

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

ANALYSE DU GÉNOME CHLOROPLASTIQUE D'EUGLENA GRACILIS SOUCHE Z
PAR DES MÉTHODES DE TRANSCRIPTION ET DE TRADUCTION IN VITRO

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

Bernard Rutti

licencié es sciences, orientation biologie expérimentale de
l'Université de Neuchâtel

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Analyse du génome chloroplastique d'*Euglena*
gracilis souche Z par des méthodes de trans-
cription et de traduction in vitro

de Monsieur Bernard Rutti

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs E. Stutz, P. Schürmann et
J.H. Weil (Strasbourg)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 9 août 1982

Le doyen :

A. Aeschlimann

A. Aeschlimann

À MES PARENTS

À LISE-HÉLÈNE

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué dans le laboratoire et sous la direction du Professeur E. Stutz à l'Institut de Botanique de Neuchâtel.

Pour l'intérêt et le soutien constants portés à notre travail ainsi que pour la formation que nous avons pu acquérir, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance au Prof. E. Stutz.

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur J.-H. Weil de l'Université de Strasbourg d'avoir bien voulu juger ce travail.

Nous exprimons aussi notre gratitude au Dr P. Schürmann pour les nombreux conseils et renseignements techniques qu'il nous a donnés ainsi que pour avoir accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Nous remercions tous les amis et collaborateurs du laboratoire de biochimie pour leur esprit de camaraderie et particulièrement Mlle B. Schlunegger et le Dr M. Keller de nous avoir facilité certaines étapes de ce travail.

La dactylographie de ce manuscrit a été confiée à Mlle M. Rapp que nous remercions sincèrement pour sa compétence et sa disponibilité.

Nous sommes également redevables à l'Etat de Neuchâtel de nous avoir attribué un poste d'assistant.

	<u>TABLE DES MATIERES</u>	<u>Page</u>
I	<u>Introduction</u>	1
II	<u>Matériel et Méthodes</u>	6
1.	Matériel biologique	6
2.	Culture des euglènes	7
2.1	Composition des différents milieux	7
2.1.1	Milieu de culture selon Vasconcelos <u>et al</u> (1971)	7
2.1.2	Milieux de culture selon Rawson et Stutz (1969)	7
2.2	Culture des euglènes pour l'isolement des chloroplastes intacts	8
2.3	Culture des euglènes pour l'isolement de l'ADN chloroplastique	9
3.	Isolement des chloroplastes et préparation des acides nucléiques chloroplastiques	9
3.1	Isolement des chloroplastes pour la préparation d'ARN	9
3.2	Isolement de l'ARN chloroplastique	13
3.3	Isolement des chloroplastes pour la préparation d'ADN	14
3.4	Isolement de l'ADN chloroplastique	15
4.	Isolement de la RuBP carboxylase	17
4.1	Etapes de purification	17
4.1.1	Méthode de Kleinkopf <u>et al</u> (1970)	17
4.1.2	Purification sur colonne Séphacryl S-300	17
4.1.3	Méthode de Buchanan et Schürmann (1973)	18
4.2	Test d'activité	18
5.	Clonage	21
5.1	Principe de l'utilisation des plasmides	21
5.2	Matériel biologique	21
5.3	Linéarisation et déphosphorylation du vecteur	21
5.4	Ligation	22
5.5	Préparation de la bactérie hôte	23
5.6	Transformation	23
5.7	Analyse des recombinants	24
5.7.1	Méthode de Birnboïm et Doly (1979)	24
5.7.2	Méthode de Grunstein et Hogness (1975)	26
5.8	Isolement des plasmides en grande quantité	26
5.8.1	Culture et amplification au chloramphénicol	26
5.8.2	Isolement de l'ADN plasmidial	27
5.8.3	Isolement de la forme I des plasmides par gradient de chlorure de césium	28

6.	Préparation du système de transcription-traduction couplé	29
6.1	Culture des cellules	29
6.1.1	Culture en continu	29
6.1.2	Culture en fermenteur	30
6.2	Préparation de l'extrait "S-30"	31
6.3	Préincubation et stockage	32
6.4	Milieu réactionnel	33
6.5	Analyse de l'incorporation de la méthionine dans des polypeptides précipitables au TCA	34
7.	Traduction dans le système acellulaire eucaryotique	35
8.	Biosynthèse <u>in organello</u>	35
9.	Electrophorèse sur gel	36
9.1	Gels pour l'analyse de l'ADN	36
9.1.1	Gels d'agarose	36
9.1.2	Gels composites	37
9.2	Gels pour l'analyse de l'ARN	38
9.3	Electroélution de fragments d'ADN	39
9.4	Gels d'analyse des protéines (SDS-PAGE)	39
9.4.1	Gel de séparation 15 ou 12,5 %	40
9.4.2	Gel de séparation, gradient linéaire de 10 à 15 %	41
9.4.3	Gel de concentration	42
9.4.4	Electrophorèse	42
9.4.5	Coloration - décoloration	43
9.4.6	Séchage et autoradiographie	43
9.4.7	Fluorographie	43
10.	Protéolyse partielle	44
10.1	Principe	44
10.2	Migration des protéines sur SDS-PAGE 10-15 %	44
10.3	Digestion protéolytique	44
11.	Transferts d'ADN et d'ARN	45
11.1	Transfert selon Southern	45
11.2	Transfert selon "Northern"	46
11.2.1	Préparation du papier NBM	46
11.2.2	Conversion du papier NBM en DBM	47
11.2.3	Préparation des gels d'ARN	47
12.	Hybridations	47
12.1	Principe	47
12.2	Hybridation ADN-ADN	48
12.2.1	Préparation des filtres	48
12.2.2	Marquage des fragments d'ADN par "Nick-translation"	48
12.2.3	Hybridation	49

12.3	Hybridation ADN-ARN	50
12.3.1	Préparation des filtres	50
12.3.2	Hybridation	50
12.4	"Hybrid selected translation" (HST)	50
12.5	"Hybrid arrested translation" (HART)	51
III	<u>Résultats</u>	53
1.	Transcription-traduction du génome chloroplastique d' <u>Euglena gracilis</u> dans un système acellulaire procaryotique	53
1.1	Introduction	53
1.2	Caractérisation du système de transcription-traduction couplé	54
1.2.1	Activité du système	54
1.2.2	Influence de la concentration en ADN	56
1.2.3	Incorporation de [³⁵ S]-méthionine en fonction du temps	59
1.2.4	Synthèse des protéines <u>in vitro</u> en présence d'ADN de bactériophage	63
1.2.5	Synthèse <u>in vitro</u> en présence du plasmide pBR ₃₂₂	65
1.3	Transcription-traduction du génome chloroplastique par le système acellulaire procaryotique	67
1.3.1	Transcription-traduction du ctADN digéré par certaines endonucléases de restriction	67
1.3.2	Transcription-traduction de quelques recombinants	72
1.3.3	Transcription-traduction du fragment EcoRI.N	76
1.4	Discussion	78
1.5	Résumé	83
2.	Traduction sélective d'ARN messagers dans un système acellulaire eucaryotique	85
2.1	Introduction	85
2.2	Traduction des ctARN dans un système procaryotique ou eucaryotique	86
2.3	Comparaison des produits de biosynthèse <u>in vitro</u> ou <u>in organello</u>	88
2.4	Traduction de mARN sélectionnés par hybridation	93
2.5	Capacité du fragment EcoRI.N à supprimer ou à sélectionner la biosynthèse <u>in vitro</u> de la protéine 53 Kd	95
2.6	Profils des protéines thylacoïdales et stromatiques	98
2.7	Discussion	98
2.8	Résumé	102

3.	Analyse du fragment EcoRI.N	104
3.1	Introduction	104
3.2	Localisation des sites de restriction	106
3.3	Transcription-traduction de pEgcE _N digéré par diverses endonucléases de restriction	113
3.4	Clonage des fragments Hind III et Bgl II re- couvrant le fragment EcoRI.N	115
3.5	Construction d'un clone contenant les fragments EcoRI.N + EcoRI.Q	121
3.6	Expérience selon "Northern"	126
3.7	Résumé	130
IV	<u>Discussion</u>	131
V	<u>Bibliographie</u>	

ABREVIATIONS ET UNITES

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
bp	paires de bases
BSA	albumine du sérum de boeuf
Ci	Curie (1 Ci = $2,2 \cdot 10^{12}$ désintégr./min.)
cpm	coups par minute
ct	chloroplastique (ctADN, ctARN)
d	Dalton (unité de poids équivalent au poids d'un atome d'hydrogène)
dATP	désoxy adénosine-5'-triphosphate
DBM	diazobenzyloxymethyl
dCTP	désoxy cytidine-5'-triphosphate
dGTP	désoxy guanosine-5'-triphosphate
dTTP	désoxy thymidine-5'-triphosphate
DTT	dithiothreitol
EDTA	sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique
kbp	1000 paires de bases
krpm	1000 tours par minute
LSU	grande sous-unité de la RuBPcase
Mr	masse relative apparente
NBM	nitrobenzyloxyméthyl
NBPC	1 - (m-nitrobenzyloxylméthyl) pyridiniumchloride
DO	densité optique
PEG	polyéthylène glycol
PPO	2,5 diphényloxazole
PVC	chlorure de polyvinyl
PVP	polyvinyl pyrrolidon
PVS	polyvinyl sulfate
psi	pound square inch
SSU	petite sous-unité de la RuBPcase
SDS	dodécyl sulfate de sodium (lauryl sulfate)
SSC	solution standard de citrate 1 x SSC = 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate trisodique
S-30	surnageant après centrifugation à 30'000 g
TCA	acide trichloroacétique
TEMED	N,N,N,N-tétraméthyl-éthylène-diamine
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TE	Tris 10mM EDTA 1mM pH 7.9
TNE	Tris 50mM NaCl 100mM EDTA 5mM pH 7.9

I Introduction

Euglena gracilis est une algue unicellulaire flagellée. Une culture axénique aisée et une croissance rapide en milieu liquide font d'elle un organisme facile à obtenir en quantité pour des études en biologie moléculaire.

Certaines de ses caractéristiques permettent l'étude de la photomorphogénèse des chloroplastes, aspect passionnant de la différenciation cellulaire.

Cette algue peut en effet vivre à l'obscurité totale dans un milieu hétérotrophe et se diviser normalement. Dans ces conditions, les chloroplastes se différencient en étioplastes (stade caractérisé par le peu de structure thylacoïdale, l'absence de chlorophylle et par conséquent l'incapacité de photosynthétiser).

Après illumination des algues cultivées à l'obscurité, les proplastides se différencient en chloroplastes actifs. Nous en trouvons une dizaine par cellules. Leur étude chez Euglena gracilis a été freinée par la difficulté de l'isolement de matériel pur et intègre (Salisbury et al, 1975).

Brawerman et Eisenstadt (1964) ont montré la présence de ctADN chez E. gracilis. La séparation de cette molécule avec l'ADN nucléaire est possible grâce à leur différence de densité.

Manning et al (1971) ont vu que ces molécules se trouvent dans les chloroplastes sous forme de superhélices circulaires de $44,5 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ de circonférence.

En comparant la longueur de l'ADN du bactériophage λ 14,9 ($\pm 0,3$) μm avec celle du ctADN d'Euglena gracilis, nous pouvons estimer un PM de $9,2 \cdot 10^7 \text{d}$, soit $2,06 \cdot 10^6 \text{d} / \mu\text{m}$ d'ADN double brin.

Le nombre de ces molécules approche la trentaine par chloroplaste selon Kolodner et Tewari (1972). Ces organites sont donc polyploïdes en admettant que toutes les molécules soient identiques.

Rawson et Boerma (1976) ont montré qu'en fait le nombre de molécules d'ADN varie. Il peut augmenter d'un facteur de 2 à 3 pendant le développement du chloroplaste induit par la lumière.

Cette augmentation permet donc un accroissement du nombre de gènes et ainsi des possibilités transcriptionnelles et traductionnelles accrues.

La découverte des enzymes de restriction a permis de mieux caractériser le génome du chloroplaste. Les fragments pouvant être clonés sont disponibles en grande quantité. Près de 104 Kbp, soit le 72 % du génome chloroplastique est disponible dans plusieurs laboratoires (Hallick, in press).

Scott et Smillie (1967) ont montré que le ctADN d'Euglena gracilis contient les gènes des rARN 23S et 16S. Depuis cette découverte, en employant les enzymes de restriction, plusieurs laboratoires ont localisé avec précision ces gènes (Gray et Hallick, 1978, Rawson et al, 1978, Jenni et Stutz, 1979). Il s'avère que l'arrangement de ceux-ci, en comparaison de la situation chez les végétaux supérieurs, représente un cas particulier.

Si la localisation des gènes de rARN a fait l'objet de nombreuses études, plusieurs gènes de tARN ont également été localisés (Orozco et Hallick, 1980, Keller et al, 1980, Graf et al, 1980). Il semble que 23 - 29 gènes soient présents sur le génome chloroplastique (Orozco et Hallick 1982/a).

Ces deux populations d'ARN constituent la majorité des ctARN totaux. Leur localisation est exclusivement portée par le génome chloroplastique. Le 13 à 14 % de ce dernier est nécessaire pour coder les rARN et les tARN. La question de savoir si l'espace restant est suffisant pour l'information génétique des protéines de structure et celles nécessaires à son métabolisme pose en fait le problème de l'autonomie du chloroplaste.

Des expériences d'hybridation selon Rawson et Boerma (1976) et de Chelm et Hallick (1976) montrent que jusqu'à 53 % du génome chloroplastique est transcrit. En retranchant les 13 - 14 % nécessaires aux rARN et tARN et si toutes les séquences sont traduites par l'appareil protéosynthétique du chloroplaste, environ 75 à 100 protéines peuvent être générées.

Nous voyons qu'il n'est pas possible que le chloroplaste soit autonome malgré la présence établie d'éléments clef tels: l'ADN, l'ADN polymérase, l'ARN polymérase et un appareil protéosynthétique distinct de celui trouvé dans le cytoplasme.

Nous savons en effet que dans les chloroplastes isolés de Pisum sativum, la fraction thylacoïdale peut être résolue pour le moins en 50 polypeptides différents alors que la fraction stromatique en 140 polypeptides (Ellis, 1981). De plus, les systèmes de transcription et de traduction sont constitués d'une centaine de protéines. Il est donc nécessaire qu'une partie de l'information génétique soit codée par le génome nucléaire.

Si le chloroplaste a sa propre information, bien qu'insuffisante à l'élaboration de ses structures, la question de la coopération entre les génomes se pose. L'exemple le mieux connu est celui de la ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase, enzyme participant aussi bien au cycle de réduction photosynthétique qu'au cycle d'oxydation photorespiratoire du carbone. Les deux sous-unités de cette enzyme (grande sous-unité de 59 Kd et petite sous-unité de 12 Kd) sont codées pour une part sur le génome du chloroplaste (LSU) et pour l'autre part sur le génome nucléaire (SSU).

D'autres exemples sont connus parmi les protéines thylacoïdales. Ainsi, certaines protéines associées à la chlorophylle a, le cytochrome b559, le cytochrome f, certaines sous-unités du facteur de couplage (α , β , et ϵ) sont codées par le génome chloroplastique et synthétisées par l'appareil protéosynthétique du chloroplaste. Par contre, la majorité des protéines ribosomiques chloroplastiques, la ferrédoxine, l'ARN polymérase chloroplastique, les aminoacyl tARN synthétases chloroplastiques et de nombreuses protéines thylacoïdales sont codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytoplasme (von Wettstein, 1981).

Nous avons commencé notre travail de thèse par essayer de mettre au point un système de transcription-traduction in vitro capable de lire l'information génétique sur le ctADN ou sur certains de ses fragments clonés. Le système décrit par Zubay et al (1970) nous semblait particulièrement adéquat vu le nombre de similitudes entre les composants, des chloroplastes et des bactéries, nécessaires à l'expression génétique.

Une deuxième approche basée sur la formation d'hétéroduplexes entre un fragment d'ADN dénaturé et la population de ctARN total nous a permis de sélectionner certains ARN messagers.

Nous avons alors comparé les produits de traduction de ces mARN avec les polypeptides chloroplastiques synthétisés dans des chloroplastes isolés.

II Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

Pour ce travail, nous utilisons la souche d'euglènes, Euglena gracilis Z, Klebs no 753 de la collection de cultures d'Algues de l'université d'Indiana, département de botanique, Bloomington Indiana, USA. Cette souche est maintenue à la lumière continue et à 14°C sur agar incliné contenant le milieu commercialisé "Euglena broth Difco".

Pour les expériences de clonage la bactérie hôte est une souche dérivée de Escherichia coli K 12 : HB 101 (Boyer, 1969).

Cette souche est conservée à -20°C dans du milieu L en présence de 40% glycérol (J.H.Miller, 1972).

Pour la préparation du système de transcription-traduction couplé la souche d'Escherichia coli possède les caractéristiques su⁻RNase I⁻ (Gesteland, 1966). Elle nous a été généreusement donnée par D.Belin, université de Genève. Cette souche est conservée à 4°C sous forme lyophilisée ou à -20°C dans du milieu L en présence de 40% glycérol.

La composition du milieu L est décrite au § 5.5.

2. Culture des euglènes

Deux techniques de culture sont employées selon les chloroplastes ou les macromolécules que nous voulons isoler.

Pour obtenir des chloroplastes intacts nous cultivons les euglènes dans le milieu modifié de Hutner selon Vasconcelos et al (1971) tandis que pour l'isolement du ct ADN la croissance hétérotrophe se fait dans du milieu Hutner, Greenblatt et Schiff (1959) modifié par l'adjonction des oligoéléments selon Crameret Myers (1952).

2.1 Composition des différents milieux

2.1.1 Milieu de culture selon Vasconcelos et al (1971)

Composés	solutions stocks	pour 1 litre
Vitamine B 12	10 µg/ml	5 ml
Vitamine B 1	0,178 M	1 ml
Tampon phosphate de potassium pH 6.0	1 M	0,6 ml
HCl	6 N	1,6 ml
Ca (NO ₃) ₂	1 M	0,1 ml
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	1 M	1,6 ml
Acide DL-malique	1 M	2 ml
KCl	1 M	2 ml
(a) Mn SO ₄ · H ₂ O	10 mM	0,9 ml
(a) Zn SO ₄ · 7 H ₂ O	10 mM	1 ml
(a) Fe ₂ (SO ₄) ₃ · 7 H ₂ O	20 mM	2 ml
(b) Glutamate d'ammonium	1 M	20,4 ml
Glucose (anhydre)	--	18 g

Le pH du milieu est ajusté à 3,5 avec HCl 6N, le volume est alors porté à 1 litre.

(a) ces solutions stocks sont préparées dans HCl 0,1N

(b) l'acide glutamique est ajusté à pH 6.0 avec NH₄OH (25%).

2.1.2 Milieux de culture selon Rawson et Stutz (1969)

Milieu hétérotrophe

Composés	solutions stocks	pour 1 litre
acide L-glutamique	--	5 g
acide DL-malique	--	2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 M	1,5 ml
KH ₂ PO ₄	1 M	3 ml
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	1 M	4,2 ml
Ca Co ₃	--	0,2 g
Solution d'oligoéléments	100 X	10 ml
Vitamine B 12	0,5 µg/ml	1 ml

Milieu autotrophe

Composés	solutions stocks	pour 1 litre
Citrate de trisodium		
$2H_2O$	1 M	1,5 ml
$(NH_4)_2HPO_4$	1 M	7,5 ml
KH_2PO_4	1 M	7,5 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 M	1,7 ml
$CaCl_2$	0,0182 M	10 ml
Solution d'oligoéléments	100 X	10 ml
Vitamine B 12	0,5 µg/ml	1 ml

Solution d'oligoéléments (100 X)

Composés	solutions stocks	pour 1 litre
Citrate de trisodium		
$2H_2O$	--	10 g
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$	--	0,3 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	18% (P : V)	1 ml
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	11% (P : V)	1 ml
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4% (P : V)	1 ml
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3% (P : V)	1 ml
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	13% (P : V)	0,1 ml
Vitamine B 1	1% (P : V)	0,1 ml

Cette solution est dissoute dans HCl 0,01 N

2.2 Culture des euglènes pour l'isolement des chloroplastes intacts

Des précultures de 100 ml de milieu selon Vasconcelos et al (1971) carencé en vitamine B 12 (50 ng/l) sont inoculées chaque semaine avec 0,2 ml de l'ancienne préculture.

De ces précultures, 10 ml sont inoculés dans 3 litres de même milieu et agités à la lumière continue pendant 5 jours à 24°C. Les algues sont récoltées par centrifugation à 3 Krpm pendant

3 minutes, à 4°C (rotor GSA).

Elles sont lavées dans du tampon phosphate, puis centrifugées comme précédemment. Le rendement est d'environ 6 à 8 g de cellules (poids humide) par litre de culture.

	conc. finale
<u>tampon phosphate pH 7.0</u> : KH_2PO_4	25 mM
K_2HPO_4	25 mM
Sorbitol	0,38 M

2.3 Culture des euglènes pour l'isolement de l'ADN chloroplastique

Cette méthode est inspirée de celle décrite par Rawson et Stutz (1969). Une préculture mixotrophe (cellules cultivées à la lumière dans un milieu hétérotrophe) est maintenue en phase exponentielle de croissance par repiquages hebdomadaires. 9 litres de milieu hétérotrophe sont inoculés avec 10 ml de la préculture et laissés à l'obscurité, à 24°C, sous agitation et aération continues pendant une semaine. Pour induire la formation de chloroplastes, 3 litres de ce milieu sont transférés dans 13,5 litres de milieu autotrophe et placés à la lumière fluorescente continue pendant 48 h. Les algues sont centrifugées en continu à 11 Krpm à 4°C (rotor SS-34) avec un débit de 1 litre par minute (Sorvall continuous flow system).

Les culots de cellules sont lavés dans du tampon Tris-HCl 50mM pH 7.5 puis centrifugés à 3 Krpm pendant 5 minutes, à 4°C (rotor SS-34). Le rendement est d'environ 1,2 g de cellules (poids humide) par litre de culture. Les algues sont conservées à -20°C jusqu'à leur emploi.

3. Isolement des chloroplastes et préparation des acides nucléiques chloroplastiques

3.1 Isolement des chloroplastes pour la préparation d'ARN (à 4°C)

Cette méthode est inspirée de celle décrite par Ortiz et al (1980).

L'isolement se fait à partir de cellules carencées en vitamine B 12. Les principales étapes sont:

- affaiblissement de la paroi de l'euglène par la trypsine avant le broyage des cellules
- centrifugations différentielles pour éliminer le maximum de cellules entières
- centrifugation sur gradient linéaire de Percoll pour séparer les chloroplastes intacts des chloroplastes brisés et des cellules entières. (voir schéma: préparation des chloroplastes intacts)

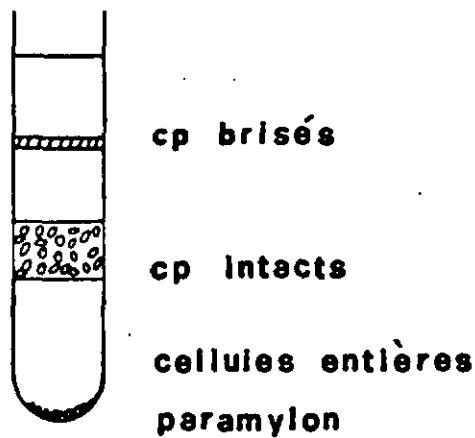
20 g de cellules fraîches (poids humide) sont remis en suspension dans 15 ml de tampon phosphate. Nous ajoutons 200 mg de trypsine (type III Sigma) et incubons la solution à 4°C sous légère agitation pendant 1 h.

La digestion est contrôlée au microscope optique et est arrêtée lorsque les cellules commencent à lyser et à s'agglutiner. Nous ajoutons alors un excès de tampon phosphate pour diluer l'enzyme (200 ml). La suspension est centrifugée à 1000 rpm pendant 3 minutes (rotor SS-34), les culots sont lavés dans 200 ml de tampon phosphate, centrifugés et remis en suspension dans 50 ml de tampon Hepes.

Nous cassons les cellules dans un "Waring blender" (vitesse minimum pendant 5 à 10 secondes).

Une centrifugation à 1000 rpm pendant 1 minute (rotor SS-34) permet d'éliminer les cellules entières. Nous répétons cette centrifugation une seconde fois après avoir récupéré soigneusement le surnageant (étapes critiques). La solution de chloroplastes est centrifugée à 3 Krpm pendant 5 minutes (rotor SS-34). Le culot représente la fraction de chloroplastes bruts que nous purifions sur gradient linéaire de Percoll 10 à 80%. Les chloroplastes sont resuspendus dans le tampon gradient (environ 2 ml) et déposés sur les gradients de Percoll. Ils sont alors centrifugés à 7 Krpm pendant 20 minutes (rotor HB-4).

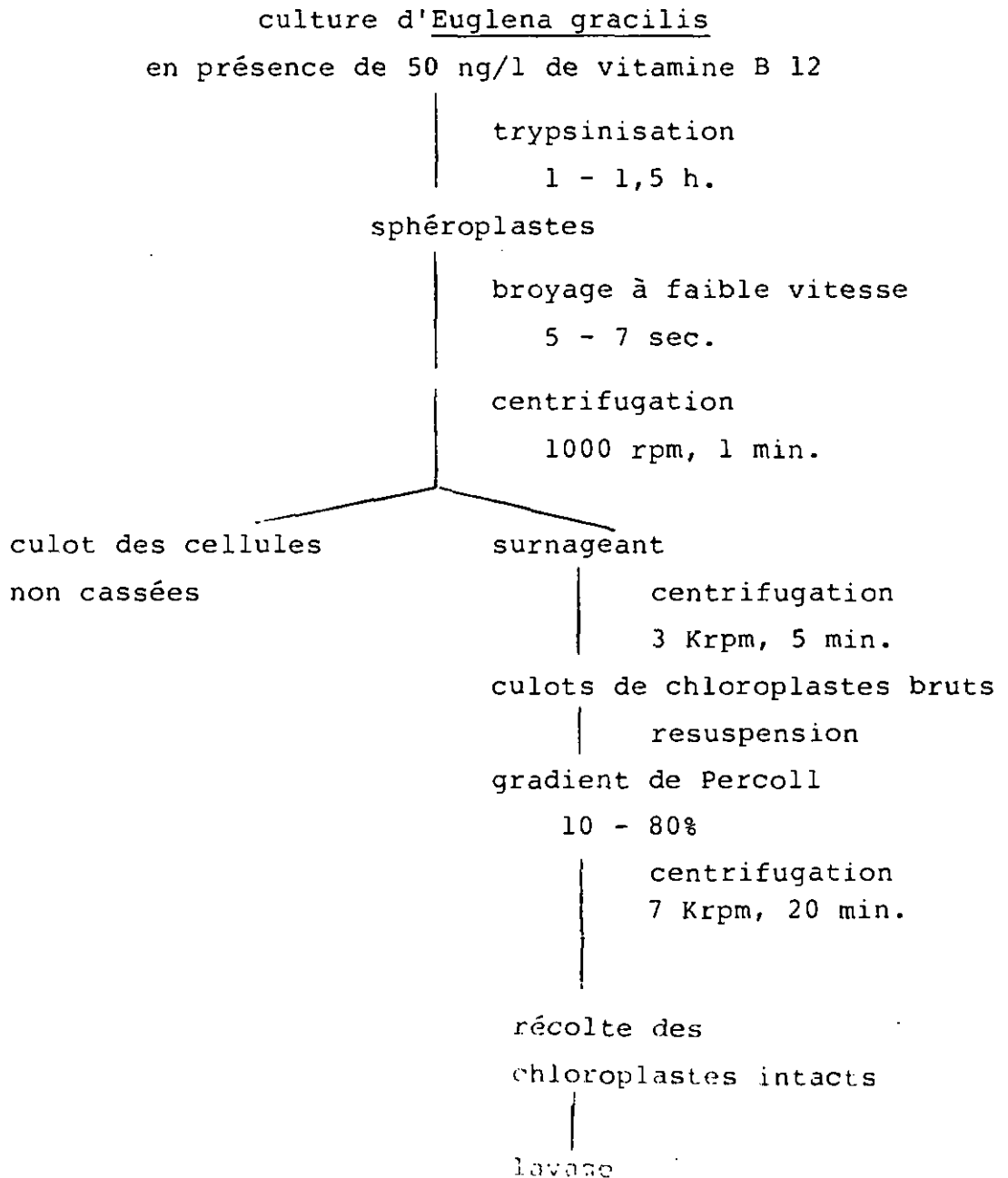
Situation après centrifugation:



Nous prélevons la bande inférieure du gradient et la diluons avec 2 volumes de tampon gradient. Après centrifugation à 7 Krpm pendant 5 minutes (rotor SS-34), les chloroplastes sont prêts pour l'isolement des ARN

Préparation des chloroplastes intacts

représentation schématique des principales étapes:



-tampon phosphate pH 7.0:

KH_2PO_4	25 mM
K_2HPO_4	25 mM
Sorbitol	0,38 M

-tampon Hepes pH 7.4:

Hepes	25 mM
EDTA 0.mM	0.5 mM
Sorbitol	0,33 M

-tampon gradient: (1x)

Hepes	5mM
Saccharose	0,15 M
Sorbitol	0,15 M
Ficoll	1%
PVS	2 $\mu\text{g/ml}$
NaCl	15 mM

Le tampon gradient est ajusté à pH 6.8 avec du NaOH 6 N.

Le PVS est un inhibiteur des RNases.

Solutions gradients

Pour 2 gradients, les solutions suivantes sont préparées juste avant l'expérience.

<u>- solution de Percoll:</u>	PEG 6000	5 g
	BSA	0,5 g
	Percoll	50 ml

- | | | |
|------------------------------------|---------------------|---------|
| - <u>solution de Percoll 10%</u> : | Solution tampon | |
| | gradient (5x) | 7 ml |
| | Solution de Percoll | 3,5 ml |
| | H ₂ O | 24,5 ml |
| - <u>solution de Percoll 80%</u> : | Solution tampon | |
| | gradient (5x) | 7 ml |
| | Solution de Percoll | 28 ml |
| - <u>solution coussin 80%</u> : | Solution tampon | |
| | gradient (5x) | 2 ml |
| | Solution de Percoll | 8 ml |

3.2 Isolement de l'ARN chloroplastique

Cette méthode est basée sur celle de Sagher et al (1976). Le culot de chloroplastes obtenu de 3 litres de culture est resuspendu dans 5 ml de tampon d'extraction. Nous ajoutons 5 ml de PCQ et 5 ml de chloroforme et nous agitons vigoureusement pendant 5 min. à température ambiante. Après centrifugation à 10 Krpm pendant 5 min. (rotor HB-4), la phase aqueuse est prélevée et agitée vigoureusement en présence de 1 volume de phénol saturé d'H₂O distillée et 1 volume de chloroforme. Les extractions phénoliques sont répétées 3x. Ensuite nous ajoutons 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5.5 et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Les acides nucléiques sont précipités à -80°C pendant 30 min. puis centrifugés à 10 Krpm pendant 20 min., à 4°C (rotor HB-4). Après 3 lavages (resuspensions et précipitations successives) le culot d'acides nucléiques est resuspendu dans 3 ml de tampon DNase. L'ADN est digéré pendant 30 min. à 0°C en présence de 10 µg/ml de DNase (RNase free).

La DNase est extraite au phénol-chloroforme et la phase aqueuse résultante est précipitée à l'éthanol. L'ARN est dissout dans de l'eau bidistillée stérile et conservé à -80°C.

- tampon d'extraction:

Triisopropylnaphtalène sulfonate de sodium	2%
NaCl	1%
MgCl ₂	2,5 mM
Tris-HCl pH 7.6	50 mM

- PCQ (phénol-crésol-quinoléine):

Phénol	70%
m-crésol	20%
8-OH quinoléine	0,1 g
H ₂ O distillée	10%

- tampon DNase:

NaCl	0,2 M
MgCl ₂	1 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM

3.3 Isolement des chloroplastes pour la préparation d'ADN (à 4°C)

Des lots de 30 g de cellules congelées sont mis en suspension dans 60 ml de saccharose 0,34 M tamponné (tampon I). Pour affaiblir leurs parois, les algues sont incubées à 4°C pendant la nuit en présence de 1 mg de trypsine par gramme de cellules. Après élimination de la trypsine par deux lavages dans la solution ci-dessus les cellules sont resuspendues dans du saccharose 0,7 M tamponné. Pour un rendement optimal en chloroplastes les euglènes sont broyées dans un mixer à vitesse maximum pendant 15 à 20 secondes. Le processus de cassage

est suivi au microscope optique.

Après passage de la suspension à travers 10 couches de gaze et centrifugation du filtrat à 3 Krpm (rotor SS-34), les culots sont resuspendus et homogénéisés dans du saccharose 1,4 M tamponné. Sur cette solution dans des tubes à centrifuger nous déposons 1 ml de solution saccharose 0,34 M. En centrifugeant l'homogénat à 5 Krpm pendant 5 min. puis à 24 Krpm pendant 20 min. à 4°C (rotor SW 27, Beckman LS-65) les cellules entières sédimentent alors que les chloroplastes forment une galette compacte au haut du tube (entre les solutions de saccharose 0,34 M et 1,4 M).

Les chloroplastes sont alors lavés deux fois dans le tampon II puis centrifugés à 10 Krpm pendant 5 min. à 4°C (rotor SS-34).

- tampon I

Tris-HCl pH 7.9	50 mM
EDTA	10 mM
KCl	40 mM

- tampon II

Tris-HCl pH 7.9	50 mM
EDTA	10 mM
NaCl	200 mM

3.4 Isolement de l'ADN chloroplastique.

Cette méthode suit essentiellement celle décrite par Kolodner et Tewari (1975). Les chloroplastes de 30 g de cellules sont resuspendus dans 3,8 ml de tampon A auquel nous ajoutons 1 ml de protéinase K (1mg/ml). Après avoir ajouté 1,2 ml de sarkosinate de sodium 10% dans du tampon A, nous incubons le mélange

pendant 30 min. à température ambiante pour lyser les chloroplastes. Nous ajoutons 2 ml de tampon A contenant 4 M de chlorure de césium et laissons la solution dans la glace pendant 1h30. Nous éliminons alors les débris protéiques après centrifugation à 3500 rpm pendant 30 min. (rotor SS-34).

Nous ajoutons 0,4 g de CsCl et 0,025 ml de bromure d'éthidium (10 mg/ml). Cette solution, déposée sur 3 ml de solution coussin permet de faire 2 gradients discontinus. Ils sont centrifugés à 33 Krpm pendant 15 h. à 20°C (rotor Ti 65, Beckmann LS-65). Les bandes d'ADN (fluorescentes sous lumière UV) sont récoltées, et traitées au 3-méthyl-1-butanol saturé avec 10 mM EDTA pour extraire le bromure d'éthidium. Un second gradient de CsCl contenant du tampon A, 1 μ g/ml de bromure d'éthidium et ayant une densité de 1,69 g/cm³ à 25°C est préparé et centrifugé à 33 Krpm pendant 50 h. à 20°C (rotor Ti 65, Beckmann LS-65). Les bandes d'ADN sont traitées comme ci-dessus. Après extraction du bromure d'éthidium la solution est dialysée contre du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.9 EDTA 1 mM, puis concentrée dans une solution de glycérol 50% tamponnée. Elle est alors dialysée contre du glycérol 50% tamponné et conservée à -20°C.

- Tampon A

Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA	20 mM

- Solution coussin

CsCl	6,89 g
Tampon A	4,9 ml
Bromure d'éthidium (10 mg/ml)	0,14 ml
Volume final environ	6,8 ml

La densité de la solution coussin est réglée pour un indice de réfraction à 25°C de 1,4031.

4. Isolement de la RuBP carboxylase

4.1 Etapas de purification

Nous avons isolé cette enzyme à partir d'euglènes cultivées dans un milieu hétérotrophe mis à la lumière pendant 7 jours. 50 g de cellules congelées sont resuspendues dans 150 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7.0, mercaptoéthanol 14 mM.

Les cellules sont cassées par 5 sonications successives de 30 secondes à l'aide d'un sonicateur Labsonic 1510 Braun, grande sonde, puissance maximum (~ 380 watts). Entre chaque sonication la solution est plongée dans un mélange glace NaCl. Le broyat est centrifugé à 20 Krpm pendant 20 min. (rotor SS-34). La fraction précipitable au sulfate d'ammonium 35 à 55% contient en grande partie l'enzyme. Le culot obtenu après cette étape est resuspendu dans un très petit volume de tampon phosphate et dialysé contre du tampon Tris-HCl 20 mM pH 7.9 pendant 2 à 3 heures. Il est ensuite centrifugé à 20 Krpm, 20 min. (rotor SS-34). Le surnageant résultant contient l'enzyme brut que l'on peut purifier selon les 3 techniques décrites ci-dessous.

4.1.1 Méthode de Kleinkopf et al (1970)

L'échantillon est placé sur un gradient linéaire de saccharose 0,15 à 0,9 M tamponné avec du Tris-HCl 20 mM pH 7.9 et il est centrifugé à 25 Krpm, 20 h., 4°C (rotor SW 27, Beckman LS-65).

4.1.2 Purification sur colonne Séphacryl S-300

L'échantillon est déposé sur une colonne Séphacryl S-300 (volume 140 ml, dimensions 1,5 x 84 cm) équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.0 NaCl 200 mM. Nous éluons l'échantillon à une vitesse de 25 ml/h et récoltons des fractions de 6 ml analysées par cellule UVICORD à 280 nm.

Les fractions contenant la carboxylase sont dialysées contre du tampon phosphate 50 mM pH 7.0 mercaptoéthanol 16 mM, puis précipitées au sulfate d'ammonium 0-60 %.

4.1.3 Méthode de Buchanan et Schürmann (1973)

L'échantillon est déposé sur une colonne DEAE Séphacel (volume 20 ml, dimensions 4,2 x 2,5 cm) équilibrée dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.0 mercaptoéthanol 2,8 mM. Nous éluons l'échantillon à une vitesse de 20 ml/h par un gradient de NaCl 0-400 mM dans le tampon ci-dessus. Nous testons l'activité des différentes fractions récoltées selon la méthode décrite au paragraphe 4.2, rassemblons les fractions intéressantes, dialysons ces dernières contre du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.0 mercaptoéthanol 14 mM et concentrons la protéine par précipitation au sulfate d'ammonium 0-60 %.

4.2 Test d'activité

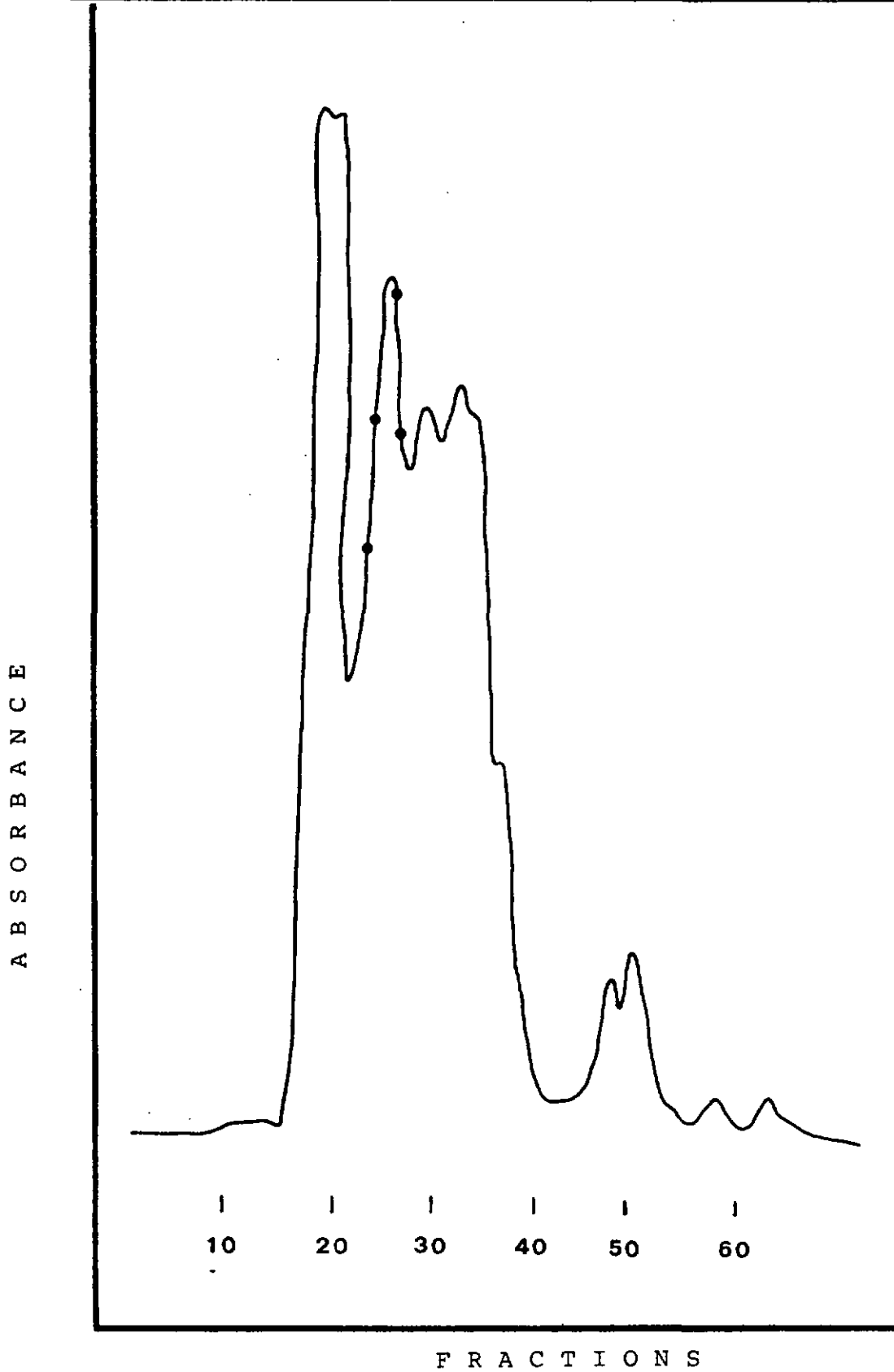
Nous avons utilisé le test décrit ci-dessous (Buchanan et Schürmann, 1973). Le volume réactionnel de 250 μ l est préincubé 15 min. à température ambiante sans le ribulose 1,5 bisphosphate.

La réaction est initiée par l'adjonction du ribulose 1,5 bisphosphate et est stoppée après 5 min. en ajoutant 50 μ l d'HCl 2 N.

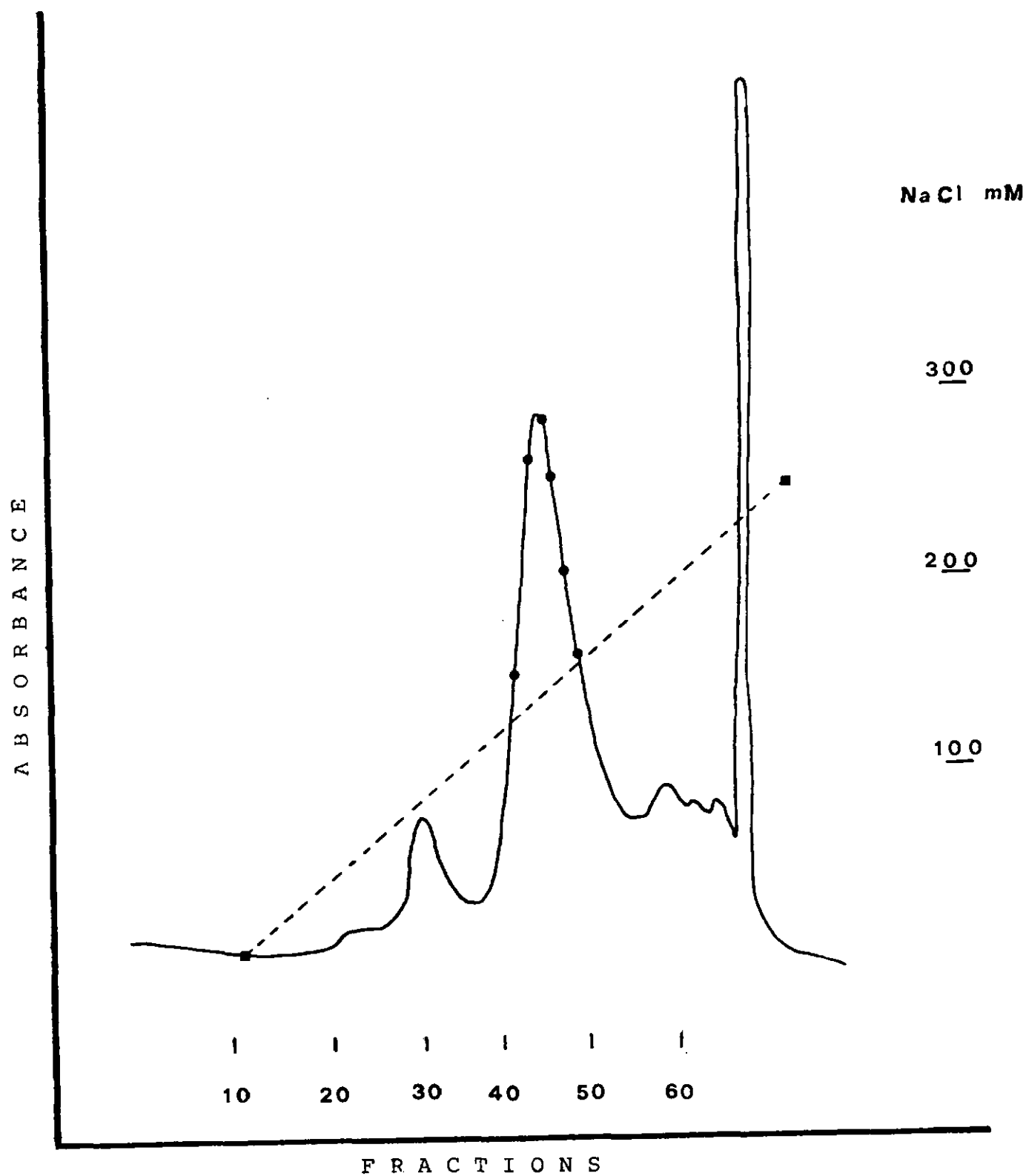
L'incorporation du ^{14}C est comptée sur papier GF/C dans 0,5 ml de mélange scintillant PP0-P0P0P.

milieu réactionnel

Tricine NaOH pH 8.2	50 mM
MgCl ₂	3 mM
Glutathion réduit	5 mM
NaH ¹⁴ CO ₃	10 mM
extrait	10 μ l
ribulose 1,5 bisphosphate	20 mM

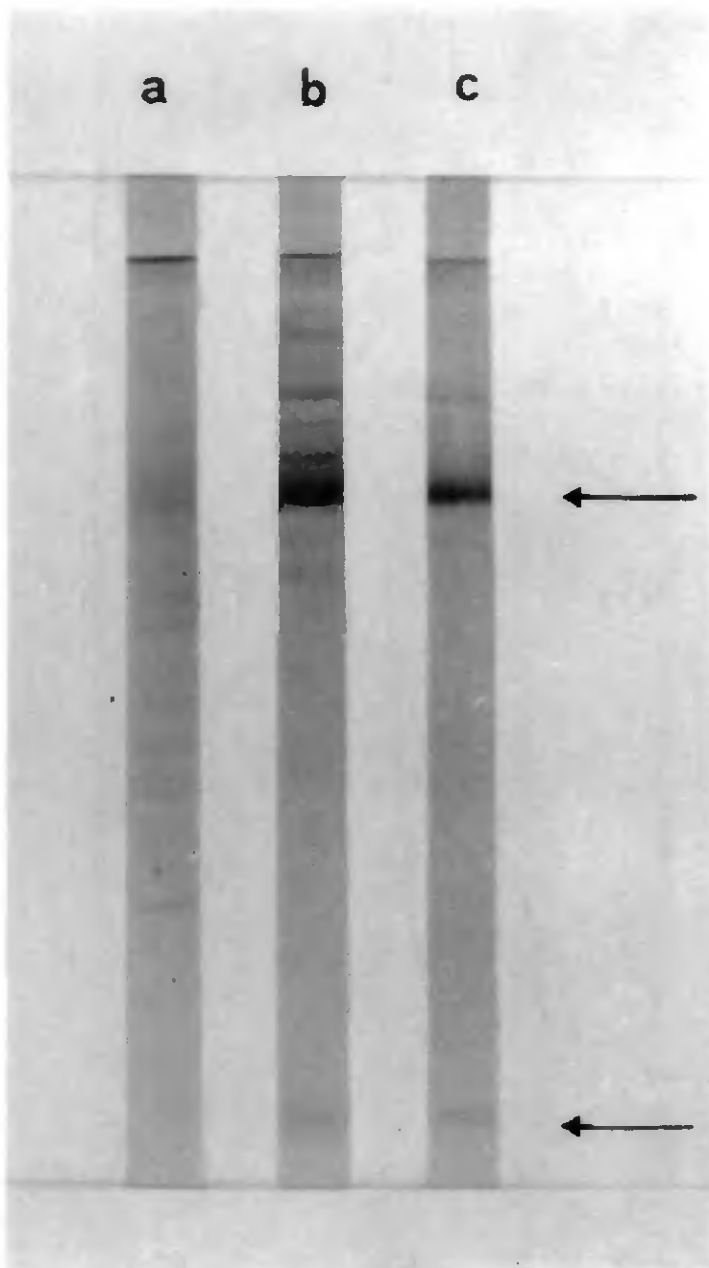
Purification de la RuBP carboxylase sur colonne Séphacryl S-300

Nous avons prélevé les fractions 23 à 26 •

Purification de la RuBP carboxylase sur colonne DEAE Séphacel

Nous avons prélevé les fractions 41 à 46 •

Analyse des étapes de purification de la RuBP carboxylase



SDS-PAGE 15 %

- a) extrait après précipitation au sulfate d'ammonium 35-55 %
- b) après première purification sur colonne Séphacryl S-300
- c) après deuxième purification sur colonne DEAE Séphacel

Les flèches indiquent la LSU ou la SSU de la RuBP carboxylase d'Euglena gracilis

5. Clonage

Ce type de manipulation se fait selon les directives P1-EK2 du N.I.H. (USA).

5.1 Principe de l'utilisation des plasmides

Un plasmide est une molécule d'ADN extrachromosomal se répliquant de manière autonome dans le cytoplasme d'une bactérie hôte.

La technique de clonage consiste à insérer un fragment d'ADN étranger dans un plasmide (= vecteur) et à transformer une bactérie hôte avec la molécule obtenue. Le clone ainsi formé peut être mis en culture. Lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle (0,8 DO à 650 nm) l'adjonction de chloramphénicol permet d'amplifier le nombre des plasmides (la réplication du génome bactérien est stoppée alors que le plasmide continue à se répliquer). Après purification de l'ADN plasmidial nous pouvons séparer le fragment du vecteur et obtenir ainsi le matériel désiré en grande quantité.

5.2 Matériel biologique

La souche hôte est décrite au § 1. Nous avons utilisé le plasmide pBR₃₂₂, vecteur ne possédant qu'un site pour les endonucléases de restriction EcoR I et Hind III employées dans notre recherche pour générer des fragments d'ADN chloroplastiques précis.

5.3 Linéarisation et déphosphorylation du vecteur

Cette méthode est inspirée de celle de Ullrich et coll. (1977). 15 µg de plasmide sont linéarisés par l'enzyme de restriction choisie (une unité d'enzyme par µg d'ADN). La digestion se fait pendant 2 h. à 37°C.

Pour éviter que le vecteur ne se referme sur lui-même pendant

la ligation les extrémités 5' sont déphosphorylées par une phosphatase (bacterial alkaline phosphatase, Worthington). 5 unités de cette enzyme (sous forme de suspension de sulfate d'ammonium) sont centrifugées dans un tube Eppendorf. Le culot est resuspendu dans 10 μ l de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0 et ajouté au milieu réactionnel contenant le même tampon et le vecteur linéarisé. Après 1 h. d'incubation à 37°C, l'enzyme est dénaturée par 4 extractions phénoliques. Après 2 extractions à l'éther, l'ADN est alors précipité en présence d'acétate de sodium 0,2 M et d'éthanol absolu froid (2,5 volumes). Après centrifugation le culot est resuspendu dans 100 μ l Tris-EDTA et est passé sur une colonne de Séphadex G-100 (pipette Pasteur). Les fractions contenant l'ADN sont récoltées et précipitées à l'éthanol comme ci-dessus. Nous obtenons des rendements de 50 à 70%.

5.4 Ligation

L'ADN chloroplastique est hydrolysé par l'enzyme de restriction adéquate. Après 1 h. de digestion à 37°C le milieu réactionnel est chauffé à 65°C pendant 10 min. (dénaturation de l'enzyme de restriction). La ligation se fait dans un tube Eppendorf stérile à 4°C pendant 4 h.

40 μ l de volume réactionnel comprennent: 1/10 de solution A, 1/10 de solution B, 0,04 unité de ligase, 2 μ g/ml de vecteur linéarisé et déphosphorylé, des quantités d'ADN chloroplastique de 2 μ g/ml, 10 μ g/ml ou 20 μ g/ml.

- Solution A

Tris-HCl pH 7.5	0,5 M
MgCl ₂	0,1 M
BSA	1 mg/ml

- Solution B

DTT	100 mM
ATP	0,7 mM

5.5 Préparation de la bactérie hôte

Cette préparation se fait selon Mandel et Higa (1970). Le but est d'augmenter la perméabilité de la paroi bactérienne par un traitement au calcium afin de favoriser la transformation par les plasmides. 1 ml de préculture saturée est inoculé dans 100 ml de milieu L. La culture est agitée à 37°C jusqu'à une densité optique de 0,6 à 600 nm (3 h. environ).

Pour une dizaine de transformations, 10 ml de la culture sont prélevés, mis dans un tube Corex stérile de 15 ml et centrifugés à 3 Krpm pendant 15 min. à 4°C (rotor SS-34).

Le culot de bactéries est resuspendu dans 5 ml de CaCl_2 50 mM stérile. Après 15 min. dans la glace les bactéries sont centrifugées comme ci-dessus et resuspendues dans 1 ml de CaCl_2 50 mM stérile.

- Milieu L

Tryptone	10g/l
Yeast extract	5g/l
NaCl	5g/l
MgSO_4	1 mM

5.6 Transformation

Dans des tubes fermés par un bouchon de coton nous introduisons 50 μl de tampon TCM, 20 μl du milieu réactionnel de ligation et 100 μl de bactéries traitées au calcium (§ 5.5).

La transformation se fait pendant 30 min. à 0°C. Le mélange est alors chauffé à 37°C pendant 2 min. puis laissé 10 min. à température ambiante.

Après avoir ajouté 1,5 ml de milieu L nous incubons les tubes à 42°C pendant 2 min. puis à 37°C pendant 1 h. Nous ajoutons

2,5 ml de "soft agar" maintenu à 42°C. Ce mélange est coulé sur une boîte de Pétri contenant du milieu L, 1,5% d'agar et 20 µg/ml d'ampicilline.

Les boîtes de Pétri sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 20 h.

- Tampon TCM

Tris-HCl pH 7.5	10 mM
CaCl ₂	10 mM
MgCl ₂	10 mM

- "Soft agar"

Agar	0,8 g
Milieu L	100 ml
+ ampicilline	20 µg/ml

5.7 Analyse des recombinants

Les colonies obtenues sont repiquées selon une grille d'identification. Deux techniques d'analyse ont été utilisées dans le cadre de ce travail.

5.7.1 Méthode de Birnboim et Doly (1979)

Le principe de cette méthode repose sur la dénaturation sélective de l'ADN bactérien de haut poids moléculaire alors que l'ADN circulaire du plasmide, de faible poids moléculaire reste double brin.

Chaque colonie de 4 mm de diamètre environ est transférée au moyen d'un cure-dent dans 100 µl de tampon de lyse froid. Après 30 min à 0°C, 200 µl de solution de dénaturation sont ajoutés. (Le SDS détruit les membranes cellulaires et le NaOH dénature l'ADN chromosomique). Après 5 min. à 0°C, 150 µl

de tampon de neutralisation sont ajoutés et le contenu du tube est mélangé par inversion. Après 1 h. à 0°C (précipitation de l'ADN chromosomique), les tubes sont centrifugés 5 min. (centrifugeuse Eppendorf). 400 μ l du surnageant sont transférés dans un tube propre. L'ADN plasmidial est précipité par adjonction de 2 volumes d'éthanol absolu froid et laissé 30 min. à -80°C. Après une centrifugation de 5 min. nous resuspendons le culot dans 100 μ l de tampon Na-acétate 0,1 M Tris-HCl 0,05 M pH 8.0 et reprécipitons l'ADN à l'éthanol comme ci-dessus. Ce lavage est répété une seconde fois.

Pour tester la présence d'un fragment étranger nous pouvons comparer la migration sur gel d'agarose des plasmides recombinants avec celle du vecteur (forme superhélice).

Pour connaître la taille de l'insertion nous digérons l'ADN plasmidial avec l'endonucléase de restriction adéquate. Avant une telle digestion l'ADN est resuspendu dans 16 μ l d'eau bidistillée et incubé 30 min. à 37°C en présence de 4 μ l de RNase (1 mg/ml).

Tampon de lyse

Lysozyme	2 mg/ml
Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8.0	25 mM

Solution de dénaturation

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Tampon de neutralisation

Na acétate pH 4.8	3 M
-------------------	-----

5.7.2 Méthode de Grunstein et Hogness (1975)

Nous repiquons les colonies à analyser sur un filtre Millipore (HCWG 047S1, 0,7 μ m) stérile, placé sur une boîte de Pétri contenant 20 μ g/ml d'ampicilline et laissons incuber une nuit. Les colonies sont lysées et l'ADN dénaturé en déposant les filtres sur plusieurs couches de papier Whatman LS 14 imbibés de NaOH 0,5 N pendant 15 min. Chaque filtre est ensuite laissé sur des papiers imbibés de Tris-HCl 1 M pH 7.1 pendant 15 min., puis placé sur du papier imbibé de Tris-HCl 0,5 M pH 7.1 NaCl 1,5 M pendant 5 min. Il est ensuite transféré sur du papier imprégné de 2 x SSC et est recouvert de protéinase K (1 mg/ml dans 2xSSC) pendant 15 min. Le filtre est alors lavé dans de l'éthanol absolu puis dans du chloroforme (5x). Pour retirer les débris cellulaires il est plongé dans une solution de NaCl 0,3 M. Il est ensuite séché à l'air et cuit à 80°C pendant 2 h.

L'analyse de l'ADN recombinant fixé sur le filtre Millipore se fait selon la technique d'hybridation décrite au § 12.2.

5.8 Isolement des plasmides en grande quantité

Cette méthode est tirée d'un cours SKMB, Billeter et Weber, (1978).

5.8.1 Culture et amplification au chloramphénicol

Chaque erlenmeyer de 1 l contenant 200 ml de milieu L et 50 μ g/ml d'ampicilline estensemencé par 2 ml d'une préculture saturée. Lorsque la DO à 650 nm est de 0,8 (3 à 4 h.) nous ajoutons 0,2 ml d'une solution alcoolique de chloramphénicol (85 mg/ml) et laissons agiter la culture à 37°C pendant 20 h.

La concentration en ADN plasmidial peut représenter le tiers de l'ADN cellulaire total après amplification (Morrow, 1979). Les bactéries sont centrifugées à 5 Krpm pendant 15 min. à

4°C (rotor GSA). Elles sont lavées dans du Tris-HCl pH 7.9 10 mM EDTA 1 mM puis après centrifugation sont resuspendues dans 6 ml d'une solution de 25% saccharose et 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Elles peuvent être congelées à -80°C jusqu'à l'isolement des plasmides. Le rendement est de 0,5 à 1 g de bactéries par 200 ml de milieu L sous les conditions de culture ci-dessus.

5.8.2 Isolement de l'ADN plasmidial

Les étapes principales de cette isolation sont:

- 1°) la lyse des cellules suivie de la précipitation selon Hirt (1967) permettant d'éliminer une grande quantité d'ADN bactérien.
- 2°) des extractions phénoliques suivies d'un traitement à la RNase et d'une précipitation au PEG permettant d'éliminer les protéines, l'ARN et de concentrer l'ADN.
- 3°) une dénaturation sélective de l'ADN bactérien selon la méthode de Currier et Nester (1971)

A la suspension de bactéries nous ajoutons: 1,2 ml de lysozyme (5 mg/ml) (incuber 5 min. à 0°C), 1,2 ml d'EDTA 0,5 M pH 7.5 (laisser reposer 5 min. à 0°C), 1,2 ml de SDS 20% dans 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (bien mélanger sur un Vortex) et 2,4 ml de NaCl 5 M (laisser précipiter pendant la nuit).

Les concentrations finales en EDTA, SDS et NaCl sont: 50 mM, 2% et 1 M.

Après 60 min. de centrifugation à 16 Krpm et à 4°C (rotor SS-34) le surnageant est récolté et agité 5 min. avec 7,5 ml de phénol saturé de TNE. Nous ajoutons 7,5 ml de chloroforme, agitons 2 min. et centrifugeons à 10 Krpm pendant 5 min. (rotor HB-4).

La phase aqueuse est traitée de la même façon que ci-dessus une seconde fois puis extraite au chloroforme seulement. Le surnageant est alors incubé à 37°C pendant 1 h. en présence

de 20 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A. Nous ajoutons 0,2 volume de NaCl 5 M et 0,45 volume de PEG 30%. Le mélange est incubé 2 h. à -10°C (précipitation de l'ADN, élimination de l'ARN). Après 20 min. de centrifugation à 10 Krpm 4°C (rotor HB-4), le culot est resuspendu à température ambiante sur un agitateur magnétique dans 5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8 EDTA 5 mM. Nous augmentons le pH du mélange jusqu'à 12,45 par adjonction de NaOH 3 N et l'incubons pendant 10 min. à température ambiante. 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 7.5 est ajouté et mélangé pendant 3 min. (le pH redescend à environ 8.5). Après avoir ajouté 0,75 ml de NaCl 5 M et 8 ml de phénol saturé avec du NaCl 0,5 M, nous agitons vigoureusement 5 min. Après une centrifugation à 10 Krpm 10 min. (rotor HB-4), la phase aqueuse est agitée avec 5 ml de chloroforme. L'ADN plasmidial récolté dans la phase aqueuse est précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu froid.

5.8.3 Isolement de la forme I des plasmides par gradient de chlorure de césium

L'ADN plasmidial peut se trouver sous trois formes différentes: la forme I (superhélice), la forme II (ouverte circulaire), la forme III (linéaire). L'ADN isolé selon le paragraphe 5.8.2 se trouve en grande partie sous forme I. Pour purifier cette forme I et éliminer la forme II et l'ADN chromosomal restants, nous utilisons la différence de densité de ces trois molécules dans un gradient de CsCl contenant du bromure d'éthidium.

Nous préparons des gradients de 3 ml de CsCl contenant 0,2 mg de bromure d'éthidium et 0,7913 g de chlorure de césium par ml de solution. Cette quantité correspond à une densité à 25°C de 1,5825.

Ces gradients peuvent contenir 300 à 400 μg d'ADN. Ils sont centrifugés à 33 Krpm 20°C pendant 50 h (rotor Ti 65, Beckman LS-65). La récolte de l'ADN après centrifugation se fait comme pour le ctADN paragraphe 3.4. Une fois dialysé contre du TE, l'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol.

Préparation d'ADN plasmidial

Bactéries
0,5- 1 g

6 ml tampon saccharose 25 %
Tris 50 mM pH 8.0

5 min 0°C	+	lysozyme 5 mg/ml: 1,2 ml
5 min 0°C	+	EDTA 0.5 M pH 7.5: 1,2 ml
bien agiter	+	SDS 20 %: 1,2 ml
précipiter selon Hirt	+	NaCl 5 M: 2,4 ml
		concentration finale: EDTA 50 mM
		SDS 2 %
		NaCl 1 M

16 Krpm 60 min 4°C
rotor SS-34

↓
surnageant

bien agiter 5 min	+	7,5 ml Phénol saturé dans TNE	2 x
		7,5 ml Chloroforme	
10 Krpm 5 min 4°C rotor HB-4	+	7,5 ml Chloroforme	
60 min 37°C	+	RNase A	20 µg/ml
mélanger	+	NaCl 5 M	0,2 volume
2 heures - 10°C	+	PEG 30 %	0,45 volume
10 Krpm 20 min 4°C rotor HB-4	+		

culot

resuspendre	+	Tris-HCl pH 8	50 mM
		EDTA	5 mM 5 ml
augmenter le pH incuber 10 min temp. ambiante	+	NaOH 3 N 3 à 4 gouttes	
mélanger 3 min	+	Tris-HCl 1 M pH 7.5	1 ml
	+	NaCl 5 M	0,75 ml
bien agiter 3 min			
	+	Phénol saturé par NaCl 0,5 M	8 ml
10 Krpm phase aqueuse 10 min 4°C rotor HB-4	+		
10 Krpm		Chloroforme	5 ml
10 min 4°C rotor HB-4	+		
		phase aqueuse	
	+	Ethanol absolu	2,5 volume
10 Krpm 20 min 4°C rotor HB-4	+		

ADN plasmidial

6. Préparation du système de transcription-traduction couplé

La préparation du système de transcription-traduction couplé ou S-30 se fait selon Zubay et al (1970) modifié par une pré-incubation du surnageant selon Bottomley et Whitfeld (1979). La souche employée pour la préparation de notre système est décrite au paragraphe 1.

6.1 Culture des cellules

La souche est réactivée pendant une nuit à 37°C dans 5 ml de milieu L. Par dilutions polygonales nous faisons pousser des colonies séparées. Une préculture est préparée par inoculation d'une colonie isolée. Pour l'obtention de grandes quantités de cellules deux types de culture ont été entreprises.

6.1.1 Culture en continu

Ce type de culture permet d'avoir des cellules en condition de croissance identique. Les cellules poussent dans une chambre de culture dont le milieu nutritif est constamment renouvelé. Une fois que les bactéries ont atteint une densité optique correspondant à la phase de croissance exponentielle désirée, le débit du milieu de renouvellement est fixé pour que le taux de dilution soit égal au taux de croissance.

Si $\mu = \frac{\ln 2}{t_g}$ où μ est le taux de croissance
 t_g est le temps de génération

et $D = \frac{f}{v}$ où D est le taux de dilution
 f est le débit du milieu de culture
 v est le volume de la chambre de culture

pour $\mu = D$ $f = \frac{\ln 2}{t_g} \cdot v$

Nous employons pour nos cultures le chemostat Bioflo. Nous travaillons à 37°C avec une agitation de 600 rpm, 280 ml de milieu Z sont inoculés avec 8 ml d'une préculture en phase de croissance exponentielle. La courbe de croissance des bactéries sous ces conditions est déterminée et le temps de génération est d'environ 35 min.

Pour maintenir une DO_{550} d'environ 2 dans la chambre de culture nous calculons un débit de 330 ml par h.

Le milieu de culture est récolté et stocké à 4°C avant d'être centrifugé à 9 Krpm pendant 15 min. dans un rotor GS-3 Sorvall. Les cellules sont resuspendues deux fois dans du tampon de lavage. Elles sont stockées à -80°C jusqu'à leur emploi. Le rendement est d'environ 2 g par litre de culture.

Milieu Z

	<u>par litre de culture</u>
KH_2PO_4	5,6 g
K_2HPO_4	28,9 g
Extrait de levures	10 g
Vitamine B1	15 mg
* Glucose (25%)	40 ml

* la solution de glucose est autoclavée séparément et rajoutée stérilement avant la culture.

Tampon de lavage

Tris-acétate pH 8.2	10 mM
Mg acétate	14 mM
KCl	60 mM
Mercaptoéthanol	6 mM

6.1.2 Culture en fermenteur

Ce type de culture est décrit par Zubay et al (1970).

Une préculture de 800 ml de milieu Z est inoculée et incubée à 27°C pendant la nuit (environ 10 h.).

Cette préculture sert d'inoculum à 8 litres de même milieu placés dans un fermenteur de type "Labor fermentor Biostat S".

La culture se fait à 28°C sous agitation de 800 rpm et aération constante. Sous ces conditions le temps de génération est d'environ 50 min. Le pH du milieu est contrôlé pendant l'incubation: il reste stable aux environs de 6,8. Après 2 h. d'incubation nous obtenons une DO_{550} de 2,5. Les cellules sont centrifugées à 9 Krpm pendant 15 min. dans un rotor GS-3 Sorvall. Après 2 lavages, les cellules sont stockées à -80°C sous forme de galette de 0,5 cm d'épaisseur dans une boîte de Pétri. Le rendement est d'environ 4 g par litre de culture après 2 h. Le milieu Z et le tampon de lavage sont décrits précédemment.

6.2 Préparation de l'extrait "S-30"

Cette méthode suit celle décrite par Bottomley et Whitfield (1979). La vaisselle employée lors de ces manipulations est autoclavée avant usage. 15 à 20 g de cellules sont dégelés doucement à 4°C en présence de 1 ml par gramme de cellules de tampon A. Les bactéries sont resuspendues dans ce tampon puis cassées par chocs de pression dans une "French press". (2 passages à 11'000 psi). Pendant ces opérations la température de la suspension est maintenue entre 5 et 10°C par un courant d'azote gazeux refroidi dans de l'azote liquide.

Après deux passages une solution de dithiothreitol 1 M est ajoutée au broyat (concentration finale de ~ 1 mM). L'extrait est alors centrifugé à 30'000 g pendant 30 min. à 4°C (rotor SS-34 Sorvall, 16 Krpm).

Le surnageant est recentrifugé dans les mêmes conditions. Seul les 4/5 supérieurs du surnageant sont prélevés.

6.3 Préincubation et stockage

La préincubation permet aux ARN fixés sur les polysomes d'être lus. Les ARN messagers endogènes libres sont alors détruits par les RNases du système.

Nous ajoutons (par 10 g de cellules) la solution de préincubation ci-dessous et l'incubons 2 h. à 37°C à l'obscurité. L'extrait est ensuite dialysé à 4°C et à l'obscurité contre plusieurs volumes de tampon A (6 litres au total).

La solution dialysée est alors centrifugée à 30'000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est conservé sous forme de billes dans de l'azote liquide. Aucune baisse d'activité de ce surnageant n'a été observée après six mois de stockage. La concentration en protéines est déterminée selon la méthode de Biuret. Les différents extraits que nous avons préparés contenaient de 20 à 25 mg de protéines par ml de surnageant.

- tampon A

Tris-acétate pH 8.2	10 mM
Mg acétate	14 mM
K acétate	60 mM
Dithiothreitol	1 mM

- solution de préincubation

par 10 g de cellules

Tris-acétate pH 8.2	1 M	1 ml
Mg acétate	1 M	5 µl
ATP	220 mM	32 µl
GTP	50 mM	12 µl
Phosphoénolpyruvate - K	500 mM	160 µl
Pyruvate kinase	(2mg/ml)	10 µl
Acides aminés (sans méthionine)	2,5mM	300 µl
Dithiothreitol	1 M	8 µl

Le surnageant étant sensible à la lumière, il est important de faire les étapes de préincubation et de dialyse à l'obscurité. D'autre part la préincubation du système semble critique. Elle permet d'optimiser la dépendance du système vis à vis d'un ADN exogène. Pour la préparation de nos S-30, nous avons suivi les temps de préincubation préconisés par Bottomley et Whitfeld (1979).

6.4 Milieu réactionnel

Ce milieu contient une solution A complexe, une solution contenant les 19 acides aminés essentiels (sans méthionine), environ 5 μ Ci de [35 S] - méthionine (Amersham > 600 Ci/mme), des concentrations variables d'ADN et 10 mg/ml du surnageant 30'000 g. La composition détaillée du mélange est décrite ci-dessous:

<u>Composition du mélange</u>		<u>Quantité finale dans 50 μl</u>
solution A	Tris-acétate pH 8.2	44 mM
	K acétate	55 mM
	NH ₄ acétate	27 mM
	Mg acétate	14 mM
	CTP, GTP, UTP	0,5 mM
	ATP	2 mM
	cAMP	0,5 mM
	tARN	5 μ g
	Pyridoxine - HCl	1,35 μ g
	FAD	1,35 μ g
	NAOP	1,35 μ g
	Acide folinique	1,35 μ g
	Acide paraaminobenzoïque	0,55 μ g
	Phosphoénolpyruvate-K	21 mM
	Dithiothreitol	1,6 mM
	Pyruvate kinase	2 μ g
	Acides aminés (- méthionine)	2,5 mM
	[35 S] - méthionine (> 600 Ci/mme)	5 μ Ci
	ADN	1-3 μ g
	S-30	0,5 μ g

- (a) solution stock préparée, autoclavée et conservée à 4°C
- (b) solution stock neutralisée par KOH, filtrée sur Millipore 0,22 μ m stérile et conservée à -20°C
- (c) solution stock filtrée sur Millipore 0,22 μ m stérile et conservée à -20°C à l'obscurité
- (d) la solution de phosphénolpyruvate stock est neutralisée par KOH

La solution A est préparée sur la glace en combinant les solutions stocks juste avant l'expérience de transcription-traduction.

La réaction se fait à 37°C pendant 20 min. dans le mélange ci-dessus. 10 μ l du milieu réactionnel sont prélevés pour mesurer l'incorporation de la méthionine selon la méthode décrite par Bollum (1968).

Au reste du milieu réactionnel nous ajoutons 10 μ l d'une solution d'arrêt. L'échantillon est alors conservé à -20°C jusqu'à l'analyse sur SDS-PAGE.

- Solution d'arrêt

SDS	12,5%
DTT	25 mM
Glycérol	20%
Bleu de bromophénol	50 μ g/ml

6.5 Analyse de l'incorporation de la méthionine dans des polypeptides précipitables au TCA

Cette méthode suit celle décrite par Bollum (1968).

5 μ l du milieu réactionnel sont placés sur un filtre Whatman GF/C prétraité (incubé dans du TCA 5% en présence de méthionine froide 1 mg/ml). Les différents filtres sont placés sur un appareil à filtrer et lavés avec 10 ml de TCA 5% froid. Les filtres numérotés sont chauffés dans 100 ml de TCA 5% à 80°C pendant 30 min. Ils sont ensuite rincés avec 5 ml de TCA 5% froid puis séchés avec 5 ml d'un mélange éthanol-éther (1:1) et avec 2 ml d'éther. Les filtres secs sont placés dans des

fioles de comptage contenant 3 ml d'un mélange scintillant. L'incorporation de la méthionine est mesurée dans un appareil Isocap 300 Nuclear-Chicago.

- Mélange scintillant

par litre de toluène

PPO	4 g
POPOP	0,1 g

7. Traduction dans le système acellulaire eucaryotique

Ce système décrit par Pelham et Jackson (1976) a été mis au point pour traduire des ARN messagers étrangers.

Nous avons utilisé dans le cadre de notre travail le système commercialisé d'Amersham (Lysate N 90).

- Milieu réactionnel

volume final 11 μ l

ct ARN	1,5 - 3 μ g
[35 S]- méthionine	10 μ Ci
lysate de réticulocyte	8 μ l

Le milieu réactionnel est incubé à 30°C pendant 60 min. La traduction est stoppée en ajoutant 5 μ l de solution d'arrêt § 6.4.

8. Biosynthèse in "organello"

Cette méthode est décrite par Salisbury et al (1975).

Par millilitre de suspension chloroplastique nous ajoutons 50-60 μ Ci de [35 S]- méthionine, incubons le mélange à 20°C sous légère agitation pendant 40 min. Les chloroplastes sont

lavés dans du tampon sorbitol 330 mM tricine-KOH 50 mM pH 8.8 et centrifugés rapidement de 0 à 6 Krpm. Ils sont alors resuspendus et lysés par choc osmotique dans du tampon Na-pyrophosphate 10 mM pH 7.4 puis centrifugés à 12 Krpm pendant 10 min. Nous ajoutons au surnageant (fraction stromatique) de la solution d'arrêt § 6.4.

Le culot (fraction thylacoïdale) est lavé 2 x dans du tampon Na-pyrophosphate 10 mM pH 7.4 puis 1 x dans du tampon saccharose 300 mM tricine-KOH 2 mM pH 7.8. La fraction thylacoïdale est stockée à -20°C dans du tampon tricine-KOH 100 mM pH 7.8.

9. Electrophorèse sur gel

9.1 Gels pour l'analyse de l'ADN

9.1.1 Gels d'agarose

Le système d'appareil d'électrophorèse est de même type que celui décrit par Studier (1973). Un moule est constitué en intercalant des baguettes de PVC (2 ou 3 mm d'épaisseur) entre deux plaques de verre (24 x 18 cm). Un socle de polyacrylamide est coulé au fond du moule pour retenir le gel d'agarose.

Des dents de plastique de l'épaisseur du gel sont placées dans l'agarose chaud. Après 1 heure de polymérisation à température ambiante elles sont retirées et constituent les poches dans lesquelles nous allons déposer les échantillons.

- Préparation du socle de polyacrylamide

Nous mélangeons 9 ml de solution A et 1 ml de tampon d'électrophorèse 10x. Après avoir ajouté 10 µl de TEMED nous initions la polymérisation en ajoutant 100 µl d'une solution de persulfate d'ammonium 10%. Le mélange est versé immédiatement entre les plaques de verre.

- Préparation du gel d'agarose

La quantité d'agarose adéquate diluée dans du tampon d'électrophorèse 1x est chauffée au bain-marie à 95°C. Une fois bien fondu l'agarose est coulé entre les plaques de verre.

- solution A pour 100 ml

acrylamide	15 g
bisacrylamide	0,75 g

- tampon d'électrophorèse (10x)

Tris	0,4 M
Na acétate	0,2 M

pH 7.8 ajusté avec de l'acide acétique.

9.1.2 Gels composites (agarose-acrylamide)

Cette technique est décrite par Peacock et Dingman (1968). Afin de solidifier les gels d'acrylamide peu concentrés et de les rendre plus faciles à manipuler nous pouvons leur ajouter de l'agarose sans affecter la séparation.

Pour un gel composite de 2,5% polyacrylamide et 1% agarose nous préparons 25 ml d'acrylamide-bisacrylamide 10-0,75% et 75 ml d'agarose 1,3%. La solution d'agarose fondue est refroidie entre 50 et 60°C. Nous y ajoutons la solution d'acrylamide-bisacrylamide après l'adjonction de 80 µl de TEMED et 800 µl de persulfate 10%.

Nous ajoutons aux échantillons analysés sur gel agarose ou composite 5 µl de solution d'arrêt pour 30 µl de solution d'ADN.

- solution d'arrêt

Saccharose	2 M
Ficoll	5%
Bleu de bromophénol	0,05%
EDTA	0,2 M

9.2 Gels pour l'analyse de l'ARN (agarose 1,5%, urée 5 M)

Ce type de gel est décrit par Lockner (1979).

Nous préparons ces gels dans un moule de 14 x 18 x 0,2 cm. Un socle en polyacrylamide est préparé selon § 9.1.1 de ce chapitre en remplaçant le tampon d'électrophorèse par celui décrit ci-dessous. Dans un erlemeyer de 100 ml nous pesons 0,9 g d'agarose y ajoutons 6 ml de tampon d'électrophorèse 10x, 50 ml d'urée 6 M, 0,9 ml de iodoacétate 1 M et de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 60 ml.

Le mélange est chauffé à 95°C pendant 20 min., refroidi jusqu'à une température de 70°C et coulé entre les plaques. Le gel est laissé à température ambiante pendant 30 min. puis gardé à 4°C pendant une nuit.

- tampon d'électrophorèse (10x concentré)

Tris	0,4 M
NaH ₂ PO ₄	0,36 M
EDTA	0,01 M
pH 7.4	

Nous ajoutons aux échantillons analysés sur gel agarose-urée 5 µl de solution d'arrêt pour 10 µl de solution d'ARN.

- solution d'arrêt

Saccharose	10%
Urée	10 M
Bleu de bromophénol	0,02%

Les conditions d'électrophorèse sont décrites dans les légendes. Les gels sont colorés 30 min. dans le tampon d'électrophorèse contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium.

9.3 Electroélution de fragments d'ADN

Cette méthode est basée sur celle décrite par Wienand et al (1979).

Après la séparation électrophorétique des différents fragments sur gel préparatif nous colorons le gel au bromure d'éthidium (1 µg/ml) pendant 30 min. Nous découpons sous les fragments intéressants une fente de 2 à 3 mm de largeur et insérons sous le gel une membrane à dialyse de manière à retenir l'ADN migrant hors du gel. Après avoir rempli la fente de tampon d'électrophorèse nous appliquons un courant de 40 mA. Lorsque l'ADN est électroélué, nous inversons le courant pendant quelques secondes et récupérons l'ADN. Le fragment est concentré par précipitation à l'éthanol.

Remarque : Les gels préparatifs ont 3 mm d'épaisseur, nous plaçons sur ces gels 100 à 150 µg d'ADN dans une poche de 4 cm de longueur.

9.4 Gels d'analyse des protéines (SDS-PAGE)

Le principe de l'analyse des protéines est celui décrit par Weber et Osborn (1969) utilisant le système de gels et de tampons discontinus de Davis (1964).

Les solutions stocks sont préparées selon Maurer (1971).

- Tris-TEMED pH 8.9: 8x	pour 100 ml de solution
Tris	36,6 g
TEMED	0,23 ml
HCl 1N	48,0 ml

- Tris-TEMED pH 6.7: 8x pour 100 ml de solution

Tris	5,98 g
TEMED	0,46 ml
HCl 1N	48 ml

- Acrylamide-bisacrylamide 30-0,8% pour 250 ml de solution

Acrylamide	75 g
Bisacrylamide	2 g

La solution d'acrylamide-bisacrylamide est traitée par une résine échangeuse d'ions (Amberlitletype MB-I).

Les trois solutions stocks ci-dessus sont conservées à 4°C à l'obscurité.

Dans le cadre de notre travail nous avons essentiellement préparé deux types de gel de séparation.

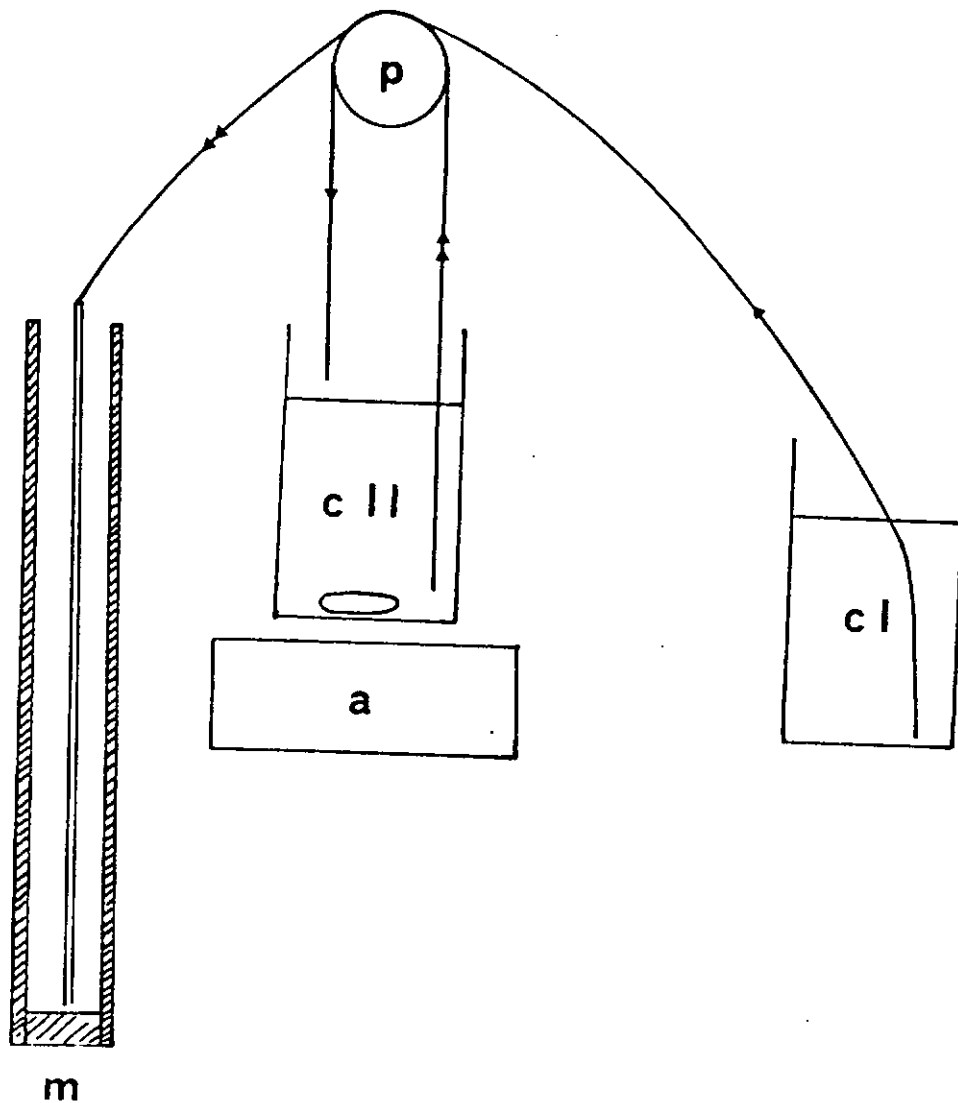
9.4.1 Gel de séparation 15 ou 12,5%

	<u>15%</u>	<u>12,5%</u>
Tris-TEMED pH 8.9 (8x)	5 ml	5 ml
Acrylamide-bisacrylamide (30-0,8%)	20 ml	16,5 ml
H ₂ O	12,6 ml	16,1 ml
La solution est dégazée		
SDS (10%)	0,4 ml	0,4 ml
Persulfate d'ammonium (2%)	2 ml	2 ml

La polymérisation est initiée par l'adjonction de persulfate d'ammonium fraîchement préparé. La solution est coulée dans un moule de 14 x 18 x 0,2 cm. Une fine couche d'eau est déposée sur le gel pour que le front soit plat. Le gel polymérise après 30 à 40 min.

9.4.2 Gel de séparation, gradient linéaire de 10 à 15 %

Pour un tel gel, nous préparons deux solutions d'acrylamide de 10 et 15 % respectivement. Les solutions sont mélangées et coulées dans un moule de 24 x 18 x 0,2 cm en faisant monter la solution légère selon le schéma ci-dessous:



- a: agitateur magnétique
- p: pompe péristaltique
- m: moule 24 x 18 x 0,2 cm
- cI : solution d'acrylamide concentrée
- cII: chambre de mélange

- Solutions pour gel de séparation:

	<u>10%</u>	<u>15%</u>
Tris-TEMED pH 8.9 (8x)	5 ml	5 ml
Acrylamide-bisacrylamide (30-0,8%)	13,3 ml	20 ml
Saccharose	2 g	6 g
H ₂ O, compléter à	40 ml	40 ml
La solution est dégazée		
SDS (10%)	0,4 ml	0,4 ml
Persulfate d'ammonium (10%)	0,1 ml	0,1 ml

Une fois que le gel de séparation a polymérisé, nous préparons un gel de concentration.

9.4.3 Gel de concentration

	<u>6%</u>
Tris-TEMED pH 6.7 (8x)	2 ml
Acrylamide-bisacrylamide (30-0,8%)	3,2 ml
Glycérol (87%)	4 ml
H ₂ O	6,48 ml
La solution est dégazée	
SDS (10%)	0,16 ml
Persulfate d'ammonium (10%)	0,16 ml

Ce gel de concentration est préparé juste avant l'électrophorèse le temps de polymérisation est de 15 min.

9.4.4 Electrophorèse

L'électrophorèse se fait à température ambiante et à courant constant. Nous appliquons un courant de 20 mA pendant que l'échantillon pénètre dans le gel de concentration (20 min.) puis de 30 mA pendant 30 min. et finalement de 50 mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 1 cm du bas du gel de séparation (3 h.).

9.4.5 Coloration-décoloration

Après 30 min. de fixation dans la solution B les gels sont colorés 1 h. à 37°C dans une solution contenant du Bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R). Ils sont ensuite décolorés dans la solution B pendant une nuit sous agitation.

- Solution de coloration

Méthanol	450 ml
Acide acétique	90 ml
Bleu de Coomassie	2,5 g
H ₂ O	450 ml

- Solution B

Acide acétique	90 ml
H ₂ O	450 ml
Méthanol	450 ml

9.4.6 Séchage et autoradiographie

Nous séchons les gels sur un appareil Zabona A6 type VSGE 300-400. Après le séchage (de 3 à 4 h.) nous plaçons un film Typon X-ray (Typox TX). Le temps d'exposition est indiqué dans les légendes.

9.4.7 Fluorographie

La détection des bandes radioactives peut être améliorée en incorporant dans le gel un dérivé fluoré (PP0) dissout dans de l'acide acétique concentré selon Burckhardt et al (1979). Le gel est préalablement incubé 2 x 30 min. dans 150 ml d'acide acétique concentré. Il est alors placé pendant 3 h. dans 200 ml

d'une solution 22% de PPO dans de l'acide acétique concentré. Le gel imprégné de PPO est rincé à l'eau courante pendant 1 h. puis laissé dans un bac d'eau pendant une nuit. Après avoir séché le gel, nous plaçons un film Typon X-ray (Typos TX) et le laissons exposer à -80°C.

10. Protéolyse partielle

10.1 Principe

Pour déterminer si deux protéines qui comigrent sur SDS-PAGE sont identiques nous appliquons la technique de Cleveland et al (1977).

Elle consiste à digérer les deux protéines avec diverses enzymes protéolytiques, à séparer sur gel les peptides obtenus et à comparer les profils.

10.2 Migration des protéines sur SDS-PAGE 10-15%

Après l'électrophorèse (voir § 9.4.4) la portion de gel contenant la protéine à analyser est découpée. (Si la protéine est radioactive et non détectable par la coloration, on se repère à des standards).

10.3 Digestion protéolytique

Les morceaux de gel sont rincés dans du tampon Tris 10 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, SDS 0,1% et placés dans les poches d'un gel SDS 15%. Un à trois μ g d'enzyme sont déposés dans chaque poche. Un courant de 10 mA est appliqué pendant 4 h., temps mis pour que l'échantillon traverse le gel de concentration, puis de 30 mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit au bas du gel (environ 4 h.). Le gel est alors fixé dans la solution B § 9.4.5 pendant 1 h. puis traité pour être fluorographié § 9.4.7.

11. Transferts d'ADN et d'ARN

11.1 Transfert selon Southern

Cette méthode décrite par Southern (1975) permet de transférer des fragments d'ADN d'un gel (après dénaturation) sur une feuille de papier de nitrocellulose sans altérer la position des bandes. Ainsi le réplikat du profil de digestion d'un ADN par une endonucléase de restriction peut être utilisé pour des expériences d'hybridation (cf. § 12.2).

Après coloration le gel est placé sur une table UV (366 nm) et photographié en présence d'une règle graduée (agrandissement du négatif au rapport 1:1).

Il est placé dans une solution de NaOH 0,5 M NaCl 1,5 M pendant 20 à 30 min. Il est ensuite neutralisé dans une solution Tris-HCl 0,5 M pH 7.9 NaCl 3M pendant 20 à 30 min. Il est alors placé dans une cuve, sur une plaque de verre surélevée recouverte de 3 couches de papier Schleicher et Schuell LS14 imbibés de 20 x SSC. Le gel est encadré par des baguettes de même épaisseur. Une feuille de nitrocellulose Millipore HAWP-304 FO et 3 couches de papier Schleicher et Schuell LS14 de la même dimension que le gel et imbibés de 2 x SSC sont déposés sur le gel de manière à éviter un contact direct avec le tampon 20 x SSC. Une couche épaisse de papier sec LS 14 et un poids sont empilés sur le dispositif décrit ci-dessus. Le papier sec pompe la solution de 20 x SSC qui va entraîner l'ADN au travers du gel.

La vitesse du transfert dépend de la longueur des fragments d'ADN. Pour nos expériences nous laissons le transfert opérer pendant une nuit à température ambiante.

La feuille de nitrocellulose est dessalée pendant 20 min. dans une solution de 2 x SSC puis est séchée à l'air. Elle est alors placée dans une étuve à 80°C, sous vide, pendant 3 h. ce qui fixe l'ADN sur la feuille de nitrocellulose.

- Solution 20 x SSC

NaCl	3,0 M
Na citrate	0,3 M

11.2 Transfert selon "Northern"

Cette technique est décrite par Alwine et al (1977). Le but de ce transfert est de fixer de manière covalente les acides nucléiques simple brin sur du papier activé chimiquement. Le groupe diazonium du papier réagit avec les résidus guanosine et uridine de l'ARN et les résidus guanosine de l'ADN simple brin.

11.2.1 Préparation du papier NBM (selon modification de A.Levy, communication personnelle)

Une feuille de papier Whatman 540 est saturée dans 8 ml d'une solution 10% de chlorure de nitrobenzèneoxyméthylpyridinium (NBPC) dans de l'éthanol 70% (La feuille est frottée avec des gants pour retirer les petites bulles). Elle est séchée à l'air (environ 10 min.) puis est chauffée dans un four à 60°C pendant 10 min.

Nous préparons ensuite 8 ml d'une solution de NBPC 10% et d'acétate de sodium (0,25 g) dans de l'éthanol 70%.

La feuille Whatman est saturée comme ci-dessus puis séchée pendant environ 20 min. à 60°C.

Le papier est alors transféré dans une étuve à 130-135°C pendant 35 à 40 min. Il est ensuite lavé 3 à 5 fois pendant 20 min. avec de l'eau distillée à température ambiante.

Le papier est alors séché à 60°C pendant environ une heure.

Il est lavé 2x pendant 10 min. dans 300 ml de benzène et finalement séché à l'air puis stocké dans un dessiccateur à 4°C.

11.2.2 Conversion du papier NBM en DBM

Cette conversion se fait juste avant le transfert. Le papier est incubé pendant 30 min. à 60°C dans 350 ml d'une solution de dithionite de sodium 20%. Le papier est alors lavé 5 min. dans de l'eau bidistillée, 5 min. dans de l'acide acétique 30% et 5 min. dans de l'eau. Il est ensuite transféré à 4°C dans une solution fraîchement préparée de NaNO_2 (10 mg/ml) dissoute dans 240 ml d'HCl 1,2 N froid et agité de temps en temps pendant 30 min. Le papier est lavé 5 fois pendant 1 min. avec environ 300 ml d'eau froide puis lavé 1 fois pendant 5 min. dans du tampon Na acétate 0,2 M pH 4. Il est gardé au froid dans cette solution pas plus de 15 min.

11.2.3 Préparation des gels d'ARN

Le gel d'agarose-urée est incubé pendant 30 min. dans une solution de NaOH 50 mM puis rincé dans du tampon de transfert (acétate de sodium 0,2 M pH 4). Le transfert se fait à 4°C pendant la nuit; après quoi, le papier DBM est séché à l'air et stocké avant son emploi.

12. Hybridations

12.1 Principe

Par hybridation nous entendons l'association de deux molécules d'acide nucléique simples brins ayant des homologies de séquence et formant sous certaines conditions un duplex. De tels duplex peuvent se former soit entre deux brins d'ADN soit entre un brin d'ARN et un brin d'ADN.

Dans le cadre de notre travail nous avons eu recours à ce principe pour:

- analyser des homologies de séquences entre des fragments d'ADN chloroplastiques générés par différentes endonucléases de restriction.
- identifier des recombinants possédant une insertion particulière.
- analyser des homologies de séquences entre ARN et ADN chloroplastiques.
- sélectionner des ARN messagers soit pour supprimer leur expression dans un système de traduction soit pour les traduire sélectivement après déshybridation.

12.2 Hybridation ADN - ADN

12.2.1 Préparation des filtres

Des filtres de nitrocellulose sont employés comme support à l'hybridation selon la technique de Gillespie et Spiegelman (1965). Pour diminuer la fixation non spécifique de l'ADN simple brin sur le filtre nous le préincubons pendant une nuit à 65°C dans la solution de Denhardt (1966) contenant 0,02% de Ficoll 400 0,02% de BSA et 0,02% de PVP dans 5 x SSC.

12.2.2 Marquage des fragments d'ADN par "nick-translation"

La méthode de Rigby et al (1977) repose sur la capacité de l'ADN polymérase de E.coli de pouvoir déplacer dans le sens 5' → 3' une coupure présente sur un des brins d'ADN (activité exonucléasique) tout en polymérisant un nouveau brin complémentaire (activité polymérasique). Si nous ajoutons un désoxyribonucléotide radioactif dans le mélange réactionnel nous obtenons de l'ADN marqué.

Nous avons effectué ces marquages au moyen du système de nick-translation commercialisé par Amersham.

- pour 100 μ l de mélange réactionnel

100 μ M dATP, dGTP et dTTP

250 picomoles α 32 P dCTP (400 Ci/mmol)

5 unités d'ADN polymérase I et 100 pg de DNase I

1 μ g d'ADN

Nous incubons le mélange pendant 2 h. à 15°C puis ajoutons 20 μ l d'EDTA 0,2 M pH 7.5. Nous éliminons le α 32 P dCTP libre par chromatographie du mélange sur une colonne Séphadex G-100 (pipette Pasteur) équilibrée dans du tampon 0,01 x SSC et récoltons les fractions radioactives sortant avec le volume d'exclusion.

Nous obtenons une incorporation de radioactivité d'environ 10^7 cpm/ μ g d'ADN.

Les fractions radioactives sont rassemblées, dénaturées à 95°C pendant 2 min. puis transférées rapidement dans un mélange carboglace-méthanol. La dénaturation est répétée une seconde fois.

Nous ajoutons à la solution d'ADN dénaturé

1 vol de 20 x SSC

2 vol de formamide

0,1 mg/ml d'ADN de thymus de veau

0,02% de solution de Denhardt

12.2.3 Hybridation

L'hybridation se fait entre deux feuilles de Parafilm "M" à 39°C pendant 20 h. Les filtres sont lavés 2 x dans un petit volume de 2 x SSC à température ambiante pour éliminer la formamide et la majeure partie de la radioactivité. Ils sont ensuite chauffés à 65°C dans du 2 x SSC changé souvent. Nous séchons les filtres, les fixons sur un papier buvard et les recouvrons d'un film Typon X-ray (Typox TX).

12.3 Hybridation ADN - ARN

12.3.1 Préparation des filtres

Les filtres sont traités pendant 12 h. à 39°C dans une solution contenant du SSC (5x), de la formamide (50%), de la glycine (1%), de l'ADN de thymus de veau soniqué et dénaturé et 0,02% de la solution de Denhardt.

12.3.2 Hybridation

Pour l'hybridation le même principe décrit au § 12.2.3 est utilisé mais la réaction se fait à 38°C pendant 72 h.

12.4 "Hybrid selected translation" (HST)

Cette technique permet de sélectionner puis de traduire l'ARN complémentaire d'un fragment d'ADN dénaturé et fixé sur une matrice. Nous avons suivi la méthode décrite par Miller et al (1980).

2 µg d'ADN sont transférés sur une feuille de nitrocellulose selon la méthode de Southern (1975). Le filtre est découpé en petits morceaux et mis dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Nous y ajoutons 100 µl de solution d'hybridation contenant

- 65% de formamide désionisée
- 10 mM Pipes-NaOH pH 6.4
- 400 mM NaCl
- 30 µg d'ARN chloroplastique

L'incubation se fait à 50°C pendant 2 h. La solution d'hybridation est retirée et les morceaux de nitrocellulose sont lavés à 60°C dans 1 ml de 1 x SSC contenant 0,5% de SDS. Ce

lavage est répété 10 x (après chaque addition de tampon les tubes sont bien mélangés pendant quelques secondes). Trois autres lavages se font dans 1 ml d'EDTA 2 mM pH 7.9 (le dernier pendant 5 min.).

L'ADN est relâché en chauffant les filtres à 95°C pendant 1 min. dans 30 µl d'EDTA 1 mM puis en les plongeant rapidement dans un bain méthanol-glace. Nous ajoutons au surnageant de l'acétate de sodium pH 5.2 (0,2 M final) et 10 µg de tARN de levure.

L'ARN est précipité à -80°C avec 2,5 ml d'éthanol. Avant d'être traduit selon le § 7 il est centrifugé 10 min. à 4°C (centrifugeuse Eppendorf) et rincé 2 x à l'éthanol 70%.

12.5 "Hybrid arrested translation" (HART)

Un fragment d'ADN connu est hybridé avec un mélange d'ARN chloroplastique total. La réaction se fait en milieu liquide et en présence d'un excès d'ADN. Après hybridation des ARN complémentaires au fragment d'ADN, le mélange est partagé en deux. Avant la traduction dans le réticulocyte une des parties est dénaturée permettant ainsi aux ARN "capturés" d'être relâchés. Cette méthode permet ainsi de mettre en évidence la disparition d'un produit de traduction par rapport au témoin.

Nous avons suivi la méthode décrite par Paterson et al (1977). 5 µg d'ARN chloroplastique total sont hybridés contre 2 µg d'ADN dans 25 µl de la solution d'hybridation décrite par Casey et Davidson (1977).

80% de formamide désionisée
10 mM Pipes-NaOH pH 6.4
0,4 M NaCl

L'hybridation se fait à 48°C pendant 2 h., elle est arrêtée par l'adjonction de 200 µl d'eau bidistillée stérile froide contenant 100 µg de tARN de levure. Le mélange est alors

divisé en deux parts égales. L'une d'entre elles est déshybridée à 95°C pendant 1 min. puis refroidie rapidement dans un mélange méthanol-glace.

Nous ajoutons alors aux deux milieux du Na acétate 3 M pH 5.5 (0,2M final) et précipitons l'ARN avec 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Les conditions de traduction dans le lysat de réticulocyte sont décrites au § 7.

III Résultats

1. Transcription-traduction du génome chloroplastique d'Euglena gracilis dans un système acellulaire procaryotique

1.1 Introduction

Le transfert de l'information génétique ADN → ARN → protéine peut se faire in vitro dans un système acellulaire procaryotique.

Un des premiers systèmes à avoir été mis au point est celui dit de transcription-traduction couplé ou S-30 décrit par Lederman et Zubay (1968).

Herrlich et Schweiger (1974) ont synthétisé plusieurs enzymes actives codées par de l'ADN phagique en utilisant un tel système. Ce dernier est donc capable de lire les signaux présents sur un ADN et de transcrire-traduire le gène d'une manière fidèle.

L'utilisation du système de transcription-traduction pour l'analyse des gènes de protéine présents sur le ctADN semble judicieux au vu de certaines observations:

1. l'ADN bactérien ne forme pas de structures nucléoprotéiques complexes (absence de protéines basiques de type histone) tout comme le ctADN
2. les ribosomes bactériens et chloroplastiques ont une taille similaire
3. leurs ARN ont des coefficients de sédimentations similaires.

De plus, l'ARN polymérase I de E. coli semble assez proche de l'ARN polymérase chloroplastique caractérisée chez le maïs (Smith et Bogorad, 1974).

Dans ce chapitre, nous avons isolé un S-30 selon la méthode de Zubay et al (1970), testé ses capacités de transcription-traduction en présence d'ADN phagique puis analysé le génome chloroplastique.

1.2 Caractérisation du système de transcription-traduction couplé

1.2.1 Activité du système

La dépendance du S-30 à l'adjonction d'un ADN exogène est une des caractéristiques que l'on peut démontrer en mesurant l'incorporation de $[^{35}\text{S}]$ -méthionine dans des polypeptides précipitables au TCA.

Pour caractériser le système, une expérience type est décrite dans le tableau I.

Nous constatons que le ctADN stimule l'incorporation de la méthionine radioactive.

L'emploi de la rifampicine, inhibiteur de l'ARN polymérase ADN dépendante d'origine procaryotique, permet de contrôler que le processus de transcription est indispensable à la biosynthèse des protéines. La présence d'ARN messagers endogènes est probablement responsable de la faible incorporation de $[^{35}\text{S}]$ -méthionine.

Le chloramphénicol, inhibiteur de la traduction, connu pour agir sur la sous-unité 50S des ribosomes procaryotiques, bloque près de 95 % d'incorporation de méthionine radioactive. La faible incorporation décelable malgré la présence de l'inhibiteur est comparable à celle trouvée dans le contrôle (système complet sans ADN exogène).

- tableau I -

Activité du système de transcription-traduction couplé

Conditions d'expérience	Incorporation de [^{35}S]-méthionine dans des polypeptides précipitables au TCA	
	cpm/10 μl	activité relative (% du système complet)
Système complet	538.400	100
+ rifampicine (50 $\mu\text{g/ml}$)	25.800	4,8
+ chloramphénicol (20 $\mu\text{g/ml}$)	31.200	5,8
- ADN	30.600	5,7
Système dénaturé (5 min, 95°C)	6.300	1,2

Le milieu réactionnel est décrit au chapitre matériel et méthodes.

Le système complet comprend 2 μg de ctADN et 8 μCi de [^{35}S]-méthionine.

Le 1,2 % d'activité relative mesuré pour le système dénaturé puis incubé en présence de $[^{35}\text{S}]$ -méthionine montre que la méthode de lavage des filtres est bonne.

Nous pouvons calculer la stimulation de l'incorporation de la méthionine due à l'ADN ajouté. Elle dépend de la nature de l'ADN et de sa concentration (tableau II). Ainsi, nous obtenons une stimulation de 17,5 x pour 2,0 μg de ctADN et de 12,5 x pour 2,3 μg d'ADN du bactériophage T7.

L'activité relative obtenue en remplaçant le ctADN par l'ADN du phage T7 est de 71 %.

1.2.2 Influence de la concentration en ADN

Dans le tableau II, nous montrons l'influence de la concentration en ADN exogène sur l'incorporation de la méthionine radioactive. Pour des concentrations en ctADN de 0 à 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, nous obtenons une augmentation d'incorporation proportionnelle à la concentration. Nous observons une diminution de l'incorporation de 31 % pour une concentration de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et de 75 % pour une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pour optimiser l'incorporation de la méthionine radioactive, la concentration en ADN exogène est importante. La stimulation de la biosynthèse des protéines varie de 10 à 75 x par rapport au système incubé sans ADN.

Bottomley et Whitfeld (1979) ont montré que la réponse du S-30 pour une augmentation croissante de ctADN d'épinard est de type sigmoïde. A la figure 1, nous comparons leurs résultats à ceux exposés dans le tableau II a.

Pour des concentrations supérieures à 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ils n'observent pas d'inhibition de l'incorporation. Par contre, Moorman et al (1978) ont, dans une expérience similaire, une légère baisse d'activité pour des quantités en ADN mitochondrial de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

- tableau II -

Influence de la concentration en ADN

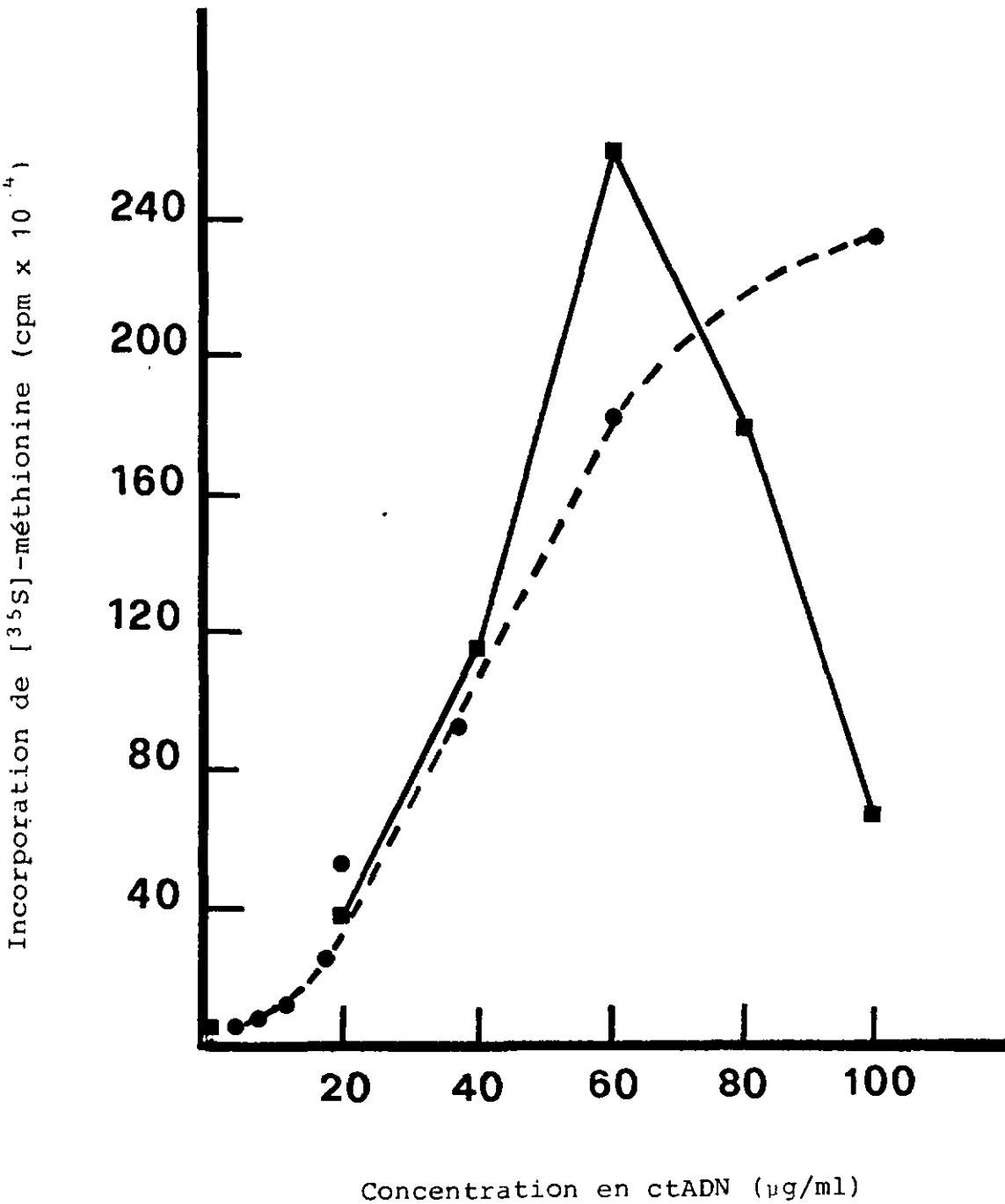
a) ctADN ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	40	60	80	100
incorporation de $[^{35}\text{S}]$ - méthionine cpm x $10^3/50 \mu\text{l}$	35	350	1150	2600	1800	670
stimulation par rapport au témoin	1x	10x	33x	74x	51x	19x

b) ADN plasmidial ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	40	80
incorporation de $[^{35}\text{S}]$ - méthionine cpm x $10^3/50 \mu\text{l}$	13	170	315	420
stimulation par rapport au témoin	1x	13x	24x	32x

Le plasmide utilisé comme modèle dans cette expérience (b) est le pCR34 contenant le fragment EcoRI 15 de Chlamydomonas reinhardii (généreusement offert par JD Rochaix, Université de Genève)

- figure 1 -

Activité du S-30 en fonction de différentes concentrations en ctADN



Le milieu réactionnel est décrit dans matériel et méthodes.

● représente la courbe de réponse du ctADN d'épinard selon Bottomley et Whitfeld (1979)

■ représente la courbe de réponse du ctADN d'Euglena gracilis (ce travail)

Dans notre cas, il est probable que le degré de pureté du ctADN d'E. gracilis soit la cause de l'effet d'inhibition observé (présence d'une substance inhibitrice et/ou de RNases).

L'analyse sur SDS-PAGE montre que si l'augmentation de la concentration en ctADN affecte l'incorporation de la méthionine radioactive, le profil des polypeptides synthétisés, par contre, ne semble pas être modifié; seule l'intensité des bandes change (figure 2). Pour l'ADN recombinant, il en va de même (figure 3).

Dans les expériences suivantes, nous avons choisi des concentrations de 50 µg/ml pour le ctADN et de 40 µg/ml pour les ADN recombinants.

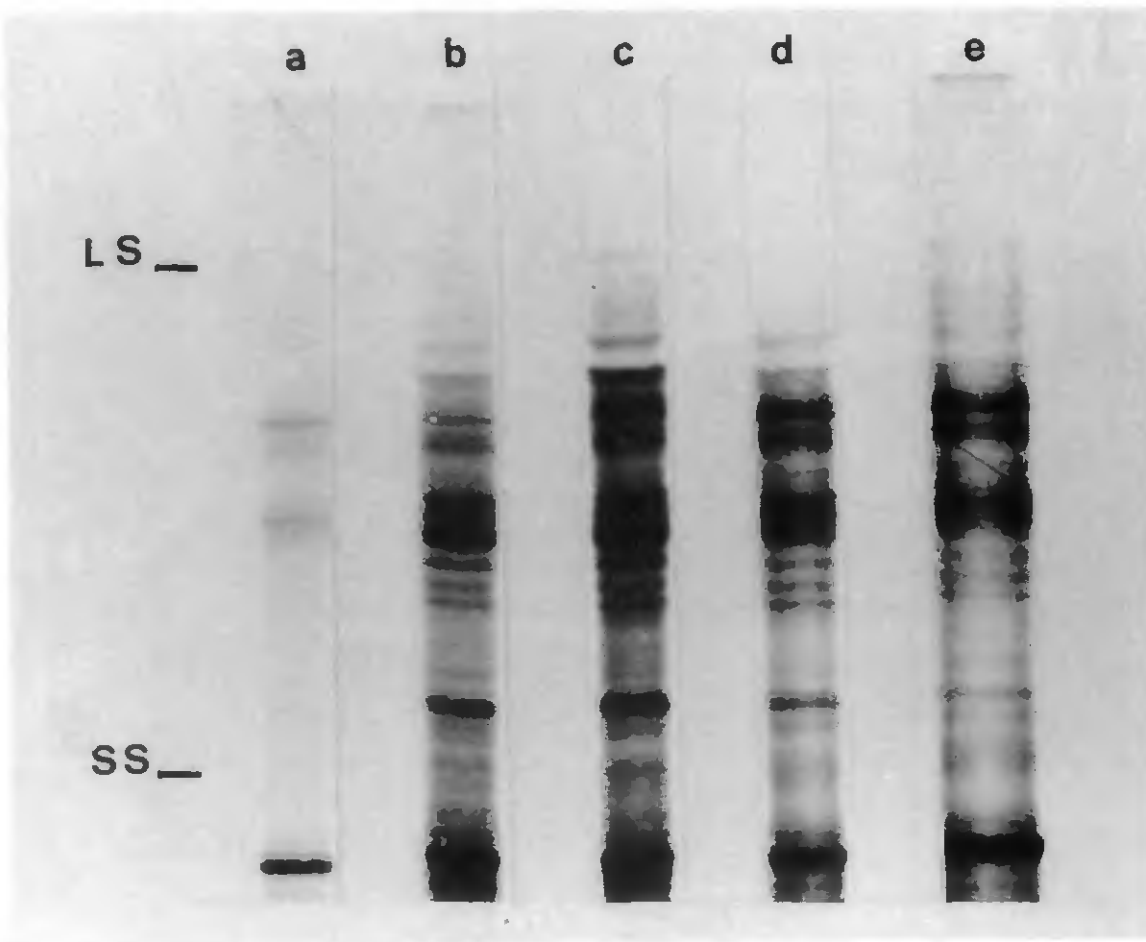
1.2.3 Incorporation de [^{35}S]-méthionine en fonction du temps

La figure 4 montre que pendant les cinq premières minutes, l'augmentation de l'incorporation est relativement faible. Ce temps de latence correspond sans doute au temps que met le milieu réactionnel pour passer de 4°C à 37°C. De cinq à vingt minutes, l'augmentation est régulière. Après trente minutes, nous constatons un arrêt de l'incorporation. L'épuisement d'un des composants peut expliquer une telle situation.

Dans les expériences suivantes, nous avons choisi un temps d'incorporation de 20 minutes.

- figure 2 -

Influence de la concentration en ctADN sur le profil des polypeptides synthétisés in vitro



Séparation sur SDS-PAGE 15 % des polypeptides synthétisés in vitro. Autoradiographie 4 jours.

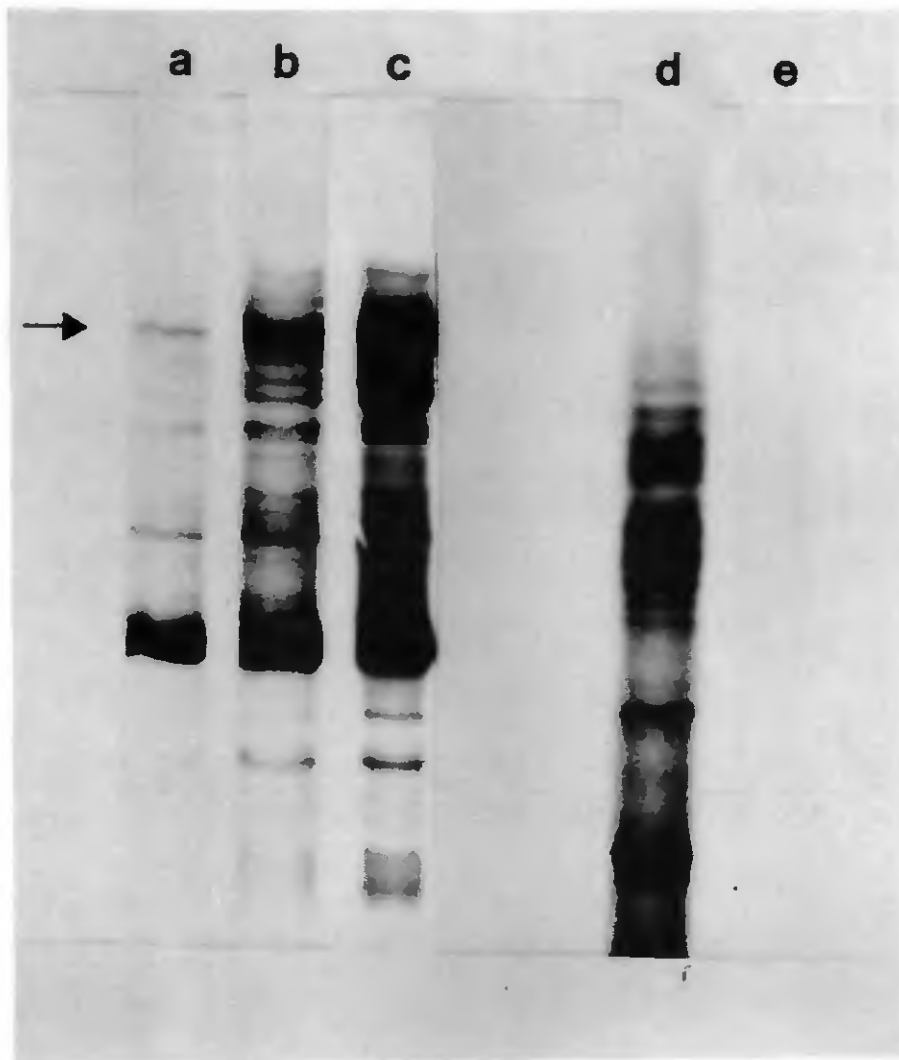
Profils a - e: 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml de ctADN

Marqueur: RuBPCase isolée d'Euglena gracilis

LS: 59 Kd SS: 12 Kd selon Rabinowitz et al (1975)

- figure 3 -

Influence de la concentration en ADN plasmidial sur le profil des polypeptides synthétisés in vitro



Séparation sur SDS-PAGE 15 % des polypeptides synthétisés in vitro. Autoradiographie 9 jours.

Profils a - c: 20, 40, 80 µg/ml d'ADN recombinant (pCR₃₄).

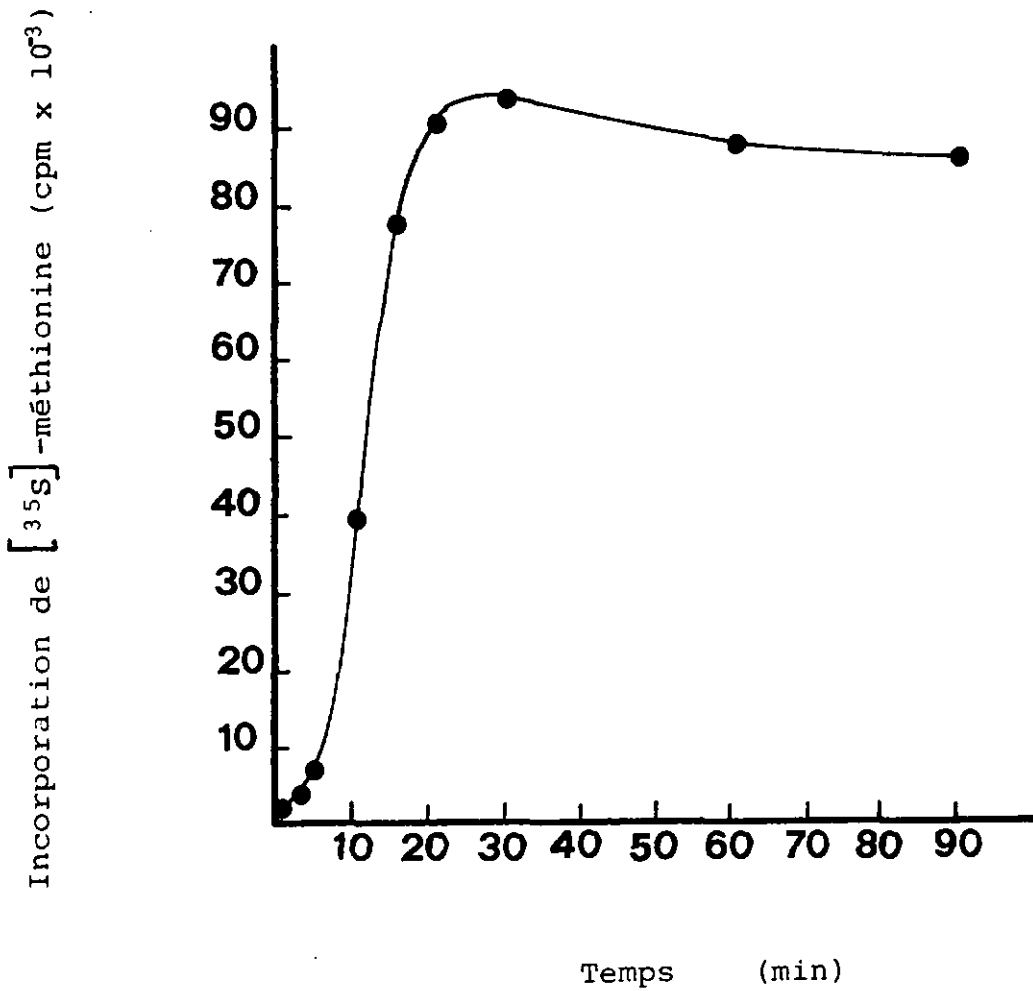
Profil d: 50 µg/ml de ctADN d'Euglena gracilis.

Profil e: témoin sans ADN exogène.

La flèche indique la LSU de la RuBP carboxylase de Chlamydomonas reinhardtii

- figure 4 -

Incorporation de $[^{35}\text{S}]$ -méthionine en fonction du temps d'incubation



100 μl de milieu réactionnel contiennent 4 μg de ctADN et 40 μCi de $[^{35}\text{S}]$ -méthionine

2 μl de ce milieu sont prélevés aux différents temps et placés sur filtres GF/C puis traités selon Bollum (1968)

1.2.4 Synthèse des protéines in vitro en présence d'ADN de bactériophage

Pour obtenir la transcription-traduction fidèle d'un modèle, il semble que le magnésium soit le facteur le plus critique.

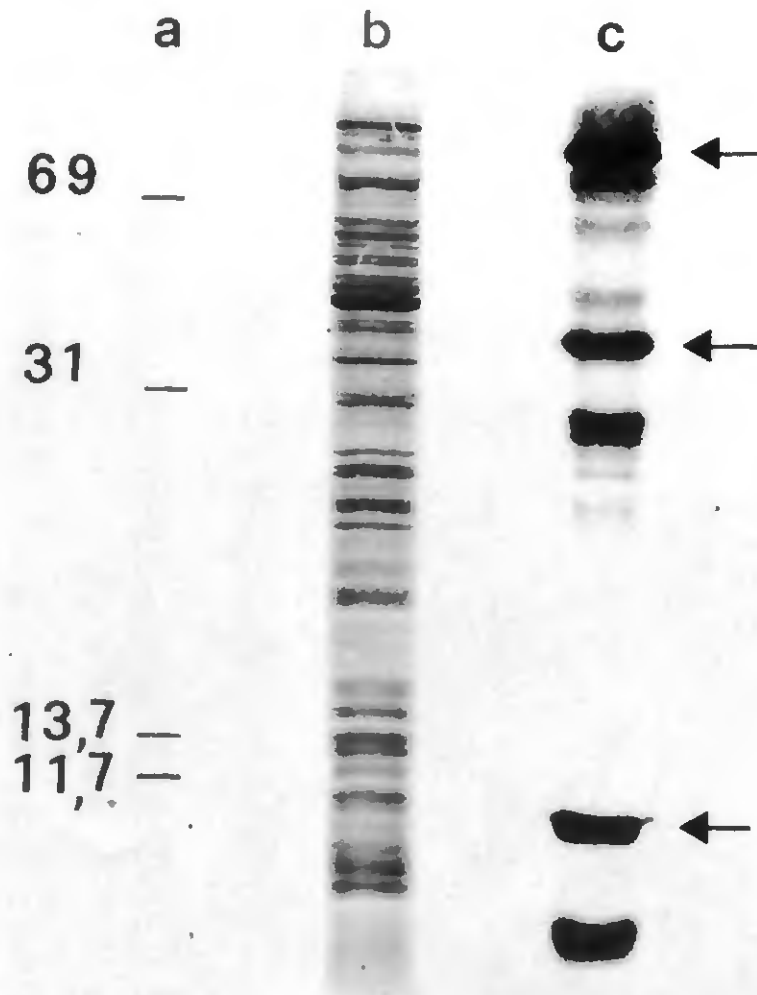
Zubay et al (1970) ont montré que le rapport magnésium-phosphoénolpyruvate était crucial. Pour la biosynthèse fidèle et optimale de certaines enzymes, Fuchs (1976) a également varié les concentrations en Mg^{2+} et en phosphoénolpyruvate. De plus, il a montré l'interdépendance du Mg^{2+} avec la spermidine (polyamine pouvant substituer ce cation). Pour la plupart de nos expériences, nous avons adopté le milieu réactionnel décrit par Zubay et al (1970). En présence de 14 mM de magnésium et de 21 mM de phosphoénolpyruvate, la transcription-traduction de l'ADN du bactériophage T7 semble donner des protéines fidèles.

Dans la figure 5, nous obtenons 3 polypeptides très marqués dont les M_r apparentes correspondent à celles des protéines codées par les gènes 0.3, 1.0 (RNA polymérase) et 1.3 (DNA ligase) décrites par Hopper et al (1975).

Le profil des autres polypeptides synthétisés en plus faible quantité est aussi semblable à celui trouvé par Hopper et al (1975) ou Moorman et al (1978).

- figure 5 -

Polypeptides synthétisés dans le S-30 en présence de l'ADN de bactériophage T7



Séparation sur SDS-PAGE 15 %

- (a) protéines standards: BSA (69 Kd) DNase (31 Kd) RNase (13,4 Kd) CytC (11,7 Kd)
- (b) coloration au bleu de Coomassie d'un profil de séparation des protéines du S-30
- (c) autoradiographie du profil des protéines synthétisées dans le S-30 en présence de l'ADN de bactériophage T7

Les flèches indiquent de haut en bas: RNA polymérase, DNA ligase, Protéine du gène 0.3.

1.2.5 Synthèse in vitro en présence du plasmide pBR₃₂₂

Le plasmide pBR₃₂₂, utilisé dans le cadre de notre thèse pour cloner des fragments de ctADN, a également été testé dans le système de transcription-traduction couplé.

Le profil (a) de la figure 6 nous montre que sous forme I (superhélice), le vecteur est transcrit-traduit avec efficacité. La Mr apparente de la protéine synthétisée in vitro est de 27 Kd. Cette protéine correspond à la β -lactamase, enzyme responsable de la résistance du plasmide à l'ampicilline (Whitfeld et Bottomley, 1980).

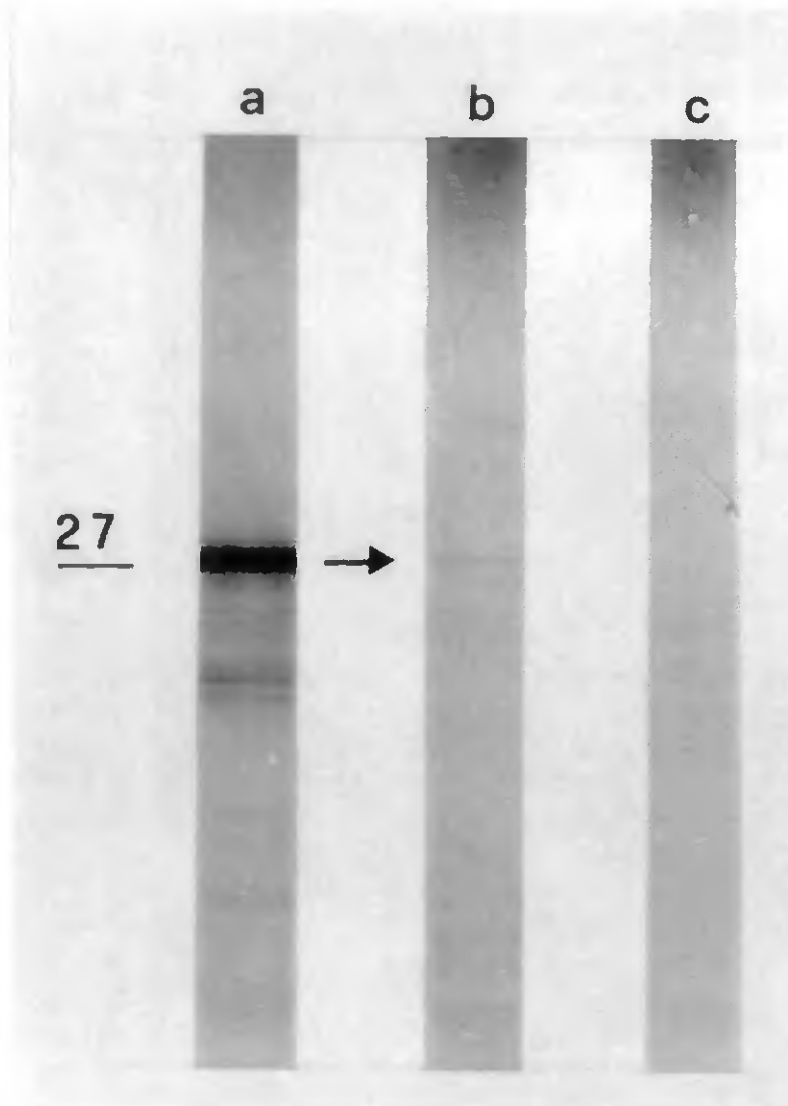
Selon l'endonucléase de restriction utilisée pour linéariser le vecteur avant la transcription-traduction, nous observons soit une faible synthèse de l'enzyme (b), soit une suppression totale de la protéine (c). La séquence du plasmide étant connue (Sutcliffe, 1978a), nous constatons que l'endonucléase BamH I ne coupe pas le plasmide au niveau du gène de résistance à l'ampicilline, ce que fait Pst I.

Par cette expérience, nous constatons que le S-30 transcrit-traduit beaucoup plus efficacement la forme superhélice (I) que la forme linéaire (III). Yang et al (1980) ont montré que cette différence d'efficacité vient en fait d'une activité exonucléolytique présente dans le surnageant 30'000 g des bactéries généralement utilisées. Ils ont construit une souche mutante dont l'extrait permet la transcription-traduction efficace de fragments d'ADN linéarisés.

Dans notre travail, nous n'avons pas employé une telle souche. Sans mettre en évidence directe une activité exonucléolytique dans notre système, la comparaison des profils (a) et (b) de la figure 6 donne raison à la théorie de Yang et al, 1980.

- figure 6 -

Dépendance de la forme du plasmide sur l'efficacité de la
transcription-traduction



Analyse sur SDS-PAGE 15 % des protéines synthétisées dans le
S-30 de E. coli en présence de

- (a) pBR₃₂₂ forme superhélice
- (b) pBR₃₂₂ digéré par BamH I
- (c) pBR₃₂₂ digéré par Pst I

Autoradiographie 3 jours.

1.3 Transcription-traduction du génome chloroplastique par le système acellulaire procaryotique

1.3.1 Transcription-traduction du ctADN digéré par certaines endonucléases de restriction

Le ctADN, digéré par différentes endonucléases de restriction (fig. 7), a été utilisé comme modèle dans le système de transcription-traduction couplé. Nous observons (fig. 8 et 9) la présence de plusieurs bandes discrètes dont les Mr apparentes varient de 45 Kd à 11 Kd. Aucun polypeptide ne comigre avec la LSU de la RuBP carboxylase, sous-unité connue pour être codée par le génome chloroplastique (Blair et Ellis, 1973; Vasconcelos, 1976).

Différents lots de ctADN ont été testés montrant des profils similaires. Parfois, des polypeptides de Mr apparente plus élevée (environ 60 Kd) ont pu être observés mais toujours présents en très faible quantité.

La digestion du ctADN par différentes endonucléases de restriction modifie plus ou moins le profil témoin (transcription-traduction du ctADN non digéré).

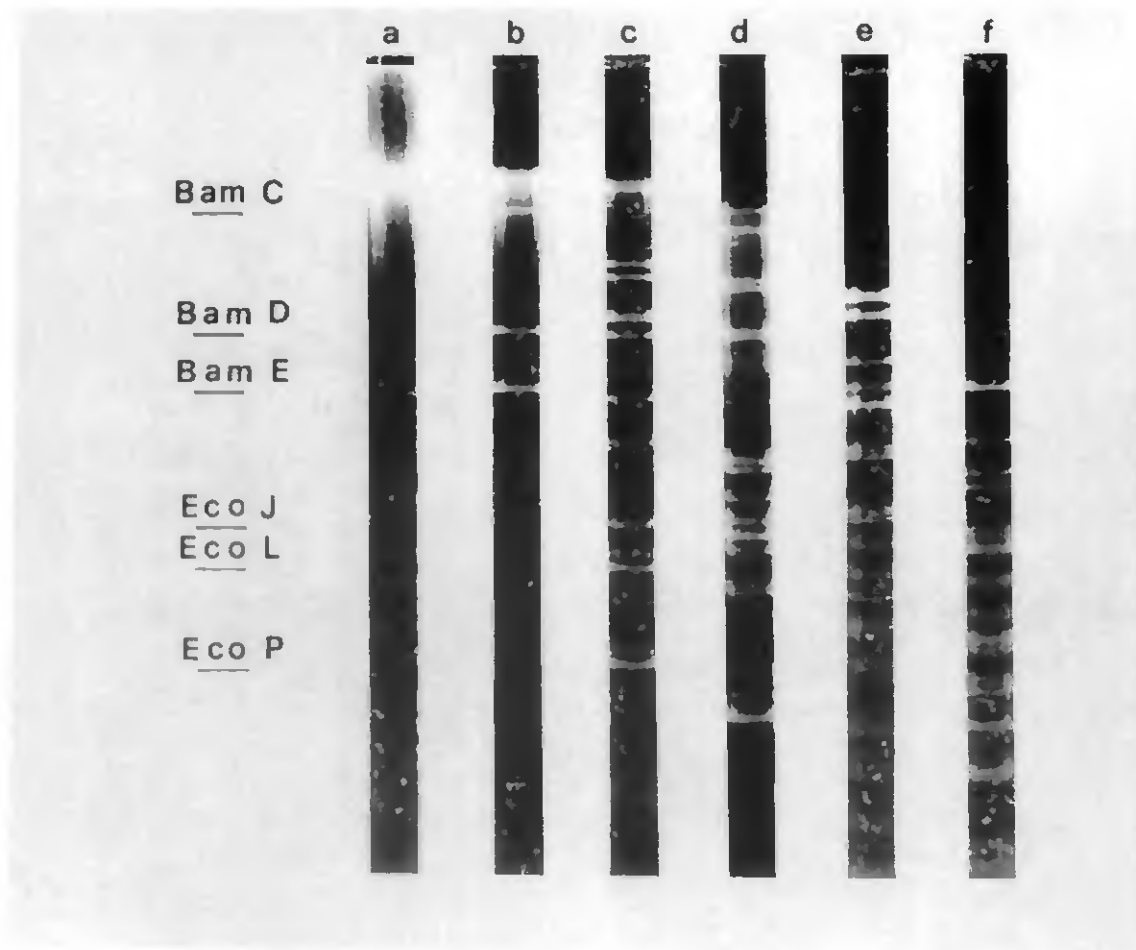
BamH I qui ne coupe le ctADN qu'en 5 fragments ne modifie pas le profil des polypeptides.

Hind III, par contre, coupe le ctADN en plus de 50 fragments et supprime l'expression d'au moins deux polypeptides.

Après digestion du ctADN par les enzymes de restriction EcoRI, Bgl II et Hae III, certains polypeptides disparaissent également (voir flèches).

- figure 7 -

Profils de digestion du ctADN par diverses endonucléases de restriction

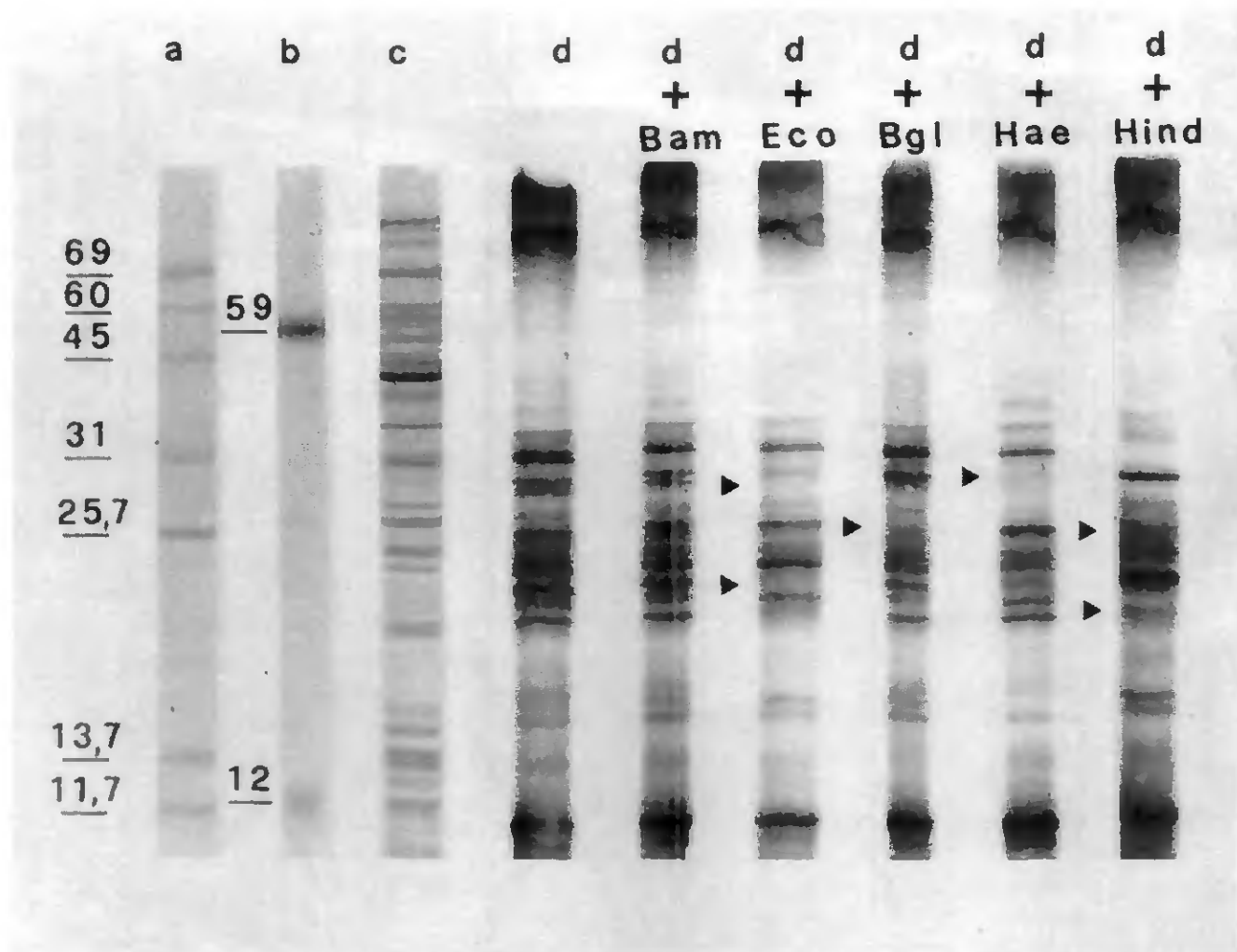


a: ctADN b: ctADN + BamH I c: ctADN + EcoRI
d: ctADN + Bgl II e: ctADN + Hae III f: ctADN + Hind III

Analyse sur gel d'agarose 1 % (3 mm) 18 mA 12 h

- figure 8 -

Analyse des produits de transcription-traduction du ctADN sur SDS-PAGE 15 %



- a : protéines standards BSA (69 Kd) Catalase (60 Kd)
Ovalbumine (45 Kd) DNase (31 Kd) Chymotrypsine (25,7 Kd)
RNase (13,7 Kd) Cytochrome C (11,7 Kd)
- b : RuBP carboxylase LS (59 Kd) SS (12 Kd) d'Euglena gracilis
- c : protéines endogènes du S-30 de E. coli
- d : protéines synthétisées dans le S-30 en présence de ctADN
(3 - 5 μ g)
- a-c: profils colorés au bleu de Coomassie
- d : autoradiographie 6 jours

- figure 9 -

Analyse des produits de transcription-traduction du ctADN sur
SDS-PAGE 12,5 %



Autoradiographie 6 jours.

Protéines synthétisées dans le S-30 de E. coli en présence de ctADN (3 - 5 μ g).

L'absence de polypeptides très marqués et le grand nombre de bandes rendent l'analyse difficile.

Bottomley et Whitfield (1979) ont montré que le ctADN d'épinard est transcrit-traduit dans le S-30 de E. coli. Le profil des polypeptides séparés sur SDS-PAGE est complexe. Un des produits synthétisés in vitro en grande quantité comigre avec la LSU de la carboxylase d'épinard. L'analyse de ces deux polypeptides par digestion protéolytique partielle montre des peptides de Mr apparentes identiques. Ces observations tendent à prouver que le S-30 de E. coli est capable de transcrire-traduire un gène chloroplastique avec fidélité.

Pour identifier les produits de gènes mitochondriaux synthétisés in vitro, Moorman et al (1978) ont montré que si les produits de biosynthèse in vitro ne comigraient pas avec des protéines mitochondriales, des tests d'immunoprécipitations indirectes suggéraient, par contre, une synthèse de polypeptides partiels. Ainsi, des anticorps anti-cytochrome c-oxydase sont capables d'immunoprécipiter 4 polypeptides de Mr apparente inférieure à la sous-unité de l'enzyme.

L'emploi d'anticorps spécifiques leur a ainsi permis de caractériser des polypeptides incomplets synthétisés dans le S-30.

1.3.2 Transcription-traduction de quelques recombina

Les quelques polypeptides synthétisés par le S-30 en présence de ctADN n'étant pas identifiables, nous avons testé certains fragments EcoRI clonés.

Dans notre laboratoire, près de 40 % du génome chloroplastique d'Euglena gracilis a été cloné dans le pBR322 (Schlunegger et al, 1979).

La transcription-traduction de ces clones montre que notre système reconnaît certaines séquences et synthétise des polypeptides de Mr apparentes différentes selon les modèles (fig. 10). Quel que soit le recombina testé dans notre système, nous observons un polypeptide de 27 Kd correspondant à la β -lactamase (Sutcliffe, 1978b)

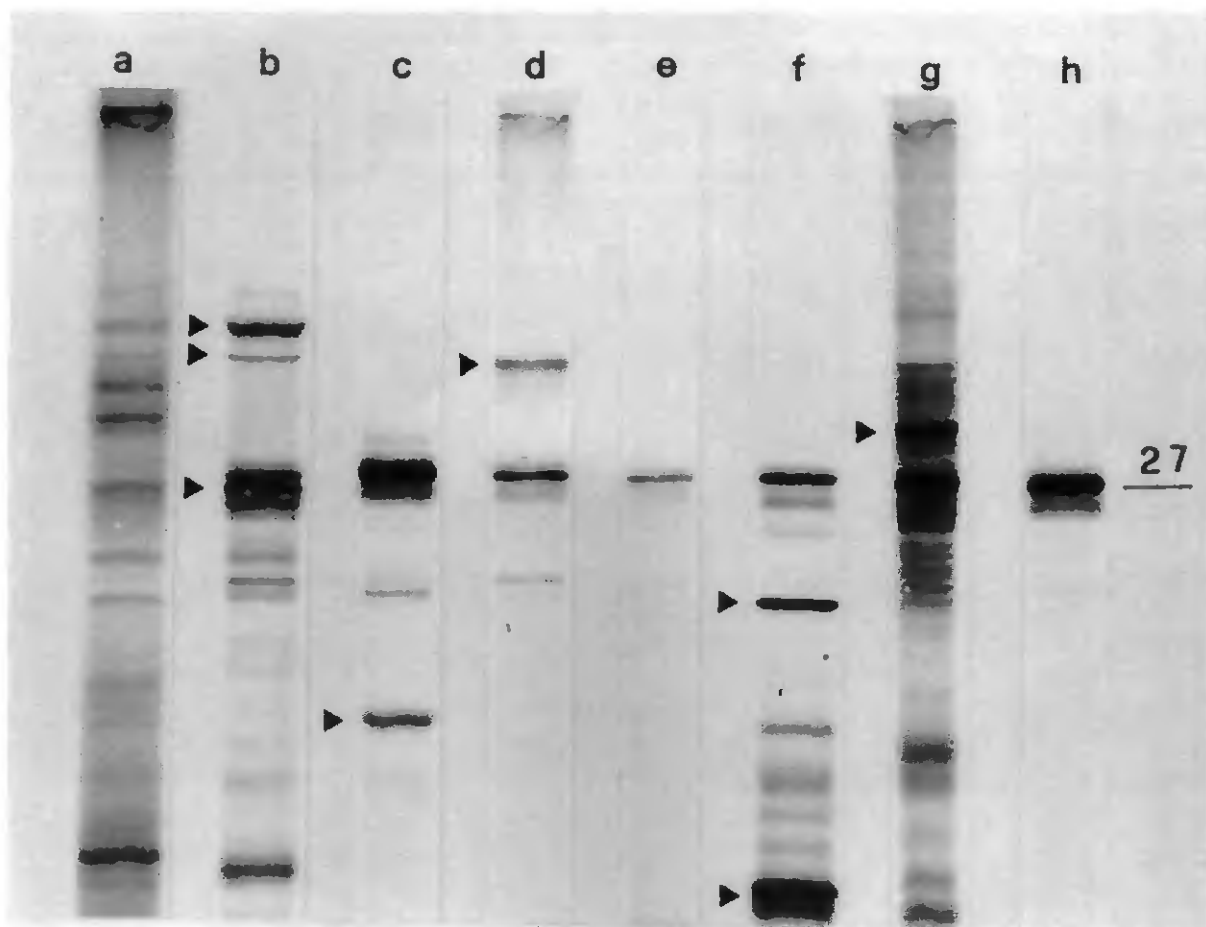
La présence du fragment EcoL ou du fragment EcoP dans le vecteur n'entraîne pas la synthèse de polypeptides supplémentaires.

Nous savons que EcoL et EcoP portent l'information génétique des rARN (Jenni et Stutz, 1978). Il semble donc que notre système soit capable de discriminer une séquence codant pour un mARN d'une séquence codant pour un rARN.

Le tableau III montre les résultats des transcriptions-traductions de différents recombina. Tous génèrent un ou plusieurs polypeptides à l'exception de pEgcE_L, pEgcE_P et pEgcE_K.

- figure 10 -

Transcription-traduction de quelques recombina



Analyse des produits synthétisés dans le S-30 de E. coli sur SDS-PAGE 15 %.

a: ctADN	b: pEgcE _G	c: pEgcE _H	d: pEgcE _J
e: pEgcE _L	f: pEgcE _N	g: pEgcE _O	h: pBR ₃₂₂

Autoradiographie 6 jours.

- tableau III -

Différents recombinants transcrits-traduits dans le système
acellulaire procaryotique

recombinants	insertion	tailles (Kbp) selon Jenni (1980)	réponse dans le S-30	Mr apparente des polypep- tides (Kd)
pEgcE ₅₁	EcoRI.F	7,2	+	17,5 15 12
pEgcE ₃₂	EcoRI.G	6,9	+	43 40 25
pEgcE ₁₅	EcoRI.H	5,4	+	17
pEgcE ₁₄	EcoRI.I	4,7	+	>70 22
pEgcE ₂₅	EcoRI.J	3,6	+	40
pEgcE ₅₂	EcoRI.J'	3,6	+	14
pEgcE ₂₉	EcoRI.K	3,3	-	-
pEgcE ₂₂	EcoRI.L	3,2	-	-
pEgcE ₂₀	EcoRI.N	2,9	+	21 11
pEgcE ₁₆	EcoRI.O	2,5	+	33
pEgcE ₉	EcoRI.P	2,4	-	-

Sur la figure 10, en comparant le profil témoin (a) aux profils (b, c, d, f ou g), nous voyons que plusieurs bandes co-migrent.

De tous les recombinants à disposition, aucun ne génère dans le S-30 un polypeptide de 59 Kd.

Un autre polypeptide présent dans les chloroplastes et fortement synthétisé in vitro est la protéine 32000 synthétisée sous forme de précurseur (Ellis et Barraclough, 1978). Ce polypeptide insoluble fortement attaché dans les thylacoïdes des végétaux est aussi présent chez E. gracilis (Vasconcelos, 1976).

L'analyse du profil des polypeptides synthétisés in vitro en présence de pEgcE_O révèle, en plus de la β -lactamase, une protéine de 33 Kd. Nous avons pensé à l'éventualité que le gène de la protéine 32000 soit localisé sur le fragment EcoRI.O chez E. gracilis et que notre système soit capable de synthétiser in vitro la protéine ou son précurseur. (Le fait qu'il soit fortement synthétisé dans notre système pourrait signifier qu'une séquence particulière est très bien reconnue).

Plusieurs arguments en défaveur de cette éventualité seront discutés au chapitre suivant.

Si les profils obtenus à la fig. 10 sont différents selon le fragment inséré dans le plasmide, l'incorporation de la méthionine varie également en fonction du recombinant testé. Dans le tableau IV, nous comparons l'incorporation de [³⁵S]-méthionine en fonction des recombinants pEgcE_G, pEgcE_N et pEgcE_O. Nous constatons que pEgcE_O est un excellent modèle pour le S-30. Nous avons vérifié que la différence d'incorporation observée n'était pas due à la synthèse d'un poly-

peptide riche en méthionine mais plutôt due à une séquence bien reconnue sur ce fragment. Pour ce faire, nous avons mesuré l'incorporation de ^3H -leucine et constaté qu'elle est également plus importante en présence de pEgcE_O.

- tableau IV -

Efficacité de l'incorporation en présence de méthionine ou de leucine

	incorporation de [^{35}S]-méthionine	% du max	incorporation de ^3H -leucine	% du max
	cpm x 10^3		cpm x 10^3	
pEgcE _G	350	87	26	88
pEgcE _N	284	70	17	57
pEgcE _O	403	100	30	100
-	8	2		

1.3.3 Transcription-traduction du fragment EcoRI.N

Nous avons observé, à la figure 6, qu'un fragment linéaire est aussi transcrit-traduit dans le S-30 (bien que d'une manière moins efficace).

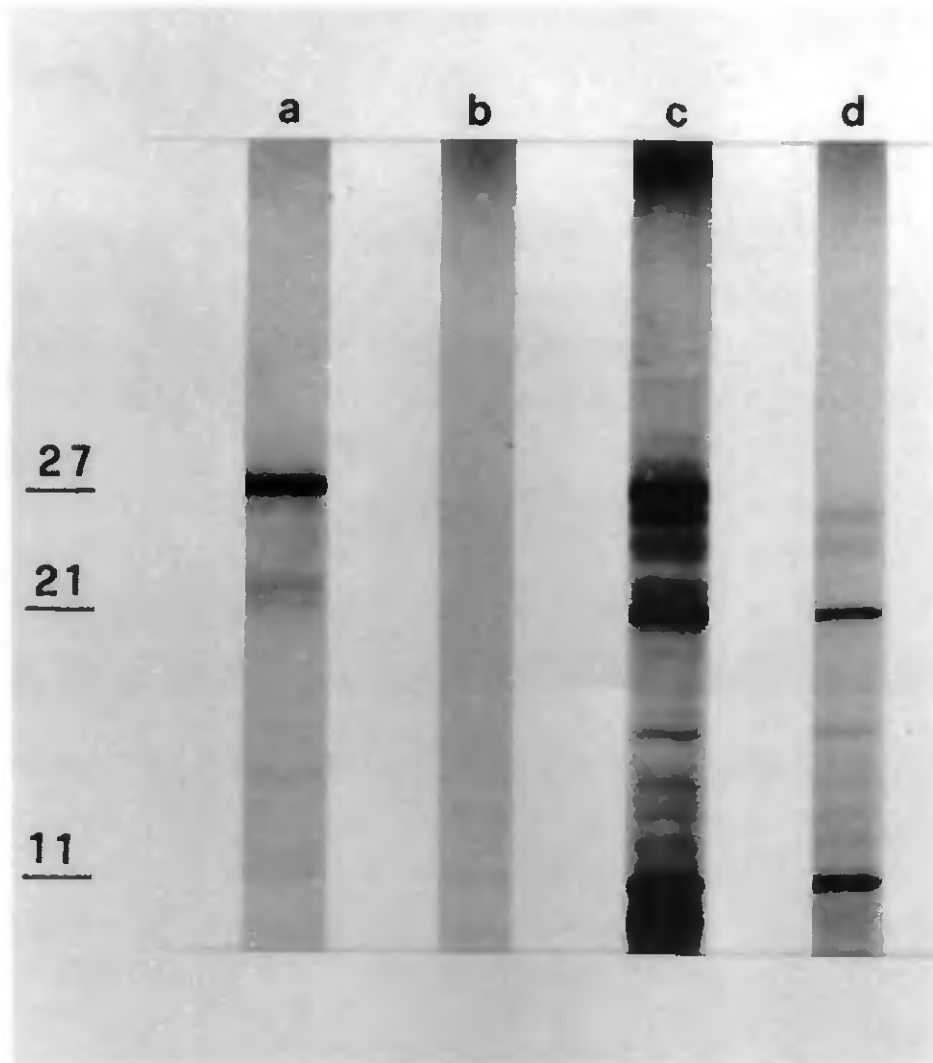
Il nous paraît intéressant de transcrire-traduire certains fragments de ctADN clonés et isolés du vecteur.

Nous savons que l'endonucléase de restriction Hae III coupe le pBR₃₂₂ en 21 fragments alors que le fragment EcoRI.N n'a pas de site Hae III (fig. 20a). Avant de transcrire-traduire pEgcE_N dans le S-30, nous l'avons incubé en présence de l'enzyme de restriction Hae III.

L'analyse des produits de synthèse sur SDS-PAGE (fig. 11) nous montre que pEgcE_N, sous forme de superhélice ou coupé par Hae III, génère deux polypeptides de 21 Kd et 11 Kd, alors que le vecteur coupé par Hae III n'est plus transcrit-traduit.

- figure 11 -

Transcription-traduction du fragment EcoRI.N



Analyse sur SDS-PAGE 15 % des protéines synthétisées dans le S-30 de E. coli en présence de

a: pBR ₃₂₂ forme I	b: pBR ₃₂₂ + Hae III
c: pEgcE _N forme I	d: pEgcE _N + Hae III

Autoradiographie 6 jours.

Le fragment EcoRI.H isolé de pEgcE_H après digestion et électroélution est aussi transcrit-traduit dans le S-30 et montre le même polypeptide que celui synthétisé en présence du recombinant superhélice (non montré).

Nous pouvons conclure que la présence du vecteur n'est pas indispensable à la transcription-traduction du fragment.

*

1.4 Discussion

- La protéine la mieux caractérisée codée par le génome chloroplastique est la LSU de la RuBP carboxylase. Bottomley et Whitfeld (1979) ont réussi à transcrire-traduire cette dernière dans un système procaryotique en y ajoutant du ctADN d'épinard. Le fragment BamH I contenant le gène entier de la LSU a été cloné et testé dans le S-30 d'E. coli (Whitfeld et Bottomley, 1980). Il génère une protéine de même Mr apparente que la LSU isolée et un profil de digestion protéolytique partielle identique.

Il semble que le gène de cette sous-unité soit mieux transcrit-traduit que le gène de la β -lactamase dans le système in vitro. Une étude de la séquence en nucléotides par ces auteurs a révélé que tant le gène que ses régions adjacentes montrent des analogies de structure avec celles trouvées chez les procaryotes à savoir:

- présence d'une séquence complémentaire à l'extrémité 3' du rARN 16S
- une région promoteur
- une séquence de terminaison.

Bien que nous ayons montré que le ctADN d'E. gracilis est transcrit-traduit dans le S-30 d'E. coli, aucun polypeptide de Mr apparente identique à celle de la LSU n'est synthétisé.

Nous savons maintenant que chez E. gracilis, le gène de la LSU est localisé sur le fragment EcoRI.A du ctADN (Stiegler et al, 1982). La présence d'un intron a été mentionnée par ces auteurs. C'est le premier exemple d'intron présent dans un gène de protéine d'origine chloroplastique. De telles séquences ont déjà été mises en évidence dans des gènes de rARN ou tARN: Rochaix et Malnoë (1978) ont localisé un intron dans le rARN 23S chez Chlamydomonas reinhardtii, Koch et al (1981) dans le tARN^{Ile} et le tARN^{Ala} chez le maïs et Steinmetz et al (1982) dans le tARN^{Leu}_{UAA} chez le maïs.

La comparaison de la séquence du gène de la LSU et des régions adjacentes chez E. gracilis avec celle déjà établie chez Zea Mays (Mc Intosh et al, 1980), Spinacia oleracea (Zurawski et al, 1981) et Chlamydomonas reinhardtii (Dron et al, 1982) sera très intéressante.

Il semble que les séquences promoteurs de type procaryotique présentes chez Spinacia oleracea soient absentes tant chez Zea mays que chez Chlamydomonas reinhardtii. Dans ces deux cas pourtant, la synthèse in vitro de la LSU a été réalisée (Coen et al, 1977, Malnoë et al, 1979).

Dans l'ADN mitochondrial des levures, des introns ont également été trouvés, par exemple dans le gène codant pour la cytochrome c oxydase (Lazowski et al, 1980). Or, Moorman et al (1978) n'ont pas réussi à synthétiser cette protéine en totalité dans le S-30 de E. coli (voir § 1.3.1).

Dans notre cas, la présence d'un intron empêche certainement une transcription-traduction in vitro fidèle dans un système procaryotique et est responsable de la synthèse de polypeptides "raccourcis".

Caractériser de tels polypeptides est un problème difficile à résoudre sans l'utilisation d'anticorps.

*

- La transcription-traduction des différents recombinants montre que le S-30 de E. coli reconnaît d'autres séquences que celles présentes sur le vecteur. L'expression de ces séquences ne dépend pas de signaux présents sur le pBR₃₂₂.

Des expériences selon "Northern" (Keller, communication personnelle) montrent que la plupart des fragments EcoRI hybrident avec un mRNA séparé sur gel agarose-urée. Cette technique permet de savoir combien de mRNA sont codés sur un fragment d'ADN.

Deux remarques sont nécessaires:

- l'ARN messager doit être en quantité suffisante,
- il ne doit pas obligatoirement être localisé en entier sur le fragment pour s'hybrider.

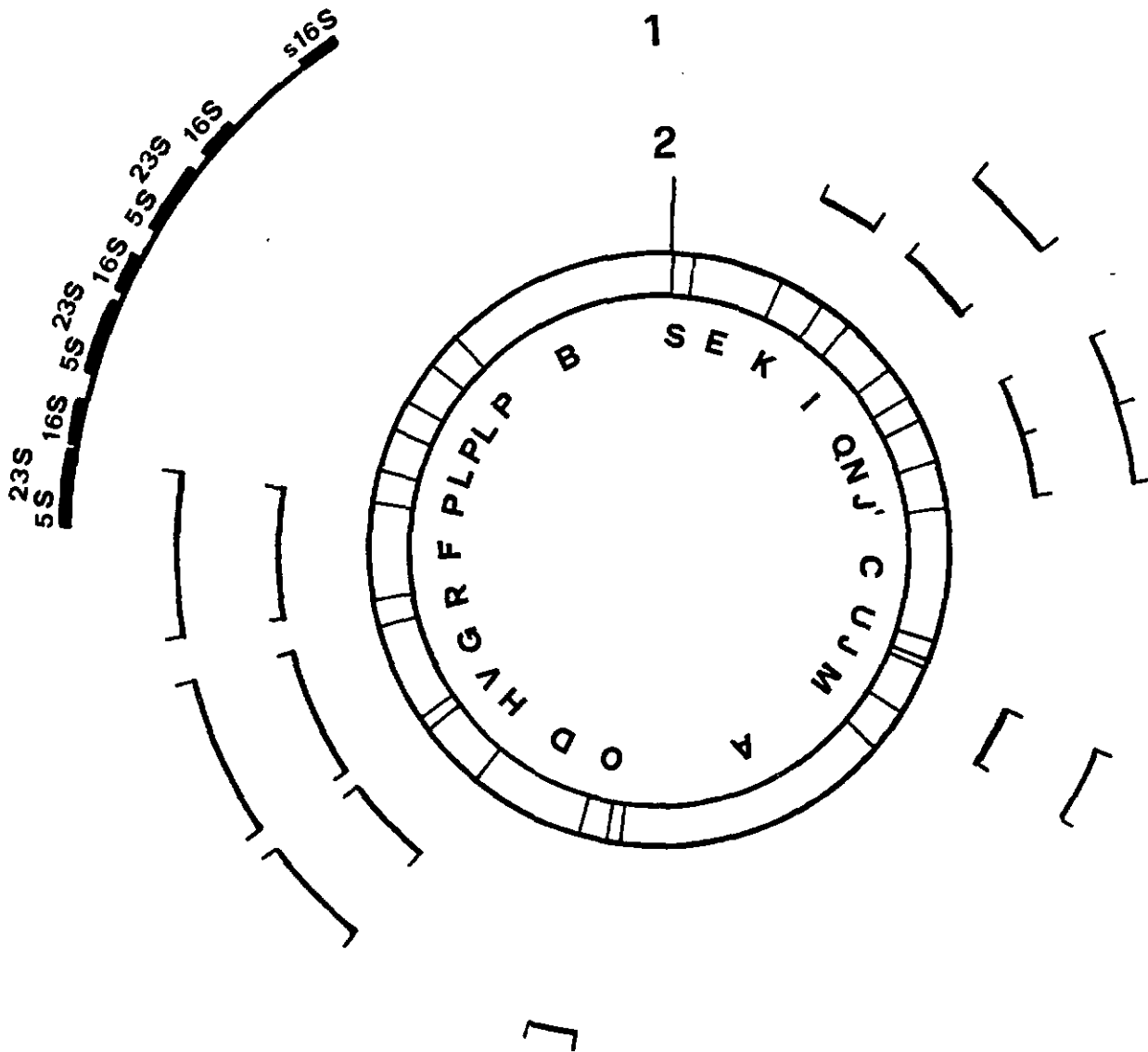
Nous avons comparé les résultats obtenus par Keller avec les nôtres à la figure 12.

Nous voyons que, à part le fragment EcoRI.K, tous les fragments hybridant avec des mRNA sont aussi sous forme de recombinants transcrits-traduits dans le S-30 de E. coli.

Le fragment EcoRI.K marqué par "Nick-translation" hybride avec un mRNA alors que pEgce_K transcrit-traduit dans le S-30 de E. coli ne génère pas de polypeptide autre que la β -lacta-

- figure 12 -

Fragments de ctADN testés selon "Northern" ou par le système Zubay



- 1 - fragments clonés transcrits-traduits dans le S-30 de E. coli (ce travail)
- 2 - expérience selon "Northern" (Keller, communication personnelle)

Carte de restriction EcoRI du ctADN d'Euglena gracilis
(Stiegler et al, 1982)

mase. Nous pouvons expliquer une telle observation en faisant l'hypothèse que le gène présent chevauche en fait le fragment EcoRI.K et un fragment EcoRI adjacent.

*

- Lors de l'expérience 1.3.2, un polypeptide de Mr apparente de 33 Kd est synthétisé en présence de pEgcE_O, polypeptide de Mr apparente similaire au précurseur de la protéine membranaire P32000 chez *Spirodela* (Weinbaum et al, 1979). L'ARN messager de ce polypeptide a un "turn over" très rapide. L'absence d'hybridation entre le fragment EcoRI.O et les ctARN pourrait être due à une quantité de mARN trop faible pour être détectée. Nous savons actuellement que le gène de la protéine P32000 chez *Euglena gracilis* est localisé sur le fragment EcoRI.I (cf discussion paragraphe 2.7).

*

- Le fragment EcoRI.N marqué par "Nick-translation" et hybridé contre le ctARN montre un signal entre les rARN 23S et 16S. La taille supposée de ce mARN (~ 1,5 Kb) permet de générer une protéine de Mr apparente de plus de 50 Kd).

Or, pEgcE_N transcrit-traduit dans le S-30, de même que le fragment EcoRI.N, génèrent essentiellement deux protéines de Mr apparentes de 21 Kd et 11 Kd seulement (fig. 11).

Les deux situations décrites ci-dessous peuvent expliquer la synthèse de polypeptides plus courts:

- le gène chevauche deux fragments EcoRI
- le gène possède un ou plusieurs introns.

1.5 Résumé

Nous avons construit un système de transcription-traduction couplé selon Zubay et al (1970). Ce système transcrit-traduit des polypeptides de masse relative élevée en présence d'ADN de phage T7. Il génère une protéine principale de Mr apparente de 27 Kd lorsque nous lui ajoutons le vecteur pBR₃₂₂ connu pour porter le gène codant pour la β -lactamase.

Le recombinant pCR34 contenant le fragment d'ADN codant pour la LSU de la RuBP carboxylase chez Chlamydomonas reinhardtii est transcrit-traduit avec fidélité dans un S-30 de E. coli selon Malnoë et al (1979). Ce plasmide testé dans notre système génère une protéine comigrant avec la LSU de la RuBP carboxylase d'Euglena gracilis. Du ctADN de soja (généreusement offert par Spielmann) transcrit-traduit dans le S-30 de E. coli, montre, parmi plusieurs produits de synthèse, une protéine majeure de Mr apparente proche de 55 Kd (résultat non montré).

Le ctADN d'Euglena gracilis, par contre, transcrit-traduit dans ce système, ne génère que des polypeptides de Mr apparente relativement petite. Sachant que le gène de la LSU de la RuBP carboxylase est codé par le génome chloroplastique, l'absence d'une telle protéine dans le profil d'analyse des produits de transcription-traduction permet de dire que le système procaryotique n'est pas capable de transcrire-traduire le ctADN d'Euglena gracilis.

A ce stade de notre étude, nous ne pouvons pas savoir à quelle étape le système hétérologue montre des limites.

L'absence d'anticorps spécifiques contre une série de protéines chloroplastiques codées par le génome du chloroplaste ne nous permet pas de savoir si les polypeptides synthétisés dans le système sont en fait des produits "raccourcis" de protéines chloroplastiques réelles.

L'analyse des séquences des gènes de protéines pourra peut-être expliquer l'inefficacité du système procaryotique vis-à-vis de modèle comme le ctADN d'Euglena gracilis.

2. Traduction sélective d'ARN messagers dans un système acellulaire eucaryotique

2.1 Introduction

Au chapitre précédent, nous avons vu que les polypeptides synthétisés dans le système de transcription-traduction couplé de E. coli n'ont pas pu être caractérisés.

Edelman et al (1976) ont montré que le S-30 de E. coli ne traduit pas avec fidélité la fraction d'ARN messenger poly A⁽⁻⁾ d'E. gracilis alors qu'elle est traduite avec fidélité dans un système eucaryotique (lysate de germe de blé).

Ces résultats semblent indiquer que le choix du système de traduction est critique.

Pour localiser des gènes de protéines sur les fragments d'ADN chloroplastique clonés, nous avons alors essayé deux approches différentes.

- La première approche consiste à transcrire le fragment cloné à l'aide de l'ARN polymérase ADN dépendante de E. coli puis de traduire les produits de transcription dans un système eucaryotique (Coen et al, 1977).
- La seconde à hybrider les ARN messagers avec des fragments d'ADN puis à traduire les mARN ainsi sélectionnés dans un système eucaryotique.

Toutes deux nous permettraient d'analyser les protéines codées par les fragments de ctADN.

Pour tenter d'identifier les protéines synthétisées dans ce système de traduction, nous les avons comparées, sur SDS-PAGE, avec les produits de biosynthèse in organello (Ortiz et al, 1980).

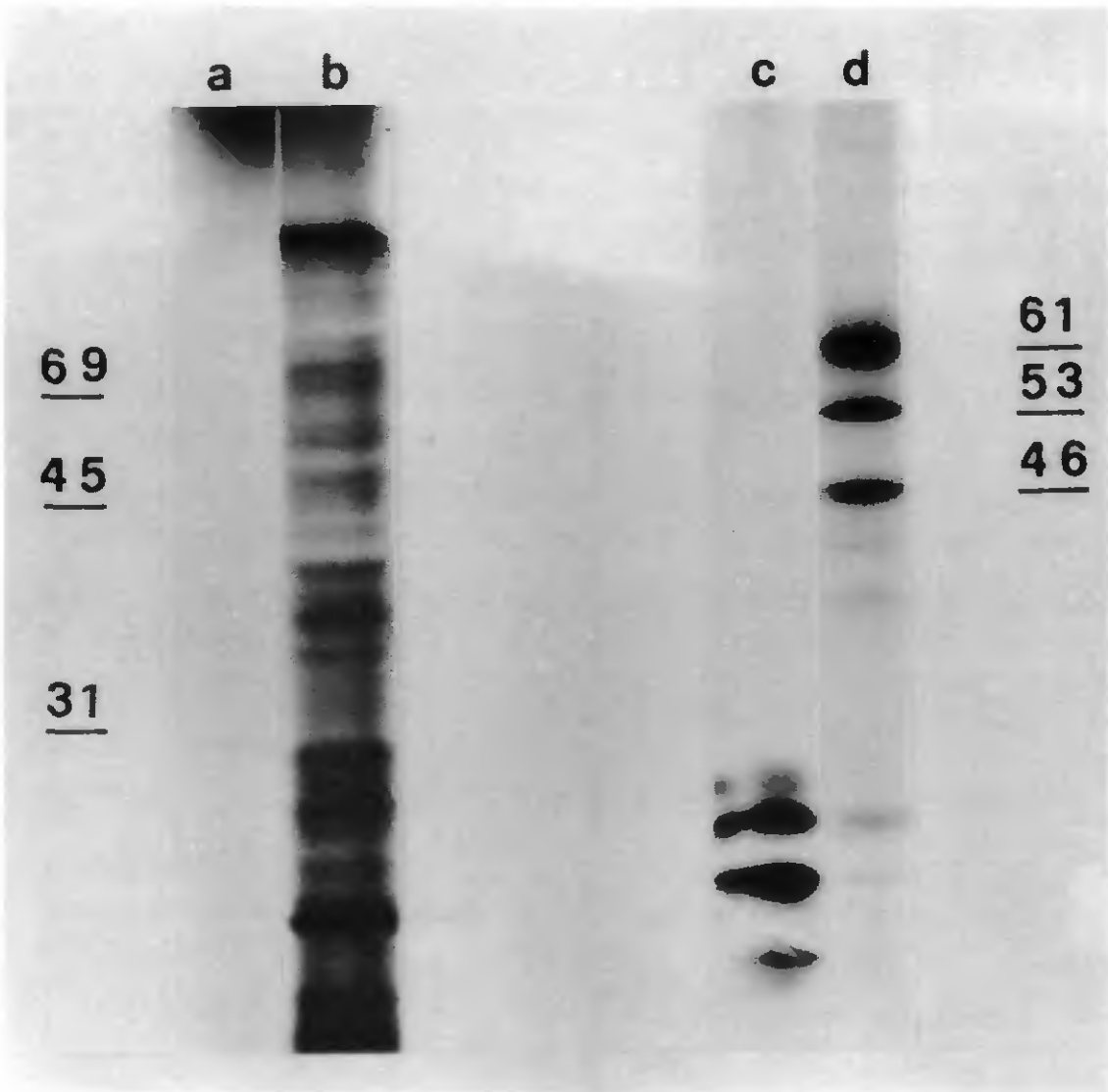
2.2 Traduction des ctARN dans un système procaryotique ou eucaryotique

Les profils de traduction des ctARN obtenus dans des systèmes acellulaires de types procaryotiques (S-30 de E. coli) ou eucaryotiques (lysate de réticulocyte de lapin) sont comparés à la figure 13.

Nous constatons que la présence d'ARN chloroplastique stimule la synthèse de polypeptides dans les deux cas.

Le profil des protéines traduites dans le S-30 de E. coli est particulièrement complexe. Des polypeptides de Mr apparente plus élevée que 45 Kd sont présents sous forme de fines bandes difficiles à caractériser.

- figure 13 -

Comparaison des systèmes de traduction in vitro

Analyse sur SDS-PAGE 12,5 % des produits de traduction dans:

- le S-30 de E. coli (a: sans ARN exogène; b: en présence de 0,6 mg/ml d'ARN chloroplastique)
- le lysat de réticulocyte de lapin (c: sans ARN exogène; d: en présence de 0,2 mg/ml d'ARN chloroplastique)

Marqueurs: BSA (69 Kd) Ovalbumine (45 Kd) DNase (31 Kd)

ab fluorographie 2 jours

cd fluorographie 5 jours

Nous n'observons pas de polypeptide fortement marqué comigrant avec la LSU de la RuBP carboxylase comme c'est le cas lors de la traduction du ctARN d'épinard. (Bottomley et Wihtfeld, 1979).

Le ctARN traduit dans le lysat de réticulocyte de lapin, système eucaryotique de Pelham et Jackson (1976), présente un profil de polypeptides moins complexe. Certaines bandes sont par contre très marquées: soit que le contenu en méthionine dans le polypeptide est élevé, soit que la concentration du mARN est plus grande et/ou que le mARN est mieux traduit, porteur de signaux bien reconnus.

Une bande particulièrement forte migre juste au-dessus de la grande sous-unité de la carboxylase, pouvant représenter son précurseur. Langridge (1981) a montré que chez l'épinard, la LSU pouvait être synthétisée sous forme d'un précurseur. Il a observé que la fraction de ctARN traduite dans un S-30 de E. coli génère un polypeptide de Mr 1000 à 2000 d plus grand que la LSU. Ce polypeptide incubé en présence d'un extrait chloroplastique puis analysé sur SDS-PAGE comigre avec la LSU.

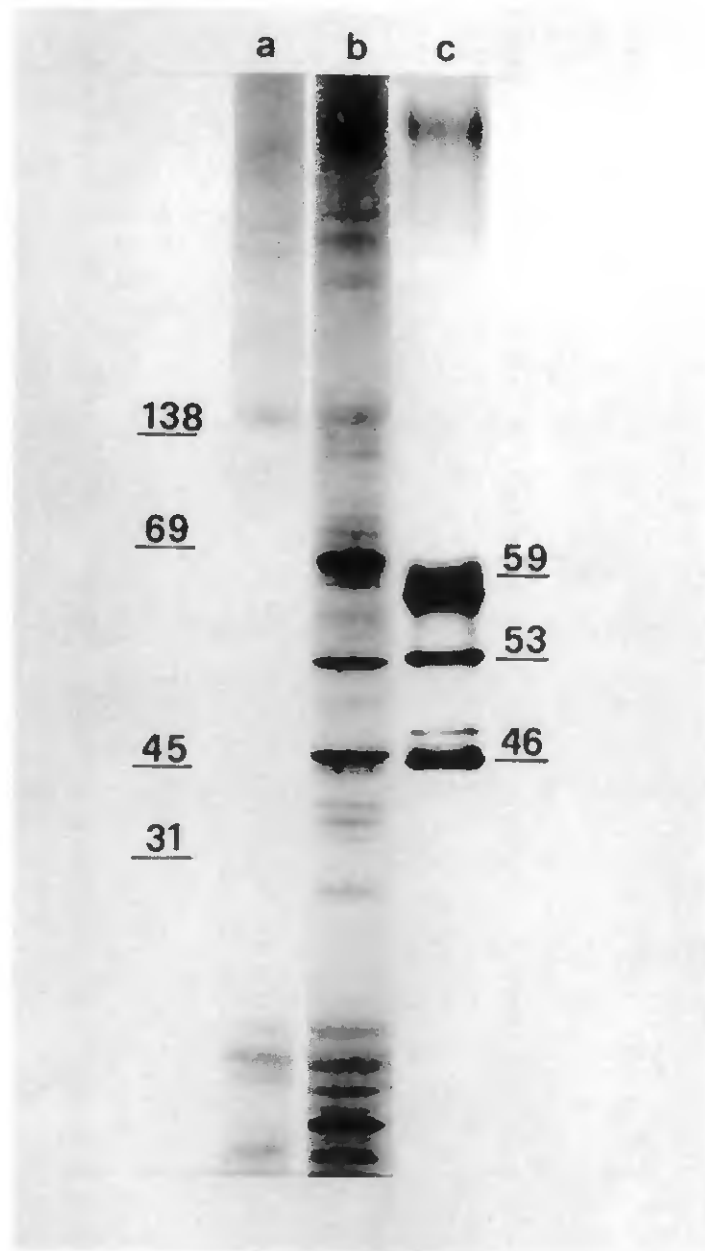
2.3 Comparaison des produits de biosynthèse in vitro ou in organello

L'isolement de chloroplastes intacts capables d'activité protéosynthétique en présence de lumière (Ortiz et al, 1980) nous a permis de comparer certaines protéines synthétisées in organello ou in vitro dans le système eucaryotique. Dans ce système, le ctARN total induit la synthèse de plusieurs polypeptides, trois d'entre eux particulièrement marqués de Mr apparente de 46, 53 et 61 Kd (figure 14).

Dans la fraction stromatique synthétisée in organello, nous observons également trois "bandes" fortement marquées. Deux d'entre elles présentent la même mobilité électrophorétique

- figure 14 -

Comparaison des produits de biosynthèse in vitro et in organello



Analyse sur SDS-PAGE 10-15 % des polypeptides synthétisés dans le lysat de réticulocyte sans ctARN (a) ou en présence de ctARN (b) et des polypeptides stromatiques synthétisés in organello (c)

Protéines standards: BSA (69 Kd) ovalbumine (45 Kd)
DNaseI (31 Kd)

Fluorographie 10 jours

que les polypeptides de Mr apparente de 53 et 46 Kd synthétisés in vitro. La 3e bande beaucoup plus importante, entre 55 et 59 Kd, semble être composée d'une "région floue" dans laquelle nous voyons un polypeptide de Mr apparente de 56 Kd.

Dans le profil in organello, le haut de la bande floue comigre avec un polypeptide présent juste au-dessous de la protéine de 61 Kd traduite dans le système in vitro.

La protéine de 61 Kd par contre ne comigre pas avec un polypeptide de la fraction stromatique. Nous pouvons faire les deux hypothèses suivantes:

- que cette protéine synthétisée in vitro est en fait une protéine thylacoïdale rapidement incorporée dans la membrane lors du processus de biosynthèse in organello;

Ortiz et Stutz (1980) ont montré que plusieurs protéines membranaires appartenant à des complexes protéine-chlorophylle sont synthétisées et assemblées in organello;

- que cette protéine représente un précurseur d'une protéine stromatique;

la synthèse in vitro d'un tel précurseur a déjà été mentionnée au paragraphe 2.2. Le précurseur d'une protéine thylacoïdale codée par le génome chloroplastique et synthétisée in vitro a également été découvert (Edelman et Reisfeld, 1978).

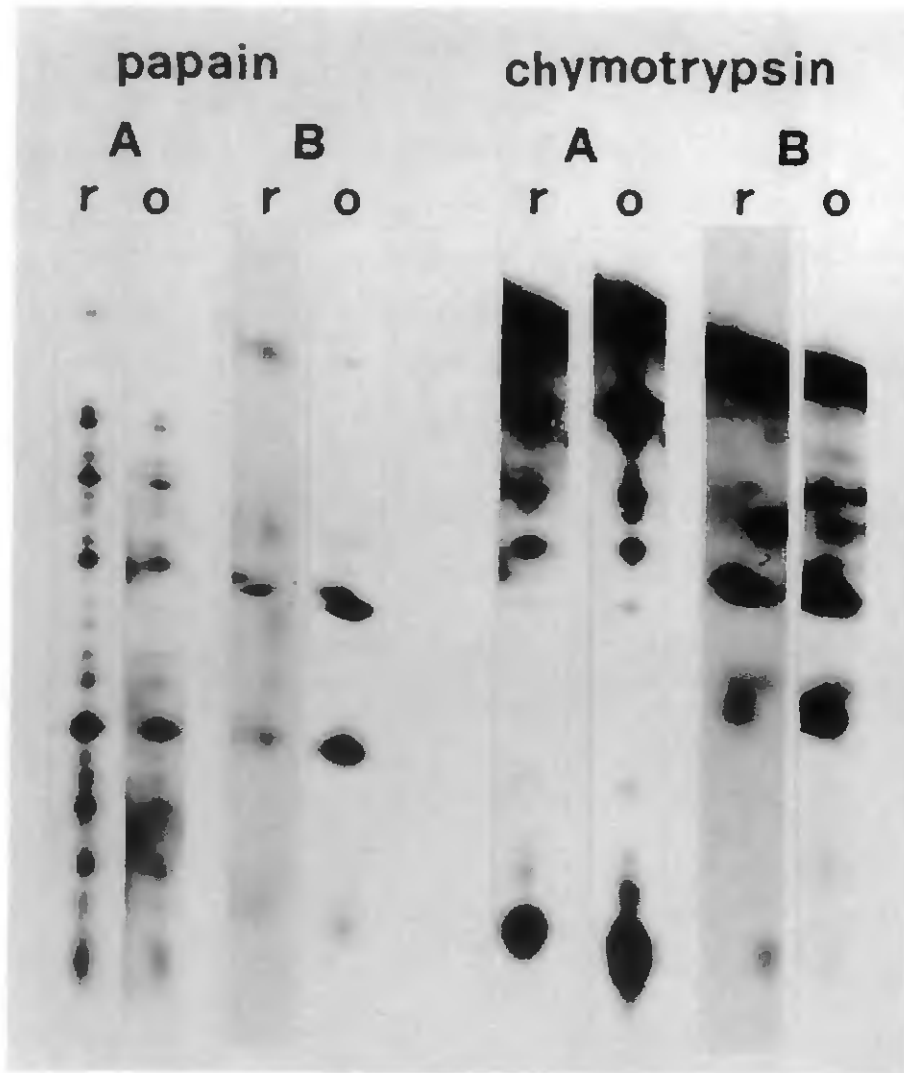
Pour vérifier que les polypeptides 53 Kd et 48 Kd présents dans le profil de traduction in vitro ou in organello sont semblables, nous avons utilisé la technique de Cleveland et al (1977), décrite au paragraphe 10 de Matériel et méthodes.

A la figure 15, nous comparons les profils obtenus après digestion par la papaïne ou la chymotrypsine des deux protéines de Mr apparente 53 et 46 Kd synthétisées dans le réticulocyte (in vitro) ou dans le chloroplaste (in organello). Nous observons que les produits de protéolyse partielle générés par les deux enzymes comigrent également. Le profil obtenu après digestion protéolytique de la protéine 53 Kd est par contre différent de celui obtenu après digestion de la protéine 46 Kd.

Ces résultats confirment que le lysat de réticulocyte synthétise avec fidélité certaines protéines chloroplastiques.

- figure 15 -

Digestion protéolytique partielle des protéines 53 et 46 Kd synthétisées in vitro ou in organello



Séparation sur SDS-PAGE 15 % des fragments obtenus après protéolyse des polypeptides de 53 Kd (A) et 46 Kd (B) synthétisés dans le réticulocyte (r) ou in organello (o)

Fluorographie 4 à 6 semaines

2.4 Traduction de mARN sélectionnés par hybridation

Dans ce type d'expérience, nous employons certains fragments d'ADN clonés et fixés sur un filtre de nitrocellulose pour capter, par hybridation, leurs mARN complémentaires.

Ce système a le grand avantage de ne pas nécessiter un gène de structure complet avec signaux d'initiations et d'arrêts, conditions impératives dans le cas de l'emploi du système de transcription-traduction couplé.

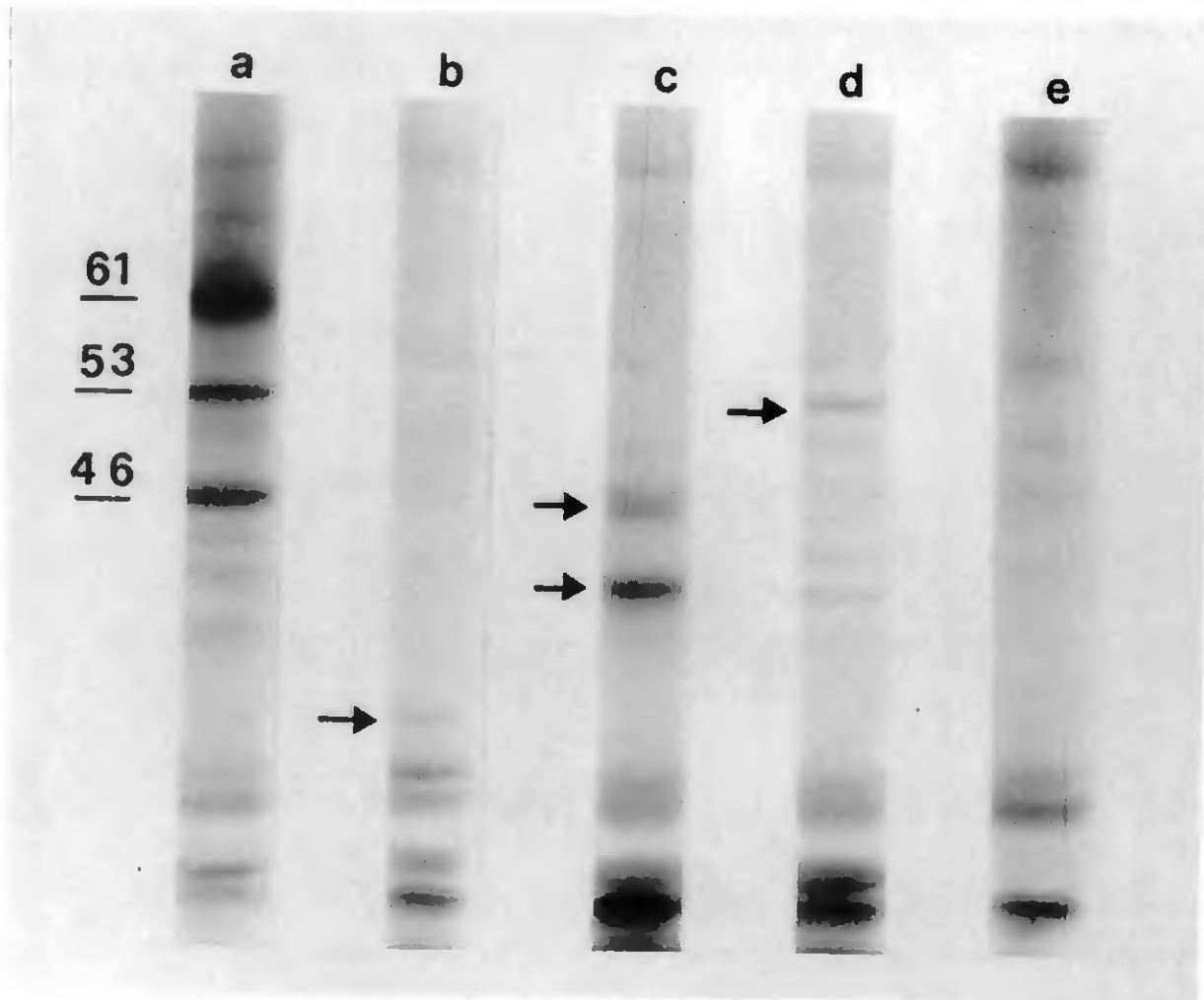
Dans la figure 16, nous comparons le profil de traduction des ARN chloroplastiques totaux dans le réticulocyte de lapin et celui d'ARN messagers sélectionnés.

Le profil obtenu après traduction des ctARN présente 3 bandes de 61, 53 et 46 Kd.

La traduction des mARN retenus sur les fragments EcoRI.H, EcoRI.I et EcoRI.N présente respectivement: pour EcoRI.H, un polypeptide de Mr apparente de 25 Kd, pour EcoRI.I, deux polypeptides de Mr apparente de 33 et 46 Kd et pour EcoRI.N, un polypeptide de Mr apparente de 53 Kd.

Les fragments EcoRI.I et EcoRI.N nous semblent particulièrement intéressants à étudier plus en détail vu qu'ils portent l'information génétique des protéines 46 Kd et 53 Kd respectivement, toutes deux fortement synthétisées tant in vitro que in organello.

- figure 16 -

Traduction d'ARN messagers sélectionnés par hybridation

Profil des protéines synthétisées après hybridation des ARN totaux sur les fragments EcoRI.H (b), EcoRI.I (c) ou EcoRI.N (d)

(a) traduction du ctARN total
(e) contrôle sans ctARN

Fluorographie 5 jours

2.5 Capacité du fragment EcoRI.N à supprimer ou à sélectionner la biosynthèse in vitro de la protéine 53 Kd

Si le fragment EcoN fixé sur une matrice est capable de sélectionner des ARN messagers codant pour une protéine de 53 Kd, il peut, en milieu liquide et dans d'autres conditions d'hybridation, supprimer l'expression de la protéine. La méthode est décrite par Paterson et al (1977). Elle met en présence un excès de fragment d'ADN par rapport aux ARN messagers à étudier. En incubant le mélange de façon à préférentiellement former des hybrides ARN-ADN, tous les messagers codés par le fragment sont captés. Ainsi, le système de traduction ne lit que les ARN restants. Le profil des polypeptides formés révèle alors la disparition d'une ou plusieurs protéines spécifiques.

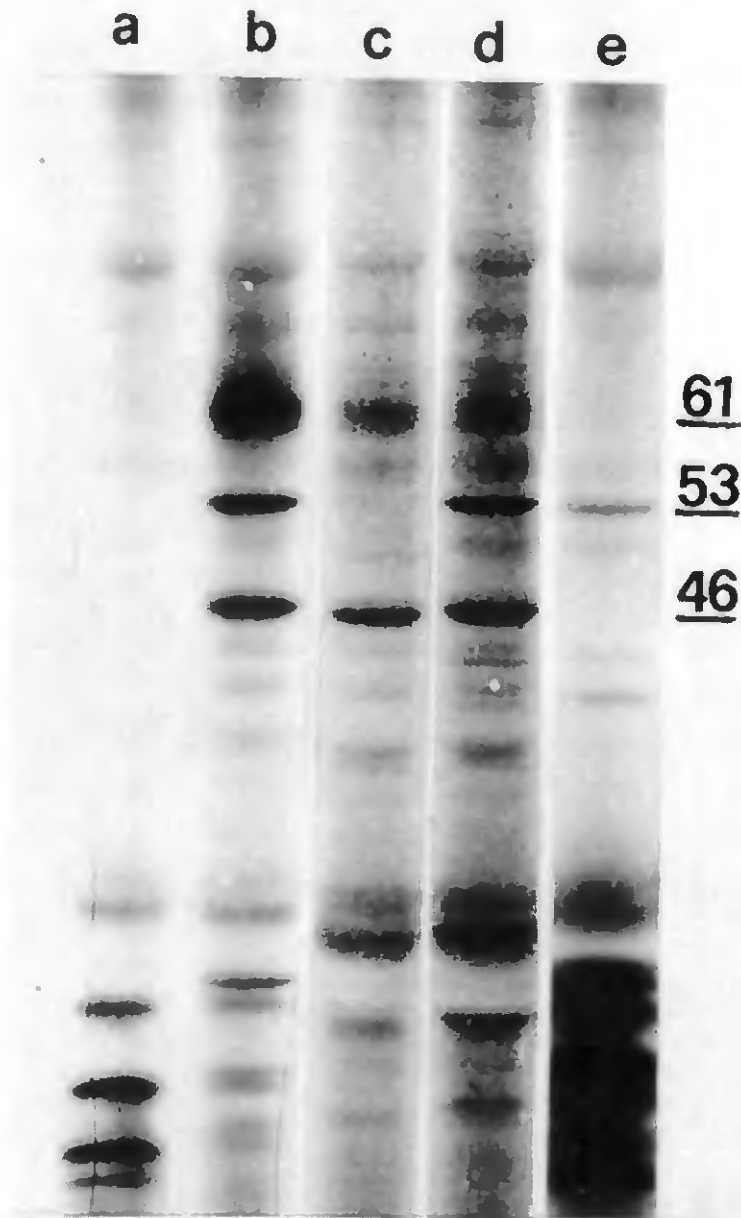
La figure 17 montre en effet que l'hybridation des ARN chloroplastiques totaux en présence du fragment EcoRI.N, suivi d'une traduction des mARN dans le système eucaryotique, permet de supprimer la synthèse de la protéine de 53 Kd.

En chauffant le mélange à 95°C pour libérer l'ARN messager du fragment d'ADN, nous voyons que le profil des polypeptides synthétisés est identique au profil témoin (traduction in vitro du ctADN total). La traduction des mARN sélectionnés par hybridation confirme que la protéine de 53 Kd synthétisée par le lysat de réticulocyte de lapin en présence d'ARN totaux ou en présence d'ARN sélectionnés par le fragment EcoRI.N est la même.

Deux polypeptides faiblement marqués disparaissent dans le profil c, réapparaissent dans le profil d et sont présents dans le profil e. Bien que le fragment EcoN, vu sa taille, puisse porter l'information génétique de plusieurs protéines, il nous paraît plus probable que ces polypeptides représentent des produits de terminaison précoce de la traduction.

- figure 17 -

Capacité du fragment EcoRI.N à supprimer ou à sélectionner
la biosynthèse in vitro de la protéine 53 Kd



Analyse sur SDS-PAGE 10-15 % des polypeptides synthétisés
 dans un lysat de réticulocyte

- a) sans ctARN
- b) en présence de ctARN total
- c) après hybridation des ctARN totaux avec un excès de
 fragment EcoRI.N
- d) après dénaturation des hybrides formés sous c
- e) après sélection des ctARN sur filtre

Fluorographie 5 jours

De telles observations ont également été faites par Driesel et al (1980). Les deux techniques d'hybridation utilisées ci-dessus permettent de dire que tout ou partie de l'information génétique d'une protéine de 53 Kd est portée par le fragment EcoRI.N.

Il nous semble intéressant, vu les résultats précédents, de répondre aux deux questions suivantes:

- quelle est la nature de la protéine de 53 Kd
- quelle est la localisation précise du gène codant pour cette protéine.

2.6 Profils des protéines thylacoïdales et stromatiques

L'emploi de la technique décrite par Ortiz et al (1980) nous a permis d'analyser les protéines stromatiques et thylacoïdales du chloroplaste (fig. 18).

En présence de $[^{35}\text{S}]$ -méthionine et à la lumière, les chloroplastes synthétisent des protéines radioactives.

Nous constatons qu'un grand nombre de protéines thylacoïdales sont synthétisées. Ortiz et Stutz (1980) ont montré que plusieurs protéines synthétisées in organello sont assemblées en des complexes chlorophylle-protéines spécifiques.

Par contre, le profil autoradiographique des protéines stromatiques synthétisées in organello est moins complexe. Nous observons cependant que la protéine de 53 Kd est présente aussi bien dans le profil coloré au bleu de Coomassie que dans le profil autoradiographique alors qu'aucun polypeptide de cette Mr apparente n'est visible dans les profils des protéines thylacoïdales. Ces deux observations suggèrent:

1. que cette protéine est synthétisée en grande quantité
2. qu'elle est stromatique ou membranaire mais non incorporée.

*

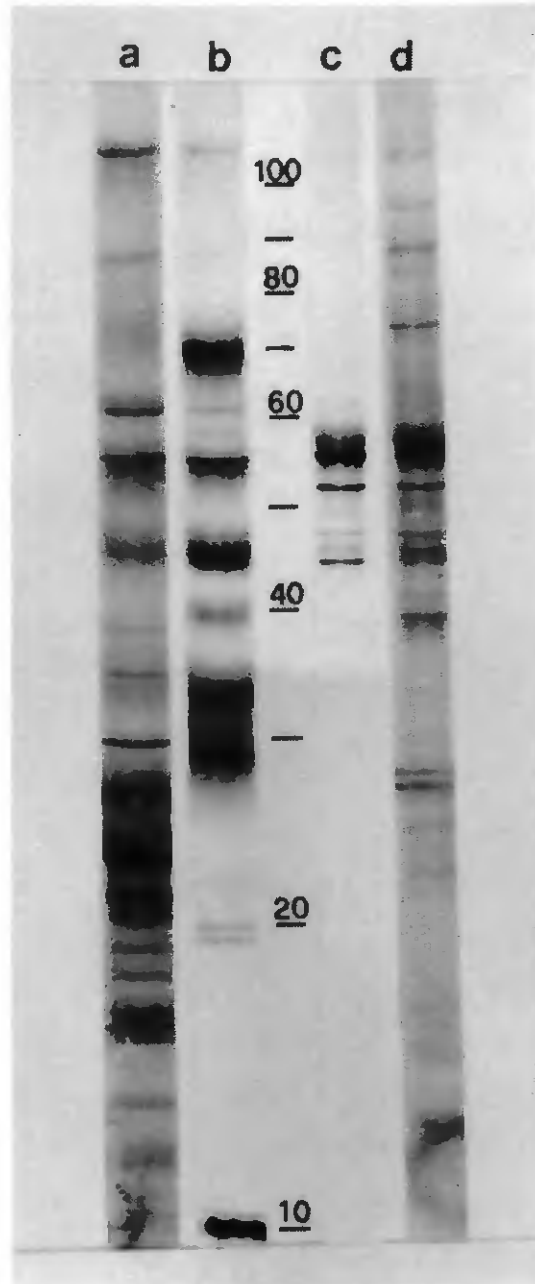
2.7 Discussion

L'ARN chloroplastique d'épinard est traduit avec fidélité dans le système procaryotique d'E. coli selon Hartley et al (1975).

D'après ces auteurs, il semble que la "machinerie" protéosynthétique chloroplastique soit plutôt de type procaryotique. Vu leurs résultats, l'emploi d'un S-30 de E. coli pour traduire du ctARN est tout indiqué.

- figure 18 -

Biosynthèse in organello, comparaison des fractions thylacoïdales et stromatiques



Analyse sur SDS-PAGE 12,5-15 % des fractions thylacoïdales (a, b) et stromatiques (c, d)

a et d: colorations au bleu de Coomassie
b et c: autoradiographie 7 jours

Bottomley et al (1976) ont testé les ARN chloroplastiques et cytoplasmiques d'épinard dans deux systèmes hétérologues différents: l'un d'origine procaryotique (S-30 de E. coli), l'autre d'origine eucaryotique (S-30 de germe de blé). Ils sont arrivés à la conclusion que le système ribosomique procaryotique "70S" traduit les ct mARN alors que le système ribosomique eucaryotique "80S" traduit les mARN cytoplasmiques.

Dans une autre étude comparative, Herrlich et Schweiger (1978) montrent qu'il existe également une discrimination lors de la traduction de mARN dans un système hétérologue mais que cette dernière se fait plutôt au niveau de l'efficacité de la traduction. Ainsi, un mARN de type procaryotique sera plus efficacement lu dans un S-30 de E. coli que dans un système eucaryotique et inversement.

Pour Euglena gracilis, la situation semble différente. Sagher et al (1976) avaient déjà montré que le S-30 de germe de blé traduit avec fidélité la fraction poly A⁻ des ARN extraits d'Euglena gracilis, alors que le S-30 de E. coli n'est pas capable de le faire.

Si l'étape critique est la traduction des mARN que le S-30 procaryotique n'est pas capable d'effectuer alors qu'un système eucaryotique est capable de la faire avec fidélité, la stratégie employée par Coen et al (1977) peut convenir à l'analyse de nos fragments EcoRI clonés. Ces auteurs emploient l'ARN polymérase purifiée de E. coli pour transcrire l'information en mARN puis traduisent les produits de transcription en protéines dans un système hétérologue eucaryotique. En employant cette technique, la traduction des mARN dans le système procaryotique est évitée.

Nous avons testé le système décrit par Coen et al (1977) au cours de notre travail (résultats non montrés).

Dans les deux systèmes couplé ou lié, la β -lactamase est synthétisée (bien qu'avec beaucoup moins d'efficacité dans le système lié). Les autres polypeptides synthétisés dans le S-30 sont absents dans le système lié. Par contre, des protéines de Mr apparentes plus élevées ont été observées. La caractérisation de tels produits n'a pas pu être faite.

Une autre stratégie employée lors de ce travail nous a permis de synthétiser préférentiellement deux des trois polypeptides fortement traduits dans le réticulocyte de lapin.

La méthode utilisée par Keller (communication personnelle), discutée au paragraphe 1.4, nous a permis de connaître les fragments EcoRI codants pour un ou plusieurs mARN. Les fragments montrant un signal positif ont été transférés après dénaturation sur filtre de nitrocellulose par la méthode de Southern et testés pour leur capacité de capturer des mARN par hybridation. Peu de mARN capturés ont été traduits dans le système eucaryotique, soit que certains mARN ne sont pas reconnus par ce système, soit que la quantité d'ARN est sous-optimale.

Parmi les fragments testés pour leur capacité de capturer des mARN, deux d'entre eux méritent un commentaire.

- Le fragment EcoRI.I hybride selon Keller contre 3 types de mARN: un de constante de sédimentation de 15S environ et deux entre les rARN 23S et 16S. Ce fragment utilisé lors de l'expérience 2.4 capte des mARN traduits dans le réticulocyte de lapin en une protéine de Mr apparente de 46 Kd et une autre de 33 Kd (figure 16).

Des expériences d'hybridation croisées avec une partie du photogène de l'épinard et un schéma de ctADN d'E. gracilis digéré par EcoRI montre un très léger signal sur le fragment EcoRI.I tendant à dire que le photogène est aussi pré-

sent chez l'euglène et qu'il est localisé sur le fragment EcoRI.I (4,7 Kb). La sélection par ce fragment des mARN codant pour une protéine de 33 Kd en est sûrement une preuve.

- Le fragment EcoRI 15 codant pour la LSU de la RuBP carboxylase chez Chlamydomonas reinhardtii a également été employé pour tenter de sélectionner les mARN de la LSU d'E. gracilis. Aucune réponse n'a été obtenue après déshybridation et traduction des "mARN captés". Cet échec pourrait être expliqué par un manque d'homologie entre les deux gènes chloroplastiques codant pour la LSU de Chlamydomonas et Euglena.

Nous savons que Hallick et al (1979), dans une expérience complémentaire, ont pu, après hybridation du fragment EcoRI 15 de Chlamydomonas reinhardtii avec la fraction poly A⁻ des ARN totaux d'Euglena gracilis, supprimer la traduction de la LSU de la RuBPcarboxylase. Nous n'avons pas essayé une telle expérience pour voir si la bande de 61 Kd correspond à un précurseur de la LSU. Nous pouvons mentionner que si, chez Spinacia oleracea un tel précurseur semble exister, la séquence du gène de la LSU chez Chlamydomonas prouve qu'il n'y en a pas dans cette algue (Dron et al, 1982).

*

2.8 Résumé

Dans ce chapitre, nous montrons (fig. 14) que deux protéines stromatiques sont synthétisées avec fidélité dans le lysat de réticulocyte en présence de ctARN. Vraisemblablement, un précurseur de la LSU de la RuBP carboxylase y est aussi formé.

La technique d'hybridation puis de traduction des mARN sélectionnés permet de localiser des gènes sur le ctADN d'E. gracilis.

Dans ce travail, nous avons localisé le gène codant pour une protéine de Mr apparente de 53 Kd et de fonction encore inconnue (Rutti et al, 1981). Par cette méthode, d'autres gènes de protéines chloroplastiques peuvent être localisés.

La limite de cette technique dépend certainement des concentrations relatives en mARN. La fixation de manière covalente de fragments d'ADN sur une résine Séphadex G-25 activée au bromure de cyanogène (Bünemann, cited in Westhoff et al, 1981) permettra peut-être de concentrer des mARN présents en trop faible quantité pour être captés d'après la technique que nous avons choisie.

Westhoff et al (1981) ont pu localiser les sous-unités α , β , et ϵ du facteur de couplage sur le ctADN d'épinard en employant ce type de colonne. Les produits synthétisés in vitro par ces auteurs ont été identifiés par les techniques d'immunoprécipitation.

3. Analyse du fragment EcoRI.N

3.1 Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons observé que le fragment EcoRI.N

- est transcrit-traduit dans un système procaryotique
- s'hybride avec des ct mARN qui, traduits dans un système eucaryotique, génèrent un polypeptide de Mr apparente de 53 Kd. Ce polypeptide, synthétisé également in organello, prouve que le réticulocyte de lapin traduit correctement certains mARN chloroplastiques. L'information génétique d'un des produits synthétisés in vitro est localisée sur le fragment EcoRI.N.

Dans ce chapitre, nous allons étudier plus particulièrement la région comprenant le fragment EcoRI.N. La carte de restriction présentée par Hallick (in press) montre que ce fragment est situé entre EcoRI.J' et une région d'environ 4,8 Kb ne possédant pas de sites de restriction EcoRI localisés (fig. 19).

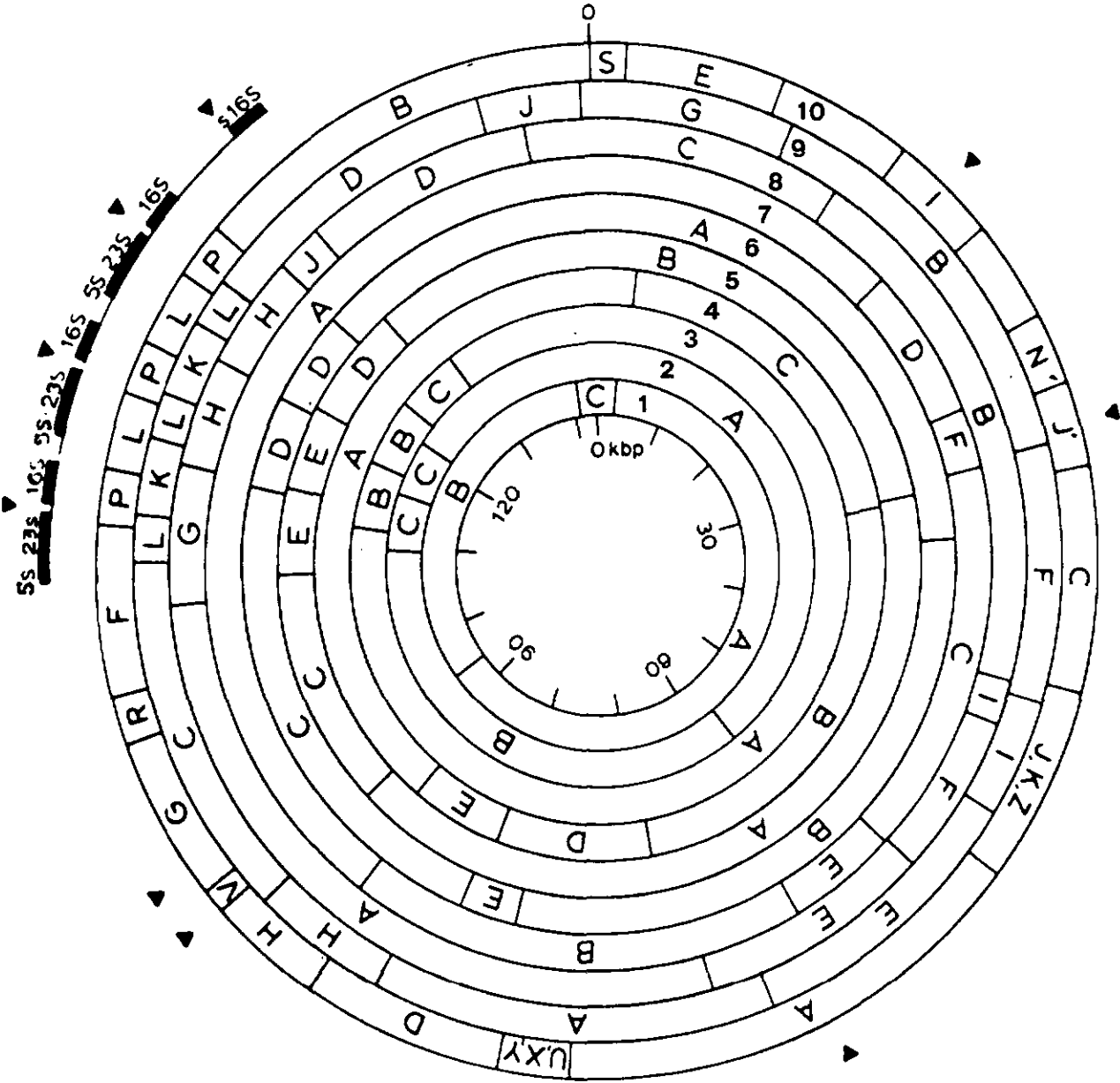
Nous voyons également que parmi les endonucléases testées, seule PvuII reconnaît une séquence de restriction dans le fragment EcoRI.N.

Dans un premier temps, nous avons cartographié ce fragment en utilisant d'autres endonucléases de restriction. Puis, nous avons cloné les fragments Hind III et Bgl II qui recouvrent EcoRI.N dans le but:

- de déterminer l'autre fragment adjacent à EcoRI.N
- de voir si le système de transcription-traduction couplé, en présence des régions de recouvrement de EcoRI.N, synthé-

- figure 19 -

Carte de restriction du ctADN d'Euglena gracilis Z
(selon Hallick, in press)



- 1 Sal I
- 2 Kpn I
- 3 Sst II
- 4 Pst I
- 5 BamH I

- 6 Xho I
- 7 Pvu II
- 8 Bal I
- 9 Hae II
- 10 EcoRI

tise la protéine de 53 Kd

- de voir si les nouveaux fragments d'ADN clonés, contenant partiellement l'information de EcoRI.N, sélectionnent les mARN codant pour la protéine de 53 Kd
- de voir, par la technique de "Northern", si ces nouveaux fragments, marqués par "Nick-translation", hybrident avec la même population de mARN séparée sur gel agarose-urée.

3.2 Localisation des sites de restriction

Le fragment EcoRI.N, localisé sur la carte de restriction publiée par Hallick (in press), peut être orienté par la présence d'un site Pvu II asymétrique (fig. 19). Pour cartographier plus finement cette région, nous avons cherché les endonucléases de restriction susceptibles de couper le fragment EcoRI.N. Les dix enzymes de restriction présentes dans le tableau V nous semblent intéressantes. En plus de Pvu II, deux endonucléases de restriction (Hind III et Bgl II) reconnaissent une séquence palindromique de 6 bases dans notre fragment. Les endonucléases reconnaissant 4 bases "GC" coupent peu EcoRI.N: Hae III n'a pas de site, Hpa II en a un et Hha I deux alors qu'elles hydrolysent toutes le pBR₃₂₂ (4,36 Kbp) en plus de 20 fragments (Sutcliffe, 1978b).

Nous pouvons mieux fragmenter notre région par les endonucléases Hinf I, Taq I, Alu I et Sau 3A.

La taille des différents fragments a été déterminée sur gel agarose, sur gel composite ou sur gel d'acrylamide (fig. 20, a, b, c).

Pour les sous-fragments Alu I, Taq I et Sau 3A, celles-ci sont difficiles à estimer (les valeurs présentées au tableau V pour ces trois enzymes ne sont qu'indicatives).

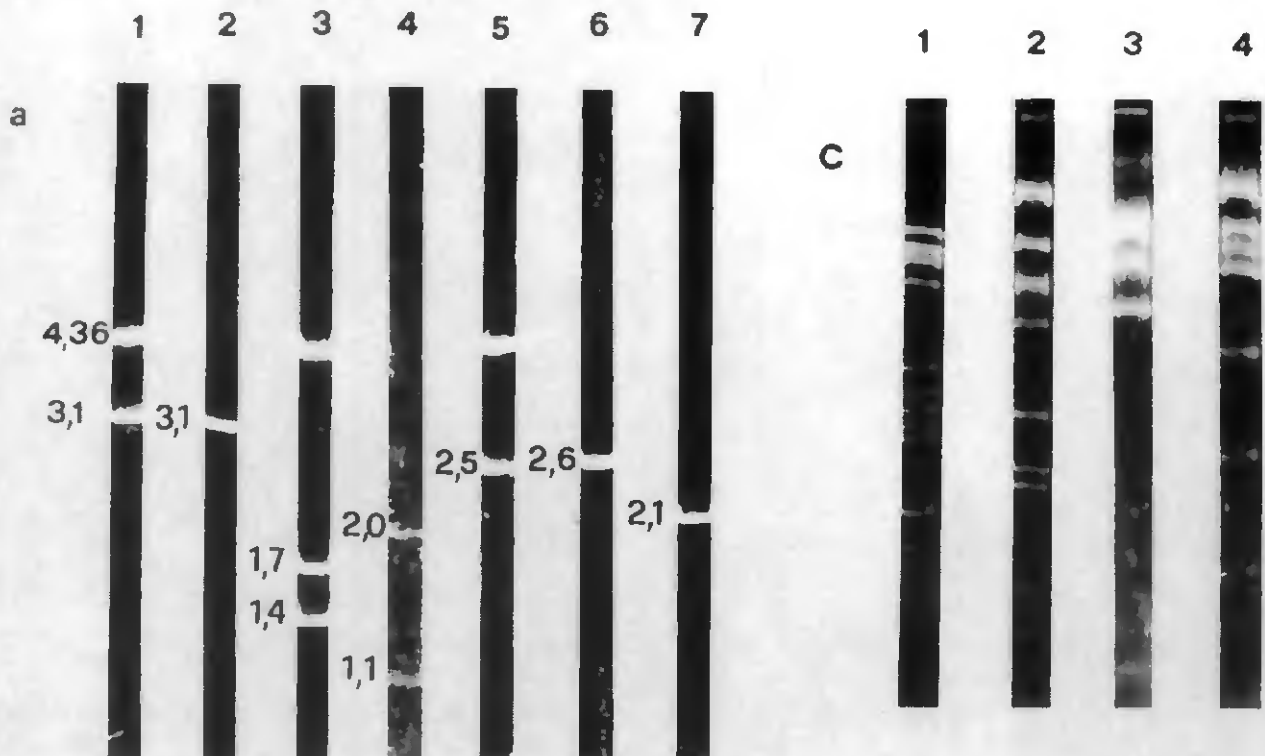
- tableau V -

Endonucléases de restriction utilisées pour l'analyse du fragment EcoRI.N

enzyme de restriction	séquence reconnue	Nb de site	taille des fragments Kbp
Hind III	A↓AGCTT	1	1,7 - 1,4
Pvu II	CAG↓CTG	1	2,0 - 1,1
Bgl II	A↓GATCT	1	2,5 - 0,6
Hae III	GG↓CC	0	-
Hpa II	C↓CGG	1	2,6 - 0,45
Hha I	GCG↓C	2	2,1 - 0,65 - 0,35
Hinf I	G↓ANTC	6	1,35 - 0,58 - 0,35 0,31 - 0,2 - 0,16 - 0,1
Alu I	AG↓CT	> 7	0,85 - 0,57 - 0,49 - 0,35 0,22 - 0,16 - 0,14 ...
Taq I	T↓CGA	5	0,65 - 0,6 - 0,45 - 0,44 0,35 ...
Sau3A	↓GATC	> 7	0,85 - 0,65 - 0,55 - 0,45 0,3 - 0,16 - 0,14

- figure 20 -

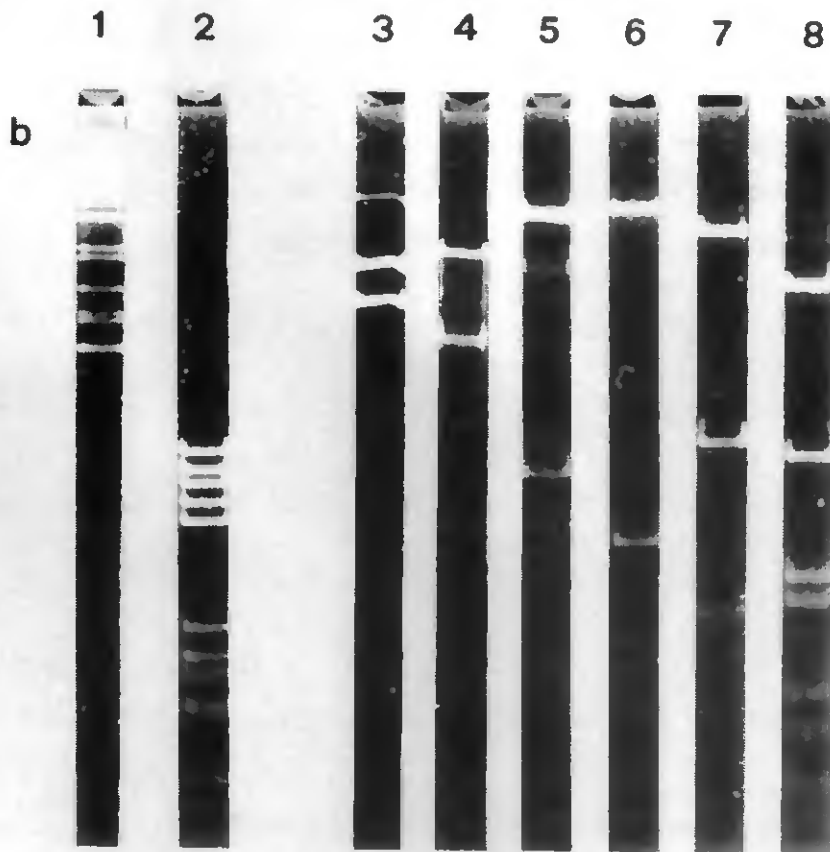
Analyse des fragments obtenus après digestion de EcoRI.N
par différentes endonucléases de restriction



- a - gel agarose 1,2 %, 2 mm, 18 mA, 18 heures
 - pEgcE_N est digéré successivement par
 (1) EcoRI; (2) EcoRI + Hae III; (3) EcoRI + Hind III;
 (5) EcoRI + Bgl II; (6) EcoRI + Hpa II; (7) EcoRI + Hha I
 - (4) EcoRI.N digéré par Pvu II
- c - gel acrylamide 6 %, 2 mm, 15 mA, 20 heures
 EcoRI.N digéré successivement par (2) Alu I; (3) Taq I;
 (4) Sau 3A
- marqueur: pBR₃₂₂ digéré par Hae III (1)

- figure 20 -

Analyse des fragments obtenus après digestion de EcoRI.N
par différentes endonucléases de restriction



b - gel composite agarose 1 % - acrylamide 2,5 %, 2 mm, 40 mA, 20 heures

(1) ctADN + EcoRI; (2) pBR₃₂₂ + Hae III;

(3-8) EcoRI.N digéré successivement par (3) Hind III;

(4) Pvu II; (5) Bgl II; (6) Hpa II; (7) Hha I; (8) Hinf I

La longueur du fragment EcoRI.N mentionnée dans la littérature est de 2,9 Kbp (Jenni et Stutz, 1979) et 3,2 Kbp (Hallick, in press). L'addition des tailles estimées pour les fragments générés par chaque endonucléase de restriction donne une valeur de 3,1 Kbp pour nos expériences (voir tableau V et fig. 22).

Pour ordonner les sous-fragments, nous avons fait des doubles digestions. Le site Pvu II étant localisé, il est aisé de placer les sites de restriction peu fréquents.

La figure 21 a nous montre quels sous-fragments EcoPvu sont coupés par les enzymes Hind III, Bgl II, Hpa II ou Hha I. Nous constatons que le fragment EcoPvu de 2,0 Kbp est coupé par Hind III, Hpa II et Hha I alors que celui de 1,1 Kbp l'est par Bgl II et Hha I.

La position des deux sites Hha I est déterminée par la double digestion Hind III Hha I. En comparant les profils 6 et 7 de la figure 21, nous constatons que les deux bandes supérieures comigrent ($\sim 1,5$ Kbp).

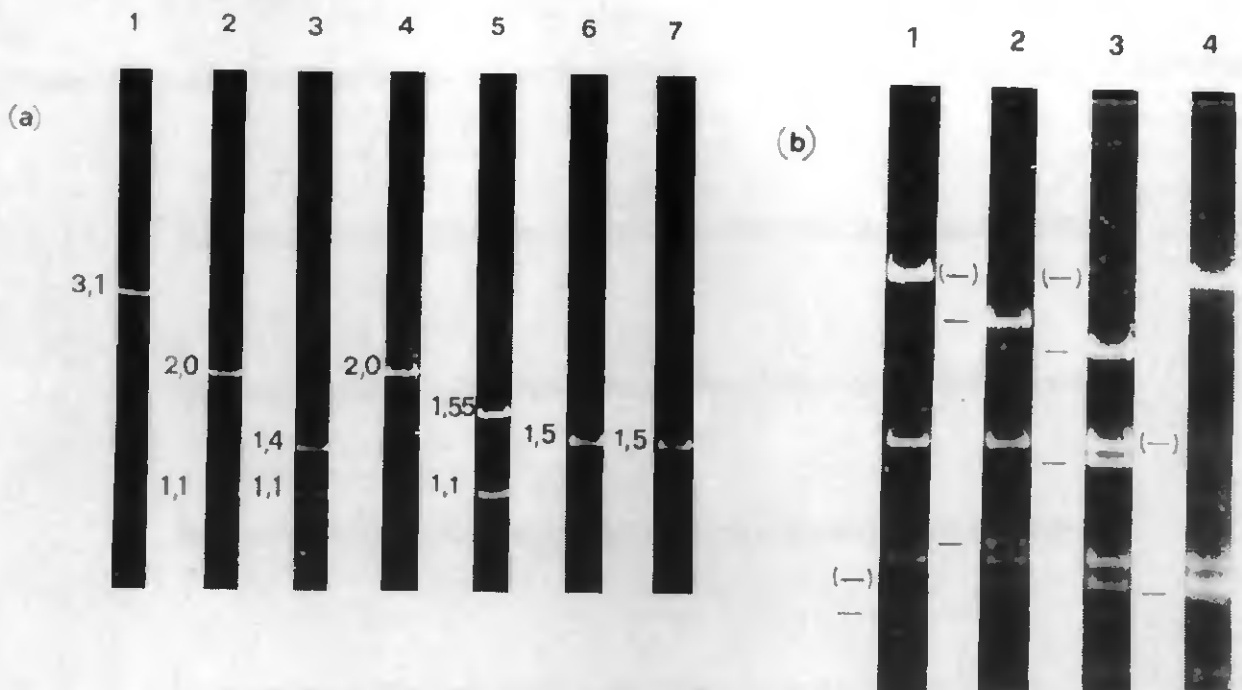
En inversant la position des sites Hha I, le plus grand fragment de la digestion Pvu II Hha I serait de $\sim 1,7$ Kbp et celui de la digestion Hind III Hha I de $\sim 1,0$ Kbp. Nous arrivons ainsi à établir une carte de restriction plus détaillée (fig. 22).

Les deux plus grands fragments Hinf I (cf tableau V) ont également été cartographiés par doubles digestions selon la figure 21 b.

- L'endonucléase Bgl II coupe le fragment de 1,35 Kbp en deux fragments de 0,95 et 0,4 Kbp environ. C'est également le fragment de 1,35 Kbp qui est coupé par Pvu II en deux fragments de 0,9 et 0,45 Kbp.

- figure 21 -

Localisation des sites de restriction sur le fragment EcoRI.N



a - gel agarose 1,5 %, 2 mm, 18 mA, 15 heures

(1) EcoRI.N

(2) EcoRI.N digéré par Pvu II

(3-6) EcoRI.N digéré par Pvu II + Hind III (3);

Pvu II + Bgl II (4); Pvu II + Hpa II (5);

Pvu II + Hha I (6)

(7) EcoRI.N digéré par Hind III + Hha I

b - gel composite agarose 1 %, acrylamide 2,5 %, 2 mm, 40 mA, 20 heures

(1) EcoRI.N + Hinf I Hind III

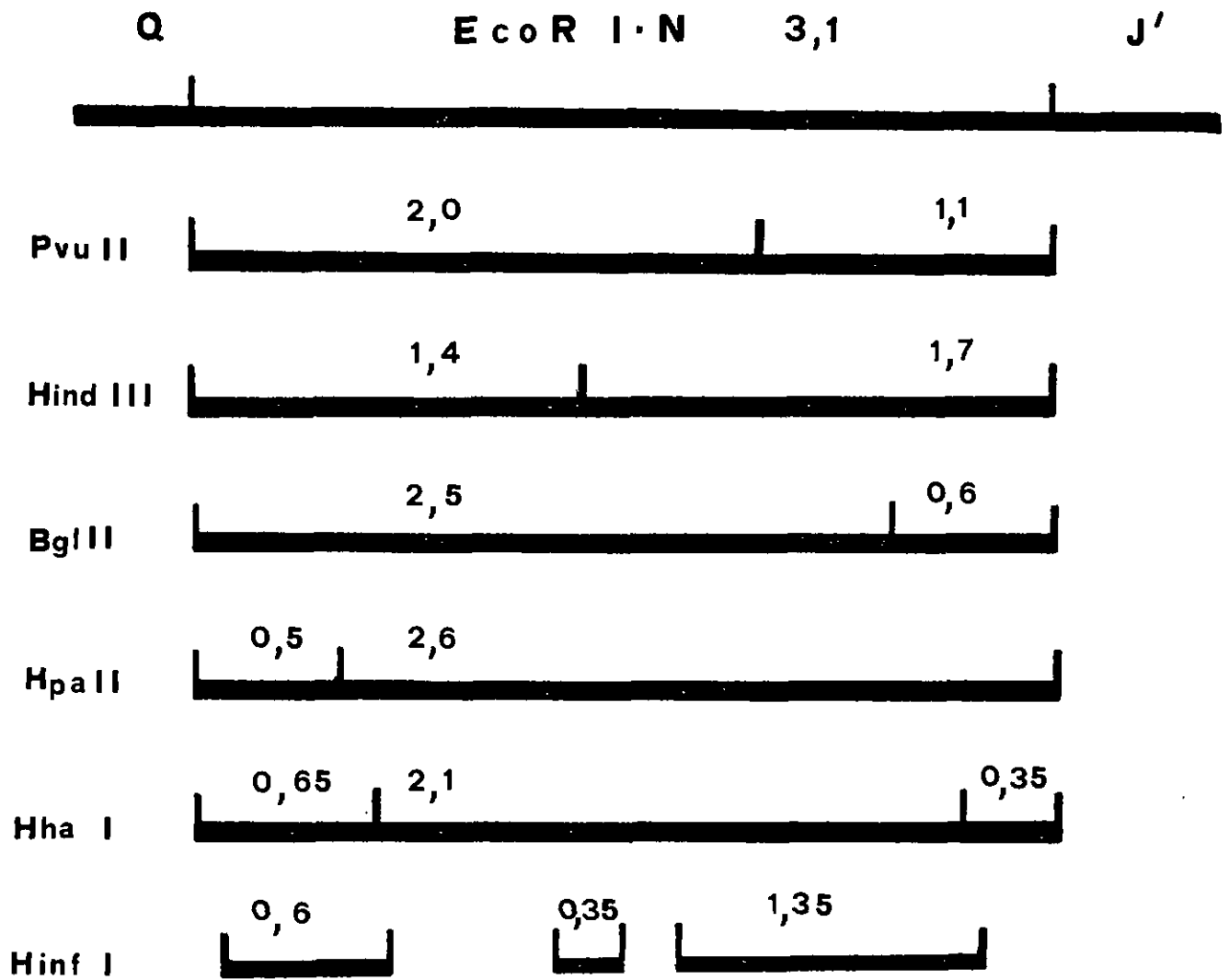
(2) EcoRI.N + Hinf I Bgl II

(3) EcoRI.N + Hinf I Pvu II

(4) EcoRI.N + Hinf I Hpa II

- figure 22 -

Carte de restriction du fragment EcoRI.N



- Le site Hpa II se trouve au milieu du fragment de 0,58 Kbp car il génère deux fragments de taille identique.

Ces observations nous ont permis de localiser approximativement les deux fragments Hinf I de 1,35Kbp et de 0,58 Kbp.

- Le fragment Hinf I de 0,31Kbp est localisé par la présence d'un site Hind III. Ce dernier étant asymétrique, deux possibilités de le placer existent.

3.3 Transcription-traduction de pEgce_N digéré par diverses endonucléases de restriction

A la figure 11, nous avons observé que le recombinant pEgce_N digéré par Hae III est toujours transcrit-traduit et génère les polypeptides de 21 et 11 Kd principalement.

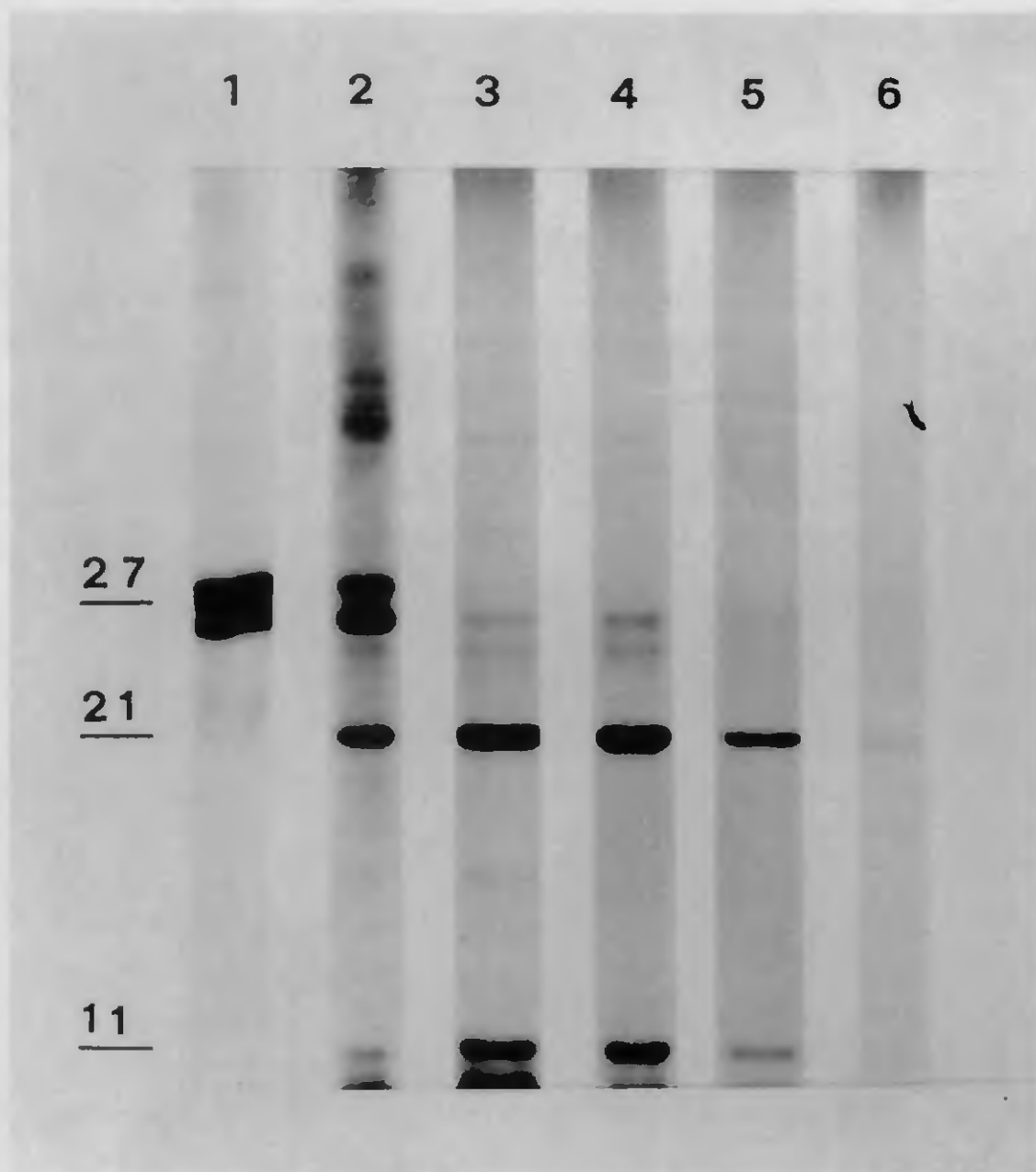
Nous essayons maintenant de voir si l'une ou l'autre des endonucléases coupant peu le fragment EcoRI.N est de plus capable de supprimer la synthèse d'un de ces polypeptides.

L'autoradiographie des polypeptides synthétisés (fig. 23) montre que ni Hae III, ni Bgl II, ni Hind III ne suppriment l'expression de la protéine "principale" de 21 Kd mais que Hpa II la supprime.

Nous pouvons supposer que le site Hpa II se trouve dans une partie du fragment transcrite-traduite. Si tel est le cas et que la protéine de 21 Kd représente une fraction de la protéine de 53 Kd, le gène codant pour cette dernière se trouve plutôt du côté EcoHind 1,4. Le fait que Hind III ne supprime pas la transcription-traduction de la protéine de 21 Kd nous a amenés à essayer de cloner les fragments Hind III recouvrant EcoRI.N. L'hypothèse étant que le gène n'est pas totalement localisé sur le fragment EcoHind 1,4 mais dépasse sur sa gauche.

- figure 23 -

Transcription-traduction de pEgcE_N digéré par diverses endonucléases de restriction



Analyse sur SDS-PAGE 15 % des produits de transcription-traduction:

(1) pBR₃₂₂; (2) pEgcE_N; (3-6) pEgcE_N digéré par (3) Bgl II; (4) Hae III; (5) Hind III; (6) Hpa II

Fluorographie 3 jours

Cette hypothèse se révéla fausse par la suite (voir paragraphes 3.6 et 3.7).

3.4 Clonage des fragments Hind III et Bgl II recouvrant le fragment EcoRI.N

Afin d'essayer de posséder, sur un fragment d'ADN, la séquence complète codant pour la protéine de 53 Kd, nous avons cloné les fragments Hind III et Bgl II recouvrant EcoRI.N.

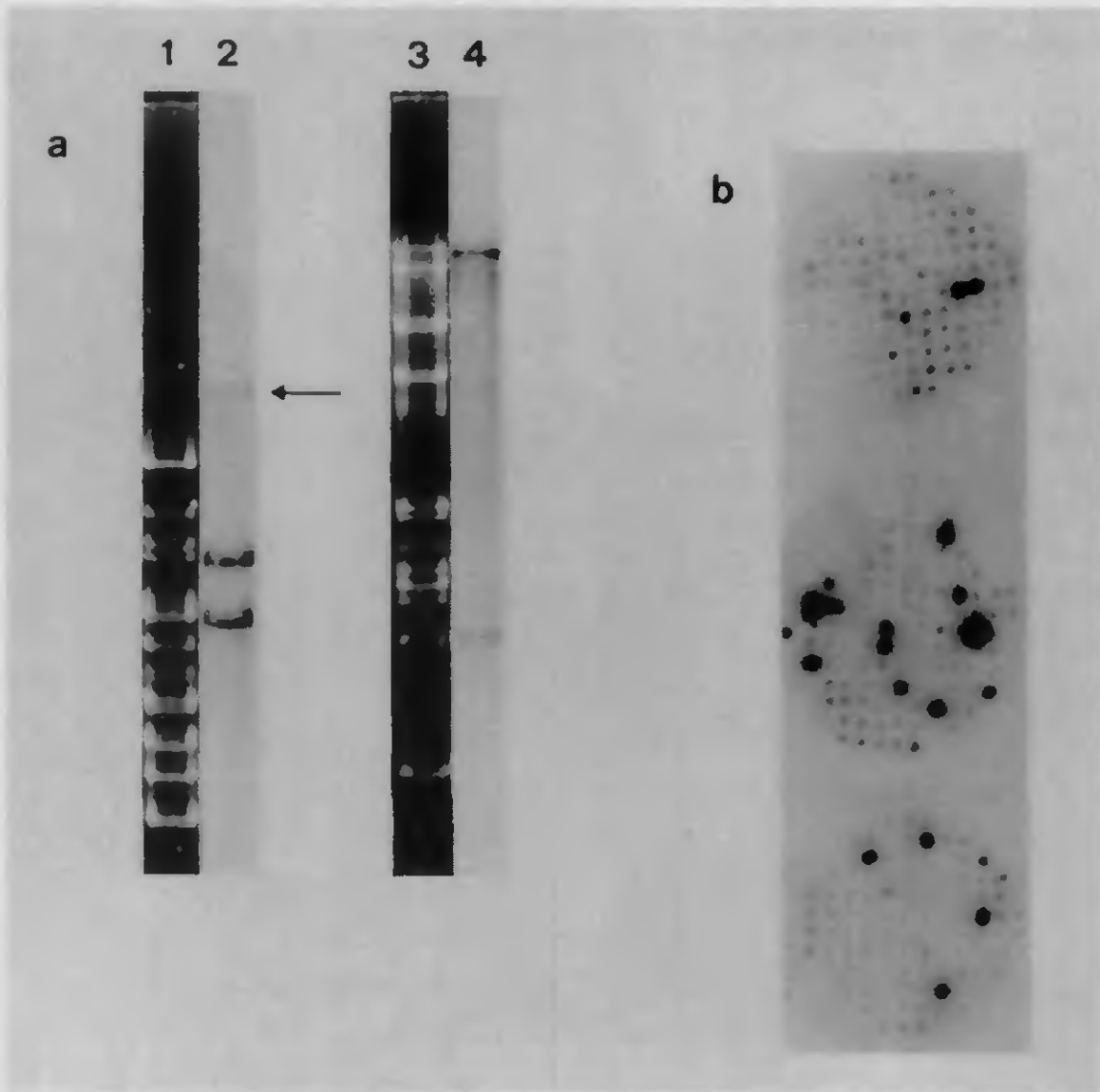
La figure 24 (a) montre l'hybridation du fragment EcoRI.N marqué radioactivement par "Nick-translation" contre les profils de ctADN coupé par l'endonucléase Hind III ou Bgl II. Dans le cas de Hind III, 2 bandes de 3,4 et 4,4 Kbp environ apparaissent. (Un léger signal apparaît à environ 7,9 Kbp ne correspondant pas à une bande colorable au bromure d'éthidium mais pouvant être interprété comme une digestion partielle).

Dans le cas de Bgl II, l'hybridation du fragment EcoRI.N montre un signal sur le fragment BglA (22 Kbp) et sur le fragment BglN (3,0 Kbp) ou BglO (2,9 Kbp).

Si le clonage des deux fragments Hind III dans le pBR₃₂₂ ne pose pas de problème particulier, le clonage des deux fragments dans ce vecteur n'est pas possible (pas de site Bgl II). Nous avons utilisé le recombinant pEgcE_p, possédant un site Bgl II connu (Jenni, 1980), pour cloner les fragments BglN et BglO. D'après l'hypothèse du paragraphe 3.3, le fragment BglA porterait le gène entier de la protéine 53 Kd, mais son clonage ne serait possible qu'en ayant recours au cosmide (Hohn, 1979).

- figure 24 -

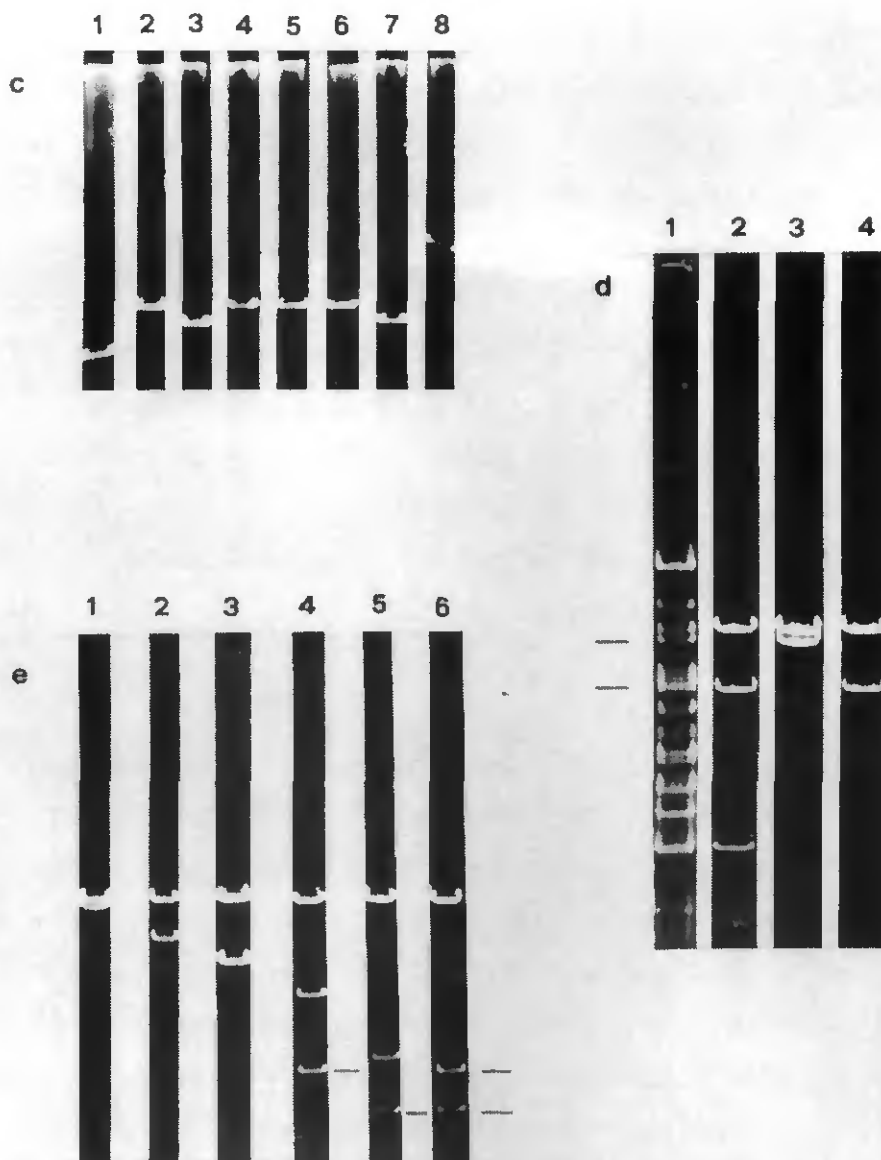
Analyse des clones pEgch et pEgcB



a) 1 et 3: profils de digestion du ctADN par Hind III ou Bgl II
 2 et 4: autoradiographie du transfert selon Southern de 1 et 3 après hybridation en présence du fragment EcoRI.N "Nick translaté"

b) Hybridation du fragment EcoRI.N "Nick-translaté" en présence de filtre nitrocellulose préparé selon Grunstein et Hogness (1975)

- figure 24 -

Analyse des clones pEgCH

c) Méthode de Birnboïm et Doly (1979)

1) pBR₃₂₂ forme I 2-8) pEgCH positifs selon Grunstein et Hogness (1975)

d) Gel agarose 1 %, 3 mm, 18 mA, 20 h

1) profil de digestion du ctADN par Hind III

2, 3, 4) analyse des clones: la bande supérieure représente la forme linéaire du pBR₃₂₂; la ou les bandes inférieures représentent les insertions Hind III

e) Localisation des fragments Hind III clonés par rapport à EcoRI.N

1 et 4) pEgCH₁₆; 2 et 5) pEgCH₁₅; 3 et 6) pEgCH_N

1 et 2) digérés par Hind III; 3) digéré par EcoRI;

4, 5 et 6) digérés par EcoRI + Hind III

L'ADN plasmidial des bactéries lysées sur les filtres de nitrocellulose est hybridé avec une sonde radioactive constituée du fragment EcoRI.N marqué par "Nick-translation".

Toutes les bactéries ayant incorporé un plasmide contenant un fragment Hind III recouvrant une partie de EcoRI.N sont positives dans ce test. Sur 300 plasmides recombinants analysés, 25 sont positifs, soit un peu plus de 12 %, (fig. 24 b).

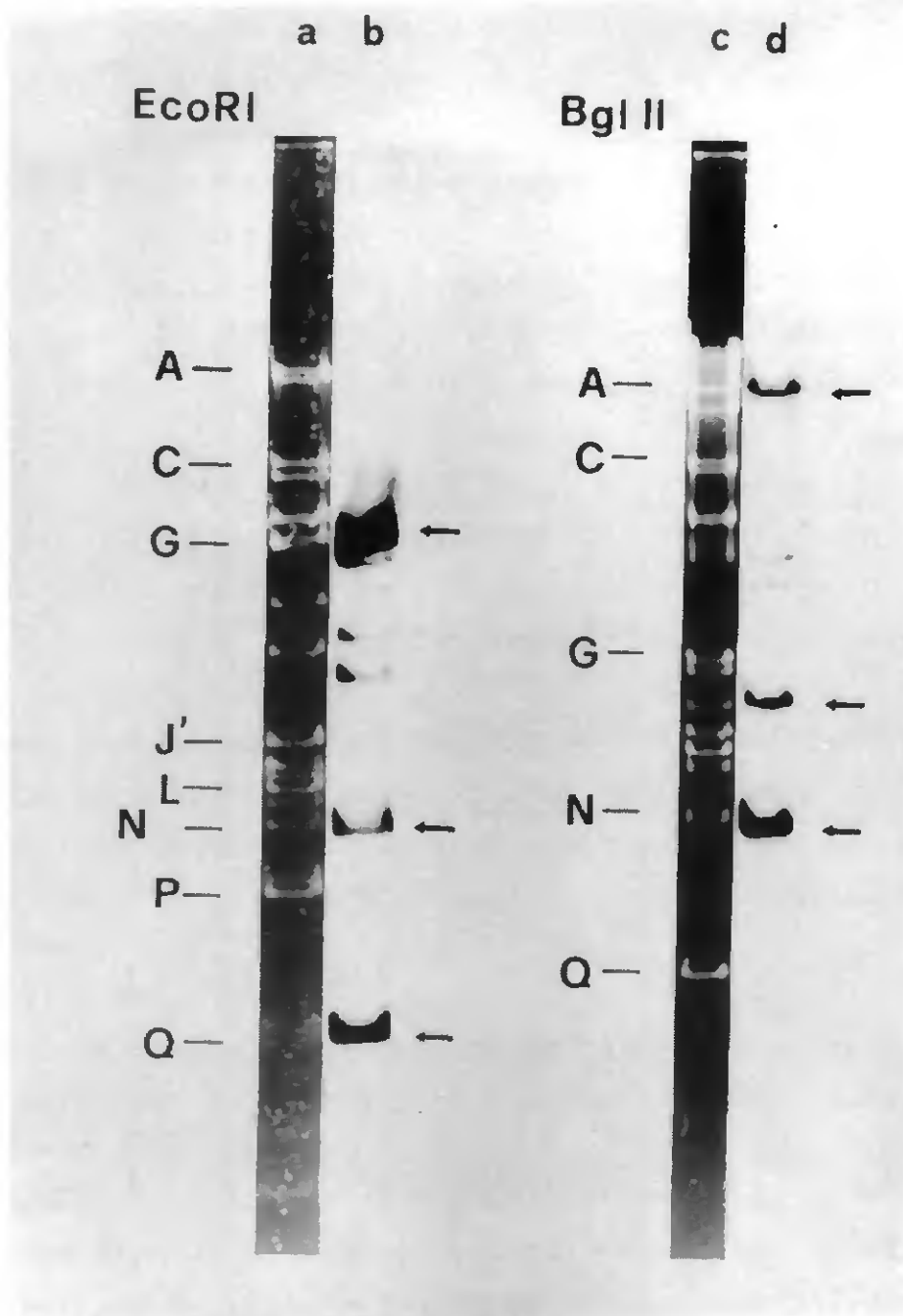
Nous pouvons avoir une idée de la taille du fragment incorporé sans pour autant digérer le recombinant, simplement en comparant la migration du vecteur seul et du recombinant. Une isolation rapide de matériel peut se faire dans ce cas par la méthode de Birnboim et Doly (1979), fig. 24 c. Pour les fragments Hind III, deux types d'insertion nous intéressent. Nous constatons pourtant, dans la figure 24 c, qu'un 3e type d'insertion est présent.

Pour déterminer la taille du ou des fragments incorporés, nous digérons les plasmides isolés par l'enzyme de restriction adéquate et analysons les fragments obtenus sur un gel d'agarose, fig. 24 d. Nous voyons, pour le 3e type d'insertion que, en plus d'un fragment de 3,4 Kbp, deux petits fragments Hind III sont présents. Nous n'avons pas essayé de savoir si ces fragments étaient adjacents et provenaient d'une digestion partielle ou s'ils résultaient d'une ligation hasardeuse.

Les deux recombinants pEgch₁₅ et pEgch₁₆ contenant des fragments de 3,4 Kbp et de 4,3 Kbp respectivement ont été digérés par EcoRI et Hind III et analysés sur gel agarose (fig. 24 e). Nous pouvons déduire que le fragment Hind4,3 recouvre EcoRI.N à droite alors que le fragment Hind3,4 le recouvre à gauche (fig. 30). Cette région n'étant pas totalement cartographiée,

- figure 25 -

Localisation de EcoRI.Q et de Bgl II.N sur le ctADN



a et c: profils EcoRI ou Bgl II du ctADN

b et d: hybridation, après transfert des profils a et c selon Southern, des fragments Hind 3,4 (b) et Hind 4,3 (d)

nous avons marqué le fragment Hind3,4 par "Nick-translation" et l'avons hybridé contre du ctADN digéré par EcoRI et transféré sur un filtre de nitrocellulose (fig. 25).

Un fort signal apparaît à la hauteur de EcoRI.N et de EcoRI.Q. Hallick nous a confirmé par la suite que ces deux fragments sont adjacents (communication personnelle). Une carte de restriction plus détaillée vient d'être publiée (Stiegler et al, 1982). Un autre signal très marqué, qui n'est pas dû à une digestion partielle, correspond au fragment EcoRI.G (6,9 Kb), localisé sur le ctADN à l'opposé de la région nous intéressant. L'organisation génétique de ce fragment est bien connue (Orozco et Hallick, 1982b); elle indique la présence d'un pseudogène et de 4 gènes de tARN: tARN^{Arg}, tARN^{Asn}, tARN^{Val} et tARN^{Leu}.

La présence d'un gène de tARN identique sur les deux fragments EcoRI.Q et EcoRI.G est possible et pourrait expliquer le signal observé sur le fragment EcoRI.G.

Nickoloff et Hallick (1982) employant une sonde synthétique complémentaire au tARN^{Asn} d'Euglena gracilis (5'-TCTACCACTGAGCT), ont observé une hybridation sur deux loci du ctADN, mais ne mentionnent pas ces derniers. Notre hypothèse reste spéculative.

Les autres signaux plus faibles correspondent soit à des digestions partielles, soit à des hybridations non spécifiques.

L'hybridation du fragment Hind4,3 contre le ctADN digéré par Bgl II montre un signal sur les fragments BglA et BglN comme prévu lors de l'expérience de la figure 24 (a). Un 3e signal (~ 3,9 Kbp) apparaît mais ne correspond pas à une bande d'ADN visible. Nous faisons l'hypothèse d'une digestion partielle contenant les fragments BglN et BglS. Nous savons en effet

que le fragment BglS est près du fragment BglA (adjacent selon Fasnacht, 1980). Or, le fragment BglS peut être localisé relativement précisément sur le ctADN par rapport à un des sites BamH I. Selon la carte de restriction (voir fig. 19), nous voyons que nous pouvons placer entre BglA et BglS notre fragment BglN.

3.5 Construction d'un clone contenant les fragments EcoRI.N + EcoRI.Q

Nous avons testé le pEgch₁₅ dans le système de transcription-traduction couplé mais n'avons pas obtenu de polypeptides de Mr apparente de 53 Kd.

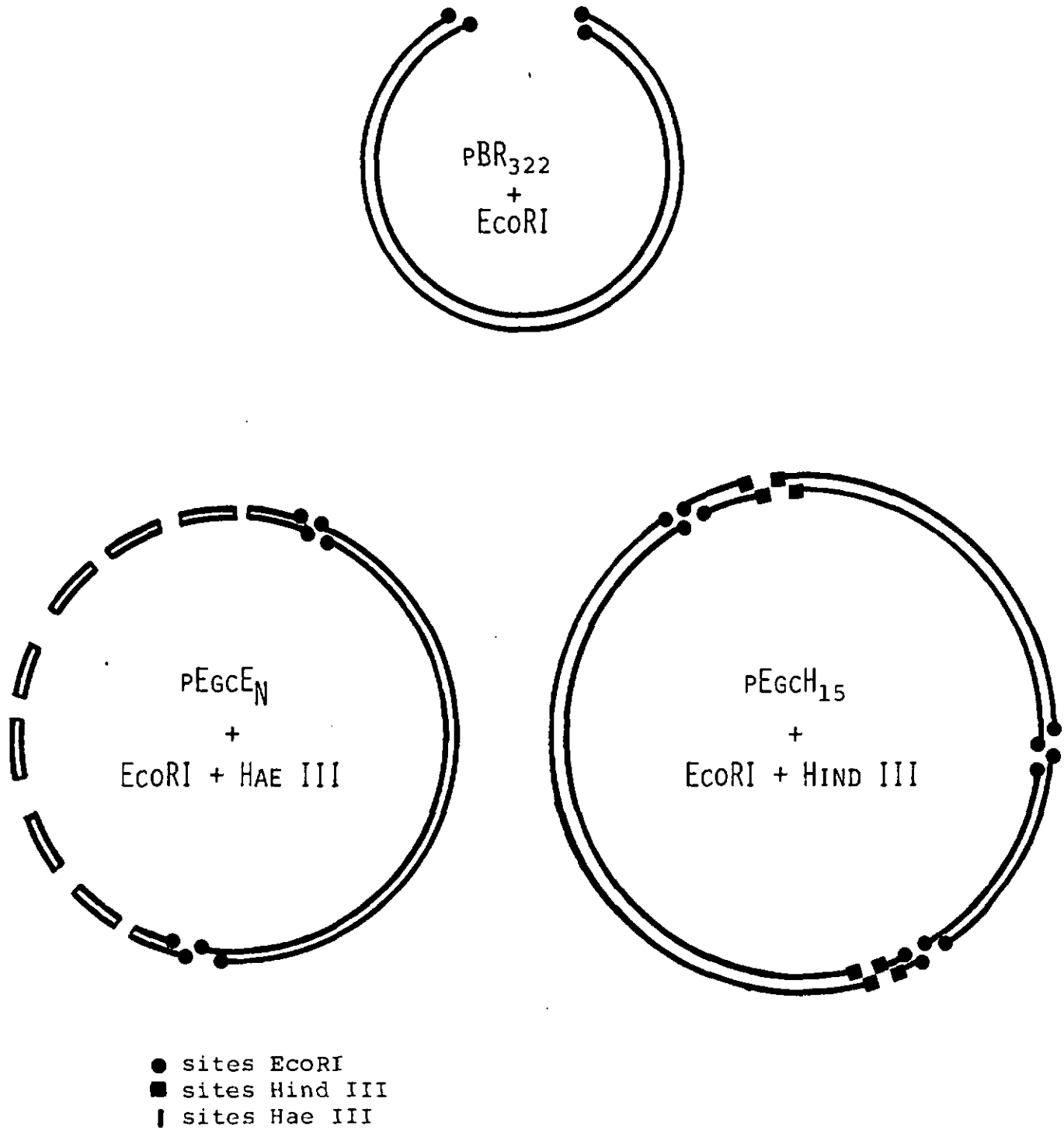
Nous avons alors essayé de cloner les fragments EcoRI.N + Q pour les mêmes raisons que celles exposées au paragraphe 3.4.

Nous utilisons la stratégie décrite à la figure 26:

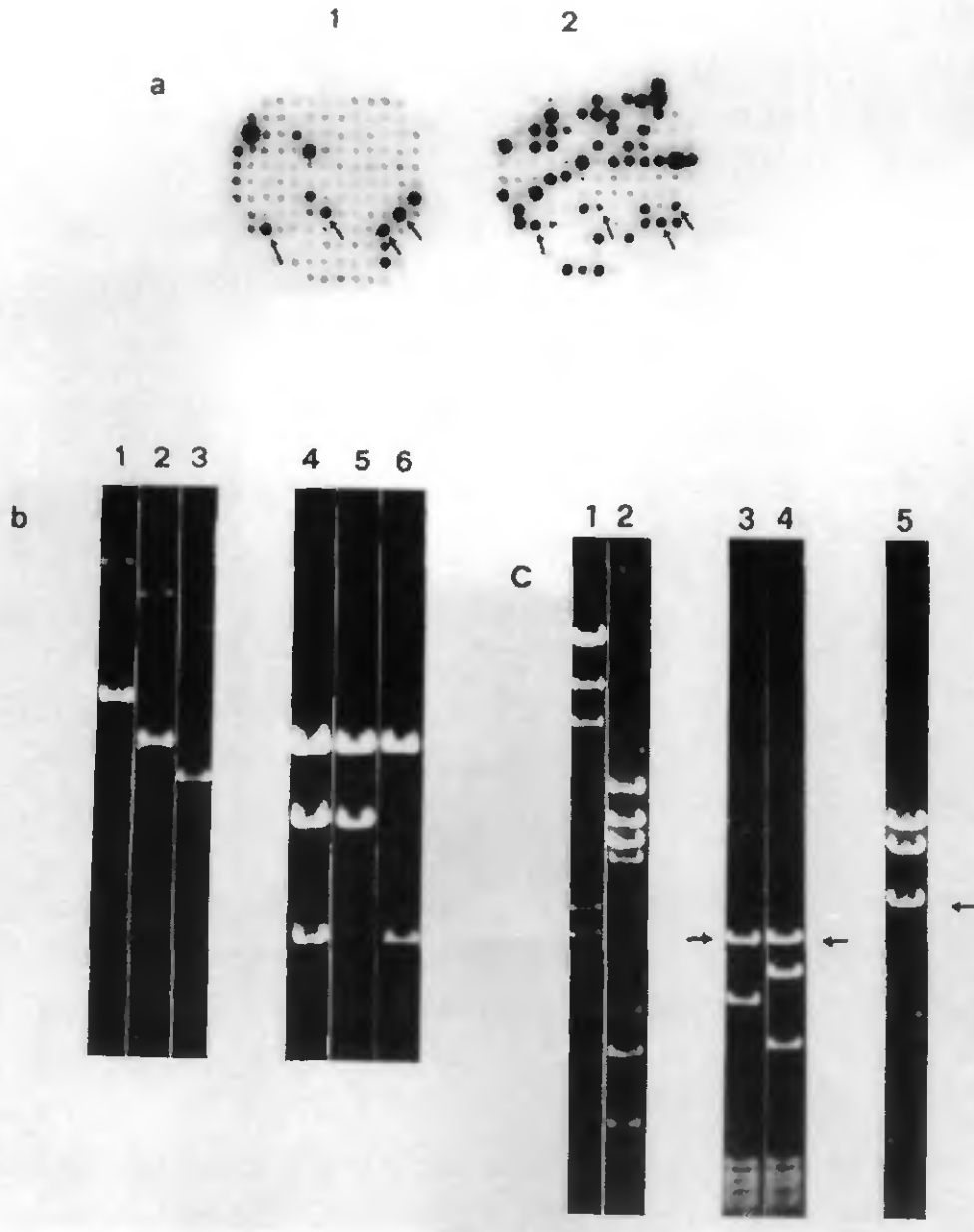
- (1) le plasmide pBR₃₂₂ linéarisé par EcoRI et déphosphorylé sert de vecteur
- (2) le pEgcE_N digéré par EcoRI et Hae III nous donne le fragment EcoRI.N
- (3) le pEgch₁₅ digéré par EcoRI et Hind III génère le fragment EcoRI.Q.

Après une préligation du mélange de (2) et de (3) puis une ligation de ce dernier avec le vecteur déphosphorylé (1), nous transformons E. coli HB-101 selon le protocole décrit dans Matériel et méthodes. Nous testons les recombinants obtenus par la méthode de Grunstein et Hogness (1975) (voir fig. 27 a) avec, comme sonde radioactive, les fragments EcoRI.N ou EcoHind 1,9 (= EcoRI.Q).

- figure 26 -

Clonage des fragments EcoRI.N + EcoRI.Q

- figure 27 -

Analyse des clones EcoRI N+Q

- a) Méthode de Grunstein et Hogness (1975):
 1) EcoRI.Q Nick-translaté; 2) EcoRI.N Nick-translaté
- b) Gel agarose 1 %
 1) pEgcE_{N+Q} forme I; 2) pEgcE_N forme I; 3) pEgcE_Q forme I;
 4, 5 et 6) digestion par EcoRI des formes I, 1, 2, et 3
- c) Gel agarose 1 %
 1) λ DNA digéré par Hind III
 2) mélange de pBR₃₂₂ digéré par: EcoRI; EcoRI+BamH I;
 EcoRI+Pst I; EcoRI+Sal I
 3) pEgcH₁₅ digéré par Hind III + Hae III
 4) pEgcE_{N+Q} digéré par Hind III + Hae III
 5) pEgcE_{N+Q} digéré par Hind III + Pst I

Les tailles des marqueurs sont

pour 1 (en kbp): 27,9; 23,6; 9,6; 6,6; 4,34; 2,26; 1,98; 0,56
 pour 2 : 4,34; 3,6; 3,24; 2,96; 1,4; 1,13; 0,75;

Nous constatons que 4 souches sont radiocatives sur les deux filtres. Elles doivent donc contenir les fragments souhaités soit réunis dans le même plasmide, soit dans deux plasmides différents.

- La figure 27 b montre l'analyse d'une de ces souches:

Le plasmide recombinant migre sous forme d'une seule bande (excluant le fait que 2 plasmides différents aient transformé la même bactérie).

- Cette migration est plus lente que celle des témoins $pEgcE_N$ ou $pEgcE_Q$ (indiquant la présence d'une insertion plus grande).
- Si nous digérons ce recombinant par l'endonucléase EcoRI, nous observons les 3 fragments de 4,3 Kbp (= pBR_{322}), 3,1 Kbp (= EcoRI.N) et 1,9 Kbp (= EcoRI.Q) comigrant avec les témoins respectifs.

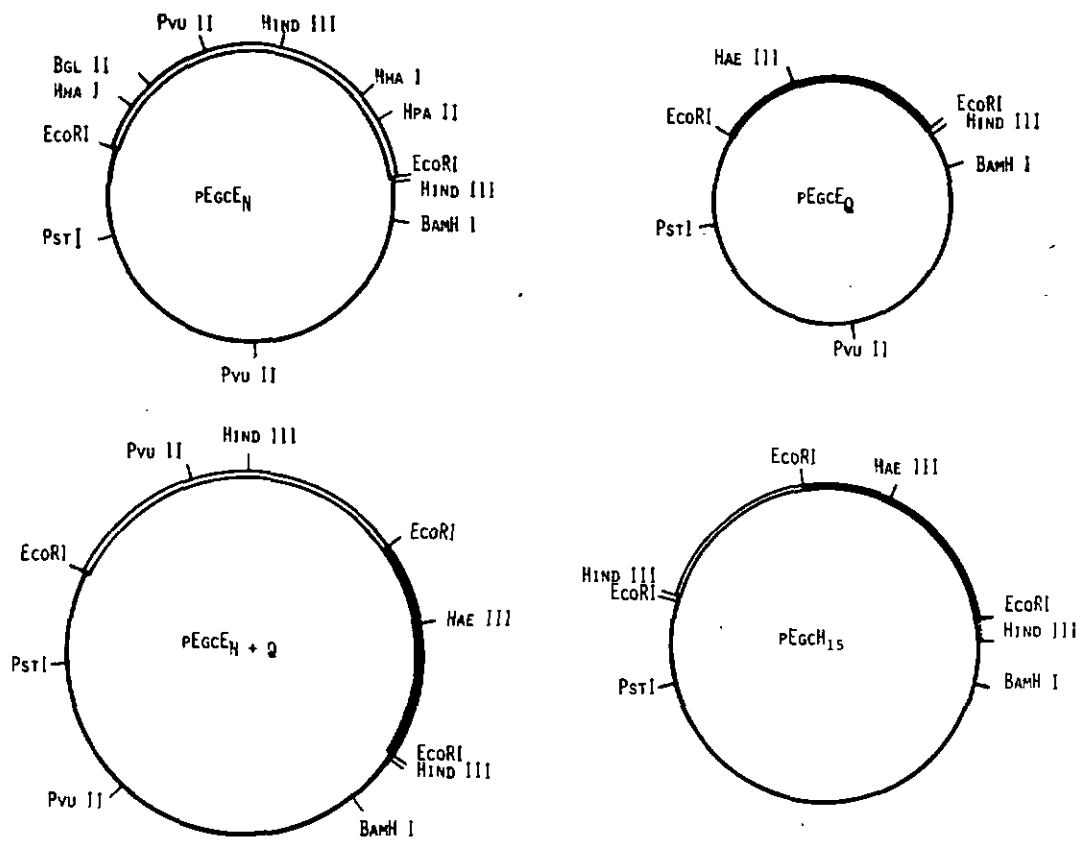
Pour déterminer l'orientation des fragments insérés dans le vecteur et vérifier qu'ils sont juxtaposés comme in situ, nous avons utilisé certaines endonucléases de restriction (voir fig. 27 c et 28).

Nous constatons que la double digestion Hind III Hae III des deux recombinants $pEgcH_{15}$ et $pEgcE_{N+Q}$ génère bien, dans chaque cas, un fragment de $\sim 2,0$ Kbp. Ce fragment est composé des sous-fragments EcoHind 1,4 provenant de EcoRI.N et EcoHae 0,6 provenant de EcoRI.Q.

Pour orienter l'insertion dans le vecteur, nous faisons la double digestion Hind III Pst I. Le plus petit fragment obtenu doit être de 2,45Kbp si la molécule schématisée à la figure 28 est correcte.

- figure 28 -

Représentation schématique des clones $pEgcE_N$, $pEgcE_Q$,
 $pEgcE_{N+Q}$, $pEgcH_{15}$



- : fragment EcoRI.N (total ou partiel)
 : fragment EcoRI.Q
 : vecteur pBR_{322}

Dans cette figure, nous représentons schématiquement les clones étudiés avec leurs principaux sites de restriction et leur orientation dans le vecteur.

3.6 Expérience selon "Northern"

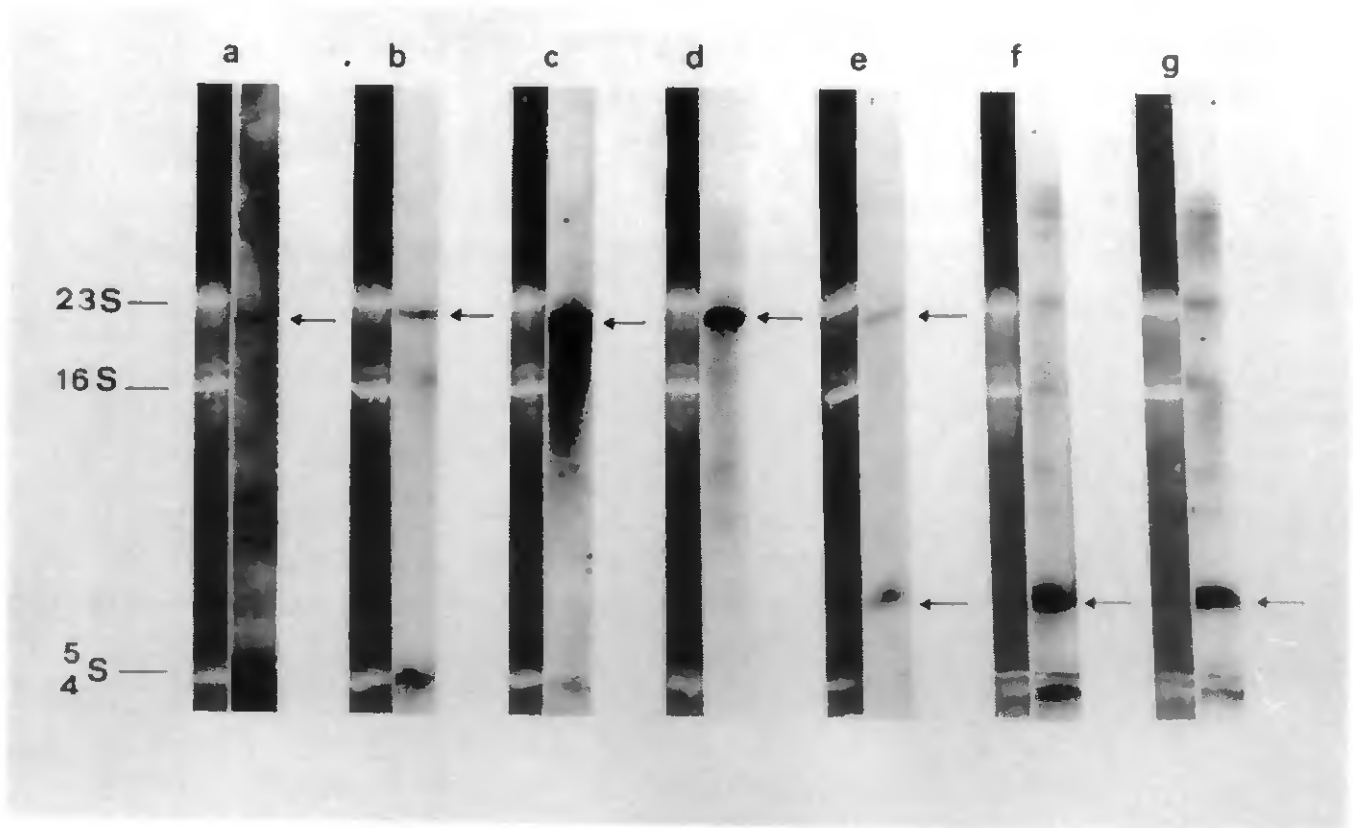
Dans l'expérience suivante, la matrice utilisée est constituée des ctARN totaux, séparés sur gel d'agarose-urée puis transférés sur papier DBM. Les fragments d'ADN que nous allons tester sont décrits dans le tableau VI. Ils proviennent de la double digestion EcoRI Hind III de pEgch₁₅ ou de pEgch₁₆ et de la digestion Bgl II de pEgcB_N. Nous les séparons du vecteur sur gel d'agarose 1 % et les électroéluons selon Matériel et méthodes paragraphe 9.3. Après marquage par "Nick-translation", ils sont hybridés contre les profils d'ARN transférés.

A la figure 29, nous constatons qu'une bande radioactive apparaît entre les ARN 23S et 16S. Le signal est très fort si la sonde employée est le fragment EcoHind 1,4 ou EcoHind 1,7. Par contre, il est plus faible si nous prenons l'ADN de pEgch₁₅ ou pEgch₁₆. La présence du vecteur peut diminuer l'appariement des séquences homologues dans les conditions d'hybridation choisies.

En analysant l'hybridation de pEgch₁₆, nous observons un autre signal correspondant à un ARN messager relativement court. Ce dernier apparaît également lorsque nous hybridons les fragments EcoHind 2,6 et BglN. Par contre, pour ces deux sondes, le signal observé entre les rARN est absent.

Nous pouvons conclure de cette expérience que le gène de la protéine 53 Kd chevauche les sous-fragments EcoHind 1,4 et EcoHind 1,7. L'emploi du fragment EcoHind 2,6 montre que ce gène ne recouvre pas le fragment EcoRI.J' (confirmation par le fragment BglN).

- figure 29 -

Expérience selon "Northern"

Séparation des ctARN sur gel agarose-urée et transfert sur papier DBM

Hybridation des fragments ou recombinants suivants marqués par "Nick-translation":

- | | | |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| a) fragment EcoHind 1,9; | b) pEgCH ₁₅ | c) fragment EcoHind 1,4; |
| d) fragment EcoHind 1,7; | e) pEgCH ₁₆ | f) fragment EcoHind 2,6; |
| g) fragment Bgl N | | |

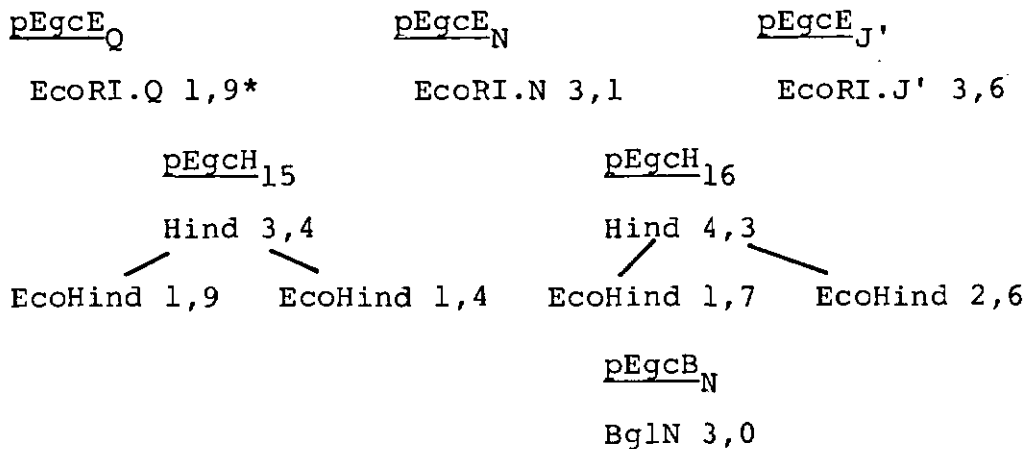
Le cas est beaucoup moins évident pour le fragment EcoHind 1,9 (= EcoRI.Q). Un très léger signal apparaît également entre les rARN 23S et 16S, au même endroit que celui observé après hybridation du fragment EcoHind 1,4.

La technique d'électroélution employée pour sortir ces fragments ne permet pas une séparation totale des sous-fragments. Nous pensons que le léger signal vu à la figure 29 (a) est plutôt dû à la présence d'une contamination (fragment EcoHind 1,4). Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'un faible signal dans la région des tARN alors que le fragment EcoRI.N (sorti de pEgcE_N) n'hybride pas dans la région des tARN (résultat non montré).

Ces résultats sont confirmés par les travaux d'Orozco et Hallick (1982a). Ces derniers ont localisé les loci de tARN sur le génome chloroplastique d'*Euglena gracilis*. Le fragment EcoRI.N n'a pas de gène de tARN alors que les fragments EcoRI.Q et EcoRI.J' en possèdent (fig. 29 (a), (f), (g)).

- tableau VI -

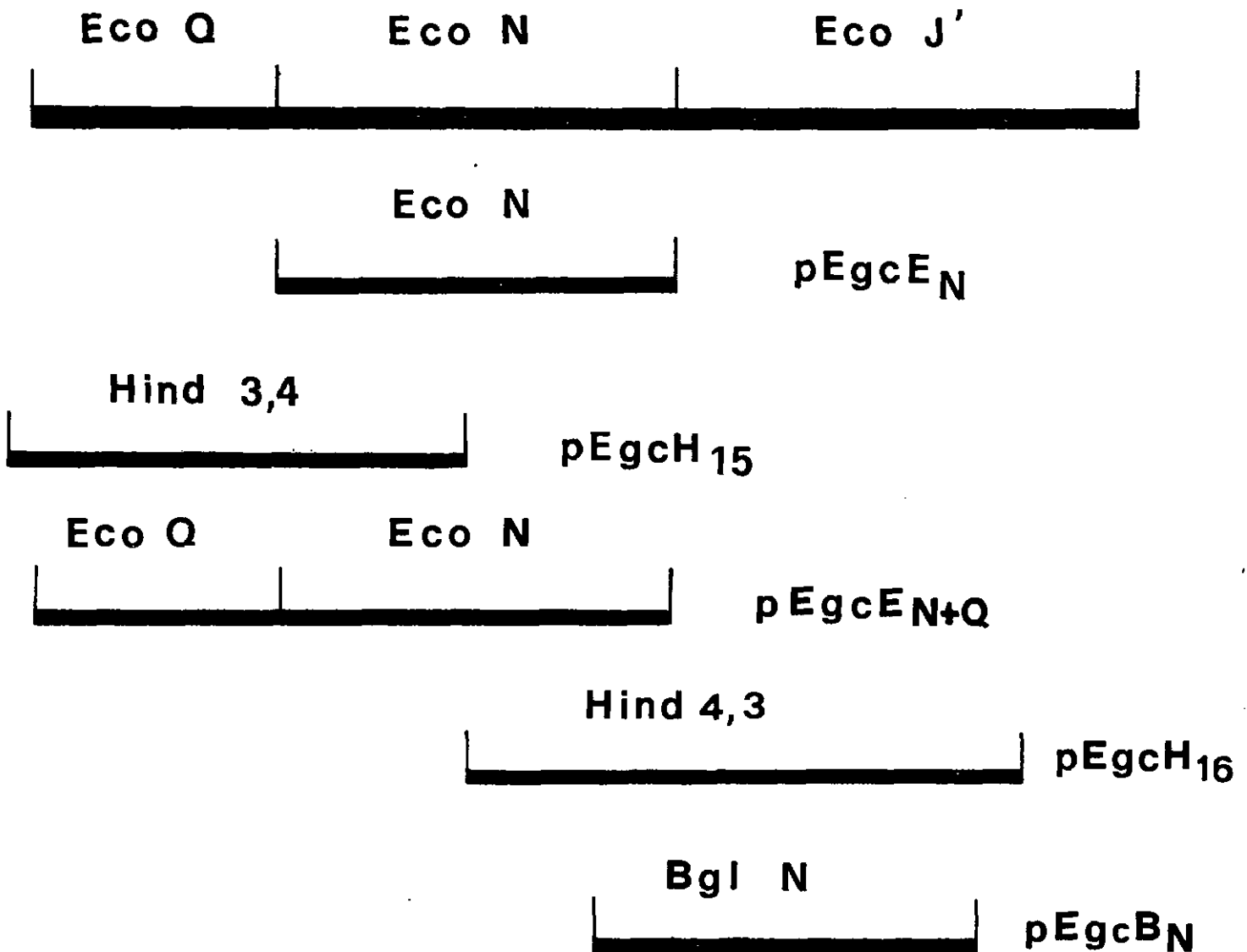
Nomenclature des recombinants, des fragments et sous-fragments étudiés (voir fig. 30)



*les chiffres après les fragments indiquent leurs tailles en Kbp

- figure 30 -

Représentation schématique des recombinants et des fragments étudiés



3.7 Résumé

- Aucun des clones isolés dans ce chapitre n'est transcrit-traduit en une protéine de 53 Kd dans le système procaryotique. La possibilité que le gène de cette protéine fasse partie d'une entité génétique plus complexe existe. Une telle situation est supposée pour les rARN chez Euglena gracilis. L'opéron serait transcrit en un rARN primaire avant le "processing" nécessaire à la maturation des rARN et tARN (pour références voir Hallick, in press). Dans notre cas, nous pourrions concevoir la présence d'un opéron relativement complexe dont la région promoteur se trouverait sur un autre fragment.
- L'analyse du fragment EcoRI.N ne nous a pas permis de localiser le gène de la protéine 53 Kd avec précision.
- Les expériences d'hybridation des fragments ou sous-fragments marqués contre les ARN chloroplastiques séparés sur gel montrent que ce gène est sur le fragment EcoRI.N à cheval sur les deux sous-fragments EcoHind. De par sa taille supposée, l'ARN messager de cette protéine pourrait être codé par une région débordant sur EcoRI.Q. En prenant comme sonde radioactive ce fragment isolé à partir de pEgcE_Q, nous pourrions vérifier que le léger signal présent à la figure 29 (a) est dû à une contamination.
- Les sous-fragments EcoHind 1,4 et EcoHind 1,7 sont tous deux capables de capturer, par hybridation, les mARN codant pour la protéine de 53 Kd (non montré).

Vu ces résultats, il nous semble intéressant d'entreprendre le séquençage du fragment EcoRI.N.

Sachant que le site Hind III coupe le gène, la stratégie pourrait être le marquage terminal de ce site suivi du séquençage des sous-fragments EcoHind 1,4 et 1,7 jusqu'à l'observation des signaux d'initiation ou d'arrêt.

IV Discussion

Les deux techniques utilisées dans ce travail pour localiser des gènes codant pour des protéines ont certaines limites.

Il est reconnu que le système procaryotique génère vraisemblablement des produits prématurément stoppés. Il est par conséquent très difficile d'analyser de tels produits.

De plus, le ctADN d'Euglena gracilis ne semble pas être un bon modèle pour un tel système. En effet, aucun polypeptide synthétisé in vitro ne comigre avec des protéines thylacoïdales ou stromatiques synthétisées in organello.

Nous ne savons pas si le manque de "fidélité" a lieu lors de la transcription et/ou de la traduction. Pour tenter de résoudre cette question, nous pouvons envisager deux types d'expérience:

- a) Jolly et Bogorad (1980) ont montré chez Zea mays que l'ARN polymérase chloroplastique, en présence d'un facteur chloroplastique soluble transcrit d'une manière préférentielle les gènes chloroplastiques intégrés dans un vecteur.

Il serait intéressant, pour tester la fidélité de la transcription, de construire un système hétérologue utilisant le fragment EcoRI.N, le surnageant 30'000 g de E. coli et d'y ajouter des fractions protéiques extraites de E. gracilis. Chez cette algue, l'ARN polymérase est mal caractérisée, rendant cette approche difficile. Par contre, Rushlow et al (1980) ont extrait un complexe actif de transcription des chloroplastes d'Euglena gracilis. En dissociant un tel complexe et connaissant la Mr apparente de la protéine codée par EcoRI.N, nous pourrions disposer d'un modèle expérimental

simple pour tester l'influence des protéines chloroplastiques solubles dans le processus de transcription.

- b) Nous avons également montré que le système de traduction de E. coli ne traduit pas avec fidélité les mARN d'Euglena gracilis alors que le système eucaryotique traduit les ARN codant pour au moins deux protéines stromatiques du chloroplaste. Les études de séquençage du gène codant pour le rARN 16S ont montré que la séquence Shine-Dalgarno manque chez E. gracilis (Graf et al, 1980). Si cette lacune est responsable de traductions non fidèles in vitro, l'approche expérimentale serait alors de construire un système de transcription-traduction couplé composé du S-30 de E. coli sans ses ribosomes et de remplacer ces derniers par ceux du chloroplaste.
- Pour l'expression des gènes chloroplastiques, la méthode la plus simple de procéder serait d'employer un système de transcription-traduction homologue, c'est-à-dire de préparer un lysat chloroplastique. Cette méthode décrite par Zaitlin et al (1981) a été tentée lors de notre travail en utilisant les chloroplastes intacts d'Euglena gracilis isolés selon Ortiz et al (1980). Aucune incorporation n'a été décelée lors de la seule tentative que nous avons faite.
- Nous pensons que la mise au point d'un tel système permettrait d'étudier les problèmes complexes de la régulation de l'expression génétique.
- Les fragments EcoRI N + Q que nous avons clonés pourraient être intéressants à analyser dans un tel système.
- L'autre approche nous a permis de localiser un gène codant pour une protéine de 53 Kd. Cette méthode nous semble intéressante mais difficile à maîtriser pour plusieurs raisons:

- il est bien connu que les ARN messagers sont peu stables et très sensibles aux ARNases
- leurs concentrations relatives sont très faibles par rapport aux ARN ribosomiques et aux ARN de transfert
- le système eucaryotique utilisé pour la traduction est sensible aux concentrations élevées d'ARN chloroplastiques (plus grandes que 0,5 mg/ml)
- nous ne savons pas s'il est capable de traduire indifféremment tous les ARN messagers du chloroplaste.

Nous pensons que seuls les produits de traduction des mARN les plus abondants sont détectables par autoradiographie, ainsi une dizaine de protéines chloroplastiques seulement pourraient être localisées. Une perspective d'avenir (mentionnée au paragraphe 2.8) est l'emploi de fragments d'ADN fixés de manière covalente sur une résine permettant ainsi de concentrer les mARN en très faible quantité dans les chloroplastes.

Pour localiser des gènes de protéines, deux autres approches nous semblent intéressantes à mentionner:

La première emploie des sondes hétérologues codant pour des protéines chloroplastiques connues. Basée sur le fait que certaines protéines ont été hautement conservées durant l'évolution au niveau de la séquence en acides aminés, les gènes correspondants doivent posséder également un degré d'homologie suffisant pour que des hybridations hétérologues puissent avoir lieu.

La technique appliquée par Stiegler et al (1982) a permis de localiser le gène de la LSU sur le génome chloroplastique d'Euglena gracilis. Ces auteurs utilisent des conditions d'hybridation peu sélectives, et comme sonde une partie des

gènes de la LSU de Zea mays ou de Chlamydomonas reinhardtii.

Une deuxième approche consiste à exploiter les nouvelles méthodes de séquençages. Ces dernières permettent non seulement de localiser avec précision les gènes mais également d'avoir une connaissance exacte de l'organisation génétique. La technique de Sanger et Coulson (1975), associée aux méthodes d'analyse par ordinateur selon Staden (1979) permettent de déduire les codons d'un gène et d'en tirer la séquence en acides aminés.

Bien que ces deux approches n'aient pas été entreprises dans le cadre de notre laboratoire, dans un proche avenir l'emploi du fragment EcoRI.N en tant que sonde hétérologue permettra de savoir indirectement si la protéine de 53 Kd trouvée chez E. gracilis est également présente chez d'autres végétaux. La détermination de la séquence du fragment, quelle que soit la méthode employée, précisera la position du gène et permettra peut-être (après déduction de la séquence en acides aminés) d'identifier son produit.

V Bibliographie

- Alwine JC Kemp DJ et Stark GR (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 5350 - 54

- Billeter M et Weber H (1978)
Cours SKMB Institut für Molekularbiologie I Universität Zürich

- Birnboim HC et Doly J (1979)
Nucl. Acids Res. 6 1513 - 23

- Blair GE et Ellis RJ (1973)
Biochim. Biophys. Acta 319 223 - 34

- Bollum FJ (1968)
dans: Methods in Enzymology Grossman and Moldare eds
Acad. Press NY vol XIIB 169 - 73

- Bottomley W Higgins TJV et Whitfeld PR (1976)
Febs Letters 63 120 - 24

- Bottomley W et Whitfeld PR (1979)
Eur. J. Biochem 93 31 - 39

- Boyer (1969)
J. Mol. Biol. 41 459 - 72

- Brawerman G et Eisenstadt JM (1964)
Biochim. Biophys. Acta 91 477 - 85

- Buchanan BB et Schürmann P (1973)
J. Biol. Chem. 248 4956 - 64

- Burckhardt J Telrofd J et Birnstiel ML (1979)
Nucl. Acids Res. 6 2963 - 71

- Casey J et Davidson N (1977)
Nucl. Acids Res. 4 1539 - 52

- Chelm BK et Hallick RB (1976)
Biochemistry 15 593 - 99

- Cleveland DW Fischer SW Kirschner MW et Laemmli UK (1977)
J. Biol. Chem. 252 1102 - 06

- Coen DM Bedbrook JR Bogorad L et Rich A (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 5487 - 91

- Cramer M et Myers J (1952)
Arch. Mikrobiol. 17 384 -

- Currier et Nester (1971)
Anal. Biochem. 76 431 -

- Davis BJ (1964)
Ann. NY Acad. Sci. 121 404 - 27
- Denhardt DT (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 641 - 46
- Driesel AJ Speirs J et Bonhert HJ (1980)
Biochim. Biophys. Acta 610 297 - 310
- Dron M Rahire M et Rochaix JD (1982)
Experientia 38 6/739
- Edelman M Sager D et Reisfeld A (1976)
Acides Nucléiques et Synthèse des Protéines chez les Végétaux
305 - 11
CNRS ed (1977)
- Edelman M et Reisfeld A (1978)
dans: Chloroplast Development
Akoyunoglou et al eds, Elsevier/North-Holland 641 - 52
- Ellis RJ et Barraclough BR (1978)
dans: Chloroplast Development
Akoyunoglou et al eds, Elsevier/North-Holland 185 - 94
- Ellis RJ (1981)
Ann. Rev. Plant Physiol. 32 111 - 37
- Fasnacht M (1981)
Travail de licence, Université de Neuchâtel
- Fuchs E (1976)
Eur. J. Biochem 63 15 - 22
- Gesteland RF (1966)
J. Mol. Biol. 16 67 - 84
- Gillespie D et Spiegelman S (1965)
J. Mol. Biol. 12 829 - 42
- Graf L Kössel H et Stutz E (1980)
Nautre 286 908 - 10
- Gray PW et Hallick RB (1978)
Biochemistry 17 284 - 90
- Greenblatt CL et Schiff JA (1959)
J. Protozool. 6 23 -
- Grunstein M et Hogness DS (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 3961 - 65

- Hallick RB Rushlow KE Orozco EM Jr Stiegler GL et Gray PW (1979)
ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 15 127 - 41
- Hallick RD (1981)
dans: The Biology of Euglena
vol IV, Academic Press NY London in press
- Hartley MR Wheeler AM et Ellis RJ (1975)
J. Mol. Biol. 91 67 - 77
- Herrlich P et Schweiger M (1974)
dans: Methods in Enzymology, Grossman and Moldave eds,
Acad. Press NY vol XXX 654 - 69
- Herrlich P et Schweiger M (1978)
Febs Letters 87 1 - 6
- Hirt B (1967)
J. Mol. Biol. 26 365 -
- Hohn B (1979)
dans: Methods in Enzymology, Grossman and Moldave eds,
Acad. Press NY vol 68 299 - 309
- Hopper JE Ko G et Young ET (1975)
J. Mol. Biol. 94 539 - 54
- Jenni B et Stutz E (1978)
Eur. J. Biochem. 88 127 - 34
- Jenni B et Stutz E (1979)
Febs Letters 102 95 - 99
- Jenni B (1980)
Travail de thèse, Université de Neuchâtel
- Jolly SO et Bogorad L (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 822 - 26
- Keller M Burkhardt G Bohnert HJ Mubumbila K Gordon K
Steinmetz A Heiser D Crouze EJ et Weil JH (1980)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 95 47 - 54
- Kleinkopf GE Huffaker RC et Matheson A (1970)
Plant Physiol 46 204 - 207
- Koch W Edwards K et Kössel H (1981)
Cell 25 203 - 13
- Kolodner R et Tewari KK (1972)
J. Biol. Chem. 247 6355 - 64
- Kolodner R et Tewari KK (1975)
Biochim. Biophys. Acta 402 372 - 90

- Langridge P (1981)
Febs Letters 123 85 - 89
- Lazowski J Jacq C et Slonimski P (1980)
Cell 22 333 - 48
- Lederman M et Zubay G (1968)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32 710 - 14
- Lockner J (1979)
Anal. Biochem. 98 358 - 67
- Malnoë P Rochaix JD Chua NH et Spahr PF (1979)
J. Mol. Biol. 133 417 - 34
- Mandel M et Higa A (1970)
J. Mol. Biol. 53 159 - 62
- Manning JE Wolstenholme DR Rayn RS Hunter JA et Richards OC (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 1169 - 73
- Maurer HR
dans: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide
Gel Electrophoresis
Watter de Gruyter Berlin NY 1971
- Mc Intosh L Carsten P et Bogorad L (1980)
Nature 288 556 - 60
- Miller JH
Experiment in Molecular Genetics Cold Spring Harbor, NY 1972
- Miller JS Ricciardi RP Roberts BE Paterson BM et Mathews MB (1980)
J. Mol. Biol. 142 455 - 88
- Moorman AFM Grivell LA Lamie F et Smits HL (1978)
Biochim. Biophys. Acta 518 351 - 65
- Morrow JF (1979)
dans: Methods in Enzymology Grossman and Moldave eds,
Acad. Press NY vol 68 3 - 24
- Nickoloff JA et Hallick RB (1982)
Fed Proceeding 41 757
- Orozco EM Jr et Hallick RB (1980)
J. Biol. Chem. 255 10997 - 11003
- Orozco EM Jr et Hallick RB (1982a)
J. Biol. Chem. 257 3258 - 64

- Orozco EM Jr et Hallick RB (1982b)
J. Biol. Chem. 257 3265 - 75
- Ortiz W et Stutz E (1980)
Febs Letters 116 298 - 302
- Ortiz W Reardon EM et Price CA (1980)
Plant Physiol 66 291 - 94
- Paterson BM Roberts BE et Kuff EL (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 4370 - 74
- Peacock AC et Dingman CW (1968)
Biochemistry 7 668 -
- Pelham HRB et Jackson RJ (1976)
Eur. J. Biochem 67 247 - 56
- Rabinowitz H Reisfeld A Sagher D et Edelman M (1975)
Plant Physiol. 56 345 - 50
- Rawson JRY et Stutz E (1969)
Biochim. Biophys. Acta 190 368 - 80
- Rawson JRY et Boerma CL (1976)
Biochemistry 15 588 - 92
- Rawson JRY Kushner SR Vapnek D Alton NK et Boerma CL (1978)
Gene 3 191 - 209
- Rigby PWJ Dieckman M Rhodes C et Berg P (1977)
J. Mol. Biol. 113 237 - 251
- Rochaix JD et Malnoë P (1978)
Cell 15 661 - 70
- Rushlow KE Orozco EM Lipper C et Hallick RB (1980)
J. Biol. Chem. 255 3786 - 92
- Rutti B Keller M Ortiz W et Stutz E (1981)
Febs Letters 134 15 - 19
- Sagher D Grosfeld H et Edelman M (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 722 - 26
- Salisbury JL Vasconcelos AC et Floyd GL (1975)
Plant Physiol. 56 399 - 403
- Sanger F et Coulson AR (1975)
J. Mol. Biol. 94 441 - 48

- Schlunegger B Rutti B et Stutz E (1979)
Experientia 35/7 66
- Scott NS et Smillie RN (1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 598 - 603
- Smith HJ et Bogorad L (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 4839 - 42
- Southern EM (1975)
J. Mol. Biol. 98 503 - 17
- Staden R (1979)
Nucl. Acids Res. 6 2601 - 10
- Steinmetz A Gubbins EJ et Bogorad L (1982)
Nucl. Acids Res. 10 3027 - 38
- Stiegler GL Matthews HM Bingham SE et Hallick RB (1982)
Nucl. Acids Res. 10 3427 - 44
- Studier FW (1973)
J. Mol. Biol. 79 327 - 48
- Sutcliffe JG (1978a)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 3737 - 41
- Sutcliffe JG (1978b)
Nucl. Acids Res. 5 2721 - 28
- Ullrich A Shine J Chirgwin J Pictet R Tischer E Rutter WJ et
Goodman HM (1977)
Science 196 1313 - 19
- Vasconcelos AC Pollak M Mendiola LR Hoffmann HP Brown DH et
Price CA (1971)
Plant Physiol. 47 217 - 21
- Vasconcelos AC (1976)
Plant Physiol. 58 719 - 721
- von Wettstein D
International Cell Biology 250 - 72
HG Schweiger, ed. Springer-Verlag Berlin 1980-81
- Weber K et Osborn M (1969)
J. Biol. Chem. 244 4406 -
- Weinbaum SA Gressel J Reisfeld A et Edelman M (1979)
Plant Physiol 64 828 - 32

- Westhoff P Nelson N Bünemann H et Herrmann RG (1981)
Current Genetics 4 109 - 20
- Whitfeld PR et Bottomley W (1980)
Biochem. International 1 172 - 78
- Wienand U Schwarz Z et Feix G (1979)
Febs Letters 98 319 - 24
- Yang HL Ivashkiv L Chen HZ Zubay G et Cashel M (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 7029 - 33
- Zaitlin D Bard J Hildebrand M et Bourque D
EMBO Workshop on Chloroplast DNA Arolla (Suisse 1981)
- Zubay G Chambers DS et Cheong LC (1970)
dans: "The Lactose Operon"
JD Beckwith and D Zipser eds, 375 - 91
- Zurawski G Perrot B Bottomley W et Whitfeld PR (1981)
Nucl. Acids Res. 9 3251 - 70