

Université de Neuchâtel

Faculté des Sciences

**Le génome chloroplastique  
d'*Euglena gracilis*:**

**"Analyse de la région voisine  
à l'origine de répllication,  
et caractérisation préliminaire  
d'une activité DNA polymérasique"**

Thèse de doctorat

**Amparo Monfort, 1990**

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Le génome chloroplastique d'*Euglena gracilis*:  
Analyse de la région voisine à l'origine de  
réplication et caractérisation préliminaire  
d'une activité DNA polymérasique.....

de Mme Amparo Monfort.....

---

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

Messieurs E. Stutz, P. Schürmann et .....

P. Puigdomènech (Barcelone) .....

.....  
autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 1er juin 1990 .....

Le doyen :

  
Cl. Mermod

**A Javier**

## REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué dans le Laboratoire de Biochimie végétale de l'Institut de Botanique de l'Université de Neuchâtel, sous la direction du Professeur E. Stutz.

Je tiens à exprimer particulièrement ma reconnaissance au Professeur E. Stutz pour la confiance et le soutien qu'il m'a accordé tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier également M. le Dr P. Schürmann, pour ses conseils, ainsi que pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie M. le Dr. P. Puigdomènech pour avoir accepté de juger ce travail.

J'aimerais finalement remercier chaleureusement M. le Dr P.E. Montandon, tous les collègues et amis du laboratoire qui m'ont encouragé tout au long de ce travail, spécialement Mme Sophie Marc-Martin qui m'a tant aidé à la rédaction de ce travail.

## RESUME

L'origine de répliation du génome chloroplastique de l'algue *Euglena gracilis* avait été placée dans le fragment Bgl 2 du génome. Ce fragment contient une séquence répétée avec un nombre variable de copies.

L'analyse des 9.1 Kpb d'ADN, séquence voisine à cette origine de répliation, se trouvant entre la région ribosomique et l'origine de répliation, nous a permis de trouver:

- Un gène tRNA Leu (anticodon CAA) probablement monocistronique, qui est transcrit dans le même sens que les gènes ribosomiques. La taille de cet ARN est de 80 b pour l'ARN mature et 790 b pour un ARN précurseur que nous avons identifié. Ces tailles ont été trouvées: par "Northern", par hybridation et dégradation à la nucléase SI, et par "Primer Extension", utilisant de l'ARN chloroplastique total.
- Une homologie de petites séquences entre l'ARN précurseur et l'ARN de la "RNase P RNA" de *E.coli*.
- Une homologie de séquence de 77 % entre le gène de tRNA Leu d'*Euglena gracilis* et les gènes tRNA Leu des plantes supérieures.
- Un ORF, région ouverte à la traduction, de 350 aa. Cet ORF est transcrit avec une taille de 0.9 Kb. Il pourrait coder pour une protéine de taille maximale 41 KDa. Aucune homologie importante avec d'autres protéines connues a été trouvée.
- Des séquences "consensus", ARS, pouvant répliquer le plasmide dans la levure. Ces séquences se trouvent dans une région riche en A-T, 82 %, qui contient beaucoup de séquences répétées de 10 nucléotides. Dans des conditions non dénaturantes, cette région présente un retard de migration.

L'activité DNA polymérasique a été testée dans les chloroplastes d'*Euglena gracilis*. Cette activité est de type  $\alpha$ -like DNA polymerase. "In vitro", elle est active en présence d'ADN activé de thymus de veau.

D'après les différents méthodes utilisées pour la purifier, nous observons que cette activité reste associé à la fraction membranaire chloroplastique.

## ABREVIATIONS

### UNITES PHYSIQUES:

g, mg, $\mu$ g	gramme, milligramme, microgramme.
l, ml, $\mu$ l	litre, millilitre, microlitre.
M, mM	Molaire, millimolaire.
V	Volt.
mA	milliampère.
pb, Kpb	paire de bases, mille paire de bases.
b, Kb	base, mille bases.
$^{\circ}$ C	degré Celsius.
C, $\mu$ Ci	Curie, microcurie.
h.	heure.
min.	minute.

### PRODUITS CHIMIQUES:

BCIG	5-Bromo 4-cloro 3-indoyl $\beta$ -galactosidase.
BrEt.	Bromure d'Ethidium.
DEP	Diethyl pyrocarbonate.
dNTP	desoxyribonucléotides.
DTT	Dithio-threitol.
EDTA	Sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra acétique.
IPTG	isopropyl-B-thio- galactopiranoside.
PEG	Polyéthylène glycol.
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl Fluoride.
POPOP	1,4 Bis(2[5-Phenyl oxazol])-benzene.
PPO	2,5 Diphenyl-oxazol.
SDS	dodécyl-sulfate de sodium.
SSC	Solution standard de citrate.
SSPE	Solution standard de phosphate, EDMA.
TA	tampon acetate.
TBE	tampon borate, EDTA.
TE	tampon tris, EDTA.
Tris	Tris-hydroxyméthyl-aminométhane.
TCA	acide-trichlore-acétique.

### MOLECULES BIOLOGIQUES:

ADN	Acide désoxyribonucléique.
ARN	Acide ribonucléique.
ct	chloroplastique.
t-RNA	ARN de transfert.
DNase	désoxyribonucléase.
ORF	"Open reading frame" région pouvant coder pour une protéine de fonction indéterminée.
ssDNA	salmon sperme DNA.
RNase	ribonucléase.

# TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION GENERAL	1
PREMIERE PARTIE: ANALYSE DE L'ADN DE LA REGION VOISINE A L'ORIGINE DE REPLICATION	4
I. INTRODUCTION	8
II. MATERIEL ET METHODES	8
II. 1. MATERIEL BIOLOGIQUE	8
II. 2. CULTURE D'EUGLENES	8
II. 3. ISOLATION D'ARN CHLOROPLASTIQUE TOTAL	9
II. 4. CLONAGE	9
II. 5. ISOLATION DE PLASMIDES	10
II. 6. ANALYSE DE L'ADN, SEPARATION, ELECTROELUTION	10
II. 7. TRANSFERT D'ADN SUR PAPIER NITROCELLULOSE	12
II. 8. CLONAGE DE SOUS-FRAGMENTS	12
II. 9. ANALYSE DES RECOMBINANTS	13
II.10. SEQUENCAGE DE L'ADN	13
II.10.1. Clonage dans le vecteur M13	14
II.10.2. Réaction de séquence	15
II.11. MARQUAGE DE L'ADN	15
II.11.1. Le marquage des extremités à la Polymérase I, Klenow	15
II.11.2. Le marquage par nick-translation	16
II.11.3. Le marquage d'un ADN simple brin	16
II.11.4. Marquage terminal d'un oligonucléotide	16
II.12. GEL D'ARN, TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE "NORTHERN"	17
II.13. HYBRIDATIONS DES ACIDES NUCLEIQUES	17
II.13.1. Hybridation sur filtre ADN-ADN ou ADN-ARN	17
II.13.2. Hybridation liquide ADN-ARN et traitement à la nuclease SI	18
II.14. PRIMER EXTENSION	20
II.15. ANALYSE DES SEQUENCES A L'ORDINATEUR	21
III. RESULTATS.ANALYSE DU RECOMBINANT pEGGB6	22
III.1. CLONAGE DU pEGCB6	22
III.2. CLONAGE DU SOUS-FRAGMENT HIND III DE 1.0 Kpb	25
III.3. CLONAGE DU SOUS-FRAGMENT HINC II DE 1.2 Kpb	29
III.4. ANALYSE DE LA SEQUENCE DU GENE tRNA LEUCINE	34
III.5. ETUDE COMPARATIVE DE LA SEQUENCE DE TRNA LEU AVEC D'AUTRES tRNAs	35
III.6. ANALYSE DE LA TRANSCRIPTION DU GENE tRNA LEUCINE	37
III.7. AUTRES STRUCTURES PRESENTES EN AMONT DE LA REGION ORI	51
IV. RESULTATS.ANALYSE DU RECOMBINANT pEGCBG1	53
IV.1. CLONAGE DU pEGCBG1	53
IV.2. SEQUENCAGE DE LA REGION HIND III-BGL II, 3 Kpb	56
IV.3. SEQUENCAGE DE LA REGION G1 1.7 Kpb ET DE LA REGION INTERNE HIND III-HIND III DE 0.3 Kpb	62
IV.4. ANALYSE DE L'ORF 350	63
IV.5. ANALYSE DE LA REGION REPETEE	69

IV.6. TEST D'ACTIVITE DE LA REPLICATION AUTONOME DANS LA LEVURE, EN PRESENCE DES REGIONS BGL G1 ET BGL 2	71
IV.7. ANALYSE DES STRUCTURES D'ADN ASSOCIES AU "ARS" DANS LA REGION REPETEE	74
IV.8. ANALYSE DE LA TRANSCRIPTION DE LA REGION REPETEE	85
V. DISCUSSION	87
DEUXIEME PARTIE: CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE DNA- POLYMERASIQUE DES PROTEINES CHLOROPLASTIQUES	
I. INTRODUCTION	90
II. MATERIEL ET METHODES	93
II.1. CULTURE D'EUGLENES	93
II.2. ISOLEMENT DES CHLOROPLASTES	93
II.3. DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE	93
II.4. TEST D'ACTIVITE DE LA DNA POLYMERASE	94
II.5. EXTRACTION DES PROTEINES CHLOROPLASTIQUES	96
II.5.1. Purification d'après la méthode de Tewari	96
II.5.2. Extrait chloroplastique préparé en utilisant la Yeda Press	97
II.5.3. Purification d'après la méthode de Hallick	97
II.5.4. Purification selon Wu. 1986	100
II.6. DOSAGE DES PROTEINES	101
II.7. ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE	102
III. RESULTATS	103
III.1. ACTIVITE DNA POLYMERASIQUE "IN ORGANELLO"	103
III.2. PURIFICATION DE L'ACTIVITE DNA POLYMERASIQUE	107
III.3. ACTIVITE DNA POLYMERASIQUE "IN VITRO"	109
IV. DISCUSSION	110
BIBLIOGRAPHIE	112
ANNEXES	125

## INTRODUCTION GENERALE

L'algue *Euglena gracilis* Z est une algue unicellulaire flagellée qui appartient à l'ordre des *Euglenidae*. Elle se multiplie par division binaire. Sa croissance est dépendante des conditions de culture. Elle pousse à l'obscurité avec une source muni de carbone réduit, (hétérotrophe), ou à la lumière sans carbone réduit, (mixo-autotrophe). On peut synchroniser la division de telles cellules, en cultures. Toutes ces conditions ont fait de l'algue *Euglena gracilis* Z, un matériel "courant" dans les laboratoires de biochimie et de biologie moléculaire.

Chaque cellule a entre 10 et 20 chloroplastes, contenant approximativement 30 molécules d'ADN circulaire d'environ 44  $\mu$ m de circonférence (Manning et al, 1972a). Ce qui correspond à une taille d'environ 143  $\pm$  2 Kb d'après des analyses faites au microscope électronique par Manning et al, (1971).

La composition en nucléotides du génome chloroplastique est de 75 % de molécule A-T et 25 % de molécule G-C, mise en évidence par un gradient de ClCs (Brawerman and Eisenstadt, 1964), ou par des analyses chimiques (Crouse et al, 1974). Ce rapport de nucléotides varie entre les différents fragments d'ADN chloroplastiques, de 12 à 60 % de G-C, (Stutz et Vandrey, 1971). Cette variation est due à la présence ou l'absence de gènes dans les fragments analysés.

Les gènes des ARN ribosomiques ont des séquences très riches en G-C, par contre la présence d'introns riches en A-T provoque une diminution du pourcentage.

Des gènes d'ARN de transfert sont très riches en G-C dans sa partie structural. En général les séquences voisines de ces gènes sont riches en A-T (80 %).

L'ADN chloroplastique d'*Euglena gracilis* Z ne contient pas deux grandes régions répétitives inversées, comme c'est le cas chez *Chlamydomonas reinhardtii* et beaucoup d'autres plantes supérieures par exemple le maïs, l'épinard, le soja et le tabac. Son ADN se distingue par sa région ribosomique organisée en 3 cistrons (Gray et Hallick, 1978); (Jenni et Stutz, 1978); (Rawson et al, 1978), alors que l'algue *Chlamydomonas*, le tabac, et le maïs n'en contiennent que deux dans les grandes régions répétées.

Des analyses par des enzymes de restriction ont démontrés que le modèle est identique à partir de plusieurs préparations d'ADN. Exception faite, pour le fragment Bgl Z (cf. annexe II) qui présente une bande diffuse par migration (Jenni et al, 1981). Ce fragment, de taille variable, a été cloné par Schlunegger et al, (1983). C'est dans cette région Z qu'a été placée par analyses au microscope électronique (Koller and Delius, 1982; Ravel-Chapuis et al, 1982) l'origine de répllication du génome chloroplastique d'*Euglena gracilis*, (seule origine de répllication).

La réplication ou duplication de l'ADN est un processus de synthèse d'ADN nécessaire, à la conservation de l'information génétique.

L'origine de réplication est une région d'ADN chromosomal contenant l'information nécessaire à l'initiation et la régulation du processus de réplication. La connaissance des mécanismes biochimiques de réplication permet de mieux étudier la régulation du cycle cellulaire.

Nous savons que la réplication est un processus semi-conservatif et semi-discontinu (Meselson et Stahl, 1977), qui commence sur une séquence spécifique du chromosome appelée "Origine de Réplication". Chez les enterobactéries, on a localisé une seule origine de réplication (ori-site), tandis que les eucaryotes en ont beaucoup (Kornberg 1982). Ces origines doivent exister pour permettre l'initiation de la réplication à plusieurs sites sur le chromosome.

La réplication peut avancer soit d'une manière unidirectionnelle, soit le plus souvent de manière bidirectionnelle. La réplication bidirectionnelle se fait:

- à des vitesses parfois différentes sur les deux brins,
- en additionnant des nucléotides de façon continue sur un des deux brins; "leading strand",
- en formant des petits morceaux d'ADN: fragments d'Okazaki (Okazaki and Okazaki 1969) sur l'autre brin; "lagging strand", qui seront ligués par la suite.

La réplication a besoin d'un double brin d'ADN comme matrice et d'une petite amorce d'ARN pour que la DNA polymérase puisse débiter.

La DNA polymérase est capable de synthétiser de l'ADN à partir de déoxyribonucléotides. Plus spécifiquement c'est la DNA Polymérase III (E. coli), qui est responsable de la polymérisation. A elle toute seule, elle n'est pas capable d'initier une fourche de réplication. Il lui faut tout un ensemble de protéines pour faire démarrer ce processus.

Les enzymes les plus importants sont:

- la primase, qui synthétise les amorces d'ARN nécessaires pour initier les fragments d'Okazaki;
- une exonucléase, pour dégrader les amorces d'ARN;
- la ligase, qui unit les fragments d'Okazaki;
- la DNA hélicase, qui écarte l'ADN double brin;

Des protéines, les "single-strand binding proteins", s'attachent aux simples brins pour les stabiliser.

L'initiation de la réplication d'un ADN double brin peut être visualisée au microscope électronique par l'apparition de boucles dans l'ADN. Ces régions appelées "ori" (origine de réplication) ont été séquencées chez certains organismes. Elles contiennent des séquences directement ou inversement répétées. Leur ADN présente une forme cruciforme, (par analyse des structures

secondaires à l'ordinateur). Cette forme pourrait être reconnue comme site d'initiation à la synthèse d'ADN par le complexe protéinique.

L'Origine de réplication se trouve sur une séquence spécifique décrite dans plusieurs plasmides. Elle est placée d'une manière précise chez *Escherichia coli* (Oka et al, 1980), et moins précise chez beaucoup de plantes supérieures et chez l'algue *Chlamydomonas*.

Le but de ce travail était:

- de mieux connaître l'origine de réplication du chloroplaste de l'algue *Euglena gracilis*. Pour cela nous avons cloné et séquencé les régions voisines à la région variable, contenu dans le fragment Bgl 2. Le fragment Bgl 2 avait déjà été cloné et séquencé en partie, par Schlunegger et Stutz, (1984). Les régions voisines vont nous permettre d'analyser 9 Kpb d'ADN qui ont, peut-être, des structures liées à l'origine de réplication.

- de trouver une activité DNA polymérasique du chloroplaste.

Par ces deux aspects, nous devrions mieux comprendre "la réplication du génome chloroplastique de l'*Euglena gracilis*".

Ces deux aspects sont traités dans les parties:

- Analyse de la région voisine à l'origine de réplication.
- Caractérisation préliminaire d'une activité DNA polymérase.

## Première partie:

# ANALYSE DE L'ADN DE LA REGION VOISINE A L'ORIGINE DE REPLICATION

## I. INTRODUCTION

L'initiation de la réplication du chromosome est placée sur une séquence particulière, appelée Origine de réplication qui se trouve dans l'ADN parental. Cette région est reconnue par les protéines qui vont démarrer la réplication. Elle a la fonction de contrôler le cycle de réplication

Chez *Escherichia coli* le chromosome est répliqué bidirectionnellement, à partir d'une seule séquence "Ori C" (Bird et al, 1972). Ce fragment d'ADN qui contient l'"Ori C", montre une réplication autonome dans d'autres plasmides (Hiraga, 1976).

Cette origine de réplication a été localisée dans un fragment de 422 pb, qui contient l'information pour l'initiation et la régulation de la réplication (Sugimoto et al, 1979). Par délétions de séquences, le plus petit fragment contenant l'information complète est de 245 pb (Oka et al, 1980).

Cette séquence est très conservée chez les Enterobactériacés. Elle contient beaucoup de petites séquences répétées et inversement répétées qui peuvent former des structures secondaires. Par exemple; la séquence "GATC" répétée 14 fois, ou d'autres séquences de 9 nucléotides, reconnues par la protéine "dna A": TTAT A/C CACA. Séquences que nous retrouvons aussi chez d'autres plasmides, avec une forte affinité pour la protéine "dna A".

Chez les chloroplastes des plantes supérieures, des origines de réplication ont été détectées au microscope électronique pour, le maïs et le petit pois (Kolodner and Tewari, 1975 a,b). Elles ont été testées dans la synthèse "in vitro" d'ADN, en présence de la DNA polymérase du petit pois. Ces deux origines de réplication ont une forte activité comme amorce dans la synthèse d'ADN par rapport à d'autres régions du chromosome testées, (Meeker et al, 1988); (Gold et al, 1987).

Une des origines de réplication du maïs présente une certaine homologie avec l'une des deux origines présentes chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Chez *Petunia hybrida*, deux régions "ARS" (indispensables pour répliquer un plasmide d'une manière autonome dans la levure) ont été trouvées. L'une d'elles présente une forte homologie au fragment Bgl Z de l'ADN chloroplastique d'*Euglena gracilis*, (Haas et al, 1986).

Chez les algues, les origines de répliation ont été trouvées chez *Chlamydomonas reinhardtii* et chez *Euglena gracilis*.

Dans *Chlamydomonas*, deux origines de répliation ont été trouvées. Ces deux origines ont été détectées au microscope électronique (Wadell et al, 1984). L'"Ori A" est placée 10 kb en amont de l'extrémité 5' du gène qui code pour l'ARN ribosomique 16s, et l'"Ori B" 16.5 Kb en amont du même gène. La répliation est bidirectionnelle. Des analyses, dans différentes espèces de *Chlamydomonas*, ont démontré des séquences Ori de 420 pb, homologues. Les extrémités de ces régions portent des séquences répétitives, spécifiques de l'espèce (Wang et al, 1984)

La séquence de la région "Ori A" est très riche en A-T et forme des structures secondaires de type cruciforme. Elle contient un ORF qui pourrait coder pour une protéine de 136 aa. (Wu et al 1986).

Chez l'algue *Euglena gracilis* la seule origine de répliation a été trouvée en utilisant le microscope électronique. Elle a été trouvée en amont du gène supplémentaire 16s par Koller et Delius, (1982) et en même temps par Ravel-Chapuis, (1982).

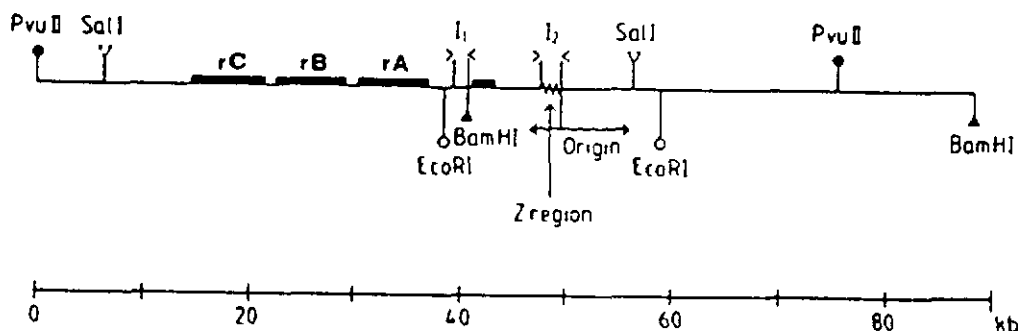
Cette région avait déjà été remarquée par Jenni et al (1981) pour avoir une taille variable, (cf. schéma I.1). Il l'avait placée dans le fragment Bgl Z, (annexe II).

**Schéma I.1 Région voisine des opérons ribosomiques dans l'ADN chloroplastique d'*Euglena gracilis*.**

rA, rB, rC: trois cistrons ribosomiques.

I1 et I2: régions inversement répétées.

Pvu II, Sal I, Eco RI, Bam HI: enzymes de restriction.



La boucle qui pourrait contenir l'origine de répliation a été placée par Koller and Delius, (1982) entre les deux régions inversement répétées I1 et I2, (schéma I.1). Ces deux régions ont été trouvées en amont des opérons ribosomiques Koller and Delius, (1982a). Cela a été déterminé en effectuant diverses mesures du "loop" de répliation, au microscope électronique, dans les fragments Pvu II, Sal I, Bam HI et EcoRI.

La distance entre, l'extrémité 5' du gène supplémentaire 16s et l'origine de réplication, est de 6800 pb. Ce calcul a été fait en fonction de la distance entre les régions palindromiques I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, et le gène S16s, (cf. schéma I.2).

Le travail de Ravel-Chapuis et al, (1982) au microscope électronique, montre que l'origine de réplication se trouve 5Kb en amont de l'extrémité 5' du gène supplémentaire 16s. La mesure des boucles de réplication est faite, après des hybridations de la région avec l'ARN ribosomique 23s.

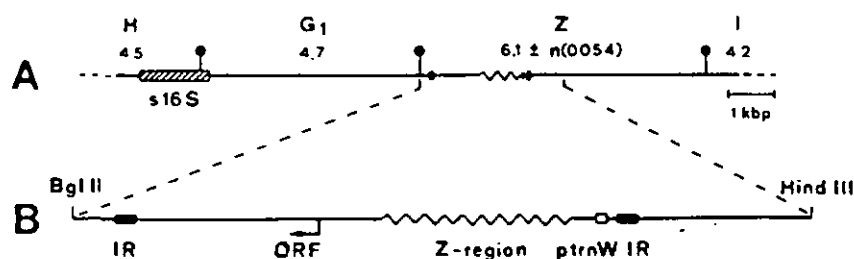
Le clonage et l'analyse des différences de taille de la région contenant l'origine de réplication ont été réalisés par Schlunegger et al, (1983). L'analyse au microscope électronique des clones pEgCH1 et pEgCH2, montre une différence de taille de 200 pb entre les deux régions inversement répétées, (cf. schéma I.2). Ces deux clones contiennent la région variable du fragment Bgl II Z, et la région adjacente au gène supplémentaire 16s. La différence correspond à la variation de taille entre les deux clones pEGCH1 et pEGCH2, qui a été démontrée par migration sur gel.

Pour différencier l'ADN double brin du simple brin au microscope électronique, une incubation à 37°C avec la protéine "T4 gène 32" est nécessaire. Cette protéine "single strand binding protein" s'attache à l'ADN simple brin en lui conférant une certaine épaisseur.

Le fragment Bgl II-Hind III qui contient la région Z (région variable) a été séquencé par Schlunegger et Stutz, (1984). Ces auteurs (cf. schéma I.2) ont trouvé une séquence répétée de 54 paires de bases, avec un nombre variable de copies. Le contenu en A-T est de 87 %.

La partie gauche de cette région contient un ORF (open reading frame). La partie droite contient un pseudogène tRNA Trp.

Schéma I.2 Carte de la région voisine à la région Z.



Des structures cruciformes "stem-loop" peuvent être formées dans la partie droite de la région Z. Ce type de structures est décrit par Zyskind and Smith, (1980), comme une région susceptible d'être reconnue par les protéines qui initient la réplication.

En analysant ces résultats, ces auteurs ont postulé que la région Z de taille variable contient l'origine de répllication du chloroplaste de l'algue *Euglena gracilis*.

En fonction de tous ces résultats, le but de notre travail a été:

- d'analyser la région voisine à l'origine de répllication;

- par séquençage du fragment Bgl Z,
- par séquençage du fragment Bgl G1.

A partir de ces 9 Kb séquencées le but était d'analyser:

- la transcription possible de l'ORF connu,
- la transcription du gène tRNA Leu trouvé après séquençage,
- la présence des structures secondaires dans cette séquence, (ARN),
- les séquences connues type: séquence promotrice, séquence ARS, ORI,...etc.
- les homologies avec d'autres séquences chloroplastiques connues.

## II. MATERIEL ET METHODES

Dans ce travail, nous avons utilisé des techniques déjà décrites dans les thèses et les travaux de licence effectués dans ce laboratoire. Les techniques de Biologie Moléculaire sont tirées des protocoles de "Molecular Cloning" (Maniatis et al, 1982). Les techniques de culture d'euglènes, d'isolation d'ARN chloroplastique, et d'isolation des plasmides ne sont pas décrites en détail. Nous avons simplement indiqué les travaux de référence et les modifications éventuelles.

### II.1 MATERIEL BIOLOGIQUE

La souche Z(ICC) de cellules *Euglena gracilis* utilisée provient de l'Université d'Indiana aux Etats-Unis, d'où le nom "Indiana Culture Collection".

Le clonage a été effectué avec les souches de cellules HB 101 et JM 83 pour les plasmides pBR<sub>322</sub> et pUc8. Les souches sont dérivées de *E. coli* K12 (Boyer, 1969).

Le clonage et le séquençage selon Sanger et al, (1980) ont été fait dans le bactériophage M13, sous les formes: mp8, mp9, mp18 et mp19, et la bactérie hôte, était la souche JM 103 ou TG1.

### II.2 CULTURE D'EUGLENES

La souche d'euglène est maintenue à la lumière, à 21°C, sur agar incliné, milieu "Difco Euglena broth". Chaque semaine des précultures liquides d'*Euglena gracilis* sont faites. Les précultures sont obtenues par inoculation de l'algue dans un milieu de Hutner. Milieu modifié selon Vasconcelos et al, (1971) par diminution de la concentration de la vitamine B12 (50 ng/l).

La culture d'euglènes est préparée en inoculant 3 litres d'un même milieu Hutner, avec 5 ml de préculture en phase exponentielle de croissance. Cette culture est placée à la lumière, à 21°C, sous agitation pendant 5 jours. La récolte donne en moyenne 23 grammes de cellules pour 3 litres de culture (poids humide).

Nous avons ajouté du Chloramphenicol, 2 g/litre de culture, 12 h avant la récolte des cellules. Le chloramphenicol diminue la dégradation des ARNs, "processing" (McGarvey et al, 1988).

### II.3 ISOLATION D'ARN CHLOROPLASTIQUE TOTAL

La purification des chloroplastes s'est faite selon la méthode décrite par Ortiz et al,(1980).

La trypsine a été utilisée pour affaiblir la paroi cellulaire. Un broyage mécanique léger a fini la lyse des cellules. Pour séparer les chloroplastes intacts des noyaux, des cellules intactes et des chloroplastes brisés, un gradient de Percoll 10-80 % a été utilisé, sur un coussin de 80 %. Méthode décrite dans la thèse de Bernard Rutti,(1982).

L'ARN chloroplastique total a été isolé de ces chloroplastes selon la méthode de Sagher et al,(1976) décrite aussi dans la thèse de Rutti,(1982).

L'isolation s'est faite par extraction des acides nucléiques, puis par extractions phénol-chloroforme pour éliminer les protéines et par précipitations et lavages des acides nucléiques.

Le traitement à la DNase (RNase libre de Wormington) a été effectué de la même manière que dans la thèse d'Etienne Roux,(1984). L'acide aurintricarboxilique (ATA), inhibiteur des RNases n'a pas été utilisé.

Lors de l'utilisation de l'"ATA", nous devons passer les ARNs sur colonne Sephadex G-100 avant le traitement à la DNase. Comme la colonne Sephadex G-100, retient les ARNs de petites tailles (ARNs qui nous intéressent) nous avons préféré ne pas utiliser l'"ATA".

Le rendement moyen obtenu est de 100 µg d'ARN/g de cellules ou 750 µg d'ARN/l de culture.

L'ARN est dissout dans l'eau bidistillée traitée au DEP et conservé à -70°C.

### II.4 CLONAGE

La région d'ADN chloroplastique, nous intéressant est comprise dans les fragments Bgl Z et Bgl G<sub>1</sub>. Ces deux fragments ont été clonés dans le vecteur pBR<sub>322</sub>. Le vecteur est modifié avec le fragment Eco P du DNA chloroplastique d'euglène qui contient un site unique Bgl II. Les deux fragments ont été clonés dans notre laboratoire par B.Schlunegger. Le fragment Bgl Z est inséré dans le plasmide appelé pEgcB6 et le fragment Bgl G<sub>1</sub> dans le plasmide pEgcG<sub>1</sub>.

Nous avons reçu le plasmide qui contient le fragment Hind III de 6 Kb inséré dans pBR<sub>322</sub> (Schlunegger et al,1983), appelé pEgc54, (cf schéma IV.2).

## II.5 ISOLATION DE PLASMIDES

Cette méthode est tirée d'un cours SKMB (Billeter et Weber, 1978). Elle est décrite en détail dans la thèse de Rutti, (1982).

Nous citons ici les étapes les plus importantes:

- Culture des cellules dans un milieu L (10 g/l triptone, 5 g/l extrait de levure, 170 mM NaCl). Les cellules utilisées étaient la souche HB101 de *E. coli*, résistante à la présence d'antibiotiques, ampicilline (20 µg/ml).

- Amplification des plasmides par l'adjonction de chloramphenicol surtout dans le cas de pBR<sub>322</sub>.

Le plasmide pUc8 nous donne un nombre suffisant de copies par lui-même. Le chloramphenicol est ajouté quand la culture de cellules a atteint la phase de croissance exponentielle (Clevell, 1972).

- Lyse des bactéries avec SDS 2 % (Godson et Vapneck, 1973).

- Précipitation des débris cellulaires selon Hirt, (1967) et extractions phénol-chloroforme pour éliminer les protéines.

- Traitement à la RNase après la précipitation au PEG, ce qui permet d'éliminer l'ARN et de concentrer l'ADN.

- Dénaturation alcaline selon Currier et Nester, (1971) et extraction du phénol dans un milieu à haute force ionique permet d'éliminer l'ADN bactérien et d'isoler l'ADN plasmidial super-hélice.

## II.6 ANALYSE DE L'ADN, SEPARATION, ELECTROELUTION

L'ADN cloné a été caractérisé par digestions avec différents enzymes de restriction.

Les enzymes de restriction qui reconnaissent une séquence de 6 nucléotides coupent relativement peu l'ADN. Ces enzymes ont été utilisés pour la séparation de grands fragments d'ADN et le sous-clonage. Ces enzymes sont:

-Bgl II	-Cla I	-Hind III
-Bam HI	-Hinc II	-Xba I

D'autres enzymes de restriction reconnaissant des séquences de 4 nucléotides, coupent l'ADN beaucoup plus souvent. Ces enzymes ont été utilisés pour déterminer la carte de restriction des clones. Ils ont aussi été utilisés pour insérer des fragments dans le vecteur M13. Ces enzymes sont:

-Alu I	-Hae III	-Rsa I
-Dde I (5 bp)	-Hha I	-Sau 3A I
-Dra I (6 bp)	-Hinf I	-Taq I

Ces enzymes ont été fournis par Boehringer Mannheim, Biolabs New England, et Toyobo Biochemicals. Nous avons suivi pour chaque enzyme les conditions de digestion décrites par les fournisseurs.

Dans les cas de digestions préparatives le temps d'incubation est plus long, la concentration d'enzyme est d'environ 0.5 unités d'enzyme/ $\mu$ g d'ADN. Il ne faut pas que la quantité d'enzyme dépasse le 1/10 du volume de la réaction.

Les différents fragments d'ADN obtenus par digestion, ont été séparés par électrophorèse, sur gel d'agarose, pour les fragments dont la taille est supérieure à 1 Kb, et sur gel de polyacrylamide quand les fragments sont plus petits.

Pour la préparation des gels, nous avons suivi la méthode décrite dans "Molecular Cloning" par Maniatis et al, (1982), en utilisant selon les besoins des gels grands ou petits, verticaux ou horizontaux.

Le tampon utilisé pour l'électrophorèse est:

- le tampon TA (Tris acide acétique 40 mM, Acétate de Na 20 mM, EDTA 1mM, pH=7.8) pour les gels d'agarose migrant lentement, 20 volt-14 h.;
- le tampon TBE (Tris 130 mM, Acide Borique 90 mM, EDTA 25 mM, pH=8.8) pour les minigels d'agarose migrant à 120 volt, et pour tous les gels de polyacrylamide.

L'ADN est visible au rayons UV (365 nm) après coloration au Bromure d'Ethidium (Sharp et al, 1973).

L'éluion des ADN, après digestions préparatives, a été faite par la méthode d'électroéluion (Maniatis et al, 1982). Nous avons d'abord utilisé la méthode classique avec des sacs à dialyses et l'extraction du phénol, puis nous nous sommes servi de l'appareil Bio-Trap (Schleicher et Schuell). Cet appareil a deux membranes différentes: BT2 qui laisse passer les acides nucléiques, et BT1 qui les retient. Par une précipitation à l'éthanol ou à l'isopropanol, selon le volume, le rendement par cette méthode est meilleur. Dans le cas où il resterait du BrEt il faut procéder à une extraction isoamylalcool (Maniatis et al, 1982).

Pour éluer de petits fragments d'ADN séparés par gel de polyacrylamide, des oligonucléotides par exemple, nous avons utilisé la méthode de Maxam and Gilbert, (1977). Avec un papier fluorescent Kieselgel 60 F<sub>254</sub> à la lumière U.V. de 254 nm.

Nous coupons l'ADN qui absorbe ces rayons et qui par conséquent ne fluoresce pas. Le tampon d'éluion contient: (0.5 M Amonium Acetate, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS).

## II.7 TRANSFERT D'ADN SUR PAPIER NITROCELLULOSE

Après séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose, nous pouvons conserver un réplica du gel, en le transférant sur papier de nitrocellulose selon la méthode de Southern, (1975).

Nous avons suivi le protocole décrit par Schleicher and Schuell, (1987). Après dénaturation de l'ADN, on le transfère sur papier nitrocellulose BA85 par capillarité avec du tampon 20xSSC. L'ADN a été fixé aux rayons UV, à une énergie de 120000  $\mu$ joules (UV Stratalinker)

## II.8 CLONAGE DE SOUS-FRAGMENTS

Pour obtenir de grandes quantités des fragments:

- Hind III de 1.0 Kb,
- Hinc II de 1.2 Kb,

provenant du clone pEgCB6 digéré par les enzymes de restriction Hind III et Hinc II, nous les avons insérés dans le vecteur pUC8. Le vecteur avait été digéré par les mêmes enzymes et les extrémités avaient été déphosphorylées à la phosphatase alcaline de veau (CIP), (Chaconas et Van Sande, 1980).

Les fragments ont été ligués séparément au vecteur, par l'enzyme T4 DNA ligase, (Weiss et al, 1968).

Le rapport du nombre de molécules lors de la ligation est de 1:3, vecteur:insert, en présence de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM, et ATP, 1 mM.

La préparation des cellules compétentes HB101 est faite selon la méthode de Hanahan, décrite dans "DNA Cloning", (Glover 1985), protocole 3. Les cellules compétentes proviennent de colonies de la souche HB101 mises en culture dans le milieu SOB (Tryptone 2 %, extrait de levure 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM), et traités avec le tampon RF1 (KCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, Acetate de K 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glycerol 15 % à pH=5.8) pendant 2 h. puis avec le tampon RF2 (MOPS 10 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glycerol 15 %, pH=6.8) pendant 15 minutes avant d'être congelées dans l'azote liquide, et stockées à -70°C.

Les cellules sont transformées avec les clones obtenues après ligation, pendant 45 minutes à 4°C, chauffées à 42°C pendant 2 minutes, puis maintenues à 37°C pendant 1 h dans le milieu SOB. Elles sont ensuite placées dans une boîte de Petri contenant du milieu L+Ampiciline pour obtenir les colonies des cellules recombinantes.

## II.9 ANALYSE DES RECOMBINANTS

L'analyse des recombinants peut se faire par la méthode de mini-lysats. Cette méthode est une extraction de plasmides en petites quantités selon Birnboim et Doly, (1979). Elle se développe en conditions de lyse alcaline. On termine par une digestion de l'ADN par des enzymes de restriction qui permettent de vérifier le ou les clones qui ont l'insertion. Insertion de taille connue.

Au cas où la différence de taille entre les insertions n'est pas appréciable, ou que le nombre de recombinants est trop élevé pour utiliser cette méthode, nous pouvons analyser les recombinants par la méthode de Benton et Davies, (1977).

Cette méthode consiste à prendre une boîte de Petri, contenant nos colonies recombinantes, de la mettre en contact avec un filtre de nitrocellulose. Une fois les colonies transférées, les filtres sont traités au NaOH. On termine par une neutralisation et une fixation de l'ADN aux U.V. Les filtres sont ainsi prêts à être hybridés à une sonde spécifique marquée avec du <sup>32</sup>P.

La méthode de Hoggness (Grunstein et Hoggness, 1975) que nous avons utilisée au début de cette thèse est plus sensible, parce que les colonies poussent en une nuit sur papier filtre. Les colonies sont lysées avec du NaOH et la protéinase K utilisée dégrade les protéines. Il faut ensuite laver les filtres à l'éthanol et les faire cuire à 80°C pendant 2 h, sous-vide. Nous pouvons alors hybrider les filtres avec une sonde spécifique marquée radioactivement par l'une ou l'autre des méthodes décrites dans le chapitre II.11.

## II.10 SEQUENCAGE DE L'ADN

Nous avons séquencé nos fragments d'ADN chloroplastique selon la méthode de Sanger et al, (1980). Dans cette méthode, on utilise l'enzyme DNA Polymerase I (fragment Klenow) et un mélange de déoxynucléotides et didéoxynucléotides. Quatre réactions sont faites et chacune contient un des quatre didéoxynucléotides. Soit ddATP, soit ddCTP, soit ddGTP, soit ddTTP.

Les didéoxynucleotides arrêtent la synthèse du brin complémentaire à différents longueurs.

Les quatre réactions permettent de déchiffrer la séquence complète de tout le fragment (Sanger et al, 1977).

Pour obtenir une matrice simple brin de notre fragment, nous utilisons le bactériophage M13 (Messing et al, 1982) dans ses formes mp8 et mp9. Ce bactériophage a l'avantage de permettre d'obtenir un double brin pour le clonage et un simple brin pour la réaction du séquençage. Le bactériophage M13 possède une partie du gène de la  $\beta$ -galactosidase dans le "poly-linker" qui est le complément de la partie du gène  $\beta$ -galactosidase qui se trouve dans les souches de E.coli JM103 ou TG1. L'induction avec de l'IPTG et le colorant BCIG donnent des colonies blanches et

bleues. Les colonies blanches ont une insertion dans le "polylinker" ce qui empêche le gène de la  $\beta$ -galactosidase de s'exprimer. Les colonies bleues n'ont pas d'insertion, ce qui permet l'expression du gène  $\beta$ -galactosidase.

### II.10.1 Clonage dans le vecteur M13.

Le mode opératoire du clonage dans le vecteur M13 et le séquençage avec des didéoxynucléotides est décrit dans le manuel "M13 cloning and sequencing" (Amersham, 1983).

Le vecteur M13 mp8 a été digéré par l'enzyme Hinc II, déphosphorylé avec de la phosphatase alcaline de veau, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %, et élué avec le système Elu-Trap, (cf.ch.II.6).

L'ADN chloroplastique a été coupé à l'aide de différents enzymes qui nous donnent soit des extrémités nettes: Alu I, Dra I, RSA I, soit des extrémités cohésives Hinf I, Dde I. Lors que les extrémités sont cohésives, elles sont alors remplies par la DNA Polymerase I, Klenow, enzyme qui est inactivée à 70°C pendant 15 minutes.

La ligation du vecteur et des fragments d'ADN a été faite avec l'enzyme T4 DNA ligase dans un rapport 1:3, vecteur:fragment. La présence de spermidine et du BSA améliore le rendement de la ligation (Montandon P.E. communication personnelle).

L'insertion des fragments de taille supérieure à 1 Kpb se fait en digérant le vecteur et le fragment à insérer par les mêmes enzymes. Les extrémités du vecteur sont dephosphorylés à la phosphatase alcaline de veau.

Nous avons préparé des cellules compétentes JM103 et TG1 à partir d'un milieu 2xTY en présence de Calcium (tampon TCN). Ces cellules sont transformées avec l'ADN ligué. Les agents IPTG et BCIG sont ajoutés avant de les étaler dans une boîte de Petri sur un milieu "Minimal Agar"(Amersham, 1983).

Nous repiquons les plaques incolores en milieu liquides 2xTY. Ceci permet d'isoler la forme simple brin selon la méthode de Messing et al, (1981). Les étapes sont:

- Culture de la plaque 6 h.
- Récolte des surnageants avec le phage.
- Précipitation au PEG.
- Extraction au phénol-éther.
- Précipitation à l'éthanol.

Nous obtenons en moyenne 200 ng d'ADN simple brin.

## II.10.2 Réaction de séquence.

La réaction de séquence s'amorce, grace au "primer", le pentadecamere:

5'-TCCCAGTCACGACGT-3'

qui hybride avec la matrice M13 au début du "polylinker". Les déoxynucléotides et didéoxynucléotides ont été fournis par la maison Boehringer, de même que l'enzyme DNA polymerase Klenow, l' $\alpha^{32}\text{PdATP}$  a été fourni par Amersham, England à une concentration de 400 Ci/mmole et l'urée ultra-pure provient de la maison Merck.

Dans la réaction de T-track le rapport que nous avons utilisé entre déoxitimidine et didéoxitimidine est de 1:1, alors que pour la réaction de séquence les rapports sont les suivants:

dGTP mix:ddGTP	0.3mM	2:1
dATP mix:ddATP	0.1mM	2:1
dCTP mix:ddCTP	0.3mM	3:1
dTTP mix:ddTTP	0.5mM	2:1

Le gel de séquence a été préparé avec du polyacrylamide 6 % et de l'urée 8 M dans le tampon TBE. La migration est faite à 30 mA; pendant 2h30 pour la réaction de T-track et pendant 2h30 et 6h00 pour la réaction de séquence. Une telle séquence permet de lire entre 250 et 300 paires de bases d'un clone. Quand une séquence nous paraît intéressante au-delà des 250 premières pb, nous avons fait un troisième gel de 5 % de polyacrylamide, migrant pendant 8 h.

Nous avons utilisé les films Kodak XAR-5 pour exposer le gel fixé à l'acide acétique 10 %, et l'éthanol 20 %. Une nuit suffit habituellement pour obtenir une bonne exposition.

## II.11 MARQUAGE DE L'ADN

La radioactivité utilisé pour marquer l'ADN est soit  $\alpha^{32}\text{PdATP}$  ou gamma- $^{32}\text{PATP}$ , selon le type de marquage choisi.

### II.11.1 Le marquage des extrémités à la Polymerase I, Klenow.

Le remplissage des extrémités cohésives avec des nucléotides par la DNA Polymerase I Klenow peut être employé pour marquer l'ADN. Nous utilisons alors le déoxynucléotide  $\alpha^{32}\text{PdATP}$ . Ce marquage est utilisé pour le plasmide pBR<sub>322</sub>, ayant été digéré par l'enzyme Hinf I. Ce plasmide est ensuite utilisé comme référence de taille.

### II.11.2 Le marquage par "nick-translation".

Cette méthode est basée sur l'utilisation de l'enzyme DNA Polymerase I Kornberg, et une DNase I. La DNase enlève plusieurs nucléotides à différents endroits, "nicks", alors que la DNA Polymerase I va réparer ces trous (nicks), en rajoutant des nucléotides, dont  $\alpha^{32}\text{PdATP}$  (Maniatis et al,1982).

La réaction se fait en présence des nucléotides (dNTP-dATP 2 mM) et le dATP marqué. Cette réaction est maintenue à 14°C pendant 2 h. Nous purifions l'ADN marqué par la centrifugation sur une petite colonne Sephadex G-50 (Maniatis et al,1982).

### II.11.3 Le marquage d'un ADN simple brin.

Pour trouver des sondes spécifiques à partir des ADNs simples brins préparés par le clonage dans le phage M13, nous avons synthétisé le brin complémentaire au phage en présence de  $\alpha^{32}\text{PdATP}$  (Montandon et al,1987).

Le fragment est ensuite sorti du vecteur par digestion, coupant de chaque côté de l'insert. Cette sonde double brin peut être utilisée après dénaturation, 15 minutes à 100°C.

Pour obtenir une sonde simple brin il suffit de couper le double brin d'un seul côté de l'insert. Le simple brin est récupéré par dénaturation, migration sur gel polyacrylamide et électroélution selon la méthode de Maxam and Gilbert,(1977). En fonction de la taille de 50 à 500 nucléotides nous obtenons des sondes plus ou moins marquées, mais toujours très spécifiques.

Le mode opératoire est décrit en détail dans la thèse de J.M.von Allmen,(1987). Les différents échantillons ont été dénaturés à 100°C pendant 10 minutes, afin de bien séparer les deux brins et de pouvoir obtenir la sonde simple brin.

Le gel a été exposé sur un film Kodak XAR-5 avec un écran "Cronex lighting-plus" de Dupont Corp, pendant 20 à 30 minutes.

### II.11.4 Marquage terminal d'un oligonucléotide.

Les oligonucléotides sont marqués avec la Polynucléotide Kinase, en présence de gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP. La radioactivité est incorporée à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide (Maniatis et al,1982).

L'oligonucléotide est d'abord purifié sur gel polyacrylamide 20 %. Il est visualisé à l'aide du papier Kieselgel 60 et élué par la méthode de Maxam and Gilbert,(1977). L'oligonucléotide est incubé avec 15 unités d'enzyme polynucléotide Kinase en présence de gamma- $\text{P}^{32}\text{dATP}$  radioactivité, et purifié par centrifugation et par colonne Sephadex G-50.

## II.12 GEL D'ARN, TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE "NORTHERN"

L'ARN chloroplastique d'*Euglena gracilis* a été séparé par électrophorèse (Roux,1984), puis transféré sur papier nitrocellulose et hybridé.

L'ARN a été dénaturé au glyoxal (Mc Master et Garmichsel,1977) avant d'être chargé sur un gel agarose 1,2 %. La migration s'est faite dans du tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=6.7, pendant la nuit, avec un système de circulation du tampon (Maniatis et al,1982). Le gel est coloré dans un bain de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Bromure d'Ethidium et décoloré par la suite dans le tampon d'électrophorèse. L'ARN a été transféré sur papier nitrocellulose BA83 par capillarité selon le protocole décrit par Schleicher and Schuell,(1987).

L'ARN est fixé à la nitrocellulose au moyen de rayons U.V.

## II.13 HYBRIDATIONS DES ACIDES NUCLEIQUES

### II.13.1 Hybridation sur filtre ADN-ADN ou ADN-ARN.

L'ADN marqué radioactivement (simple brin ou double brin dénaturé), va nous permettre de repérer des molécules d'ADN ou d'ARN fixées sur filtre de nitrocellulose. Des molécules double brin vont se former par association des simples brins chauds avec les simples brins dénaturés fixés à la nitrocellulose (Maniatis,1982). La spécificité de l'hybridation dépend de la solution d'hybridation et de la température d'incubation.

Le protocole est décrit par Schleicher and Schuell,(1987).

Les hybridations sont faites avec des sondes homologues aux fragments d'ADN ou d'ARN étudiés. Dans ce cas les conditions d'hybridation sont les mêmes pour l'ADN-ADN et l'ADN-ARN.

Tampon d'hybridation:

- 50 % Formamide desionisée
- 5x SSPE
- 2x Denhardt
- 0.1 % SDS
- 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ssDNA

Nous ajoutons 0.1 ml de solution/cm<sup>2</sup> de filtre à hybrider. Une préincubation de 2 à 6 h, à 42°C est faite. Nous ajoutons ensuite la sonde radioactive à la solution de hybridation dans un rapport de 1-5x10<sup>5</sup>cpm/ml. L'hybridation dure 20 h à 42°C.

Les filtres sont lavés avec :

-2x SSC + 0.1 % SDS	20°C	15'
-2x SSC + 0.1 % SDS	42°C	15'x2

Ils sont exposés humides avec des films XAR-5.

Les conditions d'hybridation avec un oligonucléotide sont différentes (Schleider and Schuell, 1987).

La solution de préhybridation est:

- 6x SSPE
- 5x Denhardt
- 0.1 % SDS

La solution d'hybridation est:

- 6x SSPE
- 1x Denhardt
- 0.1 % SDS
- 100-200 µg/ml ssDNA

La température d'hybridation est calculée en fonction du nombre de bases A-T et G-C que nous avons dans l'oligonucléotide.

$$T_h = T_x - 5^\circ\text{C} = 2(\text{A-T}) + 4(\text{G-C}) - 5^\circ\text{C}$$

Les hautes températures et les fortes concentrations ioniques ne peuvent pas être utilisées; cela pourrait déstabiliser l'hybride.

Le lavage du filtre est fait dans les conditions suivantes:

-6x SSPE + 0.1 % SDS	20°C	2x 15'
-6x SSPE + 0.1 % SDS	$T_h$	1x 1'

### II.13.2 Hybridation liquide ADN-ARN et traitement a la nucléase SI.

Nous utilisons ce type d'hybridation (Berck et Sharp, 1977) avec des sondes très spécifiques, préparées par marquage d'un simple brin, qu'on hybride à l'ARN chloroplastique total. Par la suite les hybrides sont traités à la Nuclease SI. Cet enzyme digère les acides nucléiques simple brin, c'est-à-dire les extrémités de l'ADN et l'ARN qui n'ont pas hybridé. Une analyse par gel d'électrophorèse permet de trouver la taille exacte de l'hybride. Les protocoles simplifiés (Maniatis et al, 1982) ont été préparés selon la méthode de Favaloro et al, (1980).

Nous avons précipité ensemble 15  $\mu\text{g}$  d'ARN chloroplastique et 50 ng d'ADN double brin et resuspendu dans 30  $\mu\text{l}$  de tampon d'hybridation:

-PIPES	40 mM
-EDTA	1 mM
-NaCl	0.4mM
-Formamide	80 %

L'ADN a été dénaturé à 100°C pendant 15 minutes et hybridé à 42°C pendant 3 h. Température déterminé par le contenu du G-C dans la sonde, 30 %.

La dégradation de simple brin ce fait à 32°C en présence de l'enzyme Nucléase SI, pendant 30 minutes dans 300  $\mu\text{l}$  de tampon:

-Na Acetate pH=4.6	50 mM
-ZnSO <sub>4</sub>	4.5 mM
-NaCl	280 mM
-ssDNA	20 $\mu\text{g/ml}$
-Nuclease SI	100-1000 u/ml

Nous stoppons la réaction en ajoutant 50  $\mu\text{l}$  de:

-NH <sub>4</sub> Acetate	4.0 M
-EDTA	0.1 mM

Les échantillons sont précipités à l'Isopropanol et resuspendus dans 3  $\mu\text{l}$  de TE + 3  $\mu\text{l}$  "formamide dye" (colorant pour séquençage)

Nous avons analysé la taille, des hybrides marqués, sur un gel de Polyacrylamide 6 à 8 %, 150 volt, 4 h. Les gels ont été fixés dans la même solution que les gels de séquence et exposés à un film XAR-5.

La même méthode avec des sondes simple brin a été utilisée pour éliminer toute renaturation de la sonde, qui pourrait gêner à l'analyse des résultats.

Quand les sondes sont très grandes (plus de 500 bp) nous analysons les hybrides sur gel Agarose 1.5 % neutre et sur gel Agarose Alcalin (Maniatis et al, 1982).

Le gel alcalin est préparé avec du tampon (NaCl 50 mM, EDTA 1 mM). La migration est effectuée à 15 volt/cm. Le gel est ensuite fixé dans du TCA 7 %, pendant 30 minutes, séché et exposé comme un gel de séquence.

## II.14 PRIMER EXTENSION

La réaction de "Primer Extension" nous permet de savoir exactement où débute un ARN messenger. Nous l'avons employée pour vérifier la taille estimée d'après les analyses à la Nucléase SI.

Cette méthode est réalisée en présence de Transcriptase inverse. Enzyme qui utilise une amorce radioactive, hybridé à l'ARN messenger pour construire un cDNA jusqu'au moment où il n'y a plus de matrice (ARNm). La méthode a été décrite par Goldenberg et Hauser, (1983).

Cette réaction a été faite en utilisant comme amorce des oligonucléotides marqués, ou des fragments simple brin que nous avons synthétisés à partir d'un fragment inséré dans le bactériophage M13.

Nous préparons l'hybridation avec 1.6 pmol d'oligonucléotide marqué ou 2  $\mu$ l d'amorce simple brin. Nous ajoutons 15  $\mu$ g d'ARN chloroplastique total et 1.4  $\mu$ l du tampon 10x RT dans un volume final de 10  $\mu$ l.

Le tampon 10x RT a la composition suivante:

-Tris HCl pH=8.3 à 37°C	500 mM
-MgCl <sub>2</sub>	60 mM
-KCl	1 M
-DTT	10 mM

L'hybridation est incubée à 65°C pendant 5 minutes, refroidie une première fois à 42°C pendant 120 minutes, puis une deuxième fois à 37°C pendant 60 minutes et finalement incubée à 0°C pendant 15 minutes. A ce moment nous ajoutons:

-10x RT	4.6 $\mu$ l
-KCl 1M	3.4 $\mu$ l
-dNTPmix	10 $\mu$ l
-H <sub>2</sub> O	32 $\mu$ l
-Reverse Transcriptase	10 u.

nous faisons alors une incubation à 25°C 5 minutes, puis à 37°C, 15 minutes.

Une "chase" a été faite avec :

-dNTP "chase"	16 $\mu$ l
---------------	------------

pendant 15 minutes à 37°C.

Nous stoppons la réaction avec:

-EDTA 0.5 M pH=8.0	2 $\mu$ l
--------------------	-----------

Pour dégrader l'ARN nous ajoutons du NaOH 100 mM et incubons à 100°C pendant 3 minutes en neutralisant par la suite avec 100 mM HCl.

Nous précipitons la réaction avec 2 volumes d'Isopropanol en présence de 500 mM Ammonium Acétate et 5  $\mu$ g de tRNA. Après 30 minutes de précipitation nous faisons un lavage à l'ETOH 100 %. Le cDNA est remis lentement en suspension dans 2  $\mu$ l de Tris HCl 20 mM et 2  $\mu$ l de "formamide dye" sont ajoutés. Les échantillons sont chauffés 3 minutes à 100°C avant d'être chargés sur un gel d'acrylamide 6 % + Urée 8 M. Le gel est fixé comme un gel de séquence et exposé avec un écran intensifiant à -70°C pendant une semaine pour obtenir un signal.

Composition du dNTPmix:

-dGTP 50 mM	6.8 $\mu$ l
-dATP 50 mM	3.4 $\mu$ l
-dCTP 50 mM	6.8 $\mu$ l
-dTTP 50 mM	6.8 $\mu$ l
-Tris HCl pH=8.3 à 37°C	5.0 $\mu$ l
-H <sub>2</sub> O bidistillée	971.2 $\mu$ l

Composition dNTP "chase":

-dGTP 50 mM	10 $\mu$ l
-dATP 50 mM	10 $\mu$ l
-dCTP 50 mM	10 $\mu$ l
-dTTP 50 mM	10 $\mu$ l
-10x RT (-DTT)	100 $\mu$ l
-H <sub>2</sub> O bidistillé e	860 $\mu$ l

## II.15 ANALYSE DES SEQUENCES A L'ORDINATEUR

Différents programmes informatiques ont été utilisés pour analyser tous nos résultats de séquence. Le programme "ANALYSE", (von Allmen,1987) à principalement été utilisé pour l'analyse: de la séquence, des enzymes de restriction et de la traduction. Les programmes "SEQUENCE ANALYSIS SOFTWARE PACKAGE", (Genetics Computer Group,1989) ont été utilisés pour la recherche d'homologies avec les banques de séquences, et pour dessiner les structures secondaires des ARNs.

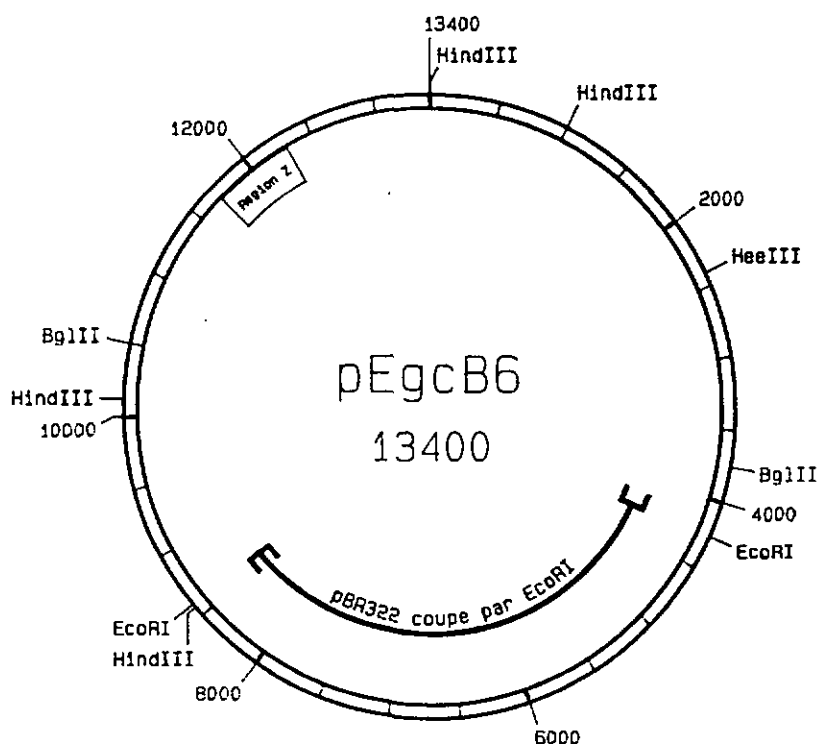
### III. RESULTATS. ANALYSE DU RECOMBINANT pEGCB6

Nous avons reçu le clone pEGCB6 de B.Schlunegger. Elle en avait séquencé une partie: entre les sites BglII-HindIII, 2.6 Kpb.

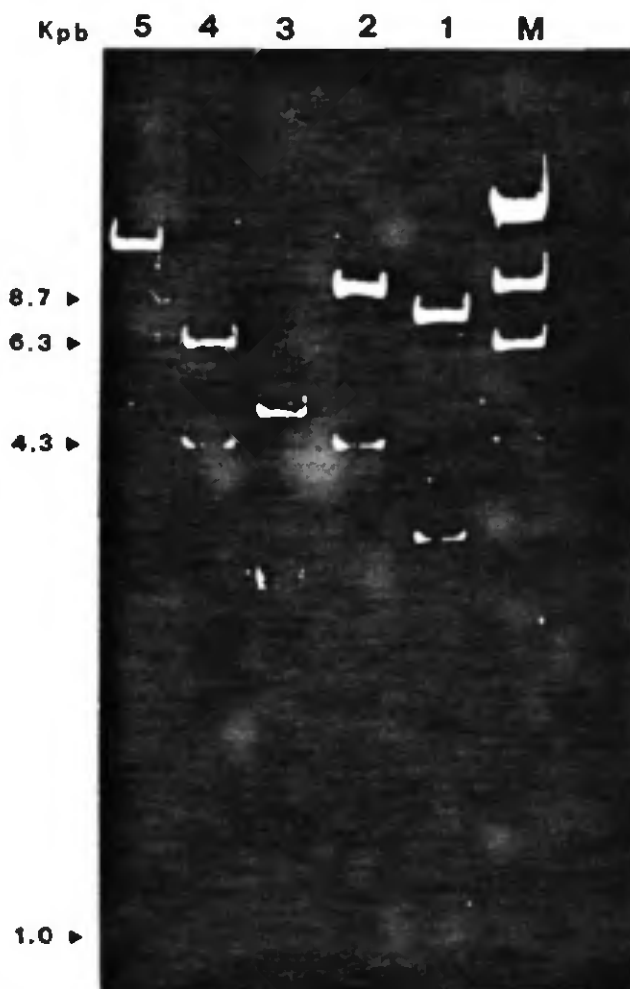
#### III.1 CLONAGE DU PEGCB6

Nous avons d'abord vérifié qu'il s'agissait bien de son clone; composé du vecteur pBR322, et des fragments d'ADN chloroplastique Eco P et Bgl Z. Bgl Z étant inséré dans le site unique Bgl II du Eco P.

Figure III.1 Carte circulaire du plasmide pEGCB6.



Plusieurs digestions et doubles digestions avec les enzymes Eco RI, Bgl II, et Hind III, Bgl II-Hind III et Bgl II-Eco RI nous démontrent l'identité du clone.

Figure III.2 Profil des digestions du clone pEGCB6.

Gel Agarose 1.2%, migration à 20 mA pendant 16 h.

Coloration au Bromure d'Ethidium. La taille des fragments est donnée en Kpb.

M) Marqueur de taille: Phage Lambda digéré avec Hind III  
23.1, 9.64, 6.68, 4.36, 2.32, 2.02, 0.56.

1) pEGCB6 digéré avec Hind III: 7.46, 3.13, 1.5, 1.0.

2) pEGCB6 digéré avec Eco RI: 8.74, 4.36,

3) pEGCB6 digéré avec Bgl II et Hind III: 4.38, 2.75, 2.6, 1.5, 1.0, (0.38).

4) pEGCB6 digéré avec Eco RI et Bgl II: 6.35, 4.36, 1.9, 0.5.

5) pEGCB6 digéré avec Bgl II: 6.74, 6.35. (digestion partial).

La digestion Eco RI, sépare le vecteur pBR322 (4.3 Kpb) de l'insert total (8.7 Kpb) col. 2 fig.III.2. La digestion Bgl II, sépare l'insert Bgl Z (6.3 Kpb) du vecteur et le fragment Eco P (6.7 Kpb), col. 5. La digestion Hind III et la double digestion Bgl II-Hind III nous confirment la présence du fragment de 1.0 Kpb à l'intérieur de Bgl Z, col. 1 et 3.

Ces résultats montrent:

- que nous avons bien le fragment Bgl Z inséré dans le site Bgl II du plasmide pBR322, modifié avec Eco P.
- que le fragment Bgl Z contient un fragment Hind III de 1.0 Kpb.

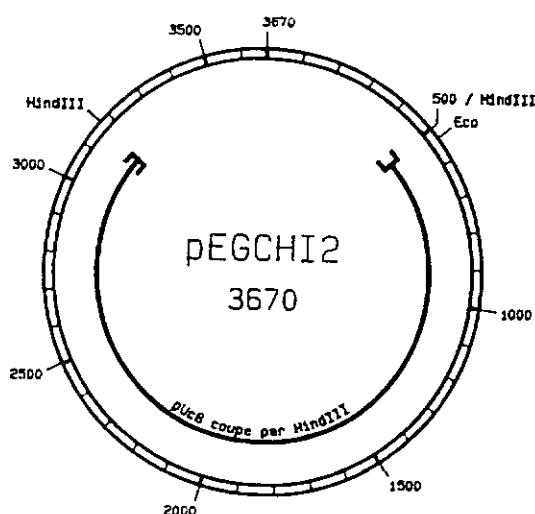
Le fragment Hind III 1.0 Kpb se trouve à la suite du site de restriction Hind III séquencé par Schlunegger et Stutz, (1984).

### III.2 CLONAGE DU SOUS-FRAGMENT HIND III DE 1.0 Kpb

Nous avons utilisé le vecteur pUc8 pour cloner le fragment Hind III de 1.0 Kpb. Ce vecteur de taille 2670 pb, a un site unique Hind III dans le "polylinker", position 397. Il contient aussi un gène qui lui confère la résistance à l'Ampiciline. Il est capable de se répliquer 100 à 200 fois dans une cellule.

Pour le clonage le vecteur pUc8 a été digéré par l'enzyme Hind III et les extrémités ont été déphosphorylées à la phosphatase alcaline de veau. Le fragment Hind III de 1.0 Kpb a été élué, après une digestion Hind III du plasmide pEGCB6. Nous avons ligué le fragment et le vecteur et transformé des cellules E.coli souche JM 83 en présence d'ampiciline. Les colonies recombinantes ont été testées par minilysats. Une des colonies qui contient l'insertion Hind III de 1.0 Kpb a été retenue. Nous l'avons appelée I2. Ce clone pEGCHI2 a été produit en grande quantité, comme matériel de départ.

Figure III.3 Carte circulaire du plasmide pEGCHI2



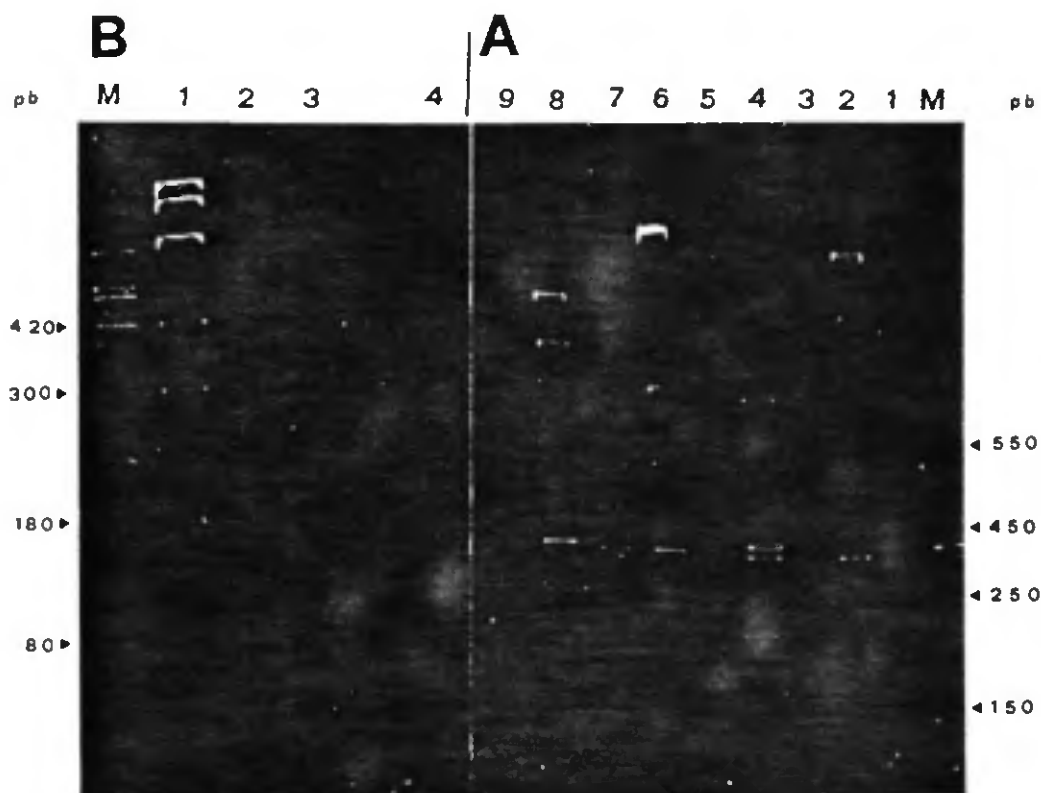
Pour obtenir la carte de restriction du fragment Hind III-I2 nous avons;

- élué l'insert Hind III-I2 à partir du matériel de départ, pEGCHI2,

- analysé les fragments obtenus après digestion et double digestion par:

Alu I, Dra I, Hinf I et Rsa I, Dra I + Alu I, Dra I + Rsa I, Dra I + Hinf I (cf. fig.III.4).

Figure III.4 Profil de digestions du clone pEGCHI2.



**A**-Légende: Migration sur gel Acrylamide 5 et 8%, électrophorèse dans du tampon TBE, pH= 8.8, à 20 mA, pendant 16 h.

Taille des fragments donnée en pb.

M) Marqueur de taille pBR322 digéré par Hae III.

587,540,504,458,434,267,234,213,192,184,124,123,104,89,80,64...

1) pEGCHI2 non digéré.

2) pI2 digéré avec Hind III et Hinf I

3) I2 " " Hinf I: 550, 450,

4) pI2 " " Hind III et Alu I

5) I2 " " Alu I:430, 380, 250, (1000) et (700) digestion partielle.

6) pI2 digéré avec Hind III et Rsa I

7) I2 " " Rsa I: 560, 380, 150

8) pI2 digéré avec Hind III et Dra I

9) I2 " " Dra I: 430, 300, 180, 90, (1000 non digéré)

**B**- Migration sur gel Acrylamide 8%, électrophorèse dans du tampon TBE, pH=8.8, à 15 mA pendant 16 h.

Taille des fragments donnée en pb.

M) Marqueur de taille pBR322 digéré par Hae III

1) pI2 digéré avec Hind III et Dra I

2) I2 " " Dra I et Alu I: 420, 300, 180, 80

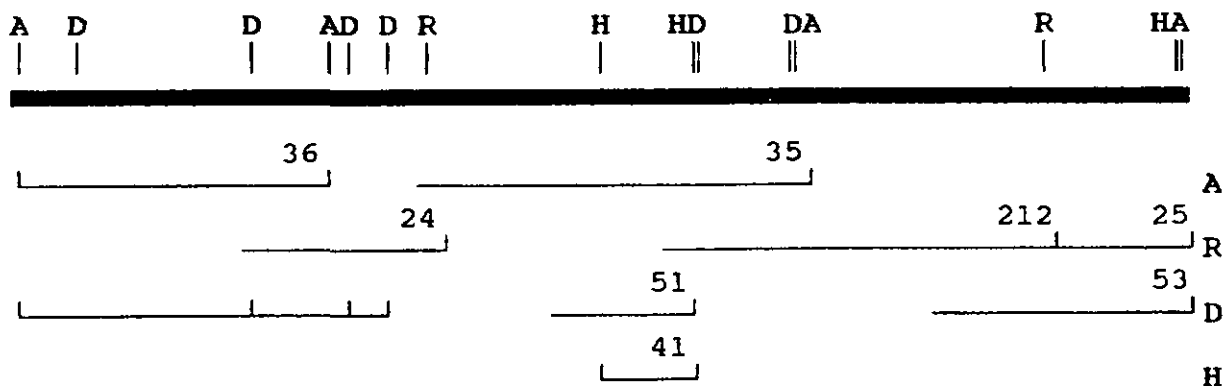
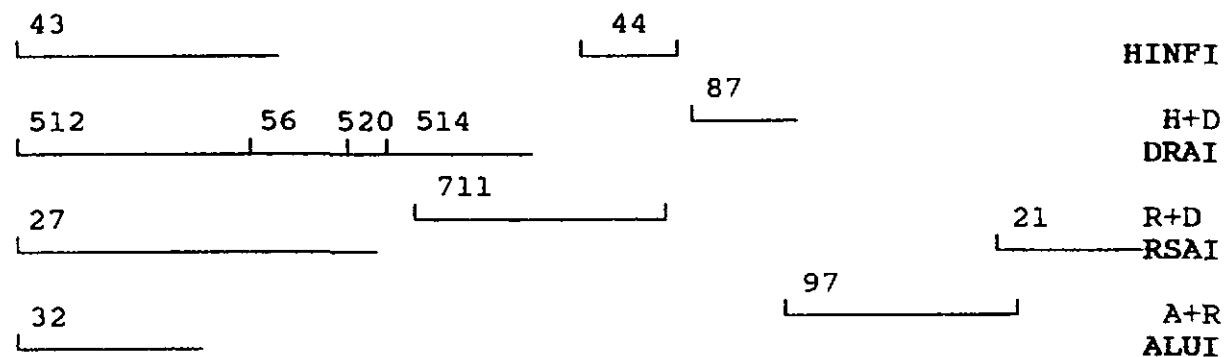
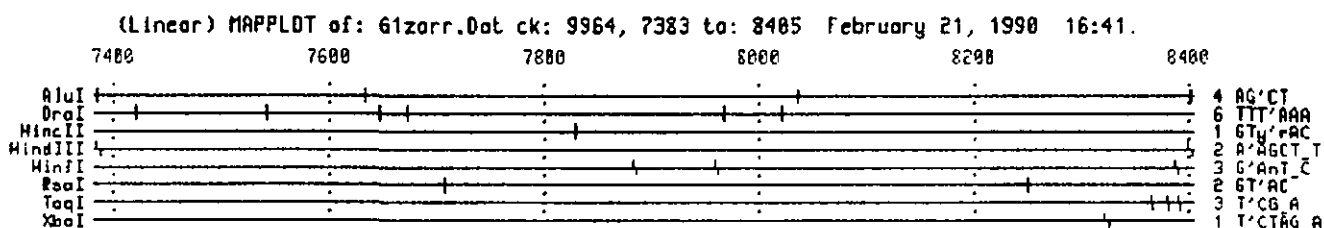
3) I2 " " Dra I et Rsa I: 270, 240, 180, 150, 90

4) I2 " " Dra I et Hinf I: 430, 240, 180, 90

Certaines des digestions décrites, ont été insérées dans le site Hinc II du bactériophage M13mp9. Le séquençage de la région a été fait par la méthode Sanger, (cf. chII.10); selon le chemin suivant:

Figure III.5 Carte de restriction et chemin de séquençage du fragment I2.

(les positions sur la carte de restriction correspondent à la séquence totale, montrée dans l'annexe 4. Les chiffres sur le chemin de séquençage correspondent au numero du clone.)



En analysant la séquence du fragment Hind III-I2, nous trouvons la séquence typique "5'-GTTC-3'" de la région "TF loop" des tRNAs.

Les ARNs de transfert sont des ARNs de petites tailles, 70 à 90 nucléotides. Ils peuvent prendre une structure secondaire en feuille de trèfle, ayant 4 zones d'appariement entre bases, les "stems", et 3 boucles, les "loops". Le "TF loop" se caractérise par une pseudouridine à la place d'une uridine. Le "TD loop" a une dihydrouridine. Le troisième est l'"anticodon loop". Ils ont aussi un "extra-loop" de différente taille pour chaque tRNA.

Dans le fragment Hind III-I2, la séquence du tRNA commence en position 8373 de la séquence complète (annexe IV), et se termine au site Hind III. Cette région correspond aux 26 dernières bases des tRNAs. Numérotation dérivée du tRNA Phe de levure adoptée au "Cold Spring Harbour Symposium on tRNA" 1979; compilation de Gauss et al, (1979).

3'-AAATGGAAGCTGGCCTGAGCTTGGCCGTTC-5'

Nous avons analysé les séquences des "TF loop" et "TF stem" des tRNAs chloroplastiques d'euglène, décrites par Hallick et al, (1984). Nous avons trouvé une certaine homologie avec la séquence de notre région "T F".

Cela pourrait bien être le tRNA Leu décrit par Kuntz et al, (1982). Ce tRNA Leu hybride avec le fragment Eco RI B du génome chloroplastique d'euglène (cf. annexe I).

Pour finir la séquence du tRNA et vérifier qu'il soit complet, nous avons cloné le fragment voisin à I2.

### III.3 CLONAGE DU SOUS-FRAGMENT HINC II DE 1.2 Kpb

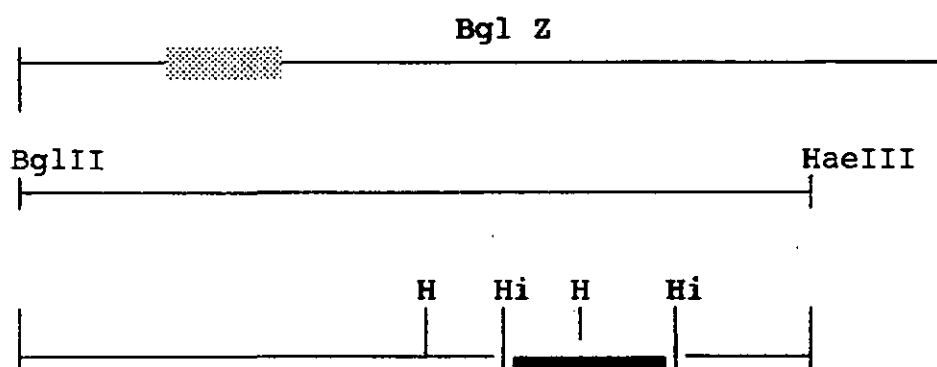
Dans le clone pEGCB6, nous avons cherché un fragment de taille raisonnable, qui contiendrait la suite de la séquence du tRNA.

Nous avons choisi l'enzyme Hinc II, qui permet un clonage facile dans le vecteur pUc8. Cet enzyme sépare un fragment de 1.2 Kpb, qui contient 500 nucléotides du fragment HindIII-I2, (schéma III.1).

Pour éliminer les fragments provenant de pBR322 et Eco P, du pEGCB6, nous avons:

- élué le fragment Bgl II-Hae III de 5 Kpb du clone pEGCB6.
- digéré ce fragment de 5 Kpb par l'enzyme Hinc II.

schéma III.1 Emplacement du fragment Hinc II.



Enzymes de restriction: H: Hind III  
Hi:Hinc II

Figure III.6 Digestion du fragment BglII-HaeIII de 5 Kpb.



Gel d'Agarose 1.2 %, migration 20 mA pendant 14 h.

M) Marqueur de taille: Phage Lambda digéré avec Hind III  
23.1, 9.64, 6.68, 4.36, 2.32, 2.02, 0.56 Kpb.

1) Fragment de 5 Kpb Bgl II-Hae III

2) " " digéré par Hinc II, 3.2, (1.2) x2 Kpb.

3) " " Hind III, 2.8, 1.5, 1.0 Kpb.

La digestion du fragment de 5 Kpb, Bgl II-HaeIII, avec l'enzyme Hinc II (colonne 2) nous donne:

- un fragment de 3.2 Kpb, correspondant à la région variable du clone,
- deux fragments de 1.2 Kpb, dont l'un contient le site Hind III du tRNA, (cf. schéma III.1).

Les fragments Hinc II de 1.2 Kpb ont été ligués au vecteur pUc8. Ce vecteur avait été digéré par Hinc II et déphosphorylé. Des souches JM83 de E. coli ont été transformées avec ces clones. Les colonies obtenues ont été transférées sur filtres, préparés selon Grunstein et Hogness (cf.ch.II.9). L'hybridation de ces filtres à la sonde Hind III-I2 a permis de repérer plusieurs clones.

L'analyse par minilysats de certains de ces clones, a toujours donné un insert de 1.2 Kpb. Nous avons appelé pEGCHic, le clone choisi.

Figure III.7 Carte circulaire du plasmide pEGCHic

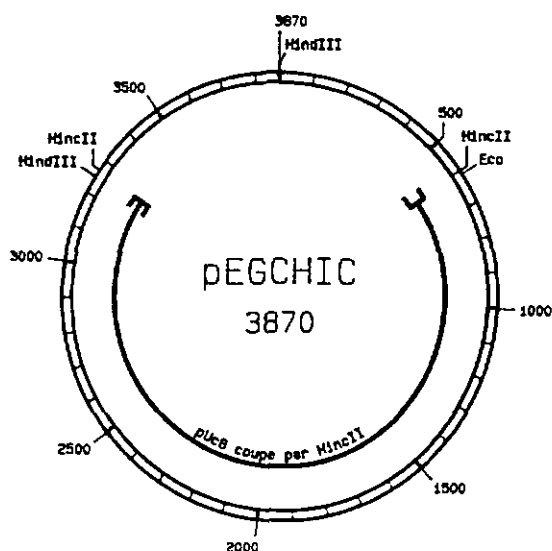
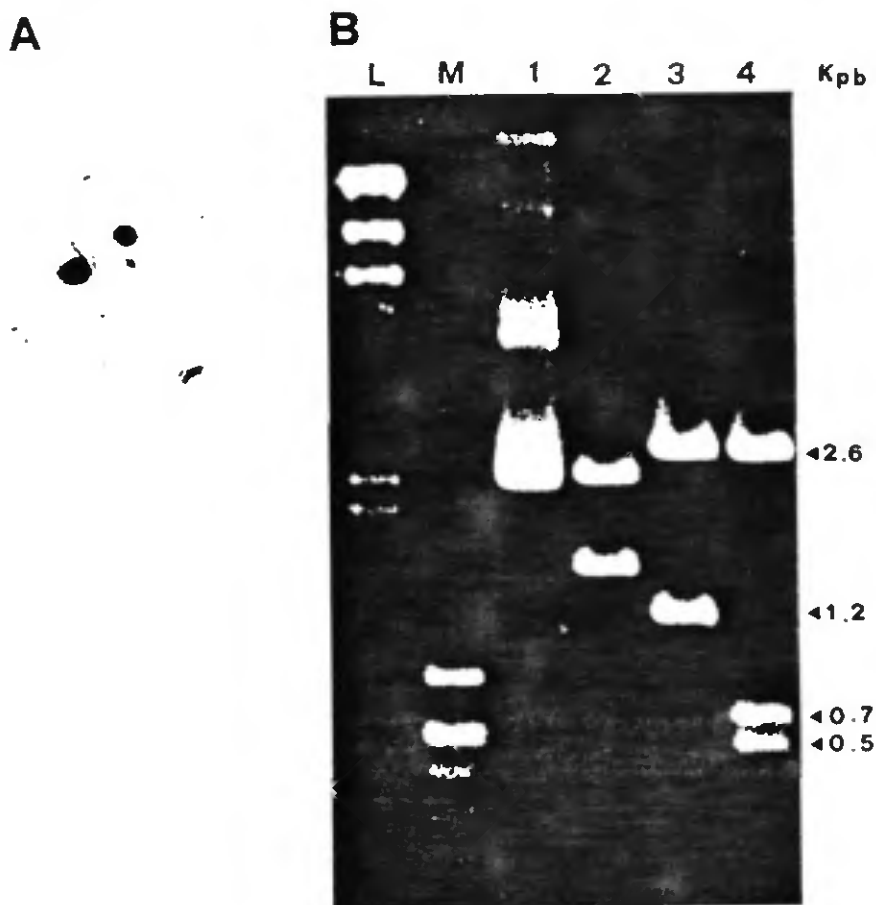


Figure III.8 Filtre d'hybridation et profil du minilysat du clone pEGCH1c



A) Filtre hybridé selon Hogness, exposition 1 nuit  
sonde I2 db, marquée par "nicktranslation".

B) Gel Agarose

L) Marqueur de taille: Phage Lambda digéré avec Hind III  
23.1, 9.64, 6.68, 4.36, 2.32, 2.02, 0.56 Kpb.

M) Marqueur de taille: Vecteur pBR322 digéré par Alu I  
910,659,655,521,403,281,257,226,136,100,....pb.

1) pEGCH1c non digéré

2) " digéré par Pvu II. Fragments 2.3, 1.5 Kpb.

3) " " Hinc II. " 2.6, 1.2 Kpb.

4) " " Eco RI et Hind III. 2.6, 0.7, 0.5 Kpb.

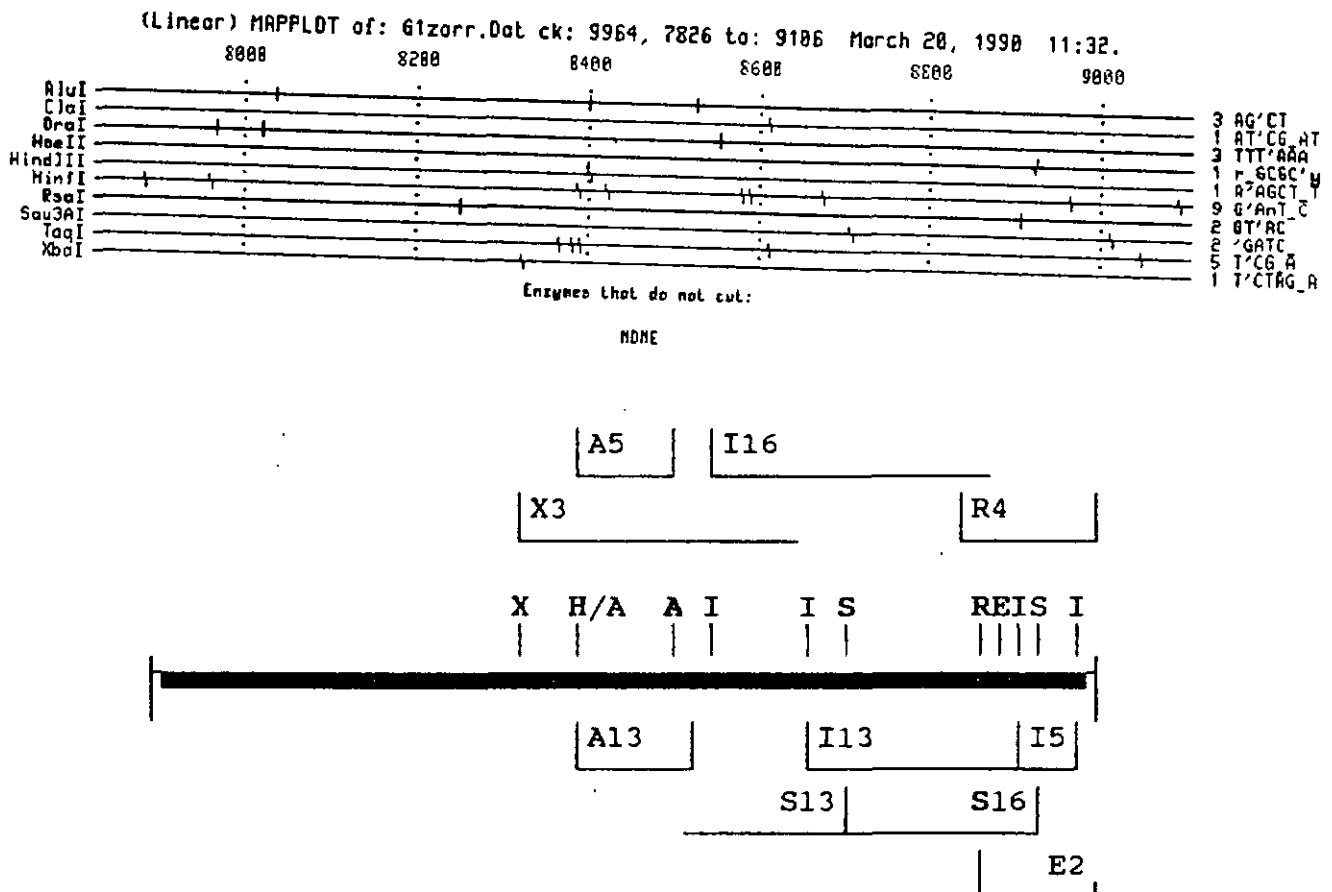
Les digestions des minilysats:

La digestion Pvu II, ajoute 300 pb du vecteur à l'insert, col.2, fig.III.8.B. La digestion Hinc II, nous sépare l'insert de 1.2 Kpb du vecteur 2.6 Kpb, col.3. La double digestion nous confirme le site de restriction Hind III dans l'insert, col.4.

Une carte de restriction du fragment Hinc II-Ic a été faite par différentes digestions et à l'aide des 573 premiers pb déjà séquencés (cf.fig.III.5).

Les 708 pb restants ont été séquencés par la méthode Sanger.

Figure III.9 Carte de restriction et chemin de séquençage du fragment Ic. (Les positions sur la carte de restriction correspondent à la séquence totale, annexe IV. Les chiffres sur le chemin de séquençage correspondent au numéro du clone.)



Liste des enzymes de restriction:

A: Alu I	R: Rsa I
E: Hae II	S: Sau 3AI
H: Hind III	X: Xba I
I: Hinf I	

Nous avons trouvé par séquençage et vérifié par digestion le site de restriction Hae II en position 8922 de la séquence total (cf.annexe 4). Ce site sépare les fragments Hae II D et Hae II J du génome chloroplastique d'euglène, et pourrait servir de point de repère pour d'autres travaux de clonage (Hollingsworth et al,1984).



Le résultat de notre séquençage et l'hybridation faite par Kuntz et al, (1982) d'un tRNA Leucine, nommé tRNA Leu 1, avec le fragment Eco B du ADNcp montre qu'il s'agit du même tRNA.

Ce codon 5 UUG 3' est utilisé, par exemple:

-1 fois par le gène rps12 du ADNcp d'euglène (Montandon et Stutz, 1984); gène qui code pour la protéine S12 de la petite sousunité du ribosome.

-1 fois par le gène psb F du ADNcp d'euglène (Cushman et al, 1988b), gène qui code pour le cytochrome b<sub>559</sub> associé au Photosystème II.

-14 fois par le gène psa A du ADNcp d'euglène (Cushman et al, 1988a).

-32 fois par le gène psa B du ADNcp d'euglène (Cushman et al, 1988a)

Les gènes psa A et psa B codent pour les deux grandes protéines du centre réactionnelle du Photosystème I (P700).

Mais nous ne pouvons pas affirmer que le codon 5'UUG 3' est forcément apparié à l'anticodon 5'CAA, (tRNA Leu 1) ou à l'anticodon 5'UAA, (tRNA Leu 2), selon la règle de flottement qui permet une souplesse dans l'appariement de la troisième base.

### III.5 ETUDE COMPARATIVE DE LA SEQUENCE DU tRNA LEU AVEC D'AUTRES tRNAs.

Nous avons comparé la séquence du tRNA Leu 1, anticodon CAA, avec:

- le tRNA Leu 2, anticodon TAA, du fragment Eco I du génome chloroplastique d'euglène, séquencé par Keller et Stutz, (1984);
- le tRNA Leu 3, anticodon TAG, du fragment Eco G, séquencé par Orozco et Hallick, (1982).
- le tRNA Leu, anticodon CAA de deux plantes supérieures.

Sans compter "l'extra-loop", le degré d'homologie est:

- de 84 % avec le tRNA Leu 2,
- de 50.6 % avec le tRNA Leu 3,
- de 77% avec le tRNA Leu de plantes supérieures, ayant le même anticodon, par exemple:
  - *Glycina max* chloroplaste L327 (Pillay et al, 1984),
  - *Zea mays* chloroplaste L321 (Steinmetz et al, 1983).

L'homologie entre les régions voisines des gènes tRNA Leu1 et tRNA2, tombe à 30%.

On constate aussi une homologie au niveau de la séquence du "TF loop" entre les tRNAs Val, Ala, Gly (Hallick et al, 1984) et le tRNA Leu1.

Figure III.11 Analyse comparative des séquences des tRNAs Leucine.

```

G***G*****C**A**C*****T*G**CTACAGAGCG **GA*****TC*TC*****C*      L327
G***GA*****TC*A**C*****T*G**TAAAGAGCG **GA*****TC*TC*****C*      L321
G*AGG*A**C*G***T**G**G**CAG***T*G**TCTTATGATG**AGA*****TCTCT*CCT***      Leu3
G*****TCA***C**T*****TG***TTATAAAGCG*A*****A**C*****          Leu2
5' TCCTTCGTTGGTGAAT  GGTAAACACCGTGTGATTCAAAATCACATGC ATAAG  CTTGCCGGTTCGAGTCCGGTCGAAGGTA 3' Leu1
  
```

Leu1, Leu2 et Leu3 séquences des tRNAs du chloroplaste d'Euglena gracilis.  
 L321 séquence du tRNA Leu du Zea mays.  
 L327 séquence du tRNA Leu du Glicina max.

Identité de séquence: Leu1-Leu2 = 84 %  
 Leu1-Leu3 = 50 %  
 Leu1-L321 = 77 %  
 Leu1-L327 = 77 %

### III.6 ANALYSE DE LA TRANSCRIPTION DU GENE tRNA LEUCINE

En sachant que le gène tRNA Leu1 peut interagir avec le codon 5'UUG, qui est utilisé par les protéines chloroplastiques, nous avons:

- analysé sa transcription,
- déterminé la taille de son transcript.

L'analyse de la transcription a été faite par hybridation de l'ARNcp total au fragment Hinc II-Ic, après:

- avoir fixé sur filtre de Nitrocellulose de l'ARN chloroplastique,
- et avoir marqué le fragment Hinc II-Ic, par "nicktranslation".

Les conditions d'hybridation était de 42°C et en présence de 50 % de formamide.

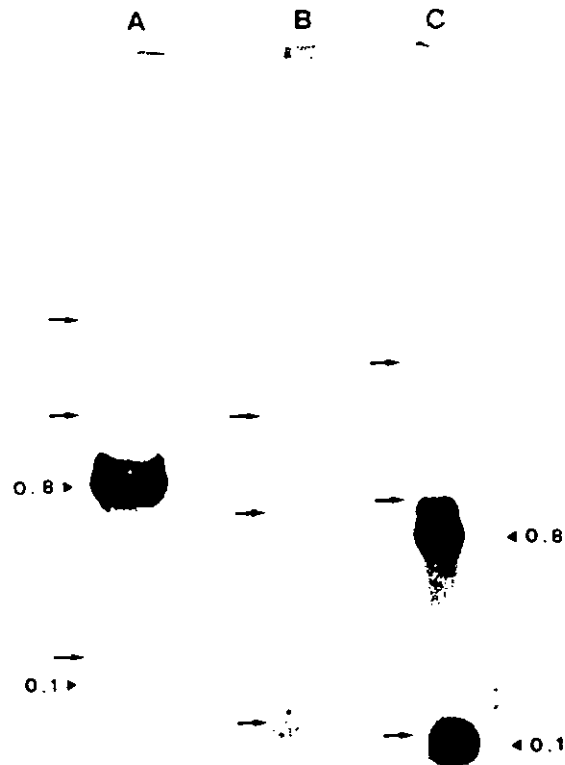
Un signal faible a été obtenu pour un ARN d'environ 100 pb, et un puissant signal pour un ARN de 0.8 Kb (cf fig.III.12).

Des hybrides de la même taille ont été obtenus en utilisant comme sondes: le clone Xba3 du M13 digéré une fois par l'enzyme Hae II, et une autre fois par l'enzyme Cla I. Sondes obtenues par marquage d'un ADN simple brin (cf. chapitre II.11,3).

Compte tenu de la spécificité des sondes, nous pouvons postulé que la bande à 0.1 Kb correspond au tRNA Leu mature et la bande à 0.8 Kb correspond à un ARN précurseur du tRNA Leu.

Il faut signaler la différence du rapport d'intensité entre le transcrit du tRNA Leu et le transcrit d'ARN précurseur quand nous avons utilisé une sonde double brin marquée par nicktraslation (cf fig.III.12-A), ou une sonde simple brin (cf fig.III.12-B,C). La différence entre les hybridations avec les sondes: Xba 3 digéré par Hae II (cf fig.III.12-B), et Xba 3 digéré par Cla I (cf fig.III.12-C), corresponde à les différents temps d'exposition.

Figure III.12 Hybridation du gène tRNA Leu avec l'ARNcp. Northern



A: Gel Agarose 1.2%, migration à 25 volt. 14 h. Exposition 1 nuit avec écran. Sonde: fragment 1.2 Kpb HincII-HincII marqué par "nicktraslation". Tailles des hybrides 0.1 et 0.8 Kb.  
 B: Gel Agarose 1.2%, migration à 25 volt, 20 h. Exposition 2 jours sans écran. Sonde: fragment simple brin du clone Xba3 digéré par Hae II, 600 b. Taille des hybrides 0.1 et 0.8 Kb.  
 C: Gel Agarose 1.2%, migration 100 volt, 6 h. Exposition 4 jours avec écran. Sonde: fragment simple brin du clone Xba3 digéré par Cla I, 290 bp. Tailles des hybrides 0.1 et 0.8 Kb.  
 Les flèches indiquent les positions de l'ARN ribosomique 23s, 16s et 5s dans chaque filtre.

Pour vérifier la taille du précurseur, des sondes simple brin de la région contenant le brin codant du tRNA Leu, ont été préparées ( cf schéma III.2).

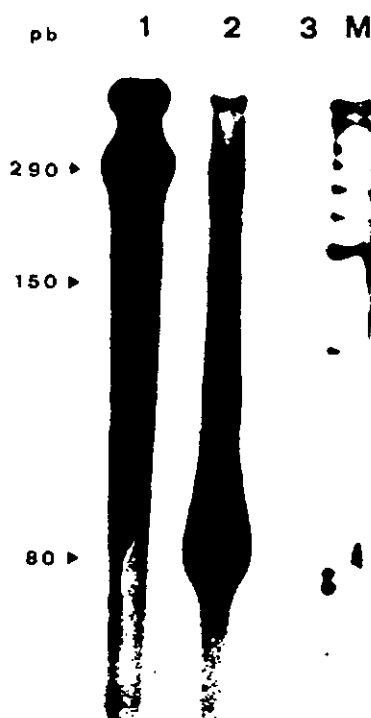
Ces sondes ont été hybridées, en phase liquide, à l'ARNcp total, et digérées à la Nucléase SI. Les fragments double brin obtenus, correspondent aux différentes tailles de cet ARN. Une migration sur gel Acrylamide 5%, permet de calculer ces différentes tailles.

Les sondes sont obtenues à partir :

- du clone Xba 3 digéré par l'enzyme Hae II (600 b) qui contient le gène tRNA et surtout la région voisine en 5'.
- du clone Xba 3 digéré par l'enzyme Cla I (290 b) qui contient essentiellement le gène tRNA Leu.
- du clone Alu 1 digéré par l'enzyme Hinf I (350 b) qui contient la partie 3' du gène et la région voisine en 3'.

Un contrôle a été fait, montrant que les fragments simple brin ont bien été dégradés (cf. fig III.13, col.3)

Figure III.13 Hybridation tRNA Leu, Traitement à la Nucléase SI.  
Premier gel.



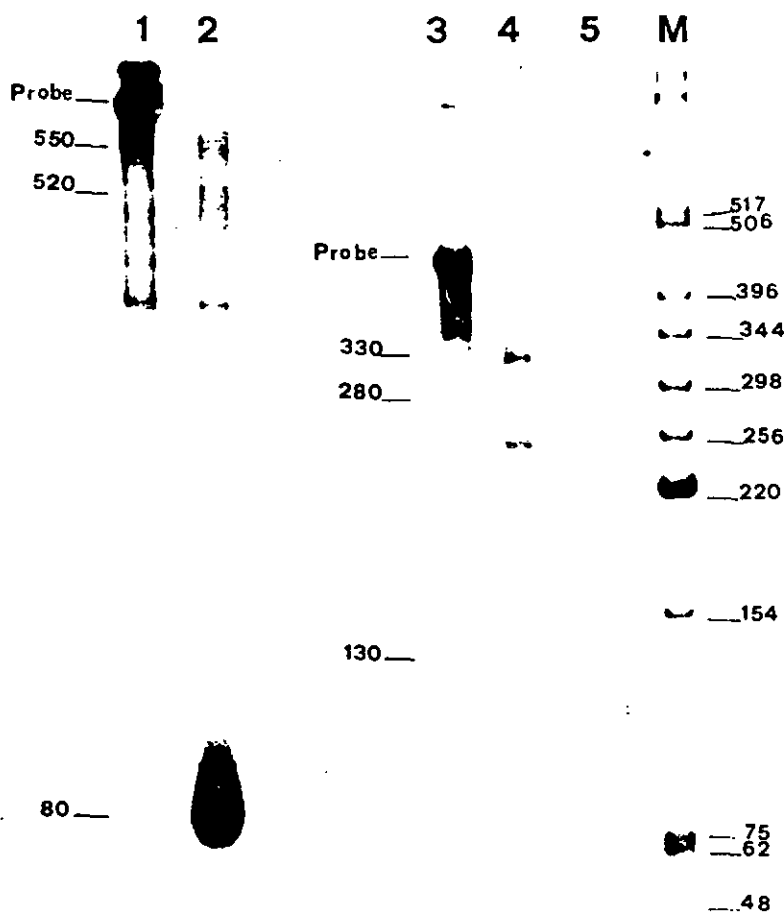
1. Sonde Xba 3, digérée par l'enzyme Cla I (290 b).
  2. Sonde hybridée avec l'ARNcp et digérée à la Nucléase SI.  
Fragments protégés: 290, 150 et 80 pb.
  3. Sonde non hybridée, complètement dégradée.
  - M. Marqueur de taille. pBR322 digéré par Hinf I (avec une petite insertion). 517, 506, 396, 344, 298, 256, 221, 220, 154, 75, 62, 48, (les fragments 256, 62 et 48 appartiennent à l'insertion).
- Gel d'acrylamide 8%, migration à 50 volt, 14 h. Exposition 1 jour sans écran.

Les résultats montrent que la sonde XbaI-ClaI (schéma III.2) est protégée dans toute sa longueur, bande à 290 pb, et donne en plus un fragment protégé de 80 pb. Ce fragment doit correspondre au tRNA mature. Une bande d'environ 150 pb est aussi protégée. Nous observons une traînée de dégradation de la sonde apparue après l'élution.

L'analyse d'une région plus grande a été faite avec les sondes:

- clone Xba 3 digéré par Hae II, et
- clone Alu 1 digéré par Hinf I, (cf. schéma III.2).

Figure III.14 Hybridation du tRNA Leu. Traitement Nucléase SI.  
Deuxième gel.



Gel d'acrylamide 5%, migration 50 volt. 14 h. exposition 2 jours.

1. Sonde Xba 3 digérée par Hae II (600 b).
2. Sonde " " " hybridée et traitée à la Nucléase SI. Taille des fragments protégés: 80, (520) et (550) pb. (La bande à 390 pb appartient à la sonde, une faible bande à 130 pb est aperçue).
3. Sonde Alu 1 digérée par Hinf I (350 b).
4. Sonde " " " hybridée et traitée à la Nucléase SI. Taille des fragments protégés: environ 130, 280, 330 pb.
5. Sonde Alu 1 non hybridée, mais digérée à la Nucléase SI.
- M. Marqueur de taille. pBR322 digéré par Hinf I (avec une petite insertion). 517, 506, 396, 344, 298, 256, 221, 220, 154, 75, 62, 48, (les fragments 256, 62 et 48 appartiennent à l'insertion).

Les résultats de la fig.III.14 montrent que:

- la sonde XbaI-HaeII, de 600 b donne deux fragments faiblement protégés de 550, et 520, et le fragment de 80 pb, bien protégé.
- la sonde AluI-HinfI, de 350 b, donne des fragments protégés de: 130, 280 et 330 pb.

Remarque: ces deux sondes se superposent (cf. schéma III.2).

L'interprétation de ces résultats permet de postuler que la taille maximale pour l'ARN précurseur est de 815 pb.

Le fragment protégé par la sonde AluI-HinfI de 20 pb, ne se voit pas dans ces résultats,(fig.III.14). Nous l'avons trouvé dans un gel plus concentré en acrylamide, 8% (cf fig III.15, col 2).

Figure III.15 Hybridation du tRNA Leu, extrémité 3'.  
Gel 8 % acrylamide.

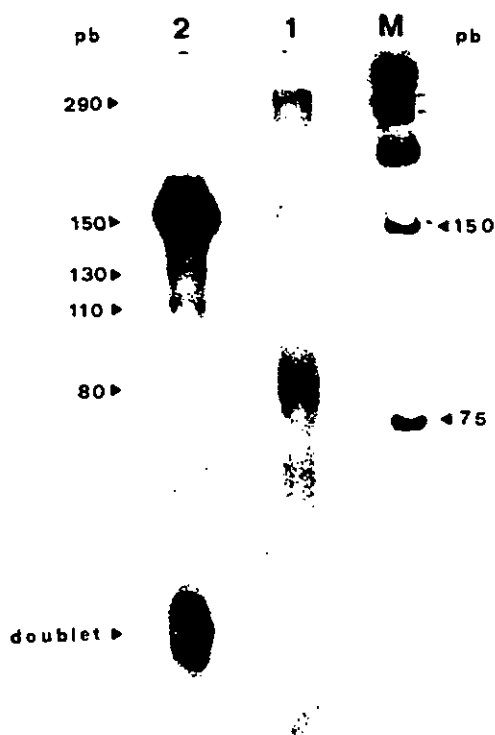


1. Sonde Alu 1 digérée par Hinf I (350 pb).
  2. Sonde " " " hybridée et traitée à la Nucléase SI. Taille des fragments protégés: 20, 130, 280, 330 pb.
  - M. Marqueur de taille. pBR322 digéré par Hinf I (avec une petite insertion). 517, 506, 396, 344, 298, 256, 221, 220, 154, 75, 62, 48, (les fragments 256, 62 et 48 appartiennent à l'insertion).
- Gel Acrylamide 8% ,migration à 60 volt, 14 h. Exposition 1 jour.

Avant d'avoir fait des hybridations avec de l'ADN simple brin, nous en avons fait avec des sondes d'ADN double brin. Les conditions d'hybridation étaient les mêmes, (milieu liquide, 42°C). Le traitement à la nucléase SI, après dénaturation de la sonde, était aussi maintenu.

Les bandes obtenues sur gel ayant les mêmes tailles que les sondes peuvent provenir aussi bien d'une hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN. Cela ne nous permet pas de dire quels sont les transcrits les plus grands, pour estimer la taille du précurseur. D'où l'idée d'utiliser une sonde simple brin. Nous présentons quand même les résultats obtenus.

Figure III.16 Hybridation des tRNA avec des sondes double brin.



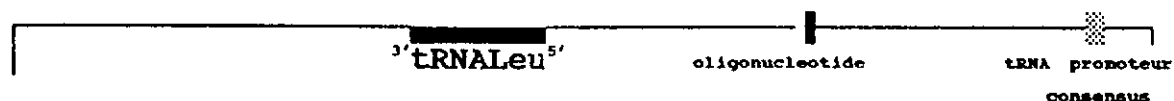
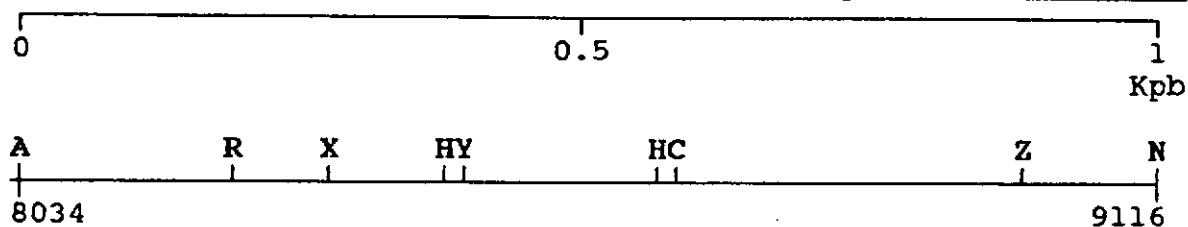
1. Sonde Xba 3 double brin (290 pb). Fragments visibles 290, 150, 80 pb
  2. Sonde Rsa 21 double brin (150 pb). Fragments visibles 150, 130, 120, 30 pb.
  - M. Marqueur de taille. pBR322 digéré par Hinf I (avec une petite insertion). 517, 506, 396, 344, 298, 256, 221, 220, 154, 75, 62, 48 pb (les fragments 256, 62 et 48 appartiennent à l'insertion).
- Gel Acrylamide 8% ,migration à 40 volt, 16 h. Exposition 1 nuit.

Les résultats sont les suivants:

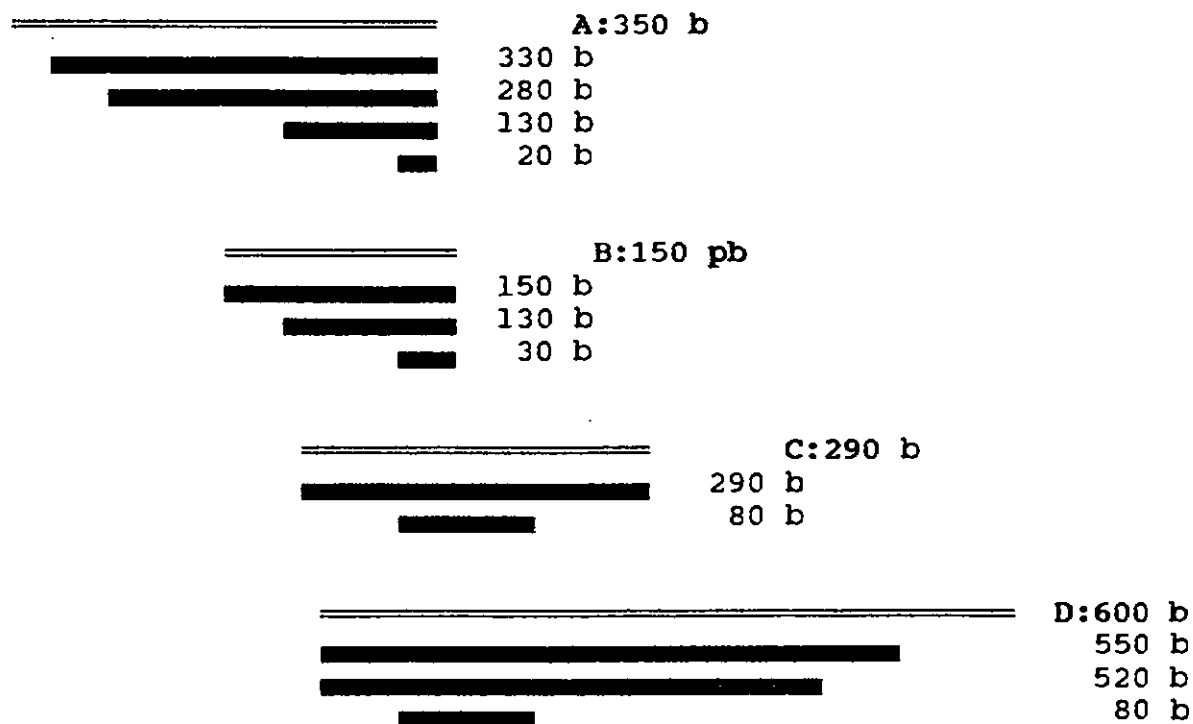
-bandes à 290, 150 et 80 pb pour la sonde XbaI-ClaI, colonne 1,  
 -bandes à 150, 130, 120 et 30 pb pour la sonde RsaI-HindIII.  
 Le doublet observé sur la colonne 2, de 30 pb, peut provenir de l'hybridation de la sonde avec le tRNA Leu1 et avec le tRNA Leu2, car l'homologie entre les deux tRNAs est de 84 %.

Une autre observation montre que les résultats obtenus avec la sonde double brin XbaI-ClaI, sont identiques à ceux obtenus avec la même sonde simple brin, (cf. fig.III.13)

## Schéma III.2 Résultats des études de transcription du tRNA Leu.



## NUCLEASE SI



Sites de restriction: A-Alu I, C-Cla I, H-Hinf I,  
 N-Hinc II, R-Rsa I, X-Xba I,  
 Y-Hind III, Z-Hae II,

==== ADN  
 \_\_\_\_\_ ARN protégé

Sonde ADN: A fragment Alu I-Hinf I, simple brin.  
 B fragment Rsa I-Hind III, double brin.  
 C fragment Xba I-Cla I, simple brin.  
 D fragment Xba I-Hae II, simple brin.

D'après les résultats obtenus (schéma III.2) nous estimons qu'un précurseur d'environ 815 b et un tRNA mature de 80 b existent. La polarité de transcription du gène tRNA Leu1 est la même que celle de l'opéron ribosomique. Le tRNA Leu1 n'a pas d'introns. Les positions 8034 et 9116 correspondent à la séquence complète (annexe IV).

La taille des transcrits, des tRNAs Leu chloroplastiques d'*Euglena gracilis* sont:

- tRNA Leu1: 80 b.
- tRNA Leu 2: 85 b (Gruissem et al, 1983),
- tRNA Leu 3: 87 b (Greenberg et al, 1984).

Les hybridations avec les sondes, AluI-HinfI et RsaI-HindIII, (cf. schéma III.2) montrent une dégradation de l'ARN en 3'.

#### Maturation des ARN de transfert.

Le "processing" en 5', des gènes tRNA d'euglène, a été décrit comme une activité "RNase P like". La dégradation en 3' fait intervenir d'autres RNases, (Greenberg et Hallick, 1986).

Des essais "in vitro" ont été fait par Robertson et al, (1972), sur des ARNs d'*Escherichia coli*. Les essais montrent que l'endonucléase "RNase P" est responsable du "processing" en 5' des tRNAs.

Bikoff et Geffer, (1975) ont purifié les enzymes responsables de la maturation des tRNAs. Les enzymes sont:

- l'ARN-polymerase ADN-dépendante, qui catalyse la formation d'une molécule d'ARN,
- une endonucléase qui hydrolyse la molécule d'ARN,
- l'endonucléase "RNase P" qui catalyse la maturation de l'extrémité 5' de l'ARN,
- la ribonucléase RNase P III qui dégrade spécifiquement l'extrémité 3' du précurseur.

Il semble que certains tRNA chloroplastiques proviennent d'un même transcrit. Chez *Euglena gracilis*, il y a des "clusters" de gènes de tRNA qui sont transcrits ensemble, et qui subissent plusieurs étapes de "processing", afin de séparer les différents ARNs. Le gène tRNA Leu1 est monocistronique, il n'est pas proche d'autres gènes.

Afin de connaître le début de la transcription tRNA Leu1, nous avons fait une "primer extension" dans la région 5' du gène. L'amorce a été préparée par la méthode de marquage d'un simple brin. Cette amorce correspond au fragment HinfI-ClaI (cf. schéma III.2) de 23 b + 36 b du M13. La fin de la réaction avec la Transcriptase inverse n'étant pas très nette, nous avons vérifié cette "Primer Extension" avec une amorce synthétique.

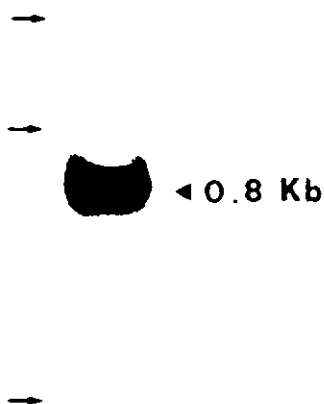
Amorce synthétique 17 mer: 5' -GGTGTACTTCTGTGCG- 3'

Cet oligonucléotide hybride avec le brin codant pour l'ARN en position 8658-8674, (cf. fig. III.19).

L'oligonucléotide 17 mer a été marqué en position 5' terminal, en utilisant du gamma-<sup>32</sup>P ATP. Il a été hybridé à l'ARN chloroplastique total qui contient le tRNA précurseur.

Par la technique de Northern nous avons vérifié l'hybridation. Elle nous a donné un fort signal de 800 pb, RNA précurseur, et aucun signal pour le tRNA mature.

Figure III.17 Hybridation de l'oligonucléotide avec le ARNcp.



Sonde: oligonucléotide 17 mer.

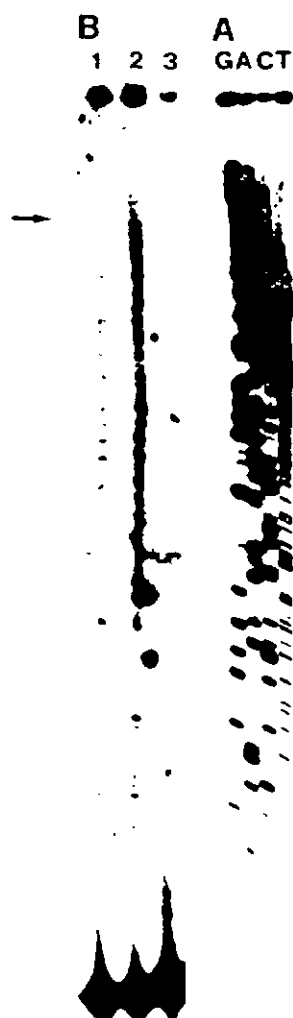
Taille de l'hybride 0.8 Kpb.

Gel Agarose 1.2 %, migration à 25 volt, 16 h. Exposition 2 jours avec écran. Hybridation à 47°C sans formamide.

Les flèches correspondent à la migration de l'ARN ribosomique 23s et 16s.

La transcriptase inverse incorpore 176 nucléotides à partir de l'oligonucléotide. La taille a été mesurée par la réaction de séquence qui a migré sur le même gel. Réaction de séquence faite à partir du clone Hinf 16 et de la même amorce, 17mer.

Figure III.18 Réaction de "primer extension".



Gel Acrylamide 8 % + urée. Migration 30 mA, 2 h.

Séquence: Hinf 16 + oligonucléotide, GACT-T

Primer Extension: oligonucléotide + RNACP total.

Exposition: 1 semaine + écran pour la "Primer Extension".  
1 nuit sans écran pour la séquence d'ADN.

A: séquence du clone Hinf 16.

B: 1, réaction de "primer extension" avec 8  $\mu$ g ARN,

2, " " " avec 15  $\mu$ g ARN,

3, " " " sens ARN.

Le précurseur du tRNA Leu 1 aurait une taille de 790 nucléotides. L'extrémité 5' du précurseur serait la position 8850 de la séquence total, (fig. III.20).

Schéma III.3 Transcrit du tRNA Leu1.

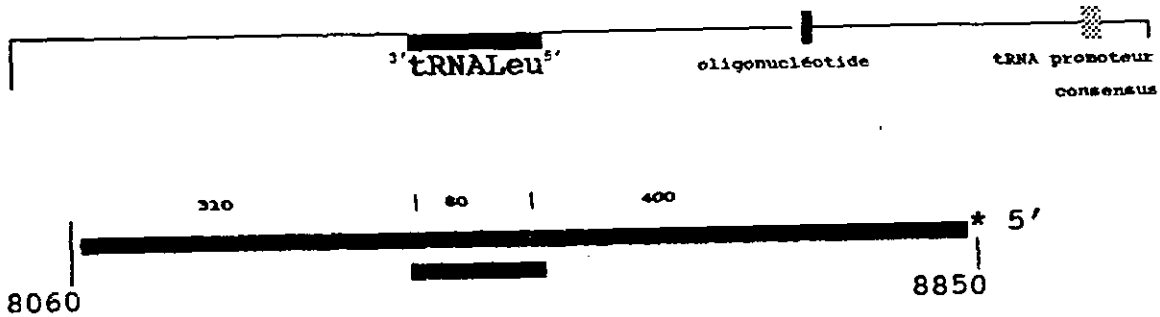


Figure III.19 Séquence du gène tRNA Leu1.  
(incluant les régions voisines au transcrit, selon les analyses de "S1" et "primer extension").

```

CTTTATCCATAAATAGTAAATTTAAATTCAGAAATAGCTTTCTATGTTTCTTCTTAAACCTATAGSTTTCTTTAGGAGTAAATCTAGTTCCACA
GAAATAGGTATTTATCATTAAATTTAAGTTTTAATDCAAAAGATTACAAAAGAGATTGGATATTCAAACAGAAATCTTCATTAGATCAAGTGT
8069 8019 8029 8039 8049 8059 8069 8079 8089 8099

TTTACTTTTTCTTTTAGTTTCATAATTTTTTCANAGTCTATATTTATTTTAACTAATAAATTTTTACATAATTATGTAAACAAAAATCA
AAATGAAAGAGAAATCAAGTATTAAGGTTTCAGATATATATTAATTTGATTTATTTAAAGATSTATTATACATTTTTTCTTTTCTAGT
8109 8119 8129 8139 8149 8159 8169 8179 8189 8199

ATATCAACTATTSTTTTAAAGATTTCAATCTACGACTATCCGTTTTG66TACTTCCATTCATTCAATTTT6TTATAAATTTACATTTTTTCAAAA
TATAGTTGATACAAACATCTAAGGTTAGATGCTGATAGTCCAAACCCATCAAGGTAAGTAAGTTTAAACAAATATTTAAATTTAAAGGTTT
8209 8219 8229 8239 8249 8259 8269 8279 8289 8299

TAAAGACDSTTGTATTTTAACTAGATATATATTCGAACCTTTTTATTAAACDSTTTTTTATTGAGAGTTTACTTOSACDGGACTOSAAACDSC
ATTTCTGSCAAACTAAAATTAAGTCTATATAACDSTTGAAGAAATATTTGCAAAATAAAGCTCTCAAAATGGAAGCTGGCTTGGCTTGGCTG
8309 8319 8329 8339 8349 8359 8369 8379 8389 8399

AAGCTTATGCATGTGATTTGATCACACGTGTTTACCATTTCACCACAGGAGAAATTTTAAACATTTTTTAAATSTATTCTGAATACTTCTCAG
TTCSAATAGCTACACTAAAACCTAGTGTGCACAATGTAAGTGTGCTTCCCTTTATAAAATTTGAAAAATTACATAAGACTTTATGAGAGATC
8409 8419 8429 8439 8449 8459 8469 8479 8489 8499

AAATGTAATAGTGTGCTG66TTTTAGCTATTTTTA6TAATGAACTTTTTAAAGGTTTCTGCACTTTATATCCAAATCTATTGATTTAAAG66
TTTACATTTATCAAAACCCAAATGATGATAAATCAATTAACCTGTGAAAAATTTCCAAAGACGTGAAATATAGGCTTATGATCAATGATTTCC
8509 8519 8529 8539 8549 8559 8569 8579 8589 8599

TTCTTTAGTAAATGATGCTGTAAGCAAGGDTTAACTACATGTAAGATGTTCTTTAGGTTTACTTCTGTSATTTCTCAAGTCTACTAATGCTTTT
ARGAATGCAATAGCTACAGCATTGTTTCCCAATTAATGTACACTTTTACAAGAAATCCAAATGAGACACDCTAAGAGTTTCAGATGATTAAGAAA
8609 8619 8629 8639 8649 8659 8669 8679 8689 8699

GCTGACDAGTSTTTACCATATCTCTCTTAGTTCCATCAACATTTAGTTCAGAACAGTATGATGATTTTTCTAAAATGDTATTTTATTAAATG
GACCTGCTACCAATGATATAGGAGGAAATCAAGGTAATTTAAATCAAGTCTTCTGATACACTATAAAGATTTTCAAGCATAAATTAATTAATAC
8709 8719 8729 8739 8749 8759 8769 8779 8789 8799

TTTTTAAATTTTTCTGACTATATTTTTTCATTAGTTTTATTTGTTCTTCTTATTTTTCTTTGAACTCTTTAGGCTTTTTCAATAGTTTC
AAAAATTAAGAAAGACTGAAATTTAAAAATTAATCAATAAANCAAGGAAATATAAAAGAACTTTGAGAAATCCDAAAAGTTTATCAAG
8809 8819 8829 8839 8849 8859 8869 8879 8889 8899

TGTGTGACTATTTTACACSAAGGCTGTTCTTTAGTGTTTAAATTTGTCATGCAATTCGAAATCTATCTAGTAATTTG66TCAAGTTCTCTCT
AGCACATGATGAAATGCTTCCDCAACAGGAAATCAAAATTTAAACCTGCTAAAGGCTTASATAGTCAATTAACCCAGATTCAGAGGAGAA
8909 8919 8929 8939 8949 8959 8969 8979 8989 8999

TCAGGATTTCCGATCTCATAGTATAAATCTTCAGSAGTGCAGAAATCCAACTCCTTCTCTTCTACDGTGTTCCATCTGAAAGCAGCAGAACTGATA
AGTCTTAAAGGCTAGGATATCATATTTAGAACDCTCTACDSTTAAAGCTTTAGGAAAGAGAAAGATGACACAAGGTAAGGACTTGTGCTCTAGATTA
9009 9019 9029 9039 9049 9059 9069 9079 9089 9099

AAACGTT
TTTGCAG
9109
    
```

Nous avons trouvé une séquence "consensus", séquence qui pourrait avoir une fonction de promoteur chez les tRNA du chloroplaste d'*Euglena gracilis* (Gruissem et al, 1983). Cette séquence se trouve à environ: 240 pb en amont de l'extrémité 5' du précurseur, et 640 pb de l'extrémité 5' du tRNA mature.

5' - GT A/T NTA A/T A/T A - 3' "séquence consensus"

5' - GT T TTA T T A - 3' position 9094 de la  
séquence totale

Dans les autres tRNAs chloroplastiques d'*Euglena*, on trouve cette séquence:

- 10 à 50 nucléotides en amont de l'extrémité 5' des gènes tRNA,  
- en début du "cluster" quand les gènes sont transcrits ensemble.  
Mais on ne la trouve pas chez le gène tRNA A qui est cotranscrit avec les gènes ribosomiques 16s et 23s.  
Cela suggère le rôle promoteur de cette séquence dans la transcription.

Il nous reste à connaître le rôle d'un si long précurseur. Nous avons étudié la possibilité que cet ARN fasse partie intégrante de la "ribonucléase P RNA".

La "RNase P RNA" est une endonucléase capable de couper l'extrémité 5' des tRNAs précurseurs. Elle est associée à une molécule d'ARN ayant une fonction catalytique. Nous savons que cet enzyme est présent chez les chloroplastes d'*Euglena gracilis*, mais nous ne savons pas, si l'ARN associé est codé dans le chloroplaste, ou s'il est importé du cytosole.

Cette molécule d'ARN a une taille de 377 nucléotides chez *Escherichia coli* (Reed et al, 1982), (Sakamoto et al, 1983) et de 401 nucléotides chez *Bacillus subtilis* (Reich et al, 1986). Une homologie de 43 % a été trouvée entre les deux molécules (James et al, 1988). Une structure secondaire de l'ARN commune aux deux bactéries nous montre deux centres importants. Des fonctions différentes à ces deux centres ont été trouvées par l'analyse de mutations ponctuelles des deux régions, chez *E. coli* (Shiraishi et Shimura, 1988). Une mutation du nucléotide 89, (remplace A→G), inhibe l'attachement de la protéine RNase P. Une mutation du nucléotide 329 élimine la fonction catalytique de l'ARN, la vitesse de la réaction diminue 400 fois.

La première mutation change la structure secondaire de l'ARN, entre les positions 89 et 239. L'activité catalytique reste intacte, mais l'interaction avec la protéine est annulée. Cette constatation amène les auteurs à postuler que la région 89-239 contient des sites d'attachement à la protéine.

Par une analyse comparative de l'ARN de *E. coli* et *B. subtilis*, Shiraishi et Shimura (1988) ont déterminé des séquences conservées dans la région 90-239, ces séquences pourraient correspondre à des sites d'attachement de la protéine RNase P. Nous avons cherché ces séquences chez notre précurseur du tRNA Leu:

5'	GUGCC	position	88	B.subtilis
	GUGCC	"	89	E.coli
	UUGCC	"	8400	cp E.gracilis
	AGUGCCACAG	"	178	B.subtilis
	AGUGCCACAG	"	124	E.coli
	AGUGCAGAAA	"	8570	cp E.gracilis
	GGUAAACCCC	"	226	B.subtilis
	GGUAAACUCC	"	229	E.coli
	GGUAAACGAU	"	8717	cp E.gracilis

Nous trouvons la première séquence, dans le tRNA Leu mature, et les deux autres dans l'ARN précurseur. L'homologie se trouve sur le brin codant pour l'ARN. La distance qui sépare les trois séquences est de:

138 nucléotides dans B.subtilis  
 140 nucléotides dans E.coli  
 315 nucléotides dans cp E.gracilis.

D'autres séquences conservées entre ces deux bactéries, n'ont pas été trouvées chez le chloroplaste d'euglène. Une analyse de toute la région donne un faible taux d'homologie. La différence de taille entre les molécules d'ARN de E.coli, B.subtilis et E.gracilis nous fait inutile l'essai de schématiser les homologies de la région.

Nous avons essayé de dessiner la même structure secondaire de l'ARN de la RNase P de E.coli, dans la molécule de l'ARN précurseur de E. gracilis à partir des séquences identiques trouvées. Nous ne trouvons pas le même schéma. Nous ne pouvons pas postuler qu'il s'agit de l'ARN de la "RNase P RNA", seulement qu'il y a une homologie des séquences.

Nous avons voulu dessiner à l'ordinateur la structure de ce tRNA Leu et de son précurseur. En prenant la taille minimum du gène, nous avons constaté que la structure qui consomme le moins d'énergie, ne nous donne pas la forme en trèfle, connue pour tous les ARNs de transfert. En analysant le dessin de tout le précurseur nous ne trouvons aucune forme de trèfle.

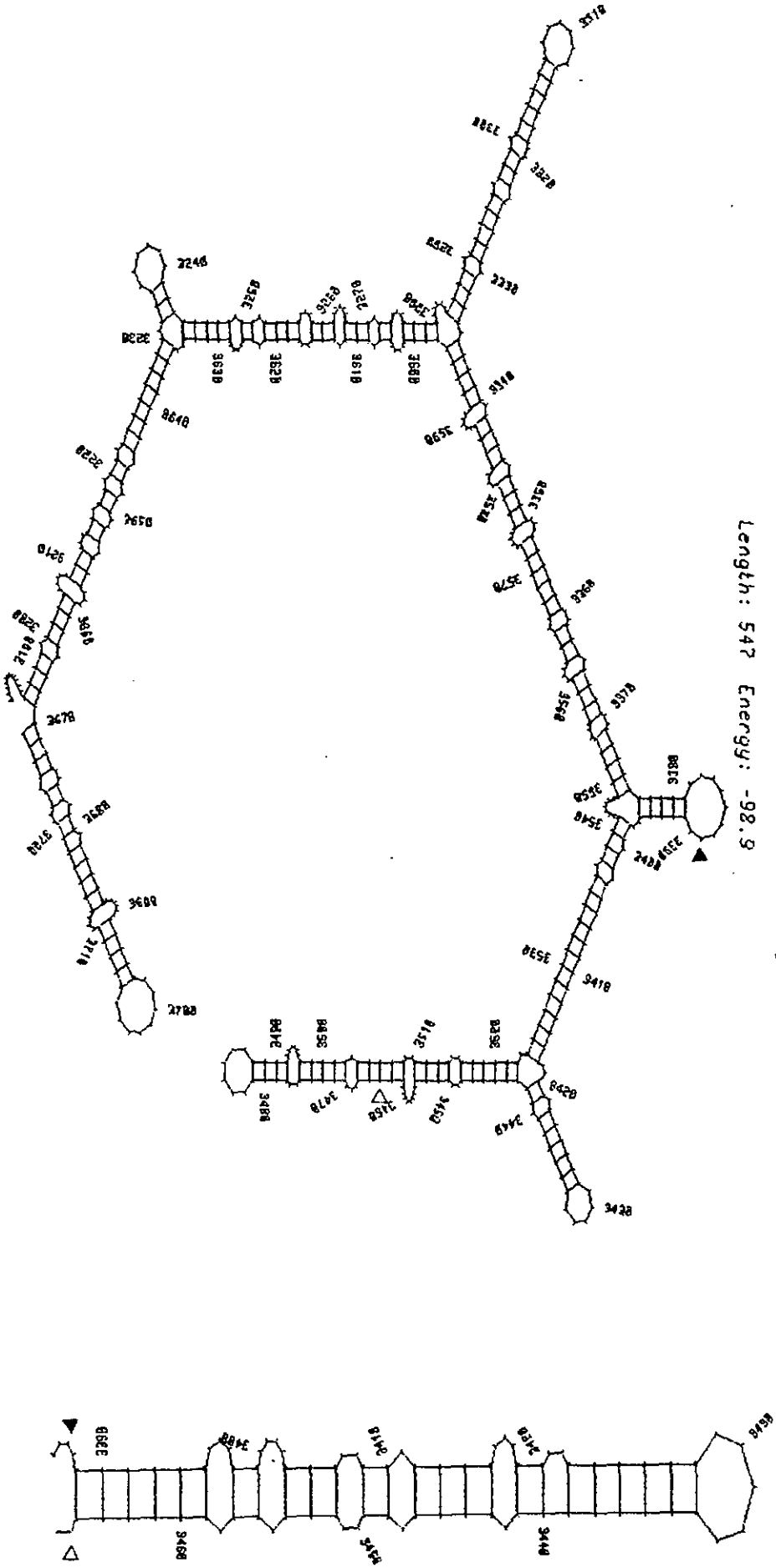
Figure III.21 Structure secondaire du tRNA Leu et son précurseur.

(Page suivante).

Les positions 3183 et 3729 correspondent à les positions 8060 et 8850 de la séquence totale, (annexe IV).

SQUIGGLES of: oregr3183.connect February 16, 1990 11:32  
FOLD of: OREGR.DAT Check: 1889 from: 3183 to: 3729 February 16, 1990 10:27

Length: 547 Energy: -98.9



### III.7 AUTRES STRUCTURES PRESENTES EN AMONT DE LA REGION ORI

#### SEQUENCES ARS

Nous avons analysé le reste de la séquence du clone et nous pouvons constater la présence d'une séquence ARS consensus, en position 7854. Cette séquence ARS correspond à la séquence décrite par Stinchcomb et al, (1980). Séquence nécessaire pour répliquer d'une manière autonome dans la levure le plasmide qui la contient.

séquence "consensus" 5' A/T TTTATPuTTT A/T 3''

Nous trouvons aussi deux séquences consensus ARC décrites par Vallet et al, (1984), en position 7765 et 7672 (brin complémentaire). C'est à dire, des séquences du chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardi*, capables de répliquer dans la levure le plasmide qui les contient.

La région de l'ADN qui contient ces séquences, entre le site Hind III (7384) et la région en aval du tRNA Leucine (8200) est très riche en A+T. Pourcentage de 82 % en moyenne.

séquence	ARS 5' TTTATGTTTA 3'	pos.7854
	ARC 5' ATTTATTTTA 3'	pos.7765
	ARC 5' TTTTATTTTA 3'	pos.7672

Nous avons analysé la capacité ARS de cette région. Cette analyse est décrite dans le chapitre III.

#### SEQUENCES ORF.

Dans la région en amont du tRNA Leucine, et à la fin de la région séquencée, nous trouvons deux séquences qui peuvent être ouvertes à la traduction (ORF).

Le premier ORF pourrait être transcrit dans le sens opposé à la transcription des gènes ribosomiques. Il débuterait en position 9037, et aurait au minimum 23 aa.

Le deuxième ORF serait transcrit dans le même sens que les gènes ribosomiques. Nous avons trouvé la fin de la séquence codante en position 8911. Le début n'a pas été trouvé. Dans cet ORF possible nous pourrions lire 65 aa.

Nous avons cherché une homologie de ces séquences ORF, avec la séquence des ORFs de tabac, et avec d'autres séquences de la banque EMBL. Il n'existe pas d'homologie, significative.

La transcription de la région Hinc II-Hinc II, inséré dans le plasmide pEGCHic, ne donne aucun transcrit additionnel à celui du tRNA avec une sonde HincII-Hinc II de 1.2 Kpb, ou une sonde plus petite (cf.schéma III.1).

Un séquençage de la région comprise entre le site Hae II et le site Bgl II, jusqu'à la fin du clone Bgl Z (Hollingsworth, 1984) pourrait nous donner la taille de ces ORFs.

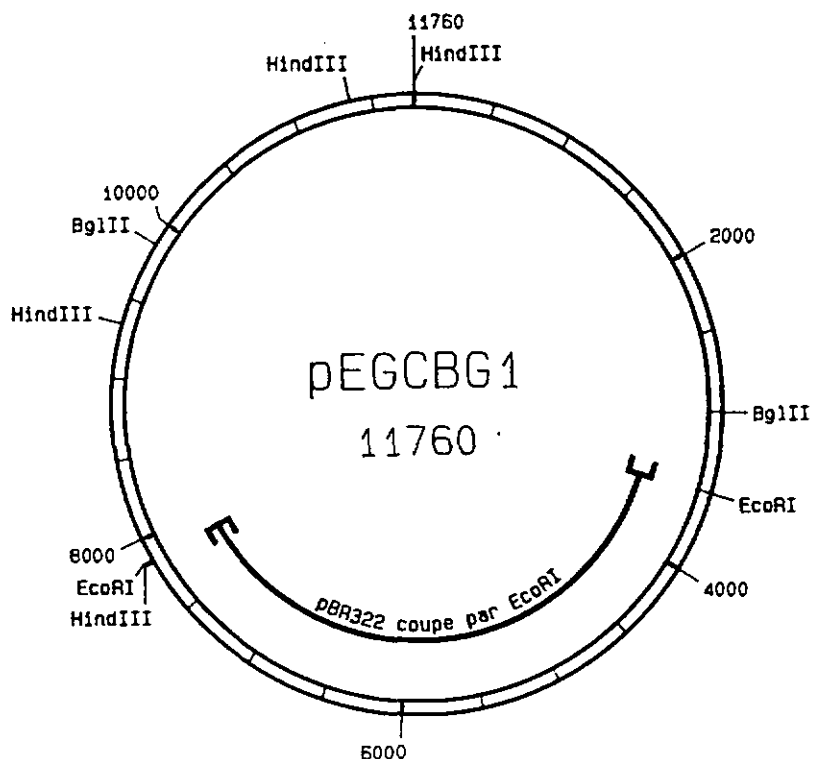
#### IV. RESULTATS. ANALYSE DU RECOMBINANT pEGCBG1

Nous avons reçu le fragment d'ADN Bgl II G1 purifié par E.Roux (Travail de thèse, 1984). Après séquençage, il a trouvé l'extrémité 5' du gène ribosomique supplémentaire 16s.

##### IV.1 CLONAGE DU pEGCBG1

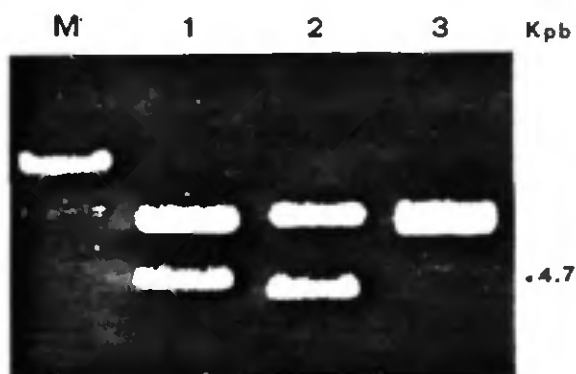
Nous avons inséré ce fragment dans le plasmide pBR322. Plasmide modifié avec le fragment chloroplastique Eco P, qui a un site de restriction Bgl II unique. Les extrémités du plasmide coupés par l'enzyme Bgl II sont dephosphorylées avec l'enzyme Phosphatase alcaline, puis liguées aux extrémités du fragment Bgl G1 de 5 Kpb. La transformation a lieu dans les cellules HB101 de E.coli. Nous analysons les colonies par la méthode des minilysats. Les colonies, qui après une digestion avec Bgl II, donnent un fragment de 7.4 Kpb (pBR322 + Eco P) et un fragment de 5 Kpb (Bgl G1) sont sélectionnées. Elles sont mises en culture pour obtenir le plasmide pur en grande quantité.

Figure IV.1, Carte circulaire du recombinant pEGCBG1



Nous vérifions le recombinant par gel après l'avoir digéré par les enzymes Bgl II et Eco RI.

Figure IV.2 Digestion test du recombinant pEGCG1.

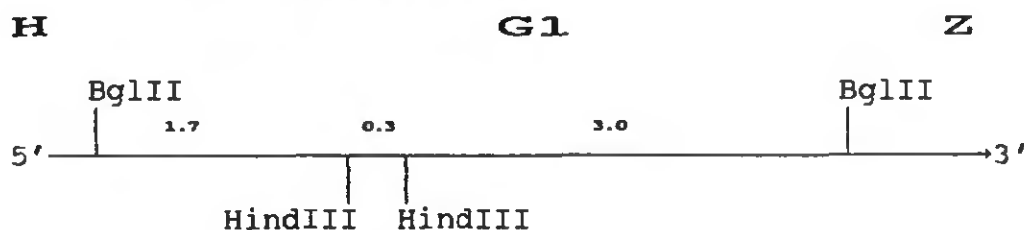


M: marqueur de taille, phage Lambda digéré par l'enzyme Hind III, 23, 9.4, 6.6, 4.7, 2.2, 2.0, 0.5 Kpb;  
 1: pEGCBG1 digéré par Bgl II: 7.4, 4.7 Kpb;  
 2: pEGCBG1, digéré par Eco RI: 7.7, 4.3 Kpb;  
 3: pEGCBG1, non digéré.  
 Gel Agarose 1 %, migration à 80 volt, 1 h. Coloration au BrEt.

Nous avons digéré le plasmide pEGCBG1 par l'enzyme Hind III. Nous avons obtenu 3 bandes avec une estimation de taille de 3, 1.7 et 0.3 Kpb.

L'arrangement des fragments Hind III sur la carte est donné au schéma IV.1.

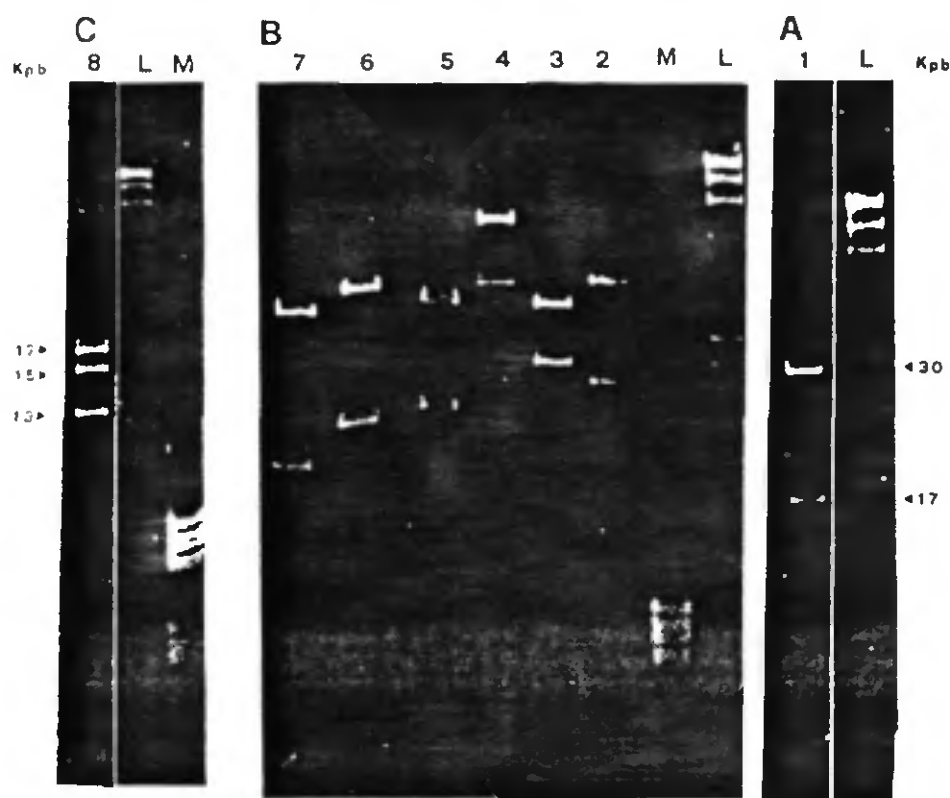
Schéma IV.1 Carte de la région.



Nous savons que le fragment Bgl G1 de 3 Kpb est placé à côté du fragment Bgl Z. La digestion du clone, pEGCH54, par l'enzyme Bgl II donne 2 fragments de 3 Kpb qui comigrent dans le gel. Le petit fragment 0.3 Kpb ne peut pas être placé du côté du gène ribosomique S16s (Bgl H). Car il n'y a pas de sites Hind III dans la séquence de 595 pb de la région 5' du gène ribosomique.

Nous avons fait d'autres digestions enzymatiques avec des enzymes qui ne coupent pas souvent (séquence reconnue de 6 nucléotides). Nous avons trouvé les sites uniques Xba I, Hha I, et Hae III. Ces trois sites se trouvent tout près du site Hind III. Site qui nous donne le fragment Hind III-Bgl II de 3 Kpb.

Figure IV.3 Analyse du Bgl GI par digestions.



- A) Gel Agarose 1.5 %. Migration 38 volt, 14 h. Coloration BrEt.  
 L: marqueur de taille, phage Lambda digéré par l'enzyme Hind III, 23, 9.4, 6.6, 4.7, 2.2, 2.0, 0.5 Kpb;  
 1: G1 5 Kpb, digéré par Hind III, 3.0, 1.7, 0.3 Kpb;
- B) Gel Agarose 1.8 %, 35 volt, 15 h.  
 L: idem;  
 M: Marqueur de taille, pBR<sub>322</sub> digéré par Hae III. 587,540,504,458,434,267,234,213,192,184,124,123,104,89,80,64.pb  
 2: G1 5 Kpb digéré par Xba I: 3, 1.9 Kpb;  
 3: G1 5 Kpb digéré par Hha I: 2.7, 2, 0.2 Kpb;  
 4: " " Hind III (digestion partielle);  
 5: " " Xba I et Hha I: 2.75, 1.6, 0.4, 0.2 Kpb;  
 6: " " Hind III et Xba I: 3, 1.5, 0.3 Kpb;  
 7: " " Hind III et Hha I: 2.75, 1.2, 0.4, 0.3, 0.2 Kpb;
- C) Gel Agarose 1.8 %, 35 volt, 15 h.  
 L: idem;  
 M: idem;  
 8: " " Dde I: 1.7, 1.5, 1.3, 0.3 Kpb;

## IV:2 SEQUENCAGE DE LA REGION HIND III-BGL II, 3 Kpb

Nous avons élué le fragment Hind III-Bgl II de 3 Kpb; à partir d'une digestion préparative du clone pEGCBG1, et aussi à partir du clone pEGCH54 digéré par Bgl II et Cla I. La digestion Cla I ajoute 4 pb du vecteur pBR322 au fragment de 3 Kpb (schéma IV.2).

Figure IV.4 Carte circulaire du recombinant pEGCH54.

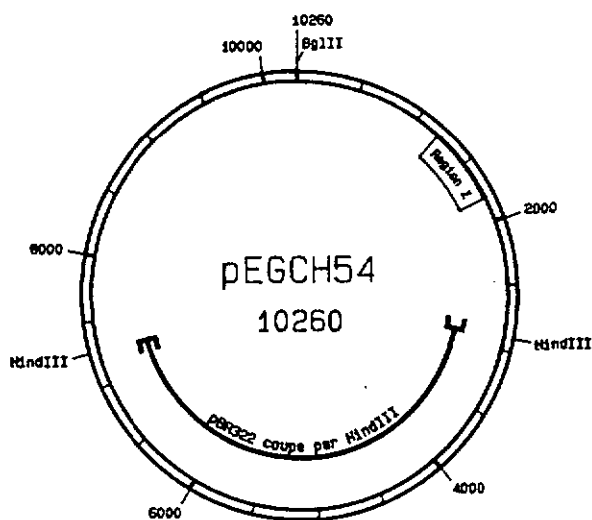
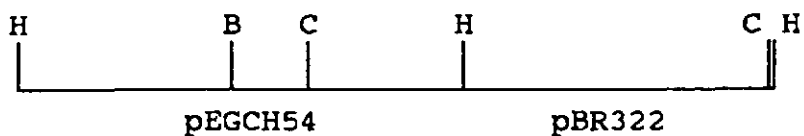
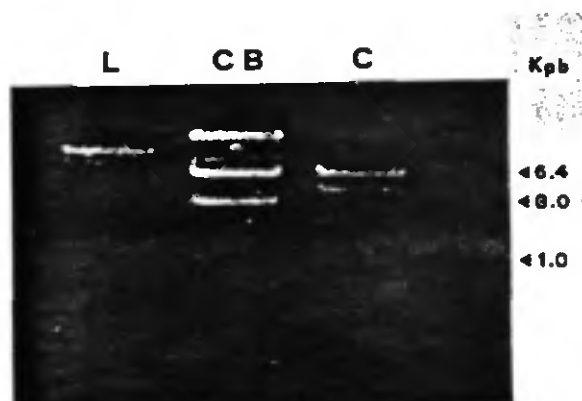


Schéma IV.2 Carte du plasmide pEGCH54.



H= Hind III  
B= Bgl II  
C= ClaI

Figure IV.5 Digestion test du recombinant pEGCH54.

Minigel Agarose 1%

C: pEGCH54 digéré par Cla I, 6.4, 4.0 Kpb;

CB: pEGCH54 digéré par Cla I et Bgl II: 6.4, 3.0, 1.0 Kpb;

L: marqueur de taille, phage Lambda digéré par l'enzyme Hind III, 23, 9.4, 6.6, 4.7, 2.2, 2.0, 0.5 Kpb;

Le fragment élué à partir du clone pEGCH54 nous permet de faire la jonction des deux fragments: Bgl G1 et Bgl Z.

Nous avons encore digéré ce fragment de 3 Kpb par les enzymes suivants Dde I, Alu I et Hpa II pour obtenir les sous-fragments:

Dde I: 1.7, 1.4 Kpb.

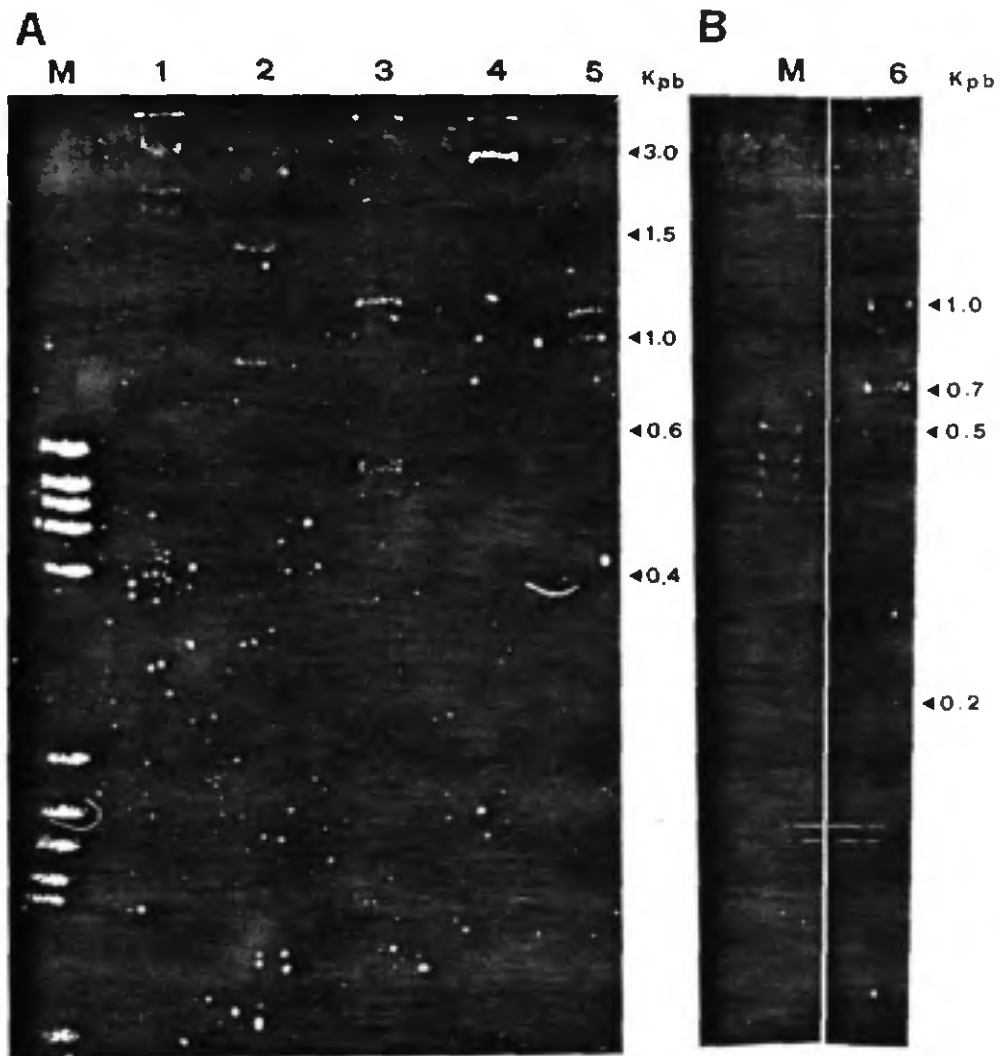
Alu I: 2 x 1.5 Kpb.

Hpa II: 2 x 1.5, 0.5 Kpb.

Les fragments d'ADN ont été traités à la polymérase "Klenow" pour obtenir un remplissage des extrémités. Nous avons ligé tous les fragments obtenus aux extrémités du bactériophage M13, digérés par l'enzyme Hinc II. Nous avons transformé des cellules JM 103 avec ces clones. Les colonies recombinantes ont été analysées par T\_track, puis séquencées, comme décrit dans les méthodes.

D'autres digestions: Dra I, Hinf I, Sau 3A, Taq I et Hha I, ont été utilisées pour séquencer ce fragment de 3 Kpb.

Figure IV.6 Profils de restriction du G1 3 Kpb, digéré par différents enzymes.



A) Gel Acrylamide 3.5 %. Migration 50 volt, 14 h. Coloration BrEt.  
 M: Marqueur de taille pBR<sub>322</sub> digéré par Hae III.  
 587,540,504,458,434,267,234,213,192,184,124,123,104,89,80,64pb;  
 1: G1 3Kpb, digéré par Alu I: 1.9, 1.7 Kpb (3 Kpb digestion partielle)  
 2: " " Dra I: 1.5, 0.8, 0.38, 0.23, 0.2, 0.1 Kpb;  
 3: " " Hinf I: 1.2, 0.55 x 2, 0.5, 0.25, 0.15 Kpb  
 4: " " Mae I: pas de sites;  
 5: " " Sau 3A: 1.1, 1.0, 0.6, 0.4, 0.2 Kpb;

B) Gel Acrylamide 3.5 %, 40 volt, 15 h. Coloration BrEt.  
 M: Marqueur de taille pBR<sub>322</sub> digéré par Hae III.  
 587,540,504,458,434,267,234,213,192,184,124,123,104,89,80,64pb;  
 6: G1 3Kpb, digéré par Taq I: 1.0 x 2, 0.7, 0.55, 0.2 Kpb;

Le séquençage ne correspondait pas à la taille de 3 Kpb. Cette différence de taille, nous a fait supposer l'existence de régions répétées. Par clonage et séquençage de fragments plus petits, nous avons distingué ces régions.

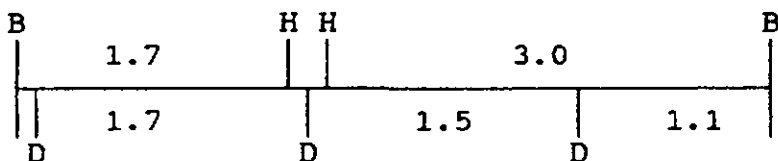
Les extrémités du fragment Bgl II-Hind III ont été clonées dans les vecteurs M13 mp8 et M13 mp9. Les vecteurs avait été coupés par les enzymes Hind III et Bam HI. L'enzyme Bam HI est compatible avec l'enzyme Bgl II.

-Bgl II 5'-A↓GATCT-3'  
-Bam HI 5'-G↓GATCC-3'

Le fragment de 3 Kpb a été inséré dans le sens Hind III-Bgl II (cf. brin - annexe 1) dans le vecteur M13mp8. Il a été inséré dans l'autre sens, dans le vecteur M13mp9 (schéma IV.1). Ainsi les deux extrémités du fragment peuvent être séquencées avec le "primer universel 17mer". 500 nucléotides de ces extrémités ont été séquencés, sur gel de polyacrylamide 5 % et urée. La migration la plus longue a duré 8 h.

Les digestions du clone pEGCBG1, et des fragments Bgl II 5.0 Kpb, Hind III-Bgl II 3.0 Kpb et Bgl II-Hind III 1.7 Kpb par l'enzyme Dde I, nous ont permis de placer les trois grands fragments Dde I 1.7, 1.5, 1.1 Kpb sur le fragment G1 (schéma IV.3).

Schéma IV.3: Arrangement des fragments DdeI dans le fragment G1 5.0 Kpb.



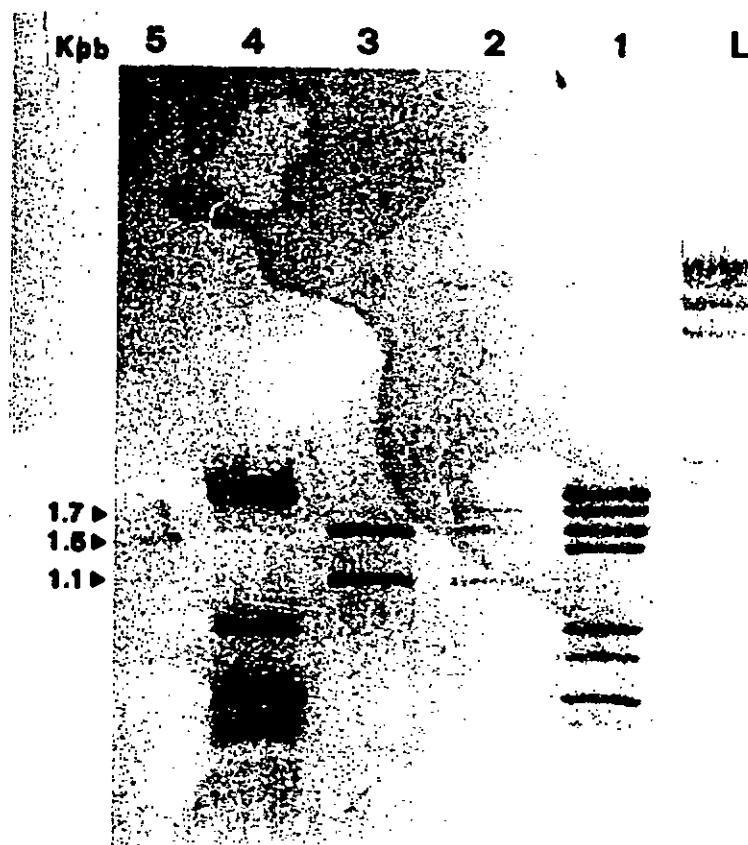
B: Bgl II

H: Hind III

D: Dde I

Taille des fragments en Kpb.

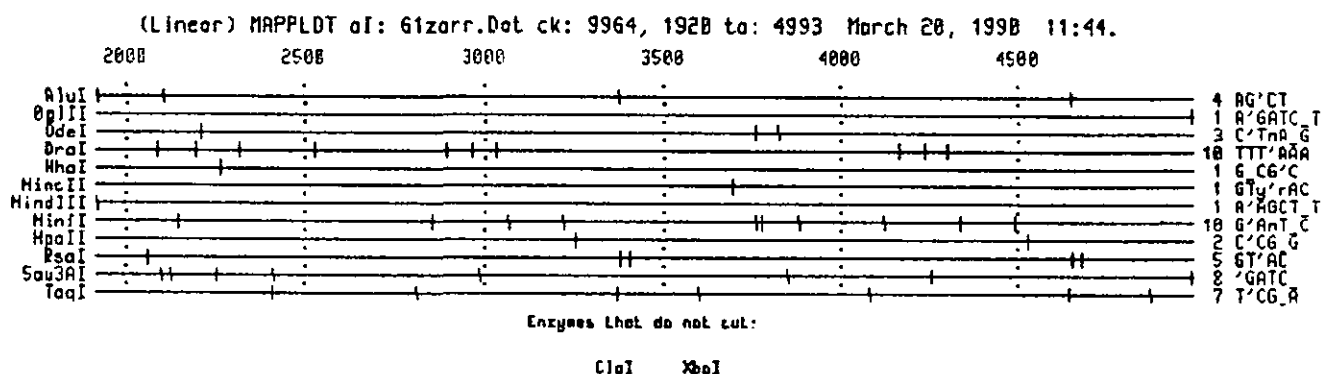
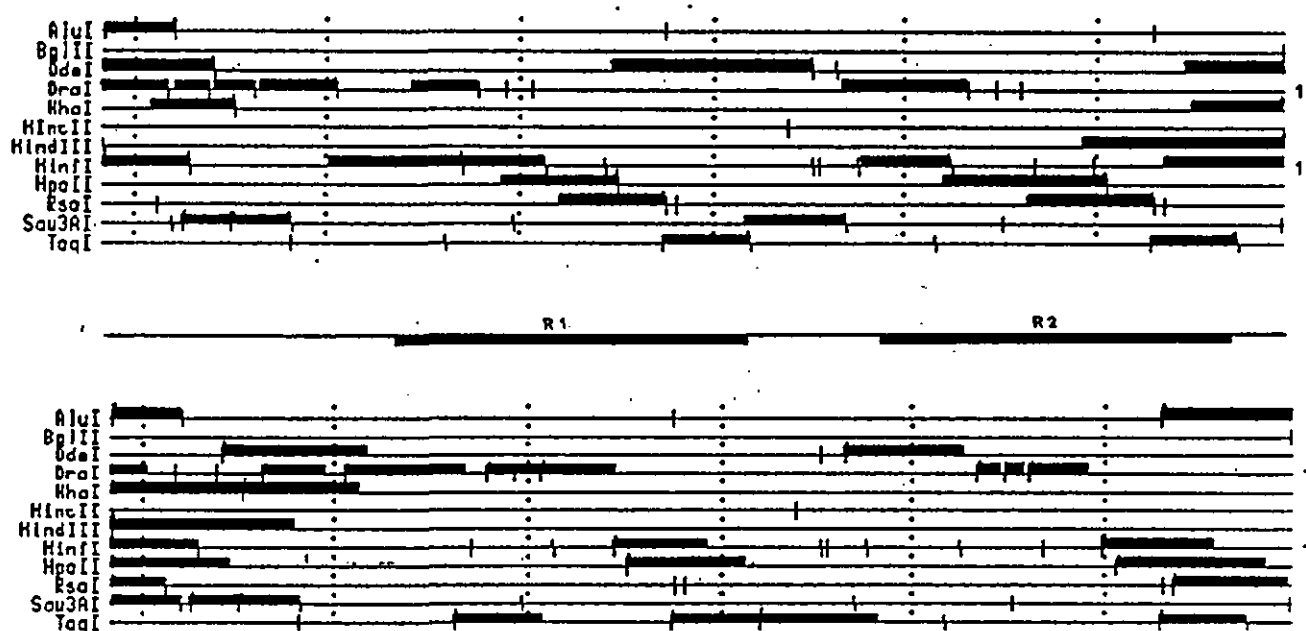
Figure IV.7 Détermination des fragments Dde I dans le fragment Bgl G1.



Gel Agarose 1.2 %. Migration 120 volt, 30 minutes. Coloration BrEt  
 L: marqueur de taille, phage Lambda digéré par l'enzyme Hind III, 23, 9.4, 6.6, 4.7, 2.2, 2.0, 0.5 Kpb;  
 1: pEGCBG1 digéré par Dde I; 2.0, 1.7, 1.5, 0.7, ... Kpb;  
 2: G1 4.7 Kpb digéré par Dde I: 1.7, 1.5, 1.1 Kpb;  
 3: G1 3.0 Kpb " " : 1.5, 1.1, 0.4 Kpb;  
 4: pBR322 + Eco P digéré par Dde I: 2.0, 0.7, ... Kpb;  
 5: G1 1.7 Kpb BglII-HindIII digéré par Dde I: 1.5, ... Kpb;

Les fragments Dde I ont été ligués séparément dans le vecteur M13. Le séquençage des 300 pb de chaque extrémité des insertions a permis:

- de positionner des séquences déjà connues,
- de confirmer la présence d'une région répétée de 920 pb.

Figure IV.8 Carte de restriction du fragment G1 de 3Kpb.Figure IV.9 Stratégie utilisée pour l'obtention de la séquence G1 de 3 Kpb.

### IV.3 SEQUENCAGE DE LA REGION G1 1.7 Kpb ET DE LA REGION INTERNE HIND III-HIND III DE 0.3 Kpb

Le fragment de 1.7 Kpb du clone pEGCBG1 a été élué après digestions Bgl II-Hind III. Ce fragment a été ensuite digéré séparément, par les enzymes suivants: Hinf I, Dra I, Rsa I, Alu I, Taq I. Les fragments obtenus ont été insérés dans le bactériophage M13 et séquencés

Le fragment Dde 1.7 Kpb, est décalé de 160 pb du fragment 1.7 Kpb Bgl II-Hind III, vers Bgl Z (schéma IV.3).

Les digestions du fragment G1 5.0 Kpb par les enzymes Hind III, Alu I et Dde I, nous ont permis de cloner et séquencer le petit fragment Hind III de 300 pb. Le pourcentage de réussite d'insérer le fragment de 300 pb est relativement grand, puisque nous obtenons un seul petit fragment de 0.3 Kpb et plusieurs supérieures à 1 Kpb.

Figure IV.10 Carte de restriction de la région G1: 1.5 et 0.3 Kpb.

(Linear) MAPPLDIT of: G1zarr.Dat ck: 9964, 1 to: 1930 March 28, 1990 11:38.

200 400 600 800 1000 1200 1400 1600 1800

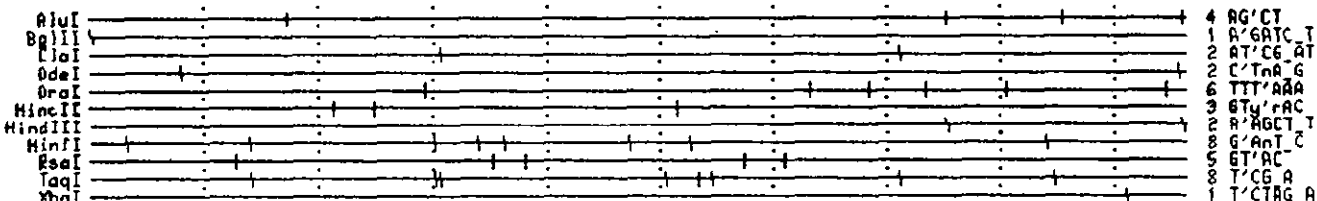
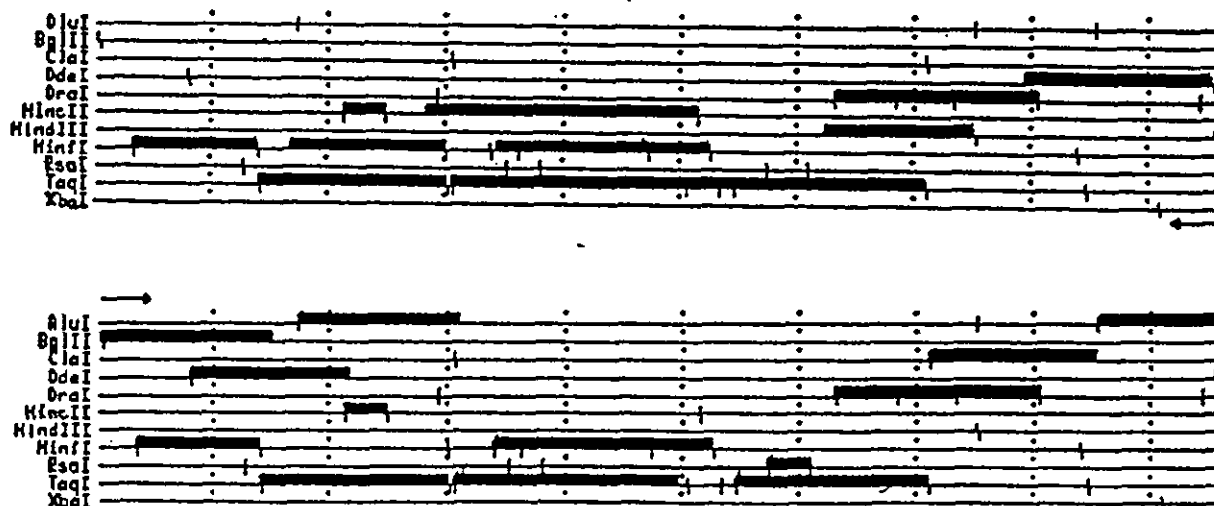


Figure IV.11 Stratégie de séquençage.



#### IV.4 ANALYSE DE L'ORF 350

La fin de la séquence ouverte à la traduction (ORF), se trouve à l'extrémité du fragment Bgl G1 (Figure IV.12). Le reste de la séquence se trouve dans le fragment Bgl Z, publié par Schlunegger et Stutz, (1984). L'extrémité 3' de l'ORF se trouve à la position 4985 et est constitué d'un codon stop TAG.

Cette séquence ouverte à la traduction, 1050 pb, pourrait coder pour une protéine de 350 acidesaminés, avec un poids moléculaire maximal de 41 KD.

Nous avons comparé la séquence de l'ORF 350 avec les séquences des banques EMBL, et SWISSPROT. Aucune homologie significative n'a été trouvée.

Figure IV.12 Séquence et traduction de l'ORF 350.

Bgl II

```

CAAATCCATCCCCACATTACAGTTGGATGAACTGCTAGATCTTGTGAACTAAACATTTTTCTTCAGGAACAACGTTCCGCCAAATCCCCAGGT
GTTTAGGTAGGGGGTSTAATGTCACCTACTTTGACGATCTAGAACACTTCATTGTAAAGAAAGTCCCTTTTGCAGCCGGGTTAAGGGGGTCCA
  D M S M M V T P H F Q * I K H L L C K K K L F L R E A W I G G P
                                     3
CAAATCCATCCCCACATTACAGTTGGATGAACTGCTAGATCTTGTGAACTAAACATTTTTCTTCAGGAACAACGTTCCGCCAAATCCCCAGGT
  4959    4989    4979    4989    4999    5009    5019    5029    5039    5049

ATTGACCGGGTCTGACATTGACTGCCCGTATGGGTAGACAAATCCTGTTTGCAGAACTCGGATTAAATTGTAAACATATCATTGCTAACCGGCTGACCTC
TAAACTGGCCACGACTGTAACCTGACGGGCATACCCATCTGTTTAGGACAAACGTTTCAGCCTAATTTAACATTGTATAGTACGATTGGCCGACTGGAG
  I Q G P A S M S Q G Y P Y V F G T Q L T P N F Q L M D N S V P Q G R

ATTGACCGGGTCTGACATTGACTGCCCGTATGGGTAGACAAATCCTGTTTGCAGAACTCGGATTAAATTGTAAACATATCATTGCTAACCGGCTGACCTC
  5059    5069    5079    5089    5099    5109    5119    5129    5139    5149

TTTTACGGTTTCAGCAATTGCATATGCATTAGCTACACACATACTTAAATAGAAACCAAGTTTGCACGATCCTTTTCATCACAATAAATGTTCTTGGAGT
AAAATGCCAAAGTCTTAACTATACGTAATCGATGTGTATGAATTTATCTTTGGTCAACCTGCTAGGANAAGTAGTGTATTACAAAGAACCTCA
  K V T E A I A Y A N A V C M S L Y F G T Q V I R K M V I F T R P T

TTTTACGGTTTCAGCAATTGCATATGCATTAGCTACACACATACTTAAATAGAAACCAAGTTTGCACGATCCTTTTCATCACAATAAATGTTCTTGGAGT
  5159    5169    5179    5189    5199    5209    5219    5229    5239    5249

TAACCATAAAGTCTTAAATGAAACCTCTAGGTCATAACCCCTCTTCCAAATAAAATTTATCAAAATCAGTTGACCAAAAATCAGGATTGAAAATGAAAA
ATTGGTATTTACGAAATTAAGTGGAGATCCAGTATTGGGAGAAAGGTTATTTAAAGATGTTTATGTCAGACTGTTTATAGTCTTAAGTCTTAACTTTT
  L W L T S L S G E L D Y G E E L L I K D F D T S W F D P N F I S F

TAACCATAAAGTCTTAAATGAAACCTCTAGGTCATAACCCCTCTTCCAAATAAAATTTATCAAAATCAGTTGACCAAAAATCAGGATTGAAAATGAAAA
  5259    5269    5279    5289    5299    5309    5319    5329    5339    5349

TCTTCAACTTTGAAACTTTGTTCGATAGAAAGAAATATTACTGGGCTTGGACTTGAATTTAAATCATCTTGGAAAGSATTGTCTTCAGAAATTATCATTTT
AGAGTTGAAACTTTGAAACAAGCTATCTTCTTATAAATGACCCAGAACTGAACTGAAATTTAGTAGAAGCCTTGTAAACAGAGTCTTAAATAGTAAAA
  D E V K F S Q E I S P I N V P D D S S K L D D E S R N D E S N D N K

TCTTCAACTTTGAAACTTTGTTCGATAGAAAGAAATATTACTGGGCTTGGACTTGAATTTAAATCATCTTGGAAAGSATTGTCTTCAGAAATTATCATTTT
  5359    5369    5379    5389    5399    5409    5419    5429    5439    5449

```

TTTGATCATGATTAAAGAGAAAAAGAGCCAAAGATTTTTGAAGATTCCTTAAAGTACACCAAAAAATTAATGCAAAATTAATGDCSCAATAACCCAGA  
AAHCTAGTACTAATTTCTCTTTTCTTDCSTTCTAAAACTTCTAAGAAATTCATGCTGTTTTTTAAATTTACGTTTTAAATTTACGCTTATTTGCTCT  
Q D H N F S F F S A L I K S S E K L V G F F K F A F N F A C Y G S

TTTGATCATGATTAAAGAGAAAAAGAGCCAAAGATTTTTGAAGATTCCTTAAAGTACACCAAAAAATTAATGCAAAATTAATGDCSCAATAACCCAGA  
5459 5469 5479 5489 5499 5509 5519 5529 5539 5549

AAAACTAATTACCATAATTACGSCAATTTGGAAATAAAATTCCTACTATAAAATATTTAATTTTTTCCAAAACTCCAAAGCCTTCAAGCAAGGCTG  
TTTTGATTAAATGGTAAATGDCSTTAAACDCTTATTTAAGAATGATATTTATAAAATTAATAAAAGGTTTTGAGGTTTOSGAAGTTGCTTCCAGC  
F S I V M I V A I K S I F H K S Y F I K I K K W F E L A K L S P D

AAAACTAATTACCATAATTACGSCAATTTGGAAATAAAATTCCTACTATAAAATATTTAATTTTTTCCAAAACTCCAAAGCCTTCAAGCAAGGCTG  
5559 5569 5579 5589 5599 5609 5619 5629 5639 5649

TTTTCAAAATTCATTTTTAGAAATTTCAAGCACTTGATTACTTTAATGTTCTGTTACCAACTTGAACAATAAAATTAAGTAAGGSCATATTGSA  
AAAAATTTTAAATGTAATCTTTAAAGTTGCTGAACTAATGAAATTTCAAGCACTGTTGAACTTTGTTTTAATGTCATTTGCTGATGAACT  
N K L I E N K S I E V S K I V K L T R N G V O F L F N C Y L A Y O I

TTTTCAAAATTCATTTTTAGAAATTTCAAGCACTTGATTACTTTAATGTTCTGTTACCAACTTGAACAATAAAATTAAGTAAGGSCATATTGSA  
5659 5669 5679 5689 5699 5709 5719 5729 5739 5749

TATAATTTTTGAAATTTATCAATAAGCCAAAGAAAACTTTTGGATCSTTTTTTTTTTACTATCCTTAGAAAAATTCCTAGGAAAAATTAATTAAT  
ATATAAAAGCTTAAATAGTATTTCGTTTTCTTTTTGAAACCTAGCAAAAAATAAATGATAGGAATCTTTAAGGATTCCTTTTTAATTTAA  
Y N K S I I L L A L L F V K P D N K K K V I R L F N R L F F I L N

TATAATTTTTGAAATTTATCAATAAGCCAAAGAAAACTTTTGGATCSTTTTTTTTTTACTATCCTTAGAAAAATTCCTAGGAAAAATTAATTAAT  
5759 5769 5779 5789 5799 5809 5819 5829 5839 5849

GTAAAAAGATAACTAGTATTAACTAACAAATAAATTTATAAATAATTTGTTTGAATAAATAAATAAATTCATTGCAAGGTAGCCAAAGCAATATCGA  
CATTTTTCTATTGATCATAATGATGTTTATTTAAATATATTAAACAACTTTTTTATGTTATTTAACGTAAGCTCCAGCTGCTTATAGCT  
Y F S L S T N V L L Y I K Y Y N T O F F Y L L I A N C T A L S Y R

GTAAAAAGATAACTAGTATTAACTAACAAATAAATTTATAAATAATTTGTTTGAATAAATAAATAAATTCATTGCAAGGTAGCCAAAGCAATATCGA  
5859 5869 5879 5889 5899 5909 5919 5929 5939 5949

TTAATTAATAGATTTACTTTAATTATATAGTTGATTAAGGCTGTAAGAAACAAATTTCTAAGCAATACATCSTAAATCATAAATGAAAT  
AATTAATTTATCTAAATGAAATTAATATATCAGTATTTCTCAGATTTTTGTTTTAAGGATTTCTTATGATGATTTAGTATTTACTTATA  
M I L I S K V \* I I Y W M F S H L F V F N R F F Y M T F I N I Y

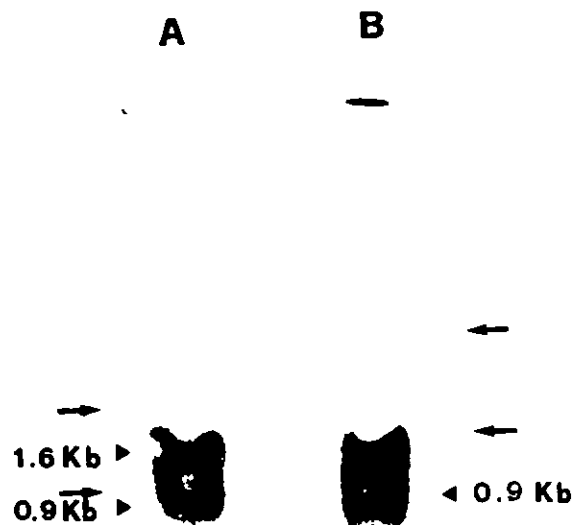
TTAATTAATAGATTTACTTTAATTATATAGTTGATTAAGGCTGTAAGAAACAAATTTCTAAGCAATACATCSTAAATCATAAATGAAAT  
5959 5969 5979 5989 5999 6009 6019 6029 6039 6049

AGAAATCSTTTTTTCTTTAATTTCTTTACCTATTTCTATGAAATG  
TTCTTTAGCAAACTAAACCAAAATTTAAAGAAATGATTAAGGATGCTTACA  
S I T k k A K L K R \* R N R H I

AGAAATCSTTTTTTCTTTAATTTCTTTACCTATTTCTATGAAATG  
6059 6069 6079 6089 6099 6109

La transcription de l'ORF a été analysée par l'hybridation des filtres d'ARNcp total à une sonde spécifique double brin. La sonde est le fragment Bgl II-Cla I du pEGCH54, 960 pb, (cf. schéma IV.4). L'hybridation nous donne deux bandes à 1.6 et 0.9 Kpb.

Figure IV.13 Northern de la région ORF 350.

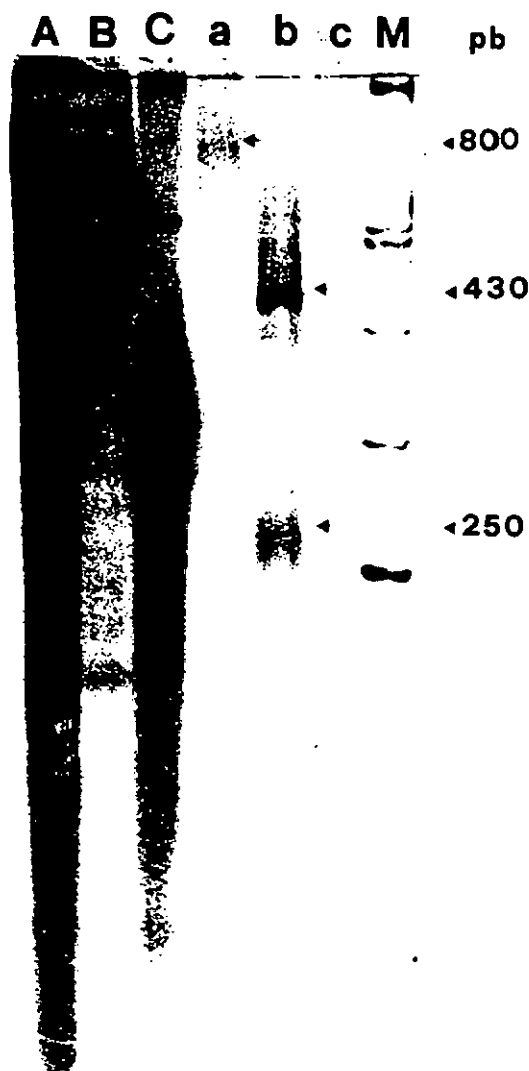


A: Gel Agarose 1.2%. Migration 20 volt, 16 h. Exposition 10 jours sans écran. Sonde Bgl II-Cla I marquée par "nicktranslation".  
 B: Gel Agarose 1.2%. Migration 25 volt, 16 h. Exposition 3 jours avec écran. Sonde Bgl II-Cla I marquée par "nicktranslation".  
 Les flèches correspondent à l'ARN ribosomique.

L'analyse des résultats de l'hybridation (cf. figure IV.13) montre que la région de l'ORF 350 est transcrite. Le sens de la transcription est le même que celui du gène tRNA Leu et des gènes ribosomiques. La taille du transcrit est de 0.9 Kpb, avec probablement un précurseur de 1.6 Kpb.

Pour mieux caractériser ces hybrides par analyse à la nucléase SI, nous avons préparé des sondes simple brin de la région.

Figure IV.14 Analyse à la Nucléase SI de la région ORF 350.



Gel Acrylamide 5 % 40 volt. 16 h. exposition 1 jour.

A: sonde Hinf 18, 760 n simple brin. 5'ORF;

B: sonde Hinf 1, 506 n simple brin. 3'ORF;

C: sonde Hinf 3, 230 n simple brin. pTRNA;

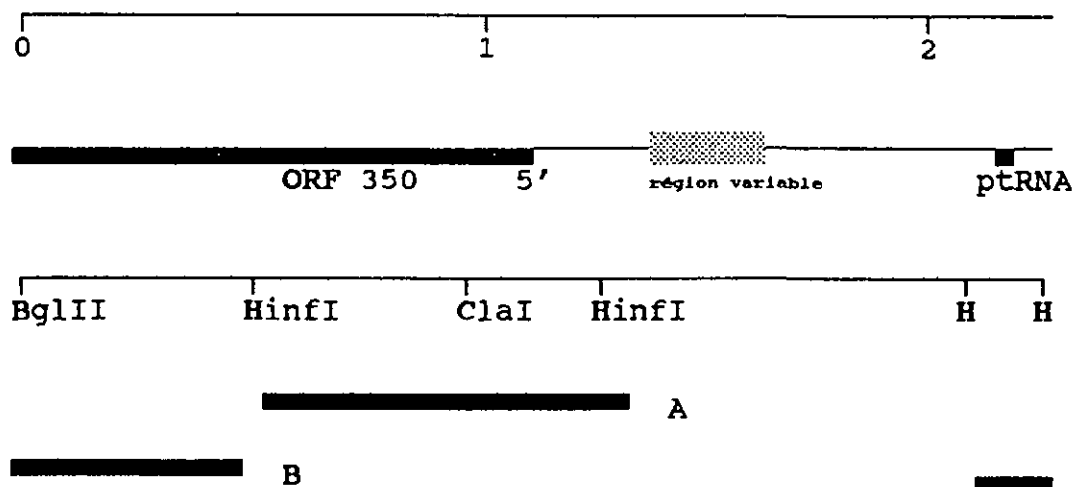
a: région protégée de la sonde A, éventuelle bande à 800 n;

b: régions protégées de la sonde B, 430 n et 250 n;

c: pas de région protégée pour la sonde C.

M: Marqueur de taille pBR<sub>322</sub> digéré par Hae III.

587,540,504,458,434,267,234,213,192,184,124,123,104,89,80,64pb

Schéma IV.4 Arrangement des sondes de la région ORF 350.

L'hybridation de l'ARN avec la sonde B (cf. schéma IV.4) et la digestion à la nucléase SI donne 2 fragments de 430 et 250 n. Par contre la même expérience avec la sonde A ne donne qu'une bande de 800 n (cf. figure IV.14). Les sondes sont partiellement dégradées.

La différence de taille entre l'ADN (1150 pb) et l'ARN (0.9 Kb) de l'ORF 350, pourrait s'expliquer par une dégradation de l'ARN. Cette dégradation se ferait du côté 3' de l'ARN. Puisque nous obtenons deux bandes avec la sonde B (côté 3') et une seule bande avec la sonde A (côté 5').

Par contre nous pouvons affirmer que la région se trouvant du côté droit de la région variable (schéma IV.4), n'est pas transcrite. Cette région contient un pseudo tRNA Trp (Schlunegger et Stutz 1984). Les "Northern" et l'analyse à la nucléase SI n'ont pas donné d'hybrides entre l'ARNcp total et la sonde spécifique "C", Hinf 3 (cf. schéma 4).

Voici l'analyse à l'ordinateur de la protéine à partir de la séquence ORF 350. Cette protéine compte 350 aa, elle a un poids moléculaire de 41 KD. L'analyse a été faite pour voir s'il pourrait s'agir d'une protéine membranaire (p.ex. thylacoïdale) qui a des domaines typiquement hydrophobes (transmembranaires).

L'ordinateur tient compte:

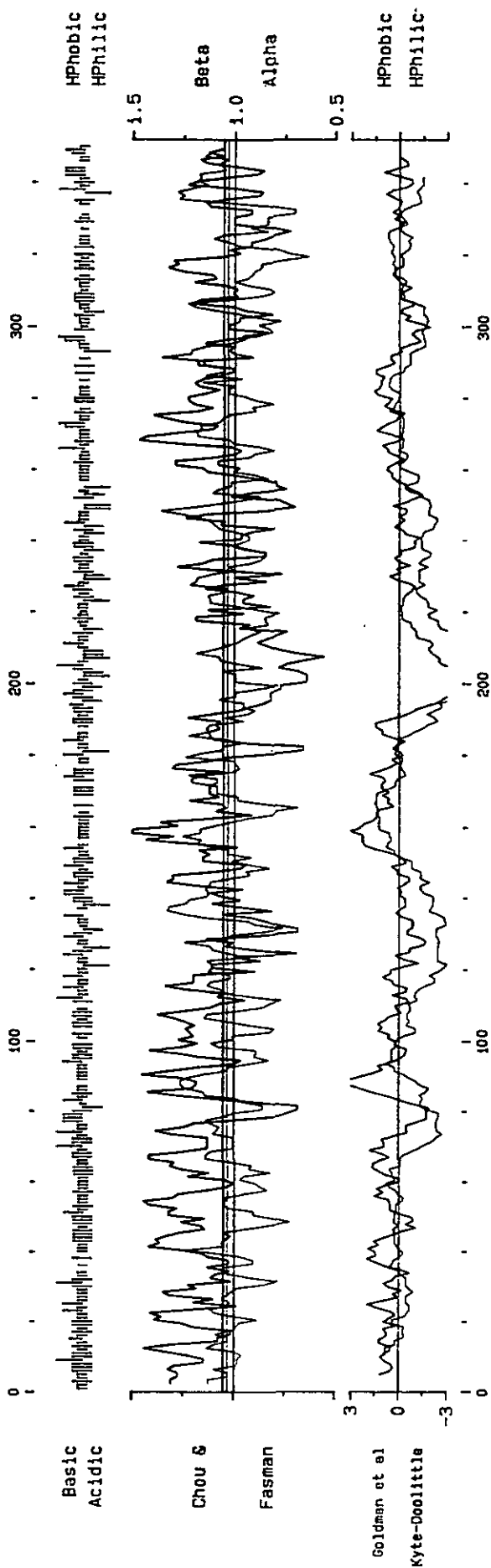
- des caractères acide ou basique, hydrophobe ou hydrophyle des aa,
- des structures en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$ .

Le rapport hydrophobe se calcule en prenant des fenêtres de: -9 aa. selon Kyte et Doolittle (1982)  
-20 aa selon méthode de Goldman et al (1986)

Il y a deux pics hydrophobes aux alentours des aa 40 et 160, et deux pics hydrophiles au niveau des aa 200 et 300.

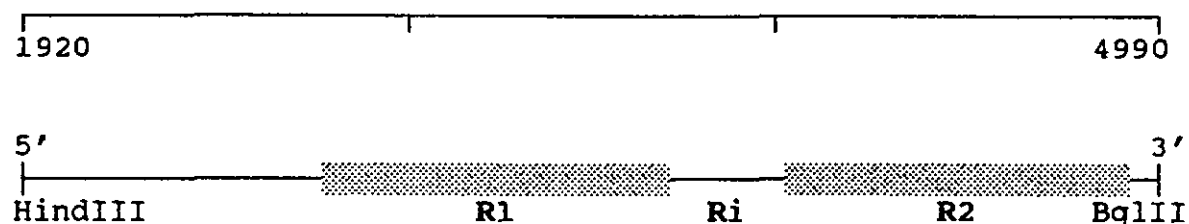
Figure IV.15 Profil de la protéine.

PEPLOT of: Orf350.Pep ck: 6252, 1 to 351 May 30, 1990 16:12  
 >P1: 350



## IV.5 ANALYSE DE LA REGION REPETEE

Schéma IV.5 Région G1 3 Kpb.



La région répétée (R1) est très riche en A+T; 77.6 %, avec un pourcentage de A presque double à celui des T. Elle contient plusieurs éléments répétitifs. L'intervalle entre les deux régions répétées (Ri), a un pourcentage en A+T de 70 %, avec beaucoup plus de T. Le rapport A/T est: 1.7 dans la région R1 et 0.7 dans la région Ri.

Tableau IV.1 Pourcentage de nucléotides:

	R1 2695 à 3610	Ri 3610 à 3965
A%	48.69	28.93
T%	28.93	41.85
G%	8.73	11.23
C%	13.64	17.97
A+T%	77.62	70.68
G+C%	22.37	29.21

Deux séquences "consensus" (ARS), "Autonomously Replicating Sequences in Yeast", (Stinchcomb et al, 1980), ont été trouvées dans la région répétée, là où il y a un pourcentage en A+T de 87 %. Ces séquences ont été trouvées aux positions suivantes:

5' A/T TTT ATPu TTT A/T 3'	séquence "consensus"	
5' T TTT ATA TTT T 3'	2917	4190
5' T TTT ATA TTT T 3'	2971	4244

Ces séquences sont encadrées par 2 séquences ARC consensus. Les séquences ARC ont été décrites chez le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii* par Vallet et al, (1984). Les plasmides qui contiennent ces régions ont la capacité de se répliquer d'une manière autonome dans la levure.

5' A TTT ATT TTT T 3'	2717	3988
5' A TTT ATT TTT T 3'	3117	4390

La séquence consensus ARS (Broach J R et al,1983) est une séquence présente dans plusieurs régions du génome de la levure. Insérée dans un plasmide, elle peut lui donner la possibilité de se répliquer d'une manière autonome dans la levure (Struhl, et al,1979). Le plasmide peut contenir le gène leu 2 ou ura 3. En utilisant des cellules de levure mutants pour les gènes leu- ou ura-, nous obtenons un système simple de sélection des colonies.

Tableau IV.2 Conditions de replication dans la levure.

Plasmide gène leu2 ou ura3	insère séquence ARS	Levure milieu sélectif
-	-	-
+	+	++++
-	+	-
+	-	+

Dans un milieu sélectif, sans leucine ou uracile, les colonies ne contenant pas le plasmide ne poussent pas, tandis que les colonies qui contiennent le plasmide poussent faiblement, et les colonies qui contiennent des séquences ARS actives, insérés dans le plasmide ont un taux de croissance très élevé.

Des séquences ARS ont été trouvées chez beaucoup d'eucaryotes, (Stinchcomb et al,1980) et chez quelques procaryotes. On les a trouvé aussi dans la mitochondrie de la levure (Blanc and Dujon 1982), dans le chloroplaste du tabac (Uchimiya et al,1983) et dans le chloroplaste de l'épinard (Briat and Dalmon 1986). Chez l'épinard, l'emplacement des séquences consensus ARS est aussi proche de l'opéron ribosomique, dans des régions répétées inverses.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, Vallet et al,(1984) ont trouvé dans le chloroplaste, quatre régions qui hybrident avec la séquence "consensus" ARS. Trois des régions sont groupées dans un fragment riche en A+T (74 %), avec plusieurs éléments répétitifs.

D'autres séquences ARS ont été trouvées dans les chloroplastes de *Chlorella ellipsoidea*. Elles sont proches aussi d'une région riche en A-T (Yamada et al,1986).

Nous allons tester si les séquences ARS détectées dans le fragment Bq1 G1 de 5.0 Kpb du génome chloroplastique d'*Euglena gracilis* sont actives ou non dans la levure.

#### IV.6 TEST D'ACTIVITE DE LA REPLICATION AUTONOME DANS LA LEVURE, EN PRESENCE DES REGIONS BGL G1 ET BGL Z

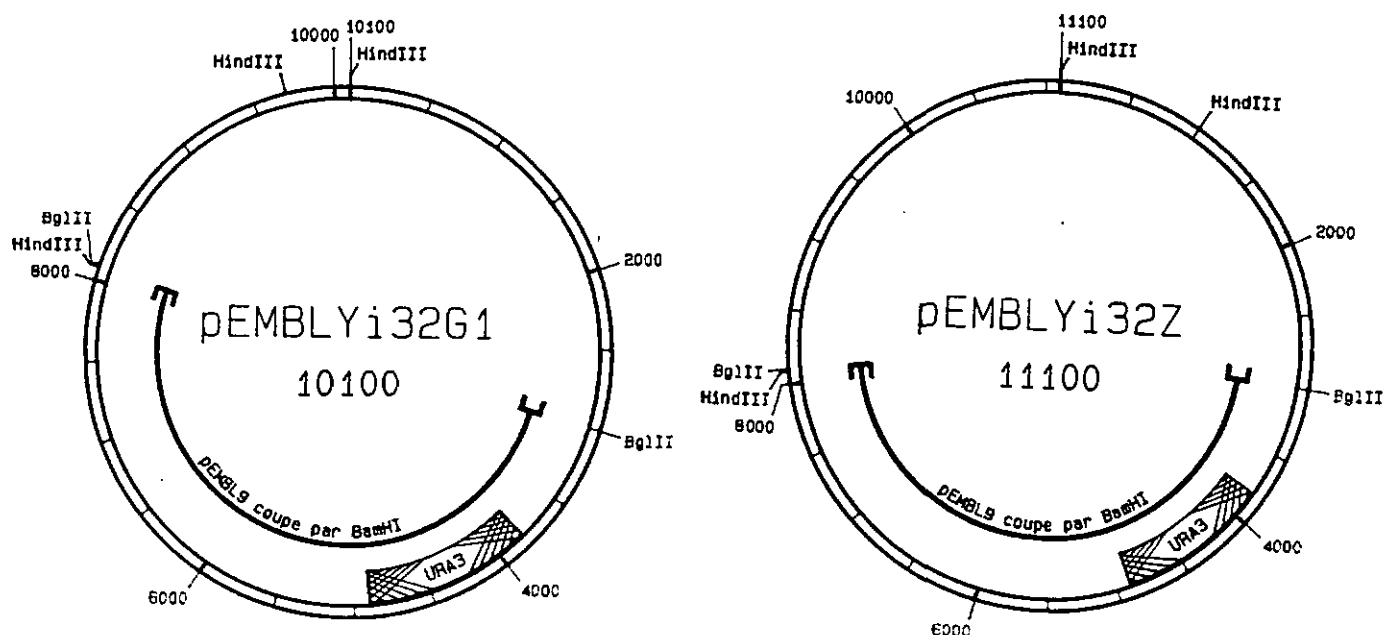
Les cellules utilisées pour la transformation sont les levures "strain CW40" ( Mata $\alpha$ , ade2, his3, leu2, ura3, trp1, can1-100), sensible à l'absence d'uracil. Le vecteur est le plasmide pEMBLy132 qui contient le gène ura 3.

Ce plasmide a été obtenu à partir du pEMBLy121: dans lequel on a remplacé le "polylinker" du plasmide pUC9 par celui du pUC19, et auquel on a enlevé le site Pst I du gène ura3 (communication personnelle de P.Linder). Le plasmide pEMBLy121 s'obtient à partir du pEMBL9 (4 Kpb) avec le gène ura 3, inséré dans le site Cla I, (Struhl et al 1979).

Pour obtenir des récombinants en grande quantité nous avons:

- digéré le vecteur pEMBLy132 par l'enzyme Bam HI et déphosphorilé les extrémités,
- séparé les fragments Bgl G1 (5 Kpb) et Bgl Z (6 Kpb) du plasmide correspondant,
- ligué les vecteurs aux fragments chloroplastiques,
- transformé des cellules E.coli XL1 Blue avec les recombinants.
- analysé les colonies blanches par minilysats.

Figure IV.17 Carte circulaire des plasmides recombinants.



Nous avons demandé à M. Patrick Linder du Biocentre à Bâle, qui travaille sur les levures, d'en transformer avec les deux plasmides pEMBLy132G1 et pEMBLy132Z.

Voici les résultats:

Tableau IV.3 Resultats de la transformation de la levure.

Transformation 1	
pEMBLy132 G1 (1.5 µgr ADN)	>>500 colonies
pEMBLy132 Z (0.6 µgr ADN)	19 colonies
Transformation 2	
pEMBLy132 G1 (1.2 µgr ADN)	75,115 col./13,14 col.
pEMBLy132 Z (1.2 µgr ADN)	2, 0 col./ 0 col.

Levure: souche CW04 (Mata, ade2, his3, leu2, ura3, trp1, can1-100) préparée pour la transformation avec ClLi.

La deuxième transformation a été moins efficace.

Voici les étapes lui permettant d'obtenir et d'analyser l'ADN du plasmide pEMBLy132G1 après transformation:

Repiquage et mise en culture de 12 colonies transformées. Seulement 9 ont poussé. Isolation de l'ADN et introduction dans la bactérie MC1061. Les colonies bactériennes obtenues ont été repiquées pour préparer du plasmide. Les digestions du plasmide par Hind III et Eco RI, nous donnent les mêmes fragments que l'ADN parental.

Les mêmes analyses ont été faites avec le plasmide pEMBLy132Z, mais là les résultats sont moins concluants. On n'est pas sûre que la carte de restriction du plasmide après la transformation, soit identique à celle du parental.

La conclusion est que le clone pEMBLy132 G1 peut se répliqué d'une manière autonome dans la levure.

Nous avons encore testé la capacité répllicative du plasmide pEMBLy132 G1, délété de la région du gène supplémentaire 16s, (cf. annexe III).

On a obtenu une telle délétion par:

- digestion du plasmide pEMBLy132G1 par Hind III, nous obtenons:(cf. schéma IV.1)
  - une bande de 1.7 Kpb,
  - une bande de 0.3 Kpb,
  - une bande de 8 Kpb,(vecteur + insertion Bgl II-HindIII, 3 Kpb, contenant R1 et R2),

- ligation des extrémités des fragments obtenues après la digestion,
- transformation des cellules MC1061 avec le produit de la ligation,
- analyse de l'ADN des clones récombinants:
  - 2 clones avec l'insère 1.7 Kpb,
  - 1 clone avec l'insère 0.3 Kpb,
  - 13 clones avec la bande 8 Kpb reliquée sur elle-même.

P. Linder a transformé la levure CW04 avec ces 16 plasmides. Il a obtenu des colonies pour tous les clones, parce que la région qui contient les séquences ARS est présente dans tous les clones. Le nombre de colonies n'est pas dépendant des insères, mais plutôt de la purification de l'ADN.

Un contrôle négatif avec délétion de la région répétée pourrait être fait par la suite.

Pour l'instant nous pouvons affirmer que le recombinant contenant la région de 3 Kpb avec les séquences ARS est capable de se répliquer d'une manière autonome dans la levure. Le reste de la région G1 n'a pas d'influence sur cette répllication.

#### IV.7 ANALYSE DES STRUCTURES D'ADN ASSOCIES AU "ARS" DANS LA REGION REPETEE

Nous savons que les régions répétées ont plus de A que de T, (cf. tableau IV.1). Les séquences poly A sont souvent associées à des séquences ARS. De telles structures pourraient donner de l'ADN courbé, "bent DNA".

L'ADN courbé est conditionné par la présence de plusieurs séries de nucléotides (A)<sub>n</sub>, qu'on trouve avec une périodicité de 10 à 11 pb. Approximativement un tour de la double-hélice d'ADN (Snyder M et al, 1986).

De telles structures "bent DNA" ont été trouvées à proximité des séquences ARS chez le bactériophage Lambda et le virus SV40. Ces structures sont nécessaires pour que les séquences ARS soient actives "in vivo".

Chez les plantes supérieures, des séquences ARS ont été trouvées chez le tabac, le pétunia, le maïs et la tomate. Elles sont encadrées par d'autres séquences différentes, mais qui sont aussi nécessaires pour l'activité ARS (Eckdahl et al, 1989). Ces structures chez les plantes, ont probablement le même rôle que chez les animaux et les levures, c'est-à-dire dans l'initiation de la réplication.

L'ADN courbé se caractérise par sa différence de mobilité électrophorétique dans un gel polyacrylamide à faible voltage. La migration de ces fragments est plus lente que d'autres fragments de la même taille. Le retard est mesuré par le rapport entre la migration espérée et la migration obtenue du fragment. Des valeurs supérieures à 1.2 ont été relevées. Ces valeurs correspondent à des fragments susceptibles de contenir des séquences d'ADN courbées.

$$K = \frac{\text{migration espérée}}{\text{migration observée}}$$

Nous avons testé la migration de la région 3 Kpb Hind III-Bgl II du clone pEMBLy132 G1

Le fragment de 3 Kpb est coupé par les enzymes de restriction Dde I et Alu I, (sites de restriction schéma IV.6). Le resultat de ces digestions est montré sur la figure IV.18. Les références de taille sont le vecteur pBlueScript KS+, digéré une fois par le enzyme Hinf I, et une autre fois par la double digestion Dde I-Bam HI. Le plasmide a aussi une origine de réplication. Cet origine se trouve dans une région susceptible d'être retardée.

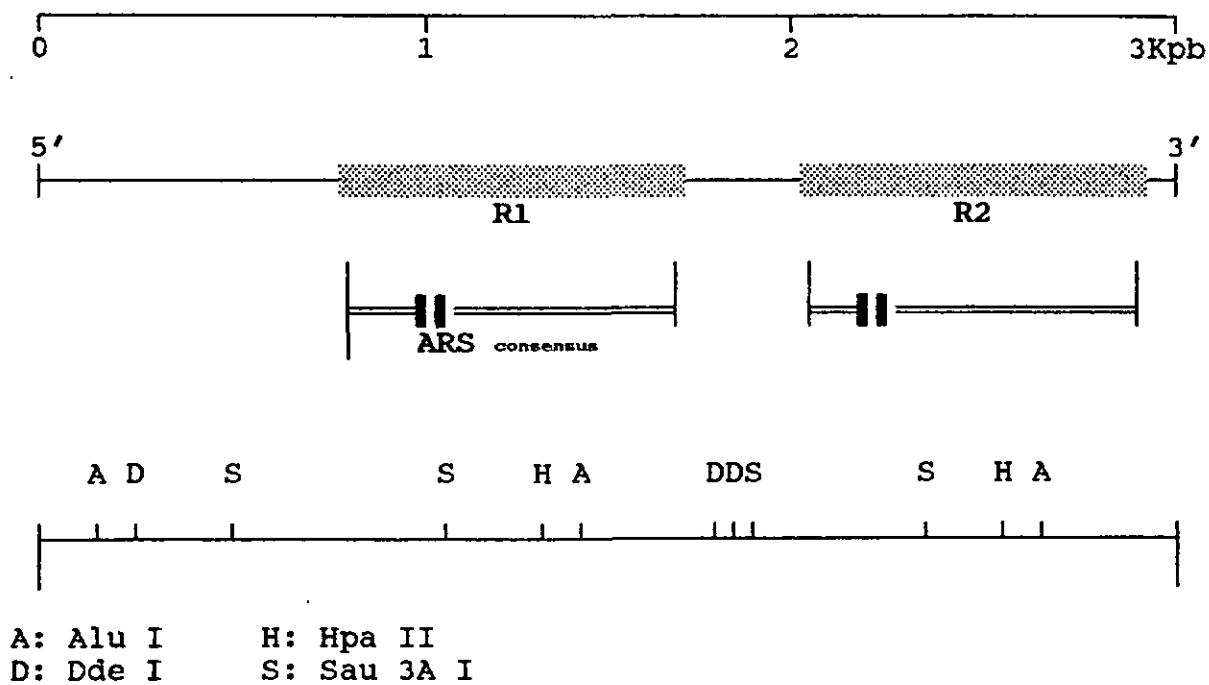
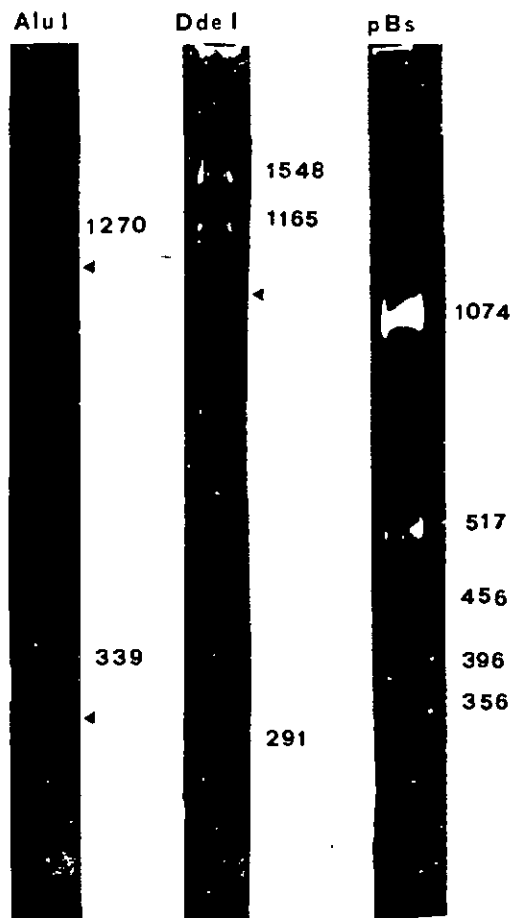
Schéma IV.6 Emplacement des séquences ARS.

Figure IV.17 Profil de migration, gel unidimensionnel 1.

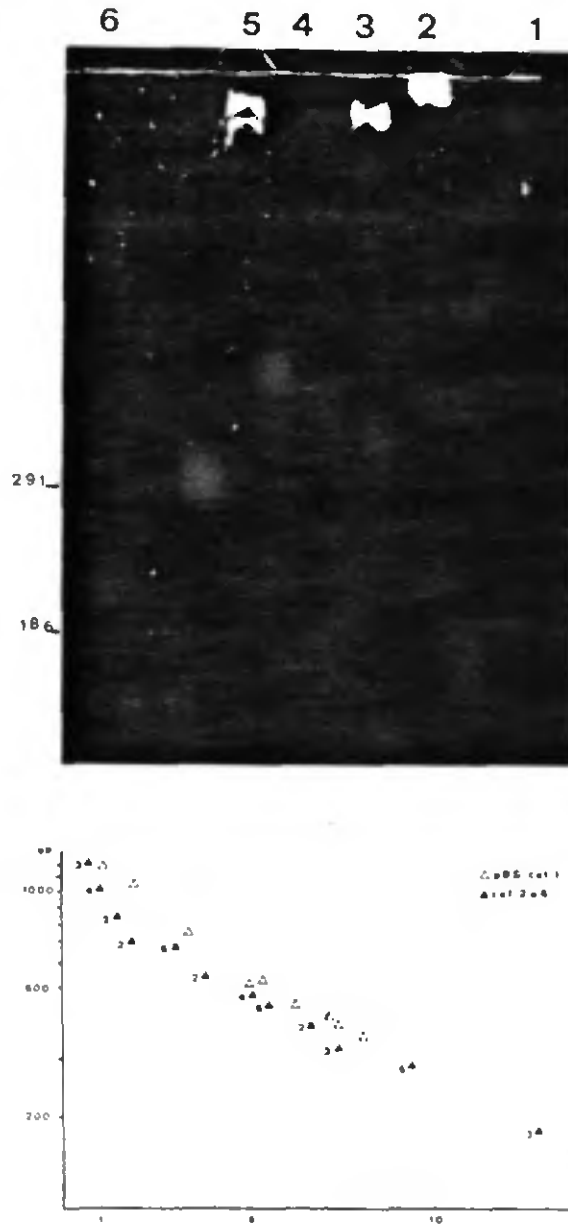
pBS: pBS KS+ digéré par Hinf I, 1074, 517, 456, 396, 356...pb  
 Alu: G1 3Kpb " " Alu I, 1270 x 2, 399, 86 pb  
 Dde: G1 3Kpb " " Dde I, 1548, 1165, 291, 66 pb  
 Les flèches indiquent la migration espérée des fragments  
 Gel Acrylamide 3.5 %, 2v/cm, 18 h, 20°C.

La Figure IV.17 montre que les fragments Dde I 1.5 et 1.1 Kpb sont retardés. Le petit fragment de 291 pb en dehors des régions répétées, présente une migration normale. Les valeurs K calculées sont les suivantes:

Fragments Dde I: 1548 pb → K=1.33, 1165 pb → K=1.41, 291pb → K=1.0  
 fragments Alu I: 1270 pb → K=1.23, 339 pb → K=1.16.

Le deuxième fragment Alu I de 1270 pb a une migration plus rapide que le marqueur.

Les deux régions répétées Dde I 1.5 Kpb et 1.1 Kpb ont été digérées séparément par l'enzyme Hpa II. Le fragment G1 3 Kb a été digéré par Sau 3A. Résultats de ces digestions colonnes 2, 4 et 6 de la figure IV.18. Pour les sites de restriction voir schéma IV.6

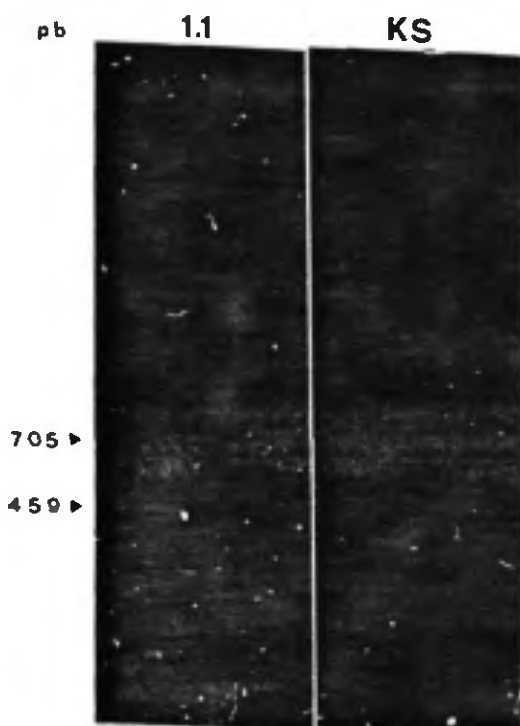
Figure IV.18 Profil de migration, gel unidimensionnel 2.

1: pBS KS+ digéré par Hinf I, 1074, 517, 456, 396, 356...pb  
 2: G1 3 Kpb " " Sau 3A 867 pb K= 1.26, 728 pb K= 1.68,  
 571 pb K= 1.26, 406 pb K= 1.07  
 3: G1 3 Kpb " " Alu I 1270 pb x 2, 339pb K= 1.13  
 186 pb K= 1.0  
 4: G1 1.5 Kpb " " Hpa II 1045 pb K= 2.0, 503 pb K= 1.14  
 5: G1 3 Kpb " " Dde I 1.5 Kpb, 1.1 Kpb, 291 pb K= 1.0  
 6: G1 1.1 Kpb " " Hpa II 705 pb K= 1.13, 459 pb K= 1.13  
 Gel Acrylamide 4%, 2 v/cm, 20°C, 20 h.

Les fragments Sau 3A (cf. Figure IV.18) sont tous retardés sauf celui de 406 bp. Le petit fragment Alu I, 186 pb (col.3 fig. IV.18), en aval des régions répétées, n'est pas non plus retardé. Les deux régions répétées ont une migration plus lente que celle des standards.

Nous avons testé le comportement de ces fragments dans des conditions normales d'électrophorèse à température élevée.

Figure IV.19 Contrôle de migration, conditions dénaturantes.



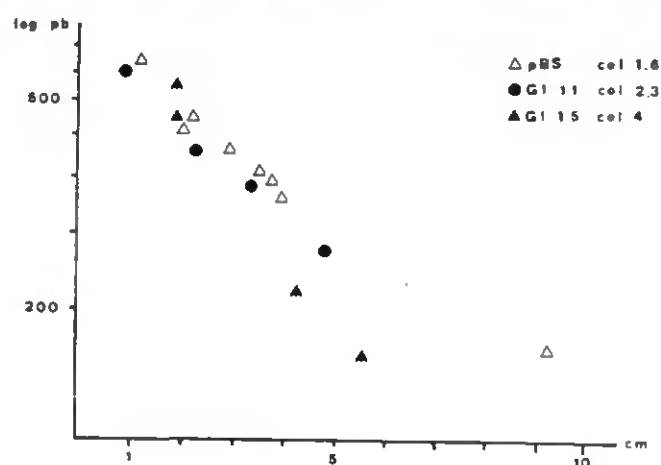
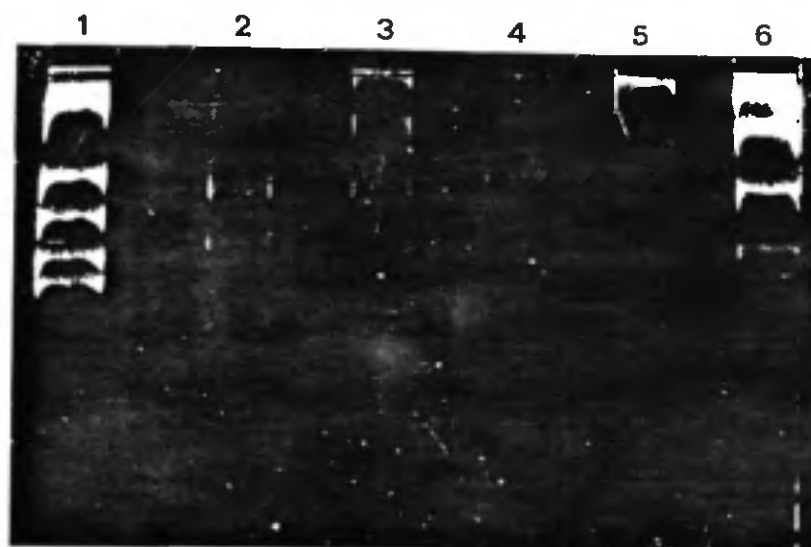
Gel Agarose 1.5 %, 10 v/cm, 40 min.

KS: pBS KS+ digéré par Hinf I, 1074, 517, 456, 396, 356...pb

1.1: G1 1.1 Kpb digéré par Hpa II, 705 et 459 pb.

Nous constatons que les fragments migrent à la même vitesse que les standards.

Afin de savoir si les séquences ARS migrent encore plus lentement que le reste de la région répétée, nous avons digéré le fragment Dde 1.1 Kpb par les enzymes Sau 3A et Hpa II, et le fragment Dde 1.5 Kpb par l'enzyme Hinf I.

Figure IV.20 Profil de migration, gel unidimensionnel 3.

Gel Acrylamide 5 %, 40 v/cm, 4°C, 27 h.

1: pBS KS+ digéré par Hinf I, 1074, 517, 456, 396, 356...pb

2: G1 1.1 " " Hpa II-Sau 3A: 459 pb K= 1.25,  
390 pb K= 1.18, 270 pb K= 1.08,

3: G1 1.1 " " Hpa II: dig. partial 1.1,  
705 pb K= 1.2,  
459 pb K= 1.25;

4: G1 1.5 " " Hinf I: 645 pb K= 1.0, 540 pb K= 1.2,  
215 pb K= 1.7, 155 pb K= 1.7,

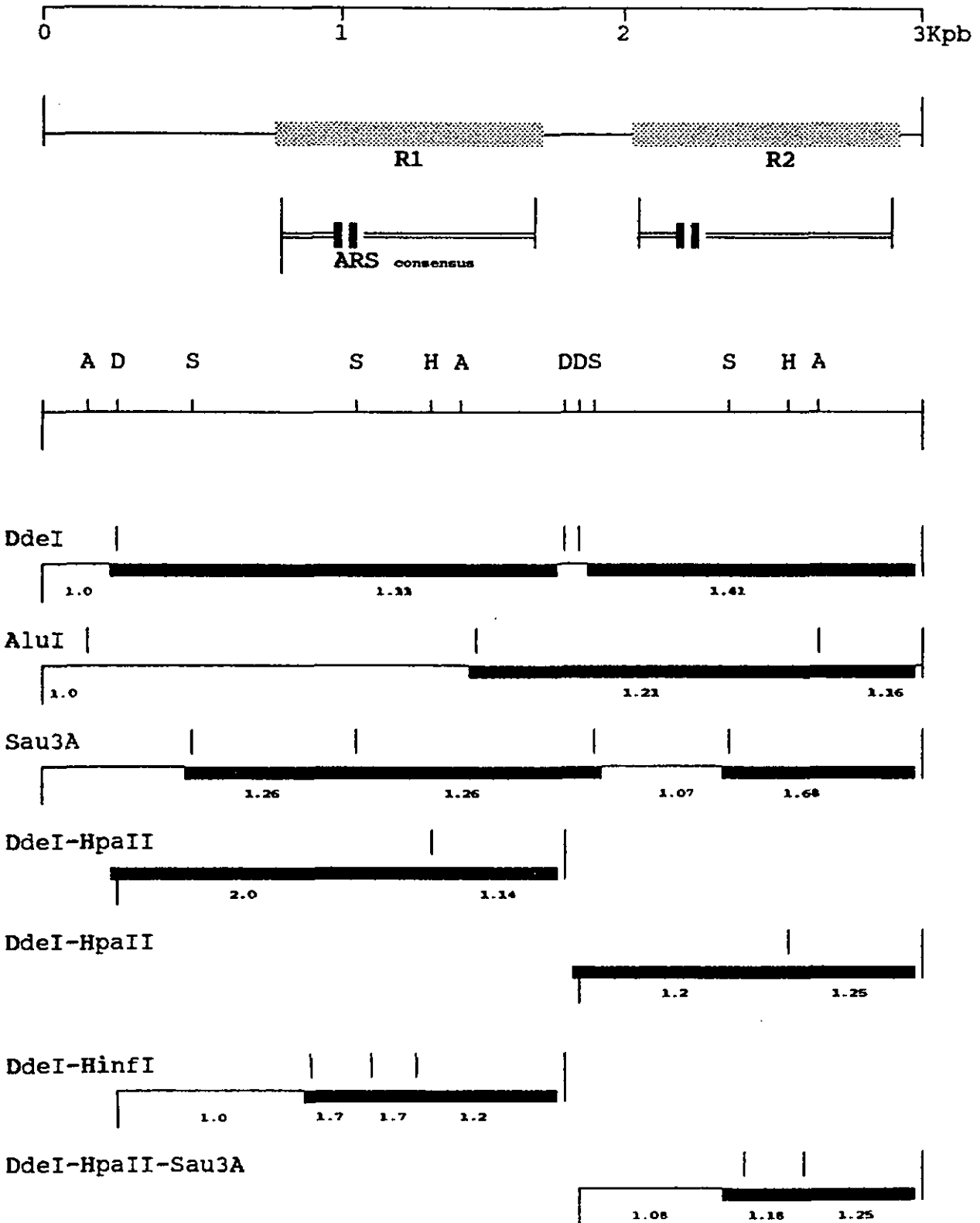
5: G1 1.5 Kpb,

6: pBS KS+ digéré par Dde I-Bam HI: 1102, 744, 540, 409, 166pb.

Nous vérifions ici avec les deux régions répétées que la partie la plus retardée n'est pas la partie ARS, mais la partie adjacente. Colonne 2 fragment de 459 pb, colonne 4 fragments 215 pb et 155 pb de la fig. IV.20.

Nous avons représenté dans le schéma IV.7 tous les fragments analysés, avec leurs valeurs K.

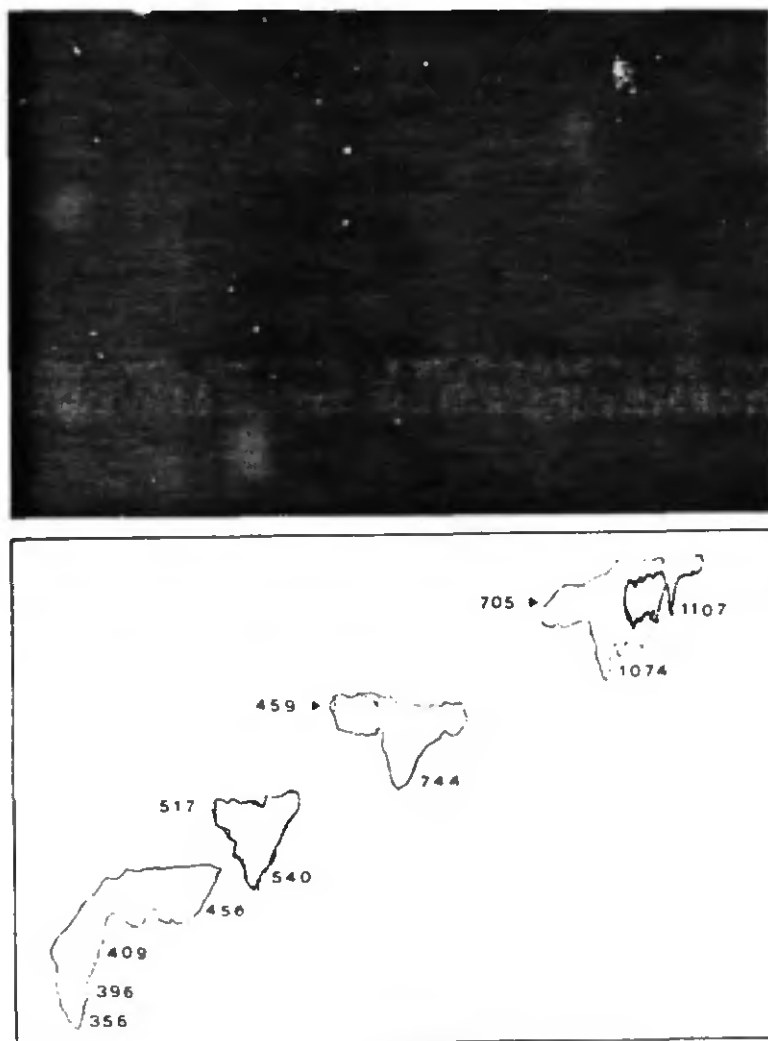
Schéma IV.7 Analyse des structures d'ADN associés au région contenant les séquences ARS.  
 (Migration retardée pendant l' électrophorèse)



Nous avons aussi essayé de voir un retard de migration, dans un gel bidimensionnel, selon les références de Anderson (1986). Cela a été fait par migration de nos échantillons standards (pBS KS+ digéré par Hinf I et pBS KS+ digéré par Bam HI-Dde I) avec le fragment Dde 1.1 Kpb digéré par l'enzyme Hpa II, dans deux gels.

- Le premier est un gel d'agarose 1.5 % en tube (0.4x13 cm). La migration se fait dans du tampon TBE avec un voltage maximum de 40 volt (3.5 v/cm), à 20°C. Ce gel sépare les bandes d'ADN.
- Le deuxième est un gel de 5 % d'acrylamide, à la surface du gel, on a déposé le gel en tube. Le contact a été fait entre les deux gels avec de l'agarose 1.2%. La deuxième migration a duré 16 h, à 40 volt (3.5v/cm), et à 4°C.

Figure IV.21 Premier gel bidimensionnel.



Standard:

pBS KS+ digéré par Hinf I, 1074, 517, 456, 396, 356...pb

pBS KS+ digéré par Dde I-Bam HI: 1102, 744, 540, 409, 166 pb

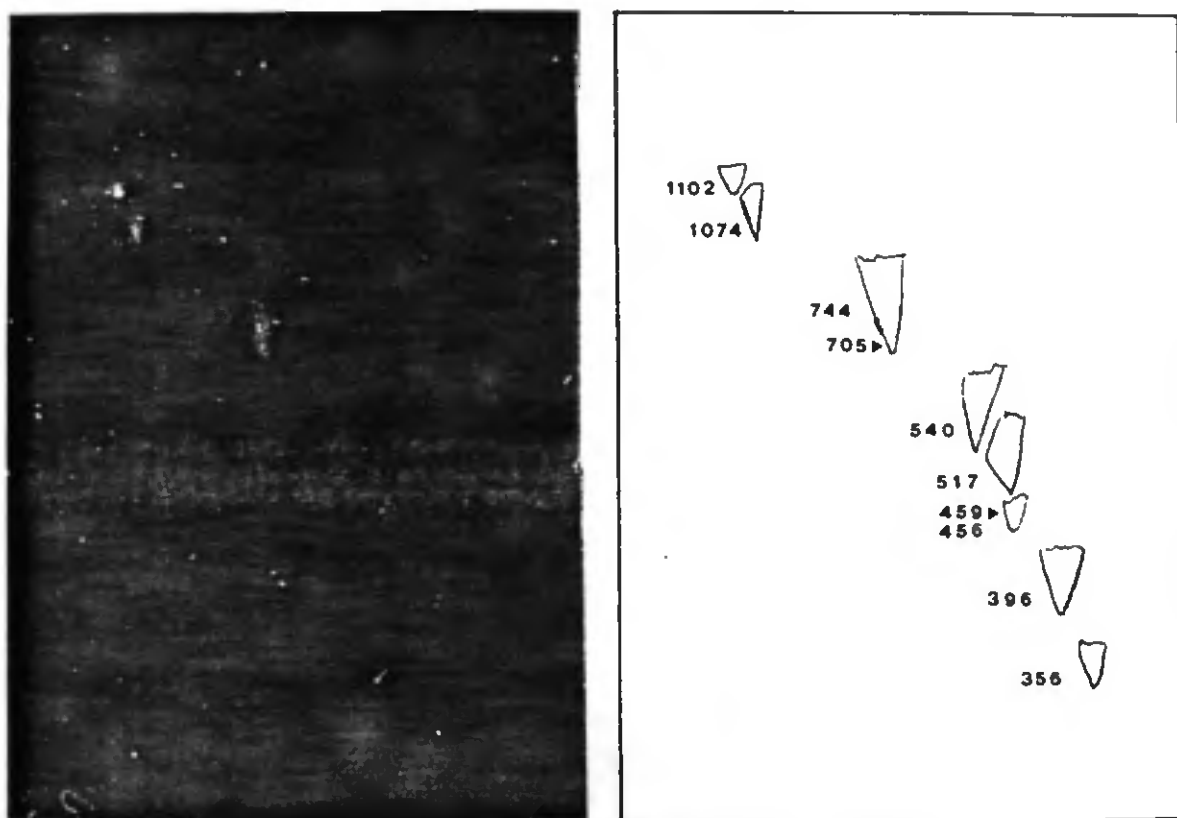
Echantillons retardés:

G1 1.1 Kpb digéré par Hpa II: 705 et 459 pb.

Les deux fragments d'ADN chloroplastique ont migré plus lentement. La photo montre que le fragment de 705 pb est à la hauteur du fragment de 1.0 Kpb du standard, celui de 459 pb est à la hauteur du 744 pb du standard. On constate en plus qu'ils sont en dehors de la ligne des standards

La même expérience a été faite avec moins de matériel et avec un gel d'acrylamide plus concentré, 7 %. Le but était d'améliorer la résolution du gel, afin d'avoir des points et non des tâches d'ADN.

Figure IV.22 Deuxième gel bidimensionnel.



**Standard:**

pBS KS+ digéré par Hinf I, 1074, 517, 456, 396, 356...pb

pBS KS+ digéré par Dde I-Bam HI: 1102, 744, 540, 409, 166 pb

**Echantillon retardé:**

G1 1.1 Kpb digéré par Hpa II: 705 et 459 pb.

Gel Agarose 1.5 %, 40 v/cm, 20°C, 4 h

Gel Acrylamide 7 %, 40 v/cm, 4°C, 20 h

La migration plus lente des fragments de 705 et 459 pb ne s'aperçoit pas.

Tous ces résultats montrent:

- un retard de migration des régions répétées dans des conditions non dénaturantes. Aucun retard ne se voit, si la migration se fait à plus de 30 °C.
- une migration normale de l'extrémité Hind III du fragment G1 de 3 Kpb, dans des conditions non dénaturantes.
- une migration faiblement ralentie ( $K=1.1$ ), pour l'intervalle entre les deux régions répétées.

Le plus important retard de migration n'a pas été trouvé pour les séquences ARS, mais pour la région en amont, dans le sens de la transcription du ORF 350.

Nous observons aussi un faible retard de migration pour le fragment de 517 pb du standard pBS KS+ digéré par Hinf I,  $K= 1.1$ . Dans ce fragment se trouve l'origine de répllication du plasmide.

Avant même d'avoir fait ces expériences, un retard de migration avait eu lieu, pour les fragments contenant les régions répétées. La migration était faite sur gel acrylamide 3.5%, pendant la nuit à 40 volt, donc sans élévation de la température (figure IV.3). La taille des fragments avait été alors surestimée par rapport à celle obtenue ultérieurement par séquençage.

Il aurait été intéressant de visualiser par ordinateur, la double hélice d'ADN de notre séquence. L'image aurait peut-être montré une double-hélice courbée. Cette analyse ne peut pas se faire dans notre laboratoire.

La relation qui existe entre la région ARS et l'origine de répllication n'est pas tout à fait claire. Nous savons que Ravel-Chappuis et al, (1982) ont placé l'initiation de la répllication dans la région ARS, après des analyses au microscope électronique. D'autre part Koller et Delius, (1982) ont placé l'origine de répllication plutôt dans la région Z de taille variable (cf. schéma I.2).

Chez le chloroplaste d'*Euglena gracilis* l'origine de la répllication reste sur la région variable Z. Maintenant on sait en plus qu'il y a, 1 Kpb en aval, des régions répétées riches en A+T. Ces régions contiennent des séquences ARS actives, c'est à dire une fonction répllicative, et une mobilité plus lente dans des conditions non dénaturantes.

Dans les régions R1 et R2 nous trouvons des petites séquences répétées. Ces séquences répétées, (figure IV.23) sont:

- Un grand sous-fragment de 31 nucléotides (A),
- cinq séquences de plus de 10 nucléotides (B,C,D,E,F),
- des séquences plus petites ( $<10n$ ).

On retrouve le même type de séquences dans la région ARS de *Chlamydomonas* (Vallet et al, 1984).



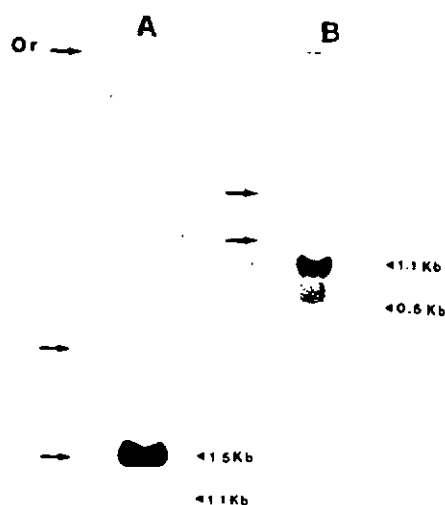
#### IV.8 ANALYSE DE LA TRANSCRIPTION DE LA REGION REPETEE.

Nous avons analysé par Northern le clone BGL G1 en utilisant 2 sondes différentes. La première sonde est le fragment Bgl G1 de 5 Kpb, marqué avec  $\alpha P^{32}dATP$  par "nicktranslation". Cette sonde nous donne deux hybrides importants de la taille de 1.5 et 1.1 Kb. Nous savons que la sonde contient l'extrémité 5' du gène S16s. La taille de l'ARN 16s chloroplastique des euglènes est de 1.5 Kb.

Nous avons préparé une sonde plus petite, ne contenant pas l'extrémité 5' du gène S16s. Cette sonde est le fragment Dde I de 1.1 Kpb qui contient la région répétée R2.

Le résultat de l'hybridation donne de nouveau une bande de 1.1 Kb et une bande plus petite de 0.6 Kb.

Figure IV.24 Northern de la région G1.



A: Sonde G1 5 Kpb, hybrides 1.5 et 1.1 Kb. Exposition 1 nuit.

B: Sonde G1 1.1 Kpb, hybrides 1.1 et 0.6 Kb. " 1 nuit.

Dans les deux filtres les conditions de gel ont été: 1.2% Agarose, migration à 25 volt pendant 16 h, hybridation à 42°C, avec 50% de formamide.

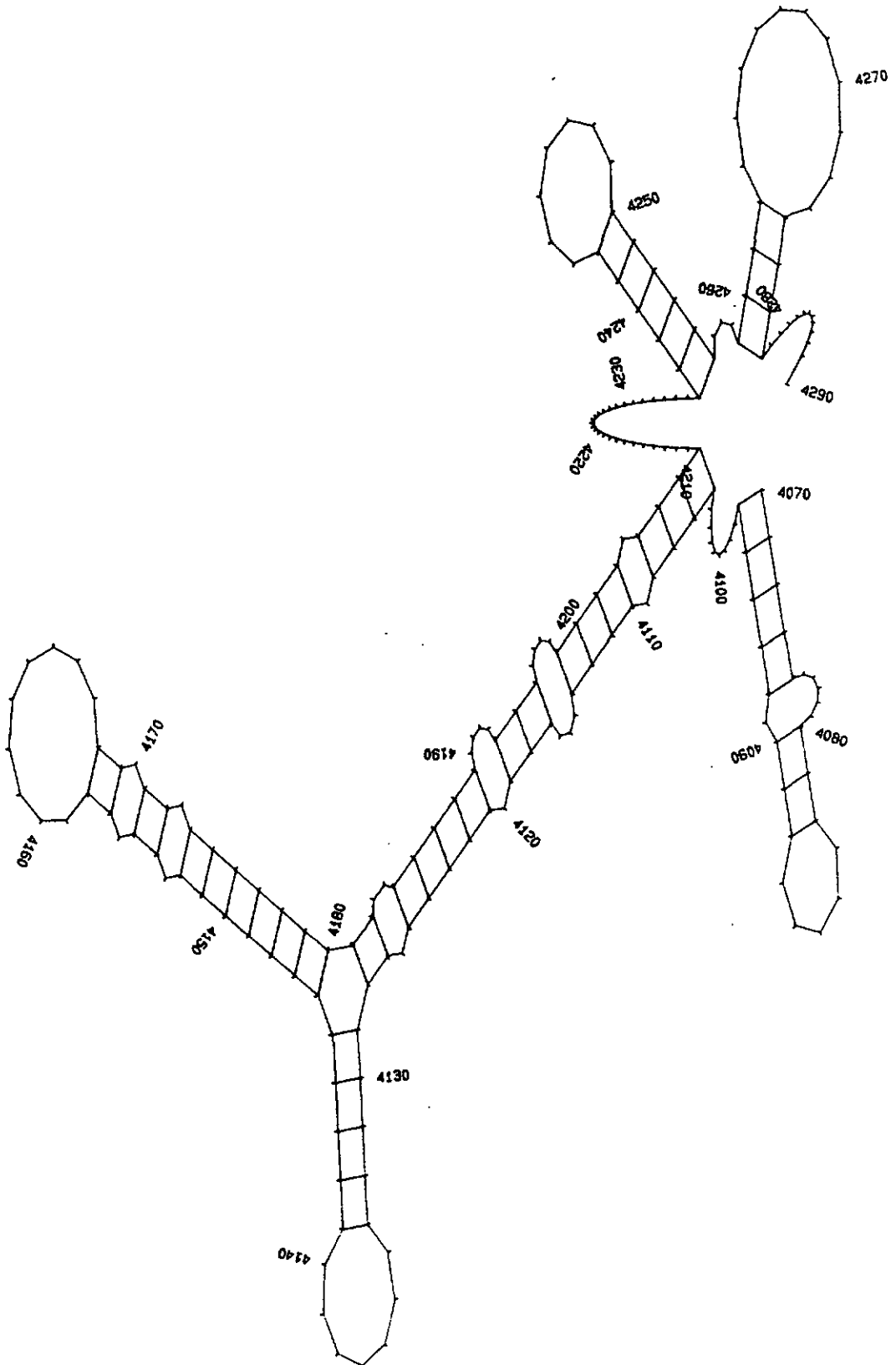
Ces deux bandes (1.1 et 0.6 Kb) pourraient correspondre à deux transcrits quelconques du génome chloroplastique, car, en analysant la séquence, nous n'observons pas de régions susceptibles d'être traduites. L'hybridation se serait faite par homologie de certaines séquences, par exemple celles riches en AT.

La structure secondaire possible du transcrit de la région ARS est la suivante:

Figure IV.25 Structure secondaire du transcrit de la région ARS.

SQUIGGLES of: G1r4070.Connect May 30, 1990 16:21.  
 FOLD of: g1r.5000 Check: 5312 from: 4070 to: 4290 February 15, 1990 18:05

Length: 221 Energy: -20.8



## V. DISCUSSION

En analysant la séquence obtenue 9,1 Kpb du génome chloroplastique se trouvant entre la région ribosomique et l'origine de réplication (cf. annexe III et IV), nous avons trouvé les structures suivantes.

### Le gène tRNA Leucine.

Un gène tRNA Leu 1, dont l'anticodon CAA est utilisé par les protéines chloroplastiques.

La "règle du flottement"(wobble), dit qu'il y a une certaine souplesse, dans l'appariement avec la troisième base du codon.

ARN messenger codon		tRNA anticodon
A	→	U
G	→	C / U

Le codon UUG est reconnu par les deux tRNA Leu, anticodons CAA et UAA. Ceci permet de dire que le codon UUG, est lu par un des deux tRNA Leu, mais pas qu'il est forcément lu par le tRNA Leu 1 (anticodon CAA).

Le gène tRNA Leu d'*Euglena gracilis*, présente une forte identité de séquence avec d'autres tRNAs des plantes supérieures (même anticodon). Identité de 77 % avec le maïs et le soja, de 75 % avec le tabac. Ceci montre une forte conservation tout au long de l'évolution de la séquence des tRNAs. Cette identité est plus forte entre les gènes tRNAs des plantes supérieures, 95 % entre maïs et soja.

Il est important de remarquer que le gène est transcrit dans le même sens que les gènes ribosomiques et est monocistronique. Les résultats par "primer extension" ou par hybridation et traitement à la nucléase SI, montrent une certaine quantité d'ARN mature et peu d'ARN précurseurs. Par contre par Northern, il y a beaucoup d'ARN précurseur.

L'ARN précurseur du tRNA Leu d'euglène montre une certaine homologie avec l'ARN faisant partie de la "RNase P RNA", des bactéries *E.coli* et *B.subtilis*,. Cette homologie existe dans la région où l'enzyme s'attache à l'ARN. Enzyme responsable de la maturation des tRNAs.

D'où l'hypothèse que ce long ARN précurseur, interviendrait dans la maturation des ARNs de transferts avec l'enzyme RNase P. On sait que cet enzyme est actif dans les chloroplastes d'euglène, (Greenberg et Hallick, 1986). Reste à démontrer cette hypothèse.

### Les homologies entre la région séquencé et d'autres plantes.

D'autres homologies ont été trouvées dans les 9.1 Kpb séquencés du génome chloroplastique d'euglène. Des homologies entre:

- les régions voisines à l'extrémité 5' des gènes tRNA Leu du tabac et de l'euglène. Le gène tRNA Leu du tabac pris en considération se trouve entre les positions 96507 et 96424 du génome chloroplastique.
- Le pseudo-gène tRNA Trp d'euglène, trouvé en 5' du gène S16s, et le tRNA Trp du tabac. L'homologie est de 64.9 % sur 174 nucléotides.
- Le pseudogène tRNA Trp d'euglène sur le fragment Bgl Z, et le gène tRNA Trp du tabac, en position 68880 à 68807. Dans ce cas l'homologie continue encore 1350 nucléotides après le gène, à un taux de 50.9 %.

Dans cette région homologue nous trouvons chez le tabac, un gène qui code pour le tRNA Pro, position 69117 ne se trouvant pas chez l'euglène. (annexe VI).

Chez le chloroplaste d'*Euglena gracilis*, le gène tRNA Trp est transcrit avec d'autres gènes tRNAs dans le même sens que l'opéron ribosomique.

Le fait que la majeure partie de cette région ne soit pas codante et soit homologue au tabac, le fait que l'acide aminé Tryptophane soit codé seulement par un seul codon UGG et la théorie que tous les chloroplastes sont dérivés d'un ancêtre procaryote photosynthétique proche des cyanobactéries (Tomoka et Sugiura, 1983), nous fait penser que la région en amont du pseudo-gène tRNA Trp chez le chloroplaste d'*Euglena gracilis*, est plus ou moins conservée tout au long de l'évolution.

### La séquence ouverte à la traduction ORF 350.

L'analyse faite sur l'ORF 350 montre qu'il est transcrit. Il reste à savoir pour quelle protéine ce gène code. Ces analyses pourraient être faites:

- en insérant la séquence codante dans un vecteur d'expression,
- en transformant des cellules, E.coli, avec cette construction.

La protéine produite en grande quantité devrait avoir un poids maximal de 41000 Da. Cette protéine pourrait être mieux caractérisée par des analyses ultérieures (pH, comportement face aux différentes méthodes de purification).

### Les séquences ARS.

L'analyse de la région de 9.1 Kpb, montre des séquences typiques en relation avec la réplication de l'ADN chloroplastique. Ces séquences sont: des séquences ARS actives, des séquences directement répétées et des structures d'ADN associées aux ARS. Toutes ces séquences se trouvent dans les régions répétées, riches en A-T.

Nous pouvons postuler que cette région joue un rôle important dans la réplication. Bramhill et Kornberg, (1988) affirment que chaque origine de réplication a ses propres séquences riches en A-T.

Les protéines: "dna A", "dna B" et "dna C", s'attachent à ces séquences, (9 et 13 nucléotides chez E.coli).

La protéine "dna A" permet d'initier la réplication. Après séparation des deux brins d'ADN, les protéines "dna B" et "dna C" forment le "prepriming complexe" où viendra se placer la future fourche de réplication.

Les séquences répétées riches en A-T, sont souvent trouvées dans la région R1 et R2 du clone pEGCBG1.

La région qui contient les ARS, joue sûrement un rôle important dans la réplication de l'ADN chloroplastique. D'ailleurs Ravel et Chappuis (1982) avaient déjà remarqué des boucles de réplication dans cette région. Nous pouvons postuler que toute la région Bgl G1, placée entre l'opéron ribosomique et la région Z de taille variable, a une relation avec la réplication.

L'activité ARS pourrait être mieux localisée, en faisant des délétions dans la région répétée. La localisation serait faite à partir de la plus petite séquence capable de répliquer un plasmide dans la levure, (Blanc, 1984). On pourrait tester ces séquences dans les Ori-test procaryotiques.

Reste à savoir si d'autres séquences ARS se trouvent dans le reste du génome dans des régions riches en AT, et si ces régions sont actives. Cette analyse pourrait se faire en préparant des sondes qui contiennent les séquences "consensus" ARS actives. Ces sondes seraient hybridées au reste du génome chloroplastique d'euglène. On testerait l'activité de ces hybrides, comme on l'a fait avec nos séquences ARS actives.

Il nous reste à dire, en accord avec Kornberg (1988b) que beaucoup de questions à propos de la réplication restent encore sans réponse. Chez le chloroplaste d'*Euglena gracilis* nous avons un peu avancé sur les structures de la région voisine à l'origine de réplication, sans pouvoir répondre à toutes les questions du mécanisme de la réplication.

## Deuxième partie:

# CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE DNA-POLYMERASIQUE DES PROTEINES CLOROPLASTIQUES

## I. INTRODUCTION

Actuellement nous savons que le réplisome est un grand complexe enzymatique, composé d'ADN et d'un grand nombre d'enzymes et de facteurs protéiques.

Un certain nombre de ces composants ont été purifiés chez *Escherichia coli*, cette bactérie est utilisée comme modèle pour une meilleure connaissance du système de répllication. On connaît la séquence Ori C, et certaines protéines ayant une fonction importante dans ce complexe. Kornberg (DNA Replication 1988b) est parvenu à décrire 25 molécules indispensables à la Réplication qui pourraient former le complexe appelé: "réplisome".

Chez les procariotes trois types de DNA polymérases ont été décrites:

- la DNA polymérase I qui joue un rôle important dans la réparation de l'ADN,
  - la DNA polymérase II, pas bien connue,
  - la DNA polymérase III holoenzyme, est responsable de la polymérisation des nucléotides au cours de la répllication.
- Cette enzyme fait partie du réplisome, complexe protéinique déjà décrit dans l'introduction générale.

Chez les cellules eucaryotes, trois types de DNA polymérases ont été détectés;  $\alpha$ ,  $\beta$ , et gamma-DNA polymérases. Elles ne correspondent pas exactement aux protéines procaryotiques. Les  $\alpha$  et  $\beta$  DNA polymérases sont actives dans le noyau et la gamma-DNA polymérase dans les organelles: mitochondries, et chloroplastes (cell.végétale). Les trois protéines ont été séparées par chromatographie, type phosphocellulose et DEAE-cellulose.

Tableau I.1 Caractérisation des DNA polymérases  $\alpha$ ,  $\beta$  et gamma du germe de blé. (Litvak et al, 1984)

	$\alpha$	$\beta$	gamma
poids moleculaire	110	50	140
Activité			
matrice poly rAdT	-	-	+
Inhibition			
Aphidicoline 50 $\mu$ g/ml	83	0	0
ddTTP (ddTTP/TTP=10)	0	66	78
BrET 10 $\mu$ M	10	5	65
N-ethylmaleimide 1mM	61	94	55

La polymérase  $\alpha$  est reconnue pour sa fonction répliquative, elle a aussi une fonction réparatrice d'ADN. Elle est active "in vitro" en présence d'ADN activé de thymus de veau. Cette matrice est un ADN traité à la DNase, qui a des trous dans sa séquence et est susceptible à une réparation.

La matrice poly rAdT est une petite amorce d'ADN riche en AT, qui pourrait être reconnue comme une origine de répliquation.

La présence de dideoxynucléotides (ddTTP) montre une forte inhibition de la fonction polymérasique, parce que les dideoxynucléotides arrêtent la synthèse des longs brins d'ADN.

Chez les plantes supérieures un certain nombre d'expériences ont été faites sur la synthèse de l'ADN. Des protéines avec une activité DNA-polymérasique ont été purifiées à partir de chloroplastes du tabac (Heinhorst et al, 1985) et du petunia (Haas et al, 1987).

Chez l'épinard une activité gamma-like DNA polymérase, a été purifiée de chloroplastes (Sala et al, 1980) et une  $\alpha$ -DNA polymérase a été purifiée, provenant du cytoplasme (Misumi et Weissbach, 1982).

Chez le maïs Zimmermann et Weissbach (1982), ont détecté une activité réparatrice de l'ADN à partir d'un extrait soluble de chloroplastes. Cette activité est dépendante de la présence de ions magnésium et de désoxyribonucléotides. Chez le petit pois, McKown et Tewari (1984) sont parvenus à purifier une DNA polymérase d'une taille de 90'000 daltons. L'activité de cette protéine "in vitro" est dépendante de la présence d'ADN activé de thymus de veau. Elle est inhibée à 90% par le Bromure d'Ethidium, et à 74% par le N-ethylmaleimide.

Une activité gamma-like polymérase est détectée chez le chloroplaste de *Petunia hybrida* (Overbeeke et al, 1984), semblable à celle détectée dans les chloroplastes d'épinard. En analysant le DNA marqué radioactivement "in organello", ces auteurs ont trouvé que tout le génome chloroplastique avait été marqué.

Chez *Chlamydomonas* CW15 une DNA polymérase a été purifiée. Cette DNA polymérase est active "in vitro" en présence d'une matrice poly (rAdT<sub>12</sub>), (Keller et Ho, 1981). Plus concrètement chez *Chlamydomonas reinhardtii*, Wu et al, (1986), ont testé la région de l'origine de répliquation du chloroplaste par un système "in vitro". Ce système a montré que la région Ori A est utilisée comme matrice dans la synthèse d'ADN. L'expérience a été faite en présence de ddCTP qui stoppe la réaction de la polymérase à différentes longueurs d'ADN synthétisé.

Chez l'algue *Euglena gracilis* deux DNA polymérases A et B ont été purifiées (McLennan et Keir, 1975). Ces protéines ont une taille de 190'000 Da pour la polymérase A et 240'000 Da pour la polymérase B. Si les deux réagissent "in vitro" en présence d'ADN activé, la pol. A semble montrer une meilleure activité en présence de polydAT et la pol. B en montre une meilleure en présence de matrice polyA-oligodT<sub>10</sub> (McLennan et Keir, 1975).

Pour les chloroplastes d'*Euglena gracilis*, le seul travail publié jusqu'à présent, montre l'incorporation de  $^{32}\text{P}_i$ , pendant la maturation des chloroplastes. Cela permet de mesurer la synthèse d'ADN (Walfield et Hershberger, 1978). Ces auteurs ont démontré une incorporation de radioactivité dans tout le génome chloroplastique sans différence appréciable.

Connaissant la région de l'origine de réplication du chloroplaste de l'algue *Euglena gracilis* Z, le but de ce travail est de caractériser autant que possible l'activité DNA polymérasique dans le chloroplaste.

Cela s'est fait par:

- la mesure de l'activité DNA polymérasique "in organello",
- la préparation des extraits de chloroplastes actifs pour le test de la DNA polymérase "in vitro",
- purification autant que possible de cette activité.

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1 CULTURE D'EUGLENES

La souche Z de l'algue *Euglena gracilis* a été utilisée pour préparer des cultures d'euglènes en grandes quantités. Les conditions de cultures étaient: milieu mixo-autotrophe, température 21°C et lumière constante. Ces conditions nous permettent d'obtenir des chloroplastes ayant une forte concentration en protéines fonctionnelles.

Les cellules d'euglène ont été synchronisées par des cycles répétés; lumière 14 h-obscurité 10 h, selon Richards et Manning (1972). Les cellules ont été récoltées pendant la phase obscure, après une heure d'obscurité.

La "Cellule de Thoma" a été utilisée, pour compter le nombre de cellules par culture et vérifier que la division cellulaire ait bien lieu pendant la phase obscure. Un changement de morphologie s'observe aussi entre ces deux phases.

phase obscure = forme arrondie  
phase lumière = forme allongée

La "Cellule de Thoma" a aussi servi à compter les chloroplastes, une fois isolés.

### II.2 ISOLEMENT DES CHLOROPLASTES

Pour la séparation des chloroplastes, la même méthode que celle utilisée pour purifier l'ARN chloroplastique a été utilisée (cf. première partie ch.II.3). On s'arrête après l'étape de séparation des chloroplastes dans un gradient Percoll 10-80 %.

Les chloroplastes obtenus seront utilisés; une partie pour des tests "in organello", le reste pour la purification de protéines. Les chloroplastes intacts peuvent être congelés dans l'azote liquide et conservés à -70°C.

### II.3 DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE

Le dosage de la chlorophylle est réalisé selon la méthode de Arnon, (1949). Cette méthode consiste à prendre 50 ul des chloroplastes, à les diluer dans 10 ml d'acétone 80 %, et à les filtrer. Le contenu de la "chlorophylle a" peut être déterminé en mesurant l'absorbance à 663 nm du filtrat. Une valeur de 1.0 d'absorbance correspond à 2.5 mg chlorophylle/ml chloroplastes.

Par cette méthode, nous pouvons aussi mesurer la quantité de chlorophylle dans la culture de cellules. Le dosage se fait avec 0,4 ml de culture de cellules diluée dans un volume final de 10 ml avec acétone 80 %. En fonction des valeurs obtenues, nous pouvons savoir si les chloroplastes sont ou non en division.

Le taux de chlorophylle double durant la phase éclairée, parce que c'est dans cette phase qu'a lieu la duplication des cellules.

## II.4 TEST D'ACTIVITE DE LA DNA POLYMERASE

Les chloroplastes isolés intacts sont resuspendus dans le tampon H.

Le tampon H est composé des produits suivants:

-Tris HCl pH=8.0	50 mM
-Sorbitol	330 mM
-NaCl	5 mM
-MgCl <sub>2</sub>	10 mM
-DTT	2 mM

Les chloroplastes sont dilués à raison de 1 ml de tampon par 5 grammes de cellules récoltées.

On a démontré la synthèse d'ADN dans les chloroplastes "in organello", par la méthode de Overbeeke et al, (1983).

Le test standard d'activité pour la synthèse d'ADN est réalisé avec 50 µl de suspension de chloroplastes dans un même volume de milieu réactionnel (selon Overbeeke) composé de:

-Tris HCl pH=8.0	50 mM
-MgCl <sub>2</sub>	10 mM
-DTT	2 mM
-ATP	4 mM
-dGTP	100 µM
-dCTP	100 µM
-dTTP	100 µM
-α <sup>32</sup> PdATP	1 µCi

Nous avons ajouté:

-KCl	120 mM
------	--------

d'après la méthode de Tewari et al, (1984).

La réaction est maintenue à 37°C aux différents temps:

0', 30'	"in vitro"
0', 5', 10', 15', 20', 30', 60', 90',	"in organello"

Elle est stoppée par l'addition de 1/10 de volume de solution stop composé de:

-Tris HCl pH=8.0	50 mM
-EDTA	20 mM
-Triton X-100	10 %

et est amenée à 0°C.

La moitié de la réaction a été déposée sur un filtre Schleicher & Schuell n 597. L'ADN a été précipité avec du TCA 5 % froid, lavé deux fois 20 minutes dans du TCA 5 % (10 ml par filtre), rincé à l'éthanol 100 % pour éliminer les restes de TCA, rincé à l'éther pour éliminer la chlorophylle qui pourrait fausser le comptage, et mis à sécher.

Les filtres secs, ont été trempés dans 2 ml de liquide à scintillation (toluène + 4 g/ l PPO + 0.1 g/ l POPOP) et le nombre des cpm incorporés a été compté.

Le test de la DNA polymérase selon McKown et Tewary (1984), a aussi été fait. Dans cette méthode les chloroplastes sont dilués dans le tampon STM qui a la composition suivante:

-Sucrose	0.5 M
-Tris HCl pH=8.0	50 mM
-MgCl <sub>2</sub>	5 mM
-2-Mercaptoethanol	10 mM
-PMSF	0.2mM

Le milieu réactionnel est composé des produits suivants:

-Tris HCl pH=7.0	50 mM
-MgCl <sub>2</sub>	12 mM
-KCl	120 mM
-ATP	1 μM
-dGTP	1 μM
-dCTP	1 μM
-dTTP	1 μM
-α <sup>32</sup> PdATP	1 μCi

Pour le test "in vitro" et "in organello", la réaction a été maintenue à 37°C. Nous avons ensuite stoppé la réaction comme indiqué dans la méthode d'Oveerbeeke. Le lavage et le comptage sont identiques à ceux décrits antérieurement.

Les différences dans le test "in vitro" sont:

- le temps d'incubation, 30 minutes
- l'adjonction d'ADN exogène.

Deux sortes de matrices ont été ajoutées:

- De l'ADN de thymus de veau activé, (Act. ctDNA), préparé avec de la DNase, enzyme qui coupe l'ADN double brin, selon la méthode de Hübscher (1977). Cette matrice va nous permettre de détecter préférentiellement une activité DNA polymérase  $\alpha$ .

- Une matrice poly rAdT, est utilisée pour détecter une activité du type DNA polymérase gamma.

Les deux types de matrices exogènes sont utilisées à une concentration de 20 ng/ $\mu$ l.

## II.5 EXTRACTION DES PROTEINES CHLOROPLASTIQUES

Ici nous décrivons les différentes méthodes utilisées pour casser les chloroplastes et obtenir des fractions de protéines solubles. Ces protéines contiendraient une DNA polymérase active ou, à défaut, nous allons purifier des extraits chloroplastiques avec une activité DNA polymérasique.

### II.5.1 Purification d'après la méthode de Tewari.

Nous avons suivi le protocole de purification de la DNA polymérase chloroplastique du petit pois, (Kown et Tewari, 1984).

A 4 ml de chloroplastes dans le tampon STM, nous ajoutons:

-Triton X-100	0.5 %
-DTT	0.5 mM
-PMSF	0.5 mM

la réaction est maintenue à 4°C pendant 30 minutes. Le Triton X-100 détruit la membrane chloroplastique.

La solution est ensuite homogénéisée 6x, à la main, avec le potter type Thoma A. Une centrifugation à 6500 rpm pendant 20 minutes nous permet de récolter la fraction protéinique soluble. Cette fraction est déposée dans une membrane de dialyse face au tampon STM à 4°C pendant la nuit, cela afin de diminuer la concentration de Triton. Une partie de la fraction est chargée sur une colonne DEAE (Whatman DE 52) de 2.5 x 2.0 cm et équilibrée avec du tampon Phosphate:

-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH=7.5

Après un premier lavage de la colonne avec du tampon KP 50 mM, nous ajoutons du tampon 350 mM pour éluer les protéines. Celles-ci sont récoltées par fractions de 1 ml. L'absorbance des fractions est mesurée à 280 nm, celles qui contiennent des protéines sont à nouveau dialysées pendant la nuit avec du tampon:

KP 10 mM + DTT 0,5 mM + PMSF 50  $\mu$ g / ml

et centrifugées à 7000 rpm pendant 20 minutes pour obtenir les fractions solubles.

### II.5.2 Extrait chloroplastique préparé en utilisant la Yeda Press.

En utilisant la Yeda Press et en imposant deux fois une pression de 50 atm., nous avons cassé la membrane chloroplastique sans devoir utiliser de détergents.

Les chloroplastes sont resuspendus dans le tampon H, auquel on ajoute du sel jusqu'à une concentration finale de:

-MgCl <sub>2</sub>	10 mM
-NaCl	5 mM

pour mieux précipiter les membranes thylacoidales. Les chloroplastes ainsi brisés sont centrifugés à 1'500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant et le culot sont testés, pour déterminer l'activité polymérasique.

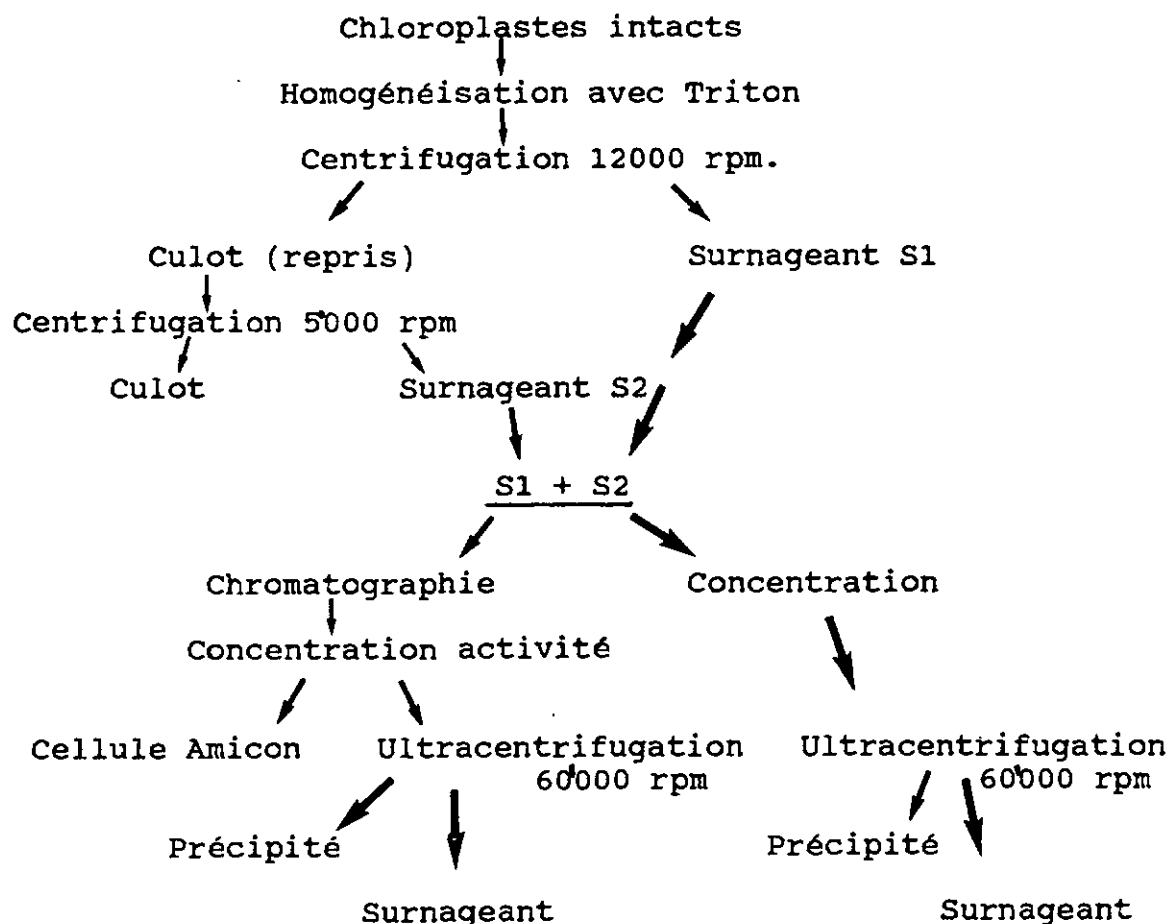
### II.5.3 Purification d'après la méthode de Hallick.

Pour montrer une activité DNA-polymérasique, nous avons utilisé la même méthode que celle utilisée par Hallick pour démontrer une activité RNA polymérasique du chloroplaste d'euglène (complexe actif de transcription) (Ruslow et Hallick, 1982). Nous aimerions obtenir un extrait de chloroplastes ayant une forte concentration en protéines fonctionnelles, liées à l'ADN.

Les chloroplastes purifiés par gradient de Percoll sont resuspendus dans 4 volumes de tampon "Hallick":

-Tris-HCl pH=7.6	50 mM
-2-Mercaptoethanol	40 mM
-Glycerol v/v	25 %
-EDTA	4 mM
-Triton X-100	1 %
-PMSF	200 µg/ml

Schéma II.1 Procédé de Purification de l'activité polymérasique selon la méthode de Hallick.



La solution chloroplastique est homogénéisée avec le Potter, à la main 5 fois. Une fois lysée, elle est centrifugée à 12000 rpm pendant 30 minutes dans le rotor HB4 de la centrifugeuse SORVALL.

Le test d'activité est fait avec le surnageant, le culot et avec le mélange des chloroplastes lysés. Les mêmes fractions sont testées mais préparées à partir de 0.5 % de Triton. En fonction des résultats le culot est resuspendu dans 500  $\mu$ l de tampon Hallick et recentrifugé pour essayer de récupérer la partie de l'activité restée dans le culot. Un deuxième surnageant S2 est obtenu. Son activité est testée une fois seule, et une autre fois avec le surnageant S1 (cf. schéma II.1).

Les deux surnageants mélangés sont amenés à une concentration de 0.1 M de sulfate d'ammonium, correspondant à la concentration de sel de la colonne où l'activité sera séparée.

L'étape suivante est une purification par chromatographie dans une colonne (2.5 x 60 cm) remplie avec 300 ml de résine Sepharose 4B de la maison Pharmacia. Le tampon utilisé pour équilibrer la colonne à la composition suivante:

-Tris HCl pH=7.6	50 mM
-(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM
-2-Mercaptoethanol	40 mM
-Glycerol v/v	25 %
-EDTA	4 mM
-PMSF	200 µg/ml

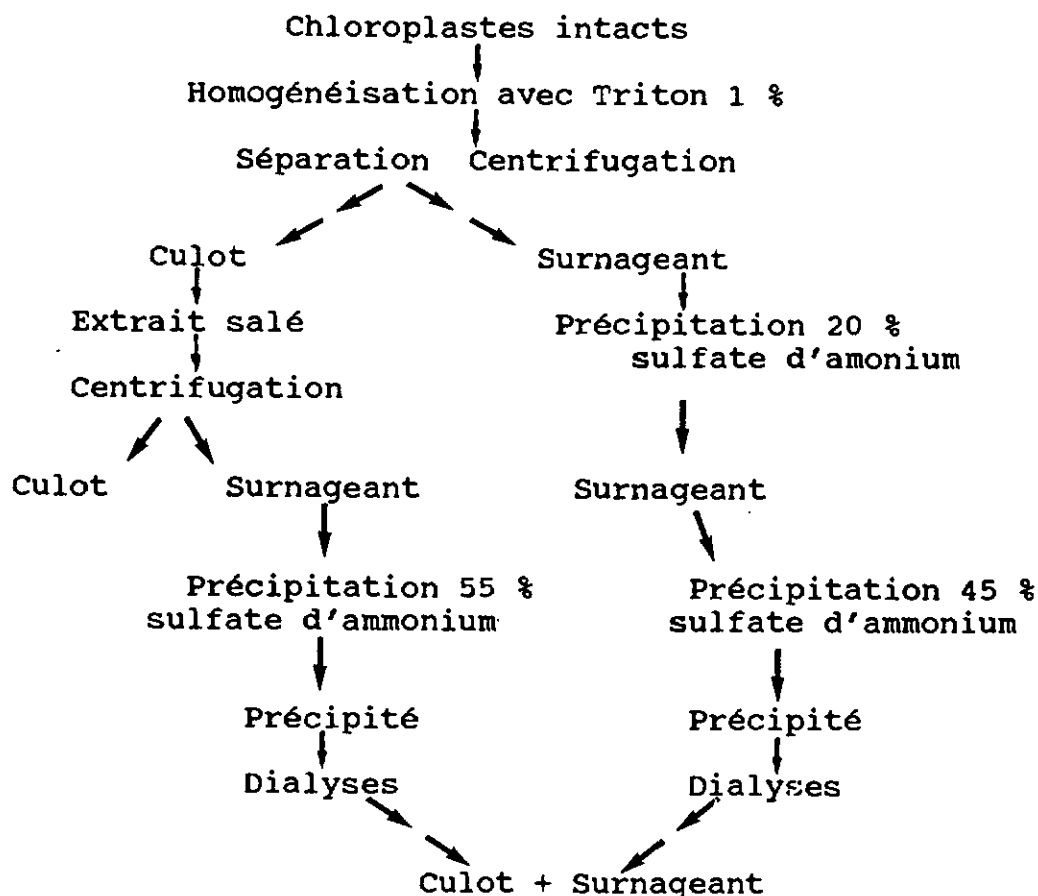
Le surnageant traité au sulfate d'ammonium est centrifugé à 20000 rpm pendant 30 minutes, afin d'éliminer les débris qui pourraient boucher le filtre de la colonne. 4 ml de surnageant sont chargés sur la colonne, mise en marche avec un débit de 250 µl par minute. Nous collectons des fractions de 5 ml. Les fractions ayant une concentration de protéines détectables aux U.V. sont testées pour leur activité répliquative et concentrées.

La méthode de concentration est la suivante:

- Par une cellule Amicon, avec une membrane XM-100 résistante au Triton, et une pression de 2 atm, les fractions sont concentrées 10 fois pendant 5 heures.
- Par ultracentrifugation, dans le rotor Ti 65, les protéines sont sédimentées à 60000rpm pendant 4 h. Le précipité est resuspendu dans le tampon de colonne sans Triton.

#### II.5.4 Purification selon Wu, (1986).

La méthode décrite pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* est une purification partiel d'un extrait chloroplastique, pour tester "in vitro" la réplication de l'ADN. Voici les étapes suivies pour préparer l'extrait:



Les chloroplastes sont brisés avec du Triton 1 % et centrifugés à 10'000 rpm pendant 7 minutes pour séparer les membranes thylacoidales des protéines solubles.

La fraction membranaire est traitée avec une concentration élevée de sel (High Salt Extract) selon Orozco et al.(1985). Les culots de chloroplastes brisés qui contiennent cette fraction membranaire sont récoltés et resuspendus dans 1 ml de tampon composé de:

-Hepes KOH	20 mM
-MgCl <sub>2</sub>	5 mM
-DTT	1 mM
-PMSF	1 mM

Pour l'extraction nous avons ajouté du:

-Glycerol	15 %
-NaCl	1 mM

Après agitation pendant 30 minutes et centrifugation pendant 30 minutes à 30'000 rpm, nous avons récolté le surnageant correspondant à l'extrait salé des membranes thylacoidales. Le surnageant est précipité au sulfate d'ammonium, jusqu'à 55 % de saturation.

Les protéines précipitées après une centrifugation à 20'000 rpm pendant 15 minutes sont resuspendues dans un volume minimal de tampon tricine, composé de:

-Tricine KOH pH=8	50 mM
-KCl	50 mM
-EDTA	0.5 mM
-DTT	0.5 mM
-PMSF	0.5 mM
-Glycerol	5 %

Une dialyse durant la nuit dans un même tampon est réalisée pour éliminer le sulfate d'ammonium.

La fraction soluble des protéines chloroplastiques est aussi précipitée au sulfate d'ammonium, 20 % de saturation et centrifugée 10 minutes à 15'000 rpm; le surnageant est à nouveau précipité avec 45 % de saturation de sulfate d'ammonium. Le culot de cette deuxième précipitation est resuspendu dans le tampon tricine, et dialysé la nuit avec le même tampon.

Le test sur l'activité réplivative est réalisé sur un mélange de 4  $\mu$ g de protéines de l'extrait des membranes thylacoidales et 40  $\mu$ g des protéines solubles, le tout dans 25  $\mu$ l de réaction.

## II.6 DOSAGE DES PROTEINES

La méthode décrite par Lowry et al (1951) nous a permis de déterminer la concentration des protéines dans nos extraits, en utilisant une courbe étalon, faite à partir de la protéine sérum-albumine de boeuf. Comme la concentration des protéines de nos échantillons est faible (moins de 20  $\mu$ g) nous avons effectué un microdosage en utilisant 0.2 ml de l'échantillon au lieu des 0.5 ml indiqués dans le protocole. Nous avons diminué les réactifs dans les mêmes proportions.

Le dosage Bio-Rad microassay a aussi été utilisé pour faire une courbe étalon entre 1 à 5  $\mu$ g de protéines. Ce test nous permet de faire des dosages de protéines solubles, sur des fractions contenant des quantités maximales des produits suivants:

- 0.1 % Triton X-100
- 1.0 M 2-Mercaptoethanol
- 5.0 M NaCl
- 1.0 M DTT

## II.7 ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE

Nous avons préparé des gels dénaturants de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium selon la méthode de Laemmli et Favre (1973). Les concentrations sont de 15 % polyacrylamide pour le gel de séparation et 6 % pour le gel de concentration.

Les protéines standards sont les suivantes:

	Poids moléculaires
-Serum albumine de boeuf	67'000
-Catalase	60'000
-Ovalbumine	43'000
-Desoxyribonuclease I	31'000
-Carboanhydrase	29'000
-Chymotrypsinogène	25'700
-Ribonuclease	13'700
-Cytocrome c	12'500

Le gel est coloré avec une solution de bleu de Coomasie, et décoloré, ensuite par agitation dans une solution de méthanol et acide acétique.

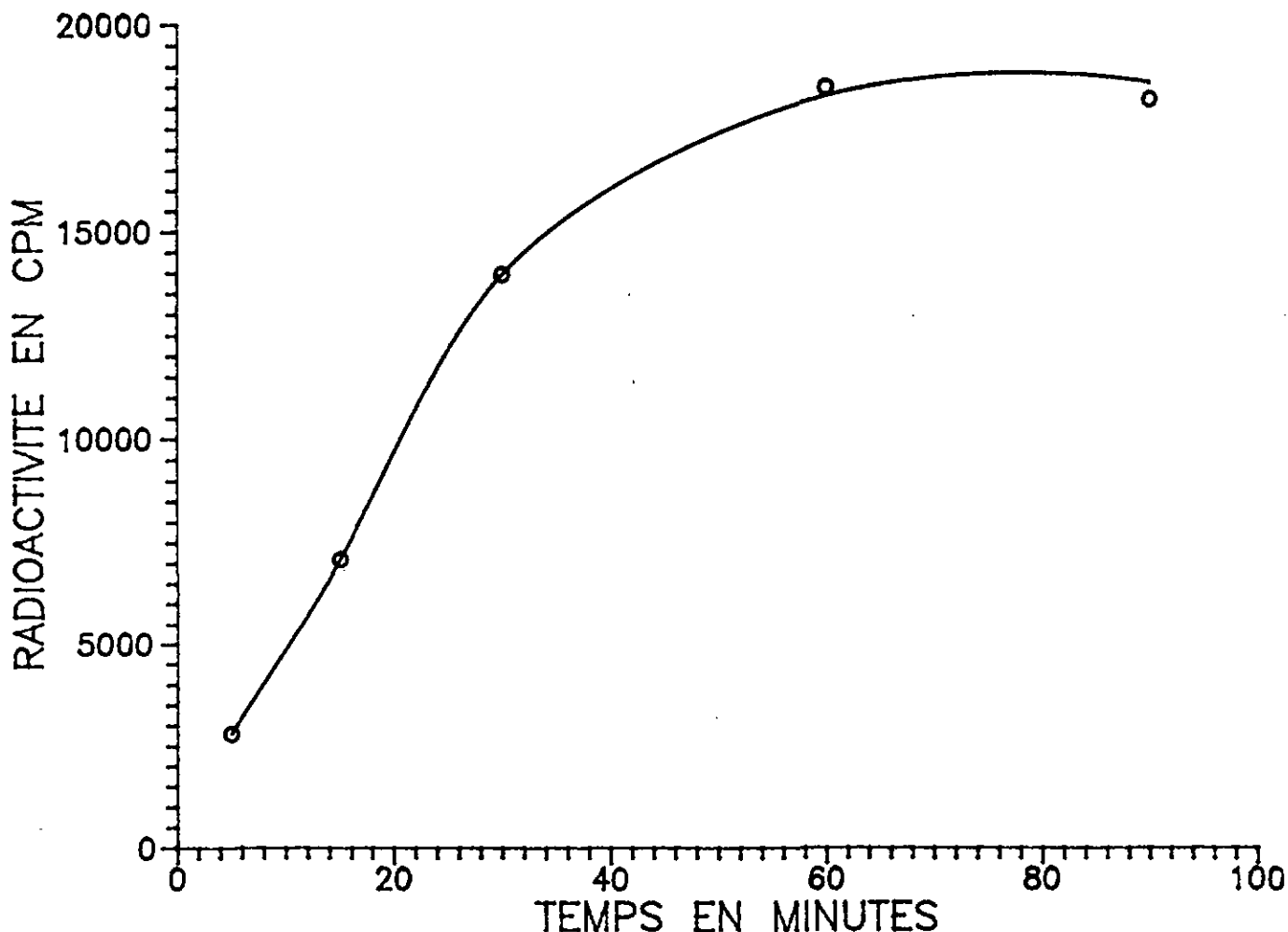
### III RESULTATS

#### III.1 ACTIVITE DNA POLYMERASIQUE "in organello"

Nous avons préparé douze isolations de chloroplastes intacts, que nous avons toujours testées pour être sûrs d'avoir un bon matériel de départ.

La vitesse d'incorporation d' $\alpha^{32}\text{P}$ dATP dans les chloroplastes est constante pendant les 30 premières minutes, après, elle diminue jusqu'à 60 minutes où se trouve le maximum d'incorporation accumulé.

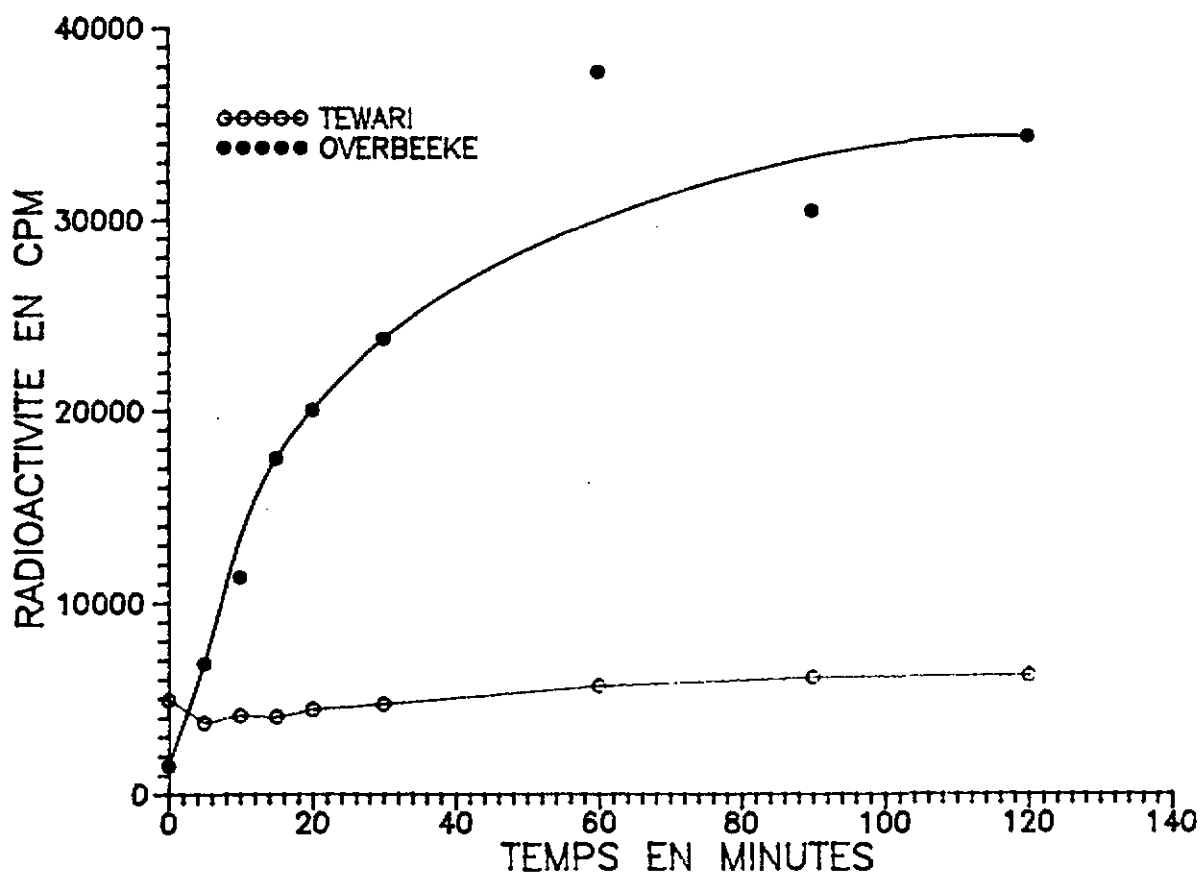
Graphe III.1 Incorporation de  $\alpha^{32}\text{P}$ dATP en fonction du temps dans les chloroplastes.



La vitesse d'incorporation maximale de la réaction est donnée en moles de  $\alpha^{32}\text{P}$ dATP par minute:  $5,17 \times 10^{-3}$  pmol/min, et la radioactivité accumulée au bout de 60 minutes de réaction est de  $2,05 \times 10^{-2}$  pmol, ce qui correspond à  $7,3 \times 10^{-3}$  pmol de  $\alpha^{32}\text{P}$ dATP/mg de protéine.

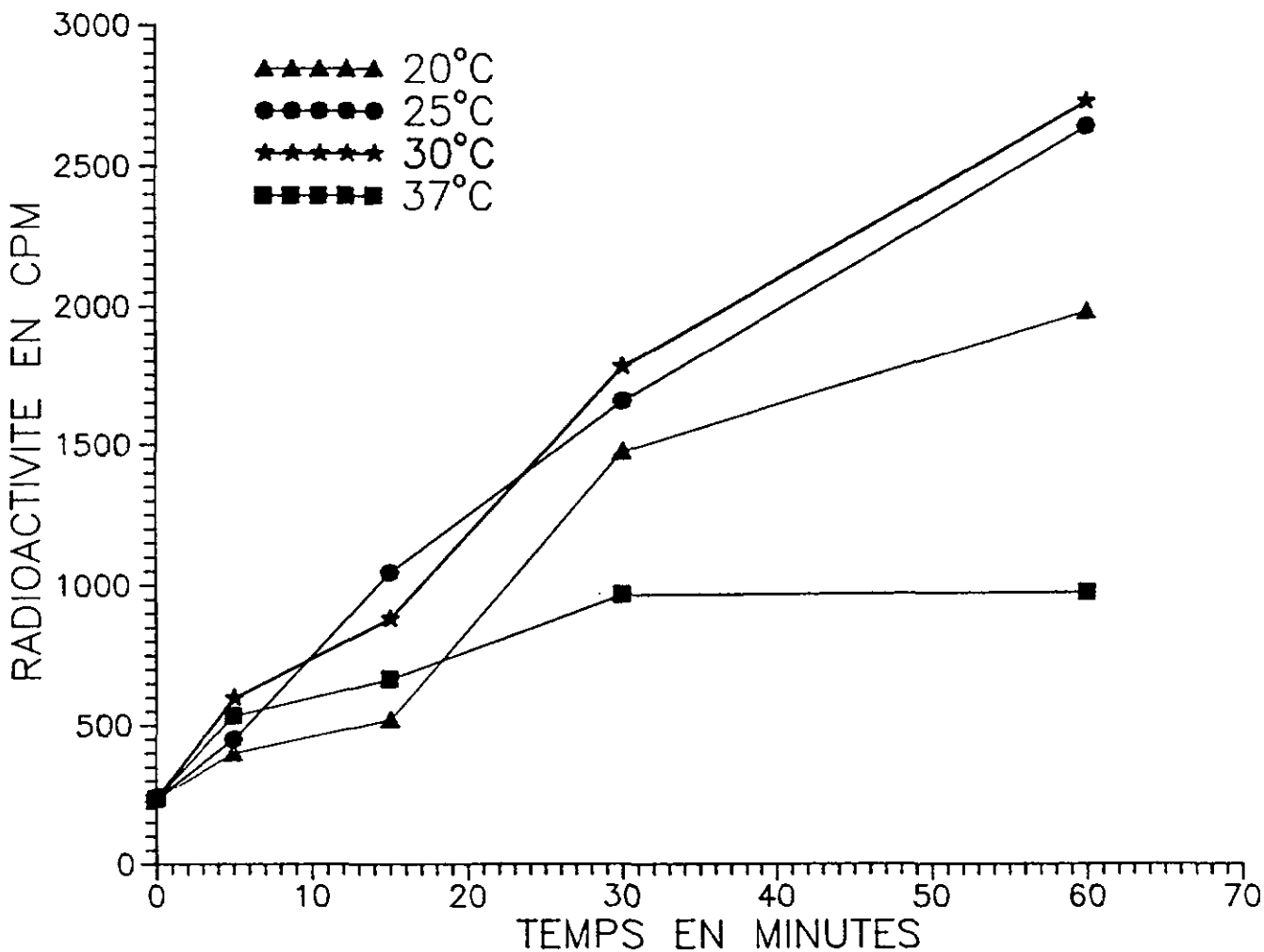
Le test d'activité DNA polymérasique fait selon Tewari (cf.ch.II.5.1) et Overbeeke (cf.ch.II.4) donne des résultats différents. Par le test de Tewari, les chloroplastes ne sont pas actifs (cf graphe III.2).

Graphe III.2 Activité DNA polymérasique selon les méthodes de Overbeeke et Tewari.



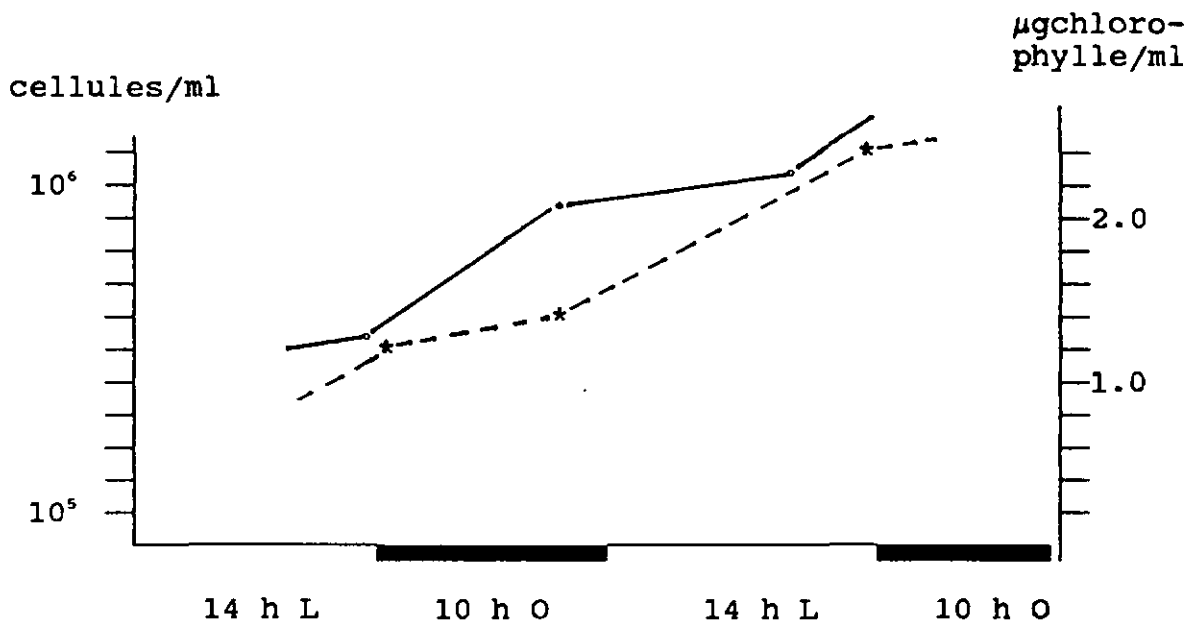
Nous avons aussi testé l'effet de la température pendant 60 minutes sur l'incorporation d' $\alpha^{32}\text{PdATP}$ . Cette incorporation est deux fois plus importante à 25°C et 30°C qu'à 37°C.

Graphes III.3 Test d'activité DNA polymérisique en fonction de la température.



Les cultures synchronisées sont aussi testées. Le nombre de cellules et la quantité de chlorophylle des cultures sont contrôlées après trois jours. La quantité d'ADN incorporée dans les chloroplastes, en fin de croissance exponentielle est la même pour une culture synchronisée et pour une culture en lumière continue.

Graphe III.4 Cultures synchronisées d'euglène.  
 °  $\mu\text{g}$  chlorophylle / ml de culture  
 \* nombre de cellules / ml de culture



Une analyse de l'ADN chloroplastique, après incorporation de la radioactivité "in organello", a été faite par Bernard Rutti (communication personnelle). L'ADN extrait du chloroplaste, coupé par les enzymes de restriction Bgl II, Hind III et Eco RI, et l'autoradiographie du gel de séparation d'ADN montrent que tous les fragments sont marqués à parts égales, pour de l'ADN extrait après une heure d'incubation en présence d' $\alpha\text{P}^{32}\text{dATP}$ .

Ce qui voudrait dire que:

- Soit il y a une activité réparatrice de l'ADN chloroplastique,
- Soit il y a une activité DNA polymérasique qui a répliqué tout le génome en une heure.

### III.2 PURIFICATION DE L'ACTIVITE DNA POLYMERASIQUE

Nous présentons ci-après les résultats de l'activité DNA polymérasique après purification.

Nous avons tenté de casser les chloroplastes par décongélation. La fraction des protéines solubles est séparée de la fraction des protéines membranaires par centrifugation. Les résultats de l'activité DNA polymérasique sont:

- Une activité dans le culot (fraction protéines membranaires), en présence d'une matrice d'ADN activé de thymus de veau,
- une activité est aussi présente dans le culot, sans adjonction d'ADN activé de thymus de veau.

Ces résultats montrent que la méthode de décongélation n'est pas assez puissante pour casser des chloroplastes intacts, puisque l'activité est aussi forte avec ADN exogène que sans ADN exogène. Nous avons trouvé des chloroplastes intacts au microscope.

L'augmentation d'incorporation de la radioactivité est due à l'adjonction d'ADN exogène (augmentation de 29 %).

Les chloroplastes ont été cassés par la Yeda-Press. La fraction des protéines solubles a été séparée de la fraction des protéines membranaire par centrifugation.

Les résultats montrent une faible activité DNA polymérasique pour la fraction des protéines membranaires. Cette activité est dépendante d'une matrice d'ADN activé de thymus de veau. Ils montrent aucune activité pour la fraction des protéines solubles, en présence d'ADN exogène, même après purification de cette fraction sur colonne DE52.

Les protéines des deux fractions sont analysées par gel. Ce gel montre une très forte concentration de protéines de petites tailles dans la fraction membranaire.

Les chloroplastes actifs "in organello", ont été brisés par la méthode Tewari (cf, ch.II.5.1). Aucune activité DNA polymérasique a été détectée dans les fractions des protéines solubles. Même après purification sur colonne DE52.

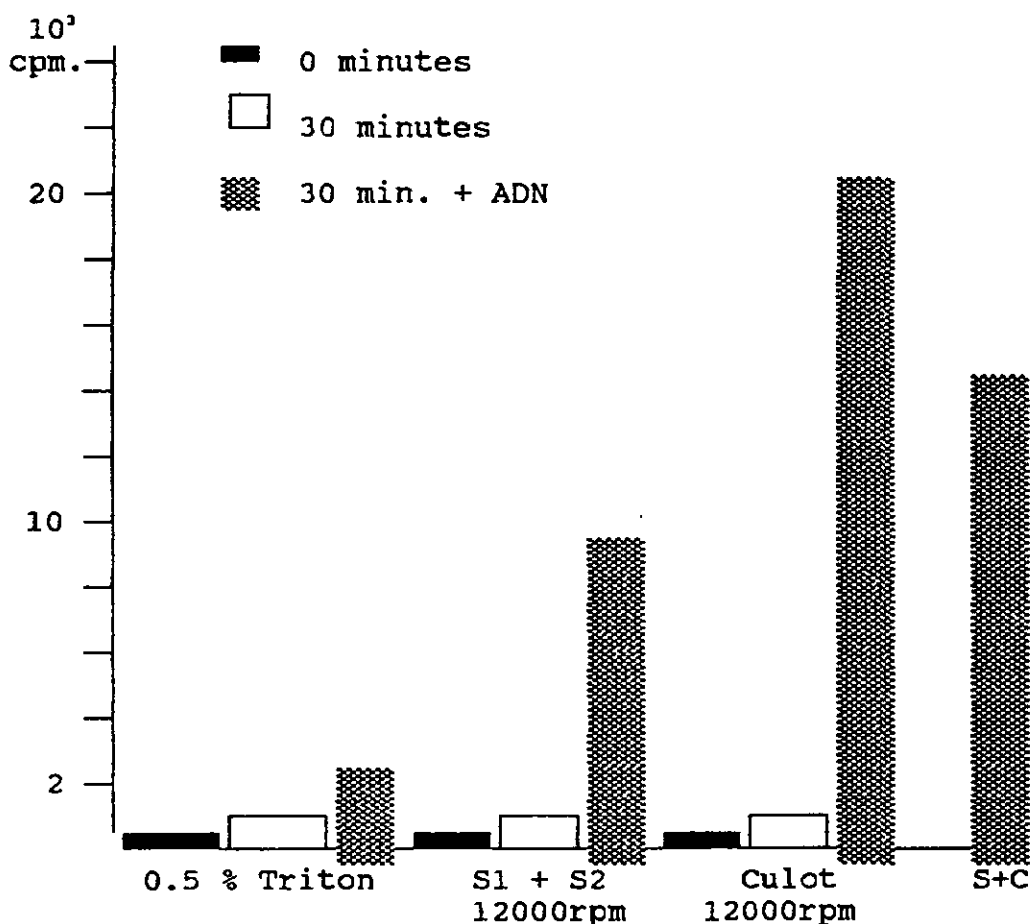
La méthode ayant donné les meilleurs résultats est celle décrite par Hallick (cf.ch.II.5.3). La concentration de Triton pour casser les chloroplastes était de 0.5%.

Les résultats montrent:

- Une bonne activité DNA polymérasique de la fraction membranaire en présence d'ADN exogène.
- Une activité DNA polymérasique de la fraction des protéines solubles (S1 + S2), toujours en présence d'ADN exogène (cf.schéma II.1).

Un contrôle a été fait ne montrant aucune activité DNA polymérasique en l'absence d'ADN exogène. Tous les chloroplastes ont donc été cassés. (cf. graphe III.5), mais l'ADN endogène n'est pas polymérisé "in vitro".

Graphe III.5 Activité DNA polymérasique des extraits de protéines, préparés selon la méthode de Hallick.



La purification des fractions, protéines solubles (S1 + S2) par colonne Sepharose 4B, n'a donné qu'une faible activité DNA polymérasique. Cette activité a été trouvée pour des protéines sortant dans le "volume mort" de la colonne.

L'activité DNA polymérasique des fractions solubles (S1 + S2) a été concentrée par centrifugation à 60'000 rpm (365'000g). Cette activité DNA polymérasique, obtenue dans le culot, est conservée dans du glycerol 50 %.

La dernière méthode essayée est celle décrite par M.Wu pour les fractions isolées de *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans cette méthode le culot et le surnageant sont purifiés séparément pour ensuite être mélangés (cf.ch.II.5.4). Cette méthode n'a pas donné d'activité; il nous a été impossible de solubiliser le culot. Le culot étant obtenu par précipitation en présence de sel concentré. Le mélange des deux fractions ne donne pas d'activité mesurable

### III.3 ACTIVITE DNA POLYMERASIQUE "in vitro"

A partir des extraits chloroplastiques les plus actifs, culots récoltés à 60'000 rpm, selon la méthode de Hallick, nous avons fait plusieurs expériences permettant de détecter:

- une bonne activité de l'extrait en présence d'ADN activé de thymus de veau,
- une faible activité sans adjonction d'ADN exogène,
- une très faible activité avec la matrice poly rAdT. Il y a une inhibition de l'activité en présence de cette matrice.

Nous avons testé les inhibiteurs décrits par Overbeeke, en présence de la matrice ADN activé de thymus de veau:

- le Bromure d'éthidium, à une concentration de 100  $\mu$ M inhibe complètement l'activité DNA polymérasique en présence d'ADN exogène;
- le N-Ethylmaleimide à concentration de 2 mM a un effet d'inhibiteur partiel.

Tableau III.1 Activité DNA polymérasique "in vitro".

	%
Culot 60'000 rpm + ADN activé 3.7 $\mu$ g	100
Culot 60'000 rpm - ADN activé -	21.1
Culot 60'000 rpm + poly rAdT 2 $\mu$ g	12.3
Culot 60'000 rpm + NEM 2 mM	60.5
Culot 60'000 rpm + BrEt 100 $\mu$ M	5.7

#### IV. DISCUSSION

A partir des chloroplastes, nous avons testé "in organello" une activité DNA polymérasique.

La vitesse d'incorporation  $\alpha P^{32}dATP$  est constante pendant les 30 premières minutes. Après, cette vitesse diminue et la réaction s'arrête après 60 minutes (cf. graphe III.1).

A la température de 25 et 30°C l'incorporation  $\alpha P^{32}dATP$  est maximale par rapport aux autres températures testées. Nos expériences ont été faites à 37°C, car l'activité DNA polymérasique des extraits chloroplastiques chez les plantes supérieures est testée à 37°C. A cette température l'ADN double brin est plus facilement séparé en simple brin.

Nous n'avons trouvé une activité DNA polymérasique positive "in vitro", qu'en présence d'ADN activé de thymus de veau. Cette activité pourrait être une activité " $\alpha$ -like polymérase" du même type que celle trouvée chez l'épinard (Amileni et al, 1979).

Aucune activité DNA polymérasique n'a été trouvée en présence d'une matrice polyrAdT. Matrice déterminant l'activité "gamma-like polymérase" chez les eucaryotes (Sala et al, 1980).

L'activité DNA polymérasique trouvée est inhibée en présence de Bromure d'éthidium et partiellement inhibée en présence de N-ethylmaleimide, (cf. tableau III.1).

Ayant trouvé, en présence d'une matrice d'ADN activé de thymus de veau, une activité DNA polymérasique inhibée par le BrEt et partiellement inhibée par le N-ethylmaleimide, nous sommes de plus en plus amenés à croire que l'activité trouvée est une activité de type " $\alpha$ -like polymérase", (cf. tableau I.1).

Cette activité n'est pas trouvée, comme espéré, dans la fraction soluble mais dans la fraction membranaire.

Les essais pour solubiliser l'activité DNA polymérasique de la fraction membranaire n'ont pas donné de résultats.

Les raisons possibles sont:

- le replisome (où se trouve l'activité DNA polymérasique) est un complexe enzymatique attaché aux membranes,
- ou le replisome se dissocie, lorsqu'on le sépare des membranes. Par exemple un traitement trop fort, qui dissocierait le complexe, et les protéines séparées n'auraient plus d'activité polymérasique.

- ou les conditions idéales pour extraire l'activité DNA polymérasique, avec adjonction des autres enzymes n'ont pas été trouvées.

La seule méthode pour obtenir une activité DNA polymérasique des chloroplastes d'euglènes "in vitro" a été:

- de concentrer l'extrait des membranes, séparé de l'extrait soluble par centrifugation à haute vitesse, ou
- de préparer un culot par centrifugation à 60'000 rpm à partir des surnageants obtenus à basse vitesse de centrifugation.

Il serait intéressant de tester, si une activité "primase" existe dans ces mêmes extraits chloroplastiques. Le complexe "primase" construit l'amorce d'ARN pour que la DNA polymérase puisse commencer la synthèse d'ADN.

Cette expérience pourrait être faite, "in vitro", par adjonction de:

- ribonucléotides (ATP, GTP, CTP, UTP),
- désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), et
- ADN simple brin exogène comme matrice ( Hübscher, 1983 ).

L'activité "primase" serait montrée par une augmentation de l'incorporation de radioactivité, par rapport à l'incorporation due à l'activité DNA polymérasique seule.

Pour montrer où commence la synthèse d'ADN "in vitro", l'incorporation de radioactivité, dans les expériences faites, a duré trop longtemps (cf.ch.III.1). Le génome a été entièrement marqué, soit par une activité réparatrice, soit une activité polymérasique.

Montrer quelle activité a été trouvée, pourrait se faire:

- Par une expérience d'incorporation de radioactivité "in organello" à des périodes de temps assez courts.
- ou par la même expérience que celle décrite par (Wu et al, 1986) chez *Chlamydomonas reinhardtii*. L'adjonction de ddCTP, à différentes concentrations, arrêterait la synthèse de longs brins d'ADN. Par isolation de l'ADN radioactif synthétisé, nous pourrions peut-être trouver le site d'initiation de la réplication.

Cette expérience faite "in organello" pourrait être aussi faite "in vitro" par adjonction d'ADN exogène; les clones pEGCBG1 ou pEGCB6 par exemple (cf.ch.III et IV). Ainsi nous pourrions déterminer si c'est dans la partie répétitive avec les séquences ARS ou dans la région Z de taille variable que se trouve l'origine de réplication (cf.annexe3).

**BIBLIOGRAPHIE**

Amileni A., Sala F., Cella R. & Spadari S. (1979)  
The Major Polymerase in Cultured Plants Cells: Partial  
Purification and correlation with Cell Multiplication.  
Planta 146, 521-527

Amersham International plc UK (1983)  
M13 cloning and sequencing handbook

Anderson J.N. (1986)  
Detection, sequence patterns and function of unusual DNA  
structures.  
Nucleic Acid Res. 14, 8513-8533

Arnon D.I. (1949)  
Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in  
*Beta vulgaris*.  
Plant. Physiol. 24, 1-15

Benton W.D. & Davies R.W. (1977)  
Screening Lambda recombinant clones by hybridization to single  
plaques in situ.  
Science 196, 180

Berk A.J. & Sharp P.A. (1977)  
Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel  
electrophoresis of SI endonuclease digested hybrids.  
Cell 12, 721-732

Billeter M. & Weber H. (1978)  
Cours SKMB  
Institut für Molekular biologie. Universität Zurich.

Bird R.E., Louarn J., Marstscelli J. & Caro L. (1972)  
Origin and sequence of chromosome replication in *E. coli*.  
J. Mol. Biol. 70, 549

Birnboim H.C. & J. Doly (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant  
plasmid DNA.  
Nucleic Acid Research. 7, 1513-1523

Biskoff E., La Rue B. & Geffer M. (1975)  
In vitro synthesis of transfer RNA II. Identification of required  
enzymatic activities.  
J. Biol. Chem. 250, 6248-6255

Biskoff E., & Geffer M. (1975)  
In vitro synthesis of transfer RNA I. Purification of required  
components.  
J. Biol. Chem. 250, 6240-6247

Blanc H. (1984)

Two modules from the hypersuppressive rho- mitochondrial DNA are required for plasmid replication in yeast.

Gene 30, 47-61

Blanc H. & Dujon B. (1982)

Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA active in vivo and in yeast transformants, Slonimski P. et al (Eds).

Mitochondrial Genes, Cold Spring Harbor Laboratory press, NY, 279-294

Boyer H.M. & Roulland-Dussoix D. (1969)

A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*.

J. Mol. Biol. 41, 459-472

Bradford M. (1976)

A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.

Anal. Biochem. 72, 248

Bramhill D. & Kornberg A. (1988)

A model for initiation at Origins of DNA Replication.

Cell 54, 915-918

Brawermann G. & Eisenstadt J.M. (1964)

Biochem. Biophys. Acta 91, 477-485

Briat J.F. & Dalmon J. (1986)

*Spinacia oleracea* chloroplast DNA sequence homology with ARS and ARC elements within the inverted repeat, upstream of the rDNA operon.

Nucleic Acid Res. 14, 8223

Broach J.R., Li Y.Y., Feldman J., Jayaram M., Abraham J., Nasmyth K.A. & Hicks J.B. (1983)

Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 47, 1165-1173

Buetow D. (1968)

The Biology of *Euglena* vol. I,II,III

Academic Press.

Carrillo N. & Bogorad L. (1987)

Chloroplast DNA replication in vitro: site-specific initiation from preferred templates.

Nucleic Acid Res. 16, 5603-5620

Chaconas G. & van de Sande J.M. (1980)

5'-32P Labelling of RNA and DNA restriction fragments.

Methodes Enzymol. 65,75-85

- Clewell D.B. (1972)  
Nature of Col E1 plasmid replication in *Escherichia coli* in presence of chloramphenicol.  
J. Bacterial. 110, 667
- Crouse E. Vandrey J. & Stutz E. (1974)  
Proc. third Intl. Congress. Photosync, Rehovot Israel. 1775-1786  
Elsevier Amsterdam.
- Currier & Nester (1971)  
Anal. Biochem. 76, 431
- Cushman J.C., Christopher D.A., Little M.C., Hallick R.B. & Price C.A. (1988b)  
Organization of the psbE, psbF, orf 38 and orf42, gene loci on the *Euglena gracilis* chloroplast genome.  
Curr. Genet. 13, 173-180
- Cushman J.C., Hallick R.B. & Price C.A. (1988a)  
The two genes for the P700 chlorophyll a apoproteins on the *Euglena gracilis* chloroplast genome contain multiple introns.  
Curr. Genet. 13, 159-171
- Dagert M. & Ehrlich S.O. (1979)  
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *E. coli* cells.  
Gene 6, 23
- Eckdahl T.T., Bennetzen J.L. & Anderson J.N. (1989)  
DNA structures associated with autonomous replication in yeast  
Plant Molecular Biology 12:507-516
- Favarolo J., Treissmann R. & Kamen R. (1980)  
Transcription maps of polyoma virus specific RNA. Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping.  
Methods in enzymology 65, 718-749
- Fasnacht M. (1981)  
Travail de licence. Université de Neuchâtel.
- Gauss D.M., Grüter F. & Sprinzl M. (1979)  
Compilation of tRNA sequences.  
Nucleic Acid Res. 5, 15-127
- Genetics Computer Group (1989)  
Sequence Analysis software package  
University of Wisconsin. Version 6.0
- Glover D.M. (1985)  
DNA cloning vol.I  
IRL Press. Oxford-Washington DC.
- Godson G.N. & Vapneck D. (1973)  
A simple method of preparing large amounts of OX174RF1 supercoiled DNA.  
Biochim. Biophys. Acta 299, 516-520

- Gold B., Carrillo N. Tewari K.K. & Bogorad L. (1987)  
Nucleotide sequence of a preferred maize chloroplast genome  
template for in vitro DNA Synthesis.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 84, 194-198
- Goldenberg C.J. & Hauser S.D. (1983)  
Accurate and efficient in vitro splicing of purified precursor  
RNAs specified by early region 2 of the adenovirus genome.  
Nucl. Acid. Res. 11, 1337-1348
- Goldman, Engelman & Steiz (1986)  
Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem 15, 321-353
- Gray P.W. & Hallick R.B. (1978)  
Biochemistry 17, 284-289
- Greenberg B.M., Gruissem W, & Hallick R.B. (1984)  
Accurate processing and pseudouridylation of chloroplasts  
transfer RNA in a chloroplasts transcription system.  
Plant Molecular Biology 3,97-109
- Greenberg B.M. & Hallick R.B. (1986)  
Accurate transcription and processing of 19 *Euglena* chloroplast  
tRNAs in a *Euglena* soluble extract.  
Plant Molecular Biologic 3, 97-109
- Gruissem W., Narita J.O., Greenberg B.M., Prescott D.M. & Hallick  
R.B. (1983)  
Selective in vitro transcription of Chloroplast Genes.  
Journal of Cellular Biochemistry 22, 31-46
- Grunstein M. & Hogness D. (1975)  
Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs  
that contain a specific gene.  
Proc. Nat. Assoc. Sci. 72, 3961-3965
- Haas J.M., Kool Ad.J., Overbeeke N., van Brug W. & Nijkamp  
J. (1987)  
Characterization of DNA synthesis and chloroplast DNA replication  
initiation in a *Petunia hybrida* chloroplast lysate system.  
Curr.Genet 12:377-386
- Haas J.M., Boot K.J.M., Haring M.A., Kool J. & Nijkamp H.J.J.  
(1986)  
A *Petunia hybrida* chloroplast DNA region, close to one of the  
inverted repeats, shows sequence homology with the *Euglena*  
*gracilis* chloroplast DNA region that carries the putative  
replication origin.  
Mol. Gen. Genet. 202, 48-54
- Hallick R.B., Hollingsworth M.J. & Nickoloff J.A. (1984)  
Transfer RNA genes of *Euglena gracilis* chloroplast DNA.  
Plant Molecular Biology 3, 169-175

- Heinhorst S., Cannon G. & Weissbach A. (1985)  
Chloroplast DNA synthesis during the Cell Cycle in Cultured Cells of *Nicotiana tabacum*: Inhibition by Nalidixic Acid and Hydroxyurea.  
Archives of Biochemistry and Biophysics 239, n.2
- Hiraga S. (1976)  
Novel F. prime factors able to replicate in E. coli Hfr strains.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 198-202
- Hirt B. (1967)  
Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures.  
J. Mol. Biol. 26, 365-369
- Hollingsworth M.J., Johanningmeier U., Karabin G.O., Siegler G.L., & Hallick R.D.(1984)  
Detection of multiple, unspliced precursor mRNA transcripts for the Mr 32000 thylakoid membrane protein from *Euglena gracilis* chloroplast.  
Nucleic Acid Res. 12:2001-2017
- Hübscher U. Kuenzle C.C., & Spadari S.(1977)  
Variation of DNA polymerases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  during perinatal tissue growth and differentiation.  
Nucleic Acid Res. 4, 2917-2929
- Hübscher U. (1983)  
The mammalian primase is part of a high molecular weight DNA polymerase  $\alpha$  polypeptide.  
The Embo Journal 2, 133-136
- Hübscher U. & Ottiger H.P. (1984)  
Mammalian DNA Polymerase  $\alpha$  holoenzyme.  
Proteins involved in DNA replication. Plenum Press 321-330.
- James B.D., Olsen G.J., Liu J. & Pace N.R. (1988)  
The secondary Structure of Ribonuclease P RNA, the Catalytic Element of a Ribonucleoprotein Enzyme.  
Cell 52, 19-26
- Jenni B., Fasnacht M. & Stutz E. (1981)  
The multiple copies of the *Euglena gracilis* chloroplast genome are not uniform in size.  
FEBS Lett. 125, 175-179
- Jenni B. & Stutz E. (1978)  
Physical mapping of the Ribosomal DNA Region of *Euglena gracilis* chloroplast DNA.  
Eur. J. Biochem. 88, 127.134
- Keller S.J. & Ho C. (1981)  
Chloroplast DNA polymerase.  
Int. review in Citology 69, 157-190

- Keller M. & Stutz E. (1984)  
Structure of the *Euglena gracilis* chloroplast gene (psbA) coding for the 32KDa protein of Photosystem II.  
FEBS 175, 173-177
- Koller B. & Delius H. (1982a)  
Electron Microscopic Analysis of the extra 16s rRNA gene and its neighbourhood in chloroplast DNA from *Euglena gracilis* strain Z.  
FEBS Lett. 139, 86-91
- Koller B. & Delius H. (1982b)  
Origin of replication in chloroplast DNA of *Euglena gracilis* located close to the region of variable size.  
EMBO 1, n.8, 995-998
- Koller B. & Delius J. (1984)  
Intervening sequences in Chloroplast Genomes.  
Cell. 36, 613-622
- Kolodner R.D. & Tewari K.K. (1975a)  
Presence of displacement loops in the covalently Closed Circular Chloroplast Deoxyribonucleic Acid from Higher Plants.  
J. Biol. Chem 250, 8840-8847
- Kolodner R.D. & Tewari K.K. (1975b)  
Chloroplast DNA from higher plants replicates by both the Cairns and the rolling circle mechanism.  
Nature 256, 708-711
- Kornberg A. (1980)  
DNA Replication.  
Freman & Cie.
- Kornberg A. (1982)  
Suplement to DNA Replication.  
Freeman and Cie.
- Kornberg A. (1988a)  
DNA Replication.  
J. Biol. Chem. 263, 1-4
- Kornberg A. (1988b)  
DNA Replication.  
Biochimica and Biophysica Acta 951, 235-239
- Kuntz M., Keller M., Crouse E.J., Burkard G. & Weil S.H. (1982)  
Fractionation and identification of *Euglena gracilis* cytoplasmic and chloroplastic tRNAs mapping of tRNA genes on chloroplast DNA.  
Current Genetics 6, 63-70
- Laemmli U.K., & Favre M. (1973)  
J.Mol.Biol 80,575-599
- Litvak S., et al, (1984)  
Studies on the initiation of DNA synthesis in plant and animal cells Proteins involved in DNA replication.

Plenum Press.321-330

Lowry O.M., Rosebrough W.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951)  
Protein measurement with de Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Maniatis T., Fritsch E.F., & Sambrook J.(1982)  
Molecular Cloning a Laboratory Manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Manning J.E., Wolstenholme D.R., Ryan R.S., Hunter J.A. &  
Richards O.C. (1971)  
Circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis*  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1169-1173

Manning J.E. & Richards O.C. (1972)  
Biochem. Biophys. Acta 269, 285-296

Maxam A.M. & Gilbert W. (1977)  
A new method for sequencing DNA.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 560-564

Mc Kown R.L. & Tewari K.K. (1984)  
Purification and properties of a pea chloroplast DNA polymerase.  
Proc.Natl.Acad.Sci. 81, 2354-2358

Mc.Leman A.G. & Keir H.M. (1975a)  
Desoxirribonucleic Acid Polymerases of *Euglena gracilis*.  
Biochem. J. 151, 227-238

Mc.Leman A.G. & Keir H.M. (1975b)  
DNA polymerases of *Euglena gracilis*: heterogeneity of molecular  
weight and subunit structure.  
Nucleic Acid Res. 2,223-237

McGarvey P. Heling R.B., Lee J.Y., Engelke D.R. & El-Gewaly R.  
(1988)  
Initiation of rrn transcription in chloroplasts of *Euglena  
gracilis bacillaris*.  
Curr. Genet. 144, 493-500

McMaster G.K. & Carmichael G.G. (1977)  
Analysis of simple and double stranded nucleic acids on  
poliacrilamide and agarose gel by using glyoxal and acridine  
orange.  
Proc. Nat. Assoc. Sci. USA 74, 4835-4838

Meeker R. Nielsen B. & Tewari K.K. (1988)  
Localization of Replication Origins Chloroplast DNA.  
Molecular and Cellular Biology 8, 1216-1223

Meselson M. & Stahl F.W. (1958)  
The replication of DNA in *E:coli*.  
Proc. Nat. Acad.Sci 44, 671-782

- Messing J., et Vieira J. (1982)  
A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragment.  
Gene 19, 269-272
- Messing J., Crea R. & Seeburg P.H. (1981)  
A system for shotgun DNA sequencing.  
Nucleic Acid. Res.9, 4835-4838
- Misumi M. & Weissbach A. (1982)  
The isolation and characterization of DNA Polymerase  $\alpha$  from Spinach.  
The Journal of Biological Chemistry 257, 2323-2329
- Monfort A., Rutti B. & Stutz E. (1986)  
Sequence of a Leucine tRNA gene from the chloroplast genome of *Euglena gracilis*  
Nucleic Acid Res.14,3971
- Montandon P.E., Knüchel-Aegerter C. & Stutz E. (1987)  
*Euglena gracilis* chloroplast DNA: The untranslated leader of tuf-A-ORF206 gene contains an intron.  
Nucleic Acid. Res. 15, 7809-7822
- Montandon P.E. & Stutz E. (1984)  
The genes for the ribosomal proteins S12 and S7 are clustered with the gene for the EF-Tu protein on the chloroplast genome of *Euglena gracilis*.  
Nucleic acid Research 12, 2851-2860
- Oka A. Sugimoto K. & Takanami M. (1980)  
Replication Origin of the E. coli K-12 Chromosome: The size and Structure of the Minimum DNA Segment Carrying the Information for Autonomous Replication.  
Molec. Gen. Genet. 178, 9-20
- Okazaki T. & Okazaki R. (1969)  
Mechanism of DNA chain growth IV. Direction of synthesis of T4 short DNA chains as revealed by exonucleotic degradation.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 64, 1242
- Oppermann T., Hong T.H., & Surzycki S.J. (1989)  
Chloroplast and nuclear genomes of *Chlamydomonas reinhardtii* share homology with *Escherichia coli* genes for DNA replication, repair and transcription.  
Curr.Genet.15,39-46
- Orozco E.M. & Hallick R.B. (1982)  
*Euglena gracilis* Chloroplast Transfer RNA Transcription Units.  
The Journal of Biological Chemistry 257, 3265-3275
- Orozco E.M., Mullet J.R & Chua N.H. (1985)  
An in vitro system for accurate transcription initiation of chloroplast protein genes.  
Nucleic Acid Res. 13, 1283-1302

- Ortiz W., Reardon E. & Price C. (1980)  
Preparation of chloroplasts from *Euglena* Highly Active in Protein Synthesis.  
*Plant Physiology* 66, 291-294
- Overbeeke N., de Waard J.H. & Kool A.J. (1984)  
Characterization of in vitro DNA synthesis in an isolated chloroplast system of *Petunia hybrida*.  
Proteins involved in DNA replication. Plenum Press N.Y. 107-112
- Pillay T.N., Guillemant P. & Weil J.M. (1984)  
Nucleotide sequences of three soybean chloroplasts tRNAs Leu and re-examination of bean chloroplast tRNA Leu2 sequence.  
*Nucleic Acid Research* 12, 2997-3001
- Ravel-Chapuis P., Heizmann P. & Nigon V. (1982)  
Electron microscopic localization of the replication origin of *Euglena gracilis* chloroplast DNA.  
*Nature* 300, n.5887, 78-81
- Rawson J.R.Y., Kushner S.R., Vapneck D., Alton N.K. & Boerma C.L. (1978)  
*Gene* 3, 191-209
- Reed R.E., Baer M.F., Guerrier-Takada C., Doris-Keller H. & Altman S. (1982)  
Nucleotide sequence of the gene encoding the RNA subunit (MI RNA) of ribonuclease P from *Escherichia coli*.  
*Cell* 30, 627-636
- Reich C., Gardiner K.J., Olsen G.J., Pace B., Marsh T.L. and Pace N.R. (1986)  
The RNA component of the *Bacillus subtilis* RNase P: sequence activity, and partial secondary structure.  
*J. Biol. Chem* 261, 7888-7893
- Richards O. & Manning J.E. (1974)  
Replication of chloroplast DNA in *Euglena gracilis*.  
Les cycles cellulaires et leur blocage chez plusieurs protistes.  
Colloques internationaux du CNRS 240, 213-221
- Robertson H.D. Altman S. & Smith J.D. (1972)  
*J. Biol chem* 247, 5243-5251
- Rochaix J.D., van Dillewijn J. & Rahire M. (1984)  
Construction and Characterization of Autonomously Replicating Plasmids in the Green unicellular Alga *Chlamydomonas reinhardtii*.  
*Cell* 36, 925-931
- Roux Etienne (1984)  
Thèse de doctorat  
Université de Neuchâtel.
- Ruslow K. & Hallick R. (1982)  
The isolation and purification of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*.

## Methods in chloroplast molecular biology 543-550

Rutti Bernard (1982)

Thèse de doctorat.

Lab.de Biochimie Université de Neuchâtel.

Sagher D., Grosfeld H. & Edelman M. (1976)

Large subunit ribulose bisphosphate Carboxylase messenger RNA from *Euglena* chloroplasts.

Proc. Nat. Assoc. Sci. USA 73, 722-726

Sakamoto K., Kimura N., Nagawa F. & Shimura Y. (1983)

Nucleotide sequence and stability of the RNA component of RNase P from a temperature-sensitive mutant of *E. coli*

Nucl. Acid. Res. 11, 8237-8251

Sala F., Amileni R., Parisi B. & Spadoni S. (1980)

A gamma-like DNA polymerase in spinach chloroplasts.

Eur. Journal. Biochemistry 112, 211-217

Sala F., Amileni A., Parisi B & Spadari S. (1980)

A gamma-like DNA polymerase in spinach chloroplasts.

Eur. J. Biochem. 112, 211-217

Sanger F., Nicklen S., & Coulson A.R. (1977)

DNA sequencing with chain terminating inhibitors.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

Sanger F. & Coulson A.R. (1978)

The use of thin acrylamid gels for DNA sequencing.

FEBS Lett. 87, 107-110

Sanger F., Coulson A.R., Barrell B.G., Smith A.J.H. & Roe B.A. (1980)

Rapid DNA sequencing.

J. Mol. Biol. 143, 161-178

Schleicher & Schuell (1987)

Transfer and Immobilization of Nucleic Acids to S & S Solid Supports.

Printed in USA

Schlunegger B., Fasnacht M., Stutz E., Koller B. & Delius H. (1983)

Analysis of a polymorphic region of the *Euglena gracilis* chloroplast genome.

Biochemica et Biophysica Acta 739, 114-121

Schlunegger B. & Stutz E. (1984)

The *Euglena gracilis* chloroplast genome: structural features of a DNA region possibly carrying the single origin of DNA replication.

Current Genetics 8:629-634

- Sharp P.A., Sugden B. & Sambrook J. (1973)  
Deletion of two restriction endonuclease activity in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose.  
Biochemistry 12, 3055
- Shinozaki K. & al (1986)  
The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression.  
EMBO J. 5, 2043-2049
- Shiraishi H. & Shimura Y. (1988)  
Functional domains of the RNA component of Ribonuclease P revealed by chemical probing of mutants RNAs.  
EMBO 7, 3817-3821
- Snyder M., Buchmann A.R. and Davis R.N. (1986)  
Bent DNA at a yeast autonomously replications sequence.  
Nature 324, 87-89
- Southern E. (1975)  
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.  
J. Mol. Biol. 98, 503-517
- Steinmetz A.A., Krebbers E.T., Schwarz Z, Gubbins E.J. & Bogorad L. (1983)  
Nucleotide Sequences of Five Maize Chloroplasts Transfer RNA Genes and Their Flanking Regions.  
J. Biol. Chem. 258, 5503-5511
- Stinchcomb D., Thomas M., Kelly J., Selker E., & Davis R. (1980)  
Eucaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 4559-4563
- Struhl K., Stinchcomb D. Scharer S. & Davis R. (1979)  
High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1035-1039
- Stutz E. & Vandrey J.P. (1971)  
Ribosomal DNA satellite of *Euglena gracilis* chloroplast DNA  
FEBS Lett. 17, 277-280
- Sugimoto K., Oka A., Sugisaki h., Takanami M., Nishimura A., Yasuda S. & Hirota Y. (1979)  
Nucleotide sequence of *Escherichia coli* K12 replication Origin.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 575-579
- Tomioka N. & Sugiura M. (1983)  
Mol. Gen. Genet. 191, 46-50
- Uchimiya H. Ohtau T., Ohgawara T., Harada H., Sugita M. & Sugiura M. (1983)  
Molecular cloning of Tobacco Chromosomal and Chloroplast DNA Segments Capable of Replication in Yeast.

Mol. Gen. Genet. 192, 1-4

Vallet J.M., Rahire M. & Rochaix J.D. (1984)  
Localization and sequence analysis of chloroplast DNA sequences of *Chlamydomonas reinhardtii* that promote autonomous replication in yeast.  
EMBO J. 3, 415-421

Vasconcelos A.C., Pollack M., Mendiola L.R., Hoffmann H.P., Brown D.H. & Price C.A (1971)  
Isolation of intact chloroplasts from *Euglena gracilis* by zonal centrifugation.  
Plant Physiol 47, 217-221

von Allmen J.M. (1987)  
Thèse de doctorat.  
Université de Neuchâtel

Wadell J., Wang X-M. & Wu M. (1984)  
Electron microscopic localization of the chloroplast DNA replicative origins in *Chlamydomonas reinhardtii*.  
Nucleic Acid Res. 12, 3843-3856

Walfield A.M. & Hershberger Ch.L. (1978)  
Turnover-Synthesis of chloroplasts DNA in Developing Chloroplasts.  
Journal of Bacteriology 133, 1437

Wang X-M., Chang C.H., Wadell J. & Wu M. (1984)  
Cloning and delimiting one chloroplast DNA replicative origin of *Chlamydomonas*.  
Nucleic Acid Res. 12, 3857-3872

Weil J.H. (1979)  
Biochimie Générale  
Masson, Paris, New York, Barcelona, Milan.

Weiss B., Jacquemin-Sablon A. Live T.R., foreed G.C. & Richardson C.C. (1968)  
Enzymatic breakage and joining of desoxyribonucleic acid. VI Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4.  
J. Biol. Chem. 243, 4543

Wu M., Lou J.K., Chang D.Y., Chang C.H. & Nie Z.Q. (1986)  
Structure and function of a chloroplasts DNA replication origin of *Chlamydomonas reinhardtii*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6761-6765

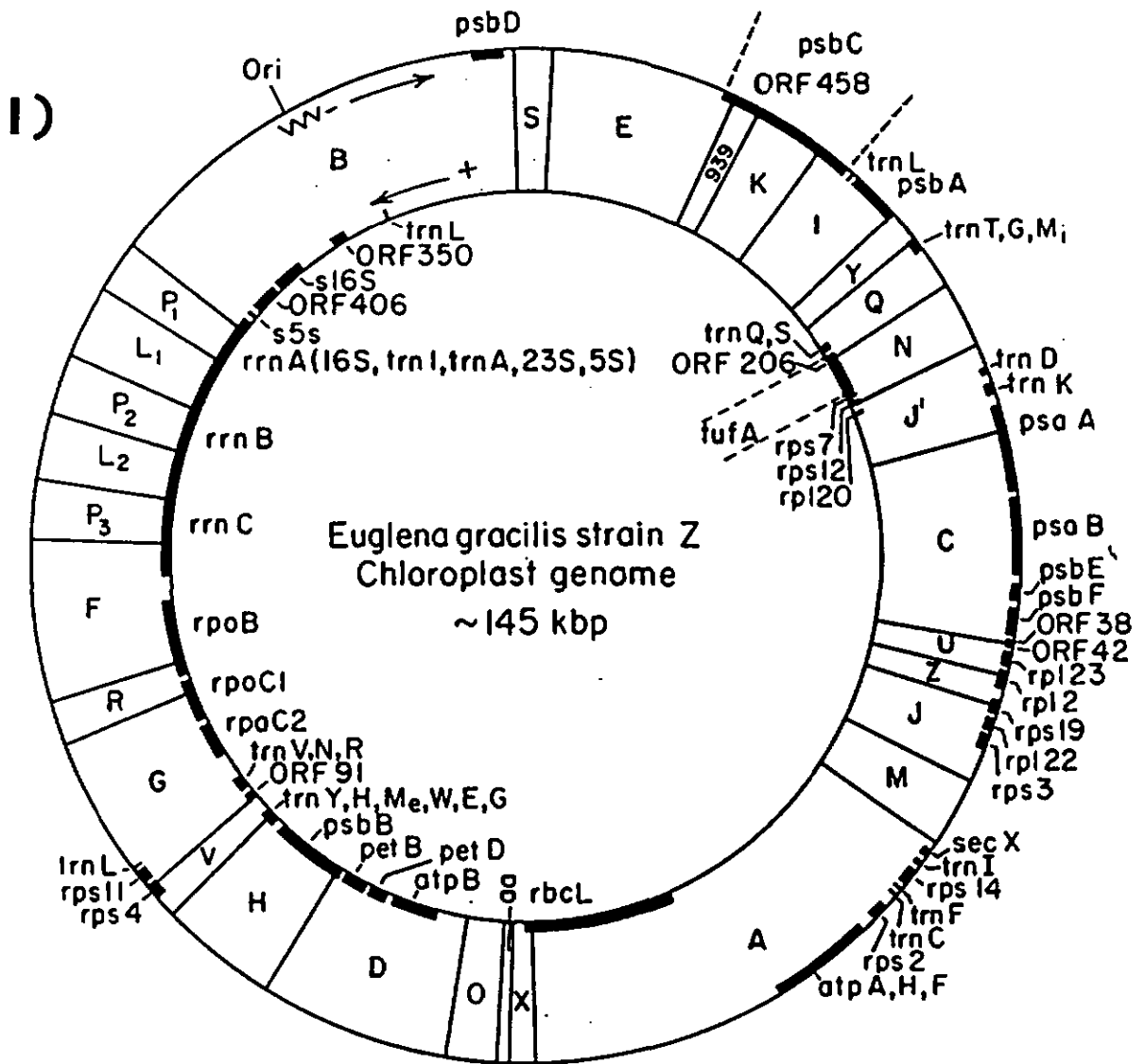
Yamada T., Shimagi M. & Fukuda Y. (1986)  
Characterization of a chloroplast DNA sequence from *Chlorella ellipsoidea* that promotes autonomous replication in yeast.  
Plant Molecular Biology 6, 245-252

Zimmermann W. and Weissbach A. (1982)  
Desoxirribonucleic Acid Synthesis in Isolated Chloroplasts and  
Chloroplast Extracts of Maize.  
Biochemistry 21, 3334-3343

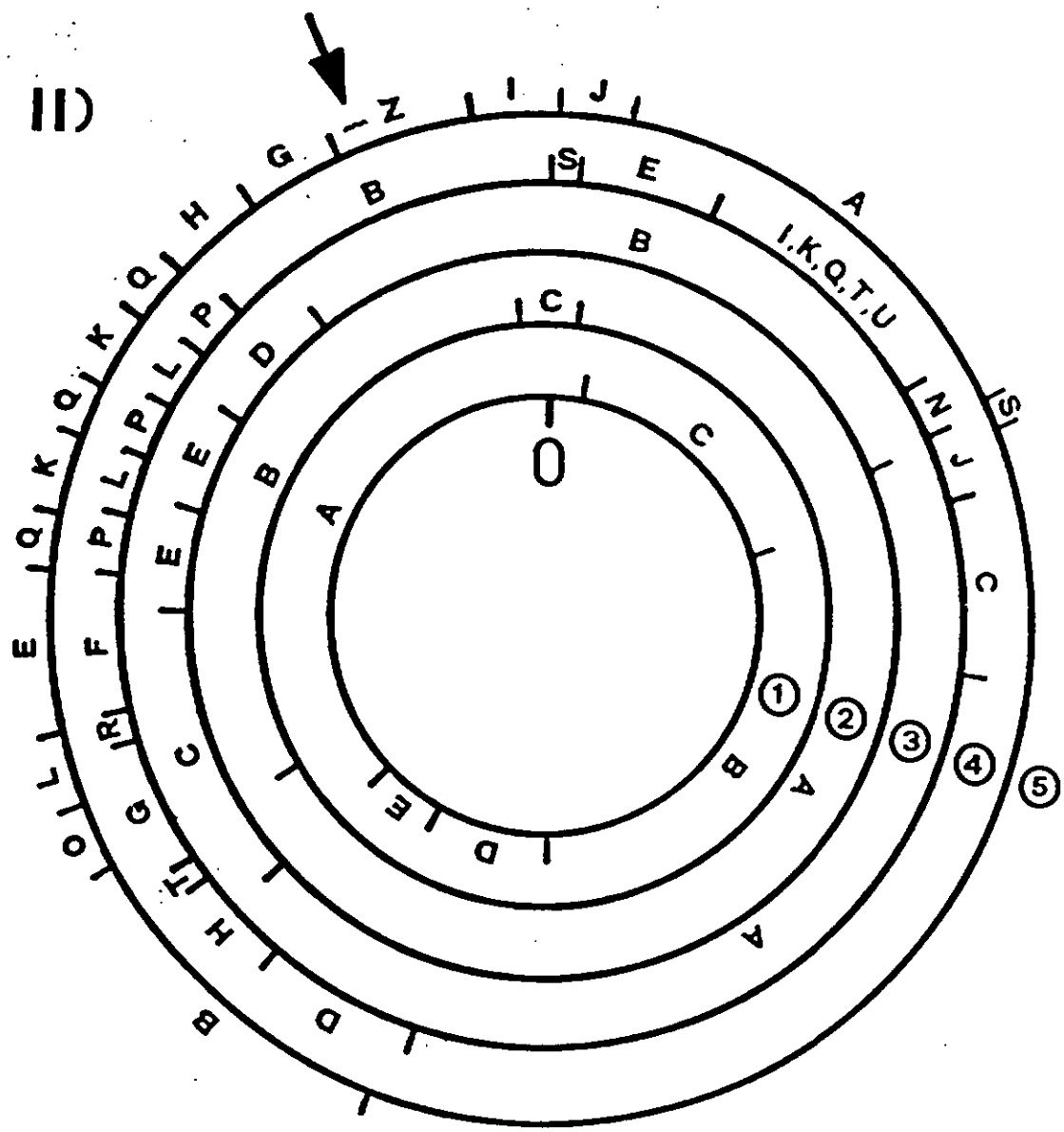
Zyskind J.N. & Smith D.N. (1980)  
Nucleotide sequence of the salmonella typhimurium origin of DNA  
replication.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 2460-2464

**ANNEXES**

- I) Carte de restriction du génome chloroplastique d'*Euglena gracilis*.
- II) Carte de restriction du génome chloroplastique d'*Euglena gracilis* . Enzymes: Bgl II, Eco RI, Bam HI, Sal I, Pst I, (Travail de licence M.Fasnacht).
- III) Carte de la région voisine à l'origine de réplication. Fragments Bgl GI et Bgl Z.
- IV) Séquence total de la région analysé, 9106 pb.
- V) Carte de restriction de touté la région analysé, 9106 pb.
- VI) Carte du génome chloroplastique du *Nicotiana tabacum*. (Shinozaki et al, 1986)
- VII) Séquence comparative des régions voisines au pseudogène tRNA Trp d'euglène et les gènes Trp et Pro de tabac. (La position 1430 du fichier OREGR (*Euglena gracilis*), correspond à la position 6418 de la séquence total, annexe IV).

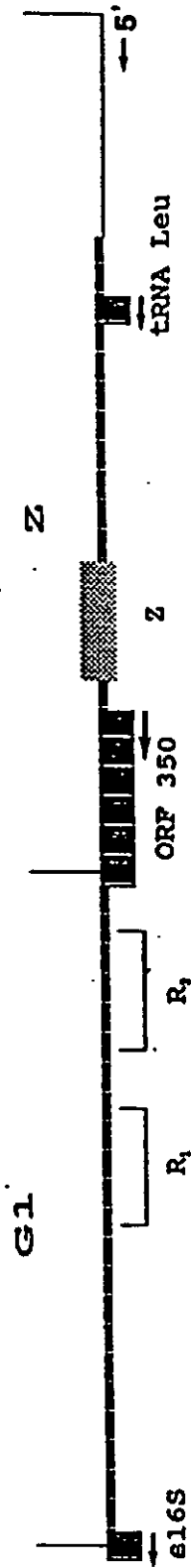
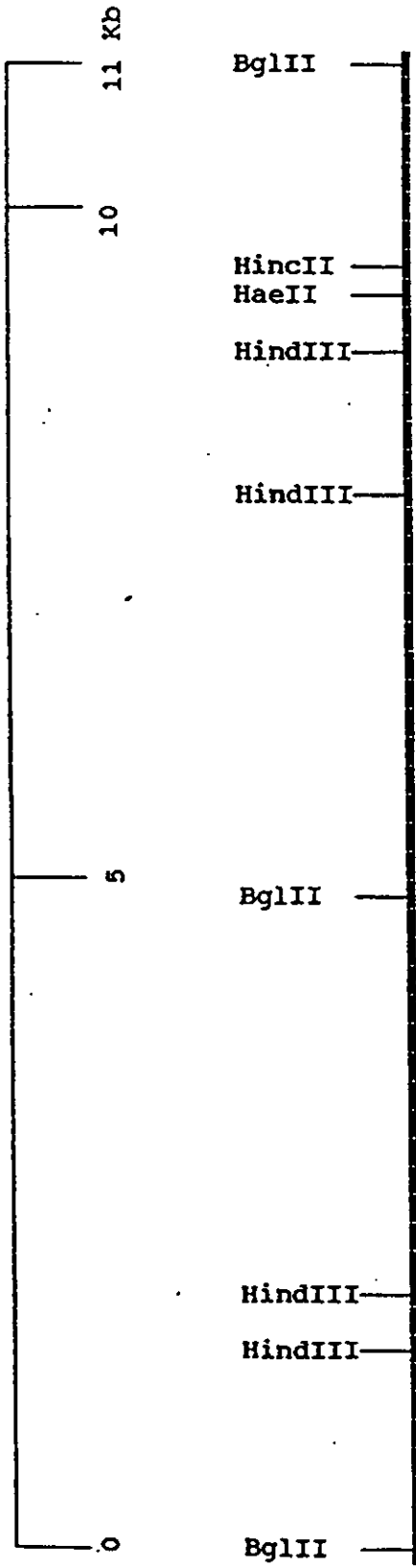


II)



- ① endoR.PstI
- ② endoR.SalI
- ③ endoR.BamHI
- ④ endoR.EcoRI
- ⑤ endoR.BgIII

# III)



R1 and R2: 920 b repeat

# IV)

1 AGATCTAGTA AATTATSAGG CATTAGCAGA CBTTCATC TGTTATTCT  
51 CACCCAGGCG CAGATTCTTA CATATTACT ACCCGTCCGC CACTAAATTA **S 16 s**  
101 CTATTGCTAG TAATTCGTT CAACTTGCAT GTGTTAAGCA TACCGCCAGC  
151 GTTCACCCG AGCAGGATC AACTCCTCA TTTCCAAAC ATCAAAGTTG  
201 GTCAATCCT TTCACCTCT TGGTGACCA GCAAGGGCA CATTACTAT  
251 AATGTGTACA CTAAGGCG GCTTTGTAGG ATTCGAACCT ACTACATCAG **pt RNA W**  
301 GTTTTGGAGA CCTACGCTT ACAATTTAA CGAAAGCAA TATTAGCTA  
351 TGCTTAACAC ATGCAGTTG AACGAGGEC TTTAATCCAC GACCTACT **pt RNA I**  
401 TTATCAAGA TATCCATAA TAGCAGTTA ACGTCGTTT TAAGAGTTG  
451 AACATGTTTT TTATCTCATT TACATTTGA TATTCAAGGA TATTTAGTT  
501 GACAAAATT ATGCATCAT AATGATAAGT ATTGTTAAT TTCAGTAAT  
551 CCTGGATTT CTTAACTACT AAAGGATAAA ABCCTTTAA ATTGCAATA  
601 AGATTCGAAA AAATCGATTA AATATCTATG TCACTGCTT AAAATTSAAA  
651 AATACCTTAT TTTGACCAT ATTTAGATGG ATTCATAAAT ATCCAACATT  
701 CATTAASTAC TTTGSTATTA TGTGATTCAT TAAATTAAT TTTTATTT  
751 ACACCTAATC TCGTACTTAA ATATATGTTT CATTAAATGA CBTTCATAG  
801 CBTGCCCC ATATACAAA TTCTGAGGT TTTCTTTT CAAACAGTAA  
851 CATAGCATT TCTATGTCC CTTTTTTC TAATCAATC ATCCTTTCT  
901 CCAAAGGAG ATATTGAAA TATTGACCA TATTTTAAG AATTGATCC  
951 GAAGCCATGA AATTGCTGA AGCACCACAA AGTTAAATAT TTTGTTTAT  
1001 TGAATAGTC GACAAATCT TTCTCATTGT TAACTCTGGC CTATAAATTT  
1051 TAGAATCAAT AGATATATCG AAAAAATTTG CCAATTTAGT ATCGACTTCT  
1101 TTAATAAAT ACGAATGCAC ATGAGGGTCC ACCTGTTCTA TGAATTTCT  
1151 GTACTAACGC ATAATCAACT AATCCATATT TAACTCAAT AGTGAAGATA  
1201 CTTATCAAAA TCTGATAAG GACTTCCTT AATATTTACT CCTATAAGT  
1251 TTTAATAAG TCAATTTAA ATTTATTAAT TTAATAAGGT AAAAAGTAGG  
1301 CAACTCACT ATACTCCATC AAAAAAAGG CCAATTATTC TACAAATTGA  
1351 CATTGATAAA AAACATATT TAAATAAGTG ATAGAATAAT CACATTTTCC  
1401 ATGACACTAT ATTTAATTA ATCGATTTT TTGACAGCT TTAAGAAAAA  
1451 TATTCTACTT CTACTACGTT TAAATAAGT CCCATTTTCA ATGATAAAAA

1501 AAAAAAGCTT TCAACTAAAT TTTTGGTCAG GTTTTTTTCA TCATATTGTG  
 1551 CTTTATAAGA ACAATATTTT TTATAGATTT TTTTACTGT TAAATTGAAT  
 1601 ATTTTTGTAT TATTTAAATT TTTTCTCTT TTTTGCATA CTTTCTCCCT  
 1651 ATATAAAAT CAAAAACAAG GCAATGAAGA CCGAATCTGC CSTAAATCGA  
 1701 CATTTCACA AGCTCTTTT CTAAATTTT TGAACCATTA TATCTAAGT  
 1751 TTCTTCACCA TAAATTTCTT TGTTCACTAA AGTATATAAT TCAAATTTAT  
 1801 CAATTTTTTA TTTTTGCTT TTCTAGAAA AAAATAAGA AGCATTTCOA  
 1851 CAAAAATCCA GTTAAATCC CAGTTTTTAT AATTATCGTT TTTAAAGAA  
 1901 TTATGTTTAT AAAACTTAGA AGCTTGCTTA AATAAAAAA TATTAGAAAT  
 1951 ATTAGAATTT GAGATACTAT TTCTAATAC TCGACTTCA GATATATACT  
 2001 TCAACAACAT AGAACBAAGT TTTATTGCAT CGTTTTTACT CGTTAAAAA  
 2051 AACAAATTTT GACTCTATT ATATATTTT CAATGAATGT TTAATAATTG  
 2101 ATCATTAGCT TTCAAACAT TAAATGATC GTGTAAAAA TTATTAGAAT  
 2151 CATTTATTC TAATTCCTT TTCTCTCTG TTATTTTTT TTCACTTTT  
 2201 AAATAATTTT CTGAGGAATT GGAATCAAT TTAGAAAAA ACGAAGGAA  
 2251 ACAATGATCT TTTCGCGCAC GACTTAATAA ATTATTTTTA ATAACAAAT  
 2301 CAAAACCTAA AGAATTTTTA AACCATTTT AACCTTGGG ACACCTGACC  
 2351 AACAACTTC AATGTTTTA TTCCCTGTT TAGAAAAAA ATTATCAAGT  
 2401 GAAGTTTTAC TACTCGATCC CTTTCTACA ATAACAGAT TTTTCAAAA  
 2451 GAAATAATT TTTAAGACC ATGCTTCGTT AATTTTTATT AAATCTATA  
 2501 TAGACCTCTA TAGTCACTC ACAAAAGTTG TTTAAATTAT TTTAGACAA  
 2551 ATCAAAACCA TAAATAATAA AAGAAATAGA GTTATAATTA ATTAATCTT  
 2601 TCCACTTTTT GATGAATAAT AAGTTAAAT CCTCAAACT ACCGAACCT  
 2651 GTTTAATGA AACATGCCA GTTTTCTG GACCATTGA ATCATAATA  
 2701 AAATCTCCA TAAATAAAA AATAATCAT TTTTGAAGA CCTCAAACT  
 2751 CCATATCTCC ATTATGCAA AAAAAAAA AAATGAAAA AAAAATTTGC  
 2801 AAACCATTCA ATTCGAATT GCGACCCACT ACGATGAAGT AACATAATCA  
 2851 CAACGATTC AAATTAAGGA ATTTTTTTC TATAATAATA AGTTTTTAA  
 2901 AAAAAATGA GTGTGA AAAA TATAAACT TAATTGAAGA AAAAATAAT  
 2951 AACAAATAAC AACTTTTTAA AAATATGAA AAATGATC ATTAATAAT  
 A R S  
 A R S

R 1

3001 ATCTTAACTA ACAATTCCT TGTAGSTTAA ATTTTAAAA ATCCCGAAGT  
3051 AAATTGCAAG AACTCTGGAA TCAAGAAAAA TATATAAGCA AAAAAATAAC  
3101 ACAGTTTTGC TTAAGAAAAA AATAAATTC TGAATAATA CTCCTAAAAA  
3151 TCATAAATAA AARTGTAGA AAAATGCTTT TTTTGATGAA TAATAAGTTA  
3201 AAAATCCTCA AAAACTACCG AATCCTGTCT TAATAAAAC AATGCCAATT  
3251 TTTACCCGGC ACTATTGAAT GCATAAAAC CTCCCATAAA TAAATCACC  
3301 GCCTTTTTAG AACATCCCC CTATTTGSCA AAAAAAAAAA AAAAAATGAA  
3351 AAAAAAATG CAAAACCAA AATTCGAGCT GTCSTACTAA ATTACGATAC  
3401 TGAAATGTA GTACCACATA GTCTACAAAG GCATTTTTT TTTCTAAAA  
3451 AATAATAAA AAAAAATGAC CTATTTTTAT ATAAAAACC ATGTGTTAAA  
3501 GAAATAATAT TACGTATAAA AAACGTAGTG ACTACTAATA ATTATGATC  
3551 AAGTATTTA ATACATAAAA AATTTAATAT ATTGATATT TTCTTGAAA  
3601 TCSAAAATAG TATGTATTGA CATCASAGGT AATTTTTTA CTCTCCGTT  
3651 TTTTGCAATT CTATAATAGT ATTATCTGTG TATAAGTTAC GCAGTTAACT  
3701 CAACTCCTTT TTCTCAAGA AATTTTTCAA TAACTCATA AAATTGCTTT  
3751 TCTCTTGTCT TAGAATCATA TTCATATGAT TCCCATACA TSTTTCTGC  
3801 GACGTTTTTC AGCAATTTCS TTTCTCAGAA CAACATCTTC CAACTAAAA  
3851 GTTGAATCATT AGGTTTTTTT TCATTAAAA TAGGAATCAT TTCTTTCTAA  
3901 TTCTTTTTA TCTTCATTA ATTTTGATA ATCTTTCGGG AACCATGAG  
3951 CACATAAAAT AAAACATAAT AAAATCTCCC ATAAATAGAA AAATAAATCA  
4001 TTTTTTGAAA ACCTCAAAAC TCCATATCT CCATTAATGC AAAAAAAAAA  
4051 AAAAAATGAA AAAAAAATTT BCAAACCAAT TCAATTGGA CTTCGACCC  
4101 ACTACGATGA AGTAACATAA TCACAAGGAT TCCAAATTAA GGAATTTTT  
4151 TTCTATAATA ATAGSTTTT TAAAAAAA TGAGTGTGA AAATATAAA  
ARS  
4201 ACTTAATTGA AAAAAAAAT AATAACAAAT ANCAACTTTT TAAAAATAT  
ARS  
4251 AAATAATAG ATCATTAAAA TATATCTTAA CTACCAATTT CGTTGTAGGT  
4301 TAAATTTTAA AAAATCCCGA AGTAATTGC ARGAACTCTG GAATCAAGAA  
4351 AAATATATAA BCAAAAAAT AACACAGTTT TGCTTAAGAA AAAAAAAT  
4401 TTCTGAATAA ATACTCTAA AATCATAAA TAAAAATGTA AAAAAATGC  
4451 TTTTTTGTAT GAATAATAAG TTAAAAATCC TCAAAAACTA CCGAATCCTG

R1

R2

4501 TCTTAATAAA AACAAATGCCA ATTTTACCC GGCCTATTG AATGCATAAA  
4551 AACCTCCCAT AAAATAAATC ACCGCCCTTT TAGAACATCC CCCCTATTG  
4601 GCAAAAAAAA AAAAAAAAAAT GAAAAAAAA ATGCARAAACC CAAAATTCSA  
4651 GCTGTCGTAC TAAATTACGA TACTGAAAAT GTAGTACCAC ATAGTCTACA  
4701 AAGGCATTTT TTTTTTCTA AAAAAATAAT AAAAAAATT GACCTATTTT  
4751 TATATAAAAA ACCATGTGTT AAAGAAATAA TATTACSTAT AAAAAACSTA  
4801 GTGACTACTA ATAATTATGT ATCAAGTTAT TTAATACATA AAAAATTTAA  
4851 TATATTGATA TTTTCTTTG AAATCGAAAA TAGAAGGAA TATTACTCGG

R2

4901 GGGSTAATG CATCCTTATA ATAATTAAT GGGATTCTA TAACCTCAAC

4951 AAATCCATCC CCCACATTAC AGTTGGATGA AACTGCTAGA TCTTGTAAAG

5001 TAAACATTTT TTCTTCAGGA ACAACGTTT GGGCCAAATT CCCCCAGSTA

5051 TTTGACC666 TGCTGACATT GACTGCCCT ATGGGTAGAC AAATCCTGTT

5101 TGCAAAGTCS GATTAAATTG TAACATATCA TTGCTAACCG GCTGACCTCT

5151 TTTTACGGTT TCAGCAATTG CATATGCATT AGCTACACAC ATACTTAAAT

5201 AGAAACCAST TTGCACGATC CTTTTCATCA CAATAAATGT TCTTGGAGTT

5251 AACCATAAAG TGCTTAATGA ACCCTCTAGG TCATAACCCT CTTCGAATAA

5301 AATTTTATCA AAATCAGTTG ACCAAAAATC AGGATTGAAA ATTGAAAAAT

5351 CTTCACCTTT GAACTTTGT TCGATAGAGG GAATATTTAC TGGGTCTTGA

5401 CTTGACTION AATCATCTTC GGAACGATTG TCTTCAGAAAT TATCATTTTT

5451 TTGATCATGA TTAAAAGAGA AAAAAGAGGC CAAGATTTT SAAGATTCTT

ORF

5501 TAAGTACACC AAAAAATTTA AATGCAAAAT TAAATGCSA ATAACCAGAA

5551 AAACTAATTA CCATAATTAC GGCATTTTG GAAATAAAT TCTTACTATA

5601 AAATATTTTA ATTTTTTCC AAAACTCCAA AGCCTCAAC GAAGGTCGT

5651 TTTCAAAAT TTCATTTTTA GAAATTTCAA CGSACTTGT TACTTTAAT

5701 GTTCTGTTAC CACTTGAAA CAAAAATTA CAGTAAGCG CATATTGGAT

5751 ATAATTTTC GAAATTATCA ATAAAGCCAA AAGAAAAACT TTTGATCGT

5801 TTTTTTTTT TACTATCCTT AGAAAATTCC TAAGGAAAAA AATTAAATTG

5851 TAAAAAGATA AACTAGTATT AACTAACAAA TAAATTTTAT AATAATTTGT

5901 TTGAAAAAAA TACAATAAAA TTGCATTGCA GGTAGCCAC GAATATCGAT

5951 TAATTAATAT ABATTTTACT TTAATTATAT AGTTCATAAA AGAGTGTAAA

6001 AAAACAAAAT TTCTAAGAA ATACATCGTA AAAATCATRA AATGAATATA

6051 AGAAATCSTT TTTTTTGCTT TTAATTTTCT TTACCTATTT CTATGAATGT  
6101 GTCATAAAAA ATAAAAAAT AATAATTCCT AATCAAATA AAAAAAATAC  
6151 AAAAAAATAA TAGATCATTG AATATATATC AATAACTATA TTTAATTGC  
6201 ATTGTAGGTT AAATGCAAAA AATCCCGAA GTAATTTTGC AAAAAACCA  
6251 ASAATCAAGG GTTATSTACT TATATATACC AATGACTTA TATATACTAT région Z  
6301 ATATACCAAT GTACTTATAT ATATTATGT ACTTATATAT ATTATATATA  
6351 CTATATATAC CAATGTACTT ATATGGTCTT TACTGATAT CTACATCAGT  
6401 CCGCTTGGTG ACCAAGCAAG GGGCACATTT ACTATAATGT GTACACTAAA  
6451 AGCGCBCTTT GTAGBATTCS AACCTACTAC ATCAGGTTTT GSAACCTAC pt RNA W  
6501 GCCTTATGGT TTTTTATTGA TTATTAACCC TGATTTATTA ATTATTAAGT  
6551 ACTTTATGGT TAAATTCCTT AACGTTTATT GTAATCCAAA GAACCACACA  
6601 AACTGCTTTC TATTTAGCTA TGTGTGTGGC TAATGCATAC STAATTTCTT  
6651 AAGGGTAAA AAGGAAGTGA ACCCATTCCT GAGGAAGTGC TTAGATTCTA  
6701 TTGCTCAATC AGGTTGTATC CATCCATAAT CCATCCATAC GTCAAGTCCG  
6751 GATGGAAGAA CTGGTTGGTT ATTTCTGCCA GATAAAGAT GTTTACTTTC  
6801 CAAGATAATA TTTAAGGTT TAAGATTCA AGATAACAA AGTTTATAAG  
6851 TGTAGTTAA TTATTACAGT TCATTATCAG AGATAGETT TTCAGAAAAA  
6901 TGATATAATG AAAAAATAGA AGATGTTTAS AGCTAACAT ATTTTACAT  
6951 GAGTTACATA TTTAATGTAA TATAAATTG TATGTTTCTG AGGATTTTAC  
7001 TTAGAAACAA ACAGAAATGT CTAGATATAT ATATAGAGTT TTTCTCAATT  
7051 TCTATTATTC TTGTTCTTAT TCAATGTTAG ATTATTATTC GTGATGATAG  
7101 ATTATCTTAC TTATTATTAT TATTCCTGTA ATCACTTATG CTATTATTCT  
7151 TCTGAAGCT CATATTCAGG TTAGTTAATA TATAATTATG GTAGTATAAA  
7201 TGATGTACT CTAAAAGTTC GATCTCATT TTTATGAATA AATACAATAC  
7251 TAAAAATTAA TTGTAGGTA TTAATATTA ATAATATTT STAACACTT  
7301 TTGATTTATT CATCTGACT TCTTGAATA CTTCTTTATA TCAAAAATGT  
7351 GGGTAAATTA TTTGATTAAG TTTAATCGGC AAAAAGCTTG TTAACAAAA  
7401 TTTTGTGTTG TGCTGGAAT TTAATTTTT ACGAAATTG ACAATGATTT  
7451 ACACATTTTG TGATAATAGT TTATTACTAA ATATGTATAT TTATACTAAT  
7501 ATTATTTCAA AAATAGGTA TAATAATAGA TTATTTAAGA TTTAAAATAA  
7551 TCTATATAAA TACTTTATAG TAGTTTATTA TGATTAAGC GCGTTTTTTA

7601 TTATTTTTTA CTGCTACTAA AATTTTTCAA GAAGCTATTA AAATTTTAAA  
 7651 AATGTTATAA TTTATATATT TTTAAGAATA AATTTTTGTA TATATATAT  
 7701 TCTGTTGAC ACTTTTTTGT TAATAAGTT TGTAAATTCC AGAAAATTTA  
 7751 TAGTTTTTAT AATATTTTAT TTTTATCAA TTATTATTCT ATGATATTTT  
 7801 TTATACCCC AGATTAGTTT TATCTTGTTA ACTCATCAAT ACTCATCAAT  
 7851 ATAGTAAACA TAAAAATTTT GAAAAACATT GTGAATCATG TTCGTTTCAA  
 7901 AABTTAATCC AAGTCATTAA AATTATTACT TTGCAAGAGA ATTTATGATT  
 7951 TGAATTAGA TTCATTTTAA AATCAAAT TTTGAATTAA TTTAATTTCC  
 8001 TTTTATCCAT AATAGTAAT TTAAGATTCA AATTAGCTT TTCTAATGTT  
 8051 TTTTCTTAA ACCTATAAGT TTGCTTTAA GAAGTAAATC TAGTTCACAT  
 8101 TTTACTTTTT CTTTTTAGTT TCATAATTTT TTCAAAGTCT ATATTATTAT  
 8151 TTTACTAAT AATAAATTTT TACATAATTA TGTAAAAAC AAAAAATCAA  
 8201 TATCAACTAT TTTTTGTAA GATTTCAATC TACBACTATC ACSTTTTGGG  
 8251 TACTTTCCAT TCATTCAAAT TTTGTTATAA ATTTAACATT TTTTCAAAT  
 8301 AAAAGACCGT TTGATTTTTA ATCTAGATAT ATATTGCAAC TTTTTATTA  
 8351 AACGTTTTTT TATTTGAGA GTTTTACCTT CGACCGGACT CGAACCGGCA  
 8401 AGCTTATGCA TGTGATTTG AATCACAGCT GTTTACCATT TCACCAGAA  
 8451 GGAAGTATAT TTTTAACTT TTTTAAATGTA TTCTGAAAT ACTTCTCAGA  
 8501 AAATGTAAT TAGTTTGTG GTTTTAGCTA TTTTTAGTA ATTGAACACT  
 8551 TTTTAAAGG TTCTGCACT TTATATCCGA ATCTATTGAT TCTAAAGGT  
 8601 TCTTTACGTA ATCATGTCG TAAACAAGC GTTAATTACA TGTAAAATG  
 8651 TTCTTTAGGT GTTACTTCTG TBCBATTCTC AAAGTCTACT AATGCTTTTG  
 8701 CTGCACGATC GTTTACCATA TCTCTCTTA GTTCCATCAA CATTTAGTTC  
 8751 AGAACAGTAT TGTGATATTT TTCTAAAAGT TCGATTTTTA TTATTAATGT  
 8801 TTTTAAATTT TTTCTTGC TTATAATTTT TCATTAGTT TATTTTGTTC  
 8851 TTCTTATAT TTTCTTTGA AACTCTTTAG GCTTTTTTC AATAGTCT  
 8901 CGTGTGACT ATTTTACAGC AAGCGCTGTT TCCTTTAGTG TTTTAAATTTG  
 8951 TGCATGCATT CGAATCTAT CTAGTAATG TGGTCTAAGT TCTCTTCTT  
 9001 CAGGATTTCC BATCCTCATA GTATAAATCT TGCAGGATG CAAATTCGAA  
 9051 ACTCCTTCTC TTTCTACCGT GTTCCATCCT GAAGCAGCGG AATTAATAA  
 9101 AAGTT

t RNA Leu

← 5'

"consensus"  
promoteur







2120 2130 2140 2150 2160 2170  
Oregr. ATCTTACTTATTATTATTATTCCTGTAATCACTTATGC-TATTATTCT-TCTGAACGTC  
Tobcpc CTGTGTCCTCAACTCTAAGCAGCCCT-TAACTACATATGCATCTGATTATATATGATTATC  
69470 69480 69490 69500 69510

2180 2190 2200 2210 2220 2230  
Oregr. ATATTCAAGTTACTTAAATATATAATTATG-GTAGTATAAATGATTGTACTCTAAG-AATT  
Tobcpc -TATTCCA-ACAATAATACAAAAGAAAGAAAGTTTTCATGCGAGATCTAAAACATAT  
69520 69530 69540 69550 69560 69570

2240 2250 2260 2270 2280  
Oregr. CGATCTCATTTTTTATGAATAAATACAATACTAAAAATTAATTGTA--AGGTAT-----T  
Tobcpc CTCTCTGTGACCAGTACTAAGTACGCTA-TGGTTCGAGGCTTTAGCAGGCTATTGAT  
69580 69590 69600 69610 69620 69630

2290 2300 2310 2320 2330 2340  
Oregr. AAATATTAATAATATTTTGTAACTACTTTTGTATTTCATCTGTACTTC-TTGTAAATC  
Tobcpc AGAGATTAACTGTTTTTCCCGGATGCGTTGA--CATTCCTTTTTTTCATTCTAGTTA  
69640 69650 69660 69670 69680 69690

2350 2360 2370 2380 2390 2400  
Oregr. TTCTTTATATCAAAAATGTTGGTAAAT--ATTTGTATTAGTTTAAATCG-CAAAAAGCT  
Tobcpc TT-GTCATGGAAGGAATGAAGAAATTAAGATCCAATCAATATTGGTGAATGATCC  
69700 69710 69720 69730 69740 69750

2410 2420 2430 2440 2450 2460  
Oregr. TGTTAAACAAAATTTTGTGTTGTTGCTGAAATTTAAATTTTACGAAAATGACAATGAT  
Tobcpc TCTCCCTCTTTTTCTCTTTTTTCC---CTTTTTASAATAAGGAGGAAAAGAAAGAA  
69760 69770 69780 69790 69800

2470 2480 2490 2500 2510  
Oregr. TTACACTATTGTTGATAAATGTTTATTAAATAATGATATTTA--TACTAATATTATT  
Tobcpc TAAAAAAGT--GGATTCAACATTGCGGCTCAAGTTCSA-ATTAAGTAAATTAATAAT  
69810 69820 69830 69840 69850 69860

2520 2530 2540 2550 2560 2570  
Oregr. TCAAAAATAGGTAATAAATAAGATTATTAGATTAAATAATCTATATAA-ATACTT  
Tobcpc AGAGGAATGCG--GGTAGAATAGAAATCTAGG--GCAAGATAT-TATACAAGTACTT  
69870 69880 69890 69900 69910 69920

2580 2590 2600 2610 2620 2630  
Oregr. TA--TAGTAGTTTATTATGTTAATAACGCTTTTTTATTATTITTTACTGTCACTAAAAT  
Tobcpc AATGATTACTTCAATTTGAAATATAC--TTTAAAAAATCGTTGATTTTACTATGAC  
69930 69940 69950 69960 69970

2640 2650 2660 2670 2680 2690  
Oregr. TTTTCAAGAGCTATTAATAATTTAAAGTGTATAATTATATATTTTTAAAATAAAT  
Tobcpc TTTGCTTTA--CTATTACTTTATTTCTGATTTTAACTT-TTACTTTTGAATGGA-  
69980 69990 70000 70010 70020 70030

2700 2710 2720 2730 2740 2750  
Oregr. TTTTGTATATATAATCTGTTGTACACTTTTTTGTAAATAAAGTTTGTAAATCCAGA  
Tobcpc -TTTCAAGTTAGTAACTTCTATTTTATCCTTTCTTCSTTTTGA--TCGAAAATAGAAAG  
70040 70050 70060 70070 70080 70090

2760 2770 2780 2790 2800 2810  
Oregr. AAATTTATATGTTTGAATATTTTATTTTATTCAATTATTATCTATGATTTTTTTA  
Tobcpc GTTGAATAATCAAAAATCCAAAGGAGGTTCAAGGCAAGGAGGAAAGATGTCGAGTAAAC  
70100 70110 70120 70130 70140 70150