

50376
1966
27

Ex du du pêt

50376
1966
27

No 67

UNIVERSITÉ DE LILLE - Faculté des Sciences

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

(mention : Sciences)



par VELIBOR KRSMANOVIC

Le 26 février 1966

1 ère Thèse : "Synthèse des acides nucléiques, in vitro, dans les noyaux isolés de cellules HeLa"

2 ème Thèse : Propositions données par la Faculté
«Structure macromoléculaire des acides ribonucléiques»

JURY

M. J. MONTREUIL	Président
M. G. BISERTE	Examineur
M. E. SEGARD	Examineur
M. M. ERRERA	Membre invité

UNIVERSITE DE LILLE.

FACULTE DES SCIENCES.

DOYENS HONORAIRES :

MM. PRUVOST, LEFEBVRE, PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ARNOULT, BEGHIN, CAU, CHAPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, GERMAIN, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL,
NORMANT, PRISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU,
ROUBINE, WIEMANN, ZAMANSKY, KAMPE DE FERRET.

DOYEN :

Monsieur TILLIEU, Professeur de Physique

ASSESSEURS :

MM. DURCHON	Professeur de Zoologie
HEUBEL	Professeur de Chimie Minérale

PROFESSEURS :

MM. BACCHUS	Astronomie Calcul Numérique
BECART	Physique
BERKER	Mécanique des Fluides
BLOCH	Psychophysiologie
BONNEMAN-BEMIA	Chimie et Physico-Chimie Industrielles
BONTE	Géologie appliquée
BOUGHON	Mathématiques

MM.	BOUISSET	Physiologie animale
	BOURIQUET	Botanique
	CELET	Géologie
	CORSIN	Paléobotanique
	DECUYPER	Mathématiques
	DEDEKER	Professeur associé de Mathématiques
	DEFRETIN	Biologie marine
	DEHORS	Physique Industrielle
	DELATRE	Géologie
	DELEAU	Géologie
	DELHAYE	Chimie Minérale
	DESCOMBES	Calcul différentiel et intégral
	GABILLARD	Radioélectricité et Electronique
	GERMAIN	Chimie Générale et Chimie Organique
	GLACET	Chimie
	GONTIER	Mécanique des Fluides
	HEIM DE BALZAC	Zoologie
	HOCQUETTE	Botanique générale et Appliquée
	LEBEGUE	Botanique
Mme	LEBEGUE	Physique
	LEBRUN	Radioélectricité et Electronique
Mlle	LENOBLE	Physique
MM.	LIEBART	Radioélectricité
	LINDER	Botanique
	LUCQUIN	Chimie Minérale
	MARION	Chimie
Mlle	MARQUET	Mathématiques
MM.	MARTINOT-LAGARDE	Mécanique des Fluides
	MAUREL	Chimie
	MENESSIER	Géologie
	MONTREUIL	Chimie Biologie
	PARREAU	Mathématiques
	PEREZ	Physique Expérimentale
	PHAM MAU QUAN	Mécanique rationnelle et expérimentale
	POUZET	Calcul Numérique
	PROUVOST	Géologie
	SAVARD	Chimie Générale
	SCHALLER	Zoologie
	SCHILTZ	Physique
Mme	SCHWARTZ	Analyse supérieure
MM.	TRIDOT	Chimie
	VIVIER	Biologie animale
	WATERLOT	Géologie et Minéralogie
	WERTHEIMER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES :

MM.	BEAUFILS	Chimie appliquée
	BLANCHARD	Chimie Générale
	BOILLET	Physique
	BUI TRONG LIEU	Mathématiques
	CHASTRETTE	Chimie Générale
	COMBET	Mathématiques
	CONSTANT	Physique
	DERCOURT	Géologie et Minéralogie
	DEVRAINNE	Chimie Minérale
Mme	DRAN	Chimie Appliquée
MM.	FOATA	Mathématiques
	FOURET	Physique
	GAVORET	Physique
	HERZ	Mathématiques
	HUARD DE LA MARRE	Calcul Numérique
	LACOMBE	Mathématiques
	MAES	Physique
	MCNTARIOI	Chimie
	MCRIAMEZ	Physique
	MOUVIER	Chimie
	NGUYEN PHONG CHAU	Physique
	PANET	Electromécanique
	RAUZY	Mathématiques
	SAADA	Physique
	SEGARD	Chimie Biologique
	TUDO	Chimie Minérale Appliquée
	VAZART	Botanique
	VAILLANT	Mathématiques
	VIDAL	Physique Industrielle

SECRETARE GENERAL, ATTACHE PRINCIPAL :

Monsieur LEGROS

ATTACHES D'ADMINISTRATION :

Messieurs COLLIGNON
FACON
JANS
LEROY

Nous tenons à exprimer ici notre respectueuse
gratitude envers MM. les Professeurs J. MONTREUIL, G. BISERTE,
M. ERRERA et E. SEGARD qui ont bien voulu juger notre travail.

Nos remerciements chaleureux vont à nos maîtres Messieurs les Professeurs M. ERRERA et D. KANAZIR dont les conseils et l'aide constants nous ont permis d'effectuer ce travail.

Nous remercions très vivement aussi Messieurs les Professeurs P. BOULANGER et J. MONTREUIL qui ont bien voulu appuyer notre demande en vue de présenter une thèse de doctorat à l'Université de Lille.

Il nous est agréable de remercier Monsieur le Professeur LONCIN qui a dirigé nos études à l'Institut Maurice-Chimie - C.E R.I.A.

Notre reconnaissance va aussi à Monsieur Segard dont les conseils nous ont été particulièrement utiles lors de la rédaction.

Ce travail a pu être réalisé grâce aux encouragements que Draga nous a prodigués si souvent.

Enfin que tous les membres du laboratoire trouvent ici le témoignage de notre gratitude pour leur collaboration.

A B R E V I A T I O N S U T I L I S E E S

A : adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARN - m : acide ribonucléique messenger
ARN - r : acide ribonucléique ribosomal
ARN - s : acide ribonucléique soluble
CPM : coups par minute
C : cytosine
DN-ase : désoxyribonucléase
D.O.₂₆₀ : densité optique à 260 *mμ*
E. coli : Escherichia coli
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
G : guanine
mC : millicurie
PCA : acide perchlorique
RN-ase : ribonucléase
SDS : dodecylsulfate de sodium
TCA : acide trichloracétique
T : thymine
tm : tours par minute
U : uracile
μC : microcurie

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

	Pages
1. G E N E R A L I T E S	1
1.1. <u>L'ADN - PORTEUR DE L'INFORMATION</u>	2
1.1.1. STRUCTURE ET CARACTERISTIQUES PHYSICO- CHIMIQUES	2
1.1.2. ROLE	4
1.2. <u>L'ARN-m ET LA TRANSCRIPTION</u>	8
1.3. <u>L'ARN-m ET LA TRADUCTION</u>	15
1.4. <u>SYNTHESE DE L'ARN DANS LES CELLULES DE MAMMIFERES</u>	19
1.5. <u>SYNTHESE IN VITRO DE L'ARN DANS LES NOYAUX ISOLES</u>	24
1.5.1. MECANISME DE SYNTHESE	24
1.5.2. PROCEDES D'ISOLEMENT DES NOYAUX METABOLIQUEMENT ACTIFS	25

	Pages
2. TRAVAUX PERSONNELS	30
2.1. <u>ETUDES PRELIMINAIRES PAR DOSAGES BIOCHIMIQUES, DE L'INCORPORATION IN VITRO DE PRECURSEURS RADIO-ACTIFS DE L'ARN DANS LES NOYAUX ISOLES.</u>	31
2.1.1. MATERIEL ET METHODES	31
A. <u>Cellules de HeLa</u>	31
B. <u>Extraction des noyaux d'après la technique de Fisher et Harris</u>	32
C. <u>Extraction des noyaux d'après la technique d'Allfrey et al.</u>	32
D. <u>Incubation des noyaux</u>	33
E. <u>Dosage des acides nucléiques</u>	34
F. <u>Le comptage de la radioactivité</u>	35
2.1.2. INCORPORATION DE CYTIDINE- ³ H DANS LES NOYAUX ISOLES	36
2.1.3. COMPARAISON DE L'ACTIVITE IN VITRO DES NOYAUX ISOLES AVEC CELLES DES CELLULES ENTIERES.	39
2.1.4. CORRECTION DE LA RADIOACTIVITE "DE FOND"	40
2.1.5. TENTATIVES D'AMELIORATION DE L'INCORPORATION DES NUCLEOSIDES MARQUES	41
A. <u>Milieu enrichi</u>	41
B. <u>Conditions de pH.</u>	42
C. <u>Concentration optimale de la suspension</u>	42
2.1.6. CARACTERISATION DE LA SYNTHESE DES ARN DEPENDANT DE L'ADN.	42

	pages
2.1.7. REDUCTION DE LA DUREE D'ISOLEMENT DES NOYAUX	43
2.1.8. CONCLUSIONS DE NOTRE ETUDE PRELIMINAIRE	44
2.2. <u>ETUDE, PAR LES METHODES DE FRACTIONNEMENT MACROMOLECULAIRE DE LA SYNTHESE IN VITRO DE L'ARN NOUVELLEMENT FORME, DANS LES NOYAUX ISOLES</u>	45
2.2.1. MATERIEL ET METHODES	
A. <u>Incubation des cellules intactes</u>	45
B. <u>Extraction des noyaux</u>	45
C. <u>Incubation des noyaux</u>	45
D. <u>Extraction de l'ARN par le mélange SDS-phénol</u>	46
E. <u>Extraction des acides nucléiques par le mélange SDS-chloroforme-alcool amylique</u>	46
F. <u>Composition en bases</u>	47
G. <u>Digestions enzymatiques</u>	47
H. <u>Dissociation du complexe au SDS</u>	48
I. <u>Dénaturation du complexe à la chaleur</u>	48
J. <u>Chromatographie sur des colonnes d'Albumine méthylée - Kieselguhr</u>	48
K. <u>Sédimentation en gradient de saccharose</u>	49
L. <u>Centrifugation en gradient de densité (CsCl)</u>	50

	pages
M. <u>Lecture de la densité optique</u>	51
N. <u>Comptage de la radioactivité</u>	51
2.2.2. ETAT PHYSIQUE DE L'ARN NOUVELLEMENT FORME	52
A. <u>Sédimentation en gradient de saccharose</u>	52
B. <u>Chromatographie sur les colonnes d'Albumine méthylée - Kieselguhr</u>	62
C. <u>Centrifugation en gradient de densité (CsCl)</u>	67
2.2.3. PROPRIETES PHYSIQUES ET BIOCHIMIQUES DE L'ARN NOUVELLEMENT FORME	71
A. <u>Ordre de grandeur du poids moléculaire de l'ARN engagé dans le complexe ADN-ARN</u>	71
B. <u>Compositions en bases</u>	77
C. <u>Action de l'actinomycine D sur la syn- thèse de l'ARN dans les noyaux incubés in vitro</u>	79
2.2.4. ETUDE COMPARATIVE DE L'ARN NOUVELLEMENT FORME DANS DES NOYAUX INCUBES IN VITRO ET DES CELLULES DE HeLa INTACTES	81

	pages
3. D I S C U S S I O N E T C O N C L U S I O N S	88
RESUME	93
BIBLIOGRAPHIE	94

1. G E N E R A L I T E S

Brachet (1941) et Caspersson (1941) ont démontré que toute cellule animale possède à la fois de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN). De plus, ils suggéraient qu'il existe une relation entre l'ARN et la synthèse des protéines. Depuis lors, la synthèse protéique et la régulation cellulaire sont activement étudiées.

Des travaux portant sur le mode d'intervention de l'ARN dans la synthèse des protéines, d'une part, et sur l'origine et les caractéristiques de cet ARN, d'autre part, ont conduit les chercheurs à préciser les mécanismes du fonctionnement de la cellule vivante.

On sait aujourd'hui que l'information requise pour la synthèse des protéines spécifiques vient de l'ADN par l'intermédiaire de l'ARN dont la séquence nucléotidique serait, pour une protéine spécifique, complémentaire d'une portion relativement petite, de l'une des hélices de l'ADN. En effet la séquence des acides aminés dans une protéine donnée est déterminée par celle des nucléotides de cet ARN complémentaire, l'ARN messager. L'ADN qui porte l'information est intégralement transmis des cellules-mères aux cellules-filles (continuité génétique).

Nous résumerons donc l'état actuel de nos connaissances concernant ces interrelations ADN - ARN - Protéines.

1.1. L'ADN - PORTEUR DE L'INFORMATION.

1.1.1. STRUCTURE ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES.

En 1953 Watson et Crick s'inspirant de différentes données déjà connues concernant les molécules d'ADN apportent une contribution élégante au problème de leur configuration spatiale : deux chaînes polynucléotiques antiparallèles sont enroulées en forme de double spirale (Fig. 1). Les chaînes sont liées entre elles par l'intermédiaire des bases azotées dont l'association en doublets spécifiques (adénine-thymine et guanine-cytosine) est assurée par des liaisons pont-hydrogène.

Les considérations stéréochimiques suivantes ont amené ces auteurs à proposer cette structure :

a) la nature cristalline de l'ADN, démontrée par la diffraction aux rayons X (Wilkins et al., 1953)

b) les quantités molaires égales d'adénine et de thymine, d'une part, de cytosine et de guanine d'autre part (Chargaff, 1951)

c) l'irréversibilité des courbes de titration (Watson et Crick, 1951)

Par la diffraction aux rayons X, il a été possible de démontrer l'existence du polymorphisme des fibres de l'ADN, fibres dont la configuration varie en fonction du taux d'hydratation. Ces variations spatiales de l'ADN nous suggèrent que les deux chaînes polynucléotidiques peuvent subir un glissement l'une par rapport à l'autre grâce à une certaine liberté que les liaisons hydrogène laissent aux bases. Cependant, il serait difficile d'admettre que c'est uniquement au moyen des ponts hydrogène que l'édifice doit sa rigidité. Il semble en effet que des forces de Van der Waals contribuent de manière primordiale au maintien de cette structure (De Voe et Tinoco, 1962 ; Mahler et Mehrotra, 1962 ; Shugar et Szer, 1962).

Une élévation de la température ou une variation du pH conduit à la dissociation de la double hélice. Cependant les travaux de Thomas (1954 et 1962) ont permis de conclure que la stabilité de l'ADN en présence des ions métalliques ($\text{NaCl } 10^{-2}$

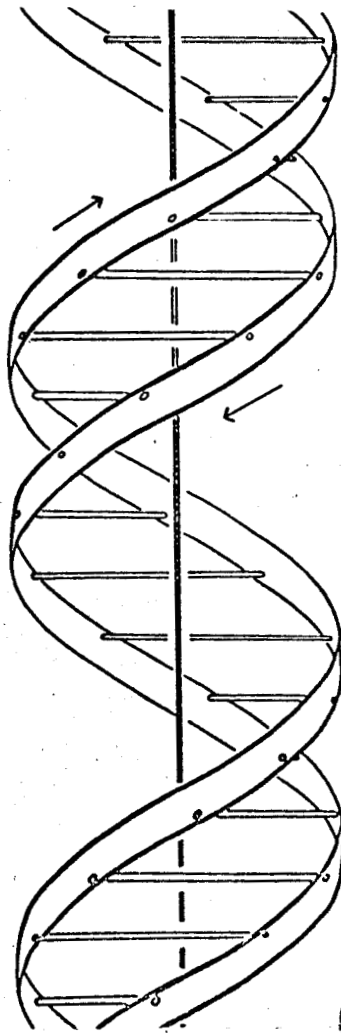


Fig. 1 Schéma de la molécule d'ADN. Les barres horizontales représentent les liaisons pont-hydrogène. La ligne verticale marque l'axe de la fibre.

(D'après Watson et Crick, 1953)

à 1 M) n'est pas altérée même à des températures voisines de 70° C ou à des pH notablement écartés de la neutralité.

BUS
LILLE

Les propriétés chimiques, physiques et biochimiques locales de la molécule d'ADN sont déterminées par les caractéristiques de chacune des bases nucléiques. Il semble qu'il soit possible d'étudier ces caractéristiques d'une manière approximative, les interactions électroniques à travers les liaisons hydrogène étant faibles (Pullman et Pullman, 1961).

1.1.2. ROLE.

A l'état macromoléculaire, l'ADN joue un rôle essentiel dans le mécanisme même de la régulation cellulaire ; il constitue en soi un sujet d'étude extrêmement passionnant, en regard à ses propriétés extraordinaires d'autoduplication d'une part et à sa capacité de former des modèles de synthèse, de l'autre. En effet la molécule d'ADN étant constituée d'une série de n séquences locales de nucléotides (gènes) détermine l'ordre dans lequel s'effectue la transformation d'un métabolite (1, 2, 3, ----- n) (Jacob et Monod, 1961 ; Jacob et Monod, 1964).

Il est permis de croire que les gènes sont disposés en bandes consécutives sur les fibres d'ADN contenues dans le chromosome.

Par ailleurs, dérivant des lois de Mendel, l'étude des mutations de la Mouche *Drosophila melanogaster* effectuée par Morgan et ses collaborateurs (1929) a permis d'établir les cartes chromosomiques indiquant les emplacements des gènes responsables des différents caractères phénotypiques de la mouche. Bridges (voir : Guyenot 1943) a fait la relation à l'aide de technique microscopique entre les cartes déjà établies et certaines variations que l'on pouvait apercevoir sur les chromosomes des glandes salivaires des larves de *Drosophila*.

Dès lors, on pouvait se demander comment se présente l'unité opérationnelle et quel est son mode de fonctionnement. La génétique bactérienne a contribué largement à la progression des connaissances dans ce domaine, grâce aux avantages que présentent les bactéries comme matériel. En effet, les études de mutations (par les expérimentations génétiques et biochimiques) des systèmes répressibles et inductibles chez les bactéries ainsi que les phénomènes de l'expression de fonctions chez les bactériophages ont permis de tracer le schéma du fonctionnement de l'unité opérationnelle (Jacob et Monod 1961). Ainsi par exemple, dans le segment chromosomique unitaire appelé l'opéron, contrôlant l'utilisation du lactose chez *E. Coli*, l'ordre des gènes est le suivant : opérateur (O), Galactosidase (Z) comprenant plusieurs cistrons, galactoside perméase (Y) et galactoside-transacétylase (Ac) (Jacob et Monod 1964).

Les gènes Z, Y et Ac sont les "gènes de structure" qui déterminent respectivement la structure de ces trois enzymes. Récemment on a pu montrer qu'entre le segment opérateur et le début de l'opéron intervient un segment désigné sous le nom de promoteur (Jacob et al. 1964).

Dans un système inductible en l'absence du métabolite inducteur, le represseur produit par le gène régulateur est actif (voir figure 2) ; il inhibe l'opérateur et l'opéron ne produit pas de messenger (le gène régulateur se trouve en dehors de l'opéron et ne doit pas nécessairement être structuralement lié à celui-ci).

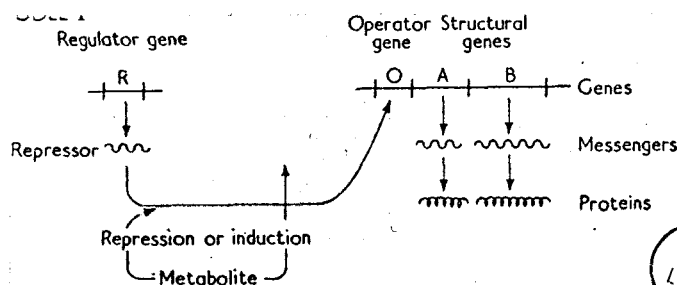


Fig.2 Schéma de la régulation de la synthèse protéique (d'après Jacob et Monod, 1961).



Au contraire, lorsque le métabolite inducteur vient au voisinage immédiat d'une région particulière du répresseur, celui-ci se trouve inhibé par effet allostérique (Monod et al., 1963), ce qui entraîne la production du messenger et, par conséquent, la synthèse des enzymes.

Dans le cas d'un système répressible, en l'absence du produit final d'une suite de transformations métaboliques, le répresseur, produit par le gène régulateur n'affecte aucunement la synthèse du messenger. Le produit final réagit avec le répresseur et l'active par allostérie, ce qui entraîne l'inhibition de l'expression de l'opéron entier et, par conséquent la synthèse des enzymes. Mais le produit terminal peut également modifier la conformation (l'allostérie) du premier enzyme de la séquence et le rendre inapte à intervenir catalytiquement. Ici nous sommes amenés à remarquer un double contrôle de l'activité enzymatique (Jacob et Monod, 1964).

Cependant, les cellules des organismes supérieurs montrent quelques particularités. Ainsi par exemple, les cellules humaines quelles que soient leurs fonctions possèdent probablement toutes la possibilité de programmer la même information génétique puisque les études microscopiques (Tijo et Levan, 1956) ont montré que le nombre et la forme des chromosomes étaient les mêmes quel que soit l'organe ou le tissu. Et pourtant les cellules d'un tissu ont une activité métabolique caractéristique du type histologique considéré.

En 1950 Stedman avait émis l'hypothèse selon laquelle la régulation de l'activité des gènes serait réalisée au moyen des protéines basiques, les histones. Cette hypothèse a reçu plus récemment une confirmation expérimentale car différents auteurs ont remarqué que la synthèse de l'ADN pouvait être inhibée in vitro en présence d'histones (Huang et Bonner, 1962 ; Allfrey et Mirsky, 1962). Inversément, l'extraction des histones

apporte un accroissement de la synthèse de l'ARN dirigée par l'ADN.

Quoique la structure de l'ADN associée à l'histone reste en double hélice (Bradbury et al., 1961), l'angle des bases par rapport à l'axe de l'hélice pourrait être modifié (Fredericq 1965). Il en résulterait donc une modification des caractéristiques électroniques de la molécule de l'ADN.

Lorsqu'on observe les chromosomes auxquels on a ajouté l'histone on remarque une rétraction de certaines régions. L'actinomycine D provoque également le même phénomène (Allfrey et Mirsky, 1963).

Les histones étant constituées par une population de molécule relativement hétérogène, il semble qu'il y ait une différence entre les propriétés inhibitrices de diverses fractions (Allfrey et Mirsky, 1963 ; Huang et al., 1964 ; Lieu et al., 1965). On étudie actuellement la spécificité d'action de ces protéines.

Certains renseignements ont été recueilli récemment à partir des histones acétylées : celles-ci ne bloquent pas la synthèse de l'ARN sur l'ADN tout en restant apte à s'associer avec celui-ci (Allfrey et al., 1964). L'acétylation de l'histone se produit en effet parallèlement à la synthèse de l'ARN dans les noyaux. Il n'est pas exclu que ces phénomènes correspondent à une variation spatiale de l'environnement immédiat de la molécule ADN-histone qui induirait corrélativement une variation dans la production de l'ARN-m.

On a également remarqué l'effet inducteur de certaines hormones qui semblent capables d'agir de manière spécifique sur une région déterminée du chromosome. L'ecdysone par exemple induit le gonflement d'une région du chromosome de la larve de *Chironomus* en dehors de l'époque de la métamorphose (Clever et

Karlson, 1960) ; ce phénomène ne se produit normalement qu'au moment de la métamorphose.

L'action de l'érythropoïétine sur la synthèse d'un ARN rapidement marqué (Krantz et Goldwasser, 1965) semble être analogue à ce que Jacob et Monod appellent le dé-répresseur chez les bactéries (Jacob et Monod, 1961). En effet, la présence de l'hormone dans le milieu de culture induit une augmentation de l'ARN rapidement marqué des cellules de la moëlle osseuse. Les constantes de sédimentation de cet ARN sont du même ordre que celles de l'ARN-m extrait à partir des polysomes des mammifères (Penman et al., 1963 ; Staehelin et al., 1964). De plus, sa synthèse est sensible à l'actinomycine D, ce qui renforce l'idée qu'il s'agit d'une espèce d'ARN de type informationnel.

1.2. L'ARN-m ET LA TRANSCRIPTION.

L'espèce de l'ARN à renouvellement rapide mise en évidence dans les bactéries ainsi que dans les cellules des organismes multicellulaires, appelé ARN messenger, joue le rôle du récepteur et du transporteur de l'information génétique de l'ADN vers le lieu de la synthèse des protéines spécifiques.

Considérons-le d'abord au niveau du chromosome c.à.d. au moment de la toute première étape de sa synthèse, avant qu'il ne quitte le voisinage immédiat de l'ADN. Tel est en effet le sujet de notre étude dont les résultats expérimentaux seront exposés dans la deuxième partie de ce travail.

Les observations autoradiographiques des chromosomes préalablement marqués par un précurseur spécifique d'ARN ou par un ribonucléoside quelconque au stade pendant lequel il n'y a pas de synthèse appréciable d'ADN, montrent que la synthèse de l'ARN s'effectue d'une manière active dans différentes bandes du chromosome (Ficq et al., 1958 ; Zalokar, 1960 ; Harris, 1965).

Les travaux de Spiegelman et ses collaborateurs (1961) (Hayashi et al., 1963) effectués sur *E. coli* infectés par le phage T₂ ou ϕ x 174 ont permis de démontrer l'existence d'une molécule complexe contenant à la fois l'ADN et l'ARN dont l'union serait assurée par des liaisons hydrogène. Il s'agit, donc, d'une chaîne d'ARN associée à une double hélice d'ADN. L'ARN devient à ce moment plus résistant à la RN-ase à une force ionique à l'ordre de 0,3.

La séparation dans le gradient de CsCl des deux chaînes complémentaires identifiables de l'ADN du phage SP8 a montré que les ARN-m produits in vivo après infection par ce phage ne s'hybridaient qu'avec une seule de ces deux chaînes, la chaîne la plus lourde et la plus riche en pyrimidine (Marmur et al., 1963).

Par contre, l'ARN synthétisé *in vitro* en présence de DNA à deux chaînes, de la RNA polymérase et des quatre ribonucléosides triphosphates, apparaît en double chaîne (Weiss et Nakamoto, 1961 ; Geiduschek et al., 1961 ; Chamberlin et Berg, 1962). Sur la figure 3 nous représentons le schéma de la synthèse de l'ARN mono et bicaténaire (Butler, 1963).

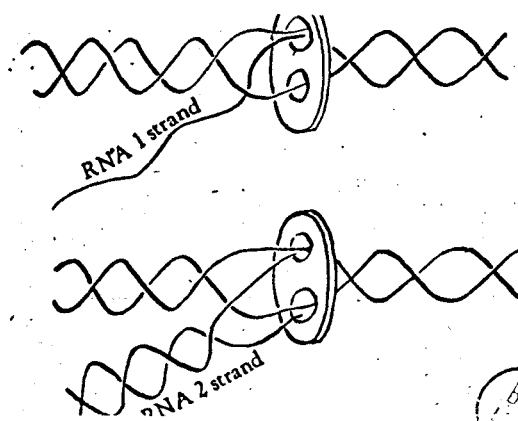


Fig. 3 Schéma de la synthèse de l'ARN. La RNA polymérase est représentée sous la forme d'un disque avec deux ouvertures dans lesquelles s'accrochent les deux chaînes de l'ADN "primer" (D'après Butler, 1963).



Ce phénomène n'est pas encore tout à fait éclairci et représente un problème complexe. Il semble cependant qu'il est possible d'obtenir une transcription asymétrique *in vitro* si les configurations natives du modèle (ADN) et de la RNA polymérase sont préservées (voir : Hayashi et al., 1964 a et b ; Geiduschek et al., 1964 ; Green, 1964 ; Colvill et al., 1965).

En ce qui concerne le sens de la synthèse de l'ARN-m et de sa lecture ce processus s'effectue de 5' vers 3' (Bremer et al., 1965 ; Thach et al., 1965).

Konrad et Stent (1964) ont étudié un hybride naturel à partir du système phage T₄ - E. coli (ce système est semblable à celui employé par Spiegelman et al., 1961, voir plus haut). En se basant sur le fait qu'un tel hybride ne survit pas à l'extraction, ils suggèrent que son intégrité résulte de la présence d'une protéine : la RNA polymérase. Et en effet, en travaillant *in vitro* (ADN de T₄, RNA polymérase de E. coli et les quatre ribonucléosides triphosphates), le complexe se dissocie en présence de SDS (Bremer et Konrad, 1964).

D'autre part les expériences biochimiques effectuées sur les organismes multicellulaires indiquent l'existence d'un complexe ADN-ARN dont la structure contiendrait aussi une protéine (Bonner et al., 1961 ; Schulman et Bonner, 1962 ; Méad, 1964).

Mandel et Borkowska (1964) ont décelé la présence d'hybrides naturels dans les cellules d'un hépatome ascitique. Un traitement à la RN-ase pancréatique permet de mettre en évidence au moyen de la colonne d'albumine méthylée, deux fractions contenant chacune simultanément l'ADN et l'ARN. Toutefois un traitement préalable par la DN-ase rend ce complexe sensible à la RN-ase.

Kidson et Kirby (1964) montrent, également à partir du foie de rat, un complexe semblable résistant à l'action de

la RN-ase. Cette fraction semble être légèrement plus dense que celle correspondant au "pic" contenant la totalité de l'ADN (centrifugation en gradient de CsCl).

Enfin, le complexe isolé à partir de l'algue *Chlorella* reste stable aussi bien après l'action de la RN-ase qu'après celle de la DN-ase (Richter et Senger, 1965).

Quoi qu'il en soit, dans le cas des organismes multicellulaires, Bonner et al. (1961), et Schulman et Bonner (1962) affirment que, dans le complexe, l'ADN est en double chaîne et l'ARN en chaîne simple.

D'après Chamberlin et Berg (1964), il n'est théoriquement pas possible d'imaginer un triplex stable et la seule possibilité d'avoir un hybride serait une double hélice rappelant celle de l'ADN dans laquelle une chaîne serait l'ARN. En accord avec cette vue, dans les hybrides obtenus à partir de l'ADN à un brin, les proportions des deux acides nucléiques sont égales (voir Bassel et al., 1964), alors que l'ADN hélicoïdal ne porte qu'une quantité très faible d'ARN. Les auteurs sont amenés à considérer la possibilité que la RNA polymérase s'attache à une partie de la molécule d'ADN dans laquelle le couplage des bases est temporairement relâché (probablement sur un bout de la chaîne). Il en résulterait donc des régions de la molécule où la chaîne complémentaire serait remplacée par l'ARN. Cet hybride local peut être détruit et par conséquent permettre, dans la suite, la réapparition de l'ADN original de structure hélicoïdale (Chamberlin et Berg, 1963).

Ces deux auteurs avancent deux hypothèses possibles au sujet du mécanisme de détachement de l'ARN de l'hybride

1°) La stabilité de l'hélice de l'ADN serait supérieure à celle de l'hybride ; le brin libre de l'ADN déplacerait spontanément l'ARN nouvellement synthétisé en reformant l'hélice de

l'ADN.

2°) La stabilité de l'hélice de l'hybride serait supérieure à celle de l'ADN ; le départ de l'ARN s'effectuerait par l'action catalytique de l'enzyme au moment de sa migration le long de la molécule d'ADN.

Mais il semble que les ribosomes soient aussi impliqués dans le mécanisme de détachement de l'ARN-m à partir de l'ADN. D'après Staehelin et al. (1963) la formation des polysomes s'effectuerait sur le bout libre de l'ARN-m naissant. Le groupe de Nirenberg (Byrne et al., 1964) a fourni les preuves expérimentales en faveur de cette idée.

Remarquons en outre que l'ARN synthétisé sur un ADN natif stimule l'incorporation des aminoacides dans un système acellulaire, alors que celui qui provient d'un ADN dénaturé en chaîne simple ne possède qu'une activité négligeable. On peut renaturer ce DNA ou le rendre bicaténaire à l'aide de DNA polymérase : dans ces conditions il redevient capable de servir de modèle à la synthèse d'un ARN capable d'activer l'incorporation d'acides aminés. La taille de l'ARN synthétisé à partir du modèle dénaturé est plus petite et la molécule est moins homogène que celle synthétisée par l'ADN natif (Wood et Berg, 1963).

Une certaine hétérogénéité de l'ARN rapidement marquée a été observée également in vivo, aussi bien dans les bactéries que dans les cellules des organismes multicellulaires. Ainsi par exemple, chez *E. coli*, on a observé des constantes de sédimentation allant de 6S à 30S (Spiegelman, 1961), la majeure partie des molécules sédimentant dans la région de 15-16S.

Le test de stimulation de l'incorporation des aminoacides dans les protéines dans le système acellulaire de Nirenberg et Matthaei (1961) a montré que les fractions provenant de la région 15S - 16S étaient actives. Les chaînes plus lourdes

(16S - 30S) sont pratiquement inactives (Grunberg-Manago et Gros, 1964). Pourtant les expériences d'induction de la β - galactosidase pendant la phase diauxique chez *E. coli* montrent une synthèse préférentielle d'un ARN lourd de 30S (Attardi et al., 1963). Le poids moléculaire de cet ARN correspond à ce que Kiho et Rich (voir Grunberg-Manago et Gros, 1964) ont trouvé en étudiant les polysomes synthétisant la β - galactosidase.

Dans les cellules des mammifères on a remarqué que l'ARN 45 S rapidement marqué stimule l'incorporation de la valine (Scherrer et al., 1963). La composition en base de cet ARN a été récemment déterminée : elle reflète celle de l'ADN (Yoshikawa - Fukada, 1965). L'ARN-m extrait à partir des polysomes de cellules de Hela se montre constitué de molécules hétérogènes, la majeure partie ayant une constante de sédimentation d'environ 10S (Darnell et al., 1963). La composition en base de cette fraction est également de type ADN.

Les constantes de sédimentation élevées indiquent le caractère polycistronique de l'ARN-m. Des preuves directes en faveur de la théorie "un opéron - un messenger" ont été apportées par plusieurs chercheurs. Ainsi par exemple la longueur de l'opéron histidine estimé correspondrait à un messenger de 30S, et l'expérience de dérégulation de l'opéron histidine permet de mettre en évidence l'existence d'un ARN-m de 34S approximativement (Martin, 1963).

L'estimation des poids moléculaire est rendue très souvent difficile ou impossible. Les variations de la forme des molécules (changement de la structure secondaire) pendant l'extraction et la centrifugation nous amènent à considérer avec une grande réserve les poids moléculaires en fonction des constantes de sédimentation.

Ainsi dans le cas de l'ARN-m des réticulocytes de lapin les constantes de sédimentation peuvent varier d'une manière appréciable alors que leur capacité d'incorporer, de façon spécifique, un aminoacide déterminé restent inchangées (Brawerman et al., 1965).

De plus les poids moléculaires de ces messagers dépassent largement ceux des ARN-m nécessaires à la synthèse des chaînes α et β de l'hémoglobine (Staehelin et al., 1964). Il est donc possible qu'il s'agisse de variations dans l'état d'agrégation, ou simplement de variations de structure secondaire.

Cependant Marbaix et Burny (1964) ont obtenu un ARN-m provenant des polysomes des réticulocytes dont la constante de sédimentation (9,2S) correspond à un poids moléculaire d'environ 160.000. Cette molécule sous la condition qu'elle soit monocaténaire pourrait coder 160 aminoacides et donner une chaîne de l'hémoglobine.

1.3. L'ARN-m ET LA TRADUCTION.

Actuellement, il est admis que la synthèse des protéines se fait dans les sites d'organisation particulière : les polyribosomes (ou polysomes) formés d'un ensemble de ribosomes monomères. Ceux-ci glissent progressivement le long de l'ARN-m (Rich et al., 1963), passant ainsi d'une manière continue par les régions consécutives dont les caractéristiques électroniques sont différentes (Fig. 4)

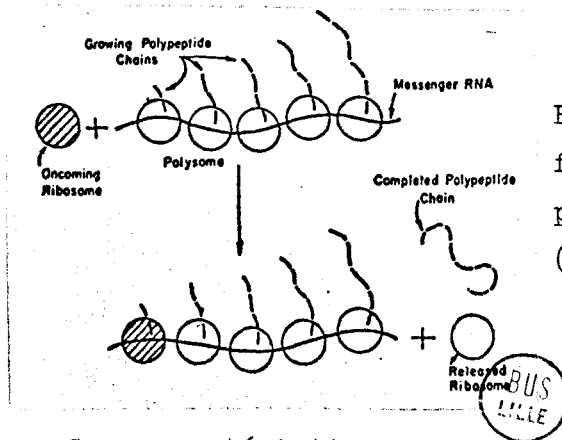


Fig. 4 Schéma du fonctionnement des polysomes.

(D'après Rich et al., 1963)

Ces caractéristiques, au niveau de chaque triplet, déterminent la nature de l'acide aminé à additionner à la chaîne polypeptidique en voie de synthèse au moyen de l'ARN-s (complexe aminoacyl-ARN-s). La stabilisation temporaire de l'anticodon de l'ARN-s, s'effectuant par la complémentarité du codon correspondant (Crick, 1963), est probablement rompue par la variation électronique de l'environnement immédiat survenue à la suite du déplacement relatif des ribosomes par rapport à l'ARN-m. Ainsi l'arrivée de l'aminoacyl-ARN-s correspondant au triplet suivant est assurée.

Si la formation d'un adénylate d'acide aminé (première étape d'activation) est catalysée par un enzyme d'activation qui n'est pas totalement spécifique vis-à-vis de l'acide aminé, la

formation d'aminoacyl-ARN-s semble hautement spécifique (deuxième étape d'activation). Ainsi par exemple l'enzyme d'activation de l'isoleucine, qui catalyse aussi la synthèse de l'adénylate de valine, ne permet la synthèse que de l'isoleucyl-ARN-s (Berg et al., 1961).

Dans une expérience particulière, Chapeville et ses collaborateurs (1962) ont démontré que la spécificité de la localisation des aminoacides au cours de la formation de la chaîne polypeptidique est déterminée par l'ARN-m et les ARN-s.

Il est intéressant de remarquer que le mouvement des ribosomes par rapport à l'ARN est approximativement de 800 nucléotides par minute (Staehelin et al., 1964). Ainsi une molécule d'hémoglobine, contenant environ 150 aminoacides, et dont le messenger a approximativement 450 nucléotides, est synthétisée en une trentaine de secondes.

En ce qui concerne le rôle des ribosomes dans le processus de la traduction, nous manquons encore de renseignements. Toutefois, il est difficile d'admettre que l'intervention de l'ARN-m et de l'ARN-s entre deux triplets complémentaires peut suffire à former un complexe stable.

Les travaux de Lipsett et al. (1960) ont montré (entre autres) que la température de dissociation du complexe entre l'acide polyuridylique et le tri-adénylate est en dessous de la température physiologique (30° C). Dans le cas de l'ARN-s et de l'ARN-m l'appariement des triplets complémentaires est encore affaibli par les bases voisines non complémentaires. Or, on a remarqué que les ribosomes peuvent fixer les ARN-s et par conséquent participer à la formation de ces complexes. Par suite de la faible stabilité de tels complexes (Cannon et al., 1963), seul l'ARN-s complémentaire serait électriquement plus privilégié dans le sens de la stabilisation temporaire.

En outre, il a été démontré que les ribosomes isolés à partir d'une souche bactérienne sensible à la streptomycine, incubés en présence de cet antibiotique et du poly U stimulent davantage l'incorporation de l'isoleucine que celle de la phénylalanine. Au contraire, les ribosomes de la souche résistante à la streptomycine ne montrent pas cette anomalie (Davis et al., 1964).

Dans le cas de *E. coli*, Herzog et Bollen (1965) suggèrent que la spécificité de la traduction pourrait être altérée par suite d'une modification de la structure des ribosomes due à une mutation.

Depuis que Nirenberg et Matthaei (1961) ont démontré qu'un système préparé à partir d'*E. coli* et composé de ribosomes, d'enzymes d'activation de l'ARN-s d'une source d'énergie et de l'acide polyuridilique, synthétise un polypeptide composé d'un seul acide aminé (la phénylalanine), la possibilité d'envisager expérimentalement la lecture du code a été offerte. Précisément dans un système acellulaire, les polymères synthétiques suivant leurs compositions stimulent l'incorporation d'un acide aminé déterminé.

Conformément à la théorie généralement admise de Crick (1963), l'unité de codage ("codon") correspondant à un aminoacide est composée de trois nucléotides. Ainsi par exemple le triplet codant la phénylalanine est UUU. Les triplets correspondant aux autres aminoacides sont estimés en déterminant le rapport entre la stimulation de l'acide aminé examiné et celui de la phénylalanine. Ce rapport est ensuite comparé au rapport des quantités de triplet UUU et des autres triplets possibles.

Le code est probablement dégénéré, puisqu'un acide aminé est incorporé par plusieurs triplets ; la spécificité est

déplacée en ce sens qu'à un acide aminé correspondent plusieurs ARN-s spécifiques et chacun requérant la présence de différents copolymères (Weisblum et al., 1962).

Nirenberg et al. (1965) dans un travail récent remarquent que souvent 2 bases d'un trinuécléotide et une base dans un trinuécléotide adjacent peuvent suffire pour la synthèse protéique. La reconnaissance du triplet par un ARN-s correspondant à plusieurs acides aminés suggère aussi une reconnaissance partielle du codon.

Il nous faut cependant noter que l'étude des codons est rendue parfois difficile également à cause de certains facteurs caractérisant les systèmes *in vitro* : par exemple la structure secondaire des polymères influence considérablement le degré d'activité du "primer" (Nirenberg et Matthaei, 1961 ; Singer et al., 1963).

Il est logique de se demander dans quel sens se fait la lecture du message. Le blocage de la synthèse des protéines en présence des codons "non-sense" (Sarabhai, 1964), indique que la lecture s'effectue dans une direction déterminée. Crick et al. (1961) pense que les triplets sont lus à partir d'un point défini dans la région de l'opérateur. Il semble que celui-ci ne soit pas traduit et il n'est pas exclu que la traduction du message par les ribosomes commence à partir du segment promoteur, celui-ci se trouvant entre l'opérateur et le premier cistron (Jacob et Monod, 1964).

1.4. SYNTHÈSE DE L'ARN DANS LES CELLULES DE MAMMIFÈRES.

L'étude par les précurseurs radioactifs de la synthèse de l'ARN dans les cellules de mammifères a révélé que la synthèse initiale de celui-ci, comme dans toutes les cellules d'ailleurs, a lieu dans le noyau. En effet la radioactivité apparaît en premier lieu dans l'ARN nucléaire, puis seulement dans l'ARN cytoplasmique (Perry, 1960 ; Zalokar, 1960 ; Perry et al., 1961 ; Srinivasan et al., 1963).

L'interprétation générale serait donc que l'ARN cytoplasmique dérive du noyau. Le retard de marquage des ARN cytoplasmiques dans le cas des cellules HeLa est de quelques minutes (Perry et al., 1961). En général la longueur de ce retard varie proportionnellement à la durée de la duplication cellulaire (Prescott, 1964).

Les études d'irradiation localisée, combinées avec les mesures quantitatives de l'incorporation de précurseurs radioactifs, montrent qu'il existe deux systèmes de synthèse de l'ARN : la synthèse nucléolaire, donnant environ 2/3 de l'ARN cytoplasmique, et la synthèse extranucléolaire, intervenant pour le tiers restant (Perry, 1960).

Un marquage par un précurseur radioactif de l'ARN, pendant un temps court, insuffisant pour avoir une radioactivité notable dans le cytoplasme, permet de voir la synthèse rapide des ARN lourds dont les vitesses de sédimentation se situent aux environs de 45S et de 35S (Scherrer et Darnell, 1962 ; Rake et Graham, 1964). D'après Perry (1964), le site de la synthèse de ces ARN lourds serait exclusivement le nucléole. L'étude cinétique de ces deux constituants (Scherrer et Darnell, 1962) montre que l'ARN 45S est synthétisé plus rapidement que l'ARN 35S et qu'il est métaboliquement moins stable. Scherrer et al. (1963)

ont pu préciser le sort du 45S : la radioactivité de cet ARN, en présence d'actinomycine, apparaît progressivement au sein des constituants 35S et 18S pour finalement se trouver dans les "pics" des ARN ribosomiques (28S et 18S). Environ le tiers des produits radioactifs formés au cours de ces opérations devient acido-soluble. La nature de cette fraction n'est pas connue.

Il est donc raisonnable de penser que l'ARN 45S représente le premier produit des gènes (voir aussi Perry, 1964). Sa structure complexe contiendrait plusieurs cistrons responsables de la formation de l'ARN-r (Scherrer et al., 1963). Dans le nucléole même, le 45S donnerait deux molécules : 35S et 18S dont la séquence des bases serait préservée (Perry et al., 1964). Leur association avec les protéines extranucléolaires fournirait respectivement les fractions 60S et 40S dont l'union dans le cytoplasme, constituerait les ribosomes 76S (Perry, 1964)

Comme nous l'avons signalé si l'on extrait l'ARN à partir de polysomes cytoplasmiques des cellules, préalablement marquées au ^{32}P pendant un temps relativement court, on obtient un ARN marqué assez hétérogène, se situant aux environs de 10S (Darnell et al., 1963).

On pourrait donc supposer que l'ARN 45S sert de précurseur aux ARN-r (28S et 18S) alors que l'ARN 10S représente un ARN engagé dans les polysomes comme messenger.

Mais la présence de l'ARN 45S dans l'extrait cytoplasmique montré récemment par Girard et al. (1965) et Henshaw et al. (1965) introduit une certaine incertitude à l'égard de cette conception, à moins qu'il s'agisse d'une perte de cet ARN pendant l'isolement du cytoplasme. Il est toutefois surprenant de constater que c'est l'ARN 18S qui se marque d'abord bien que les deux ARN-r métaboliquement stables (18S et 28S) existent

en quantités équimoléculaires.

Girard et al. (1965) pensent que l'on pourrait admettre un décalage dans la synthèse des deux espèces d'ARN, tandis que Perry (1964) trouve que la richesse du "pool" nucléaire en particules 60S conditionnerait un retard de l'apparition de la radioactivité dans l'ARN 28S par apport à l'ARN 18S. Une certaine différence entre ces deux espèces d'ARN-r a été également décelée dans le cas des bactéries par les tests d'hybridation qui indiquent qu'ils proviennent de "loci" génétiques différents (Yankofsky et Spiegelman, 1962).

En ce qui concerne la composition en base des ARN 35S, 18S et 28S les tests ont montré qu'il s'agit de molécules du type ARN-r (Scherrer et al., 1963), alors que les ARN 10S (Scherrer et al., 1963) et 45S (Yoshikawa-Fukada et al., 1965) seraient complémentaires de l'ADN.

Remarquons que la capacité de stimulation des aminoacides in vitro semble être l'apanage du 45S (Scherrer et al., 1963).

D'après sa composition et son instabilité métabolique, le constituant 45S est considéré par Yoshikawa-Fukada et al. (1965), et à titre d'hypothèse de travail, comme un ARN messager. Ces auteurs postulent qu'il est raisonnable de croire qu'il ne s'agit pas d'un agrégat quelconque d'ARN rapidement marqué, mais bien d'un ARN-m polycistronique. Il est intéressant de remarquer que le constituant 45S puisse servir à la fois comme précurseur des ARN-r et avoir les propriétés de l'ARN-m.

Le travail récent de Henshaw et al. (1965), basé sur les propriétés de sédimentation et de stimulation de l'incorporation des aminoacides, suggère que l'ARN 45S serait une molécule mixte contenant à la fois l'ARN-r et l'ARN-m. De plus, suivant le mode d'extraction, ce constituant peut apparaître sous la

forme de 18S ou même se dégrader et apparaître sous une forme hétérogène d'environ 10S. Les auteurs pensent que ce résultat traduit l'élimination de différents inhibiteurs solubles au cours de l'extraction. On voit donc que l'ARN 45S pourrait être constitué de deux ou plusieurs subunités ayant différentes propriétés biochimiques et physicochimiques. Une de ces subunités, par exemple, pourrait avoir une synthèse plus rapide et une composition en bases semblable à celle de l'ADN comme le prouvent Yoshikawa-Fukada et al. (1965).

Dans ce cas l'étude de la cinétique de formation des ARN-r métaboliquement stables est rendue difficile par la radioactivité du constituant 45S qui peut, dans certaines circonstances sédimenter sous la forme de 18S, comme nous venons de le voir, et brouiller ainsi la radioactivité du composant 18S métaboliquement stable.

Toutefois la capacité de l'ARN 45S d'apparaître également sous une forme hétérogène dans la région 10S pourrait peut-être indiquer que l'ARN-m extrait des polysomes des cellules de HeLa dérive du constituant 45S. Il n'est donc pas exclu que ce constituant lourd, rapidement marqué, décroché de l'ADN par les ribosomes et transféré sur le lieu de la synthèse des protéines (Byrne et al., 1964), se soit dégradé au cours de l'extraction en l'absence des inhibiteurs solubles éliminés au cours de l'isolement des polysomes.

Par contre, la conception de Harris (1964 a et b) diffère assez bien de celle que nous venons d'exposer. En effet cet auteur pense que seule une petite quantité de l'ARN macromoléculaire rapidement marquée reste inchangée depuis son détachement de l'ADN et sert à la synthèse des protéines. Le reste est presque entièrement dégradé et cela déjà dans le noyau et les fragments réincorporés dans les ARN-r. La quantité de l'ARN-m

est très faible et c'est grâce à sa stabilité que la synthèse des protéines s'effectue normalement. D'autres auteurs plaident également en faveur d'un ARN-m stable (Brachet et al., 1955 ; Hammerling et al., 1959).

Comme nous venons de le voir, le transfert de l'ARN du noyau vers le cytoplasme est probablement très complexe. Il nous est difficile sinon impossible pour le moment de faire une conclusion valable. Nous nous permettons toutefois de résumer la synthèse des ARN nucléaires et leur transfert dans le cytoplasme par le schéma de Noll H. (1965) (Fig. 5)

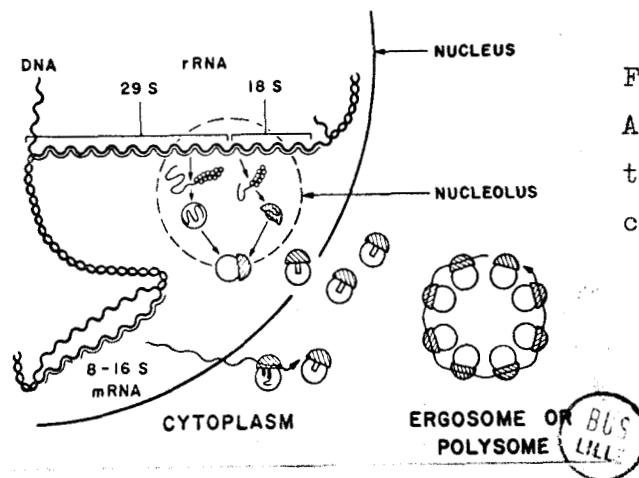


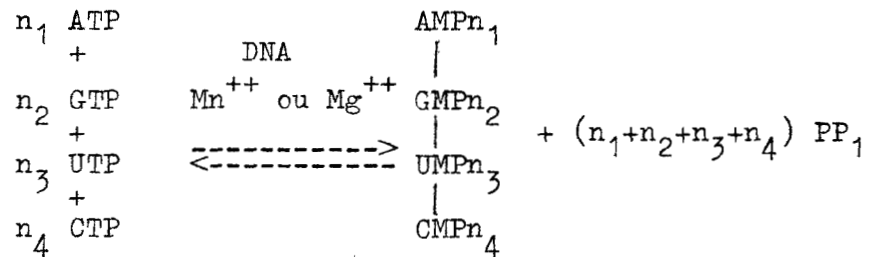
Fig. 5 Synthèse des ARN nucléaires et leur transfert dans le cytoplasme.

(D'après Noll H., 1965)

1.5. SYNTHÈSE IN VITRO DE L'ARN DANS LES NOYAUX ISOLES.

1.5.1. MECANISME DE SYNTHÈSE.

La synthèse in vitro de l'ARN dirigée par l'ADN et en présence des quatre ribonucléosides triphosphates est catalysée par l'ARN-polymérase. Cette réaction peut être représentée sommairement de la manière suivante :



L'ARN polymérase semble se trouver dans le noyau (Weiss, 1960) et plus précisément associée avec les chromosomes (Huang et Bonner, 1962). Dans les gradients de saccharose, cet enzyme sédimente avec l'ADN (Hurwitz et August, 1963). Il en résulte que, in vivo, l'enzyme pourrait être associé de manière spécifique à l'ADN.

Toutefois, le maximum d'activité enzymatique n'est obtenu que si au "primer" ADN et aux quatre ribonucléosides triphosphates on additionne un métal bivalent (Mg^{++} par exemple) et un réducteur porteur du groupe SH (Mercaptoethanol par exemple) (Furth et al. 1962). Il n'est donc pas surprenant de constater que de nombreux auteurs aient obtenu une synthèse d'ARN dans les noyaux in vitro en présence des quatre ribonucléoside triphosphates (Magee et Burrous 1961 ; Weiss, 1962).

Récemment Allfrey et Mirsky ont montré qu'il est possible d'obtenir in vitro une synthèse d'ARN par les noyaux

de cellules de thymus même si l'on met les quatre ribonucléosides triphosphates, l'incubation étant effectuée dans un milieu saccharose-glucose-sels minéraux (Frenster et al., 1960 ; Mager et Burrous, 1961 ; Sibatani et al., 1962 ; Allfrey et Mirsky, 1962 ; voir Harris et al., 1963).

La capacité des noyaux à synthétiser l'ARN in vitro dans de telles conditions se comprend mieux lorsqu'on sait également qu'ils sont capables de synthétiser l'ATP (Allfrey et Mirsky, 1957 ; Betel et Klowem, 1964) et d'incorporer les aminoacides (Ficq et Errera, 1956 et 1958 ; Allfrey et Mirsky, 1957). Il a été prouvé, chose importante, que ce type de synthèse de l'ARN est "dépendante" de l'ADN et de la synthèse d'ATP (Allfrey et Mirsky, 1962). D'ailleurs en 1954, Baltus a démontré d'une manière directe la présence des deux enzymes du métabolisme nucléotidique dans le nucléole : la nucléoside phosphorylase et l'enzyme de synthèse de la cozymase. Il semble donc que le noyau soit le siège de phosphorylations oxydatives; par conséquent la capacité des noyaux à synthétiser l'ARN est acquise sans l'intervention nécessaire du cytoplasme. Malheureusement, un certain danger de contamination par les substances ou particules d'origine cytoplasmique n'est pas tout à fait écarté.

1.5.2. PROCÉDES D'ISOLEMENT DES NOYAUX METABOLIQUEMENT ACTIFS

Le rôle du noyau dans la cellule vivante représente un très important sujet d'étude. Les méthodes biochimiques ont conduit les chercheurs à envisager l'isolement du noyau et à examiner son activité métabolique en absence du cytoplasme.

Les techniques d'isolement des noyaux sont nombreuses. Dans les milieux d'isolement les facteurs déterminant l'aspect et la fonction des noyaux sont la force ionique, le pH et la

pression osmotique, alors que dans les solutions non aqueuses ce sont la composition et la densité du mélange binaire des solvants.

Les méthodes d'isolement dans les solutions non aqueuses ne donnent pas de préparations suffisamment purifiées et dans la plupart des cas les noyaux ainsi obtenus ne sont pas métaboliquement actifs (voir Allfrey et al., 1952 et Allfrey, 1959).

Par contre certaines méthodes d'isolement dans les solutions aqueuses donnent des résultats plus satisfaisants. Nous exposerons rapidement quelques méthodes principales.

La technique d'isolement dans de l'acide citrique 1 % (Mirsky et Pollister, 1946) permet d'obtenir des noyaux d'une pureté très élevée. Cependant le pH bas provoque un endommagement sérieux de la fonction enzymatique et de l'organisation des noyaux. En plus une partie importante des protéines est perdue au cours de l'isolement (voir Allfrey et al., 1952 ; Smellie et al., 1955 ; Defert-Kobus et al., 1966).

L'isolement dans les solutions saccharosées donne les homogénats pouvant contenir un pourcentage faible de noyaux contaminés ou de cellules intactes. Une méthode qui s'est montrée satisfaisante surtout pour l'obtention de noyaux métaboliquement actifs et qui est utilisée depuis une dizaine d'années pour les cellules de thymus de veau, est celle d'Allfrey et al. (1957). Ces auteurs utilisent du Saccharose 0,25 M (solution isotonique) et du CaCl_2 0,003 M, ce dernier afin de prévenir la formation du gel.

Cependant les essais effectués par Srinivasan et al. (1962) sur des noyaux extraits en milieu isotonique (saccharose- CaCl_2) suggèrent qu'au cours de l'isolement, on perd environ 20 % de la radioactivité attribuée à l'ARN nucléaire rapidement marqué.

De plus il semble que la pureté des noyaux extraits selon Allfrey et al. (1957) (même milieu), n'est pas aussi bonne qu'on pourrait le souhaiter.

Les milieux à concentration plus élevée en saccharose (solutions hypertoniques) (Chauveau et al., 1956) permettent d'obtenir des noyaux très purs, mais ceux-ci ne sont pas capables d'incorporer les acides aminés dans les protéines ni les précurseurs pyrimidiques dans les ARN (Allfrey et Mirsky, 1957 ; Zalta et al., 1962).

L'isolement de noyaux à l'aide de détergents dans les solutions hypotoniques fournit d'excellents résultats en ce qui concerne la pureté des préparations. Ces préparations semblent être capables d'activité métabolique. Ainsi par exemple les noyaux de cellules d'ascite, provenant d'hépatome de Zadjela extraits au Nonyl-phénol-polyoxyéthylène, conservent leur capacité d'incorporer des acides aminés et semblent synthétiser un ARN infectieux d'un virus à acide ribonucléique (Zalta et al., 1962).

Le détergent Tween 80 (Polyoxyéthylène sorbitane monooléate) a également été utilisé dans le cas de cellules de HeLa par Fisher et Harris (1962). Les noyaux, ainsi obtenus, présentent une très grande pureté et sont exempts de contamination cytoplasmique, à raison de 95 à 98 % (observations personnelles au microscope optique). De plus le contrôle, effectué au microscope électronique, montrent que ces noyaux ne portent pas de traces de contaminations cytoplasmiques (Fisher et Harris, 1962). Un avantage de cette méthode, par rapport à celle d'Allfrey et al., (1957) est qu'ainsi il ne subsiste aucune cellule intacte et que l'on ne remarque aucune perte en ARN rapidement marqué (Harris, 1963). La méthode au Tween 80 représente donc un bon moyen d'isolement des noyaux et semble être suffisamment étudiée.

Il était donc intéressant de vérifier si les noyaux extraits au Tween 80 conservent leur activité métabolique.

Le processus de la synthèse des ARN nucléaires et de leur cheminement vers le cytoplasme demeure mal connu, comme nous l'avons vu. A cet effet nous avons entrepris un travail dans le but de rechercher les simplifications du système. L'idée de départ a été d'étudier la synthèse de l'ARN in vitro dans des noyaux isolés.

Les avantages et les possibilités d'un tel système étaient les suivants :

a) L'étude de la synthèse initiale des ARN nucléaires et les modifications éventuelles que ceux-ci subissent au sein du noyau en absence des éléments cytoplasmiques.

b) La réduction du "pool" des précurseurs de l'ARN lors de l'extraction des noyaux, et, par conséquent, l'incorporation plus rapide des précurseurs exogènes.

c) De plus, ce système devait peut-être permettre l'étude du détachement de l'ARN de son modèle d'ADN ou peut-être des relations entre les divers ARN du noyau.

2. TRAVAUX PERSONNELS.

Les buts de ce travail sont les suivants :

- 1° - déterminer dans quelle mesure des noyaux de cellules de HeLa sont capables de synthétiser de l'ARN in vitro et préciser les facteurs d'incorporation optimale des précurseurs ;
- 2° - étudier l'état et les propriétés physiques et biochimiques de cet ARN, par les méthodes de fractionnement chromatographique et d'ultracentrifugation.

2.1. ETUDE PRELIMINAIRE, PAR DOSAGES BIOCHIMIQUES, DE L'INCOR-
PORATION IN VITRO DE PRECURSEURS RADIOACTIFS DE L'ARN
DANS LES NOYAUX ISOLEES.

2.1.1. MATERIEL ET METHODES

A. Les cellules de HeLa qui nous ont servi de matériel ont été cultivées à 37°C, en couches monocellulaires, dans des boîtes de Roux contenant 80 ml du milieu suivant :

NaCl	8 gr/l
KCl	0,4 gr/l
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,2 gr/l
Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	0,1512 gr/l
KH ₂ PO ₄	0,06 gr/l
Rouge phénol	0,02 gr/l
Hydrolysate de lactalbumine	5 gr/l
Extrait de levure	0,5 gr/l
Glucose	2 gr/l
NaHCO ₃	2 gr/l
CaCl ₂	0,14 gr/l
Pénicilline	10 ⁵ unités/l
Streptomycine	0,1 gr/l
Sérum de veau	0,1 l/l

Nous avons utilisé des cultures âgées de 48 heures afin d'avoir un nombre suffisant de cellules en phase exponentielle. Une boîte de Roux, dans ces conditions, contient en moyenne 10^7 cellules.

Le détachement des cellules est effectué par agitation dans une solution de NaCl 0,14 M en présence de billes de verre de 2 mm de diamètre.

Le sédiment cellulaire obtenu par une centrifugation de 5 min à 1000 tm est ensuite lavé une fois dans la même solution.

B. Extraction des noyaux d'après la technique d'Allfrey et al. (1957).

Le sédiment contenant $5 \cdot 10^7$ cellules est dispersé dans 10 ml de saccharose 0,25 M, 0,003 M en CaCl_2 et homogénéisé pendant 5 minutes à 4°C dans un appareil du type Potter-Elvehjem à 3.500 tm.

C. Extraction des noyaux d'après la technique de Fisher et Harris (1962).

Le sédiment contenant 10^8 à $4 \cdot 10^8$ cellules est dispersé dans 30 à 80 ml d'une solution aqueuse de Tween 80 à 0,1 % (v/v) et est mélangé, à 4°C pendant 30 minutes, à l'aide d'une hélice en plastique à pales non coupantes tournant à 4.200 tm.

Au cours de notre travail, cette méthode a été améliorée. Nous basant sur les résultats de Holland (1962) qui utilise une solution de β -mercaptoéthanol pour isoler les noyaux des cellules HeLa, il était tentant de voir si l'usage de Tween 80 (0,1 %) et de β -mercaptoéthanol ($2 \cdot 10^{-3}$ M) était susceptible de

raccourcir la durée de l'opération. En effet, un traitement de 5 à 7 minutes dans ces conditions permet d'obtenir des noyaux dont la pureté vérifiée au microscope optique, est comparable à celle des "noyaux Tween" (durée d'isolement : 30 min. environ (Fisher et Harris, 1962)).

D. Incubation des noyaux.

Après la centrifugation de l'homogénat à 1.500 tm pendant 5 minutes à 4°C, le sédiment est dispersé dans le milieu d'Allfrey et Mirsky (1962) dont la composition est la suivante :

Tampon phosphate de potassium	0,0125 M, pH 6,75
Saccharose	0,156 M
Glucose	0,02 M
NaCl	0,0137 M
MgCl ₂	0,005 M
CaCl ₂	0,0015 M

et en présence du précurseur marqué (Cytidine-³H, Uridine-³H ou ¹⁴C).

Le milieu enrichi contient en plus les substances suivantes :

ATP	1 μM/ml
GTP	0,125 μM/ml
CTP	0,125 μM/ml
Cystéine	10 μM/ml
Phosphoénolpyruvate-kinase	10 μg/ml
Phosphoénol-pyruvate	5 μM/ml
Uridine- ³ H	10 μC/ml
	(5 . 10 ⁻³ μM/ml)

Les quantités de précurseur utilisées ainsi que la durée d'incubation seront indiquées pour chaque expérience. A la fin de l'incubation, la suspension nucléaire est additionnée d'un volume égal d'une solution de PCA 10% contenant 100 μ g/ml de précurseur non marqué. Après un séjour de 15 minutes à 0°C le matériel est centrifugé à 3.500 tm pendant 5 minutes et lavé 2 fois au PCA 5% à 4°C.

E. Dosage des acides nucléiques.

Le matériel précipité et lavé au PCA 5% (conc. fin.) est lavé d'abord à l'alcool-éther, (3/1), puis à l'alcool-éther à 50°C pendant 10 minutes, et finalement à l'éther pur. L'ARN est extrait dans du PCA 10% pendant 18 heures à 4°C (Ogur et Rosen, 1950). Le dosage est effectué par la méthode de Miller et al. (1950) modifiée : à un volume de la solution inconnue, on ajoute un volume égal d'une solution d'orcinol (10 mg d'orcinol par ml d'HCl concentré contenant 4 μ g d'alun ferrique par ml). Le mélange est chauffé pendant 30 minutes à 100°C puis refroidi. Un volume égal d'alcool 94° est ajouté pour stabiliser la coloration, et on lit la densité optique à 690 m μ . Du RNA de levure est utilisé comme standard.

Du précipité, on extrait ensuite le DNA dans du PCA 5% pendant 20 minutes à 70°C. Le dosage est effectué par la méthode décrite par Burton (1956).

Les solutions standard sont préparées à partir d'ADN de sperme de saumon.

F. Le comptage de la radioactivité se fait à l'aide d'une solution scintillante dont voici la composition :

400 ml de Toluène
400 ml de Dioxane
240 ml d'alcool éthylique absolu
52 gr de Naphtalène
5,2 gr de PPO
0,1 gr de Diméthyl POPOP

Nous mélangeons 0,2 ml d'extrait radioactif avec 10 ml de la solution scintillante. Le compteur que nous utilisons est du type "Nuclear Chicago model 725".

2.1.2. INCORPORATION DE CYTIDINE-³H DANS LES NOYAUX ISOLES.

Si la méthode d'extraction des noyaux au Tween 80 convient très bien semble-t-il pour les cellules prémarquées (Fisher et Harris, 1962), nous ne savions pas si de tels noyaux seraient encore capables d'incorporer des précurseurs des ARN in vitro. A cet effet, nous avons comparé les noyaux extraits au saccharose-CaCl₂ (Allfrey et al., 1957) et ceux extraits au Tween 80.

Le sédiment contenant environ $5 \cdot 10^7$ cellules est dispersé dans 10 ml de saccharose 0,25 M, 0,003 M en CaCl₂. Les noyaux sont extraits suivant la méthode d'Allfrey et al. (1957) (voir le chapitre 2.1.1.).

Un autre sédiment contenant environ $2,5 \cdot 10^7$ cellules est dispersé dans 30 ml d'une solution aqueuse de Tween 80 à 0,1% (v/v). Les noyaux sont extraits suivant la méthode de Fisher et Harris (1962) (voir le chapitre 2.1.1.). Les noyaux ainsi obtenus sont incubés séparément dans le milieu d'Allfrey et Mirsky (1962) (voir le chapitre 2.1.1.) en présence de 10 µC/ml de Cytidine-³H (2,02 C/mM). La concentration des noyaux est de l'ordre de $5 \cdot 10^6$ /ml dans les deux cas. La durée de l'incubation est de 30 minutes.

Les dosages biochimiques que nous avons effectués suggèrent une incorporation plus élevée dans les noyaux "Tween" que dans les noyaux "saccharose" (voir tableau ci-dessous).

	ARN _{µg}	ADN _{µg}	CPM	CPM/µgARN	CPM/µgADN	ARN/ADN
Saccharose	120	684	1350	11,2	1,97	0,176
	114	650	1250	11,0	1,92	0,176
Tween	50	400	1240	21,5	3,10	0,145
	62	395	1310	21,3	3,32	0,157

Ceci pourrait s'expliquer du fait que certains enzymes respiratoires sont stimulés en présence de Tween 80 (Nakazawa, 1962). Les rapports ARN/ADN montrent, d'autre part, que les noyaux "Tween" sont plus propres que les noyaux "Saccharose".

Observations microscopiques : Les observations microscopiques montrent l'absence totale de cellules entières ; les contaminations cytoplasmiques sont inférieures à 5 %. La figure 6 montre l'aspect de noyaux extraits au Tween 80.



Fig. 6 Noyaux isolés
au Tween 80.

(Coloration à
l'aide du violet
de gentiane
acétique)

Les noyaux isolés dans la solution saccharosée présentent une contamination plus élevée (10 à 15 % de noyaux contaminés et de cellules entières).

Il est à noter ici que l'âge des cellules joue un rôle important dans le cas des noyaux "Tween". En effet les cellules parvenues en fin de période exponentielle peuvent contribuer à une sérieuse contamination cytoplasmique.

CONCLUSION :

Compte tenu de la capacité d'incorporation de la Cytidine-³H et de la pureté des noyaux, nous avons adopté la méthode d'isolement des noyaux au Tween 80.

2.1.3. COMPARAISON DE L'ACTIVITE IN VITRO DES NOYAUX ISOLEES AVEC CELLE DES CELLULES ENTIERES.

Afin de vérifier le temps maximum de fonctionnement du système, nous avons effectué une cinétique de l'incorporation de la Cytidine- ^3H dans les conditions que nous avons décrites (chapitre 2.1.1.). En même temps et dans les mêmes conditions nous avons incubé des cellules intactes. Les courbes des deux cinétiques, représentées figure 7, montrent une certaine similitude jusqu'à 30 minutes environ.

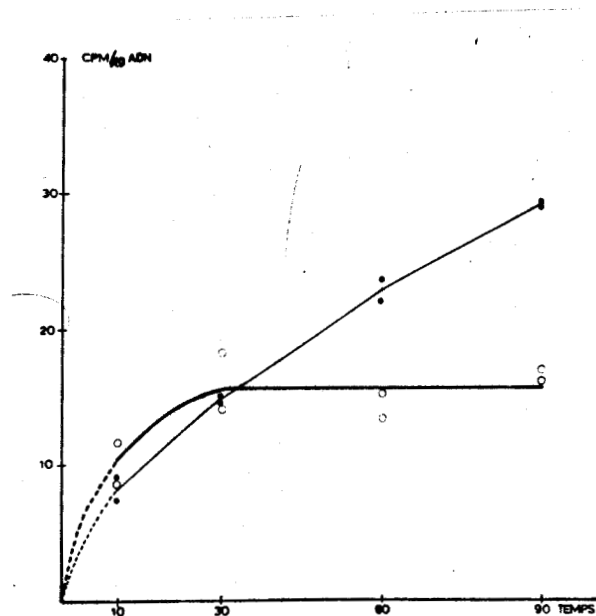


Fig. 7 La cinétique de l'incorporation de la Cytidine- ^3H . (Noyaux ○ ○ ○ ○ ; Cellules intactes ● ● ● ●).

Ce graphique représente la relation, au cours du temps, entre la radioactivité (nombre de coups par minute) de l'ARN et la teneur en ADN (μg).

BHS
LILLE

L'incorporation de Cytidine radioactive s'arrête après une trentaine de minutes dans le cas des noyaux.

L'incorporation d'Uridine ^{-3}H ($10 \mu\text{C}/\text{ml}$; $2,1 \text{ C}/\text{mM}$) montre que la radioactivité atteint un maximum entre 10 et 30 minutes (Fig. 8).

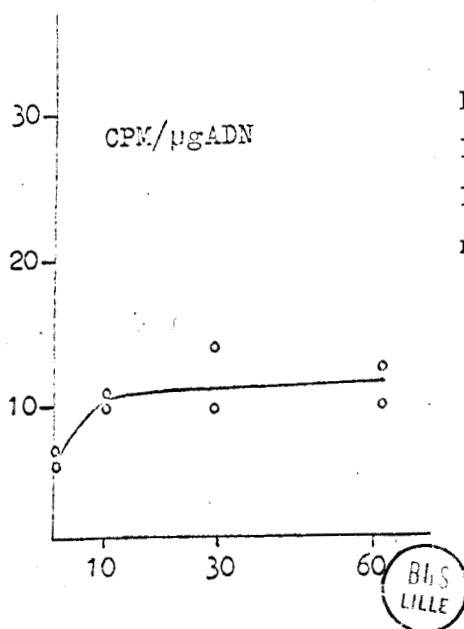


Fig. 8 La cinétique de l'incorporation de l'Uridine- ^{-3}H dans les noyaux.

2.1.4. CORRECTION DE LA RADIOACTIVITE "DE FOND".

Dans de nombreuses expériences, nous avons remarqué une radioactivité au temps 0 anormalement élevée, comme on peut d'ailleurs le voir sur les figures 7 et 8. Cette radioactivité peut atteindre 30 à 50 % de la valeur maximale de l'incorporation. Le même phénomène a été signalé par Magee et Burrous (1961).

Essais avec l'échantillon au temps 0 : Si l'on ajoute un volume de PCA à 10%, contenant les quantités habituelles du précurseur marqué et non marqué, au même volume d'une suspension de noyaux exempte du précurseur marqué, on décèle

encore une radioactivité atteignant 15 à 30% de celle correspondant au maximum de l'incorporation. Ceci suggère une adsorption importante du précurseur dont il est difficile de se débarrasser.

Dorénavant, nous tiendrons compte de la radioactivité du temps 0 lors de l'estimation des radioactivités relatives aux différents temps d'incorporation.

2.1.5. TENTATIVES D'AMELIORATION DE L'INCORPORATION DES NUCLEOSIDES MARQUES.

A. Milieu enrichi

Si l'on considère les figures 2 et 3 et si l'on tient compte de l'adsorption du précurseur, il en résulte que l'incorporation ne peut pas être considérée comme suffisante si l'on a l'intention d'entreprendre une étude du fractionnement des ARN.

Nous avons cherché à activer l'incorporation par l'addition au milieu d'incubation de substances organiques (milieu enrichi) (En collaboration avec M. Lefebvre dans le cadre de son travail de fin d'études). A ce sujet nous nous sommes inspirés des travaux de Weiss (1960 et 1962), Furth et al. (1962), Burdon et Smellie (1962) et Ro (1964). (La composition du milieu enrichi est décrite dans le chapitre 2.1.1.).

Plusieurs cinétiques effectuées même avec des quantités plus élevées du précurseur radioactif (50 $\mu\text{C}/\text{ml}$) ne nous ont pas permis de mettre en évidence la moindre activité stimulatrice d'un tel système.

B. Conditions de pH.

Des essais en vue de déterminer le pH optimum dans le milieu simple (saccharose-glucose-sels minéraux) ont montré que, à pH élevé (de 7,45 à 8,05, en tampon Tris) l'incorporation est de 2 à 3 fois plus faible qu'aux pH plus bas (de 6 à 7,45 en tampon phosphate de potassium). Nous avons donc continué nos essais au pH original, soit 6,75.

C. Concentration optimale de la suspension.

Enfin nous avons examiné quelles sont les concentrations en noyaux pour lesquelles l'incorporation est maximale. Le plateau de radioactivité est atteint pour des concentrations comprises entre $1,5 \cdot 10^7$ noyaux/ml et $2,7 \cdot 10^7$ noyaux/ml.

2.1.6. CARACTERISATION DE LA SYNTHÈSE DES ARN DÉPENDANTE DE L'ADN.

Afin de déceler dans quelle mesure l'incorporation des précurseurs des ARN est dépendante de l'ADN, nous avons pré-incubé les noyaux en présence d'Actinomycine D ($5 \mu\text{g/ml}$) et de DN-ase (2 mgr/ml) pendant 10 minutes, en l'absence de précurseur marqué. Puis les noyaux ont été transférés dans le milieu contenant le précurseur marqué et l'incubation s'est poursuivie pendant 20 minutes encore. Une diminution de la radioactivité d'environ 50% dans le cas de l'échantillon traité à la DN-ase a été enregistrée. La radioactivité des noyaux traités à l'Actinomycine n'a été réduite que de 20%.

2.1.7. REDUCTION DE LA DUREE D'ISOLEMENT DES NOYAUX.

A la fin de cette période de travail, l'extraction des noyaux a été améliorée. L'introduction du β -mercaptoéthanol ($2 \cdot 10^{-3}$ M), (voir Holland, 1962) dans la solution aqueuse de Tween 80 nous a permis de raccourcir considérablement le temps d'isolement des noyaux (5 à 7 minutes).

La pureté des noyaux, contrôlée au microscope optique, est comparable à celle des noyaux isolés par la méthode de Fisher et Harris (1962).

2.1.8. CONCLUSIONS DE NOTRE ETUDE PRELIMINAIRE.

Les remarques que nous venons de faire au sujet de l'incubation in vitro des noyaux de cellules HeLa, sont le résultat d'une étude préliminaire.

Nous en retiendrons les points suivants :

- a. L'isolement des noyaux dans le Tween 80 semble être satisfaisant du point de vue de la pureté des préparations ainsi que de leur activité métabolique.
- b. Les tests de marquage montrent que l'accroissement de la radioactivité dans l'extrait d'ARN s'arrête complètement au bout d'une trentaine de minutes.
- c. L'enrichissement du système par les riboside-triphosphates et un système régénérateur d'ATP semble être sans effet.
- d. La quantité de radioactivité trouvée dans l'extrait d'ARN dans le cas des noyaux est semblable à celle des cellules intactes jusqu'à 30 minutes.
- e. Le pH (6,75) du milieu d'incubation se montre satisfaisant.
- f. Les incorporations optimales sont obtenues pour des concentrations comprises entre $1,5 \cdot 10^7$ noyaux/ml et $2,7 \cdot 10^7$ noyaux/ml.
- g. Les tests à la DN-ase et à l'Actinomycine D suggèrent qu'une partie de la radioactivité semble appartenir à de l'ARN dont la synthèse dépend de l'ADN.

2.2. ETUDE, PAR LES METHODES DE FRACTIONNEMENT MACROMOLECULAIRE
DE LA SYNTHÈSE IN VITRO DE L'ARN NOUVELLEMENT FORME,
DANS LES NOYAUX ISOLES.

2.2.1. MATERIEL ET METHODES.

A. Incubation des cellules intactes.

Les cellules de HeLa ($2 \cdot 10^7$) sont incubées en boîtes de Roux dans un milieu pauvre (ne contenant que NaCl, KCl, $MgSO_4$, Na_2HPO_4 et rouge phénol en concentrations identiques à celles utilisées dans le milieu ϕ_{10} . Ce milieu pauvre est connu sous le nom de Hank). Après l'incorporation pendant 30 minutes en présence de 10 $\mu C/ml$ d'Uridine- 3H (1,08 C/mM) à 37°C le matériel est refroidi (0-4°C) et lavé dans le même milieu contenant 100 $\mu g/ml$ d'Uridine non marquée.

B. Extraction des noyaux.

La méthode a déjà été décrite dans le chapitre 2.1.1. Nous utilisons une combinaison des deux milieux d'extraction : celui de Fisher et Harris (1962) et celui de Holland (1962).

C. Incubation des noyaux.

Le milieu d'Allfrey et Mirsky (1962) a aussi été décrit dans le chapitre 2.1.1. Cependant la concentration du tampon au phosphate de potassium a été réduite à 0,00025M dans les expériences au ^{32}P inorganique. Dans cette partie du travail, nous avons utilisé de la bentonite à raison de 1 mg/ml dans le milieu d'incubation, afin d'éviter une dégradation éventuelle de l'ARN. Les concentrations des noyaux dans le milieu ont été de l'ordre

$2 \cdot 10^7$ /ml. A la fin de l'incubation les noyaux sont refroidis, centrifugés rapidement à 1500 tm pendant 3 minutes, puis lavés 1 fois à 0-4°C avec une solution de NaCl 0,14 M contenant 100 µg/ml du précurseur correspondant non marqué. Dans les expériences dans lesquelles nous avons utilisé du ^{32}P , le lavage est effectué avec une solution de NaCl 0,3 M en tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH-6,7.

D. Extraction de l'ARN par le mélange SDS-phénol.

Le matériel est mis en suspension dans du tampon acétate 0,01 M, pH-5,2 contenant $5 \cdot 10^{-4}$ M de MgCl_2 et 1 mg/ml de bentonite. Ensuite du SDS recristallisé est ajouté jusqu'à la concentration finale de 0,34 % et la suspension est agitée pendant 5 minutes à la température ambiante ; un volume égal de phénol saturé est ajouté et l'agitation est prolongée encore 10 minutes. Dans le cas des noyaux, nous effectuons une extraction supplémentaire de l'interphase à 60°C pendant 3 minutes. La suspension est ensuite refroidie à 4°C et centrifugée pendant une minute à 20.000 g. La phase aqueuse est gardée et l'interphase est extraite à nouveau dans les mêmes conditions. Les phases aqueuses réunies sont précipitées par deux volumes d'alcool absolu à -25°C et maintenues à cette température pendant une ou plusieurs heures. Le sédiment est lavé encore une fois (à 4°C) dans l'alcool à 67 % pour éliminer les traces de phénol.

E. Extraction des acides nucléiques par le mélange SDS-chloroforme-alcool amylique.

Le sédiment contenant $2 \cdot 10^8$ à $4 \cdot 10^8$ noyaux est suspendu dans 6 à 12 ml du mélange suivant : solution tris/HCl

0,01 M, pH-7,4 ; NaCl 0,3 M ; citrate de sodium 0,03 M ; EDTA* 0,001 M ; SDS 1 %. Après une agitation de 15 minutes à 4°C, la suspension est additionnée d'un volume égal de chloroforme-alcool amylique (35/10 v/v) et l'agitation est prolongée pendant 45 minutes. A la phase aqueuse obtenue après une centrifugation de 10 minutes à 20.000 g on ajoute un volume d'alcool absolu afin de récolter les fibres d'ADN. Le matériel, ainsi précipité, peut être conservé pendant une semaine, à la température de -20°C.

F. Composition en bases.

L'hydrolyse de l'ARN se fait dans du KOH 0,3 N à 37°C pendant 18 heures. L'hydrolysate est acidifié à froid par de l'acide perchlorique jusqu'à pH-2 et centrifugé à 3.500 tm. Le surnageant est ensuite neutralisé à pH-7 et chromatographié sur une colonne de Dowex 1x2 par élution à l'aide d'un gradient exponentiel d'HCl. Les fractions appartenant à chacun des nucléotides sont rassemblées et séchées à 60°C, puis redissoutes dans 1 ml d'eau distillée, et leur radioactivité est mesurée dans la solution de Bray (1960). (Pour la composition voir plus loin.)

G. Digestions enzymatiques.

La RN-ase préalablement traitée afin d'éliminer les traces de DNase (chauffage à 80°C pendant 10 minutes dans une solution de citrate de sodium 0,03 M et de NaCl 0,3 M, pH-5) est utilisée à raison de 25 μ gr/100 μ gr d'acides nucléiques. L'hydrolyse est effectuée pendant

* $MgCl_2$ 0,001 M si le matériel est destiné à la chromatographie.

45 minutes à 27°C dans une solution de Tris/HCl 0,005 M, pH-7,4, de citrate de sodium 0,03 M et de NaCl 0,3 M (voir Hayashi et al., 1965) ou dans une solution de Tris/ HCl 0,01 M, pH-7,4 et de NaCl 0,01M. Dans une expérience nous avons utilisé une solution de citrate de sodium 0,03 M, NaCl 0,3 M, pH-5. La DNase est utilisée à raison de 10 µg/ml, dans une solution de Tris/ HCl 0,01 M, pH-7,4, de MgCl₂ 0,001 M, de Bentonite à 1 mgr/ml, avec ou sans NaCl 0,3 M. L'hydrolyse est effectuée à 37°C pendant 45 ou 60 minutes.

La chymotrypsine α est utilisée, à raison de 75 µgr/ml, dans une solution de Tris/HCl à 0,01 M, pH-7,4 et de NaCl 0,3 M à 37°C pendant 45 minutes.

H. Dissociation du complexe au SDS

Le traitement s'effectue dans une solution de Tris/ HCl à 0,01 M, pH-7,4, de NaCl à 0,01 M et de SDS à 1%, à 0-4°C pendant 5 minutes.

I. Dénaturation du complexe à la chaleur

Elle s'effectue dans une solution de Tris/HCl 0,005 M, pH-7,4 de citrate de sodium 0,015 M et de NaCl 0,15 M à 85°C pendant 10 minutes. L'échantillon est refroidi rapidement dans la glace, immédiatement après ce traitement.

J. Chromatographie sur des colonnes d'albumine méthylée-Kieselguhr

L'albumine de boeuf (fraction V) est estérifiée par la méthode de Mandell et Hershey (1960) en présence du mélange méthanol-HCl, pendant plusieurs jours à l'obscurité et à 37°C. 4 gr de Kieselguhr, suspendu dans 20 ml

d'une solution de NaCl 0,3 M dans du tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH-6,7 sont portés à ébullition pendant quelques minutes, refroidis et additionnés de 1 ml d'une solution aqueuse d'albumine méthylée à 1%. Après une agitation de quelques minutes, la suspension est versée dans une colonne à chromatographie de 1 cm × 20 cm. On laisse les particules se déposer, et on lave la colonne avec 10 ml de la solution saline. A la surface de cette couche on met soigneusement 0,5 gr de Kieselguhr traité comme plus haut mais exempt d'albumine méthylée. On peut fixer sur cette colonne jusqu'à 800 µgr d'acides nucléiques. L'éluion se fait au moyen d'un gradient linéaire de 0,3 M à 1,2 ou 1,5 M de NaCl dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH-6,7, sous une pression de 0,2 kg/cm² environ. Les fractionneuses sont du type "LKB" et "Pleuger".

K. Sédimentation en gradient de saccharose

Dans le cas de l'ARN extrait au phénol : les aliquots de 300 à 500 µgr ont été dissous dans 0,3 ml du tampon Tris/HCl 0,01 M, pH-7,4, MgCl₂ 5×10⁻⁴ M contenant , 0,5 mgr/ml de bentonite et mis sur un gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 % (p/v) (Britten and Roberts, 1960) préparé dans le même tampon. La centrifugation est effectuée dans une centrifugeuse Spinco préparative dans le rotor SW 39 (tubes de 5 ml) à 39.000 tm pendant 3,5 ou 4 heures à 4°C environ.

Les différentes zones du gradient sont obtenues en perçant le fond du tube à l'aide d'une fine épingle. La vitesse d'écoulement des gouttes est réglée par l'application d'une pression variable au moyen d'un appareil simple à colonne d'eau. Habituellement on s'arrange pour avoir 30 à 45 fractions.

Dans le cas des acides nucléiques extraits au mélange SDS- chloroforme - alcool amylique, des aliquots de 350 à 500 μ gr ont été dissous dans 0,5 à 1 ml de tampon Tris/HCl 0,01 M, pH-7,4, NaCl 0,3 M, EDTA 0,001 M, et mis sur un gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 % ou de 10 à 40 % préparé dans le même tampon. La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 (tubes de 27 ml) à 22.000 tm pendant 14 heures à 4°C environ.

L. Centrifugation en gradient de densité (CsCl)

Les échantillons de 0,3 à 0,5 ml sont additionnés de CsCl solide pour avoir une densité (ρ) de 1,72 et déposés dans le fond de tubes à 5 ml du rotor SW 39.

Ensuite, on dépose soigneusement à la surface de cette couche 4,5 à 4,7 ml d'une solution de Tris/HCl 0,01 M, pH-7,4 et d'EDTA 0,001 M contenant du CsCl dont la concentration correspond à une densité de 1,72. La centrifugation est effectuée dans le rotor SW 39 à 32.500 tm pendant 60 à 72 heures à 18°C environ.

Le gradient formé dans ces conditions est linéaire et sa densité va de 1,65 à 1,80 (le contrôle est effectué par des mesures au réfractomètre).

M. Lecture de la densité optique

Les fractions sont amenées à 1 ml (sauf spécification contraire) au moyen du tampon qui a servi à faire le gradient. La densité optique est lue à 260 m μ .

N. Comptage de la radioactivité

Les fractions de 1 ou 2 ml provenant de la colonne d'albumine méthylée sont mélangées avec 10 ml de la solution de Bray (1960), dont voici la composition :

60 gr de naphthalène, 4 gr de PPO, 0,2 gr de POPOP, 100 ml de méthanol absolu, 20 ml d'éthylène glycol et ramenée à 1 litre par du dioxane. Les fractions provenant des gradients de saccharose ou de CsCl sont précipitées par du TCA à 5 % (concentration finale) en présence de 100 µg d'albumine de boeuf (dans le cas de l'ARN extrait au phénol) ou de 100 µg d'ADN de sperme de saumon (dans le cas des acides nucléiques extraits par le mélange SDS-chloroforme-alcool amylique). La filtration est effectuée sur des filtres Millipore (HA 0,45) ; les précipités sont lavés 2 fois par du TCA 5% et séchés dans une étuve à 37°C pendant 90 minutes, puis déposés dans des fioles contenant 5 ml du milieu scintillant suivant : 1 litre de toluène, 5 gr de PPO et 0,5 gr de dimethyl POPOP.

2.2.2. ETAT PHYSIQUE DE L'ARN NOUVELLEMENT FORME.

A. Sédimentation en gradient de saccharose.

Nous avons incubé les noyaux pendant 30 minutes, en présence de $5,6 \mu\text{C/ml}$ d'Uridine- ^{14}C (28 mC/mM) ou de $1 \mu\text{C/ml}$ de ^{32}P sans entraîneur. L'ARN, extrait de ces noyaux par le mélange SDS-phénol à la température ambiante, est analysé en gradient de saccharose. La préparation comprend exclusivement l'ARN-r (28S et 18S) et l'ARN 4S. Aucune radioactivité importante n'a été décelée (Figure 9, courbe D.O. 260).

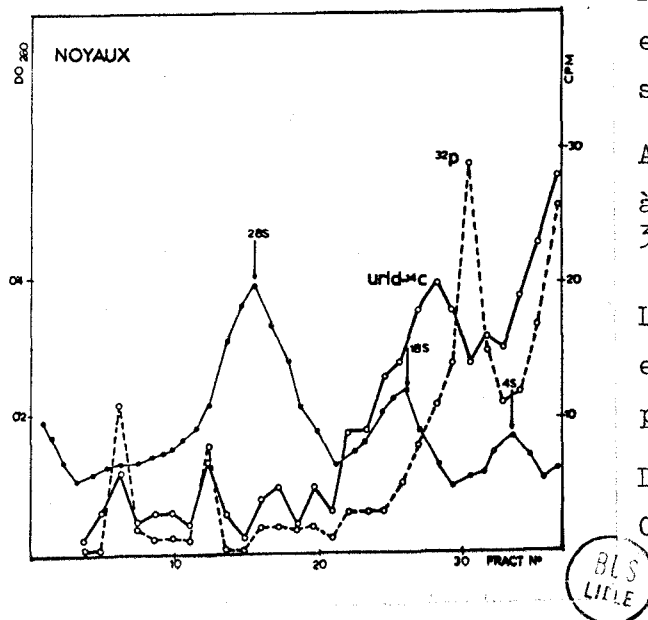


Fig. 9 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 %.

ARN des noyaux marqués à l'Uridine- ^3H et au ^{32}P .

La centrifugation est effectuée à 39.000 tm pendant 4 heures à 4°C .

D.O. 260 • • • •

CPM ° ° ° °

Afin de vérifier si la méthode d'extraction que nous utilisons permet d'extraire les ARN rapidement marqués nous l'avons utilisée pour extraire les ARN de cellules de HeLa intactes préalablement marquées à l'Uridine- ^3H pendant 30 minutes.

Comme on peut le voir, les profils que nous avons obtenus à partir de ces ARN (Fig. 10) sont comparables à ceux des cellules de HeLa et de cellules L marquées dans des conditions similaires par d'autres auteurs (Scherrer et Darnell, 1962 ; Graham et Rake, 1964).

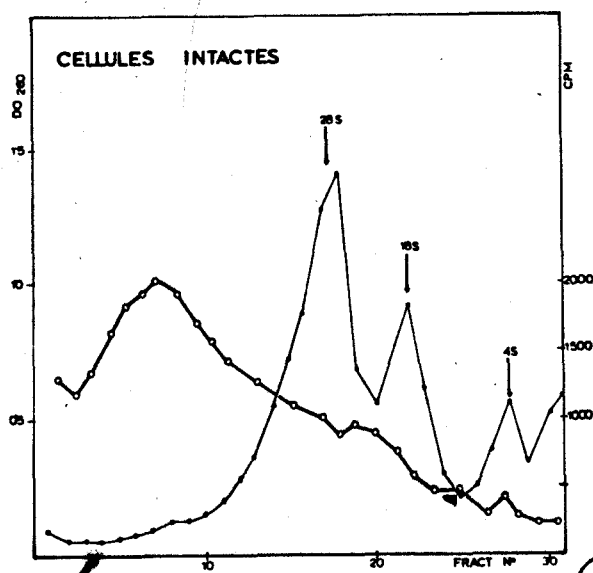


Fig. 10 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 %.

Cellules de HeLa marquées à l'Uridine-³H pendant 30 minutes.

La centrifugation est effectuée à 39.000 tm pendant 3,5 heures à 4°C.

D.O. 260 • • • •

CPM ○ ○ ○ ○



Cependant, si l'on effectue sur l'interphase des noyaux une extraction supplémentaire à 60°C, on décèle une radioactivité quoique faible dans la région située entre 4S et 18S (Figure 9).

Des dosages biochimiques effectués parallèlement ont confirmé que lorsqu'on effectue l'extraction à la température ordinaire, la majeure partie de la radioactivité (80 à 90 %) de l'ARN reste associée à l'interphase. Moins de 8 % de l'activité de l'interphase est due à l'ADN.

Ces indications plaident en faveur de l'existence d'un ARN radioactif associé soit avec l'ADN, soit avec les protéines soit avec les deux à la fois. Il s'est donc avéré nécessaire d'étudier, dans un premier temps, la fraction des acides nucléiques totaux. Dans ce but, nous avons employé la méthode au SDS-chloroforme-alcool amylique, conseillée par Monsieur le Professeur Kanazir. Nous avons augmenté la force ionique du tampon d'extraction (voir le chapitre 2.2.1.) afin de protéger la structure de l'ADN et du complexe ADN-ARN, si toutefois ce dernier était présent dans nos préparations. De plus, pour avoir des marquages plus élevés nous utiliserons dorénavant du ^{32}P à raison de $500 \mu\text{C}$ par ml de milieu d'incubation, sauf dans le cas des acides nucléiques de la figure 19 (voir indication dans la légende).

L'examen spectrographique des acides nucléiques extraits au SDS-chloroforme-alcool amylique nous donne un rapport $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{230}$ se situant entre 2,1 et 2,3 ce qui signifie une déprotéinisation assez poussée.

Les fibres d'acides nucléiques obtenues dans ces conditions ont été étudiées en gradient de saccharose (10 à 40 %).

Après une centrifugation de 14 heures à 22.000 tm le profil de la densité optique à 260 m μ permet de distinguer un grand pic qui est aussi plus léger et qui représente l'ADN et l'ARN 18S non séparés alors que l'épaule, plus lourde, représente l'ARN 28S (Figure 11).

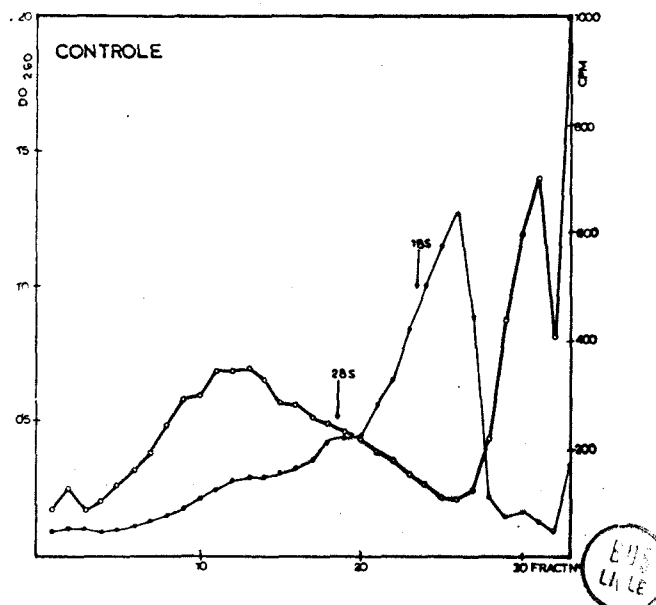


Fig. 11 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 10 à 40 %.

Acides nucléiques marqués au ^{32}P (500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes.

La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 22.000 tm pendant 14 heures à 4°C.

D.O. 260

CPM

Le profil de la radioactivité indique qu'il existe 2 groupes de molécules radioactives : l'un relativement homogène qui est plus léger que l'ADN et l'autre assez hétérogène et plus lourd que l'ADN.

La même quantité de matériel a été incubée en présence de RN-ase, dans une solution de force ionique de l'ordre de 0,3, pH-7,4 (voir chapitre 2.2.1.). Dans ces conditions le pic le plus léger est presque entièrement détruit, tandis que le pic hétérogène et lourd résiste

à la RN-ase à raison de 80 % ou plus (Fig. 12).

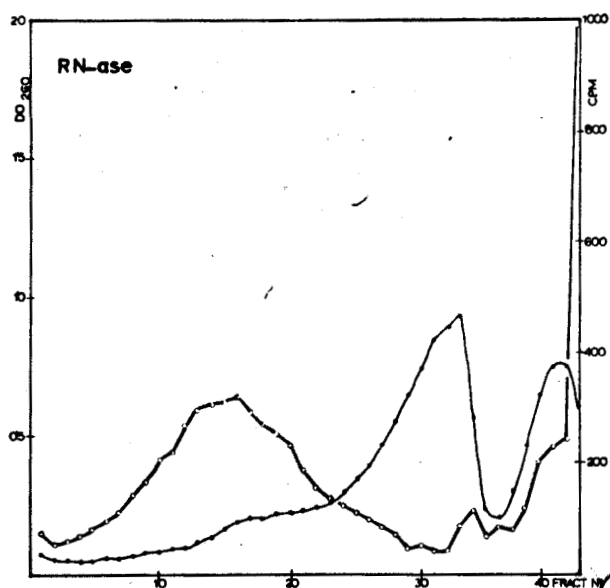


Fig. 12 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 10 à 40 %.

Mêmes acides nucléiques que ceux de la figure 11 sont traités à la RN-ase (force ionique de l'ordre de 0,3, pH-7,4).

Conditions de centrifugation similaires à celles de la figure 11.

D.O. 260

CPM

Une digestion à la RN-ase dans une solution de force ionique de l'ordre de 0,02, pH-7,4 donne un effet semblable (Figure 13).

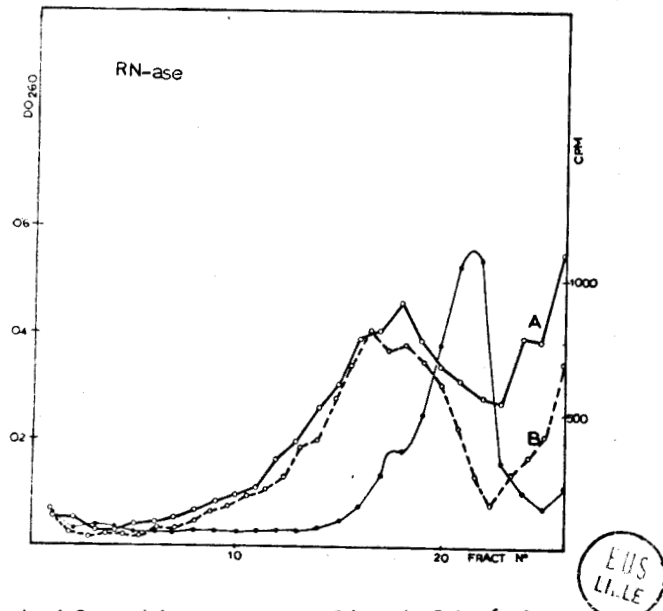


Fig. 13 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 10 à 40 %.

Acides nucléiques marqués au ^{32}P (500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes sont traités à la RN-ase (courbe B) (force ionique de l'ordre de 0,02, pH-7,4).

Conditions de centrifugation similaires à celles de la figure 11.

D.O. 260 (de l'échantillon non traité)

CPM

Courbe A : échantillon non traité

Courbe B : échantillon traité à la RN-ase

L'action de la DN-ase (force ionique de l'ordre de 0,3) permet de distinguer, sur le profil de densité optique à 260 m μ , les ARN-r (28S et 18S) (Figure 14).

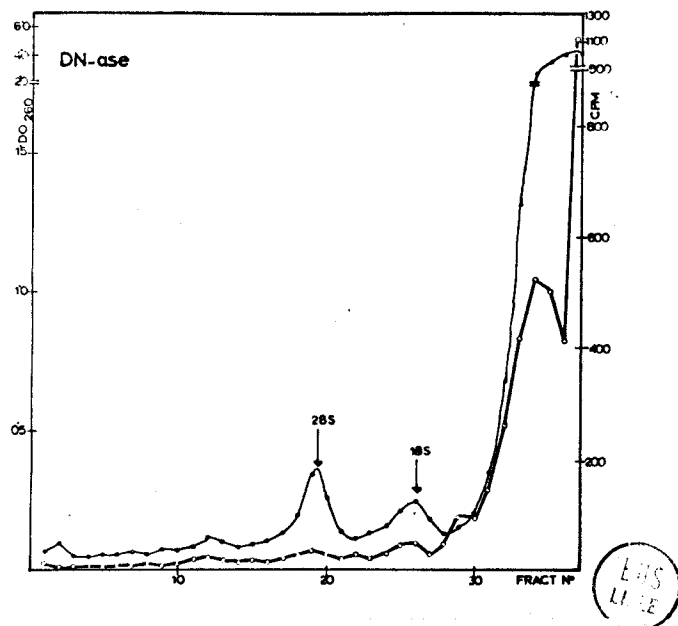


Fig. 14 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 10 à 40 %.

Mêmes acides nucléiques que ceux de la figure 11 sont traités à la DN-ase (force ionique de l'ordre de 0,3, pH-7,4).

Conditions de centrifugation similaires à celles de la figure 11.

D.O. 260 • • • •

C.P.M. ° ° ° °

Les produits d'hydrolyse de l'ADN, qui sédimentent beaucoup plus lentement ne masquent plus les deux pics d'ARN-r. (Nous avons comparé les vitesses de sédimentation de ces ARN avec celles des ARN ribosomiaux de réticulocytes de lapin. Le résultat obtenu suggère des constantes de sédimentation semblables ; voir : Marbaix et Burny, 1964).

La radioactivité du pic lourd disparaît complètement, alors que celle du pic léger reste pratiquement inchangée. Après l'action de la DN-ase, la radioactivité du sédiment du gradient, contrôlée à tout hasard, est négligeable par rapport à la radioactivité totale de l'aliquot non traité. Il en résulte que l'ARN radioactif présent dans le pic lourd est hydrolysé en composés acido solubles en présence de la DN-ase. Ajoutons que cette hydrolyse n'est pas due à un enzyme du type de la RN-ase pancréatique puisque la réaction enzymatique est effectuée en présence de bentonite (1 mgr/ml).

Les résultats que nous venons d'exposer suggèrent que les molécules du pic hétérogène et lourd contiennent à la fois de l'ADN et de l'ARN sous la forme d'un complexe.

En ce qui concerne la quantité d'ARN engagé dans le complexe, elle est extrêmement faible et ne représente que quelques pourcents de la quantité d'ADN. Afin de vérifier si, éventuellement, une protéine ne serait pas impliquée dans la structure de ce complexe, nous avons traité les échantillons par de la chymotrypsine α (force ionique de l'ordre de 0,3) et du SDS à 1 % (force ionique de l'ordre de 0,02). Ces deux traitements donnent des effets semblables comme le montrent les figures 15 et 16.

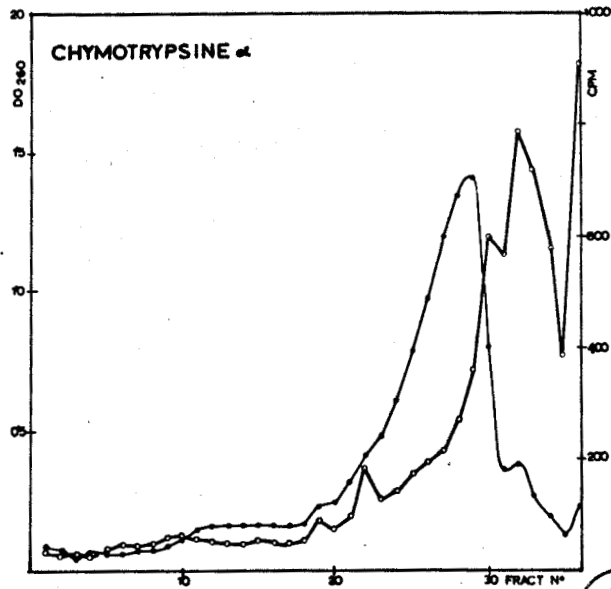


Fig. 15 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 10 à 40 %.

Mêmes acides nucléiques que ceux de la figure 11 sont traités à la Chymotrypsine α (force ionique de l'ordre de 0,3, pH-7,4).

Conditions de centrifugation similaires à celles de la figure 11.

D.O. 260 • • • •

CPM ° ° ° °

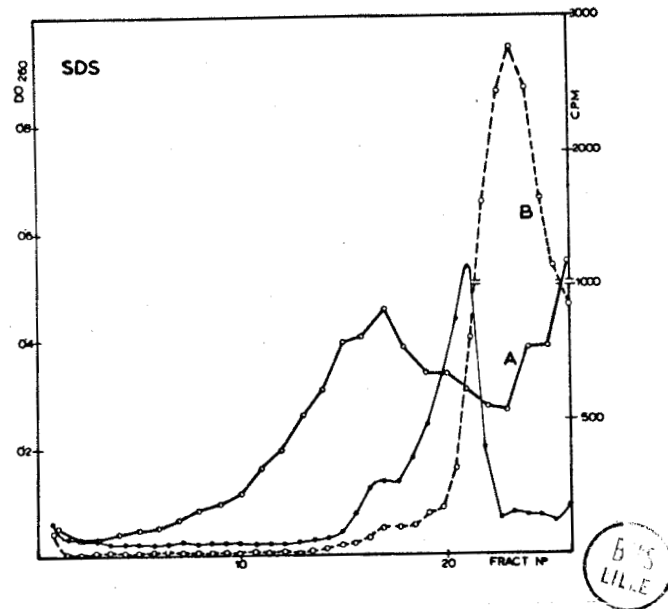


Fig. 16 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 10 à 40 %.

Acides nucléiques marqués au ^{32}P (500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes sont traités au SDS (courbe B) (force ionique de l'ordre de 0,02, pH-7,4).

Conditions de centrifugation similaires à celles de la figure 11.

D.O.₂₆₀ (échantillon non traité)

CPM

Courbe A : échantillon non traité

Courbe B : échantillon traité au SDS

La dissociation provoquée par la Chymotrypsine α ou le SDS suggère qu'une protéine pourrait être impliquée dans la liaison entre l'ADN et l'ARN.

B. Chromatographie sur les colonnes d'albumine méthylée.
- Kieselguhr.

Les acides nucléiques examinés par chromatographie sur une colonne d'albumine méthylée (élution par un gradient de NaCl de 0,3 à 1,2 M) donnent un profil de densité optique à 260 m μ où se distinguent un grand pic représentant l'ADN (II), élué par du NaCl 0,75 M et un pic plus petit, l'ARN (III), élué par du NaCl 0,9 M (Figure 17). La vérification a été faite

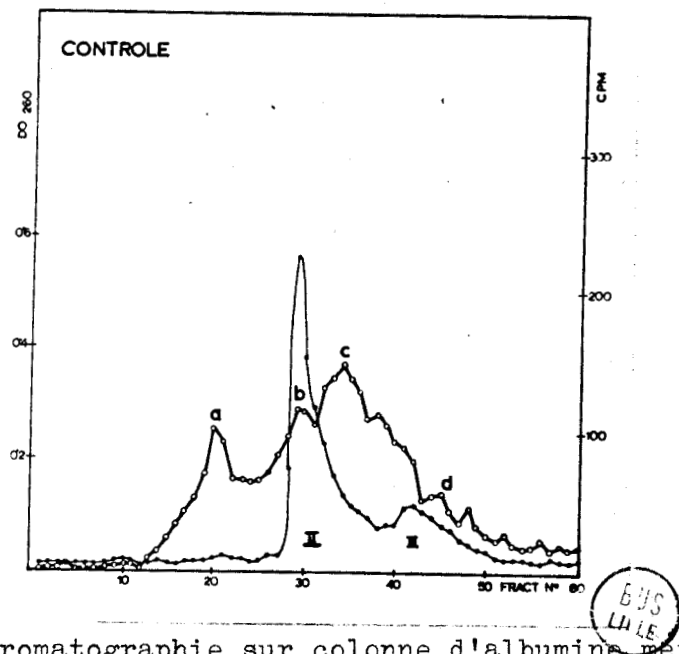


Fig. 17 Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée. Acides nucléiques marqués au ^{32}P (500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes.

Elution de la colonne d'albumine méthylée se fait par un gradient linéaire de NaCl de 0,3 à 1,2 M ; le volume total d'éluant est de 120 ml.

Pic II : ADN	D.O. 260	• • • •
Pic III : ARN-r	CPM	• • • •

à l'aide des réactions colorimétriques et enzymatiques. Le profil de radioactivité indique (comme dans le cas des gradients de saccharose) deux groupes de molécules radioactives ; l'un relativement homogène (a) (le pic le plus léger dans le gradient de saccharose) qui s'élué peu avant l'ADN et l'autre assez hétérogène (b, c) (le pic le plus lourd dans le gradient de saccharose) qui s'élué dans la région de l'ADN. Il semble qu'on puisse distinguer plusieurs espèces de molécules dans cette région hétérogène.

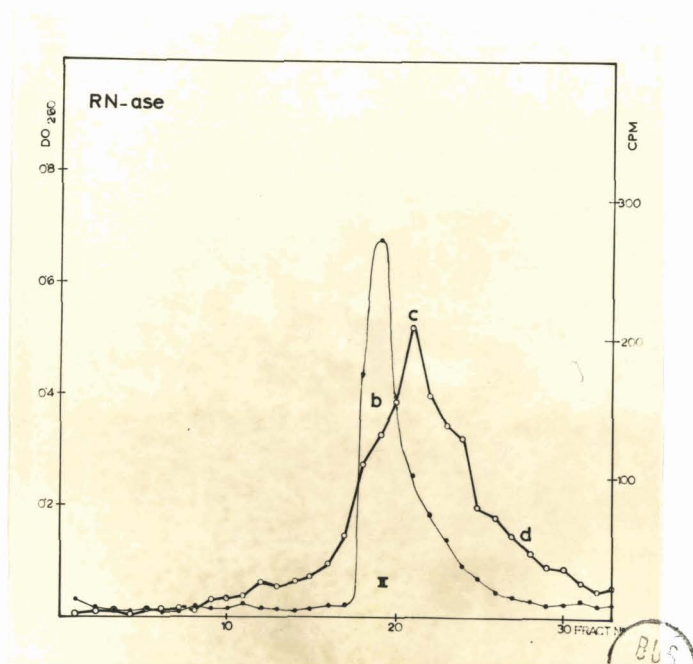


Fig. 18 Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.

Mêmes acides nucléiques que ceux de la figure 17 sont traités à la RN-ase (force ionique de l'ordre de 0,3, pH-7,4).

Conditions d'éluion similaires à celles de la figure 17.

Volume total d'éluant est de 80 ml.

Pic II : ADN

D.O. 260 ●●●●

CPM ○○○○

Quand les fibres sont traitées par de la RN-ase (force ionique de l'ordre de 0,3) on constate la disparition du pic qui s'élué avant l'ADN et qui représente environ 20% de la radioactivité totale. Par contre, le pic hétérogène est pratiquement résistant à la RN-ase (Figure 18, page précédente).

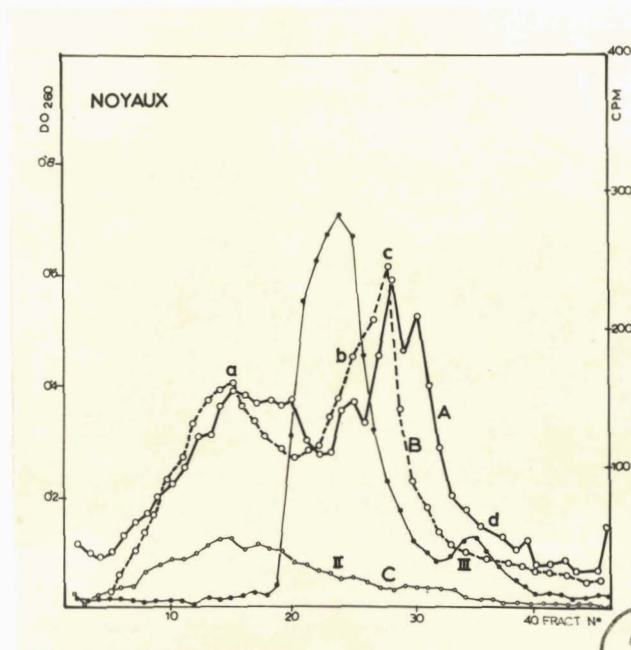


Fig. 19 Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.

Acides nucléiques marqués au ^{32}P (200 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 min. sont traités à la RN-ase (courbe B) (force ionique de l'ordre de 0,3, pH-5) et à la DN-ase (courbe C) (force ionique de l'ordre de 0,01, pH-7,4).

Conditions d'éluion similaires à celles de la figure 17.

Volume total d'éluant est 100 ml.

Courbe A : échantillon non traité

Courbe B : échantillon traité à la RN-ase

Courbe C : échantillon traité à la DN-ase

D.O. 260 • • • • (de l'échantillon non traité)

CPM ° ° ° °

Pic II : ADN

Pic III : ARN-r

Moins de 20 % de celui-ci est sensible à la RN-ase. L'examen en gradient de saccharose de fibres traitées à la RN-ase fournit des profils similaires comme nous l'avons vu.

Cependant il est intéressant de signaler que le pic précédant l'ADN sur la colonne d'albumine (pic léger dans le gradient de saccharose) est également résistant à la RN-ase si la digestion se fait à pH-5 (force ionique de l'ordre de 0,3). L'ARN-r dans ces conditions est entièrement hydrolysé (Figure 19).

Le traitement par la DN-ase (force ionique de l'ordre de 0,01) provoque la disparition de la majeure partie de la radioactivité. Sur la figure 19 la courbe de la densité optique à 260 m μ et la courbe A de la radioactivité appartiennent toutes deux à un échantillon non traité (contrôle). Les radioactivités des aliquots traités à la RN-ase (courbe B) et à la DN-ase (courbe C) sont corrigées en fonction de la quantité d'acides nucléiques utilisées. Remarquons que les résultats des extractions dans le mélange Tris 0,01 M, pH-7,4, NaCl 0,3 M, citrate de sodium 0,03 M contenant du MgCl₂ 0,001 M ou une quantité équivalente d'EDTA, sont similaires. Cependant les fibres destinées à l'examen sur colonne d'albumine méthylée ont été extraites dans le tampon contenant du MgCl₂. (Les traces d'EDTA qui restent dans les fibres après la précipitation semblent gêner l'élution de la population de molécules marquées appartenant au pic hétérogène alors que le profil de la D.O.₂₆₀ est normal.)

Les fibres extraites en présence du $MgCl_2$ et centrifugées sur un gradient de saccharose (10 à 40 %) (Figure 20) donnent des profils similaires à ceux que nous avons déjà obtenus en présence de l'EDTA.

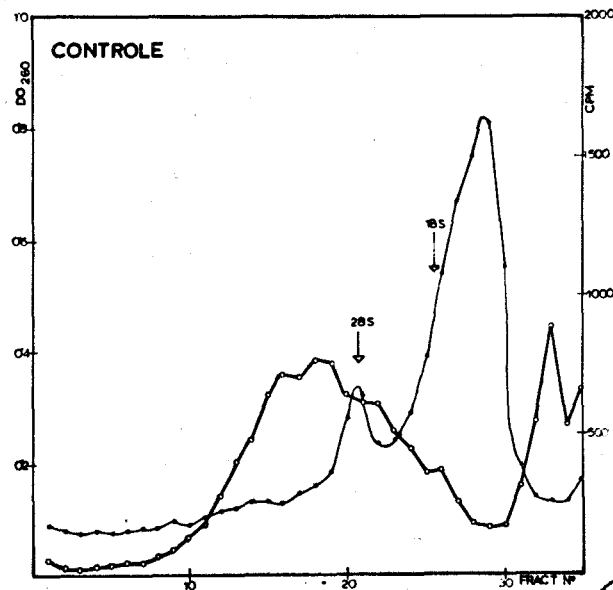


Fig. 20 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 10 à 40 %.

Mêmes acides nucléiques que ceux de la figure 17. La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 22.000 tm pendant 14 heures à 4°C.

D.O. 260 • • • •

CPM ° ° ° °

De plus, il semble que l'on puisse distinguer plusieurs sous-groupes de molécules marquées composant le pic hétérogène aussi bien dans le cas de la colonne d'albumine méthylée que dans le cas du gradient de saccharose (voir figures 17 et 20).

C. Centrifugation en gradient de densité (CsCl)

Les essais que nous allons décrire ont pour but d'apporter éventuellement des renseignements supplémentaires à l'association entre l'ADN et l'ARN.

Nous savons qu'un hybride ADN-ARN produit artificiellement par l'appariement d'une chaîne d'ADN avec une chaîne complémentaire d'ARN reste stable au sein d'une solution de force ionique très élevée. (Hayashy et al., 1964) Aussi avons-nous examiné les fibres des acides nucléiques dans un gradient de densité de CsCl ($\rho = 1,72$).

Le profil de la densité optique (Fig. 21) montre une bande correspondant à l'ADN alors que la radioactivité (courbe A) augmente de plus en plus lorsqu'on approche du fond du tube. La même quantité de matériel a été incubée en présence de RN-ase et soumise à la même analyse. La diminution de la radioactivité (courbe B) de cet aliquot est inférieure à 50 %. Ces examens nous permettent de penser qu'il est vraisemblable qu'une bonne partie du pic radioactif hétérogène (centrifugation en gradient de saccharose ou chromatographie sur colonne d'albumine méthylée) se dissocie dans la solution de CsCl.

Il nous a paru nécessaire de voir si une température élevée mais toutefois insuffisante pour dénaturer l'ADN, peut dissocier le complexe ADN-ARN.

Un aliquot dissous dans le mélange de citrate de sodium 0,015 M, NaCl 0,15 M et Tris 0,005 M, pH- 7,4 est chauffé pendant 10 min. à 85°C, puis refroidi dans la glace.

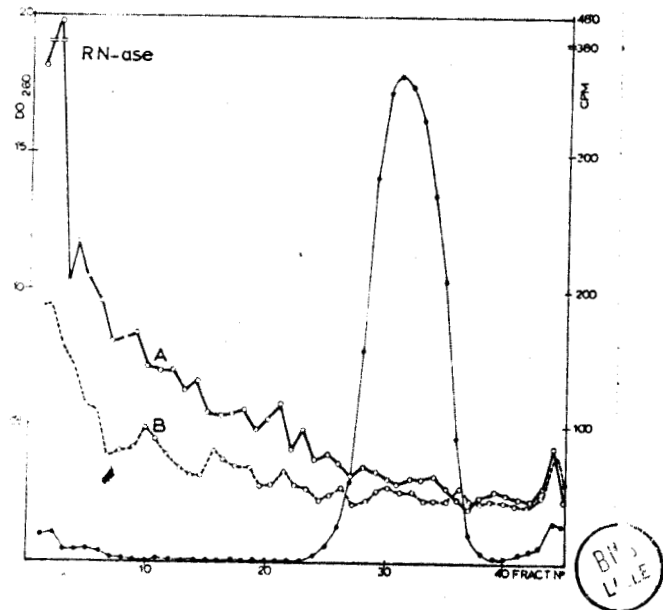


Fig. 21 Centrifugation en gradient de densité de CsCl Acides nucléiques marqués au ^{32}P ($500 \mu\text{C/ml}$ du milieu) pendant 15 minutes sont traités à la RN-ase (courbe B) (force ionique de l'ordre de 0,3 ; pH-7,4); gradient de densité de CsCl est linéaire, la densité va de 1,65 à 1,80. La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 39 à 32.500 tm pendant 60 heures à 18°C environ.

D.O. 260
 CPM
 Courbe A : échantillon non traité
 Courbe B : échantillon traité à la RN-ase

La moitié sert de contrôle alors que l'autre moitié est traitée par la RN-ase. Le profil de la densité optique figure 22 ne semble pas avoir été changé d'une manière appréciable ce qui indique que la densité de l'ADN reste approximativement la même et que l'ADN n'a pas été dénaturé.

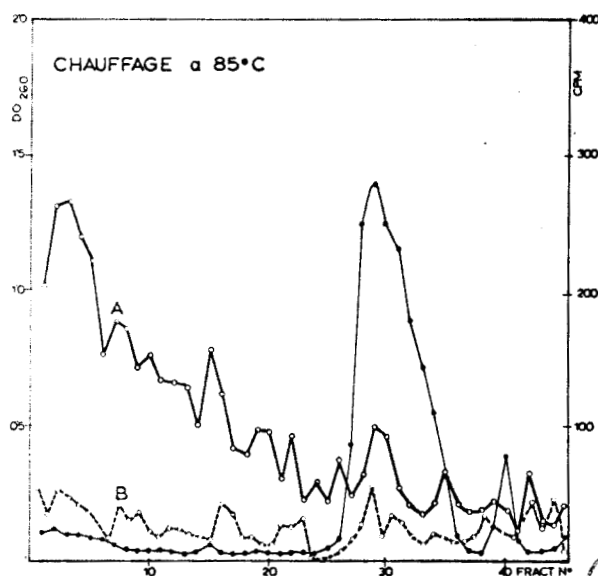


Fig. 22 Centrifugation en gradient de densité de CsCl Acides nucléiques marqués au ^{32}P (500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes sont chauffés, puis refroidis. La moitié de l'aliquot est traitée à la RN-ase, l'autre moitié sert de témoin. Conditions de centrifugation similaires à celles de la figure 21.

D.O. 260

CPM
 ooooo

Courbe A : échantillon non traité à la RN-ase

Courbe B : échantillon traité à la RN-ase

Cependant la diminution importante de la radioactivité de l'échantillon traité à la RN-ase suggère que la majeure partie de l'ARN se détache à 85°C.

La sensibilité à la RN-ase après le chauffage pourrait être expliquée en se basant sur le fait que les liaisons hydrogène sont rompues par l'élévation de la température. Par contre, ces liaisons devraient rester stables dans les concentrations élevées du CsCl, ce qui ne semble pas être le cas de notre complexe.

2.2.3. PROPRIETES PHYSIQUES ET BIOCHIMIQUES DE L'ARN NOUVELLEMENT FORME.

A. Ordre de grandeur du poids moléculaire de l'ARN engagé dans le complexe ADN-ARN.

Notre intérêt s'est porté ensuite sur l'estimation de la grandeur des chaînes d'ARN se trouvant sous leur forme native dans le complexe ADN-ARN. Dans ce but nous avons employé des gradients de saccharose de concentrations plus faibles (5 à 20 %), alors que les conditions (durée, vitesse et température) des centrifugations restaient les mêmes que celles des gradients plus denses (10 à 40 %) (voir le chapitre 2.2.1.). Quand des fibres prétraitées par la chymotrypsine α sont mises sur le gradient de saccharose, (Figure 23 et 24), on observe une population très hétérogène de molécules allant jusqu'à 18 S, ce qui correspondrait à un poids moléculaire de l'ordre de 6×10^5 (Hall et Doty 1959).

Comme nous l'avons déjà vu, le traitement par la DN-ase (Figure 14) provoque l'hydrolyse de l'ARN contenu dans le complexe (pic lourd), qui libère des composés acido-solubles. Nous avons toutefois vérifié, si l'on peut obtenir après l'action de la DN-ase l'apparition d'une quantité, même très faible, d'ARN plus lourd. D'après les figures 25 et 26 on peut se rendre compte qu'il s'agit uniquement des molécules du pic léger.

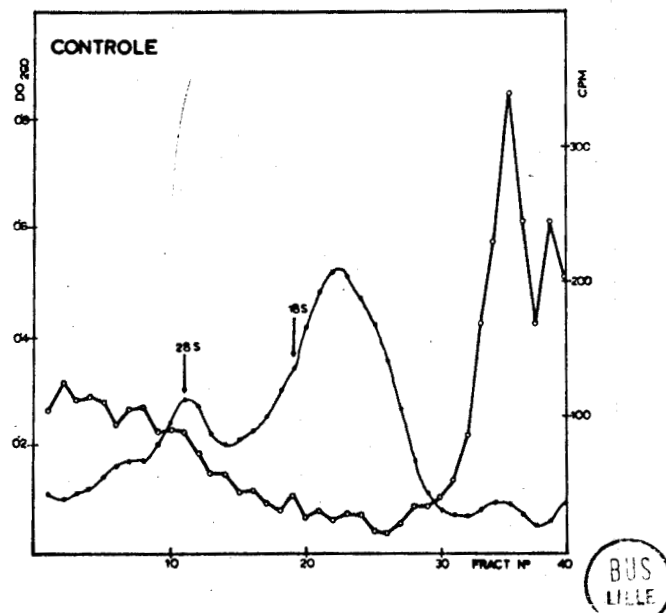


Fig. 23 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 %.

Acides nucléiques marqués au ^{32}P (500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes.

La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 22.000 tm pendant 14 heures à 4°C .

D.O. 260 ••••

CPM ••••

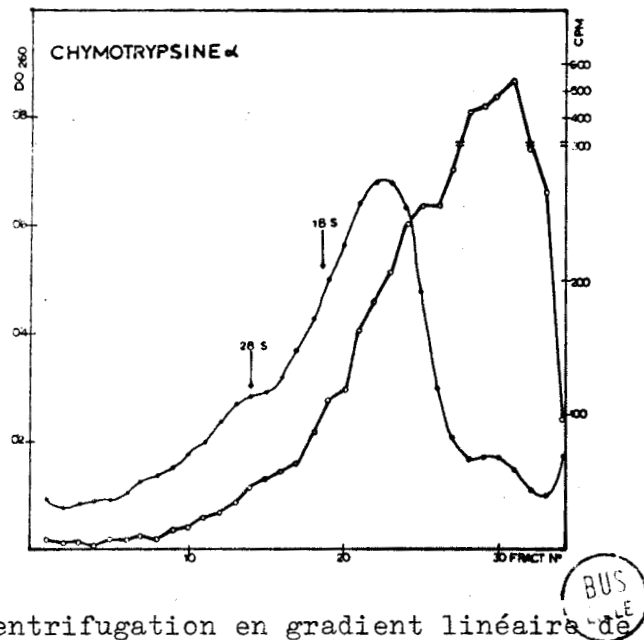


Fig. 24 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 %.
 Mêmes acides nucléiques que ceux de la figure 23 mais traités à la chymotrypsine α (force ionique de l'ordre de 0,3 , pH-7,4)
 Conditions de centrifugation similaires à celles de la figure 23.

D.O. 260 •••••
 CPM •••••

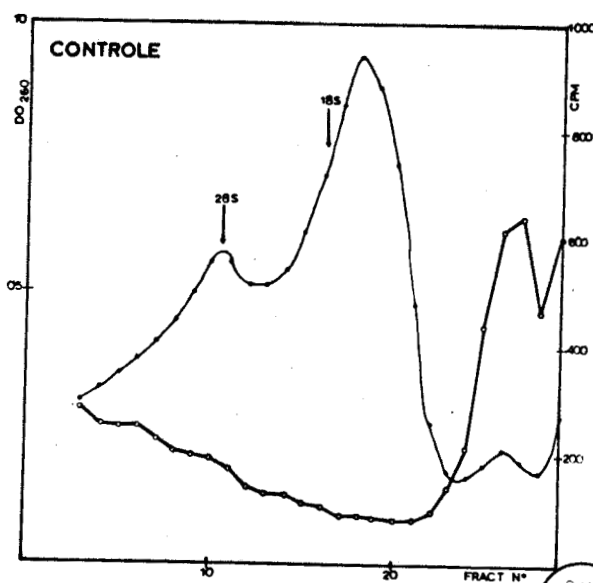


Fig. 25 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 %.

Acides nucléiques marqués au ^{32}P (500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes.

La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 22.000 tm pendant 14 heures à 4°C.

D.O. 260

CPM

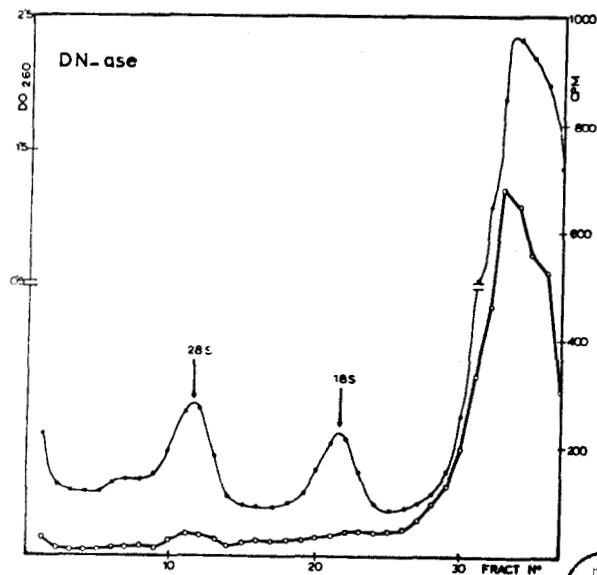


Fig. 26 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 %.

Mêmes acides nucléiques que ceux de la figure 25 sont traités à la DN-ase (force ionique de l'ordre de 0,3, pH=7,4).

Conditions de centrifugation similaires à celles de la figure 25.

D.O. 260 • • • •

CPM • • • •

L'ARN provenant de la dissociation du complexe en présence du SDS dans le tampon à basse force ionique peut être rendu sensible à la RN-ase (figure 27).

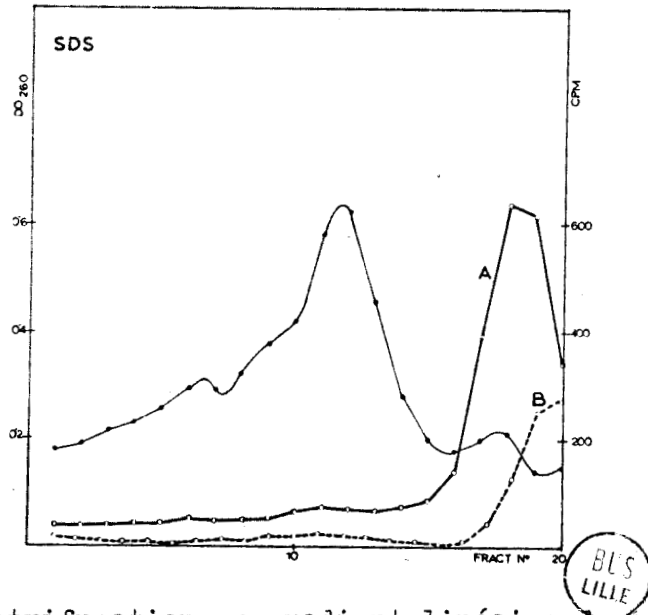


Fig. 27 Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 %.

Acides nucléiques marqués au ^{32}P (500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes sont traités au SDS (force ionique de l'ordre de 0,02, pH-7,4) afin de dissocier le complexe ADN-ARN. Après l'élimination du SDS (précipitation par 2 volumes d'alcool absolu) les acides nucléiques sont traités à la RN-ase (courbe B) (force ionique de l'ordre de 0,3, pH-7,4).

D.O. 260 • • • •
 CPM

La radioactivité, persistant après la digestion, est de l'ordre de 20 % et correspond après hydrolyse, aux produits acido insolubles.

Cependant, cet ARN possède un poids moléculaire plus homogène et ne semble pas contenir des quantités importantes de fractions plus lourdes (10S à 14S). Cette variation du poids moléculaire pourrait s'expliquer par le fait que la solution dans laquelle s'effectue la dissociation en présence du SDS doit être traitée par 2 volumes d'alcool absolu afin d'éliminer le SDS dont la présence diminue l'activité de la RN-ase pancréatique. Cette action sur le poids moléculaire de l'ARN n'est pas surprenante puisqu'on sait que le mode d'extraction des ARN rapidement marqués peut introduire de sérieuses modifications dans la vitesse de sédimentation, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce travail (voir le chapitre 1.2.).

B. Composition en bases.

Pour tenter de caractériser biochimiquement les deux espèces d'ARN synthétisées dans les noyaux in vitro (pic précédant l'ADN et pic hétérogène s'éluant dans la région de l'ADN sur la colonne d'albumine méthylée), nous avons étudié la répartition du ^{32}P dans leurs ribonucléotides.

Les fibres extraites par la méthode au SDS-chloroforme-alcool amylique sont tout d'abord traitées par la RN-ase puis les acides nucléiques précipitables par 1 volume d'alcool absolu sont lavés au PCA 5% et hydrolysés par KOH 0,3 N.

La composition en bases de l'ARN hydrolysé rappelle celle de l'ADN, comme nous pouvons le voir sur le tableau ci-dessous : (* voir Errera, 1963)

	A	(U)T	G	C
* ADN	31,0%	28,8%	17,5%	22,8%
ARN	35,1%	25,4%	18,5%	21,0%

La composition en bases du pic hétérogène (b, c) s'éluant dans la région de l'ADN (voir la figure 17) est la suivante

A	U	G	C
39,9%	19,7%	26,8%	13,6%

L'ARN contenu dans le pic radioactif (a) qui précède l'ADN a (voir la figure 17) les caractéristiques suivantes

A + C	U	G
54,5%	4,7%	40,8%

Enfin, voici les caractéristiques de la toute petite quantité de substance radioactive (d) s'éluant avec l'ARN-r (voir figure 17) :

A	U	G	C
48,1%	13,8%	20,6%	17,5%

Ces résultats suggèrent des différences biochimiques entre les populations de molécules qui s'éluent à des concentrations variables de NaCl.

Remarquons cependant que le "pool" peut influencer les résultats concernant la composition en bases déterminée par la radioactivité des 4 ribonucléotides. Il est en effet connu que le "pool" ne se marque pas d'une manière instantanée et qu'il possède sa propre cinétique de marquage. Par conséquent, la composition en bases des ARN n'est pas constante au cours du temps (voir Roberts, 1965). Bien que le "pool" soit probablement peu important dans le cas des noyaux isolés nous ne savons pas quelle est son influence sur la composition en bases du RNA.

La détermination directe des rapports molaires des bases de l'ARN engagé dans le complexe n'a pas été possible, en raison de la quantité trop faible de cet ARN.

C. Action de l'Actinomycine D sur la synthèse de l'ARN dans les noyaux incubés in vitro.

Les noyaux sont incubés pendant 10 minutes en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$ d'Actinomycine D et l'incubation est poursuivie en présence de ^{32}P (500 $\mu\text{C/ml}$) pendant 15 minutes.

Les fibres sont absorbées sur une colonne d'albumine méthylée, et éluées par un gradient de NaCl de 0,3 M à 1,5 M (Figure 28).

Il en résulte une réduction de la radioactivité de l'ordre de 50 % par rapport au témoin non traité au niveau du pic de l'ADN (D.O.₂₆₀). La radioactivité s'éluant avant ce pic ne semble pas être affectée.

2.2.4. ETUDE COMPARATIVE DE L'ARN NOUVELLEMENT FORME
DANS DES NOYAUX INCUBES IN VITRO ET DES CELLULES
DE HeLa INTACTES.

Par l'étude chromatographique des acides nucléiques des noyaux incubés in vitro, nous avons remarqué qu'il ne semble pas y avoir de synthèse d'ARN lourds rapidement marqués (voir les figures 17 et 19). Ces ARN s'éluent normalement peu après l'ARN-r, comme nous allons le voir dans un instant. De plus, la radioactivité, quoique très faible dans cette région, est portée par un ARN dont la composition en bases semble être totalement distincte de celle des ARN 45S et 35S. Mais si nous ne détectons pas dans les noyaux incubés in vitro la présence d'ARN lourds rapidement marqués, cela ne veut pas dire nécessairement qu'ils ne sont pas synthétisés, car on ne peut écarter la possibilité d'une dégradation éventuelle au cours de l'incubation.

Afin de savoir si les ARN 35S et 45S sont susceptibles de se dégrader dans nos conditions d'incubation, nous avons employé des noyaux provenant de cellules intactes, dont les ARN 45 S et 35S avaient été marqués au préalable. Environ $1,6 \cdot 10^8$ cellules ont été marquées par le ^{32}P (100 $\mu\text{C}/\text{ml}$) pendant 15 minutes à 37°C. Après un lavage rapide à froid $0,4 \cdot 10^8$ cellules ont été traitées immédiatement par une solution de SDS-chloroforme-alcool amylique, afin d'extraire les fibres d'acides nucléiques.

A partir des $1,2 \cdot 10^8$ cellules restantes, nous avons extrait les noyaux. La moitié de ces noyaux a été immédiatement traitée en vue de l'extraction des acides nucléiques.

L'autre moitié a été incubée dans le milieu ne contenant pas de phosphore radioactif. Sur les figures 29 et 30 on peut voir les profils correspondants aux cellules et aux noyaux respectivement.

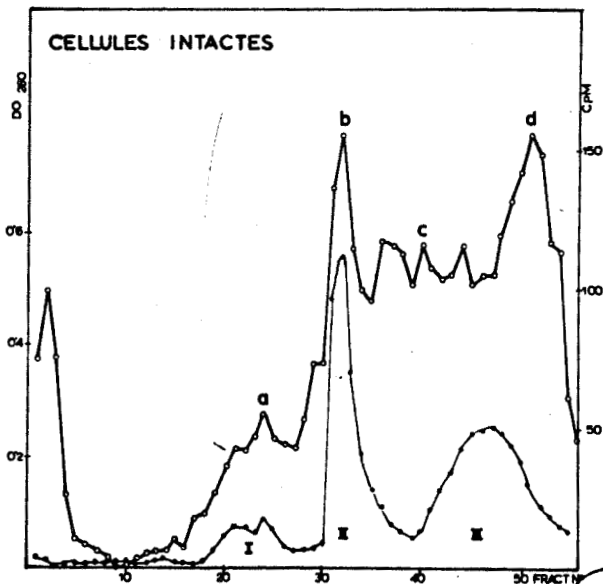


Fig. 29 Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée. Acides nucléiques (cellules intactes) marqués au ^{32}P (100 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes. L'éluion de la colonne d'albumine méthylée se fait par un gradient linéaire de NaCl de 0,3 à 1,2 M ; le volume total d'éluant est de 120 ml.

Pic II	: ADN	D.O.	260
Pic III	: ARN-r	CPM	
Pic d	: ARN 35S et 45S			

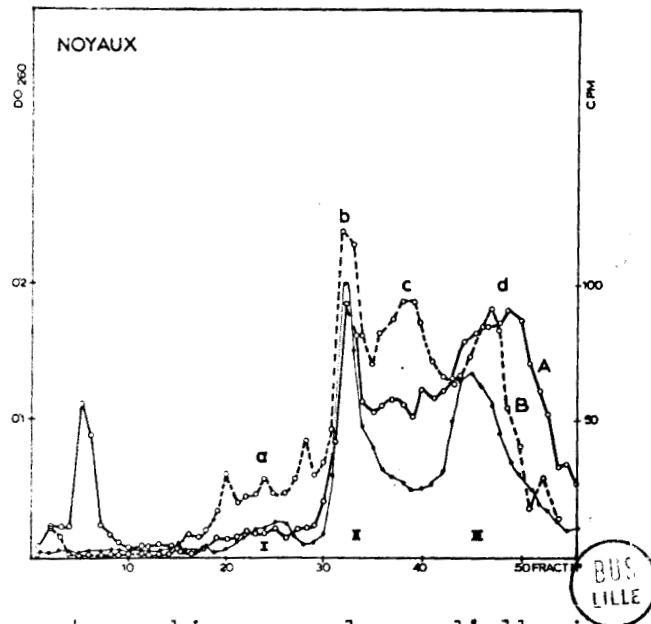


Fig. 30 Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.

Les noyaux des mêmes cellules que celles de la figure 29 ont été incubés dans le milieu sans ^{32}P pendant 15 minutes à 37°C (courbe B) Conditions d'éluion similaires à celles de la figure 29.

D.O. 260 ••••

CPM ◊◊◊◊

Courbe A : noyaux non incubés

Courbe B : noyaux incubés

Pic II : ADN

Pic III : ARN-r

Pic d : ARN 35S et 45 S

Le profil de la radioactivité provenant des cellules intactes (figure 28) dont les ARN lourds avaient été marqués (pic d) est semblable à celui des noyaux non incubés (fig. 30, courbe A). Cependant le pic d du profil de la radioactivité (fig. 30, courbe B) des noyaux incubés

pendant 15 minutes dans le milieu non radioactif montre une certaine dégradation des fractions lourdes ce qui pourrait signifier que l'ARN 45S est partiellement dégradé ; mais, par contre, le constituant 35S n'est pas affecté. Il n'est donc pas exclu que l'ARN 45S, étant métaboliquement instable, se soit transformé en produits plus légers, alors que la majeure partie de l'ARN 35S soit restée telle quelle au cours de l'incubation. Quoi qu'il en soit, si la majeure partie du constituant 35S reste présente pendant l'incubation, on devrait aussi pouvoir détecter sa présence éventuelle dans les noyaux incubés in vitro.

Comparons maintenant les courbes d'éluion des acides nucléiques provenant de noyaux et de cellules intactes marquées au ^{32}P pendant 15 minutes. Sur la figure 31 représentant les acides nucléiques totaux (précipités par 2 volumes d'alcool absolu) des cellules intactes, nous distinguons, dans le profil de la densité optique à 260 m μ , l'ARN-s (I), l'ADN (II) et l'ARN-r (III).

La courbe de la radioactivité fait apparaître l'ARN-s (a), l'ADN (b) (celui-ci contenant en majeure partie l'ADN marqué), la zone hétérogène entre l'ADN et l'ARN-r (c) et le pic d'ARN lourd rapidement marqué (d), ce dernier contenant le mélange des ARN 45S et 35S.

Un traitement préalable à la RNA-ase ne laisse subsister que deux régions radioactives ; le pic b et l'épau-
le c (figure 32).

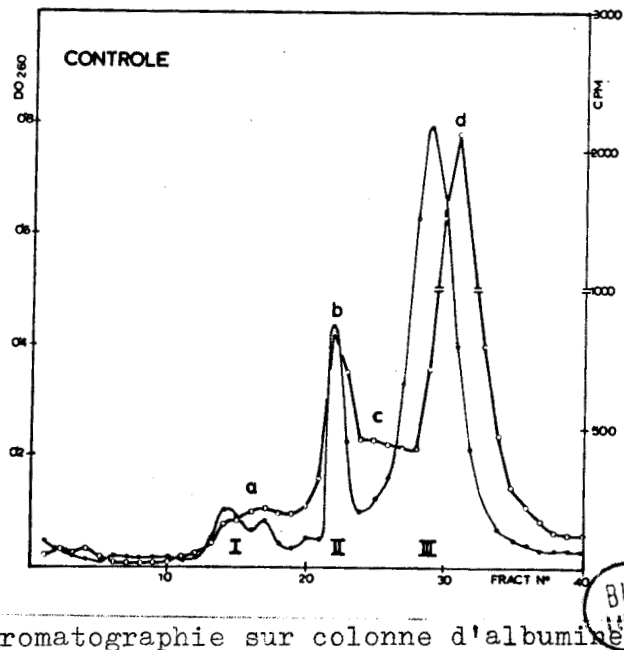


Fig. 31 Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.
Acides nucléiques (cellules intactes) marqués
au ^{32}P (100 $\mu\text{C}/\text{ml}$ du milieu) pendant 15 minutes.
Conditions d'élution similaires à celles de la
figure 29.

D.O. 260 • • • •

CPM ° ° ° °

Pic II : ADN

Pic III : ARN

Pic d : ARN 35S et 45S

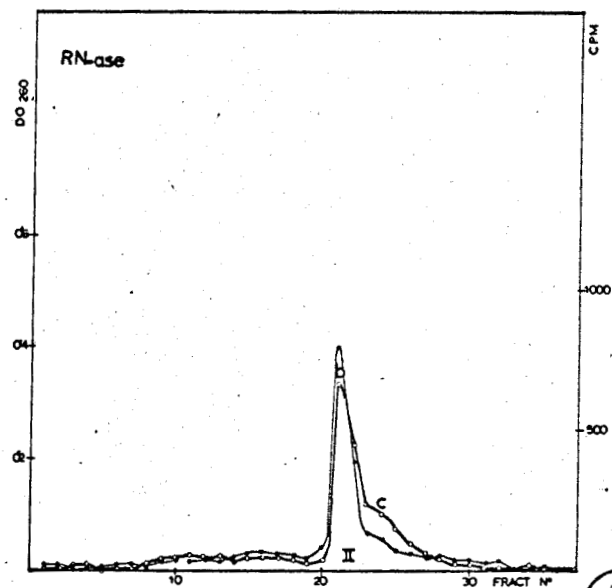


Fig. 32 Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.
 Les mêmes acides nucléiques que ceux de la
 figure 31 sont traités à la RN-ase (force ionique
 de l'ordre de 0,3, pH-7,4).
 Conditions d'élution similaires à celles de la
 figure 29.

D.O. 260 • • • •
 CPM ° ° ° °
 Pic II : ADN

Nous avons pu montrer que la radioactivité du pic b appartient en grande partie à l'ADN (étude préliminaire faite en collaboration avec Mademoiselle Brunfaut), alors que l'épaule c, si l'on en juge d'après la radioactivité spécifique relative (rapport nombre de coups/unité de D.O.₂₆₀) contient une fraction importante d'ARN marqué résistant à la RNA-ase et partiellement lié à de l'ADN. Cette fraction d'ADN est appelée par Mandel et Borkowska (1964) "l'ADN nucléolaire".

Dans le cas des noyaux (voir la figure 17) le pic c (qui est résistant à la RNA-ase) s'élue à peu près dans la même région que l'épaule des cellules intactes préalablement traitées à la RNA-ase.

Les expériences préliminaires, effectuées par Madame Szapary et Mademoiselle Brunfaut, en marquant des cellules intactes par de l'Uridine-³H de radioactivité spécifique très élevée, précisent l'existence d'un pic dans la région c, alors que, dans le cas d'un marquage au ³²P, la radioactivité de l'ADN masque partiellement ce pic.

Il est donc vraisemblable que la synthèse d'ARN radioactif détectée dans les noyaux in vitro représente la première ou l'une des toutes premières étapes de la synthèse de l'ARN nucléaire total telle qu'elle se déroule dans les noyaux des cellules intactes. Des études futures sur les noyaux isolés seront sans doute très utiles pour l'étude des premières étapes de la synthèse de l'ARN et du mécanisme de son cheminement vers le cytoplasme.

3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

L'extraction de complexe ADN-ARN à partir d'organismes multicellulaires, présente un problème particulier qui doit être abordé par des méthodes quelque peu différentes des méthodes courantes d'extraction des acides nucléiques.

En effet, le complexe ADN-ARN contiendrait une ou plusieurs protéines (Bonner et al., 1961 ; Mead, 1964) probablement des polymérases (Konrad et Stent, 1964 ; Bremer et Konrad, 1964) ; dès lors, se pose le problème d'effectuer une déprotéinisation ménagée du complexe, sans altérer cette protéine particulière qui participerait au maintien même du complexe ADN-ARN.

Sachant que des forces ioniques élevées peuvent contribuer à la stabilité de la double hélice d'ADN, il nous a paru raisonnable de supposer que le même effet pourrait éventuellement intervenir dans la protection de tels complexes. Pour cette raison, nous avons utilisé une solution de force ionique de l'ordre de 0,3 qui nous a permis d'extraire une certaine quantité d'un complexe ADN-ARN. Il est probable que les recherches ultérieures permettront de déterminer des conditions qui conduiront à de meilleurs résultats. On sait que Bremer et Konrad (1964) n'ont pas été à même de mettre en évidence le complexe ADN-ARN dans un gradient de saccharose. Nous supposons que la destruction du complexe est due à l'utilisation de SDS dans un milieu d'extraction à faible force ionique. Nous avons en effet démontré que le complexe ADN-ARN se dissocie en présence de SDS dans une solution de force ionique de l'ordre de 0,02.

Le complexe extrait selon le processus que nous avons mis au point (force ionique de l'ordre de 0,3) est presque totalement (80 à 90 %) résistant à la RN-ase pancréatique quelle que soit la force ionique du tampon utilisé pour la digestion enzymatique (de 0,02 à 0,3). Cependant la majeure partie du complexe se dissocie dans un gradient de CsCl (forces ioniques très élevées) et sous l'action de la chaleur (85°C). Ces résultats suggèrent que la stabilité du complexe n'est pas assurée de la même manière que dans le cas des hybrides ADN-ARN obtenus par Spiegelman et ses collaborateurs (Hayashi et al., 1965).

Nos expériences montrent que le complexe ADN-ARN est dissocié en présence de chymotrypsine (ainsi qu'en présence du SDS à basse force ionique) ce qui suggère qu'une protéine (peut-être la RNA polymérase se trouvant probablement au bout de la molécule en cours d'accroissement) interviendrait également dans le maintien de son intégrité. La libération de l'ARN du complexe par la chymotrypsine α montre que les chaînes d'ARN nouvellement synthétisées peuvent avoir un poids moléculaire allant jusqu'à $6 \cdot 10^5$ c.à.d. jusqu'à 18S. Il en est de même dans le cas d'ARN extrait au phénol à chaud ; ce qui correspond aux ordres de grandeurs observés par Darnell et al. (1963) pour l'ARN-m des polysomes de cellules de HeLa.

Il n'est pas exclu que ces ARN soient partiellement dégradé au cours de leur extraction et lors des traitements ultérieurs, car, nous l'avons vu dans le travail de Henshaw et al. (1965), certains facteurs physiques peuvent dégrader l'ARN 45S en fraction sédimentant autour de 10 S. Les mêmes auteurs pensent, non sans raison, que l'ARN 45S contient de l'ARN-m associé aux précurseurs des ARN-r. Il en découle que le poids moléculaire de l'ARN-m proprement dit est beaucoup plus faible que celui de la molécule mixte de l'ARN 45S. Si l'on admet, avec Grunberg-Manago et Gros (1964), que la plupart des monomères

protéiques ont un poids moléculaire se situant entre 10.000 et 40.000, des ARN-m allant jusqu'à 14S pourraient suffire pour la synthèses de telles protéines.

Il est toutefois probable que ces ARN proviennent du découpage de chaînes plus lourdes comprenant les ARN-m polycystroniques.

Cependant un traitement du complexe par la DN-ase en présence de bentonite ne fait pas apparaître de RNA libre. Cet ARN est probablement hydrolysé en produits acido-solubles.

Harris et al. (1963) ont remarqué aussi que l'ARN nucléaire rapidement marqué des cellules de HeLa est dégradé si les noyaux sont traités par la DN-ase. Il se pourrait qu'une nucléotide phosphorylase, localisée sur les chromosomes, soit libérée sous l'action de la DN-ase et qu'elle agisse préférentiellement sur l'ARN nucléaire (Harris et al., 1963).

Remarquons que Henshaw et al. (1965) ont décelé dans un système acellulaire une sensibilité différente de l'ARN rapidement marqué (6 - 14S) vis-à-vis des nucléases.

Dans notre cas, il est donc vraisemblable que l'ARN libéré du complexe soit dégradé par cet enzyme même en présence de bentonite.

En ce qui concerne la composition en bases du complexe séparé sur colonne d'albumine méthylée, l'on remarque surtout une quantité élevée d'acides adénylique et guanylique. Un résultat similaire a été signalé par Harris et al. (1963) dans le cas d'un marquage de HeLa pendant 10 à 15 minutes.

Dans ce travail l'étude de la répartition du ^{32}P dans les quatre ribonucléotides nous a servi de test pour détecter des différences entre les populations de molécules s'éluant aux différentes concentrations de NaCl. Comme il est difficile

actuellement de donner une très grande signification biologique à ces résultats nous n'avons pas poussé plus loin l'étude de ce problème. En effet, les expériences effectuées par Edström et Beermann (1962) ont montré que les ARN liés aux différents chromosomes ont une composition en bases différentes. Même les compositions en bases des différents "puffs" d'un seul chromosome différent également entre elles. Une remarque intéressante des mêmes auteurs attire l'attention sur le fait que la composition en bases de l'ARN des "puffs" ne ressemble pas à celle de l'ADN et qu'il n'y a pas de symétrie de bases entre A et U d'une part et G et C de l'autre. Ceci pourrait signifier qu'une seule des deux chaînes de l'ADN est copiée, comme dans le cas du phage SP 8 (Marmur et al., 1963).

Les ARN des différentes fractions du complexe ne doivent donc pas nécessairement avoir une composition en bases correspondante à celle de l'ADN, ni montrer une symétrie rigoureuse des bases. De plus, le "pool" peut introduire des erreurs dans la détermination de la composition en bases comme nous l'avons vu.

La centrifugation du complexe dans un gradient de force ionique de l'ordre de 0,02 montre que les constantes de sédimentation sont un peu plus faibles par rapport aux gradients de force ionique de l'ordre de 0,3. Ceci est probablement dû à une moindre rigidité des molécules à haute force ionique.

La question que l'on se pose est de savoir si la dissociation du complexe ARN-ADN a lieu ou non pendant l'incubation des noyaux. Le gros de l'ARN lourd rapidement formé provenant de cellules intactes préalablement marqué n'est pas hydrolysé au cours de l'incubation de ces noyaux ; on pourrait en déduire que cet ARN devrait être décelable, s'il est effectivement synthétisé. Or, nous l'avons constaté, on n'observe pas de radioactivité significative dans la région où cet ARN devrait

être normalement élué d'une colonne d'albumine méthylée.

Dès lors, deux hypothèses sont permises :

1° le détachement de l'ARN du complexe n'a pas lieu dans les noyaux incubés in vitro,

2° le constituant lourd n'est pas synthétisé.

Afin de mieux comprendre le détachement de l'ARN à partir de l'ADN de nouvelles expériences semblent être nécessaires en particulier pour préciser le rôle des ribosomes ou de leurs précurseurs dans ce mécanisme.

La chromatographie dans laquelle l'ARN s'éluant dans la région de l'ADN est réduit d'environ 50 % en présence d'actinomycine D constitue une preuve directe de ce que les molécules du complexe contiennent un ARN dont la synthèse est dirigée par l'ADN.

La diminution de radioactivité en présence d'actinomycine se trouve confirmée par l'étude cinétique exposée dans la première partie de ce travail.

R E S U M E.

Un complexe contenant à la fois de l'ADN et de l'ARN a été isolé après incubation in vitro de noyaux de cellules HeLa. Les expériences de dissociation de ce complexe par le SDS et la chymotrypsine dans les conditions décrites, suggèrent qu'une protéine participe à cette liaison entre l'ADN et l'ARN.

Les profils de sédimentation montrent une hétérogénéité assez élevée des molécules du complexe et de l'ARN provenant de celui-ci ; de plus les analyses chromatographiques (colonne d'albumine méthylée) suggèrent que ce complexe comprend réellement un ARN à marquage rapide, comparable à celui qui est synthétisé dans les noyaux des cellules intactes.

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

- ALLFREY, V.G., STERN, H., MIRSKY, A.E., and SAETREN, H.,
J. Gen. Physiol. (1952), 35, 529
- ALLFREY, V.G., and MIRSKY, A.E., Proc. Natl. Sci. U.S. (1957),
43, 589
- ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E. and OSAWA, S., J. Gen. Physiol.
(1957), 40, 451
- ALLFREY, V.G., dans "The Cell", 1959, I, 234, édité par
Brachet J. et Mirsky A.E.
- ALLFREY, V.G. and MIRSKY, A.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
(1962), 48, 1590
- ALLFREY, V.G. and MIRSKY, A.E., Cold Spring Harbor Symp. Quant.
Biol. (1963), 28, 247
- ALLFREY, V.G., FAULKNER, R. and MIRSKY, A.E., Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. (1964), 51, 786
- ATTARDI, G., NAONO, S., ROUVIERE, S., JACOB, F. and GROS, F.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1963), 28, 363
- BALTUS, E., Biochim. Biophys. Acta (1954), 15, 263
- BASSEL, A., HAYASHI, M. and SPIEGELMAN, S., Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. (1964), 52, 796
- BERG, P., BERGMANN, F.H., OFENFARD, E.J. and DIECKMANN, M.,
J. Biol. Chem. (1961), 236, 1726
- BETEL, I. and KLOUWEN, H.M., Biochim. Biophys. Acta (1964),
85, 348
- BOLTON, E.T. and Mc CARTY, B.O., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
(1962), 48, 1390

- BONNER, J., HUANG, R.C. and MAHESHWARI, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1961), 47, 1548
- BRACHET, J., Enzymologia (1941), 10, 87
- BRACHET, J., CHANTRENNE, H. and VANDERHAEGHE, F., Biochim. Biophys. Acta (1955), 18, 205
- BRADBURY, E.M., PRICE, W.C. and WILKINSON, G.R., J. Mol. Biol. (1961), 3, 301
- BRAWERMAN, G., BIEZUNSKI, N. and EISENHADT, J., Biochim. Biophys. Acta (1965), 103, 201
- BRAY, G.A., Anal. Biochim. (1960), 1, 279
- BREMER, H. and KONRAD, M.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964), 51, 801
- BREMER, H., KONRAD, M.W., GAINES, K. and STENT, G.S., J. Mol. Biol. (1965), 13, 540
- BRITTEN, R.J. and ROBERTS, R.B., Science, (1960), 131, 32
- BURDON, R.H. and SMELLIE, R.M.S., Biochim. Biophys. Acta (1962), 49, 393
- BURTON, K., Biochim. J. (1956), 62, 315
- BUTLER, J.A.V., Nature (1963), 199, 68
- BYRNE, R., LEVIN, J.G., BLADER, H.A. and NIRENBERG, M.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964), 52, 140
- CANNON, M., KRUG, R. and GILBERT, W.J., Mol. Biol. (1963), 7, 360
- CASPERSSON, T., Naturwissenschaften (1941), 29, 33
- CERIOTTI, G., J. Biol. Chem. (1955), 214, 59
- CHAMBERLIN, M. and BERG, P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1962), 48, 81

- CHAMBERLIN, M. and BERG, P., J. Mol. Biol. (1964), 8, 297
- CHAMBERLIN, M. and BERG, P., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1963), 28, 67
- CHAUVEAU, J., MOULE, Y. and ROUILLER, C., Exptl. Cell. Research (1956), 11, 317
- CHAPEVILLE, F., LIPMANN, F., EHRENSTEIN, G., VON WEISBLUM, B., RAY, W.J. Jr. and BENZER, S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1962), 48, 1086
- CHARGAFF, E., J. Cell. Comp. Physiol. (1951), 38 suppl. 1,41
- CLEVER, V. and KARLSON, P., Exptl. Cell Res. (1960), 20, 623
- COLVILL, A.J., KANNER, L.C., TOCCHINI-VALENTINI, G.P., SARNAT, M.T. et GEIDUSCHEK, E.P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1965), 53, 1140
- CROWLEY, J.C.W. and HARRIS, H., Exptl. Cell Res. (1963), 31, 70
- CRICK, F.C.H., BARRET, L., BRENNER, S. and WATTSOBIN, R.J., Nature (1961), 192, 1227
- CRICK, F.H.C. dans "Progress in nucleic acid research" (J.N. Davidson et W.E. Cohn, Edit.) Acad. Press Inc., vol. 1 (1963), 163
- DARNELL, J.E., PENMAN, S., SCHERRER, K. and BECKER, Y., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1963), 28, 211
- DAVIS, J., GILBERT, W. et GORINI, L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964), 51, 883
- DEFERT-KOBUS, W., SEGARD, E. et MONTREUIL, J. (1966)
En préparation.
- DE VOE, H. and TIROCO, I., J. Mol. Biol. (1962), 4, 500
- EDSTROM, J.E. and BEERMANN, W., J. Cell. Biol. (1962), 14, 371

- ERRERA, M. , Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires (1963), 18, n°3, 85
- FICQ, A. et ERRERA, M., Arch. Internat. Physiol. Biochim. (1956), 64, 533
- FICQ, A. et ERRERA, M., Expl. Cell Res. (1958), 14, 182
- FICQ, A., PAVAN, C. and BRACHET, J., Exptl. Cell. Res. (1958), 6 suppl., 105
- FISHER, H.W. and HARRIS, H., Proc. Roy. Soc. (1962), B156, 521
- FREDERICQ, E., Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires (1965), 19, n°6
- FRENSTER, J.H., ALLFREY, V.G. and MIRSKY, A.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1960), 46, 432
- FURTH, J.J., HURWITZ, J. and ANDERS, M., J. Biol. Chem. (1962), 237, 2427
- GEIDUSCHEK, E.P., NAKAMOTO, T. and WEISS, S.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1961), 47, 1405
- GEIDUSCHEK, E.P., TOCCHINI-VALENTINI, G.P. and SARNOT, S.T., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964), 52, 486
- GIRARD, M., LATHAM, H., PENMAN, S. and DARNELL, J.E., J. Mol. Biol. (1965), 11, 187
- GREEN, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964), 52, 1388
- GROS, F., HIATT, H., GILBERT, W., KURLAND, C.G., RISEBROUGH, R.W. and WATSON, J.D., Nature (1961), 190, 581
- GRUNBERG-MANAGO, M. et GROS, F., Bull. Soc. Chim. Biol. (1964), 46 n°12, 1441
- GUYENOT, E., L'Hérédité (3e édit.) Encycl. Sci., Paris 1943
- HALL, B.D. and DOTY, P., J. Mol. Biol. (1959), 1, 11

- HÄMMERLING, J., CLAUSS, J., KECK, K., RICHTER, G. and WERZ, G.,
Exptl. Cell Res. suppl. (1959), 6, 210
- HARRIS, H., FISHER, H.W., RODGERS, A., SPENCER and WATTS, J.W.,
Proc. Roy. Soc. (1963), B157, 117
- HARRIS, H., Nature (1964 a), 201, 863
- HARRIS, H., Nature (1964 b), 202, 249
- HARRIS, H., Endeavour (1965), 24, n°91, 50
- HAYASHI, M., HAYASHI, M.N. and SPIEGELMAN, S., Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S. (1963), 50, 664
- HAYASHI, M., HAYASHI, M.N. and SPIEGELMAN, S., Science (1964 a),
143, 47
- HAYASHI, M., HAYASHI, M.N. and SPIEGELMAN, S., Science (1964 b),
51, 664
- HENSHAW, E.C., REVEL, M., HIATT, H.H., J. Mol. Biol. (1965)
(sous presse)
- HERZOG, A. et BOLLEN, A., Arch. Internat. Physiol. Biochim.
(1965), 73
- HIATT, H.H., J. Mol. Biol. (1962), 5, 217
- HOLLAND, J.J., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1962), 9, 556
- HUANG, R.C.C. and BONNER, J., Fed. Proc. (1962), 21, 384
- HUANG, R.C.C. and BONNER, J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
(1962), 49, 1216
- HUANG, R.C.C., BONNER, J. and MURRAY, K., J. Mol. Biol.
(1964), 8, 54
- HURWITZ, J. and AUGUST, J.T., Progress in Nucleic Acid
Research. Ed. by Davidson J.N. and Cohn W.E.
Acad. Press, New York and London (1963), 1, 59

- JACOB, F. and MONOD, J., J. Mol. Biol. (1961), 3, 318
- JACOB, F. and MONOD, J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1961), 25, 193
- JACOB, F. et MONOD, J., Bull. Sci. Chim. Biol. (1964), 46, 1499
- JACOB, F., ULLMAN, A. et MONOD, J., C.R. Acad. Sci. (1964), 258, 3125
- KIDSON, C. and KIRBY, K.S., J. Mol. Biol. (1964), 10, 187
- KONRAD, M.W. and STENT, G.S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964), 51, 647
- KRANTZ, S.B. and GOLDWASSER, E., Biochim. Biophys. Acta (1965), 103, 325
- LIAU, M.C., HNILICA, L.S. and HULBERT, R.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1965), 53, 627
- LIPSETT, M.N., HEPPEL, L.A. and BRADLEY, D.F., Biochim. Biophys. Acta (1960), 41, 175
- MAGEE, W.E. and BURROUS, M.J., Biochim. Biophys. Acta (1961) 49, 393
- MEAD, C.G., J. Biol. Chem. (1964), 239, 550
- MAHLER, H.R. and MEHROTRA, B.D., Biochim. Biophys. Acta (1962), 55, 789
- MANDEL, P. et BORKOWSKA, I., Biochim. Biophys. Acta (1964), 91, 683
- MANDELL, J.D. and HERSHEY, A.D., Analytical Biochemistry (1960), 1, 66
- MARBAIX, G. and BURNY, A., Biochem. Biophys. Res. Comm., (1964), 16, 522



- MARMUR, J., GREENSPAN, C.M., PALECEK, E., KAHAN, F.M.,
LEVINE, J. and MANDEL, M., Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. (1963), 28, 191
- MARTIN, R.G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1963),
28, 357
- MILLER, G.L., MILLER, E.E. and GOLDER, R.H., Fed. Proc.
(1950), 9, 206
- MIRSKY, A.E. and POLLISTER, A.W., J. Gen. Physiol. (1946),
30, 101
- MONOD, J., CHANGEUX, J.P. and JACOB, F., J. Mol. Biol.
(1963), 6, 306
- MORGAN, T.H., The theory of the gene. Yale Univ. Press,
New Haven (2e éd.), 1929
- NAKAJAWA, T., Scientific Papers of the College of Gen. Educat.,
Univ. of Tokio (1962), 12, 223
- NIRENBERG, M.W. and MATTHAEI, J.H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
(1961), 47, 1588
- NIRENBERG, M.W., LEDER, P., BERNFIELD, M., BRIMACOMBE, R.,
TRUHIN, J., ROTTMAN, F. and O'NEAL, C., Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S. (1965), 53, 1161
- NOLL, H., Proc. 19th An. Sympos. Canc. Rec., The University
of Texas, March 1965
- OGUR, M. et ROSEN, G., Arch. Biochem. Biophys. (1950), 25, 268
- PENMAN, S., SCHERRER, K., BECKER, Y. and DARNELL, J.E.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1963), 49, 654
- PERRY, R.P., Exptl. Cell. Res. (1960), 20, 216
- PERRY, R.P., ERRERA, M., HELL, A. and DURWALD, H., J. Biophys.
Biochem. Cytol. (1961), 11, 1

- PERRY, R.P., dans "The nucleus and the synthesis of ribosomes"
présenté au "Symp. on genes and chromosomes, structure
and function, Buenos Aires, Argentina 30 nov.-4 dec.1964"
- PERRY, R.P., SRINIVASAN, P.R. and KELLY, D.E., Science
(1964), 145, 504
- PRESCOTT, D.M., Progress in nucleic acid research and molecular
biology (Ed. by Davidson J.N. and Cohn, W.E.)
(1964), 3, 33
- PULLMAN, A. and PULLMAN, B., Quantum Biochemistry, Wiley's
Interscience Division, New York, 1963
- RAKE, A.V. and GRAHAM, A.F., Biophys. J. (1964), 4, 267
- RICH, A., WARNER, J.R. and GOODMAN, H.M., Cold Spring Harbor
Symp. Quant. Biol. (1963), 28, 269
- RICHTER, G. and SENGER, H., Biophys. Biochim. Acta (1965),
95, 362
- RO, T.S., MURAMATSU, M. and BROCH, H., Biochim. Biophys. Acta
(1964), 84, 149
- ROBERTS, W.K., Biochim. Biophys. Acta (1965), 108, 474
- SARABHAI, A.S., STRETTON, O.W., BRENNER, S. and BOLLE, A.,
Nature, 201 (1964), 13
- SCHERRER, K. and DARNELL, J., Biophys. Biochem. Res. Comm.
(1962), 7, 486
- SCHERRER, K., LATHAM, H. and DARNELL, J.E., Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. (1963), 49, 240
- SCHULMAN, A.M. and BONNER, D.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
(1962), 48, 53
- SHUGAR, D. and SZER, W., J. Mol. Biol. (1962), 5, 580

- SIBATANI, A., DE KLOET, S.R., ALLFREY, V.G. and MIRSKY, A.E.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1962), 48, 471
- SINGER, M.F., JONES, O.W. et NIRENBERG, M.W., Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S., (1963), 49, 392
- SMELLIE, R.M.S., HUMPHREY, G.F., KAY, E.R. and DAVIDSON, J.M.,
Biochem. J. (1955), 60, 177
- SMELLIE, R.M.S., Progress in Nucleic Acid Research (Ed. by
Davidson, J.N. and Cohn, M.E.) Acad. Press, New York
and London (1963), 1, 27
- SPIEGELMAN, S., HALL, B.B. and STORCK, R., Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. (1961), 47, 1135
- SRINIVASAN, P.R., MILLER-FAURES, A. and ERRERA, M., Biochim.
Biophys. Acta (1962), 65, 501
- SRINIVASAN, P.R., MILLER-FAURES, A., BRUNFAUT, M. and ERRERA, M.,
Biochim. Biophys. Acta (1963), 72, 209
- STAEHELIN, T., BRINTON, C.C., WETTSTEIN, F.O. and NOLL, H.,
Nature (1963), 199, 865
- STAEHELIN, T., WETTSTEIN, F.O., OURA, H. and NOLL, H.,
Nature (1964), 201, 264
- STEDMAN, E. and STEDMAN, E., Nature (1950), 166, 780
- TAMAOKI, T. and MUELLER, G.C., Biochem. Biophys. Res. Comm.
(1962), 9, 451
- THACH, R., CECERE, M., SUNDARARAJAN, T. and DOTY, P.
(sous presse), (1965)
- THOMAS, R., Bull. Soc. Chim. Biol., Paris (1953), 35, 609
- THOMAS, R., Biochim. Biophys. Acta (1954), 14, 231
- THOMAS, R., Actualités Biochimiques (publiées par Florkin, M.
et Roche, J.) (1962), 21, 22

- TJIO, J.H. and LEVAN, A., "The chromosome member of man"
Hereditas (1956), 42, 1
- WATSON, J.D. and CRICK, F.H.C., Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. (1953), 18, 123
- WEISS, S.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1960), 46, 1020
- WEISS, S.B. and NAKAMOTO, T., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
(1961), 47, 694
- WEISS, S.B., Fed. Proc. (1962), 21, I, 120
- WEISBLUM, B., BENZER, S. et HOLLEY, R.W., Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. (1962), 48, 1449
- WILKINS, M., STOKES, A. and WILSON, H., Nature (1953),
171, 964
- WOOD, W.B., and BERG, P., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
(1963), 28, 237
- YANKOFFSKY, S.A. and SPIEGELMAN, S., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,
(1962), 48, 1069
- YOSHIKAWA-FUKADA, M., FUKADA, T. and KAWADE, Y., Biochim.
Biophys. Acta (1965), 103, 383
- ZALOKAR, M., Exptl. Cell. Res. (1960), 19, 184
- ZALOKAR, M., Exptl. Cell. Res. (1960), 19, 559
- ZALTA, J.P., ROZENCWAJG, R., CARASSO, N. et FAVARD, P.,
C.R. Acad. Sc., juillet, 1962

