

**Structure et fonction des gènes pour l'ARNr 16S
et le facteur d'élongation Tu engagés dans la protéosynthèse
de E.coli et du chloroplaste de soja**

Thèse de doctorat

Christophe Bonny, 1992

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Structure et fonction des gènes pour
l'ARNr 16S et le facteur d'élongation Tu
engagés dans la protéosynthèse de
E.coli et du chloroplaste de soja

de M. Christophe Bonny

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel
sur le rapport des membres du jury,

MM. E. Stutz (directeur de thèse),
P. Schurmann et H. Kössel (Fribourg-en-
Brisgau)

autorise l'impression de la présente thèse

Neuchâtel, le 28 juin 1992

Le doyen :



A. Robert

A mes parents et mes frères

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur Erhard Stutz pour toute la confiance et la grande liberté accordée tout au long de ce travail.

Nos remerciements vont également à Monsieur le Professeur H. Kössel pour avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de thèse, ainsi qu'à Monsieur le Docteur P. Schürmann qui a toujours été disponible pour des discussions.

Nous remercions encore spécialement Monsieur Paul-Etienne Montandon, sans qui rien de tout ceci n'aurait été effectué, ainsi que Marie-Claude Grand-Guillaume Perrenoud, Marie-Thérèse Napoli, Stéphane Pinaud, Sophie Marc-Martin, Fabienne Maurer, et Mayte Arreguit, qui tous ont participé à ce travail.

SUMMARY

PART I

We previously reported about *Escherichia coli* transformation experiments yielding streptomycin-resistant cells carrying a C912 to T transition in a plasmid-born 16S rRNA gene. These experiments were based on results obtained with streptomycin-resistant *Euglena* chloroplasts bearing an equivalent mutation in the single chloroplast 16S rRNA gene. We extended this study and transformed *E. coli* with plasmids constructs having a mutated 16S rRNA gene at position 914 (A to C) or a double mutation at positions 912 and 888 (C to T;G to A) or a mutation in the S12 gene (Lys 42 to Thr). Reverse transcription experiments showed that the 16S rRNA mutations are indeed incorporated to about 70% of the ribosome population. We tested the transformed cells before, during, and after a screening procedure in the presence of streptomycin. We find that the plasmid-born mutations protect colonies against a short streptomycin exposure (at least one to 16 hours in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin), but ribosomes carrying mutated 16S rRNA do not significantly reduce codon misreading *in vitro*. However, ribosomes isolated from transformed cells after the screening procedure resist misreading. In no case could we show that this resistance was due to an increase of the mutated 16S rRNA in the ribosomes. Instead, we find in one case that the ribosomes had acquired a second mutation in the S12 protein as shown by sequencing and by transformation experiments. Furthermore, we show, as already reported, that streptomycin strongly protects nucleotides 912-915 from chemical attack by dimethylsulfate; moreover, the A914 to C mutation prevents (strongly reduces) base methylation in the central domain of 16S rRNA. No additional protection by streptomycin can be detected in these mutants. The same results were obtained with the *Euglena* ribosomes carrying an equivalent C to U mutation.

PART II

The chloroplast translation elongation factor Tu (EF-Tu) is coded for by nuclear DNA in land plants including soybean (*Glycine max*). We identified and partially sequenced two cDNA clones carrying the EF-Tu genes. The deduced amino acid sequences are to 81-95% identical with other chloroplast EF-Tu proteins. The two nucleotide sequences of the cDNAs match to 84% within the coding parts, but show little identity downstream of the stop codons. cDNA probes were used in Southern hybridisation experiments to retrieve EF-Tu genes (*tuf*). Soybean has four genes per haploid genome which can be grouped in two distinct families (two members per family). One of the four *tuf* gene was totally sequenced having the following structural features: 1. The coding part yields a protein with 88-95% sequence identity with other chloroplast EF-Tu proteins. 2. The N-terminal part (70 aminoacids) displays structural elements of a chloroplast transit peptide. 3. The gene is not disrupted by introns. 4. The codon usage is adapted to the nuclear genome environment with a strong bias for C's in the 3rd position. Preliminary studies of gene expression (Northern experiments) reveal that the *tuf*-mRNA concentration rapidly increases in light and remains at a high level for at least two days (seedlings). Transcription start site of the mRNA was determined by S1 nuclease protection studies. Based on this analysis we searched for regulatory cis-elements 5' to the start site. We show and discuss consensus sequences which may be involved in the light regulation process. We also note that the untranslated leader of *tuf*-mRNA is extremely C/U rich, and speculated roles of this feature in regulating translation are presented.

ABREVIATIONS

La composition des produits munis d'une "*" est donnée sous la rubrique "solutions" de ce chapitre.

Unités physiques

°C	degré Celsius
cm, mm	centimètre, millimètre
cpm	coups par minute
g, mg, µg	gramme, milligramme, microgramme
l, ml, µl	litre, millilitre, microlitre
M, mM, µM	molaire, millimolaire, micromolaire
mA	milliampère
min, '	minute
µmole, nmole, pmole	micromole, nanomole, picomole
OD	densité optique
pb, kb	paire de bases, mille paires de bases
rpm	révolution par minute
U	unité (internationale)
V	volt
vol	volume

Produits chimiques

Amp	ampicilline
BSA	albumine de sérum de boeuf
Denhardt's*	solution de Denhardt's
DEP	diethyl pyrocarbonate
DMS	dimethylsulfate
DTT	dithio-threitol
EDTA	sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique
EtBr	bromure d'éthidium
LB*	milieu de Luria-Bertani
PEG	polyéthylène glycol
SDS	dodécyl-sulfate de sodium
Sm	streptomycine
Spc	spectinomycine
SSC*	solution standard de citrate
TBE*	tampon tris, borate, EDTA
TE*	tampon tris, EDTA
Tris	Tris hydroxyméthyl-aminométhane

Molécules biologiques

aa	acide aminé
aa-ARNt	ARNt aminoacylé
α ³² PdATP	dATP marqué en α ³² P
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
dNTP, ddNTP	désoxyribonucléotide-5'-triphosphate, didNTP
DNase	désoxyribonucléase
RNase	ribonucléase
ORF	"open reading frame"

Autres

Sm ^D , Sm ^R	Sm-dépendant, Sm-résistant
-----------------------------------	----------------------------

Solutions

100xDenhardt's

LB

1xSSC

TE

1xTBE

2% BSA, 2% Ficoll, 2% polyvinylpyrrolidone

1% bacto tryptone, 0,5% bacto yeast extract, 1% NaCl

0,15M NaCl, 0,015M citrate de sodium

10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7,6)

0,9M Tris-borate, 2mM EDTA (pH 8,0)

I. Analyse de mutants de E.coli résistants à la Streptomycine

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION	2
II MATERIEL ET METHODES	4
II.I METHODES GENERALES	4
Souches et vecteurs	4
Préparations de cellules compétentes et transformations	5
Extractions de plasmides	5
Extraction d'ADN génomique de la souche 50.109	5
Production d'ADN simple brin	5
Séquençage d'ADN et amorces	6
Purification de ribosomes de <i>E.coli</i>	6
Purification de ribosomes de <i>E.gracilis</i>	6
Préparation du surnageant S100	7
Extraction d'ARN ribosomiques	7
Séquençage d'ARN	7
Phosphorylation et marquage des oligonucléotides	8
II.II METHODES SPECIFIQUES	8
Mutagenèse de A888, A914 et A915	8
Production des mutations	8
Caractérisation et purification des phages mutants	9
Détermination de la température de discrimination	10
Purification et réinsertion des mutations dans pKK3535	10
Isolement du gène S12 de la souche 50.109	11
Sélection de cellules Sm-résistantes	11

Survivance des cellules non adaptées	11
Polymérisation des ribosomes <i>in vitro</i>	12
Protections	12
III RESULTATS	13
III.1 Choix, construction et caractérisation des mutations	13
III.1.1 Construction des mutations dans le vecteur simple brin M13 mp18	13
III.1.2 Insertion des mutations dans le vecteur pKK3535	13
III.1.3 Séquençage des ARNr mutés	17
III.2 Résistances des cellules transformées	17
III.2.1 Sélection de cellules poussant sur 25 µg/ml Sm	18
III.2.2 Résistance sans adaptation à 100 µg/ml de Sm	21
III.2.3 Conclusions des tests <i>in vivo</i>	22
III.3 Résistances des ribosomes <i>in vitro</i>	22
III.3.1 Culture des cellules	23
III.3.2 Polymérisation en présence de poly(U) et de Sm	23
III.3.3 Polymérisation en présence de poly(U) de populations mixtes de ribosomes	26
III.3.4 Polymérisation en présence d'ARNm viral et de Sm	26
III.3.5 Conclusion des tests <i>in vitro</i>	27
III.4 Comment les cellules peuvent-elles devenir progressivement résistantes ?	28
III.4.1 Une augmentation du nombre de ribosomes mutants serait-elle responsable de la résistance ?	28
III.4.1.1 L'adaptation ne consiste pas en un transfert des mutations sur le génome et ne réside pas sur le plasmide	29
III.4.2 La proportion de ribosomes mutés varie peu durant les étapes d'adaptation	30
III.4.3 La protéine S12 de la souche 50.109 est mutée	31
III.4.3.1 Construction d'une banque génomique partielle dans lambda gt10	31
III.4.3.2 Séquençage de la région critique de la S12	32
III.4.3.3 Le gène S12 de la souche 50.109 est-il bien exprimé?	32

III.5 Interaction de la Sm avec la région 912-915 de l'ARNr 16S	36
III.5.1 Système <i>E.coli</i>	36
III.5.2 Ribosome chloroplastique	37
IV DISCUSSION	39
Résistance à l'effet tueur et adaptation	39
Le site de fixation de la Sm sur le ribosome	40
Les mutations 912-915: effets configurationnels	42
Interaction entre la Sm et les ribosomes mutants	43
Rôle de la région 912-915 dans la traduction	44
Quelques remarques associées à la protection de la Sm: comment différentes mutations peuvent-elles induire le même changement configurationnel et comment une si petite molécule peut-elle protéger un si grand nombre de nucléotides ?	46
REFERENCES	48

AVANT-PROPOS

La vie cellulaire est réglée par tout un nombre de mécanismes divers et plus ou moins imbriqués. Tous requièrent l'activité spécifique d'enzymes bien définis, mais certains n'agissent que sur un nombre limité de molécules différentes, alors que d'autres, tels la transcription et la traduction sont de portée bien plus générale.

La transcription a été la première des deux activités à être bien documentée: la production de l'ARN est en effet la première des étapes qui vont déterminer la production de la protéine. Chez les procaryotes tels *E.coli*, la quantité d'une protéine semble bien d'abord dépendre de l'abondance de l'ARNm. Avec les eucaryotes et les étapes complexes amenant la "maturation" des messagers, cette régulation s'est enrichie d'un nombre fort divers d'étapes post-transcriptionnelles, qui elles aussi ont fait l'objet de nombreuses publications.

Bien que les étapes de la traduction soient admises depuis longtemps, une certaine image de la "mécanique interne" du ribosome émerge seulement, et la régulation de l'activité protéosynthétique focalise un intérêt grandissant. Il devient en fait toujours plus évident que la traduction (et notamment l'élongation) fait l'objet d'un contrôle important, au même titre que la transcription. Par exemple, une diminution des taux d'élongation a été associée au vieillissement, et il a été montré que la restauration des taux prolongeait la durée de vie.

Les deux sujets que nous avons traité lors de ce travail s'adressent plus ou moins implicitement à ces deux problèmes: le facteur d'élongation Tu participe en effet directement à l'élongation de la chaîne peptidique, et la région 912-915 de l'ARNr 16S est le site d'attaque de la streptomycine, un antibiotique connu pour altérer la qualité de la traduction. En fait, aussi bien la région 912-915 que le facteur Tu ont été impliqués dans des perturbations du "proofreading", montrant que les deux éléments peuvent agir de concert pour la bonne traduction des ARNm.

INTRODUCTION

La Streptomycine (Sm) agit principalement sur le ribosome de deux manières: elle est tout d'abord capable de bloquer le ribosome en phase d'initiation et ensuite de perturber sélectivement le décodage [Gorini,1974]. La première de ces actions apparaît dans une cellule pour des concentrations de 5 $\mu\text{g/ml}$ (pour la souche *E.coli* B), et à la condition que la cellule soit en pleine phase exponentielle. L'action est très rapide, et les cellules ne peuvent plus régénérer en l'espace de quelques minutes (c'est l'effet "tueur" de la Sm) [Gorini,1974]. La deuxième (qui se manifeste déjà à partir de moins de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Sm) peut être observée *in vivo* avec des mutants *ram* (pour lesquels 2 $\mu\text{g/ml}$ de Sm bloquent totalement la croissance), et aboutit à la production de protéines aberrantes [Gorini,1974]. L'accumulation de ces protéines détermine à la longue l'arrêt de la croissance (effet principalement bactériostatique), mais, sa cause étant différente, cet effet ne doit pas être confondu avec celui des hautes concentrations. Phénotypiquement, les deux actions peuvent être facilement distinguées: dans un hétérozygote $\text{Sm}^{\text{S}}/\text{Sm}^{\text{R}}$, la résistance à l'effet tueur est dominante, alors que la résistance à l'effet bactériostatique est récessive [Breckenridge et Gorini,1969].

Au niveau de la traduction, la Sm bloque fortement le complexe d'initiation et la traduction d'un ARNm est effectivement empêchée pour plusieurs minutes. Pour le ribosome en phase d'élongation, l'effet est moins sévère et permet à l'élongation de se poursuivre, quoique sous une forme altérée. Il est possible que, dans ce cas, le site de fixation de la Sm soit partiellement masqué (bien que la Sm se lie toujours fortement aux polysomes). Les résistances à l'antibiotique permettant de maîtriser les deux effets, il est possible que les deux types d'altérations soient liées au niveau moléculaire [Davies et al,1974]. L'idée que la Sm agit sur l'initiation et l'élongation par des mécanismes proches se trouve encore confortée par le fait qu'une seule molécule puisse se fixer au ribosome [Pestka,1977].

Les études ayant tenté de localiser la Sm sur le ribosome ont déterminé deux sites principaux. La Sm ne se lie pas aux protéines ribosomiques (notamment les protéines S4, S5 et S12 bien connues pour moduler la qualité de la traduction), et recouvre en fait deux sites de l'ARNr 16S [Biswas et Gorini,1972]. Les deux régions semblent centrées autour des nucléotides 910 et 1400. La Sm a pu être "cross-liquée" dans des proportions équivalentes aux deux régions [Gravel et al,1987] et l'antibiotique protège de plus des nucléotides des deux régions d'une attaque au DMS (dans des proportions différentes il est vrai, les nucléotides 912-915 étant beaucoup plus fortement protégés que les nucléotides 1437, 1487 et 1494 [Moazed et Noller,1987]). En fait les deux régions semblent spatialement proches [Moazed et Noller,1987], et l'unique molécule de Sm pourrait être maintenue entre deux par différents points de contacts.

La situation concernant les mutations affectant la réponse à la Sm est nettement plus compliquée et se répartit en mutations de protéines de la petite sous-unité et en mutations de l'ARNr 16S. Trois protéines, qui ne fixent pas l'antibiotique, sont connues: il s'agit des protéines S4 et S5 dont les mutations confèrent le phénotype *ram* (piètre qualité de lecture et hypersensibilité à la Sm), et de la protéine S12 aux mutations Sm^{R} et Sm^{D} notamment [Wittmann et Wittmann-Liebold,1974]. Les mutations affectant l'ARNr 16S sont réparties en quatre loci: des mutants dans les régions équivalentes à 10-13, 530 et 912-915 confèrent des résistances [Montandon et al,1985 et 1986, Harris et al,1989, Gauthier et al,1988, Melançon et al,1988, Etzold et al,1987, Fromm et al,1989]. Les régions 10-13 et 912-915 sont spatialement proches et sont susceptibles de s'apparier; ces mutations pourraient agir directement en perturbant la fixation de la Sm. La région 530 se trouve éloignée du site de fixation de l'antibiotique, et son action doit impliquer quelques phénomènes allostériques "à distance" [Stern et al,1988]. La dernière mutation répertoriée se situe en 1469. Il a été démontré que cette mutation conférait un phénotype *ram*, et que des

cellules Sm-dépendantes (phénotype porté par des mutants de la protéine S12) retrouvent un état non-dépendant lorsque cette mutation est introduite. Ici encore l'action doit être de nature "allostérique" [Allen et Noller, 1991].

La première mutation de résistance portée par un ARNr a été mise en évidence par P-E Montandon *et al* [1985]. Le chloroplaste de la souche d'*Euglena gracilis* qu'il analysait avait perdu deux des trois opérons ribosomiques; de plus, un changement d'un C par un T en la position équivalente à la position 912 de l'ADNr 16S de *E.coli* était apparu. Le gène pour la protéine S12 de cette souche étant demeuré sauvage, il a été postulé que le T912 était responsable de la résistance. Afin de confirmer cette hypothèse, P-E Montandon a entrepris d'introduire la même mutation dans *E.coli*. A la différence de l'euglène, la mutation dans ce nouveau contexte n'est plus homozygote, car les sept opérons de *E.coli* expriment toujours une proportion d'ARNr sauvages. L'expérience a tout de même été entreprise et a fait l'objet d'une publication [Montandon *et al*, 1986].

Bien que les cellules transformées soient incapables de pousser "directement" sur Sm, les travaux de P-E Montandon démontraient qu'il était possible d'"adapter" des cellules possédant la mutation T912 à la croissance en présence de streptomycine. La portée générale de ces travaux souffrait cependant de la démarche même choisie pour les démontrer: une croissance en présence de l'antibiotique n'apparaissait qu'à la suite de nombreux repiquages, et la mutation finalement ne semblait que conférer un "avantage", en permettant aux cellules la possédant de *devenir* résistantes. Le mécanisme qui permettait à ces cellules de finalement pousser sur Sm, de même que la responsabilité de la mutation T912 dans ce phénomène, n'était pas déterminé, et il était possible que résoudre les diverses facettes de ce problème allait permettre de mieux cerner les relations entre la Sm, la région 912-915, et certains mécanismes de la traduction.

Les expériences que nous décrivons ici ont donc pour but premier de comprendre les observations *in vivo* en les reliant à des observations *in vitro*, effectuées sur les ribosomes. Nous nous sommes en fait laissés guider par quelques questions:

D'autres mutations des nucléotides 912-915 pouvaient-elles conférer une résistance?

Etait-il possible de mettre en évidence une résistance "immédiate", sans passer par les étapes hasardeuses de "sélections"?

Par quel(s) mécanisme(s) les cellules devenaient-elles résistantes?

Quelle est l'influence des mutations sur la relation entre la Sm et le ribosome?

Les mutations agissent-elles de la même manière sur les effets tueurs et bactériostatiques?

Est-il possible d'analyser la réponse des ribosomes mutants seuls, sans être perturbé par les ribosomes sauvages?

II MATERIEL ET METHODES

II.1 METHODES GENERALES

Souches et vecteurs

L'opéron *rrnB* de *E.coli* ayant servi de base à tout ce travail a été précédemment isolé et la séquence nucléotidique déterminée [Brosius *et al*,1981]. Un fragment BamHI de 7 kb, contenant tout l'opéron des promoteurs aux terminateurs de la transcription, a été introduit dans le site BamHI du vecteur pBR322 donnant le plasmide pKK3535 [Brosius *et al*,1981]. Le plasmide maintient la résistance à l'ampicilline et exprime l'opéron *rrnB* dans une proportion allant de 61% à 67% des ARNr 16S totaux selon les estimations et le type de mutations de la région 912-915 introduites [Leclerc *et al*,1991; Frattali *et al*,1990]. Le nombre de copies du plasmide dans les cellules DH1 (Sm^s) [Maniatis *et al*,1982], qui ont été utilisées pour recevoir tous les variants du clone pKK3535, est d'ailleurs relativement peu élevé et se situe autour d'une quinzaine par cellules [Brosius *et al*,1981]. Le plasmide pEM109 (que nous appellerons plus volontiers pT912 dans ce travail) nous a été gracieusement confié par P-E Montandon; ce plasmide contient la mutation T912 déjà décrite [Montandon *et al*,1986].

Un fragment EcoRI-XbaI de 1056 pb a été introduit par P-E Montandon dans le vecteur simple brin M13 mp18 afin d'effectuer les étapes de mutagenèse. Ce fragment renferme un sous-fragment BglII-ApaI de 223 pb (positions 704 à 927 de l'ADNr 16 S) qui contient les positions mutées, et que nous avons utilisé pour leur insertion dans le vecteur pKK3535 (ces deux sites de restriction sont uniques dans pKK3535, contrairement au site EcoRI précédemment utilisé [Montandon *et al*,1986]).

La banque EcoRI partielle ayant servi à l'isolement du gène codant pour la protéine S12 mutante a été préparée dans le phage lambda gt10 [Murray *et al*,1977] et étalée dans les cellules NM514 selon les conditions décrites par Huynh *et al* [1985]. Le gène a été isolé par hybridation à une sonde homologue préparée à partir du plasmide pLL145, qui renferme un fragment KpnI de l'opéron *str* de *E.coli* [Post et Nomura,1980]. Ce gène a ensuite été sous cloné dans le vecteur pBR322 et introduit dans les souches DH1, HB101 et JM83 [Maniatis *et al*,1982], afin d'en étudier les caractéristiques phénotypiques. Un sous-fragment HpaI de 1,2 kb a été introduit dans le vecteur pBluescript II SK+ de Stratagene et les simples brins produits par les cellules XL1-Blue [Stratagene,1988] en présence du phage "helper" VCS M13 [Stratagene,1988] ont été séquencés comme nous le spécifierons.

Les souches utilisées lors de la production des mutants ont été tout d'abord la souche "conventionnelle" JM103 [Maniatis *et al*,1982], puis sur la fin de ce travail les souches spécifiques RZ1032 (*duf*, *ung*, *supE*) et CJ236 (*duf*, *ung*), qui permettent l'introduction et la maintenance de résidus uracils dans les ADN [Kunkel,1985]. Toutes les souches contenant le facteur F' ont été étalées sur des boîtes "Minimal Agar", et amplifiées en milieu liquide LB [Maniatis *et al*,1982]. La souche D-10 (déficiante en la RNase A) [Montandon *et al*,1985 et réf. incluses] a été utilisée pour la production de surnageant S-100.

Finalement, le vecteur pUC-8 [Messing,1983] a encore été utilisé pour divers recombinants.

Les souches d'*Euglena gracilis* ZICC (Sm-sensible) et 139.12 (Sm-résistantes) sont décrites dans Montandon *et al* [1985 et réf. incluses]. Ces souches ont poussé dans du milieu de culture de Hutner en présence de 50 ng/l de vitamine B12 [Vasconcelos *et al*,1971] et en l'absence de Sm; elles ont été utilisées pour l'isolement des ribosomes chloroplastiques.

Préparations de cellules compétentes et transformations

Les cellules *E.coli* compétentes ont été préparées soit par la procédure simplifiée employant une solution de CaCl_2 0,1M (DH1, HB101, JM103, JM83) [Maniatis *et al*,1982], soit par la procédure plus élaborée de Hanahan (DH1, HB101, XL-1 Blue) [Hanahan,1985, protocole 8] permettant notamment de conserver les cellules à -70°C . Les transformations sont effectuées comme décrit [Hanahan,1985] et les cellules sont étalées sur du milieu LB en présence de $40 \mu\text{g/ml}$ d'ampicilline.

Extractions de plasmides

Les plasmides ont été purifiés en petites quantités essentiellement par la méthode de Birnboïm, en suivant les modifications de Maniatis *et al* [1982]. Les purifications en grande quantité ont été effectuées selon le même principe, en ajoutant une précipitation par le polyéthylène glycol [Maniatis *et al*,1982]. Les plasmides ont été digérés par les enzymes de restriction (Boehringer, Toyobo) en suivant les indications des fabricants.

Extraction d'ADN génomique de la souche 50.109

200 ml de cultures saturées dans du milieu LB + $40 \mu\text{g/ml}$ d'Amp sont centrifugés (Sorvall GSA, 3000 rpm, 15') et repris dans 4 ml de 5mM EDTA, 50mM Tris-HCl, (pH 7,5). 4 mg de lysosyme (Merck) sont ajoutés et les tubes incubés 5' à 37°C ; 7 ml de 0,2M EDTA, 3% SDS, 0,5M Tris-HCl, (pH 9,0) préchauffés à 65°C sont ajoutés et 1 mg de protéinase K; les tubes sont mélangés, puis laissés 2 heures à 65°C . L'ADN est purifié par deux extractions avec 6 ml de phénol (15' et 5' dans un mélangeur tournant à 50 rpm) et une extraction avec 10 ml de chloroforme. Les ADN sont finalement précipités deux fois en présence de 0,3M Na-acétate, (pH 5,5) et deux volumes d'éthanol, lavés à l'éthanol 70% et repris dans $500 \mu\text{l}$ d'eau.

Production d'ADN simple brin

Les cellules ont été infectées soit à partir de stocks de virus M13 congelés dans du TE, soit à l'aide d'un cure-dent à partir de cellules infectées étalées sur boîtes. $10 \mu\text{l}$ d'une culture saturée de cellules JM 103 ou XL1-Blue sont inoculés dans 1 ml de milieu LB et infectés avec les virus. Pour les plasmides pBluescript, 10^{11} - 10^{12} phages VCS M13 sont encore ajoutés. La culture est incubée 6 h à 37°C avec agitation, les cellules sont centrifugées (5' dans la centrifugeuse eppendorf), et $200 \mu\text{l}$ de solution 20% PEG 6000, 2M NaCl sont ajoutés au surnageant et les tubes abandonnés 15' à température ambiante. Les solutions sont centrifugées (eppendorf, 5') et le milieu éliminé par aspiration. Les culots de phages sont repris dans $100 \mu\text{l}$ de TE (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA) et $50 \mu\text{l}$ de phénol-TE, vortexés 30'', centrifugés 1' et la phase aqueuse est extraite avec $500 \mu\text{l}$ d'éther. Après centrifugation (1'), les ADN sont précipités par $10 \mu\text{l}$ de 3M Na-acétate, (pH 5,5) et $250 \mu\text{l}$ d'éthanol froid (20' à -70°C ou la nuit à -20°C). Les solutions sont centrifugées 10' (eppendorf), les culots lavés avec 1ml d'éthanol 70% froid et repris dans $30 \mu\text{l}$ de TE.

Séquençage d'ADN et amorces

Les ADN ont été en général produits sous une forme simple brin (voir ci-dessus) avant d'être séquencés. Les réactions ont été effectuées selon la méthode générale de Sanger modifiée par Amersham [1985] en présence de la polymérase de Klenow (Boehringer). Pour les séquençages employant du matériel "double brin", ces derniers ont été dénaturés en présence de l'oligonucléotide amorce et 0,2N NaOH (10', 37°C) puis neutralisés avec 0,2N HCl. Les réactions sont ensuite poursuivies comme pour du matériel double brin.

Les amorces utilisées ont été en général l'amorce "universelle" de séquençage (Boehringer) ou d'autres oligonucléotides spécifiques; cependant le séquençage des mutations 912-915 a été effectué à l'aide d'un fragment de restriction HincII, purifié à partir d'un plasmide pUC-8 contenant le fragment de 7 kb pour l'opéron *rrnB* (ce plasmide contient certaines modifications non caractérisées, cf Bonny, 1989). Ce fragment a été préparé à partir d'un gel d'acrylamide 8%, 1xTBE selon la méthode "crush and soak" de Maxam et Gilbert [1977]. Des quantités optimales de ce fragment sont mélangées aux simples brins comme pour un oligonucléotide et les ADN sont dénaturés 5' à 100°C avant d'être laissés 30' à température ambiante. La suite des réactions est identique au protocole décrit.

Purification de ribosomes de *E.coli*

200 ml de milieu de culture LB ont été inoculés avec 1ml de cultures saturées de cellules DH1 contenant les différents plasmides. Les cultures ont été mises sous agitation à 37°C en présence d'ampicilline (40 µg/ml) et en absence ou présence de Sm (20 µg/ml) jusqu'à ce que les cellules atteignent une OD₅₅₀ de 0,6. A partir de ce stade, toutes les opérations sont effectuées dans la glace. Les cultures sont laissées 10' à 0°C puis centrifugées (Sorvall GSA, 5000 rpm, 15') et resuspendues dans 10 ml de milieu d'extraction I (60mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂, 10mM Mercaptoéthanol, 20 mM Tris-HCl, (pH 7,6)); les cellules sont recentrifugées (elles peuvent être conservées à -70°C après cette opération) et 5 grammes d'Alcoa (Fluka) sont ajoutés. Les cellules sont broyées 10' dans un mortier et sont récupérées avec 5 ml de milieu d'extraction I. 5 µg/ml de DNase I (qualité "RNase-free" de Worthington) sont ajoutés et les solutions mélangées gentiment pendant 10'. Les tubes sont centrifugés 15' à 10000g et les surnageants récupérés; les culots sont réextraits 10' avec du milieu I et les solutions recentrifugées comme précédemment. Les surnageants sont combinés avant d'être déposés sur un coussin de 15 ml de solution de saccharose (1,1M saccharose, 500mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂, 10mM Mercaptoéthanol, 20 mM Tris-HCl, (pH 7,6)) et centrifugés 24 heures à 40000 rpm dans le rotor Ti 60 de Beckman. Les surnageants sont décantés et les culots rapidement lavés avec 2 ml de milieu d'extraction II froid (50mM NH₄Cl, 6mM MgCl₂, 3mM DTT, 20 mM Tris-HCl, (pH 7,6)). 0,5 ml de "milieu ribosomes" sont ajoutés (150mM KCl, 20mM MgCl₂, 3mM DTT, 50 mM Tris-HCl, (pH 7,4)) et les culots, "décrochés" du fond du tube à l'aide d'une baguette de verre, sont laissés un maximum de 5 heures dans la glace; les solutions sont remuées à la main toutes les 30' environ afin de faciliter la resuspension des ribosomes. Finalement le matériel indissoluble est éliminé par une centrifugation de 1' à 800 rpm et les ribosomes sont dilués à une concentration de 240-260 OD₂₆₀/ml dans du milieu ribosome. La solution est divisée en part de 50-100 µl et congelée à -70°C.

Purification de ribosomes de *E.gracilis*

Les chloroplastes d'euglène ont été isolés selon Ortiz *et al* [1980], à l'exception du culot de chloroplastes qui a été resuspendu dans du milieu 0,25M saccharose, 25mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, (pH 7,5). Les ribosomes ont ensuite été purifiés selon Buetow [1982], à partir de trois litres de cultures et les ribosomes ont été finalement culottés par une centrifugation de 16h à 200000g. Les étapes de purification sont en fait essentiellement les mêmes que pour les

ribosomes de *E.coli*.

Préparation du surnageant S100

Le surnageant S-100 a été préparé comme décrit par Nirenberg et Matthai [1961].

200 ml de culture de cellules D-10 sont incubés à 37°C jusqu'à une OD₅₈₀ de 0,6. Les cellules sont laissées 10' dans de la glace et sont centrifugées (Sorvall GSA, 5000 rpm, 15'). A partir de ce stade, toutes les opérations s'effectuent dans de la glace. Le culot est resuspendu avec 30 ml de "milieu standard" (0,06M KCl, 0,01M Mg-acétate, 0,006M Mercaptoéthanol, 0,01M Tris-HCl, (pH 7,8)) et recentrifugé. 5 g d'Alcoa (Fluka) sont ajoutés au culot et ce dernier broyé 10' dans un mortier. 5ml de milieu standard sont ajoutés et les solutions centrifugées (Sorvall SS-34, 13000 rpm, 20'). Le surnageant est récupéré et 3 µg/ml de DNase I (qualité "RNAse-free" de Worthington) sont ajoutés et les solutions incubées 10'. Les surnageants sont alors centrifugés une première fois (SS-34, 13000 rpm, 20'), puis une seconde (SS-34, 16000 rpm, 30'), et finalement une dernière fois (Beckman Ti 70, 32000 rpm (100000g)) pendant deux heures. Le surnageant est récupéré jusqu'à environ 0,5 mm du culot, et dialysé pendant 16 h dans 60 volumes de milieu standard. Le surnageant est alors divisé en part de 50-100 µl avant d'être congelé à -70°C.

Extraction d'ARN ribosomiques

Les extractions d'ARNr ont été effectués à partir de 100-200 µl des préparations de ribosomes de *E.coli*. Tout d'abord, les solutions ont été retraitées par 1 µg/ml de DNase I (qualité "RNAse-free" de Worthington) pendant 15' à 37°C, afin d'éliminer complètement toutes traces d'ADN. Les solutions sont alors extraites deux fois au phénol et une fois à l'éther avant d'être précipitées par deux volumes d'éthanol en présence de 0,3M Na-acétate, (pH 5,5). Les culots sont resuspendus dans 200 µl de TE, et les ARN se trouvent à une concentration de 2,5 à 5 µg/µl. 2 µl sont analysés sur gel agarose afin de vérifier qu'aucune trace d'ADN n'est détectable visuellement.

Séquençage d'ARN

Les ARN ont été séquencés à partir de l'oligonucléotide CCACCGCTTGTGCGGG hybridant aux positions 945 à 930 de l'ARNr 16S de *E.coli*. Cette région est parfaitement conservée pour les sept opérons de *E.coli*, de même que pour les opérons chloroplastiques de l'euglène [Carbon et al, 1979; Graf et al, 1982] cet oligonucléotide a donc pu servir d'amorce aux séquençages des ARNr de *E.coli* et de *E.gracilis*. Afin d'éviter que des réactions parasites initiées à partir d'autres "primer" que l'oligonucléotide n'apparaissent lors de l'autoradiographie, l'oligonucléotide est tout d'abord marqué en son extrémité 5' (cf paragraphe suivant).

1 pmole de l'oligonucléotide marqué sont alors mélangés à 5 µg des ARNr extraits des ribosomes purifiés. 5,6 µl de solution de réaction sont ajoutés (1M KCl, 0,06M MgCl₂, 0,5M Tris-HCl, (pH 8,3) (37°C)), et les échantillons amenés à 40 µl avec de l'eau. Les solutions sont chauffées 5' à 65°C puis laissées 3 h à 37°C, avant d'être mises 15' dans de la glace. 13,6 µl de KCl 1M, 18,4 µl de solution de réaction et 40 µl de dNTP_{mix} (0,34mM de chaque dNTP dans une solution 10mM Tris-HCl, (pH 8,3) (37°C)) sont ajoutés. Les solutions sont partagées dans quatre tubes et 5 µl de 0,25mM ddATP (ou ddCTP ou ddGTP ou ddTTP), 27 µl d'eau et 1 U de transcriptase inverse (Boehringer) sont ajoutés à chaque tube. Les solutions sont incubées 15' à 37°C, 16 µl de dNTP chase (0,5 mM dNTP dans la solution de réaction diluée 10x) sont encore ajoutés et l'incubation poursuivie 15'. Les réactions sont stoppées avec 2 µl d'EDTA 0,5M et 8

μl de NaOH 1N; les ARN sont hydrolysés 3' à 100°C et les solutions neutralisées par 8 μl de HCl 1N. Les ADNc sont précipités avec 8 μl de NH_4 -acétate 5M et 240 μl d'isopropanol pendant 15' à -70°C. Les tubes sont centrifugés (Sorvall SS-34, 15000 rpm, 10'), les culots lavés avec de l'éthanol 70% froid, séchés avec une pipette reliée à une pompe à vide et resuspendus dans 2 μl de Tris-HCl 20 mM (pH 8). 2 μl de solution de formamide (98% formamide, bleu de bromophénol, xylène cyanol) sont encore ajoutés avant que les échantillons ne soient chargés sur un gel dénaturant 6% acrylamide, 8M urée et 1xTBE.

Phosphorylation et marquage des oligonucléotides

Les oligonucléotides nous ont été fournis par différents fabricants (Boehringer; Microsynth, Lucerne-CH; ISREC, Epalinges-CH). 10-20 pmoles ont été marquées en leur extrémité 5' par la polynucléotide kinase du phage T4 (1 U, Boehringer) en présence de 1-5 μl de gamma- ^{32}P -dATP (Amersham, 10mCi/ml) pendant 30-45' à 37°C dans 30 μl de milieu 10mM MgCl_2 , 50mM Tris-HCl, (pH 8,0). Les oligonucléotides (200 pmoles) utilisés lors de la polymérisation initiale pour la mutagenèse ont été phosphorylés dans les mêmes conditions en présence de 1mM ATP, puis les réactions sont stoppées en chauffant 10' à 65°C.

II.II METHODES SPECIFIQUES

Mutagenèse de A888, A914 et A915

Production des mutations

Les oligonucléotides suivants ont été synthétisés pour diriger les diverses mutagenèses:

"G888":	GGCATGAAGGGTCCGC
"C914":	GGTTAAA <u>ACT</u> CATGAATTGAC
"G915":	GGTTAAA <u>ACT</u> CAAGTGAATTGAC

Ces oligonucléotides sont complémentaires aux régions correspondantes de l'ADNr 16S, sauf en le nucléotide souligné qui dirige la mutagenèse.

L'extrémité 5' de 200 pmoles de ces oligonucléotides est tout d'abord phosphorylée comme indiqué plus haut. 20 pmoles sont mélangées à 1 pmole du vecteur simple brin M13 contenant les fragments à modifier dans 10 μl de milieu 0,05M NaCl, 0,01 M MgCl_2 , 0,001M DTT, 0,02M Tris-HCl, (pH 7,5), chauffés 5' à 56°C puis laissés 20' à température ambiante avant d'être déposés dans de la glace (20'). La polymérisation a été lancée en ajoutant 1 μl de solution (0,1M MgCl_2 , 0,1M DTT, 0,2M Tris-HCl, (pH 7,5)) froide, 5 U de polymérase de Klenow (Boehringer) et 5 U de ligase du phage T4 (Boehringer) en présence de 1 μl de α - ^{32}P dATP, 1mM ATP et 1mM dNTP (20 μl final). Les réactions sont laissées 5' à 0°C, 5' à 8°C et finalement la nuit à 15°C. Les échantillons sont précipités 15' dans de la glace avec du polyéthylène glycol (200 μl de PEG 6000 6,5%, 0,8M NaCl) et centrifugés 5' (ependorf). Afin de séparer les formes circulaires fermées des formes ouvertes et partiellement polymérisées, les ADN sont dénaturés par l'adjonction de 0,2N NaOH (concentration finale). Les échantillons sont alors chargés sur un gradient de 5% à 25% de saccharose dans une solution de 1M NaCl, 0,2N NaOH, 2mM EDTA.

Ce gradient est formé dans les tubes Beckman pour le rotor SW 50.1. Les tubes sont centrifugés 16 heures à 50000 rpm et finalement des fractions de 200 μ l sont récoltées en perçant les tubes par le bas et comptées dans le compteur à scintillation Betamatic II de Kontron. Les fractions correspondant au premier pic de radioactivité sont rassemblées (ce sont celles qui contiennent la forme circulaire fermée), précipitées, et des aliquots sont mis à transformer dans des cellules compétentes JM103. Les cellules sont étalées sur du milieu "Minimal Agar" [Maniatis *et al*, 1982] en présence d'un "gazon" de cellules JM103 non transformées et les boîtes sont incubées la nuit à 37°C. Le lendemain, les cellules infectées (qui exhibent une croissance ralentie) apparaissent comme des "plages" claires au milieu des cellules non infectées.

Vers la fin de ce travail, nous avons abandonné ce protocole de mutagenèse relativement lourd au profit de la méthode très allégée de Kunkel [1985]. Dans cette méthode des ADN contenant des résidus uracils sont produits par les cellules RZ1032 (*dut*⁻, *ung*⁻) cultivées en présence de 0,25 μ g/ml d'uridine. Les étapes de polymérisation/ligation sont alors effectuées tout à fait normalement sur les moules contaminés par 4-5 résidus uracils (nous avons substitué la polymérase de Klenow par celle du phage T4 dans ces expériences. Cette polymérase a les immenses avantages de ne pas soulever l'oligonucléotide de mutagenèse lorsqu'elle arrive en son extrémité 5' et donc d'arrêter là la polymérisation (contrairement à ce que peut faire la polymérase de Klenow), et de plus de pouvoir polymériser bien plus efficacement les longs fragments (le phage M13 recombiné approche tout de même les 8 kb)). La présence des résidus uracils dans les ADN parentaux permettant la destruction très efficace de ces derniers par des cellules *dut*⁺ et *ung*⁺ (par exemple JM103 ou XL1-Blue), cette méthode permet d'éviter la purification des formes circulaires fermées par ultracentrifugation tout en augmentant considérablement les rendements. Dans nos mains, et sur d'autres gènes que ceux pour les ARN ribosomiques, les modifications ainsi décrites nous permettent de recueillir 60% de clones mutés.

Caractérisation et purification des phages mutants

Les phages ayant incorporé les mutations sont identifiés par hybridation avec l'oligonucléotide de mutagenèse: celui-ci forme en effet un hybride plus stable avec un ADN muté qu'avec un ADN sauvage. Il est donc possible de discriminer entre phages mutés et sauvages simplement en lavant les hybrides à une température bien choisie.

Les boîtes portant les virus potentiellement mutés sont incubées 30' à 0°C, puis un filtre nitrocellulose BA85 (Schleicher & Schüell) est déposé 5 minutes sur la surface d'agar, et les ADN sont rapidement fixés en cuisant les filtres 2h à 80°C sous vide sans autre forme de traitement. Les filtres sont préhybridés 1h dans du milieu 6xSSC, 10xDenhardt's et hybridés 1-5h à température ambiante avec l'oligonucléotide de mutagenèse marqué en son extrémité 5'. Les filtres sont lavés 2 fois 2' dans du milieu 6xSSC à température ambiante puis exposés environ 1 heure. Les filtres sont alors lavés deux fois 2' à la "température de discrimination" déterminée (voir ci-dessous) avant d'être exposés environ 16 heures. Les phages mutés apparaissent alors comme étant ceux dont l'hybridation avec l'oligonucléotide mutant a résisté préférentiellement aux lavages effectués. Notons tout de même le très faible taux de mutants obtenus, qui est de l'ordre de 1 clone muté sur 1000 (nous avons obtenu un tel taux avec toutes les mutagenèses décrites ici). Ces faibles rendements pourraient être dus à la présence de nombreux sites *dcm* dans la région centrale de l'ADNr du 16S. Ces sites sont méthylés dans *E.coli*, et même s'il n'est pas fermement établi que ces sites soient impliqués dans les mécanismes de réparation des ADN endommagés, leur analogie avec les sites *dam* le laisse fortement supposer [Fritz, 1985].

Détermination de la température de discrimination

La mise en évidence des phages mutés repose, dans les cas où la proportion de mutants est, comme dans nos expériences, très faible (1/1000), sur le choix de la température finale de lavage: cette température doit en effet maintenir une quantité maximale d'hybrides parfaits (entre l'oligonucléotide mutant et le virus muté), tout en conférant une stabilité minimale aux hybrides imparfaits (entre l'oligonucléotide mutant et le virus sauvage).

Une pmole du vecteur M13 recombiné simple brin est déposée sur un filtre NC BA85 (Schleicher & Schüll) et l'ADN fixé aux UV (Stratalinker de Stratagene). Le filtre est préhybridé une heure dans du milieu 6xSSC, 10xDenhardt's et 10 pmoles de l'oligonucléotide marqué sont ajoutées. L'hybridation est poursuivie une heure à température ambiante, puis le filtre est lavé 2x2' dans 50 ml de milieu 6xSSC. Le filtre est retiré, entouré dans du papier Saran et mis à compter dans le Betamatic II de Kontron. Le filtre est ensuite lavé deux fois 1' dans 50 ml de milieu 6xSSC à 30°C et remis à compter; les mêmes opérations sont recommencées en augmentant la température de 5°C à chaque étape. Nous pouvons alors dessiner la courbe d'éluion de l'oligonucléotide sur le moule sauvage, en représentant en ordonnée le nombre de cpm présents sur le filtre en fonction de la température. La courbe d'éluion sur le moule muté est dessinée en assumant que sa forme est identique, mais déplacée de 5°C vers les plus hautes stabilités [Mason et Williams, 1985]. Les différences en ordonnée de ces deux courbes représentent pour chaque température la stabilité relative de l'oligonucléotide sur le moule muté par rapport à sa stabilité sur le moule sauvage. La température de discrimination est alors simplement définie comme étant celle permettant la plus grande différence. Cette température se situe vers 51,5°C, 62°C et 61°C pour les oligonucléotides A888, C914 et G915, respectivement.

Purification et réinsertion des mutations dans pKK3535

Les clones positifs sont repiqués à l'aide d'un cure-dent dans 1 ml de milieu LB et amplifiés 5-6 heures à 37°C. Afin d'éliminer la présence toujours possible de virus sauvages dans les cellules (lors de la toute première transformation, on introduit toujours conjointement un brin sauvage et un brin muté dans les cellules), un second cycle de transformation est effectué à partir des ADN extraits, et les étapes de dépistages réeffectuées. Les clones positifs sont séquencés, et nous purifions la forme répliquative du phage comme pour un plasmide normal. Après digestion, 50 ng des fragments BglII-ApaI sont purifiés et mélangés à 200 ng de vecteur pKK3535 préalablement digéré par BglII et ApaI et purifié. Les ligations sont effectuées la nuit dans 30 µl de solution 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM Tris-HCl, (pH 7,4) en présence de 1mM ATP et 1 U de ligase du phage T4 (Boehringer). Des dilutions de ces ligations sont mises à transformer des cellules DH1 compétentes. Les plasmides ayant incorporé la mutation sont dépistés avec l'oligonucléotide de mutagenèse, et une seconde étape de transformation est réeffectuée, toujours dans le souci de ne pas contaminer les clones mutés avec des copies sauvages. Un plasmide choisi est finalement amplifié et produit en grande quantité, puis caractérisé par restrictions et hybridations avec l'oligonucléotide de mutagenèse. Ces plasmides sont ceux que nous allons servir pour toute la suite de ce travail et sont dénommés comme suit:

pTA : plasmide pKK3535 contenant les deux mutations T912 et A888
 pC914 : plasmide pKK3535 contenant la mutation C914
 pG915 : plasmide pKK3535 contenant la mutation G915
 pT912 : plasmide pKK3535 contenant la mutation T912; ce plasmide a été produit par P-E Montandon *et al* [1986]; il s'agit en fait du plasmide pEM109 que nous avons renommé dans ce travail par souci de cohérence

Isolement du gène S12 de la souche 50.109

10 μg de l'ADN total extrait de la souche 50.109 a été digéré par EcoRI et chargé sur un gel d'agarose à 0,8% et 1xTBE. L'ADN migrant entre 3 et 5 kb a été élué (Biotrap de Schleicher & Schüell), précipité et 500 ng ont été ligués à 500 ng de lambda gt10 digéré par EcoRI. Les ligations ont été effectuées dans 10 μl de solution 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM Tris-HCl, (pH 7,4) en présence de 1mM ATP et 1 U de ligase (T4, Boehringer) pendant 8h à 14°C. 2 μl de ces ligations ont été empaquetés par 11 μl du "Packagene" de Stratagene pendant 2h à température ambiante. Les empaquetages ont été dilués avec 250 μl de milieu SM (100mM NaCl, 10mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl, (pH 7,5)) et 20 μl ont été utilisés pour infecter des cellules NM514 (15', 37°C) [Huynh *et al*, 1985], puis étalées. Nous avons obtenu environ 500 plaques, qui ont été transférées sur filtres NC selon la procédure de Benton décrites par Mason et Williams [1985]. Les filtres ont été préhybridés 3h dans du milieu 6xSSC, 10xDenhardt's puis hybridés au fragment EcoRI de 1,6 kb du plasmide pLL145 préalablement marqué par "nick-translation" [Maniatis *et al*, 1982] (ce fragment contient les parties codantes pour la S7 (partiellement) et la S12; le deuxième site EcoRI en amont de la S12 provient du vecteur). Une dizaine de plaques se sont révélées positives. L'ADN de l'une d'entre elles a été amplifié (cf "Matériel et méthodes", de la partie "tuf" de ce travail) et le fragment EcoRI introduit dans un plasmide pBR322 digéré par EcoRI et déphosphorylé [Maniatis *et al*, 1982]. Les deux orientations de l'insert par rapport au vecteur, que nous avons dénommées pS12.1 et pS12.2, ont été obtenues.

Sélection de cellules Sm-résistantes

Les cellules DH1 sont tout d'abord transformées avec les différents plasmides sur du milieu LB ne contenant que de l'ampicilline (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Chaque colonie est alors repiquée avec le même cure-dent sur différentes boîtes LB contenant 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp; la première boîte contient en plus 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Sm, la seconde 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sm, la troisième 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sm, la quatrième 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sm, et la dernière ne contient pas de Sm, afin de s'assurer que toutes les boîtes ont bien été inoculées. 87 colonies pour chaque construction ont ainsi été transférées. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant en général 36-48 heures, et les colonies présentant une croissance sont comptées. Les cycles subséquents de repiquage sont effectués à partir de la boîte qui contient la plus haute concentration en Sm permettant à 87 colonies de pousser.

Survivance des cellules non adaptées

Les cellules DH1 sont transformées avec les différents plasmides comme précédemment. 87 colonies sont repiquées sur un filtre NC BA85 déposé sur du milieu LB contenant 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline et les boîtes sont incubées 8-10 heures à 37°C. Les filtres sont alors transférés sur des boîtes identiques contenant de plus 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Sm et incubées la nuit à 37°C. Le lendemain, les colonies sont repiquées sur une boîte LB ne contenant que de l'ampicilline, afin de déterminer la proportion de colonies " survivantes". Les boîtes sont incubées la nuit à 37°C et les colonies présentant une croissance sont comptées.

Nous avons également employé un test similaire en milieu liquide: une colonie fraîchement transformée comme précédemment est inoculée à 5 ml de milieu LB + 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp. La culture est incubée sous agitation à 37°C jusqu'à ce qu'elle soit en milieu de phase log ($\text{OD}_{600}=0,6$). La culture est alors rapidement séparée en deux: la première moitié est traitée avec 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sm et remise à 37°C pendant une heure; elle est ensuite traitée exactement de la même façon que la seconde moitié, qui elle est rapidement diluée dans du milieu LB froid et étalée sur du milieu LB + 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp. Toutes les boîtes sont laissées la nuit à 37°C, et les colonies sont comptées.

Polymérisation des ribosomes *in vitro*

Les tests ont été effectués comme décrits par Zimmermann *et al* [1971], en utilisant de l'ATP, de la créatine phosphate et de la créatine kinase comme source d'énergie [Reisfeld et Edelman, 1982]. La quantité de ribosomes est de 30 μg pour les tests employant du poly(U) et de 60 μg pour ceux employant l'ARN du phage MS2; dans ce dernier cas, la quantité d'ARN viral est de 20 μg et la concentration de Mg^{2+} est abaissée à 8 mM (15 mM pour le poly U). La Sm est présente à 5 μg pour 100 μl de réaction. 10 ou 20 μl ont été prélevés aux temps indiqués dans le texte et déposés sur du papier filtre (Schleicher & Schüell). Les papiers sont alors incubés 20' à 100°C dans du 10% TCA contenant 0,5% Phe et 0,5% Ile, 5' à température ambiante dans la même solution, 5' dans de l'éthanol et finalement 5' dans de l'éther. Les filtres sont alors séchés et comptés dans le Bètamatic II de Kontron.

Protections

Nous avons suivi le protocole de Moazed et Noller [1987].

100 pmoles des ribosomes sont incubées 30' à 37°C dans 100 μl de solution 20mM MgCl_2 , 100mM NH_4Cl , 1mM DTT, 0,5mM EDTA, 80mM K-cacodylate, (pH 7,5) en absence ou en présence de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Sm. Les réactions sont refroidies 10' dans de la glace et les méthylations effectuées par l'adjonction de 2 μl de diméthylsulfate (dilué 1:6 dans de l'éthanol) pendant 10' à 37°C. Les réactions sont arrêtées avec 50 μl de solution 1M Mercaptoethanol, 0,1mM EDTA, 1M Tris-HCl, (pH 7,5) et 200 μl d'éthanol. Les ribosomes sont centrifugés (Sorvall HB-4, 10000 rpm, 10') et repris dans 300 μl de 0,3M Na-acétate. Les ARNr sont alors extraits trois fois au phénol et deux fois au chloroforme en présence de 0,5% SDS et 5mM EDTA, avant d'être précipités avec 2,5 volumes d'éthanol. Les ARNr sont centrifugés, lavés et repris dans 90 μl d'eau; nous les obtenons à une concentration de 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2 μg des ARNr modifiés sont mélangés à 0,5 pmoles de l'oligonucléotide ayant déjà servi au séquençage des ARNr dans 7,5 μl de solution 100mM KCl, 50mM Hepes-KOH, (pH 7,0). Les tubes sont chauffés 1' à 90°C et refroidis en 10' à 45°C. 5 μl de solution de réaction sont ajoutés (9mM MgCl_2 , 40mM KCl, 9mM DTT, 5 μM dGTP, 5 μM dCTP, 5 μM dTTP, 45mM Tris-HCl), 0,6 μl de $\alpha^{32}\text{P}$ dATP (10mCi/ml) et 1 U de transcriptase inverse (Boehringer). Les réactions sont incubées 30' à 37°C, 1 μl de chase sont ajoutés (dNTP 1mM chacun), et les réactions poursuivies 15' à 37°C. Les acides nucléiques sont précipités par 35 μl de 0,3M Na-acétate, 1mM EDTA et 90 μl d'éthanol. Les tubes sont laissés au moins une heure dans la glace, avant d'être centrifugés (Sorvall SS-34, 11500 rpm, 10'). Les culots sont lavés à l'éthanol 70% froid, séchés et repris dans 10 μl de milieu de charge (8M urée, 1xTBE, bleu de bromophénol, xylène cyanol).

III RESULTATS

III.1 Choix, construction et caractérisation des mutations

Au début de ce travail, les mutations équivalentes à C914, G915 et T912 avaient été mises en relation avec la résistance à la streptomycine chez *C.reinhardtii* [Harris *et al*,1989]. (cf fig. 1 pour une carte de l'ARNr 16S de *E.coli*). Les auteurs avaient de plus "hiérarchisé" ces mutations, en les classant depuis celle conférant la plus forte résistance à celle conférant la plus faible: C914 > G915 > T912. Jusque là seule la mutation T912 était connue pour conférer une résistance dans *E.coli* [Montandon *et al*,1986]. Nous avons donc décidé d'introduire ces mutations dans le vecteur pKK3535 (fig. 2) [Brosius *et al*,1981], qui contient l'opéron *rrnB* de *E.coli*, afin de déterminer si d'autres mutations que T912 pouvaient conférer des résistances à la bactérie. En outre, la région 912-915 fait suite à l'hélice 27 de l'ARNr 16S, et le nucléotide C912 peut-être apparié au nucléotide G888 (cf fig. 1). Afin de tester l'éventuel rôle de cet appariement, nous avons restauré ce dernier dans le mutant T912 en créant le double mutant T912/A888.

Pour des raisons techniques, les mutations sont d'abord construites dans un vecteur simple brin contenant un sous-fragment du plasmide pKK3535, avant d'être réintroduites.

III.1.1 Construction des mutations dans le vecteur simple brin M13 mp18

Le fragment EcoRI-XbaI de 1056 pb du plasmide pKK3535, qui contient les nucléotides 673 (de l'ADNr 16S) à 1729 (cette position est située 187 pb au-delà du 3' de l'ADNr 16S), a été introduit dans le phage M13 mp18 [Montandon *et al*,1986]. Après mutagenèse, les ADN simple brin sont séquencés, en parallèle avec du matériel sauvage. Le primer utilisé est un fragment de restriction HincII de 53 pb (positions 823 à 876), qui permet de lire à partir du nucléotide 877 vers les nucléotides 912-915. Après réinfection (étape de purification indispensable) les ADN sont à nouveau séquencés (fig. 3), puis l'ADN double brin est produit et digéré par les enzymes BglII et Apal (ces deux enzymes sont uniques au plasmide pKK3535).

III.1.2 Insertion des mutations dans le vecteur pKK3535

Les fragments BglII-Apal sont réinsérés dans le plasmide pKK3535, et la présence des différentes mutations est confirmée par hybridation avec les oligonucléotides de mutagenèse. Le fait que ces fragments soient petits (223 pb) limite la probabilité qu'une seconde mutation accidentelle ne soit réintroduite. Nous n'avons pas cherché à séquencer les plasmides doubles brins, mais le séquençage se fera ultérieurement sur les ARNr. Les digestions Apal et BglII de ces plasmides montrent que les sites de clonage sont conservés, et les digestions EcoRI indiquent finalement qu'aucune délétion importante n'est apparue durant le clonage, même si nous ne pouvons exclure de petites délétions et/ou mutations (fig. 4).

La mutation G915, au contraire des autres constructions, nous a posé quelques problèmes lors de son introduction dans pKK3535; en fait, le nombre de colonies recombinantes était dans ce cas très faible. Ayant tout de même sélectionné un plasmide muté, nous l'avons testé sur repiquage (cf III.2.1). La faible résistance conférée par ce plasmide nous a incité à recommencer toute la procédure depuis la purification du fragment BglII-Apal (ce résultat était particulièrement surprenant car G915 confère une résistance supérieure à T912 dans *C.reinhardtii*). Les mêmes problèmes sont réapparus et le plasmide finalement choisi ne se comportait pas différemment du précédent. Comme le montre la figure 4, ce plasmide exhibe toujours une bande supplémentaire sur gel, qui indique à tout le moins sa mauvaise tolérance par la cellule.

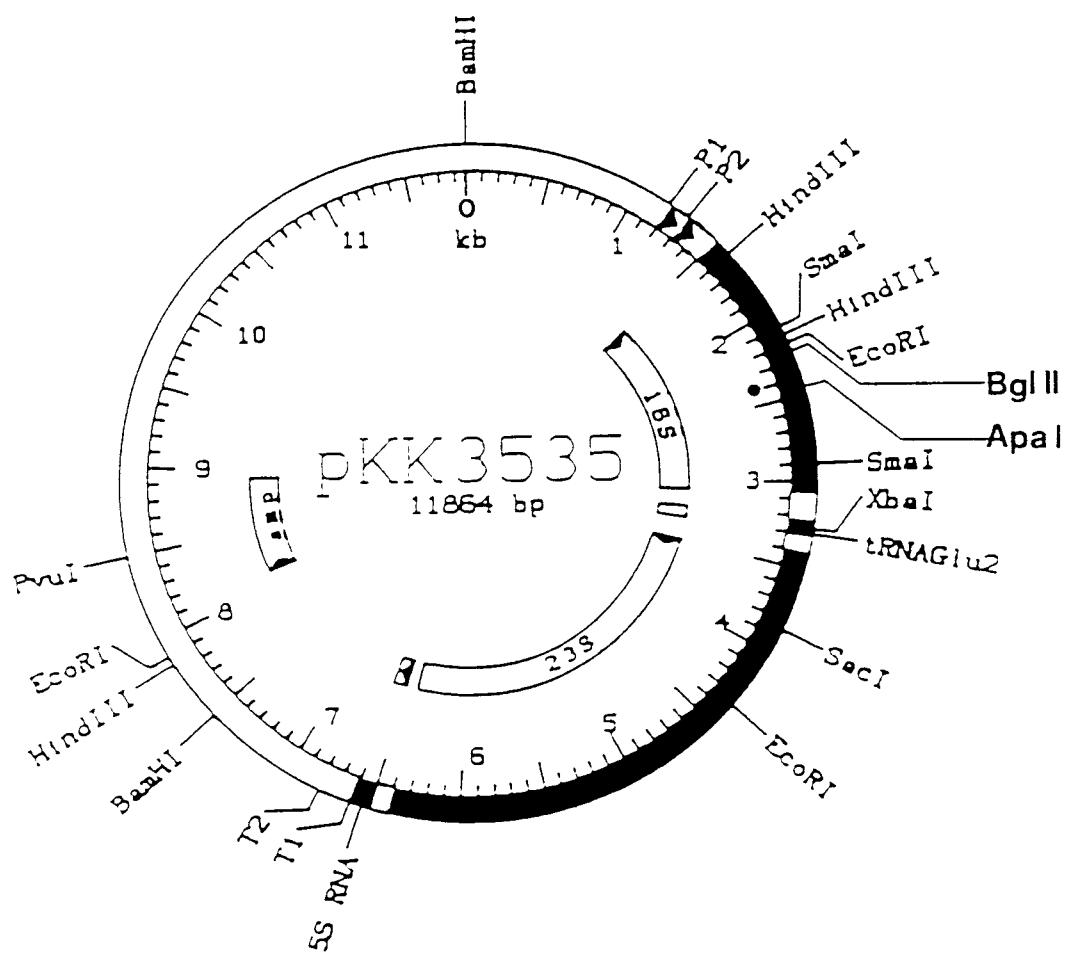


Figure 2

Carte du plasmide pKK3535

Les valeurs dans la figure représentent les kb à partir du site BamHI, et progressent dans le sens de la transcription de l'opéron *rrnB*. Le vecteur est pBR (positions 7,5 à 0). L'insert (positions 0 à 7,5) contient l'opéron *rrnB* de *E. coli* introduit dans le site BamHI du vecteur. Les ARNr 16S, 23S, 5S ainsi que l'ARNt^{Glu2} sont représentés par une ligne épaisse sur la carte. Le site approximatif de la région 912-915 est indiqué (●). Certains sites de restriction sont indiqués.

P1, P2: promoteurs 1 et 2 de l'opéron *rrnB*
 T1, T2: terminateurs 1 et 2 de l'opéron *rrnB*
 amp: gene conférant la résistance à l'ampicilline

Toutes les constructions, que nous dénommerons par la suite pT912, pC914, pG915 et pTA, ont été introduites dans la souche Sm-sensible DH1, qui a servi pour toutes les expériences de ce travail.

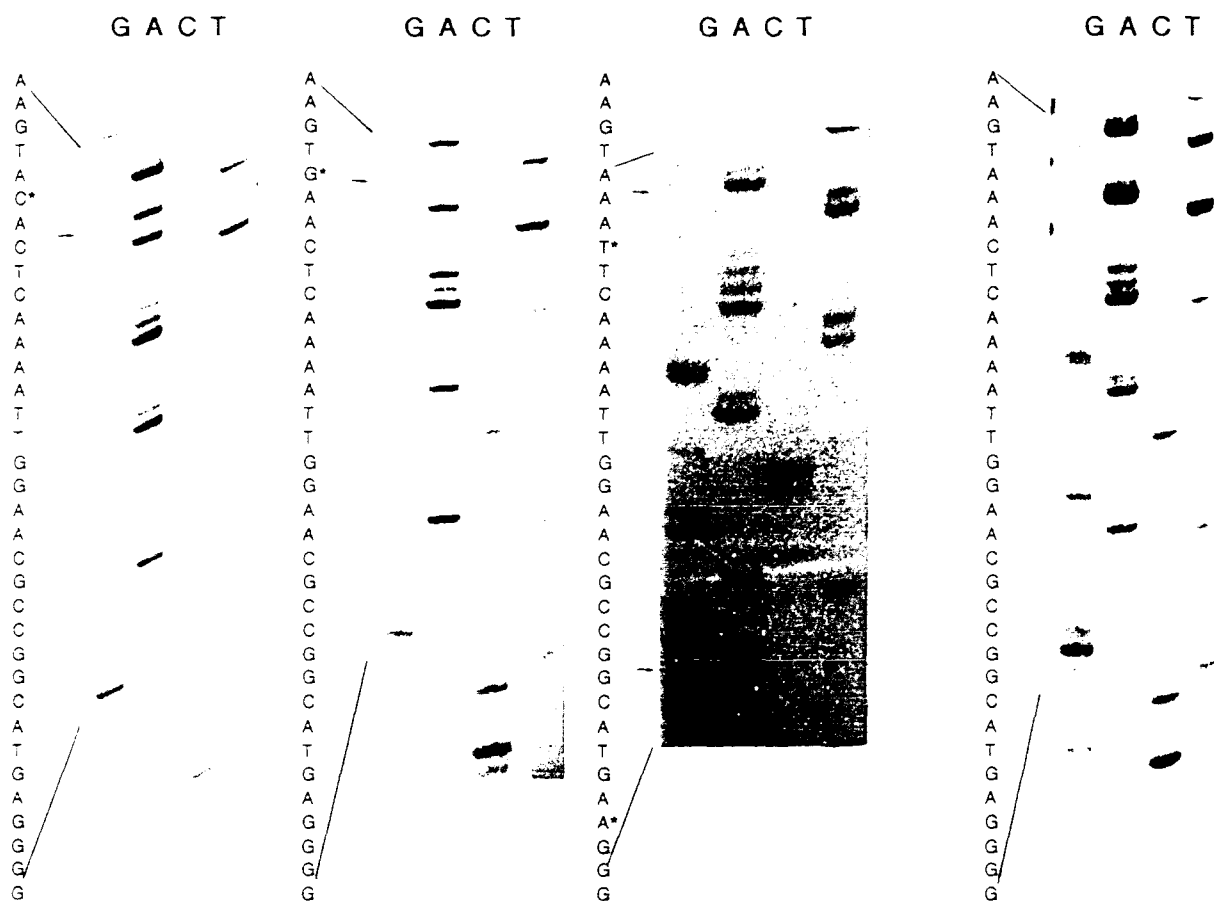


Figure 3

Séquençage des mutations C914 (à gauche), G915 (au centre) et T912/A888 (à droite) dans le vecteur M13 mp18. Une séquence sauvage légèrement contaminée par la mutation C914 est représentée à l'extrême droite; les séquences se lisent G, A, C, T et correspondent à la séquence de l'ARNr; les nucléotides mutés sont indiqués par une flèche sur les figures et par une astérisque (*) dans les séquences présentées dans les marges.

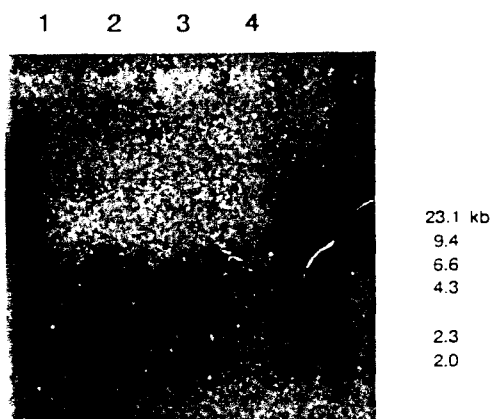


Figure 4

Restriction par EcoRI des plasmide pKK3535 (ligne 1), pG915 (ligne 2), pTA (ligne 3) et pC914 (ligne 4) extraits de cellules DH1. La bande supplémentaire pour le plasmide pG915 est bien visible. La référence de poids moléculaire est λ -HindIII

III.1.3 Séquençage des ARNr mutés

Les ribosomes des souches transformées sont purifiés et les ARNr extraits séquencés en utilisant un oligonucléotide (position 945 à 930), toujours en parallèle avec un échantillon sauvage. Cet oligonucléotide permet de complètement analyser la région contenue dans les sites de clonage. L'examen attentif des gels de séquence ne permet pas de déceler de mutations autre que celles introduites volontairement. Par contre, la présence des mutations désirées est fermement établie (fig. 5). Dû aux problèmes rencontrés, nous n'avons pas cherché à séquencer le mutant G915.

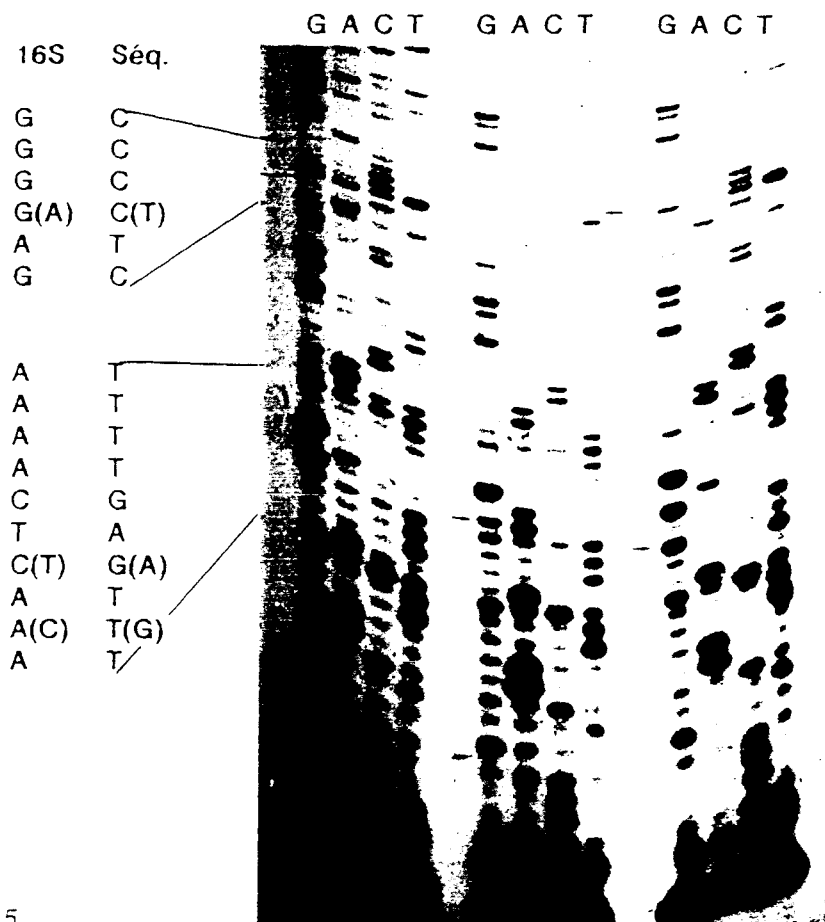


Figure 5

Séquençage des ARNr sauvages (à gauche), U912/AB88 (au centre) et C914 (à droite); la séquence des ARNr U912 a été déterminée par Montandon *et al* [1986]. Les séquences se lisent G, A, C, T et sont complémentaires à la séquence de l'ARNr. La séquence sauvage (complémentaire à l'ARNr 16S) aux alentours des positions critiques est donnée dans les marges, sous la ligne "Séq."; la séquence complémentaire, qui correspond à l'ARNr 16S est donnée sous la ligne "16S". Les nucléotides mutés sont indiqués par une flèche sur les figures, et entre parenthèses dans les marges

III.2 Résistances des cellules transformées

Les sept opérons ribosomiques de *E.coli* font qu'il est très difficile d'isoler des résistances (récessives) conférées par les ARNr [Morgan *et al*, 1988]. De telles mutations sont par contre beaucoup plus facilement caractérisables dans les chloroplastes, car le nombre d'opérons y est plus limité [Kössel, 1991], et la perte d'un opéron est relativement fréquente [par exemple Montandon *et al*, 1986, et ref. incluses]. La démarche suivie par différents groupes a donc été en général l'introduction dans *E.coli* de mutations caractérisées sur les ADNr chloroplastiques [Montandon *et al*, 1986; Melançon *et al*, 1988; Frattali *et al*, 1990; De Stasio *et al*, 1989; Leclerc *et al*, 1991].

Pour les mutations conférant une résistance à la Sm, il a été démontré à plusieurs reprises que les cellules transformées avec des opérons ribosomiques mutés ne poussent pas directement en présence de l'antibiotique [Montandon *et al*, 1986, Morgan *et al*, 1988, Melançon *et al*, 1988, Frattali *et al*, 1990]; Morgan *et al* [1988] ont même tiré la conclusion que la mutation U912 ne causait aucune résistance, quelle que soit la concentration de Sm testée. Cependant, P-E Montandon *et al* [1986] ont montré qu'il était possible de mettre en évidence les éventuelles résistances, en suivant un protocole dans lequel les cellules sont progressivement "adaptées" à la Sm: les cellules sont successivement repiquées sur des concentrations croissantes de l'antibiotique, et, en répétant les cycles de repiquage, un certain nombre de cellules finissent par bien croître sur Sm (cf III.2.1).

Rigoureusement, et comme nous allons le démontrer, il n'est pas possible par cette expérience d'affirmer que la croissance finale sur Sm soit rendue possible uniquement par les mutations. Ce que ces expériences démontrent, c'est que les mutations ont permis aux cellules de s'adapter à la croissance sur Sm, mais il n'est pas possible d'en tirer plus de conclusions. En fait, l'idée même que les cellules doivent être "habituées" ou "adaptées" à la Sm montre qu'un autre mécanisme doit intervenir; la nature de ce mécanisme pourrait bien ne rien avoir affaire avec les mutations 912-915. Cette idée a été en fait soutenue plus récemment par Frattali *et al* [1990]: des cellules adaptées puis débarrassées du plasmide pT912 conservent une haute résistance à la Sm, mais n'expriment pas la mutation U912.

L'impossibilité pour les cellules de pousser directement (sans adaptation) sur Sm doit être imputable à la présence des ribosomes sauvages (30%-40%): il a en effet été démontré depuis longtemps que dans un hétérozygote, la sensibilité dominait [Davies *et al*, 1974]. Cependant, même si la croissance est inhibée, la population mixte des ribosomes doit permettre aux cellules de "survivre" à l'antibiotique, même à forte concentration [Breckenridge et Gorini, 1969]. Nous avons donc montré dans les expériences qui suivent que les cellules peuvent survivre à de fortes concentrations en Sm, bien supérieures à celles utilisées lors des adaptations; lorsque ces cellules sont débarrassées de la présence de l'antibiotique, elles se remettent à croître tout à fait normalement (cf III.2.2 et III.4.3.3). Ces expériences précisent la nature de la résistance conférée *per se* par les mutations, et démontrent que la toute première fonction des mutations est de permettre aux cellules de survivre en présence de l'antibiotique; la croissance est alors un phénomène secondaire, impliquant vraisemblablement des mécanismes supplémentaires.

III.2.1 Sélection de cellules poussant sur 25 µg/ml Sm

Les repiquages sont effectués comme nous le décrivons dans matériel et méthodes. Les boîtes sont incubées 1 à 2 jours à 37°C avant de servir de stock de base pour un nouveau cycle. La concentration finale en Sm est de 25 µg/ml.

Nous présentons ci-après deux expériences représentatives des repiquages effectués (Tableau I).

Remarquons tout d'abord que, d'une expérience à l'autre, le nombre de repiquages nécessaires pour obtenir un nombre important de colonies résistantes varie passablement. Nous avons pu mettre ces variations sur le compte de différents impondérables: par exemple la fraîcheur des boîtes utilisées ainsi que la quantité d'agar dans celles-ci; de même, les différentes personnes ayant effectué des repiquages semblent transférer des quantités différentes de cellules à chaque étape. La fraîcheur des stocks de cellule de départ (par exemple si elles ont été conservées un certain temps à 4°C) semble également avoir une influence.

D'une manière générale, les résultats du Tableau I démontrent que les cellules transformées avec les plasmides pT912, pC914 et pT912/A888 peuvent être adaptées à la croissance sur Sm (25 µg/ml), au contraire des cellules transformées avec pKK3535 (voir aussi Montandon *et al*, 1986).

D'autre part, la plus forte "résistance" est toujours conférée par la mutation C914, suivie de T912, T912/A888 et G915, respectivement; C914 est bien, comme dans le cas de *C.reinhardtii* [Harris *et al*,1989], plus "fort" que T912, alors que G915 ne confère aucune résistance, à l'opposé de la situation chez *Chlamydomonas*. Il semble en fait que cette mutation soit mal tolérée par la cellule (cf III.1.2). Finalement, l'introduction de la mutation A888 dans le mutant T912 diminue la résistance de ce dernier. Il est fortement possible que la réintroduction de l'appariement U912-A888 dans le ribosome soit responsable de cet effet. En effet, Frattali *et al* [1990] ont démontré que les mutations U912 et G912 conféraient une résistance; à l'opposé, A912, qui peut reformer un appariement avec G888, ne confère aucune résistance. Ainsi, les constructions U912-A888 et A912-G888 sont plutôt sensibles à la Sm, alors que les constructions U912|G888 et G912|G888 sont clairement plus résistantes. Des situations similaires ont été relevées pour des résistances à la spectinomycine [Sigmund *et al*,1984; Fromm *et al*,1987] et à la paromomycine/hygromycine [Li *et al*,1982; Spangler et Blackburn,1985]. Notons cependant que l'appariement des nucléotides 888-891 et 909-912 n'est pas considéré comme prouvé dans la structure secondaire de l'ARNr 16S de Noller [1984], malgré leur proximité.

Tableau I

Sélection de transformants Sm-résistants.

Les Sélections I et II représentent deux expériences distinctes. Les transformants sont traités comme décrit dans le texte. Les valeurs indiquent le nombre de colonies

Sélection I

Plasmide	Série	Concentration en Sm (ug/ml)							
		0,5	5	10	25	55	75	100	200
pTA	I	87	16	5	0	-	-	-	-
	II	87	23	1	1	-	-	-	-
	III	87	87	28	13	-	-	-	-
	IV	-	87	75	48	-	-	-	-
	V	-	87	87	87	-	-	-	-
	VI	-	-	-	87	87	-	-	-
pT912	I	87	79	6	0	-	-	-	-
	II	87	87	2	2	-	-	-	-
	III	87	87	87	4	-	-	-	-
	IV	-	87	87	86	-	-	-	-
	V	-	87	86	83	-	-	-	-
	VI	-	-	-	83	83	-	-	-
pC914	I	87	87	87	3	-	-	-	-
	II	87	87	87	1	-	-	-	-
	III	87	87	87	87	-	-	-	-
	IV	-	-	-	87	-	-	-	-
	V	-	-	-	87	87	87	-	-
	VI	-	-	-	-	-	87	87	87

-: non effectué

Sélection II

Plasmide	Série	Conc. en Sm ($\mu\text{g/ml}$)			
		0,5	5	10	25
pKK3535	I	87	87	3	0
	II	87	31	6	0
	III	87	61	14	0
.....					
pG915	I	87	6	2	0
	II	87	32	18	1
	III	87	65	20	0
.....					
pTA	I	87	87	56	0
	II	87	27	8	0
	III	87	81	32	1
.....					
pT912	I	87	87	0	0
	II	87	38	38	3
	III	87	86	72	24
.....					
pC914	I	87	87	18	15
	II	87	87	18	5
	III	87	87	77	40

Nous pouvons encore ajouter trois résultats ou remarques qui n'apparaissent pas tous à la simple lecture du Tableau I:

1) pour une même construction, les résultats obtenus ne sont pas linéaires d'un cycle de repiquage à l'autre: par exemple la construction pTA obtient un score de 56 colonies après le premier repiquage sur 10 $\mu\text{g/ml}$ Sm et seulement de 8 colonies après le deuxième (Sélection II). Nous en déduisons qu'à ces étapes *la résistance n'est pas acquise de manière stable*.

2) les temps de croissance sont toujours longs, ce qui nous a conduit à attendre deux jours pleins entre chaque repiquage. Même après ce laps de temps, la taille des colonies n'excédait que rarement 2 à 3 mm (sauf exceptions que nous mentionnerons plus loin). Dans toutes les étapes, *la croissance est donc fortement ralentie*.

3) arrivés à 25 $\mu\text{g/ml}$ Sm, *deux types de colonies*, très facilement distinguables, apparaissent. Le premier type ne présente aucune caractéristique particulière: la croissance est extrêmement lente (2 à 3 jours pour une colonie de 1 à 2 mm). Le deuxième type, par contre, se distingue par une croissance très rapide (16 hres pour une colonie de 3 mm à 1 cm de diamètre), et très souvent par d'autres critères plus surprenants: aspect "étoilé" de la colonie, apparition d'une coloration jaune ou verdâtre, Ces cellules poussent bien sur de plus hautes concentrations en Sm (nous les avons testées jusqu'à 500 $\mu\text{g/ml}$ Sm) et peuvent être stockées indéfiniment en

présence de Sm, à l'inverse des colonies du premier type (après environ 15 jours sur 25 $\mu\text{g/ml}$ Sm, il n'est plus possible d'en inoculer du milieu liquide). La souche 50.109 précédemment isolée [Montandon *et al*, 1986] appartient à ce groupe particulier de cellules que nous qualifierons de "totalement résistantes".

III.2.2 Résistance sans adaptation à 100 $\mu\text{g/ml}$ de Sm

Nous décrivons ici les résultats du test "tueur" ("killing") effectué sur boîte. Les colonies sont mises à pousser sur filtre nitrocellulose (8-10 heures), puis le filtre est transféré la nuit sur 100 $\mu\text{g/ml}$ de Sm. Le lendemain, les cellules sont repiquées sur du milieu frais ne contenant pas de Sm.

Les expériences effectuées (voir tableau II pour une expérience représentative) confirment l'ordre précédemment apparu: pC914 confère la résistance la plus nette, suivi de pT912 et pTA. Ce résultat suggère que les deux types de résistance ne sont pas deux phénomènes indépendants.

Tableau II

Résistance des transformants à 100 $\mu\text{g/ml}$ Sm.

Les cellules transformées sont traitées comme décrit dans matériel et méthodes. Les valeurs indiquent le nombre de colonies. L'expérience a été répétée plusieurs fois, et donne le même type de résultats

Plasmide	Colonies	
	Avant Sm	Après Sm
pKK3535	87	2
pTA	87	49
pT912	87	65
pC914	87	74

III.2.3 Conclusions des tests *in vivo*

Pris conjointement, les deux tests décrits ici (killing et repiquages) montrent que les cellules transformées sont capables de résister (du moins provisoirement et sans adaptation) à de hautes concentrations en Sm (100 µg/ml) mais que, sans adaptation, elles sont incapables de pousser au-delà de concentrations bien plus faibles (5-10 µg/ml).

La mutation U912 était jusqu'ici la seule de la région 912-915 qui permette à des cellules de *E.coli* de devenir résistantes. Les résultats présentés démontrent que d'autres mutations de la région 912-915 confèrent des résistances, et qu'il est possible de mettre en évidence *in vivo* une résistance directe des transformants (III.2.2). Cette résistance (à l'effet tueur), peut être spécifiquement attribuée aux mutations de la région 912-915, car elle ne demande aucune "adaptation" pour être mise en évidence.

Ces expériences entrouvrent de plus le mécanisme par lequel les cellules s'adaptent à la croissance sur Sm:

Les ribosomes sauvages représentant 30% à 40% des ribosomes totaux [Leclerc *et al*,1991; Frattali *et al*,1990], il semble bien que la présence de ces ribosomes doive effectivement inhiber la croissance sur Sm [Davies *et al*,1974]. De plus les cellules de *E.coli* sauvages sont tuées déjà à 5 µg/ml Sm [Gorini,1974]. La résistance à l'effet tueur pourrait alors être la première des étapes qui permettent aux cellules de s'adapter: les cellules sont tout d'abord capables de survivre en présence de l'antibiotique, puis, durant les repiquages, d'acquérir les mécanismes qui leur permettront de pousser sur Sm. La présence d'antibiotiques étant connue depuis longtemps pour favoriser l'apparition de caractères nouveaux, un tel mécanisme nous paraît déjà tout à fait réaliste. Cependant, ces considérations ne nous renseignent pas encore sur les caractères acquis par la cellule pour croître sur Sm (caractères acquis par les cellules "totalement résistantes").

III.3 Résistances des ribosomes *in vitro*

Le site d'action principal de la Sm étant les ribosomes, l'apparition des différents types cellulaires que nous avons relevés lors des repiquages doit très certainement refléter une évolution de leur population. Caractériser la résistance des ribosomes à différents stades d'adaptation devrait donc permettre de mettre directement en évidence la résistance à l'effet tueur, et également de suivre l'éventuelle évolution de la population des ribosomes en réponse à l'antibiotique.

Nous avons donc effectué trois isoléments distincts de ribosomes, chacun avec des cellules provenant d'étapes d'adaptation différentes:

- Isolement A: les cellules *n'ont jamais été en présence de Sm*
- Isolement B: les cellules ont été adaptées à 25 µg/ml, *mais ne présentent aucune des caractéristiques des cellules "totalement résistantes"*
- Isolement C: les cellules sont du type *"totalement résistantes" (plus de 25 µg/ml de Sm)*

La résistance à l'effet tueur est mise en évidence avec un ARNm viral (III.3.3). Les tests employant un poly(U) ne sont en effet pas capables de recréer le blocage de l'initiation: les concentrations en Mg²⁺ sont trop élevées, et les ribosomes initient par un mécanisme se passant des différents facteurs d'initiation [Davies *et al*,1974]. Nous mesurons simplement dans ce test la quantité d'un acide aminé marqué en présence ou en absence de Sm (index d'incorporation I). La précision du décodage est quant à elle mesurée en présence d'un ARN poly(U). La Sm

force l'incorporation d'isoleucine à la place de phénylalanine [Gorini,1974], et le rapport entre les deux acides aminés incorporés donne directement une estimation de la résistance à l'antibiotique (index de misreading M).

III.3.1 Culture des cellules

Les 3 extractions de ribosomes ont été effectuées dans les conditions suivantes: les ribosomes de l'**extraction A** sont issus de cellules transformées *n'ayant jamais été en contact avec la Sm*; seule une sélection Amp a été maintenue, de même d'ailleurs que pour les extractions B et C. **Les ribosomes B** ont été obtenus à partir de cellules *adaptées poussant sur 25 µg/ml Sm*, mais ne présentant *aucune des caractéristiques des cellules "totalement résistantes"* (voir III.2.1). Afin d'éviter l'apparition de cellules à croissance rapide dans les cultures (qui contiennent en permanence 25 µg/ml Sm), nous avons contrôlé régulièrement les OD. Si la croissance de la culture s'accélérait, celle-ci était immédiatement écartée. Typiquement, ces cultures demandaient 8 à 10 heures d'incubation avant d'arriver en fin de phase log. Dans les mêmes conditions, les cultures A et C demandaient 3 à 4 heures. **Les ribosomes C** représentent quant à eux les souches *"totalement résistantes"*. La croissance de ces cultures est rapide en présence de Sm.

III.3.2 Polymérisation en présence de poly(U) et de Sm

Nous présentons ci-après les résultats obtenus avec les extractions de ribosomes A, B et C. Nous donnons dans la figure 6 les courbes d'incorporation (cpm) de l'Ile en fonction du temps. Le tableau III donne quant à lui les valeurs (cpm) d'une expérience représentative, obtenues après 30' de polymérisations.

Les résultats se résument ainsi:

- 1) les ribosomes A et B montrent une grande sensibilité à la Sm, alors que **les ribosomes C** se distinguent très nettement *par une absence de réponse*
- 2) **les ribosomes C** méritent une attention toute particulière: en effet l'absence de tout "bruit de fonds" dû aux ribosomes sauvages (30%-40%, tableau III) normalement présents est extrêmement intrigante, et suggère en fait *l'absence de ribosomes sensibles fonctionnels*. En fait, ces ribosomes se comportent comme ceux de la souche HB101, dont la résistance est conférée par une mutation de la protéine S12 (population homogène de ribosomes résistants).
- 3) l'index de misreading des **ribosomes B (et A)** mutants est tout à fait semblable à l'index des ribosomes sauvages. Ce point implique que *la population des ribosomes des transformants* (33% de ribosomes sauvages et 67% de ribosomes mutants) *reste aussi sensible à la Sm que les ribosomes sauvages seuls*; les ribosomes mutants semblent donc aussi sensibles que les ribosomes sauvages. Ce point important sera encore détaillé plus loin (III.3.3).

Tableau III

Index de misreading des ribosomes extraits des cellules *E.coli* transformées

Index de misreading M: $\text{cpm } [^3\text{H}]\text{Phe}/\text{cpm } [^{14}\text{C}]\text{Ile}$; les valeurs sont indiquées pour une polymérisation de 20 ou 30'. Les classes de ribosomes sont définies dans le texte. Les expériences qui ont été effectuées avec différentes préparations de S-100 ou des stocks de $[^3\text{H}]\text{Phe}$ aux activités spécifiques différentes ont été regroupées; ces différences expliquent pourquoi les valeurs ne sont pas directement comparables

Souche	Plasmide	Classe	cpm(-Sm) . M			cpm(+Sm) . M		
			Phe	Ile	.	Phe	Ile	.
DH1	pKK3535		1329	81	16	2691	942	2,9
	pTA	A	1302	40	33	1793	392	4,6
	pT912	A	1179	85	14	2066	728	2,8
	pC914	A	729	70	10	2011	915	2,2
.....								
DH1	pKK3535		2048	81	25	4377	926	4,7
	pTA	B	2032	91	22	2728	556	4,9
	pT912	B	2024	98	21	2966	588	5,0
	pC914	B	1873	98	19	2832	685	4,1
	pC914	C	1596	59	27	1385	97	14
HB101	-	-	1505	39	38	1145	42	27
.....								
DH1	pKK3535		850	118	7	1465	1059	1,4
	pTA	C	438	35	12	1001	88	11
	pT912	C	479	49	10	446	50	8,9
	pC914	C	762	41	19	1081	66	16

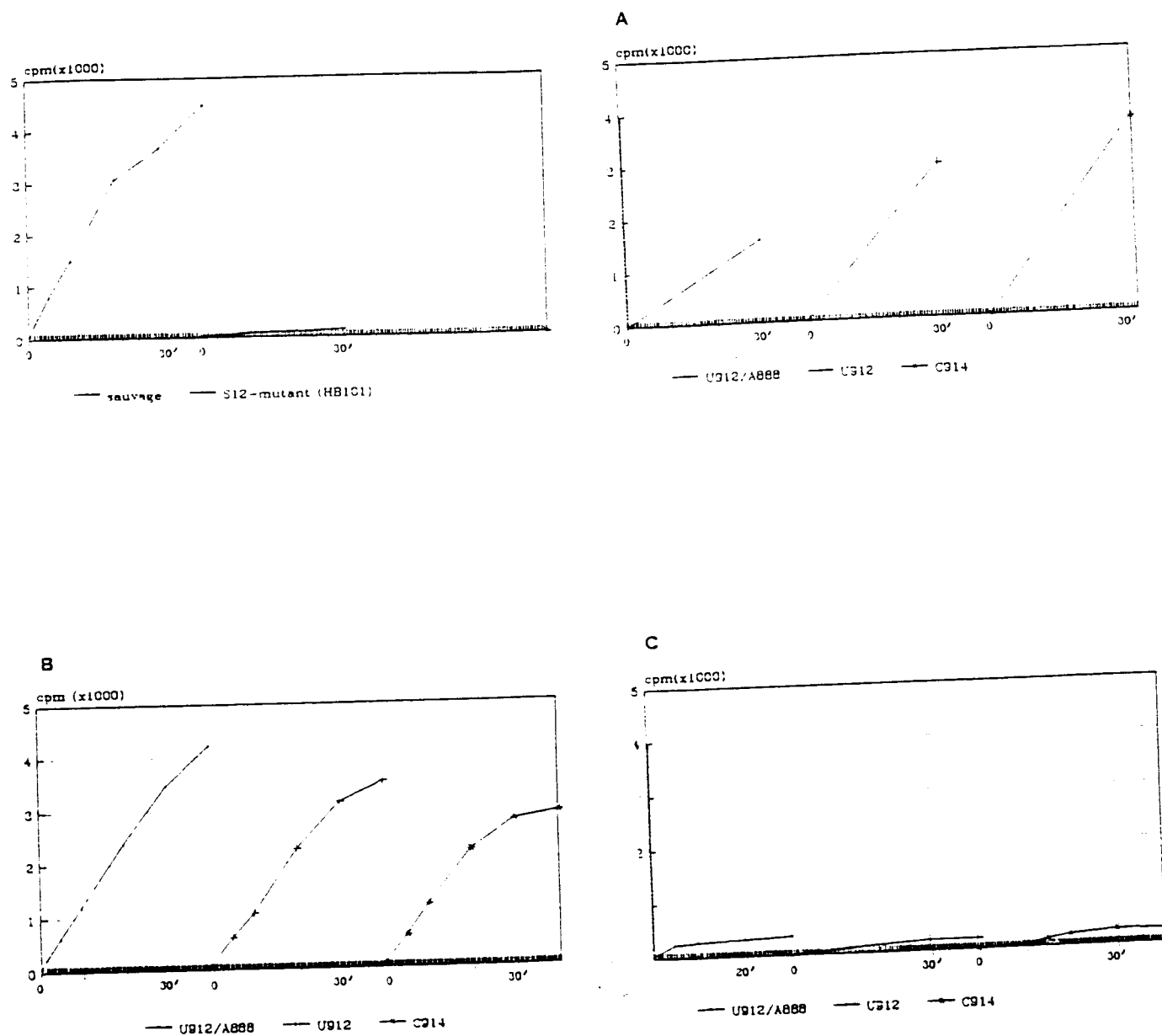


Figure 6

Incorporation de [^{14}C]Ile des ribosomes A, B et C en fonction du temps

Les classes de ribosomes sont définies dans le texte. Le messenger est du poly(U) en présence de $5\ \mu\text{g Sm}$; les valeurs (cpm) représentent les incorporations de 1/10 du volume total des réactions. Les expériences représentées ne sont pas celles du Tableau III. Les valeurs finales sont celles obtenues après une polymérisation de 30' ou 40'

III.3.3 Polymérisation en présence de poly(U) de populations mixtes de ribosomes

Les ribosomes que nous avons analysés représentent des populations mixtes de ribosomes (ribosomes "résistants" des plasmides et sensibles des opérons génomiques). Dans un tel mélange, il se pourrait que chacun des deux types de ribosomes contribue différemment à la polymérisation. Afin de déterminer l'influence de ribosomes "Sm^R" dans une préparation, nous avons effectué les mêmes tests avec des mélanges de deux populations de ribosomes: les premiers proviennent de la souche DH1 transformée avec le plasmide sauvage pKK3535, et les seconds de la souche Sm^R JM83. Ces résultats peuvent être directement comparés à ceux obtenus avec, par exemple, les ribosomes U912.

Les résultats sont présentés dans le Tableau IV, et s'interprètent comme suit:

1° les mélanges de ribosomes DH1 et JM83 montrent que, en présence de ribosomes Sm^R, l'incorporation d'Ile est directement proportionnelle à la quantité de ribosomes sauvages, produisant du miscoding

2° ces résultats confirment que dans un test poly(U), les ribosomes mutants U912 restent aussi sensibles à la Sm que les ribosomes sauvages

Tableau IV

Polymérisation de populations mixtes de ribosomes

Index de misreading M: cpm [³H]Phe/cpm [¹⁴C]Ile; les valeurs sont indiquées pour une polymérisation de 30'. 1:1 et 1:3 indiquent la proportion de ribosomes sauvages (DH1) et résistants (JM83) dans la préparation. Les classes de ribosomes sont définies dans le texte

Souche	Plasmide	Classe ou %	cpm (-Sm)			cpm (+Sm)		
			Phe	Ile	M	Phe	Ile	M
DH1	pKK3535 pT912	A	7442	146	27	14494	2642	5
		A	9792	405	24	14246	2808	5
JM83			7229	81	89	7379	97	76
DH1/JM83		1:1	10462	138	75	10665	1133	9
		1:3	9050	104	87	9736	683	14

III.3.4 Polymérisation en présence d'ARNm viral et de Sm

Les tests *in vivo* indiquent que les cellules transformées résistent à l'effet tueur. Si cet effet est bien dû à un blocage de la traduction en phase d'initiation, les ribosomes des transformants doivent montrer une résistance.

Nous avons donc testé la capacité des ribosomes à initier/polymériser un ARNm viral (MS2) (Tableau V). Ce test, qui permet de recréer *in vitro* le blocage de l'initiation par la Sm, nous renseigne en fait sur l'aspect dominant de la résistance (voir introduction).

Les valeurs du Tableau V montrent clairement une résistance des ribosomes mutés, quelle que soit la classe des ribosomes testés. Ce résultat est tout à fait en accord avec les expériences de "killing" *in vivo* (cf III.2.3). De plus, la résistance des ribosomes C est "totale" (100%), alors que celle des ribosomes A et B correspond *grosso modo* à la proportion des ribosomes mutants dans les préparations (environ 60%; remarquons encore que les résultats ne sont pas significativement différents entre les préparations A et B). A nouveau, les préparations C se comportent de manière particulière, en ce sens que toute la préparation semble constituée de ribosomes résistants.

Tableau V

Polymérisation en présence d'ARN viral

Index d'incorporation I: $\text{cpm } [^3\text{H}]\text{Phe (+Sm)} / \text{cpm } [^3\text{H}]\text{Phe (-Sm)}$; les valeurs sont indiquées pour un temps de polymérisation de 30'. Les classes de ribosomes sont définies dans le texte

Plasmide	Classe	Incorporation (cpm Phe)		I (%)
		(-Sm)	(+Sm)	
pKK3535		2698	677	25
pTA	A	617	316	51
pT912	A	946	497	53
pC914	A	1687	1065	63
pTA	B	2843	1090	38
pT912	B	2223	1384	62
pC914	B	2239	1527	68
pTA	C	1993	1933	97
pT912	C	1946	1956	100
pC914	C	1189	1153	97

III.3.5 Conclusion des tests *in vitro*

La première conclusion est l'apparente "homogénéisation" des ribosomes de type C: la population de ces ribosomes se comporte effectivement comme si tous les ribosomes étaient résistants, ceci dans les deux tests effectués. Ce fait est à rapprocher des observations *in vivo*: les cellules C croissent en effet bien en présence de streptomycine; nos résultats montrent que cette croissance peut être attribuée à la maîtrise combinée des effets misreading et tueurs par les ribosomes C. Pour les ribosomes A et B, nous pouvons mettre en relation la résistance au blocage de la traduction à la survivance en présence de fortes concentrations en Sm; la présence de ribosomes sauvages gêne cependant très fortement la croissance sur Sm.

La seconde conclusion est que les ribosomes A et B mutés sont aussi sensibles au misreading que les sauvages (III.3.3). Ce point soulève un paradoxe important: les mutations équivalentes

dans *E.gracilis* ou *C.reinhardtii* permettent aux chloroplastes de ces organismes de se développer en présence de Sm; dans ces organites, les mutations permettent donc de maîtriser les deux effets, tueur et bactériostatique. Une explication plausible, que nous discuterons d'ailleurs en détail dans le chapitre IV, repose sur le fait que les ribosomes chloroplastiques semblent avoir une affinité plus faible pour la Sm. Par exemple, les ribosomes chloroplastiques (70S) de *C.reinhardtii* fixent 0,6 molécules de Sm par ribosome [Boschetti et Bogdanov,1973] et ceux de l'euglène 0,13 seulement [Freysinet,1975]. De plus, la sous-unité 30S de *C.reinhardtii* fixe plus de Sm que la 70S, à l'opposé de la situation dans *E.coli* [Pestka,1977]. Il semble donc que les modalités de la fixation dans les deux types d'organismes soient différentes. En outre, il est probable que le site d'interaction de la Sm chez *E.coli* ne se limite pas aux nucléotides 912-915 (cf introduction). Les effets de la même mutation pourraient ainsi avoir des intensités différentes dans les ribosomes chloroplastiques ou bactériens. L'existence d'une affinité résiduelle des ribosomes U912 de *E.coli* a d'ailleurs été notée [Powers et Noller,1991], expliquant peut-être la réponse de nos ribosomes à l'antibiotique.

III.4 Comment les cellules peuvent-elles devenir progressivement résistantes ?

A ce stade des analyses, il est clair qu'une résistance "immédiate", intrinsèque aux ribosomes peut être mise en évidence par les tests de killing (cf III.2.3). Le mécanisme de cette résistance à l'effet tueur de la Sm peut d'ailleurs être visualisé *in vitro*: les ribosomes mutants ne sont pas bloqués irrémédiablement en phase d'initiation/élongation, et une synthèse quantitativement appréciable (de 50% à 100% selon les ribosomes A, B ou C) peut se dérouler.

Par contre il n'est pas possible d'observer directement une résistance à l'effet bactériostatique. Une croissance sur Sm (même à de faibles concentrations comme 5-10 $\mu\text{g/ml}$) ne s'observe qu'à la condition d'effectuer de multiples repiquages. Ce comportement suggère une "adaptation" des cellules à des concentrations toujours plus élevées de l'antibiotique.

Précisons maintenant que le terme d'adaptation recouvre deux phénomènes bien distincts:

1) jusqu'à 25 $\mu\text{g/ml}$ les cellules (B) "s'adaptent" en conservant quelques caractéristiques principales: la croissance est très lente, la résistance à une mauvaise lecture est quasi nulle et la résistance *in vitro* au blocage de la polymérisation est de l'ordre de 50%. De plus, la résistance obtenue n'est pas acquise de manière stable.

2) à partir de 25 $\mu\text{g/ml}$ un nombre toujours important de colonies acquiert quelques caractéristiques nouvelles: la croissance est rapide, la résistance est stable, les taux de misreading sont insensibles à la présence de Sm et les résistances au blocage de la polymérisation *in vitro* sont de 100% (cellules C).

Différents mécanismes peuvent être responsables de ces phénomènes. Dans ce qui suit, nous nous sommes particulièrement intéressés aux cellules de type C.

III.4.1 Une augmentation du nombre de ribosomes mutants serait-elle responsable de la résistance ?

Nous présentons ci-après deux évidences qui permettent d'affirmer qu'un tel phénomène n'apparaît pas. La première réfute un mécanisme simple par lequel une telle augmentation pourrait se produire: le transfert des mutations sur le génome; nous montrons de plus qu'un plasmide extrait de cellules adaptées ne confère pas de résistance supplémentaire lorsqu'il est

réintroduit dans des cellules vierges de toute adaptation. La deuxième montre directement que la proportion de ribosomes mutés ne varie que peu.

III.4.1.1 L'adaptation ne consiste pas en un transfert des mutations sur le génome et ne réside pas sur le plasmide

Au moins trois voies simples pourraient être utilisées par la cellule pour augmenter le nombre de ribosomes résistants: soit une "inactivation" des opérons chromosomiques, soit une augmentation notable du nombre de plasmides ou soit, comme déjà suggéré [Montandon *et al*, 1986] le transfert de la mutation sur ces opérons. Nous avons testé la dernière hypothèse. 10 μ g de l'ADN total de la souche totalement résistante 50.109 [Montandon *et al*, 1986] (cette souche contient le plasmide pEM109 (T912)) ont été digérés par l'enzyme PvuII, séparés sur gel agarose et transférés sur membrane nitrocellulose. Des quantités égales d'ADN des souches DH1 et DH1 transformées avec le plasmide pKK3535 ont été incluses en parallèle. Nous avons hybridé la membrane à l'oligonucléotide de séquence TTAAACTTAAATGAA (positions 904-919), marqué au 32 P en son extrémité 5'. Cet oligonucléotide forme un hybride parfait avec la région mutée de pEM109, alors que le nucléotide T912 (souligné dans la séquence) ne peut s'apparier aux opérons sauvages (chromosomiques ou de pKK3535). Les conditions que nous avons choisies (6xSSC, 10xDenhardt, 25°C) favorisent les appariements entre la sonde et le plasmide pEM109 au détriment des hybridations sonde-opérons chromosomiques/pKK3535. Notons que Howe et Aldrich [1988] ont employé avec succès la même approche pour affirmer l'incorporation de la mutation T912 dans les génomes chloroplastiques de *N.tabacum*. Dans les conditions choisies par les auteurs, et comme dans les nôtres (fig. 7), les oligonucléotides n'hybridaient qu'aux opérons mutés.

La sonde mutante révèle l'opéron muté de pEM109 (fig. 7, ligne 3; la position T912 est comprise dans un fragment PvuII de 7,1 kb). Aucune autre bande n'est détectable dans la figure 7 (une hybridation contrôle effectuée avec un oligonucléotide "sauvage", recouvrant les positions 930-945 révèle 6-7 bandes supplémentaires, qui doivent correspondre aux différents opérons ribosomiques (non-montré)). Nous en concluons que l'adaptation ne s'est pas effectuée par un transfert de la mutation sur les opérons chromosomiques. La même conclusion a d'ailleurs été mise en évidence différemment par Frattali *et al* [1990], sur le même système (DH1 et pT912): des cellules adaptées puis débarrassées du plasmide gardent un haut niveau de résistance, alors que les ribosomes ne présentent pas trace de la mutation U912.

Nous avons encore vérifié que l'adaptation ne résidait pas sur le plasmide: nous avons extrait le plasmide pT912 de cellules adaptées (50.109) et l'avons introduit dans des cellules vierges de toute adaptation. Nous avons étalé 10^3 - 10^4 cellules ainsi transformées sur du milieu LB + Amp + 25 μ g/ml Sm: aucune cellule n'apparaît après une nuit à 37°C (la même expérience sur du milieu LB + Amp montre le nombre de colonies attendu). Par contre, les cellules 50.109 étalées dans ces conditions se retrouvent sur boîte contenant de la Sm. Remarquons que ce contrôle n'a rien de trivial: par exemple, Allen et Noller [1991] ont montré qu'il était effectivement possible de sélectionner *in vivo* des mutations du *rrnB* portées par un plasmide; de même, Sigmund *et al* [1984], avaient déjà reporté que des résistances à des antibiotiques pouvaient être sélectionnées sur un plasmide contenant le *rrnH*.

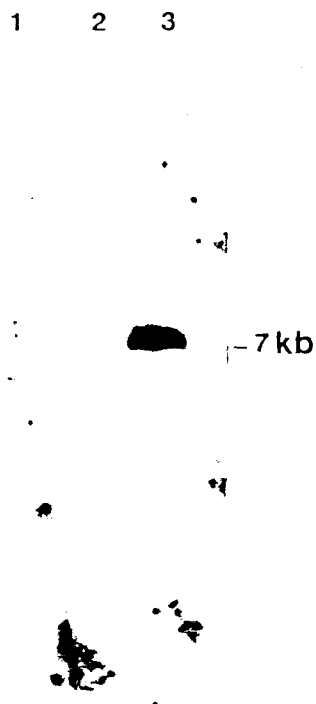


Figure 7

La mutation T912 n'a pas été acquise par les opérons chromosomiques de la souche 50.109. Les ADN extraits des souches DH1 (ligne 1), DH1-pKK3535 (ligne 2) et 50.109 (ligne 3) ont été digérés par PvuII, séparés sur gel agarose, transférés et hybridés avec un oligonucléotide spécifique pour la mutation T912. L'enzyme de restriction PvuII a été choisi parce qu'il ne coupe qu'une seule fois dans le *rrnB*, ce qui pouvait permettre de bien séparer les divers opérons *rrn*.

III.4.2 La proportion de ribosomes mutés varie peu durant les étapes d'adaptation

Nous avons examiné le contenu en ribosomes mutés en séquençant les ARNr des extractions de ribosomes A et C (il ne s'agit donc pas des ARN totaux; si cela avait été le cas, cette expérience n'aurait pas amené le résultat recherché, car nous aurions en effet pu imaginer une incorporation différente des ARNr mutés et sauvages dans les ribosomes). Dans cette expérience, l'intensité des bandes correspondant aux mutations donne une indication directe du taux de ribosomes mutants (fig. 8).

Les séquençages ne montrent aucune augmentation sensible de la proportion de ribosomes "résistants" (fig. 8 dans le cas de U912; des expériences identiques avec les transformants C914 et TA donnent des résultats similaires (non-montré)). Cette observation est sans commune mesure avec le saut franchi par les cellules C dans leur résistance à la Sm (cf III.2.1). Il semble donc que la résistance finale (C) ne puisse pas être attribuée à une augmentation de la proportion de ribosomes mutés.

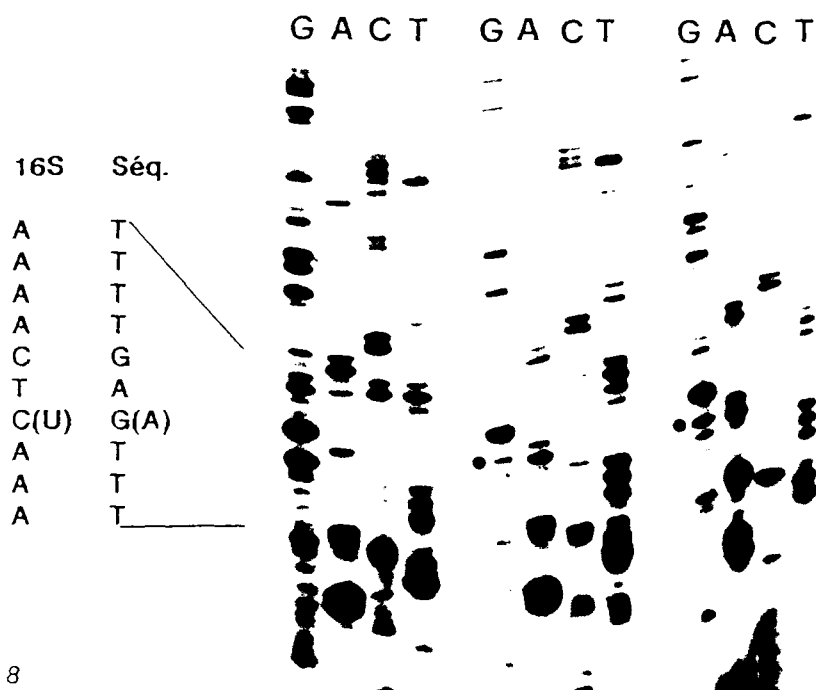


Figure 8

L'augmentation du nombre de ribosomes mutés n'est pas responsable de l'adaptation. Les séquences des ribosomes U912 avant adaptation (au centre) et après adaptation (à droite) ne montrent pas une augmentation de la proportion du nucléotide muté U912. La séquence des ribosomes sauvages est présentée à gauche. Les séquences se lisent G, A, C, T et sont complémentaires à l'ARNr. Le nucléotide U912 (A912 sur la figure) est indiqué. La séquence dans la marge est celle des ribosomes sauvages, et le nucléotide muté est indiqué entre parenthèses (); ligne "Séq.": séquence lue sur le gel (complémentaire à l'ARNr 16S); ligne "16S": séquence complémentaire à la séquence du gel, et qui correspond à l'ARNr 16S

III.4.3 La protéine S12 de la souche 50.109 est mutée

Les résultats ci-dessus ont donc démontré que l'"homogénéisation" des ribosomes C n'est pas attribuable à une "homogénéisation" des ARNr, car la proportion d'ARNr sauvages reste semblable.

Un ultime moyen pour rendre tous les ribosomes résistants serait que l'unique gène S12 de la cellule ait muté. Nous avons alors isolé et caractérisé le gène S12 de la souche C 50.109.

III.4.3.1 Construction d'une banque génomique partielle dans lambda gt10

La séquence de l'opéron S12 est connue et est donnée par Post et Nomura [1980]; malheureusement, cette séquence ne remonte pas en amont des promoteurs, mais indique tout de même qu'aucun site EcoRI ne vient couper le gène S12. Un site EcoRI se trouve dans le gène pour le facteur EF-G, environ 2 kb après le codon stop de la S12. Cependant, la carte du génome complet de *E.coli* [Kohara *et al*, 1987] montre que le gène est compris dans un fragment de 4-5 kb. Afin de vérifier que cette carte était également valable pour la souche 50.109, nous avons digéré l'ADN de cette dernière par EcoRI avant de le transférer sur filtre nitrocellulose. L'hybridation avec une sonde homologue (cf matériel et méthodes) montre un fragment de 4,3 kb, qui est conforme à la taille attendue (fig. 9). La taille de ce fragment permet un clonage dans lambda gt10, et implique de plus que environ 2 kb en amont des promoteurs sont encore inclus dans l'insert.

Nous avons alors digéré par EcoRI l'ADN de la souche 50.109, élué tous les fragments allant d'une taille de 3 kb à 5 kb, et ligué ceux-ci dans lambda gt10. Nous avons purifié l'ADN d'un phage hybridant à une sonde homologue, et l'avons baptisé lambda 15.1 (fig. 11). Le fragment

EcoRI de ce phage a alors été introduit dans pBR322 (cf IV.3.3) et des sous-fragment RsaI et RsaI-PvuII dans le vecteur pBluescriptII afin d'en déterminer la séquence.

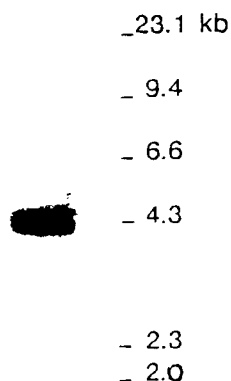


Figure 9

Le fragment EcoRI pour la protéine S12 de la souche 50.109 est de 4,3 kb. L'ADN total a été digéré par EcoRI, séparé sur gel agarose et transféré sur filtre avant d'être hybridé à une sonde homologue pour la S12. La référence de poids moléculaire est λ - HindIII

III.4.3.2 Séquençage de la région critique de la S12

Les mutations S12 conférant une résistance à la Sm sont localisées en deux loci chez *E.coli* [Wittmann et Wittmann-Liebold, 1974]: les mutations Asp42, Thr42, Arg42 et Arg85 confèrent en effet une résistance.

Nous avons alors entrepris de séquencer les régions critiques avec l'oligonucléotide de séquence GGCGTATGTA^CCTCG (codons 31 à 35). Cet oligonucléotide se situe 19 pb en amont du premier site, et 154 pb en amont du second, ce qui permet de rapidement visualiser les deux sites.

Nous obtenons alors la séquence CCTACAAAA pour le premier site (voir figure 10). Cette séquence diffère par le second A de la séquence sauvage reportée (CCTAAAAAA) [Post et Nomura, 1980]. Le changement, d'un A en un C, convertit la Lys 42 (AAA) en une Thr (ACA), et correspond à la mutation de résistance à la Sm de type A2 [Wittmann et Wittmann-Liebold, 1974]. Aucun autre changement n'apparaît dans le gel, en particulier en ce qui concerne le second locus. Nous concluons que le gène S12 de la souche 50.109 est d'un type Sm-résistant "classique".

III.4.3.3 Le gène S12 de la souche 50.109 est-il bien exprimé?

Afin de répondre à cette question, nous avons tout d'abord séquencé les positions +1 à -200 qui remontent de la première Met du gène jusqu'à 120 pb en amont des promoteurs. Aucune différence n'apparaît avec la séquence reportée par Post et Nomura [1980], ce qui tend à démontrer que la région promotrice doit pouvoir gouverner tout à fait normalement la transcription du gène S12 mutant.

Afin d'affirmer encore plus fortement notre réponse, nous avons introduit le fragment EcoRI de 4,3 kb dans le plasmide pBR322, ce qui nous a donné les constructions pS12.1 et pS12.2. Les deux constructions diffèrent uniquement dans l'orientation du gène relativement au plasmide. Les deux plasmides ont été caractérisés par les digestions BamHI (qui permettent de déterminer l'orientation) et EcoRI, et hybridations avec une sonde homologue (fig. 11; notons que le fragment de 4,3 kb comigre exactement avec le plasmide pBR322 linearisé).

Nous avons alors introduit les deux constructions pS12.1 et pS12.2 dans les souches DH1 (Sm^S) et HB101 (Sm^R), et soumis ces souches transformées au test de "killing" et à un test de croissance.

a) test killing:

Nous raisonnons que si le gène du plasmide est *résistant et exprimé*, il doit alors, dans un test killing:

1° conférer une résistance à la souche Sm^S DH1

2° ne pas modifier la résistance de la souche Sm^R HB101

Nous avons utilisé le test en culture liquide (cf matériel et méthodes), et présentons les différents résultats dans le tableau VI. Comme il est important que les cellules soient en phase de croissance exponentielle [Breckenridge et Gorini, 1969, Gorini, 1974], nous précisons les OD avant étalements lorsque celles-ci ont été mesurées. A titre de comparaison, les valeurs obtenues avec le plasmide pC914 ont été incluses.

Tableau VI

Test tueur en milieu liquide pour les transformants pS12

Les transformants sont traités comme décrit dans le texte. La souche est DH1. Le nombre de colonies est estimé à partir de dilutions 10^{-4} et 10^{-8} étalées sur boîtes L+Amp. Le plasmide pC914 a été inclus à titre de comparaison

Plasmide	OD ₅₅₀	Nombre de colonies		Réduction
		-Sm	+Sm	
pKK353	-	$2,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^3$	2×10^4
	0,330	$3,4 \times 10^7$	$3,4 \times 10^3$	1×10^4
	0,600	$4,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$	2×10^3
	1,000	$4,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^5$	5×10^2
pC914	0,190	$1,3 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$	7
	-	$1,1 \times 10^7$	$7,5 \times 10^5$	15
pS12.1	0,450	$1,6 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	2,7
pS12.2	0,320	$7,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^7$	0,14
	0,750	$1,4 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	1,75

-: non effectué

b) test de croissance:

Les cellules transformées ont été étalées sur boîtes contenant du milieu LB plus 40 $\mu\text{g/ml}$ Amp et 100 $\mu\text{g/ml}$ Sm. Si le gène résistant est exprimé il doit :

- 1° ne pas entraver la croissance de la souche Sm^r HB101 (auquel cas il serait de type sauvage)
- 2° en aucun cas (qu'il soit mutant ou sauvage) permettre la croissance de la souche Sm^s DH1.

Les boîtes sont incubées 16 heures à 37°C, et le tableau VII résume les croissances observées après ce laps de temps. Un "oui" indique qu'une bonne croissance a été observée (colonies de plusieurs mm), alors qu'un "non" indique qu'aucune croissance n'a été relevée. Le tableau VII résume de plus de manière qualitative les résultats du tableau VI (test tueur). Les données de ce dernier tableau s'interprètent comme suit:

- 1) la mutation des plasmides pS12.1 et pS12.2 est bien du type Sm-résistant (ce qui confirme les résultats du séquençage)
- 2) le gène S12 de la souche 50.109, bien que muté, est exprimé dans les souches DH1 et HB101. Nous admettons que ce résultat reste valable pour la souche 50.109, qui est une souche DH1 "adaptée"
- 3) les expériences en culture liquide confirment la résistance de la mutation C914 à l'effet tueur. Notons tout de même que la résistance semble légèrement plus faible que les résistances conférées par les mutants S12 (Tableau VI)
- 4) les cellules (non adaptées) transformées avec le plasmide pC914 se comportent différemment des cellules HB101 et 50.109
- 5) ces expériences confirment la dominance de l'effet bactériostatique et la récessivité de l'effet tueur [Breckenridge et Gorini, 1969].

Tableau VII

Résumé des tests tueurs (en milieu liquide) et de croissance pour le plasmide pS12.

Les transformants ont été traités comme décrit dans le texte. Les résultats de pC914 et de la souche C 50.109 sont inclus. Un "oui" indique que les transformants sont résistants à l'effet considéré, un "non" qu'ils ne le sont pas

Souche	Plasmide	Croissance	Survivance
HB101	pS12	oui	oui
	pBR322	oui	oui
50.109 (C)	pT912	oui	oui
DH1 (A)	pS12	non	oui
	pC914	non	oui
	pBR322	non	non

III.5 Interaction de la Sm avec la région 912-915 de l'ARNr 16S

III.5.1 Système *E.coli*

Il a été montré que la Sm interagissait de diverse manière avec la région 912-915: elle peut-être cross-linkée à la région 892-917 [Gravel *et al*,1987], elle protège les nucléotides 912 à 915 d'une attaque au dimethylsulfate (DMS) [Moazed et Noller,1987], et les mutations de cette région confèrent des phénotypes Sm-résistants. Toutes ces observations suggèrent une interaction directe entre la Sm et ces nucléotides. Il est donc raisonnable de penser que les mutations agissent en altérant directement le site de fixation de l'antibiotique, et par là-même la fixation de la Sm au ribosome.

Nous avons alors soumis les ribosomes C914 (classe A) à une attaque au DMS, en présence et en absence de Sm. Les ribosomes sauvages (pKK3535) ont été inclus comme contrôle. Le DMS méthyle les G en N7, les A en N1 et les C en N3 [Christiansen *et al*,1990]. Après extraction des ARNr, une amorce (l'oligonucléotide que nous avons déjà employé lors du séquençage des ARNr (cf III.1.3)) est allongée par la "transcriptase inverse" en présence des 4 bases, dont l'une est marquée radioactivement. Les méthylation ont pour effet de forcer l'enzyme à certaines pauses, qui sont finalement visualisées sur un gel de séquence ordinaire. La figure obtenue représente donc l'accessibilité des groupements -N= au DMS. Si certains groupements sont devenus inaccessibles (soit par une interaction directe avec une molécule, soit par des changements configurationnels induits "à distance"), cela se traduit par une absence de pause de la transcriptase inverse. Nous le visualisons par un "blanc" dans le gel. Notons encore que les nucléotides méthylés normalement dans les ARNr apparaissent, ainsi que différentes pauses de l'enzyme dues à des structures secondaires. Il est donc nécessaire d'inclure un témoin non traité dans les réactions.

Finalement, la transcriptase inverse n'effectue pas une pause *sur* les nucléotides méthylés, mais s'arrêtera juste avant, sur le nucléotide qui *les précède*. Ainsi une bande apparaissant en position 916 rendra compte d'une méthylation en 915.

Les résultats de la figure 12 montrent clairement la protection des ARNr sauvages en présence de Sm (lignes 3 et 4, nucléotides 913 à 915). Pour les ribosomes mutants, les bandes 913 à 914 disparaissent quasi complètement déjà en absence de l'antibiotique, empêchant leur utilisation pour tester la protection de la Sm. La bande 915 reste par contre suffisamment apparente, et ne semble que peu protégée par la Sm. Cette bande est celle subissant la plus forte protection dans les ribosomes sauvages (lignes 3 et 4). L'analyse de A915 montrerait donc une interaction diminuée de la Sm. Le site d'interaction semblant être malheureusement plus large (nucléotides 912 à 915), nous ne pouvons pas tirer de conclusion définitive quant à l'interaction de la Sm et de l'ensemble du site 912-915. Seule reste valable l'affinité réduite pour la base A915, qui est la plus protégée dans les ribosomes sauvages [Moazed et Noller,1987].

Remarquons encore que la réactivité de A908 ne semble en tout cas pas diminuée dans les ribosomes C914. Nous commenterons ce résultat dans la partie "discussion".

Le comportement particulier de toute la région 912 à 915 dans le mutant C914 mérite une attention spéciale. Cette accessibilité diminuée au DMS n'a pas été relevée avec des mutations S12 ou S4 [Allen et Noller,1989], et semble particulière à la mutation C914. A titre d'exemple, d'autres mutations-points de l'ARNr 16S confèrent une résistance à des antibiotiques ne sont pas associées à de tels changements configurationnels [De Stasio *et al*,1989]. Afin de déterminer la généralité (ou le côté fortuit) de cette observation, nous avons refait les mêmes expériences avec des *ribosomes chloroplastiques* contenant une *mutation différente* (U912).

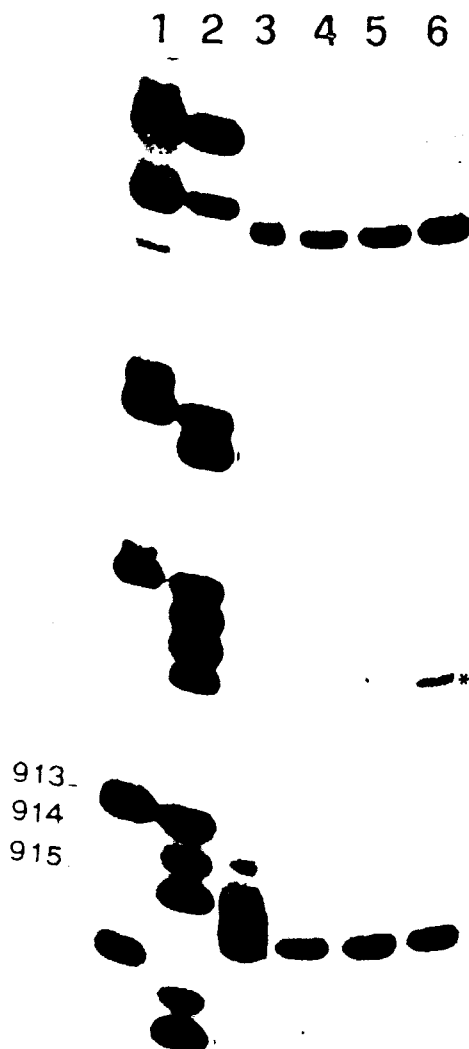


Figure 12

Protection par la Sm de la région 915 des ribosomes de *E.coli*

(1) ARNr sauvage non modifié; (2) "A-Track"; (3) ribosomes sauvages modifiés; (4) ribosomes sauvages modifiés en présence de Sm; (5) ribosomes des transformants pC914 modifiés; (6) ribosomes des transformants pC914 modifiés en présence de Sm. Les positions des bases les plus protégées ainsi que de A908 (*) sont indiquées dans les marges

III.5.2 Ribosome chloroplastique

Le laboratoire disposant de souches d'euglènes dont l'ARNr chloroplastique 16S est muté en position équivalente à C912 (C876—>U876, équivalent à C912—>U912 chez *E.coli*) [Montandon et al.1985], nous avons refait les mêmes expériences avec les ribosomes chloroplastiques purifiés. Les résultats sont essentiellement les mêmes que ceux obtenus avec les ribosomes de *E.coli* (fig. 13):

1) les ribosomes chloroplastiques équivalents à U912 montrent en l'absence de Sm la même accessibilité diminuée au DMS que les ribosomes C914 de *E.coli* (lignes 5 et 4 des figures 12 et 13, respectivement). L'hypothétique changement configurationnel associé à la mutation C914 n'est donc ni spécifique de la mutation (ce résultat est d'ailleurs confirmé chez *E.coli* par les résultats de Powers et Noller [1991] avec la mutation U912), ni spécifique des ribosomes de *E.coli*. Il est donc très intéressant de noter que des mutations différentes induisent le même changement configurationnel dans des organismes différents. En ce qui concerne ce dernier effet, tout se passe en fait comme si l'intégrité des nucléotides 912 à 915 était indispensable à une certaine configuration. Changer n'importe lequel de ces nucléotides amène à un relâchement de

l'ensemble de la structure 912-915. Ce résultat renforce l'idée que les nucléotides 912 à 915 forment une *structure liée* (et non pas un ensemble de nucléotides aux fonctions disparates) dont la fonction reste à déterminer (cf discussion).

2) la protection par la Sm des ribosomes sauvages, bien qu'évidente, reste particulièrement faible. Ce résultat est surprenant quand on le compare à *E.coli*: la structure primaire de la région est totalement conservée et la réactivité au DMS est équivalente (comparer les lignes 4 et 3 des figures 12 et 13). De plus la S12 de toutes ces souches est du type sauvage. Ce résultat laisse entrevoir que d'autres facteurs, non directement liés à la structure de la région 912-915 ou de la protéine S12, peuvent être importants dans la fixation de la Sm.

3) les mêmes remarques (cf III.5.1) faites au sujet de l'utilisation des nucléotides 912 à 915 pour tester l'affinité de la Sm dans les mutants, peuvent être formulées ici pour les nucléotides équivalents.

4) nous n'avons pas cherché à analyser la bande apparaissant en la position U876 (équivalente à U912) des ribosomes mutants (fig. 13, lignes 4 et 5); cette bande n'apparaît d'ailleurs pas dans les figures de Powers et Noller [1991] pour les ribosomes U912 de *E.coli*. Le DMS n'attaquant pas les uridines [Christiansen *et al.*, 1990], cette bande pourrait représenter par exemple une structure secondaire nouvelle dans les ARNr extraits, un site de scission particulièrement exposé, ... La première vérification serait de remplacer l'ARNr sauvage du contrôle non-méthylé par de l'ARNr muté.



Figure 13

Protection par la Sm de la région 876-879 des ribosomes chloroplastiques de *E.gracilis*

(1) "A-Track"; (2) ribosomes sauvages modifiés; (3) ribosomes sauvages modifiés en présence de Sm; (4) ribosomes des mutants 139.12/4 modifiés; (5) ribosomes des mutants 139.12/4 modifiés en présence de Sm. Les positions des bases les plus protégées sont données à gauche

IV DISCUSSION

Résistance à l'effet tueur et adaptation

Les résultats que nous avons présentés permettent de mieux cerner la relation entre la résistance à l'effet tueur et la croissance finale sur Sm.

La présence des mutations C914 et U912 (de même très certainement que U912/A888) altère l'interaction entre la Sm et le ribosome [III.5 et Powers et Noller,1991]. Dans le cas de U912 (de même que pour G915), il a été démontré que les ribosomes fixaient moins de Sm [Leclerc *et al*,1991]. L'absence quasi totale de protection de A915 (III.5), de même que le changement configurationnel de la région 912-915 peuvent donc être associés à une interaction diminuée avec la Sm [Powers et Noller,1991]. Dans un premier temps, cette affinité diminuée peut rendre compte de la résistance à l'effet tueur *in vivo* (III.2 et III.4), et de la résistance au blocage de la traduction *in vitro* [III.3 et Leclerc *et al*,1991]

Dans les cellules transformées, les mutations sont incorporées par 60-70% des ribosomes totaux. Les 30-40% de ribosomes sauvages sont très vraisemblablement fonctionnels, comme le démontrent les tests *in vitro* employant un poly(U) ou un ARNm (III.3 et Leclerc *et al*,1991). De plus, les transformants sont incapables de pousser en présence de Sm (>5-10 µg/ml) (III.2 et Montandon *et al*,1986; Morgan *et al*,1988; Melançon *et al*,1988; Frattali *et al*,1990), à moins d'être successivement repiqués sur des concentrations croissantes de l'antibiotique (III.2 et Montandon *et al*,1986; Melançon *et al*,1988). Cette incapacité à croître peut donc être attribuée à la présence des ribosomes sauvages [Davies *et al*,1974; Gorini,1974; Powers et Noller,1991]. La résistance à l'effet tueur que nous avons mise en évidence permet aux cellules exposées à plus de 5 µg/ml Sm de survivre (III.2 et III.4; Gorini,1974). Pendant le temps que durent les repiquages, cette survivance permet alors à une cellule d'acquérir éventuellement une résistance "totale", et de se développer lors des repiquages successifs. Notons que les transformants qui acquièrent le plus rapidement cette résistance sont aussi ceux qui résistent le mieux au killing de l'antibiotique (III.2).

Le temps après lequel des cellules totalement résistantes apparaissent est toujours assez long: chaque cycle de repiquage ne s'effectuant en moyenne qu'après deux jours d'incubation, et les colonies résistantes apparaissant après 3 à 4 cycles [III.2 et Montandon *et al*,1986], cela signifie qu'il faut attendre 6-8 jours avant que les premières cellules n'apparaissent. Ce résultat explique notamment l'échec d'autres groupes ayant tenté de mettre en évidence des résistances [Morgan *et al*,1988], simplement en étalant les transformants en présence de l'antibiotique.

Le mécanisme par lequel les cellules deviennent totalement résistantes repose sur l'"élimination" des ribosomes sauvages; en effet toutes les extractions de ribosomes de telles souches se comportent comme si elles étaient constituées uniquement de ribosomes résistants. Par exemple, ces ribosomes ne "miscodent" pas en présence de Sm [III.3 et Montandon *et al*,1986; Melançon *et al*,1988] et les taux de résistances au blocage de la traduction sont de 100% (III.3). Cette situation est à l'opposé de celle des ribosomes non-adaptés [III.3 et Leclerc *et al*,1991].

Afin de déterminer quelle était la responsabilité de la mutation dans la résistance finale, nous avons caractérisé plus en détail certains transformants pT912. La proportion des ribosomes U912 n'augmente pas dans ces transformants (III.4, et de même pour C914 et UA), de même que le génome de la souche 50.109 (souche totalement résistante sélectionnée par P-E Montandon [1986]) n'a pas acquis la mutation T912 (III.4; ce résultat a été confirmé pour d'autres transformants pT912 adaptés [Frattali *et al*,1990]). De plus, le plasmide pEM109 (pT912 adapté) extrait des cellules 50.109 n'est pas porteur des nouvelles caractéristiques (III.4).

Finalement, nous avons encore montré que l'acquisition de la résistance finale était due, dans le cas de la souche 50.109, à une mutation de la protéine S12. Cette mutation a été caractérisée par le séquençage du gène (III.4), et s'est trouvée correspondre à une mutation Sm^R

classique [Wittmann et Wittmann-Liebold,1974]; l'introduction du gène dans des cellules montre encore que la résistance est bien exprimée (III.4). Comme le gène S12 est unique au chromosome de *E.coli* [Kohara *et al*,1987], cette simple mutation peut rendre tous les ribosomes résistants. Les analyses des ribosomes de la souche 50.109 [III.4 et Montandon *et al*,1986], montrent de plus que les mutation S12 et U912 sont parfaitement compatibles. Nous imaginons que ce résultat reste valable pour les mutations C914 et U912/A888. Nous pouvons cependant nous demander si ce résultat l'est également pour G915: Leclerc *et al* [1991] ont démontré que G915 conférait une forte résistance *in vitro*, alors que nous n'avons pas pu sélectionner de cellules Sm^R (III.2). Il est dès lors possible que cette mutation ne soit simplement pas compatible avec une mutation S12. Par exemple, Frattali *et al* [1990] avaient déjà démontré que la mutation U912 n'était pas compatible avec des mutations S12 Sm-dépendantes.

Au vu des comportements similaires des ribosomes de type C (III.3), nous pensons que le comportement de la souche 50.109 peut servir de modèle à tous les autres transformants analysés. L'analyse de mutations Sm^R du 16S ne se limitant pas aux nucléotides 912-915 [Melançon *et al*,1988], le comportement de cette souche démontre les limites de la méthodologie [Montandon *et al*,1986; Melançon *et al*,1988; Frattali *et al*,1990], et met en relief la prudence nécessaire dans l'analyse des résultats.

Le site de fixation de la Sm sur le ribosome

La Sm est un aminoglycoside de taille faible relativement au ribosome. Sa masse moléculaire est de l'ordre de celle d'une base purique. Elle est composée de deux parties: la streptobiosamine (un disaccharide aminé) et la streptidine, un sucre possédant deux groupements (NH)₂CNH₂. Ces deux groupements, fortement basiques, constituent la partie active de la molécule. La Sm possède donc une charge nette positive qui explique son affinité forte pour les acides nucléiques [Pongs et Edermann,1973; Davies *et al*,1964].

L'ARNr 16S natif fixe deux molécules de Sm [Biswas et Gorini,1972]. Dénaturé, il en fixe beaucoup plus. Le ribosome (70S ou sous-unité 30S) fixe quant à lui essentiellement 1 molécule. D'autres liaisons, moins spécifiques, peuvent encore survenir à hautes concentrations de l'antibiotique [Pestka,1977].

L'affinité du ligand dépend pour une grande part de l'engagement du ribosome dans la traduction: l'unité 70S libre fixe fortement et de manière irréversible la Sm (en tout cas dans les conditions physiologiques; seul un lavage à de hautes concentrations en sels peuvent éliminer la molécule), alors que les polysomes la fixent de manière plus labile et réversible [Gorini,1974].

Au niveau moléculaire, Moazed et Noller [1987] ont montré que la Sm protégeait fortement les bases 912 à 915 de l'ARNr 16S d'une attaque au DMS. Une protection, moins forte, apparaît aussi pour les deux bases appariées A1413 et G1487 ainsi que pour la base G1494. Cette dernière protection est intéressante, car elle pourrait représenter un site d'interaction direct avec l'antibiotique [Moazed et Noller,1987]; notons immédiatement que la protection forte de la région 912-915 ne rend pas nécessairement compte d'une affinité plus forte de la molécule pour ce site [Christiansen *et al*,1990]. La Sm pouvant être de plus cross-linkée à la région 892-917 [Gravel *et al*,1987] ajouté au report d'un nombre important de mutations des nucléotides 912 à 915 conférant une résistance [Montandon *et al*,1985 et 1986; Harris *et al*,1989; Etzold *et al*,1987; Fromm *et al*,1987; Leclerc *et al*,1991], il a été immédiatement suggéré que ces nucléotides sont en contact direct avec la Sm.

Il est cependant extrêmement intéressant de noter que les mêmes expériences [Gravel *et al*,1987] ont permis de cross-linker la Sm à la région 1400 (1394-1415) dans des proportions parfaitement équivalentes au cross-link en 912-915. Le fait qu'une seule molécule de Sm soit fixée dans les conditions décrites suggère fortement que les deux régions soient spatialement proches, et que le site de fixation est peut-être constitué par des éléments des deux régions. D'autres résultats supportent cette hypothèse:

- l'ARNt lié au ribosome, de même que la tetracycline, la gentamycine et la streptomycine inhibent la scission entre les bases 1493 et 1494 par la Colicine E3 [Nomura *et al*,1974]. Il est vraisemblable que l'ARNt et la gentamycine agissent par interférence directe sur le site de scission. Par contre, le site principal d'attaque de la tetracycline et de la Sm a été localisé autour des positions 900 [Moazed et Noller,1987]; la proximité des sites 900 et 1400 expliquerait alors l'action des deux antibiotiques [Moazed et Noller,1987].
- l'action de la colicine E3 empêche la fixation de la Sm [Davies *et al*,1974]. Ce résultat est facilement explicable si l'on admet que la région 1400-1500 fait partie du site de fixation de l'antibiotique
- IF-3, qui se fixe en 1500-1535, empêche la fixation de la Sm [Van Duin *et al*,1976; Revel,1977]
- le cas de la myomycine est particulièrement frappant: cet antibiotique, qui produit un ensemble de perturbations absolument identiques à la Sm [Davies *et al*,1988], ne protège pas les bases 912-915. A la place, une faible interaction apparaît en A1408. Ce constat a fait émettre l'hypothèse que les deux antibiotiques agissaient sur le même site fonctionnel, mais en des points de contacts différents [Woodcock *et al*,1991].

Les 2 sites 912-915 et 1400 formeraient ainsi une pochette de fixation de la Sm. Pour être complet, ajoutons qu'une résistance a été décrite en position 14 (équivalente à la position 13 chez *E.coli*) de l'ARNr 16S de *C.reinhardtii*. Le fait que cette région soit proche des positions 912-915 [Moazed et Noller,1986], ajouté au possible appariement aux nucléotides 911-915 [Leclerc et Brakier-Gingras,1991], étend peut-être le site de fixation à cette région. Notons que la région 12-16 a été impliquée dans un changement configurationnel associé à l'état d'initiation et d'élongation (ce changement s'opérerait par l'appariement des nucléotides 14 à 18 au 3' du 16S) [Kössel *et al*,1990]. Rappelons que la Sm bloque l'initiation et ralentit l'élongation [Davies *et al*,1974].

D'autre part, la Sm perturbe beaucoup plus fortement l'unité 70S libre (qu'elle *bloque* totalement) que les polysomes (dont elle *ralentit* la polymérisation). La Sm se liant avec une forte affinité aux deux types de ribosomes, Davies [Davies *et al*,1974] avait suggéré que *le site de fixation de la Sm était partiellement masqué dans les polysomes*. Aujourd'hui, l'on sait que la région 1400-1500 est le siège de nombreuses interactions lors de l'élongation:

Certains ARNm ont pu être directement cross-linké aux nucléotides 1390-1400 [Rinke-Appel *et al*,1991]. Les bases 1399-1401, 1408, et 1492-1493 sont protégés par les ARNt des sites A ou P [Moazed et Noller,1990]. La région 1502-1529 a été impliqués dans un appariement avec l'ARNr 23S [Van Duin *et al*,1976]. Les nucléotides 1496, 1515, 1516 font partie des nucléotides protégés par la sous-unité 50S et dont la modification par le kethoxal empêche l'association avec la sous-unité 50S [Herr *et al*,1979]. Il est donc évident que la région 1400 est stériquement occupée lorsque les ribosomes sont en élongation. De plus, les nucléotides 12-16 sont peut-être indisponibles par l'appariement avec le 3' du 16S. Si le site de fixation de l'antibiotique recouvre ces positions, il est clair que la fixation sera altérée lorsque les ribosomes se trouvent en phase d'élongation.

Notons encore que la structure de la région 1400 des ribosomes chloroplastiques est toujours quelque peu différente des ribosomes de *E.coli* (fig. 14) (au contraire de la région 912-915). Ces différences pourraient expliquer la faible affinité de ces ribosomes pour la Sm [Boschetti et Bogdanov,1973; Freyssinet,1975] et la protection faible de la région 912-915 (III.5). La même mutation en 912-915 aurait ainsi des résultats beaucoup plus prononcés dans ces ribosomes.

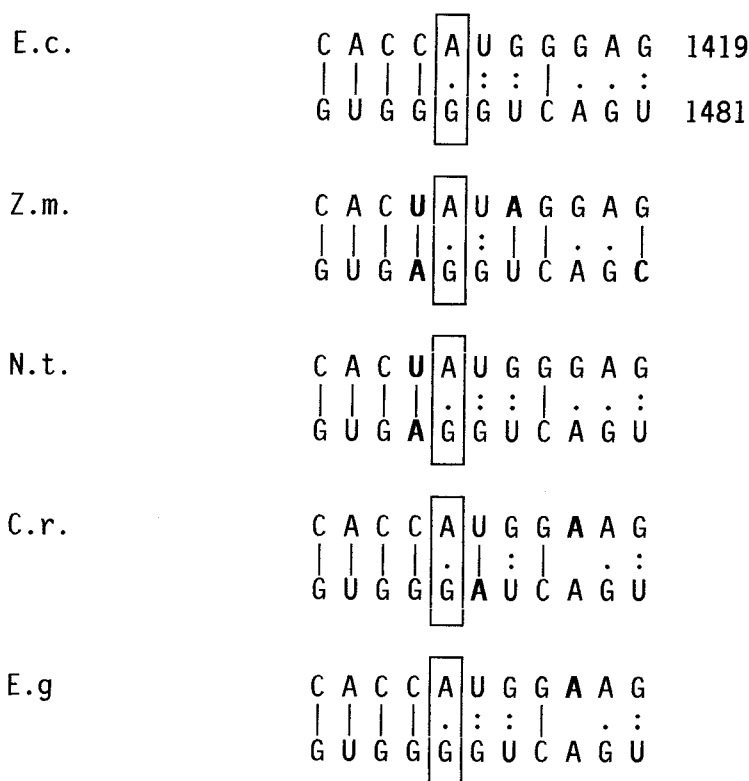


figure 14

Encadré: nucléotides protégés par la Sm chez *E.coli* [Moazed et Noller,1987]

Gras: nucléotides différents de *E.coli*

E.c.: *E.coli*; Z.m.: *Z.mais*; N.t.: *N.tabacum*; C.r.: *C.reinhardtii*; E.g.: *E.gracilis*

Les mutations 912-915: effets configurationnels

Allen et Noller [1989] ont proposé que le ribosome pouvait se trouver sous deux états configurationnels, chacun de ces états modulant la précision du décodage. La balance entre ces deux états est sous le contrôle des protéines S12 et S4, dont les mutations favorisent ou diminuent la qualité du décodage, respectivement [Gorini,1974]. Les mutations S12, qui diminuent l'affinité de la Sm, déplaceraient l'équilibre dans un sens, alors que les mutations S4, qui favorisent le binding [Böck et al,1979], le déplaceraient dans l'autre sens. L'état conformationnel du ribosome pourrait ainsi influencer l'association avec la Sm [Leclerc et Brakier-Gingras,1991].

La réactivité du nucléotide A908 face au DMS semble suivre l'état de "précision" du ribosome [Allen et Noller,1989]. En effet, la réactivité de ce nucléotide est faible dans les ribosomes "hyper-précis" Sm^p, et augmente progressivement avec les ribosomes Sm^r jusqu'à atteindre un maximum avec les ribosomes *ram*. Il a donc été proposé que le nucléotide A908 soit un indicateur de l'état d'équilibre du ribosome: plus sa réactivité face au DMS est grande, et plus le ribosome se trouve dans un état "relâché".

Ribosomes	Précision	Réactivité A908	Protection 912-915 (Sm)
Sm ^D	grande	faible	faible
ram	faible	forte	forte

Selon ce modèle, *le comportement de A908 suggère que ce nucléotide est étroitement lié à une partie du ribosome dont la configuration est cruciale pour la précision de la traduction [Allen et Noller,1989].*

Nous pouvons exprimer le modèle de Allen et Noller en disant que la qualité de la lecture est *modulée* par deux grands ensembles dans le ribosome: le premier ensemble (celui de la S12 ?) permet une lecture extrêmement précise (et très lente), alors que le deuxième favorise la vitesse (c'est l'ensemble de la S4). Le travail effectué par ces deux ensembles serait transmis par l'intermédiaire du nucléotide A908 (et des régions adjacentes), qui ainsi exprime quel est l'ensemble prépondérant associé au type de ribosome.

Cette notion n'est vraisemblablement pas qu'une vue de l'esprit: la S4 recouvre en effet le domaine bordé par les nucléotides 27-47 et 394-556 [Stern *et al*,1986], et la S12 a été crosslinkée aux nucléotides 1316-1322 [Chiaruttini *et al*,1982]. Bien que ces deux domaines soient éloignés sur la structure secondaire de l'ARNr 16S, les deux protéines produisent des perturbations sur des sites communs de l'ARNr 16S [Stern *et al*,1989]. En trois dimensions [Stern *et al*,1989], les deux domaines auxquels appartiennent ces protéines apparaissent reliées par la région 908, qui semble ainsi faire office de "charnière" entre les deux (nous discuterons ce point plus en détail ci-après).

Le nucléotide A908 est directement adjacent aux nucléotides 912-915. Nous avons montré que des mutations dans cette région induisaient un changement configurationnel, et ces mutations diminuent la protection par la Sm (III.5). Paradoxalement, la réactivité de A908 semble bien accrue dans les mutants C914 et U912 (III.5, fig. 12 et 13 et les figures présentées par Powers et Noller,1991). Cette remarque situerait nos ribosomes dans la configuration *ram* (lecture relâchée) qui se caractérise par une grande sensibilité à la Sm [Gorini,1974]. En d'autres termes, une affinité même réduite de la Sm pourrait entraîner des perturbations (cf III.3 et discussion ci-après). Ce résultat implique encore que configuration du ribosome (dans le sens de Allen et Noller,1989) et binding de la Sm ne sont pas toujours directement liés (contrairement à l'hypothèse de Leclerc et Brakier-Gingras [Leclerc et Brakier-Gingras,1991].

Interaction entre la Sm et les ribosomes mutants

Les différentes résistances observées par différents groupes avec différentes mutations (U912/A888, U912, G912, A912, G913, C914, G915) montrent que ces mutations *modulent* la réponse du ribosome, et que l'on n'a pas une inhibition totale de l'interaction ribosome-Sm, mais plutôt un gradient de résistance, certaines mutations semblant dans ce contexte plus efficaces que d'autres [ce travail, Frattali *et al*,1990, Leclerc *et al*,1991, Harris *et al*,1989].

Les ribosomes mutants (912-915) lient moins bien la Sm [Leclerc *et al*,1991], et les expériences de protection ne montrent qu'une réponse résiduelle à la présence de l'antibiotique. Notons cependant que, bien que fortement diminuée, cette réponse peut encore atteindre 25 à 30% de la protection des ribosomes sauvages à haute concentration en Sm [Powers et Noller,1991]. Il est à noter que les variations dans les mesures faites étaient ici anormalement élevées, et suggèrent peut-être un comportement particulier.

DMS-experiment et binding studies s'accordent ainsi sur une affinité réduite de la Sm pour le ribosome. La question est alors de savoir si cette affinité réduite implique une absence totale de réponse du ribosome, particulièrement *in vivo*, là où l'assemblage s'effectue en présence de l'antibiotique. Les résultats que nous présentons ici ne s'accordent pas parfaitement à ceux de Leclerc *et al* [1991], qui montre que les ribosomes mutés U912 non adaptés résistent au miscoding. Nous ne pouvons que suggérer que ces différences proviennent de conditions expérimentales différentes; la notion que les mutations modulent la réponse à la Sm suggère en fait que différentes conditions expérimentales peuvent amplifier ou au contraire atténuer un effet donné. En conclusion, ce désaccord ne permet pas de déterminer quelle est la situation *in vivo*. Cependant, pour les ribosomes ayant été assemblés en présence de Sm (ribosomes B), la situation est quelque peu différente: il est en effet connu que la Sm se lie à deux sites de l'ARNr 16S [Biswas et Gorini,1972]; si ces deux sites sont bien séparés sur l'ARNr 16S, et que la fixation de la Sm à chacun des sites est indépendante de la fixation à l'autre, alors les mutations 912-915 ne devraient altérer qu'un des sites, et la Sm devrait se lier normalement au second. Il a été de plus démontré que des ribosomes Sm^r assemblés *in vivo* en présence de Sm montraient une sensibilité accrue à l'antibiotique *in vivo* et *in vitro* [Gorini,1974]. Il est donc tout à fait possible que, dans le cas des ribosomes B, nos expériences rendent compte de la situation dans la cellule.

Pour la situation *in vivo*, remarquons tout d'abord que les cellules transformées ne parviennent pas à croître au-delà de concentrations relativement faibles de Sm (5-10 µg/ml, III.2; valeur environ identique obtenue par Frattali *et al* [1990]). Ce faible résultat peut s'expliquer tout d'abord par la présence de ribosomes sauvages (30-40%), capables de bloquer les ARNm en phase d'initiation de la traduction, et excluant toute polymérisation par les ribosomes mutants.

Afin de contourner cette difficulté, Powers et Noller [1991] construisirent des ARNr 16S double mutant Sm^r + Spc^r. En présence de Spectinomycine, les ribosomes sauvages se trouvent vraisemblablement bloqués, laissant les ribosomes mutants exercer leur traduction; la résistance à la Spc est donc dominante, et il a été démontré que ce système permettait la détection aisée de phénotypes récessifs [Triman *et al*,1989]. Malgré cet artifice, les résistances restent extrêmement faibles: les cellules poussent bien à 3 µg/ml Sm et l'on peut observer une croissance jusqu'à 10 µg/ml [Powers et Noller,1991].

Ces résultats ne sont donc pas significativement meilleurs que ceux observés en l'absence de la double mutation. Pour les expliquer, les auteurs invoquent la présence des ribosomes sauvages, et la possibilité de leur inactivation partielle par la Spc.

Une autre explication serait que les ribosomes simple mutant U912 restent toujours quelque peu sensibles aux effets de la Sm, notamment en ce qui concerne la qualité de leur traduction. Nos résultats supportent fortement cette hypothèse.

Rôle de la région 912-915 dans la traduction

Deux régions de l'ARNr 16S sont bien connues pour leur implication dans les mécanismes de la traduction. Il s'agit des régions non appariées centrées autour des positions 530 et 1400. Nous n'utiliserons pas ici les termes de "têtes de lecture" proposés pour ces deux régions; en fait les seules "têtes de lecture" connues sont composées par l'ensemble des anticodons portés par les ARNt. La première fonction de l'appareil protéosynthétique est d'amener la tête de lecture à la distance adéquate du codon, nécessaire à une traduction de bonne qualité.

La région 1400: cette région sert de support direct à l'ARNm pendant toute la traduction. Plusieurs évidences supportent cette affirmation:

- des ARNm ont pu être directement cross-linké aux nucléotides 1390-1400 [Rinke-Appel

et al,1991]. Ce cross-link dépend de la présence d'ARNt, implique les nucléotides du site de décodage, et ne s'observe qu'avec des ribosomes 70S [Dontsova *et al*,1991].

-l'anticodon de l'ARNt Val du site P a également pu être cross-linké au nucléotide C-1400 [Prince *et al*,1982]. Il est clair que si cette région fournit le support aux ARNm en phase de décodage, l'anticodon doit se trouver très proche

-cette région contient une suite ..GxxGxxGxxG.. responsable de la maintenance du cadre de lecture des ARNm. Cette fonction avait été postulée par Trifonov [1987], avant d'être démontrée par Weiss *et al* [1988]

-la Sm, qui perturbe la qualité du décodage de même que d'autres antibiotiques tels la paromomycine, la néomycine, la gentamycine, la kanamycine, l'hygromycine, l'apramycine, la neamine et dans une proportion moindre la myomycine produisent tous des perturbations de cette région [Moazed et Noller,1987; Woodcock *et al*,1991]

-la structure de cette région a été mise en cause pour la qualité de la traduction: une mutation en 1469 supprime la dépendance en la Sm de ribosomes Sm^p, et cette mutation introduite dans des ribosomes sauvages confère des taux de misreading comparables à ceux de mutations S4 *ram*. Il est vraisemblable que cette mutation agisse en modifiant la structure des ARNr et, partant, de la région 1400 [Allen et Noller,1991].

Ces résultats impliquent donc que non seulement les nucléotides 1400-1500 interagissent directement avec l'ARNm, mais de plus montrent une relation étroite entre la structure de cette région et la qualité du décodage.

La région 530: jusqu'à récemment il était généralement admis que cette région se trouvait assez loin du "site de décodage" (1400). Des expériences récentes ont montré que les deux régions pourraient être en fait très proches, en ce sens qu'un nucléotide d'un ARNm a pu être cross-linkée simultanément aux positions 532 et 1390-1400 [Rinke-Appel *et al*,1991]. La région 530 est l'une des plus conservées de l'ARNr 16S (15 nucléotides sur 18 sont invariants [Woese *et al*,1980 et 1990] et a été impliquée dans une liaison des ARNm sur la base d'une périodicité -G-non G-N- [Trifonov,1987]. Les ARNt protègent les bases 529-531 d'une attaque au kethoxal; la proximité nouvelle de cette région avec la région 1400 permet de penser que cette protection est peut-être due à un contact plus direct qu'admis jusqu'ici [Rinke-Appel *et al*,1991]. Une interaction directe dans la fixation des ARNm ou des ARNt avait déjà été avancée [Trempe *et al*,1982] et la proximité du site de liaison du facteur Tu va fortement dans ce sens [Lasater *et al*,1990, Stern *et al*,1988, Girshovich *et al*,1986, Moazed *et al*,1988], puisque ces deux derniers éléments sont liés. Cette proximité, ajoutée à d'autres facteurs, suggère un rôle direct de la région dans le fonctionnement de EF-Tu [Stern *et al*,1989]. Ce facteur Tu, qui forme un complexe ternaire avec l'ARNt et le GTP est impliqué dans la qualité de la traduction, notamment parce que certaines mutations diminuent la fidélité du décodage [Hughes *et al*,1987, Hughes,1987, Tapio et Kurland,1986]. D'autres mutations altèrent le maintien du cadre de lecture [Hughes *et al*,1987, Hughes,1987], une fonction déjà proposée pour la région 530 [Trifonov,1987]. Le lien sous-jacent liant la région 530, le complexe ternaire et la qualité de la traduction s'affirme encore lorsqu'on considère certaines mutations de la boucle 530 qui confèrent une résistance à la Sm [Gauthier *et al*,1988; Fromm *et al*,1989; Harris *et al*,1989; Powers et Noller,1991]. D'autres mutations sont léthales en bloquant une étape de l'élongation peu après l'initiation [Powers et Noller,1990], et l'appariement des bases 524-526 et 505-507 ("pseudoknot") est en relation directe avec la résistance à la Sm [Powers et Noller,1991]. En ce qui concerne la Sm, la région ne fixe pas l'antibiotique, ce qui implique que les effets des mutations sont indirects et pourraient agir indépendamment d'une fixation de l'antibiotique. Cependant, la mutation U525 diminue la protection de la région 912 par la Sm, sans pour autant induire le changement configurationnel associé aux mutations 912-915 [Powers et Noller,1991 et III.5].

Les résultats accumulés nous permettent ainsi de proposer que les deux régions 1400 et 530 pourraient former les deux bras d'une articulation visant à positionner correctement le codon de l'ARNm d'une part et l'anticodon du complexe ternaire d'autre part. Il est d'ailleurs connu que le ribosome est une structure hautement flexible dans laquelle la dynamique est nécessaire à toute fonction [Atkins *et al*,1990]. Les différents changements configurationnels associés aux

protéines S4, S5, S12 et les ARNt dans la même région centrale du ribosome suggèrent que la précision de la traduction pourrait être modulée par une dynamique des ARNr [Stern *et al*,1989]. Une telle dynamique pourrait être rendue possible entre des régions importantes du ribosome par un certain nombre de charnières.

L'importance de la région 912-915 a été soulignée à plusieurs reprises, mais son rôle n'a jamais été fermement établi [Leclerc et Brakier-Gingras,1991; Neefs *et al*,1990]. Il est possible que la région 912-915 puisse jouer un tel rôle de charnière. Les quelques évidences ou remarques suivantes s'accordent dans ce sens:

- 1) la région semble montrer une apparente unité structurelle, comme nous l'avons déjà relevé (cf III.5)
- 2) la région possède une grande souplesse configurationnelle [Noller,1991; et nos résultats]. Cette souplesse semble indispensable à une "charnière" nucléique
- 3) la proximité des différents appariements considérés comme mutuellement exclusifs 9-13/21-25 et 17-20/915-918, 12-16/911-915 et 17-20/915-918, 14-18/1530-1534 et 17-20/915-918 [Noller,1984, Leclerc et Brakier-Gingras,1991, Kössel *et al*,1990]. Tous ces appariements sont associés à la formation ou la destruction de structures "pseudoknot" proches de la région 912-915. Les appariements de type pseudoknot ont été proposé pour conférer un certain mouvement aux grandes structures des ARNr [Noller,1984]
- 4) la Sm, qui se fixe à cette région, "durcit" le ribosome [Davies *et al*,1974]; ceci implique que les nucléotides 912-915 jouent un rôle important dans la "souplesse", c-à-d les mouvements internes du ribosome.
- 5) bien que très conservée [Woese,1980], un grand nombre de mutations sont tolérées par la région 912-915. Par contre une délétion ne l'est pas [Frattali *et al*,1990]. On s'attend effectivement à un tel comportement de la part d'une charnière, la délétion d'un élément rapprochant par trop les parties qu'elle articule, alors que le remplacement d'une base par une autre aurait moins d'effets.
- 6) la situation "géographique" de la région la situe idéalement pour une telle fonction. En fait la région 912-915 représente réellement le carrefour des trois grands domaines de l'ARNr 16S (ceci est encore plus évident lorsqu'on considère la structure tridimensionnelle de l'ARNr 16S dans le ribosome [Stern *et al*,1989]). La boucle 530 se situe dans le domaine principal 5' et la région 1400 dans le domaine mineur 3'. Les deux domaines étant impliqués dans la qualité de la traduction, les nucléotides 912-915 peuvent réellement représenter la charnière du mécanisme. Remarquons que l'existence des grands domaines de l'ARNr 16S correspond à de "véritables entités structurelles" [Noller,1984], et peut-être fonctionnelles
- 7) le comportement de A908 qui suggère que ce nucléotide fait partie "d'un lien structurel entre différentes régions du ribosome importantes pour la traduction" [Allen et Noller,1989]. Ce nucléotide semble réagir aux deux états configurationnels définis par Allen et Noller [1989]: la "balance" entre l'état "précis" et l'état "relâché" semble impliquer la structure proche de A908.
- 8) la Sm induit du miscoding: malheureusement cette information ne peut pas être attribuée à la seule fixation en 912, car l'antibiotique perturbe aussi directement la région 1400

Quelques remarques associées à la protection de la Sm: comment différentes mutations peuvent-elles induire le même changement configurationnel et comment une si petite molécule peut-elle protéger un si grand nombre de nucléotides ?

La forte attaque des adénines 913 à 915 par le DMS n'implique pas que ces bases soient libres de tout appariement. Au contraire une adénine liée dans une conformation *syn* A-U (ou G-A) est modifiable par l'agent méthylant et peut être détectée par la transcription inverse [Christiansen *et al*,1990]. Le nucléotide A915 est d'ailleurs apparié dans la structure secondaire "classique" [Noller,1984] et réagit pourtant fortement au DMS. La figure de méthylation n'est donc pas en

désaccord avec un possible appariement des nucléotides 912-915 (CAAA) avec les nucléotides 13-16 (UUUG), comme déjà proposé [Leclerc et Brakier-Gingras,1991]. Dans une telle figure, n'importe laquelle des mutations 912-915 romperait l'appariement et induirait donc le même changement configurationnel; or c'est précisément ce que nous observons: les mutations C914 et U912 induisent la même inaccessibilité au DMS pour toute la région 912-915 (III.5). Il est possible que cette inaccessibilité soit responsable de la résistance. Dans ce cas, les différentes résistances observées seraient en relation avec l'intensité du changement configurationnel en 912-915, et on pourrait observer une intensité spécifique à chaque mutation. De manière encore plus intéressante, la figure de la protection par la Sm des ribosomes sauvages est absolument indiscernable de la figure des mutants, avec ou sans Sm (III.5, fig. 12 et 13). Ce résultat est d'autant plus surprenant que la Sm est une molécule petite, de dimensions comparables à celles d'une base nucléique : la "surface" recouverte par l'antibiotique dans ces expériences (c-à-d les cinq nucléotides 911 à 915 [Moazed et Noller,1987]) est donc bien supérieure à sa taille. Aucune des protections conférées par d'autres antibiotiques de tailles similaires n'est composée d'une telle suite [Moazed et Noller,1987; De Stasio *et al*,1989; Woodcock *et al*,1991]. Nous serions alors tenté de proposer que la Sm, en s'intercalant entre (ou en perturbant) les bases 912-915 et 13-16, rompe l'appariement de la même manière qu'une mutation en 912-915. Dans les deux cas, la protection observée serait le résultat du même relâchement de la structure 912-915. Dans cette hypothèse, l'appariement 912-915 et 13-16 serait un facteur clé qui déterminerait la sensibilité à la Sm. Si cet appariement est déstabilisé par une mutation (C914, G915, U912, A912), alors le phénotype sera résistant. Notons qu'une mutation en 13-16 devrait avoir le même effet: effectivement la mutation G13 confère le phénotype résistant [Harris *et al*,1989]. Resterait alors à vérifier l'hypothétique changement configurationnel en 912-915... .

REFERENCES

- Allen, P.N. and Noller, H.F. (1989). Mutations in ribosomal proteins S4 and S12 influence the higher order structure of 16S ribosomal RNA. *J.Mol.Biol.* 208, 457.
- Allen, P.N. and Noller, H.F. (1991). A single base substitution in 16S rRNA suppresses streptomycin dependence and increases the frequency of translational errors. *Cell* 66, 141.
- Amersham (1985). M13 cloning and sequencing handbook. Amersham international pictures.
- Atkins, J.F., Weiss, R.B., and Gesteland, R.F. (1990). Ribosome gymnastics: Degree of difficulty 9.5, style 10.0. *Cell* 62, 413.
- Biswas, D.J., and Gorini, L. (1972). The attachment site of Streptomycin to the 30S ribosomal subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 69, 2141.
- Böck, A., Petzet, A., and Piepersberg, W. (1979). Ribosomal ambiguity (*ram*) mutations facilitate dihydrostreptomycin binding to the ribosome. *FEBS Lett.* 104, 317.
- Bonny, C. (1988). Des mutations ponctuelles dans une région du gène pour l'ARNr 16S de *Escherichia coli* confèrent une résistance à la streptomycine. Mémoire de licence, faculté des sciences, Université de Neuchâtel.
- Boschetti, A., and Bogdanov, S. (1973). Binding of dihydrostreptomycin to ribosomes and ribosomal subunits from streptomycin-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 38, 19.
- Breckenridge L., and Gorini, L. (1969). The dominance of streptomycin sensitivity re-examined. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 62, 979.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., and Noller, H.F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosome RNA operon from *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 148, 107.
- Brimacombe, R. (1991). RNA-protein interactions in the *Escherichia coli* ribosome. *Biochimie* 73, 927.
- Buetow, D. E. (1982). Isolation of chloroplast polyribosomes from *Euglena gracilis*. in *Methods in chloroplast molecular biology* (Edelman, R.B., Hallick, R.B., and Chua, N.-H. eds), pp 637-644, Elsevier Biomedical.
- Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Ebel, J.-P. (1979). Nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA: cistron heterogeneities. *Eur.J.Biochem.* 100, 399.
- Chiaruttini C., Expert-Bezançon A., and Hayes, D. (1982). Protein-RNA cross-link in *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits. Identification of a 16S rRNA fragment crosslink to protein S12 by the use of the chemical crosslinking reagent 1-ethyl-3-dimethyl-aminopropylcarbodiimide. *Nucl.Acids.Res.* 10, 7657.

- Christiansen, J., Egebjerg, J., Larsen, N., and Garret, R.A. (1990). Analysis of ribosomal RNA structure: experimental and theoretical considerations. in *Ribosomes and protein synthesis* (Spedding, G. ed.), pp 229-252, IRL Press.
- Davies, B.D., Tai, P.C., and Wallace, B.J. (1974). Complex interactions of antibiotics with the ribosome. in *Ribosomes* (Nomura, M., Tissière, A., and Lengyel, P. eds), pp 771-789, Cold Spring Harbor, Monograph series
- Davies, J., Gilbert, W., and Gorini, L. (1964). Streptomycin, suppression, and the code. *Biochemistry* 51, 883.
- Davies, J., Cannon, M., and Mauer, M. B. (1988). Myomycin: mode of action and mechanism of resistance. *J.Antibiotics* 41, 366.
- De Stasio, E.A., Moazed, D., Noller, H.F., and Dahlberg, A.E. (1989). Mutations in 16S rRNA disrupt antibiotic-RNA interactions. *EMBO J.* 8, 1213.
- Dontsova, O., Kopylov, A., and Brimacombe, R. (1991). The location of mRNA in the ribosomal 30S initiation complex; site-directed cross-linking of mRNA analogues carrying several photo-reactive labels simultaneously on either side of the AUG start codon. *EMBO J.* 10, 2613.
- Etzold, T., Fritz, C.C., Schell, J., and Schreier, P.H. (1987). A point mutation in the chloroplast 16S rRNA gene of a streptomycin resistant *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett.* 219, 343.
- Frattali, A.L., Flynn, M.K., De Stasio, E.A., and Dahlberg, A.E. (1990). Effects of mutagenesis of C912 in the streptomycin binding region of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct. Expression* 1050, 27.
- Freyssinet, G. (1975). Changes in chloroplast ribosomal proteins in a streptomycin-resistant mutant of *Euglena gracilis*. *Plant Sc.Lett.* 5, 305.
- Fritz, H.J. (1985). The oligonucleotide-directed construction of mutations in recombinant filamentous phage. in *DNA cloning, volume I* (Glover, D.M. éd), pp 151-164, IRL Press.
- Fromm, H., Edelmann, M., Aviv, D., and Galun, E. (1987). The molecular basis for the rRNA-dependent spectinomycin resistance in *Nicotiana* chloroplasts. *EMBO J.* 6, 3233.
- Fromm, H., Edelmann, M., Koller, B., Goloubinoff, P., and Galun, E. (1986). The enigma of the gene coding for protein S12 in the chloroplast of *Nicotiana*. *Nucl.Acids Res.* 14, 883.
- Fromm, H., Galun, E., and Edelmann, M. (1989). A novel site for streptomycin resistance in the '530 loop' of chloroplast 16S rRNA. *Plant Mol. Biol.* 12, 499.
- Gauthier, A., Turmel, M. and Lemieux, C. (1988). Mapping of chloroplast mutations conferring resistance to antibiotics in *Chlamydomonas*: evidence for a novel site of streptomycin resistance in the small subunit rRNA. *Mol.Gen.Genet.* 214, 192.
- Graf, L., Roux, E., Stutz, E. and Kössel, H. (1982). Nucleotide sequence of a *Euglena gracilis* chloroplast gene coding for the 16S rRNA: homologies to *E.coli* and *Z.mays* chloroplast 16S rRNA. *Nucl.Acids.Res.* 10, 6369.
- Girshovich, A.S., Bochkareva, E.S., and Vasiliev, V.D. (1986). Localization of elongation factor Tu on the ribosome. *FEBS Lett.* 197,192.

- Gorini, L. (1974). Streptomycin and the misreading of the genetic code. in Ribosomes (Nomura, M., Tissière, A., and Lengyel, P. eds), pp 791-803, Cold Spring Harbor, Monograph series.
- Gravel, M., Melançon, P., and Brakier-Gingras, L. (1987). Cross-linking of streptomycin to the 16S rRNA of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 6227.
- Gutell, R.R. and Woese, C.R. (1991). Higher order structural elements in rRNAs: pseudo-knots and the use of noncanonical pairs. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 663.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. in DNA cloning, volume I (Glover, D.M. éd), pp 109-136, IRL Press.
- Harris, E.H., Burkhardt, B.D., Gilham, N.W., and Boynton, J.E. (1989). Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. *Genetics* 123, 281.
- Herr, W., Chapman, N.M., and Noller, H.F. (1979). Mechanism of ribosomal subunit association: discrimination of specific sites in 16S rRNA essential for association activity. *J.Mol.Biol.* 130, 433.
- Howe, G., and Aldrich, J. (1988). Use of oligonucleotides to discriminate chloroplasts-encoded streptomycin-resistant from streptomycin-sensitive tobacco plants using total DNA mini-preps. *Plant Mol.Biol Rep.* 6, 258.
- Hughes, D. (1987). Mutant forms of tufA and tufB independently suppress nonsense mutations. *J.Mol.Biol.* 197, 611.
- Hughes, D., Atkins, J. F., and Thompson, S. (1987). Mutants of elongation factor Tu promote ribosomal frameshifting and nonsense readthrough. *EMBO J.* 6, 4235.
- Huynh, T.V., Young, R.A., and Davis, R.W. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in lambda gt10 and lambda gt11. in DNA cloning, volume I (Glover, D.M. éd), pp 49-78, IRL Press.
- Kohara, Y., Akiyama, K., and Isono, K. (1987). The physical map of the whole *Escherichia coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* 50, 495.
- Kössel, H. (1991). Structure and expression of rRNA genes. in The translational apparatus of photosynthetic organelles (Mache, R., Stutz, E., and Subramanian, A.R. eds), Vol. 55, pp 1-18, NATO ASI series, Springer Verlag, Berlin.
- Kössel, H., Hoch, B., and Zeltz, P. (1990). Alternative base pairing between 5'- and 3'-terminal sequences of small subunit RNA may provide the basis of a conformational switch of the small ribosomal subunit. *Nucl.Acids Res.* 18, 4083.
- Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82, 488.
- Lasater, S.L., Montesano-Roditis, L., Cann, P.A., and Glitz, D.G. (1990). Localization of an oligodeoxynucleotide complementing 16S rRNA residues 520-531 on the small subunit of *Escherichia coli* ribosomes: electron microscopy of ribosome-cDNA-antibody complexes. *Nucl.Acids.Res.* 18, 477.
- Leclerc, D. and Brakier-Gingras, L. (1991). A conformational switch involving the 915 region of *E.coli* 16S rRNA. *FEBS Lett.* 279, 171.

- Leclerc, D., Melançon, P., and Brakier-Gingras, L. (1991). Mutations in the 915 region of *Escherichia coli* 16S rRNA reduce the binding of streptomycin to the ribosome. *Nucl.Acids Res.* 19, 3973.
- Li, M., Tzagoloff, A., Underbrink-Lyon, K., and Martin, N.C. (1982). Identification of the paromomycin resistance mutation in the 15S rRNA gene of yeast mitochondria. *J.Biol.Chem.* 257, 5921.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Mason, P.J., and Williams, J.G. (1985). Hybridisation in the analysis of recombinant DNA. in *Nucleic acids hybridization* (Hames, B.D. and Higgins, S.J. eds), pp 113-138, IRL Press.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 74, 560.
- Melançon, P., Lemieux, C., and Brakier-Gingras, L. (1988). A mutation in the 530 loop of *Escherichia coli* 16S rRNA causes resistance to streptomycin. *Nucl.Acids Res.* 16, 9631.
- Melançon, P., Leclerc, D., and Brakier-Gingras, L. (1990). A deletion mutation at the 5' end of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct. Expression* 1050, 98.
- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101, 20.
- Moazed, D., and Noller, H. F. (1986). Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes. *Cell* 47, 985.
- Moazed, D., and Noller, H. F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S rRNA. *Nature* 327, 389.
- Moazed, D., Robertson, J.M., and Noller, H.F. (1988). Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S rRNA. *Nature* 334, 362.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1990). Binding of tRNA to the ribosomal A and P site protects two distinct sets of nucleotides in 16S rRNA. *J.Mol.Biol.* 211, 135.
- Montandon, P-E, Nicholas, P., Schürmann, P., and Stutz, E. (1985). Streptomycin-resistance of *Euglena gracilis* chloroplast: identification of a point mutation in the 16S rRNA gene in an invariant position. *Nucl.Acids Res.* 13, 4299.
- Montandon, P-E, Wagner, R., and Stutz, E. (1986). *E. coli* ribosomes with a C912 to U base change in the 16S rRNA are streptomycin resistant. *EMBO J.* 5, 3705.
- Morgan, E.A., Gregory, S.T., and Curt, D. (1988). Antibiotics resistance mutations in *Escherichia coli* ribosomal RNA genes and their use. in *Genetics of translation* (Tuite, M.F., Picard, M., and Bolotin-Fukuhara, M. eds), Vol. 14, pp 43-54, NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin.
- Murray, N.E., Brammar, W.J., and Murray, K. (1977). Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol.Gen.Genet.* 150, 53.
- Neefs, J.-M., Van de Peer, Y., Hendriks, L., and De Wachter, R. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl.Acids Res.* 18 Suppl., 2237.

- Nirenberg, M.W., and Matthei, J.H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *Escherichia coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 47, 1588.
- Noller, H.F., and Woese, C.R. (1981). Secondary structure of 16S rRNA. *Science* 212, 403.
- Noller, H.F. (1984). Structure of ribosomal RNA. *Ann.Rev.Biochem.* 53, 119.
- Noller, H.F. (1991). Ribosomal RNA and translation. *Ann.Rev.Biochem.* 60, 191.
- Nomura, M., Sidikaro, J., Jakes, K., and Zinder, N. (1974). Effects of colicin E3 on bacterial ribosomes. in *Ribosomes* (Nomura, M., Tissière, A., and Lengyel, P. eds), pp 805-814, Cold Spring Harbor, Monograph series.
- Ortiz, W., Reardon, E.M., and Price, C.A. (1980). Preparation of chloroplasts from *E.gracilis* active in protein synthesis. *Plant Physiol.* 66, 291.
- Pestka, S. (1977). Inhibitors of protein synthesis. in *Molecular mechanism of protein biosynthesis* (Weissbach, H., and Petska, S. eds), pp 468-555, Academic Press, NY.
- Pongs, O. and Edermann, V.A. (1973). Affinity labelling of *Escherichia coli* ribosomes with or without streptomycin analogue. *FEBS Lett.* 37, 47.
- Post, L. E., and Nomura, M. (1980). DNA Sequences from the str-operon of *E.coli* . *J.Biol.Chem.* 255, 4660.
- Powers, T. and Noller, H.F. (1990). Dominant lethal mutations in a conserved loop in 16S rRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 1042.
- Powers, T. and Noller, H.F. (1991). A functional pseudoknot in 16S rRNA. *EMBO J.* 10, 2203.
- Prince, J.B., Taylor, B.H., Thurlow, D.L., Ofengang, J., and Zimmermann, R.A. (1982). Covalent crosslinking of tRNA^{Val} at the ribosomal P site: identification of cross-linked residues. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 79, 5450.
- Reisfeld, A., and Edelman, M. (1982). Translation of chloroplast poly(A)⁺ mRNA in the wheat germ system. in *Methods in chloroplast molecular biology* (Edelman, M., Hallick, R.B., and Chua, N.H. eds), pp 605-614, Elsevier Biomedical.
- Revel, M. (1977). Initiation of messenger RNA translation into protein and some aspects of its regulation. in *Molecular mechanism of protein biosynthesis* (Weissbach, H., and Petska, S. eds), pp 246-323, Academic Press, NY.
- Rinke-Appel, J., Jünke, N., Stade, K., and Brimacombe, R. (1991). The path of the mRNA through the *Escherichia coli* ribosome; site-directed cross-linking of mRNA analogues carrying a photo-reactive label at various points 3' to the decoding site. *EMBO J.* 10, 2195.
- Spangler, E.A., and Blackburn, E.H. (1985). The nucleotide sequence of the 17S ribosomal RNA gene of *Tetrahymena thermophila* and the identification of point mutations resulting in resistance to the antibiotics paromomycin and hygromycin. *J.Biol.Chem.* 260, 6334.
- Sigmund, C. D., Ettayebi, M., and Morgan, E. A. (1984). Antibiotic resistance mutations in 16S and 23S rRNA genes of *E.coli*. *Nucl.Acids Res.* 12, 4653.
- Stern, S., Powers, T., Changchien, L.-M., and Noller, H. F. (1988). Interaction of ribosomal proteins S5, S6, S11, S12, S18 and S21 with 16 S rRNA. *J.Mol.Biol.* 201, 683.

- Stern, S., Powers, T., Changchien, L.-M., and Noller, H. F. (1989). RNA-protein interactions in 30S ribosomal subunits: folding and function of 16S rRNA. *Science* 244, 783.
- Stern, S., Wilson, R. C., and Noller, H. F. (1986). Localisation of the binding site for protein S4 on 16S rRNA by chemical and enzymatic probing and primer extension. *J.Mol.Biol.* 192, 101.
- Stratagene (1988). pBluescriptII exo/mung DNA sequencing system; et: DSK ³²P sequencing kit. Stratagene, Technical services.
- Tapio, A., and Kurland, C.G. (1986). Mutant EF-Tu increases missense error *in vitro*. *Mol.Gen.Genet.* 205, 186.
- Trempe, M.R., Ohgi, K., and Glitz, D.G. (1982). Ribosome structure. Localization of 7-methylguanosine in the small subunit of *Escherichia coli* and chloroplast ribosomes by immunoelectron microscopy. *J.Biol.Chem.* 257, 9822.
- Trifonov, E.N. (1987). Translation frame code and frame monitoring mechanism as suggested by the analysis of mRNA and 16S rRNA nucleotide sequences. *J.Mol.Biol.* 194, 643.
- Triman, K., Becker, E., Dammel, C., Katz, J., Mori, H., Douthwaite, S., Yoast, S., and Noller, H.F. (1989). Isolation of temperature-sensitive mutants of 16S rRNA in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 209, 645.
- van Duin, J., Kurland, C.G., Dondon, J., Grunberg-Mangago, M., Branlant, C., and Ebel, J.P. (1976). New aspect of the IF-3-ribosome interaction. *FEBS Lett.* 62, 111.
- Vasconcelos, A., Pollack, M., Mendiola, L.R., Hoffmann, H.-P., Brown, D.H., and Price, C.A. (1971). Isolation of intact chloroplast from *E.gracilis* by zonal centrifugation. *Plant Physiol* 47, 217.
- Weiss, R.B., Dunn, D.M., Dahlberg, A.E., Atkins, J.F., and Gesteland, F. (1988). Reading frame switch caused by base-pair formation between the 3' end of 16S rRNA and the mRNA during elongation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 7, 1503.
- Wittmann, H.G., and Wittmann-Liebold, B. (1974). Chemical structure of bacterial ribosomal proteins. in *Ribosomes* (Nomura, M., Tissière, A., and Lengyel, P. eds), pp 115-140, Cold Spring Harbor, Monograph series.
- Woese, C.R., Magrum, L.J., Gupta, R., Siegel, R.B., Stahl, D.A., Kop, J., Crawford, N., Brosius, J., Gutell, R., Hogan, J.J., and Noller, H.F. (1980). Secondary structure model for bacterial 16S rRNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucl.Acids.Res.* 8, 2275.
- Woese, C.R., Winker, S., and Gutell, R.R. (1990). Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 8467.
- Woodcock, J., Moazed, D., Cannon, M., Davies, J., and Noller, H.F. (1991). Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 10, 3099.
- Zimmermann, R.A., Rosset, R., and Gorini, L. (1971). Nature of phenotypic masking exhibited by drug-dependent streptomycin a mutants of *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 57, 403.

II. Structure et expression d'un gène nucléaire codant pour le facteur d'élongation Tu du chloroplaste de soja

TABLE DES MATIERES

I INTRODUCTION	57
II MATERIEL ET METHODES	59
II.1 Souches et conditions de cultures	59
Souches et vecteurs	59
Etalements des banques cDNA et génomiques	59
II.2 Isolement des acides nucléiques	60
Extraction de plasmides	60
Production d'ADN simples brins	60
Extraction d'ADN des phages lambda et EMBL4	60
Extraction d'ADN de feuilles de soja	61
Extraction d'ARN de feuilles de soja	61
Elution des fragments d'ADN	62
II.3 Marquage des fragments d'ADN	62
Marquage par nick-translation ou "random priming"	62
Marquage par la polymérase du phage T4	62
Marquage de sondes simples brins par la polymérase de Klenow ou la Sequenase	63
II.4 Caractérisations des acides nucléiques	63
Southern, Northern blots	63
Transfert de plaques de lyses ou de colonies sur papier nitrocellulose	64
Hybridations	64
Séquençages	64
Détermination de l'origine de trancription par la nucléase SI	65
II.5 Outil informatique	65

	56
III RESULTATS	66
III.1 Caractérisation de deux clones cDNA codant pour le facteur d'élongation Tu	66
III.2 Séquençage des cDNA	66
III.3 Nombre de gènes tuf dans le génome du soja	69
III.4 Isolement d'un clone génomique codant pour le facteur Tu	71
III.5 Caractérisation du fragment HindIII de 6 kb dans pBluescript	72
III.6 Séquençage de la région contenant le gène tuf	73
III.7 La partie codante du gène tuf	77
III.8 Usage des codons	77
III.9 L'extension N-terminale	79
III.10 La protéine EF-Tu	81
III.11 Les séquences en amont du gène	82
III.12 Expression des ARNm	83
III.13 détermination de l'origine de transcription	84
III.14 La séquence 5' "leader" non traduite	86
IV DISCUSSION	88
IV.1 Nombre de gènes tuf dans le soja	88
IV.2 Ajustement de l'usage des codons	88
IV.3 Rôle du facteur EF-Tu dans le développement du chloroplaste	89
REFERENCES	93

I INTRODUCTION

Le facteur d'élongation Tu, codé par les gènes *tuf*, catalyse le transfert de l'aa-ARNt sur le ribosome de type procaryote, conjointement à une molécule de GTP [Gordon,1968]. Sur le ribosome le facteur participe à l'amélioration de la qualité de la traduction, lors de laquelle la molécule de GTP est hydrolysée [Thompson *et al*,1986]. Le temps que dure cette hydrolyse (c'est l'étape de la "reconnaissance initiale") est mis à profit pour comparer la durée de l'interaction codon-anticodon: si la liaison est faible, le faux aa-ARNt a une première *chance* d'être éjecté. Après hydrolyse, le complexe EF-Tu-GDP reste encore quelques temps associé au ribosome, empêchant l'acide aminé d'effectuer la liaison peptidique avec la chaîne protéique naissante. Cette deuxième latence (le "proofreading") donne une seconde *chance* à un faux ARNt d'être écarté. L'amélioration de la qualité apparente de la lecture est donc le résultat d'un processus statistique opérant en deux étapes successives, et qui permet en fait d'amener les taux d'erreurs aux environs de 10^{-4} [Kurland,1977 et réf. incluses]; par comparaison, la seule reconnaissance codon-anticodon en solution ne permettrait qu'un taux supérieur à 10^{-1} [Uhlenbeck *et al*,1975; Kurland,1977]. Après ces étapes, le complexe EF-Tu-GDP quitte alors le ribosome (cette étape peut être bloquée à l'aide de kirromycine [Pestka,1977]), et le facteur Ts s'associe à l'EF-Tu et catalyse la dissociation du GDP.

Le site de fixation du GTP a été caractérisé en trois dimensions [Jurnak,1985; la Cour *et al*,1985; Clark *et al*,1990; Jurnak *et al*,1990] et se trouve être très similaire à celui de la protéine *ras* p21 [McCornick *et al*,1985; Pai *et al*,1989] et du facteur d'initiation 2 [Cenatiempo *et al*,1987]. En fait, la plupart des protéines liant le GTP possèdent un domaine dont la structure primaire est très semblable [Dever *et al*,1987]. Le domaine recouvre la première moitié de la protéine EF-Tu (positions 1 à 200 de la protéine de *E.coli* [Clark *et al*,1990]), et associe la présence de six feuillets plissés bêta et de six hélices alpha. Plus récemment, des modèles complets pour la quasi totalité de la protéine ont été obtenus à partir des facteurs cristallisés de *E.coli* et de *Thermus aquaticus* [Clark *et al*,1990; Reshetnikova *et al*,1991]. Par rapport à son homologue eucaryote (eEF-1 α), le facteur Tu a une affinité bien plus grande pour le GDP que pour le GTP (K_d 4,9nM et 3,6 μ M respectivement), alors que eEF-1 α montre une affinité similaire pour les deux molécules (K_d 0,5 μ M et 0,2 μ M respectivement) [Nygard et Nilsson,1990]. Bien que le site de fixation de l'ARNt n'ait pas été précisément déterminé, l'His 66 et la Lys 118 du domaine liant le GTP [Jonak *et al*,1984], de même que les Lys 208 et 237 ont été impliquées [Van Noort *et al*,1984]. La liaison de l'ARNt au facteur Tu protège la liaison labile entre l'acide aminé et l'ARNt [Ofengang,1977; Nygard et Nilsson,1990]. Cette protection requiert notamment que le facteur Tu et les ARNt soient en concentrations égales dans la cellule: effectivement, la concentration en EF-Tu chez *E.coli* est de huit à quatorze fois celle des ribosomes, ce qui correspond à la concentration en ARNt à des taux de doublings variant de 2 par heures à 0,22 par heures [Furano,1975]. On peut donc s'attendre à ce que le facteur soit également très abondant dans d'autres organismes; effectivement, la concentration en facteur Tu dans le chloroplaste de l'épinard est par exemple environ sept fois celle des ribosomes [Tiboni *et al*,1978]. En plus que de protéger l'ARNt aminoacylé, une concentration élevée du facteur est importante pour la fidélité de la traduction [Pingoud *et al*,1990], de même que pour permettre à la machinerie protéosynthétique de fonctionner à une vitesse élevée; en fait, même si les concentrations en EF-Tu sont toujours grandes, la quantité de complexes ternaires n'est jamais saturante (ce qui revient à dire que l'appareil protéosynthétique ne fonctionne pas à sa vitesse maximale) [Kurland,1991].

Bien que la régulation de son homologue eucaryote eEF-1 α implique des méthylations, phosphorylations, et l'adjonction de résidus glycérolphosphoryléthanolamine [Ryazanov *et al*,1991], seule la régulation de l'activité du facteur EF-Tu par méthylation est bien documentée.

Dans le cas de eEF-1 α , certaines de ces modifications ont par exemple été liées à la sénescence chez le rat et la drosophile [Moldave,1985 et réf. incluses; Webster et Webster,1984], et la méthylation du facteur à une augmentation de l'activité de eEF-1 α lors de la germination du champignon *Mucor* [Hiatt et al,1982]. Chez *E.coli*, le facteur EF-Tu est méthylé lorsque la cellule est privée de nutriments [Young et Bernlohr,1991], et dans le chloroplaste de l'euglène il a été démontré que le facteur était méthylable [Toledo et Jerez,1990].

Des gènes pour les facteurs Tu ont été caractérisés chez un certain nombre de procaryotes tels *E.coli* (deux gènes tuf divergeant seulement par 12 positions sur l'entier de la partie codante) [An et Friesen,1980], et plus récemment chez *Flexistipes sinusarabici* [Ludwig et al,1991], *Mycoplasma hominis* [Ladefoged et Christiansen,1991], *Mycoplasma pneumoniae* [Yogev et al,1990], *Thermus thermophilus* [Sato et al,1991], *Halobacterium marismortui* [Baldacci et al,1990] et *Methanococcus vannielii* [Lechner et Böck,1987]. Le gène pour la protéine mitochondriale a encore été caractérisé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [Nagata et al,1983]. Les gènes pour les facteurs Tu chloroplastiques sont présents dans les chloroplastes des algues unicellulaires telles *Euglena gracilis* [Montandon et Stutz,1983], *Chlamydomonas reinhardtii* [Baldauf et Palmer,1990], *Astasia longa* [Siemeister et al,1990] et *Codium fragile* [Kushel,1990]. Le gène, qui se trouve ici à une copie unique, peut soit être morcelé en exons-introns comme dans le cas de l'euglène et d'*Astasia*, soit être présent sous une forme ininterrompue dans les autres cas. Un gène de type chloroplastique a encore été caractérisé pour des algues bleues, telles *Anacystis nidulans* [Meng et al,1989], *Spirulina platensis* [Butarelli et al,1989] et *Cyanophora paradoxa* [Kraus et al,1990].

L'absence du gène dans les génômes chloroplastiques totalement séquencés de *Nicotiana tabacum*, *Marchantia polymorpha*, *Oryza sativa* [Shimada et Sugiura,1991 pour une revue] suggère que le gène ait dû émigrer dans le noyau. Effectivement, la séquence du gène (unique) nucléaire d'*Arabidopsis thaliana* a permis de dater le transfert à 450-500 millions d'années en arrière, avant l'émergence des plantes terrestres [Baldauf et Palmer,1990; Baldauf et al,1990]. Une sonde préparée à partir du gène de *Chlamydomonas* a de plus montré sa présence dans le noyau d'un certain nombre de plantes supérieures (notamment des *Brassicaceae*, 5-10 gènes), et son absence dans les chloroplastes d'une grande variété de plantes terrestres (notamment deux monocots: *Zea mays* et *Narcissus X hybridus*, et des dicots: *Spinacea oleracea*, *Pisum sativum*, *Pelargonium hortorum*, *Rumex obtusifolius*, *Trifolium subterraneum*, *Brassica campestris*, *Nicotiana tabacum* et *Glycine max*) [Baldauf et al,1990].

La relocation nucléaire du gène tuf dans les organismes "évolués" implique différents réarrangements de la séquence nucléotidique, afin que celle-ci permette l'expression régulée et efficace du gène dans un environnement eucaryote. Par exemple, les gènes codant pour des protéines chloroplastiques possèdent des promoteurs de type eucaryote, et exhibent des "codons usage" typiques d'autres gènes nucléaires [Murray et al,1989], et les gènes transférés du chloroplaste vers le noyau ont une composition en bases, une distribution en dinucléotides et un "codon usage" plus proche des gènes nucléaires que des gènes chloroplastiques [Oliver et al,1990]. Les messagers de ces gènes sont encore polyadénylés (ce qui nécessite la présence des signaux adéquats), avant que la protéine ne soit traduite dans le cytoplasme, et importée dans le chloroplaste [Herrmann et al,1985]; cette production cytoplasmique de la protéine implique de plus la présence N-terminale d'un peptide de transit, dirigeant la protéine dans le compartiment chloroplastique [Keegstra,1989; Keegstra et Olsen,1989].

II MATERIEL ET METHODES

II.1 Souches et conditions de cultures

Souches et vecteurs

Les plasmides pBluescriptII [Stratagene,1988] recombinés ou non ont été répliqués par les cellules XL1-Blue (supE44,hsdR17,recA1,endA1,gyrA46,thi,relA1,lac⁻,F'⁺[proAB⁺,lacI^q,lacZ deltaM15,Tn10 (tet^r)] [Bullock *et al*,1987], en présence de 40 µg/ml d'ampicilline. La préparation des cellules compétentes et les transformations ont été effectuées selon Hanahan [1985, protocole 8]. Les cellules ainsi obtenues sont gardées à -70°C.

Les conditions générales pour les cultures des phages lambda sont décrites par Huynh *et al* [1985]. La banque cDNA de soja dans le vecteur lambda gt11 a été étalée dans les cellules Y1090(supF,hsdR,araD139,lon,lacU169,rpsL,hflA150[chr::Tn10(tet^r)],pMC9)[YoungetDavies,1983], en présence de 10mM MgSO₄. La banque génomique dans le vecteur EMBL4 a été elle étalée dans les cellules NM539 (supF,hsdR,lacY (P2cox)) [Frischauf *et al*,1983], également en présence de 10mM MgSO₄.

Le soja (*Glycine max*), variété Maple Arrow, a été fourni au laboratoire par Nestlé S.A. Les graines sont d'abord préimbibées dans de l'eau courante pendant 6 à 10 heures à l'obscurité, puis semées dans des bacs contenant de la vermiculite. Les conditions de culture sont 15 h de photopériode (25°C, 70% d'humidité relative) et donc 9 h d'obscurité (20°C, 85% d'humidité relative). Les conditions pour les plantules ayant servi aux extractions d'ARN sont les mêmes, excepté le fait que les plantules ont été cultivées trois à quatre semaines à l'obscurité, puis illuminées pendant les temps indiqués (3h, 16h, 24h et 48 h), avant que les feuilles ne soient récoltées puis immédiatement plongées dans de l'azote liquide et conservées à -70°C.

Etalements des banques cDNA et génomiques

Nous avons toujours choisi une densité d'étalement maximale, en prenant bien soin que la majorité des plaques de lyse ne se touche pas; les phages produisant de petites plaques (par exemple ceux contenant les gènes tuf) n'ont en effet pas la possibilité de se répliquer lorsque la confluence est trop importante. Les cellules sont préparées selon Huynh *et al* [1985] en inoculant du milieu LB+10mM MgSO₄ jusqu'à ce que les cellules soient en milieu de phase exponentielle; elles sont alors centrifugées et reprises dans 1/2 vol de 10mM MgSO₄ et agitées 1 h à 37°C. Les infections s'effectuent en inoculant 200-700 µl de cellules ainsi traitées avec les phages pendant 15' à 37°C. Les cellules sont finalement étalées avec de l'agar mou+10mM MgSO₄ sur des boîtes LB+10mM MgSO₄, (pH7,5. Les boîtes sont laissées une nuit à 37°C, puis au moins 30' à 0°C avant que les phages ne soient transférés sur un filtre nitrocellulose (BA 85, Schleicher & Schüell)

II.2 Isolement des acides nucléiques

Extraction de plasmides

Les plasmides pBluescript recombinés ou non ont été isolés en "petites quantités" à l'aide d'une procédure très simplifiée adaptée de Serghini [Serghini *et al*,1989]. Cette méthode ne cherche pas à éliminer les ADN génomiques de la préparation, contrairement aux protocoles plus anciens [Maniatis *et al*,1982]; ces ADN ne posent en fait aucun problème, car ils ne forment après digestion qu'un "smear" peu intense relativement aux bandes très nettes des plasmides. Cependant, et ceci dû à la contamination par les ADN génomiques digérés, nous n'avons jamais effectué d'élutions à partir de telles préparations.

En bref, 1,5 ml d'une culture saturée sont centrifugés 3 minutes dans la centrifugeuse "eppendorf", le surnageant est aspiré et le culot de cellules repris dans 100 μ l de TNE (10mM Tris-HCl (pH8), 100mM NaCl, 1mM EDTA) et 100 μ l de phénol-chloroforme (1:1); le tube est vortexé 30''-1', centrifugé 5' et 10 μ l de 3M Na-acétate, pH5,5 sont ajoutés. Les ADN sont précipités par 2 volumes d'éthanol à 0°C pendant 15' et centrifugés 10'. Le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70%, séché et repris dans 30 μ l de TE contenant 50 μ g/ml RNase A. 3 μ l sont en général largement suffisants pour des analyses sur gel.

Les isolations en grande quantité ont été effectuées selon la procédure de lyse alcaline et de purification par précipitation au Polyéthylène Glycol de Sambrook *et al* [1989]. Typiquement, une telle procédure nous permet d'obtenir 1-3 mg de plasmides à partir de 200 ml de cultures saturées.

Production d'ADN simples brins

Le protocole de base est celui de Stratagene [Stratagene,1989], avec quelques modifications. 0,3 ml d'une culture fraîche (XL1-Blue contenant le vecteur pBluescriptII recombiné) sont inoculés dans 3 ml de tampon LB dans un tube conique de 50 ml. Approximativement 10^{12} phages "helper" VCSM13 (Stratagene) sont immédiatement ajoutés et les tubes sont incubés 8 h à 37°C sous agitation.

1 ml des cultures sont centrifugés 5' et les phages précipités avec 200 μ l de PEG 6000 20%, 2,5M NaCl pendant 15' à température ambiante. Les tubes sont centrifugés 5' (eppendorf), le surnageant éliminé et les culots repris dans 100 μ l de TE et 50 μ l de phénol-TE. Les tubes sont vortexés 10'', centrifugés 2' et la phase aqueuse extraite avec 500 μ l d'éther. Après centrifugation, l'éther est éliminé et les ADN précipités 30' à -70°C par 10 μ l de 3M Na-acétate et 250 μ l d'éthanol. Après une dernière centrifugation (10'), les ADN sont lavés à l'éthanol 70% et repris dans 30 μ l de TE. 5 μ l sont utilisés pour le séquençage.

Extraction d'ADN des phages lambda et EMBL4

Nous avons employé une méthode de lyse sur boîte, qui dans nos mains est plus reproductible que la méthode en culture liquide [Sambrook *et al*,1989]. Il est absolument indispensable que la matrice solide sur laquelle nous étalons les cellules soit composée d'agarose et non d'agar, afin que les digestions des ADN fonctionnent. Le rapport lors de l'infection entre le nombre de particules phagiques et le nombre de cellules est également un paramètre important: si le nombre de phages est supérieur au nombre de cellules, toutes les cellules seront lysées après le premier cycle d'infection, et aucune amplification suffisante n'aura lieu; les boîtes auront un aspect de lyse totale sans que nous ne puissions récupérer d'ADN. Pour un rendement maximum la confluence doit donc être totale, mais les plaques encore discernables.

Les boîtes (diam. 8,5 cm) sont recouvertes de 5 ml de tampon SM (50mM Tris-Cl (pH 7,5),

100mM NaCl, 10mM MgSO₄) et laissées la nuit à 4°C. Le SM est centrifugé (Sorvall HB-4, 10000 rpm, 10') et le surnageant traité par 10 µg/ml DNase I et 10 µg/ml RNase A pendant 30' à température ambiante. La solution est extraite une première fois avec 1/20 vol chloroforme, centrifugée (HB-4, 10000 rpm, 10'), réextraite avec 1 vol chloroforme et recentrifugée (HB-4, 4000 rpm, 5'). Le surnageant est conservé à 4°C pour d'autres isolations d'ADN ou infections. Les particules phagiques de 700 µl de cette solution sont précipitées par 1 vol de PEG 20%, 2M NaCl pendant 1 heure dans la glace. Les phages sont récupérés par une centrifugation de 10' dans la centrifugeuse eppendorf, le surnageant est éliminé, les phages recentrifugés 1' (il reste toujours une quantité de phages importantes sur les parois du tube), et le surnageant une nouvelle fois éliminé. Le culot est resuspendu dans 500 µl de SM, et 5 µl de 10% SDS et 5 µl de 0,5M EDTA sont ajoutés. La solution est incubée 10' à 65°C, extraite une fois au phénol, deux fois au chloroforme et précipitée 30' à -20°C par l'adjonction de 2 volumes d'éthanol. Le culot d'ADN est centrifugé (eppendorf, 5'), lavé à l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 50 µl de TE contenant 50 µg/ml de RNase A. Pour de grandes quantités de phages, nous partions d'une dizaine de boîtes de lyse et adaptions cette méthode aux volumes correspondants.

Extraction d'ADN de feuilles de soja

Nous avons employé la méthode utilisée par Shure *et al* [1983]. Afin de garder des ADN aussi intacts que possible, toutes les solutions en contenant ont été pipetées soit avec des pipettes pasteurs inversées, soit avec des pointes pour pipettes Gilson jaunes dont nous avons coupé les deux premiers centimètres.

5 à 10 grammes de feuilles sont broyées dans un mortier en présence d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. 8 ml de tampon de lyse (8M urée, 0,35M NaCl, 0,05M Tris-Cl (pH7,5), 0,02M EDTA, 2% sarcosyl et 5% phénol saturé dans du TE) sont ajoutés par grammes de feuilles. La solution est très légèrement remuée dans un erlenmeyer jusqu'à homogénéisation. 1 volume de phénol-chloroforme (3:1) est ajouté, du SDS à une concentration finale de 0,5% et toute la solution est mise à tourner dans un agitateur (200 rpm, 10'). Après centrifugation (Sorvall HB-4, 5000rpm, 10', 5°C), la phase aqueuse est réextraite encore trois fois avec du phénol-chloroforme. L'ADN est précipité avec 1 volume d'isopropanol froid, recueilli avec une pipette pasteur et lavé avec de l'éthanol 70%. L'ADN est resuspendu dans 15 ml de TE, et traité avec 50 µg/ml de RNase DNase-free pendant 1 heure à 37°C, puis avec 100 µg/ml de protéinase K pendant 2 heures. Finalement, la solution est extraite deux fois avec du phénol-chloroforme, précipitée et le culot lavé resuspendu dans 1 à 2 ml de TE. Nous obtenons 1-2 mg d'ADN par cette méthode.

Extraction d'ARN de feuilles de soja

Nous avons adapté notre procédure de Dean [Dean *et al*, 1986]. A l'exception de celles contenant une amine (Tris), toutes les solutions sont traitées la nuit à 37°C avec 0,1% DEP [Sambrook *et al*, 1989] puis autoclavées. Les pointes de pipette que nous utilisons sont manipulées avec des gants avant d'être autoclavées.

2 g de feuilles de soja âgées de trois à quatre semaines sont broyées dans un mortier en présence d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. 4,5 ml de tampon NTES (0,1M NaCl, 0,001M Tris-Cl (pH7,5), 1mM EDTA, 1% SDS) et 3 ml de phénol-chloroforme (1:1) sont ajoutés et le broyage poursuivi jusqu'à ce que la solution se réchauffe. Le mortier est lavé avec 4,5 ml de NTES et 3 ml de phénol-chloroforme. La solution est vortexée pendant 5', puis centrifugée à 10000g pendant 10'. La phase aqueuse est récupérée et l'interface est lavée avec 2 ml de NTES; les solutions combinées sont extraites encore 2 fois au phénol-chloroforme, et les acides nucléiques sont précipités par l'addition de 1/10 vol 3M Na-acétate et 2 vol d'éthanol. Le précipité est lavé à l'éthanol 70% et resuspendu dans 2,5 ml d'eau. Les ADN et les ARN de

faibles poids moléculaires sont éliminés à la suite d'une précipitation au LiCl (1 vol de 4M LiCl) pendant 3 heures à 0°C. Le précipité est centrifugé à 10000g pendant 10' et resuspendu dans 0,9 ml d'eau. Les ARN sont une dernière fois précipités à l'éthanol, lavés à l'alcool 70% et finalement resuspendus dans 1 ml d'eau. Les rendements sont de l'ordre de 4 mg.

Elution des fragments d'ADN

Les éluions ont été effectuées en règle générale avec le système "Biotrap" de Schleicher & Schüell. Cependant, lorsque nous avons beaucoup de fragments à éluer simultanément, nous creusions plutôt une petite poche juste devant les bandes à éluer, faisons migrer les ADN dans les poches et récupérons la solution [Maniatis *et al*,1982]. Les ADN ainsi élués se trouvent concentrés dans un petit volume (30-50 μ l), et sont aptes à être marqués, ligués,

II.3 Marquage des fragments d'ADN

Marquage par nick-translation ou "random priming"

Le fragment contenant le gène *tuf* d'euglène [Montandon et Stutz,1983] a été marqué par nick-translation [Sambrook *et al*,1989], en utilisant la préparation d'enzyme de Boehringer déjà contaminée par de la DNase I.

Le marquage par random priming avec le mélange d'oligonucléotides de Boehringer [Sambrook *et al*,1989] a été utilisé épisodiquement pour des contrôles internes à ce travail.

Marquage par la polymérase du phage T4

Le marquage du fragment EcoRI-XbaI de 0,36 kb utilisé tout au long de ce travail a été effectué par la polymérase du phage T4. Ce type de marquage a deux avantages par rapport aux marquages par "nick-translation" classiques [Sambrook *et al*,1989]: tout d'abord la quantité du nucléotide marqué incorporé est de l'ordre de 90%, ce qui est bien supérieur à la quantité obtenue par nick-translation (environ 30%) [Sambrook *et al*,1989]; deuxièmement, ce marquage permet de synthétiser des sondes complètes, non morcelées en petits fragments; cette caractéristique est notamment importante lorsque les fragments sont plutôt petits (0,1-0,3 kb). La réaction s'effectue en trois étapes: tout d'abord l'activité exonucléasique 3'-5' de la polymérase T4 dégrade le fragment aux deux extrémités, exposant deux zones simples brins; secondement, l'adjonction du nucléotide radioactif et des trois autres non marqués permet alors de stopper cette activité exonucléasique et de marquer le fragment par l'activité polymérasique bien plus efficace de l'enzyme. Finalement, l'adjonction des 4 nucléotides froids permet de resynthétiser complètement les brins dégradés. Notons qu'il n'est pas nécessaire de laisser l'activité exonucléasique opérer bien longtemps: dans nos conditions (env. 500 ng de fragment et 2-5 μ l de dATP marqué à 10 mCi/ml, 410 Ci/mmol) l'excès molaire du nucléotide marqué par rapport au fragment est de l'ordre de la dizaine, c-à-d que seuls dix ATP marqués peuvent s'insérer sur la molécule. En moyenne, une vingtaine de nucléotides dégradés à chaque extrémité sont donc suffisant pour incorporer tout l'ATP.

Les conditions que nous avons utilisées sont directement tirées de Sambrook *et al* [1989]. 200 ng du fragment EcoRI-XbaI sont dégradés 3' et 15'' à 37°C en présence de 1,2 unités d'enzyme dans 20 μ l de solution 66mM K-acétate, 10mM Mg-acétate, 0,5mM DTT, 0,1mg/ml BSA, 33mM Tris-acétate (pH 8,0); 2 μ l d' α^{32} PdATP sont ajoutés de même que les 3 autres nucléotides froids

et la réaction laissée 1 h à 37°C; après adjonction des 4 nucléotides froids, la réaction est laissée encore 15', puis les nucléotides non incorporés sont séparés sur une mini-colonne P4 centrifugée [Sambrook *et al*, 1989].

Marquage de sondes simples brins par la polymérase de Klenow ou la Sequenase

De telles sondes simples brins ont été utilisées pour toutes les expériences employant la nucléase SI (détermination des extrémités 5' des messagers codant pour le facteur EF-Tu). Le principe pour la synthèse de telles sondes est le suivant:

un vecteur simple brin (sspBluescript) contenant la partie 5' du gène à étudier est préparé. L'orientation du gène dans le vecteur est telle que le brin produit soit *colinéaire* à l'ARNm; le simple brin est hybridé à un oligonucléotide complémentaire dans la partie codante du gène et le second brin (*complémentaire à l'ARNm*) est synthétisé en présence des nucléotides (dont un marqué) et de la polymérase de Klenow (nous avons aussi utilisé la Sequenase 2.0, qui est également dépourvue d'activité exonucléasique 5'-3'). Le vecteur partiellement double brin est alors digéré par un enzyme coupant en amont de la partie codante, et la sonde simple brin marquée est séparée sur un gel dénaturant puis éluee.

Nous avons suivi le protocole de Sambrook *et al* [1989]. Les sondes ont été synthétisées à partir d'un vecteur pBluescript II KS- contenant le fragment EcoRI-XbaI de 1,3 kb (cf III.5). Ce fragment contient 590 pb de parties 5' non codantes et 690 pb de parties codantes à partir de l'ATG. Environ 1 µg du recombinant simple brin (1 pmole) sont hybridés à 5 pmoles de l'oligonucléotide de séquence GGAGGTTTGAGTATGAT. Cet oligonucléotide hybride aux nucléotides +40 à +25 à partir de l'ATG. La polymérisation a été effectuée en présence de 5 µl d'α³²PdATP (400 Ci/mmol, 10 mCi/ml), sans dATP froid. Après l'adjonction d'une "chase", le fragment marqué est digéré soit par HaeIII, soit par XbaI, séparé sur un gel dénaturant d'acrylamide 4%, 8M urée et 1xTBE. Le gel est exposé 1-3', et les bandes radioactives éluées dans l'élutrap de Schleicher & Schüell (II.1).

Avant d'être utilisées dans les expériences avec la nucléase SI, ces sondes sont encore traitées par 50 µg/ml de protéinase K et 0,1% SDS pendant 30' à 60°C, afin d'éliminer les RNAses [Sambrook *et al*, 1989]. A partir de ce stade, nous manipulons nos échantillons avec les mêmes précautions que lors des extractions d'ARN (II.1), c-à-d que toutes les solutions sont traitées au DEP. Nous éliminons la protéinase K par deux extractions au phénol-chloroforme suivies d'une précipitation. Les sondes sont finalement resuspendues dans 10 µl d'eau.

II.4 Caractérisations des acides nucléiques

Southern, Northern blots

Les transferts d'ADN ont été effectués selon Sambrook *et al* [1989] à partir de 50 µg d'ADN de soja digérés et séparés sur gel d'agarose à 0,8% dans du tampon 1xTBE.

Les ARN ont été traités selon Williams et Mason [1985] : les ARN sont tout d'abord dénaturés au glyoxal (1h à 50°C) avant d'être chargés sur gel 1% agarose dans du tampon 10mM Naphosphate (pH6,5), avec recirculation. Après transfert, le glyoxal est éliminé en incubant le filtre 1' dans du TE à 100°C, puis en laissant la solution revenir à température ambiante.

Transfert de plaques de lyses ou de colonies sur papier nitrocellulose

La procédure pour les replica de phages ou de colonies est la même [Williams et Mason, 1985]; cependant, pour les colonies, nous transférons en plus les filtres 3' sur du 10% SDS avant de les transférer sur NaOH.

Le filtre est laissé 3-5' sur les boîtes, puis transféré sur du papier buvard imbibé de 0,5M NaOH, 1,5M NaCl pendant 5', puis 5' sur du 1M Tris-Cl (pH 7,5), 1,5M NaCl et finalement 5' sur du 4xSET (20xSET=3M NaCl, 20mM EDTA, 0,4M Tris-Cl (pH 7,5)). Les ADN sont fixés soit par une cuisson de 2 h à 80°C sous vide, soit aux UV par le "Stratalinker" de Stratagene.

Hybridations

Toutes les hybridations sur filtres ont été effectuées selon la même procédure: les filtres sont tout d'abord préhybridés 5-6 h dans du tampon 6XSSC (1xSSC=0,15M NaCl, 0,015M trisodium citrate, (pH7,0), 1xDenhardt's (50xDenhardt's=1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% BSA) à la température d'hybridation choisie, puis les sondes marquées (en général 100 ng pour 5ml) sont ajoutées et les hybridations laissées la nuit. Après hybridation, les filtres sont lavés dans du 2xSSC pendant 30', puis deux fois 20' dans du 0,1xSSC, 0,1% SDS à la température d'hybridation.

Les hybridations avec la sonde tuf hétérologue d'euglène ont été conduites à 58°C. Les hybridations avec la sonde EcoRI-XbaI homologue de soja ont été conduites à 68°C en l'absence de formamide pour les hybridations ADN-ADN ("Southern blots",...), et à 42°C en présence de 50% formamide pour les hybridations ADN-ARN ("Northern blots").

Séquençages

Toutes les séquences ont été obtenues à partir de dégradations progressives des inserts introduits dans les vecteur pBluescriptII, en suivant rigoureusement les instructions de Stratagene [1988]. Les recombinants sont tout d'abord digérés par un enzyme laissant une extrémité protubérante 5', puis par un enzyme laissant une extrémité 3'. Cette dernière digestion est chargée de protéger le vecteur lors des futures digestions par l'exonucléase III, alors que la première digestion permet à l'exonucléase de dégrader l'insert. Les réactions de dégradations sont stoppées après des temps déterminés, les extrémités simples brins sont rendues franches par la nucléase de Mung-Bean, tous ces enzymes sont inactivés et les plasmides dégradés sont reliqués, puis les transformations sont effectuées dans les cellules XL1-Blue. Nous sélectionnons les plasmides qui seront séquencés en analysant la taille des inserts sur gel d'agarose.

Les circonstances nous ont forcé à certaines modifications pour le séquençage des clones génomiques:

- la dégradation du vecteur pBluescriptII KS+ contenant le fragment EcoRI-XbaI de 1,3 kb ne peut pas être empêchée par un enzyme laissant une extension 3'. Nous avons donc digéré ce plasmide par l'enzyme XbaI, dégradé et l'insert et le vecteur, rendu les extrémités franches, inactivé les enzymes par des extractions phénol-chloroforme et digéré par EcoRI (qui coupe en aval des fragments dégradés). Les fragments dégradés ont été élués et reclés dans pBluescriptII SK+ digéré par EcoRI et HincII (Hinc II laisse des extrémités franches), et séquencés à partir de l'extrémité HincII.

- les plasmides dégradés contenant l'insert EcoRI de 1 kb ont été élués avant d'être reliqués. Cette opération supplémentaire permet de gagner un temps considérable lors de la caractérisation des délétions: sans cette étape, nous analysons 5-10 colonies par temps de dégradation pour effectivement trouver un plasmide correspondant. Avec l'éluion, tous les plasmides correspondent aux temps de dégradation.

Le séquençage des cDNA a été effectué avec la polymérase de Klenow, celui du clone génomique avec la Sequenase version 2.0, en utilisant des clones avec des délétions progressives

de 250-300 paires de base. Les gels sont des gels d'acrylamide 6%, 8M urée, 1xTBE de 40 cm de longueur [Sambrook *et al*, 1989].

Détermination de l'origine de transcription par la nucléase SI

Nous avons hybridé les sondes préparées selon II.III à 100 µg d'ARN total (II.I). Les sondes sont mélangées aux ARN dans 60 µl (vol final) de tampon 400mM NaCl, 10mM Pipes (pH 6,4) en présence de 7 µg d'ADN dénaturé de thymus de veau (cet ADN est simplement autoclavé à partir des stocks fournis par Boehringer, puis traité à la protéinase K selon II.II). Les tubes sont chauffés 10' à 90°C et rapidement incubés à 65°C pour le restant de la nuit. Afin d'éliminer les problèmes d'évaporation, nous avons recouvert les échantillons d'une couche de 2-3 mm d'huile minérale (Sigma). Après hybridation, l'huile minérale est éliminée à la pipette. 140 µl de mélange de digestion sont ajoutés (120 µl d'eau, 20 µl de 2M NaCl, 20 mM ZnSO₄, 0,3M Na-acétate (pH 4,6) et 300-1000 U de nucléase SI) et les échantillons incubés 45' à 37°C. Les réactions sont stoppées avec 2 µl d'EDTA 0,5M; 10 µg d'ARNt, 20 µl de 3M Na-acétate, (pH5,5) et 500 µl d'éthanol froid sont ajoutés. Après 30' à -70°C, les acides nucléiques ayant résisté à l'hydrolyse sont centrifugés 20' à 10000 rpm dans le rotor HB-4, rincés à l'éthanol 70%, séchés sous vide et repris dans 6ul d'eau et 4ul de tampon formamide (98% formamide, 0,01M EDTA, xylène cyanol, bleu de bromophénol). Les fragments résistants sont analysés sur gel acrylamide 6%, 8M urée et 1xTBE. Nous avons inclus en parallèle les réactions de séquences effectuées à partir du même oligonucléotide qui a servi à la préparation des sondes (II.III). Il est donc possible de visualiser directement sur le gel la séquence correspondant aux fragments protégés.

La présence d'ADN de thymus de veau *pendant* l'hybridation peut paraître surprenante. En fait, si nous omettons cet ADN, la sonde (*simple brin !*) ne se fait pas dégrader, et apparait quasi intacte sur gel. Cependant, si nous chauffons les échantillons à 100°C juste avant l'adjonction de la nucléase SI, les sondes se font totalement digérer.

Pour être efficace, l'ADN de thymus doit être présent lors de la dénaturation initiale avant l'hybridation. Si cet ADN est ajouté seulement en même temps que la nucléase SI (comme le recommande les protocoles utilisant un tel "carrier"), la dégradation reste partielle. Nous pensons que cet ADN sert à fixer des inhibiteurs qui pourraient être les molécules de porphyrines que l'on trouve en grandes quantités dans les végétaux. Ces porphyrines ont une forte affinité pour les acides nucléiques [Ford *et al*, 1987 et réf. incluses], et peuvent donc se retrouver en quantités gênantes dans les extractions; de plus, elles sont bien connues pour inhiber la dégradation de nucléases telles la DNase I et la nucléase de micrococcus [Ford *et al*, 1987]. Certains auteurs ont tenté d'attribuer quelques spécificités quant aux séquences reconnues par ces molécules, sans résultats nets [Ford *et al*, 1987]. L'affinité du pigment pour les ADN simples brins est particulièrement élevée, et favorisée par de hautes concentrations en sels [Ford *et al*, 1987]. De plus, l'échange des porphyrines entre différentes molécules d'ADN est rapide [Ford *et al*, 1987 et réf. incluses]. Si nous supposons que les ADN fixent plus fortement le pigment que les ARN, comme cela est par exemple le cas pour le bromure d'éthidium [Sambrook *et al*, 1989], il nous semble alors possible que la faible quantité de sondes que nous utilisons (environ 100 ng) "fixe" une partie des pigments portés par les 100 µg d'ARN. Ces sondes sont ainsi protégées de la dégradation par la nucléase SI. L'adjonction de 7 µg d'ADN "carrier" (un excès de 700 fois) permet alors de lever cette protection.

II.5 Outil informatique

Toutes les séquences ont été traitées avec les programmes du "Sequence analysis software package" de "Genetic computer group" ("GCG"), version 6.0 de février 1989 [Devereux *et al*, 1984]. Les programmes "Gap", "Peptidestructure" et "Peplot" ont été les plus employés.

III RESULTATS

III.1 Caractérisation de deux clones cDNA codant pour le facteur d'élongation Tu

Les gènes codant pour les facteurs d'élongation Tu sont toujours bien conservés [Möller *et al*, 1987]. Par exemple, l'homologie de séquence entre le gène d'*Arabidopsis thaliana* [Baldauf et Palmer, 1990] et celui de l'algue verte *Euglena gracilis* [Montandon et Stutz, 1983] est de l'ordre de 80%. *Arabidopsis* et le soja étant évolutivement très proches par rapport à l'euglène qui a divergé très tôt du tronc commun menant aux plantes supérieures [Baldauf *et al*, 1990], une telle homologie doit permettre une reconnaissance très spécifique des gènes du soja à l'aide de la sonde d'euglène.

La banque cDNA a été construite dans le phage lambda gt11 [Young et Davies, 1983] à partir de pousses de soja âgées de 6 jours. Le site d'insertion est le site EcoRI du vecteur.

Nous avons utilisé comme sonde le fragment PvuII-EcoRI de 2,0 kb du tuf d'euglène [Montandon et Stutz, 1983]. Ce fragment contient l'entier de la partie codante du tuf répartie sur trois exons. Sur environ 12000 plaques hybridées à 55°C en absence de formamide, 2 se sont révélées positives. Ce score est identique à celui obtenu par F. Aguilar avec les gènes *tef* [Aguilar, 1990], i.e. la représentativité des deux ARNm dans la banque cDNA semble similaire.

Nous avons purifié et sous-cloné dans le plasmide pBluescriptII l'insert de l'un des positifs. L'un des sites EcoRI étant détruit dans le phage, le sous clonage a été effectué par les digestions EcoRI et SacI (SacI est situé à environ 1kb du site EcoRI du vecteur lambda gt11), ce qui nous donne un fragment d'environ 2 kb. L'insert cDNA est de environ 1kb, et ne peut donc être que partiel.

Le second positif a été lui aussi introduit dans le vecteur pBluescriptII, simplement à l'aide des digestions EcoRI. L'insert de ce fragment est plus long et s'élève à 1,4 kb. Des analyses rapides par restrictions montrent que les deux cDNA sont très différents.

III.2 Séquençage des cDNA

Les deux cDNA ont été séquencés et les figures 1 et 2 présentent les séquences nucléotidiques ainsi que les traductions déduites en acides aminés. Le cDNA de 1 kb (en fait 932 pb, cDNA1) contient un poly(A) de 6 pb et une partie codante de 720 pb pour la protéine EF-Tu. Toute la partie N-terminale correspondant au "GTP binding domain" [La Cour *et al*, 1985] ainsi qu'au peptide de transit est absente. L'homologie en acides aminés avec les gènes d'*Arabidopsis*, d'euglène, de *E.coli* et de la levure est de 95, 88, 83 et 77%, respectivement (ces valeurs tiennent compte des acides aminés "homologues", tels la leucine et l'isoleucine). Par rapport aux séquences publiées de l'euglène et d'*arabidopsis*, le gène de la levure (mitochondrial) présente des délétions de 8 acides aminés et 1 acide aminé (positions 180-187 et 364 de la protéine de *E.coli*), et de même qu'une insertion d'un a.a en position 265 [Nagata *et al*, 1983]. Nous n'observons aucune de ces différences dans le cDNA1; cette analyse exclut ainsi fortement que ce gène puisse coder pour la protéine mitochondriale.

Le cDNA de 1,4 kb (cDNA2) semble être une chimère. La partie 3' est typiquement un gène tuf, alors que la partie 5' est totalement divergente (nous n'avons pas inclus cette partie partiellement séquencée dans les figures). Ce clone "hybride" a peut-être été produit artificiellement lors de

la construction de la banque. Néanmoins, le cDNA contient un poly(A) de 16 nucléotides.

Comparé à l'autre cDNA, la séquence diverge totalement en 3' du codon stop, confirmant que les deux clones proviennent de deux gènes différents. La séquence codante est de plus divergente aussi bien au niveau des acides nucléiques (84% d'identité) que de la traduction en acides aminés (96% d'homologies). Ce résultat se distingue des gènes *tef* [Aguilar, 1990] où seule la séquence nucléotidique varie. Les homologies avec les facteurs Tu d'*Arabidopsis*, de l'euglène, de *E.coli* et de la levure sont toujours quelque peu inférieures au cDNA1 (90, 81, 79 et 71%). L'insertion d'un acide aminé (position 354 sur la figure 2) par rapport à la protéine de la levure est également présente, ce qui suggère qu'il s'agit bien d'un gène chloroplastique.

Les signaux de polyadénylation des végétaux sont variables et recourent rarement le consensus AATAAA bien défini chez les mammifères; la séquence riche en G/T située en aval du poly(A) est également absente et se situerait plutôt une trentaine de nucléotides en amont [Proudfoot, 1991]; seul un vague consensus AATAAT semble émerger [Dean *et al.*, 1986]. De plus, les ARNm des végétaux sont souvent polyadénylés en de multiples sites [Dean *et al.*, 1986], ceci même pour les ARNm provenant d'un même gène.

Aucun des deux cDNA isolé ne présente de séquence AATAAT dans les 30 nucléotides précédant le poly(A). Le cDNA1 possède une séquence AATGAA 20 nucléotides en amont du poly(A); une séquence identique a par exemple été trouvée à la même position dans un des gènes codant pour la petite sous-unité de la carboxylase du pois [Coruzzi *et al.*, 1984]. Pour le cDNA2 les consensus sont encore moins bien conservés. En fait, nos résultats confirment l'absence de similitudes nettes entre les signaux des végétaux et ceux des mammifères. Nous ne notons également pas de séquence enrichie en G/T en amont de cette région.

La longueur des poly(A) semble influencer le niveau d'expression des ARNm. Dans certains cas, il a été montré que des poly(A) d'une trentaine de nucléotides augmentaient l'expression d'un facteur 20 à 30 [Gallie *et al.*, 1989]; augmenter le poly(A) à 50 nucléotides pouvait encore tripler l'expression, et l'adjonction d'une séquence 5' "enhancer" (cf III.13) résultait en une augmentation de 500 à 600 fois [Gallie *et al.*, 1989].

Les poly(A) des deux cDNA sont relativement courts, ce qui n'exclut pas des poly(A) bien plus long sur les ARNm; comme nous le verrons plus loin (III.13), la longueur du poly(A) des ARNm *tuf* ne doit pas excéder 40 nucléotides. Cette longueur semble de fait suffisante pour conférer une expression maximale aux gènes *tuf* [Gallie *et al.*, 1989].

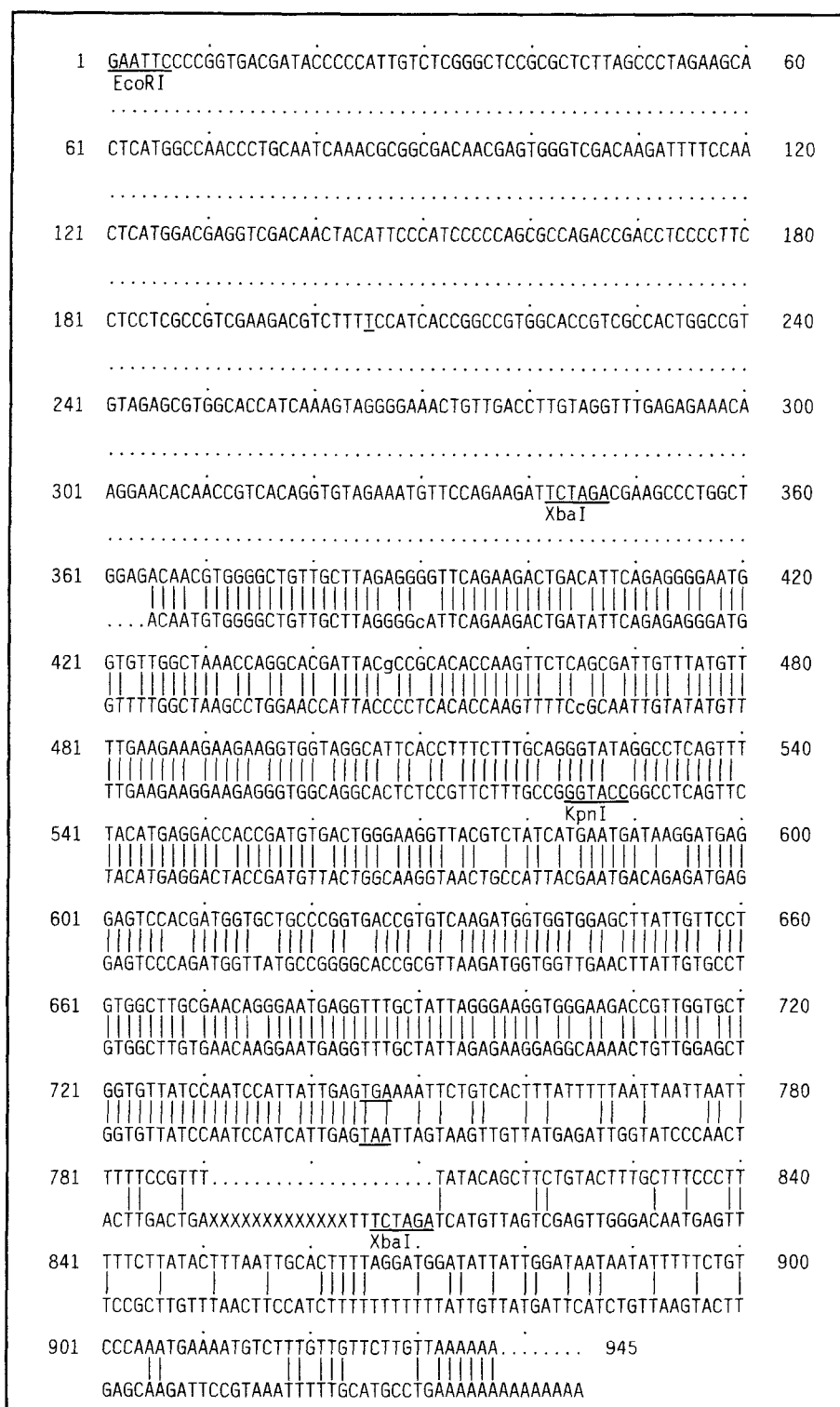


figure 1

Alignement des séquences nucléotidiques des cDNA1 et 2

Séquence du haut: cDNA1; séquence du bas: cDNA2. Les séquences ont été alignées avec le programme GAP jusqu'à la position 790; à partir de cette position, les deux séquences ont été disposées (*sans l'aide du programme gap*) de façon à faire coïncider les deux premiers A des deux poly(A). Cette manipulation nous a fait introduire un trou, représenté par des ".", dans la séquence du cDNA1. Les "X" représentent environ 230 nucléotides qui n'ont pas été séquencés dans le cDNA2. Le nucléotide "édité" (position T205) est souligné, de même que les codons stop TGA et TAA et les sites EcoRI, XbaI et KpnI. La numérotation débute à la première position du cDNA1, et ne correspond donc pas à celle de la figure 6. Les minuscules dénotent une incertitude de séquence

	290		310		330		350
Gm1	GLLLRGVQKT	DIQRGMVLAK	PGTITPHTKF	SAIVYVLKKE	EGGRHSPFFA	GYRPQFYMRT	TDVTGKVTSI
Gm2		I					A
At		I A		S	E I		K
Eg	V	I N VE		R N	DSQ I T	T E	V IE F
Sc	V	IRRD QLK		VKA	I L SL I S	G GE N	MFI A VVMR.F
Ec	V	IKRE E E Q		K	ESE I S D	T K	F TI...
	360		380		400		409
Gm1	MNDKDEESTM	VLPGDRVKMV	VELIVPVACE	QGMRFIREG	GKTVGAGVIQ	SIIE	
Gm2	T R	Q M H					
At		K M		I		G T L	
Eg	RS N NPAQ	M I K		Q I I K		R VL Q	
Sc	PKEVEDH MQ	M N E E CD		H TPL V Q N		R T L T R	
Ec	. .ELP GVE	M NI		T H I MD D L		R VA KVL S	

figure 2

Alignement des séquences déduites en acides aminés des cDNA1 et 2 et des facteurs EF-Tu d'espèces différentes

Les séquences ont été alignées avec le programme GAP, en prenant comme référence la protéine portée par le cDNA1. Seules les positions différentes du cDNA1 sont indiquées. La numérotation correspond à celle de la fig.8, et indique la position relativement à la protéine de soja mature. Gm1: *G.max*, cDNA1; Gm2: *G.max*, cDNA2; At: *A.thaliana*; Eg: *E.gracilis*; Sc: *S.cerevisiae*; Ec: *E.coli*. Toutes les protéines sont chloroplastiques, à l'exception de la levure (mitochondriale) et de *E.coli*. Les "." représentent les trous introduits par le programme GAP pour optimiser les alignements

III.3 Nombre de gènes *tuf* dans le génome du soja

Avant de poursuivre la caractérisation au niveau génomique, nous avons déterminé le nombre de copies des gènes *tuf* par hybridation des ADN totaux avec des sous-fragments des cDNA1 et 2. 50 µg des ADN extraits de plantules âgées de quelques semaines ont été digérés par les enzymes EcoRI, BamHI, PstI, HindIII, Sall et XbaI, séparés sur gel agarose et transférés sur membrane nitrocellulose ("Southern Blot"). Nous avons hybridé ces membranes avec une sonde de environ 500 paires de bases du cDNA2 (positions équivalentes à 524-806 sur la fig. 1) à 63°-68°C en absence de formamide (la différence de température représente les fluctuations de notre étuve). Les filtres ont été exposés (fig. 3A) puis lavés avant d'être réhybridés dans les mêmes conditions à une sonde pour le cDNA1 (fig. 3B; la fig. 3C représente une autre expérience effectuée avec la même sonde; dans ce dernier cas, le filtre n'a jamais été hybridé à une sonde pour le cDNA2). Cette dernière sonde (positions 1-342 sur la fig. 1) ne recouvre pas la séquence portée par la sonde du cDNA2.

Les résultats de la figure 3 montrent clairement que chaque sonde révèle "préférentiellement" des fragments différents, montrant qu'il existe *deux familles de gènes tuf*. Pour la sonde du cDNA1, les fragments indiqués par une astérisque (*) correspondent aux fragments d'ADN *génomiques* que nous avons caractérisés, au moins partiellement, par séquençage (cf III.6). Dans ces cas, aucun des sites de restriction choisi pour la fig. 3 ne vient couper la séquence portée par la sonde. Il est donc clair que cette famille de gènes est composée de *deux membres*. Il est de plus extrêmement intéressant de noter que les fragments donnant un signal plus faible avec la sonde cDNA1 (fig. 13C, et particulièrement les digestions HindIII) correspondent aux fragments révélés fortement par le cDNA2, et *vice versa* (fig. 13A et 13B). Ce résultat supporte fortement une conclusion regroupant *les gènes tuf en deux familles de deux gènes*.

Notons que le nombre de gènes est ici inférieur à celui dans différentes *brassicaceae*, où les gènes *tuf* semblent représenter une famille de 5 à 10 gènes [Baldauf et Palmer,1990]. Dans la levure, le gène mitochondrial se trouve à une copie unique [Nagata *et al*,1983].

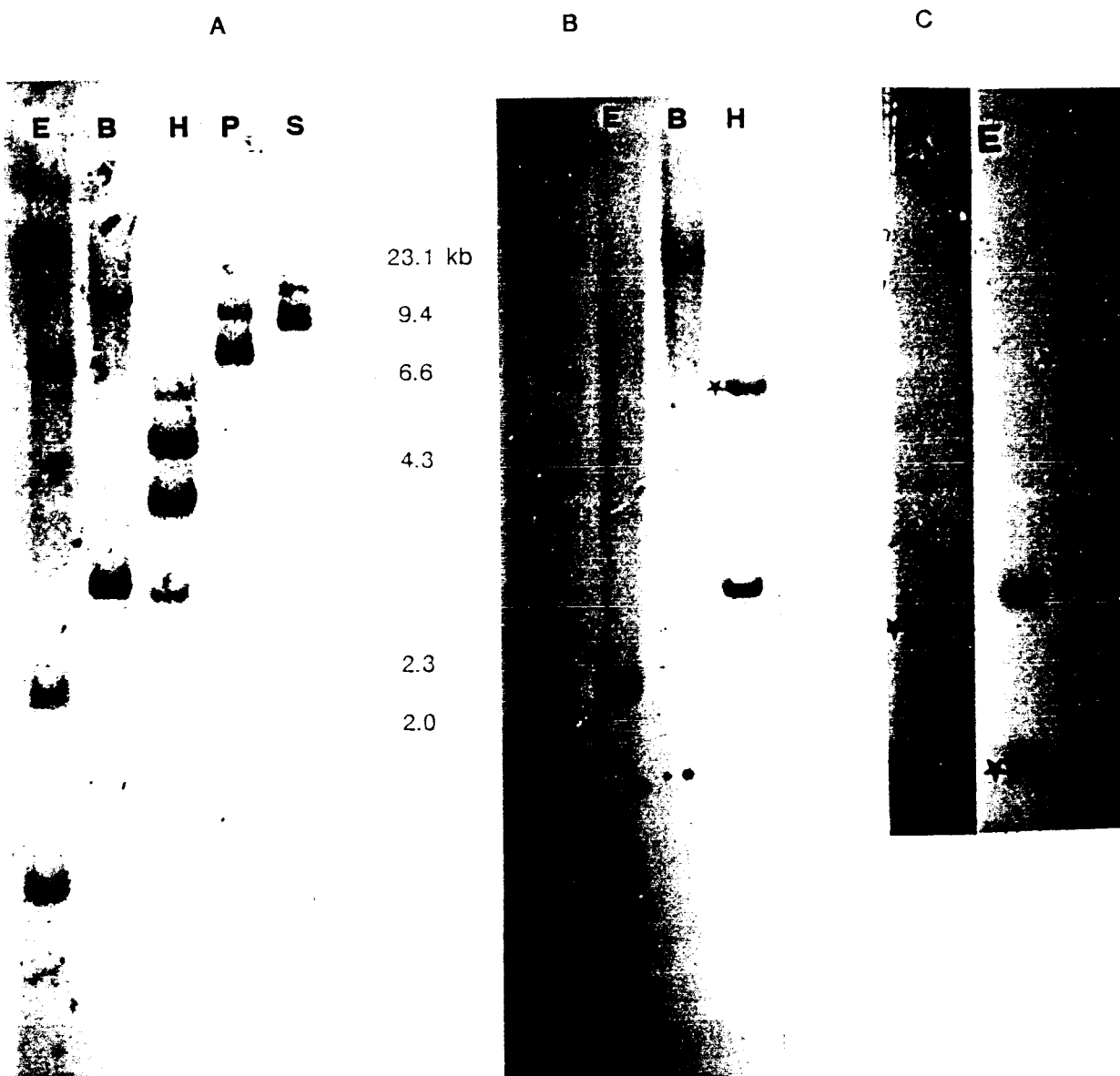


Figure 3

Les gènes pour le facteur d'élongation Tu sont composés de deux familles de deux membres. L'ADN de feuilles de soja a été digéré par différents enzymes de restriction, puis transféré et hybridé à une sonde spécifique du cDNA2 (A); le même filtre a été ensuite lavé et rehybridé à une sonde spécifique du cDNA1 (B), qui a également servi pour l'hybridation à un autre transfert (C). Les fragments marqués (*) correspondent aux fragments que nous avons au moins partiellement séquencés au niveau génomique (III.6). Aucun de ces fragments n'est interrompu par un des sites de restrictions choisis. La référence de poids moléculaire lambda - HindIII est visible sur la figure (B).
 E: EcoRI; B: BamHI; H: HindIII; X: XbaI; S: SmaI; P: PstI

III.4 Isolement d'un clône génomique codant pour le facteur Tu

Une probabilité de 99% de trouver un fragment unique dans une banque d'ADN de soja ($1,81 \times 10^9$ pb) contenant des inserts de 20 kb nous force à analyser 440000 clônes [Meyerowitz et Pruitt, 1985].

La banque que nous avons utilisée a été préparée par F.Aguilar [1990] dans le vecteur EMBL4 et avait déjà servi pour l'isolement des gènes *tef*. Nous avons utilisé comme sonde le fragment homologue EcoRI-XbaI de 360 pb déjà employé (cf. III.3). Sur environ 150000 plaques analysées, sept sont apparues hybridées (d'autres tentatives nous ont donné des résultats similaires); ce résultat, bien qu'en bon accord avec la théorie, est en net contraste avec ceux obtenus pour les gènes *tef*, où F.Aguilar a trouvé 12 positifs pour 10000 clônes analysés (cette valeur a été confirmée par J.Hernandez et S.Marc-Martin, com.pers.). Cette différence s'explique si le nombre de gènes *tef* (ou de pseudogènes *tef*; chez l'homme et le poulet, il existe en effet une vingtaine de pseudogènes pour une copie fonctionnelle [Madsen *et al*, 1990]) est effectivement supérieur à deux, comme suggéré à diverses reprises dans notre laboratoire.

Nous avons purifié et amplifié deux plaques positives par étalements successifs. Les phages contenant le facteur d'élongation Tu donnent de très petites plaques souvent indiscernables. Nous étions généralement contraint d'effectuer une ou deux étapes d'amplifications supplémentaires afin d'obtenir des quantités "travaillables" de phages; ce problème avait déjà été rencontré par F.Aguilar (com.pers.). Notons simplement que la présence de gènes codants pour ces facteurs d'élongations semble gêner la prolifération du phage.

Les restrictions des deux ADN phagiques (isolés à partir de deux infections *distinctes* des cellules NM539 par la banque) montrent que ces deux clônes sont absolument identiques, ceci sur les 20 kb des inserts (fig.4). Il est dès lors probable qu'un "biais" se soit introduit dans la construction de la banque, notamment lors de l'amplification de celle-ci ou pendant les digestions BamHI et Sau3A de l'ADN de soja (cf F.Aguilar, 1991). L'isolement de deux clones identiques suggère néanmoins que les fragments isolés n'ont pas subi de modifications importantes, telles des délétions, insertions,

L'analyse par restriction de ces clônes et l'hybridation à la sonde *tuf* 360 pb montre des fragments (EcoRI 1,1kb, HindIII 6kb, XbaI 1,7kb, cf fig. 4 et 5) identiques à ceux obtenus avec l'ADN total (fig. 3). Ce résultat montre l'intégrité des inserts obtenus et nous assure qu'aucun artefact majeur ne se soit introduit pendant le clonage. Finalement les digestions doubles EcoRI et HindIII nous laissent supposer que le fragment HindIII de 6kb contient le gène *tuf* relativement bien centré. Nous avons alors sous-cloné ce fragment dans le vecteur pBluescriptII, en espérant que non seulement il ne contienne le gène en son entier mais également suffisamment de séquences 5' et 3' afin d'en étudier l'expression.

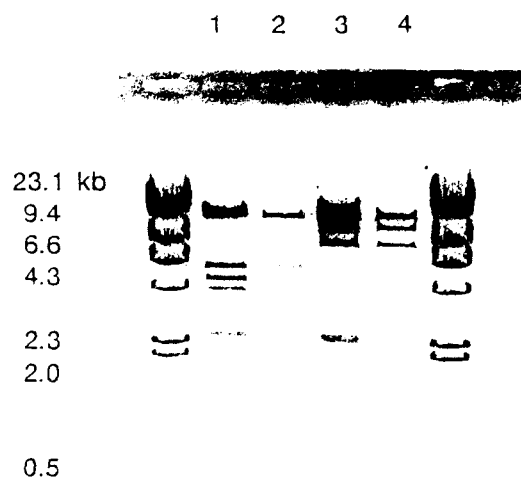


Figure 4

Deux clones indépendants de la banque d'ADN génomique contiennent des inserts identiques. Lignes 1 et 3: clone n°1 digéré par EcoRI et XbaI; lignes 2 et 4: clone n°2 digéré par les mêmes enzymes. La référence de poids moléculaire est λ + HindIII

III.5 Caractérisation du fragment HindIII de 6 kb dans pBluescript

Le plasmide pBluescriptII contenant le fragment HindIII de 6 kb est appelé pHtuf. Nous avons digéré ce plasmide par les enzymes EcoRI, XbaI, ApaI, KpnI et par les deux enzymes EcoRI et XbaI simultanément. Ajouté aux hybridations avec la sonde cDNA 360 et au séquençage des fragments EcoRI 1,1 et EcoRI-XbaI 1,32 (cf III.6), nous pouvons dresser la carte de restriction de la figure 5. Le plasmide pHtuf contient le gène *tuf* (1,4 kb) complet; l'extrémité 3' du gène se situe à environ 1,8 kb du site HindIII et l'extrémité 5' à 2,6 kb de l'autre site HindIII. Notons que les digestions HindIII et NcoI permettent d'isoler 2,6 kb de parties promotrices (NcoI coupe exactement sur l'ATG du peptide de transit; beaucoup de sites eucaryotiques d'initiation de la traduction contiennent un tel site de restriction). Un fragment de cette taille devrait être suffisant pour contenir l'essentiel des éléments de contrôle du gène par la lumière; il a été montré par exemple que des fragments plus courts (moins de 1kb) contenaient effectivement tous les éléments essentiels à la photorégulation [Fluhr et al,1986; Herrera-Estrella et al,1984; Faciotti et al,1985; Nagy et al,1985]. Notre fragment a d'ailleurs été introduit dans *A.tumefaciens*, devant le gène codant pour la β -glucuronidase (GUS) du vecteur Ti employé, et a servi à transformer *N.tabacum* (cf III.11).

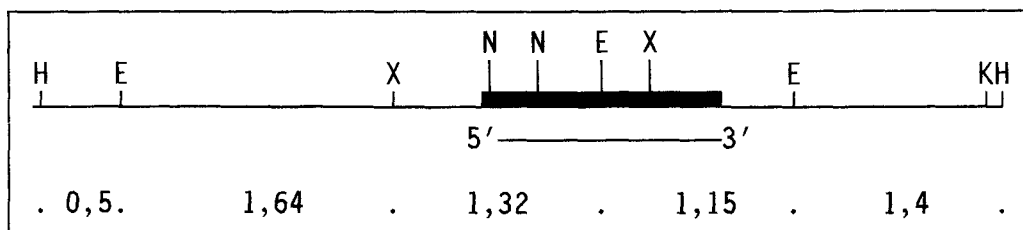


figure 5

Carte de restriction de pHtuf

Le gène tuf est représenté par la barre épaisse et l'orientation 5'-3' du gène est indiquée. H:HindIII; E:EcoRI; N:NcoI; K:KpnI; X:XbaI; les distances sont en kb

III.6 Séquençage de la région contenant le gène tuf

Le gène a été complètement séquencé à partir des deux fragments EcoRI 1,15 et EcoRI-XbaI 1,32 sous-clônés dans pBluescriptII. Nous avons encore ajouté 120 paires de bases du fragment EcoRI-XbaI 1,64, également sous-clôné dans pBluescript. Toute la séquence a été obtenue avec le primer "universel" à partir de délétions progressives, toujours effectuées depuis la partie 5' du gène (voir figure 5). Notons que les clones dégradés de la région promotrice ont été introduits dans le tabac (cf F.Maurer, en préparation).

La séquence présentée dans la figure 6 comporte 2313 paires de bases; à partir de la position 763 (site EcoRI) la séquence est parfaitement identique à celle du cDNA1 de 1 kb. Cette identité se prolonge dans la partie 3' jusqu'au premier A du poly(A); on admet généralement que la première adénosine de la queue poly(A) provient du génome [Dean *et al*,1986]. Cette parfaite identité nous permet de penser que le cDNA1 a été transcrit à partir du gène séquencé. Nous observons cependant dans cet alignement une conversion convertissant *la cytosine 966 du clone génomique en une thymine sur le cDNA* (position 205, voir fig.1 et 7). Plusieurs raisons peuvent avoir amené ce changement, et un éventuel artefact de clonage n'est pas à exclure (par exemple une mauvaise copie de l'ARNm par l'ARN-polymérase lors de la synthèse du cDNA). Néanmoins ce changement rappelle fortement les cas d'"editing" connus dans les mitochondries et les chloroplastes [Gualberto *et al*,1990; Hoch *et al*,1991].

Les exemples connus montrent dans leur majorité des conversions de cytosines sur le génome en uridines sur l'ARNm; aucun cas d'éditing d'un gène eucaryote n'a été mentionné à ce jour. Le changement observé dans notre gène convertit le codon TTC en TTT, ce qui n'en modifie pas la traduction (phénylalanine). L'éventuel rôle du mécanisme dans ce cas précis reste donc obscur (par exemple, un cas d'editing chloroplastique convertit un codon ACG en un codon initiateur AUG [Hoch *et al*,1991]); cependant, le gène provenant phylogénétiquement du compartiment chloroplastique, il est possible que nous ayons affaire à la "relique" d'un mécanisme autrefois actif. Dans un ordre d'idées différent, il faut noter que la transversion fait partie d'une séquence palynromique parfaite de 12 nucléotides (le nucléotide "édité" est souligné):

GAAGACGTCTTC
CTTCTGCAGAAG

La présence de ce palynrome pourrait conférer une structure secondaire locale à l'ARNm; il a été proposé que ces structures puissent altérer l'avance du ribosome sur le messenger [Yamamoto *et al*,1985], ou plus vraisemblablement servir de sites d'attaques à des RNases

spécifiques des ARN doubles brins [Kurland,1991]. Le changement du C par un T pourrait déstabiliser l'appariement de la séquence sur elle-même, avec comme conséquence un meilleur taux de traduction du message.

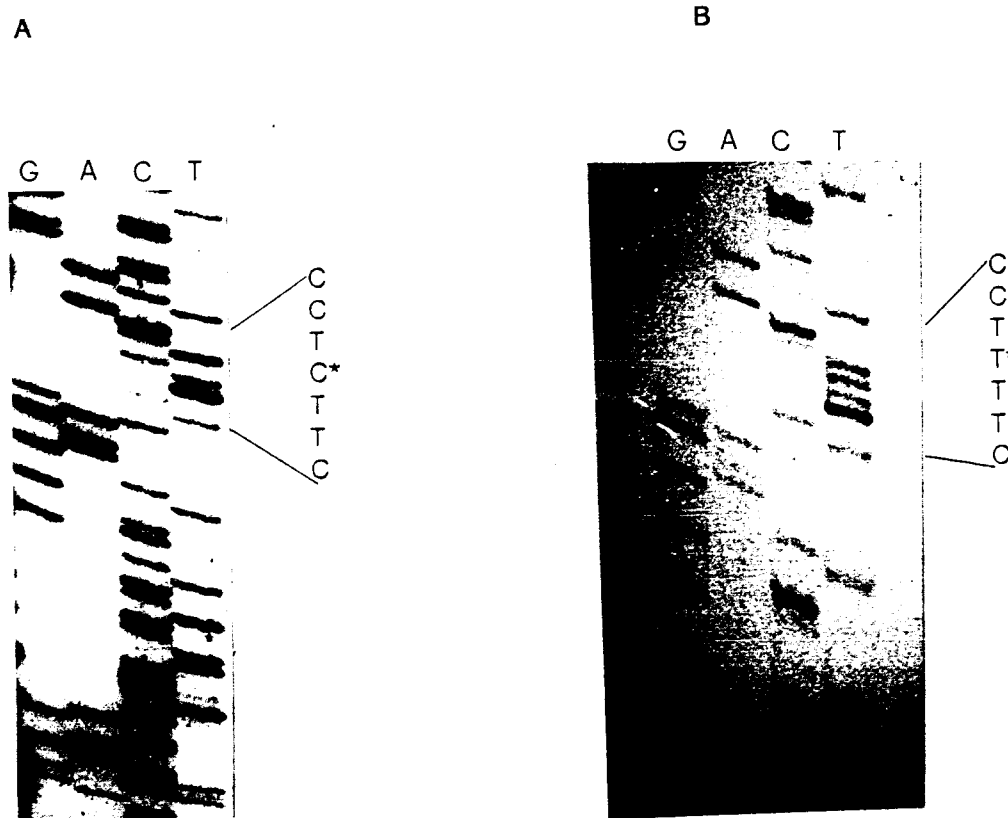


Figure 7

Les séquençages du clone génomique (A) et du cDNA1 (B) montrent la conversion d'une cytosine sur le génome en une thymine sur le cDNA. Les séquences se lisent G, A, C, T, ont été effectués dans les deux cas depuis la partie 5' du gène, et correspondent à l'ARNm. La position du nucléotide "édité" est indiquée (*) pour les séquences dans les marges

1 TTCCATCCTTATGAACTAAGTTTTTCTGACAAATTATTTAATTTAACTTTGTTCTCAGTAATCTTTTAAATATAAATTCAT 90

91 TTAATTTTATTTCTTGCAAATTTTAATTTAGATAGACTAATAAGGTTGAATCATAAAAGAGAATCTCTCCTTCTTTCGGGGAATAAAT 180

181 ATGATAAACATAAAAACTTCAATAATTAACAAATATAAATATCAATATATAGCAACAAAAAGTAAAAAGTAAACAAATGAAATATTTAA 270

271 AGCAAATTTAAAAGAAGAACA AAAAGCAAAGCCTAAATTAACAAAATGAATAAATACTAAAATTTACCAAAAAAAAAAACACATTTTAA 360

361 CTAGTTTGACTCCTCTCCAATTGACATAAAAAGACTTTGTGTTGTGATACCTAGGAGAGAATCTTTTTTCCCATTTTAATTTTAA 450

451 CCTTCACCTTGCTTCAATTGACATCGACTTGGGTTAATAGTGAGAGAAAGAGAAAGCAAAGATGTGATCCAGTGCCTCCAAAATTG 540

541 AGGCAGAAAAGAGGATAGAGCTGATATGAGGCCATCTTTTATCTATCCACACATTCACCAACATCACCAATAGATAACACAACAATACAC 630

631 AATTTTTACATTACTCAATACACTACACTAACATAATCCTTCTACTCTTCTCTTCTATCCAAAATTTCTCCACCAGCCATGGCAGTTTC 720

721 S A T A S S K L I L L P H A S S S S S L N S T P F R S S T T 810

811 N T H K L T P L S S S F L H P T T V L R R T P S S T T T P R 900

901 R T F T V R A A R G K F E R K K P H V N I G T I G H V D H G 990

991 K T T L T A A L T M A L A A L G N S A P K K Y D E I D A A P 1080

1081 E E R A R G I T I N T A T V E Y E T E N R H Y A H V D C P G 1170

1171 H A D Y V K N M I T G A A Q M D G A I L V V S G A D G P M P 1260

1261 Q T K E H I I L A K Q V G V P N M V V F L N K Q D Q V D D E 1350

1351 E L L Q L V E I E V R D L L S S Y E F P G D D T P I V S G S 1440

1441 A L L A L E A L M A N P A I K R G D N E W V D K I F Q L M D 1530

1531 E V D N Y I P I P Q R Q T D L P F L L A V E D V F S I T G R 1620

1621 G T V A T G R V E R G T I K V G E T V D L V G L R E T R N T 1710

1711 T V T G V E M F Q K I L D E A L A G D N V G L L L R G V Q K 1800

1801 T D I Q R G M V L A K P G T I T P H T K F S A I V Y V L K K 1890

1891 E E G G R H S P F F A G Y R P Q F Y M R T T D V T G K V T S 1980

1981 I M N D K D E E S T M V L P G D R V K M V V E L I V P V A C 2070

2071 E Q G M R F A I R E G G K T V G A G V I Q S I I E * 2160

2161 CTTTATTTTAAATTAATTTTTTCCGTTTTATACAGCTTCTGACTTTGCTTTCCCTTTTTCTTATACTTTAATTGCACTTTTAGGA 2250

2251 TGGATATTATGGATAATAATTTTTTCTGTCCCAATGAAATGTCTTTGTGTCTTGTTA 2313

Figure 6

Séquence de la région entourant le gène tuf et traduction déduite de la longue ORF

Les barres verticales indiquent les premières bases protégées de la nucléase SI (cf III.13), et représentent très vraisemblablement l'origine de transcription. La première Met du peptide de transit est représentés en gras, et la position "éditée" C1606 est soulignée. Le dernier A de la séquence (position 2313) correspond au premier A du poly(A) du cDNA1. Une boîte de Goldberg-Hogness potentielle a été soulignée (position 611-616), ainsi que toutes les séquences CAAT situées en amont de cette position. Toutes les séquences "TATA" de la région promotrice sont également soulignées, ainsi que la séquence (position 226-244) montrant une homologie avec un "light responsive element" du pois [Fluhr *et al.*, 1986].

III.7 La partie codante du gène tuf

La traduction de la séquence présentée montre une ORF ininterrompue de 495 acides aminés (479 acides aminés à partir de la première méthionine) (figure 6); l'alignement avec les séquences des gènes tuf d'*Arabidopsis*, d'euglène, de *E.coli* et de la levure montre une homologie importante à partir de l'alanine que nous avons notée +1 sur la figure 8 (95, 88, 84 et 77% en tenant compte des acides aminés "homologues"), et s'étend jusqu'au codon stop; la partie codante ne contient donc aucun intron, une situation déjà rencontrée pour le tuf mitochondrial de la levure [Nagata *et al*,1983], les deux tuf chloroplastiques de *N.sylvestris* [Murayama *et al*,1991] et le tuf d'*Arabidopsis* [Baldauf et Palmer,1990]. La région contenue dans les acides aminés -71 à -1 représente très vraisemblablement le peptide de transit, dont nous discuterons la structure sous III.9. La séquence GCCATGG recouvrant le premier ATG en phase de l'ORF recoupe parfaitement le consensus reconnu pour les ARNm traduits efficacement (A/GNNAUGG) [Kozack,1981], ce qui confère un argument dans la désignation de ce site pour l'initiation de la traduction (cf III.9). Notons que Kozack n'ont jamais trouvé le consensus entourant un ATG non fonctionnel en amont de l'ATG initiateur.

III.8 Usage des codons

Dans la levure et dans *E.coli*, il existe une corrélation entre l'expression d'une protéine et le nombre de codons utilisés, les protéines fortement exprimées utilisant moins de codons [Gouy et Gauthier,1982; Sharp et Li,1986]. Chez les végétaux, certaines expériences suggèrent que la population des ARNt s'adapte aux gènes les plus exprimés dans certains tissus [Viotti *et al*,1978]. Le compartiment chloroplastique utilise un set très restreint de codons, dû à la présence de seulement 30-31 ARNt [Shimada et Sugiura,1991]. Par rapport aux gènes eucaryotes, les gènes chloroplastiques contiennent une haute proportion de A et T, alors que les gènes nucléaires préfèrent G et C, notamment à la troisième position du codon [Murray *et al*,1989]. Le gène tuf ayant migré du chloroplaste vers le noyau, il est intéressant de noter l'adaptation de la structure primaire du gène à un environnement traductionnel différent.

Nous notons une répartition homogène de la teneur en G, C, A et T dans la partie codante du gène tuf ne contenant pas le peptide de transit (27, 29, 25 et 19%, respectivement), avec un léger biais en faveur de G+C (56%). La troisième position du codon est encore enrichie en G+C (68%), ce qui est également un caractère typiquement eucaryote. En ce qui concerne la troisième position, il est intéressant de noter que le gène de *Chlamydomonas* utilise A et T à 86%, alors que celui d'*Arabidopsis* utilise G, C et A dans les mêmes proportions (environ 20%) et T à 44% [Baldauf et Palmer,1990]. Il a été proposé que cette haute teneur en T ne représente pas une dernière trace du gène chloroplastique, mais est le résultat d'une adaptation supplémentaire pour un gène fortement exprimé (diminution de la diversité des codons utilisés). Nos résultats supportent largement cette hypothèse, en ce sens que nous observons une proportion de C en troisième position du triplet encore bien plus importante (58%). En fait, *tous les acides aminés sont codés préférentiellement par des codons se terminant par un C*, une situation totalement différente de celle recensée par Murray *et al* [1989] où dans les 29 gènes du soja analysé, la troisième position du codon ne contient que 22% de C. Il est donc très fortement probable qu'il existe un "codon bias" dans les génomes d'*Arabidopsis* et du soja, l'un favorisant les T en troisième position, l'autre les C. Il est intéressant de noter comment le même gène reçu relativement tard dans l'évolution peut évoluer en deux variantes différentes, mais qui néanmoins satisfont les exigences d'une stratégie identique.

Remarquons que le biais dans l'usage des codons peut fournir un argument supplémentaire à la désignation chloroplastique de notre gène: le gène tuf pour la protéine mitochondriale de la levure ne montre en effet aucun biais, par opposition au gène tef du même organisme (qui est plus de dix fois plus exprimé [Nagata *et al*,1983]).

AA	Codon	Nombre	AA	Codon	Nombre
Gly	GGG	6	Trp	TGG	1
Gly	GGA	3	End	TGA	1
Gly	GGT	10	Cys	TGT	0
Gly	GGC	18	Cys	TGC	2
Glu	GAG	16	End	TAG	0
Glu	GAA	14	End	TAA	0
Asp	GAT	4	Tyr	TAT	2
Asp	GAC	23	Tyr	TAC	7
Val	GTG	14	Leu	TTG	4
Val	GTA	4	Leu	TTA	4
Val	GTT	8	Phe	TTT	3
Val	GTC	15	Phe	TTC	9
Ala	GCG	3	Ser	TCG	1
Ala	GCA	4	Ser	TCA	2
Ala	GCT	8	Ser	TCT	1
Ala	GCC	18	Ser	TCC	6
Arg	AGG	7	Arg	CGG	0
Arg	AGA	2	Arg	CGA	1
Ser	AGT	0	Arg	CGT	4
Ser	AGC	2	Arg	CGC	7
Lys	AAG	13	Gln	CAG	8
Lys	AAA	10	Gln	CAA	7
Asn	AAT	1	His	CAT	1
Asn	AAC	12	His	CAC	8
Met	ATG	14	Leu	CTG	5
Ile	ATA	4	Leu	CTA	4
Ile	ATT	11	Leu	CTT	7
Ile	ATC	12	Leu	CTC	7
Thr	ACG	4	Pro	CCG	2
Thr	ACA	3	Pro	CCA	1
Thr	ACT	4	Pro	CCT	4
Thr	ACC	21	Pro	CCC	12

Figure 9

Fréquence des codons du gène tuf

Les valeurs indiquent le nombre de codons dans le gène. La partie correspondant au peptide de transit n'a pas été incluse dans les calculs

III.9 L'extension N-terminale

L'ORF débute 87 acides aminés avant la position correspondant au N-terminal présumé du facteur EF-Tu (position +1 sur la fig.8). Dans ces 87 acides aminés, seule une méthionine (désignée Met -71, fig.8) apparaît en phase, située 16 acides aminés après le début de l'ORF. Cette remarque, ajoutée au consensus entourant le codon ATG (III.7), désigne la Met -71 comme étant très vraisemblablement le premier acide aminé traduit. La séquence comprise entre cette méthionine et l'alanine +1 possède de plus toutes les caractéristiques du peptide de transit chloroplastique nécessaire au facteur. Bien que la séquence primaire de ces peptides ne montre aucune homologie, certains traits permettent d'assigner la destination sans équivoque [von Heijne et al, 1989].

Tout d'abord, les peptides de transit chloroplastiques sont composés de trois domaines bien distincts: la partie N-terminale contient une suite de 10 acides aminés essentiellement non chargés et peu de proline ou de glycine; la partie centrale est riche en serine et la partie C-terminale est composée d'une dizaine d'acides aminés pouvant former un feuillet plissé. Par opposition, les peptides mitochondriaux n'ont que deux domaines: la partie N-terminale qui peut être pliée en hélice alpha et la partie C-terminale avec un fort moment hydrophobe. De plus, les peptides chloroplastiques sont enrichis en thréonine (9%) et surtout en serine (19%); il semble possible de différencier efficacement les peptides chloroplastiques si $\%Ser > 7 + 1,4 \times \%Arg$. Finalement, le second acide aminé traduit est presque toujours une alanine. Le contour d'hydropathie (fig.10) et le tableau I résumant ces différentes données et permettent de visualiser le parfait accord entre les caractéristiques du peptide de transit du facteur EF-Tu et les consensus. Remarquons encore les contours très similaires de la figure 10 entre les peptides du soja et de *A.thaliana*, ceci même en l'absence d'une structure primaire conservée (à l'exception des 9 a.a. C-terminaux).

	consensus chloroplastique	EF-Tu
N-terminal	10 a.a. non chargés peu de Pro/Gly	Oui (charge=0,9 à pH7,5) Oui (0/0)
Central	riche en Ser	Oui (25%)
C-terminal	8-10 a.a. feuillet plissé	Oui (figure 10)
%Ser	$\%Ser > 7 + 1,4 \times \%Arg$ élevé (20%)	Oui (24% > 19%) Oui (24%)
%Thr	élevé (9%)	Oui (20%)
Second a.a.	Ala	Ala

Tableau I

Caractéristiques du peptide de transit pour le facteur EF-Tu

Un oui indique que le peptide de transit satisfait au critère énoncé. Les caractéristiques sont tirées de von Heijne et al [1989]. La charge nette a été calculée par le programme PEPLLOT, en ne tenant pas compte du NH₂-terminal. La présence des structures secondaires (feuillet plissé) a été établie par le programme PEPTIDESTRUCURE; un oui indique une forte probabilité selon les normes du programme

Peu de choses précises sont connues sur le site de clivage du peptide de transit. Néanmoins, en plus du feuillet plissé des 10 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale, cette partie est riche en arginine (R, environ 14% contre 3%) et très pauvre en leucine (L, 2% contre 10%). De même, les acides aminés connus pour induire des "turn" (G, S, D, N, P) sont en général absents des positions -3 à +1. L'alanine (A), par contre, est fréquemment présente dans ces positions [von Heijne *et al*, 1989]. Toutes ces caractéristiques se retrouvent aux alentours du site de clivage potentiel: les dix derniers résidus peuvent former un feuillet plissé, trois arginines sont présentes dans ces positions (R, 30%), aucune leucine, serine, glycine, acide aspartique, asparagine ou proline ne se trouvent dans les résidus -3 à +1 et deux Ala sont présentes dans ces dernières positions.

III.10 La protéine EF-Tu

Même si la structure tridimensionnelle montre trois domaines [Clark *et al*, 1990], il est possible de séparer le facteur Tu en deux parties fonctionnelles bien distinctes: tout d'abord la partie N-terminale qui s'étend des acides aminés +1 à +200 (*E.coli*) et qui représente la structure liant le GTP [La Cour *et al*, 1985]. Le degré de conservation de cette structure est extrêmement élevé (95, 91, 86, et 80% d'homologies entre notre protéine et les facteurs Tu d'*Arabidopsis*, de l'euglène, de *E.coli* et de la levure). A l'intérieur de cette structure, trois motifs sont même quasi totalement conservés pour toutes les protéines liant le GTP [Dever *et al*, 1987]; il s'agit des séquences GXXXXGK, DXXG, et NKXD (positions 18-24, 80-84 et 135-138) que nous retrouvons parfaitement conservées dans notre protéine. La séquence comprise entre les acides aminés Ile 131 et Asp 138 semble impliquée dans la liaison avec le facteur EF-Ts chez *E.coli* [Hwang *et al*, 1989; Bourne *et al*, 1991]. Cette séquence est bien conservée dans notre protéine, seul un acide glutamique remplaçant une cystéine en position 137.

La partie C-terminale (positions 200-409) confère la spécificité à la structure N-terminale liant le GTP. Par exemple, c'est cette partie qui semble responsable de la liaison de la partie "médiane" des ARNt ou de la kyrromycine [Jacquet et Parmeggiani, 1988]. Cette partie est évolutivement moins bien conservée (94, 86, 81 et 75%), et présente un certain nombre de délétions ou d'insertions, comme nous l'avons déjà mentionné (cf III.2). La figure 8 montre que ces différences n'apparaissent qu'avec les facteurs mitochondriaux ou de *E.coli*, mais que les protéines chloroplastiques sont toutes composées du même nombre d'acides aminés (408; nous n'avons pas considéré ici les insertions spécifiques du gène de *Chlamydomonas* [Baldauf et Palmer, 1990]). Notons encore qu'il pourrait être supposé que la plus importante des insertions (10 acides aminés, positions 180 à 189), qui semble spécifique des organismes photosynthétiques, est peut-être en rapport avec une photorégulation de la protéine (activation/inactivation du facteur Tu en présence/absence de lumière). Un mécanisme direct par le système ferrédoxine/thiorédoxine est cependant à exclure, car aucune des insertions ne contient la moindre cystéine [Marcus *et al*, 1988]. De plus l'homologie de séquence entre les insertions de différents organismes photosynthétiques est presque nulle (seuls 3 a.a. sur 10 sont totalement conservés). La plus petite des insertions des deux gènes du soja n'est également que peu conservée (6 des 7 différences observées se trouvent aux alentours direct de cette région, fig.1).

III.11 Les séquences en amont du gène

De toutes les régulations étudiées, celles concernant la lumière sont peut-être les plus documentées. Un grand nombre de gènes voient leurs transcriptions fortement augmentées lorsque les cellules sont illuminées [par ex. Thompson *et al*,1983], et le contrôle de ces expressions s'effectue dans plusieurs cas par le(s) phytochrome(s) [Thompson et Meagher,1990]. Les séquences de plusieurs "light responsive elements" ont été proposées [Fluhr *et al*,1986; Granbastien *et al*,1986; Kuhlemeier *et al*,1987]. Ces séquences sont extrêmement intéressantes car elles peuvent réagir à un stimulus commun, ceci quels que soient les gènes considérés; elles ont donc la potentialité de se retrouver dans des gènes tout à fait différents. La transcription du tuf étant photorégulée (voir III.12) c'est parmi de telles séquences que nous avons cherché à identifier quelques "light responsive elements" (LRE) dans la partie 5' du gène.

Trois séquences potentiellement intéressantes ont été recensées:

1) la séquence AATAT que l'on retrouve huit fois dans les 700 nucléotides analysés. Cette séquence se retrouve dans d'autres parties 5' de gènes régulés par la lumière [Granbastien *et al*,1986]

2) la séquence GGTTAA située en position -159. Cette séquence est l'un des éléments du consensus (boîte II) capable de lier le facteur nucléaire GT-1 [Green *et al*,1987]. Dans le cas du rbcS-3A, la liaison du facteur sur cette séquence est capable de conférer la transcription du gène après illumination. De plus, l'activité transcriptionnelle est présente à la condition qu'une boîte III (qui est définie comme possédant un triplet GTG) se trouve 22 à 36 pb en aval [Gilmartin et Chua,1990]. Les homologies entre les différentes boîtes III étant très faibles, nous nous contentons de relever la présence d'un triplet GTG 33 pb en aval du premier G de la boîte II (l'espacement entre les deux boîtes est défini à partir des G des deux séquences, car ceux-ci représentent les points de contact avec le facteur GT-1).

3) la séquence comprise entre les positions -640 à -390. Cette séquence comprend *les deux seules séquences TATAAA* de la région promotrice séquencée (720 pb) et deux séquences TATA imbriquées (nucléotides -415 à -410, *ces deux séquences TATA sont également les seules de la région séquencée*). La région -418 à -397 contient 3 boîtes TATA successives, précédées de 14 et 182 nucléotides par deux séquences CAAT; ces séquences sont connues pour moduler les niveaux de transcription des gènes de mammifères, et se retrouvent dans de nombreux gènes végétaux [Johnson et Mc Night,1989, et par ex. Granbastien *et al*,1986]. 15 nucléotides de cette séquence, seulement interrompue par une transversion de 4 bases (CAAAA————>GTTTT), sont identiques à une séquence de régulation importante de la carboxylase du pois (rbcS-3A et rbcS-E9) [Fluhr *et al*,1986]

	-410	-400
tuf	ATCAATATATAGCAACAAAAAGTAAAAAGTAAA	
rbcS-3A	CATTATATATAGCAAGTTTTAGCAGAAGCTTTG	
rbcS-9A	CATTATATAAAGCAAGTTTTAGTACAAGCTTTG	

La séquence de 33 nucléotides présentée est suffisante pour permettre l'induction de la transcription des gènes rbcS par la lumière [Fluhr *et al*,1986]. Elle contient de plus directement le "TATA box" du gène, ce qui nous a fait penser par analogie que l'origine de transcription du tuf pouvait se situer 20-30 nucléotides en aval.

Cette recherche est à ce stade purement spéculative: elle ne sert qu'à orienter les différentes délétions progressives qui seront introduites dans le tabac (cf F.Maurer, en préparation).

III.12 Expression des ARNm

L'expression des ARNm en fonction du temps d'illumination a été étudiée par "Northern blot", en collaboration avec F.Aguilar [1990]. 20 μ g des ARN extraits à partir des feuilles de plantules âgées de 3-4 semaines cultivées à l'obscurité puis illuminées pendant 3, 16 et 24 heures ont été dénaturés au glyoxal, séparés sur gel agarose, transférés sur membrane nitrocellulose et hybridés à la sonde tuf EcoRI-XbaI 0,36. La figure 11a montre que les ARNm ne sont pas détectables à l'obscurité; à partir de trois heures d'illumination, la quantité d'ARNm augmente et atteint un niveau relativement constant jusqu'à la fin de l'expérience. Une seule bande de 1,6-1,7 kb apparaît, ce qui montre une homogénéité de taille des transcrits. Comme l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines plastidiales s'effectue principalement au niveau de la transcription [Taylor, 1989], on peut s'attendre à ce que les taux des ARNm tuf correspondent assez bien aux taux des facteurs EF-Tu.

La figure complémentaire 11b qui a été réalisée en hybridant les mêmes ARNm à une sonde pour la petite sous-unité de la carboxylase montre que les résultats obtenus sont spécifiques de la sonde tuf: l'abondance des messagers aux temps déterminés est en effet totalement différente dans les deux cas. De plus, la figure obtenue avec le gène *rbcS* est conforme à l'expression dans le soja [Berry-Lowe et al, 1982].

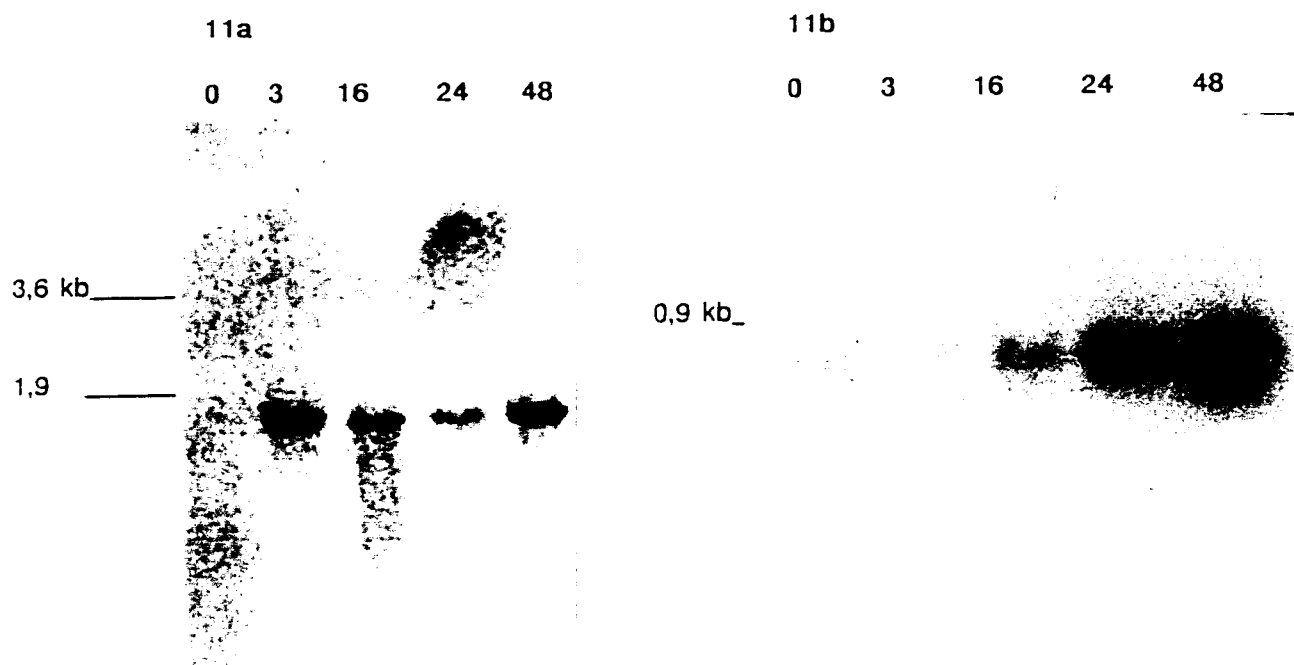


Figure 11

11a: Les ARNm pour la protéine EF-Tu sont très peu abondants à l'obscurité et apparaissent après illumination. 20 μ g des ARN extraits des feuilles de pousses de soja illuminées pendant, de gauche à droite, 0, 3, 16, 24 et 48 hres ont été séparés sur gel, transférés sur filtre, puis hybridés à la sonde EcoRI-XbaI 0,36 du cDNA1. 11b: Les mêmes ARN hybridés avec une sonde spécifique pour le *rbcS* (cf Aguilar, 1990).

III.13 détermination de l'origine de transcription

La séquence depuis le premier ATG du peptide de transit (ce codon servira de référence pour la suite) jusqu'au premier A du poly(A) représente 1590 paires de bases (fig.6). Comme l'ARNm compte 1600-1700 pb (III.12), l'extrémité 5' non traduite et le poly(A) doivent être contenus dans 110 nucléotides. L'extrémité 5' de l'ARNm doit donc se trouver au maximum à environ 100 nucléotides de l'ATG.

Les sondes que nous avons utilisées dans les expériences employant la nucléase SI ont été synthétisées à partir d'un oligonucléotide complémentaire à une région située en aval de l'ATG (positions 41 à 26 à partir de l'ATG, fig.12). Les sondes ont été polymérisées sur un moule simple brin, digérées soit par HaeIII soit par XbaI, éluées à partir d'un gel dénaturant, et sont donc simples brins elles-mêmes. La première des sondes employées remonte 138 pb en amont de l'ATG jusqu'à un site HaeIII. La seconde sonde remonte 590 pb en amont de l'ATG, jusqu'au site XbaI.

Les figures 13a et 13b montrent la même protection des deux sondes à partir des nucléotides T+1 et T+2 sur la figure 6. Bien que nous n'ayons pas observé de fragments en dessous de ces positions, il se pourrait qu'un petit fragment, indicateur d'un splicing, nous ait échappé. Cependant, comme aucun dinucléotide AG ne se trouve à moins de 28 nucléotides des positions T+1 et T+2 (ces nucléotides se retrouvent pour *tous* les sites 3' de splicing des végétaux [Brown,1986]), nous pouvons exclure fortement une telle hypothèse. Nous en concluons que cette expérience définit bien l'extrémité 5' des messagers. Notons tout de même que la figure de protection recouvre un nombre de nucléotides assez élevé (une dizaine); de telles figures ont été attribuées à un "rognage" des extrémités doubles brins par la nucléase SI [par exemple: Vodkin *et al*,1983]. Les mêmes résultats (cf Mat. et Méth.) ont été obtenus avec au moins 3 extractions indépendantes d'ARN.

Notons encore que nous n'observons pas de "TATA box" canonique en amont des positions délimitées par la nucléase SI; cette boîte pourrait cependant être remplacée par les séquences TAGATAA 30 pb en amont qui elles même précèdent la séquence consensus CAAT de 145 nucléotides [Johnson et McNight,1989].

Les boîtes TATA d'autres gènes tuf semblent situées assez loin du premier ATG; chez *Arabidopsis*, ces séquences semblent se trouver à plus de 350 pb, chez *Chlamydomonas* aux environs de -500 [Silk *et al*,1988] et de -225 chez la levure [Nagata *et al*,1983].

Remarquons que la boîte homologue à la LRE du pois (cf III.11, 3) et positions -418 à -397 dans la figure 6) ne peut pas représenter la boîte de Goldberg-Hogness du gène, contrairement à la situation dans le pois. Comme les seules séquences "TATA" de la région promotrice ont été recensées autour de ces positions, il est concevable que ces boîtes servent de "sites d'ancrage" à la polymérase II (pour autant que ces boîtes aient bien une fonction); ce mécanisme a été proposé pour la transcription de l'ARNr 23S de *Xenopus*, où la partie non transcrite du gène contient plusieurs séquences promotrices (de la polymérase III) non fonctionnelles [Moss,1983]. D'un autre côté, ces boîtes (notamment la LRE) pourraient servir à la liaison d'un facteur de transcription spécifique; il a par exemple été montré dans les cellules HeLa que les séquences TATA formaient des complexes de préinitiation stable en l'absence de la polymérase B [Davison *et al*,1983]. Chez les bactéries, certains facteurs différents de σ^{70} se lient à des séquences proches du consensus de Pribnow [Stragier *et al*,1985] et d'autres se lient à des sites 60 à 180 pb en amont des promoteurs [Collado-Vides *et al*,1991]; dans ce dernier cas, les séquences entre les sites de fixation du facteur σ et la polymérase II formeraient une boucle permettant aux deux protéines d'entrer en contact. Il a été proposé que certains facteurs de transcription eucaryotes agiraient par un mécanisme analogue [Gralla,1991], et il est donc concevable d'imaginer un facteur de transcription reconnaissant un promoteur "classique" éloigné (les séquences TATA en amont du tuf) qui stabiliserait par un mécanisme de "looping out" la polymérase sur le promoteur fonctionnel.

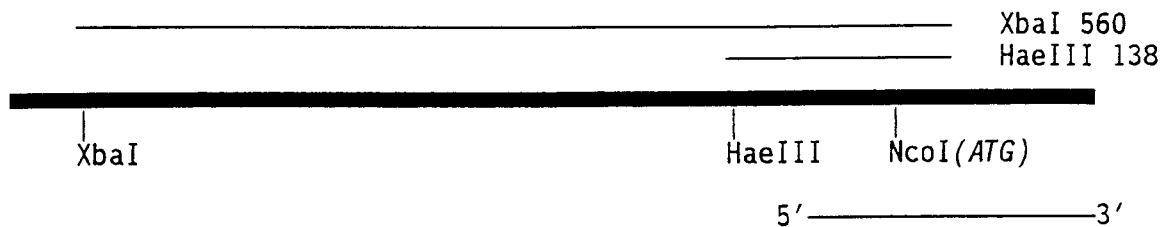


Figure 12

Sondes employées lors de la digestion par la nucléase Si

Les sondes sont représentées par les lignes fines au-dessus de la barre épaisse (560 et 138 représentent les pb en amont de l'ATG pour chacune des sondes). Les sites de restrictions employés pour la préparation des sondes sont indiqués (XbaI et HaeIII). Le site NcoI recouvre la première position du peptide de transit. L'orientation 5'-3' du messager est indiquée

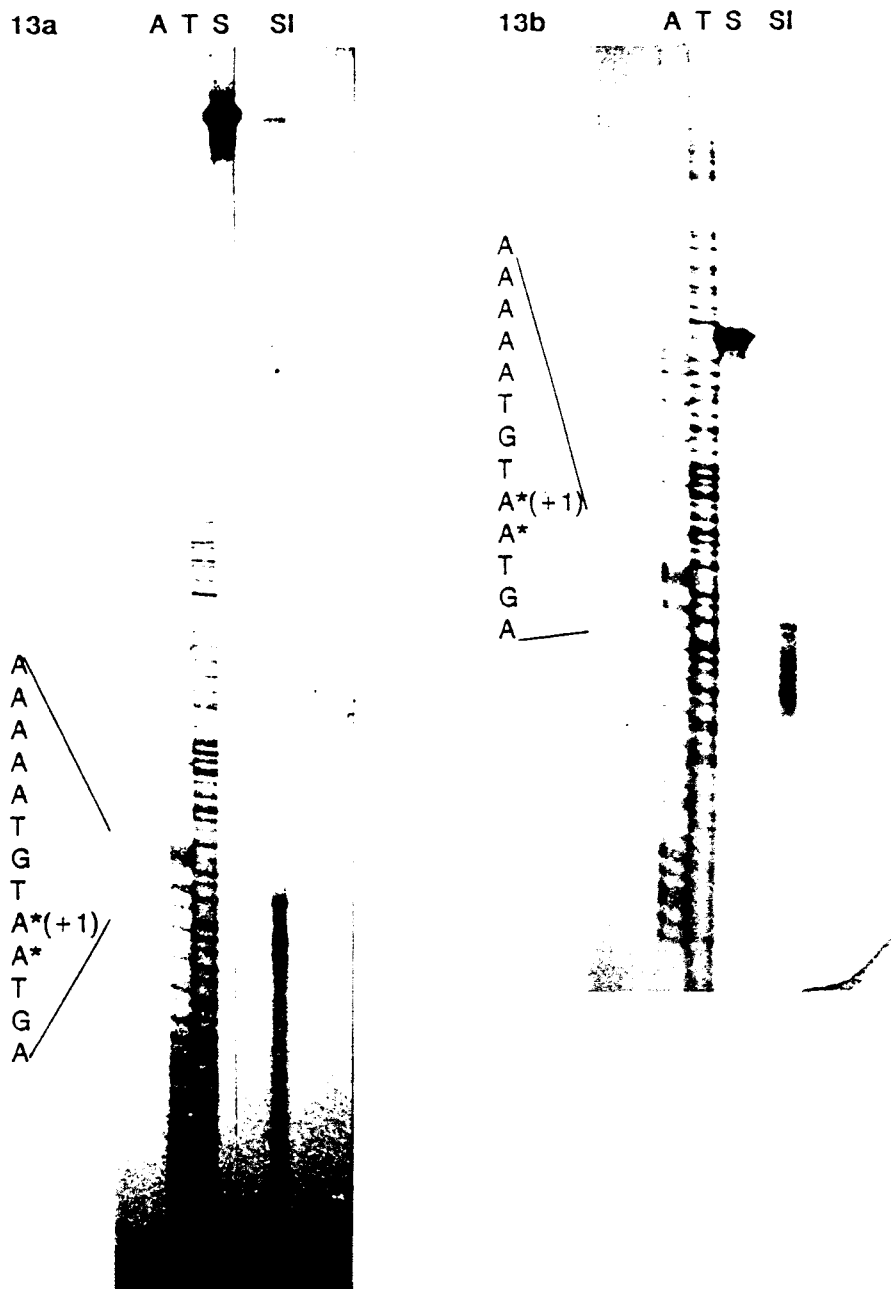


Figure 13

Analyse par la nucléase Si de la partie 5' du gène tuf

100 µg des ARN extraits de feuilles récoltées sur des plantules poussées quinze jours en présence de lumière ont été hybridés à des fragments marqués (cf fig. 12 et II.IV) recouvrant la partie 5' du tuf, puis traités par la nucléase Si. 13a: fragment XbaI remontant 560 pb en amont de l'ATG du peptide de transit (cf texte et fig. 12). 13b: fragment HaeIII, remontant 138 pb en amont de l'ATG. (A): séquence des 'A'; (T): séquence des 'T'; (S): 'sondes', non traitées par la nucléase Si; (SI): fragments protégés de la dégradation par la nucléase Si. Les séquences donnent directement les positions protégées de la nucléase Si (cf II.IV). Les séquences dans les marges sont complémentaires à celles de la fig.6 ((+1) réfère à la numérotation de la fig.6); les positions des deux premières bases protégées sont indiquées (*).

III.14 La séquence 5' "leader" non traduite

La séquence 5' non traduite présente la particularité de posséder une longue suite de 24 nucléotides C/U, seulement interrompue par deux A (ce qui correspond à 92% C/U). Nous avons pu retrouver une telle suite dans de nombreux gènes (notamment ribosomiques), comme l'indique le tableau II. De manière particulièrement intéressante, le premier exon du tef de soja, qui représente l'extrémité 5' non traduite, possède une séquence similaire; il n'a pas été encore possible d'assigner une fonction à cet exon. Pour les gènes tuf et tef du soja, nous pouvons aligner parfaitement les deux séquences sur 11 nucléotides, l'homologie en amont et en aval de l'alignement restant de plus très élevée; la longueur et la conservation du motif C/T (tableaux II et III) suggère qu'il s'agit d'un élément important.

Chez l'euglène, les nématodes et les trypanosomes, la plupart des ARNm possèdent des séquences similaires entre elles qui sont ajoutées en 5' des messagers par cis ou trans-splicing [Blumenthal et Thomes,1988; Tessier *et al*,1991]. Il a été proposé que ces séquences étaient impliquées dans la traduction des ARNm, soit en la favorisant, soit au contraire en l'inhibant à l'aide par exemple d'ARN antisens [Tessier *et al*,1991]. De telles séquences sont connues chez les végétaux supérieurs [Gallie *et al*,1987], et impliquent généralement la liaison à des facteurs d'initiation [Gallie *et al*,1988]. Les séquences 5' peuvent généralement adopter des structures secondaires dont l'importance pour la traduction a été souvent démontrée [Sonenberg *et al*,1981; McGarry et Lindquist,1985].

Il est peu probable qu'une structure secondaire stable se rencontre pour les gènes tuf et tef, dans une région composée presque uniquement de C et de U. Cependant, la séquence 5' enhancer de certains virus végétaux ne possède absolument pas de structure secondaire [Jobling et Gehrke,1987], et une telle absence semble corrélée à un besoin diminué en facteurs d'initiations (un des rôles du complexe d'initiation est justement de dérouler la structure 5' que l'on trouve dans la plupart des messagers eucaryotes [Sonenberg *et al*,1981]); ce besoin diminué est en tout cas en partie responsable de la traduction très compétitive de ces messagers en présence de fortes concentrations en ARNm [Jobling et Gehrke,1987], une situation que l'on trouve dans les cellules végétales peu après illumination. Il est extrêmement intéressant de noter que le rapport entre le facteur d'initiation eIF-4F (une sous-unité du complexe se liant au "cap" des ARNm ("cap-binding")) et les ribosomes est égal à 0,09 seulement [Browning *et al*,1990]; cette faible concentration explique pourquoi les messagers liant fortement ce facteur (tels les ARNm du virus alfalfa) sont traduits préférentiellement [Browning *et al*,1988]. Un mécanisme d'initiation fonctionnant avec un besoin diminué en facteurs d'initiations serait alors parfaitement adapté à des gènes importants comme le tuf ou le tef, notamment dans des conditions où les facteurs d'initiation deviendraient limitants (c-à-d peu après illumination, là où la concentration en ARNm subit une très forte augmentation). Notons que si un tel mécanisme devait exister, il est probable que d'autres facteurs, tels justement les facteurs d'initiation, adoptent un système similaire.

Une séquence riche en C/U, bien que plus courte, a été mise en évidence chez de nombreux virus à ARN humains [Beck *et al*,1983]. L'intérêt provient du fait que l'initiation de la traduction de ces ARNm semble se faire par un mécanisme de fixation du ribosome interne au message [Kaminsky *et al*,1990]. L'absence d'un mécanisme de "scanning" à partir du "cap site" montre la possibilité d'une liaison directe de l'ARNm au ribosome, sans passer par les nombreux facteurs d'initiation, et il a été démontré que la région C/U était justement cruciale pour ce mécanisme [Pestova *et al*,1991]. Récemment, un tel mode d'initiation a été proposé pour des ARNm de gènes cellulaires eucaryotes [Macejak et Sarnow,1991]. Il a été proposé que la fixation de la région C/U au ribosome se fasse par l'intermédiaire d'une séquence complémentaire (G/A, positions 1751-1764) de quatorze nucléotides sur l'ARNr 16S (rappelant l'appariement avec la boîte anti-Shine-Dalgarno du 16S bactérien). Cette séquence (qui est la plus longue suite G/A de l'ARNr 16S du soja [Eckenrode *et al*,1985]) se situe à l'extrémité de la boucle 39 qui suit

directement la région de l'ARNr 16S en contact avec l'ARNm (positions 1390 à 1400 chez *E.coli*) [Rinke-Appel *et al*,1991]. Un appariement direct entre la séquence leader riche en C/U et la séquence du 16S riche en G/A serait possible à la condition d'ouvrir l'hélice formée par ces nucléotides (hélice 39). A ce jour, aucun mécanisme n'a été proposé pour expliquer la liaison directe des ribosomes eucaryotes à certains messagers.

Finalement, notons qu'une évidence indirecte du rôle de cette séquence a peut-être déjà été réalisée dans notre laboratoire: les parties 5' des gènes tuf (2,2 kb) et tef (1,8 kb) ont été introduites dans le tabac, juste devant le marqueur GUS du vecteur de transformation. Le clonage de la partie tuf a nécessité la manipulation d'un nombre important de nucléotides entre l'ATG du GUS et la partie correspondante du tuf, modifiant ainsi la position de la séquence C/T par rapport au codon d'initiation. Ces manipulations n'ont pas été nécessaires pour le tef. Le résultat est que le GUS soumis à la région promotrice du tef est exprimé plus de 1000 fois plus que le GUS soumis au tuf. Une telle différence est particulièrement étonnante, d'autant plus si l'on se réfère à la représentativité similaire des deux gènes dans la banque cDNA (cf III.1). Considérant la taille importante des régions promotrices insérées, ce résultat tend à démontrer un niveau de traduction totalement différent des deux gènes. La cause pourrait en être les modifications apportées à la région C/T par rapport à l'ATG. F.Maurer est actuellement en train de tester cette hypothèse, en insérant l'ATG du tuf directement sur l'ATG du GUS, à l'aide des sites NcoI coupant les codons d'initiations des deux gènes.

tuf (Gm)	TAACATAATCCTCTTCACTCTTCTCTTTCTATCCAAAATTCTCCACCAGCCA <u>ATG</u>
tef (Gm)	CTCCTTCGTTCACTCTTCTCTTCTTGC GGCTAGGGTTTTAGCGCAGCTTCTTCTAGATTTAAGGAAG <u>ATG</u>
tuf (At)	TTTCTCTCCTCTGCTCTCCAATTCCATCTTCCCA <u>ATG</u>
L13 (So)	CTCTCTTTCTCTCTCTACAGAGCTACAACATACAACA <u>ATG</u>
L21 (So)	TTCTTCTCCTCTCTATCTCTCACAGAGTTTAGAGCTCAACTAAAA <u>ATG</u>
FMDVc1	CCGGCACCTTTCTTTACAATTAATGACCC <u>ATG</u>
FMDVo1k	CCGGCACCTTTCTTTTATAACCACTGAACAC <u>ATG</u>
Polio	CAACAGTTATTTCAATCAGACAATTGTATCATA <u>ATG</u>

Tableau II

Séquences C/T devant divers gènes ou messagers

Les séquences riches en C/T sont mises en évidence en gras. Les nucléotides soulignés désignent les sites d'initiation de la traduction. Gm: *G.max* [Aguilar,1991]; At: *A.thaliana* [Baldauf et Palmer,1990]; So: *S.oleoracea* [Phua *et al*,1989; Johnson *et al*,1990]; FMDV: Foot and Mouth Disease Virus [Beck *et al*,1983]; polio: poliovirus polyprotéine [Kitamura *et al*,1981]. Les séquences ont été obtenues à partir de: tuf(Gm): ARN; tuf(At): ADN (génomique); tef(Gm): ADNc; L13, L21(So): ADNc

tuf	TAATCCTCTTCACTCTTCTCTTTCTATCCAAAATTCTCCACCAGCCA <u>ATG</u>
tef	CTCCTTCGTTCACTCTTCTCTTGC GGCTAGGGTTTTAGCGCAGCTTCTTCTAGATTTAAGGAAG <u>ATG</u>

Tableau III

Séquences C/T alignées des gènes tuf et tef montrant la séquence conservée

Les nucléotides en gras représentent la séquence totalement conservées entre les deux gènes (cf. texte). Les nucléotides soulignés désignent les sites d'initiation de la traduction

IV DISCUSSION

IV.1 Nombre de gènes tuf dans le soja

Le soja (*Glycine max*) possède un génome amphidiploïde résultant de la fusion de deux espèces de Papilionoïdeae [Grandbastien *et al*,1986], et l'on peut donc s'attendre à ce que chaque gène se retrouve à au moins deux exemplaires (ou un multiple de deux). Nous avons montré qu'il existait deux familles de gènes tuf dans le soja (que nous appellerons A et B), chacune semblant composée de deux membres (A1, A2, et B1, B2, respectivement). Ces deux familles peuvent être distinguées en employant des conditions d'hybridations stringentes et deux sondes spécifiques différentes, l'une révélant la paire A1/A2 et l'autre la paire B1/B2.

Cette situation peut être comprise de deux façons: soit les paires A1/A2 et B1/B2 proviennent chacune de l'une des Papilionoïdeae, et dans ce cas les deux familles A et B représentent les deux espèces de Papilionoïdeae ayant fusionné (situation chromosomique A1/A2 et B1/B2); soit chaque famille A et B contient en fait des membres des deux Papilionoïdeae et dans ce cas la situation chromosomique des espèces initiales serait A1/B1 et A2/B2. En termes clairs, la première situation revient à dire que, dans chaque espèce, les gènes étaient très similaires, alors que la deuxième implique que les gènes étaient déjà bien différents dans la même plante.

Le tabac (*Nicotiana tabacum*) résulte lui aussi de la fusion de deux espèces, dont l'une est *N.sylvestris*. Cette dernière renferme deux gènes tuf, qui ont été complètement séquencés [Murayama *et al*,1991]. Cette situation fait qu'il est probable que le tabac *N.tabacum* renferme 4 gènes, tout comme le soja (*G.max*). L'identité en acides aminés est de 95% entre les deux gènes de *N.sylvestris*, et l'un des peptides de transit est plus court de sept acides aminés. L'identité en acides nucléiques n'est elle que de 87%. Ces valeurs sont très proches de celles que nous obtenons pour les gènes A et B de *G.max* (94% et 84% respectivement; la valeur réelle se situe quelques % au-dessus, car nous n'avons pas inclu la partie plus conservée du "GTP-binding domain" dans nos calculs). Au vu de cette similitude, nous proposons que les deux espèces de Papilionoïdeae possédaient chacune deux tuf passablement différents, représentés par les deux familles A et B de *G.max* (les deux cDNA que nous avons séquencés représenteraient dans ce cas chacun un membre de chaque famille).

Dans *N.sylvestris*, le premier gène tuf semble exprimé de manière constitutive, alors que le second est exprimé très fortement dans les feuilles (2-3 fois plus que le premier) et peu dans les racines (1-2 fois moins). Il est dès lors possible que l'expression de ces gènes soit associée au développement de différents types plastidiaux. Les deux gènes que nous avons caractérisés, s'ils représentent bien les espèces présentes dans chaque Papilionoïdeae, pourraient alors parfaitement être utilisés différenciellement à des stades spécifiques des plastides (cf ci-après).

IV.2 Ajustement de l'usage des codons

Les génomes de différents organismes montrent souvent de grandes divergences dans les pourcentages G+C. Par exemple, les génomes chloroplastiques sont riches en A+T, alors que les génomes nucléaires des mêmes organismes sont généralement plus riches en G+C [Murray *et al*,1989; Oliver *et al*,1990]. L'adaptation de la teneur en G+C pour des gènes homologues a

d'abord été démontrée pour des microorganismes et des mitochondries [Jukes et Bhushan, 1986]. Plus récemment, l'adaptation de la teneur en G+C de gènes chloroplastiques transférés dans le génome eucaryote a été déterminée pour deux monocots (blé et maïs) et deux dicots (pois et tabac) [Oliver *et al*, 1990]. Dans les quatre espèces analysées, la teneur en G+C des gènes transférés est semblable aux gènes nucléaires, et donc relativement différente des gènes chloroplastiques. Comme la teneur en G+C des gènes nucléaires des deux monocots (57%) est bien supérieure à la teneur dans les dicots analysées (43-45%), l'augmentation de la teneur en G+C pour des gènes transférés devrait être particulièrement prononcée dans les monocots [Oliver *et al*, 1990].

Le problème est de déterminer comment une bonne partie des A et T d'un gène peut être remplacée par des G et des C, avec la contrainte de conserver une protéine fonctionnelle. La réponse est que cette opération est en fait presque exclusivement réalisée en modifiant les "positions silencieuses" des codons [Oliver *et al*, 1990], ce qui concerne principalement la troisième position de tous les codons. Ce type de remplacement doit donc naturellement augmenter la proportion de G+C en troisième position; effectivement, la teneur en G+C des positions silencieuses des gènes transférés est 7-19% plus élevée que dans les gènes nucléaires des monocots, et 3-7% plus élevée dans les dicots. La conclusion est que, pour la troisième position, *les gènes transférés montrent un pourcentage G+C plus élevé que les gènes nucléaires.*

Cette démonstration nous amène à reconsidérer la haute teneur en C du tuf à la troisième position du codon (III.8); les conclusions décrites plus haut suggèrent que cette haute teneur en C n'est peut-être que le résultat de l'adaptation de la teneur en G+C à un environnement eucaryote. Par exemple, Oliver *et al* [1990] citent le cas des gènes GAPDH du maïs, pour lesquels un fort biais dans l'usage des codons a été reporté [Brinkmann *et al*, 1987]. Cependant, le même gène dans d'autres organismes ne montrant aucun biais, ajouté à l'extrême biais dans la teneur en G+C des gènes transférés du maïs (67%; 96% pour la troisième position), montre plutôt que le "codon bias" reflète ici simplement une adaptation de la teneur en G+C.

La situation pour le gène tuf du soja est cependant bien différente: tout d'abord le soja étant un dicot, tout "codon bias" impliquant des G et des C est plus significatif que dans un monocot [Oliver *et al*, 1990]. Secondement, le même gène chez *A.thaliana* montre lui aussi un fort biais en troisième position, comme nous l'avons déjà mentionné (cf. III.8). Dans ce cas, le fait que le biais touche les T exclut l'explication relative à un "ajustement" de la teneur en G+C du gène. Troisièmement, la teneur en C des positions silencieuses des deux dicots analysées par Oliver *et al* est de 20 à 23% pour les gènes nucléaires, et de 19 à 25% pour les gènes transférés (les teneurs en C des positions silencieuses sont calculées en additionnant les C en troisième position de tous les codons avec les C des codons CTR et CGR (R=A ou G)). Ces valeurs sont donc très largement en dessous de celle pour le gène tuf (58% de C en troisième position; notons encore que la teneur en G de la troisième position est de 10% pour le tuf de soja, et de 18% pour les gènes transférés de tabac et de pois). Nous pensons donc que la haute teneur en C en troisième position est bien le résultat d'une très forte pression de sélection, visant vraisemblablement à optimiser la synthèse de la protéine [Kurland, 1991].

IV.3 Rôle du facteur EF-Tu dans le développement du chloroplaste

Les taux de transcription dans les plastides des plantes supérieures semblent d'abord régulés par la force des promoteurs. Si par exemple les taux totaux de transcription peuvent changer de manière importante pendant le développement du chloroplaste, la contribution relative de chaque promoteur semble assez constante [Deng et Gruissem, 1987; Gruissem, 1989]. Les changements les plus importants concernant les taux relatifs des ARNm sont principalement dus à des

changements sélectifs de la stabilité de certains ARNm (on observe par exemple de tels changements lors de la différenciation des chloroplastes en chromoplastes [Piechulla *et al*,1986; Gruissem,1989; Mullet,1988]). Il est de plus bien connu que les taux des ARNm ne sont pas toujours liés à la quantité de protéines, et ceci est particulièrement vrai dans les plastides [Taylor,1989; Mullet,1988; Bisanz-Seyer *et al*,1989]. Il semble donc que les régulations post-transcriptionnelles puissent jouer un rôle important dans les organelles [Deng et Gruissem,1987; Gruissem,1989 et van Grinsven et Kool,1988 pour des revues].

La très vaste majorité des gènes portés par le génome chloroplastique sont des gènes directement impliqués dans les processus de photosynthèse, et relativement très peu pourraient être impliqués pour toutes les fonctions nécessaires par exemple au développement d'un chromoplaste ou d'un amyloplaste [Ngerprasisiri *et al*,1988a et 1988b; Morden *et al*,1991; Shinozaki *et al*,1986; Shimada et Sugiura,1991] (les exceptions concernant cette affirmation se rapportent en fait surtout aux gènes engagés dans la formation des complexes transcriptionnels et protéosynthétiques, car ces gènes peuvent bien entendu être engagés dans le développement de tous les types plastidiaux).

Dans les plastides d'un type non-"chloroplastique", la transcription de la grande majorité des gènes est donc réprimée, à l'opposé de la situation dans les chloroplastes [Mullet,1988; Ngerprasisiri *et al*,1988b]. Comme le génome chloroplastique a encore perdu une très grande partie de sa capacité codante (et que ce génome semble trop restreint pour ne contenir au mieux que quelques gènes de régulation [Taylor,1989]), il est clair que le cytoplasme peut exercer une influence certaine sur le fonctionnement du chloroplaste. Ces résultats ont donc amené l'idée qu'il pouvait exister un ou des facteur(s) (cytoplasmique(s)) qui contrôlerai(en)t l'ensemble de la différenciation du chloroplaste, en agissant par exemple sur la transcription des gènes plastidiaux [Mullet,1988; Taylor,1989]. Cette vue est en fait aujourd'hui largement supportée par les travaux de Klein [1991; et également Nivison et Stocking,1983], qui démontre que, lorsque la synthèse protéique cytoplasmique est bloquée à l'aide de cycloheximide, l'induction de la transcription des gènes plastidiaux par la lumière est abolie; cette situation est à l'opposé de celle obtenue en bloquant la synthèse protéique des plastides à l'aide de chloramphénicol [Klein,1991]. Au niveau traductionnel, Ellis [1977] postula notamment que la traduction des gènes plastidiaux dépendait de la synthèse de produits traductionnels cytoplasmiques. Bien que la validité du principe ait été largement démontrée [Taylor,1989; Rodermeil *et al*,1988], il n'était cependant pas clair si l'expression abrupte des gènes plastidiaux peu après illumination était due à un changement important dans les niveaux de traduction ou de transcription des gènes. Ce n'est que très récemment que Klein démontra que l'expression des gènes plastidiaux après illumination était principalement due à une augmentation brutale de l'activité *traductionnelle* [Klein,1991], et donc que les plastides utilisaient des ARNm déjà présents.

Si le développement (et certaines "activités") du chloroplaste semble effectivement contrôlé depuis le cytoplasme [Taylor,1989], l'origine endosymbiotique des plastides implique que la cellule a du soit créer ou utiliser des molécules régulatrices agissant sur certains facteurs chloroplastiques, soit importer dans le cytoplasme ou le noyau les éléments clés du développement. Il apparaît en fait que les cellules utilisent aussi bien un contrôle sur un élément spécifique de la synthèse d'une molécule particulière, qu'un contrôle sur des mécanismes généraux tels la transcription ou la traduction [Gruissem,1989]. Le fait que les cellules aient importé dans le noyau les facteurs d'élongation [Fox *et al*,1980; Baldauf et Palmer,1990; Shimada et Sugiura,1991] pourrait ainsi relever d'une stratégie visant à mieux contrôler l'activité des plastides depuis le cytoplasme.

Une régulation de l'activité protéosynthétique au niveau de la traduction est bien documentée, particulièrement chez les plantes [Mullet,1988 et van Grinsven et Kool,1988 pour des revues; Klein et Mullet,1987]. Par exemple, les ARNm pour le *psbA* se trouvent déjà associés aux polysomes dans les chloroplastes d'orge isolés à l'obscurité, mais ne sont pas traduits; la traduction ne s'effectue qu'après transfert à la lumière [Klein et Mullet,1987 et Klein *et al*,1988].

Dans le sens inverse, les ARNm pour le *rbcL* d'amaranthes transférés de la lumière à l'obscurité restent associés aux polysomes, bien que la protéine ne soit plus synthétisée [Berry *et al*, 1988]. Ces situations extrêmes ne sont pas les seules, et des modifications moins "brutales" de l'activité *élongationnelle* ont été souvent décrites [Ryazanov *et al*, 1991]. Bien qu'en théorie ces régulations pourraient toucher la concentration ou la modification de tous les facteurs concernés (tRNA, tRNA synthétases, ...), il semble en fait que les *facteurs d'élongation* soient la première cible de ces régulations [Ryazanov *et al*, 1991]. Par exemple, l'activité du facteur EF-2 d'une variété d'organisme est modulée par phosphorylation [Carlberg *et al*, 1990; Celis *et al*, 1990; Ryazanov *et al*, 1988 et Ryazanov et Spirin, 1990], et l'activité de EF-1 α est stimulée après phosphorylation [Venema *et al*, 1991]. Le facteur EF-Tu de *E.coli* est quant à lui méthylé en l'absence d'éléments nutritifs, et celui de l'euglène est également méthylable *in vivo* [Young et Bernlohr, 1991; Toledo et Jerez, 1990]. Chez les plantes, il a été confirmé que l'âge des tissus est en relation avec un déclin d'activité de EF-1 α , et que les activités les plus fortes du facteur se retrouvent dans les tissus les plus métaboliquement actifs [Ursin *et al*, 1991]. Ces expériences démontrent qu'une régulation de l'élongation est donc un phénomène important (notamment chez les plantes), et que le contrôle global des taux de traduction pourrait s'effectuer dans certains cas *via* la modification covalente des facteurs d'élongation. Il serait ainsi peut-être intéressant de suivre les modifications du facteur Tu à différents stades développementaux du soja.

La migration des facteurs d'élongation du chloroplaste vers le noyau fait songer à un autre type de régulation que la modification covalente: il est connu que la concentration en facteur Tu modifie les vitesses d'élongation (50% de facteurs en moins est associé à une diminution des taux de doublement de dix fois chez *E.coli*) [Moldave, 1985; Kurland, 1991], et il est donc possible que le contrôle des taux généraux de protéosynthèse puisse s'effectuer directement par le contrôle de la production du facteur, comme il été fortement suggéré dans le tabac pour EF-1 α [Ursin *et al*, 1991]. Dans le cas des étioplastes, un faible taux en facteurs Tu, associé à une vitesse d'élongation particulièrement lente, pourrait rendre compte de la présence des polysomes [Klein, 1991], et préserverait les ARNm d'une dégradation enzymatique [Ryazanov *et al*, 1991]. Le fait que le facteur Tu, qui serait *indispensable à sa propre production*, soit synthétisé par une machinerie indépendante (le complexe protéosynthétique cytoplasmique), permettrait même la mise en place d'un système "on/off" pour toute l'élongation de la protéosynthèse chloroplastique: la rapide explosion des taux de traduction après illumination montre que le gros de la machinerie protéosynthétique est "prête", et que la synthèse protéique n'attend qu'un "signal" cytoplasmique [Klein, 1991, dans le cas de l'orge]; notre hypothèse suggère que, plutôt que d'attendre un "signal", l'arrivée massive du facteur Tu décuple le niveau très bas de traduction, et permet à la protéosynthèse de passer d'un stade "latent" à un stade "actif".

Si le transfert des facteurs d'élongation vers le noyau permet réellement le contrôle de la protéosynthèse chloroplastique par le contrôle des taux des facteurs, la question est de savoir si ce type de mécanisme est réellement utilisé, et à quels stades. Plus spécifiquement, l'absence d'ARNm tuf détectables à l'obscurité et leur forte présence à la lumière permet de se demander si la synthèse du facteur EF-Tu dans le cytoplasme sert effectivement d'amorce pour démarrer la protéosynthèse chloroplastique.

La réponse est qu'actuellement, très peu d'évidences ont été reportées à ce sujet. Remarquons cependant que le premier facteur ayant peut-être été utilisé dans un tel but est assurément le facteur EF-Ts, qui a été le premier à disparaître des génomes chloroplastiques des algues unicellulaires [Fox *et al*, 1980]. Chez *Chlamydomonas*, la synthèse du facteur EF-Tu précède la synthèse des protéines produites dans le chloroplaste, et Boschetti et ses collaborateurs [Breidenbach *et al*, 1990] suggèrent que l'abondance du facteur EF-Tu puisse jouer un rôle important dans l'activité protéosynthétique. Le fait que le gène tuf de *Chlamydomonas* soit chloroplastique laisse penser que le facteur puisse jouer un rôle encore plus important chez les plantes supérieures. Bien qu'il ait été démontré que l'expression du facteur EF-1 α pouvait être limitante pour la traduction dans le tabac [Ursin *et al*, 1991], il n'existe à notre connaissance aucune preuve directe d'un rôle similaire pour EF-Tu dans les chloroplastes. Remarquons cependant que chez les dicots, l'activité traductionnelle des étioplastes est au moins deux fois inférieure à celle des chloroplastes, à *quantités d'ARN égales* [Reger *et al*, 1972]. De plus, un

homogénat de plantes poussées à l'obscurité n'inhibe pas la traduction des chloroplastes [Drum et Margulies,1970]. Or le rapport ARNr/ARNm dans les étioplastés semble bien supérieur à celui dans les chloroplastes, comme il a été reporté plus récemment pour l'épinard [Deng et Gruissem,1987], et il a été montré de plus que la mesure des ARNr représente directement la quantité des ribosomes [Fish et Jagendorf,1980]. Dans ces conditions, la conclusion est que l'"activité" des ribosomes des étioplastés est très fortement diminuée, comme il a été déjà suggéré pour l'orge [Klein et Mullet,1987] (les auteurs parlent ici "de facteurs inconnus qui limitent la traduction"). Notons encore une fois le paradoxe entre les ARNr des plastides qui sont déjà extrêmement abondants à l'obscurité [Deng et Gruissem,1987, pour l'épinard], de même que les ARNm pour toutes les protéines ribosomiques testées [Bisanz-Seyer *et al*,1989], et l'absence d'ARNm tuf (cf III.8). Il serait donc intéressant de déterminer si l'activité diminuée des ribosomes des étioplastés à quelque chose à voir avec la concentration en EF-Tu. Il est cependant clair que cette éventuelle régulation, même si elle est potentiellement importante, n'est qu'un élément de tout un système de contrôle. Par exemple, les résultats de Bisanz-Seyer *et al* [1989] suggèrent chez l'épinard une régulation de la *formation* des ribosomes, qui seraient à certains stades privés de certaines protéines (par exemple les protéines CS-S4 et CS-S5 qui sont présentes pendant l'imbibition des graines, et semblent très peu abondantes pendant la germination avant de réapparaître après illumination); d'autres protéines sont par contre graduellement exprimées d'un stade à l'autre (par exemple les protéines CS-S8, CS-S23, CS-L4, CS-L15 et CS-L18).

Dans un autre ordre d'idées, remarquons que trois différentes formes du facteur EF-1 α ont été associées à différents stades développementaux chez la xenope [Djé *et al*,1990; Coppard *et al*,1991]; chez la drosophile, il existe deux facteurs EF-1 α , dont l'un est exprimé préférentiellement dans les stades "pupaux", alors que l'autre semble constitutif [Hovemann *et al*,1988]. Dans le tabac, l'un des gènes tuf semble également constitutif, alors que l'autre est exprimé surtout dans les racines [Murayama *et al*,1991]. Ces résultats montrent que les facteurs eEF-1 α et EF-Tu semblent étroitement liés au développement. Comme les changements dans les taux d'élongation modifient l'expression de différentes manières (stimulation de la traduction des gènes normalement peu exprimés par rapport à l'ensemble des ARNm, effets sur la stabilité des ARNm, élimination des protéines labiles de "courtes demi-vies" [Ryazanov *et al*,1991]), ces changements peuvent être utilisés pour moduler l'activité protéosynthétique. Les gènes tuf du soja semblent se regrouper dans deux familles passablement divergentes, il se pourrait que ces familles puissent être utilisées à des stades spécifiques du développement du chloroplaste, ou pourquoi pas, utilisées différenciellement lors des différenciations des étioplastés en chloroplastes, chromoplastes, amyloplastés, ... (cf IV.1).

Finalement, et pour conclure, certains gènes importants pour le développement du chloroplaste ont été caractérisés, comme par exemple les mutants *ijobab* et *chloroplast mutator* dans le maïs [Taylor,1989]. Les auteurs soulignent cependant la difficulté à isoler et étudier de "vraies" déficiences du *développement* du chloroplaste. La construction de plantes transgéniques produisant des ARN-antisens aux ARNm tuf pourrait ajouter un élément supplémentaire aux deux mutants décrits. En fait, cette étude pourrait prendre toute son importance pour différencier l'éventuel rôle des deux facteurs EF-Tu dans le développement des plastides: les gènes tuf semblent en effet particulièrement bien adaptés pour ces expériences, car les grandes divergences entre les séquences codant pour les peptides de transits [Murayama *et al*,1991] devraient réellement permettre d'inhiber très spécifiquement la production de chaque (famille de) facteurs.

REFERENCES

- Aguilar, F. (1990). Structural and functional analysis of nuclear genes coding for the elongation factor eEF-1 α (*Glycine max*) and the chloroplast specific thioredoxin *f* (*Spinacea oleracea*). Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel.
- An, G. and Friesen, J.D. (1980). The nucleotide sequence of *tufB* and four nearby tRNA structural genes of *Escherichia coli*. *Gene* 12, 33.
- Arai, K., Clark, B.F.C., Duffy, L., Jones, M.D., Kaziro, Y., Laursen, R.A., L'Italien, J., Miller, D.L., Nagarkatti, S., Nakamura, S., Nielsen, K.M., Petersen, T.E., Takahashi, K., and Wade, M. (1980). Primary structure of elongation factor Tu from *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 77,1326.
- Baldacci, G., Guinet, F., Tillit, J., Zaccai, G., and Recondo, A.-M. (1990). Functional implications related to the gene structure of the elongation factor EF-Tu from *Halobacterium marismortui*. *Nucl.Acids Res.* 18, 507.
- Baldauf, S.L., Manhart, J.R., and Palmer, J.D. (1990). Different fates of the chloroplast *tufA* gene following its transfer to the nucleus in green algae. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 5317.
- Baldauf, S.L. and Palmer, J.D. (1990). Evolutionary transfer of the chloroplast *tufA* gene to the nucleus. *Nature* 344, 262.
- Beck, E., Forss, S., Strebel, K., Cattaneo, R., and Fell, G. (1983). Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucl.Acids Res.* 11, 7873.
- Berry, J.O., Carr, J.P., and Klessig, D.F. (1988). mRNAs encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase remain bound to polysomes but are not translated in amaranth seedlings transferred to darkness. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85, 4190.
- Berry, J.O., Breiding, D.E., and Klessig, D.F. (1990). Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledons. *Plant Cell* 2, 795.
- Berry-Lowe, S. L., Mc Knight, T. D., Shah D. M., and Meagher, R. B. (1982). The nucleotide sequence, expression, and evolution of one member of a multigene family encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in soybean. *J.Mol.Applied.Gene* 1, 483.
- Bisanz-Seyer, C., Li, Y.-F., Seyer, P., and Mache, R. (1989). The components of the plastid ribosome are not accumulated synchronously during the early development of spinach plants. *Plant Mol.Biol.* 12, 201.
- Blumenthal, T., and Thomes, J. (1988). *Cis* and *trans* messenger RNA splicing in *C.elegans*. *Trends.Genet.* 4, 305.
- Bourne H. R., Sanders D. A., and Mc Cormick (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117.
- Breidenbach, E., Leu, S., Michaels, A., and Boschetti, A. (1990). Synthesis of EF-Tu and distribution of its mRNA between stroma and thylakoids during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct.Expression* 1048, 209.
- Breitenberger, C. A., Graves, M. C., and Spremulli, L. L. (1979). Evidence for the nuclear location of the gene for chloroplast elongation factor G. *Arch.Biochem.Biophys.* 194, 265.

Brinkmann, H., Martinez, P., Quigley, F., Martin, W., and Cerff, R. (1987). Endosymbiotic origin and codon bias of the nuclear gene for the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *J.Mol.Evol.* 26, 320.

Brown, J.W.S. (1986). A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from higher plant introns. *Nucl.Acids Res.* 14, 9549.

Browning, K.S., Lax, S.R., Humphreys, J., Ravel, J.M., Jobling, S.A., and Gehrke, L. (1988). Evidence that the 5' untranslated leader of mRNA affects the requirement for wheat germ initiation factors 4A, 4F and 4G. *J.Biol.Chem.* 263, 9630.

Browning, K.S., Humphreys, J., Hobbs, W., Smith, G.B., and Ravel, J.M. (1990). Determination of the amounts of the protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ. *J.Biol.Chem.* 265, 17967.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987). XL-1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376.

Butarelli, F.R., Calogero, R.A., Tiboni, O., Gualerzi, C.O., and Pon, C.L. (1989). Characterization of the *str* operon genes from *Spirulina platensis* and their evolutionary relationship to those of procaryotes. *Mol.Gen.Genet.* 217, 97.

Carlberg, U., Nilsson, A., and Nygård, O. (1990). Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *Eur.J.Biochem.* 191, 639.

Celis, J.E., Madsen, P., and Ryazanov, A.G. (1990). Increased phosphorylation of elongation factor 2 during mitosis in transformed human amnion cells correlates with a decreased rate of protein synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 4231.

Cenatiempo, Y., Deville, F., Dondon, J., Grunberg-Manago, M., Sacerdot, C. et al (1987). The protein synthesis initiation factor 2 G-domain. Study of a functionally active C-terminal 65 Kd fragment from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 5070.

Clark, B.F.C., Kjeldgaard, M., La Cour, T.F.M., Thirup, S., and Nyborg, J. (1990). Structural determination of the functional sites of *E. coli* elongation factor Tu. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct.Expression* 1050, 203.

Collado-Vides J., Magasanik B., and Gralla J. D. (1991). Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55, 371.

Coppard, N. J., Poulsen, K., Madsen, H. O., Frydenberg, J., and Clark, B. F.C. (1991). 42Sp48 in premitellogenic *Xenopus* oocytes is structurally homologous to EF-1 α and may be a stage specific elongation factor. *J.Cell Biol.* 112, 237.

Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C., and Chua, N.-M. (1984). Tissue specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3, 1671.

Davison, B.L., Egly, J.-M., Mulvihill, E.R., and Chambon, P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eucaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* 301, 680.

Dean C., Tamaki, T., Dunsmuir P.M, Favreau M., Katayama C., Dooner H., and Bedbrook, J. (1986). mRNA transcript of several plant genes are polyadenylated at multiple sites in vivo. *Nucl.Acids Res.* 14, 2229.

- Deng, X. W., Stern, D. B., Tonkyn, J. C., and Gruissem, W. (1987). Plastid run-on transcription. *J.Biol.Chem.* 262, 9641.
- Deng, X. W., and Gruissem, W. (1987). Control of plastid gene expression during development: The limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49, 379.
- Dever, T. E., Glynias, M. J., and Merrick, W. (1987). GTP-binding domain: Three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84, 1814.
- Devereux, J.R., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of Sequence Analysis Programs for the VAX. *Nucl.Acids Res.* 12, 387.
- Djé, M. K., Mazabraud, A., Viel, A., Le Maire, M., Denis, H. Crawford, E., and Brown, D. D. (1990). Three genes under different developmental control encode elongation factor 1- α in *Xenopus laevis*. *Nucl.Acids Res.* 18, 3489.
- Drum, H.E., and Margulies, M.M. (1970). *in vitro* protein synthesis by plastids of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 45, 435.
- Eckenrode, V.K., Arnold, J., and Meagher, R.B. (1985). Comparison of the nucleotide sequence of soybean 18S rRNA with the sequences of other small-subunit rRNAs. *J.Mol.Evol.* 21, 259.
- Ellis, R. J. (1977). Protein synthesis by isolated chloroplasts. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct.Expression* 463, 185.
- Facciotti, D., O'Neel, J. K., Lee, S., and Shewmaker, C. K. (1985). Light-inducible expression of a chimaeric gene in soybean tissue transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology* 3, 241.
- Fish, L., and Jagendorf, A.T. (1980). A method for enzymic extraction and the measurement of chloroplast rRNA. *Plant Physiol.* 65, 746.
- Fluhr R., Kuhlemeier C., Nagy F., and Chua N.-H. (1986). Organ-specific and light-induced expression of plant genes. *Science* 232, 1106.
- Ford, K., Fox, K.R., Neidle, S., Waring, M.J. (1987). DNA sequence preference for an intercalating porphyrin compound revealed by footprinting. *Nucl.Acids Res.* 15, 2221
- Fox, L., Erion, J., Tarnowsky, J., Spremulli, L., Brot, N., and Weissbach, H. (1980). *Euglena gracilis* chloroplast EF-Ts. *J.Biol.Chem.* 255, 6018.
- Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A., and Murray, N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J.Mol.Biol.* 170, 827.
- Furano, A.V. (1975). Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 72, 4780.
- Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C., and Wilson, T. M. (1987). The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucl.Acids Res.* 15, 3257.
- Gallie, D. R., Walbot V., and Hershey W. B. (1988). The ribosomal fraction mediates the translational enhancement associated with the 5' leader of tobacco mosaic virus. *Nucl.Acids Res.* 16, 8675.

- Gallie, D. R., Lucas, W. L., and Walbot V. (1989). Visualising mRNA expression in plant protoplasts: Factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* 1, 301.
- Gilmartin, P.M. and Chua, N.-H. (1990). Spacing between GT-1 binding sites within a light-responsive element is critical for transcriptional activity. *Plant Cell* 2, 447.
- Gordon, J. (1968). A stepwise reaction yielding a complex between a supernatant fraction from *Escherichia coli*, guanosine 5'triphosphate, and aminoacyl-tRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 59, 179.
- Gouy, M. and Gauthier, C. (1982). Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucl.Acids Res.* 10, 7055.
- Gralla J. D. (1991). Transcriptional control: lessons from an *E.coli* promoter data base. *Cell* 66, 415.
- Granbastien M. A., Berry-Lowe S., Shirley B. W., and Meagher R. B. (1986). Two soybean ribulose 1,5 biphosphate carboxylase small subunit genes share extensive homology even in distant flanking sequences. *Plant Mol. Biol.* 7, 451.
- Green J. P., Kay, S.A., and Chua N.-M. (1987). Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J.* 6, 2543.
- Gruissem, W. (1989). Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. *Cell* 56, 161.
- Gualberto, J.M., Weil, J.-H., and Grienenberger, J.-M. (1990). Editing of the wheat *coxIII* transcript: Evidence for twelve C to U and one U to C conversions and for sequence similarities around editing sites. *Nucl.Acids Res.* 18, 3771.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. in *DNA cloning*, volume I (Glover, D.M. éd), pp 109-136, IRL Press.
- Herrera-Estrella, L., van den Broeck, G., Maenhaut, R., van Montagu, M., Schell, J. et al. (1984). Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced in *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector. *Nature* 310, 115.
- Herrmann R. G., Westhoff P., Alt J., Titgen J., and Nelson N. (1985). In: van Vloten-Doting, L., van Groot, G.S.P., and Hall, T.C., eds. *Molecular form and function of the plant genome*. (New York: Plenum Press), 233.
- Hiatt, W.R., Garcia, R., Merrick, W.C., and Sypherd, P.S. (1982). Methylation of elongation factor 1 α from the fungus *Mucor*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 79, 3433.
- Hovemann, B., Richter, S., Walldorf, U., and Cziepluch, C. (1988). Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 α (EF-1 α) in *drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucl.Acids Res.* 16, 3175.
- Hoch, B., Maier, R.M., Appel, K., Igloi, G.L., and Kössel, H. (1991). Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature* 353, 178.
- Huynh, T.V., Young, R.A., and Davis, R.W. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in lambda gt10 and lambda gt11. in *DNA cloning*, volume I (Glover, D.M. éd), pp 49-78, IRL Press.
- Hwang, Y.-W., Sancher, A., and Miller, D.L. (1989). Mutagenesis of bacterial elongation factor Tu at lysine 136. *J.Biol.Chem.* 264, 8304.

- Jacquet, E., and Parmeggiani, A. (1988). Structure-function relationship in the GTP binding domain of EF-Tu: mutation of Val 20, the residue homologous to position 12 in p21. *EMBO J.* 9, 2861.
- Jobling, S. A., and Gehrke, L. (1987). Enhanced translation of chimaeric mRNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature* 325, 622.
- Johnson, C.H., Kruff, V., and Subramanian, A.R. (1990). Identification of a plastid-specific ribosomal protein in the 30 S subunit of chloroplast ribosomes and isolation of the cDNA clone encoding its cytoplasmic precursor. *J.Biol.Chem.* 265, 12790.
- Johnson, P.F., and McNight, S.L. (1989). Eucaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann.Rev.Biochem.* 58, 799.
- Jonak, J., Petersen, T.E., Meloun, B., Rychlik, I. (1984). Histine residues in elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli* protected by aminoacyl-tRNA against photo-oxidation. *Eur.J.Biochem.* 144, 295.
- Jukes, T.H., and Bhushan, V. (1986). Silent nucleotides substitutions and G+C content of some mitochondrial and bacterial genes. *J.Mol.Evol.* 24, 39.
- Jurnak, F. (1985). Structure of the GDP domain of EF-Tu from *Escherichia coli* and location of the amino acids homologous to *ras* oncogene proteins. *Science* 230, 32.
- Jurnak, F., Heffron, S., Schick, B., and Delaria, K. (1990). Three-dimensional models of the GDP and GTP forms of the guanine nucleotide domain of *Escherichia coli* elongation factor Tu. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expression* 1050, 209.
- Kaminsky, A., Howell, M.T., and Jackson, R.J. (1990). Initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation: the authentic initiation site is not selected by a scanning mechanism. *EMBO J.* 9, 3753.
- Keegstra K. (1989). Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* 56, 247.
- Keegstra, K., and Olsen, L.J. (1989). Chloroplastic precursors and their transport across envelope membranes. *Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 40, 471.
- Kitamura, N., Semler, B.L. *et al* (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 291, 547.
- Klein R.R., and Mullet J.E. (1987). Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. *J.Biol.Chem.* 262, 4341.
- Klein R.R., Mason, H.S. and Mullet J.E. (1988). Light regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J.Cell.Biol.* 106, 289.
- Klein, R.R. (1991). Regulation of light-induced chloroplast transcription and translation in eight-day-old dark-grown barley seedlings. *Plant Physiol.* 97, 335.
- Kozack, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eucaryotic ribosomes. *Nucl.Acids Res.* 9, 5233.
- Kraus M., Götz M., and Löffelhardt W. (1990). The cyanelle *str* operon from *Cyanophora paradoxa*: Sequence analysis and phylogenetic implications. *Plant Mol.Biol.* 15, 561.

- Kuhlemeier C., Green P. J., Chua N.-M. (1987). Regulation of gene expression in higher plants. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 38, 221.
- Kurland, C. G. (1977). Aspects of ribosome structure and function. in *Molecular mechanism of protein biosynthesis* (Weissbach, H., and Pestka, S. eds), pp 81-116, Academic Press.
- Kurland, C. G. (1991). Codon bias and gene expression. *FEBS Lett.* 285, 165.
- Kushel, M. Non publié, réf. dans Baldauf et Palmer, 1990
- La Cour, T.F.M., Nyborg, J., Thirup, S., and Clark, B.F.C. (1985). Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *Escherichia coli* as studied by X-ray crystallography. *EMBO J.* 4, 2385.
- Ladefoged, S. A., and Christiansen, G. (1991). Analysis of the nucleotide sequence of the *Mycoplasma hominis* *tuf* gene and its flanking region. *FEMS Lett.* 79, 133.
- Lam E., and Chua N.-M., (1990). GT-1 binding sites confers light responsive expression in transgenic tobacco. *Science* 248, 471.
- Lechner, K., and Böck, A. (1987). Cloning and nucleotide sequence of the gene for an archebacterial protein synthesis elongation factor Tu. *Mol.Gen.Genet.* 208, 523.
- Ludwig, W., Wallner, G., Tesch, A., and Klink, F. (1991). A novel eubacterium phylum: comparative nucleotide sequence of analysis of a *tuf*-gene of *Flexistipes sinusarabici*. *FEMS Lett.* 78, 139.
- Macejak D. G., and Sarnow P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353, 90.
- McCornick, F., Clark, B.F.C, La Cour, T.F.M., Kjeldgaard, M., Norskov-Lauritsen, L., and Nyborg, J. (1985). A model for the tertiary structure of p21, the product of the *ras* oncogene. *Science* 230, 78.
- McGarry, T.J., and Lindquist, S. (1985). The preferential translation of drosophila hsp70 mRNA requires sequences in the untranslated leader. *Cell* 42, 903
- Madsen, H.O., Poulsen, K., Dahl, O., Clark, B.F.C., and Hjorth, J.P. (1990). Retropseudogenes constitute the major part of the human elongation factor EF-1 α in gene family. *Nucl.Acids Res.* 18, 1513.
- Maniatis, T., Fritsh, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Marcus, F., Moberly, L., and Latshaw, S. P. (1988). Comparative amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphatases: Identification of a region unique to the light-regulated chloroplast enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85, 5379.
- Meng B. Y., Shinozaki K., and Sugiara M. (1989). Genes for the ribosomal proteins S12 and S7 and elongation factors EF-G and EF-Tu of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*: Structural homology between 16S rRNA and S7 mRNA. *Mol.Gen.Genet.* 216, 25.
- Meyerowitz E. M., and Pruitt R. E. (1985). *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* 229, 1214.
- Moldave, K. (1985). Eucaryotic protein synthesis. *Ann.Rev.Biochem.* 54, 1109.

- Möller, W., Schipper, A., and Amons, R. (1987). A conserved amino acid sequence around Arg⁶⁸ of *Artemia* elongation factor 1 α is involved in the binding of guanine nucleotides and aminoacyl tRNAs. *Biochimie* 69, 983.
- Montandon, P.-E., and Stutz, E. (1983). Nucleotide sequence of a *Euglena gracilis* chloroplast genome region coding for the elongation factor Tu; evidence for a split mRNA. *Nucl.Acids Res.* 17, 477.
- Morden, C.W., Wolfe, K.H., de Pamphilis, C.W., and Palmer, J.D. (1991). Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudogenes. *EMBO J.* 10, 3281.
- Morelli G., Nagy F., Fraley R. T., Rogers S. G., and Chua N.-M. (1985). A short conserved sequence is involved in the light inducibility of a gene encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit of pea. *Nature* 315, 200.
- Moss, T. (1983). A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in *Xenopus laevis*. *Nature* 302, 223.
- Mullet, J. E., and Klein, R. R. (1987). Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.* 6, 1571.
- Mullet J. E. (1988). Chloroplast development and gene expression. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 39, 475.
- Murray, E.E., Lotzer, J., and Eberle, M. (1989). Codon usage in plant genes. *Nucl.Acids Res.* 17, 477.
- Murayama, Y., Matsubayashi, T., Sugita, M., and Sugiura, M. (1991). Two nuclear genes coding for chloroplast EF-Tu of tobacco. in *The international society for plant molecular biology, third international congress: Molecular biology of plant growth and development* (Hallick, R.B., ed), poster abstract 1949. Tucson, Arizona.
- Nagata S., Tsunetsugu-Yokota Y., Naito A., and Kaziro Y. (1983). Molecular cloning and sequence determination of the nuclear gene coding for mitochondrial elongation factor Tu of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 80, 6192.
- Nagy, F., Morelli, G., Fraley, R.T., Rogers, S.G., and Chua, N.H. (1985). Photoregulated expression of a pea *rbcS* gene in leaves of transgenic plants. *EMBO J.* 4, 3063.
- Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H., and Akazawa, T. (1988a). DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cell. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85, 4750.
- Ngernprasirtsiri, J., Macherel, D., Kobayashi, H., and Akazawa, T. (1988b). Expression of amyloplast and chloroplast DNA in suspension-cultured cell of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Plant Physiol.* 86, 137.
- Nivison, H.T., and Stocking, C.R. (1983). Ribulose bisphosphate carboxylase synthesis in barley leaves. *Plant Physiol.* 73, 906.
- Nygård, O. and Nilsson, L. (1990). Translational dynamics: Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. *Eur.J.Biochem.* 191, 1.
- Ofengang, J. (1977). tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases. in *Molecular mechanism of protein biosynthesis* (Weissbach, H., and Pestka, S. eds), pp 8-80, Academic Press.

Ohto, C., Torozawa, K., Tanaka, M., Shinozaki, K., and Sugiura, M. (1988). Transcription of ten ribosomal protein genes from tobacco chloroplast: a compilation of ribosomal protein genes found in the tobacco chloroplast genome. *Plant Mol.Biol.* 11, 589.

Ohyama, K., Fukuzama, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., et al. (1986). Chloroplast gene organisation deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572.

Oliver, J.L., Marin, A., and Martinez-Zapater, J.M. (1990). Chloroplast genes transferred to the nuclear plant genome have adjusted to nuclear base composition and codon usage. *Nucl.Acids Res.* 18, 65.

Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J., and Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the *ras* oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 341, 209.

Parmeggiani, A., and Swart, G.W.M (1985). Mechanism of action of kirromycin-like antibiotics. *Ann.Rev.Microbiol.* 39, 557.

Pestka, S. (1977). Inhibitors of protein synthesis. in *Molecular mechanism of protein biosynthesis* (Weissbach, H., and Petska, S. eds), pp 468-555, Academic Press, NY.

Pestova, T. V., Hellen, C.U.T., and Wimmer, E. (1991). Translation of poliovirus RNA: role of an essential *cis*-acting oligopyrimidine element within the 5' nontranslated region and involvement of a cellular 57-kilodalton protein. *J.Virol.* 65, 6194.

Phua S. H., Srinivasa B. R., and Subramanian A. R. (1989). Chloroplast ribosomal protein L13 is encoded in the nucleus and is considerably larger than its bacterial homologue. *J.Biol.Chem.* 264, 1968.

Piechulla, B., Pichersky, E., Cashmore A.R., Gruissem, W. (1986). Expression of nuclear and plastid genes for photosynthesis-specific proteins during tomato fruit development and ripening. *Plant Mol.Biol.* 7, 367.

Pingoud, A., Gast, F.-U., and Peters, F. (1990). The influence of the concentrations of elongation factors and tRNAs on the dynamics and accuracy of protein biosynthesis. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct.Expression* 1050, 252.

Proudfoot N. (1991). Poly(A) signals. *Cell* 64, 671.

Reger, B.J., Smillie, R.M., and Fuller, R.C. (1972). Protein synthesis by isolated etioplasts and chloroplasts from pea and wheat and the effects of chloramphenicol and cycloheximide. *Plant Physiol.* 50, 19.

Reshetnikova, L.S., Reiser, C.O.A., Schirmer, N.K., Berchtold, H., Storm, R., Hilgenfeld, R., and Sprinzl, M., (1991). Crystals of intact elongation factor Tu from *Thermus thermophilus* diffracting to high resolution, *J.Mol.Biol.* 221, 375.

Rinke-Appel, J., Jünke, N., Stade, K., and Brimacombe, R. (1991). The path of the mRNA through the *Escherichia coli* ribosome; site-directed cross-linking of mRNA analogues carrying a photo-reactive label at various points 3' to the decoding site. *EMBO J.* 10, 2195.

Rodermel, S. R., Abbott, M. S., and Bogorad, L. (1988). Nuclear-organelle interactions: Nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell* 55, 673

- Ryazanov, A.G., Rudkin, B.B., and Spirin, A.S. (1991). Regulation of protein synthesis at the elongation stage: New insights into the control of gene expression in eukaryotes. *FEBS Lett.* 285, 170.
- Ryazanov, A. G., Shestakova, E. A., and Natapov, P. G. (1988). Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature* 334, 170.
- Ryazanov, A.G. and Spirin, A.S. (1990). Phosphorylation of elongation factor 2: A key mechanism regulating gene expression in vertebrates. *New Biologist* 2, 843.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Satoh, M., Tanaka, T., Kushiro, A., Hakoshima, T., and Tomita, K. (1991). Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the *tufB* gene encoding elongation factor Tu from *Thermus thermophilus* HB8. *FEBS Lett.* 288, 98.
- Serghini, M.A., Ritzenthaler, C., and Pinck, L. (1989). A rapid and efficient "miniprep" for isolation of plasmid DNA. *Nucl.Acids Res.* 17, 3604.
- Severinov, K.V., Melnikova, E.G., and Ryazanov, A.G. (1990). Downregulation of the translation elongation factor 2 kinase in *Xenopus laevis* oocytes at the final stages of oogenesis. *New Biologist* 2, 887.
- Sharp, P.M. and Li, W.-H. (1986). Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for "rare" codons. *Nucl.Acids Res.* 14, 7737
- Shimada, H. and Sugiura, M. (1991). Fine structural features of the chloroplast genome: Comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucl.Acids Res.* 19, 983.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., et al (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5, 2043.
- Shure, M., Wessler, S., and Federoff, N. (1983). Molecular identification and isolation of the waxi locus in maize. *Cell* 35, 225.
- Siemeister, G., Buchholz, C., and Hachtel, W. (1990). Genes for the plastid elongation factor Tu and ribosomal protein S7 and six tRNA genes on the 73 kb DNA from *Astasia longa* that resembles the chloroplast DNA of *Euglena*. *Mol.Gen.Genet.* 220, 425.
- Smooker, P.M., Choli, T., and Subramanian, A.R. (1990). Ribosomal protein L35: Identification in spinach chloroplasts and isolation of a cDNA clone encoding its cytoplasmic precursor. *Biochemistry* 29, 9733.
- Smooker, P.M., Kruff, V., and Subramanian, A.R. (1990). A ribosomal protein is encoded in the chloroplast DNA in a lower plant but in the nucleus in angiosperms. Isolation of the spinach L21 protein and cDNA clone with transit and an unusual repeat sequence. *J.Biol.Chem.* 265, 16699.
- Sonenberg, N., Guertin, D., Cleveland, D., and Trachsel, H. (1981). Probing the function of the eucaryotic 5' cap structure by using a monoclonal antibody directed against cap-binding proteins. *Cell* 27, 563.
- Stragier, P., Parsot, C., and Bouvier, J. (1985). Two functional domains in major and alternate bacterial sigma factors. *FEBS Lett.* 187, 11.

- Stratagene (1988). pBluescriptII exo/mung DNA sequencing system; et: DSK ³²P sequencing kit. Stratagene, Technical services.
- Sundstrom, P., Smith, D., and Sypherd, P.S. (1990). Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 α from the dimorphic yeast *Candida albicans*. *J.Bacteriol.* 172, 2036.
- Taylor W. C. (1989). Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 40, 211.
- Tessier, L.-H., Keller, M., Chan, R.L., Fournier, R., Weil, J.-H., and Imbault, P. (1991). Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by *trans*-splicing in *Euglena*. *EMBO J.* 10, 2621.
- Thompson, W.F., Everett, M., Polans, N.O., Jorgensen, R.A., and Palmer J.D. (1983). Phytochrome control of RNA levels in developing pea and mung-bean leaves. *Planta* 158, 487.
- Thompson R. C., Dix D. B., and Karim A. M. (1986). The reaction of ribosomes with elongation factor Tu-GTP complexes. *J.Biol.Chem.* 262, 4868.
- Thompson, D.M. and Meagher, R.B. (1990). Transcriptional and post-transcriptional processes regulate expression of RNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase differently in petunia and in soybean. *Nucl.Acids Res.* 18, 3621.
- Thompson, W.F. and White, M.J. (1991). Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 42, 423.
- Tiboni O., di Pasquale G., and Ciferri O. (1978). Purification of the elongation factors present in spinach chloroplasts. *Eur.J.Biochem.* 92, 471.
- Toledo, H. and Jerez, C.A. (1990). *In vivo* and *in vitro* methylation of the elongation factor EF-Tu from *Euglena gracilis* chloroplast. *FEMS Lett.* 71, 241.
- Uhlenbeck, O.C., Baker, J., and Doty, P. (1975). Complementary oligonucleotide binding of the anticodon loop of fMet transfert RNA. *Nature* 225, 208.
- Ursin, V.M., Irvine, J.M., Hiatt, W.R., and Shewmaker, C.K. (1991). Developmental analysis of elongation factor-1 α expression in transgenic tobacco. *Plant Cell* 3, 583.
- Valencia, A., Kjeldgaard, M., Pai, E.F., and Sander, C. (1991). GTPase domains of ras p21 oncogene protein and elongation factor Tu: Analysis of three-dimensional structures, sequence families, and functional sites. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88, 5443.
- Van Grinsven M. Q. J. M., and Kool A. J. (1988). Plastid gene regulation during development: an intriguing complexity of mechanisms. *Plant Mol.Biol.Rep.* 6, 213.
- Van Noort, J.M., Kraal, B., Bosch, L., La Cour, T.F.M, Nyborg, J., and Clark, B.F.C. (1984). Cross-linking of tRNA at two different sites of the elongation factor Tu. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81, 3969.
- Venema, R.C., Peters, H.I., and Traugh, J.A. (1991). Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF- 1 activity. *J.Biol.Chem.* 266, 12574.
- Viotti, A., Balducci, C., and Weil, J.H. (1978). Adaptation of the tRNA population of maize endosperm for zein synthesis. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct.Expression* 517, 125.

Vodkin, L.O., Rhodes, P.R., and Goldberg, R.B. (1983). cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell* 34, 1023.

von Heijne G., Stepphun J., and Herrmann R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur.J.Biochem.* 180, 535.

Webster, G.C., and Webster, S.L. (1984). Specific disappearance of translatable mRNA for elongation factor one in aging *Drosophila melanogaster*. *Mech.Ageing.Dev.* 24, 335.

Williams, J.G., and Mason, P.J. (1985). Hybridisation in the analysis of RNA. in *Nucleic acids hybridisation* (Hames, B.D. and Higgins, S.J. eds), pp 139-160, IRL Press.

Williams, M.E., Mundy, J., Kay, S.A., and Chua, N.-H. (1990). Differential expression of two related organ-specific genes in pea. *Plant Mol.Biol.* 14, 765.

Yamamoto, T., Suyama, A., Mori, N., Yokota, T., and Wada, A. (1985). Gene expression in the polycistronic operons of *E.coli* heat-labile toxin and cholera toxin: a new model of translational control. *FEBS Lett.* 181, 377.

Yogev, D., Sela, S., Bercovier, H., and Razin, S. (1990). Nucleotide sequence and codon usage of the elongation factor Tu (EF-Tu) gene from *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol.Microbiol* 4, 1308.

Young, R.A., and Davies, R.W. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80, 1194.

Young, C.C. and Bernlohr, R.W. (1991). Elongation factor Tu is methylated in response to nutrient deprivation in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 173, 3096.

Littérature non citée, en rapport direct avec le sujet:

Abrahams, J.P., Van Raaij, M.J., Ott, G., Kraal, B., and Bosch, L. (1991). Kirromycin drastically reduces the affinity of *Escherichia coli* elongation factor Tu for aminoacyl-tRNA. *Biochemistry* 30, 6705.

Angenon, G., Van Montagu, M., and Depicker, A. (1990). Analysis of the stop codon context in plant nuclear genes. *FEBS Lett.* 271, 144.

Anthony, D.D. and Merrick, W.C. (1991). Eukaryotic initiation factor (eIF)-4F. Implications for a role in internal initiation of translation. *J.Biol.Chem.* 266, 10218.

Archer, E.K. and Keegstra, K. (1990). Current views on chloroplast protein import and hypotheses on the origin of the transport mechanism. *J.Bioenerg.Biomembr.* 22, 789.

Bauerle, C. and Keegstra, K. (1991). Full-length plastocyanin precursor is translocated across isolated thylakoid membranes. *J.Biol.Chem.* 266, 5876.

- Bensch, K., Pieper, U., Ott, G., Schirmer, N., Sprinzl, M., and Pingoud, A. (1991). How many EF-Tu molecules participate in aminoacyl-tRNA binding. *Biochimie* 73, 1045.
- Boschetti, A., Breidenbach, E., and Blättler, R. (1990). Control of protein formation in chloroplasts. *Plant Sci.* 68, 131.
- Davydova, E.K. and Ovchinnikov, L.P. (1990). ADP-ribosylated elongation factor 2 (ADP-ribosyl-EF-2) is unable to promote translocation within the ribosome. *FEBS Lett.* 261, 350.
- Dietz, K. J., and Bogorad, L. (1987). Plastid development in *Pisum sativum* leaves during greening I. A comparison of plastid polypeptide composition and *in organello* translation characteristics. *Plant Physiol.* 85, 808.
- Fejes, E., Pay, A., Kanevsky, I., Szell, M., Adam, E., Kay, S., and Nagy, F. (1990). A 268 bp upstream sequence mediates the circadian clock-regulated transcription of the wheat Cab-1 gene in transgenic plants. *Plant Mol.Biol.* 15, 921.
- Fluhr, R. (1990). Regulation of nuclear genes encoding chloroplast proteins in transgenic plants. *Dev.Genet.* 11, 197.
- Frydenberg, J., Poulsen, K., Petersen, A.K.B., Lund, A., and Olesen, O.F. (1991). Isolation and characterization of the gene encoding EF-1 α O, an elongation factor 1- α expressed during early development of *Xenopus laevis*. *Gene* 109, 185.
- Harmark, K., Cool, R.H., Clark, B.F.C., and Parmeggiani, A. (1990). The functional and structural roles of residues Gln114 and Glu117 in elongation factor Tu. *Eur.J.Biochem.* 194, 731.
- Healy, A.M. and Zitomer, R.S. (1990). A sequence that directs transcriptional initiation in yeast. *Curr.Genet.* 18, 105.
- Ludwig, W., Weizenegger, M., Betzl, D., Leidel, E., Lenz, T., Ludvigsen, A., Möllenhoff, D., Wenzig, P., and Schleifer, K.H. (1990). Complete nucleotide sequences of seven eubacterial genes coding for the elongation factor Tu: Functional, structural and phylogenetic evaluations. *Arch.Microbiol.* 153, 241.
- Lutcke, H.A., Chow, K.C., Michel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F., and Scheele (1987), Selection of AUG initiator codons differs in plants and animals. *EMBO J.* 6, 43.
- Ott, G., Schiesswohl, M., Kiesewetter, S., Förster, C., Arnold, L., Erdmann, V.A., and Sprinzl, M. (1990). Ternary complexes of *Escherichia coli* aminoacyl-tRNAs with the elongation factor Tu and GTP: Thermodynamic and structural studies. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct.Expression* 1050, 222.
- Pieper, U., Ehbrecht, H.-J., Fliess, A., Schick, B., Journak, F., and Pingoud, A. (1990). Genetic engineering, isolation and characterization of a truncated *Escherichia coli* elongation factor Tu comprising domains 2 and 3. *Biochim.Biophys.Acta Gene Struct.Expression* 1087, 147.
- Silk, G. W., and Wu, M. (1988). Darkness and antibiotics increase the steady-state transcript of the elongation factor gene (*tuf*) in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genet.* 14, 119