



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude in vitro du rôle fonctionnel de la seconde base de la coiffe du mRNA dans un système couplé de transcription - traduction

Dessy, Francis

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.



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

**Etude in vitro du rôle fonctionnel de la
seconde base de la coiffe du mRNA dans un système
couplé de transcription - traduction.**

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

1986
Francis
DESSY

*FM

B04/1986/

10

BUMP

Au Professeur J. Delcour qui m'a accueilli dans son laboratoire,

au Docteur J. Vandehaute qui a bien voulu assurer la direction de ce mémoire, et a su par sa patience et ses conseils judicieux m'aider à mener à bien ce travail,

à mesdames R.M. Wilmet, C. Démoncourt, M. Dewez, J. Libion et mademoiselle G. Renauld pour l'aide qu'elles m'ont apportée et pour la sympathique ambiance qu'elles ont su créer tout au long de cette année,

ainsi qu'à mes parents qui m'ont permis d'entreprendre ces études ,

je tiens à exprimer toute ma gratitude.

LISTE DE ABBREVIATIONS

A₆₀₀: Absorbance à 600 nm

ATP: Adénosine triphosphate

bla: Gène codant pour la β lactamase

BET: Bromure d'ethidium

cat: Gène codant pour la chloramphénicol acétyl transférase

Coiffe A: Coiffe dont la seconde base est l'adénine

Coiffe G: Coiffe dont la seconde base est la guanine

Coiffe C: Coiffe dont la seconde base est la Cytidine

Coiffe U: Coiffe dont la seconde base est l'uridine

cpm: Coups par minute

CTP: Cytosine triphosphate

d: Dalton

DMSO: Diméthyl sulfoxyde

DNA: Acide desoxyribonucléique

D.O.: Densité optique

DTT: Dithiothréitol

EDTA: Ethylène diamine tétra acétate

EGTA: Ethylène glycol bis (β - aminoéthylether) - N,N' - tétra acétate

GTP: Guanosine triphosphate

KAc: Acétate de potassium

Mg Ac: Acétate de magnésium

⁷mG: 7 - méthyl guanosine

mRNA: RNA messenger

NTP: Nucléotide triphosphate

pDS...: Plasmide Dobberstein Stueber ...

PM ou MW: Poids moléculaire

RNA: Acide ribonucléique

RNA pol.: RNA polymérase

RNAsin: Inhibiteur de RNase

RNAse: Ribonucléase

rNTP: Ribonucléotide triphosphate

rpm: Rotations par minute

rRNA : RNA ribosomique

SDS: Sodium dodécyl sulfate

STA: Système de traduction acellulaire

TCA: Acide trichloroacétique

TEMED: N,N,N',N' - Tetra methyl - éthylènediamine

TMV: Virus de la mosaïque du tabac

tRNA: RNA de transfert

UTP: Uridine triphosphate

Les autres abréviations sont définies dans le texte.

TABLE DES MATIERES

I) INTRODUCTION GENERALE

- 1) La synthèse protéique.
- 2.) Le contrôle au niveau de la transcription.
 - 2.1.) La RNA polymérase.
 - 2.2.) Les sites promoteurs.
- 3.) La traduction, contrôle particulier chez les eucaryotes.
 - 3.1.) Les ribosomes.
 - 3.1.1.) Structure générale et constitution.
 - 3.1.2.) Fonctions.
 - 3.2.) Les mRNA.

II) DONNEES ACTUELLES SUR LE COIFFAGE DES mRNA.

- 1.) Coiffe et coiffage.
 - 1.1.) Formation et structure.
 - 1.2.) Rôles.
 - 1.3.) Mode d'action.
- 2.) Approche in vitro du rôle de la coiffe.
 - 2.1.) Transcription in vitro.
 - 2.1.1.) Systèmes eucaryotiques.
 - 2.1.1.1.) Transcription de gènes eucaryotiques dans des systèmes reconstitués.
 - 2.1.1.2.) Transcription dans des extraits cellulaires totaux.
 - 2.1.1.3.) Transcription dans le système viral de la vaccine.
 - 2.1.2.) Systèmes procaryotiques.
 - 2.1.2.1.) Système SP6.
 - 2.1.2.2.) Système pDS... (Stueber (1984)).
 - 2.2.) Traduction in vitro.
 - 2.2.1.) Lysat de réticulocytes de lapin.
 - 2.2.2.) Extrait de germes de blé.
 - 2.2.2.1.) Préparation.
 - 2.2.2.2.) Critique.

III) BUT DU TRAVAIL.

IV) MATERIEL ET METHODES.

- 1.) Préparation du plasmide.

- 1.1.) Transformation de *E. coli* par le plasmide .
 - 1.1.1.) Croissance des bactéries (batch culture).
 - 1.1.2.) Transformation proprement dite.
- 1.2.) Amplification du plasmide.
- 1.3.) Récolte des plasmides par la méthode de la lyse claire.
 - 1.3.1.) Lyse.
 - 1.3.2.) Gradient de CsCl.
 - 1.3.3.) Elimination du BET et du CsCl.
 - 1.3.4.) Concentration du DNA.
- 1.4.) Vérification de la qualité du plasmide.
 - 1.4.1.) Préparation du gel.
 - 1.4.2.) Préparation des échantillons.
 - 1.4.3.) Coloration du gel.
- 2.) Analyse des protéines marquées (par ^{35}S méthionine).
 - 2.1.) Précipitation au TCA et comptage de la radioactivité.
 - 2.2.) Electrophorèse.
 - 2.2.1.) Préparation du gel.
 - 2.2.2.) Préparation des échantillons.
 - 2.2.3.) Coloration du gel.
 - 2.2.4.) Autoradiographie.
- 3.) Analyse des mRNA marqués.(par α - ^{32}P - UTP).
 - 3.1.) Précipitation au TCA.
 - 3.2.) Electrophorèse.
 - 3.2.1.) Préparation du gel.
 - 3.2.2.) Préparation des échantillons.
 - 3.2.3.) Mise en évidence des bandes de RNA.
- 4.) Purification du DNA par chromatographie sur colonne NENSORB₂₀.

V) RESULTATS ET DISCUSSION.

- 1.) Préparation du plasmide .
 - 1.1.) Croissance de la souche *E. coli* C600.
 - 1.2.) Estimation de la quantité de plasmide nécessaire à la transformation.
 - 1.3.) Transformation par pDS5/4-1.
 - 1.4.) Amplification.
 - 1.5.) Récolte du plasmide.
 - 1.6.) Verification de l'état du plasmide.
- 2.) Effet global de la coiffe: transcription et traduction couplées .
 - 2.1.) Définition préliminaire des conditions expérimentales.

- 2.1.1.) Conditions de transcription.
- 2.1.2.) Conditions de traduction.
- 2.1.3.) Conditions de comptage.
- 2.2.) Résultats négatifs.
- 2.3.) Tests additionnels.
 - 2.3.1.) Vérification de la fonctionnalité du STA.
 - 2.3.2.) Mise en cause du système de transcription.
 - 2.3.2.1.) Hypothèse d'un inhibiteur sur la transcription.
 - 2.3.2.2.) Hypothèse d'un inhibiteur sur la traduction.
- 2.4.) Conclusion
- 3.) Effet particulier de la coiffe sur la transcription.
 - 3.1.) Définition préliminaire des conditions expérimentales.
 - 3.1.1.) Conditions de comptage.
 - 3.1.2.) Conditions de marquage.
 - 3.1.3.) Cinétique de transcription.
 - 3.1.4.) Conclusion.
 - 3.2.) Etude de l'influence de la nature de la coiffe sur la transcription.
 - 3.2.1.) Etude quantitative au niveau de l'incorporation.
 - 3.2.2.) Etude qualitative de la taille des transcrits.

VI) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

VII) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

I) INTRODUCTION GENERALE

1) La synthèse protéique

Le processus de la synthèse protéique requiert le passage de l'information génétique de sa forme "de stockage", c'est - à - dire le DNA, vers sa forme active, c'est - à - dire la séquence d'acides aminés (protéines) en passant par une forme intermédiaire : le RNA.

Les mécanismes régissant le passage d'une forme à l'autre sont :

- La transcription :

Réalisée par une RNA polymérase qui, grâce à l'intervention de différents facteurs protéiques, va se fixer sur un des brins du DNA et catalyser l'association, par liens phosphodiester, de ribonucléotides correspondant à la séquence du DNA servant de modèle.

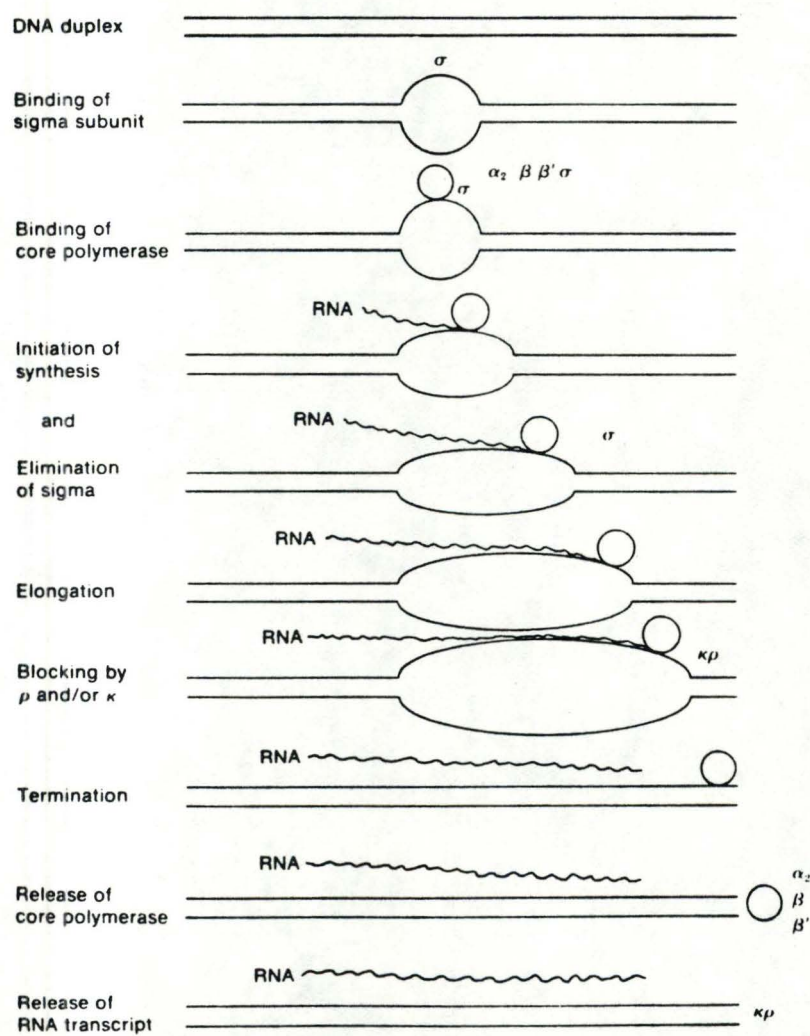


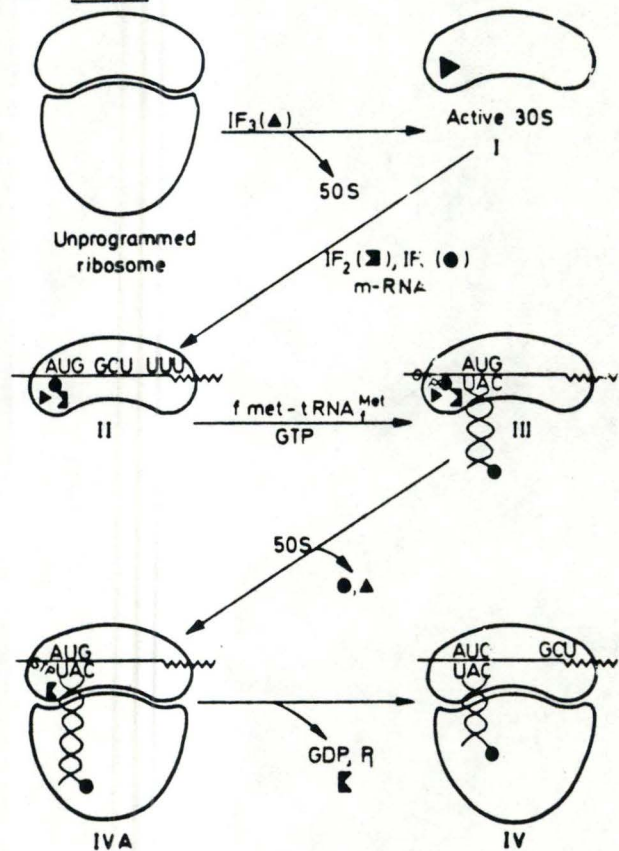
FIGURE 111
FACTORS THAT INFLUENCE TRANSCRIPTION
Recognized steps in transcription:
1 Binding of RNA polymerase to DNA templates
2 Initiation of chain growth
3 Chain elongation
4 Termination of chain growth and release of RNA polymerase
FACTORS:

Sigma (σ): essential for the identification by the polymerase of initiation sites on the template. The σ subunit is inert when separated from the polymerase complex
Omega (ω): present in some preparations of *E. coli* polymerase but absent in others; its function is unknown, but it is suspected of being essential to chain elongation.
Rho (ρ): function unknown; suspected of influencing chain termination.
Kappa (κ): function unknown, suspected of influencing chain termination.

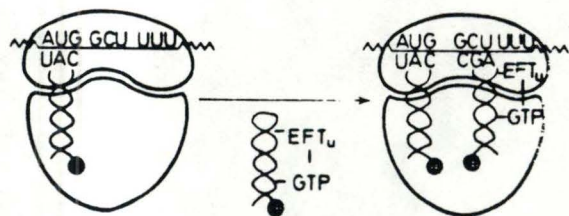
fig. 1: Mécanismes de la transcription.

(Woodward & Woodward (1977))

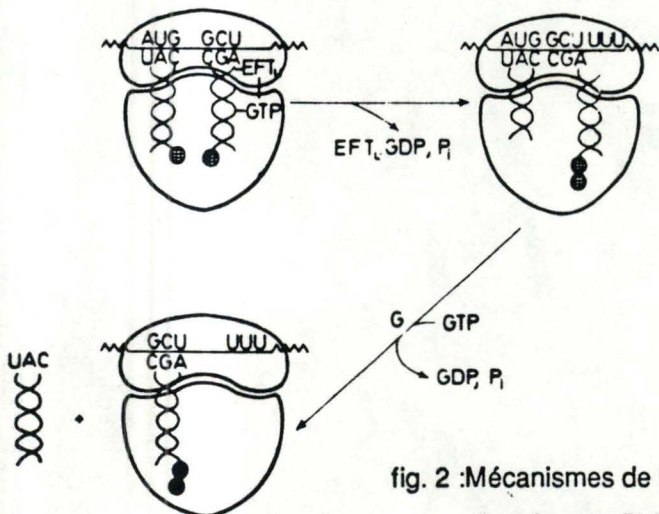
(a) INITIATION



(c) RECOGNITION OF INTERNAL CODONS

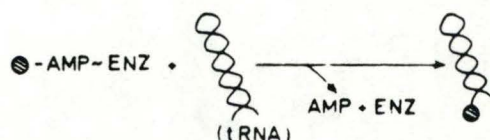
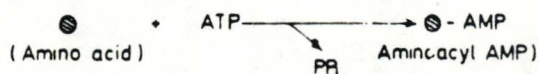


(d) PEPTIDE BOND FORMATION, TRANSLOCATION

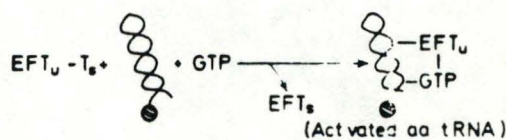
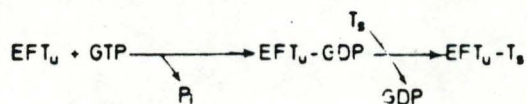


(b) AMINO ACID ACTIVATION AND AMINOACYL tRNA FORMATION

(i) Formation



(ii) Activation of aminoacyl tRNA by complex formation



(e) TERMINATION

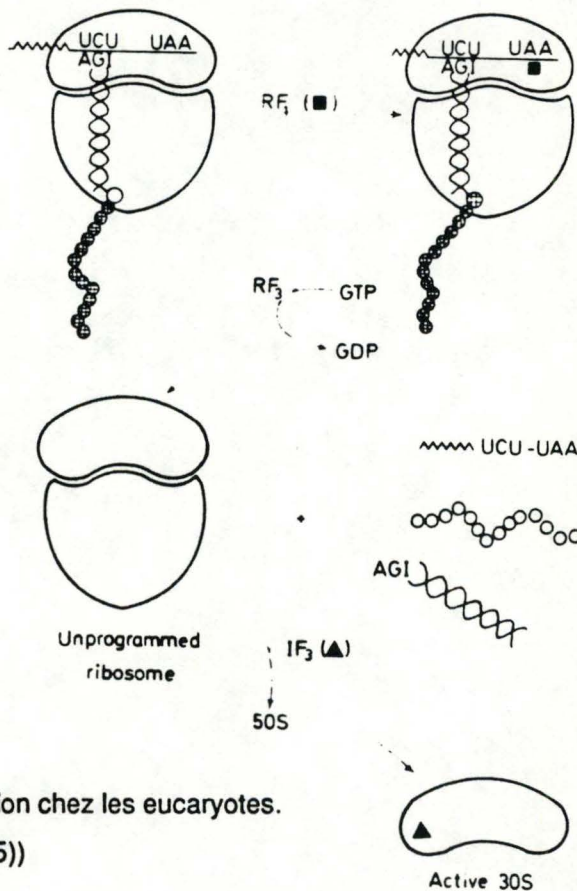


fig. 2 : Mécanismes de la traduction chez les eucaryotes.
(kornberg & Phillips (1975))

- La traduction:

Faite grâce aux ribosomes qui , aidés par d'autres facteurs protéiques , vont assembler les acides aminés en chaîne et ce , conformément aux instructions données par le mRNA.

Mais , une partie seulement du potentiel DNA étant exprimée par la cellule à un moment donné, les mécanismes de régulation, et principalement ceux opérant à la transcription , seront capitaux pour le contrôle de l'expression génique.

2)Le contrôle au niveau de la transcription

Ce contrôle va surtout s'exercer à la phase initiale de la transcription :

- Au niveau de la RNA polymérase elle - même.
- Au niveau du site de fixation de cette RNA polymérase.

2.1) La RNA polymérase :

La RNA polymérase fut découverte en 1959 par Weiss et Gladston dans le foie de rat (68). Mais , ces RNA polymérases se sont avérées difficiles à purifier (on ne parvenait pas à les débarasser du DNA auquel elles étaient associées) . Plus tard , une forme hautement purifiée en fut obtenue à partir de bactéries diverses (*Escherischia coli* , *Micrococcus* , *azotobacter*) (19,52,32).

Chez *E.coli* , un seul type de RNA polymérase est responsable de toutes les synthèses de RNA (mRNA, tRNA, rRNA).

Cette polymerase est composée de 5 sous-unités.L'enzyme complet (holoenzyme) a un poids moléculaire de 500.000 d.

Ses 5 sous-unités sont :

2 α P.M.= 44.000 d.

1 β P.M.= 155.000 d.

1 β' P.M.= 160.000 d.

1 σ P.M.= 70.000 d.

On doit distinguer deux parties dans cette molécule:

- le core ($\alpha_2\beta\beta'$) qui a pour fonction :

- la fixation du DNA matriciel
- la catalyse de l'élongation du mRNA (formation des liens

phosphodiesters)

- le facteur σ qui permet au core de reconnaître les signaux chimiques qui marquent le début de la transcription d'un gène ou d'un groupe de gènes (initiation).

2.2) Les sites promoteurs :

La RNA polymérase de *E.coli* possède une grande affinité pour le DNA, quelle qu'en soit l'origine biologique. Ainsi, lorsqu'on étudie l'attachement de la RNA polymérase sur un brin de DNA (51), on se rend compte que toutes les molécules enzymatiques fixées ne participent pas nécessairement à la synthèse de nouvelles chaînes de RNA. Il faut donc que certains sites d'attachement aient une propriété en plus : ils sont PROMOTEURS.

La fixation de la RNA polymérase sur ces sites promoteurs, les protège de la digestion par la DNAase I. Cette propriété a permis de les étudier :

Chez *E.coli*, la région protégée (p-DNA =protected DNA) est de 42 nucléotides et centrée sur le site d'initiation de la transcription. Ces p-DNA ont été séquencés pour la première fois par Schaller et al (1975) et Pribnow (1975). Ils mirent en évidence une homologie de séquence entre les promoteurs étudiés, centrée sur la position -10 : TATAAT (=Pribnow box). Une autre, centrée sur la position -35 : TTGACA fut découverte plus tard.

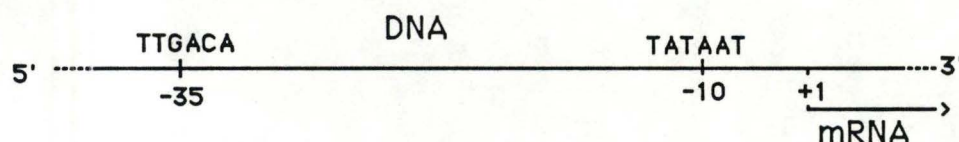


Fig.3 disposition des sites promoteurs de transcription chez E.coli

C'est l'addition de σ qui assure la liaison spécifique (=reconnaissance) et stable (=fixation) de la RNA polymérase aux sites promoteurs pour former le complexe de préinitiation.

On sait maintenant que c'est le core ($\alpha_2 \beta\beta'$) de l'enzyme qui est responsable de l'attachement au DNA, car un core se fixe même si σ est absent, alors que l'inverse n'est pas vrai. La sous-unité β' est directement impliquée dans l'attachement core/DNA, alors que la sous-unité β est, elle, impliquée dans la liaison core/ σ .

Hinckel et Chamberlain (1970), ont montré que l'association core/DNA se réalise en des sites non

spécifiques et est très rapidement réversible. C'est l'addition du facteur σ qui stabilise la liaison. On a proposé 2 mécanismes pour expliquer l'effet stabilisateur de σ :

- 1) σ contiendrait un site de reconnaissance pour la séquence faisant fonction de promoteur. Ainsi, une fois qu'il est arrivé sur ce site promoteur, l'enzyme est activé et commence à travailler.
- 2) En s'attachant sur le core, σ y provoquerait un changement allostérique lui permettant de se fixer sur le promoteur.

Mais, quel que soit le mode d'action de σ , c'est l'intensité de l'interaction polymérase/DNA qui va déterminer ce qu'on appelle la "force du promoteur" c'est-à-dire, la capacité qu'il aura, mis en présence d'une polymérase, d'initier la transcription. Ceci est très important pour le contrôle de la transcription : plus un promoteur sera fort, plus le gène qu'il contrôle sera exprimé.

Le contrôle exercé au niveau de la transcription n'est cependant pas suffisant. Il existe d'autres mécanismes.

3.) La traduction, contrôle particulier chez les eucaryotes.

Des mécanismes post-transcriptionnels contrôlant l'expression génique chez les eucaryotes, la traduction est sans aucun doute le plus important. En effet, le fait que chez les eucaryotes, à l'inverse de ce qui se passe chez les procaryotes, la traduction s'effectue dans un compartiment cellulaire séparé de celui où se fait la transcription, permet l'existence d'un contrôle de l'utilisation des transcrits produits dans le noyau et exportés dans le cytoplasme.

C'est au niveau de la stabilité et de la traductibilité des mRNA que la traduction est modulée chez les eucaryotes via les interactions fonctionnelles entre le mRNA et les ribosomes.

C'est la structure et la fonction de ceux-ci que nous considérerons brièvement ci-dessous.

3.1) Les ribosomes

3.1.1) Structure générale et constitution

Aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, les ribosomes sont formés par deux sous-unités : une grosse et une petite, constituées de rRNA et de protéines. Bien que leur tailles soient différentes, les ribosomes procaryotiques et eucaryotiques présentent une similitude de forme

remarquable.

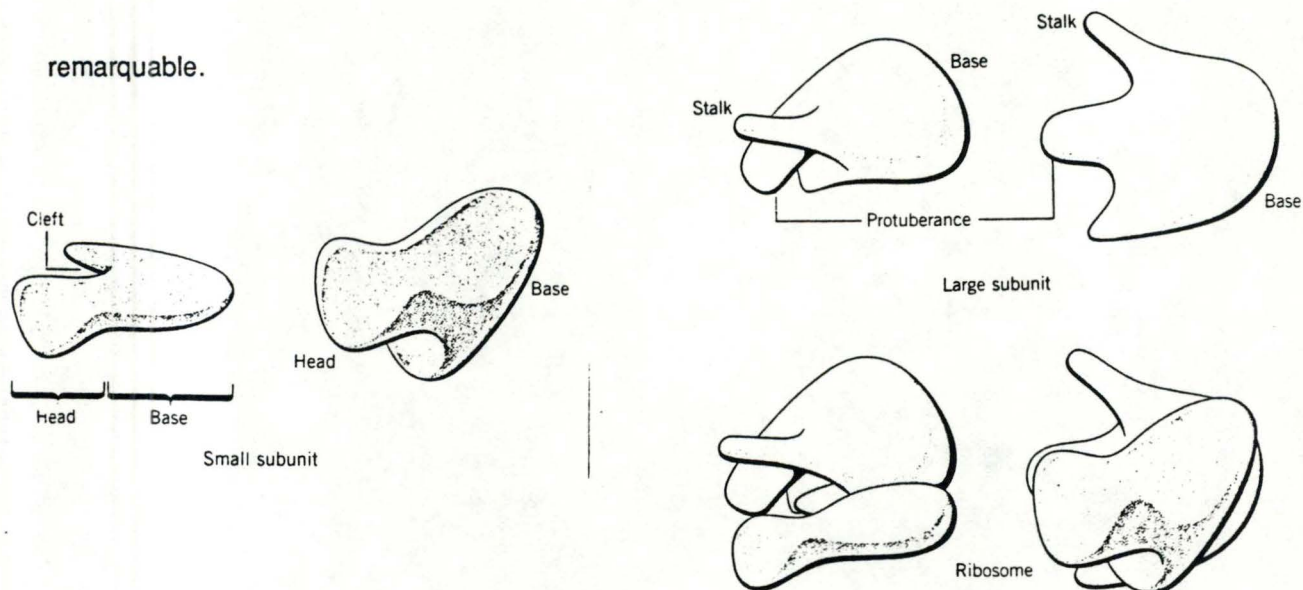


fig.4 : Forme des ribosomes procaryotiques. (Lewin (1984)).

	Ribosome	Small Subunit	Large Subunit
Sedimentation	80S	40S	60S
Mass, daltons	4,420,000	1,400,000	2,820,000
RNA		18S = 1900 bases	28S = 4700 bases
Major			5.8S = 160 bases
Smaller			5S = 120 bases
Mass of RNA		700,000	1,820,000
Proportion of mass	60%	50%	65%
Proteins		33 polypeptides	49 polypeptides
Mass of protein		700,000	1,000,000
Proportion of mass	40%	50%	35%

'tableau 1: Composants des ribosomes cytoplasmiques du foie de rat.

	Ribosome	Small Subunit	Large Subunit
Sedimentation	70S	30S	50S
Mass, daltons	2,520,000	930,000	1,590,000
RNA		16S = 1541 bases	23S = 2904 bases
Major			5S = 120 bases
Smaller			
Mass of RNA		560,000	1,104,000
Proportion of mass	66%	60%	70%
Proteins		21 polypeptides	31 polypeptides
Mass of protein		370,000	487,000
Proportion of mass	34%	40%	30%

tableau 2 : Composants des ribosomes de *E. coli*.

3.1.2) Fonctions

Ils servent à décoder le mRNA et à synthétiser les peptides . C'est-à-dire qu'en interagissant avec le mRNA , ils vont permettre la fixation des aminoacyl-tRNA correspondant aux triplets codants du messenger et l'assemblage séquentiel des acides aminés former une chaîne peptidique. La différence fonctionnelle essentielle entre les procaryotes et les eucaryotes , réside dans la phase d'initiation :

- Chez les procaryotes , le ribosome peut initier sur des AUG situés à l'intérieur de la molécule de mRNA.
- Chez les eucaryotes , la traduction débute obligatoirement au premier AUG coté 5' terminal.

Cette propriété remarquable des mRNA eucaryotiques est à mettre en relation avec certaines caractéristiques particulières de leur structure.

3.2) Les mRNA

Le "messenger" porte l'information génétique sous forme de triplets permettant la synthèse séquentielle d'une protéine par les ribosomes. Il existe une différence majeure entre les mRNA procaryotiques et eucaryotiques :

Alors que les messagers procaryotiques portent habituellement l'information correspondant à plusieurs protéines (plusieurs "messages" = messenger polycistronique), les messagers eucaryotiques sont toujours monocistroniques. Ce monocistronisme fonctionnel trouve son origine dans les caractéristiques structurales du mRNA.

– Structure générale des mRNA.

Après la transcription , le RNA n'est pas immédiatement fonctionnel , il doit subir un processus de maturation car il se présente alors sous forme d'un hnRNA "heterogenous nuclear RNA" beaucoup plus grand et plus instable que le mRNA correspondant . La maturation comportera l'excision de parties de séquence ribonucléotidiques (les introns) au moyen de ribonucléases particulières. Les exons ainsi isolés , sont réassociés ce qui confère à la molécule de mRNA sa taille finale. Plusieurs autres modifications post - transcriptionnelles (coiffage, méthylation, polyadénylation,...) achève la constitution définitive du messenger eucaryotique mûr.

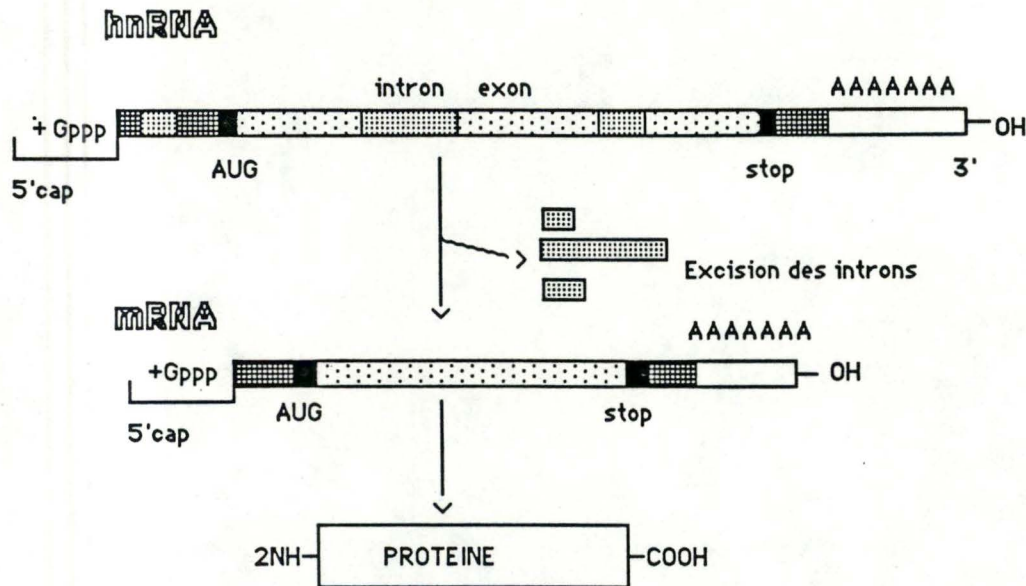


fig.4 Maturation des RNA eucaryotiques (d'après: molecular biology of the cell . Garland publishing, Inc.1983)

Le messenger ainsi constitué comprend:

1) - Une région 3' terminale (trailer) non codante. Elle débute par le codon "non sense" qui termine la région codante et s'achève par une chaîne de A (poly-A) ajoutée au RNA, dans le noyau cellulaire, après la transcription, par une poly-A polymérase.

Ce poly-A joue un rôle stabilisateur pour certains mRNA, mais d'autres semblent en être dépourvus. On connaît peu de chose sur la région trailer, mais il est probable qu'elle ait un rôle à jouer lors de la traduction, car elle tolère mal les mutations.

2) - Une région codante.

Monocistronique chez les eucaryotes. Elle débute par un codon initiateur (AUG) qui, très généralement, est le premier AUG rencontré à partir de l'extrémité 5' de la molécule.

3) - Une région 5' non codante (leader).

Elle débute par une structure spéciale: la coiffe, dont nous parlerons plus tard.

Le reste de la séquence pourrait influencer la reconnaissance du codon initiateur AUG par les ribosomes. Une augmentation de la taille de cette séquence leader n'a pas grande importance, il est cependant évident que plus elle sera longue, plus la probabilité de voir apparaître un codon AUG parasite augmente et plus la structure secondaire risque d'être importante et de jouer un rôle, peut-être néfaste à l'association des ribosomes. Ils ont d'ailleurs montré, qu'une complexification de la structure secondaire de cette région leader diminuait l'efficacité de traduction de certains mRNA eucaryotiques (42).

Qui ça?

Pour ce qui est de la structure primaire de cette région , on y retrouve quelques constantes :

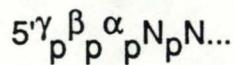
- Elle contient très rarement un AUG. S'il existe , il est rapidement suivi d'un codon "non sense" (stop).
- Le codon AUG terminant cette région non codante est localisé dans un contexte de bases relativement conservées (...ANNAUGN...).
- Les séquences leaders sont souvent très riches en A et U et pauvres en G.

II) Données actuelles sur le coiffage des mRNA.

1) Coiffe et coiffage

1.1) Formation et structure.

Nous avons mentionné plus haut qu'une des caractéristiques des mRNA eucaryotiques était d'être "coiffés" à leur extrémité 5'. Cette coiffe est mise en place au tout début de la transcription : celle-ci débute par l'association d'un ribonucléotide à un nucléoside 5' triphosphate.



Très vite, le phosphate terminal (γ) est éliminé sous l'action d'une pyrophosphatase. Le diphosphate restant réagit avec une guanosine triphosphate (GTP), sous le contrôle d'une guanylyl transférase, pour former, après méthylation(s), la coiffe proprement dite, où la guanine terminale se trouve en orientation inverse par rapport aux autres nucléotides.

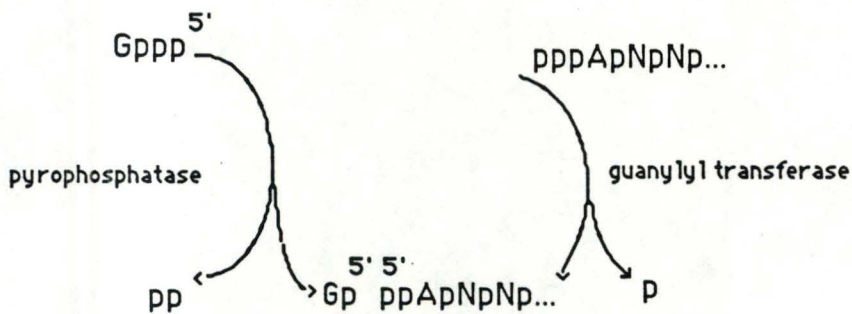


fig. 6 Formation de la coiffe

Cette coiffe sert de substrat à différentes méthyl transférases, ce qui permet de différencier 3 types de coiffes :

- coiffe 0 : méthylée en position 7 de la guanine terminale
- coiffe 1 : coiffe 0 méthylée en position 2' du ribose du second

nucléotide

- coiffe 2 : coiffe 1 méthylée en position 2' du ribose du 3^e nucléotide .

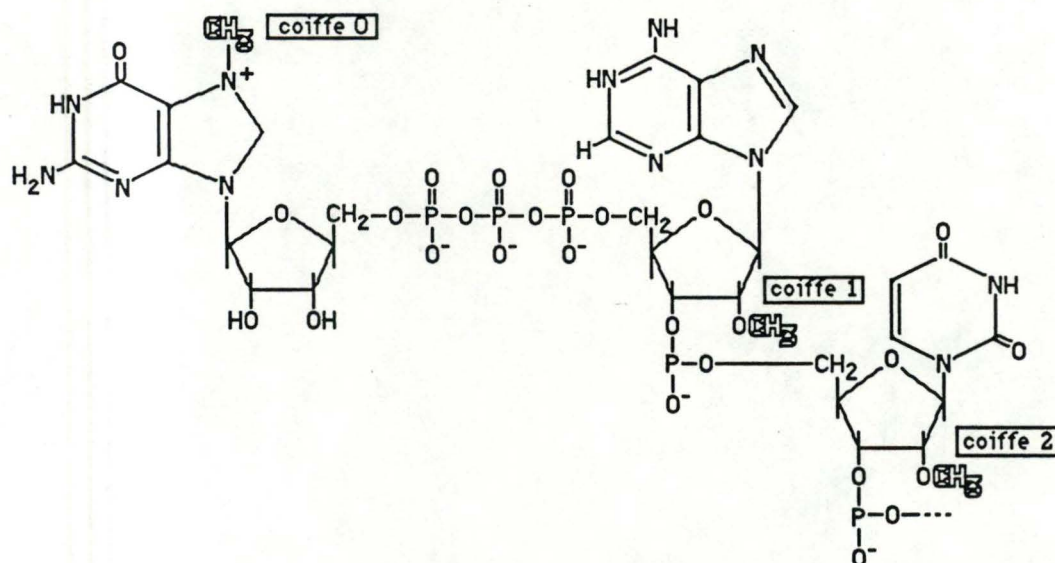


fig 7 : Méthylations de la coiffe

1.2) Rôles

On admet généralement que la coiffe a 2 rôles principaux :

- 1- Elle facilite l'entrée du mRNA dans le complexe d'initiation avec les ribosomes eucaryotiques.
- 2- Elle protège les mRNA contre la dégradation par les RNAases cellulaires.

Ceci a été mis en évidence par différents groupes de chercheurs. Ainsi, Patterson et Rosenberg (1979), on fait traduire des mRNA procaryotiques (non coiffés) par des systèmes de traduction acellulaire eucaryotiques (extraits de germes de blé et lysats de réticulocytes de lapins). Ils constatèrent que ces systèmes nécessitaient une grande quantité de mRNA procaryotiques pour donner lieu à une synthèse protéique détectable. Mais, si les mRNA sont préparés *in vitro* en présence de S - adénosyl - méthionine (S . A . M .) (donneur de méthyles nécessaire pour faire des coiffes fonctionnelles), la traduction est beaucoup plus efficace (x3) dans l'extrait de germes de blé car ce système a une action endogène de coiffage. Muthukrishnan et.al. (1975) ont montré que la traductibilité, *in vitro*, de mRNA dont la coiffe a été détruite par β -élimination au periodate et à l'aniline est réduite de plus ou moins 85%.

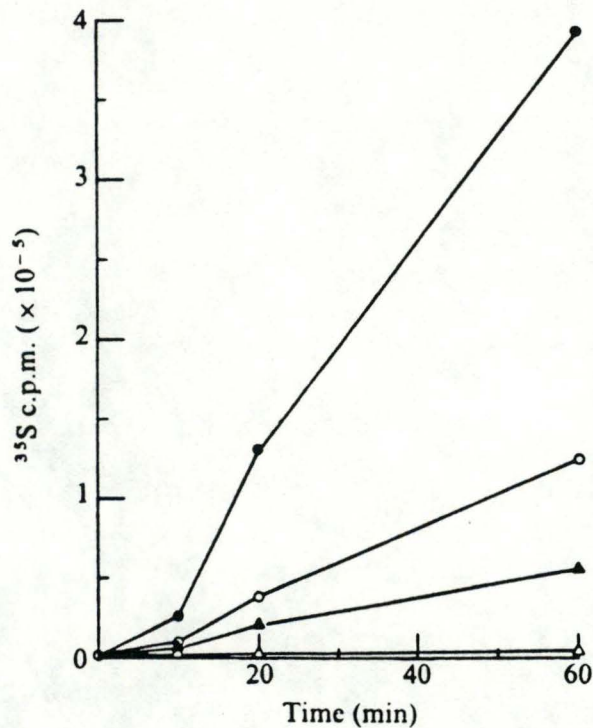


Fig. 4 Effect of removal of 5'-terminal m⁷G on the ability of reovirus mRNA to stimulate protein synthesis. Methylated mRNA was synthesised *in vitro* with purified reovirus³. A sample of this RNA was oxidised with 10 mM potassium periodate, and the 5'-terminal m⁷G was removed by incubation for 2 h at room temperature with 0.33 M aniline^{11,18}. Equal amounts of untreated and treated RNA were used to programme polypeptide synthesis in wheat germ cell-free extracts as described⁵. Incorporation of ³⁵S-methionine into acid-precipitable material was determined. Untreated mRNA in the presence of 160 μM SAH (●); β-eliminated mRNA with 160 μM SAH (▲) or 2 μM SAM (○); and no added mRNA (△).

fig. 8 : Effet de la coiffe sur la traductibilité. (Muthukrishnan (1975)).

C'est au niveau de la liaison avec les ribosomes que la sélection des mRNA coiffés correctement se fait. Grâce à l'utilisation d'analogues de la coiffe, Hickey et al. (1976) ont montré que c'est la 7-méthyl-guanosine-5'-monophosphate qui est nécessaire à la liaison au ribosome. En effet, ajoutée à un système de traduction acellulaire, la 7mG5'p inhibe la synthèse protéique (il y a compétition avec les mRNA coiffés pour se fixer sur les ribosomes).

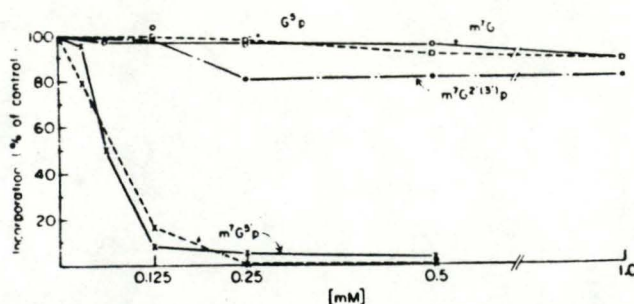


FIG. 1. Inhibition of translation of rabbit globin mRNA by m^7G^5p . The incubations were carried out in the wheat germ cell-free system as described in *Materials and Methods*. Aliquots (5 μ l) were sampled in duplicate after 60 min at 24°. Globin mRNA was added at 13 μ g/ml in all incubations except those measuring endogenous incorporation (x--x). The concentration of the guanosine nucleotides added is indicated on the abscissa. Translation in the presence of the nucleotides is expressed as % of the untreated control; the endogenous incorporation of the control was 1160 cpm. The control incorporation with globin mRNA added was 37,000 cpm.

fig.9: Inhibition de la synthèse protéique *in vitro* par des analogues de la coiffe.

Le rôle stabilisateur de la coiffe a été démontré par Furuichi et al. (1977). Ils injectèrent des mRNA, marqués au ^{32}P , coiffés et non coiffés dans des oocytes de Xénope et quantifièrent la radioactivité restant après différents intervalles de temps : après 8h., ils retrouvèrent encore 55% des mRNA coiffés alors que seulement 25% des mRNA non coiffés étaient détectables.

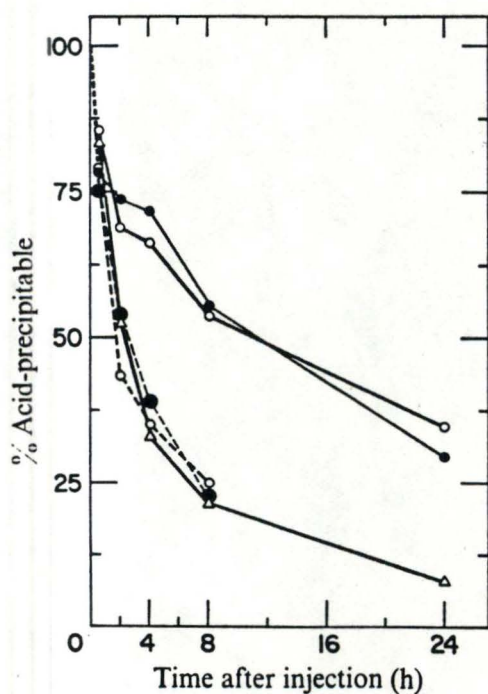


Fig. 1 Degradation of reovirus mRNA injected into *X. laevis* oocytes. Reovirus mRNA was synthesised *in vitro* by the virion-associated RNA polymerase in the presence of $\alpha\text{-}^{32}P\text{-UTP}$ in conditions¹¹ that yielded ^{32}P -labelled products (final specific activity = 1.2×10^6 c.p.m. per μ g RNA) containing 5'-terminal 94% ppG (with 6% GpppG), 93% GpppG (with 7% ppG), or >94% m^7GpppG^m . Aliquots of the last two samples were oxidised with periodate and treated with aniline to obtain mRNA with 5'-terminal pppG and pppG^m (ref. 21). The β -elimination was >90% complete as monitored with 3H -methyl-labelled mRNA. RNAs were purified by Sephadex G-100 gel filtration, passed through sterile 0.22- μ m filters, reprecipitated with ethanol and dissolved in H₂O at concentrations of 3.3 μ g μ l⁻¹. For each time point, 10 oocytes were injected with 50 nl of RNA solution per oocyte and incubated at room temperature in 5 ml of amphibian media consisting of 15 mM Tris buffer pH 7.4, 88 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂ and 0.8 mM MgCl₂ as suggested by Dr L. Burzio, Rockefeller University. At the indicated times, oocytes were removed, washed three times with 2 ml of media, resuspended in 0.2 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.6 containing 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, and 0.5% sodium dodecyl sulphate and homogenised in a Dounce homogeniser. The lysates were extracted with an equal volume of redistilled, H₂O-saturated phenol, centrifuged (3000 r.p.m., 10 min), and the aqueous layers were assayed for total and acid-precipitable radioactivity by counting aliquots directly in Aquasol and on Millipore filters after precipitation in 5% trichloroacetic acid. Because the recovery of intracellular radioactivity varied (23-79% of the estimated amount of micro-injected mRNA) presumably due to leakage, values were normalised by expressing them as a percentage of recovered c.p.m. that were acid-precipitable. mRNAs with 5'-terminal m^7GpppG^m (●), GpppG (○), ppG (△), pppG^m (●-●) and pppG (○-○).

fig. 10 : Effet stabilisateur de la coiffe dans les oocytes de *Xenope*. (Furuichi (1977))

Ceci montre , de plus , que c'est le blocage de l'extrémité 5' de la guanosine qui est nécessaire pour la protection. La méthylation ne joue pas de rôle ici.

Des expériences de Hickey et. al. et de Furuichi et. al. , on retire que la stabilité et la traductibilité des mRNA ne sont pas directement liées , puisque la guanosine terminale seule suffit à assurer la stabilité du messenger alors qu'elle ne permet pas la fixation au ribosome.

La dégradation des mRNA non coiffés est réalisée par une exonucléase 5'. Celle-ci se retrouve dans les oocytes de Xénopes , l'extrait de germes de blé , mais pas dans le lysat de réticulocytes.

1.3) Mode d'action

Le rôle protecteur de la coiffe , contre cette exonucléase 5' , peut être expliqué par l'orientation inverse de la guanine terminale par rapport aux autres nucléotides : le mRNA n'a ainsi plus d'extrémité 5'. Le pont triphosphate , quant à lui , permettrait un repliement de la coiffe donnant lieu à des interactions coplanaires entre les 2 premiers nucléotides.

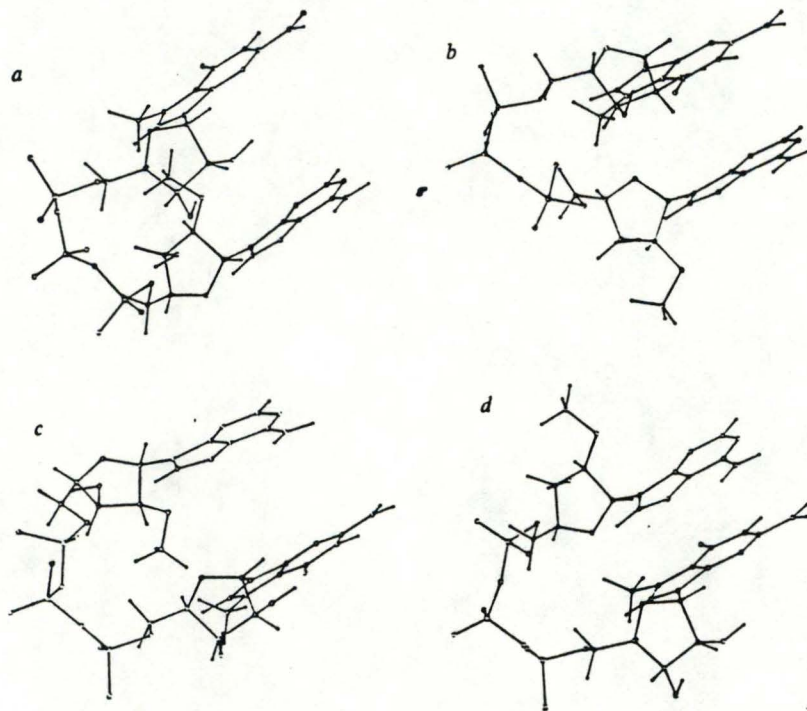


fig. 11 : Configuration spatiale de la coiffe. (Kim (1977)).

Pour ce qui est de la traduction, il semble qu'en provoquant un relâchement de la structure 5' terminale du mRNA, le m7G favorise l'attachement de la sous-unité 40S des ribosomes à l'extrémité de ces mRNA. Cette sous-unité migrerait alors le long du mRNA jusqu'à ce qu'elle rencontre un codon AUG où se fera la rencontre avec la sous-unité 60S.

Des protéines associées (CBP=Cap Binding Proteins) seraient également nécessaires à la traduction de certains mRNA (Sonenberg et al. 1980). On sait en effet que c'est en inhibant ces CBP que certains virus abolissent la traduction endogène des cellules qu'ils infectent.

Un autre mode de parasitisme viral (influenza virus) utilise la coiffe pour initier la transcription. Une endonucléase virale clive la coiffe d'un mRNA de la cellule hôte et s'en sert pour initier la transcription de ses propres mRNA.

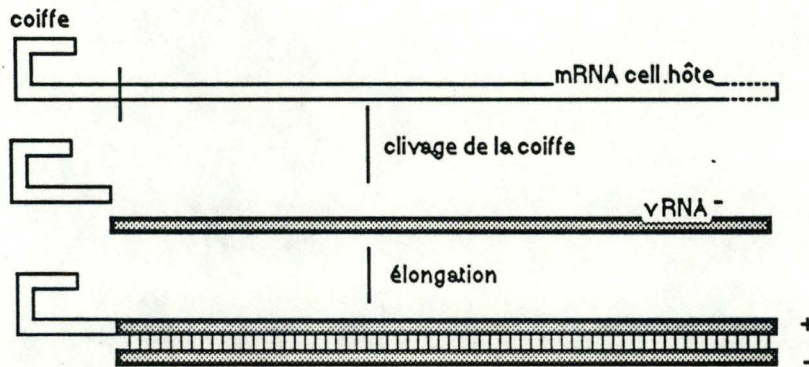


fig. 12 : Utilisation de la coiffe par les influenza virus pour amorcer leur transcription (d'après Plotch (1981))

2) Approche in vitro du rôle de la coiffe

Le développement récent de systèmes reconstitués *in vitro* a permis l'étude détaillée, dans des conditions bien contrôlées, de différents aspects de l'expression génétique.

Pour ce qui est de l'étude du rôle fonctionnel précis de la coiffe au niveau de la traductibilité et de la stabilité des mRNA, on comprend que la disponibilité de systèmes d'étude *in vitro* performants pour la transcription et la traduction fournissent, en principe, un moyen d'aborder ces questions dans des conditions expérimentales parfaitement contrôlées.

2.1) Transcription in vitro

2.1.1.) Systèmes eucaryotiques

2.1.1.1.) Transcription de gènes eucaryotiques dans des systèmes reconstitués.

Chez les eucaryotes , les grands RNA ribosomiaux , les mRNA et quelques RNA de faible poids moléculaire (5S RNA , tRNA) sont transcrits par 3 enzymes différents (respectivement : RNA polymérase I , II , III). Très purifiées , ces polymérases sont incapables de diriger la transcription in vitro. Mais , on a développé des systèmes moins purifiés capables d'initier la transcription de DNA viraux intacts , ou de gènes viraux ou cellulaires clônés. Ces systèmes provenaient de cellules en culture , de noyaux d'oocytes ou d'oocytes entiers de Xenope.

Ils nécessitent l'addition de RNA polymérase II ou III purifiée , suivant le type de gène étudié , pour être fonctionnels. Leur efficacité est cependant relativement réduite , eu égard à la somme de travail que requièrent leur utilisation et préparation.

2.1.1.2.) Transcription dans des extraits cellulaires totaux.

Un autre système de transcription eucaryotique consiste simplement en un lysat cellulaire concentré contenant , non seulement , les facteurs nécessaires à la transcription , mais aussi une quantité suffisante de RNA polymérases pour que leur addition ne soit pas nécessaire.

2.1.1.3.) Transcription dans le système viral de la vaccine.

Il a été utilisé pour le virus de la vaccine (Pelham 1977) . Ce virus à DNA double brin se réplique dans le cytoplasme de cellules animales. Suite à l'infection , il y a production d'un "core" dans l'hôte au dépend duquel se réalise la transcription des mRNA viraux.

En traitant des virions avec des détergents non ioniques et du mercaptoéthanol on peut produire ce "core" in vitro. Si on lui fournit des nucléosides triphosphates , la synthèse de mRNA viraux traductibles dans un système de traduction acellulaire a lieu.

Ce système présente le gros désavantage de ne pouvoir traduire que des mRNA endogènes. Il est donc très limité quant à son utilisation.

2.1.2.) Systèmes procaryotiques.

2.1.2.1.) Système SP6.

Quand le bactériophage SP6 infecte *Salmonella typhimurium*, il synthétise une RNA polymérase phagienne montrant une grande affinité pour le promoteur phagien. Cette polymérase est une simple chaîne polypeptidique et est relativement simple à purifier à partir des cellules infectées. Une fois purifié, l'enzyme reste stable et très actif in vitro. De plus, il garde sa haute spécificité pour le promoteur SP6. C'est cette propriété qui est exploitée pour réaliser la transcription à partir de vecteurs spécialisés (pSP64 et pSP65) dans lesquels on clone, immédiatement en aval du promoteur SP6, le DNA choisi, grâce à un polylinker (=sites d'insertion multiples = nombreux sites de restriction).

Préparation des transcrits SP6.

Un fragment de DNA est cloné dans le polylinker du vecteur pSP64 ou pSP65 (ces deux plasmides ne diffèrent que par l'orientation de leur polylinker). Le DNA recombinant résultant est linéarisé par clivage en un site de restriction localisé sur le polylinker du côté distal par rapport au DNA inséré. Le DNA linéarisé est mis en présence de la RNA polymérase SP6 et de rNTP (ribonucléotides triphosphates) pour produire une population homogène de transcrits initiant tous sur un résidu G situé 5 bases en amont du polylinker.

Dans les conditions optimales, c'est-à-dire : DNA : 100µg/ml

enzyme :100 U/ml 40°C

on peut obtenir jusqu'à 10 µg de RNA par heure.

On obtient ainsi, soit le brin codant, soit le brin anti-codant, suivant l'orientation de l'insertion du DNA dans le vecteur.

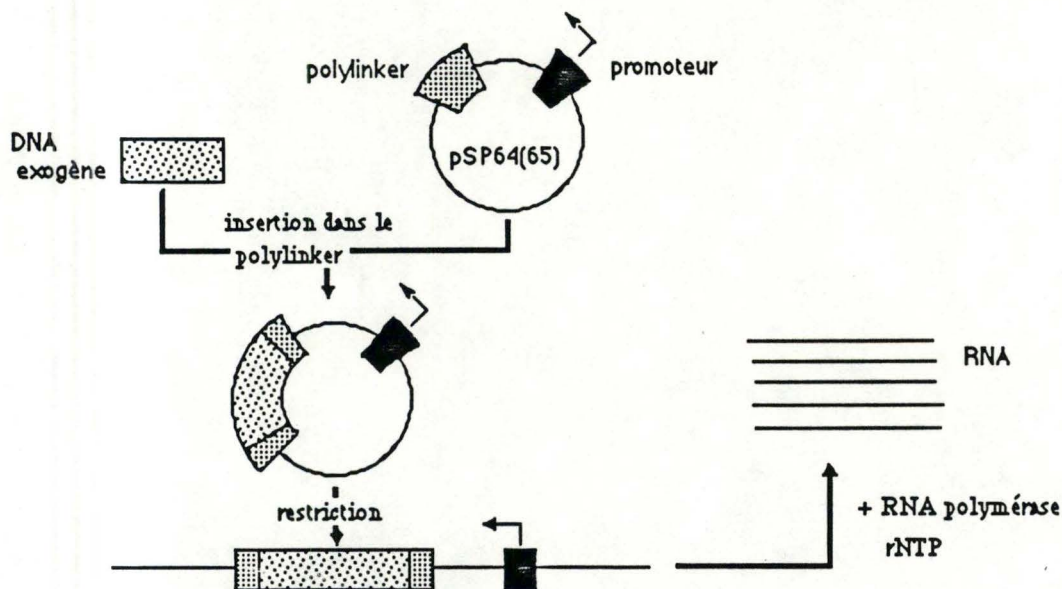


fig.13: Préparation de transcrits à partir du système SP6.

2.1.2.2.) Système pDS...(Steuber (1984)).

Ce système de transcription repose exactement sur le même principe que le système SP6. C'est - à - dire qu'on a une polymérase, qui agira sur un promoteur inséré dans le plasmide. On utilise ici, la polymérase de *E.Coli* qui reconnaîtra le promoteur du coliphage T5 ($P_{N25/X0}$).

Ce promoteur est inséré dans un plasmide (pDS5) contenant :

- l'origine de réplication (ori) et le gène de la β - lactamase (bla) de pBR322.
- le polylinker de pUC8.
- un gène codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (cat) qui contient toujours son site de liaison pour les ribosomes (RBS) et un terminateur (t1).

Le gène "cat" confère à la bactérie qui le possède, la résistance au chloramphénicol. Cette propriété sera utilisée pour sélectionner les bactéries transformantes lors de l'amplification du plasmide (voir matériel et méthodes).

Il existe toute une série de plasmides dans la série pDS... . Celui que nous avons utilisé pour ce travail est pDS5/4-1 qui contient le gène de lysozyme de poulet inséré dans le polylinker en aval de $P_{N25/X0}$, et dont une partie du gène "bla" a été excisée.

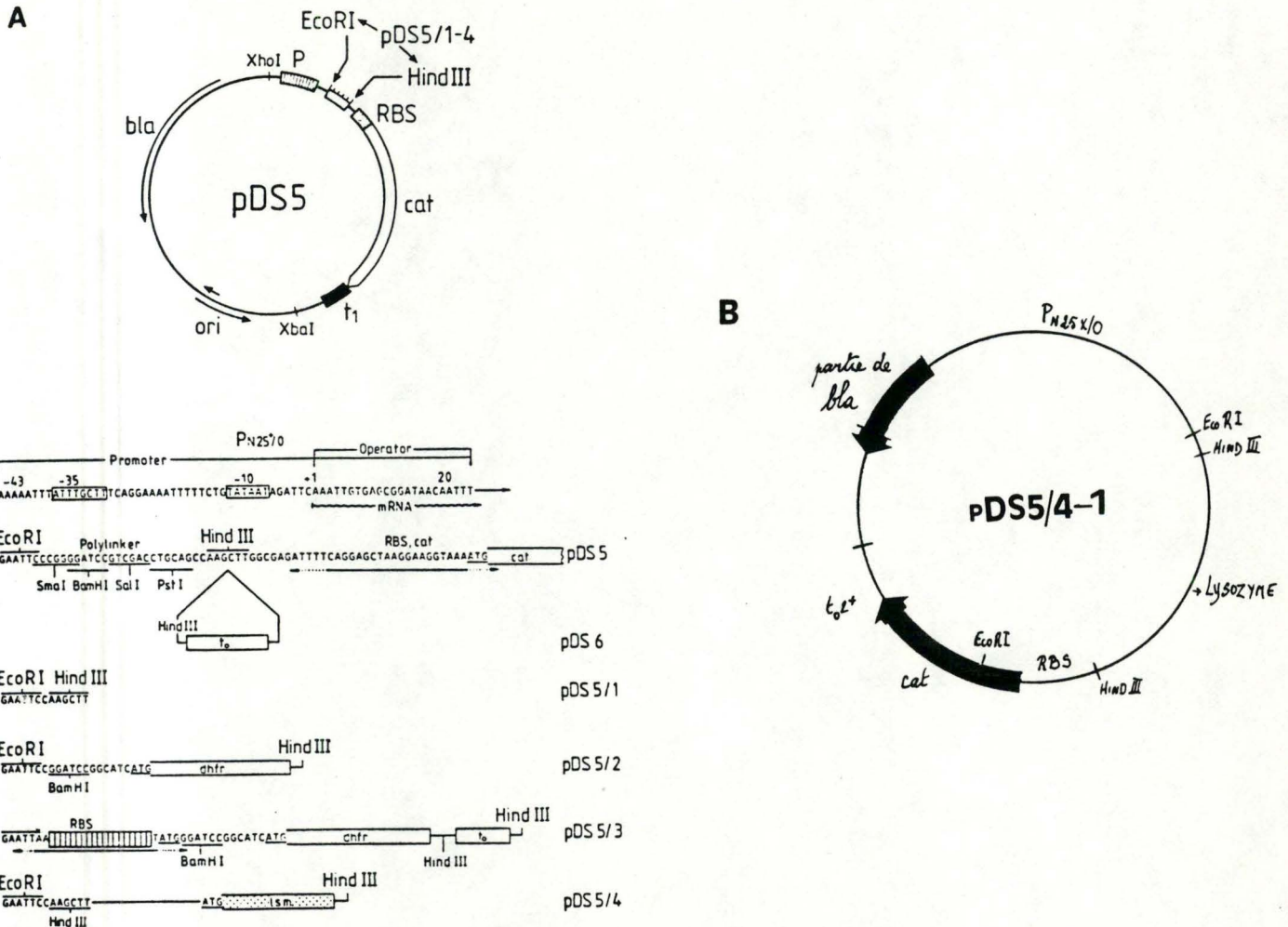


fig.14:A) Description des plasmides de la série pDS... (Stueber (1984)).

B) Schéma de pDS5/4-1

2.2.) Traduction in vitro.

De nombreux systèmes de traduction acellulaire (STA) sont ou ont été utilisés pour réaliser la synthèse protéique in vitro.

Ces systèmes doivent contenir tous les éléments nécessaires à la traduction sauf le mRNA qui sera, lui, apporté par l'expérimentateur. Quel que soit le type de STA, ils doivent répondre à une série d'exigences:

1- Sensibilité:

C'est-à-dire, peu de traduction endogène si on n'ajoute pas de mRNA, et réponse

importante si on en ajoute.

2- Fidélité de traduction :

Il faut peu de terminaisons prématurées ainsi que d'activité nucléasique ou protéolytique.

3- Reproductibilité des résultats :

Minimum de variation des caractéristiques du système d'une préparation de lysat à l'autre.

4- Versatilité:

Un bon STA doit pouvoir traduire une large gamme de mRNA .

5- Commodité :

Il doit être commode d'utilisation et , si possible , peu coûteux et facile à obtenir.

6- Insensibilité à l'inhibition :

Il doit généralement être peu sensible aux inhibiteurs de traduction tels que les polysaccharides , RNA bicaténaires (dsRNA) susceptibles de se retrouver dans une préparation de mRNA .

On constate que certains systèmes fonctionnent très bien (extrait de germes de blé , lysat de réticulocytes , ...) tandis que des lysats d'autres organes sont , pour des raisons mal comprises , quasi inefficaces (foie , cerveau , ...).

2.2.1.) Lysat de réticulocytes de lapin.

C'est en 1976 que Pelham et Jackson améliorent la préparation de ce système acellulaire de traduction de mRNA exogènes , jusqu'alors peu efficace , en le traitant avec une nucléase dont l'activité est parfaitement contrôlable.

- On induit une crise réticulocytaire chez un lapin par injection de chlorure de phénylhydrazine.

On recueille le sang et le centrifuge pour récupérer les réticulocytes (élimination du plasma et du "buffy coat"= leucocytes) qu'on lysera ensuite par choc osmotique . Une seconde centrifugation permettra d'éliminer les débris cellulaires , mitochondries...etc. Le surnageant est récupéré et congelé.

le lysat est traité avec une RNase Ca^{++} dépendante (=nucléase micrococcale) provenant de *Staphylococcus aureus* . Après incubation , on stoppera l'action de la nucléase en additionnant un agent chélateur du Ca^{++} :EGTA.

Ce STA contient donc ainsi tout ce qui est nécessaire à la traduction. Les seules choses à y ajouter sont le mRNA et un acide aminé marqué qui permettra de suivre cette traduction.

2.2.2.) Extrait de germe de blé

2.2.2.1.) Préparation

Ce STA a tout d'abord été décrit par Roberts et Paterson (1973) . Depuis , différentes améliorations se sont greffées sur ce système.

Il est réalisé à partir de germes de blé qu'on va , tout d'abord, passer sur un tamis pour en éliminer l'endosperme et la capsule . Les germes sont alors broyés dans du sable à l'aide d'un mortier et mélangés dans un tampon d'extraction pour obtenir une pâte qu'on centrifugera pour éliminer le sable , les lipides et les débris cellulaires . Le surnageant est récupéré et filtré sur colonne pour en éliminer le matériel de faible poids moléculaire . Le reste est recentrifugé pour éliminer le matériel insoluble , puis aliquoté et stocké à -70°C .

2.2.2.2.) Critique

Ce STA a les avantages de présenter un taux d'incorporation endogène faible , d'être peu coûteux et relativement facile à préparer.

Avant l'apparition de la méthode de traitement à la nucléase du lysat de réticulocytes , il était le plus utilisé en raison de son faible "back-ground" . Il présente de plus l'avantage , sur le lysat de réticulocytes , de bien résister à l'inhibition par RNA bicaténaires . Cependant , préparé de manière routinière , il peut présenter une faible vitesse d'élongation et engendrer un nombre non négligeable de terminaisons prématurées ainsi que des clivages du mRNA . Ceci peut être amélioré par l'addition d'inhibiteur de RNAses provenant du placenta humain et de spermidine , qui stimule la vitesse d'élongation.

On a montré (Gallis et al.,1975) que ce système altérait cependant certains produits de traduction par l'action de protéases endogènes.

Il existe d'autres systèmes de traduction acellulaires , tels que ceux réalisés à partir de muscles d'embryon de poulet , levures , différentes lignées de cellules en culture (HeLa , cellules tumorales d'ascite , ovaires de hamster) , ou bactéries (*E. coli* , *B. subtilis*). Mais ils sont d'application moins courante et ne seront pas détaillés ici .

III) But du travail

Les systèmes de transcription et de traduction couplées in vitro sont, à priori, des outils intéressants dans l'étude du rôle fonctionnel de la coiffe sur la traduction des mRNA. En effet, la transcription massive d'un gène, cloné dans un plasmide, par une polymérase en présence de coiffes synthétiques diverses servant d'amorce, devrait permettre l'étude comparative de l'influence de chaque coiffe sur l'efficacité de traduction dans un système acellulaire.

Pour éprouver cette idée, les étapes nécessaires du travail sont :

- 1) La préparation en masse du plasmide pDS5/4-1 décrit récemment comme fonctionnel dans un système couplé.
- 2) L'obtention, dans un système de transcription in vitro, des transcrits diversement coiffés du gène de lysozyme cloné dans pDS5/4-1. Les coiffes se distinguent par la nature de leur seconde base; à savoir : ${}^7\text{mGpppA}$, ${}^7\text{mGpppG}$, ${}^7\text{mGpppC}$. (La coiffe ${}^7\text{mGpppU}$ n'est pas disponible dans le commerce.)
- 3) La synthèse des protéines correspondant à chaque type de transcrit .

De la comparaison des résultats obtenus aux étapes de transcription et de traduction dans les diverses situations expérimentales, nous attendons la réponse à la question posée.

IV) Matériel et méthodes

1) Production de plasmides

Pour amplifier un plasmide, il faut l'introduire dans une bactérie (*Escherichia coli*) . et Après multiplication, on récolte le DNA plasmidique extrait du lysat de bactéries.

1.1.) Transformation de *E.coli* par le plasmide.

On utilise pour cela la souche C600 qui est :

- leucine (-)
- thréonine (-)
- Ampicilline sensible
- Tétracycline sensible
- Chloramphénicol sensible

1.1.1.) Croissance des bactéries (Batch cultures)

On réalise tout d'abord une préculture en inoculant une colonie de C600 dans 5ml de milieu LB stérile .

LB=Yeast Extract	1%
Bacto Tryptone	1%
NaCl	0.5%
Porter à volume avec de l'eau distillée	

Cette préculture est incubée une nuit à 37°C (les bactéries sont ainsi en phase exponentielle de croissance). 1 ml de cette préculture est prélevé et inoculé dans 50 ml de LB stérile (dans un erlen de 100 ml) .L'incubation se fait à 37°C sous agitation constante. On suit régulièrement l'évolution de la densité de la culture par turbidimétrie à 600 nm . Quand $A_{600} = 0.4$, la croissance est arrêtée en plongeant l'erlen dans la glace pendant 10 min. Il faut ensuite rendre les cellules compétentes , c'est-à-dire , aptes à incorporer le plasmide , en perméabilisant leur paroi par un traitement au $CaCl_2$. Après centrifugation du milieu de culture 5 minutes à 5700 rpm (rotor GSA à 4°C) , le surnageant est décanté et le culot (les bactéries) resuspendu dans 10 ml de $CaCl_2$ 50mM stérile et froid . On incube pendant 20' dans la

Francis

glace, puis recentrifuge dans les mêmes conditions : 5 minutes à 5700 rpm, rotor GSA, 4°C. Après décantation, le culot est resuspendu dans 25 ml de CaCl₂ stérile et froid.

1.1.2.) Transformation proprement dite.

Ces 25 ml de cellules sont répartis dans des cupules Eppendorf. Chacune contenant 200 µl de cellules. On y ajoute : 200 µl de TCM

100 µl de TE contenant 40 ng de plasmide (on considère habituellement qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 µg d'acide nucléique.)

TCM : Tris-HCl pH 7.5	10mM
CaCl ₂	10mM
MgCl ₂	10mM
TE : Tris-HCl pH 7.5	10mM
EDTA	1mM

et incube 15 minutes dans la glace. Incubées à 37°C pendant 5 minutes, les cellules subissent alors un choc thermique. Après avoir ajouté 0.5 ml de LB à chaque cupule, on réincube 30' à 37°C.

On étale ensuite 100 µl de cette suspension sur une boîte de Petri remplie de LB gélosé (c'est-à-dire LB + 2% de bacto tryptone) contenant du chloramphénicol (3.2 mg/L de LB) (solution stock de chloramphénicol 40 mg/ml EtOH 98%). Ainsi, seules les bactéries ayant incorporé le plasmide qui contient le gène "cat" (chloramphénicol acétyl transférase) pourront pousser. Ces boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant la nuit.

1.2.) Amplification du plasmide

Cette amplification se fait au moyen du chloramphénicol qui a la propriété de bloquer la synthèse

protéique en inhibant la transpeptidation.

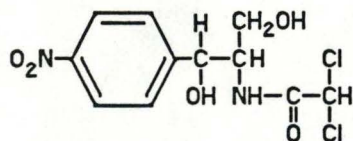


fig.15: Structure du Chloramphénicol.

La réplication des plasmides n'est cependant pas inhibée. Ainsi, la bactérie ne se divise plus, on obtient plusieurs copies plasmidiques par bactérie.

- Une préculture est donc réalisée à partir d'une colonie transformante dans 5 ml de LB = chloramphénicol (32 µg/ml) (= milieu de sélection). Incubation pendant la nuit à 37°C.
- 4 ml de cette préculture sont inoculés dans 400 ml de LB + chloramphénicol (32µg/ml). On incube sous agitation constante à 37°C jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm soit égale à 1.
- A ce moment, on ajoute 5 ml de la solution stock de chloramphénicol (40 mg/ml EtOH 98°) et incube à 37°C, sous agitation, pendant 15 à 16 h. C'est à ce moment que se réalise l'amplification.

1.3.) Récolte des plasmides par la méthode de la lyse claire

1.3.1.) Lyse

- 400 ml de milieu sont centrifugés dans des bouteilles plastiques stériles pendant 10 minutes à 6000 rpm, rotor GSA, 4°C. Les culots sont lavés avec du TE froid.
- Les culots sont resuspendus dans 8 ml d'une solution contenant 50 mM Tris
25 % (p/v) sucrose
qui va produire un choc osmotique et léser les parois bactériennes. Tous les culots sont alors rassemblés dans un erlen de 100 ml.
- On y ajoute :- 1 ml d'une solution de lysosyme (15 mg/ml) qui va lyser la paroi bactérienne.
agitation 5 minutes dans la glace.
- 1 ml d' EDTA 0.5 M pH 8.5 . Agiter 5 minutes dans la glace
- 10 ml de solution TETH . Agiter 10 minutes dans la glace.

TETH : EDTA pH 8.5	0.0625 M
Tris pH 8.0	0.05 M
Triton X-100	0.1 % (v/v)

- La solution ainsi obtenue est transvasée dans un tube à 60 Ti et centrifugée 30 minutes à 30.000 rpm au rotor 60 Ti à 4°C.

Les débris cellulaires et le DNA chromosomique qui sédimentent sont ainsi séparés du DNA plasmidien qui reste dans le surnageant, ainsi que le RNA.

1.3.2.) Gradient de CsCl.

Le DNA plasmidien peut se trouver sous trois formes :

- covalently closed circular (C.C.C) : super-enroulé .
- open circular (O.C) : un des deux brins de la double hélice est coupé ;
ce qui supprime la tension de superenroulement de la spire .
- linéaire (L) : deux coupures se sont produites l'une en face de l'autre .

Ces trois formes de plasmide et le RNA pourront être séparés grâce à une centrifugation sur gradient de chlorure de césium (CsCl) en présence de bromure d'éthidium (BET). Le principe de cette méthode est simple : à certaines concentrations en BET (100 µg/ml), les molécules de colorant s'insèrent entre les bases du DNA et provoquent une diminution de densité d'environ 0.13 g/cm³ pour les DNA bicaténares linéaires (L) et circulaires relaxés (O.C). Tandis que la diminution est de 0.09 g/cm³ pour le DNA superhéliçoïdal (C.C.C).

0.9 g de CsCl sont donc ajoutés par ml de surnageant. 0.8 ml d'une solution de BET (10 mg/ml) sont ensuite ajoutés par 10 ml de solution obtenue après addition du CsCl. Le tout est transvasé dans un tube 60 Ti et centrifugé 48 heures à 35.000 rpm dans un rotor 60 Ti à 15°C. On obtient ainsi deux bandes et un culot.

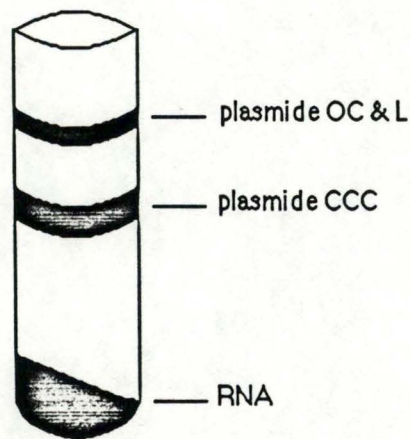


fig. 16: Séparation des différentes formes plasmidiques sur gradient de CsCl.

La bande C.C.C est récupérée à l'aide d'une seringue .

1.3.3.) Elimination du BET et du CsCl.

- Le BET est éliminé en ajoutant un volume de butanol saturé en eau . On mélange doucement puis centrifuge 3 minutes à 4.000 rpm dans un rotor SS34 à 4°C . La phase alcoolique (supérieure) est enlevée à l'aide d'une pipette pasteur .

L'opération est recommencée cinq à six fois jusqu'à ce que la teinte rosée ait tout à fait disparu de la phase aqueuse .

- Le CsCl sera ensuite éliminé par dialyse contre du TE pH 8.0 (un litre) .

La dialyse dure douze heures , et le tampon est changé deux fois.

1.3.4) Concentration du DNA .

Le DNA est précipité à l'éthanol .

On ajoute à la solution de plasmide recueillie après dialyse :

- 0.1 volume de NaAc 3M , pH 5.5 .

- 2 volumes d'EtOH 98° .

et incube quelques heures à -20°C .

La solution est ensuite centrifugée 25 minutes à 9.500 rpm dans un rotor rotor SS34 (11.200 x g) à 4°C .

Le surnageant est décanté et le culot séché sous vide . On le redissout dans le volume de TE voulu .
Pour déterminer celui-ci , il faut estimer la quantité de DNA que l'on a récupéré . Pour cela , l'absorbance à 260 nm de la solution obtenue après dialyse est mesurée. Sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond plus ou moins à 50 µg d'acides nucléiques et que la précipitation à l'alcool à un rendement proche de 50% , on peut aisément déterminer le volume de TE à utiliser pour dissoudre le culot à une concentration choisie .

1.4.) Vérification de la quantité du plasmide .

L'état des plasmides ainsi obtenus est vérifié en réalisant une électrophorèse sur gel d'agarose 0.7%

1. 4.1.) Préparation du gel .

0.7 gr d'agarose A

10 ml de tampon TEB 10 X

90 ml d'eau

TEB 10X : Tris	108 gr
EDTA	9 gr
Ac. Borique	55 gr
Porter à pH 8.0 avec HCl concentré	
Amener à 1 L. avec de l'eau distillée.	

sont mélangés et chauffés jusqu'à 100°C . On laisse refroidir la solution jusque 60°C puis , coule le gel sur une plaque de verre (10 X 10 cm) sur laquelle un cadre en plexiglass est fixé au moyen d'un papier adhésif fort. On y a préalablement déposé un peigne pour ménager des créneaux dans lesquels les échantillons seront déposés .

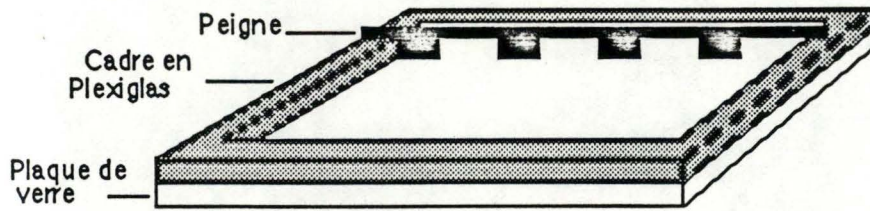


fig. 17 : Montage pour le coulage des gels d'agarose

1.4.2.) Préparation des échantillons .

Les plasmides doivent être linéarisés pour que la migration se fasse uniquement selon leur taille et non selon leur conformation (C.C.C , O.C , L) . Pour cela , des endonucléases de restriction coupant le plasmide en un site unique sont utilisées.

5 μ g de DNA sont incubés en présence de - 11.3 U d'enzyme de restriction

- 2.5 μ l de tampon de restriction

- 5 μ l de TEB + sucrose .

pendant deux heures à 37°C .

Tampon de restriction :

Tris-HCl 1M pH 7.5	20 μ l
MgSO ₄ 1M	20 μ l
NaCl	40 μ l
Mercaptoethanol 1M	10 μ l
H ₂ O	110 μ l

Les enzymes de restriction sont inactivés en plaçant les échantillons dans un bain thermostatisé à 70°C pendant 10 minutes . 5 μ l d'une solution de Bleu de Bromophénol y sont ajoutés.

Solution de bleu de Bromophénol :

pour 10 ml

10 mM tris-HCl pH 7.7

1.5 % ficoll 400

1 pointe de spatule de bleu de bromophénol

Porter à 10 ml avec de l'eau

Vortexer et centrifuger brièvement pour récupérer tout ce qui est sur les parois de la cupule . Les échantillons sont ensuite déposés dans les créneaux du gel . La migration se fait dans du tampon TEB 1 X à 80 mA (110 V) pendant trois heures .

1.4.3.) Coloration du gel .

Après migration , le gel est plongé dans un litre de tampon (TEB 1 X) contenant 200 µl d'une solution de bromure d'éthidium (10 mg/ ml) . Après 30 minutes, on place le gel sur un transilluminateur UV afin de détecter la fluorescence émise par le bromure d'éthidium fixé dans le DNA . Le gel est photographié dans ces conditions grâce à un appareil polaroid HP 4 . (Ouverture du diaphragme : 8 , durée d'exposition : 0.125 sec , film polaroid type 667) .

2.) Analyse des protéines marquées (par ³⁵S méthionine)**2.1.) Précipitation au TCA et comptage de la radioactivité**

2 µl de solution de protéines sont dilués 50 fois dans de l'eau distillée stérile. La solution diluée est déposée sur une pièce (2x2cm) de papier Whatman 3MM. Les papiers sont séchés à l'air puis plongés dans 200 ml de TCA 10% froid pendant 15 minutes et bouillis ensuite pendant 15 minutes. Refroidis, ils

sont plongés dans 3 bains successifs de TCA 5% froid (sous agitation douce) et lavés 3 fois avec de l'eau distillée pour enlever le TCA qui a un effet quenchant assez important. Les filtres sont alors séchés sur du papier Joseph puis déposés dans une fiole de comptage contenant 10 ml d'Aqualuma et passés au compteur à scintillation.

2.2.) Electrophorèse

Les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel vertical de polyacrylamide 15%. Le running gel (15%) étant surmonté par un stacking gel (3%) qui permet de concentrer l'échantillon.

2.2.1.) Préparation du gel

a) Running gel

solution d'acrylamide 30%	: 11,46 ml	
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	: 5,31 ml	
H ₂ O	: 6,15 ml	
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 10%	: 52 µl	(à préparer le jour de l'emploi)

Le tout est dégazé à la pompe à vide et on ajoute:

TEMED	: 8,7 µl
SDS 10%	: 0,21 ml

Le gel est coulé entre 2 plaques, couvert d'un film d'eau pour aplanir sa surface et laissé polymériser pendant 60 minutes, après quoi un peigne est inséré et le stacking gel (3%) coulé.

b) Stacking gel

solution d'acrylamide 30%	: 1 ml
Tris - HCl 0,5M pH 6,8	: 2,5 ml
H ₂ O	: 6,3 ml
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	: 100 µl

Après dégazage, on ajoute:

TEMED	: 5 µl
SDS 10%	: 100 µl

Le gel est laissé polymériser pendant 30 minutes.

<p>Solution d'acrylamide 30 % :</p> <p>7.5 gr d'acrylamide recristallisée</p> <p>0.2 gr de bisacrylamide recristallisée</p> <p>Porter à 25 ml avec de l'eau distillée</p> <p>Filtrer (filtre Whatman 42) et stocker à l'obscurité</p>

2.2.2.) Préparation des échantillons

Un volume de solution protéique (50000 cpm) est mélangé à un volume de solubiliseur.

Le solubiliseur contient:

SDS	:	1 g
Bleu de bromophénol	:	30 mg
Glycérol pur	:	10 ml
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	:	25 ml
H ₂ O	:	15 ml

Les protéines sont ensuite dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors déposés au fond des créneaux du gel. La migration s'effectue pendant 7 heures avec un courant de 10 mA dans un tampon à pH 8,4 contenant (pour 5 L):

Glycine	:	72 g
Tris	:	15 g
SDS	:	5 g

2.2.3.) Coloration du gel

Le gel est plongé pendant au moins 60 minutes dans un bain fixant contenant:

TCA 100%	:	57 ml
Ac. sulfosalicylique	:	17 g
Méthanol	:	150 ml
H ₂ O	:	350 ml

Il est ensuite coloré pendant 60 minutes dans un bain contenant:

Bleu de Coomassie R	:	500 mg
Méthanol	:	115 ml
HAc	:	20 ml

H₂O : 115 ml

Il est alors décoloré pendant 4 heures dans un bain contenant:

Méthanol : 300 ml

HAc : 100 ml

H₂O : 100 ml

Le gel est ensuite plongé dans du Méthanol 50% pendant 90 minutes, puis séché sous vide.

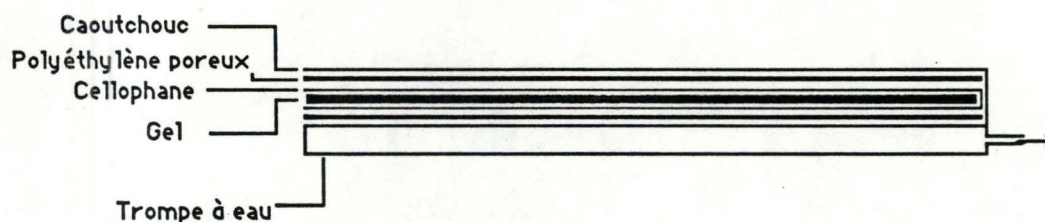


fig. 18 : montage utilisé pour le séchage des gels de polyacrylamide

2.2.4) Autoradiographie

Si les protéines sont marquées (³⁵S), on réalise en plus une autoradiographie. Après le bain de méthanol 50%, le gel est immergé pendant 20 minutes dans du Enlightning, séché comme précédemment puis, mis en contact avec le film radio (Kodak X-S 1) dans une cassette X-O-Mat qui assure un bon contact entre la plaque autoradiographique et le gel, à -80°C pendant 36 à 48 heures. La cassette est alors ramenée à température ambiante pendant 30 minutes et la pellicule est développée en chambre noire avec un bain révélateur Kodak LX 24 et un bain fixateur AL4, tous deux dilués selon les normes du fabricant.

Développement proprement dit: - 5 minutes dans le révélateur en agitant

- 30 à 40 secondes dans l'eau courante (bain d'arrêt)

- 3 minutes dans le fixateur en agitant

La plaque radiographique est alors lavée à l'eau et séchée.

3) Analyse des mRNAs marqués (par α -³²P-UTP)

3.1.) Précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA)

1 μ l de solution de transcription est dilué 100 fois et déposé sur un filtre Whatman 3 MM (2x2 cm).

Les filtres sont séchés à l'air puis plongés pendant 30 minutes dans 200 ml d'un bain de TCA 10% froid contenant du pyrophosphate de sodium (qui empêche la fixation des NTPs sur le filtre) et d'EDTA.

Solution de TCA (pour 1 L):

- TCA 100% : 100 ml
- Pyrophosphate de Na : 100 g
- EDTA : 0,037 g

Le bain de TCA est changé toutes les 10 minutes et est remplacé ensuite par 100ml d'éthanol dénaturé (à changer 2 fois) qui va enlever l'eau et le matériel non fixé soluble dans l'alcool. Les filtres sont alors lavés 2 fois avec 100 ml d'acétone qui élimine l'alcool et le matériel non fixé alcool - insoluble. Les filtres séchés à l'air, sont placés dans une fiole de comptage contenant 10 ml d'Aqualuma. Les fioles sont placées dans le compteur à scintillation .

3.2.) Electrophorèse

On réalise ici des gels dénaturants d'agarose 1,4%.

3.2.1) Préparation du gel

La technique de préparation du gel est la même que pour les gels à DNA 0,7%. Seule la composition du gel change (pour 75 ml):

- Agarose A : 1,05 g
- Tampon phosphate 0,1 M pH 7,0 : 7,5 ml
- H₂O : 67,5 ml

Tampon phosphate 0,1 M pH 7,0:

NaH₂PO₄ 0,1M : 310 ml

Na₂HPO₄ 0,1M : 690 ml

3.2.2.) Préparation des échantillons

Dans une cupule Eppendorf, on mélange:

- Glyoxal 30% désionisé : 2,7 µl
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) : 8,0 µl
- Tampon phosphate 0,1M pH 7,0 : 1,3 µl

Solution de transcription : 1 μ l
(contenant le mRNA)

Le glyoxal est désionisé en mélangeant 2 gr d'Amberlite pour 50 ml de glyoxal pendant 2 heures, il est ensuite filtré.

Les cupules sont incubées pendant 60 minutes à 50°C, puis ramenées à température ambiante et 4 μ l de tampon de chargement sont ajoutés.

Tampon de chargement (à autoclaver):

Tampon phosphate 0,1M pH 7,0 : 1 ml
Glycérol 87% : 5,74 ml
H₂O : 3,26 ml

Après quoi, les échantillons sont immédiatement déposés dans les créneaux du gel. Celui-ci est complètement immergé dans du tampon phosphate 0,01M pH 7,0 et la migration se fait pendant 8 heures à 40 V. Il faut contrôler régulièrement le pH du tampon. En effet, dès qu'il arrive à pH 8,0, le tampon doit être changé car à pH alcalin (> 8,0), le glyoxal se dissocie du RNA et ne joue plus son rôle dénaturant (la structure secondaire du RNA peut se reformer).

3.2.3.) Mise en évidence des bandes de RNA

Le gel est plongé dans de l'eau contenant du bromure d'éthidium (2 mg/l) pendant 15 min. Il est examiné au transilluminateur UV et les bandes étalons sont repérées (DNA λ restreint par Pst I et dénaturé dans les mêmes conditions que les RNAs). Il est ensuite trempé pendant 20 minutes dans du Enlightning (New England Nuclear) puis est séché dans une étuve à 40°C entre une feuille de cellophane et un papier Whatman N°1 dans une étuve à 40°C pendant 15-16 heures.

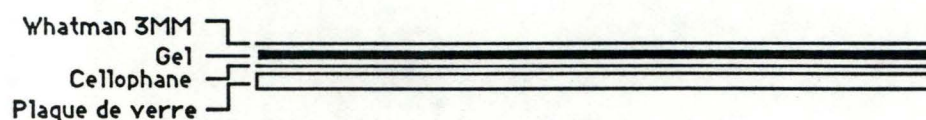


fig.19 : Montage utilisé pour le séchage des gels d'agarose.

L'autoradiographie s'effectue dans les mêmes conditions que pour les gels de polyacrylamide.

4.) Purification du DNA par chromatographie sur colonne NENSORB™₂₀ (NEN)

Suivant les recommandations de la firme, la colonne est prééquilibrée avec 2 ml de méthanol puis, équilibrée avec 2 ml d'une solution A contenant :

0.1 M Tris - HCl

10 mM Triéthylamine pH7.7

1 mM EDTA di K

20µg de DNA dissous dans 400 µl de cette solution A sont déposés au sommet de la colonne.

Le lavage s'effectue par 3 ml de solution A puis, 3 ml d'H₂O. L'élution est réalisée par 1ml d'ETOH 20%.

Le DNA ainsi recueilli est séché sous vide et resuspendu dans du TE.

v) Résultats et discussion

1.) Préparation du plasmide pDS5/4-1

Pour réaliser nos expériences de transcription, nous avons besoin de beaucoup de plasmide (1-2 ug/exp.). Or, nous ne disposons, au départ, que de 0,5ug de ce plasmide. Il est donc capital de pouvoir l'amplifier. Pour cela, nous l'avons introduit dans une souche de *E.Coli* C600.

1.1.) Croissance de la souche de *E.Coli* C600.

Les cellules à transformer sont mises en culture dans 50 ml de LB liquide à 37°C sous agitation constante. On en mesure régulièrement la densité optique (D.O.) à 600 nm. Cette D.O. est en relation directe avec la quantité de bactéries présentes dans le milieu.

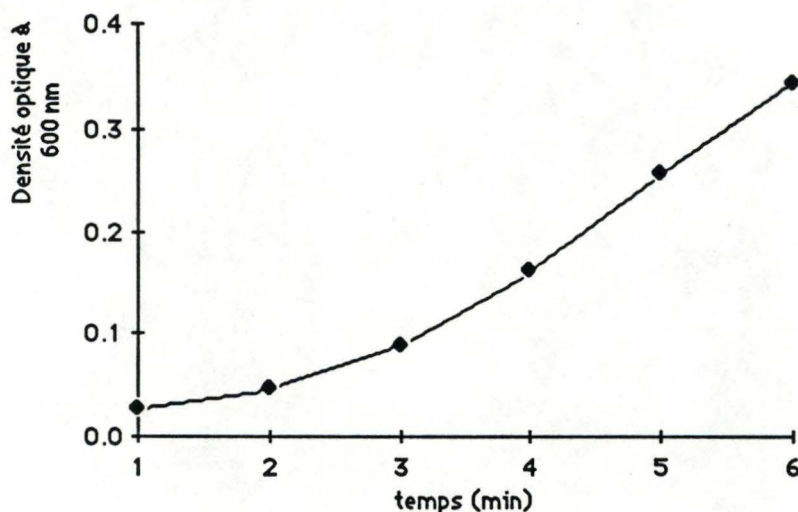


fig. 20: Courbe de croissance de *E. coli* C600

La transformation des bactéries doit être réalisée au moment où celles-ci sont en phase exponentielle de croissance (0,3 - 0,4 D.O.600).

1.2.) Estimation de la quantité de plasmide nécessaire à la transformation

Cette détermination a été faite avec le plasmide pDS5 pour ne pas gaspiller pDS5/4-1. Comme pDS5/4-1 provient directement de pDS5, on a toutes les raisons de penser qu'ils se comportent de la même façon quant à leur capacité de pénétration dans une cellule et de répllication. On réalise des transformations de bactéries par des solutions de plasmide à différentes concentrations. 200 µl de cellules

sont incubés avec 100 µl de DNA (400 ng/100 µl de TE) ou 100 µl de DNA (40 ng/100 µl de TE). On étale 200 µl et 100 µl de ces suspensions ainsi que 100 µl de suspension diluée 5 fois sur du milieu LB + Chloramphénicol gélosé et incube une nuit à 37°C. Les dilutions ont été réalisées afin d'éviter la formation d'un tapis cellulaire continu si la transformation est très efficace car dans ce cas, il ne serait pas possible de récupérer des colonies isolées (= clones d'1 seule cellule souche).

quantité de DNA	400ng			40ng		
quantité étalée	200µl	100µl	100µl dilué 5X	200µl	100µl	100µl dilué 5X
nb. de colonies transformantes	450	2*	56	30	11	3

tableau 3 : résultats de la transformation de *E. coli* C600 par pDS5.

*Ce résultat aberrant pouvant s'expliquer par le fait que la boîte de Pétri dans laquelle a été réalisée cette culture contenait trop peu de milieu.

On constate ainsi que 40 ng de plasmide sont largement suffisants pour transformer 200 µl de *E. coli* C600. Ceci correspond avec ce qui est rapporté par la littérature pour des plasmides tels que pBR322 (Maniatis (1982)).

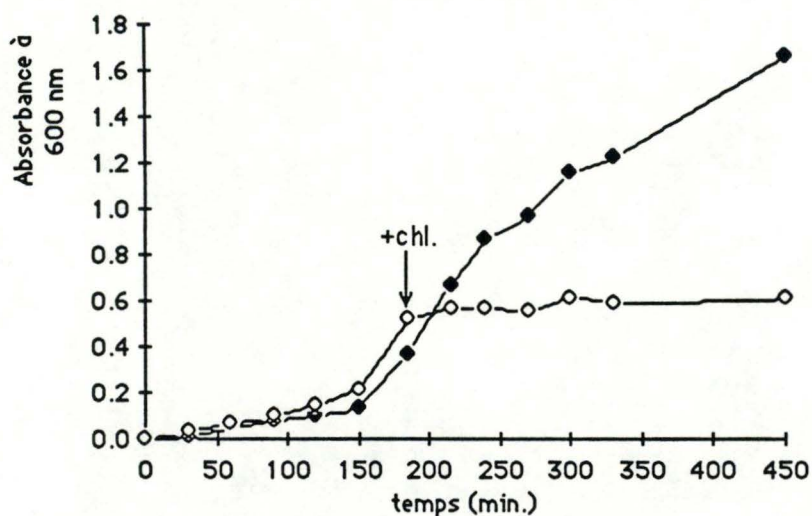
1.3.) Transformation par pDS5/4-1.

On réalise donc la transformation de *E. coli* C600 par pDS5/4-1 à partir de 40 ng de plasmide. Après une nuit d'incubation à 37°C, on peut dénombrer une quarantaine de colonies transformantes sur les boîtes de milieu LB gélosé + Chloramphénicol.

1.4.) Amplification

Une fois les transformants obtenus, il faut leur faire multiplier le plasmide incorporé. Ceci est réalisé grâce au chloramphénicol (cfr. Mat. et Meth.)

Dans un premier temps, nous effectuons la transformation avec 200 µg de Chl./ml de culture. Cependant, il est apparu que cette quantité ne suffisait pas. En effet, les bactéries continuaient à se multiplier, ce qui s'explique si on se rappelle que le gène "cat" (chloramphénicol acétyltransférase) - contenu dans le plasmide - les rend résistantes à cet antibiotique. Nous avons alors doublé la quantité de chloramphénicol, ce qui sature l'enzyme. Le chloramphénicol peut ainsi jouer son rôle bactériostatique donnant lieu à l'amplification du plasmide.



- croissance normale des bactéries.
- croissance des bactéries en présence de chloramphénicol 400 μ g /ml.

fig. 21 : Effet bactériostatique du chloramphénicol.

1.5.) Récolte du plasmide

Après la lyse claire, les plasmides sont purifiés par une centrifugation sur gradient de CsCl. Nous ajoutons au départ 1 g. de CsCl par ml de solution de DNA - suivant en cela les techniques décrites par Maniatis (36). Cependant, à cette concentration en sel, la séparation entre la bande plasmidienne et le culot de RNA s'est avérée insuffisante. Les risques de contamination lors du prélèvement de la bande de plasmide étaient trop grands. Nous avons donc augmenté la quantité de CsCl (soit 1,05 g/ml) et réalisé le gradient dans un tube plus haut (type 60 Ti au lieu de type 65), ce qui nous permet d'isoler facilement le plasmide sous forme CCC de ses autres formes et des RNAs bactériens.

Le plasmide est alors débarrassé du bromure d'éthidium et du CsCl (cfr. Mat. et Méth.). Après la dialyse, le plasmide est récupéré dans 6.5 ml de TE. On en mesure l'absorbance à 260 nm pour déterminer quelle quantité de DNA a été isolée. Dans une expérience type, 100 μ l de solution de DNA sont dilués 10 fois dans de l'eau distillée et passés au spectrophotomètre, soit $A_{260\text{nm}} = 0.097$ D.O. Si 1 unité d'absorbance à 260 nm = 50 μ g d'ac. nucléique/ml, on a $6.5 \times 0.097 \times 10 = 375$ μ g d'ac. nucléique qui pourront être précipités et resuspendus dans du TE à concentration voulue (2 μ g/ μ l). On mesure aussi l'absorbance à 280 nm. $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0,097/0,052 = 1.84$

Le rapport obtenu indique que la contamination en protéines est faible

1.6.) Vérification de l'état du plasmide

Pour cela, on réalise une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%. 5 µg de plasmide sont restreints par une enzyme de restriction. Ne disposant pas au laboratoire d'endonucléase pour des sites uniques du plasmide, nous l'avons restreint par Hind III. pDS5/4-1 possède 2 sites de restriction Hind III situés de chaque côté du gène "lysozyme" (ce sont eux qui ont utilisés pour insérer le gène dans le plasmide). Après restriction, on obtient donc 2 fragments: 1 correspondant au gène "lysozyme" (=600 bp) et 1 correspondant au reste du plasmide (=2600 bp). L'étalonnage pour la détermination de la taille des fragments est réalisée avec le DNA du phage λ CI 857Sam7 restreint par Hind III, ce qui donne 6 fragments :

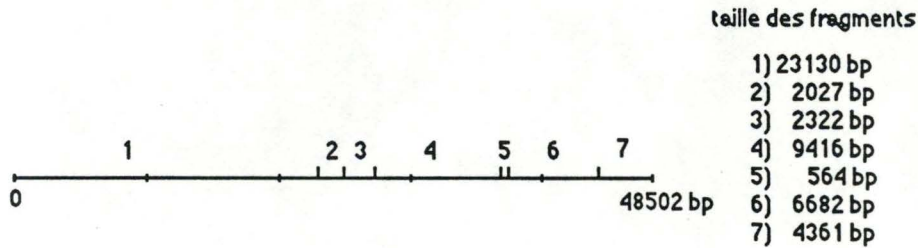


fig. 22: Carte de restriction de λ par Hind III.

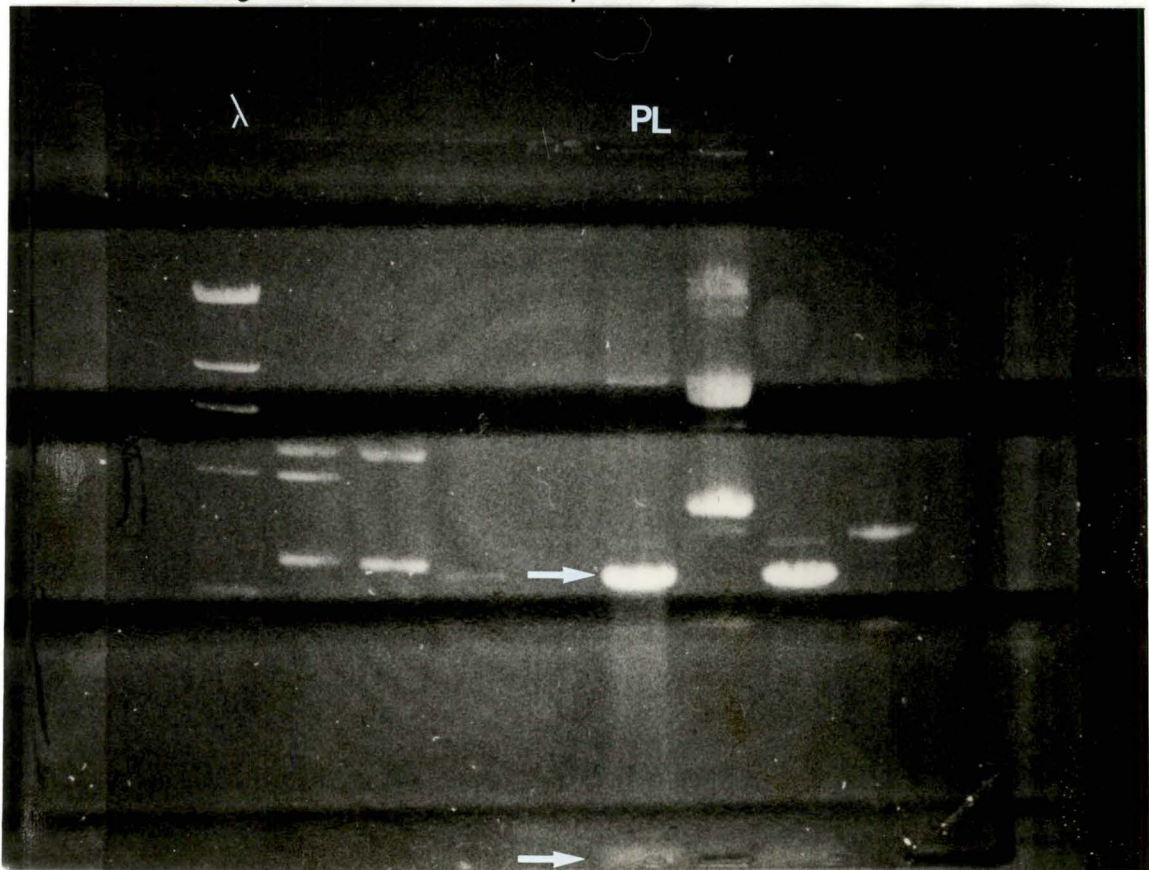


fig.23: Electrophorèse du plasmide pDS5/4-1.

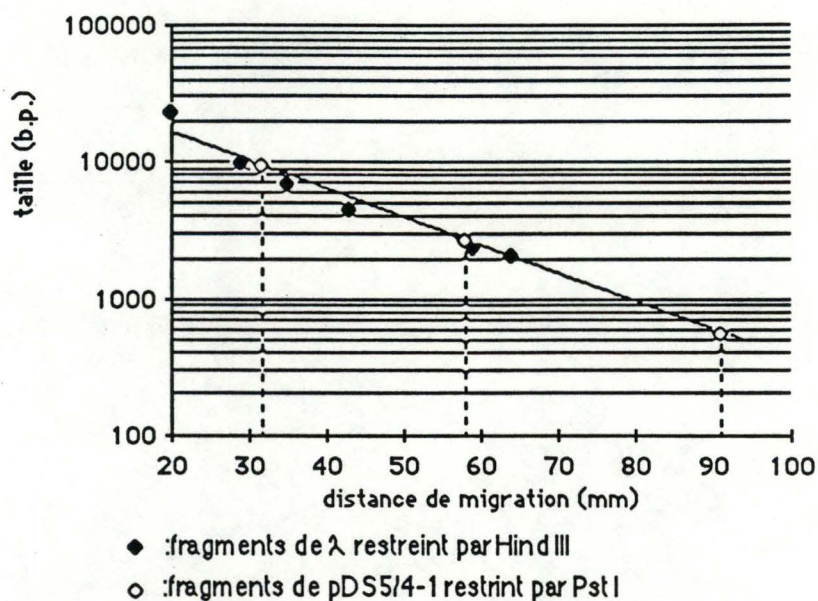


fig.24: Estimation de la taille du plasmide par électrophorèse après restriction.

2) Effet global de la coiffe sur la transcription et la traduction couplées :

Nous avons tout d'abord tenté une approche globale du problème. C'est - à - dire que nous cherchons à mettre en évidence l'effet des différentes coiffes au terme de la traduction.

Pour cela, nous réalisons des transcriptions *in vitro* immédiatement suivies de traduction dans un système acellulaire (lysate de réticulocytes de lapins).

2.1.) Définition préliminaires des conditions expérimentales.

2.1.1.) Conditions de transcription.

Les transcriptions sont réalisées en 2 étapes :

- La première a pour but de permettre à la coiffe de servir d'amorce.

On met en présence (dans 10 μ l de solution finale)

- 2 μ g de DNA plasmidique.
- 2.25 U de RNA polymérase de *E. coli*.
- 20 mM d'Hepes - KOH pH 7.5.
- 10 mM de MgAc.

- 200 mM de Kac .
- 0.2 mM de spermidine.
- 5 mM de dithiothréitol (DTT).
- 10 U d'inhibiteur de RNase de placenta humain (RNAsin).
- 0.25 mM de coiffe.
- 0.5 mM d'UTP.

suivant le type de coiffe utilisée, on ajoutera 1 μ l d'une solution de NTP (ATP, GTP, CTP) 5mM pour 2 des NTP et 5 mM pour le 3^{ème} NTP (celui dont la base correspond à la seconde base de la coiffe). Ainsi, si on utilise la coiffe ⁷mGpppA, on ajoutera 1 μ l de solution contenant :

GTP 5 mM

ATP 5 μ M

- La seconde étape doit permettre à la transcription de se continuer (une fois l'initiation réalisée).
- Après 5 min d'incubation au bain - marie à 37°C, on ajoute, à la mixture préparée lors de la 1^{ère} étape, 5 μ l d'une solution du NTP déficient à la concentration de 5 mM. Les échantillons sont ensuite mis à incuber pendant 15 min à 37°C (bain - marie).

2.1.2.) Conditions de traduction.

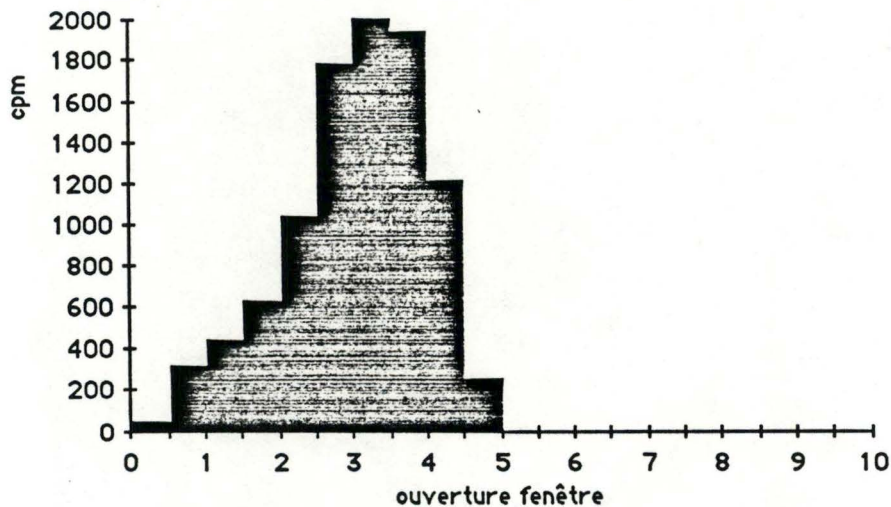
5 μ l de solution de transcription sont prélevés et mis dans 10 μ l de lysat de réticulocytes mRNA - dépendant en présence de 10 μ Ci de ³⁵S méthionine. L'incubation dure 60 min à 30°C. Après traduction et précipitation au TCA 10% froid (cfr. matériel et méthodes) , la radioactivité est mesurée en scintillation liquide.

2.1.3.) Conditions de comptage.

Détermination de l'ouverture optimale de la fenêtre du compteur:

0.01 μ Ci de ³⁵S méthionine sont appliquées sur un filtre Whatman 3 MM. Le filtre est déposé dans une fiole de comptage contenant 10 ml d'Aqualuma puis, compté en scintillation liquide.

Les comptages sont réalisés avec des ouvertures de fenêtres progressant de 0.5 unités.

fig.25 : Spectre d'émission du ^{35}S

Nous adoptons donc une fenêtre 0.5 - 6.

2.2.) Résultats négatifs

Les 1^{ères} expériences réalisées visent à comparer l'incorporation de ^{35}S méthionine après traduction de transcrits préparés en présence de l'une ou l'autre coiffe, par rapport à l'incorporation contrôle enregistrée quand on incube, dans le système de traduction une mixture de transcription sans DNA.

Ces expériences, réalisées sans DNA, servent à déterminer la traduction endogène au lysat de réticulocytes (due à des mRNA non détruits lors du traitement à la nucléase micrococcale).

Nous obtenons les résultats suivants:

coiffe A (cpm)	coiffe G (cpm)	coiffe C (cpm)	mixture de trans. sans DNA (cpm)
1320	3075	1149	1584
1502	3183	1157	1318
1147	4102	1057	3653
3890	1492	4009	
		3637	

⇒ ANOVA!

tableau 4 : cpm incorporés lors d'expériences de transcription - traduction réalisées avec différentes coiffes.

Test de comparaison des moyennes:

1) Homogénéité des variances. (test de Bartlett).

$$H_0: S^2_i = S^2 \text{ pour tout } i$$

$$H_1: S^2_i \neq S^2 \text{ pour au moins un } i$$

Pour éprouver H_0 , on utilise la statistique:

$$\chi^2 = (N-k) \ln S_g^2 - \sum (n_i-1) \ln S_i^2$$

$$S_g^2 = \frac{\sum (n_i-1) S_i^2}{\sum (n_i-1)}$$

Il y aura rejet de H_0 au niveau α si $\chi^2_{\text{obs.}} = \chi^2_{1-\alpha}$ pour $k-1$ degrés de liberté.

	S^2	n	\bar{x}
A	1668380	4	1965
G	1174035	4	2963
C	2209083	5	2202
DNA	1633957	3	2185

$k=4$

$$S_g^2 = 1719291$$

$$\chi^2_{\text{obs.}} = 0,334$$

$$\chi^2_{3;0.95} = 7,81 \quad \text{NS}$$

On ne peut donc pas montrer que les variances ne sont pas homogènes. Les moyennes sont donc comparables.

2) Comparaison des moyennes de 2 échantillons indépendants:

H_0 : la traduction avec DNA = la traduction endogène.

H_1 : la traduction avec DNA est différente de la traduction endogène.

Pour éprouver H_1 , on utilise la statistique :

$$t_{\text{obs.}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_g^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

avec
$$S_g^2 = \frac{SCE_1 + SCE_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Il y aura rejet de H_0 si:

$$|t_{\text{obs.}}| > t_{n_1+n_2-2; 1-\frac{\alpha}{2}}$$

	S_g^2	$t_{\text{obs.}}$	$t_{n_1+n_2-2; 0.975}$	
Coiffe A	1654610	-0.22	2.571	NS
Coiffe G	1358003	0.84	2.571	NS
Coiffe C	2017374	0.016	2.447	NS

On ne peut donc pas montrer qu'il y a eu traduction exogène lors de ces expériences.

Toutes les conditions nécessaires à la traduction ne semblent donc pas réunies.

Nous avons cependant mis sur gel de polyacrylamide des échantillons de solution de traduction. Comme le vérifie la photo ci - après, rien ne paraît avoir été synthétisé suite à l'addition de transcrits.

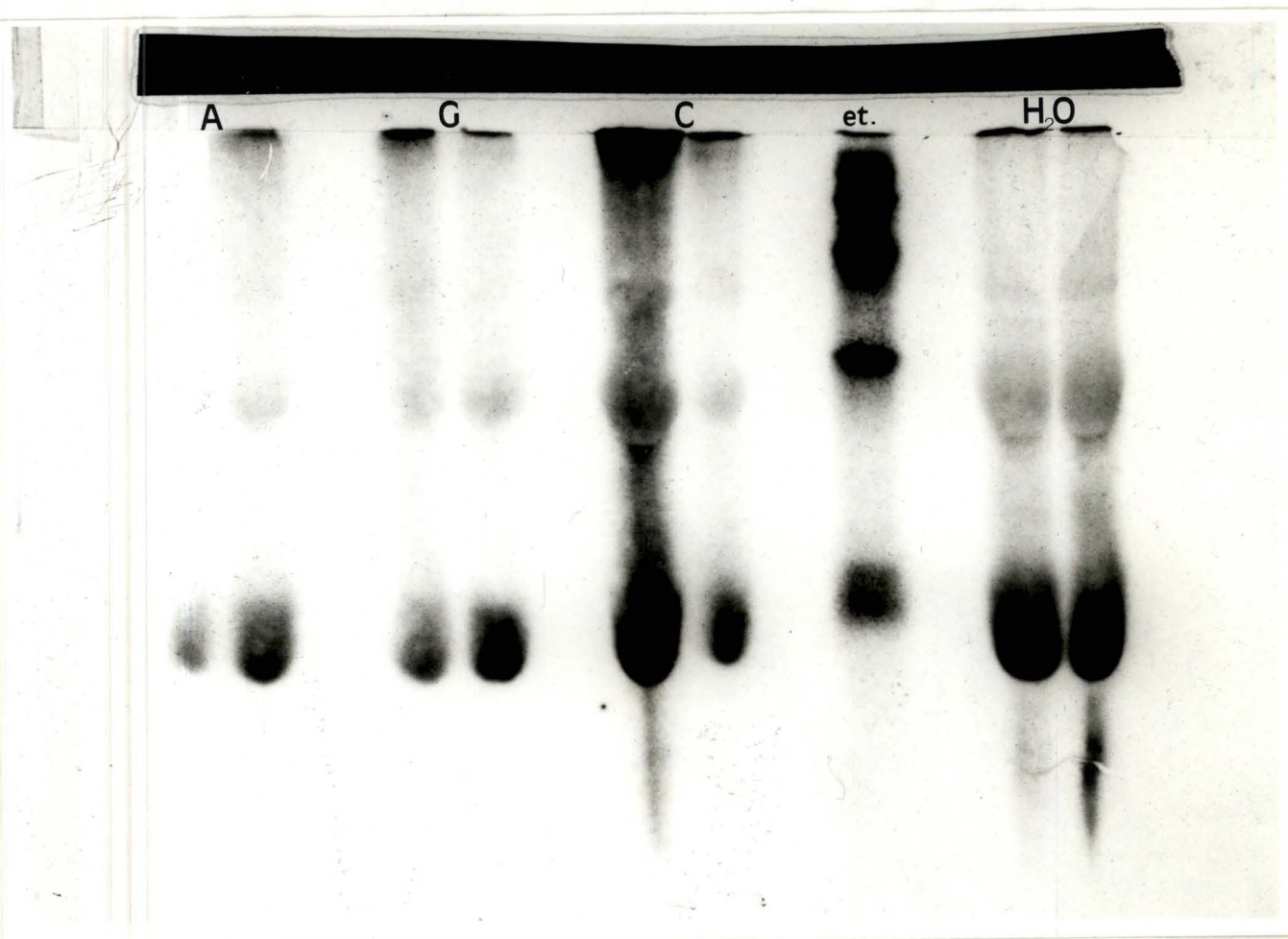


fig.26: Electrophorèse des produits de traduction sur gel de polyacrylamide.

On peut envisager différentes raisons à cela:

- soit le système de traduction est non fonctionnel: suite à un défaut intrinsèque ou à l'apport d'un inhibiteur par l'aliquot de transcription.
- soit les transcrits font défaut ou sont défectueux.

2.3.) Tests additionnels.

2.3.1.) Vérification de la fonctionnalité du STA

Nous avons, dès lors, testé le système de traduction lui - même.

Pour cela, 3 μ l d'une solution de mRNA de virus de la mosaïque du tabac (TMV) dilué 30 fois, sont ajouté à 10 μ l de lysat de réticulocytes, en présence de 10 μ Ci de 35 S méthionine. Après 60 min d'incubation à 30°C et précipitation au TCA , nous obtenons:

	TMV	H ₂ O
cpm incorporés	62177	4184

Ce qui est en accord avec les données fournies par la firme (Amersham).

Le système de traduction étant mis hors de cause, il nous faut chercher ailleurs la (les) causes(s) du manque d'incorporation de 35 S méthionine.

2.3.2.) Mise en cause du système de transcription.

2.3.2.1.) Hypothèse d'un inhibiteur sur la transcription.

- a) Inhibition provenant de la préparation de plasmide:

Une nouvelle préparation de plasmide fut réalisée.

Après électrophorèse et analyse du pattern obtenu, la préparation de plasmide semble conforme.

Nous l'utilisons dans le système de transcription - traduction couplées, mais n'obtenons cependant pas de meilleurs résultats. Le plasmide apparaît donc, à ce niveau d'analyse, hors de cause.

- b) Inhibition provenant des solutions de précurseurs.

Les solutions de nucléotides triphosphates et de coiffes ont été testées à leur tour. Nous pensons que leur conservation était peut - être mauvaise.

Des solutions fraîches en furent donc préparées, ce qui nous permit d'obtenir les résultats suivants :

Anciens NTP Anciennes coiffes (cpm)	Anciens NTP Nouvelles coiffes (cpm)	Nouveaux NTP Anciennes coiffes (cpm)	Nouveaux NTP Nouvelles coiffes (cpm)
3095	5856	3548	4346

Ces changements n'apportent donc aucune amélioration aux résultats.

- c) Inhibition due à la RNA polymérase.

Un nouveau batch de polymérase fut testé. Bien que dans deux expériences sur six, une augmentation d'incorporation fut observée,

Coiffe A (cpm)	Coiffe G (cpm)	Coiffe C (cpm)	Test sans DNA (cpm)
5021 6755	17442 7248	5051 13550	2430 1597

elle est loin d'atteindre les valeurs rapportées par D. Stueber et B. Dobberstein (58) (10^5 cpm dans des conditions de tests comparables.

- d) Conclusion.

Les différentes expériences ci-dessus visant à tester les composants du système de transcription ne nous ont pas permis de déceler une déficience pouvant expliquer des résultats négatifs. Il semble que les composants commerciaux ne puissent être suspectés. Toutefois, à défaut d'incorporation finale significative dans une fraction protéique, nous sommes incapables de préciser d'où provient le non-fonctionnement.

En particulier, la question se pose de l'efficacité de la transcription éventuelle et de l'état fonctionnel des produits de la réaction. Réactifs non consommés et produits non fonctionnels pourraient exercer une influence néfaste sur la traduction en système couplé.

2.3.2.2.) Hypothèse d'un inhibiteur de la traduction.

- a) Expérience préliminaire de mise en évidence.

Lors de traductions réalisées à partir de mRNA de TMV, la traduction endogène était déterminée en ajoutant de l'eau stérile au lysat de réticulocytes. Nous avons comparé cette traduction

endogène avec la traduction obtenue quand la mixture d'une transcription réalisée sans DNA était ajoutée au système de traduction.

Mixture de transc. réalisée sans DNA (cpm)	H ₂ O (cpm)
2636	4727
2430	4314
1584	3880
1597	3183
2932	4146

▫ test d'homogénéité des variances:

Pour comparer deux variances, la statistique à éprouver est:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

On rejettera l'hypothèse nulle si:

$$F_{\text{obs.}} > F_{1-\frac{\alpha}{2}} \text{ avec } (n-1) \text{ et } (n-2) \text{ degrés de liberté}$$

On a donc:

	S ²	\bar{X}
sans DNA	378869	2235
H ₂ O	351632	4040

 \Rightarrow

$F_{4;4;0.975}$	= 9.60	
$F_{\text{obs.}}$	= 1.077	NS

Ce test étant négatif, on peut comparer les moyennes.

▫ Comparaison des moyennes.

$$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$$

$$H_1: \bar{X}_1 < \bar{X}_2$$

puisque nous soupçonons la présence d'un inhibiteur.

$$\text{On rejette } H_0 \text{ si } t_{\text{obs.}} < t_{n_1 + n_2 - 2; \alpha}$$

Comme,

$$S_0^2 = 365250$$

$$t_{8;0.01} = -2.896$$

$$t_{\text{obs.}} = -4.72 \quad \text{SS}$$

Cette différence hautement significative entre les deux traductions indique qu'il y a bien un inhibiteur dans le milieu même qui sert à la transcription avant même que celle-ci n'ait lieu.

- b) Expériences relatives à la nature de l'inhibiteur.

◊ Un candidat tout désigné pour le rôle d'inhibiteur est sans doute la coiffe: Canaani et al. (1976) ont, en effet, montré que 0.3 mM de coiffe inhibait fortement la traduction dans un STA. Il s'agirait d'une compétition entre les coiffes précurseurs et les mRNA coiffés pour les facteurs de l'initiation (cfr. Introduction générale). Or, nous avons, dans nos expériences, 0.8 mM de coiffe. En outre, ceci met en évidence la difficulté des contrôles de traduction car, si la transcription n'est pas très efficace, il restera des coiffes dans le milieu de transcription après incubation, ce qui inhibera l'incorporation de ^{35}S méthionine. La concentration en coiffe restant dans le milieu ne sera cependant pas connue: le blanc utilisé soit négligera totalement l'effet inhibiteur (H_2O), soit le surestimera (transcription réalisée sans DNA).

◊ Effet différentiel possible des milieux de transcription différant par la nature des coiffes amorces.

Nous avons voulu savoir si la nature de la seconde base de la coiffe influençait son pouvoir inhibiteur. Des expériences furent réalisées dans lesquelles les mixtures de transcription, sans DNA, préparées avec les trois coiffes, étaient incubées dans du lysat de réticulocytes en présence de ^{35}S méthionine. Nous obtenons les résultats suivants:

	coiffe A (cpm)	coiffe G (cpm)	coiffe C (cpm)	H_2O (cpm)
	1600	2664	3705	3133
	3164	2868	2949	4146
	2216	1032	1609	1652
	1956	1933	1558	4239
	1038	1597	2932	3661
S^2	622199	634502	877173	1149889
\bar{X}	1995	2019	2550	3406

trouvé x > que dans le test précédent

▫ test d'homogénéité des variances:

Nous réalisons un test de Hartley car les effectifs sont égaux.

on utilise la statistique

$$H = \frac{S_{\text{max.}}^2}{S_{\text{min.}}^2}$$

La différence entre les deux tests (SS et NS) ne peuvent pas de lui à l'autre les moyennes, mais des p entre variance.

Pour éprouver les hypothèses $H_0: S^2_i = S^2$ pour tout i
 $H_1: S^2_i \neq S^2$ pour au moins un i

L'hypothèse nulle sera rejetée si

$$H_{obs.} > H_{k;(n-1); 1-\alpha}$$

Or

$$H_{4;4;0.95} = 20.6$$

$$H_{obs.} = 1.85 \quad \text{NS}$$

Donc, la comparaison des moyennes peut se faire valablement.

▫ Comparaison des moyennes:

On réalise un test d'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA 1) fixe.

Ce test compare la variabilité à l'intérieur des échantillons (estimée par SCE_F) par rapport à la variabilité entre échantillons (estimée par SCE_R). Si celle-ci est significativement supérieure à la première, on peut conclure à un effet du facteur étudié.

$$H_0 : m_1 = \dots = m_i = \dots = m_k$$

H_1 : Les moyennes ne sont pas toutes égales.

On éprouvera H_0 par la statistique:

$$F_{obs.} = \frac{CM_F}{CM_R}$$

avec

$$CM_F = \frac{SCE_F}{k-1}$$

$$CM_R = \frac{SCE_R}{N-k}$$

H_0 sera rejetée si

$$F_{obs.} > F_{(k-1);(N-k);(1-\alpha)}$$

SCE _F = 987168	$F_{2;12;0.95} = 3.89$ $F_{obs.} = 0.071$	NS
CM _F = 493584		
SCE _R = 8293964		
CM _R = 691163		

On ne peut pas mettre en évidence de différence entre les mixtures de transcription. Il n'y a donc soit pas d'effet inhibiteur visible de la coiffe, soit pas de différence détectée entre les coiffes variant par leur seconde base.

◇ Effet possible d'ions inhibiteurs.

Parmi les autres facteurs susceptibles d'influer sur la traduction *in vivo*, les conditions ioniques (Mg⁺, K⁺, Cl⁻, ...) sont réputé d'importance capitale. La littérature nous apprenant que les ions Cl⁻ ont aussi un effet inhibiteur sur la traduction *in vitro* (Vazquez 1979), nous nous sommes demandé si la solution de plasmides elle-même n'était pas inhibitrice car, il est possible qu'il y demeure des ions Cl⁻ provenant du gradient de CsCl.

Des traductions sont donc réalisées en présence de 3 µl de mRNA de TMV (dilué 30X) et de 2 µl de solution plasmidique.

TMV + H ₂ O (cpm) ²	TMV + solution plasmidique (cpm)
62177	1424

La traduction est donc nettement inhibée par la solution de DNA plasmidique. Cet effet, conjugué à celui probable de la coiffe, peut expliquer les faibles taux d'incorporation obtenus jusqu'ici.

Nous essayons d'éliminer l'inhibiteur en dialysant une nouvelle fois la solution de DNA contre 2 fois 1 L. de TE ou en réalisant une chromatographie sur colonne NENSORBTM 20 (cfr matériel et méthodes). Puis, nous effectuons une traduction de mRNA de TMV dilué 30 fois en présence de ces plasmides traités.

TMY seul (cpm)	TMY + sol. plasmide (cpm)	TMY + sol. plasmide dialysée (cpm)	TMY + sol. plasmide chromatographiée (cpm)
82447 54796	1784 —	76294 —	— 51932

La dialyse, comme la chromatographie, permettent donc d'éliminer un ou des inhibiteur(s) de petite taille (Cl^- ,...) . Ce n'est cependant pas suffisant car, des transcriptions - traductions couplées ont été réalisées avec ces nouvelles préparations plasmidiques . Elles montrent toujours une incorporation très faible. Dans ces conditions, il était illusoire d'espérer mettre en évidence un effet du type de coiffe sur la traduction.

2.4.) Conclusions.

L'approche globale consistant à utiliser le protocole préconisé par les auteurs ayant décrit ce système de transcription - traduction couplées pour tenter d'observer une influence éventuelle de la nature de la coiffe sur le taux d'incorporation de ^{35}S méthionine dans la fraction TCA insoluble a échoué. En effet, l'incorporation, dans ces conditions, ne diffère pas du contrôle.

La fonctionnalité du STA de réticulocytes ayant été vérifiée et les différents produits du système de transcription semblant répondre aux critères de qualité prescrits, l'hypothèse d'un inhibiteur de la traduction introduit via l'aliquote du milieu de transcription a été avancée. Parmi les candidats à jouer un tel rôle, on trouve au premier chef les coiffes elles - même (surtout dans la mesure où leur taux d'incorporation lors de la traduction serait insuffisant) et certains ions dont le Cl^- (qui pourrait provenir du gradient isopycniqne de préparation du DNA).

Par le recours à la dialyse et à la chromatographie, nous avons pu montrer la présence effective d'un inhibiteur de petite taille. Toutefois, ces opérations ne restaurent pas une traduction efficace, ce qui indiquerait que d'autres facteurs seraient en cause. On songe à un inhibiteur non préexistant mais apparaissant secondairement dans le milieu de transcription à la suite de l'incubation.

Il nous a alors paru nécessaire d'aller voir ce qui se passait au niveau de la transcription.

3.) Effet particulier de la coiffe sur la transcription.

3.1.) Définition préliminaire des conditions expérimentales.

3.1.1.) conditions de comptage.

L'optimum d'ouverture de la fenêtre du compteur pour la détection de la radioactivité émise

par le ^{32}P a été déterminé.

0.013 μCi d' α - ^{32}P - UTP sont mis dans une fiole de comptage en présence de 10 ml d'Aqualuma. Les fenêtres sont ouvertes de 0.5 en 0.5 unité.

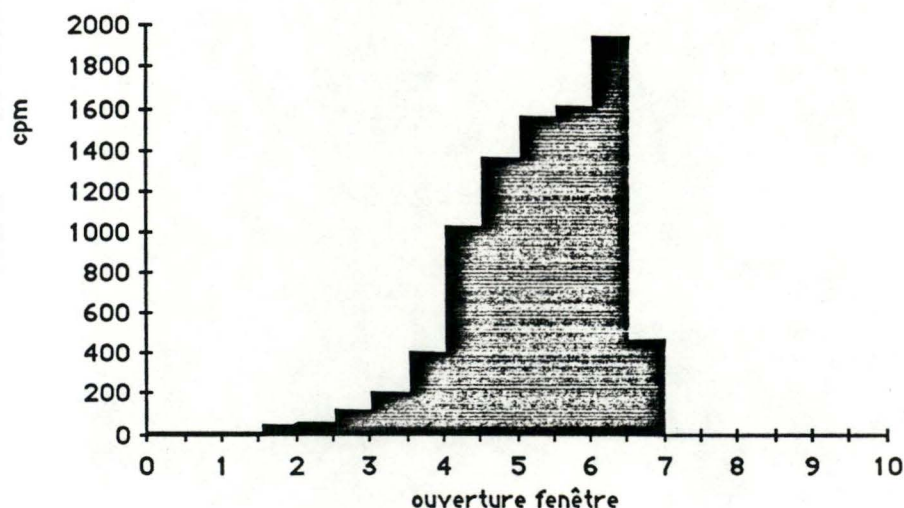


fig. 27: Spectre d'émission du ^{32}P .

L'optimum est donc atteint avec une ouverture de fenêtre allant de 3 à 8.

3.1.2.) conditions de marquage.

Les premières transcriptions sont réalisées en présence d' α - ^{32}P - UTP (40 μCi). Si on utilise la solution d'UTP radioactif telle quelle, toutes les transcriptions dépassent largement la capacité du compteur à scintillation (10^6 cpm) après précipitation au TCA 10% + pyrophosphate de Na. Nous avons donc dilué 200 fois la solution "mère" dans de l'UTP froid 5mM. On obtient ainsi une solution à 0.1 mCi/ml.

3.1.3.) Cinétique de transcription.

Nous avons, dans un premier temps, réalisé des cinétiques de transcription pour vérifier, si après 15 min, nous étions réellement au maximum de la transcription.

Voici les résultats obtenus pour les différents coiffes.

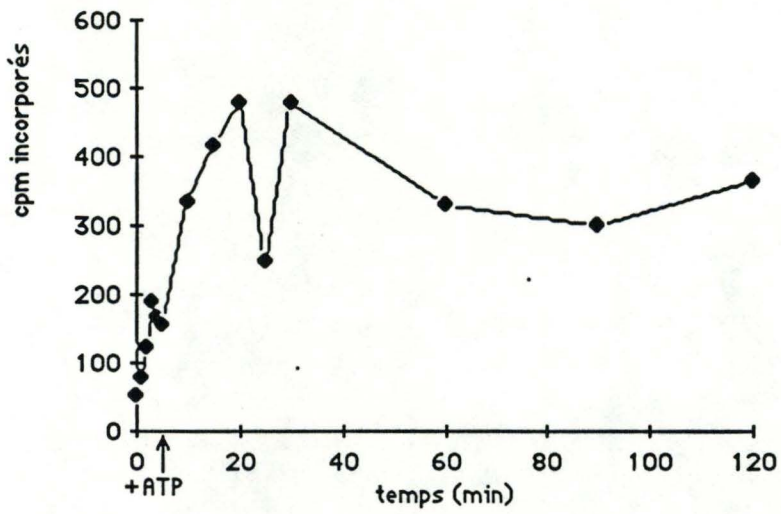


fig. 28: Cinétique de transcription réalisée avec la coiffe A

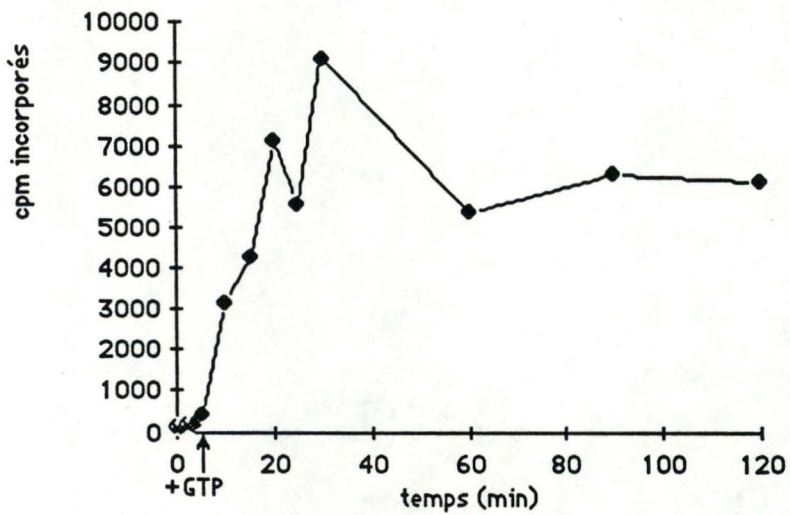


fig. 29: Cinétique de transcription réalisée avec la coiffe G

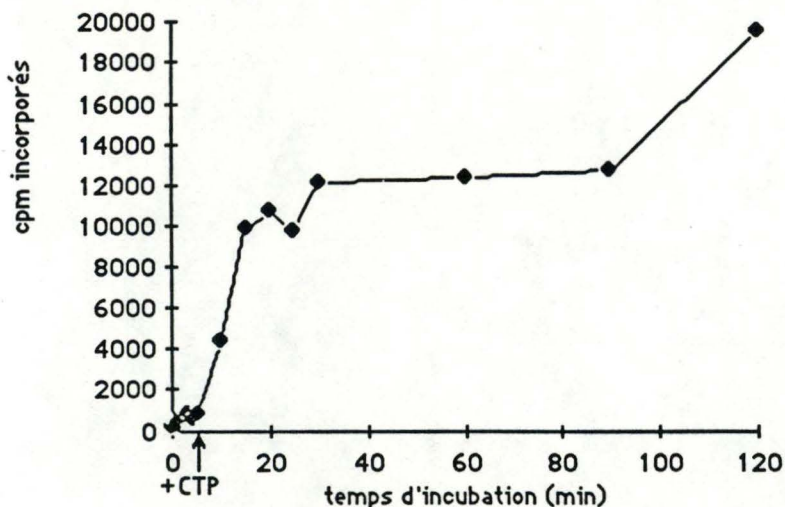


fig.30: Cinétique de transcription réalisée avec la coiffe C.

On peut constater qu'après 15 min nous nous trouvons bien proche du maximum de transcription. Celui-ci semble cependant se situer à 30 min

Les deux étapes de la transcription sont observables:

- La phase d'initiation, de 0 à 5 min, pendant laquelle la coiffe sert d'amorce.
- La phase d'élongation, après 5', c'est - à dire, dès que le nucléotide triphosphate déficient a été ajouté.

Dans les trois cas présentés on observe que le point 25 min est sensiblement décalé par rapport à la courbe sans qu'on puisse en proposer une explication raisonnable.

3.1.4.) Conclusion.

Ces résultats montrent une incorporation significative du précurseur marqué dans la fraction TCA insoluble. La question se pose dès lors de quantifier et de qualifier les produits obtenus dans le système de transcription et d'étudier l'influence éventuelle, à ce niveau, de la nature de la coiffe servant d'amorce.

3.2) Etude de l'influence de la nature de la coiffe sur la transcription.

3.2.1.) Etude quantitative au niveau de l'incorporation.

Pour déceler un éventuel effet du type de coiffe, des transcriptions ont été réalisées avec les 3 types de coiffe. Après précipitation au TCA et pyrophosphate, nous obtenons les résultats suivants:

coiffe A (cpm)	coiffe G (cpm)	coiffe C (cpm)	sans DNA (cpm)
2579	12053	15373	259
50	718	664	58
468	2377	2964	182
447	9115	11949	

* Analyse de la variance: ANOVA 2 croisée mixte.

Ce test a été préféré à une ANOVA 1 croisée car la radioactivité de l' α - ^{32}P - UTP a beaucoup varié d'une expérience à l'autre en raison de la décroissance radioactive naturelle, induisant une grande variabilité à l'intérieur des échantillons. Il fallait donc tenir compte de ce facteur.

	SCE	DL	CM	F	
T	342275736	11			
F	342275736	11			
A	102130255	2	51065127	4.98	S
B	178603603	3	59534534		
AB	61541877	6	10256979		

A = Type de coiffe.

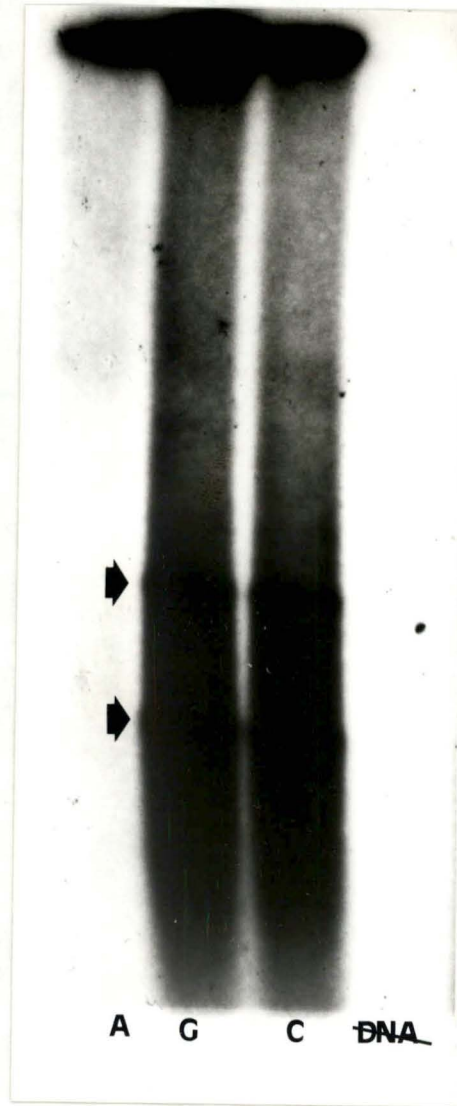
B = Radioactivité.

Ce qui permet d'affirmer avec moins de 6% de chance de se tromper que la nature de la seconde base de la coiffe a un effet sur la transcription.

Après réalisation des contrastes,

Coiffe A	Coiffe G	Coiffe C	F	
1	0	-1	4.57	S
1	-1	0	2.61	NS
0	1	-1	0.27	NS
2	-1	-1	4.7	S

Quels contrastes ?



on peut conclure que la coiffe $7mGpppA$ a une action significativement différente de $7mGpppC$. On ne peut cependant montrer de différence significative par rapport à $7mGpppG$.

Comme nous ne disposons pas de la coiffe $7mGpppU$, il nous était difficile de faire des comparaisons de groupes. Cependant, si nous comparons les bases qui s'unissent par trois ponts hydrogènes dans la double hélice de DNA (G et C) par rapport à l'adénine (deux ponts hydrogènes dans la double hélice), nous pouvons déceler une différence significative. Ceci n'est évidemment donné qu'à titre indicatif. Il faudrait, pour pouvoir tirer des conclusions plus précises disposer de la coiffe $7mGpppU$.

3.2.2.) Etude qualitative de la taille des transcrits.

Suite à ces résultats, il nous a semblé nécessaire de voir à quel(s) mRNA nous avons affaire: (s'agit-il bien du mRNA de lysozyme? , d'autres fragments pouvant interférer avec la traduction sont-ils détectables?...).

Pour répondre à cette question, des échantillons de transcription marqués au α - ^{32}P -UTP ont été déposés sur gel d'agarose 1.4% dans des conditions dénaturantes (glyoxal et DMSO) (cfr matériel et méthodes).

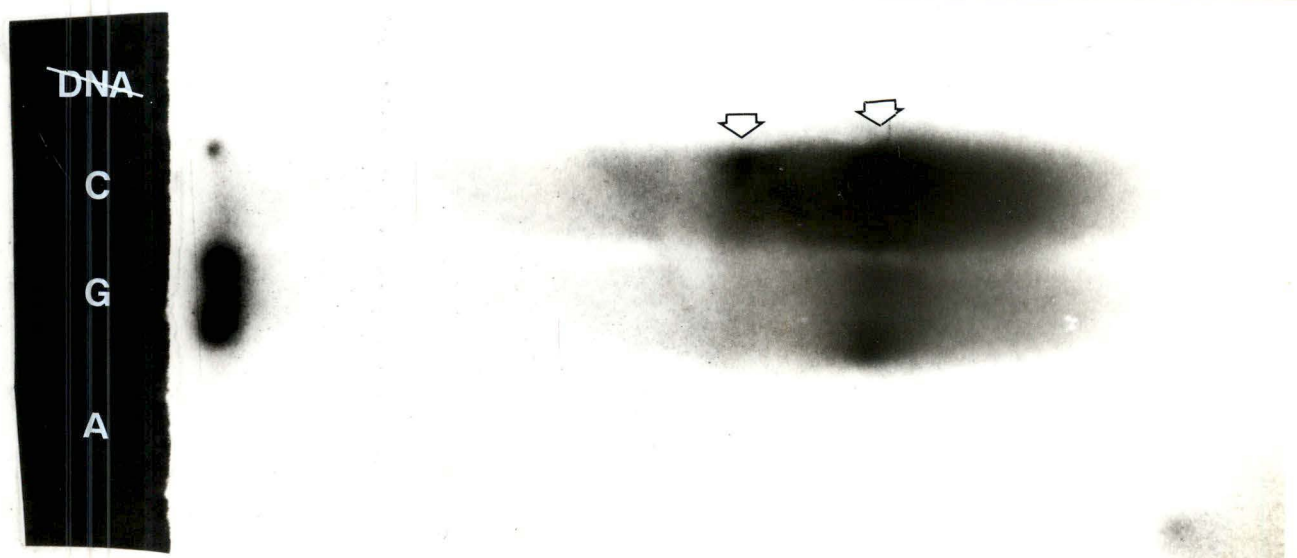


fig.31 : Analyse électrophorétique de la taille des RNA sur gel dénaturant d'agarose.

2 bandes majeures apparaissent : une au niveau de 600 b., l'autre au niveau de 1400 b. On sait que le gène de lysozyme a une taille de 600 bp. et le gène 'cat' 800 bp.

Le fragment de 1400 b. pourrait donc être dû à un "readthrough" sur le terminateur du gène de lysozyme.

La transcription s'arrête alors sur le terminateur t_{02} inséré après le gène 'cat' (cfr fig.14).

Les faibles bandes que l'on peut distinguer au dessus des 2 bandes principales, ainsi que la tache intense localisée dans les créneaux de départ sont sans doute dues à des molécules de RNA réassociées formant ainsi des complexes de plus grandes tailles.

Ces gels permettent aussi de constater que la coiffe 7mGpppA ne donne lieu à aucune synthèse.

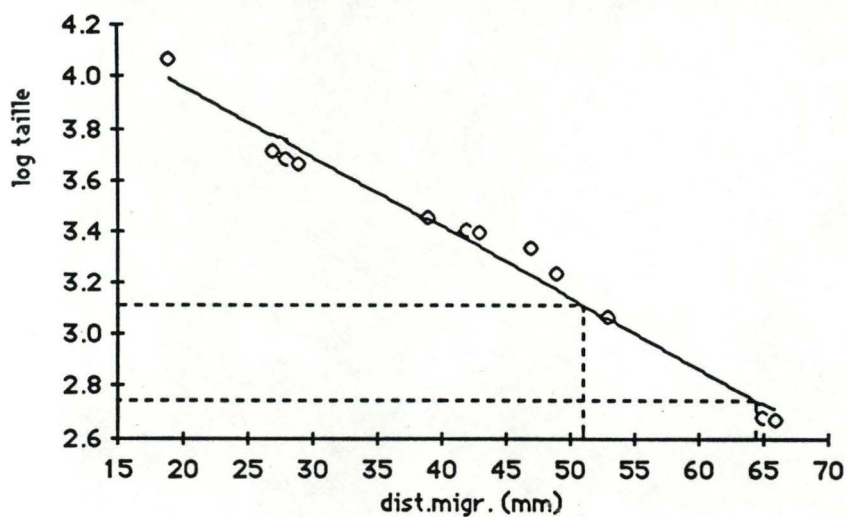


fig.32: Estimation de la taille des RNA par λ restreint par Pst I.

VI) Conclusion et perspectives

Dans la mesure où le système de transcription utilisé permet la production de mRNA diversement constitués (différents poly A, coiffes, trailers ou leader), les relations structure - fonction correspondantes peuvent être établies dans un système de traduction traditionnel.

L'optique de notre travail étant d'éprouver l'influence différentielle possible des coiffes $7mGpppA$, G, C sur l'efficacité de traduction (traductibilité et / ou stabilité), nous avons eu recours à un système réputé produire des transcrits, suite à l'amorçage par des coiffes commerciales synthétiques qui lui sont présentées. Un avantage particulier du système de Stueber, adopté ici, est la possibilité qu'il offre de réaliser la traduction des transcrits directement à partir d'un aliquot du milieu dans lequel a été réalisée la transcription.

Dans un premier temps, nous avons préparé le plasmide propre au système puis tenté, en vain, d'obtenir la traduction - transcription couplées du gène du lysozyme de poulet cloné.

L'origine de cet insuccès pouvant provenir de la matrice (le plasmide) ou des autres composants du système de traduction et / ou de transcription, nous avons procédé à une série de vérifications.

L'existence d'une inhibition due à des molécules de petite taille présentes dans le milieu de transcription et la fraction plasmidique purifiée a été décelée et sa nature discutée. Toutefois, l'élimination de cet inhibiteur (chromatographie, dialyse) ne restaure pas la traduction au départ des transcrits que nous produisons dans le système pDS. Un défaut de synthèse ou une déficience touchant les transcrits eux-mêmes ont été envisagés.

Une mesure de la radioactivité TCA insoluble après marquage au ^{32}P a montré qu'il y avait synthèse de RNA. Les plasmides fournissent donc des "template" donnant lieu à une transcription quantitativement efficace (Chaque molécule de plasmide sert de matrice pour produire 7 molécules de RNA). D'un point de vue qualitatif les profils électrophorétiques des RNA transcrits en présence des coiffes G et C sont compatibles avec les tailles attendues des gènes clonés dans le plasmide. A ce niveau d'analyse, grossier, les transcrits sont satisfaisants et, de plus, aucune différence marquante n'apparaît entre les coiffes G et C. Par contre, la coiffe A ne semble pas permettre de transcription détectable. Pour rendre compte de ces résultats, nous pouvons imaginer une altération de la coiffe commerciale A (à vérifier, par exemple par chromatographie) qui l'empêcherait de jouer son rôle d'amorce ou qui déstabiliserait tout RNA qui en serait pourvu. On ne peut cependant pas exclure que dans nos conditions de transcription in vitro la coiffe A, même intacte, soit un mauvais substrat, bien que dans les mains des inventeurs du système pDS et avec un plasmide analogue, mais non identique, il n'en soit rien (58). L'utilisation de coiffe marquée devrait permettre de mieux suivre leur devenir dans le système.

La question demeure de comprendre les causes de l'inefficacité des transcrits obtenus, avec quelle que coiffe que ce soit (G ou C), à servir de template dans le STA utilisé. Outre l'existence d'un inhibiteur déjà évoquée, il n'est pas à exclure qu'une inhibition plus spécifique du type de transcrit obtenu

ici soit due à un agent qui n'aurait pu être éliminé par les protocoles adoptés. Il y aurait lieu de vérifier, comme suggéré, l'absence effective de coiffe ou de débris de coiffe non incorporée dans le STA. Des fragments de RNA (ou des RNA produits de synthèse ou de dégradation dans le système), même non décelés sur gel, pourraient aussi avoir un effet défavorable.

La question de l'intégrité des transcrits eux - même, et en particulier de la coiffe qui les équipe, se pose aussi. Des analyses (HPLC, ...) pourraient répondre à cette question.

Enfin, dans le même ordre d'idée, il n'est pas exclu que d'autres altérations des transcrits(plus subtiles qu'une modification de taille dont l'absence a été vérifiée vérifiée par électrophorèse) les rendent inaptes à la traduction. Elles pourraient provenir d'un réarrangement du plasmide pDS5/4-1 ,à un moment ou à un autre du cycle de sa préparation, conduisant à un blocage précoce de la translation des ribosomes sur le RNA ce qui expliquerait automatiquement le défaut de traduction (Il est à noter que le plasmide particulier pDS5/4-1 de la série pDS confectionné dans les laboratoires de Dobberstein et Stueber et gracieusement mis à notre disposition par ces auteurs, n'est pas mentionné dans leurs publications. Il s'agit d'une version "améliorée" pDS5/4, mais dont nous ne savons pas si effectivement, il a pu être montré, dans ces laboratoires, qu'il avait tous les attributs requis. Cette version de pDS5/4, ou le lot que nous avons reçu, aurait pu avoir, dès l'origine ou aurait acquis ensuite un défaut structural le rendant inapte au fonctionnement complet dans le système de transcription - traduction couplées). L'évaluation de la taille, le mapping ou le séquençage de l'insert présent dans le plasmide dont nous disposons ,par comparaison avec le DNA originel correspondant devrait éclairer ce problème. Une autre manière de vérifier le blocage des ribosomes serait l'évaluation de la taille des polysomes par gradient ou directement par microscopie électronique.

Ces tests et contrôles n'ont pas été réalisés dans le cadre de ce travail dont le but central était d'adapter et de mettre au point un outil qualifié, par ses inventeurs, de simple à l'emploi pour l'étude des relations structure - fonction de la coiffe des mRNA. Mais, à l'évidence, les difficultés rencontrées, si elles nous ont permis de nous familiariser avec l'approche méthodologique de la question et d'en cerner la problématique, nous forcent à conclure qu'entre nos mains, le système pDS5/4-1 n'est pas immédiatement utilisable à cette fin.

En conclusion, nous pensons que l'idée d'aborder la question importante que pose la relation structure - fonction de la coiffe des mRNA eucaryotiques par le recours à ce système de transcription - traduction in vitro apparait, au terme de ce travail préliminaire comme une perspective valide et qui reste opérationnelle. En effet, le système pDS5/4-1 , entre nos mains, permet la production massive de transcrits (beaucoup plus importante que ce qu'offre le système commercialisé

SP6) ce qui démontre l'efficacité des signaux de pDS.

Aussi, plutôt que de rechercher davantage l'origine du non fonctionnement des transcrits obtenus jusqu'ici avec le pDS5/4-1, ce qui est toujours difficile et fastidieux dans un système couplé donnant une réponse de type tout - ou - rien, nous proposons de cloner un nouveau gène dans pDS5 lui - même (ce gène pourrait être celui de la luciférase, car il offre l'avantage d'un test de détection aisé par luminescence). Car pDS5, à l'inverse de pDS5/4-1, présente l'avantage d'être une construction bien éprouvée à notre connaissance.

VII) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) B.Alberts, D.Bray , J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, J.D.Watson
Molecular biology of the cell
Garland Publishing ,Inc. New-York & London (1983).
- 2) C.W.Anderson, J.W.Strauss, B.S.Dudock
Preparation of cell - free protein - synthetising system from wheat - germ.
Methods in enzymology;101 :635-645 .
Academic Press (1983)
- 3) S.A.Bonanou-Tzedaki, M.K.Sohi, H.R.V.Arnstein
Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysate.
Eur.J.Biochem.;114 :69-77 (1981).
- 4) H.Bujard
The interactions of *E.coli* RNA poymerase with promoters.
T.I.B.S. :274-278 (1980)
- 5) G.W.Both, Y.Furuichi, S.Muthukrishnan, A.J.Shatkin
Ribosomes binding to reovirus mRNA in protein synthesis requieres 5' terminal methylguanosine.
Cell ; 6 :185-195 (1975)
- 6) D.Canaani, M.Revel, Y.Groner
Translational discrimination of "capped" and "non capped" mRNA's:
Inhibition by a series of analogs of m⁷GpppX.
FEBS Letters; 64; 326-330 (1976)
- 7) V.L.Clark
Inhibition of the initiation of translation by a factor isolated from *E.coli* cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA; 77: 1181-1184 (1980)
- 8) R.Contreras, H. Cheroute, W. Degrave, W.Fiers
Simple,efficient *in vitro* synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eukaryotic genes.
Nucleic Acid Research ;10 :6353-6351 (1982)
- 9) H.A.Crissman, Z.Dardzynkiewicz, R.A.Tobey, J.A.Steinkamp
Correlate measurement of DNA,RNA and protein in individual cell by flow cytometry
Science ;228 :1321-1324 (1985)
- 10) J.D.Dignam, P.L.Martin, B.S.Shastry, R.G.Roeder
Eukaryotic gene transcription with purified components .
Methods in enzymology ;101 part C:583-598
Academic Press (1983)
- 11) J.A.R.Dillon, A.Nasim, E.R.Nestmann

Recombinant DNA methodology
Wiley & sons (1985)

- 12) D.R.Drummond, J.Armstrong, A.Colman
Effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNA's in *Xenopus* oocytes.
Nucleic Acid Research ;13 :7375-7395 (1985)
- 13) J.Engelbrecht, M.Simon, M.Silverman
Measuring gene expression with light.
Science ;227 :1345-1347 (1985)
- 14) W.Fillipowicz
Functions of the 5'- terminal m⁷G cap in eukaryotic mRNA.
F.E.B.S. Letters; 96 :1-9 (1978)
- 15) H.Fraenkel - Conrat, B.Singer
Effect of introduction of small alkyl group on mRNA function.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA;4 ;1983-1985 (1980)
- 16) M.Fresno, D.Vasquez
Inhibitory effects of "cap"analogues on globin mRNA and encephalomyocarditis RNA translation in the reticulocyte cell - free system.
Eur.J.Biochem; 103 :125-132 (1980)
- 17) A.Fritsch
Les centrifugations préparatives en gradient de densité.
Beckman instrument France :129-131 (1975)
- 18) Y .Furuichi, A.LaFiandra, A.J.Shatkin
5' terminal structure and mRNA stability.
Nature; 266 :235-239 (1977)
- 19) E.P. Geiduschek , R. Haselkorn.
Ann. Rev. Biochem. ;38 : 647 5 (1969). (in 19 bis)
- 19 bis) F. Gros, M.Grunberg - Manago.
Biosynthèse des acides nucléiques - Réplication et transcription.
Hermann Paris Cell Methode (1974)
- 20) T.Hashimoto - Gotoh, K.Ishii
Temperature sensitive replication plasmids are passively distributed during cell division at non - permissive temperature.
A new model for replication, duplication and partitioning
Mol.Gen.Genet. ;187; 523-525 (1982)
- 21) Hinckel & Chamberlain.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. ;35:65 (1970) (in 19 bis)

- 22) E.D.Hickey, L.A.Weber, C.Baglioni
Inhibition of initiation of protein synthesis by 7- methylguanosine - 5 - monophosphate.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA ;73 :19-23 (1976)
- 23) T.D.Kennedy, L.K.Hanley - Bowdoin, B.G.Lane
Structural integrity of RNA and translational integrity of ribosomes in nuclease - treated
cell - free protein synthesising systems prepared from wheat - germ and rabbit reticulocytes.
J. Biol. Chem. ;256 :5802-5809 (1981)
- 24) T.D.Kennedy, B.G.Lane
The probable "capping" of wheat leaf messenger ribonucleates by 7-methylguanosine.
Can.J.Biochemistry ;53 : 1346-1348 (1975)
- 25) D.Kennel
Isolation and fractionation of nucleic acids.
Methods in Enzymology ;vol. XII:688 - 693
Academic Press (1967).
- 26) F.T.Kenney , B.A.Hamkalo , G.Favelukes , J.T.August
Gene expression and its regulation (vol .I)
Plenum Press ,New-York (1973)
- 27) C.H.Kim, R.H.Sarma
Spatial configuration of mRNA 5' terminus.
Nature ;270 :223-227 (1977)
- 28) A.Kornberg
RNA - Polymerases
Supplement to DNA replication pp S52-S59
W.H.Freeman & company San Francisco (1982)
- 29) H.L.Kornberg FRS , D.C.Phillips FRS
Synthesis of amino acids and proteins.
MTP International Review of Science
Biochemistry series 1 (vol.7)
Butterworth University Park Press (1975).
- 30) M.Kozak
Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes
Nature ;280 :82-85 (1979)
- 31) M.Kozak
Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes,eukaryotes and organelles.
Microbiological Reviews ;47 n°1 :1- 45 (1983)
- 32) Krakow, Ochoa.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 49 :88 (1963). (in 19 bis)

- 33) S.Lax, W.Fritz, K.Browning, J.Ravel
Isolation and characterisation of factors from wheat-germ that exhibit eukaryotic initiation factor 4B activity and overcome 7- methylguanosine 5'- triphosphate inhibition of polypeptides synthesis.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA ;82 :330-333 (1985)
- 34) C.B.Lawrence
Activation of an internal initiation site for protein synthesis during in vitro translation.
Nucleic Acid Research ;8 :1307-1317 (1980).
- 35) B.Lewin
Genes II
John Wiley & sons (1984)
- 36) T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook
Molecular cloning . A laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
- 37) J.L.Manley, A.Fire, M.Samuels, P.A.Sharp.
In vitro transcription: whole-cell extract.
Methods in enzymology ;101 part C :568-583
Academic Press (1983)
- 38) W.C.Merrick
Translation of exogenous mRNA in reticulocyte lysate.
Methods in enzymology; 101 :606-615
Academic Press (1983)
- 39) W.C.Merrick
Purification of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes
Methods in enzymology ;Vol. LX :125-135
Academic Press (1979).
- 40) D.Micard, M.L.Sorbier, J.L.Couderc, B.Dastugue
Purification of RNA -free plasmid DNA using alkaline extraction followed by ultrogel A2 column chromatography.
Analytical biochemistry ;148 :121-126 (1985)
- 41) A.K.Mukkerjee, S.Sarkar
Non selective inhibition of mRNA translation by highly purified low molecular weight RNA species from ribosomal salt wash of chick embryonic muscle.
Molec.Biol.Report ;8 :51-56 (1981).
- 42) S.Muthukrishnan, G.W.Both, Y.Furuichi, A.J.Shatkin
5'- terminal -7- methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation.
Nature ;225 :33-37 (1975).
- 43) E.Ohtsubo, M.Zenilman, H.Ohstubo

Plasmids containing insertion elements are potential transposons.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA ;77 :750-754 (1980).

- 44) S.Pantoja, A.M.Zarraga, J.Villanueva, M.Krauskopf
Effect of calcium on protein synthesis in reticulocyte lysates.
I.R.C.S. Medical Science:biochemistry;Cell & membrane biology 9 ;651-652 (1981).
- 45) B.M.Paterson, M.Rosenberg
Efficient translation of procaryotic mRNA's in a eukaryotic cell-free system requierd addition of a cap structure.
Nature ;279 :692-696 (1979).
- 46) H.R.B.Pelham
Use of coupled transcription and translation to study mRNA production by vaccinia cores.
Nature ;269 :532-534 (1977)
- 47) J.Pelletier, N.Sonenberg
Insertion mutagenesis to increase secondary structure within 5'-noncoding region of an eukaryotic mRNA reduces translational efficiency.
Cell ;40 :515-526 (1985).
- 48) R.P.Perry, D.E.Kelley.
Kinetics of formation of 5'- terminal caps in mRNA.
Cell; 8 :433-442 (1976).
- 49) S.J.Plotch, M.Bouloy, I.Ulmanen, R.M.Krug.
A unique cap (m^7GpppX_m) dependent influenza virion endonuclease cleaves capped mRNA to generate the primers that initiate viral RNA transcription.
Cell; 23 :847-858 (1981).
- 50) Pribnow.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA ;72 :784 (1975). (in 4)
- 51) Richardson.
J. Mol. Biol. ; 21 : 83 (1966) (in 19 bis)
- 52) Richardson.
Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 9 :75 (1969) (in 19 bis)
- 53) M.Rosenberg, B.M.Paterson
Efficient cap - dependent translation of polycistronic prokaryotic mRNA's is restricted to the first gene in the operon.
Nature ;279: 696-701 (1979).
- 54) Schaller et al.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA ;72 :784 (1975).
- 55) E.T.Schenborn, R.C.Mierendorf jr.
A novel transcription property of SP6 & T7 RNA polymerases :dependance on template

structure.

Nucl. Acid. Research; 13 :number 17 (1985).

- 56) N. Sonenberg, H. Trachsel, S. Hecht, A. J. Shatkin
Differential stimulation of capped mRNA translation in vitro by cap binding protein.
Nature ; 285 :331-333 (1980)
- 57) A. Spina, E. Krause, B. Dobberstein
Translation efficiency of zein mRNA is reduced by hybrid formation between the 5'- and 3'- untranslated region
The EMBO journal ; 4 :2153-2158 (1985).
- 58) D. Stueber, I. Ibrahim, D. Cutler, B. Dobberstein, H. Bujard
A novel in vitro transcription - translation system : accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences.
The EMBO journal ; 3 :3143-3148 (1984)
- 59) D. Stueber, H. Bujard
Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes.
The EMBO journal ; 1 :1399-1404 (1982).
- 60) B. V. Treadwell, L. Mauser, W. G. Robinson
Initiation factors for protein synthesis from wheat germ.
Methods in enzymology ; Vol. LX :194-204
Academic Press (1979)
- 61) C. P. H. Vary, J. N. Vournakis
The use of acrylamide-agarose composite gels to measure relative rates of initiation of protein synthesis by eukaryotic mRNA's.
Gene Anal. Techn ; 2 :50-56 (1985)
- 62) D. Vasquez
Inhibition of protein biosynthesis
Springer -verlag Berlin Heidelberg New York (1979).
- 63) P. Verdonck
Modélisation d'un système de traduction acellulaire.
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques.
F.N.D.P. (1985)
- 64) A. Von Gabain, H. Bujard
Interaction of *E. coli* RNA polymerase with promoters of coliphage and plasmid DNA's.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; 76 :189-193 (1979)
- 65) H. O. Voorma, A. Thomas, H. Goumans, H. Ames, C. Van der Mast
Isolation and purification of initiation factors of protein synthesis from rabbit reticulocyte lysate.
Methods in enzymology; Vol. LX :125-135
Academic Press (1979).

- 66) O.M.H.De Vries, J.H.C.Hoge, J.G.H.Wessels
Translation of RNA from *Schizophyllum commune* in a wheat germ and rabbit reticulocyte lysate.
Comparison of in vitro and in vivo products after 2- dimensional gel electrophoresis.
Biophysica et biochemica acta:607 :373-378 (1980)
- 67) B.J.Walthall, L.L.Spremlili, S.R.Lax, J.M. Ravel
Isolation and purification of protein synthetising initiation factors from wheat germ.
Methods in enzymology:Vol. IX:194-204
Academic Press (1979).
- 68) Weiss , Gladston.
J. Amer. Chem. Soc. ; 81 : 4118 (1959). (in 19 bis)
- 69) R.Westerman
Simple drying of polyacrylamid gels for fluorography and storage.
Electrophoresis :6 :136-137 (1985)
- 70) J.Wilhlem , Haselkorn
In vitro protein synthesis directed by RNA from T4 - infected E . coli.
Methods in Enzymology vol XX : 531 - 537.
Academic Press (1971)
- 71) W.R.Woodward , J.L.Ivey , E .Herbert
Protein synthesis with rabbit reticulocytes preparations.
Methods in Enzymology vol XXX :724 - 731.
Academic Press (1974).
- 72) Woodward & woodward..
Concept of molecular genetics.
Mc Graw - Hill (1977)
- 73) SP6 system : for in vitro RNA synthesis
Amersham research news ; 48 :2 - 8 (1985)