

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Purification et caractérisation partielles d'une poly(A)polymérase isolée à partir d'un surnageant de lysat de *Saccharomyces cerevisiae*

Houze, Agnès

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Titre du Mémoire:

Purification et caractérisation partielles d'une poly(A)polymérase isolée à partir d'un surnageant de centrifugation de lysat de levure *Saccharomyces cerevisiae*.

HOUZE Agnès

Résumé

La présence d'une queue de poly(A) à l'extrémité 3' de la majorité des ARNm d'eucaryotes est un argument en faveur d'un rôle important de cette structure dans la régulation de l'expression génétique. L'objectif de ce travail est de purifier la(les) poly(A)polymérase(s) qui catalyse(nt) la réaction de polyadénylation chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

A partir d'un lysat, nous avons préparé un surnageant de centrifugation S_n65, qui après chromatographie sur une échangeuse de cations, nous a permis de révéler un pic d'activité poly(A)polymérase élué à une concentration en NaCl comprise entre 200 et 300 mM.

Le test d'activité standard consiste à mesurer l'incorporation d'AMP radioactif à partir d'ATP sur une amorce d'ARNr. Nous avons caractérisé biochimiquement cette activité.

La purification et la caractérisation de l'enzyme constituent la première étape du clonage du gène codant pour la poly(A)polymérase.

Abstract

The presence of a poly(A) tail at the 3' end of the majority of eukaryotic mRNA suggests an important role of this structure in the regulation of gene expression. The aim of this work is to purify from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* the poly(A)polymerase(s) which catalyse(s) polyadenylation.

From a crude extract, we prepared a supernatant fraction S_n65, which, after ion exchange chromatography, enabled us to isolate a poly(A)polymerase activity peak after elution with 200-300mM NaCl. The standard assay consists in measuring the incorporation of radioactive AMP from ATP using rRNA as a primer. We have biochemically characterized this activity.

The purification and characterization of the enzyme constitute the first step in the cloning of the gene coding for poly(A)polymerase.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1989

Promoteur : Prof. J. Vandenhoute

Toute ma reconnaissance va aux Professeurs J. Delcour et J. Vandenhoute qui m'ont accueillie dans leur laboratoire et qui ont su, durant toute cette année, guider mon travail efficacement.

Un tout grand merci à Anne, sans qui je n'aurais pas pu mener à bien ce travail.

Par sa gentillesse et ses connaissances, elle a été pour moi plus qu'une aide précieuse.

J'adresse également mes remerciements à R.M. Wilmet-Génicot, M. Dewez-Jadin, J. Libion pour leur assistance technique et leur sympathie.

Je remercie Deborah, Olivier, Jean-Pol, Anne, Thierry, Geneviève pour toute leur disponibilité ainsi que pour l'excellente ambiance qu'ils ont fait régner.

J'exprime ma gratitude à Messieurs F. Mainferme et J.M. Van Dyck pour leur aide spontanée.

Merci à Maryline, Pascal, Jean-Marc avec qui j'ai partagé les joies et le stress du travail.

A Messieurs E. Feytmans, M. Jadot, M. Roger qui ont accepté de lire ce mémoire, je témoigne ma reconnaissance.

Merci à Christiane qui a réalisé la dactylographie du texte avec son enthousiasme et sa gentillesse bien à elle.

Merci à mes parents qui m'ont permis d'entreprendre ces études.

Namur, août 1989

LISTE DES ABREVIATIONS

AMP* : adénosine monophosphate marquée

ARN pol.II : ARN polymérase II

ARNr : ARN ribosomique

ARNase : ribonucléase

CPM : coups par minute

D.O. : densité optique

DTT : dithiothreitol

EDTA : éthylène diamine tétra(acétate)

PAS : peroxydisulfate d'ammonium

PMSF : phénylméthyl-sulfonyl fluoride

TEMED : N,N,N',N'-tétra-méthyléthylènediamine

SDS : sodium dodecyl sulfate

TRIS : TRIS-(hydroxyméthyl)-aminométhane

TABLE DES MATIERES

	page
I. INTRODUCTION	1
1.1. <u>La biogenèse de l'ARN messager</u>	1
1.1.1. La transcription	1
A. L'initiation	1
B. L'élongation	2
C. La terminaison	2
1.1.2. Les modifications post-transcriptionnelles	2
A. Addition d'une coiffe à l'extrémité 5'	3
B. La polyadénylation	3
C. Les méthylations internes	3
D. L'épissage	3
1.2. <u>La polyadénylation</u>	5
1.2.1. Rôles proposés à la queue de poly(A)	5
A. Transport nucléo-cytoplasmique	5
B. Stabilité de l'ARNm	6
C. Efficacité de la traduction de l'ARNm	6
1.2.2. Les approches nouvelles	7
A. La réaction	8
B. Les signaux de reconnaissance	9
C. Les facteurs	11
1.3. <u>Les poly(A)-polymérase</u>	13
1.3.1. Localisation	13
1.3.2. Caractéristiques enzymatiques	14
A. Sa structure	14
B. Exigences ioniques - amorces - substrat - pH	14
C. Les inhibiteurs	14

	page
1.4. <u>Choix du matériel biologique utilisé</u>	16
1.4.1. La levure comme matériel biologique	16
1.4.2. La polyadénylation chez la levure	16
1.5. <u>But du travail</u>	19
II. <u>MATERIEL ET METHODES</u>	20
2.1. <u>Purification partielle de la poly(A)-polymérase</u>	20
2.1.1. Souche	20
2.1.2. Préparation d'un extrait cellulaire	20
A. Lyse des cellules	20
B. Obtention du surnageant Sn65	21
2.1.3. Purification de la poly(A)-polymérase	21
2.1.4. Dosage des protéines par le réactif de Bradford	22
2.1.5. Test d'activité de la poly(A)-polymérase	23
2.1.6. Analyse des protéines par électrophorèse verticale	24
2.2. <u>Préparation de l'ARN ribosomique de levure S. cerevisiae</u>	26
2.2.1. Sa préparation	
A. Préparation de l'ARNr à partir de ribosomes lavés	26
B. Extraction au phénol-chloroforme	26
C. Quantification spectrophotométrique de l'ARN	27
2.2.2. Analyse de l'ARNr par électrophorèse horizontale dans un gel agarose-formaldéhyde	27
A. La préparation du gel agarose-formaldéhyde	28
B. La préparation des échantillons	28
C. Détection de la radioactivité incorporée dans l'ARN par radio thin layer chromatography analyser	30

	page
III. RESULTATS ET DISCUSSION	31
3.1. <u>Recherche d'une activité poly(A)-polymérase</u>	31
3.1.1. Préparation d'un extrait cellulaire comme source enzymatique	31
3.1.2. Mise en oeuvre d'un test d'incorporation de l'AMP* à une amorce d'ARN.	31
3.1.3. Purification partielle d'une activité poly(A)-polymérase à partir d'un Sn65	33
3.2. <u>Caractérisation enzymatique de la fraction active</u>	34
3.2.1. Analyse des fractions actives par électrophorèse en gel polyacrylamide-SDS	34
3.2.2. Analyse des produits de la réaction	35
A. Séparation de l'ARN ribosomique par électrophorèse en gel d'agarose	35
B. Détection de la radioactivité incorporée sur l'ARN ribosomique	35
3.3. <u>Spécifications fonctionnelles de l'enzyme</u>	36
3.3.1. Inactivation de l'enzyme au cours du temps	36
3.3.2. La cinétique enzymatique	39
A. Evolution de l'activité en fonction du temps	40
B. Evolution de l'activité en fonction de la concentration en substrat ARNr	41
3.3.3. Activité en fonction de la concentration en enzyme	43
3.3.4. Recherches des optima	43
A. Influence des ions bivalents : Mg ²⁺ , Mn ²⁺	43
B. Influence du pH	44
C. Influence de la température	45
3.3.5. Effets de la concentration en Ara-ATP	45
IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	47
V. BIBLIOGRAPHIE	

Introduction

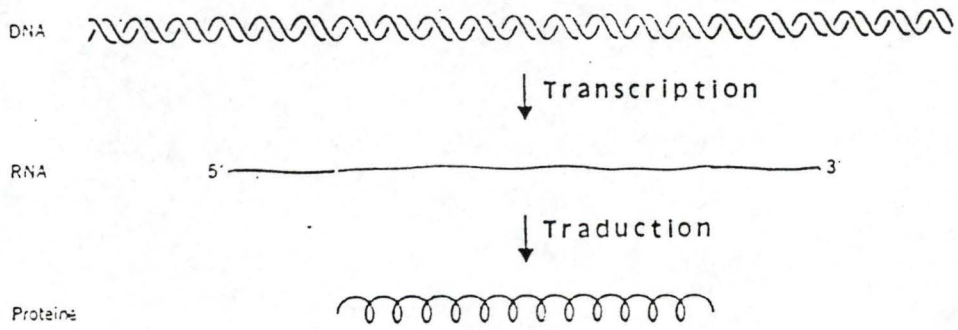


Fig.1: l'information génétique passe de l'ADN vers l'ARNm puis vers les protéines grâce aux réactions de transcription de traduction (LEWIN, 1987).

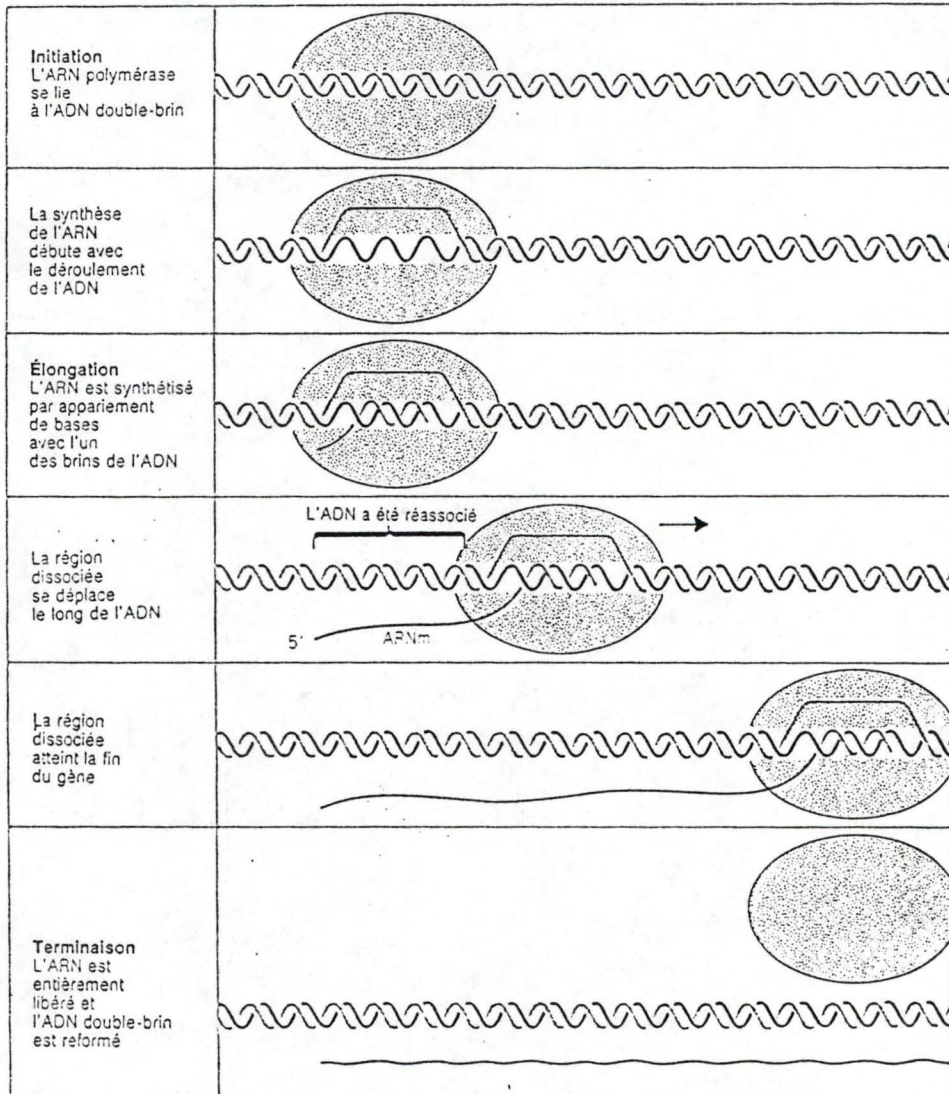


Fig.2: représentation schématique des trois étapes de la transcription: l'initiation, l'élongation et la terminaison (LEWIN, 1987).

I. INTRODUCTION

1.1. LA BIOGENESE DE L'ARN MESSAGER (Lewin 1987; Vandenhoute 1980)

Les protéines, produits du flux de l'information génétique, sont essentielles à la constitution de l'organisme et au fonctionnement de son métabolisme.

Les étapes du processus de synthèse protéique sont résumées à travers le dogme central de la biologie (fig. 1) :

l'information génétique passe de l'ADN dans l'ARNm (transcription) puis vers les protéines (traduction). Bien que ce processus repose sur l'assemblage d'acides aminés dans l'ordre dicté par le programme génétique, l'ARNm occupe une place centrale dans la machinerie de synthèse protéique : il est le substrat informatif de la traduction.

1.1.1. LA TRANSCRIPTION

L'expression d'un gène est contrôlée à chaque niveau - transcriptionnel, traductionnel - ainsi qu'aux étapes intermédiaires (post-transcriptionnelle et post-traductionnelle).

La première étape de la transcription constitue le verrou essentiel du contrôle de l'expression d'un gène. La transcription peut être scindée en 3 étapes (Fig. 2).

A. L'initiation : l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II nécessite l'interaction de cette enzyme avec des facteurs protéiques ainsi que la reconnaissance de séquences signal sur l'ADN. La séquence d'ADN impliquée dans l'initiation est appelée "promoteur". Le premier nucléotide incorporé lors de la synthèse de l'ARNm est le nucléotide +1 et constitue le "startpoint" ou cap site (fig. 3).

B. L'élongation : cette phase correspond à l'allongement de la chaîne de polynucléotides par addition de nucléotides à l'extrémité 3'. L'ARNm nouvellement synthétisé s'hybride localement avec l'ADN monocaténaire.

Au fur et à mesure que l'ARN polymérase progresse, l'ADN se déroule, exposant de nouvelles séquences. En amont de l'ARN polymérase, le brin codant s'hybride avec son partenaire original pour reformer la double hélice d'ADN. (Fig. 4)

C. La terminaison : on connaît peu de choses sur ce mécanisme et les signaux de terminaison chez les eucaryotes.

Le phénomène est mieux connu chez les bactéries : tous les terminateurs de procaryotes contiennent une séquence palindromique, juste en amont du site de terminaison. La formation de "hair-pins" par ces séquences conduit à un arrêt momentané ou définitif de la transcription.

L'ARNm est complètement déplacé de son site de synthèse, l'enzyme quitte l'ADN et la double hélice d'ADN se reforme (fig. 5).

1.1.2. LES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES

Les gènes eucaryotes codant pour l'ARNm sont copiés par l'ARN polymérase II sous forme de transcrits appelés ARN nucléaire hétérogène (ARNhn) ou précurseur de l'ARNm (pré-ARNm).

Lors du transport nucléo-cytoplasmique, cet ARNhn subit des modifications post-transcriptionnelles le "maturant" en ARN messenger.

Ces modifications comprennent : l'adjonction d'une coiffe à l'extrémité 5', la formation de la queue de poly(A) à l'extrémité 3', les méthylations internes, l'épissage (ou splicing) (fig. 6).

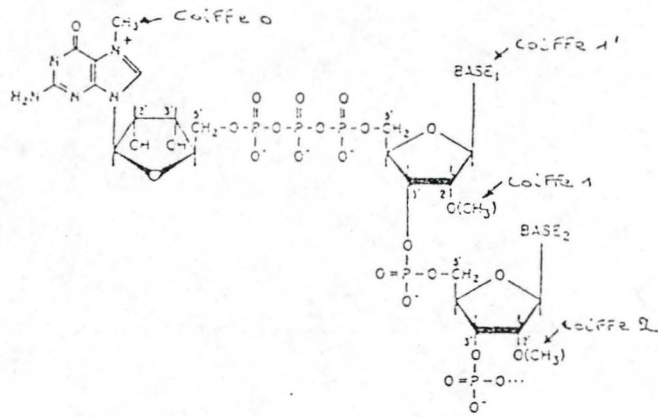


Fig.7: structure des différentes coiffes (VANDENHAUTE, 1980).

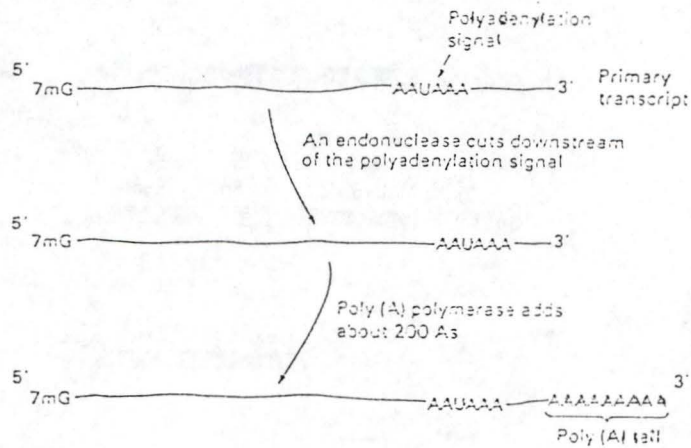


Fig.8: la maturation de l'extrémité 3' nécessite une réaction de clivage suivie par l'addition séquentielle d'une queue de poly(A) (DARNELL et al,1986).

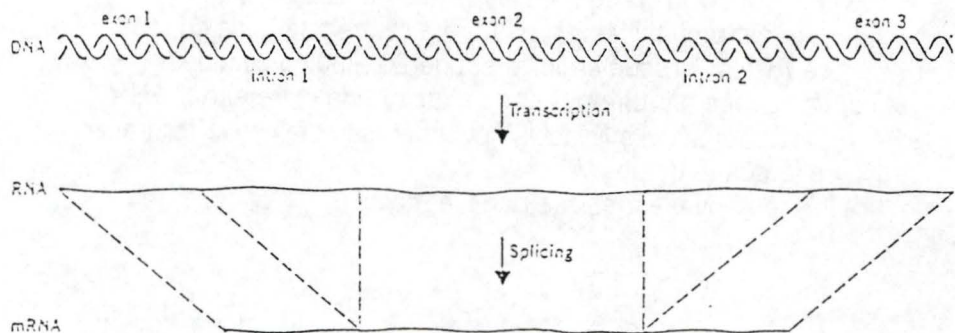


Fig.9: le pré-ARNm subit des excisions: les introns sont enlevés, tandis que les exons sont conservés et soudés les uns aux autres pour former l'ARNm (LEWIN,1987).

A. Addition d'une coiffe à l'extrémité 5'

Au cours de cette étape, une guanosine est ajoutée à l'extrémité 5' de l'ARNhn par la guanylyltransférase. Cette guanosine est ensuite méthylée en position 7 (la S-adénosyl-méthionine (SAM) jouant le rôle de donneur de méthyle).

Cette structure s'appelle la coiffe de degré 0 et est de la forme $m^7G^{5'}ppp^{5'}XY$.

Des méthylations additionnelles sont possibles et conduisent aux coiffes de degré de méthylation 1, 1' ou 2 (Fig. 7).

Tous les ARNm d'eucaryotes possèdent une coiffe méthylée. Son degré de complexité augmente au fur et à mesure que l'on monte dans l'échelle évolutive.

B. La polyadénylation (ou maturation extrémité 3')

Une queue de poly(A) serait présente chez la majorité des messagers eucaryotiques et viraux bien que certains ARNm d'histones en soient dépourvus. Elle consiste en une séquence de 50 à 250 résidus adénylés liés de façon covalente à l'extrémité 3'OH des messagers. La réaction de polyadénylation se ferait en deux étapes : il y aurait d'abord un clivage endonucléolytique de l'ARNhn, suivi par l'addition séquentielle d'une queue de poly(A). (Fig. 8)

C. Les méthylations internes : elles sont de fréquence variable suivant l'espèce d'ARNm. Elles s'effectueraient dans le noyau. Les méthylations internes se font souvent en position N_6 d'une adénine, plus rarement en position 5 d'une cytosine.

D. L'épissage (ou splicing) : la maturation des ARNm comporte des étapes d'excision de morceaux de pré-ARNm (les introns) suivis de ressoudures (épissage) des fragments (les exons) conservés dans la molécule mature. (Fig. 9)

Toutes ces modifications aboutissent à la formation de la structure primaire des ARN messagers.

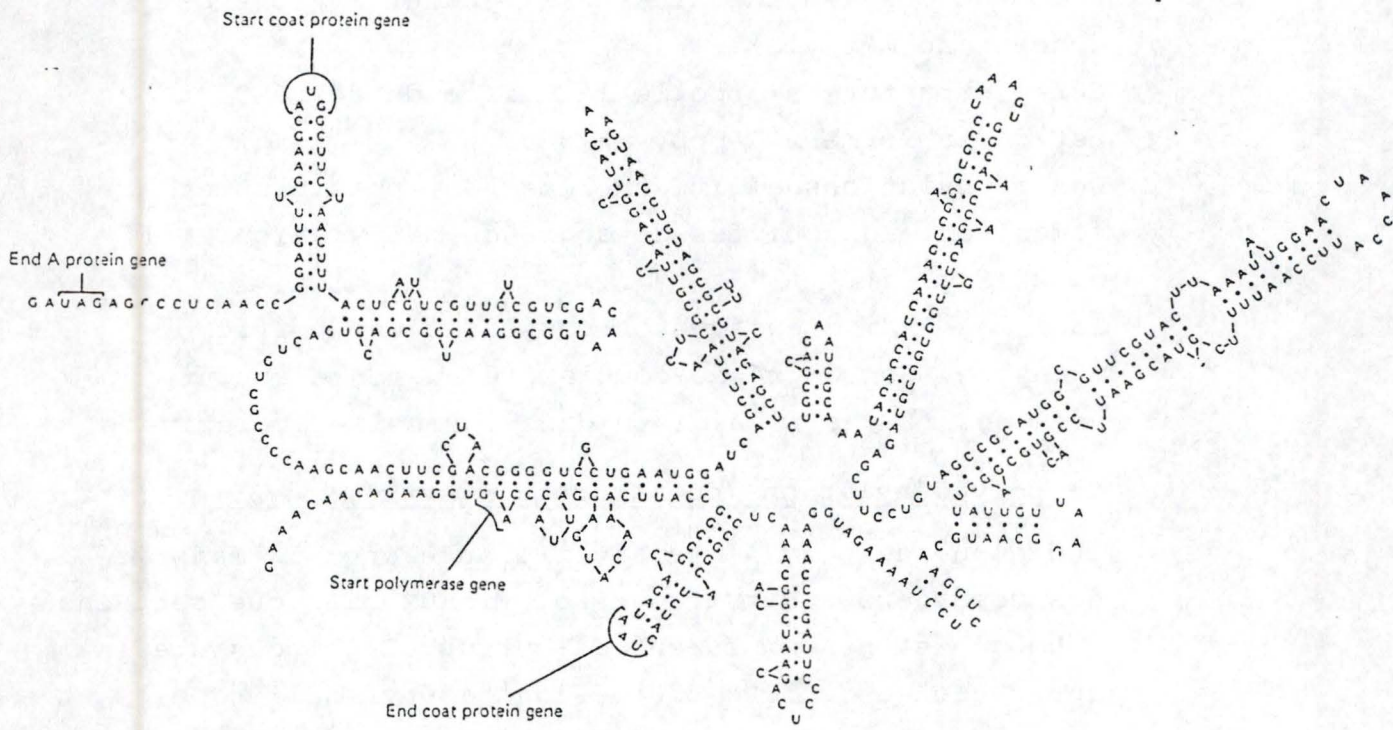


Fig.11: exemple de structure secondaire de l'ARNm au niveau du gène de la protéine de manteau du virus MS2 (VANDENHAUTE, 1980).

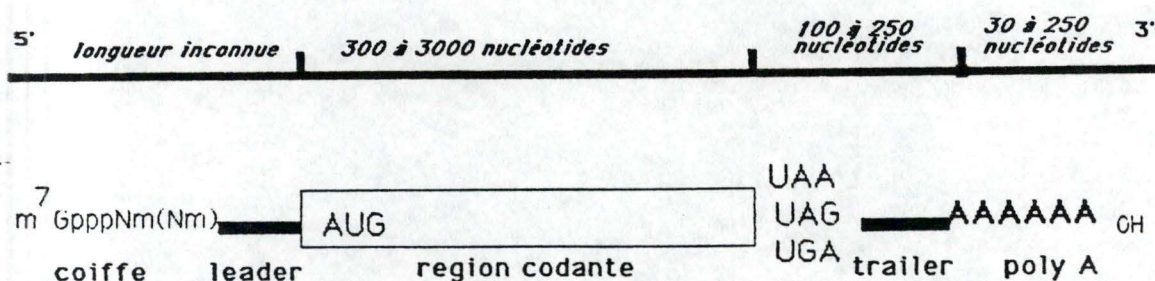


Fig.10: représentation schématique de la structure primaire d'un ARNm d'eucaryotes (VANDENHAUTE, 1980).

- la coiffe se trouve en position 5' terminale.
- le leader : région non codante de longueur variable.
- la région codante : le premier codon = codon initiateur est toujours un AUG tandis que le dernier codon est un codon stop de non sens (UGA, UAA, UAG). Les autres bases de cette séquence constituent une suite ininterrompue de triplets qui déterminent la succession des acides aminés de la chaîne polypeptidique complète.
- le trailer : région non codante.
- la queue poly(A) à l'extrémité 3'.

L'ARNm possède également une structure secondaire, tertiaire ou quaternaire : l'ARNm monocaténaire se replie localement pour former des structures bicaténaires. D'autres repliements entre régions éloignées peuvent s'ajouter ainsi que des interactions avec d'autres molécules. (Fig. 11)

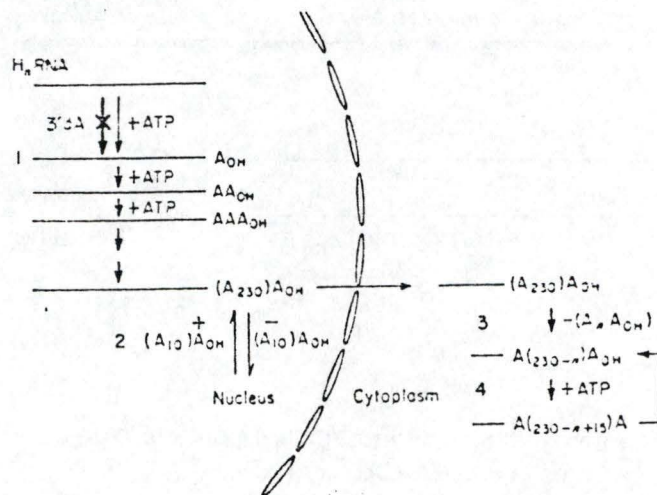


Fig.12: représentation du processus double d'adénylation:
 1) suite a une polyadénylation de "novo" au sein du noyau, il y a une élongation de la queue de poly(A).
 2) turn-over de la queue de poly(A) dans le noyau.
 3) transférée dans le cytoplasme, la queue de poly(A) subit aussi une élongation mais à un taux plus lent que dans le noyau.
 4) le processus d'élongation est en compétition avec un raccourcissement de la queue de poly(A): dégradation partielle de la queue de poly(A) au cours de l'âge.
 N.B.d'A symbolyse la cordycépin.
 (SAYICKI et al.1977)

1.2. LA POLYADENYLATION

A priori, la grande conservation de la queue de poly(A) (à l'exception notoire d'ARNm de certaines histones) argumente en faveur d'un rôle important de celle-ci. Dès 1960, de nombreuses études ont été consacrées à la polyadénylation et ont permis de proposer certains rôles à cette structure (Tsiapalis, 1987).

1.2.1. Rôles proposés à la queue de poly(A)

A. Transport nucléo-cytoplasmique (Vandenhoute, 1980)

La présence de la poly(A)-polymérase aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme suggère un processus double d'adénylation (Rose et al, 1982) (Fig. 12).

Suite à une polyadénylation "de novo" dans le noyau, il faut ajouter une adénylation supplémentaire dite d'addition dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau (Sawicki et al, 1977).

Des activités exo et/ou endonucléolytiques dont certaines sont spécifiques de la queue de poly(A) dégraderaient partiellement celle-ci au sein du cytoplasme.

Des expériences combinant l'inhibition du transport nucléo-cytoplasmique et celle de la polyadénylation par la cordycépin (3'-déoxyadénosine) (Zeeve, Darnell et al, 1982; Rose et al, 1976) ont permis de montrer que lorsque la polyadénylation est inhibée, l'ARNm néosynthétisé n'apparaît plus au niveau du cytoplasme.

Cependant, la polyadénylation ne serait pas une condition suffisante pour le transport nucléo-cytoplasmique. Ainsi, une grande partie des ARNhn est dégradée dans le noyau malgré la présence d'une queue de poly(A). De plus, certains ARNm dépourvus d'une queue de poly(A) ou possédant une courte queue de poly(A) sont transportés efficacement et rapidement dans le cytoplasme.

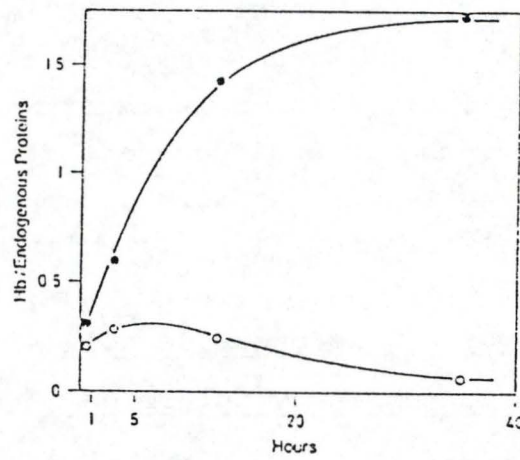


Fig.13: synthèse relative en fonction du temps de l'hémoglobine par rapport à celle des protéines endogènes d'oocytes de Xénope. ---: mRNA poly(A)+ de globine; -o-: poly(A)- de globine (HUEZ et al, 1974).

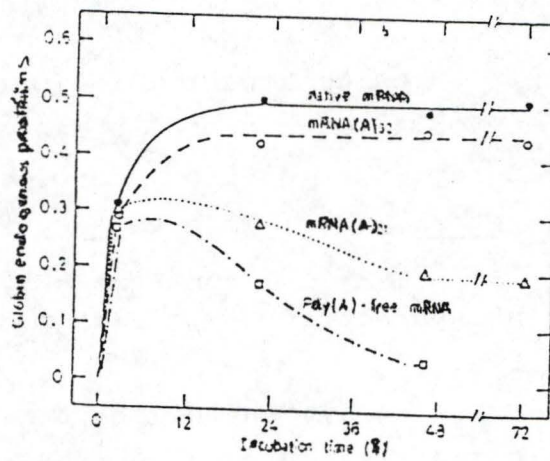


Fig.14: effet de la longueur du poly(A) sur la stabilité fonctionnelle de l'ARNm (NUDEL et al, 1976).

B. Stabilité de l'ARNm

On doit aux travaux des biologistes de Bruxelles sur l'ARNm de globine (Huez et al., 1974; 1978) d'avoir établi clairement une corrélation positive entre la présence de la queue de poly(A) à l'extrémité de l'ARNm et la stabilité fonctionnelle de celui-ci telle qu'on peut la mesurer par le taux et la durée de la traduction de globine marquée après micro-injection dans un oocyte de xénope (Fig. 13). Des expériences additionnelles (Huez et al., 1981; Nudel et al., 1976) ont pu démontrer qu'une longueur minimale de la queue de poly(A) était responsable de l'effet de stabilisation observé (Fig. 14). Les raisons en seraient une résistance accrue aux dégradations endo et/ou exo-nucléolytiques bien que le mécanisme n'en soit pas élucidé (repliement intramoléculaire impliquant la queue de poly(A), interaction avec un facteur protéique particulier). Le problème des ARNm dépourvus de queue de poly(A) demeure pour l'essentiel entier. D'autres facteurs de stabilisation (couverture de ribosomes, structure secondaire ou tertiaire, protéines ou séquences particulières) devraient jouer dans ce cas un rôle plus spécifique (Brawerman, 1987). Citons, par exemple, les ARNm d'histones (Pandley et al., 1987; Lieber et al., 1988) pour lesquels une structure en boucle à l'extrémité 3' est nécessaire et suffisante pour la régulation de la stabilité des ARNm.

C. Efficacité de la traduction de l'ARNm

Stabilité et traductibilité sont indissociables. En effet, la traductibilité des ARNm est comme la stabilité sous la dépendance d'interactions de l'ARNm avec d'autres molécules, et on peut concevoir que des modifications au niveau de ces interactions

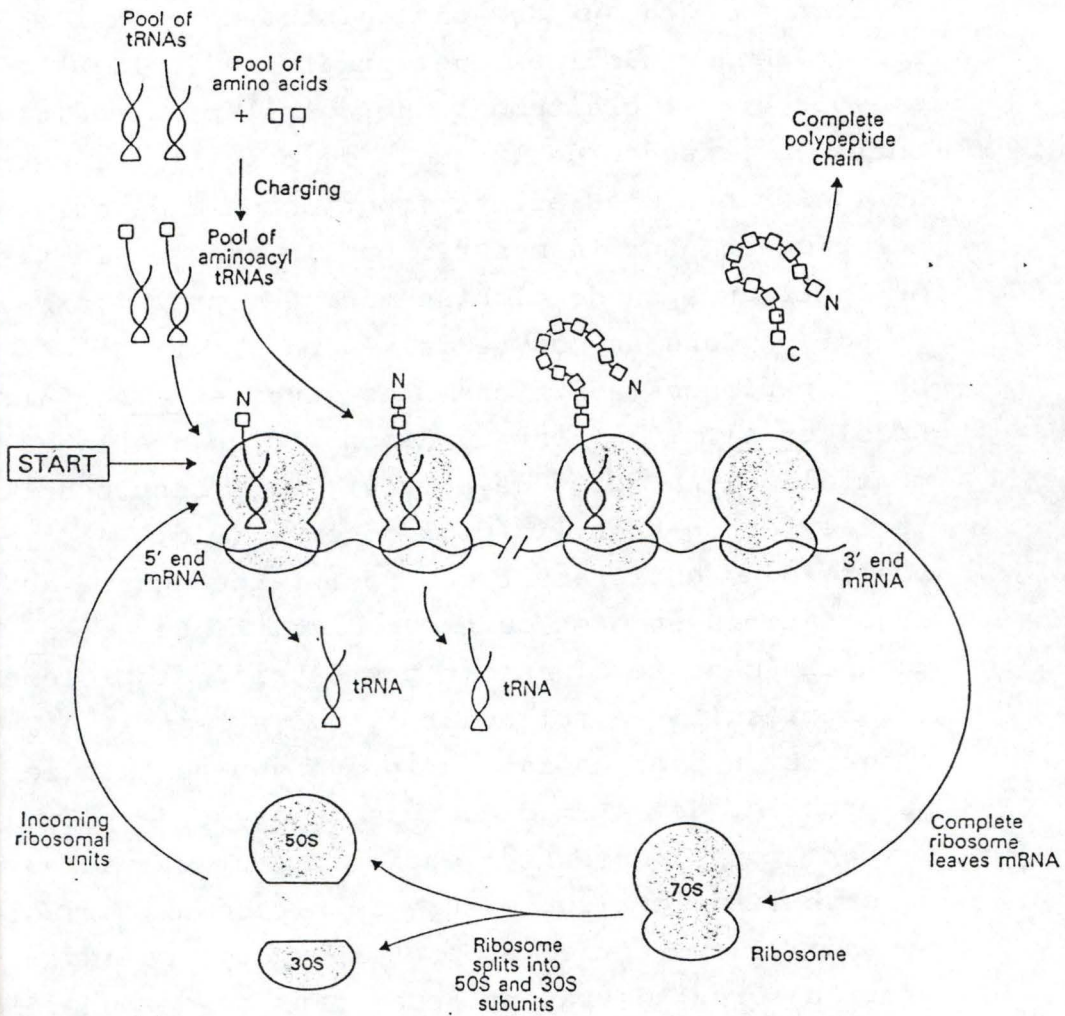


Fig.16: représentation schématique des étapes de la traduction chez les eucaryotes (STERNBERG, 1984).

agissent simultanément sur l'ensemble des propriétés fonctionnelles de la machinerie de synthèse protéique (J. Vandenhoute, 1980).

Ainsi, Drummond (Drummond et al., 1985) montre que des ARNs exogènes polyadénylés injectés dans des oocytes de xénope ont une stabilité accrue par rapport aux non adénylés et leur traduction est jusque 20 fois plus efficace (l'augmentation de l'efficacité de la traduction étant supérieure à celle de la stabilité).

Ces expériences suggèrent que la queue de poly(A) intervient dans la régulation de la traduction et plus particulièrement dans l'initiation de la traduction (étape de traduction la plus soumise aux processus de régulation) (Fig. 16).

En effet, la queue de poly(A) faciliterait l'interaction entre les régions non codantes 3' et 5' d'un ARNm permettant aux ribosomes de fin de chaîne de se placer à proximité de la coiffe du même ARNm favorisant ainsi la réinitiation des ribosomes durant la synthèse protéique (Galili et al, 1988). En l'absence d'une telle interaction, les ARNm non adénylés seront défavorisés en faveur des ARNm adénylés lorsque les composants de l'appareil de traduction sont limitants.

1.2.2. Les approches nouvelles

Bien que la majorité des ARNm d'eucaryotes présentent une queue de poly(A) à l'extrémité 3', les rôles qui lui sont attribués restent hypothétiques et le mécanisme de polyadénylation n'est pas encore clairement connu.

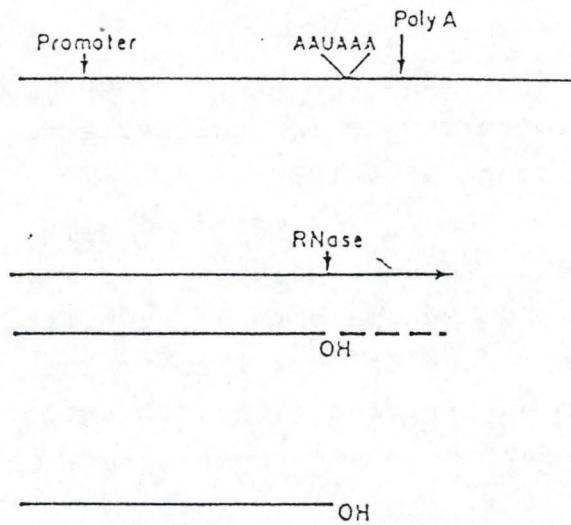


Fig.17: mécanismes possibles pour générer des sites d' addition de la queue de poly(A).

a) la terminaison se termine au-delà du site de polyadénylation; un clivage endonucléolytique produit une extrémité 3'OH.

b) la terminaison de la transcription au site poly(A) génère une extrémité 3'OH disponible pour l'addition d'une queue de poly(A)(NEVINS,1984).

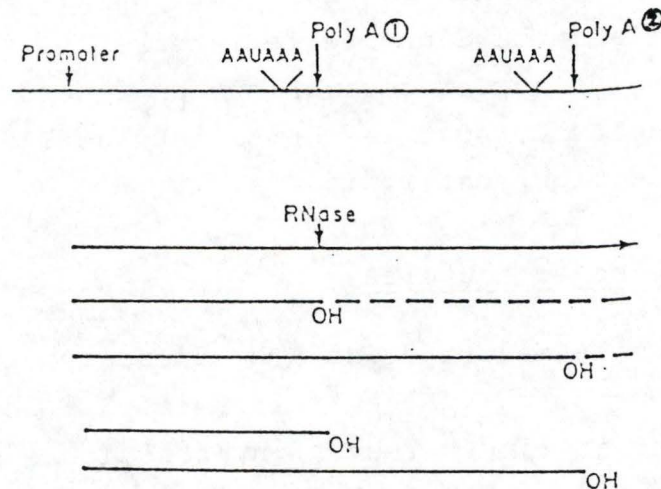


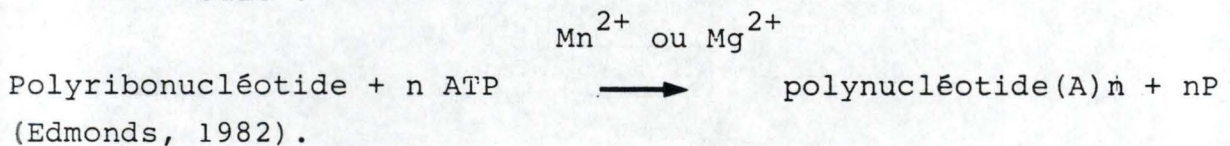
Fig.18: une unité de transcription simple peut contenir plusieurs sites pour l'addition d'une queue de poly(A): un long transcrit primaire sera processé à l'un ou l'autre des sites de polyadénylation possibles selon les mécanismes décrits ci-dessus (NEVINS, 1984).

Par son approche moléculaire, le génie génétique tente de reconstituer, in vitro, la réaction de polyadénylation : la purification des différents facteurs qui interviennent dans cette réaction et le clonage des gènes pourront permettre de mettre en évidence les interactions existantes entre eux et avec diverses séquences signal sur l'ARNm; ces interactions aboutissent à la formation de la queue de poly(A).

A. La réaction

La maturation de l'extrémité 3'OH de l'ARNm nécessite deux réactions : une réaction de clivage formant une extrémité 3'OH libre suivie d'une réaction d'addition de la queue de poly(A).

La réaction de polyadénylation se schématise comme suit :



Au cours de la réaction de clivage endonucléolytique (Fig. 17a) l'ARNm précurseur est clivé produisant une extrémité 3' libre utilisée comme amorce de polyadénylation.

Dans certains cas, l'ARN précurseur se termine précisément au site d'addition de la queue de poly(A) (Navins, 1984), l'étape préliminaire de clivage n'ayant dès lors pas lieu (Fig. 17b).

Une situation plus complexe peut se présenter : plusieurs sites de polyadénylation sont contenus dans une unité de transcription simple (Fig. 18), un long transcrit primaire synthétisé sera processé à l'un ou l'autre des sites de polyadénylation possibles. Ainsi, par exemple, l'ARNm du gène late de l'adénovirus possède cinq sites potentiels de polyadénylation;

l'expression du gène est régulée à la fois par la terminaison de la transcription et le choix du site poly(A) en fonction du stade de développement (early - late) de l'adénovirus (Fig. 19).

Bien qu'in vivo de l'ARNm clivé non adénylé n'ait jamais été isolé, les deux réactions (clivage et polyadénylation) semblent pouvoir se dérouler indépendamment, in vitro. En effet, à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa, différentes équipes, notamment celle de Manley et de Jacob (Manley et al., 1988; Jacob et al., 1989) ont séparé une fraction contenant une activité de clivage endonucléolytique d'une autre fraction contenant une activité de polyadénylation.

B. Les signaux de reconnaissance

La formation de l'extrémité 3' adénylée fait intervenir une série de facteurs mal connus dont certains seraient capables de réagir avec les sites de reconnaissance de la région 3' de l'ARNm.

En 1976, Proudfoot a mis en évidence, par homologie de séquences, un consensus chez six ARNm d'eucaryotes (Fig. 20) : dans chaque cas, l'hexanucléotide 5' - AAU AAA - 3' est localisé à une distance comprise entre 6 à 30 nucléotides en amont du site de polyadénylation.

Cette séquence est hautement conservée chez les eucaryotes supérieurs (Proudfoot et al., 1976).

De plus, en aval du site de polyadénylation, on trouve une séquence riche en (U-G) et/ou en (U) pour laquelle le consensus YGUGUUY a été proposé (Mc Lauchlan et al., 1985) (Y : pyrimidine).

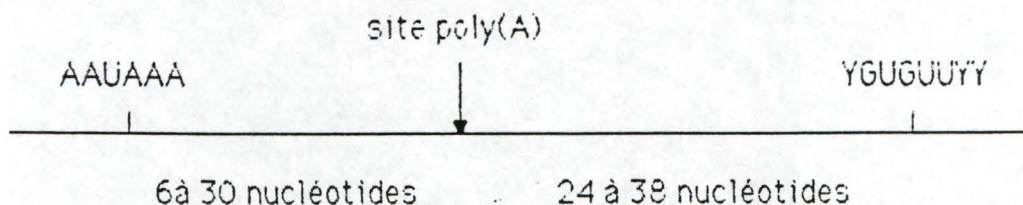


Fig. 21: représentation schématique des séquences signaux.

Des variantes de ces séquences consensus ont été suggérées mais elles sont beaucoup plus rares .

Plusieurs équipes (Montell et al., 1983; Wickens et Stephensen, 1984) ont étudié les effets des mutations dans la séquence AAU AAA d'ARNm .

In vivo, elles ont pu montrer une activité de clivage sur ces ARNm mutés jusqu'à cinquante fois inférieure à la valeur sur l'ARNm sauvage.

Cependant, la petite quantité d'ARNm muté clivée est systématiquement adénylée. Ces chercheurs en arrivent à la conclusion que l'hexanucléotide AAU AAA bien que nécessaire à la réaction de clivage et de polyadénylation ne s'avère cependant pas suffisant. De plus, la séquence AAU AAA est parfois observée dans les régions codantes de l'ARNm où elle n'est apparemment jamais utilisée (Sadofsky et al, 1985; Manley et al, 1985).

L'importance des séquences (G-U) et/ou (U) a également été mise en évidence par des expériences de mutations ponctuelles. Ainsi, par exemple, les 2 séquences (G-U) et (U) présentent chez les ARNm de globine bêta de lapin semblent agir en synergie pour une polyadénylation adéquate. En effet, l'efficacité de maturation est fortement diminuée lorsqu'un des deux éléments (G-U) ou (U) est absent chez l'ARNm mutant (Gil et Proudfoot, 1987).

Soulignons que Higgs (1983) et Proudfoot (1986) ont montré qu'une mutation ponctuelle dans l'hexanucléotide (AAT AAA \longrightarrow AAT AAG) porté par le gène de la globine α_2 est la cause d'une thalassémie (Higgs et al., 1983; Proudfoot et al., 1986).

Ils observent un niveau réduit d'accumulation de l'ARNm de la globine α_2 dans les globules rouges des patients portant cette mutation.

C. Les facteurs

La formation de l'extrémité 3' de l'ARN poly(A)⁺ est complexe et nécessite l'action concertée de composants nucléaires distincts.

Les équipes de chercheurs ont montré, in vitro, à partir d'extrait de cellules HeLa l'existence de divers facteurs nécessaires à la fois à la réaction de clivage et de polyadénylation des pré-ARNm d'adénovirus.

Trois facteurs ont été isolés et correspondent l'un à une activité poly(A) - polymérase, l'autre à un facteur de clivage et le dernier à un facteur de clivage et de polyadénylation (CPF) (Mc Dewitt et al., 1988; Christofori et Keller, 1988).

Le CPF est nécessaire pour la réaction de clivage et, de plus, il confère la spécificité à l'activité poly(A) - polymérase.

La poly(A) - polymérase additionnée de CPF est suffisante pour polyadényler spécifiquement des substrats, pré-ARNm qui ont été préclivés au site d'addition de la poly(A). Cependant les 3 composants sont essentiels à un clivage et à une polyadénylation adéquate.

Christofori et Keller suggèrent que le facteur CPF corresponde à une ribonucléoprotéine (Sn RNP), non identifiée jusqu'à présent.

Selon cette hypothèse, le facteur CPF contiendrait un petit ARN nucléaire (Sn RNA) qui faciliterait la reconnaissance des séquences signaux sur le pré-ARNm. Cet Sn ARN se lierait à l'hexanucléotide AAU AAA (Hashimoto et al., 1986)

Cependant, d'autres chercheurs, notamment Manley et Ryner (Manley et Ryner, 1987) ont montré que l'efficacité et le taux de maturation de l'extrémité 3' n'étaient pas réduits dans un extrait nucléaire dont les Sn RNA ont été au moins partiellement dégradés.

Signalons que dans le cas des cellules HeLa et du virus SV40, un complexe de "pré-clivage" se forme sur l'ARNm précurseur avant le clivage. Après le clivage, un complexe de "post-clivage" est présent sur la demi-molécule 5' tandis que la demi-molécule 3' est relâchée.

Après clivage et polyadénylation, l'ARN polyadénylé est aussi relâché (Zarkover et Wickens, 1987).

Il nous faut également citer, parmi les facteurs interagissant avec l'extrémité 3' de l'ARNm une des protéines majeures liée à la queue de poly(A) et isolée chez plusieurs organismes (Slegers et al., 1982; 1984; Kornberg et al., 1986) : la "poly-A-binding-protein" ou PABP.

Le complexe formé par la PABP et la queue de poly(A) serait un déterminant essentiel de la stabilité des ARNm.

Il protégerait l'extrémité 3' d'une attaque nucléolytique et déterminerait indirectement le taux de turn-over des ARNm (Bernstein et al., 1989; Manrow et al., 1988).

La PABP jouerait également un rôle dans l'efficacité de la traduction. En effet, des chercheurs français ont montré que la traduction d'ARNm poly(A)⁺, in vitro, est facilitée en présence de la PABP (Grossi de Sa et al., 1988).

SOURCE ENZYMATIQUE	LOCALISATION	CATIONS BIVALENTS	INHIBITION PAR LA CORDYCEPIN	AMORCE	POIDS MOLECULAIRE
<i>Escherichia coli</i> (Kurland, 1956)	liée au ribosomes	Mn ²⁺ /Mg ²⁺	—	ARN	—
foie de rat (Rose et Jacob, 1977)	·nucléaire -liée à la chromatine -libre ·mitochondriale	Mg ²⁺ Mn ²⁺	sensible résistance	ARN polyA	48000
thymus de veau (Edmonds, 1973, Tsiapalis, 1975)	nucléaire cytoplasmique	Mg ²⁺ /Mn ²⁺	résistance sensible	ARN, polyA ARN, oligoA	150000 62000
cellules HeLa (Nevins et al, 1977)	nucléaire cytoplasmique	Mn ²⁺ /Mg ²⁺	—	ARN oligoA	50000 75000
cellules tumorales ascites de Erlich (Avramova et al, 1980; 1981)	cytosolique lié au ribosomes (un peu dans le cytosol)	Mn ²⁺ Mg ²⁺ /Mn ²⁺	— —	polyA ARNr, polyA	80000
<i>Artémia salina</i> (Sastre et al, 1981)	nucléaire cytoplasmique	Mn ²⁺ Mn ²⁺	— —	ARN, polyA polyA	70000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Haff et KELLER, 1975; 1973)	nucléaire cytoplasmique mitochondriale	Mn ²⁺ Mn ²⁺ Mn ²⁺	— — —	ARNr polyA	100000 100000

Fig. 2 : tableau des différentes poly(A)-polymérase chez divers organismes.

1.3. LES POLY(A) - POLYMERASES (Rose et Jacobs, 1983)

1.3.1. Localisation

Des activités poly(A)-polymérasiques ont été mises en évidence dans différentes fractions cellulaires :

- noyau
- ribosomes
- mitochondries
- chloroplastes
- cytosol

Les poly(A)-polymérasases ont été étudiées chez de nombreux organismes tels que E. coli, Artemia Salina, S. cerevisiae. Cette enzyme a également été étudiée dans le thymus de veau, le foie et l'hépatome de rat, dans les cellules tumorales ascites de Erhlich, les cellules HeLa etc... La caractérisation des activités poly(A)-polymérasases se base sur des paramètres biochimiques tels que :

- la préférence pour l'amorce
- les exigences ioniques
- la sensibilité à la cordycépin

En se basant sur ces données, nous pouvons dresser un tableau constituant un répertoire non exhaustif des poly(A)-polymérasases (Fig. 22)

L'enzyme nucléaire d'abord étudiée dans les noyaux de foie de rat existerait sous 2 états fonctionnels, d'une part, la forme liée à la chromatine catalyserait la réaction de polyadénylation "de novo" et d'autre part, la forme libre de l'enzyme participerait à l'élongation de la queue de poly(A).

L'activité poly(A)-polymérasique cytosolique a été mise en évidence dans le thymus de veau, les cellules HeLa. Avramova signale l'existence de 2 activités cytosoliques dans les cellules tumorales ascites : l'une est en fait la forme libre de l'enzyme ribosomique, l'autre serait l'enzyme nucléaire passée dans le cytosol au cours de

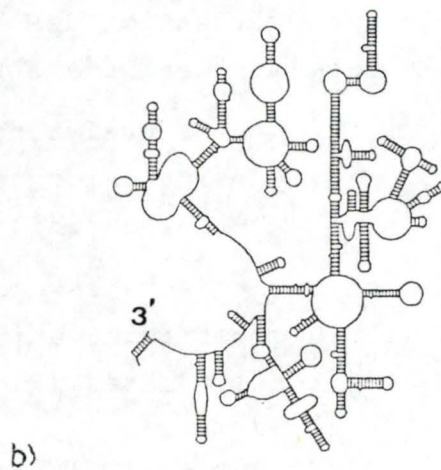
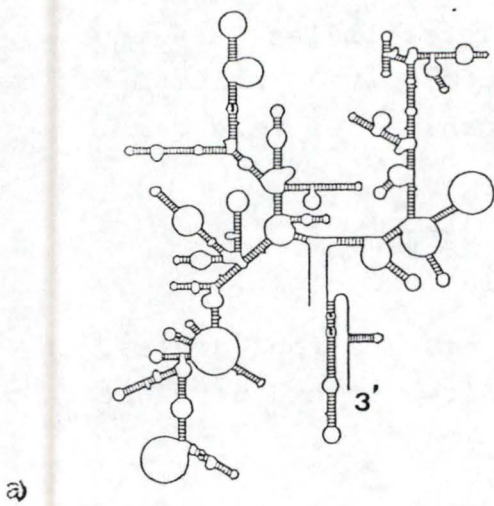


Fig.22bis: structure secondaire de l'ARN 18S et de la partie terminale 3' de l'ARN 28S de levure.
a) ARN 18S; b) partie terminale 3' de l'ARN 28S.

la préparation.

Afin de pallier aux problèmes de redistribution de la poly(A)-polymérase après disruption des cellules, on fait appel pour localiser la poly(A)-polymérase, in vivo, à des inhibiteurs radioactifs spécifiques de l'enzyme détectés par une autoradiographie ou à l'immunofluorescence directe.

1.3.2. Caractéristiques enzymatiques

A. Sa structure

Les poly(A)-polymérases purifiées chez les eucaryotes sont constituées d'un simple polypeptide de P.M. estimé à 48.000 pour l'enzyme nucléaire de foie de rat, à 120.000 pour l'enzyme nucléaire de thymus de veau (une aggrégation de l'enzyme expliquerait un P.M. aussi élevé).

B. Exigences ioniques - amorces - substrat - pH

Pour catalyser la réaction de polyadénylation, la poly(A)-polymérase a besoin d'une amorce, RNA (Fig.22b) ou poly(A), d'un substrat le plus souvent l'ATP, d'un ion bivalent Mn^{2+} ou Mg^{2+} . Suivant la source enzymatique, le substrat (=ATP), la concentration en amorce, l'enzyme nécessitera pour une activité optimale la présence de Mn^{2+} ou Mg^{2+} .

Le pH optimum oscille généralement entre 8 et 9 pour la plupart des organismes étudiés.

C. Les inhibiteurs

Les poly(A)-polymérases nucléaires, mitochondriales et cytosoliques sont inhibées par une variété de dérivés de la rifamycine (compétition avec l'ATP pour l'enzyme).

De même à faible concentration, la cordycépin triphosphate (3' d ATP) peut inhiber sélectivement

l'activité poly(A)-polymérase liée à la chromatine. L'Ara-A ou Vidarabine est un inhibiteur spécifique de la poly(A)-polymérase.

Enfin, les polyamines sont une classe d'inhibiteurs très actifs.

En outre, les poly(A)-polymérases sont généralement inhibées à de faibles concentrations en sel (100 mM KCl).

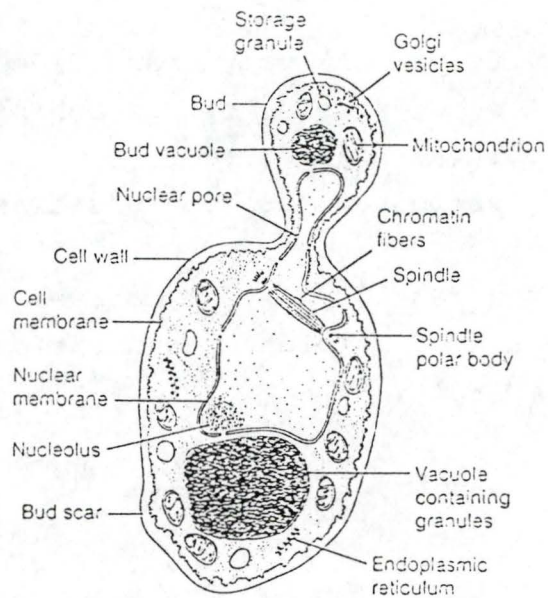


Fig.22: cellule de levure *S. cerevisiae* (MARGULIS., 1988)

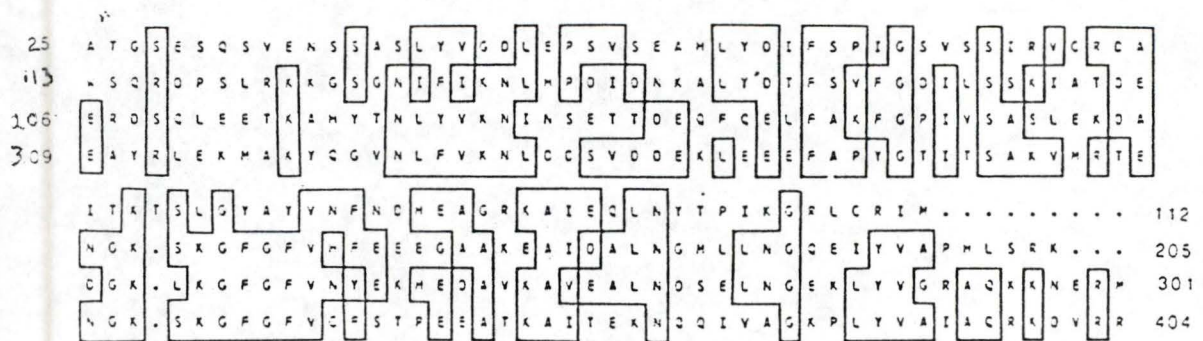


Fig.23: répétition de séquences dans le gène de la "poly(A)-binding protein": quatre régions de séquences d'acides aminés (résidus 25-112, 113-205, 206-301 et 309-404) sont comparées. Les acides aminés conservés sont entourés. (KORNBERG, 1986)

1.4. Choix du matériel biologique utilisé

1.4.1. La levure comme matériel biologique

Le matériel biologique que nous utilisons est la levure de boulangerie Saccharomyces cerevisiae (Fig. 22).
La levure convient bien aux manipulations en laboratoire. Elle peut, en effet, être facilement produite en grande quantité. De plus, on dispose de nombreuses techniques permettant son utilisation pour des applications biochimiques ou génétiques. Il est à noter que de nombreuses souches contenant des mutations dans différents aspects du métabolisme de l'ARNm existent et sont disponibles dans différents laboratoires (Adam et al., 1986).

1.4.2. La polyadénylation chez la levure

Les ARNm de levure possèdent une queue de poly(A) comprenant environ 50 nucléotides. Signalons que la protéine nucléaire et la protéine cytoplasmique liées à la queue de poly(A) (PABP) ont été purifiées chez S. cerevisiae (Kornberg et al., 1986). Ces PABP ont un poids moléculaire estimé à 53.000 et 68.000. Un gène codant pour ces 2 PABP a été cloné (Adam et al., 1986).

La séquence nucléotidique de ce gène montre quatre régions homologues de 90 acides aminés (Fig. 23) qui représenteraient les domaines de liaison de la PABP à la queue de poly(A).

Il apparaît que la protéine nucléaire dérive de la protéine cytoplasmique par clivage protéolytique.

Chez les eucaryotes supérieurs, le clivage et la polyadénylation nécessitent la présence sur l'ARNm d'une séquence signal hautement conservée AAU AAA et de séquences en aval.

Chez S. cerevisiae, tous les transcrits connus de l'ARN-polymérase II (y compris les ARNm d'histones) sont polyadénylés après leur synthèse bien que les séquences

ADHI	TGACACTTC	TAAATAAGCGAA	TTCTT	ATGATT	TATGATTTT	ATATTA
ADHI	TTT	TATFAT	TAAATAAG	TTATAAAAAA	ATAAGT	TACAAATTTAAA
ADHI	GT	TATAAAAAA	TAAAGT	GTATACAAATTTT	AAAGT	GACTCTTAGGTTTT
MATa1	TA	TGAGATC	TAAATAA	TTTCGTTT	CAATGATTA	AAATAGCATAGTCGGG
MATa1	CT	ATGATT	TGTATAA	ATATGATTT	ACTCAGACT	CAAGCAATCAATCA
MATa2	TG	TGTAGAA	TATATATATA	TATTTG	CAAAAAACATAAA	CAATCAAC
CYC1	GT	TATGTTAGT	ATAAGAACG	TATTTT	ATATTTCAAA	TTTTCTTTTT
Consensus	T	TAAATAAG	T	A	A	T
CYC7	GT	TATTTAT	TAAATAA	TATTITT	TATATGCAT	GCACATAAAAAAGTCTATA
H3	AA	TAAAATA	TAAATCA	TATATTT	TAGGTTT	ACTGGGTTCTTTAAACAGTTG
H4	AA	TATAAAC	ATAAGGG	TATTAATTT	AAATGGGTTT	AAACAGTTGA
G3POH	TC	TGCATT	TAAATAA	TTTTCTTTTT	TATAGCTTT	TATGACTTACTTCA

Fig.24: homologies de l'extrémité 3' chez plusieurs gènes de levure.
(BENNETZEN, 1982)

connues d'ARNm de levure n'aient en commun ni une séquence signal AAU AAA ni une autre séquence hautement conservée responsable de la maturation de l'extrémité 3'. En effet, la comparaison de séquences qui apparemment dirigent la formation de l'extrémité 3' chez plusieurs ARNm de levure (ADH I, (Bennetzen et Hall, 1982) (Zaret et Sherman, 1982), CYC 1) (Fig. 24) met en évidence des similitudes de séquences mais aucune des séquences consensus proposées ne convient pour toutes les extrémités 3' connues de levure.

Cette absence de forte similitude de séquences et le fait que tous les transcrits de l'ARN pol II soient polyadénylés ont conduit Zaret et Sherman à suggérer, en 1982, (Zaret et Sherman, 1982) que la polyadénylation serait couplée à la terminaison de la transcription dans le cas de la levure.

Terry Platt et ses collaborateurs (Platt et al., 1988) ont mis en évidence dans un extrait brut de levure S. cerevisiae d'une part une activité de clivage endonucléolytique et d'autre part, une activité de polyadénylation sur le pré-ARNm de l'iso 1 - cytochrome C (CYC-1) de levure synthétisé *in vitro* et ajouté à l'extrait.

Ces deux activités produisent donc in vitro l'extrémité 3' de cet ARNm.

Ceci suggère que le clivage endonucléolytique et que la polyadénylation pourraient être responsables de la maturation de l'extrémité 3' de tous les ARNm de levure comme c'est le cas chez les autres eucaryotes (certains transcrits d'histone faisant exception).

Dans l'alternative, ce système de maturation serait limité à une classe de gènes de levure à laquelle le gène CYC-1 appartiendrait.

Etant donné l'absence d'une séquence signal hautement conservée, il est possible que la structure de l'ARN formée par des éléments de séquences disparates permette la reconnaissance du site de formation de l'extrémité 3' chez la levure.

Les auteurs proposent comme deuxième hypothèse que des facteurs spécifiques à certaines classes d'ARNm dirigerait le clivage et la polyadénylation de ces transcrits.

Si les résultats montrant un clivage et une polyadénylation, in vitro, reflètent le mécanisme utilisé, in vivo, cela impliquerait que la transcription par l'ARN pol.II se poursuive au delà de l'extrémité mature de l'ARNm. Cependant, contrairement aux autres eucaryotes, il n'existe pas de preuve expérimentale montrant que cette transcription dépasse le site de polyadénylation chez la levure.

Ces auteurs proposent un modèle de terminaison de transcription faisant intervenir des facteurs trans-actifs comme une exonucléase 5'-3'. Celle-ci, à partir du site de clivage remonterait le long de l'ARN jusqu'à rattraper la polymérase et entraîner l'arrêt de la transcription (Platt et Butler, 1988) (Fig. 25).

En conclusion, Platt et ses collaborateurs proposent un modèle d'après lequel une maturation de l'ARN et non la terminaison de la transcription formerait l'extrémité 3' des ARNm de S. cerevisiae.

De plus, les résultats de Platt et al confirment que des facteurs trans-actifs participeraient à la formation de cette extrémité 3'.

Ce travail s'inscrit dans le cadre général des recherches visant à identifier les différents facteurs intervenant dans la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNm.

1.5. BUT DU TRAVAIL

La maturation de l'ARNm (coiffe, polyadénylation, méthylations, splicing) conditionne les performances de la machinerie de synthèse protéique.

Notre travail s'inscrit dans une problématique générale qui tend à comprendre le rôle et le mécanisme de la polyadénylation chez la levure Saccharomyces cerevisiae.

Notre but immédiat consistera à mettre en évidence une activité de polyadénylation, à la purifier et enfin à caractériser l'enzyme responsable de cette activité.

A cette fin, il nous faudra mettre au point un test in vitro nous permettant de suivre l'incorporation de l'adénosine monophosphate dans l'ARN à partir d'adénosine triphosphate marquée au tritium.

Ce test permettra de suivre l'enzyme au cours des différentes étapes de purification et d'établir ses caractéristiques générales (son substrat, sa cinétique enzymatique, sa préférence vis à vis des conditions ioniques, son pH optimum, sa température optimale...).

Cette étude s'inscrit dans une perspective de clonage du (des) gène(s) codant pour la (les) poly(A)-polymérase(s) chez S. cerevisiae.

La purification enzymatique est l'étape préliminaire à la réussite du clonage du gène correspondant. Le clonage permettra par rétrogénétique l'obtention de mutants qui ouvrent la voie à l'étude fonctionnelle du rôle de la polyadénylation.

Matériel et méthodes

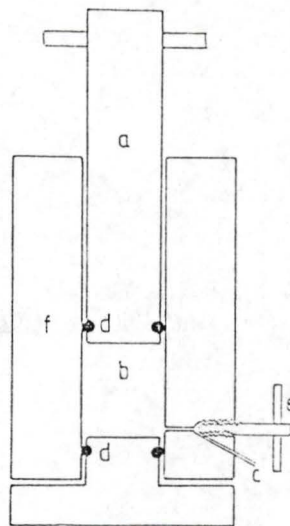


Fig.26 : la presse de FRENCH: a) piston; b) puits; c) orifice de sortie;
d) anneau; e) vis réglant l'écoulement; f) paroi (CAMPBELL et al, 1988).

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. PURIFICATION PARTIELLE DE LA POLY(A)-POLYMERASE

2.1.1. Souche : Nous utilisons la levure de boulangerie : Saccharomyces cerevisiae (levure royale Gist brocades).

2.1.2. Préparation d'un extrait cellulaire

- tampon A : Tris HCl pH 8.0 50 mM
EDTA 0.5 mM
DTT 0.1 mM
Ethylène glycol 10%
- tampon B : Tris HCl pH 8.0 50 mM
EDTA 0.5 mM
MgCl₂ 5 mM
DTT 0.1 mM
Ethylène glycol 10%
- tampon C : Phosphate de K 10 mM pH 6.5
EDTA 0.5 mM
DTT 0.1 mM

A. Lyse des cellules

Les étapes suivantes sont réalisées à 4° C :

- 50 gr de levure lavée 2 fois dans 50 ml d'eau distillée stérile (resuspendre la levure dans l'eau et centrifuger 5' à 3.500 RPM -rotor SS34, Sorvall-).
- laver le culot de cellules avec 50 ml de tampon B
- lyse proprement dite à la presse de French : le contenu cellulaire est libéré par lyse mécanique.

Principe de la presse de French (E. Campbell et J.H. Dreffus, 1988) (Fig.26) :

Les cellules de levure en suspension, soumises à de fortes pressions hydrauliques (capables d'atteindre

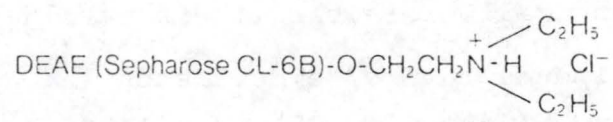


Fig.27: structure partielle d'une DEAE-sépharose.

Une pression de $2,75 \text{ kg/cm}^2$ et utilisée à une pression de 1.100 kg/cm^2) passent à travers un petit orifice. Ceci entraîne des forces de cisaillement qui cassent les cellules.

Avantage de ce procédé de lyse :

- ne nécessite pas l'addition d'élément abrasif.
- utilisation à t° proche de 0° C .
- efficace pour rompre les parois cellulaires de levure.

On recueille le lysat de cellules de levure dans un inhibiteur de protéase, le PMSF (phényl méthyl sulfonyl fluoride) à une concentration finale de 1 mM .

B. Obtention du surnageant Sn65

Toutes les étapes se déroulent à 4°C . :

- centrifuger le lysat à 10.000 RPM pendant $10'$
(rotor SS34, Sorvall)
- prélever le surnageant et centrifuger à 30.000 RPM pendant $30'$ (rotor type 60 Ti, Beckman).
- centrifuger le surnageant à 65.000 RPM pendant $4\text{h}30'$
(rotor type 65, Beckman).

On obtient un surnageant final appelé Sn65 qui servira de source enzymatique.

2.1.3. Purification de la poly(A)-polymérase

Chromatographie sur matrices échangeuses d'ions

Le surnageant Sn65 est appliqué sur une colonne contenant 20 ml de gel échangeur d'anions DEAE-sépharose fast-flow (fig. 27) (diéthylaminoéthyle) (Pharmacia) équilibré avec le tampon A.

Le gel est lavé avec 3 volumes de tampon A afin d'éliminer les protéines non fixées.

Les protéines sont éluées avec 80 ml de gradient continu en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 à 500 mM dans du tampon A.

CM (Sephacrose CL-6B)-O-CH₂CO₂⁻ Na⁺

Fig. 28: structure partielle d'une CM-sépharose

Le lavage de cette colonne est déposé sur une colonne contenant 20 ml de matrice échangeuse de cations CM-sépharose CL-6B (fig.28) (carboxyméthyl) (Pharmacia) équilibrée avec le tampon A.

L'activité enzymatique est éluée avec 80 ml d'un gradient continu en NaCl de 0 à 500 mM dans du tampon A.

Lors de certaines expériences, nous avons appliqué le surnageant Sn65 directement sur une colonne CM-sépharose CL-6B. Les conditions d'utilisation sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

Pour la caractérisation de la poly(A)-polymérase, les fractions actives recueillies à la sortie de la CM-sépharose CL 6B sont groupées et déssalées sur une colonne PD-10 (9,1 ml de gel séphadex G25 sur une hauteur de 5 cm) (Pharmacia) équilibrée avec le tampon A.

2.1.4. Dosage des protéines par le réactif de Bradford

La teneur en protéines des fractions recueillies est mesurée à 595 nm selon la méthode de Bradford (1976). Une courbe standard est établie au moyen de la sérum albumine bovine (SAB).

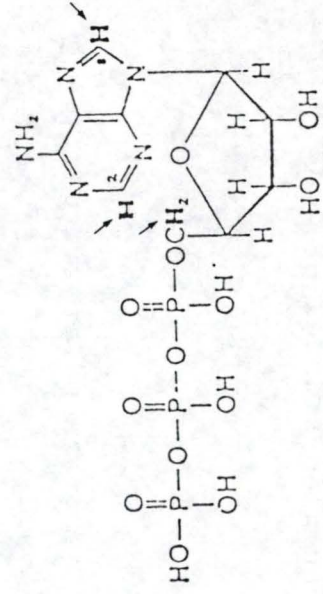


Fig.30. (2.5.8³-H) adenosine 5'- triphosphate

2.1.5. Test d'activité de la poly(A)-polymérase

L'activité poly(A)-polymérase est testée sur une amorce qui est l'ARN ribosomique de levure (ARNr) que nous préparons, ou sur un poly(A) commercial (Boehringer).

Le test est inspiré de celui de Haff et Keller (1975). Le mélange réactionnel d'un volume de 250 μ l contient : 0.5 mM 3H ATP ((2,5',8-3H) adénosine 5' triphosphate avec 4 μ ci/ μ M) , 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1mM DTT, 0.5 mM $MnCl_2$, de l'amorce (0,5 mg/ml) et de l'enzyme.

Le test est incubé 30' à 30° C.

Les protéines et les acides nucléiques du test sont alors précipités par addition d'un volume d'acide trichloracétique (TCA) 10% froid contenant 2% de pyrophosphate de sodium, on laisse 15' dans la glace.

Ce mélange est dilué 10 fois dans du TCA 10%, pyrophosphate de Na 2%, puis filtré sur filtre en microfibres de verre (GF/C Whatman).

Le filtre est lavé successivement avec 5 ml de TCA 5%, 5 ml d'eau, 5 ml d'alcool-éther, puis séché.

La radioactivité est comptée dans 5 ml d'aqualuma dans un compteur à scintillation liquide (Beckman LS-3150T).

2.1.6. Analyse des protéines par électrophorèse verticale

L'électrophorèse est réalisée dans un gel SDS-polyacrylamide (10%) surmonté d'un gel de concentration.

- "running_gel" (gel de séparation)

2,5 ml acrylamide 30% bisacryl 0,8%
1,875 ml Tris 1,5 M SDS 0,4% pH 8,8
2,75 ml H₂O
7,5 ul Temed pur
0,375 ml PAS 1%

- "stacking_gel" (gel de concentration)

0,5 ml acrylamide 30% bisacryl 8%
1,25 ml Tris 0,5 M SDS 0,4% pH 6,8
2,75 ml H₂O
5 ul Temed pur
0,5 ml PAS 1%

- tampon électrophorèse

Tris 25 mM
Glycine 125 mM
SDS 0,1%

- tampon échantillon (concentré 2 x) pH 6,8

Tris 125 mM
SDS 4% (P/V)
bleu de bromophénol 0,002% (P/V)
béta-mercaptoéthanol 10% (V/V)
glycérol 20% (V/V)

Les fractions protéiques à analyser sont diluées 2 fois dans le tampon échantillon. Les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 3 minutes.

L'électrophorèse est réalisée sous une tension d'environ 150 volts pendant environ 45 minutes.

Les protéines sont visualisées après coloration au bleu de Coomassie :

Coloration au bleu de Coomassie (Hayes et al. 1969)

Après migration, les protéines sont colorées dans une solution contenant 0,1% de bleu de Coomassie, 10% d'acide acétique, 40% de méthanol et 50% d'eau pendant un minimum d'une heure. Le gel est décoloré dans une solution de méthanol 40%, acide acétique 10%, eau 50%. Lorsqu'il est décoloré, le gel est immergé dans une solution de méthanol 30%, glycérol 3%.

Il est séché sous vide sur papier de cellulose

Marqueurs de taille

Protein	Mol. Wt.	Subunit Mol. Wt.	Source
Thyroglobulin	669.000	330.000	hog thyroid
Ferritin	440.000	18.500 (220.000)	horse spleen
Catalase	232.000	60.000	beef liver
Lactate dehydrogenase	140.000	36.000	beef heart
Albumin	67.000	67.000	bovine serum
<u>Haut poids moléculaire</u>			
		Subunit Mol. Wt.	Source
Phosphorylase b		94.000	rabbit muscle
Albumin		67.000	bovine serum
Ovalbumin		43.000	egg white
Carbonic Anhydrase		30.000	bovine erythrocyte
Trypsin Inhibitor		20.100	soybean
- Lactalbumin		14.400	bovine milk
<u>Faible poids moléculaire</u>			

2.2. PREPARATION DE L'ARN RIBOSOMIQUE DE LEVURE S. CEREVISIAE

- Tampon TEN : 0,1 M Tris pH 9
1 mM EDTA
0,1 M NaCl
- Tampon D : tampon B (idem point 2) contenant 0,5M KCl
0,25M sucrose
- tampon E : tampon B (idem point 2) contenant 0,5M KCl
0,5M sucrose

2.2.1. Sa préparation

A. Préparation de l'ARNr à partir de ribosomes lavés :

le Sn65 est éliminé, le culot de ribosomes est resuspendu dans le tampon D par agitation en chambre froide pendant 1 heure.

Les pellets dissous sont déposés sur une couche de 3 ml de tampon E. Ils sont alors centrifugés à 65.000 RPM (rotor type 65) pendant 70 minutes. Le culot obtenu contient les ribosomes lavés.

B. Extraction au phénol-chloroforme :

L'extraction au phénol chloroforme permet de dénaturer et d'éliminer les protéines de la solution d'acides nucléiques.

Solution phénol-chloroforme : phénol 50 ml
chloroforme 50 ml
alcool isoamylique 2 ml
hydroxyquinoline 0,05gr

Les ribosomes lavés sont resuspendus dans du tampon TEN à raison de 10 DO₂₆₀/ml auquel on ajoute 10 mgr/ml de SDS (dissout les complexes

nucléoprotéiques et donc facilite la dénaturation des protéines et l'extraction de l'ARNr) et 1 volume de chloroforme-phénol.

On mélange vigoureusement la phase aqueuse et la phase organique.

On centrifuge 5' à 5.000 RPM (rotor GSA, Sorvall).

La phase aqueuse supérieure est prélevée en évitant tout contact avec l'interface.

On effectue une seconde extraction au phénol de cette phase aqueuse.

L'ARN est précipité avec 2 volumes d'éthanol 100% froid en présence de NaCl en concentration finale 0,3 M à -80°C pendant 1 heure.

La solution est centrifugée 10' à 4°C à 5.000 RPM (rotor GSA, Sorvall) et décantée.

Le culot d'ARN est séché sous vide puis resuspendu dans de l'eau distillée.

C. Quantification spectrophotométrique de l'ARN .

La mesure de l'absorbance DO_{260nm} permet de calculer la concentration des acides nucléiques. Une absorbance de 260 nm égale à 1 correspond à 40 ug d'ARN natif par ml.

Le rapport entre les absorbances à 260 nm et à 280 nm donne une estimation de la pureté de l'ARN.

Les préparations pures ont un rapport $\frac{DO_{260}}{DO_{280}}$ de 1,8.

S'il y a contamination de la solution par du phénol ou des protéines, ce rapport sera inférieur.

2.2.2. Analyse de l'ARNr par électrophorèse horizontale dans un gel agarose - formaldéhyde.

On sépare l'ARNr sur gel d'agarose 1,2% formaldéhyde. La formaldéhyde dénature l'ARNr.

Tampons :Formaldéhyde loading buffer :

- EDTA 1mM pH 8,0
- bleu de bromophénol 0,25%
- xylène cyanol 0,25%
- glycérol 50%

MOPS 10 x 3 - (N-morpholino) - propanesulfonic acid running buffer

A 800 ml d'eau traitée au DEPC (diéthyl pyrocarbonate)
on ajoute :

- 41,8 gr de MOPS ajusté à pH 7 (NaOH)
- 16,6 ml d'acétate de sodium 3 M traité au DEPC
- 20,0 ml d'EDTA pH 8,0 traité aussi au DEPC

L'ensemble est porté à un volume final de 1 litre
avec de l'eau traitée au DEPC, on filtre le tout.

A. La préparation du gel agarose/formaldéhyde

Pour un gel de 1,2% de taille 10,5 x 7,5 cm.

- mélanger 0,96 gr de gel d'agarose dans 80 ml d'eau.
- porter à ébullition et laisser la solution à refroidir (55° C).
- ajouter 8 ml de MOPS 10 x running buffer
 - 2,4 ml de formaldéhyde 37%
 - 2 µl (0,2 µg/ml) d'éthidium bromide
- couler le gel.

La migration s'effectue sous une ddp de 65 V pendant
environ 3 heures.

Lorsque la migration est terminée, le gel est lavé
à l'eau afin d'éliminer l'éthidium bromide.

B. La préparation des échantillons

Un test d'activité est réalisé sur 80 µl d'une
fraction active. Parallèlement, on réalise un témoin

(blanc) dans lequel l'enzyme est remplacée par de l'eau.

L'incubation est arrêtée en ajoutant 1 volume de phénol-chloroforme.

On répète une seconde fois cette extraction au phénol.

Ajouter 2 volumes d'éthanol 100% froid et NaCl à concentration finale de 0,3 M.

Laisser à -80° C pendant 1 heure.

Centrifuger 5' à 12.000 RPM (centrifugeuse Janetsky).

Décantier et sécher sous vide le culot d'ARN.

Resuspendre l'ARN dans 20 µl d'eau distillée.

On utilisera 4 µl de cet ARN dans l'électrophorèse.

Un échantillon pour l'électrophorèse est constitué de :

4 µl MOPS 10x running buffer
7 µl de formaldéhyde 37%
20 µl de formamide

Remarque : la formamide doit être désionisée au préalable (utilisation du gel Amberlit).

Mélanger et centrifuger à 12.000 RPM (Janetsky) quelques secondes.

Incuber à 55° C pendant 15'.

Ajouter 8 µl de formaldéhyde loading buffer à chaque échantillon.

Centrifuger 2 secondes à 12.000 RPM (Janetsky).

Les échantillons d'1 volume de 48 µl sont alors déposés dans les puits du gel.

Après la migration, le gel est séché sous vide sur feuille de papier.

C. Détection de la radioactivité incorporée dans l'ARN par RADIO THIN LAYER CHROMATOGRAPHY ANALYSER (RITA IBM PC/XT/AT)

(RITA ou Rapid-Intelligent-Thin layer-Analyser)

La radioactivité bêta se mesure par une méthode utilisant une chambre d'ionisation.

Le gel est séché sur une seule face et la radioactivité présente sur les pistes est lue par la tête de lecture de la chambre ionisante.

Principe de la méthode :

Une particule bêta qui pénètre dans la chambre de comptage provoque l'ionisation d'un gaz en l'occurrence le méthane, celle-ci induit une décharge entre 2 électrodes qui est détectée et enregistrée électroniquement.

Résultats et discussion

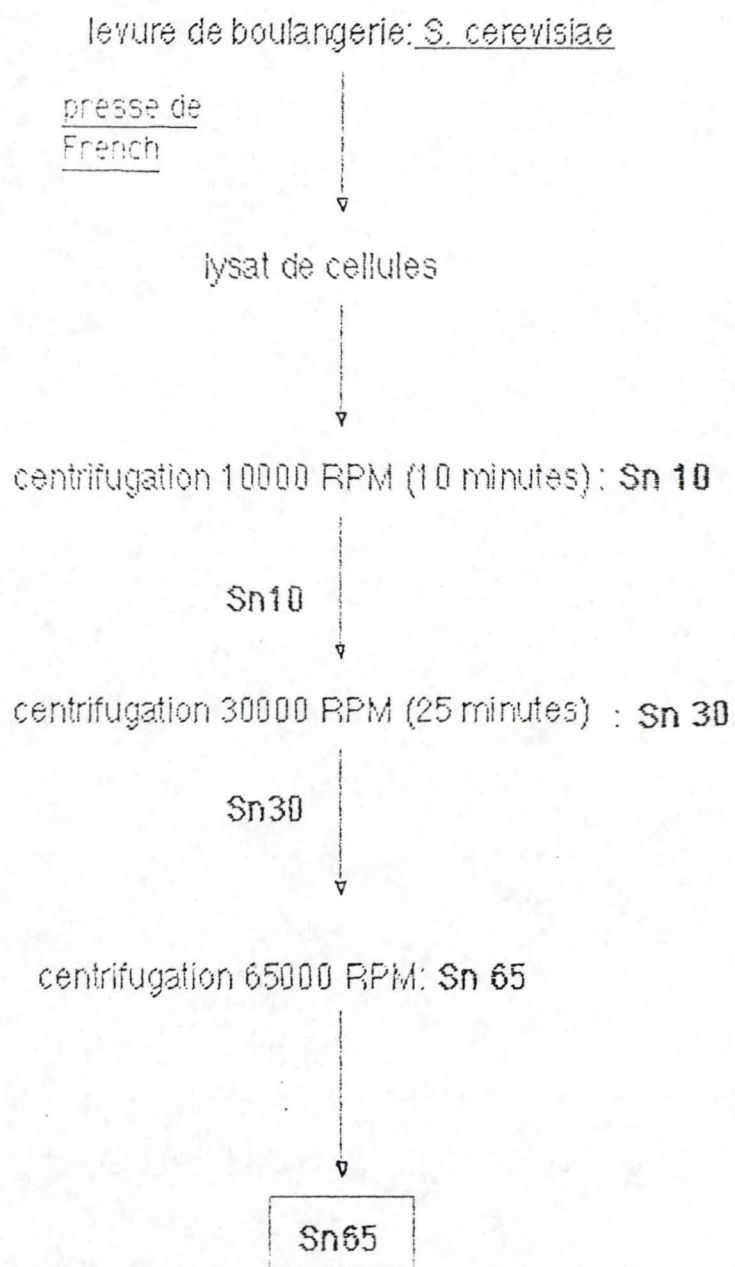


Fig 30: schéma du protocole de la préparation de l'extrait cellulaire.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Recherche d'une activité poly(A)-polymérase

Nous nous proposons de rechercher une activité poly(A)-polymérase à partir d'un extrait cellulaire de levure Saccharomyces cerevisiae.

Des travaux antérieurs anciens portant sur la poly(A)-polymérase de levure ont suggéré l'existence d'une activité liée aux ribosomes et libre dans le surnageant (Haff et Keller, 1975).

Pour notre part, nous avons choisi de nous intéresser à l'activité poly(A)-polymérase libre (c'est à dire présente dans le surnageant de centrifugation appelé Sn 65, comme décrit dans Matériel et Méthodes).

3.1.1. Préparation d'un extrait cellulaire comme source enzymatique.

Nous provoquons une lyse mécanique des cellules de levure (Cfr. Matériel et Méthodes). Puis, par centrifugations successives du lysat, nous séparons les débris cellulaires et les organites d'un surnageant, noté Sn 30 (Fig.30). Le Sn 30 est alors débarrassé des ribosomes par une centrifugation à haute vitesse (65.000 RPM). Nous obtenons un surnageant désigné Sn 65 (Fig.30).

3.1.2. Mise en oeuvre d'un test d'incorporation de l'AMP* à une amorce d'ARN

Plusieurs auteurs (notamment Kurland et al., 1966; Avramova et al., 1980; Winters et Edmonds, 1973; Nevins et al., 1977; Rose et Jacob, 1976) avaient mis en évidence, dans divers organismes une activité poly(A)-polymérase, capable à partir d'ATP, d'incorporer de l'AMP sur une amorce constituée d'ARN.

Plus récemment (Brawerman, 1976) on a découvert l'existence de la queue de poly(A) à l'extrémité 3' de l'ARNm et on a dès lors émis l'hypothèse que l'activité poly(A)-polymérase détectée précédemment, in vitro, pourrait être responsable de la réaction de polyadénylation de l'ARNm, in vivo.

Ces études, in vitro, utilisent généralement comme amorce de la réaction de l'ARN ribosomique ou des oligonucléotides de synthèse de taille et de nature variables.

Dans notre cas, nous avons choisi de réaliser les essais de détection de l'activité poly(A)-polymérase à l'aide de deux amorces différentes : l'ARNr total préparé à partir du lysat de levure ou un poly(A) commercial (Boehringer) (Cfr. Matériel et Méthodes).

Les conditions physico-chimiques utilisées dans notre test d'activité se basent sur celles indiquées par les auteurs (Haff et Keller, 1975; Slegers, 1985) et sont décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Les résultats des tests d'activité réalisés aux diverses étapes de la préparation (Fig.30) (lysat, Sn10, Sn30, Sn 65), n'ont pas permis de détecter une activité poly(A)-polymérase (Cfr. tableau ci-dessous).

	<u>activité</u> (cpm)
blanc (eau)	536
lysat - blanc	258
Sn10 - blanc	301
Sn30 - blanc	292
Sn65	436

Fig.31 : tests d'activité réalisés sur le lysat Sn10, Sn30 Sn65.

Remarque : le blanc consiste à remplacer les 80 µl d'extrait (lysate, Sn10, Sn30 et Sn65) par 80 µl d'eau. Le blanc permet d'évaluer la quantité d'ATP radioactif non incorporé enzymatiquement mais se fixant de manière aspécifique sur le filtre malgré les lavages.

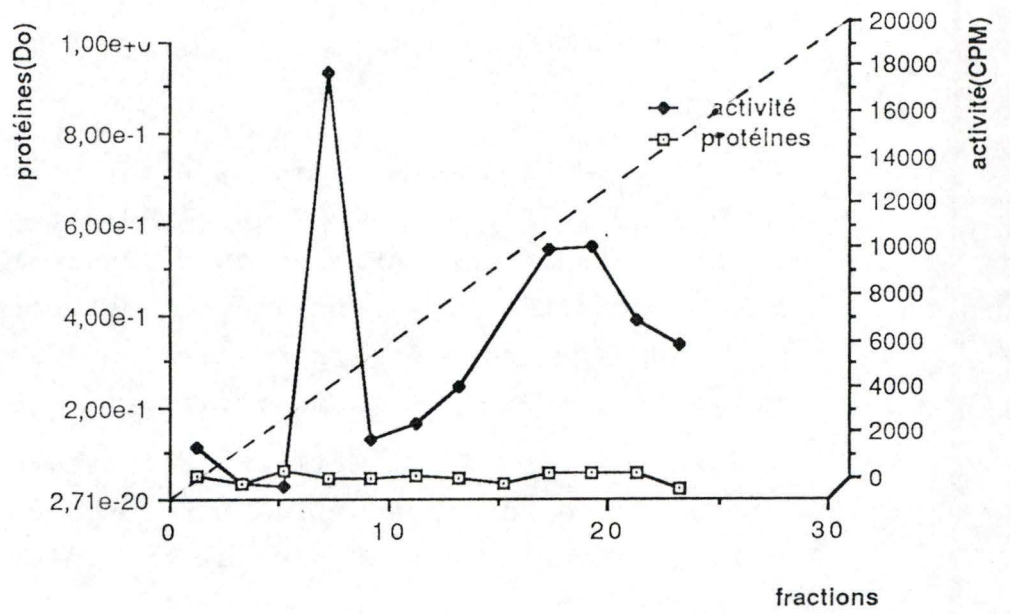


Fig.32: mesure de l'activité et de la quantité de protéines dans les fractions à la sortie de la DEAE-sépharose éluée par un gradient continu de 0 à 500mM en $(NH_4)_2SO_4$ (amorce=ARNr)

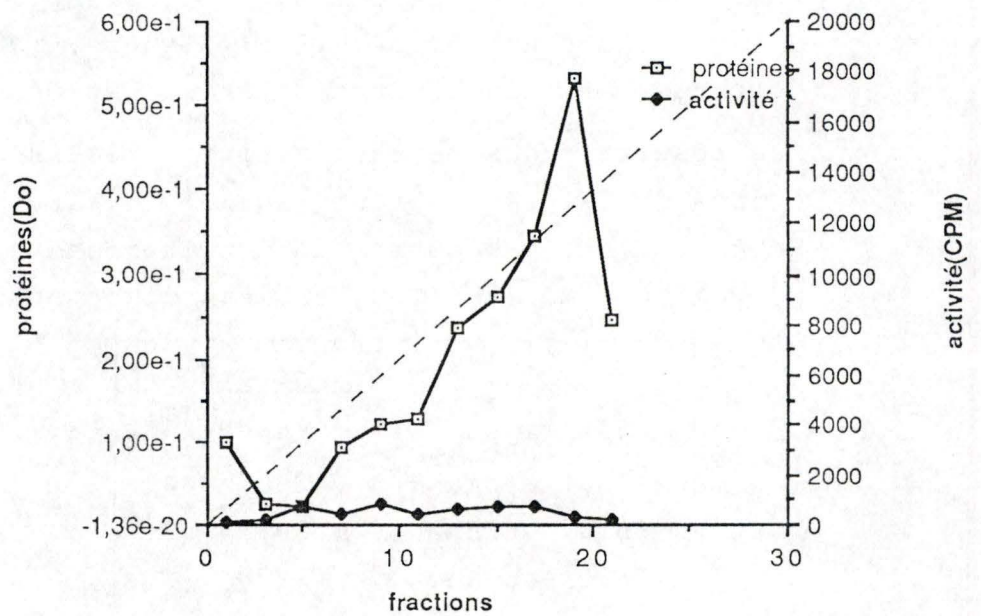


Fig.33: mesure de l'activité et de la quantité de protéines dans les fractions à la sortie de la DEAE-sépharose éluée par un gradient continu de 0 à 500 mM en $(NH_4)_2SO_4$. (amorce= poly(A))

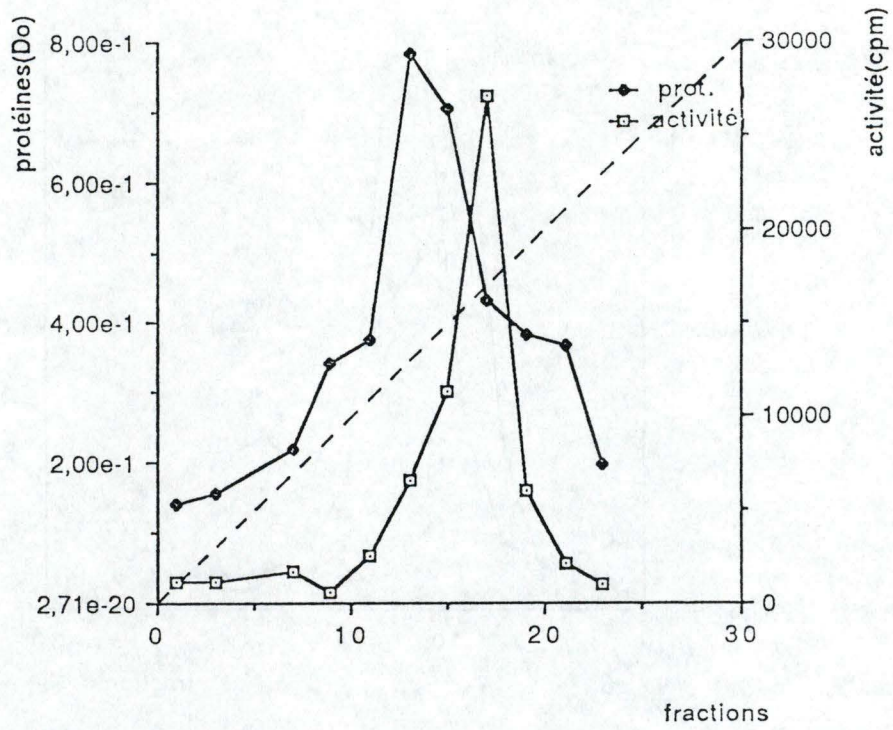


Fig.34: mesure de l'activité et de la quantité de protéines dans les fractions à la sortie de la CM-séparation élue par un gradient continu de 0 à 500 mM en NaCl. (amorce=ARNr)

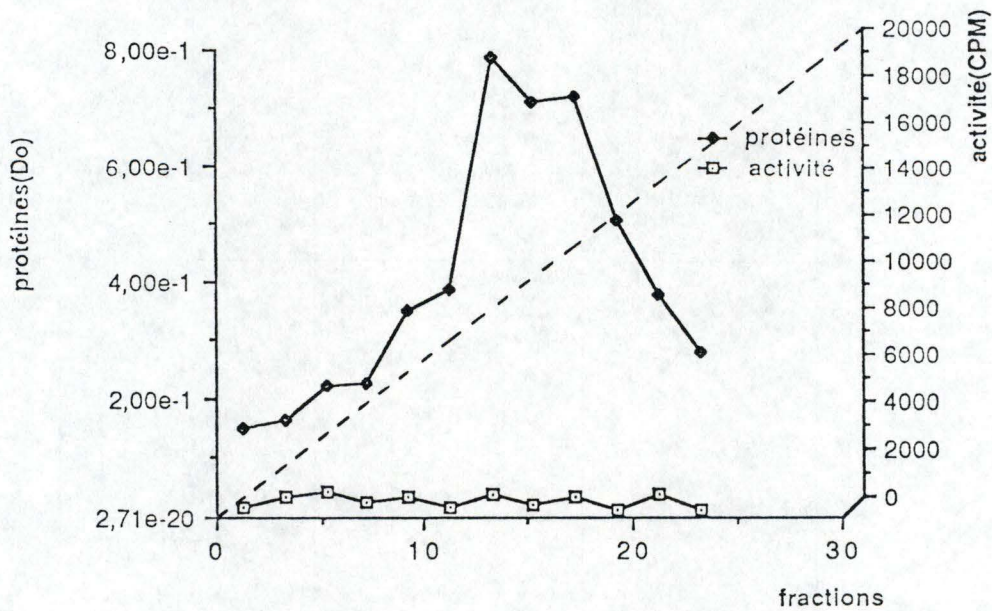


Fig.35: mesure de l'activité et de la quantité de protéines dans les fractions à la sortie de la CM-séparation élue par un gradient continu de 0 à 500 mM en NaCl. (amorce=poly(A))

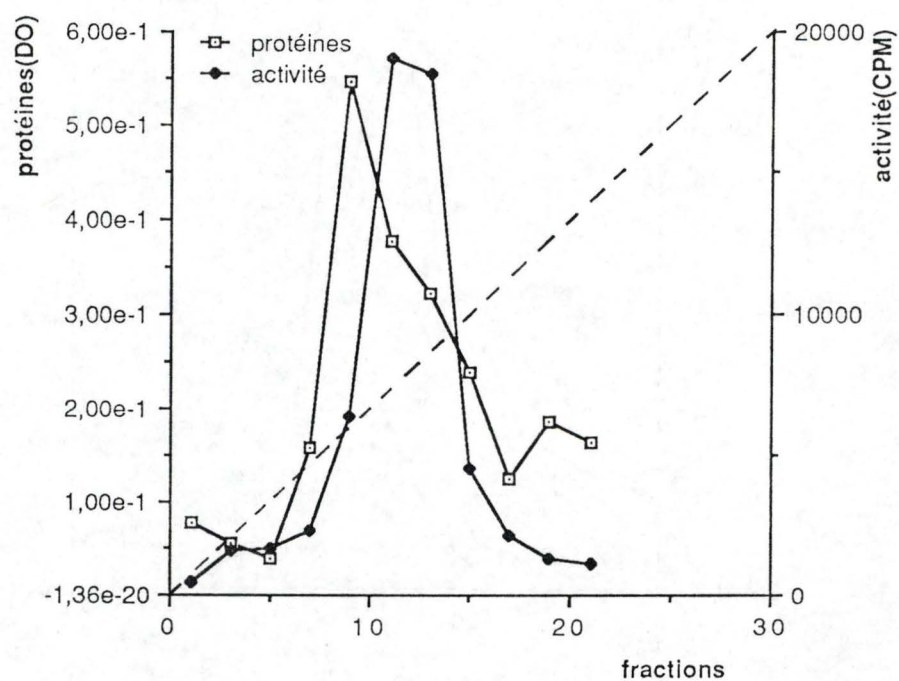


Fig.36: mesure de l'activité et de la quantité de protéines dans les fractions à la sortie de la CM-sépharose (non précédée par une DEAE-sépharose) éluée par un gradient continu de 0 à 500 mM en NaCl.

Fractions	volume (ml)	protéines (mg/ml)	protéines totales (mg)	unités enzymatiques totales	activité spécifique (unités/mg)
extrait brut	80 ml	13,2	1.056	-	-
surnageant	60 ml	6,8	408	-	-
lavage DEAE	110 ml	1,92	211,2	-	-
pic CM-séph. (1)	4,5 ml	1,34	6,03	1.600	265,3
pic CM-séph.	4,5 ml	1,12	5,04	1.500	297,6

(1) Passage sur CM-sépharose précédé par un passage sur DEAE-sépharose.

Fig. 37: calcul de l'activité spécifique.

3.1.3. Purification partielle d'une activité poly(A) -polymérase à partir d'un Sn65.

Nous inspirant de la méthode de purification suivie par Haff et Keller (Haff et Keller, 1975), nous avons opté pour une échangeuse d'anions DEAE-sépharose.

Les tests effectués sur les fractions éluées par un gradient continu de 0 à 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ne nous révèlent pas d'activité enzymatique (Fig.32 et Fig.33).

Le produit du lavage (correspond aux protéines non fixées éluées par 3 volumes de tampon A) de la colonne DEAE-sépharose est appliqué sur une colonne échangeuse de cations, CM- sépharose éluee par un gradient continu de 0 à 500 mM en NaCl; on teste les fractions à la sortie de la colonne.

On observe un pic d'activité correspondant aux fractions 11 à 17 et éluées à une concentration de 200 à 300 mM. (Fig.34)

Dans les conditions utilisées, cette activité enzymatique est observée avec de l'ARNr choisi comme substrat mais non avec le poly(A) commercial (Boehringer) (Fig.35).

Par la suite, la purification par application directe du surnageant sur une échangeuse de cations CM-sépharose a été effectuée avec succès (Fig.36).

L'activité spécifique (Fig.37) correspond à l'activité totale divisée par la quantité de protéines totales en mgr.

L'unité enzymatique correspond à l'incorporation en 30' d'1 nmole d'AMP (à partir d'ATP) dans le matériel précipité au TCA.

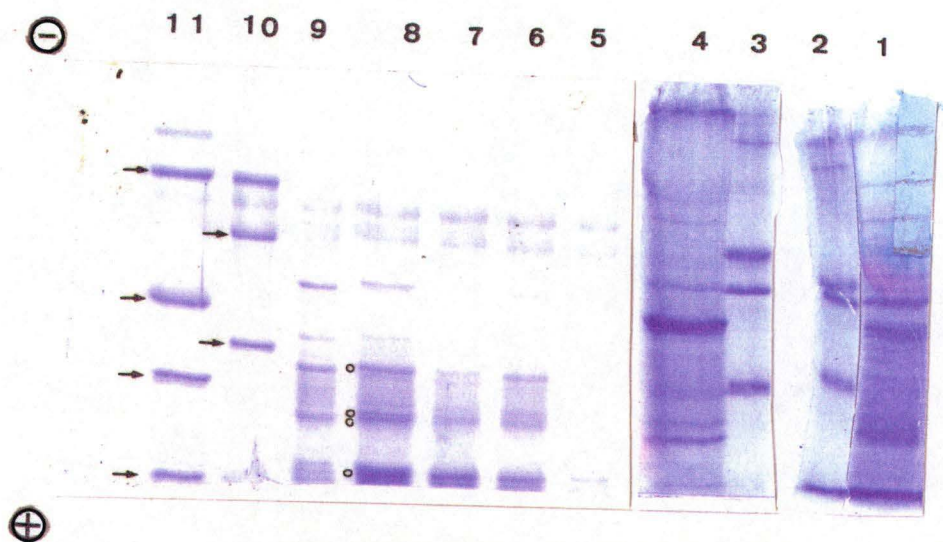
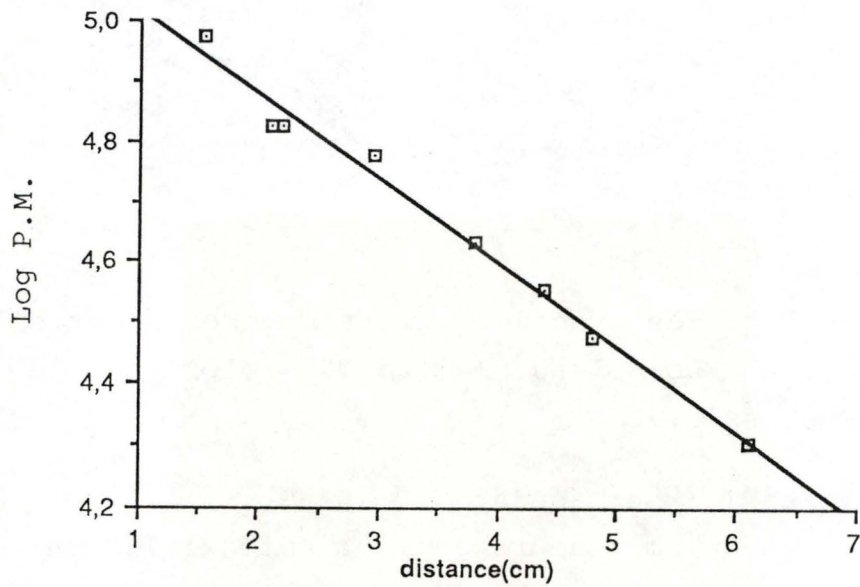


Fig. 38 : analyse des fractions protéiques en électrophorèse en gel SDS-polyacrylamide 10% coloré au bleu de Coomassie.

- piste 1 : surnageant
- 2 : marqueurs de haut poids moléculaire
- 3 : marqueurs de haut poids moléculaire
- 4 : lavage de la CM-sépharose
- 5 : fraction inactive
- 6 : fraction active
- 7 : fraction active
- 8 : fraction très active
- 9 : fraction active
- 10 : marqueurs de haut poids moléculaire
- 11 : marqueurs de bas poids moléculaire



Droite de régression exprimant le log du poids moléculaire en fonction de la distance de migration des protéines sur le gel.

3.2. Caractérisation enzymatique de la fraction active

Le pic d'activité au sortir de la colonne CM-sépharose a été soumis à une série d'études visant à déterminer les caractéristiques de la réaction enzymatique.

3.2.1. Analyse des fractions actives par électrophorèse en gel polyacrylamide-SDS (Fig.38)

Le passage sur CM-sépharose permet d'obtenir des fractions actives débarrassées d'une grande partie des protéines du surnageant; beaucoup de protéines étant déjà éliminées par le lavage de la carboxyméthyl.

Certaines bandes protéiques, désignées par un point sur la photographie du gel, sont clairement présentes dans toutes les fractions actives et absentes de la fraction non active. De plus, leur intensité (proportionnelle à la quantité) est maximale dans la fraction la plus active. On établit une droite d'étalonnage exprimant le $\log PM$ de la protéine en fonction de la distance de migration, et à partir de l'équation de cette droite, on évalue le P.M. des 4 protéines les plus nettement visibles dans les fractions actives.

Ces P.M. ainsi estimés sont respectivement de 33.000, 27.500, 27.000, 21.000.

Ainsi, l'enzyme poly(A)-polymérase pourrait être constituée de sous-unités de P.M. différents séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes.

Une autre explication serait qu'à ce stade, des protéines sont copurifiées avec l'enzyme.

Ces protéines contaminantes pourraient être éliminées dans une étape ultérieure de purification utilisant un autre critère que la charge, tel par exemple, le poids moléculaire ou l'affinité pour le substrat.

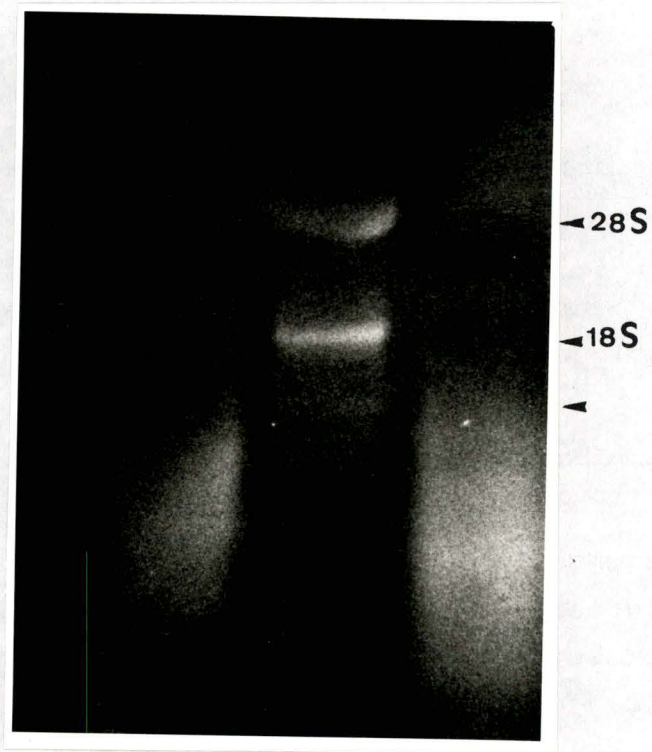


Fig.39: analyse de l'ARNr total en gel agarose/formaldéhyde coloré au bromure d'éthidium.

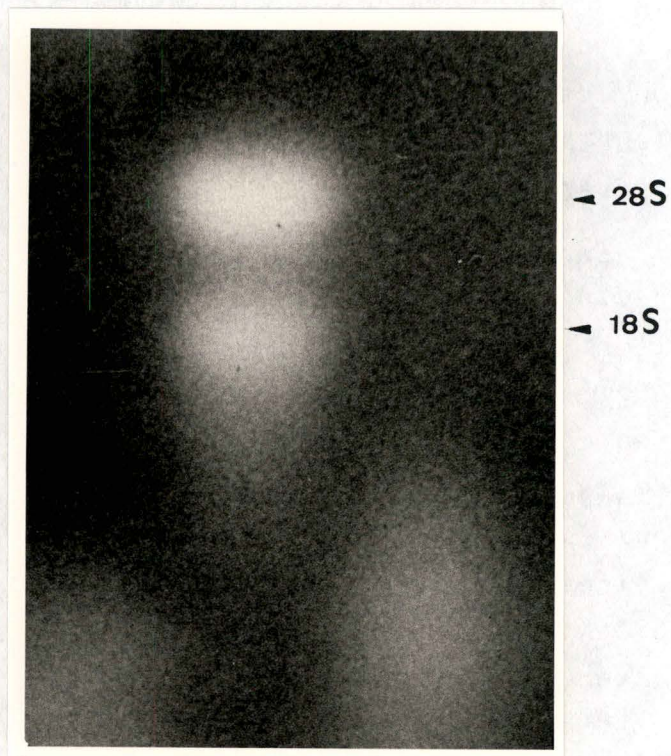


Fig.40: analyse de l'ARNr total en gel agarose/SDS coloré au bromure d'éthidium.

3.2.2. Analyse des produits de la réaction

A. Séparation de l'ARN ribosomique par électrophorèse en gel d'agarose.

L'ARN ribosomique total utilisé comme amorce est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose en conditions dénaturantes (formaldéhyde) puis visualisé par coloration au bromure d'éthidium.

Sur la figure 39, on observe 2 bandes de forte intensité correspondant aux ARN ribosomiques 28S et 18S respectivement.

Des bandes de faible intensité apparaissent en aval de la bande 18S. Elles correspondent probablement à des molécules d'ARN produit d'une légère dégradation des ARN 28S et 18S.

En effet, il est bien connu qu'au cours de la préparation de l'ARN, des nucléases peuvent introduire des coupures ("nick") dans la séquence de l'ARNr.

Des liaisons faibles responsables de la structure secondaire maintiennent cependant la majorité de ces fragments de dégradation associés.

Au contraire, dans les conditions dénaturantes utilisées lors de l'électrophorèse, les divers fragments se séparent, ce qui pourrait expliquer la présence de bandes minoritaires d'ARNr.

Notons qu'en effet ces bandes ne sont pas visualisées après électrophorèse en gel d'agarose en conditions non dénaturantes (Fig. 40).

B. Détection de la radioactivité incorporée sur l'ARN ribosomique.

La poly(A)-polymérase que nous avons isolée catalyse l'incorporation d'AMP* en présence de l'ARNr total. L'ARN ribosomique total est constitué majoritairement d'ARN 28S, 18S et 5S ainsi que d'éventuels produits de dégradation de ces ARN.

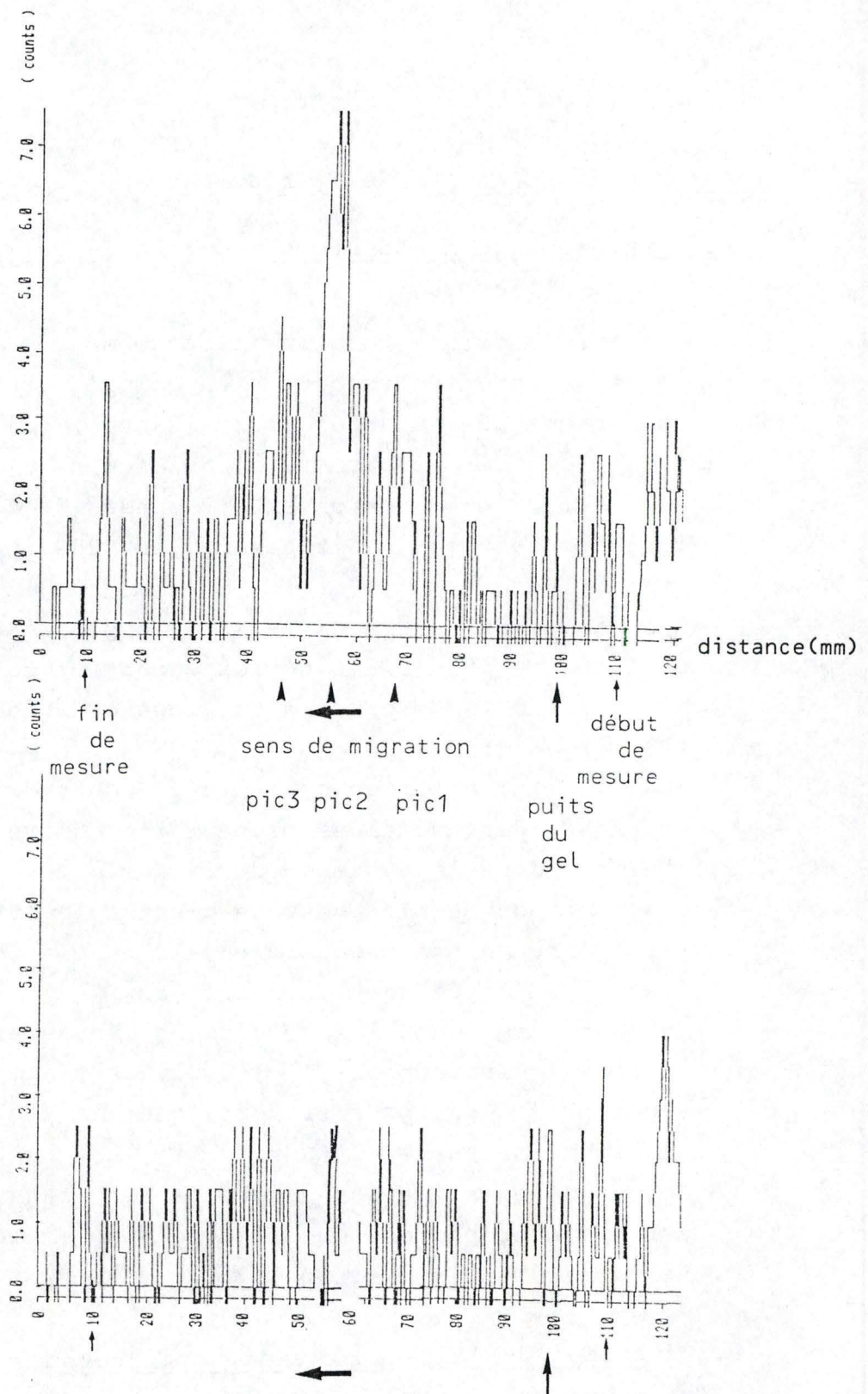


Fig.41: la radioactivité incorporée en fonction de la distance sur le gel pour les pistes test (42 a) et contrôle (42b).

L'ARN total extrait du mélange réactionnel après 30 minutes d'incubation est séparé en ses divers constituants par électrophorèse en gel d'agarose-formaldéhyde. Sur la piste voisine du gel, on fait migrer de l'ARN contrôle extrait d'un test d'activité dans lequel la fraction active est remplacée par de l'eau.

Le gel est séché puis l'analyseur RITA mesure la radioactivité présente sur les deux pistes (cfr Matériel et Méthodes).

Après incubation dans un mélange réactionnel, on mesure la radioactivité associée à ces polyribonucléotides séparés par électrophorèse en gel d'agarose formaldéhyde (Fig. 41).

La figure 12a montre un pic principal de radioactivité et 2 pics d'amplitude plus faible.

Ces 3 pics (1, 2 et 3) correspondent respectivement aux ARN 28S, 18S et à d'éventuels produits de dégradation de ces 2 ARN, tels que visualisés sur le gel d'agarose formaldéhyde coloré au bromure d'éthidium (Fig. 39). Ces résultats montrent donc bien que la poly(A)-polymérase que nous avons isolée catalyse l'incorporation de l'AMP radioactif sur l'ARN.

Nous constatons que la radioactivité incorporée est la plus intense au niveau du pic de l'ARN 18S.

Il est possible que la poly(A)-polymérase marque une affinité plus grande pour l'ARN 18S par rapport au 28S vu les différences de structure secondaire existant entre ces ARN.

Ainsi, par exemple (Fig. 22 bis) chez l'ARN 28S, l'extrémité 3'OH libre de la poly(A)-polymérase est impliquée dans la formation d'un Hair pin alors que l'extrémité 3'OH de l'ARN 18S ne forme pas de pont hydrogène avec une séquence complémentaire.

3.3. Spécifications fonctionnelles de l'enzyme

3.3.1. Inactivation de l'enzyme au cours du temps

Dans les conditions standards de préparation, les fractions actives se trouvent dans un tampon contenant 10% d'éthylène glycol.

Le test d'activité effectué toutes les 24 heures sur une fraction active (Fig. 42) montre une inactivation de l'enzyme supérieure à 80% après 3 jours à 4°C.

Cette inactivation peut résulter d'une dénaturation ou d'une protéolyse.

	Activité (cpm)					
	jour 1	%	jour 2	%	jour 3	%
éthylène glycol 10%	28.423	100	13.213	46	3.240	11

Fig. 42 : exemple illustrant l'inactivation enzymatique au cours du temps dans les conditions standards de préparation.

Nous avons cherché des conditions qui assurent une meilleure conservation de l'enzyme.

Nous avons stocké plusieurs fractions actives à des températures de + 4°C, - 20°C et - 80°C en présence de glycérol ou d'éthylène glycol (Fig. 43).

	% d'activité								
	+ 4°C			- 20°C			- 80°C		
Glycérol 30%	100	49	15	100	49,9	24,4	100	42,2	16,4
Ethylène glycol 30%	100	51	12	100	43,3	14,5	100	38,9	10,9
Temps	jour1	jour2	jour3	jour1	2mois	4mois	jour1	2mois	4mois

Fig. 43 : inactivation de l'enzyme au cours du temps à différentes températures en présence de glycérol ou d'éthylène glycol.

D'une façon générale, les risques de déstabilisation sont moindres aux basses températures pour la majorité des enzymes. Le stockage à très basse température est rarement néfaste.

Le glycérol ou l'éthylène glycol sont des agents stabilisants car ils miment les conditions environnementales intracellulaires et ont des propriétés antigél.

Des résultats obtenus, nous pouvons conclure qu'à 4°C après 3 jours même en présence de glycérol ou d'éthylène glycol, l'activité est fortement diminuée (inactivation de 80%).

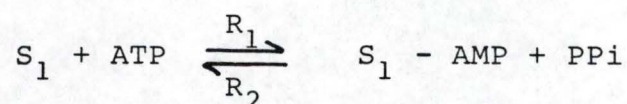
A très basse température (- 20°C, - 80°C) la durée de la conservation de l'activité augmente (environ 50% d'activité conservée après 2 mois).

Les données qui précèdent nous ont permis d'établir des conditions de conservation de l'activité enzymatique. Nous préconisons de stocker les fractions actives en présence de glycérol 30% à - 20°C.

Il serait intéressant de tester la conservation de l'activité enzymatique en présence de glycérol 50% à basse température ainsi qu'à différentes concentrations de glycérol ou d'éthylène glycol combinées.

3.3.2. La cinétique enzymatique

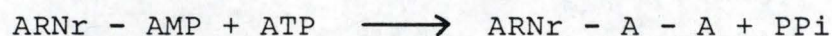
La réaction catalysée par la poly(A)-polymérase est une réaction à deux substrats, que l'on schématise comme suit :



où S_1 est un polyribonucléotide

Ainsi, dans une première étape, dite d'initiation, de l'AMP est lié à l'extrémité 3'OH du S_1 (ARNr).

Mais au cours des étapes suivantes, constituant l'élongation, cet ARNr adénylé produit de la première réaction devient à son tour substrat de la réaction catalysée par la poly(A)-polymérase.



où A symbolise AMP.

Notre méthode de mesure de l'activité enzymatique ne nous permet pas de distinguer les différentes étapes. En effet, nous mesurons la radioactivité c'est-à-dire l'incorporation d'AMP radioactif dans l'ARNr dont la queue de poly(A) est présente à différents stades de synthèse.

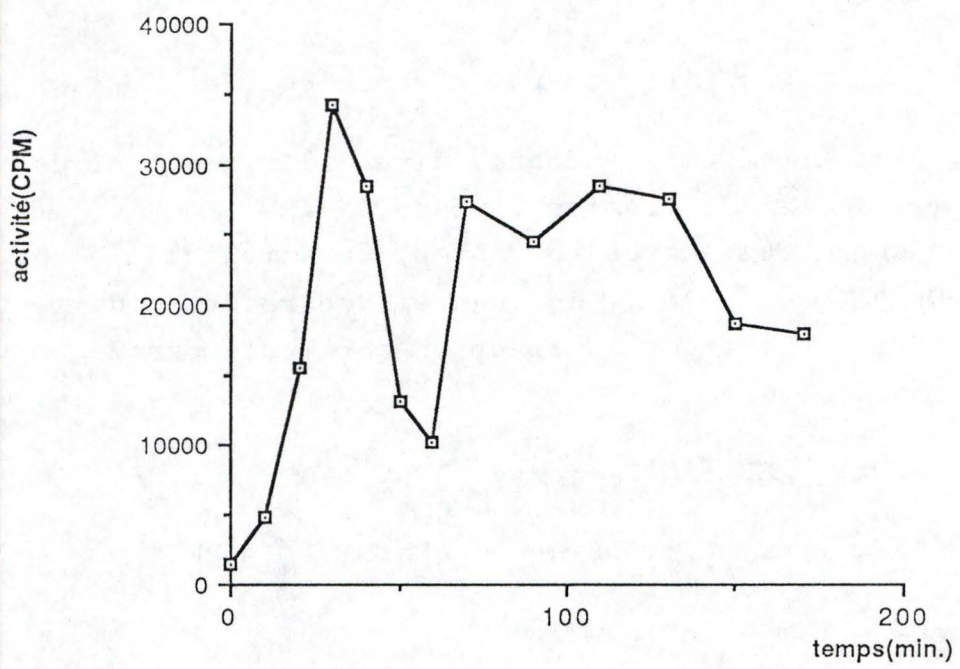


Fig 44: évolution de l'activité en fonction du temps.

Les réactions d'initiation et d'élongation peuvent répondre différemment à des variations de concentration en substrat (ARN et ATP) ou en enzyme (Edmonds, 1982). Par conséquent, le graphe de la vitesse de réaction que nous établissons en fonction de la concentration en ARNr nous permettra d'évaluer la cinétique d'un phénomène global d'incorporation d'AMP dans l'ARN.

Ce graphe ne nous permet pas de tirer des conclusions quant à la cinétique des réactions d'initiation et d'élongation.

Soulignons que l'étude systématique et approfondie de la cinétique enzymatique ne rentre pas dans le cadre de notre travail.

A. Evolution de l'activité en fonction du temps

L'activité (nombre de μ moles de produits formées) (Fig. 44) augmente en fonction du temps pendant 30 minutes environ (valeur retenue comme temps d'incubation d'un test).

Cette augmentation est suivie d'une brutale diminution de l'activité enzymatique pendant 20 à 30' puis cette activité réaugmente.

Pour ce qui concerne cette dernière augmentation d'activité, nous ne trouvons pas d'explication plausible.

Quant à la chute d'activité après 30', nous émettons plusieurs hypothèses.

Selon la première, la réaction catalysée par la poly(A)-polymérase serait réversible.

Avromova et ses collaborateurs (Avramova et al., 1980) proposent que la poly(A)-polymérase purifiée à partir de cellules tumorales serait capable de catalyser la dégradation de la queue de poly(A) en présence d'une accumulation de pyrophosphate inorganique.

De manière à tester cette hypothèse, il faudrait mesurer l'effet d'un apport de différentes quantités de pyrophosphate dans le mélange réactionnel après 20' d'incubation.

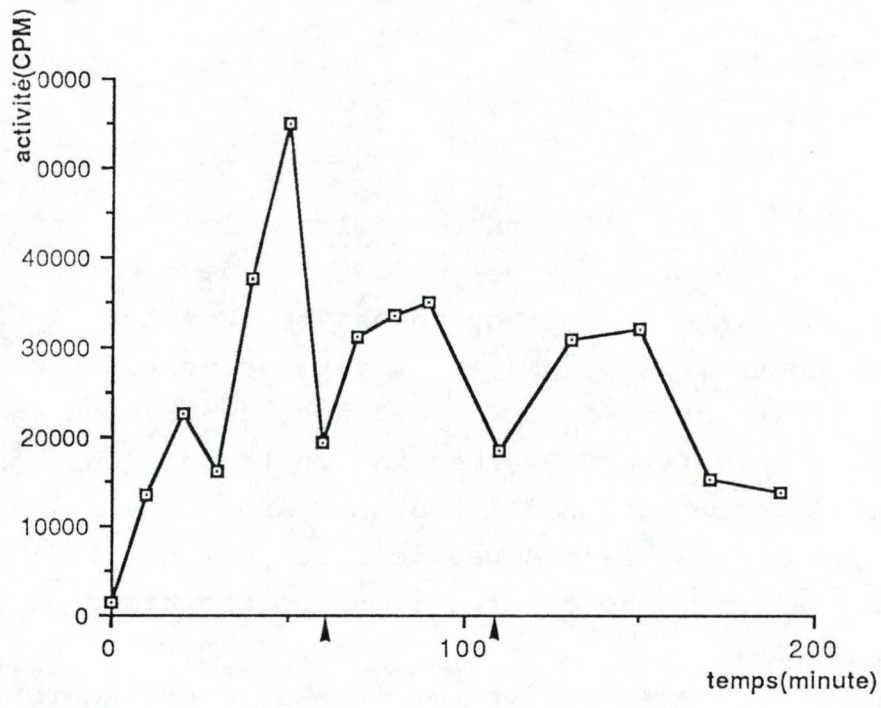


Fig 45: évolution de l'activité en fonction du temps avec ajout d'ATP (▲)

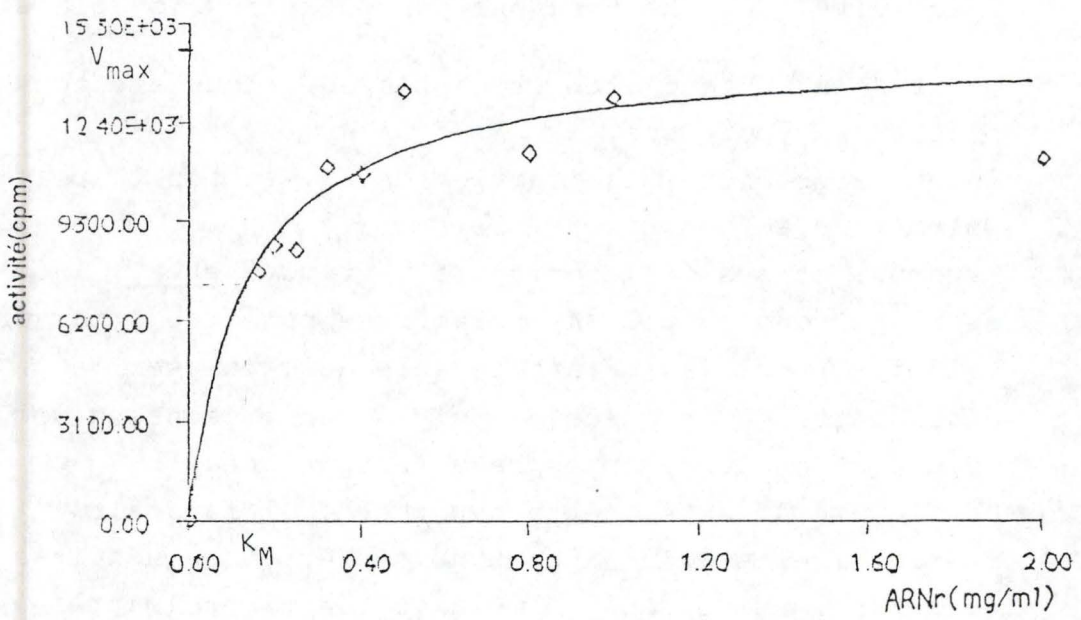


Fig 46 : évolution de l'activité en fonction de la concentration en substrat ARNr.

La seconde hypothèse suggère que la baisse de radioactivité incorporée serait due à une diminution de la quantité d'ATP (substrat) disponible, la concentration en substrat deviendrait dès lors un facteur limitant.

Pour tester cette hypothèse, nous avons ajouté une quantité d'ATP égale à celle de départ dans le mélange réactionnel, ceci après un temps d'incubation de 60' et de 110' (Fig. 45).

Avant l'addition d'ATP, on observe une diminution de la radioactivité incorporée. Dès que l'on ajoute de l'ATP, la radioactivité incorporée réaugmente pour une durée de temps limitée à 20'.

Nous en concluons qu'après 30' de réaction, la concentration en ATP devient un facteur limitant dans le milieu réactionnel.

Dans une troisième hypothèse, la chute de radioactivité incorporée serait expliquée par l'action de nucléases (présentes dans la fraction active) dégradant la queue de poly(A).

B. Evolution de l'activité en fonction de la concentration en substrat ARNr.

Dans les conditions de saturation en ATP, nous avons mesuré l'activité en fonction de la concentration en ARNr (Fig. 46).

La cinétique du phénomène global d'incorporation d'AMP semble être du type Michaelis-Mentem.

Un programme implémentant l'algorithme de Levenberg-Marquardt a été utilisé pour ajuster l'équation de Michaelis-Mentem aux valeurs expérimentales par la méthode des moindres carrés non-linéaires.

Rappelons que la vitesse de la réaction est liée à la concentration en substrat par la relation suivante :

$$v = V_{\max} \frac{S}{S + K_M}$$

où v = la vitesse de la réaction

V_{\max} = la vitesse maximum

S = la concentration en substrat

K_M = la constante de Michaelis-Mentem

Dans ce graphique (Fig. 46) v correspond à l'activité exprimant les CPM mesurés dans le précipité après 30' d'incubation.

Soulignons que l'activité est toujours exprimée en CPM.

La conversion en nombre d'unités enzymatiques (où 1 unité enzymatique correspond à l'incorporation en 30' d'1 nmole d'AMP (à partir d'ATP) dans le matériel précipité au TCA) a été réalisée dans le tableau d'activité spécifique (Fig. 37).

V_{\max} est évalué à 14.000 CPM

K_M est évalué à 0,13 mg/ml d'ARNr

D'après cette estimation, l'activité atteinte lorsque la concentration en ARNr est de 0.5 mg/ml serait proche bien qu'inférieure à l'activité maximale.

Pour obtenir une plus grande précision dans l'estimation des paramètres, il aurait été nécessaire de mesurer l'activité pour des concentrations en substrats inférieures à 0,16 mg/ml.

Dans des expériences futures, pour confirmer les valeurs de K_M et de V_m , il serait nécessaire de réaliser des réplicats pour des concentrations en ARN avoisinant le K_M et d'autres concentrations en ARN pour lesquelles la vitesse est moindre.

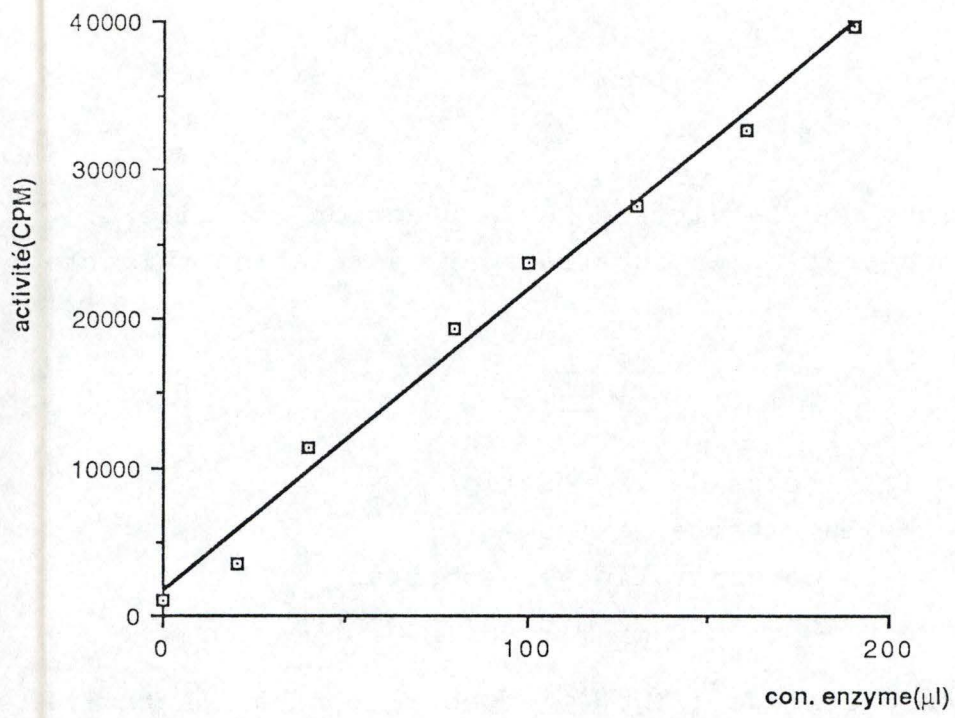


Fig.47 : évolution de l'activité en fonction de la concentration en enzyme.

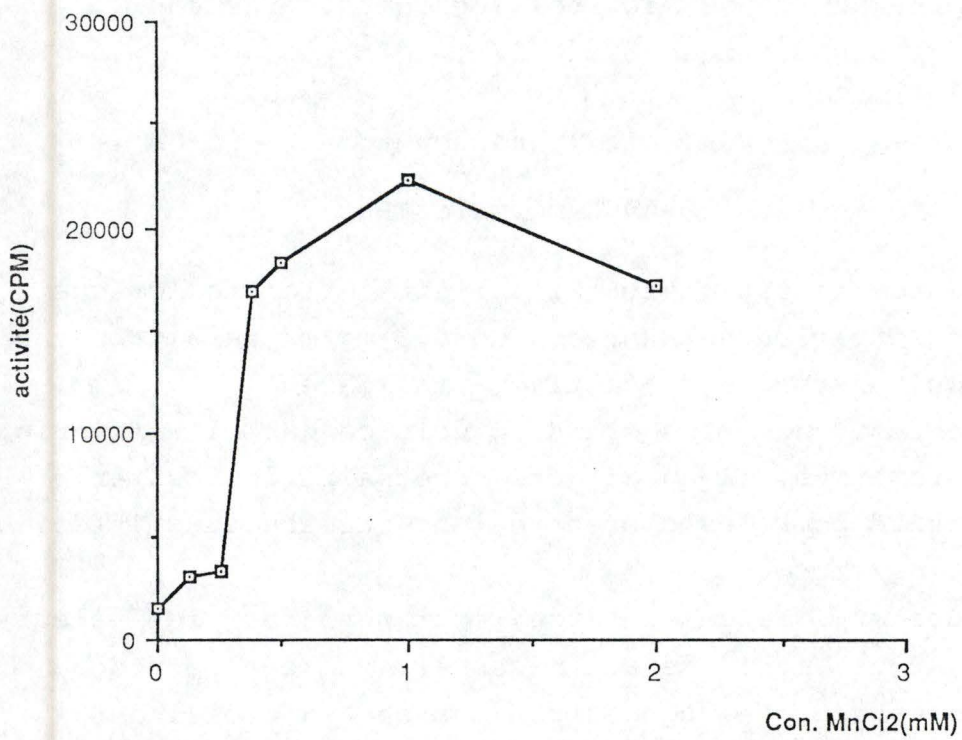


Fig.48 : évolution de l'activité en fonction de la concentration en $MnCl_2$.

3.3.3. Activité en fonction de la concentration en enzyme

Dans les conditions de saturation en substrat (ATP = 0,5 mM; ARN = 1 mg/ml) l'incorporation d'AMP est proportionnelle au volume de la fraction active utilisée, et, donc à la concentration en enzyme (Fig. 47).

3.3.4. Recherches des optima

A. Influence des ions bivalents : Mg^{2+} , Mn^{2+}

La réaction de polyadénylation est dépendante de la présence d'ions bivalents Mn^{2+} ou Mg^{2+} .

Ainsi, nous obtenons une incorporation optimale d'AMP (Fig. 48) pour une concentration en $MnCl_2$ égale à 1 mM.

D'autre part, en présence de $MgCl_2$, on observe une incorporation optimale d'AMP (Fig. 49) pour une concentration en $MgCl_2$ égale à 2 mM.

La valeur optimale pour $MgCl_2$ représente 50% de l'activité optimale mesurée en présence de $MnCl_2$.

D'après plusieurs auteurs (Edmond, 1983; Rose et Jacob, 1977) la concentration optimale en cations bivalents est liée à celle de la concentration en ATP.

De manière à pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus précédemment par les auteurs (Fig. 21).

sur les poly(A)-polymérase de levure, nous avons utilisé les mêmes concentrations en ATP soit 0,5 mM

	optimum Mn^{2+}	optimum Mg^{2+}	$\frac{\text{act. opt. } Mg^{2+}}{\text{act. opt. } Mn^{2+}}$
			en %
extrait de levure (Haff et Keller 75)			
activité pic I	0,5 mM	proche 1 mM	10%
activité pic II	2,0 mM	proche 1 mM	50%
ribosome de levure (TWV et Bretthauer 1971)			
une activité	1,0 mM	10 mM	80%

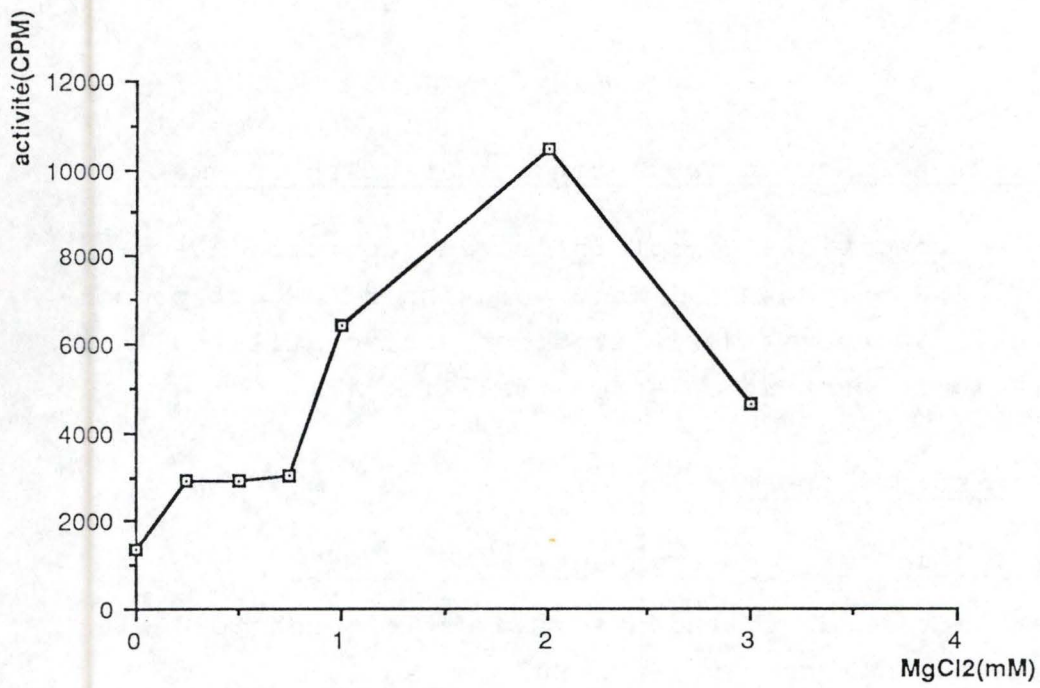


Fig.49 : évolution de l'activité en fonction de la concentration en $MgCl_2$

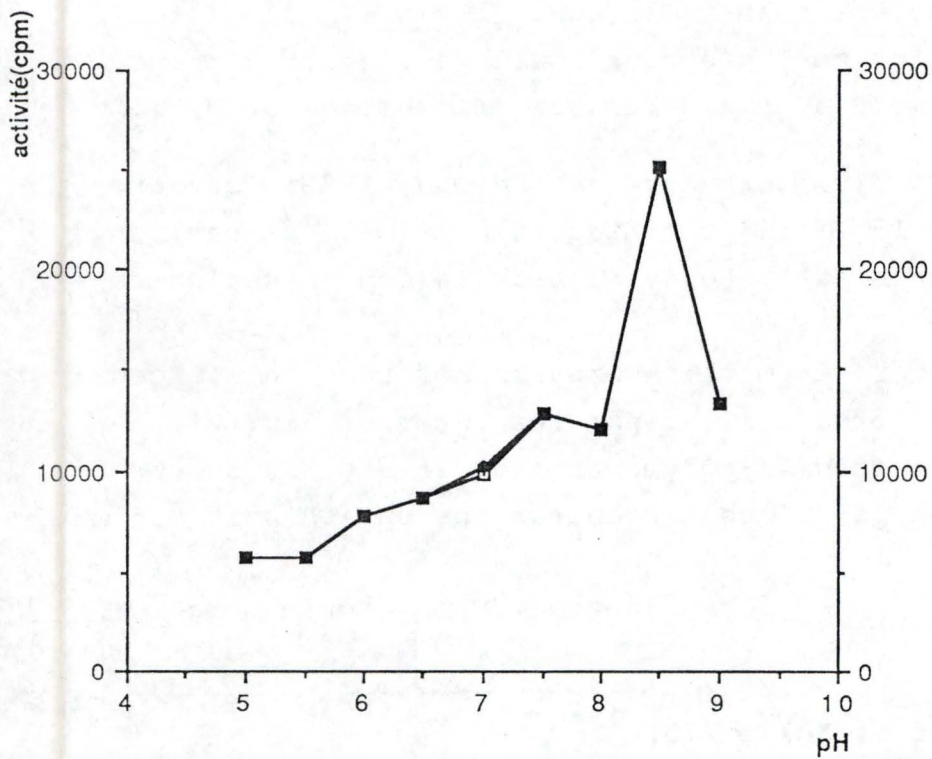


Fig.50 : évolution de l'activité en fonction du pH.

On s'aperçoit que nos résultats ne s'accordent que partiellement avec ceux proposés par les auteurs. En fait, les méthodes de purification de l'enzyme ainsi que la source enzymatique sont différentes dans les 2 travaux de références concernant la levure.

Les conditions de préparation que nous avons mises au point sont également différentes.

Aussi, les différences d'exigences en cations bivalents que nous venons d'évoquer pourraient être dues d'une part aux différentes poly(A)-polymérases qui ont fait l'objet de ces travaux, d'autre part à la méthode de purification propre à chaque protocole.

Soulignons que Haff et Keller suggèrent l'existence de 3 poly(A)-polymérases chez la levure.

De même, chez d'autres organismes, plusieurs types de poly(A)-polymérase ont été isolées.

Ces polymérases ont été classifiées notamment sur base de leur spécificité pour des cations bivalents.

Il semble pourtant que ce critère de classification soit discutable, les exigences en cations bivalents étant variables en fonction de la concentration en ATP, du type d'amorce, du mode de préparation (Edmonds 1982; Rose et Jacob, 1977).

Ainsi, par exemple, on a pu montrer que pour une même enzyme, à savoir la poly(A)-polymérase nucléaire liée à la chromatine, il suffisait de la libérer de la chromatine pour que son exigence ionique change et devienne identique à celle de la poly(A)-polymérase libre (Mn^{2+}).

B. Influence du pH

L'influence du pH sur l'incorporation d'AMP est mesurée dans du tampon phosphate 50 mM dans une gamme de pH allant de 5 à 7 et dans du tampon Tris 50 mM dans une gamme de pH de 7 à 9.

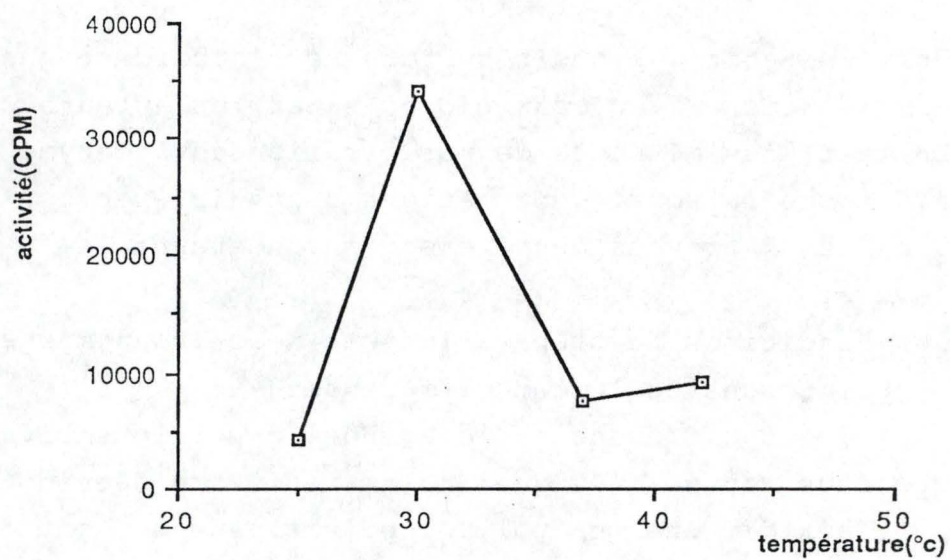


Fig.51: évolution de l' activité en fonction de la température.

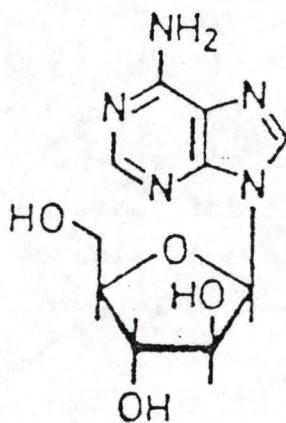


Fig.52 : Ara-ATP (adénine-9- β -D- arabino-furanoside).

Le graphique (Fig. 50) nous montre que le pH est optimum à 8,5.

Il est à noter que chez divers organismes, les poly(A)-polymérase sont actives dans une gamme de pH comprise entre 7 et 9.

D'après les données de Haff et Keller, la valeur de pH 8,5 est aussi optimale pour une poly(A)-polymérase de levure.

C'est cette valeur qui nous a servi pour la recherche d'une activité enzymatique.

C. Influence de la température

La figure 51 montre l'influence de la température sur l'incorporation d'AMP. La température optimale est située à 30°C; c'est à cette température que la levure se multiplie.

3.3.5. Effet de la concentration en Ara-ATP

L'Ara-ATP (9- β -D arabinofuranosyladénine triphosphate) (Fig. 52) analogue structurel de l'ATP, pourrait également être son analogue fonctionnel et inhiber des réactions nécessitant l'ATP.

Les travaux de Rose et Jacob (1978) sur les noyaux de foie de rat (Rose et Jacob, 1978) montrent que l'Ara-ATP inhibe la poly(A)-polymérase nucléaire libre et celle liée à la chromatine.

D'après leurs résultats, une inhibition de 50% de l'activité de la poly(A)-polymérase liée à la chromatine s'observe pour une concentration en Ara-ATP de 17 ug/ml alors que la concentration de 120 ug/ml provoque une inhibition comparable de l'activité de la poly(A)-polymérase libre.

En outre, à des concentrations aussi élevées que 120 ug/ml, l'Ara-ATP a un effet négligeable sur l'ARN polymérase. Cette sélectivité de l'Ara-ATP pour la poly(A)-polymérase la différencie d'un autre inhibiteur cité dans la littérature, le 3'dATP (Edmonds, 1983).

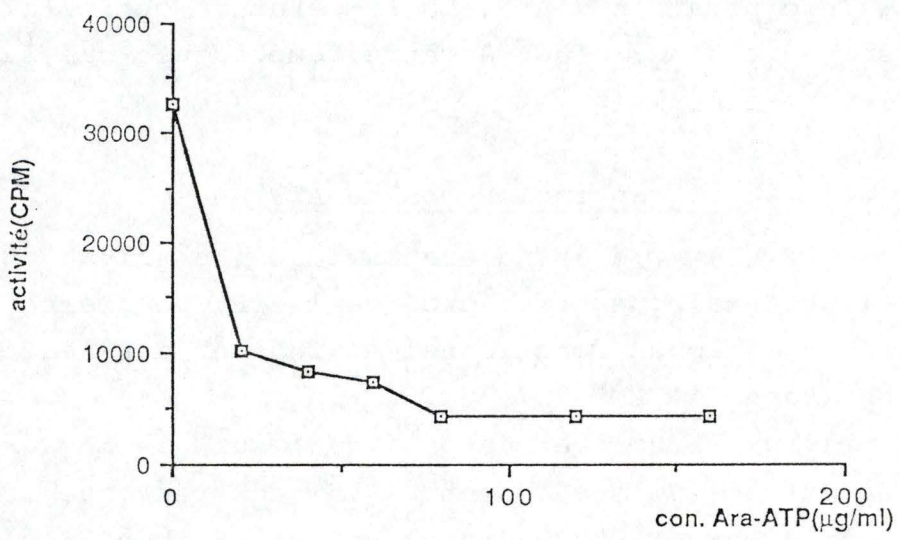


Fig. 53 : évolution de l'activité en fonction de la concentration en Ara-ATP.

Nous avons donc choisi de tester l'effet de l'Ara-ATP sur l'activité poly(A)-polymérasique que nous avons mise en évidence.

La figure 53 nous montre la variation d'incorporation d'AMP en fonction de la concentration en Ara-ATP.

Nous observons une inhibition de \pm 70% de l'incorporation d'AMP pour une concentration en Ara-ATP égale à 20 μ g/ml.

Dans la continuation du travail, la détermination du type d'inhibition (inhibiteur compétitif ou non compétitif) pourrait se faire selon deux méthodes : celle de Lineweaver-Burk d'une part et de Dixon d'autre part.

Conclusions et perspectives

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La présence d'une queue de poly(A) à l'extrémité 3' de la plupart des ARNm d'eucaryotes est un argument en faveur d'une fonction importante de cette structure dans la régulation de l'expression génétique.

A l'heure actuelle, les rôles qui sont attribués à la queue de poly(A) et le mécanisme de polyadénylation ne sont pas encore clairement connus.

Notre travail s'inscrit dans une perspective de clonage du (des) gène(s) de la (des) poly(A)-polymérase(s) chez la levure S. cerevisiae.

La première étape, essentielle à cette approche génétique consiste à purifier la (les) enzyme(s) catalysant la réaction de polyadénylation et de la (les) caractériser biochimiquement.

Pour ce faire, nous avons recherché une activité poly(A)-polymérase dans un surnageant (appelé Sn 65) obtenu par centrifugations successives d'un lysat de levure.

N'ayant pu mettre en évidence une activité dans le surnageant, nous l'avons appliqué sur une colonne échangeuse de cations (CM-sépharose).

Nous avons détecté une activité poly(A)-polymérasique dans les fractions éluées à une force ionique correspondant à une concentration en NaCl comprise entre 200 et 300 mM.

Nous avons montré par séparation par électrophorèse en gel agarose/formaldéhyde que l'ARN ribosomique incubé dans un mélange réactionnel en présence de fractions actives était le substrat d'une incorporation significative d'AMP.

Nous avons caractérisé l'activité enzymatique mise en évidence après chromatographie sur échangeuse de cations.

L'activité enzymatique se traduit par une augmentation de l'incorporation d'AMP au cours du temps (au moins pendant les 30 premières minutes).

La pH optimum de l'enzyme est de 8,5.

L'activité enzymatique est optimale à une température de 30°C.

La présence de cations bivalents est essentielle, la poly(A)-polymérase marque une nette préférence pour le manganèse avec un maximum d'activité pour une concentration de 1 mM.

Le phénomène global d'incorporation d'AMP sur l'ARNr catalysée par l'enzyme que nous avons isolée semble suivre une cinétique de type Michaelis-Menten.

Cette activité enzymatique est inhibée de manière radicale en présence d'un analogue de l'ATP, l'Ara-ATP décrit dans la littérature comme inhibiteur spécifique de la poly(A)-polymérase. Dans la continuation de ce travail, il faudrait poursuivre la purification de l'enzyme : une chromatographie d'affinité, par exemple l'ATP-sépharose pourrait accroître l'activité spécifique.

Une fois l'enzyme purifiée, le gène de la poly(A)-polymérase serait cloné.

La stratégie de clonage envisagée pourra être la suivante :

le microséquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine purifiée permettra d'en déduire une ou plusieurs séquences oligonucléotidique(s).

Ces oligonucléotides marqués terminalement serviront au criblage d'une banque génomique de levure.

De cette façon, un clone portant l'entièreté du gène de la poly(A)-polymérase sera isolé à partir de la banque génomique. On déterminera alors si le gène, c'est-à-dire la fonction Poly(A)-polymérase est essentielle ou non à la viabilité de la levure.

Un mutant (conditionnel si le gène est essentiel) de levure pour le gène de la poly(A)-polymérase sera créé et comparé à la souche isogénique sauvage.

Ainsi, on pourra identifier les étapes de l'expression génétique affectées par l'absence d'une activité poly(A)-polymérase.

Bibliographie

V BIBLIOGRAPHIE

ADAM, S. A., NAKAGAWA, T., SWANSON, M.S., WOODRUFF, T.K.
DREYFUSS, G.(1986)
mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and
sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus
sequence Molecular and Cellular Biology, 6: 2932-
2943

AVRAMOVA, Z.V., HADJIOLOV, A.A., MILCHEV, G.I.(1980)
Primer specificity of ribosome-associated poly(A)-
polymerase from *Ehrlich* ascites tumour cells.
Eur. J. Biochem., 103: 109-115

AVRAMOVA, Z.V., MILCHEV, G.I., HADJIOLOV, A.A.(1980)
Two distinct poly(A)-polymérasés isolated from the
cytoplasm of *Ehrlich* ascites tumour cells.
Eur. J. Biochem., 103: 99-107

BENNETZEN, J.C., HALL, B.D.(1982)
The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene
for alcohol deshydrogenase I.
The journal of biological chemistry, 257: 3018-3025

BERNSTEIN, P, PELTZ, S.W., ROSS, J.(1989)
The poly(A)- poly(A)-binding protein complex is a major
determinant of mRNA stability in vitro.
Molecular and Cellular Biology, 9: 659-670

BRADFORD, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of μ g
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye
binding.
Analytical biochemistry, 72: 248-254

BRAWERMAN, G.(1987)
Determinant of messenger RNA stability.
Cell, 48: 5-6

BROWN, T.A.(1989)
Genetics, a molecular approach
Van Nostrand Reinhold (International)
Eur. J. Biochem, 176: 521-526

CAMPBELL, I., DUFFUS, J.H. (1988)
Yeast, a practical approach.
Rickwood, D., Hames, B.D. (ed)
Practical Approach Series
IRL PRESS

CHRISTOFORI, G., KELLER, W. (1988)
3' cleavage and polyadenylation of mRNA precursors in vitro
requires a poly(A)-polymerase, a cleavage factor and a Sn RNP
Cell, 54: 875-889

DARNELL, L., LODISH, B., BALTIMORE (1986)
Molecular cell biology
Scientific American Books.

DRUMMOND, D.R., ARMSTRONG, J., COLMAN, A. (1985)
The effect of capping and polyadenylation on the stability,
movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus*
oocytes.
Nucleic Acids Research, 13: 7375-7391

EDMONDS, M., WINTERS, M.A. (1973)
A poly(A)-polymerase from calf thymus.
The Journal of Biological Chemistry, 248: 4756-4762

EDMONDS, M. (1982)
Poly(A) adding enzymes.
The enzymes 15: 218-240
Academic Press. Inc.

FRIEDMAN, D.I., IMPERIALE, M.J. (1987)
RNA 3' end formation in the control of gene expression.
Ann. Rev. Genet., 21: 453-488

GALILI, G., KAWATA, E.E., SMITH, L.D., LARKINS, B.A. (1988)
Role of the 3' poly(A) sequence in translational regulation of
mRNAs in *Xenopus laevis* oocytes.
The Journal of Biological Chemistry, 263: 5764-5770

GIL, A., PROUDFOOT, N.J. (1987)
Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA
are required for efficient rabbit beta-globin mRNA 3' end
formation.
Cell, 49: 398-400

GROSSI de SA, M.F., STANDART, N., MARTINS de SA, C., AKHAYAT, O., HUESCA, M., SCHERRER, K. (1988)

The poly(A)-binding protein facilitates *in vitro* translation of poly(A)-rich mRNA.

Eur. J. Biochem, 176: 521-526

HAFF, L.A., KELLER, E.B. (1973)

Two distinct poly(A)-polymerases in yeast nuclei.

Biochemical and Biophysical Research communications, 3: 704-710

HAFF, L.A., KELLER, E.B. (1975)

The polyadenylate polymerases from yeast.

The Journal of Biological Chemistry, 250: 1838-1846

HASHIMOTO, C., STEITZ, J. (1986)

A small nuclear ribonucleoprotein associates with the AAUAAA polyadenylation signal *in vitro*.

Cell, 45: 581-591

HAYES et COL. (1969)

J. Biol. Chem., 244: 6636-6644

HIGGS, D.R., GOODBURN, E.Y., LAMB, J., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J. (1983)

alpha-thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation.

Nature, 306: 398-404

HUESCA, M., SCHERRER, K. (1988)

The poly(A)-binding protein facilitates *in vitro* translation of poly(A)-rich mRNA.

Eur. J. Biochem, 176: 521-526

HUEZ, G., MARBAIX, G., HUBERT, E., LECLERCQ, M., NUDEL, U., SOREQ, M., SALOMON, R., LEBLEU, B., REVEL, M., LITTHAUER, U.Z. (1974)

Role of the polyadenylate segment in the translation of globin messenger

RNA in *Xenopus* oocytes.

Proc. Natl. Acad. sci. USA, 71: 3143-3146.

HUEZ, D., MARBAIX, G., GALLWITZ, D., WEINBERG, E., DEVOS, R., HUBERT, E., CLEUTER, Y. (1978)

Functional stabilisation of HeLa cell histone messenger RNAs injected into *Xenopus* oocytes by 3'-OH polyadenylation.

Nature, 271: 572-573

HUEZ,G., BRUCK, C., CLEUTER, Y.(1981)

Translational stability of native and deadenylated rabbit globin mRNA

injected into HeLa cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 908-911

JACOB, S.T., TERNS, M.P.(1989)

Role of poly(A) -polymérase in the cleavage and polyadenylation of mRNA precursor.

Molecular and Cellular Biology,9: 1435-1444.

KORNBERG, R.D., SACHS,A.B., BOND, M.W.(1986)

A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-

binding proteins: domain structure and expression.

Cell, 45: 827-835

KURLAND, C.G., HARDY, S.J.S.(1966)

The polynucleotide product of poly(A)-polymerase from *Escherichia coli*.

Biochemistry, 5:3668-3670

LEWIN,B.(1987)

GENES III

Wiley, J.& Sons, Inc. New-York

LIEBER,T., ANGERER, L.M., ANGERER, R.C., CHILDS,G.(1988)

A histone H1 protein in sea urchins is encoded by a poly(A) mRNA

Proc. Natl. Acad.Sci., 85: 4123-4127

MANLEY J.L., YU,H., RYNER,L.(1985)

RNAsequence containing hexanucleotide AAUAAA directs efficient mRNA

polyadenylation *in vitro*.

Molecular and Cellular Biology, 5: 373-379

MANLEY,J.C., RYNER,L.C.(1986)

Requirements for accurate and efficient mRNA3'end cleavage and polyadenylation of a simian virus 40early pré-RNA *in vitro*

Molecular and Cellulqr Biology,6:2317-2327

MANLEY, J.L., RYNER, L.C., TAKAGAKI,Y.(1988)

Separation and characterisation of a poly(A) polymerase and a cleavage/

specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation.

Cell, 52: 731-742

MANROW, R.E., SHAPIRO, R.A., HERRICK, D., STEEL, L.F., BLINDER, D., JACOBSON, A. (1987) Regulation of mRNA stability and the poly(A) problem
in *Dictyostelium discoideum*.
Developmental Genetics, 9:403-419

MARGULIS, L., SCHWARTZ, K.V. (1988)
Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth.
Foreword by Stephen Jay Gould

McLAUCHLAN, J., GAFFNEY, D., WHITTON, J.L., CLEMENTS, J.K. (1985)
The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini.
Nucleic Acids Research, 13:1347-1368

McDEVITT, M.A., GILMARTIN, G.M., REEVES, W.H., NEVINS, J.R. (1988)
Multiple factors are required for poly(A) addition to a mRNA 3' end.
Genes and Development, 2:588-597

MONTELL, C., FISHER, E.F., CARUTHERS, M.H., BERK, A.J. (1983)
Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in
mRNA 3' consensus sequence AAUAAA.
Nature, 305: 600-605

NEVINS, J.R., JOKLIK, W.K. (1977)
Isolation and partial characterization of the poly(A) polymerases from HeLa cells infected with vaccinia virus.
The Journal of Biological Chemistry, 252:6939-6945

NUDEL, U., SOREQ, H., LITTAUER, U.Z., MARBAIX, G., HUEZ, G., LECLERCQ, M., HUBERT, E., CHANTRENNE, H. (1976)
Globin mRNA species containing poly(A) segments of different lengths,
their functional stability in *Xenopus* oocytes.
Eur. J. of Biochem., 64: 115

PANDEY, N.B., MARZLUFF, W.F. (1987)
The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability.
Molecular and Cellular Biology, 7:4557-4559

PLATT, T., RUOHOLA, H., BAKER, S.M., PARKER, R. (1988)
Orientation-dependent function of short CYC1 DNA fragment in directing mRNA 3' end formation in yeast.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5041-5045

PLATT, T., BUTLER, J.S. (1988)
RNA processing generates the mature 3' end of yeast CYC1 messenger RNA in vitro
Science, 242: 1270-1274

PROUDFOOT, N.J., BROWNLEE, G.G. (1976)
3' non-coding region sequences in eucaryotic messenger RNA.
Nature, 263: 211-214

PROUDFOOT, N., WHITELAW, E. (1986)
alpha-Thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human alpha2 globin gene.
The EMBO Journal, 5: 2915-2922

REES, A.R., STERNBERG, M.J.E. (1984)
From Cells to Atoms: an illustrated introduction to molecular biology.
Blackwell Scientific Publications

ROSE, K.M., JACOB, S.T. (1976)
Nuclear poly(A) polymerase from rat liver and hepatoma.
Eur. J. Biochem., 67: 11-21

ROSE, K.M., JACOB, S.T. (1978)
Selective inhibition of RNA polyadenylation by Ara-ATP *in vitro*: a possible mechanism for antiviral action of Ara-A.
Bioch. and Biophysical Research Communications, 81, 1418-1424

ROSE, K.M., JACOB, M.R. (1983)
Poly(A)-polymerase from eukaryotes,
Enzymes of Nucleic Acid Synthesis and Modification, 2: 135-157

SADOFSKY, M., CONNELLY, S., MANLEY, J.C., ALWINE, J.C. (1985)
Identification of a sequence element on the 3' side of AAUAAA which is necessary for simian virus 40 late mRNA 3' end processing.
Molecular and Cellular Biology, 5: 2713-2719

SASTRE ,L., SEBASTIAN,J.(1981)

Purification and properties of a polyadenylate polymerase from *Artemia* dormant embryos.

Biochimica et Biophysica Acta, 661:54-62

SAWICKI,S.G., SELINEK,W., DARNELL,J.E.(1977)

3' -terminal addition to HeLa cell nuclear and cytoplasmic poly(A).

J. Mol. Biol., 113:219-235

SLEGERS,H., De HERDT,E., PIOT,E., KONDO,M.(1982)

The 38000-Mr poly(A)-binding protein of non-polysomal messenger

ribonucléoproteins of cryptobiotic gastrulae of *Artemia salina*.

Eur. J. Biochem., 122:453-460

SLEGERS,H., De HERDT, E., THOEN, C., VAN HOVE,L., ROGGEN, E.(1984)

Identification and properties of the 38000-Mr poly(A)-binding protein of non-polysomal messenger ribonucleoproteins of cryptobiotic gastrulae of *Artemia salina*

Eur. J. Biochem., 139:155-162

SLEGERS,H., H.,ROGGEN, E.(1985)

Isolation and characterization of cytoplasmic poly(A)-polymerase from cryptobiotic gastrulae of *Artemia salina*.

Eur. J. Biochem.,147: 225-231

TIBOR,A.(1988)

Projet I.R.S.I.A.

TSIAPALIS,C.M.,DORSON,J.W., BOLLUM, F.J.(1975)

Purification of terminal riboadenylate transferase from calf thymus gland.

The Journal of Biochemistry,250:4486-4496

TSIAPALIS,C.M(1987)

Regulation of mRNA polyadenylation-deadenylation

Molecular Biology Reports,12:291-298

TWU, J.S., BRETTHAUER,R.K.(1970)

Properties of a polyriboadenylate polymerase isolated from yeast ribosomes.

Biochemistry, 10:1576-1582

TWU, J.S., BRETTHAUER, R.K. (1970)

Properties of a polyribadenylate polymerase isolated from yeast ribosomes.

Biochemistry, 10:1576-1582

VANDENHAUTE (1980)

Biologie moléculaire de la machinerie de synthèse protéique.

Rev. Quest. Sci., 151:158-161, 488-489.

WICKENS, M., STEPHENSEN, P. (1984)

Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants

prevent mRNA 3' end formation.

Science, 226:1045-1051

ZARET, K.S., SHERMAN, F. (1982)

DNA sequence required for efficient transcription terminator in yeast.

Cell, 28:563-573

ZARKOWER, D., WICKENS, M. (1987)

Formation of mRNA 3' termini stability and dissociation of a complex

involving the AAUAAA sequence.

The EMBO Journal, 6:4185-4192

ZEEVE, M., NEVINS, J.R., DARNELL, J.E. (1982)

Newly formed mRNA lacking poly(A) enters the cytoplasm and the polyribosomes but has a shorter half-life in the absence of poly(A).

Mol. Cell. Biol., 2:517