

Résumé

La ribonucléase J (RNase J) est la seule RNase qui possède à la fois une activité endonucléolytique et une activité exonucléolytique chez les bactéries. Les RNases de la famille J sont largement distribuées dans le monde bactérien et les archées; plus de la moitié des génomes procaryotiques séquencés contiennent des orthologues de la RNase J, mais elle n'est pas présente chez *E. coli*. En revanche, des orthologues de la RNase J existent chez les plantes. Au cours de ces trois dernières années j'ai concentré mes efforts sur l'étude de la RNase J, que nous avons pu identifier chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (CrRNase J).

J'ai surproduit et purifié différentes formes de l'enzyme. La surproduction des constructions basées sur l'ADNc de *C. reinhardtii* a abouti à de mauvais rendements en protéines solubles dus à la forte présence de corps d'inclusion. Tous les essais n'ont pas permis de résoudre les problèmes liés aux corps d'inclusions. Nous avons alors décidé de changer de stratégie et d'effectuer la purification dans des conditions dénaturantes, en présence d'urée. J'ai enfin pu tester les protéines dans un test d'activité avec, comme substrat, la séquence de l'ARN "leader" de *thrS*, qui code la thréonine ARNt synthétase. Cet ARN permet de détecter aussi bien l'activité 5' exonucléolytique (avec l'extrémité 5' monophosphorylée) que l'activité endonucléolytique (présence d'un site spécifique). Nous avons alors mis en évidence une activité endonucléolytique pour les différentes constructions de la CrRNase J, mais une activité 5'-3'exonucléolytique très faible.

Une faible activité exonucléolytique pourrait être due à une renaturation non optimale. Pour tester cet argument nous avons réalisé trois nouvelles constructions, cette fois-ci en optimisant l'usage des codons pour *E. coli* et *B. subtilis*, qui est très différent par rapport aux plantes. Les résultats des tests d'activité avec ces protéines purifiées étaient quasi-identiques à ceux obtenus avec les protéines rénatuées, i.e. une activité endo- mais également une très faible activité 5' exonucléolytique comparée à celle de BsRNase J1.

Pour confirmer ce résultat, nous avons testé si la CrRNase J pouvait compenser la délétion des RNases J de *B. subtilis* (mutants $\Delta J1$, $\Delta J2$ ou $\Delta J1J2$). Nous avons suivi la croissance de ces souches en LB (Luria-Bertani) et en SMS (milieu minimum) et avons constaté que la CrRNase J n'était pas capable de compenser la perte de la RNase J1 de *B. subtilis*. L'absence de complémentation de la RNase J1 n'indique pas une absence de l'activité 5' exonucléolytique de la Cr RNase J. Nous avons suivi la croissance de ces souches en LB (Luria-Bertani) et en SMS (milieu défini) et avons constaté que la CrRNase J n'est pas capable de compenser la perte de la RNase J1 de *B. subtilis*. L'absence de complémentation de la RNase J1 n'indique pas une absence d'activité 5' exonucléolytique de la Cr RNase J. Nous avons décidé de tester l'activité 5' exonucléase *in vivo* (chez *B. subtilis*) sur des substrats pour lesquels cette activité a été bien caractérisée (ARNr 16S et *glmS*). En accord avec nos résultats *in vitro*, nous n'avons pas pu observer la moindre activité 5'-3' exonucléolytique pour la RNase J de *Chlamydomonas in vivo*, du moins dans le système hétérologue utilisé ici.

Nous avons aussi entamé des expériences de double hybride dans la levure (Y2H), dans le but d'identifier les partenaires potentiels de la Cr RNaseJ. L'expérience de double hybride dans la levure nous a permis de mettre en évidence des partenaires potentiels pour la Cr RNase J (NDA3, EF3 ou HP4). Nos résultats montrent que même en présence de ces protéines, indépendamment de la nature du nucléotide à l'extrémité 5' ou de la présence d'ions dans le mélange réactionnel, Cr RNase J montre seulement une activité endoribonucléolytique.

Mots clés:

RNase J1, CrRNase J, Endoribonucléase, 5'-3' Exoribonucléase, chloroplastes, dégradation de l'ARNm