

50376
1966
22

N° d'ordre

Exclu du prêt

50376
1966
22

UNIVERSITÉ DE LILLE - FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

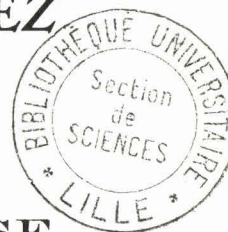
pour obtenir le grade de

Docteur ès Sciences Naturelles

par

PAULETTE DERUMEZ

Assistante en Chimie Biologique



PREMIÈRE THÈSE

**Études sur la Composition et le Métabolisme
des Acides Ribonucléiques des Tissus du Rat**

DEUXIÈME THÈSE

LES LYSOSOMES

Soutenues le 8 Janvier 1966, devant la Commission d'Examen

JURY : MM. les Professeurs J. MONTREUIL, Président

M. DURCHON

R. DEFRETIN

P. BOULANGER

1966

FACULTE DES SCIENCES DE LILLE.

- Doyens Honoraires : MM. LEFEBVRE, PRUVOST.
 - Professeurs Honoraires : MM. ARNOULT, BEGHIN, CAU, CHAPELON,
CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS,
DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN,
KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG,
MM. MAZET, A. MICHEL, NORMANT, PARISELLE,
PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUBINE,
WIEMANN, ZAMANSKY.
-

Doyen : M. TILLIEU, Professeur de Physique

- Assesseurs : M. DURCHON, Professeur de Zoologie
M. HEUBEL, Professeur de Chimie Minérale.
- Professeurs : MM. BACCHUS, Astronomie Calcul Numérique
BECART, Physique
BERKER, Mécanique des Fluides
BLOCH, Psycho-physiologie
BONNEMAN-BEMIA, Chimie et Physico-Chimie
industrielles
BONTE, Géologie appliquée
BOUISSET, Physiologie animale
BOURIQUET, Botanique
CELET, Géologie
MM. CORSIN, Paléobotanique
DECUYPER, Mathématiques
DEDEKER, Professeur associé Mathématiques
DEFRETIN, Biologie marine
DEHORS, Physique industrielle
DELATTRE, Géologie

DELEAU, Géologie
DELHAYE, Chimie générale
DESCOMBES, Calcul différentiel et intégral
GABILLARD, Radioélectricité et électronique
GERMAIN, Chimie Générale et Chimie Organique
GLACET, Chimie
GONTIER, Mécanique des Fluides
HEIM de BALZAC, Zoologie
HOCQUETTE, Botanique Générale et Appliquée
Mme LEBEGUE, Physique, Amiens
MM. LEBEGUE, Botanique
LEBRUN, Radioélectricité et Electronique
Melle LENOBLE, Physique
MM. LIEBART, Radioélectricité
LINDER, Botanique
LUCQUIN, Chimie Minérale
MARION, Chimie
Melle MARQUET, Mathématiques
MM. MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des Fluides
MAUREL, Chimie
MENESSION, Géologie
MONTREUIL, Chimie Biologique
PARREAU, Mathématiques
PEREZ, Physique Expérimentale
PHAM MAU QUAN, Mécanique rationnelle et
expérimentale
POITOU, Algèbre supérieure Calcul numérique
POUZET, Mathématiques
PROUVOST, Géologie
MM. SAVARD, Chimie Générale
SCHALLER, Zoologie
SCHILTZ, Physique
Mme SCHWARTZ, Analyse Supérieure
TRIDOT, Chimie

VIVIER, Biologie animale
WATERLOT, Géologie et Minéralogie
WERTHEIMER, Physique

- Maîtres de Conférences :

MM. BEAUFILS, Chimie Générale et Organique
BLANCHARD, Chimie de la houille
BOILLET, Physique Générale
BOUGH ON, Mathématiques
BUI TRONG LIEU, Mathématiques
CHASTRETTE, Chimie Générale
COMBET, Mathématiques
CONSTANT, Physique
DANZE, Géologie
DEVRAINNE, Chimie minérale
Mme DRAN, Chimie de la houille
MM. FOURET, Physique
GAVORET, Physique théorique
HERZ, Mathématiques
HUARD DE LA MARRE, Calcul numérique
LACOMBE, Mathématiques
MAES, Physique
MONTARIOL, Chimie
MORIAMEZ, Physique
MOUVIEZ, Chimie
NGUYEN PHONG CHAU, Physique
PANET, Physique et Electricité industrielles
RAUZY, Mathématiques
SAASA, Physique
SEGARD, Chimie Biologique
TUDO, Chimie Minérale
VAZARD, Mathématiques
VAILLANT, Calcul des probabilités
VIDAL, Physique industrielle

- Conseiller d'Administration Universitaire : M. JARRY

- Attaché Principal : M. FACON

- Attachés d'administration : M. COLIGNON
M. LEROY
M. JANS

A MON PERE

dont la vie de chaque jour est un exemple
pour moi.

Je suis heureuse de lui donner aujourd'hui la
joie qu'il mérite et de lui témoigner toute mon
affection.

A TOUTE MA FAMILLE

A MES AMIS

A MES COLLEGUES

A TOUS CEUX qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation et à la présentation de ce travail.

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur MONTREUIL qui nous en a donné le sujet et qui a guidé nos recherches avec beaucoup d'autorité pendant de nombreuses années. Nous sommes reconnaissante à Monsieur le Professeur MONTREUIL d'avoir bien voulu superviser la rédaction de ce mémoire et d'avoir accepté la présidence de notre Jury.

Nous remercions Messieurs les Professeurs DEFRETIN et DURCHON de nous avoir donné un deuxième sujet de thèse aussi intéressant que celui des "Lysosomes" et d'avoir accepté si aimablement de faire partie de notre Jury. Qu'ils trouvent ici l'expression de notre gratitude.

Nous tenons à exprimer aujourd'hui tout notre attachement à Monsieur le Professeur BOULANGER qui, après nous avoir accueillie dans son service de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille en 1956, nous a dirigée vers la Faculté des Sciences, lors de la création du Service de Chimie Biologique. Il n'a jamais cessé de nous prodiguer ses conseils et nous le remercions de sa haute bienveillance. Nous le remercions aussi de la confiance qu'il veut bien nous témoigner et de l'honneur qu'il nous fait en jugeant ce travail.

Nous avons eu l'immense privilège d'être Préparatrice pendant neuf ans, de 1946 à 1955, à l'Institut Pasteur de Lille, dirigé par Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX et de côtoyer chaque jour des Hommes de grande valeur. Nous remercions Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX d'avoir toujours encouragé notre désir d'apprendre et de nous avoir inculqué le goût de la recherche, guidée par la soif de connaître, mais aussi et surtout par le souci de soulager et guérir les malades.

Nos recherches présentées aujourd'hui ont été effectuées à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille où Monsieur le Professeur DRIESSENS, Directeur de cet Etablissement, a bien voulu mettre à notre disposition un Laboratoire ; nous l'en remercions vivement.

Nous sommes reconnaissante à Monsieur le Professeur BISERTE de nous avoir toujours donné de précieux conseils et d'avoir contribué pour une grande part à notre formation de Biochimiste. Nous le remercions de la bienveillante sympathie qu'il nous témoigne et le prions de croire à notre admiration.

Monsieur le Professeur OSTEUX a bien voulu effectuer pour nous les courbes d'enregistrement des radio-activités et les autoradiogrammes présentés dans ce Mémoire. Nous le remercions très chaleureusement de son aide et de sa cordialité

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

Nos recherches s'inscrivent dans le cadre général des travaux qui ont été entrepris, depuis plusieurs années à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, sur la physico-chimie et le métabolisme des acides nucléiques et qui se justifient par le rôle important que jouent ces derniers dans les phénomènes de la mitose. Il n'est d'ailleurs pas de laboratoire de Recherches sur le Cancer qui ne s'intéresse à ces composés, car l'hypothèse la plus classiquement admise en Cancérologie est que le Cancer est une "maladie" des acides nucléiques.

L'un des buts que poursuivent les biochimistes cancérologues est de démontrer la présence éventuelle, dans les cellules cancéreuses, d'acides nucléiques "anormaux" d'origine endogène (théorie mutationnaire) ou exogène (théorie virale) ou de mettre en évidence des facteurs d'activation de la synthèse des acides nucléiques qui pourraient être rendus responsables de la cancérisation.

Dans une première série de travaux, nous nous sommes attachée à perfectionner ou à mettre au point des méthodes fines d'exploration de la structure des acides ribonucléiques, suffisamment précises pour saisir d'éventuelles modifications de leur composition dans les cellules cancéreuses. Nos recherches nous ont conduite à la description d'un procédé de détermination de la composition molaire en nucléotides des acides ribonucléiques. Son application à différents tissus du Rat nous a amenée à établir une relation physico-chimique entre les acides ribo et désoxyribonucléiques.

Dans une seconde série de travaux, nous avons étudié la biosynthèse des acides ribonucléiques des différentes particules cytoplasmiques à l'aide de l'acide radiophosphorique. Ces recherches nous ont permis de démontrer qu'il existait une relation métabolique entre les acides nucléiques du noyau et ceux du cytoplasme.

Enfin, l'interprétation des résultats de ces deux groupes de recherches nous ont permis de conclure à l'existence d'un acide ribonucléique de type "messenger" dans les cellules du foie de Rat.

Notre mémoire comportera quatre chapitres.

Dans le premier, réservé à des généralités sur les acides nucléiques, nous préciserons leurs principales propriétés physico-chimiques, leur métabolisme et leur rôle. Dans le second, nous décrirons un procédé original de détermination de la composition des acides ribonucléiques. Dans le troisième, nous rassemblerons les résultats concernant le métabolisme des acides ribonucléiques des fractions cellulaires. Dans le dernier, nous apporterons des arguments en faveur de l'existence d'un acide ribonucléique de type "messenger" dans les cellules de foie de Rat.

C H A P I T R E I

GENERALITES.

- I - IMPORTANCE DES ACIDES NUCLEIQUES.
- II - PHYSICO-CHIMIE DES ACIDES NUCLEIQUES.
- III - METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES.
- IV - BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET BIOCHIMIE
DE L'HEREDITE ET DE LA MITOSE.

I - IMPORTANCE DES ACIDES NUCLEIQUES.

En 1871, MIESCHER (1) isola des cellules de pus et des spermatozoïdes de Saumon un composé phosphoré qu'il appela nucléine et dans lequel il mit en évidence deux constituants : une protéine basique et un composé phosphoré acide. Depuis, de très nombreux chercheurs, cytologistes, biochimistes et physiciens, se sont intéressés à cette substance dont la connaissance des propriétés physico-chimiques et métaboliques devait révolutionner la Biologie et donner naissance à une science nouvelle : la Biochimie Moléculaire.

En 1889, ALTMANN (2) proposa d'appeler acide nucléique le groupement prosthétique de cet hétéroprotéide qu'il avait réussi à isoler et à purifier. En 1891, KOSSEL (3) mit en évidence l'existence de deux acides nucléiques différents, suivant leur origine, par la nature de leurs constituants : l'un isolé de la Levure et appelé en raison même de son origine, acide zymonucléique, l'autre extrait du thymus et appelé acide thymonucléique. Longtemps, on crut que le premier était spécifique du règne végétal et le second du règne animal. C'est pourquoi, on les désigna par les termes plus généraux d'acide phytonucléique et d'acide zoonucléique (LEVENE) (4).

Enfin, à la suite de l'isolement et de l'identification par LEVENE, du ribose et du désoxyribose parmi les produits de leur hydrolyse, on les appela acide ribonucléique et acide désoxyribonucléique.

Les acides nucléiques sont des constituants constants de la matière vivante. Depuis les travaux de HAMMARSTEN (5), de CASPERSSON (6) et de BRACHET (7), on sait en effet que ces deux acides coexistent dans toute cellule,

animale et végétale. Les nucléoprotéides ont en outre été mis en évidence dans les virus et les bactéries.

Dans les tissus animaux et végétaux, l'acide désoxyribonucléique (ou ADN) est localisé dans le noyau au niveau des chromosomes, (x) tandis que l'acide ribonucléique (ou ARN) se trouve, à la fois, dans le noyau, -en particulier dans le nucléole-, et dans le cytoplasme (suc cellulaire et granules cytoplasmiques : mitochondries et microsomes).

Les désoxyribonucléoprotéides sont des constituants des gènes et les supports chimiques de l'hérédité, tandis que les ARN interviennent dans la biosynthèse des protéines et dans la mitose.

Le rôle fondamental des acides ribonucléiques a été pressenti par des résultats obtenus par l'application de méthodes cytochimiques, cytophysiques et biochimiques.

Les analyses cytochimiques et cytophysiques ont montré que les ARN se trouvent en quantité élevée dans les tissus où la synthèse protéique est active, comme, par exemple, la glande séricigène du ver à soie (DENUCE) (12) ou les graines en germination (OOTA) (13) et dans les micro-organismes qui se multiplient rapidement (CASPERSSON) (14), MALMGREEN et HEDEN (15).

(x) Certains auteurs l'ont caractérisé, toutefois récemment dans le cytoplasme : au niveau des chloroplastes chez les végétaux (KIRK (8) ; BRAWERMAN (9)), et dans les mitochondries du foie de Rat (NASS & Coll. (10)).

L'ADN a été trouvé aussi dans les nucléoles chez les mammifères (MANDEL & Coll. (11)).

Ces résultats ont été confirmés par les dosages biochimiques (DAVIDSON (16), LESLIE (17) et BRACHET (18)) : les tissus glandulaires qui sécrètent de grosses quantités de protéines sont beaucoup plus riches en ARN que les autres. Par exemple, le pancréas, les glandes salivaires, le foie, les muqueuses gastrique et intestinale contiennent plus d'ARN que le rein, le cerveau, le coeur et le poumon. De même, les tissus doués d'une activité mitotique intense possèdent un taux élevé d'ARN : c'est le cas en particulier, des tissus embryonnaires (ELSON, GUSTAFSON, CHARGAFF) (19), des tissus néoplasiques et des tissus en régénération (NOVIKOFF & POTTER) (20).

L'autoradiographie a démontré qu'il y avait une relation étroite entre la teneur en ARN et l'incorporation des acides aminés dans les protéines (FICQ (21) ; BRACHET & FICQ (22) ; NIKLAS & OEHLERT (23)).

L'augmentation induite du taux de synthèse protéique s'accompagne d'une élévation de la teneur en ARN (PRICE) (24) et de la vitesse d'incorporation des précurseurs marqués dans les ARN (FEIGELSON & Coll.) (25).

Enfin, les essais d'inhibition de la synthèse protéique par la ribonucléase, effectuée, non seulement chez les microorganismes (GALE et FOLKES (26), LESTER (27), BELJANSKI (28), CASTERMAN et JEENER (29), GROTH (30), THOMAS (31), LE CLERC (32)), SPIEGELMAN (33), mais aussi chez les végétaux (BRACHET (34) et les cellules animales (BRACHET & Coll. (35), LEDOUX & Coll. (36), et FISQ (37)) confirment le rôle de l'ARN dans la biosynthèse des protéines.

L'ARN peut, en outre, être considéré comme un déterminant génétique après les nombreuses expériences effectuées sur les virus végétaux par MARKHAM (38-39), JEENER (40-41), COMMONER & MERCER (42), MATTHEWS (43), FRAENKEL-CONRAT (44) et GIERER & SCHRAMM (45). En effet, l'infection d'une plante par un virus s'accompagne de la synthèse d'une protéine anormale identique à la protéine du virus. Cette protéine

est dépourvue de toute activité infectieuse et la présence de l'ARN dans le virus paraît bien être la condition essentielle à sa multiplication, c'est-à-dire à la synthèse de ses propres protéines. Au contraire, l'ARN viral seul est infectieux et l'intégrité de sa molécule est indispensable à la synthèse protéique. En effet, les particules virales "dénaturées" par l'incorporation d'azaguanine ou de thio-uracile, bases analogues à celles de l'ARN, perdent leur pouvoir de se multiplier.

D'autre part, FRAENKEL-CONRAT (46) a réussi à séparer l'ARN de la protéine de deux virus d'espèces différentes et à réassocier la protéine de l'un avec l'ARN de l'autre. Il a démontré que la protéine qui se forme au cours de la multiplication de ce virus hybride était celle de l'espèce dont provient l'ARN.

Le nombre de travaux concernant le rôle des acides ribonucléiques est considérable et il était illusoire, et même impossible, de tenter de les résumer. C'est pourquoi nous nous sommes limités à l'exposé des plus démonstratifs de l'importance biochimique et biologique des acides ribonucléiques et de leur intervention dans la biosynthèse des protéines et dans la mitose (voir revues générales de BRACHET (47)).

Le rôle des acides ribonucléiques a été précisé ces dernières années et sera développé dans le paragraphe IV de ce chapitre.

II - PHYSICO-CHIMIE DES ACIDES NUCLEIQUES.

A - LES CONSTITUANTS.

1°) Les produits d'hydrolyse totale.

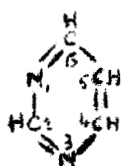
L'hydrolyse totale d'un acide nucléique conduit à trois sortes de composants : de l'acide orthophosphorique, un pentose et 4 bases azotées.

a) Les Bases.

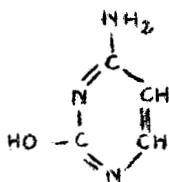
Les bases appartiennent à deux séries de dérivés hétérocycliques et se rattachent aux schémas de la pyrimidine ou de la purine dans lesquels un ou plusieurs atomes d'hydrogène sont substitués par des fonctions hydroxyles ou amines (Fig. 1). Les bases pyrimidiques sont : la cytosine (2-hydroxy-6-amino-pyrimidine) ; l'uracile (2,6-dihydroxypyrimidine) et la thymine (5-méthyl-uracile). Les bases puriques sont : la guanine (2-amino-6-hydroxy-purine) et l'adénine (6-amino-purine). La guanine, l'adénine et la cytosine sont communes aux deux types d'acides nucléiques, tandis que l'uracile n'existe que dans les ARN et la thymine que dans les ADN.*

Les bases peuvent exister sous deux formes tautomères, l'une contenant des groupes NH_2 et C=O (forme lactame), l'autre contenant des groupes $=\text{NH}$ et C-OH (forme lactime). Ces bases absorbent fortement la lumière ultra-violette et l'on met à profit cette propriété pour les identifier et pour les doser. Chaque base possède, en effet, un maximum et un minimum d'absorption caractéristiques qui varient avec le pH du milieu. Elles transmettent cette propriété aux composés qui les renferment dans leur molécule.

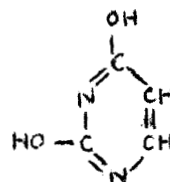
* La thymine a cependant été mise en évidence dans certains ARN : les ARN solubles (voir page 11)



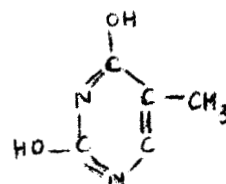
Pyrimidine



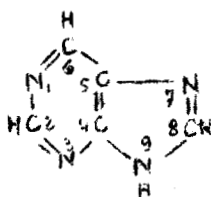
Cytosine



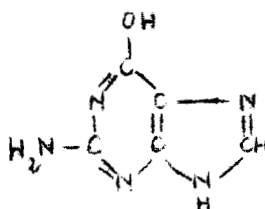
Uracile



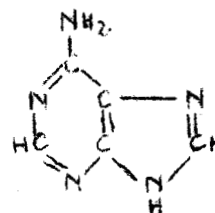
Thymine



Purine



Guanine



Adénine

FIGURE 1



Formules des bases puriques et pyrimidiques constituant les acides nucléiques.

Composants mineurs des acides ribonucléiques. (✱)

Les acides ribonucléiques de diverses origines renferment, outre les 4 bases "conventionnelles", -guanine, adénine, cytosine et uracile-, de faibles quantités de dérivés de substitution de ces dernières. Jusqu'à présent, les bases suivantes ont été identifiées :

- la thymine
- la 1-méthyl-guanine
- la 2-méthylamino-6-hydroxy-purine
- la 2-diméthylamino-6-hydroxy-purine
- la 2-méthyl-adénine
- la 6-méthyl-amino-purine
- la 6-diméthylamino-purine
- la 5-méthylcytosine
- le 5-ribosyluracile

Ces bases sont généralement présentes à l'état de traces dans les acides ribonucléiques "totaux" des cellules. Toutefois, les acides ribonucléiques "solubles" (ARNS) (voir p.26) en renferment des quantités non négligeables (comme le montre le Tableau A) et la mise au point de procédés de séparation et de dosage de ces composés devient une absolue nécessité. En outre, on ne peut exclure à priori l'idée que certains des acides nucléiques "anormaux", comme les acides nucléiques des tissus cancéreux, n'en soient particulièrement riches et les premiers résultats acquis dans ce domaine sont en faveur de cette hypothèse (Tableau B).

(✱) Voir revues générales de ALLEN (48) et de COHN (49).

TABLEAU A

COMPOSITION CENTESIMALE D'ACIDES RIBONUCLEIQUES SOLUBLES.
(ARNS)

	E.coli (x)	Foie de Rat (xx)
Guanine	32,1	29,2
Adénine	20,3	19,7
Cytosine	28,9	28,8
Uracile	15	18,2
Thymine	1,1	-
1-méthyl-guanine	0,1	-
6-méthyl-aminopurine	0,1	-
2-méthyl-adénine	0,3	-
5-ribosyluracile	2,1	3,95

(x) DUNN & Coll. (50)

(xx) OSAWA (51)

TABLEAU B

RESIDUS DE BASES METHYLEES (p. 100 résidus d'uracile) DANS
LES ACIDE RIBONUCLEIQUES SOLUBLES (ARNS) DE FOIE NORMAL ET
DE TISSU TUMORAL DE LA SOURIS (d'après BERGQVIST & MATTHEWS)
(52)

	Foie normal	Foie hépatomateux
1-méthyl-guanine	0,86	1,03
2-méthylamino-6-hydroxy- purine	5,2	12,40
2-diméthylamino-6-hydroxy- purine	1,36	3,20
2-méthyl-adénine	0,10	0,10
6-méthyl-aminopurine	0,78	4,20
6-diméthylamino-purine	0,55	1,16

b) Les Glucides.

Les acides nucléiques renferment généralement des pentoses : le D-ribose dans le cas des ARN et le 2-désoxy-D-ribose dans celui des ADN (Fig.2). La présence de ce dernier, qui est très labile, explique la grande fragilité des ADN vis-à-vis des agents d'hydrolyse acide, tandis que les dérivés du ribose - en particulier les dérivés pyrimidiques - sont plus stables et cette notion sera mise à profit dans le choix des procédés d'hydrolyse des acides nucléiques (voir p. 84).

Les pentoses ne sont pas les constituants glucidiques exclusifs des acides nucléiques : on trouve, par exemple, le D-glucose, dans les acides nucléiques phagiques.

c) L'acide phosphorique.

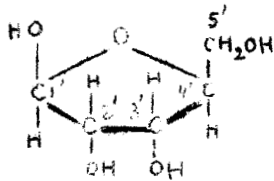
L'acide phosphorique constituant les acides nucléiques est l'acide orthophosphorique. Il convient toutefois de signaler que des complexes d'acides ribonucléiques et de poly ou métaphosphates ont été isolés de la Levure (voir à ce sujet les travaux de EBEL & Coll.) (53).

2°) Les produits d'hydrolyse partielle.

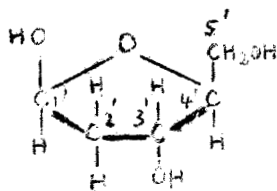
L'hydrolyse chimique ou enzymatique des acides nucléiques conduit à des produits d'association des bases et des glucides que l'on appelle des nucléosides et à des esters phosphoriques de ces derniers qui sont des nucléotides.

a) Les nucléosides.

Les nucléosides ne sont pas réducteurs : la fonction semi-acétalique de l'ose est donc engagée dans la liaison glucosidique. La labilité particulière de celle-ci laisse supposer qu'elle se fait par l'intermédiaire d'un atome d'azote. Les nucléosides sont donc des N-ribosides, ou des N-désoxyribosides dans lesquels le pentose se trouve sous



D-ribose
(ARN)



2-désoxy-D-ribose
(ADN)



FIGURE 2

Formules des oses constituant les acides nucléiques.
(forme furannique)

sa forme furannique. Les propriétés physiques et chimiques de ces composés et les expériences de synthèse ont permis de conclure que les nucléosides sont des β -osides et que les nucléosides puriques sont des N_9 -osides et les nucléosides pyrimidiques des N_3 -osides.

Les nucléosides absorbent la lumière ultra-violette et possèdent, comme les bases correspondantes, des maxima et des minima d'absorption caractéristiques. Les ribosides sont stables vis-à-vis des alcalis. Les ribosides puriques sont facilement hydrolysés par les acides dilués (SO_4H_2 N à 100° (1 h.)), mais les ribosides pyrimidiques résistent énergiquement à l'hydrolyse acide, Au contraire, les désoxyribonucléosides (ou désoxyribosides) sont très instables en milieu acide. Les nucléosides sont préparés par déphosphorylation enzymatique des nucléotides.

b) Les nucléotides.

L'hydrolyse chimique (hydrolyse par la soude ou par la potasse, dans le cas des acides ribonucléiques) ou enzymatique (hydrolyse des deux types d'acides) par des phosphodi-estérases, conduit à des nucléotides qui résultent de l'association d'une base, d'un glucide et d'acide phosphorique. Cette définition laisse présager de l'existence de nombreux isomères : isomères de position du reste phosphoryle sur le pentose ; isomères cycliques ; présence d'un ou deux restes "phosphoryle". Une nomenclature précise a été instituée qui répond aux règles suivantes :

- 1. Les nucléotides seront des ribonucléotides (ou ribotides) ou des désoxyribonucléotides (ou désoxyribotides)
- 2. Ils seront puriques ou pyrimidiques
- 3. Ils seront appelés nucléosides phosphates ou nucléosides-polyphosphates suivant qu'ils renfermeront un ou plusieurs restes "phosphoryle" et l'on précisera alors la position de

ceux-ci sur le pentose, en affectant les chiffres du signe "prime" afin d'éviter toute confusion avec la désignation des atomes de l'hétérocycle.

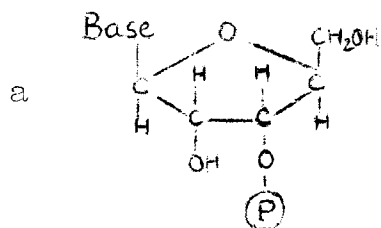
Nous limiterons notre présentation aux ribonucléotides présents dans les hydrolysats d'ARN.

Les ribosides-2' et 3'-phosphates (Fig. 3a et b) coexistent dans les hydrolysats alcalins des ARN où leur présence s'explique par le mécanisme même de l'hydrolyse sodique ou potassique des ARN (voir p.23). Ce sont les acides uridylique, cytidylique, guanylique et adénylique. L'isomère 3' est seul présent dans les hydrolysats ribonucléasiques des ARN.

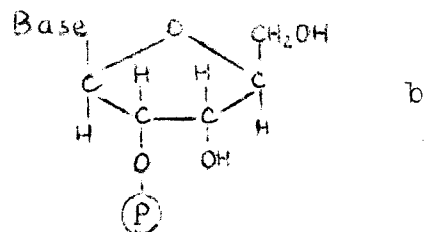
Les ribosides-5'-phosphates (Fig. 3c) se forment au cours de l'hydrolyse des ARN par des phosphodiesterases (phospho-diesterase de venin de Serpent, par exemple).

Les ribosides-2', 3'-phosphates (Fig. 3d) sont des nucléotides cycliques qui apparaissent transitoirement dans les hydrolysats d'ARN par la soude diluée (voir p.23) ou par la ribonucléase. Ils sont désignés par l'initiale de la base qui les constitue suivie d'un point d'exclamation (par exemple : A !). Selon certains auteurs, ils préexisteraient dans des ARN où ils se trouveraient en position terminale. Leur hydrolyse par les alcalis conduit au mélange des deux isomères 2' et 3'.

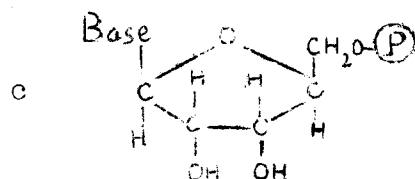
Les nucléosides-diphosphates (Fig. 3e) sont présents dans les hydrolysats alcalins d'ARN et proviennent de la coupure de la liaison phospho-diester du nucléotide en position P-terminale. (voir p. 25).



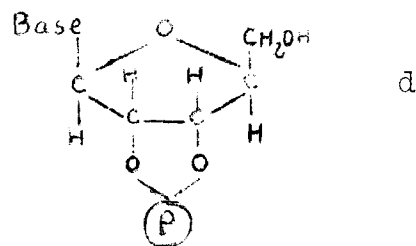
Nucléoside 3' phosphate



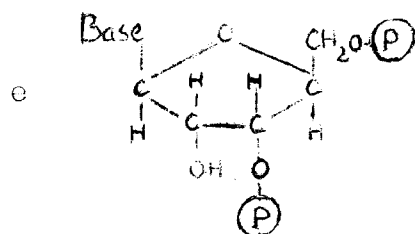
Nucléoside 2' phosphate



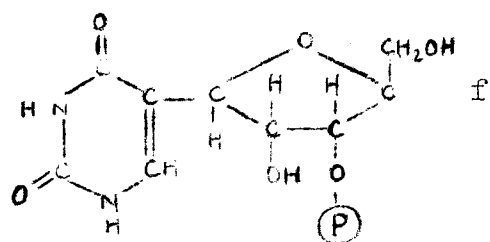
Nucléoside 5' phosphate



Nucléoside 2'3' phosphate



Nucléoside 3'5' diphosphate



Acide pseudo-uridylique
(isonère 3')

FIGURE 3

Formules des nucléotides présents dans les hydrolysats
d'ARN.

(Le signe $\textcircled{\text{P}}$ désigne le groupement "phosphoryle")

L'acide pseudo-uridylique (Fig. 3f) possède une configuration particulière puisque la liaison du ribose et de l'uracile est du type C-C. L'acide pseudo-uridylique, que l'on désigne par le signe Ψ U, est un constituant des acides ribonucléiques solubles (ARNS) du cytoplasme (voir p. 26) qui en renferment, suivant leur origine de 5 à 25 résidus pour 100 résidus d'acide uridylique.

Les nucléotides sont actifs sur la lumière polarisée et possèdent un spectre d'absorption caractéristique. Ils sont solubles dans l'eau, les solutions alcalines et dans les acides dilués ^{*}. Ils sont insolubles dans les solvants organiques. Ce sont des acides forts et leur acidité est supérieure à celle des orthophosphates minéraux. Ils donnent des sels bien cristallisés. Ils sont déphosphorylés sous l'action de l'ammoniaque concentré à 16 p. 100 à 180° pendant 3 heures (LEVENE & JACOBS) (54) ou de la pyridine à 50 p. 100 à l'ébullition pendant 5 jours (BREDEREK) (55) ou sous l'action des nucléotidases. Les nucléotides puriques sont très sensibles à l'action des acides dilués : ils sont totalement hydrolysés par HCl N à 100°C pendant 1 heure en libérant les bases et une faible proportion de nucléosides (5 à 10 p. 100). Les nucléotides pyrimidiques, au contraire, sont très stables et leur hydrolyse nécessite l'emploi d'acides concentrés et de températures élevées : acide formique pur à 175°C (**), acide perchlorique 12 N à 100°C ou acide chlorhydrique 6 N à 120°C.

^{*} L'acide guanylique est difficilement soluble dans l'eau, dans les solutions ammoniacales et dans l'acide chlorhydrique 0,01 N.

(**) Même dans ces conditions brutales, l'acide uridylique est incomplètement hydrolysé.

B -- LES ACIDES NUCLEIQUES.

De très nombreux travaux relatifs à la physico-chimie des acides nucléiques ont été effectués depuis plus d'un siècle et principalement dans la dernière décade. Aussi ne décrirons-nous sous une forme résumée, que les résultats qui sont indispensables à l'argumentation de notre mémoire.

1°) Acides Désoxyribonucléiques (ADN).

Les ADN sont des polynucléotides de poids moléculaire élevé, (de l'ordre de plusieurs millions). L'union des désoxyribonucléotides est réalisée par des liaisons "3', 5'-phosphodiester". Cette structure primaire a été démontrée par CARTER (56), et par MICHELSON & SCODD (57) qui ont prouvé que les désoxyribonucléotides sont des nucléosides-5'-phosphate et par DEKKER & Coll. (58) qui ont isolé des hydrolysats acides de l'ADN du sperme de Hareng, les acides thymidine- et cytidine-3', 5'-diphosphoriques.

L'étude physique de l'ADN et, en particulier, la microscopie électronique (SCOTT (59)) ont montré que la molécule est une fibre de $20 \overset{0}{\text{Å}}$ d'épaisseur. L'utilisation des rayons X (WILKINS & Coll.)(60-61), (FRANKLIN & Coll.)(62) a permis à WATSON & CRICK (63)(64) de proposer pour cette fibre la représentation suivante : deux chaînes polynucléotidiques enroulées en spirale autour d'un axe commun et unies par des "ponts hydrogène". Les bases puriques et pyrimidiques sont orientées vers l'intérieur de la fibre et disposées perpendiculairement à l'axe, tandis que le pentose et le radical phosphoryle se trouvent en position externe et sont par conséquent seuls accessibles à la titration. Les ponts hydrogène unissent toujours une base purique et une base pyrimidique par l'intermédiaire de la fonction CO du carbone 6 d'une base et la fonction NH_2 du carbone 6 de la base opposée. L'adénine s'apparie toujours avec la thymine

et la guanine avec la cytosine (Fig.4).

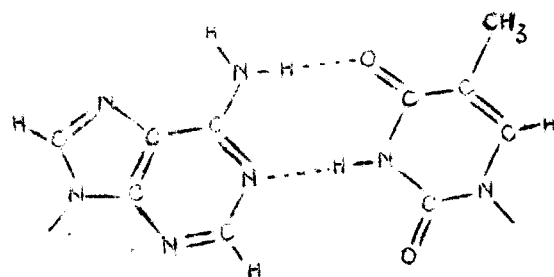
La molécule d'ADN peut donc être comparée à une échelle hélicoïdale dont les montants seraient constitués par l'enchaînement de désoxyribose et de groupe phosphoryle et dont les barreaux seraient représentés par les bases appariées (Fig. 5 et 6).

Les molécules d'ADN ne sont pas stables et l'on sépare aisément les deux chaînes polynucléotidiques par un simple chauffage d'une solution saline à 70-80° (x). Ce mécanisme entraîne une modification des caractéristiques physiques de la molécule (viscosité, absorption de la lumière; pouvoir rotatoire, etc...). Par refroidissement très lent de ces solutions les deux chaînes peuvent se réassocier pour reformer une double hélice.

La représentation en double hélice de l'ADN est en parfait accord avec les données analytiques concernant la composition de cette macromolécule (WYATT) (65); (CHARGAFF) (66). En effet, les rapports : bases puriques/bases pyrimidiques; adénine/thymine; guanine/cytosine; fonction 6 CO/fonction 6 NH₂, sont tous égaux à 1, quelle que soit la source de l'ADN étudié. Cependant, la composition des ADN varie suivant les organismes dont ils proviennent (voir par exemple, les revues générales de CHARGAFF (67) et de BOULANGER & MONTREUIL (68)). Elle est constante dans les divers organes d'une même espèce et elle est caractéristique de cette espèce. Cette spécificité des ADN s'accorde parfaitement avec le rôle de support chimique des caractères héréditaires qui leur est attribué.

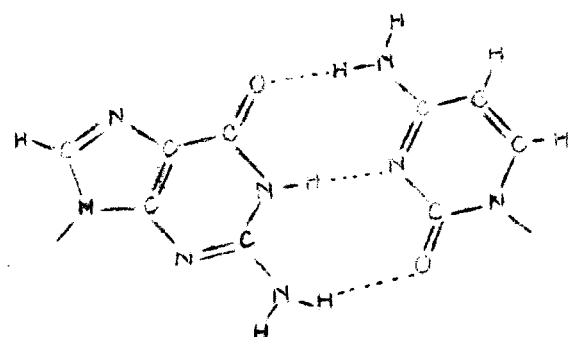
La séquence des nucléotides à l'intérieur des chaînes d'ADN n'est pas encore connue. Cette séquence représente le code génétique lui-même : chaque gène est caractérisé par un enchaînement défini de nucléotides. Cette notion sera développée à propos de la Biochimie de l'hérédité (voir p.52).

(x) ou par les solutions concentrées d'urée.



Adénine

Thymine



Guanine

Cytosine



FIGURE 4

Appariement des bases dans la molécule d'ADN.

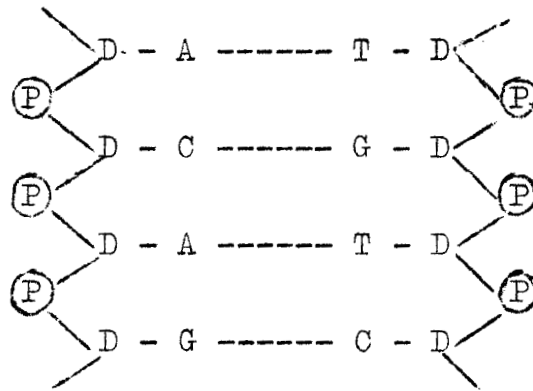


FIGURE 5

Schéma d'un fragment de molécule d'ADN.

P : groupe "phosphoryle" ; D : désoxyribose ;
A : adénine ; G : guanine ; C : cytosine ;
T : thymine.

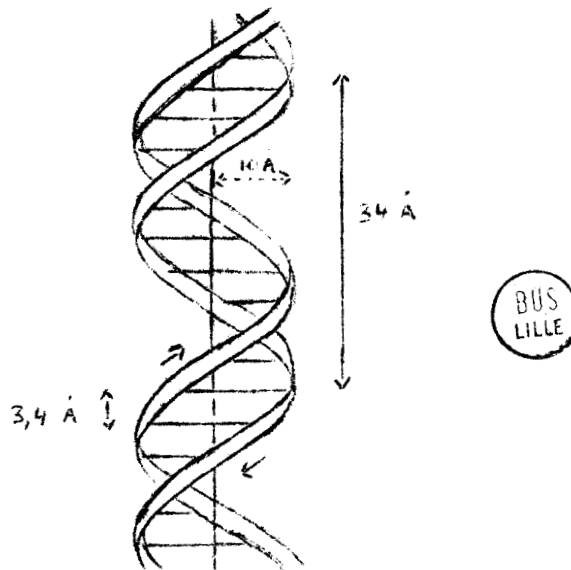


FIGURE 6

Structure en hélice de l'ADN, proposée par
WATSON & CRICK.

2°) Acides ribonucléiques.

1) Structure des ARN.

Les ARN sont des polyribonucléotides et LEVENE (69) en 1926, avait émis l'hypothèse que l'unité structurale fondamentale était un tétranucléotide constitué par l'union des 4 nucléotides différents et que les nucléotides puriques et pyrimidiques alternaient régulièrement au sein de cette molécule. Le schéma qu'il proposait reposait sur les résultats suivants :

a - L'ARN de Levure possède 4 bases différentes en proportions équimoléculaires

b - Les expériences de titration effectuées par l'auteur éliminaient l'éventualité d'une liaison des nucléotides par l'intermédiaire des radicaux de ribose et des restes phosphoryles. Elles révélaient en effet la présence de 4 fonctions acides primaires et une fonction acide secondaire.

Cette hypothèse fut longtemps étayée par un résultat obtenu par MYRBACK & JORPES (70) concernant le poids moléculaire d'un ARN qu'ils avaient trouvé égal à $1,31 \times 10^3$. Le poids moléculaire du tétranucléotide structural est en effet de 1300. Cependant, aucun argument expérimental n'est venu confirmer par la suite l'existence de ce tétranucléotide régulier et des méthodes analytiques plus rigoureuses ont montré que, dans les molécules d'ARN, les bases n'étaient pas réparties en proportions équimoléculaires. L'hypothèse du tétranucléotide structural ou statistique (polymérisation du précédent) est depuis longtemps abandonnée, mais les travaux de LEVENE et ceux de FLETCHNER, GULLAND & JORDAN (71) avaient toutefois établi que les nucléotides étaient unis par une liaison phospho-diester. Le ribose, dans un nucléoside, possédant 3 fonctions alcool libres (en 2', 3' et 5'), il existe plusieurs points d'attache possibles des liaisons internucléotidiques.

Nous avons vu, à propos des constituants des acides nucléiques, que les nucléotides libérés au cours de l'hydrolyse alcaline des ARN étaient un mélange de nucléosides-2' et 3'-phosphates. La présence de ces nucléotides s'explique par le mécanisme même de l'hydrolyse alcaline (sodique ou potassique) qui implique dans un premier temps, la formation d'un triester, puis l'hydrolyse de la liaison internucléotidique et enfin l'ouverture en a ou en b du nucléotide cyclique instable (MARKHAM & SMITH) (72) ; (BROWN & TODD)(73) (Fig.7). D'autre part, l'hydrolyse ribonucléasique conduit toujours aux nucléosides-3'-phosphates, tandis que l'hydrolyse par la phosphodiesterase de venin de serpent fournit des nucléosides-5'-phosphates. On peut donc conclure, que la liaison internucléotidique est, dans les ARN, du type 3', 5'-phosphodiester (Fig.8).

Mais, si le mode d'union des nucléotides est bien établi, la structure primaire de la chaîne ribonucléique suscite encore de nombreuses controverses et reste, pour l'instant pratiquement inconnue.

2) Hétérogénéité des ARN.

La sensibilité particulière des ARN aux enzymes de dépolymérisation et aux sels minéraux présents dans les solutions d'extraction a longtemps retardé la connaissance de leurs poids moléculaires exacts. En effet, la dégradation partielle des ARN au cours de leur isolement conduisait toujours à des préparations constituées par des mélanges de composés, de poids moléculaires très variables. L'amélioration des procédés d'extraction des ARN tissulaires a permis d'obtenir des ARN "natifs", sans toutefois éliminer la notion d'hétérogénéité. Actuellement, on connaît trois types d'ARN distincts par leurs propriétés physico-chimiques et par leur rôle biochimique : les ARN "solubles", les ARN ribosomiaux et les ARN "messagers".

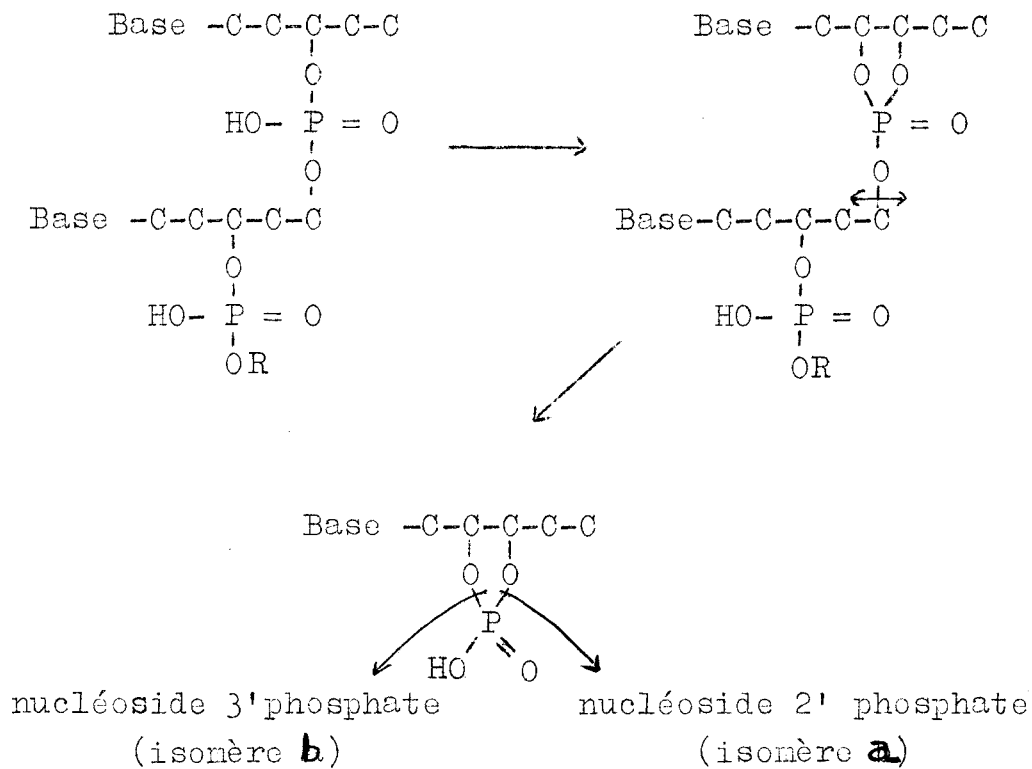


FIGURE 7

Schéma de l'hydrolyse alcaline des ARN

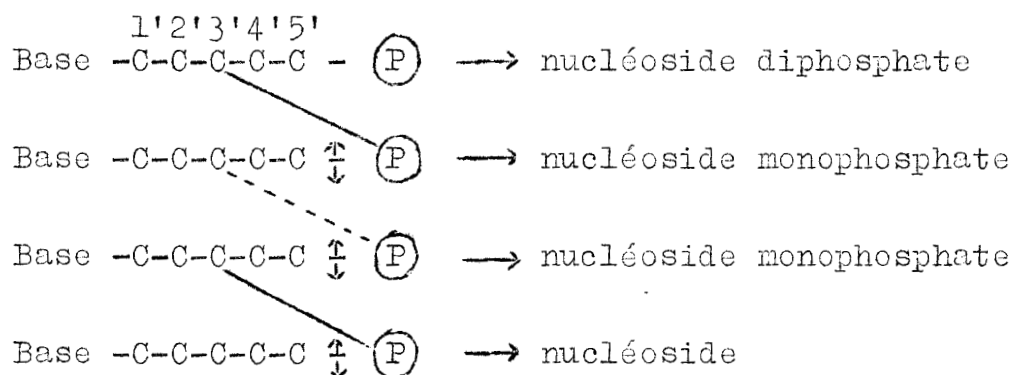


FIGURE 8



Schéma de structure des acides ribonucléiques.
 (Les doubles flèches ↕ indiquent les points
 d'attaque de l'hydrolyse alcaline).

a) ARN "solubles" (ARNS)

La purification des ARN cellulaires totaux, par précipitation de leurs solutions par le chlorure de sodium 1 M a montré que ces ARN étaient hétérogènes. En effet, certains précipitent tandis que d'autres restent en solution (CRESTFIELD & Coll.)(74); (DAVIS & ALLEN)(75); (MIURA & Coll.)(76); (KAWADE & Coll.)(77); (COLTER & Coll.)(78); (BROWN & Coll.)(79)). Les ARN ainsi obtenus sont différents par leurs poids moléculaires (MIURA & Coll.)(80) par leur comportement électrophorétique en gel de silice (HARRIS & DAVIS)(81) et par leur composition en nucléotides (LIPSHITZ & CHARGAFF)(82).

Les ARN solubles dans le chlorure de sodium M ont été identifiés aux ARN de la solution cytoplasmique (OTAKA & Coll.)(83), (SMITH)(84), (et appelés, pour cette raison ARN "solubles" ou ARNS), à l'ARN pH 5 obtenu par précipitation à pH 5 de la solution cytoplasmique (HOAGLAND)(85) et aux "ARN de transfert" (SMITH)(86), (BROWN)(87) (MEROLA & DAVIS)(88) des acides aminés du milieu cellulaire vers les ribosomes, sièges des synthèses protéiques. Ils semblent être identiques pour toutes les espèces (CANTONI & Coll.)(89). On les a caractérisé, à la fois dans le "suc" nucléaire et dans le "suc" cytoplasmique. Il s'agit d'ARN "libres" non conjugués à des protéines, dont les caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes, (voir revues générales de SPIRIN (90) et de BROWN (91) :

1 - La molécule est constituée par l'association de 80 nucléotides et possède une longueur de 100 Å. Elle est formée d'une seule chaîne enroulée en une double spirale analogue à celle des ADN, avec les appariements G-C et A-U classiques. Cette structure a été confirmée par les spectres de diffraction des rayons X. Deux schémas différents ont été proposés pour représenter la molécule d'ARNS (Fig. 9a et b).

2 - Ils possèdent une constante de sédimentation de 4 S et un poids moléculaire de 25.000 ± 1.000 . Par chauffage à 100°C , on obtient un composé cristallisable de constante de sédimentation de 2,5 S et d'un poids moléculaire de 10.000. Ce résultat est en faveur du schéma de structure b de la Fig.9.

3 - Les ARN S renferment des proportions non négligeables de bases "anormales" : pseudo-uracile (4 p. 100 environ), thymine (1 p. 100 environ), 5-méthyl-cytosine et de petites quantités de bases puriques méthylées (voir p.11).

4 - Les séquences nucléotidiques sont spécifiques de chaque ARNS. Toutefois, certains enchaînements sont communs à tous les ARNS ; les molécules d'ARNS commencent par un résidu guanylique, (porteur d'un reste phosphoryle en 3') et se terminent par la séquence cytidyl-cytidyl-adénylique. Le triplet nucléotidique terminal n'est donc pas spécifique.

5 - Au contraire, le triplet subterminal est spécifique de l'acide aminé dont l'ARNS est responsable du transfert : par exemple ce triplet est G-C-A pour la leucine et U-C-A pour l'isoleucine (LAGERKVIST & BERG (92) ; BERG & Coll. (93)). L'acide aminé se fixe par son carboxyle sur l'OH en 3' du ribose de l'acide adénylique terminal. (Fig. 10).

6 - Dans la "courbure" de la double hélice trois nucléotides ne sont pas appariés avec des nucléotides complémentaires. Ils permettraient, selon les auteurs, la fixation de l'aminoacyl-ARNS sur l'ARN "messenger", par l'intermédiaire d'un triplet nucléotidique complémentaire (voir Fig.22 ; p. 59).

b) ARN "ribosomaux".(ARNR)

Les ARN insolubles dans le chlorure de sodium M ont été identifiés aux ARN ribosomaux. Ils ont été fractionnés en ARN 16 S et 23 S chez les bactéries et en ARN 18 S et 28 S chez les mammifères. Ces ARN sont les constituants "majeurs" des ARN cellulaires : ils existent sous la forme de nucléoprotéines que l'on trouve libres dans le cytoplasme et dans le suc nucléaire (ribosomes) ou associées au réticulum endoplasmique (grains de PALADE) (¶). Les ribosomes les plus abondants (70-80 S) ont un PM de l'ordre de 3 millions et se dissocient en sous-unités 30 S et 50 S lorsque le milieu est pauvre en ions Mg^{++} (GROS & Coll.)(94). Ils s'associent entre eux pour former des agrégats appelés polysomes ou ergosomes. Ces derniers ont été mis en évidence, au microscope électronique, non seulement dans des préparations acellulaires, mais aussi dans les cellules elles-mêmes (voir à ce sujet, la revue générale de MUNRO & Coll. (95)). Il s'agit de ribosomes attachés en nombre variable (de 3 à 40 environ) à une molécule linéaire d'ARN que certains auteurs identifient à l'ARN "messenger".

Les principales propriétés des ARN "ribosomaux" sont les suivantes : (voir revue générale de SPIRIN (96))

1 - Il s'agit d'ARN de poids moléculaire élevé : $5,6 \times 10^5$ (16S) et $1,1 \times 10^6$ (23S) chez les bactéries, selon KURLAND (97) ; 6×10^5 (18S) et $1,3 \times 10^6$ (28S) chez les mammifères selon HALL & DOTY (98).

2 - Leur composition molaire varie dans de larges limites et les résultats contradictoires obtenus jusqu'à présent s'expliquent par la grande labilité des ARN "ribosomaux" vis-à-vis de la ribonucléase ou des sels minéraux présents dans les solutions d'extraction. Cependant, il semble que le nombre de fonctions $6 NH_2$ égale celui des fonctions $6 CO$ et que la somme $A + G$ égale la somme $C + U$.

(¶) Le "complexe" grains de PALADE -réticulum lipoprotéidique- constitue les "microsomes" (ou "fraction microsomale") de CLAUDE que l'on obtient par centrifugation différentielle

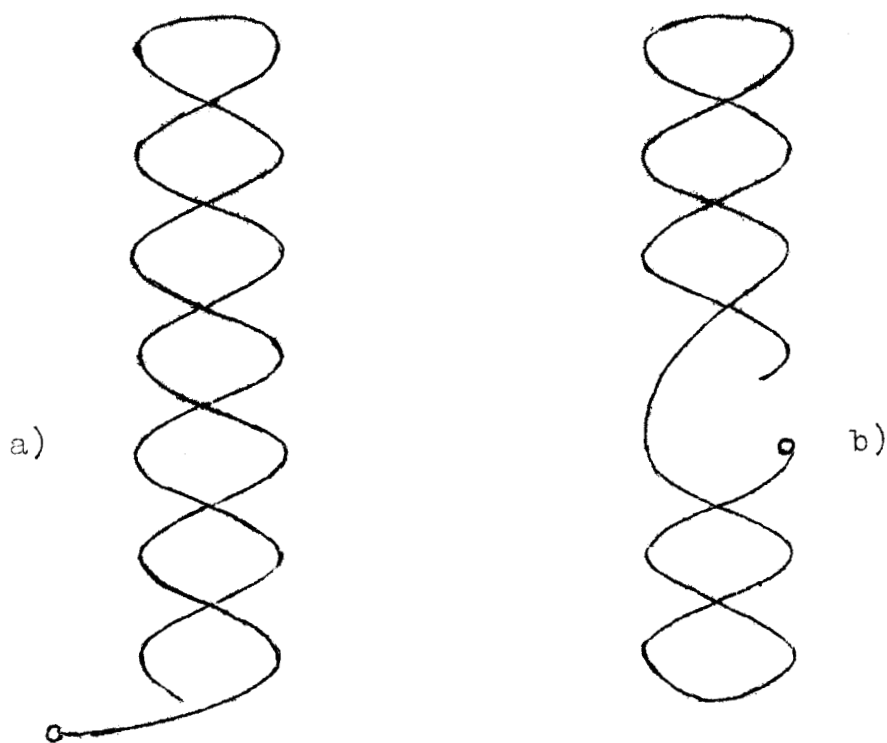


FIGURE 9

Schémas de structure des ARN solubles
(ARN S)

o : point d'attache de l'acide aminé



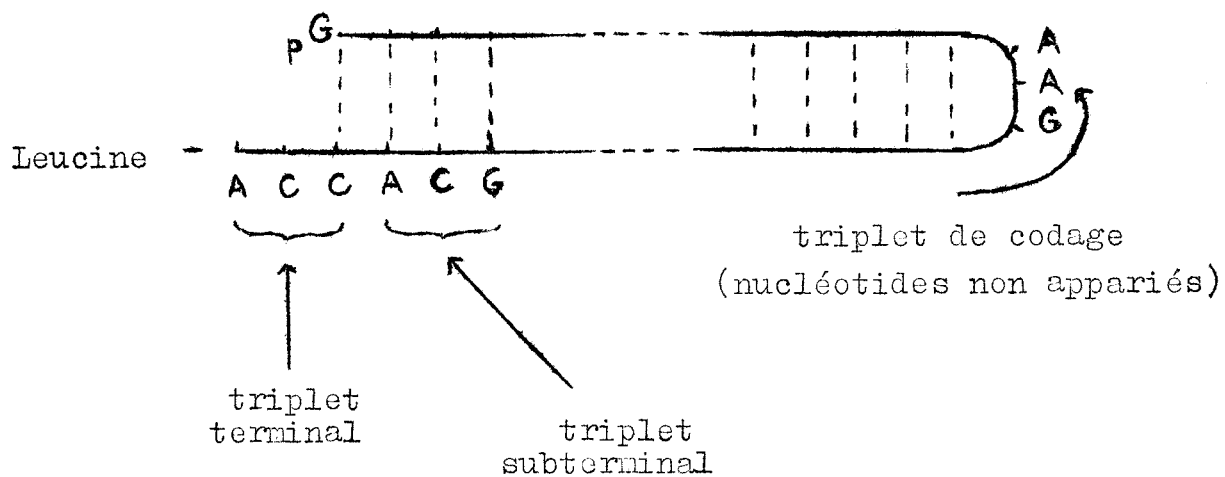


FIGURE 10

Schéma de structure de l'ARN S. responsable du
transfert de la leucine.

3 - Les spectres de diffraction des rayons X semblent démontrer l'existence d'une structure partielle en double hélice. Le schéma de la Fig. 11 illustre les conceptions actuelles concernant la structure des ARN "ribosomaux".

4 - Les ARN ribosomaux 16 S (ou 18 S) sont les constituants des particules ribosomales 30 S tandis que les ARN ribosomaux 23 S (ou 28 S) se trouvent dans les particules 50 S. L'association d'une particule 30 S et d'une particule 50 S donne un ribosome 70 S ; celle de deux ribosomes 70 S donne un ribosome 100 S. La cohésion de ces agrégats est en relation étroite avec la concentration en ions magnésium (Mg^{++}) du milieu.

c) ARN "messagers". (ARN m.)

L'existence d'acides ribonucléiques instables, à vitesse de renouvellement très élevée, a été démontrée par VOLKIN & ASTRACHAN, en 1956-1958 (99-100) par GROS & Coll. (101) et BRENNER & Coll. (102) chez les microorganismes. Ces acides ribonucléiques particuliers se formeraient par "moulage" sur les molécules d'ADN dont ils seraient des répliques exactes et, passant dans le cytoplasme, seraient le support actif de la synthèse des protéines (voir p.55). A ces acides ribonucléiques qui transportent les "informations" génétiques, JACOB & MONOD (103) ont donné le nom d'ARN "messagers". Ces ARN messagers ont été recherchés chez les mammifères par de très nombreux auteurs. Leurs propriétés sont encore mal connues, en raison même des difficultés que l'on rencontre à les isoler. Nous pouvons toutefois résumer leurs principales caractéristiques de la manière suivante : (voir revues générales de LUPMANN (104) et de GRUNBERG-MANAGO et GROS (105))

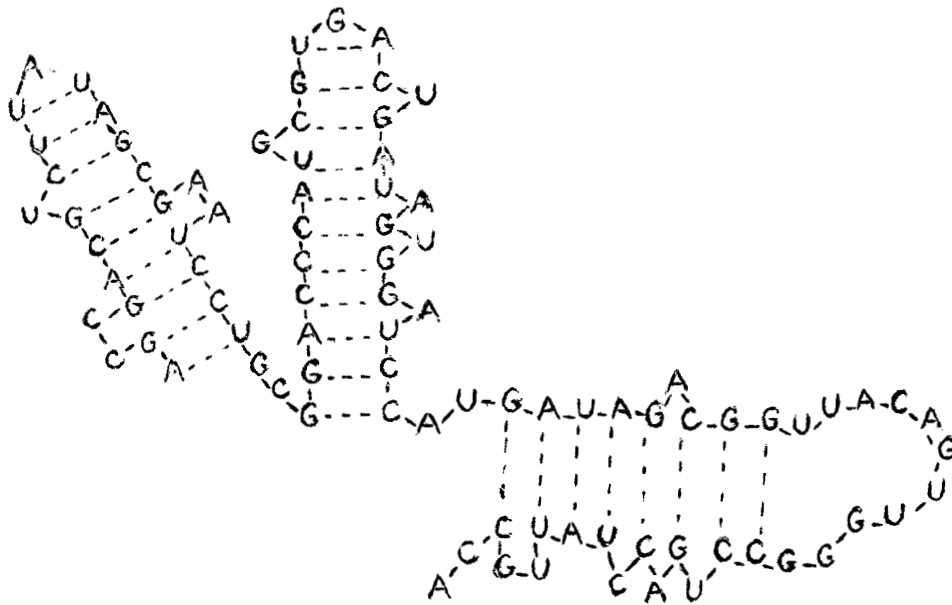


FIGURE 11

Schéma structural hypothétique des ARN macromolé-
culaires.

L'appariement des bases par des "ponts hydrogène"
est indiqué par des pointillés.

(d'après FRESCO & Coll. (106)).

1 - Les ARN "messagers" sont présents dans les cellules en très faible proportion, n'excédant pas 4 à 7 p. 100 des ARN totaux.

2 - Leur vitesse de renouvellement est extrêmement rapide et leur demi-vie est brève. (2 à 3 mn chez les bactéries ; 3 à 4 h. chez les cellules animales).

3 - Leur composition molaire se rapproche de celle des ADN. Chez les mammifères, elle est inverse de celle des autres ARN cellulaires : si la composition centésimale des ADN est

G : 20 C : 20 A : 30 T : 30

celle des ARN "messagers" sera théoriquement :

G : 20 C : 20 A : 30 U : 30

et celle des autres ARN :

G : 30 C : 30 A : 20 U : 20

4 - Le poids moléculaire des ARN "messagers" n'est pas défini avec précision. On sait, cependant qu'il s'agit de macromolécules de constante de sédimentation 6 à 30 S chez les bactéries. L'hétérogénéité est encore plus grande dans les cellules animales où l'on trouve en outre des molécules de constante de sédimentation supérieure à 30 S.

5 - Les ARN "messagers" s'associent in vivo et in vitro avec un nombre variable de ribosomes 70 ou 100 S pour former les ergosomes ou polysomes (Fig. 22 ; p. 59).

3) Fractionnement des ARN.

L'isolement et l'étude de ces différents ARN ont pu être réalisés ces dernières années, grâce aux perfectionnements apportés aux méthodes de préparation et de fractionnement des ARN (voir à ce sujet la revue générale de STAEHELIN (107)).

Les ARN solubles sont généralement préparés à partir de la "solution cytoplasmique" obtenue après élimination, par centrifugation, des particules cellulaires (voir p.181) ou à partir d'ARN totaux en mettant à profit leur caractère de solubilité dans le chlorure de sodium IM, propriété qui permet de les séparer des ARN ribosomiaux ainsi isolés.

Quelques essais de séparation des ARN solubles et des ARN ribosomiaux ont été faits par chromatographie sur colonne de cellulose modifiée (voir par exemple : GOLDTHWAIT & Coll. (108) ; BOSCH & Coll. (109) ; OSAWA (110) ; OTAKA & Coll. (111)) ou d'amidon cationique (SMITH & Coll. (112)). Mais ce sont surtout les méthodes de centrifugation en gradient de saccharose (McQUILLEN & Coll. (113) ; BRITTEN & Coll. (114)) et de chromatographie sur colonne de sérumalbumine méthylée (MANDELL & HERSHEY (115)) qui ont contribué le plus à la connaissance parfaite des différentes classes d'ARN. (voir par exemple : COCITO & Coll. (116) ; SUEOKA (117) ; TAKAI & Coll. (118) ; KUBINSKI & Coll. (119)).

Ces techniques de fractionnement ont permis en outre de confirmer l'hétérogénéité des ARN solubles (SUEOKA (120)) et de démontrer celle des ARN messagers (voir par exemple : TAKAI & Coll. (121) ; MONIER & Coll. (122) ; ISHIHAMA & Coll. (123)) et cette notion s'accorde parfaitement avec le rôle biologique que jouent ces ARN.

De nombreux travaux ont été consacrés au fractionnement des différents ARN solubles ; ceux-ci ont été séparés par la méthode de distribution à contre courant (HOLLEY & Coll. (124) ; EVERETT & Coll. (125) ; DOCTOR & Coll. (126) ; APGAR & Coll. (127) ; ZACHAU & Coll. (128) ; TADA & Coll. (129) ; WIESMEYER & Coll. (130) ; STAEHELIN & Coll. (131)), par chromatographie sur colonne de cellulose modifiée (HOAGLAND & Coll. (132) ; NISHIYAMA & Coll. (133) ; OFFENGAND & Coll. (134) ; BROWN & Coll. (135) ; KAWADA & Coll. (136)) ou d'amidon cationique (SMITH & Coll. (137)) ou sur colonne de phosphate de calcium (HARTMAN & Coll. (138) ; CANTONI (139)) ou encore par ultra-

centrifugation (IUBORSKY & CANTONI (140) ou gel filtration sur Séphadex (TANAKA & Coll. (141)) ou par chromatographie sur papier imprégné de DEAE cellulose[‡](JACOBSON & Coll.(142)). Il devient possible d'isoler l'ARN de transfert spécifique d'un amino-acide donné pour en étudier la composition et la séquence nucléotidique (voir par exemple : HOLLEY & Coll.(143)).

Quant au fractionnement des ARN messagers les expérimentations sont encore trop fragmentaires pour permettre une interprétation sérieuse des résultats (voir par exemple : BOLTON & McCARTHY (144) ; KIDSON & Coll. (145)).

[‡] DEAE cellulose : diéthylaminoéthylcellulose.

III - METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES.

Nous décrirons brièvement dans ce paragraphe les étapes essentielles du métabolisme des acides nucléiques dont la connaissance est indispensable pour discuter les résultats de nos travaux concernant le renouvellement du radio-phosphore dans les acides ribonucléiques tissulaires. La synthèse des acides nucléiques comporte les deux étapes suivantes :

A - Synthèse des nucléotides

B - Synthèse des acides nucléiques eux-mêmes.

A - SYNTHÈSE DES NUCLEOTIDES.

La cellule réalise la synthèse des nucléotides, soit à partir de précurseurs "non nucléiques" comme des acides aminés, des carbonates, des radicaux formyle (synthèse "de novo"), soit à partir de précurseurs "nucléiques" comme les bases et les nucléosides. La synthèse "de novo" conduit à la formation de deux ribonucléotides, l'un purique, l'acide inosinique, l'autre pyrimidique, l'acide uridylique, qui sont, par des réactions de conversion, à l'origine de tous les nucléotides, respectivement puriques et pyrimidiques. On sait d'autre part, que les désoxyribonucléotides se forment à partir des produits de la dégradation des ribonucléotides (bases et ribonucléosides) et des ribonucléotides eux-mêmes.

Le schéma général du métabolisme des ribo et des désoxyribonucléotides est illustré par la Fig. 12

Nous décrirons en premier lieu, les étapes de la synthèse des ribonucléotides puriques et pyrimidiques, à partir de précurseurs d'origine non nucléique ("synthèse de novo"). Nous exposerons ensuite le mécanisme de la formation des ribo et des désoxyribonucléotides à partir de précurseurs d'origine nucléique : les bases et les nucléosides.

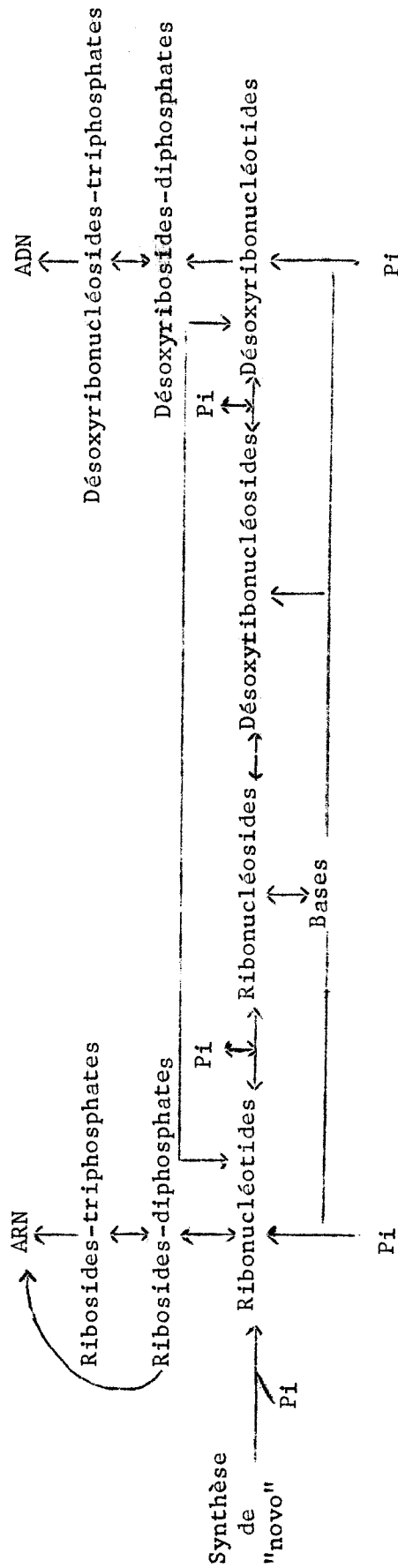


FIGURE 12

Réactions générales de synthèse et de conversion des
nucléotides et de synthèse des acides **nucléiques**

Les lettres Pi précisent les points d'incorporation de l'acide orthophosphorique dans les nucléosides-monophosphates.



1°) Synthèse des nucléotides à partir de précurseurs non nucléiques (Synthèse "de novo").

a) Synthèse "de novo" des ribonucléotides puriques.

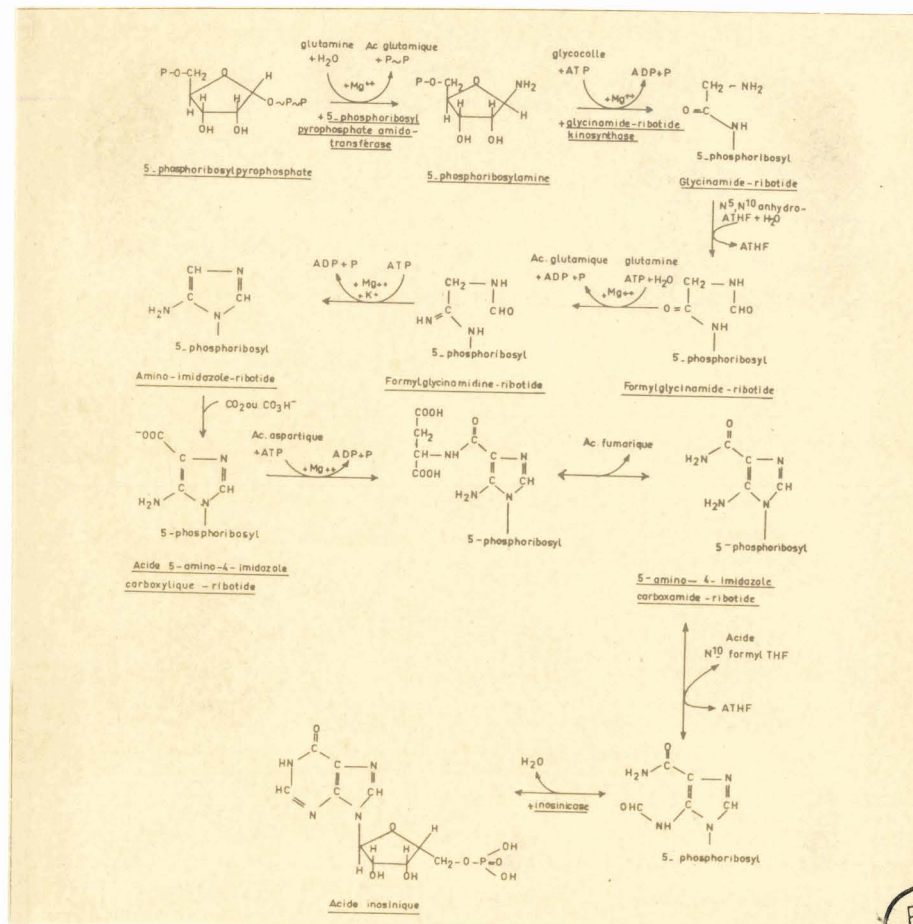
L'utilisation de composés marqués par des atomes de ^{14}C ou de ^{15}N a permis de reconstituer la voie de la synthèse du noyau purique et de démontrer que cet hétérocycle complexe se construisait à partir de molécules très simples : le glycolle, l'ammoniaque, le CO_2 , l'acide aspartique et des radicaux "formyl" transportés par des dérivés de l'acide folique. Les réactions métaboliques, rassemblées dans la Fig. 13, conduisent à l'acide inosinique qui donne par des réactions de conversion décrites dans la Fig. 14, les acide ribo-guanylique et ribo-adénylique.

b) Synthèse "de novo" des nucléotides pyrimidiques.

La synthèse "de novo" des nucléotides pyrimidiques conduit à la formation d'acide ribo-uridylique, à partir duquel se forment l'acide ribo-cytidylique, l'acide désoxyribo-cytidylique et l'acide désoxyribo-thymidylique, suivant le schéma de la Fig. 15.

2°) Synthèse des nucléotides à partir de précurseurs d'origine nucléique.

L'administration à des animaux d'expérience de bases et de nucléosides marqués par le radiocarbène et par le tritium est suivie d'une incorporation de ces composés dans les acides nucléiques. Les organismes sont donc capables d'effectuer la synthèse de nucléotides à partir de bases ou de nucléosides, et ce processus métabolique semble présenter la principale voie de formation des désoxyribonucléotides.



BUS
LILLE

FIGURE 13

Synthèse "de novo" de l'acide inosinique.

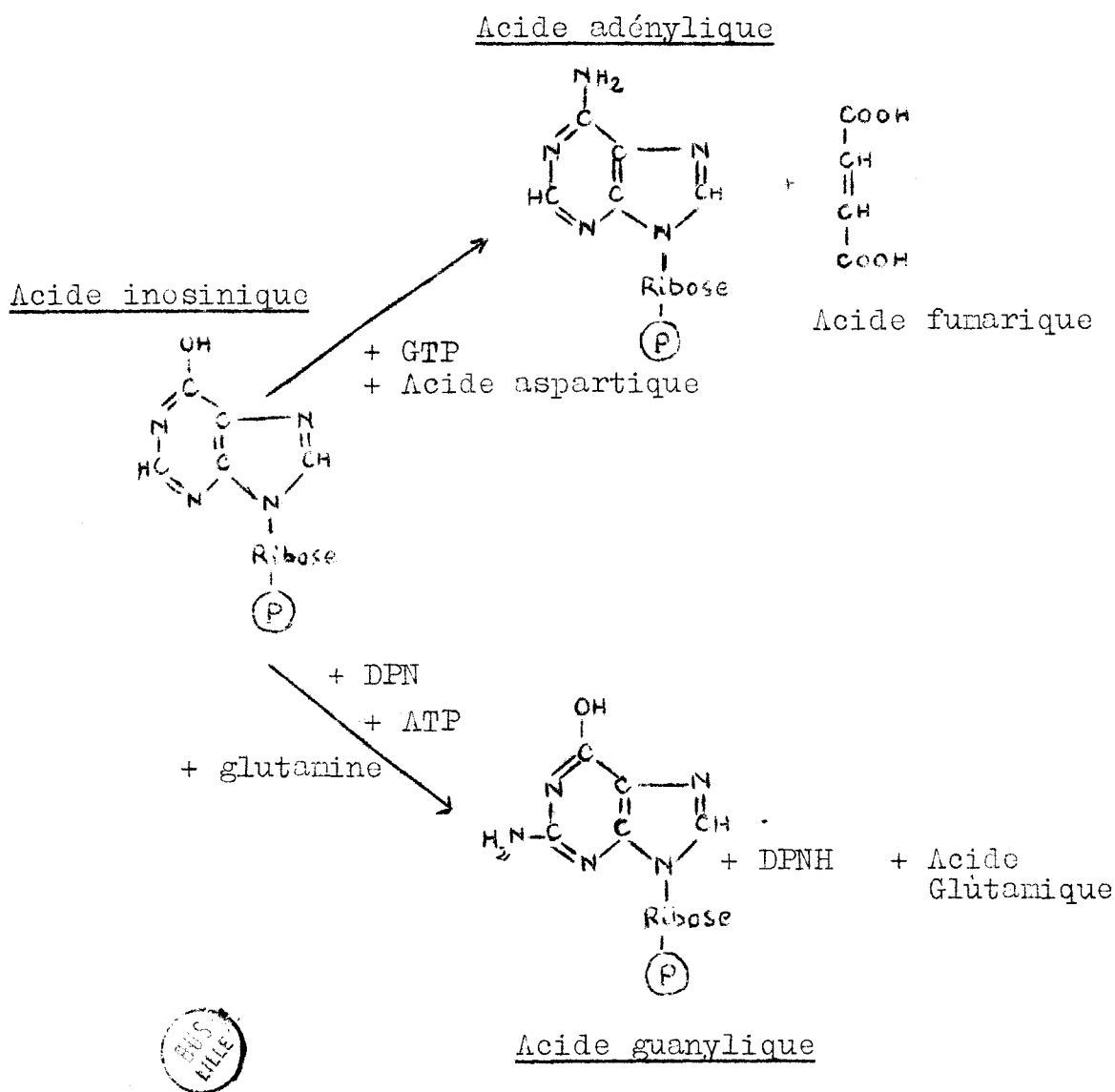


FIGURE 14

Synthèse des acides adénylique et guanylique à partir de l'acide inosinique.

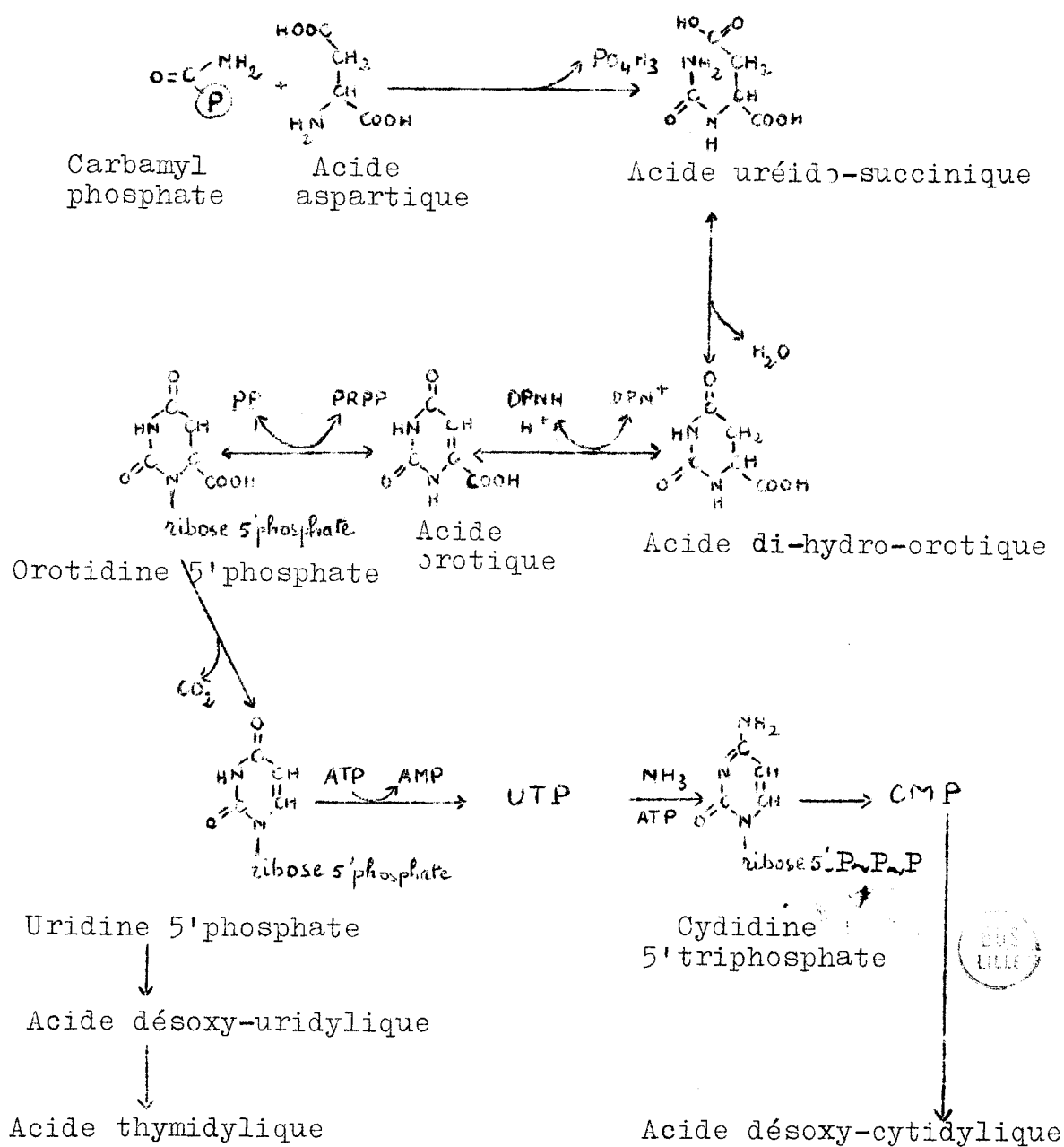


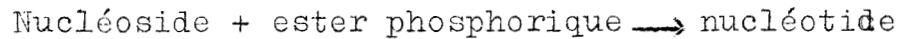
FIGURE 15

Biosynthèse des nucléotides pyrimidiques.

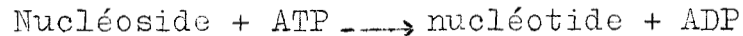
a) Formation des nucléotides à partir des nucléosides.

La phosphorylation des nucléosides est réalisée :

- soit par des phosphatases

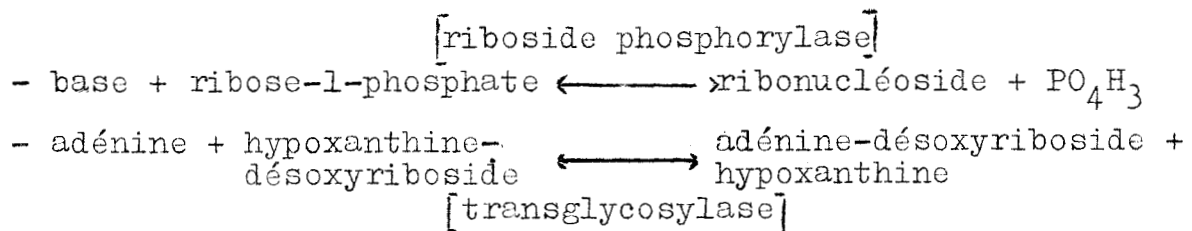


- soit par des nucléoside-phosphokinases



Origine des nucléosides.

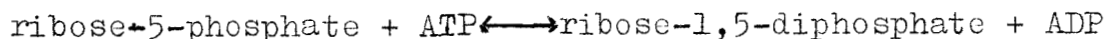
Les nucléosides possèdent une double origine. Ils proviennent en effet, soit des nucléotides, dont la déphosphorylation est réalisée par des phosphatases ou par des nucléotidases spécifiques, soit des bases sur lesquelles le pentose est greffé par des nucléoside-phosphorylases ou par des transglycosylases



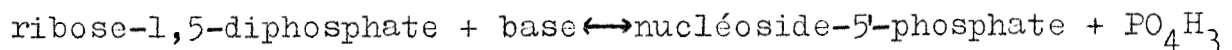
b) Formation des nucléotides à partir des bases.

Les nucléotides peuvent se former par condensation des bases avec l'acide 5-phospho-ribosylpyrophosphorique (PRPP) en présence d'une nucléotide-pyrophosphorylase. Le PRPP lui-même est synthétisé par l'action de la 5-phosphoribopyrophosphokinase sur le ribose-5-phosphate et l'ATP (Fig.16).

Selon KALCKAR, une 5-phosphoribokinase catalyse la réaction suivante :



Le ribose-1,5-diphosphate réagit ensuite sur les bases et donne lieu à la formation de nucléotides grâce à l'action d'une nucléotide-phosphorylase :



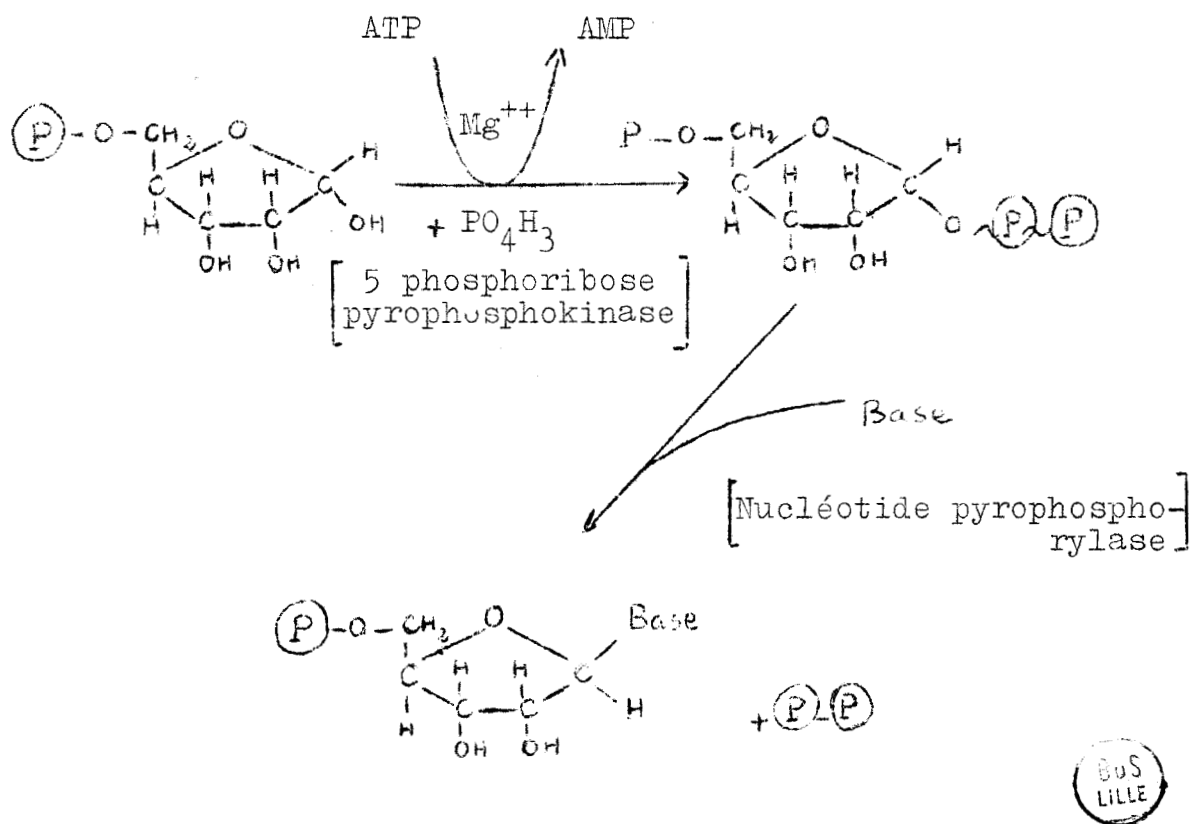
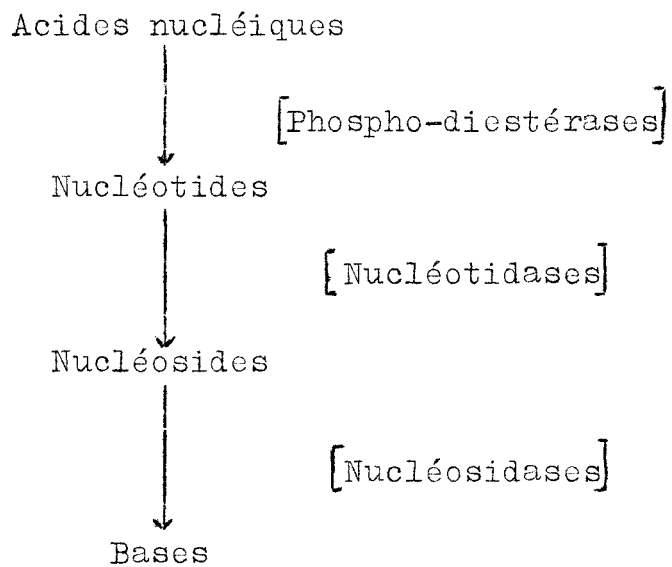


FIGURE 16

Biosynthèse du phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) et des nucléotides à partir du PRPP.

Origine des bases.

Les bases puriques et pyrimidiques proviennent essentiellement de la dégradation des nucléotides dont les étapes sont les suivantes :

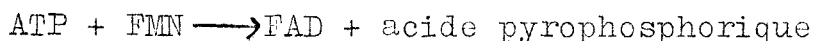
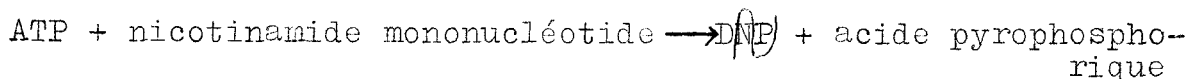


B - BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES.

Depuis les travaux de KORNBERG et d'OCHOA, on sait que les chaînes polynucléotidiques qui constituent les molécules d'acides nucléiques se forment à partir de nucléoside-polyphosphates selon des modalités légèrement différentes pour les deux types d'acides nucléiques.

1°) Biosynthèse des acides désoxyribonucléiques.

Les travaux de KORNBERG (146) ont permis de préciser les modalités de la synthèse des acides désoxyribonucléiques. L'auteur a démontré en utilisant des nucléotides marqués, que la formation des chaînes polynucléotidiques des acides désoxyribonucléiques s'effectuait suivant un mécanisme identique à celui qui conduit à la synthèse de coenzymes nucléotidiques, comme le diphosphopyridine-nucléotide (DPN) ou le flavine-adénine-dinucléotide (FAD) :



Sous l'action d'un enzyme extrait de E. Coli, l'ADN polymérase, un mélange des désoxyriboside-triphosphates (voir p. 47) de la guanine, de l'adénine, de la cytosine et de la thymine conduit en présence d'un acide désoxyribonucléique à la synthèse d'un acide désoxyribonucléique identique à celui qui a été introduit dans le milieu réactionnel et qui sert, semble-t-il, de modèle moléculaire. KORNBERG a démontré que le mécanisme d'allongement de la chaîne polynucléotidique s'effectuait conformément au schéma de la Fig.17.

L'étude de l'incorporation de désoxyribonucléosides triphosphates, marqués spécifiquement par le ^{32}P sur l'un des trois restes phosphoryle a permis en outre, à l'auteur, de préciser la destinée des résidus phosphorylés et de montrer que la formation des molécules d'ADN s'effectuait selon le

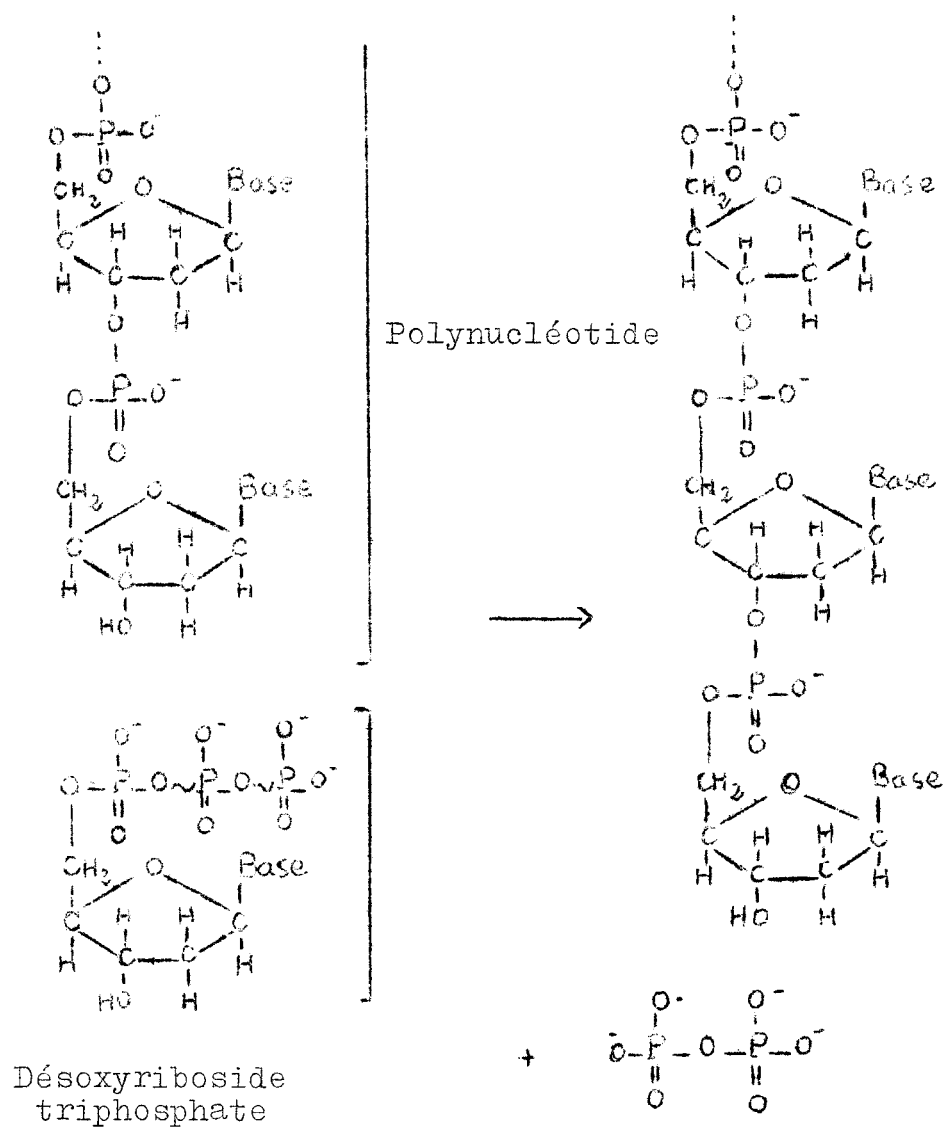
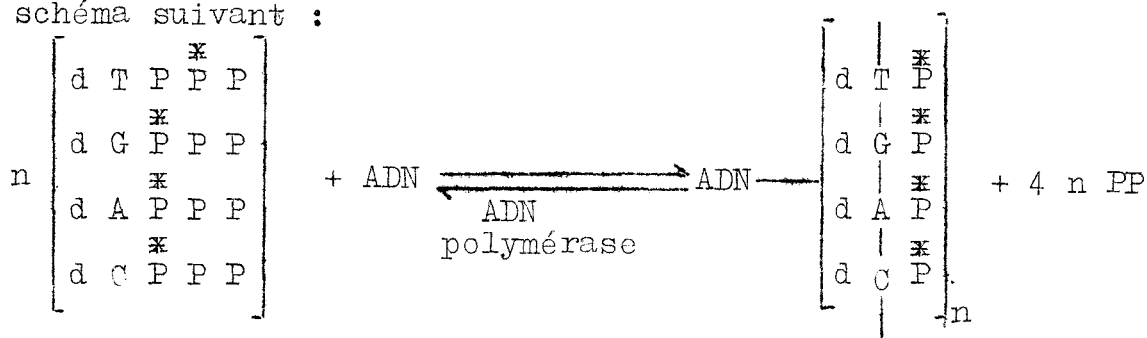


FIGURE 17

Mécanisme de l'allongement de la chaîne polynucléotidique d'un ADN.

schéma suivant :



En conclusion, il apparaît donc :

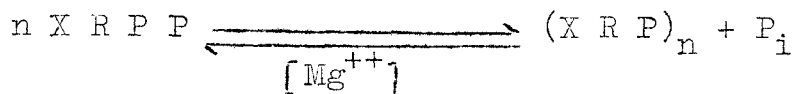
- a) que l'enzyme impliqué dans la réaction nécessite un démoulage sur un chaînon préexistant (il s'agit d'une polymérase) ;
- b) que dans le cas de dG, dA et dC, le phosphoryle α est incorporé dans la molécule tandis, que dans le cas de l'acide thymidylique, il s'agit du phosphoryle β de la T P P P d'origine.

2°) Biosynthèse des acides ribonucléiques.

Deux mécanismes sont actuellement proposés pour expliquer les réactions de polymérisation des ribonucléotides.

a) Polymérisation à partir des nucléosides diphosphates sous l'action de la polynucléotide phosphorylase.

Les travaux de GRUNBERG-MANAGO et d'OCHOA (147) ont conduit à l'isolement de la polynucléotide-phosphorylase à partir d'*Azotobacter vinelandii* et d'autres bactéries. L'enzyme catalyse spécifiquement la synthèse d'ARN à partir de nucléosides diphosphates selon le schéma suivant :



$\times$ marque l'emplacement du ^{32}P

dTPPP, dGPPP, dAPPP, dCPPP : respectivement, désoxythymidine, désoxyguanosine-, désoxyadénosine-, désoxycytidine-triphosphates.

PP : acide pyrophosphorique.

dTP, dGP, dAP, dCP : respectivement désoxyribotides de la thymine, de la guanine, de l'adénine et de la cytosine.

(X = adénine, hypoxanthine, guanine, uracile ou cytosine ;
R = ribose ; P_i = orthophosphate).

Cet enzyme a permis d'obtenir des polynucléotides de synthèse dans lesquels les nucléotides sont unis par des liaisons 3', 5', comme dans les ARN cellulaires et qui possèdent des activités biologiques. Nous évoquerons, dans le paragraphe suivant consacré à la biosynthèse protéique, les expérimentations fondamentales qui ont été entreprises à partir de ces polynucléotides de synthèse et qui ont permis de préciser la plupart des séquences nucléotidiques spécifiques des acides aminés (voir p. 61).

La polynucléotide phosphorylase n'a pas été mise en évidence avec certitude chez les mammifères. De plus, cet enzyme provoque la polymérisation des nucléotides sans avoir recours à un modèle ; in vitro la séquence nucléotidique se répartit au hasard et ce mode de répartition est difficilement acceptable in vivo.

b) Formation des séquences ribonucléotidiques spécifiques sous l'action de l'ARN polymérase (ARN nucléotidyl transférase).

La synthèse des séquences nucléotidiques spécifiques s'effectue, par une voie différente, à partir des nucléosides triphosphates et implique un démoulage sur l'ADN, sous l'action d'une ARN polymérase. Cet enzyme a été caractérisé dans la plupart des cellules vivantes. Il présente la particularité d'être inhibé sélectivement par l'actinomycine D. Les deux mécanismes réactionnels possibles sont schématisés dans les Fig. 18 et 18-Bis. Les ARN formés sont à chaîne simple et possèdent une séquence nucléotidique codée, déterminée par celle des ADN.

Il a été démontré, d'autre part, chez les bactéries, que l'ARN pouvait se "répliquer", mais jusqu'à présent, les enzymes de polymérisation des nucléotides, nécessitant l'ARN pour modèle, n'ont pas été mis en évidence avec certitude dans les cellules différenciées.

Notons que dans les virus à ARN monocaténaire, la forme "replicative" est une double chaîne.

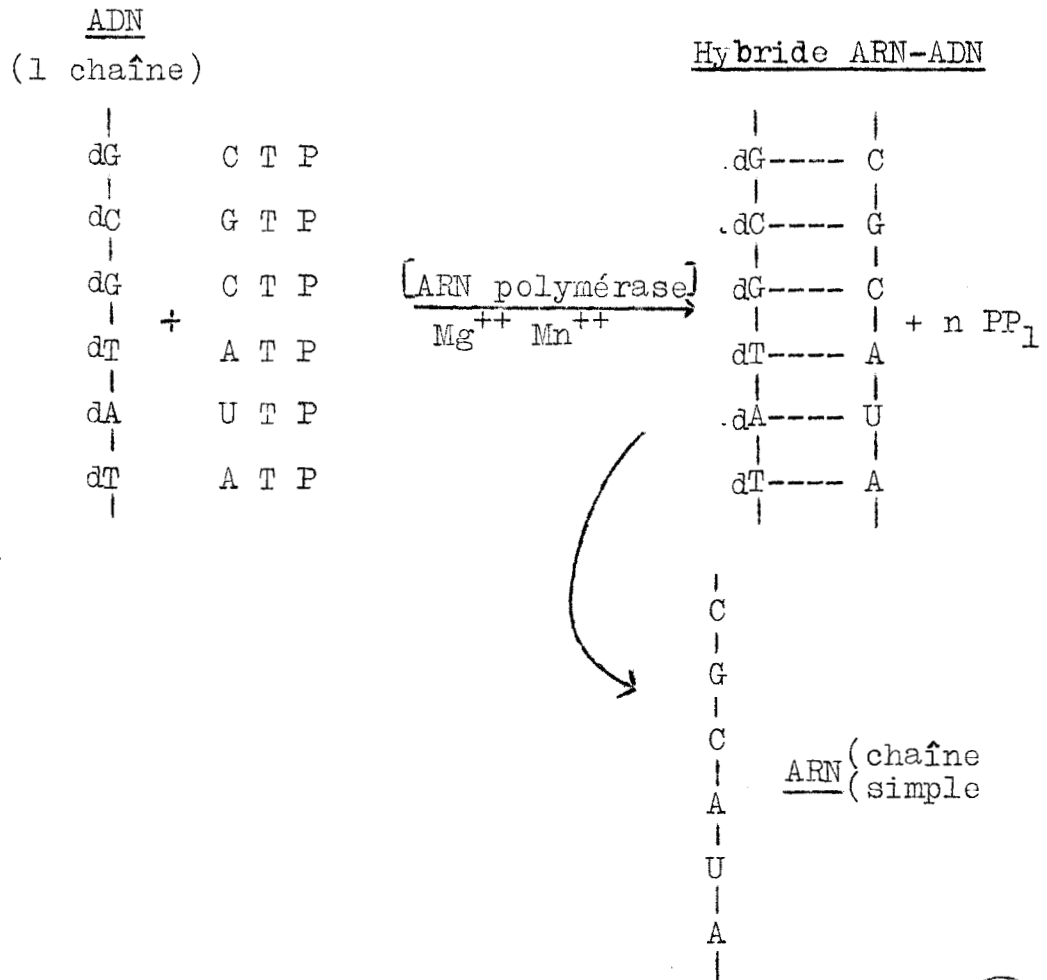


FIGURE 18

Mécanisme de formation des chaînes d'ARN par démolage sur l'ADN dissocié (1 chaîne), sous l'action de l'ARN polymérase.

La chaîne ARN formée est complémentaire de la chaîne ADN modèle.

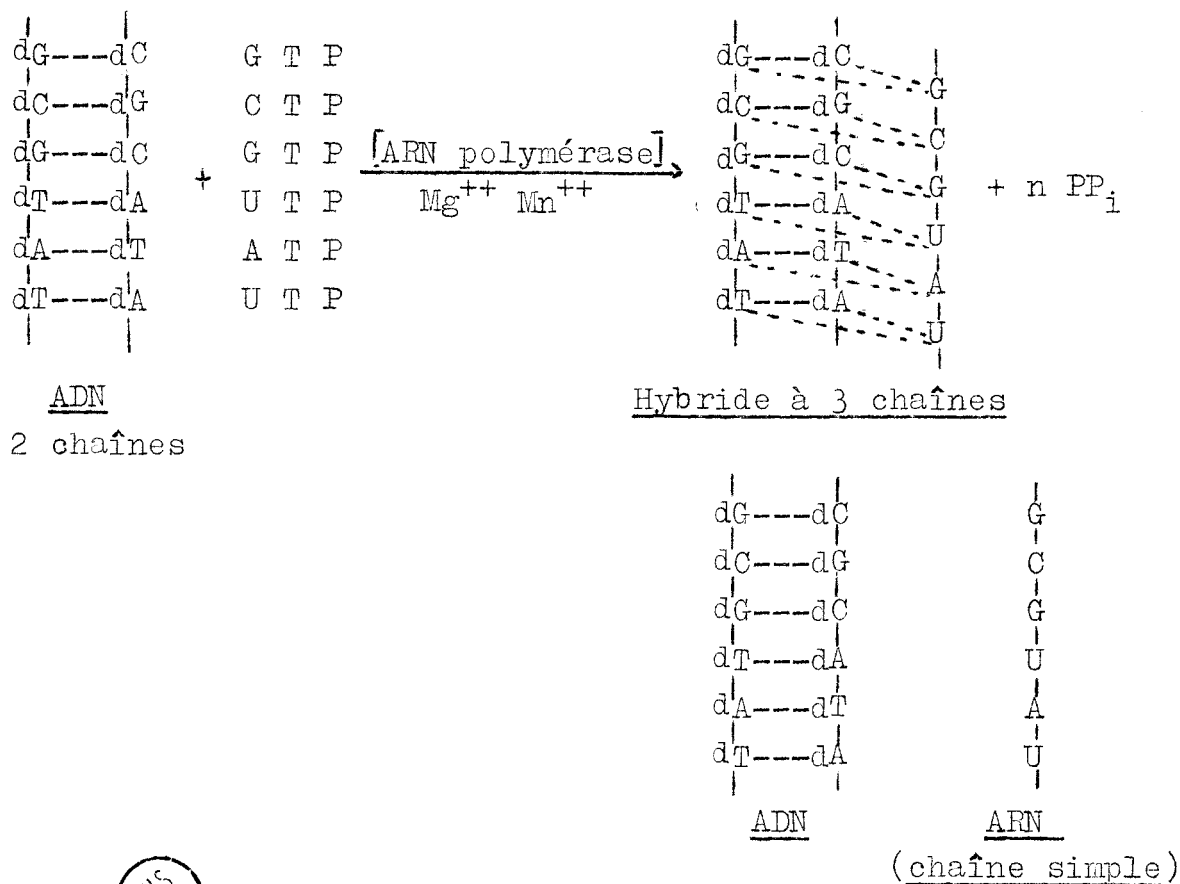


FIGURE 18-Bis

Mécanisme de formation des chaînes d'ARN par démoulage sur l'ADN en double chaîne, sous l'action de l'ARN polymérase.

La chaîne ARN formée est identique à une chaîne ADN et complémentaire de l'autre.

CONCLUSIONS.

Ces connaissances métaboliques nous permettent de faire ressortir les points suivants :

1°) La biosynthèse de novo des nucléotides est liée, comme nous l'avons vu, au métabolisme des acides aminés puisque le glycocolle participe à la formation des noyaux puriques et que l'acide aspartique est impliqué dans la synthèse des noyaux pyrimidiques. En outre, de nombreux travaux, en particulier ceux de PARDEE & al. (148), de MUNRO & MUCKERJI (149) et de GROS & GROS (150) ont démontré que les amino-acides, comme le tryptophanne, étaient nécessaires à la polymérisation des nucléotides. Cette dernière requiert d'ailleurs "in vivo" la présence de tous les amino-acides indispensables et on sait que des régimes protéiques déséquilibrés sont utilisés pour déclencher des cancers expérimentaux en agissant sur le métabolisme nucléaire par l'intermédiaire des acides aminés. Ces mécanismes font appel à des phénomènes régulateurs fondés essentiellement sur des actions de "feed-back".

2°) Les réactions de formation des chaînes polynucléotidiques des acides ribonucléiques font intervenir l'ARN-polymérase et un mécanisme de moulage et de démoulage sur les ADN. Cette synthèse, soumise aux lois de la complémentarité nucléotidique de CRICK (151) détermine la formation de molécules d'ARN dont la séquence nucléotidique est exactement calquée sur celle des ADN géniques : c'est le codage génétique des ARN dont la connaissance était indispensable à la compréhension des mécanismes de la synthèse de protéines spécifiques sous le contrôle du noyau.

IV - BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET BIOCHIMIE DE L'HEREDITE ET DE LA MITOSE.

Il pourrait à priori paraître surprenant qu'un phénomène biochimique comme la synthèse des protéines puisse être associé dans un même paragraphe à deux phénomènes biologiques comme l'hérédité et la mitose. En fait, les trois mécanismes sont étroitement liés puisqu'il est bien établi actuellement, d'une part, que les supports actifs de l'hérédité sont, non pas les gènes, mais les enzymes et, d'autre part, qu'il existe une relation étroite entre la mitose et la biosynthèse des protéines.

Il nous est impossible de décrire en détail tous les résultats expérimentaux qui ont permis de démontrer les faits précédents et nous nous proposons de résumer, sans effectuer une bibliographie détaillée, les bases principales de l'argumentation en revoyant le lecteur aux nombreuses revues générales qui concernent ces sujets.

A - BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET BIOCHIMIE DE L'HEREDITE.

1°) La théorie "un gène, un enzyme".

Les travaux historiques de EPHRUSSI & BEADLE (152) sur les pigments ommatidiques de *Drosophila melanogaster* et ceux de BUTENANDT (153) sur les pigments tégumentaires d'*Ephestia* ont démontré que la biosynthèse des enzymes spécifiques se trouvait sous le contrôle direct des gènes.

Les travaux de BUTENANDT ont porté sur deux variétés d'*Ephestia*. L'une est colorée en brun par un pigment particulier : la xanthommatine et possède le phénotype v^+ . L'autre est dépigmentée et possède le phénotype v . Dans une première

série de travaux portant, les uns sur la structure du pigment, les autres sur son métabolisme, BUTENANDT démontra qu'il existait une relation étroite entre le catabolisme du tryptophanne et la biosynthèse de la xanthommatine, dont nous avons résumé dans le schéma de la figure 19, les principales étapes. Dans une seconde série de recherches, BUTENANDT montra que l'existence de l'*Ephestia* v était liée à l'absence, chez ce mutant, de la tryptophanne-pyrrolase. En effet, d'une part, le tryptophanne s'accumule dans les tissus d'*Ephestia* v et, d'autre part, l'injection à cette dernière, de formylcynurénine[‡] provoque sa pigmentation. La mutation d'*Ephestia* v et la disparition d'un caractère héréditaire sont donc dues à l'absence d'un seul enzyme.

De nombreux travaux ont confirmé les résultats de BUTENANDT comme ceux de PAULING (154) et d'INGRAM (155) sur les hémoglobines anormales et ceux de YANOFSKY (156) sur les tryptophanne-synthétases d'*Escherichia coli*.

Il est donc bien établi que les caractères héréditaires sont liés à l'existence d'enzymes et que ces derniers sont les supports actifs de l'hérédité. Actuellement, les théories biochimiques de l'hérédité reposent essentiellement sur l'axiome "un gène, un enzyme". Elles ont été puissamment renforcées par les découvertes récentes concernant les mécanismes de la biosynthèse des protéines spécifiques et du contrôle génétique de cette dernière.

2°) Biosynthèse des protéines spécifiques.

Deux mécanismes de synthèse des protéines ont été mis en évidence. L'un, le mieux connu, se déroule au niveau des ribosomes. Il fait intervenir plusieurs types d'acides ribonucléiques et sa connaissance trouve son origine dans les travaux de HOAGLAND (157). L'autre révélé par HENDLER (158) a

[‡] ou de cynurénine

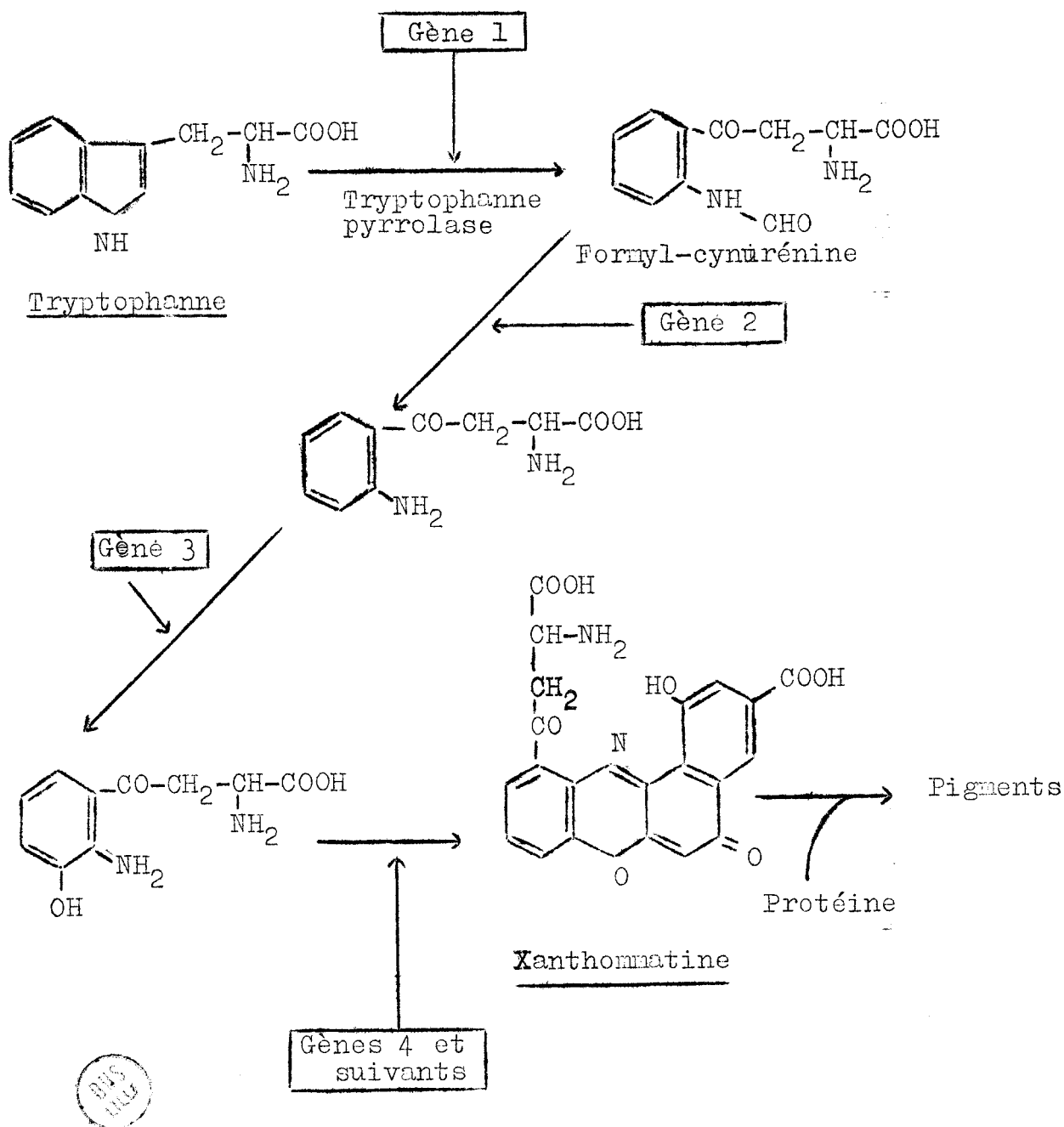


FIGURE 19

Schéma simplifié de la biosynthèse de la xanthomatine (d'après BUTENANDT).

lieu dans les membranes ergastoplasmiques. Il implique la participation de phospholipides.

a) Synthèses ribosomales des protéines.

Le mécanisme se décompose en trois étapes essentielles :
1ère étape : activation de l'acide aminé par l'ATP et par des enzymes spécifiques et formation d'un amino-acyladénylate.

(Fig. 20).

2ème étape : condensation de l' amino-acyladénylate avec un ARN soluble spécifique.

3ème étape : transfert des complexes ARN-S-amino-acides vers les polysomes et la formation de chaînes peptidiques spécifiques contrôlée par l'ARN-messager.

La figure 21 résume les réactions essentielles des deux premières étapes et la figure 22 schématise le mécanisme du transfert de l'ARN-S - AA* sur les polysomes en tenant compte de la structure secondaire de l'ARN-S. La polymérisation des acides aminés se fait au niveau des polysomes, par l'intermédiaire des polypeptides synthétases ; les particules ribosomales 80 S sont les supports des chaînes peptidiques néoformées, dont la séquence est déterminée par les triplets nucléotidiques complémentaires des ARN-S et de l'ARN messager. Le mouvement des particules 80 S le long de la chaîne de l'ARN messager détermine vis-à-vis de chaque triplet nucléotidique, l'ordonnement des acides aminés de la chaîne protéique en cours de formation.

De cet ensemble de données on peut donc faire ressortir les points suivants :

1°) Les enzymes d'activation, porteurs de deux sites actifs, spécifiques, l'un de l'acide aminé, et l'autre de l'ARN-S correspondant, déterminent la première complémentarité : acide aminé - triplet nucléotidique spécifique de l'ARN-S.

*) ARNS-AA : Complexe ARN soluble-Amino-acide.

2°) L'ARN messenger est l'ordonnateur des séquences peptidiques en faisant intervenir la deuxième complémentarité : triplet nucléotidique de l'ARN-S - triplet complémentaire de l'ARN-messenger.

Les deux agents déterminants sont donc l'enzyme activateur cytoplasmique d'une part, et l'ARN messenger des polysomes, d'autre part. Les deux "ouvriers" sont l'ARN-S qui transporte les acides aminés du cytoplasme vers les polysomes d'une part et les ribosomes qui, en migrant le long des chaînes d'ARN messenger, transportent les acides aminés et les polymérisent en chaînes peptidiques spécifiques.

Contrôle génétique de la biosynthèse des protéines.

Les polysomes (ou ergosomes) sont donc les sites actifs de la biosynthèse protéique. La spécificité des séquences peptidiques est déterminée par l'ordonnancement des triplets nucléotidiques des ARN-messagers. Ces ARN messagers, produits de transcription d'un ou plusieurs gènes dirigent au niveau de chaque polysome la synthèse d'une ou de plusieurs protéines spécifiques.

Le contrôle génétique de la biosynthèse protéique, qui s'appuie sur le mécanisme de biosynthèse des ARN à partir des ADN par le jeu des polymérases (Fig. 18 page 49) a été définitivement démontré par les expérimentations faisant appel aux polynucléotides de synthèse et à l'ARN chimiquement modifié du virus de la mosaïque du Tabac.

NIRENBERG et MATTHAEI (161) en 1961, puis OCHOA et coll. WABHA (162) et bien d'autres depuis, ont préparé, à partir des polymérases de KORNBERG (163) et des polynucléotide-phosphorylases de GRUNBERG-MANAGO (164), des polynucléotides de synthèse dont les séquences nucléotidiques sont connues.

L'obtention in vitro de polysomes par introduction d'un poly U par exemple (P. M. 30 à 50.000) dans un mélange de ribo-

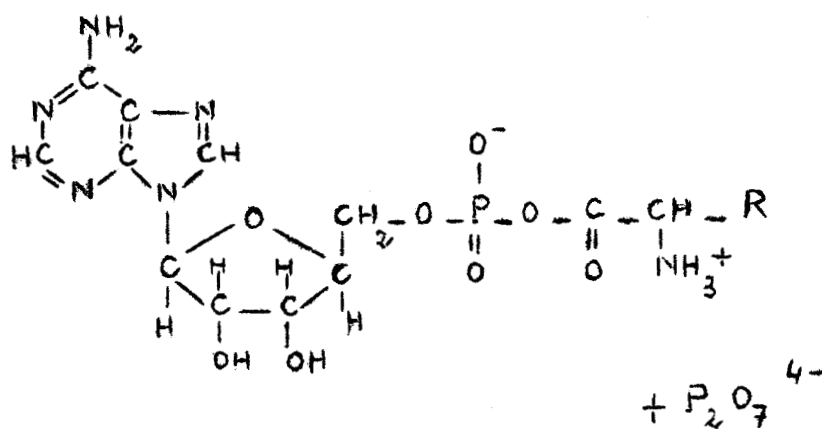
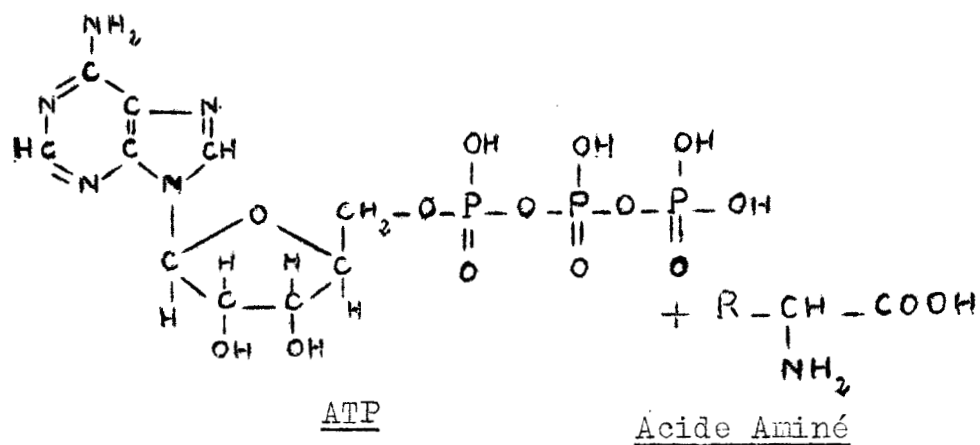


FIGURE 20

"Activation" des acides aminés destinés aux synthèses protéiques. Formation d'un amino-acyladénylate.

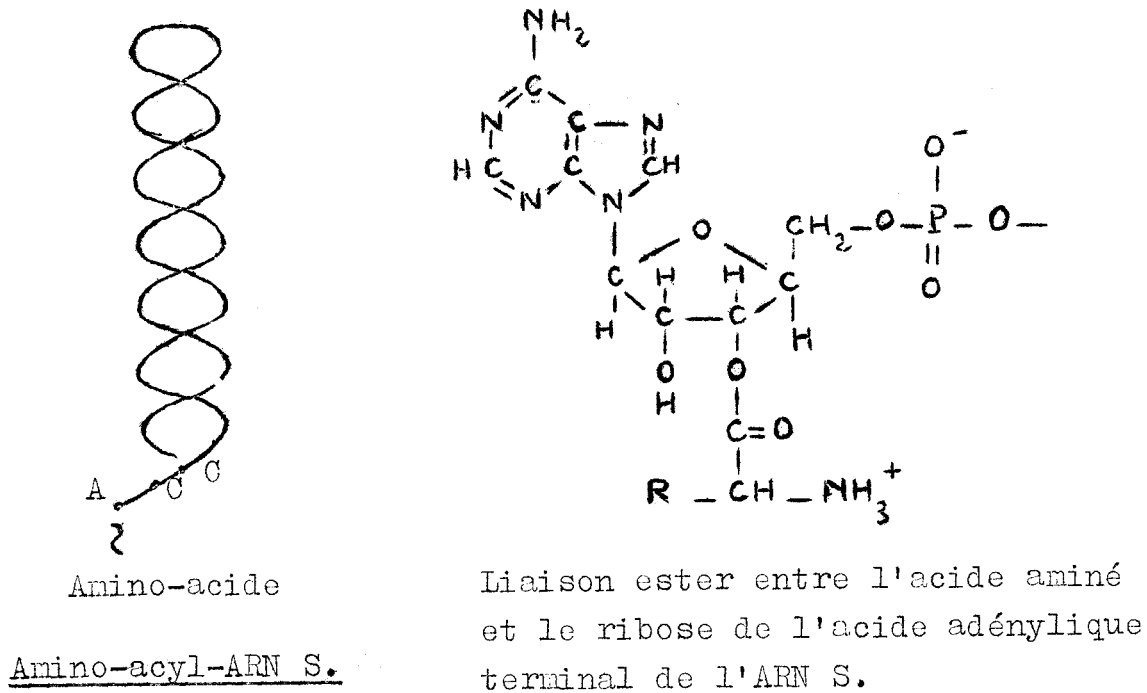
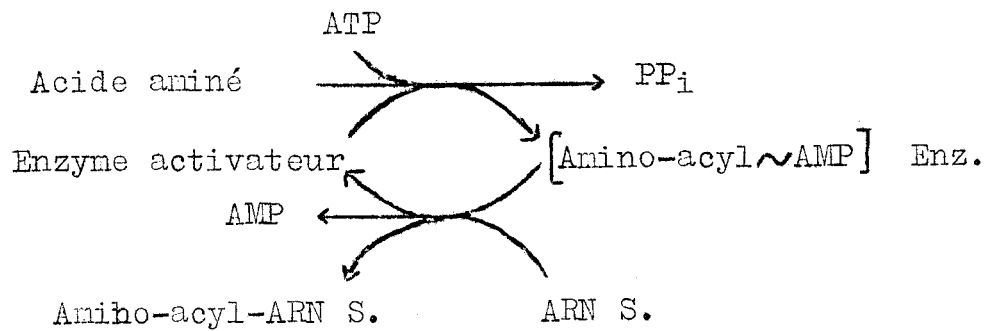


FIGURE 21

Représentation schématique des deux premières étapes de la biosynthèse protéique (d'après MONIER)(159).
Nous avons précisé le mode de liaison de l'ARN S. et de l'acide aminé.

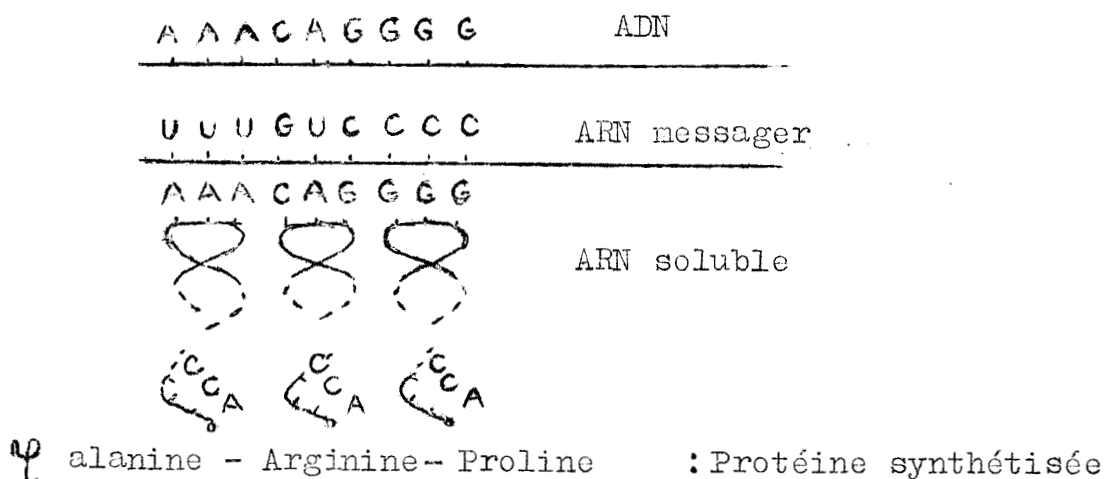
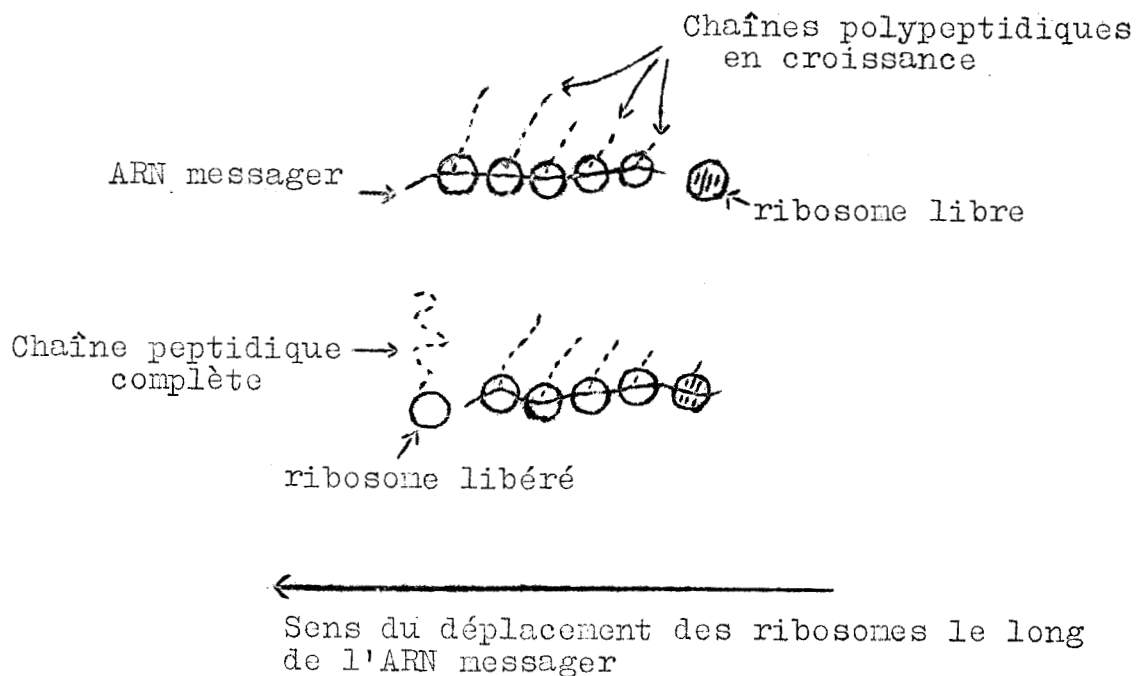


FIGURE 22

Représentation de la 3ème étape de la synthèse protéique d'après OCHOA -(160).

Nous avons montré la correspondance entre triplets nucléotidiques de l'ADN, de l'ARN messenger, de l'ARN de transfert et l'ordonnancement des amino acides dans la protéine synthétisée.

somes et de solution cytoplasmique, provoque la biosynthèse spécifique d'une poly-phénylalanine. Les poly A **synthétisent** des polylysines, dans les mêmes conditions ; les poly C des polyprolines, etc... L'utilisation des polynucléotides mixtes, dont il est possible par un calcul statistique, de déterminer le pourcentage de certains triplets préférentiels a permis d'établir une liste (Tableau C) de la plupart des triplets spécifiques de chaque amino-acide.

b) Système protéosynthétique de HENDLER.

De nombreux auteurs ont observé depuis les travaux de l'équipe de HOAGLAND que l'activité protéosynthétique des systèmes acellulaires ne représentait que 1 p. 100 à 1 p. 1000 de l'activité totale des cellules intactes, aussi bien dans le cas des tissus animaux que dans celui de cellules microbiennes.

HENDLER a donc proposé un nouveau système qui fait intervenir les phospholipides des membranes intracytoplasmiques dans le mécanisme d'activation et de polymérisation des acides aminés, soit sous la forme de complexe phospholipides-acides aminés, soit sous la forme d'associations phospholipides-ARN, présents dans l'ergastoplasme. Selon TRIA et BARNABEI (165) les cathepsines joueraient un rôle dans la pénétration des acides aminés dans la cellule ; les acides aminés se fixeraient sur la membrane cellulaire sous forme de phosphatidopeptides, pour être ensuite libérés dans le cytoplasme par les **cathepsines et être pris en charge** par les complexes phospholipides -ARN de l'ergastoplasme.

Ces mécanismes sont à l'étude actuellement et les données expérimentales ne sont pas encore suffisamment concordantes pour pouvoir confirmer ces hypothèses.

<u>ACIDE AMINE</u>	<u>TRIPLETS DE CODAGE (ARN m.)</u>
Alanine	CUG , CAG , CCG
Arginine	GUC GAA GCC
Asparagine	UAA CUA CAA
Acide aspartique	GUA GCA
Cystéine	GUU
Acide glutamique	AUG AAG
Glutamine	UAC AAC
Glycocolle	GUG GAG GCG
Histidine	AUC ACC
Isoleucine	UUA AAU CAU
Leucine	UUC CCU UGU UAU
Lysine	AUA AAA
Méthionine	AGU
Phényl-alanine	UUU UCU
Proline	CUC CAC CCC
Sérine	CUU ACG UCC
Thréonine	UCA ACA CCA
Tryptophanne	UGG
Tyrosine	AUU ACU
Valine	UUG

TABLEAU C

Code génétique des triplets nucléotidiques
correspondant aux différents amino-acides.
d'après OCHOA (160).

B - ACIDES NUCLEIQUES, SYNTHÈSE DES PROTÉINES ET
MITOSE

Les recherches de CASPERSSON et de BRACHET, puis celles de nombreux autres auteurs, ~~ont démontré~~ "qu'il existait une corrélation étroite entre la teneur en ARN d'une cellule et son aptitude à synthétiser des protéines", d'une part, et "que l'intégrité de l'ARN est, dans les cellules vivantes indispensable pour que la croissance, l'activité mitotique, l'incorporation des acides aminés dans les protéines et la synthèse même de celles-ci puissent se produire". C'est sur ces deux notions fondamentales que repose la démonstration que les ARN interviennent indirectement par l'intermédiaire des protéines à la synthèse desquelles ils participent, dans la mitose.

De nombreux arguments expérimentaux pourraient être apportés dans cette démonstration et nous nous bornerons à citer ceux qui sont les plus sûrs et les plus démonstratifs.

1 - La vitesse d'échange des acides aminés dans les protéines est plus élevée dans les tissus qui sont le siège de mitoses actives (Tableau D).

2 - Les tissus qui possèdent une activité mitotique importante sont riches en acides ribonucléiques (Tableau E).

3 - Il existe un parallélisme étroit entre les mitoses, la teneur en ARN et la synthèse des protéines chez les Bactéries qui sont en phase logarithmique de croissance et le taux des ARN est proportionnel au taux de la croissance.

4 - Le métabolisme des acides nucléiques mesuré par la vitesse des échanges de l'azote et du phosphore isotopiques, est beaucoup plus actif dans les cellules des tissus qui sont le siège de mitoses nombreuses.

TABLEAU D.

Vitesse d'échange de l'alanine marquée dans
les protéines de tissus divers (en coups par minute)
d'après ZAMECNIK & Coll. (166)

Foie Normal	Foie en régénération	Foie foetal	Hépatome	Fraction non néoplasique de l'hépatome
38	91	179	255	91

TABLEAU E

Teneur en acide ribonucléique (exprimée en mg de phosphore
pour 100g de tissu frais) de différents tissus du Rat et de la
Souris (d'après SCHNEIDER) (167)

Rat	Rein	27,2
	Rate	42,5
	Foie	63,4
	<u>Pancréas</u>	179
	Muscle	6,7
	Coeur	12,4
	Cerveau	17,5
	Poumon	18
Souris	<u>Sarcome de Jensen</u>	53,2
	Poumon	22,6
	<u>Tumeur du poumon</u>	59,6

5 - La ribonucléase inhibe les synthèses des protéines et arrête les mitoses. L'injection de ribonucléase dans des oeufs fécondés d'Oursin empêche la segmentation. L'immersion de racines d'oignons dans des solutions de ribonucléase inhibe l'incorporation des acides aminés dans les protéines et provoque l'arrêt de la croissance. Des résultats identiques ont été obtenus avec des amibes, des bactéries et des virus

6 - La plupart des facteurs antimitotiques, qu'ils soient de nature physique, comme les radiations ionisantes ou le rayonnement ultra-violet, ou de nature chimique, comme les moutardes azotées ou comme les antimétabolites nucléiques, sont des agents de dénaturation des acides nucléiques.

CONCLUSIONS

Les interrelations fondamentales qui unissent la chimie et le métabolisme des ARN aux deux facteurs biologiques essentiels à l'équilibre vital de la cellule, à savoir l'hérédité et la mitose, suffiront à justifier notre travail. Cet exposé succinct démontre en effet que l'hypothèse du cancer, maladie des ARN, permet d'expliquer le phénomène néoplasique. Cette hypothèse de travail impose la mise au point de méthodes d'étude des ARN, particulièrement fines et sensibles, pour permettre de déterminer des modifications dans la composition ou dans les séquences nucléotidiques des acides ribonucléiques.

C H A P I T R E I I

DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

HISTORIQUE

- I - PREPARATION DES ARN.
- II - PROCEDES DE DETERMINATION DE LA COMPOSITION
MOLAIRE DES ARN.
- III - CONCLUSIONS.

TRAVAUX PERSONNELS

- I - TECHNIQUES.
- II - RESULTATS.
- III - DISCUSSION.

b) Préparation et dissociation des ribonucléoprotéides.

Les ribonucléoprotéides, contrairement aux désoxyribonucléoprotéides, sont solubles dans le chlorure de sodium 0,14 M, et cette propriété a été mise à profit pour la préparation des ribonucléoprotéides par MIRSKY & POLLISTER (176). Leur méthode d'extraction des ribonucléoprotéides tissulaires par le chlorure de sodium 0,14 M a été appliquée par de nombreux auteurs, en particulier par KERR & SERAIDARIAN (177), VOLKIN & CARTER (178), KAY & DOUNCE (179), qui ont utilisé des procédés différents pour réaliser la dissociation des ARN et des protéines.

Procédé de KERR & SERAIDARIAN.

Dans le procédé de KERR & SERAIDARIAN, les ribonucléoprotéides sont dissociés par le chlorure de sodium à demi-saturation pendant 36 heures. L'addition à la solution obtenue d'acide chlorhydrique jusqu'à pH 4,2 permet de précipiter les protéines qui sont éliminées par filtration. Les ARN contenus dans le filtrat, sont précipités par l'éthanol. Cette technique a permis aux Auteurs de préparer l'ARN de pancréas (180) et a été utilisée par GOLD & STURGIS (181) pour l'étude des ARN de foie et d'utérus de rate.

Procédé de VOLKIN & CARTER.

VOLKIN & CARTER (182) ont décrit, en 1951, une méthode de préparation des ARN des tissus animaux dans laquelle la solution de nucléoprotéines, extraite par le chlorure de sodium 0,15 M tamponné à pH 6,8, est additionné de chlorhydrate de guanidine (concentration finale 2 M). Le mélange est porté à 38°C pendant 30 mn, puis à 0° pendant 1 heure. La plupart des protéines restent en solution, tandis que les ARN forment un précipité gélatineux, qui est recueilli par centrifugation et lavé avec la solution de chlorure de sodium tamponné et de chlorhydrate de guanidine. Les ARN sont débarrassés des traces de protéines par le procédé de SEVAG

C H A P I T R E I I

DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

HISTORIQUE

- I - PREPARATION DES ARN.
- II - PROCEDES DE DETERMINATION DE LA COMPOSITION
MOLAIRE DES ARN.
- III - CONCLUSIONS.

TRAVAUX PERSONNELS

- I - TECHNIQUES.
- II - RESULTATS.
- III - DISCUSSION.

HISTORIQUE

I - PREPARATION DES ARN.

A : Isolement des ARN purs.

B : Préparation des tissus en vue de l'étude des ARN sans isolement préalable.

II - PROCEDES DE DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLAIRES DES ARN.

A : Détermination des rapports molaires des bases constituant les ARN.

B : Détermination des rapports molaires des nucléosides des ARN.

C : Détermination des rapports molaires des nucléotides des ARN.

III - CONCLUSIONS.

I - PRÉPARATION DES ARN

La composition molaire ou centésimale en bases, nucléosides ou nucléotides, des ARN, peut être déterminée, soit sur des ARN purs, soit directement sur des préparations de tissus, sans réaliser l'isolement préalable des ARN.

A - ISOLEMENT DES ARN PURS.

La plupart des auteurs qui se sont attachés à la détermination de la composition des ARN se sont efforcés d'isoler ces composés à l'état pur. Peu de méthodes étant satisfaisantes, on a vu s'accumuler dans la littérature de nombreuses descriptions de techniques plus ou moins "quantitatives", plus ou moins "sélectives" et donnant des préparations d'ARN plus ou moins dégradées (voir revues générales de MAGASANIK (168) , de JORDAN (169) et d'ALLEN (170)).

1°) Méthodes anciennes.

Les ARN des tissus animaux ont été préparés, soit par extraction directe à partir des tissus délipidés, soit par dissociation des ribonucléoprotéides préalablement isolés.

a) Extraction directe des ARN.

L'extraction des ARN était effectuée à l'aide du chlorure de sodium à 10 p. 100 à l'ébullition, selon un procédé analogue à celui de CLARKE & SCHRYVER (171) mis au point pour la préparation de l'ARN de Levure. Cette technique plus ou moins modifiée, a été appliquée par DAVIDSON & WAYMOUTH (172), CHARGAFF & Coll. (173), TSUBOI & STOWELL (174) et DAVIDSON & Coll. (175).

b) Préparation et dissociation des ribonucléoprotéides.

Les ribonucléoprotéides, contrairement aux désoxyribonucléoprotéides, sont solubles dans le chlorure de sodium 0,14 M, et cette propriété a été mise à profit pour la préparation des ribonucléoprotéides par MIRSKY & POLLISTER (176). Leur méthode d'extraction des ribonucléoprotéides tissulaires par le chlorure de sodium 0,14 M a été appliquée par de nombreux auteurs, en particulier par KERR & SERAIDARIAN (177), VOLKIN & CARTER (178), KAY & DOUNCE (179), qui ont utilisé des procédés différents pour réaliser la dissociation des ARN et des protéines.

Procédé de KERR & SERAIDARIAN.

Dans le procédé de KERR & SERAIDARIAN, les ribonucléoprotéides sont dissociés par le chlorure de sodium à demi-saturation pendant 36 heures. L'addition à la solution obtenue d'acide chlorhydrique jusqu'à pH 4,2 permet de précipiter les protéines qui sont éliminées par filtration. Les ARN contenus dans le filtrat, sont précipités par l'éthanol. Cette technique a permis aux Auteurs de préparer l'ARN de pancréas (180) et a été utilisée par GOLD & STURGIS (181) pour l'étude des ARN de foie et d'utérus de rate.

Procédé de VOLKIN & CARTER.

VOLKIN & CARTER (182) ont décrit, en 1951, une méthode de préparation des ARN des tissus animaux dans laquelle la solution de nucléoprotéines, extraite par le chlorure de sodium 0,15 M tamponné à pH 6,8, est additionné de chlorhydrate de guanidine (concentration finale 2 M). Le mélange est porté à 38°C pendant 30 mn, puis à 0° pendant 1 heure. La plupart des protéines restent en solution, tandis que les ARN forment un précipité gélatineux, qui est recueilli par centrifugation et lavé avec la solution de chlorure de sodium tamponné et de chlorhydrate de guanidine. Les ARN sont débarrassés des traces de protéines par le procédé de SEVAG

(183) (agitation à 40°C, avec un mélange de chloroforme et d'octanol (5/1)). Ils sont purifiés par précipitation éthanolique de leur solution aqueuse, redissous dans le chlorure de sodium 0,05 M et précipités de nouveau par l'éthanol.

La méthode de VOLKIN & CARTER a été modifiée par GRINNAN & MOSHER (184) qui ont porté la concentration en chlorhydrate de guanidine à 4 M.

Procédé de KAY & DOUNCE.

Les détergents anioniques qui précipitent les protéines en les dénaturant avaient été utilisés avec succès pour la préparation des ADN à partir des désoxyribonucléoprotéides. KAY & DOUNCE (185) ont étendu leur utilisation à la préparation des ARN tissulaires : la technique des auteurs consiste à ajouter à une solution de ribonucléoprotéides dans le chlorure de sodium 0,14 M, du dodécylsulfate de sodium (SDS) à 5g p. 100 dans une solution aqueuse d'éthanol à 45 p. 100 (v : v), sous agitation, puis de la soude à 10 p. 100, jusqu'à pH 7. L'agitation est poursuivie pendant trois heures et du chlorure de sodium solide est ajouté (concentration finale : 1 M). Les protéines dénaturées sont éliminées par centrifugation et les sels de sodium des ARN sont précipités de la solution surnageante par l'éthanol.

2°) Méthode "au phénol".

En 1956, KIRBY (186) décrit une méthode d'isolement des ARN des tissus de Mammifères dans laquelle l'homogénat tissulaire est traité par un égal volume de phénol aqueux à 90 p. 100 sous agitation pendant 1 heure à 23°. Une centrifugation permet de recueillir une phase aqueuse qui contient les ARN, tandis que les protéines dénaturées se trouvent dans la phase phénolique ou dans l'interphase. La phase aqueuse renferme également des polysaccharides (le glycogène, en particulier) qui sont éliminés par traitement avec le 2-méthoxy-

éthanol et le phosphate 1,25 M suivi de centrifugation. La solution surnageante est purifiée par dialyse et les ARN précipités par l'éthanol après addition d'acétate de potassium (concentration finale 2 p. 100).

3°) Méthode de TRAVAGLINI & MELONI.

En 1962, TRAVAGLINI & MELONI (187) ont publié une méthode d'extraction et de séparation des acides nucléiques d'un homogénat cellulaire effectué dans le chlorure de césium saturé. Une centrifugation en gradient de densités dans du tampon phosphate 0,05 M de pH 6,4, contenant du sulfate de magnésium 0,01 M et saturé en chlorure de césium permet d'obtenir les acides nucléiques et les polysaccharides d'une part et les protéines et les lipoprotéines d'autre part. ARN et ADN sont ensuite séparés par centrifugation dans un autre gradient de densité. Selon ces auteurs, l'extraction est totale et fournit des acides nucléiques non dégradés. Toutefois, une partie des ARN reste conjuguée avec les protéines et l'élimination du chlorure de césium nécessite, en outre, une dialyse.

CRITIQUE DES METHODES D'ISOLEMENT DES ARN.

Tous ces procédés d'isolement et de purification des ARN ont été mis au point pour faciliter l'analyse de ces macromolécules. Cependant, si l'on compare les résultats obtenus par les différents auteurs qui les ont utilisés pour déterminer la composition nucléotidique, on est frappé par leur grande divergence (Tableau I). On comprendra facilement celle-ci en faisant la critique des méthodes de préparation des ARN.

TABLEAU I

COMPOSITION CENTESIMALE DES ARN DE FOIE DE RAT
PREPARES PAR DIFFERENTES METHODES.

AUTEURS	Procédés d'extraction	U	G	C	A
DAVIDSON & SMELLIE (188)	Chlorure de sodium 10 p. 100 100°	20,9	33,4	26,6	19,1 [⌘]
GOLD & STURGIS (189)	Chlorure de sodium 1/2 saturation	27,8	32,2	18,9	21,1
VOIKIN & CARTER (190)	Chlorhydrate de guanidine	15,2	32,8	34	18 [⌘]
KIRBY (191)	phénol	16,2	34,8	29,7	19,3

U, G, C, A : respectivement, acides uridylique, guanylique, cytidylique et adénylique.

[⌘] : Composition calculée d'après les résultats des Auteurs.

^{⌘⌘} : ARN extrait à partir de nucléoprotéines précipitées par l'acide trichloracétique.

1°) Toutes les techniques que nous avons décrites sont longues et d'application délicate.

De plus, elles exigent des quantités importantes de tissus. Enfin, elles comportent deux causes d'erreur principales : le risque de l'hydrolyse enzymatique des ARN au cours des manipulations et le risque d'une extraction non quantitative ou préférentielle de certaines classes d'ARN.

2°) Dégradation des ARN au cours de leur isolement.

a) Méthodes anciennes.

Les ARN sont extrêmement sensibles à l'action des nucléases, or, dans toutes les méthodes que nous avons décrites, celles-ci ne sont pas inhibées, ou, si elles le sont, elles le sont trop tardivement. En effet, l'hydrolyse enzymatique des ARN s'effectue au cours de la préparation des tissus, précédant l'extraction des ARN par le chlorure de sodium à 10 p. 100.

Elle a lieu également pendant la dissolution des ribonucléoprotéides dans le chlorure de sodium 0,14 M qui constitue l'étape préliminaire commune de la plupart des méthodes anciennes ; elle continue pendant la dissociation des ARN et des protéines, dans le procédé de KERR & SERAIDARIAN.(192). Le traitement des tissus par le chlorure de sodium à 10 p.100 à l'ébullition (procédé de DAVIDSON & WAYMOUTH (193)), celui des nucléoprotéides par le dodécyl sulfate de sodium (procédé de KAY & DOUNCE (194)) ou par le chlorhydrate de guanidine (procédé de VOLKIN & CARTER (195)), dénaturent les enzymes hydrolytiques mais leur action est trop tardive.

D'heureuses modifications ont été apportées à ces techniques : c'est ainsi que DAVIDSON & SMELLIE (196) ont préconisé de précipiter les nucléoprotéides par l'acide trichloracétique avant de procéder à l'extraction des ARN par le chlorure de sodium à 10 p. 100 ; d'autre part, VOLKIN & CARTER (197) ont conseillé d'homogénéiser directement le tissu frais dans la

chlorhydrate de guanidine 2,5 M froid. Malgré ces améliorationsⁿ les méthodes précédentes demeurent sujettes à critique : nous verrons plus loin (p.75) que l'extraction des ARN par le chlorure de sodium à 10 p. 100 n'est pas quantitative ; d'autre part, le chlorhydrate de guanidine n'inhibe la ribonucléase qu'à la concentration de 4 M (voir SELA & Coll. (198)). Une amélioration sensible de la méthode de VOLKIN & CARTER à été obtenue en 1962 par COX & ARNSTEIN (199) qui semblent obtenir des ARN non dégradés.

b) La méthode "au phénol".

Elle fut considérée pendant quelque temps comme l'une des meilleures méthodes d'extraction des ARN. Le phénol, en effet, inhibe les nucléases. Cependant en 1959, LASKOV & Coll. (200) signalent qu'ils obtiennent, par la technique de KIRBY (201), à partir du foie de rat, un matériel polydispersé de poids moléculaire bas. Aussi, ces auteurs préconisèrent-ils quelques modifications, comme le broyage du tissu préalablement congelé et l'addition, à la poudre obtenue d'EDTA (éthylène diamine tétraacétate de sodium) 10^{-4} M., avant son traitement par le phénol à 90 p. 100. KIRBY lui-même (202) s'aperçut que les ARN obtenus étaient partiellement dégradés et il conseilla d'effectuer l'extraction en présence de naphthalène 1-5 disulfonate. Plus tard (203) il ajouta au phénol aqueux de la 8-hydroxy-quinoléine et obtint des préparations moins riches en acide guanylique dont "moins dégradées".

Toutefois, l'étude de la composition chimique de la "fraction ARN" obtenue par la méthode d'extraction phénolique a montré (MONTREUIL & Coll. (204)) qu'elle renfermait, outre des ADN et des protides divers, des nucléotidyl peptides et des nucléo-protéides intacts. Ces composés, hydrolysés en même temps que les ARN, peuvent évidemment apporter une erreur dans la détermination de la composition des ARN. Cette fraction contient aussi des nucléosides 5' mono et polyphosphates qui sont éliminés pour

la plupart par dialyse mais cette opération de purification est dangereuse. En effet, la ribonucléase survit à l'extraction phénolique (LITTAUER et Coll. (205) ; HUPPERT et PELMONT (206)) et les ARN subissent l'hydrolyse enzymatique dès l'élimination du phénol, c'est à dire au cours des opérations de purification : précipitation des polysaccharides à l'aide du méthoxyéthanol et du phosphate de sodium 1,25 M et surtout dialyse prolongée de la solution d'ARN. Aussi, en 1963, KIDSON, KIRBY et RALPH (207) modifièrent de nouveau leur technique : ils ajoutèrent à la phase aqueuse, du 4 amino-salicylate, du dodécyl-sulfate de sodium (préconisé déjà en 1959 par HALL et DOTY (208) et procédèrent à un deuxième traitement phénolique. Du benzoate de sodium fut ajouté à la nouvelle phase aqueuse et les ARN furent précipités par l'éthanol.

C'est dans le but d'éviter aussi une hydrolyse enzymatique des ARN au cours de leur isolement que SARKAR (209) conseilla d'homogénéiser le tissu directement dans le phénol aqueux. La méthode d'extraction phénolique des ARN a encore été améliorée par l'addition de Bentonite au milieu d'homogénéisation. SINGER et FRAENKEL CONRAT (210) ont montré que son emploi augmentait l'infectivité et la stabilité de l'ARN préparé à partir des Virus et l'utilisation de la Bentonite est maintenant généralisée. Il convient toutefois de signaler que HITCHBORN et DUNN (211) ont montré que l'élimination incomplète de la bentonite introduit une cause d'erreur si l'on étudie, après hydrolyse acide, la composition en bases. Au contraire, les nucléotides sont peu affectés surtout en milieu alcalin.

c) Méthode de TRAVAGLINI et MELONI.

Cette technique ne paraît pas avoir reçu de nombreuses applications, peut être à cause des risques d'hydrolyse des ARN au cours de la dialyse.

3°) Les pertes d'ARN au cours de l'extraction.

- a) Méthodes anciennes : La teneur des tissus en acides ribonucléiques peut être déterminée par les méthodes de SCHNEIDER (212), d'OGUR et ROSEN (213) ou de SCHMIDT et THANNHAUSER (214) (voir plus loin). Les résultats obtenus permettent de calculer le rendement des techniques d'isolement des ARN. Il est de 50 p. 100 par la méthode de KAY et DOUNCE (215), de 15 p. 100 à 20 p. 100 par celle de KERR et SERAIDARIAN (216), de 20 à 30 p. 100 par celle VOLKIN et CARTER (217). D'autre part, le chlorure de sodium à 10 p. 100 n'extrait à 100° C que les 70 p.100 des ARN, selon WEIL (218). Ces faibles rendements soulignent l'importance des pertes en ARN (ou en constituants des ARN puisqu'il y a dégradation). Dans ces conditions, il est difficile de s'adresser à de telles préparations pour déterminer la composition des ARN totaux d'un tissu donné.
- b) La méthode de KIRBY ne réalise pas non plus une extraction quantitative des ARN, en premier lieu, parce que la précipitation des ARN de la phase aqueuse n'est pas totale et en second lieu parce que les procédés "au phénol" réalisent un fractionnement des ARN.
- α) Précipitation des ARN : Les ARN peuvent être précipités de la phase aqueuse par l'éthanol (LITTAUER 219 ; KIRBY 220) mais aussi par le sulfate d'ammonium ou le chlorure de sodium (COLTER 221). Les ARN précipités par le sulfate d'ammonium sont riches en protéines dénaturées et en polysaccharides. Au contraire, les ARN préparés par le chlorure de sodium 3 M sont pratiquement purs (LASKOV 222) ; il était donc tentant d'appliquer ce procédé. Cependant, les rendements obtenus par ce type de précipitation sont inférieurs à ceux que donne la purification par l'éthanol. LASKOV a montré que ces faibles rendements étaient dûs à la perte de molécules de faible constante de sédimentation. Maintenant que l'on connaît l'existence des ARN de transfert 4 S, cette perte paraît extrêmement grave. Elle s'explique aisément quand on se souvient des travaux de

CRESTFIELD & Coll. (223) qui ont montré dès 1955, qu'une partie de l'ARN de levure ne précipitait pas par le chlorure de sodium 1 M. Ce fractionnement des ARN par le chlorure de Sodium a été confirmé par de nombreux auteurs et a été utilisé pour séparer les différentes classes d'ARN (voir "Généralités" p. 26 et "Applications de la méthode de KIRBY" p.77).

Enfin la précipitation éthanolique des ARN à partir de la phase aqueuse a été critiquée parce qu'incomplète (SAMIS & Coll. (224)) et dépendant de la concentration de l'alcool. Selon SEGOVIA & Coll. (225), ce sont les polysaccharides présents dans cette phase qui modifient les propriétés physiques des ARN et en particulier leurs caractères de solubilité dans l'alcool.

D'autres agents de précipitation des ARN ont été récemment préconisés : ils permettent d'éliminer rapidement les polysaccharides, et d'éviter toute dialyse.

- Bromure de cétyltriméthylammonium (RALPH & BELLAMY (226))
- Sels de triéthyl ou tétraméthylammonium qui donnent des sels d'ARN solubles dans l'éthanol à 50 p. 100 (voir revue générale de KIRBY (227)).
- Sulfate de Protamine (PHILIPPS & Coll. (228))
- Trichlorure d'indium (SAMIS & Coll. (229))
- Trihexylamine ou 22' diéthylldihexylamine (KIDSON & Coll. (230)) qui donnent des sels d'ARN solubles dans les solvants organiques.

La purification des ARN peut en outre être poursuivie par "passage" de leur solution sur colonne de Séphadex. (voir par exemple HYMER & Coll. (231) ou SEBRING & Coll. (232)).

(3) Fractionnement des ARN.: GEORGIEV & Coll. (233) et SIBATANI & Coll. (234) ont montré qu'il restait des ARN dans la phase phénolique et que la technique de KIRBY (235) séparait les ARN en deux classes métaboliquement distinctes et de compositions différentes.

Depuis, de nombreux auteurs parmi lesquels, YAMANA & Coll. (236), EDMONDS (237), OTAKA (238), MILMAN (239), KIT (240) ont confirmé la possibilité de fractionner les ARN par le phénol aqueux et la méthode de KIRBY a le mérite d'avoir été le point de départ de recherches de plus en plus nombreuses sur l'hétérogénéité des ARN.

Applications de la méthode de KIRBY.

Presque en même temps que SIBATANI & Coll. (241), GEORGIEV & Coll. (242) ont signalé que la méthode de "préparation phénolique" des ARN n'était pas quantitative. Les ARN qui restent dans la phase phénolique ou plus exactement dans l'interphase, sont beaucoup plus radioactifs que les ARN extraits dans la phase aqueuse, lorsque les molécules ont été marquées préalablement par des précurseurs radioactifs. Ces ARN étaient donc vraisemblablement d'origine nucléaire ; il avait été démontré en effet, que les ARN nucléaires incorporent plus rapidement les précurseurs marqués que les ARN cytoplasmiques (voir le Chapitre III).

GEORGIEV & Coll. (243) prouvèrent, en effet, qu'ils appartenaient à l'appareil "nucléolo-chromosomal" et étaient constitués d'un mélange d'ARN de haut poids moléculaire. Dès lors, la méthode de KIRBY fut modifiée et améliorée pour permettre :

- soit une extraction totale des ARN dans la phase aqueuse (HIATT) (244)
- soit une extraction sélective des ARN "rapidement marqués" (GEORGIEV & Coll.)(245), (SIBATANI)(246), (KIDSON & Coll.)(247). Ces ARN métaboliquement actifs étaient considérés comme les ARN messagers porteurs de l'information génétique et tout a été mis en oeuvre pour les isoler et les étudier.

Selon HIATT (248), ces ARN peuvent passer dans la phase aqueuse, si on ajoute au phénol du dodécylsulfate de sodium. La récupération des ARN nucléaires n'est toutefois que de 72 p. 100 et la préparation renferme un peu d'ADN.

KIDSON & Coll. (249) trouvent que l'ARN rapidement marqué peut être isolé du gel de nucléoprotéides constituant l'interphase, par extraction avec le 4-aminosalicylate et le phénol. GEORGIEV & MANTIEVA (250) extraient les ARN restés dans l'interphase par un traitement de celle-ci avec du phénol aqueux à haute température. A 45° un ARN de type ribosomal passe dans la phase aqueuse, tandis qu'à 60° on recueille un ARN dont la composition rappelle celle de l'ADN. Ces auteurs ont isolé à partir du foie de rat l'ARN messager dont l'existence était pressentie depuis quelques années.

Simultanément, SABATANI & Coll. (251) mettaient eux aussi en évidence un ARN de même composition que l'ADN dans la "fraction nucléolaire" de thymus de Veau préalablement isolée. Une extraction phénolique à 25° leur a permis d'obtenir des ARN ribosomiaux ; l'interphase débarrassée de toute trace de phénol est ensuite traitée par l'eau qui extrait les ARN messagers. La méthode d'extraction phénolique des ARN représente donc un excellent procédé de fractionnement de ces derniers. Toutefois, les résultats du fractionnement dépendent de la température, du pH et des ions inorganiques présents dans le milieu utilisé. Selon KIMURA (252), le phénol aqueux doit contenir du chlorure de sodium 0,14 à 0,24 M et être tamponné à pH 6,8 avec du phosphate de sodium 0,02 M, pour obtenir un bon fractionnement. D'une manière générale, les ARN cytoplasmiques sont extraits par le phénol à basse température, en même temps que les ARN du suc nucléaire (ARN solubles ou de transfert et ARN ribosomiaux) ; deux fractions ARN nucléaires sont obtenues à haute température : à 45°C, ARN ribosomal, et à 60°C, ARN messager, tous deux appartenant à "l'appareil nucléolochromosomal". (GEORGIEV & Coll.)(253), (COOLSMA & Coll.)(254).

Les ARN extraits à basse température peuvent être fractionnés par le chlorure de sodium M qui précipite les ARN ribosomiaux, tandis que les ARN de transfert (ARN S) restent en solution.

D'autres chercheurs préfèrent effectuer une extraction totale des ARN par le phénol aqueux à haute température et fractionner ensuite les ARN par des méthodes chromatographiques ou par centrifugation en gradient de densité (SCHERRER & Coll.) (255), (HYMER)(256), (KOCH)(257), par exemple.

CONCLUSION

Au moment où nous avons commencé ce travail les méthodes d'isolement des ARN n'étaient pas quantitatives et fournissaient des molécules profondément dégradées. Il nous a donc paru indispensable de déterminer la composition des ARN tissulaires sans les isoler au préalable, à la suite d'autres auteurs comme WERKHEISER & Coll. (258), DE LAMIRANDE & Coll. (259), ELSON & CHARGAFF (260). En même temps que nous, quelques chercheurs s'attachaient aussi à ce problème : voir KLEINSCHMIDT (261) et WEILL (262) par exemple.

B - PREPARATION DES TISSUS EN VUE DE L'ETUDE DES ARN SANS ISOLEMENT PREALABLE.

Plusieurs méthodes de traitement des tissus en vue du dosage des acides nucléiques avaient été décrites et il nous paraissait raisonnable de les appliquer pour obtenir des préparations renfermant la totalité des ARN tissulaires. Il s'agissait des procédés de SCHNEIDER (263), d'OGUR & ROSEN (264) et de SCHMIDT & THANNHAUSER (265).

1°) Procédé de SCHNEIDER.

Dans le but de déterminer la teneur des tissus en acides nucléiques, SCHNEIDER (266) a mis au point, en 1945, une méthode d'extraction de ces acides par l'acide trichloro-

cétique chaud. Cette méthode consistait à chauffer un homogénat tissulaire avec de l'acide trichloracétique à 5 p. 100 pendant 15 mn, après avoir éliminé les composés acido-solubles (dans l'acide trichloracétique froid) et les phospholipides par ébullition dans un mélange d'alcool et d'éther. L'acide trichloracétique chaud dissocie, en effet, les nucléoprotéines. SCHRAMM & DANNENBERG (267) l'avaient démontré à propos de l'ARN du virus de la mosaïque du tabac qui est quantitativement libéré par l'acide trichloracétique chaud. Cette dissociation peut même se produire quand le tissu est en contact prolongé avec de l'acide trichloracétique froid (KAPLAN, GREENBERG (268)). Il est bien évident que, dans ces conditions ce sont les produits de dégradation des acides nucléiques qui sont extraits, tandis que les protéines dénaturées précipitent. Cette méthode n'est donc pas "préparative", mais le dosage des constituants nucléiques extraits (dosage en lumière ultra-violette, dosage du phosphore ou des pentoses) peut constituer un mode de détermination de la teneur en acide nucléique des tissus traités.

D'autres acides ont été utilisés pour scinder les nucléoprotéines : DAVIDSON & WAYMOUTH (269) et SEVAG, SENOLEUS & LACKMAN (270) ont employé l'acide chlorhydrique et CASPERSSON & HAMMARSTEN (271) l'acide malonique. Mais ces deux acides ne sont pas des agents précipitants des protéines aussi efficaces que l'acide trichloracétique.

Après avoir fait des études cinétiques de l'action de l'acide trichloracétique en fonction du temps et en fonction de la concentration, SCHNEIDER proposa le mode opératoire suivant :

Le tissu est homogénéisé dans l'appareil de POTTER & ELVEHJEM (272). Les composés acido-solubles sont éliminés par traitement de l'homogénat avec de l'acide trichloracétique froid (concentration finale : 7 p. 100) et centrifugation. Le précipité formé est suspendu dans l'éthanol, puis recueilli par une nouvelle centrifugation. Un second lavage par l'éthanol permet d'éliminer toute trace d'acide trichloracétique et le culot acido-insoluble est délipidé, avec un mélange d'alcool

et d'éther (3/1) à l'ébullition (3 fois 3 mn). Le résidu suspendu dans l'eau distillée est lavé avec un égal volume d'acide trichloracétique à 10 p. 100 puis mélangé avec de l'acide trichloracétique à 5 p. 100 et chauffé pendant 15 mn. à 90°C. La solution d'extraction est recueillie par centrifugation : les acides nucléiques totaux peuvent être estimés après dosage du phosphore selon la méthode de LEPAGE & UMBREIT (273) ; l'ADN par la réaction de DISCHE (274) (dosage du désoxyribose) et l'ARN par la réaction de MEJBAUM (275) (dosage du ribose).

2°) Procédé d'OGUR & ROSEN.

La méthode de SCHNEIDER a été critiquée par OGUR & ROSEN (276) qui ont essayé de l'appliquer aux tissus végétaux. Ces auteurs ont vérifié que l'acide trichloracétique absorbe la lumière à 260 m μ et que par conséquent le dosage spectrophotométrique des acides nucléiques était faussé. D'autre part, le dosage des pentoses est dans ce cas impossible, car les extraits des tissus végétaux renferment des pentosanes et des polyuronides. Les Auteurs ~~proposèrent~~ ^{proposèrent} alors une méthode d'extraction des acides nucléiques par l'acide perchlorique qui n'absorbe pas l'ultra-violet. En étudiant les conditions de temps, de température et de concentration, ils s'aperçurent que l'ARN était beaucoup plus rapidement extrait que l'ADN, probablement sous une forme dégradée. L'acide perchlorique normal en contact prolongé à 4°C avec les tissus, extrait lentement les constituants de l'ARN. Un traitement par l'acide perchlorique à température élevée (70°C) est nécessaire pour solubiliser les constituants de l'ADN.

La détermination des acides nucléiques par spectrophotométrie , par dosage du phosphore selon la méthode de FISKE & SUBBAROW (277), des pentoses par la technique de MEJBAUM (278) modifiée, du désoxyribose par la technique de DISCHE (279) étant concordants, les Auteurs concluent à une extraction complète et sélective des ARN et des ADN.

Cependant, comme ils préconisent d'éliminer les substances alcool-solubles, éthero-solubles et acido-solubles avant de procéder à l'"extraction" proprement dite des acides ribonucléiques, il est fort probable qu'au cours des traitements préliminaires les ribonucléases tissulaires ont pu agir et rendre acido-solubles les produits de dégradation des ARN. Cela est suffisant pour expliquer le "déficit" en ARN trouvé par DE DECKEN (280) dans le foie de rat avec cette méthode.

Il semble bien par conséquent que la méthode décrite par SCHNEIDER soit plus satisfaisante que celle d'OGUR & ROSEN (toutefois, ceux-ci ont introduit l'utilisation de l'acide perchlorique 0,2 N pour la précipitation des nucléoprotéines).[‡]

D'autre part, de nombreux auteurs (CASSEL)(281), (PATTERSON (282), (OGUR lui-même)(283), (BADOLATO)(284), (TEICHI)(285) ont montré que la technique d'OGUR & ROSEN sépare incomplètement ARN et ADN.

3°) Procédé de SCHMIDT & THANNHAUSER.

Le procédé de SCHMIDT & THANNHAUSER (286) paraît à cet égard plus satisfaisant. Il offre en outre le mérite de détruire tous les enzymes dès le début des opérations sans dégrader les ARN. Les nucléoprotéines sont précipitées par l'acide trichloracétique froid puis hydrolysées par un alcali. L'ARN est ainsi scindé en ses constituants nucléotidiques ; les protéines sont hydrolysées en peptides et acides aminés tandis que l'ADN reste intact et peut être précipité de l'hydrolysât par acidification.

Le mode opératoire qui précède l'hydrolyse des nucléoprotéines est identique à celui du procédé de SCHNEIDER avec toutefois, les modifications suivantes :

[‡] Cette technique de précipitation est encore utilisée par certains chercheurs.

les tissus finement hachés sont suspendus dans l'acide trichloracétique à 7 p. 100 (p/v). En outre, la délipidation par l'alcool-éther est poursuivie par le méthanol-chloroforme (1 : 1) à l'ébullition et à reflux.

La technique de SCHMIDT & THANNHAUSER a fait l'objet des critiques d'OGUR & ROSEN (287), car la solution des ribonucléotides renferment de nombreux produits de l'hydrolyse des protéines qui absorbent l'ultra-violet. Cependant, TSANEV & MARKOV (288) ont montré qu'il était possible de doser les ARN par spectrophotométrie, en mesurant la densité optique à deux longueurs d'onde différentes (λ max. du composé à doser ; λ max. des contaminants). DE DECKEN & DE DECKEN (289) préconisent d'adsorber les ribonucléotides sur échangeurs d'anions et de les récupérer par élution acide de la résine. Après cette purification, les résultats des dosages spectrophotométriques concordent avec ceux des dosages des pentoses.

D'autre part, des pertes d'ARN ont été mises en évidence au cours de la délipidation (VENKATARAMAN (290), HALLINAN & Coll. (291), STEELE & Coll. (292), SRIPATI (293)) et l'existence d'un ARN trichloracético-soluble a été signalée par LEVY & LYNT (294), mais ces résultats demandent à être confirmés.

Enfin, la "fraction SCHMIDT-THANNHAUSER" renferme des substances phosphorées non nucléotidiques qui faussent les dosages de phosphore. Cette question sera développée plus loin et nous verrons que certains de ces composés ont été identifiés et qu'il est possible de les éliminer.

CONCLUSION

Malgré la présence de composés phosphorés non nucléotidiques dans "la fraction ARN", la technique de SCHMIDT & THANNHAUSER représente la méthode de choix pour étudier la composition des ARN. Elle répond en effet, aux impératifs suivants :

- détruire le plus tôt possible les enzymes pouvant dégrader les ARN.
- séparer complètement les ARN et les ADN.
- être quantitative.

II - PROCÉDES DE DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION MOLAIRE DES ARN.

Trois techniques différentes paraissent à priori applicables à la détermination de la composition molaire des ARN :

- le dosage des bases préalablement libérées par une hydrolyse acide totale des ARN,
- le dosage des nucléosides,
- le dosage des nucléotides libérés par hydrolyse alcaline des ARN.

Chacune de ces techniques nécessite 3 étapes :

- l'hydrolyse des acides nucléiques,
- la séparation chromatographique ou électrophorétique des produits d'hydrolyse,
- le dosage des constituants : bases, nucléosides ou nucléotides.

A - DÉTERMINATION DES RAPPORTS MOLAIRES DES BASES CONSTITUANT LES ARN.

Cette méthode a attiré de nombreux chercheurs. En effet, la séparation chromatographique des bases sur papier ou sur colonne est relativement aisée : de nombreuses résines synthétiques et différents systèmes solvants ont été essayés avec succès (voir la revue générale de BOULANGER & MONTREUIL (295)). D'autre part, la méthode de dosage spectrophotométrique des bases est extrêmement sensible et précise ; on pouvait donc espérer, en associant ces deux procédés d'analyse, déterminer avec exactitude la composition des ARN. Malheureusement, la libération quantitative des bases constituant les ARN n'est pas réalisable. En effet, les nucléotides pyrimidiques sont particulièrement résistants aux agents d'hydrolyse acide et dans les conditions d'hydrolyse qui permettent de libérer quantitativement les bases, on ne peut éviter la

dégradation de celles-ci : désamination des bases aminées, destruction des bases puriques.

1°) Hydrolyse des ARN et libération des bases.

HOTCHKISS (296) proposa d'utiliser l'acide chlorhydrique concentré à 120°C pendant 2 heures : l'extrême prutalité de cette hydrolyse la fit abandonner et DALY, ALLFREY & MIRSKY (297), préconisèrent alors l'emploi d'acide chlorhydrique 6 N, pendant 2 heures à 120°C, en tube scellé.

MARKHAM & SMITH (298), puis MacDONALD (299) utilisèrent l'acide sulfurique 1 N pendant 1 heure à 100°C. Cette hydrolyse conduit à un mélange de bases puriques et de nucléotides pyrimidiques. Ceux-ci, peuvent, selon VISCHER & CHARGAFF (300) après isolement, être traités, par l'acide formique concentré en tube scellé à 175°C, pendant 2 heures, qui libère alors les bases pyrimidiques. Cette méthode a été appliquée à l'étude de l'ARN de Levure et du Pancréas de Rat ; mais CHARGAFF & Coll. (301) ont montré qu'elle était imparfaite car l'acide uridylique résistait à l'hydrolyse formique. L'hydrolyse partielle des ARN par l'acide sulfurique 1 N ou l'acide chlorhydrique 1 N a reçu de nombreuses applications à la suite de la mise au point par MARKHAM & SMITH d'un procédé mixte de chromatographie des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques (MARKHAM & SMITH (302), SMITH & MARKHAM (303)). Cependant ces auteurs mettent en évidence une légère déphosphorylation des nucléotides pyrimidiques et doivent appliquer à leurs résultats une correction de +5 p. 100 (304). D'autre part, ABRAMS (305) estime à 7 p. 100 la désamination de l'adénine et de la guanine provoquée par ces acides chauds. Et enfin, LORING & Coll. (306) signalent la transformation d'une partie de l'acide cytidylique en acide uridylique.

MARSHAK & VOGEL (307) utilisent l'acide perchlorique 12 N pendant 1 heure à 100° en tube scellé. Cette méthode peut être appliquée à des ARN tissulaires non isolés et a

été employée par MARSHAK lui-même (308), ELMES & Coll. (309), SCHNEIDER (310), CROSBIE & Coll. (311). Ces derniers montrèrent que ce mode d'hydrolyse ne libérait pas quantitativement les bases pyrimidiques.

Enfin, une méthode d'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique à 155°C pendant 80 mn a été décrite par DUTTA, JONES & STACEY (312), mais, cette technique ne semble pas avoir reçu de nombreuses applications.

2°) Séparation de bases.

a) La chromatographie des bases puriques et pyrimidiques sur échangeurs d'ions a été introduite par COHN (313), et peut être réalisée avec succès, soit sur résines cationiques (Dowex 50, par exemple), soit sur des résines anioniques (Dowex-1, par exemple). En effet, en milieu acide, l'ionisation des groupes aminés de la guanine, de la cytosine et de l'adénine permet leur fixation sur les échangeurs de cations; leur élution est effectuée par un acide dilué (HCl 2 N). L'uracile n'est pas fixé sur la résine et se trouve dans la fraction de lavage à l'eau de la colonne. En milieu alcalin, l'énolisation des groupements cétoniques des bases, leur confère des propriétés acides et explique leur fixation sur les échangeurs d'anions.

b) La séparation des bases peut être effectuée par chromatographie de partage sur colonne d'amidon (EDMAN & Coll.) (314), DALY & MIRSKY (315), mais c'est surtout la chromatographie sur papier qui a connu le plus de succès, en raison même de son extrême simplicité.

c) De très nombreux systèmes solvants capables de réaliser la séparation des bases par chromatographie sur papier ont été décrits :

Les plus satisfaisants sont les suivants :

MARKHAM & SMITH (316) :

n-butanol/eau (86 : 14)

n-butanol/éthanol/eau (50 : 15 : 35)

n-butanol/eau (atmosphère d'ammoniaque)(86 : 14)

alcool isoamylique saturé d'eau

n-butanol/ac. formique/eau (77 : 10 : 13)

WYATT (317) : isopropanol/acide chlorhydrique/eau (170:41:39)
HCl d = 1,19

isopropanol/eau (65 : 35) ou (680 : 176 : 144).

Signalons aussi le système solvant de SMITH & MARKHAM (318) qui réalise la séparation des nucléotides pyrimidiques et des bases puriques obtenus par hydrolyse des ARN par l'acide chlorhydrique ou par l'acide sulfurique 1 N à 100°C (voir plus haut) :

butanol tertiaire/acide chlorhydrique/eau
(700 : 132 : 168)

d) La séparation des bases peut enfin être effectuée par électrophorèse sur papier, par exemple dans la solution tampon suivante : acide citrique/phosphate (pH 2,2, 220 V, 8h.,) (GHOSH & BURMA) (319).

3°) Dosage des bases.

Les bases puriques et pyrimidiques absorbent la lumière ultra-violette, et cette propriété permet leur dosage spectrophotométrique. Celui-ci peut être effectué sur les éluats des résines et des colonnes d'amidon ou des carrés de papier découpés sur le chromatogramme ou l'électrophorégramme et correspondant à l'emplacement des différentes substances préalablement repérées en lumière ultra-violette. Ces carrés de papier sont introduits dans des petits récipients avec une solution appropriée (Acide chlorhydrique 0,01 N) qui extrait les dérivés nucléiques. Les dosages sont effectués sur les

solutions obtenues : on déduit, de la densité optique et du coefficient d'absorption molaire, la concentration des bases. Les mesures se font, en général à la longueur d'onde d'absorption maximum et un facteur de correction est apporté, tenant compte de l'absorption du solvant et du papier.

B - DETERMINATION DES RAPPORTS MOLAIRES DES NUCLEOSIDES DES ARN.

Le dosage des nucléosides différents contenus dans les ARN, a été peu utilisé pour déterminer la composition quantitative de ces molécules. En effet, l'hydrolyse chimique des ARN en nucléosides est longue et délicate. Les nucléosides peuvent être obtenus par l'action de la phosphatase acide sur des nucléotides préalablement libérés par une hydrolyse alcaline des ARN. Cette technique est, par conséquent, très longue. En outre, aux inconvénients de l'hydrolyse alcaline des ARN (voir plus loin) s'ajoutent ceux de l'hydrolyse enzymatique des nucléotides. Il convient toutefois de noter que la séparation des nucléotides, s'étant révélée assez difficile, on comprend que certains auteurs aient songé à les convertir en nucléosides dont la séparation est aisément réalisable, soit par chromatographie sur colonne, soit par chromatographie sur papier.

1°) Préparation des nucléosides.

Les ARN sont hydrolysés en nucléosides par une solution d'ammoniaque à 16 p. 100 à 180°C pendant 3 à 4 heures (LEVENE) (320) ou par la pyridine à 50 p. 100 à 118°C pendant 5 jours (BREDEREK) (321). Ces techniques n'ont pas reçu beaucoup d'applications car elles ne sont pas quantitatives (voir revue générale de BOULANGER & MONTREUIL) (322) et les nucléosides en général sont préparés, comme nous l'avons vu ci-dessus, à partir des nucléotides libérés des ARN par hydrolyse sodique, à l'aide de la phosphatase acide d'origine prostatique.

2°) Séparation des nucléosides.

a) Le comportement des nucléosides sur les échangeurs d'ions est sensiblement le même que celui des bases, mais le fractionnement sur résine à échange d'anions est en général préféré au fractionnement sur échangeurs de cations. En effet, en milieu alcalin, la liaison glucosidique est stable et de plus, l'élution des nucléosides peut se faire avec des solutions tamponnées diluées qui remplacent avantageusement les solutions d'acides. Au contraire, les échangeurs de cations hydrolysent certains nucléosides (ANDERSEN & Coll.)(323). La chromatographie sur échangeur d'anions est améliorée en milieu borate (COHN)(324), (JAENIKE & VON DAHL)(325) car l'acidité de l'adénosine et de la cytidine est augmentée et leur fixation facilitée. COHN (326) sépare les nucléosides en solution dans $B_4O_7K_2$ 0,01 M, sur Dowex 1 (forme chlorure), l'élution de la colonne se faisant par un mélange de $B_4O_7K_2$ 0,02 M et KCl 0,03 M.

b) La chromatographie de partage sur colonne d'amidon suivant le mode opératoire décrit par EDMANN & Coll. (327) a été utilisée par BUELE & Coll. (328) pour la détermination de la composition des ARN du sarcome de la Poule. Le déplacement des ribonucléosides est réalisé par le passage de n-butanol saturé d'eau.

c) Les ribonucléosides sont aisément séparés par chromatographie sur papier dans les systèmes solvants décrits par MARKHAM & SMITH (329) et WYATT (330) pour séparer les bases.

d) Des méthodes de séparation électrophorétique des nucléosides ont été décrites par DIMROTH & Coll. (331), JAENIKE & Coll. (332), WERKHEISER & Coll. (333), BURKE (334).

3°) Dosage des nucléosides.

Les nucléosides, comme les bases, sont dosés par spectrophotométrie.

C - DETERMINATION DES RAPPORTS MOLAIRES DES NUCLEOTIDES DES ARN.

Cette technique présente, elle aussi, quelques difficultés. En effet, si l'hydrolyse par la soude ou la potasse des ARN en nucléotides est aisée, la séparation de ceux-ci pose un problème qui a retenu l'attention de nombreux chercheurs. Nous verrons plus loin que de nombreuses méthodes de séparation des nucléotides furent et sont encore proposées, ce qui semble indiquer que la perfection n'est pas encore atteinte.

1°) Hydrolyse des ARN en nucléotides.

L'hydrolyse des ARN en mononucléotides peut être réalisée soit par une hydrolyse ammoniacale mise au point par MONTREUIL (335) soit par une hydrolyse sodique suivant la technique de STEUDEL (336).

La soude peut être remplacée avantageusement par la potasse qui est éliminée plus facilement de la solution de nucléotides obtenue, sous forme de perchlorate de potassium (WEILL) (337).

a) Hydrolyse ammoniacale.

L'ammoniaque à 25 p. 100 avait été utilisé en 1918 par LEVENE (338) pour préparer les mononucléotides (chauffage à l'autoclave à 115°C, pendant 1 heure). A cette température, même avec des concentrations en ammoniaque inférieures, des quantités importantes d'acide phosphorique sont libérées. Au contraire, l'ammoniaque concentré, utilisé pendant 10 jours à la température du laboratoire (CALVERY et JONES) (339) ne provoque aucune déphosphorylation mais elle ne réalise qu'une hydrolyse partielle. Aussi BOULANGER & MONTREUIL (340) ont-ils préconisé l'emploi d'ammoniaque concentré en tube scellé à 37° pendant 8 jours. L'hydrolyse reste cependant incomplète. L'hydrolyse ammoniacale a été utilisée aussi par SZAFARZ & PATERNOTTE (341), mais elle est actuellement abandonnée.

b) Hydrolyse sodique.

La plupart des auteurs utilisent la soude 1 N ou

0,5 N à 37°C ou à température ordinaire : l'hydrolyse des ARN est totale en 18 heures.

L'hydrolyse sodique ou potassique est donc rapide, mais elle présente l'inconvénient de fournir des hydrolysats riches en ions Na^+ ou K^+ qui gênent considérablement la séparation chromatographique des nucléotides.

En outre, l'expérience a montré qu'elle n'était pas toujours quantitative et qu'elle désaminait parfois l'acide cytidylique en le transformant en acide uridylique. Ces observations seront discutées dans un prochain chapitre (voir p.109)

2°) Séparation des nucléotides.

1. Chromatographie sur colonnes.

a) Chromatographie sur colonnes d'amidon.

Quelques essais de chromatographie sur colonne d'amidon ont été faits par REICHART (342), HARRIS & Coll. (343), DALY, ALLFREY & MIRSKY (344). La lenteur de cette méthode et l'inexactitude des résultats obtenus ont conduit les Auteurs à l'abandonner.

b) Chromatographie sur résines échangeuses d'ions.

La chromatographie des nucléotides sur colonne de résine à échange d'ions met à profit le caractère acide de ces composés. La présence d'un radical phosphoryle dans leur molécule confère aux nucléotides des propriétés d'acide fort. Cependant la charge totale d'un nucléotide est la somme des charges provenant de l'ionisation du radical phosphoryle et des fonctions des bases puriques et pyrimidiques et elle varie avec le pH.

Les nucléotides présentent aux pH élevés une grande affinité pour les échangeurs d'anions. Inversement, pour des valeurs basses de pH, ils sont fixés par les échangeurs de cations. Dans les deux cas, l'élution peut être effectuée, soit

par augmentation de la concentration d'un ion compétitif, soit en modifiant le pH, de façon à abaisser ou à inverser la charge totale des nucléotides.

La séparation des ribomononucléotides sur résine à échange d'ions a été mise au point par COHN (345) et par CARTER (346). Elle a conduit à la mise en évidence des isomères a (2'-phosphate) et b (3'-phosphate) dont la découverte a apporté des renseignements précieux sur la structure des ARN (COHN)(347), et sur le mécanisme de l'hydrolyse sodique des ARN. (voir p. 24)

α) L'échangeur de cations, généralement utilisé est le Dowex 50, résine polystyrène sulfoné, sous la forme acide et l'élu-tion des nucléotides (introduits en solution dans l'acide acétique 0,1 M) est réalisée par le passage d'une solution d'acide acétique 0,1 M (COHN)(348). Nous avons montré que les ribomononucléotides, introduits à pH 4 sur une colonne de Dowex-50, de Permutite-50 ou d'Amberlite-IR 120 (mesh 25-50) pouvaient être déplacés par l'eau distillée dans l'ordre suivant : acide uridylique, acide guanylique et ensemble les acides cytidylique et adénylique (voir Travaux personnels). Plus récemment, KATZ & COMB (349) ont montré que les ribonu-cléotides en solution dans l'acide chlorhydrique 0,05 N pou-vaient être séparés sur une colonne de Dowex-50 x 4 (mesh 200-400) par le passage successif d'acide chlorhydrique 0,05 N pour l'acide uridylique et par l'eau distillée pour les autres nucléotides, l'acide guanylique précédant les acides adénylique et cytidylique élués ensemble.

La chromatographie des nucléotides sur échangeur de cations a été peu utilisée pour la détermination de la compo-sition des ARN sauf par KATZ & COMB (350) qui sont obligés de séparer les acides cytidylique et adénylique par chromato-gra-phie sur Dowex-1 et de purifier l'acide uridylique avant de le doser car il contient des composés phosphorés non nucléotidi-ques.

Dans nos recherches personnelles, nous avons utilisé le Dowex-50 uniquement pour purifier les hydrolysats sodiques d'ARN, les nucléotides élués ensemble étant ensuite séparés par chromatographie ou par électrophorèse sur papier.

(β) Les échangeurs d'anions employés le plus couramment sont le Dowex-1 et le Dowex-2 sous la forme chlorure (COHN) (351), l'élution des nucléotides étant réalisée par le passage de l'acide chlorhydrique dilué. Cette technique de séparation des ribomononucléotides a été utilisée par VOLKIN & CARTER (352), pour étudier la composition des ARN des tissus sains et néoplasiques de différents Mammifères et pour mesurer les activités spécifiques des nucléotides provenant d'ARN marqués. Elle a aussi été appliquée par OLMSTED & VILLEE (353) et DE LAMIRANDE, ALLARD & CANTERO (254).

La méthode a été améliorée en 1958 par PONTIS & BLUMSON (355) qui ont utilisé pour effectuer l'élution un gradient concave d'acide chlorhydrique et chlorure de calcium, le pH décroissant de 4 à 2 et la concentration en chlorure de calcium croissant jusqu'à 0,14 M. L'élimination du chlorure de calcium se fait par un mélange d'alcool et d'éther qui le dissout complètement alors que les nucléotidates de calcium restés en suspension peuvent être récupérés par centrifugation.

Les résines à échange d'anions ont encore été employées sous la forme formiate, l'élution des nucléotides étant réalisée par un gradient discontinu (COHN & CARTER (356)) ou continu d'acide formique (HURLBERT & Coll. (357)). L'élution peut se faire aussi successivement, avec de l'acide formique dilué qui déplace les acides cytidylique et adénylique, puis avec des solutions tamponnées (mélange d'acide formique et de formiate de sodium) qui déplacent les acides uridylique et guanylique (COHN & VOLKIN (358)). Cette technique a été utilisée par MORTREUIL & KHOUVINE (359) pour la détermination des radioactivités spécifiques des différents nucléotides.

En 1960, COHN (360) préconisa d'utiliser un gradient d'acide formique et de formiate d'ammonium et, un peu plus tard, il conseilla (COHN & BOLLUM) (361) l'emploi des bicarbonates qui se décomposent rapidement au cours du passage sur la résine avec perte de CO_2 et élévation du pH. Ces éluants sont préférables aux solutions salines et aux solutions acides habituellement utilisées, car ils évitent l'hydrolyse des nucléotides au cours de la chromatographie ou de l'élimination des ions.

Les procédés d'élution des nucléotides ont subi de nombreuses modifications : voir par exemple WADE (362) qui a étudié l'influence de la concentration saline et du changement de pH de l'éluant sur la résolution des nucléotides, et ANDERSON & Coll. (363) qui ont décrit une méthode permettant de séparer sur la même colonne de Dowex 1 x 8 (0,9 x 150 cm ; mesh 400) les bases, les nucléosides et les nucléotides. Un gradient linéaire d'acétate de sodium (0,6 M à 2 M) à pH 4,4 permet d'obtenir à 20°C (0,48 ml par mm) la cytosine, la cytidine, l'uridine, l'uracile, la thymine et l'inosine et, à 45°C (0,82 ml par mm), l'adénosine, l'adénine, la guanine, la guanosine, les acides cytidylique, uridylique, adénylique et guanylique dont les isomères a et b (2' et 3') sont, en outre, séparés.

Malgré les perfectionnements apportés à la méthode, la chromatographie des nucléotides sur résine à échange d'anions, appliquée à des hydrolysats d'ARN, demeure une technique longue et délicate. Il est vrai que les collecteurs de fractions et les appareils d'enregistrement automatique des densités optiques ont facilité beaucoup la tâche des Chercheurs. Cependant, bien souvent, ceux-ci doivent vérifier la pureté des composés élués, par chromatographie sur papier ou par électrophorèse, car les souillures sont nombreuses. Par exemple, YAMANA & SIBATANI (364) ont montré que l'acide uridylique était élué en même temps que de nombreuses substances de densité optique

élevée qui introduisent une cause d'erreur dans les dosages. De même, HOSODA & Coll. (365) ont décelé la présence de contaminants à côté des acides uridylique et guanylique, élués ensemble d'une résine de Dowex 1 x 8 (forme formiate). Souvent, les nucléotides sont souillés de phosphates inorganiques, ce qui a amené MITSUI, ISHAMA et OSAWA (366) à modifier la méthode décrite par OSAWA & Coll. (367) : après leur séparation sur Dowex-1, les solutions de mononucléotides sont agitées avec un égal volume d'un mélange de benzène et d'isobutanol (1 : 1) en présence de molybdate d'ammonium 0,0016 M et d'acide sulfurique 0,1 M, pour éliminer les contaminants.

La chromatographie des nucléotides sur échangeur d'anions connaît cependant encore de nombreux adeptes (voir par exemple NOMURA & Coll. (368), ISHIHARA & Coll. (369), SIBATANI & Coll. (370), SRINIVASAN (371), ALLFREY & MIRSKY (372), HIATT (373), OTAKI & Coll. (374), CANTONI (375), KITAZUME & YCAS (376), ANDOH & Coll. (377), BRACHET (378), DECROLY & Coll. (379). Il est vrai que lorsque les ARN ont été préalablement isolés par extraction phénolique suivie d'un fractionnement par chromatographie ou centrifugation différentielle (voir p. 77) comme ils le sont généralement dans les études actuelles des ARN messagers, solubles et ribosomaux, les hydrolysats contiennent moins de contaminants susceptibles de perturber la résolution des nucléotides sur résine. Toutefois, il semble préférable, avant de procéder à l'adsorption des nucléotides sur Dowex-1, de purifier, comme le font BRACHET & Coll. (380), DECROLY & Coll. (381), l'hydrolysat des ARN par une chromatographie sur charbon qui ne retient pas les impuretés, mais **fixe les nucléotides** que l'on élue ensuite par le passage d'un mélange de pyridine et d'alcool. (mode opératoire de MANDEL & Coll. (382)) (voir p.120)

c) Chromatographie sur celluloses modifiées.

Les nucléotides peuvent également être séparés par chromatographie sur DEAE-cellulose* (élution avec un gradient

* Diéthylaminoéthyl-cellulose.

de carbonate d'ammonium à pH 8,7) (SINGER & CANTONI) (383). MORISAWA & CHARGAFF (384) utilisent la DEAE-cellulose avec un gradient de concentration en chlorure de lithium (0,01 M à 1 M) dans un tampon acétate de lithium 0,01 M à pH 5.

2. Chromatographie sur papier.

La chromatographie sur papier reste la méthode la plus utilisée, car elle est plus simple, plus rapide et plus exacte. (MARKHAM 385) et de nombreux systèmes solvants ont été décrits :

- Celui de CHARGAFF (386) & Coll. : VISCHER (387), MAGASANIK (388), ELSON (389), BRAWERMAN (390) (acide isobutyrique tamponné) ne permet pas la séparation des acides uridylique et guanylique qui doivent être dosés ensemble ; la méthode chromatographique bidimensionnelle publiée en 1960 par LIPSHITZ et CHARGAFF (391) ne se prête pas à des dosages en série, pas plus que celle de GRESTFIELD et ALLEN (392).
- BOULANGER & MONTREUIL (393) ont mis au point une série de solvants phénoliques dont l'utilisation permet la séparation des 4 ribonononucléotides ; le dosage spectrophotométrique rendu impossible par la présence du phénol, est remplacé par un dosage colorimétrique du phosphore selon la méthode d'ALLEN (394) modifiée.

D'autres systèmes solvants ont été proposés, en particulier par :

- CARTER (395) : solution aqueuse à 5 p. 100 (p : v) de phosphate disodique saturée d'alcool isoamylique.
- MARKHAM & SMITH (396) : solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium/tampon acétate de sodium 0,1 M pH 6/isopropanol (79 : 19 : 2) ; ce système solvant ne sépare pas les acides cytidylique et uridylique.
- CARPENTER (397) : alcool isoamylique/tétrahydrofurfural/citrate de potassium 0,08 M pH 3,02 (1 : 1 : 1).
- KIRBY (398) : méthanol/acide chlorhydrique concentré/eau (70 : 20 : 10) ; méthanol/éthanol/acide chlorhydrique concentré/eau

(50 : 25 : 6 : 19) ; méthyl-éthyl-cétone/butanol tertiaire/ acide acétique/acide chlorhydrique/eau (22,5 : 22,5 : 35 : 19 : 1).

MANDEL, WEILL & LEDIG (399) ont publié une méthode chromatographique en deux temps. Une première chromatographie de 48 heures dans le système solvant ; propanol/ammoniaque/eau (60 : 30 : 10) permet d'isoler l'acide guanylique des trois autres nucléotides qui sont séparés dans un système solvant à base d'isobutyrate d'ammonium (acide isobutyrique/ammoniaque 0,5 N (50 : 30) pH 7 : cette deuxième chromatographie se fait dans le même sens que la première après séchage du papier, découpage de la partie supérieure où se trouve l'acide guanylique et remplacement de celle-ci par un morceau de papier de mêmes dimensions.

LANE (400) obtient de bonnes séparations des nucléotides par chromatographie sur papier imprégné de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, avec un système solvant qui est un mélange d'éthanol à 95 p. 100 et d'eau (8 : 2). Une chromatographie de 15 à 24 heures à 22°C sépare les nucléotides dans l'ordre suivant : acides cytidylique, guanylique, adénylique, uridylique.

Enfin GERLACH & Coll. (401) viennent de donner la composition de différents systèmes solvants qui permettent de séparer, selon les Auteurs, les bases, les nucléosides et les nucléotides.

Chromatographie sur papier échangeur d'ions.

Certains Auteurs ont préconisé l'emploi des papiers échangeurs d'ions pour séparer les ribonononucléotides :

- papier cellulosique contenant 46,6 p. 100 en poids d'Amberlite, résine fortement basique (forme formiate). On fait migrer pendant 2 heures, et de bas en haut, de l'acide formique 3,8 M, puis le papier est séché à l'air et coupé à 10,4 cm de l'origine. Le développement du chromatogramme pendant 6 heures avec du formiate d'ammonium 0,5 M de pH 5 achève la séparation des nucléotides récupérés par élution des bandes de 0,8 cm et repérés par leur densité optique $\lambda_{260 \text{ m}\mu}$ (SMELLIE)(402).

- papier Whatman n°1 imprégné de polyéthylène-imine : la chromatographie est réalisée avec des solutions d'électrolytes neutres (RANDERATH)(403), (VERACHTERT)(404).

- papier de diéthylaminoéthylcellulose (DEAE) sous la forme formiate; migration pendant 2 à 3 heures d'acide formique 0,05 M ; U et G migrent ensemble et sont séparés par passage, en sens inverse, dans cette zone, d'acide formique 4 M, 45 mn (JACOBSON)(405).

3. Chromatographie en couche mince.

La chromatographie en couche mince est applicable à la séparation des mononucléotides :

- couche mince de cellulose : le développement est réalisé avec le système solvant : isopropanol/ammoniaque/eau (60 : 35 : 5) ou avec le système : solution saturée de sulfate d'ammonium/isopropanol/acétate de sodium 0,5 M (80 : 20 : 18)(JOSEFSSON)(406).

- couche mince de cellulose microcristalline ; développement effectué avec le système solvant : isopropanol/acide chlorhydrique/eau (65 : 16,7 : 18,3) (GRIPPO)(407).

- couche mince de polyéthylène-imine-cellulose (RANDERATH)(408) les nucléotides sont séparés par le passage de chlorure de sodium 0,6 M pendant 5 mn, puis sans séchage intermédiaire de chlorure de sodium 0,8 M pendant 30 mn.

Cette méthode est très rapide et très sensible. Elle permet, en outre, le microdosage des substances séparées (JOSEFSSON)(409). Il semble cependant que, si ce procédé peut rendre de grands services pour des études qualitatives, il ne peut avoir la précision d'une technique plus longue mais qui fait intervenir des quantités plus importantes de substances dont le dosage est plus exact.

4. Electrophorèse.

La séparation des ribomononucléotides peut aussi être réalisée par électrophorèse sur papier (voir la revue générale de SMITH (410)).

DAVIDSON & Coll. (411), SMELLIE (412), McINDOE (413), et CROSBIE (414) utilisent un tampon citrate de sodium 0,02 M de pH 3,5 et leur technique est appliquée par de nombreux auteurs et par nous-mêmes.

Le tampon acétate (pH 3,7, force ionique 0,03), préconisé par WERKHEISER & WINZLER (415) permet lui aussi, une bonne résolution d'un mélange de mononucléotides.

D'autres systèmes-tampons ont encore été décrits :

- tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 3,2, électrophorèse sous 1000 Volts dans le tétrachlorure de carbone (MARKHAM & SMITH) (416).

- tampon formiate de pH 3,5 et de force ionique 0,1 (30 V/cm) ou tétraborate de sodium 0,1 M (CRESTFIELD & ALLEN) (417).

- solutions aqueuses d'acide butyrique à 9,2 p. 100 et de soude à 0,1 p. 100 (v:v) ; électrophorèse de 4 à 5 heures sous 400 volts sur papier Whatman n°3 lavé avec de l'acide formique 1 N (WADE & MORGAN) (418).

- tampon formiate 0,4 M de pH 3,3 ; électrophorèse de 5 heures sous 950 volts sur papier Whatman n°1 (SMITH, REBHUM & KAPLAN) (419).

- tampon acétate de lithium 0,1 M de pH 3,5 (70 V/cm) (BADER-HIRSCH & Coll.) (420).

- tampon pyridine/acétate pH 3,5, électrophorèse de 70 mm sous 3000 volts (SEBRING & Coll.) (421).



Signalons aussi la méthode de KINNORY & Coll. (422), mise au point pour la séparation des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques libérés par hydrolyse chlorhydrique des ARN (tampon acide monochloracétique de pH 3,1 et de force ionique 0,05 ; électrophorèse de 6 heures sous 9 V/cm sur papier Schleicher et Schüll 589, entre deux glaces paraffinées) et la méthode de microélectrophorèse sur fibre de cellulose d'EDSTROM (423).

FRONTALI (424) a décrit une technique d'électrophorèse sur colonne de poudre de cellulose (2 x 70) en tampon formiate d'ammonium 0,05 M, de pH 3,5 (750 Volts, 22 mA). Après 22 heures d'électrophorèse, l'élution de la colonne donne des nucléotides dans l'ordre suivant : U, G, A, C. L'opération est très longue et dure 88 heures.

Signalons enfin les techniques récentes d'électrophorèse sur couche mince :

- DE FILIPPES (425) : électrophorèse sur couche mince de cellulose dans un tampon formiate de pH 3,4, force ionique 0,1, pendant 75 mn.

- COCITO & LADURON (426) : électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose Schleicher et Schüll, 3 à 4 heures sous 300 volts en tampon acide citrique/citrate de sodium 0,01 M de pH 3,15.

3°) Dosage des nucléotides.

La plupart des auteurs et nous-mêmes (revues générales de BEAVEN & Coll. (427), LOHRING (428) et BOULANGER & Coll. (429)) mettons à profit la propriété d'absorption de l'ultra-violet que possèdent les nucléotides, pour les repérer et les doser. Mais les dosages spectrophotométriques en lumière ultra-violette sont souvent entachés d'erreurs à cause de la présence de substances interférentes. Ils ne doivent donc s'adresser qu'à des corps purs et le Chercheur doit éliminer

l'absorption propre du papier et du solvant en effectuant de nombreux "dosages à blanc".

TSANEV & MARKOV (430) préconisent une méthode fort simple pour donner une valeur plus grande au dosage spectrophotométrique, en mesurant la densité optique à 2 longueurs d'onde différentes. REID & PRATT (431) donnent une technique de détermination de la composition d'un mélange de nucléotides à partir des densités optiques à différentes longueurs d'onde. Celle-ci permet alors d'utiliser le système-solvant de VISCHER, MAGASANIK & CHARGAFF (432) qui, nous l'avons vu, ne sépare pas les acides guanylique et uridylique.

Les nucléotides peuvent être déterminés par un dosage de phosphore, après élution ou directement sur le papier du chromatogramme après minéralisation. Il s'agit d'un dosage colorimétrique, reposant sur la transformation du phosphomolybdate en bleu de molybdène, par un réducteur (voir p.128). Différentes méthodes ont été mises au point, parmi lesquelles celle de BELL & DOISY (433) modifiée par BRIGGS (434) ; celle de MACHEBOEUF & DELSAL (435) ; celle de BERENBIUM & CHAIN (436) ; celle de CHEN TORIBARA & WARNER (437) ; celle de DRYER & Coll. (438) ; celle d'HIRATA & APPLEMAN (439). Nous leur avons préféré la méthode d'ALLEN (440) qui nous a toujours donné entière satisfaction.

Pour vérifier les résultats obtenus par dosage de phosphore ou dosage spectrophotométrique, certains Auteurs déterminent la teneur en ribose. La méthode consiste à transformer, par l'acide chlorhydrique dilué, le ribose en furfural, et à doser par colorimétrie les composés de condensation que ce dernier donne avec l'orcinol (MEJBAUM) (441), le phloroglucinol (EULER) (442) ou l'acétate d'aniline (REEVES) (443). Mais seul, le ribose des nucléotides puriques réagit entièrement dans ces conditions.

DISCUSSION

Cette longue énumération des techniques de dosages chromatographiques ou électrophorétiques des mononucléotides constituant les ARN, pourrait laisser croire que le Chercheur n'a que l'enbaras du choix lorsqu'il désire déterminer les quantités relatives de ces constituants des ARN. En fait, la plupart des méthodes que nous avons citées sont applicables à l'analyse d'hydrolysats d'ARN purs mais ne sont pas satisfaisantes quand elles s'adressent à des hydrolysats d'ARN tissulaires non isolés au préalable. Il est donc indispensable, avant de procéder à une chromatographie ou à une électrophorèse des nucléotides, de les débarrasser des substances qui gênent leur séparation.

III - CONCLUSIONS.

Le seul procédé permettant de déterminer correctement la composition molaire des ARN est le dosage des nucléotides, préparés par hydrolyse alcaline de ces macromolécules, et séparés par chromatographie ou électrophorèse. Au moment où nous avons commencé nos travaux, certaines méthodes chromatographiques et électrophorétiques avaient été décrites, mais elles n'étaient applicables qu'à l'étude des ARN purs. Or les techniques d'extraction des ARN n'étaient pas satisfaisantes : la plupart fournissaient des ARN dégradés ; d'autres conduisaient à des préparations d'ARN natifs, mais l'extraction n'était pas quantitative et réalisait en outre un fractionnement des ARN en plusieurs familles de propriétés physico-chimiques et métaboliques différentes. La seule solution qui s'offrait à nous était donc d'étudier les ARN tissulaires sans effectuer leur isolement préalable. Le problème se posait alors de débarrasser les hydrolysats de tissus d'une quantité importante de substances dont la présence interdisait la séparation et le dosage des nucléotides : soude ou potasse utilisées dans l'hydrolyse ; produits de dégradation des protéides et des lipides ; ADN. Dans le chapitre suivant, nous décrirons les méthodes que nous avons mises au point et qui ont permis de résoudre ce problème. Nous exposerons, en outre, dans nos discussions, les résultats obtenus par différents Auteurs grâce à l'application des méthodes analytiques précédentes.

TRAVAUX PERSONNELS

I - TECHNIQUES

- A : Préparation des tissus
- B : Hydrolyse des ARN
- C : Purification de l'hydrolysat
- D : Séparation des nucléotides
- E : Dosage des nucléotides
- F : Vérification de la pureté des nucléotides.
- G : Composés phosphorés non nucléotidiques de la fraction ARN de SCHMIDT & THANNHAUSER.
- H : Protocole expérimental.

II - RESULTATS.

III - DISCUSSION.

I - TECHNIQUES.

L'étude critique des méthodes de préparation des ARN nous a montré la nécessité d'étudier la composition de ces macromolécules sans chercher à les isoler et à les purifier. Une hydrolyse sodique selon SCHMIDT & THANNHAUSER (444), pratiquée directement sur un homogénat tissulaire, débarrassé, par le procédé de SCHNEIDER (445), des composés acido solubles et des lipides, nous a paru un excellent moyen de scinder les ARN en leurs constituants nucléotidiques. Toutefois, les conditions de l'hydrolyse alcaline devaient être déterminées pour que celle-ci soit complète et sans danger pour les nucléotides libérés. D'autre part, la purification et la séparation des nucléotides représentaient le principal problème à résoudre pour doser sans erreur ces composés. Nos recherches ont donc porté essentiellement sur les points suivants :

- 1 - la préparation des tissus
- 2 - l'hydrolyse alcaline des ARN non isolés
- 3 - la purification des hydrolysats
- 4 - la séparation des nucléotides et la vérification de leur pureté
- 5 - le dosage de ces composés.

A) PREPARATION DES TISSUS.

Toutes nos expériences ont porté sur des rats blancs de souche Wistar, élevés au Laboratoire et nourris au Ratigène. Nous avons utilisé des animaux de 250g environ, soumis à un jeûne de 12 heures pour réduire le glycogène hépatique.

Les organes sont prélevés immédiatement après la mort de l'animal et broyés à l'aide de broyeur à main de FISCHER. La pulpe est débarrassée de la trane conjonctive par passage à travers la grille métallique de l'appareil et recueillie dans une solution aqueuse d'acide trichloracétique froid à 10 p. 100 (p/v). Au broyage fait suite une homogénéisation de 2 mn

dans 10 volumes d'acide trichloracétique à 10 p. 100, réalisée dans un appareil de POTTER-ELVEHJEM (A THOMAS Co de Philadelphie), constitué par un piston en téflon tournant dans un cylindre en verre pyrex plongé dans la glace fondante (vitesse de rotation du piston : 800 t/mn). Toutes ces opérations ont lieu en chambre froide. Il est indispensable en effet d'empêcher l'action de la ribonucléase pendant les manipulations précédant l'addition d'acide trichloracétique, c'est-à-dire avant la précipitation et la dénaturation de l'enzyme. D'autre part, il faut éviter tout risque d'hydrolyse chimique qui pourrait entraîner la perte de petits fragments au cours de l'élimination des composés acido-solubles.

Le culot de précipitation, obtenu après centrifugation 10 mn à 3000 t/mn, est traité deux fois par l'acide trichloracétique à 10 p. 100 à 4°C environ. Le résidu acido-insoluble est lavé à l'éthanol absolu puis délipidé par un mélange d'éthanol et d'éther (v/v) à l'ébullition, sous réfrigérant ascendant. On procède ainsi à 3 délipidations successives de 30 mn, en changeant le solvant que l'on élimine ensuite par centrifugation.

B - HYDROLYSE ALCALINE.

La nature de l'agent d'hydrolyse alcaline et les conditions de l'hydrolyse diffèrent suivant les Auteurs : soude ou potasse à des concentrations variant de 0,3 à 1 N, pendant des temps variant entre 12 à 24 heures, entre 20 et 40°C. C'est pourquoi nous avons réalisé une étude critique des modalités de l'hydrolyse de manière à préciser les conditions optimales pour obtenir une hydrolyse quantitative sans dégradation des ribonucléotides.

1°) Choix de la méthode d'hydrolyse.

Il était important de vérifier que l'hydrolyse alcaline ne s'accompagnait pas d'une déphosphorylation des nucléotides et d'une désamination des nucléotides aminés : acides cytidylique, adénylique et guanylique.

a) Action des alcalis sur les nucléotides aminés.

L'expérience nous a montré que les acides guanylique et adénylique étaient stables en milieu alcalin. Au contraire, l'acide cytidylique, instable, se désamine facilement en se transformant en acide uridylique. Cette propriété risquait donc, si l'hydrolyse était trop brutale, d'introduire une double erreur, par défaut dans le dosage de l'acide cytidylique, par excès dans le dosage de l'acide uridylique. Nous avons donc étudié d'une manière systématique la stabilité de l'acide cytidylique dans les conditions expérimentales suivantes.

Mode opératoire :

10 mg d'acide cytidylique pur (SCHWARZ Laboratories) sont incubés avec 20 ml de soude ou de potasse à des concentrations variables, pendant 18 heures et à des températures différentes :

NaOH 0,3 N à 20°C et à 37°C

NaOH 0,5 N à 20°C et à 37°C

NaOH 1 N à 20°C

KOH 0,3 N à 20°C et à 37°C

KOH 0,5 N à 20°C et à 37°C

KOH 1 N à 20°C

Le pH est ensuite ajusté à 4 avec de l'acide formique concentré et les solutions, préalablement diluées à 100 ml avec de l'eau distillée, sont passées sur des colonnes de Dowex 50 x 2 (forme acide ; mesh 25-50 ; 2 x 20 cm) pour être débarrassées des ions Na^+ dans des conditions identiques à celles qui seront

ultérieurement appliquées aux ARN tissulaires (voir p.119). La résine est ensuite éluée avec 1 l. d'eau distillée. Les éluats sont concentrés, puis desséchés sous un courant d'air froid. Les résidus, repris par 1 ml. d'eau distillée, sont soumis à une électrophorèse dans le tampon citrate de DAVIDSON (0,02 M ; pH 3,5 ; 600 volts ; 6 heures)(446).

L'acide uridylique, formé par désamination de l'acide cytidylique, et l'acide cytidylique lui-même, repérés en lumière ultra-violette (lampe Mineralight) sont élués dans une quantité connue d'acide chlorhydrique 0,01 N et dosés par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

Une autre série d'expériences a été réalisée en présence de sérumalbumine. En effet, le traitement par les alcalis, de l'acide cytidylique pur, représentait les conditions d'hydrolyse d'acides ribonucléiques purs, mais non celles d'acides ribonucléiques mêlés à des quantités importantes de protéides qui pouvaient parfaitement jouer un rôle de "protection" vis-à-vis de l'acide cytidylique libéré. C'est pourquoi nous avons reproduit les conditions expérimentales précédentes, mais en ajoutant à la solution d'acide cytidylique 1 g de sérumalbumine.

Résultats

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau II. Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

- 1 - La potasse est plus "agressive" que la soude.
- 2 - Le taux de désamination de l'acide cytidylique croît avec la concentration en alcali et avec la température.
- 3 - Les protéines diminuent le taux de désamination.
- 4 - Seule la soude 0,3 N, utilisée à 20°C pendant 18 heures en présence de sérumalbumine, ne désamine pas l'acide cytidylique.

TABLEAU II

Désamination de l'acide cytidylique par les alcalis

Conditions d'hydrolyse	Pourcentage d'acide cytidylique désaminé
NaOH 0,3 N 20°C 18 Heures } NaOH 0,5 N 20°C 18 Heures } NaOH 1 N 20°C 18 Heures } en l'absence NaOH 0,3 N 37°C 18 Heures } de sérumalbumine NaOH 0,5 N 37°C 18 Heures }	3,21 3,81 4,78 4,96 5,24
NaOH 0,3 N 20°C 18 Heures } NaOH 0,5 N 20°C 18 Heures } en présence NaOH 0,3 N 37°C 18 Heures } de sérumalbumine NaOH 0,5 N 37°C 18 Heures }	0 1,78 2,45 2,65
KOH 0,3 N 20°C 18 Heures } KOH 0,5 N 20°C 18 Heures } en l'absence KOH 1 N 20°C 18 Heures } de sérumalbumine KOH 0,3 N 37°C 18 Heures } KOH 0,5 N 37°C 18 Heures }	4 4,4 4,85 5,4 6
KOH 0,3 N 20°C 18 Heures } KOH 0,5 N 20°C 18 Heures } en présence de KOH 0,3 N 37°C 18 Heures } sérumalbumine KOH 0,5 N 37°C 18 Heures }	1 1,97 3,24 4,7

Discussion

Il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux qui ont été obtenus par d'autres Auteurs.

MARRIAN & Coll. (447) estiment à 33 p. 100 la désamination de l'acide cytidylique par la soude 1 N, après 12 heures d'incubation à 37°C. Au contraire, selon ces auteurs la soude 0,3 N à 37° ou 1 N à 20° ne provoquerait pas de désamination même après 24 heures.

LORING (448) signale une légère désamination provoquée par la soude 1 N à 28-30°C.

DAVIDSON & SMELLIE (449) ont montré que la désamination de l'acide cytidylique par la potasse 1 N, à 37° était égale à 10 p. 100 tandis qu'elle est nulle quand on emploie la potasse 1 N à 25°C ou la potasse 0,3 N à 37°C.

Par contre, KLEINSCHMIDT & MANTHEY (450) estiment à 2,4 p. 100 la désamination de l'acide cytidylique provoquée par la potasse 0,3 N agissant à 37°C.

La désamination de l'acide cytidylique par la potasse 1 N à 37°C est signalée aussi par RÖTTGER & FRITZ (451) : 22 p. 100 après 24 heures.

On voit donc que nos résultats sont dans l'ensemble en accord avec ceux des Auteurs précédents et que la démonstration est faite de l'agressivité des agents alcalins d'hydrolyse vis-à-vis de l'acide cytidylique. Aussi leur application doit elle être envisagée avec la plus grande prudence.

Conclusion

L'hydrolyse des ARN purs doit être effectuée avec de la soude 0,3 N à 20°C en présence de séralbumine (1 g de séralbumine pour 30 mg d'ARN pur) pour limiter la désamination de l'acide cytidylique. Celle des ARN tissulaires non isolés, avec de la soude utilisée à cette concentration et cette température, paraît sans danger, puisqu'elle est effectuée en présence d'une quantité de protéines équivalente à 1 g de séralbumine. Il reste néanmoins à vérifier le caractère

quantitatif de l'hydrolyse dans ces conditions.

b) "Quantitativité" de l'hydrolyse alcaline.

Mode opératoire.

Nous avons hydrolysé 30 mg d'ARN commercial de levure, d'une part, avec 20 ml de soude 1 N à 37°C pendant 18 heures et d'autre part avec 20 ml de soude 0,3 N à 20°C en présence de sérualbumine. Nous avons déterminé la teneur en phosphore total (voir p.129) des 2 hydrolysats, que nous avons, ensuite, amenés à pH 4 avec de l'acide formique concentré et centrifugés. La teneur en phosphore total des 2 solutions a été déterminée puis celles-ci ont été purifiées sur Dowex 50 selon le mode opératoire décrit p. 123 . Les hydrolysats purifiés ont ensuite été concentrés et soumis à l'analyse électrophorétique (voir p.128 et 130).

Résultats.

1 - Les teneurs en phosphore total des hydrolysats, avant et après acidification par l'acide formique, sont identiques (Tableau III). Il n'y a donc pas d'entraînement de composés phosphorés (oligonucléotides éventuels) par le précipité de protéines, dans le cas de l'hydrolyse par la soude 0,3 N.

2 - Dans les deux hydrolysats, nous n'avons identifié, par électrophorèse, que les quatre nucléotides constituant, à l'exclusion de toute trace d'oligo ou de polynucléotides et de nucléosides.

3 - La somme des "densités optiques" U.V. des quatre nucléotides séparés par électrophorèse est égale à la densité optique totale de la solution déposée au point de départ (Tableau III).

Nos résultats montrent que l'hydrolyse par la soude 0,3 N à 20°C pendant 18 heures, est quantitative et que les effets de ce mode d'hydrolyse sont identiques à ceux de l'hydrolyse par la soude 1 N à 37°C pendant 18 heures : l'absence d'oligonucléotides dans les deux hydrolysats est à cet égard démonstrative. D'autre part, ils confirment l'existence d'une

TABLEAU III

	Conditions d'hydrolyse	
	NaOH 1 N 37°C ; 18 h	NaOH 0,3 N ; 20°C ; 18 h en présence de sérumalbumine
Phosphore total de l'hydrolysate	2,468 ng	2,406 mg
Phosphore total du surnageant de la préci- pitation à pH 4	2,485 ng	2,421 mg
Densité optique des solutions d'élution de chaque nucléotide séparé par électrophorèse Ξ		
U	0,368	0,352
G	0,277	0,274
C	0,141	0,155
A	0,354	0,355
Total	1,140	1,136
Densité optique de la solution déposée au point de départ de l'électrophorèse $\Xi\Xi$	0,282 → 1,128	0,285 → 1,14

Ξ : Chaque nucléotide est élué dans 5 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N

$\Xi\Xi$: Ce dépôt (non soumis à l'électrophorèse) est élué dans 20 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N.

NOTA: Tous les dosages sont effectués en 4 exemplaires. Ce tableau rassemble les moyennes des résultats d'une expérience qui a été répétée 4 fois.

désamination de l'acide cytidylique par la soude 1 N à 37°C (Tableau IV). Enfin, l'absence de nucléosides, montre qu'il n'y a pas de déphosphorylation des nucléotides libérés.

TABLEAU IV

COMPOSITION NUCLEOTIDIQUE DE L'ARN DE LEVURE DETERMINEE
APRES HYDROLYSE DANS DES CONDITIONS DIFFERENTES.

NUCLEOTIDES	Conditions d'hydrolyse	
	NaOH 0,3 N 20°C en présence de sérumalbumine	NaOH 1 N 37°C
U	14,1 [*]	14,8 [*]
G	9,2 [*]	9,4 [*]
C	9,1 [*]	8,3 [*]
A	10	10

* nombre de molécules pour 10 molécules d'acide adénylique

NOTA : le pourcentage de désamination de l'acide cytidylique par la soude 1 N à 37°C est de l'ordre de 8,8

Discussion.

De nombreux auteurs se sont penchés sur la question de l'hydrolyse quantitative des ARN par les alcalis et montré que certaines liaisons internucléotidiques possédaient une stabilité relative.

Des études cinétiques de l'hydrolyse alcaline indiquent des différences de susceptibilité au clivage entre les liaisons esters phosphoriques internes de ces polynères (CAVALIERI(452), BACHER (453), HAKIM (454), KALTREIDER (455));

en particulier, les liaisons purines-nucléotides sont plus résistantes que les liaisons pyrimidiques (MAGASANIK & CHARGAFF (456) ; BOULANGER & Coll. (457) ; MONTREUIL (458) ; LANE & BUTLER (459). Ces dernières sont "stabilisées" par la substitution d'un groupe NH_2 par un groupe OH en position 6 de la pyrimidine (LANE & ALLEN)(460). RICH (461) parvient à la même conclusion en expérimentant avec des polyribonucléotides synthétiques (poly U, poly C, poly ribopurine nucléotides).

CRESTFIELD & Coll. (462) ont publié que 3 p. 100 de l'ARN résistaient à l'activité de la soude 1 N à 37°C et ALLEN & Coll. ont démontré la présence d'oligonucléotides dans les hydrolysats d'ARN de Levure (SMITH & ALLEN)(463) et de pancréas (KEMP & ALLEN (464) effectués par la soude 1 N pendant 24 heures à 22°C.

DE LAMIRANDE, ALLARD & CANTERO (465) ont signalé que la proportion des nucléotides libres est beaucoup plus élevée avec la potasse 1,5 N pendant 24 heures (98 %) qu'avec la potasse 1 N (90 %). Et d'après ces auteurs, la densité optique des nucléotides libérés par la potasse 0,3 N est égale aux 70 p. 100 de celle de l'hydrolysat.

Selon POTTER & DOUNCE (466) la soude 1 N agissant à 37°C pendant 20 heures libère 62,3 p. 100 des nucléotides de l'ARN
de pancréas

82,1 p. 100 des nucléotides de l'ARN
de foie

94,6 p. 100 des nucléotides de l'ARN
de Levure.

Les fractions alcali-stables seraient des complexes nucléotides-acides aminés, et une liaison phospho-amide a même été proposée pour expliquer la résistance à l'alcali : elle empêcherait la formation de phosphates cycliques étape intermédiaire de l'hydrolyse alcaline (BROWN & TODD (467)).(voir p. 24).

Enfin, signalons que LANE & BUTLER (468) ont trouvé dans la fraction résistant à l'action de la potasse 1 N à 20°C pendant 24 heures, des oligonucléotides différents parmi lesquels l'acide di-adénylique qui constitue le composant majeur.

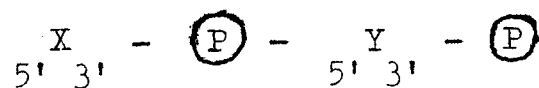
Il semble donc que les ARN ne soient pas entièrement hydrolysés en mononucléotides et qu'il subsiste une petite proportion de séquences nucléotidiques résistant aux alcalis. Ceci avait déjà été signalé par CHARGAFF & Coll. (469) ; MAGASANIK & CHARGAFF (470) et COHN (471).

L'explication actuellement proposée est la présence d'un substituant occasionnel sur l'OH en 2 du ribose qui empêcherait la formation de l'intermédiaire cyclique triester. En effet, le 2-méthyl-ribose a été identifié dans certaines préparations (SMITH & DUNN (472)) (BRAWERMAN & CHARGAFF (473)). MORISAWA (474) vient de montrer que les di-nucléotides alcali-stables de l'ARN du foie de Rat donnent, après digestion enzymatique, la 2'O méthylguanosine et la 2'O méthylcytidine en plus des nucléosides habituels. Ces dinucléotides possèderaient la structure schématisée dans la Fig..23 où X est le 2-méthyl-riboside de G ou C, Y étant un riboside normal de U, G, C ou A. Selon MORISAWA, ces di-nucléotides constitueraient, avec le guanosine-diphosphate (voir p.25) provenant de l'extrémité de la chaîne (MARKHAM, MATTHEWS & SMITH (475)), les 3,6 p.100 du phosphore ARN total du foie de Rat. Des 2'-O-méthylribonucléotides ont été caractérisés aussi par HALL (476) dans l'ARN de Levure.

Conclusion.

L'hydrolyse sodique selon STEUDEL (477) qui est classiquement utilisée, ne semble donc pas être quantitative..

Toutefois, nos résultats personnels semblent démontrer que l'hydrolyse de l'ARN de Levure est pratiquement totale, qu'elle soit effectuée avec de la soude 0,3 N à 20°C ou avec de la soude 1 N à 37°C.



X : guanosine

Y : adénosine

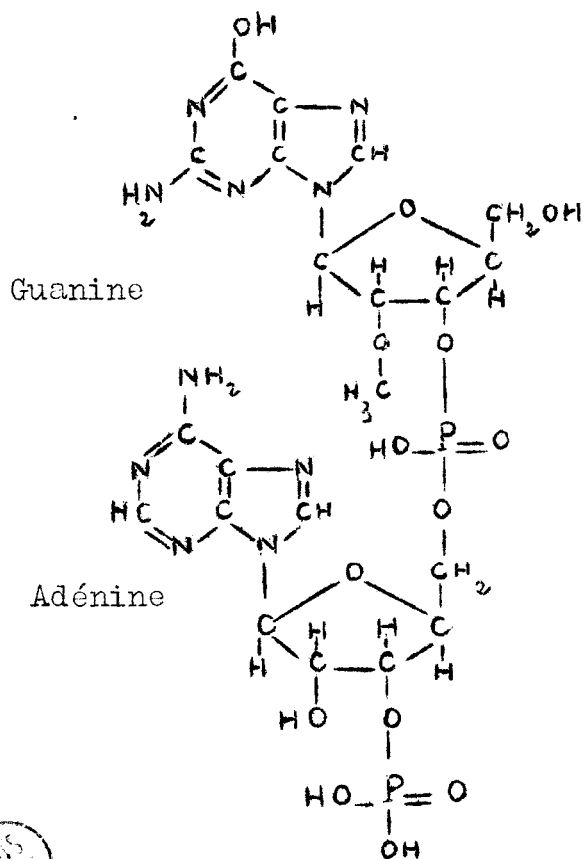


FIGURE 23

Structure d'un dinucléotide alcali-stable.

c) Application à un ARN tissulaire.

Les expériences précédentes ont montré que :

- l'hydrolyse d'un ARN de levure pur par la soude 0,3 N à 20°C en présence de sérualbumine, est complète et ne désamine pas l'acide cytidylique.
- la soude, à la même concentration ou à concentration légèrement supérieure (0,5 N), mais employée à 37°C en présence de sérualbumine, désamine l'acide cytidylique pur dans des proportions assez faibles (2,45 - 2,65 %).

Il nous a paru alors raisonnable, afin de ne pas courir le risque d'une hydrolyse incomplète, d'utiliser pour les ARN tissulaires, la soude 0,5 N à 37°C, 18 heures, et d'appliquer éventuellement un facteur de correction pour compenser la désamination de l'acide cytidylique. Avant d'appliquer ce mode d'hydrolyse, systématiquement à des ARN tissulaires, nous avons procédé aux essais suivants :

Mode opératoire.

Deux foies de rats sont traités selon la méthode décrite plus haut. Le culot de centrifugation, après traitement à l'alcool-éther est homogénéisé dans 40 ml de soude 0,3 N en chambre froide. La solution obtenue est divisée en deux parties égales. Une partie est laissée à 20°C pendant 18 heures. L'autre partie est additionnée d'un faible volume de soude concentré de façon à anener la concentration finale en soude à 0,5 N, puis maintenue à l'étuve à 37°C pendant 18 heures. Les deux hydrolysats sont alors anenés à pH 4 avec de l'acide formique et centrifugés : les liquides surnageants sont filtrés et dilués à 25 ml avec de l'eau distillée. Le dosage de P est pratiqué sur 1 ml. de chaque solution.

Après purification sur Dowex 50 x 2 (voir p. 123), les hydrolysats sont soumis à une électrophorèse en tampon citrate pH 3,5 et les 4 nucléotides sont dosés spectrophotométriquement (voir p. 130).

Résultats.

1 - Les dosages de phosphore total dans les solutions de "défécation" formique ont donné les résultats suivants :

Hydrolyse par la soude 0,5 N à 37°C : 3 002 mg

Hydrolyse par la soude 0,3 N à 20°C : 2,967 mg (soit 1,16 p. 100 de moins)

2 - Les rapports molaires des nucléotides présents dans les deux hydrolysats sont précisés dans le Tableau V . On voit que l'application des deux procédés d'hydrolyse ne révèle pas de différences significatives.

3 - Il n'a pas été trouvé sur les électrophorogrammes de composés absorbant l'U.V., autres que les 4 nucléotides classiques : pas d'oligonucléotides, pas de nucléosides.

TABLEAU V

Composition en nucléotides des ARN de Foie de Rat hydrolysés dans différentes conditions.

		Conditions d'hydrolyse	
		NaOH 0,3 N 20°C, 18 h	NaOH 0,5 N 37°C, 18 h
<u>Composition</u>			
<u>centésimale</u>			
	U	19,1	19,6
	G	30,6	30,6
	C	31,2	30,6
	A	19,2	19,1
<u>Rapports molaires:</u>			
(*)	U	10	10,3
	G	16	16
	C	16,3	16
	A	10	10

(*) Calculés pour 10 moles d'acide adénylique.

Discussion.

Si l'on considère que l'hydrolyse des ARN de foie de rat par la soude 0,3 N à 20°C est totale (malgré le faible "déficit" en phosphore total de l'hydrolysats) et que la désamination de l'acide cytidylique est nulle dans ces conditions, on peut calculer que 1,8 molécules pour 100 molécules d'acide cytidylique sont transformées en acide uridylique au cours de l'hydrolyse par la soude à 0,5 N à 37°C.

2°) Conclusions générales.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que :

- 1 - la potasse est plus agressive que la soude.
- 2 - les protéines exercent un effet protecteur sur les produits de clivage des ARN. L'hydrolyse doit donc être plus douce en absence de protéines et effectuée par la soude 0,3 N à 20°C.
- 3 - la soude 0,5 N utilisée pour hydrolyser des ARN non isolés, à 37°C, pendant 18 heures, ne dégrade pas les nucléotides qu'elle libère quantitativement. (faible désamination de l'acide cytidylique, inférieure à 2 p. 100).

(L'hydrolyse de nos ARN tissulaires non isolés sera donc réalisée par la soude 0,5 N à 37°C pendant 18 heures.

C - PURIFICATION DES HYDROLYSATS.

Avant d'être soumis à l'analyse chromatographique ou électrophorétique, les hydrolysats tissulaires doivent être débarrassés de l'ADN, des produits de clivage des protéines et des cations provenant de l'agent d'hydrolyse.

L'ADN et les peptides sont facilement écartés par acidification de l'hydrolysats. L'abaissement du pH fait en effet précipiter ces molécules que l'on peut éliminer par centrifugation.

Les ions K^+ (dans le cas d'une hydrolyse par la potasse) peuvent être éliminés sous forme de perchlorate de potassium insoluble mais ce précipité entraîne parfois quelques

nucléotides (KITAZUME & YCAS (478)). D'autre part, la chromatographie des hydrolysats ainsi débarrassés des cations demeure assez difficile. C'est ainsi que MANDEL (479) et ses Collaborateurs LEDIG (480) et WEILL (491) ont été amenés à mettre au point différents procédés de purification des hydrolysats pour pouvoir séparer correctement les nucléotides, tels que chromatographie préliminaire dans le système Butanol/ammoniaque 0,5 N(90 : 40), ou "passage" sur charbon activé qui adsorbe les nucléotides et laisse passer les contaminants : les nucléotides sont ensuite élués par un mélange éthanol-ammoniaque-eau (50 : 20 : 30).

La purification des hydrolysats d'ARN peut aussi être réalisée à l'aide des résines à échange d'anions. Celles-ci fixent en effet les nucléotides qui peuvent ensuite être déplacés par des solutions acides (voir p.93). Un tel procédé a été utilisé par BOULANGER, MONTREUIL & MASSE (482) et BOULANGER & MONTREUIL (483) pour leurs études d'incorporation du radio-phosphore dans les ribomononucléotides. Toutefois, il ne semble pas que la récupération des nucléotides soit totale et, si nous avons adopté le mode opératoire de ces Auteurs (en y apportant quelques modifications : voir p.183) pour la mesure des radioactivités spécifiques des nucléotides, au cours de nos études métaboliques, nous ne l'avons pas utilisé pour nos essais de détermination de la composition nucléotidique des ARN.

Nous préférons utiliser les résines à échange de cations, qui, non seulement fixent les ions Na^+ provenant de la soude utilisée pour l'hydrolyse, mais aussi les acides aminés et les petits peptides non précipités par acidification de l'hydrolysat et qui gênent la chromatographie et l'électrophorèse des nucléotides.

1°) Choix de la résine.

L'emploi des résines à échange de cations avait été préconisé par MONTREUIL & BOULANGER (484), BOULANGER & MONTREUIL (485) pour la purification des hydrolysats d'ARN isolés. Des essais systématiques nous ont montré que plusieurs échangeurs de cations étaient satisfaisants : Amberlite IR 120, Permutite-50 ou Dowex-50 ; à 2, 4 ou 8p. 100 de liaisons croisées ; de mesh 25-50. Nous utilisons couramment au Laboratoire le Dowex-50 x 2 ; mesh 25-50 ; sous sa forme acide. Cette dernière est obtenue par le passage, sur la résine, d'une solution d'acide chlorhydrique 2,5 N (0,5 l. pour une colonne de 2 x 20 cm) suivi d'un lavage soigneux à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne 6 à 6,5.

2°) Choix de la solution d'élution.

Dans le procédé original de BOULANGER & MONTREUIL (486) le déplacement des acides uridylique et guanylique se faisait par l'eau distillée, celui des acides cytidylique et adénylique était réalisé par le passage d'une solution ammoniacale. Ce procédé n'était pas applicable aux hydrolysats tissulaires car l'ammoniaque éluait les protides fixés sur la résine et la présence de ceux-ci rendait ininterprétables nos chromatogrammes et électrophorégrammes.

Après l'essai de nombreuses solutions d'élution, nous avons eu la surprise de constater que les acides cytidylique et adénylique n'étaient pas énergiquement "échangés" sur l'échangeur de cations, mais simplement "retardés" dans leur déplacement dans la colonne, par rapport aux acides guanylique et uridylique et que le passage d'un grand volume d'eau distillée permettait leur récupération totale. Ce résultat est illustré par la Fig. 24. On voit que l'ordre d'apparition des nucléotides est le suivant : acide uridylique, acide guanylique (x), acides cytidylique et adénylique.

(x) L'acide phosphorique et l'acide glycérophosphorique accompagnent ces nucléotides.

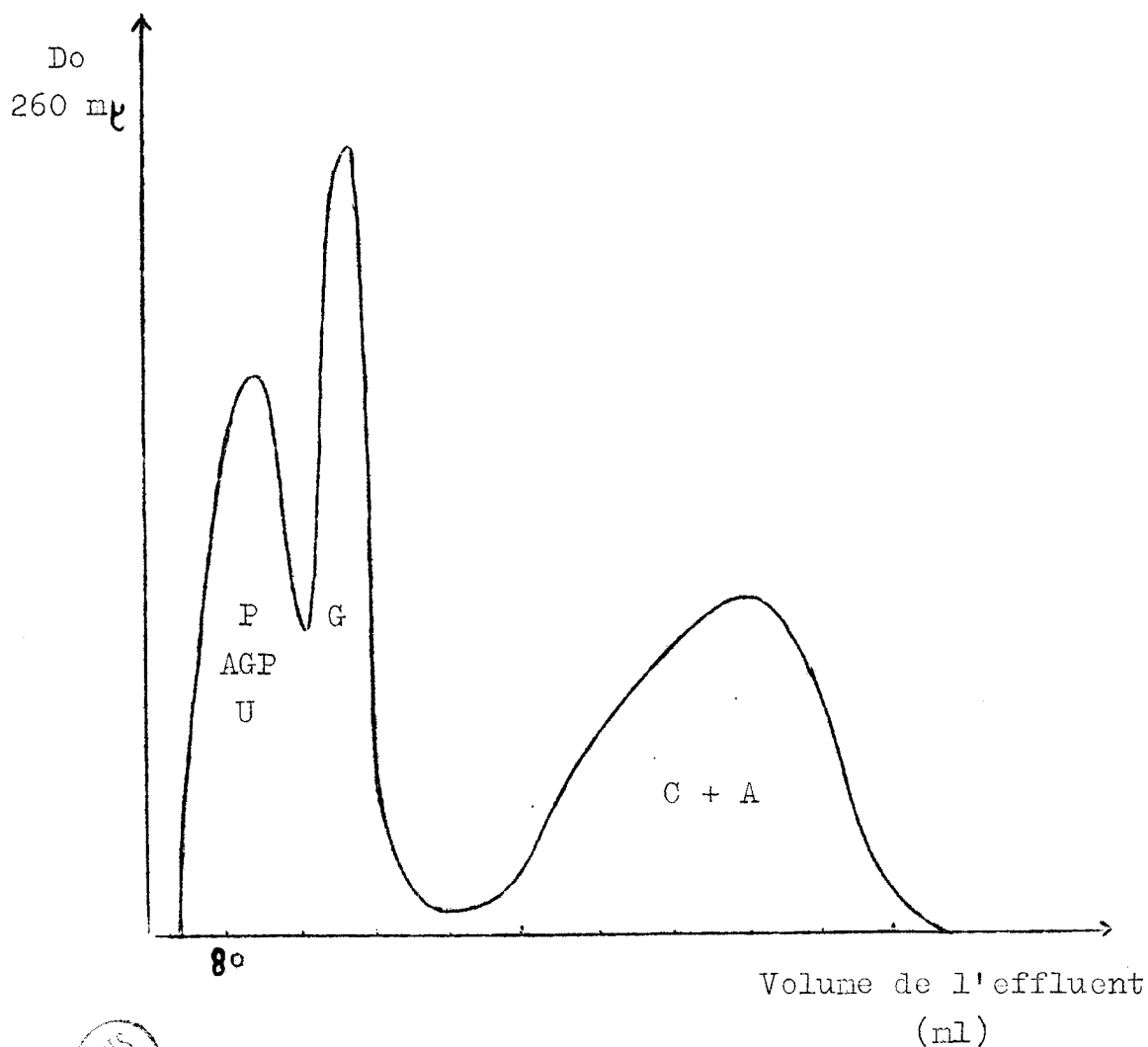


FIGURE 24

Courbe de déplacement par l'eau distillée des ribonucléotides (4 mg de phosphore total) passés sur une colonne de Dowex-50 x 2 (mesh 25-50 ; forme acide ; 2 x 20 cm).

P, AGP, U, G, C, A : respectivement les acides phosphorique, glycérophosphorique, uridylique, guanylique, cytidylique et adénylique, identifiés par chromatographie sur papier.

L'expérience nous a montré que la purification des solutions de nucléotides par le Dowex-50 obéit aux règles suivantes :

a - le volume de la résine à utiliser est fonction de la quantité de phosphore total présent dans la solution à purifier. Une colonne de 2 x 20 cm assure la purification d'un hydrolysât tissulaire contenant 4 mg de phosphore total et 20 ml de soude 0,5 N.

b - le volume d'eau distillée à passer sur la colonne pour assurer le complet déplacement des nucléotides est fonction de la quantité de ces derniers présents dans l'hydrolysât. Par exemple, sur une colonne de 2 x 20 cm, il faudra passer :

500 ml d'eau pour 1 mg de phosphore total
640 ml d'eau pour 2 mg de phosphore total
945 ml d'eau pour 4 mg de phosphore total.

c - la vitesse d'écoulement de l'hydrolysât et de l'eau de lavage de la résine possède une importance capitale pour la valeur de la purification. Celle-ci nous a paru correcte lorsque le débit de la colonne est réglé à 0,6 ml/mn.

Conclusion.

(La purification des hydrolysats tissulaires (4 mg
{ de phosphore total - 20 ml de soude 0,5 N) se fera par "pas-
{ sage" sur une colonne de Dowex-50 x 2 (mesh 25-50) (2 x 20 cm)
{ suivi d'un lavage de la résine par 1 l. d'eau distillée.
{ Hydrolysât et eau de lavage coulent à la vitesse de 0,6 ml/mn
{ et sont recueillis dans un récipient renfermant du chloroforme.

D - CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE SUR PAPIER
DES RIBONUCLEOTIDES.

Les solutions d'élution des nucléotides sont concentrées sous pression réduite dans un évaporateur rotatif ERAI à 30°C ou sous un courant d'air. Elles sont ensuite évaporées à siccité dans une capsule sous un courant d'air froid en présence de chloroforme. Le résidu sec est repris par un faible volume d'eau distillée (0,5 à 2 ml, suivant concentration). La solution obtenue est centrifugée en tube conique et décantée. Elle est soumise immédiatement à l'analyse chromatographique descendante sur papier Whatman n°1 (W1) dans le système solvant de BOULANGER & MONTREUIL (487), et à l'analyse électrophorétique dans le tampon de DAVIDSON & Coll. (488). Ce mode opératoire a été défini à la suite des expérimentations suivantes :

1°) Dissolution des nucléotides.

La dissolution des nucléotides se révéla comme un problème assez délicat à résoudre. Il importait en effet que la récupération des nucléotides fût totale et surtout non sélective. Il importait aussi que ce solvant ne gênât pas les analyses ultérieures. Nous avons tout d'abord utilisé l'ammoniac à 5 p. 100 (v/v) comme le préconisait MONTREUIL (489) mais la dispersion des résultats de dosages nous firent penser que la solubilisation des nucléotides était incomplète. Des essais systématiques suivants furent alors entrepris :

Un hydrolysât de 4 foies de Rats a été partagé en 4 parties égales qui ont été passées sur des colonnes de Dowex-50, lavées ensuite avec la même quantité d'eau distillée. Des dosages de phosphore pratiqués sur les 4 éluats donnèrent des résultats identiques. Les éluats furent concentrés, puis desséchés en capsules. Les résidus des quatre capsules furent repris par la même quantité d'eau distillée, d'ammoniac à

5 p. 100 ou d'acide chlorhydrique 0,1 N ou 0,01 N.

Des chromatogrammes ont ensuite été exécutés avec les mêmes quantités de chacune des solutions obtenues et les rapports molaires des différents nucléotides ont été calculés (suivant le mode opératoire décrit plus loin: p.147) ainsi que la quantité de nucléotides récupérés.

Résultats.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau VI. On voit que :

a - la chromatographie sur papier est perturbée par la présence de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Cependant, les dosages de phosphore pratiqués sur les nucléotides mal séparés permettent de constater que leur récupération est totale dans ces conditions. Toutefois, ~~est~~ bien que l'acide chlorhydrique 0,1 N ne gêne pas la séparation électrophorétique des nucléotides, ce solvant fut abandonné : nous désirions en effet effectuer, d'une manière comparative, sur les mêmes solutions, à la fois les chromatogrammes et électrophorégrammes pour vérifier nos résultats.

b - l'acide chlorhydrique 0,01 N ne gêne pas la chromatographie sur papier, mais l'acide guanylique y est peu soluble.

c - l'ammoniaque à 5 p. 100 dissout en même temps que les nucléotides, quelques peptides non retenus par la résine, dont la présence nuit à la qualité des chromatogrammes. En outre, l'acide guanylique est peu soluble en solution ammoniacale.

d - la récupération des nucléotides par l'eau distillée est totale.

Conclusion.

(Pour ces différentes raisons, les résidus d'évaporation des éluats de résine seront repris par l'eau distillée.

TABLEAU VI

Variation, en fonction du procédé de solubilisation des

nucléotides,

des quantités récupérées pour chacun d'eux, et des rapports molaires calculés après chromatographie sur papier (Hydrolysats de Foie de Rat).

Procédé de solubilisation	Quantité de P déposé	Quantité de P récupérée						Rapports molaires			
		P ⁰	X ⁰	U	3	C	A	Total	U	G	C
Eau distillée	27,91	3,25	4,12	4,12	6,25	6	4	27,74	20,2	30,6	29,4
Ammoniaque 5 p. 100	27,79	3,15	4,25	4,37	5,62	6,12	4	27,51	21,8	28,1	30
Ac. chlorhydrique 0,1 N	27,83	3,25	4,12	4,12		(G + C)				(G + C)	
Ac. chlorhydrique 0,01 N	27,71	3,15	4,12	4,25	4,25	5,87	3,87	25,51	23,3	23,3	32,1

- (*) quantité déduite - du dosage de P effectué sur l'éluat de la résine avant dessiccation (4 mg environ).
 - du volume de la solution obtenue après reprise du résidu de dessiccation par 2 ml.
 - du volume déposé sur les chromatogrammes (15 p1).

(⁰) P et X désignent respectivement l'acide orthophosphorique provenant de l'hydrolyse des phosphopeptides et l'acide glycérophosphorique (voir p.137).

NOTA : Tous les dosages ont été effectués en 4 exemplaires.

2°) Séparation des nucléotides par chromatographie sur papier;

La chromatographie se fait sur papier Whatman n°1 dans le solvant suivant (BOULANGER & MONTREUIL (490)) :

Acide formique/isopropanol/phénol/eau (10 : 5 : 85 : 100)

Le phénol utilisé est du phénol aqueux préparé par l'addition de 100ml. d'eau distillée à 950 g de phénol pur fondu. La phase phénolique du système solvant constitue la phase mobile. La phase aqueuse, additionnée d'une pincée de KCN (cyanure de potassium) constitue la phase de saturation de la cuve.

Nos cuves à chromatographie sont de dimensions réduites pour permettre une bonne saturation et placées dans une pièce climatisée dont la température est réglée à 22°C.

Les dépôts sont faits sous forme de traînées de 2,5 cm de longueur et de largeur minimum (ou de 3 spots distants de 1 cm), à 10 cm du bord supérieur du papier. Sur chaque chromatogramme est déposé un témoin constitué par un mélange des 4 nucléotides purs (50 µg de chaque ribonucléotide : mélange des nucléosides 2' et 3' phosphates).

Après passage du solvant, les feuilles de papier sont séchées à l'étuve à 80°C et les composés phosphorés sont révélés par pulvérisation du réactif de HANES & ISHERWOOD (491).

Molybdate d'ammonium à 8 p. 100	:	125 ml.
Acide perchlorique pur		50 ml.
Acide chlorhydrique 1 N		100 ml.
Eau distillée qsp		1000 ml.

Après exposition des chromatogrammes à la lumière solaire (MONTREUIL)(492) ou devant une lampe germicide (BANDURSKI & Coll. (493)), (GUERIN)(494), l'emplacement des nucléotides est marqué par l'apparition de taches bleues sur un fond blanc.

Ces taches sont découpées et les dosages de phosphore sont pratiqués selon la méthode décrite plus loin.

Les résultats obtenus permettent de déterminer les quantités relatives des différents nucléotides des ARN analysés.

3°) Séparation électrophorétique des ribonucléotides.

Après purification sur Dowex-50, la solution des ribonucléotides peut être soumise à une électrophorèse dans une cuve "en toit", sur papier d'Arches n°304 ou sur papier Whatman n°1 dans le tampon citrate 0,02 M de pH 3,5, de DAVIDSON & SMELLIE (495). Elle est déposée (quantité correspondant à 100 µg maxima de chaque nucléotide) à 12 cm du bord du papier plongeant dans le godet cathodique et on applique une tension de 11 V/cm pendant 6 heures. L'expérience a montré que les acides cytidylique et adénylique étaient mieux séparés quand la pente du papier est plus douce du côté cathodique que du côté anodique. Après séchage des électrophorogrammes à la température du Laboratoire, l'emplacement des nucléotides est repéré en lumière ultra-violette.

E - DOSAGE DES NUCLEOTIDES.

1°) Dosage du phosphore des nucléotides séparés par chromatographie sur papier.

Les taches bleues correspondant aux nucléotides révélés avec le réactif de HANES & ISHERWOOD (496) sont découpées et introduites dans des tubes jaugés en verre pyrex. On ajoute :

0,5 ml. d'acide nitrique concentré

1 ml. d'un mélange d'acide sulfurique d'acide perchlorique (3 v/2 v)

et on chauffe fortement jusqu'à destruction complète du papier et disparition des vapeurs nitreuses. On poursuit la minérali-

sation une demie heure à chauffage modéré. Après refroidissement, on ajoute dans chaque tube 10 ml. d'eau distillée et on porte à l'étuve à 80°C pendant 2 heures pour hydrolyser les métaphosphates.

Le dosage de phosphore est effectué dans les tubes refroidis selon la méthode d'ALLEN (497). On ajoute :

- 1 ml. de molybdate d'ammonium à 8,3 g p. 100 ml. d'eau bidistillée
- 1 ml. de solution réductrice préparée extemporanément en dissolvant 1 g d'amidol dans 100 ml. d'une solution aqueuse de sulfite de sodium anhydre à 20 g p. 100 ml.
- de l'eau distillée qsp 15 ml.

Le développement de la coloration bleue a lieu à l'obscurité pendant 20 mn et on en mesure l'intensité au photomètre de MEUNIER (écran rouge, cuve de 4 cm d'épaisseur). Des dosages témoins sont effectués à partir de morceaux de papier de mêmes dimensions découpés sur les bords des chromatogrammes. L'étalonnage préalable de l'appareil a été effectué à l'aide de solutions de phosphate monopotassique.

2°) Dosage des nucléotides séparés par électrophorèse.

Les nucléotides repérés, après séchage du papier, dans une chambre noire au moyen d'une lampe à lumière ultraviolette (Mineralight) sont cerclés par un fin trait de crayon. Ils sont dosés spectrophotométriquement, si l'électrophorèse a lieu sur papier d'Arches, et par la méthode d'ALLEN décrite précédemment, si elle a été faite sur papier Whatman n°1. En effet, le papier d'Arches n'est pas indiqué si l'on désire pratiquer les dosages de phosphore après minéralisation du papier : il est trop épais et sa destruction nécessite des quantités importantes d'acide nitrique. D'autre part, le papier Whatman n°1 est à déconseiller pour les dosages spectrophotométriques car il absorbe fortement l'UV.

Le dosage spectrophotométrique des nucléotides est réalisé sur les solutions d'élution de carrés de papier dont la surface est à peine supérieure aux surfaces délimitées par la trait de crayon. Ces carrés sont découpés et introduits en petits morceaux dans des flacons contenant un volume connu d'acide chlorhydrique 0,01 N (0,1 N pour l'acide guanylique). On utilise en général 5 ml. pour éluer une quantité de nucléotide voisine de 100 μ g. L'élution des nucléotides est totale après 18 heures à la température du Laboratoire. Des carrés de papier de mêmes dimensions sont découpés à côté des nucléotides et élués de la même manière : ils servent de témoins et permettent d'éliminer l'absorption propre du papier et du solvant. Les densités optiques des solutions sont mesurées à 250, 260, 280 et 290 m μ . Les quantités de nucléotides sont déduites des densités optiques à 260 m μ et des coefficients d'extinction moléculaire donnés par BEAVEN & Coll. (498).

Tous les dosages sont faits en 4 exemplaires en présence de 4 témoins papier.

F - VERIFICATION DE LA PURETE DES NUCLEOTIDES
SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE
SUR PAPIER.

1°) Pureté des nucléotides séparés par chromatographie sur papier.

Les quantités de chaque nucléotide étant déduites des dosages de phosphore pratiqués directement sur les chromatogrammes, il importait de vérifier qu'aucune substance phosphorée susceptible de fausser les déterminations, ne migrerait en même temps que les nucléotides. Les dosages de phosphore devaient donc être vérifiés par des dosages spectrophotométriques ; or, l'étude spectrophotométrique est rendue impossible par la présence du phénol sur les chromatogrammes. Il nous fallait donc recueillir séparément les nucléotides par une

élution dans l'eau distillée, éliminer le phénol des solutions obtenues par une deuxième chromatographie dans un système solvant qui n'absorbe par l'UV, pratiquer à partir de ces derniers chromatogrammes l'élution des nucléotides dans l'acide chlorhydrique 0,1 N ou 0,01 N pour effectuer l'étude spectrophotométrique.

Voici le mode opératoire que nous avons adopté :
Les hydrolysats purifiés sur Dowex-50 sont déposés sous forme de traînées de 30 cm environ (dépôt de 200 à 250 μ l) sur papier Whatman n°1 et soumis à la chromatographie dans le système solvant phénolique décrit plus haut. Après séchage des chromatogrammes sous une hotte ventilée, nous repérons l'emplacement des nucléotides par révélation de bandes latérales. Les surfaces de papier correspondantes à chaque nucléotide sont découpées et on pratique une élution avec de l'eau distillée au moyen de l'appareil de DENT en présence de chloroforme. Les solutions obtenues sont évaporées à siccité et les résidus sont repris par une faible quantité d'eau distillée. Des quantités identiques de ces dernières solutions sont soumises à une deuxième chromatographie.

a) dans le système solvant ; isopropanol/ammoniaque/eau (70 : 40 : 30) de MARKHAM & SMITH (499), pour l'étude spectrophotométrique ;

b) dans le solvant phénolique, pour le dosage du phosphore.

Sur les premiers chromatogrammes, les nucléotides sont repérés en chambre noire avec la lampe Minéralight et les carrés de papier correspondants sont introduits en petits morceaux avec de l'acide chlorhydrique 0,01 N (0,1 N pour l'acide guanylique) dans des petits flacons. L'élution des nucléotides se fait à la température du Laboratoire pendant 18 heures et les solutions obtenues (20 μ g de nucléotides environ par ml.) sont étudiées en spectrophotométrie. Nous avons tracé pour chaque nucléotide, la courbe des absorptions en fonction de la longueur d'onde à

pH 2 (pH 1 pour l'acide guanylique peu soluble dans l'acide chlorhydrique 0,01 N). Nous avons effectué les rapports des densités optiques à différentes longueurs d'onde qui sont caractéristiques pour chaque corps pur. De plus, nous avons déterminé, à partir des densités optiques à 260 m μ et selon la méthode décrite plus haut (voir p.130) les quantités de chaque nucléotide déposées sur les chromatogrammes. Nous en avons déduit les quantités de phosphore correspondantes et nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus par dosage direct effectué sur les deuxièmes chromatogrammes développés dans le système phénolique.

Résultats.

Nos résultats sont réunis dans le Tableau VII dans lequel nous avons précisé les valeurs trouvées pour des nucléotides purs commerciaux (mélange des nucléosides 2' et 3' phosphate).

Les courbes d'absorption en fonction de la longueur d'onde, de nos nucléotides, sont superposables à celles des nucléotides purs. Les rapports des quantités de nucléotides, déterminées par spectrophotométrie et par le dosage du phosphore, sont très voisins de 1 (Tableau VIII)

Conclusion.

Nous pouvons donc affirmer que les nucléotides séparés par chromatographie sur papier dans le système solvant phénolique sont purs.

2°) Pureté des nucléotides séparés par électrophorèse sur papier

a) Afin de vérifier la pureté des nucléotides séparés par électrophorèse sur papier, nous avons soumis le même hydrolysât tissulaire (après purification sur résine) à une électrophorèse sur papier d'Arches et à une électrophorèse sur papier Whatman n°1.

TABLEAU VII

Propriétés optiques en lumière ultra-violettes des nucléotides provenant d'hydrolysats tissulaires, séparés par chromatographie sur papier.

Nucléotides	pH	Λ_{max} m μ	Λ_{min} m μ	$\frac{\text{DO } 250}{\text{DO } 260}$	$\frac{\text{DO } 280}{\text{DO } 260}$	$\frac{\text{DO } 290}{\text{DO } 260}$	
U	F	2	261	227	0,75	0,31	0,03
	C	2	261	227	0,76	0,31	0,03
G	F	1	252	225	0,93	0,68	0,41
	C	1	252	225	0,93	0,68	0,35
C	F	2	278	240	0,44	2,04	1,40
	C	2	278	240	0,45	2	1,39
A	F	2	257	230	0,82	0,25	0,04
	C	2	257	230	0,85	0,24	0,036

F : nucléotides de l'ARN de foie de rat

C : nucléotides du commerce

TABLEAU VIII

Comparaison des quantités de nucléotides, exprimées en μ g de phosphore

- déterminées par dosage direct sur chromatogramme effectué dans le système solvant phénolique.
- déduites des densités optiques à 260 m μ après rechromatographie dans le système de MARKHAM & SMITH (500)

NUCLEOTIDES	P dosé	P calculé	P calculé/P dosé
U	9,38	9,30	0,99
G	6,61	6,57	0,99
C	11,25	11,37	1,01
A	9,10	9,14	1,01

NOTA : les résultats rapportés sont les moyennes de 4 dosages.

Les dosages des nucléotides sont effectués par spectrophotométrie à partir des premiers électrophorégrammes et par dosage du phosphore à partir des deuxièmes électrophorégrammes.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau IX où l'on peut voir que les quantités de nucléotides déterminées par les deux méthodes, sont très voisines, sauf pour l'acide uridylique. Il semble en effet qu'un composé phosphoré non nucléotidique migre en même temps que l'acide uridylique. Il a été montré (voir plus loin) que celui-ci était souillé d'acide glycérophosphorique qui donne une erreur par excès dans les dosages de phosphore.

Le dosage spectrophotométrique semble donc préférable au dosage de phosphore dans ce cas-ci.

TABEAU IX

Quantités de nucléotides, exprimées en μ g de P, déduites des dosages UV après électrophorèse sur papier d'Arches et déduites des dosages de P après électrophorèse sur papier Whatman n°1.

NUCLEOTIDES:	Quantités de nucléotides: (μ g de P)		Rapport des quan- tités de nucléoti- des
	Dosage UV	Dosage de P	Dosage UV/Dosage P
U	3,87	4,06	0,95
G	5,95	5,87	1,01
C	5,89	5,75	1,02
A	3,80	3,81	1

b) L'étude spectrophotométrique des nucléotides séparés par électrophorèse sur papier d'Arches, a permis de calculer les rapports des densités optiques à différentes longueurs d'onde : ces rapports sont identiques à ceux calculés pour les nucléotides purs commerciaux (voir Tableau X)..

c) Nous avons, de plus, vérifié qu'aucun acide aminé ou peptide, susceptible de fausser les dosages spectrophotométriques ne migre en même temps que les nucléotides sur les électrophorégrammes. L'imprégnation de ceux-ci par une solution acétonique de ninhydrine à 1 p. 100 ne montre en effet que l'existence de faibles taches "ninhydrine positives" entre les acides adénylique et guanylique.

1°) Isolement des constituants de la tache X.

La "fraction ARN" de 20 foies de Rat a été soumise dans un premier temps, à la chromatographie préparative dans le système solvant phénolique décrit plus haut, ce qui nous a fourni une quantité importante de la tache X.

Dans un second temps, et à la suite de recherches chromatographiques systématiques, destinées à trouver un système solvant qui réalisât la séparation des différents constituants éventuels de la tache X, celle-ci a été soumise à la chromatographie préparative dans le système solvant isopropanol/ammoniaque/eau (70 : 40 : 30).

Nous avons obtenu de cette manière deux composés X_a et X_b, le composé mineur X_a absorbant l'ultra-violet.

2°) Identification de l'acide pseudo-uridylique.

Le composé X_a a été identifié à l'acide pseudo-uridylique de la manière suivante :

1 - Sa courbe d'absorption de la lumière ultra-violettre à pH 2 est identique (voir Fig. 25 et Tableau XI) à celle du 5ème nucléotide de DAVIS & ALLEN (513) découvert dans les hydrolysats de Levure et dont les études de structure ont permis d'affirmer qu'il s'agissait de l'acide pseudo-uridylique. (voir Fig. 3 p. 16)(YU & ALLEN(514) ; SCANELL & Coll. (515) ; COHN (516)).

2 - Il a été soumis à une chromatographie sur papier dans le système solvant : isopropanol/acide acétique/eau (60 : 30 : 10) et nous avons observé que son R_F, comme celui du 5ème nucléotide de DAVIS & ALLEN (517) était égal à la moitié de celui de l'acide uridylique déposé comme témoin.

TABLEAU IX

Quantités de nucléotides, exprimées en μ g de P, déduites des dosages UV après électrophorèse sur papier d'Arches et déduites des dosages de P après électrophorèse sur papier Whatman n°1.

NUCLEOTIDES:	Quantités de nucléotides: (μ g de P)		Rapport des quan- tités de nucléoti- des
	Dosage UV	Dosage de P	Dosage UV/Dosage P
U	3,87	4,06	0,95
G	5,95	5,87	1,01
C	5,89	5,75	1,02
A	3,80	3,81	1

b) L'étude spectrophotométrique des nucléotides séparés par électrophorèse sur papier d'Arches, a permis de calculer les rapports des densités optiques à différentes longueurs d'onde : ces rapports sont identiques à ceux calculés pour les nucléotides purs commerciaux (voir Tableau X).

c) Nous avons, de plus, vérifié qu'aucun acide aminé ou peptide, susceptible de fausser les dosages spectrophotométriques ne migre en même temps que les nucléotides sur les électrophorégrammes. L'imprégnation de ceux-ci par une solution acétonique de ninhydrine à 1 p. 100 ne montre en effet que l'existence de faibles taches "ninhydrine positives" entre les acides adénylique et guanylique.

TABLEAU X

Propriétés optiques en lumière ultra-violette des nucléotides provenant d'hydrolysats tissulaires, séparés par électrophorèse sur papier.

Nucléotides	pH	Λ_{max} m μ	Λ_{min} m μ	$\frac{\text{DO } 250}{\text{DO } 260}$	$\frac{\text{DO } 280}{\text{DO } 260}$	$\frac{\text{DO } 290}{\text{DO } 260}$	
U	F [*]	2	261	227	0,79	0,32	0,06
	C [*]	2	261	227	0,76	0,31	0,03
G	F	1	252	225	0,91	0,64	0,39
	C	1	252	225	0,93	0,68	0,35
C	F	2	278	240	0,54	2,1	1,5
	C	2	278	240	0,45	2	1,39
A	F	2	257	230	0,85	0,25	0,07
	C	2	257	230	0,85	0,24	0,036

* F = nucléotides de l'ARN de foie de Rat

C = nucléotides du commerce

Conclusion.

Nous pouvons donc affirmer que les nucléotides séparés par électrophorèse sur papier sont purs sauf l'acide uridylique. La présence de composé phosphoré migrant en même temps que ce nucléotide fait préférer la séparation électrophorétique sur papier d'Archès suivie du dosage spectrophotométrique des nucléotides.

G - LES COMPOSES PHOSPHORES NON NUCLEOTIDIQUES DE LA "FRACTION ARN" DE SCHMIDT ET THANNHAUSER.

Plusieurs Auteurs (BOULANGER & MONTREUIL (501) ; DAVIDSON & SMELLIE (502) ; DAVIDSON (503) ; MOULE (504) ; MANDEL (505)) ont montré que des composés phosphorylés accompagnaient les ribonucléotides dans la "fraction ARN" des tissus traités selon la méthode de SCHMIDT & THANNHAUSER (506). Parmi eux, DAVIDSON & ses Coll.: CROSBIE (507), et HUTCHINSON (508) ont caractérisé plusieurs phosphopeptides et un acide inositolphosphorique. La présence d'inositol-phosphates a été confirmée plus tard par MONTREUIL & BOULANGER (509), celle des phosphopeptides par MANDEL & Coll.: LEDIG (510) et DOLY (511). Cependant, aucune de ces substances ne correspondait à une tache importante qui se situait, sur les chromatogrammes de la "fraction ARN" des tissus, effectués dans le système solvant phénol/isopropanol/acide formique/eau (85 : 5 : 10 : 100), entre l'acide orthophosphorique et l'acide uridylique :

R_F acide orthophosphorique	0,36
R_F tache X inconnue	0,43
R_F acide uridylique	0,50

Les recherches que nous avons effectuées (MONTREUIL & Coll. (512)) nous ont permis de démontrer que la tache inconnue était essentiellement composée d'acide glycérophosphorique accompagné d'une très faible quantité d'acide pseudo-uridylique

1°) Isolement des constituants de la tache X.

La "fraction ARN" de 20 foies de Rat a été soumise dans un premier temps, à la chromatographie préparative dans le système solvant phénolique décrit plus haut, ce qui nous a fourni une quantité importante de la tache X.

Dans un second temps, et à la suite de recherches chromatographiques systématiques, destinées à trouver un système solvant qui réalisât la séparation des différents constituants éventuels de la tache X, celle-ci a été soumise à la chromatographie préparative dans le système solvant isopropanol/ammoniaque/eau (70 : 40 : 30).

Nous avons obtenu de cette manière deux composés Xa et Xb, le composé mineur Xa absorbant l'ultra-violet.

2°) Identification de l'acide pseudo-uridylique.

Le composé X_a a été identifié à l'acide pseudo-uridylique de la manière suivante :

1 - Sa courbe d'absorption de la lumière ultra-violet à pH 2 est identique (voir Fig. 25 et Tableau XI) à celle du 5ème nucléotide de DAVIS & ALLEN (513) découvert dans les hydrolysats de Levure et dont les études de structure ont permis d'affirmer qu'il s'agissait de l'acide pseudo-uridylique. (voir Fig. 3 p. 16)(YU & ALLEN(514) ; SCANELL & Coll. (515) ; COHN (516)).

2 - Il a été soumis à une chromatographie sur papier dans le système solvant : isopropanol/acide acétique/eau (60 : 30 : 10) et nous avons observé que son R_F, comme celui du 5ème nucléotide de DAVIS & ALLEN (517) était égal à la moitié de celui de l'acide uridylique déposé comme témoin.

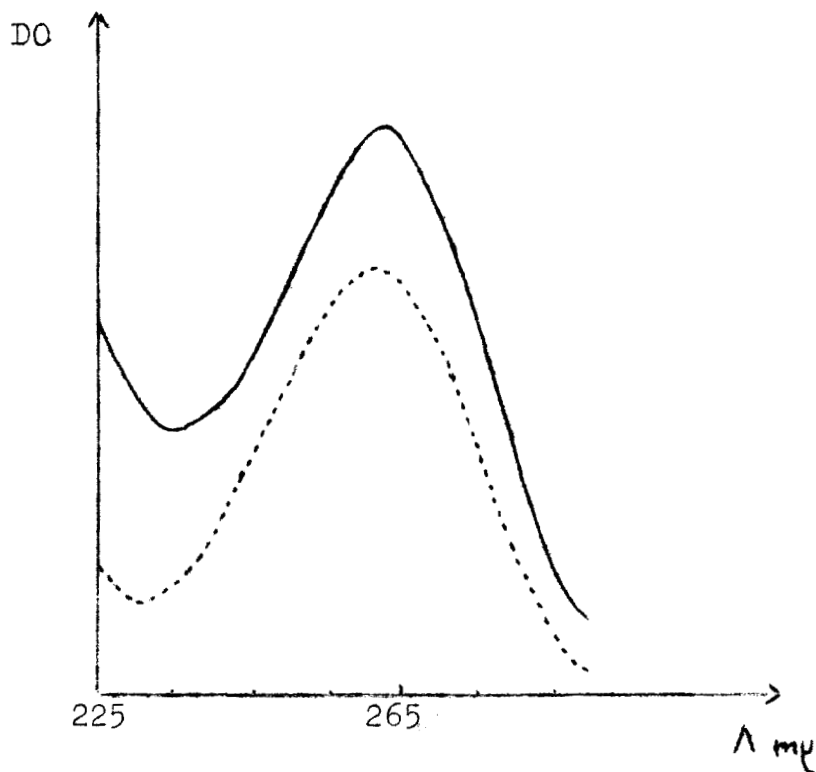


FIGURE 25

Spectre d'absorption en lumière ultra-violette du composé X_a (en trait plein) et de l'acide uridylique (en pointillé) en solution dans l'acide chlorhydrique 0,01 N.

Acide uridylique	$\Lambda_{\max} = 261 \text{ m}\mu$	$\Lambda_{\min} = 227 \text{ m}\mu$
X_a	$\Lambda_{\max} = 263 \text{ "}$	$\Lambda_{\min} = 234 \text{ "}$



TABIEAU XI

Propriétés optiques en lumière ultra-violette du composé X_a et de l'acide pseudo-uridylique, avant et après déphosphorylation : rapports des densités optiques à différentes longueurs d'onde (pH 2)

	Λ_{max} m μ	Λ_{min} m μ	$\frac{DO\ 250}{DO\ 260}$	$\frac{DO\ 280}{DO\ 260}$	$\frac{DO\ 290}{DO\ 260}$
Acide pseudo-uridylique	263	233	0,74-0,76	0,38-0,42	0,06-0,07
X_a	263	234	0,74	0,40	0,13
Pseudo-uridine	263	234	0,75	0,44	0,08
X_a déphosphorylé	263	234	0,79	0,50	0,08

3 - En électrophorèse sur papier, en tampon acide citrique/citrate de sodium 0,02 M, de pH 3,5 (DAVIDSON & SMELLIE (518)) sa "mobilité" est presque identique à celle de l'acide uridylique.

4 - Nous avons hydrolysé le composé X_a par la phosphatase alcaline en présence de chlorure de Magnésium et en tampon acétate de sodium de pH 8,6 pendant 1 heure à 37°C. Le composé déphosphorylé obtenu absorbe la lumière ultra-violettes ; son R_F est égal à la moitié de celui de l'uridine dans les systèmes solvants :

n Butanol/eau (84 : 16)

n Butanol/acide formique/eau (77 : 10 : 13)

Ce comportement chromatographique est celui de la pseudo uridine.

5 - Les propriétés optiques du composé X_a déphosphorylé sont identiques à celles de la pseudo-uridine (voir Tableau XI).

3°) Identification de l'acide glycérophosphorique.

Le composé X_a ne représente que les 5p. 100 environ de la tache X dont il nous restait à identifier le constituant majeur. Nous avons pu démontrer qu'il s'agissait de l'acide glycérophosphorique sur la base des résultats expérimentaux suivants :

- 1 - L'acide glycérophosphorique possède, dans le système solvant phénolique, le même comportement que la tache X.
- 2 - Nous avons identifié le glycérol parmi les produits de l'hydrolyse phosphatasique des constituants de la tache X.
- 3 - Nous avons en outre montré qu'il existait un reste "phosphoryle" par mole de glycérol de la manière suivante :

Nous avons effectué sur une feuille de papier Whatman n°1 :

- 3 dépôts d'une solution de glycérol correspondant respectivement à des quantités de 25,50 et 75 μ g de glycérol.
- 4 dépôts identiques de l'hydrolysate phosphatasique des constituants de la tache X.
- 3 dépôts témoins constitués respectivement par la solution de phosphatase utilisée, de l'acide orthophosphorique et du glycérol.

Après chromatographie dans le système solvant de PARTRIDGE (519) : butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) et séchage du papier, on révèle l'emplacement, sur les bandes témoins :

- de l'acide phosphorique par pulvérisation du réactif de HANES & ISHERWOOD (520)
- du glycérol par la méthode de TREVELLYAN (521) au nitrate d'argent sodique.

On découpe alors les chromatogrammes en deux parties : la partie supérieure où se trouve l'acide phosphorique sert au dosage du phosphore effectué selon la méthode d'ALLEN (522) (voir p.128) sur les morceaux de papier découpés après révélation. La partie inférieure, où se trouve le glycérol sert à

effectuer un dosage semi-quantitatif de cette substance, par comparaison des intensités des taches données par le réactif au nitrate d'argent avec les taches données par les dépôts témoins.

4°) Localisation des composés phosphorylés non nucléotidiques sur les électrophorégrammes.

Il nous a paru intéressant de rechercher sur nos électrophorégrammes l'emplacement des composés phosphorés non nucléotidiques présents dans la fraction "ARN de SCHMIDT & THANNHAUSER" purifiée sur Dowex-50.

La révélation des composés phosphorés étant difficile à cause de la persistance du tampon sur le papier, nous avons soumis à la séparation électrophorétique des préparations radioactives provenant d'animaux marqués par injection de ^{32}P . Phosphate de sodium. Les autoradiogrammes ont montré l'existence de deux taches fortement radioactives, migrant plus rapidement que les 4 nucléotides (Fig. 26).

Ces deux taches ont été identifiées de la façon suivante :

Des chromatogrammes séparatifs ont été effectués dans le système phénolique de BOULANGER & MONTREUIL (523) à partir d'hydrolysats d'ARN radioactifs, de façon à recueillir séparément l'acide orthophosphorique et le "spot X" marqués.

Nous avons ensuite soumis l'hydrolysats d'ARN tissulaire marqué au ^{32}P à la séparation électrophorétique dans le tampon de DAVIDSON & SMELLIE (524), en déposant sur la même feuille de papier les témoins acide orthophosphorique et "spot X" radioactifs. Les autoradiogrammes nous ont permis de constater que le composé le plus rapide est l'acide orthophosphorique. Le deuxième composé radioactif, accolé quelque fois à l'acide uridylique, et souvent dédoublé, est le phosphoglycérol.

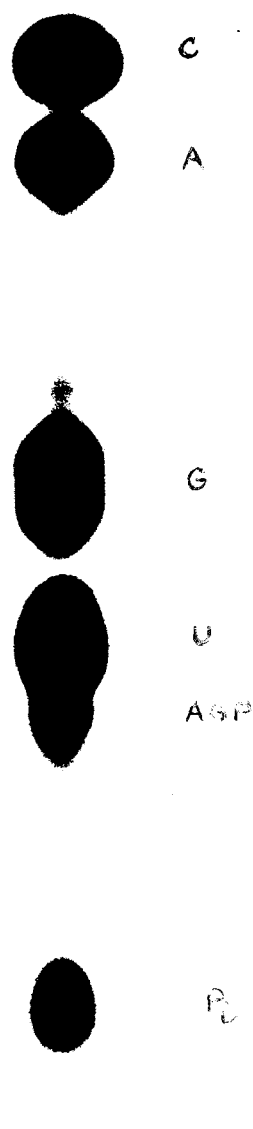


FIGURE 26

Autoradiogramme de la "fraction ARN de SCHMIDT & THANNHAUSER" provenant de foies de rats marqués par injection de ^{32}P phosphates.

Electrophorèse en tampon citrate de pH 3,5

P_i, AGP, U, G, C, A : respectivement les acides phosphorique, glycérophosphorique, uridylique, guanylique, cytidylique, adénylique.

Nous avons en outre, observé que l'acide pseudo-uridylique migre en même temps que l'acide uridylique sur les électrophorogrammes.

Les autoradiogrammes ont révélé aussi la présence de composés radioactifs entre les acides adénylique et guanylique. Cette constatation, rapprochée de celle de l'existence de substances révélées par la ninhydrine dans cette région, peut nous permettre de conclure à la présence de traces de phosphopeptides, dont l'existence a déjà été signalée, comme nous l'avons vu plus haut, dans la fraction de SCHMIDT & THANNHAUSER (525).

5°) Signification des composés phosphorés non nucléotidiques dans la fraction "ARN" des tissus.

1 - La présence d'acide pseudo-uridylique s'explique aisément depuis que l'on sait que ce nucléotide entre dans la composition de certains acides ribonucléiques cellulaires comme les ARNS (voir p. 27).

2 - Quant à l'acide glycérophosphorique (comme les inositol-phosphates) il provient de l'hydrolyse alcaline des phospholipides comme le démontrent les résultats suivants :

a - Des délipidations très poussées de tissus, effectuées dans un appareil de KUMAGAWA, successivement par l'éther, l'acétone, le chloroforme et le tétrachlorure de carbone s'accompagnent d'une diminution notable de la teneur en acide glycérophosphorique des hydrolysats tissulaires.

b - Le dosage chromatographique de l'acide glycérophosphorique de la "fraction ARN" de différents tissus montre que ce composé représente une proportion importante du phosphore total de cette fraction et que le cerveau en est particulièrement riche (Tableau XII). Ce dernier résultat confirme l'observation de LOGAN & Coll. (526) qui estimaient que 50 p.100 du phosphore de la "fraction ARN" du cerveau n'était pas de nature nucléotidique.

TABLEAU XII

Teneur en acide glycérophosphorique de différents tissus préparés selon la méthode de SCHMIDT & THANNHAUSER (en g de phosphore de l'acide glycérophosphorique pour 100 g de phosphore des acides ribonucléiques). (x)

Rate	11,28 $\pm$ 1,70	Rein	27 $\pm$ 4,70
Foie	18,53 $\pm$ 4,64	Cerveau	45 $\pm$ 0,50
Poumon	24,51 $\pm$ 1,18		

(x) Le "phosphore de l'acide glycérophosphorique" et le "phosphore des acides ribonucléiques" ont été déterminés chromatographiquement. Le dernier est obtenu en effectuant la somme des quantités de phosphore de chacun des ribonucléotides.

Conclusions.

1 - La "fraction ARN" des tissus traités selon le mode opératoire de SCHMIDT & THANNHAUSER (527) contient des proportions variables de composés phosphorés non nucléotidiques qui introduisent une cause d'erreur très importante dans les dosages des ARN tissulaires par les méthodes classiques.

2 - Plusieurs d'entre eux ont été identifiés par différents Auteurs. Il s'agit d'inositol-phosphates et de phosphopeptides. Nous-mêmes avons en outre démontré l'existence d'acide glycérophosphorique.

3 - L'acide glycérophosphorique et l'acide pseudo-uridylique possèdent des comportements chromatographiques identiques et constituent la "tache X" qui se situe entre l'acide orthophosphorique et l'acide uridylique sur les chromatogrammes effectués avec le système solvant phénol/isopropanol/acide formique/eau (85 : 5 : 10 : 100). Au contraire, ces deux composés sont séparables par électrophorèse dans le tampon de DAVIDSON (Ac. citrique/citrate de sodium de pH 3,5) l'acide pseudo-uridylique migrant avec l'acide uridylique et l'acide glycérophosphorique se situant au dessous de la tache d'acide uridylique.

4 - La présence des composés phosphorés non nucléotidiques s'explique aisément ; les phosphopeptides proviennent d'une hydrolyse incomplète des phosphoprotéides ; l'acide glycérophosphorique et les inositol-phosphates sont des produits d'hydrolyse alcaline de phospholipides dont ils sont les constituants. En outre, les tissus les plus riches en lipides comme le cerveau fournissent des proportions importantes d'acide glycérophosphorique et des délipidations poussées provoquent une diminution de ce dernier.

5 - Des délipidations prolongées de tissus ne permettent pas d'éliminer totalement des "fractions ARN" tissulaires les acides inositol et glycérophosphoriques. Une observation identique a été faite par HAWTHORNE (528) qui a montré la présence

d'inositol et de glycérol dans les fractions protéiques de foie de Lapin soumises à des délipidations aussi complètes que possible.

D'autre part, des phosphatido-peptides ont été signalés dans tous les tissus de mammifères par HUGGINS & COHN (529) et MANDEL & ses Coll. LEDIG (530) et DOLY (531) ont montré que les phosphopeptides de la fraction ARN sont d'origine phosphatidique.

Ces résultats sont en faveur de l'existence de complexes stables de phospholipides et de protéides.

6 - Comme nous le verrons plus loin (p.198), l'étude de la cinétique d'échange de l'acide radiophosphorique dans l'acide glycérophosphorique des "fractions ARN" du foie entier et des fractions cytoplasmiques montre qu'il existe vraisemblablement une relation physico-chimique et métabolique entre les acides ribonucléiques et les phospholipides, déjà envisagée par plusieurs Auteurs (TS'O & SATO)(532) ; (HUNTER & GODSON) (533) ; (GODSON & HUNTER)(534).

H - PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Sur la base des expérimentations précédentes, nous nous sommes finalement arrêtée au protocole expérimental suivant qui rassemble les différentes techniques décrites dans les paragraphes différents.

1°) Traitement des tissus.

Les tissus broyés et débarrassés de la trame conjonctive sont homogénéisés en chambre froide avec de l'acide trichloracétique à 10 p. 100.

Après traitement à l'acide trichloracétique, l'homogénat est lavé trois fois à l'éthanol absolu puis délipidé par un mélange d'éthanol et d'éther (v/v) à l'ébullition et à reflux. (voir détails au paragraphe A ; p.105).

2°) Hydrolyse sodique.

Le résidu acido insoluble est soumis à une hydrolyse sodique pendant 18 heures à 37°C. Nous utilisons de la soude 0,5 N à raison de 20 ml par foie (3 mg de phosphore ARN environ soit 4 mg de phosphore total).

Les hydrolysats refroidis sont amenés à pH 4 par addition d'acide formique concentré. Après repos une heure, le précipité constitué par l'ADN et les produits de clivage des protéines est éliminé par centrifugation. (**voir schéma ci-contre**)

3°) Purification sur échangeur de cations.

Le liquide surnageant précédent est filtré ; il contient les ribonucléotides, l'acide phosphorique libre provenant de l'hydrolyse des phosphoprotéides, des substances phosphorées non nucléotidiques (voir p.137), des ions Na^+ et quelques produits de dégradation alcaline des protéines.

Cette solution, à laquelle est ajoutée l'eau de lavage du filtre, est diluée à 100 ml avec de l'eau distillée, puis passée sur résine Dowex-50 x 2 (mesh 25-50)(2 x 20 cm) à la vitesse de 0,6 ml par mn. La résine est ensuite lavée avec 1 litre d'eau distillée que l'on fait couler à la même vitesse que l'hydrolysate. L'effluent est recueilli sur chloroforme pour éviter la dégradation des nucléotides.

La solution de nucléotides purs obtenue, est concentrée à l'évaporateur rotatif Eral à 30° ou sous courant d'air en cristalliseur à la température du laboratoire, puis desséchée en capsule sous courant d'air froid.

4°) Séparation chromatographique et électrophorétique.

Le résidu de dessiccation est repris par un faible volume d'eau distillée (0,5 à 2 ml). La solution obtenue est centrifugée en tube conique et décantée. Elle est soumise immédiatement à l'analyse chromatographique et électrophorétique.

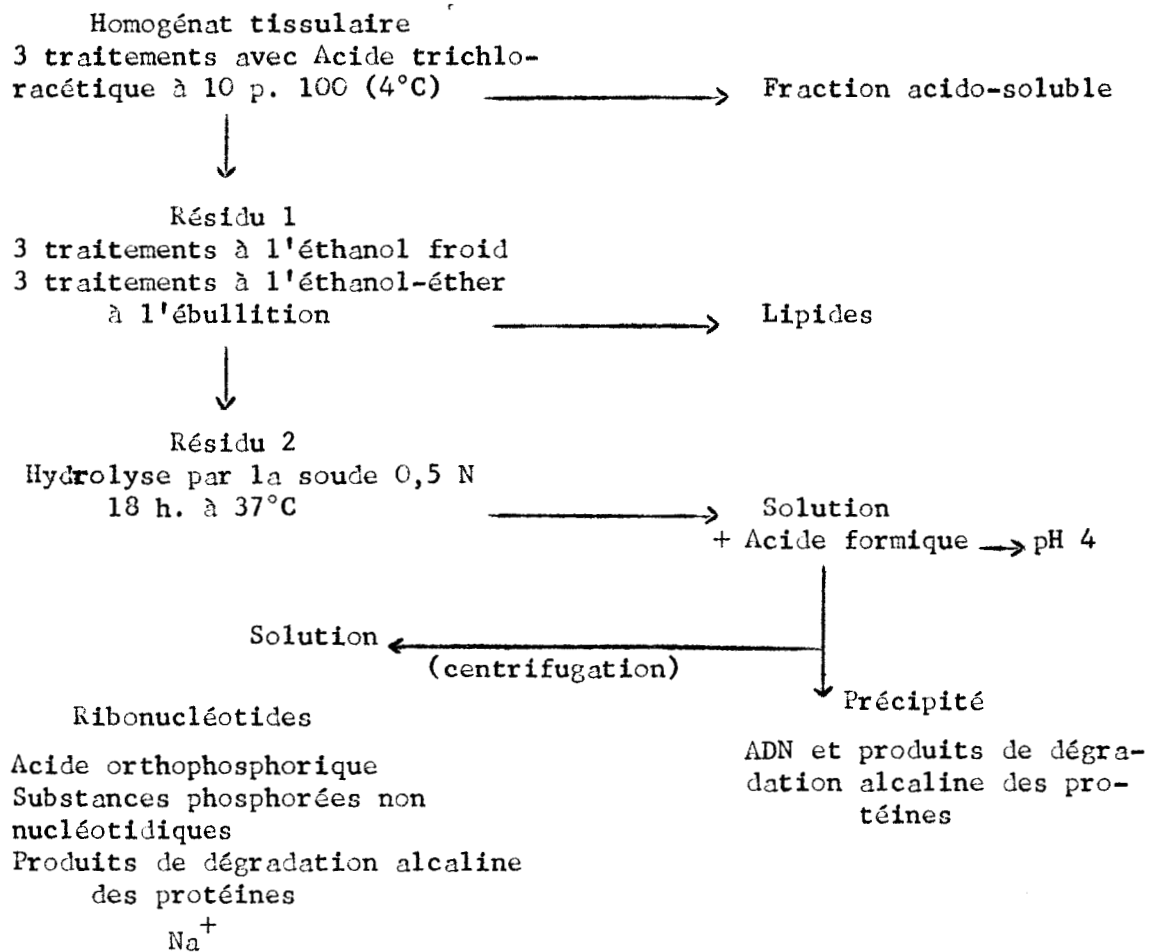


Schéma de fractionnement des tissus.

La chromatographie se fait sur papier Whatman n°1 à 22°C dans le système solvant de BOULANGER & MONTREUIL (535) acide formique/isopropanol/phénol/eau (10 : 5 : 85 : 100). Les composés phosphorés sont révélés par le réactif de HANES & ISHERWOOD (536).

L'électrophorèse est pratiquée dans une cuve en toit sur papier d'Arches n°304 dans le tampon acide citrique/citrate de sodium 0,02 M de pH 3,5 , de DAVIDSON & SMELLIE (537) (11 V/cm ; 6 heures). Les nucléotides sont repérés en chambre noire à l'aide de la lampe Minéralight. (voir détails techniques au paragraphe D ; p.127 et 128).

5°) Dosage des nucléotides.

Les nucléotides séparés par chromatographie sur papier sont dosés par la méthode colorimétrique d'ALLEN (538) avec le photomètre de Meunier. Les nucléotides séparés par électrophorèse sur papier sont dosés par spectrophotométrie. (voir détails techniques au paragraphe E ; p.128 et 130).

Ces dosages nous ont permis de calculer la composition centésimale nucléotidique des ARN des tissus du Rat.

II - RESULTATS ET OBSERVATIONS.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XIII.

1°) Composition des ARN du foie de Rat.

Il est intéressant de comparer nos résultats concernant la composition des ARN du foie de Rat avec ceux d'autres Auteurs qui, comme nous, ont tenté de déterminer la composition de ces ARN, sans isolement préalable. (Tableau XIV).

Ils sont assez voisins de ceux de ELSON & CHARGAFF (539), KLEINSCHMIDT (540) et WEILL (541). Cependant la teneur un peu élevée en acide uridylique donnée par WEILL (542) accompagnant une valeur un peu faible pour l'acide cytidylique, fait penser à une désamination possible de celui-ci au cours de l'hydrolyse potassique.

Par contre, WERKHEISER (543), DE LAMIRANDE, ALLARD & CANTERO (544) trouvent des nombres beaucoup plus élevés, pour la teneur en acide guanylique. Mais, il convient de signaler : a) que WERKHEISER (545) sépare les composants acido-solubles en faisant agir l'acide trichloracétique 30 mn à la température du laboratoire. Il est probable qu'il se produit dans ces conditions une hydrolyse partielle de l'ARN et que, par conséquent, les résultats sont entachés d'erreurs.

b) que DE LAMIRANDE & Coll. (546) effectuent des dosages spectrophotométriques des nucléotides séparés par chromatographie sur colonne de résine. Il se peut que ces nucléotides ne soient pas purs et que des substances absorbant l'ultra-violet viennent interférer et fausser les dosages.

Nous nous sommes mise à l'abri de telles critiques en multipliant les vérifications de pureté de nos nucléotides. Aucune substance **phosphorée** ne migre en même temps qu'eux sur les chromatogrammes, dans le système phénolique. Aucune substance absorbant l'ultra-violet ne vient fausser les dosages spectrophotométriques effectués à partir des électrophorégrammes. Sur ces derniers, la présence de glycérophos-

TABLEAU XIII

Composition des acides ribonucléiques de divers tissus du Rat.

Nature du tissu	Méthode de dosage	Ribonucléotides **					Purines Pyrimidines		$\frac{6 \text{ NH}_2}{6 \text{ CO}}$
		U	G	C	A				
erveau	C	20,0 + 0,4	31,4 + 0,6	28,7 + 0,6	19,9 + 0,4		1,05		0,95
	E	20,6 - 0,4	29,5 - 0,5	31 - 0,5	18,7 - 0,6		0,94		0,99
Coeur	C	19,9 + 0,3	31,3 + 0,6	28,8 + 0,7	20 + 0,4		1,05		0,95
	E	21 - 0,4	29,9 - 0,8	30,6 - 0,5	18,5 - 0,6		0,94		0,96
Foie	C	19,6 + 0,6	29,9 + 0,9	30,5 + 0,9	20 + 0,6		1		1,02
	E	19,9 - 0,6	29,9 - 0,8	30,9 - 0,8	19,2 - 0,6		0,97		1
Muscle	C	21,6 + 0,6	28 + 1	29,8 + 0,7	20,6 + 0,6		0,95		1,02
	E	20,5 - 0,4	29,2 - 0,8	30,6 - 0,6	19,4 - 0,6		0,95		1,01
Poumon	C	20,8 + 0,4	30,5 + 0,5	29,2 + 0,5	19,5 + 0,5		1		0,96
	E	20,7 - 0,4	29,6 - 0,6	30,4 - 0,6	19,3 - 0,6		0,96		0,99
Rate	C	19,4 + 0,6	31 + 0,6	30,4 + 0,6	19,2 + 0,4		1		0,98
	E	20,5 - 0,6	29,5 - 0,6	30 - 0,6	20 - 0,4		0,98		1
Rein	C	18,8 + 0,6	31 + 0,7	31 + 0,7	19,2 + 0,4		1		1
	E	20,7 - 0,4	29,5 - 0,8	30,5 - 0,6	19,3 - 0,4		0,96		0,99

(*) C : méthode chromatographique ; E : méthode électrophorétique.

(**) G, C, A, U désignent respectivement, les acides guanylique, cytidylique, adénylique et uridylique

$$\text{déviati on standard} = \sqrt{\frac{\sum (x - m)^2}{n (n - 1)}}$$

TABEAU XIV
COMPOSITION CENTESIMALE DES ARN DE
FOIE DE RAT

AUTEURS	Réf.	Méthode d'hydrolyse	**	Méthode de résolution	***	Méthode de dosage	Résultats			
							U	G	C	A
WERKHEISER & WINZLER *	543	NaOH 0,3 N 37°, 24 h.		E sur papier		UV	18,8	36,6	24,2	20,4
DE LAMIRANDE, ALLARD CANTERO	544	KOH 1,5 N 37°, 42 h.		C sur Dowex 1		UV	19,5	34,3	27,1	19,1
		KOH 0,3 N 37°, 24 h.		C sur Dowex 1		UV	18,9	36,5	26,9	17,7
ELSON & CHARGAFF	539	NaOH pH 13 30°, 18 h.		C sur papier		UV	20,3	31,7	30	18
								(cytoplasme)		
KLEINSCHMIDT	540	KOH 0,3 N 37°		C sur papier		UV	19,7	31,4	28,5	21,2
								(sours)		
WEILL	541	KOH 0,5 N 37°		C sur papier		UV	21,6	31,1	27,1	20,2
Valeurs personnelles		NaOH 0,5 N 37°, 18 h.		C sur papier		P	19,6	29,9	30,5	20
				E sur papier		UV	19,9	29,9	30,9	19,2

(*) Les valeurs données par les Auteurs nous ont permis de calculer les % de chacun des nucléotides.

(**) E : électrophorèse ; C : chromatographie

(***) P : dosage du phosphore ; UV : dosage spectrophotométrique.

phate (voir page 142) accolé à la tache d'acide uridylique, fait préférer le dosage spectrophotométrique à celui du phosphore, pour l'acide uridylique tout au moins (Tableau IX et Fig. 26).

Des études statistiques effectuées après de très nombreux dosages ont montré que nos résultats sont reproductibles et que les écarts à la moyenne sont de l'ordre de 3 p. 100.

Notre but lointain étant de comparer la composition des ARN des tissus sains et des tissus néoplasiques, il était extrêmement important pour nous de posséder une technique à la fois simple, exacte et fidèle. Il nous fallait, en effet, pouvoir calculer avec précision les quantités relatives de chaque nucléotide, afin de déceler de faibles changements pathologiques ou des modifications d'origine virale.

Cette méthode est maintenant bien au point et peut être appliquée à l'étude de la composition des différents ARN cellulaires et à celle des ARN des tissus cancéreux.

2°) Composition des ARN des différents tissus.

Quel que soit le tissu envisagé, les ARN totaux cellulaires ont la même composition (Tableau XIII).

S'il y a une spécificité d'espèce, il n'y a donc pas de spécificité d'organe en ce qui concerne l'ARN. Ceci est également la conclusion des travaux de MAGASANIK (547), KLEINSCHMIDT (548), KIT (549).

Il peut paraître surprenant à priori que les résultats soient identiques dans tous les tissus quand on sait maintenant que les ARN sont hétérogènes et constitués de molécules distinctes que l'on appelle : ARN messagers, ARN de transfert et ARN ribosomiaux.

D'autre part, la centrifugation différentielle d'homogénats tissulaires a permis d'obtenir des fractions cellulaires (noyaux, mitochondries, microsomes, suc cellulaire) dont les ARN ont une composition voisine de celle de l'ARN

total sauf pour les noyaux qui se distinguent des autres fractions, quelles que soient la méthode d'isolement et la méthode d'analyse utilisées (MARSHAK (550), CROSBIE, SMELLIE & DAVIDSON (551), ELSON & CHARGAFF (552), OSAWA (553), HOTTA (554), OLMSTED & VILLEE (555), KIT (556), DERUMEZ (557)). Or, dans ces fractions cellulaires, comme dans les organes étudiés, les proportions des différents ARN ne sont pas forcément les mêmes et une telle égalité ne pouvait provenir que d'une similitude de composition des différents ARN. C'est en effet le cas; en outre, il n'y a pas de différence d'espèces dans les tissus animaux pour l'ARN ribosomal et l'ARN de transfert possède la même composition chez les microorganismes et chez les animaux supérieurs (HOAGLAND (558)).

La composition particulière trouvée pour les ARN des noyaux est probablement due à la présence de l'ARN messager qui, lui, est différent des autres ARN (voir p.33). Cet ARN messager n'étant qu'en très faible proportion dans la cellule, sa composition modifie peu celle des "ARN totaux". On peut par conséquent

- spéculer sur les résultats obtenus après l'étude de ces ARN totaux
- prévoir qu'il sera difficile de mettre en évidence des modifications pathologiques en étudiant la composition globale des ARN cellulaires.

3°) Relation entre la composition des ARN totaux et celle des ADN totaux.

La teneur en acides guanylique et cytidylique des acides ribonucléiques est identique à la teneur en acide adénylique et thymidylique des acides désoxyribonucléiques ; il existe de même une correspondance étroite entre les acides adénylique et uridylique des acides ribonucléiques et les acides guanylique et cytidylique des acides désoxyribonucléiques (voir Tableau XIII et XV).

TABLEAU XV

Composition des acides désoxyribonucléiques de
divers tissus de Rat.

Nature du tissu	Désoxyribonucléides (⌘)				Purines	$\frac{6NH_2}{6 CO}$	Références
	dG	dC	dA	dT	Pyrimidi- nes		
Coeur	20,2	20,9	29,7	29,1	1	1,05	KLEINSCHMIDT(559)
Foie	20,84	21,4	27,9	30,1	0,95	1,03	YAMANA (560)
Rate	22,90	20,1	29	28,2	1,08	0,962	KLEINSCHMIDT(559)
Rein	21,80	20,3	28,2	29,8	1	0,945	KLEINSCHMIDT(559)

(⌘) dG, dC, dA, dT désignent, les acides désoxyguanylique, désoxy-
cytidylique, désoxyadénylique et thymidylique.

Ces constatations, faites en 1960 (MONTREUIL & Coll. (561)), étaient donc en faveur d'une biosynthèse des acides ribonucléiques par "moulage" sur les molécules d'acides désoxyribonucléiques. Elles étaient en désaccord avec les schémas de moulage proposés par LOCKINGEN & DE BUSK (562) et par RICH (563) (appariement des ribonucléotides G, C, A, U avec, respectivement, les désoxyribonucléotides des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) : dC, dG, dT, dA) et par STENT (564) (appariement des ribonucléotides G, C, A, U, respectivement, avec les "doublets nucléotidiques" suivants des ADN : dC-dG, dG-dC, dT-dA, dA-dT). Elles confirmaient au contraire, l'hypothèse de ZUBAY (565) : appariement des ribonucléotides G, C, A, U, respectivement, avec les "doublets nucléotidiques" suivants des ADN : dT-dA ou dA-dT, dA-dT ou dT-dA, dG-dC ou dC-dG, dC-dG ou dG-dC.

Ce mécanisme invoque la présence d'un intermédiaire en triple hélice formé par la double chaîne de l'ADN et une simple chaîne polyribonucléotidique ; cette triple chaîne se formerait en même temps que la chaîne ARN elle-même, constituée à partir des nucléosides triphosphates du milieu cellulaire. Toutefois, la formation de cet intermédiaire à 3 chaînes nécessite quelques modifications dans la structure de l'ADN (ZUBAY)(566) :

- rupture des liaisons H entre les groupes NH_2 et le groupe CO des bases appariées ;
- rotation des plans de ces bases l'un par rapport à l'autre
- rotation des groupes NH_2 de l'adénine et de la cytosine hors du plan de la base.

L'association des deux chaînes polynucléotidiques dans la molécule d'ADN se fait par liaison "pont hydrogène" entre l'hydrogène du groupement -NH d'une base et un azote du cycle de l'autre base. Leur union avec la chaîne polyribonucléotidique se fait par liaison "pont hydrogène" entre le groupement CO d'une base (G ou U) de la chaîne ARN et le groupement -NH_2 d'une base (A ou C) d'une des chaînes de l'ADN et entre le groupement -NH de la même base de l'ARN et le groupement CO d'une base (T ou G) de l'autre chaîne de l'ADN.

La liaison se fait également entre le groupement NH_2 d'une base (A ou C) de l'ARN et le groupement CO d'une base (G ou T) d'une des chaînes de l'ADN et entre un azote de la même base de l'ARN et le groupement NH_2 d'une base (C ou A) de l'autre chaîne de l'ADN.

Le modèle proposé par ZUBAY (Fig.27) est structuralement raisonnable et en accord avec les données chimiques. Cependant, dans chacun des 4 triplets schématisés dans la Fig. 27 il est possible de mettre un ribomononucléotide différent (Fig. 28).

Donc, ou bien le moulage de l'ARN sur l'ADN a lieu suivant le schéma de la Fig. 27 et l'ARN formé à une composition telle que :

$$\frac{G + C}{A + U} \text{ (ARN)} = \frac{A + T}{G + C} \text{ (ADN)}$$

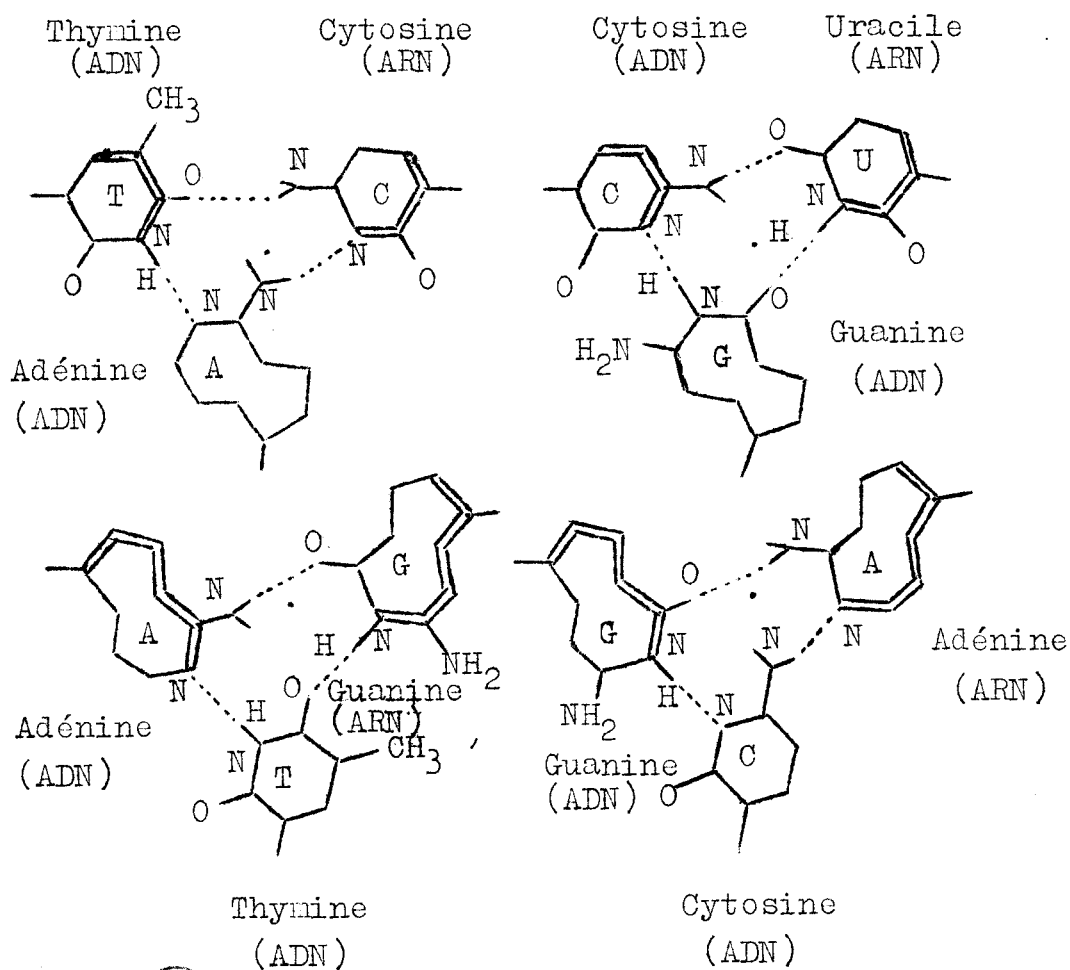


FIGURE 27

Appariement des bases de la double chaîne ADN modèle avec celles de la chaîne ARN formée. Schéma A de ZUBAY (566)

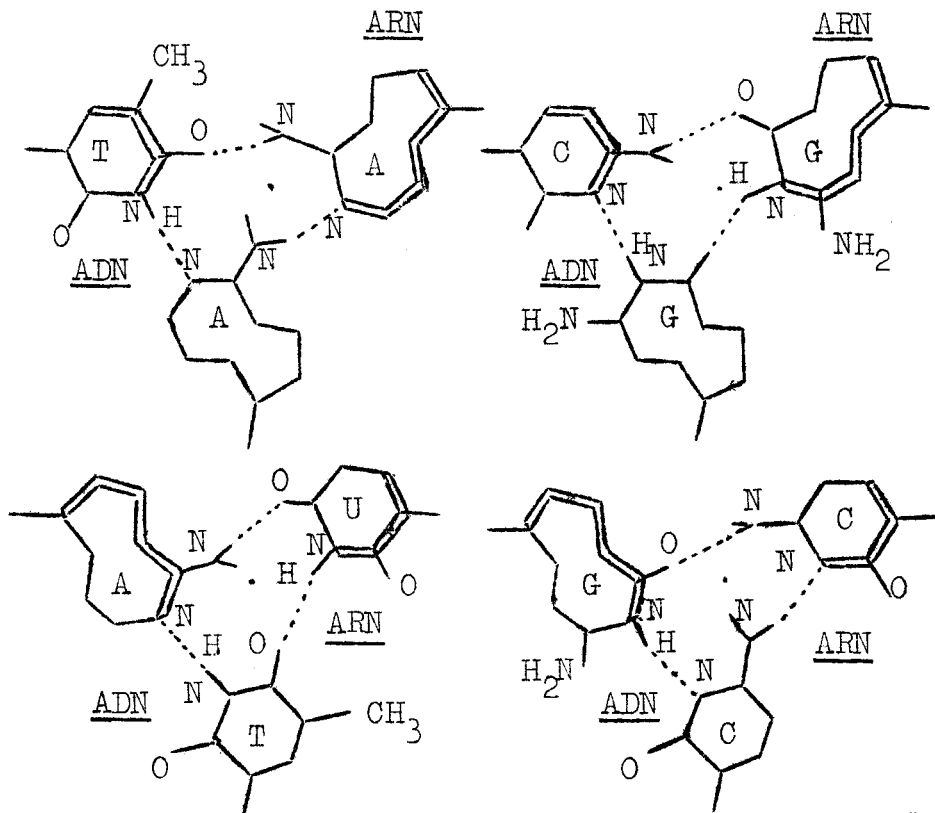


FIGURE 28

Appariement des bases de la double chaîne ADN
modèle avec celles de la chaîne ARN formée.
Schéma B de ZUBAY (566).



comme c'est le cas des ARN totaux

- ou bien le moulage de l'ARN se fait sur l'ADN suivant le schéma de la Fig. 28 et l'ARN formé est alors identique à l'une des chaînes de l'ADN et complémentaire de l'autre chaîne.

Au cours de ces dernières années, l'hétérogénéité des ARN a été démontrée et maintenant que l'on connaît l'existence d'ARN solubles et ribosomaux, de composition voisine de celle des ARN totaux, et l'existence d'ARN messagers dont la composition globale doit être le reflet de celle des ADN, on peut reconsidérer le problème. On est tenté d'imaginer un schéma de moulage analogue à celui de la Fig. 27 pour les ARN solubles et ribosomaux et un autre analogue à celui de la Fig. 28 pour les ARN messagers, en laissant à l'enzyme de biosynthèse, le soin de choisir entre l'un ou l'autre des intermédiaire à trois chaînes.

D'autre part, les schémas de moulage de LOCKINGEN & Coll. (567), RICH (568) et STENT (569), rejetés pour les ARN totaux (MONTREUIL & Coll. (570)) peuvent être retenus pour la synthèse des ARN messagers.

4°) Structure de l'ARN.

Les rapports molaires symétriques des bases de l'ARN ($G = C$; $A = U$) et la valeur des rapports purines/pyrimidines = 1 et $6 \text{ NH}_2 / 6 \text{ CO} = 1$ pourraient être une conséquence de la structure double de cette molécule, identique à celle de l'ADN (WATSON & CRICK)(571). Certains Auteurs (LESLIE)(572), (GOLDTHWAIT)(573) ayant mis en évidence l'existence d'"ARN assymétrique", l'appariement de deux de ces chaînes pourrait former une molécule dont la composition est voisine de celle trouvée par nous-mêmes (574) et par d'autres Auteurs(ELSON & Coll. (575)). Cependant, il semble bien que l'ARN soit une simple chaîne polynucléotidique. Les travaux de KIT (576) aboutissent à cette conclusion. Notons toutefois que les études de diffraction des rayons X font attribuer aux ARN de transfert (WILKINS (577) ; BROWN & ZUBAY (578)) une structure en double hélice et font penser à l'existence de régions en double hélice dans les ARN ribosomaux (LANGRIDGE & Coll.(579) ; ZUBAY & WILKINS (580)).(voir pages 29 et 32).

III - DISCUSSION.

La notion de spécificité d'espèce des ARN et la similitude des ARN totaux des différents organes d'un même animal, amènent tout naturellement à rechercher une marque génétique dans les ARN. L'observation des relations suivantes :

$$\left. \begin{array}{lcl} A = U & \text{et} & G = C \\ A + G & = & U + C \\ A + C & = & U + G \end{array} \right\} \quad \text{dans l'ARN}$$

et

$$\left. \begin{array}{lcl} A = T & \text{et} & G = C \\ A + G & = & T + C \\ A + C & = & T + G \end{array} \right\} \quad \text{dans l'ADN}$$

$$\begin{aligned} A \text{ (ARN)} &= U \text{ (ARN)} = G \text{ (ADN)} = C \text{ (ADN)} \\ G \text{ (ARN)} &= C \text{ (ARN)} = A \text{ (ADN)} = T \text{ (ADN)} \end{aligned}$$

est en faveur du mécanisme de synthèse des ARN de mammifères proposé par ZUBAY (Fig. 27). Cependant, la complexité des ARN des tissus de Mammifères, observée dès 1956 par BRADLEY & RICH (581) grâce à la chromatographie sur Ecteola cellulose, est à présent un fait acquis, (voir revue générale de STAHELIN (582)) et la recherche d'une marque génétique dans les ARN doit se faire dans les différentes classes d'ARN.

1°) Rôle de l'ADN dans la synthèse des ARN.

La participation de l'ADN dans la synthèse de l'ARN est maintenant bien démontrée :

a) On a découvert l'enzyme responsable de la synthèse des chaînes polyribonucléotidiques à partir des nucléosides 5' triphosphates et nécessitant la présence d'un modèle qui est l'ADN. Cet enzyme, l'ARN polymérase, a été mis en évidence, non seulement chez les microorganismes (HURWITZ & Coll. (583) ; STEVENS

(584) ; OCHOA & Coll. (585), mais aussi chez les végétaux (HUANG & Coll. (586)) et chez les animaux :

dans le foie de Rat par WEISS & GLADSTONE (587)

dans le thymus de Veau par ABRAMS & Coll. (588)

dans le foie d'embryon de Veau par MANDEL (589)

dans le prostate par HANCOCK & Coll. (590)

dans le foie de Poulet par WEILL & Coll. (591)

Son existence a en outre été signalée dans certaines tumeurs cancéreuses par HURDON & SMELLIE (592) et par MANDEL (593). Cet enzyme semble être associé aux acides nucléiques, il coprécipite avec ceux-ci par addition de streptomycine ou de protamine à des préparations acellulaires (FURTH & Coll.)(594) et plus spécialement avec l'ADN car il sédimente avec celui-ci en gradient de saccharose (HURWITZ & Coll. (595)). D'ailleurs dans le foie de Rat, il est localisé dans le noyau et HUANG & Coll. (596) ont montré chez les végétaux qu'il est associé avec l'ADN chromosomal. KADOYA & Coll. (597) ont signalé sa présence sous forme de complexe ADN-protéine chez E.coli.

b) La composition de l'ARN formé in vitro sous l'action de l'ARN polymérase dépend de celle de l'ADN utilisé comme modèle (FURTH & Coll. (598) ; WEISS & NAKAMOTO (599) ; STEVENS (600) ; CHAMBERLIN & BERG (601)).

Des expériences avec des polymères synthétiques ont permis de montrer que le poly dT conduit à la formation de poly A (KHORANA & Coll. (602)), le poly dC à la formation de poly G (FALASCHI & Coll. (603)) et le copolymère dA.T. à la formation de poly AU (FURTH & Coll. (604)).

Les désoxyribonucléotides dA, dT, dG, dC semblent donc diriger respectivement l'incorporation dans la chaîne polyribonucléotidique en formation, des nucléotides U, A, C et G. (voir Fig.29).

La réaction catalysée par l'ARN polymérase peut donc se schématiser ainsi :

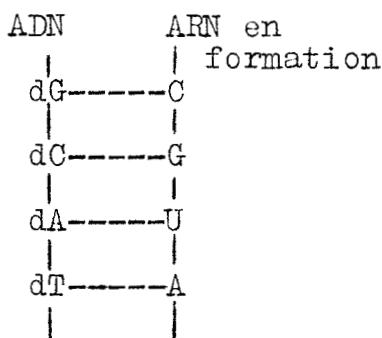
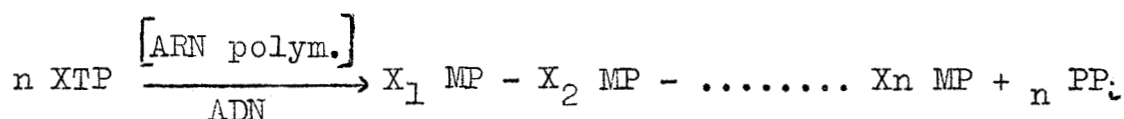


FIGURE 29

La nature des produits de la réaction, et la synthèse, par des méthodes physiques, d'hydrides ADN-ARN (RICH (605) ; HALL & SPIEGELMAN (606) ; GEIDUSCHEK & Coll. (607) ont permis de poser l'hypothèse d'un appariement par liaisons hydrogènes, des bases de la chaîne ADN modèle avec celles de la chaîne ARN formée, selon le schéma de WATSON & CRICK (608) donné pour la structure de l'ADN en double chaîne. La chaîne ARN formée est donc complémentaire de la chaîne ADN "modèle". La découverte d'hybrides ADN-ARN dans les synthèses in vitro (WARNER & Coll. (609) ; SINSHEIMER & Coll. (610) ; CHAMBERLIN & BERG (611) et celle d'hybrides naturels (SPIEGELMAN & Coll. (612) ; SCHULMAN & Coll. (613) ; BORKOWSKA & Coll. (614)) ont confirmé cette hypothèse.

Il semble que les expérimentations réalisées in vitro permettent d'envisager une transcription des deux chaînes d'ADN (CHAMBERLIN & BERG (615)) et que l'ARN polymérase puisse utiliser aussi bien un modèle à une chaîne qu'un modèle à deux chaînes polydésoxyribonucléotidiques (HURWITZ & Coll. (616)). Toutefois, l'ADN natif paraît plus efficace que l'ADN dénaturé par la chaleur (WEISS)(617).

L'ensemble de ces expériences ont montré que la synthèse des ARN était bien dirigée par l'ADN et qu'il devait donc exister in vivo une relation entre la composition des ARN synthétisés et celle de l'ADN qui servait de "modèle". Elles ont été effectuées pour la plupart avec des préparations enzymatiques de microorganismes (E.coli.) mais on peut poser en hypothèse qu'un mécanisme identique préside à la synthèse des ARN dans les cellules des Mammifères. Le problème est alors de savoir si l'ensemble des ARN cellulaires sont synthétisés sur l'ADN ou si la synthèse de l'ARN messager est seule contrôlée par les ADN. Il convient encore de préciser si les deux chaînes de l'ADN participent à la formation de l'ARN ou si une seule des deux chaînes est impliquée dans le mécanisme.

2°) Synthèse des différentes classes d'ARN.

Les ARN ribosomiaux et solubles ne semblant pas porter la marque génétique (HOAGLAND (618)), seul, l'ARN messager serait alors synthétisé au contact de l'ADN. Comme les ARN messagers ne représentent qu'une faible proportion des ARN cellulaires, il n'est pas étonnant que ceux-ci aient une composition assez voisine pour des espèces différentes. Cette observation avait été faite par BELOZERSKY & SPIRIN (619) chez les bactéries où la composition de l'ARN ne change pas aussi considérablement que celle de l'ADN. Ces Auteurs en avaient conclu que seulement une faible proportion des ARN présente une relation étroite avec l'ADN, en ce qui concerne la composition et que la synthèse de la plus grande partie de l'ARN peut ne pas être faite sous le contrôle immédiat de l'ADN (620). D'autre part, la

"transformation" de certaines bactéries s'accompagne de modifications importantes de la composition des ADN et de modifications discrètes de celle des ARN totaux. Ce résultat est en faveur de la modification d'une faible fraction seulement des ARN cellulaires (SPIRIN & BELOZERSKY (621)). Cette fraction (ARN messenger vraisemblablement) transmet aux autres substrats cellulaires, aux protéines en particulier, les changements génétiques qui ne sont pas apparents dans les autres ARN. Faut-il en conclure à propos de ces "autres ARN" à l'existence d'une biosynthèse indépendante de l'ADN ?

Il a été montré in vitro que l'actinomycine inhibait la synthèse des ARN en se combinant aux ADN (KIRK (622) ; RAUEN (623) ; REICH & Coll. (624) ; NATAKA & Coll. (625) ; GOLBERG & (626) ; HURWITZ & Coll. (627) ; KAHAN & Coll. (628) ; HARBERS & MÜLLER (629) ; CAVALIERI & Coll. (630)) et plus spécialement sur les sites dG des ADN (HURWITZ & Coll. (631)). Or, in vivo, l'actinomycine inhibe la synthèse de l'ensemble des ARN cellulaires. La formation des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert paraît donc dépendre des ADN (ACS & Coll. (632) ; REICH & Coll. (633) ; PERRY (634)). Il a même été démontré que tandis qu'elle inhibait complètement la formation des ARN ribosomiaux et solubles, l'actinomycine laisse subsister celle des ARN messagers (GEORGIEV (635)). Ceci est en contradiction avec l'idée que seuls les ARN messagers sont synthétisés au contact de l'ADN. Par contre, on conçoit aisément l'existence de fractions d'ADN différentes, dont l'une, de spécificité étroite dirigerait la synthèse des ARN messagers et l'autre, moins spécifique, dirigerait la formation des ARN solubles et ribosomiaux. Il existerait vraisemblablement aussi deux ARN polymérases différentes.

D'autre part, les ARN ribosomiaux peuvent donner des complexes hybrides avec les ADN isologues (SPIEGELMAN (636) ; YANOFSKI & Coll. (637)) ; des hybrides partiels d'ARN S. et d'ADN ont été isolés par GOODMAN & RICH (638) ; GOLDBERG & Coll. (639) ; SPIEGELMAN (640)). D'ailleurs la nécessité pour les ARN S. de posséder des séquences complémentaires de certaines

séquences des ARN messagers suggère une biosynthèse des ARN S. dépendante de l'ADN. Il se peut que la spécificité des ARN S., comme celle des ARN ribosomiaux d'ailleurs, soit liée à la séquence des nucléotides, spécificité qui n'apparaît pas nécessairement après l'étude de la composition de ces molécules : en effet, NISHIMURA & Coll. (641) ont montré des différences de sensibilité à la ribonucléase de *Bacillus Subtilis*, entre les ARN S. d'*E.Coli.*, de Levure et de foie de Rat. Cependant, au cours de synthèse protéique in vitro, on a montré que les ARN S. d'espèces différentes pouvaient se remplacer dans les systèmes cellulaires et ce résultat n'est pas en faveur d'un contrôle génétique de leur synthèse (VON EHRENSTEIN & Coll. (642) ; BISHOP & Coll. (643)).

CONCLUSION

Le problème de la synthèse des différentes classes d'ARN ne peut être résolu par la seule connaissance de leur composition. Il semble indispensable d'étudier la structure de ces molécules et les recherches doivent être orientées dans cette direction. Il est nécessaire aussi de suivre cette synthèse par l'incorporation d'un traceur, précurseur des ARN. L'étude de ce phénomène fera l'objet de la seconde partie de ce mémoire (Chapitre III).

C H A P I T R E I I I

-:-

ETUDE DE L'INCORPORATION D'UN PRECURSEUR
MARQUE DANS LES ACIDES RIBONUCLEIQUES

-:-:-:-:-

HISTORIQUE

TRAVAUX PERSONNELS

HISTORIQUE

- I - VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES DIFFERENTS RIBO-
NUCLEOTIDES.
- II - VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES ARN DES DIFFERENTES
FRACTIONS CELLULAIRES.
- III - CONCLUSIONS.

HISTORIQUE

La mesure du renouvellement de l'acide ribonucléique par la détermination de la vitesse d'incorporation d'un constituant marqué, a fait l'objet de nombreux travaux. La plupart d'entre eux ont été effectués à l'aide de radiophosphate mais d'autres traceurs, comme l'azote lourd ^{15}N , le carbone ^{14}C ou le tritium ^3H , marquant des précurseurs des ARN tels que glycolle, formiate ou bases puriques, ont été aussi souvent utilisés. Malgré les discordances que l'on observe dans les résultats obtenus par les différents Auteurs et qui sont vraisemblablement dues aux conditions expérimentales, des renseignements précieux ont été acquis, que nous pouvons résumer de la manière suivante :

- les différents ribomononucléotides semblent posséder des vitesses de renouvellement différentes ; ceci a été observé non seulement dans les ARN totaux mais aussi dans les ARN des différentes fractions cellulaires isolées.
- les ARN de ces différentes fractions cellulaires incorporent plus ou moins vite les précurseurs marqués. D'une manière générale, après administration d'un traceur radioactif, l'activité spécifique de l'ARN nucléaire est nettement supérieure à celle de l'ARN du suc cellulaire, elle même supérieure à celle des ARN des granules cytoplasmiques.

I VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES DIFFERENTS RIBOMONONUCLEOTIDES

En 1951, VOLKIN & CARTER (644) démontraient que la distribution du radiophosphore n'était pas uniforme dans les mononucléotides des ARN du foie du Rat et de la Souris. Ces résultats furent confirmés par SELLIE (645) & DAVIDSON (646) qui trouvaient une radioactivité spécifique différente dans chacun des ribonucléotides du foie de Rat, sacrifié 2 heures après l'injection de radiophosphates.

BOULANGER & Coll. (647) ont souligné également cette différence, dans le marquage par le radiophosphore, des nucléotides des ARN hépatiques chez le Rat. Ces auteurs ont cru pouvoir en tirer des conclusions concernant la structure des ARN : les nucléotides pyrimidiques étaient plus radioactifs que les nucléotides puriques, et ce fait, rapproché de la libération préférentielle des premiers par la ribonucléase, pouvait faire penser à l'existence, dans l'ARN, d'une structure ramifiée, dans laquelle des chaînes latérales riches en nucléotides pyrimidiques, auraient été attachées à un "noyau" riche en nucléotides puriques. La connaissance ultérieure de l'activité pyrimidine-phosphodiesterasique de la ribonucléase et du métabolisme des ARN, ont fait rejeter cette hypothèse.

Le marquage préférentiel de certains nucléotides par le radiophosphore se retrouve dans toutes les fractions cellulaires étudiées :

- WARD et GRIFFIN (648) trouvent que l'acide adénylique a une activité spécifique supérieure de 25 à 30 p 100 par rapport à celle des autres nucléotides de l'ARN nucléaire, 2 heures après l'injection de radiophosphates, mais inférieure de 30 p 100 après 18 heures d'incorporation.

- En ce qui concerne les ribonucléotides des autres fractions cellulaires, la séquence des radioactivités est, selon SMELLIE & Coll. (649), après 2 heures d'incorporation : A, C, U, G dans les ARN du suc cellulaire et dans les ARN microsomaux, A, U, C, G, pour les ARN mitochondriaux.

- D'après MOLDAVE et HEIDELBERGER (650) cette séquence est A, U, C, G, dans les ARN microsomaux après 40 minutes d'incorporation.

- Elle est différente (G, A, C, U ; A, G, U, C ; A, G, C, U) dans les ARN des sous-fractions microsomaux du foie de cobaye, isolées par BARGHAVA & Coll. (651).

Notons toutefois que SMELLIE (652) signale des radioactivités identiques des nucléotides de l'ARN nucléaire dans

le foie de Rat au temps "2 heures" et que MARSHAK (653) constate le même fait pour le foie de Lapin au temps "3 heures".

Les expériences de PRICE & Coll. (654), qui perfusent pendant 4 heures des reins ou des testicules de Chiens avec un liquide renfermant des radiophosphates, montrent, dans le noyau comme dans le cytoplasme, un marquage différent des nucléotides, tel que $U > A > C > G$.

La même séquence se retrouve après les études in vitro de DE LUCA, ROSSITER et STRICKLAND (655) sur les coupes de cerveaux de Chats, placées pendant 4 heures dans un milieu contenant des phosphates radioactifs, et dans celles de SEKIGUCHI et SIBATANI (656).

D'autres travaux pour lesquels le traceur utilisé était, soit l'acide orotique radioactif (SCHNEIDER et VAN POTTER (657)), soit le formiate marqué sur le carbone, (TOTTER & Coll. (658)) ; (DROCHMAN & Coll. (659)), soit le ^{15}N - ou ^{14}C (sur CH_2) glyccocolle (BERGSTRAND & Coll. (660)), (LE PAGE et HEIDELBERGER) (661) font ressortir l'hétérogénéité du marquage des constituants de l'ARN.

Ces observations ont amené certains auteurs (BROWN et Coll. (662) ; DUNNING et Coll. (663)) à voir pour chacun des composants de l'ARN, une grande indépendance dans la vitesse et l'importance de son renouvellement ; ils en conclurent que l'acide ribonucléique ne se comportait pas comme une entité, mais que le catabolisme et l'anabolisme ne portaient que sur des portions de la molécule.

D'autres auteurs (BRUMM, VAN POTTER et SIEKEVITZ (664)) ont vu dans la vitesse d'incorporation du radiophosphore dans les nucléotides, une mesure, non pas de la synthèse de l'ARN mais de la participation de ces nucléotides aux transferts qui sont opérés dans la cellule.

Cependant, les travaux récents sur la biosynthèse des ARN ont démontré qu'ils se formaient à partir des nucléosides-triphosphates avec libération de pyrophosphates (voir

page 48). Le radiophosphore contenu dans les ARN nouvellement formés provient donc des nucléosides triphosphates devenus radioactifs à la suite d'injection de radiophosphates à l'animal et la mesure de l'incorporation de ces derniers rend compte de la biosynthèse de l'ARN. Les nucléosides triphosphates ont peut-être des vitesses de formation différentes, donc des radioactivités différentes qui entraînent des activités spécifiques différentes des nucléotides libérés par hydrolyse de l'ARN formé.

D'autre part, il est important de souligner que l'hydrolyse alcaline libère des nucléosides 2'- ou 3'-phosphates (voir page 25). Le ^{32}P phosphorylé attaché à chaque nucléotide libéré provient donc du nucléotide voisin ; en conséquence, les radioactivités spécifiques des nucléotides étudiés ne reflètent pas le métabolisme des nucléotides polyphosphates dont ils proviennent.

Une autre question peut encore être posée à propos de l'incorporation des isotopes dans les ARN ; celle-ci traduit-elle une activité métabolique ou n'est-elle pas simplement la conséquence de la mort de certaines cellules et de leur remplacement par des cellules néoformées ? Autrement dit, le dosage du marqueur traduit-il le renouvellement des composants de la cellule ou bien le nombre des cellules renouvelées ? (voir revue générale de TERROINE (665)). Il semble que, si la radioactivité des molécules étudiées n'était due qu'à la présence de nouvelles cellules, il y aurait un renouvellement parallèle de l'ADN et de l'ARN ; or, toutes les expériences montrent, quel que soit le précurseur et quelles que soient les conditions expérimentales, que la vitesse d'incorporation est toujours considérablement plus faible pour l'ADN que pour l'ARN :

(DAVIDSON & RAYMOND (666) ; McINDOE & DAVIDSON (667) ; MARSHAK & CALVET (668) ; BARNUM & HUSEBY (669) ; STRICKLAND (670) ; ANDERSON & AQUIST (671) ; HAMMARSTEN & Coll. (772) ; REICHARD (673) ; WEED & WILSON (674) ; HURLBERT & VAN POTTER (675) ; ANDERSON & Coll. (676) ; BROWN & Coll. (677) ; FRESCO & Coll. (678) ; WATTS & HARRIS (679) ; SMELLIE & Coll. (680) ;

SIBATANI (681) ; TOTTER & Coll. (682) ; ABRAMS & Coll. (683) ; DINNING (684).

Au contraire, dans les tissus en voie de croissance, la fixation du traceur dans l'ADN est importante (SWICK & Coll. (685)). Elle se réalise avec vitesse élevée dans le foie, après hépatectomie partielle, c'est-à-dire dans le cas d'une multiplication cellulaire (BRUES & Coll. (686) ; FURST & Coll. (687) ; ANDERSON & AQUIST (688) ; SMELLIE & Coll. (689) ; SIBATANI (690) ; BOLIUM & VAN POTTER (691).

Les mêmes observations ont été effectuées sur les tissus concréux dans lesquels les mitoses sont nombreuses (BARNUM & Coll. (692) ; KELLY & Coll. (693) ; WINZTERITH (694) ; MORTREUIL & Coll. (695) ; TYNER (696) ; MARSHAK (697)) et sur les cultures de tissus ou de cellules quand le développement est actif (HULL & Coll. (698) ; GERARDE & Coll. (699).

En conclusion, on peut affirmer que la détermination de la vitesse d'incorporation d'un précurseur dans les ARN, constituant les cellules au repos ou les cellules en voie de multiplication, apporte des informations exactes sur la synthèse des ARN.

II - VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES ARN DES DIFFERENTES FRACTIONS CELLULAIRES.

1°) Noyau cellulaire

MARSHAK (700), JEENER & SZAFARZ (701), JARDETZKY (702), BARNUM & HUSEBY (703), DAVIDSON & Coll. (704), Mc INDIE (705) et SMELLIE (706) sont tous d'accord pour affirmer, qu'après introduction d'un traceur, l'activité spécifique des ARN du noyau est très supérieure à celle des ARN du cytoplasme et que celle des ARN du suc cellulaire est supérieure à celle des ARN des granules cytoplasmiques. JEENER (707) et MARSHAK (708) concluent que l'ARN nucléaire est le précurseur de l'ARN cytoplasmique : une telle conclusion semble un peu hâtive car les travaux de ces Auteurs n'ont porté que sur un prélèvement unique,

effectué 2 ou 3 heures après l'injection du phosphate radioactif.

Pour affirmer que l'ARN du noyau est le précurseur de l'ARN cytoplasmique, il était en effet nécessaire d'effectuer comme l'ont fait de nombreux chercheurs, une étude cinétique, de l'incorporation du radiophosphore dans les ARN des différentes fractions cellulaires.

La radioactivité est maximale dans les ARN des noyaux cellulaires après 2 ou 3 heures d'incorporation selon MARSHAK & CALVET (709), BARNUM & HUSEBY (710) et WEILL (711).

BARNUM et HUSEBY (712), poursuivant leur étude jusqu'à 24 heures d'incorporation, ont démontré que l'ARN du noyau ne satisfaisait pas aux exigences théoriques pour être le précurseur de l'ARN cytoplasmique et concluent à l'existence d'un précurseur commun.

D'après MARSHAK (713), la radioactivité de l'ARN des mitochondries n'atteint pas encore celle de l'ARN nucléaire après 73 heures d'incorporation.

SMELLIE & Coll. (714) ont étudié la radioactivité des nucléotides des fractions cellulaires du foie de Lapin, en fonction du temps et jusqu'à 96 heures, et n'ont pas obtenu de point de rencontre des courbes de radioactivité des ARN du noyau et du cytoplasme. Des résultats identiques ont été obtenus par MORTREUIL et KHOUVINE (715), les Auteurs ayant suivi l'incorporation des radiophosphates pendant 48 heures.

WEILL et LEDIG (716) par contre, ont saisi le moment où les ARN du noyau et du cytoplasme du foie de Rat, possèdent la même radioactivité, et ont montré qu'au quatrième jour, les ARN du noyau devenaient moins radioactifs que ceux du cytoplasme. Cependant, ces Auteurs n'en ont pas tiré pour autant la conclusion que les ARN nucléaires étaient les précurseurs des ARN cytoplasmiques.

D'autres recherches effectuées avec le glycocolle, l'acide orotique, le formiate ou l'adénine marqués (HURLBERT

(717) ; ANDERSON (718) ; BENNETT (719) ; SMELLIE (720) ; OGATA (721) ; HARTH (722) ; FRESCO (723) ; TYNER (724) ; FICQ (725) ; VAN POTTER (726)) ont donné les mêmes résultats et ont montré que les ARN nucléaires incorporaient beaucoup plus rapidement le traceur utilisé que les ARN cytoplasmiques.

Des expériences réalisées in vitro et des autoradiographies ont confirmé le métabolisme intense des ARN du noyau (GROSSMAN (727) ; TAYLOR (728) ; HARRIS (729) ; Mc MASTER KAY (730) ; FICQ (731) ; HERBERT (732) ; PRICE (733)) et amené certains auteurs (GOLDSTEIN & Coll. (734) ; PRESCOTT (735)) à voir dans ceux-ci les précurseurs immédiats des ARN cytoplasmiques. De même, ZALOKAR (736) et SIRLIN (737) après leurs travaux respectifs sur *Neurospora Crassa* et sur les glandes salivaires de *Surritia*, pour lesquels ils ont utilisé l'uridine tritiée, ont conclu à la formation de l'ARN cellulaire dans le noyau et à sa migration ultérieure dans le cytoplasme.

L'origine nucléaire des ARN cytoplasmiques semblent ressortir aussi des travaux de WOODS et TAYLOR (738), BRACHET (739), PERRY & Coll. (740), HARRIS et WATTS (741), SCHOLTISSEK (742).

D'autre part, SCHNEIDER (743) a montré par des expériences réalisées in vitro, le passage des ARN nucléaires dans le cytoplasme.

Toutefois, tous les résultats obtenus jusqu'à présent, ne sont pas en faveur d'une biosynthèse des ARN cytoplasmiques dans le noyau. Par exemple, ANDERSON & Coll. (744) ont suivi l'incorporation de l'acide ¹⁴C uréido-succinique (précurseur des pyrimidines, précédant l'acide orotique (voir page

41) et observé qu'il n'y avait pas de différence entre le renouvellement des ARN du noyau et celui des ARN cytoplasmiques. De même NOGUCHI et MIURA (745) ont conclu à une synthèse égale des ARN nucléaires et des ARN microsomaux après leur étude d'incorporation de la 4-amino-5-imidazole carboxamide radioactive, précurseur des purines (Voir p. 39).

D'autre part, SACHS & Coll. (746) dans leurs essais d'hydrolyse ménagée des ARN des différentes fractions cellulaires ont trouvé des fragments d'ARN des mitochondries, microsomes et suc cellulaire qui avaient une vitesse de renouvellement plus élevée que celle de quelques fragments d'ARN nucléaire. Ces résultats étaient à rapprocher des travaux de OSAWA & Coll. (747) qui avaient réussi à fractionner l'ARN des noyaux de thymus de Veau en deux "familles" : l'une possédant une composition identique à celle des ARN cytoplasmiques et une activité spécifique sensiblement égale, 3 heures après l'injection de radiophosphates, l'autre possédant une activité nettement plus élevée.

L'hétérogénéité des ARN nucléaires ressort aussi des expériences de KAY & Coll. (748) qui ont observé que la radioactivité des noyaux était différente suivant qu'ils étaient préparés en milieu aqueux ou en milieu non aqueux.

LOGAN et DAVIDSON (749) ont montré que l'incorporation soit de phosphate radioactif, soit de la ^{14}C adénine, soit de ^{14}C -formiate dans les noyaux de thymus de Veau ou de Lapin permet de distinguer au moins deux fractions différentes par leur activité métabolique.

L'existence dans le noyau cellulaire de plusieurs ARN différents par leur vitesse de renouvellement, a été démontrée aussi par VINCENT (750), ALLFREY et MIRSKY (751), BROWN & Coll. (752), JARDETZKY et BARNUM (753) et confirmée plus tard par Mc MASTER KAYE (754) et AMANO et LEBLOND (755), SIBATAI (1956), GEORGINY & Coll. (757).

2°) Suc cellulaire

Parmi les fractions cytoplasmiques étudiées, le suc cellulaire est le plus précocement et le plus intensément radioactif.

BARNUM et HUSEBY (758) ont trouvé, 4 heures après l'injection de phosphate marqué, une radioactivité du suc cytoplasmique trois fois plus élevée que celle des ARN micro-

somaux. Cette supériorité se retrouve quel que soit le temps considéré (d'une demi-heure à six heures) par JARDETZKY (759). Elle a été signalée aussi par SHIGEURA et CHARGAFF (760) dans les deux premières heures qui suivent l'administration du traceur.

Le suc cellulaire présente toujours une plus haute activité que les "granules cytoplasmiques", que l'on étudie le foie de Rat normal, le foie de Rat ayant subi une hépatectomie partielle, le foie de lapin adulte, de foetus ou de femelle gestante (SMELLIE Coll.) (761). Ce marquage plus intense des ARN du suc cytoplasmique a été démontré aussi par TYNER & Coll. (762) après injection simultanée de phosphate radioactif et de ^{14}C glycocolle à des rats carcinomateux, à la fois dans le tissu sain et dans le tissu tumoral. Il l'a encore été à l'aide du ^{15}N -glycocolle (HULTIN & Coll.) (763), de ^{14}C -formiate (SMELLIE (764)) et d'acide orotique marqué (REID et STEVENS (765)). Ces derniers auteurs ont vu dans leurs résultats la démonstration du rôle précurseur du suc cellulaire dans la synthèse des ARN microsomaux.

3°) Particules cytoplasmiques

L'accord est loin d'être parfait en ce qui concerne les radioactivités des granules cytoplasmiques.

Selon JEENER et SZAFARZ (766), les gros granules (mitochondries) sont plus radioactifs que les petits (microsomes). C'est ce qu'ont observé aussi DAVIDSON & Coll. (767).

Par contre, TYNER & Coll. (768) ont trouvé une radioactivité supérieure dans les microsomes ainsi que HULTIN & Coll. (769) après leurs expériences d'incorporation de ^{15}N -glycocolle ou de radiophosphate dans les fractions de foie de Poussin.

BENNETT (770), après avoir injecté de la ^{14}C -adénine à des Souris, a observé que cette base est moins rapidement incorporée dans les microsomes que dans les autres granules. SMELLIE & Coll. (771) n'ont noté aucune différence entre microsomes et mitochondries quand ils ont utilisé, comme précurseurs

des ARN, le ^{15}N -glycocolle ou le ^{14}C -formiate.

Signalons, enfin, que BHARGAVA & Coll. (772) ont fractionné les microsomes de foie de Cobaye et que ces fractions possèdent des radioactivités différentes quand le traceur utilisé est le radiophosphore. Cette hétérogénéité microsonale a encore été démontrée par POLLI (773), SACHS (774), SHIGEURA et CHARGAFF (775) et par MOULE & Coll. (776). Elle accentue la complexité des ARN déjà signalée à propos des noyaux et suggérée aussi par SHIGEURA (777) et SIBATANI (778) en ce qui concerne le suc cytoplasmique.

III - CONCLUSIONS

Plusieurs doctrines tendant à fixer les origines de l'ARN de chacune des fractions cellulaires ont été formulées. JARDETZKI et BARNUM (779) les a résumées dans le schéma ci-dessous :

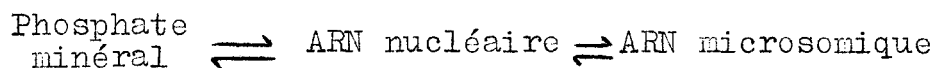
$\Rightarrow$ Noyau $\rightleftharpoons$ Surnageant cytoplasmique $\rightleftharpoons$ Microsomes
(d'après JEENER & SZAFARZ (780))

$\Rightarrow$ Surnageant $\rightleftharpoons$ $\begin{matrix} \text{X} \\ \updownarrow \\ \text{microsomes} \end{matrix}$ $\rightleftharpoons$ Ultramicrosomes
(d'après JEENER (781))

$\Rightarrow$ Surnageant $\rightleftharpoons$ Ultramicrosomes $\rightleftharpoons$ Microsomes
(d'après CHANTRENNE (782))

ADN $\rightarrow$ $\begin{matrix} \text{X} \\ \updownarrow \\ \text{Surnageant} \end{matrix}$ $\rightleftharpoons$ Noyau
 $\rightleftharpoons$ Ultramicrosomes $\rightleftharpoons$ Microsomes
(d'après BARNUM & Coll. (783))

JARDETZKI (784) a proposé le schéma suivant :



Toutes ces conceptions étaient évidemment hypothétiques et fondées, pour la plupart, sur des travaux imparfaits. Pour avoir une idée exacte du processus de synthèse des ARN, il était nécessaire de suivre l'incorporation des précurseurs en effectuant de fréquents prélèvements, convenablement échelonnés dans le temps et de faire porter l'étude sur des temps très courts.

En outre, il fallait se mettre à l'abri des critiques concernant les méthodes de fractionnement cellulaire utilisées, les techniques de préparation des ARN et la contamination de ceux-ci par des composés phosphorés non nucléotidiques (voir p.137) qui possèdent généralement une radioactivité spécifique très supérieure à celle des ARN.

C'est parce que le problème du renouvellement des ARN au sein des différentes fractions cellulaires nous paraissait loin d'être résolu en 1957 que nous avons entrepris des études sur la cinétique d'incorporation du radiophosphore dans les ARN des noyaux, des mitochondries, des microsomes et du "suc cytoplasmique" du foie de Rat, en effectuant des prélèvements de 5 mn à 2 heures après l'injection de phosphate radioactif à des rats normaux.

Nous nous sommes particulièrement attachée :

- 1) à la purification des fractions cellulaires isolées
- 2) à la purification des nucléotides avant d'en déterminer les radioactivités spécifiques.

TRAVAUX PERSONNELS

I - MODE OPERATOIRE.

- 1°) Animaux d'expériences.
- 2°) Fractionnement cellulaire.
- 3°) Préparation et séparation des ribonucléotides.
- 4°) Détermination des radioactivités spécifiques
des nucléotides.
- 5°) Vérification de la pureté des nucléotides.
- 6°) Identification du spot "X".

II - RESULTATS.

III - DISCUSSION.

I - MODE OPERATOIRE.

1°) Animaux d'expériences.

Nos expériences ont été effectuées sur des Rats blancs de souche Wistar, élevés au Laboratoire et nourris au "Ratigène".

Nous avons injecté à des animaux de 250 g environ, par voie intrapéritonéale, des doses de phosphate de sodium marqué au ^{32}P , variant de 1 à 4 millicuries, suivant le temps écoulé entre l'injection et le sacrifice. Nous avons été amenée à utiliser des doses importantes pour les expérimentations effectuées pendant des temps courts, afin d'obtenir des radio-activités spécifiques des ribonucléotides suffisamment élevées. Les animaux ont été sacrifiés par décapitation après des temps variant de 5 mn à 2 heures, et leur foie a été prélevé immédiatement.

Chaque expérience a été réalisée sur 6 animaux ayant reçu la même dose de radiophosphate et sacrifiés après un temps d'incorporation identique. Elle a, de plus, été effectuée 3 fois dans les mêmes conditions.

2°) Fractionnement cellulaire.

Les foies, dès leur prélèvement, ont été lavés rapidement dans un bain de saccharose 0,25 M maintenu à 4°C environ, puis broyés à l'aide d'un broyeur à main de Fischer. La pulpe obtenue a été recueillie dans 10 volumes de saccharose 0,25 M à 4°C contenant du chlorure de calcium 0,0018 M. On a recueilli ensemble les pulpes provenant des 6 foies des 6 animaux de la même expérience et on a réalisé ensuite une homogénéisation à l'aide d'un homogénéiseur constitué par un piston en téflon, tournant dans un cylindre en verre Pyrex (*) plongé dans la

(*) A. THOMAS Co. PHILADELPHIE.

glace fondante. La vitesse de rotation du piston a été maintenue à 600 t/mn environ et l'homogénéisation a été prolongée 2 mn. Les fractions cellulaires (noyaux, mitochondries, microsomes et solution cytoplasmique) ont été obtenues à partir de cet homogénat tissulaire effectué dans le saccharose 0,25 M, par centrifugation différentielle selon la méthode de SCHNEIDER (785).

Les noyaux ont été obtenus par une centrifugation de 10 mn à 800 g dans l'International Refrigerated Centrifuge Model P R₂ de l'International Equipment Co. de BOSTON. Après un traitement par l'acide citrique à 1 p. 100 (p/v) pendant 15 mn, ils ont été lavés dans du saccharose 0,25 M et de nouveau centrifugés.

Les mitochondries et les microsomes ont été séparés du suc cellulaire dans l'ultracentrifugeur réfrigéré Spinco, model L (x) par une centrifugation respectivement de 10 mn à 10.000 g et de 90 mn à 40.000 g. Ces deux fractions ont été lavées dans du saccharose 0,25 M et recueillies par une nouvelle centrifugation, à la même vitesse et pendant le même temps. Toutes les opérations ont été effectuées en chambre froide et le protocole expérimental a été établi après de nombreux essais réalisés sur des foies provenant d'animaux non marqués. En particulier, le temps et la vitesse d'homogénéisation ont été déterminés pour que soit préservée la morphologie des noyaux qui devaient par ailleurs être débarrassés de toute trace de cytoplasme : ces contrôles ont été faits au microscope optique par examen de gouttelettes d'homogénat, entre lame et lamelle, après coloration au Bleu Lavedan.

Nous nous sommes, d'autre part, efforcée d'obtenir des fractions pures, en effectuant des lavages et des nouvelles centrifugations : les noyaux ont été traités à l'acide citrique dilué qui élimine tout lambeau de cytoplasme ; les mitochondries et les microsomes ont été lavés avec du saccharose 0,25 M et

nouveau sédimentés.

L'examen de ces fractions obtenues a été effectué au microscope électronique par MONTREUIL & Coll. (786) et a montré que notre technique était satisfaisante. Il faut signaler toutefois que les noyaux ainsi isolés et purifiés présentent une morphologie altérée.

3°) Préparation et séparation des ribomononucléotides.

Chaque fraction cellulaire, lavée dans du saccharose 0,25 M et recueillie par une nouvelle centrifugation a été homogénéisée dans de l'acide trichloracétique à 10 p. 100 (p/v). On a ajouté, au suc cytoplasmique, de l'acide trichloracétique à 50 p. 100 en quantité suffisante pour que la concentration finale soit égale à 10 p. 100.

L'élimination des composés acido-solubles et des lipides a été effectuée suivant le mode opératoire décrit plus haut à propos des organes entiers (voir p.105).

L'hydrolyse de l'ARN a été réalisée par la soude 0,5 N à 37° pendant 18 heures. La solution obtenue a été amenée à pH 4 avec de l'acide formique concentré et centrifugée. La solution surnageante limpide renferme les ribomononucléotides mais aussi des produits de clivage des protéines, des ions Na^+ et les composés phosphorés non nucléotidiques (voir première partie de notre travail, p.149). Les nucléotides ont été purifiés selon le mode opératoire décrit par BOULANGER, MONTREUIL & MASSE (787) et BOULANGER & MONTREUIL (788) avec toutefois quelques modifications. La solution précédente a été "passée" sur une colonne de résine à échange d'anions (Amberlite IR 4 B; 2 x 20 cm, préalablement régénérée par le "passage" de 500 ml d'acétate de sodium 0,25 M) qui fixe les nucléotides et laisse passer les "contaminants". Après lavage de la colonne avec 500 ml d'eau distillée, l'élution des acides cytidylique et adénylique a été réalisée à l'aide de 500 ml d'acide formique à 2 p. 100 (v/v) (fraction F_1) ; celle des acides uridylique et guanylique par le passage de 500 ml

d'acide formique à 15 p. 100 (v/v) (Fraction F_2). Cette dernière renferme de l'acide orthophosphorique et des composés phosphorés non nucléotidiques que nous avons identifiés.

Les fractions F_1 et F_2 ont été évaporées complètement sous un courant d'air tiède et les résidus ont été repris par de l'eau distillée (0,5 à 2 ml suivant la concentration). Les solutions de nucléotides ont été soumises à la chromatographie sur papier dans le système solvant de BOULANGER & MONTREUIL (789) : phénol/isopropanol/acide formique/eau

Des courbes d'enregistrement de la radioactivité (voir Fig. 30) ont été effectuées à partir des chromatogrammes. Elles confirment :

- l'absence de composés phosphorés au spot de départ
- la présence de composés phosphorés migrant de part et d'autre de l'acide orthophosphorique dans la fraction F_2 . Ce sont les phospho-inositols et le phospho-glycérol, de radioactivité spécifique très élevée (MONTREUIL & Coll. (790))(voir p.144).

Le développement par l'acide formique à 2 p. 100 n'est pas absolument sélectif et la fraction F_1 renferme des traces de phospho-glycérol qui est le composé majeur non nucléotidique de la fraction F_2 et que nous avons appelé "spot X".

4°) Détermination des radioactivités spécifiques des nucléotides.

Les mesures de radioactivité ont été faites sur des pastilles de papier découpées à l'emporte-pièce sur les chromatogrammes, après révélation des composés phosphorés effectuée suivant le mode opératoire décrit p.127 . La même solution (F_1 ou F_2) étant déposée sous forme de 12 spots sur chaque chromatogramme, nous disposons pour chaque composé à étudier de 12 pastilles de même concentration

Les mesures de radioactivité ont été faites sur 3 pastilles superposées, dans un sens puis dans l'autre.

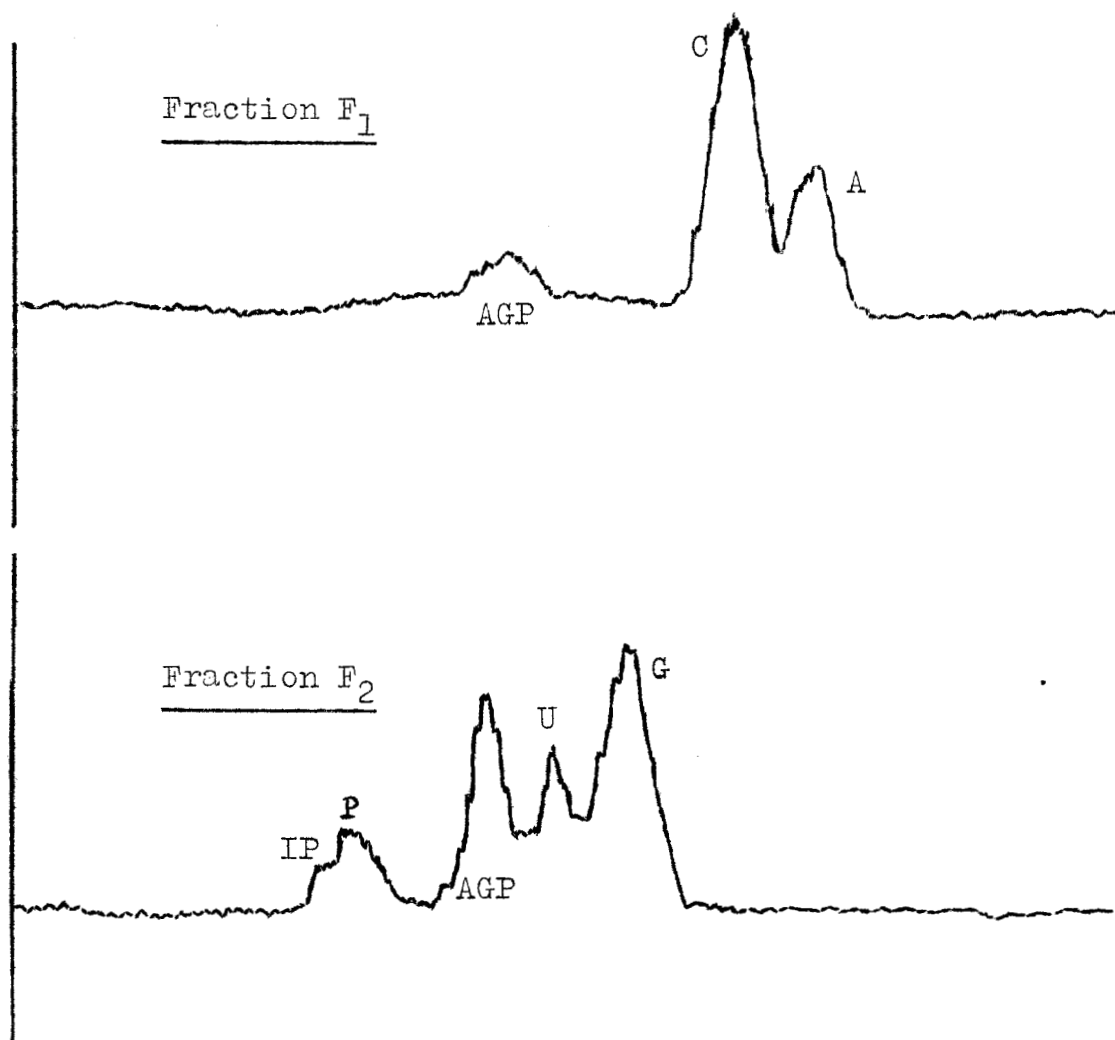


FIGURE 30

Courbes d'enregistrement de la radioactivité des composants des fraction F₁ et F₂ (foie total temps de marquage 20 mn).

Les dosages du phosphore ont été effectués sur ces mêmes pastilles de papier, selon la méthode d'ALLEN décrite plus haut (voir p.128). Des dosages témoins ont été effectués sur des pastilles de papier découpées sur les bords des chromatogrammes.

Les radioactivités spécifiques ont été exprimées en nombre de coups par mn et par mg de phosphore pour une injection de 1 mc. Nous désignons par radioactivité spécifique moyenne, la moyenne des résultats, ramenée au jour de l'injection, c'est-à-dire compte tenu de la perte de radioactivité pendant l'expérimentation.

Nous avons ainsi calculé la radioactivité spécifique moyenne ;

- des 4 nucléotides
- de l'acide orthophosphorique provenant en majeure partie de l'hydrolyse alcaline des phosphopeptides
- du "spot X"

et ceci pour chacune des différentes fractions cellulaires isolées : noyaux (N), mitochondries (M), microsomes (μ), suc cytoplasmique (S).

5°) Vérification de la pureté des nucléotides.

Etant donné que les radioactivités spécifiques des nucléotides étaient déterminées directement sur les chromatogrammes, il importait de vérifier la pureté de ces nucléotides. Cette vérification a été faite pour les nucléotides d'ARN de foie total purifiés selon le mode opératoire décrit plus haut (c'est-à-dire adsorbés sur Amberlite IR 4 B et élués par l'acide formique) et séparés par chromatographie sur papier dans le système solvant phénolique.

Les solutions F_1 et F_2 ont été déposées sous forme de traînées de 30 cm sur une feuille de papier Whatman n°1 et soumises à la chromatographie descendante dans le système solvant

phénolique de BOULANGER & MONTREUIL (791). Les chromatogrammes ont ensuite été séchés sous une hotte ventilée et l'emplacement des composés phosphorés a été repéré par révélation de bandes latérales. Les nucléotides ont été recueillis par élution avec de l'eau distillée selon le procédé de DENT. Les solutions obtenues, auxquelles on a ajouté une ou deux gouttes de chloroforme ont été desséchées en capsules, sous courant d'air froid et les résidus secs ont été repris par un faible volume d'eau distillée. Les solutions de nucléotides ont été soumises à une deuxième chromatographie sur papier :

- une partie dans le système-solvant de MARKHAM & SMITH (792) isopropanol/ammoniaque/eau (70 : 40 : 30),
- une autre partie dans le système solvant phénolique de BOULANGER & MONTREUIL (793).

Les courbes d'absorption en fonction des longueurs d'ondes et les dosages spectrophotométriques des nucléotides ont été effectués à partir des premiers chromatogrammes. Les dosages de phosphore ont été pratiqués à partir des deuxièmes chromatogrammes selon le protocole expérimental décrit p. 130).

Nous avons réuni dans le tableau XVI les résultats de cette étude.

On peut voir que les $\Lambda_{\max}$ et $\Lambda_{\min}$, les rapports des densités optiques à 290, 280 et 260 m μ sont ceux des nucléotides purs commerciaux.

Les rapports entre les quantités de phosphore, déduites des densités optiques à 260 m μ et dosées directement, sont égaux à 1. Les courbes d'absorption des nucléotides sont superposables à celle des nucléotides purs. (Fig. 31).

Nous pouvons donc affirmer qu'aucun composé phosphoré non nucléotidique, ne migre en même temps que les nucléotides sur les chromatogrammes quand la purification a été faite par adsorption sur Amberlite IR 4B.

6°) Identification du "spot X"

Ce composé a été préparé en grande quantité par chro-

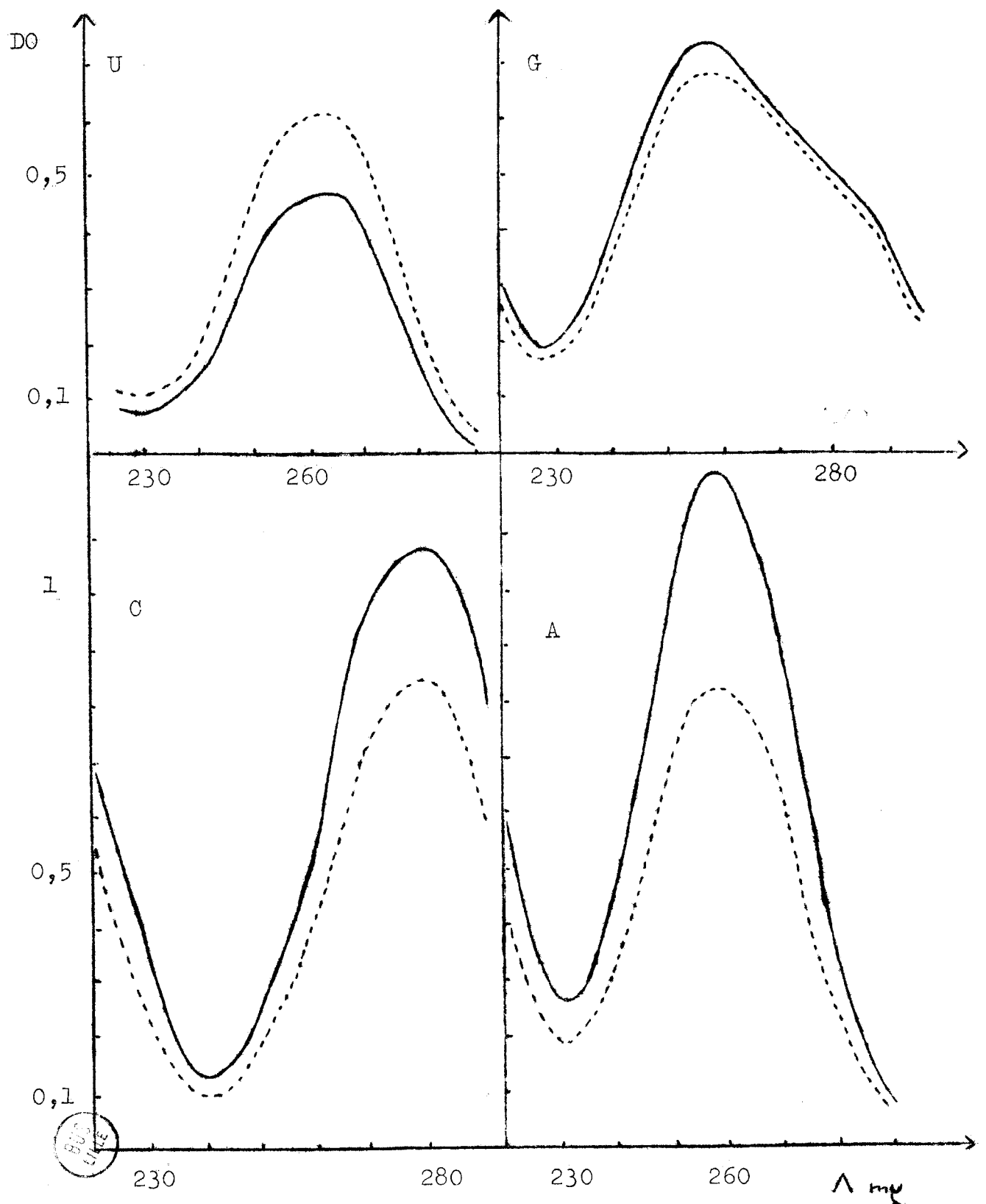


FIGURE 31

Spectres d'absorption en lumière ultra-violette des nucléotides purs (en pointillé) et des nucléotides constituant les ARN du Foie de Rat, purifiés sur échangeur d'anions et séparés par chromatographie sur papier (en trait plein).

matographie séparative afin d'être identifié. Il a été recueilli par élution des chromatogrammes, après révélation de son emplacement par pulvérisation du réactif de HANES et ISHERWOOD (794) sur des bandes latérales découpées de part et d'autre de la feuille de papier. Il a été soumis à la chromatographie sur papier dans d'autres systèmes-solvants de façon à comparer son R_F à ceux de substances témoins et à effectuer différentes méthodes de révélation.

Après de nombreux tâtonnements, il fut identifié au phospho-glycérol (voir mode opératoire dans la première partie de ce travail, page 141).

Nous avons également montré la présence de trace d'acide pseudo-uridylique migrant en même temps que notre "spot X" sur les chromatogrammes phénoliques. (voir page 138).

TABLEAU XVI

Propriétés optiques en lumière ultra-violette des nucléotides de l'ARN de Foie de Rat purifiés sur résine à échange d'anions et séparés par chromatographie sur papier.

Nucléotides	pH	Λ max. (m μ)	Λ min. (m μ)	$\frac{DO. 250}{DO. 260}$	$\frac{DO. 280}{DO. 260}$	$\frac{DO. 290}{DO. 260}$	$\frac{P \text{ calculé}}{P \text{ dosé}}$	
U	C*	2	261	227	0,76	0,31	0,03	0,99
	F	2	261	227	0,76	0,31	0,03	0,99
G	G	1	252	225	0,93	0,68	0,35	1
	F	1	252	225	0,94	0,68	0,35	1,02
C	C	2	270	240	0,45	2	1,39	1
	F	2	270	240	0,45	2	1,38	1,02
A	C	2	257	230	0,85	0,24	0,036	1
	F	2	257	230	0,83	0,24	0,037	1

(*) C : nucléotides du commerce (mélange de 2' et 3' nucléosides phosphates)

F : nucléotides de l'ARN de foie de Rat, purifiés sur Amberlite IR 4B.

II - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau n° XVII et illustrés par les courbes des figures 32, 33 et 34. Nous pouvons les résumer de la manière suivante :

1°) Radioactivité des ARN nucléaires

Les ribonucléotides du noyau (N) ont une radioactivité supérieure à celle des nucléotides du suc cellulaire (S), des microsomes (μ) et des mitochondries (M). Après 5 mn d'incorporation du traceur, seuls les ARN des noyaux sont radioactifs ; au temps "+ 15 mn" ils sont deux fois plus radioactifs que les ARN de la fraction S et dix à quinze fois plus radioactifs que les ARN des granules cytoplasmiques.

Le renouvellement des ARN des noyaux est donc plus rapide que celui des ARN cytoplasmiques, (voir fig. 32, les courbes des activités spécifiques de l'acide adénylique dans les ARN des N, S, et μ en fonction du temps de marquage)

2°) Radioactivité des ARN du suc cellulaire

Le suc cellulaire possède, dans le cytoplasme, une radioactivité relativement élevée et précoce.

3°) Radioactivité des ARN des granules cytoplasmiques

La radioactivité apparaît dans les mitochondries et les microsomes, 15 mn après l'administration de phosphate marqué à l'animal et, quel que soit le temps expérimental considéré, les activités spécifiques de ces granules semblent très voisines.

4°) Radioactivité comparée du spot "X"

Dans toutes les fractions cellulaires, la séquence des radioactivités des composés étudiés est la suivante :



(voir fig. 33-34 les courbes des activités spécifiques de l'acide orthophosphorique Pi, glycérophosphorique AGP et adénylique A, en fonction du temps de marquage dans les noyaux et le suc cytoplasmique).

5°) Radioactivité des différents nucléotides

Quelle que soit la fraction cellulaire envisagée, les ribonucléotides possèdent des activités spécifiques différentes.

TABLEAU XVII

Radioactivités spécifiques des nucléotides des ARN des différentes fractions cellulaires du foie de Rats ayant reçu une injection de phosphates marqués au ^{32}P

Temps de marquage	Fraction cellulaire (*)	U**	G	C	A	P _i	AGP
5 mn	N	1.137	850	789	1.043	19.870	2.773
	M	radioactivité nulle				17.180	2.983
	μ	"	"	"	"	15.000	4.843
	S	"	"	"	"	100.000	7.363
10 mn	N	2.610	1.696	1.403	2.292	21.339	9.710
	M	radioactivité faible				21.781	4.885
	μ	"	"	"	"	13.000	7.234
	S	1.753	758	1.428	1.613		14.615
15 mn	N	11.000	8.000	17.000	25.000	145.000	27.000
	M	2.280	1.200	850	1.700	150.000	33.000
	μ	1.400	700	600	1.000	115.500	40.000
	S	3.000	4.200	6.500	7.000	403.000	85.000
20 mn	N	30.000	50.000	60.000	95.000	800.000	30.000
	M	9.000	2.500	2.800	4.000	500.000	120.000
	μ	4.000	2.000	3.000	4.500		100.000
	S	9.000	8.000	14.000	9.000		150.000
1 h.	N	242.000	245.000	262.000	360.000		250.000
	M	12.000	6.500	5.500	8.500	207.000	125.000
	μ	7.000	4.500	8.000	11.000	190.000	150.000
	S	24.000	13.000	30.000	25.000	700.000	230.000
2 h.	N	520.000	480.000	500.000	600.000	660.000	260.000
	M	17.000	10.000	8.500	20.000	247.000	135.000
	μ	16.000	10.000	17.000	24.000	85.000	30.000
	S	37.000	28.000	65.000	50.000	660.000	209.000

(*) N, M, μ, S désignent respectivement les noyaux, mitochondries, microsomes et suc cellulaire.

(**) U, G, C, A, P_i, AGP désignent respectivement les acides uridylique, guanylique, cytidylique, adénylique, orthophosphorique, glycérophosphorique.

Les radioactivités spécifiques sont exprimées en nombre de coups/mn. Les chiffres donnés sont les moyennes des résultats des trois expériences effectuées dans les mêmes conditions. Les résultats de chaque expérience sont eux-mêmes des moyennes de 4 valeurs.

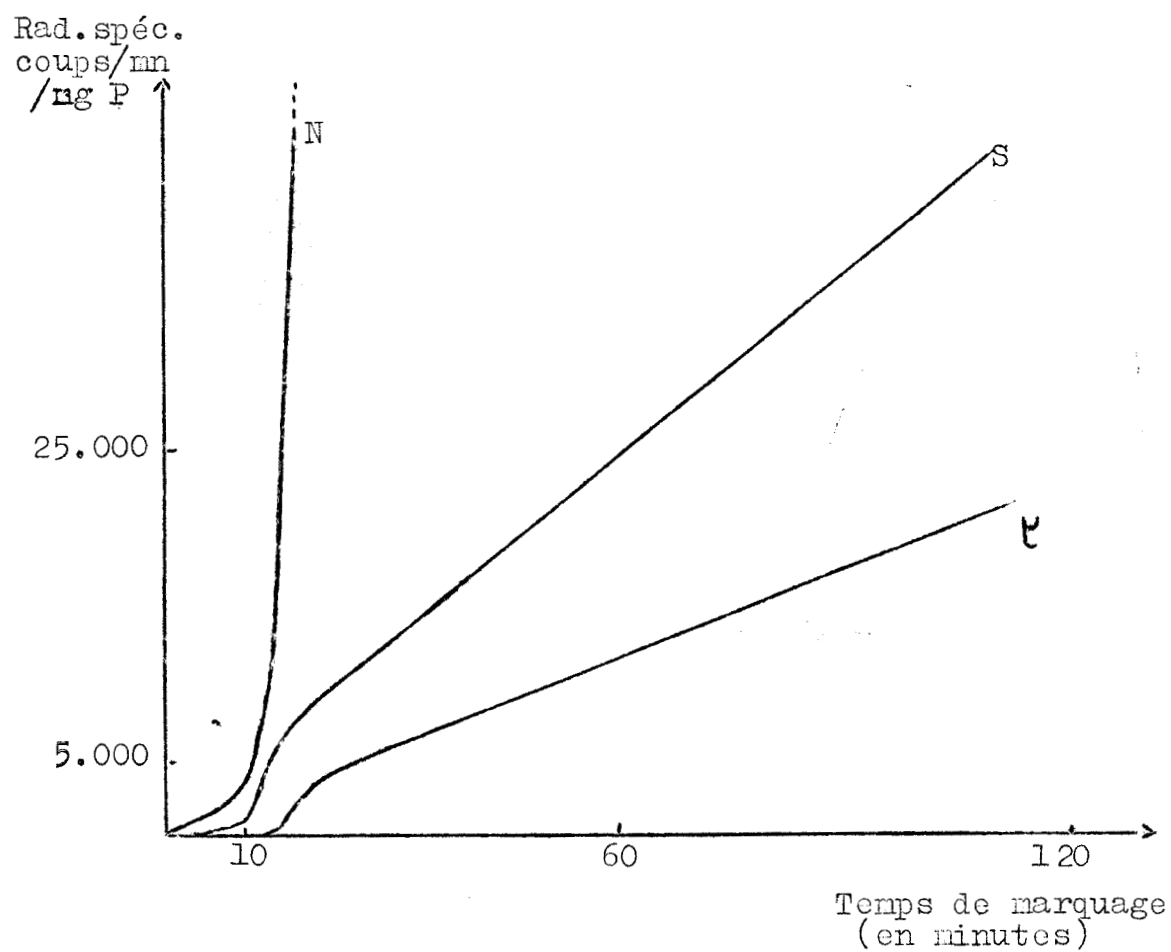


FIGURE 32

Courbes des radioactivités spécifiques de l'acide adénylique dans les différentes fractions cellulaires en fonction du temps de marquage.

N : noyaux S : suc cellulaire μ : microsomes

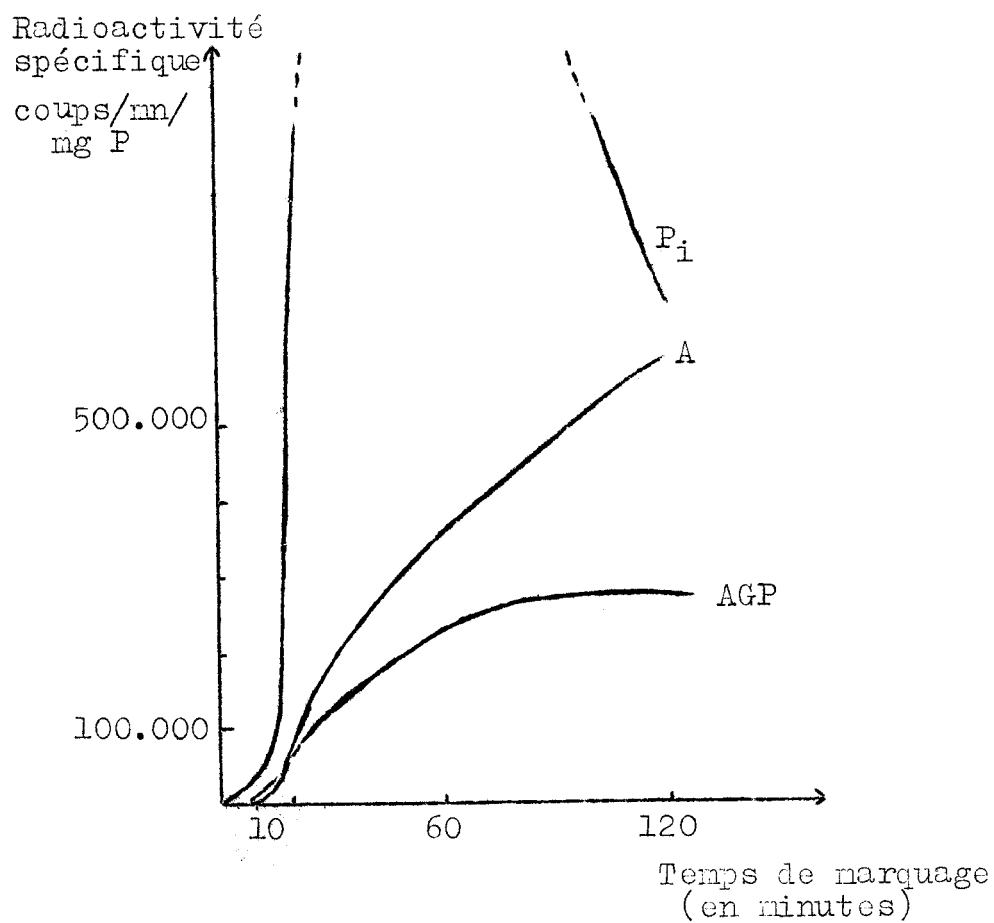


FIGURE 33

Courbes des radioactivités spécifiques des acides orthophosphorique (P_i), glycérophosphorique (AGP) et adénylique (A) en fonction du temps de marquage dans les noyaux de foie de rat.

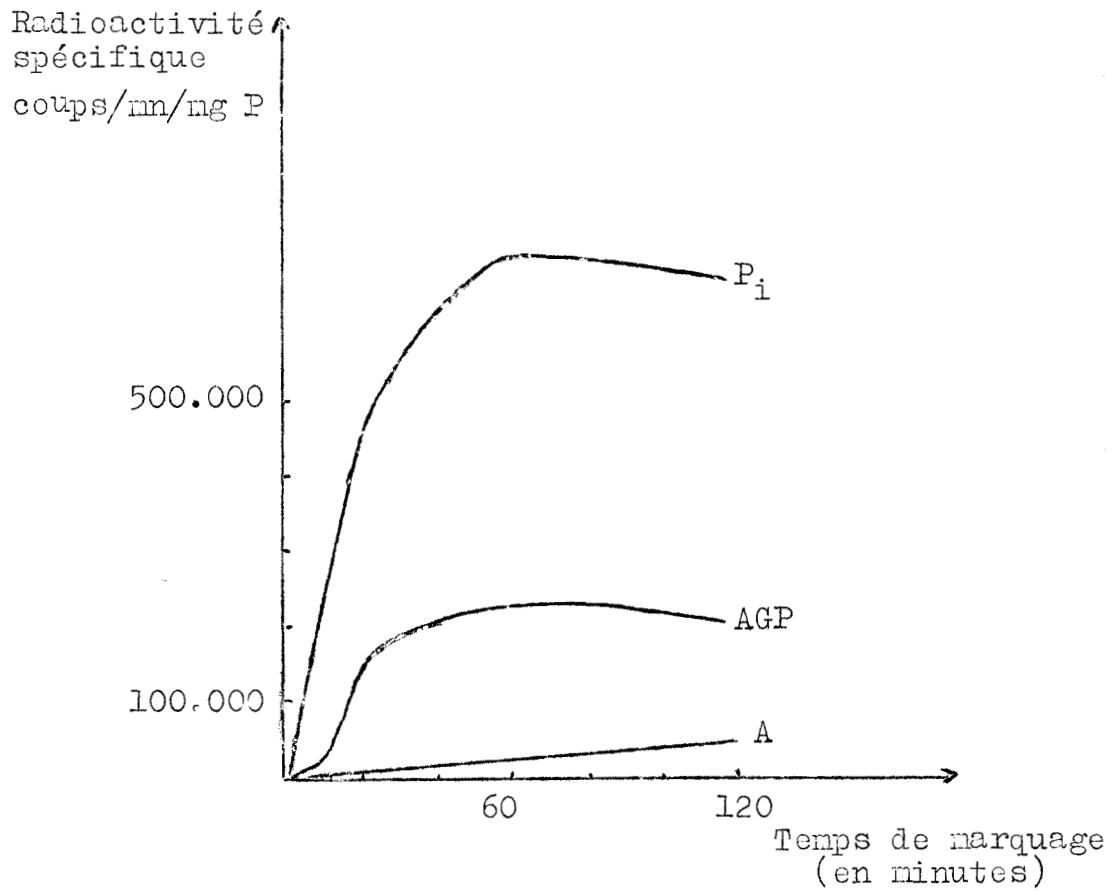


FIGURE 34

Courbes des radioactivités spécifiques des acides orthophosphorique (P_i), glycérophosphorique (AGP) et adénylique (A) en fonction du temps de marquage, dans la fraction "suc cellulaire".

III - DISCUSSION

1°) Radioactivité des ARN nucléaires

L'entrée du traceur se fait lentement et après un certain délai dans les ARN cytoplasmiques ; au contraire le renouvellement des ARN nucléaires est extrêmement rapide : après de tels résultats, nous sommes tentée de conclure, comme certains Auteurs, que les ARN du noyau sont les précurseurs des ARN cytoplasmiques. Cette conclusion est appuyée par le fait que :

a) des expériences d'énucléation, effectuées par BRACHET (795), PRESCOTT (796), GOLDSTEIN & Coll. (797), RICHTER (798) ont montré que le noyau était indispensable à l'incorporation des précurseurs marqués dans l'ARN cytoplasmique.

Certains travaux sur *Acetabularia* et *Amoeba* protéus sont en faveur d'une synthèse partielle d'ARN en l'absence du noyau (BRACHET & Coll. (799) ; PLAUT & RUSTAD (800) ; NAORA & Coll. (801) ; SCHWEIGER & BRENNER (802)). Mais les résultats obtenus semblent dûs, chez les amibes à la présence de Rickettsies et chez les algues, à la présence d'ADN dans les chloroplastes. HARRIS (803) a montré également l'existence d'une synthèse indépendante de l'ARN cytoplasmique dans les cellules animales et végétales, mais l'interprétation des résultats obtenus par cet Auteur semble sujette à discussion.

b) l'actinomycine qui bloque la synthèse des ARN nucléaires, bloque aussi celle des ARN cytoplasmiques (REICH & Coll. (804) ; PERRY (805)). Par contre quand elle est ajoutée après le marquage du noyau, elle n'empêche pas l'apparition de la radioactivité dans les ARN cytoplasmiques.

c) la destruction du nucléole par microirradiation diminue de 60 à 70 p. 100 l'incorporation de la cytidine tritiée dans les ARN cytoplasmiques (PERRY & Coll. (806)). On observe aussi une chute de la radioactivité du reste du noyau en relation, peut être, avec une certaine latence dans l'incorporation des précur-

seurs radioactifs dans les 30 à 40 p. 100 des ARN cytoplasmiques apparemment non contrôlés par le nucléole.

Enfin les progrès récemment accomplis dans la connaissance de la synthèse des ARN et du rôle de l'ADN dans cette biosynthèse (voir p.48) expliquent aisément le fait que les ARN nucléaires incorporent plus rapidement les précurseurs marqués que les ARN cytoplasmiques. C'est dans le noyau, au contact de la chromatine, que se forment les molécules d'ARN et il est vraisemblable que ces molécules diffusent à travers la paroi nucléaire dans le cytoplasme ou migrent dans ce dernier, au moment de la mitose.

2°) Radioactivité des ARN du suc cellulaire.

On pouvait se demander si la radioactivité élevée et précoce du suc cytoplasmique n'était pas due à une contamination de cette fraction par des ARN nucléaires. En effet, l'examen au microscope électronique des noyaux (MONTREUIL & Coll. (807)) avait montré quelques images de structures altérées.

Toutefois, l'hypothèse précédente concernant la migration physiologique des ARN d'origine nucléaire au sein du cytoplasme et la découverte de l'existence d'ARN messagers et d'ARN solubles au métabolisme accéléré nous permet de reconsidérer le problème. La radioactivité du suc cellulaire peut être due à la présence d'ARN messagers libres, ou associés aux ribosomes présents dans notre fraction S ou à celle des ARN de transfert. Certains Auteurs (voir par exemple HIATT (808) et SRINIVASAN (809)) ont montré récemment que les ARN S sont en effet les premiers marqués dans le cytoplasme.

3°) Radioactivité des ARN des granules cytoplasmiques.

L'apparition simultanée de la radioactivité dans les ARN des mitochondries et des microsomes et la similitude des activités spécifiques des nucléotides de ces deux fractions font penser à une certaine continuité entre petits et gros granules ou à la présence de microsomes dans notre fraction mitochondriale. Les techniques de fractionnement cellulaires sont évidemment sujettes à critiques mais il faut considérer que la taille de certains polysomes les font sédimenter vraisemblablement en même temps que les mitochondries.

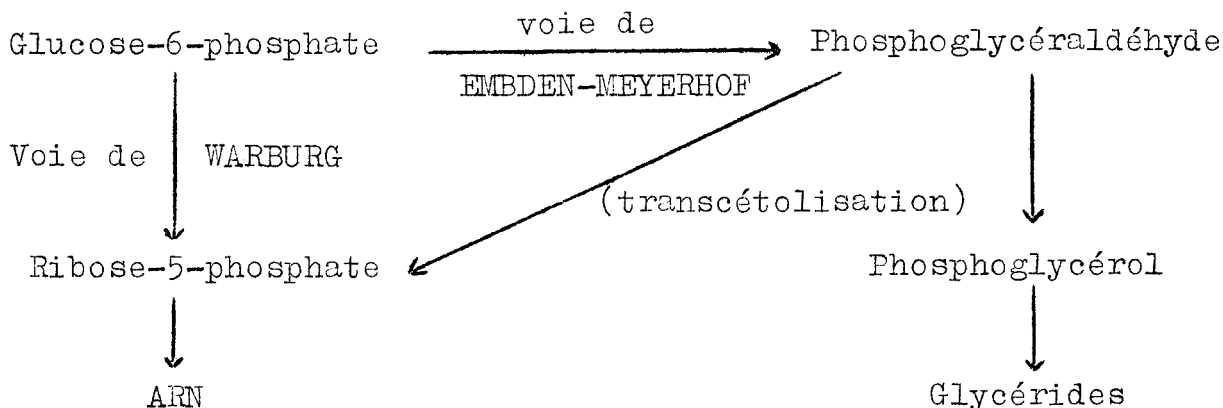
4°) Radioactivité comparée du "spot X".

Les courbes de radioactivité de la figure 34 font voir dans le "spot X" un précurseur possible des ARN, tout au moins en ce qui concerne le radical phosphoryle et l'ARN cytoplasmique, car, au temps "20 mn", les ribonucléotides de l'ARN nucléaire sont déjà aussi radioactifs que le "spot X".

Une cinétique d'incorporation du ^{32}P poursuivie jusqu'au dixième jour dans l'ARN total de la cellule (MONTREUIL & MASSE (810)) donne des courbes caractéristiques qui semblent ne laisser aucun doute sur le rôle d'intermédiaire de ce composé dans la synthèse des ARN. Cependant, si l'on considère que les ARN ont pour précurseurs les nucléosides triphosphates synthétisés à partir du ribose-5-phosphate provenant du glucose-6-phosphate, si l'on considère d'autre part que notre "spot X" est un produit de réduction du phosphoglycéraldéhyde provenant lui aussi du glucose-6-phosphate, on comprend aisément que le "spot X" puisse avoir le comportement d'un précurseur des ARN (voir Fig. 35).

On peut penser aussi avec WEILL (811) qu'il y a compétition entre phospholipides et ARN pour l'incorporation du ^{32}P .

FIGURE 35



5°) Radioactivité des différents nucléotides.

Les activités spécifiques des nucléotides des ARN nucléaires et des ARN cytoplasmiques sont différentes et ce résultat confirme les constatations de très nombreux Auteurs.

Or, nous avons vu que les ARN sont formés à partir des nucléosides 5'-triphosphates et que l'hydrolyse alcaline de ces macromolécules libère des nucléosides 2 et 3'-monophosphates donc le Phosphore attaché à un nucléotide particulier étudié provient en fait du nucléotide voisin.

Par conséquent, les différences observées dans les radioactivités spécifiques des nucléosides 2' et 3'-phosphates sont liées, non seulement aux différences des activités des nucléosides 5'-triphosphates précurseurs des ARN, mais aussi à la séquence nucléotidique. Si l'on admet que l'arrangement des nucléotides se fait statistiquement au hasard, les différences des activités spécifiques doivent disparaître. Puisque ces différences subsistent, elles sont donc en relation :

- soit avec une séquence préférentielle particulière des nucléotides dans la molécule d'ARN.
- soit avec l'existence de plusieurs fractions ARN de radioactivités différentes et de compositions différentes.

BUS
LILLE

Dans ce cas, en effet, même si les radioactivités spécifiques des nucléosides 3'-phosphates sont identiques dans chaque ARN, les facteurs de dilution de ces activités sont différents pour chaque nucléotide.

Prenons par exemple le cas du mélange d'un ARN fortement radioactif et d'un ARN non marqué, dans les proportions 1 et 80. Supposons en outre que le premier ait une composition de type A U (30 p. 100 de U, 30 p. 100 de A, 20 p. 100 de G, 20 p. 100 de C) et possède des radioactivités spécifiques identiques pour tous les nucléotides et égales à 10 coups par minute et par micromole. Supposons encore que le deuxième ait une composition de type GC (30 p. 100 de G, 30 p. 100 de C, 20 p. 100 de A, 20 p. 100 de U). Dans ces conditions, les radioactivités apparentes des nucléotides libérés par hydrolyse du mélange seront égales à :

$$\frac{10 \times 30}{(20 \times 80) + 30} = 0,18 \text{ coups/mn/micromole} \quad \text{pour A et U}$$

$$\frac{10 \times 20}{(30 \times 80) + 20} = 0,08 \text{ coups/mn/micromole} \quad \text{pour G et C}$$

La radioactivité plus élevée des acides adénylique et uridylique révèle la présence d'une faible proportion d'ARN de type A U et fortement radioactif.

Considérons à présent les résultats que nous avons obtenus :

- les activités spécifiques des acides uridylique et adénylique sont toujours supérieures à celles des acides guanylique et cytidylique, dans toutes les fractions cellulaires, au début du marquage des ARN correspondants. On peut voir dans ce fait l'indice, comme dans l'exemple choisi, de la présence d'un ARN de type A U qui se renouvelle activement.

CONCLUSION.

Nos résultats sont en accord avec les conceptions actuelles sur la synthèse des ARN au sein du noyau et à leur migration ultérieure dans le cytoplasme. Ils soulignent l'hétérogénéité des ARN et suggèrent l'existence d'ARN de type A U (ARN messagers ?) dans toutes les fractions cellulaires étudiées.

Les études métaboliques retracées dans ce chapitre et celles concernant la composition des ARN (Chapitre II) vont nous permettre de faire quelques considérations sur la synthèse des différents ARN et d'apporter quelques arguments en faveur de l'existence d'ARN messagers dans les hépatocytes de Rat. Ceci fera l'objet du 4ème Chapitre de ce travail que nous avons intitulé "DISCUSSION GENERALE".

C H A P I T R E I V

-:-:-:-:-

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE.

L'étude de la composition des ARN des tissus du Rat nous a conduite à mettre au point une méthode de détermination des rapports molaires des nucléotides. Nous l'avons par la suite appliquée aux différentes fractions cellulaires.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus nous ont montré que le suc cytoplasmique, les mitochondries et les microsomes possédaient des ARN dont la composition globale était voisine de celle des ARN cellulaires étudiés "in toto". Cette composition se rapprochait fort de la composition théorique de l'ARN formé sur l'ADN selon le schéma de ZUBAY (voir p. 158)

A = 20 p. 100 ; U = 20 p. 100 ; G = 30 p. 100 ; C = 30 p. 100

Par contre les noyaux possédaient une composition particulière caractérisée par une teneur relativement élevée en acide uridylique et basse en acide cytidylique, par rapport à la composition des ARN totaux (Voir Tableau XVIII).

Les résultats obtenus pouvaient faire penser à une désamination de l'acide cytidylique et à sa transformation consécutive en acide uridylique. Toutefois nos expériences concernant l'agressivité de la soude (voir p. 107) vis-à-vis de l'acide cytidylique libéré au cours de l'hydrolyse des ARN, n'avaient pas montré une action aussi violente de nos conditions opératoires.

La morphologie altérée des noyaux isolés, constatée au microscope électronique pouvait être en relation avec une modification de la composition des ARN nucléaires, soit par dégradation, soit par perte de certaines molécules. Cependant la composition des ARN des noyaux préparés selon la méthode de CHAUX (812) et qui sont morphologiquement intacts (MONTREUIL & Coll.)(813) s'est révélée identique à celle des noyaux préparés selon la technique décrite page 181 (voir Tableau XVIII). Ceci nous a amené à tirer parti de nos résultats et à y voir

TABLEAU XVIII
Composition centésimale nucléotidique des ARN nucléaires
du Foie de Rat.

Méthode de préparation des noyaux	Nucléotides			
	U	G	C	A
Centrifugation à 600 g d'un homo- génat tissulaire dans le Saccha- rose 0,25 M + Ca Cl ₂ 0,0018 M. Traitement du culot par acide citrique 1 p. 100.	25,2 ± 0,3	28,4 ± 0,5	25,1 ± 0,5	20,2 ± 0,4
Méthode de CHAUVEAU (812)	25 ± 0,2	29,4 ± 0,2	25 ± 0,3	20,5 ± 0,4



la démonstration de l'existence d'ARN nucléaires particuliers.

D'autre part, nos études sur l'incorporation de phosphate radioactif dans les nucléotides des ARN nucléaires et cytoplasmiques nous ont conduite à pressentir l'existence d'ARN de type AU au métabolisme accéléré, dans les différentes fractions cellulaires, mais surtout dans le noyau, marqué le premier et intensément.

La composition particulière des ARN nucléaires pouvait donc être due à la présence d'un pourcentage relativement élevé de cet ARN de type AU marqué précocement et cette hypothèse nous a amenée à calculer la composition des ARN néoformés. Si l'on suppose que les radioactivités spécifiques des nucléotides de ces ARN néoformés sont égales, les radioactivités totales relatives de ces nucléotides rendent compte de leur composition. Or les radioactivités relatives des nucléotides des ARN néoformés sont égales aux produits des activités spécifiques des nucléotides des ARN totaux par les rapports molaires de ces nucléotides.

Nous avons réuni dans le Tableau XIX les compositions (ainsi calculées) des ARN néoformés, présents dans les différentes fractions cellulaires, dès l'apparition de la radioactivité dans ces fractions.

On y observe que la composition des ARN néoformés dans les noyaux au temps "+5 mn" est presque identique à celle des ARN radioactifs que l'on trouve dans les microsomes et les mitochondries au temps "+15 mn".

La composition de l'ARN radioactif présent, au temps 10 mn, dans le suc cytoplasmique, est au contraire nettement différente et caractérisée par une teneur élevée en acide cytidylique.

TABLEAU XIX

Composition des ARN néoformés présents dans les différentes fractions cellulaires dès l'apparition de la radioactivité dans des fractions.

Fraction*	Temps de marquage	Nucléotides	Act. Spécifique des nucléotides	Comp. de l'ARN** total	Act. relative des nucléotides	Comp des ARN** néoformés
N	5 mn.	U	1.137	25	29.675	30,9
		G	850	29	24.650	25,6
		C	789	25	19.725	20,5
		A	1.043	21	21.903	23
S	10 mn.	U	1.753	20	3.506	26,6
		G	758	32	2.425	18,5
		C	1.428	28	3.998	30,3
		A	1.613	20	3.226	24,6
μ	15 mn.	U	1.400	20	280	32,1
		G	700	30	210	24,2
		C	600	30	180	20,7
		A	1.000	20	200	23
M	15 mn.	U	2.280	20	456	32,3
		G	1.200	30	360	25,5
		C	850	30	255	18
		A	1.700	20	340	24,1

(*) N, S, μ, M désignent respectivement les noyaux, suc cellulaire, microsomes et mitochondries.

(**) molécules de nucléotide pour 100 molécules de nucléotides totaux.

I - MISE EN EVIDENCE D'ARN MESSAGERS.

La notion d'ARN messagers "métaboliquement actifs" et dirigeant la synthèse protéique sur les ribosomes (voir p.55) amène tout naturellement à chercher ces "vecteurs de l'information génétique" dans les noyaux, qui se marquent précocement et intensément, et dans les granules cytoplasmiques où se fait la majeure partie des synthèses protéiques.

1°) On est alors tenté de considérer l'ARN néoformé présent dans les N au temps "5 mn" et dans les M et P au temps "15 mn" comme étant l'ARN messenger bien que sa composition diffère de celle de l'ADN. Cette divergence de composition peut être interprétée comme la preuve d'une non saturation par le ^{32}P de l'ARN néoformé ou de l'inégalité des activités spécifiques de ses nucléotides.

2°) Il devient alors intéressant de suivre la composition de l'ARN marqué dans le N au fur et à mesure que se prolonge le temps de marquage : on constate ainsi qu'au temps 20 mn cette composition rappelle celle de l'ADN (Voir Tableau XX).

TABLEAU XX

Composition des ARN néoformés présents dans les noyaux au temps 20 mn

· Nucléo- · tides ·	· Act. spécifique · des · Nucléotides ·	· Comp. de · l'ARN · total * ·	· Act. relative · des · Nucléotides ·	· Comp. des ARN · néoformés * ·
· U ·	· 80.000 ·	· 25 ·	· 20 ·	· 28,8 ·
· G ·	· 50.000 ·	· 29 ·	· 14,5 ·	· 20,8 ·
· C ·	· 60.000 ·	· 25 ·	· 15 ·	· 21,6 ·
· A ·	· 95.000 ·	· 21 ·	· 20 ·	· 28,8 ·

* Molécules de nucléotide pour 100 molécules de nucléotides totaux

On peut donc supposer que l'on ait saisi le moment où tous les gènes ont été transcrits et voir dans la différence de composition entre ADN et ARN néoformé dans les temps courts, l'existence d'une transcription progressive et ordonnée des différents gènes, donnant naissance à de nombreuses molécules d'ARN messagers.

L'hétérogénéité des ARN messagers, démontrée par chromatographie sur sérumalbumine méthylée, centrifugation en gradient de saccharose, hybridation avec l'ADN et déplacement progressif (voir p.33) est en faveur de cette hypothèse. De plus, les diagrammes obtenus sont différents suivant le moment choisi pour l'expérience. C'est le cas en particulier des bactéries infectées où la durée de l'infection a son importance (KANO SUEOKA & SPIEGELMAN)(814) : peu de temps après l'introduction du phage, il apparaît un ARN qui semble en relation avec la synthèse des enzymes. Plus tard, on voit apparaître un autre ARN qui correspond à la formation de la protéine de revêtement du phage (HALL & Coll.)(815). Ces "early RNA" et "late RNA" ont aussi été observés par MINAGAWA & Coll. (816).

D'autre part, HIATT & Coll. (817), ATTARDI & Coll. (818) ont montré par des expériences d'induction enzymatique chez les microorganismes, que la synthèse d'une nouvelle protéine implique celle d'un nouvel ARN messager qui contient l'information. Chaque ARN m. semble donc n'être formé qu'en réponse à un stimulus spécifique.

BRAWERMAN & CHARGAFF (819) et POGO & Coll. (820) ont montré chez *Euglena Gracilis* que l'apparition de l'appareil de photosynthèse s'accompagne d'une augmentation de la teneur en ARN et d'apparition de molécules différentes, de poids moléculaire élevé. Ces ARN sont peut être les ARN messagers porteurs de l'information à transmettre aux protéines de l'appareil de photosynthèse. Tous les ARN ne sont donc pas des caractères permanents de la cellule ; c'est ainsi que les algues vertes et les algues décolorées (croissant à l'obscurité), génétiquement identiques mais ayant des métabolismes différents, ont

des ARN totaux de compositions différentes : cette différence semble due chez les premières à la présence d'ARN particuliers en relation avec le développement des chloroplastes.

Chez les animaux supérieurs, les expériences de WEILL & Coll. (821), qui soumettent des rats au jeûne protéique, ont montré clairement la modification de la composition des ARN des microsomes, due vraisemblablement à la disparition de certains ARN en relation avec l'arrêt des synthèses protéiques (QUIRIN & Coll.)(822). La disparition de ces ARN change le potentiel messager des microsomes utilisés dans les systèmes d'incorporation d'acides aminés in vitro.

D'ailleurs l'accroissement de l'activité de l'ARN-polymérase (BUSCH)(823) et (MANDEL)(824), qui coïncide avec un apport protéique faisant suite à un jeûne azoté, fait entrevoir la possibilité de la synthèse d'ARN messagers chargés de diriger la néoformation des protéines. Notons qu'il existe également un parallélisme entre l'activité de l'ARN polymérase d'un organe ou d'une tumeur et la quantité et la diversité des protéines synthétisées par cet organe ou cette tumeur (PETE & Coll. (825)).

L'expérience de MICHELAZZI & Coll. (826) prouve aussi que la synthèse d'une protéine particulière suit celle d'un ARN particulier. En effet, ces Auteurs injectent l'ARN du sérum d'un animal immunisé à un autre et provoquent, chez celui-ci, la formation d'anticorps, spécifiques de l'antigène utilisé pour préparer le premier animal.

Il semble donc que tous les gènes ne soient pas transcrits simultanément et il n'est pas déraisonnable de penser que cet ARN néoformé de composition particulière que nous trouvons dans les noyaux et le cytoplasme, dès l'apparition d'une radioactivité mesurable, est bien un ARN messager. L'ARN néoformé, présent au temps 20 mn dans les noyaux, représenterait alors un ensemble de molécules, produits de transcription de tous les gènes et dont la composition globale serait alors celle de l'ADN total.

3°) Toutefois, si on associe théoriquement l'ARN marqué, présent dans les N au temps "5 mn" avec une chaîne complémentaire, l'ARN formé possède une composition qui rappelle celle de l'ADN (Tableau XXI). Il est alors permis de supposer que la similitude observée entre la composition de l'ARN marqué au temps 20 mn et celle de l'ADN est due :

- soit à l'existence de doubles chaînes ARN de ce type
- soit à la transcription de la 2ème chaîne ADN après celle de la première chaîne observée au temps 5 mn.

TABLEAU XXI

Nucléo- tides	Comp. ARN marqué N "5 mn"	ARN complé- mentaire théorique	ARN formé théorique	ADN
U	30,9	23	27	28,4
G	25,6	20,5	23	21,4
C	20,5	25,6	23	21,5
A	23	30,9	27	28,7

De nombreux travaux sont en faveur de la transcription d'une seule chaîne ADN in vivo :

- BAUTZ & HALL (827) qui étudient la composition de l'ARN néoformé chez E. Coli après infection par le phage T₄ trouvent que les quantités de A et U d'une part, et de G et C d'autre part, sont inégales. Si les deux chaînes ADN, qui sont complémentaires, avaient été transcrites, la composition de l'ARN spécifique du phage serait telle que A = U et G = C. Ces Auteurs en concluent que seule 1 chaîne ADN avait été copiée au moment de leur expérience. C'est à cette conclusion qu'aboutissent également GUILD & ROBISON (828), HAYASHI & Coll. (829), TOCCHINI-VALENTINI & Coll. (830), CHAMPE & Coll. (831), RICHTER & Coll. (832).

- MARMUR & GREENSPAN (833) isolent l'ARN néoformé chez E.Coli sous l'impulsion du bactériophage SP8 : l'ADN de celui-ci est formé de 2 chaînes complémentaires nettement différentes, possédant des densités différentes et pouvant être séparées par chromatographie sur sérumalbumine méthylée ou par centrifugation en gradient de chlorure de césium. Seule la chaîne lourde est capable de former in vitro un hybride avec l'ARN synthétisé par l'hôte infecté. Donc, la seule chaîne (la chaîne lourde) a été transcrite in vivo.

Ceci est démontré aussi par McCARTHY & BOLTON (834) chez E.Coli normal.

Cependant les résultats concernant la composition de l'ARN rapidement marqué, identique à celle de l'ADN, sont en faveur de la transcription des deux chaînes. Toutefois si la "replication" de l'ARN messenger est possible, la chaîne formée sur l'ADN peut induire la synthèse de la chaîne qui lui est complémentaire : la composition globale de ces deux chaînes ARN m. est alors identique à celle de l'ADN.

L'ARN rapidement marqué a été montré de même composition que l'ADN du phage chez les bactéries infectées (VOLKIN & ASTRACHAN (835), WATANABE & Coll. (836), NOMURA & Coll.(837)).

Ce "DNA like RNA" a été trouvé chez les microorganismes sains (GROS & Coll.)(838) et la Levure (YCAS & VINCENT) (839) et cette découverte a été en grande partie à l'origine de l'hypothèse de l'existence d'ARN messagers (JACOB & MONOD) (840)(voir p. 31). La présence d'ARN instable de même composition que l'ADN a depuis été confirmée par de multiples travaux. (voir par exemple SUIT (841) ; ANDOH (842) ; FUKUHARA (843) ; TAKAI (844). De très nombreux chercheurs ont essayé alors de mettre en évidence chez les animaux supérieurs et en particulier chez les mammifères cet ARN rapidement marqué de même composition que l'ADN. Presque simultanément en 1962 GEORGIEV & Coll (845) et BIBATANI & Coll. (846) l'ont isolé, les premiers de cellules de foie de rat et les deuxièmes des nucléoles de

cellules de thymus de veau. (Tableau XXII). Leur méthode d'extraction fractionnée, de même que celle de BRAWERMAN (847) publiée un peu plus tard, semblent difficiles à appliquer et on serait tenté d'accorder plus d'attention aux résultats d'autres Auteurs qui ont étudié la composition de l'ARN néoformé sans l'isoler. ALLFREY & MIRSKY (848) ont ainsi déterminé, à partir des activités relatives des nucléotides de l'ARN total des noyaux de thymus de veau, la composition d'un ARN marqué qui ressemble assez à celle de l'ADN (Tableau XXIII).

TABLEAU XXII

Composition de l'ARN marqué précocement, isolé par extraction fractionnée avant d'être étudié.

AUTEURS	MATERIEL	COMP. ARN m.			
		A	U	G	C
GEORGIEV & Coll.(845)	Foie de Rat	27,2	28,8	20,4	23,6
SIBATANI & Coll.(846)	nucléoles thymus de veau	29,3	28,4	22,5	19,8
BRAWERMAN & Coll.(847)	Foie de Rat	27,1	21,7	25,3	25,9
CHARGAFF (849)	ADN	28,7	28,4 (T)	21,4	21,5

Les améliorations apportées ces dernières années aux méthodes d'extraction totale des ARN et aux procédés de fractionnement des ARN totaux par chromatographie ou centrifugation en gradient de densité, ont permis de déterminer, non seulement le poids moléculaire des ARN rapidement marqués mais aussi de les isoler et d'en étudier la composition molaire.

Nous avons réuni dans le Tableau XXIII quelques résultats relevés dans la littérature concernant les ARN messagers totaux des cellules animales, ou décelés dans les noyaux ou la fraction ribosomale.

TABLEAU XXIII

AUTEURS	Réf.	MATÉRIEL	Temps de marquage	MÉTHODES	COMPOSITION ARN m. **			
					A	U	G	C
SCHERRER	850	N cell. Hela	30 mn.	Activités relatives des nucléotides de l'ARN m. isolé	19,8	20,1	29,3	29,8
BEZDEK	851	N foie de lapin	60 mn.		28,2	25,5	24,3	22
HAREL	852	Tumeur ascitique de souris	30 mn.		27,7	30,3	23,7	21,4
PENMAN	853	ribosomes cell. Hela	40 mn.		25,4	27,3	21	26,9
YOSHIKAWA	854	cell. FL	30 mn.		30	30,6	20,3	19,6
KOCH	855	cell. Hela			26,1	28	23,2	21,8
ELLEM	856	cell. L	3 h.		22,1	26,2	26,2	25,4
ISHIKAWA	857	ribosomes foie de Rat	40 mn.		21,5	22,5	29,2	26,8
MURAMATSU	858	N.foie de Rat	15 mn.		25,6	24,3	27,1	23,1
WELLING	859	N.foie de Rat	30 mn.		24,5	24,1	27,3	24,1
ALLFREY-MIRSKY	848	N.thymus veau	30 mn.	Détermination sur ARN total:	25,9	28,1	23,4	22,6
SAMARINA	860	N.foie de Rat *	6 h.	ARN m. non isolé	26,8	27,4	23,3	22,5
CHARGAFF	849	ADN			28,7	(T) 28,4	21,4	21,5

(*) animaux traités par l'actinomycine

(**) nombre de molécules de chaque nucléotide pour 100 molécules de nucléotides totaux.

Parmi ces résultats, on peut souligner ceux de KOCH, YOSHIKAWA, HAREL, ALLFREY & MIRSKY, SAMARINA : la composition de l'ARN instable donnée par ces Auteurs ressemble fort à celle de l'ADN.

"L'ARN marqué" de BEZDEK est du type AU, ainsi que celui de PENMAN, mais le premier est trop riche en acide guanylique et le 2ème trop riche en acide cytidylique pour ressembler à l'ADN.

Au contraire l'ARN signalé par SCHERRER est nettement du type GC., de même que celui de HIATT (861) dont la composition a été déterminée par la mesure de la densité optique des différents nucléotides (Tableau XXIV).

TABLEAU XXIV

AUTEURS	A	U	G	C
HIATT (UV sur ARN m.isolé)	14,3	24,4	34,7	26,6
SRINIVASAN (comp.ARN labile)	23,7	26,7	22,2	27,3

Il n'a pas été possible non plus à SRINIVASAN (862) et à MANDEL (863) de mettre en évidence des ARN instables de même composition que l'ADN, et de nombreux travaux dirigés dans ce sens ont sans doute été négatifs (BRUNS & Coll.)(864). La mise en évidence au cours de nos travaux de ce "DNA like RNA" est peut être fortuite, elle mérite cependant d'être signalée. Elle est probablement due à notre mode opératoire où toute dégradation des ARN m. est impossible. Ceux-ci sont en effet extrêmement sensibles à l'action des nucléases et les méthodes d'isolement de ces molécules ne sont pas sans danger.

4°) Au delà de 20 mn, la composition des ARN marqués dans le noyau est différente de celle des ADN. Au temps 2 heures par exemple, les taux d'acides uridylique et adénylique sont diminués tandis que ceux des acides cytidylique et guanylique sont augmentés. Tout se passe comme s'il y avait superposition d'ARN de type AU (ARN messenger ou "DNA like RNA") et d'ARN de type GC (ARN ribosomal ou soluble). (voir Tableau XXV).

TABLEAU XXV

Composition des ARN néoformés dans les noyaux au temps
" 2 heures ".

Nucléo- tides	Act.spécifique des nucléotides	Composition de l'ARN total	Act.relative des nucléotides	Composition des ARN néoformés
U	520.000	25	130	25
G	480.000	29	139	26,7
C	500.000	25	125	24
A	400.000	21	126	24,3

* molécules de nucléotide pour 100 molécules de nucléotides totaux.

Il a été noté par certains Auteurs chez les bactéries et la Levure que l'ARN nouvellement synthétisé possède parfois, non pas une composition identique à celle de l'ADN, mais intermédiaire entre celle de l'ADN et celle de l'ARN ribosomal. Cette composition est compatible avec la présence d'un mélange d'ARN formé de 60 p. 100 environ d'ARN de type ribosomal et de 40 p. 100 d'ARN de type ADN. (MIDGLEY & Coll. (865), KITAZUME & YCAS (866), HAYWOOD & Coll. (867), BOLTON & McCARTHY (868), MITSUI & Coll. (869)). Ces constatations ont trouvé leur explication dans l'observation faite par FUKUHARA & Coll. (870) chez la Levure, du changement graduel de la composition de l'ARN néoformé. Après une légère exposition de

la Levure au ^{32}P , la composition de cet ARN, déterminée à partir des activités relatives des nucléotides, est voisine de celle de l'ADN. Au fur et à mesure que l'exposition au ^{32}P est prolongée, la composition de l'ARN radioactif change et se rapproche de celle de l'ARN global. Or la méthode de fractionnement des ARN par centrifugation en gradient de saccharose, utilisée dans une expérience de "chasse" de l'isotope par dilution avec des précurseurs non marqués des ARN, permet d'assister à l'apparition progressive d'ARN ribosomaux et solubles radioactifs. Ce sont donc ces ARN formés plus tardivement qui modifient la composition de l'ARN marqué étudié "in toto".

Chez les mammifères, les travaux de GEORGIEV & Coll. (871) et YOSHIKAWA & Coll. (872) ont montré que l'ARN rapidement marqué pouvait être aussi un mélange d'ARN de type ribosomal et d'ARN de type messenger. Mais ces ARN de type ribosomal sont des ARN de haut poids moléculaire distincts des ARN ribosomaux 28 S et 18 S[‡]. Notre mode opératoire ne nous a pas permis de vérifier la nature des ARN marqués : nous pouvons simplement dire que la synthèse d'ARN de type GC semble suivre celle d'ARN de type AU.

II - SYNTHÈSE DES ARN RIBOSOMAux.

1°) Origine des ARN ribosomaux.

Certains Auteurs (KITAZUME & Coll. (874), MARKS & Coll. (875), SCHERRER & Coll. (876), FENWICK (877), ANDOH & Coll. (878), PERRY (879), TAMAOKI (880), HIATT (881)), ont cru pouvoir conclure que l'ARN messenger était le précurseur des ARN ribosomaux, parce que, dans des expériences de "chasse" de

[‡] Ces ARN de haut poids moléculaire sont peut être des complexes ARN m. - ARN R. qui en se dissociant donnent les ARN ribosomaux normaux. (voir MUNRO & KORNER (873)).

l'isotope utilisé comme traceur, celui-ci apparaît dans les ARN ribosomaux au fur et à mesure qu'il disparaît de l'ARN marqué précocement.

Par contre REVEL & Coll. (882) ont montré que la synthèse de l'ARN ribosomal est en grande partie indépendante de celle de l'ARN rapidement marqué : si on pratique à des rats, 30 mn après l'administration de radiophosphore, une injection de phosphate de sodium non marqué, pour diluer le pool des précurseurs, l'ARN ribosomal est peu radioactif, alors qu'il l'est fortement chez les animaux témoins, n'ayant pas reçu de phosphate non marqué 2 heures avant le sacrifice. Selon ces Auteurs, si l'ARN ribosomal tirait son origine de l'ARN messenger, il devrait être radioactif puisque formé à partir d'une molécule déjà marquée au moment de la dilution du pool des précurseurs.

Au lieu d'imaginer une conversion de l'ARN messenger en ARN ribosomal, on peut supposer pour celui-ci une synthèse à partir des nucléosides triphosphates du milieu, dirigée par l'ARN messenger, donc synthèse postérieure à celle de ce dernier, ce qui est en accord avec les cinétiques d'incorporation du ^{32}P . Le même mécanisme pourrait d'ailleurs être envisagé pour la formation des ARN S.

D'autre part, maintenant que l'on sait que l'ARN "marqué" précocement peut être un mélange d'ARN de type AU et d'ARN de type GC, on peut reconsidérer le problème. Il est vraisemblable que c'est l'ARN de type GC, le véritable précurseur des ARN ribosomaux^x, tandis que l'ARN messenger proprement dit est dégradé au cours de la biosynthèse protéique et ses produits de dégradation retournent au pool des nucléotides précurseurs.

^x SI notre hypothèse d'une synthèse de l'ARN R. dirigée par l'ARN m. est exacte, ces ARN de haut poids moléculaire pourraient être des complexes intermédiaires formés entre RNA m. et ARN R. et ceci expliquerait leurs conversions en ARN ribosomaux (GEORGIEV & LERMAN (883)).

Il ne semble pas partir de nos études cinétiques que ces deux types d'ARN soient synthétisés simultanément - s'ils le sont, ce ne peut être que dans des sites différents : l'ADN chromosomal donnant des ARN de type AU par ex. (ARN messenger) ; l'ADN nucléolaire donnant des ARN de type GC (ARN ribosomal). A ce propos, il nous faut signaler que RO TAE SUK & Coll. (884) viennent de réaliser in vitro la synthèse d'ARN de type GC sur un ADN nucléolaire et que MURAMATSU & Coll. (885) ont montré in vivo une synthèse des ARN nucléolaires indépendante du reste du noyau.

- s'ils le sont successivement sur le même modèle, ce ne peut être que sous l'action de deux ARN polymérases différentes, puisque les produits de la réaction sont différents. Or, il vient d'être mis en évidence, par WIDNELL & TATA (886) deux ARN polymérases dans les noyaux de foie de Rat. Ceci n'est qu'une note préliminaire et les produits de la réaction ne sont pas encore étudiés. On peut néanmoins penser dès à présent que :

- l'ARN messenger est synthétisé sur l'ADN chromosomal qui porte la marque génétique.

- l'ARN ribosomal est synthétisé sur l'ADN nucléolaire sous l'action d'un enzyme différent. (les ARN ribosomaux étant identiques dans des espèces différentes, il serait intéressant de vérifier si l'ADN nucléolaire ne l'est pas aussi).

Le fait que l'actinomycine inhibe préférentiellement la synthèse des ARN ribosomaux et laisse subsister celle de l'ARN messenger (GEORGIEV & Coll.)(887) renforce l'hypothèse selon laquelle il existe deux mécanismes différents (ou tout au moins des cistrons géniques différents).

2°) Migration dans le cytoplasme des ARN ribosomaux nucléaires.

L'origine nucléaire des ARN ribosomaux cytoplasmiques a été montrée par les expériences de SINGH & Coll. (888), GEORGIEV & Coll. (889) et FLAMM & Coll. (890) respectivement dans les cellules He La, les cellules hépatiques et les

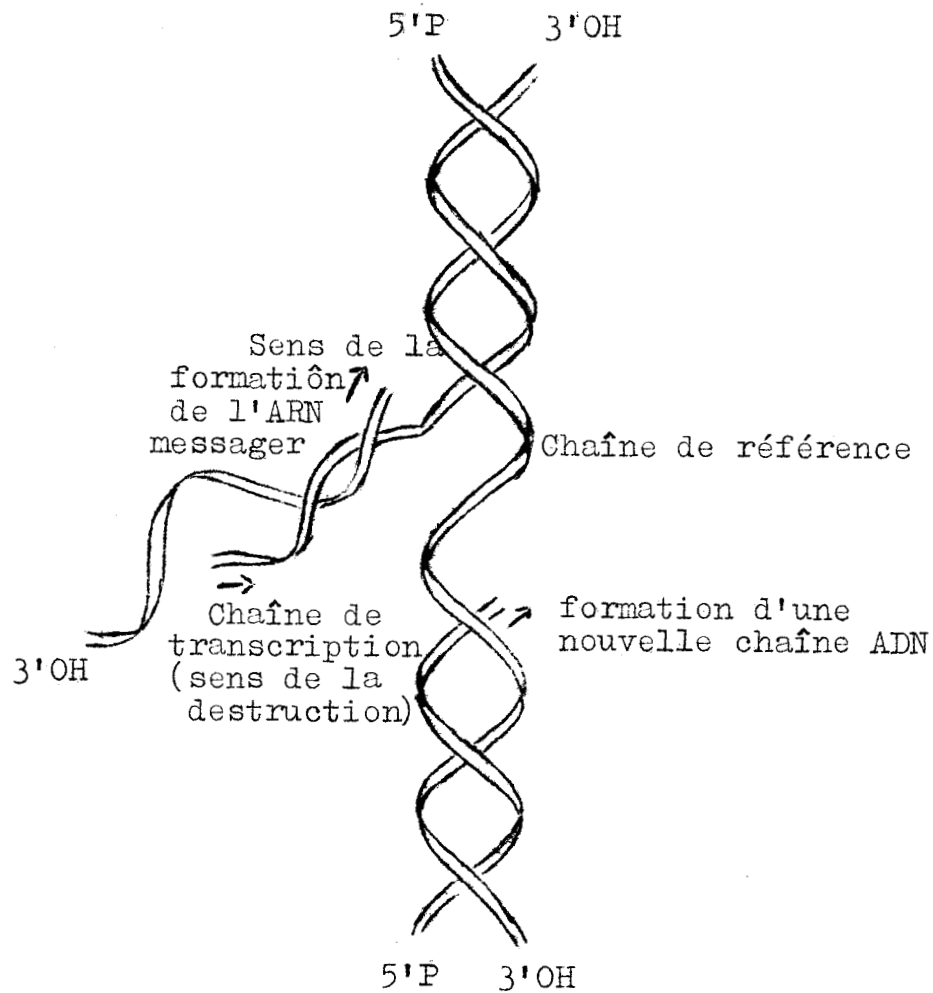


FIGURE 36

Schéma de synthèse de l'ARN sur l'ADN selon
JONES (901)

la Levure au ^{32}P , la composition de cet ARN, déterminée à partir des activités relatives des nucléotides, est voisine de celle de l'ADN. Au fur et à mesure que l'exposition au ^{32}P est prolongée, la composition de l'ARN radioactif change et se rapproche de celle de l'ARN global. Or la méthode de fractionnement des ARN par centrifugation en gradient de saccharose, utilisée dans une expérience de "chasse" de l'isotope par dilution avec des précurseurs non marqués des ARN, permet d'assister à l'apparition progressive d'ARN ribosomaux et solubles radioactifs. Ce sont donc ces ARN formés plus tardivement qui modifient la composition de l'ARN marqué étudié "in toto".

Chez les mammifères, les travaux de GEORGIEV & Coll. (871) et YOSHIKAWA & Coll. (872) ont montré que l'ARN rapidement marqué pouvait être aussi un mélange d'ARN de type ribosomal et d'ARN de type messenger. Mais ces ARN de type ribosomal sont des ARN de haut poids moléculaire distincts des ARN ribosomaux 28 S et 18 S[‡]. Notre mode opératoire ne nous a pas permis de vérifier la nature des ARN marqués : nous pouvons simplement dire que la synthèse d'ARN de type GC semble suivre celle d'ARN de type AU.

II - SYNTHÈSE DES ARN RIBOSOMAux.

1°) Origine des ARN ribosomaux.

Certains Auteurs (KITAZUME & Coll. (874), MARKS & Coll. (875), SCHERRER & Coll. (876), FENWICK (877), ANDOH & Coll. (878), PERRY (879), TAMAOKI (880), HIATT (881)), ont cru pouvoir conclure que l'ARN messenger était le précurseur des ARN ribosomaux, parce que, dans des expériences de "chasse" de

[‡] Ces ARN de haut poids moléculaire sont peut être des complexes ARN m. -ARN R. qui en se dissociant donnent les ARN ribosomaux normaux. (voir MUNRO & KORNER (873)).

l'isotope utilisé comme traceur, celui-ci apparaît dans les ARN ribosomaux au fur et à mesure qu'il disparaît de l'ARN marqué précocement.

Par contre REVEL & Coll. (882) ont montré que la synthèse de l'ARN ribosomal est en grande partie indépendante de celle de l'ARN rapidement marqué : si on pratique à des rats, 30 mn après l'administration de radiophosphore, une injection de phosphate de sodium non marqué, pour diluer le pool des précurseurs, l'ARN ribosomal est peu radioactif, alors qu'il l'est fortement chez les animaux témoins, n'ayant pas reçu de phosphate non marqué 2 heures avant le sacrifice. Selon ces Auteurs, si l'ARN ribosomal tirait son origine de l'ARN messenger, il devrait être radioactif puisque formé à partir d'une molécule déjà marquée au moment de la dilution du pool des précurseurs.

Au lieu d'imaginer une conversion de l'ARN messenger en ARN ribosomal, on peut supposer pour celui-ci une synthèse à partir des nucléosides triphosphates du milieu, dirigée par l'ARN messenger, donc synthèse postérieure à celle de ce dernier, ce qui est en accord avec les cinétiques d'incorporation du ^{32}P . Le même mécanisme pourrait d'ailleurs être envisagé pour la formation des ARN S.

D'autre part, maintenant que l'on sait que l'ARN "marqué" précocement peut être un mélange d'ARN de type AU et d'ARN de type GC, on peut reconsidérer le problème. Il est vraisemblable que c'est l'ARN de type GC, le véritable précurseur des ARN ribosomaux^x, tandis que l'ARN messenger proprement dit est dégradé au cours de la biosynthèse protéique et ses produits de dégradation retournent au pool des nucléotides précurseurs.

^x SI notre hypothèse d'une synthèse de l'ARN R. dirigée par l'ARN m. est exacte, ces ARN de haut poids moléculaire pourraient être des complexes intermédiaires formés entre RNA m. et ARN R. et ceci expliquerait leurs conversions en ARN ribosomaux (GEORGIEV & LERMAN (883)).

Il ne semble pas partir de nos études cinétiques que ces deux types d'ARN soient synthétisés simultanément - s'ils le sont, ce ne peut être que dans des sites différents : l'ADN chromosomal donnant des ARN de type AU par ex. (ARN messenger) ; l'ADN nucléolaire donnant des ARN de type GC (ARN ribosomal). A ce propos, il nous faut signaler que RO TAE SUK & Coll. (884) viennent de réaliser in vitro la synthèse d'ARN de type GC sur un ADN nucléolaire et que MURAMATSU & Coll. (885) ont montré in vivo une synthèse des ARN nucléolaires indépendante du reste du noyau.

- s'ils le sont successivement sur le même modèle, ce ne peut être que sous l'action de deux ARN polymérases différentes, puisque les produits de la réaction sont différents. Or, il vient d'être mis en évidence, par WIDNELL & TATA (886) deux ARN polymérases dans les noyaux de foie de Rat. Ceci n'est qu'une note préliminaire et les produits de la réaction ne sont pas encore étudiés. On peut néanmoins penser dès à présent que :

- l'ARN messenger est synthétisé sur l'ADN chromosomal qui porte la marque génétique.

- l'ARN ribosomal est synthétisé sur l'ADN nucléolaire sous l'action d'un enzyme différent. (les ARN ribosomaux étant identiques dans des espèces différentes, il serait intéressant de vérifier si l'ADN nucléolaire ne l'est pas aussi).

Le fait que l'actinomycine inhibe préférentiellement la synthèse des ARN ribosomaux et laisse subsister celle de l'ARN messenger (GEORGIEV & Coll.)(887) renforce l'hypothèse selon laquelle il existe deux mécanismes différents (ou tout au moins des cistrons géniques différents).

2°) Migration dans le cytoplasme des ARN ribosomaux nucléaires.

L'origine nucléaire des ARN ribosomaux cytoplasmiques a été montrée par les expériences de SINGH & Coll. (888), GEORGIEV & Coll. (889) et FLAMM & Coll. (890) respectivement dans les cellules He La, les cellules hépatiques et les

cellules végétales. Elle a été démontrée aussi par microirradiation des nucléoles (PERRY)(891) et confirmée par autoradiographie de cellules marquées en présence d'actinomycine (PERRY) (892). Cette origine nucléaire est en faveur de l'hypothèse d'un mécanisme de synthèse des ARN ribosomiaux dirigé par l'ADN.

III - SYNTHÈSE DES ARN SOLUBLES.

La radioactivité relativement précoce du suc Cellulaire comparativement à celle des granules cytoplasmiques, pouvait faire penser à la présence d'ARN messenger libre, celui-ci devant se fixer ensuite sur les ribosomes et les polysomes. Malheureusement, la composition de l'ARN marqué est différente de celle qui a été calculée dans les noyaux et les microsomes. Cependant on peut attribuer l'activité élevée de l'acide cytidylique, au "turn-over" terminal des ARN S. mis en évidence par ROSSET (893), MONIER (894), SCHOLTISSEK (895), HOLT & Coll. (896), BURNY & Coll. (897), CANNON (898), MERITZ (899), FRANKLIN (900).

Ce "turn-over" terminal vient fausser la détermination de la composition de l'ARN néoformé qui paraît alors différente de celle de l'ARN marqué nucléaire. Notons toutefois que l'ARN radioactif du suc cellulaire est, comme ceux trouvés dans les noyaux et les granules cytoplasmiques, plus riche en A et U que l'ARN total cellulaire. Ceci permet de conclure qu'il existe dans cette fraction, des ARN de type messenger au renouvellement rapide, en plus des ARN solubles possédant un "turn-over" terminal. Ces ARN messagers sont, ou libres, ou fixés sur les ribosomes vraisemblablement présents dans le suc cellulaire qui n'a été isolé qu'après centrifugation à 40 000 g.

IV - MECANISME DE LA SYNTHÈSE DES ARN.

Les expériences en faveur de la théorie de la transcription d'une seule chaîne ADN in vivo impliquent l'existence d'une chaîne "passive" : ceci a amené JONES (901) à tracer un schéma rendant compte de la synthèse des ARN m. sur une chaîne ADN et celle de l'ADN sur l'autre chaîne dite "chaîne de replication" (voir Fig. 36).

Cette hypothèse repose sur la séparation des 2 chaînes ADN or certains travaux font penser plutôt à l'existence d'un intermédiaire à 3 chaînes dans le mécanisme de biosynthèse des ARN : mécanisme analogue à celui postulé par ZUBAY (voir p.159), le schéma B pouvant rendre compte de la formation des ARN messagers, le schéma A de celle des ARN ribosomiaux et solubles. C'est ainsi que :

- REITER & LITTLEFIELD (902) observent que la synthèse de l'ARN nucléaire diminue pendant la période de synthèse de l'ADN, c'est-à-dire quand les deux chaînes sont séparées pour la "replication". Ceci a été constaté aussi par SISKEN (903), TAYLOR (904), PRESCOTT (905) par autoradiographie.
- SEKIGUCHI & Coll. (906) montrent que, lorsque des phages irradiés, c'est-à-dire dans lesquels les deux chaînes ADN ne peuvent plus se séparer, sont introduits dans une culture de bactéries, il y a synthèse continue des enzymes du phage donc synthèse continue des ARN messagers correspondants.

D'autre part nos résultats permettent de penser que les ARN m. peuvent se "repliquer" ; on peut imaginer un mécanisme analogue à celui observé chez les virus à une seule chaîne ARN : synthèse sur la chaîne complémentaire préalablement formée (voir par exemple FENWICK & Coll. (907), BALTIMORE & Coll. (908), MONTAGNIER & Coll. (909), NONOYAMA & Coll. (910) WATANABE (911).

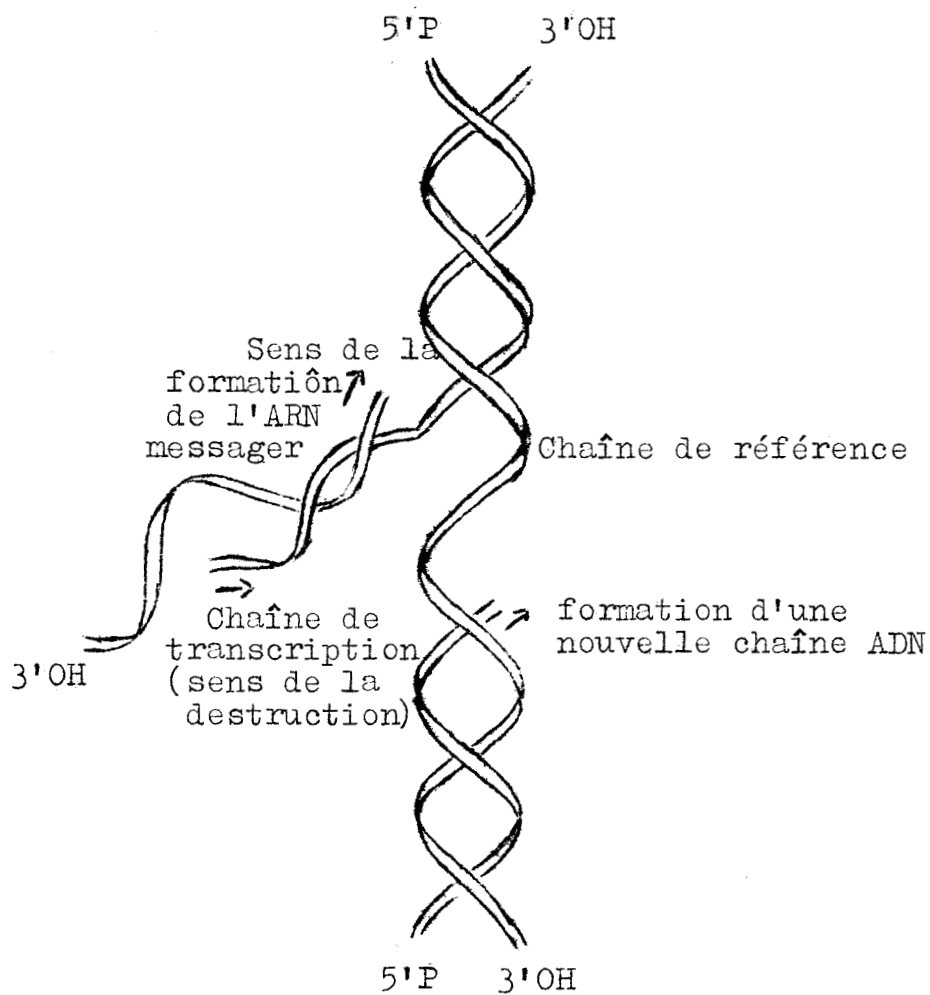


FIGURE 36

Schéma de synthèse de l'ARN sur l'ADN selon
JONES (901)

Ceci pourrait expliquer que l'actinomycine qui inhibe la synthèse de tous les ARN en se combinant avec l'ADN, laisse subsister celle des ARN messagers.

Ceci pourrait expliquer également, la persistance, pendant un certain temps, de la synthèse protéique dans les cellules anucléées.

CONCLUSION GENERALE

Nous pouvons conclure à la suite de cette étude que :

- l'activité élevée et précoce des ARN du noyau est due à celle d'ARN de type messenger dont la composition rappelle celle de l'ADN.
- cet ARN messenger se retrouve quelques instants plus tard sur les microsomes.
- les ARN solubles possèdent un renouvellement intense de leur dernier nucléotide, en relation ou non avec la synthèse protéique.
- la synthèse d'ARN de types ribosomal et soluble suit celle des ARN messagers dans le noyau.

Nos résultats semblent apporter une confirmation au schéma de la Fig. 37 fondé en partie sur les travaux de nombreux autres Auteurs.

Mais la connaissance parfaite du mécanisme de synthèse des ARN et des relations entre les différents ARN du noyau et du cytoplasme nécessite d'autres recherches. Il serait intéressant d'observer l'apparition de la radioactivité dans les ARN messagers, les ARN ribosomiaux et les ARN solubles, dans chacune des fractions cellulaires et de vérifier les hypothèses émises, en particulier, celles concernant :

- l'égalité des activités spécifiques des nucléotides des ARN messagers.
- la "réplication" de ces molécules.
- la synthèse des ARN ribosomiaux et solubles postérieure à celle des ARN messagers.

Les cinétiques d'incorporation du radiophosphore dans chaque classe d'ARN de chaque fraction cellulaire ne peuvent être réalisées que sur des préparations d'ARN purs non dégradés :

le problème qui se pose alors pour une telle étude est de mettre tout d'abord au point une méthode de préparation et de fractionnement des ARN qui fournisse des molécules intactes, débarrassées de tout contaminant.

L'importance des ARN messagers dans les phénomènes de synthèse protéique, donc dans la vie de la cellule, sa croissance et sa multiplication, normale ou anarchique, en font un sujet de recherches passionnant. Il devient indispensable d'étudier non seulement la synthèse de ces molécules et la régulation de cette synthèse mais aussi leur composition et leur séquence nucléotidique.

D'autre part le "décodage" de ces ARN messagers par les ARN de transfert attire l'attention sur la nécessité de l'intégrité des ARN S. pour l'équilibre métabolique de la cellule.

Les recherches en Cancérologie doivent donc s'orienter maintenant vers l'étude de ces deux classes d'ARN.

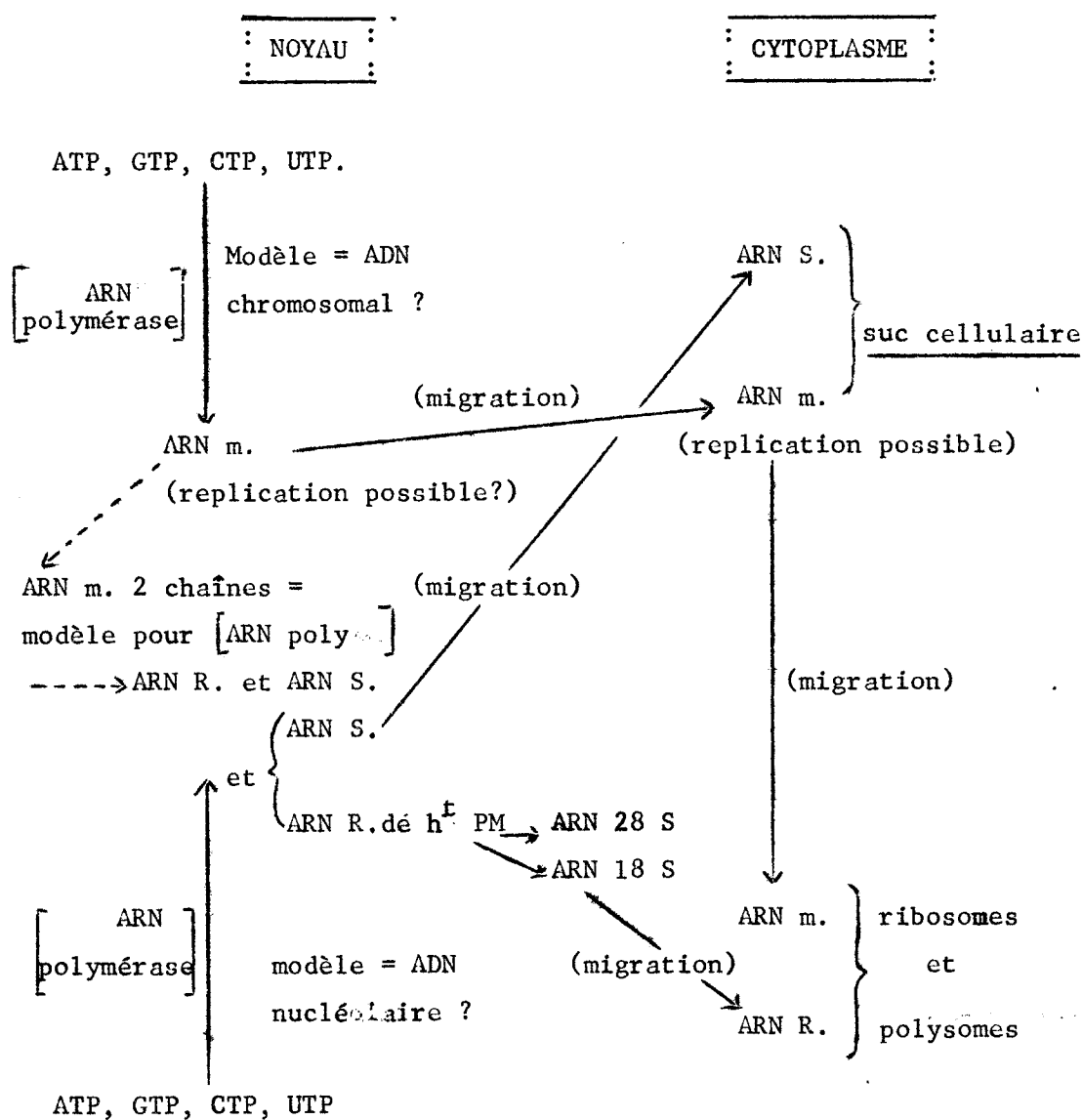


FIGURE 37

Schéma de synthèse des différents ARN cellulaires.

NOTA : Les flèches pointillées et les points d'interrogation rendent compte des hypothèses personnelles.

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

-:-:-:-

- ABRAMS R., GOLDINGER J.M., BARRON E.S.G., Biochim. Biophys. Acta., 1950, 5, 74, (683).
- ABRAMS R., Arch. Biochem., 1951, 30, 44, (305).
- ABRAMS R., EDMONDS M., BISWAS B.B., Symp. sur les ARN et polyphosphates Colloq. intern. CNRS STRASBOURG 1962, 106, 323, (588).
- ACS G., REICH E., VALANJU S., Biochim. Biophys. Acta. 1963, 76, 68, (632).
- ALLEN R.J.L., Biochem. J., 1940, 34, 858, (394, 440, 497, 522, 538).
- ALLEN F.W., Ribonucléoprotéins and Ribonucléic Acids Préparation and composition Elsevier Publishing Company N.Y., 1962, (48, 170).
- ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., OSAWA S., J. Gen. Physiol., 1957, 40, 451, (751).
- ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1957, 43, 821, (751).
- ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1962, 48, 590, (372, 848).
- ALTMANN R., Arch. Anat. Physiol., 1889, 524, (2).
- AMANO M., LEBLOND C.P., Exp. Cell. Res., 1960, 20, 250, (755).
- ANDERSEN W., DEKKER C.A., TODD A.R., J. Chem. Soc. 1952, 2721, (323).
- ANDERSON E.P., AQUIST S.E.G., J. Biol. Chem., 1953, 202, 513, (671, 688 et 718).
- ANDERSON E.F., YEN C.Y., MANDEL G.H., SMITH P.H., J. Biol. Chem., 1955, 213, 625, (676, 744).
- ANDERSON N.G., SISTER FRANCIS CLARE LADD., Biochim. Biophys. Acta., 1962, 55, 275, (363).
- ANDOH T., MIZUNO D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1961, 6, 104, (842).
- ANDOH T., NATORI S., MIZUNO D., Biochim. Biophys. Acta., 1963, 76, 477, (377, 878).
- APGAR J., HOLLEY W., MERRIL H., Biochim. Biophys. Acta., 1961, 53, 220, (127).

- APGAR J., J.Biol.Chem., 1962, 237, 797, (127).
- ASTRACHAN L., VOLKIN E., Biochim.Biophys.Acta., 1958, 29, 536, (100, 835).
- ASTRACHAN L., VOLKIN E., Biochim.Biophys.Acta., 1959, 32, 449, (835).
- ASTRACHAN L., FISCHER T.N., Feder.Proc., 1961, 20, 359, (835).
- ATTARDI G., NAONO S., GROS F., BUTTIN G., JACOB F., C.R. Acad.Sci., 1963, 256, 805, (818).
- BACHER J.E., KAUZMANN W.J., J.Am.Chem.Soc., 1952, 74, 3779, (453).
- BADER-HIRSCH A.M., SEWSENBRENNER M., MANDEL P., Bull.Soc. Chim.Biol., 1964, 46, 495, (420).
- BADOLATO F., GALABRESE A., Ricerca Sci., 1955, 25, 2558, (284).
- BALTIMORE D., BECKER Y., DARNELL J.E., Science, 1964, 143, 1034, (908).
- BANDURSKI R.S., AXELROD B., J.Biol.Chem., 1951, 193, 405, (493).
- BARNUM C.P., HUSEBY R.A., Fed.Proc., 1949, 8, 182, (703).
- BARNUM C.P., HUSEBY R.A., Arch.Biochem., 1950, 29, 7, (669, 710, 712, 758).
- BARNUM C.P., HUSEBY R.A., VERMUND H., Cancer Research, 1953, 13, 880, (692, 710, 783).
- BAUTZ E.K.F., HALL B.D., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S., 1962, 48, 400, (827).
- BEALE R.N., HARRIS R.J.C., ROE E.M.F., J.Chem.Soc., 1950, 1397, (328).
- BEAVER G.H., HOLIDAY E.R., JOHNSON E.A., in The Nucleic Acids, CHARGAFF E. DAVIDSON IN Ed., Acad. Press., 1955, 1, 493, (427, 498).
- BELJANSKI M., Biochim.Biophys.Acta., 1954, 15, 425, (28).
- BELLER D., DOISY E.A., J.Biol.Chem., 1920, 44, 55, (433).
- BELOZERSKY A.N., SPIRIN A.S., Nature, 1958, 182, 111, (619)
- BELOZERSKY A.N., SPIRIN A.S., in The Nucleic Acids, CHARGAFF E. DAVIDSON J.N. ed., Acad.Press. N.Y., 1960, 3, 147, (620).
- BENNETT E.L., Biochim.Biophys.Acta., 1953, 11, 487, (719, 770).
- BERENBLUM J., CHAIN E., Biochem. J., 1938, 32, 286, (436).
- BERG P., LAGERKVIST U., DIECKMANN M., J.Mol.Biol., 1962, 5, 159, (93).

- BERGQUIST P.L., MATTHEWS R.E.F., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 34, 567, (52).
- BERGSTRAND A., ELIASSON N.A., HAMMARSTEN E., NORBERG B., REICHARD P., VON UBISCH H., Gold.Spring Harbor Symp. on quant. biol., 1948, 13, 22, (660).
- BEZDEK M., SKALKA M., Experientia, 1963, 19, 12, (851).
- BHARGAVA P.M., SIMKIN J.L., WORK T.S., Biochem. J., 1958, 68, 265, (651, 772).
- BISHOP J., FAVELUKES G., SCHWEET R., RUSSELL E., Nature, 1961, 191, 1365, (643).
- BOLIUM F.J., VAN POTTER R., J.Am.Chem.Soc., 1957, 79, 3003, (691).
- BOLTON E.T., MCCARTHY B.J., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S., 1962, 48, 1390, (144, 868).
- BORKOWSKA I., WINTZERITH M., MANDEL P., C.R. Acad.Sci., 1964, 258, 6561, (614).
- BOSCH H., BLOEMENDAL C., SLUYSER M., Biochim.Biophys. Acta, 1960, 41, 444, (109).
- BOULANGER P., MONTREUIL J., Bull.Soc.Chim.Biol., 1951, 33, 784, (393, 487, 490, 523, 535, 791, 793).
- BOULANGER P., MONTREUIL J., Bull.Soc.Chim.Biol., 1951, 33, 791, (340, 485, 486, 789).
- BOULANGER P., MONTREUIL J., Biochim.Biophys.Acta., 1952, 9, 619, (483, 501, 647, 788).
- BOULANGER P., MONTREUIL J., C.R. Acad.des Sciences, 1953, 236, 2275, (647).
- BOULANGER P., MONTREUIL J., Traité de Biochimie Générale, Tome I, Fasc 2, p.1015, MASSON éd. 1959, (68).
- BOULANGER P., MONTREUIL J., In "Chromatographie" LEDERER 1959, p.485, (295, 322, 429).
- BOULANGER P., MONTREUIL J., MASSE L., C.R. Acad.Sci., 1951, 232, 1256, C.R. Acad.Sci., 1951, 234, 565, (457, 482, 647).
- BOULANGER P., MONTREUIL J., MASSE L., Résultats non publiés (787).
- BRACHET J., Arch.Biol. LIEGE : 1933, 44, 519 ; 1937, 48, 529 ; 1940, 51, 151 ; 1942, 53, 207 ; C.R.Soc.Biol. : 1940, 133, 88, Enzymologia : 1941, 10, 87, (7).
- BRACHET J., FICQ A., Arch.Biol., 1956, 67, 431, (22).
- BRACHET J., SZAFARZ D., Biochim.Biophys.Acta, 1953, 12, 588, (799).
- BRACHET J., CHANTRENNE H., VANDERHAEGHE F., Biochim. Biophys.Acta, 1955, 18, 544, (799).

- BRACHET J., in The Nucleic Acids CHARGAFF E. DAVIDSON J.N.
éd., Acad. Press. N.Y., 1955, 2, 475, (18).
- BRACHET J., Nature, 1954, 174, 879, (34).
Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 611, (34).
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 19, 583, (34).
- BRACHET J., LEDOUX L., Exp. Cell. Res., 1955, Suppl. 3,
27, (35).
- BRACHET J., Biochemical Cytology. Acad. Press. N.Y., 1957,
p. 321, (47, 739, 795).
- BRACHET J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 1387; The
biological rôle of RNA Elsevier Publishing Company
N.Y., 1960, (47).
- BRACHET J., Nature, 1960, 186, 194, (739).
- BRACHET J., DECROLY M., FICQ A., QUERTIER J., Biochim.
Biophys. Acta, 1963, 72, 660, (378, 380).
- BRADLEY D.F., RICH A., J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 5898,
(581).
- BRAWERMAN G., CHARGAFF E., Biochim. Biophys. Acta, 1954, 15,
549, (390).
- BRAWERMAN G., CHARGAFF E., Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31,
172, (473, 819).
- BRAWERMAN G., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 61, 313, (819).
- BRAWERMAN G., HUFNAGEL D.A., CHARGAFF E., Biochim. Biophys.
Acta, 1962, 61, 340, (819).
- BRAWERMAN G., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 317, (819).
- BRAWERMAN G., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 76, 322, (847).
- BRAWERMAN G., GOLD L., EISENSTADT J., Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S., 1963, 50, 630, (847).
- BRAWERMAN G., EISENSTADT J.M., Biochim. Biophys. Acta, 1964,
91, 497, (9).
- BREDERECK H., MARTINI A., RICHTER F., Ber. dtsch. Chem. Ges.,
1941, 74, 694, (55, 321).
- BRENNER S., JACOB F., MESELSON M., Nature, 1961, 190, 576,
(102).
- BRIGGS A.P., J. Biol. Chem., 1922, 53, 13, (434).
- BRITTEN R.J., ROBERTS R.B., Science, 1960, 131, 32, (114).
- BROWN G.B., PETERMAN M.L., FURST S.S., J. Biol. Chem., 1948,
174, 1043, (662, 677).
- BROWN D.M., TODD A.R., J. Chem. Soc., 1952, 52, (73, 467).
- BROWN R.A., DAVIES M.C., COLTER J.S., LOGAN J.B.,
KRITCHEVSKY D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1957, 43, 857,
(79, 752).

- BROWN G.L., ZUBAY G., J.Mol.Biol., 1960, 2, 287, (87, 578).
- BROWN G.L., KOSINSKI Z., CARR C., Colloq. intern. CNRS Paris 1962, 106, 183, (135). Acides ribonucléiques et polyphosphates.
- BROWN G.L., In Progress in Nucleic Acid Research., 1963, 2, 259, (91) DAVIDSON J.N. & COHN W.E. éd.
Academic Press.
- BRUES A.M., TRACY M.M., COHN W.E., J.Biol.Chem., 1944, 155, 619, (686)
- BRUMM A.F., VAN POTTER R., SIEKEVITZ P., J.Biol.Chem., 1956, 220, 713, (664).
- BRUNS G.P., FISCHER S., LOWY B.A., Biochim.Biophys.Acta, 1965, 95, 280, (864).
- BURDON R.H., SMELLIE R.M.S., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 633, (592).
- BURKE D.C., Chemistry and Industry, 1954, 1510, (334).
- BURNY A., CHANTRENNE H., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 80, 31, (897).
- BUSCH SALMON S., Thèse Univ. de Strasbourg, Faculté des Sciences, 1963, (823).
- BUTENANDT A., Endeavour, 1952, XI, n°44, p.188, (153).
- CALVERY H.O., JONES W., J.Biol.Chem., 1927, 73, 73, (339)
- CANNON M., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 87, 154, (898).
- CANTONI G.L., GELBOIN H.V., IUBORSKY S.W., RICHARDS H.H., SINGER M.F., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 354, (89, 375).
- CANTONI G.L., In "Acides Ribonucléiques et polyphosphates" Colloq. intern. CNRS, Paris, 1962, 106, 201, (139).
- CARPENTER D.C., Anal.Chem., 1952, 24, 1203, (397).
- CARTER C.E., COHN W.E., Feder.Proc., 1949, 8, 190, (346).
- CARTER C.E., COHN W.E., J.Amer.Chem.Soc., 1950, 72, 2604, (346).
- CARTER C.E., J.Amer.Chem.Soc., 1950, 72, 1466, (395).
- CARTER C.E., J.Amer.Chem.Soc., 1951, 73, 1537, (56).
- CASPERSSON T., HAMMARSTEN E., HAMMARSTEN H., Tr.Faraday Soc., 1935, 31, 367, (271).
- CASPERSSON T., Skand.Arch.Physiol., 1936, 73, Suppl. 8. Nature, 1939, 143, 602 ; Naturwiss., 1941, 29, 33 ; J. Roy. microscop. Soc., 1940, 60, 8 ; Cell Growth and cell. function Norton N.Y., 1950, (6).
- CASPERSSON T., BRANDT K., Protoplasma, 1941, 3, 507, (14).

- CASSEL V.A., J. Bactériol., 1950, 59, 185, (281).
- CASTERMAN C., JEENER R., Biochim.Biophys.Acta., 1955, 16, 433, (29).
- CAVALIERI L.F., J.Am.Chem.Soc., 1951, 73, 4899, (452).
- CAVALIERI L.F., NEMCHIN R.G., Biochim.Biophys.Acta., 1964, 87, 641, (630).
- CHAMBERLIN M., BERG P., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S., 1962, 48, 81, (601, 615).
- CHAMBERLIN M., BERG P., J.Mol.Biol., 1964, 8, 297, (611).
- CHAMPE S.P., BENZER S., Proc.Natl.Acad.Sci.US., 1962, 48, 532, (831).
- CHANTRENNE H., Biochim.Biophys.Acta., 1947, 1, 437, (782).
- CHARGAFF E., MAGASANIK B., DONIGER R., VISCHER E., J.Am.Chem.Soc., 1949, 71, 1513, (386).
- CHARGAFF E., MAGASANIK B., VISCHER E., GREEN C., DONIGER R., ELSON D., J.Biol.Chem., 1950, 186, 51, (173, 301, 469).
- CHARGAFF E., LIPSHITZ R., J.Amer.Chem.Soc., 1953, 75, 3658, (66).
- CHARGAFF E., in "The Nucleic Acids" (CHARGAFF E. DAVIDSON, JN éd.) 1955, 1, p.307, Acad Press N.Y. (67, 849).
- CHAUVEAU J., MOULE Y., ROUILLER C., Bull.Soc.Chim.Biol., 1957, 39, 1521, (812).
- CHEN P.S., TORIBARA T.Y., WARNER H., Anal.Chem., 1956, 28, 1756, (437).
- CLARKE G., SCHRYVER S.B., Biochem.J., 1917, 11, 319, (171).
- COCITO C., PRINZIE A., DE SOMER P., Nature, 1961, 191, 573, (116).
- COCITO C., DE SOMER P., Experientia, 1962, 18, 218, (116).
- COCITO C., LADURON P., Anal.Biochem., 1964, 7, 429, (426).
- COHN W.E., J.Amer.Chem.Soc., 1949, 71, 2275, (347).
- COHN W.E., Science, 1949, 109, 377, (313, 345, 348).
- COHN W.E., J.Amer.Chem.Soc., 1950, 72, 1471, (345, 351).
- COHN W.E., CARTER C.E., J.Amer.Chem.Soc., 1950, 72, 2606, (345, 356).
- COHN W.E., J.Amer.Chem.Soc., 1950, 72, 2811, (345).
- COHN W.E., J.Cell.and Comp.Phys., 1951, 38, supplt 1, 21, (313, 345, 471).
- COHN W.E., VOLKIN E., Nature, 1951, 167, 483, (358).
- COHN W.E., In "The Nucleic Acids" (CHARGAFF E., et DAVIDSON J.N. éd) Academic Press N.Y., 1955, 1, 211, (313, 324, 326).

- COHN W.E., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 32, 569, (516).
- COHN W.E., J.Biol.Chem., 1960, 235, 1488, (360, 516).
- COHN W.E., BOLLUM F.J., Biochim.Biophys.Acta, 1961, 48, 588, (361).
- COHN W.E., Bull.Soc.Chim.Biol., 1964, 46, 239, (49).
- COLTER J.S., BROWN R.A., Science, 1956, 124, 1077, (78, 221).
- COMMONER B., MERCER J., Arch.Biochem.Biophys., 1952, 35, 278, (42).
- COOLSMA J.W.Th., AB G., CAMPAGNE R.N., GRUBER M., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 494, (254).
- COX R.A., ARNSTEIN H.R.V., Biochem.J., 1962, 83, 4P, et 1963, 89, 574, (199).
- CRESTFIELD A.M., ALLEN F.W., Anal.Chem., 1955, 27, 424, (417).
- CRESTFIELD A.M., "The résolution of nucléotides by zone electrophoresis". Thèse Univ.de California, 1954, (417).
- CRESTFIELD A.M. SMITH K.C., ALLEN F.W., J.Biol.Chem., 1955, 216, 185, (74, 223, 462).
- CRESTFIELD A.M. ALLEN F.W., Chromatog.Methodes, 1957, 2, 422, (392).
- CRICK F.H.C., "The biological replication of macromolécules", Symposia Soc.Exptl.Biol., 1958, 12, (151).
- CROSBIE G.W., SMELLIE R.M.S., DAVIDSON J.N., Biochem.J., 1953, 54, 287, (311, 414, 551).
- CROSBIE G.W., HUTCHINSON W.C., McINDOE W.M., CHILDS M., DAVIDSON J.N., Biochim.Biophys.Acta, 1954, 14, 580, (507).
- DALY M.M., MIRSKY A.E., J.Biol.Chem., 1949, 179, 981, (315).
- DALY M.M., ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., J.Gen.Physiol., 1950, 33, 497, (297, 344).
- DAVIDSON J.N., WAYMOUTH C., Biochem.J., 1944, 38, 39 et 379, (269).
- DAVIDSON J.N., WAYMOUTH C., Biochem.J., 1944, 38, 375, (172 193, 269).
- DAVIDSON J.N., Cold Spring Harbor Symp.quant.Biol., 1947, 12, 50, (16).
- DAVIDSON J.N., RAYMOND W., Biochem.J., 1948, 42, Pr.XIV, (666).
- DAVIDSON J.N., FRAZER S.C., HUTCHISON W.C., Biochem.J., 1951, 49, 311, (175).
- DAVIDSON J.N., McINDOE W.M., SMELLIE R.M.S., Biochem.J., 1951, 49, P XXXVI, (704, 767).

- DAVIDSON J.N., SMELLIE R.M.S., Biochem.J., 1952, 52, 594, (188, 196, 411, 446, 449, 488, 495, 518, 524, 537)
- DAVIDSON J.N., SMELLIE R.M.S., Biochem.J., 1952, 52, 599, (502, 704).
- DAVIDSON J.N., Bull.Soc.Chim.Biol., 1953, 35, 49, (503, 646, 704).
- DAVIS F.F., ALLEN F.W., J.Biol.Chem., 1957, 227, 907, (75, 513, 517).
- DECROLY M., CAPE M., BRACHET J., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 87, 34, (379, 381).
- DE DECKEN M., DE DECKEN R.H., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 31, 195, (280, 289).
- DE FILIPPES F.M., Science, 1964, 144, 1350, (425).
- DEKKER C.A., MICHELSON A.M., TODD A.R., J.Chem.Soc., 1953, 947, (58).
- DE LAMIRANDE G., ALLARD C., CANTERO A., Cancer Research., 1955, 15, 329, Biochim.Biophys.Acta, 1958, 27, 395, J.Biophys.Biochem.Cytol., 1955, 6, 291, (354).
- DE LAMIRANDE G., ALLARD C., CANTERO A., J.Biol.Chem., 1955, 214, 519, (259, 354, 465, 544, 546).
- DELUCA H.A., ROSSITER R.J., STRICKLAND K.P., Biochem.J., 1953, 55, 193, (655).
- DENUGE J.M., Biochim.Biophys.Acta, 1952, 8, 3, (12).
- DERUMEZ P., C.R. Acad.Sc., 1964, 259, 1909, (557).
- DIMROTH K., JAENICKE L., VOLLBRECHTSHAUSEN I., Z.Phys.Chem., 1952, 289, 71, (331).
- DINNING J.S., J.Biol.Chem., 1955, 212, 735, (684).
- DINNING J.S., SIME J.T., DAY P.L., J.Biol.Chem., 1955, 217, 205, (663).
- DISCHE Z., Mikrochemie, 1930, 8, 4, (274, 279).
- DOCTOR B.P., CONNELLY C.M., Biochem.Biophys.Res.Comm., 1961, 6, 201, (126).
- DOCTOR B.P., APGAR J., HOLLEY R.W., J.Biol.Chem., 1961, 236, 1117, (126).
- DOLY J., LEDIG M., MANDEL P., Bull.Soc.Chim.Biol., 1963, 45, 449, (511, 531).
- DROCHMANS P., MARRIAN D.H., BROWN G.B., Arch.Biochem.Biophys., 1952, 39, 310, (659).
- DRYER R.L., TAMMES A.R., ROUTH J.I., Feder.Proc., 1956, 15, 244, (438).
- DUNN D.B., SMITH J.D., SPAHR R.F., J.Mol.Biol., 1960, 2, 113, (50).

- DUTTA S.K., JONES A.S., STACEY M., J.Gen.Microbiol., 1956, 14, 1960, (312).
- EBEL J.P., DIRHEIMER G., STAHL A.J.C., YACoub M., Bull. Soc.Chim.Biol., 1963, 45, 865, 875, 887, (53).
- EDMANN P., HAMMARSTEN E., LOW B., REICHARD P., J.Biol. Chem., 1949, 178, 395, (314, 327).
- EDMONDS M., ABRAMS R., J.Biochem., 1960, 235, 1142, (237).
- EDSTRÖM J.E., Nature, 1953, 172, 809, (423).
- EDSTRÖM J.E., HYDEN H., Nature, 1954, 174, 128, (423).
- EDSTRÖM J.E., Microchem.J., 1958, 2, 71, (423).
- ELLEM K.A.O., SHERIDAN J.W., Biochem.Biophys.Res.Comm., 1964, 16, 505, (856).
- ELMES P.C., SMITH J.D., WHITE J.C., 2ème Congrès international de Biochimie Paris 21-27 Juillet 1952, Résumé p.8, Soc. d'ed. Enseig. sup. (309).
- ELSON D., CHARGAFF E., Phosphorus metabolism, 1952, 2, 329, (552).
- ELSON D., CHARGAFF E., Nature, 1954, 173, 1037, (389).
- ELSON D., GUSTAFSON T., CHARGAFF E., J.Biol.Chem., 1954, 209, 285, (19, 389).
- ELSON D., CHARGAFF E., Biochim.Biophys.Acta, 1955, 17, 362, (260, 389, 539, 552, 575).
- EPHRUSSI B., BEADLE G.W., Biol.Bull., 1937, 71, 75, (152).
- EULER H., HAHN L., Svensk.Kem.Tidskrift, 1946, 58, 251, (442).
- EVERETT G.A., MERRILL S.H., HOLLEY R.W., J.Amer.Chem.Soc., 1960, 82, 5756, (125).
- FALASCHI A., ADLER J., KHORANA H.G., Fed.Proc., 1963, 22, 462, J.Biol.Chem., 1963, 238, 3080, (603).
- FEIGELSON P., FEIGELSON M., FANCHER C., Biochim.Biophys. Acta, 1959, 32, 133, (25).
- FENWICK M.L., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 87, 388, (877).
- FENWICK M.L., ERIKSON R.L., FRANKLIN R.M., Science, 1964, 146, 527, (907).
- FICQ A., ERRERA M., Arch.intern.Physiol., 1954, 52, 563, (725).
- FICQ A., ERRERA M., Arch.intern.Physiol., 1955, 63, 259, (37).
- FICQ A., Arch.Biol., 1955, 66, 509, Exp.Cell.Res., 1955, 9, 286, (21).
- FICQ A., ERRERA M., Biochim.Biophys.Acta, 1955, 16, 45, (731).

- FICQ A., Exp.Cell.Res., 1961, 23, 427, (731).
- FISKE C.H., SUBBAROW Y., J.Biol.Chem., 1925, 66, 375, (277)
- FLAMM W.G., BIRNSTIEL M.L., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 87, 101, (890).
- FLETCHNER W.E., GULLIAND J.M., JORDAN D.O., J.Chem.Soc., 1944, 33, (71).
- FRAENKEL-CONRAT H., WILLIAMS R.C., Proc.Natl.Acad.Sci.US., 1955, 41, 690, (44).
- FRAENKEL-CONRAT H., J.Amer.Chem.Soc., 1956, 78, 882, (46).
- FRANKLIN R.E., GOSLING R.G., Acta cryst., 1953, 6, 673, Nature, 1953, 171, 740; 172, 156, (62).
- FRANKLIN R.M., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 555, (900).
- FRESCO J.R., MARSHAK A., J.Biol.Chem., 1953, 205, 585, (723).
- FRESCO J.R., BENDICH A., RUSSEL P.J., Feder.Proc., 1955, 14, 214, (678).
- FRESCO J.R., ALBERTS B.M., DOTY P., Nature, 1960, 188, 98, (106).
- FRONTALI N., Acta.Chem.Scand., 1959, 13, 2, 390, (424).
- FUKUHARA H., SHORTMAN K., C.R.Acad.Sci., 1962, 255, 1529, (843, 870).
- FURTH J.J., HURWITZ J., GOLDMANN M., Biochem.Biophys.Res. Comm., 1961, 4, 362, (594, 598).
- FURTH J.J., HURWITZ J., ANDERS M., Biochem.Biophys.Res. Comm., 1961, 4, 431, (604).
- FURST S.S., ROLL P.M., BROWN G.B., J.Biol.Chem., 1950, 183, 251, (687).
- GALE E.P., FOLKES J.P., Nature, 1954, 172, 1223 ; Biochem.J., 1955, 59, 661, 675 ; Nature, 1955, 175, 592 ; C.R. 3è Congrès Intern.Bioch. Bruxelles, 1956, p.345 (26).
- GEIDUSCHEK E.P., MOOHR J.W., WEISS S.B., Proc.Natl.Acad. Sci.U.S., 1962, 48, 1078, (607).
- GEIDUSCHEK E.P., NAKAMOTO T., WEISS S.B., Proc.Natl.Acad. U.S., 1961, 47, 1405, (607).
- GEORGIEV G.P., Biokhimiya, 1959, 24, 472, (233)(242).
- GEORGIEV G.P., MANTIEVA V.L., Biokhimiya, 1960, 25, 143; 1961, 26, 265, (233).
- GEORGIEV G.P., MANTIEVA V.L., ZBARSKY I.B., Biochim. Biophys.Acta, 1960, 37, 373, (243).
- GEORGIEV G.P., SAMARINA O.P., MANTIEVA V.L., ZBARSKY I.B., Biochim.Biophys.Acta, 1961, 46, 399, (757).

- GEORGIEV G.P., MANTIEVA V.L., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 153, (243, 245, 250, 253, 845, 889).
- GEORGIEV G.P., SAMARINA O.P., LERMAN M.I., SMIRNOV M.N., SEVERTZOV A.N., Nature, 1963, 200, 1291, (635, 871, 887).
- GEORGIEV G.P., LERMAN M.I., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 91, 678, (883).
- GERARDE H.W., JONES M., WINNICK Th., J.Biol.Chem., 1952, 196, 69, (699).
- GERLACH E., FREISBACH C.H., DEUTICKE B., J.of Chromatography, 1965, 18, 81, (401).
- GHOSH A.R., BURMA D.P., Science et Culture, 1953, 19, 103, (319).
- GIERER A., SCHRAMM G., Z.Naturforsch., 1956, 11b, 138, (45).
- GODSON G.N., HUNTER G.D., Biochem.J., 1961, 79, 37P, (534).
- GOLD N.I., STURGIS S.H., J.Biol.Chem., 1954, 206, 51, (181, 189).
- GOLDBERG I.H., RABINOWITZ M., Biochim.Biophys.Acta, 1961, 54, 202, (639).
- GOLDBERG I.H., RABINOWITZ M., Science, 1962, 136, 315, (626).
- GOLDTHWAIT D.A., J.Biol.Chem., 1959, 234, 3245-3251, (108, 573).
- GOLDTHWAIT D.A., STARR J.L., J.Biol.Chem., 1960, 235, 2025 (108).
- GOLDTHWAIT D.A., KERR O.S., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 930, (108).
- GOLDSTEIN L., PLAUT W., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1955, 41, 874, (734).
- GOLDSTEIN L., MICOU J., J.Biophys.Biochem.Cytol., 1959, 6, let-301, (734).
- GOLDSTEIN L., MICOU J., CROCKER T.T., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 45, 82, (797).
- GOLDSTEIN L., CAILLEAU R., CROCKER T.T., Exptl.Cell.Res., 1960, 19, 332, (797).
- GOODMAN M.M., RICH A., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 2101, (638).
- GRINNAN E.L., MOSHER W.A., J.Biol.Chem., 1951, 191, 719, (184, 184).
- GRIPPO P., IACCARINO M., ROSSI M., SCARANO E., Biochim.Biophys.Acta, 1965, 95, 1, (407).
- GROS F., GROS F., Biochim.Biophys.Acta, 1956, 22, 200, (150).
- GROS F., HIATT H.H., GILBERT W., KURLAND C.G., RISEBROUGH R.W., WATSON J.D., Nature, 1961, 190, 581, (94, 101, 838).

- GROS F., GILBERT W., HIATT H.H., ATTARDI G., SPAHR P.F.,
WATSON J.D., Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.,
1961, 26, 111, 126, (838).
- GROSSMAN L., VISSER D.W., J.Biol.Chem., 1954, 209, 447, (727)
- GROTH D.P., Biochim.Biophys.Acta, 1956, 21, 18, (30).
- GRÜNBERG MANAGO M., OCHOA S., J.Amer.Chem.Soc., 1955, 77,
3765, (147, 164).
- GRÜNBERG MANAGO M., ORTIZ P.J., OCHOA S., Biochim.Bio-
phys.Acta, 1956, 20, 269, (147).
- GRÜNBERG MANAGO M., in Acides ribonucléiques et poly-
phosphates - Colloque Intern. CNRS, Strasbourg, 1961,
CNRS, Paris, 1962, (147).
- GRÜNBERG MANAGO M., GROS F., Bull.Soc.Chim.Biol., 1964,
46, 1441, (105).
- GUERIN J., Bull.Soc.Chim.Biol., 1954, 36, 1453, (494).
- GUILD W.R., ROBISON M., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1963,
50, 106, (828).
- HAKIM A.A., J.Biochem.Soc., 1957, 225, 689, (454).
- HALL B.D., DOTY P., J.Mol.Biol., 1959, 1, 111, (98, 208).
- HALL B.D., SPIEGELMAN S., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1961,
47, 137, (606).
- HALL R.H., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 68, 278, (476).
- HALL B.D., NYGAARD A.P., GREEN M.H., J.Mol.Biol., 1964,
9, 143, (815).
- HALLINAN T., FLECK A., MUNRO H.N., Biochim.Biophys?Acta,
1963, 68, 131, (291).
- HAMMARSTEN D., Z.Physiol.Chem., 1894, 19, 19, (5).
- HAMMARSTEN D., REICHARD P., SALUSTE E., J.Biol.Chem.,
1950, 183, 105, (672).
- HANCOCK R.L., ZELIS R.F., SHAW M., WILLIAMS-ASHMAN H.G.,
Biochim.Biophys.Acta, 1962, 55, 257, (590).
- HANES C.S., ISHERWOOD F.A., Nature, 1949, 164, 1107,
(491, 496, 520, 536, 794).
- HARBERS E., MULLER W., Biochem.Biophys.Res.Comm., 1962,
7, 107, (629).
- HAREL J., HAREL L., LACOUR F., BOER A., IMBENOTTE J.,
J.Mol.Biol., 1963, 7, 645, (852)..
- HARRIS R.S.C., BEALE R.N., ROE E.M.F., J.Chem.Soc.,
1950, 1397, (343).
- HARRIS H. Biochem.J., 1959, 73, 362, (729, 803).

- HARRIS D.N., DAVIS F.F., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 40, 373, (81).
- HARRIS H., WATTS J.W., Proc.Roy.Soc.London, 1962, 156, 109, (741).
- HARRIS H., LACOUR L.F., Nature, 1963, 200, 227, (803).
- HARTH S., MARDELL R., BORKOWSKI T., WANDEL P., J.Physiol. 1961, 53, 362, (722).
- HARTMANN G., COY U., Biochim.Biophys.Acta, 1961, 47, 612, (138).
- HAWTHORNE J.N., Biochim.Biophys.Acta, 1957, 26, 636, (528).
- HAYASHI M., HAYASHI M.N., SPIEGELMAN S., Proc.Natl.Acad. Sci.U.S., 1963, 50, 664, (829).
- HAYWOOD A.M., GRAY E.D., CHARGAFF E., Biochim.Biophys. Acta, 1962, 61, 1555, (867).
- HENDLER R.W., Science, 1963, 142, 402. (158)
- HERBERT E., VAN POTTER R., HECHT L.I., J.Biol.Chem., 1957, 225, 659, (732).
- HIATT H.H., J.Mol.Biol., 1962, 5, 217, (244, 248, 373, 808, 861, 881).
- HIATT H.H., GROS F., JACOB F., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 15, (817).
- HIRATA A.A., APPLEMAN D., Anal.Chem., 1959, 31, 2097, (439).
- HITCHBORN J.H., DUNN D.B., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 68, 139, (211).
- HOAGLAND M.B., STEPHENSON M.L., SCOTT J.F., HECHT L.I., ZAMECNIK P.C., J.Biol.Chem., 1958, 231, 241, (85, 132, 157)
- HOAGLAND M.B., in The Nucleic Acids, 1960, 3, 349, Acad. Press N.Y., CHARGAFF E. et DAVIDSON J.N., ed.) (558, 618).
- HOLLEY R.W., MERRIEL S.H., Feder.Proc., 1959, 18, 982, (124).
- HOLLEY R.W., DOCTOR B.P., MERRILL S.H., SAAD F., Biochim. Biophys.Acta, 1959, 35, 272, (124).
- HOLLEY R.W., MERRILL S.H., J.Amer.Chem.Soc., 1959, 81, 753, (124).
- HOLLEY R.W., APGAR J., EVERETT G.A., MADISON J.T., MARQUISEE M., MERRILL S.H., PENSWICK J.R., ZAMIR A., Science, 1965, 147, 1462, (143).
- HOLT C.E., HERBERT E., JOEL P.B., Feder.Proc., 1962, 21, 381, (896).
- HOSODA J., SHIGEMATSU H., TAKESHITA H., MIZUNO S., TATAHASHI H., MARJO B., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 544, (365).

- HOTCHKISS B.D., J.Biol.Chem., 1948, 175, 315, (296).
- HOTTA Y. et OSAWA S., Biochim.Biophys.Acta, 1958, 28, 642, (554, 747).
- HUANG R.C., MAHESHWARI N. et BONNER J., Biochem.Biophys.Res. Communic., 1960, 3, 689, (586).
- HUANG R.C. et BONNER J., Feder.Proc., 1962, 21, 384, (596).
- HUGGINS C.G. et COHN D.V., J.Biol.Chem., 1959, 234, 257, (529).
- HULL W. et KIRK P.L., J.Gén.Physiol., 1950, 33, 335, (698).
- HULTIN T., SLAUTTERBACK D.B. et WESSEL G., Exp.Cell.Res., 1951, 2, 696, (763, 769).
- HUNTER G.D., GODSON G.N., Nature, 1961, 189, 140, (533).
- HUPPERT J. et PELMONT J., Arch.Biochem.Biophys., 1962, 98, 214, (206).
- HURLBERT R.B. et POTTER J.R., J.Biol.Chem., 1952, 195, 257, (675, 717).
- HURLBERT R.B., SCHMITZ H., BRUMM A.F. et POTTER J.R., J.Biol. Chem., 1954, 209, 23, (357).
- HURWITZ J., BRESLER A. et DIRINGER R., Biochem.Biophys.Res. Communic., 1960, 3, 15, (583, 631).
- HURWITZ J., FURTH J.J., MALAMY M. et ALEXANDER M., Proc.Natl. Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 1222, (627).
- HURWITZ J., FURTH J.J., ANDERS N. et EVANS A., J.Biol.Chem., 1962, 237, 3752, (616).
- HURWITZ J. et AUGUST J.T., Progress in Nucleic Acids Research, 1963, 1, 59 (DAVIDSON J.N., COHN W.E. Ed., Acad.Press)(595)
- HUTCHINSON W.C., CROSBIE G.W., MENDES C.B., McINDOE M.M., CHILDS M. et DAVIDSON J.N., Biochim.Biophys.Acta, 1956, 21, 44, (508).
- HYMER W.C. et KUFF E.L., Biochem.Biophys.Res.Communic., 1964, 15, 506, (231, 256).
- INGRAM V.M., Hemoglobin and its abnormalities - Springfield Ill., Charles C. THOMAS, 1960, (155).
- ISHIHAMA A., MIZUNO N., TAKAI M., OTAKA E., et OSAWA S., J.Mol. Biol., 1962, 5, 251, (123, 369).
- ISHIKAWA K., OGATA K. et SUGANO H., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 87, 523, (857).
- JACOB F. et MONOD J., J.Mol.Biol., 1961, 3, 318, (103, 840).
- JACOBSON K.B. , Science, 1962, 138, 515, (405).
- JACOBSON K.B., et NISHIMURA S., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 68, 490, (142).

- JACOBSON K.B. et NISHIMURA S., J.of Chromatography, 1964, 14, 46, (142).
- JAENICKE L. et VOLLBRECHTSHAUSEN I., Naturwiss, 1952, 39, 86, (332).
- JAENICKE L. et VON DAHL K., Naturwiss, 1952, 39, 87, (325).
- JARDETZKY C.D. et BARNUM C.P., Feder.Proc., 1956, 15, 282, (702).
- JARDETZKY C.D. et BARNUM C.P., Arch.Biochem.Biophys., 1957, 67, 350, (702, 753, 759, 779, 784).
- JEENER R., Nature, 1949, 163, 837, (766).
- JEENER R. et SZAFARZ D., Arch.Biochem.Biophys., 1950, 26, 54, (701, 707, 766 et 780).
- JEENER R. et SZAFARZ D., Experientia, 1950, 6, 60, (701).
- JEENER R., Biochim.Biophys.Acta, 1952, 8, 270, (781).
- JEENER R., Biochim.Biophys.Acta, 1952, 8, 125 ; 1954, 13, 307, (40
- JEENER R., et ROSSEELS J., Biochim.Biophys.Acta, 1953, 11, 438, (4
- JONES K.W. et TRUMAN D.E.S., Nature, 1964, 202, 1264, (901).
- JOSEFSSON L., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 133, (406, 409).
- JORDAN D.O., The chemistry of Nucleic Acids, Butterworth and Co (Publishers) 1960.
- KADOYA M., MITSUI H., TAGAGI Y., OTAKA E., SUZUKI H. et OSAWA S., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 91, 36, (597).
- KAHAN E., KAHAN F.M. et HURWITZ J., J.Biol.Chem., 1963, 238, 2491, (628).
- KALTREIDER H.B. et SCOTT J.F., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 55, 379, (455).
- KANO-SUEOKA T. et SPIEGELMAN S., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 1942, (814).
- KAPLAN N.O. et GREENBERG D.M., J.Biol.Chem., 1944, 156, 511, (268)
- KATZ S. et COMB D.G., J.Biol.Chem., 1963, 238, 3065, (349, 350).
- KAWADE Y. et KITAMURA T., Nippon Kagaku Zasshi, 1957, 78, 1801, (77)
- KAWADE Y., OKAMOTO T. et YAKAMOTO Y., Biochem.Biophys.Res. Communic., 1963, 10, 200, (136).
- KAY E.R.M. et DOUNCE A.L., J.Amer.Chem.Soc., 1953, 75, 4041, (179, 185, 194, 215).
- KAY E.R.M., SMELLIE R.M.S., HUMPHREY G.F. et DAVIDSON J.N., Biochem.J., 1956, 62, 160, (748).
- KELLY L.S., PAYNE A.H., WHITE M.R. et JONES H.B., Cancer Res., 1951, 11, 694, (693).
- KEMP J.W. et ALLEN F.W., Biochim.Biophys.Acta, 1958, 28, 51, (464).
- KERR S.E. et SERAIDARIAN K., J.Biol.Chem., 1949, 180, 1203, (177, 192, 216).
- KERR S.R., SERAIDARIAN K., WARGON M., J.Biol.Chem., 1949, 181, 773, (180).

- KHORANA H.G. et VIZSOLYI J.P., J.Amer.Chem.Soc., 1961, 83, 675, (602).
- KHOUVINE Y., Pathol.Biol., 1959, 7, 829, (715).
- KIDSON C., KIRBY K.S. et RALPH R.K., J.Mol.Biol., 1963, 7, 312, (207, 230, 247, 249).
- KIDSON C. et KIRBY K.S., J.Mol.Biol., 1964, 10, 187, Cancer Res., 1964, 24, 1604, (145).
- KIMURA K., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 55, 22 (252).
- KINNORY D.S., ZORN E.M. et GAINES D.S., Feder.Proc., 1956, 15, 289 (422).
- KIRBY K.S., Biochim.Biophys.Acta, 1955, 18, 575, (398).
- KIRBY K.S., Biochem.J., 1956, 64, 405, (186,191,201,220,235).
- KIRBY K.S., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 40, 193, (202).
- KIRBY K.S., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 55, 545, (203).
- KIRBY K.S., in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, DAVIDSON J.N. et COHN W.E. ed., 1964, 3, 1, Academic Press. (227).
- KIRK J.M., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 42, 167, (622).
- KIRK J.T.O., Biochem.Biophys.Res.Communic., 1964, 14, 393, (8).
- KIT S., Nature, 1959, 184, 36, (576).
- KIT S., Arch.Biochem.Biophys., 1960, 88, 1, (240, 549, 556).
- KIT S., Cancer Res., 1960, 20, 1121, (240).
- KITAZUME Y., YCAS M. et VINCENT W.S., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 265, (874).
- KITAZUME Y. et YCAS M., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 76, 391, (376, 478, 866).
- KLEINSCHMIDT W.J. et MANTHEY J.A., Arch.Biochem.Biophys., 1958, 73, 52, (261, 450, 540, 548 et 559).
- KOCH G. et KUBINSKI H., Biochem.Biophys.Res.Communic., 1964, 15, 308, (257, 855).
- KORNBERG A., Science, 1960, 131, 1503, (163).
- KORNBERG A., Enzymatic synthesis of DNA -The Harvey Lectures, série 53, 83, Acad.Press.N.Y., 1959, (146).
- KOSSEL A., Arch.Anat.physiol., Physiol.Abt, 1891, 181, (3).
- KUBINSKI H., KOCH G. et DREES O., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 332, (119).
- KURLAND C.G., J.Mol.Biol., 1960, 2, 83, (97).

- LAGERKVIST U. et BERG P., J.Mol.Biol., 1962, 5, 139, (92).
- LANE B.G. et BUTLER G.C., Can.J.Biochem.Physiol., 1959, 37, 573, (459).
- LANE B.G. et BUTLER G.C., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 33, 281, (459, 468).
- LANE B.G. et ALLEN F.W., Can.J.Biochem.Physiol., 1961, 39, 721, (460).
- LANE B.G., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 110, (400).
- LANGRIDGE R. et HOLMES K.C., J.Mol.Biol., 1962, 5, 611, (579).
- LANGRIDGE R., Science, 1963, 140, 1000, (579).
- LASKOV R., MARGOLIASH E., LITTAUER U.Z. et EISENBERG H., Biochim. Biophys.Acta, 1959, 33, 247, (200, 222).
- LE CLERC J., Ann.Inst.Pasteur, 1957, 93, 772, (32).
- LEDIG M., WEILL J.D. et MANDEL P., Bull.Soc.Chim.Biol., 1958, 40, 599, (480).
- LEDIG M., FEIGENBAUM H. et MANDEL P., C.R.Acad.Sci., 1962, 253, 2003, (510).
- LEDIG M., FEIGENBAUM H. et MANDEL P., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 332, (510, 530).
- LEDoux L., LE CLERC J. et BRACHET J., Exp.Cell.Res., 1955, 9, 338, (36).
- LEVENE P.A. et JACOBS W.A., Ber.Dtsch.Chem.Ges., 1909, 42, 335, et 1911, 44, 746, (54).
- LEVENE P.A. et JACOBS W.A., Ber.Dtsch.Chem.Ges., 1910, 43, 3154, (320).
- LEVENE P.A., J.Biol.Chem., 1918, 33, 425 et 1919, 40, 415, (338).
- LEVENE P.A. et SIMMS H.S., J.Biol.Chem., 1926, 70, 332, (69).
- LEVENE P.A. et BASS L.W., Nucleic Acids.ACS monographs Chemical catalog Company, N.Y., 1931, (4).
- LEVY H.B. et LYNT R.K., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 529, (294).
- LEPAGE G.A. et UMBREIT W.W., in Manometric techniques and related methods for the study of tissu metabolism UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STANFFER J.F., Minnéapolis, 1945, (273).
- LEPAGE G.A. et HEIDELBERGER Ch., J.Biol.Chem., 1951, 188, 593, (661).
- LESLIE I., The Nucleic Acids, 1955, 2, 1, CHARGAFF E., DAVIDSON J.N., ed., Academic Press, N.Y., (17).
- LESLIE I., Nature, 1961, 189, 260, (572).
- LESTER R.L., J.Amer.Chem.Soc., 1953, 75, 5448, (27).

- LIPMANN P., in Progress in Nucleic Acid Research, 1963, 1, 135,
- DAVIDSON J.N., COHN W.E., ed, Academic Press. (104).
- LIPSHITZ R. et CHARGAFF E., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 42, 544,
(82, 391).
- LITTAUER U.Z. et EISENBERG H., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 32,
320, (219).
- LITTAUER U.Z. et SELA M., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 609,
(205).
- LOCKINGEN L.S. et DE BUSK A.G., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1955,
41, 925, (562, 567).
- LOGAN J.E., MANNELL W.A. et ROSSITER R.J., Biochem.J., 1952, 52,
480, (526).
- LOGAN R., Biochim.Biophys.Acta, 1957, 26, 227, (749).
- LOGAN R. et DAVIDSON J.N., Biochim.Biophys.Acta, 1957, 24, 196,
(749).
- LORING H.S. et BORTNER H.W., LEVY L.W. et HAMMELL M.L., J.Biol.
Chem., 1952, 196, 807, (448).
- LORING H.S., FAIRLY J.L., BORTNER H.W. et SEAGRAN H.L., J.Biol.
Chem., 1952, 197, 809, (306).
- LORING H.S., in "The Nucleic Acids", CHARGAFF E., DAVIDSON J.N. ed.,
N.Y., Academic Press, 1955, 1, 191, (428).
- IUBORSKY S.W. et CANTONI G.L., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61,
481, (140).
- MAC DONALD I.W., Biochem.J., 1954, 57, 566, (299).
- MACHEBOEUF M. et DELSAL J.L., Bull.Soc.Chim.Biol., 1943, 25,
116, (435).
- MAGASANIK B., VISCHER E., DONIGER R., ELSON D. et CHARGAFF E.,
J.Biol.Chem., 1950, 186, 37, (388).
- MAGASANIK B. et CHARGAFF E., Biochim.Biophys.Acta, 1951, 7, 396,
(456 et 470).
- MAGASANIK B., in "The Nucleic Acids" CHARGAFF E., DAVIDSON J.N., ed.
Academic Press, N.Y., 1955, 1, 373, (168, 494).
- MAIMGREN B. et HEDEN C.G., Acta Pathol.Microbiol.Scand., 1948,
437, 448, 472, 496, (15).
- MANDEL P., WEILL J.D. et LEDIG M., C.R.Acad.Sci., 1955, 24, 257,
(399).
- MANDEL P., WEILL J.D. et LEDIG M., Bull.Soc.Chim.Biol., 1956,
38, 71, (399).
- MANDEL P. et REVEL M., C.R.Soc.Biol., 1958, 152, 152, (382, 479).
- MANDEL P., KLEIN N., WINTZERITH M., MANDEL L. et LIPOVSKY A.,
5ème Congrès int.Biochim. MOSCOU 1961, résumé des Communi-
cations, p. 75 3/64/1222, (824).

- MANDEL P., Communication personnelle, 1961, (505).
- MANDEL P., Symp. ARN et polyphosphates - Colloq.Intern.CNRS, Strasbourg, 1962, 106, 385, (589).
- MANDEL P., Ann.Nutr.Aliment., 1963, 17, B135, (824).
- MANDEL P., WINTZERITH M., BORKOWSKA I. et MANDEL L., C.R.Acad. Sci., 1964, 258, 1914, (11).
- MANDEL P., Bull.Soc.Chim.Biol., 1964, 46, 43, (593 et 863).
- MANDELL J.D. et HERSHEY A.D., Anal.Biochem., 1960, 1, 66, (115).
- MARKHAM R. et SMITH J.D., Biochem.J., 1949, 45, XXXII, (302).
- MARKHAM R. et SMITH J.D., Biochem.J., 1949, 45, 294, (302, 316, 329).
- MARKHAM R. et SMITH K.M., Parasitology, 1949, 39, 330, (38).
- MARKHAM R. et SMITH J.D., Biochem.J., 1950, 46, 513, (298).
- MARKHAM R. et SMITH J.D., Research, 1951, 4, 344, (72).
- MARKHAM R. et SMITH J.D., Biochem.J., 1951, 49, 401, (304, 396).
- MARKHAM R. et SMITH J.D., Biochem.J., 1952, 52, 552, (416, 499, 500, 722).
- MARKHAM R., Adv. in Virus Res., 1953, 1, 315, (39).
- MARKHAM R., British Medical Bulletin, 1954, 10, 214-217, (385).
- MARKHAM R., MATTHEWS R.E.F. et SMITH J.D., Nature, 1954, 173, 537, (475).
- MARKS D.A., WILLSON C., KRUH J. et GROS F., Biochem.Biophys.res. Commun., 1962, 8, 9, (875).
- MARMUR J. et GREENSPAN C.M., Science, 1963, 142, 387, (833).
- MARRIAN D.H., SPICER V.L., BALIS M.E. et BROWN G.B., J.Biol.Chem., 1951, 189, 533, (447).
- MARSHAK A., J.Gen.Physiol., 1941, 25, 275, (697, 700, 708).
- MARSHAK A., J.Cell.Comp.Physiol., 1948, 32, 381, (700).
- MARSHAK A. et CALVET F., J.Cell.Comp.Physiol., 1949, 34, 451, (668, 709, 713).
- MARSHAK A. et VOGEL H.J., J.Cell.Comp.Physiol., 1950, 36, 97, (653).
- MARSHAK A., Biol.Bull., 1950, 99, 332, (308).
- MARSHAK A., Amer.J.Physiol., 1950, 163, 732, (308).
- MARSHAK A. et VOGEL H., Feder.Proc., 1950, 9, 85, (307).
- MARSHAK A. et VOGEL H., J.Biol.Chem., 1951, 189, 597, (307, 330).
- MARSHAK A., J.Biol.Chem., 1951, 189, 607, (550).
- MATHEWS R.E.F., J.Gen.Microbiol., 1954, 10, 521, (43).
- MCCARTHY B.J. et BOLTON E.T., J.Mol.Biol., 1964, 8, 184, (834).

- McINDOE W.M. et DAVIDSON J.N., Brit.J.Cancer, 1952, 6, 200, (413, 567, 705).
- McMASTER KAY E.R. et TAYLOR J.H., J.Biophys.Biochem.Cytol., 1958, 4, 5, (754).
- McMASTER KAY E.R., J.Biophys.Biochem.Cytol., 1960, 8, 365, (730, 754).
- McQUILLEN K., ROBERTS R.B. et BRITTEN R.J., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S., 1959, 45, 1437, (113).
- MEJBAUM M., Z.Physiol.Chem., 1939, 258, 117, (278, 441).
- MERITZ I., Biochem.Biophys.Res.Communic., 1963, 10, 254, (899).
- MEROLA A.J. et DAVIS F.F., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 56, 431, (88).
- MIDGLEY J.E.M., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 513, (865).
- MIDGLEY J.E.M. et MCCARTHY B.J., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 696, (865).
- MIESCHER F., Hoppe Seyler's Med.Chem.Untersuch., 1871, 441, 502, Die Histochemischen und physiologischen Arbeiten, Leipzig, 1897, F.C.W. VOGEL ed. (1).
- MICHELAZZI L., NANNI G. et BALDINI I., Experientia, 1964, 20, 447, (826).
- MICHELSON A.M. et TODD A.R., J.Chem.Soc., 1953, 951; 1954, 34, (57).
- MILMAN L.S., 5ème Congrès International de Biochimie Moscou, Août 1961, Res. des comm., 3, 67, 184, p.76, (239).
- MINAGAWA T., OKAMOTO T., AONO H., UCHIDA A. et MIZUNO N., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 91, 158, (816).
- MITSUI H., ISHAMA A. et OSAWA S., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 76, 401, (366, 869).
- MIRSKY A.E. et POLLISTER A.W., J.Gen.Physiol., 1946, 30, 117, (176).
- MIURA K., KITAMURA T. et KAWADE Y., Biochim.Biophys.Acta, 1958, 27, 420, (76, 80).
- MOLDAVE K. et HEIDELBERGER Ch., J.Amer.Chem.Soc., 1954, 76, 679, (13, 650).
- MONIER R., SHIRO N., HAYES D., HAYES F. et GROS F., J.Mol.Biol., 1962, 5, 311, (122).
- MONIER R., Bull.Soc.Chim.Biol., 1962, 44, 109, (159, 894).
- MONTAGNIER L. et SANDERS F.K., Nature, 1963, 199, 664, (909).
- MONTREUIL J. et BOULANGER P., C.R.Acad.Sci., 1950, 231, 247, (393, 484).
- MONTREUIL J., Etude sur les Acides pentose-nucléiques - Thèse Université, Lille, Faculté des Sciences, 1952, (335, 393, 458, 492).

- MONTREUIL J. et BOULANGER P., C.R.Acad.Sci., 1954, 239, 367, (509, 790).
- MONTREUIL J. et MASSE L., Résultats non publiés (810).
- MONTREUIL J., Communication personnelle, 1956, (489).
- MONTREUIL J., DERUMEZ P., BOULANGER P., C.R. Acad.Sci., 1960, 251 3100, (561, 570, 574).
- MONTREUIL J., DUPONT A., DEMAILLE A. et DRIESSENS J., C.R.Soc. Biol., 1960, 154, 2079, (786, 807, 813).
- MONTREUIL J. et SEGARD E., C.R.Acad.Sci., 1961, 252, 4217, (204).
- MONTREUIL J., DERUMEZ P. et BOULANGER P., C.R.Acad.Sci., 1962, 254, 4516, (512, 790).
- MORISAWA S. et CHARGAFF E., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 68, 147, (384, 474).
- MORTREUIL M. et KHOUVINE Y., Bull.Soc.Chim.Biol., 1956, 38, 951, (695).
- MORTREUIL M., DUPLAN J.F. et KHOUVINE Y., Bull.Soc.Chim.Biol., 1957, 39, 151, (695).
- MORTREUIL M. et KHOUVINE Y., Bull.Soc.Chim.Biol., 1957, 39, 161, (359, 715).
- MOULE Y., J.Physiol., 1953, 45, 204, (504).
- MOULE Y., CHAUVEAU J. et BOUVET C., 5ème Congrès International de Biochimie, Moscou, 1961, Res. des comm., 3, 70, 2072, p.77, (776).
- MUNRO H.N. et MUCKERJI F., Biochem.J., 1958, 69, 321, (149).
- MUNRO A.J. et KORNER A., Nature, 1964, 201, 1194, (873).
- MUNRO A.J., JACKSON R.J. et KORNER A., Biochem.J., 1964, 92, 289, (95).
- MURAMATSU M., HODNETT J.L. et BUSCH H., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 91, 592, (885).
- MURAMATSU M. et BUSCH H., Cancer Research, 1964, 24, 1028, (858).
- MYRBACK K. et JORPES E., Z.Physiol.Chem., 1935, 237, 159, (70).
- NAKATA A., SEKIGUCHI M. et KAWAMATA J., Nature, 1961, 189, 246, (625).
- NAORA H., NAORA H. et BRACHET J., J.Gen.Physiol., 1960, 43, 1083, (801).
- NIKLAS A. et OEHLERT W., Beitr.Pathol.Anat.u.allgen.Pathol., 1956, 116, 92, (23).
- NASS S., NASS M.M.K. et HENNIX U., Biochim.Biophys.Acta, 1965, 95, 426, (10).

- NIRENBERG M.W. et MATTHAEI J.M., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1961, 47, 1958. 5ème Congrès Intern.Biochimie Moscou 1961, communic. 2, 115, et 1, 245 (161).
- NISHIMURA S. et NOVELLI G.D., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 80, 340, (641).
- NISHIYAMA K., OKAMOTO T., WATANABE I., Biochim.Biophys.Acta, 1961, 47, 193, (133).
- NOGUCHI T. et MIURA Y., J.Biol.Chem., 1956, 233, 635, (745).
- NOMURA M., HALL B.D. et SPIEGELMAN S., J.Mol.Biol., 1960, 2, 306, (368, 837).
- MONOYAMA M. et IKEDA Y., J.Mol.Biol., 1964, 9, 763, (910).
- NOVIKOFF A.B. et POTTER V.R., J.Biol.Chem., 1948, 173, 223, (20).
- OCHOA S., BURMA D.P., KROGER H. et WEILL J.D., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1961, 47, 670, (585).
- OCHOA S., Experientia, 1964, 20, 57, (160).
- OFENGAND E.J., DIECKMANN M. et BERG P., J.Biol.Chem., 1961, 236, 1741, (134).
- OGATA K; SHIMIZU T. et NOHARA H., J.Biol.Chem., 1954, 41, 787, (721).
- OGUR M. et ROSEN G., Arch.Biochem., 1950, 25, 262, (213, 264, 276, 287).
- OGUR M., MINKLER S., LINDEGREN G. et LINDEGREN C.C., Arch.Biochem Biophys., 1952, 40, 175, (283).
- OLMSTED P.S. et VILLEE C.A., J.Biol.Chem., 1955, 212, 179, (353, 555).
- OTA Y. et OSAWA S., Biochim.Biophys.Acta, 1954, 15, 162, (13).
- OSAWA S., TAKATA K. et HOTTA Y., Biochim.Biophys.Acta, 1957, 25, 656, (553, 747).
- OSAWA S., TAKATA K. et HOTTA Y., Biochim.Biophys.Acta, 1958, 28, 271, (367, 553, 747).
- OSAWA S., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 43, 110, (51, 110).
- OTAKA E., HOTTA Y. et OSAWA S., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 35, 267, (83).
- OTAKA E., Exptl.Cell.Res., 1960, 21, 229, (238).
- OTAKA E., OSAWA S., OTA Y., ISHIHAMA A. et MITSUI H., Biochim. Biophys.Acta, 1962, 55, 310, (111, 374).
- PARDEE A.B., SHORE V.G. et PRESTIDGE L.S., Biochim.Biophys.Acta, 1956, 21, 406, (148).
- PARTRIDGE S.M., Biochem.J., 1948, 42, 238, (519).
- PATTERSON E.K. et DACKERMANN M.E., Arch.Biochem.Biophys., 1952, 36, 97, (282).
- PAULING L., ITANO M.A., SINGER S.J. et WELLS I.G., Nature, 1950, 166, 677, (154).
- PENMAN S., SCHERRER K., BECKER Y. et DARNELL J.E., Proc.Natl. Acad.Sci.U.S., 1963, 49, 654, (853).

- PERRY R.P., Réunion à Gembloux de la Sté Belge de Biochimie, 17, 21 Nov., 1959, (806).
- PERRY R.P., Exptl.Cell.Res., 1960, 20, 216, (740).
- PERRY R.P., ERRERA M., HELL A., DURWALD J., J.Biophys.Biochem.Cytol., 1961, 11, 1, (740, 806).
- PERRY R.P., HELL A. et ERRERA M., Biochim.Biophys.Acta, 1961, 49, 47, (806, 891).
- PERRY R.P., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 2179, (879, 892).
- PERRY R.P., Exp.Cell.Res., 1963, 29, 400, (634, 805, 892).
- PETE N., WINTZERITH M., MANDEL L. et MANDEL P., C.R.Acad.Sci., 1964, 258, 5283, (825).
- PHILIPPS G.R. et WEST J., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 91, 416, (228).
- PLAUT W. et RUSTED R.C., J.Biophys.Biochem.Cytol., 1957, 3, 625, Biochim.Biophys.Acta, 1959, 33, 59, (800).
- PLAUT W., Exp.Cell.Res., 1958, suppl.6, 69, (800).
- POGO A.O., BRAVERMAN G. et CHARGAFF E., Biochem.J., 1962, 1, 128, (820).
- PONTIS H.G. et BLUMSON N.L., Biochim.Biophys.Acta, 1958, 27, 618, (355).
- POLLI E., BIANCHESSI M., CORNEO G. et PICCININI P., The Italian Journal of Biochemistry, vol. IX n°3, Mai-Juin, 1960, (773).
- POTTER V.R. et ELVEHJEM C.A., J.Biol.Chem., 1938, 114, 495, (272).
- POTTER J.L. et DOUNCE A.L., Feder.Proc., 1956, 15, 329, (466).
- POTTER J.L. et DOUNCE A.L., J.Amer.Chem.Soc., 1956, 78, 3078, (466).
- PRESCOTT D.M., Exp.Cell.Res., 1957, 12, 196, (735).
- PRESCOTT D.M., J.Biophys.Biochem.Cytol., 1959, 6, 203, (796).
- PRESCOTT D.M., Exptl.Cell.Res., 1960, 19, 29, (796).
- PRESCOTT D.M. et KIMBALL R.F., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1961, 47, 686, (905).
- PRESCOTT D.M., J.Histochem.Cytochem., 1962, 10, 145, (796).
- PRICE W.H., J.Gen.Physiol., 1952, 35, 741, (24).
- PRICE T.D., HUDSON P.B., EISLER L. et FUTTER I., Feder.Proc., 1954, 15, 276, (654, 733).
- QUIRIN C., JACOB M. et MANDEL P., C.R.Acad.Sci., 1964, 258, 6013, (822).
- RALPH R.K. et BELLAMY A.R., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 87, 9, (226).
- RANDERATH K., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 852, (408).
- RANDERATH K., Angew.Chem., 1962, 74, 780 (403).
- RANDERATH K., Thin Layer Chromatography, Verlag Chemie Weinheim an der Bergstrasse and Academic Press, N.Y., 1963, (408).
- RANDERATH K., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 76, 622, (408).
- RANDERATH K., J.Chromatography, 1963, 10, 235, (403).
- RANDERATH K., Experientia, 1964, 20, 406, (408).

- RAUEN H.M., KESTERN H. et KESTERN W., Z.Physiol.Chem., 1960, 321, 139, (623).
- REICH E., FRANKLIN R.M., SHATKIN A.J. et TATUM E.L., Science, 1961, 134, 556, (624).
- REICH E., GOLDBERG I.H., RABINOWITZ M., Nature, 1962, 196, 743; (624).
- REICH E., FRANKLIN R.M., SHATKIN A.J., TATUM E.L., Proc.Natl.Acad. Sci.U.S., 1962, 48, 1238, (633, 804).
- REICHART P., Nature, 1948, 162, 662, (342).
- REICHART P., Acta Chem.Scand., 1949, 3, 422, (673).
- REID E. et STEVENS B.M., Biochem.J., 1957, 67, 262, (765).
- REID J.C. et PRATT A.W., Biochem.Biophys.Res.Communic., 1960, 3, 337, (431).
- REEVES J.E. et MUNRO J., Ind.and Eng.Chem.Anal.Ed., 1940, 12, 551, (443).
- REITER J.M. et LITTLEFIELD J.W., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 80, 562, (902).
- REVEL M., DELEMEN N. et MANDEL P., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 68, 547, (882).
- RICH A., Brookhaven Symposia in Biology, 1959, 12, 17, (461).
- RICH A., Ann. N.Y. Acad.Sci., 1959, 81, 709, (563, 568).
- RICH A., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1960, 46, 1044, (605).
- RICHTER G., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 34, 407, (798).
- RICHTER G. et SENGHER H., Biochim.Biophys.Acta, 1965, 95, 362, (832).
- RÖTTGER B. et FRITZ H.G., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 621, (451).
- RÔ TAE SUK, MURAMATSU M. et BUSCH H., Biochem.Biophys.Res.Communic. 1964, 14, 149, (884).
- ROSSET R. et MONIER R., Biochem.Biophys.Res.Communic., 1963, 10, 195, (893).
- SACHS H., J.Biol.Chem., 1958, 233, 643, (774).
- SACKS J. et SAMARTH KUMUD D., J.Biol.Chem., 1956, 223, 423, (746).
- SAMARINA O.P., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 91, 688, (860).
- SAMIS H.V., WULFF V.J. et FALZONE J.A., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 91, 223, (224, 229).
- SARKAR N.K., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 55, 233, (209).
- SCANNELL J.P., CRESTFIELD A.M. et ALLEN F.W., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 32, 406, (515).
- SCHERRER K. et DARNELL J.E., Biochem.Biophys.Res.Communic., 1962, 7, 486, (255).
- SCHERRER K., LATHAM H. et DARNELL J.E., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1963, 49, 240, (850, 876).

- SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.J., J.Biol.Chem., 1945, 161, 83, (214, 265, 286, 444, 506, 525, 527).
- SCHNEIDER W.C., J.Biol.Chem., 1945, 161, 293, (167, 212, 263, 266, 445).
- SCHNEIDER W.C. et HOGEBOOM G.H., J.Biol.Chem., 1948, 176, 259, J.Biol.Chem., 1950, 183, 123, (785).
- SCHNEIDER W.C. et EDNER H., Experientia, 1955, 11, 491, (310).
- SCHNEIDER J.H. et VAN POTTER R., J.Biol.Chem., 1958, 233, 154, (657).
- SCHNEIDER J.H., J.Biol.Chem., 1959, 234, 2728, (743).
- SCHNEIDER J.H., Biochim.Biophys.Acta, 1961, 47, 107, (743).
- SCHOLTISSEK C., SCHNEIDER J.H., POTTER V.R., Feder.Proc., 1958, 17, 306, (742).
- SCHOLTISSEK C., Biochem.Z., 1960, 332, 458, (742).
- SCHOLTISSEK C., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 499, (895).
- SCHRAMM G., DANNENBERG H., Ber.Chem.Ges., 1944, 77, 53, (267).
- SCHULMAN H.M., BONNER D.M., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 53, (613).
- SCHWEIGER H.G., BRENNER H.J., Exp.Cell.Res., 1960, 20, 617, Biochim.Biophys.Acta, 1961, 51, 50, (802).
- SCOTT, Biochim.Biophys.Acta, 1948, 2, 1, (59).
- SEBRING E.D., SALZMAN N.P., Anal.Biochem., 1964, 8, 126, (232, 421).
- SEGOVIA Z.M.M., SOKOL F., GRAVES I.L., ACKERMANN W.W., Biochim.Biophys.Acta., 1965, 95, 329, (225).
- SEKIGUCHI M., SIBATANI A., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 34, 444, (656).
- SEKIGUCHI M., COHEN S.S., J.Mol.Biol., 1964, 8, 638, (906).
- SELA M., ANFINSEN C.B., HARRINGTON W.F., Biochim.Biophys.Acta, 1957, 26, 502, (198).
- SEVAG M.G., LACKMAN D.B., SMOLENS J., J.Biol.Chem., 1938, 124, 425, (183).
- SEVAG M.G., SMOLENS J., LACKMAN D.B., J.Biol.Chem., 1940, 134, 523, (270).
- SHIGEURA H.T., CHARGAFF E., Biochim.Biophys.Acta, 1957, 24, 450, (760, 775).
- SHIGEURA H.T., CHARGAFF E., Biochim.Biophys.Acta, 1958, 30, 434, (777).
- SHIGEURA H.T., CHARGAFF E., J.Biol.Chem., 1958, 233, 197, (775).
- SIBATANI A., Biochem.J., 1956, 64, 12P, (681, 690).

- SIBATANI A., Biochim.Biophys.Acta., 1957, 25, 592, (681, 690).
- SIBATANI A., Exptl.Cell.Res., 1959, 17, 131, (234).
- SIBATANI A., YAMANA K., KIMURA K., OKAGAKI H., Biochim.Biophys. Acta, 1959, 33, 590, (234, 241).
- SIBATANI A., YAMANA K., KIMURA K., TAKAHASHI T., Nature, 1960, 186, 215, (234, 756, 778).
- SIBATANI A., DE KLOET S.R., ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., Proc.Natl. Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 471, (246, 251, 370, 846).
- SINGER M.F., CANTONI G.L., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 39, 182, (383).
- SINGER B., FRAENKEL-CONRAT H., Virology, 1961, 14, 59, (210).
- SINGH V.N., KOPPELMAN R., EVANS E.A., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 516, (888).
- SINSHEIMER R.L., LAWRENCE M., J.Mol.Biol., 1964, 8, 289, (610).
- SIRLIN J.L., Exp.Cell.Res., 1960, 19, 177, (737).
- SISKEN J.E., Exp.Cell.Res., 1959, 16, 602, (903).
- SMELLIE R.M.S., DAVIDSON J.N., Biochem.J., 1951, 49, Proceedings XV, (645).
- SMELLIE R.M.S., McINDOE W.M., Biochem.J., 1952, 52, Proceedings XXII, (714).
- SMELLIE R.M.S., McINDOE W.M., DAVIDSON J.N., Biochim.Biophys.Acta, 1953, 11, 559, (680, 720, 764, 771).
- SMELLIE R.M.S., McINDOE W.M., LOGAN R., DAVIDSON J.N., Biochem.J., 1953, 54, 280, (412, 649, 652, 689, 714, 761).
- SMELLIE R.M.S., HUMPHREY G.F., KAY E.R.M., DAVIDSON J.N., Biochem. J., 1955, 60, 177, (706).
- SMELLIE R.M., Arch.Biochem.Biophys., 1959, 85, 557, (402).
- SMITH J.D., MARKHAM R., Biochem.J., 1950, 46, 509, (303, 318).
- SMITH K.C., ALLEN F.W., J.Amer.Chem.Soc., 1953, 75, 2131, (463).
- SMITH J.D., in The Nucleic Acids, 1955, 1, 267, CHARGAFF et DAVIDSON J.N., ed., Academic Press, N.Y., (410).
- SMITH J.D., DUNN D.B., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 31, 573, (472).
- SMITH K.C., CORDES E., SCHWEET R.S., Biochim.Biophys.Acta, 1959, 33, 286, (137).
- SMITH K.C., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 40, 360, (84, 86).
- SMITH K.C., REBHUN S., KAPLAN H.S., Anal.Biochem., 1960, 1, 202, (112, 419).
- SPIEGELMAN S., C.R. 3ème Congrès Intern.Bioch. Bruxelles, 1956, p.185, Acad.Press.N.Y., (33).

- SPIEGELMAN S., HALL B.D., STORCK R., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1961, 47, 1135, (612).
- SPIEGELMAN S., Feder.Proc., 1963, 22, 36, (636, 640).
- SPIRIN A.S., BELOZERSKY A.N., SHUGAYEVA N.V., Biokhimiya, 1957, 22, 744, (620).
- SPIRIN A.S., BELOZERSKY A.N., Biokhimiya, 1958, 23, 154, (621).
- SPIRIN A.S., in Progress in Nucleic Acid Res., 1963, 1, 301, DAVIDSON J.N. et COHN W.E., ed., Academic Press., (90, 96).
- SRINIVASAN P.R., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 526, (371, 862).
- SRINIVASAN P.R., MILLER-FAURES A., BRUNFAUT M., ERRERA M., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 209, (809).
- SRIPATI C.E., Bull.Soc.Chim.Biol., 1964, 46, 214, (293).
- STAEBELIN M., in Progress in Nucleic Acid Res., DAVIDSON J.N. et COHN W.E., ed., Academic Press, 1963, 2, 169, (107, 582).
- STEELE W.J., OKAMURA N., BUSCH H., Biochim.Biophys. Acta, 1964, 87, 490, (292).
- STENT C.S., J.Gen.Physiol., 1955, 38, 853, Virology, 1956, 2, 737, Adv.Virus.Res., 1958, 5, 95, (564, 569).
- STEUDEL H., Z.Physiol.Chem., 1936, 241, 84, (336, 477).
- STEVENS A., Biochem.Biophys.Res.Comm., 1960, 3, 92, (584).
- STEVENS A., J.Biol.Chem., 1961, 236, PC 43, (600).
- STRICKLAND R.P., Can.J.of Med.Sci., 1952, 30, 484, (670).
- SUEOKA N., YAMANA T., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 1454, (1179).
- SUEOKA N., CHENG T.Y., J.Mol.Biol., 1962, 4, 161, (120).
- SUIT J.C., J.Bactériol., 1962, 84, 1061, Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 488, (841).
- SWICK R.W., KOCH A.L., TAHARA D.M., Feder.Proc., 1955, 14, 149, (685).
- SZAFARZ D., PATERNOTTE C., Bull.Soc.Chim.Biol., 1951, 33, 1518, (341).
- TADA M., SCHWEIGER M., ZACHAU H.G., Hoppe Seyler's, 1962, 328, 1-2, 1, (129).
- TAKAI M., KONDO N., OSAWA S., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 55, 416, (118, 121, 844).
- TAMAOKI T., MUELLER G.C., Biochem.Biophys.Res.Comm., 1962, 9, 451, (880).
- TANAKA K., RICHARDS H.H., CANTONI G.L., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 846, (141).
- TAYLOR J.H., McMASTER R.D., CALUYA M.F., Exptl.Cell.Res., 1955, 9, 460, (728).
- TAYLOR J.H., Am.J.Botany., 1958, 45, 123, (904).
-
- * STAEBELIN M., SCHWEIGER M., ZACHAU H.G., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 68, 129, (131).

- TEIICHI M., WAGNER B., STRAUSS B., Arch.Biochem.Biophys., 1959, 80, 442, (285).
- TERROINE E.F., C.N.R.S. 1960, "Le métabolisme nucléique" (665).
- THOMAS R., Arch.Intern.Physiol., 1956, 64, 539, (31).
- TOCCHINI-VALENTINI G.P., STODOLSKY M., AURISICCHIO A., SARNAT M., GRAZIOSI F., WEISS S.B., GEIDUSCHEK E.P., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1963, 50, 935, (830).
- TOTTER J.R., VOLKIN E., CARTER C.E., J.Am.Chem.Soc., 1951, 73, 1521, (658, 682).
- TOTTER J.R., J.Am.Chem.Soc., 1954, 76, 2196, (682).
- TRAVAGLINI E.C., MELONI M.L., Biochem.Biophys.Res.Comm., 1962, 7, 162, (187).
- TREVELYAN W.E., PROCTOR D.P., HARRISON J.S., Nature, 1950, 166, 444, (521).
- TRIA, BARNABEI O. NATURE 1963 197 598 (165)
- TSANEV R., MARKOV G.G., Biokhimiya, 1960, 25, 151, (288).
- TSANEV R., MARKOV G.G., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 42, 442, (288, 430).
- TS'O P.O.P., SATO C.S., J.Biophys.Biochem.Cytol., 1959, 5, 59, (532)
- TSUBOI K.K., STOWELL R.E., Biochim.Biophys.Acta, 1950, 6, 192, (174)
- TYNER E.P., HEIDELBERGER C., LE PAGE G.A., Feder.Proc., 1952, 11, 300, (696, 724, 762).
- TYNER E.P., HEIDELBERGER C., LE PAGE G.A., Cancer Res., 1953, 13, 186, (696, 762, 768).
- VAN POTTER R., RECKNAGEL R.O., HURLBERT R.B., Feder.Proc., 1951, 10, 646, (726).
- VENKATARAMAN P.R., LOWE C.U., Biochem.J., 1959, 72, 430, (290).
- VENKATARAMAN P.R., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 39, 352, (290).
- VENKATARAMAN P.R., Biochim.Biophys.Acta, 1963, 72, 24, (290).
- VERACHTERT H., BASS S.T., WILDER J., HANSEN R.G., Anal.Biochem., 1965, 11, 497, (404).
- VINCENT W.S., Science, 1957, 126, 306, (750).
- VISCHER E., CHARGAFF E., J.Biol.Chem., 1948, 176, 715, (300).
- VISCHER E., MAGASANIK B., CHARGAFF E., Fed.Proc., 1949, 8, 263, (387, 422).
- VOLKIN E., CARTER C.E., J.Amer.Chem.Soc., 1951, 73, 1516, (178, 182, 190, 195, 197, 217, 352).
- VOLKIN E., CARTER C.E., J.Amer.Chem.Soc., 1951, 73, 1519, (352, 644).
- VOLKIN E., ASTRACHAN L., Virology, 1956, 2, 149, (99, 835).

- VOLKIN E., ASTRACHAN L., in "The Chemical Basis of Hérédity"
BALTIMORE Johns HOPKINS Press, 1957, 686, (99, 835).
- VOLKIN E., ASTRACHAN L., COUNTRYMAN J.L., Virology, 1958, 6, 545,
(99, 835).
- VOLKIN E., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1960, 46, 1336, (835).
- VON EHRENSTEIN G., LIPMANN F., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1961, 47,
941, (642).
- WABHA A., GARDNER R.S., BASILIO C., MILLER R.S., SPEYER J.F.,
LENGYEL P., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1963, 49, 116, (162).
- WABHA A.J., MILLER R.S., BASILIO C., GARDNER R.S., LENGYEL P.,
SPEYER J.F., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1963, 49, 880, (162).
- WADE H.E., MORGAN D.M., Biochem.J., 1955, 60, 264, (418).
- WADE H.E., Biochem.J., 1960, 77, 534, (362).
- WARD D.N., GRIFFIN A.C., Cancer Res., Juillet 1955, 15, 456, (648).
- WARNER R.C., SAMUELS H.H., ABBOTT M.T., KRAKOW J.S., Proc.Natl.
Acad.Sci.U.S., 1963, 49, 533, (609).
- WATANABE I., KIHIO Y., Proc.Int.Symp.Enzyme Chem., Tokyo-Kyoto,
1957, p.478, (836).
- WATANABE Y., Biochim.Biophys.Acta, 1965, 95, 515, (911).
- WATSON J.D., CRICK F.H.C., Nature, 1953, 171, 737, (63, 571, 608).
- WATSON J.D., CRICK F.H.C., Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.,
1953, 18, 123, (64).
- WATTS W.J., HARRIS H., Biochem.J., 1959, 72, 147, (679).
- WEED L.L., WILSON D.W., J.Biol.Chem., 1953, 202, 745, (674).
- WEILL J.D., LEDIG M., MANDEL P., Bull.Soc.Chim.Biol., 1956, 38,
81, (399).
- WEILL J.D., LEDIG M., MANDEL P., Biochim.Biophys.Acta, 1956, 20,
430, (821).
- WEILL J.D., LEDIG M., C.R. Soc.Biol., 1957, 151, 1587, (716).
- WEILL J.D., Thèse université de Strasbourg, 1958, Faculté des
Sciences, (218, 262, 337, 399, 481, 541, 542, 711, 811).
- WEILL J.D., BUSCH S., CHAMBON P., MANDEL P., Biochem.Biophys.
Res.Comm., 1963, 10, 122, (591).
- WEISS S.B., GLADSTONE L., J.Amer.Chem.Soc., 1959, 81, 4118, (587).
- WEISS S.B., NAKAMOTO T., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1961, 47, 694,
et 1400, (599).
- WEISS S.B., Feder.Proc., 1962, 21, 120, (617).
- WELLING W., BOOTSMA D., VAN MUISWINKEL E., BERGHEGEN C.A.P.,
Biochim.Biophys.Acta, 1965, 95, 262, (859).

- WERKHEISER W.C., WINZLER R.J., J.Biol.Chem., 1953, 204, 971, (258, 333, 415, 543, 545).
- WIDNELL C.C., TATA J.R., Biochim.Biophys.Acta, 1964, 87, 531, (886).
- WIESMEYER H., KJELLIN K., BOMAN H.G., Biochim.Biophys.Acta, 1962, 61, 625, (130).
- WILKINS M.F.H., STOKES A.R., WILSON H.R., Nature, 1953, 171, 738, (60).
- WILKINS M.H.F., RANDALL J.T., Biochim.Biophys.Acta, 1953, 10, 192, (61).
- WILKINS M.H.F., Science, 1963, 140, 941, (577).
- WINTZERITH M., MANDEL L., C.R.Soc.Biol., 1957, 151, 2199, (694).
- WOODS P.S., TAYLOR J.H., J.Labo.Invest., 1959, 8, 309, (738).
- WYATT G.R., Biochem.J., 1951, 48, 584, (65, 317, 330).
- WYATT G.R., J.Gen.Physiol., 1952, 36, 201, (65).
- YAMANA Y., SIBATANI A., Biochim.Biophys.Acta, 1960, 41, 295, (236, 364, 560).
- YANOFSKY C., in "Enzymes units of Biological Structure and Function" GAEBLER ed., N.Y., Acad.Press., 1956, p.147, (156)
- YANOFSKY C., Bact.Rev., 1961, 24, 221, (156).
- YANOFSKY J.A., SPIEGELMAN S., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 1069, (637).
- YANOFSKY C., in "Methodology in Basic Genetics" BURDETTE ed. SAN FRANCISCO, 1963, p.303, (156).
- YCAS M., VINCENT W.S., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1960, 46, 804, (839).
- YOSHIKAWA M., FUKADA T., KAWADE Y., Biochem.Biophys.Res.Comm., 1964, 15, 22, (854, 872).
- YU C.T., ALLEN F.W., Biochem.Biophys.Acta, 1959, 32, 393, (514).
- ZACHAU H.G., TADA M., LAWSON W.B., SCHWEIGER M., Biochem.Biophys. Acta, 1961, 53, 221, (128).
- ZALOKAR M., Nature, 1959, 183, 1330, Exp.Cell.Res., 1960, 19, 114, (736).
- ZAMECNIK P.C., in "Cold Spring Harbor Symp.on Quant.Biol.", 1947, 12, (166).
- ZUBAY G., Nature, 1958, 182, 112, (565).
- ZUBAY G., Nature, 1958, 182, 1290, (566).
- ZUBAY G., WILKINS M.H.F., J.Mol.Biol., 1960, 2, 105, (580).
- ZUBAY G., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1962, 48, 456, (566).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

<u>CHAPITRE I</u>	:	<u>GENERALITES</u>	3
I -		<u>IMPORTANCE DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	4
II -		<u>PHYSICO CHIMIE DES ACIDES NUCLEIQUES</u> ...	8
		A) <u>LES CONSTITUANTS</u>	8
		1 ^o) Les produits d'hydrolyse totale .	8
		a) Les bases	8
		Composants mineurs	10
		b) Les glucides	12
		c) L'acide phosphorique	12
		2 ^o) Les produits d'hydrolyse partielle	12
		a) Les nucléosides	12
		b) Les nucléotides	14
		B) <u>LES ACIDES NUCLEIQUES</u>	18
		1 ^o) Les acides désoxyribonucléiques (ADN)	18
		2 ^o) Les acides ribonucléiques (ARN)	22
		1) Structure des ARN	22
		2) Hétérogénéité des ARN	23
		a) ARN solubles (ARN.S)	26
		b) ARN ribosomaux (ARN.R) ...	28
		c) ARN messagers (ARN.m)	31
		3 ^o) Fractionnement des ARN	33
III -		<u>METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	36
		A) <u>SYNTHESE DES NUCLEOTIDES</u>	36
		1 ^o) Synthèse des nucléotides à partir des précurseurs non nucléiques (synthèse de novo)	38

a) Synthèse de novo des ribonucléotides puriques	38
b) Synthèse de novo des ribonucléotides pyrimidiques	38
2°) Synthèse des nucléotides à partir des précurseurs d'origine nucléique	38
a) Formation des nucléotides à partir des nucléosides	42
b) Formation des nucléotides à partir des bases	42
B) <u>BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	45
1°) Biosynthèse des acides désoxyribonucléiques	45
2°) Biosynthèse des acides ribonucléiques	47
a) Polymérisation à partir des nucléosides diphosphates sous l'action de la polynucléotide phosphorylase	47
b) Formation des séquences ribonucléotidiques spécifiques sous l'action de l'ARN polymérase .	48
<u>CONCLUSIONS</u>	51
IV - <u>BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET BIOCHIMIE DE L'HEREDITE ET DE LA MITOSE</u>	52
A) <u>BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET BIOCHIMIE DE L'HEREDITE</u>	52
1°) La théorie "un gène un enzyme"	52
2°) Biosynthèse des protéines spécifiques	53
a) Synthèses ribosomales des protéines	55
Contrôle génétique de la biosynthèse des protéines	56
b) Système protéosynthétique de HENDLER	60
B) <u>ACIDES NUCLEIQUES - SYNTHESE DES PROTEINES ET MITOSE</u>	62
<u>CONCLUSIONS</u>	64

<u>CHAPITRE II</u>	: <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES</u>	
	<u>ACIDES RIBONUCLEIQUES</u>	65
	<u>HISTORIQUE</u>	
I -	<u>PREPARATION DES ARN</u>	67
A)	<u>ISOLEMENT DES ARN PURS</u>	67
1 ^o)	Méthodes anciennes	67
a)	Extraction directe des ARN	67
b)	Préparation et dissociation des ribonucléoprotéides	68
	- Procédé de KERR et SERAIDARIAN	68
	- Procédé de VOLKIN et CARTER ..	68
	- Procédé de KAY et DOUNCE	69
2 ^o)	Méthode "au phénol"	69
3 ^o)	Méthode de TRAVAGLINI et MELONI	70
	<u>CRITIQUE DES METHODES D'ISOLEMENT DES</u>	
	<u>ARN</u>	70
	- Dégradation des ARN	72
	- Pertes d'ARN au cours de l'extrac- tion	71
	Applications de la méthode de KIRBY	77
	<u>CONCLUSIONS</u>	79
B)	<u>PREPARATION DES TISSUS EN VUE DE L'ETUDE</u> <u>DES ARN SANS ISOLEMENT PREALABLE</u>	79
1 ^o)	Procédé de SCHNEIDER	79
2 ^o)	Procédé d'OGUR et ROSEN	81
3 ^o)	Procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER ..	82
	<u>CONCLUSIONS</u>	83
II -	<u>PROCEDES DE DETERMINATION DE LA COMPOSITION</u> <u>MOLAIRE DES ARN</u>	84
A)	<u>DETERMINATION DES RAPPORTS MOLAIRES DES</u> <u>BASES CONSTITUANT LES ARN</u>	84

1°) Hydrolyse des ARN et libération des bases	85
2°) Séparation des bases	86
3°) Dosage des bases	87
B) <u>DETERMINATION DES RAPPORTS MOLAIRES DES NUCLEOSIDES DES ARN</u>	88
1°) Préparation des nucléosides	88
2°) Séparation des nucléosides	89
3°) Dosage des nucléosides	89
C) <u>DETERMINATION DES RAPPORTS MOLAIRES DES NUCLEOTIDES DES ARN</u>	90
1°) Hydrolyse des ARN en nucléotides	90
2°) Séparation des nucléotides	91
1) Chromatographie sur colonne	91
2) Chromatographie sur papier	96
3) Chromatographie en couche mince ...	98
4) Electrophorèse	99
3°) Dosage des nucléotides	100
Discussion	102
III - CONCLUSIONS	103

TRAVAUX PERSONNELS

I - <u>TECHNIQUES</u>	105
A) <u>PREPARATION DES TISSUS</u>	105
B) <u>HYDROLYSE ALCALINE</u>	106
1°) Choix de la méthode d'hydrolyse	107
a) Action des alcalis sur les nucléotides aminés	107
b) "Quantitativité" de l'hydrolyse alcaline	111
c) Application à un ARN tissulaire .	117

2°) Conclusions générales	119
C) <u>PURIFICATION DES HYDROLYSATS</u>	119
1°) Choix de la résine	121
2°) Choix de la solution d'élution	121
Conclusions	123
D) <u>CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE SUR</u>	
<u>PAPIER DES RIBONUCLEOTIDES</u>	124
1°) Dissolution des nucléotides	124
2°) Séparation des nucléotides par chroma- tographie sur papier	127
3°) Séparation électrophorétique des nucléotides	128
E) <u>DOSAGE DES NUCLEOTIDES</u>	129
1°) Dosage du phosphore des nucléotides séparés par chromatographie sur papier	129
2°) Dosage des nucléotides séparés par électrophorèse	129
F) <u>VERIFICATION DE LA PURETE DES NUCLEOTIDES</u>	
<u>SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE</u>	
<u>SUR PAPIER</u>	130
1°) Pureté des nucléotides séparés par chromatographie sur papier	130
2°) Pureté des nucléotides séparés par électrophorèse sur papier	132
G) <u>LES COMPOSES PHOSPHORES NON NUCLEOTIDIQUES</u>	
<u>DE LA "FRACTION ARN" DE SCHMIDT et</u>	
<u>THANNHAUSER</u>	137
1°) Isolement des constituants de la tache X	138
2°) Identification de l'acide pseudo- uridylique	138
3°) Identification de l'acide glycérophosphorique	141
4°) Localisation des composés phosphorylés non nucléotidiques sur les électro- phorégrammes	142

5°)	Signification des composés phosphorés non nucléotidiques dans la "fraction ARN" des tissus	144
	Conclusions	146
H -	<u>PROTOCOLE EXPERIMENTAL</u>	147
1°)	Traitement des tissus	147
2°)	Hydrolyse sodique	148
3°)	Purification sur échangeur de cations	148
4°)	Séparations chromatographique et électrophorétique	148
5°)	Dosage des nucléotides	150
II -	<u>RESULTATS ET OBSERVATIONS</u>	151
1°)	Composition des ARN du foie de rat ...	151
2°)	Composition des ARN des différents tissus	154
3°)	Relation entre la composition des ARN totaux et celle des ADN totaux	155
4°)	Structure de l'ARN	160
III -	<u>DISCUSSION</u>	161
1°)	Rôle de l'ADN dans la synthèse des ARN	161
2°)	Synthèse des différentes classes d'ARN	164
	CONCLUSIONS	166
<u>CHAPITRE III : ETUDE DE L'INCORPORATION D'UN PRECURSEUR MARQUE DANS LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ...</u>		167
<u>HISTORIQUE</u>		
I -	<u>VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES DIFFERENTS RIBOMONONUCLEOTIDES</u>	169
II -	<u>VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES ARN DES DIFFERENTES FRACTIONS CELLULAIRES</u>	173
1°)	Noyau cellulaire	173

2°) Suc cellulaire	176
3°) Particules cytoplasmiques	177
CONCLUSIONS	178

TRAVAUX PERSONNELS

I - <u>MODE OPERATOIRE</u>	181
1°) Animaux d'expériences	181
2°) Fractionnement cellulaire	181
3°) Préparation et séparation des ribomono- nucléotides	183
4°) Détermination des radioactivités spé- cifiques des nucléotides	184
5°) Vérification de la pureté des nucléotides	186
6°) Identification du "spot X"	187
II - <u>RESULTATS</u>	191
1°) Radioactivité des ARN nucléaires	191
2°) Radioactivité des ARN du suc cellu- laire	191
3°) Radioactivité des ARN des granules cytoplasmiques	191
4°) Radioactivité comparée du "spot X" ...	191
5°) Radioactivité des différents nucléo- tides	191
III - <u>DISCUSSION</u>	196
1°) Radioactivité des ARN nucléaires	196
2°) Radioactivité des ARN du suc cellu- laire	197
3°) Radioactivité des granules cytoplas- miques	198
4°) Radioactivité comparée du "Spot X" ...	198
5°) Radioactivité des différents nucléotides	199
<u>CONCLUSION</u>	201

<u>CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE</u>	203
I - <u>MISE EN EVIDENCE d'ARN MESSAGERS</u>	208
II - <u>SYNTHESE DES ARN RIBOSOMAux</u>	217
1 ^o) Origine des ARN ribosomAux	217
2 ^o) Migration dans le cytoplasme des ARN ribosomAux nucléaires	219
III - <u>SYNTHESE DES ARN SOLUBLES</u>	220
IV - <u>MECANISME DE SYNTHESE DES ARN</u>	221
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	224

