Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Importance de la méthylation de la coiffe de l'ARN messager : étude in vitro dans un système couple de transcription-traduction

Biernaux, C.

Award date:
1986

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D.DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

IMPORTANCE DE LA METHYLATION DE LA COIFFE DE L'ARN MESSAGER : ETUDE IN VITRO DANS UN SYSTEME COUPLE DE TRANSCRIPTION-TRADUCTION

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

C. BIERNAUX

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
Namur
Facultés des SCIENCES

Laboratoire de Génétique Moléculaire

Importance de la méthylation de la coiffe de l'A.R.N. messager : étude *in vitro* dans un système couplé de transcription-traduction

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Licenciée en
Sciences Zoologiques
par
C. Biernaux
Année Académique 1985-1986
Promoteurs : Prof. J. Delcour
Dr J. Vandenhaute

Je n'aurais jamais pu mener à bien ce travail sans la coopération de toute une équipe dont je voudrais souligner ici la compétence, la disponibilité et l'accueil; à tous je voudrais exprimer ma gratitude et les remercier.

Au professeur J. Delcour, qui m'a acceptée dans son laboratoire.

Au Docteur J. Vandenhaute, qui tout au long de ce mémoire m'a aidée à aller toujours plus loin dans mes recherches et m'a appris à argumenter et à affirmer mes idées.

Au Révérend Père A. Elens qui m'a ouvert les yeux au monde de la recherche et qui, secondé par Madame Libion, m'a fait découvrir la rigueur de la méthode scientifique.

A tous les membres de l'équipe du laboratoire de génétique moléculaire des Facultés Notre Dame de la Paix, spécialement à Madame R.M. Wilmet-Génicot, à Madame M. Dewez-Jadin et à Mademoiselle G. Renauld, qui m'ont intégrée amicalement, ont toujours répondu à toutes mes interrogations et qui se sont trouvées présentes pour me stimuler dans les moments de découragement.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'équipe du laboratoire de génétique moléculaire de Louvain-la-Neuve et plus spécialement à Mademoiselle H. Bouchet et Madame C. Féron-Verhaeghe qui m'ont acceptée, aidée et secondée chaque fois que j'ai fait appel à elles.

Au Docteur J.P. Lecocq qui m'a communiqué sa passion pour la recherche scientifique et m'a fait entrevoir les multiples applications industrielles de la génétique.

Au Docteur A. Ghysen qui a toujours répondu à mes interrogations et m'a aidée dans mes choix d'orientation.

A mes parents qui furent toujours à mes côtés et qui ont apporté leur aide précieuse à la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS

A	adénine
A_{260}	absorbance
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNasin	inhibiteur des nucléases d'ARN
ARNhn	acide ribonucléique hétérogène nucléaire
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNpolymérase	polymérase d'ARN
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ARNt	acide ribonucléique de transfert
BET	bromure d'ethidium
C	cytosine
CAT	chloramphénicol acétyl transférase
CBP	cap binding proteins
CH_3	méthyl
CHl	chloramphénicol
Cpm	coups par minute
CPT	cytosine triphosphate
DO	densité optique
dpm	désintégration par minute
EDTA	éthylénediamine-tétraacétate
EGTA	éthyléneglycol bis (B-aminoethylether)-N,N'-tetra-acetic acid
G	guanine
GTP	guanosine triphosphate
KAc	acétate de potassium
NaAc	acétate de sodium
RNases	nucléases d'ARN
rpm	rotations par minute
SAM ou SAdoMET	S-adénosyl-L-méthionine
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine
SDS	sodium diodécyl sulfate
Spect	spectinomicyne
T	thymine

TCA	acide trichloracétique
Temed	tétraméthyléthylène diamine
TET	tétracycline
ts	thermosensible
U	uridine
UTP	uridine triphosphate
WG	wheat germ

Les autres abréviations sont définies dans le texte.

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION

1. MATERIEL GENETIQUE CHEZ LES EUCARYOTES 1

2. LE MESSAGER D'EUCARYOTES. STRUCTURE, BIOGENESE, ROLE 2

2.1. STRUCTURE DU MESSAGER 2
2.1.1. STRUCTURE PRIMAIRE 2
2.1.1.1. La coiffe 2
2.1.1.2. La portion leader 3
2.1.1.3. La portion codante 3
2.1.1.4. La portion trailer 4
2.1.1.5. Le Poly A 4
2.1.2. STRUCTURE SECONDAIRE 5
2.1.3. STRUCTURE TERTIAIRE ET D'ORDRE SUPERIEUR 5

2.2. BIOGENESE DU MESSAGER 7
2.2.1. MATURATION POSTTRANSCRIPTIONNELLE 8
2.2.1.1. Polyadénylation 9
2.2.1.2. "Splicing" 9
2.2.1.3. Méthylation 10
2.2.1.4. Coiffage 10

2.3. ROLE DE L'ARNm 12
2.3.1. GENERALITES 12
2.3.1.1. L'ARNt 12
2.3.1.2. Les ribosomes 12
2.3.1.3. Les facteurs protéiques de traduction 13
2.3.2. LA SYNTHESE PROTEIQUE PROPREMENT DITE 13
2.3.2.1. L'initiation 14
2.3.2.2. L'élongation 14
2.3.2.3. La terminaison 14
2.3.3. ROLE POSSIBLE DE LA COIFFE 15
2.3.3.1. Rôle dans l'initiation synthèse protéique 15
2.3.3.2. Rôle dans la stabilité 17
2.3.3.3. Rôle dans l'initiation de transcription 18

2.3.4. IMPORTANCE DE LA METHYLATION DE LA COIFFE SUR LA TRANSCRIPTION ET LA TRADUCTION 19
2.3.4.1. Approche in vivo 19
2.3.4.1.1. Utilisation d'agents inhibiteurs de la méthylation de la coiffe 19
2.3.4.1.2. Utilisation d'agents déméthylants 21
2.3.4.2. Approche génétique 21
2.3.4.2.1. Obtention d'un mutant par mutagénèse classique 22
2.3.4.2.2. Obtention d'un mutant par les voies du génie génétique et de la mutagénèse dirigée. 22

3. APPROCHE IN VITRO DU ROLE DE LA METHYLATION DE LA COIFFE 23
3.1. NOUVELLES POSSIBILITES 23

3.2. SYSTEMES DE TRADUCTION IN VITRO 25
3.2.1. SYSTEMES DE TRADUCTION CELLULAIRE 25
3.2.2. SYSTEMES DE TRADUCTION ACELLULAIRE 26

3.3. SYSTEME DE TRANSCRIPTION TRADUCTION 28
3.3.1. LE SYSTEME SP 6 28
3.3.2. LE SYSTEME pDS5 29
3.3.2.1. Description du pDS5 29
3.3.2.2. Description du pDS5/4-1 30
3.3.2.3. Annexe 31
3.3.2.4. Mode d'utilisation 35
3.3.2.4.1. Le clonage 35
3.3.2.4.2. La transcription 35
3.3.2.4.3. La traduction 35

BUT DU TRAVAIL 36

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS 37

2. METHODES 38

2.1. PREPARATION DE PLASMIDES 38

2.1.1. LA TRANSFORMATION 38

- MILIEU DE CULTURE ET SOLUTIONS

2.1.1.1. La préculture 40

2.1.1.2. L'obtention des cellules compétentes 40

2.1.1.3. La transformation proprement dite 41

2.1.2. L'AMPLIFICATION DE PLASMIDES 42

2.1.2.1. Préculture 42

2.1.2.2. L'amplification proprement dite 43

2.1.2.2.1. Lyse et extraction alcalines 44

A. Déroulement de l'expérience 45

B. Purification du plasmide ADN par centrifugation isopycnique 46

C. Extraction du bromure d'Ethidium par isobutanol et dialyse contre du TE 48

D. Concentration de l'ADN 49

2.1.2.2.2. La lyse claire 49

Solution

A. Déroulement de l'expérience 50

B. Concentration du plasmide ADN par centrifugation isopycnique 51

C. Extraction du bromure d'Ethidium par isoamylalcool et dialyse et précipitation à l'éthanol 52

2.2. ANALYSE D'ADN PAR ELECTROPHORESE 53

2.2.1. PRINCIPE

2.2.2. TYPES DE GEL

2.2.3. GEL D'AGAROSE 53

. La taille moléculaire de l'ADN 53

. La conformation de l'ADN 53

. La concentration de l'agarose 54

. Courant appliqué 54

2.2.3.1. Manipulation 54
. Protocole de l'expérience
A. Coulage du gel 56
B. Préparation des échantillons 56
C. Migration des échantillons 57

2.2.4. GEL D'ELECTROPHORESE POLYACRYLAMIDE 58
2.2.4.1. Principe 58
. Structure du gel 58
. Concentration en acrylamide et bisacrylamide 59
2.2.4.2. Manipulation 62
. Protocole
- matériel
- solutions
A. Coulage de gels 64
B. Préparation des échantillons 64
C. Migration des échantillons 66

2.3. FLUOROGRAPHIE 66
2.3.1. PREPARATION 66
2.3.2. SECHAGE DU GEL 67
2.3.3. AUTORADIOGRAPHIE 67

2.4. SYSTEME DE TRANSCRIPTION ET DE TRADUCTION COUPLE 68
2.4.1. TRANSCRIPTION 71
2.4.1.1. Protocole de transcription 72
2.4.2. TRADUCTION 72
2.4.2.1. Protocole de traduction 73

2.5. PRECIPITATIONS AU TCA 75
2.5.1. PRECIPITATION DES ARNs 75
2.5.2. PRECIPITATION DES PROTEINES MARQUEES A LA S^{35} METHIONINE 77
2.5.2.1. Méthode 77

2.6. TESTS PRELIMINAIRES DU LYSAT DE RETICULOCYTES ET DE WHEAT GERM 78

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1. PREPARATION DES PLASMIDES 79

1.1. COURBE DE CROISSANCE DE LA SOUCHE C_{600} 79

1.2. TECHNIQUES DE PREPARATION DES PLASMIDES : ESSAIS PRELIMINAIRES AVEC pBr 322 ET pJDB 207 80

1.2.1. TRANSFORMATION PROPREMENT DITE 80

1.2.2. OBTENTION DES PLASMIDES 80

1.3. PREPARATION DES PLASMIDES pDS DE STUEBER (pDS5 ET pDS5/4-1) 81

1.3.1. pDS5 81

1.3.1.1. Transformation pDS5 81

1.3.1.2. Obtention de pDS5 83

1.3.2. pDS5/4-1 84

1.3.2.1. Transformation pDS5/4-1 84

1.3.2.2. Obtention du plasmide 84

1.4. ADAPTATION DES METHODES DE PREPARATION DES PLASMIDES AU pDS5/4-1 86

1.4.1. Obtention de pDS5/4-1 86

1.4.2. Précipitation à l'éthanol 87

1.5. CARACTERISATION DES PLASMIDES PAR GEL ELECTROPHORESE D'AGAROSE 89

2. SYSTEME DE TRANSCRIPTION TRADUCTION 91

2.1. ESSAIS PRELIMINAIRES 91

2.1.1. TENTATIVES INFRUCTUEUSES AVEC LE LYSAT DE GERMES DE BLE 91

2.1.2. PREMIERS ESSAIS INFRUCTUEUX AVEC LE LYSAT DE RETICULOCYTE 93

2.1.2.1. Epreuves pour tester la fonctionnalité des composants du système 93

2.1.2.1.1. Activité du lysat de réticulocyte 94

2.1.2.1.2. Activité du système de transcription et traduction 96

. état fonctionnel du plasmide

. activité de la polymérase d'Escherichia coli

a) essais d'optimisation des conditions ioniques 96

b) démonstration de l'inactivité du lot de la polymérase 99

2.1.3. CONCLUSIONS DES ESSAIS PRELIMINAIRES 101

2.2. EXPERIENCES VISANT A MONTRER L'IMPORTANCE DE LA METHYLATION 101

2.2.1. EXPERIENCES AVEC DES COIFFES METHYLEES ET NON-METHYLEES 101

2.2.2. EXPERIENCES AVEC DES COIFFES ^{7m}GpppA 103

GpppA

^{7m}GpppG

GpppG

. Comparaison des moyennes de ^{7m}GpppA et GpppA 103

a) Calcul de variances de ^{7m}GpppA et GpppA 104

b) Comparaison des moyennes 104

. Comparaison des moyennes de ^{7m}GpppG et GpppG 105

a) Calcul des variances de ^{7m}GpppG et GpppG 105

b) Comparaison des moyennes 105

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 108

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. MATERIEL GENETIQUE CHEZ LES EUCARYOTES

2. LE MESSAGER D'EUCARYOTES. STRUCTURE, BIOGENESE, ROLE

2.1. STRUCTURE DU MESSAGER

2.1.1. STRUCTURE PRIMAIRE

2.1.1.1. La coiffe

2.1.1.2. La portion leader

2.1.1.3. La portion codante

2.1.1.4. La portion trailer

2.1.1.5. Le Poly A

2.1.2. STRUCTURE SECONDAIRE

2.1.3. STRUCTURE TERTIAIRE ET D'ORDRE SUPERIEUR

2.2. BIOGENESE DU MESSAGER

2.2.1. MATURATION POSTTRANSCRIPTIONNELLE

2.2.1.1. Polyadénylation

2.2.1.2. "Splicing"

2.2.1.3. Méthylation

2.2.1.4. Coiffage

2.3. ROLE DE L'ARNm

2.3.1. GENERALITES

2.3.1.1. L'ARNt

2.3.1.2. Les ribosomes

2.3.1.3. Les facteurs protéiques de traduction

2.3.2. LA SYNTHESE PROTEIQUE PROPREMENT DITE

2.3.2.1. L'initiation

2.3.2.2. L'élongation

2.3.2.3. La terminaison

2.3.3. ROLE POSSIBLE DE LA COIFFE

2.3.3.1. Rôle dans l'initiation synthèse protéique

2.3.3.2. Rôle dans la stabilité

2.3.3.3. Rôle dans l'initiation de transcription

2.3.4. IMPORTANCE DE LA METHYLATION DE LA COIFFE SUR LA TRANSCRIPTION ET LA TRADUCTION

2.3.4.1. Approche in vivo

2.3.4.1.1. Utilisation d'agents inhibiteurs de la méthylation de la coiffe

2.3.4.1.2. Utilisation d'agents déméthylants

2.3.4.2. Approche génétique

2.3.4.2.1. Obtention d'un mutant par mutagénèse classique.

2.3.4.2.2. Obtention d'un mutant par les voies du génie génétique et de la mutagénèse dirigée.

3. APPROCHE IN VITRO DU ROLE DE LA METHYLATION DE LA COIFFE

3.1. NOUVELLES POSSIBILITES

3.2. SYSTEMES DE TRADUCTION IN VITRO

3.2.1. SYSTEMES DE TRADUCTION CELLULAIRE

3.2.2. SYSTEMES DE TRADUCTION ACELLULAIRE

3.3. SYSTEME DE TRANSCRIPTION TRADUCTION

3.3.1. LE SYSTEME SP 6

3.3.2. LE SYSTEME pDS5

3.3.2.1. Description du pDS5

3.3.2.2. Description du pDS5/4-1

3.3.2.3. Annexe

3.3.2.4. Mode d'utilisation

3.3.2.4.1. Le clonage

3.3.2.4.2. La transcription

3.3.2.4.3. La traduction

BUT DU TRAVAIL

1. MATERIEL GENETIQUE CHEZ LES EUCARYOTES

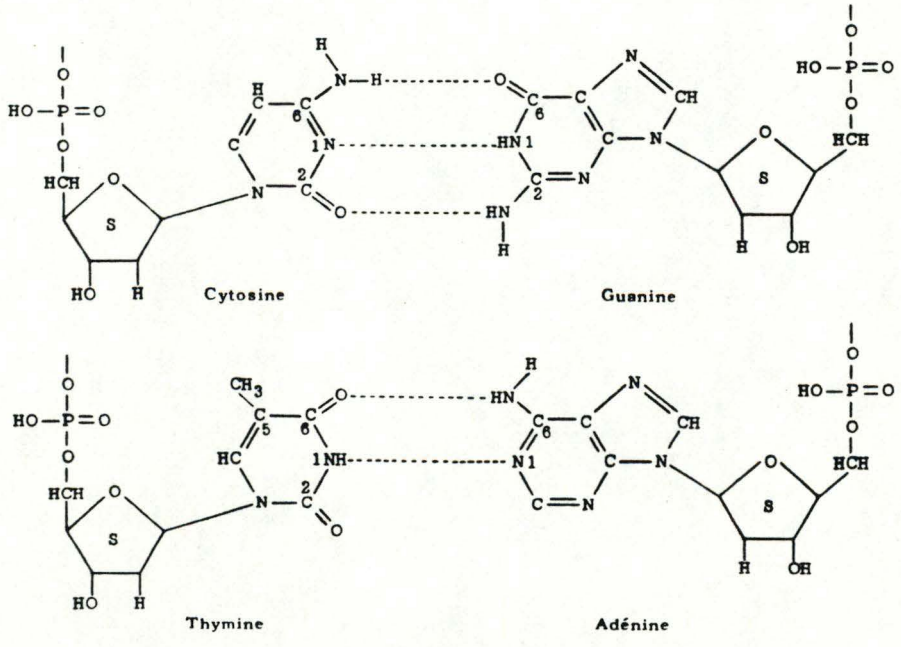
Durant les années 1950, on va assister à l'essor de la génétique moléculaire. Le véritable point de départ en est l'élucidation de la structure de l'A.D.N.

L'ADN est alors décrit comme une séquence de nucléotides liés chimiquement entre eux par des ponts 5'-3'phosphate.

WATSON et CRICK proposent pour l'ADN une structure en double hélice. (77)

Les deux chaînes anti-parallèles polynucléotidiques de cette hélice sont associées par des ponts hydrogènes entre les bases: 3 ponts hydrogènes entre G et C et 2 entre A et T.

On sait que l'information contenue dans certaines séquences des chaînes d'ADN, appelées gènes, fait l'objet d'une transcription. Les produits de transcription, ARN, constituent des ARNms, des ARNrs ou des ARNts (et d'autres petits ARN_s)utilisés le plus souvent en association avec des protéines dans la machinerie de traduction. Celle-ci a pour mission de traduire en protéines les produits de transcription informatifs, c'est-à-dire les ARNms qui sont les copies de gènes de structure. fig. 1

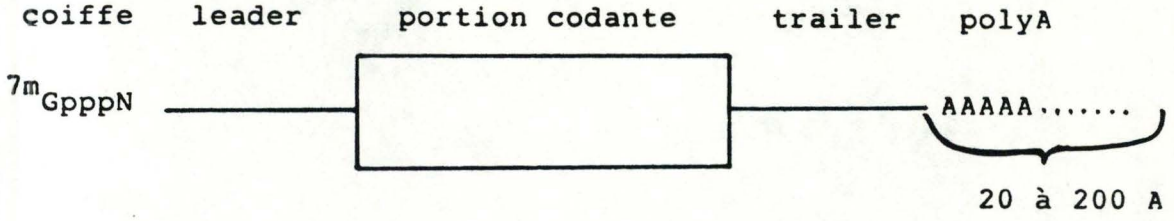


2. LE MESSAGER D'EUCARYOTE. STRUCTURE, BIOGENESE, ROLE

2.1. STRUCTURE DU MESSAGER

2.1.1. STRUCTURE PRIMAIRE

Chez les eucaryotes, on peut reconnaître différentes caractéristiques structurales aux ARNms (cfr schéma). (46) (130)

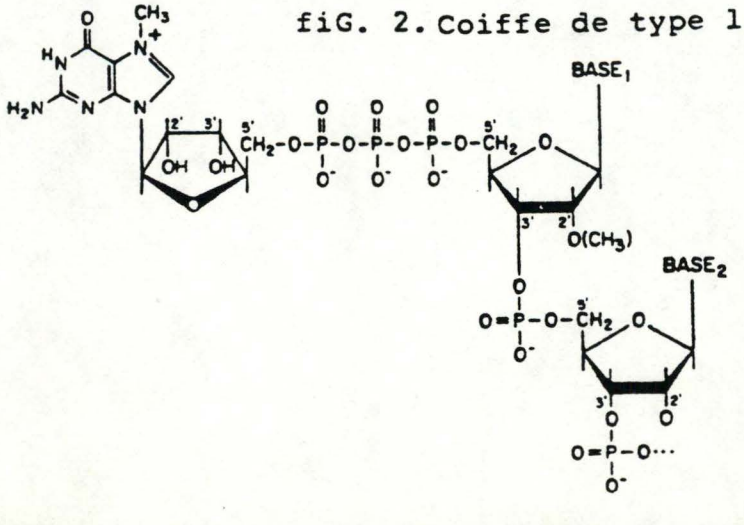


2.1.1.1. La coiffe

Les ARNms eucaryotiques diffèrent de ceux des protocaryotes par la structure particulière de leur extrémité 5' appelée coiffe. Elle est ajoutée après la transcription de l'ARNm lors de sa maturation.

Elle consiste en une 7 méthylguanosine liée à la première base transcrite de l'ARNm par un pont 5'-5' triphosphate. Tous les ARNms eucaryotiques se terminent par une 7 méthylguanosine. (115) Fig. (2)

fiG. 2. Coiffe de type 1



La structure générale de la coiffe est

^{m7}G (5')ppp(5')N,m N2(m)

N1 et N2 peuvent être méthylés en position 2'-Ø.

Selon leur degré de méthylation, on définit 3 types de coiffe:

Coiffe Ø ^{m7} GpppN1pN2p pas de méthylation

Coiffe 1 ^{m7} GpppN1^{m} N2 méthylation en position 2' du ribose.

Dans le groupe des coiffes de type 1, on rencontre parfois une méthylation supplémentaire en position N G, si le pénultième nucléotide est une adénine.

Cette coiffe est appelée de type 1'

^{m7} G 5'ppp5mNGAmp

Coiffe 2 ^{m7} GpppN1^{m}N2^{m} les deux nucléotides adjacents sont méthylés en position 2'

La coiffe Ø est le type exclusif rencontré chez la levure.

Quant à celles de type 1 ou 2, elles existent chez les autres eucaryotes avec une prédominance de type 1. (79)(6)

2.1.1.2. La portion leader

La portion leader est comprise entre la coiffe et le premier codon initiateur. C'est une séquence non codante au rôle encore mal défini. (76) (103)

2.1.1.3. La portion codante

Sa séquence commence généralement par un codon initiateur en 5', le codon AUG qui code pour la méthionine et termine du côté 3' par un codon non sens: UAG, UAA, UGA.

L'ensemble des autres bases constitue une suite ininterrompue de triplets qui, lus en phase avec le codon initiateur, déterminent la succession des acides aminés d'une seule chaîne polypeptidique complète.

C'est le template de longueur totale de 300 à 3000 résidus selon la taille protéique. (35)

2.1.1.4. La portion trailer

Dans cette séquence "TRAILER", on observe la présence de l'hexanucléotide AAUAAA commun à la plupart des ARNms eucaryotiques étudiés jusqu'à ce jour. Chez la pré-proinsuline du rat, on l'a retrouvé à l'intérieur d'un segment de 21 nucléotides adjacents à la queue de poly A. Peut-être aurait-il un rôle pour favoriser la polyadéylation? (8)

2.1.1.5. Le poly A

L'extrémité 3'-O H du messager est modifiée par l'adjonction d'une séquence monotone d'adénine. Cette adénylation s'effectue par un mécanisme enzymatique grâce à la poly A polymérase. (12) (20)

La queue de poly A a une longueur variable de 50 à 200 résidus. On la retrouve dans tous les ARNms d'eucaryotes mais on n'a pas pu détecter dans la majorité des ARNms d'histones.(51)

La présence du poly A à l'extrémité de l'ARNm est à la base de la technique généralement utilisée pour purifier les préparations et isoler les ARNms.

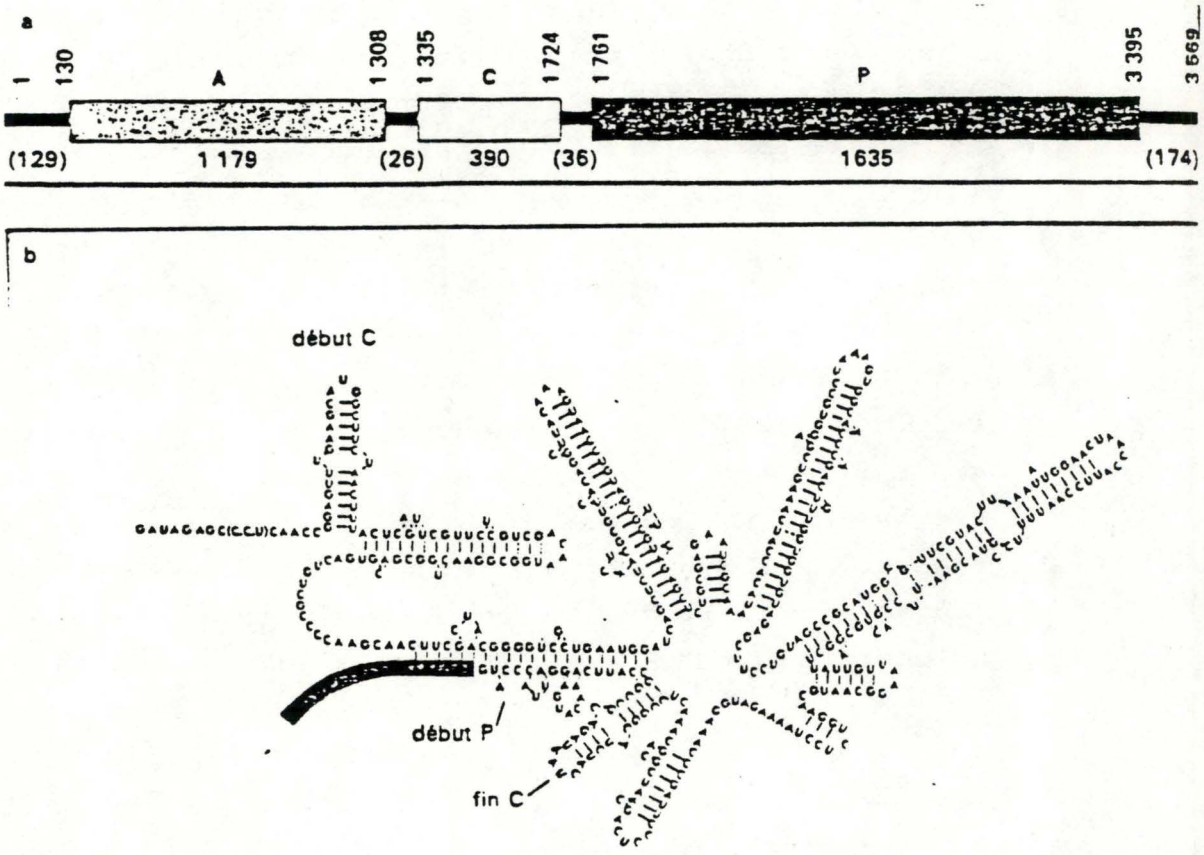


Fig. 3 : structure du génome du bactériophage MS2.

a) Ordre des gènes. Le génome de MS2 comprend de l'extrémité 5' vers l'extrèmité 3' une séquence non traduite de 129 nucléotides puis le gène de la protéine A (1179 nucléotides), une séquence non traduite 26 nucléotides, le gène C (390 nucléotides), une séquence non traduite de 36 nucléotides, le gène P (1635 nucléotides) et enfin une séquence non traduite de 174 nucléotides. La séquence de 3569 nucléotides est connue et la structure de l'ARN peut en être déduite.

b) Séquence de nucléotides dans le gène C codant pour une protéine capsidale. La forte proportion de séquences appariées est frappante.

2.1.2. STRUCTURE SECONDAIRE

La présentation de l'ARN eucaryote sous la forme d'une chaîne nucléotidique monocatenaire est simpliste et constitue la structure primaire.

Les travaux de FIERS et al. ont permis de proposer pour l'ARN de MS2 des configurations secondaires thermodynamiquement les plus stables. (17) (91) Fig. (3)

Des études semblables ont démontré l'existence possible d'appariement chez le messager d'eucaryote de l'ordre de 45 à 60 % chez l'ARN de globine de canard et α cristalline de brebis.

2.1.3. STRUCTURE TERTIAIRE ET D'ORDRE SUPERIEUR

A cette structure secondaire potentielle, il faut ajouter l'existence possible de reploiement entre diverses régions distantes du messager et l'interaction de certaines parties de celui-ci avec d'autres molécules, protéines, polyamines, ARN conférant ainsi à l'ensemble une structure tertiaire et quaternaire complexe.

Les régions leaders possèdent des régions homologues qui peuvent s'apparier pour former des hairpins. (43)

A propos de trailer, la possibilité de complémentarité entre les bases semble faible. Mais selon Darnell, chez le messager de la β globine, une proportion de répétitions de séquences permettrait l'existence d'une double hélice. (36)

La queue de poly A pourrait se replier au-dessus du messager et s'associer avec une séquence complémentaire 5' terminale. (53)

Il faut mentionner l'existence de protéines associées à l'ARNm et formant des mRNP ou "mRNA ribonucleoprotein particles". Une protéine particulière de 78.000 daltons se lie à la séquence poly A du messager. (8) (126)

Concernant la coiffe, plusieurs configurations tridimensionnelles sont proposées. KIM et SARMA ont avancé que l'extrémité ^{m7}G5'ppp5'Am pouvait se replier sur elle-même grâce à la flexibilité des liaisons phosphodiesters successives du brin triphosphate (66) et donner lieu à une stabilisation par interactions coplanaires entre la base G de la coiffe et les deux premières bases transcrites. Fig. (4)

On peut donc représenter schématiquement le messager d'eucaryote comme dans la figure ci-contre. Fig. (5)

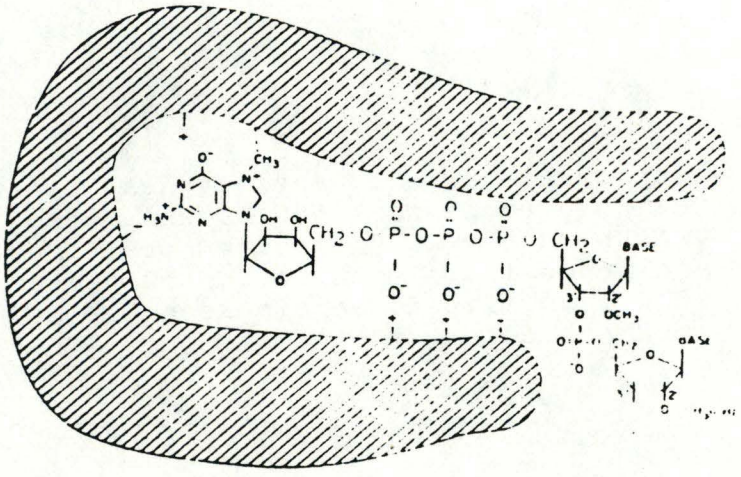


Fig. 4 - Dessin schématique des relations hypothétiques entre le "cap" et une protéine associée (d'après Busch, 1976).

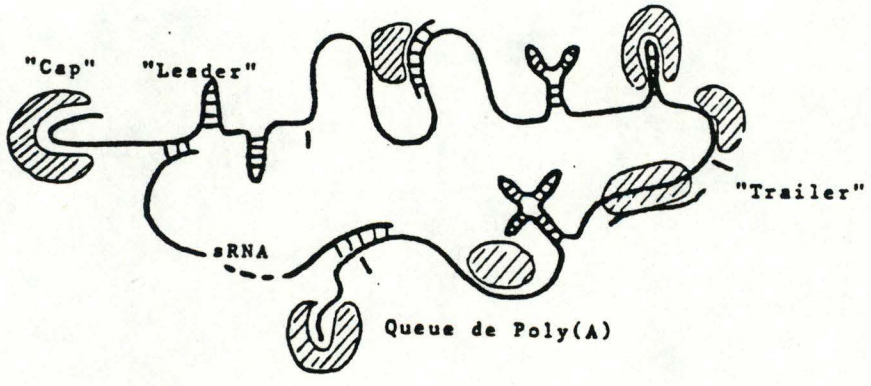


Fig. 5 - structure schématique de l'ARNm : interaction avec protéine et formation d'hairpin.

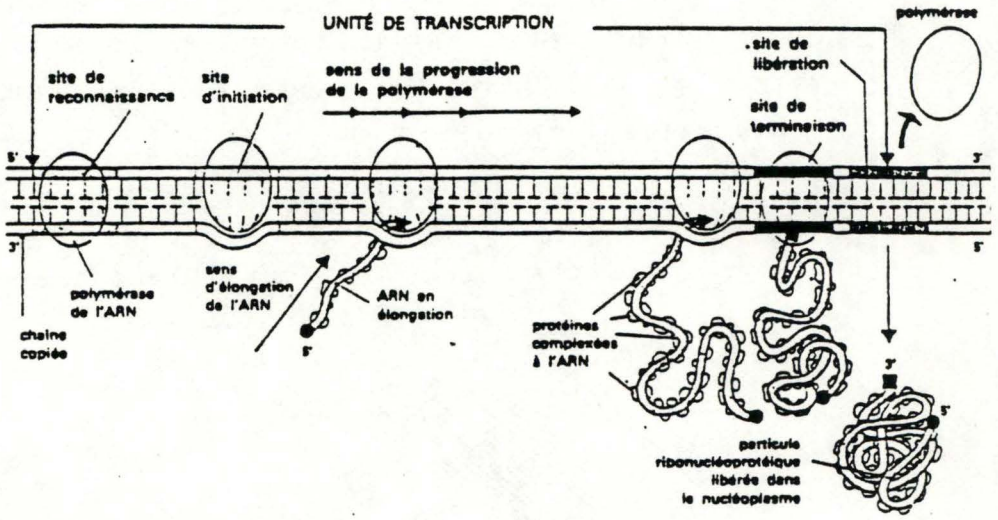


Fig.6. - représentation schématique des étapes de la transcription. La polymérase de l'ARN après s'être introduite sur le duple d'ADN au niveau d'un site spécifique de reconnaissance, commence la polymérisation au niveau du sité d'initiation. C'est au site de terminaison que la polymérase achève la transcription.

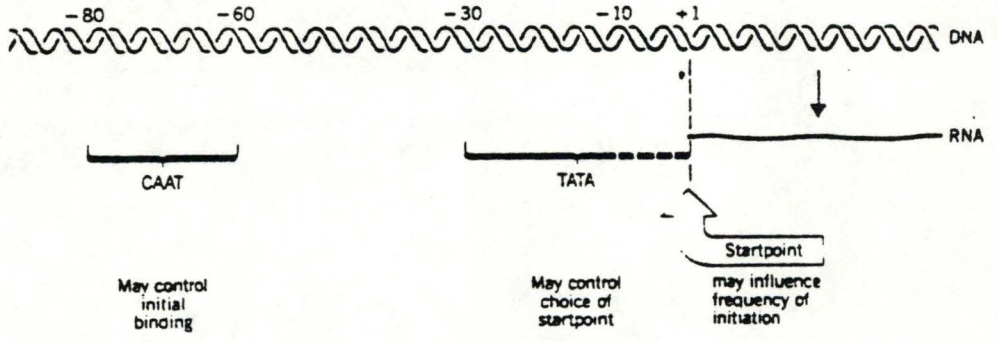


Fig.7 - La séquence consensus $GG^{C}_{T}CAATCT$ (CAAT box) se retrouve en amont de nombreux gènes eucaryotes, elle pourrait intervenir dans l'interaction cognitive entre l'ADN et la polymérase de l'ARN.

2.2. BIOGENESE DU MESSAGER

La transcription réalise la synthèse séquentielle d'un ARN sur une matrice d'ADN à l'intervention d'une ARN polymérase ADN-dépendante. Chez les eucaryotes, on distingue trois ARN polymérases différentes selon la synthèse d'ARNm, d'ARNr ou d'ARNt.

Classe de l'enzyme	Localisation subcellulaire	Sensibilité à l' -amanitine	ARN transcript	Poids moléculaire global x 10^3
I	nucléole	insensible	pré-ARNr	550
II	nucléoplasme	inhibée à 10^{-8} à 10^{-9} M	ARNhn	500
III	nucléoplasme	inhibée à 10^{-4} à 10^{-5} M	pré-ARNt	450

La transcription de l'ADN et ARN comporte 3 étapes:

l'initiation,
l'élongation,
la terminaison.

Fig. (6)

Les premiers produits de transcription des gènes de structures se trouvent dans le nucléoplasme des eucaryotes sous la forme de molécules de tailles très diverses appelées ARNmh. Leur synthèse s'opère grâce à l'intervention de l'ARN polymérase II qui interagit avec une séquence d'ADN hautement conservée appelée promoteur. (23) (132) (16)

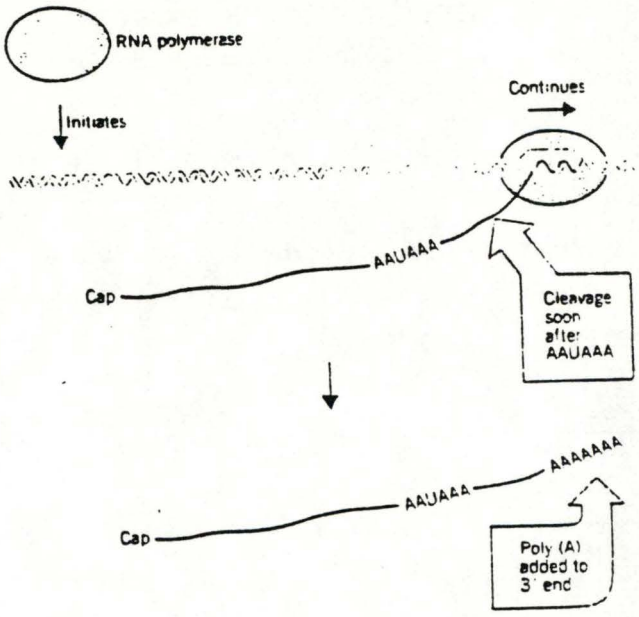


Fig.8. - La séquence AAUAAA est nécessaire pour le clivage et polyadénylation des ARN messagers du virus SV 40.

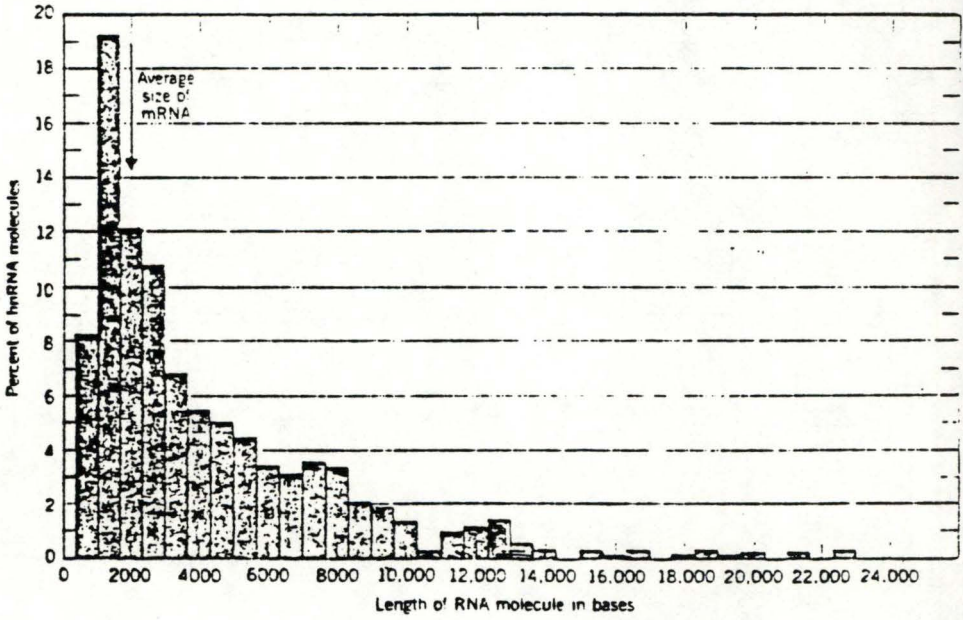


Fig. 9. - la taille moyenne de l'ARN messager eucaryote est très inférieure à celle de l'ARN hétérogène nucléair

Ce dernier est constitué de 7 nucléotides situés 25-23 nucléotides en amont d'où la polymérisation commence. Ces 7 nucléotides forment une séquence consensus appelée GOLDBERG-HOGNESS box. (GOLDBERG). Parfois plus en amont, se situe une séquence à -80, appelée CAAT box. (32b) fig.7

Il est à noter qu'il existe des séquences distantes du promoteur qui jouent un rôle important dans l'efficience de la transcription. Ces séquences s'appellent "enhancer". Une délétion dans la région enhancer réduit très fortement la transcription in vivo. (59)

L'ARN polymérase II achève la transcription au niveau du site terminateur.

Une endonucléase clive l'ARN transcript ± 15 nucléotides après la séquence AAUAAA. (82) fig.8

2.2.1. MATURATION POSTTRANSCRIPTIONNELLE

Ces ARNmhs sont transformés en ARNms suivant un processus de très grande complexité.

Ce processus appelé maturation peut comprendre:

- des additions de nucléotides à l'extrémité terminale 3' de la molécule: polyadénylation,

- des clivages et "re-soudures" ("cut and splice") assurant l'excision d'introns de gènes en mosaïque, Fig. (9)

- des modifications de nucléotides: méthylation,

- des additions de structure complexe à l'extrémité 5' de la molécule: le coiffage.

2.2.1.1. Polyadénylation

La polyadénylation constitue une étape nucléaire de la maturation (94) des ARNms. Cependant à cette adénylation, il faut ajouter une adénylation supplémentaire dite d'addition qui se déroule essentiellement dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau.

Elle se fait plus lentement et ajoute seulement une dizaine de bases à la queue de poly A préexistante.

HUEZ et al. ont montré que la queue de polyA contribue à la stabilité fonctionnelle de l'ARNm de globine in vivo. Après injection dans des ovocytes de xénopes, les auteurs ont suivi la synthèse protéique. Ils ont montré que la déadélylation réduit la synthèse de globine, tandis que la réadélylation la restitue. (99)

DRUMMOND a étudié la relation de longueur de la queue et le taux de dégradation de l'ARNm. Il en a déduit que plus le polyA et long, plus l'ARN est stable. (4)

Il faut cependant tenir compte d'une limite de 10 à 20 adénosines. En deçà de ce nombre, le poly A n'assure plus sa fonction de stabilité et le messager est inactivé.

Ceci peut être compris par les données obtenues par HIETER qui a montré que la queue de poly A présente une grande affinité pour les endonucléases. (56a)

De la sorte, l'activité endonucléotidique serait focalisée en dehors de la partie codante. De plus, le poly A pourrait protéger l'ARNm à la suite de son repliement stérique couvrant le reste du messager. (91b)

2.2.1.2. "Splicing"

L'excision et l'épissage font partie d'un processus par lequel les ARNm matures sont formés par l'excision de morceaux (introns) de pré ARNm et par la soudure de fragments conservés (exons) qui forment le support définitif de l'information. Ce phénomène se produit dans le noyau des

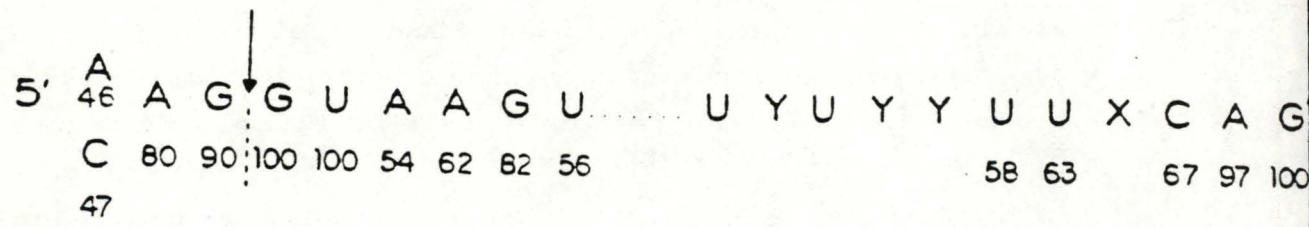


fig. 10. Séquence consensus hautement conservées entre exons et introns des gènes en mosaïque des cellules eucaryotes

eucaryotes mais aussi dans les mitochondries de levure par exemple. Il se retrouve chez les ARNs des virus mais aussi chez certains pré ARNrs et pré ARNts. Ceci montre la généralité.

Selon les données actuelles la transcription du gène se déroule de manière continue en générant un transcript primaire qui est clivé et resoudé. Ceci se déroule en respectant la règle de CHAMBON: le splicing a lieu entre des nucléotides invariants AG et GU (sauf pour la levure de bière (13) (68) (110). Fig. (10)

2.2.1.3. Méthylation

Ces méthylations principalement m^6 A et m^6 C internes s'effectueraient dans le noyau, mais seulement un petit nombre de résidus serait concerné (2,2 groupe méthyl par 100 nucléotides dans des cellules de souris). (19)

PERRY et KELLY ont montré que la méthylation est un processus posttranscriptionnel. (104) Mais les rôles de méthylations internes restent encore au niveau de suppositions.

2.2.1.4. Le coiffage

Chez les eucaryotes, la formation d'une structure coiffe complète demande la participation de 4 à 5 enzymes semblables à ceux découverts chez le réovirus.

Les séries de réactions sont catalysées par ces 5 enzymes associés actifs en présence de deux ribonucléotides triphosphates et de la SAM. (114)

Elles se déroulent comme suit :

RNA polymérase

1. pppN' + pppN'' ----------> pppN' pN'' + PPi

nucléotide phosphohydrolase

2. pppN' pN'' ----------> ppN'pN'' + Pi

guanylyl transférase

3. pppG+ppN'pN''----------> $G^{5'}$ppp5'N'pN''+PPi

méthyltransférase 1

4. GpppN'N''+ SAM ----------> m7 GpppN'pN''+SAH

méthyltransférase 2

5. m7GpppN'pN''+SAM ----------> m7GpppN'^{m}pN''+SAH

(64) (45)

Plus tard, les enzymes catalysant les mêmes réactions ont été purifiés du noyau de cellule Hela et de "wheat germ", de levure... (131) (62) (63) (78)

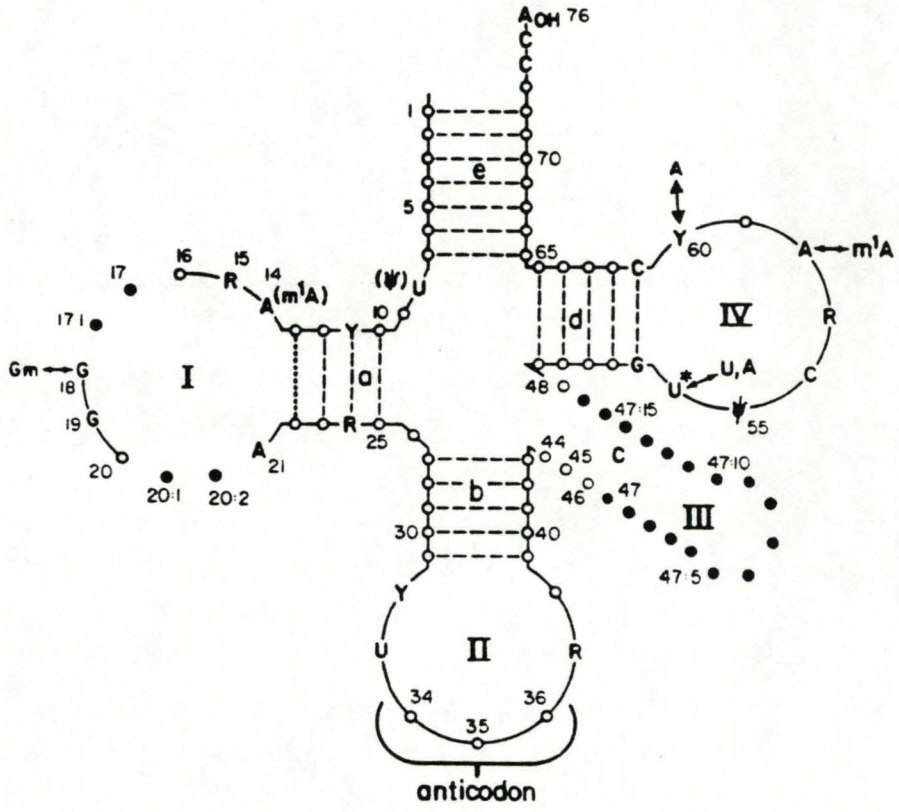


Fig. 11. - schéma de l'ARN de transfert.

2.3. ROLE DE L'ARNm

2.3.1. GENERALITES

Le rôle ultime d'un messager est d'être traduit en protéines mais cette production doit obéir à des critères qualitatifs et quantitatifs. La traduction doit s'opérer sans faute et à un taux adéquat pour chaque ARNm. L'interaction entre l'ARNm, son milieu et les partenaires de la machinerie de synthèse protéique sont susceptibles de jouer un rôle à ce niveau. Différents partenaires sont requis outre l'ARN lui-même:

l'ARNT
les ribosomes
les facteurs protéiques
et divers éléments (GTP, ions, ...)

2.3.1.1. L'ARNT

L'ARNT est un petit polyribonucléotide formé d'une chaîne continue d'environ 80 nucléotides d'un poids moléculaire de 25 à 30.000 daltons. Sa structure primaire est très variable. Il présente des nucléotides modifiés (méthylés ou autres). (40) (65) (108).

Sa structure secondaire est une configuration bidimensionnelle de type "feuille de trèfle" cfr fig.11(97)

Il sert d'intermédiaire entre l'ARNm et le ribosome, qui réalise le transfert de l'acide aminé et son adaptation à l'appareil de traduction et la reconnaissance du signal qui le spécifie sur l'ARNm. (98)

2.3.1.2. Les ribosomes

Chez les eucaryotes, les ribosomes ont un coefficient de sédimentation de 80 S et se caractérisent par l'association d'une grande et d'une petite sous-unité,

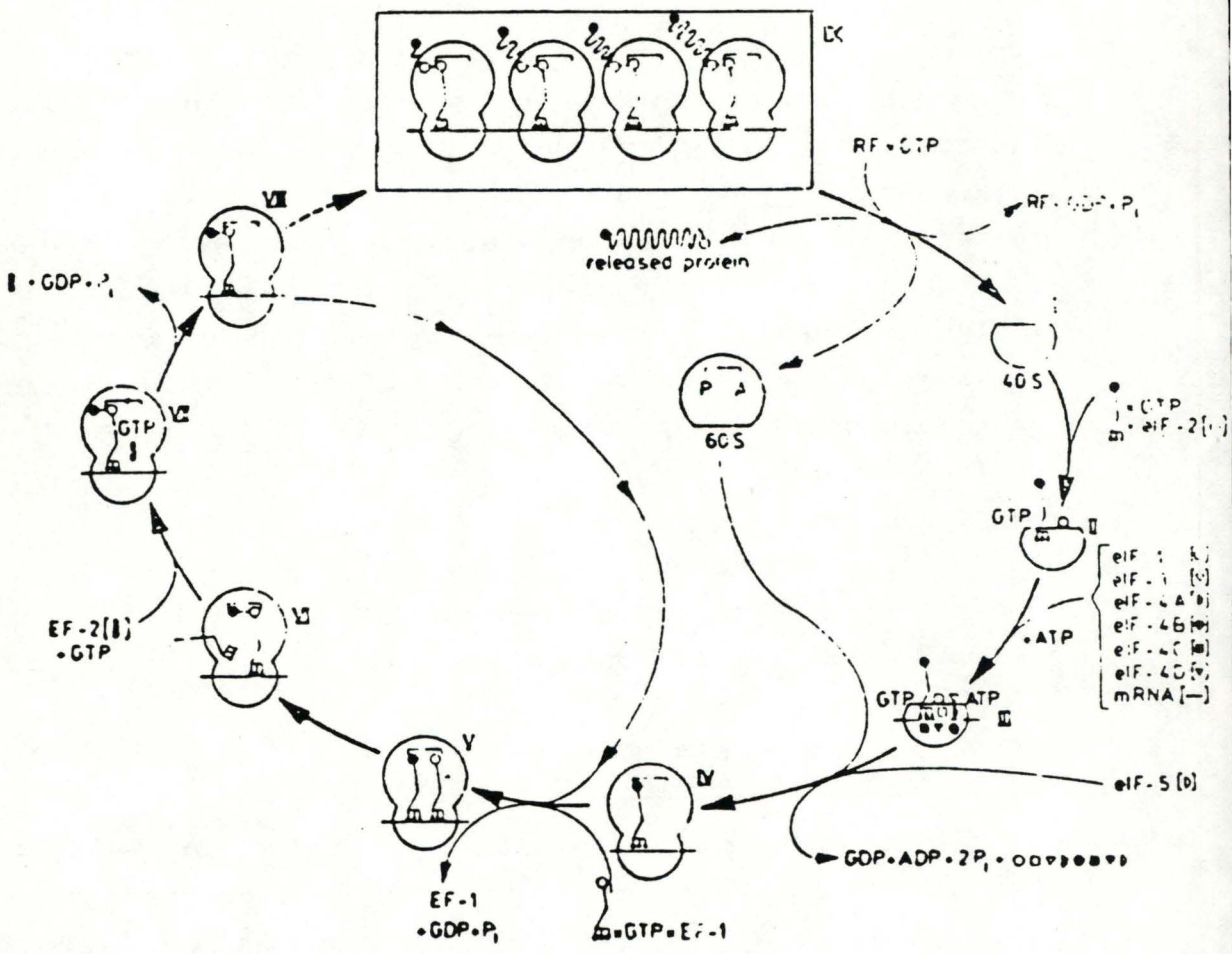


Fig. 12. - schéma de synthèse protéique chez les eucaryotes
P. site de fixation ribosomale de l'ARNt peptidyl (site
A. site de fixation ribosomale de l'ARNt aminoacyl (site
CIF. facteur d'initiation eucaryotique
EF. facteur d'élongation
FF. facteur de relâchement
ARNt eucaryotique initiateur
ARNt aminoacyl

respectivement désignées par le coefficient approximatif de 60 et 80 S. Ils sont formés par l'association de protéines très basiques à des ARNsribosomiques (46) (133) (134) (54).

2.3.1.3. Les facteurs protéiques de traduction

On connaît de plus en plus d'éléments dont les principaux sont:

- les facteurs d'initiation, intervenant au début de la traduction (formation des couples de préinitiation et d'initiation);

- les facteurs d'élongation, intervenant au niveau des interactions entre les aminoacyl - TRNA - GTP et les sites spécifiques du ribosome;

- les facteurs de terminaison déclenchant la libération de la chaîne peptidique et la séparation des sous-unités ribosomiques. (52) (45)

2.3.2. LA SYNTHESE PROTEIQUE PROPREMENT DITE (55) (129)

Elle comporte 3 phases: 1. L'INITIATION
2. L'ELONGATION
3. LA TERMINAISON Fig. (12)

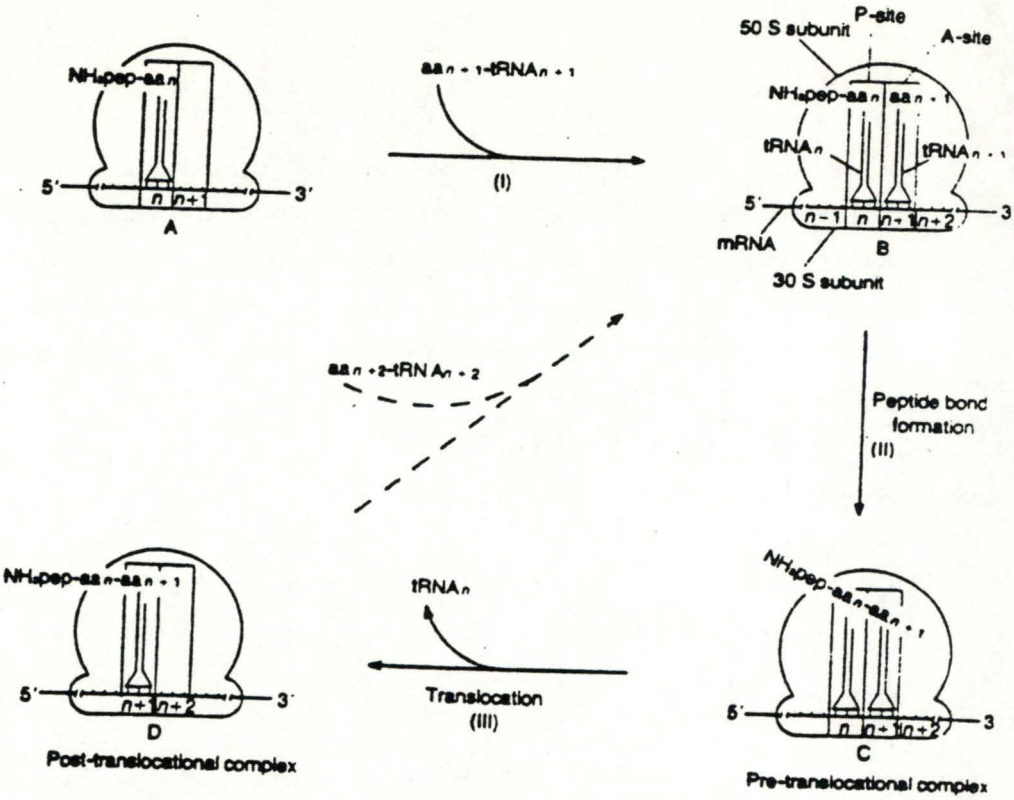


Fig. 14. - Schéma cyclique pour l'élongation de la chaîne polypeptidique pour montrer la relation entre le monoribosome et l'ARNm. Ce cycle commence au stade A (équivalent à D), avec le peptide croissant attaché à l'ARNt dans le site de liaison ARNt peptidyl (Bitep) du 80 S , ribosome décodant le codon n de l'ARNm.

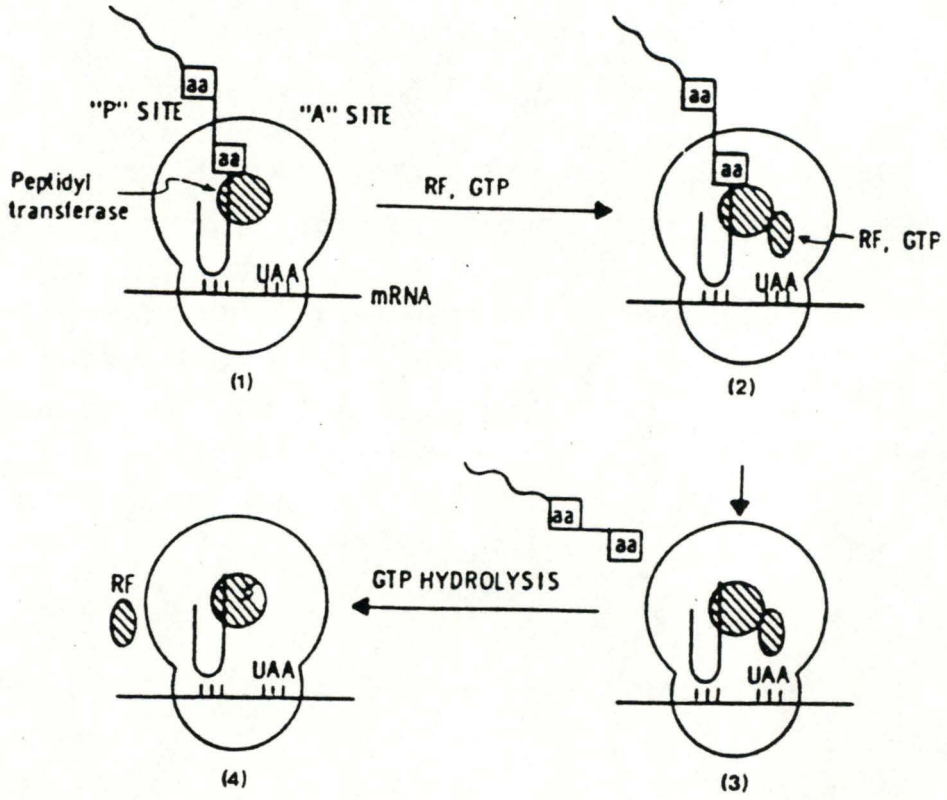


Fig. 15. - schéma de la termination
(1) ARNt peptidyl dans le site P après translocation
(2) Interaction de RF avec le ribosome en réponse du codon terminateur
(3) hydrolyse peptidyl ARNt avec interaction de RF et la peptidyltransférase
(4) dissociation du RF du ribosome.

2.3.2.1. L'initiation (58)

L'initiation de la transcription requiert bon nombre d'éléments: sous-unités ribosomiques, ARNts, facteurs d'initiation rendant le phénomène très complexe, comme le montre la fig. (13)

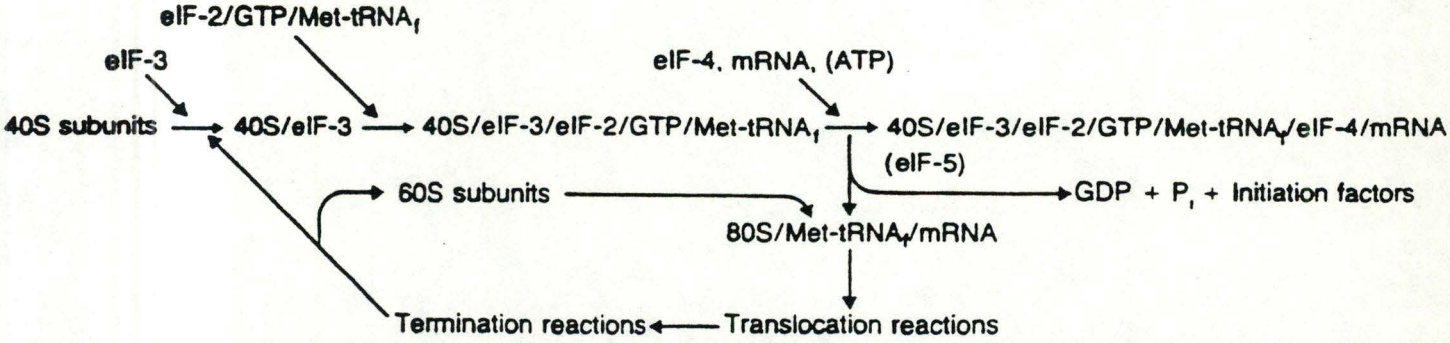


Fig. 13. - La séquence de réactions pour l'initiation est la suivante; les ribosomes 40 S produits durant l'étape de terminaison se lient à eIF - 3 . Ensuite, le tRNAf-Met, l'ARNm et les sous-unités 60 S se joignent au complexe suivant cet ordre. Il est à noter que l'ARNm pourrait avoir normalement plus de ribosomes engagés en même temps dans la traduction, ce qui donne une structure en polysomes. Les structures résultantes de la combinaison de polysomes et de 40 S sont directement détectables parmi les polysomes plus conventionnels contenant l'attachement de l'ARNm, sont dénommés eIF-4: en fait, au moins 3 facteurs 4 A, 4 B et 4 C sont demandés. Les facteurs entre parenthèses dans le schéma jouent plus un rôle catalytique qu'un rôle de formation de complexes.

2.3.2.2. L'élongation (27) (26)

Ce schéma cyclique pour l'élongation d'une chaîne polypeptidique montre la relation entre le monoribosome et l'ARNm. Le cycle commence en A (équivalent à D au rond suivant) avec un peptide croissant attaché à l'ARNt dans le site de liaison (site P) peptidyl-ARNt d'un ribosome eucaryotique 80 S décodant le codon n de l'ARNm. Fig. (14)

2.3.2.3. La terminaison (21)

Au niveau de l'ARNm, les 3 codons UAA, UAG, UGA, signalent la terminaison de la chaîne polypeptidique. A cet endroit, les facteurs de relâchement RF1 et RF2 agissent sur la peptidyltransférase qui libère le polypeptide du dernier ARNt. Au même moment, le ribosome se dissocie du messager sous forme de plusieurs sous-unités et le RF est libéré. Fig. (15)

2.3.3. ROLES POSSIBLES DE LA COIFFE

Différentes expériences mettant en évidence les rôles possibles de la coiffe ont été menées pour montrer l'importance au niveau de l'initiation de la synthèse protéique, de la stabilité et de l'initiation de la transcription.

Les conclusions de ces expériences en ordre chronologique sont reprises sous les trois en-têtes suivants:

- rôle dans l'Initiation Synthèse Protéique,
- rôle dans la Stabilité
- rôle dans l'Initiation de Transcription.

2.3.3.1. Initiation Synthèse Protéique

- Selon KOZAK, la coiffe a un rôle de reconnaissance de la sous-unité ribosomique 40 S. (71)

- KOZAK et SHATKIN en 1976, ont étudié la formation et la stabilité des complexes d'initiation avec les ribosomes des ARNmS coiffés et non coiffés (69). Ils ont découvert que la coiffe sur laquelle s'est fixé le ribosome est protégée de l'action des RNAases.

- SONENBERG et al. ont étudié des polynucléotides synthétiques coiffés du type:

$m^7G(5')ppp(5')G^mpG(pU)n$ ou

$m^7G(5')ppp(5')G^mpC(pApC)^n$ qui sont capables de se lier à la sous-unité ribosomiale 40 S avec plus d'efficience que les mêmes polynucléotides non coiffés (121); la fixation d'une coiffe sur un ARNm qui en a été dépourvu à la suite d'une réaction d'élimination restaure sa capacité de liaison avec le ribosome via la sous-unité 40 S.

- ROSENBERG et PATERSON ont montré qu'un ARNm procaryote coiffé grâce à des enzymes de coiffage du virus de la vaccine peut former un complexe avec des ribosomes de germes de blé. L'interaction de l'ARNm eucaryote avec le ribosome pourrait être médiée par des facteurs d'initiation comme le eIF-4B. (108 C)

- KOZARICH et DEEGAN ont montré qu'en utilisant des produits réagissant spécifiquement avec la coiffe en altérant sa structure, la traduction des ARNms coiffés était inhibée. (72).

- SONENBERG a découvert dans des systèmes acellulaires de traduction, certaines protéines pouvant se fixer spécifiquement à la coiffe (CAP binding Proteins: CBP.). Ces dernières interviennent dans la formation des complexes d'initiation et protègent l'extrémité 5' du messager des nucléases (119) (42). La coiffe du messager se fixerait sur un polypeptide qui a beaucoup d'affinités pour le facteur d'initiation eIF3 lié à la sous-unité 40 S.

Cette protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur m^7GDP-sepharose.

Quand on ajoute cette protéine purifiée à un extrait de cellules Hela, la traduction des ARNms coiffés est largement stimulée. Cet effet n'est pas obtenu avec des ARNms non-coiffés. (108B)

- Le groupe de SONENBERG en utilisant un anticorps monoclonal contre cette protéine fixatrice de coiffes a montré que cet anticorps inhibe différentiellement la traduction des ARNms coiffés par rapport aux non-coiffés. (111)

- Il a aussi mis en évidence la dépendance de la formation du complexe CBP-coiffe vis à vis de l'ATP et du Mg^{++}. Il en a déduit que les CBP agiraient en déroulant la molécule de l'ARNm à son extrémité 5' en permettant la fixation de la sous-unité 40 S. (120).

- SONENBERG et al. observent aussi qu'un système acellulaire préparé à partir de cellules Hela infectées par le poliovirus, traduit préférentiellement les ARNms non coiffés du virus. L'ajoute de CBP restaure la traduction des ARNms cellulaires sans pour cela augmenter la traduction des messagers du poliovirus. Cette observation suggère que le poliovirus inhibe la traduction des ARNms cellulaires par l'inactivation des CBP. (119) (127)

2.3.3.2. Rôle dans la Stabilité

La coiffe protégerait l'ARNm de l'action de nucléases comme le suggère bon nombre d'expériences.

FURUICHI, LA FIANDRA et SHATKIN ont montré que les ARNms de réovirus avec en 5' terminal du 7^{m}GpppGm ou GpppG étaient plus stables physiquement que des ARNms contenant du ppG lorsqu'ils étaient injectés dans des ovocytes de Xénopes ou incubés dans un extrait de germe de blé. La grande stabilité de l'ARNm avec 7^{m}GpppGm serait due à la protection contre la dégradation 5' -exonucléotidique. (48)

- Des observations convergentes furent obtenues en étudiant la stabilité des ARNms pendant la synthèse protéique dans des systèmes utilisant des messagers de globine ou de CPV. Dans chaque cas, l'ARNm coiffé demeurait intact, alors que l'ARNm non-coiffé était rapidement dégradé dans un système acellulaire de traduction de germes de blé. (81) (116)

Cette dégradation est probablement due à l'activité d'une exonucléase 5' 3' car les résidus d'hydrolyse sont des mononucléotides 5'.

- De même, DRUMMOND et COLMAN ont prouvé en utilisant un ARN synthétique codant pour le lysozyme de poulet que la coiffe augmentait la stabilité des transcripts et qu'au moins 40% d'entre eux restaient intacts après l'injection dans des ovocytes de Xénopes. (41)

2.3.3.3. Rôle dans l'Initiation de Transcription

Jusqu'à présent, il n'a pas encore été possible de déterminer de manière univoque si la coiffe est impliquée ou même nécessaire à l'initiation de la synthèse de l'ARNm. Cependant chez le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), le coiffage pourrait être indispensable à la synthèse des ARNms dans la mesure où on n'a jamais pu isoler des messagers non-coiffés dans ce système. (7)

Un autre système viral, le virus de la grippe, nous révèle un mécanisme unique pour la synthèse de ces ARNms. Les messagers coiffés de la cellule hôte sont clivés par une endonucléase spécifique à une dizaine de nucléotides de leurs extrémités 5'. Les polynucléotides générés et portant une coiffe 1 servent ensuite d'amorce pour la synthèse des ARNms viraux. (106)

Mais COPPOLA et al. ont montré dans l'adénovirus 2 que tant que les ARNms naissants n'ont pas dépassé 20 résidus, la molécule de SAdoMet demeure inaccessible au complexe de coiffage car l'ARN polymérase II couvre toujours le polymère naissant de moins de 20 nucléotides. Ceci suggère que le coiffage n'est pas couplé directement à l'initiation de la transcription. (32)

2.3.4. IMPORTANCE DE LA METHYLATION DE LA COIFFE SUR LA TRANSCRIPTION ET LA TRADUCTION

Le rôle propre de la méthylation de la coiffe dans le contrôle de la traduction des ARNms est mal connu.

Cependant, CONTRERAS lors d'une expérience a avancé l'hypothèse suivant laquelle un ARNm coiffé avec ^{m7}GpppA donnerait peut-être une meilleure efficience de traduction qu'avec GpppA.

Cela reviendrait à dire que si cette différence existait réellement, elle serait imputable au CH3.

L'étude de l'importance du CH3 peut être abordée selon au moins 3 approches:

- une approche in vivo,
- une approche génétique,
- une approche in vitro.

2.3.4.1. Approche in vivo

Elle pourrait être envisagée du point de vue biochimique et consisterait à injecter des substances qui peuvent, soit empêcher la méthylation, soit enlever le CH3 de la coiffe.

2.3.4.1.1. Utilisation d'agents inhibiteurs de la méthylation de la coiffe

La réaction de méthylation de la coiffe est catalysée par la 7- méthyl-guanosine méthyltransférase. (92)

SAdoMet + GpppN1pN2p... ^{m7}GpppN1pN2p... + Ado-5-homocystéine (104)

Pour étudier le problème du rôle du méthyl, une substance qui agirait spécifiquement sur la 7 - méthyl guanosine méthyltransférase pourrait être trouvée et la rendrait inactive.

Un des premiers essais consistait à utiliser la SAH, inhibiteur de méthylation; les résultats furent les suivants:

Au lieu d'avoir une déméthylation spécifique de la coiffe, on inhibait non seulement les méthylations de l'ARNm (92); mais aussi de l'ADN (84), des protéines et d'autres molécules. (117) (49)

Ensuite d'autres drogues furent utilisées:

La 5 -tubercidinylhomocystéine fut incorporée dans des cultures de tissus de mammifères. Cet inhibiteur de la méthylation permettait la synthèse d'ARNms déficients en m^6A localement et en groupes méthyl-2'O de la coiffe. (61) (109)

Des observations similaires ont été faites chez l'ARNm du virus du sarcome aviaire produit dans les cellules embryonnaires du poulet, traitées avec de la cycloleucine. (39)

Malheureusement, avec ces deux inhibiteurs de la méthylation de l'ARNm 5' terminal G, il n'a pas été possible d'inhiber la formation du m7 G sans décroître fortement la synthèse de l'ARNm.

Le problème abordé sous cet aspect reste entier car on n'a pas encore trouvé l'enzyme inhibant spécifiquement la 7méthyl-guanosine méthyltransférase.

2.3.4.1.2. Utilisation d'agents déméthylants

Les substances éliminant le CH3 utilisées dans un milieu in vivo, altéreraient bon nombre de molécules importantes pour le fonctionnement de la cellule. Pour contourner cette difficulté, il fallait tenter d'affecter la seule méthylation de la coiffe. L'expérience suivante est un exemple d'approche du problème par ce biais.

FURUICHI, LA FIANDRA et SHATKIN utilisent un procédé pour enlever le CH3 de la coiffe par β élimination. (48) Ils se servent de réovirus synthétisés in vitro, traités par après avec du périodate et de l'aniline. Après purification, l'ARNm des virus ainsi traités est introduit dans des ovocytes de Xaenopus laevis. Mais leurs observations furent empêchées et limitées par le peu de stabilité et la vitesse de dégradation de l'ARNm obtenu, dû à l'enlèvement des méthyls internes de l'ARNm ou à l'absence du CH3 de la coiffe ou des deux facteurs en même temps.

Cette approche ne permettait pas l'étude détaillée attendue.

2.3.4.2. Approche génétique

Elle consisterait à rechercher un mutant pour le gène de la 7 méthylguanosine transférase et de le comparer à son témoin isogénique mais sauvage.

Le matériel de choix pour une approche génétique chez les eucaryotes est la levure Saccharomyces cerevisiae. La méthode pour obtenir le mutant intéressant peut consister à réaliser une mutagénèse aléatoire et faire une sélection adéquate dans une banque de mutants (tous thermo-sensibles pour la croissance), ou, alternativement, à recourir aux techniques du génie génétique et à la mutagénèse dirigée pour atteindre le même résultat.

2.3.4.2.1. Obtention d'un mutant par mutagénèse classique

Les mutants intéressants sont à rechercher parmi les mutants thermo-sensibles pour la croissance où l'enzyme serait déficient à 36°C mais fonctionnel à 23°.

Le test de "criblage" utilisé consiste à mettre en présence l'ARN des mutants présumés, la SAM radioactive et de l'enzyme purifié; seul l'ARN des clones mutants pour l'enzyme incorporera le CH3 radioactif, car les autres sont déjà méthylés par leur propre enzyme.

L'examen des différences phénotypiques entre le mutant isolé et son témoin permettra de préciser le rôle fonctionnel recherché de la méthylation de la coiffe.

2.3.4.2.2. Obtention d'un mutant par les voies du génie génétique et de la mutagénèse dirigée (39)

L'approche alternative à la méthodologie classique décrite ci-dessus consiste à isoler le gène sauvage (par exemple en détectant par réaction avec un anticorps anti-méthylase, le clone de E. coli exprimant l'enzyme à la suite d'une infection avec le vecteur d'expression >gt" dans lequel une banque génomique de levure sauvage a été constituée) et à le muter *in vitro* de manière dirigée avant de le transplacer en lieu et place du gène sauvage de la levure.

Les mutants, tous obtenus de cette manière et le témoin sauvage constituent le matériel de l'étude fonctionnelle visée.

3. APPROCHE IN VITRO DU ROLE DE LA METHYLATION DE LA COIFFE

La production par transcription in vitro d'ARNms avec divers types de coiffes devrait permettre d'établir le rôle fonctionnel de cette structure, dans la mesure où ils pourront être testés dans des systèmes de traduction acellulaire.

3.1. NOUVELLES POSSIBILITES

Avec l'avènement de ces techniques de clonage, on peut à présent isoler et caractériser des gènes qui n'étaient pas accessibles auparavant.

L'étape centrale consiste à cloner le gène, c'est-à-dire à l'incorporer dans un réplicon, habituellement un plasmide.

Le plasmide est introduit dans une cellule hôte, par exemple E. coli, qui est dite "transformée".

Ce plasmide chimérique est un élément autonome qui se réplique de la même manière que le plasmide original et qui peut être obtenu en plus grande quantité indépendamment du chromosome bactérien. Dans la bactérie, il se trouve sous forme de simple copie ou multicopies. (96) (29)

Souvent on utilise des plasmides qui possèdent deux gènes de résistance à différents antibiotiques. (28)

Incorporé dans la bactérie, le nombre de copies par cellule va être accru par des procédés qui vont inhiber la multiplication du génome cellulaire. Le plasmide se multipliera au détriment du génome bactérien, s'il est par exemple introduit dans une bactérie. (17)

Pour obtenir un nombre d'exemplaires élevé du plasmide, il suffira de le récupérer après lyse cellulaire et purification, par exemple par centrifugation isopycnique.

Ainsi cloné dans un plasmide, un gène peut non seulement être étudié mais aussi transcrit (128) (22).

Depuis peu, on dispose de systèmes de transcription in vitro extrêmement performants, offrant dès lors la possibilité d'obtenir des transcripts en grande quantité pour servir dans des études structurales et/ou fonctionnelles ultérieures.

3.2. SYSTEME DE TRADUCTION "IN VITRO"

Pour étudier la machinerie de synthèse protéique, il est indispensable de posséder un bon système capable de réaliser la traduction dans des conditions standardisées et contrôlées. (124)

De tels systèmes existent actuellement et sont même commercialisés. Ils doivent répondre à différents critères :

a) Il doit avoir une activité nucléasique et protéolytique quasi nulle.

b) Il doit être capable de traduire des messagers d'eucaryotes aussi bien que viraux.

c) L'incorporation d'acides aminés doit être réduite au maximum en l'absence d'ARN exogène.

d) Le système doit être exempt de contaminants pouvant inhiber la traduction.

e) Il doit être reproductible d'une préparation à l'autre, aisé à obtenir et à utiliser, et peu coûteux.

Les systèmes de traduction peuvent être classés en deux grands types:

- cellulaire,
- acellulaire.

3.2.1. LES SYSTEMES DE TRADUCTION CELLULAIRE

- Ovocytes de Xénope

L'utilisation d'un système cellulaire nécessite la microinjection. Cette méthode est assez difficile à mettre en oeuvre mais très sensible.

Les produits synthétisés ont le temps de s'accumuler pour être détectés. (41)

- Cellules en cultures

Les cellules les plus utilisées sont les fibroblastes. La difficulté de microinjection est ici un facteur limitant. Seuls certains laboratoires tels celui de l'EMBO disposent du matériel qui permette l'injection quotidienne programmée en série de certaines cellules ou noyaux.

Cependant, le taux de synthèse des ovocytes et des cellules en culture reste élevé, ce qui ne facilite pas la détection des protéines traduites des messagers exogènes. (124)

3.2.2. LES SYSTEMES DE TRADUCTION ACELLULAIRE

L'homogénéisation implique la disparition de toute compartimentation, ce qui simplifie l'interprétation des résultats par rapport à ceux obtenus in vivo.

- Le lysat de réticulocytes

Traité à la nucléase de microcoque calcium dépendante, ce système ne présente qu'une traduction faible d'ARNms endogènes.

Le taux de synthèse est identique dans le lysat et la cellule intacte.

Les terminaisons prématurées sont très rares. De plus, comme l'initiation s'arrête toujours avant l'élongation, la probabilité d'obtenir des produits de traduction complets augmente. (101)

- Wheat germ

Les terminaisons dans les wheat germ sont souvent prématurées, dues au faible taux d'élongation. Qualitativement, les peptides synthétisés dans un lysat de wheat germ présentent des erreurs de traduction par rapport aux protéines fabriquées in vivo. Malgré tout, ce système est utilisé pour de petits ARNms car peu sensibles aux inhibiteurs tels que des ARNs.

Malgré une efficience de traduction légèrement plus élevée pour le blé, les caractéristiques des deux systèmes sont identiques. (100) (9)

Les systèmes de traduction acellulaire ne permettent pas d'approcher toutes les étapes de la traduction d'un ARNm. Cependant, leur simplicité et les possibilités d'intervention qu'ils offrent à l'expérimentateur qui peut modifier le milieu comme il l'entend, en font des outils performants et très utiles pour la caractérisation des agents modulant la traduction des messagers d'eucaryotes, tels que la coiffe.

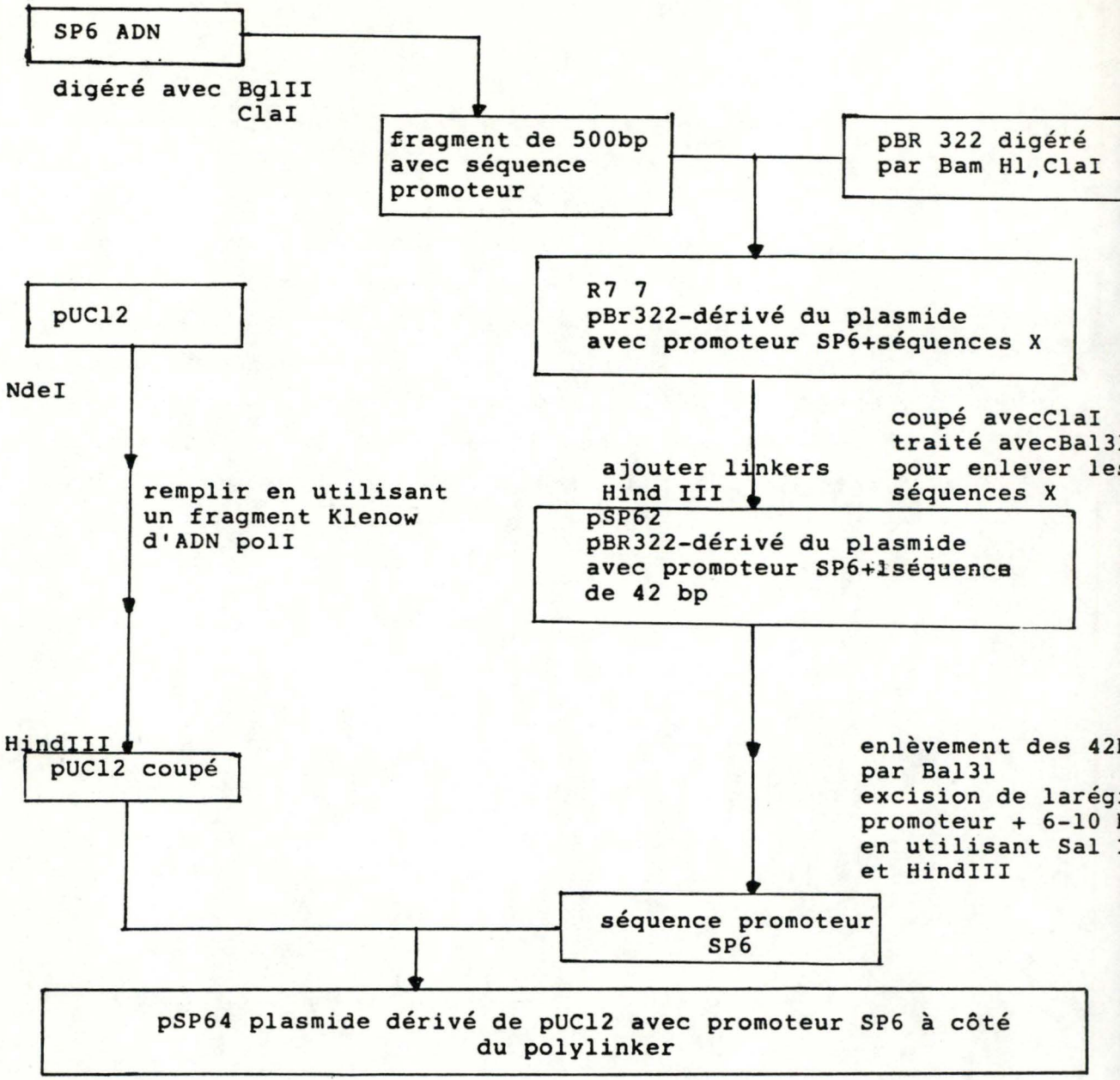


fig. 16.Origine du plasmide SP6.

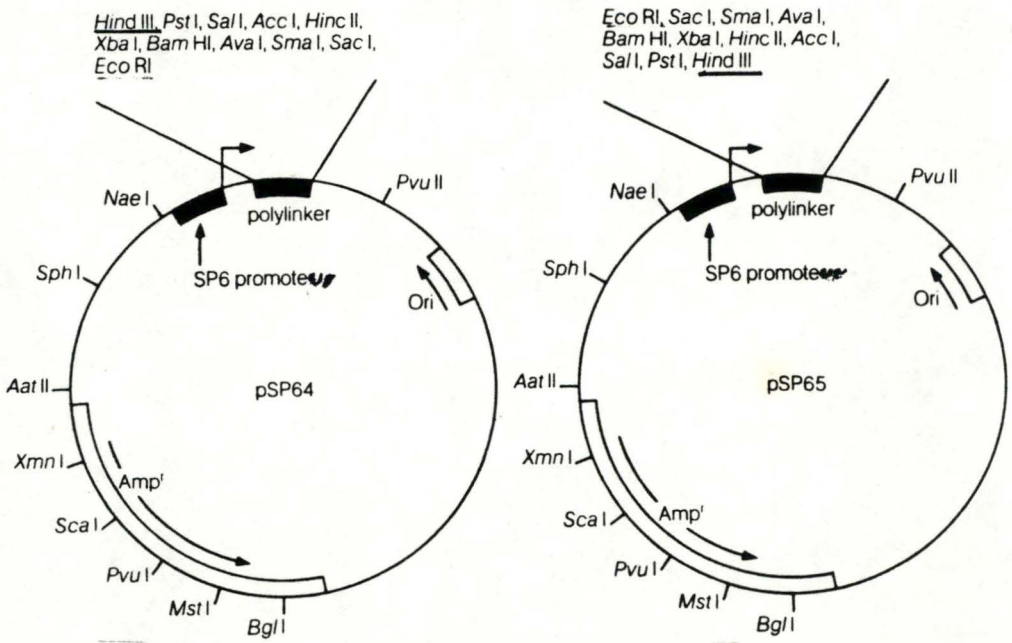


fig. 17. Description des plasmides pSP64 et pSP65.

3.3. SYSTEME TRANSCRIPTION TRADUCTION

3.3.1. LE SYSTEME SP6 (4)

Le système SP6 offre d'excellents moyens de synthétiser spécifiquement un simple brin d'ADN de séquences déterminées et de grandes longueurs en quantité non négligeable. (87) (60)

Il se base actuellement sur l'utilisation de deux vecteurs:

PSP6 4

PSP6 5

qui comportent tous deux un promoteur SP6. Fig. (16) (17)

Ces deux vecteurs dérivent du plasmide PUC 12 avec un promoteur SP6 jouxtant des polylinkers contenant des sites de restriction d'enzyme.

La différence entre les deux vecteurs se situe au niveau de l'orientation du polylinker -Hind III

-Ecor I

En effet en regardant la séquence du promoteur polylinker de pSP64 et pSP65, les deux vecteurs ont avant le promoteur SP6, un M 13 PUC polylinker comportant 11 sites de restriction uniques. Fig. (18)

Cette différence permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un plasmide pSP64 dans l'autre orientation que celle du pSP65 avec les mêmes enzymes de restriction.

On peut donc cloner en insérant pour Hind III à 6 paires de bases du site de départ de transcription.

Les transcriptions des 2 plasmides seront en sens inverse et pouvant former des ARN complémentaires. Fig. (19)



fig. 18. Promoteur pSP64 / séquence polylinker
Promoteur pSP65 / séquence polylinker

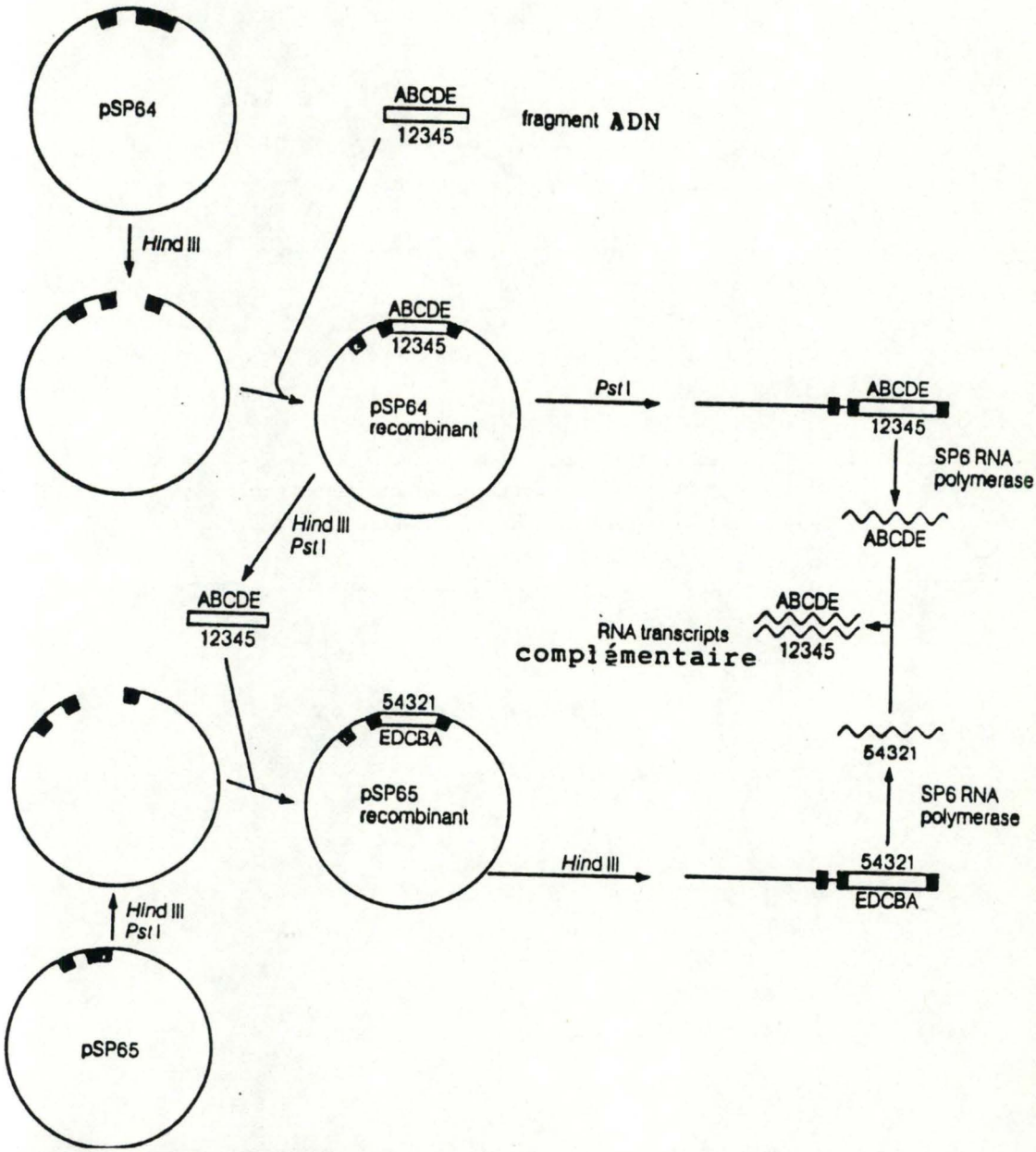
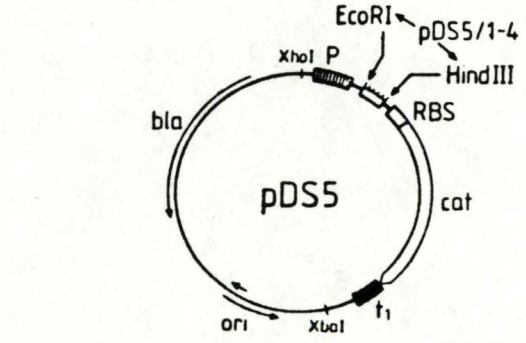


fig. 19.Synthèse d'ARN complémentaire au moyen des plasmides pSP64 et pSP65.



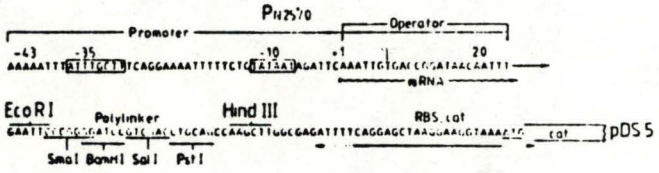


fig. 20.Description du p DS5

Mais pour que ce système fonctionne, une polymérase reconnaissant ce promoteur doit exister.

Elle a été mise en évidence lors d'infection de Salmonella typhimurium par un bactériophage SP6.

Elle se compose d'une chaîne simple de polypeptide d'un poids moléculaire de 96.000, facilement purifiable et stable. (18)

Cet enzyme **in vitro** garde sa capacité de reconnaître les promoteurs SP6 qui incorporés dans les vecteurs pSP64 et pSP65 permettent leur transcription. (95) (11)

3.3.2. LE SYSTEME PDS5

3.3.2.1. Description du PDS5

Les caractéristiques générales des plasmides de type PDS5 sont décrites à la figure (2o).

On observe la région d'originie PBR 322 comprise entre Xho I (initialement Eco RI) et Xba I (initialement Pvu II) avec le gène la et l'origine de replication.

PDS5 comprend en outre un promoteur fort P (Promoteur P_{N25} du phage T5 fusionné à l'opérateur lac. de E. Coli : $P_{N25}{}^{X}{}_{O}$) pour la transcription en aval jusqu'au terminateur t_1 (de l'opéron de rrnB d'E. coli.

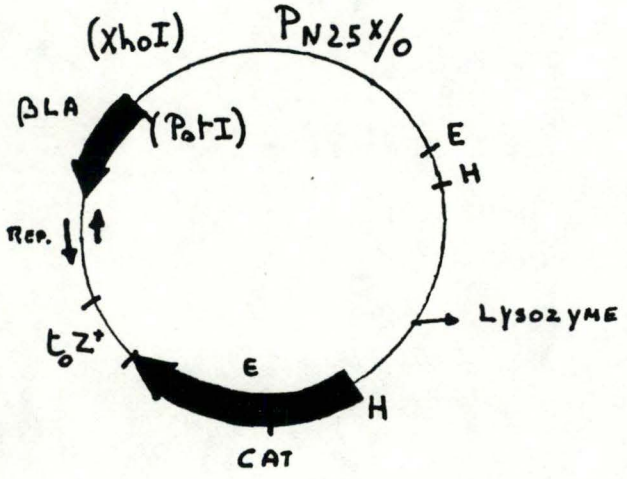
PDS5 comprend dans cette région un RBS (site de fixation du ribosome indispensable à la traduction dans un système procaryote) suivi du gène CAT. Ceci permet la synthèse de l'acétyl chloramphénicol transférase dans E. coli. Cette caractéristique a permis de vérifier l'incorporation du plasmide PDS5/4-1 dans la souche 600 d'E. coli.

Entre le promoteur fort et le RBS se trouve une séquence polylinker limitée par les sites EcoRI et HindIII provenant de pUC8.

Dans PDS5/4-1, le site HindIII a servi à insérer le CDNA de lysozyme de poulet.

3.3.2.2. Description du PDS5/4-1

Le PDS5/4-1 se distingue du PDS5 par l'insertion du gène de lysozyme de poulet par l'enlèvement d'une partie du gène βla, de Xho I, Pst I selon le schéma suivant :



Comme on peut le voir sur ce schéma, le PDS5/4-1 comporte le même promoteur que PDS5 : $P_{N25X/O}$ commençant à -43 et suivi à -35 par une "CAT" box modifiée en une séquence ATTGCTT.

La TATAAT box de situe à -10.

Le gène codant pour le lysozyme est inséré par 2 sites HindIII dans le plasmide, précédé par 1 site EcoRI.

A la suite de cette séquence, se situent successivement, le gène codant pour CAT, son RBS et un terminateur to2^{+} provenant de l'opéron lactose.

En ce qui concerne le gène codant pour la lactamase, il a été réduit volontairement avec la disparition de Xho I et Pst I pour permettre une meilleure stabilité du plasmide.

On trouvera en annexe les séquences des différents éléments cités.

3.3.2.3. Annexe

Les descriptions des promoteurs, RBS, CAT, terminateurs... sont données ci-dessous :

Promoteur PN_{25}

AAAAATTTATTTGCTTTCAGGAAAATTTTTCTGTATAATAGATTCATA

Promoteur lac.

ACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT

Promoteur $PN_{25}X/O$

```
        Promoteur
-43       -35                                        -10      +1        Opérateur
AAAAATTTATTTGCTTTCAGGAAAATTT TTCTGTATAATGATTCAAATTGTGACCGG
     20
ATAACAATTT
```

pDS5/4

```
EcoRI                                              Hind III
GAATTCCAAGCTT                ATG       15mt
```

RBS

```
5,- d [GTAAGGAGGTTTAAC] - 3'
3'- d [CATTCCTCCAAATTG] - 5'
```

Gène lysosyme

TTTCTTTCCTCCTATACATTTTCACATACTTTTCTTTCTTTTTGTTTTAAAACCTGCAAGGGGGATCCCCGGCAACATGA

GGTCTTTGCTAATCTTGGTGCTTTGCTTCCTGCCCCTGGCTGCTCTGGGGAAAGTCTTTGGACGATGTGAGCTGGCAGCG

GCTATGAAGCGTCACGGACTTGATAACTATCGGGGATACAGCCTGGGAAACTGGGTGTGTGCCGCAAAATTCGAGAGTAA

CTTCAACACCCAGGCTACAAACCGTAACACCGATGGGAGTACCGACTACGGAATCCTACAGATCAACAGCCGCTGGTGGT

GCAACGATGGCAGGACCCCAGGCTCCAGGAACCTGTGCAACATCCCGTGCTCAGCCCTGCTGAGCTCAGACATAACAGCG

AGCGTGAACTGCGCGAAGAAGATCGTCAGCGATGGAAACGGCATGAACGCGTGGGTCGCCTGGCGCAACCGCTGCAAGGG

TACCGACGTCCAGGCGTGGATCAGAGGCTGCCGGCTGTGAGGAGCTGCCGCACCCGGCCCGCCCGCTGCACAGCCGGCCG

CTTTGCGAGCGCGACGCTACCCGCTTGGCAGTTTTAAACGIATCCCTCATTAAAACGACTATACGCAAACGC

Gène CAT

TAAAATGG AGAAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT
AAAGAACATT TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAG
CTGGATATTA CGGCCTTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA AGCACAAGTT TTATCCGGCC
TTTATTCACA TTCTTGCCCG CCTGATGAAT GCTCATCCGG AATTCCGTAT GGCAATGAAA
GACGGTGAGC TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCTTGTT ACACCGTTTT CCATGAGCAA
ACTGAAACGT TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG ATTTCCGGCA GTTTCTACAC
ATATATTCGC AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG CCTATTTCCC TAAAGGGTTT
ATTGAGAATA TGTTTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA GTTTCACCAG TTTTGATTTA
AACGTGGCCA ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTTCA CCATGGGCAA ATATTATACG
CAAGGCGACA AGGTGCTGAT GCCGCTGGCG ATTCAGGTTC ATCATGCCGT CTGTGATGGC
TTCCATGTCG GCAGAATGCT TAATGAATTA CAACAGTACT GCGATGAGTG GCAGGGCGGG
GCG

Séquence terminateur, ORI, gène β-la

TAATTTT TTTAAGGCAG TTATTGGTGC CCTTAAACGC CTGGGGTAAT GACTCTCTAG
AGACTCCTGT TGATAGATCC AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATTT GTTCAGAACG
CTCGGTTGCC GCCGGGCGTT TTTTATTGGT GAGAATCTCT AGAGCTGCCT CGCGCGTTTC
GGTGATGACG GTGAAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGTCTG
TAAGCGGATG CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT
CGGGGCGCAG CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATACTGG CTTAACTATG
CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT
GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC
GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT
CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAACA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA
GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC
ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC
AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG
GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA
GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG
TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC
ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG
GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT
TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT
CCGGCAAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC
GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT
GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT
AGATCCTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT
GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC
GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC
CATCTGGCCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT
CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG
CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA
GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGC

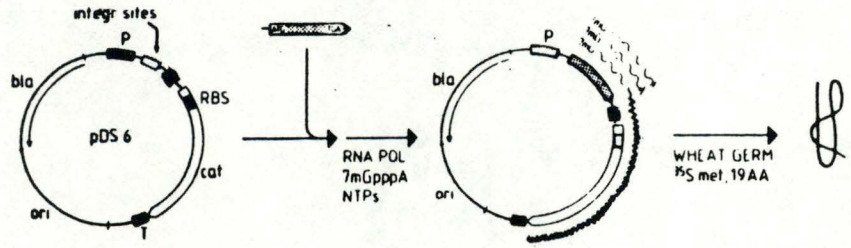
PDS5/4.1

AAAAAT TTATTTGCTT TTTTCTGTAT AATGATTCAA ATTGTGACCG
GATAACAATT TGAATTCCAA GCTTTTTCTT TCCTCCTATA CATTTTCACA TACTTTTCTT
TCTTTTTGTT TTAAAACCTG CAAGGGGGAT CCCCGGCAAC ATGAGGTCTT TGCTAATCTT
GGTGCTTTGC TTCCTGCCCC TGGCTGCTCT GGGGAAAGTC TTTGGACGAT GTGAGCTGGC
AGCGGCTATG AAGCGTCACG GACTTGATAA CTATCGGGGA TACAGCCTGG GAAACTGGGT
GTGTGCCGCA AAATTCGAGA GTAACTTCAA CACCCAGGCT ACAAACCGTA ACACCGATGG
GAGTACCGAC TACGGAATCC TACAGATCAA CAGCCGCTGG TGGTGCAACG ATGGCAGGAC
CCCAGGCTCC AGGAACCTGT GCAACATCCC GTGCTCAGCC CTGCTGAGCT CAGACATAAC
AGCGAGCGTG AACTGCGCGA AGAAGATCGT CAGCGATGGA AACGGCATGA ACGCGTGGGT
CGCCTGGCGC AACCGCTGCA AGGGTACCGA CGTCCAGGCG TGGATCAGAG GCTGCCGGCT
GTGAGGAGCT GCCGCACCCG GCCCGCCCGC TGCACAGCCG GCCGCTTTGC GAGCGCGACG
CTACCCGCTT GGCAGTTTTA AACGTATCCC TCATTAAAAC GACTATACGC AAACGCAAGC
TTTAAAATGG AGAAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT
AAAGAACATT TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAG
CTGGATATTA CGGCCTTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA AGCACAAGTT TTATCCGGCC
TTTATTCACA TTCTTGCCCG CCTGATGAAT GCTCATCCGG AATTCCGTAT GGCAATGAAA
GACGGTGAGC TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCTTGTT ACACCGTTTT CCATGAGCAA
ACTGAAACGT TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG ATTTCCGGCA GTTTCTACAC
ATATATTCGC AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG CCTATTTCCC TAAAGGGTTT
ATTGAGAATA TGTTTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA GTTTCACCAG TTTTGATTTA
AACGTGGCCA ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTTCA CCATGGGCAA ATATTATACG
CAAGGCGACA AGGTGCTGAT GCCGCTGGCG ATTCAGGTTC ATCATGCCGT CTGTGATGGC
TTCCATGTCG GCAGAATGCT TAATGAATTA CAACAGTACT GCGATGAGTG GCAGGGCGGG
GCGTAATTTT TTTAAGGCAG TTATTGGTGC CCTTAAACGC CTGGGGTAAT GACTCTCTAG
AGACTCCTGT TGATAGATCC AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATTT GTTCAGAACG
CTCGGTTGCC GCCGGGCGTT TTTTATTGGT GAGAATCTCT AGAGCTGCCT CGCGCGTTTC
GGTGATGACG GTGAAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGTCTG
TAAGCGGATG CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT
CGGGGCGCAG CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATACTGG CTTAACTATG
CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT
GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC
GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT
CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAACA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA
GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC
ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC
AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG
GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA
GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG
TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC
ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG
GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT
TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT
CCGGCAAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC
GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT
GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT
AGATCCTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT
GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC
GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC
CATCTGGCCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT
CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG
CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA
GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGC

3.3.2.4. Mode d'utilisation

Ce système permet la transcription et la traduction couplées d'un plasmide circulaire, non linéarisé, ce qui n'est pas le cas dans le système SP6.

Il permet le clonage, la transcription et la traduction couplées selon le schéma suivant :



3.3.2.4.1. Le clonage

Il permet d'insérer n'importe quel gène dans PDS5 par les sites de restriction du polylinker. Dans notre cas, nous avons utilisé le PDS5/4-1 contenant déjà le gène lysozyme.

3.3.2.4.2. La transcription

Le gène inséré dans le plasmide peut être transcrit in vitro en présence d'ARN polymérase d'E. coli, de la coiffe et des NTPs.

Le transcript serait plus long que sur le schéma car le t_o n'existe pas dans PDS5 et PDS5/4-1.. Il comportera le transcript du lysozyme, et du CAT qui ne sera pas traduit dans un système eucaryote.

3.3.2.4.3. La traduction

Les transcripts obtenus in vitro sont directement traduits dans un système acellulaire lysat de réticulocytes de wheat germ (125), en présence des 19 aa et S^{35} méthionine pour produire du lysozyme marqué à la méthionine.

BUT DU TRAVAIL

Le but de ce mémoire est d'éprouver les hypothèses relatives à un rôle de la méthylation de la coiffe du RNA dans l'expression génétique au niveau de la traduction.

La méthodologie adoptée consite à produire in vitro, une grande quantité de transcriptions à partir d'un RNA plasmidique (ici le gène du lysozyme de poule) en présence de la RNA polymérase de l'Escherichia coli et des dénucléotides GpppA ou G méthylées ou non, en position 7 de la Guanine terminale comme amorce de la transcription.

Ces transcriptions sont alors soumises à un système standard de traduction acellulaire, afin de préciser l'influence de la méthylation de la coiffe dans le processus de traduction.

MATERIELS

ET

METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS

2. METHODES

2.1. PREPARATION DE PLASMIDES

2.1.1. LA TRANSFORMATION

- MILIEU DE CULTURE ET SOLUTIONS

2.1.1.1. La préculture

2.1.1.2. L'obtention des cellules compétentes

2.1.1.3. La transformation proprement dite

2.1.2. L'AMPLIFICATION DE PLASMIDES

2.1.2.1. Préculture

2.1.2.2. L'amplification proprement dite

2.1.2.2.1. Lyse et extraction alcalines

A. Déroulement de l'expérience

B. Purification du plasmide ADN par centrifugation isopycnique

C. Extraction du bromure d'Ethidium par isobutanol et dialyse contre du TE

D. Concentration de l'ADN

2.1.2.2.2. La lyse claire

Solution

A. Déroulement de l'expérience

B. Concentration du plasmide ADN par centrifugation isopycnique

C. Extraction du bromure d'Ethidium par isoamylalcool et dialyse et précipitation à l'éthanol

2.2. ANALYSE D'ADN PAR ELECTROPHORESE

2.2.1. PRINCIPE

2.2.2. TYPES DE GEL

2.2.3. GEL D'AGAROSE

. La taille moléculaire de l'ADN

. La conformation de l'ADN

. La concentration de l'agarose

. Courant appliqué

2.2.3.1. Manipulation

. Protocole de l'expérience

A. Coulage du gel

B. Préparation des échantillons

C. Migration des échantillons

2.2.4. GEL D'ELECTROPHORESE POLYACRYLAMIDE

2.2.4.1. Principe

. Structure du gel

. Concentration en acrylamide et bisacrylamide

2.2.4.2. Manipulation

. Protocole

- matériel
- solutions

A. Coulage de gels

B. Préparation des échantillons

C. Migration des échantillons

2.3. FLUOROGRAPHIE

2.3.1. PREPARATION

2.3.2. SECHAGE DU GEL

2.3.3. AUTORADIOGRAPHIE

2.4. SYSTEME DE TRANSCRIPTION ET DE TRADUCTION COUPLE

2.4.1. TRANSCRIPTION

2.4.1.1. Protocole de transcription

2.4.2. TRADUCTION

2.4.2.1. Protocole de traduction

2.5. PRECIPITATIONS AU TCA

2.5.1. PRECIPITATION DES ARNs

2.5.2. PRECIPITATION DES PROTEINES MARQUEES A LA S^{35} METHIONINE

2.5.2.1. Méthode

2.6. TESTS PRELIMINAIRES DU LYSAT DE RETICULOCYTES ET DE WHEAT GERM

1. MATERIELS

- La souche dans laquelle les plasmides sont incorporés est la C 600. Son génôme est caractérisé par les facteurs suivants:

  F-, thi 1, thr -1, leu B 6, lac Y 1, ton A 21, sup E 44, ; cette souche est aussi connue sous le nom de CR 34.

- Les plasmides utilisés provenaient de diverses firmes commerciales (B.R.L. pour PBr 325 et PBr 322), ou ont été obtenus d'autres laboratoires (U.C.L. pour pJDB 207, BUJARD (ROCHE) pour pDS 5 et pDS 5/4 - 1).

- Les produits pour tampons et autres solutions sont des réactifs "pro analysis" de la firme Merck ou de Fulka.

- Les coiffes et la RNA polymérase proviennent de Pharmacia.

- Les systèmes de traduction wheat germ, lysat de réticulocyte de lapins et l'inhibiteur de RNAses extraits de placenta humain, la méthionine marquée au S^{35} sont fournies par Amersham.

- Tout le matériel utilisé (verrerie, cupules, ...) est autoclavé à la chaleur humide sous une pression d'une atmosphère pendant 10 minutes. Lorsqu'il s'agit de matériel utilisé pour les traductions in vitro, ce dernier est traité préalablement avant l' utilisation avec un inhibiteur puissant de RNAses (DEPC qui a pour but d'inactiver les protéines, à 1/1000 en volume aqueux pendant 15 minutes à 100° centigrades puis, séchage à 60°C).

2. METHODES

2.1. PREPARATION DE PLASMIDES

2.1.1. LA TRANSFORMATION

Cette technique est celle utilisée en routine au laboratoire (méthode selon MANIATIS) légèrement modifiée d'après COHEN et DAGERT)(82)(30)(34).

La souche hôte est Escherichia coli C 600.

L'expérience de transformation comprend trois phases:

- la préculture,
- l'obtention de cellules compétentes,
- la transformation proprement dite.

Milieux de culture et solutions

milieu LB	1% yeast extract 1% bactotryptone 0,5% NaCl
en plus, si milieu solide	2% Bacto-agar.

milieu m9	quantité données pour un litre
Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
NaCl	Ø,5 g
NH_4Cl	1 g
1M $MgSO_2$	2 ml
1M $CaCl_2$	Ø,1 ml

Les milieux sont passés à l'autoclave ainsi que les solutions suivantes sauf les solutions de tétracycline et thréonine qui sont filtrées et stérilisées au moyen de disques gelman de Ø,2 m.

Après autoclavage, les milieux "solides" sont coulés dans des boîtes de pétri entreposées dans des chambres à 4° C.

$CaCl_2$	5Ø m M
Tris HCl	1Ø m M pH 8
NaCl	1 M
Tris HCl	1Ø m M pH 7,8
EDTA	Ø,1 M
$MgCl_2$	1 N
$CaCl_2$	1 N
Tétracycline	5 mg/1 ml d'éthanol
Thréonine	2%

T C M pour un litre
1Ø ml Tris N pH 7,5
1Ø ml $CaCl_2$ 1 N
1Ø ml $MgCl_2$ 1 N

T E pour un litre
1Ø ml Tris N pH 7,5
1Ø ml EDTA Ø,1 M

2.1.1.1. La préculture

Une colonie de C 600 prélévée d'une boîte de pétri ensemencée la veille est inoculée dans 5 ml d'une solution LB.

L'incubation se fait à 37° C pendant toute la nuit (14h) sans agitation.

2.1.1.2. L'obtention des cellules compétentes

Pour permettre l'entrée du plasmide dans l'Escherichia coli les parois de ces derniers doivent être fragilisées par le traitement au $CaCl_2$.

A 50 ml de LB placés dans un erlen de 250 ml, 1 ml de préculture est ajoutée.

L'incubation se déroule à 37° C sous agitation constante.

La croissance des cellules est suivie par turbidimétrie au spectrophotomètre pour atteindre 0,3 à 0,4 DO lu à 650 nm soit environ 3.210^8 cellules/ml.

La croissance est alors arrêtée à ce point en incubant 10 minutes dans la glace.

Les 50 ml de LB sont divisés en 2 x 25 ml qui sont centrifugés dans un rotor Sorvall à 2.500 rpm pendant 10 minutes à 4°C.

Le culot obtenu est alors suspendu dans 5 ml de $CaCl_2$ 50 mM à 0° C, remis en suspension et recentrifugé à 2.500 rpm.

Ce dernier culot est lavé une seconde fois dans 5 ml de $CaCl_2$.

Ces 5 ml sont répartis dans des cupules stériles en aliquots de 0,2 ml et incubés 2 heures dans la glace pour parachever la fragilisation des parois.

2.1.1.3. La transformation proprement dite

A chaque aliquot de 200 µl, 100 µl de TCM et 1 µl d'une solution de TE contenant le plasmide (concentration de 0,4 µg/ml) sont ajoutés.

Les cupules sont soumises ensuite à un choc thermique de 5 minutes à 37°C. Cette élévation de température induirait la pénétration des plasmides.

Ensuite 0,5 ml de ml LB est ajouté à chaque cupule et le tout est placé à 37° C pendant 30 minutes pour permettre aux cellules d'Escherichia coli de pousser.

100 µl ou 200 µl du contenu de cette cupule sont étalés sur des boîtes LB et LB + TET. On juge de l'efficacité de la transformation par le dénombrement des colonies en présence de tétracycline.

2.1.2. L'AMPLIFICATION DE PLASMIDES

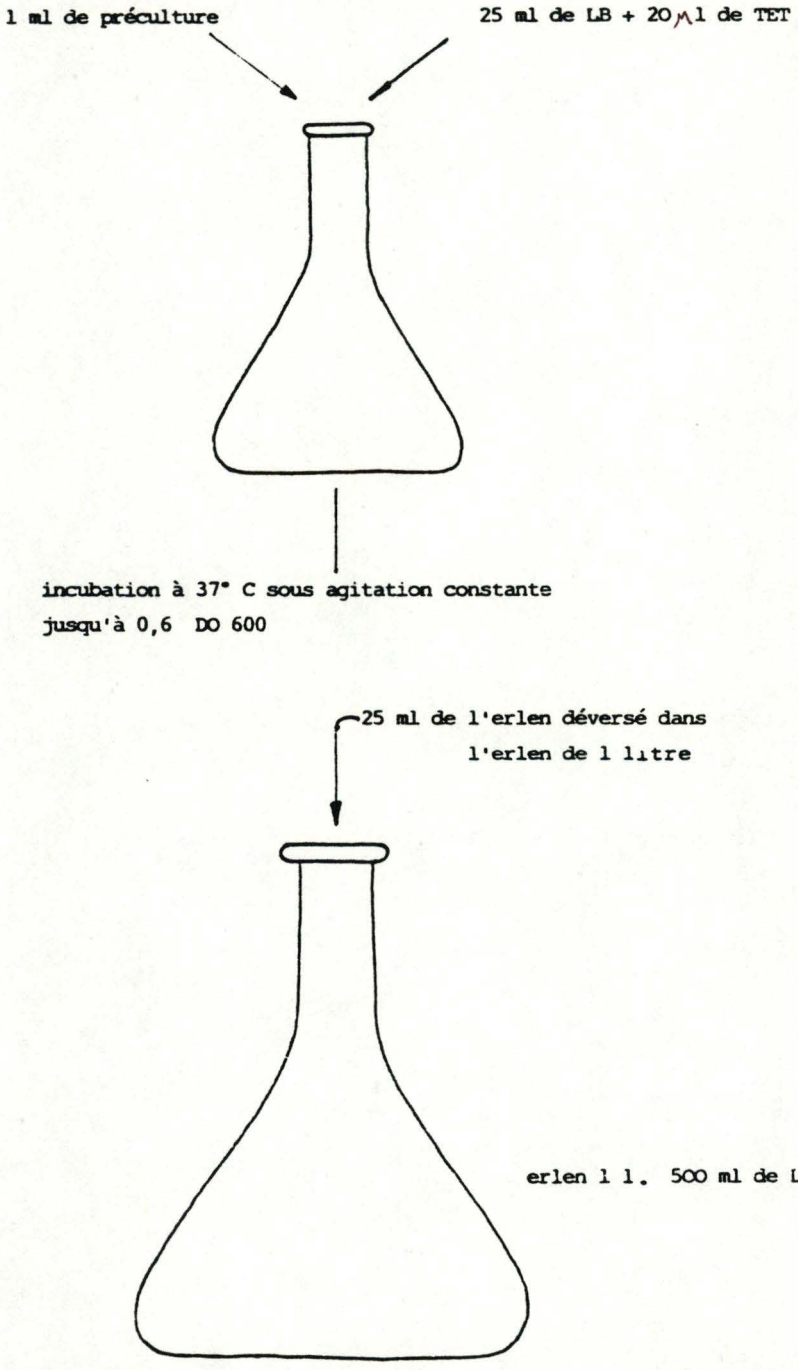
La transformation réalisée, les plasmides doivent être multiplés, c'est-à-dire amplifiés, puis extraits et purifiés.

milieu LB	1% yeast extract
	1% bactotryptophane
1 litre	0,5% NaCl
réparti en	500 ml
	25 ml et 5 ml
	470 ml
solutions	
TET	5 mg/ml EtOH
Chloramphénicol (Chl)	30 µg/ml EtOH
Spectinomycine (Spect)	300 µg/ml H_2O
	stérilisés par filtration

2.1.2.1. Préculture

5 ml de LB + TET (4 µl) sont inoculés avec une colonie isolée de C 600 contenant le plasmide et incubé à 37° C pendant toute la nuit.

2.1.2.2. Amplification proprement dite

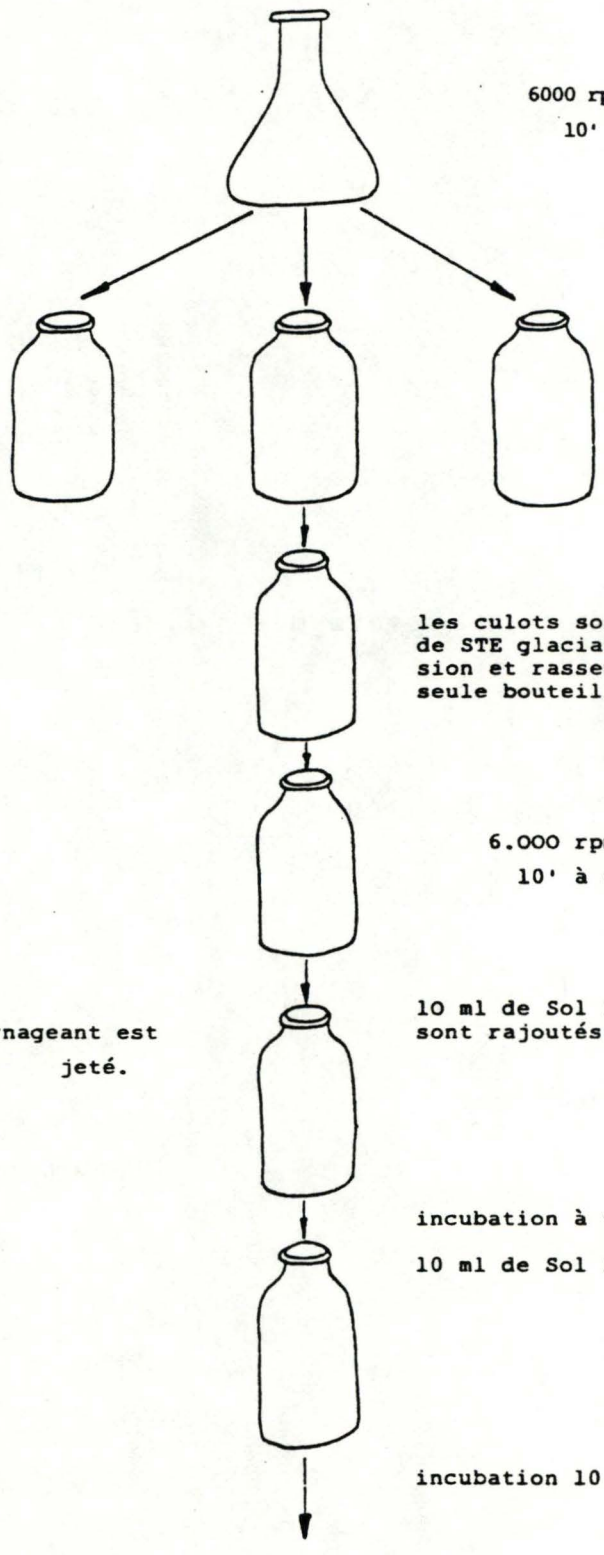


2.1.2.2.1. Lyse et extraction alcaline

Solutions:

STE	0,1 NaCl
	10 mM Tris Cl pH 7,8
	1 mM EDTA
Solution I	
	50 mM Glucose
	25 mM Tris HCl pH 8
	10 mM EDTA
	+ 5 mg/ml de lysozyme
Solution II	
	0,2 N NaOH
	1% SDS
Solution acétate de Na	
	3 M pH 4,8
Isopropanol	
éthanol 70%	
TE pour 1 litre	10 ml de Tris N pH 7,5
	10 ml d'EDTA 0,1 N

A. Déroulement de l'expérience



6000 rpm dans Sorvall
10' à 4° C.

les culots sont lavés dans 100 ml de STE glacial, remis en suspension et rassemblés dans une seule bouteille.

6.000 rpm dans Sorvall
10' à 4° C.

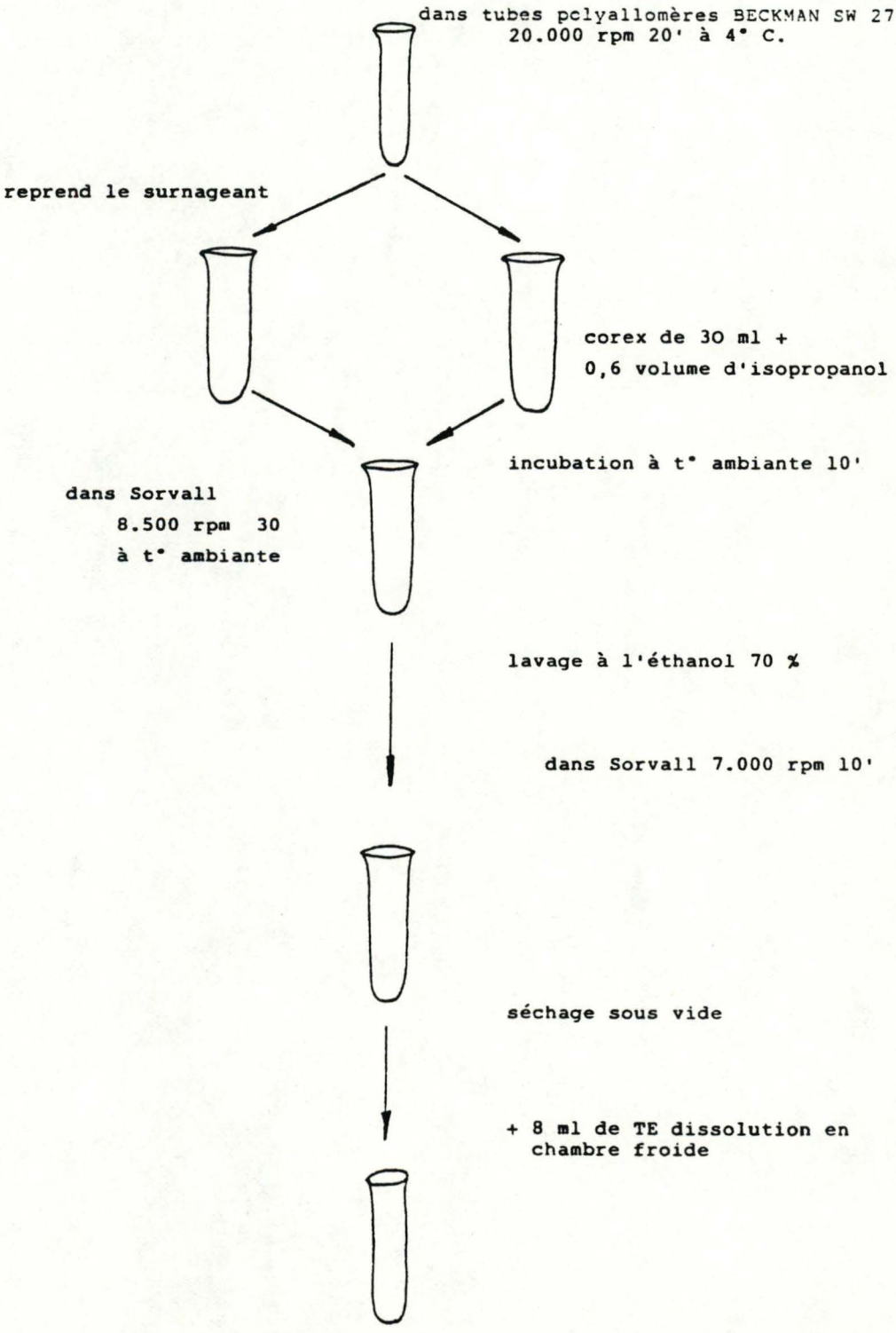
le surnageant est jeté.

10 ml de Sol I + lysczyme sont rajoutés

incubation à t° ambiante 5'

10 ml de Sol II sont rajoutés

incubation 10' dans la glace


dans tubes polyallomères BECKMAN SW 27
20.000 rpm 20' à 4° C.
reprend le surnageant
corex de 30 ml +
0,6 volume d'isopropanol
incubation à t° ambiante 10'
dans Sorvall
8.500 rpm 30
à t° ambiante
lavage à l'éthanol 70 %
dans Sorvall 7.000 rpm 10'
séchage sous vide
+ 8 ml de TE dissolution en
chambre froide

B. Purification du plasmide ADN par centrifugation isopycnique

Principe physique de la méthode (A. Fritsch - Beckman)

"Lorsque l'on centrifuge une solution concentrée d'un sel - du chlorure de césium, par exemple - il apparaît entre les deux extrémités de la colonne liquide une variation continue de la concentration du sel; à cette variation de concentration est liée une variation de densité, ou gradient de densité. Ce gradient de densité atteint un état d'équilibre au bout d'un certain temps de centrifugation; celui-ci dépend de la vitesse de centrifugation, de la hauteur de la colonne liquide, de la nature du sel et de la température."

Si on a mélangé initialement avec la solution saline une petite quantité de macromolécules dont la densité dans cette solution saline est à peu près égale à celle de la solution, elles formeront une bande plus ou moins étroite dans le tube de centrifugation; elles occupent une position, où leur densité apparente est égale à celle de la solution saline. La position et la largeur de la bande atteignent, elles aussi, des valeurs d'équilibre.

Lorsque l'on centrifuge deux espèces de macromolécules dont les densités apparentes sont différentes, elles occupent dans le tube de centrifugation des positions différentes; on réalise une séparation des macromolécules, basée sur leur différence de densité apparente et non plus sur leurs coefficients de sédimentation.

Solutions :

bromure d'éthidium 10 mg/ml d'eau

butanol saturé en H_2O

Avec précision, le volume de solution d'ADN est mesuré et par millilitre de solution d'ADN, 1g de ClCs est ajouté.

Quand le sel est totalement dissout, par chaque 1 ml de solution, nous ajoutons 0,8 ml de solution de bromure d'éthidium.

La densité finale de la solution doit être à 1,55 et la concentration du bromure d'ethidium 600 µg /ml.

Cette solution est transvasée dans deux tubes centrifugés dans un rotor Beckman 65 Ti, dont le volume non occupé est rempli d'huile de paraffine.

Ces tubes sont soumis à une centrifugation à 45.000 rpm à 20° C au maximum 36 heures.

Le bromure d'éthidium a comme caractéristique de s'intercaler entre les deux brins d'ADN.

Sous l'action des UV, il devient fluorescent.

Dans le tube de centrifugation, on aperçoit au moins deux bandes fluorescentes nettes comme on peut le voir dans la photo ci-contre.

1. correspond à l'ADN chromosomique et l'ADN plasmidique ouverts;

2. correspond à l'ADN circulaire plasmidien fermé (CCC).

La bande est reprise à l'aide d'une seringue.

Le liquide prélevé est placé dans un corex de 30 ml stérile.

C. Extraction du bromure d'éthidium par isobutanol et dialyse contre du TE

Un volume de 1 - butanol saturé en H_2O est mélangé au volume du liquide prélevé. Ce mélange s'effectue en retournant doucement le corex.

Le tout est centrifugé à 8.500 rpm 3 minutes à température ambiante, la phase butanol est jetée et à la phase aqueuse inférieure, un volume de 1 butanol est ajouté...

L'extraction est répétée 4 à 6 fois jusqu'à ce que la couleur rose disparaisse de la solution aqueuse.

La phase aqueuse est dialysée contre du TE à froid dans une membrane bouillie 15 minutes au préalable dans de l'eau distillée en changeant 1 litre de TE toutes les trois heures pour 10 ml dialysés et cela 3 fois.

Ces expériences ont été réalisées pour les plasmides pBr 322, pJDB 205, pDS 5, pDS 5/4-1, les résultats se trouvent ci-contre.

Mais les concentrations en ClCs ont été modifiées pour pDS 5 et pDS 5/4-1 pour obtenir une meilleure séparation de l'ADN plasmidique et du culot. ρ est passé de 1,55 à 1,60 et pour ce faire la quantité de ClCs est augmentée de 8 g à 8,4 g pour 8 ml, selon la relation:

$m_o = v \rho F$

m_o = masse ClCs

v = volume de solution d'ADN ClCs

ρ > 1,55, soit choix 1,6

$8,4 = v \times 0,510 \times 1,6$

$v = 10,294$ ml

D. Concentration de l'ADN

Pour concentrer l'ADN plasmidique, une précipitation à l'éthanol a été opérée sur l'échantillon dialysé (38).

A 3 ml d'échantillon, 0,3 ml de NaAc 3 N et 2 volumes d'éthanol = 6,6 ml sont ajoutées et le corex est laissé à -20° C pendant une nuit.

Le mélange est centrifugé à 8.500 rpm dans le rotor HB4 à 4° C pendant 25 minutes.

Le surnageant jeté, le culot est séché sous vide. Ce dernier est dissous dans un volume de TE pour obtenir une concentration de 1 µg/µl.

2.1.2.2.2. La lyse claire

Cette méthode donne de meilleurs résultats au niveau de la qualité de la préparation car le plasmide est moins contaminé d'ARNm et d'ADN chromosomique comme nous l'avons vérifié au cours des expériences (82).

Solutions:

TE	Tris 10 mM
	EDTA 1 mM
Solution A	Sucrose 25%
	Tris 50 mM

Solution lysosyme	15 mg/ml	
	EDTA 0,5 M pH 8,5	
Solution B	triton 10%	700 µl
	EDTA 0,5 M pH 8,5	8,75 ml
	Tris 1 M pH 8	3,5 ml
	H_2O	57,05 ml
		70 ml

EDTA 2 mM

A. Déroulement de l'expérience

Les cultures sont centrifugées dans des bouteilles plastiques Sorvall de 250 ml, durant 10 minutes à 6.000 rpm. Les culots sont rincés avec 10 ml de TE, remis en suspension et recentrifugés durant 10 minutes à 6.000 rpm.

Le surnageant enlevé, les culots sont resuspendus dans 6 ml de solution A, froide et transvasés dans un erlen stérile de 100 ml placé dans la glace.

La bouteille est rincée par 2 ml de Solution A, ce qui donne en tout 8 ml par tube.

1 ml de solution de lysosyme est ajoutée à ce mélange qui est agité durant 5 minutes dans la glace. Ensuite 1 ml d'EDTA 0,5 M pH 8,5 y est versé et la solution est placée dans la glace durant 5 minutes sous agitation.

A cette solution, 10 ml de solution B sont ajoutés et mis durant 10 minutes dans la glace.

Le tout est transvasé dans des tubes de rotor 60 TI et centrifugé durant 30 minutes à 30.000 rpm 4° C.

B. Concentration du plasmide ADN par centrifugation isopycnique

Le surnageant obtenu est placé dans un cylindre de 100 ml avec 31 g ClCs. Le volume est amené à 35 ml avec du TE et 3,5 ml de BET y est ajouté.

Le volume total est amené à 40 ml avec du TE.

A ce moment-là, l'indice de réfraction doit être de 1,3 q 4.

Avec une seringue de 10 ml et une aiguille, ce volume est transféré dans des tubes de centrifugation rotor Beckman 60Ti de 38 ml et fermés au moyen d'un capuchon adapté à ce rotor.

Ces tubes seront soumis à une centrifugation à 35.000 rpm avec une accélération et une décélération lentes.

Après centrifugation, la bande de plasmide sera récupérée avec une seringue.

C. Extraction du bromure d'éthidium par isoamylalcool, dialyse et précipitation à l'éthanol

Le BET est enlevé par des lavages (4) à l'isoamylalcool.

- Dans un sac à dialyse bouilli 5 minutes dans EDTA 2 mM, la solution est transvasée et dialysée contre 2 litres de TE sans agitation (le tampon est changé 3 fois).
- Pour concentrer le plasmide, le sac est placé dans du Ficoll 400.
- La précipitation à l'éthanol se fait à -20° C, et le liquide est centrifugé. Le culot est suspendu dans du TE et la DO est lue.

2.2. ANALYSE D'ADN PAR ELECTROPHORESE

Gels d'électrophorèse.

2.2.1. PRINCIPE (38)

Une particule de charge électrique Q migre dans un milieu à une vitesse déterminée si elle est soumise à l'action d'un champ électrique E suivant sa mobilité électrophorétique μ :

$$V = \mu \times E$$

Cette vitesse de migration est fonction:

- des conditions extérieures, pH, température, degré de réticulation du gel, force ionique, ...
- des caractéristiques de la particule: charge, taille, ...

2.2.2. TYPES DE GEL

- Gel d'agarose utilisé pour identifier et purifier les fragments d'ADN.
- Gel discontinu de polyacrylamide utilisé pour séparer les protéines.

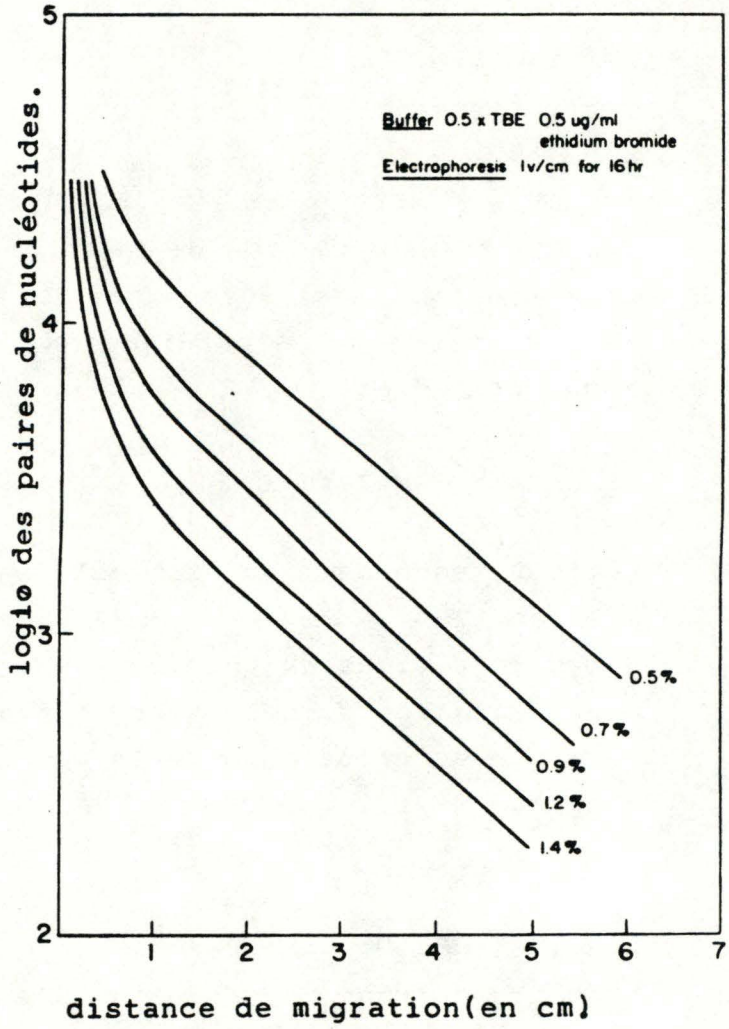


fig. 21.Migration de l'ADN en fonction de sa taille moléculaire.

2.2.3. GEL D'AGAROSE

L'électrophorèse par gel d'agarose est une méthode standard pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN.

Cette technique est rapide. Elle permet de séparer des mélanges de fragments d'ADN, et de les localiser à de faibles concentrations d'1 ng par le bromure d'éthidium.

La vitesse de migration de l'ADN à travers un gel d'agarose dépend de quatre facteurs:

- la taille moléculaire de l'ADN,
- la conformation de l'ADN (CCC, OC, L),
- la concentration de l'agarose,
- le courant appliqué.

. La taille moléculaire de l'ADN

Les molécules linéaires ou double ADN migrent avec une vitesse inversément proportionnelle au log10 de leur poids moléculaire.

. La conformation de l'ADN

Les formes circulaires fermées (CCC), circulaires avec une entaille (OC) - un nick (OC), c'est-à-dire une absence d'un ou plusieurs nucléotides au niveau d'un brin d'ADN - , et linéaires (L) d'ADN de même poids moléculaire migrent à des vitesses différentes dans un gel d'agarose.

Ces mobilités variables dépendent de la concentration en agarose du gel, mais aussi de la force du courant, de la force ionique du tampon, de la densité des formes et de la configuration de l'ADN.

. La concentration de l'agarose

Il existe une relation linéaire entre log. de la mobilité électrophorétique de l'ADN (82) et la concentration du gel.

Log. μ = log. μ_o - K,

μ_o = la mobilité libre électrophorétique,

K = le coefficient de freinage, une constante dépendante des propriétés du gel et de la taille, de la forme des molécules migrantes.

. Le courant appliqué

Aux bas voltages, le taux de migration des fragments linéaires d'ADN est proportionnel au voltage appliqué.

Cependant, quand les voltages augmentent, la mobilité des fragments de haut poids moléculaire de l'ADN augmente différemment.

Alors l'échelle de séparation diminue quand le voltage augmente.

2.2.3.1. Manipulation

Matériels

plaque de verre
tape, cupules, bain-marie
2 pinces, 1 peigne
1 cuve électrophorétique

Solutions

Tampon d'électrophorèse

TEB 1 litre
109,9 g Tris
9,35 g EDTA
59 g H_3BO_3

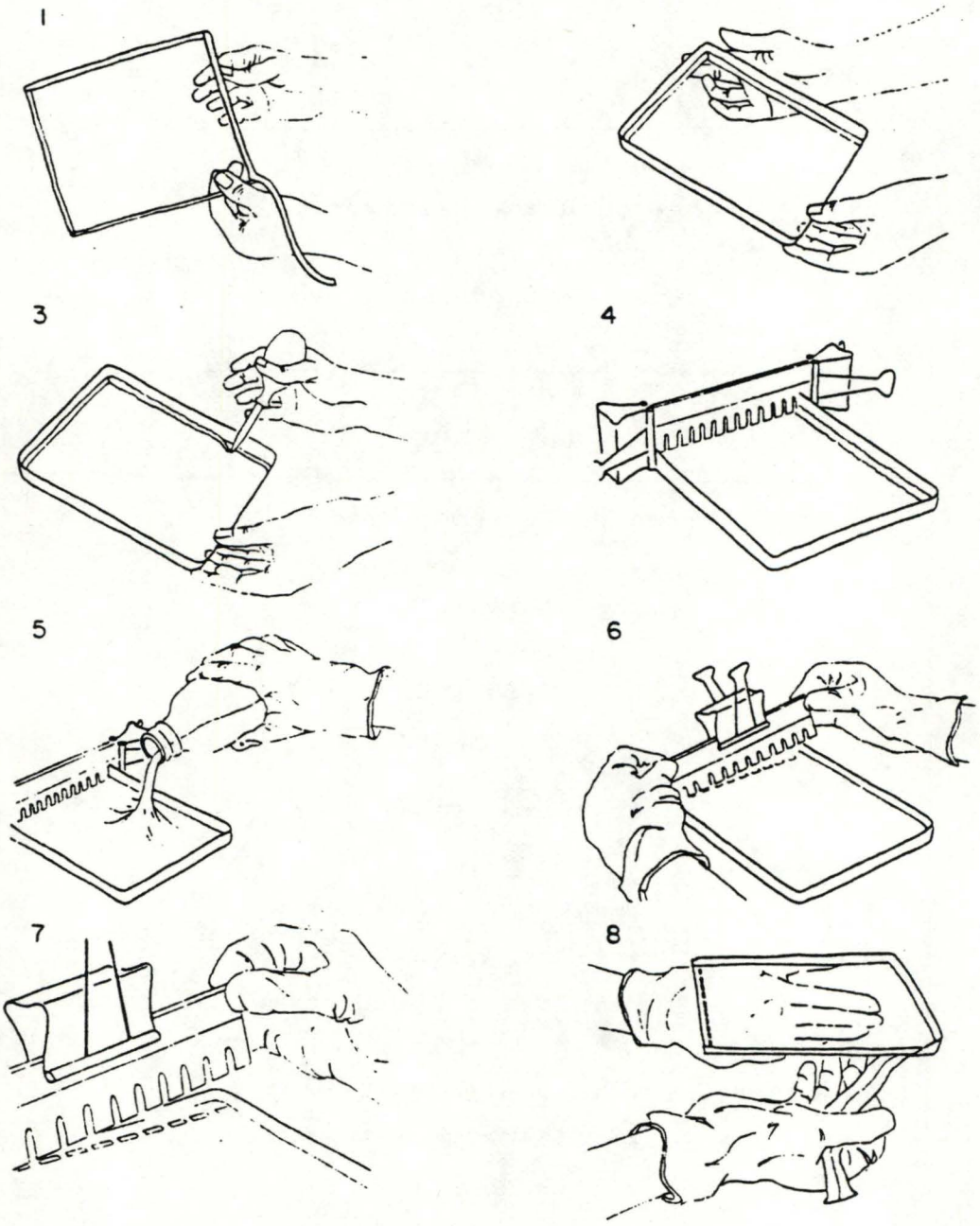
Bleu de bromophénol
10 ml H_2O
10 mM Tris HCl pH 7,5
1,5% Ficoll 400
pointe spatule de bleu de bromophénol

TE

Tampon de restriction pour 200 µl
20 µl Tris HCl pH 7,5
20 µl $MgSO_4$ 1 M
40 µl NaCl 2,5 N
20 µl Mercaptoéthanol
---
100 µl
+ 100 µl H_2O bidistillée stérile

Sol gel (0,7%) pour 2 gels
35 ml TEB
2,5 g agarose A
315 ml H_2O

fig.22 Déroulement du coulage du gel.



Protocole de l'expérience

A. Coulage du gel (82) Fig. (22)

- 1 Une plaque de verre lavée à l'alcool-éther est entourée en périphérie d'un papier adhésif pour délimiter la hauteur du gel.
- 2 Le liquide est porté à ébullition puis refroidi jusqu'à 60° C.
- 3 Avec une pipette Pasteur, l'agarose est coulé le long d'un papier adhésif pour empêcher les fuites.
- 4 Le peigne est placé sur la plaque en veillant bien à ce qu'il ne la touche pas.
- 5 A la température de 60° C, le gel est coulé sur la plaque de verre en enlevant les bulles.
- 6 - 7 Après au moins une demi-heure, le peigne est enlevé.
- 8 Délicatement, l'adhésif est détaché du pourtour.

B. Préparation des échantillons

Pour obtenir une bonne visualisation de l'ADN on prépare 1 µg d'ADN par créneau.

A cette quantité d'ADN, du TE est rajouté (1,5 µl), un enzyme de restriction (1 µl), 2,5 µl de tampon de restriction dans une cupule stérile.

Le tout est placé à 37° dans un bain-marie pendant 2 heures pour permettre la restriction.

Elle est arrêtée en plaçant les cupules 10 minutes à 70° C :

- par cupule, 5 µl de TE et 5 µl de bleu de bromophénol sont ajoutés;
- les échantillons sont alors déposés dans les créneaux du gel.

C. Migration des échantillons

Quand les échantillons sont déposés dans les créneaux, deux techniques peuvent être utilisées :

- soit le gel submergé,
- soit le gel avec un contact par ponts de papier.

Dans les deux cas, le gel est mouillé du tampon et soumis à une différence de potentiel de 100 volts/cm^2 qui sera diminuée par la suite après une migration d'au moins 1,5 cm des échantillons pour atteindre 40 volts.

Le temps de migration varie en fonction des deux techniques.

La migration arrêtée, le gel est plongé dans une solution de 1 litre de TEB + 200 µl à 400 µl de BET.

Après une heure, les bandes d'ADN sont visibles sous éclairement UV et photographiables au moyen du Polaroïd.

2.2.4. GEL D'ELECTROPHORESE POLYACRYLAMIDE

2.2.4.1. Principe

* Structure du gel

Le gel est constitué de longues chaînes de polyacrylamide relié transversalement par des résidus de "Bis", de telle manière que l'ensemble forme un réseau tridimensionnel.

Dans un gel idéal, les liaisons transversales sont distribuées au hasard.

Pour préparer un gel, il est important d'ajouter à la solution à polymériser une quantité convenable d'initiateur.

. Un excès conduit à la formation de chaînes trop courtes et trop nombreuses par rapport à la quantité d'agent réticulant employé : le gel ne peut se former dans ces conditions.

. Une trop faible quantité conduit à un allongement démesuré de la période d'induction préalable à la formation du gel.

* Concentration en acrylamide et en bisacrylamide

Les gels de polyacrylamide sont caractérisés par les paramètres T et C.

T = concentration totale en monomère (acrylamide + bisacrylamide) en g/100 ml de solution

$$T = \frac{(a+b) \times 100}{V}$$

C = mesure le degré de réticulation

$$C = \frac{b}{a + b} \cdot 100$$

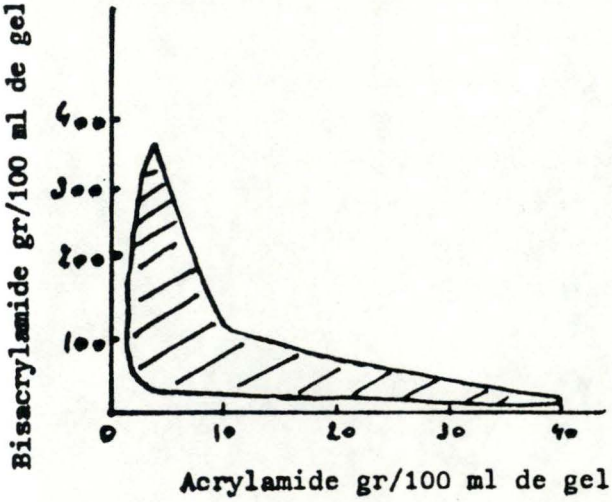
a : poids d'acrylamide utilisé, en grammes
b : poids de N.N' bisacrylamide utilisé, en grammes
V : volume de la solution en ml

Les gels ont un aspect qui dépend essentiellement de ces deux paramètres, ils ont un spectre continu allant du mou, presque visqueux et transparent au gel dur, cassant et opaque.

En plus des effets que peut avoir la concentration en acrylamide sur l'aspect du gel, celle-ci influence considérablement la mobilité électrophorétique : une augmentation de concentration produit une réduction de mobilité en modifiant la dimension moyenne des "pores" du gel.

Une augmentation de la concentration en bisacrylamide provoque essentiellement une diminution de la dimension maximale des pores du gel, la diminution de mobilité qui en résulte touche surtout les molécules dont les dimensions s'approchent de celles du diamètre maximum des pores.

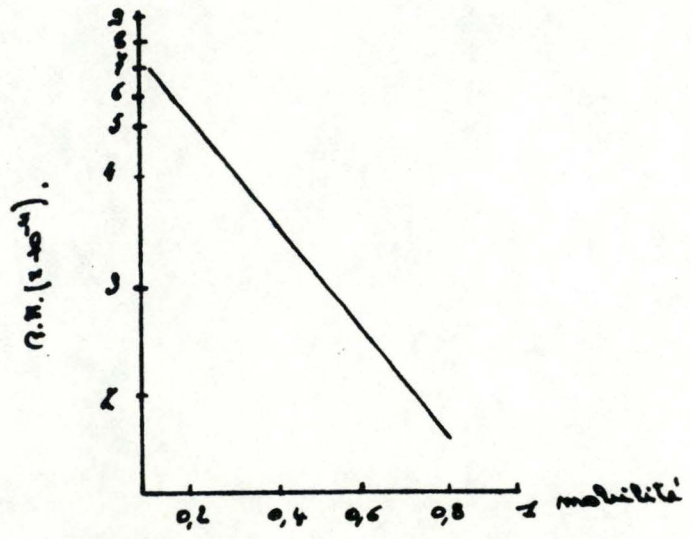
La mobilité des protéines dans ces électrophorèses dépend de la charge des protéines mais aussi de la taille des protéines. Plus les molécules seront grosses et plus elles seront ralenties dans le gel.



Les concentrations permettant de préparer des gels utilisables correspondent à un point de la zone hachurée.

Une application importante de cette technique est de réaliser l'électrophorèse en présence de docécyl sulfate de sodium (SDS). Dans ces conditions, en effet, la mobilité est directement proportionnelle au logarithme du P.M. de la protéine. Si le gel contient trop ou trop peu de bisacrylamide, la relation n'est plus linéaire.

La mobilité est définie comme le rapport entre la distance parcourue par la protéine et la distance parcourue par le colorant (bleu de bromophénol à 0,05%). Ce rapport est corrigé pour le gonflement du gel lors de la coloration.



La relation linéaire entre la distance de migration et le logarithme du P.M. indique que l'effet de chromatographie est ici dominant sur l'effet électrophorétique. On l'explique par la fixation importante des molécules de SDS sur les protéines. Le SDS étant chargé négativement rend toutes les protéines négatives quelle que soit leur charge de départ. L'abondance de ces charges négatives couplées, où l'effet de chromatographie rend négligeables les différences entre les compositions des protéines de départ, provoque ce comportement uniforme des protéines.

Ce gel comprend :

- 1 stacking gel : gel de tassement qui concentre l'échantillon

- 1 running gel : gel qui sépare les protéines.

Les gels plats sont utilisés car ils permettent de soumettre les échantillons à des conditions identiques et de réaliser des autoradiographies pour détecter les molécules radioactives.

Pour une meilleure séparation des protéines, les gels discontinus en concentration d'acrylamide, en force ionique et pH sont utilisés.

2.2.4.2. Manipulation

- Protocole

Matériels

Plaques de verre 20 cm
16 cm

Spacers

Appareil Pharmacia Bio - rad - protean TM 11

Peigne, seringue

Solutions

A. Solutions d'acrylamide - bisacrylamide

acrylamide recristallisé 30 g

bisacrylamide recristallisé 0,8 g

portés à 100 ml avec eau bidistillée.

B. Tampon Tris HCl 1,5 M pH 8,8

Tris 36,32 g

porté à 200 ml avec eau bidistillée

C. Tampon Tris HCl 0,5 M pH 6,8

Tris 12,1 g

porté à 200 ml avec eau bidistillée

Persulfate d'ammonium 10%

SDS 10%

Running gel (volume pour deux plaques)

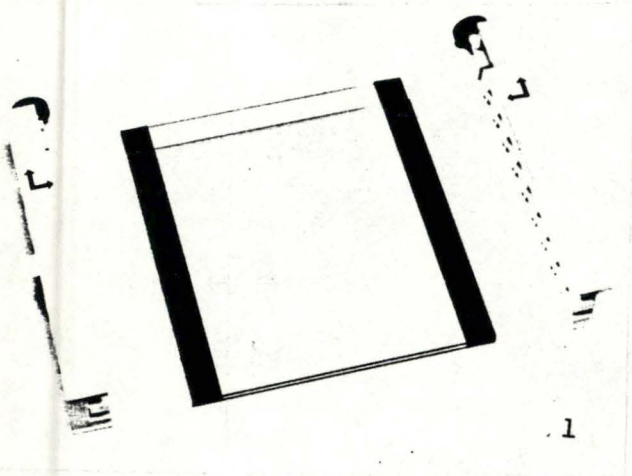
solution A	37,5 ml
solution B	21,5 ml
H_2O	24,6 ml
SDS 10% (ajouté après dégazage)	0,85 ml
Persulfate d'ammonium 10%	0,85 ml
Temed	35µl

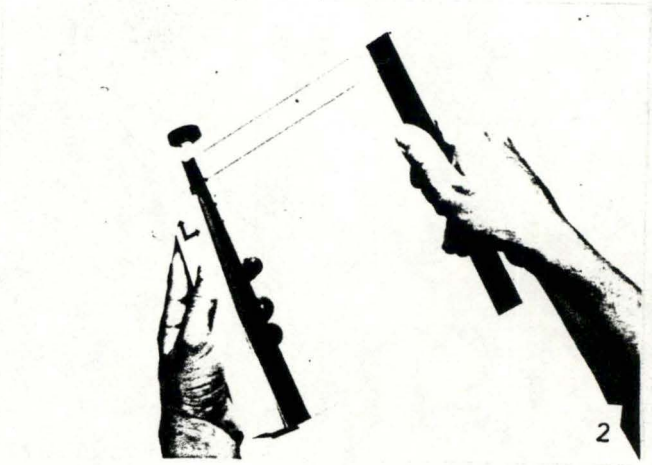
Stacking gel (volume pour deux plaques)

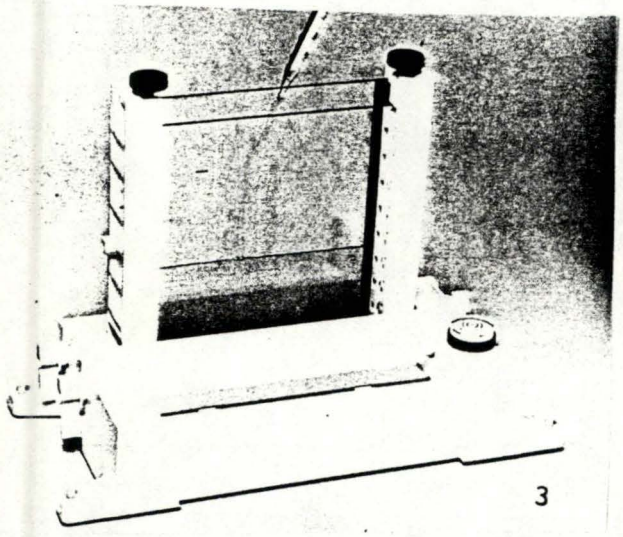
solution A	6 ml
solution C	15 ml
H_2O	37,8 ml
SDS 10%	0,6 ml
Temed	30µl

Les solutions de running et stacking gels sont dégazées en plaçant ces solutions dans une pompe à vide.

En effet, l'oxygène inhibe la polymérisation du polyacrylamide. Le Temed et le Persulfate d'ammonium réagissent entre eux et initient la polymérisation.







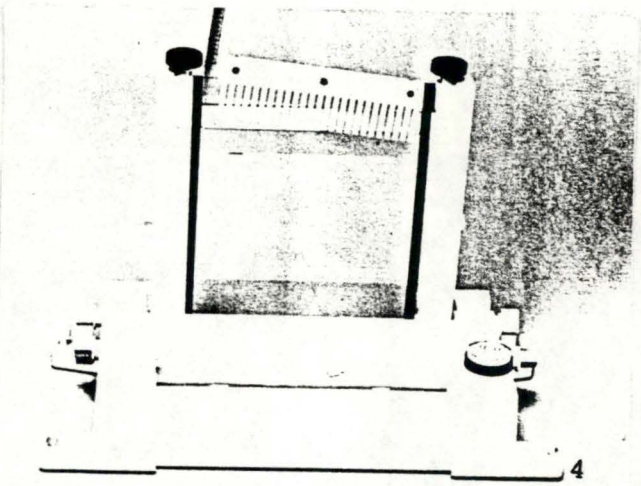


fig . 23.Montage de l'appareil

1.Entre les plaques les spacers sont placés
2.Les plaques sont glissées dans les montants
3.Le tout est placé dans le support et le stacking gel est coulé
4.Coulage du running gel

A. Coulage des gels

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre séparées par des espaceurs de 1 mm dans un appareil Pharmacia Bio-rad Protean TM II Tab-cell.

Avant le montage de l'appareil, toutes les pièces sont lavées, dégraissées au mélange alcool-éther.

L'appareil monté comme dans la figure ci-jointe est directement utilisé en injectant de l'eau pour vérifier l'étanchéité. Fig. (23)

L'eau enlevée, le stacking gel est coulé jusqu'au niveau de la flèche à l'aide d'une pipette de 10 ml et 1 cm d'eau est placé au-dessus pour tasser le gel.

Nous attendons une heure pour une bonne polymérisation puis enlevons l'eau à l'aide d'une seringue, plaçons le peigne et coulons rapidement le running gel.

Après 30 minutes, nous retirons le peigne.

B. Préparation des échantillons

Produits

solubiliseur	pour 50 ml
SDS	1 g
bleu de bromophénol	30 mg
glycérol pur	10 ml
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	25 ml
H_2O	15 ml

solubiliseur + DTT:

25 ml de solubiliseur + 77,5 mg de DTT	
tampon de dissolution	
SDS 10%	2 ml
sucrose 66%	1 ml
H_2O	2 ml

Le sucrose sert uniquement à alourdir l'échantillon. Le bleu de bromophénol permet la visualisation de l'échantillon dans les puits et lors de la migration.

Le DTT est un agent réducteur qui évite la formation de ponts disulfures entre les chaînes protéiques.

Avant d'être déposés sur le gel, les échantillons sont portés à 95° C durant cinq minutes.

Ces échantillons comportent:

1 volume d'aliquot de protéine, pour avoir 100.000 cpm par créneau

1 volume de solubiliseur, ou 1 volume de tampon de dissolution, si l'aliquot a un volume inférieur à 2 µl.

Pour une meilleure visualisation en autoradiographie, nous nous arrangeons pour avoir 100.000 cpm par créneau.

C. Migration des échantillons

Le gel placé dans l'appareil Pharmacia est soumis à un courant constant de 10 mA pendant un laps de temps de 8 à 12 heures. Cette durée dépend du temps que le bleu de bromophénol quitte le gel.

2.3. FLUOROGRAPHIE

2.3.1. PREPARATION

A la fin de l'électrophorèse, les gels sont démoulés et plongés dans un bain fixant les protéines et empêchant leur diffusion dans le gel (82).

Cette fixation demande au minimum une heure et peut être prolongée si la suite des opérations ne peut pas se faire immédiatement.

Bain fixant

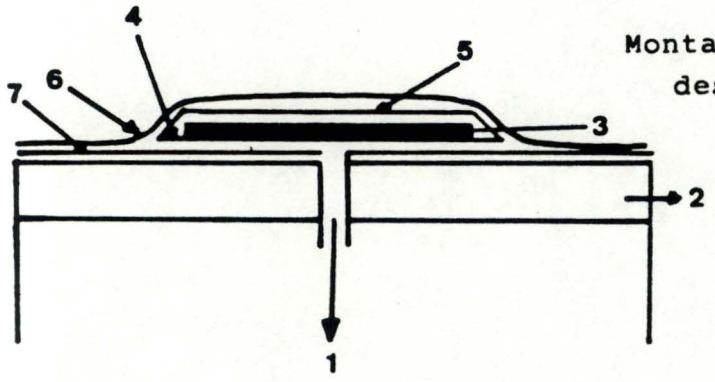
TCA	10% (W/V)
Acide acétique technique	10% (v/v)
Méthanol technique	10% (v/v)

Les gels sont plongés dans un bain de méthanol une heure trente minutes pour déshydrater le gel.

Ensuite, les gels sont placés dans du Enlighting pendant 20 minutes pour révéler la radioactivité (New England Nuclear Cat N - NEF 974).

2.3.2. SECHAGE DU GEL

Il se fait sous vide et demande au moins 13 heures. Le gel est soit mis sur une feuille de papier Whattmann 3 mm humidifié et séché directement sous vide, soit pris en sandwich entre deux feuilles de papier cellophane comme l'indique le schéma suivant:



Montage utilisé pour le séchage des gels d'électrophorèse

1.Vers la pompe à vide
2.Table
3.Gel
4-5.Cellophane
6.Caoutchouc assurant l'étanchéité
7.Polyéthylène

2.3.3. AUTORADIOGRAPHIE

Après séchage, les gels sont placés dans une cassette X-omatic et mis en contact avec un film radiographique Kodak X-ONA S.

L'exposition se fait à -80° C; le temps d'exposition est déterminé par la quantité de radioactivité déposée sur le gel.

Avant de révéler le film, celui-ci doit revenir à température ambiante; pour cela il faut attendre au moins une heure.

Ensuite, les films sont révélés en chambre noire dans un révélateur Kodak LX 24 et fixateur AL 4 dilués selon les normes du fabricant.

L'opération se déroule comme suit:

révélateur	5'
rinçage à l'eau courante	30"
bain d'arrêt (H2O)	30"
fixateur	2 à 4'

Laver abondamment à l'eau courante et sécher à l'air.

2.4. SYSTEME DE TRANSCRIPTION ET DE TRADUCTION COUPLE

Les premiers essais ont visé à reproduire les données rapportées par Stueber, obtenues par traduction dans le W.G de transcripts d'un plasmide de type pDS5. Il s'est avéré que le lot de lysat fourni était défectueux. Nous avons dès lors bifurqué en utilisant un lysat de réticulocyte.

Du reste, le W.G ne constituait pas le milieu idéal pour l'objectif visé - l'influence de la méthylation de la coiffe - dans la mesure où on connaît l'existence de divers méthyles endogènes dans ce système.

En ce qui concerne le lysat de réticulocyte de lapin, il est traité avec la nucléase de microcoque qui supprime la traduction des ARNms endogènes.

Cette nucléase de microcoque qui est calcium dépendante est arrêtée par un chélateur de calcium, l'EGTA.

Dans un tel système, les terminaisons prématurées sont très rares.

Ce lysat compte les différents aa et ions à concentrations données.

Dans nos expériences, nous avons suivi les recommandations de Mr Stueber pour la transcription.

Quelques modifications ont été introduites en ce qui concerne la traduction :

- addition de EGTA pour prévenir l'action de nucléase
- addition de GTP pour promouvoir l'initiation de la synthèse protéique.

N.B. Quand un produit ne doit pas être mis dans le milieu de transcription ou traduction, il est remplacé par son même volume en eau pour ne pas changer les concentrations.

Ce qui suit a été mis au point pour le WG.

Pour la transcription dans le WG, les concentrations finales sont:

2 µg ADN plasmidique
0,3 unités Escherichia coli polymérase RNA
20 mM Hepes KOH pH 7,5
10 mM Mg acétate
200 mM K acétate
0,2 mM spermidine (polyamine: joue un rôle sur le taux d'incorporation des aa dans les protéines synthétisées)
5 mM DTT
10 unités de RNasin
0,5 mM GTP
CTP
UTP
5 µM ATP
0,25 mM ^{7m}GpppA

Dans un volume final de 10 µl.

Pour la traduction, dans le volume total de 25 µl:

5 µl de mixture transcription
10 µl WG
10 µl de 20 mM Hepes KOH pH 7,5
110 mM K acétate
2,8 mM Mg acétate
1 mM DTT
1 mM ATP
10 mM créatine phosphate
80 µg/mm créatine phosphokinase
20 µM des 19 aa
10 µCi ^{35}S méthionine

PREPARATIONS SOLUTIONS STOCKS

2.4.1. TRANSCRIPTION

Solutions

Hepes KOH 400 mM	10 ml
Mg acétate 200 mM	10 ml
KAc 8 M	10 ml
RNAsin dilué le stock	340 u/mg + 153µl
	0,3 u par 1µl
RNA polymérase	
Spermidine	10 mM
DTT	50 mM ensemble
Coiffes	

Prend 9,5 ml Hepes KOH et Mg acétate

au total 1 ml de stock I

On prélève de cette solution stock I 0,5 ml que l'on met en présence de 0,5 ml (de KAC = 8M 0,25 ml et NTP 0,25 ml).

De ces "1 ml", on réalise des aliquots de 10 ml dont on prend par expérience 2 µ l (solution B).

2.4.1.1. Le protocole de transcription comporte les solutions en quantité donnée comme suit:

solution B	1 µl
RNA poly	1 µl
DTT spermidine	1 µl
RNasin (inhibiteur des RNases)	1 µl
coiffe	2 µl
UTP	1 µl
ADN	2 µl
H_2O	1 µl
	-----
	10 µl

Incubation: 3 minutes à 37° C

Ajouter 1 µ l ATP 5mM et remettre 15 minutes à 37° C et arrêt dans la glace.

2.4.2. TRADUCTION

Les concentrations des produits sont calculées en fonction des quantités de produits présents dans les 5 µ l de solution de transcription. Pour cette raison, le DTT et l'ATP sont en quantité suffisante. Les autres produits sont mis en solution de la manière suivante:

Hepes KOH	400 mM	
KAc	2,75 mM	
Mg AC	1,4 mM	10 ml de solution II

Dans ces 10 ml, nous avons dissous la créatine phosphate 250 mM.

De cette solution, nous avons réalisé des aliquots de 10 µl en tenant compte qu'1 µl suffit par expérience.

Solution créatine phosphokinase 80 µg/ml dont nous prélevons 1 µ l.
Solution aa fournie par Amersham diluée
S^{35} méthionine

2.4.2.1. Le protocole de traduction est le suivant:

Solutions

Solution II	1 µ l	
Solution créatine phosphokinase	1 µ l	
Solution aa	2 µ l	
S^{35} méthionine	2 µ l	
SAM	3 µ l	
ou	2 µ l	H_2O
Transcription	5 µ l	
Eau	2 µ l	
Wheat germ	10 µ l	
	25 µ l	

Incubation 25° C 60 minutes.

Solutions

GTP pH 7,2 KOH	10 mM
créatine phosphokinase	32,7 mg
EGTA pH 7,2 KOH	250 mM
KAc	2 M
Tampon Hepès pH 7,2 KOH	250 mM

Cocktail 1 ml	
GTP	100 µl
créatine phosphokinase	32,7 mg
EGTA	20 µl
Tampon Hépès	880 µl
	1.000 µl répartis en

aliquots de 50 µl à -20° C.

Protocole proprement dit

Pour uniformiser, les mesures obtenues lors des traductions, nous avons réalisé un prémix dont nous prélevons 21 µl pour chaque expérience.

Ce prémix comprend pour 3 cinétiques ou expériences:

lysat		42 µl
cocktail		6 µl
KAc 2 M		2,76 µl
méth S^{35}	varient en fonction de l'activité de la	
H_2O	radioactivité de la méthionine	
		68,4 µl

Chaque solution ou produit est vortexé puis centrifugé rapidement pour homogénéiser le contenu avant le prémix.

Par expérience, il faut prélever 21 µl de prémix, mettre 5 µl du produit de transcription, incuber 60 minutes à 30°C et puis arrêter la traduction en mettant les cupules dans la glace.

N.B.: des expériences définitives ont été menées avec les solutions de transcription décrites dans le protocole Wheat Germ et suivant le protocole ci-dessus pour la traduction.

2.5. PRECIPITATIONS AU TCA

Pour confirmer la présence d'un produit radioactif dans une solution, il faut pouvoir séparer les précurseurs des autres.

L'utilisation du TCA froid précipite les macromolécules de poids moléculaire élevé sur des filtres.

Après un traitement acide, les matériaux non fixés sont enlevés du filtre par lavages successifs dans différents solvants.

La radioactivité d'un échantillon est alors mesurée par comptage dans un liquide de scintillation.

2.5.1. PRECIPITATION DES ARNS

Solutions

Solution I	TCA	10%
	EDTA	0,01 mM
	Sodium pyrophosphate	10%
Ethanol technique		
Acétone technique		

Matériels

Filtres Whatmann 3 MM cellulose prétrempés dans TCA 10% et séchés à l'étuve

Protocole de la précipitation

- 5 µl d'aliquots de transcription sont déposés sur les disques filtres Whatmann

- ces disques sont séchés à température ambiante puis placés dans un berlin contenant 200 ml de solutionI dans la glace

- les filtres sont laissés pendant 30 minutes à 4°C en changeant le TCA toutes les 10 minutes

- ils sont lavés ensuite dans deux bains de 100 ml d'éthanol pour enlever l 'eau et les matériaux non fixés, solubles dans l'éthanol

- ensuite, ils sont plongés dans deux bains d'acétone qui retire l'éthanol insoluble dans l'alcool

- pour finir, les filtres sont séchés à l'air et placés dans 10 ml d'aqua luma pour permettre ensuite la lecture de la radioactivité de l'ARNm.

2.5.2. PRECIPITATION DES PROTEINES MARQUEES A LA S^{35} METHIONINE

Différentes techniques sont utilisées pour la précipitation des protéines marquées au S^{35}. La grande différence entre ces dernières se situe au niveau de l'utilisation de la méthionine froide incorporée dans la solution de TCA.

2.5.2.1. Méthode

Solutions

TCA	10%
TCA	5%
NAOH	Ø,1 N
HAc concentré	

Matériel

filtres GF/C 2-4 cm Whatmann microfiltre de verre prétraités dans un bain TCA 10% et séchés à l'étuvée sur papier Kleenex

- 2 µl d'échantillons sont mis dans 110 µl H2O placée ce mélange vortexé, nous prélevons 100 µl que nous déposons sur le filtre
- ce filtre est plongé dans du TCA 10% 15 minutes dans la glace
- ensuite, le même TCA avec filtre est porté à ébullition pendant 15 min., refroidi dans la glace
- les filtres sont rincés deux fois avec du TCA 5%

puis deux fois avec de l'eau bidistillée séchée à l'étuve , mis dans des fioles avec 1 ml de NaOH Ø,1 N à 6Ø°C pendant 3Ø min. pour hydrolyser les ARNt

- nous ajoutons 1ØØ µl HAc concentré pour neutraliser la solution et 1Ø ml d'aqua luma; le comptage peut avoir lieu directement après que le filtre ait été dissous dans le liquide

N.B.: d'autres techniques ont été testées mais non décrites ici. Ces deux techniques explicitées s'avérèrent les plus fiables et reproductibles. Quatre types de filtres ont été utilisés et il ne semble pas avoir beaucoup de différences, sauf pour le GF/c Whatmann qui, déchiqueté, permet un meilleur comptage.

2.6. TEST PRELIMINAIRES DU LYSAT DE RETICULOCYTES ET DE WHEAT GERM

Dans un système acellulaire, n'importe quel type d'ARNm peut être traduit si la synthèse endogène est réprimée.

Le taux de synthèse est donc mesuré par l'incorporation d'un acide aminé radioactif dans une chaîne protéique nouvellement synthétisée.

Dans notre cas, l'aa radioactif est la méthionine.

Cette méthionine est employée pour tester les différents batchs de wheat germ ou de réticulocytes en présence d'ARNm TWV selon un protocole fourni par la firme Amersham.

Avec ces résultats, nous construisons le graphique d'incorporation de méthionine S^{35} en fonction du temps dans soit un lysat de réticulocyte ou de wheat germ.

RESULTATS

ET

INTERPRETATIONS

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1. PREPARATION DES PLASMIDES

1.1. COURBE DE CROISSANCE DE LA SOUCHE C_{600}

1.2. TECHNIQUES DE PREPARATION DES PLASMIDES : ESSAIS PRELIMINAIRES AVEC pBr 322 ET pJDB 207

1.2.1. TRANSFORMATION PROPREMENT DITE

1.2.2. OBTENTION DES PLASMIDES

1.3. PREPARATION DES PLASMIDES pDS DE STUEBER (pDS5 ET pDS5/4-1)

1.3.1. pDS5

1.3.1.1. Transformation pDS5

1.3.1.2. Obtention de pDS5

1.3.2. pDS5/4-1

1.3.2.1. Transformation pDS5/4-1

1.3.2.2. Obtention du plasmide

1.4. ADAPTATION DES METHODES DE PREPARATION DES PLASMIDES AU pDS5/4-1

1.4.1. Obtention de pDS5/4-1

1.4.2. Précipitation à l'éthanol

1.5. CARACTERISATION DES PLASMIDES PAR GEL ELECTROPHORESE D'AGAROSE

2. SYSTEME DE TRANSCRIPTION TRADUCTION

2.1. ESSAIS PRELIMINAIRES

2.1.1. TENTATIVES INFRUCTUEUSES AVEC LE LYSAT DE GERMES DE BLE

2.1.2. PREMIERS ESSAIS INFRUCTUEUX AVEC LE LYSAT DE RETICULOCYTE

2.1.2.1. Epreuves pour tester la fonctionnalité des composants du système

2.1.2.1.1. Activité du lysat de réticulocyte

2.1.2.1.2. Activité système de transcription et traduction

. état fonctionnel du plasmide

. activité de la polymérase d'Escherichia coli

a) essais d'optimisation des conditions ioniques

b) démonstration de l'inactivité du lot de la polymérase

2.1.3. CONCLUSIONS DES ESSAIS PRELIMINAIRES

2.2. EXPERIENCES VISANT A MONTRER L'IMPORTANCE DE LA METHYLATION

2.2.1. EXPERIENCES AVEC DES COIFFES METHYLEES ET NON-METHYLEES

2.2.2. EXPERIENCES AVEC DES COIFFES ^{7m}GpppA

GpppA

^{7m}GpppG

GpppG

. Comparaison des moyennes de ^{7m}GpppA et GpppA

a) Calcul de variances de ^{7m}GpppA et GpppA

b) Comparaison des moyennes

. Comparaison des moyennes de ^{7m}GpppG et GpppG

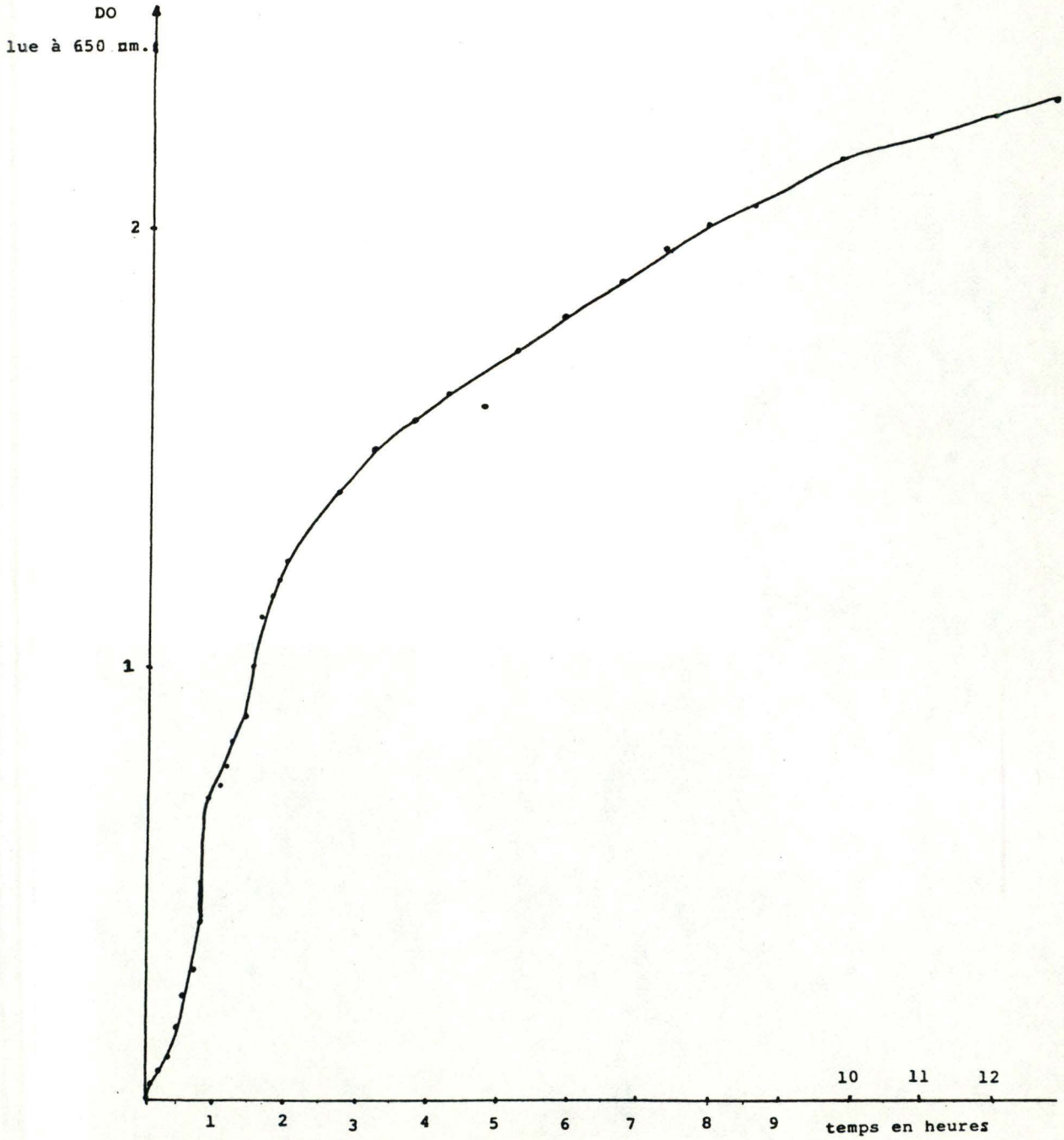
a) Calcul des variances de ^{7m}GpppG et GpppG

b) Comparaison des moyennes

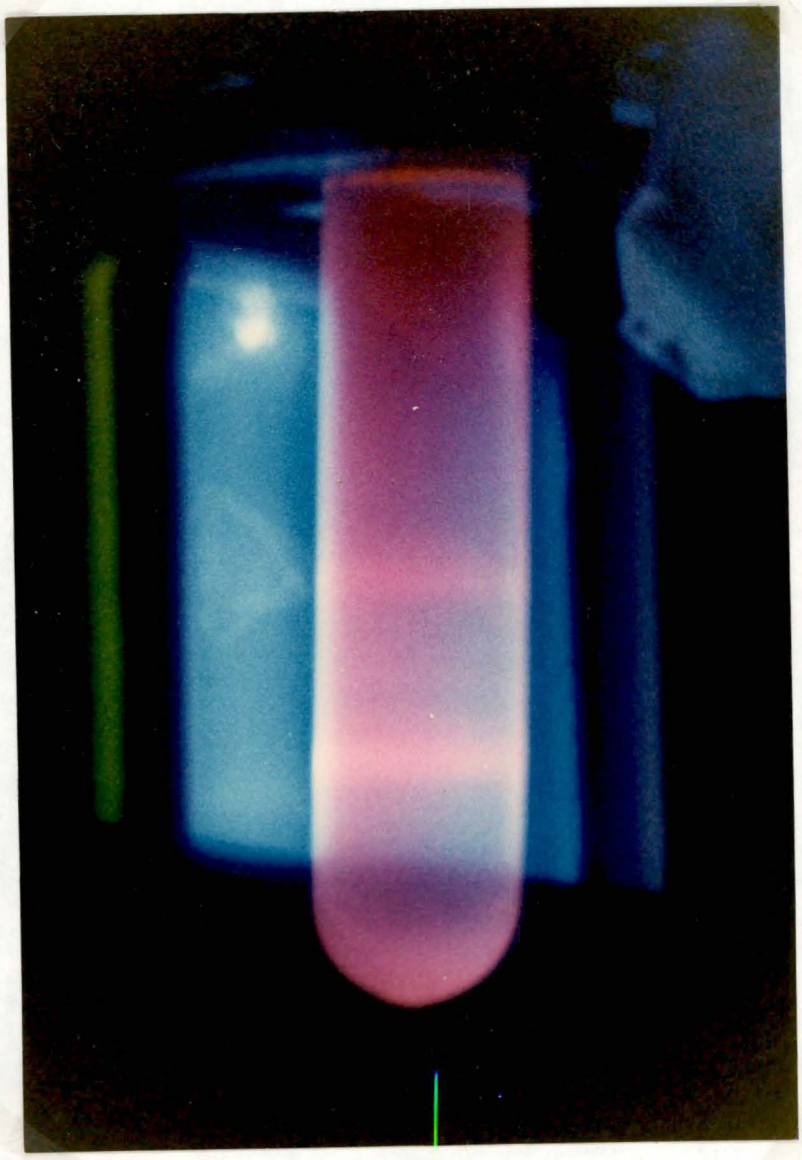
1. PREPARATION DES PLASMIDES

1.1. COURBE DE CROISSANCE DE LA SOUCHE C_{600}

La courbe de croissance est obtenue après inoculation de 250 ml de culture LB avec 5 ml de LB + C 600 (1 colonie isolée) et lectures à intervalles donnés de la densité optique du milieu (turbidimétrie).



Schema de croissance de la souche C 600.



1.2. TECHNIQUES DE PREPARATIONS DE PLASMIDES : ESSAIS PRELIMINAIRES AVEC pBr 322 ET pJDB 207

1.2.1. TRANSFORMATION PROPREMENT DITE

On a réalisé la transformation de la souche Escherichia coli C 600 par pBr 322, pJDB 207 comme décrit dans matériels et méthodes. (2.1.1.)

Les transformants ont été sélectionnés sur un milieu LB + TET et M9. 50 colonies différentes contenant pBr 322 et ayant poussé sur LB + TET sont repiqués sur M9 et LB + TET. Pour pJDB 207, nous avons pris 40 colonies.

Les cellules ayant incorporé pBr 322 ne poussent pas sur M9 mais bien sur le milieu LB + TET.

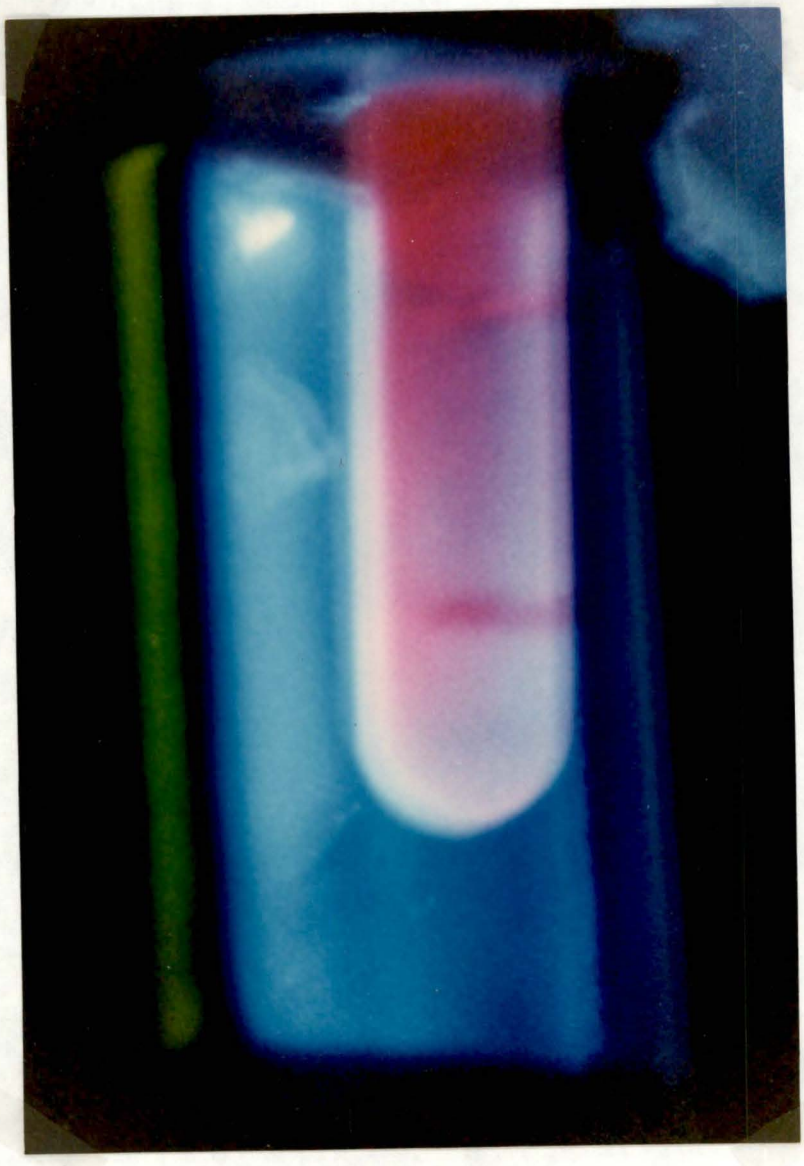
Celles qui ont incorporé pJDB 207 poussent aussi bien sur M9 que sur LB + TET.

Chaque fois, une d'entre elles a servi à inoculer les précultures.

1.2.2. OBTENTION DES PLASMIDES

Les plasmides ont été obtenus suivant la technique décrite au numéro 2.1.2.2.1. de méthodes.

Le pBr 322 dans un gradient de ClCs se présentait à ce niveau comme sur la photo ci-dessous.



Le pJDB 205 se présentait suivant le cliché ci-dessous.

Les plasmides recueillis furent traités suivant la méthode de purification employée au laboratoire (2.1.2.2.1.C), en obtenant le résultat suivant :

	pBr 322	pJDB 205
A 260 nm	2,3	2,6
ml	2	1,76
g	230	228,8

Pour le calcul, la valeur de 50 µg d'ADN par unité d'absorbance à 260 nm a été prise.

1.3. PREPARATION DES PLASMIDES pDS DE STUEBER (pDS5 ET pDS5/4-1)

1.3.1. pDS5

1.3.1.1. Transformation pDS5

La transformation se réalise suivant le protocole décrit dans matériels et méthodes (2.1.1.).

Nous ne possédions que 5 µg d'ADN pDS5 et 0,5 µg de pDS5/4-1. Selon MANIATIS (82), il suffirait de 40 ng par transformation, du moins avec pBr 322.

Afin de ne pas gaspiller le matériel, nous avons fait quelques tests préliminaires. Nous avons dilué les 5 µg dans 1,25 ml de TE et obtenu une concentration finale du plasmide de 400 ng/100 µl.

De ces 1,25 ml, 10 µl ont été prélevés et rajoutés à 90 µl de TE pour amener le plasmide à une concentration de 40 ng/100 µl.

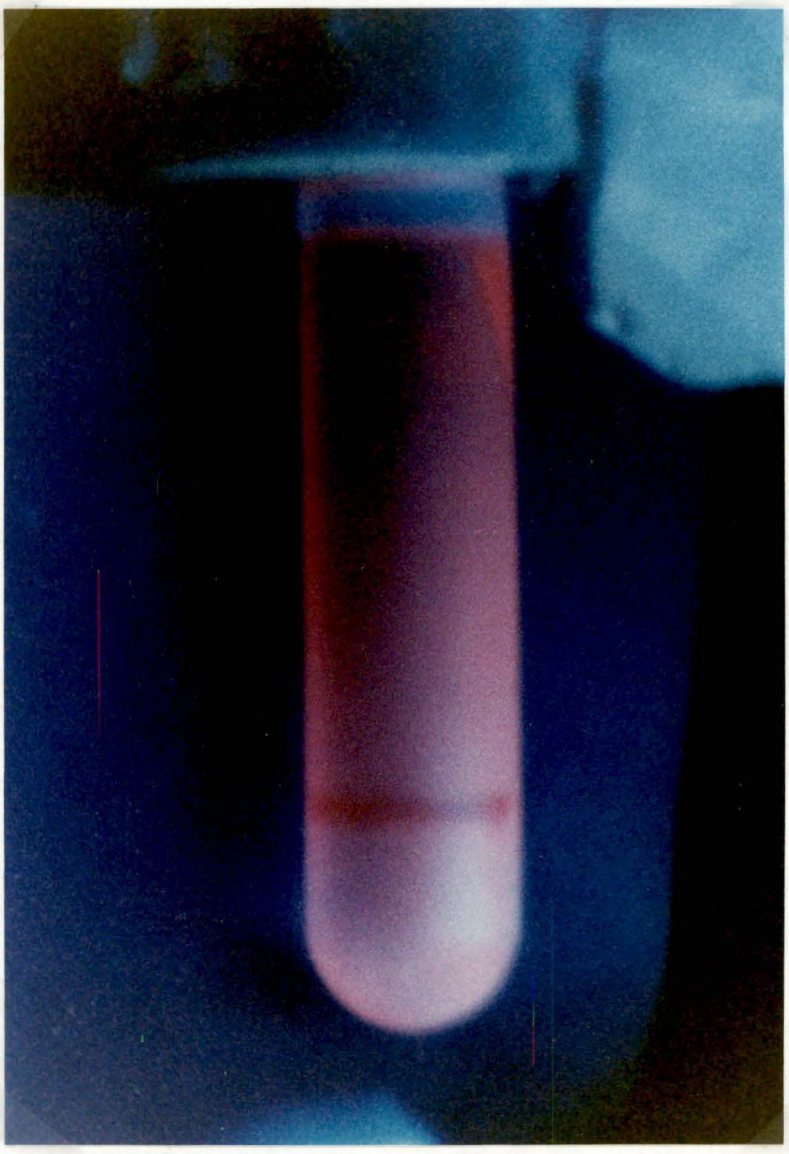
Les cellules transformées ont été étalées sur des boîtes LB milieu maximum et LB chloramphénicol où ne pousseraient que les cellules ayant incorporé le plasmide.

Sur le milieu LB, tout a poussé.
Sur le milieu LB + chloramphénicol, seules les cellules transformées poussent.

- Cellules transformées avec 400 ng d'ADN dans 100 µl

	200 µl	100 µl	40 µl dilués 5 x = 200µl	20 µl dilués 5 x = 100µl
colonies	500	2 *	100	56

* Trop peu de milieu dans la boîte,
ou autre raison non définie.



- Cellules transformées avec 40 ng d'ADN dans 100 µl

	200 µl	100 µl	100 µl dilués 5 x
colonies	30	11	3

Ces résultats nous montrent qu'une transformation avec 40 ng/100 µl est réalisable et qu'il était donc parfaitement raisonnable de faire la transformation avec 50 ng/100 µl de pDS5/4-1.

Mais avant tout, nous avons vérifié si ces colonies qui avaient poussé avaient réellement incorporé le plasmide. Pour cela, nous avons repiqué celles-ci individuellement sur de nouvelles boîtes de LB + Chl.

Avec ce matériel, il nous a été possible de réaliser une amplification.

1.3.1.2. Obtention de pDS5

Ce plasmide comporte le gène codant pour chloramphénicol acétyl transférase (CAT). Nous avons choisi de l'amplifier non en présence de chloramphénicol, mais de streptomycine, comme décrit dans Méthodes (2.1.2.).

L'isolation du plasmide s'est réalisée selon la méthode de centrifugation isopycnique, pour obtenir une séparation visible sur la photo ci-dessous.

La quantité finale de plasmide recueillie est de :

A 260 nm 2,458
ml 2,4
µg 295

1.3.2. pDS5/4-1

1.3.2.1. Transformation pDS5/4-1

Les 50 ng de pDS5/4-1 ont été dissous dans 100 µl de TE puis placés dans une cupule contenant 200 µl de cellules et 200 µl de TCM, en suivant le protocole expérimental (cfr Méthodes (2.1.3.)). A la fin de ce protocole, nous ensemençons 4 boîtes de LB + Chl et une boîte de LB.

Les résultats furent les suivants :

LB	LB + Chl
tout pousse	± 20 dans les 4 boîtes.

Une colonie qui a bien poussé a été repiquée sur un nouveau milieu. Lorsqu'elle sera bien développée, celle-ci servira pour la préculture de l'amplificaiton du plasmide.

1.3.2.2. Obtention du plasmide

La purification fut réalisée par gradient isopycnique et obtenue selon la photo suivante :

Le plasmide fut préparé à deux reprises avec les rendements suivants :

	expérience 1	expérience 2
A 260 nm	2,35	2
ml	3,5	1,5

Le plasmide de l'expérience 1 fut précipité par la technique à l'éthanol (méthode 2.2.2.1. D) et redissous dans 350 µl de TE pour obtenir une concentration finale de 200 µg/100 µl.

La préparation obtenue a donné lieu après transcription et traduction à des patterns électrophorétiques de protéines comportant de multiples bandes au lieu de patterns caractéristiques (bandes de prélysosyme).

La contamination par des RNAs peut rendre compte de ces résultats.



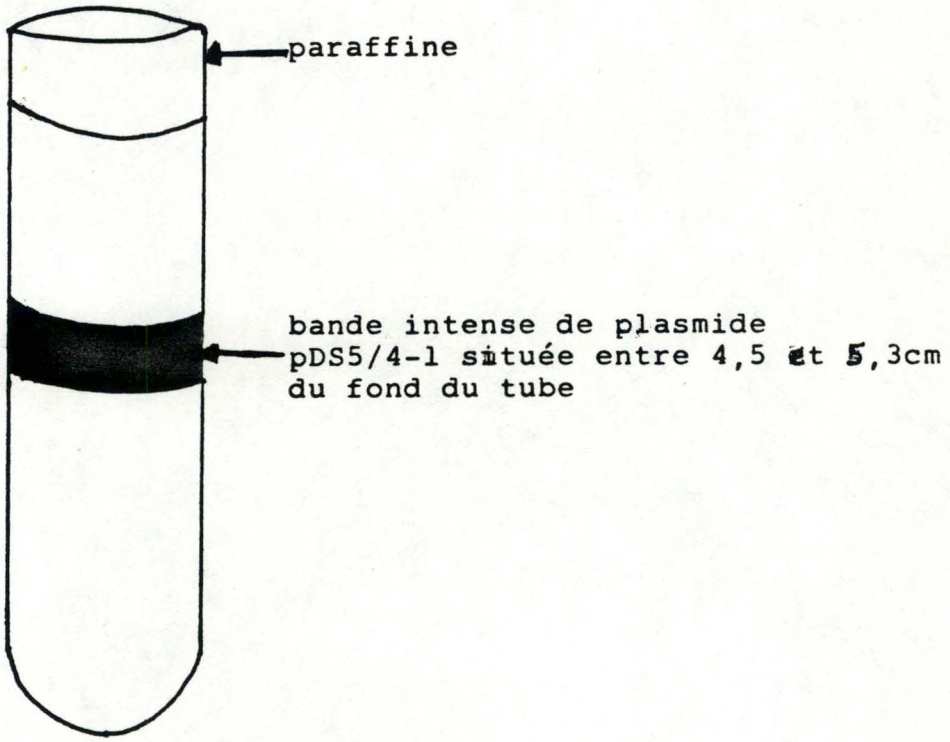
1.4. ADAPTATION DES METHODES DE PREPARATION DE PLASMIDES AU pDS5/4-1

L'amplification et l'extraction ont été réalisées selon méthodes 2.1.2.2.2. qui est une lyse beaucoup plus simple et rapide que celle utilisée précédemment.

De plus, le gradient de ClCs a un volume plus élevé et des concentrations permettant une meilleure séparation du plasmide du culot et des ARNms; voir figure suivante.

1.4.1. OBTENTION DU PLASMIDE pDS5/4-1

Le plasmide se stabilise à 4,5cm du fond.



Quantité de plasmide obtenu :

A 260 mm 2,5

935,5 µg

ml 7,5

1.4.2. PRECIPITATION A L'ETHANOL

Pour plus de sécurité, nous avons réparti les 7,5 ml dans deux corex de 15 ml et effectué une précipitation à l'éthanol.

* Pour le premier corex, nous avons centrifugé le corex à 8.500 rpm dans une Sorvall, séché le culot et redissous dans 200 µl de TE. Mais la dissolution n'était pas suffisante, malgré 1 DO mesurée pour 3µl dans 1 ml : 0,040, car l'expérience d'incorporation ne donna que 5600 cpm.

Nous avons cru que l'absorbance lue était obtenue à cause d'un pic de 260 nm de NaAc3N, de ClCs et éthanol pur. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé les spectres respectifs de NaAc Fig. (24)
ClCs Fig. (25)
éthanol pur suivant Fig. (26)

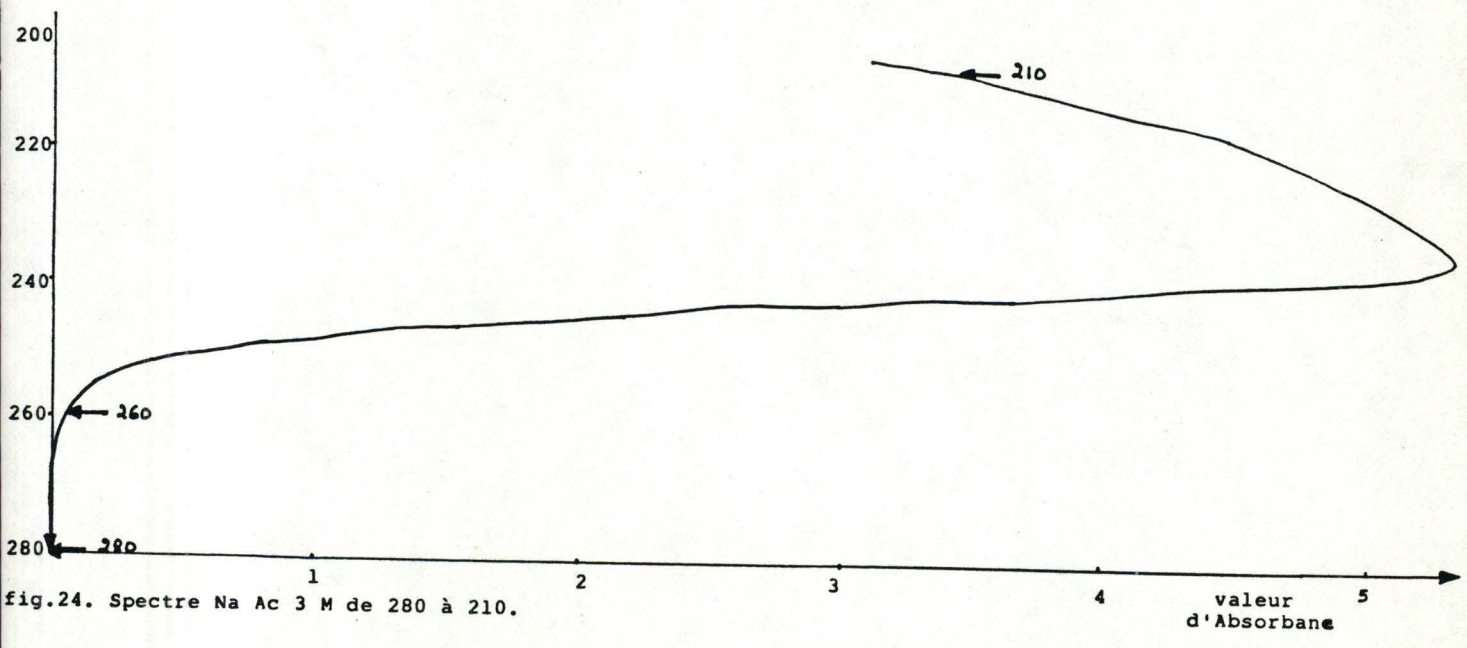


fig.24. Spectre Na Ac 3 M de 280 à 210.

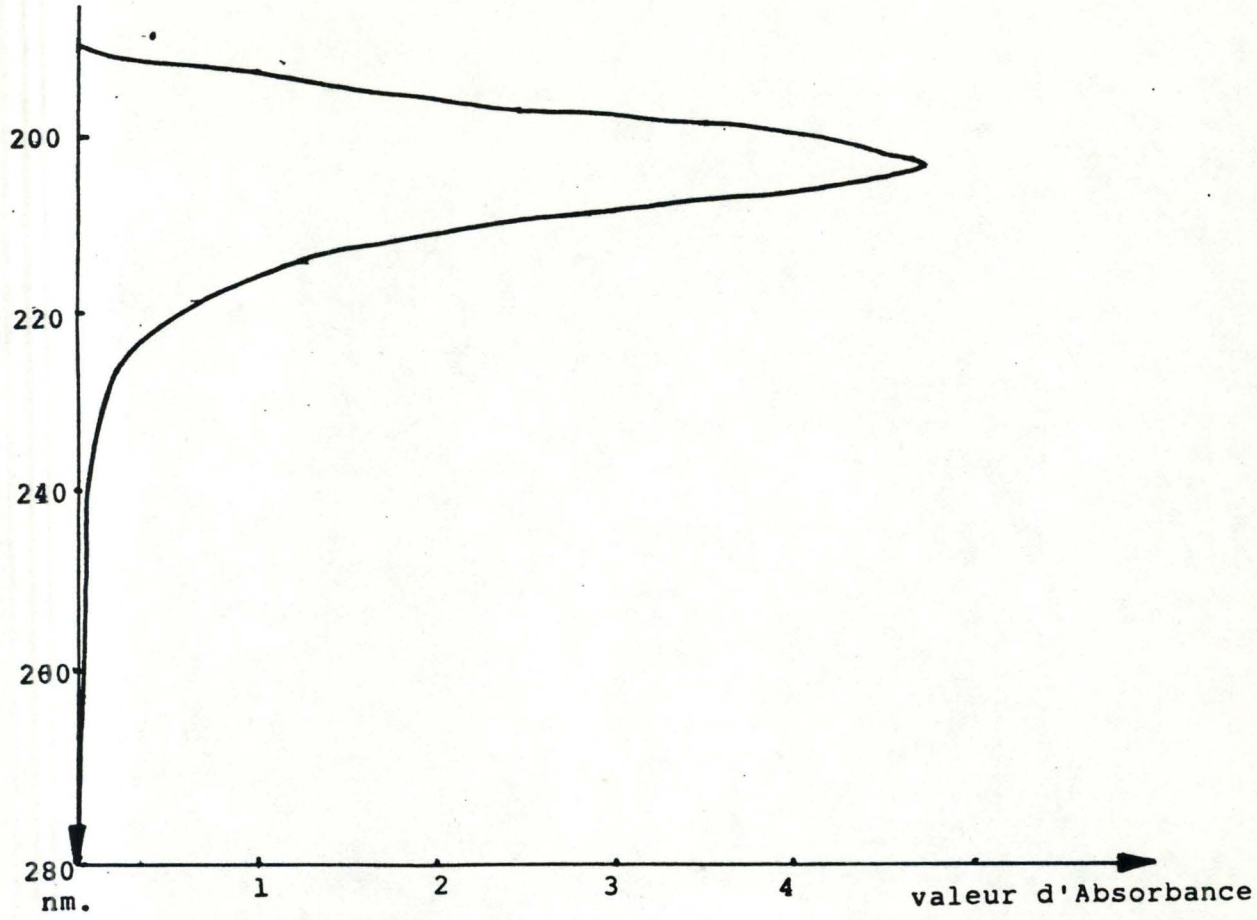


fig. 25. Spectre ClCs à partir de 280 nm.

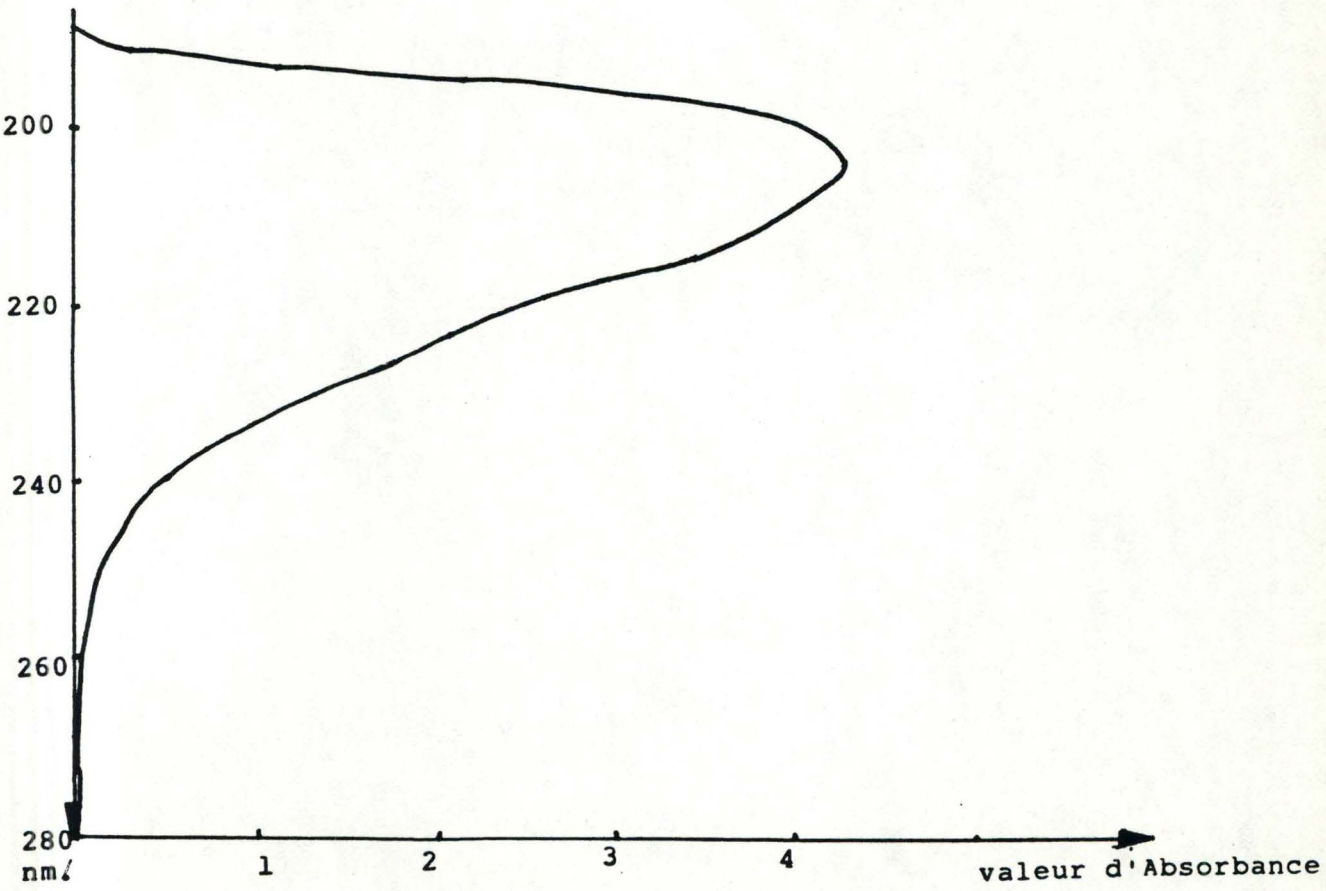


fig.26. Spectre Ethanol pur à partir de 280 nm.

Ces trois spectres n'interfèrent pas du tout avec la lecture à 260 nm.

Nous en avons déduit qu'il n'y avait pas assez de plasmide, ce qui fut démontré par le gel d'agarose où rien n'était visible à part le standard.

* Le contenu du deuxième corex fut centrifugé en 10 fois dans une cupule stérile à 8500 rpm pendant chaque fois 5 minutes, séché sous vide et le culot redissous dans 200 µl de TE en chambre froide.

Avec cette quantité de plasmide nous avons réalisé toutes les expériences suivantes :

1.5. CARACTERISATION DES PLASMIDES PAR GEL D'ELECTROPHORESE D'AGAROSE

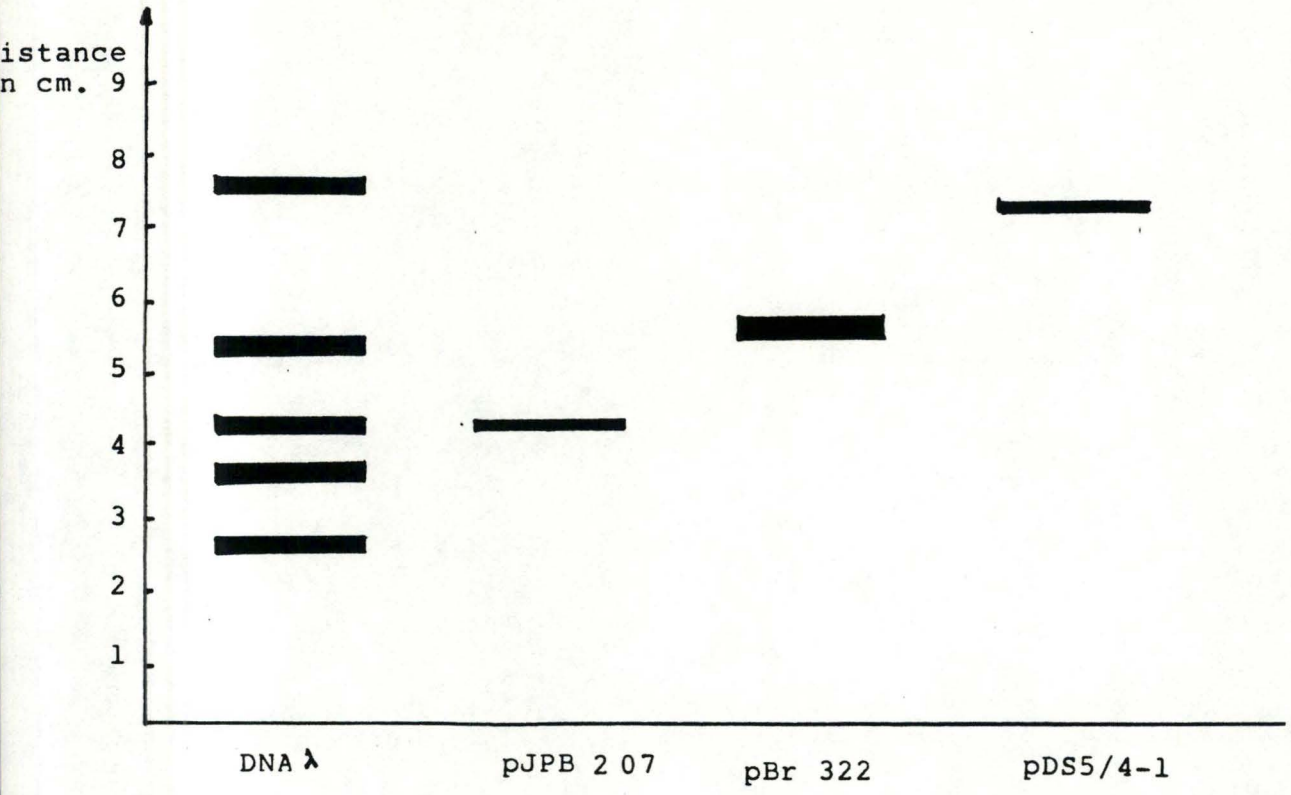
Sur un gel, sont repris tous les plasmides utilisés : pBr 322, pJDB 205, pDS5, pDS5/4-1, et l'étalon standard DNA λ.

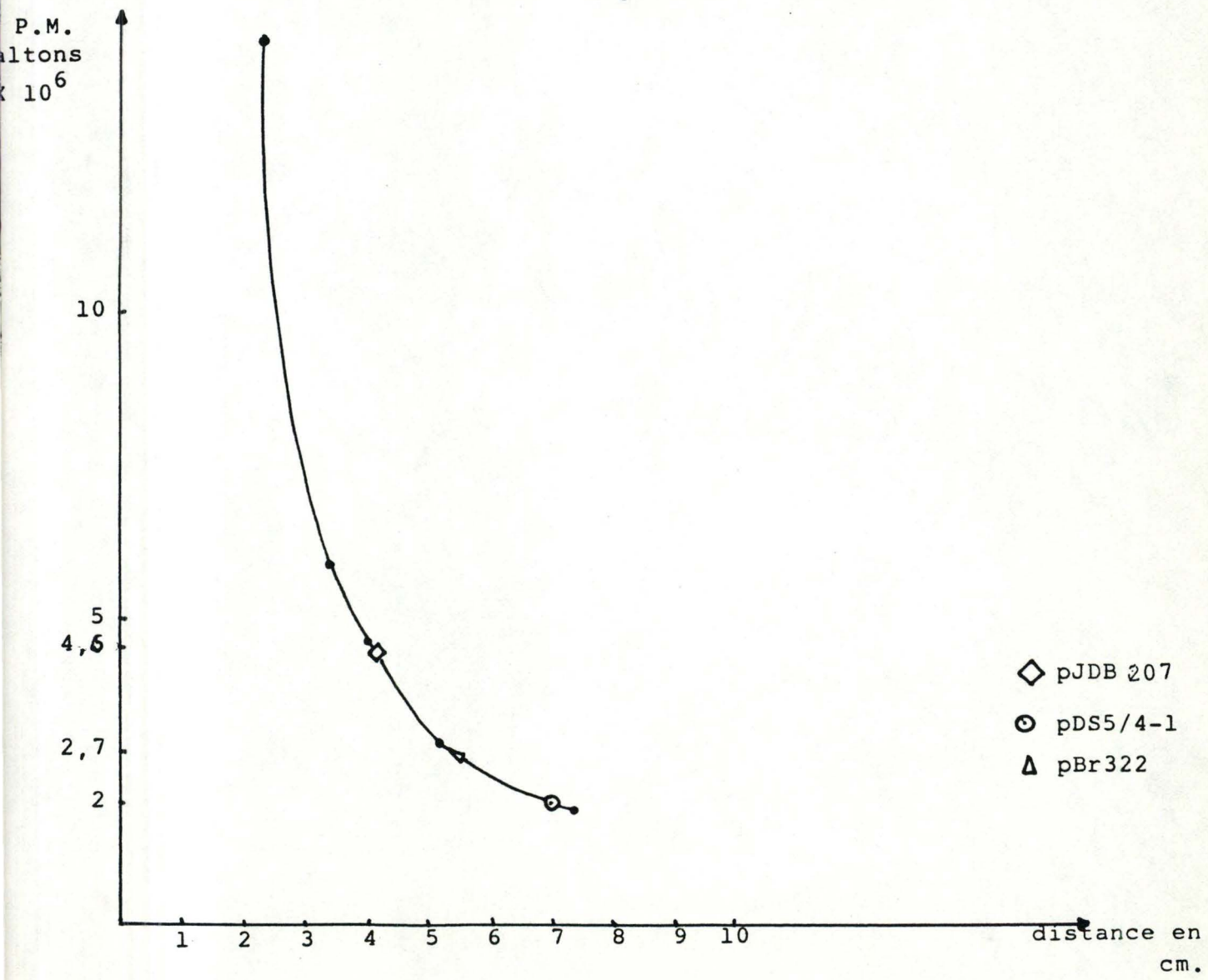
Ces plasmides ont été linéarisés en utilisant un enzyme à site de restriction unique. Ces échantillons ont été posés sur un gel d'agarose.

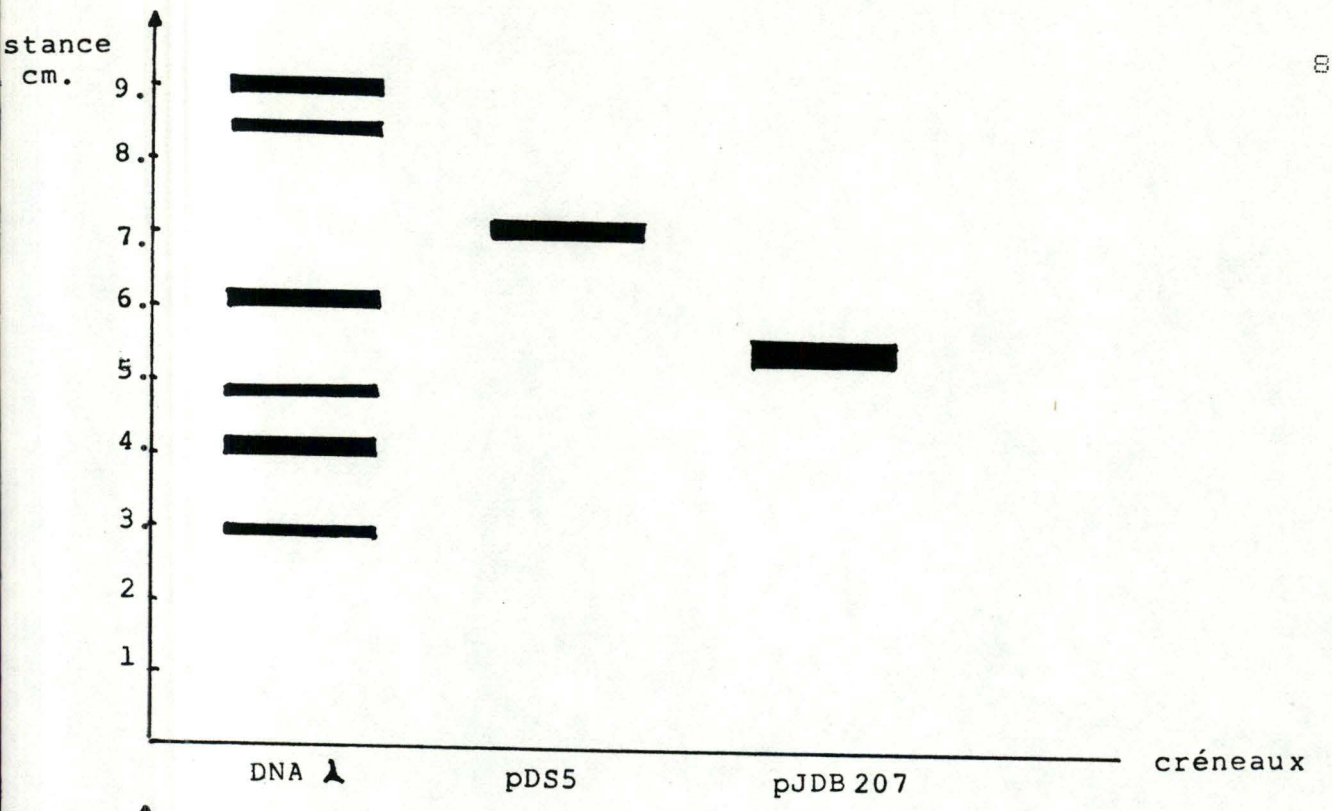
Les résultats sont les suivants :

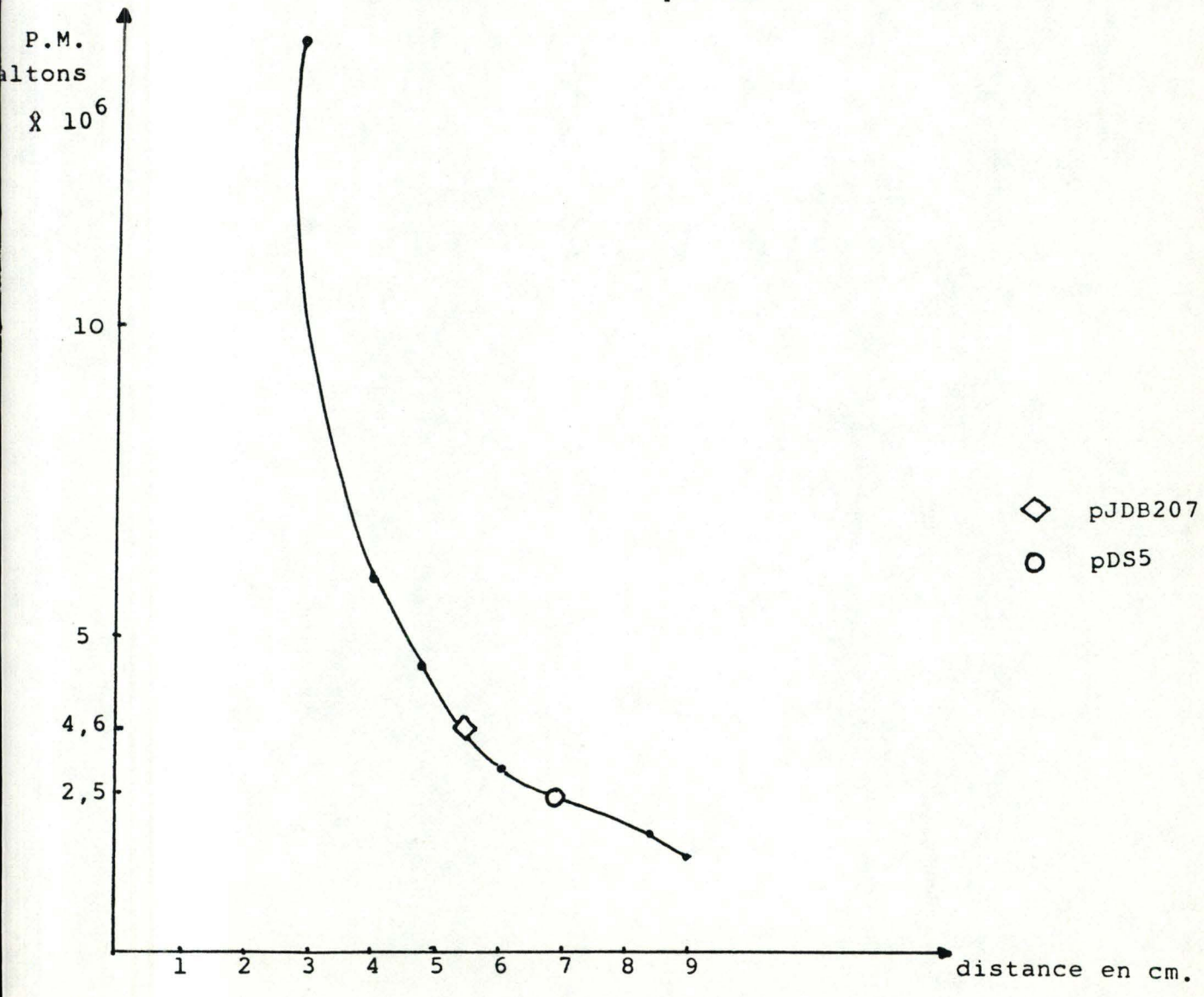
étalon DNA 32 10^6 daltons 48.502 b.p.
a été coupé avec Hind III donne 5 bandes

1.	22.000 bp	14,52 10^6 d.
2.	9.000 bp	5,94 10^6 d.
3.	7.000 bp	4,62 10^6 d.
4.	4.500 bp	2,97 10^6 d.
5.	3.000 bp	1,98 10^6 d.
6.	2.500 bp	1,65 10^6 d.


istance
n cm.
9
8
7
6
5
4
3
2
1
DNA λ
pJPB 2 07
pBr 322
pDS5/4-1


P.M.
altons
x 10^6
10
5
4,6
2,7
2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
distance en cm.
pJDB 207
pDS5/4-1
pBr322


stance
cm.
9
8
7
6
5
4
3
2
1
DNA λ
pDS5
pJDB 207
créneaux


P.M.
altons
x 10^6
10
5
4,6
2,5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
distance en cm.
pJDB207
pDS5

- pJDB 207 coupé avec PstI se situe à 4,2 cm entre 2 et 3 plus proche de 3, ce qui correspond à un poids moléculaire de 4,6 10^6 daltons

- pBr 322 coupé avec Pst 1 à 1 PM 2,7 10^6 daltons (5,6 cm)

- pDS5 coupé avec Hind III migre à une distance de 7 cm ce qui est normal vu son nombre de paires de base de 3800

- pDS5/4-1 coupé avec Hind III est obtenu en une seule bande située à 7 cm entre la quatrième bande et la cinquième, ce qui correspond au poids moléculaire de 2 10^6 dalton

2. SYSTEME DE TRANSCRIPTION TRADUCTION

2.1. ESSAIS PRELIMINAIRES

2.1.1. TENTATIVES INFRUCTUEUSES AVEC LE LYSAT DE GERMES DE BLE (WHEAT GERM)

Nos premiers essais n'ont pas permis d'obtenir des incorporations importantes de méthionine S^{35}.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

	coiffe SAM	^{7m}GpppA SAM	^{7m}GpppA ~~SAM~~	GpppA SAM	GpppA ~~SAM~~
cpm	16.620	16.270	9.183	7.700	6.176

	~~coiffe~~ ~~SAM~~	~~coiffe~~ SAM	~~ADN~~ SAM	H_2O SAM
cpm	11.592	11.000	7.000	7.000

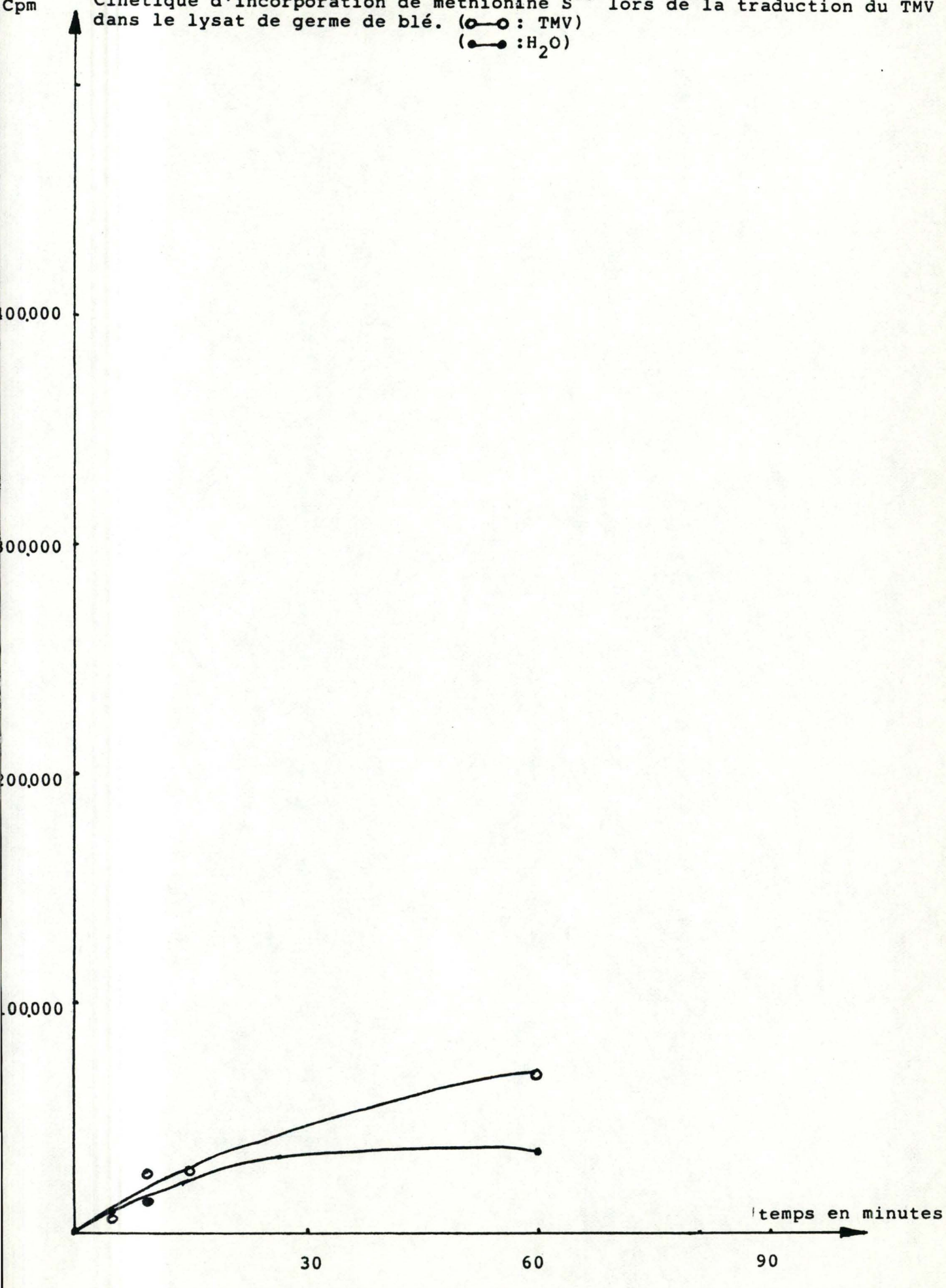
Afin d'établir l'origine de cette faible incorporation de méthionine S^{35}, nous avons testé l'efficience du système de traduction acellulaire de wheat germ en réalisant une cinétique d'incorporation de méthionine S^{35} dans la traduction du TMV.

Dans le protocole fourni par la firme, l'incorporation au bout de 60 minutes est de 400.000 cpm; or, la valeur obtenue est de 67.075 cpm, c'est-à-dire à peine 20 % du résultat escompté.

A la vue de la courbe établie ci-dessous, le wheat germ ne fonctionne pas bien, on n'arrive pas au plateau d'incorporation. Fig. (27)

fig.27.

Cinétique d'incorporation de méthionine S^{35} lors de la traduction du TMV dans le lysat de germe de blé. (o—o : TMV)
(•—• : H_2O)



Nous nous sommes tournés alors vers le lysat de réticulocyte de lapin. Ce choix se justifiait : le wheatgerm avec lequel nous voulions vérifier le système pDS5 selon les prescriptions des auteurs, n'aurait de toute manière pas été indiqué pour notre propos : l'étude de l'importance de la méthylation de la coiffe.

En effet, dans le wheat germ, l'enzyme méthylant la coiffe (7 méthyl-guanosine) a pu être purifié. Sa présence rendrait évidemment caduque tout essai pour tester l'importance fonctionnelle de celle-ci au moyen de ce système.

2.1.2. PREMIERS ESSAIS INFRUCTUEUX AVEC LE LYSAT DE RETICULOCYTE

2.1.2.1. Epreuves pour tester la fonctionnalité des composants du système

Après incubation du plasmide en présence de coiffe dans le système de transcription, on procède à l'incubation d'un aliquot dans le système de réticulocyte. Les premiers essais se sont révélés infructueux, comme permet d'en juger le tableau suivant :

minutes	^{7m}GpppA	GpppA	H_2O
	cpm	cpm	cpm
0	3.110	3.089	2.900
60	4.386	4.083	3.017

Cet échec peut trouver son origine à plusieurs niveaux:

2.1.2.1.1. Activité du lysat de réticulocyte

La vérification de son activité a été faite en réalisant une cinétique d'incorporation de S^{35} méthionine en présence d'ARNmTMV selon le protocole proposé par Amersham(26)

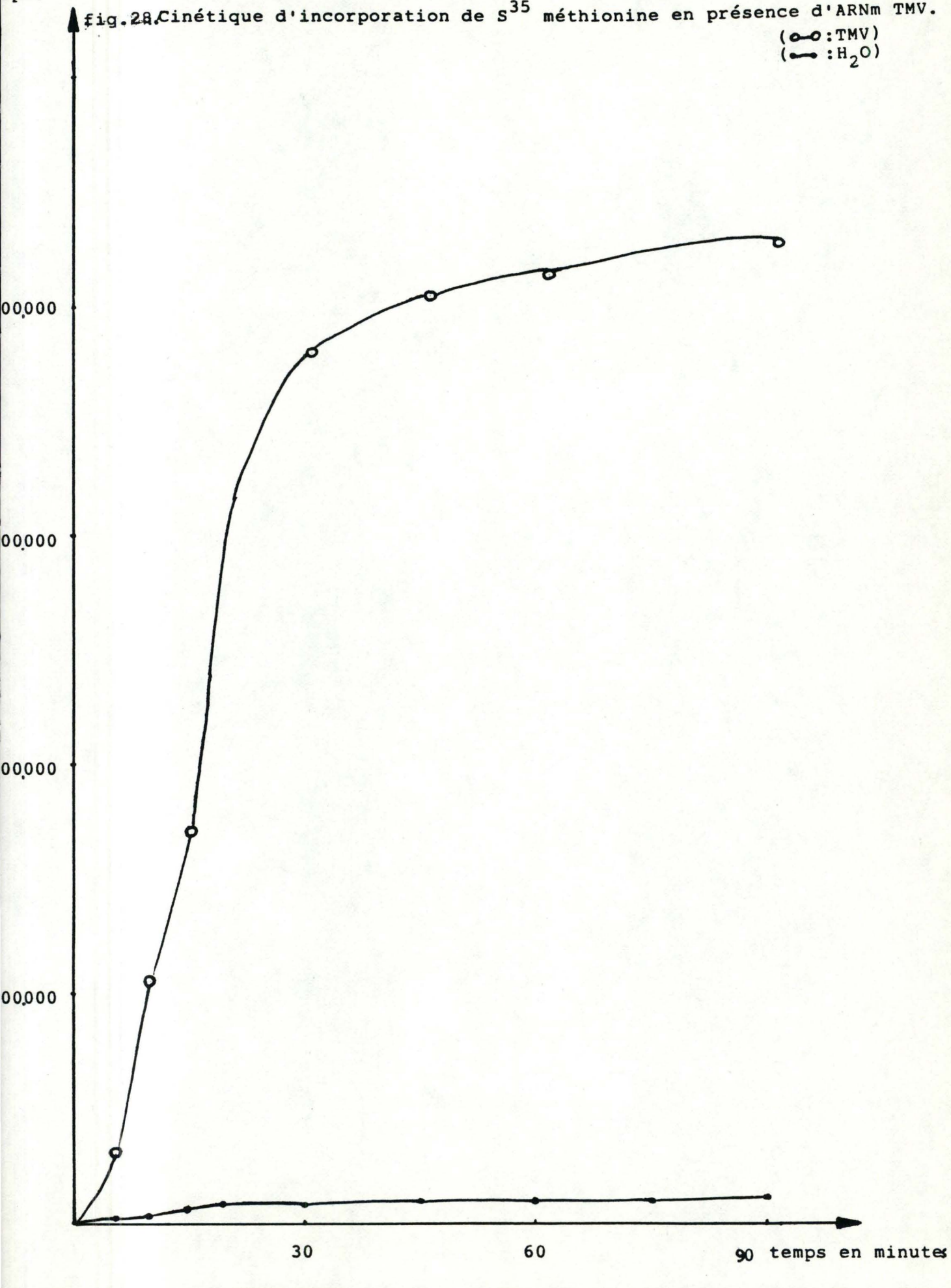
700.000 dpm sont garantis à 60 minutes. En cpm, cela équivaut à environ 400.000 (efficience de 30%).

Les résultats sont donnés dans les tableau et figure suivants.

Nous concluons donc à un bon fonctionnement du système de traduction.

minutes	TMV	H_2O
	cpm	cpm
0'	1959	623
5'	30287	2299
10'	106440	3193
15'	175890	4555
20'	174900	2820
30'	382100	6522
45'	406133	6761
60'	414200	9454
75'	428500	10365
90'	401670	10865

fig.28. Cinétique d'incorporation de S^{35} méthionine en présence d'ARNm TMV.
(o—o : TMV)
(•—• : H_2O)



2.1.2.1.2. Activité du système de transcription-traduction

Nous avons suspecté ensuite les éléments utilisés dans le système.

* Etat fonctionnel du plasmide.

L'analyse du pattern d'électrophorèse réalisée avec le plasmide purifié (cfr p.90) et l'estimation qu'elle a donné de la taille de celui-ci, concordent entièrement avec les données relatives aux caractéristiques du pDS5/4-1.

* Activité de la polymérase d'Escherichia coli.

Avant de suspecter la qualité de la polymérase, nous avions suspecté les solutions de transcription et de traduction utilisées dans le système couplé, qui pouvaient ne pas être parfaitement adéquates pour une traduction optimale des transcripts spécifiques produits. Nous avons donc fait des essais de traduction en jouant sur les conditions ioniques d'une part, et en vérifiant d'autre part l'effet protecteur des RNAasin sur les ARNms.

a) Essai d'optimisation des conditions ioniques.

Une expérience fut menée en utilisant un aliquot d'une incubation de transcription (en présence de ^{7m}GpppA) dans un lysat de réticulocyte en utilisant du KAc 0,2 mM en concentration finale.

Les résultats se trouvent dans le tableau ci-dessous :

minutes	^{7m}G pppA	H_2O
	cpm	cpm
0	2.738	3.030
30	8.452	4.891

Ces valeurs ne permettent pas de conclure à une incorporation significative de méthionine marquée. Peut-être les conditions ioniques du lysat ne conviennent-elles pas à la traduction des ARNms particuliers produits. Des essais d'optimisation ont été réalisés.

Les expériences suivantes ont été réalisées en présence de KAc mais à des concentrations différentes : KAc Ø,1 mM
KAc Ø,3 mM

Les résutats sont les suivants :

	KAc Ø,3 mM	KAc Ø,3 mM	KAc Ø,1 mM	H_2O KAc Ø,3 mM
cpm à Ø min.	3.743	3.159	2.849	4.233
cpm à 60 min.	5.486	5.000	8.564	4.461

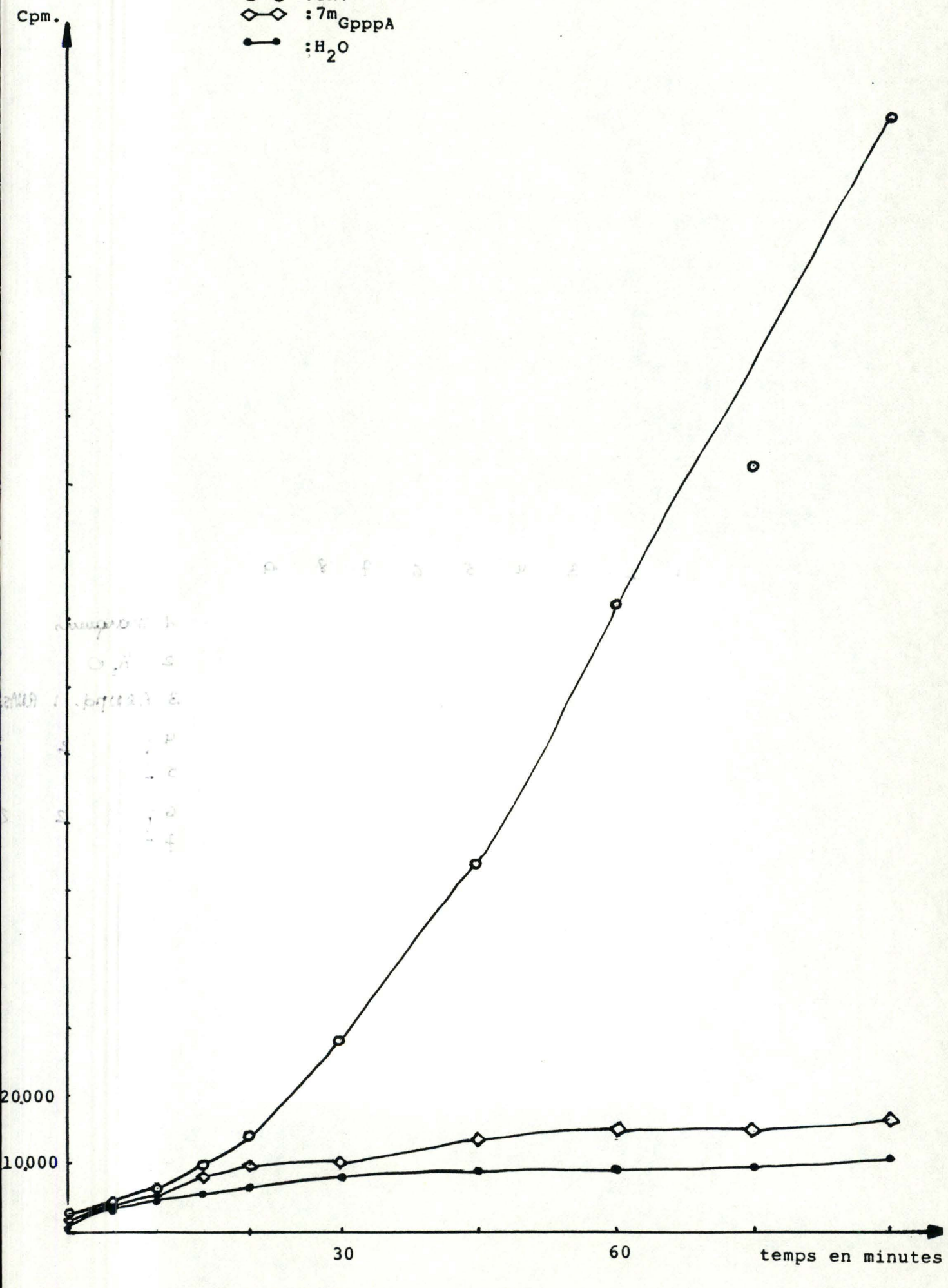
La modification des concentrations en K^+ n'apporte pas d'amélioration perceptible dans le taux d'incorporation observé.

Nous avons donc conservé les conditions de départ (Ø,1 mM final en KAc), qui donnaient les meilleurs résultats.

Les cinétiques de traduction opérée dans ces conditions avec TMV et après essai de transcript <u>in vitro</u> de pDS5/4-1, donnaient les résultats suivants :

minutes	^{7m}GpppA	TMV	H_2O
	cpm	cpm	cpm
Ø	3.754,5	3.111	987
5	5.046	4.260	3.723
10	6.025	6.128	4.809
15	8.054	9.304	5.139
20	8.622	14.177	6.817
30	10.297	27.975	8.374
45	13.081	54.051	8.496
60	15.299	97.582	8.546
75	10.465	115.112	9.484
90	11.037	130.015	10.844

fig.29. Cinétique d'incorporation de S^{35} méthionine





1 marqueurs

2 H_2O

3 ARNpd. 1 RNAS

4 } 2
5 }

6 } 2
7 }

Les contrôles TMV et H20 sont semblables à ceux d'autres cinétiques déjà réalisées. Quant à la traduction de l'ARNm coiffé ^{7m}GpppA, la valeur à 90 minutes est très proche du contrôle H20. Le problème se situe donc ailleurs. Nous avons envisagé un défaut de transcription par suite de l'inactivité de l'ARNpolymérase, ou encore un défaut de protection de l'ARN par inactivité de l'ARNasin.

b) Démonstration de l'inactivité du lot de l'ARNpolymérase

Les résultats donnés dans le tableau ci-dessous nous permettent effectivement d'avancer l'hypothèse que l'ARNpolymérase ou/et l'ARNasin sont déficient(s).

minutes	^{7m}GpppA	^{7m}GpppA	H_2O
	cpm	cpm	cpm
0	1.260	1.331	1.044
60	3.202	2.077	1.177

Pour trancher la question, nous avons ensuite réalisé le test suivant :

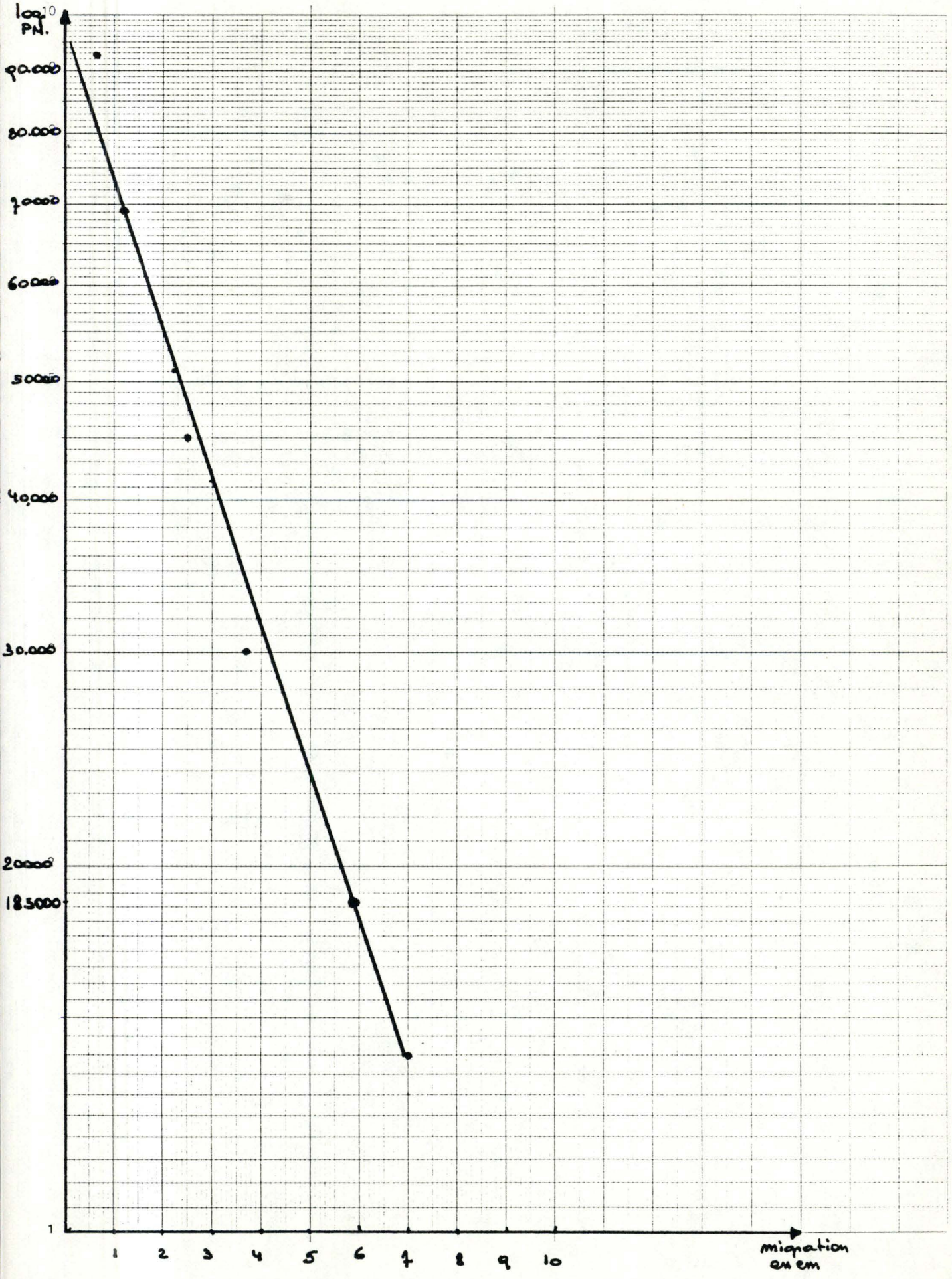
	ARNpolymér.(1) RNAsin (2)	ARNpolymér.(2) RNasin (1)	ARNpolymér.(2) RNasin (2)	H_2O
min	cpm	cpm	cpm	cpm
0	6.568	11.554	11.012	9.542
60	7.620	33.283	33.900	11.125

(1) équivaut à l'ancien lot
(2) équivaut au nouveau lot

On voit que c'était le lot d'ARNpolymérase qui était défectueux, et non la ARNasin.

Les électrophorégrammes présentés ci-dessous permettent de vérifier que le prélysozyme est produit dans le système d'un poids moléculaire de 18.500 selon l'abaque donnée ci-dessous.

Droite d'étalonnage



2.1.3. CONCLUSION DES ESSAIS PRELIMINAIRES

En somme, nous avons, lors de ces expériences préliminaires, montré que :

- la polymérase utilisée était déficiente
- le bon fonctionnement du système a été contrôlé par cinétique d'incorporation. Il permet la synthèse du produit prélysozyme de poids moléculaire déterminé.

Nous sommes donc en mesure d'éprouver l'hypothèse de l'importance de la méthylation de la coiffe dans un système couplé de transcription-traduction mis au point.

2.2. EXPERIENCES VISANT A MONTRER L'IMPORTANCE DE LA METHYLATION DE LA COIFFE

2.2.1. EXPERIENCES AVEC DES COIFFES METHYLEES ET NON-METHYLEES

^{7M}GpppA	GpppA
G	G
C	C

Des expériences préliminaires avec les différentes coiffes méthylées ou non méthylées disponibles ont été réalisées, afin de choisir la coiffe à étudier ensuite plus en détails.

Les résultats obtenus furent les suivants :

min.	^{7m}GpppA		GpppA		^{7m}GpppG		GpppG	
	cpm	cpm	cpm	cpm	cpm	cpm	cpm	cpm
0	3600	3700	3000	3900	3600	5400	3500	4100
60	24000	28000	36000	37000	15000	17000	9300	8800

min.	^{7m}GpppC		GpppC		H_2O	
	cpm	cpm	cpm	cpm	cpm	cpm
0	4.500	4.000	3.200	3.400	3.090	3.695
60	31.000	32.000	24.000	20.000	9.170	8.000

Les contrôles H2O et absence de coiffe donnent des résultats comparables to de 3000, t60 de ± 9000.

Nous en concluons que le système est dépendant de l'addition de coiffe.

La comparaison des résultats obtenus avec les différentes coiffes nous permet de voir les groupes dans lesquels l'incorporation la plus importante est obtenue; en présence de GpppA et ^{7m}GpppA.

Par la suite, nous avons choisi d'étudier l'influence de la méthylation de ces coiffes suivant l'incorporation.

Les premières données indiquent que la méthylation aurait des effets opposés pour les deux coiffes considérées (GpppA, GpppG).

Après gel d'électrophorèse, on observe une bande de poids moléculaitre de 18.500 et une autre aux environs de 16.000 plus diffuse.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1. [illegible]
2. [illegible]
3. [illegible]
4. [illegible]
5. [illegible]
6. [illegible]
7. [illegible]
8. [illegible]
9. [illegible]
10. [illegible]

2.2.2. EXPERIENCES AVEC DES COIFFES ^{7m}GpppA GpppA ^{7m}GpppG GpppG

---

^{7m}GpppA
GpppA
^{7m}GpppG
GpppG

Des transcriptions de 20 µl ont été réalisées au lieu de 10 µl pour mener 4 traductions en parallèle et assurer ainsi des conditions semblables pour des comparaisons.

cpm coups nets (1) obtenus après 60 minutes d'incubation :

n° exp. \ type de coiffe	^{7m}GpppA	GpppA	^{7m}GpppG	GpppG
1	22.430	16.968	12.661	12.700
2	24.540	17.000	13.368	12.600
3	22.821	20.000	13.078	16.000
4	24.377	19.094	10.897	15.000
	moyenne	moyenne	moyenne	moyenne
	23.542	18.265,5	12.501	14.075

(1) On a décompté les blancs 0 minutes qui sont toujours inférieurs à 3.000 cpm.

Comparaison des moyennes de ^{7m}GpppG et GpppG

a) Calcul des variances de ^{7m}GpppA et GpppA

$$S^2 = \frac{1}{N-1} SCEX$$

* ^{7M}GpppA

$$S^2 = 1.149.871,333$$

* GpppA

$$S^2 = 2.326.633$$

Test de F

$$F = \text{rapport des } S^2$$
$$= 0,5$$

$$F^{3}_{3th} \quad 0,95 = 9,28$$

F obs < Fth 0,95 ce qui permet de dire que la variabilité est la même dans les deux cas.

b) Comparaison des moyennes

$$H_0 \quad m_1 - m_0 = 0$$

$$t = \frac{\bar{x}_1 \; \bar{x}_2}{(S^2_g \; (\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})}$$

$$S^2_G = \frac{(n_1 - 1) S^2_1 + (n_2 - 1) S^2_2}{n_1 + n_1 - 2}$$

$$t = 6,931$$

$$t_{0,95} = 1,943$$

t obs > t th 0,95, ce qui permet de dire que m1 est supérieur à m2.

La moyenne obtenue dans l'expérience ^{7m}GpppA est supérieure à celle de GpppA.

Comparaison des moyennes de ^{7m}GpppG et GpppG

a) Calcul de variances de ^{7m}GpppG et GpppG

* ^{7m}GpppG $S^2 = 1.227.678$

* GpppG $S^2 = 2.875.833,3$

F obs = 0,4269

F obs < F th0,95 ce qui permet de montrer la même variabilité au niveau des expériences.

b) Comparaison des moyennes

$H_0 = m_1 - m_2 = 0$

$S^2_g = 2.051.755,667$

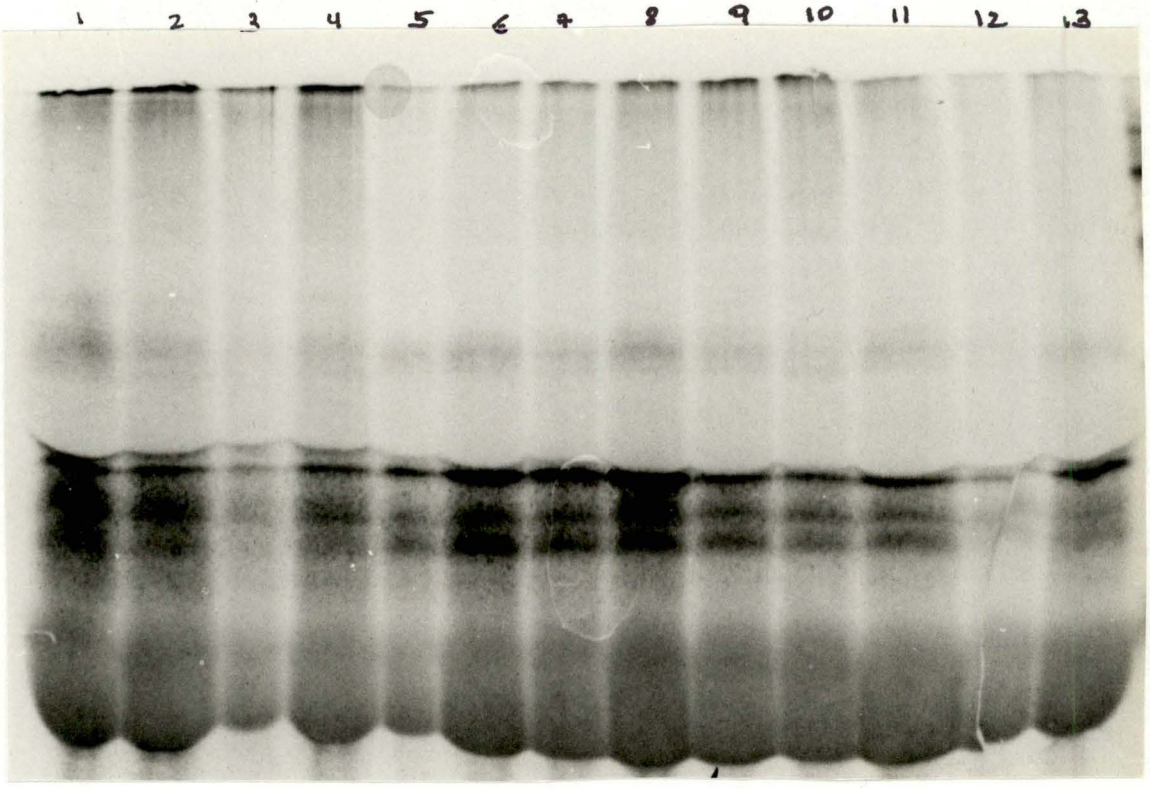
$t = -1,9033$

$t_{0,950} = -1,943$

Nous devons accepter l'hypothèse nulle et admettre que les moyennes sont semblables car t obs > t .

Il semble que dans le cas de la coiffe GpppA la méthylation influence favorablement sur l'incorporation observée.

L'examen d'électrophorégramme correspondant à ces expériences nous révèle une grande similitude du pattern.



La bande caractéristique du prélysozyme se retrouve bien marquée (cfr la flèche) dans pratiquement toutes les pistes. Deux bandes supplémentaires plus diffuses migrant à des positions correspondant à des poids moléculaires approximatifs de 16.000 et 17.500 s'observent également.

L'existence de bandes multiples peut trouver son origine soit dans une fragmentation de ARNm transcrit avant traduction, soit dans des transcriptions différentes, par exemple inactivées ou initiées à des sites distincts, soit encore dans une fragmentation des protéines traduites.

Nos données ne nous permettent pas de trancher la question.

۱۳ ۱۲ ۱۱ ۱۰ ۹ ۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱

۱۳ ۰۰۰

L'influence éventuelle des conditions de l'expérience, de la nature de la coiffe sur la stoéchiométrie des protéines obtenues, peut être étudiée par l'examen des patrons électrophorétiques.

Bien que certaines variabilités de pattern apparaissent entre les pistes (par exemple entre la piste 1 et la piste 2 ou piste 2 et piste 6), les variabilités au sein d'une même expérience interdisent de conclure à tout effet significatif de la coiffe sur la proportion relative des trois types de produits correspondant aux bandes de migrations.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons réalisé une série d'expériences recourant au système de transcription-traduction conçu par les professeurs STUEBER et BUJARD pour éprouver l'hypothèse d'une influence de la méthylation de la coiffe sur la traduction d'ARNm de prélysozyme.

Dans un premier temps, nous avons testé le système selon les prescriptions des auteurs. Par le fait que le lot d'un composant de source commerciale, l'ARN polymérase était défectueux, il a fallu procéder à une enquête laborieuse pour établir ce défaut. Une fois mis au point, le système nous a permis d'obtenir la synthèse du prélysozyme détecté par autoradiographie sur gel et quantifié par la mesure des cpm après précipitation au TCA.

Dans une série de quelques répétitions, les résultats comparés après utilisation des deux types de coiffes (A et G) à l'état non méthylé ou méthylé ont montré un effet favorable de la méthylation pour la coiffe A, et pas d'effet significatif pour le cas de la coiffe G.

D'un point de vue qualitatif global, l'incorporation avec la coiffe de type A est très supérieure à celle obtenue avec G.

Pour une raison indéterminée, une expérience préliminaire faite dans les mêmes conditions nous avait conduit à des conclusions différentes.

Les derniers résultats concordent avec des observations rapportées précédemment par le groupe de FIERS travaillant sur l'importance de la coiffe au niveau de la transcription.

Les auteurs notent que l'utilisation de la coiffe ^{7m}GpppA est à préférer à celle de GpppA lorsqu'ils procèdent à la transcription du gène lysozyme et à la traduction ultérieure dans un système in vivo.

Le fait que la méthylation de cette coiffe comme telle améliore sensiblement l'incorporation est en faveur de l'hypothèse de travail de notre mémoire, à savoir que la méthylation de la coiffe de l'ARNm, toute autre chose étant égale, influerait favorablement sur la traductibilité de celui-ci.

Bien qu'une série d'arguments plaident en faveur de cette hypothèse, la production d'une population pure d'ARNm antérieurement dépourvu de méthyl sur la coiffe constitue évidemment le matériel idéal pour trancher définitivement la question.

Il semble qu'entre nos mains le système pDS5/4-1 permette effectivement la production de transcripts pouvant être traduits dans un système de traduction acellulaire.

Toutefois, pour distinguer le niveau réellement en cause dans les différences d'efficacité de l'incorporation d'acides aminés marqués, il est indispensable de quantifier et caractériser non seulement les produits de traduction, mais aussi les trancripts eux-mêmes.

De plus, l'influence possible des précurseurs de la transcription non incorporés - les nucléotides, mais surtout les coiffes restantes elles-mêmes - sur le processus de la traduction constitue un biais certain du type d'expérience que nous avons réalisée.

A cet égard, des mesures d'incorporation d'uridine ^{32}P dans le cas d'un transcript avec ^{7m}GpppA et GpppA ont été faites.

Les résultats quantitatifs sont les suivants:

^{7m}GpppA 20.000 cpm, après 15 minutes

GpppA 10.000 cpm, après 15 minutes.

On voit donc que, dans ce cas, il semble bien que les différences résultant de la comparaison des incorporations des acides aminés dans le système de traduction acellulaire peuvent être attribuables à la seule différence de taux de transcription différents obtenus au départ des deux coiffes utilisées comme amorce.

Une analyse de la taille des transcripts sur gel aurait permis de pousser plus loin la comparaison et de répondre à la question posée sur l'origine des bandes surnuméraires observées sur le gel de protéines, mais l'expérience a avorté, par le fait d'un problème au niveau du gel.

Idéalement, l'analyse quantitative et qualitative des transcripts devrait se faire en parallèle avec la même relation à leur traduction, par exemple par double marquage.

Alternativement, on pourrait aussi songer à utiliser des sondes ADN pour quantifier l'ARN.

La purification des ARNm transcrits (par affinité, ou encore par le recours à des sondes) s'imposerait dans la mesure où l'influence des coiffes restantes dans le lysat doit être éliminée.

Ces expériences futures que nous projetions n'ont pas pu être réalisées.

La raison en a été le coût prohibitif pour le laboratoire des expériences que nous avons effectuées avec des quantités importantes de précurseurs (coiffes, nucléotides, et acides aminés marqués).

Par ailleurs, le fait que le système, même utilisé dans les conditions prescrites par les auteurs, fournisse non pas le seul prélysozyme mais également des bandes correspondant à des protéines de taille inférieure constitue, à notre sens, une limitation sérieuse à son utilisation.

Le système commercial SP6, réputé comme ayant également une haute efficacité de transcription, n'a pas été testé à ce point de vue.

BIBLIOGRAPHIE

(1) AMERSHAM 1985.
Hybond tm -mAP a novel and unique product for rapid mRNA isolation.

(2) AMERSHAM 1985.
Products for protein synthesis studies.

(3) AMERSHAM 1985.
Amprobe *tm.nucleic acid probes.

(4) AMERSHAM 1985.
SP6 System for efficient in vitro RNA synthesis.

(5) AYAD 1971.
Analytical Methods in Nucleic Acid Biochemistry, 59-63.

(6) BANERJEE, A.K., ABRAHAM, G., COLONNO, R.J., 1977.
J. Gen. Virol., 34, 1-8.

(7) BANERJEE, A.K., 1980.
Microbiological Review, 1-75.

(8) BELL, G.I., SWAIN, W.F., PICTEL, R., CORDELL, B., GOODMAN, H.M. and RUTTER, W.J. 1979.
Nature 282, 525-527.

(9) BESCHIN, A. 1983.
"Optimation d'un système de traduction acellulaire extrait de germes de blé", Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques.

(10) BLAAS, D., PATZELT, E., KUECHLER, E. 1982.
Academic Press 116, 339-348.

(11) BOEHRINGER 1985.
Manheim, colloquium No 2/1985, 4.

(12) BRAWERMAN, G. 1974.
Annu. Rev. Biochem, 43, 621-642.

(12b) BRAWERMAN, G. and DIEZ, J. 1975.
Cell 5, 271-280.

(13) BREATHNACH, R., BENOIST, C., O'HARE, K., GANNON, F., CHAMBON P. 1978.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4853-4857.

(14) BROSIUS, S., DULLT, SLEETER, D.D., and NOLLER, H.F. 1981.
J. Mol. Biol. 148, 107-127.

(15) BROT, N. 1982.
"Protein biosynthesis in Eukaryotes", NATO Advanced Study Institute Series 253-254.

(16) BUJARD, H. 1980.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press 276-280.

(16a) BUJARD, H. 1985.
Communication personnelle.

(17) BUJARD, H., BALDARI, C., BRUNNER, M., DEUSCHLE, V., GENTZ, R., HUGUES, J., KAMMERER, W. and STUEBER, D., in PAPAS, T., ROSENBERG, M. and CHIRIKJIAN, J.G.
Vol. III, Expression of Cloned Genes in Prokaryotic and Eukaryotic Cells, Elsevier North-Holland 65-88.

(18) BUTLER, Et., and CHAMBERLIN M. 1982.
J. Biol. Chem. 257, 5772-5778.

(19) CALVIN, T.I., PREECHA, K., MARVIN, R.P. 1985.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 1668-1672.

(20) CARLIN, R.K. 1978.
J. Theor. Biol., 71, 323-338.

(21) CASKEY, C.Th. 1983
DNA makes RNA makes protein, Elsevier Biomedical Press 220-225.

(22) CHAMBERLIN, M., KINGSTON, R., GILMAN, M., WIGGS, J., DEVERA, A. 1983.
Methods in Enzymology, 101, 540-568.

(23) CHAMBON, P. 1975.
Ann. Rev. Bio. Chem., 44, 613-638.

(24) CHEN, H.Z., ZUBAY, G. 1983.
Methods in Enzymology, 101, 674-690.

(25) CHURCH, G.M. and GILBERT, W. 1984.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 1991-1995.

(27) CLARK, B. 1983.
DNA makes RNA makes protein, Elsevier Biomedical Press, 213-219.

(28) CONTRERAS, R., CHEROUTE, W., DEGRAVE, W., FIERS, W., 1982.
Nucleic Acids Res., 10, 6353-6362.

(29) CLOWES, J. 1972.
"Molecular Structure of Bacterial Plasmids", Bacterial Rev., 36, 388-397.

(30) COHEN, S.N., CHANG, A.C., HSU, L. 1972.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 1078.

(31) COLSON, C., LHOEST 1982
In USDIN, F., BERCHARDT, R.T., and CREVELING, C.R. Eds, 31-37.

(32) COPPOLA, J.A., FIELD, A.S., LUSE, D.S., 1983
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 1251-1255.

(32) CORDEN, M., 1981.
Science, 209, 1406-1414.

(33) COX, K.H. et al. 1984.
Develop. Biol. 101, 485-502.

(34) DAGERT, M., EHRLICH, S.D. 1979.
Gene, 16, 23.

(35) DARNELL, J.E. 1976.
Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 19, 493-512.

(36) DARNELL, J.E. 1979.
Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 22, 327-353.

(37) DIGNAM, J.D., MARTIN, P.L., SHASTRY, B.S., ROEDER, R.G. 1983.
Methods in Enzymology, 101, 568-582.

(38) DILLON, J.A., NASIM, A., NESTMANN, E.R. 1984.
Methodology 25-30, 106-107.

(39) DIMOCK, K. and STOLTZFUS, C.M. 1978.
Biochemistry, 17, 3627-3632.

(40) DIRHEIMER, G., KEITH, G., MARTIN, R. and WEISSENBACH. 1976.
Polish Acad. Sci.., Poznan, 273.

(41) DRUMMOND, D.R., ARMSTRONG, J., COLMAN, A. 1985.
Nucleic Acids Res. 13, 20, 7375-7394.

(42) DYNAN, W.S., TJIAN, R. 1985.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Biochemistry, 316, 774-780.

(43) EESTRADIATIS, A., KAFATOS, F.C. and MANIATIS, T. 1977.
Cell, 10, 571-585.

(44) ELIAS, H.G., FRITSCH, A. 1976.
Méthodes de l'ultracentrifugation analytique.

(45) ENSINGER, M.J., MOSS, B. 1976.
J. Biol. Chem., 251, 5283.

(46) FERON Christiane 1981.
"Contribution à l'étude du mécanisme de dégradation des polysomes de cristallin de boeuf" par la RNAse pancréatique bovine", Mémoire pour l'obtention du grade de licenciée en sciences zoologiques.

(47) FIERS, W., CONTRERAS, R., DUERINCK, F., HAEGEMAN, G., ISENRENTANT, D., MERREGAERT, J., MINJOU, W., MOLEMANS, F., RAEMAECKERS, A., VANDENBERGHE A., VOLCKAERT, G. and YSEBAERT, M. 1976.
Nature (Lond.), 260, 500-507.

(48) FURUICHI, Y., LA FIANDRA, A., SHATKIN, A.J. 1977
Nature, 266 March, 235-239.

(49) GALLI-KIENLE, M., GIULIDORI, P., CATTO, E., STRAMENTINOLI, G. 1982.
USDIN, F., BOSCHARDT, R.T. and CREVELING, C.R. EDS, 613-616.

(50) GREEN, M.R., MANIATIS, T. and MELTON, D.A. 1983.
Cell, 32, 681-694.

(51) GREENBERG, J.R. 1975.
Cell. Biol., 64, 269.

(52) GRUNDBERG, MANAGO, MGROS, F. 1977.
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 20, 211-284.

(53) GUILLEY, H., JONARD, G., KUKLA, B. and RICHARDS, K.E., 1979.
Nucleic Acids Rev. 6, 1287-1308.

(54) HAMILTON, M.G., PAVLOVEC, A., PETERMANN, M.L. 1971.
Biochemistry, 10, 3424-3427.

(55) HARRIS, R.J. and PESTKA, S. 1977.
WEISSBACH, H. and PETSKA, S., EDS, Academic Press, N.Y., 413-465.

(56) HERSHEY, JWB. 1982.
Protein biosynthesis in Eukaryotes 97-99.

(56a) HIETER, P., LEGENDRE, S., LEVY, C. 1976.
J. Biol. Chem., 251, 3287.

(57) HUEBNER, D. and MATTHEWS, H.R. 1984.
Methods in molecular biology, 20, 137-144.

(58) HUNT, T. 1983
DNA makes RNA makes protein, Elsevier Biomedical Press, 205-212.

(59) JONGSTRA,J., REUDELHUBER,T.L., OUDET, P., BENOIST, C., CHAE, C.B., JELTSCH, J.M., MATHIS, D.J., CHAMBON, P. 1984.
Nature, 307, 708-714.

(60) KRIEG, P.A. and MELTON, D.A. 1984.
Nature, 308, 203-206.

(61) KAEHLER, M., COWARD, J. and ROTTMAN, F. 1977.
Biochemistry, 16, 5770-5775.

(62) KEITH, J.M. 1982.
USDIN, F., BORCHARDT, R.T. and CREDVELING, C.R., EDS 111-134.

(63) KEITH,J.M., VENKATESAN,S., GERSHOWITZ, A. and MOSS, B. 1981.
"Purification and characterization of the mRNA capping enzyme GTP : RNA guanylyltransferase from wheat germ".
Biochemistry.

(64) KEITH, J.M., GALER, D., WESTREICH 1982.
In Transmethylation, USDIN, F., BORCHARDT, R.T., and CREVELING, C.R., 341-344.

(65) KERSTEN, H. 1983.
USDIN, F., BOSCHARDT, R.T., and CREVELING, C.R., EDS 357-369.

(66) KIM, C.H., SARMA; H.R. 1977.
Nature, 270, 223-227.

(67) KONORSKA, M.M. et al. 1984.
Cell, 38, 731-736.

(68) KOURILSKY, P., CHAMBON, P. 1978
TIBS, 3, 244-247.

(69) KOZAK, M., SHATKIN, A.J. 1976.
J. Biol. Chem., 251, 4259-4266.

(70) KOZAK, M. 1978.
Cell, 15, 1109-1123.

(71) KOZAK, M. 1983.
Microbiological Reviews, 1-45.

(72) KOZARICH, J.W., DEEGAN, J.L. 1979.
J. Biol. Chem., 254, 9345-9348.

(73) KRAINER, A.R. et al. 1984.
Cell, 36, 993-1005.

(74) KRIEG, P.A. and MELTON, D.A. 1984.
Nucl. Acids Res., 12, 7035-7056.

(75) LAX, S., FRITZ, W., BROWNING, K., RAVEL, J. 1985.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 330-333.

(76) LEGON, S. 1979.
J. Md. Biol., 134, 219.

(77) LEWIN, B. 1985.
"Genes", Edition Cell, 20.

(78) LOCHT, C., BOUCHET, H., DELCOUR, J., 1982.
USDIN, F., BORCHARDT, R.T., and CREVELING, C.R., EDS,
337-340.

(79) LOCHT, C., 1984.
Thèse U.C.L., "Méthylation in vitro de la coiffe 5'-terminale de l'ARNm de la levure Saccharomyces cerevisiae au moyen d'enzymes extraits de germes de blé et de levure", Université Catholique de Louvain.

(80) LOCKARD, R.E., PIESER, L., VOURNAKIS, N.J. 1981
Gene Amplification and Analyses, 2, 231-251.

(81) LODIS H.F., ROSE J.K. 1977
J. Biol. Chem, 252, 1181-1189.

(82) MANIATIS 1982.
"DNA Cloning".

(83) MANLEY, J.L., FIRE, A., SAMUELS and SHARP, P.A. 1983.
Methods in Enzymology, 101, 568-582.

(84) MARINUS, M.G. 1983
USDIN, F., BOSCHART, R.T. and CREVELING, C.R. EDS, 249-253.

(85) MARZLUFF, W.F. and HUANG, R.C. 1984.
B.D. HEMES et S.J. HIGGINS TRL press, 89-130.

(86) McGOOKIN, R. 1984.
Methods in Molecular Biology, 12, 93-100.

(87) MELTON, D.A. 1986.
Proc. Nalt. Acad. Sci. U.S.A. in press.

(88) MELTON, D.A. et al. 1984.
Nucl. Acids Res., 12, 7057-7070.

(89) MERRICK, W.C. 1983.
Methods in Enzymology, 101, 606-615.

(90) MICARD, D.I., SOBRIER, M.I., COUDERC,J.L., DASTUGUE,B. 1985.
Analytical Biochemistry, 148, 121-126.

(91) MINJOU, W. and FIERS, W. 1978.
Int. Rev. Biochem., 17, Clark B.F.C. (Ed.), Un. Park Press, Baltimore, 75-123.

(91b) MULLER, W.E., ARENDER J., ZAHN R.K., SCHRODER, H.C. 1977.
Eur. J. Biochem., 86, 283-290.

(92) MUTHUKRISHNAN, S., BOTH, G.W., FURUICHI, Y., SHATKIN, A.J. 1975.
Nature, 255, 33-37.

(93) MUTHUKRISHNAN, S. 1982.
Messenger RNA methylation in plants. USDIN, F., BORCHARDT, R.T. and CREVELING, C.R., 329-336.

(94) NAKAZATO, H., VENKATESAN, S., EDMONS, M., 1975.
Nature, 256, 144-146.

(95) NEN RESEARCH PRODUCTS.
SP6 RNA POLYMERASE. A new method for highly efficient synthesis of (^{35}S)- and (^{32}p)- labeled RNA 30-32.

(96) OFENGAND, J. 1982.
Protein Biosynthesis in Eukaryotes NATO. Advanced Study Institutes Series, 253-254.

(97) OFENGAND, J. 1982.
Protein Biosynthesis in Eukaryotes 1-11.

(98) OHTA, N., SANDERS, M., NEWTON, A., 1975.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 2343-2346.

(99) OLLIVER, C.L., GROBLER-RABIE, A., and BOYD, C.D. 1984.
Methods in Molecular Biology, 20, 137-144.

(100) OLLIVER, C.L., BOYD, C.D. 1984.
Methods in Molecular Biology, 21, 145-155.

(101) PELLETIER, J., SONENBERG, N. 1985.
Nen Product News, 4, 1-8.

(102) PELLETIER, J., SONENBERG, N. 1985.
Cell, 40, 515-526.

(103) PERRY, R.P. 1982.
NATO. Advanced Study Institutes Series, 124-125.

(104) PETERSON, D.T., MERRICK, W. and SAFER, B. 1979.
J. Biol. Chem., 254, 2509-2516.

(105) PLOTCH, S.J., BOULOY, M., ULMANEN, J., KRUG, R.M., 1981, Cell., 23, 847-858.

(106) PRATT, J.M. 1984.
B.D. Hemes et S.J. HIGGINS, T.R.L. Press, 185-190.

(107) RICHA, A., KIM, S.H. 1978.
SC. American, 238, 52-62.

(108) ROSENBERG, M., PATERSON, B.M., 1979.
Nature, 279, 692-701.

(109) ROTTMAN, F.M., CAMPER, S.A., WOYCHIK, R.P.
Gene expression, Alfred BENZON Symposium 19, 277-290.

(110) ROYAL,A., GARAPIN,A., CAMI,B., PERRIN, F., MANDEL,J.L, LEMEUR, M., BREGEGEGRE, F., GANNON, F., LEPENNEC, J.P., CHAMBON. P., KOURILSKY, P. 1979.
Nature, 279, 125-132.

(111) RUPPRECHT,K.M., SONENBERG,N., SHATKIN,A.J., HECHT,S.M, 1981.
Biochemistry, 20, 6570-6577.

(112) SCHENBORN, E.T., MIERENDORT, R.C. 1985.
Nucleic Acids Research, 13, 6223-6236.

(113) SCHWARTZ, T., CRAIG, E., KENNELL , D. 1970.
J. Mol. Biol., 54, 299-311.

(114) SHATKIN, A.J. 1976.
Cell, 9, 645.

(115) SHATKIN, A.J. 1982.
Protein biosynthesis in Eukaryotes, NATO Advanced Study Institutes Series, 200.

(116) SHIMOTOHNO,K., KODAMA,Y., HASHIMOTO,J., MIURA,K.,1977.
Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 2734.

(117) SMITH, O.H. 1982.
USDIN, F., BORCHARDT, R.T. and CREVELING, C.R. EDS, 205-212.

(118) SONENBERG, N., MORGAN, M.A., TESTA, D., COLONNO, R.J. and SHATKIN, A.J. 1979.
Nucleic Acid. Res., 7, 15-29.

(119) SONENBERG, N., TRACHSEL, N., HECHT, S., SHATKIN, A.J., 1980.
Nature, 285, 331-333.

(120) SONENBERG, N., 1981.
Nucleic Acids Res., 9, 1643-1656.

(120b) SONENBERG,N., GUERTIN,D., CLEVELAND,D., TRACHSEL, H., 1981.
Cell, 27, 563-572.

(121) SONENBERG,N., SKUP,D., TRACHSEL, H., MILLWARD,S. 1981.
Bio. Chem. J., 256, 4138-4141.

(122) SONENBERG,N., TRACHSEL, H., HECHT, S. and SHATKIN, A., 1980.
Nature, 285, 331-333.

(123) STUEBER, D., BUJARD, H. 1981.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 78, 4936-4940.

(124) STUEBER, D., BUJARD, H. 1982.
EMBO J., 1, 1399-1404.

(125) STUEBER, D., IBRAHIMI,I., CUTTLER,D., DOBBERSTEIN, B., BUYARD, H., 1984.
EMBO J., 3, 3143-3148.

(126) SUNDQUIST, B., PERSSON, T. and LINDBERG, U., 1977.
Nucl. Acids Res., 4, 899-916.

(127) TRACHSEL,H., SONENBERG, N., SHATKIN, A.J., ROSE, J.K., LEONG, K., BERGMANN, J.E., GORDON, J., BALTIMORE, D., 1980.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 770-774.

(128) TRN7 Polymerase NEMOURS

(129) VANDENHAUTE, J., 1980.
Biologie moléculaire de la machinerie de synthèse protéique.
Rev. Quest. Sc., 151.

(130) VON GABAIN, A., BUJARD, H. 1979.
Proc. Natl. Sci. U.S.A., 76, 189-193.

(131) WOOL, I.G. 1982.
Protein biosynthesis in Eukaryotes.
NATO Advanced Study Institutes Series. 69-79.

(132) WOOL, I.G., STOFFLER, G., 1974.
Cold Spring Harbor Laboratory, 417-460.

(133) ALWINE, J.C. 1981.
Gene Amplification and Analysis, Elsevier/North-Holland, 565-569.

(134) LAPEYRE, B., AMALRIC, A., 1985.
Gene, 37, 215-220.

(135) KEVIN, S. 1983.
Nature, 305, 391-397.

(136) WALL, J., MEZL, U.A. 1984.
IRCS Medical Science, 12, 1032-1033.