établir que la protéine de 70 kDa se fixe en premier sur le complexe TFIIC/ADN. Cette liaison est nécessaire à la fixation ultérieure de la protéine de 90 kDa. La présence simultanée de ces deux protéines rend le complexe résistant à l'héparine.

De plus, l'incorporation de TFIIB dans le complexe d'initiation provoque une courbure de l'ADN (85). Ce phénomène aide sans doute l'accession de Pol III sur la matrice et/ou l'ouverture de la double hélice d'ADN nécessaire pour initier la transcription (70).

TBP : sous unité de TFIIB

La découverte fondamentale durant ces deux dernières années dans le domaine de la

transcription est sans aucun doute l'identification de TBP comme facteur universel de transcription (27,29,139,165).

Auparavant, TBP fut découvert comme un facteur de transcription de Pol III grâce aux études menées sur le gène U6 de levure (99) et le gène U6 humain (88). Des expériences de reconstitution *in vitro* ont montré que l'addition de TBP recombinant à certaines fractions purifiées permettait la transcription par Pol III du gène U6. A cette époque, la présence d'une boîte TATA fonctionnelle dans le promoteur du gène de classe III corrèle avec une transcription TBP-dépendante de ce gène. Maintenant, on sait que TBP est nécessaire à la transcription de tous les gènes de classe III, même si leurs promoteurs ne possèdent pas de séquence TATA. D'ailleurs, TBP est apporté par des complexes protéiques différents selon la nature du promoteur.

Pour la première fois, White et al. (165) suggèrent que TBP est nécessaire à la transcription des gènes de classe III dont les promoteurs sont intragéniques. Il montre qu'un excès d'oligonucléotides possédant la séquence TATA inhibe la transcription des gènes d'ARNt, 5S et VA dans des extraits cellulaires Hela. Cet effet est réversible par simple addition de TBP humain recombinant. Finalement, des expériences réalisées chez la levure *in vivo* (29) et *in vitro* (139), ont montré que TBP était non seulement nécessaire à la transcription de tous les gènes de classe III, mais que TBP est aussi un facteur de transcription universel utilisé toutes les ARN polymérases eucaryotes.

La structure de TBP de plante *Arabidopsis Thaliana* a récemment été déterminée par cristallographie aux rayons X (1) et révèle que la protéine est capable de s'asseoir sur le duplex ADN. Il semble que chaque face de TBP assure un rôle distinct. La face interne est sensée interagir avec l'ADN, tandis que la face externe interagit avec les autres facteurs de transcription. Plusieurs expériences soutiennent ces suppositions puisque les mutations qui affectent la liaison de TBP sur la boîte TATA se localisent principalement sur la face interne (30). Certaines mutations affectent spécifiquement la transcription par Pol III. Elles sont situées exclusivement sur la face externe de TBP (30). Cette région hypersensible de TBP s'est d'ailleurs révélée interagir avec la protéine de 70 kDa (TDS4/PCF4/BRF1) récemment clonée et qui compose TFIIB (cf ci dessous).

TFIIB et la transcription à partir des promoteurs Pol III ne contenant pas de boîte TATA.

En isolant des suppresseurs extragéniques de mutations dans TBP ou dans le bloc A des promoteurs de gène d'ARNt, trois groupes ont indépendamment identifiés chez la levure le gène TDS4/PCF4/BRF1 (16,26,91). Ce gène code la protéine de 70 kDa qui compose la fraction TFIIB'. L'isolement de BRF1 en tant que suppresseur allèle spécifique d'un

mutant thermosensible de TBP suggère que ces deux protéines interagissent directement. Comment TFIIB s'assemble-t-il sur un gène d'ARNt? Chez la levure, des expériences de photo-cross-linking ont déterminé que les protéines de TFIIB interagissent avec l'ADN (70). Quand TFIIC se lie aux blocs A et B du promoteur des gènes d'ARNt, la sous-unité de 131 kDa de TFIIC se projette en amont du site d'initiation de la transcription et interagit avec BRF1 (10). L'incorporation de BRF1 dans le complexe recrute TBP (8). En absence de TBP, l'association de BRF1 avec le complexe TFIIC/ADN est peu stable. C'est la liaison de la protéine de 90 kDa qui stabilise le complexe sur l'ADN (Fig.2).

Parallèlement à ces études chez la levure, plusieurs groupes ont montré que TBP est aussi associé au TFIIB humain (89,144,154,165). Cependant, la nature exacte des polypeptides qui composent cette fraction reste inconnue. Récemment, Lobo et al. (89) ont séparé sur colonne mono Q l'activité TFIIB en deux fractions 0.38M-TFIIB et 0.48M-TFIIB, toutes deux nécessaires à la transcription des gènes VA et d'ARNt (Fig.3). La fraction 0.38M-TFIIB contient TBP et trois polypeptides associés (TAF) de 54 kDa, 82 kDa et 150 kDa. Plusieurs études se sont attachées à déterminer si certains des TAFs associés à la transcription par Pol III sont aussi nécessaires à Pol II. Toutes suggèrent que les TAFs sont importants dans le déterminisme de la spécificité des polymérases (24,89,110).

Le complexe de transcription d'un gène 5S est, quant à lui, identique à celui d'un gène d'ARNt mais nécessite la fixation première de TFIIA pour permettre l'association successive des autres facteurs (Fig.3).

GENE tRNA (*S.cerevisiae*)

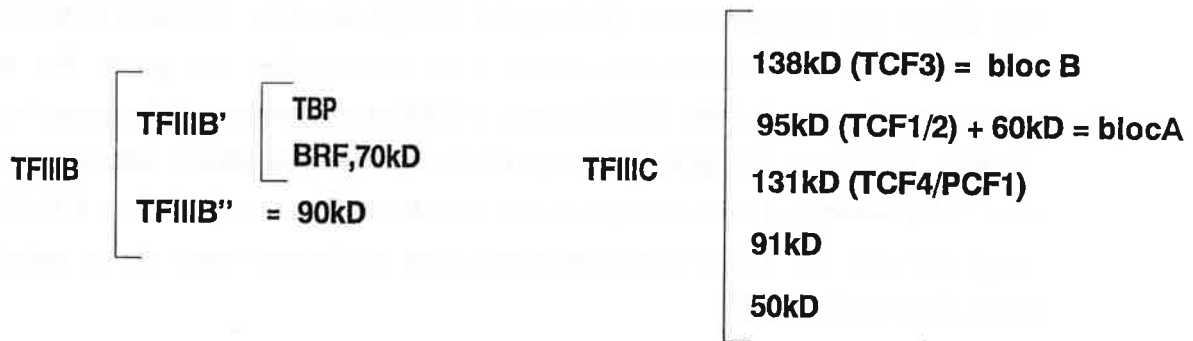
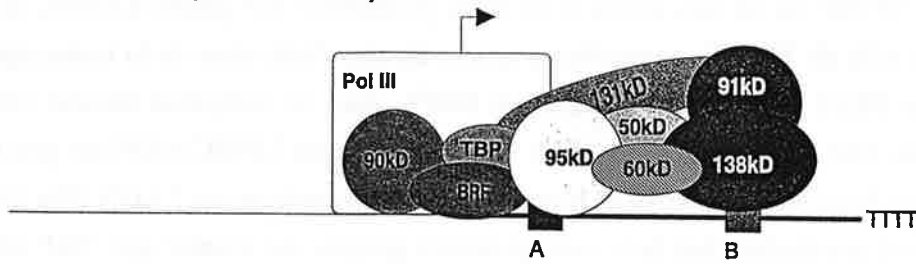


Figure 2: Assemblage du complexe de transcription sur un promoteur de type 2 chez *S. cerevisiae*.

Les protéines, connues à ce jour pour constituer les facteurs TFIIC et TFIIIB, sont indiquées. Les sous-unités de 138 kDa et 95 kDa contactent respectivement le bloc B et le bloc A du promoteur. Cette double liaison projette la sous-unité de 131 kDa en amont du site d'initiation qui induit l'assemblage de TFIIIB (voir détails dans le texte correspondant).

PROMOTEURS SANS BOITE TATA

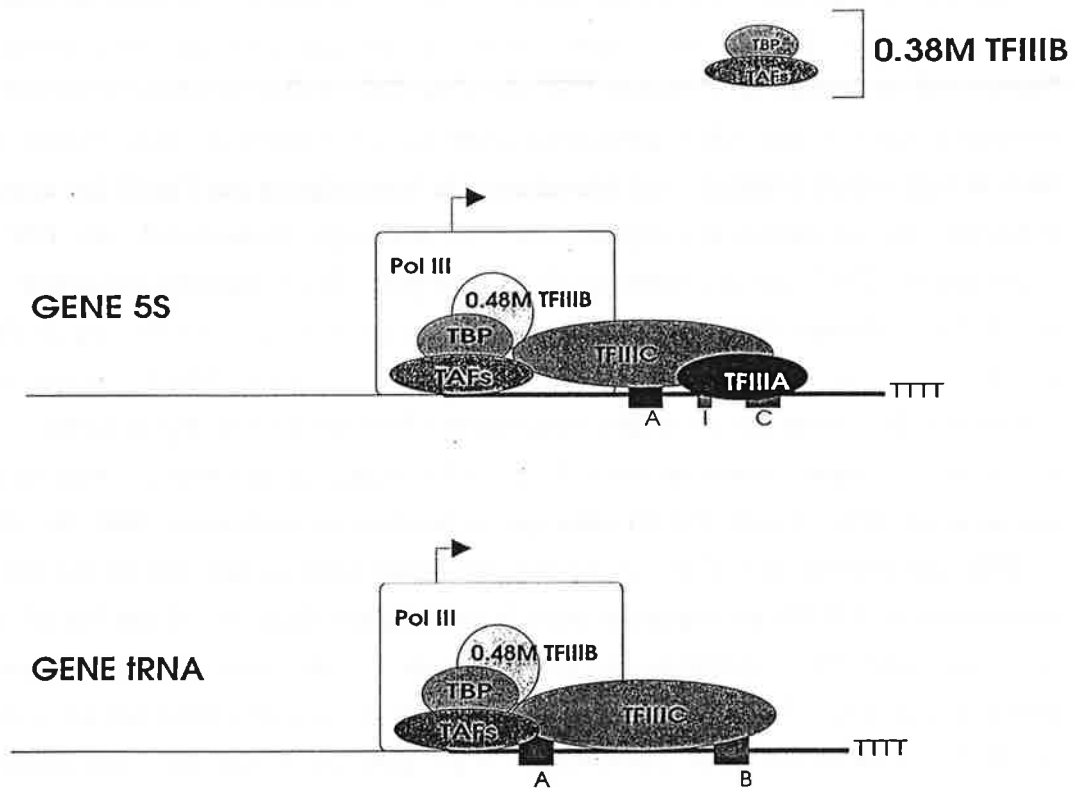


Figure 3: Assemblage du complexe de transcription sur les promoteurs de type 1 et de type 2 chez les eucaryotes supérieurs.

Pour les gènes d'ARN 5S et d'ARNt, TBP est apporté par la fraction 0.38M TFIIB et se trouve associée à d'autres protéines, les TAFs. C'est par l'intermédiaire de ces TAFs que TBP incorpore le complexe puisque ces gènes ne possèdent pas d'élément TATA. La transcription de ces gènes nécessite la présence supplémentaire de TFIIC, 0.48M TFIIB et Pol III. Dans le cas du gène 5S, TFIIA doit se fixer en premier sur le bloc C de l'ICR pour permettre l'assemblage de TFIIC sur le bloc A. Dans le cas du gène d'ARNt, TFIIC contacte simultanément les blocs A et B. Une fois que TFIIC est incorporé, TFIIB s'assemble à son tour dans le complexe d'initiation.

TFIIIB et la transcription à partir des promoteurs Pol III contenant une boîte TATA

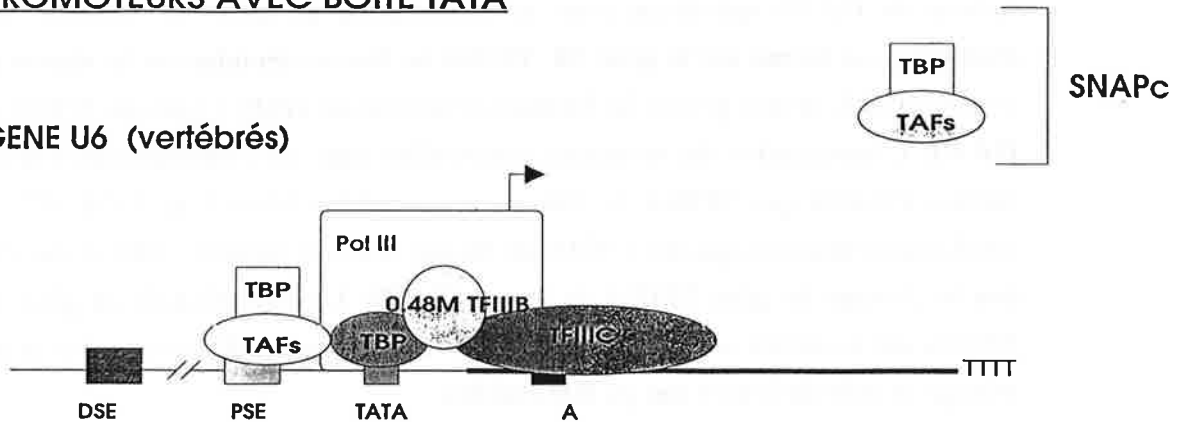
Le complexe d'initiation de transcription du gène U6 humain contient au moins deux formes de TBP. Le fractionnement chromatographique d'extrait Hela révèle que le facteur qui reconnaît la séquence PSE du gène U6 co-élue systématiquement avec le complexe SNAPc (sn RNA associated protein). Ce complexe, dans lequel TBP est associé à plusieurs protéines, est nécessaire à la transcription par Pol II des autres gènes d'ARNsn. Si un extrait est déplété avec un anticorps monoclonal anti-TBP qui ne reconnaît pas TBP dans le complexe SNAPc, le gène U6 est transcrit par simple addition de TBP recombinant (89). Ce résultat confirme la présence de deux formes de TBP dans le complexe d'initiation du gène U6, l'une complexée avec le SNAPc et qui reconnaît l'élément PSE, l'autre qui reconnaît directement l'élément TATA (Fig.4) (136).

De même, la transcription *in vitro* du gène U6 nécessite la présence simultanée des fractions SNAPc, TFIIIB, Pol III ainsi que la protéine recombinante TBP. Or, SNAPc et TFIIIB contiennent déjà TBP, ce qui suggère qu'un autre composant de ces fractions et notamment de TFIIIB est important pour la transcription du gène U6 par Pol III. Quel est ce composant? Est-il spécifique au promoteur de U6 ou commun aux promoteurs des gènes de classe III? Certaines expériences réalisées *in vitro* montrent que les composants de TFIIIB nécessaires à la transcription d'un gène de classe III, sont différents en fonction du type de promoteur. Par exemple, le composant de TFIIIB nécessaire à la transcription du gène U6 semble être contenu dans la fraction 0.48M-TFIIIB. Pour ce promoteur, TBP et SNAPc recruteraient 0.48M-TFIIIB pour permettre l'entrée de Pol III dans le complexe d'initiation (Fig.4). Par contre, pour la transcription du gène VA1, c'est la fraction 0.38M-TFIIIB qui est importante (56).

Etrangement, le gène U6 de levure semble se comporter plus comme un gène d'ARNt que comme le gène U6 humain, dans la mesure où TFIIIC doit se fixer sur le bloc B pour lever la répression chromatinienne de la transcription (17). Actuellement, il n'existe pas de données précises quant aux interactions des sous-unités de TFIIIC avec le gène de levure. On sait que le TBP contenu dans TFIIIB est essentiel pour la transcription du gène (99) mais il n'est pas clair s'il entre seul dans le complexe d'initiation ou par l'intermédiaire des TAFs de TFIIIB (Fig.4).

PROMOTEURS AVEC BOITE TATA

GENE U6 (vertébrés)



GENE U6 (*S. cerevisiae*)

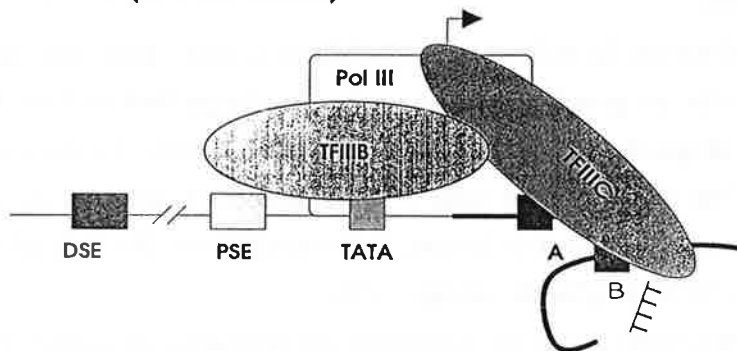


Figure 4: Assemblage du complexe de transcription sur un promoteur d'un gène de classe III possédant un élément TATA.

Deux catégories de promoteurs sont ici considérées: le promoteur de type 3, exclusivement extragénique, représenté par le gène U6 des vertébrés; et le promoteur mixte représenté par le gène U6 de levure. (se référer au texte pour un commentaire détaillé).

3.2) Les facteurs d'initiation séquence-spécifiques

TFIIIA et gènes 5S

TFIIIA a été le premier facteur de transcription à être purifié et cloné (50). C'est le facteur de Pol III spécifique pour la transcription du gène 5S. Lorsque le complexe d'initiation se forme sur le gène 5S, TFIIIA se fixe en premier sur la région de contrôle interne (ICR), ce qui permet la fixation ultérieure de TFIIIC, puis de TFIIIB et enfin de Pol III. L'introduction de mutations ponctuelles dans les différents éléments de l'ICR a permis d'établir que TFIIIA de *Xénope* reconnaît les blocs C et I (95,107). Depuis, la purification biochimique du TFIIIA de levure (161) et humain (140) a été réalisée ainsi que le clonage du gène TFIIIA de levure (5,170). La disruption de ce gène montre que TFIIIA est essentiel à la viabilité cellulaire. Quelques différences entre la protéine de xénope et celle de levure ont pu être établies :

-bien que la protéine de levure (50 kDa) soit plus grande que celle du xénope (38 kDa), elle couvre une plus courte région du gène 5S : 30bp chez la levure (13) contre 50bp pour le xénope (108,169).

-les deux protéines présentent la même structure "doigt à zinc" avec une particularité chez la levure qui possède un grand espacement entre les doigts No8 et No9. En dehors des résidus C₂H₂ des doigts à zinc, la similarité de séquence entre les deux espèces ne dépassent pas 20%. C'est probablement pour cette raison qu'un gène 5S de xénope ne peut être transcrit dans un extrait brut de levure. Ceci corrèle avec l'incapacité du TFIIIA de levure à reconnaître l'ICR du gène de xénope (150).

-chez le xénope, la région doigt à zinc de la protéine est nécessaire et suffisante pour lier spécifiquement l'ADN (137) tandis que la partie carboxy-terminale correspond au domaine d'activation de la transcription (97). La distance qui sépare le doigt No9 du domaine d'activation doit être conservée pour maintenir l'efficacité transcriptionnelle. Chez la levure, cette partie C-terminale peut être délétée sans conséquence sur la transcription. Par contre, la portion comprise entre les doigts No8 et No9 (=81 AA) est indispensable à l'activité transcriptionnelle (111).

TFIIIA est une protéine particulière par la dualité de ses fonctions. Non seulement c'est un facteur de transcription du gène 5S, mais c'est aussi une protéine de stockage des ARNs 5S. L'association TFIIIA/ARN 5S forme des particules ribonucléoprotéiques, les 7S RNPs. Plusieurs groupes ont récemment montré que certains doigts à zinc de TFIIIA reconnaissent l'ADN alors que d'autres reconnaissent préférentiellement des structures secondaires de l'ARN (111,158).

TFIIIC

Ce facteur de transcription est également très important car sa fixation préliminaire sur les gènes d'ARNt détermine la fixation ultérieure de TFIIIB et, par conséquent de Pol III. TFIIIC est un complexe multiprotéique (600 kDa) dont la composition peut désormais être évaluée grâce aux efforts de purification du facteur humain (76,172) et celui de levure (9,48,117).

Chez la levure, TFIIIC est composé d'au moins 6 polypeptides (145/138 kDa, 135/131 kDa, 100/95 kDa, 90 kDa, 62 kDa et 55 kDa) fortement associés les uns aux autres. L'implication de chaque sous-unités a été mise en évidence par des approches très diverses : South-Western, méthodes immunologiques ou UV-cross-linking (67,117). Parmi ces études, celles de Bartholomew fournissent le plus d'indication (9,10) quant aux interactions entre TFIIIC et les gènes d'ARNt, ainsi qu'entre les sous-unités de TFIIIC. A ce jour, seulement 3 protéines qui composent TFIIIC sont clonées :

-TFC1 (95 kDa) par Swanson et al. (153) et Parsons et Weil (118).

-TFC3 (145/138 kDa) (47).

-TFC4 (135/131 kDa) ou PCF1 (128). Le gène PCF1 a d'abord été isolé comme suppresseur d'une mutation dans le bloc A du promoteur d'un gène d'ARNt (168). La mutation compensatrice de ce gène semble augmenter l'efficacité de transcription en facilitant l'incorporation de TFIIIB dans le complexe d'initiation (167).

TFIIIC interagit avec les blocs A et B des promoteurs intragéniques (120). Plus précisément, des expériences de cross-linking montrent que TFC1 contacte le bloc A des gènes d'ARNt (12). Dans le cas des gènes 5S, TFC1 se lie au même endroit par rapport au site d'initiation bien qu'un bloc A-like se situe 30pbs en aval, suggérant une interaction non-spécifique de la séquence d'ADN. TFC3, quant à lui, se fixe sur le bloc B des gènes d'ARNt (Fig.2).

Une caractéristique importante du TFIIIC de levure a été établie par le groupe de Sentenac. *In vitro*, la transcription du gène U6 est indépendante de la présence de TFIIIC (112). Seule les fractions TFIIIB et Pol III sont nécessaires. Pourtant, *in vivo*, le bloc B du gène U6 est indispensable à une transcription efficace. Burnol et al. ont réussi à montrer que TFIIIC est en fait capable de lever l'inhibition chromatinienne de la transcription de U6 (17). Pour cela, ils ont utilisé 2 plasmides portant le gène U6. Un des plasmides contient un bloc B dans la séquence de U6, l'autre pas. L'addition d'histones purifiées à ces plasmides permet la constitution de nucléosomes. Dans ces conditions, seul le gène U6 contenant un bloc B peut être transcrit *in vitro* en présence de TFIIIC.

Les protéines du TFIIIC humain apparaissent moins fortement associées que leurs

homologues chez la levure car une étape chromatographique a permis de les séparer en deux sous fractions, TFIIC1 et TFIIC2 (172). TFIIC2 contient 5 protéines : 230, 110, 100, 90 et 60 kDa. Seule la sous-unité de 230 kDa, d'ailleurs récemment clonée, peut cross-linker avec l'ADN (173). Son clonage a permis d'établir que cette protéine intervient dans la transcription des gènes d'ARNt, 5S et VAI et n'est pas requise pour la transcription des gènes U6 et 7SK (79).

Autres facteurs liant les régions 5' flanquantes

La transcription des gènes U6 chez les vertébrés nécessite la présence d'une protéine PBP qui reconnaît la séquence PSE du promoteur extragénique. La protéine PBP humaine, 90 kDa, a été partiellement purifiée (160) et fixe effectivement la séquence PSE (-42 à -78) du gène U6. La transcription du gène U1 par Pol II nécessite également la présence d'une séquence PSE dans le promoteur extragénique. Les séquences PSE étant interchangeables entre les gènes U6 et U2 (88) et les gènes U1 et U2 étant transcrits par la même polymérase, on peut se demander si PBP et PSE1 sont équivalentes. D'autre part, dans une étude concernant le gène 7SK, la protéine PTF, capable de lier les séquences PSE des promoteurs Pol II et Pol III, a également été purifiée (113). Il reste désormais à définir si PTF, PSE1 et PBP représentent la même activité. Des évidences suggèrent déjà que PSE1 et PTF sont deux facteurs différents puisque seul PSE1 reconnaît spécifiquement des extrémités d'ADN.

La transcription par Pol III chez le ver à soie et TFIIR

Chez *Bombyx mori*, la nomenclature des facteurs nécessaires à la transcription par Pol III peut porter à confusion puisque TFIIC et TFIID correspondent respectivement au TFIIC1 et TFIIC2 humain. Alors que TFIIC2, seul, est capable de lier l'ADN au niveau du promoteur intragénique, ni TFIIC, ni TFIID ne lient spécifiquement cette région. La présence simultanée de ces deux facteurs est nécessaire (175). Une découverte étonnante a été réalisée par le groupe de K. Sprague qui travaille sur la transcription des gènes 5S et d'ARNt chez le ver à soie *Bombyx mori*. Par reconstitution *in vitro*, ce groupe a identifié un nouveau facteur de transcription TFIIR (174). Le poids moléculaire apparent de cette activité se situe aux alentours de 45 kDa. TFIIR présente des caractéristiques particulières puisqu'il résiste à la chaleur, au phénol, aux protéases et aux DNases. Par contre, il est sensible aux agents alcalins et aux RNases, suggérant que la forme active de TFIIR est un ARN et non une RNP. Cet ARN a depuis été séquencé et identifié comme l'ARNt Isoleucine (37). Cet ARNt, transcrit *in vitro* par l'ARN T7

polymérase, est capable de remplacer l'activité TFIIR. Il semble que TFIIR n'influence pas la formation des complexes de transcription mais plutôt la capacité de ces complexes à assurer plusieurs tours de transcription. De récentes expériences suggèrent que l'ARNt I_{le} inhibe des protéines qui déstabilisent les complexes de transcription dans les événements de réinitiation (38).

TFIIE

Dans le but d'observer des différences entre le système du ver à soie et celui de la levure, le groupe de Sprague a purifié des extraits de levure selon le protocole normalement utilisé pour des extraits de ver à soie (36). Ils ont ainsi identifié une fraction, TFIIE, qui supplémentée à TFIIB, TFIIC et Pol III est nécessaire à la transcription des gènes d'ARNt et 5S. L'activité TFIIE est présente dans la fraction TFIIB du groupe de Geiduschek (levure), mais différente des activités TFIIB' et TFIIB'' puisque TFIIE est présente en mêmes proportions dans chacune de ces fractions.

TFIIE (30 kDa) ne lie pas l'ADN et ne stabilise pas la liaison de TFIIC ou de TFIIB sur le complexe d'initiation. Pourtant, TFIIE semble être requis pour assurer le premier tour de transcription. Apparemment, TFIIE n'est pas l'homologue chez la levure de TFIIR puisqu'il est résistant aux nucléases.

A.2- ELONGATION ET TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION PAR POL III

1) L'élongation

En fonction des promoteurs, des facteurs spécifiques ou communs s'assemblent de manière ordonnée pour permettre à la polymérase de se positionner correctement sur le site d'initiation. D'une manière générale, TFIIA et TFIIC sont plutôt considérés comme des facteurs d'association tandis que TFIIB est considéré comme le véritable facteur d'initiation de la transcription (71).

L'étude des complexes de préinitiation (complexe binaire = Pol III+ADN) et d'élongation (complexe ternaire = Pol III+ADN+ARN) montre que les sous-unités de Pol III contacte

l'ADN en des points différents selon les deux situations (8). Dans les complexes binaires, l'ensemble des sous-unités de Pol III interagit avec l'ADN sur environ 10 pbs de part et d'autre du site d'initiation. Dans le complexe ternaire arrêté en position +19 de la chaîne ARN, les contacts avec l'ADN sont privilégiés sur une vingtaine de nucléotides en 5' du site de pause, principalement dans la bulle de transcription. Quelles sont les différentes étapes qui permettent la transition d'un complexe d'initiation à un complexe d'élongation? Lorsque le complexe binaire se stabilise suite à l'incorporation de Pol III, la double hélice d'ADN s'ouvre localement sur environ 22pbs (70). Cette transition du complexe fermé au complexe ouvert est un processus endothermique réversible. L'ouverture augmente progressivement quand la température varie de 10°C à 40°C. A 0°C, la bulle de transcription n'existe pas. Lorsque la synthèse d'ARN est initiée, le complexe ternaire est extrêmement stable en présence de polyanions ou de sels à haute concentration. On distingue deux sortes de complexes ternaires post-initiation qui diffèrent selon la longueur de la chaîne ARN. Quand l'ARN est court (5nts), la bulle de transcription s'étend sur 22pbs, alors que cette ouverture est réduite à 13-17nts quand l'ARN atteint 17nts (70).

De très récentes expériences montrent que l'élongation est un mécanisme processif. La vitesse d'élongation varie en fonction de la séquence à transcrire. Par exemple, le temps de pause de la polymérase s'allonge lorsque les résidus A ou U succèdent à un autre résidu U dans la chaîne ARN (7,101).

2) La terminaison

Alors que les éléments qui dirigent l'initiation de la transcription par Pol III sont désormais bien caractérisés, ceux qui contrôlent la terminaison des transcrits de classe III le sont beaucoup moins. La séquence consensus nécessaire à la terminaison de la transcription par cette polymérase est constituée d'une série de résidus T dans le brin non codant de l'ADN (11). Chez les eucaryotes supérieurs, un minimum de 4 T suffit à assurer une terminaison efficace, tandis que chez la levure au moins 6T sont nécessaires (3). Si ces résidus sont délétés, la polymérase génère de longs transcrits qui se terminent dans le prochain groupe de T rencontré. Ces transcrits sont processés normalement si la mutation n'affecte pas la séquence codante (2). Inversement, l'insertion d'un groupe de T dans le brin non codant d'un gène provoque l'arrêt prématuré de la transcription (75). Les séquences qui entourent cette suite de T affectent l'efficacité de terminaison mais

aucun consensus n'a pu être établi. Dans le cas du gène 5S de *Xénope*, la présence de séquences riches en GC renforce le terminateur alors que des séquences riches en A l'affaiblissent (11). A l'inverse, les séquences terminatrices normales du gène codant l'ARNt Lys du *Xénope* sont riches en A. Des mutations introduisant des séquences riches en GC diminuent l'efficacité de terminaison (105). Cependant, contrairement à la polymérase d'*E. coli*, la présence de séquences palindromiques proches du site de terminaison ne semblent pas être requises (11). D'autres signaux de terminaison plus exotiques ont été identifiés pour le gène 5S de souris (39) et pour un membre de la famille Alu (58), respectivement constitués de 23 et 9 résidus A. De telles séquences terminatrices ont également été caractérisées chez les procaryotes (122).

Des études concernant la terminaison de la transcription par Pol III ont conduit à des antagonismes, à savoir la thèse d'une terminaison facteur-indépendante et celle d'une terminaison facteur-dépendante. Des expériences utilisant des préparations purifiées de Pol III suggèrent que la polymérase est capable de terminer efficacement la transcription en absence de tout autre facteur (18,31,163). D'autres expériences montrent que la polymérase purifiée de *Xénope* reconnaît le signal de terminaison comme un site de pause mais le transcrit naissant n'est relâché que s'il n'est pas fortement hybridé à l'ADN (18). La reconnaissance du signal de terminaison et le relâchement du transcrit seraient deux événements indépendants.

Chez la levure, le gène suppresseur d'une mutation qui affecte l'efficacité du signal de terminaison d'un gène de classe III code pour la sous-unité C128 de la polymérase III (64,65). Cette protéine est l'homologue de la sous-unité β de l'ARN polymérase d'*E. coli* impliquée dans les événements de terminaison de la transcription (122). A côté de ces résultats qui suggèrent que Pol III, seule, termine efficacement la terminaison, d'autres expériences proposent qu'un facteur protéique, la protéine La, intervient dans ce processus de terminaison. La prochaine section s'attache à décrire les principales propriétés de cette protéine et les données expérimentales qui ont conduit à l'hypothèse que La est un facteur de terminaison de Pol III.

3) Implication de la protéine La dans la terminaison par Pol III

La protéine La est une phosphoprotéine (≈ 50 kDa) localisée principalement dans le

noyau des cellules eucaryotes (54) et caractérisée initialement par son immunoprécipitation avec des sérums de patients atteints de maladies auto-immunes comme le Lupus érythémateux dissimulé ou le syndrome de Sjögren (127). La principale caractéristique de cette protéine est son association transitoire avec une série d'ARN de petit poids moléculaire, formant des particules ribonucléoprotéiques La-RNPs (84). La majorité de ces ARN sont des transcrits primaires synthétisés par Pol III. Il s'agit des précurseurs d'ARNt, d'ARN 5S (133), des transcrits de la famille Alu (143), de l'ARN 7S (21), U6 (134), mais aussi de transcrits viraux comme les ARNs VA de l'adenovirus (44) ou EBER du virus Epstein-Barr (83). La peut aussi être associée aux précurseurs de l'ARN U1 transcrit par Pol II (94), à l'ARN leader du virus de la somatite vésiculaire ou encore à l'ARN viral du Poliovirus (109), tous deux transcrits par la polymérase virale (78). Excepté l'ARN du virus de la Polio, l'ensemble de ces ARNs ont en communs de posséder à leur extrémité 3' une suite de résidus U qui correspond au site de liaison pour la protéine La (100,129,148). Ces résidus, codés par les gènes de classe III, sont équivalents au signal de terminaison reconnu par Pol III. Cette corrélation a naturellement conduit à l'idée que la protéine La pouvait être impliquée dans les processus de terminaison, de maturation ou de transport des transcrits primaires synthétisés par Pol III.

Le gène VAI transcrit dans un extrait cellulaire immunodéplété en protéine La par des anticorps α -La de patient génère peu d'ARN et l'extrémité 3' de ces ARNs est manquante. Ces expériences ont suggérées qu'en absence de protéine La, la polymérase est incapable de transcrire l'extrémité 3' de l'ARN, en particulier les résidus U terminaux. Par conséquent, le complexe de transcription s'arrête en amont du signal de terminaison et la transcription est bloquée. L'addition de protéine La recombinante humaine restaure à la fois la longueur et le nombre des transcrits, suggérant que La est non seulement nécessaire pour compléter la synthèse des ARNs mais aussi pour les relâcher du complexe de transcription et permettre de recycler la polymérase (51,52). Récemment, un autre groupe propose que La facilite le relâchement des transcrits Pol III. Un gène Alu est immobilisé sur des billes d'agarose et incubé avec un extrait cellulaire HeLa en présence d'ATP, CTP et GTP pour initier la synthèse d'un petit ARN. Les complexes ternaires (Protéines/ADN/ARN) ainsi formés sont lavés plusieurs fois pour éliminer la protéine La endogène. La synthèse des ARNs se poursuit par addition des NTP, et les ARNs qui sont relâchés se trouvent dans le surnageant tandis que les autres restent accrochés aux billes. Lorsque les complexes ternaires sont lavés, la majorité des ARNs sont retenus sur les billes. L'addition de protéine La recombinante humaine permet de

libérer ces transcrits dans le surnageant (98). Par analogie avec la protéine Rho, une fonction ADN/ARN hélicase a été proposée pour la protéine La (6). Plus récemment, un groupe a identifié une fonction ARN/ARN hélicase pour la protéine La (171). Ce résultat est cohérent avec la découverte du groupe de Sonnenberg qui a montré que La est impliquée dans l'initiation interne de la traduction de l'ARNm du Poliovirus en stimulant et corrigeant la traduction de la protéine P1 (109). Il a été observé que l'infection virale provoque la fuite de La vers le cytoplasme ce qui rend possible une telle fonction pour la protéine La.

Certains faits suggèrent en outre, par analogie avec les snurps, que La pourrait contrôler le transport de précurseurs non matures par l'intermédiaire de sa liaison avec les transcrits primaires. Par exemple, le précurseur de l'ARN 5S se lie transitoirement à la protéine La qui est rapidement remplacée par la protéine ribosomale L5 ou TFIIA favorisant le passage de cet ARN vers le cytoplasme (53). On peut aussi imaginer que La régule la maturation des précurseurs comme il l'a déjà été mentionnée (124,157).

Plusieurs années après sa découverte, l'ambiguïté fonctionnelle de la protéine La n'est toujours pas élucidée. Le principal travail de cette thèse a porté sur l'étude de la protéine La de *Xénope* dans la terminaison de la transcription par Pol III. Nous avons cherché à montrer par des approches biochimiques si cette protéine est réellement nécessaire à la synthèse des U terminaux et au relâchement du transcrit primaire. Mais avant de présenter et de discuter les résultats obtenus, regardons quels sont les mécanismes de terminaison de la transcription utilisés par les organismes procaryotes et eucaryotes.

B: LES MECANISMES DE TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION DES GENES

L'appareil transcriptionnel des cellules procaryotes et eucaryotes utilisent des mécanismes plus ou moins sophistiqués pour contrôler la biosynthèse des ARNs. Les évènements liés à la terminaison de la transcription ne sont d'ailleurs pas sans importance dans le contrôle de l'expression génétique. Les ARN polymérases ADN dépendantes utilisent des signaux, localisés sur l'ADN ou sur l'ARN naissant, qui sont reconnus comme terminateurs de la transcription. Aucune séquence, structure ou même facteur protéique commun n'a pu être défini à partir de l'étude comparative de ces régions terminatrices. Cependant, les mécanismes qui aboutissent à la terminaison de la transcription sont parfois très semblables et dépendent moins du type d'organisme que des impératifs nécessaires à la survie cellulaire.

Chez les procaryotes, les processus d'élongation et de terminaison de la transcription ont pu être étudiés en combinant des approches biochimiques et génétiques (46). Ces études ont permis d'identifier avec précision les sites de terminaison et les facteurs qui influencent l'efficacité de la terminaison. Par contre, chez les eucaryotes, des études comparables sont difficilement réalisables, souvent faute de mutants intéressants, car les ARNs nouvellement synthétisés sont très rapidement maturés. Les ARNs isolés à partir de cellules eucaryotes ne correspondant pas à des transcrits primaires, la possibilité d'identifier des sites de terminaison par ce procédé est exclue.

La terminologie utilisée dans la littérature pour décrire les mécanismes de terminaison porte parfois à confusion. Par définition, la terminaison résulte à la fois d'un arrêt de la transcription par la polymérase et du relâchement du transcrit. On parle de terminaison intrinsèque quand, dans un système où la polymérase et l'ADN ont été purifiés biochimiquement, l'enzyme arrête la transcription et relâche le transcrit en l'absence de tout autre facteur. Il ne faut pas confondre terminaison et pause de la transcription. En effet, la pause de la transcription résulte seulement en l'arrêt de l'élongation mais ne s'accompagne pas du relâchement du transcrit. Lorsque la polymérase a ainsi stoppée l'élongation, elle a la possibilité soit de terminer la transcription en relâchant le transcrit, soit de poursuivre la synthèse de la chaîne ARN. Le choix de poursuivre ou de terminer la transcription est presque toujours sous la dépendance de facteurs protéiques régulateurs (cf ci-dessous).

B.1- QUELS SONT LES SIGNAUX DE TERMINAISON RECONNUS INTRINSEQUEMENT PAR LES ARN POLYMERASES ?

Seulement certains sites sont reconnus de façon intrinsèque par les polymérase bactériennes (122), phagiques (66) ou eucaryotes (49,131). Un signal de terminaison intrinsèque implique une interaction entre la polymérase et les acides nucléiques (ARN et/ou ADN), et doit provoquer à la fois l'arrêt de la transcription et le relâchement du transcrit.

La plupart des transcrits bactériens possèdent une série de résidus uridine à leur extrémité 3' précédée d'une région palindromique riche en GC capable de former une structure en forme d'épingle à cheveux (122). Cette région est communément appelée terminateur Rho-indépendant. Des mutations ponctuelles qui consistent à stabiliser ou, au contraire, à destabiliser la structure secondaire, augmentent ou diminuent respectivement l'efficacité de terminaison (23). La réduction du nombre de résidus U terminaux affaiblit également le potentiel du terminateur (93). Le modèle actuel propose que la structure en forme d'épingle à cheveux favorise l'arrêt de la polymérase tandis que la présence d'uridine facilite le relâchement du transcrit puisque l'appariement rU-dA est exceptionnellement instable.

Pour certains terminateurs, une série de résidus adénine remplace celle de résidus uridine, toujours précédée de la même région riche en GC, comme c'est le cas pour les gènes codants la protéine Rho ou certaines sous-unités de la polymérase procaryote (122).

De même, chez les eucaryotes, les sites de terminaison intrinsèques correspondent à des régions riches en résidus thymine dans le brin non codant (49,131). En général, le nombre de T ne permet pas de prédire la force du terminateur, et toutes les régions riches en T ne provoquent pas l'arrêt de la polymérase. Les séquences qui entourent le site terminateur influencent l'efficacité de terminaison (74,156) mais contrairement à la polymérase bactérienne, la structure de l'ARN naissant n'est pas nécessaire pour que les ARN polymérase II et III (11,74) terminent la transcription. Par contre, l'efficacité de terminaison intrinsèque est affectée par la structure de l'ADN (74) ou par sa séquence (119,147).

Des expériences récentes ont étudiées la longueur de l'hybride ADN:ARN dans la bulle de transcription (région déroulée de l'ADN permettant la transcription du brin non codant par la polymérase) en soumettant les complexes ternaires (ARN/ADN/polymérase) à une digestion par la ribonucléase A. Dans ces conditions, le transcrit naissant est entièrement

dégradé excepté les 3 derniers nucléotides de l'extrémité 3' (132). Ce complexe reste actif en transcription puisqu'il est capable de continuer l'élongation.

L'efficacité avec laquelle les polymérases reconnaissent des sites de terminaison est modulée par de nombreux facteurs qui peuvent interagir sur les trois partenaires du complexe de transcription, à savoir l'ARN naissant, l'ADN transcrit ou la polymérase. Nous allons discuter successivement ces différents mécanismes.

B.2-REGULATION DE LA TERMINAISON PAR DES PROTEINES LIANT L'ARN NAISSANT

1) Procaryotes

1.1) Terminaison Rho-dépendante

L'élongation des transcrits est un mécanisme processif c'est à dire que l'ARN n'est pas synthétisé à vitesse constante. Deux évènements affectent la vitesse d'élongation : les sites de pause qui induisent temporairement et de façon réversible l'arrêt de la synthèse et les terminateurs qui provoquent le relâchement du transcrit. La protéine Rho facilite cette dernière étape. Elle se produit lorsque la polymérase s'arrête en des sites de terminaison spécifiques appelés Rho-dépendants. Ces terminateurs sont présents dans les molécules d'ARN naissants et correspondent à une séquence d'environ 80 nts en amont du site de terminaison. Ces séquences, peu structurées et riche en C, constituent les sites de fixation de Rho sur le transcrit (34,123). Le facteur Rho est une protéine hexamérique composée de sous-unités identiques (123). Chacune possède deux domaines séparés : un domaine de liaison à l'ARN et un domaine de fixation et d'hydrolyse d'ATP. La liaison de Rho avec l'ARN active sa fonction ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à la translocation de Rho le long de l'ARN jusqu'au terminateur, et à son activité hélicase qui libère le transcrit du complexe de transcription en séparant l'hybride ADN/ARN.

1.2) Antiterminaison

Des protéines régulatrices modifient les propriétés d'élongation de la polymérase de telle sorte que cette dernière passe au travers des terminateurs. Généralement, l'intervention de ces protéines a pour effet d'augmenter la vitesse d'élongation. Par conséquent, le temps de pause de la polymérase sur les terminateurs diminue et la terminaison est inhibée.

La protéine N du phage λ provoque l'antiterminaison de la transcription en des sites Rho-

dépendant et Rho-indépendant, en synergie avec des protéines bactériennes comme NusA (34). L'antiterminaison nécessite la présence de sites spécifiques sur l'ADN, les sites *nut*, qui doivent être transcrits par la polymérase(59). On sait depuis peu que N lie l'ARN sur l'équivalent de ces séquences *nut*, mais on ignore comment N modifie les propriétés transcriptionnelle de la polymérase .

Par contre, la protéine *psu* du phage P4 supprime de façon spécifique la terminaison Rho-dépendante. Une des hypothèses suggérée pour expliquer cette spécificité est que *psu* entre en compétition avec Rho pour la liaison avec l'ARN (34).

1.3)Atténuation

Certains opérons biosynthétiques d'*E.coli* possèdent un site spécifique de terminaison appelé atténuateur qui contrôle la terminaison de la transcription des gènes en réponse à un signal métabolique. Très souvent, le ribosome en cours de synthèse protéique participe au processus d'atténuation.

Dans le cas de l'opéron *bgl*, la terminaison de la transcription est contrôlée par une protéine qui lie le transcrit naissant (34). Cet opéron contient 3 gènes (BglG, BglF et BglB) nécessaires pour l'utilisation des β -glucosides comme source de carbone par la bactérie. Le gène BglG code la protéine régulatrice qui lie l'ARNm de l'opéron *bgl*. En présence de β -glucosides, BglG est déphosphorylée. Ainsi activée, elle lie sous forme de dimère l'ARNm cible en des régions qui contiennent des terminateurs en forme d'épingle à cheveux. La liaison de BglG sur l'ARNm inhibe la formation de structures terminatrices et permet l'expression de l'opéron *bgl*.

2) Virus

2.1)Terminaison par la polymérase du virus de la vaccine

Dans ce cas, le signal de terminaison (UUUUUNU) ne correspond pas directement au site de terminaison puisque cet évènement se produit 20 à 50 nts en aval du signal. Si ce dernier est incorporé dans une structure secondaire, l'efficacité de la terminaison est affectée.

L'enzyme qui coiffe l'extrémité 5' des ARNm viraux est un hétérodimère (95 et 34 kDa) capable d'aider la polymérase virale à terminer la transcription. Seule la sous-unité de 95 kDa est suffisante pour lier l'ARN. Cette liaison est inhibée préférentiellement par la présence de poly(U) (92) mais paradoxalement, l'enzyme ne lie par les ARNm au niveau

du signal de terminaison. Le mécanisme par lequel cette protéine aide à la reconnaissance du site de terminaison reste inconnu. Il pourrait impliquer des interactions protéiques où la protéine de 95 kDa interagit avec un facteur qui reconnaît le signal de terminaison.

2.2) Antiterminaison par la protéine Tat du virus HIV

La transcription du génome de HIV est initiée à partir de promoteurs forts (LTR) pour produire des ARNs viraux qui possèdent à leur extrémité 5' une séquence régulatrice en forme d'épingle à cheveux, TAR. La protéine virale Tat reconnaît l'élément TAR et la liaison protéine/ARN stimule l'initiation de la transcription (82). En absence de protéine Tat, les ARNm viraux se terminent majoritairement au niveau de la séquence TAR. Des expériences montrent que Tat aide la polymérase II à transcrire le gène en stabilisant le complexe d'élongation lorsque ce dernier rencontre la séquence TAR. Si des mutations sont introduites dans la protéine Tat ou dans l'élément TAR de sorte à inhiber l'interaction TAR/Tat, l'élongation de la transcription est affectée (34). Malgré l'identification de composants cellulaires capables d'interagir avec Tat, les mécanismes par lesquels cette protéine module l'efficacité de terminaison restent aujourd'hui inconnus.

3) Eucaryotes

3.1) Terminaison par l'ARN polymérase II

En ce qui concerne la transcription des gènes codant les ARNm polyadénylés, la terminaison nécessite la présence de deux signaux : un site de polyadénylation (AAUAAA) fonctionnel et un site de pause proche du site de terminaison (96). L'efficacité de terminaison semble dépendre de la distance séparant le signal fonctionnel de polyadénylation et l'élément de terminaison (155). Une mutation ponctuelle dans le signal de polyadénylation inactive non seulement la maturation 3' de l'ARNm mais aussi accroît la longueur des transcrits primaires au-delà du site naturel de terminaison (126). La maturation 3' des transcrits doit donc être un événement important dans la terminaison de la transcription. Un modèle propose que lorsque le signal de polyadénylation est accessible au système de maturation des ARNm, le transcrit est relâché grâce au clivage qui se produit normalement en 3' du signal AAUAAA. La polymérase synthétise alors un ARN dont l'extrémité 5' n'est plus protégée par la structure "coiffe". Cet ARN devient sensible à l'action d'exonucléases qui dégradent l'ARN dans le sens 5'→3'. D'autres

protéines de type hélicases doivent intervenir pour dérouler l'hybride ADN:ARN et relâcher l'ARN (126). Des résultats récemment obtenus chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* supporte ce modèle en identifiant sur l'ADN des régions en aval du signal de polyadénylation où la transcription s'arrête temporairement (63). De telles séquences ont également été identifiées chez les eucaryotes supérieurs. Ces sites de pause facilitent l'utilisation d'un signal faible de polyadénylation localisé en amont de ce site, voire même l'utilisation d'un site de polyadénylation localisé à l'intérieur d'un intron (40).

La terminaison de la transcription des ARNm des histones est comparable à celle des ARNm polyadénylés dans le sens que terminaison et maturation 3' de ces ARNs sont intimement liées. Ces ARNs sont clivés par des endonucléases mais les séquences signales et les facteurs impliqués dans ce processus sont différents de ceux rencontrés dans la maturation des ARNm polyadénylés (25,96).

B.3- REGULATION DE LA TERMINAISON PAR DES PROTEINES LIANT L'ADN

Ce mécanisme ne dirige pas toujours une terminaison au sens stricte du terme car si ces protéines participent à l'arrêt de l'élongation, elles ne sont pas pour autant impliquées dans le relâchement du transcrit. En effet, certaines protéines bloquent l'élongation, mais ce blocage ne s'accompagne pas toujours d'une déstabilisation du complexe ternaire ARN/ADN/Polymérase. Dans ce cas, la polymérase peut continuer la synthèse d'ARN lorsque ces protéines quittent l'ADN.

1) Procaryotes

1.1) Terminaison du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose

Chez *E. coli*, le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose *lacI*, est localisé juste en amont de ce même opéron. Le répresseur et les trois gènes structuraux (*lacZ*, *Y* et *A*) sont transcrits dans la même direction. Une région de 84 nts située entre la séquence codante pour le répresseur et le site d'initiation de la transcription du gène *lacZ* contrôle l'expression de l'opéron. Cette région contient un site de liaison pour le répresseur *lacI*. La liaison de *lacI* sur cet opérateur permet d'accomplir simultanément deux fonctions :

réprimer la transcription du gène *lacZ* et terminer efficacement la transcription du répresseur *lacI* (141). Il est intéressant de noter que dans le cas de constructions chimériques où le site de liaison pour *lacI* est inséré dans un gène normalement transcrit par Pol II, la présence de *lacI* sur l'ADN bloque l'élongation de la transcription par la polymérase eucaryote (35). Ceci suggère que l'activité des polymérases procaryotes et eucaryotes peut être régulées par des mécanismes communs.

1.2) Antiterminaison

Le cycle lytique du phage λ est contrôlé par les protéines d'antiterminaison N (cf ci-dessus) et Q qui permettent l'expression respective des gènes précoces et tardifs du phage. La protéine Q lie l'ADN en reconnaissant une séquence dans le promoteur des gènes tardifs (*qut*). Nus A agit en synergie avec Q pour modifier les propriétés enzymatiques de la polymérase puisqu'en présence de Q, la vitesse d'élongation est augmentée d'un facteur 3 au minimum. Les propriétés d'antiterminaison de Q s'appliquent indépendamment du type de terminateur (intrinsèque ou Rho-dépendant). Un modèle qui tente d'expliquer le mécanisme d'action de Q suggère que cette protéine réduit le temps de pause de la polymérase sur les terminateurs en facilitant l'interaction de l'enzyme avec les NTPs (135).

2) Eucaryotes

Chez les eucaryotes, les ARN polymérase I et II ainsi que l'ARN polymérase mitochondriale utilisent des protéines qui lient l'ADN dans le but de stopper le processus d'élongation.

2.1) Transcription par l'ARN polymérase I

L'étude de la transcription par Pol I a montré qu'une courte séquence de 18 bps, appelée boîte Sal chez la souris et T3 chez le Xénope, était impliquée dans les événements de terminaison (119). Cet élément est spécifique de l'espèce et est situé entre chaque unité transcriptionnelle codant pour les ARNs ribosomiques (ces unités étant répétées plusieurs fois en tandem dans le génome). Ce terminateur peut fonctionner de façon unidirectionnelle dans un contexte hétérologue, mais reste spécifique de Pol I, c'est à dire qu'il est incapable de terminer la transcription par Pol II ou par une polymérase bactérienne. Chez la souris, plusieurs protéines interagissant avec la boîte Sal ont été identifiées comme étant le facteur de terminaison murin (TTFI) (146). En fait, ces

protéines sont issues de la protéolyse limitée d'une protéine précurseur de 130 kDa. Cette forme précurseur possède peu d'affinité pour l'ADN contrairement à ses dérivés protéolytiques. La liaison de TTFI sur la boîte Sal induit une courbure de l'ADN suggérant que des modifications structurales sont impliquées dans les événements de terminaison. D'autre part, la spécificité de ce facteur de terminaison suggère qu'il interagit probablement avec un des composants du complexe d'élongation de Pol I, voire une sous-unité spécifique de la polymérase.

2.2) Transcription par l'ARN polymérase mitochondriale

Chez certains patients, le syndrome de MELAS (encephalopathie mitochondriale) est associé à une mutation de l'ADN mitochondrial dans une séquence nécessaire pour la terminaison de la transcription des gènes ribosomiques. Une expérience récente montre que cette séquence qui dirige la terminaison fonctionne *in vivo*, chez les bactéries, indépendamment de son orientation comme un terminateur Rho-dépendant (147).

Le facteur de terminaison mTERM qui reconnaît spécifiquement cette séquence a été purifié par chromatographie d'affinité pour l'ADN à partir de lysats mitochondriaux humains (77). mTERM est composé de trois polypeptides : 2 sous-unités de 34 kDa et une de 31 kDa. Seules les sous-unités p34 sont nécessaires pour assurer l'activité de terminaison de la transcription (33).

2.3) Transcription par l'ARN polymérase II

La transcription du proto-oncogène *c-myc* et des ARNs_n U1 et U2 constitue un exemple aujourd'hui bien caractérisé où les séquences promotrices influencent les propriétés des complexes d'élongation.

Le gène codant pour *c-myc* possède deux régions promotrices P1 et P2 à partir desquelles la transcription peut être initiée. L'injection de ce gène dans des oocytes de *Xénotopus* révèle que la majorité des transcrits se terminent dans la jonction exon1:intron1 à l'intérieur de séquences riches en T (81). Les transcrits initiés à partir de P2 sont plus sensibles à ce signal de terminaison, peut-être parce que leur transcription implique un complexe d'élongation de type Pol III plutôt que Pol II (151).

De même, les mécanismes de terminaison de la transcription des gènes codant les ARNs_n (surtout U1 et U2) ont été bien caractérisés (57). La maturation de l'extrémité 3' de ces ARNs est co-transcriptionnelle et est probablement responsable de la terminaison de la transcription de ces gènes. Une séquence appelée boîte 3' et conservée parmi tous les gènes ARNs_n transcrits par Pol II, a été identifiée comme étant nécessaire pour terminer efficacement la transcription. La reconnaissance de la boîte 3' comme signal de

terminaison dépend des séquences promotrices du gène et par conséquent du complexe de transcription associé (facteurs de transcription et polymérase). En effet, si les promoteurs de ces gènes sont remplacés par des promoteurs d'ARNm, la boîte 3' est ignorée par le complexe d'élongation et la transcription se poursuit au-delà du signal de terminaison (57). De même, si le promoteur est remplacé par celui du gène U6 (transcrit Pol III), les gènes sont transcrits par Pol III et se terminent à l'intérieur d'une suite de T qui correspond au signal de terminaison normalement reconnu par Pol III (90). Ces résultats impliquent que Pol II et/ou des facteurs associés au complexe de transcription de ces gènes sont impliqués dans la reconnaissance de la boîte 3'.

D'autres séquences promotrices comme CCAAT reconnues spécifiquement par des protéines sont impliquées dans la terminaison de la transcription par Pol II en bloquant l'élongation de la synthèse d'ARN (28).

B.4- REGULATION DE LA TERMINAISON PAR DES FACTEURS INTERAGISSANT AVEC L'ARN POLYMERASE

1) Procaryotes

1.1) Atténuation

En réponse à un signal métabolique, le ribosome en cours de synthèse participe aux événements de terminaison de la transcription de certains opérons. Ce mécanisme de régulation de la terminaison implique un couplage entre la traduction et la transcription puisque selon les cas, le ribosome contraint le transcrit naissant à adopter une structure secondaire qui provoque la terminaison de la transcription, ou au contraire inhibe la formation de ce terminateur (81).

Par exemple, dans le cas de l'opéron tryptophane (trp), la synthèse d'un peptide leader contenant des codons régulateurs trp gouverne la formation d'un terminateur quand le trp est suffisamment abondant dans la cellule. La terminaison de l'opéron trp est Rho-indépendante. La régulation de la transcription de cet opéron nécessite la formation de deux structures secondaires qui sont exclusives l'une de l'autre : l'une correspond au signal de terminaison, l'autre à l'atténuateur. A basse concentration intracellulaire en trp,

le ribosome ralentit la synthèse du peptide leader au moyen des codons de contrôle trp. Ce ralentissement force le transcrit à adopter la structure "atténuateur", ce qui exclue la formation du terminateur. Par conséquent, les gènes de l'opéron trp sont exprimés. Inversement, quand le trp devient abondant, le ribosome progresse rapidement jusqu'au codon stop empêchant la formation de la structure "atténuateur". Par défaut, la structure secondaire correspondant au terminateur est permise et la transcription se termine (81).

Dans le cas de l'opéron pyrBI, la terminaison est régulée par la concentration d'UTP. Cet opéron code un enzyme de la biosynthèse des pyrimidines et possède un site de terminaison rho-indépendant en amont de l'atténuateur. La région où la polymérase stoppe momentanément la transcription est riche en résidus U. Lorsque le taux d'UTP est faible, la polymérase s'arrête suffisamment longtemps pour permettre au ribosome d'initier la synthèse d'un peptide "leader" de 44 AA. La traduction se poursuit jusqu'à ce que le ribosome rejoigne la polymérase. L'interaction entre les deux entités empêche la polymérase de reconnaître l'atténuateur et la transcription se poursuit jusqu'au terminateur. Par contre, lorsque la concentration d'UTP est suffisante, l'initiation de la traduction du peptide "leader" ne peut se faire car le temps de pause de la polymérase est trop court (81) et les transcrits se terminent majoritairement au niveau de l'atténuateur.

1.2) Antiterminaison

La purification de l'ARN polymérase d'*E. coli* a montré que la protéine nusA est associée à l'enzyme. Selon les conditions expérimentales, nusA agit comme facteur de terminaison ou d'antiterminaison. La présence de nusA réduit la vitesse d'élongation, ce qui a pour effet d'accentuer le temps de pause de la polymérase favorisant ainsi la terminaison de la transcription. Ce phénomène s'explique actuellement par une compétition entre le site de liaison de nusA et celui des NTPs sur la polymérase (74).

2) Eucaryotes

Plusieurs protéines interagissant physiquement avec Pol II ont été identifiées (34,74). En particulier, une protéine nucléaire, appelée différemment selon les sources (protéine SII, TFIIS, RAP38 ou P37) stimule l'élongation quand la polymérase rencontre un site de pause (130). Au moins deux ADNc codant la protéine SII humaine sont clonés (22). Des expériences *in vitro* réalisées avec Pol II et SII purifiées (chez la drosophile ou à partir de

thymus de veau) montrent que ces deux protéines sont suffisantes pour médier l'élongation de la transcription (145). Cependant, tous les sites de pause ne sont pas affectés par la présence de SII.

Un homologue de SII chez la levure a également été identifié, mais contrairement à la protéine humaine, la protéine de levure est aussi active dans la transcription par Pol I et Pol II (138). La liaison de TFIIS sur un complexe binaire (Pol II/ARN) à l'arrêt induit le clivage de l'ARN. Il semble que cette activité ribonucléasique soit intrinsèque à Pol II. Ce mécanisme aurait pour but de secourir la polymérase immobilisée dans un complexe de transcription inactif (68).

MATERIELS ET METHODES

A: MODIFICATIONS ENZYMATIQUES DE L'ADN

A.1: Digestion par les endonucléases de restriction

En général, 1µg d'ADN purifié est digéré par 1U d'enzyme en 60mn. Il est possible de digérer jusqu'à 4µg d'ADN dans un volume final de 20µl. Toutefois, le volume d'enzyme de restriction à ajouter ne doit pas excéder 1/10 du volume final car le glycérol contenu dans le tampon de conservation de l'enzyme peut diminuer l'efficacité de la digestion.

(dans tous les cas, se référer aux indications du vendeur)

Pour effectuer des digestions partielles, on peut augmenter le volume final de réaction à 100µl et diminuer la quantité d'enzyme (maximum 0.3U/µg d'ADN). Prélever à des intervalles de temps entre 3mn et 60mn, 16µl de réaction et ajouter de l'EDTA à 20mM final, puis le tampon de charge 5 x FDM. Les échantillons sont prêts à être directement chargés sur un gel d'agarose.

A.2: Fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'E. coli

Cette enzyme correspond à la partie carboxyl terminal de l'ADN polymérase. Elle conserve les activités ADN polymérase et exonucléase 3'→5' mais a perdu l'activité exonucléase 5'→3'.

Marquage de l'extrémité 3' de l'ADN par un α -³²P dATP ou un Bio7-dATP

ADN	0.75mg/ml
dNTPs (sauf dATP)	100µM chacun
dATP (α - ³² P ou Bio7)	50µCi ou 20µM
Klenow	15U/ml
H ₂ O	qsp 20µl

réaction : 1h à 37°C

Remplissage 3'→5' des extrémités ADN: La réaction est la même que précédemment mais on augmente la quantité de dNTPs à 1mM chacun.

10x tampon Pol I :	500mM Tris-HCl pH7.5
	100mM MgSO ₄
	10mM DTT

A.3: Phosphatase alcaline (CIP)

Cette enzyme est utilisée pour déphosphoryler l'extrémité 5' des acides nucléiques dans le but:

- de marquer en 5' avec un radioisotope ³²P un fragment d'ADN qui doit être séquencé par la méthode de Maxam-Gilbert ou un ARN qui doit être séquencé par fingerprint.
- d'éviter une ligation sur lui-même d'un vecteur ADN préalablement digéré.

Le plus souvent, la réaction s'effectue dans le tampon utilisé pour digérer l'ADN. On ajoute 1µl de CIP

(18U) à la réaction et l'on poursuit l'incubation 30mn à 37°C. L'enzyme est inactivée en chauffant 10mn à 70°C ou par extraction au phénol.

A.4: T4 polynucléotide kinase (PNK)

Cette enzyme catalyse le transfert du phosphate γ de l'ATP sur l'extrémité 5' hydroxyle des acides nucléiques.

Fragment de restriction	10-200pmoles d'extrémités
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (a.s > 5000Ci/mmmole)	50 μCi
PNK	10U
H ₂ O	qsp 20 μl

réaction : 1h à 37°C.

10 x tampon kinase :	0.5M Tris HCl pH7.5
	0.1M MgCl ₂
	50mM DTT
	1mM spermidine

Rq: Pour un oligonucléotide, on phosphoryle 10pmoles dans un tampon qui ne contient pas de spermidine. Si la phosphorylation ne s'accompagne pas d'un marquage radioactif, le $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP est remplacé par 5mM ATP final.

L'enzyme est inactivée en chauffant 10mn à 70°C.

A.5: T4 ADN ligase

Cette enzyme catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les groupes terminaux 3'OH et 5'P d'un duplex ADN.

vecteur	50ng
insert	3-10 x d'excès molaire
T4 ADN ligase	1U
H ₂ O	qsp 10 μl

réaction : 30mn minimum à RTC (20°C).

Pour la ligation d'extrémités cohésives, augmenter le temps d'incubation (5 heures minimum)

10 x tampon ligase:	200mM Tris HCl pH7.5
	100mM MgCl ₂
	100mM DTT
	5mM ATP

A.6: Mutagenèse dirigée

Un kit commercialisé chez Amersham permet d'obtenir une grande efficacité de mutagenèse en éliminant de façon spécifique le brin non muté, générant ainsi un homoduplexe ADN mutant.

Un oligonucléotide portant la mutation désirée est hybridé à une matrice ADN simple brin et sert d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire. Un hétéroduplexe ADN composé d'un brin de type sauvage et d'un brin muté est ainsi généré. L'élimination sélective du brin non muté est rendue possible grâce à l'incorporation dans le brin mutant d'un thionucléotide au cours de la synthèse par le fragment Klenow de la polymérase I. En présence de ce type de nucléotide, l'enzyme de restriction NciI ne peut cliver l'hétéroduplexe ADN mais génère seulement une coupure dans le brin non muté qui permet ultérieurement à l'exonucléase III de digérer spécifiquement ce brin.

A.6.1- Synthèse de l'ADN simple brin

Le plasmide Gem3LaY contenant le gène codant la protéine La de *S.cerevisiae* est digéré avec Hind III. Un fragment de 150 pb issu de la digestion et contenant la région RNP1 de la protéine est sous cloné dans le vecteur pBS qui possède une origine de répllication pour le phage M13. Une souche d'*E. coli* infectée par le phage M13 est transformée avec ce nouveau plasmide et est surinfectée avec un phage helper à raison de 2.10¹⁰pfu/ml, soit un excès de phage égal à 20 fois le nombre de bactéries.

A.6.2-Synthèse du brin mutant

10 pmol d'oligonucléotide contenant la mutation sont phosphorylées comme décrit dans la section A.4 et hybridées à 5µg d'ADN simple brin en chauffant 3mn à 70°C puis en incubant 30mn à 37°C avant de placer sur la glace. La synthèse du brin mutant est effectuée pendant la nuit à 16°C en présence de 6U de Klenow et 6U de T4 ADN ligase et d' α -S-dCTP.

A.6.3-Filtration de l'hétéroduplexe

Les molécules d'ADN simple brin non converties en hétéroduplexe sont éliminées par filtration. A 0.5M NaCl, l'ADN simple brin s'attache à la membrane de nitrocellulose alors que l'hétéroduplexe passe au travers et se trouve ainsi purifié.

- ajouter à la réaction de synthèse du brin mutant 170 µl H₂O et 30 µl NaCl 5M.
- filtrer en centrifugeant 10 mn à 1500 rpm, RTC.
- rincer le filtre en ajoutant 100 µl de 0.5M NaCl et centrifuger à nouveau.
- précipiter le filtrat avec de l'éthanol dans 0.3M NaOAc final.

A.6.4-Coupure du brin non muté par NciI

Le thionucléotide α -S-dCTP n'est pas mutagénisant et ne modifie pas la spécificité d'appariement des bases. Incorporé dans le brin mutant au cours de la première étape, il protège ce dernier au niveau des sites NciI de l'action de l'enzyme de restriction correspondante qui ne peut alors que faire une simple coupure dans le brin non mutant. 5U de NciI sont ajoutées au filtrat et la réaction est incubée 90 mn à 37°C.

A.6.5-Digestion du brin non mutant par l'exonucléase III

Cette enzyme digère l'ADN dans le sens 3'→5' à partir d'une extrémité 3' libre. Pour les raisons décrites ci-dessus, seul le brin non muté est digéré par cette enzyme. 50U d'exonucléase III sont suffisantes pour digérer la totalité du brin non muté en 30 mn à 37°C. L'enzyme est inactivée en chauffant 15 mn à 70°C.

A.6.6-Repolymérisation et ligation du duplexe ADN partiellement digéré par l'exonucléase III

La réaction s'effectue la nuit à 16°C en présence de 3U d'ADN polymérase I et 2U de T4 ADN ligase. L'ADN est précipité 10 mn à RTC en ajoutant:

- 1 volume de 4M NH₄OAc pH5.4
- 4 volumes d'éthanol.

Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 100 µl de TE.

La souche DH5 α est transformée avec ce nouveau plasmide qui contient 2 acides aminés mutants dans la région RNP1 de la protéine La de *S.cerevisiae*. Cette mutation est vérifiée par séquençage (cf. F.1.2) puis le fragment est réintroduit dans la séquence originale à la place du fragment de type sauvage.

B: ELECTRO-TRANSFORMATION D' E. COLI

B.1: Préparation des cellules électro-compétentes

- à partir d'une colonie d'*E. coli* DH5, inoculer 15ml de LB et cultiver la nuit à 37°C.
- avec 10ml de cet inoculum, ensemencer 1L de LB et incubé à 37°C en agitant vigoureusement jusqu'à obtenir une D.O_{600nm}=0.5 - 0.8 (~2h).
- refroidir les cellules dans la glace 15-30mn et centrifuger dans un rotor froid à 4000g pendant 15mn.
- resuspendre les cellules dans 500ml dH₂O refroidie sur glace et centrifuger comme précédemment.
- recommencer l'opération en resuspendant les cellules dans 500ml dH₂O froide et centrifuger.
- resuspendre dans 10ml de 10% glycérol et centrifuger à nouveau.
- resuspendre dans 1.5ml de 10% glycérol et aliquoter par 50µl en congelant directement sur carboglace. Stocker les aliquots à -70°C.

B.2: Electro-transformation

- refroidir tubes et cuvettes sur la glace.
- régler l'appareil Gene Pulser (Biorad) sur une capacité de 25µF et 2.5kV et une résistance de 200Ω.
- ajouter à 50µl de suspension cellulaire, 2µl de la réaction de ligation (= 1/5). Mélanger et laisser sur glace environ 1mn.

- transférer dans une cuve à électroporer (0.2cm, Biorad). Vérifier l'absence de bulles d'air et appliquer le pulse jusqu'au signal sonore.
- ajouter immédiatement 1ml de SOC (conservé à RTC) dans la cuvette avec une pipette Pasteur, homogénéiser doucement et transférer le tout dans un tube de polypropylène.
- incuber 1h à 37°C, 225rpm.
- étaier sur milieu sélectif à raison de 250µl pour une grande boîte de Petri.

SOC :	2% Bacto tryptone (Gibco)	10mM MgCl ₂
	0.5% Bacto yeast extract (Gibco)	10mM MgSO ₄
	10mM NaCl	20mM glucose
	2.5mM KCl	

C: PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE

C.1: Minipréparation de plasmides

- inoculer 1 colonie par 5ml de LB + antibiotique de sélection et incuber la nuit à 37°C, 250rpm.
- centrifuger 3ml de culture dans un tube Eppendorf et éliminer le surnageant par aspiration.
- resuspendre le culot dans 100µl d'une solution 50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA pH8 en vortexant.
- ajouter 200µl d'une solution 0.2N NaOH, 1% SDS fraîchement préparée. Mélanger par inversion du tube et incuber 5mn à RTC.
- ajouter 150µl de 3M/5M KAc (conservé à 4°C) et vortexer sur le bouchon. Incuber 5mn à 4°C.
- centrifuger 2mn à RTC à 10000rpm.
- transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf et extraire avec 1 volume de chloroforme (1 vol. phénol / 1 vol. chloroforme).
- ajouter 1ml d'éthanol 100% et incuber 1mn à RTC. Centrifuger 2mn à RTC.
- rincer les culots avec 500µl d'éthanol 80% et sécher les culots avant de les resuspendre dans 50µl d'H₂O.

Rq1: les ADNs plasmidiques préparés selon cette méthode peuvent être directement séquencés. Dans ce cas, le culot est dissous dans seulement 30µl H₂O et 4 à 5µl sont utilisés pour séquencer selon Sanger.

Rq2: pour les analyses de restriction, 2µl de suspension (soit 1/25) sont suffisants.

LB:	Tryptone	10g
	Extrait de levure	5g
	NaCl	5g
	NaOH 1N	1ml
	H ₂ O	qsp 1l
	autoclaver 20mn à 120°C.	

C.2: Maxipréparation de plasmides

- inoculer 1 colonie dans 11ml de LB + antibiotique de sélection et cultiver la nuit à 37°C, 250rpm.
- ajouter 5ml de la pré-culture à 500ml LB contenant l'antibiotique et incuber à 37°C, 250rpm jusqu'à une D.O_{600nm} ≈ 1 (≈4h).
- ajouter 200µg/ml final de chloramphénicol (= 1ml d'une solution à 100mg/ml dissous dans l'éthanol 80%) pour amplifier l'ADN plasmidique en incubant la nuit à 37°C, 250-300 rpm.
- centrifuger 15mn à 4000rpm.
- laver les cellules en les resuspendant dans 20ml de 50mM Tris HCl pH8 et centrifuger à nouveau.
- resuspendre dans 4.2ml de 25% sucrose, 50mM Tris HCl pH8.
- lyser les bactéries par addition de 1.4 ml lysozyme à 10mg/ml (dissous dans 50mM Tris HCl pH8) et incuber 5mn dans la glace.
- ajouter 2.3ml de 0.25M EDTA et incuber 10mn dans la glace.
- ajouter 5ml d'une solution 2% triton X-100, 60mM EDTA, 50mM Tris HCl pH8 et incuber 30mn sur glace.

- transférer le mélange dans des tubes polycarbonate et centrifuger 1h à 32000 rpm, 4°C (rotor Ti60).
- prélever le surnageant et ajuster le volume à 14ml avec dH₂O. Mélanger ce volume à 14g de CsCl préalablement pesé et ajouter 1ml EtBr à 10mg/ml.
- centrifuger la nuit à 37000rpm, 20°C (rotor vertical VTI65).
- récouter la bande inférieure (ADN plasmidique) et extraire 4 fois avec 1 volume d'isoamylalcool saturé en CsCl.
- dialyser 3 x 2h dans 1L TE à 4°C, ajuster à 0.3M NaOAc pH7.4 et précipiter avec 2.5 volume d'éthanol la nuit à -20°C.
- centrifuger à 10000rpm, 4°C. Rincer le culot avec 1ml d'éthanol à 80% et resuspendre le culot dans 170µl TE.

TE: 10mM Tris HCl pH7
1mM EDTA pH8

C.3: Purification sur colonne Biogel A-50 (Biorad)

Cette procédure permet l'élimination des ARNs contaminants la maxipréparation d'ADN plasmidique.

-hydrater le biogel A-50 avec une solution 20mM Tris HCl pH8, 0.2M NaCl, 1mM EDTA. Laisser gonfler la résine la nuit à RTC et remplir une colonne (Ø=1cm, l=25cm, Biorad).

La colonne doit être rincée au moins 2h entre chaque purification.

-ajouter 30µl de colorant 25% glycine, 0.1% BPB, 0.5% bleu de Sarkosyl aux 170µl de solution ADN/TE et charger l'échantillon sur la colonne.

-laisser pénétrer et récolter 30 fractions de 500µl en éluant avec le même tampon que celui ayant servi à gonfler la résine. Mesurer la D.O à 260nm ; le premier pic d'éluion correspond à la sortie d'ADN, le second pic à la sortie d'ARN.

- grouper les fractions contenant l'ADN puis précipiter cet ADN en ajoutant 2.5 volumes d'éthanol. Après centrifugation à 10000rpm, rincer le culot avec 1ml d'éthanol et le resuspendre dans 500µl H₂O.

Rq: en général, 500ml de culture contiennent 500µg d'ADN plasmidique.

D: ELECTROPHORESE

Cette technique permet de séparer selon le poids moléculaire, non seulement des protéines mais aussi des fragments d'ADN ou d'ARN. Une fois linéarisés, ces derniers parcourent une distance qui est inversement proportionnelle au log₁₀ de leur taille (nombre de paires de bases).

D.1: Gel d'agarose

Il est utilisé pour séparer et purifier des fragments d'ADN dont la longueur est comprise entre 0.5kb et 25kb.

L'agarose est dissous dans du tampon 1xTEB, puis l'EtBr est ajouté à 0.2µg/ml final.

Le tampon de charge Ficoll Dye Mix (FDM) est ajouté aux échantillons. Laisser migrer de 1 à 10V/cm (distance de séparation des deux électrodes).

5 x FDM : 10% Ficoll
50mM EDTA
0.1% (w/v) XCFE
0.1% (w.v) BPB

10 x TEB : Tris base : 96.9g
acide borique : 49.5g
EDTA : 3.7g
H₂O : qsp 1L

% d'agarose	résolution (kb)
0.5	30-1
0.7	12-0.8
1	10-0.5
1.2	7-0.4
1.5	3-0.2

D.2: Gel d'acrylamide non dénaturant

Ce type de gel sépare des fragments d'ADN dont la taille est inférieure à 1000pb.

Un volume de solution d'acrylamide/bisacrylamide 29:1 (w/v) est mesuré selon le pourcentage désiré et mélangé au tampon TEB 1x final.

La migration se fait à RTC, à puissance constante de 12W. Le tampon de charge des échantillons est le même que celui utilisé pour les gels d'agarose.

% acrylamide	résolution (kb)	migration du BPB (kb)	migration du XCFE (kb)
3.5	100-1000	100	
5	100-500	65	250-300
8	60-400	45	120
12	50-200	20	70
20	5-100	12	

D.3: Gel d'acrylamide dénaturant

L'urée à la concentration de 8M est l'agent dénaturant.

On utilise également une solution d'acrylamide à 40% (38% acrylamide/2% bisacrylamide w/v).

D.3.1: Gel de séquence d'ADN:

Acrylamide 40%	(6%, 8% ou 14% final)
10 x TBE	7ml
urée	35g
H2O	qsp 70ml

L'urée est dissoute par chauffage à 37°C.

Une fois coulés, ces gels de séquences sont préchauffés 1h à une puissance constante de 50W pour les gels à 8% et 14%, de 45W pour les gels à 6%.

Le culot d'ADN est resuspendu dans le tampon de charge suivant:

Formamide 95%
XCFE 0.1%
BPB 0.1%
EDTA 10mM

L'ADN doit être dénaturé en le chauffant 3mn à 95°C et refroidi sur glace avant d'être chargé.

10 x TBE :	Tris base	: 109g
	acide borique	: 55.7g
	EDTA	: 9.3g
	H2O	: qsp 1L

D.3.2: Gel de transcription

Le principe est le même que pour les gels de séquence mais le tampon TEB est remplacé par du TBE. Le gel est préchauffé 1h à puissance constante de 30W.

Les ARNs sont resuspendus dans le tampon suivant:

Urée 7M
XCFE 0.1%

TEB 0.25 x

Les ARNs doivent être dénaturés 3mn à 65°C et refroidis sur glace avant d'être chargés.
Poursuivre l'électrophorèse à 30W pendant 1h à 1h30.

% d'acrylamide	BPB (nt)	XCFF (nt)
5	35	130
6	26	106
8	19	75
10	12	55
12		40

D.4: Gel de protéines à une dimension

Dans un gel dénaturant SDS-polyacrylamide, les protéines sont séparées sur la base de leur poids moléculaire. L'échantillon protéique est dénaturé par chauffage à 100°C en présence de SDS et d'un agent réducteur, le β -mercaptoethanol. De cette façon, la quantité de SDS incorporée dans les protéines est directement proportionnelle à sa longueur.

La procédure détaillée ci-dessous correspond à celle utilisée pour un minigel de protéines (Protean II gels, Biorad).

Gel de séparation (pour 10ml)	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	17.5%	20%
acrylamide 30%	1666	2500	3333	4166	5000	5830	6660
bisacrylamide 1%	2600	1930	1300	1033	870	730	650
Tris 1M pH8.7	3740	3740	3640	3740	3740	1875*	1875*
SDS 20%	←-----50----->						
H ₂ O	1933	1766	1433	1000	333	1485	728

* volume en μ l de Tris 2M pH8.7

ajouter 40 μ l APS 10% et 4 μ l TEMED pour la polymérisation.

Gel de concentration (pour 5ml) :

acrylamide 30%	835 μ l
bisacrylamide 1%	650 μ l
Tris 1M pH6.8	625 μ l
SDS 20%	25 μ l
H ₂ O	2850 μ l

ajouter 37.5 μ l APS 10% et 3.75 μ l TEMED pour la polymérisation.

5x tampon de protéine pH8.3 :

Tris base	: 15g
glycine	: 72g
SDS	: 5g
H ₂ O	: qsp 1L

2 x tampon de charge (pour 1.5ml, pH6.8) :

20% glycérol
10% β -mercaptoethanol
6% SDS
125mM Tris pH6.8
0.02% BPB

E: EXTRACTION D'ACIDE NUCLEIQUE D'UN GEL

E.1: Gel d'agarose

E.1.1: Extraction par électroélution

- découper la bande d'ADN dans le gel d'agarose et la mettre dans un sac à dialyse contenant un peu de tampon 0.5 x TEB.
- placer le sac dans une cuve à électrophorèse, perpendiculairement au champ électrique.
- appliquer un courant de 100V pendant 15-30mn. Vérifier sous la lampe U.V que l'ADN a été électroélué.
- purifier l'ADN sur colonne NACS. Pour cela ajouter du NaCl à 0.5M final.

Colonne NACS

- hydrater la colonne avec 3ml 2M NaCl/TE.
- équilibrer avec 3ml 0.5M NaCl/TE.
- charger l'échantillon.
- rincer avec 4ml 0.5M NaCl/TE.
- éluer avec 3 x 200µl 2M NaCl/TE.
- précipiter l'ADN comme suit:
 - 200µl d'éluat
 - 200µl TE
 - 2µg ARNt d'*E.coli*
 - 1ml EtOH 100%
- précipiter à nouveau en resuspendant l'ADN dans 0.1M NaCl.
- resuspendre enfin dans du TE.

E.1.2: Extraction par élution sur feuille de DEAE

- découper la feuille de DEAE NA-45 (Schleicher & Schull) selon les dimensions nécessaires.
- rincer cette membrane dans dH₂O, puis dans le tampon A (1.6M NaCl, 20mM Tris pH8, 1mM EDTA).
- placer la membrane derrière la bande à éluer et ajouter du tampon 1 x TEB sur les bords du gel.
- appliquer un courant de 100V pendant 10-15mn.
- mettre la membrane contenant l'ADN dans 400µl de tampon A et incubé 1h à 65°C.
- précipiter 2 fois l'ADN. (pour la première précipitation, ajouter 2µg d'ARNt d'*E.coli*)

E.1.3: Extraction par liquéfaction de l'agarose

Cette méthode ne nécessite pas l'utilisation d'un agarose spécial. L'ADN est extrait du gel à l'aide d'un kit commercialisé par Biorad : kit PrepA Gene.
(Suivre la procédure fournie par la firme)

E.2: Gel d'acrylamide

Les acides nucléiques présents dans un gel d'acrylamide sont facilement extraits par simple diffusion à RTC ou à 37°C. L'efficacité de récupération dépend de la longueur du fragment :

- 95% pour un oligonucléotide de 20nt
- 60-70% pour un fragment de 250pb
- 30-40% pour des fragments de 400pb

- découper en petits morceaux la bande d'acrylamide contenant l'acide nucléique.
- placer les morceaux dans une pipette de 1ml dont l'extrémité interne est obstruée par un coussin de laine de verre et l'extrémité externe par du parafilm.
- ajouter 400µl de tampon MG et incubé la nuit à 37°C.

-récupérer l'éluat en perçant l'extrémité extérieure de la pipette et précipiter avec 2.5 volumes d'éthanol 100% et 10µg d'ARNt d'*E.coli* (sauf si le fragment doit être phosphorylé).

tampon MG-ADN :	NH ₄ OAc pH7	: 0.5M
	EDTA	: 1mM
tampon MG-ARN :	NH ₄ OAc pH5.3	: 0.5M
	EDTA	: 0.1mM
	SDS	: 0.1%

F: SEQUENCAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

F.1: Séquençage de l'ADN

F.1.1Selon Maxam et Gilbert

Cette méthode chimique de séquençage est décrite en détail dans *Methods in Enzymology*, 65 : 499-559
Après avoir isolé et purifié un fragment d'ADN marqué à une extrémité, resuspendre le culot d'ADN dans 23µl H₂O dans des tubes siliconnés.

Répartir comme suit :

- 4µl pour la réaction G
- 7µl pour la réaction R (G+A)
- 7µl pour la réaction Y (C+T)
- 5µl pour la réaction C

Réaction	R	G	C	Y
ADN µl	7	4	5	7
ajouter	13µl H ₂ O	200µl Caco Mix	15µl NaCl 5M	13µl H ₂ O
mélanger et	2µl Pyr. For.	1µl DMS	30µl Hydrazine	30µl Hydrazine
incuber	15mn, 37°C	3mn, 20°C	14mn, 20°C	12mn, 20°C
ajouter	220µl NaAc 0.3M	50µl 5xDMS-stop	200µl C-stop	200µl T-stop
<----- 10µg ARNt -----> <-----750µl EtOH 100% ----->				

précipiter 30mn à -70°C.
centrifuger et rincer le culot avec 1ml EtOH 80%.
resuspendre dans 0.3M NaAc pH7.5 et précipiter à nouveau.
resuspendre les culots dans:

	R	G	C	Y
Pipéridine 1M	30µl	30µl	100µl	100µl

vortexer et incuber 30mn à 90°C.
lyophiliser 3x dans 30µl H₂O.
resuspendre les culots dans 8µl de tampon de charge.
chauffer 3mn à 90°C, refroidir sur glace avant de charger.

Composition des solutions:

Pyridinium formate (Pyr. For.) : acide formique 4%
pyridine (pour ajuster à pH2)

Acide formique 50%
DMS (Fluka)
Hydrazine anhydre pure, 95% (Serva)
Pipéridine pure (Serva)

5 x DMS-Stop : NaOAc 1.5M pH7
β-mercaptoéthanol 1M

Caco Mix : sodium cacodylate 50mM pH8
EDTA 1mM

C-Stop : NaOAc 30mM
EDTA 0.1mM

T-Stop : NaOAc 300mM
EDTA 0.1mM

Rq: Le DMS est inactivé par une solution 5M NaOH.
L'hydrazine est inactivée par une solution 3M chlorure de fer.

F.1.2: Selon Sanger

Cette méthode est aussi appelée séquençage par terminaison de chaînes (Sanger et al., 1977, PNAS 74 : 5463-5467).

Une amorce oligonucléotidique complémentaire est hybridée à la matrice ADN. L'amorce sert de point d'ancrage à une ADN polymérase qui initie la synthèse d'ADN à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. La synthèse se fait dans 4 tubes différents, chacun contenant un ddNTP et les trois dNTPs restants. La présence du ddNTP incorporé dans la chaîne naissante provoque l'arrêt de la synthèse par la polymérase. La procédure suivie pour séquencer selon Sanger est décrite en détail par le fournisseur du kit Séquenase (USB).

L'ADN double brin est dénaturé 30mn à 37°C dans une solution 0.2M NaOH, 2mM EDTA avant d'être hybridé à l'amorce. L'ADN est ensuite précipité dans du NaOAc 0.3M pH5.5.

F.2: Séquençage d'ARN

Le principe du fingerprinting est détaillé par Gupta et al., 1979, NAR 7 : 959-971.

La structure primaire d'un ARN est déterminée en 2 étapes:

- l'ARN est digéré par des endonucléases et les oligonucléotides sont séparés selon leur charge.
- ces oligonucléotides sont ensuite séparés par chromatographie sur couche mince selon leur masse et leur séquence.

F.2.1: Hydrolyse de l'ARN par la RNase T1

Cette endonucléase coupe les liaisons phosphodiester après les 3'P des résidus guaniliques.

L'ARN est marqué au ³²P, purifié sur gel d'acrylamide et élué par diffusion dans du tampon GM-ARN, puis précipité en présence de 20µg d'ARNt d'*E.coli*. Le culot sec d'ARN est directement resuspendu dans 2µl de solution enzymatique (RNase T1 5U/µl, dans 20mM Tris pH7.4, 2mM EDTA). La réaction se fait à 37°C dans un capillaire (embout de pipette Oxford) placé dans un four saturé en eau.

F.2.2: Première dimension: électrophorèse sur acétate de cellulose.

-imprégner la languette d'acétate de cellulose (30 x 550cm, Schleicher & Schull) dans une solution 5% acide acétique, 0.5% EDTA, 7M urée. Ajuster à pH3.5 avec la pyridine.

-déposer les 2µl d'hydrolysate à 10cm de l'extrémité de la bandelette ainsi qu'une goutte de colorant (1% acide fuchique, 1% XCFF, 1% méthylorange) à côté de l'échantillon.

-quand les échantillons ont pénétré la bandelette, fixer cette dernière sur un support plastique que l'on introduit ensuite dans une cuve à électrophorèse à haut voltage.

tampon d'électrophorèse: 5% acide acétique
0.5% pyridine
pH3.5

-faire migrer à 5000V pendant 25mn (le colorant rose doit avoir parcouru 21cm)

F.2.3: Deuxième dimension: chromatographie sur couche mince

La cellulose en couche mince (0.1mm) imprégnée de polyéthylèneimine (PEI 300, Schleicher & Schull) est utilisée pour séparer les oligonucléotides selon leur masse et séquence.

-éliminer les impuretés par pré-chromatographie dans dH₂O.

-agraffer une feuille de papier 3MM (Wattman) 20 x 14cm en haut de la plaque PEI pour augmenter la distance de migration.

-transférer les oligonucléotides de la languette d'acétate de cellulose sur la plaque PEI. Laisser transférer 30mn. Rincer la plaque à l'éthanol et la sécher.

L'électrophorèse s'effectue dans une cuve en verre saturée contenant 15ml d'homomix C-15. La cuve est placée 1h dans une étuve à 65°C pour saturer son atmosphère.

-pré-chromatographier la plaque PEI avec dH₂O jusqu'à ce que le front de migration dépasse de 5mm la ligne de dépôt des oligonucléotides. Essuyer l'excès d'eau et déposer la plaque dans la cuve saturée à 65°C.

-laisser migrer 4-5h (XCFF à 2cm du haut de la plaque PEI).

-rincer la plaque dans un bain d'éthanol 5mn, sécher et autoradiographier.

Selon la position de migration, on peut estimer la composition des oligonucléotides, mais pour connaître plus précisément la séquence, il faut effectuer une analyse secondaire.

Homomix C-15 (3% ARN, 7M urée):

-dissoudre 10g d'ARN de levure (Sigma) dans 90ml H₂O.

-ajouter 10ml de 10N KOH et mélanger 15mn.

-ajuster à pH7.5 avec environ 3ml d'HCl concentré.

-dialyser 2-4h contre 4-5L H₂O jusqu'à ce que le volume augmente de 30%.

-ajouter 140g d'urée et ajuster le volume à 333ml avec H₂O

Pour l'analyse secondaire des oligonucléotides, ces derniers sont élués de la plaque PEI et digérés par les endonucléases P1, T2 et RNase A.

Les produits de digestion de P1 et T2 sont séparés par chromatographie sur plaque PEI-UV. Passer successivement la plaque dans des cuves saturées contenant: 0.2M LiCl, 10mM EDTA → 2mn

1M LiCl, 10mM EDTA → 6mn

1.6M LiCl, 10mM EDTA → le front de migration doit atteindre le haut de la plaque

Pour déterminer la molarité respective des nucléotides, extraire le spot radioactif pour le compter en Cerenkov.

Les produits de digestion de la RNase A sont séparés par électrophorèse sur feuille DEAE dans un tampon 5% acide acétique, 0.5% pyridine pH3.5, 0.5mM EDTA. L'électrophorèse se fait à haut voltage, 1000V, 4h.

G: TRANSCRIPTION IN VITRO DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES

G.1: Culture de cellules

Nous avons utilisée une lignée de cellules de rein de *Xenopus laevis*. Les cellules sont incubées à 25°C.

-décongeler une ampoule (1ml) et la resuspendre dans 25ml de MEM 75% (Gibco), 5% CO₂ et cultiver dans une boîte falcon 75cm² (volume final 15ml). Quand les cellules deviennent confluentes à 90%, les repiquer à 1/5 dans 4 petites boîtes (75cm²).

-préparer alors 20 grandes boîtes (150cm², volume final 30ml) repiquées au 1/10. Généralement, les cellules sont confluentes à 80% en trois jours.

G.2: Préparation d'extrait de cellules somatiques S-100

La méthode initialement décrite par Weil et al. (1979, J. Biol. Chem. 254 : 6163-6173) a été adaptée par Koski et al. (1980, Cell 22 : 415-425). Il est important que les cellules soient confluentes entre 70% et 80% ce qui indique qu'elles sont en phase de croissance et donc transcriptionnellement actives.

- aspirer le milieu nutritif et laver les cellules avec 8ml de 75% PBS.
 - aspirer le PBS et ajouter à nouveau 8ml de 75% PBS.
 - détacher le tapis cellulaire à l'aide d'une raclette en plastique et collecter la suspension cellulaire dans 4 tubes de 50ml incubés sur glace.
 - centrifuger les cellules 5mn à 1500rpm (500g) à 4°C dans une Beckmann J-6. Resuspendre chaque culot de cellules dans 10ml de 75% PBS, grouper le tout dans un tube (40ml final) et centrifuger à nouveau 5mn à 2200rpm (800g). Aspirer le surnageant et estimer le volume du culot cellulaire.
 - resuspendre le culot dans 40ml de tampon hypotonique (refroidi sur glace) contenant 0.2mM PMSF et centrifuger comme précédemment.
 - resuspendre les cellules dans 2 x leur volume initial. Mélanger doucement avec une pipette d'1ml (embout tronqué) et laisser 10mn sur la glace.
 - transférer la solution dans un homogénéisateur en verre et broyer les cellules par un minimum de 13 allers et retours du piston. Vérifier sous microscope l'état des cellules.
 - ajouter 0.11 volume de tampon 10 x S-100, mélanger et transférer dans des tubes SW60 refroidis à 4°C.
 - centrifuger 1h, 4°C, 30000rpm.
 - prélever le surnageant entre le culot de débris cellulaires et la couche lipidique supérieure. Aliquoter par 60µl, 90µl ou 130µl et congeler rapidement sur carboglace.
- Un extrait décongelé peut être recongelé et réutilisé pour des réactions de transcription.

tampon hypotonique : 10mM Hépès pH7.9
 10mM KCl
 1.5mM MgCl₂
 0.5mM DTT

tampon 10 x S-100 : 0.3M Hépès pH7.9
 1.4M KCl
 30mM MgCl₂

PBS : 8g/L NaCl
 0.2g/L KCl
 0.132g/L CaCl₂ 6H₂O
 0.1g/L MgCl₂ 6H₂O
 1.25g/L Na₂HPO₄
 0.2g/L KH₂PO₄

G.3: Préparation d'extrait de cellules oocytaires S-150

Les ovaires sont prélevés sur une femelle *X.laevis*, coupés en morceaux et défolliculés par incubation à 20-22°C dans un tampon OR2 sans calcium contenant 0.2% de collagénase (type III, Sigma). Après 2-3h, lorsque les oocytes sont libérés de leur follicule, ils sont rincés 5 fois dans 100ml de tampon OR2 sans calcium, puis transférés dans le tampon OR2 complet (avec Ca²⁺).

- laver les oocytes 3 fois dans un tampon refroidi sur glace contenant 0.1M KCl, 20% glycérol, 20mM Hépès, 1mM DTT, 0.1mM EDTA.
 - à un volume d'oocytes, ajouter un volume de ce même tampon dans des tubes SW60 refroidis à 4°C et centrifuger à 4°C 30mn à 37000rpm.
 - prélever à 4°C l'interphase transparente avec une seringue en prenant soin de ne collecter ni la phase supérieure lipidique ni le culot de débris cellulaires.
 - passer l'extrait sur une colonne gel filtration (desalting column 10 DG, Biorad) équilibrée avec le tampon 1xS-100 si les extraits sont utilisés pour des réactions de transcription.
- Si les extraits sont fractionnés par des étapes chromatographiques, les placer dans un tampon adéquate choisi en fonction du protocole de purification.

G.4: Procédure de transcription in vitro

En général, on utilise un volume d'extrait S-100 équivalent à la moitié du volume final de la réaction, soit 10µl d'extrait pour 20µl final. Les produits de transcription sont synthétisés en présence de 10µCi d' α -³²P-GTP ou α -³²P-UTP (Amersham, 410 Ci/mmmole).

Pour chaque extrait, il faut tester la quantité optimale d'ADN à transcrire, ainsi que le rapport optimal entre l'ADN matrice et l'ADN "carrier" (ce dernier sert à sequestrer les inhibiteurs non spécifiques de la réaction de transcription).

Les concentrations finales des composants sont :

ADN 10µg/ml

Hépès pH7.9	20mM
KCl	70mM
MgCl ₂	5mM
DTT	0.5mM
Créatine Phosphate	10mM
ATP	0.2mM
UTP	0.2mM
CTP	0.2mM
GTP	0.025mM
α- ³² P-GTP	10μCi

La réaction est incubée à 20°C pendant un temps variable selon le degré désiré de maturation des précurseurs, puis stopper par extraction phénolique. Les ARNs sont précipités comme d'habitude avec de l'éthanol.

Le culot est resuspendu dans 5μl de TDM, chauffé 3mn à 65°C et chargé sur un gel dénaturant polyacrylamide-8M urée.

G.5: Fractionnement des extraits oocytaires S-150 sur colonne de phosphocellulose P11.

Pour tenter de séparer l'activité transcriptionnelle de l'activité exonucléase, nous avons testé plusieurs types de résines échangeuses d'ions. Pour des raisons quantitatives, des extraits oocytaires ont servi de matériel de base au fractionnement. Effectivement, ces extraits sont plus rapides à préparer, moins coûteux et permettent d'obtenir de grandes quantités de protéines.

La seule résine ayant donné satisfaction est une résine de phosphocellulose P11 échangeuse de cations. La procédure suivie pour le fractionnement a été décrite par Shastry et al. (1982, J. Biol. Chem. 257 : 12979-12986). Toutes les étapes chromatographiques sont réalisées à 4°C.

G.5.1: Colonne de phosphocellulose P2

Cette colonne permet d'obtenir l'extrait oocytaire dans le même tampon que celui qui équilibre la colonne P11, soit le tampon E 0.21M KCl.

-gonfler 45g de résine P2 (Wattmann) dans 250ml de tampon E 0.21M KCl, pendant la nuit à 4°C.

-enlever le surnageant et ajouter 200ml de tampon E 0.21M KCl. (le volume de résine est aussi égal à 200ml)

-remplir la colonne (Pharmacia C26/40, Ø = 26mm, l = 40cm) avec 150ml de résine et équilibrer la colonne en passant 300ml de tampon E 0.21M KCl.

-charger 30ml d'extrait S-150 et collecter des fractions de 2ml par addition du même tampon. débit = 2ml/mn.

-suivre la sortie des protéines par lecture des D.O à 260 et 280nm (prendre 20μl de fraction + 480μl dH₂O) et regrouper les fractions contenant les protéines.

G.5.2: Colonne de phosphocellulose P11

-peser 2 fois 0.5g de résine P11 (Wattmann).

-ajouter dans chaque tube 5ml 0.5N HCl, mélanger et laisser 5mn à RTC.

-rincer de nombreuses fois avec dH₂O jusqu'à pH4.

-ajouter 5ml 0.5N KOH, mélanger et laisser 2mn à RTC.

-retirer l'excès de liquide puis ajouter 10ml 0.5N KOH pendant 2mn à RTC.

-rincer de nombreuses fois jusqu'à pH 8.

-laver la résine avec 0.5M KCl, 20mM Hépès pH7.9 et laisser la résine se tasser.

-remplir la colonne (Biorad, Ø = 15mm, l = 10cm) avec 9ml de résine P11 et équilibrer avec 150ml de tampon E 0.21M KCl.

-charger 34ml d'échantillon et laisser pénétrer.

-rincer avec 40ml du même tampon et éluer avec 30ml de tampon E 1M KCl. débit = 600-700μl/mn.

-collecter des fractions de 700μl et lire la D.O à 280nm comme précédemment.

Les fractions non retenues (4ml) ou éluées à 1M KCl (7ml) contenant des protéines, sont dialysées 3 fois 2h contre 500ml de tampon E 0.14M KCl. Chaque fraction est ensuite aliquotée.

tampon E : 20% glycérol
 20mM Hépès
 1mM DTT
 0.1mM EDTA
 0.2mM PMSF

G.6: Transcription de matrice ADN immobilisée sur billes magnétiques

Cette technique a récemment été mise au point par Arias et Dynan (1989, J. Biol. Chem. 264 : 3223-3229) et consiste à fixer une matrice ADN, biotinylée à une extrémité, sur des billes de streptavidine. Dans un premier temps, nous avons utilisé des billes de streptavidine agarose (Sigma) mais pour des raisons d'efficacité de transcription, nous avons rapidement utilisé des billes magnétiques de streptavidine.

Afin de biotinyler la matrice ADN, le plasmide d'intérêt est linéarisé avec une enzyme de restriction créant une extrémité 5' surplombante (ex: EcoRI, HindIII), de préférence en amont du promoteur. L'extrémité est alors remplie à l'aide du fragment Klenow de la T4 ADN polymérase en présence des dNTPs nécessaires dont un est biotinylé (en général, on utilise biotin-7-dATP). Le site de linéarisation doit se trouver à une certaine distance du promoteur de sorte à éviter tout encombrement stérique entre le support et le promoteur pouvant inhiber la formation du complexe d'initiation de transcription.

La procédure d'immobilisation suivie pour nos expériences est la suivante :

–le plasmide pJ53KS (50µg) est linéarisé avec EcoRI, extrait 2 fois avec un mélange phénol/chloroforme et précipité avec 0.1M NaCl.

–l'extrémité 5' surplombante est remplie en incubant 0.75µg/ml d'ADN, 30mn à 37°C, dans une solution contenant 20µM biotin-7-dATP (BRL), 100µM dCTP, dGTP, dTTP, 50mM Tris-HCl pH7.2, 10mM MgSO₄, 1mM DTT, 500µg/ml BSA et 15U/ml Klenow. L'ADN est extrait comme précédemment, passé sur une colonne de sephadex G-50 pour éliminer l'ATP biotinylé non incorporé, puis précipité.

–le plasmide linéarisé et biotinylé est digéré une seconde fois avec ScaI. Après extraction et précipitation, les fragments sont resuspendus dans du TE. Nous obtenons ainsi deux fragments biotinylés, de 2079pb (contenant le gène ARNt^{Phe}) et de 1141pb. L'extrémité biotinylée se situe à environ 90pb du site d'initiation de la transcription.

–fixer 30µg de cette préparation d'ADN sur 1ml de solution de billes magnétiques (Dyna) dans un tampon contenant 1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.6, 1mM EDTA, en plaçant le tube à tourner la nuit à 4°C. Au préalable, laver les billes 3 fois avec le même tampon pour éliminer les molécules de streptavidine mal ou non immobilisées. Répéter l'opération après couplage.

Les conditions de transcription *in vitro* sont les mêmes que lorsque le gène n'est pas immobilisé. Dans le cas où les complexes d'initiation de transcription doivent être rincés, la solution de rinçage est identique au tampon dans lequel s'effectue la transcription soit 70mM KCl, 20mM Hépès, 5mM MgCl₂. Pour limiter la déstabilisation de ces complexes, on ajoute également 10% glycérol et 250µg/ml BSA.

En pratique, 15µl de billes portant le gène à transcrire sont rincés 3 fois avec le tampon de rinçage et incubés 2h à RTC, sous rotation, avec 10µl d'extrait S-100 dans 70mM KCl, 20mM Hépès, 5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 200µM ATP, 250µg/ml BSA. La réaction de transcription est alors initiée en ajoutant un mélange de NTPs (25µM α-³²P-GTP, 200µM dATP, 100µM dCTP, 100µM dUTP) et 10mM créatine phosphate, et en incubant 1h à 20°C

H: TRANSCRIPTION IN VITRO PAR L'ARN T7 POLYMERASE

L'ADN servant de matrice doit être linéarisé par digestion avec une enzyme de restriction laissant une extrémité franche ou 5' surplombante. En général, un stock de 10µg d'ADN est ainsi préparé. L'ADN est extrait une première fois avec du phénol, puis une seconde fois avec du chloroforme, précipité, puis resuspendu dans du TE à 1mg/ml.

Les concentrations finales des composants sont :

ADN linéarisé	40µg/ml (1µg pour 25µl final)
Tris-HCl pH7.5	50mM
MgCl ₂	15mM
DTT	10mM
ATP, CTP, UTP	1mM
GTP	0.1mM
α- ³² P-GTP	10µCi
RNasin	30U
T7 ARN polymérase	20U

La réaction est incubée 1h à 37°C.

L'ADN peut être digéré en ajoutant 1µl (1U) de DNase RNase Free (Biofinex) et en incubant 15mn supplémentaires à 37°C.

Stopper la réaction par extraction au phénol, puis au chloroforme et précipiter l'ARN en présence de 20µg de glycogène.

Il est possible de séparer l'ARN des nucléotides non incorporés avec une colonne de Séphadex G-50:

-remplir une seringue de 1ml (dont le bout est obstrué avec de la laine de verre siliconnée) avec du Séphadex G-50 équilibré dans du TE.

-centrifuger 5mn à 2500rpm pour tasser la résine.

-renouveler ces opérations jusqu'à l'obtention d'1ml de résine après centrifugation.

-charger l'échantillon d'un volume maximal de 100µl et centrifuger 5mn à 2500rpm. L'ARN se trouve dans l'éluat tandis que les nucléotides libres restent dans la colonne.

5 x tampon de transcription : 200mM Tris-HCl pH7.5
 75mM MgCl₂

I: SYNTHÈSE IN VITRO DES PROTEINES

Les ARNm sont transcrits par l'ARN T7 polymérase selon le protocole décrit ci-dessus dans la section H, mais comportant quelques modifications.

1µg d'ADN plasmidique portant les séquences codantes est linéarisé puis transcrit par l'ARN T7 polymérase dans un tampon contenant 40mM Tris-HCl pH7.5, 15mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, CTP, UTP chacun, 0.1mM GTP, 1mM m⁷G(5')ppp(5')G (Biolabs), 30U RNasin et 20U d'ARN T7 polymérase pendant 1h à 37°C. Les ARNm sont extraits au phénol puis au chloroforme et précipités dans de l'éthanol en présence de 0.3M NaOAc pH5.5.

Après précipitation, l'ARNm est resuspendu dans 10µl d'H₂O.

1.1: Traduction dans des extraits de germe de blé

Un cinquième de cette préparation (≈2µg) est ajouté à 25µl d'extrait de germe de blé (Promega) pour un volume réactionnel final égal à 50µl. Le milieu réactionnel contient 12mM Hépès, 10mM créatine phosphate, 50µg/ml créatine phosphokinase, 5mM DTT, 50µg/ml d'ARNt de foie de veau, 3mM MgOAc, 120mM KOAc, 0.5mM spermidine, 1.2 mM ATP, 0.1mM GTP, 80µM des 19 acides aminés et 10µCi de méthionine marquée au ³⁵S. La réaction est incubée 90mn à 25°C. 1/50 de la réaction de traduction suffit à visualiser la protéine sur gel SDS-PAGE.

Lorsque l'extrait nous a été fourni par D. Belin (C.M.U Genève, département de Pathologie), 0.1µg d'ARNm est traduit dans 40% (v/v) d'extrait dans un tampon contenant 44mM Hépès/KOH pH7.6, 80mM KOAc, 4.5mM MgOAc, 2.5mM ATP, 0.25mM GTP, 8mM créatine phosphate, 50µg/ml créatine phosphokinase, 10mM DTT, 250µg/ml d'ARNt de foie de veau, 20µM des 19 acides aminés et 10µCi de méthionine marquée au ³⁵S. La réaction est incubée 90mn à 26°C.

1.2: Traduction dans des extraits de réticulocytes de lapin (Promega)

Un dixième de la préparation de l'ARNm (≈1µg) est ajouté à 13µl d'extrait pour un volume final égal à 20µl. Le milieu réactionnel contient 20µM d'hémoglobine, 10mM créatine phosphate, 50µg/ml créatine

phosphokinase, 2mM DTT, 50µg/ml d'ARNt de foie de veau, 3.3mM MgOAc, 100mM KOAc, 80µM des 19 acides aminés et 10µCi de méthionine marquée au ³⁵S. La réaction est incubée 90mn à 37°C. 1/10 de la réaction de traduction suffit à visualiser la protéine sur gel SDS-PAGE.

Dans certains cas, l'extrait de réticulocyte traité spécialement peut être directement utilisé pour des réactions couplées transcription/traduction. Dans ces conditions, 0.5µg d'ADN linéarisé est directement ajouté à l'extrait ainsi que les rNTPs à 750µM chaque et 16U d'ARN T7 polymérase.

J: PRODUCTION DE LA PROTEINE La DE XENOPE RECOMBINANTE

J.1: Production de la protéine recombinante

Une colonie bactérienne d'*Escherichia Coli* est transformée avec le plasmide CBA-B1. Ce plasmide contient deux unités de transcription:

-la première code la protéine La de *X. laevis*.

-la seconde code la protéine CI mutée ayant la particularité d'être thermolabile.

La transcription de l'ADN codant la protéine La est contrôlée par le promoteur PL du phage λ. Ce promoteur est inducible par choc thermique et est normalement réprimé par la molécule CI. Lorsque la culture est réalisée à 28°C, CI, actif, réprime la synthèse d'ARNm codant La. Par contre, à 42°C, CI n'est plus fonctionnel: l'ARNm codant La est transcrit à partir du promoteur PL et la protéine se trouve surexprimée par *E.coli*.

La colonie bactérienne portant le plasmide CBA-B1 est inoculée dans 100ml de milieu LB contenant 5µg/ml de tétracycline.

-cultiver la nuit à 28°C.

-ensemencer 300ml de LB préchauffés à 42°C avec cet inoculum de 100ml. L'induction de la synthèse de protéine La s'effectue à cette température pendant 4h. La culture est alors centrifugée à 4°C sur Beckmann J-6 à 4000rpm pendant 20mn. La protéine La de xénope ainsi produite n'est ni soluble, ni sécrétée dans le milieu de culture. Il est donc nécessaire de l'extraire. Pour cela, le culot bactérien est resuspendu dans 10ml de PBS préalablement refroidi sur glace.

J.2: Extraction de la protéine recombinante

La suspension bactérienne obtenue comme ci-dessus est soniquée dans la glace, 4 fois successivement pendant 30s sur un appareil BRANSON indice N°6. Entre chaque sonication, la suspension est centrifugée 10mn sur Sorvall RC-5B (Dupont instruments) à 8000rpm. Le culot est resuspendu dans 5ml PBS entre chaque sonication.

Après la dernière centrifugation, le culot est repris dans 2.5ml PBS/6M urée, soniqué et centrifugé comme précédemment. Le surnageant contient l'extrait protéique débarrassé d'une majorité de protéines bactériennes. Cet extrait est aliquoté et conservé à -20°C.

J.3: Purification de la protéine recombinante

La méthode de purification utilisée est inspirée du protocole de Stefano (1984, Cell 36 : 145-154).

500µl d'extrait protéique soniqué dans une solution PBS/6M urée est dilué progressivement (de 2 en 2) dans le tampon A (25mM Tris-HCl pH8, 3mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.5mM DTT) contenant 0.1M NaCl jusqu'à une concentration finale de 100mM urée. La solution protéique est passée sur une colonne contenant 2ml d'héparine-sépharose CL4B (Pharmacia) équilibrée avec le tampon A 0.1M NaCl.

Rincer la colonne avec 3 volumes (soit 6ml) de tampon A 0.1M NaCl.

Les protéines fixées sur la colonne sont éluées en augmentant progressivement la concentration en NaCl du tampon A de la façon suivante :

-3ml de tampon A 0.25M NaCl.

-3ml de tampon A 0.4M NaCl.

-3ml de tampon A 0.6M NaCl.

-3ml de tampon A 0.8M NaCl.

-3ml de tampon A 1M NaCl.

Le débit d'élution est ajusté à 0.2-0.3ml/mn

Le volume des fractions collectées est égal à 500 μ l.

L'élution des protéines est contrôlée par mesure de la D.O à 280nm. Le contenu protéique est quantifié selon la méthode de Bradford (cf. ci-dessous), et analysé par minigel SDS-PAGE 12.5%.

La colonne est régénérée en appliquant une solution 5M NaCl, puis en rinçant abondamment avec le tampon A 0.1M NaCl.

Une purification a également été réalisée en utilisant du KCl à la place du NaCl, tout en conservant les mêmes molarités.

J.4: Dosage de Bradford

Le réactif utilisé pour ce dosage est commercialisé par Biorad sous le nom de "Protein Assay kit".

Le réactif concentré est dilué avec dH₂O : 1.55ml de réactif pur qsp 10ml dH₂O.

Une gamme étalon est réalisée en mesurant la D.O à 595nm de solutions protéiques contenant 0, 2, 4, 6, 8 et 10 μ g de BSA. Le volume de l'échantillon est ajusté à 300 μ l avec dH₂O et 3ml de réactif dilué sont ajoutés. Une coloration bleutée apparaît instantanément et la lecture peut se faire immédiatement. La réaction reste stable pendant 1h environ.

K: PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX α -La

K.1: Immunisation des lapins

Quatre lapins ont été immunisés avec des préparations différentes de la protéine La recombinante de *Xenopus laevis* produite par *E. coli*.

-Deux lapins femelles (N°74, N°75) ont été immunisés par injection de la protéine La extraite d'un gel SDS-PAGE. Les protéines contenues dans l'extrait PBS/6M urée sont séparées sur gel SDS-PAGE 12.5%. Après coloration au bleu de Coomassie, la bande correspondant à la protéine La est découpée et broyée à l'ultra-turrax T25 (IKA Labortechnik) dans 1.5ml PBS.

-Deux autres lapins mâles (N°78, N°79) ont été immunisés avec la protéine La partiellement purifiée sur colonne d'héparine sépharose.

Le protocole d'immunisation est le suivant :

→ première injection : 100 μ g de protéine La par lapin.

→ deuxième injection, 3 semaines plus tard : 50 μ g de protéine La par lapin.

→ troisième injection, 2 semaines plus tard : 50 μ g de protéine La par lapin.

Deux à trois semaines après la troisième injection, environ 30ml de sang sont prélevés avant de réaliser une quatrième injection de 50 μ g de protéine. Les lapins sont alors sacrifiés 7 à 15 jours plus tard.

K.2: Purification des IgG α -La

Les anticorps de lapins, dirigés contre la protéine La de xénope, sont purifiés sur une colonne de protéine A sépharose (Biorad, Econo-Pac Protein A Kit) selon les instructions du fournisseur.

En général, 3ml de sérum sont passés sur une première colonne qui permet d'obtenir les anticorps dans le tampon de charge adéquate pour fixer les IgG sur la colonne de protéine A.

Les fractions contenant les IgGs sont ensuite passées sur la colonne de protéine A. Cette dernière est rincée abondamment pour éliminer les autres protéines plasmatiques. Puis les anticorps sont élués à pH acide (pH3). A la sortie de la colonne, l'acidité du tampon est neutralisée par l'addition de 180 μ l 2M Tris-HCl pH8.9 pour 1ml d'éluat.

La colonne peut être régénérée et utilisée de nombreuses fois.

L: APPLICATIONS EXPERIMENTALES UTILISANT LES ANTICORPS α -La

L.1: Western-Blot

Après séparation des protéines selon leur poids moléculaire sur gel SDS-PAGE, le gel est équilibré 30mn dans le tampon de transfert contenant 25mM Tris Base (Sigma), 192mM Glycine (Merck), 20% méthanol. Le transfert des protéines s'effectue à 4°C 1h à 100V ou la nuit à 30V dans une cellule de transfert (mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell, Biorad). Les membranes utilisées pour le transfert sont différentes selon la méthode de révélation choisie.

L.1.1: Révélation par un substrat coloré : BCIP/NBT

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (BA83, 0.2 μ m, Schleicher & Schüll). Pour bloquer les sites de fixation non spécifiques, la membrane est incubée dans une solution PBSW (PBS/5% skim milk (Gibco BRL)/0.01% antifoam A), 5mn à RTC.

Dans la première réaction antigène-anticorps (Ag-Ac), le sérum α -La est utilisé au 1/250ème dans PBSW 0.05% Tween-20. L'incubation est réalisée pendant 1h à RTC ou la nuit à 4°C. La membrane est rincée 2 fois 30mn dans PBS/0.05% Tween-20 avant d'être incubée avec l'anticorps anti-lapin marqué à la phosphatase alcaline (Promega) dilué au 1/3000ème dans PBSW/0.05% Tween-20, 2 à 4h à RTC.

La membrane est rincée à nouveau et incubée dans 15ml de tampon AP contenant 99 μ l NBT et 49.5 μ l BCIP. L'incubation persiste jusqu'à l'apparition d'une coloration violette. La réaction est alors stoppée en incubant la membrane dans 50ml de tampon stop.

Tampon AP: 100mM Tris pH9.5
100mM NaCl
5mM MgCl₂

Tampon stop: 20mM Tris pH8
5mM EDTA

Cette méthode couramment utilisée est en fait peu sensible. Pour augmenter la sensibilité, on peut révéler la liaison Ag-Ac en utilisant de la protéine A marquée au ³⁵S (Amersham). Dans ce cas, on utilise 1 μ Ci par filtre (10 μ l/10ml PBS) et le filtre est autoradiographié la nuit à RTC.

L.1.2: Révélation par un substrat chemiluminescent AMPPD

(Boehringer)

Pour cette méthode, il est nécessaire de transférer les protéines sur une membrane de nylon (positively charged nylon membrane, Boehringer) pour limiter le bruit de fond. Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués en incubant la membrane 90mn à RTC dans 2% agent bloquant/TBS. Le sérum α -La est utilisé à la même dilution que précédemment dans 2% agent bloquant/TBST et incubé avec la membrane 1h à RTC. Après rinçage dans TBST, la membrane est incubée avec un anticorps anti-lapin marqué à la phosphatase alcaline dilué au 1/10000ème dans TBST, 30mn à RTC. Après un nouveau rinçage, 1ml du substrat AMPPD dilué au 1/100ème dans 0.1M Tris-HCl pH9.5, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂ est répandu sur la membrane pendant 1mn, puis éliminé. La membrane est incubée 15mn à 37°C et autoradiographiée 1 à 10mn selon l'intensité du signal.

10% agent bloquant (w/v) : agent bloquant (poudre)
0.1M acide maléique
0.15M NaCl
ajuster pH7.5 avec 10N NaOH

TBS : 0.1M Tris pH7.5
0.15M NaCl

TBST: TBS
0.1% Tween-20

L.2: Immunoprécipitation

40µl de billes de protéine A sépharose (CL-4B, Pharmacia) ou de protéine A agarose (Boehringer) suspendus à 50% dans un tampon NET 300 ou 1xS-100, sont incubés avec 10µl de sérum α-La, 2h à 4°C, sous rotation. Les billes de protéine A couplées aux anticorps sont lavées 3 fois avec 1ml de NET 300 et resuspendues dans 100µl de ce même tampon.

Pendant ce temps, la liaison entre la protéine La et les précurseurs des ARNt est effectuée en incubant la protéine (extraite d'*E. coli* ou contenue dans les extraits S-100) avec les transcrits, 30mn sur glace dans un tampon 1xS-100. 200ng de protéine La recombinante ou 10µl d'extrait S-100 sont incubés avec 100000cpm de chaque transcrit (spécifique et non spécifique) ainsi qu'avec 10µg d'ARNt d'*E. coli*

Les La-RNPs sont ajoutés aux billes déjà couplées aux anticorps et le tout est incubé 1h, sous rotation à 4°C. Les billes sont lavées à nouveau trois fois avec 1ml de NET 300.

Les ARNs sont extraits par double extraction phénolique dans 0.3M NaOAc pH5.5, précipités avec 20µg de glycogène et analysés sur un gel 6.8% polyacrylamide-7M urée.

Les protéines peuvent être analysées en mélangeant les billes à du tampon de charge 1x utilisé pour les gels de protéines et portées 5mn à ébullition avant d'être chargées sur un minigel SDS-PAGE.

NET 300 : 300mM NaCl
50mM Tris-HCl pH8
0.1% NP 40

L.3: Immunodéplétion

200µl de billes de protéine A agarose suspendus à 50% dans du tampon 1x S-100 sont incubés la nuit, à 4°C, sous rotation, avec 200µl du même tampon et 100µl de sérum α-La purifié pré-immun ou immun.

Les billes sont rincées 3 fois avec 1ml de tampon S-100. 400µl d'extrait S-100 contenant 250µg/ml BSA sont ajoutés au culot de billes et incubés 20mn à 4°C, sous rotation. L'extrait déplété une première fois est transféré dans un second tube et l'opération est répétée quatre fois pour optimiser la déplétion. Après ces déplétions successives, l'extrait est concentré par ultrafiltration dans des unités UFCMC (Millipore) en centrifugeant à 4°C à 5000rpm, soit 2000g jusqu'à ce que l'échantillon soit concentré d'un facteur 3.

L'extrait est alors utilisé pour effectuer des réactions de transcription classique décrites précédemment.

M: PREPARATION D'ADN GENOMIQUE DE LEVURE

L'ADN est préparé à partir d'une culture de 10ml dans YPD incubée la nuit à 30°C, 250rpm, jusqu'à saturation (O.D>2 à 600nm).

-centrifuger les cellules à 3000rpm, 5mn, et laver les cellules en resuspendant le culot dans 500µl d'H₂O. Centrifuger à nouveau et éliminer le surnageant.

-resuspendre les cellules dans 200µl d'un tampon contenant 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA, 2% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) SDS.

-ajouter 0.3g (≈200µl) de billes de verre (Sigma, Ø = 0.45-0.5mm et préalablement lavées à l'acide nitrique) et 200µl de phénol/chloroform/isoamyl alcool et vortexer à puissance 10 pendant 3 à 4mn.

-ajouter 200µl de TE et vortexer brièvement.

-centrifuger 5mn à 14000rpm, à RTC et précipiter la phase aqueuse (400µl) avec 1ml d'éthanol. Mélanger par inversion du tube et un précipité apparaît immédiatement.

-centrifuger 3mn à 14000rpm, et resuspendre le culot dans 400µl TE en pipettant.

-ajouter 30µl de 1mg/ml RNase A et incubé 5mn à 37°C.

-ajouter 10µl de 4M NH₄OAc et 1ml d'éthanol, mélanger doucement par inversion du tube jusqu'à ce que l'ADN précipite en une seule pelote.

-centrifuger 3mn à 14000rpm, RTC. Rincer et sécher le culot. Resuspendre l'ADN génomique dans 100µl de TE (≈200µg/ml).

YPD : 1% extrait de levure
2% peptone
2% glucose

solution sorbitol : 0.9M sorbitol
0.1M Tris-HCl pH8
0.1M EDTA

N: SOUTHERN-BLOT GENOMIQUE

Grâce à la petite taille du génome de *S. cerevisiae*, 1µg d'ADN génomique suffit pour représenter un grand nombre de genome.

N.1: Transfert des fragments d'ADN du gel d'agarose sur une membrane de nitrocellulose

On prévoit pour chaque piste de digérer 1µg d'ADN avec une ou plusieurs enzymes de restriction déterminées. Les digestions sont effectuées pendant la nuit, puis chargées sur un midigel agarose 0.8%.

Après l'électrophorèse et la coloration au bromure d'éthidium, le gel est immergé dans les bains suivant à RTC, avec une légère agitation :

-500ml 0.2N HCl, 1 x 30mn, puis rincer avec dH₂O.

-500ml 1.5M NaCl/0.5M NaOH, 2 x 15mn, puis rincer avec dH₂O.

-500ml 3M NaCl/0.5M Tris, 1 x 30mn.

-pendant ce temps, préparer une feuille de nitrocellulose pour le transfert, ainsi que des feuilles de papier à chromatographie 3MM et une pile de 6cm de papier absorbant, le tout de la dimension du gel.

-mettre la feuille de nitrocellulose 1mn dans dH₂O, puis 5 à 10mn dans 20 x SSC.

-préparer la pyramide de transfert et transférer pendant la nuit à RTC en appliquant un poids de 0.3 à 0.5kg.

-le lendemain, laver la membrane dans 2 x SSC, 10mn en agitant.

-sécher la membrane à l'air puis la cuire 2h dans un four à 80°C.

-préhybrider la membrane 3h à la température d'hybridation (65°C dans des conditions normales, entre 35°C et 45°C dans des conditions de faible stringence).

-hybrider la nuit à la même température. Dénaturer la sonde en la faisant bouillir 2mn et l'ajouter au tampon de préhybridation, à la concentration de 10⁶ cpm/ml

-rincer le filtre à la même température dans une solution de SSC. Utiliser la même concentration de SSC que celle du tampon d'hybridation.

conditions normales de rinçage:

→3 x 5mn dans 3 x SSC, 0.1% SDS à 65°C.

→1 x 10mn dans 0.2 x SSC, 0.1% SDS à 65°C.

tampon de préhybridation : 3 x Denhardt
3 x SSC (6 x SSC pour faible stringence)
100µg/ml de ADN de sperme de hareng
0.1% SDS

50 x Denhardt : 1% ficoll
1% polyvinylpyrrolidone
1% BSA

20 x SSC : 0.3M Na citrate
3M NaCl

N.2: Synthèse de la sonde ADN

La sonde est préparée en hybridant l'ADNc avec un oligonucléotide servant d'amorce au fragment Klenow de la T4 ADN polymérase qui synthétise le brin complémentaire en présence d' α -³²P-dCTP.

-hybrider l'ADN avec le primer nonamérique 5mn à 95°C, puis laisser refroidir 10mn à RTC, comme suit:

ADN	20-30ng
primer N9	5µl (=5µg)
H2O qsp	13µl

-ajouter :

5 x NLB	5µl
BSA (10mg/ml)	1µl
α-32P-dCTP	50µCi
Klenow (2U/µl)	1µl

-incuber 1h à 37°C

-extraire au phénol et passer sur colonne sephadex G-50 pour éliminer les nucléotides non incorporés. L'activité spécifique de la sonde doit se situer entre 10⁸ et 10⁹cpm/ug d'ADN.

5 x NLB:

250mM Tris-HCl pH8
25mM MgCl ₂
5mM β-mercaptoéthanol
2mM dATP, dGTP, dTTP
1M Hépes pH6.6

O: TRANSFORMATION DE LEVURES

O.1: Préparation des levures compétentes

- faire une préculture en incubant la nuit à 30°C, 2ml YPDensemencés avec une colonie de levure.
- ajouter 500µl de cette préculture dans 50ml YPD préchauffés à 30°C de sorte à obtenir une O.D = 0.2 à 600nm.
- incuber à 30°C, toujours sous agitation, jusqu'à O.D = 0.6-1 à 600nm.
- centrifuger 5mn à 1500rpm, et laver le culot de cellules avec 20ml TE en le resuspendant doucement avec la pipette.
- centrifuger à nouveau et resuspendre le culot avec 10ml TE/0.1M LiCl.
- renouveler l'opération en utilisant seulement 500µl TE/0.1M LiCl et incuber 10mn à 30°C, en remuant le tube de temps en temps.

O.2: Transformation

- dans un tube Eppendorf stérile, mélanger 100µl de levures compétentes avec 1-3µg de plasmide (issu d'une miniprep) et 20µg d'ADN simple brin.
- incuber 25mn à 30°C.
- ajouter 9 volumes de 40% PEG/0.1M LiCl/TE. Mélanger par inversion du tube, puis avec une pipette de 1ml.
- incuber 15-30mn à RTC, puis 10mn à 42°C.
- étalet 100µl de la suspension sur milieu solide sélectif préalablement incubé à 30°C. Placer la boîte environ deux jours à 30°C avant de voir apparaître les premiers transformants.

P: PRODUCTION DE LA PROTEINE La DE XENOPE DANS LA LEVURE S.CEREVISIAE

Deux ADNc codant, soit pour la protéine entière (La WT), soit pour la protéine tronquée dans la région qui lie les ARNs (La Δ106-184), sont insérés dans un plasmide portant le marqueur de sélection URA. La synthèse des protéines de xénope est sous contrôle du promoteur GAL1 inductible en présence de

galactose.

Les transformants sont étalés en forme de ligne sur une boîte *ura-* (pour maintenir le plasmide), *gal+* (pour induire la synthèse des protéines hétérologues. Ce type d'étalement permet de voir comment l'expression de la protéine influence la croissance cellulaire. Pour observer des effets plus subtiles sur la taille des colonies, les transformants sont étalés de façon classique.

P.1: Préparation d'extraits protéique pour analyse sur gel SDS-PAGE

Cette méthode utilise comme matériel de départ, l'équivalent de 5ml de culture en phase stationnaire (D.O = 2 à 600nm).

- centrifuger la culture et laver le culot avec 500µl TEN/1mM PMSF.
- resuspendre dans 500µl TEN (refroidi sur glace) et ajouter 67µl de LB*.
- laisser 10mn sur glace en vortexant chaque minute.
- centrifuger 10mn à 4°C.
- laver le culot avec 1ml d'acétone.
- ajouter successivement au culot : 200µl 8M urée, vortexer doucement.
200µl de 2 x tampon de charge pour gel de protéines.
- bouillir 5mn et charger 10µl par piste sur un minigel.

TEN : 100mM NaCl
50mM Tris-HCl pH7.5
5mM EDTA

LB* : 10N NaOH
0.28M β-mercaptoéthanol.

P.2: Préparation d'extrait brut

La méthode que nous avons choisi pour préparer ce type d'extrait utilise des billes de verre pour casser les cellules.

- faire pousser une souche protéase déficiente dans 100ml de YDP à 30°C, jusqu'à une D.O=1-5 à 600nm.
- centrifuger la culture 5mn à 3000rpm.
- laver 2 fois avec 10ml dH₂O.
- resuspendre dans le tampon de solubilisation à raison de 2ml de tampon pour 1g de cellules.
- ajouter un volume égal de billes de verre.
- vortexer à 4°C, 8 fois 30s. Entre chaque vortex, refroidir le tube au moins 3mn dans la glace. Vérifier au microscope que les cellules sont bien lysées.
- laisser décanter l'homogénat et le transférer dans un nouveau tube. Rincer les billes en ajoutant 3 fois 5ml de tampon de solubilisation.
- ajouter 1mM PMSF et 10mM β-mercaptoéthanol final.
- ajouter 1/10 (v/v) d'une solution de sulfate d'ammonium saturée et mélanger doucement par rotation du tube à 4°C pendant 20mn.
- centrifuger 1h à 165000g (40000rpm dans SW60).
- récupérer le surnageant et précipiter les protéines à 4°C en ajoutant le plus lentement possible la poudre d'ammonium sulfate à raison de 0.35g/ml d'extrait. L'ammonium doit se dissoudre au fur et à mesure qu'il est ajouté à l'extrait. Laisser l'agitateur aimanté sur force 3 et attendre 40mn.
- centrifuger 30mn à 65000g (25000rpm pour SW60, 23000rpm pour SW41).
- redissoudre le culot avec une baguette de verre dans 1ml de tampon D.
- dialyser 3 fois 2h contre le tampon D 0.1M NaCl et aliquoter par 50µl.

tampon de solubilisation : 200mM Tris-HCl pH8
10% glycérol
10mM MgCl₂
10mM β-mercaptoéthanol
1mM PMSF

tampon D : 20mM Hépès-KOH pH7.9
20% glycérol
0.2mM EDTA
10mM β-mercaptoéthanol
0.1mM PMSF

Q: CRIBLAGE D'UNE BANQUE GENOMIQUE λ gt11 DE *S.CEREVISIAE*

Chez la levure, très peu de gènes possèdent des introns. C'est pourquoi, lorsque l'on cherche à détecter une protéine de levure exprimée dans *E. coli* grâce à l'insertion du fragment génomique correspondant dans un vecteur d'expression λ gt11, on utilise couramment des banques génomiques. La présence de la protéine peut être révélée par un anticorps spécifique. Pour plus de détails concernant le système λ gt11 et la méthode de sélection utilisant les anticorps, se référer à l'article de Young R. et Davis D., 1983, PNAS 80 : 1194-1198.

La banque génomique (YL1001b) que nous avons criblée est commercialisée par Clontech et nous a été gracieusement offerte par le Dr. Paravacini (Glaxo Genève). La cellule hôte *E. coli* provient de la souche Y1090(-) et croît en présence de 15 μ g/ml de tétracycline.

Q.1: production des protéines par *E. coli*

- cultiver la nuit à 37°C, 50ml LB/0.2% maltose inoculés avec une colonie de Y1090(-).
- le lendemain, ajouter une solution de 1M MgSO₄ pour avoir 10mM final.
- mélanger 3.10⁴ pfu à 600 μ l de bactéries et laisser les phages s'adsorber à la surface des bactéries, 20mn à 37°C.
- ajouter 7.5ml de Top-Agarose (LB + 0.7% agarose) préchauffé à 48°C dans un tube stérile. Mélanger et étaler sur boîte de Petri (\varnothing 150mm) contenant du LB. (10 boîtes au total)
- laisser le Top-Agarose se solidifier 15mn à RTC et mettre les boîtes 4h à 42°C jusqu'à l'apparition des premières plages de lyse.
- appliquer alors sur les boîtes les filtres de nitrocellulose saturés en 10mM IPTG préparés la veille et marquer les boîtes assymétriquement. La synthèse des protéines est induite lors de cette étape.
- placer les boîtes 5h à 37°C, puis retirer les filtres.

Q.2: traitement des filtres

- rincer les filtres 10mn dans du TN pour éliminer les morceaux d'agarose.
- bloquer les sites non spécifiques en incubant les filtres 90mn sous agitation à 37°C dans une solution TN/3% gélatine.
- rincer brièvement dans du TN.
- hybrider avec l'anticorps α -La 75 dilué au 1/200ème dans la solution d'hybridation, en incubant la nuit à 4°C, puis 45mn à 37°C (le temps que la gélatine se liquéfie).
- rincer les filtres :
 - 2 fois 5mn dans TN.
 - 1 fois 5mn dans TN/0.3% triton X-405.
 - 2 fois 15mn dans TN.
- hybrider avec l'anticorps anti-lapin marqué à la phosphatase alcaline (Promega) dilué au 1/7500ème dans la solution d'hybridation, pendant 1-2h à RTC sous agitation.
- rincer 4 fois 15mn dans du TN.
- révéler avec les substrats NBT/BCIP de la même façon que pour les Western-blot, en utilisant 5ml de solution par filtre. Attendre qu'une coloration apparaisse (jusqu'à 20-30mn si nécessaire) et stopper la réaction avec 5mM EDTA.
- prélever les plages positives (disque violet avec centre blanc) à l'aide d'une carotte et les mettre dans 1ml SM avec 2 gouttes de chloroforme. Vortexer, laisser 1h à RTC puis conserver à 4°C.
- estimer le titre des plages sélectionnées et cribler une deuxième puis une troisième fois, jusqu'à obtenir toutes les plages positives.

TN : 500mM NaCl
20mM Tris-HCl pH7.6

SM : 5.8g/L NaCl
2g/L MgSO₄
50mM Tris-HCl pH7.6
0.01% gélatine

PARTIE 1: LA PROTEINE La DE XENOPUS LAEVIS

A: CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE La DE X. LAEVIS PRODUITE PAR E. COLI

A.1- Une protéine de 49 kDa est synthétisée par E. coli.

Afin d'obtenir des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine de *Xenopus*, l'ADNc codant la protéine LaB1 a été sous cloné dans un vecteur d'expression bactérien pour produire une protéine recombinante dans *E. coli*. La protéine La de *X. laevis* pouvant être toxique pour les bactéries, nous avons choisi d'utiliser des vecteurs d'expression possédant des promoteurs inductibles. L'utilisation de tels vecteurs permet, d'obtenir une importante biomasse bactérienne avant d'induire la synthèse de la protéine d'intérêt en stimulant le promoteur par un facteur adéquat. Deux constructions plasmidiques pBS-B1 et CBA-B1 ont été réalisées dans le but de produire la protéine La de *X. laevis* dans la souche HB101 d'*E. coli*.

Le plasmide pBS-B1 contient le promoteur de l'opéron lactose inductible par l'IPTG, un analogue de l'allolactose; les bactéries transformées avec pBS-B1 synthétisent une protéine La hybride constituée de la protéine de xénope dont l'extrémité amino-terminale est fusionnée à 24 acides aminés appartenant à la β -galactosidase.

Le plasmide CBA-B1 contient le promoteur P_L du phage λ inductible par choc thermique. Il code, outre la protéine La de xénope, une protéine CI mutante ayant la particularité d'être thermosensible. La fonction naturelle de la molécule CI d'origine phagique est d'inhiber la transcription à partir du promoteur P_L . Les bactéries transformées avec CBA-B1 et cultivées à 28°C, synthétisent le répresseur CI qui, stable à cette température, inhibe la synthèse de la protéine La. Par contre, lorsque ces bactéries sont cultivées à 42°C, la molécule CI est inactivée et la protéine La est exprimée. Notons que ce vecteur d'expression, contrairement au vecteur pBS-B1, présente l'avantage de diriger la synthèse de la protéine La originale et non celle d'une protéine de fusion.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'efficacité de production des constructions plasmidiques décrites ci-dessus. Les résultats de cette analyse sont reportés dans la figure 5. Après 3h ou 6h de culture, un échantillon des bactéries transformées avec pBS-B1 ou avec CBA-B1 est prélevé, centrifugé et rincé avec du PBS. Le culot bactérien est directement resuspendu dans le tampon de charge des protéines et analysé par SDS-

PAGE. La production de La par le clone CBA-B1 n'a pas posé d'ambiguïté, puisqu'une protéine majoritaire d'environ 49 kDa apparaît nettement après coloration du gel au bleu de Coomassie. Par contre, en ce qui concerne la construction pBS-B1, la bande correspondant à la protéine La se trouve masquée par la présence de protéines d'origine bactérienne. La synthèse de la protéine La, par ce clone, a cependant été confirmée par Western-blot en utilisant des anticorps anti-La humains (résultats non montrés).

Le système d'induction par choc thermique étant plus efficace que celui qui utilise l'IPTG, nous avons choisi de poursuivre notre étude en utilisant les transformants CBA-B1. Ces derniers présentent d'ailleurs un autre avantage pour la réalisation de futurs tests fonctionnels, celui de produire la protéine La originale et non pas une protéine de fusion.

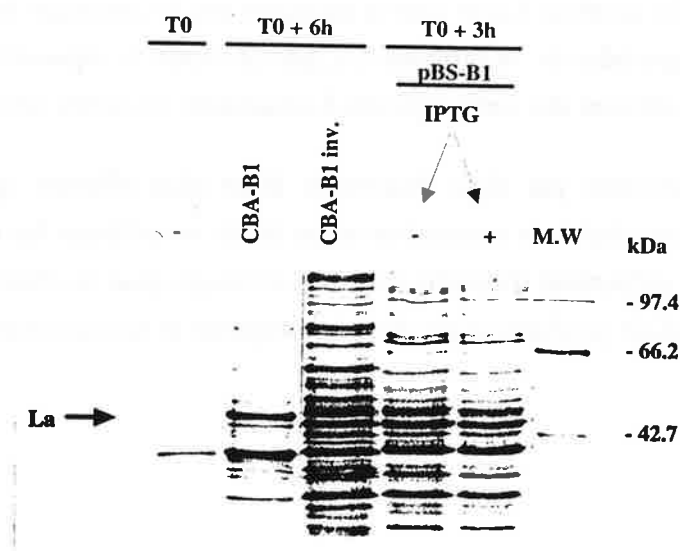


Figure 5: Production de La par *E. coli*

Les bactéries *E. coli* HB101 ont été transformées avec les plasmides suivants:

- 1) CBA-B1 codant la protéine La sous contrôle du promoteur P_L du phage λ inducible à 42°C (piste 2).
- 2) CBA-B1 inv. contenant le cDNA LaB1 en orientation inverse par rapport au promoteur et qui ne code donc pas pour la protéine La (piste 3).
- 3) pBS-B1 codant la protéine La fusionnée à l'extrémité N-terminale de la β-galactosidase sous contrôle d'un promoteur inducible par l'IPTG (pistes 4 et 5).

Les bactéries transformées avec CBA-B1 ou avec CBA-B1 inv. sont cultivées la nuit à 28°C et induites à 42°C pendant 6 heures, tandis que celles transformées avec pBS-B1 sont cultivées la nuit à 37°C et induites pendant 3 heures toujours à 37°C avec 5mM final d'IPTG. Un échantillon de chaque culture est prélevé avant l'induction (piste 1: T₀), 3h après l'induction par l'IPTG (piste 5: T₀+3h pour pBS-B1) ou 6h après l'induction à 42°C (piste 2: T₀+6h pour CBA-B1 et piste 3: T₀+6h pour CBA-B1 inv.). Après centrifugation, le culot bactérien est resuspendu dans 200µl de tampon Laemmli 1x et 1/20 est analysé sur SDS-PAGE 12.5%. La protéine La est indiquée par une flèche (pistes 2, 5). La piste 4 représente les bactéries transformées avec pBS-B1 cultivée à 37°C non induites par l'IPTG. La piste 6 indique les marqueurs de poids moléculaire.

A.2- Purification partielle de la protéine La sur colonne d'héparine-sépharose.

Préalablement à toute purification, deux questions se posent. La protéine synthétisée par *E.coli* se trouve-t-elle sécrétée dans le milieu de culture? Est-elle produite sous forme soluble? En effet, très souvent les protéines recombinantes surexprimées dans *E.coli* s'assemblent sous forme d'aggrégats appelés corps d'inclusion qui rendent les protéines insolubles. Ces corps d'inclusion présentent l'avantage de protéger les protéines recombinantes contre la protéolyse endogène.

Afin de déterminer si la protéine est sécrétée dans le milieu de culture, 1ml de suspension bactérienne, cultivée 4h à 42°C, est prélevé et centrifugé; les protéines contenues dans le surnageant et dans le culot bactérien sont séparées sur minigel SDS-polyacrylamide 12.5%. Il s'avère que la protéine La produite *in vivo* n'est pas excrétée puisqu'elle comigre avec les protéines du culot bactérien (Fig. 6, ligne 1). Pour tenter d'extraire la protéine, le culot bactérien est soniqué plusieurs fois dans du PBS, puis dans du PBS-6M urée. Bien que ce traitement fragilise et dégrade une faible proportion de la protéine recombinante, la majorité est solubilisée (ligne 5). Le surnageant 6M urée contient trois protéines majoritaires (Fig.6). La protéine qui migre avec un poids moléculaire apparent de 49 kDa correspond à la protéine La de *X. laevis*. Deux autres protéines de poids moléculaire inférieurs, apparaissant progressivement au cours de la sonication, migrent respectivement à 42 kDa et 39 kDa. Nous avons vérifié par Western-blot, en utilisant des anticorps anti-La humain, que ces protéines correspondent à des formes dégradées de la protéine La (données non montrées).

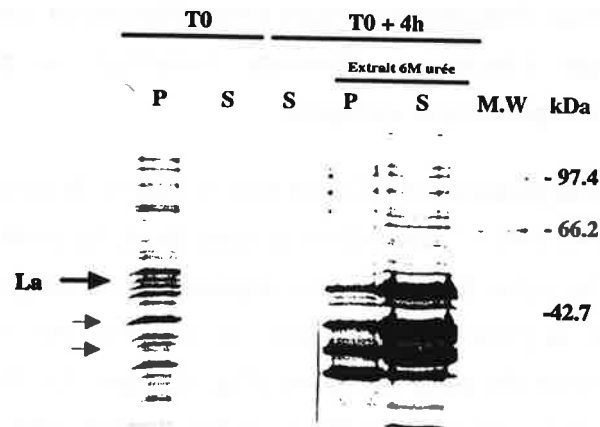


Figure 6: Extraction de La dans une solution PBS-6M urée

Les bactéries transformées par CBA-B1 sont induites à 42°C. Un aliquot d'1ml de culture est prélevé avant l'induction (T₀) et 4h après l'induction (T₀+4h). Le surnageant et les bactéries sont séparés par centrifugation et les protéines contenues dans le culot bactérien (P) et dans le milieu de culture (S) sont analysés sur gel SDS-PAGE 12.5%. Pour extraire la protéine La du culot bactérien, ce dernier est soniqué dans du PBS, puis dans du PBS-6M urée de façon à solubiliser la protéine recombinante.

Piste 1: protéines contenues dans le culot à T₀. Piste 2: protéines contenues dans le surnageant à T₀. Piste 3: protéines contenues dans le surnageant après 4h d'induction à 42°C. Pistes 4 et 5: protéines contenues dans le culot ou dans le surnageant de l'extrait 6M urée (la grande flèche indique la protéine La de 49 kDa, les deux petites flèches indiquent les produits de dégradations de 42 kDa et 39 kDa). Piste 6: marqueurs de poids moléculaire.

Les protéines contenues dans l'extrait 6M urée sont purifiées sur la base du protocole utilisé par Stefano (148). L'extrait protéique est fractionné sur une colonne chromatographique d'héparine-sépharose. Ce type de support est très largement employé pour purifier des facteurs de transcription et autres molécules présentant une affinité pour les acides nucléiques.

L'extrait protéique est progressivement dilué de sorte à abaisser la concentration de l'urée jusqu'à 100mM avant d'être chargé sur la colonne. Les protéines qui restent fixées sur la résine sont éluées avec des solutions salines (NaCl ou KCl) de concentrations croissantes. Le contenu des fractions éluées est estimé quantitativement par lecture des D.O à 280nm, puis par dosage des protéines selon la méthode de Bradford. La nature des protéines éluées est analysée en séparant 1.5% de chaque fraction sur minigel SDS-polyacrylamide 12.5%. La figure 7A représente le chromatogramme de la colonne d'héparine-sépharose obtenu avec les tampons NaCl et KCl. L'éluion en NaCl fournit trois pics à 0.25M, 0.4M et 0.6M avec un pic d'éluion majeur à 0.6M NaCl, tandis que l'éluion en KCl fournit seulement deux pics, un pic mineur à 0.25M et un pic majeur à 0.4M KCl. L'amplitude du pic majeur d'éluion en KCl est nettement supérieure à celle du pic majeur d'éluion à 0.6M NaCl, suggérant que l'éluion en KCl est quantitativement plus importante que celle en NaCl.

Si l'on compare l'aspect qualitatif, c'est à dire la nature des protéines éluées dans chacun des pics, on remarque que la protéine La de 49 kDa se comporte de façon identique à 0.4M KCl et à 0.6M NaCl. La n'est jamais purifiée de manière homogène mais sous trois formes : la protéine complète de 49 kDa et les deux produits de dégradation de 42 kDa et 39 kDa (Fig. 7B et 7C). Ces trois protéines sont donc capables de se fixer de façon équivalente sur le support pour une concentration saline donnée. La forme dégradée de 39 kDa est également éluée seule et en quantité non négligeable à 0.25M et 0.4M NaCl (Fig. 7B) ainsi qu'à 0.25M KCl (Fig.7C). Pour les autres concentrations (0.8M NaCl, 0.6M KCl, 0.8M KCl), nous n'observons que des taux résiduels de ces trois formes protéiques.

Dans l'espoir d'obtenir une fraction qui contienne exclusivement la protéine complète de 49 kDa, nous avons tenté de séparer ces trois protéines en fonction de leur affinité respective pour les résidus uridines (U). En effet, il est possible d'imaginer que les formes dégradées de La, contrairement à la protéine de 49 kDa, ont perdu la capacité de reconnaître la séquence UUUU_{3'}OH. Pour cela, la fraction protéique éluée à 0.6M NaCl est chargée sur une colonne de poly(U)-agarose. Les protéines fixées sur la résine sont éluées par des solutions de concentration croissante en NaCl. A 0.6M NaCl, toutes les

protéines se fixent sur la colonne et l'ensemble des trois protéines est élué à 1M NaCl (Fig. 7D). Ces conditions ont pourtant été utilisées par Stefano pour distinguer la fraction de La capable de lier une série de U à une fraction qui ne l'est pas (148). Ces résultats indiquent que les trois protéines purifiées sur colonne d'héparine-sépharose sont capables de reconnaître un ARN qui possède la séquence UUUU_{3'}OH. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée en incubant cette fraction protéique avec un précurseur d'ARNt biotinylé et fixé sur des billes de streptavidine. Les protéines contenues dans les complexes ARN/protéines ont été analysées par électrophorèse sur gel SDS. Cette expérience a montré que les trois formes protéiques restent accrochées aux billes par l'intermédiaire de leur liaison avec l'ARN qui se termine par la séquence UUUU_{3'}OH (données non montrées).

Figure 7: Purification de La sur colonne d'héparine-sépharose et polyU-sépharose

L'extrait 6M urée est dilué dans du tampon A 0.1M NaCl ou 0.1M KCl, puis chargé sur une colonne d'héparine-sépharose équilibrée respectivement avec 0.1M NaCl ou 0.1M KCl en tampon A.

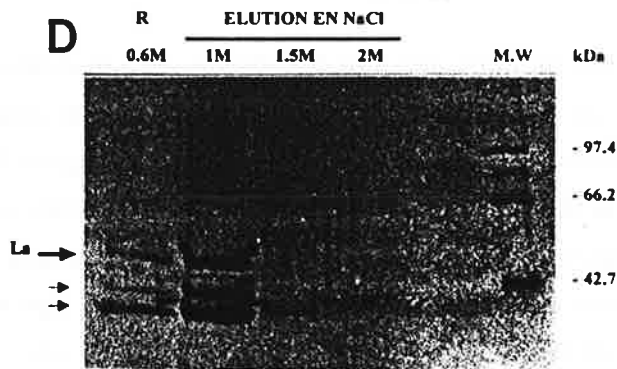
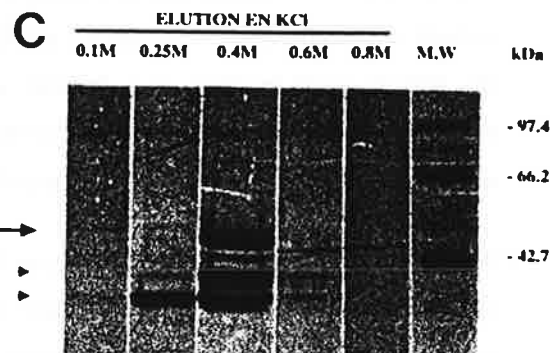
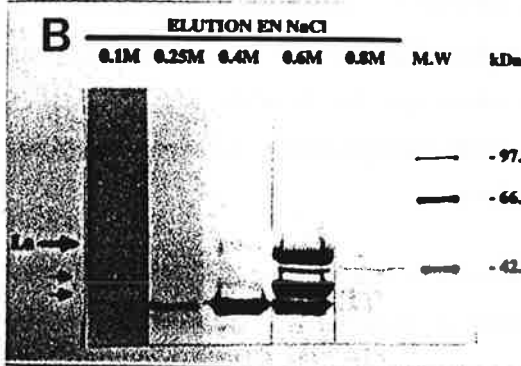
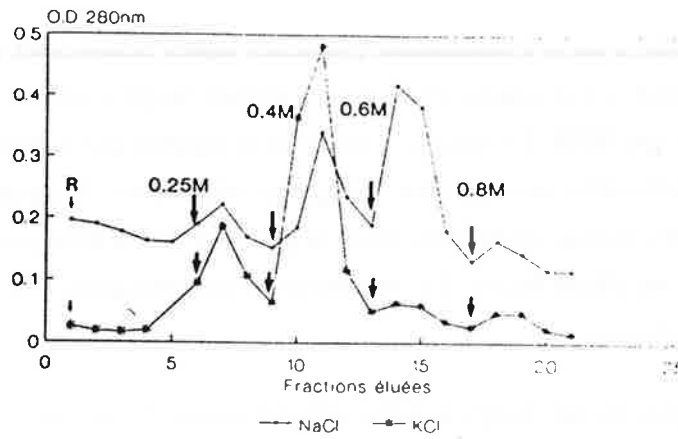
7A : chromatogrammes des fractions d'1ml éluées avec des concentrations croissantes de NaCl ou de KCl, tracé à partir de la lecture des D.O à 280nm. Les flèches verticales précisent le passage du tampon d'éluion à la salinité supérieure. R: rinçage de la colonne avec le tampon A 0.1M NaCl ou KCl.

7B: purification sur colonne d'héparine sépharose et composition en protéines des fractions éluées dans un tampon NaCl. 1.5% des fractions les plus concentrées ont été chargés sur un minigel SDS-polyacrylamide 12.5%. Fractions éluées à 0.1M NaCl (piste 1), à 0.25M NaCl (piste 2), à 0.4M NaCl (piste 3), à 0.6M NaCl (piste 4), à 0.8M NaCl (piste 5). Piste 6: marqueurs de poids moléculaire. La protéine La et les produits de dégradation sont indiqués par les flèches.

7C: purification sur colonne d'héparine sépharose et composition en protéines des fractions éluées dans un tampon KCl. 1.5% des fractions les plus concentrées ont été chargés sur un minigel SDS 12.5%. Fractions éluées à 0.1M KCl (piste 1), à 0.25M KCl (piste 2), à 0.4M KCl (piste 3), à 0.6M KCl (piste 4), à 0.8M KCl (piste 5). Piste 6: marqueurs de poids moléculaire. La protéine La et les produits de dégradation sont indiqués par les flèches.

7D: purification sur colonne de polyU sépharose et composition en protéines des fractions éluées dans un tampon NaCl. La fraction éluée à 0.6M NaCl sur colonne d'héparine sépharose est directement chargée sur une colonne de polyU sépharose. Après rinçage de la colonne (piste 1;R), les protéines sont éluées à 1M NaCl (piste 2), 1.5M NaCl (piste 3), et 2M NaCl (piste 4). 1.5% des fractions les plus concentrées ont été chargés sur un minigel SDS 12.5%. Piste 6: marqueurs de poids moléculaire. La protéine La et les produits de dégradation sont indiqués par les flèches.

A Fractionnement de l'extrait protéique 6M urée sur colonne Héparine-Séparose



PolyU sépharose

Figure 7

A.3- Les anticorps polyclonaux de lapin reconnaissent une protéine de 49 kDa.

L'extrait 6M urée a servi à immuniser plusieurs lapins selon deux protocoles. Le premier a consisté à injecter aux lapins 74 et 75 un extrait broyé contenant la protéine La de 49 kDa, isolée sur gel SDS. Le second a consisté à injecter aux lapins 78 et 79 les fractions purifiées partiellement sur colonne d'héparine-sépharose. Rappelons que ces fractions contiennent trois formes protéiques dont la protéine de 49 kDa partiellement renaturée et deux produits de dégradation. Le protocole d'immunisation est décrit dans la section matériels et méthodes.

Les taux sériques en anticorps anti-La ont été contrôlés au cours de l'immunisation par Western-blot en mesurant la capacité de ces anticorps à reconnaître la protéine La d'un extrait cellulaire S-100. L'extrait est diluée en série d'un facteur 2 et différentes dilutions de sérum sont testées. La liaison antigène-anticorps est révélée par l'utilisation de protéine A marquée au ³⁵S permettant d'autoradiographier la membrane et les autoradiographies sont analysées par densitométrie.

Nous avons également testé la capacité des sérums à reconnaître la protéine La sous sa forme native en immunoprécipitant directement la protéine de l'extrait S-100 avec les anticorps de lapins. Pour cela, l'extrait S-100 est incubé en présence de deux précurseurs d'ARNt marqués au ³²P, dont un possède la séquence spécifique UUUU3'OH. Si l'anticorps de lapin α -La reconnaît la protéine de xénope en solution, le précurseur d'ARNt doit co-précipiter avec la protéine.

Ces expériences ont montrés que tous les sérums reconnaissent la protéine La contenue dans l'extrait S-100, aussi bien sous sa forme native que dénaturée. Ils reconnaissent également la protéine La synthétisée par *E. coli*. La figure 8A indique les titres en anticorps relatifs à chaque sérum. Ces titres sont très variables puisque celui du sérum 78 est quatre fois plus élevé que celui du sérum 74. Nous n'avons pas pu déterminer si ces différences reflètent effectivement des titres différents ou des réactivités différentes. En effet, les sérums de lapins immunisés par injection de La sous sa forme native (N°78 et N°79) possèdent des titres relativement élevés en anticorps qui sont comparables à ceux du sérum humain d'Elliston (sérum de malade servant de référence). Par contre, les titres des sérums 74 et 75 sont trois à quatre fois plus faibles que le sérum de malade (Fig.8B et 8C). Ces résultats peuvent s'expliquer par la nature même de l'échantillon injecté aux lapins. Il est possible que la présence de SDS dans la solution d'injection dénature la

protéine, masquant ainsi des épitopes antigéniques de La. Cependant si l'on tient compte du processus de présentation des antigènes aux lymphocytes, il semble plus probable que la présence de SDS et d'acrylamide dans l'échantillon injecté aux lapins 74 et 75 ait empêché ou inhibé partiellement la réponse immunitaire. La variation entre les différents titres sériques peut également être expliquée par la quantité de protéines réellement injectée. En effet, il est relativement difficile d'estimer, à partir de la concentration protéique globale de l'extrait 6M urée, le volume à charger sur le gel, pour obtenir finalement 100µg de protéine.

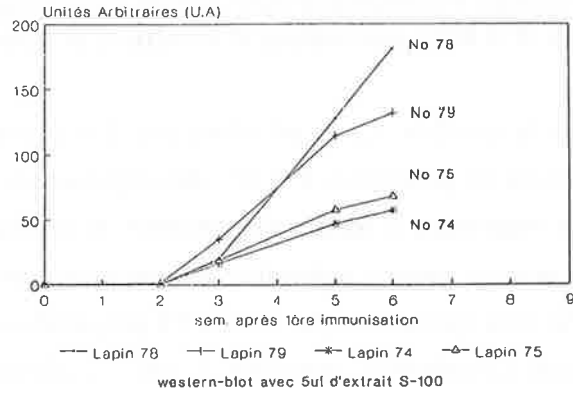
Par ailleurs, nous avons estimé, compte tenu des 3 formes de La, que 2µl à 3µl de la fraction purifiée (concentration protéique égale à 60µg/ml) correspondent à 4µl d'extraits S-100. La concentration en protéine La des extraits S-100 a donc été évaluée entre 10 et 15µg/ml.

Figure 8: Variation des taux d'anticorps chez les lapins immunisés contre la protéine La.

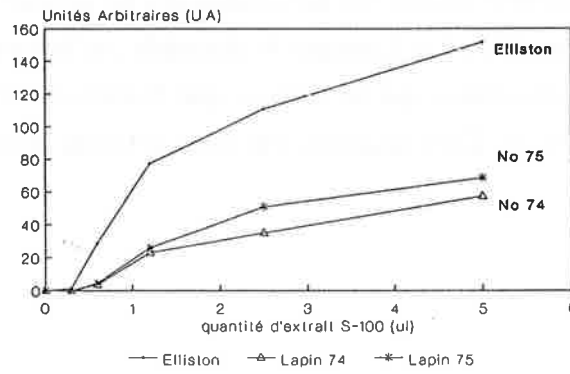
8A: Titres des séra α -La au cours de l'immunisation contre la protéine La isolée à partir d'un gel SDS-PAGE (lapins N°74 et N°75), et de l'immunisation contre la protéine La partiellement purifiée sur colonne d'héparine-sépharose (lapins N°78 et N°79). Les protéines contenues dans 5 μ l d'extrait S-100 sont séparées par SDS-PAGE 12.5% et transférées sur une membrane de nitrocellulose qui est hybridée avec chacun des antisérums de lapins (74, 75, 78, 79) dilués au 1/250ème, puis avec une solution de protéine A-35S diluée au 1/1000ème. Les autoradiographies exposées 66h à température ambiante sont analysées par densitométrie.

8B et 8C: Comparaison des titres en anticorps des séra α -La 74 et 75 (B) et des séra α -La 78 et 79 (C) avec le sérum humain de référence Elliston. 1, 2, 3, 4 et 5 μ l d'extrait S-100 sont séparés sur minigel SDS-PAGE 12.5% et transféré sur membrane de nitrocellulose. Des Western-blots sont réalisés en utilisant les séra de lapin α -La (74, 75, 78, 79) et le sérum humain anti-La/anti-Ro (Elliston) au 1/250ème. La formation des complexes protéine-anticorps est révélée par addition de protéine A-35S (utilisée au 1/1000ème). Les autoradiographies sont exposées 66h et analysées par densitométrie.

A Variation des taux d'anticorps chez les lapins immunisés contre la protéine La



B Comparaison des titres en anticorps sérum humain/sérums 74 et 75



C Comparaison des titres en anticorps sérum humain/sérums 78 et 79

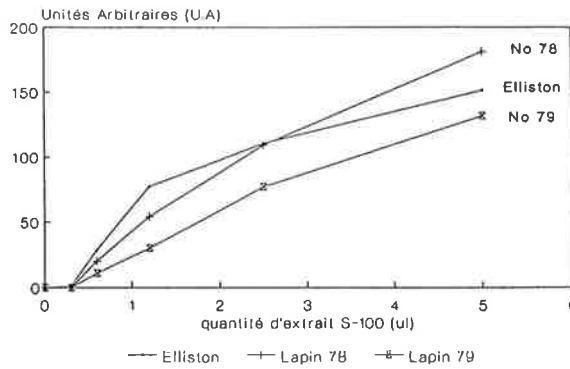


Figure 8

A.4- La protéine synthétisée par E.coli immunoprécipite les précurseurs d'ARNt possédant 4 uridines à leur extrémité 3'OH.

Afin de vérifier si la protéine La synthétisée par *E.coli* est capable de lier un ARN ressemblant à un transcrit précurseur Pol III, des expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées. Elles consistent à mettre en présence la protéine La recombinante et un excès d'ARNt précurseurs, puis à précipiter les complexes avec les anticorps α -La. Les précurseurs d'ARNt sont synthétisés par l'ARN T7 polymérase en présence d' α -³²P-GTP, à partir du plasmide Gem4SP11 contenant le gène d'ARNt^{Phe} de xénope en aval du promoteur T7. Ces précurseurs ont la particularité de posséder une extrémité 3'OH différente selon l'enzyme de restriction utilisée pour linéariser le plasmide (Fig.9). Une linéarisation par *Bam*HI fournit un précurseur qui se termine par GAUC_{3'OH} liant ainsi très faiblement la protéine La. Lorsque le plasmide est linéarisé par *Dra*I, la polymérase T7 synthétise un précurseur qui se termine par l'extrémité 3' naturelle des transcrits de classe III (UUUU_{3'OH}). Cette séquence est donc optimale pour la liaison avec la protéine La.

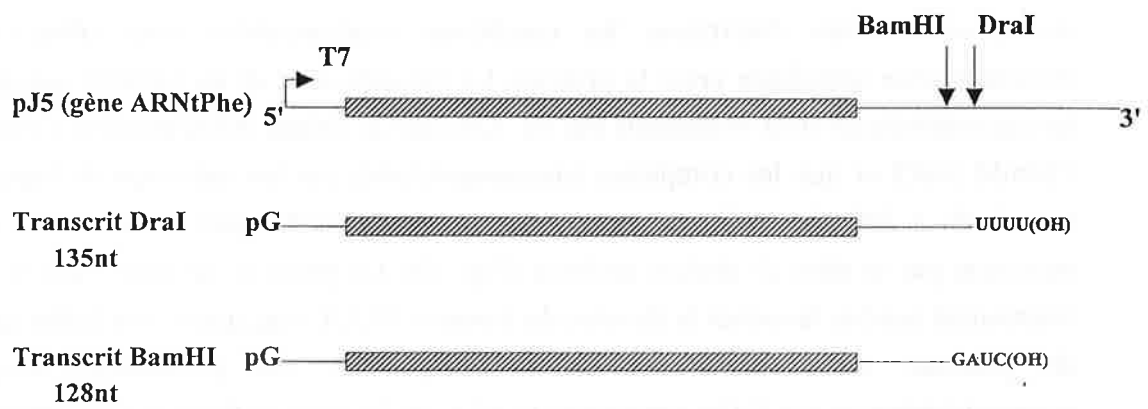


Figure 9: synthèse des précurseurs d'ARNt UUUU(OH) et GAUC(OH) par l'ARN T7 polymérase.

Le plasmide GEM4SP11 contenant le gène tRNAPhe est linéarisé par digestion avec *Bam* HI ou *Dra* I, puis transcrit *in vitro* à 37°C par l'ARN T7 polymérase en présence d' α -³²P-GTP ou d' α -³²P-UTP. Le transcrit *Dra*I (135nts) se termine en 3' par le signal de terminaison de Pol III, soit la séquence UUUU(OH). Le transcrit *Bam*HI (128nts) se termine en 3' par GAUC(OH) qui ne représente pas une bonne séquence de liaison pour la protéine La.

Des tests préliminaires ont montré que la reconnaissance spécifique des ARNs par la protéine recombinante est influencée par la concentration en NaCl du milieu réactionnel (données non montrées). En effet, dans la gamme de concentration variant de 60mM NaCl à 120mM NaCl, les deux molécules d'ARNs sont immunoprécipitées en quantité équivalente. Ce résultat suggère que dans ces conditions expérimentales, la protéine La lie sans spécificité apparente les deux types de précurseurs GAUC_{3'}OH et UUUU_{3'}OH. La discrimination entre les deux ARNs ne se produit qu'au cours du lavage des complexes ARNs/protéine. En effet, il est possible de déplacer la liaison entre La et le transcrit GAUC_{3'}OH à partir de 300mM NaCl sans modifier la liaison avec le transcrit UUUU_{3'}OH. Cette dernière reste stable jusqu'à 500mM NaCl.

Ainsi, nous avons déterminé les conditions expérimentales pour observer une reconnaissance spécifique entre la protéine La recombinante et un transcrit qui possède les caractéristiques d'un précurseur Pol III. Lorsque la liaison ARN/protéine s'effectue à 120mM NaCl et que les complexes immunoprécipités par les anticorps de lapin α -La sont lavés à 300mM NaCl, la protéine La lie préférentiellement les transcrits qui se terminent par la série de résidus uridines (Fig. 10). La présence de BSA dans le milieu réactionnel semble favoriser la fixation du transcrit UUUU_{3'}OH quand une faible quantité de protéine recombinante est utilisée (Fig. 10). Ce phénomène s'explique vraisemblablement par l'effet saturant de la BSA sur les sites de fixation non spécifiques.

L'augmentation progressive de la quantité de protéine La accroît le nombre de transcrits immunoprécipités. Ces expériences permettent d'estimer qu'environ 30ng de protéine La fixe environ 1/200 des transcrits UUUU_{3'}OH, soit moins d'une picomole d'ARN. En d'autres termes, une mole de protéine recombinante fixe une mole d'ARN. Des résultats similaires ont été obtenus avec la protéine La de l'extrait S-100 suggérant que les protéines native et recombinante possèdent la même affinité pour les pré-ARNt.

La spécificité de liaison entre la protéine recombinante et un transcrit UUUU_{3'}OH a été confirmée en réalisant les mêmes expériences en présence d'un excès d'ARN compétiteur spécifique. Deux types de compétiteurs ont été utilisés. Premièrement, nous avons utilisé un hexanucléotide portant la séquence U(5)U_{3'}OH. Curieusement, ce type de compétiteurs n'a jamais été capable de déplacer la liaison de La avec le transcrit UUUU_{3'}OH. Dans un second temps, nous avons choisi d'utiliser comme compétiteur un substrat naturel pour La, à savoir le transcrit précurseur T7P2. Ce précurseur est synthétisé par l'ARN T7 polymérase à partir du plasmide GSP11HAIR2. Quand ce plasmide est linéarisé avec

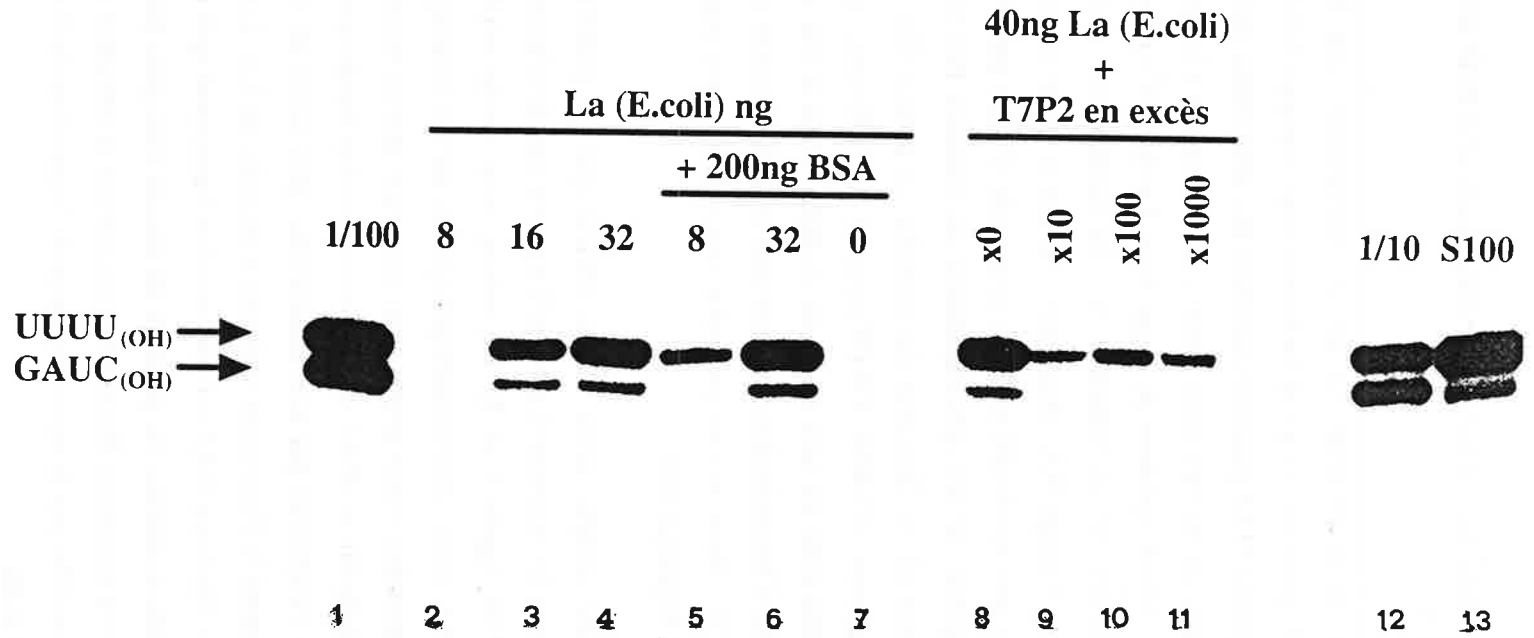
DraI, il code le précurseur de l'ARN^tPhe dont l'extrémité 3' est constituée d'une structure secondaire juste en amont de la séquence UUUU_{3'}OH. L'ARN compétiteur est ajouté simultanément aux précurseurs marqués au ³²P. Dans ces conditions, un excès égal à dix fois la quantité de précurseurs marqués suffit à déplacer la majorité des transcrits UUUU_{3'}OH liés à La (Fig. 10). De façon surprenante, nous n'avons pas réussi à inhiber totalement la liaison de La avec le transcrit UUUU_{3'}OH en augmentant la quantité d'ARN compétiteur. Pourtant la liaison de La avec le précurseur UUUU_{3'}OH est spécifique puisqu'aucun ARN n'est immunoprécipité par le sérum pré-immun ou lorsque la protéine recombinante est remplacée par de la BSA.

Figure 10: Analyse fonctionnelle de la protéine La recombinante.

Les précurseurs UUUU(OH) et GAUC(OH) synthétisés en présence d'un radioisotope marqué au ^{32}P sont incubés avec la protéine La recombinante. Les ARNs liés à La sont immunoprécipités par les anticorps de lapins α -La et analysés sur un gel de transcription 6.8% polyacrylamide-7M urée.

piste 1: 5000cpm de chaque ARN radioactif synthétisés sont directement chargés sur le gel. pistes 2, 3 et 4 : 500000cpm de chaque ARN (UUUU(OH) et GAUC(OH)) sont incubés respectivement avec 8ng, 16ng et 32ng de protéine La purifiée. Pistes 5 et 6 : idem que les pistes 2 et 4 mais en ajoutant 200ng de BSA dans le milieu réactionnel. Piste 7 : la protéine La est remplacé par 200ng de BSA. pistes 8 à 11: la liaison ARN/protéine La est réalisée en absence (piste8) ou en présence d'un excès x10 (piste 9), x100 (piste 10), x1000 (piste 11) d'ARN UUUU(OH) compétiteur spécifique. piste 12: 50000cpm de chaque ARN radioactif synthétisés sont directement chargés sur le gel. piste 13: 4 μ l d'extraits S-100 sont incubés avec 500000cpm de de chaque précurseur. Les pistes 1 à 11 sont exposées 24h à 4°C avec un écran SE8, film X-OMAT-AR (Kodak), les pistes 12 et 13 sont exposées 19h à 4°C avec un écran SE8, film X-OMAT-S (Kodak) mais seulement 1/5ème des ARNs immunoprécipités ont été chargés sur le gel.

Figure 10



A.5- La protéine La lie les précurseurs d'ARNt sous la forme d'un monomère.

Pour déterminer si la protéine La lie les précurseurs sous forme de monomère ou d'homodimère, la protéine La a été fusionnée avec l'épitope HA1 du virus influenza. La présence de l'épitope HA1 pouvant entraîner des altérations dans la conformation de la protéine de fusion, cet épitope a été placé alternativement à l'extrémité amino et carboxyl terminale de La. Deux versions de la protéine La ont été traduites séparément dans un extrait de germe de blé en présence de ³⁵S-méthionine. Il s'agit de la protéine La complète portant l'épitope HA1 d'une part (La-HA1), et de la protéine La qui a perdu 37 acides aminés à son extrémité carboxy-terminale d'autre part. Cette protéine tronquée (Δ C37) reste capable de lier spécifiquement un transcrit Pol III (Moreau,G., *The RNA binding properties of the Xenopus La proteins, in prep.*). Ces protéines sont incubées avec les précurseurs d'ARNt GAUC3'OH et UUUU3'OH, puis les La-RNPs sont immunoprécipitées avec les séras α -La ou α -HA1. Dans le cas où la protéine La fixe les ARNs sous forme d'homodimère, les anticorps α -HA1 doivent coprécipiter les protéines La-HA1 et Δ C37. Dans le cas contraire, les mêmes anticorps ne précipitent que la protéine portant l'épitope HA1.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la protéine Δ C37 est reconnue spécifiquement par le sérum α -La et qu'il n'existe pas de réaction croisée avec le sérum α -HA1 (Fig. 11A, lignes 1 et 2). De même, nous avons vérifié que les protéines de fusion N-HA1 et C-HA1 sont immunoprécipitées par les anticorps monoclonaux α -HA1 (résultats non montrés). Nous avons ainsi remarqué que la reconnaissance de la protéine C-HA1 par l'antisérum α -HA1 est légèrement moins bonne que celle de la protéine N-HA1. Ceci peut s'expliquer par une accessibilité plus faible de l'épitope HA1 lorsque ce dernier est fusionné à l'extrémité carboxy-terminale de La. L'immunoprécipitation des protéines portant l'épitope HA1 est une réaction hautement spécifique car si l'épitope est inséré en orientation inverse, la protéine de fusion n'est plus précipitée par le sérum α -HA1 (résultats non montrés). Notons également que la présence de l'épitope HA1 dans la protéine La ne modifie pas la reconnaissance de la protéine de fusion par les anticorps α -La (Fig. 11A et 11B).

Nous avons montré que la protéine Δ C37 incubée en présence des protéines de fusion La-HA1 n'est jamais co-précipitée par le sérum α -HA1 (résultats non montrés). La position de l'épitope n'influence pas une interaction potentielle entre ces protéines puisque des

résultats identiques ont été observés quand $\Delta C37$ est incubée avec N-HA1 ou C-HA1. Ce résultat suggère qu'en solution, la protéine La existe sous forme de monomère. Il reste cependant possible que La interagisse avec d'autres protéines mais les expériences réalisées ici ne permettent pas de répondre à cette question.

Dans certains cas, la formation de dimère ou de trimère nécessite une traduction simultanée des protéines en question. Pour tester cette éventualité, les protéines $\Delta C37$ et La-HA1 ont été co-traduites puis immunoprécipitées comme précédemment. De la même façon, $\Delta C37$ ne co-précipite jamais avec la protéine de fusion N-HA1 ou C-HA1 lorsque ces protéines sont immunoprécipitées par le sérum α -HA1 (résultats non montrés), renforçant l'idée que La n'existe pas sous forme d'homodimère en solution.

Pour tester l'hypothèse que la formation de dimère est dépendante de la présence d'ARNt précurseurs, les mêmes expériences ont été réalisées en incubant les deux versions de La (tronquée ou fusionnée à HA1) avec un excès de précurseurs marqué au ^{32}P et synthétisés *in vitro* par l'ARN T7 polymérase. Les La-RNPs ainsi formées ont été précipitées par les séra α -La et α -HA1. Les protéines contenues dans ces particules ont été analysées par SDS-PAGE, tandis que les ARNs ont été analysés sur gel dénaturant d'acrylamide 6% (Fig. 11A et 11B). Comme précédemment, le sérum α -HA1 ne précipite jamais la version tronquée de La, même si cette dernière est co-traduite avec la protéine La de fusion (Fig. 11A, pistes 5 et 8, et Fig. 11B pistes 2 et 4). Pourtant les protéines de fusion C-HA1 et N-HA1 sont fonctionnelles puisqu'elles lient spécifiquement le transcrit UUUU $3'$ OH. Toutefois, alors que la protéine N-HA1 reconnaît ce précurseur de façon équivalente à la protéine $\Delta C37$ et à celle contenue dans l'extrait S-100, la protéine C-HA1 semble reconnaître plus faiblement cet ARN (comparer Fig. 11A pistes 1, 5, 8 et 9 avec Fig. 11B pistes 2, 4, et 5). En effet, bien que le sérum monoclonal α -HA1 immunoprécipite autant de protéine N-HA1 que C-HA1, le nombre d'ARN précipités est réduit quand ces derniers sont incubés avec la protéine C-HA1. Tout se passe comme si la présence de l'épitope viral à l'extrémité carboxyl terminale de La inhibait légèrement la reconnaissance des ARNs. Ce résultat est quelque peu inattendu quand on sait que les motifs RNP de la protéine La, c'est à dire les régions impliquées dans la fixation des ARNs, se situent dans la partie N-terminale de la protéine (Moreau, G., The RNA binding properties of the *Xenopus* La proteins, in prep.).

Figure 11: Une forme tronquée de la protéine La recombinante se lie à l'ARN sous forme d'un monomère.

La protéine La portant l'épitope viral HA1 du virus parainfluenza à l'extrémité aminoterminal (N-HA, Fig. 11A) ou carboxy-terminale (C-HA, Fig. 11B) est traduite séparément (M) ou co-traduite (C) avec la protéine La tronquée de 37 acides aminés du côté carboxy-terminal (Δ C37), dans un extrait de germe de blé en présence de 35 S-méthionine. Ces protéines, ainsi que 5 μ l d'extrait S-100 sont incubées avec les précurseurs d'ARNt UUUU(OH) et GAUC(OH) synthétisés par l'ARN T7 polymérase en présence d' α - 32 P-UTP, puis les complexes ARN/protéines sont immunoprécipités par le sérum de lapin α -La (La) ou par le sérum monoclonal dirigé contre l'épitope HA1 (HA). Les protéines qui composent les RNPs sont analysées par SDS-PAGE 12.5% (panneau supérieur), les ARNs sur gel dénaturant 6.8% polyacrylamide-7M urée (panneau inférieur). Les expériences réalisées avec la protéine N-HA sont reportées dans la figure 11A, celles réalisées avec la protéine C-HA dans la figure 11B. Les différentes protéines ainsi que les différents transcrits sont indiqués par des flèches.

Les gels de protéines sont fixés puis directement séchés à 80°C et exposés la nuit à température ambiante (Film X-AR). Les gels d'ARN sont exposés la nuit à -70°C avec un écran SE8 (Film X-AR).

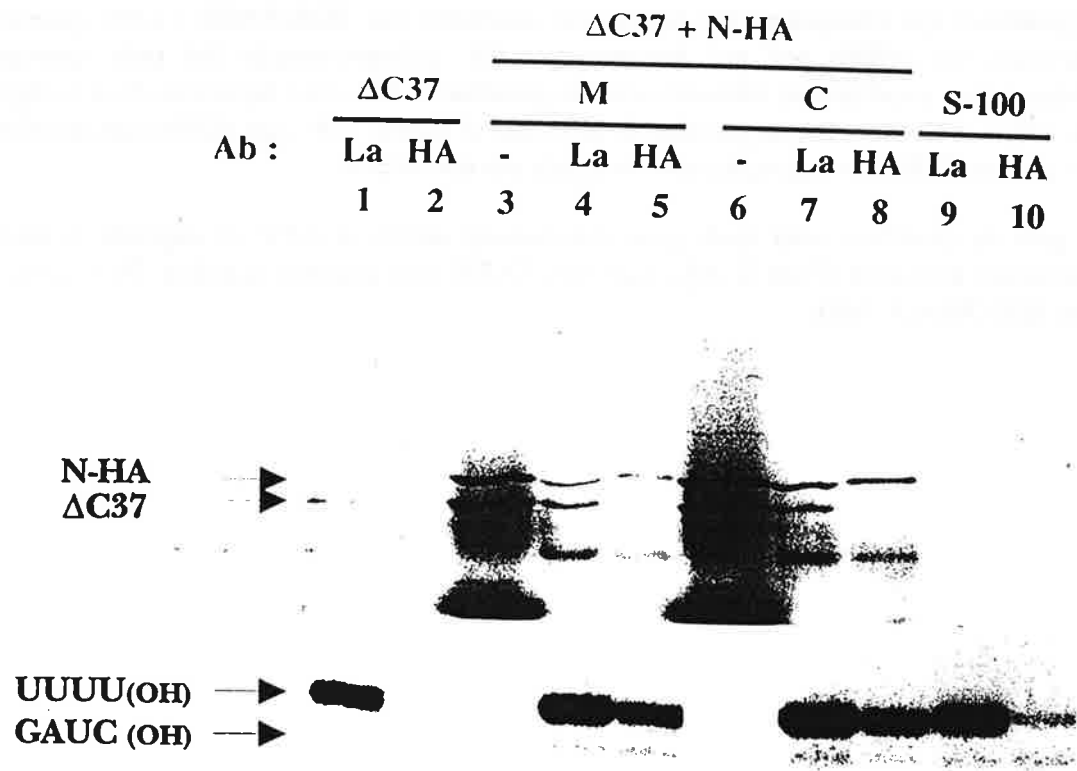


Figure 11A

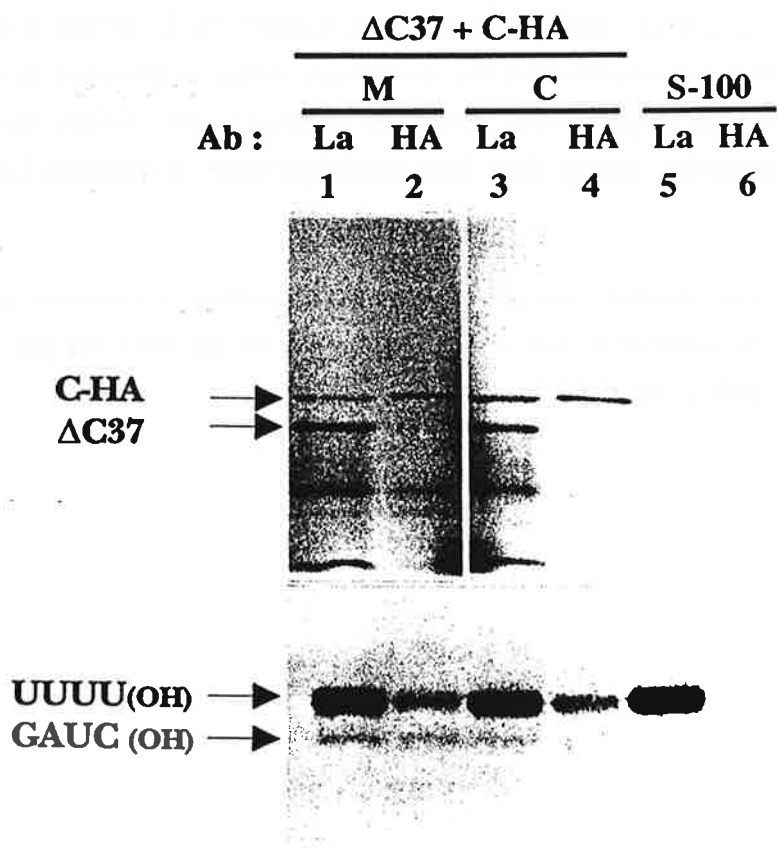


Figure 11B

Ces dernières expériences suggèrent que La se fixe à son substrat sous forme de monomère et que la présence de l'épitope HA1 n'altère pas les propriétés de liaison de La avec les précurseurs d'ARNt. Cependant, il reste possible que la présence de l'épitope viral gêne le processus de dimérisation. De plus, si le domaine de dimérisation de La se localise dans les 37 derniers acides aminés de la protéine, $\Delta C37$ est incapable de dimériser avec les protéines La-HA1. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé les expériences précédentes en remplaçant la protéine $\Delta C37$ par la protéine La complète (LaB1). Le poids moléculaire de LaB1 et La-HA1 étant similaire, les expériences ont été réalisées en utilisant la protéine LaB1 marquée à la ^{35}S -méthionine et les protéines N-HA1 et C-HA1 non marquée. Si la protéine LaB1 dimérise avec les protéines de fusion, alors l'analyse sur gel des protéines immunoprécipitées par le sérum α -HA1 révélera la présence de LaB1. Ces expériences ont montré que même en présence de précurseurs, les anticorps α -HA1 ne co-précipitent jamais la protéine LaB1. Toutes les protéines sont pourtant fonctionnelles puisqu'elles lient spécifiquement le transcrit UUUU3'OH (Fig. 12).

L'ensemble de ces résultats indique donc que la protéine La n'existe pas sous forme d'homodimère en solution et que la formation d'un tel dimère n'est pas nécessaire à sa liaison avec un précurseur d'ARNt.

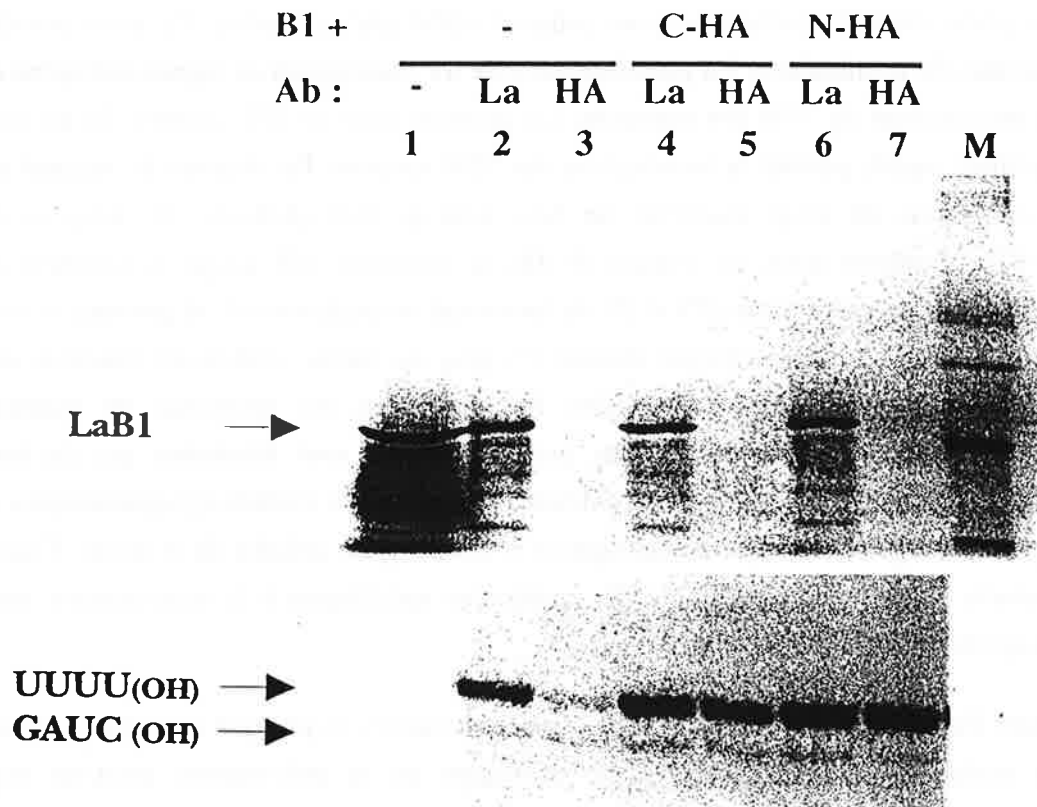


Figure 12: La protéine La recombinante se lie à l'ARN sous forme d'un monomère.

La protéine LaB1 est synthétisée en présence de ^{35}S -méthionine dans un extrait de germe de blé et incubée séparément avec les protéines C-HA ou N-HA synthétisées sans acide aminé marqué. Le mélange protéique et les précurseurs d'ARNt UUUU(OH) et GAUC(OH) synthétisés par l'ARN T7 polymérase en présence d' α - ^{32}P -UTP sont incubés 30mn à 0°C , puis les complexes ARN/protéines sont immunoprécipités par le sérum de lapin α -La (La) ou par le sérum monoclonal dirigé contre l'épitope HA1 (HA). Les protéines qui composent les RNPs sont analysées par SDS-PAGE 12.5%, les ARNs sur gel dénaturant 6.8% polyacrylamide-7M urée. Les gels de protéines sont fixés puis directement séchés à 80°C et exposés la nuit à température ambiante (Film X-AR). Les gels d'ARN sont exposés la nuit à -70°C avec un écran SE8 (Film X-AR). La protéine LaB1 ainsi que les différents transcrits sont indiqués par des flèches.

A.6- Un excès de protéine La dans les extraits S-100 inhibe l'efficacité de transcription et diminue le nombre de formes matures des ARNt.

Le plasmide pJ5 contient le gène codant l'ARNt phénylalanine. Ce gène possède deux signaux de terminaison. La première suite de 4T correspond au signal endogène et dirige la terminaison de 75% des transcrits. La seconde suite de 15T, ajoutée 24 bp en aval du premier signal, permet la terminaison des 25% restants. En absence du second signal de terminaison, de longs transcrits de fuite sont générés (Scherly, D., *rapport de thèse 1987*). Transcrit dans les extraits S-100, le plasmide pJ5 dirige la synthèse de deux catégories de précurseurs P2 et P1 se terminant respectivement au premier et au second groupe de T, et à une forme mature P3 plus ou moins visible en fonction du temps d'incubation (Fig. 13). Les ARNs P4 sont issus du processus de maturation et correspondent aux régions 3' des précurseurs qui sont éliminées par l'action d'une endonucléase. Rappelons que les extraits S-100 sont des extraits cytoplasmiques, obtenus après homogénéisation et centrifugation à 100000g de cellules de reins de *X.laevis*. Ces extraits contiennent l'ensemble des molécules spécifiques à la transcription par l'ARN polymérase III.

Dans l'hypothèse où La est un facteur de terminaison, et puisque la terminaison implique le relâchement du transcrit et le recyclage de la polymérase, peut-on augmenter l'efficacité de transcription du gène ARNt^{Phe} en favorisant le processus de terminaison? De même, si les transcrits P1 sont générés suite à un déficit de la terminaison au premier signal, un excès de protéine La peut-il favoriser la reconnaissance de ce signal de terminaison? Pour cela, différentes quantités de protéine La recombinante purifiée ont été ajoutées aux réactions de transcription dans les extraits S-100 (Fig. 14). Contrairement à l'effet attendu, le nombre de précurseurs P1 et P2 diminue progressivement au fur et à mesure que des quantités croissantes de protéine La sont ajoutées. Cette baisse d'efficacité de transcription se produit de façon proportionnelle entre les deux précurseurs, c'est à dire que le rapport P1/P2 ne varie pas.

De plus, les formes matures des ARNt disparaissent progressivement avec l'augmentation de la protéine La dans les extraits S-100. L'addition d'une quantité équivalente de BSA (500ng) ne modifie pas la transcription, indiquant que l'effet observé est spécifique à La. Il semble que l'effet inhibiteur de La soit plus drastique sur la maturation des ARNt précurseurs que sur la transcription elle-même, comme si la liaison de la protéine avec les

précurseurs retardait leur prise en charge par le système de maturation. Cette liaison a d'ailleurs été confirmée en immunoprécipitant les précurseurs P1 et P2 avec les anticorps α -La (résultats non montrés).

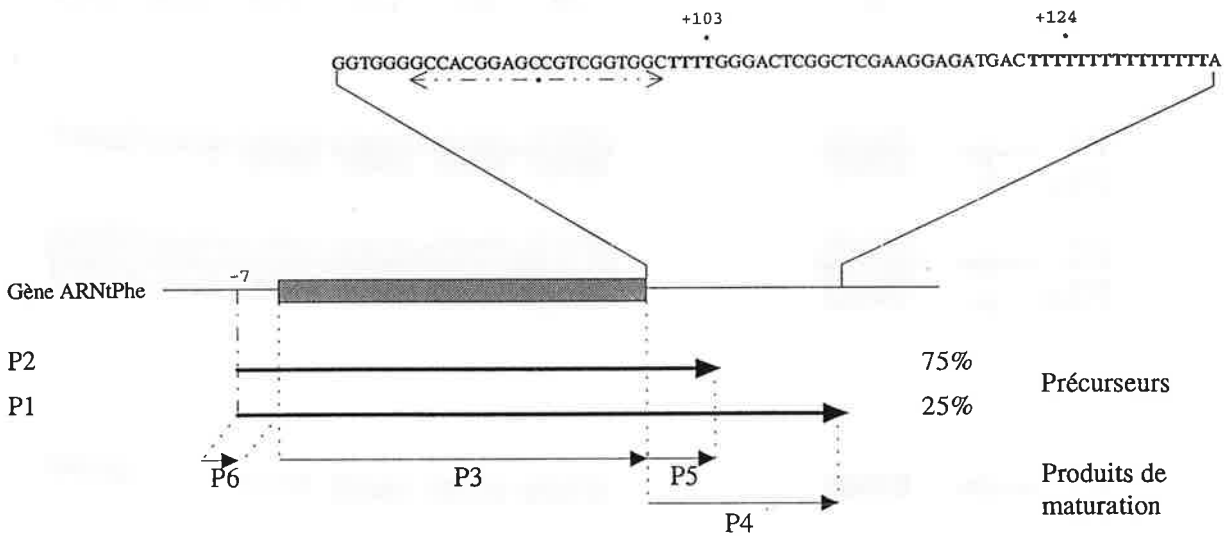


Figure 13 : Produits de transcription du gène d'ARNtPhe et produits de maturation.

Le plasmide pJ5 contient le gène codant pour l'ARNt Phenylalanine. Le site d'initiation de la transcription est localisé en position -7. 75% des transcrits initiés se terminent au premier groupe de 4T qui constitue le signal de terminaison endogène (P2), tandis que les transcrits restant se terminent dans le second groupe de 15T introduit par mutagénèse (P1). Dans l'extrait S-100, les précurseurs P1 et P2 sont maturés par la RNase P qui, en clivant l'extrémité 5' des précurseurs, libère le produit P6, et par une endonucléase qui agit sur les extrémités 3' des précurseurs libérant les produits P4 à partir de P1 et P5 à partir de P2. L'ARNt mature qui résulte de ce double clivage correspond au produit P3. Les flèches situées en amont du premier signal de terminaison indique la présence d'une séquence palindromique responsable de la formation d'une structure secondaire en forme d'épingle à cheveux dans les molécules d'ARN précurseurs P1 et P2.

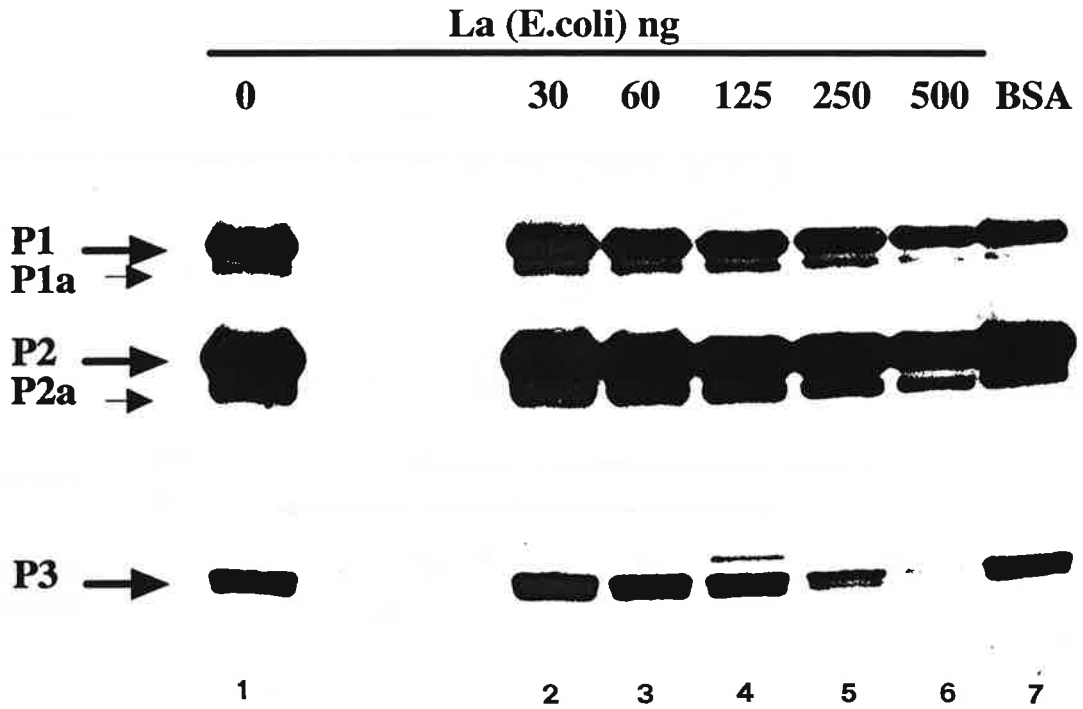


Figure 14 : Transcription du gène d'ARNt^{Phe} dans les extraits S-100 en présence d'un excès de protéine La recombinante.

10ng de plasmide contenant le gène d'ARNt^{Phe} est transcrit 1h à 20°C dans 10µl d'extraits S-100 en présence d' $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP et de quantité croissante de protéine La recombinante purifiée (respectivement 0, 30, 60, 125, 250 et 500ng dans les pistes 1 à 6) ou en présence de 500ng de BSA (piste 7). Les produits de transcription sont analysés sur un gel 12% polyacrylamide-7M urée après extraction au phénol et précipitation dans l'éthanol. (19h d'exposition à 4°C avec écran SE8, film X-OMAT-S (Kodak)). Les ARNs précurseurs P1 et P2, ainsi que les formes matures des ARNt P3 sont indiqués par les flèches horizontales. Les produits P1a et P2a correspondent aux ARNt précurseurs déjà processés en 5' par la RNase P.

B: MODIFICATION DE LA TRANSCRIPTION D'UN GENE DE CLASSE III DANS UN EXTRAIT DEplete EN PROTEINE LA?

Pour tester le rôle éventuel de la protéine La dans la terminaison de la transcription des gènes de classe III, nous avons séquestré, puis éliminé la protéine La des extraits S-100 afin de comparer la transcription du gène d'ARNt^{Phe} en présence ou en absence de La. La déplétion des extraits S-100 a été réalisée en utilisant :

- 1) un excès d'ARNt^{Phe} précurseurs représentant des molécules naturellement reconnues par la protéine La et qui, pré-incubés avec l'extrait, permet de séquestrer la protéine La endogène. L'inconvénient de cette méthode est que la protéine reste présente dans l'extrait.
- 2) l'alternative consiste à éliminer physiquement la protéine avec les anticorps α -La de lapin dirigés contre la protéine de xénope.

B.1- Un ARN plus court apparaît quand le gène ARNt^{Phe} est transcrit en présence d'un excès d'ARNt précurseurs.

Le plasmide possédant le gène d'ARNt^{Phe} sous contrôle du promoteur T7 est linéarisé avec *Dra*I pour générer, comme précédemment, un ARNt précurseur dont l'extrémité 3' est identique à celle des transcrits primaires synthétisés par Pol III (UUUU_{3'}OH). Ce précurseur synthétisé par l'ARN T7 polymérase en absence de radioisotope est incubé 30mn sur la glace dans un extrait S-100 avant d'ajouter l'ADN à transcrire et les NTPs. Cette étape de pré-incubation est destinée à séquestrer la protéine La endogène. La réaction de transcription s'effectue en présence de 10 μ Ci d' α -³²P-GTP pendant 1h à 20°C, puis stoppée par extraction phénolique des ARNs. Ces derniers sont analysés sur gel dénaturant polyacrylamide-urée. Lorsque le gène d'ARNt^{Phe} est transcrit dans un extrait pré-incubé avec des ARNt précurseurs, un ARN plus court de quelques nucléotides est synthétisé (Fig. 16), alors que la pré-incubation de l'extrait avec un excès d'ARNt mature d'*E. coli* n'a aucun effet sur la transcription du même gène. Il est intéressant de remarquer qu'en présence d'un excès de précurseurs, les ARNs nouvellement synthétisés sont maturés avec une très faible efficacité. Ce phénomène peut s'expliquer par la saturation du système de maturation en présence d'un large excès d'ARN précurseurs.

Pour déterminer si l'apparition du transcrit plus court est spécifique au gène d'ARNt^{Phe}

ou commun aux gènes transcrits par Pol III, nous avons analysé la transcription d'autres gènes de classe III dans les mêmes conditions que précédemment. Nous avons ainsi remarqué qu'en présence d'un excès d'ARNt précurseurs, l'apparition d'un transcrit plus court n'est pas systématique alors qu'une diminution globale du nombre de transcrits a toujours été observée (résultats non montrés). De plus, lorsqu'un transcrit plus court apparaît, le nombre de nucléotides manquant est variable. Pour déterminer si la nature des séquences 3' des gènes est responsable de l'apparition de ce nouveau transcrit, des gènes hybrides ont été transcrits en présence d'un excès de précurseurs. Les constructions chimériques testées sont représentées sur la figure 15 ainsi que les séquences de terminaison rencontrées par Pol III au cours de la transcription des gènes hybrides. On peut constater que pour la majorité des constructions, le nombre de transcrits synthétisés dans un extrait pré-incubé avec un excès d'ARNt précurseur, est réduit par rapport aux réactions contrôles. Ce phénomène est d'ailleurs très marqué pour les gènes Lys/Phe et 5S/Phe. De plus, un ARN raccourci du même nombre de nucléotides est présent dans les transcriptions des hybrides Lys/Phe et 5S/Phe tout comme dans celle du gène Phe. Par contre, bien que l'hybride Phe/Lys, transcrit en présence d'un excès de précurseurs, génère aussi un transcrit plus court, la taille de cet ARN est plus fortement réduite que dans le cas des autres constructions hybrides. L'apparition du transcrit plus court peut s'expliquer par une très grande instabilité des précurseurs d'ARNt quand la protéine La se trouve mobilisée par un excès de substrats non marqués.

Ces résultats suggèrent que l'apparition d'un ARN plus court lors de la transcription d'un gène de classe III est intimement liée à la pré-incubation de l'extrait avec un excès d'ARNt précurseurs et que la taille du nouveau transcrit dépend des séquences 3' du gène. Il est peu probable que le transcrit court soit issu d'une terminaison prématurée car si tel était le cas, la transcription du gène Lys/Phe aurait dû générer un même transcrit raccourci des U finaux. Cette dernière observation suggère que la modification qui se produit sur l'extrémité 3' du transcrit est post-transcriptionnelle. Cependant, ces expériences ne permettent pas de distinguer réellement entre une terminaison précoce ou une déstabilisation du transcrit.

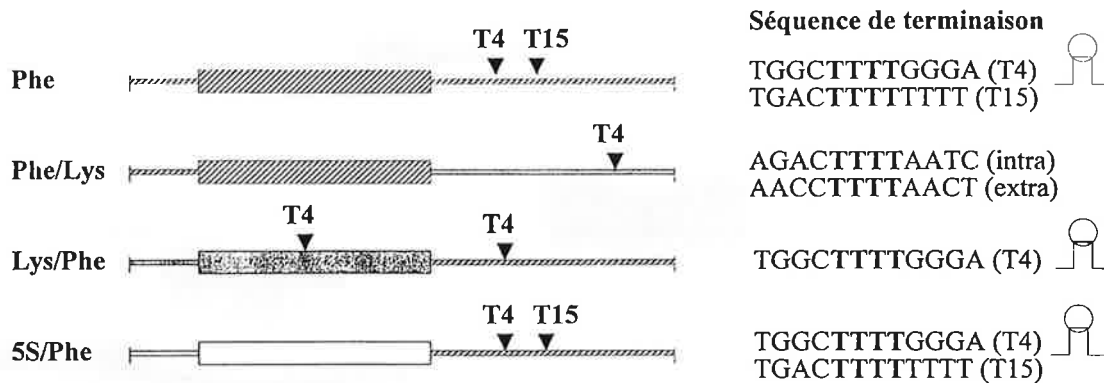


Figure 15: Constructions chimériques entre les gènes d'ARNtPhe, d'ARNtLys et d'ARNr 5S.

La position des signaux de terminaison et la nature de ces séquences sont mentionnés pour chaque construction. Les régions 3' et 5' flanquantes non codantes sont représentées par un segment linéaire, tandis que les régions codantes sont représentées par un rectangle. La présence d'une séquence palindromique créant une structure secondaire en amont des sites de terminaison est également indiquée.

Le gène Phe représente le gène muté d'ARNtPhe dans lequel T4 et T15 correspondent respectivement au signal endogène et exogène de terminaison de la transcription, le deuxième site de terminaison ayant été introduit par mutagenèse.

Le gène Phe/Lys est constitué de la partie 5' non codante ainsi que de la séquence codant l'ARNtPhe et de la partie 3' non codante du gène d'ARNtLys. Cette région contient un signal de terminaison (extra) sans séquence palindromique amont.

Le gène Lys/Phe contient la partie 5' non codante ainsi que la séquence codante de l'ARNtLys et la partie 3' non codante du gène sauvage d'ARNtPhe. Cette construction possède deux sites de terminaison. Le premier est situé dans la partie codante du gène Lys (intra), le second correspond au signal endogène T4 du gène Phe.

Le gène 5S/Phe est un hybride entre les séquences 5' et codante du gène 5S et les séquences 3' non codantes du gène muté Phe. Par conséquent, ce gène chimère contient les mêmes sites de terminaison que le gène Phe.

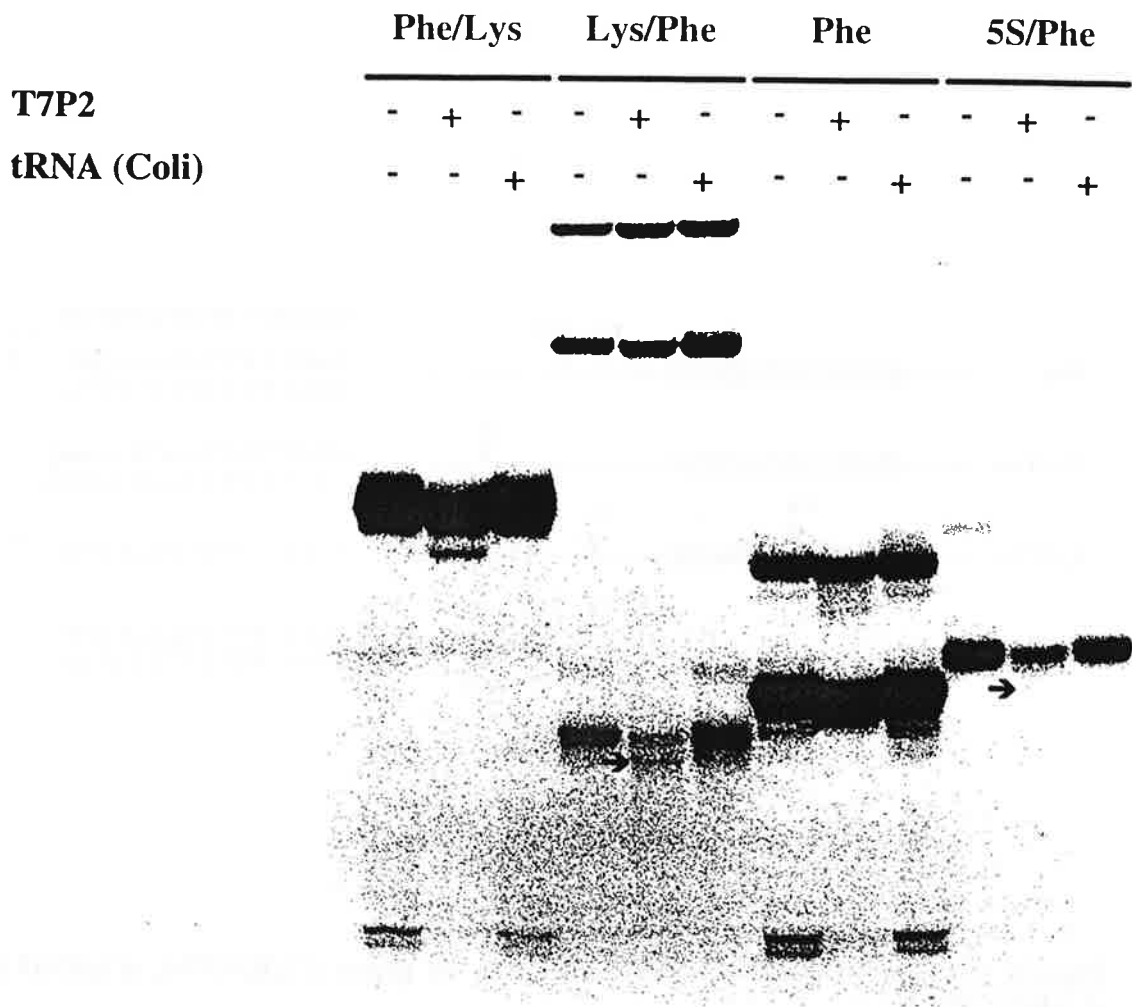


Figure 16: Transcription du gène d'ARNtPhe dans un extrait S-100 pré-incubé en présence de précurseurs d'ARNt.

10µl d'extraits S-100 sont pré-incubés 30mn à 0°C en présence de précurseurs d'ARNt synthétisés par l'ARN T7 polymérase (T7P2 dont l'extrémité 3' correspond à la séquence UUUU(OH)) ou d'ARNt mature provenant d'E.coli, à la concentration finale de 20µg/ml chaque. A ce moment, 10ng du plasmide codant le gène Phe ou les constructions hybrides Phe/Lys, Lys/Phe et 5S/Phe sont transcrits pendant 1h à 20°C et les produits de transcription sont analysés sur un gel dénaturant 12% polyacrylamide-7M urée. L'autoradiographie est exposée la nuit à -70°C avec un écran SE8 (Film X-AR). Les flèches indiquent l'apparition d'un produit plus court commun aux constructions hybrides contenant la région 3' non codante du gène Phe.

A.2- Un ARN plus court apparaît quand le gène d'ARNtPhe est transcrit dans un extrait immunodéplété en protéine La.

La protéine La est une protéine nucléaire très abondante (2.10⁷ copies/cellule). Cette abondance a été problématique car plusieurs déplétions successives ont été nécessaires pour diminuer au maximum la quantité de protéine La contenue dans les extraits S-100. En pratique, trois immunodéplétions successives doivent être réalisées pour éliminer 98% de la protéine. Après chaque tour d'immunodéplétion, la quantité de protéine La restant dans les extraits est estimée par Western-blot (Fig.18). Entre chaque immunodéplétion, un aliquot est prélevé pour transcrire le gène d'ARNtPhe (Fig.17). Les extraits traités avec du sérum pré-immun sont notés PI, ceux traités avec le sérum immun sont notés α -La. Le chiffre qui suit indique le nombre d'immunodéplétion réalisée avec le même extrait.

Au cours des déplétions, l'efficacité de transcription diminue (Fig. 17 comparez les pistes c, h et k et les pistes e, i et m). Cette diminution du nombre de transcrits a d'ailleurs été expliquée par d'autres groupes comme secondaire à la déplétion simultanée du facteur de transcription TFIIC. En ce qui nous concerne, cette hypothèse ne peut être confirmée. En effet, les résultats obtenus avec le sérum pré-immun montrent que la diminution du nombre de transcrits est indépendante de l'absence de La. Nous avons montré qu'en fait, au cours de l'immunodéplétion, l'extrait se dilue. Cette dilution est intrinsèque au protocole utilisé et nous avons estimé que l'activité d'un extrait immunodéplété 3 fois correspond à 30% de l'activité d'un extrait non traité (données non montrées). Ces résultats impliquent que les extraits α -La1 doivent être directement comparés avec les extraits PI1, α -La2 avec PI2 et α -La3 avec PI3.

La transcription du plasmide pJ5 dans les extraits immunodéplétés est un outil de choix pour tester l'hypothèse de Gottlieb et Steitz (51,52) selon laquelle la protéine La est nécessaire à la synthèse des U terminaux. Rappelons que ce plasmide code l'ARNtPhe et que dans des conditions normales de transcription, 75% des transcrits (P2) se terminent au signal de terminaison endogène alors que les 25% restants (P1) se terminent au deuxième signal. Pour vérifier l'hypothèse citée ci-dessus, on peut imaginer que lorsque la protéine La devient limitante, la majorité des transcrits s'arrêtent avant le premier signal de terminaison. Dans ce cas, les transcrits P2 devraient être synthétisés prioritairement sur les transcrits P1 et le rapport P1/P2 devrait diminuer. Or comme le montre la figure 17, les transcrits P1 sont toujours synthétisés et le rapport P1/P2 n'est jamais modifié même quand la quantité de protéine La est inférieure à 2% du taux

initiale. On peut également remarquer qu'à chaque immunodéplétion, des formes matures sont présentes aussi bien dans les extraits traités avec le sérum pré-immun (PI) que dans ceux traités avec le sérum immun (α -La). Ces résultats confirment indirectement que des transcrits normaux sont synthétisés dans les extraits déplétés en La et indiquent qu'ils sont normalement maturés.

Par contre, il est intéressant de noter que la longueur des précurseurs synthétisés dans un extrait déplété est très variable (Fig. 17 comparez les pistes c et e, g et i). Quand la protéine La devient limitante par rapport au nombre de précurseurs synthétisés, les transcrits P1 et P2 sont allongés ou raccourcis de façon hétérogène et un nouveau transcrit plus court, Px, apparaît (Fig. 17, piste i). L'addition de protéine recombinante préalablement à la réaction de transcription dans les extraits déplétés restaure à la fois le taux et la longueur des transcrits synthétisés (Fig. 17, comparez les pistes g, h, i et j). Cependant, en présence d'un excès de La, les transcrits P1a et P2a qui correspondent aux formes précurseurs maturées à l'extrémité 5' s'accumulent. Tout se passe comme si la liaison de La à l'extrémité 3' des précurseurs ralentissait le processus de maturation à cette extrémité.

En conclusion, il semble que la diminution du taux de protéine La dans les extraits S-100 influence peu la terminaison de la transcription, du moins selon l'hypothèse de départ. Comment expliquer alors l'apparition de transcrits de tailles hétérogènes? Et surtout, comment expliquer l'apparition du transcrit plus court qui ressemble à celui observé lorsque le gène est transcrit dans un extrait pré-incubé avec un excès de pré-ARNt? En regardant le devenir des ARNs P4 dans les différents extraits au cours des immunodéplétions successives, il est étonnant de remarquer que dès la première immunodéplétion, ces ARNs sont absents dans les extraits déficients en La. Or ces molécules proviennent de la maturation 3' des ARNt précurseurs et correspondent à la partie 3' terminale du transcrit primaire. Inversement, quand la protéine La est ajoutée à l'extrait déplété, les ARNs P4 réapparaissent. Cette observation nous a conduit à émettre l'hypothèse suivante: les transcrits synthétisés par Pol III se lient à la protéine La dès leur relâchement et cette liaison est nécessaire pour protéger les ARNs des activités enzymatiques telles que les nucléases ou les polymérases présentes dans l'extrait.

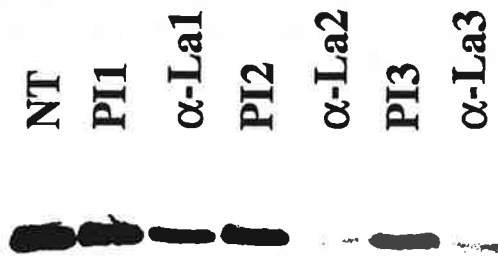


Figure 18: Western-blot des extraits S-100 progressivement déplétés.

3 μ l des extraits NT, PI1, α -La1, PI2, α -La2, PI3 et α -La3 sont chargés sur gel SDS-PAGE 12.5%. Après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, la présence de la protéine La est estimée en incubant la membrane avec des anticorps de lapin α -La dilués au 1/250^{ème}, puis avec une solution de protéine A-35S diluée au 1/1000^{ème}. La membrane est autoradiographiée la nuit à température ambiante.

Figure 17: Transcription du gène d'ARNt^{Phe} dans un extrait S-100 progressivement déplété en protéine La par les anticorps de lapin α -La.

10ng de plasmide codant le gène d'ARNt^{Phe} sont transcrits 2h à 20°C en présence d' α -³²P-GTP, dans 10 μ l d'extrait S-100 non traité (NT), ou incubé une fois avec le sérum pré-immun (PI1) ou immun (α -La1), ou incubé deux fois successives avec le sérum pré-immun (PI2) ou immun (α -La2), ou trois fois successives avec le sérum pré-immun (PI3) ou immun (α -La3). Chaque réaction est réalisée en double. Les pistes a, c, e, g, i, k et m correspondent aux transcriptions réalisées respectivement avec les extraits NT, PI1, α -La1, PI2, α -La2, PI3 et α -La3, tandis que les pistes b, d, f, h, j, l et n montrent les produits de transcription réalisées avec les mêmes extraits mais en présence de 500ng de protéine La recombinante purifiée. Les différents produits de transcription sont indiqués par des flèches, le transcrit court Px par une étoile. Le gel est autoradiographié la nuit à -70°C avec un écran SE8 (film X-AR).

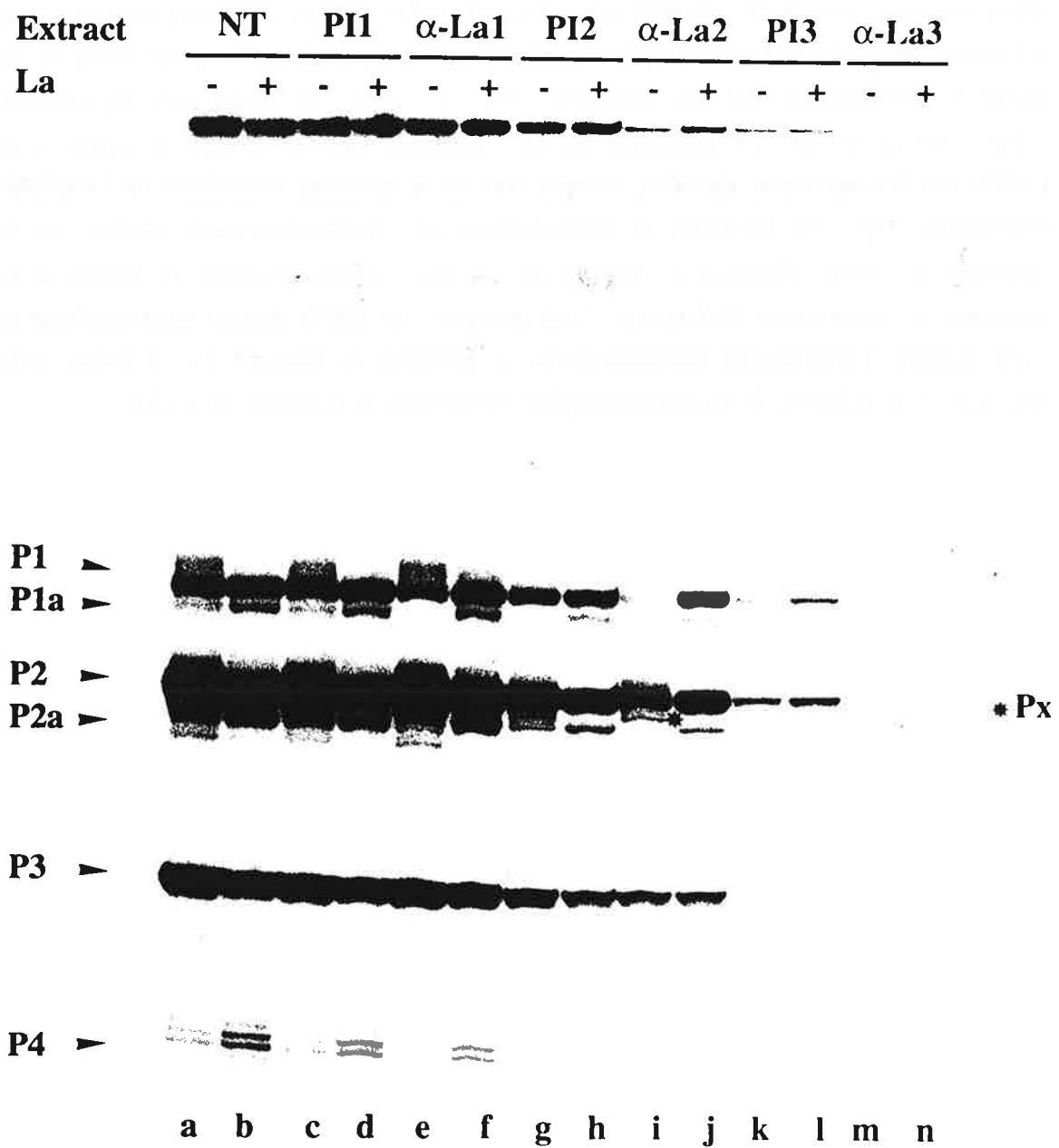


Figure 17

Lorsque la protéine La est limitante, certains transcrits sont rapidement pris en charge par le système de maturation. C'est pourquoi, dans de tels extraits les formes matures apparaissent plus rapidement (cf. ci-dessous). Dans l'hypothèse où ce système est saturable, c'est à dire que les transcrits sont synthétisés plus vite qu'ils ne sont maturés, les ARNt précurseurs qui ne sont pas protégés par leur liaison avec La et qui attendent d'être maturés, servent de substrats à des enzymes telles que les nucléases (en particulier les exonucléases qui digèrent dans le sens 3'→5') qui raccourcissent les précurseurs ou les poly(U) polymérase qui les allongent (Fig. 17, piste i). Selon ces hypothèses, l'apparition du transcrit Px s'explique par une différence dans la cinétique de digestion de l'ARN par l'exonucléase. En effet, compte tenu de la structure secondaire de l'ARNtPhe précurseur (Fig. 19), l'activité de l'exonucléase est momentanément inhibée par la structure en forme d'épingle à cheveux qui se situe immédiatement en amont de la séquence de terminaison UUUU_{3'}OH. C'est pourquoi, les ARNs digérés jusqu'à la base de cette épingle s'accumulent transitoirement et génèrent le transcrit Px. Lorsque cette structure se déstabilise, la nucléase complète rapidement la digestion de l'ARN.

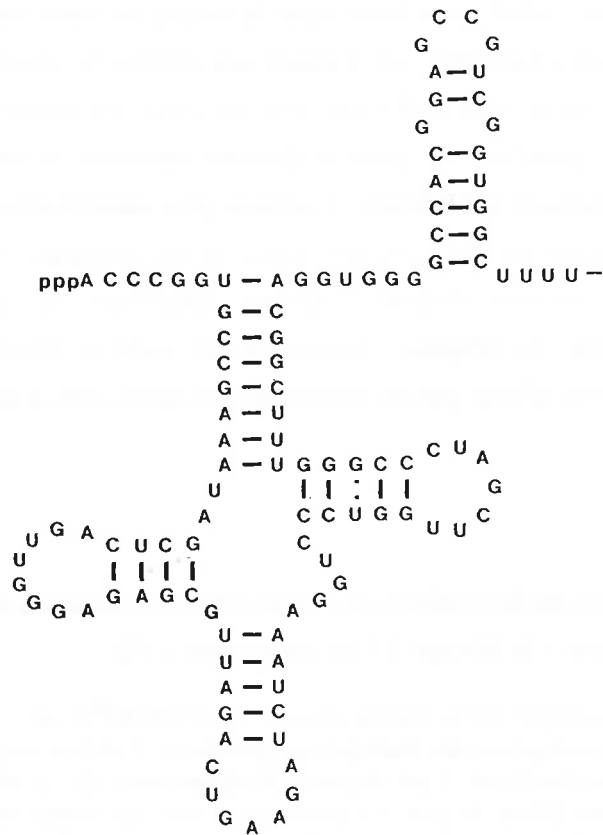


Figure 19: Structure secondaire du précurseur P2 du gène d'ARNtPhe.

Cette structure a été déterminée à partir du programme SECOND d'analyse des séquences d'acides nucléiques de PC-GENE. Les tirets entre deux bases représentent les liaisons hydrogènes A/T et C/G, les doubles points les liaisons G/U. Cette analyse montre la présence d'une structure en forme d'épingle à cheveux juste en amont des résidus U terminaux.

Afin de vérifier cette hypothèse, une réaction de transcription utilisant 100µl d'extrait S-100 a été réalisée avec un extrait α-La2 et les produits de transcription ont été analysés sur gel. Les bandes correspondantes aux transcrits P2 et Px ont été excisées, et les ARNs élués et séquencés par fingerprinting. Cette étude montre que les spots 24 et 25 qui correspondent à la séquence CUUUU_{3'}OH sont absents dans le transcrit Px (Fig. 20 et 21). Cette expérience établit sans équivoque la nature du transcrit plus court Px, comme étant le précurseur de l'ARNtPhe, qui a perdu ses résidus U terminaux. L'absence de ces résidus est difficilement explicable par une synthèse incomplète de l'ARN dans des extraits déficients en protéine La, puisque d'autres transcrits de longueur normale ou plus longs sont simultanément synthétisés. Il semble plus raisonnable d'expliquer l'apparition de Px, par l'action d'une exonucléase qui digère progressivement P2 et P1 jusqu'à la base de la structure secondaire décrite ci-dessus. D'ailleurs la transcription d'un gène d'ARNtPhe muté dans la séquence terminale de sorte à inhiber la formation d'une structure secondaire ne génère pas de transcrits similaires à Px dans les mêmes conditions expérimentales.

Figure 20: Séquence nucléotidique des transcrits précurseurs du gène d'ARNtPhe et produits de digestion à la RNase T1 du précurseur P2.

La séquence nucléotidique de la forme mature de l'ARNtPhe est soulignée (73nts), le site d'initiation de la transcription est indiqué en position -7 et les séquences 3' non codantes sont numérotées positivement. Les oligonucléotides issus de la digestion à la RNase T1 du précurseur P2 sont désignés par les traits verticaux et chaque séquence particulière est numérotée. Les numéros sont identiques à ceux des spots radioactifs du fingerprint de la figure 21.

Figure 21: Fingerprints des digestions à la RNase T1 des produits de transcription P2 et Px du gène d'ARNtPhe.

100µl d'extrait S-100 sont immunodéplétés deux fois successives avec du sérum de lapin α-La et 100ng de plasmide contenant le gène d'ARNtPhe sont transcrits 1h30 à 20°C dans cet extrait en présence de 10µCi d'α-³²P-UTP. Les produits de transcription P2 et Px sont isolés après séparation sur gel dénaturant 12% polyacrylamide-7M urée et élués du gel selon le protocole décrit dans matériels et méthodes. Ces produits sont ensuite digérés 30mn à 37°C avec 10U de RNase T1 dans une étuve saturée en eau et les oligonucléotides issus de la digestion sont séparés dans deux dimension (taille et charge). Après chromatographie sur couche mince, la plaque PEI est séchée à l'air libre, puis exposée la nuit à -70°C avec un écran SE8 (film X-AR). La séquence nucléotidique des spots radioactifs est indiquée dans la figure 20 par le même numéro. Les spots 24 et 25 sont absents dans Px.

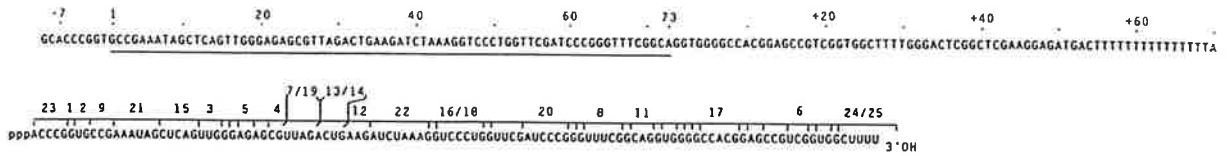
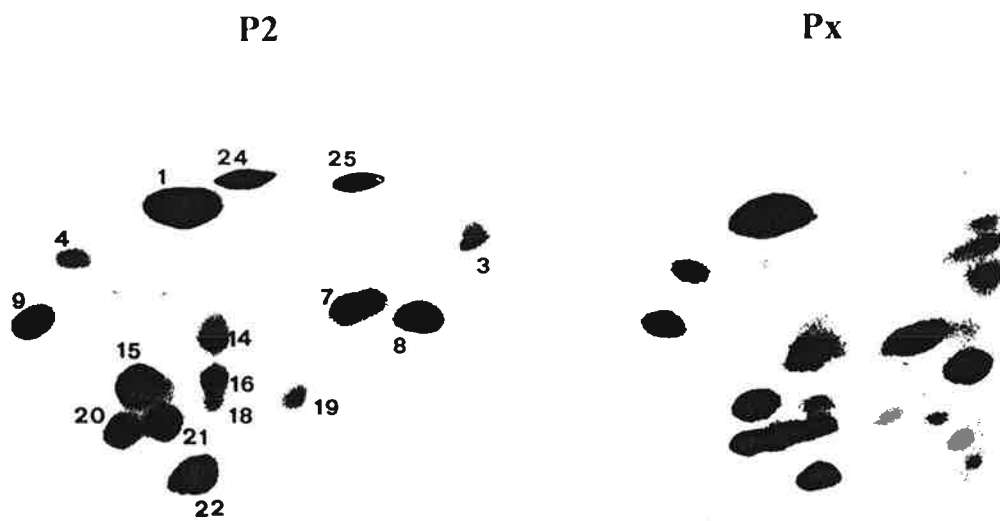


Figure 20



Fingerprints de digestion à la Rnase T1 des produits de transcription in vitro P2 et Px du gène codant pour le tRNA Phe

Figure 21

C: L'APPARITION DE Px ET LA TRANSCRIPTION PAR Pol III SONT DEUX EVENEMENTS INDEPENDANTS.

Dans l'hypothèse où Px est issu d'une attaque nucléolytique plutôt que d'un arrêt précoce de la transcription, ce transcrit doit apparaître indépendamment de la transcription par Pol III. Pour cela, nous avons construit un plasmide codant le précurseur naturel P2 du gène ARNt^{Phe} sous contrôle du promoteur T7. Cet ARN T7P2 est transcrit par l'ARN T7 polymérase en présence d' α -³²P-GTP et incubé 15, 30, 60 ou 120mn dans des extraits PI3 ou α -La3 (Fig. 22). Les précurseurs incubés dans l'extrait PI3 sont normalement processés et sont relativement stables même après 2h d'incubation à 20°C (Fig. 22, pistes a, c, e, g et i). En présence d'un excès de La, la stabilité des précurseurs est augmentée (comparez pistes i et j). Par contre, lorsque le précurseur T7P2 est incubé dans un extrait déplété α -La3, il est très rapidement dégradé ou allongé et le transcrit Px apparaît dès 15mn d'incubation (Fig. 22, pistes m, o et q). Par contre, l'ARN T7P2 est très stable s'il est incubé 2h dans le tampon de réaction même en présence de la fraction purifiée de La (Fig. 22, pistes u et v). Après 60mn et 120mn d'incubation, la majorité des transcrits précurseurs est dégradée (Fig. 22, pistes q et s); il ne subsiste dans ces extraits que la forme mature. On peut à nouveau remarquer que les précurseurs sont plus rapidement maturés dans les extraits α -La3 que dans les extraits PI3, puisque les premières formes matures apparaissent après 15mn d'incubation dans les premiers contre 30mn dans les seconds (comparez les pistes c et m). Inversement, un excès de La favorise l'accumulation des précurseurs maturés en 5' et semble diminuer la cinétique d'apparition des transcrits matures.

Là encore, l'addition de la protéine La recombinante dans les deux types d'extraits, simultanément à l'ARN T7P2 restaure le nombre de transcrits et la longueur initial de cet ARN. Ces expériences confirment notre hypothèse quant à la protection des transcrits T7P2 par la protéine La et montrent que la stabilité des ARNt précurseurs est fortement réduite dans les extraits déplétés en La. De plus, toutes les catégories de transcrits (P2, P2a, P3, Px) peuvent être obtenues en absence d'une transcription par Pol III. Autrement dit, Px est issu d'un mécanisme indépendant de la transcription par Pol III tout comme P2a et P3 sont issus de la maturation. Ces résultats suggèrent donc que Px n'est pas issu d'un arrêt précoce de la transcription, mais correspond plutôt au produit d'une attaque nucléolytique.

Figure 22: Stabilité du précurseur P2 dans un extrait PI3 ou α -La3.

Le précurseur d'ARNtPhe P2 est synthétisé in vitro par l'ARN T7 polymérase en présence d' α - 32 P-GTP et 90 fmol de cet ARN sont incubé à 20°C dans des extraits S-100 traités trois fois successivement avec du sérum pré-immun (PI3, a à j) ou avec du sérum α -La (α -La3, k à t). Dans certains cas, 500ng de protéine La recombinante purifiée sont ajoutés à la réaction (PI3: b, d, f, h et j. α -La3: l, n, p, r, et t). Un aliquot de la réaction est prélevé avant l'incubation (a, b, k et l) ou après 15mn (c, d, m et n), 30mn (e, f, o et p), 60mn (g, h, q et r) ou 120mn d'incubation (i, j, s et t). Les ARNs sont aussi incubés 120mn à 20°C dans du tampon 140mM KCl en absence (u) ou en présence (v) de 500ng de protéine La recombinante purifiée. Les formes pré-mature P2a et mature P3 sont indiquées par des flèches, le transcrit plus court Px par une étoile. Les gels sont autoradiographiés la nuit à -70°C avec un écran SE8 (film X-AR).

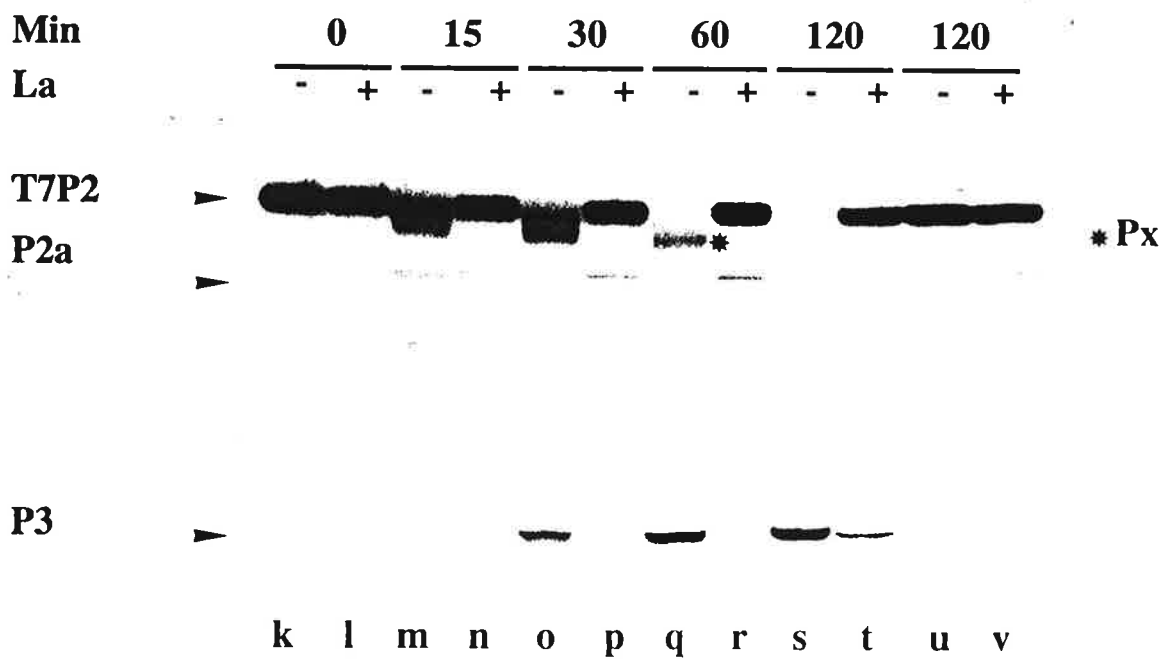
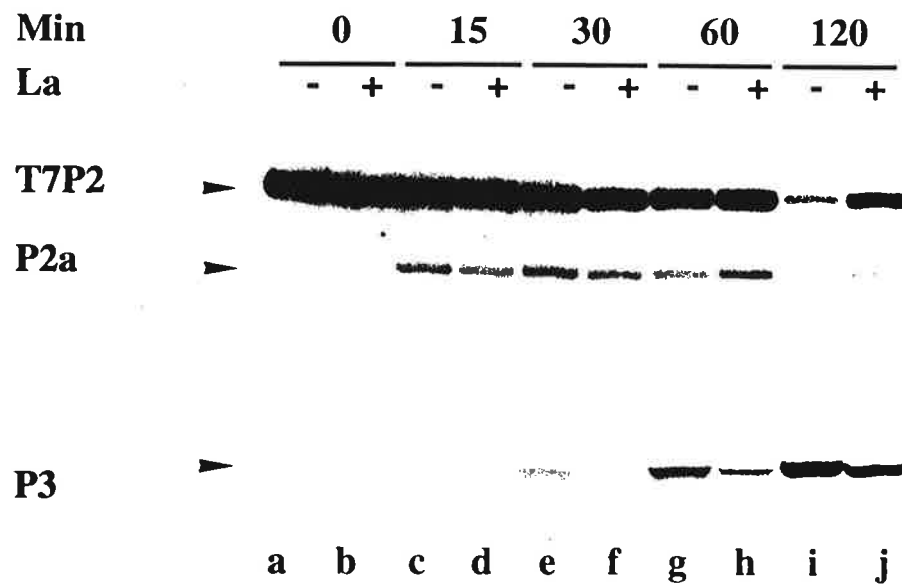


Figure 22

D: LA PROTEINE La EST-ELLE NECESSAIRE A LA SYNTHÈSE DES RESIDUS URIDINES TERMINAUX?

Nous avons démontré précédemment que le transcrit Px ne contient pas les 4 résidus U terminaux et que cet ARN est très sensible à l'action d'exonucléases dans des extraits immunodéplétés en protéine La. Il est possible d'obtenir ce transcrit indépendamment de la transcription par Pol III, simplement en incubant cet ARN, préalablement transcrit par l'ARN T7 polymérase, dans un extrait déplété. La combinaison de ces résultats suggère que l'absence des U terminaux ne résulte sans doute pas d'un arrêt prématuré de la transcription. Cependant, aucune des expériences précédentes ne suffisent pour écarter l'implication éventuelle de La dans la synthèse des U terminaux. Pour cela, il est nécessaire de fractionner les extraits afin de séparer les activités transcriptionnelles et nucléasiques contenues dans l'extrait. Dans ces conditions, la transcription du gène d'ARN^tPhe dans un extrait déplété et dépourvu de nucléases doit produire des transcrits de longueur normale. Au contraire, si La est nécessaire à la synthèse des U finaux, de tels extraits doivent synthétiser des transcrits plus courts de type Px.

De nombreuses colonnes chromatographiques ainsi que plusieurs conditions d'élution ont été testées pour satisfaire la condition suivante: obtenir une fraction sans nucléase et suffisamment active pour transcrire un gène de classe III. Ces expériences de fractionnement ont été réalisées avec des extraits d'oocytes de xénope, simplement pour des raisons quantitatives. Les oocytes, contrairement aux cultures de cellules permettent de manipuler de grandes quantités de protéines, ce qui devient un avantage pour les purifications chromatographiques.

Des colonnes échangeuses d'anions telles que DEAE Affi-Gel blue ou DEAE-Agarose (Biorad) n'ont pas permis la séparation des activités transcriptionnelles et nucléasiques. Avec ce type de support, les deux activités co-éluent de façon systématique.

Nous avons également essayé un fractionnement sur colonne échangeuse de cations Biorex 70 (Biorad) utilisée couramment pour fractionner les facteurs de transcription de Pol III chez la levure. Pour ce type de colonne, plusieurs conditions de tampon d'élution ont été testées: ces tampons contiennent soit du chlorure de potassium, soit de l'ammonium sulfate. Cependant, les fractions éluées avec ce type de colonne n'ont jamais été capables, seule ou en combinaison les unes aux autres, de transcrire un gène de classe III. Le même résultat a été observé avec une colonne d'héparine sépharose (Pharmacia).

Il est probable que la polymérase reste attachée très fortement sur ce type de support.

Finalement, la seule colonne qui ait donné des résultats satisfaisants est une colonne échangeuse cationique faible de phosphocellulose P11 (Wattmann). Lorsque la colonne est équilibrée dans un tampon contenant 0.1M KCl, les fractions éluées respectivement à 0.35M et 1M KCl contiennent l'activité nucléase et l'activité transcriptionnelle. Cette dernière est cependant peu active comparée à celle de l'extrait non fractionnée. Cette même résine équilibrée à 0.21M KCl a donné les meilleurs résultats à savoir, que dans ces conditions, l'activité nucléase n'attache pas la colonne tandis que la fraction éluee à 1M KCl contient l'activité transcriptionnelle ainsi que l'activité RNase P (Fig. 23, pistes b et c et g à n). Un Western-blot réalisé sur ces deux fractions montre que la protéine La est répartie de façon équivalente entre la fraction 0.21M KCl et 1M KCl (données non montrées).

La fraction non retenue sur la colonne contient un inhibiteur de la transcription puisque l'efficacité de transcription est plus faible quand celle-ci est mélangée à la fraction 1M (Fig.23, comparez piste b et d). Peut-être est ce pour cela que la fraction éluee à 1M est beaucoup plus active en transcription que l'extrait initial (comparez piste e avec b et c). Les produits P4 issus de la maturation des ARNt précurseurs sont stables grâce à l'absence de la nucléase. Les bandes multiples correspondant aux ARNs P4 représentent des ARNs dont la longueur est modifiée d'un nucléotides à chaque fois mais qui résulte d'une addition d'extranucléotides par Pol III et non d'une dégradation en 3'. L'incubation des transcrits T7P2 et T7P2a dans chacune des fractions montre que l'exonucléase responsable de la dégradation des précurseurs en 3' co-élue avec la fraction à 0.21M KCl (cf piste k), tandis qu'une autre exonucléase qui digèrent probablement le transcrit dans le sens 5'→3' co-élue avec la fraction à 1M KCl (cf piste h). Cette expérience montre également que chez le xénope, la maturation des ARNt précurseurs se fait dans un ordre déterminé (cf piste g et k), à savoir que l'ARN doit d'abord être mûré à son extrémité 5' par la RNase P avant d'être modifié en 3' par une endonucléase, étape nécessaire à l'addition du CCA terminal.

Nous avons par la suite vérifié que la stabilité d'un transcrit T7P2 incubé dans une fraction 1M KCl déplété en protéine La est identique à celle d'un transcrit incubé dans une fraction non déplétée. Le gène d'ARNt^{Phe} a également été transcrit dans la fraction 1M déplétée en La. La réaction génère des produits précurseurs de longueur normale et en quantité équivalente, en comparaison avec une fraction non-déplétée (résultats non montrés). Cependant, les extraits oocytaires étant riches en protéine La, même après

fractionnement chromatographique, nous avons estimé qu'environ 5% de protéine La demeure dans la fraction 1M après immunodéplétion. Plusieurs tentatives se sont révélées infructueuses pour éliminer ces 5% restants. Une autre stratégie a donc été envisagée. Elle consiste à utiliser des extraits somatiques moins riches en protéines et par conséquent plus facile à immunodépléter.

Des réactions de transcription ont été réalisées pendant 5mn. Ce temps a été choisi sur la base de deux critères:

- i) être suffisamment long pour transcrire assez de précurseurs analysables sur un gel.
- ii) être suffisamment court pour ne pas observer la dégradation des précurseurs par les nucléases.

Ces expériences ont montrées qu'il est peu probable que La intervienne dans la synthèse des U terminaux pour les raisons suivantes. D'abord parce que le nombre de précurseurs synthétisés dans les deux types d'extraits est identique et que la longueur des précurseurs synthétisés dans les extraits déplétés en La est normale. Enfin parce que le rapport P2/P1 reste inchangé, quelque soit l'extrait (résultats non montrés).

Figure 23: Séparation des activités transcriptionnelles et nucléasiques de l'extrait S-150.

Les fractions éluées à 0.21M KCl et 1M KCl de la colonne de phosphocellulose P-11 sont testées pour leur capacité à transcrire le gène d'ARNtPhe (a à d) ou à contenir l'activité 3' exonucléase (g à n). 10ng de plasmide sont transcrits 2h à 20°C dans 5µl de fraction 0.21M KCl (a), 5µl de fraction 1M KCl (b), 10µl de fraction 1M KCl (c), 5µl de fraction 0.21M KCl complémentée avec 5µl de fraction 1M KCl (d), 5µl d'extrait S-150 avant fractionnement sur la colonne P-11 (e), et dans 10µl d'extrait S-100 (f).

Les précurseurs P2 et P2a sont synthétisés *in vitro* par l'ARN T7 polymérase en présence d' α -³²P-GTP. 90 fmol de chaque ARN sont incubées 2h à 20°C dans 10µl de fraction 0.21M KCl (g et k), 10µl de fraction 1M KCl (h et l), 10µl d'extrait S-150 avant fractionnement sur la colonne P-11 (i et m) ou dans du tampon 140mM KCl (j et n).

Tous les ARNs sont analysés sur un gel dénaturant 12% polyacrylamide-7M urée et le gel est autoradiographié la nuit à -70°C avec un écran SE8 (film X-AR). Les différentes formes d'ARN sont indiquées par des flèches (P1 à P3) ou par des crochets (P4).

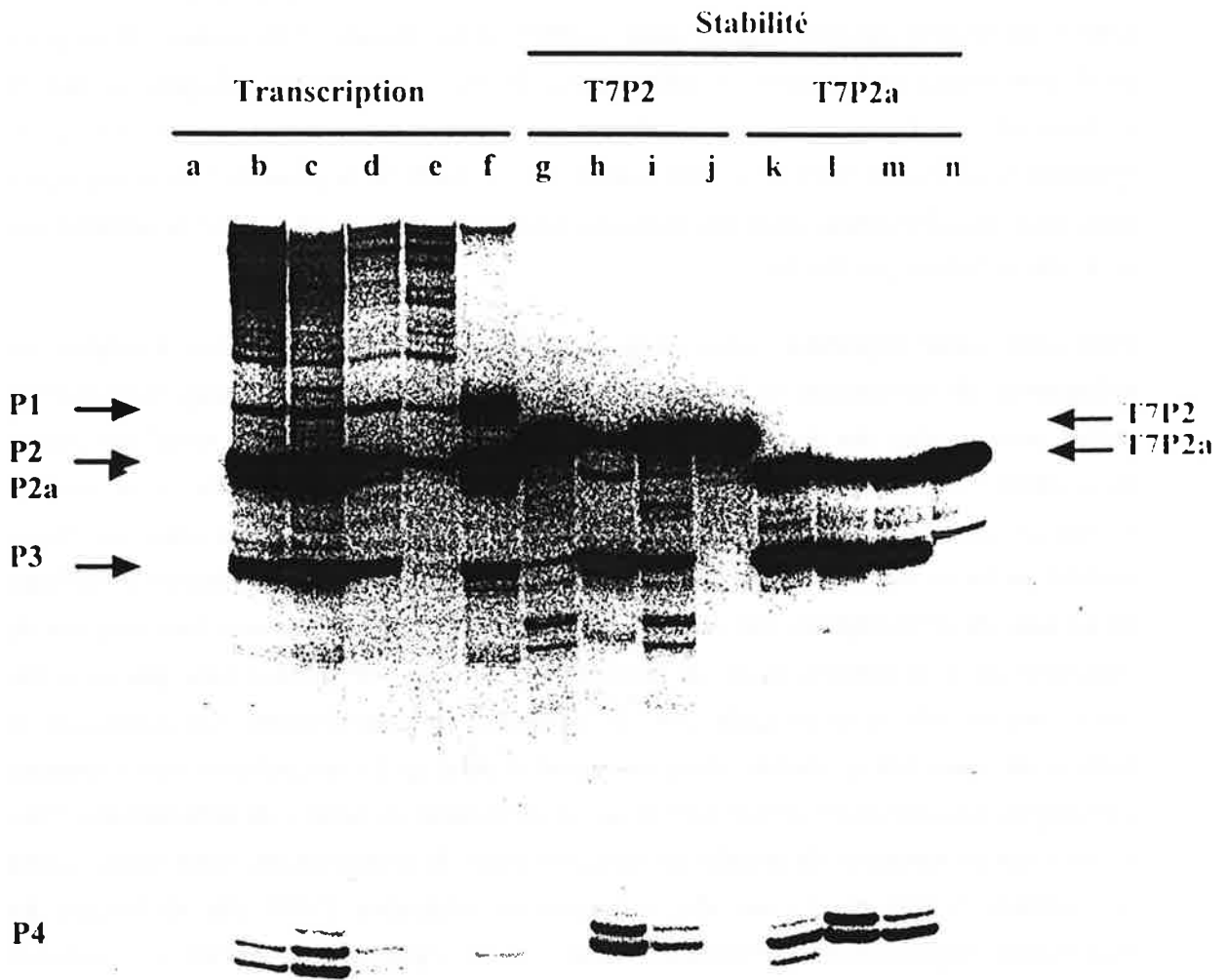


Figure 23

E: LA PROTEINE La EST-ELLE NECESSAIRE POUR RELACHER UN TRANSCRIT SYNTHETISE PAR POL III?

Le modèle de Gottlieb et Steitz (52) proposé en 1989 suggère que non seulement la protéine La est nécessaire pour compléter la synthèse des transcrits, mais qu'elle est aussi nécessaire à leur relâchement. Nous avons vu précédemment que la protéine La de xénope ne semble pas être requise pour synthétiser les résidus U terminaux. Mais qu'en est-il concernant la fonction de relâchement du transcrit naissant? Rappelons que la terminaison de la transcription implique deux événements successifs: l'arrêt de la synthèse de la chaîne ARN et le relâchement de cet ARN. Si la protéine La est impliquée dans cette dernière étape, alors elle peut être considérée comme un facteur de terminaison de la transcription par Pol III.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la capacité de l'héparine à inhiber les événements de réinitiation de la transcription (71). L'héparine est un polyanion souvent utilisé pour purifier des facteurs de transcription. Son effet inhibiteur s'explique par la séquestration probable des composants de la machinerie transcriptionnelle. Si la protéine La est un facteur de relâchement, le nombre de transcrits synthétisés dans un extrait déplété en La en absence d'héparine doit correspondre au nombre de transcrits synthétisés en un tour de transcription. En effet, si les ARNs naissants ne peuvent être relâchés du complexe de transcription, faute de protéine La, alors la polymérase n'est pas recyclée. Au contraire, elle reste bloquée avec le complexe de transcription. En comparant le nombre de transcrits synthétisés dans un extrait déplété en La, en présence ou en absence d'héparine, nous devrions déterminer si La est réellement un facteur de relâchement. Pour réaliser ces expériences de simple ou multiples tours de transcription, nous avons utilisé des extraits S-100 passés sur des colonnes de séphadex G-50 afin d'éliminer les nucléotides triphosphates endogènes. Nous avons également construit un nouveau plasmide contenant le gène codant l'ARN^t_{Phe}, mais dont la séquence 5' a été modifiée de sorte que le premier résidu U transcrit s'incorpore en position +14. Cette mutation a été réalisée dans le but d'observer un transcrit court de 13nts dans la phase de pré-élongation. Cette étape s'effectue en présence d'héparine (= simple tour) et des triphosphates ATP, CTP et GTP. L'ARN doit servir de contrôle interne pour affirmer qu'un seul tour de transcription s'est réellement effectué. Cependant, cet ARN fut toujours très difficilement détectable, essentiellement pour deux raisons. La première concerne la stabilité du complexe ternaire; en effet, il a été mentionné que la longueur minimale de l'ARN doit être égale à 17nts pour que le complexe ARN/ADN/Pol III soit stable. Si l'ARN se

détache du complexe, alors il est rapidement dégradé par les nucléases contenus dans l'extrait. La deuxième raison est inhérente à l'extrait S-100 qui contient toute une panoplie de protéines, y compris les enzymes qui convertissent le CTP en UTP. C'est pourquoi, nous avons le plus souvent observé des produits de transcription dont la taille est supérieure à 13nts (résultats non montrés). La seule situation où nous avons pu observé ce transcrit de 13nts pendant la phase de pré-élongation nécessite la présence de 3'dUTP qui bloque l'incorporation ultérieure de NTP et qui peut-être protège l'ARN des exonucléases dans le cas où il se libère du complexe ternaire (résultats non montrés). Pour nous convaincre qu'en présence d'héparine un seul tour de transcription s'effectue, nous avons changé de stratégie puisque la présence simultanée du 3'dUTP empêche la phase d'élongation.

Nous avons donc réalisé une cinétique de transcription avec des extraits PI5 et α -La5 en prélevant des aliquots de la réaction effectuée en présence d'héparine aux temps 30sec, 2mn et 5mn (Fig. 24B, pistes a, b et c). Le gel séché et analysé au Phosphorimager a permis la quantification des transcrits P1 et P2 (Fig. 25). En présence d'héparine, le nombre de transcrits P2 se stabilise entre 30s et 2mn alors que le nombre de transcrits P1 augmente progressivement, comme si la vitesse de transcription des complexes engagés dans la synthèse d'un transcrit P1 était moins rapide que celle des complexes qui synthétisent P2. A ce titre, on peut remarquer que dans le cas des extraits PI5, le taux de précurseurs P2 diminue entre 2mn et 5mn, alors que celui des précurseurs P1 augmente, suggérant qu'un certain nombre de complexes se pausent momentanément au signal T4 pour ne terminer la synthèse qu'au signal T15. Le nombre total de transcrits tendant à se stabiliser, nous considérons qu'en présence d'héparine un seul tour de transcription est effectué. Dans l'espace de 5mn, les extraits PI5 et α -La5 ont synthétisés un nombre équivalents de transcrits à savoir respectivement 1.07 et 1.13 fmoles d'ARN représentant 33-35% de matrices ADN compétentes. Dans ces conditions, l'addition simultanée des NTPs et de protéine La recombinante ne modifie pas le profil de transcription (Fig. 24B, comparez les pistes c et e). Par contre, elle permet l'immunoprécipitation des précurseurs synthétisés dans les extraits α -La5 (Fig. 24B, comparez les pistes d et f et Fig. 26). Le fait d'obtenir dans les extraits α -La5 des précurseurs de longueur normale qui ne sont pas immunoprécipités par les anticorps α -La renforce l'idée que la protéine La de xénope n'est pas nécessaire à la synthèse des U terminaux (Fig. 24B, piste d). De plus, ce résultat indique que la protéine La détectée en Western-blot dans les extraits α -La5 (moins de 1% du taux initial) et qui ne peut être éliminée par des immunodéplétions supplémentaires, n'est probablement pas fonctionnelle (Fig. 24A).

Rappelons que si la protéine La est nécessaire au relâchement du transcrit naissant, une réaction de transcription effectuée dans un extrait α -La5 en absence d'héparine (= plusieurs tours de transcription) doit produire le même nombre de transcrits que celui obtenu avec un seul tour de transcription. Pour vérifier cette hypothèse, les mêmes expériences que précédemment ont été réalisées avec des extraits PI5 et α -La5 dans des conditions qui permettent les évènements de réinitiation, c'est à dire en absence d'héparine (Fig. 24B et 27A). La quantité de transcrits synthétisés dans ces extraits est là encore similaire puisque 30.83 fmoles d'ARN sont produites dans les extraits PI5 contre 28.82 fmoles d'ARN dans les extraits α -La5. Ces valeurs correspondent à une augmentation du nombre de transcrits d'un facteur compris entre 24 et 29 si l'on compare un tour et plusieurs tours de transcription (Fig. 27B). Alors qu'environ 30% des précurseurs synthétisés dans l'extrait PI5 sont liés à la protéine La endogène, ceux synthétisés dans l'extrait α -La5 ne le sont qu'après addition de la protéine recombinante. De plus, l'addition de protéine La dans les extraits PI5 ou α -La5 n'augmente pas le nombre de transcrits synthétisés (Fig. 24B, comparez les pistes i et j).

L'ensemble de ces résultats montre qu'un extrait déplété en protéine La est capable d'effectuer plusieurs tours de transcription au même titre qu'un extrait normal suggérant que La n'est pas un facteur de relâchement des transcrits synthétisés par Pol III.

Figure 24: Comparaison du nombre de transcrits synthétisés en un tour ou en plusieurs tours de transcription dans des extraits déplétés en protéine La.

24A: Western-blot pour estimer la quantité de La dans 3 μ l d'extrait S-100 non traités (NT), dans 3 μ l d'extrait S-100 traités 5 fois successivement avec du sérum pré-immun (PI5) ou dans 3 μ l d'extrait S-100 traités 5 fois successivement avec du sérum immun α -La (α -La5). En comparaison, l'équivalent de 10%, 5% ou 1% de 3 μ l d'extrait S-100 non traités ont été chargé sur le gel 12.5% SDS-polyacrylamide. Après transfert des protéines sur membrane de nylon, cette dernière est incubée avec des anticorps de lapin α -La dilués au 1/250ème, puis avec anticorps de chèvre anti-lapin dilué au 1/10000ème, et enfin avec un substrat chemiluminescent AMPPD dilué au 1/100ème. La membrane est autoradiographiée 2mn à température ambiante.

24B: 400 μ l d'extraits S-100 sont passés sur une mini-colonne de séphadex G-50 et traités 5 fois successivement avec du sérum pré-immun (PI5) ou immun α -La (α -La5), puis concentrés jusqu'à 100 μ l par ultrafiltration. Les complexes de transcription sont formés en incubant 180mn à 20°C, 10 μ l d'extrait et 10ng de plasmide codant le gène d'ARNtPhe dans 20 μ l final en présence d'ATP et de MgCl₂. Après cette incubation, 50ng de précurseurs d'ARNt P2 synthétisé par l'ARN T7 polymérase sont ajoutés pour mobiliser la protéine La endogène résistante à l'immunodéplétion. En même temps est ajouté un mélange contenant les sels, le MgCl₂, les nucléotides dont l' α -³²P-GTP nécessaires à la transcription (a à l).

a à f: 300 μ g/ml final d'héparine sont ajoutés pour réaliser un tour de transcription.

e, f, k et l: réactions réalisées en présence de 500ng de protéine La recombinante purifiée (+ La).

Les réactions sont arrêtées par un excès d'EDTA ajouté après 30s (a, g), 2mn (b, h) ou 5mn (c à f, i à l) d'élongation. Pour les réactions réalisées en présence de La recombinante, 50% de la réaction est directement chargé sur le gel et 50% est soumis à une immunoprécipitation avec des anticorps de lapin α -La pendant 1h à 4°C (IPP). Les ARNs immunoprécipités ainsi que les produits de transcription sont analysés sur gel dénaturant 12% polyacrylamide-7M urée. Le gel est fixé, séché et autoradiographié la nuit à -70°C avec un écran SE8 (film X-AR). Le gel est également analysé par densitométrie et les résultats de cette analyse sont regroupés dans les figures 25 à 27.

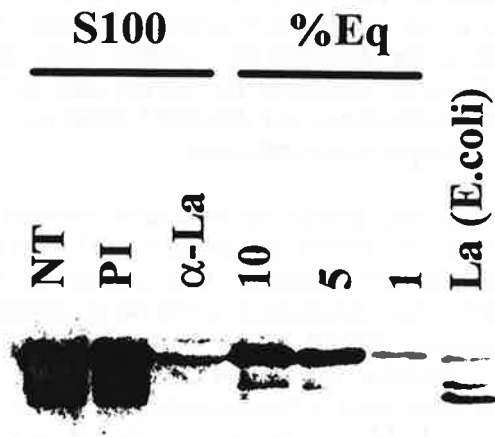


Figure 24A

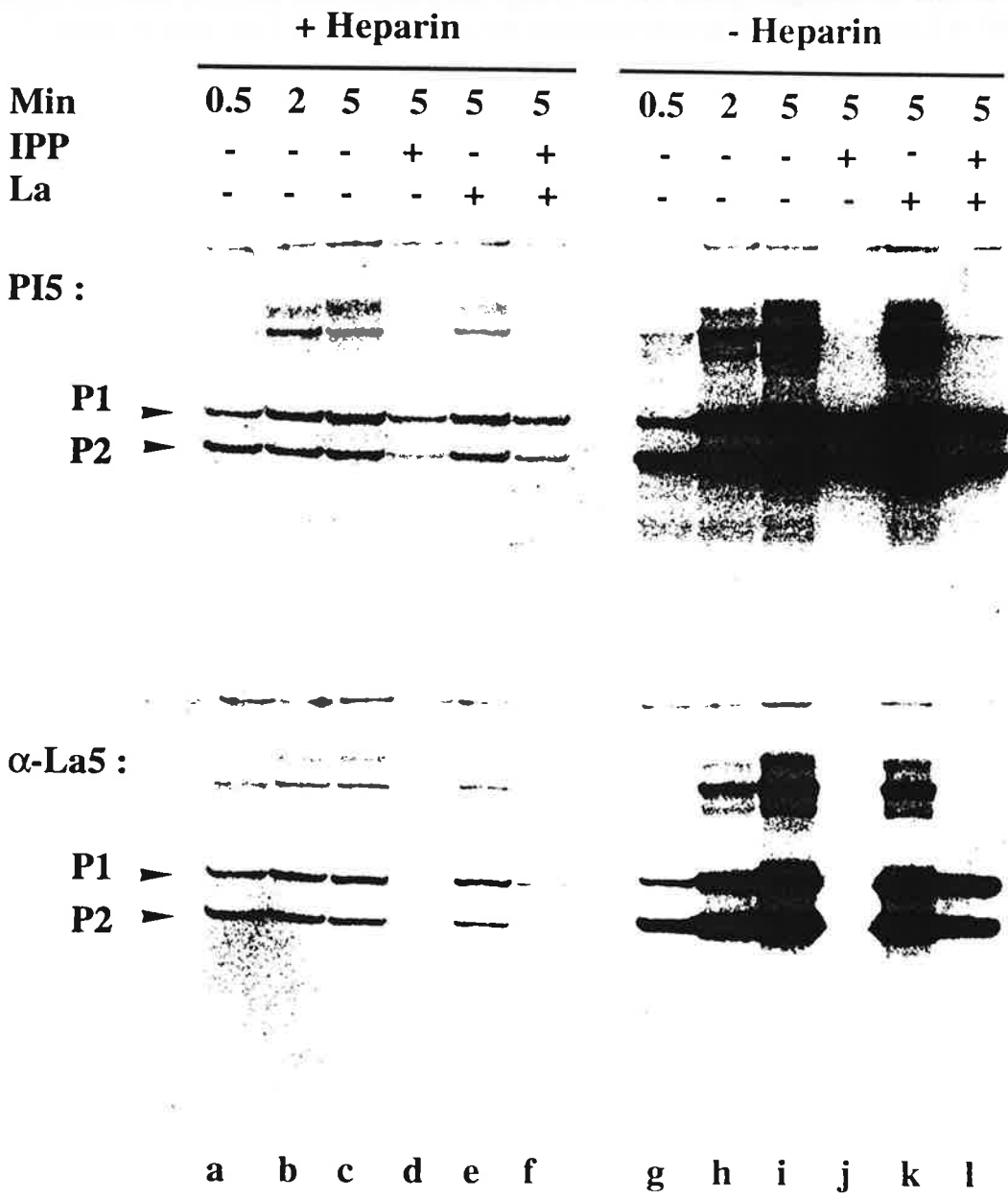


Figure 24B

Figure 25: Synthèse des précurseurs P1 et P2 dans un simple tour de transcription.

Le gel décrit dans la figure 24 a été analysé au phosphorimager et l'intensité des bandes correspondant aux transcrits précurseurs a été déterminée. Ainsi, le nombre de transcrits P1 et P2 synthétisés en un tour de transcription dans des extraits traités 5 fois successivement avec du sérum pré-immun (PI5) ou immun α -La (α -La5) a pu être estimé. Les graphiques reportent le taux de synthèse des ARNs P1 et P2 séparément ainsi que le taux de synthèse global (P1+P2) dans des extraits non déplétés (PI5) ou déplété en protéine La (α -La5) en fonction du temps de transcription (0.5mn, 2mn et 5mn).

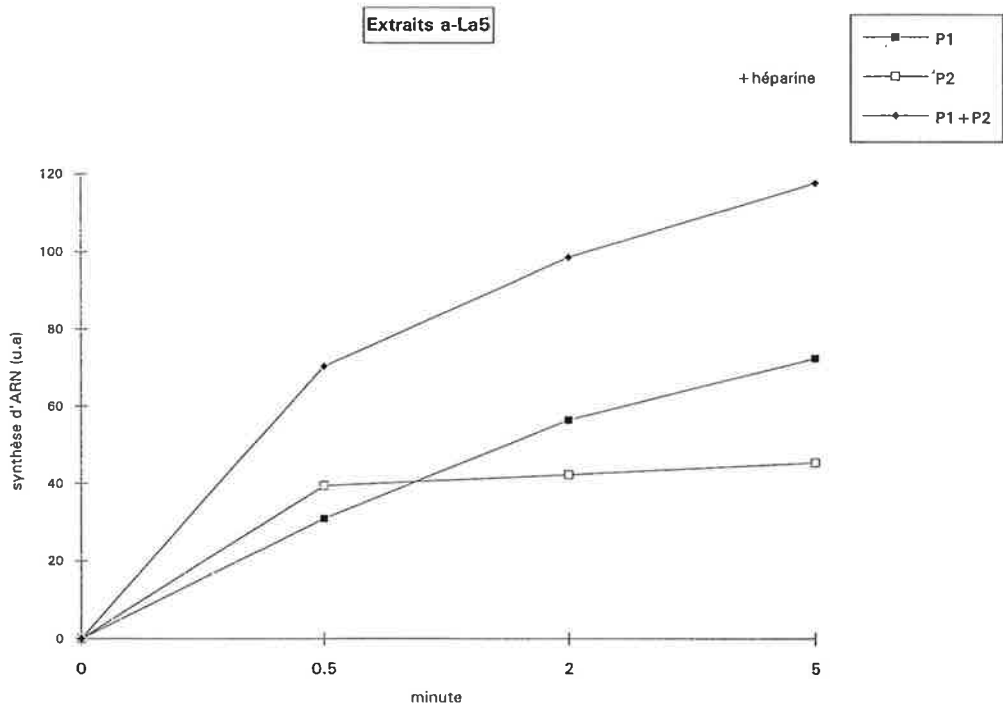
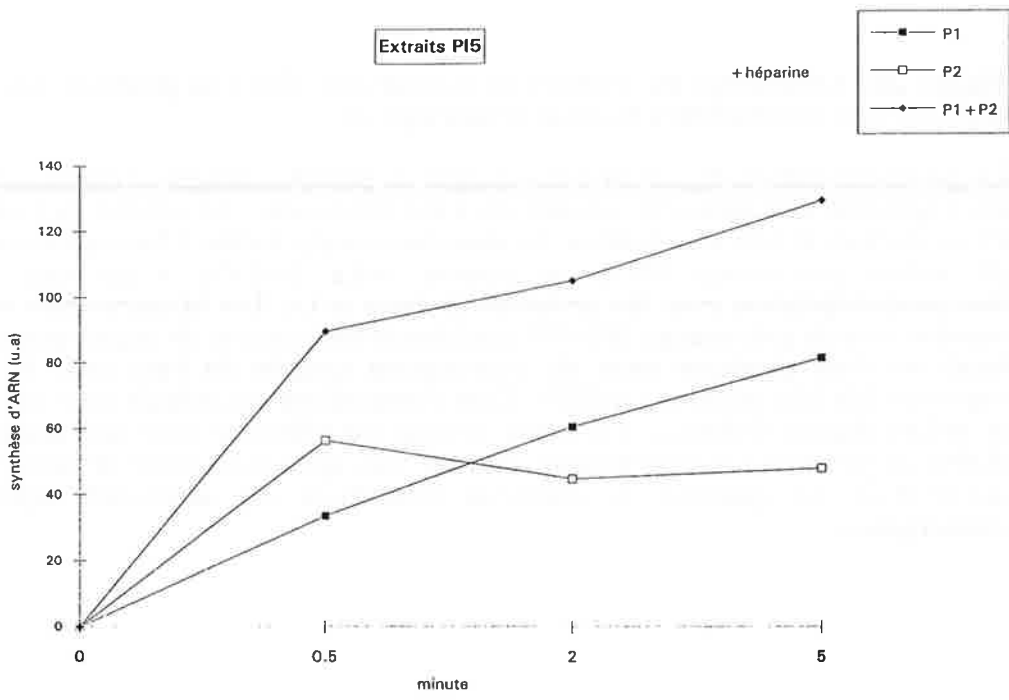


Figure 25

Figure 26: Estimation du nombre de précurseurs liés à la protéine La, synthétisés dans un tour ou plusieurs tours de transcription.

Le gel décrit dans la figure 24 a été analysé au phosphorimager et l'intensité des bandes correspondant aux transcrits précurseurs a été déterminée. Le nombre de transcrits P1 et P2 synthétisés et liés à la protéine La dans des extraits traités 5 fois successivement avec du sérum pré-immun (PI5) ou immun α -La (α -La5) a pu être estimé par immunoprécipitation avec des anticorps de lapin α -La. Les histogrammes comparent le nombre total de précurseurs (P1+P2) synthétisés dans un tour de transcription (graphe du haut) ou dans plusieurs tours de transcription (graphe du bas) avec la quantité de transcrits liés à la protéine La (IPP). Cette comparaison est réalisée avec des extraits PI5 et α -La5 décrits ci-dessus. La même analyse est effectuée avec des extraits auxquels 500ng de protéine La recombinante purifiée sont ajoutés en début de réaction (PI5+La, α -La5+La). La quantité de transcrits synthétisés est déterminée après 5mn de transcription.

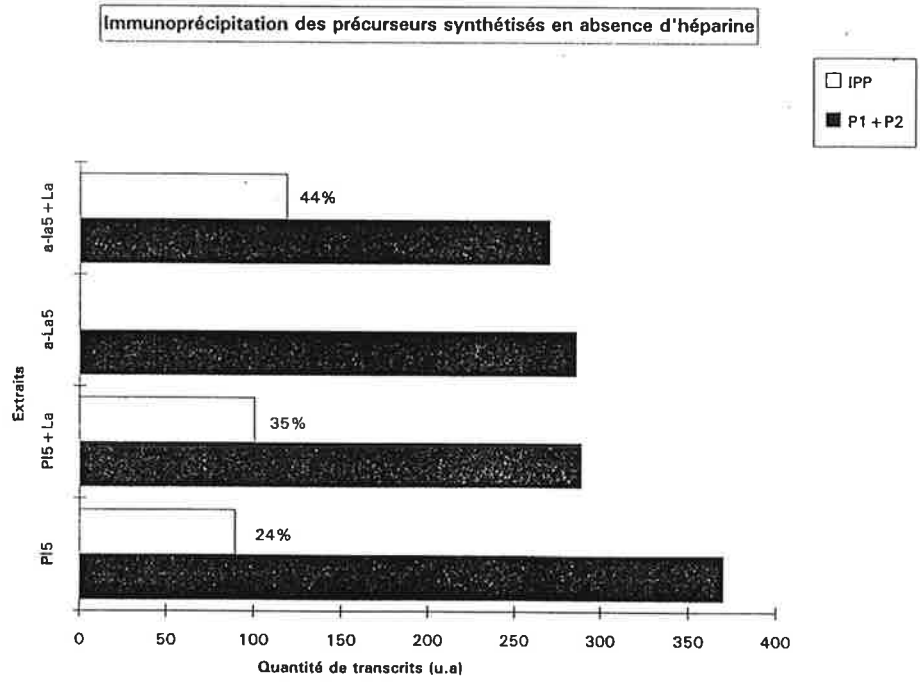
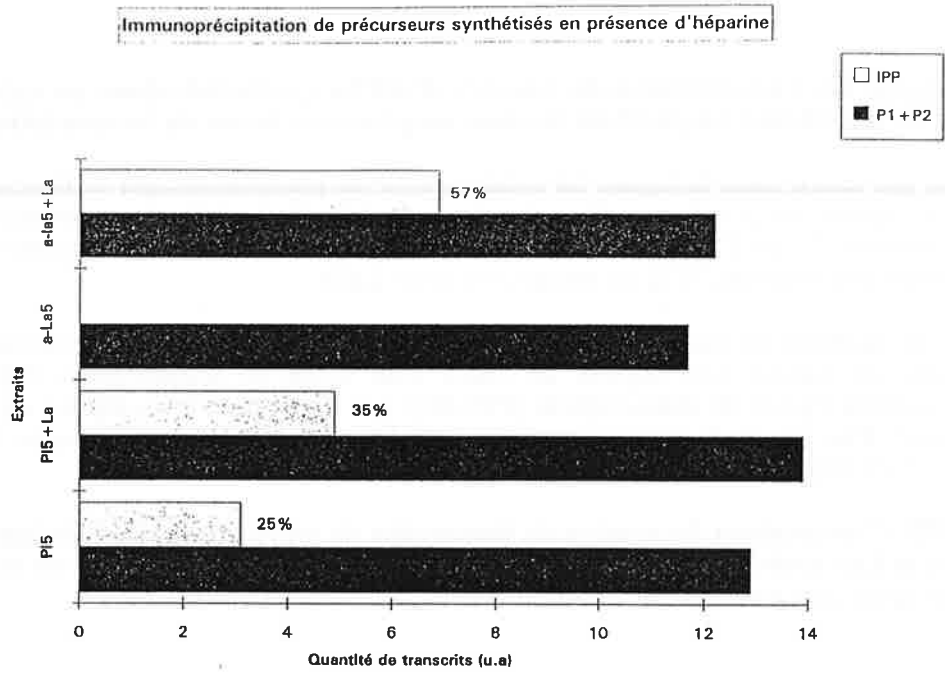


Figure 26

Figure 27: Comparaison du nombre d'ARNs synthétisés dans un extrait déplété ou non en protéine La pendant un tour ou plusieurs tours de transcription.

Le gel décrit dans la figure 24 a été analysé au phosphorimager et l'intensité des bandes correspondant aux transcrits précurseurs a été déterminée pour estimer le nombre de transcrits P1 et P2 synthétisés dans des extraits traités 5 fois successivement avec du sérum pré-immun (PI5) ou immun α -La (α -La5).

27A: quantité de transcrits synthétisés après 0.5mn, 2mn ou 5mn de transcription à 20°C dans un extrait non déplété au cours d'un cycle de transcription (PI5+Hép.) ou de plusieurs cycles de transcription (PI5-Hép.) et dans un extrait déplété en protéine La au cours d'un cycle de transcription (α -La5+Hép.) ou de plusieurs cycles de transcription (α -La5-Hép.).

27B: Comparaison du nombre de femtomoles de transcrits synthétisés dans un extrait PI5 ou α -La5 après 5mn de transcription en permettant (sans héparine) ou en inhibant (avec héparine) les évènements de réinitiation.

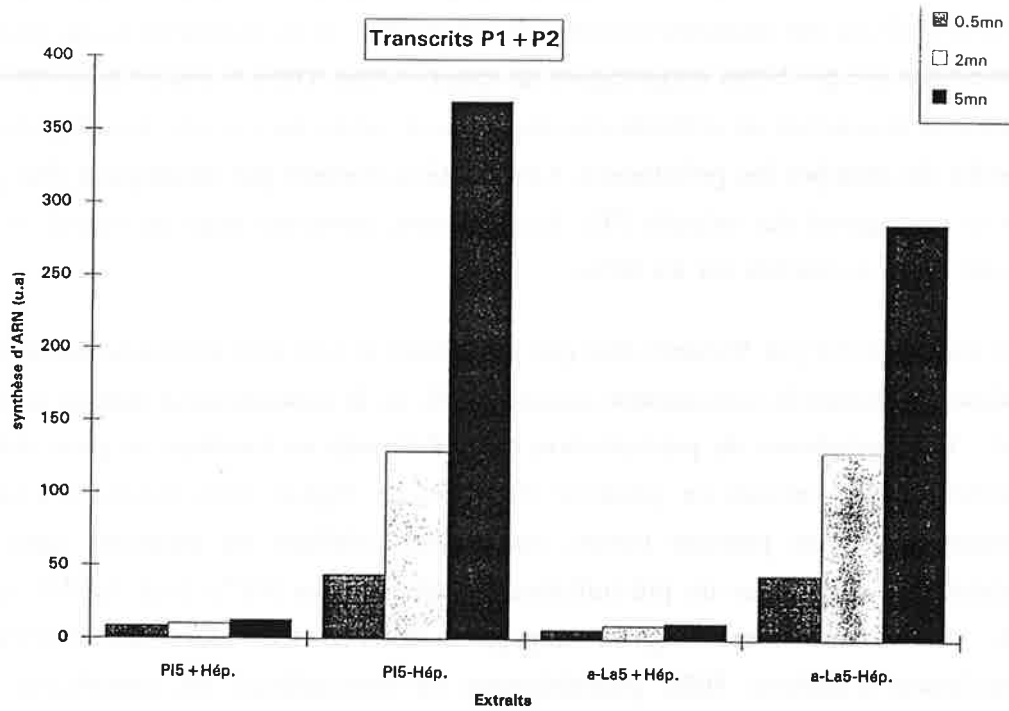


Figure 27A

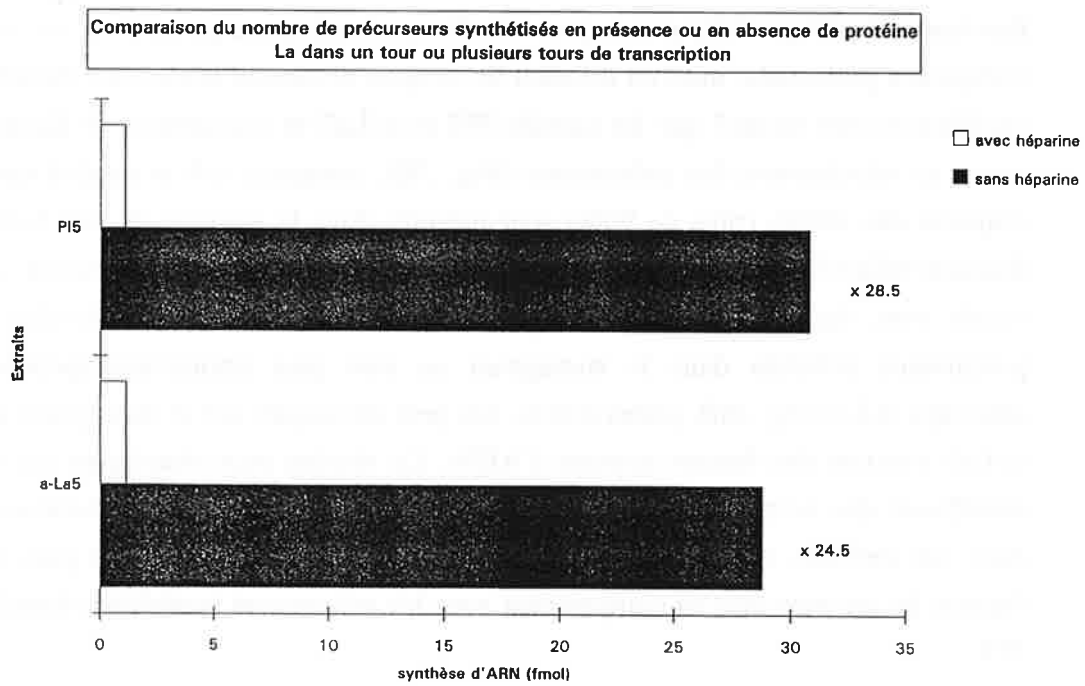


Figure 27B

Afin de confirmer ce dernier résultat, des expériences de transcription dans les extraits PI5 et α -La5 ont été réalisées en utilisant une matrice ADN biotinylée à une extrémité et immobilisée sur des billes magnétiques de streptavidine. Dans le cas où la protéine La est réellement nécessaire au relâchement du transcrit, seuls les extraits non déplétés seront capables de relâcher les précurseurs. Ces derniers doivent par conséquent être présents dans le surnageant des extraits PI5. Au contraire, transcrits dans un extrait α -La5, ils doivent rester accrochés sur les billes.

Nous avons vérifié par Western-blot que les extraits α -La5 sont suffisamment déplétés en protéine La puisqu'ils contiennent moins de 1% de la concentration initiale de La (Fig. 28A). Les complexes de pré-initiation ont été formés en incubant le gène d'ARNtPhe immobilisé avec l'extrait en présence d'ATP et de MgCl₂ deux heures à température ambiante. Dans un premier temps, nous avons réalisés les réactions sans rinçage préalable des complexes de pré-initiation en ajoutant les NTPs dont l' α -³²P-GTP. En effet, nous avons observé qu'un rinçage à 200mM KCl diminuait l'efficacité de transcription d'environ 30%, probablement en déstabilisant les complexes de pré-initiation (Fig. 28B, comparez les pistes a et e). Cependant, en absence de rinçage, une faible proportion de précurseurs synthétisés dans les extraits α -La5 sont immunoprécipités par les anticorps α -La, indiquant que la protéine endogène restante est fonctionnelle (Fig. 28B, pistes j et k). Nous avons donc procédé à un rinçage des complexes préformés, mais en utilisant un tampon contenant seulement 70mM KCl. Ces expériences ont montré que les extraits PI5 et α -La5 se comportent de façon identique quant au relâchement des précurseurs (Fig. 28B, comparez e-h et m-p) à savoir que la majorité des ARNs (plus de 90%) sont présents dans le surnageant c'est à dire dans la fraction relâchée. Si les complexes de pré-initiation formés dans un extrait α -La5 sont rincés avec du tampon de transcription avant l'addition des nucléotides, alors les précurseurs relâchés dans le surnageant ne sont plus immunoprécipitables par les anticorps α -La (Fig. 28B, pistes n et o). On peut remarquer que le surnageant des extraits α -La5 contient des formes matures d'ARNt. Ce résultat peut s'expliquer par un rinçage insuffisant des complexes. En effet, s'il demeure une activité de maturation résiduelle dans ces extraits, les précurseurs qui ne peuvent être liés à La sont plus sensibles à l'action de ces enzymes en comparaison avec les précurseurs synthétisés dans les extraits PI5.

Ces résultats indiquent que la protéine La de xénope n'est pas nécessaire au relâchement du transcrit.

Figure 28: Tanscription du gène d'ARNtPhe immobilisé sur des billes magnétiques.

28A: Western-blot pour estimer la quantité de La dans 2µl d'extrait S-100 non traités(NT), dans 2µl d'extrait S-100 traités 4 fois successivement avec du sérum pré-immun (PI) ou dans 2µl d'extrait S-100 traités 4 fois successivement avec du sérum immun α-La (α-La). En comparaison, l'équivalent de 10%, 5% ou 1% de 2µl d'extrait S-100 non traités a été chargé sur le gel 12.5% SDS-polyacrylamide. Après transfert des protéines sur membrane de nylon, cette dernière est incubée avec des anticorps de lapin α-La dilués au 1/250ème, puis avec anticorps de chèvre anti-lapin dilué au 1/10000ème, et enfin avec un substrat chemiluminescent AMPPD dilué au 1/100ème. La membrane est autoradiographiée 2mn à température ambiante.

28B: 300µl d'extrait S-100 contenant 300µg/ml de BSA sont traités 4 fois successives avec du sérum pré-immun (PI) ou avec du sérum immun α-La (α-La), puis concentrés jusqu'à 100µl final. Pour chaque réaction, l'équivalent de 15µl de suspension de billes contenant le gène d'ARNtPhe immobilisé est incubé avec 10µl d'extrait dans 20µl final d'un tampon contenant 3.5mM MgCl₂ et 400µM ATP et soumis à rotation 120mn à RTC pour former les complexes de transcription. +R indique qu'après cette incubation, les complexes sont rincés avec 300µl de tampon 70mM KCl, 20mM Hépès-KOH pH7.9, 5mM MgCl₂, 10% glycérol, et 250µg/ml BSA. Lorsque les complexes sont formés, un mélange réactionnel apportant l'énergie (créatine phosphate, rNTPs), les sels et l'α-32P-GTP est ajouté pour permettre la transcription. Après 1h d'incubation à 20°C, sont analysés les ARNs contenus dans une réaction totale (T), ceux présents dans le surnageant (S) ou ceux qui restent fixés aux billes (P). Les ARNs contenus dans le surnageant sont immunoprécipités par des anticorps de lapin α-La (Im) et l'ensemble des ARNs est extrait au phénol, précipités et chargés sur un gel dénaturant 12% polyacrylamide-7M urée.

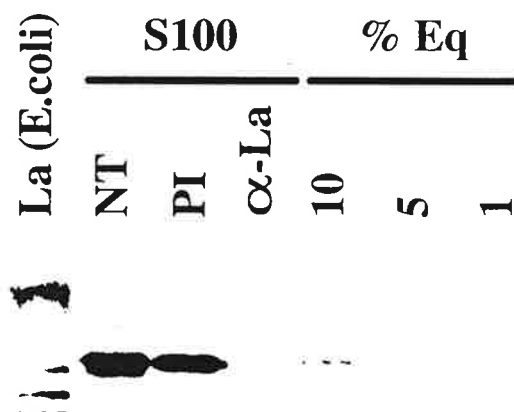


Figure 28A

Figure 28: Transcription du gène d'ARNtPhe immobilisé sur des billes magnétiques.

28A: Western-blot pour estimer la quantité de La dans 2µl d'extrait S-100 non traités(NT), dans 2µl d'extrait S-100 traités 4 fois successivement avec du sérum pré-immun (PI) ou dans 2µl d'extrait S-100 traités 4 fois successivement avec du sérum immun α-La (α-La). En comparaison, l'équivalent de 10%, 5% ou 1% de 2µl d'extrait S-100 non traités a été chargé sur le gel 12.5% SDS-polyacrylamide. Après transfert des protéines sur membrane de nylon, cette dernière est incubée avec des anticorps de lapin α-La dilués au 1/250ème, puis avec anticorps de chèvre anti-lapin dilué au 1/10000ème, et enfin avec un substrat chemiluminescent AMPPD dilué au 1/100ème. La membrane est autoradiographiée 2mn à température ambiante.

28B: 300µl d'extrait S-100 contenant 300µg/ml de BSA sont traités 4 fois successives avec du sérum pré-immun (PI) ou avec du sérum immun α-La (α-La), puis concentrés jusqu'à 100µl final. Pour chaque réaction, l'équivalent de 15µl de suspension de billes contenant le gène d'ARNtPhe immobilisé est incubé avec 10µl d'extrait dans 20µl final d'un tampon contenant 3.5mM MgCl₂ et 400µM ATP et soumis à rotation 120mn à RTC pour former les complexes de transcription. +R indique qu'après cette incubation, les complexes sont rincés avec 300µl de tampon 70mM KCl, 20mM Hépès-KOH pH7.9, 5mM MgCl₂, 10% glycérol, et 250µg/ml BSA. Lorsque les complexes sont formés, un mélange réactionnel apportant l'énergie (créatine phosphate, rNTPs), les sels et l'α-³²P-GTP est ajouté pour permettre la transcription. Après 1h d'incubation à 20°C, sont analysés les ARNs contenus dans une réaction totale (T), ceux présents dans le surnageant (S) ou ceux qui restent fixés aux billes (P). Les ARNs contenus dans le surnageant sont immunoprécipités par des anticorps de lapin α-La (Im) et l'ensemble des ARNs est extrait au phénol, précipités et chargés sur un gel dénaturant 12% polyacrylamide-7M urée.

Figure 28A

PI extract

α -La extract

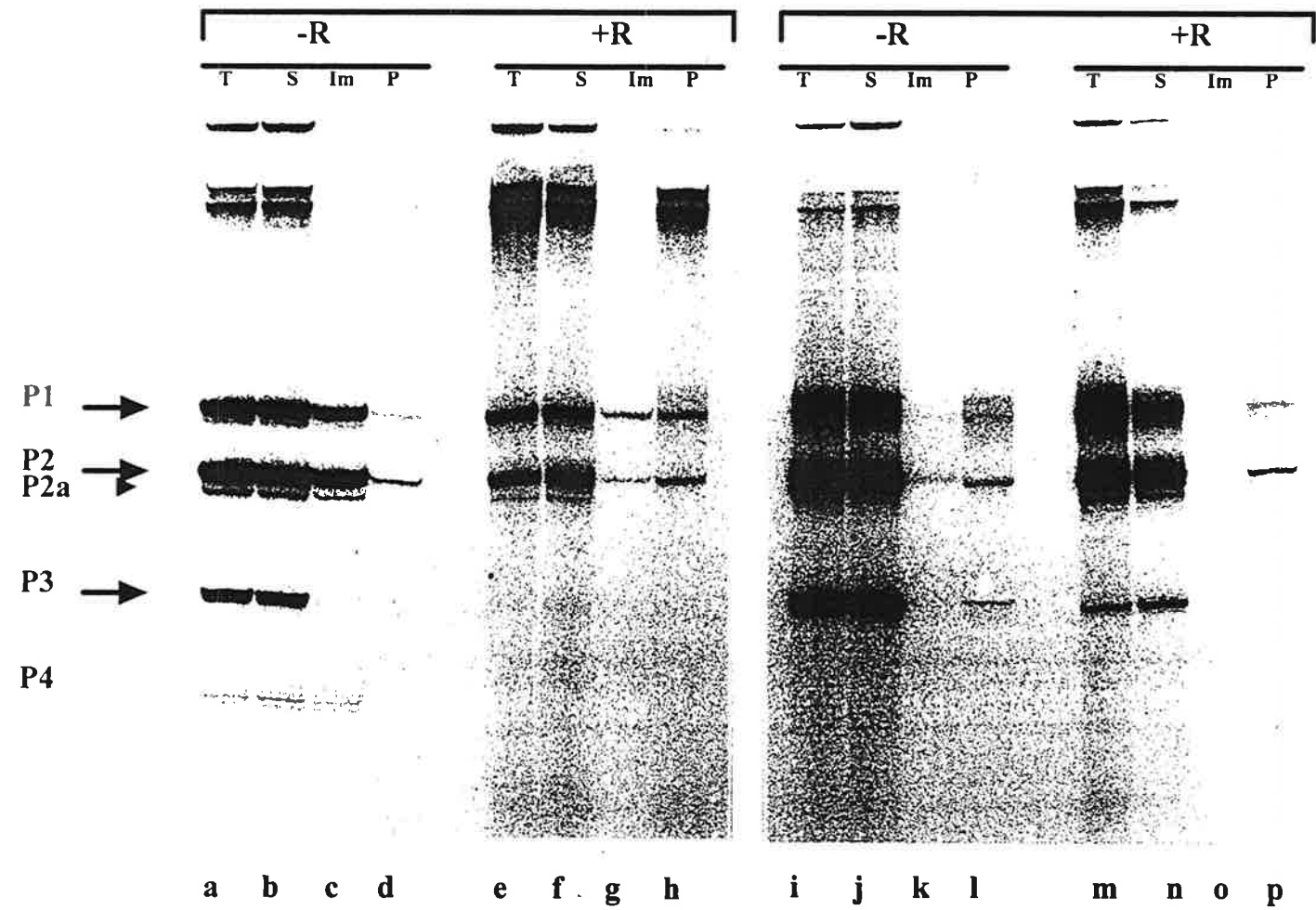


Figure 28B

***PARTIE 2: LA PROTEINE $L\alpha$ DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

A: UNE PROTEINE QUI LIE PREFERENTIELLEMENT UN TRANSCRIT DONT L'EXTREMITÉ 3' SE TERMINE PAR LA SEQUENCE UUUU(OH) EXISTE CHEZ S. CEREVISIAE.

Nous avons montré dans la section précédente que la protéine La de xénope n'intervient pas dans les processus de terminaison de la transcription par Pol III, du moins comme l'a suggéré un précédent modèle. Rappelons que ce modèle proposait que La était nécessaire à la fois à la synthèse des U terminaux et au relâchement du transcrit naissant. Désormais la question reste ouverte quant à la fonction de la protéine La. Il existe peu d'évidence aujourd'hui pour impliquer cette protéine dans la synthèse des transcrits Pol III. Qu'en est-il de la maturation des transcrits ou de leur transport nucléocytoplasmique? En fait, peu de données existent dans la littérature qui reflètent l'étude de l'implication de La dans ces mécanismes. Les systèmes d'étude *in vitro* tels que les extraits cellulaires ou *in vivo* tels que les microinjections dans les oocytes de xénope ne correspondent pas forcément à des méthodes de choix. Par contre la levure représente un système extrêmement puissant car il permet la réalisation d'études aussi bien génétiques que biochimiques. A ce titre, il devient un organisme de choix non seulement pour l'isolement de nouveaux gènes mais aussi pour l'étude fonctionnelle des produits des gènes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à savoir si un homologue de la protéine La, qui est relativement bien conservée des protozoaires jusqu'à l'homme, existe aussi chez la levure *S. cerevisiae*. Plusieurs études ont déjà été réalisées dans cet objectif, mais elles n'ont jamais permis l'identification d'une telle protéine. En particulier, il n'a jamais été possible de détecter une réaction croisée entre la protéine La humaine et un homologue chez la levure. Une comparaison de séquences protéiques entre trois protéines La issues d'organismes différents montre que la protéine de xénope est plus distante des protéines humaine ou bovine que ne le sont ces deux dernières protéines entre elles (176). A titre d'indications, la protéine La humaine est homologue à 96% avec la protéine bovine tandis que la protéine de xénope présente une homologie de 75% et 74%, respectivement avec les protéines humaine et bovine. Nous avons tenté de tirer avantage de cette observation en testant les séras polyclonaux de lapin α -La dirigés contre la protéine de xénope, l'idée étant la suivante: puisque la protéine La de xénope est moins homologue que les autres protéines La entre elles, alors peut-on espérer qu'elle partage un ou plusieurs épitopes antigéniques avec la protéine La de levure?

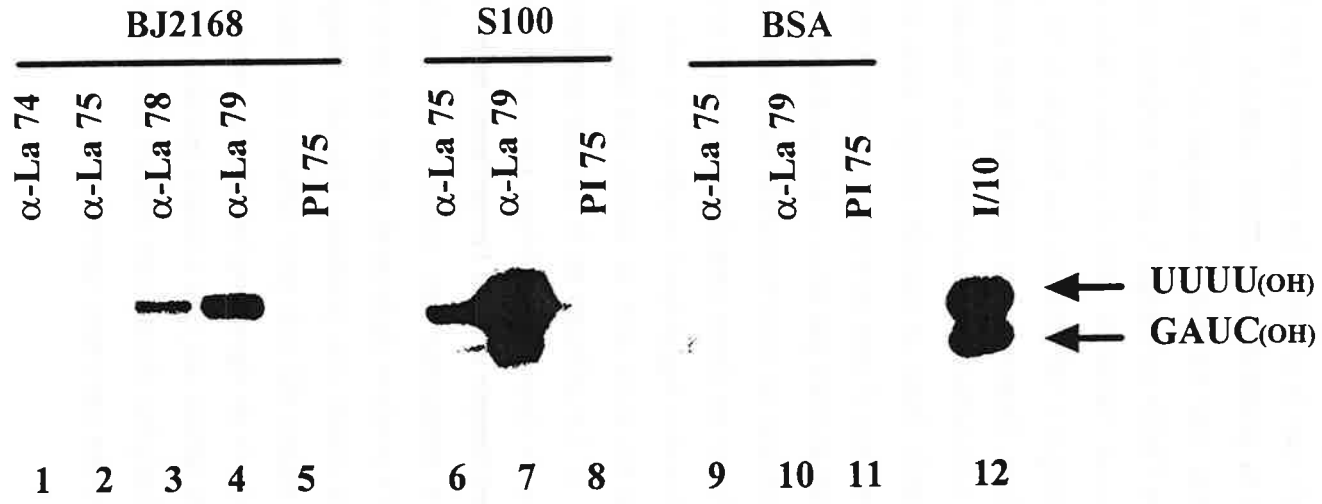
Pour tester cette hypothèse, un extrait protéique préparé à partir d'une souche déficiente en protéases (BJ2168) a été incubé avec les précurseurs d'ARNt UUUU(OH) et

GAUC(OH) décrits dans la partie 1. Les particules ribonucléoprotéiques ont ensuite été immunoprécipitées avec les quatre séras α -La disponibles ainsi qu'avec le sérum pré-immun. Après extraction phénolique, la nature des ARNs immunoprécipités a été analysée par électrophorèse sur un gel dénaturant 6% polyacrylamide-7M urée (Fig. 29). Ces expériences montrent que tous les séras α -La précipitent préférentiellement le transcrit UUUU(OH) contrairement au sérum pré-immun qui ne précipite aucun précurseurs (Fig. 29, pistes 1 à 5). Cependant, les séras α -La 78 et 79 fournissent un signal beaucoup plus important que les séras α -La 74 et 75 (Fig. 29, comparez les pistes 1 et 2 avec 3 et 4). De même, lorsque la protéine La de l'extrait S-100 est immunoprécipitée par les différents séras, on peut remarquer que les séras α -La 74 et 75 sont moins réactifs que les séras α -La 78 et 79 (Fig. 29, pistes 6 à 8) indiquant que les titres en anticorps sont plus faibles pour les séras α -La 74 et 75 que ceux des séras α -La 78 et 79 ou que les déterminants antigéniques reconnus par les séras α -La 74 et 75 sont moins bien exposés que ceux reconnus par les séras α -La 78 et 79. Lorsque la BSA est utilisée en remplacement des extraits protéiques aucun précurseurs n'est précipité. Ces résultats indiquent que les anticorps α -La dirigés contre la protéine La de xénope reconnaissent dans l'extrait protéique de levure *S. cerevisiae* une protéine qui se caractérise comme étant l'homologue fonctionnelle de la protéine La, c'est à dire capable de lier de façon préférentielle un ARN qui se termine par la séquence UUUU(OH).

Figure 29: Immunoprécipitation par les anticorps α -La dirigés contre la protéine de xénope d'une protéine de *S.cerevisiae* capable de lier spécifiquement un ARN qui se termine par la séquence UUUU(OH).

6 μ l d'extrait protéique de levure *S.cerevisiae* (BJ2168) et 3 μ l d'extrait S-100 sont incubés 30mn à 0°C avec 100000cpm de chaque ARN précurseur UUUU(OH) et GAUC(OH). Dans les pistes 9 à 11, la BSA remplace les extraits protéiques. Les complexes RNP sont immunoprécipités 1h à 4°C avec les anti-séras de lapin dirigés contre la protéine de xénope (α -La 74, 75, 78 et 79) , ainsi qu'avec le sérum pré-immun (PI75). Les ARNs immunoprécipités sont analysés sur un gel dénaturant 6.8% polyacrylamide-7M urée. Le gel est autoradiographié la nuit à -70°C avec un écran SE8.

Figure 29



B: CLONAGE DU GENE YLA1 CODANT LA PROTEINE La DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

Le fait de posséder des anticorps capables de reconnaître en solution une protéine qui présente les mêmes propriétés que la protéine La équivaut à posséder un outil essentiel pour cloner le gène codant la protéine LaY. Cette méthode de clonage implique de transformer des bactéries avec une banque génomique d'expression où les fragments génomiques sont insérés dans l'ADN du phage λ pour produire les protéines associées à ces fragments. Chez *S.cerevisiae*, moins de 10% des gènes contiennent des introns, c'est pourquoi, une banque génomique a été utilisée. La banque a été gracieusement offerte par le Dr G. Pavaracini (Glaxo, Genève). Les protéines ainsi produites par *E.coli* sont transférées sur des filtres de nitrocellulose et soumises à un Western-blot pour révéler la présence de la protéine d'intérêt. Dans un premier temps, nous avons testé la réactivité des séra α -La en Western-blot car il peut arriver qu'un sérum reconnaisse une protéine sous sa forme native (en solution) mais pas sous sa forme dénaturée (après migration sur gel SDS et transfert sur membrane de nitrocellulose). Cette série d'expériences a montré que seul le sérum α -La 75 donne un signal spécifique puisqu'il reconnaît principalement une protéine de poids moléculaire légèrement supérieur à celui de la protéine La de xénope (Fig. 30, pistes 4 à 6), alors que le sérum pré-immun ne reconnaît aucune protéine (Fig. 30, pistes 1 à 3). Le criblage de la banque génomique a donc été réalisé avec le sérum α -La 75 mais au deuxième criblage nous nous sommes aperçu que les résultats étaient inexploitable compte tenu de l'importance du bruit de fond. En effet, la protéine La ayant servie à immuniser les lapins a été produites par *E.coli*. Par conséquent, le sérum α -La 75 contient également, outre les anticorps contre la protéine La, d'autres anticorps dirigés contre des protéines d'*E.coli*. Malgré l'utilisation dans la solution d'hybridation d'un extrait d'*E.coli* pour saturer ces anticorps non spécifiques, nous n'avons pas réussi à obtenir de signal exploitable. La seule possibilité, sans doute, était l'immunopurification du sérum sur une colonne portant la protéine La issue d'un extrait S-100. La quantité d'antigène devant être utilisée pour ce genre de méthode étant très importante, nous avons choisi une autre approche.

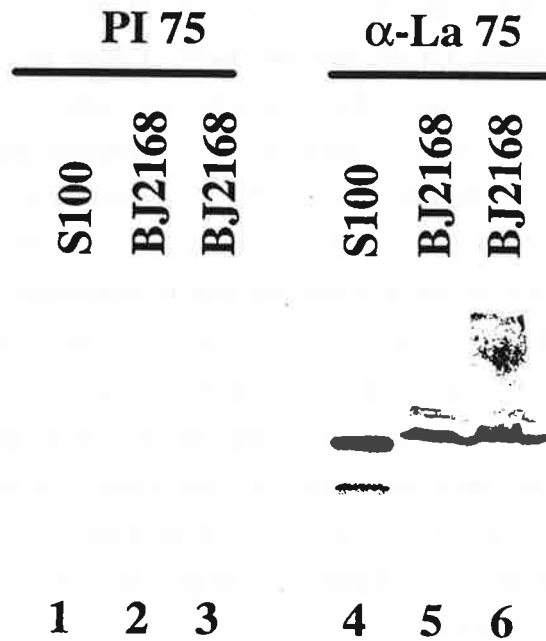


Figure 30: Western-blot d'un extrait de levure avec le sérum α -La 75.

2 μ l d'extrait S-100 (6mg/ml de protéines, pistes 1 et 4), 5 μ l d'extrait de levure BJ2168 (5mg/ml de protéines, pistes 2 et 5) et 10 μ l d'extrait de levure BJ2168 (pistes 3 et 6) sont chargés sur un gel SDS-PAGE 12.5%, transférés sur membranes de nylon et hybridés avec le sérum pré-immun PI75 (pistes 1 à 3) ou immun α -La 75 (pistes 4 à 6). La liaison antigène-anticorps est révélée par hybridation avec un anticorps de chèvre anti-lapin marqué à la phosphatase alcaline dilué au 1/10000 me, puis par incubation 15mn à 37 C avec le substrat chemiluminescent AMPPD dilué au 1/100 me. La membrane est exposée 2mn à température ambiante avec un film X-AR.

Cette approche consiste à surexprimer *in vivo*, dans *S. cerevisiae*, la protéine La hétérologue de xénope dans l'espoir de déstabiliser l'équilibre interne de la levure et par conséquent d'observer une différence phénotypique avec la souche sauvage. Pour cela, la souche FY104 a été transformée avec un plasmide 2 μ portant le marqueur de sélection URA et codant la protéine La de xénope (LaWT) sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose. Une deuxième construction codant pour la protéine La non fonctionnelle (La Δ 106-184) et qui correspond à une délétion interne de la région RNP1, a également été introduite dans la souche FY104. Aucun phénotype particulier n'a été observé sur milieu riche entre les cellules exprimant la protéine La hétérologue et les cellules transformées avec le vecteur seul ou non transformées. Nous avons vérifié par Western-blot la validité des constructions à savoir si la protéine La de xénope est réellement synthétisée. L'expression de La étant réprimée en présence de glucose et induite en présence de galactose (Fig. 31), nous avons conclu que la surexpression de la protéine La de xénope dans la levure *S. cerevisiae* n'induit pas de changement phénotypique. Par conséquent, les essais de complémentation à l'aide d'une banque génomique pour restaurer un phénotype sauvage dans les cellules surexprimant la protéine hétérologue, sont exclus.

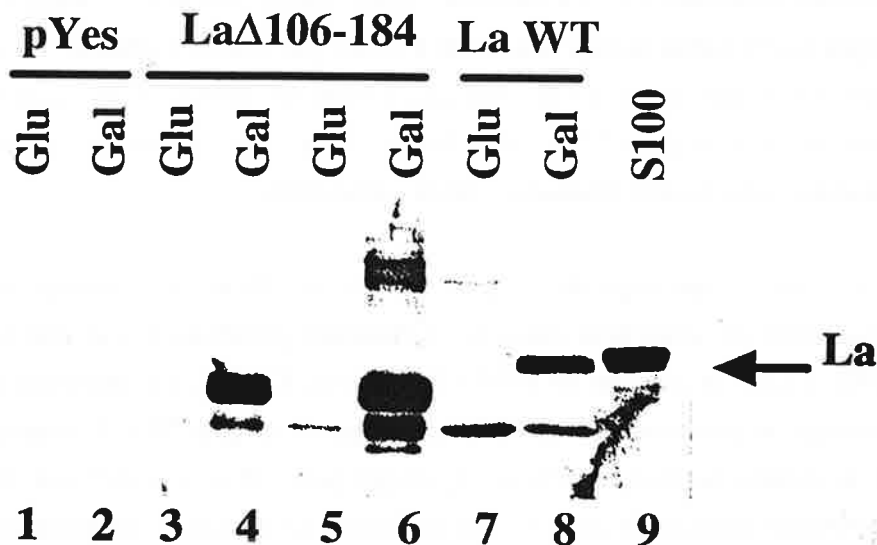


Figure 31: Western-blot des levures transformées avec les plasmides LaWT et La Δ 106-184 et cultivées en présence de glucose ou de galactose.

Les cellules transformées avec le plasmide control (pYes) ou le plasmide exprimant la protéine La de xénope sauvage (LaWT) ou mutée non fonctionnelle (La Δ 106-184) sont cultivées la nuit à 30°C, 220rpm dans un milieu sélectif contenant du glucose. Ces cultures en phase stationnaire sont utilisées pour ensemencer à une D.O_{600nm}=0.4, 2ml de milieu contenant soit 2% glucose (Glu), soit 2% galactose (Gal). Ces nouvelles cultures sont incubées jusqu'à une D.O_{600nm}=2. Les cellules sont traitées comme décrit dans matériels et méthodes pour préparer un extrait protéique brut. L'équivalent en protéines de 5.10⁶ cellules (liges 1 à 4, 7 et 8) ou 1.10⁷ cellules (pistes 5 et 6) ainsi que 2 μ l d'extrait S-100 est séparé par SDS-PAGE 12.5%, transféré sur membranes de nylon et hybridé avec le sérum immun α -La 79 dilué au 1/250^{ème}. La liaison antigène-anticorps est révélée par hybridation avec un anticorps de chèvre anti-lapin marqué à la phosphatase alcaline dilué au 1/10000^{ème}, puis par incubation 15mn à 37°C avec le substrat chemiluminescent AMPPD dilué au 1/100^{ème}. La membrane est exposée 1mn à température ambiante avec un film X-AR.

La troisième approche a consisté à identifier par Southern-blot le gène LaY en utilisant une sonde synthétisée à partir du cDNA de xénope. A partir de l'alignement des séquences des protéines La de xénope, humaine et bovine, une sonde couvrant l'extrémité carboxyl terminale de La a été choisie pour éviter de couvrir aussi les régions RNP pouvant donner de faux-positifs. Cette région présente 75% d'homologie entre les différentes protéines La et s'étend de l'acide aminé 304 à 428. Malgré la réalisation des rinçages à très faible stringence, nous n'avons pas réussi à détecter un signal significatif. L'autre sonde qui aurait pu être utilisée couvre les 100 premiers acides aminés de La et représente une région 95% homologue. Une telle recherche a déjà été effectuée auparavant sans succès (communication personnelle).

Enfin, nous avons reçu de la part du Dr B. Baum un courrier qui contenait une comparaison de séquences entre les différentes protéines La et une ORF X codée par l'ADNc YLA1 et publiée en 1993 (115). Cette ORF X est contenue dans un fragment génomique et positionnée tête bêche par rapport au gène SLC1, suppresseur d'un défaut dans la chaîne de biosynthèse des sphingolipides. Il s'est avéré que l'ORF X présentait une certaine homologie avec la région amino-terminale de la protéine La. Nous avons donc décidé d'isoler le gène codant l'ORF X et voir si le produit de ce gène correspond à la protéine identifiée dans le paragraphe A en se comportant fonctionnellement comme la protéine La. L'oligonucléotide SC-127 (5'CCAATGACGATGAGTCCAACG3') complémentaire à la séquence YLA1 (+946 à +966) a été utilisé pour cribler une banque génomique de *S. cerevisiae*. Cette fois encore, la banque nous a été fournie par le Dr. G. Pavaracini (Glaxo, Genève) sous la forme de plasmides déjà isolés et fixés sur des membranes de nylon. Ces plasmides centromériques portent le marqueur URA et le gène de résistance à l'ampicilline. La taille des fragments génomiques insérés varie entre 9 et 15 kb. La totalité des plasmides représente environ 3 fois le génome d'une levure haploïde. Au total, six clones positifs ont été identifiés et la digestion des ADN plasmidiques par différentes enzymes de restriction n'a révélé que deux profils différents. Un Southern-blot réalisé sur chacun de ces profils issus de la même digestion, hybride avec un fragment de taille identique suggérant qu'il s'agit du même gène. Un fragment génomique EcoRV-SphI d'environ 4 kb a finalement été inséré entre les sites XbaI et SphI du vecteur pGEM3 et séquencé pour compléter l'ORF X. La longueur de cette ORF a été déterminée comme égale à 832 bp et code une protéine de 275 acides aminés dont le poids moléculaire est estimée à 32.1 kDa (Fig. 32 et 33).

From: SACCHAROMYCES CEREVISIAE (YEAST);
 EUKARYOTA; PLANTAE; THALLOBIONTA; EUMYCOTA; HEMIASCOMYCETES;
 ENDOMYCETALES; SACCHAROMYCETACEAE.

	10	20	30	40	50	60
1	ATGTCTGAAA TACAGACTTT	AACCACAACA TTGGTGTGTG	AGAGGAGCAA TCTCCTCGTT	GAGAAACCAC CTCTTTGGTG	AATCAAGACG TTAGTTCTGC	TAATTCATTT ATTAAGTAAA
61	GCTGTGATTG CGACACTAAC	AATTTACTTC TTAAATGAGG	AGAAGTCTTG TCTTCAGAAC	GACAGATGTT CTGTCTACAA	TAAAGCAAGT ATTTCGTTCA	GGAATTCTAC CCTTAAGATG
121	TTTTCTGAAT AAAAGACTTA	TCAACTTTCC AGTTGAAAGG	ATATGACAGG TATACTGTCC	TTCTTGCGCA AAGAACGCGT	CAACAGCGGA GTTGTCGCCCT	AAAAAACGAT TTTTTTGCTA
181	GGATGGGTCC CCTACCCAGG	CCATCAGCAC GGTAGTCTGT	CATCGCCACA GTAGCGGTGT	TTCAACCGTA AAGTTGGCAT	TGAAGAAATA ACTTCTTTAT	TAGACCAAGT ATCTGGTCCAC
241	GATAAGGTTA CTATTCCAAT	TCGAAGCACT AGCTTCGTGA	ACGTAGTTCT TGCATCAAGA	GAAATTTTGG CTTTAAAACC	AAGTATCTGC TTCATAGACG	TGATGGAGAG ACTACCTCTC
301	AACGTCAAGA TTGCAAGTCT	GACGTGTTCC CTGCACAAGG	TTTGGACCTA AAACCTGGAT	ACTGCTGCCA TGACGACGGT	GAAATGCCAG CTTTACGGTC	AATTGAGCAA TTAACTCGTT
361	AACCAACGGA TTGGTTGCCT	CTTTGGCTGT GAAACCGACA	AATGAATTC TTACTTAAAG	CCACATGAGG GGTGTACTCC	ACGTTGAAGC TGCAACTTCG	TTCCCAAATT AAGGGTTTAA
421	CCAGAATTGC GGTCTTAAACG	AGGAGAAGTT TCCCTTTGAA	GGAAGCCTTT CCTTCGGAAA	TTCAAAAAAT AAGTTTTTTA	TAGGTGAAAT ATCCACTTTA	CAACCAAGTG GTTGGTTCAC
481	CGTTTGAGAA GCAAACTCTT	GAGATCACAG CTCTAGTGTG	AAACAAGAAA TTTGTCTTTT	TTAATGGTA AAATTACCAT	CGGTCTTGGT GCCAGAACCA	GGAATTTAAG CCTTAAATTC
				SC - 127		
541	ACAATTCAG TGTTAAGGTC	AATGTGAAGC TTACTACTCG	TTTTTTGAAA AAAAAACTTT	TCGTATTTCA AGCATAAGGT	ATGACGATGA TACTGCTACT	GTCCAAGGAA CAGGTTGCTT
601	ATTTTGTGAT TAAAACAGTA	ATGAAGGTAA TACTTCCATT	GAAACTGAGT CTTTGACTCA	GTTTTGACGA CAAACTGCT	AAAAACAGTT TTTTTGTCAA	TGATTTACAG ACTAAATGTC
661	AGAGAGGCGT TCTCTCCGGA	CGAAGTCCAA GCTTCAGGTT	AAACTTCAGC TTTGAAGTCG	GGTAGATCAA CCATCTAGTT	GATCCTTTAA CTAGGAAATT	CGGCCATAAG GCCGGTATTC
721	AAGAAAAACT TTCTTTTTGA	TGCCTAAATT ACGGATTTAA	CCCCAAAAAT GGGTTTTTTA	AAGAAGAANN TTCTTCTTNN	ACGGCAAGGA TGCCGTTCCCT	AGAGTCAAAA TCTCAGTTTT
781	GAGGACTCTT CTCCTGAGAA	CTGCCATTGC GACGGTAACG	CGATGACGAT GCTACTGCTA	GAGGAGCACA CTCCTCGTGT	AGGAGTGATT TCCTCACTAA	CTTGTGTTTC GAACACAAGG
841	TTCTGGTTCT AAGACCAAGA	CGTATCTCAT GCATAGAGTA	TATCATAGCA ATAGTATCGT	TATTAAGAAT ATAATTCTTA	ATATGTACTA TATACATGAT	ACATATGTAC TGTATACATG
901	TAAACAGAAA ATTTGTCTTT	CACAATATGA GTGTATACT	ATTACAACCTA TAATGTTGAT	ATACTATATT TATGATATAA	ATTTGTCTCC TAAACAGAGG	TTTTTTTATT AAAAAAATAA
961	AGTATTAATA TCATAATTTT	ATTACCGTTA TAATGGCAAT	CTGGTTAAAA GACCAATTTT	TGGAATACAG ACCTTATGTC	CTCATCCATT GAGTAGGTAA	TAAAAAATAA ATTTTTTTTT
1021	AAAAAATAGA TTTTTTATCT	ATAACAATAA TATTGTTATT	TTAAGCGAAA AATTCGCTTT	AAATGTTAAC TTTACAATTG	GAATATAATA CTTATATTAT	AATCGAATTTG TTAGCTAAAC
1081	TCCATTTTCA AGGTAAAAGT	T A				

Total number of bases is: 1091.
 DNA sequence composition: 399 A; 188 C; 209 G; 293 T; 2 OTHER;

Figure 32: Séquence nucléotidique du gène YLA1.

L'ORF codant la protéine est constituée de 825bp. Les codons d'initiation (ATG) et de terminaison (UGA) de la traduction sont soulignés avec des traits pleins, l'oligonucléotide SC-127 est indiqué par un chochet.

```

          5              10              15
          |              |              |
1   Met Ser Glu Lys Pro Gln Gln Glu Glu Gln Glu Lys Pro Gln Ser
16  Arg Arg Asn Ser Phe Ala Val Ile Glu Phe Thr Pro Glu Val Leu
31  Asp Arg Cys Leu Lys Gln Val Glu Phe Tyr Phe Ser Glu Phe Asn
46  Phe Pro Tyr Asp Arg Phe Leu Arg Thr Thr Ala Glu Lys Asn Asp
61  Gly Trp Val Pro Ile Ser Thr Ile Ala Thr Phe Asn Arg Met Lys
76  Lys Tyr Arg Pro Val Asp Lys Val Ile Glu Ala Leu Arg Ser Ser
91  Glu Ile Leu Glu Val Ser Ala Asp Gly Glu Asn Val Lys Arg Arg
106 Val Pro Leu Asp Leu Thr Ala Ala Arg Asn Ala Arg Ile Glu Gln
121 Asn Gln Arg Thr Leu Ala Val Met Asn Phe Pro His Glu Asp Val
136 Glu Ala Ser Gln Ile Pro Glu Leu Gln Glu Asn Leu Glu Ala Phe
151 Phe Lys Lys Lys Leu Gly Glu Ile Asn Gln Val Arg Leu Arg Arg Asp
166 His Arg Asn Lys Lys Phe Asn Gly Thr Val Leu Val Glu Phe Lys
181 Thr Ile Pro Glu Cys Glu Ala Phe Leu Lys Ser Tyr Ser Asn Asp
196 Asp Glu Ser Asn Glu Ile Leu Ser Tyr Glu Gly Lys Lys Leu Ser
211 Val Leu Thr Lys Lys Gln Phe Asp Leu Gln Arg Glu Ala Ser Lys
226 Ser Lys Asn Phe Ser Gly Arg Ser Arg Ser Phe Asn Gly His Lys
241 Lys Lys Asn Leu Pro Lys Phe Pro Lys Asn Lys Lys Lys Asn Gly
256 Lys Glu Glu Ser Lys Glu Asp Ser Ser Ala Ile Ala Asp Asp Asp
271 Glu Glu His Lys Glu

```

Number of residues : 275.
Molecular weight (MW) : 32104 ; Checking number (CN) : 364618

Amino acid composition

```

=====
15 Ala          2 Cys          4 His          3 Met          10 Thr
20 Arg          12 Gln         11 Ile         18 Phe          1 Trp
19 Asn          33 Glu          19 Leu         12 Pro          5 Tyr
15 Asp          8 Gly           31 Lys         22 Ser         15 Val

```

```

          5              10              15              20              25              30
          |              |              |              |              |              |
1   M S E K P Q Q E E Q E K P Q S R R N S F A V I E F T P E V L
31  D R C L K Q V E F Y F S E F N F P Y D R F L R T T A E K N D
61  G W V P I S T I A T F N R M K K Y R P V D K V I E A L R S S
91  E I L E V S A D G E N V K R R V P L D L T A A R N A R I E Q
121 N Q R T L A V M N F P H E D V E A S Q I P E L Q E N L E A F
151 F K K L G E I N Q V R L R R D H R N K K F N G T V L V E F K
181 T I P E C E A F L K S Y S N D D E S N E I L S Y E G K K L S
211 V L T K K Q F D L Q R E A S K S K N F S G R S R S F N G H K
241 K K N L P K F P K N K K K N G K E E S K E D S S A I A D D D
271 E E H K E

```

Figure 33: Composition en acides aminés de la protéine LaY.

La protéine LaY est constituée de 275 acides aminés. Le poids moléculaire estimé à partir de cette séquence est égal à 32.1 kDa. La séquence du haut est donnée en utilisant la notation à trois lettres, celle du bas la notation à une seule lettre.

C: CARACTERISTIQUE DE LA PROTEINE LaY CODEE PAR LE GENE YLA1.

Pour s'assurer que l'ORF identifiée précédemment code une protéine qui ressemble à la protéine La, les séquences protéiques humaine, bovine, du xénope et de la souris ont été comparées avec celle de levure. Cette comparaison sur les séquences complètes révèle une très faible homologie de l'ordre de 35-40% avec seulement 20-24% d'identité (tableau 2), alors que la protéine du xénope est 70% homologue à celle des mammifères. Ces dernières sont d'ailleurs conservées entre 87-97%. Il est étonnant de noter qu'au niveau nucléotidique, la séquence codante de LaY est 46-47% identique à l'ensemble des autres séquences codant la protéine La. Généralement, l'homologie nucléotidique est plus faible que l'homologie en acides aminés. Pour comparaison, les séquences du xénope présentent 63-66% d'identité avec celles codant la protéine La chez les mammifères. Cependant, le pourcentage d'identité observé pour la séquence nucléotidique de LaY semble peu significatif car les régions conservées sont très courtes. Ceci explique les tentatives infructueuses pour isoler le gène YLA1 avec une sonde ADNc choisie en comparant les séquences nucléotidiques des gènes codant la protéine La des eucaryotes supérieurs.

	LA_HUMAN	LA_BOVIN	LA_MOUSE	LAA_XENLA	LAB_XENLA	LA_YEAST
LA_HUMAN	100	93.3 (96.3)	79.9 (86.3)	61.8 (74.3)	63.2 (75.8)	22.5 (40.4)
LA_BOVIN	92.4	100	79.9 (86.9)	61.1 (73.8)	62.9 (75.5)	23.3 (40.4)
LA_MOUSE	82.6	81.9	100	56.4 (68.4)	57.8 (70.4)	24 (41.1)
LAA_XENLA	65.4	64.9	62.6	100	89.7 (95.1)	19.6 (35.6)
LAB_XENLA	66.3	66.7	63.5	91.1	100	21.4 (33.8)
LA_YEAST	47.6	47.1	45.8	45.9	47	100

Tableau 2: Comparaison 2 à 2 des séquences protéiques et nucléotidiques des différentes protéines La connues.

Les valeurs au dessus de la diagonale des 100% indiquent le pourcentage d'acides aminés identiques et entre parenthèse, le pourcentage d'acides aminés identiques ou similaires. Les acides aminés considérés comme similaires sont: A, S et T; D et E; N et Q; R et K; I, L, M et V; F, Y et W. Les valeurs au dessous de la diagonale des 100% indiquent le pourcentage des nucléotides identiques dans les régions codantes.

L'alignement des séquences protéiques de La beaucoup plus convaincant a révélé une homologie de 74% dans la partie amino-terminale de la protéine. Par contre, la partie carboxy-terminale de La est beaucoup plus divergente (Fig. 34 et 35). Ce résultat est intéressant puisque la région N-terminale a été identifiée comme la partie fonctionnelle de la protéine La des eucaryotes supérieurs contenant les motifs RNP1 et RNP2, présents dans les protéines capables de lier l'ARN (Moreau, G., *The RNA binding properties of the Xenopus La proteins, in prep.*). De façon surprenante, une recherche concernant la présence d'un motif consensus RNP pour la liaison avec les ARNs dans la protéine LaY a été infructueuse. Cependant, d'après un article paru récemment dans NAR (32), l'identification d'une telle séquence consensus pour les protéines de levure est parfois difficile. Il ressort de cette étude que parmi ces protéines, très peu possèdent le motif RNP identifié chez les eucaryotes supérieurs et il est encore plus étonnant d'apprendre que les régions fonctionnelles de ces protéines peuvent être très différentes entre elles. Cette observation explique probablement pourquoi, aucun motif RNP n'ait apparu clairement dans la séquence LaY. Pourtant une homologie certaine existe pour les séquences RNP1 et RNP2 entre LaY et les autres protéines La, notamment en ce qui concerne RNP1, ce qui suggère que LaY est capable de lier les ARNs tout comme la protéine La des eucaryotes supérieurs.

Mise à part la différence de poids moléculaire avec les autres protéines La, LaY partage certaines caractéristiques avec ces protéines comme par exemple un point iso-électrique basique ($pI=9.04$ pour LaY contre $pI=9.28$ pour LaB1), plusieurs sites de N-glycosylation, un site d'amidation ainsi qu'un signal bipartite de localisation nucléaire dans la partie carboxyl terminale. De même, il est possible que LaY soit une phosphoprotéine puisqu'elle possède de nombreux sites de phosphorylation potentielle sensibles à l'action des kinases dépendantes du cAMP ou cGMP, de la protéine kinase C ou de la caséine kinase II. Cependant, contrairement aux autres protéines La, LaY ne possède pas de sites pour les N-myristilation, ni des sites de phosphorylation par des tyrosine kinases.

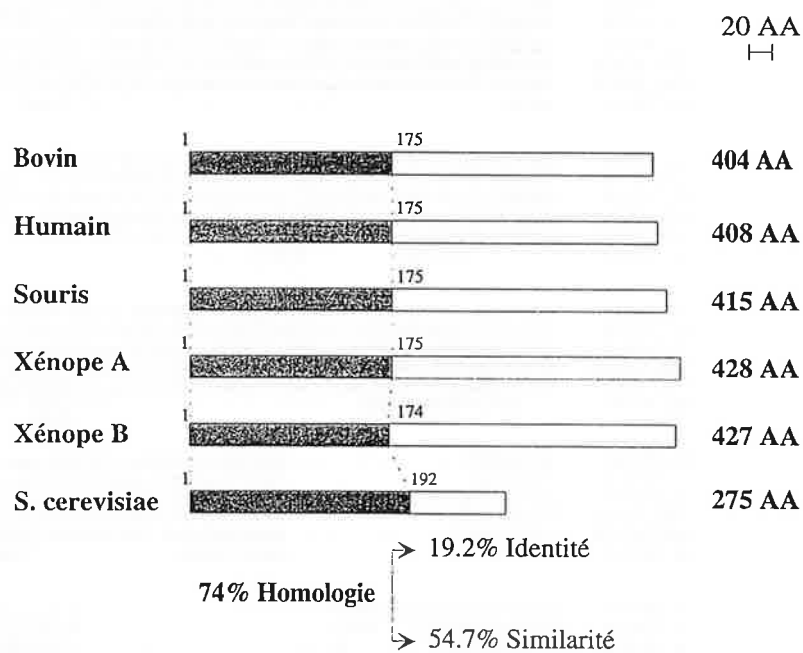


Figure 35: Représentation schématique des différentes protéines La.

La longueur totale des protéines est indiquée ainsi que le pourcentage d'homologie (identité + similarité) concernant les premiers 192 acides aminés de LaY.

D: DISRUPTION DU GÈNE YLA1

Pour déterminer si le gène YLA1 est essentiel à la viabilité cellulaire nous avons construit un allèle de délétion (*yla1Δ::URA3*) dans lequel une région interne de 150 pb couvrant la séquence RNP1 a été éliminée et remplacée par la séquence du gène URA3 (Fig. 36A et 36B). Cet allèle de délétion a été utilisé pour remplacer dans la souche diploïde MY542 (MY1 x MY4) une copie chromosomale du gène YLA1. Les transformants Ura⁺ ont été analysés par Southern-blot pour vérifier que les cellules diploïdes contiennent un allèle de type sauvage (4000 pb) et un allèle disrupté (1040 pb) (Fig. 36B, pistes 1 à 7). Après sporulation des cellules diploïdes, l'analyse des tétrades a montré que chaque tétrade produit deux spores Ura⁺ et deux spores Ura⁻, chacune des spores étant viables sur milieu YPD. La croissance des transformants Ura⁺ a été analysée sur milieu riche et sur milieu minimal aux températures de 16°C, 25°C, 30°C et 37°C. Le seul phénotype apparu pour les souches portant l'allèle de disruption est mineure. Il a été observé sur milieu riche à 16°C et semble correspondre à un petit gain de fonction. En effet, les cellules qui portent la disruption croissent plus vite que les cellules parentales. Toutefois, il semble que le gène YLA1 n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire. Ce résultat est renforcé par l'obtention de transformants Ura⁺ à partir de la souche haploïde MY4 (Fig. 36B, pistes 8 à 10). Nous avons vérifié par Southern-blot l'insertion du gène URA3 par la présence d'un fragment de 1040 pb. Le signal observé à 4000 pb correspond, dans ce cas, au fragment EcoRV qui couvre la partie 3' du gène YLA1 et qui hybride avec la sonde utilisée.

Figure 36: Construction de la souche portant la disruption du gène YLA1 par le marqueur URA3.

36A: Diagramme de l'allèle de disruption *layΔ::URA3* où le marqueur URA3 a été introduit dans le cDNA codant la protéine LaYΔ136-185.

36B: Analyse par Southern-blot du locus LaY dans les souches haploïde MY4 ou diploïde MY542 parentales (respectivement pistes 10 et 7) ou portant l'allèle de délétion (pistes 1 à 5 et 8,9). L'ADN génomique des cellules Ura⁺ transformées avec un plasmide linéaire portant l'allèle de délétion *layΔ::URA3* est digéré avec l'enzyme de restriction EcoRV, transféré sur membrane de nitrocellulose et hybridé avec une sonde marquée correspondant à un fragment BamHI-HpaI de LaY. L'équivalent d'1μg (piste 11) ou 10μg (piste 12) de génome d'une cellule haploïde a également été chargé sur le gel en utilisant respectivement 0.5ng et 5ng d'un plasmide linéarisé avec Sall et contenant le gène LaY. La présence du fragment à 1040bp indique l'intégration correcte du marqueur URA.

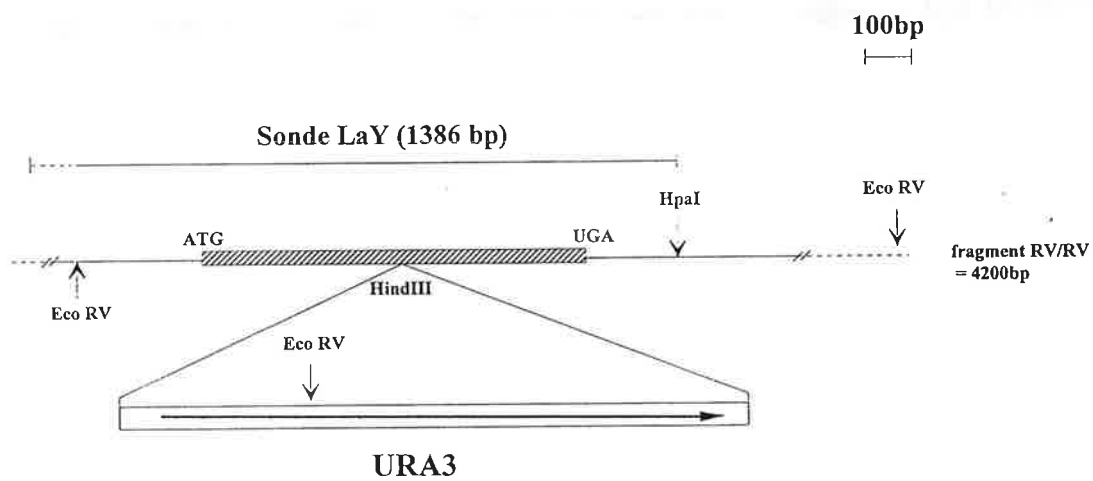


Figure 36A

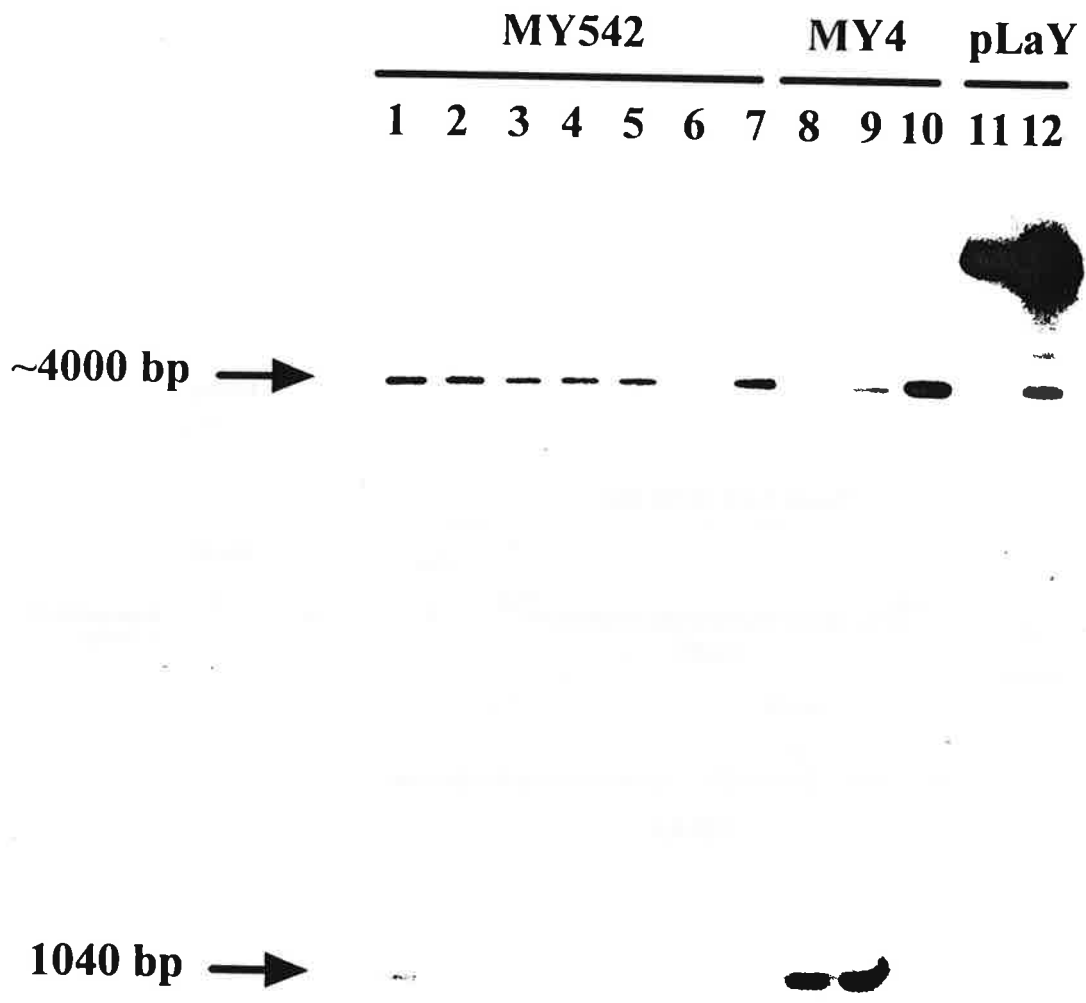


Figure 36B

E: CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE LaY

Un résultat surprenant est celui relatif à la longueur de la protéine LaY estimée à partir de la séquence nucléotidique comme étant égal à 275 AA alors que celle des autres protéines La varie entre 404 et 428 AA (Fig. 35). De plus, sur Western-blot le sérum α -La 75 révèle une protéine d'environ 52-55 kDa alors que le poids moléculaire de LaY est seulement de 32.1 kDa. Comment peut-on réconcilier les résultats des immunoprécipitations, des Western-blots et du clonage? Quelle protéine est l'homologue de la protéine La? Existe-t-il plusieurs protéines "La-like" chez la levure?

E.1- Le fragment génomique contenant le gène YLA1 code une protéine de poids moléculaire apparent égal à 36 kDa.

Afin de vérifier que l'ORF code effectivement une protéine de 32 kDa, nous avons linéarisé le plasmide pGEM3LaY avec Sall, laissant en aval du promoteur T7 un fragment d'ADN d'environ 2 kb. A partir de ce fragment, un ARNm a été synthétisé par l'ARN T7 polymérase, puis traduit dans un extrait de réticulocytes de lapin en présence de 35S-méthionine. Le produit de cette réaction correspond à une protéine de 36 kDa confirmant la présence du codon stop UGA identifié en position +825 de la séquence codante.

Nous avons tenté d'immunoprécipiter cette protéine avec chacun des séras α -La, sans succès (résultats non montrés). Dans l'hypothèse où la liaison entre LaY et son substrat induit un changement conformationnel qui rend accessible un épitope de LaY au séra α -La, nous avons incubé simultanément la protéine LaY avec un précurseur d'ANRt connu pour lier la protéine (cf ci-dessous). Les particules LaY-RNPs ont été ensuite précipitées par les anticorps α -La. Cependant, une nouvelle fois, l'analyse des protéines immunoprécipitées dans cette expérience montre que seule la protéine LaB1 est présente (Fig.43A).

L'ensemble de ces résultats suggère que les anticorps α -La dirigés contre la protéine de xénope ne reconnaissent pas la protéine LaY en tant que telle ou sous forme de RNP.

E.2- La protéine LaY, comme la protéine LaB1, lie préférentiellement un ARN possédant la séquence UUUUOH à son extrémité 3'.

Afin de déterminer si la protéine LaY est fonctionnellement équivalente à la protéine LaB1, nous avons tenté de caractériser la spécificité de liaison de la protéine de levure avec les substrats naturels de la protéine La que sont les précurseurs d'ARNt. Pour cela, deux précurseurs ont été synthétisés par l'ARN T7 polymérase en présence de Bio-11-UTP. Comme précédemment, le précurseur se terminant par la séquence GAUC(3'OH) représente un substrat non spécifique pour la liaison avec La, tandis que le précurseur se terminant par la séquence UUUU(3'OH) est reconnu par la protéine. Chacun de ces ARNs est incubé avec les protéines LaB1 ou LaY synthétisées dans les extraits de réticulocyte en présence de ³⁵S-méthionine, et les protéines liées aux ARNs biotynilés sont récupérées sur des billes magnétiques de streptavidine. Après rinçages des complexes RNPs, la nature des protéines précipitées est analysée sur gel SDS-polyacrylamide. Cette expérience montre que, comme la protéine de xénope LAB1, la protéine LaY se lie préférentiellement aux précurseurs d'ARNt qui possèdent la séquence UUUU(3'OH) à son extrémité 3' (Fig. 37, pistes 5 et 6). Ce résultat suggère que la protéine LaY est l'homologue fonctionnel de la protéine LaB1 et par conséquent qu'une protéine La existe aussi chez la levure *S.cerevisiae*.

Pour tenter de mieux caractériser les domaines fonctionnels de LaY, nous avons construit quelques mutants (Fig. 38). Les protéines LaY Δ C53 et LaY Δ C140 correspondent à des formes tronquées de la protéine LaY dont la partie carboxyl terminale a été déléetée respectivement de 53 et 140 AA. Le même genre d'analyse que celle réalisée précédemment montre que contrairement à la protéine LaY Δ C53, LaY Δ C140 n'est plus capable de lier spécifiquement le transcrit UUUU(3'OH) (Fig. 39, comparez les pistes 2,3 et 5,6). L'alignement des séquences protéiques entre LaY et les autres protéines La a révélé une certaine conservation des régions RNP1 et RNP2. LaY Δ C53 possède encore les deux régions RNP alors que LaY Δ C140 n'a conservée que RNP2. Ceci suggère que RNP1 est impliqué dans la liaison avec les précurseurs d'ARN.

Pour confirmer ce résultat, une autre protéine mutante a été synthétisée. Cette protéine LaY Δ 136-185 possède une délétion interne de 49 AA qui entoure la région RNP1. LaY Δ 136-185, comme LaY Δ 136-185 ne lie aucun précurseurs (Fig. 40), ce qui implique que la région comprise entre les acides aminés 136 et 185 est importante pour la liaison entre LaY et un transcrit UUUU(3'OH).

Pour tester l'hypothèse selon laquelle le motif RNP1 de LaY est responsable de la liaison avec l'ARN, une double mutation ponctuelle a été réalisée par mutagenèse dirigée sur les acides aminés 173 et 174. La glycine non polaire en position +173 a été remplacée par la glutamine qui est un acide aminé polaire non chargé. La thréonine en position +174 a été remplacée par un acide aminé acide, l'aspartate. Nous avons choisi de muter la glycine pour les deux raisons suivantes; la première est que ce résidu est le plus souvent invariant dans le motif RNP1 et la seconde est que ce résidu est justement conservé entre LaY et les autres protéines La. Cependant, l'analyse fonctionnel de ce mutant a révélé que la protéine LaYQ173D174 est toujours capable de lier spécifiquement le transcrit UUUU(3'OH) (Fig. 41, pistes 4 à 6). Bien que ce résultat soit surprenant, il est possible que les mutations introduites ne perturbent pas suffisamment la structure secondaire de la protéine pour inhiber sa liaison avec les précurseurs d'ARNt. La seconde possibilité est que malgré la conservation du résidu G du motif RNP1, ce dernier n'est peut-être pas directement impliqué dans la liaison de LaY avec l'ARN.

Pour conclure, la protéine LaY est une protéine capable de lier des ARNs avec une grande spécificité pour des ARNs qui se terminent par la séquence UUUU(3'OH). A ce titre, elle est une bonne candidate pour représenter l'homologue de la protéine La chez la levure *S.cerevisiae*. Nous n'avons réussi qu'à délimiter grossièrement la région de la

protéine nécessaire à sa liaison avec un ARN. Cette région s'étend entre les acides aminés 136 et 185 et contient le motif RNP1 caractéristique des protéines qui lient les ARNs. Cependant, la construction d'autres mutants est nécessaire pour identifier avec plus de précisions les acides aminés qui composent réellement ce motif RNP1 dans la protéine LaY.

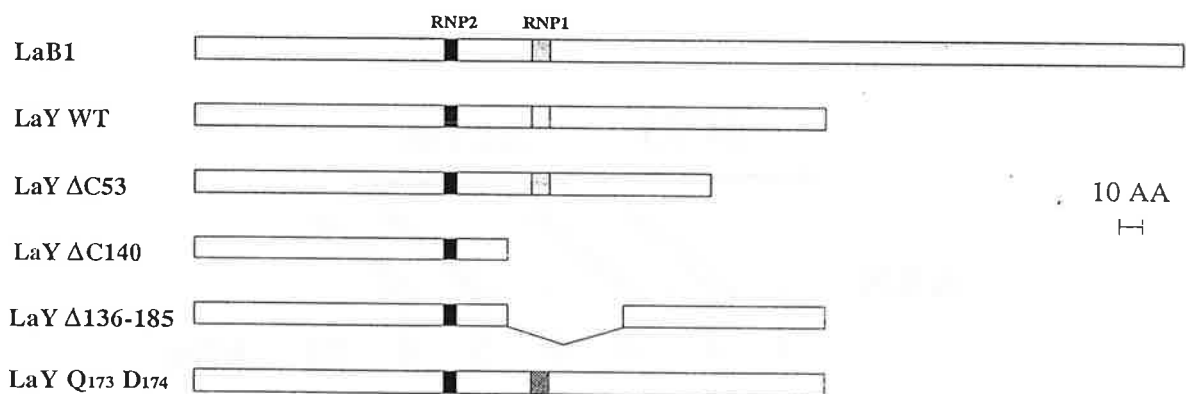


Figure 38: Représentation schématique de la protéine LaY sauvage et des protéines LaY mutantes.

Les régions d'homologie avec RNP1 et RNP2 sont indiquées dans la protéine sauvage (LaWT). Les protéines LaYΔC53 et LaYΔC140 ont respectivement perdues les 53 et 140 derniers acides aminés. La protéine LaYΔ136-185 a perdu 49 acides aminés dans une région qui contient RNP1 et la protéine LaYQ173D174 possède deux mutations ponctuelles dans la région d'homologie avec RNP1 au position 173 et 174 où les résidus glycine et thréonine ont été remplacés respectivement par les résidus glutamine et aspartate.

Figure 39, 40 et 41: Analyse fonctionnelle des différentes protéines LaY mutantes.

Les protéines LaY, sauvage ou mutantes, sont traduites dans du lysat de réticulocyte à partir d'une réaction couplée transcription/traduction en présence de ³⁵S-méthionine. 9/20 de la réaction sont incubés 30mn à 0°C avec 1/5 d'une réaction de transcription par l'ARN T7 polymérase des précurseurs UUUU(OH) et GAUC(OH) synthétisés en présence d'UTP biotinylé. Les complexes RNP sont récupérés en les incubant 1h à 4°C avec 20µl d'une suspension de billes magnétiques de streptavidine. Les billes sont alors rincées avec du tampon NET 300mM NaCl et les protéines liées aux billes via les ARNs sont analysées par SDS-PAGE 15%. Le gel est séché et autoradiographié la nuit à température ambiante.

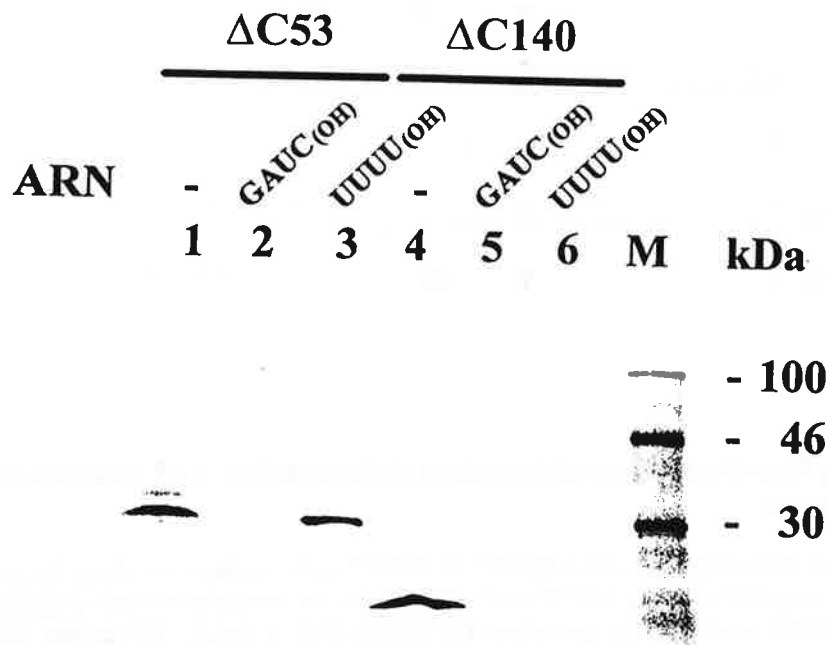


Figure 39

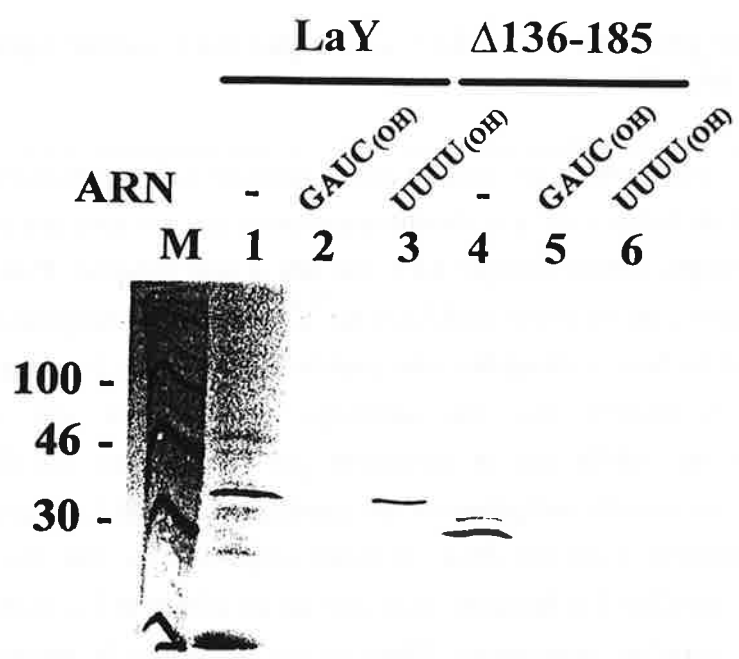


Figure 40

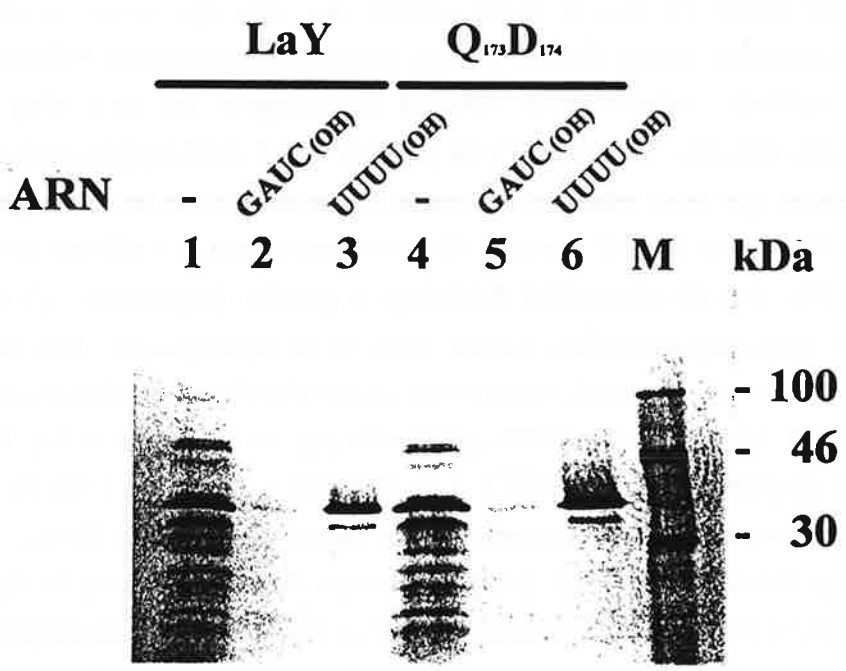


Figure 41

E.3- Une protéine "La-like", autre que LaY, existe t-elle chez S.cerevisiae?

Des expériences précédentes ont montré que la protéine LaY synthétisée dans des extraits de réticulocyte de lapin n'est pas immunoprécipitée par les séra α -La dirigés contre la protéine de xénope, même lorsque LaY est liée à son substrat. Pourtant LaY se fixe préférentiellement à un transcrit UUUU(3'OH). Ce résultat est surprenant car les analyses préliminaires cherchant à identifier une protéine homologue fonctionnelle de La chez *S.cerevisiae* ont montré que ces anticorps reconnaissent une protéine qui lie spécifiquement les ARNs qui se terminent par la séquence UUUU(3'OH). De plus l'analyse des déterminants antigéniques des protéines LaB1 et LaY révèle qu'un épitope semble être conservé entre les deux protéines (Fig. 42). Le fait que cette épitope est absent dans la protéine La humaine explique qu'un sérum α -La humain n'a jamais pu identifier cette protéine auparavant. Dans ce cas, pourquoi la protéine LaY n'est pas détectée lors des expériences décrites en D.I? Une des possibilités pour expliquer ce phénomène est qu'une autre protéine qui possède les mêmes caractéristiques fonctionnels que LaY et un épitope commun à LaB1 existe dans les extraits protéiques de levures. La seconde possibilité est que la faible affinité des anticorps α -La est responsable d'un résultat faussement négatif. En effet, si les anticorps reconnaissent faiblement la protéine LaY, la méthode utilisée pour détecter la présence de LaY n'est peut-être pas suffisamment sensible. De plus LaY ne possède que 3 méthionines contre 9 pour LaB1. Ceci implique que pour observer un signal équivalent entre les deux protéines, il faut précipiter 3 fois plus de LaY que de LaB1. Par conséquent, si l'affinité des anticorps pour LaY est faible, il faudrait accroître davantage la quantité de protéine LaY en comparaison avec LaB1, pour augmenter les chances d'obtenir un signal positif. Afin de contourner ce problème d'intensité du signal, nous avons choisi d'analyser simultanément les protéines (Fig. 43A) et les ARNs (Fig. 43B) précipités par les anticorps α -La, les ARNs étant synthétisés en présence d' α - 32 P-UTP. Les protéines LaY et LaB1 ont été synthétisées in vitro en présence de 35 S-méthionine dans un extrait de germe de blé qui ne contient pas ou peu de protéine La endogène. Les protéines ont été incubées avec les deux précurseurs d'ARNt (GAUC(3'OH) et UUUU(3'OH)) et les La-RNPs ont été immunoprécipitées par les anticorps α -La. Ces expériences confirment les résultats précédents à savoir que les anticorps α -La dirigés contre la protéine LaB1 ne reconnaissent pas la protéine LaY puisque ni la protéine LaY, ni les ARNs liés à LaY ne sont détectables (Fig. 43A, piste 3 à 4 et Fig. 43B, comparez pistes 1 à 3). Pourtant si LaY est remplacée par un extrait

protéique de levure (BJ2168), le transcrit UUUU(3'OH) est préférentiellement précipité au transcrit GAUC(3'OH). Ce résultat indique qu'il est probable qu'une autre protéine ayant les mêmes caractéristiques fonctionnels que LaY existe chez *S.cerevisiae*. Toutefois, il reste possible que la protéine LaY produite *in vitro* ne possède pas les modifications post-traductionnelles nécessaires à la reconnaissance par les anticorps ou que l'affinité des anticorps est trop faible pour détecter LaY dans les conditions expérimentales utilisées.

LaB1	S D D E D D M D D S
	• ** • • • •
LaY	A D D D E E H K E

Figure 42: Analyse des déterminants antigéniques de LaB1 et LaY.

Cette analyse a révélé 3 régions très hydrophiles caractéristiques des sites antigéniques. Parmi ces sites, une région est relativement conservée entre la protéine de xénope LaB1 et de *S.cerevisiae* LaY. Ce déterminant est absent de la protéine La humaine. Les acides aminés similaires sont indiqués par un point (.), les acides aminés identiques par une étoile (*).

Figure 43: Immunoprécipitation de LaY traduite dans un extrait de germe de blé.

Les protéines de xénope LaB1 et de *S.cerevisiae* LaY sont traduites 90mn à 25°C dans un extrait de germe de blé en présence de ³⁵S-méthionine. 1/4 de la réaction de traduction est incubé 30mn à 0°C avec 100000cpm de chaque ARN précurseur UUUU(OH) et GAUC(OH). Les complexes RNP sont immunoprécipités 1h à 4°C avec l'anti-séra de lapin α -La 79 dirigés contre la protéine de xénope.

43A: Gel 12.5% SDS-polyacrylamide pour analyser les protéines incubées en présence des ARNs précurseurs (pistes 1, 3 et 6) ou en absence d'ARNs (pistes 2, 4 et 7) et immunoprécipitées par le sérum α -La 79. Les pistes 5 et 8 représentent respectivement 1/10 de la réaction de traduction. Dans les pistes 1 et 2, l'extrait de germe de blé (WGE) n'est pas programmé pour une synthèse protéique. Le gel est fixé, séché et autoradiographié la nuit à température ambiante.

43B: Gel dénaturant 6.8% polyacrylamide-7M urée pour analyser les ARNs immunoprécipités par le sérum α -La 79. Les pistes 1 et 3 correspondent à l'extrait de germe de blé programmé respectivement avec le plasmide codant LaY et LaB1, la piste 2 à l'extrait de germe de blé non programmé (WGE). 5 μ l d'extrait S-100 et 5 μ l d'extrait de levure BJ2168 sont également testés (pistes 4 et 5 respectivement). Le gel est autoradiographié la nuit à -70°C avec un écran SE8.

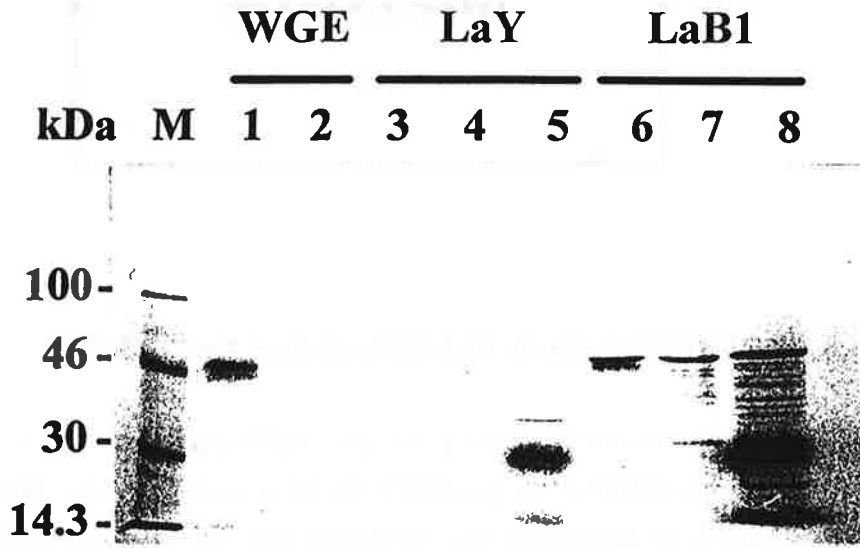


Figure 43A

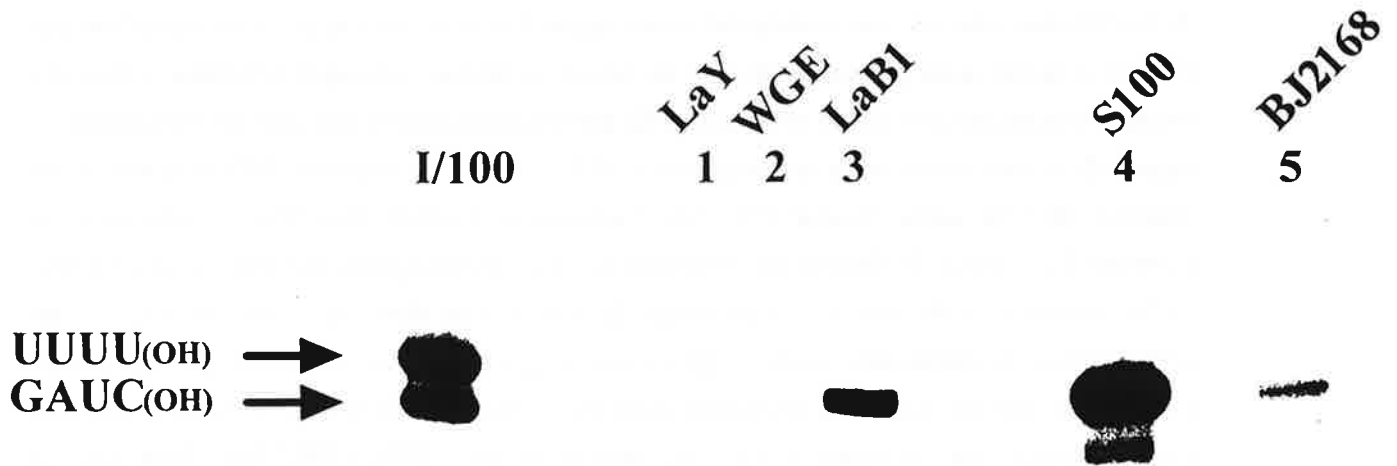


Figure 43B

DISCUSSION

Protéine La et terminaison de la transcription par Pol III

Si les mécanismes qui initient la transcription par l'ARN polymérase III sont aujourd'hui bien connus, ceux qui dirigent les processus de terminaison le sont beaucoup moins. Seule une succession de quatre résidus thymidine dans le brin non codant de l'ADN représente la séquence consensus de terminaison des gènes de classe III(11). Chez la levure, le nombre de résidus T est supérieur et doit atteindre un minimum de 6T (3). Les séquences adjacentes au signal de terminaison sont très variables d'un gène à l'autre (11,105). Elles déterminent souvent l'efficacité de terminaison dans un contexte précis, c'est à dire pour un gène donné. Mais la nature d'une séquence ainsi que la présence ou non de structures secondaires à proximité du signal de terminaison ne permet pas de prédire l'efficacité de la terminaison(11).

Actuellement, une certaine ambiguïté existe quant à la terminaison de la transcription par Pol III, à savoir si ce processus dépend ou non d'un facteur protéique cellulaire. Plusieurs expériences suggèrent que la polymérase III est intrinsèquement capable de reconnaître le signal de terminaison de la transcription (18,31,162) et de relâcher l'ARN transcrit en absence de tout autre facteur (18,162). Cependant, d'autres expériences présentent la protéine La comme le facteur de terminaison de la transcription par Pol III (51,52,98). Cette protéine reste encore aujourd'hui la seule candidate au rôle de facteur de terminaison. Initialement, cette supposition s'appuie sur la propriété de La à lier transitoirement les transcrits primaires synthétisés par Pol III (83,133) en reconnaissant une séquence qui constitue l'extrémité terminale de l'ARN (100,148). Bien que la localisation nucléaire de La soit compatible avec une telle fonction (54), son abondance (2.10^7 copies/cellule) est quelque peu étonnante, comparée à celle des autres facteurs de transcription. Ceci suggère que La peut ne pas être le facteur de terminaison escompté ou

que la protéine peut avoir d'autres fonctions cellulaires.

Afin d'évaluer la responsabilité de la protéine La de *Xenopus* dans la terminaison de la transcription par Pol III, nous avons choisi d'étudier la transcription du gène d'ARNtPhe dans un système homologue. L'approche a essentiellement consisté à dépler des extraits cellulaires S-100 dérivés de cellules de reins de *Xenopus* à l'aide d'anticorps α -La polyclonaux de lapin puis à comparer le profil de transcription dans un extrait normal ou dans un extrait dépleté à 98%-99% en protéine La.

Production d'anticorps α -La spécifiques pour la protéine de *Xenopus*

Afin de nous procurer les outils indispensables aux expériences d'immunodéplétion, c'est à dire des anticorps capables de reconnaître spécifiquement la protéine La de *Xenopus*, la protéine LaB1 a été produite par les bactéries *E. coli*, isolée par électrophorèse ou partiellement purifiée par chromatographie, et injectée aux lapins selon un protocole couramment utilisé pour les immunisations. Nous avons vérifié que les antiséra reconnaissent spécifiquement la protéine de *Xenopus* aussi bien sous sa forme dénaturée (Fig. 8) que sous sa forme native (Fig.10, piste 12). L'estimation des titres des séra de lapin a montré que l'immunisation réalisée avec la protéine native fournit des résultats comparables à ceux obtenus avec le sérum auto-immun de malade (Fig. 8).

Ces antiséra sont désormais disponibles pour immunodépler les extraits de transcription et suivre l'immunodéplétion par Western-blot.

Une protéine La recombinante fonctionnelle

Dans l'optique de compléter les extraits de transcription, nous avons testé la capacité de la protéine La recombinante à lier des ARNs, similaires à ceux synthétisés par Pol III, mais transcrits *in vitro* par l'ARN T7 polymérase. L'immunoprécipitation des La-RNPs montre que la protéine recombinante lie préférentiellement le précurseur d'ARNtPhe qui possède la séquence UUUUOH à son extrémité 3' (Fig.10). Les précurseurs qui se terminent par la séquence GAUCOH sont très faiblement immunoprécipités (environ 20 fois moins bien que le précurseur UUUUOH). Un tel résultat est aussi obtenu quand les précurseurs sont incubés avec un extrait S-100 indiquant que la protéine recombinante possède des propriétés identiques à la protéine La endogène. Cependant, dans des

conditions peu stringentes de liaison ARN/protéine recombinante ou de lavage des La-RNPs, une quantité équivalente des précurseurs UUUUOH et GAUCOH est immunoprécipitée (résultats non montrés). Cette perte de spécificité reflète probablement l'affinité naturelle de La pour une molécule d'ARN. D'ailleurs, La peut se trouver associer à des ARNs qui ne possèdent pas forcément la séquence UUUUOH à leur extrémité 3'(109,171). Par exemple, dans le cas du virus de la Polio, la protéine La se trouve associée à l'ARN viral dans la région 5'UTR (région 5' non traduite) entre les nucléotides 559 et 591. Cette région possède à la fois des résidus U internes et des structures secondaires(109), mais il n'a pas été déterminé avec précision la nature de l'interaction entre La et cet ARN du Poliovirus. Il est possible que la protéine La reconnaisse une structure secondaire particulière dans la molécule d'ARN, cette propriété de La ayant été précédemment mentionnée (44). La parution récente d'un manuscrit décrivant la protéine La recombinante humaine capable de lier des ARNs double brin indique qu'effectivement La reconnaît de telles structures (171). Un alignement de séquences protéiques révèle d'ailleurs que la région de La comprise entre les acides aminés 338 et 358 présente une certaine similitude avec le motif consensus des protéines qui lient l'ARN double brin (171). Il faut noter cependant que ce motif, présent dans la protéine La d'origine humaine et bovine, n'apparaît pas clairement dans la protéine de *Xenopus*.

D'autre part, l'expression du cDNA LaB1 dans des extraits de germe de blé nous a permis de déterminer que la protéine La reconnaît l'ARN sous forme de monomère. Bien que les protéines La portant l'épitope HA1 (N-HA,C-HA) soient fonctionnelles, nous n'avons jamais réussi à les co-précipiter avec la protéine La en utilisant un sérum anti-HA (Fig. 11 et 12). Les protéines ont été traduites séparément ou simultanément avec la protéine La pour écarter la possibilité que la dimérisation s'effectue en cours de synthèse. Nous avons également vérifié que la protéine La Δ C37 n'avait pas perdue un éventuel domaine de dimérisation. Les expériences réalisées en remplaçant la protéine tronquée par la protéine complète B1, ont confirmé les résultats obtenus avec la protéine Δ C37.

Protéine La et synthèse des résidus U terminaux

La transcription des gènes viraux VA et EBER, dans des extraits de cellules HeLa immunodéplétés en protéine La par des auto-anticorps de patients, génère un nombre réduit de transcrits dont la longueur est diminuée par rapport aux transcrits synthétisés

dans un extrait normal (51,52). Le séquençage des ARNs plus courts révèle que l'extrémité 3' des transcrits est manquante, en particulier la séquence UUUUOH (52). En fractionnant les complexes de transcription sur un gradient de glycérol, après avoir incubé le gène EBER2 dans un extrait S-100 normal, deux types de complexes sont identifiés. Le complexe α qui sédimente le plus rapidement, génère des transcrits complets. Le complexe β , plus lent, synthétise les transcrits courts (51). Les auteurs interprètent ce résultat en suggérant que le complexe α , contrairement au complexe β , contient la protéine La ce qui permet aux complexes α de générer des transcrits normaux, alors que les complexes β arrêtent la transcription en amont des résidus U. Cependant, la présence de La dans ces complexes n'a pu être détectée par analyse en ELISA. Toutefois, Gottlieb et Steitz suggèrent que la protéine La est nécessaire pour synthétiser les U finaux des ARNs (51,52).

Pour tester cette hypothèse, nous avons transcrit le gène d'ARNtPhe dans des extraits déplétés avec un sérum pré-immun ou immun α -La. Ce gène contient deux sites de terminaison: les transcrits P2, majoritaires, se terminent au premier signal rencontré (4T), tandis que les transcrits P1 se terminent 24 nts en aval dans une série de 15T successifs. Généralement, le rapport P2/P1 est égal à 3 puisque 75% des transcrits s'arrêtent au premier signal de terminaison, les 25% restants s'arrêtant au second signal. Dans l'hypothèse où La est nécessaire à la synthèse des U terminaux selon le modèle discuté ci-dessus, des extraits déplétés en protéine La doivent transcrire des ARNs P1 et P2 plus courts. De plus, la transcription des ARNs P2 doit être avantagée au dépend de celle des ARNs P1, si on considère que La est nécessaire pour la synthèse de résidus U successifs. En d'autres termes, le rapport P2/P1 doit devenir supérieur à 3 quand La devient limitante. Nous avons montré, en immunodéplétant successivement les extraits S-100 de *Xenopus* avec des anticorps α -La que:

i) contrairement aux résultats de Gottlieb et Steitz, la diminution du nombre de transcrits synthétisés dans un extrait déplétés en La est indépendante de l'absence de protéine La. En effet, cette réduction du taux de transcription s'observe également quand les extraits sont déplétés avec le sérum pré-immun (Fig.17). Cette diminution de l'efficacité de transcription dans de tels extraits a été précédemment signalée et attribuée à une co-déplétion de La et du facteur d'initiation TFIIC (52). En ce qui nous concerne, ce phénomène est inhérent à la méthode utilisée et nous avons estimé que les extraits déplétés conservent environ 30% d'activité par rapport à un extrait non traité. Par conséquent, l'efficacité de transcription des extraits déplétés en La ou celle des extraits traités avec le sérum pré-immun est sensiblement équivalente.

ii) la longueur des transcrits est extrêmement variable dans des extraits traités avec le sérum immun α -La. Tandis que les extraits non déplétés synthétisent des transcrits P1 et P2 de longueur normale, la taille des ARNs synthétisés dans des extraits déplétés en La est hétérogène: certains transcrits sont de longueur normale, d'autres sont allongés ou raccourcis. Un transcrit court Px s'accumule particulièrement quand la protéine La devient limitante. Le séquençage de l'ARN Px montre que l'oligonucléotide CUUUUOH terminal manque (cf. Fig.21). Il suffit d'ajouter la protéine La recombinante aux extraits déplétés avant d'initier la transcription pour restaurer à la fois le nombre et la longueur des transcrits primaires. La présence de transcrits plus longs est incompatible avec l'hypothèse de Gottlieb et Steitz (51,52) qui suppose, qu'en absence de protéine La, la synthèse des transcrits Pol III s'arrête en amont des résidus U. La présence simultanée d'ARN normaux, plus longs ou plus courts suggère davantage que, la liaison de La avec les ARNs inhibe des activités enzymatiques capables d'allonger ou de dégrader les transcrits naissants.

iii) nous n'avons jamais observé l'augmentation du rapport P2/P1 dans les extraits déplétés en protéine La.

iv) nous avons montré que l'apparition du transcrit court Px peut être dissociée de la transcription par Pol III. En effet, l'incubation dans un extrait déplété d'un précurseur d'ARNt synthétisé par l'ARN T7 polymérase, génère des ARNs de tailles variables ainsi que l'ARN Px, de façon similaire à une réaction de transcription dans les extraits S-100 (cf. *Protéine La et stabilité des transcrits primaires*).

Nos résultats suggèrent que la protéine La de *Xenopus* n'est pas nécessaire à la synthèse des U finaux. Cependant, la variation du rapport P2/P1 ne constitue pas un argument majeur si on considère que les complexes de transcription qui synthétisent les transcrits P1 sont déficients pour la reconnaissance d'un signal de terminaison constitué seulement de quatre T dans le brin non codant de l'ADN. Néanmoins, la présence d'ARNs P1 et P2 plus longs dans des extraits déplétés en La contrarie l'idée que La est nécessaire pour compléter les transcrits Pol III et qu'en absence de La les complexes de transcription pausent en amont des résidus U. Nous avons d'ailleurs confirmé en fractionnant les extraits pour séparer les activités transcriptionnelles et nucléasiques, que les ARN synthétisés en absence de La sont complets et qu'ils possèdent une extrémité 3' normale (résultats non montrés).

Protéine La et stabilité des transcrits primaires

Nous avons discuté précédemment qu'il est peu probable que La soit impliquée dans la synthèse des résidus U terminaux des transcrits Pol III. Dans ce cas, comment expliquer la présence du transcrit court Px dans les extraits déplétés en La? Le profil de transcription observé en absence de protéine La, c'est à dire une grande hétérogénéité de taille des ARNs, nous conduit à émettre l'hypothèse que la protéine La stabilise les transcrits naissants synthétisés par Pol III. Cette hypothèse constitue une interprétation alternative à celle de Gottlieb et Steitz si on envisage qu'une nucléase co-migre avec les complexes β et dégrade les ARNs non protégés à leur extrémité 3' par la protéine La. En effet, la majorité des résultats obtenus par ce groupe peut s'expliquer par la présence d'une telle activité, exceptée l'expérience de Pulse-Chase. Cette expérience décrit que le transcrit court EBER2 synthétisé dans un extrait déplété en protéine La, retrouve une longueur normale après l'addition d'extrait S-100 ou de protéine recombinante purifiée. Cependant, nous n'avons pas d'explication pour interpréter ce résultat dans l'hypothèse d'une activité nucléasique.

L'expérience réalisée dans la figure 17 ne permet pas de distinguer si l'ARN est modifié à son extrémité 5' ou 3', de même qu'on ne peut faire la distinction entre un effet transcriptionnel ou post-transcriptionnel. En effet, si comme le suggère Gottlieb et Steitz (51,52), la protéine La est associée au facteur d'initiation TFIIC, une co-déplétion de La et de TFIIC pourrait conduire à une déficience dans l'assemblage du complexe d'initiation. Par conséquent, la polymérase, mal positionnée sur le site d'initiation, débiterait la synthèse en amont et en aval du site +1.

Pour distinguer entre ces possibilités, nous avons choisi d'incuber dans des extraits préalablement immunodéplétés avec le sérum pré-immun ou le sérum immun, un précurseur d'ARN synthétisé in vitro par l'ARN T7 polymérase (Fig.22). Nous avons remarqué que l'ARN incubé dans des extraits déplétés en La est très instable et que sa taille subit les mêmes fluctuations que dans l'expérience de transcription (Fig.17 et ci-dessus). De plus, le même transcrit court Px s'accumule. La stabilité des ARNs est complètement restaurée quand la protéine La recombinante est ajoutée simultanément aux précurseurs. Ces expériences suggèrent que le mécanisme responsable de l'altération des transcrits primaires est un événement post-transcriptionnel qui agit sur l'extrémité 3' des transcrits. L'activité enzymatique allongeant le transcrit est supposée être une

poly(U)-polymérase, déjà identifiées et purifiées à partir d'extraits cellulaires (4). De même, nous expliquons le raccourcissement des ARNs par une activité nucléasique, et plus précisément 3' exonucléasique, dont certaines ont été reportées comme nécessaires à la maturation de nombreux ARNs comme U1, U6, des ARNs ribosomiques ou des ARNt (14,121,157). La structure secondaire du précurseur permet à elle seule d'expliquer l'accumulation du transcrit Px. En effet, le précurseur possède une structure secondaire en forme d'épingle à cheveux juste en amont de la séquence UUUUOH (Fig.19). Dans l'hypothèse où le précurseur d'ARNt est dégradé à partir de son extrémité 3' par une exonucléase, les régions simple brin de la molécule sont sensibles à l'activité nucléasique, contrairement aux régions double brin. La présence d'une structure secondaire pourrait donc ralentir provisoirement la dégradation de l'ARN ayant comme conséquence l'accumulation de Px. A cet égard, en réexaminant les données obtenues avec l'ARN VA200 (52), le séquençage du transcrit court synthétisé dans un extrait déplété en protéine La révèle une diminution, non seulement du nombre de mole d'oligonucléotide terminal, mais aussi du nombre de mole d'oligonucléotide CUAG. Cet oligonucléotide se situe juste en amont de l'oligo(U) correspondant à la séquence 3' terminale de l'ARN. Cette séquence CUAG fait partie d'une région d'ARN simple brin, donc sensible à l'action d'une exonucléase qui digère le transcrit dans le sens 3'→5'. La diminution de cet oligonucléotide est donc compatible avec l'idée que l'interaction de la protéine La avec un transcrit Pol III stabilise cet ARN en le protégeant d'une activité exonucléasique. Par contre, il discrédite le modèle selon lequel la protéine La est nécessaire pour la synthèse des résidus U terminaux. Nous avons d'ailleurs vérifié que des précurseurs d'ARNt mutés dans la région 3' dans le but d'éliminer les structures secondaires sont instables en absence de La et surtout ne génèrent pas l'ARN Px (Fig.16 et résultats non montrés).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'apparition d'un transcrit incomplet auquel il manque les résidus U terminaux est indépendante de la transcription par Pol III. Au contraire, la présence d'un tel transcrit s'explique par sa dégradation 3' exonucléasique. Il semble donc que la protéine La protège l'extrémité 3' des transcrits Pol III et que l'activité exonucléase responsable de leur dégradation est inhibée par des structures secondaires.

Protéine La et relâchement des transcrits Pol III.

La terminaison de la transcription implique deux événements successifs: l'arrêt de la synthèse du transcrit naissant et son relâchement du complexe de transcription. Cette

disruption du complexe ternaire (ADN/ARN/Pol III) est sensé permettre le recyclage de la polymérase pour d'autres tours de transcription.

Nous avons montré en utilisant des approches différentes que la protéine La de *Xenopus* n'est pas nécessaire pour faciliter le relâchement des transcrits naissants.

La première approche consiste à comparer l'efficacité de transcription d'un extrait déplété en protéine La en présence ou en absence d'héparine (Fig.24B). L'héparine est couramment utilisée comme inhibiteur de la réinitiation. Ce genre d'expérience permet de quantifier les transcrits synthétisés en un tour de transcription (71). Si La est nécessaire pour relâcher les transcrits naissants, et par conséquent pour recycler la polymérase, le nombre d'ARNs synthétisés dans un extrait déplété à près de 99% en protéine La doit correspondre au nombre d'ARNs synthétisés en un seul tour de transcription. Nous avons montré que de tels extraits sont capables d'assurer plusieurs tours de transcription avec une efficacité de transcription similaire à celle d'extraits traités avec le sérum pré-immun. Nous avons estimé que les deux types d'extraits réinitient la transcription près de 30 fois si l'on considère seulement 30% des matrices engagées avec un complexe de transcription (Fig.24B et 27B). Ce nombre de matrices actives a été déterminé sur la base des expériences réalisées en présence d'héparine. Au total sont synthétisées environs 30 fmol de transcrits. Or, les extraits, déplétés à 99% en protéine La, contiennent encore entre 20 à 30 fmol de protéine. Afin de déterminer si la protéine La restant dans ces extraits est fonctionnelle, nous avons immunoprécipité les transcrits néo-synthétisés avec les anticorps α -La. L'absence d'ARNs précipités prouve que ces derniers ne sont pas engagés dans une liaison avec la protéine La. Ces résultats suggèrent que La n'est pas nécessaire au recyclage de la polymérase, en d'autres termes au relâchement du transcrit. De plus, la longueur des ARNs P1 et P2 est identique pour les deux types d'extraits. Cette observation nous permet d'appuyer la conclusion du paragraphe précédent, à savoir que la synthèse des résidus U terminaux ne dépend pas de la présence de La. D'autre part, nous pouvons affirmer que dans ces conditions expérimentales, une durée de transcription égale à 5mn permet exclusivement l'analyse d'évènements transcriptionnels et non post-transcriptionnels puisque les formes maturées ou dégradées des ARNs n'apparaissent pas sur le gel, même en absence de protéine La. Nous pouvons aussi remarquer que l'addition de protéine La n'augmente pas le nombre de précurseurs synthétisés signifiant que dans un extrait normal, la protéine La n'est pas un facteur limitant de la transcription par Pol III. L'immunoprécipitation des transcrits, suite à l'addition de protéine La recombinante, suggère pourtant que cette protéine est fonctionnelle. Bien sûr, nous ne pouvons affirmer que la protéine recombinante est entièrement active, sur la seule base de sa liaison avec les transcrits primaires. L'absence de modifications post-traductionnelles telles que les

phosphorylations ou glycosylations sur une protéine d'origine eucaryote produite dans *E. coli*, peuvent être nécessaires pour assurer d'autres fonctions à la protéine La.

La seconde approche consiste à immobiliser le gène d'ARNtPhe sur des billes magnétiques par l'intermédiaire d'une forte liaison entre la biotine et la streptavidine (Fig.28B). Après formation et lavages des complexes binaires (ADN/Pol III), la transcription est initiée par addition des NTPs, puis la réaction est séparée en une fraction relâchée ou retenue. La fraction relâchée contient les ARNs libres ou sous forme de RNP. La fraction retenue contient les ARNs attachés au complexe de transcription. Comme précédemment, si La permet de relâcher les transcrits naissants, les ARNs synthétisés à partir d'un extrait déplété en protéine La doivent rester accrochés aux billes par l'intermédiaire du complexe de transcription. Cette expérience montre que plus de 90% des ARNs synthétisés dans de tels extraits sont relâchés du complexe. Ces ARNs se trouvent sous forme libre, non associés à la protéine La, puisqu'ils ne peuvent être précipités par les anticorps α -La. Contrairement aux extraits déplétés avec le sérum pré-immun, les extraits déplétés avec les anticorps α -La contiennent quelques ARNs matures. Ce phénomène peut s'expliquer par un rinçage insuffisant des complexes. En effet, nous avons remarqué que la maturation des précurseurs transcrits dans un extrait α -La est plus rapide (cf. ci-dessous *Protéine La et maturation des transcrits Pol III*). Dans ce cas, en présence d'activité résiduelle de maturation, les précurseurs qui ne sont pas liés à leur extrémité 3' par la protéine La sont maturés. Toutefois, il semble que le rinçage ait permis l'élimination des nucléases puisque le nombre de précurseurs synthétisés dans les deux types d'extrait (déplété et non déplété) est similaire. De plus, le nombre d'ARNs des fractions retenues étant équivalent pour chaque extrait, ceci est un argument supplémentaire pour dire que la protéine La de *Xenopus* n'est pas nécessaire au relâchement des transcrits Pol III.

Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs groupes suggérant que la polymérase III est capable de terminer et donc de relâcher un transcrit naissant en absence de tout autre facteur. Cette idée repose essentiellement sur deux expériences utilisant une fraction purifiée de la polymérase et sur une troisième expérience utilisant la génétique chez la levure:

i) la première expérience concerne la transcription du gène 5S somatique de *Xenopus* par la polymérase purifiée à partir d'extraits ovariens (31). Les auteurs montrent que si la polymérase ne peut initier correctement la transcription en absence de facteurs d'initiation, elle est cependant capable de terminer correctement la transcription des ARN

5S. Toutefois, la procédure analytique utilisée dans cette expérience ne permet pas de déterminer si les transcrits sont effectivement relâchés. Pourtant il est peu probable que le complexe soit dans un état de pause "forcée" par l'absence d'un éventuel facteur de relâchement. En effet, certaines polymérases qui rencontrent cette situation disposent d'une activité ribonucléasique 3'→5' (probablement dans la sous-unité β du noyau de la polymérase (14)) leur permettant de faire marche arrière pour tenter de surpasser l'obstacle qui provoque l'arrêt momentanée de l'élongation. C'est le cas aussi bien pour la polymérase d'*E. coli* (14), que pour l'ARN polymérase II (68) et la polymérase III (166). On peut alors imaginer que dans une telle situation, un certain nombre de transcrits plus courts doit apparaître. Or la longueur des ARNs identifiés dans cet article correspond toujours à celle attendue.

ii) la seconde expérience correspond à la transcription promoteur-indépendante du même gène. La transcription par une fraction purifiée de Pol III est initiée à partir d'une extrémité poly(dC) 3' surplombante (18). Dans ces conditions, 40% des transcrits se terminent au signal de terminaison caractéristique d'un gène de classe III, les 60% restants correspondent à des transcrits de fuite. Les auteurs montrent que non seulement Pol III purifiée est capable de terminer correctement la synthèse des transcrits mais aussi de relâcher ces derniers du complexe de transcription. Par contre, les transcrits de fuite forment des hybrides stables avec l'ADN. Il est intéressant de noter que l'addition de protéine La recombinante ne modifie pas le profil de transcription, c'est à dire que La n'est pas capable de déplacer l'ARN hybridé avec l'ADN. Ceci est en désaccord complet avec un manuscrit attribuant une activité ARN/ADN hélicase à la protéine La recombinante humaine (6). Cependant, ce manuscrit est aujourd'hui contesté car les anticorps monoclonaux utilisés pour purifier la protéine La se sont révélés reconnaître une autre protéine liant les ARNm, la protéine SC35 (20).

iii) la troisième expérience utilise la génétique de la levure en cherchant à compenser une mutation dans la séquence de terminaison d'un gène d'ARNt. La seule mutation compensatrice identifiée pour un tel défaut se localise dans la sous-unité C128 de la polymérase qui possède justement une certaine homologie avec la sous-unité β de la polymérase d'*E. coli* (64,65). A ce sujet, il est intéressant de noter qu'une mutation dans cette sous-unité β de la polymérase d'*E. coli* altère simultanément la pause et la terminaison de la transcription. Un temps de pause réduit corrèle avec une diminution de l'efficacité de terminaison. Ceci renforce l'idée que les mécanismes qui gouvernent la terminaison de la transcription sont intrinsèques aux polymérases (43).

La transcription est un mécanisme processif, c'est à dire qu'elle s'effectue avec une

vitesse variable (7,101). Des expériences réalisées avec la polymérase III purifiée de levure montrent que, très souvent, l'incorporation d'un A ou d'un U successif à un résidu U dans la chaîne ARN ralentit la vitesse d'élongation (7,101 et B. Hall communication personnelle). Il est possible d'imaginer que l'augmentation du temps de pause de la polymérase sur une séquence particulière favorise la disruption du complexe de transcription en relâchant l'ARN naissant et en recyclant la polymérase. La nature même de la séquence 3' terminale des transcrits Pol III, UUUUOH, représente des conditions particulièrement défavorables à la poursuite de l'élongation puisqu'elle implique des additions successives de résidus U.

De récentes expériences suggèrent que la polymérase III purifiée à partir de germe de blé reconnaît seule le signal de terminaison de la transcription et que les ARNs synthétisés sont complets et relâchés. Dans ce cas, ni l'addition d'extrait brut, ni l'addition de protéine La recombinante humaine ne modifie le profil de transcription (162). Ces résultats impliquent que, soit l'extrait ne contient pas de facteur semblable à la protéine La ou que la protéine La n'est pas un facteur de relâchement, ou encore que la protéine recombinante n'est pas fonctionnelle. Pourtant, un manuscrit récent indique que la protéine recombinante est active puisqu'il montre même qu'elle facilite le relâchement des transcrits Pol III (98). Dans cet article, un gène Alu, muté dans les séquences adjacentes au signal de terminaison T4, est immobilisé sur des billes d'agarose par l'intermédiaire d'une liaison streptavidine-biotine. Les réactions de transcription sont effectuées avec un complexe ternaire (ADN/ARN/Pol III) préalablement rincé pour éliminer la protéine La endogène. Dans ces conditions, les transcrits sont inefficacement relâchés. L'addition de protéine La recombinante, contrairement à l'addition de TFIID, s'accompagne d'un relâchement des ARNs puisque ceux-ci se retrouvent dans le surnageant. La question est désormais de savoir comment réconcilier ces résultats avec les nôtres, sachant que les approches utilisées sont sensiblement les mêmes.

Bien sûr, les systèmes étudiés sont différents et concernent les plantes, la levure, les amphibiens ou les mammifères. Mais cela est-il suffisant? Car s'il est possible que la protéine recombinante humaine ne complémente un extrait de germe de blé, il est peu probable qu'elle ne complémente pas aussi un extrait de *Xenopus*, étant donnée l'homologie entre ces deux protéines. D'autre part, la complémentation d'un extrait de levure était jusqu'à ce jour impossible faute d'identification de la protéine La dans cet organisme.

Si les fonctions des protéines La de *Xenopus* et humaine sont similaires, comment

expliquer la différence entre nos résultats et ceux de Maria et al. (98). Bien que nous ayons tous deux choisi d'immobiliser les gènes à transcrire, les conditions expérimentales varient dans la manière de former les complexes de transcription et dans les gènes immobilisés. En effet, dans notre cas, préalablement à la transcription, nous rinçons des complexes binaires (ADN/protéines) où l'ADN est un gène d'ARNt alors que Marais et al. rincent des complexes ternaires (ADN/ARN/protéines) où l'ADN est un gène Alu. On pourrait alors supposer que la protéine La, présente dans un complexe binaire, quitte ce complexe au moment de l'élongation. Ce phénomène a, par exemple, été démontré pour le facteur TFIIF. Cependant, cette explication est peu probable car nous utilisons des extraits déplétés dans lesquels plus de 99% de la protéine La a été éliminée. De plus, nous montrons que les ARNs relâchés dans le surnageant ne sont pas associés à la protéine La restante. Ce dernier résultat suggère que les traces de protéine La que nous n'arrivons pas à éliminer, n'est accessible ni aux anticorps, ni aux précurseurs.

Le choix d'ajouter TFIID à la place de La dans les extraits de transcription est quelque peu contestable, car il ne permet pas de distinguer entre un effet spécifique de La et un effet dû à une simple affinité pour l'ARN. La protéine La présente une grande affinité pour les séquences poly(U) terminales. La présence d'une telle protéine à proximité d'un complexe de transcription à l'arrêt (dans l'hypothèse où La est un facteur de relâchement) peut entraîner la disruption de ce complexe par l'intermédiaire de sa liaison avec l'ARN. Pour distinguer entre ces deux phénomènes (forte attraction ARN/La ou relâchement spécifique), il eut été plus judicieux d'utiliser comme contrôle négatif des protéines qui présentent elles aussi une affinité pour des séquences poly(U), telles que PUB1 (poly(U)-binding protein 1 (104)) ou PTB (polypyrimidine tract protein).

L'ensemble de nos résultats n'a pas apporté d'évidence quant au rôle de La dans la terminaison de la transcription par l'ARN polymérase III. Des expériences troublantes effectuées avec une fraction brute contenant la polymérase III de levure et les facteurs d'initiation montrent que des réactions de transcription simple tour génèrent des transcrits complets qui sont ultérieurement relâchés du complexe de transcription (101). De même, la présence de fractions hautement purifiées contenant Pol III d'une part et TFIIB d'autre part suffit pour assurer plusieurs tours de transcription. Les ARNs alors synthétisés sont complets et se terminent au signal de terminaison de la transcription pour Pol III (71). La composition de TFIIB et de Pol III indiquent qu'il est peu probable qu'un facteur intervienne pour relâcher le transcrit naissant. Cependant, seules des expériences de transcription utilisant des produits clonés permettront de confirmer cette hypothèse.

Protéine La et maturation des transcrits Pol III

Une particularité de la protéine La est son association transitoire avec les ARNs précurseurs synthétisés par Pol III. Dans l'hypothèse où la protéine La n'est pas un facteur de terminaison, quelle est la signification de cette liaison? Permet-elle de contrôler le transport nucléocytoplasmique de ces ARNs en assurant la rétention nucléaire des formes non matures? Dirige t-elle ces précurseurs vers des sites de maturation spécifiques par l'intermédiaire d'interactions avec d'autres protéines nucléaires? Assure t-elle essentiellement la protection des nouveaux transcrits contre la dégradation par des 3' exonucléases?

Nous avons remarqué qu'en absence de protéine La, les précurseurs qui échappent à la dégradation nucléasique sont plus rapidement maturés que dans un extrait normal (Fig.22). Les formes matures apparaissent après 15mn d'incubation dans un extrait α -La, contre 30mn dans un extrait normal. Inversement, l'excès de protéine La ralentit la vitesse de maturation des précurseurs (Fig.17 et 22). Ce ralentissement concerne l'extrémité 3' du précurseur puisque les formes intermédiaires de maturation, qui correspondent au précurseur maturé à l'extrémité 5' par la RNaseP, s'accumulent. Cette inhibition de la maturation 3' des précurseurs Pol III a été mentionnée dans des organismes tels que la levure *S. cerevisiae* (14) et la drosophile *D. melanogaster* (87,124). Par exemple, les précurseurs d'ARN 5S synthétisés dans un extrait de levure en présence d'un excès d'oligonucléotide (Up)₄UOH sont raccourcis à leur extrémité 3'. Dans ces conditions de transcription, le nombre d'ARNs matures est diminué. Ce résultat suggère qu'une protéine "La-like" qui reconnaît des séquences riches en U se lie aux précurseurs pour les protéger d'une activité 3' nucléasique et participe ainsi à la régulation fonctionnelle des ARN 5S (14). On ignore les séquences nucléotidiques et la nature des protéines impliquées dans la maturation de cet ARN, mais la destruction de certaines structures secondaires inhibe le processus de maturation. Chez la levure comme chez la drosophile, on suppose que ce processus fait intervenir une 3' exonucléase. Chez la drosophile, on a remarqué que l'extrémité 3' de l'ARN 5S prémature, constituée d'une série de résidus U (U5) inhibe l'activité 3' exonucléase impliquée dans la réaction de maturation (125). Une protéine d'environ 50 kDa, affine pour le poly(U) simple brin est responsable de cette inhibition (87). L'importance de la protéine La (ou d'une protéine analogue) dans la maturation du précurseur de l'ARN 5S a été mentionnée préalablement pour maintenir les formes précurseurs dans le noyau (53) et pour assurer à cet ARN, naturellement instable, une maturation en un produit fonctionnel (124). Ces éventuelles

fonctions pour La peuvent être transposées aux précurseurs d'ARNt car il semble que chez la levure, la maturation de l'extrémité 3' des ARN 5S et des ARNt partagent certains composants. En effet, des précurseurs d'ARNt dimériques et d'ARN 5S partiellement maturés s'accumulent dans les cellules *rna82* qui possèdent une mutation dans l'endonucléase impliquée dans la maturation des pré-ARNt dimériques. Le séquençage des produits intermédiaires de maturation a révélé qu'une 3' exonucléase qui catalyse le raccourcissement des pré-ARNt pourrait être identique à l'activité qui raccourcit l'extrémité 3' des pré-ARN 5S (121).

De même, la protéine La pourrait être un régulateur fonctionnel de l'ARN U6 puisque seule la forme précurseur est liée à la protéine. Une modification à l'extrémité 3' ou 5' de l'ARN U6 libère l'ARN des particules La-RNP, permettant son association avec U4 (157), les particules snRNP U4/U6 correspondant aux formes actives dans l'épissage des ARNm.

Protéine La et traduction des ARNm

Récemment, il a été proposé que La facilite l'initiation interne de la traduction des ARNm (109,152). Ce processus est essentiellement étudié chez les virus tels le virus de la poliomyélite ou de l'encéphalomyocardite. Il s'oppose au modèle de "scanning" du ribosome selon lequel le ribosome atteint le codon initiateur AUG en s'ancrant d'abord sur l'extrémité 5' coiffée de l'ARNm et en parcourant cet ARN jusqu'à rencontrer la meilleure séquence consensus pour l'initiation de la traduction. Comment expliquer l'effet de la protéine La sur la traduction *in vitro* de l'ARNm du Poliovirus? Existe-t-il des ARNm cellulaires également traduits par des mécanismes d'initiation interne et qui nécessitent la présence de La?

L'augmentation de l'efficacité globale de traduction de l'ARNm du Poliovirus n'est pas spécifique à la protéine La. D'autres protéines comme GEF (guanine nucleotide exchange factor) et le facteur d'initiation de la traduction eIF-2 augmentent la quantité de protéines produites dans un extrait de réticulocyte de lapin (152). Cependant, seule La corrige l'initiation de la traduction en permettant l'utilisation préférentielle du codon d'initiation pour la protéine virale P1 et en diminuant l'initiation sur des codons AUG qui conduisent à la synthèse de protéines aberrantes. Alors que la protéine La se localise principalement dans le noyau, ce même groupe a montré que, suite à l'infection virale, la protéine La est redistribuée préférentiellement dans le cytoplasme (109). Ce phénomène n'est pas isolé et il existe d'autres exemples où des protéines changent de compartiment cellulaire en se

liant avec un ARN viral (159). Or on sait que La lie directement l'ARN viral dans sa région 5' non traduite (5'UTR). Cette région 5'UTR contient le motif hautement conservé caractéristique de l'initiation cap-indépendante de la traduction. Cette région est très structurée et la nécessité de La pour aider l'initiation interne de la traduction revêt une dimension particulière depuis la découverte très récente que La possède aussi la capacité de dérouler un double brin d'ARN (171). On imagine aisément qu'une telle fonction facilite la lecture du ribosome sur l'ARN. Dans l'hypothèse où le meilleur codon initiateur serait masqué par une structure secondaire, le ribosome initierait la traduction sur d'autres codons AUG donnant des protéines aberrantes. La présence de la protéine La rendrait accessible le bon codon initiateur au ribosome, en déstabilisant les structures secondaires de la région 5'UTR. Bien qu'il existe dans les cellules, des ARNm traduits par un mécanisme d'initiation interne (106,116), on ignore actuellement si La est utilisée de façon similaire par l'appareil traductionnel.

Une protéine La existe chez la levure *S.cerevisiae*

Malgré certaines évidences mentionnant l'existence d'une protéine "La-like" chez la levure, toutes les approches utilisées pour identifier une telle protéine ont échoué (14,64,65). Pourtant le fait de déstabiliser un pré-ARN 5S simplement par un excès d'oligo(U) constitue une bonne indication pour dire qu'une protéine capable de lier une séquence riche en U existe dans un extrait cellulaire de levure (14). Nous avons montré à l'aide d'un test fonctionnel qu'effectivement, ces extraits contiennent une protéine qui lie préférentiellement un précurseur d'ARNt se terminant par la séquence UUUUOH (Fig.29). Une protéine qui présente les mêmes caractéristiques a été clonée en isolant le gène YLA1 à partir d'une banque génomique de *S. cerevisiae* à l'aide d'un oligonucléotide spécifique pour la partie 5' codante (Fig.32 et 37). D'autres approches se sont révélées infructueuses, soit parce que le sérum α -La de lapin reconnaissant une protéine de levure d'environ 52 kDa contenait trop d'anticorps dirigés contre des protéines d'*E. coli*, soit parce que la surexpression de la protéine La de *Xenopus* dans la levure ne perturbait pas la croissance de la cellule hôte. Cet effet de tolérance apparente pour la protéine de *Xenopus* peut s'expliquer principalement par deux raisons. Soit la protéine de *Xenopus* ne complémente pas celle de *S. cerevisiae*, soit la protéine de levure n'est pas essentielle à la viabilité cellulaire. Ceci a d'ailleurs été confirmé ultérieurement en disruptant le gène YLA1 avec le marqueur de sélection URA3. L'analyse des tétrades donnant quatre spores viables sur milieu riche ou une ségrégation 2/2 sur milieu sélectif

confirme que ce gène n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire. Il existe d'ailleurs d'autres exemples dans cet organisme où des gènes codant des protéines qui lient l'ARN ne sont pas essentiels (32).

La comparaison des séquences protéiques a révélé que la protéine La de levure (LaY) est 34% homologue à la protéine de *Xenopus* et jusqu'à 40% homologue à la protéine humaine (Tableau 2). L'homologie avec les protéines La des eucaryotes supérieurs atteint même 74% si on ne considère que le 192 premiers acides aminés. Ces pourcentages suffisent pour soutenir l'idée que LaY est probablement l'homologue fonctionnel de la protéine La puisque l'homologie entre le facteur d'initiation TFIIA de levure et celui de *Xenopus* ne dépasse pas 20% (5,170). Sur la base de cette comparaison nous avons défini les motifs RNP1 et RNP2 qui ressemblent aux régions consensus de liaison à l'ARN. La structure du motif RNP consiste en quatre brins β antiparallèles maintenus par deux hélices α (73,102). La partie qui contacte l'ARN se situe généralement sur les brins β 2 et β 3 ainsi que sur la boucle qui les relie. Cette boucle étant très variable selon les motifs RNPs, elle est supposée conférer la spécificité de liaison à l'ARN.

Dans la protéine de levure, les régions RNP qui ressemblent aux motifs RNP1 et RNP2 sont moins bien conservées que pour l'ensemble des autres protéines La (cf. Fig.34). Il semble que, dans la levure, le motif RNP est souvent peu homologue au motif RNP des eucaryotes supérieurs. Il peut même être parfois très variable entre les protéines de levure, au point d'être assez distant de la séquence consensus RNP (32). Pour vérifier si la séquence RNP1 identifiée dans la protéine LaY correspond à la région de la protéine qui contacte l'ARN, nous avons construit quelques mutants (Fig.38). Nous avons déterminé une région comprise entre les acides aminés 136 et 185 qui contient RNP1 comme nécessaire pour lier l'ARN (Fig.40). Cependant, le changement du deuxième et du troisième acide aminé de RNP1 ne modifie pas la liaison avec l'ARN (Fig.41). Alors que ces acides aminés sont généralement importants pour la liaison protéine/ARN, il semble que dans la levure, d'autres acides aminés sont impliqués dans la liaison de La avec les précurseurs d'ARNt. Des expériences de mutagenèse supplémentaires sont nécessaires pour définir avec plus de précision les points de contacts entre la protéine La et un ARN simulant un transcrit Pol III.

En se basant sur la capacité de la protéine LaY à lier un précurseur d'ARNt (UUUUOH) et sur l'homologie de séquence qui existe entre cette protéine et les autres protéines La, LaY est défini comme l'homologue fonctionnel de la protéine La chez la levure. Bien sûr, nous ne pouvons exclure la possibilité qu'il existe une autre protéine équivalente dans cet

organisme. L'existence d'une telle protéine pourrait d'ailleurs expliquer l'absence de phénotype particulier suite à la disruption du gène YLA1. Cependant, le résultat négatif concernant l'immunoprécipitation des La-RNP formées à partir de la protéine LaY traduite dans un extrait de germe de blé ne signifie pas obligatoirement que le sérum α -La reconnaît dans l'extrait brut une autre protéine capable de se substituer à la protéine LaY. En effet, les extraits de germe de blé produisent peu de protéines. Or, nous savons que les anticorps α -La dirigés contre la protéine de *Xenopus* ont peu d'affinité pour la protéine de levure. Il est donc possible que ces expériences aient été réalisées en dessous du seuil de détectabilité. Cependant, on ne peut exclure qu'il existe dans la levure une autre protéine qui ressemble à la protéine La. En effet, d'après un gel d'électrophorèse en deux dimensions de protéines isolées à partir de *S. cerevisiae* sur la base de leur affinité pour la séquence poly(U), au moins trois protéines basiques peuvent être identifiées. Une de ces protéines migre avec un poids moléculaire apparent de 37 kDa et pourrait correspondre à la protéine que nous avons clonée. Une autre protéine qui semble avoir le même point isoélectrique (pI) migre avec un poids moléculaire apparent égal à 56 kDa. Une troisième protéine de 52 kDa, possédant un pI légèrement plus basique, est nettement plus abondante que les protéines précédentes. Les protéines de 52 kDa et 56 kDa représentent des candidats potentiels pour suppléer la protéine LaY dans les cellules dont le gène YLA1 a été interrompu par le marqueur URA3.

Perspectives

La découverte chez la levure d'une protéine qui ressemble à la protéine La va suscité sans nul doute un grand intérêt. Des expériences peuvent désormais être réalisées dans cet organisme pour tenter d'éclaircir le rôle de La dans la terminaison de la transcription des gènes de classe III. Le fait que le gène YLA1 soit unique et non essentiel à la viabilité cellulaire permet d'étudier à l'aide de méthodes biochimiques, la synthèse et le devenir des transcrits Pol III en absence totale de protéine LaY. En effet, il est maintenant possible d'éliminer complètement la protéine La d'un extrait cellulaire par délétion chromosomale du gène YLA1 et de comparer directement la transcription d'un gène de classe III en absence ou en présence de La. De telles expériences permettront de confronter le modèle qui propose la protéine La comme facteur de relâchement du transcrit (51,52,98) et celui qui suggère que l'ARN polymérase III termine efficacement la transcription en absence de facteur protéique (7,18,31,64,65,101,162).

L'utilisation du pouvoir génétique des levures permettra peut-être d'identifier d'autres fonctions pour la protéine La. L'approche qui consiste à utiliser des mutants thermosensibles de La et à identifier les mutations compensatrices seront importantes pour confirmer le rôle de La dans la terminaison de la transcription ou, au contraire pour suggérer de nouvelles fonctions pour la protéine. Par exemple, des investigations sur le rôle potentiel de La dans le transport ou la maturation des transcrits synthétisés par Pol III sont désormais facilitées, sans oublier une fonction éventuelle de La dans l'initiation interne de la traduction. Les années qui suivent seront certainement très riches en découvertes et permettront sans doute d'éclaircir le mystère quant à la fonction de la protéine La.

REFERENCES

1. **Nikolov, D. B., Hu, S-H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N-H., Roeder, R.G. and B** 1992. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* **360**:40-46.
2. **Adeniyi-Jones, S., P. H. Romeo, and M. Zasloff.** 1984. Generation of long read-through transcripts in vivo and in vitro by deletion of 3' termination and processing sequences in the human tRNAⁱ met gene. *Nucleic Acids Res.* **12**:1101-1115.
3. **Allison, D. S. and B. D. Hall.** 1985. Effects of alterations in the 3' flanking sequence on in vivo and in vitro expression of the yeast SUP4-0 tRNA^{Tyr} gene. *EMBO J.* **4**:2657-2664.
4. **Andrews, N. C. and D. Baltimore.** 1986. Purification of a terminal uridylyltransferase that acts as host factor in the in vitro poliovirus replicase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:221-225.
5. **Archambault, J., C. A. Milne, K. T. Schappert, B. Baum, J. D. Friesen, and J. Segall.** 1992. The deduced sequence of the transcription factor TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* reveals extensive divergence from *Xenopus* TFIIIA. *J. Biol. Chem.* **267**:3282-3288.
6. **Bachmann, M., K. Pfeifer, H. C. Schröder, and W. E. G. Müller.** 1990. Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell* **60**:85-93.
7. **Bardeleben, C., G. A. Kassavetis, and P. E. Geiduschek.** 1994. Encounters of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III with its transcription factors during RNA chain elongation. *Jour. of Mol. Biol.* **235**:1193-1205.
8. **Bartholomew, B., D. Durkovich, G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek.** 1993. Orientation and topography of RNA polymerase III in transcription complexes. *Mol. Cell Biol.* **13**:942-952.
9. **Bartholomew, B., G. A. Kassavetis, B. R. Braun, and E. P. Geiduschek.** 1990. The subunit structure of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIC probed with a novel photocrosslinking reagent. *EMBO J.* **9**:2197-2205.
10. **Bartholomew, B., G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek.** 1991. Two components of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIB (TFIIIB) are stereospecifically located upstream of a tRNA gene and interact with the second-largest subunit of TFIIIC. *Mol. Cell Biol.* **11**:5181-5189.
11. **Bogenhagen, D. F. and D. D. Brown.** 1981. Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination. *Cell* **24**:261-270.
12. **Braun, B. R., B. Bartholomew, G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek.** 1992. Topography of transcription factor complexes on the *Saccharomyces cerevisiae* 5 S RNA gene. *J. Mol. Biol.* **228**:1063-1077.
13. **Braun, B. R., D. L. Riggs, G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek.** 1989. Multiple states of protein-DNA interaction in the assembly of transcription complexes on *Saccharomyces cerevisiae* 5S ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:2530-2534.
14. **Brow, D. A** 1987. In vitro transcripts of a yeast variant 5S rRNA gene exhibit alterations in 3'-end processing and protein binding. *J. Biol. Chem.* **262**:13959-13965.
15. **Brow, D. A., and Guthrie, C.** 1990. Transcription of a yeast U6 snRNA gene requires a polymerase III promoter element in a novel position. *Genes & Dev.* **4**:1345-1356.
16. **Buratowski, S. and H. Zhou.** 1992. Transcription factor IID mutants defective for interaction with transcription factor IIA. *Science* **255**:1130-1132.

17. **Burnol, A. F., F. Margottin, J. Huet, G. Almouzni, M. N. Prioleau, M. Mechali, and A. Sentenac.** 1993. TFIIC relieves repression of U6 snRNA transcription by chromatin. *Nature* **362**:475-477.
18. **Campbell, F. E. and D. R. Setzer.** 1992. Transcription termination by RNA polymerase III : uncoupling of polymerase release from termination signal recognition. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2260-2272.
19. **Carbon, P. and Krol, A.** 1991. Transcription of the *Xenopus laevis* selenocysteine tRNA (Ser) Sec gene : a system that combines an internal B box and upstream elements also found in U6 snRNA genes. *EMBO J.* **10**:599-606.
20. **Carmo-Fonseca, M., R. Pepperkok, B. S. Sproat, W. Ansorge, M. S. Swanson, and A. I. Lamond.** 1991. In vivo detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells. *EMBO J.* **10**:1863-1873.
21. **Chambers, J. C., M. G. Kurilla, and J. D. Keene.** 1983. Association between the 7S RNA and the lupus La protein varies among cell types. *J. Biol. Chem.* **258**:11438-11441.
22. **Chen, H. C., L. England, and C. M. Kane.** 1992. Characterization of a HeLa cDNA clone encoding the human SII protein, an elongation factor for RNA polymerase II. *Gene* **116**:253-258.
23. **Cheng, S. W., E. C. Lynch, K. R. Leason, D. L. Court, B. A. Shapiro, and D. I. Friedman.** 1991. Functional importance of sequence in the stem-loop of a transcription terminator. *Science* **254**:1205-1207.
24. **Chiang, C. M., H. Ge, Z. Wang, A. Hoffmann, and R. G. Roeder.** 1993. Unique TATA-binding protein-containing complexes and cofactors involved in transcription by RNA polymerases II and III. *EMBO J.* **12**:2749-2762.
25. **Chodchoy, N., N. B. Pandey, and W. F. Marzluff.** 1991. An intact histone 3' processing site is required for transcription termination in a mouse histone H2a gene. *Mol. Cell. Biol.* **11**:497-509.
26. **Colbert, T. and S. Hahn.** 1992. A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* **6**:1940-1949.
27. **Comai, L., N. Tanese, and R. Tjian.** 1992. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* **68**:965-976.
28. **Connelly, S. and J. L. Manley.** 1989. RNA polymerase II transcription termination is mediated specifically by protein binding to a CCAAT box sequence. *Mol. Cell. Biol.* **9**:5254-5259.
29. **Cormack, B. P. and K. Struhl.** 1992. The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell* **69**:685-696.
30. **Cormack, B. P. and Struhl K.** 1993. Regional codon randomization : defining a TATA-binding protein surface required for RNA polymerase III transcription. *Science* **262**:244-248.
31. **Cozzarelli, N. R., S. P. Gerrard, M. Schlissel, D. D. Brown, and D. F. Bogenhagen.** 1983. Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S RNA genes. *Cell* **34**:829-835.
32. **Cusick, M. E.** 1994. RNP1, a new ribonucleoprotein gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **22**:869-877.

33. **Daga, A., V. Micol, D. Hess, R. Aebersold, and G. Attardi.** 1993. Molecular characterization of the transcription termination factor from human mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**:8123-8130.
34. **Das, A.** 1993. Control of transcription termination by RNA-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:893-930.
35. **Deuschle, U., R. A. Hipskind, and H. Bujard.** 1990. RNA polymerase II transcription blocked by *E. coli* lac repressor. *Science* **248**:480-483.
36. **Dieci, G., L. Duimio, F. Coda Zabetta, K. U. Sprague, and S. Ottonello.** 1993. A novel RNA polymerase III transcription factor fraction that is not required for template commitment. *J. Biol. Chem.* **268**:11199-11207.
37. **Dunstan, H. M., L. S. Young, and K. U. Sprague.** 1994. TFIIR is an isoleucine tRNA. *Mol. Cell. Biol.* **14**:3588-3595.
38. **Dunstan, H. M., L. S. Young, and K. U. Sprague.** 1994. TFIIR plays an indirect role in silkworm class III transcription in vitro and inhibits low-frequency DNA cleavage. *Mol. Cell. Biol.* **14**:3596-3603.
39. **Emerson, B. M. and R. G. Roeder.** 1984. DNA sequences and transcription factor interactions of active and inactive forms of mammalian 5S RNA genes. *J. Biol. Chem.* **259**:7926-7935.
40. **Enriquez Harris, P., N. Levitt, D. Briggs, and N. J. Proudfoot.** 1991. A pause site for RNA polymerase II is associated with termination of transcription. *EMBO J.* **10**:1833-1842.
41. **Eschenlauer, J. B., Kaiser, M.W., Gerlach, V.L. and Brow, D.A** 1993. Architecture of a yeast U6 RNA gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **13**:3015-3026.
42. **Field, S. and Song, O.K.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
43. **Fisher, R. F. and C. Yanofsky.** 1983. Mutations of the beta subunit of RNA polymerase alter both transcription pausing and transcription termination in the trp operon leader region in vitro. *J. Biol. Chem.* **258**:8146-8150.
44. **Francoeur, A. M. and M. B. Mathews.** 1982. Interaction between VA RNA and the lupus antigen La: formation of a ribonucleoprotein particle in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:6772-6776.
45. **Frendewey, D., Barta, I., Gillespie, M., Potashkin, J.** 1990. *Schizosaccharomyces* U6 genes have a sequence within their introns that matches the box B consensus of tRNA internal promoters. *Nucleic Acids Res.* **18**:2025-2032.
46. **Friedman, D. I., M. J. Imperiale, and S. L. Adhya.** 1987. RNA 3' end formation in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genetics* **21**:453-488.
47. **Gabrielsen, O. S. and Sentenac, A.** 1991. RNA polymerase III (C) and its transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **16**:412-416.
48. **Gabrielsen, O. S., N. Marzouki, A. Ruet, A. Sentenac, and P. Fromageot.** 1989. Two polypeptide chains in yeast transcription factor tau interact with DNA. *J. Biol. Chem.* **264**:7505-7511.
49. **Geiduschek, E. P. and Tocchini-Valentini, G.P.** 1988. Transcription by RNA polymerase III. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:873-914.

50. Ginsberg, A. M., B. O. King, and R. G. Roeder. 1984. Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell* **39**:479-489.
51. Gottlieb, E. and J. A. Steitz. 1989. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* **8**:851-861.
52. Gottlieb, E. and J. A. Steitz. 1989. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBO J.* **8**:841-850.
53. Guddat, U., A. H. Bakken, and T. Pieler. 1990. Protein-mediated nuclear export of RNA:5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus laevis*. *Cell* **60**:619-628.
54. Habets, W. J., J. H. Den Brok, A. M. T. Boerbooms, L. B. A. Van de Putte, and W. J. van Venrooij. 1983. Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. *EMBO J.* **2**:1625-1631.
55. Hartl, P., Gottesfeld, J. and Forbes, D. J. 1993. Mitotic repression of transcription in vitro. *J. Cell. Biol.* **120**:613-624.
56. Hernandez, N. 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes & Dev.* **7**:1291-1308.
57. Hernandez, N., 1992. snRNA gene transcription. *Transcriptional regulation CSH Laboratory Press Monographie* **20**:286-306.
58. Hess, J., C. Perez-Stable, J-G. Wu, B. Weir, I. Tinico, and C. K. J. Shen. 1985. End to end transcription of an Alu family repeat. A new polymerase III dependent terminator and its evolutionary implication. *Jour. of Mol. Biol.* **185**:7-21.
59. Horwitz, R. J., J. Li, and J. Greenblatt. 1987. An elongation control particle containing the N gene transcription termination protein of bacteriophage lambda. *Cell* **51**:631-641.
60. Howe, J. G. and Shu, M. D. 1989. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes : unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* **57**:825-834.
61. Howe, J. G. and Shu, M. D. 1993. Upstream basal promoter element important for exclusive RNA polymerase III transcription of the EBER 2 gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**:2655-2665.
62. Huibregtse, J. M. and D. R. Engelke. 1989. Genomic footprinting of a yeast tRNA gene reveals stable complexes over the 5'-flanking region. *Mol. Cell Biol.* **9**:3244-3252.
63. Hyman, L. E. and C. L. Moore. 1993. Termination and pausing of RNA polymerase II downstream of yeast polyadenylation sites. *Mol. Cell Biol.* **13**:5159-5167.
64. James, P. and B. D. Hall. 1990. ret1-1, a yeast mutant affecting transcription termination by RNA polymerase III. *Genetics* **135**:293-303.
65. James, P., S. Whelen, and B. D. Hall. 1991. The RET1 gene of yeast encodes the second-largest subunit of RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* **266**:5616-5624.
66. Jeng, S. T., J. F. Gardner, and R. I. Gumpert. 1990. Transcription termination by bacteriophage T7 RNA polymerase at Rho-independent terminators. *J. Biol. Chem.* **265**:3823-3830.

67. **Johnson, D. L. and S. L. Wilson.** 1989. Identification of a 150-kilodalton polypeptide that copurifies with yeast TFIIC and binds specifically to tRNA genes. *Mol. Cell Biol.* **9**:2018-2024.
68. **Johnson, T. L. and M. J. Chamberlin.** 1994. Complexes of yeast RNA polymerase II and RNA are substrates for TFIIIS-induced RNA cleavage. *Cell* **77**:217-224.
69. **Kassavetis, G. A., B. Bartholomew, J. A. Blanco, T. E. Johnson, and E. P. Geiduschek.** 1991. Two essential components of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIB: transcription and DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:7308-7312.
70. **Kassavetis, G. A., J. A. Blanco, T. E. Johnson, and E. P. Geiduschek.** 1992. Formation of open and elongating transcription complexes by RNA polymerase III. *J. Mol. Biol.* **226**:47-58.
71. **Kassavetis, G. A., B. R. Braun, L. H. Nguyen, and E. P. Geiduschek.** 1990. *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIC are assembly factors. *Cell* **60**:235-245.
72. **Kassavetis, G. A., D. L. Riggs, R. Negri, L. H. Nguyen, and E. P. Geiduschek.** 1989. Transcription factor IIB generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes. *Mol. Cell Biol.* **9**:2551-2566.
73. **Kenan, D. J., C. C. Query, and J. D. Keene.** 1991. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **16**:214-220.
74. **Kerpolla, T. K. and C. M. Kane.** 1990. Analysis of the signal for transcription termination by purified RNA polymerase II. *Biochemistry* **29**:269-278.
75. **Kosky, R. A., S. G. Clarkson, J. Kurjan, and B. D. Hall.** 1980. Mutations of the yeast tRNA^{Tyr} locus: transcription of the mutants genes in vitro. *Cell* **22**:415-425.
76. **Kovelman, R. and Roeder, R.G.** 1993. Purification and characterization of two forms of human transcription factor IIC. *J. Biol. Chem.* **267**:24446-24456.
77. **Kruse, B., N. Narasimhan, and G. Attardi.** 1989. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* **58**:391-397.
78. **Kurilla, M. G. and J. D. Keene.** 1983. The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* **34**:837-845.
79. **Lagna, G., R. Kovelman, J. Sukegawa, and R. G. Roeder.** 1994. Cloning and characterization of an evolutionarily divergent DNA-binding subunit of mammalian TFIIC. *Mol. Cell. Biol.* **14**:3053-3064.
80. **Lalo, D., Carles, C., Sentenac, A. and Thuriaux, P.** 1993. Interactions between three common subunits of yeast RNA polymerase I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:5524-5528.
81. **Landick, R. and Jr. Turnbough.** 1992. Transcriptional attenuation. *Transcriptional regulation* CSH Laboratory Press **Monograph 22**:407-446.
82. **Laspia, M. F., A. P. Rice, and M. B. Mathews.** 1989. HIV-1 tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* **59**:283-292.
83. **Lerner, M. R., N. C. Andrews, G. Miller, and J. A. Steitz.** 1981. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by sera from patients with systemic lupus

erythematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78**:805-809.

84. **Lerner, M. R. and J. A. Steitz.** 1979. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**:5495-5499.

85. **Leveillard, T., G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek.** 1991. Saccharomyces cerevisiae transcription factors IIIB and IIIC bend the DNA of a tRNA(Gln) gene. J. Biol. Chem. **266**:5162-5168.

86. **Leveillard, T., G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek.** 1993. Repression and redirection of Saccharomyces cerevisiae tRNA synthesis from upstream of the transcriptional start site. J. Biol. Chem. **268**:3594-3603.

87. **Levinger, L., V. Vasisht, V. Greene, and I. Arjun.** 1992. The effects of stem I and loop A on the processing of 5S rRNA from Drosophila melanogaster. J. Biol. Chem. **267**:23683-23687.

88. **Lobo, S. M., J. Lister, M. L. Sullivan, and N. Hernandez.** 1991. The cloned RNA polymerase II transcription factor IID selects RNA polymerase III to transcribe the human U6 gene in vitro. Genes Dev. **5**:1477-1489.

89. **Lobo, S. M., Tanaka, M., Sullivan, M. L. and Hernandez, N.** 1992. A TBP complex essential for transcription from TATA-less but not TATA-containing RNA polymerase III promoters is part of the TFIIB fraction. Cell **71**:1029-1040.

90. **Lobo, S. M. and Hernandez, N.** 1989. A 7 bp mutation converts a human RNA polymerase II snRNA promoter into an RNA polymerase III promoter. Cell **58**:55-67.

91. **Lopez-De-Leon, A., M. Librizzi, K. Puglia, and M. Willis.** 1992. PCF4 encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIB. Cell **71**:211-220.

92. **Luo, Y. and S. Shuman.** 1993. RNA binding properties of vaccinia virus capping enzyme. J. Biol. Chem. **268**:21253-21262.

93. **Lynn, S. P., L. M. Kasper, and J. F. Gardner.** 1988. Contributions of RNA secondary structure and length of the thymidine tract to transcription termination at the thr operon attenuator. J. Biol. Chem. **263**:472-479.

94. **Madore, S. J., E. D. Wieben, and T. Pederson.** 1984. Eucaryotic small ribonucleoproteins. Anti-La human autoantibodies react with U1 RNA-protein complexes. J. Biol. Chem. **259**:1929-1933.

95. **Majowski, K., Mentzel, H. and Pieler, T.** 1987. A split binding site for TFIIC on the Xenopus 5S gene. EMBO J. **6**:3057-3063.

96. **Manley, J. L., N. J. Proudfoot, and T. Platt.** 1989. RNA 3' end formation. Genes & Dev. **3**:2218-2244.

97. **Mao, X. and Darby, M. K.** 1993. A position-dependent transcription-activating domain in TFIIA. Mol. Cell. Biol. **13**:7496-7506.

98. **Maraia, R. J., D. J. Kenan, and J. D. Keene.** 1994. Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. Mol. Cell. Biol. **14**:2147-2158.

99. **Margottin, F., G. Dujardin, M. Gerard, J. M. Egly, J. Huet, and A. Sentenac.** 1991. Participation of the TATA factor in transcription of the yeast U6 gene by RNA polymerase C. Science **251**:424-426.

100. **Mathews, M. B. and A. M. Francoeur.** 1984. La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridyate tail of a small RNA. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1134-1140.
101. **Matsuzaki, H., G. A. Kassavetis, and P. E. Geiduschek.** 1994. Analysis of RNA chain elongation and termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *Jour. of Mol. Biol.* **235**:1173-1192.
102. **Mattaj, I. W.** 1994. RNA recognition: a family matter? *Cell* **73**:837-840.
103. **Mattaj, I. W., Dathan, N.A., Parry, H.W., Carbon, P. and Krol, A.** 1988. Changing the RNA polymerase specificity of U snRNA gene promoters. *Cell* **55**:435-442.
104. **Matunis, M. J., E. L. Matunis, and G. Dreyfuss.** 1993. PUB1: a major yeast poly(A)+ RNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**:6114-6123.
105. **Mazabraud, A., D. Scherly, F. Müller, D. Rungger, and S. G. Clarkson.** 1987. Structure and transcription termination of a lysine tRNA gene from *Xenopus laevis*. *Jour. of Mol. Biol.* **195**:835-845.
106. **Mc Bratney, S., C. Y. Chen, and P. Sarnow.** 1993. Internal initiation of translation. *Curr. Op. in Cell Biol.* **5**:961-965.
107. **Mc Conkey, G. A. and Bogenhagen, D.F.** 1987. Transition mutations within the *Xenopus borealis* somatic 5S RNA gene can have independent effects on transcription and TFIIIA binding. *Mol. Cell. Biol.* **7**:486-494.
108. **Mc Conkey, G. A. and Bogenhagen, D.F.** 1988. TFIIIA binds with equal affinity to somatic and major oocyte 5S RNA genes. *Genes & Dev.* **2**:205-214.
109. **Meerovitch, K., Y. V. Svitkin, H. S. Lee, F. Lejbowicz, D. K. Kenan, E. K. L. Chan, V. I. Agol, J. D. Keene, and N. Sonenberg.** 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of Poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *Journ. of Virol.* **67**:3798-3807.
110. **Meyers, R. E. and Sharp, P.A.** 1993. TATA-binding protein and associated factors in polymerase II and polymerase III transcription. *Mol. Cell. Biol.* **13**:7953-7960.
111. **Milne, C. A. and J. Segall.** 1993. Mapping regions of yeast transcription factor IIIA required for DNA binding, interaction with transcription factor IIIC, and transcription activity. *J. Biol. Chem.* **268**:11364-11371.
112. **Moenne, A., S. Camier, G. Anderson, F. Margottin, J. Beggs, and A. Sentenac.** 1990. The U6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is transcribed by RNA polymerase C (III) in vivo and in vitro. *EMBO J.* **9**:271-277.
113. **Murphy, S., J. B. Yoon, T. Gerster, and R. G. Roeder.** 1992. Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol. Cell Biol.* **12**:3247-3261.
114. **Myslinski, E., Krol, A. and Carbon, P.** 1992. Optimal tRNA (Ser) Sec gene activity requires an upstream SPH motif. *Nucleic Acids Res.* **20**:203-209.
115. **Nagiec, M. M., G. B. Wells, R. L. Lester, and R. C. Dickson.** 1993. A suppressor gene that enables *Saccharomyces cerevisiae* to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an *Escherichia coli* fatty acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **268**:22156-22163.

116. **Oh, S-K. and P. Sarnow.** 1993. Gene regulation: translational initiation by internal ribosome binding. *Curr. Op. in Genetics and Dev.* **3**:295-300.
117. **Parsons, M. C. and P. A. Weil.** 1990. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIC. Polypeptide composition defined with polyclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **265**:5095-5103.
118. **Parsons, M. C. and P. A. Weil.** 1992. Cloning of TFC1, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding the 95-kDa subunit of transcription factor TFIIC. *J. Biol. Chem.* **267**:2894-2901.
119. **Paule, M. R.** 1993. Polymerase I transcription, termination, and processing. *Gene Expr.* **3**:1-9.
120. **Pieler, T., Hamm, J. and Roeder R.G.** 1987. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* **41**:91-100.
121. **Piper, P. W. and K. B. Straby.** 1989. Processing of transcripts of a dimeric tRNA gene in yeast uses the nuclease responsible for maturation of the 3' termini upon 5S and 37S precursor rRNAs. *FEBS* **250**:311-316.
122. **Platt, T.** 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **55**:339-372.
123. **Platt, T. and J. P. Richardson.** 1992. *Escherichia coli* Rho factor: Protein and enzyme of transcription termination. *Transcriptional regulation CSH Laboratory Press Monograph* **22**:365-387.
124. **Preiser, P., V. Vasisht, A. Birk, and L. Levinger.** 1993. Poly(U)-binding protein inhibits *Drosophila* pre-5S RNA 3' exonuclease digestion. *J. Biol. Chem.* **268**:11553-11557.
125. **Preiser, P. R. and L. F. Levinger.** 1991. In vitro processing of *Drosophila melanogaster* 5S ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.* **266**:7509-7516.
126. **Proudfoot, N. J.** 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **14**:105-110.
127. **Pruijn, G. J. M., R. L. Slobbe, and W. J. van Venrooij.** 1990. Structure and function of Ia and Ro RNPs. *Mol. Biol. Reports* **14**:43-48.
128. **Rameau, G., K. Puglia, A. Crowe, I. Sathy, and I. Willis.** 1994. A mutation in the second largest subunit of TFIIC increases a rate-limiting step in transcription by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **14**:822-830.
129. **Reddy, R., D. Henning, E. Tan, and H. Busch.** 1983. Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5I RNA). *J. Biol. Chem.* **258**:8352-8356.
130. **Reinberg, D. and R. G. Roeder.** 1987. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Transcription factor II_s stimulates elongation of RNA chains. *J. Biol. Chem.* **262**:3331-3337.
131. **Reines, D., D. Wells, M. J. Chamberlin, and C. M. Kane.** 1987. Identification of intrinsic termination sites in vitro for RNA polymerase II within eucaryotic gene sequences. *Jour. of Mol. Biol.* **196**:299-312.
132. **Rice, G. A., C. M. Kane, and M. J. Chamberlin.** 1991. Footprinting analysis of mammalian RNA

polymerase II along its transcript: an alternative view of transcription elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:4245-4249.

133. **Rinke, J. and J. A. Steitz.** 1982. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* **29**:149-159.

134. **Rinke, J. and J. A. Steitz.** 1985. Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **13**:2617-2629.

135. **Roberts, J.** 1992. Antitermination and the control of transcription elongation. Transcriptional regulation CSH Laboratory Press **Monograph 22**:389-406.

136. **Sadowski, C. L., R. W. Henry, S. M. Lobo, and N. Hernandez.** 1993. Targeting TBP to a non-TATA box cis-regulatory element: a TBP-containing complex activates transcription from snRNA promoters through the PSE. *Genes Dev.* **7**:1535-1548.

137. **Sakonju, S. and Brown, D.D.** 1982. Contact points between a positive transcription factor and the *Xenopus* 5S RNA gene. *Cell* **31**:395-405.

138. **Sawadago, M., J. Huet, and P. Fromageot.** 1980. Similar binding site for P37 factor on yeast RNA polymerases A and B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**:258-264.

139. **Schultz, M. C., R. H. Reeder, and S. Hahn.** 1992. Variants of the TATA-binding protein can distinguish subsets of RNA polymerase I, II, and III promoters. *Cell* **69**:697-702.

140. **Seifart, K. H., L. Wang, R. Waldschmidt, D. Jahn, and E. Wingender.** 1989. Purification of human transcription factor IIIA and its interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5S rRNA. *J. Biol. Chem.* **264**:1702-1709.

141. **Selitti, M. A., P. A. Pavco, and D. A. Steege.** 1987. Lac repressor blocks in vivo transcription of lac control region DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:3199-3203.

142. **Sentenac, A. et al.** 1992. Yeast RNA polymerases. Transcriptional regulation. (CSHL Press, New York) **Monograph 22**:27-54.

143. **Shen, C. J. and T. Maniatis.** 1982. The organisation, structure and in vitro transcription of Alu family RNA polymerase III transcription units in the human-like globin gene cluster: precipitation of in vitro transcripts by lupus anti-La antibodies. *Jour. Mol. Appl. Genet.* **1**:343-360.

144. **Simmen, K. A., R. Waldschmidt, J. Bernues, H. D. Parry, K. H. Seifart, and I. W. Mattaj.** 1992. Proximal sequence element factor binding and species specificity in vertebrate U6 snRNA promoters. *J. Mol. Biol.* **223**:873-884.

145. **SivaRaman, L., D. Reines, and C. M. Kane.** 1990. Purified elongation factor SII is sufficient to promote read-through by purified RNA polymerase II at specific termination sites in the human histone H3.3 gene. *J. Biol. Chem.* **265**:14554-14560.

146. **Smid, A., M. Finsterer, and I. Grummt.** 1992. Limited proteolysis unmask specific DNA-binding of the murine RNA polymerase I-specific transcription termination factor TTFI. *J. Mol. Biol.* **227**:635-647.

147. **Staub, J. M. and F. J. Castora.** 1993. Mammalian mitochondrial DNA sequences can function as in vivo bacterial transcription terminators. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **192**:616-626.

148. **Stefano, J. E.** 1984. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* **36**:145-154.
149. **Stettler, S., N. Chiannilkulchai, S. Hermann Le Denmat, D. Lalo, F. Lacroute, A. Sentenac, and P. Thuriaux.** 1993. A general suppressor of RNA polymerase I, II and III mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **239**:169-176.
150. **Struksnes, K., A. Forus, O. S. Gabrielsen, and T. B. Oyen.** 1991. Yeast TFIIIA + TFIIC/tau-factor, but not yeast TFIIIA alone, interacts with the *Xenopus* 5S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* **19**:565-571.
151. **Sussman, D. J., J. Chung, and P. Leder.** 1991. In vitro and in vivo analysis of the c-myc RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.* **19**:5045-5052.
152. **Svitkin, Y. V., K. Meerovitch, H. S. Lee, J. N. Dholakia, D. J. Kenan, V. I. Agol, and N. Sonenberg.** 1994. Internal translation on Poliovirus RNA: further characterization of La function in Poliovirus translation in vitro. *Journ. of Virol.* **68**:1544-1550.
153. **Swanson, R. N., C. Conesa, O. Lefebvre, C. Carles, A. Ruet, E. Quemeneur, J. Gagnon, and A. Sentenac.** 1991. Isolation of TFC1, a gene encoding one of two DNA-binding subunits of yeast transcription factor tau (TFIIC). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:4887-4891.
154. **Taggart, A. K., T. S. Fisher, and B. F. Pugh.** 1992. The TATA-binding protein and associated factors are components of pol III transcription factor TFIIB. *Cell* **71**:1015-1028.
155. **Tantravahi, J., M. Alvira, and E. Falk-Pederson.** 1993. Characterization of the mouse beta maj globin transcription termination region: a spacing sequence is required between the poly(A) signal sequence and multiple downstream termination elements. *Mol. Cell. Biol.* **13**:578-587.
156. **Telesnitsky, A. P. and M. J. Chamberlin.** 1989. terminator-distal sequences determine the in vitro efficiency of the early terminators of bacteriophages T3 and T7. *Biochemistry* **28**:5210-5218.
157. **Terns, M. P., E. Lund, and J. E. Dahlberg.** 1992. 3'-end dependent formation of U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in *Xenopus laevis* oocyte nuclei. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3032-3040.
158. **Theunissen, O., F. Rudt, U. Guddat, H. Mentzel, and T. Pieler.** 1992. RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA. *Cell* **71**:679-690.
159. **Toczyski, D. P., A. G. Matera, D. C. Ward, and J. A. Steitz.** 1994. The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:3463-3467.
160. **Waldschmidt, R., I. Wanandi, and K. H. Seifart.** 1991. Identification of transcription factors required for the expression of mammalian U6 genes in vitro. *EMBO J.* **10**:2595-2603.
161. **Wang, C. K. and P. A. Weil.** 1989. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIA. *J. Biol. Chem.* **264**:1092-1099.
162. **Wang, X. and W. R. Folk.** 1994. Termination of transcription by RNA polymerase III from wheat germ. *J. Biol. Chem.* **7**:4993-5004.
163. **Watson, J. B., D. W. Chandler, and J. D. Gralla.** 1984. Specific termination of in vitro transcription by calf thymus RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res.* **12**:2295-2299.

164. **Werner, M. S., Hermann-Le Denmat, Treich, I., Sentenac, A. and Thuriaux, P.** 1992. Effect of mutations in a zinc binding domain of yeast RNA polymerase C on enzyme function and subunit association. *Mol. Cell. Biol.* **12**:1087-1095.
165. **White, R. J., S. P. Jackson, and P. W. Rigby.** 1992. A role for the TATA-box-binding protein component of the transcription factor IID complex as a general RNA polymerase III transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:1949-1953.
166. **Whitehall, S. K., C. Bardeleben, and G. A. Kassavetis.** 1994. Hydrolytic cleavage of nascent RNA in RNA polymerase III ternary transcription complexes. *J. Biol. Chem.* **269**:2299-2306.
167. **Willis, I., A. Oksman, and A. Lopez De Leon.** 1992. The PCF1-1 mutation increases the activity of the transcription factor (TF) IIIB fraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **20**:3725-3730.
168. **Willis, I., P. Schmidt, and D. Soll.** 1989. A selection for mutants of the RNA polymerase III transcription apparatus: PCF1 stimulates transcription of tRNA and 5S RNA genes. *EMBO J.* **8**:4281-4288.
169. **Windsor, W. T., Lee, T.C., Daly, T.J. and Wu, C.W.** 1988. *Xenopus* transcription factor IIIA binds to the flanking regions of the 5S RNA gene intragenic control region in a unique and highly ordered state. *J. Biol. Chem.* **263**:10272-10277.
170. **Woychik, N. A. and R. A. Young.** 1992. Genes encoding transcription factor IIIA and the RNA polymerase common subunit RPB6 are divergently transcribed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:3999-4003.
171. **Xiao, Q., T. V. Sharp, I. W. Jeffrey, M. C. James, G. J. M. Pruijn, W. J. van Venrooij, and M. J. Clemens.** 1994. The La antigen inhibits the activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**:2512-2518.
172. **Yoshinaga, S. K., Boulanger, P.A. and Berk, A.J.** 1987. Resolution of human transcription factor TFIIIC into two functional components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:3585-3589.
173. **Yoshinaga, S. K., L'Etoile, N.D. and Berk, A.J.** 1989. Purification and characterization of transcription factor IIIC2. *J. Biol. Chem.* **264**:10726-10731.
174. **Young, L. S., H. M. Dunstan, P. R. Witte, T. P. Smith, S. Ottonello, and K. U. Sprague.** 1991. A class III transcription factor composed of RNA. *Science* **252**:542-546.
175. **Young, L. S., D. H. Rivier, and K. U. Sprague.** 1991. Sequences far downstream from the classical tRNA promoter elements bind RNA polymerase III transcription factors. *Mol. Cell Biol.* **11**:1382-1392.
176. **Scherly, D., Stutz, F., Lin-Marq, N., and Clarkson, S.G.** 1993. La proteins from *Xenopus*: cDNA cloning and developmental expression. *J. Mol. Biol.* **231**: 196-204.

