



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCE

#### Influence du vieillissement sur l'efficacité de traduction des polysomes de foie de souris en milieu acellulaire

Trussart, Nadine

*Award date:*  
1979

*Awarding institution:*  
Université 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.

*N. Reclinger*

*Vanderkaut*



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX.

NAMUR

FACULTÉ DES SCIENCES

---



**Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
zoologiques  
par**



50 17375/1979/2

FACULTES  
UNIVERSITAIRES  
N.-D. DE LA PAIX  
NAMUR

Bibliothèque



FMB 07/1979/03

Unité de Génétique Moléculaire  
et Physiologie Cellulaire.

**Influence du vieillissement  
sur l'efficiencce de traduction  
des polysomes de foie de souris  
en milieu acellulaire.**

**Nadine  
Trussart**



UBS 8815263

## A B R E V I A T I O N S

ADN : acide déoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomique  
ARNt : ARN de transfert  
ATP : adénosine 5'-triphosphate  
CPM : coups par minute  
D.O. : densité optique  
DOC : déoxycholate de sodium  
GTP : guanosine 5'-triphosphate  
Kev : kilo électron-volts  
nm : nanomètres  
PCA : acide perchlorique  
PEG : polyéthylène glycol  
PMS : post mitochondrial supernatant  
RNase : ribonucléase  
RNP : ribonucléoprotéine  
RPM : révolutions par minute  
TCA : acide trichloracétique  
VSV : vesicular stomatitis virus

REMERCIEMENTS

Au Docteur J. DELCOUR, pour m'avoir initiée de manière rigoureuse, patiente et amicale aux théories et aux techniques de la génétique moléculaire. Je tiens à le remercier également pour son aide, ses conseils et ses encouragements prodigués tout au long de ce travail.

Au Révérend Père ELENS, pour son accueil au Département de Physiologie Cellulaire et de Génétique.

A Madame N. CLAES-RECKINGER, pour m'avoir initiée à la technique du milieu acellulaire, pour sa présence, son aide et sa bonne-humeur dispensées tout au long de ce travail. Un grand merci également pour sa réalisation pratique et sa rédaction.

A Monsieur J. VAN DEN HAUTE, pour ses conseils, ses encouragements et sa présence aux heures tardives. Je tiens aussi à le remercier pour l'intérêt qu'il a accordé à ce travail, notamment dans sa rédaction. *M. JADIN*

A Madame N. LIBION-MANNAERT, qui avec beaucoup de patience et de gentillesse m'a formée aux techniques nécessaires à la réalisation de ce travail.

A Monsieur J. LECHIEN, pour sa disponibilité et sa bonne-humeur. *M. JADIN*

A Mademoiselle R-M. GENICOT ainsi qu'à tous les membres du laboratoire, pour leur intérêt et leur amical soutien.

Aux Professeurs A. BAUCHAU, J. MENGEOT et R. WATTIAUX, pour le libre accès de leurs laboratoires.

A mes parents, et plus particulièrement maman qui m'a aidée à réaliser l'impression de mon travail.

A Pascale, Alain, et Pierre.

A tous ceux que je n'ai pu remercier ici et qui m'ont aidés, de quelque manière que ce soit, à tous un grand merci.

# I N T R O D U C T I O N

## I. LE VIEILLISSEMENT : GENERALITES

## II. LA MACHINERIE DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE "IN VIVO"

### A. Caractéristiques structurelles et fonctionnelles

#### 1. Le ribosome

##### 1.1. Structure

##### 1.2. Synthèse et maturation

##### 1.3. Rôle des différents constituants du ribosome

#### 2. L'ARN messager

##### 2.1. Généralités

##### 2.2. Le poly-A

##### 2.3. Le cap

##### 2.4. Les protéines associées à l'ARNm

##### 2.5. Biosynthèse et maturation

#### 3. L'ARN de transfert

##### 3.1. Généralités

##### 3.2. Biosynthèse des ARNt

### B. Fonctionnement

#### 1. L'aminocyclation

#### 2. L'initiation

#### 3. L'élongation

#### 4. La terminaison

### C. Le polysome, unité de fonction

## III. LA MACHINERIE DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE "IN VITRO" : LES MILIEUX ACELLULAIRES

## IV. BUT DU TRAVAIL



## I N T R O D U C T I O N

### I. LE VIEILLISSEMENT : GENERALITES.

Le vieillissement est actuellement un des phénomènes vers lequel de nombreuses recherches se tournent en vue d'en comprendre les mécanismes. Mais, comment définir le vieillissement ?

La sénescence est une augmentation de la probabilité d'inactivation en relation avec une augmentation de l'âge chronologique.

Si, au niveau des organismes, des organes et des tissus, de multiples descriptions ont été faites, les causes des altérations observées restent mal comprises. Au niveau cellulaire par contre, les cultures in vitro et les progrès de la biologie moléculaire notamment, ont permis de mieux comprendre les mécanismes régulateurs de la croissance, de la différenciation et du vieillissement.

C'est aux protéines et à leur synthèse que nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à cause de la position centrale qu'elles jouent dans le maintien de l'homéostasie. La quantité de protéines à un moment donné dans une cellule, va dépendre de l'équilibre qui existe entre leur synthèse et leur dégradation. Une rupture dans cet équilibre est un évènement possible à étudier au cours du vieillissement.

Mais, avant d'aller plus loin, il nous faut rappeler brièvement le processus de synthèse des protéines. L'information nécessaire à la formation d'une protéine se trouve sous forme codée au niveau des brins d'ADN. Une première étape consiste en la copie d'un des deux brins sous forme d'ARN messager : c'est la transcription. La séquence en nucléotides de l'ARNm "programme" directement l'ordre des acides aminés dans une protéine. On sait que c'est la séquence de trois nucléotides ( un triplet) qui code pour un acide aminé.

Voilà presque vingt ans qu'on sait également, grâce aux travaux de DINTZIS que la synthèse d'un polypeptide commence à son extrémité N-terminale et avance vers l'extrémité C-terminale par addition séquentielle d'acides aminés (DINTZIS, 1961).

Un tournant décisif dans la connaissance du mécanisme de la synthèse protéique fut réalisé quand GILBERT (1963) reconnut que chaque ribosome était le centre de croissance d'une et une seule chaîne polypeptidique. C'est à ce niveau que les molécules d'ARN de transfert étaient supposées apporter l'acide aminé codé par le triplet correspondant du messenger. Une fois cette idée acceptée, le postulat du mouvement de translation du messenger relativement au ribosome suivit de lui-même. Le passage de la séquence en nucléotides de l'ARNm à la séquence en acides aminés dans une protéine est la deuxième étape : c'est la traduction .

A partir de ce moment, les preuves expérimentales du mécanisme de la synthèse protéique s'accumulèrent. On connaît actuellement de façon approfondie le mécanisme et le rôle qu'y jouent les ribosomes. De plus, l'importance des facteurs protéiques et des sources d'énergie est reconnue (WEISSBACH & OCHOA, 1976). Nous y reviendrons en détail dans un paragraphe ultérieur.

Une des théories expliquant le vieillissement au niveau moléculaire est celle d'ORGEL (1963), qui propose que la diminution progressive dans la fidélité de la synthèse protéique pourrait être un des facteurs contribuant à la détérioration cellulaire au cours du temps. Bien que la plupart des erreurs métaboliques soient sans importance, d'autres, notamment celles qui entraîneraient des modifications au niveau des enzymes responsables de la synthèse protéique seraient plus graves. En effet, ces enzymes, par exemple l'ADN polymérase, altérés vont causer de plus en plus d'erreurs, par un effet de feedback positif, conduisant ainsi la cellule vers une limite telle qu'elle ne sera plus capable de fonctionner normalement. C'est ce qu'on appelle la théorie de "l'erreur catastrophe".



Depuis lors, de nombreux travaux ont tenté d'apporter des éléments qui confirmeraient cette théorie. C'est le cas pour les travaux de HOLLIDAY qui ont mis en évidence une perte de fidélité de traduction au cours du vieillissement (HOLLIDAY & TARRANT, 1972). WULF & CUTLER (1974) ont montré également que la thermolabilité de la glucose-6-déshydrogénase augmentait avec l'âge, dans le cerveau et le foie des souris.

On a montré que dans la synthèse de protéines ribosomiques, in vivo, l'incorporation de l'éthionine (acide aminé analogue à la méthionine) augmente au cours du vieillissement (OGRODNIK & al, 1975). Plus récemment, MARIOTTI & RUSCITTO (1977) ont étudié, in vitro, au moyen de microsomes de foie de rat et d'un messager artificiel (poly-U) la synthèse de polyphénylalanine. Ils constatent que le taux de leucine incorporée à la place de la phénylalanine augmente avec l'âge, en accord avec la théorie d'Orgel.

Mais, d'autres travaux montrent le contraire : une étude comparable à la précédente, met en évidence que le taux d'erreur dans la synthèse de polyphénylalanine est plus faible en présence de microsomes de souris âgées (KURTZ, 1975).

Une autre question qui s'est posée à propos de la synthèse protéique et à laquelle nous nous attacherons, est de savoir s'il existe des variations dans le taux de synthèse protéique au cours du vieillissement.

Des observations très diverses ont été faites à ce sujet. Des microsomes d'animaux âgés (MAINWARING, 1969 - BUETOW & GANDHI, 1973 - KURTZ, 1975 - MARIOTTI & RUSCITTO, 1977) provenant de divers tissus, montrent une diminution de leur capacité de traduction in vitro. Au contraire, d'autres expériences in vivo (BEAUCHENE & al, 1970 - DU & al, 1977) et, in vitro, pour l'albumine (CHEN & al, 1973 - OVE & al, 1972) montrent une augmentation de l'incorporation d'acides aminés au cours du vieillissement.

Pour mieux comprendre les observations que nous avons faites à ce sujet, il serait bon de "décortiquer" ce processus complexe qu'est la traduction, et de détailler les éléments principaux qui y interviennent; l'ensemble de ceux-ci est généralement regroupé sous le terme de "machinerie de synthèse protéique".

## II. LA MACHINERIE DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE "IN VIVO"

### A. Caractéristiques structurelles et fonctionnelles.

#### 1. Le ribosome

##### 1.1. Structure

Les ribosomes d'eucaryotes, particules sphériques d'environ 250 Å, se constituent de deux sous-unités. La petite sous-unité est composée d'un brin d'ARN 18 S et d'environ 30 protéines, tandis que la grande sous-unité est composée de brins d'ARN 28 S, 5,8 S et 5 S et d'environ 40 protéines.

D'autres macromolécules peuvent s'associer de manière temporaire avec les ribosomes; c'est le cas pour les facteurs intervenant dans la synthèse protéique.

Le ribosome d'eucaryote est communément désigné par son coefficient de sédimentation c'est-à-dire 80 S, la grande sous-unité 60 S et la petite sous-unité 40 S.

Tableau I : Caractéristiques du ribosome de foie de rat (HAMILTON, 1976)

	Monomère	Grande sous-unité	Petite sous-unité
Coefficient de sédimentation	81 S	59,1 S	40,9 S
P.M. ( $\times 10^{-6}$ )	4,5	3,00	1,50
ARNr Coef. sédiment. et P.M.		28 S - $1,7 \times 10^6$ 5,8 S 5 S - $3,2 \times 10^4$	18 S - $0,7 \times 10^6$
Nombre de protéines	70	40	30



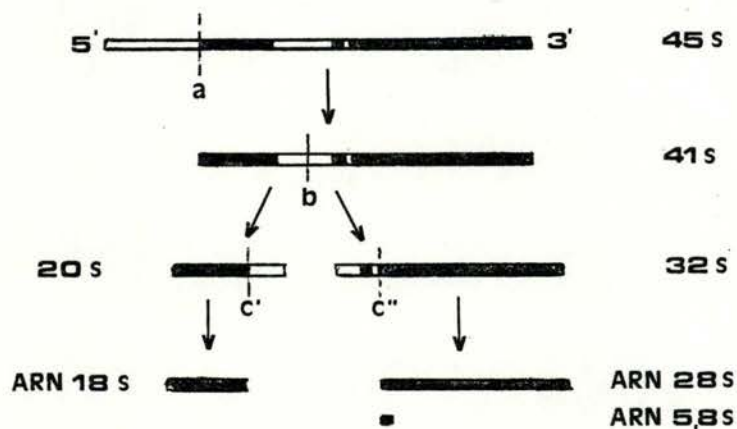
### 1.2. Synthèse et maturation

La formation du ribosome commence avec la transcription des gènes d'ARNr dans la nucléole, sous la forme d'un précurseur. Chez les eucaryotes, cette molécule contient les séquences de l'ARNr 28 S, 18 S, et 5,8 S ainsi que des "spacers" qui sont éliminés durant la maturation du ribosome (MADEN, 1976).

Dans les cellules Hela (mammifères) cette molécule a un coefficient de sédimentation de 45 S (MADEN, 1976).

La maturation du précurseur 45 S consiste principalement en une série de clivages, qui conduiront à l'obtention des trois ARNr : 18 S, 28 S, et 5,8 S, et en une série de méthylations qui s'opèrent pendant ou immédiatement après la synthèse du précurseur 45 S (MURAMATSU & FUJISAWA, 1968).

Fig. 1 : Schéma de la maturation du précurseur 45 S d'après HADJIOLOV, 1977.



Tous les groupements méthyls présents dans le précurseur 45 S se retrouvent dans les molécules d'ARNr 18, 28, et 5,8 S. Les segments éliminés ne sont pas méthylés (HAMILTON, 1976).

L'ARNr 5 S appartenant à la sous-unité 60 S ne dérive pas du précurseur 45 S (WEINBERG, 1973) et n'est pas synthétisé dans la nucléole (ATTARDI & AMALDI, 1970).

Il vient s'associer avec le ribosome dans une étape précoce de son développement dans le nucléole (WARNER & SOEIRO, 1967).

Il en va de même pour les protéines ribosomiques qui interagissent avec le précurseur de l'ARNr dans le nucléole. Les ARNr 45 S et 32 S peuvent être extraits des nucléoles sous la forme de "particules ribosomiques naissantes" (WARNER & SOEIRO, 1967). Ces particules sont aussi souvent appelées "particules ribonucléoprotéiques" ou RNP.

### 1.3. Rôle des différents constituants du ribosome

Les protéines ribosomiques sont beaucoup moins bien connues que l'ARNr, surtout chez les eucaryotes. Les protéines peuvent être séparées et analysées principalement par électrophorèse en deux dimensions sur gel de polyacrylamide.

En gros, on peut dire qu'elles sont très basiques, généralement plus petites que les autres protéines de la cellule, mais plus grandes que les protéines ribosomiques de E. Coli (WOOL & STÖFFLER, 1974). Chacune des 70 protéines du ribosome 80 S du foie de rat est unique. On le sait suite à des données sur leur mobilité électrophorétique, les différences au point de vue de leur composition en acides aminés et leurs propriétés immunologiques (BIELKA, 1978 - WOOL & STÖFFLER, 1974). De nombreux auteurs ont tenté d'assigner des fonctions à chacune de ces protéines, mais dans ce domaine, les recherches sont loin d'être terminées.

Quant aux rôles de l'ARNr, une revue en a été faite par BRIMACOMBE en 1976.

De plus en plus, on pense que l'ARN ribosomique, outre son rôle structural, a un rôle fonctionnel très important. Pour les procaryotes, SHINE & DALGARNO (1974) avaient émis l'hypothèse que la séquence 3'-terminale de l'ARN 16 S était impliquée dans la reconnaissance du site d'initiation sur l'ARN messenger. STEITZ & JAKES ont réussi à isoler un complexe oligonucléotidique, constitué de l'extrémité 3' de l'ARN 16 S et d'un fragment d'ARN initiant la synthèse d'une protéine du phage R 17. Chez les eucaryotes, il est intéressant de noter que la région 3'-terminale de l'ARN 18 S est identique dans de nombreuses classes d'eucaryotes : pGpApUpCpApUpUpA-OH (BIELKA, 1978).



ENDMAN & al (1973) ont montré le rôle de l'ARN 5 S dans la liaison de l'ARNt à la sous-unité 50 S chez les procaryotes. AVANTHANI & BUETOW (1973) ont également mis en évidence que l'activité de synthèse protéique avec les deux sous-unités dégradées était conservée uniquement si l'ARN 5 S était intact.

## 2. L'ARN messenger.

### 2.1. Généralités

Dans le cadre du dogme central de la génétique moléculaire, l'ARN messenger est défini comme le produit de la transcription des gènes portés par l'ADN; c'est lui qui sera lu par les ribosomes et les ARN de transfert dans leur travail de synthèse de protéines.

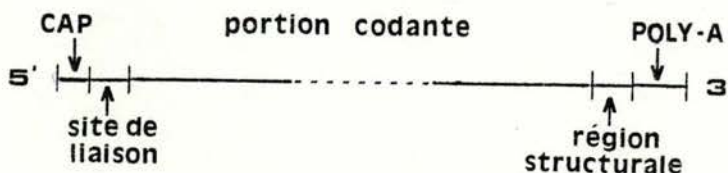
La méthode d'hybridation moléculaire entre l'ARNm et l'ADN a permis de montrer que la structure de l'ARNm est monocaténaire et complémentaire de l'une des chaînes de l'ADN.

Lorsqu'on analyse la population totale d'ARNm d'un organisme, on remarque une hétérogénéité des tailles moléculaires : le coefficient de sédimentation varie de 6 S à 30 S. Cette hétérogénéité reflète la variété des protéines fabriquées par la cellule.

Nous allons maintenant passer en revue les structures qui caractérisent l'ARNm d'eucaryotes, c'est-à-dire le poly-A et le cap.

Fig. 2 : Schéma d'une molécule d'ARN messenger d'eucaryotes d'après BUSCH (1976).

De l'extrémité 5' à l'extrémité 3', nous trouvons le "cap", une région comprenant les sites de liaison des ribosomes, une grande portion centrale codante, une région structurale particulière où peuvent se lier des protéines et la "queue" de poly-A.



## 2.2. Le Poly-A.

Cette "queue" de 50 à 200 résidus adénosiques est attachée à l'extrémité 3' des ARNm d'eucaryotes mais est associée à de nombreux ARN viraux (BRAVERMAN, 1974). On a montré que notamment l'ARNm d'histones ne contient pas cette séquence (GREENBERG & PERRY, 1972). Il semble que cette "queue" de poly-A soit ajoutée par un processus post-transcriptionnel du précurseur de l'ARNm (DARNELL & al, 1973) dans le noyau, et que sa taille diminue dès le passage de l'ARNm dans le cytoplasme (SHEINESS & al, 1975 - NOKIN & al, 1976).

Quel est le rôle de cette séquence ?

L'addition de poly-A à l'ARN nucléaire peut être inhibée par un traitement des cellules à la cordycepin (3'-déoxyadénosine), mais en même temps, on bloque le transfert de l'ARNm dans le cytoplasme. Cela suggère que le poly-A interviendrait dans le transport de l'ARNm hors du noyau (PERRY & al, 1973).

Le poly-A semble aussi jouer un rôle important dans le maintien de l'activité biologique des molécules d'ARN auxquelles il est associé (SPECTOR & al, 1974 - HUEZ & al, 1974).

Par exemple, il a été montré que cette séquence 3'-terminale est nécessaire au pouvoir infectieux de l'ARN du virus de la polio (HUEZ & al, 1974). Des comparaisons de taux de traduction ont aussi été effectuées entre l'ARNm de globine intact et de l'ARNm "amputé" de sa "queue" de poly-A. Bien que leur taux initial de traduction soit identique, l'ARNm sans poly-A commence à perdre son activité bien avant l'ARNm intact (NOKIN & al, 1973).

Un autre type de comparaison a été faite, c'est celle de la sensibilité de différents ARNm à une RNase. On a montré que la sensibilité à la RNase diminuait quand la longueur en poly-A augmentait (HIETER & al, 1976).

## 2.3. Le cap .

On observe également des modifications à l'extrémité 5'-terminale de la plupart des ARNm d'eucaryotes et de virus.

Ce "cap" se caractérise par la présence d'un 7-méthylguanosine comme résidu terminal, relié à la première base du message par un pont triphosphate entre les deux groupes 5'-hydroxyl des riboses (fig.3) (SHATKIN, 1976).



On distingue principalement trois types de caps :

- \* un cap de " type zéro " :  $m^7GpppXp$  ne contenant pas de méthylation supplémentaire.
- \* un cap de " type un " :  $m^7GpppX^m pYp$  où l'on trouve un groupe méthyl en position 2' du ribose de la première base.
- \* un cap de " type deux " :  $m^7GpppX^m pY^m pZp$  qui contient deux nucléotides méthylés en 2' sur le ribose. (X, Y et Z représentent n'importe lequel des quatre nucléotides habituels de l'ARNm).

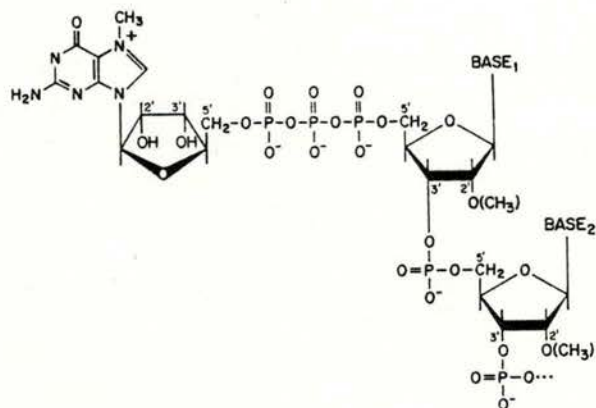


Fig. 3 : Structure d'un cap de "type deux" (SHATKIN, 1976).

Pour ce cap, deux fonctions semblent ressortir : (FILIPOWICZ, 1978)

- la première est d'aider l'ARNm à entrer dans le complexe d'initiation avec les ribosomes d'eucaryotes.
- la seconde est une fonction de protection de l'ARNm contre la dégradation par les nucléases cellulaires.

1) La première observation mettant en évidence la nécessité du cap pour une traduction efficace est la comparaison des activités de réovirus, VSV et ARNm de globine de lapin avec et sans cap, dans un système de synthèse protéique acellulaire de germe de blé (MUTHUKRISHNAN & al, 1975).

Une autre approche pour déterminer l'importance du cap dans la traduction a été l'utilisation d'analogues de caps. Des analogues tels,  $pm^7G$ ,  $m^7GDP$ ,  $m^7GpppN^m$ , agissent au niveau de l'initiation en inhibant la liaison de l'ARNm au ribosome (CANAANI & al, 1976).

D'autres expériences, de "compétition", appuient l'idée du rôle de facilitation de  $m^7G$  dans la traduction de l'ARNm. Un mélange de molécules d'ARNm avec et sans cap est testé au point de vue de leur capacité de liaison aux ribosomes; les molécules qui portent un cap  $m^7G$  sont liées de manière préférentielle (MUTHUKRISHNAN, 1978).

L'importance apparente de l'extrémité 5'  $m^7G$  pour la traduction des ARNm dépend cependant des conditions de synthèse *in vitro*. Parmi ces conditions, on peut citer : la concentration en ARNm (HICKEY & al, 1976), les facteurs d'initiation (HELD & al, 1977) et les conditions ioniques, parmi lesquelles la concentration en potassium est d'une importance particulière (WEBER & al, 1978).

Finalement, la raison de l'apparition de cette structure particulière qu'est le cap, dans les cellules évoluées, pourrait être de remplacer l'interaction directe ARNm - ARNr qui facilite la liaison au ribosome chez les organismes procaryotes (CLEMENS, 1979).

De plus, comme les caps ne semblent pas se lier directement aux ribosomes mais nécessitent des facteurs d'initiation pour le faire, on pourrait aussi voir là une explication partielle du grand nombre de tels facteurs nécessaires à la synthèse des protéines chez les eucaryotes, par opposition aux procaryotes (CLEMENS, 1979).

2) Le cap à l'extrémité 5' de l'ARNm a un important effet de stabilisation sur l'ARNm injecté dans des oocytes de Xenopus laevis ou ajouté à des extraits de germe de blé (FURUICHI & al, 1977). Dans ces systèmes, les ARNm de reovirus contenant à leur extrémité 5'  $m^7GpppG^m$  ou  $GpppG$  sont dégradés plus lentement que les molécules portant une extrémité telle que  $pppG^m$ ,  $pppG$  ou  $ppG$ .

#### 2.4. Les protéines associées à l'ARN messenger.

Dans les cellules d'eucaryotes, l'ARNm existe dans le cytoplasme sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (mRNP).

Il est certain actuellement qu'il existe au moins deux protéines, l'une d'un poids moléculaire de 50000 et l'autre de 78000, associées à l'ARNm (MOREL & al, 1971). L'une d'elles est attachée dans une région particulière de l'extrémité 3' terminale (Fig. 2). L'autre pourrait être liée au cap mais ce n'est pas encore certain (BUSCH, 1976).



## 2.5. Biosynthèse et maturation de l'ARN messenger

Dans les cellules d'eucaryotes, la formation d'un ARNm qui puisse être traduit est un processus complexe. Les précurseurs des ARNm, transcrits dans le noyau à partir de l'ADN, subissent des modifications post-transcriptionnelles, à savoir :

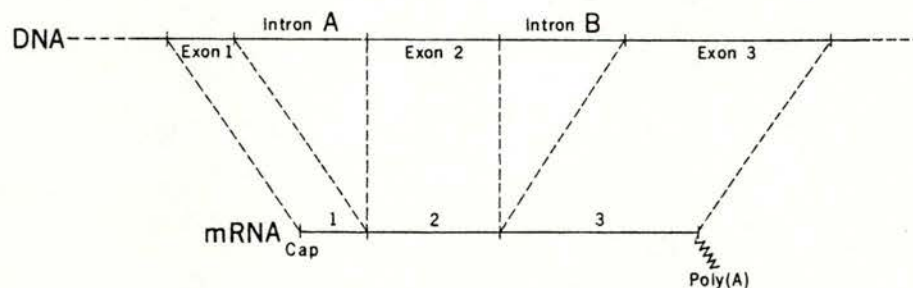
- \* des clivages du précurseur et la reconstitution d'une seule chaîne d'ARNm à partir des différents fragments obtenus.

Il est en effet admis qu'un gène, dans un organisme supérieur, codant pour une protéine, peut contenir des séquences de bases qui n'apparaissent pas au niveau de l'ARNm cytoplasmique. Ces séquences sont appelées "Introns" par opposition aux séquences codantes appelées "Exons" .(voir fig.4)

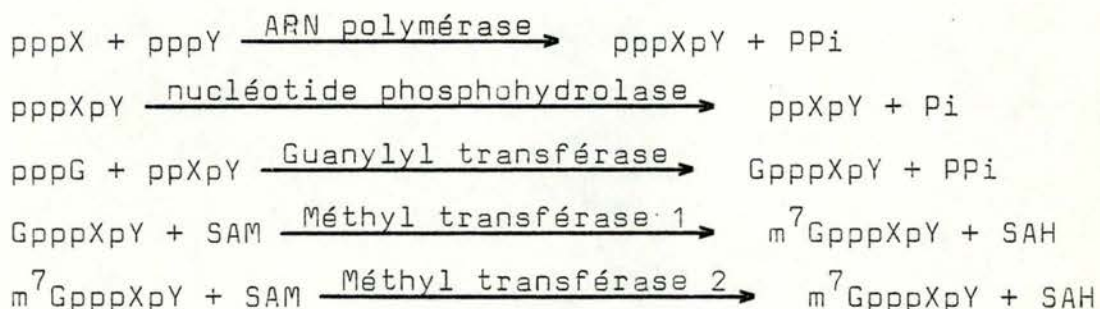
Le mécanisme suivant lequel un pré-ARNm contenant à la fois les exons et les introns est d'abord synthétisé et ensuite clivé et reconstitué est le plus généralement admis.

C'est le cas pour l'ARNm de l'ovalbumine : son gène se compose de huit morceaux différents (KOURILSKY & CHAMBON, 1978).

Fig.4 : Représentation schématique d'un brin d'ADN (ligne horizontale supérieure) et de l'ARN messenger qui en dérive (ligne inférieure). Dans ce gène imaginaire, il y a trois exons, marqués 1, 2, et 3, et deux introns, notés A et B. D'après CRICK, 1979.



- \* la polyadénylation à l'extrémité 3', étape post-transcriptionnelle relativement tardive. Elle se passe au cours du derniers tiers de l'intervalle de temps qui sépare la transcription du message et l'association aux ribosomes (PERRY & al, 1974).
- \* le "capping" à l'extrémité 5'.  
Le mécanisme serait du type suivant : (d'après FURUICHI & al, 1976 pour reovirus)



Une troisième méthylation peut se faire s'il s'agit d'un cap de "type 2".

(SAM : S-adenosylmethionine - SAH : S-adenosylhomocystéine )

- \* des méthylations internes. Un taux élevé de N<sup>6</sup>-méthyladénosine est observé (ROTTMAN et al, 1976)



### 3. L'ARN de transfert

#### 3.1. Généralités

Le rôle de l'ARN messenger est de diriger l'assemblage des acides aminés en une séquence caractéristique d'une protéine donnée, dans le processus de la traduction. Mais, d'autres molécules d'ARN, les ARN de transfert, jouent un rôle tout aussi important dans ce processus : elles agissent en tant qu'intermédiaires entre la séquence linéaire de nucléotides de l'ARN messenger et la séquence linéaire en acides aminés d'une protéine.

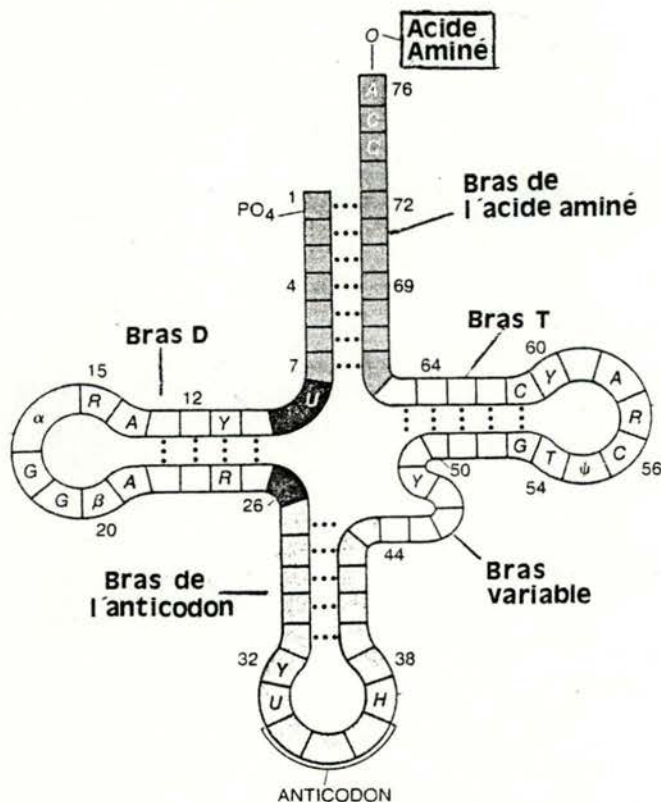
Comparés aux autres molécules d'ARN, les ARN de transfert sont caractérisés par leur poids moléculaire d'environ 25 à 30000, ce qui correspond à une molécule de 75 à 90 nucléotides et par un contenu élevé en nucléotides modifiés (nucléotides méthylés, ou autres nucléotides tels : l'acide pseudo-uridylique, ribothymidilique).

L'étude de la séquence en bases de ces ARNt a révélé les caractéristiques suivantes : (voir fig. 5)

- \* Dès 1965, HOLLEY & al, propose comme structure secondaire quelque chose ressemblant à un "trèfle à 4 feuilles" sur la base de l'étude des complémentarités possibles entre les différentes bases.
- \* L'extrémité 3' de la chaîne est toujours formée du même trinuécléotique : pCpCpA. Le groupement hydroxyl libre de l'acide adénylique peut être estérifié enzymatiquement par le carboxyle de l'-aminoacide spécifique pour donner la forme active de l'ARNt, l'aminoacyl-tARN (voir plus loin).
- \* A l'extrémité 5' on trouve souvent un acide guanylique relié à un groupement phosphate.
- \* Il existe également une séquence de 3 bases qui diffère dans chaque ARN de transfert : c'est l'anticodon. Ce triplet de l'aminoacyl-tARN possède une séquence telle qu'elle lui permet de s'apparier spécifiquement, par des liaisons hydrogènes avec le codon correspondant des ARNm : ainsi, l'acide aminé est transféré à sa position correcte sur la chaîne polypeptidique en croissance. Cependant, il faut admettre une certaine tolérance dans l'appariement des bases, au niveau de la 3<sup>e</sup> base du codon. C'est l'hypothèse du "Wobble" émise par Crick (CRICK, 1966).

Assez récemment, la structure tertiaire de l'ARNt de le phénylalanine a été élucidée (RICH<sup>& KIM</sup> 1978). Dans l'espace, cet ARNt aurait la forme d'un " L " dont l'un des bras porterait l'acide aminé et l'autre porterait l'anticodon.

Fig. 5 Représentation schématique en feuille de trèfle établie à partir d'environ 100 ARNt isolés de bactéries, de cellules végétales et animales. Les bases rencontrées aux mêmes positions dans tous les ARNt sont indiquées. Les abréviations sont : A (adénosine) - G (guanosine) - C (cytidine) - U (uridine) - R (adénosine ou guanosine) - Y (cytidine ou uridine) - T (ribothymidine) -  $\Psi$  (pseudouridine) - H (adénosine ou guanosine modifiée).  
D'après RICH & KIM, 1978.



### 3.2. Biosynthèse des ARNt

Dans les cellules des mammifères, l'ARNt est synthétisé à partir d'un précurseur de taille moléculaire d'environ 5 S (KAY & COOPER, 1969). Ce précurseur contient déjà des nucléotides méthylés, de la dihydrouridine et de la pseudouridine, mais en proportion moins importante que celle qu'on trouve dans l'ARNt mature ( KAY & COOPER, 1969 - CHOE & TAYLOR, 1972).

La maturation du précurseur consistera donc principalement en des clivages et des modifications de nucléotides.

Chez les procaryotes, l'isolement du précurseur ARNt (tyr) de E.Coli (ALTMAN, 1971), a montré qu'il possédait des nucléotides supplémentaires aux deux extrémités de la séquence de l'ARNt mature. De plus, il manquait les trois nucléotides CCA de l'extrémité 3' des ARNt. On a isolé l'enzyme qui catalyse la réaction d'addition de ces trois nucléotides chez E.Coli : la CTP (ATP)-tRNA nucléotidyltransférase (CARRE & al, 1970).

Tous les éléments que nous venons de décrire participent au fonctionnement de la machinerie de synthèse protéique dont il sera question dans le paragraphe suivant.



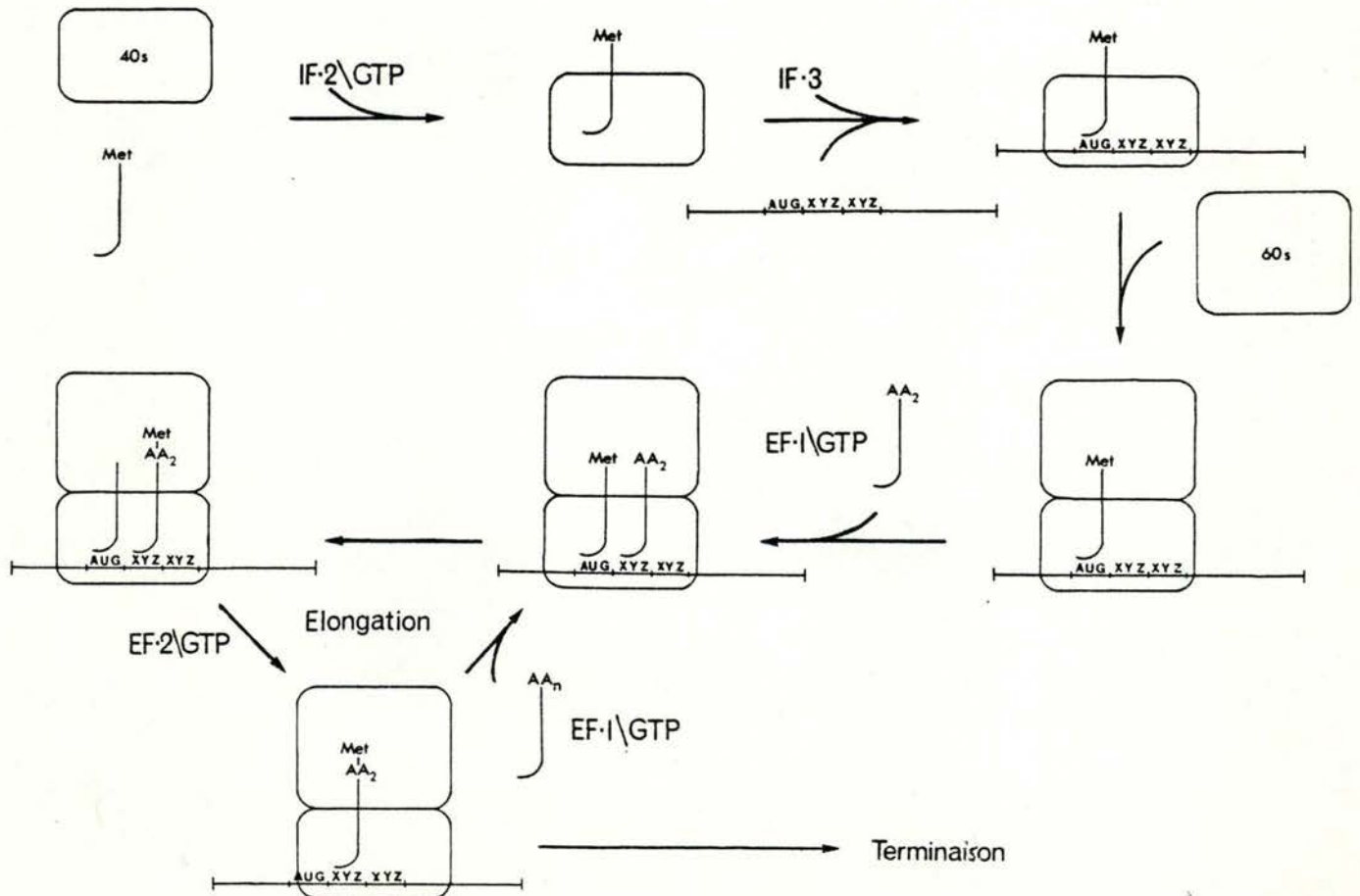
B. Fonctionnement

La synthèse d'une protéine comprend :

- 1) Le départ de la synthèse d'une chaîne protéique au site d'initiation correct de l'ARNm.
- 2) Le mouvement du ribosome le long de l'ARNm avec, en même temps, l'assemblage de la chaîne peptidique. On sait que la position d'un acide aminé dans la chaîne naissante est dictée par la nature des codons disposés dans le messenger d'une façon séquentielle.
- 3) La libération de la chaîne polypeptidique complète du ribosome, suivie par le départ de la synthèse d'une nouvelle chaîne.

Ces trois phases par lesquelles passent les ribosomes de manière cyclique ont été appelées respectivement initiation, élongation et terminaison.

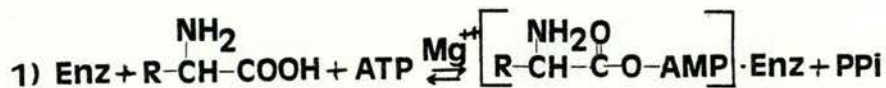
Fig. 6 : Modèle général de la synthèse des protéines chez les eucaryotes (SMITH, 1976).



## 1. L'aminocacylation .

C'est l'étape préliminaire nécessaire à la synthèse protéique car, pour former une liaison peptidique, chaque acide aminé doit être activé. L'aminocacylation peut être subdivisée en 2 étapes :

- 1) L'activation du groupe carboxyle de l'acide aminé.
- 2) Le transfert de l'acide aminé sur son ARNt spécifique par estérification de la fonction carboxyle.



C'est la haute valeur en énergie potentielle de la liaison ester réalisée entre le groupement -COOH de l'acide aminé et l'hydroxyle du sucre du dernier adénosine de l'ARN de transfert qui permet ensuite la formation d'une liaison peptidique sur le ribosome.

## 2. L'initiation. (GRUNBERG-MANAGO, 1977 - KOZAK, 1978)

L'initiation comprend toutes les étapes permettant au ribosome de s'attacher à l'ARNm et de se placer au bon endroit pour permettre la formation du premier lien peptidique.

- \* Dans une première étape, un complexe stable se forme entre le facteur eIF-2, GTP et l'ARNt<sup>fMet</sup> (ARNt initiateur). Le complexe ternaire ainsi formé peut être transféré à la sous-unité 40 S, en l'absence de l'ARNm, cette interaction étant stabilisée par les facteurs eIF-1 et eIF-3.
- \* eIF-3 est indispensable pour l'étape suivante c'est à dire l'attachement de l'ARNm, une réaction qui dépend aussi des facteurs eIF-4A 4B et 4C et qui nécessite de l'ATP.

Un mécanisme possible pour l'initiation de la traduction chez les eucaryotes a été proposé par KOZAK (1978) : la sous-unité 40 S ( plus les facteurs qui lui sont associés) s'attacherait à l'extrémité 5' du message et avancerait jusqu'à ce qu'il rencontre le premier triplet AUG.

\* A ce point là se réaliserait la dernière phase de l'initiation : l'association du complexe 40 S.(ARNt initiateur).ARNm à la sous-unité 60 S. Elle est catalysée par eIF-5 et nécessite l'hydrolyse du GTP en GDP+Pi.

Ce modèle expliquerait les caractéristiques de l'initiation chez les eucaryotes, à savoir :

- 1) Elle se limite à un site unique, localisé à l'extrémité 5' .
- 2) Le premier triplet AUG peut se trouver à une distance variable de l'extrémité 5' .
- 3) L'absence de codons AUG dans la séquence 5' non codante, précédant le triplet initiateur de la traduction.
- 4) La présence d'un cap m7G, qui coiffe l'extrémité 5' de la plupart des messagers d'eucaryotes et qui facilite l'initiation.

Ce modèle suppose que la sous-unité 40 S (plus les facteurs) est capable de se déplacer seul sur le message; des expériences récentes ont permis de confirmer cette hypothèse (KOZAK & SHATKIN, 1978).

Une fois le complexe 80 S.messenger.facteurs.ARNt<sup>fMet</sup> en place, la lecture de l'ARNm et la formation de la chaîne polypeptidique peuvent commencer.

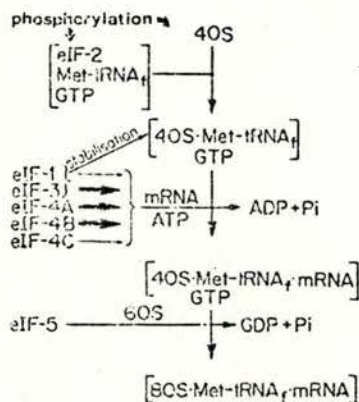


Fig. 7 : Initiation de la synthèse protéique chez les mammifères.  
D'après REVEL & GRONER, 1978

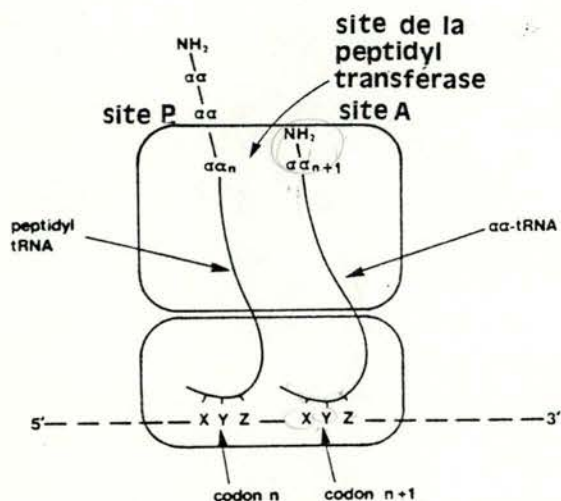


### 3. L'Elongation . (LENGYEL, 1974)

L'addition d'un acide aminé à la chaîne protéique naissante est un processus répétitif.

Le ribosome y joue en quelque sorte le rôle de "tête de lecture" puisqu'il se meut le long de l'ARNm dans le sens 5'- 3' tout en effectuant la synthèse d'une chaîne polypeptidique.

La réaction centrale dans ce processus est la formation de la liaison peptidique. Pour comprendre ce mécanisme qui va être détaillé de suite, il faut envisager le modèle impliquant la présence de "sites" au niveau du ribosome. En effet, pour qu'il y ait formation d'un lien peptidique, il faut que deux aminoacyls tRNA ou un aatRNA et un peptidyl tRNA, soient proches l'un de l'autre. Il faut donc supposer au niveau du ribosome au moins deux sites où l'ARNt peut venir se lier. Ces sites sont appelés : site P ou site peptidyl-tRNA et site A ou site aminoacyl-tRNA.



$aa^* + tRNA \xrightarrow{Syn} aa-tRNA$

Fig.8 :

Dessin schématique d'un ribosome montrant les sites A et P. (SMITH, 1976).

Le produit final de la phase d'initiation est un complexe d'initiation dans lequel l'ARNt<sup>fMet</sup> est lié au site P.

\* Dans la première partie du cycle d'élongation, un aminoacyl-tRNA se lie au site A. L'aminoacyl-tRNA est celui spécifié par le codon adjacent du côté 3' du codon initiateur.

Il est attaché au complexe ARNm-ribosome sous la forme d'un complexe aminoacyl tRNA.EF-1<sub>L</sub>.GTP (EF-1<sub>L</sub> est la forme active du facteur EF-1. Cette protéine est souvent présente dans les tissus sous forme d'agrégat de haut poids moléculaire : EF-1<sub>H</sub>)

\* La deuxième partie du cycle comprend la formation de la liaison peptidique (voir fig. 9). Le GTP du complexe cité est hydrolysé en GDP+Pi et l'ensemble EF-1<sub>L</sub>.GDP quitte le ribosome. Le résidu Met se trouvant au site P est libéré de sa liaison peptidique avec le groupe acide aminé de l' aminoacyl-tRNA du site A.  
L'enzyme catalysant la formation de cette liaison est appelée peptidyl transférase et fait partie de la grande sous-unité.

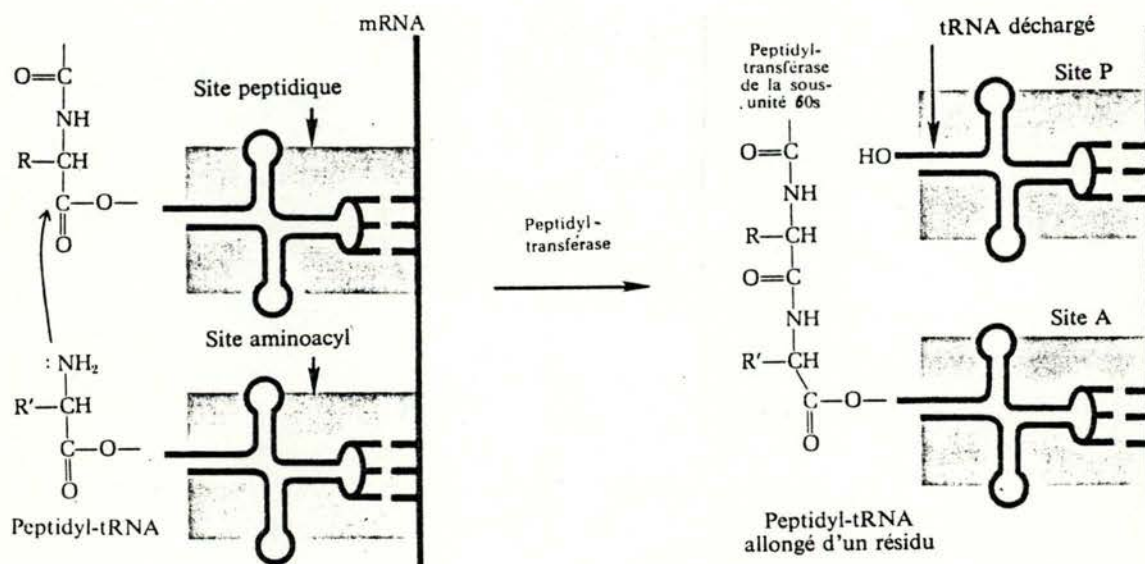


Fig.9 : La réaction de formation de la liaison peptidique. Elle se forme par un mécanisme de déplacement nucléophile : le groupement aminé du nouvel aminoacyl-tRNA déplace le tRNA de l'acide précédent au niveau du carboxyl, ce qui conduit à un peptidyl-tRNA allongé d'un résidu (LEHNINGER, 1977).

\* Dans la troisième partie du cycle, la translocation, le facteur EF-2 et du GTP sont liés au ribosome.  
Après que le site P ait été libéré, le dipeptidyl-tRNA est déplacé du site A au site P, le ribosome se déplaçant le long de l'ARNm de trois nucléotides en direction 3'.  
Le GTP lié au ribosome est hydrolysé en GDP+Pi et les produits d'hydrolyse quittent le ribosome en même temps que le facteur EF-2.  
A ce stade, nous nous retrouvons dans la situation initiale et un nouveau cycle peut recommencer.  
Pour que cela soit possible, il suffit de régénérer le complexe EF-1.GTP à partir de EF-1.GDP (fig. 10).



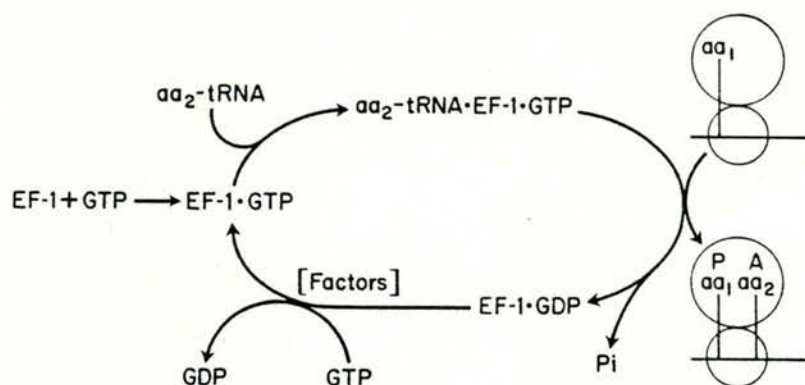


Fig. 10 : Etape de l'élongation nécessitant l'intervention du facteur EF-1 et recyclage de celui-ci (WEISSBACH & OCHOA, 1976).

#### 4. La terminaison. (WEISSBACH & OCHOA, 1976)

Le processus de terminaison comprend la libération de la chaîne polypeptidique complète du complexe ribosome-ARNm.

Le peptide est alors au site P du ribosome et au site A se trouve un des trois codons de terminaison : UAA, UAG ou UGA.

De plus, un facteur spécifique RF et du GTP sont nécessaires.

Le GTP permettrait l'association du RF avec le ribosome mais son hydrolyse n'interviendrait que dans une étape ultérieure, peut-être dans le recyclage du facteur. On peut aussi mettre en évidence que l'activité de la peptidyl transférase joue une part importante dans le processus de libération du peptide attaché à un ARNt au site P (GOLDSTEIN & al, 1970).



### C. Le polysome, unité de fonction

Nous avons jusque maintenant décrit les différents évènements qui aboutissent à la synthèse des protéines. Les éléments nécessaires sont un ARN messenger, un ribosome, des ARN de transfert, des acides aminés, des facteurs protéiques et énergétiques, des enzymes, ... Dans la cellule, nous observons pourtant un nombre de ribosomes beaucoup plus élevé que de messagers; d'autre part, on sait aussi que le ribosome suit un cycle, c.à.d. qu'après la libération de la chaîne protéique qu'il vient de terminer, le ribosome se scinde en ses deux sous-unités, celles-ci sont ainsi prêtes à recommencer la synthèse d'une nouvelle chaîne protéique.

#### Découverte des polysomes.

C'est au début des années 60 que furent faites les observations décisives qui établirent la signification des agrégats ribosomiques. Des expériences avec des réticulocytes, montrèrent que des chaînes naissantes de protéines, qui avaient été marquées dans des cellules intactes, étaient associées avec une fraction ribosomique hétérogène 170 S et non pas avec les ribosomes 80 S (WARNER & al, 1963 - WETTSTEIN & al, 1963). D'autres expériences testant l'activité d'incorporation d'acides aminés par des ribosomes de foie de rat, dans un milieu acellulaire, montrèrent que l'activité augmentait proportionnellement à la présence d'agrégats lourds. Les préparations les plus actives contenaient très peu de ribosomes 80 S et étaient constituées surtout de matériel "lourd".

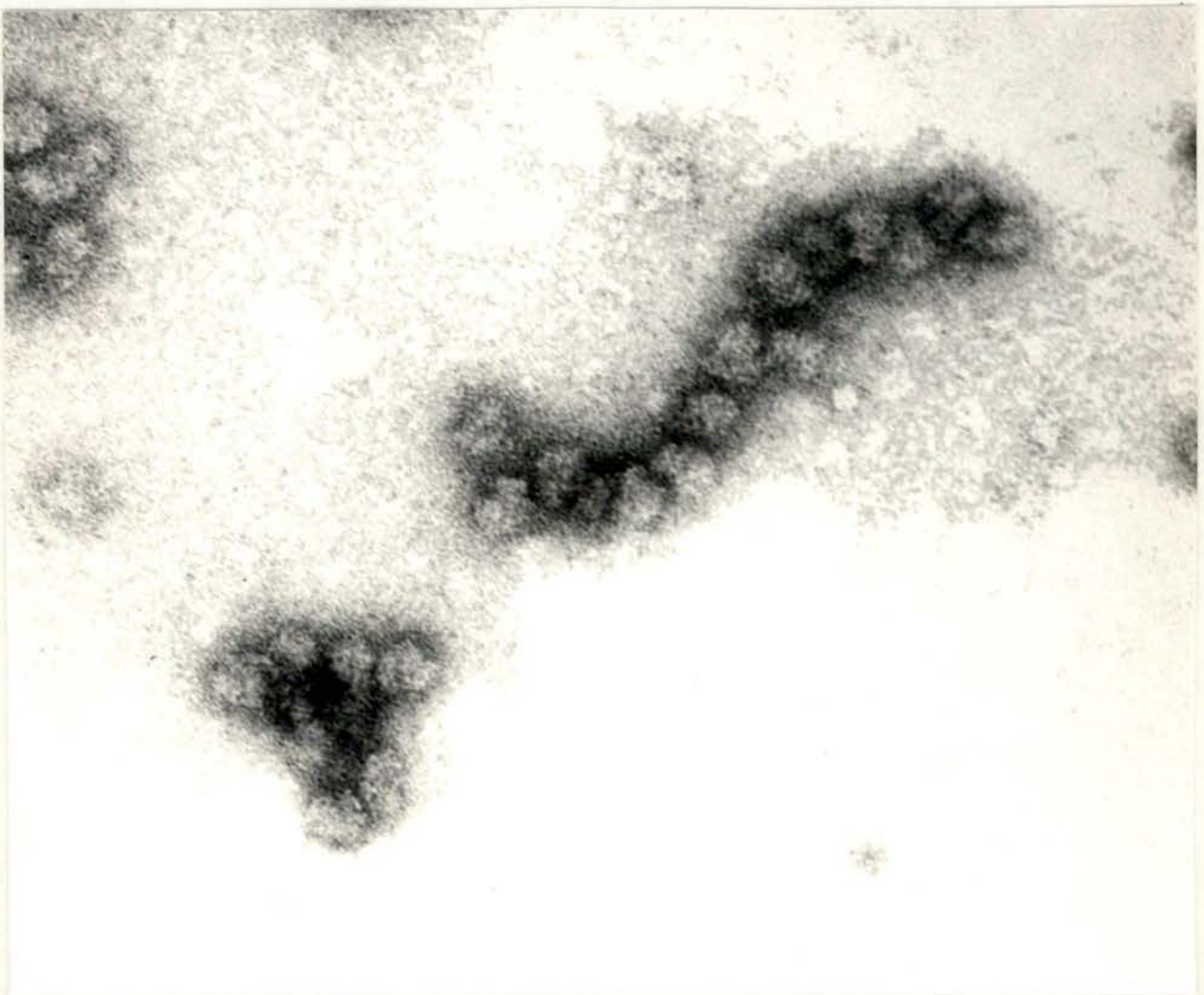
La relation existant entre la structure des agrégats et l'incorporation d'acides aminés, suggéra immédiatement que l'ARN messenger était responsable de la formation de ces agrégats. L'interprétation la plus attrayante représentait les polysomes comme des ribosomes "enfilés" sur un brin unique et continu d'ARNm.

Cette conception était appuyée par le fait de l'extrême sensibilité de ces agrégats à des traces d'endonucléases.

De plus, on observait une proportionnalité entre la taille des polysomes et le poids moléculaire de l'ARNm, une réduction de la taille moyenne du messager par fragmentation des polysomes avec des traces de RNases, la rupture des polysomes suite à une inhibition de la synthèse de l'ARNm par l'actinomycine, ainsi que la formation des polysomes à partir de ribosomes et d'ARN viral (NOLL, 1969).

Sur un polysome, plusieurs ribosomes peuvent donc lire simultanément le même message, avec bien sûr un décalage, qui correspond au temps mis par un ribosome pour quitter le site d'initiation et permettre au ribosome suivant de s'y fixer.

Le polysome n'est plus actuellement une simple vue de l'esprit permettant d'expliquer les diverses observations effectuées, mais bien une unité structurale visible au microscope électronique.





### Etats topographiques

Les polysomes existent dans deux états différents : ils sont soit libres dans le cytoplasme, soit liés aux membranes du réticulum endoplasmique. On a attribué à ces derniers la fonction de synthèse des protéines destinées à être sécrétées par la cellule. Ces protéines passeraient directement dans le réticulum endoplasmique pendant leur élaboration.

Des méthodes ont été mises au point pour préparer ces polysomes, soit séparément ( VENKATESAN & STEELE, 1972 - BLOEMENDAL & al, 1973 - RAMSEY & STEELE, 1976) soit ensemble (RAMSEY & STEELE, 1976). Lors de l'extraction des polysomes, ce sont non seulement des ribosomes et des messagers qui sont extraits, mais également des facteurs protéiques associés aux ribosomes lors de la synthèse protéique. Toutefois, de fortes concentrations en KCl (500mM) permettent de les "détacher" des ribosomes et donc de les préparer séparément. (PICCIANO & al, 1974)

### Taille des polysomes

Un polysome peut se caractériser par sa taille, c.à.d. le nombre de ribosomes par messenger. Cette taille ( $R_0$ ) dépendra de la longueur du messenger ( $A_0$ ) et de la distance qui sépare deux ribosomes ( $a$ ), exprimés tous les deux en nombre d'acides aminés (triplets) ou de nucléotides.

$$R_0 = A_0 / a$$

A un temps donné, la distance entre deux ribosomes consécutifs sur l'ARNm, dépend de la vitesse d'élongation ( $V_e$ ) et de la fréquence d'initiation ( $\nu_i$ ). Ceci, à condition que la terminaison ne soit pas limitante.

$$a = V_e / \nu_i$$

La taille du polysome dépend donc de la vitesse d'élongation et de la fréquence d'initiation.

$$R_0 = A_0 \times \nu_i / V_e$$



Mais, dans une cellule, nous avons à faire à une population de polysomes. Pour étudier la distribution en taille de ces polysomes, une technique simple est utilisée : la centrifugation sur gradient de saccharose.

La centrifugation de zone sépare les macromolécules en fonction de leur taille, de leur densité et de leur forme. Si ces molécules sont soumises à un champ centrifuge, la force agissant sur elles sera contrecarrée par des forces de friction et de flottaison. Si le poids moléculaire augmente, le rapport surface / masse et la résistance relative à la friction diminuent. C'est pourquoi, la vitesse de sédimentation va augmenter en fonction du poids moléculaire, au sein d'une famille de molécules ayant même forme et même densité.

La centrifugation zonale produit une série de bandes, à intervalles réguliers, en accord avec le nombre croissant de ribosomes sur l'ARNm. Cela permet donc de séparer les différentes classes de taille de polysomes. (Fig. 11)

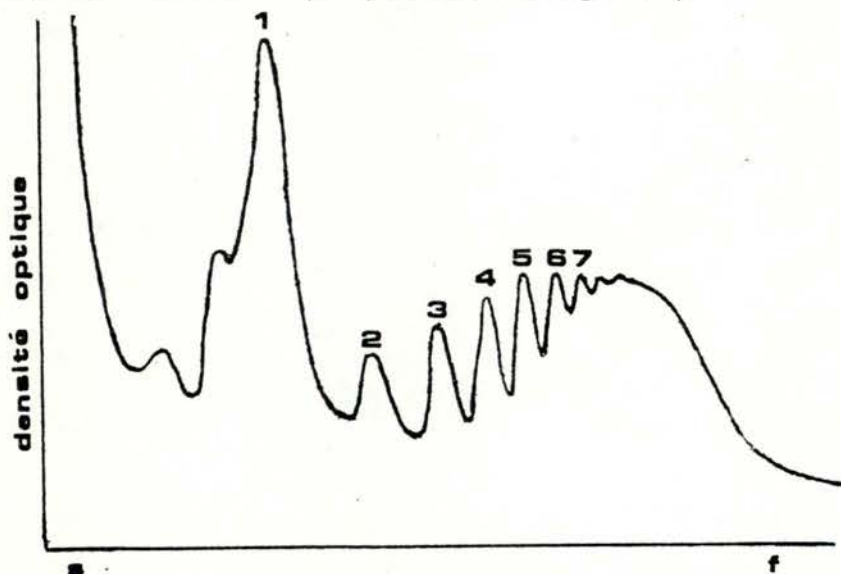


Fig. 11 : Profil de sédimentation de polysomes de foie de souris. Gradient analytique 15-50 Ramsey. Les chiffres au-dessus des pics désignent la taille des polysomes.

Le polysome étant l'unité fonctionnelle de la synthèse protéique, il nous a semblé intéressant d'étudier cette unité en tant que telle, isolée de son contexte cellulaire, et de voir si, à son niveau, on peut déceler des différences en fonction de l'âge.

### III. LA MACHINERIE DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE "IN VITRO" : LES MILIEUX ACELLULAIRES.

Les milieux acellulaires ont d'abord été utilisés dans le but d'étudier le mécanisme de la synthèse protéique. Un messenger naturel ou artificiel (Poly-U, par exemple) peut y être introduit et traduit, différents facteurs variant d'une expérience à l'autre.

Différents milieux ont été mis au point et les plus couramment utilisés sont les suivants :

- \* Le système de lysat d'ascite, développé par MATHEWS & KORNER (1952) est dérivé de cellules ascites se développant dans la cavité péritonéale des souris.
- \* Le système acellulaire de germe de blé décrit par WEEKS & MARCUS (1971), ROBERTS & PATERSON (1973), SHIH & KAESBERG (1973) est facilement préparé à partir de germes de blé disponibles dans le commerce.
- \* Le lysat de réticulocytes, un des premiers systèmes utilisés et que nous avons choisi.

Les réticulocytes sont des globules rouges immatures qui synthétisent principalement de l'hémoglobine. Des extraits bruts de ces cellules fournissent un excellent système acellulaire (ADAMSON & al, 1968). L'extrait est préparé en lysant les cellules avec de l'eau distillée et en sédimentant les débris cellulaires. Bien que l'efficacité de traduction d'un ARNm exogène soit élevée, l'extrait brut possède encore un haut degré de synthèse protéique endogène qui interfère souvent avec l'analyse des protéines synthétisées à partir de l'ARNm ajouté.

Le milieu avec lequel nous avons travaillé, est à base de lysat de réticulocytes de lapin, modifié suivant le principe de PELHAM & JACKSON (1976) pour éviter ce problème. Le but est de détruire l'ARNm endogène. Ceci est fait en ajoutant une nucléase micrococcalle activée en présence de calcium. L'addition d'un excès d'EGTA (éthylèneglycol-bis(2-aminoéthylether)-N,N'-tétracétique acid) complexe les ions et inactive donc la nucléase.



Après ce traitement, aucune activité résiduelle en nucléase n'a pu être détectée et l'activité de synthèse protéique endogène est négligeable. C'est là son grand avantage par rapport aux autres systèmes acellulaires, puisque ce dernier système peut être ainsi sensible à de très faibles concentrations en ARNm.

En comparaison, le système acellulaire d'ascites a une activité d'incorporation endogène très élevée et contient des nucléases qui dégradent rapidement l'ARNm ajouté.

Le système dérivé de germes de blé a un "background" comparable à celui du système utilisé, mais il apparaît moins sensible à l'adjonction d'ARNm. De plus, le système acellulaire de germes de blé a une haute activité nucléasique (PELHAM & JACKSON, 1976).

Les milieux acellulaires peuvent être "programmés" de deux manières différentes. La première est d'y ajouter un messenger naturel ou artificiel (poly-U, par exemple); la lecture de ceux-ci se fera par les ribosomes endogènes. La deuxième consiste à enlever les ribosomes propres au milieu acellulaire et d'y ajouter alors des polysomes provenant de divers tissus.

C'est le deuxième type d'approche que nous avons choisi pour notre travail, puisque notre but est d'étudier les caractéristiques fonctionnelles des polysomes de foie de souris, en fonction de l'âge, en dehors de leur contexte cellulaire et dans un milieu toujours identique et reproductible.



#### IV. BUT DU TRAVAIL

Il est généralement admis que le vieillissement s'accompagne d'une déficience de la machinerie de synthèse protéique (ORGEL, 1973 - MEDVEDEV, 1967 - COMFORT, 1977). De plus, l'observation des profils de sédimentation de polysomes de foie de souris, montre une diminution de la taille moyenne des polysomes en relation avec l'âge (VAN DEN HAUTE, communication personnelle).

Dès lors, on peut se poser la question de savoir si ces différences "morphologiques" observées au cours du vieillissement, vont de pair avec des différences fonctionnelles de la machinerie de synthèse protéique.

Pour répondre à cette question, nous avons adopté comme stratégie expérimentale, de faire l'étude comparative des performances des polysomes de foie de souris jeune et vieille, en milieu acellulaire. C'est le taux d'incorporation d'acides aminés marqués qui nous permettra de nous rendre compte des différences éventuelles. Nous avons choisi de travailler en milieu acellulaire, afin d'éliminer des variations qui pourraient intervenir "in vivo", au niveau des facteurs énergétiques, des enzymes intervenant dans la traduction (tels les aminoacyl-tRNA synthétases), des ARNt, ...

# M A T E R I E L   E T   M E T H O D E S

## I. MATERIEL

- A. Animaux
- B. Produits
- C. Conditionnement du matériel
- D. Appareillage

## II. METHODES

- A. Extraction des polysomes
  - 1. Préparation du foie
  - 2. Homogénéisation
  - 3. Préparation des polysomes
  - 4. Purification des polysomes
  - 5. Isolement de polysomes "lourds"
- B. Techniques préparatives et analytiques
  - 1. Mesure de la distribution en taille des polysomes par centrifugation en gradient de saccharose
    - a) Préparation des gradients
    - b) Centrifugation
    - c) Analyse
  - 2. Précipitation au PEG
  - 3. Mesure de l'absorbance des acides ribonucléiques par la méthode de Schmidt-Thannhauser
  - 4. Mesure de la radioactivité  $\beta$  par scintillation liquide.
- C. Traduction en milieu acellulaire

M A T É R I E L   E T   M E T H O D E S

I. MATERIEL

A. Animaux

Pour nos expériences, nous avons utilisé des souris femelles de souche C 57 Black, nourries "ad libitum". Les jeunes souris sont âgées de 1 à 2 mois et les vieilles souris de 17 à 20 mois.

B. Produits

Les solutions sont préparées avec de l'eau bidistillée et des produits "pro analysi" de la firme Merck.

Le diéthylpyrocarbonate (D.E.P.C. ou Baycovin, marque commerciale) est obtenu de la firme Bayer.

Le "Translation kit - reticulocyte lysate - amino acid L [<sup>3</sup>H]" est de la firme New England Nuclear.

Les filtres utilisés sont en fibre de verre (Whatmann), diamètre 2,5 cm GF/C (série n° 7566)

Le cocktail (solvant + scintillant) utilisé pour le comptage à scintillation liquide est de l'AQUALUMA de la firme LUMAC.

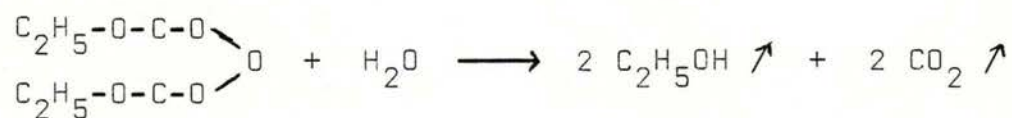
C. Conditionnement du matériel

Toutes les solutions utilisées sont préalablement stérilisées. Ceci est réalisé en leur ajoutant de la Baycovin 1/1000 (vol / vol) et en laissant ensuite bouillir le tout pendant 30 minutes afin d'éliminer la Baycovin. Il en est de même pour la verrerie et les instruments qui sont plongés dans une solution de Baycovin 1/1000. Ceux-ci sont ensuite séchés à l'étuve (120 °C).

De plus, tout autre matériel (tels l'appareil de confection et de récolte des gradients) est rincé avec une solution du même type.



La Baycovin est rapidement hydrolysée (après 2-3 heures à 20 °C et après 30 minutes à 100 °C) selon la réaction suivante :



La Baycovin inactive les protéines et est un puissant inhibiteur de la RNase, elle exerce un effet protecteur sur les polysomes. Il en est de même pour le dithiothreitol (DTT) qui agit en maintenant les ponts disulfures à l'état réduit. Il est ajouté aux solutions de saccharose et aux tampons juste avant leur emploi à raison de 1/500 (vol / vol) d'une solution 1,5 M.

#### D. Appareillage

Les centrifugations sont effectuées dans deux types de centrifugeuses : - à basse vitesse : Sorvall RC 5

Rotors type SS 34 ou HB 4

- à haute vitesse : Beckman-spinco L5-75 et L2-75 B

Rotors SW 40, SW 65 et 65 à angle

Les mesures d'absorbance se font sur un spectrophotomètre Beckman, modèle 24.

Un système "ISCO density gradient scanning" modèle 184, connecté à un "absorbance monitor ISCO" modèle UA-5, permet d'établir les profils de sédimentation en gradient de saccharose.

Une pompe péristaltique 2speed Proportionning Pump, Technicon.

Un compteur à scintillation : Beckman, LS-3150 T.

Une microfuge B, Beckman.

## II. METHODES

### A. Extraction des polysomes

Le but des manipulations qui suivent, est de préparer à partir d'un foie de souris (qu'elle soit jeune ou vieille), des polysomes purifiés, d'une part, et des polysomes "lourds" (> trisomes), d'autre part.

### 1. Préparation du foie.

Les souris sont tuées par rupture des vertèbres cervicales et décapitées ensuite. Le foie est prélevé et aussitôt plongé dans une solution de sucrose M/4 PB 75 pH 8,5 glacé (voir tableau II). Toutes les opérations suivantes sont effectuées à une température de 0 °C à 4 °C.

Le foie est ensuite pesé et passé à travers un presse-ail de manière à éliminer les tissus fibreux qui pourraient diminuer l'efficacité de l'homogénéisation.

### 2. Homogénéisation

Le tissu broyé est plongé dans 3 volumes (poids/vol) de sucrose M/4 PB 75 et homogénéisé dans un potter ( B. Braun Melsungen AG, de contenance 20 ml, n° 854240) avec un piston en teflon. La vitesse de rotation est de 2000 tours/min et on effectue 10 va-et-vient successifs.

### 3. Préparation des polysomes

L'homogénat obtenu est transvasé dans un tube en verre de 15 ml et centrifugé 3'40" à 20000 rpm (48280 g  $R_{max.}$ ) avec le rotor SS 34. Cette centrifugation sédimente les noyaux, les mitochondries et les débris cellulaires.

Le surnageant ou PMS I est recentrifugé dans les mêmes conditions. Le deuxième surnageant (PMS II) est décanté et on y ajoute 1/9 (vol/vol) de désoxycholate de sodium (DOC) à 13 %/o. L'action de ce détergent est de solubiliser les membranes et de libérer ainsi les ribosomes attachés au reticulum endoplasmique.

La mesure de l'absorbance d'un aliquot, montre qu'1 gramme de foie donne en moyenne 130 D.O. de PMS II-DOC.

Ce PMS II-DOC va, dans une première partie des expériences, être encore purifié en polysomes et, dans une seconde partie, être utilisé comme source de préparation de polysomes "lourds".

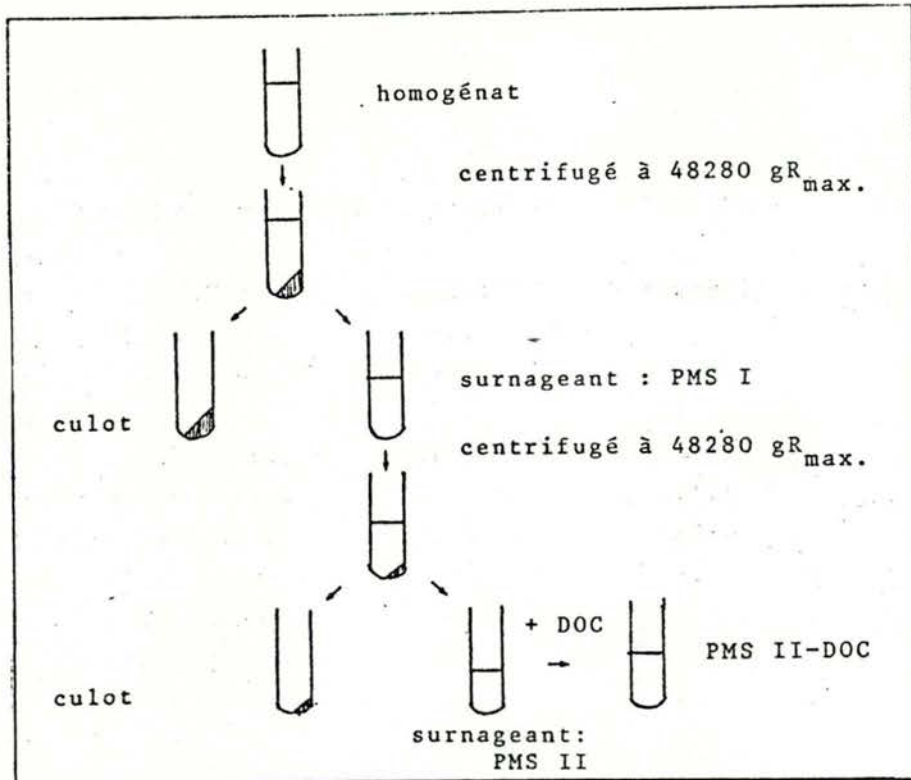


Fig. 12 : Résumé des principales étapes conduisant à l'obtention de la fraction PMS II-DOC.

Tampon PB 75	pH 8,5
Tris. HCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
KCl	75 mM

Tableau II :  
Composition du tampon PB 75.

Tampon Ramsey pH 7,4	
Tris HCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
KCl	75 mM
EDTA	0,5 mM

Tableau III :  
Composition du tampon Ramsey.



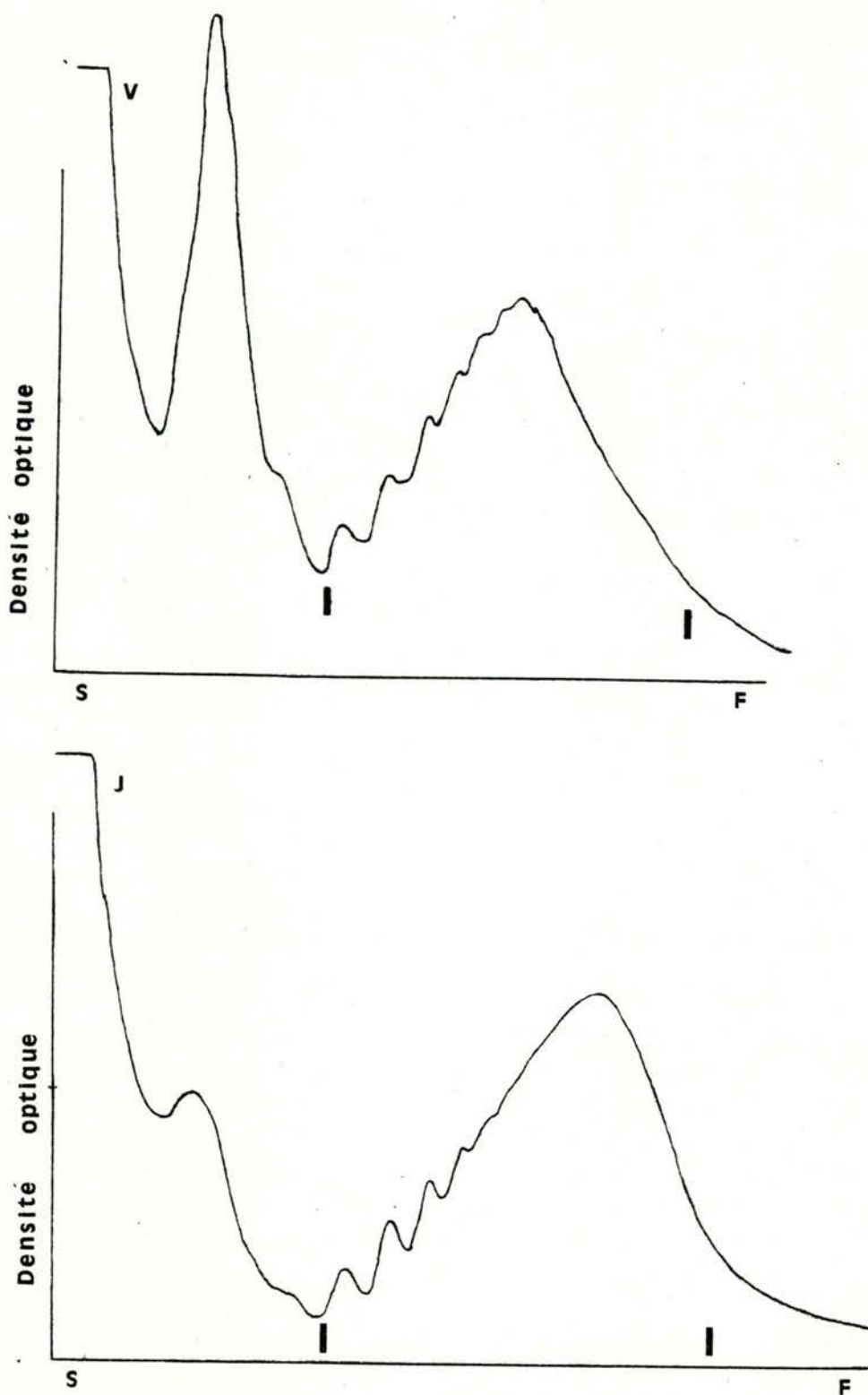


Fig. 13 : Profils de sédimentation de polysomes de foie de souris jeune (J) et vieille (V). Gradients préparatifs 15-50 de PMS II-DOC. Les deux traits indiquent la fraction du gradient récoltée : ce sont les polysomes "lourds". S et F désignent respectivement le sommet et le fond du gradient.

#### 4. Purification des polysomes.

Le PMS II-DOC est déposé sur un gradient discontinu réalisé avec 3 ml de chacune des solutions de saccharose 55 et 40,3 %/o. Ces deux solutions sont elles-mêmes obtenues à partir d'une solution stock de saccharose 2,3 M PB 75 pH 8,5 et de tampon PB 75 de manière à obtenir la concentration souhaitée. On complète le gradient avec du tampon PB 75 pH 8,5. Les gradients sont centrifugés à 65000 rpm ( $368000 \text{ g R}_{\text{max}}$ ) toute la nuit (intégrateur : 322990) dans le rotor 65 à angle fixe de manière à sédimenter les polysomes.

Après la centrifugation, les couches surnageantes sont éliminées et le culot clair que l'on obtient est lavé 3 fois avec 1 ml d'eau bidistillée. Il est ensuite resuspendu dans 100 à 150  $\mu\text{l}$  d'eau bidistillée à l'aide d'une baguette de verre. Ces polysomes sont amenés par dilutions successives à une concentration finale de 0,2 D.O. / 4  $\mu\text{l}$  pour être ensuite ajoutés au milieu acellulaire.

Le degré de pureté de cette préparation est révélé par son spectre d'absorption avec un maximum à 254 nm et le rapport  $\text{D.O.}_{260 \text{ nm}} / \text{D.O.}_{280 \text{ nm}}$  qui passe de 1,3 - 1,4 pour le PMS II-DOC à 1,7 - 1,9 pour les polysomes purifiés. Les profils de sédimentation, d'autre part, ne montre plus une forte absorbance au sommet du gradient due à des protéines. (voir fig. 14)

#### 5. Isolement de polysomes "lourds".

Le matériel de base nécessaire est le PMS II-DOC. Celui-ci est déposé sur un gradient 15-50 Ramsey préparatif et centrifugé (voir détails plus loin). Ce gradient est analysé en D.O. (fig. 13) et seule la fraction contenant les polysomes "lourds" (> trisomes) est gardée. Celle-ci est précipitée au PEG (voir plus loin p:39) et le culot est resuspendu dans quelques  $\mu\text{l}$  d'eau bidistillée jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,2 D.O. / 4  $\mu\text{l}$ . Ces polysomes seront ajoutés au milieu acellulaire.

Un aliquot de ce culot est déposé sur un gradient analytique 15-50 Ramsey de manière à vérifier "l'état" de ces polysomes, par leur profil de sédimentation. (voir fig. 15)



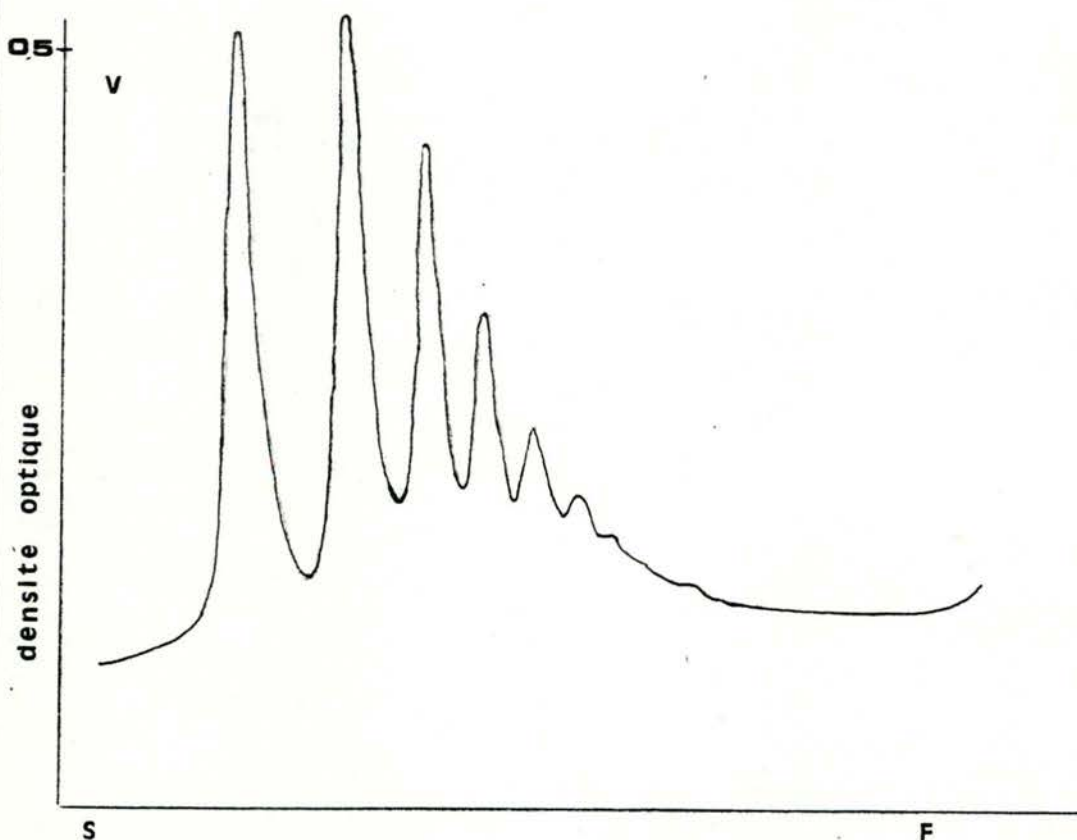
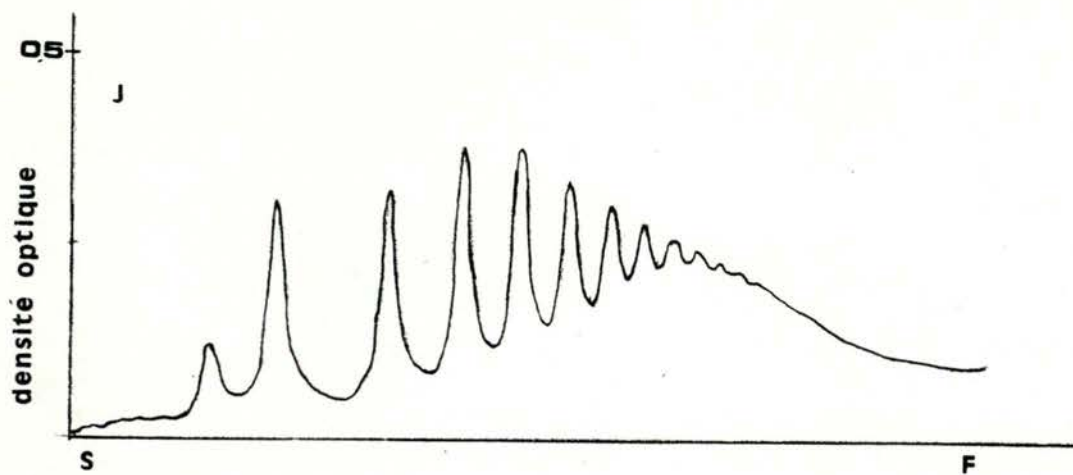


Fig. 14 : Profils de sédimentation de polysomes purifiés de foie de souris jeune (J) et vieille (V). Gradients analytiques 15-50 Ramsey . S et F désignent respectivement le sommet et le fond du gradient.

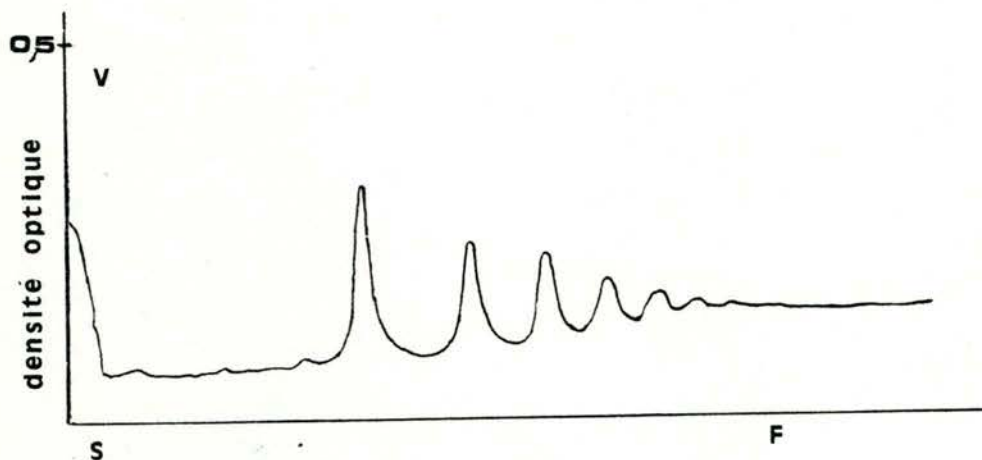
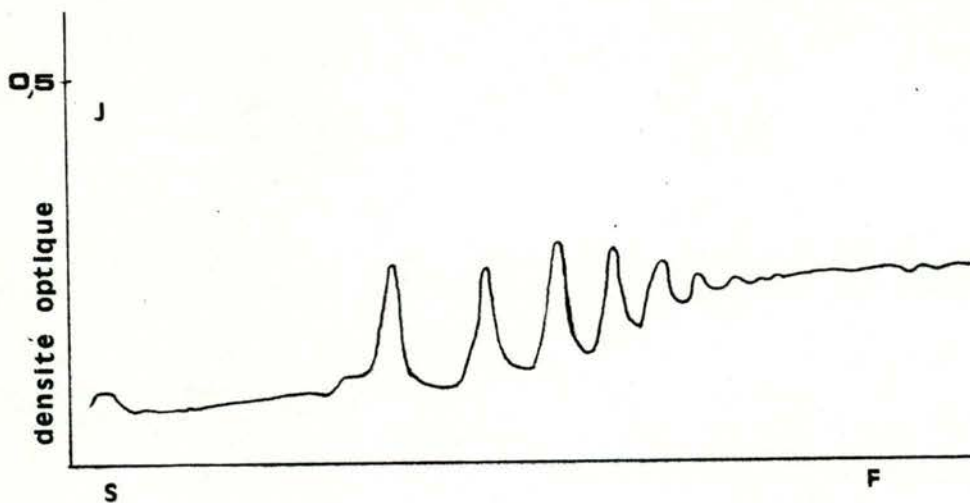


Fig. 15 : Profils de sédimentation de polysomes "lourds" de foie souris jeune (J) et vieille (V), préparés par précipitation au PEG. Gradients analytiques 15-50 Ramsey. S et F désignent respectivement le sommet et le fond du gradient.

## B. Techniques préparatives et analytiques.

### 1. Mesure de la distribution en taille des polysomes par centrifugation en gradient de saccharose.

La centrifugation de zone sépare les macromolécules suivant leurs coefficients de sédimentation. La densité du milieu de sédimentation est toujours inférieure à celle des macromolécules, de sorte qu'au delà d'un certain temps de centrifugation, celles-ci s'accumulent au fond du tube. Le gradient de densité incorporé au milieu empêche l'étalement des zones contenant des macromolécules de même coefficient de sédimentation. Le temps de centrifugation et le gradient de densité sont choisis de manière à obtenir la meilleure résolution possible.

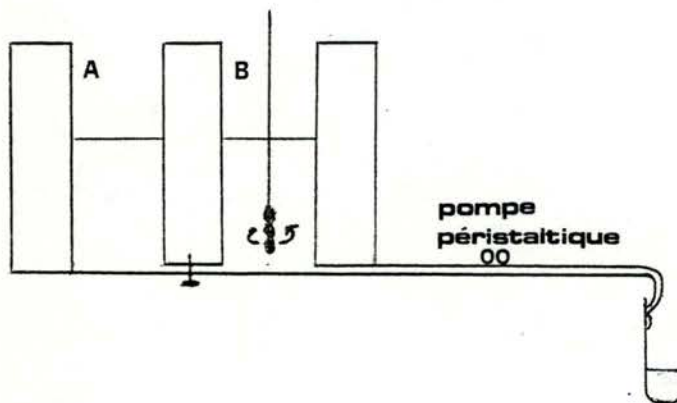
#### a) Préparation des gradients.

Ceux-ci sont réalisés à partir de deux solutions :

- \* une solution de saccharose 15 % tampon Ramsey pH 7,5
- \* une solution de saccharose 50 % tampon Ramsey pH 7,5

( la composition de ce tampon est donné dans le tableau III.)

L'appareil utilisé pour la confection des gradients est schématisé ci-dessous :



Deux compartiments, A et B, sont reliés entre eux par un conduit inférieur muni d'un robinet. Dans le compartiment B plonge un agitateur et ce compartiment communique à l'extérieur par trois canaux étroits.



Dans le compartiment A est déposé un volume de la solution de saccharose 15 % . On en introduit également dans le conduit inférieur de manière à éviter la formation d'une bulle d'air. Un même volume est ensuite déposé dans le compartiment B.

Ce volume est de 7,5 ml pour 3 tubes SW 65

19 ml pour 3 tubes SW 40.

L'agitateur est mis en route et les deux compartiments mis en communication par l'ouverture du robinet. Simultanément, on fait démarrer la pompe péristaltique. Le débit de cette pompe est de - 3 ml/min. pour les trois tuyaux utilisés pour remplir trois tubes SW 40.

- 1,35 ml/min. pour les trois tuyaux utilisés pour remplir trois tubes SW 65.

Le saccharose lourd est d'abord aspiré par la pompe, tandis que dans le compartiment B s'effectue le mélange progressif des deux solutions. On réalise qu'ainsi, du saccharose de plus en plus léger est aspiré et remplit les tubes. Le gradient formé est linéaire.

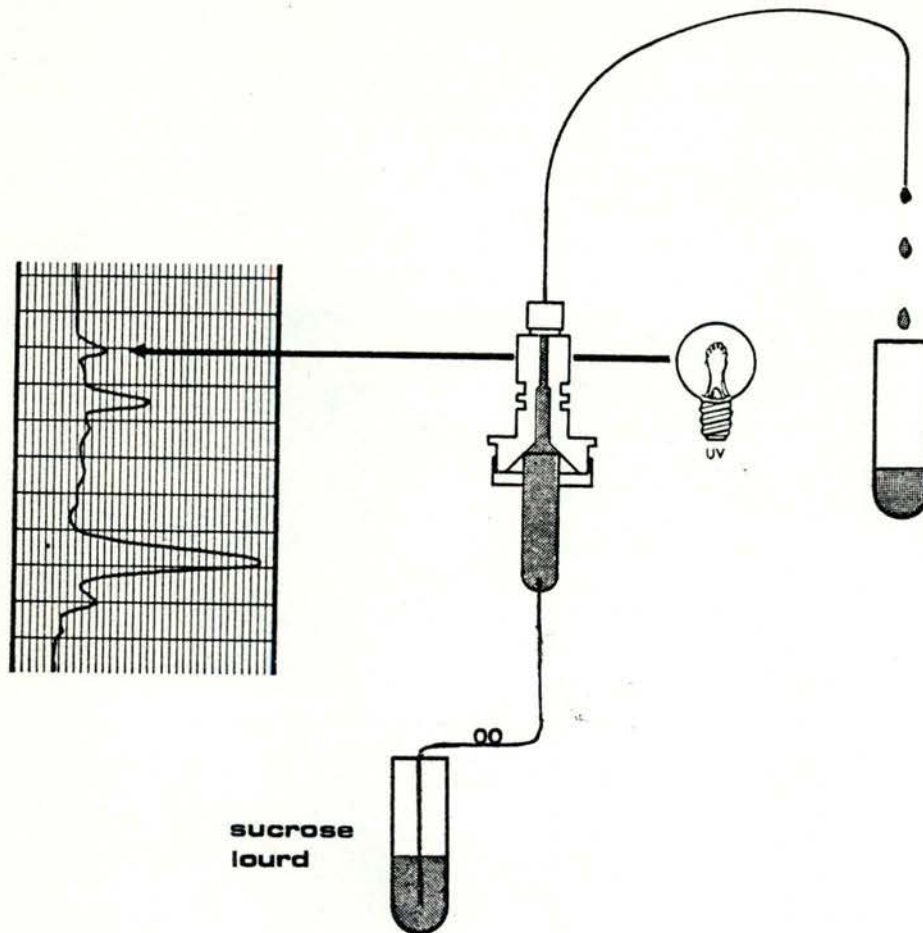
#### b) Centrifugation.

Pour des gradients analytiques, un aliquot de la suspension de polysomes (PMS II-DOC, polysomes purifiés ou polysomes "lourds") est déposé à la surface du gradient. Les gradients sont centrifugés pendant 45' à 65000 rpm (420000 g  $R_{max.}$ ) dans le rotor SW 65.

Pour des gradients préparatifs, une plus grande quantité de polysomes (PMS II-DOC) est déposée à la surface du gradient, c.à.d. environ 750  $\mu$ l. Les gradients sont centrifugés pendant 105' à 40000 rpm (284000 g  $R_{max.}$ ) dans le rotor SW 40.

#### c) Analyse.

Les gradients sont recueillis grâce à un système de percée ISCO, modèle 184 (voir "Appareillage" p:30) selon le procédé décrit dans le schéma suivant :



Le fond du tube est percé au moyen d'une aiguille creuse dans laquelle est injectée une solution de saccharose lourd (55 - 60 %). Celle-ci repousse donc vers le haut le contenu du tube. Le débit est maintenu constant grâce à une pompe péristaltique.

Tout le contenu du gradient passe devant une cellule photo-électrique et l'absorbance est mesurée en continu à 254 nm et enregistrée sur papier.

Pour les gradients analytiques, le contenu n'est pas conservé. Pour les gradients préparatifs, seule la fraction contenant les polysomes "lourds" est recueillie dans un tube en verre de 30 ml maintenu dans la glace.

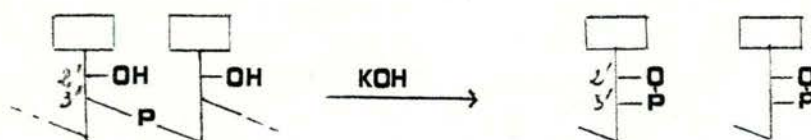
## 2. Précipitation au PEG.

Une solution de polyéthylène glycol 20 % tampon PB 75 pH 8,5 est ajoutée volume/volume à la fraction polysomale recueillie.

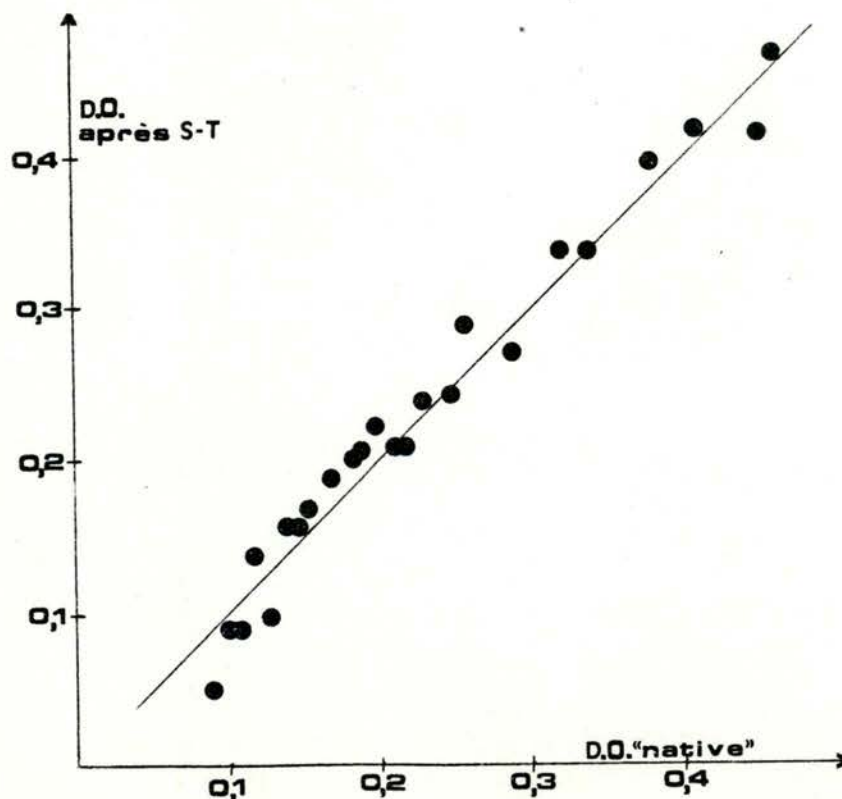
Le tout est porté à une concentration finale en  $MgCl_2$  de 10 mM, soit 1/50 (vol/vol) de  $MgCl_2$  M. Après avoir mélangé au vortex, on met le tube en verre au réfrigérateur (-16 °C) pendant toute la nuit. Le lendemain, après avoir dégelé la solution, celle-ci est centrifugée 30' à 5000 rpm (4080 g  $R_{max}$ .) avec le rotor HB 4. Le surnageant est éliminé et le culot est séché sous vide (1/2 heure minimum).

3. Mesure de l'absorbance des acides ribonucléiques par la méthode de Schmidt-Thannhauser.

Le but de cette mesure est de vérifier si la D.O. d'un échantillon lue au spectrophotomètre à 260 nm est bien due à de l'ARN. Pour cela, l'échantillon est soumis à une hydrolyse alcaline. Le KOH, en effet, hydrolysera l'ARN en fragments acido-solubles mais respectera l'ADN et la plupart des protéines cellulaires qui vont précipiter lors de l'acidification du milieu. La lecture de la D.O. à 260 nm du surnageant donnera une mesure de l'absorbance due à l'ARN.



Des expériences préliminaires (FOULON, communication personnelle) ont été réalisées à partir de différentes concentrations en polysomes purifiés. La D.O. "native" et la D.O. mesurée après le Schmidt-Thannhauser de différents échantillons mises en graphique, donne la relation suivante :





Pour chaque échantillon, on procède comme suit :

- \* On travaille à partir d'un échantillon de 0,5 ml dont on mesure la D.O. à 260 nm. C'est ce qu'on appelle la "D.O. native".
- \* On y ajoute 250  $\mu$ l d'acide perchlorique (PCA) 2 N froid. On mélange au vortex et après 15 min. à 0 °C, l'échantillon est centrifugé 4' 30" à la microfuge.
- \* Le surnageant est recueilli et le précipité est lavé en lui ajoutant 0,5 ml de PCA 0,7 N froid. Après mélange, on centrifuge le tout 4' 30" à la microfuge.  
Le surnageant est écarté et le précipité est lavé de la même manière. On obtient donc un nouveau précipité et un troisième surnageant, qu'on joint aux deux autres.
- \* Les trois surnageants rassemblés, forment le "blanc" du test. L'échantillon pouvait effectivement contenir de l'ARN hydrolysé qui aurait interféré avec l'ARN hydrolysé par le KOH dans la mesure de D.O.

La lecture de l'absorbance se fait à 260 nm. Le "blanc" est lu contre le mélange suivant : 1 ml d'eau bidistillée, 1 ml de PCA 2 N et 2 ml de PCA 0,7 N.

- \* Le précipité est entre-temps soumis à une digestion alcaline en lui ajoutant 0,5 ml de KOH 0,3 N. Ceci pendant 1 heure à 37 °C.
- \* Après 1 heure, l'échantillon refroidi est acidifié en lui ajoutant 100  $\mu$ l de PCA 5 N froid. Après 15 min. à 0 °C, il est centrifugé pendant 4' 30" à la microfuge.
- \* Le surnageant est conservé et le précipité est lavé avec 0,5 ml de PCA 0,5 N froid. Après une nouvelle centrifugation, la même opération est répétée de manière à obtenir une récupération maximale des fragments d'ARN acido-solubles.
- \* Les trois surnageants sont rassemblés et centrifugés 10 min. à 5000rpm (4080 g  $R_{max.}$ ) avec le rotor HB 4.  
Le surnageant de cette centrifugation contient l'ARN hydrolysé et on en mesure la D.O. à 260 nm. Cette lecture se fait contre une solution composée de 1 ml de KOH 0,3 N, 200  $\mu$ l de PCA 5 N et 2 ml de PCA 0,7 N. Elle est centrifugée en même temps que les échantillons et c'est le surnageant qui sert à faire la lecture.

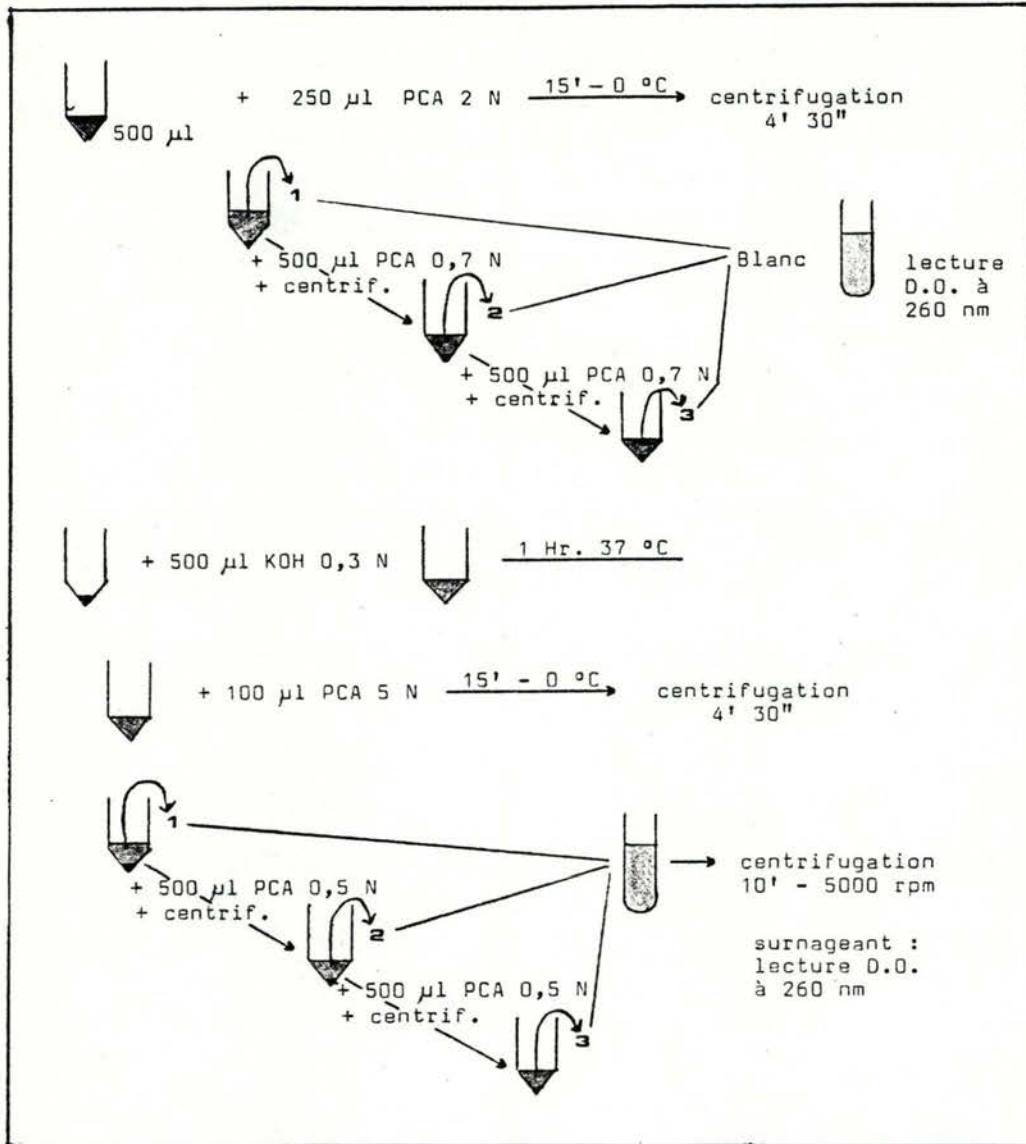


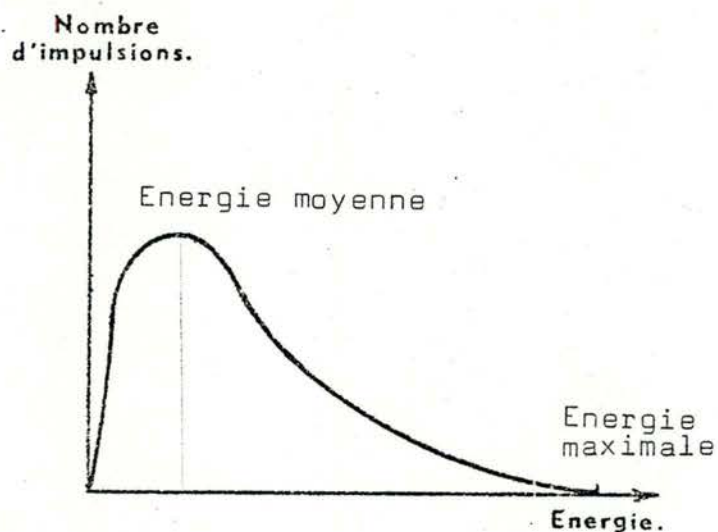
Fig. 16 : Schéma résumant les différentes étapes de la méthode appliquée (détails p:41)

Le rapport de la D.O. après et avant le Schmidt-Thannhauser donne une idée de la fiabilité de la lecture de la D.O. "native" en tant que mesure de la concentration en ARN. En effet, l'absorbance à 260 nm peut être due en partie à des protéines. Si ce rapport est égal à 1, la "D.O. native" sera une mesure fiable de la concentration en ARN.

4. Mesure de la radioactivité  $\beta$  par scintillation liquide.

Le comptage à scintillation liquide se base sur la mesure de la lumière émise par les photons provenant d'atomes qui ont été excités, directement ou indirectement, par les rayonnements  $\beta$  c.à.d. par des électrons.

Chaque isotope  $\beta$  émet des électrons qui ont des énergies cinétiques très différentes. On peut ainsi tracer le spectre d'émission des rayonnements :



Isotope	En. max.	En. moy.
$^3\text{H}$	18 Kev	55 Kev
$^{14}\text{C}$	159 Kev	49 Kev
$^{32}\text{P}$	1700 Kev	
$^{35}\text{S}$	167 Kev	50 Kev
$^{45}\text{Ca}$	254 Kev	75 Kev

On voit ainsi que chaque isotope est caractérisé par son énergie de désintégration.



Le but du comptage à scintillation liquide étant de transformer l'énergie cinétique des électrons lors de l'émission, en énergie lumineuse, on interpose entre l'endroit où ces électrons sont émis et l'endroit de la mesure, des intermédiaires.

L'échantillon est placé dans une fiole en verre, et on lui adjoint du "cocktail", qui est composé d'un faible taux de scintillant primaire (le soluté) dissout dans un solvant organique.

Les meilleurs solvants organiques sont des hydrocarbures aromatiques, comme le toluène ou le xylène. La configuration chimique de ces molécules avec un noyau benzène, est telle qu'elles ont des électrons particuliers qui sont relativement peu liés aux atomes de carbone et peuvent ainsi atteindre des états excités lors de radiations.

L'énergie absorbée peut être transférée à des molécules de scintillant qui possèdent à leur tour des électrons excités. A la suite de quoi, ces molécules émettent des radiations visibles ou photons. Ces scintillants sont aussi des molécules aromatiques. (Ex. : PPO = 2-5 diphenyloxazole)

Si la lumière émise à partir du premier scintillant n'est pas dans la bonne gamme de longueur d'onde pour le photomultiplicateur, un second scintillant peut être ajouté au cocktail. Il absorbera l'énergie venant du premier scintillant et la réémettra sous forme de photons de longueur d'onde plus élevée. (Ex. : POPOP = 1,4,bis-5-phenyloxazolyl benzène)

Les photons émis vont passer ensuite dans un photomultiplicateur qui est une cellule photoélectrique transformant la mesure du photon en mesure électrique. Le tube du photomultiplicateur comprend une photocathode qui émet des électrons sous l'action des photons. Les électrons sont attirés par la dynode suivante (ou électrode intermédiaire) qui se trouve à un potentiel plus positif que la photocathode. Les électrons ainsi accélérés vont frapper la dynode et un nombre plus important d'électrons vont être réémis par la dynode. Ceux-ci sont attirés par la dynode suivante et ainsi de suite jusqu'à l'anode.

On constate donc que de l'électron émis jusqu'à l'impulsion électrique, de nombreuses pertes interviennent aux différents niveaux.

On appelle - cpm le nombre de coups par minute indiqué par l'appareil de comptage.

- dpm le nombre de désintégrations par minute des atomes radioactifs.

- l'efficacité d'un comptage, le rapport  $\frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$

Tous les phénomènes qui tendent à affaiblir l'efficacité portent le nom de "quenching".

Par exemple, l'énergie d'excitation électronique, plutôt que d'être réémise sous forme de photons, est convertie en énergie de vibration qui se dissipe en chaleur soit spontanément, soit au cours de collisions ou de réactions avec des molécules voisines.

Le "quenching" peut aussi provenir de la présence de substances étrangères au sein de la solution scintillante. Certaines impuretés du solvant ou des substances scintillantes, de même que certains éléments de l'échantillon à compter, captent l'énergie à leur profit et la réémettent sous une forme non radiative et dégradée, souvent sous forme de chaleur.

Dans les dernières étapes de transfert d'énergie, l'atténuation des photons peut se faire par la coloration de l'échantillon.

Un dernier facteur contribuant à la diminution du rendement de comptage, est le phénomène d'autoabsorption. Celle-ci se produira, et c'est ici notre cas, lors du comptage d'échantillons se trouvant sur un papier filtre. Cette perte est due à l'absorption des rayons  $\beta$  par l'échantillon lui-même et dépendra de la forme physique de l'échantillon et de l'énergie de la particule.

Naturellement, l'efficacité sera d'autant plus faible que l'énergie du radioisotope sera faible.

Les effets des différentes formes de "quenching" sont toujours les mêmes : un certain nombre de désintégrations étant "perdues", il en résulte d'une part, une perte du nombre d'impulsions enregistrées à la sortie du tube photomultiplicateur, et d'autre part, une diminution de l'amplitude de ces impulsions. (Ce deuxième effet ne sera pratiquement pas observé pour le tritium.)

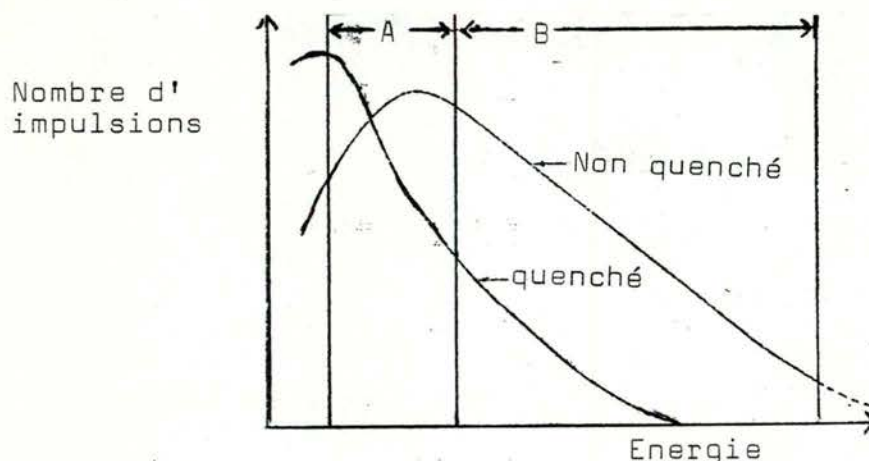


Pratiquement, comment peut-on déterminer l'efficacité du comptage ?

a) Méthode du rapport des canaux de comptage.

Tout "quenching", quelle que soit sa nature, entraîne un déplacement du spectre d'énergie vers les énergies plus faibles, consécutif à une atténuation de l'intensité de l'émission lumineuse.

Dans un échantillon "quenché", le rapport entre le nombre d'impulsions enregistré dans deux parties du spectre diffère donc de celui calculé à partir d'un échantillon non "quenché".



Au plus le "quenching" augmente, au plus le déplacement du spectre sera important et au plus le rapport B/A deviendra petit. Comment, à partir de ce rapport trouver l'efficacité ?

On établit une droite d'étalonnage en utilisant une quantité fixe d'isotope, en présence de différents agents "quenchant". Sachant que  $1 \mu\text{Ci}$  vaut  $2,22 \times 10^6$  dpm, on peut estimer le nombre de dpm qu'on a par échantillon. Le nombre de cpm étant donné par l'appareil, on peut calculer l'efficacité. Le rapport B/A étant aussi fourni, on pourra construire une droite d'étalonnage, qui sera différente pour chaque isotope.



b) Standardisation par source externe.

C'est la méthode que nous avons adoptée. Elle est entièrement automatisée. Elle est basée sur le principe suivant : on amène près de la fiole à compter une source de radioactivité  $\gamma$  très énergétique ( $Cs^*$ ). La courbe d'émission des rayons  $\gamma$  sera différente suivant le "quenching".

Les mesures de l'efficiéne permettent de constater si, d'une fiole à l'autre, celle-ci est différente. Si c'est le cas, une correction des valeurs de cpm en dpm est nécessaire pour pouvoir comparer ces valeurs.

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé comme supports du matériel radioactif, des disques en fibre de verre. Pourquoi ?

Un des avantages réside dans le fait qu'aucune absorption ne se fait dans la fibre elle-même, de plus, les disques peuvent être traités avec des acides forts dans le but de redissoudre des matériaux, sans avoir d'effet nuisible sur le support lui-même. Mais, ces disques en fibre de verre posent des problèmes : le premier se situe au niveau du marquage de ceux-ci, car le graphite est facilement effacé. Il faut donc graver un chiffre dans le disque de manière délicate. En effet, ces disques en fibre de verre sont très fragiles et se désagrègent facilement; c'est là leur second inconvénient. Au cours des traitements qu'ils subissent, passages dans des acides, chauffage, etc..., de petits fragments peuvent se détacher, emportant avec eux des parcelles de radioactivité. Cela se marquera alors dans les résultats des expériences.

C. Traduction en milieu acellulaire.

Nous avons vu dans l'introduction (p:26) le type de système acellulaire que nous avons utilisé.

Pour pouvoir tester les polysomes de foie de souris, les ribosomes du lysat de réticulocytes sont enlevés par une centrifugation préalable. Celle-ci est réalisée dans une airfuge (Beckman) pendant 1 heure à 100000 rpm (165000 g  $R_{max}$ ). Pour vérifier si les ribosomes ont bien été enlevés, on fait un test en ajoutant au milieu d'incubation de l'ARNm de globine. L'incorporation d'acides aminés marqués, dans ce cas, est quasi nulle.

Pour les tests d'incorporation d'acides aminés marqués, nous procédons comme suit :

- Des filtres numérotés sont prétrempés dans de l'acide trichloracétique (TCA) 10 % et séchés avant de commencer les tests.
- Des petits tubes contenant 110  $\mu$ l d'eau bidistillée sont également préparés et maintenus dans la glace fondante. Ils serviront à diluer les 2  $\mu$ l que l'on prélèvera du milieu. Ensuite, 100  $\mu$ l de l'échantillon dilué sont déposés sur le filtre. De cette manière, la radioactivité est répartie sur toute la surface et l'efficacité de comptage meilleure que dans le cas où l'échantillon de 2  $\mu$ l est déposé directement sur le filtre.
- Finalement, le milieu d'incubation est réalisé par le mélange de :
  - \* 8,5  $\mu$ l de leucine tritiée
  - \* 2  $\mu$ l de "cocktail", préparation commerciale contenant de la spermidine, de la créatine phosphate et de la guanosine triphosphate dans de l'acide N-2-hydroxyethyl piperazine N-2-éthane sulfonique.
  - \* 2  $\mu$ l d'acétate de K 1M.
  - \* 0,5  $\mu$ l d'acétate de Mg 32,5mM. 50- N  
→ 32.5 -
  - \* 8  $\mu$ l de lysat.
- Ce milieu est préincubé 2 min. à 25 °C. C'est à cette même température que le test d'incorporation est réalisé.

- Après ces 2 min., 4  $\mu$ l de polysomes sont ajoutés au milieu. (Ils sont à une concentration de 0,2 D.O./4  $\mu$ l.) Directement après mélange, 2  $\mu$ l sont prélevés et déposés <sup>dans</sup> un tube contenant 110  $\mu$ l d'eau bidistillée. Après avoir mélangé, on reprélève 100  $\mu$ l qu'on dépose sur le filtre n° 1, aussitôt plongé dans le TCA 10 % froid, ceci en vue de précipiter les protéines, les acides aminés, l'ARN ... sur le filtre.
- Cette opération est répétée après 2,4,6,8,10,15,20,30 et 45 min.
- Le TCA est ensuite porté à ébullition pendant 15 min. de manière à redissoudre tout ce qui n'est pas protéines.
- Après refroidissement, les filtres sont lavés successivement à l'eau bidistillée, à l'éthanol et à l'acétone. TCA 10%
- Dès qu'ils sont secs, ils sont placés dans des fioles en verre utilisées pour le comptage à scintillation, avec 10 ml d'Aqualuma. Les fioles sont mises à compter pendant 10 min. chacune.



## R E S U L T A T S   E T   I N T E R P R E T A T I O N

### I. MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

- A. Contrôle de la "quantité" des polysomes.
- B. Contrôle de la "qualité" des polysomes.
- C. Caractérisation de la cinétique d'incorporation d'acides aminés marqués en fonction du temps.
- D. Contrôle de la reproductibilité de la méthode.
- E. Contrôle de la sensibilité de la méthode.
- F. Optimisation des conditions pour la comparaison de l'efficiéce des polysomes "jeunes" et "vieux".
  1. Choix de l'acide aminé marqué.
  2. Choix de la température d'incubation.
  3. Choix de la "quantité" de polysomes.
  4. Choix du "type" de polysomes.

### II. CINETIQUES D'INCORPORATION DE LEUCINE TRITIEE

- A. Résultats.
- B. Analyse.
- C. Interprétation.
  1. Que signifie l'existence d'un plateau ?
  2. Que représente l'intervalle de temps séparant le moment où les polysomes sont mis dans le milieu (temps 0) et le moment où le plateau est atteint (temps t) ?
  3. Comment interpréter la pente ?
  4. Qu'est-ce que l'efficiéce de traduction ?
  5. Pourquoi observe-t-on, pour les polysomes "jeunes", une vitesse d'incorporation (pente) et un taux d'incorporation (plateau) de leucine tritiée plus élevés ?
    - 5.1. Ces différences sont-elles dues à l'ARNm ?
    - 5.2. Ces différences sont-elles dues aux ribosomes eux-mêmes ?
    - 5.3. Ces différences sont-elles dues aux facteurs protéiques associés aux ribosomes ?

## R E S U L T A T S     E T     I N T E R P R E T A T I O N

### I. MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Le but de nos expériences est d'étudier les performances de la machinerie de synthèse protéique en fonction du vieillissement. Pour ce faire, nous avons mesuré la synthèse protéique in vitro, par des polysomes de foie de souris jeunes et vieilles. (Nous parlerons dorénavant en abrégé de polysomes "jeunes" et de polysomes "vieux".)

Nous avons vérifié la "quantité" (mesurée en D.O.) et la "qualité" des polysomes ainsi que la reproductibilité et la sensibilité du système expérimental.

#### A. Contrôle de la "quantité" des polysomes.

Celle-ci est mesurée par la D.O. lue au spectrophotomètre à 260 nm. L'absorbance est à la fois due à l'ARN, pour la plus grande partie, et à des protéines. . . .

Nous pouvions craindre que le rapport ARN/protéines ne soit pas le même pour les "jeunes" et pour les "vieux" polysomes. De ce fait, nous aurions introduit une "quantité" différente de polysomes dans les deux cas. Pour mesurer cette éventuelle différence, nous avons appliqué la méthode de Schmidt-Thannhauser décrite dans le paragraphe "méthodes", (p. 40-41). Les valeurs obtenues pour quelques expériences sont données dans le tableau résumé p: 62.

Ces valeurs sont le rapport de la D.O. lue à 260 nm après et avant le S-T. Nous constatons que nous obtenons des valeurs proches de 1 pour les deux classes d'âge.

Ceci nous permet de nous fier à cette mesure de la D.O. comme indication de la "quantité" de polysomes utilisée.

#### B. Contrôle de la "qualité" des polysomes.

Si nous voulons étudier les différences fonctionnelles de polysomes "jeunes" et "vieux", il faut nous assurer de leur état de conservation au terme de leur purification.

En effet, au cours de ces manipulations, l'ARNm reliant entre eux les ribosomes, peut avoir été clivé après avoir été soumis à des forces de cisaillement mécaniques ou à l'action non contrôlée d'une RNase exogène ou endogène. De tels polysomes sont à écarter, leurs capacités fonctionnelles étant diminuées.

Le test utilisé pour ce contrôle est le profil de sédimentation, couramment utilisé au laboratoire. La fig. 17 nous montre deux profils, un profil de polysomes intacts et un profil de polysomes dégradés.

Notons, qu'au niveau des profils de polysomes intacts, on observe une différence entre "jeunes" et "vieux" (fig. 13 et 14). Ce n'est pas dû à un mauvais contrôle de cet "outil", mais à une variabilité biologique propre aux polysomes. Nous constatons, par exemple, que les profils de "jeunes" et de "vieux" sont différents quant à la proportion de monosomes, qui est plus grande chez les "vieux" et quant à la taille moyenne des polysomes, qui est plus élevée chez les "jeunes".

Cette proportion plus importante de monosomes chez les "vieux" ne provient pas d'un artéfact, car des expériences effectuées au laboratoire, de marquage de chaînes naissantes, in vivo, par de la leucine tritiée, montrent que la radioactivité ne se retrouve pas au niveau des monosomes, ce qui serait le cas s'ils provenaient d'une dégradation.



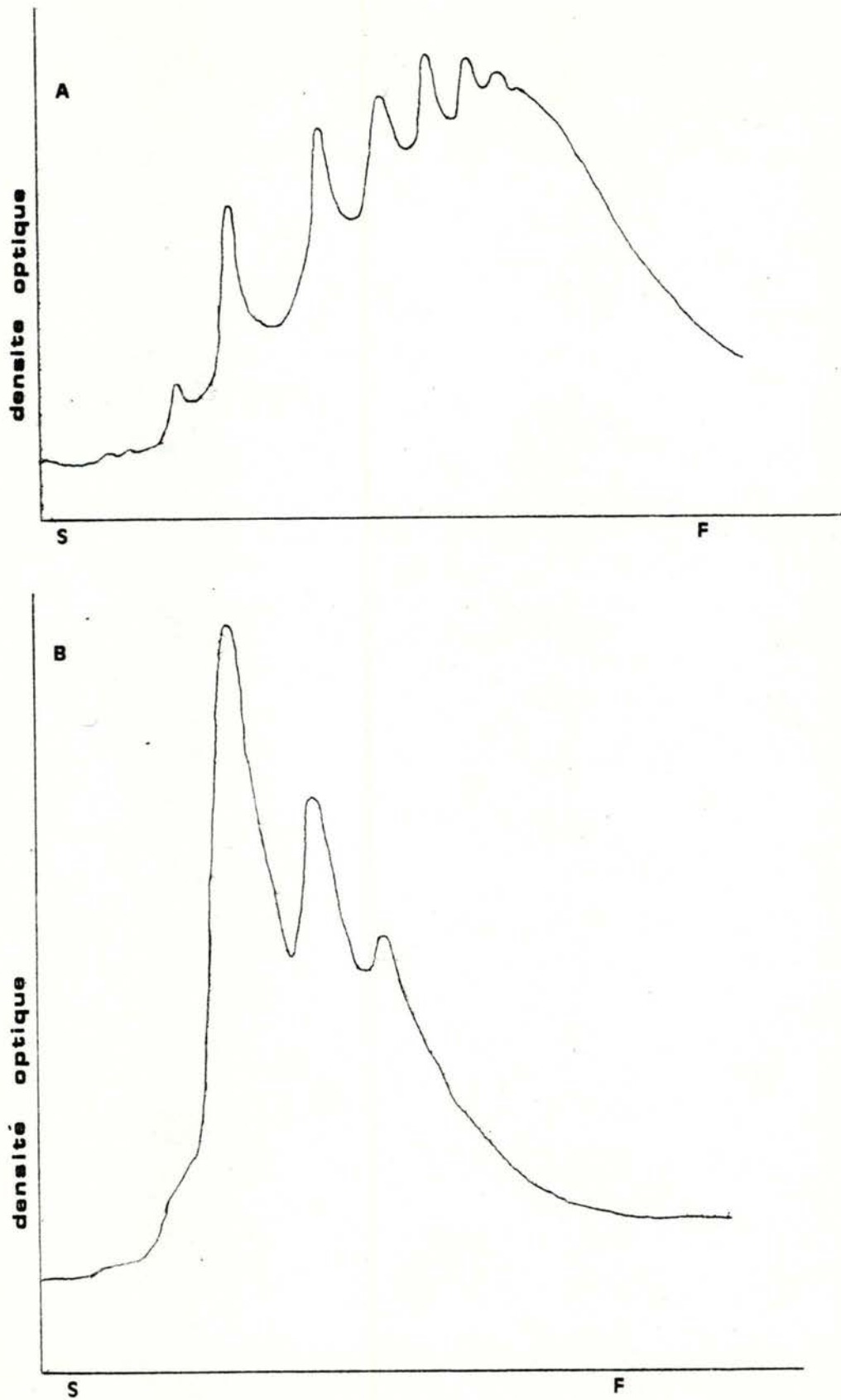


Fig. 17 : Comparaison des profils de sédimentation de polysomes de foie de souris jeunes, purifiés, intacts (A) et dégradés (B). Gradients analytiques 15-50 Ramsey. S et F désignent respectivement le sommet et le fond du gradient.

C. Caractérisation de la cinétique d'incorporation d'acides aminés marqués en fonction du temps.

Cette cinétique est "l'outil" qui nous a permis d'effectuer nos expériences et les contrôles dont nous allons parler.

L'allure générale de cette cinétique est donnée à la fig. 18. Nous avons décidé de la caractériser par :

- la hauteur de son plateau qui est le nombre de coups/min. maximum obtenu en fin de cinétique.
- la valeur de sa pente, qui est la tangente de l'angle  $\alpha$ , c'est-à-dire l'augmentation du nombre de CPM/unité de temps dans la partie linéaire de la cinétique.
- le temps  $t$  après lequel le plateau est atteint. Cette valeur étant difficilement appréciable, nous avons choisi de déterminer ce temps comme étant celui correspondant à l'intersection des droites caractérisant la pente et le plateau.

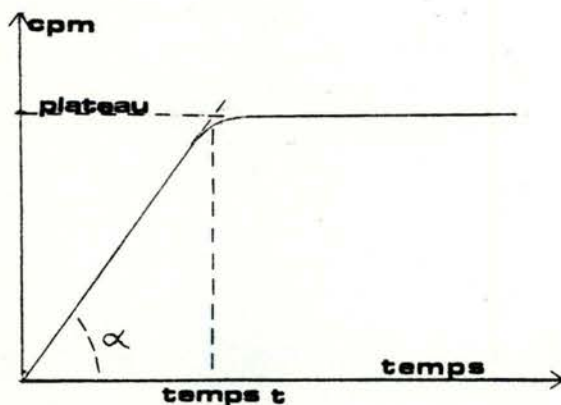


Fig. 18 :

Représentation schématique d'une cinétique d'incorporation d'acides aminés marqués en fonction du temps.

D. Contrôle de la reproductibilité de la méthode.

Pour effectuer ce contrôle, 2 expériences d'incorporation de leucine tritiée ont été réalisées consécutivement et dans des conditions identiques. Les 2 cinétiques sont présentées à la fig.19.

Nous constatons que les valeurs obtenues s'alignent assez bien sur des courbes et que celles-ci sont quasiment superposables.

E. Contrôle de la sensibilité de la méthode.

Il s'agit dans ce cas, de vérifier si des variations de concentration en polysomes se traduisent par une incorporation différente. Pour ce faire, une "quantité" différente de polysomes a été ajoutée à 3 milieux d'incubation identiques (voir fig. 20).

Nous constatons, qu'au voisinage du plateau (à 12 min.) une différence de 0,1 D.O. se traduit par une différence de 5000 CPM.

Celle-ci nous paraît suffisante pour dire que la méthode utilisée est sensible.

F. Optimisation des conditions pour la comparaison de l'efficacité des polysomes "jeunes" et "vieux".

Rappelons d'abord que nous avons travaillé avec un milieu acellulaire fourni par la firme NEN. Cet ensemble commercial ne permet qu'un choix limité des conditions, les volumes, concentrations, ... étant des conditions standards.

1. Choix de l'acide aminé marqué.

La firme NEN fournit ce genre de milieu acellulaire avec, soit de la méthionine marquée au  $^{35}\text{S}$ , soit avec de la leucine marquée au tritium ( $^3\text{H}$ ).

Quelques expériences de mise au point des conditions expérimentales ont été effectuées avec de la méthionine [ $^{35}\text{S}$ ]. Toutes les autres expériences ont été réalisées en présence de leucine tritiée. La leucine est en effet un acide aminé plus fréquent dans les protéines que la méthionine. Sa probabilité d'incorporation est donc plus élevée. Bien que le niveau de radioactivité atteint (hauteur du plateau) en présence de leucine tritiée soit moins élevé (d'environ 30 %) qu'en présence de méthionine [ $^{35}\text{S}$ ], celui-ci est suffisant pour effectuer nos mesures.



## 2. Choix de la température d'incubation.

La traduction étant réalisée grâce à des enzymes, nous comprenons qu'elle dépendra de la température. A 37 °C, les cinétiques d'incorporation d'acides aminés présentaient des pentes trop élevées et les plateaux étaient atteints après des temps  $t$  trop courts. Nous avons choisi dès lors de travailler à la température de 25 °C, de manière à ralentir la réaction. Ceci nous a permis d'effectuer plusieurs prélèvements dans la partie linéaire de la cinétique.

## 3. Choix de la "quantité" de polysomes.

Les cinétiques obtenues en présence de différentes concentrations en polysomes sont présentées à la fig. 20. Nous voyons que la vitesse initiale d'incorporation d'acides aminés marqués et le nombre de CPM atteint au voisinage du plateau (12 min.) sont proportionnels à la concentration en polysomes ajoutée. Nous avons choisi la concentration de 0,2 D.O./4  $\mu$ l car nous sommes dans une zone où la sensibilité et la fidélité de la méthode ont été testées (voir fig. 19 et 20).

## 4. Choix du "type" de polysomes.

Dans les méthodes de préparation de polysomes décrites dans la littérature, de nombreux tampons sont utilisés. Leur principale différence se situe au niveau de la concentration en KCl. Celle-ci varie de 50 à 500 mM. Nous avons testé deux concentrations : 75 mM et 250 mM. Les polysomes préparés en présence de KCl 75 mM seront appelés "polysomes 75" et ceux préparés en présence de KCl 250 mM seront appelés "polysomes 250".

La fig. 21 nous montre le type de cinétiques observées dans les deux cas.

Nous voyons qu'à environ 6 min. les "polysomes 250" sont arrivés à leur maximum d'incorporation, tandis que les "polysomes 75" continuent à incorporer jusqu'à 20 min. environ.

Nous avons travaillé avec les "polysomes 75" de manière à pouvoir effectuer facilement plusieurs prélèvements dans la zone linéaire de la cinétique. Le fait qu'une forte concentration en KCl peut enlever les facteurs d'initiation (voir "introduction" p: 24) a aussi orienté notre choix.

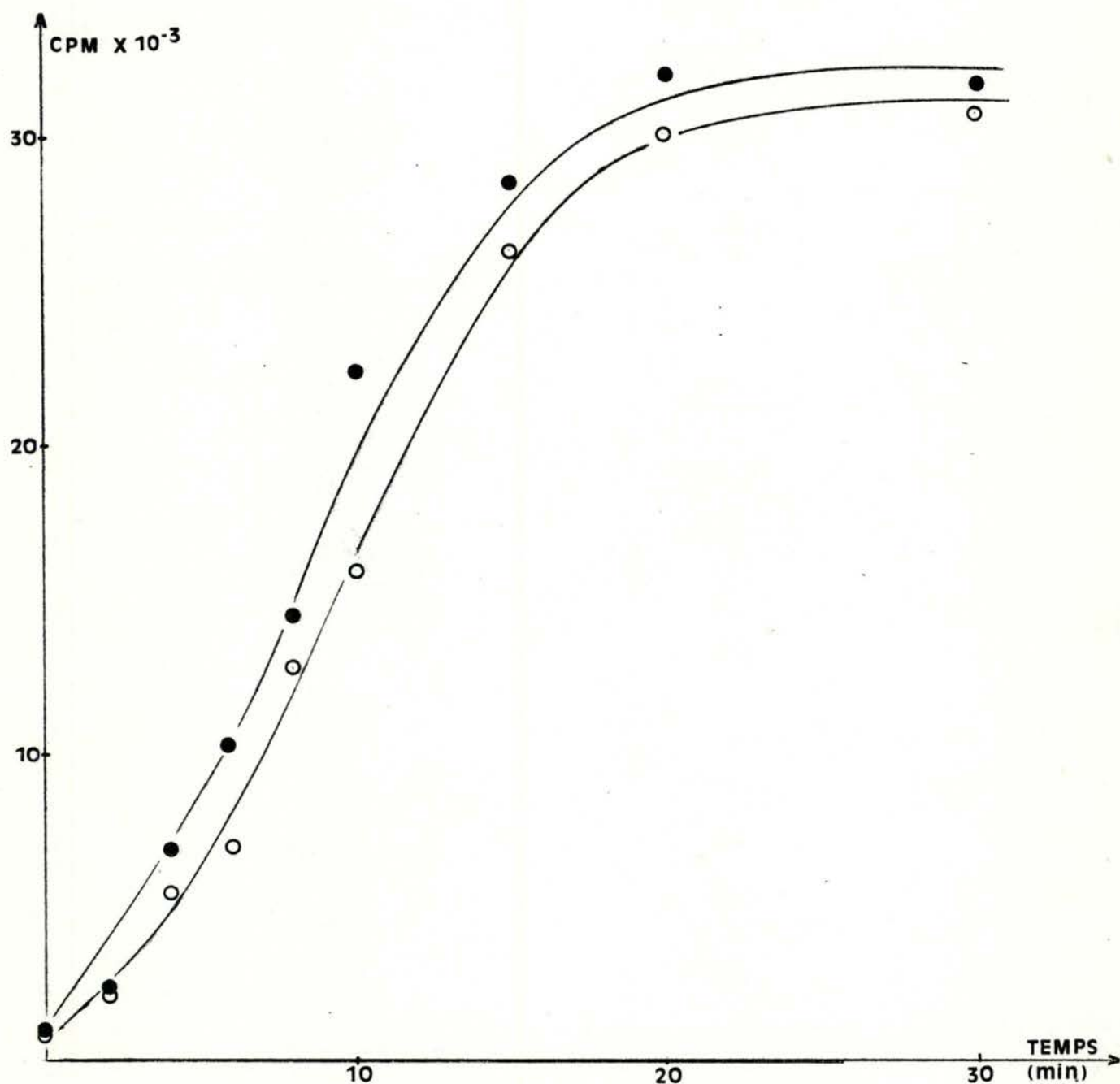


Fig. 19 : Etude de la reproductibilité de la méthode. Cinétiques d'incorporation de leucine tritiée par des "polysomes jeunes" (● et ○). Ces polysomes sont à une concentration de 0,2 D.O./ 4  $\mu$ l. La température d'incubation est de 25 °C. La radioactivité, exprimée en CPM x 10<sup>-3</sup> est mesurée dans la fraction insoluble dans le TCA.

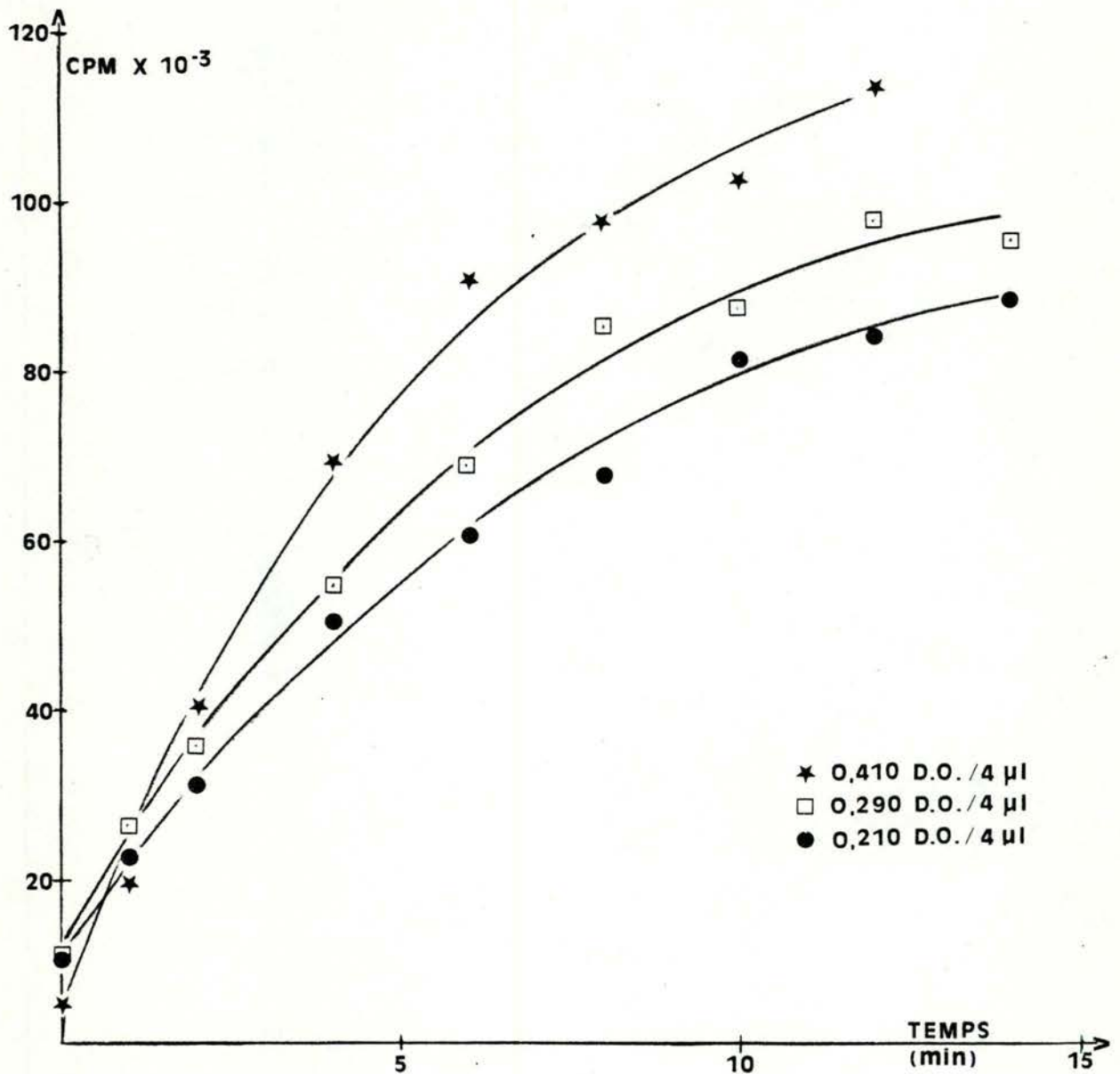


Fig. 20 : Comparaison des cinétiques d'incorporation de méthionine  $[^{35}\text{S}]$  par des polysomes "jeunes", purifiés, se trouvant à des concentrations variables dans le milieu. La température d'incubation est de 25 °C. La radioactivité exprimée  $\text{CPM} \times 10^{-3}$  est mesurée dans la fraction insoluble dans le TCA.



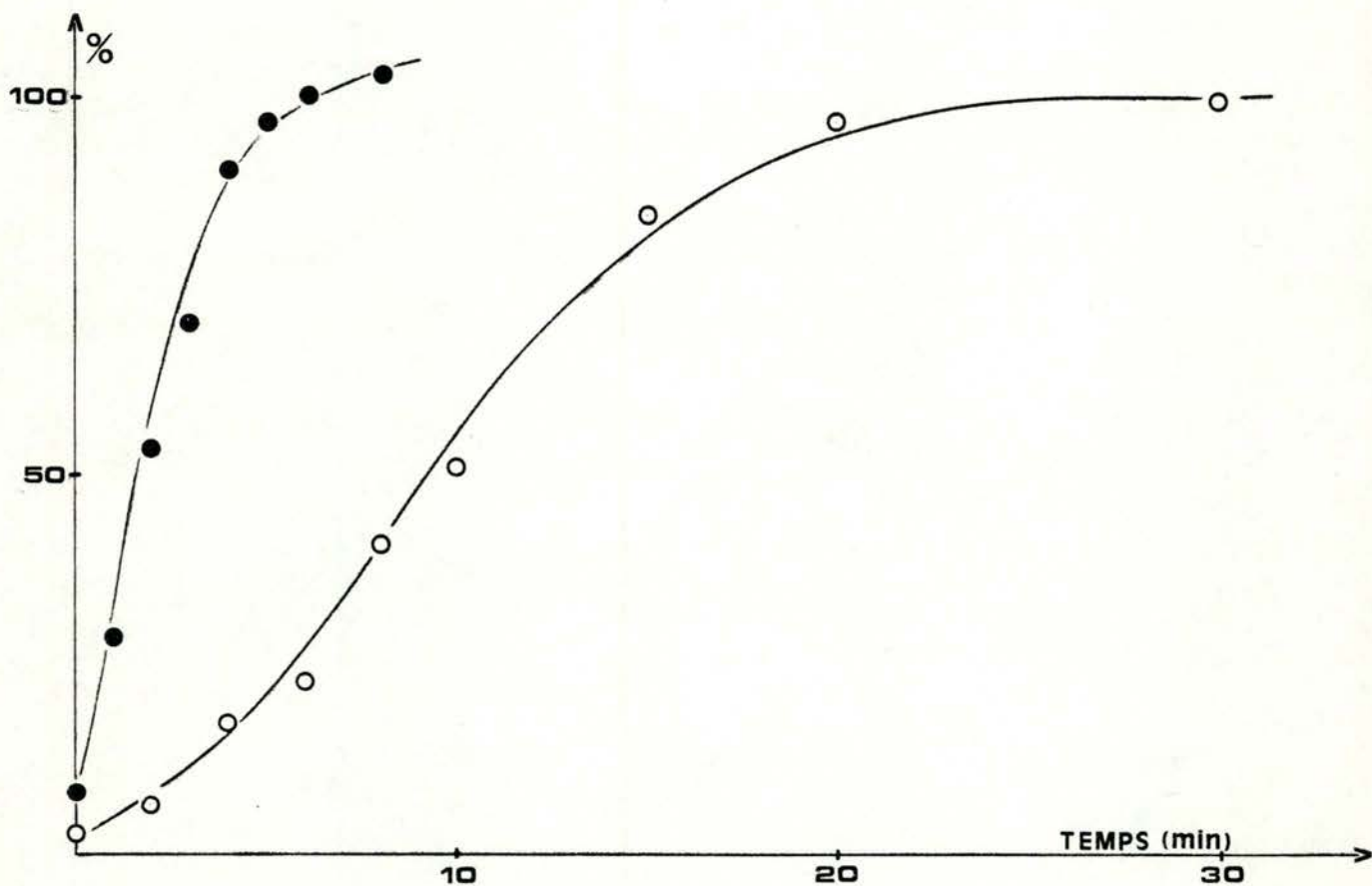


Fig. 21 : Comparaison des cinétiques d'incorporation d'acides aminés marqués par des "polysomes 250" (●) et des "polysomes 75" (○). La radioactivité, mesurée dans la fraction insoluble dans le TCA, est exprimée en pourcentage de radioactivité maximum. La température d'incubation est de 25 °C.

## II. CINETIQUES D'INCORPORATION DE LEUCINE TRITIEE

### A. Résultats

La fig. 22 nous montre les cinétiques obtenues pour des polysomes purifiés (voir "méthodes" p:34). Au total, 7 expériences ont été réalisées. Les résultats en sont donnés dans le tableau résumé p:62.

Ces résultats peuvent aussi se présenter graphiquement. Les graphiques (fig. 23 et 24) représentent les relations entre, d'une part, la hauteur du plateau et le temps après lequel celui-ci est atteint et, d'autre part, la hauteur du plateau et la valeur de la pente au cours d'une même cinétique.

### B. Analyse

L'analyse des données présentées au tableau IV révèle une certaine variabilité au sein de chaque classe d'âge. Cette variabilité peut provenir de la variabilité biologique des échantillons et de différences non contrôlées dans la procédure expérimentale. Cette dernière source de variation se manifeste principalement pour nos premières expériences, dans la proportion en polysomes "lourds" après purification.

Une réduction de la taille moyenne des polysomes dans l'échantillon de polysomes purifiés peut refléter une extraction préférentielle de petits polysomes, ou l'action non contrôlée de RNases présentes dans le milieu de purification.

On doit s'attendre à ce que la présence de polysomes fragmentés par des RNases réduise le taux d'incorporation de leucine dans les chaînes polypeptidiques. On a pu éliminer l'éventualité de la présence de RNases, en vérifiant qu'il n'y avait pas d'augmentation relative de la radioactivité associée aux chaînes naissantes des monosomes après un marquage bref à la leucine.

Il eût été utile, pour faciliter la comparaison de l'efficacité des polysomes des deux classes d'âge en milieu acellulaire, de rapporter la hauteur du plateau à la proportion de polysomes "lourds". Nous avons appelé ce rapport "plateau spécifique".

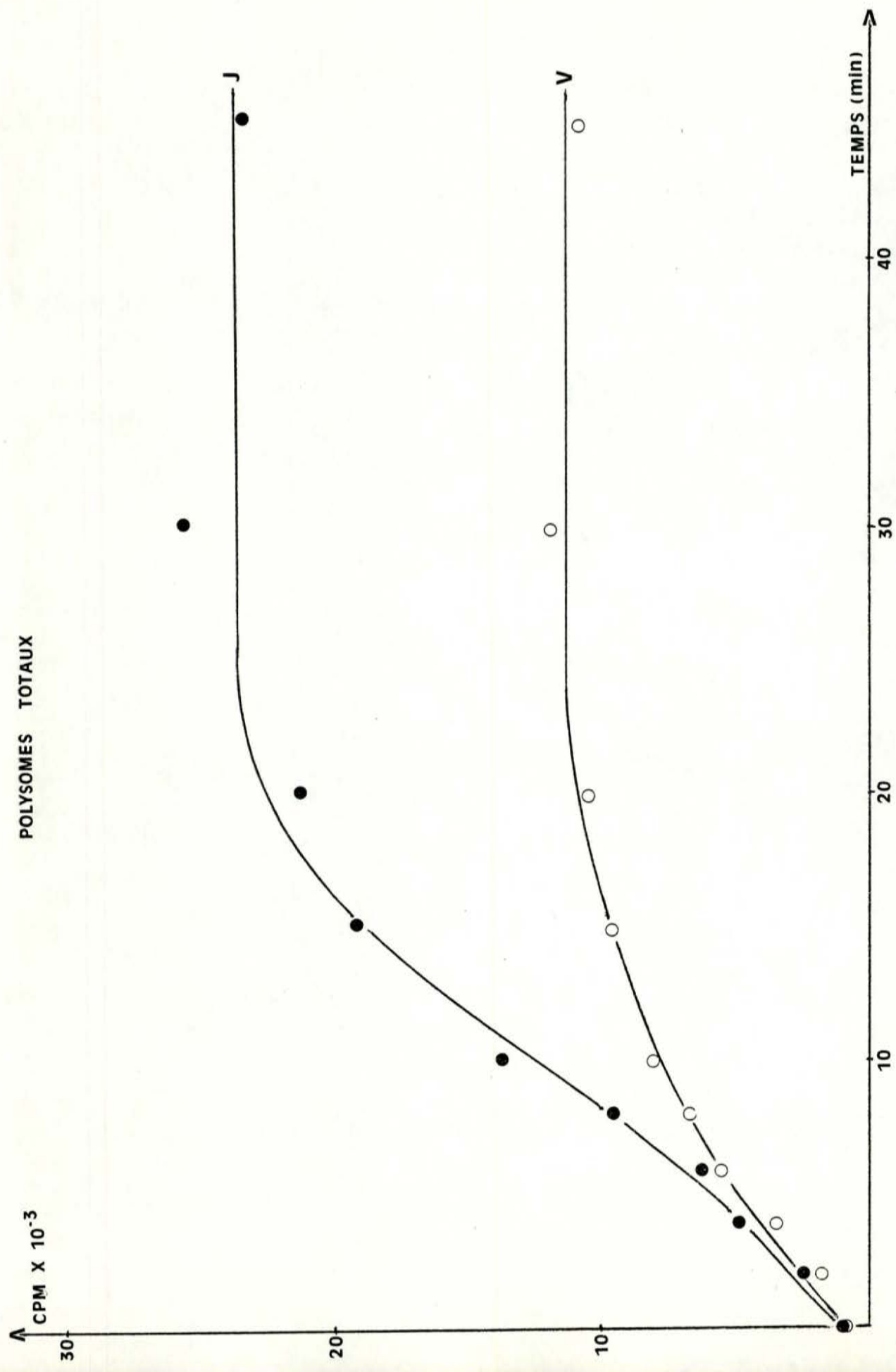


Fig. 22 : Cinétiques d'incorporation de leucine tritiée par des polysomes totaux, "jeunes" (●) et "vieux" (○). Ces polysomes sont à une concentration de 0,2 D.O./4 µl. La température d'incubation est de 25 °C. La radioactivité, exprimée en CPM x 10<sup>-3</sup>, est mesurée dans la fraction insoluble dans le TCA.



Tableau IV : Tableau résumé des cinétiques d'incorporation de leucine tritiée par des polysomes totaux. Le plateau est exprimé en CPM. Le temps est exprimé en minutes. La pente est exprimée en CPM/minute. S-T est le rapport de la D.O. avant et après le Schmidt-Thannhauser.

Expérience	JEUNES				VIEUX			
	Plateau	temps	Pente	S-T.	Plateau	temps	Pente	S-T.
1	10800	26	349		7500	24	256	
2	24000	18,6	1245		8000	12	590	
3	16400	17	980	1,00	7500	11	460	0,95
4	17000	20,2	835		5200	12,6	360	
5	13000	16,6	550	0,96	15400	17	860	0,89
6	35000	25,4	1440	0,96	22400	19	770	0,92
7	30000	20	1500		10000	15	550	
8					11200	14,2	735	
9	35000				14000			
Moyenne	20886	20,5	986		10900	15,6	573	
Ecart-type	9047	3,8	439		5573	4,3	209	

Tableau V : Tableau résumé des cinétiques d'incorporation de leucine tritiée par des polysomes "lourds".

Expérience	JEUNES				VIEUX			
	Plateau	temps	Pente	S-T.	Plateau	temps	Pente	S-T.
1	24000	12,8	1650		11400	24	<del>315</del>	
2	22000	14,8	1060	1,02	18000	19,8	610	1,02
3	24000	14	1520	1,03	9000	10,3	600	0,99
4	11000	10,5	830	0,98	12000	15,8	510	1,02
Moyenne	20450	13	1265		12600	17,5	509	
Ecart-type	6409	11,9	385		3826	5,8	137	

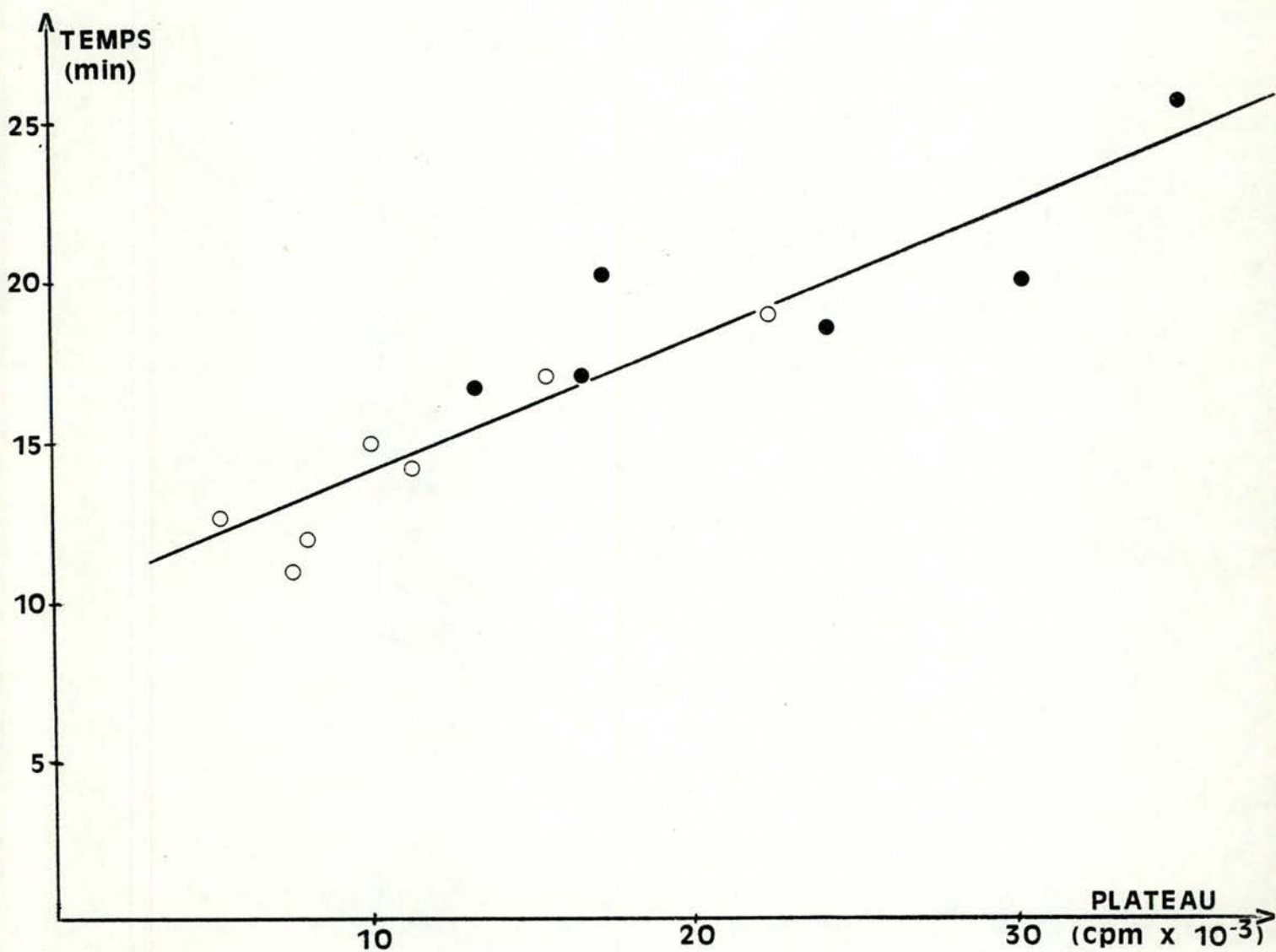


Fig. 23 : Relation plateau / temps t après lequel ce plateau est atteint. Cette relation a été établie à partir des valeurs observées pour les cinétiques d'incorporation de leucine tritiée par des polysomes totaux "jeunes" (●) et "vieux" (○).

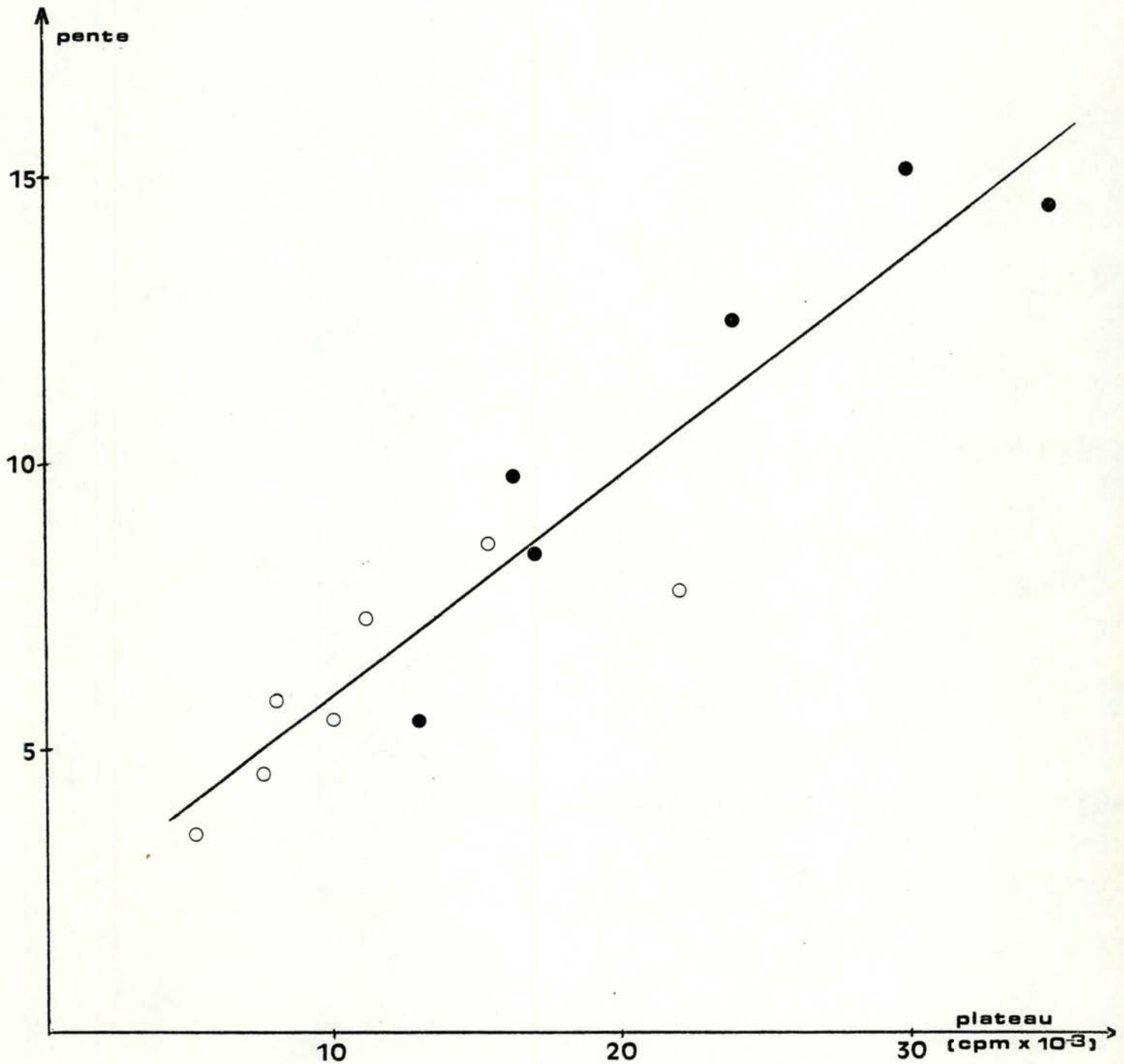


Fig. 24 : Relation plateau / pente . Celle-ci a été établie à partir des valeurs observées pour les cinétiques d'incorporation de leucine tritiée par des polysomes totaux "jeunes" (●) et "vieux" (○).



Nov 1974  
Rochester NY

Ne se peut que de  
fragmentation  
Quid pendant  
(p. 1070)  
appelons ainsi que ... ml  
ambr. que RN as associis  
sur tout aux lettres lofomes ?  
AVANT incubation  
incubation

? exprimé comme si c'était un artefact d'extraction -

Pour définir cette proportion de manière précise, il aurait fallu réaliser des profils analytiques selon des critères de résolution plus exigeants que ceux que nous avons adoptés en routine au début de ce travail. Dans quelques cas (5), cette mesure a pu être faite. Si la variabilité avait pour cause l'existence d'une proportion plus ou moins grande de polysomes fragmentés (surtout des monosomes et des disomes) alors, le fait de ramener la hauteur du plateau à la proportion de polysomes "lourds" doit diminuer cette variabilité. On constate que celle-ci ne diminue presque pas. C'est donc une extraction préférentielle de petits polysomes qui explique principalement la diminution de la taille moyenne des polysomes purifiés.

Il ressort des données que :

- la hauteur du plateau atteint par les polysomes "jeunes" est, en moyenne, plus élevée que celle atteinte par les polysomes "vieux".
- le temps t après lequel ce plateau est atteint est plus long pour les polysomes "jeunes".
- la vitesse d'incorporation de leucine tritiée (la pente) est plus grande pour les polysomes "jeunes".

Après calcul des plateaux spécifiques, la différence entre polysomes "jeunes" et "vieux" subsiste, mais est réduite.

C. Interprétation

1. Que signifie l'existence d'un plateau ?

Qu'il n'y a plus de protéines formées, que la machinerie de synthèse protéique s'est arrêtée, qu'il n'y a plus d'initiation.

Deux cas sont ici à envisager : soit les ribosomes réinitient un nombre limité de fois, soit ils ne réinitient pas. Dans ce dernier cas, la hauteur du plateau dépendra du nombre de protéines formées après un temps de transit, les polysomes se "vidant" peu à peu.

élongation  
translation  
de terminaison

"à taille + petite" *spécifier + petite* Pg?  
ce n'est pas la taille ? *taille qui joue jusqu'à un autre ribosome doit donner un output qq.*  
donc c'est qq. chose qui accompagne le fait d'être



Des polysomes ayant "fonctionné" dans le milieu acellulaire pendant un certain temps, peuvent être purifiés et séparés sur un gradient analytique. Comme la quantité de polysomes prélevée du milieu est trop faible pour permettre une analyse en D.O., on y ajoute une "D.O. marqueur" (+ ou - 1 D.O. de polysomes "froids"). La lecture en D.O. du gradient permet d'identifier les pics correspondants aux différentes tailles de polysomes alors que les chaînes naissantes, associées aux différentes classes de polysomes, sont "repérées" grâce à une mesure de la radioactivité dans chaque fraction. Si cette expérience est faite à des temps d'incubation variables, on peut suivre l'évolution du "profil de chaînes naissantes" en fonction du temps.

S'il n'y a pas réinitiation, on peut s'attendre à ce que, après un bref temps d'incubation, la radioactivité associée aux polysomes soit déplacée vers la région des polysomes légers.

Si par contre, il y a réinitiation, alors la distribution des chaînes naissantes coïncidera pendant plusieurs temps de transit avec la distribution des différentes classes de taille de polysomes.

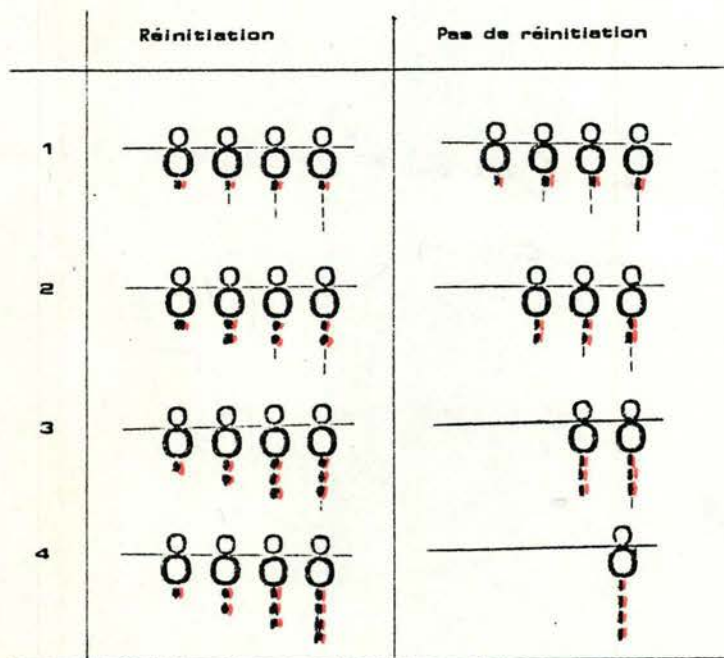


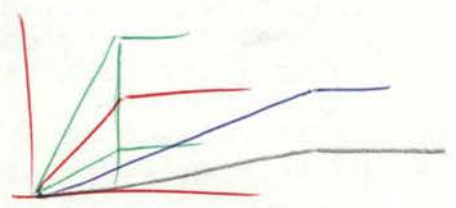
Fig. 25 : Représentation schématique des 2 cas envisagés. Dans le cas où il n'y a pas réinitiation, le polysome figuré se "vide" peu à peu et devient consécutivement un trisome, un disome et finalement un monosome. Il en va de même pour un polysome de n'importe quelle taille. S'il y a réinitiation, le polysome figuré reste tel qu'il est. Il finira pas se "vider" après un certain temps. Chaque trait représente la portion de protéine synthétisée pendant le temps  $T_i$ , qui est le temps séparant deux initiations successives. Ce trait est rouge quand la portion de protéine est marquée.

*supplément  
longueur  
de réinitiation*



elle peut constater aussi d'un  
 bloc de terminaison.  
 à voir : y a-t-il un décalé du micromètre pour  
 si on : programme zéro ←  
 bon  
 aussi  
 pas p 70.

distinguer en l'avant pour les  
 situations rhéologiques



*résultats  
(non  
numériques)*

Les expériences préliminaires réalisées au laboratoire montrent que, après des temps d'incubation de 5 à 15 min., il y a des chaînes naissantes associées aux polysomes "lourds" et, la distribution des chaînes naissantes semble coïncider avec celle des polysomes, ce qui indique que dans nos conditions il y a réinitiation pendant un certain temps.

Pourquoi le nombre d'initiations est-il limité ?

La cause est à rechercher soit dans le milieu d'incubation (comprenant les facteurs énergétiques, les ARN de transfert, les acides aminés, ...), soit dans la préparation de polysomes qui y est ajouté.

Pour savoir ce qui est "limitant", nous avons rajouté des polysomes au milieu, alors que le plateau était atteint. Dans ce cas, on observe une nouvelle augmentation de radioactivité liée aux protéines (fig. 26) (N. RECKINGER, communication personnelle). La contre-expérience consistant à rajouter du lysat au milieu d'incubation, alors que le plateau est atteint, ne modifie pas la cinétique initiale.

Ce sont donc les polysomes qui deviennent non fonctionnels après un certain temps.

- 2. Que représente l'intervalle de temps séparant le moment où les polysomes sont mis dans le milieu (temps 0) et le moment où le plateau est atteint (temps t) ?

Dans le cas où il y a réinitiation, ce temps t est celui durant lequel les ribosomes recyclent. Au plus nombreux seront les cycles, au plus il y aura de protéines synthétisées et plus haut sera le plateau atteint. *toute autre chose égale (si constante)*

Nos résultats sont en accord avec ce principe. En effet, nous observons que dans le cas où le temps t est grand, le plateau atteint est élevé (Fig. 23). C'est le cas pour les polysomes "jeunes" où on observe un nombre de cycles ou un nombre d'initiations plus grand que pour les polysomes "vieux".

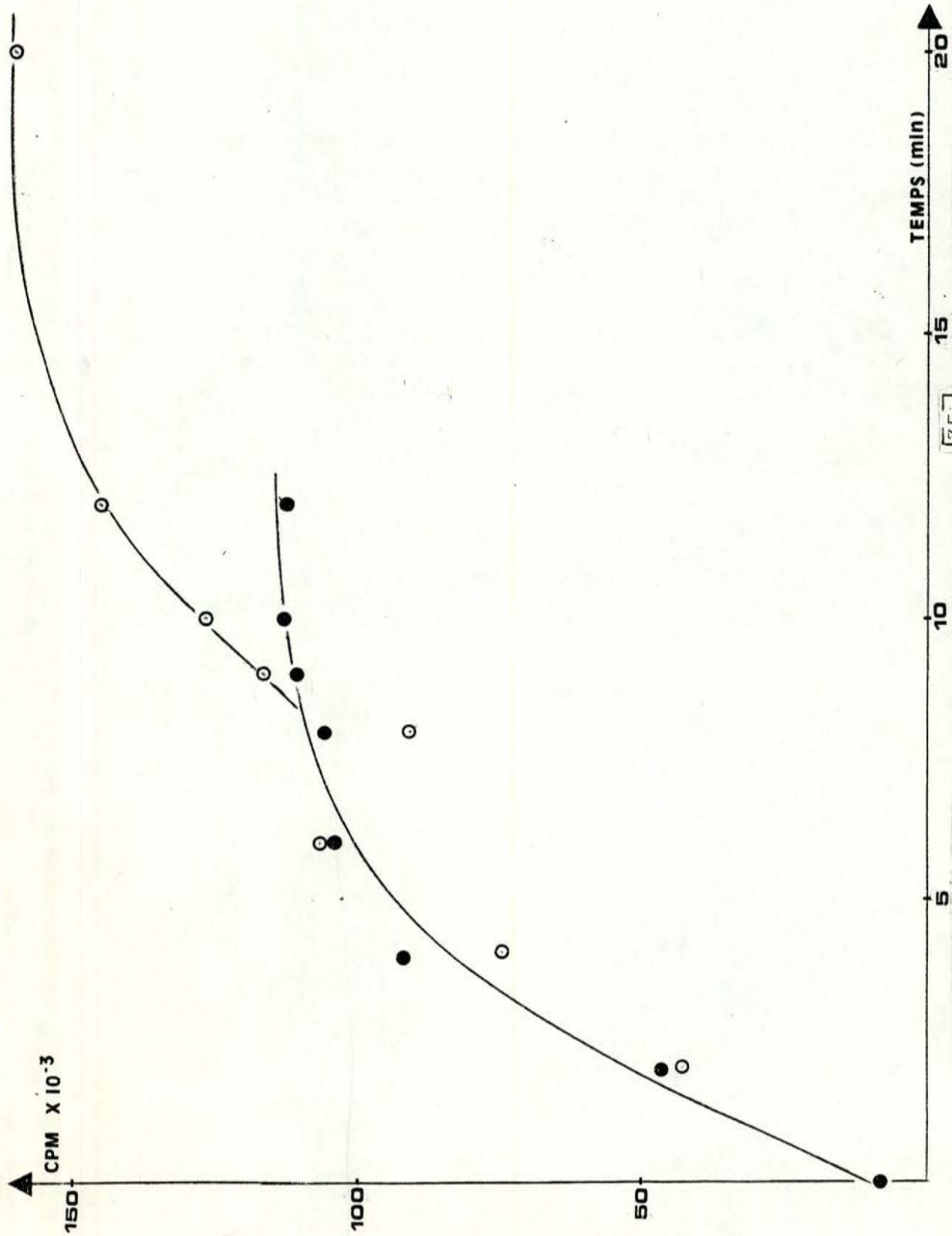


Fig. 26 : Cinétiques d'incorporation de méthionine [35S], par des "polysomes 250". Ceux-ci sont à une concentration de 0,350 D.O./4  $\mu$ l. La cinétique "contrôle" est figurée par -○-. La cinétique observée après addition de 2  $\mu$ l de polysomes est figurée par ●-●-. La température d'incubation est de 25 °C. La radioactivité, exprimée en CPM x 10<sup>-3</sup>, est mesurée dans la fraction insoluble dans le TCA.



in support steady state

alors  $v_i \rightarrow$  lié à }  $v_{termination}$   
dit  $v_{elongation}$  }  $\rightarrow$  détermine  $\hat{v}_{synth. prot.}$

l'un ne peut changer sans les autres  
en d'autres termes:  $v_i \rightarrow$  lié à  $v_j$

le veut par dire que c'est l'initiation qui est  
limitante et encore moins que  $v_{termination}$  (à l'initiation)  
et en cause.

pour inspecter vale blement l'initiation

dire - c'est possible (cf autres syst.)

= in vitro: profils moins lents  $f_{vitesse}$  -  
à savoir le contraire si  $\left. \begin{matrix} \text{élongation} \\ \text{ralentis} \end{matrix} \right\} t.$

= in vitro: shift <sup>16</sup> Castic acid profils vers  
les light.

c'est contraire qui attendrait un  
block de termination !!

l'immobilisation  
effet RNase ?  
+ activité sur  
polyomes gels?

pour vérifier: test direct - heparine (block i)

### 3. Comment interpréter la pente ?

C'est la vitesse d'incorporation de leucine tritiée dans les protéines. La radioactivité totale liée aux protéines est la somme de la radioactivité "soluble" c.à.d. liée aux protéines libérées et de radioactivité "polysomique" c.à.d. liée aux chaînes naissantes.

Selon un modèle mathématique décrivant l'augmentation de la radioactivité lors de la synthèse protéique (J. DELCOUR, communication personnelle), on montre que

$$t_r = k A_0 \nu_i t$$

où  $t_r$  = radioactivité totale

$k = i \times C$       $i$  = activité spécifique du pool de traceur  
 $C$  = contenu des protéines en traceur

$\nu_i$  = la fréquence d'initiation  
( le nombre d'initiation / unité de temps )

$A_0$  = longueur moyenne des messages ( en acides aminés ou en codons)

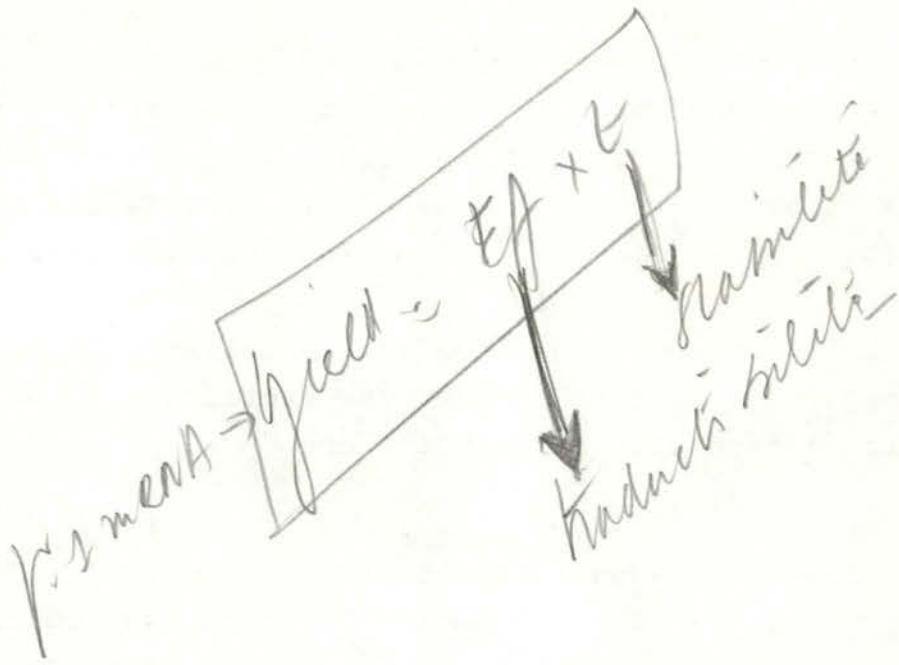
Il apparaît, tout autre chose étant égale, que la vitesse d'incorporation du précurseur, ou l'augmentation / unité de temps de la radioactivité liée aux protéines, est fonction de la fréquence d'initiation.

La pente plus grande qu'on observe pour les polysomes "jeunes" peut donc s'interpréter en terme de fréquence d'initiation plus grande.

*autre interprétation → p 5!*

La comparaison des profils de sédimentation des polysomes "jeunes" et "vieux", in vivo, montre une diminution de la taille moyenne des polysomes chez les "vieux".

Sachant que  $R_0 = A_0 \times \nu_i / V_e$  (voir "Introduction" p: 24), tout autre chose étant égale, une diminution de la fréquence d'initiation peut expliquer la proportion plus élevée de polysomes "lourds" chez les "jeunes".





*n définit p<sub>2</sub>  
② m RNA  
m RNA m RNA m RNA ?*

4. Qu'est-ce que l'efficiencia de traduction ?

L'efficiencia de traduction est définie comme le nombre de chaînes polypeptidiques complètes libérées par chaque ARNm, par unité de temps (PALMITER, 1975).

L'efficiencia de traduction est fonction de la taille du polysome (R<sub>0</sub>) et du temps de transit d'un ribosome (t<sub>e</sub>), par la relation :

$$T_{eff.} = R_0 / t_e \quad \text{où} \quad R_0 = A_0 \times v_i / V_e$$
$$t_e = A_0 / V_e$$

$$T_{eff.} = v_i$$

Ceci est vrai, si chaque ribosome qui commence la synthèse d'un polypeptide le termine. Cela suppose que ni l'élongation, ni la terminaison ne soient limitantes, ou encore, que tous les ARNm soient intacts, ce dont nous ne pouvons être entièrement certains.

*frig incorporation ↑*  
5. Pourquoi observe-t-on, pour les polysomes "jeunes", une vitesse d'incorporation (pente) et un taux d'incorporation (plateau) de leucine tritiée plus élevés ? *entre i*

Nous savons, que c'est de la préparation de polysomes que nous ajoutons au milieu d'incubation, que proviennent les différences observées.

5.1. Ces différences sont-elles dues à l'ARNm ?

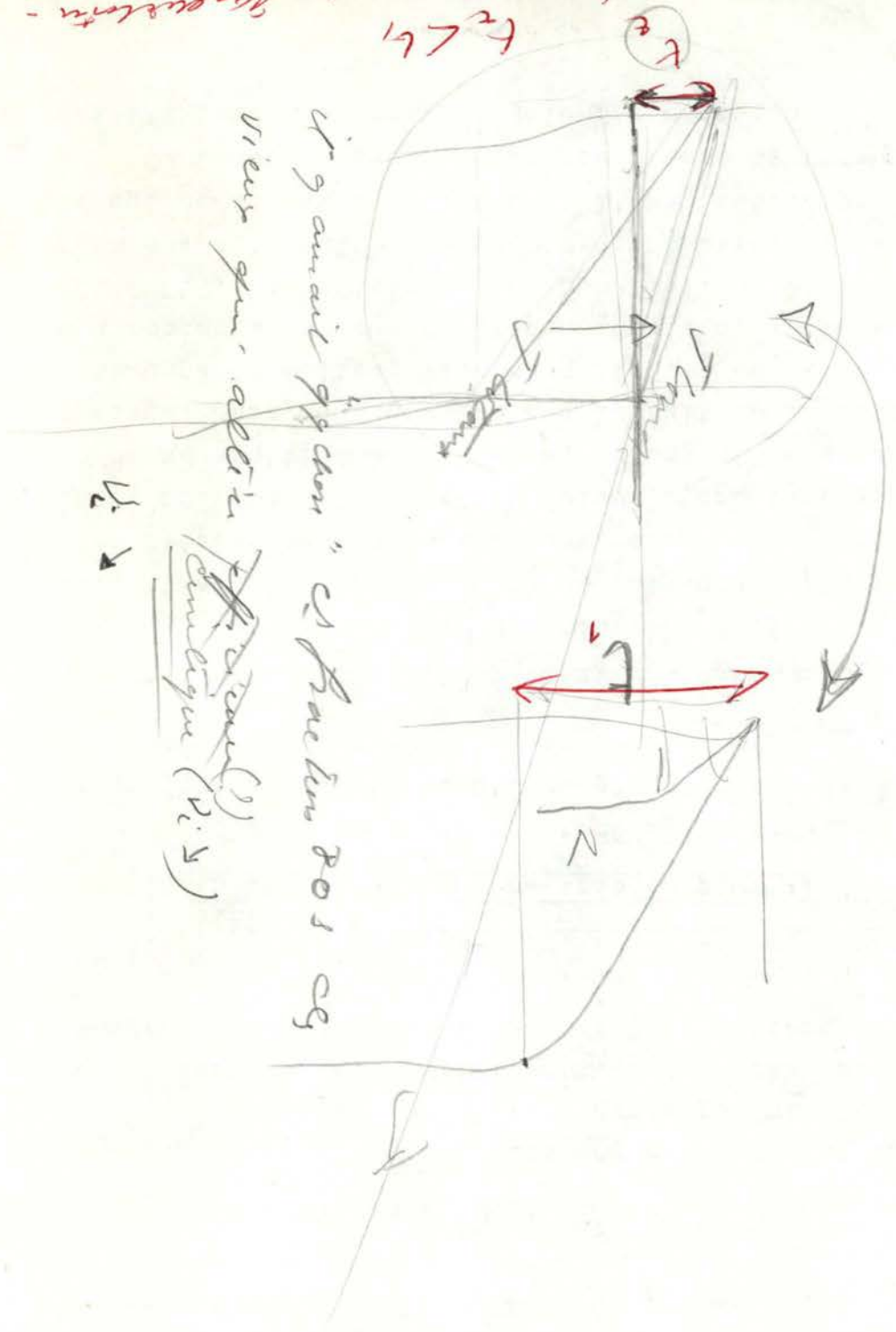
Celui-ci, en effet, pourrait être clivé par une RNase, conduisant ainsi à la formation de polysomes fragmentés, incapables de synthétiser des protéines. Dans ce cas, les différences observées entre polysomes "jeunes" et "vieux", proviendraient d'une différence de sensibilité à une RNase, ou une différence de stabilité du message. Mais, on constate que le fait de rajouter de l'ARNm de globine dans le milieu, alors que le plateau est atteint, ne permet pas une remise en marche de la machinerie de synthèse protéique ( N. RECKINGER, communication personnelle). De plus, à l'approche du plateau, des chaînes naissantes sont associées aux polysomes "lourds", ce qui ne serait pas le cas si l'ARNm avait été clivé.

*R<sub>25</sub>  
livelle*

Ces deux expériences nous permettent de penser que ce n'est pas l'ARNm qui est responsable des différences observées.

*Et n'après un nombre de cycles d'arrêt avait bloc de terminaison? (par le vote de répéter "taille"?)*

Pointe de vue centrale  
 $T_2 \perp L_1$



"général système" et "Pointe de vue centrale"

Viewing direction  
 (Pointe de vue centrale)  
 (Pointe de vue centrale)



5.2. Les différences sont-elles dues aux ribosomes eux-mêmes ?

La "quantité" de ribosomes, mesurée en D.O., mise dans le milieu acellulaire est la même pour les polysomes "jeunes" et "vieux". Mais, parmi ceux-ci, il pourrait y avoir une proportion plus ou moins grande de ribosomes "actifs". Nous entendons par là, des ribosomes qui effectuent la lecture d'un message, qui synthétisent des protéines. Les polysomes "lourds" auxquels sont associées des chaînes naissantes, correspondent à cette définition. Les ribosomes "inactifs" seront les monomères, que ce soient des 80 S "en attente", c.à.d. provisoirement inactifs, ou des 80 S définitivement inactifs. *(cf. Fr. Fah. Fontey)* Ceux-ci se retrouveront dans le pic des "80 S". Dans celui-ci nous trouverons aussi des monosomes ( 1 ribosome lisant 1 message) "actifs".

Pour vérifier si une proportion inégale de ribosomes "inactifs" peut expliquer les différences observées, nous avons mis, en milieu acellulaire, uniquement des polysomes "lourds" (> trisomes) c.à.d. "actifs".

Ceux-ci ont été mis en même "quantité" (0,2 D.O. /4 µl) pour les deux classes d'âge. Deux cinétiques observées dans ce cas, sont présentées à la fig. 27. Au total, 4 expériences ont été réalisées et un tableau résumé en est donné p: 62.

Comme pour les polysomes totaux, on observe :

- un plateau en moyenne plus élevé pour les polysomes "jeunes".
  - une pente en moyenne plus élevée pour les polysomes "jeunes".
- Par contre, le temps t après lequel le plateau est atteint, est plus long pour les polysomes "vieux". De plus, la différence de plateau et de pente est légèrement plus faible, entre les deux classes d'âge, que pour les polysomes totaux. *For éminent*

Quand on compare les cinétiques obtenues en présence de polysomes totaux et en présence de polysomes "lourds", on constate, pour les polysomes "jeunes", une pente plus élevée dans le second cas. ? Mais, la hauteur du plateau semble inchangée, tandis que le temps t après lequel ce plateau est atteint est plus faible. *vs. L'âge des Jeunes*  
En d'autres termes, le nombre d'initiations semble inchangé, la fréquence d'initiation augmente et le temps t diminue. *J. Comodis vs. J. Totansy.*

Pour les polysomes "vieux", des différences ne peuvent être mises en évidence. (voir fig. 28) ?

*plus court p. les jeunes*

*comme si un capital?*



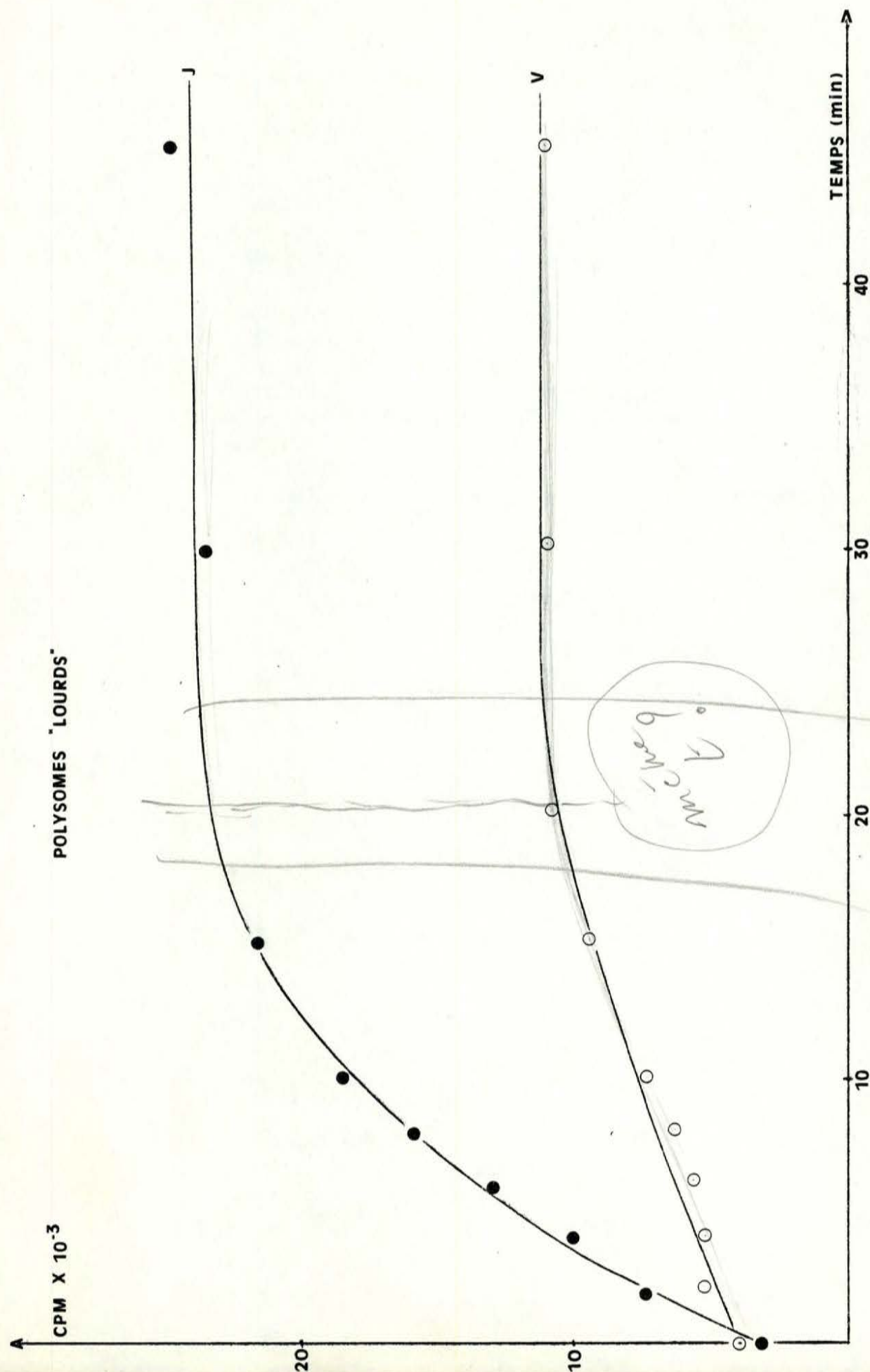


Fig. 27 : Cinétiques d'incorporation de leucine tritiée par des polysomes "lourds", "jeunes" (●) et "vieux" (○). Ces polysomes sont à une concentration de 0,2 D.O./4 µl. La température d'incubation est de 25 °C. La radioactivité, exprimée en CPM x 10<sup>-3</sup>, est mesurée dans la fraction insoluble dans le TCA.

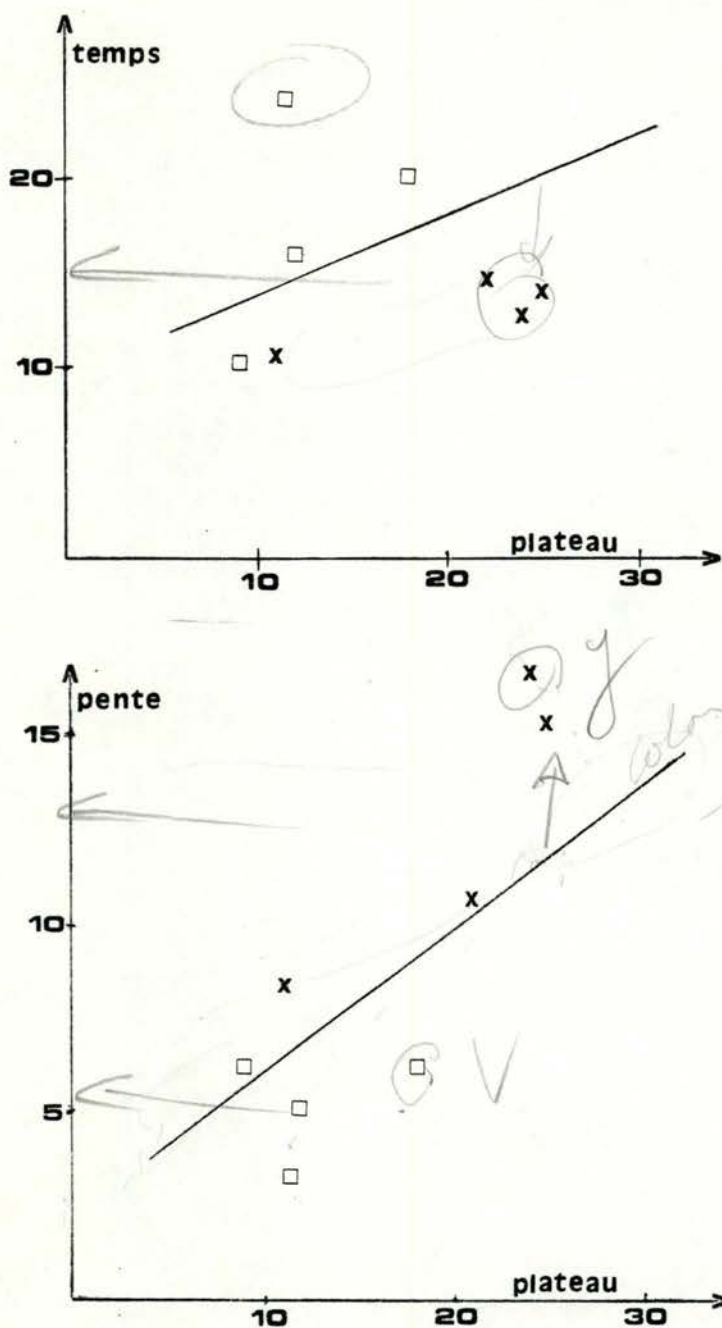


Fig. 28 : Relations plateau / temps après lequel ce plateau est atteint et plateau / pente, établies à partir des valeurs observées pour les cinétiques d'incorporation de leucine tritiée par des polysomes "lourds", "jeunes" (x) et "vieux" (□). Les droites dessinées sur les graphiques sont celles établies à partir des valeurs observées pour les cinétiques des polysomes totaux. (Fig. 23 et 24).

On constate que ce n'est pas uniquement par une "quantité" plus importante de ribosomes "actifs" chez les "jeunes", que l'on peut expliquer les différences observées; il faut envisager en plus une variation dans "l'intensité" de leur activité.

5.3. Ces différences sont-elles dues aux facteurs protéiques associés aux ribosomes ?

Ces facteurs leur sont associés de manière transitoire et leur permettent d'effectuer la synthèse protéique. Les facteurs les plus importants sont les facteurs d'initiation (voir p: 17-18).

Le fait du nombre limité d'initiations, aussi bien pour les polysomes "jeunes" que pour les polysomes "vieux", pourrait peut-être s'expliquer par un "mauvais" recyclage des facteurs, un nombre trop limité de ceux-ci, ou l'inactivation de ces facteurs au cours du temps.

La différence d'efficience entre les polysomes "jeunes" et "vieux", pourrait s'expliquer par une déficience en facteurs d'initiation dans les cellules de foie de souris âgées.

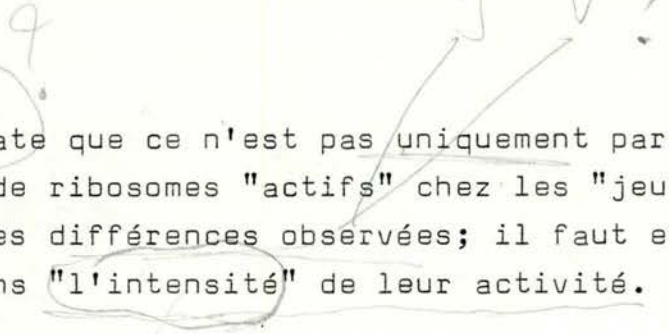
Cette hypothèse est appuyée par celle de COMOLLI (1975). Celui-ci a mis en évidence une déficience en "protéines accessoires" de la sous-unité 40 S, qu'il suppose être des facteurs d'initiation, dans le foie de rats âgés. Cette déficience va de pair avec l'accumulation de monomères avec l'âge (COMOLLI, 1975).

Des modifications non seulement quantitatives, mais aussi qualitatives peuvent être envisagées. Si de telles modifications pouvaient être mises en évidence, elles s'accorderaient avec la théorie d'ORGEL envisagée dans le premier chapitre (p: 2).

*Il manque:*

5.4. *Il y a des cellules qui ne sont pas dues à la quantité de ribosomes altérant l'intensité de leur activité (p.e. en le temps de recyclage de l'initiation)*

*pourrait être dû à nature de facteurs ou de Ribosomes!*



?

?

?



S O M M A I R E   E T   P E R S P E C T I V E S

La comparaison des capacités fonctionnelles des polysomes "jeunes" et "vieux", en milieu acellulaire, montre une diminution de l'efficacité de traduction chez les souris âgées.

Cette observation va dans le même sens que celles faites par plusieurs auteurs.

Notamment, MAINWARING (1969) constate que des microsomes de foie de souris âgées, *in vitro*, ont une capacité d'incorporation de phénylalanine, marquée au  $^{14}\text{C}$ , dans les protéines, inférieure à celle de microsomes de foie de souris jeunes, dans les mêmes conditions.

Plus tard, des expériences semblables ont été tentées avec également des microsomes de foie de souris (KURTZ, 1975) et des microsomes de foie de rat (BUETOW & GANDHI, 1973 - MARIOTTI & RUSCITTO, 1977). Ces expériences montrent aussi une diminution de la capacité d'incorporation d'acides aminés marqués avec l'âge.

Nous avons envisagé une diminution de la fréquence d'initiation pour les polysomes de foie de souris âgées, ce qui pourrait expliquer les différences fonctionnelles observées.

MEEDEL & LEVINE (1978) ont, dans des cultures de fibroblastes humains, observé que l'efficacité de l'initiation est diminuée dans des cultures en phase de dégénération.

En procédant par déduction, nous avons émis l'hypothèse que cette diminution de la fréquence d'initiation pour les polysomes "vieux", pourrait provenir d'une déficience en facteurs d'initiation. COMOLLI (1975) a mis en évidence une déficience en "protéines accessoires" de la sous-unité 40 S, qu'il suppose être des facteurs d'initiation, dans le foie de rats âgés.

Une fréquence d'initiation plus faible pour les polysomes "vieux", peut expliquer la diminution de la taille moyenne que l'on observe pour les polysomes de foie de souris âgées.

Pour vérifier notre hypothèse de déficience des facteurs d'initiation avec l'âge, il faudrait en préparer à partir de foie de souris jeune et vieille, et voir si le fait de les ajouter au milieu, alors que le plateau est atteint, permet une reprise d'incorporation de leucine tritiée dans les protéines. Si c'est le cas, cela signifierait que les facteurs étaient effectivement déficients, leur présence permettant de nouvelles initiations.

On peut également réaliser des expériences croisées, c.à.d. mettant en présence des polysomes "jeunes" et des facteurs préparés à partir de foie de souris vieille et inversement. Dans de telles expériences, l'efficacité des polysomes, observée dans les deux cas sera identique, si du moins uniquement les facteurs peuvent expliquer les différences observées dans notre travail.

D'autres expériences croisées avec des sous-unités, peuvent être réalisées. En effet, les facteurs d'initiation se trouvent associés à la petite sous-unité 40 S. En croisant des sous-unités 40 S "jeunes" avec des sous-unités 60 S "vieilles" et inversement, on peut étudier l'efficacité de traduction de ~~messagers~~ de tels ribosomes "chimériques". Dans ce cas, on constatera si la présence de la sous-unité 40 S "jeune" favorise ou non la traduction.

Une autre voie de recherche serait d'utiliser d'autres systèmes d'étude que le milieu acellulaire, comme par exemple les oocytes de Xenopus laevis. L'avantage de ce système est que la traduction se fait dans un environnement physiologique et que ce fait permet la détection de moyens de régulation éventuels, qui pourraient échapper dans l'emploi de systèmes plus artificiels. Cette voie de recherche nous permettrait d'aborder le problème des capacités fonctionnelles des polysomes en fonction de l'âge, in vivo. En effet, au niveau cellulaire, d'autres facteurs telle la concentration en polysomes, entrent en ligne de compte s'il s'agit d'expliquer une détérioration de la machinerie de synthèse protéique au cours du vieillissement. Nous voyons que dans cette voie, de nombreuses recherches restent à faire.

Comment?



# T A B L E D E S M A T I E R E S

REMERCIEMENTS

ABREVIATIONS

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. LE VIEILLISSEMENT : GENERALITES	p : 1
II. LA MACHINERIE DE SYNTHÈSE PROTEIQUE "IN VIVO"	p : 4
A. Caractéristiques structurelles et fonctionnelles.	p : 4
1. Le ribosome.	p : 4
1.1. Structure.	
1.2. Synthèse et maturation.	
1.3. RÔle des différents constituants du ribosome.	
2. L'ARN messenger.	p : 7
2.1. Généralités.	
2.2. Le poly-A.	
2.3. Le cap.	
2.4. Les protéines associées à l'ARNm.	
2.5. Biosynthèse et maturation.	
3. L'ARN de transfert.	p : 13
3.1. Généralités.	
3.2. Biosynthèse des ARNt.	
B. Fonctionnement.	p : 16
1. L'aminocyclation.	p : 17
2. L'initiation.	p : 17
3. L'élongation.	p : 19
4. La terminaison.	p : 21
C. Le polysome, unité de fonction.	p : 22
III. LA MACHINERIE DE SYNTHÈSE PROTEIQUE "IN VITRO" : LES MILIEUX ACELLULAIRES.	p : 26
IV. BUT DU TRAVAIL.	p : 28



## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.

I. MATERIEL.	p :29
A. Animaux.	p :29
B. Produits.	p :29
C. Conditionnement du materiel.	p :29
D. Appareillage.	p :30
II. METHODES.	p :30
A. Extraction des polysomes.	p :30
1. Préparation du foie.	
2. Homogénéisation.	
3. Préparation des polysomes.	
4. Purification des polysomes.	
5. Isolement des polysomes.	
B. Techniques préparatives et analytiques.	p :37
1. Mesure de la distribution en taille des polysomes par centrifugation en gradient de saccharose.	p :37
a) Préparation des gradients.	
b) Centrifugation.	
c) Analyse.	
2. Précipitation au PEG.	p :39
3. Mesure de l'absorbance des acides ribonucléiques par la méthode de Schmidt-Thannhauser.	p :40
4. Mesure de la radioactivité par scintillation liquide.	p :43
C. Traduction en milieu acellulaire.	p :48

## CHAPITRE III : RESULTATS ET INTERPRETATION

I. MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES.	p :50
A. Contrôle de la "quantité" de polysomes.	p :50
B. Contrôle de la "qualité" des polysomes.	p :50
C. Caractérisation de la cinétique d'incorporation d'acides aminés marqués en fonction du temps.	p :54
D. Contrôle de la reproductibilité de la méthode.	p :54
E. Contrôle de la sensibilité de la méthode.	p :55

F. Optimisation des conditions pour la comparaison de l'efficience des polysomes "jeunes" et "vieux".	p : 55
1. Choix de l'acide aminé marqué.	p : 55
2. Choix de la température d'incubation.	p : 56
3. Choix de la "quantité" de polysomes.	p : 56
4. Choix du "type" de polysomes.	p : 56
II. CINÉTIQUES D'INCORPORATION DE LEUCINE TRITIÉE.	p : 60
A. Résultats.	p : 60
B. Analyse.	p : 60
C. Interprétation.	p : 65
1. Que signifie l'existence d'un plateau ?	p : 65
2. Que représente l'intervalle de temps séparant le moment où les polysomes sont mis dans le milieu (temps 0) et le moment où le plateau est atteint (temps t) ?	p : 67
3. Comment interpréter la pente ?	p : 69
4. Qu'est-ce que l'efficience de traduction ?	p : 70
5. Pourquoi observe-t-on, pour les polysomes "jeunes", une vitesse d'incorporation (pente) et un taux d'incorporation (plateau) de leucine tritiée plus élevés ?	p : 70
5.1. Ces différences sont-elles dues à l'ARNm ?	p : 70
5.2. Ces différences sont-elles dues aux ribosomes eux-mêmes ?	p : 71
5.3. Ces différences sont-elles dues aux facteurs protéiques associés aux ribosomes ?	p : 74
CHAPITRE IV : <u>SOMMAIRE ET PERSPECTIVES</u>	p : 75
BIBLIOGRAPHIE	p : I à IX

B I B L I O G R A P H I E

- ADAMSON, S.D., HERBERT, E., & GODCHAUX, W. - 1968 -  
Factors affecting the rate of protein synthesis in lysate systems from reticulocytes.  
Arch. Biochem. Biophys., 125, 671-683
- ATTARDI, G., & AMALDI, F. - 1970 -  
Structure and synthesis of ribosomal RNA.  
Ann. Rev. Biochem., 39, 183-226
- BEAUCHENE, R.E., ROEDER, L.M., & BARROWS, C.H. Jr. - 1970 -  
The interrelationships of age, tissue protein synthesis, and proteinuria.  
J. Geront., 25, 359-363
- BENNE, R., & HERSHEY, J.W.B. - 1978 -  
The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes.  
J. Biol. Chem., 253, 3078-3087
- BIELKA, H. - 1978 -  
The eucaryotic ribosome.  
TIBS, 3, 156-158
- BLOEMENDAL, H., BENEDETTI, E.L., & BONT, W.S. - 1973 -  
Preparation and characterization of free and membrane-bound polysomes.  
Methods Enzymol., 30 (Part F), 313-327
- BRAWERMAN, G. - 1974 -  
Eukaryotic messenger RNA.  
Ann. Rev. Biochem., 43, 621-642
- BRIMACOMBE, R. - 1976 -  
Role of ribosomal RNA.  
Nature, 260, 94-96
- BUETOW, D.E., & GANDHI, P.S. - 1973 -  
Decreased protein synthesis by microsomes isolated from senescent rat liver.  
Exp. Geront., 8, 243-249





BUSCH,H. - 1976 -

The function of the 5' cap of mRNA and nuclear RNA species.  
Perspectives in Biology and Medecine, summer 1976, 549-567

CANAANI,D., REVEL,M., & GRONER,Y. - 1975 -

Translational discrimination of "capped" and "non-capped" mRNAs :  
Inhibition by a series of chemical analogs of m<sup>7</sup>GpppX.  
FEBS Letters, 64 , 326-331

CARRE,D.S., LITVAK,S., & CHAPEVILLE,F. - 1970 -

Purification and properties of Escherichia coli CTP(ATP)-tRNA  
nucleotidyltransferase.  
Biochim. Biophys. Acta, 224 , 371-381

CHEN,J.C., OVE,P., & LANSING,A.I. -1973-

X In vitro synthesis of microsomal protein and albumin in young  
and old rats.  
Biochim. Biophys. Acta, 312 , 598-607

CHOE,B.K., & TAYLOR,M.W. - 1972 -

Kinetics of synthesis and characterization of transfer RNA  
precursors in mammalian cells.  
Biochim. Biophys. Acta, 272 , 275-287

CLEMENS,M.J. - 1979 -

Why do messengers wear caps ?  
Nature, 279 , 673-674

COMFORT,A. - 1973 -

The position of aging studies.  
Mechanims of Ageing and Development, 3 , 1-31

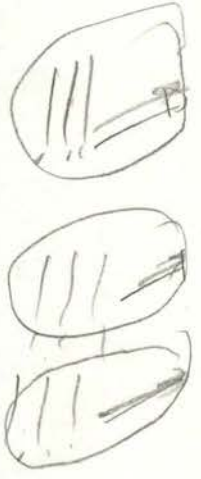
COMOLLI,R. - 1975 -

X Deficiency in accessory protein of native 40 S ribosomal  
subunits in the liver of aging rats  
Exp. Geront., 10 , 31-36

CRICK,F. - 1979 -

Split genes and RNA splicing.  
Science, 204 , 264-271

111 →





- DARNELL, J.E. - 1976 -  
mRNA structure and function.  
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 19 , 493-511
- DARNELL, J.E., JELINEK, W.R., & MOLLOY, G.R. - 1973 -  
Biogenesis of mRNA : Genetic regulation in mammalian cells.  
Science, 181 , 1215-1221
- DINTZIS, H.M. - 1961 -  
Assembly of the polypeptide chains of haemoglobin.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 47 , 247-261
- DU, J.T., BEYER, T.A., & LANG, C.A. - 1977 -  
Protein biosynthesis in aging mouse tissues.  
Exp. Geront., 12 , 181-191
- FILIPOWICZ, W. - 1978 -  
Functions of 5'-terminal m<sup>7</sup>G cap in eucaryotic mRNA.  
FEBS Letters, 96 , 1-9
- FURUICHI, Y., MUTHUKRISHNAN, S., TOMASZ, J., & SHATKIN, A.J. - 1976 -  
Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked  
and methylated sequence, m<sup>7</sup>GpppG<sup>m</sup>pC.  
J. Biol. Chem., 251 , 5043-5053
- FURUICHI, Y., LAFIANDRA, A., & SHATKIN, A.J. - 1977 -  
5'-terminal structure and mRNA stability.  
Nature, 266 , 235-239
- GOLDSTEIN, J.L., BEUDET, A.L., & CASKEY, C.T. - 1970 -  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 67 , 99-106
- GREENBERG, J.R., & PERRY, R.P. - 1972 -  
The isolation and characterization of steady-state labeled  
messenger RNA from L-cells.  
Biochim. Biophys. Acta, 287 , 361-366
- GRUNBERG-MANAGO, M., & GROS, F. - 1977 -  
Initiation mechanisms of protein synthesis.  
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 20 , 211-284
- HADJILOV, A.A. - 1977 -  
Patterns of ribosome biogenesis in eucaryotes.  
TIBS, 2 , 84-86



HAMILTON, M.G. - 1976 -

Eukaryotic ribosomes.

in "Handbooks of Genetics" ed. R.C. KING - Plenum Press (New-York and London) , p: 325-349

HELD, W.A., WEST, K., & GALLAGHER, J. - 1977 -

Importance of initiation factors preparation in the translation of reovirus and globin mRNAs lacking a 5'-terminal 7-methylguanosine.

J. Biol. Chem., 252 , 8489-8497

HICKEY, E.D., WEBER, L.A., & BAGLIONI, C. - 1976 -

Inhibition of initiation of protein synthesis by 7-methylguanosine 5'-monophosphate.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 73 , 19-23

HIETER, P.A., LEGENDRE, S.M., & LEVY, C.C. - 1976 -

Stabilization of an RNA molecule by 3'-terminal Poly(A)-induced inhibition of RNase activity.

J. Biol. Chem., 251 , 3287-3293

HOLLIDAY, R., & TARRANT, G.M. - 1972 -

Altered enzymes in ageing human fibroblasts.

Nature, 238 , 26-30

HUEZ, G., MARBAIX, G., HUBERT, E., LECLERCQ, M., NUDEL, U., SOREQ, H., SALOMON, R., LEBLEU, B., REVEL, M., & LITTAUER, U.Z. - 1974 -

Role of polyadenylate segment in the translation of globin messenger RNA in Xenopus oocytes.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 71 , 3143-3146

KAY, J.E., & COOPER, H.L. - 1969 -

Rapidly labeled cytoplasmic RNA in normal and phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocytes.

Biochim. Biophys. Acta, 186 , 62-84

KOURILSKY, P., & CHAMBON, P. - 1978 -

The ovalbumin gene : an amazing gene in eight pieces.

TIBS, 3 , 244-247

KOZAK, M. - 1978 -

How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA ?

Cell, 15 , 1109-II23



Handwritten scribble consisting of several wavy lines and a small arrow pointing to the right.

Handwritten scribble consisting of three vertical lines and a small arrow pointing to the right.

Handwritten scribble consisting of three vertical lines and a small arrow pointing to the right.

KOZAK, M., & SHATKIN, A.J. - 1978 -

Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA in the presence of Edeine.

J. Biol. Chem., 253 , 6568-6577

KURTZ, D.I. - 1975 -

X The effect of ageing on in vitro fidelity of translation in mouse liver.

Biochim. Biophys. Acta, 407 , 479-484

KURTZ, D.I. - 1978 -

X A decrease in the number of active mouse liver ribosomes during aging.

Exp. Geront., 13 , 397-402

LENGYEL, P. - 1974 -

The process of translation : a bird's-eye view.  
in "Ribosomes". Cold spring Harbor Laboratory.  
Edited by Nomura, Tissières, et Lengyel. pp: 13-52

LEHNINGER, A.L. - 1977 -

Biochimie, bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. (2d édition)

Flammarion, médecine-science. Paris.

MADEN, B.E.H. - 1976 -

Ribosomal precursor RNA and ribosome formation in eukaryotes.

TIBS, 1 , 196-198

MAINWARING, W.I.P. - 1969 -

The effect of age on protein synthesis in mouse liver.

Biochem. J., 113 , 869-878

MARIOTTI, D., & RUSCITTO, R. - 1977 -

X Age-related changes of accuracy and efficiency of protein synthesis machinery in rat.

Biochim. Biophys. Acta, 475 , 96-102

MEDVEDEV, Zh.A. - 1967 -

Molecular aspects of ageing.

Symp. Soc. exp. Biol., 21, 1-28

111 →  
000





MEEDEL, T.H., & LEVINE, E.M. - 1978 -

Regulation of protein synthesis in human diploid fibroblasts :  
reduced initiation efficiency in resting cultures.

J. Cell. Physiol., 94 , 229-242

MOREL, C., KAYIBANDA, B., & SCHERRER, K. - 1971 -

Proteins associated with globin messenger RNA in avian erythroblasts:  
isolation and comparison with the proteins bound to nuclear  
messenger-like RNA.

FEBS Letters, 18 , 84-88

MURAMATSU, M., & FUJISAWA, T. - 1968 -

Methylation of ribosomal RNA precursor and tRNA in rat liver.

Biochim. Biophys. Acta, 157 , 476-492

MUTHUKRISHNAN, S., BOTH, G.W., FURUICHI, Y., & SHATKIN, A.J. - 1975 -

5'-terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required  
for translation.

Nature, 255 , 33-37

MUTHUKRISHNAN, S., MOSS, B., COOPER, J.A., & MAXWELL, E.S. - 1978 -

Influence of 5'-terminal cap structure on the initiation of  
translation of vaccinia virus mRNA.

J. Biol. Chem., 253 , 1710-1715

NOKIN, P., HUEZ, G., MARBAIX, G., BURNY, A., & CHANTRENNE, H. - 1976 -

Molecular modifications associated with ageing of globin  
messenger RNA in vivo.

Eur. J. Biochem., 62 , 509-517

NOLL, H. - 1969 -

Polysomes : Analysis of structure and function.

From Campbell, P.N. and Sargent, J.R.

Techniques in protein biosynthesis. Vol.2 - Academic Press.

New-York. pp: 101-179

OGRODNIK, J.P., WULF, J.H., & CUTLER, R.G. - 1975 -

Altered protein hypothesis of mammalian ageing processes.

II. Discrimination ratio of methionine VS ethionine in the synthesis  
of ribosomal protein and RNA of C 57 BL/6J mouse liver.

Exp. Geront., 10 , 119-136

ORGEL, L.E. - 1973 -

Ageing of clones of mammalian cells.

Nature, 243 , 441-445

2293

~~AA~~

Exp. Yecant 239P

→

OVE, P., OBENRADER, M., & LANSING, A. - 1972 -

X → Synthesis and degradation of liver proteins in young and old rats.  
Biochim. Biophys. Acta, 277 , 211-221

PALMITER, R.D. - 1975 -

Quantitation of parameters that determine the rate of ovalbumin synthesis.  
Cell, 4 , 189-197

PELHAM, R.B., & JACKSON, R.J. - 1976 -

EEH → An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.  
Eur. J. Biochem., 67 , 247-256

PERRY, R.P., KELLEY, D.E., & LATORRE, J. - 1974 -

Synthesis and turnover of nuclear and cytoplasmic polyadenylic acid in mouse L cells.  
J. Mol. Biol., 82 , 315-331

PFUDERER, P., CAMMARANO, P., HOLLADAY, D.R., & NOVELLI, G.D. - 1965 -

A helical polysome model.  
Biochim. Biophys. Acta, 109 , 595-606

\* RAMSEY, J.C., & STEELE, W.J. - 1976 -

A procedure for the quantitative recovery of homogeneous populations of undegraded free and bound polysomes from rat liver.  
Biochem., 15 , 1704-1712

REVEL, M., & GRONER, Y. - 1978 -

Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eucaryotes.  
Ann. Rev. Biochem., 48 , 1079-1126

RICH, A., & KIM, S.H. - 1978 -

The three-dimensional structure of transfer RNA  
Sc. American, 238 , 52-62

ROBERTS, B.E., & PATERSON, B.M. - 1973 -

GO → Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9 S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 70 , 2330-2334

ROTTMAN, F.M., DESROSIERS, R.C., & FRIDERICI, K. - 1976 -

Nucleotide methylation patterns in eukaryotic mRNA.  
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 19 , 21-38





SHATKIN, A.J. - 1976 -

Capping of eucaryotic mRNAs.

Cell, 9 , 645-653

SHEINESS, D., PUCKETT, L., & DARNELL, J.E. - 1975 -

Possible relationship of poly(A) shortening to mRNA turnover.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 72 , 1077-1081

SHIH, D.S., & KAESBERG, P. - 1973 - 1339

Translation of brome mosaic viral ribonucleic acid in a cell-free system derived from wheat embryo.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 70 , 1799-1803

SHINE, J., HUNT, J.A., & DALGARNO, L. - 1974 -

Studies on the 3' terminal sequence of the large ribosomal ribonucleic acid of different eukaryotes and those associated with "hidden" breaks in heat-dissociable insect 26 S ribonucleic acid.

Biochem. J., 141 , 617-625

SMITH, A.E. - 1976 -

Protein biosynthesis

Outline Studies of Biology . Chapman and Hall, London

SPECTOR, D.H., & BALTIMORE, D. - 1974 -

Requirement of 3'-terminal polyadenylic acid for the infectivity of poliovirus RNA.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 71 , 2983-2987

VENKATESAN, N., & STEELE, W.S. - 1972 -

Free and membrane bound polysomes of rat liver : separation in nearly quantitative yield and analysis of structure and function.

Biochim. Biophys. Acta , 287 , 526-537

WARNER, J.R. - 1974 -

The assembly of ribosomes in eucaryotes.

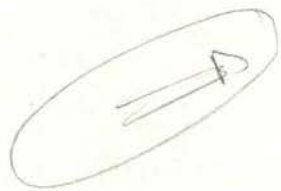
in "Ribosomes" . Cold spring Harbor Laboratory.

Edited by Nomura, Tissières, Lengyel. pp: 461-488

WARNER, J.R., KNOPF, P.M., & RICH, A. - 1962 -

A multiple ribosomal structure in protein synthesis.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 49 , 122-129





- WARNER, J.R., & SOEIRO, R. - 1967 -  
 Nascent ribosomes from Hela cells.  
 Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 58 , 1984-1990
- WEBER, L.A., HICKEY, E.D., & BAGLIONI, C. - 1978 -  
 Influence of potassium salt concentration and temperature on  
 inhibition of mRNA translation by 7-methylguanosine 5'-mono-  
 phosphate.  
 J. Biol. Chem., 253 , 178-183
- WEEKS, D.P., & MARCUS, A. - 1971 -  
 Preformed messenger of quiescent wheat embryos.  
 Biochim. Biophys. Acta, 232 , 671-684
- WEINBERG, R.A. - 1973 -  
 Nuclear RNA metabolism.  
 Ann. Rev. Biochem., 42 , 329-354
- WEISSBACH, H., & OCHOA, S. - 1976 -  
 Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis.  
 Ann. Rev. Biochem., 45 , 191-213
- WETTSTEIN, F.O., STAEHELIN, T., & NOLL, H. - 1963 -  
 Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis : characterization  
 of the ergosome.  
 Nature, 197 , 430-435
- WOOL, I.G., & STÖFFLER, G. - 1974 -  
 Structure and function of eucaryotic ribosomes.  
 in "Ribosomes". Cold spring Harbor Laboratory.  
 Edited by Nomura, Tissières, Lengyel. pp: 417-460
- WULF, J.M., & CUTLER, R.G. - 1975 -  
 Altered protein hypothesis of mammalian ageing processes :  
 I. Thermal stability of glucose-6-phosphate déhydrogenase in  
 C 57 BL./6J mouse tissue.  
 Exp. Geront., 10 , 101-117
- \* PICCIANO, D., & ANDERSON, W.F. - 1974 -  
 Preparation of protein synthesis initiation factors from rabbit  
 liver.  
 Methods in enzymology, 30 (Part F), 171-180

BUMP



~~008815263~~

~~=SB11313/1979/02~~



