

50376
1971
120

50376
1971
120

N° d'ordre : 257

UNIVERSITÉ DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE I

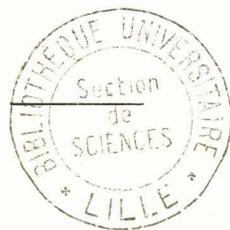
MÉMOIRE PRÉSENTÉ
A L'UNIVERSITÉ DE LILLE I
POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR
DE TROISIÈME CYCLE EN BIOCHIMIE

par

André VERBERT

Assistant à l'Unité de Recherche
et d'Enseignement de Chimie

ETUDES DES COMPLEXES ADN-ARN DANS LES CELLULES
DE MAMMIFERES
RECHERCHES SUR LE SENS DE LA TRANSCRIPTION



Présenté le 26 Juin 1971, devant la commission d'examen

Président : J. MONTREUIL (Rapporteur)
Examineurs : M. DURCHON
J. GUILLAUME



Ce travail a été effectué, sous la direction de Monsieur VéliBOR KRSMANOVIĈ, dans les Laboratoires suivants :

- Laboratoire de Chimie Biologique (Professeur Jean MONTREUIL) et Centre de Recherches sur la Cellule de la Faculté des Sciences de Lille.

- Laboratoire de Biophysique et de Radiobiologie (Professeur Maurice ERRERA) de la Faculté des Sciences de L'Université Libre de Bruxelles.

A Monsieur Vélibor KRSMANOVIC, qu'il nous est agréable de pouvoir appeler Bora. Nous lui adressons nos sincères remerciements pour ce travail qu'il a guidé avec enthousiasme mais aussi, et surtout, pour l'amitié qu'il a voulu créer entre nous.

Nous exprimons nos vifs remerciements :

- à Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL qui nous a permis de réaliser ce travail dans son Laboratoire.
- à Monsieur le Professeur Maurice ERRERA qui nous a fait l'honneur d'accepter notre collaboration.
- à Monsieur Alain SERGEANT dont la collaboration efficace et agréable nous a permis de réaliser ce travail d'équipe.

Nous tenons aussi à remercier :

- Mademoiselle le Docteur Rita WARCCQUIER,
(Service de Virologie - Institut Pasteur de LILLE) qui nous a aimablement fourni les cultures de cellules KB.
 - Monsieur le Docteur Paul CAPPELAERE,
(Service de Biologie Cellulaire, Laboratoire de cultures des tissus Institut de Recherches sur le Cancer de LILLE) qui a mis à notre disposition les cultures de cellules HeLa.
 - Monsieur le Professeur Claude LIEBECQ,
(Université de LIEGE) pour le don d'Adénosine tétraphosphate (ppppA) qui nous a servi de référence.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
GENERALITES	5
MECANISMES DE LA TRANSCRIPTION DE L'ADN PAR L'ARN-POLYMERASE	6
<u>I - PROCESSUS GENERAL DE LA TRANSCRIPTION DU GENOME EN ARN</u>	6
<u>A - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ARN POLYMERASE</u>	7
1 - <u>L'ARN POLYMERASE D'E. COLI</u>	7
a - Observation au microscope électronique et dimensions	7
b - Constante de sédimentation	9
c - Structure quaternaire	9
2 - <u>L'ARN-POLYMERASE DES EUCARYOTES</u>	12
a - L'ARN polymérase nucléolaire	13
b - L'ARN polymérase nucléoplasmique	13
<u>B - FIXATION DE L'ENZYME SUR L'ADN</u>	13
1 - <u>FORMATION DU COMPLEXE ADN-ARN POLYMERASE</u>	13
a - Attachement de l'enzyme sur des séquences spécifiques de l'ADN.	13
b - Influence des histones	14
c - Intervention du facteur "sigma"	14
2 - <u>STABILITE DU COMPLEXE BINAIRE ADN-ARN POLYMERASE</u>	15
a - Influence de la force ionique	15
b - Influence de la température	15
c - Spécificité des sites de fixation	17
1) La structure secondaire	17
2) La structure des séquences nucléotidiques de l'ADN	17
d - Influence du facteur "sigma"	17
e - Stabilisation du complexe par les nucléoside-5'-triphosphates	18
3 - <u>STABILISATION DU COMPLEXE LORS DE LA SYNTHESE</u>	18

C - <u>DEBUT DE LA SYNTHÈSE</u>	19
1 - <u>NATURE DU PREMIER NUCLEOTIDE</u>	19
a - Importance de la connaissance du nucléotide 5'-terminal.	19
b - Nature du nucléotide initial	19
2 - <u>DEPHOSPHORYLATION DU NUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATE TERMINAL</u>	22
3 - <u>LA SEQUENCE 5'-TERMINALE</u>	23
4 - <u>IDENTIFICATION DES SITES DE DECLENCHEMENT DE LA SYNTHÈSE</u>	23
D - <u>DEPLACEMENT DE L'ENZYME LE LONG DE L'ADN</u>	24
1 - <u>FORMATION D'UN HYBRIDE ADN-ARN POLYMERASE-ARN NAISSANT</u>	24
2 - <u>CINETIQUE DE LA SYNTHÈSE IN VITRO</u>	24
a - A faible force ionique	24
b - A force ionique plus élevée	24
3 - <u>LE SENS DE LA SYNTHÈSE</u>	24
a - Détermination du sens de la transcription par l'incorporation de 3'-désoxyadénosine-5'-triphosphate (3'-dATP) marqué au ¹⁴ C.	25
b - Détermination du sens de transcription par l'incorporation de nucléoside-5'-triphosphate marqué par ³ H	28
c - Détermination du sens de la transcription par l'incorporation de nucléoside-5'-triphosphate marqué sur le phosphore en γ	28
4 - <u>ASYMETRIE DE LA TRANSCRIPTION</u>	29
E - <u>ARRET DE LA SYNTHÈSE - LIBERATION DE L'ARN NEOSYNTHESE ET DE L'ENZYME</u>	29
II - <u>REGULATION DE LA TRANSCRIPTION</u>	30
A - <u>REGULATION CHEZ LES PROCARYOTES</u>	30
B - <u>REGULATION CHEZ LES EUCARYOTES</u>	31
1 - <u>FORMES CONJUGUEES DANS LE NOYAU</u>	31
a - Particules ribonucléoprotéiques, précurseurs ribosomaux	31
b - Particules ribonucléoprotéiques, précurseurs d'ARN messagers	32

2 - <u>FORMES CONJUGUEES DANS LE CYTOPLASME</u>	32
a - Précurseurs ribosomaux	32
b - Précurseurs des ARN messagers	33
α - Formes conjuguées inactives	33
1°) Chez les organismes embryonnaires	33
2°) Chez les organismes différenciés	33
β - Formes conjuguées actives	33
3 - <u>CONCLUSIONS</u>	34
LES HYBRIDES NATURELS	
I - <u>HYBRIDES DES PROCARYOTES</u>	36
II - <u>HYBRIDES DES EUCARYOTES</u>	37
TRAVAUX PERSONNELS	
MATERIEL ET METHODES	
I - <u>MARQUAGE DES ACIDES NUCLEIQUES PAR DES PRECURSEURS RADIOACTIFS</u>	41
A - <u>MARQUAGE DES CELLULES</u>	41
B - <u>MARQUAGE DES HEPATOCYTES DE RAT</u>	42
II - <u>ISOLEMENT DES NOYAUX DE FOIE DE RAT</u>	42
III - <u>EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES PAR LE MELANGE SDS/CHLOROFORME/ ALCOOL ISOAMYLIQUE</u>	42
IV - <u>FRACTIONNEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	43
A - <u>FRACTIONNEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES PAR SEDIMENTATION EN GRADIENT DE SULFATE DE CESIUM</u>	43
B - <u>SEDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITE DE SACCHAROSE</u>	43

C - <u>PRECIPITATION SUR FILTRE DU COMPLEXE ADN-ARN</u>	45
V - <u>TRAITEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	45
A - <u>ACTION DES ALCALIS</u>	45
1 - <u>MODE D'ACTION</u>	45
2 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	46
B - <u>ACTION DE LA RIBONUCLEASE PANCREATIQUE</u>	46
1 - <u>PRINCIPE</u>	46
2 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	46
C - <u>DENATURATION DU COMPLEXE ADN-ARN PAR LA CHALEUR OU LA FORMAMIDE</u>	48
D - <u>LECTURE DE LA DENSITE OPTIQUE</u>	48
E - <u>MESURE DE LA RADIOACTIVITE</u>	48
1 - <u>DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE DES ACIDES NUCLEIQUES RECUEILLIS SUR FILTRE</u>	48
2 - <u>COMPTAGE DES ECHANTILLONS LIQUIDES (de 0,5 ml à 1 ml)</u>	49
3 - <u>ETABLISSEMENT DES PROFILS DE MIGRATION DES NUCLEOTIDES RADIOACTIFS SEPARES PAR ELECTROPHORESE</u>	49
VI - <u>SEPARATION ET ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE ALCALINE DU COMPLEXE ADN-ARN</u>	49
A - <u>ANALYSE DES NUCLEOTIDES</u>	50
1 - <u>PRINCIPE DE LA METHODE</u>	50
2 - <u>MATERIEL</u>	53
B - <u>MISE EN EVIDENCE D'UN RESIDU DE NUCLEOSIDE TETRAPHOSPHATE</u>	53
1 - <u>PRINCIPE DE LA METHODE : CHOIX DU pH</u>	55

2 - <u>MATERIEL</u>	56
a - Choix du tampon	56
b - Choix de la différence de potentiel	56
1°) Electrophorèse en cuve "en toit"	56
2°) Electrophorèse à haut voltage	56
C - <u>MISE EN EVIDENCE DE PRODUITS PHOSPHORYLES NON NUCLEOTIDIQUES POUVANT SOUILLER LES ELECTROPHOREGRAMMES</u>	58
1 - <u>ION PHOSPHATE</u>	58
a - Révélation des ions phosphates	58
b - Résultats	59
2 - <u>RIBOSE PHOSPHATE</u>	59
a - Préparation du ribose-5-phosphate	59
b - Révélation du ribose-5-phosphate	59
c - Résultats	60
D - <u>ANALYSE DES COMPOSES MIGRANT DANS LA ZONE DES NUCLEOSIDES TRI- OU TETRAPHOSPHATES</u>	60
1 - <u>EXTRACTION DES PRODUITS</u>	62
2 - <u>PRINCIPE DE L'ANALYSE</u>	62
3 - <u>HYDROLYSE ACIDE</u>	62
4 - <u>SEPARATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE</u>	63
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">RESULTATS</div>	65
I - <u>IDENTIFICATION DES COMPLEXES ADN-ARN DANS LES NOYAUX DES HEPATOCYTES DE RAT ET ETUDE DE LEUR STABILITE</u>	65
A - <u>EXTRACTION DES COMPLEXES</u>	67
B - <u>PURETE DU COMPLEXE</u>	65
C - <u>ACTION DE LA POTASSE ET DE LA RNase</u>	66
D - <u>ACTION DE LA CHALEUR ET DE LA FORMAMIDE ET LONGUEUR DES CHAINES D'ARN</u>	66

E - <u>CONCLUSIONS</u>	66
II - <u>ETUDE CHIMIQUE DU COMPLEXE EXTRAIT DES HEPATOCYTES DE RAT</u>	70
A - <u>COMPOSITION EN BASES</u>	70
B - <u>ETUDE DE L'EXTREMITÉ 5'-TRIPHOSPHATE</u>	70
C - <u>DETERMINATION DU SENS DE LA TRANSCRIPTION PAR ACTION DE LA RNase SUR LES CHAINES D'ARN EN COURS DE SYNTHÈSE</u>	74
III - <u>ETUDE DE L'EXTREMITÉ 5' DES ARN DES COMPLEXES EXTRAITS DE CELLULE HELA ET DE CELLULE KB</u>	77
A - <u>COMPOSITION EN BASES DE L'ARN ASSOCIÉ À L'ADN</u>	77
B - <u>ETUDE DE L'EXTREMITÉ 5'-TRIPHOSPHATE</u>	77
1 - <u>MARQUAGE PAR INCORPORATION DE GUANINE TRITIÉE</u>	77
a - Spécificité du marquage	77
b - Mise en évidence d'un nucléoside tétraphosphate	80
2' - <u>MARQUAGE PAR INCORPORATION D'ADENINE TRITIÉE</u>	80
a - Spécificité du marquage	80
b - Mise en évidence des nucléosides polyphosphates	84
c - Identification de ces nucléosides polyphosphates	84
α - Calcul de ce rapport dans les cellules HeLa	84
β - Détermination de ce rapport par analyse directe dans les cellules KB.	84
3 - <u>MARQUAGE DES BASES PYRIMIDIQUES</u>	88
a - Spécificité du marquage	88
b - Analyse de l'hydrolysate alcalin par électrophorèse de pH 5,7	88
4 - <u>CONCLUSIONS</u>	91
DISCUSSION	94
CONCLUSIONS	98
BIBLIOGRAPHIE	99

Abréviations utilisées

=====

°	Angström = 10^{-10} mètre.
Å	
Ade	Adénine
Ado	Adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARN-m	Acide ribonucléique messenger
ARN-r	Acide ribonucléique ribosomal
ARN-t	Acide ribonucléique de transfert
c.p.m.	Coups par minute
Cyd	Cytidine
Cyt	Cytosine
dN	Désoxyribonucléoside (dA - dC - dG - dT)
DNase	Désoxyribonucléase
D.O. ₂₆₀	Densité optique à 260 nm
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
Gua	Guanine
Guo	Guanosine
mCi	10^{-3} curie
NMP	Nucléoside monophosphate (AMP - CMP - GMP - UMP)
Np	Nucléoside-3' -monophosphate (Ap - Cp - Gp - Up)
NDP	Nucléoside diphosphate (ADP - CDP - GDP - UDP)
NTP	Nucléoside triphosphate (ATP - CTP - GTP - UTP)
nm	Nanomètre = 10^{-9} mètre
P _i	Acide orthophosphorique (phosphore inorganique)
PP _i	Groupement pyrophosphate
pN	Nucléoside-5' -monophosphate (pA - pC - pG - pU)
ppNp ou ppXp	Nucléoside 5' -diphosphate, 3' monophosphate
pppNp ou pppXp	Nucléoside 5' -triphosphate, 3' monophosphate.
ppppA	Adénosine 5' -tétraphosphate
Pu	"Purique"
Py	"Pyrimidique"
PES	Polyéthylène sulfonate d'ammonium
RNase	Ribonucléase pancréatique (E.C. 2.7.7.16).
Rib	Ribose

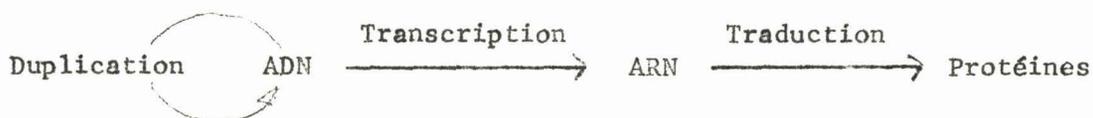
Rib-5-P	Ribose-5-phosphate
SDS	✓ Dodecylsulfonate de sodium (Duponol)
SSC	Solution 0,15 M en NaCl et 0,015 M en citrate trisodique.
S	¶ Constante de sédimentation en unité SVEDBERG (10-13 sec).
t/mn	¶ Tours par minute
Tris	¶ Amino-2 hydroxyméthyl-2 propanediol 1,3
Ura	Uracile
Urd	Uridine
μCi	10 ⁻⁶ curie
μg	10 ⁻⁶ gramme.

INTRODUCTION

Les connaissances acquises depuis plusieurs années sur la structure des macromolécules essentielles, acides nucléiques et protéines, permettent de comprendre, au moins dans ses grandes lignes, le rapport entre les fonctions de ces macromolécules et leur structure chimique.

Les récentes confirmations des travaux de TEMIN (1,2), montrant que l'ADN pouvait être synthétisé par moulage sur l'ARN, n'ont pas mis en défaut le modèle proposé en 1958 par CRICK (3) mais ont permis de le préciser ou plutôt de le compléter.

L'information nécessaire à la synthèse de protéines spécifiques, se transmet dans la majorité des cas, selon le schéma traditionnel :



La synthèse des chaînes polypeptidiques résulte des diverses interactions stéréospécifiques (appariement des bases, structure tertiaire) et séquentielles (codage) entre les différents types de macromolécules : ADN, ARN messager, ribosomes et ARN de transfert.

L'ARN messager est le récepteur de l'information génétique conservée par l'ADN et son transporteur vers le cytoplasme. En association avec les ribosomes, il déterminera l'ordre de l'assemblage des acides aminés apportés par les ARN-t pendant la synthèse des protéines spécifiques.

Il apparaît donc que la polymérisation des ribonucléotides en une chaîne complémentaire de l'ADN sous l'action enzymatique de l'ARN polymérase est une étape cruciale dans le transfert de l'information génétique. Bien que l'on soit en mesure de tracer, en lignes générales, un tableau assez cohérent des étapes de la transcription de la séquence nucléotidique de l'ADN en ARN, on possède encore peu d'informations sur les mécanismes *in vivo*, - chez les Eucaryotes en particulier -, du déclenchement et de la régulation de la biosynthèse des polyribonucléotides.

C'est l'étude in vivo de la toute première étape de la transcription de l'ADN par l'ARN polymérase (voir Fig. 1 et fig. 2) qui a fait l'objet de notre travail. Nous nous sommes plus particulièrement attaché à déterminer la nature du nucléotide initial et, par voie de conséquence, le sens de la polymérisation.

Avant de décrire les résultats de nos travaux qui ont été effectués dans le Laboratoire du Professeur J. MONTREUIL, en étroite collaboration avec A. SERGEANT et sous la direction de V. KRSMANOVIC, nous exposerons succinctement les propriétés physico-chimiques de l'ARN polymérase, le processus général de la transcription, de ses différentes étapes et de sa régulation.

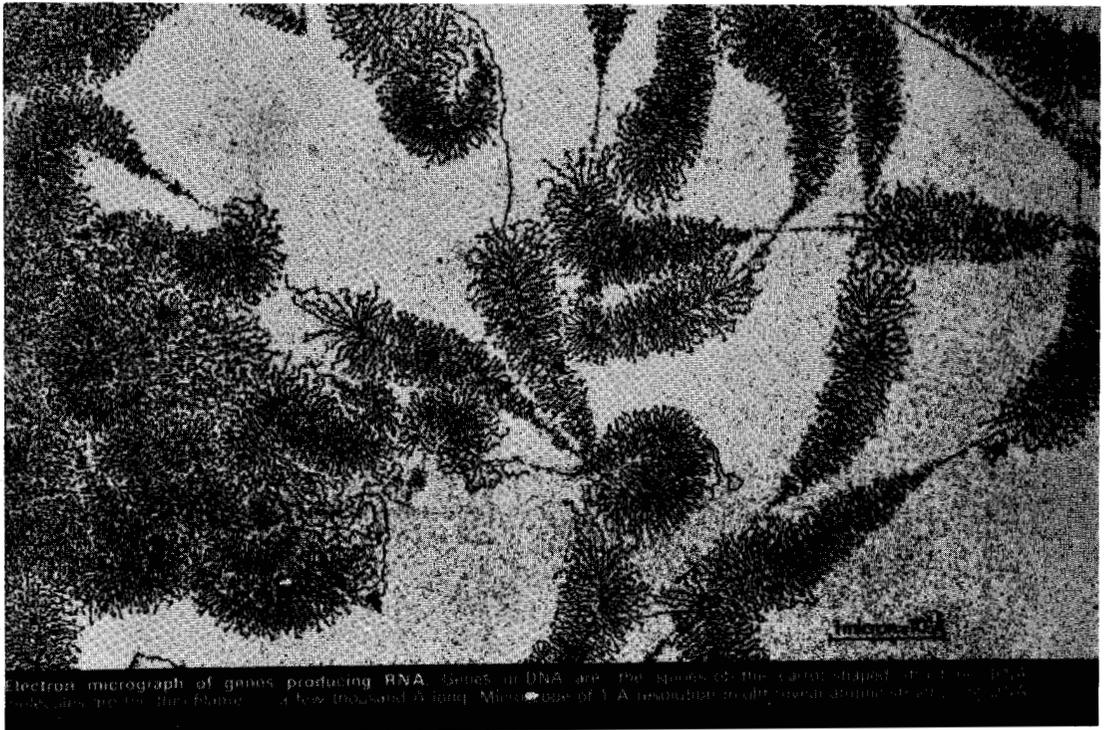


Figure n° 1 : Observation au microscope électronique des
ARN en cours de synthèse, in vivo, dans les ovocytes d'amphibiens
(Triturus viridescens) (MILLER et BEATTY) (4).



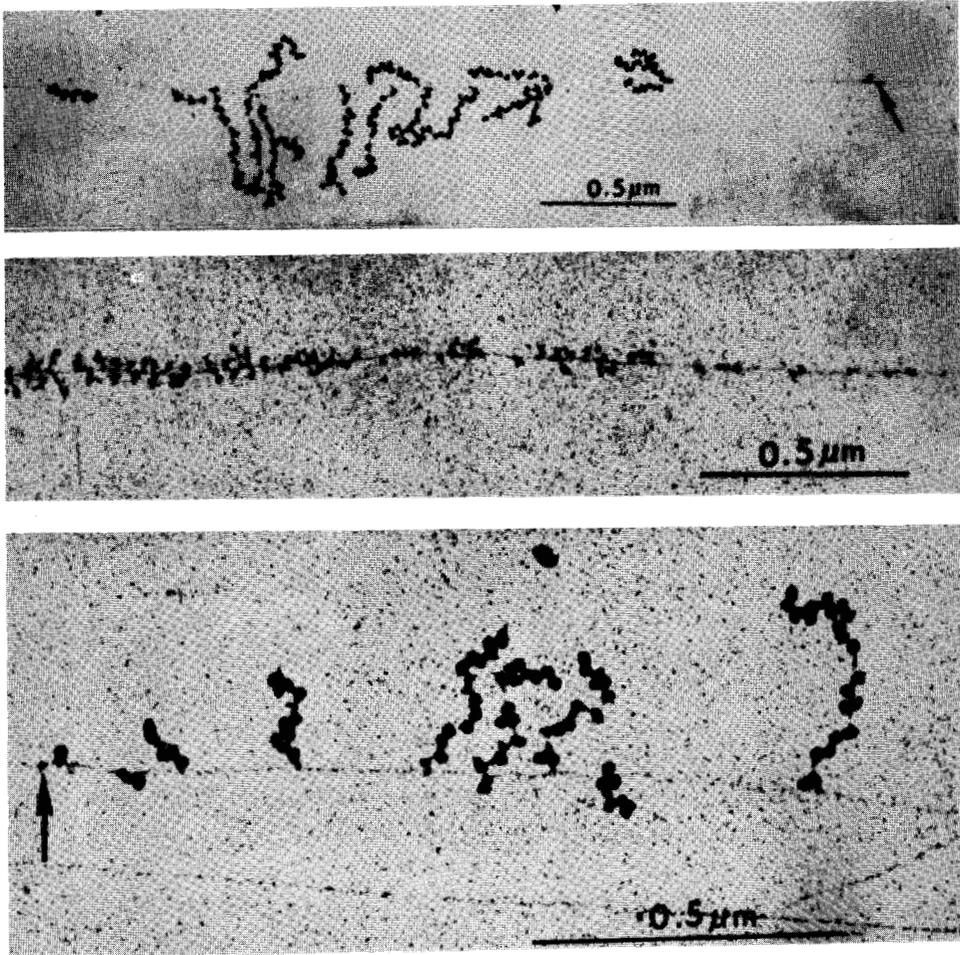


Figure n° 2 : Observation au microscope électronique de gènes d'E. coli en cours de transcription et de translation simultanée. (MILLER et al.)(5)

(La flèche indique le site de déclenchement de la synthèse).

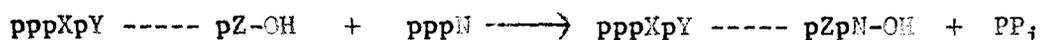
GENERALITES

MECANISMES DE LA TRANSCRIPTION DE
L'ADN PAR L'ARN-POLYMERASE

I - PROCESSUS GENERAL DE LA TRANSCRIPTION
DU GENOME EN ARN

Il est actuellement bien établi que la synthèse des ARN dans les cellules bactériennes et animales est catalysée par l'ARN polymérase qui a été découverte en 1959 par WEISS et GLADSTONE (6).

Après avoir isolé cette enzyme, il a été possible de la faire fonctionner in vitro, utilisant l'ADN comme modèle, en présence des quatre ribonucléosides triphosphates, des ions magnésium (Mg^{++}) et manganèse (Mn^{++}), pour assister à la naissance et à la croissance d'une chaîne polyribonucléotidique selon le schéma proposé par BREMER et al. (7).



Comme toutes les polymérisations en général, la polymérisation des nucléoside-5'-triphosphates procède par différentes étapes dont les mécanismes sont distincts mais en corrélation les uns avec les autres. Ces divers stades peuvent être plus ou moins arbitrairement répertoriés de la façon suivante :

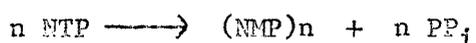
- Fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN et formation d'un complexe binaire ADN-ARN polymérase.
- Déclenchement de la polymérisation.
- Propagation de la polymérisation par le déplacement relatif de l'enzyme le long de l'ADN et la formation d'un complexe ternaire ADN-ARN polymérase-ARN naissant.
- Arrêt de la polymérisation et libération de l'enzyme et de l'ARN nouvellement synthétisé.

Tout au long de ces étapes se pose le problème du contrôle de la transcription tant du point de vue qualitatif (contrôle de l'expression de certains gènes plutôt que d'autres, différenciation) que du point

de vue quantitatif (contrôle de l'activité et du taux de transcription des gènes).

A - PROPRIETES PHYSICO-CHEMIQUES DE L'ARN POLYMERASE

L'ARN polymérase (nucléoside-triphosphate : ARN nucléotidyl transférase, EC 2.7.7.6.) est l'enzyme qui assure in vivo la polymérisation des ribonucléotides en catalysant la réaction suivante :



Cette réaction nécessite, en outre, la présence des quatre nucléoside-5'-triphosphates, des ions magnésium (Mg^{++}) et manganèse (Mn^{++}) et de l'ADN "modèle".

L'ARN polymérase extraite d'E. coli est celle qui a été et est encore la plus étudiée. Toutefois, des travaux récents ont apporté quelques informations sur l'ARN polymérase des cellules d'Eucaryotes.

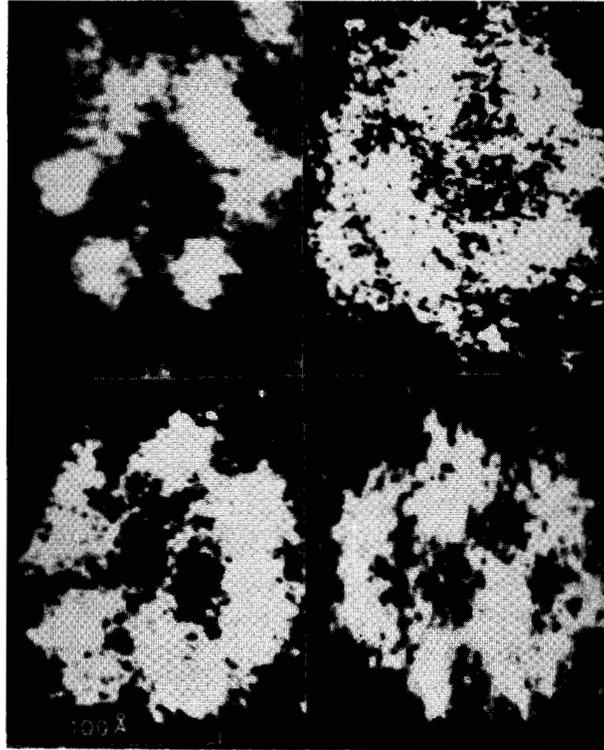
1 - L'ARN POLYMERASE D'E. COLI

a - Observation au microscope électronique et dimensions

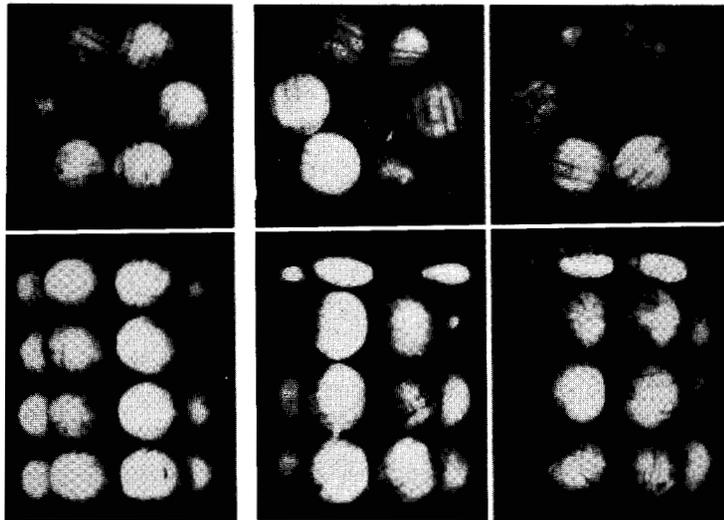
La structure de l'ARN polymérase et la géométrie de sa conjugaison à l'ADN ont été observées au microscope électronique par plusieurs équipes (FUCHS et al. (8) ; CRAWFORD et al. (9) ; SLAYTER et al. (10)).

L'ARN polymérase a la forme d'un cylindre creux de 95Å de hauteur, de 125Å de diamètre externe et 40Å de diamètre interne, formé par l'assemblage de six sous-unités. Cette structure a été précisée par KITANO et KAMEYAMA (11) qui ont montré que les six sous-unités sont elles-mêmes formées par l'empilement de 5 à 6 sous-unités secondaires sphéroïdes (voir fig. 3 p.8). Il est suggéré que lors de la transcription le brin d'ADN passe au travers du trou central.

Cependant, il convient de préciser que LUBIN (12) a observé que l'ARN polymérase décrite par FUCHS et al. (13) n'était pas suffisamment purifiée et contenait 4 à 5 structures étrangères qui donnaient un aspect hétérogène à la préparation. Selon l'auteur, après purification plus poussée par sédimentation en gradient de densité et digestion enzymatique,



a) Microscopie électronique de la polymérase 22 S d'E.coli.



b) Modèles artificiels de polymérase 22 S d'E. coli.

Figure n° 3 : Etude au microscope électronique de l'ARN polymérase 22 S d'E.coli (KITANO et KAMEYAMA) (voir p. 7 et réf. 11).



l'ARN polymérase, tout en restant fonctionnelle, apparait sous la forme de particules "poreuses", très homogènes, d'un diamètre moyen de 105 Å (voir fig. 4, p. 10).

Tous les auteurs s'accordent à penser que la fixation de l'enzyme sur l'ADN entraîne une modification de sa structure (voir fig. 5, p. 11).

b - Constante de sédimentation :

RICHARDSON (14), COLVILLE et al. (15) et STEVENS et al. (16) ont montré que le fonctionnement de l'enzyme dépend étroitement de la force ionique. Chez E. coli, à basse force ionique, elle existe sous une forme qui sédimente avec une constante de 21 à 24 S dont la masse moléculaire avoisine 900.000. A force ionique élevée, l'enzyme est dissociée réversiblement en deux unités dont le coefficient de sédimentation égale 13S (RICHARDSON)(17), (PREUSS et ZILLIG)(18).

Cette unité, de masse moléculaire égale à 400.000, représenterait la forme monomère fonctionnelle de l'enzyme.

c - Structure quaternaire :

Ce sont principalement les travaux de BURCESS et al. (19a, 19b) et ZILLIG et al. (20) qui ont permis de détailler la structure quaternaire de l'enzyme.

Par chromatographie sur colonne de phospho-cellulose, BURCESS et al. (21) ont pu séparer l'enzyme en deux fractions : le facteur sigma (σ) et l'enzyme minimum (qu'ils ont appelée "core enzyme").

Dans l'urée 6M, à pH 9, l'enzyme se dissocie en différentes sous-unités qui peuvent être séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfonate de sodium, ou sur acétate de cellulose. Dans les deux cas, quatre sous-unités sont mises en évidence :

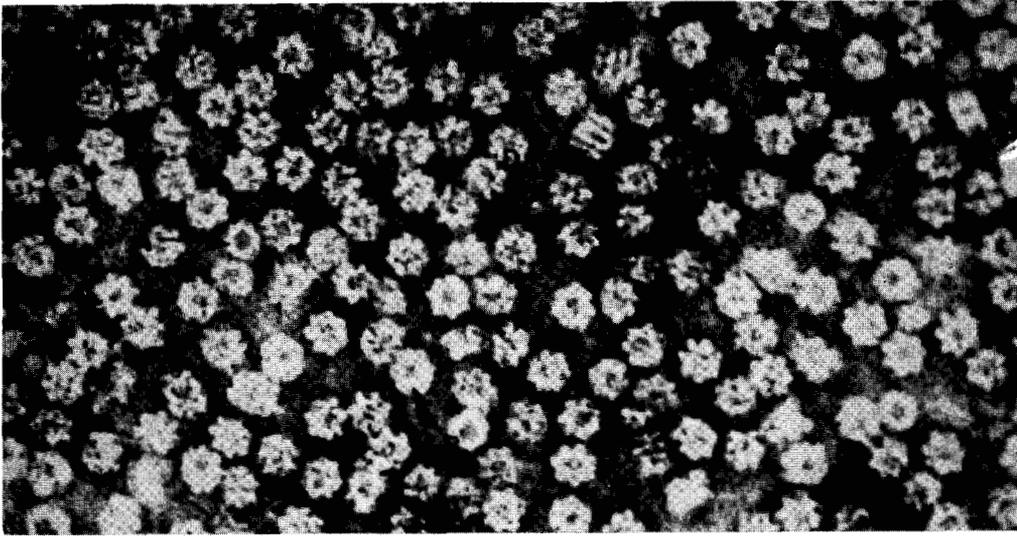
La sous-unité σ , masse moléculaire = 90.000

La sous-unité β , masse moléculaire = 150.000

La sous-unité β' , masse moléculaire = 155.000

et deux sous-unités α , chacune d'une masse moléculaire de 45.000.

La formule stœchiométrique de l'enzyme complète serait



Aspect hétérogène de l'ARN polymérase : particules en forme d'anneau (A), d'hexagone (B), de tétraèdre (C), de rectangle (D) et de rosette (E).



Aspect homogène de l'ARN polymérase hautement purifiée : particules "poreuse" et irrégulière (LUBIN)(voir p. 7, réf. 12).

Figure n° 4

500Å



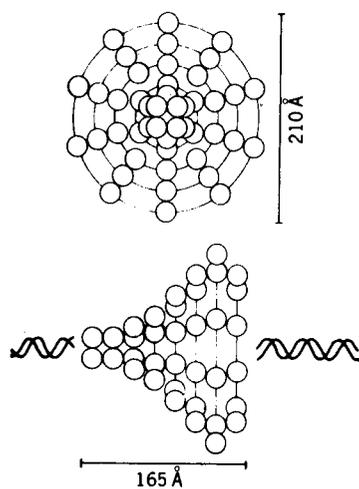
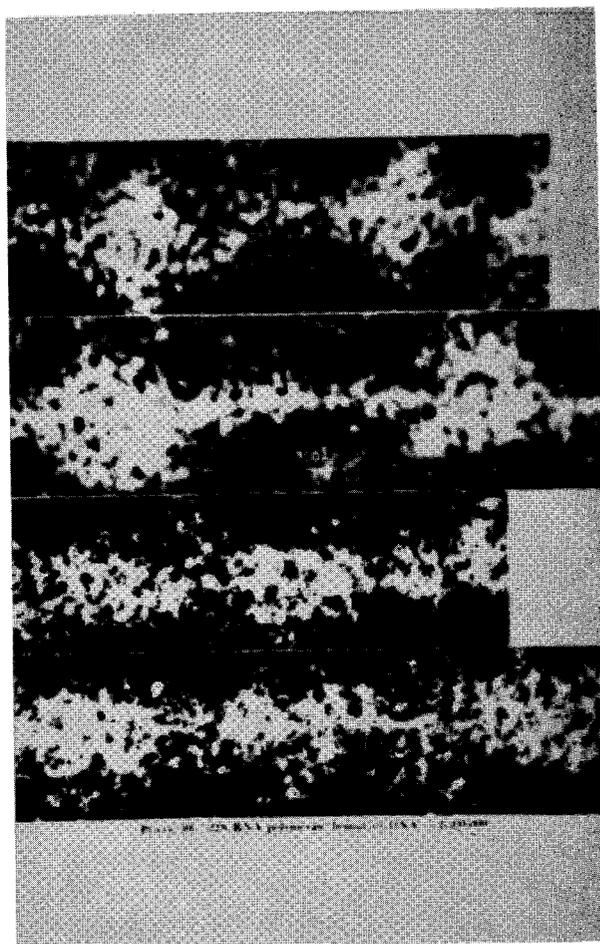


FIG. 5. Schematic representation of 22S RNA polymerase bound to DNA.

Upper: The figure viewed from the axis of DNA line.

Lower: The figure viewed from the side in perpendicular to the axis of DNA line.



**Figure n° 5 : Etude au microscope électronique de l'ARN polymé-
rase 22 S d'E. coli fixée que l'ADN (KITANO et KAMAYAMA) (voir p.7, réf.11).**

$(\alpha_2, \beta, \beta')\sigma$, ce qui est en accord avec une masse moléculaire de 480.000 environ.

Ces résultats ont été confirmés par des expériences récentes de LILL et HARTMANN (22) et de ZILLIG et al. (23). Ils ont pu reconstituer, à partir des sous-unités, l'enzyme complète et fonctionnelle. Il convient de noter que les sous-unités τ et ω , primitivement décrites, ne sont pas retrouvées constamment dans les préparations et semblent être considérées comme des artefacts.

Les mêmes auteurs, grâce aux expériences de reconstitution de l'enzyme, sont parvenus à préciser les fonctions plus particulières de certaines sous-unités :

- La particule β' présente une grande affinité pour l'héparine (polyanion analogue structural de l'ADN) et serait plus particulièrement responsable de la fixation de l'enzyme sur l'ADN (ZILLIG et al.) (24).

- La particule β possède un site de fixation pour le facteur σ mais est aussi sensible à l'action de la streptolydigne (inhibiteur spécifique de l'allongement de la chaîne d'ARN). Elle serait à la fois impliquée dans le processus de déclenchement par son intervention dans la fixation du facteur σ et dans le processus de propagation de la synthèse par son rôle dans le déplacement de l'enzyme sur l'ADN (HEIL et ZILLIG) (25).

- Enfin, nous verrons plus loin la fonction et l'importance du facteur σ lors de la fixation de l'enzyme sur l'ADN, première étape du processus de la transcription.

2 - L'ARN-POLYMERASE DES EUCARYOTES

Dans le noyau cellulaire, l'ARN-polymérase a tout d'abord été décrite comme existant sous deux formes en équilibre : une forme liée à l'ADN (the "aggregate RNA polymerase") et une forme libre (the "soluble RNA polymerase") (CHAMBON et al.) (26) et ces deux formes seraient deux états différents de la même enzyme. Ce phénomène d'allostérie permettrait, peut-être, de comprendre le système de régulation.

Les recherches actuelles tendent surtout à distinguer deux types principaux d'enzyme, liés à leurs fonctions et à leur localisation dans le noyau.

a - L'ARN polymérase nucléolaire dont l'activité in vitro produit un ARN de type ribosomal ($G + C / A + U = 1,5$) et fonctionne à basse force ionique, en présence d'ions magnésium.

b - L'ARN polymérase nucléoplasmique qui produit in vitro, à haute force ionique et en présence d'ions manganèse, un ARN de type messenger ($G + C / A + U = 0,8$). Cette enzyme, contrairement à la précédente est inhibée par l' α -amanitine.

De telles enzymes ont été isolées chez différents animaux : embryon d'Oursin (ROEDER et RUTTER)(27), foie de Rat (ROEDER et RUTTER)(28) ; SEIFART (29), thymus de Veau (KEDINGER et al.)(30) et placenta humain (VOIGT et al.)(31). Les masses moléculaires de ces différentes enzymes qui peuvent être séparées en différentes sous-unités avoisinent généralement 400.000 (CHAMBON et al.)(32).

Enfin, il est intéressant de noter qu'une ARN polymérase a été extraite des mitochondries de levure (WINTERSBERGER et al.)(33)(34) et de Neurospora crassa (KÜNTZEL et SCHÄFER)(35). Sa masse moléculaire, beaucoup plus faible que celle de l'enzyme extraite du noyau est d'environ 65.000.

B - FIXATION DE L'ENZYME SUR L'ADN

1 - FORMATION DU COMPLEXE ADN-ARN POLYMERASE

La formation du complexe ADN-ARN polymérase tient compte des interactions stéréospécifiques dues à la fois à l'ADN et à l'enzyme. Nous allons voir successivement les divers facteurs qui peuvent intervenir dans la formation de ce complexe binaire.

a - Attachement de l'enzyme sur des séquences spécifiques de l'ADN.

SZYBALSKI et al. (36) ont observé que les séquences riches en bases pyrimidiques, - surtout en cytosine -, étaient distribuées principalement sur l'un des brins de l'ADN du phage λ . Sur la base de ces observations, les auteurs ont proposé un modèle dans lequel de telles sé-

quences introduiraient un élément de discontinuité dans la double hélice de l'ADN en modifiant sa structure secondaire et seraient les sites spécifiques de reconnaissance pour l'attachement de l'ARN-polymérase. De cette manière, seraient déterminés, à la fois, le brin d'ADN qui doit être transcrit et le point de départ de fonctionnement de l'enzyme.

Cette hypothèse particulièrement satisfaisante pour interpréter d'une manière physico-chimique le "promoteur" génétique de JACOB (37), ne peut cependant pas être soutenue totalement. NAKANA et SAKAGUCHI (38) ont isolé les sites d'ADN liés à la polymérase d'E. coli et en ont établi la composition en bases : elle ne diffère pas de celle de l'ADN total. Les sites de fixation de l'ARN polymérase d'E. coli sur l'ADN d'E. coli (MATSUKAGE et al.) (39) et sur l'ADN de T₅ (BLATTNER et al.) (40) ne révèlent pas non plus une spécificité particulière (dc + dc = 50 p.100).

b - Influence des histones :

La fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN bicaténaire se fait dans les régions dénaturées dont une chaîne est rendue accessible à l'enzyme par des propriétés moléculaires spécifiques (BERG et al.) (41). L'accroissement de l'activité de l'ARN polymérase lors de la dissociation des désoxynucléohistones par le polyéthylène sulfonate de sodium (CHAMBON et al.) (42), suggère que ces régions dénaturées, sites préférentiels de fixation de l'enzyme, peuvent être aussi démunies d'histones (voir aussi p. 34).

c - Intervention du facteur "sigma".

In vitro, on observe une fixation de l'ARN polymérase quelque peu au hasard de la double chaîne d'ADN. Ces résultats concordent mal avec la notion de déclenchement spécifique de la synthèse. La découverte du facteur "sigma" (BURGESS et al.) (43) a permis de préciser cette première étape.

Etudiant la séquence 5' terminale des ARN transcrits in vitro, SUGIURA, OKAMOTO et TAKANAMI (44) ont montré que, démunie du facteur σ , l'enzyme peut encore transcrire l'ADN mais perd sa capacité de sélectionner les sites appropriés du déclenchement de la polymérisation. Au contraire, le facteur σ limite le fonctionnement de l'enzyme à cer-

tains sites spécifiques ("initiation sites"). Ce facteur, en permettant à l'enzyme de commencer à transcrire un opéron donné, agirait donc comme un contrôle "positif" de la synthèse, en opposition au contrôle "négatif" exercé par le répresseur.

Ce facteur ne ferait pas partie intégrante de l'enzyme mais viendrait s'y joindre, lors de la fixation sur l'ADN, pour lui conférer la spécificité voulue. Une fois la polymérisation commencée, l'ARN ayant atteint une longueur de 40 nucléotides environ (KRAKOW)(45), il se séparerait à nouveau de l'enzyme et pourrait être réutilisé dans une nouvelle opération de fixation spécifique de l'enzyme. (voir fig. 6 p.6)

2 - STABILITE DU COMPLEXE BINAIRE ADN-ARN POLYMERASE

a - Influence de la force ionique

Bien que le complexe ADN-ARN polymérase soit peu dissociable, la liaison est réversible. FUCHS et al. (46) WALTER et al. (47) ont proposé une hypothèse selon laquelle la fixation de l'enzyme s'effectuerait en deux étapes :

- la première serait une simple fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN nécessitant une basse force ionique ;

- la seconde, plus lente, correspondrait à une "fusion" localisée de l'ADN et serait responsable de la phase de latence que l'on observe quand la synthèse de l'ARN est mesurée à basse température.

En 1965, CHAMBON et al. (48) observaient qu'une forte augmentation de la force ionique avant l'addition des nucléosides triphosphates inhibait la synthèse ultérieure de l'ARN. Ceci s'explique par l'impossibilité de former, dans ces conditions, un complexe ADN-Enzyme car l'ARN polymérase se dissocie alors en sous-unités 11-13 S.

Il existerait une relation entre ces deux phénomènes.

Bien que l'association ADN-ARN polymérase soit instable aux forces ioniques élevées, il faut noter que la formation d'un court oligonucléotide (3 à 4 nucléotides) suffit à stabiliser l'ensemble (NIYOGI et al.)(49).

b - Influence de la température

Des observations s'accordent pour émettre l'hypothèse

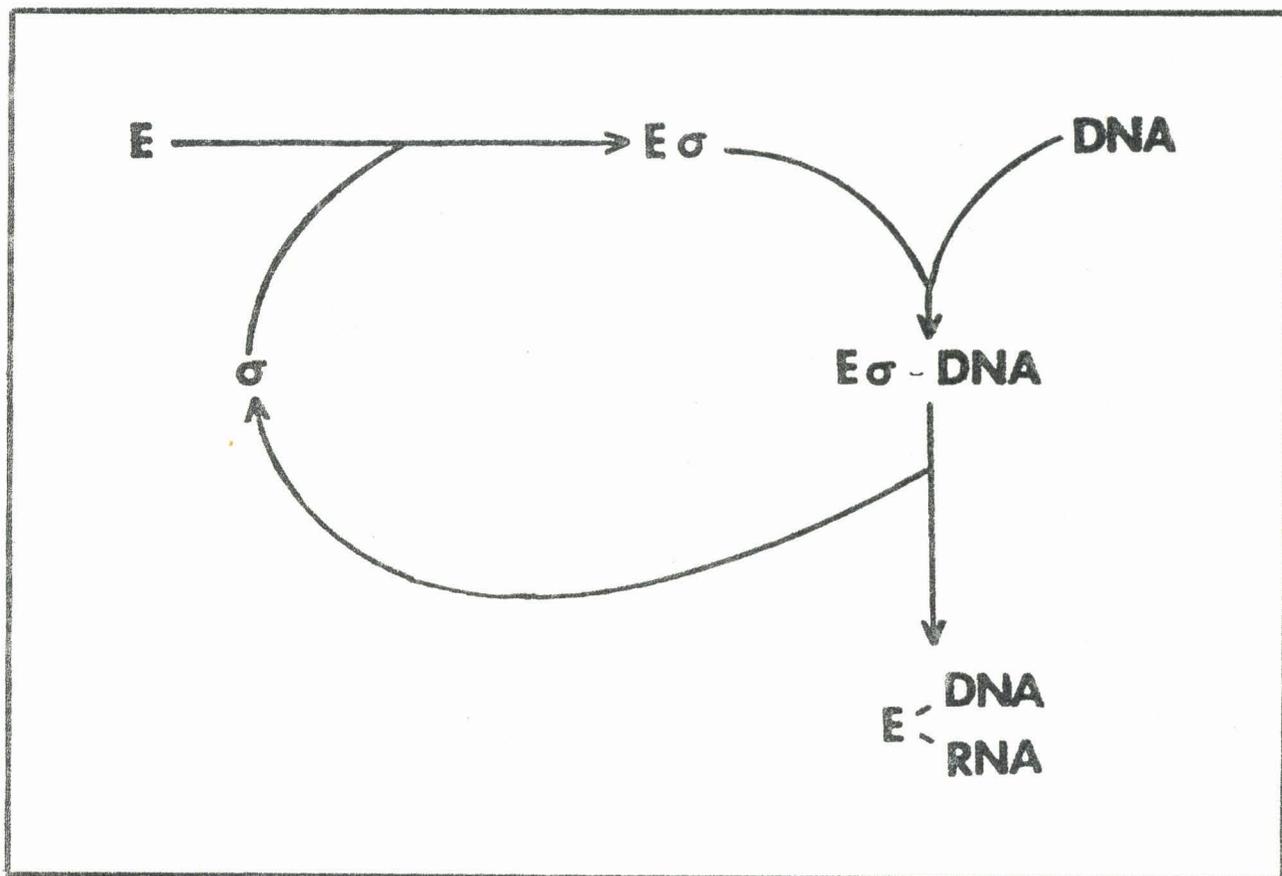


Figure n° 6 : Cycle d'utilisation du facteur "sigma" au cours de la transcription (TRAVERS et BURGESS) (50).

Le facteur sigma, associé à l'ARN polymérase, intervient dans la sélection des sites de déclenchement de la transcription. La polymérisation commencée, il se dissocie du complexe ADN-Enzyme-ARN naissant et peut être utilisé à nouveau.

d'un appariement de l'ADN avec l'ARN polymérase par des liaisons correspondant à des énergies relativement faibles (liaison "pont hydrogène", liaison de VAN DER WAALS). Ces suggestions sont renforcées par le fait qu'une augmentation de température labilise le complexe, or, structure secondaire et tertiaire sont plus stables à basse température (DUBERT et al.)(51).

Enfin, d'autres facteurs agissent sur la fixation de l'ARN polymérase, comme le pH, la concentration en ions magnésium ou manganèse.

c - Spécificité des sites de fixation

STEAD et JONES (52) ont observé que sur 100 sites de fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN du phage T₇; une quinzaine seulement sont très peu dissociables, certains sites de l'ADN sont donc privilégiés. Deux facteurs principaux peuvent être invoqués :

1°) La structure secondaire

les effets de,
Etudiant la température, DUBERT et al. (53) montrent que les conditions d'attachement ou de détachement excluant une transcription appréciable, les deux phénomènes doivent se produire aux mêmes sites. Ce sont, probablement, ces mêmes régions qui, sous des conditions normales, ont une affinité maximale pour l'ARN polymérase.

2°) La nature des séquences nucléotidiques de l'ADN.

La fixation de l'ARN polymérase sur des séquences riches en bases pyrimidiques, permet de penser que la stabilité du complexe liée à la nature des liaisons entre l'enzyme et l'ADN, doit dépendre fortement des séquences nucléotidiques de l'ADN.

d - Influence du facteur "sigma".

La rifampicine est un antibiotique qui empêche la formation du complexe stable entre l'ADN et l'enzyme, mais n'inhibe pas la synthèse si un complexe stable peut se former avant l'addition de la rifampicine. BAUTZ et BAUTZ (54) suggèrent que le facteur "sigma" est nécessaire à la formation d'un véritable complexe stable (qu'ils dénomment

"pre-initiation complex") car seuls de tels complexes formés sur les sites appropriés de l'ADN en présence du facteur σ , restent résistants à l'action de l'antibiotique.

e - Stabilisation du complexe par les nucléoside-5'-triphosphates.

A haute force ionique, en absence de synthèse, l'enzyme se détache de l'ADN. Cependant la présence de nucléoside-5'-triphosphates empêche cette dissociation (ANTHONY et GOLDTHWAIT) (55). En fait, GOLDTHWAIT et al. (56) ont montré que deux nucléotides suffisaient à stabiliser le complexe si l'un de ces nucléosides triphosphates était de type purique. Ces résultats sont en accord avec leurs études de spectroscopie de fluorescence (WU et GOLDTHWAIT) (57) et d'équilibre de dialyse (WU et al.) (58) qui avaient mis en évidence, sur l'enzyme, un site de fixation préférentiel des purine nucléoside-5'-triphosphates.

3 - STABILISATION DU COMPLEXE LORS DE LA SYNTHÈSE

La stabilisation du complexe s'accroît dès la formation de la première liaison phosphodiester. DUNN et BAUTZ (59) ont d'ailleurs montré que, in vitro, avec l'ADN du phage T₄, cette stabilisation était plus efficace lorsque cette première liaison se faisait entre un nucléotide purique et un nucléotide pyrimidique.

Ces résultats sont en accord avec le fait que l'ARN synthétisé débute principalement par la séquence pppApU ---.

Cette stabilisation devient totale dès que la polymérisation est commencée. Formé à basse force ionique, le complexe ADN-ARN polymérase devient alors fonctionnel en présence des quatre ribonucléotide-5'-triphosphates. Cependant, une fois la synthèse induite, il faut accroître la force ionique de l'ordre de 0,4, si l'on veut poursuivre la polymérisation dans des conditions optimales (FUCHS et al.) (60). Cette augmentation de la force ionique détache, en outre, l'ARN-polymérase non spécifiquement liée et non fonctionnelle, c'est-à-dire non stabilisée.

Dans ce complexe ternaire, l'ARN polymérase recouvre une partie de l'ADN. Mettant à profit cette propriété, SENTENAC, RUET et FROMAGEOT (61) ont excisé ce complexe par action de la DNase et calculé que la portion d'ADN imbriquée dans le complexe est constituée d'environ 75

nucléotides. Ils ont très récemment montré que le facteur "sigma" était déjà absent du complexe ternaire ARN polymérase - ADN-ARN naissant (RUET et al.)(62)

C - DEBUT DE LA SYNTHÈSE

1 - NATURE DU PREMIER NUCLEOTIDE

a - Importance de la connaissance du nucléotide 5'-terminal

La détermination du premier ribonucléotide incorporé lors de la synthèse est particulièrement importante. En effet :

- La stabilisation du complexe par les nucléotides puriques et la mise en évidence de leur site préférentiel de fixation ("initiation site" de GOLDTHWAIT et al.)(63) soulignent l'influence de la nature du premier nucléotide même avant le déclenchement de la synthèse.

- La présence d'un nucléotide 5'-terminal unique permet de déterminer le sens de la synthèse (voir p. 24).

- Enfin, une dernière raison de l'étude du nucléotide 5'-terminal pourrait venir de son rôle éventuel dans le processus de la lecture de l'ARN messenger.

La présence d'une extrémité 5'triphosphate pourrait notamment jouer un rôle dans la durée de vie de l'ARN messenger en empêchant sa dégradation. En effet, la ribonucléase V, mise en évidence par KUWANO, SCHLESSINGER et APIRIOM (64), dégrade sélectivement l'ARN messenger de 5' vers 3' et il est vraisemblable que son action nécessite la déphosphorylation préalable de l'extrémité triphosphate.

b - Nature du nucléotide initial

La formation de la chaîne polyribonucléotidique se fait par addition de nucléoside-5'-triphosphates à l'extrémité 3'-hydroxyle du polymère (BREMER et al.)(65) ; MAITRA et HURWITZ (66)(cf. page 24), la persistance des phosphoryles α , β et γ en extrémité 5' permet de mettre en évidence la nature de ce nucléotide.

Les résultats acquis jusqu'à présent sont rassemblés dans les tableaux I et II (p. 20 et 21).

TABLEAU I : Extrémités 5' terminales d'ARN synthétisés in vitro.

ARN synthétisés <u>in vitro</u>		Extrémité 5' terminale	Références		
avec l'ARN polymérase de :	utilisant comme modèle l'ADN de :				
<u>E. coli</u>	Phage T ₄	ppp A --- (prédominant de 0 à 4 mm)	BREMER <u>et al.</u> (67)		
		ppp G --- (prédominant de 4 à 20 mm)	MULLER <u>et al.</u> (68)		
	Phage T ₇ Phage Φ80	ppp G --- ppp A --- et ppp G ---	SENTENAC <u>et al.</u> (69) OKAMOTO <u>et al.</u> (70)		
<u>E. coli</u>	ADN d'E. coli	ppp A et ppp G ---	GOLDSTEIN <u>et al.</u> (71)		
<u>E. coli</u>	ADN thymus de Veau	ppp A et ppp G ---	TADA <u>et al.</u> (72)		
	ADN de la forme répliquative du phage φd	ppp A pUpGp --- ppp G pUpAp --- ppp G pUpUp ---	SIGIURA <u>et al.</u> (73)		
Qβ replicase	Phage Qβ	ppp G pGpGp ----- X176	BILLETER <u>et al.</u> (74)		
<u>Azotobacter Vinelandii</u>	Phage T ₂ Phage T ₄ Phage T ₇ ADN thymus de Veau	} ppp A --- ppp G --- (prépondérance si l'ADN est dénaturé).	KRAKOW <u>et al.</u> (75)		
ARN polymérase du Réovirus	ARN du Réovirus			ppp G p et pp G p ---	LEVIN <u>et al.</u> (76)
ARN polymérase de thymus de Veau					
- nucléolaire	ADN thymus de Veau			ppp G ---	CHAMBON <u>et al.</u> (77)
- nucléoplasmique	ADN thymus de Veau	ppp G } pppG = 3 ppp A } pppA			
ADN polymérase nucléoplasmique de foie de Rat	ADN de foie de Rat	ppp G } pppG = 2 ppp A } pppA	SEIFART (Communication personnelle).		

TABLEAU II : Extrémités 5'-terminales d'ARN nouvellement synthétisés (observation in vivo).

ARN	Extrémité 5'-terminal	Références
f ₂	pppG ---	ROBERTSON <u>et al.</u> (78) DAHLBERG (79)
R ₁₇	pppG p(Pu)p(Py)p---	ROBLIN <u>et al.</u> (80)(81)
MS ₂	pppG pGpGpUp pppG p---	DE WACHTER <u>et al.</u> (82)(83) GLITZ (84) VANDENBERGHE (85)
Qβ	pppG p---	WATANABE <u>et al.</u> (86)
R ₂₃	pppG p---	WATANABE <u>et al.</u> (87)
Qβ "self-replicating variant"	ppp(Gp) ₄ (Ap) ₂ (Cp) ₂ ---	BISHOP <u>et al.</u> (88)
ARN du virus de la nécrose du tabac(TNV)	ppA pGpUp ---	LESNAW <u>et al.</u> (89)
<u>E. coli</u>	pppG p--- et pppA p--- } $\frac{pppG}{pppA} = 1$	JORGENSEN <u>et al.</u> (90)
ARN 5S de cellules HeLa	pppG pUp--- (76 à 87 p.100)	HATLEN <u>et al.</u> (91)
ARN 5S de cellules KB	(pp)pG pUp---	FORGET <u>et al.</u> (92)
d-ARN lourd de foie de Rat	pppXp--- et ppXp---	RYSKOW <u>et al.</u> (93)

Il est tout-à-fait remarquable que le GTP ou l'ATP (les deux ribonucléotides puriques) est le nucléotide 5'-terminal de tous les ARN de Bactériophages ou d'ARN nouvellement synthétisés in vitro, étudiés jusqu'à alors.

La signification de ce fait est encore incertaine. Il est tout d'abord possible qu'il soit lié aux sites spécifiques de déclenchement de la synthèse. GOLDTHWAIT et al. (94) ont d'ailleurs mis en évidence deux sites de fixation des nucléosides 5'-triphosphates sur l'ARN-polymérase : d'une part un site de déclenchement de la synthèse (propre aux nucléotides puriques) et, d'autre part, un site de polymérisation (fixation égale des quatre ribonucléotides). Enfin, la stabilisation du complexe, lors de la formation de la première liaison phosphodiester exige la présence d'au moins un nucléotide purique.

En outre, il faut noter que chez les Eucaryotes, in vivo, très peu de résultats ont été acquis jusqu'à présent. HATLEN, AMALDI et ATTARDI (95) ont montré que l'ARN 5S des cellules HeLa possède le GTP en position 5'-terminale. RYSKOV et GEORGIEV en 1970 (96) ont précisé que les dARN géants possèdent une extrémité 5'-polyphosphate.

Il est cependant intéressant de mettre en lumière le fait, in vitro, que la nature du nucléotide 5'-terminal puisse être reliée à la synthèse de certaines classes d'ARN. Utilisant l'ADN de thymus de Veau comme modèle, CHAMBON et al. (97) observent que l'extrémité 5'-triphosphate diffère si l'ARN polymérase utilisée est d'origine nucléaire ou nucléoplasmique. De même, avec l'ARN polymérase extranucléolaire de foie de Rat, SEIFART (Communication personnelle) retrouve une proportion pppG/pppA égale à 2, à l'extrémité 5' des ARN synthétisés in vitro sur l'ADN de foie de Rat.

2 - DEPHOSPHORYLATION DU NUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATE TERMINAL

Tandis que les ARN nouvellement formés possèdent encore le groupement triphosphate 5'-terminal, les ARN cellulaires stables (ARN-r, ARN-t) possèdent un monophosphate 5'-terminal (MADISON)(98). Il se pose donc la question du rôle de ce nucléotide, de la signification et du mode de sa déphosphorylation ultérieure. MAITRA et al. (99) ont mis en évidence à partir d'homogénats bactériens, deux enzymes capables de libérer le phosphoryle γ des chaînes d'ARN commençant par un résidu de GTP ou d'ATP. Ils

les ont appelées "GTP terminus enzyme" et "ATP terminus enzyme". Le premier nécessite la présence de ribosomes.

3 - LA SEQUENCE 5'-TERMINALE

Pour connaître les mécanismes moléculaires de l'initiation, des auteurs se sont attachés à étudier la nature de la séquence 5'-terminale. Il fut, tout d'abord encourageant de remarquer que du côté 5', le pénultième nucléotide était fréquemment l'UMP (dans 40 p.100 des cas) (MAITRA et al.)(100), tandis que les codons inducteurs de la synthèse des protéines sont précisément AUG et GUG (SALAS et al.)(101).

Cependant, au fil des expériences, cette règle fut infirmée (DE WACHTER et al.)(102). De même, récemment, les travaux de TADA et al. (103), réalisés in vitro, montrent une grande diversité de la séquence 5'-terminale tandis que le nucléotide initial reste identique. Il semble cependant, qu'il se dégage une certaine prédominance des bases puriques. Cette remarque a d'ailleurs été mise à profit pour tenter de déterminer des sites privilégiés de début de synthèse. Faisant fonctionner in vitro l'ARN polymérase d'E. coli, SUGIURA et al. (104) ont trouvé que trois espèces différentes d'ARN débutant par les séquences pppApUpG--, pppGpUpA---, pppGpUpU---, sont synthétisées sous la direction de l'ADN de la forme répllicative du phage fd. En absence du facteur "sigma", ils remarquent une diversité beaucoup plus grande dans la séquence 5' terminale, diversité qui se réduit aux trois espèces précédemment observées si le facteur "sigma" est réassocié à l'enzyme. Il se confirme donc bien que ce facteur empêche un déclenchement, au hasard, de la synthèse.

4 - IDENTIFICATION DES SITES DE DECLENCHEMENT DE LA SYNTHÈSE

Nous avons vu précédemment que l'ARN polymérase se fixe sur l'ADN en des sites spécifiques liés à une séquence donnée. Cette séquence, riche en bases pyrimidiques, devait avoir son reflet dans l'ARN néosynthétisé possédant une séquence 5' terminale riche en bases puriques. Cette hypothèse sans être infirmée ne peut pas être complètement soutenue devant la diversité des séquences 5' terminales observées. D'ailleurs il convient de noter que très récemment SZYBALSKI (résultats non publiés)(105) a montré que, sur le phage λ , une certaine distance (60 à quelques

centaines de nucléotides) séparerait le site de fixation de l'ARN polymérase ("Promotor site") du site de déclenchement de la synthèse ("Start signal site").

D - DEPLACEMENT DE L'ENZYME LE LONG DE L'ADN

1 - FORMATION D'UN HYBRIDE ADN-ARN POLYMERASE -ARN NAISSANT

Avec la croissance de la chaîne polyribonucléotidique se forme un complexe ternaire entre l'ADN, l'ARN polymérase et l'ARN naissant.

La stabilité de ce complexe est assurée par des liaisons "pont hydrogène" entre les bases de la chaîne d'ADN et celles de l'ARN. Il est important de noter que cette structure résiste à l'action de la ribonucléase pancréatique (cf. p. 45).

2 - CINETIQUE DE LA SYNTHÈSE IN VITRO

a - A faible force ionique

Toutes les chaînes sont amorcées pendant les quinze premières minutes (BREMER *et al.* (106) ; MAITRA *et al.* (107) ; RICHARDSON (108) et KRAKOW *et al.* (109)), BREMER et KONRAD (110) ont montré que la croissance de la chaîne diminuait rapidement jusqu'à son arrêt. La vitesse de croissance est d'environ une dizaine de nucléotides par seconde.

b - A force ionique plus élevée

Le déclenchement n'est plus limité au premier quart d'heure mais se prolonge pendant plusieurs heures. Ces caractéristiques seront exploitées pour interpréter le mécanisme d'arrêt de la synthèse (cf. p.29).

3 - LE SENS DE LA SYNTHÈSE

Dans le processus de polymérisation des ribonucléoside-5'-triphosphates, la séquence de l'ARN est déterminée par la complémentarité des bases avec le brin d'ADN transcrit suivant la conception de

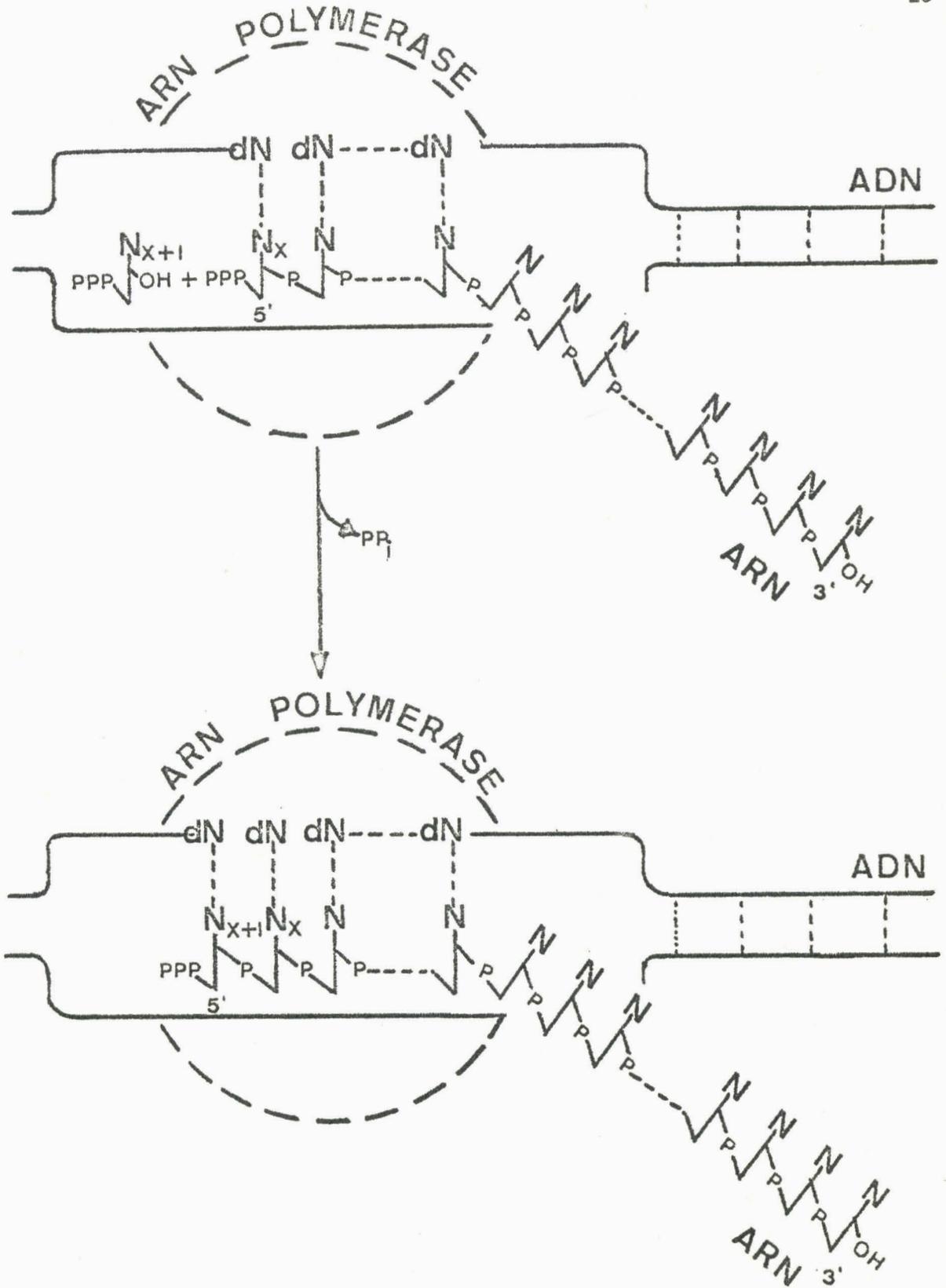


Figure n° 7 : Polymérisation hypothétique de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' des ribonucléoside-5'-triphosphates par l'ARN polymérase sous la direction de l'ADN.



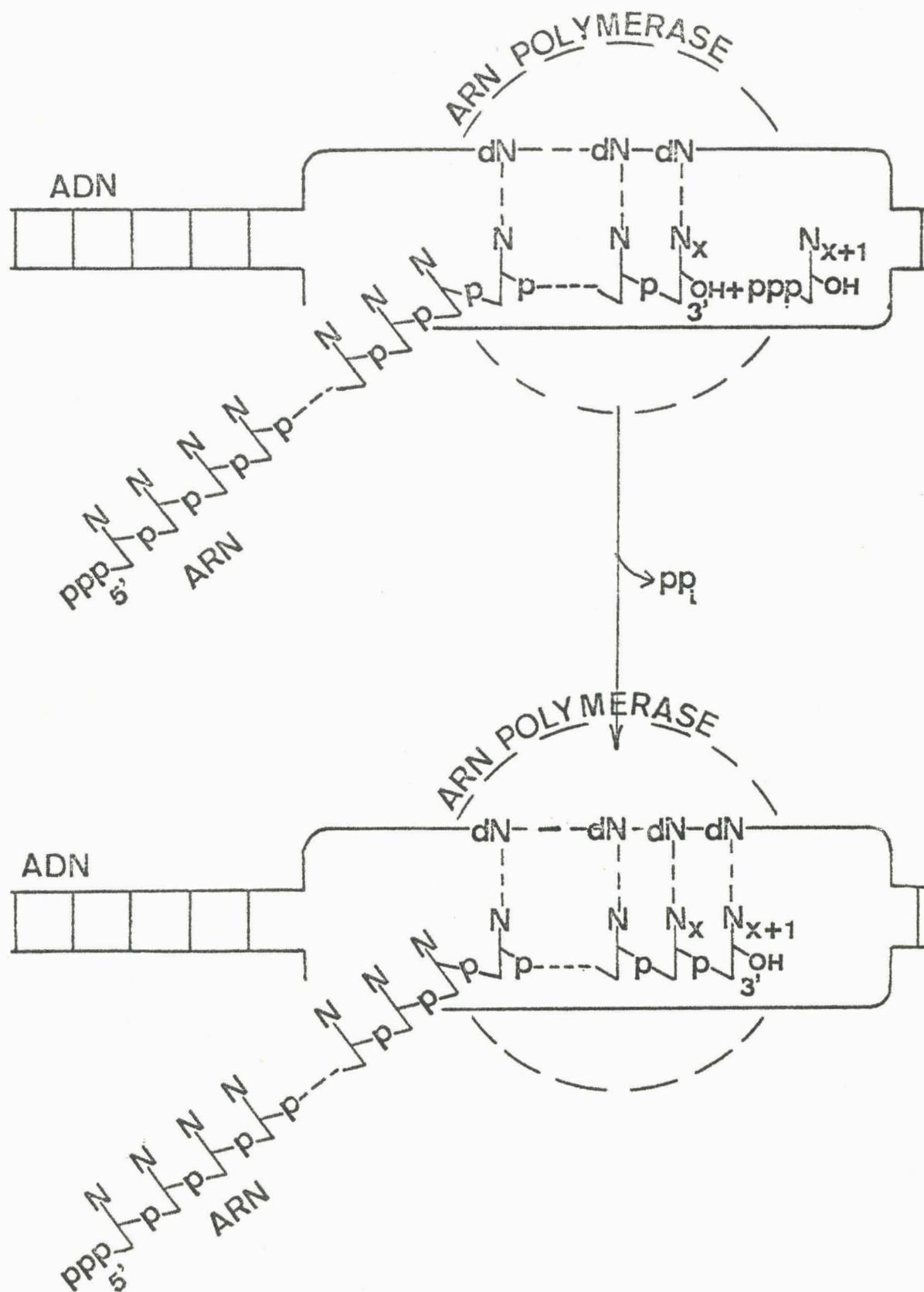
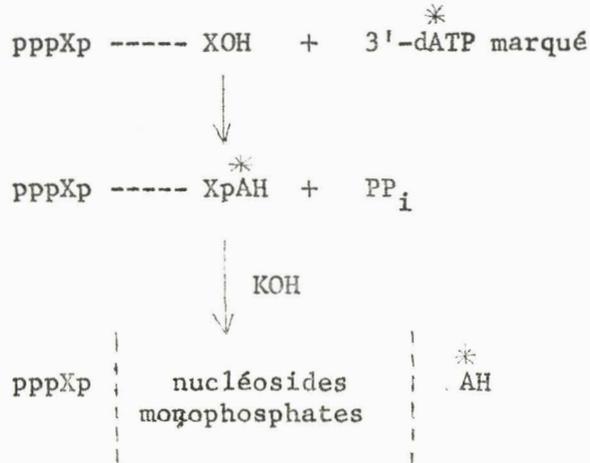


Figure n° 8 : Polymérisation de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' des ribonucléoside-5'-triphosphates par l'ARN polymérase sous la direction de l'ADN.

BUS
LILLE

outre, dans le produit d'hydrolyse alcaline de l'ARN dont la synthèse a été bloquée, toute la radioactivité est pratiquement présente dans la fraction nucléosidique.



L'addition des nucléosides triphosphates se fait donc sur l'extrémité 3'-hydroxyle.

b - Détermination du sens de transcription par l'incorporation de nucléoside-5'-triphosphate marqué par ^3H .

Le sens chimique de la synthèse de l'ARN in vitro contre l'ADN du phage T4 a été démontré par BREMER et KONRAD (113). L'ATP 5'-terminal de la chaîne n'est spécifiquement marqué que si l'incorporation de l'ATP- ^3H a été faite dès le début de la synthèse.

c - Détermination du sens de la transcription par l'incorporation de nucléoside-5'-triphosphate marqué sur le phosphoryle en δ .

Des expériences avec l'ARN polymérase d'E. coli et différents ADN ont confirmé le sens de la transcription de 5' vers 3'. Notamment, MAITRA et HURWITZ (114) ont montré que la radioactivité était spécifiquement liée à l'extrémité 5'-terminale lorsque la synthèse était tout d'abord déclenchée avec des nucléosides triphosphates marqués puis poursuivie avec des nucléosides non marqués.

C'est pour tenter d'élucider le sens de la transcription in vivo chez les Eucaryotes que nous nous sommes attaché à déterminer

l'extrémité 5'-terminale des ARN rapidement marqués dans les cellules HeLa et KB et dans les cellules de foie de Rat.

4 - ASYMETRIE DE LA TRANSCRIPTION

Sachant que la transcription s'effectuait sur un seul brin de l'ADN, la question s'est posée de savoir si une seule chaîne privilégiée servait à la formation des ARN ou si les deux chaînes pouvaient être copiées.

Par la technique des hybridations, MARMUR *et al.* (115) ont montré chez le phage SP 8, que seul, le brin d'ADN le plus riche en bases pyrimidiques était complémentaire de l'ARN nouvellement formé. D'autre part même en large excès, il n'est pas possible d'hybrider plus de 50 p.100 d'ARN avec l'ADN chez les Bactéries (Mc CARTHY et BOLTON)(116). En outre, tous les ARN cellulaires, stables ou à haute vitesse de renouvellement, sont des molécules monocaténaïres qui ne peuvent s'hybrider entre elles ; ils n'ont donc pas pu être codés par deux chaînes complémentaires d'ADN. Cependant, dans de récents travaux, COHEN et HURWITZ (117) ont démontré que les deux chaînes de l'ADN du phage λ servaient de moule *in vivo*.

Actuellement, il est donc possible d'émettre l'hypothèse d'une synthèse asymétrique qui impliquerait la copie des deux brins de l'ADN, bien que pour un tronçon donné une seule fibre soit transcrite.

E - ARRÊT DE LA SYNTHÈSE - LIBÉRATION DE L'ARN NEOSYNTHÉTISÉ ET DE L'ENZYME

A force ionique élevée, la synthèse de l'ARN se poursuit pendant plusieurs heures. Il se synthétise des molécules plus longues que leurs équivalents *in vivo*. Le signal d'arrêt ne semble donc pas respecté *in vitro*, et l'enzyme n'est d'ailleurs pas libérée.

Le mécanisme moléculaire de la "terminaison-libération" est encore mal connu.

Selon KRAKOW (118) et MAITRA et HURWITZ (119), il se pourrait que l'ARN lui-même inhibe l'action de l'ARN-polymérase par fixation compétitive sur le site propre à l'ADN. Ce mécanisme permettrait de comprendre l'action stimulatrice de la ribonucléase ou de la force ionique élevée qui, en détachant artificiellement l'ARN naissant du complexe, empêcherait cette inhibition.

Il est aussi probable qu'une séquence spécifique de l'ADN soit un signal d'arrêt. En accord avec cette hypothèse, MAITRA (120) a récemment identifié le nucléoside 3'-OH terminal des ARN libérés lors de la polymérisation in vitro : il s'agit principalement, sinon exclusivement, de l'uridine. SUMMERS et SZYBALSKI (121) ont par ailleurs montré que l'arrêt de la synthèse se produisait ~~transcrit~~ fréquemment quand le poly dG.dC ou le poly dA.dT ~~était~~ transcrit in vitro. Les différences entre les synthèses in vitro et in vivo ont conduit ROBERTS (122) à découvrir dans la fraction soluble d'extrait de E. coli un facteur qui crée l'arrêt spécifique de la transcription et provoque la libération de l'ARN. Ce facteur, appelé "rho", est une protéine de masse moléculaire avoisinant 200.000. Ajouté lors des synthèses effectuées in vitro sur le phage λ , il régule l'arrêt de la synthèse et confère aux ARN une taille homogène et semblable à celle des ARN transcrits in vivo sur le même modèle. Il pourrait agir en se fixant sur l'ARN naissant et provoquer son détachement. Il est aussi possible qu'il modifie la structure spatiale de l'enzyme et lui permette de reconnaître les séquences de l'ADN codant pour une fin de synthèse.

II - REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Quantitativement, et surtout qualitativement, l'activité de l'ARN polymérase in vitro est de loin inférieure à son activité observée in vivo. Après avoir rappelé brièvement les données acquises chez les Procaryotes, nous exposerons les connaissances actuelles de la régulation de la transcription chez les Eucaryotes.

A - REGULATION CHEZ LES PROCARYOTES.

La connaissance des divers contrôles exercés sur la transcription a pu être établie par des études génétiques menées sur les Phages, Bactéries et leurs mutants. Il apparaît actuellement que cette régulation, en fait très complexe, soit due à l'action concomitante d'activateurs (contrôle "positif") et d'inhibiteurs (contrôle "négatif") agissant directement ou indirectement sur le déclenchement de l'activité polymérasique.

Outre la régulation exercée sur le processus même de déclenchement de la synthèse, il existe, selon l'hypothèse proposée par STENT (123), un couplage entre synthèse protéique et synthèse d'ARN. Le groupe de NIREMBERG (BYRNE et al.)(124) a pu mettre en évidence, in vitro, un complexe dans lequel le ribosome était déjà attaché à l'ARN messenger alors que celui-ci était encore lié à l'ADN, la transcription n'étant pas terminée. De plus, in vivo, il y a une corrélation entre la quantité de ribosomes présents dans une Bactérie et la proportion d'ARN messagers synthétisés. L'hypothèse de STENT (125) proposant un couplage entre synthèse protéique et synthèse d'ARN se vérifiait donc.

Utilisant le système de synthèse protéique associé à la transcription de l'ADN du phage T₄, NAONO, ROUVIERE et GROS (126), REVEL et GROS (127) ont recherché s'il existait un effet des ribosomes sur la transcription. Ces auteurs ont montré que si l'addition des ribosomes seuls n'avait aucune influence, l'action conjuguée d'une protéine particulière (le facteur "C") et des ribosomes (plus particulièrement la fraction 30S) provoquait, au contraire, une forte stimulation de la transcription.

B - REGULATION CHEZ LES EUCARYOTES

Le système de régulation est beaucoup plus difficilement abordable chez les Eucaryotes. En plus d'un contrôle direct au niveau de la transcription, comme dans les systèmes bactériens, l'ARN doit être transporté de son site de synthèse, - le noyau-, jusqu'à son lieu d'utilisation, - le cytoplasme-.

Le fait le plus caractéristique est qu'il se synthétise, dans le noyau, des chaînes d'ARN beaucoup plus longues que celles finalement utilisées dans le cytoplasme. Qu'il s'agisse de des ARN ribosomiaux ou messagers, ou solubles, tous sont issus de molécules de tailles plus élevées, associées dès leur synthèse à des protéines, -sauf dans le cas des ARNt- qui joueraient à la fois un rôle de transport et de protection de l'ARN.

1 - FORMES CONJUGUEES DANS LE NOYAU

a - Particules ribonucléoprotéiques, précurseurs ribosomiaux.

Les ribosomes sont des RNP formés principalement par l'asso-

ciation de protéines à deux types d'ARN, l'ARN 28S et l'ARN 18S. Cependant, dans le nucléole, c'est une molécule géante d'ARN de type ribosomal qui est synthétisée et sera clivée ensuite. Cet ARN 45S est associé à des protéines pour former une particule RNP de coefficient de sédimentation égal à 80S (SCHERRER et al. (128) ; PERRY et al. (129) ; WARNER et al. (130) ; SHANKAR et al. (131) ; LIAU et PERRY (132).

b - Particules ribonucléoprotéiques, précurseurs d'ARN messagers.

SAMARINA, ASRIYAN et GEORGIEV (1965)(133) ont montré que les d-ARN synthétisés dans le noyau de foie de Rat se combinaient dès leur synthèse à des particules de protéines spécifiques : Les "informofères". Ces protéines joueraient un rôle de protection mais aussi de régulation dans la dégradation ultérieure des ARN. Elles pourraient aussi avoir une action plus directe sur la transcription en jouant un rôle semblable à celui qui est exercé par les ribosomes chez les Procaryotes. Ces d-RNP sont ensuite clivées et une partie seulement (moins de la moitié) passe dans le cytoplasme, le reste étant dégradé dans le noyau.

Des structures analogues ont été mises en évidence dans différents laboratoires, soit à partir d'extraits de noyaux de foie de Rat (MOULE et al. (134) ; PARSONS et Mc Carty (135) ; ISHIKAWA et al. (136) ou sous forme de particules spontanément diffusibles de ces noyaux (DEFERT-KOBUS, KERCKAERT, SEGARD et MONTREUIL)(137). Des particules RNP semblables ont été étudiées à partir d'autres tissus : cerveau de Rat, (STEVENIN, MANDEL et JACOB)(138) ; thyroïde de Mouton (CARTOUZOU, POIREE et LISSITSKY)(139).

2 - FORMES CONJUGUEES DANS LE CYTOPLASME

Les complexes de rRNP et de dRNP, après avoir subi une réduction de taille, passent au travers de l'enveloppe nucléaire et se retrouvent dans le cytoplasme.

a - Précurseurs ribosomiaux

SCHERRER et al. (140) et PERRY et al. (141) ont observé que le précurseur 45S des rRNA était dégradé à plus de 50 p.100 dans le noyau.

et que seuls passaient dans le cytoplasme les ARN 28S et 18S sous la forme de particules 60-65 S et 40-45S pour former les nouveaux ribosomes.

b - Précurseurs des ARN messagers.

α - Formes conjuguées inactives

1°) Chez les organismes embryonnaires, des cellules énucléées peuvent poursuivre le processus de la division cellulaire et contiennent donc à synthétiser des protéines (HARVEY)(142). On peut penser que l'ARN-m existe dans le cytoplasme sous une forme de réserve. Il revient à SPIRIN et al. (143) d'avoir, les premiers, en 1964, mis en évidence des associations de protéines et d'ARN de type messenger dans l'embryon de Misgurnus fossilis.

Ces particules de ribonucléoprotéines sont de tailles très différentes (20S - 30S - 40S - 50S - 55S - 65S - 75S et 90S - 100S - 110S) mais possèdent toutes, outre la propriété fondamentale d'être une association ARN m-protéines, des propriétés physico-chimiques précises, différentes des ribosomes et des polysomes (densité : 1,40 ; pourcentage de protéines : 80 p.100).

Rappelant leur rôle de transporteur de l'information génétique, ces particules furent nommées "informosomes". SPIRIN et NEMER (144) puis INFANTE et NEMER (145) ont caractérisé des structures identiques dans des cellules embryonnaires diverses.

2°) Chez les organismes différenciés. Dès lors, de nombreux auteurs s'attachèrent à identifier des particules semblables dans des organismes différenciés. Ces particules furent caractérisées dans des extraits cytoplasmiques de cellules HeLa (Mc CONKEY et HOPKINS (146) ; PERRY et KELLEY (147) et de foie de Rat (HENSHAW et LAREAU (148), SAMARINA et al. (149)). Dans ce cas, les ribonucléoprotéines ne présentent plus la diversité de taille observée chez les cellules embryonnaires mais ont toutes une constante de sédimentation avoisinant 45S.

β - Formes conjuguées actives

Des rôles divers peuvent être attribués à ces ribonucléoprotéines de type "informosome". Représentant une forme de protection contre

les actions des nucléases, elles seraient une forme de stockage de l'information génétique. Des travaux de MANO et NAGANO (150)(151), ont montré que l'activation des ARN maternels (porteurs de l'information génétique) présents dans le cytoplasme des cellules embryonnaires se fait par l'action d'une protéase agissant comme la trypsine ("trypsin-like factor").

En outre, il est possible que ces protéines puissent jouer un rôle dans le contrôle de la lecture de l'ARN messager.

3 - CONCLUSIONS

GEORGIEV (152) a récemment proposé une hypothèse générale de la régulation de la transcription chez les Eucaryotes (voir fig. 9, p. 35). Selon son modèle, les cistrons contenant les gènes de structure sont localisés dans la partie distale de l'opéron tandis que la partie proche du promoteur contiendrait les séquences d'ADN capables de fixer les protéines de régulation de la synthèse.

Ces protéines pourraient être, d'une part, certaines histones dont l'affinité pour l'ADN serait telle qu'elles formeraient un complexe indissociable et empêcheraient le déplacement de l'ARN polymérase. Ces histones joueraient un rôle primordial dans le blocage définitif de l'expression de certains gènes lors de la différenciation cellulaire.

Ces protéines pourraient être, d'autre part, des protéines non histoniques, analogues au répresseur mis en évidence chez les Procaryotes par GILBERT et MULLER-HILL (153)(154) en exerçant un contrôle négatif de la transcription.

La différence fondamentale entre la situation observée chez les Procaryotes et chez les Eucaryotes résiderait dans la longueur de cette zone de régulation et dans la diversité des différents répresseurs. Certains sites (a_1, a_2) communs à toute une classe de gènes seraient bloqués par un même répresseur. D'autres sites (a_n), plus spécifiques, apporteraient une régulation "plus fine".

GEORGIEV et son équipe ont récemment apporté quelques confirmations à ce modèle en montrant :

- que l'extrémité 5' des dARN géants possède un taux d'hybridation plus élevé que le reste de la molécule, ce qui confirme

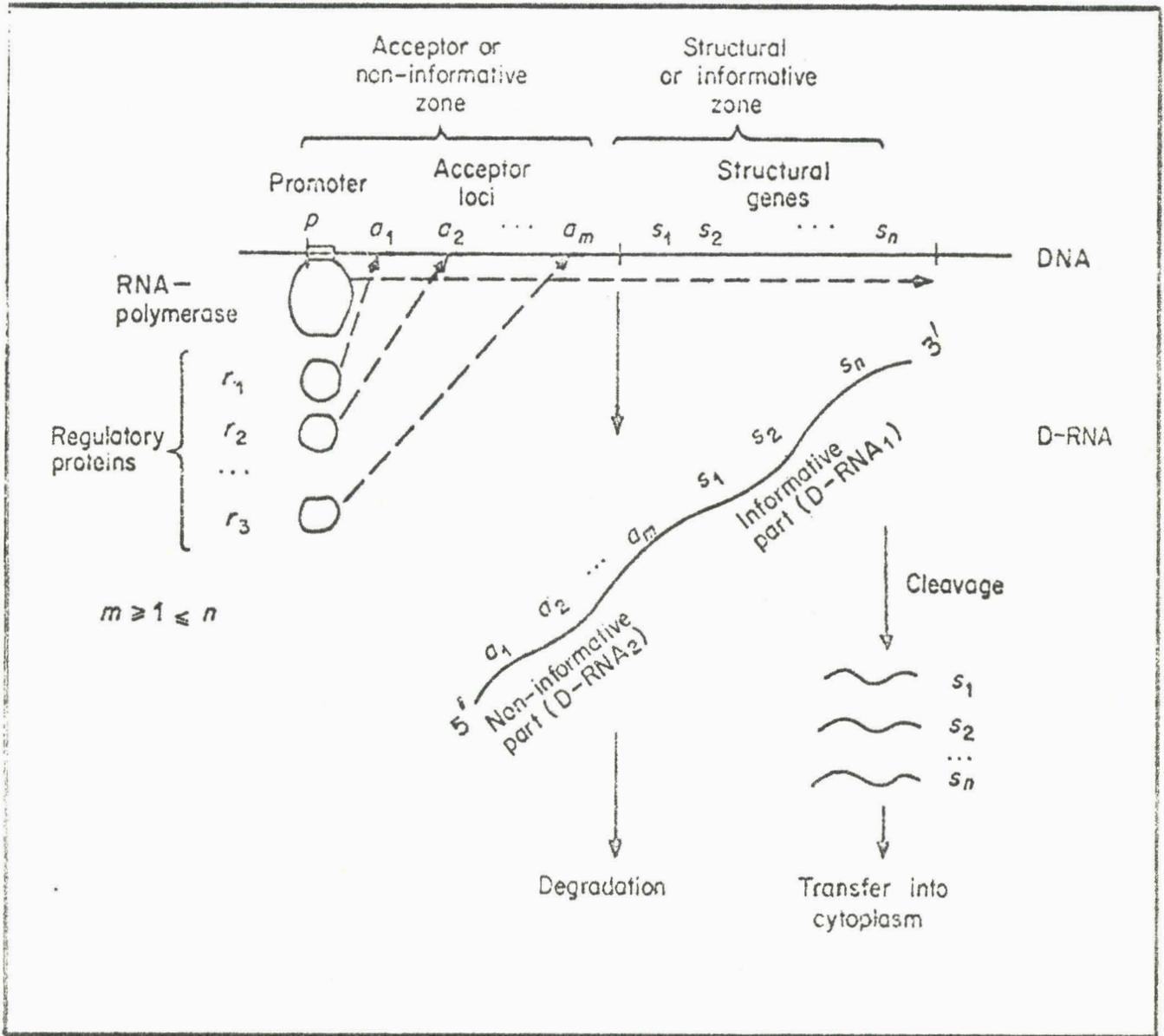


Figure n° 9 : Modèle proposé par GEORGIEV (voir p. 34 et réf. 152) de la régulation de la transcription chez les Eucaryotes.

la présence de séquences hautement répétitives dans la partie proximale de l'opéron (nombreux sites a_1 , a_2) (RYSKOV et al.)(155).

- que la partie de ces d-ARN géants qui passait dans le cytoplasme (zone contenant le message pour les protéines de structure) se trouvait localisée du côté de l'extrémité 3'-OH (COUTELLE et al.)(156).

Cette hypothèse est particulièrement attrayante car elle présente un modèle très général de la régulation de la transcription chez les Eucaryotes, valable pour toutes les classes d'ARN transcrits : messagers ou ribosomiaux.

LES HYBRIDES NATURELS

L'étude des hybrides naturels ADN-ARN, formés in vivo lors de la transcription, permet de connaître, au niveau moléculaire, les détails de la polymérisation des ribonucléotides.

De nombreux auteurs ont consacré leurs travaux à l'extraction et à l'étude de telles structures. MILLER et al., en 1969-1970 (157)(158) sont parvenus à observer au microscope électronique ces complexes représentant le "gène en action".

I - HYBRIDES DES PROCARYOTES

Les premières tentatives d'extraction de ces complexes ont été réalisées à partir de cultures d'E. coli infectées par le phage T₂ par SPIELGELMAN et al. (159) qui utilisèrent le mélange chloroforme/alcool isoamylique en présence de dodécyl sulfonate de sodium (SDS). Cependant, les quantités obtenues étaient malheureusement insuffisantes et des travaux semblables menés par KONRAD et STENT (160) n'ont pas été plus fructueux.

HAYASHI et al. (161) ont repris ces travaux en isolant l'hybride ADN-ARN par le SDS-phénol-chloroforme à partir d'E. coli infecté par le phage ϕ X-174. Cette structure fut alors étudiée en détail. Ils montrèrent que l'ARN associé à l'ADN était résistant à l'action de la ribonucléase, et que le complexe se dissociait sous l'action de la chaleur ou de la formamide (rupture

des ponts "hydrogène"). La longueur du brin d'ARN hybridé fut évaluée à une cinquantaine de nucléotides (3 à 3,5S). Enfin, ce complexe n'était pas un artéfact puisque, même après 70 heures de mélange à haute force ionique, l'ARN rapidement marqué n'était pas associé avec l'ADN (deux pics distincts lors de la centrifugation en gradient de densité de sulfate de césium).

Chez les Bactéries (E. coli, Staphylococcus aureus, Micrococcus lysodeikticus), TONGUR et al. (162) ont mis en évidence un complexe identique dont la structure est préservée par une protéine qu'il soupçonne d'être l'ARN polymérase elle-même. L'ARN peut être détaché de l'hybride par chauffage ou sous l'action de l'urée 6M, son coefficient de sédimentation moyen est de 7,5S. La quantité d'ARN représente 10 à 15 p.100 de l'ADN et 2 à 4 p.100 de la totalité de l'ARN cellulaire. Sa composition en bases ressemble plus à celle de l'ARN total qu'elle ne reflète celle de l'ADN.

Enfin, très récemment, STONINGTON et PETTIJOHN (163) ont isolé l'ADN d'E. coli sous la forme d'une structure compacte (3200S) contenant de petites quantités d'ARN nouvellement synthétisés et de protéines caractérisées comme étant l'ARN polymérase.

II - HYBRIDES DES EUCARYOTES

Des hybrides naturels ADN-ARN ont été mis en évidence chez les Eucaryotes. A partir de la fraction microsomale (sédimentation sous 105.000 g) de Neurospora crassa, SCHULMAN et BONNER (1962)(164) ont obtenu un complexe ADN-ARN par une extraction effectuée par le mélange de désoxycholate ^(de sodium) et de chloroforme-alcool isoamylique. En se fondant sur les courbes de dénaturat~~ion~~ thermique, sur la centrifugation en gradient de chlorure de césium (diminution de densité du complexe après l'action de la RNase) et sur la sensibilité à la DNase, les auteurs pensent qu'il s'agit d'un hybride contenant deux brins d'ADN et un brin d'ARN.

Un complexe ADN-ARN a aussi été isolé par MEAD (1964) (165) par une méthode semblable à partir de Drosophila melanogaster. Le rapport ADN/ARN est, dans ce cas, égal à deux.

Dans les cellules de l'hépatome ascitique, MANDEL et BORKOWSKA(1964) (166) ont utilisé le SDS suivant le procédé de KAY (167), et le phénol (BORKOWSKA et al.)(168). Ils obtiennent par chromatographie sur colonne MAK (méthyl-albumine Kieselguhr) deux fractions contenant à la fois l'ADN et l'ARN, qu'ils dénomment hybrides naturels et qui ont des propriétés métaboliques différentes.

RICHTER et SENCER (1965) (169) ont étudié un complexe ADN-ARN isolé de Chlorella après un marquage court par le radiophosphore. La composition en bases de l'ARN néosynthétisé suggère, selon les auteurs, qu'une seule chaîne de l'ADN sert de modèle à la polymérisation des ribonucléotides.

WILKINSON et KIRBY (1966) (170) ont, semble-t-il, obtenu un complexe ADN-ARN à partir du foie de Rat sain et hépatomateux, au moyen du 4-amino-salicylate de sodium et du phénol. Ce complexe est légèrement sensible à la RNase. Par une méthode semblable, WATSON et RALPH (1967)(171) ont isolé un ARN associé à l'ADN dans le cas de cellules de Sarcome 180.

Dans le cas de cellules HeLa, faisant appel au mélange SDS-chloroforme-alcool isoamylique, LEVIS, KRSMANOVIC et ERRERA (1967) (172) ont pu mettre en évidence un ARN rapidement marqué associé à l'ADN.

Récemment dans notre laboratoire, KRSMANOVIC, SEGARD et MONTREUIL (1968) (173) sont parvenus à isoler un complexe ADN-ARN du foie de Rat par une méthode semblable. L'action de la force ionique, la dissociation par la chaleur et la formamide, la résistance partielle à la RNase ont montré l'action prépondérante des liaisons ponts "hydrogène" dans la stabilité de ce complexe (SERGEANT et al.)(174).

AVADHANI et al. (1970)(175) ont isolé et montré qu'un tel complexe ADN-ARN existait chez Euglena gracilis. En outre, ce complexe stimule fortement l'incorporation des amino-acides dans un système acellulaire d'E. coli (AVADHANI et al.) (176). Il convient cependant d'être prudent quant à l'interprétation de ces résultats.

Enfin, GAITSKHOKI et al. (1970)(177) ont isolé de mitochondries d'hépatocytes de Rat des complexes ADN-ARN qui stimulent aussi la synthèse protéique dans un système acellulaire de foie de Rat. Les auteurs distinguent deux types de complexes selon la stabilité des liaisons ADN-ARN lors du passage sur colonne MAK. Ces

complexes peuvent être, notamment, obtenus à partir de la membrane.

C'est sur l'étude de ce matériel que nous avons fondé nos travaux. A partir du complexe ADN-ARN, - dont les propriétés physico-chimiques ont été plus particulièrement étudiées par SERGEANT (178)(179) -, nous avons tenté :

- de mettre en évidence l'extrémité 5'-terminale de l'ARN en voie de synthèse,
 - de déterminer l'extrémité résistante à l'action de la RNase,
 - de tirer des conclusions quant au sens de la transcription in vivo dans le cas de cellules de Mammifères.
-

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

I - MARQUAGE DES ACIDES NUCLEIQUES PAR DES PRECURSEURS
RADIOACTIFS.

A - MARQUAGE DES CELLULES

Les cellules Hela et les cellules KB 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 (milieu Φ 10) :

NaCl	8 / g/litre
KCl	0,4 g/litre
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g/litre
Na ₂ PO ₄ H, 12 H ₂ O	0,15 g/litre
KH ₂ PO ₄	0,06 g/litre
Rouge phénol	0,02 g/litre
Hydrolysate de lactalbumine	5,0 g/litre
Extrait de levure	0,5 g/litre
Glucose	2 g/litre
NaHCO ₃	2 g/litre
CaCl ₂	0,14 g/litre
Pénicilline	10 ⁵ unités/litre
Streptomycine	0,1 g/litre
Sérum de Veau	0,1 l/litre

Nous avons utilisé des cellules âgées de 36 heures afin d'avoir un nombre suffisant de cellules en phase exponentielle de croissance. Une boîte de ROUX, dans ces conditions contient en moyenne 2 à 4 x 10⁷ cellules.

Le marquage des cellules intactes est effectué en présence de :

- 5 μ Ci de ³H-8-guanine par ml de milieu de culture
- 5 μ Ci de ³H-8-adénine par ml de milieu de culture
- 5 μ Ci de ³H-5-uridine par ml de milieu de culture
- 4 μ Ci de ³²P-orthophosphate par ml de milieu de culture.

pendant 16 heures dans le milieu indiqué ci-dessus.

Après l'incorporation, le matériel est refroidi par le mélange glace-eau, le milieu radio-actif est éliminé puis remplacé par du milieu EAGLE (milieu \emptyset 10 sans sérum de Veau) préalablement maintenu à 4°C. Le détachement des cellules est effectué par agitation de la boîte de ROUX en présence de billes de verre de 2 mm de diamètre, dans le milieu EAGLE.

Le sédiment cellulaire obtenu par une centrifugation de 5 minutes à 1000 t/mn est ensuite lavé une fois dans le milieu de EAGLE puis centrifugé à nouveau, à la même vitesse.

B - MARQUAGE DES HEPATOCYTES DE RAT

Des rats mâles âgés de trois mois laissés à jeûn pendant 4 heures (eau à discrétion), reçoivent une injection intrapéritonéale de ^{2m}Ci de radiophosphate neutralisé par une solution de bicarbonate. Après une incubation de 14 heures à jeûn, les rats sont sacrifiés par décapitation et les foies prélevés.

II - ISOLEMENT DES NOYAUX DE FOIE DE RAT

Les foies sont lavés dans une solution 0,25 M en saccharose à 4°C, broyés finement et homogénéisés à 0°C dans 20 volumes d'une solution 2,2 M en saccharose et 3,3 mM en acétate de calcium (CHAUVEAU et al.) (180). L'homogénat est centrifugé dans le rotor 21 de l'ultra-centrifugeuse préparative Spinco L2-65B à 20.000 t/mn pendant 60 mn à 4°C. Cette méthode permet d'obtenir un sédiment de noyaux de haute pureté.

III - EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES PAR LE MELANGE SDS/CHLOROFORME/ALCOOL ISOAMYLIQUE.

Le sédiment contenant 5 à $7 \cdot 10^7$ noyaux de foie de Rat par ml (ou 2 à 3×10^7 cellules) est mis en suspension dans 15 ml de la solution suivante :

Tris/HCl 0,01 M ; pH 7,4
NaCl 0,3 M
Citrates de sodium 0,03 M

EDTA 0,001 M ; pH 7,4
 Bentonite 1 mg/ml

Les noyaux (ou les cellules) sont lysés par addition de dodécyl-sulfonate de sodium (SDS) recristallisé (CRESTFIELD *et al.*) (181), jusqu'à une concentration de 1 p.100 (solution stock de SDS 10 p.100 dans l'éthanol à 50 p.100). Après une agitation de 15 minutes à 4°C, le lysat est additionné d'un volume égal du mélange chloroforme/alcool isoamylique (35:10) (v:v) et l'agitation poursuivie pendant 45 minutes à 4°C. Ensuite, le lysat est centrifugé 10 minutes à 10.000 g et la phase aqueuse est extraite une seconde fois par le mélange chloroforme/alcool isoamylique, sous agitation pendant 15 mn à 4°C (LEVIS *et al.*) (182). Les fibres contenant l'ADN et l'ARN sont recueillies à partir de la phase aqueuse finale par addition d'un volume égal d'éthanol absolu et enroulées sur des baguettes de verre. Les acides nucléiques peuvent être conservés pendant une semaine dans l'éthanol à 67 p.100, à - 20°C (voir fig. 10, p. 44).

IV - FRACTIONNEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES

A - FRACTIONNEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES PAR SEDIMENTATION EN GRADIENT DE SULFATE DE CESIUM.

La solution de Cs_2SO_4 (densité moyenne = 1,535) contenant du Tris/HCl 10 mM et de l'EDTA 1 mM est ajustée à pH 7,4 par de la potasse 0,3N. Les gradients de 3,5 ml contenant 400 à 800 µg d'acides nucléiques bruts sont centrifugés dans le rotor SW 39 de l'ultracentrifugeuse Spinco L2-65B à 33 000 t/mn pendant 72 heures à 20°C ou à 35 000 t/mn pendant 60 heures dans le rotor SW 40. A la fin de la centrifugation, chaque gradient est divisé en fractions égales, chaque fraction est ensuite diluée à 1 ml.

B - SEDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITE DE SACCHAROSE

Des quantités de 300 à 400 µg d'acides nucléiques sont dissoutes dans 1 ml de tampon de composition suivante :

Tris/HCl 0,01 M ; pH 7,4
 NaCl 0,3 M

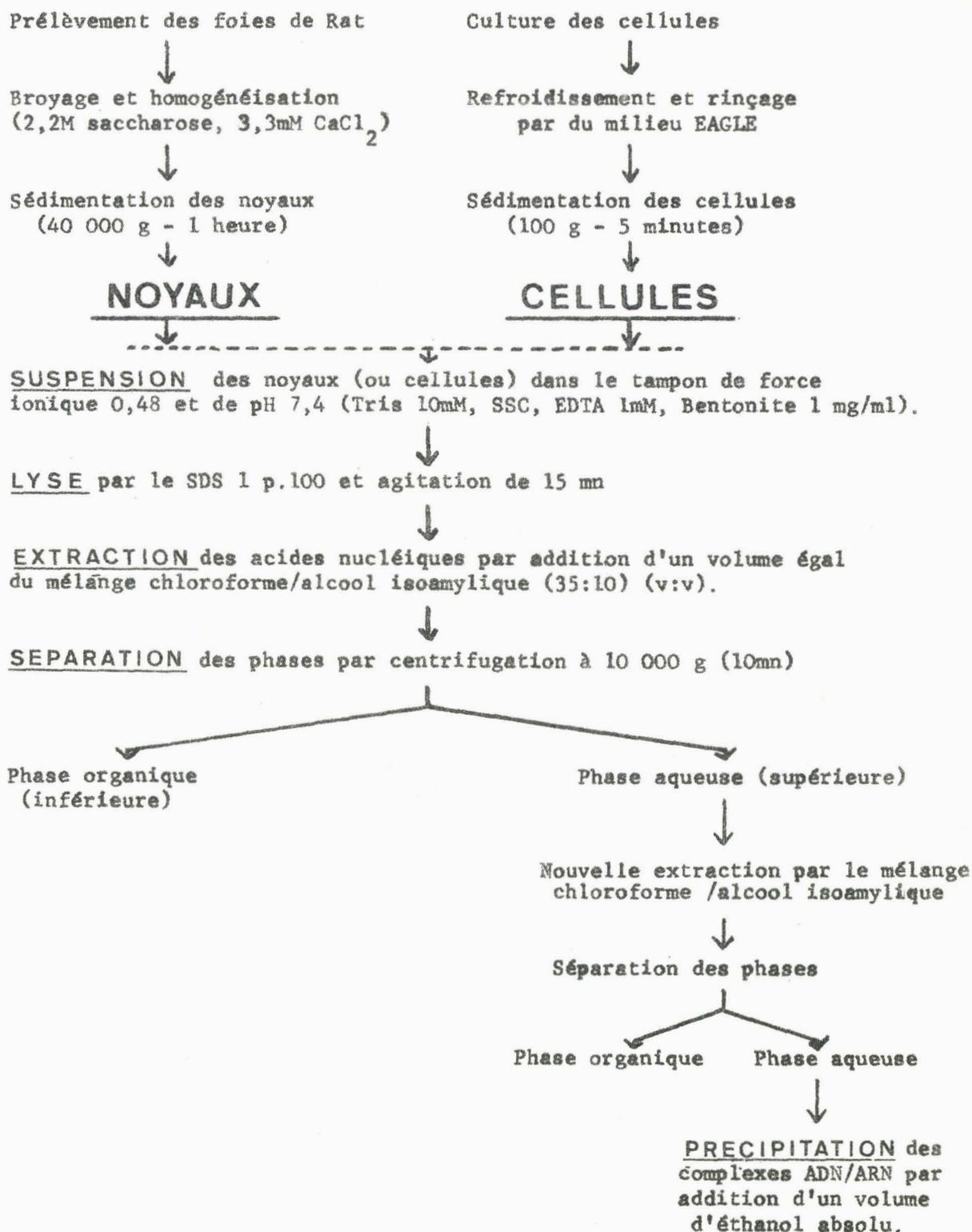


Figure n° 10 : Extraction des complexes ADN-ARN.

Toutes les opérations sont menées à + 4°C.



Citrate trisodique 0,03 M
 EDTA 0,001M ; pH 7,4

et déposées sur un gradient linéaire de sucrose de 5 à 20 p.100 dans le même tampon. Les centrifugations sont effectuées dans le rotor SW 25 de la Spinco L2-65B à 24 000 t/mn pendant 16 heures à 4°C. Des fractions de 1 ml sont collectées à la fin de chaque centrifugation.

C - PRECIPITATION SUR FILTRE DU COMPLEXE ADN-ARN

Les fibres d'acides nucléiques sont dissoutes dans le tampon 2 SSC de composition suivante :

NaCl 0,3 M
 Citrate trisodique 0,03 M

La solution est ensuite mise à dialyser pendant 24 heures contre 2 litres de la solution suivante :

NaCl 0,3 M
 Citrate trisodique 0,03 M
 Na_2HPO_4 0,02 M

ajustée à pH 7,5 par l'acide orthophosphorique. L'adialysat est ensuite précipité par de l'acide trichloracétique 10 p.100 pendant 15 minutes à 0°C, recueilli sur filtre de papier Whatman GF 83 et lavé abondamment par de l'acide trichloracétique dilué (0,03 p.100).

V - TRAITEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES

A - ACTION DES ALCALIS

1 - MODE D'ACTION

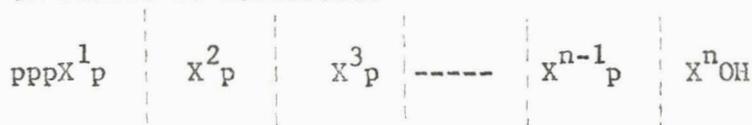
Les ARN contenant une extrémité 5'-triphosphate peuvent être schématisés de la façon suivante :



L'hydrolyse alcaline coupe les liaisons phosphodiester du côté 5' et libère pour une chaîne contenant n ribonucléotides :

un résidu de nucléoside-5'-triphosphate, 3'-monophosphate
(n-2) résidu de nucléoside-3'-monophosphates,

un résidu de nucléoside



2 - MODE OPERATOIRE

Employant les mêmes conditions que BREMER et KONRAD (183), l'hydrolyse alcaline est effectuée par l'action de la potasse 0,3N, à 37°C, pendant 16 heures. La réaction est arrêtée par refroidissement à 0°C.

B - ACTION DE LA RIBONUCLEASE PANCREATIQUE

1 - PRINCIPE

La RNase pancréatique coupe spécifiquement les liaisons des nucléotides pyrimidiques des ARN monocaténares. Elle libère donc des oligonucléotides composés d'enchaînements de nucléotides puriques possédant en position 3'-terminale un nucléotide pyrimidique. Elle est, en outre, inactive sur l'ARN engagé dans l'hybride ADN/ARN par des liaisons "pont hydrogène" comme il est schématisé dans la figure 11 p.47.

2 - MODE OPERATOIRE

La ribonucléase pancréatique (polyribonucléotide-oligonucléotide-transférase, EC 2.7.7. U Sigma) dissoute dans le tampon citrate de sodium 0,015 M, NaCl 0,15 M, pH 5 (SSC), à raison de 5 mg/ml, est chauffée à 80°C pendant 10 mn pour éliminer toute trace de désoxyribonucléase. Ainsi préparée, la ribonucléase est utilisée à raison de 25 µg par 100 µg d'acides nucléiques sans toutefois descendre au dessous de 10 µg par ml. L'hydrolyse est effectuée pendant 45 mn, à 27°C, dans une solution de citrate de sodium 0,03M, NaCl 0,3 M (2 SSC) ajustée à pH 7,4. La réaction est arrêtée par refroidissement à 0°C et par addition d'acide trichloracétique à 10 p.100.

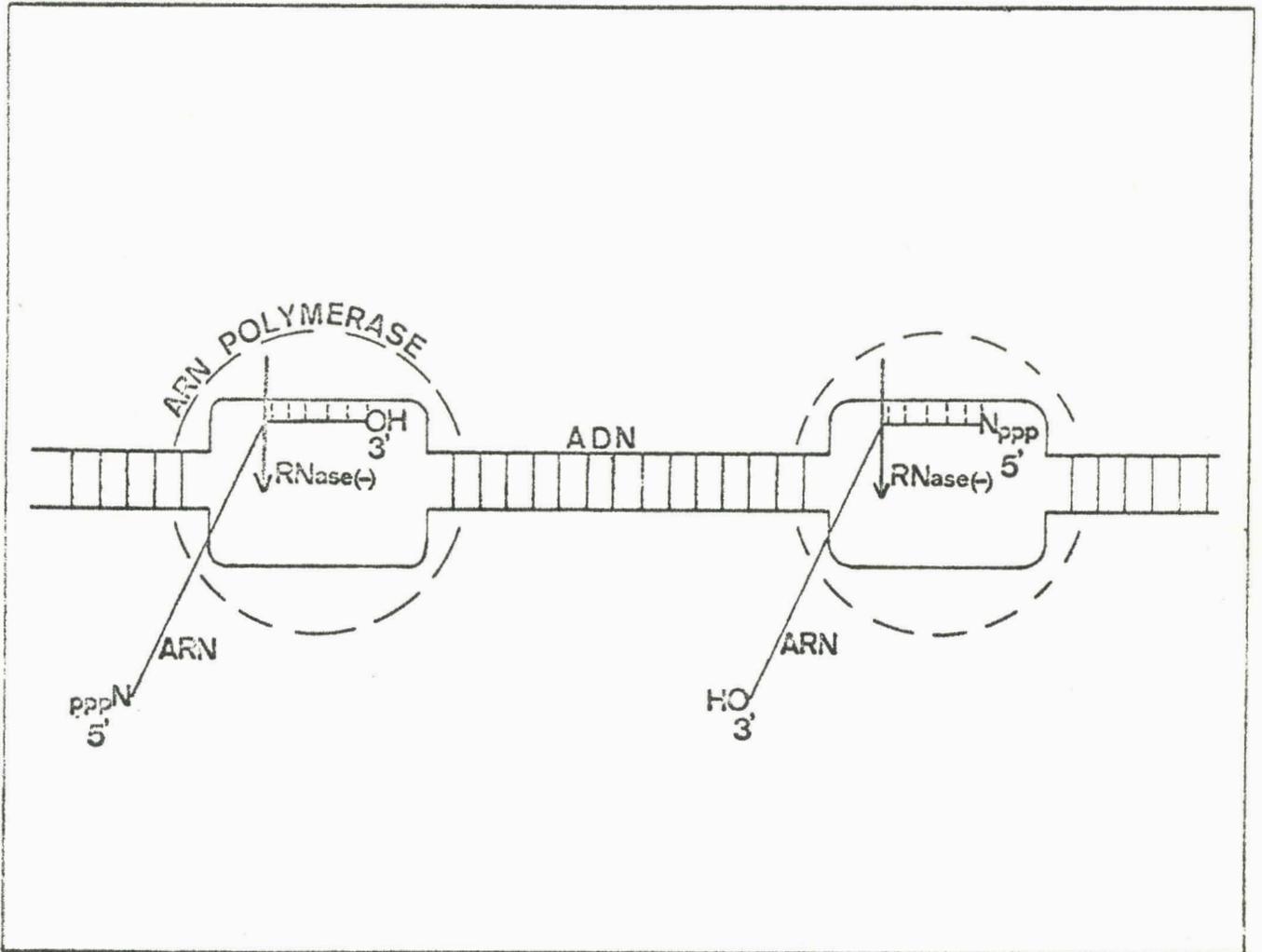


Figure n° 11 : Action de la ribonucléase pancréatique sur l'hybride naturel ADN-ARN naissant.

A gauche : Dans l'hypothèse d'une croissance de la chaîne d'ARN de 5' vers 3'.

A droite : Dans l'hypothèse d'une croissance de la chaîne d'ARN de 3' vers 5'.

C - DENATURATION DU COMPLEXE ADN-ARN PAR LA CHALEUR OU LA FORMAMIDE

La dénaturation thermique s'effectue par chauffage à 95°C pendant 10 mn dans une solution de 0,1 SSC (force ionique 0,02), la réaction étant interrompue par refroidissement brutal à 0°C.

La dénaturation par la formamide s'effectue par une dialyse de l'échantillon contre une solution aqueuse de formamide à 80 p.100 (v:v) pendant une nuit, à 4°C, suivie par un chauffage de 20 mn à 37°C (HAYASHI et HAYASHI) (184).

D - LECTURE DE LA DENSITE OPTIQUE

La lecture de la densité optique est effectuée à 260 nm. Pour en déduire la quantité d'acides nucléiques présents dans les solutions, nous avons utilisé les rapports de conversion suivants :

D.O.₂₆₀ = 1 correspondant à 35 µg/ml d'ARN dénaturé ou hydrolysé.

D.O.₂₆₀ = 1 correspondant à 40 µg/ml d'ARN monocaténaire dont certaines portions sont pseudo-bicaténaires.

E - MESURE DE LA RADIOACTIVITE

Les mesures de radioactivité sont effectuées à l'aide d'un groupe de comptage par scintillation liquide Nuclear Chicago Unilux ou Mark 1.

Pour éviter toute erreur due à une souillure par des reliquats de substances radioactives, il est procédé systématiquement, juste avant l'introduction des produits radioactifs, à un précomptage des flacons. Est éliminé tout flacon dont la radioactivité est supérieure à celle du "fond moyen" ainsi déterminé.

I - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE DES ACIDES NUCLEIQUES RECUEILLIS SUR FILTRE

Les acides nucléiques sont précipités par l'acide trichloracétique 10 p.100 en présence de 100 µg d'ADN du sperme de Saumon comme entraîneur. Après quinze minutes à 0°C, le matériel est recueilli sur filtre de papier Whatman GF 83 et lavé par 10 ml d'acide trichloracétique

dilué (0,03 p.100). Les filtres sont séchés dans une étuve à 37°C pendant une heure et placés dans des fioles contenant 10 ml du milieu scintillant suivant :

0,5 g de diméthyl POPOP (1,4-bis-(2-(5 phényloxazolyl)) benzène)
5 g de PPO (2-5 diphényloxazol)
toluène q.s.p, 1 litre.

2 - COMPTAGE DES ECHANTILLONS LIQUIDES (de 0,5 ml à 1 ml)

La solution radioactive (dont le volume ne doit pas excéder 1 ml) est mélangée à 10 ml de la solution de BRAY (185), dont la composition est la suivante :

0,2 g de POPOP
4 g de PPO
60 g de naphthalène
20 ml d'éthylène glycol
100 ml de méthanol absolu
Dioxane q.s.p. 1 litre



3 - ETABLISSEMENT DES PROFILS DE MIGRATION DES NUCLEOTIDES RADIOACTIFS SEPARES PAR ELECTROPHORESE.

Après séchage de la feuille, celle-ci est découpée en 40 bandes de papier (1 x 8 cm) numérotées de 0 à 40 du trait de départ de la migration (côté cathode) vers l'anode. Chaque bande est ensuite découpée en 10 fragments égaux qui sont introduits dans les flacons de comptage contenant le liquide scintillant décrit précédemment.

Les travaux d'YCAS et VINCENT (186) ont établi que le marquage des ARN par le radiophosphore s'effectuait uniformément et au hasard. Ce principe permet de connaître la composition en bases des ARN par la détermination de la radioactivité des nucléotides monophosphates.

VI - SEPARATION ET ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE ALCALINE DU COMPLEXE ADN-ARN

Le complexe recueilli sur filtre est soumis à l'action de la potasse pendant 16 h à 37°C. L'hydrolyse est arrêtée en refroidissant

la solution à 0°C, le filtre est retiré et essoré. Après avoir précipité l'ADN par acidification à froid (acide perchlorique de concentration finale 0,2 N) l'extrait est amené à pH 6,5 par addition de potasse. Le précipité de perchlorate de potassium (solubilité à 0°C = 7,5 mg/ml) est éliminé par centrifugation et le surnageant contenant les ribonucléotides est concentré par lyophilisation.

L'analyse des nucléotides est réalisée par électrophorèse en cuve "en toit", sur papier Arches 304. Suivant que l'on désire séparer les quatre ribonucléoside-2' (ou 3') phosphates pour déterminer la composition en bases de l'ARN ou que l'on veuille mettre en évidence le nucléoside tétraphosphate les tampons d'électrophorèse seront respectivement à pH 3,5 ou à pH 5,7.

A - ANALYSE DES NUCLEOTIDES

1 - PRINCIPE DE LA METHODE

L'hydrolyse alcaline libère principalement des nucléosides (2') ou 3'-monophosphates (MARKHAM et SMITH)(187); BROWN et TODD (188). Les groupements ionisables de ces molécules sont les fonctions acides primaire et secondaire des groupements phosphates, les fonctions amines (C, A et G) et les fonctions énoliques (C, G et U) des différentes bases (Fig. 12, p. 51). Le tableau III (p.52) résume les valeurs des pK de ces groupements. Il permet de comprendre le choix du pH 3,5 qui a été fait pour obtenir une bonne séparation des quatre ribonucléotides.

- Les fonctions énoliques dont les valeurs de pK sont supérieures à 9,5 et les fonctions phosphates secondaires dont les valeurs de pK avoisinent 6 ne sont pas ionisées à pH 3,5, et n'entraînent donc pas une différence de charge entre les différents nucléotides.

- Les valeurs de pK des fonctions phosphates primaires s'étalent entre 0,7 et 1,0 la dissociation est complète à pH 3,5.

Les valeurs de pK des groupements amines varient notablement entre 2 et 5, la séparation des acides cytidylique, adénylique, guanylique et uridylique est donc réalisable en se fondant sur les différents degrés d'ionisation des fonctions amines (respectivement + 0,84, + 0,54 et + 0,05 pour CMP, AMP et GMP). Comme chaque nucléotide transporte une charge négative (égale à 1'unité) due à la fonction phosphate

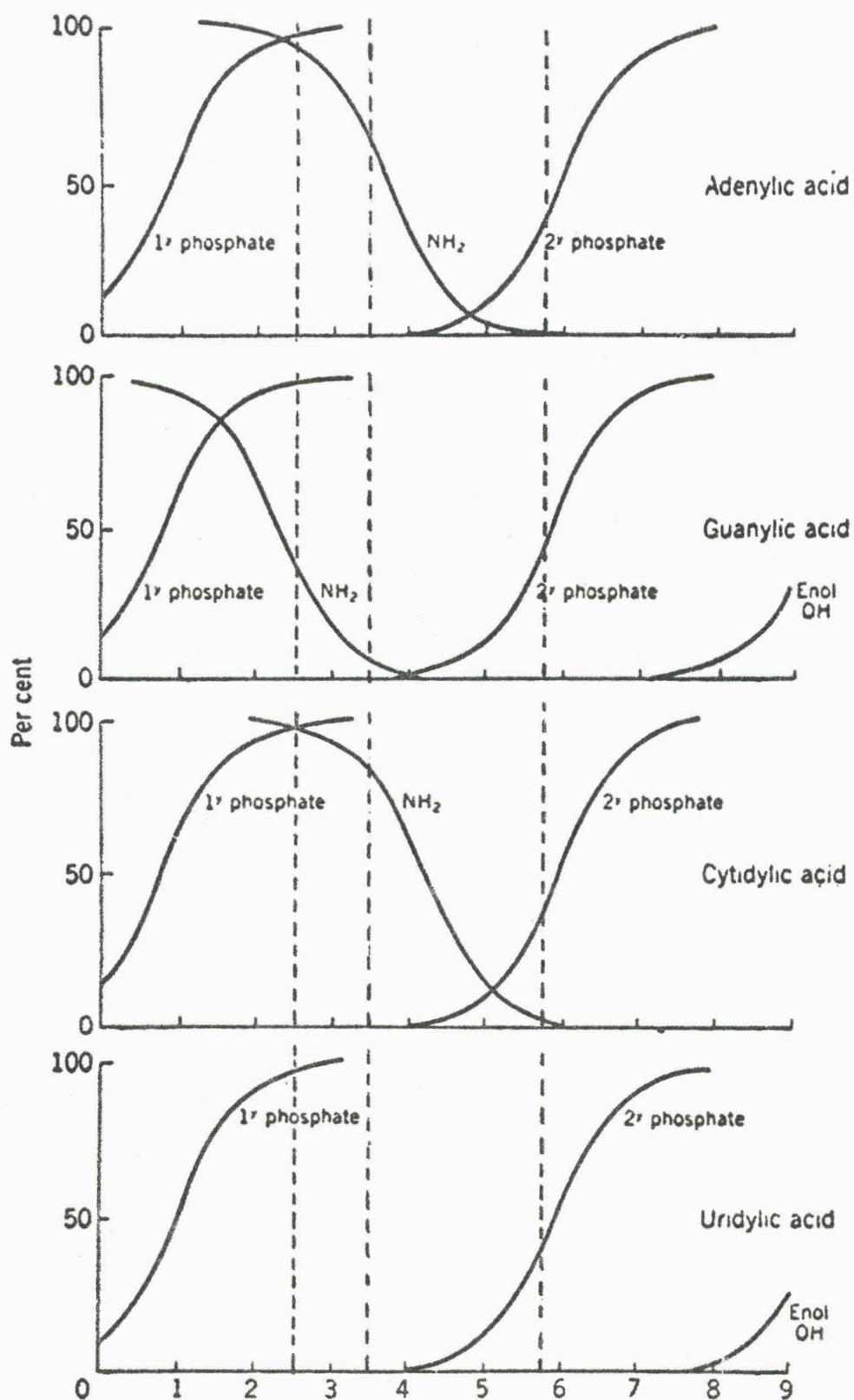


Figure n° 12 : Courbes de dissociation des fonctions ionisables des acides adénylique, guanylique, cytidilique et uridylique selon LEVENE et SIMMS (189).

Tableau III

Valeurs des pK des différentes fonctions portées par les nucléosides monophosphates.
Charge globale de ces nucléosides monophosphates à pH 3,5 et à pH 5,7.

	Première fonction acide	Seconde fonction acide	Fonction amine	Fonction énole	charge globale à pH 3,5	à pH 5,7
CMP	0,80	5,97	4,24	13,20	- 0,16	- 1,32
AMP	0,89	6,01	3,70		- 0,46	- 1,32
GMP	0,70	5,92	2,30	9,70	- 0,95	- 1,34
UMP	1,02	5,88		9,43	- 1,00	- 1,38

primaire, la charge globale est de :

- 0,16 pour CMP
- 0,46 pour AMP
- 0,95 pour GMP
- 1,0 pour UMP à pH 3,5

Les quatre ribonucléotides ont approximativement la même taille et, de ce fait, la même résistance au flux hydrodynamique. Leurs mobilités relatives sont donc directement proportionnelles à leurs charges globales.

2 - MATERIEL

L'électrophorèse est réalisée dans des cuves "en toit" sur du papier Arches 304 (format 54 x 56 cm). Le tampon de pH 3,5 est de composition suivante :

- Acide citrique 0,015 M
- Citrate trisodique 0,05 M (DAVIDSON et SMELLIE) (190).

La migration électrophorétique est conduite pendant 10 h 30 sous une tension de 800 V (champ électrique : 16 V/cm). Dans ces conditions, l'ordre croissant des vitesses de migration anodique est CMP, AMP, GMP, UMP conformément à ce que le calcul de la charge globale permettrait de prévoir (voir Tableau III, p. 52).

B - MISE EN EVIDENCE D'UN RESIDU DE NUCLEOSIDE TETRAPHOSPHATE

La mise en évidence d'un nucléoside-5'-triphosphate, 3' monophosphate (pppNp) posait plusieurs problèmes:

- L'absence de témoin, mis à part l'adénosine-5'-tétraphosphate ppppA ne nous permettait pas d'envisager une étude systématique des meilleures conditions de séparation.

La vitesse de migration des nucléotides dans les conditions habituelles (pH entre 2 et 4) étant sous la principale dépendance du degré de dissociation des fonctions amines des bases, on observait un chevauchement des zones de migration des nucléosides mono, di ou triphosphates (voir fig. 13 p.54). Il était donc prévisible qu'un nucléoside tétraphosphate migrerait avec les nucléosides diphosphates et triphosphates et serait alors difficilement identifiable.

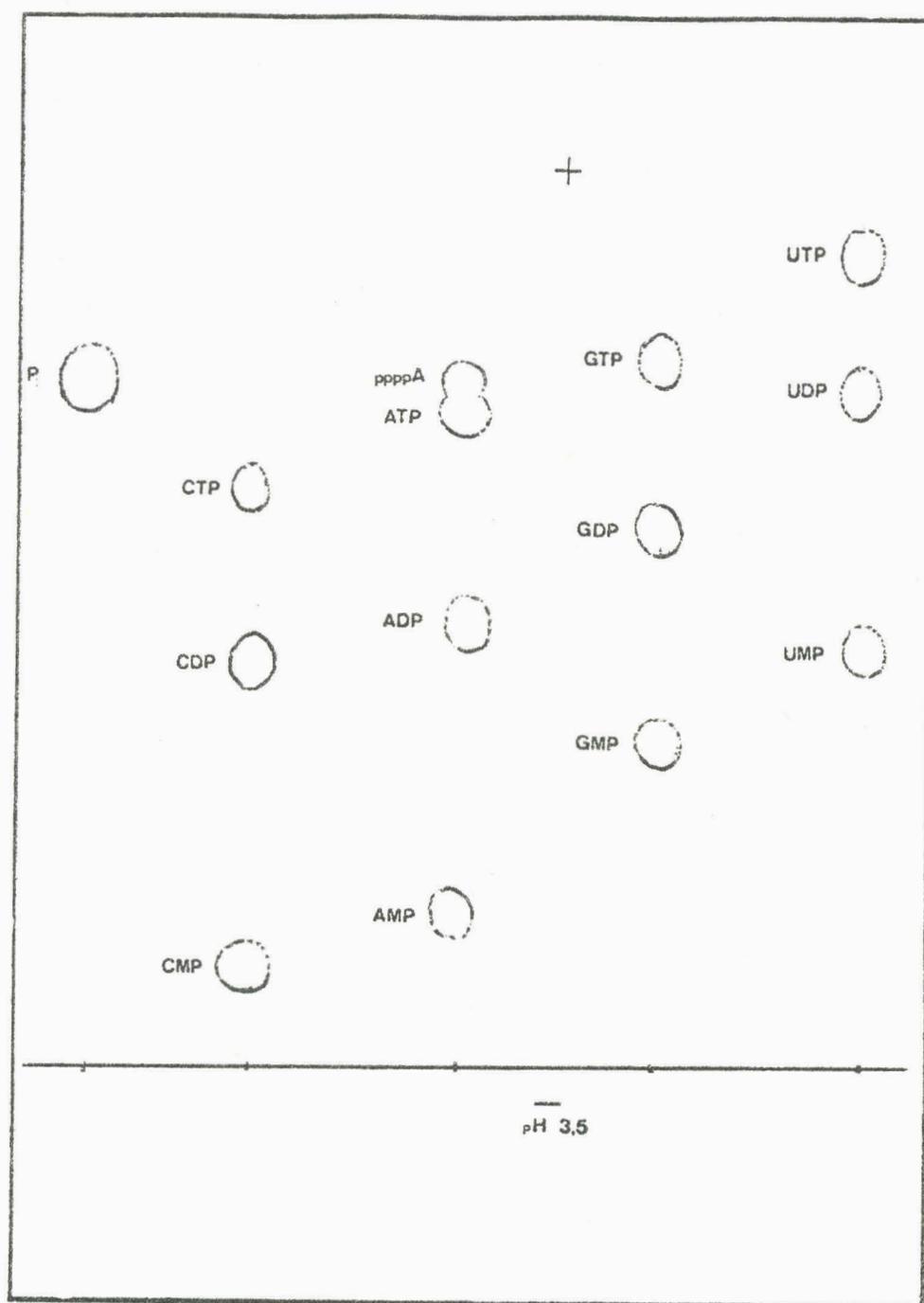


Figure n° 13 : Electrophorèse à pH 3,5 (tampon citrate de sodium/ acide citrique) des nucléosides mono, di- et triphosphates sur papier Arches 304. L'électrophorèse est conduite pendant 4 heures sous une tension de 700 V.

- Le marquage métabolique par le radiophosphore et les traitements chimiques (notamment la précipitation par l'acide perchlorique) pouvaient entraîner la présence d'ion phosphate libre et de ribose phosphate dont il fallait préciser la position par rapport au nucléoside tétraphosphate.

Ce sont ces raisons qui nous ont amené à étudier, en se fondant sur l'estimation des charges électriques portées par les nucléotides, de nouvelles conditions de migration électrophorétique permettant d'isoler et de caractériser, dans la mesure du possible, un nucléoside tétraphosphate.

1 - PRINCIPE DE LA METHODE : CHOIX DU pH

Pour mettre en évidence un nucléoside tétraphosphate, il fallait mettre à profit sa propriété particulière de posséder quatre groupements phosphates ionisables. Nous nous sommes attaché à trouver des conditions de pH permettant une migration dépendant quasi totalement de ce nombre de groupements. Le choix du pH devait répondre aux critères suivants :

- ne pas être trop acide car les nucléotides sont peu stables dans ces conditions ;
- ne pas permettre une différenciation des bases par l'ionisation de la fonction amine (pH entre 2 et 4) ou celle des fonctions énoliques (pH supérieur à 9);
- être tel que tous les ions phosphates soient totalement dissociés.

Les pK des fonctions phosphates primaire et secondaire avoisinant respectivement les valeurs de 1 et 6, il fallait donc choisir un pH voisin de la neutralité. Le tableau III (p.52) nous permet de vérifier qu'en cette zone de pH la charge globale est sensiblement égale à -1,4 pour chaque nucléotide monophosphate. Ils migreront donc ensemble.

Les divers nucléosides mono-, di-, tri-, et tétraphosphates ne diffèrent que par leur nombre de fonctions phosphates (totalement ionisées à pH neutre) il nous était donc permis de penser qu'ils migreraient par "groupes". L'ordre de migration vers l'anode

serait régi par le nombre total de charges électriques, c'est-à-dire les mono-, les di-, les tri- puis les tétraphosphates.

2 - MATERIEL

a - Choix du tampon

Le pouvoir tampon (κ) du mélange citrate de sodium/acide citrique étant encore satisfaisant à pH 5,7, nous avons adopté cette valeur de pH donnée par le mélange de composition suivante :

Citrate trisodique M	15 ml
Acide citrique M	5 ml
Eau distillée q.s.p.	1 litre

b - Choix de la différence de potentiel

Pour réduire le temps de migration il était intéressant de choisir une tension suffisamment élevée.

1°) Electrophorèse en cuve "en toit". Bien qu'une bonne séparation nécessite alors une durée de 10 h 30, la tension est limitée à 400 V car au dessus de cette valeur, l'intensité, donc l'effet joule, devient trop grande et provoque un important courant de rhéophorèse qui modifie notablement les vitesses de migrations.

2°) Electrophorèse à haut voltage. Pour réduire le temps, des essais ont été faits à haut voltage avec l'appareil "TECHNIK" possédant un circuit de refroidissement. La séparation est obtenue après 55 mn sous une différence de potentiel de 6000 V (champ électrique : 120 V/cm) avec le même mélange tampon.

Les résultats d'une électrophorèse effectuée dans ces conditions sont présentés par la figure 14 (p.57). La séparation se produit par "groupes" avec toutefois un déplacement un peu plus rapide des nucléotides pyrimidiques et notamment des acides uridyliques. Puisqu'à pH 3,5 (voir fig.13; p.54) les nucléotides pyrimidiques migrent aussi plus rapidement que ne le laisse prévoir la valeur de leurs charges, il est possible d'attribuer cette modification de la vitesse à une adsorption plus forte des nucléotides puriques sur le papier.

$$\kappa = \frac{de}{dpH} \quad (\text{VAN SLYKE}) \quad (191) \quad e = \text{nombre d'équivalent } H^+ \text{ (ou } OH^-) \text{ ajouté à l'électrolyte.}$$

C - MISE EN EVIDENCE DE PRODUITS PHOSPHORYLES NON NUCLEOTIDIQUES
POUVANT SOILLER LES ELECTROPHOREGRAMMES.

1 - ION PHOSPHATE

La présence d'ion phosphate libre accompagnant les hydrolysats d'acides nucléiques pourrait être une source d'erreur lors du marquage par le radiophosphore. L'électrophorèse des ions phosphates fut donc pratiquée systématiquement à pH 3,5 et à pH 5,7 à partir de solution contenant des ions de différentes origines :

- ions phosphates provenant d'acide orthophosphorique dilué, de solutions de NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 et Na_3PO_4 ;
- ions phosphates provenant de solutions vieilles de triphosphates partiellement dégradés en nucléosides diphosphates et monophosphates ;
- ions phosphates marqués au radiophosphore.

a - Révélation des ions phosphates

Les ions marqués par le radiophosphore sont révélés par les méthodes précédemment décrites (voir p. 49). Les ions phosphates sont mis en évidence par la formation d'un composé phospho-molybdique.

Après électrophorèse, les feuilles sont séchées à l'air libre et les ions phosphates sont révélés par pulvérisation du réactif de HANES et ISHERWOOD (192) :

- | | |
|--|---------|
| - Molybdate d'ammonium à 8 p.100 (p:v) | 125 ml |
| - Acide perchlorique pur | 50 ml |
| - Acide chlorhydrique 1 N | 100 ml |
| - Eau distillée q.s.p. | 1000 ml |

La pulvérisation se fait à raison de 1 à 5 ml de réactif pour 100 cm² de papier.

L'emplacement des ions phosphates est marqué par l'apparition (après 1 à 2 minutes) de taches jaunes de phosphomolybdate d'ammonium. Après exposition des électrophorégrammes à la lumière ultra-violette, les nucléotides apparaissent sous la forme de taches bleues sur un fond blanc (MONTREUIL) (193).

b - Résultats

- A pH 3,5, la vitesse de migration des ions phosphates est identique à celle de l'adénosine tétraphosphate.

- -- A pH 5,7, au contraire, les ions phosphates libres migrent plus lentement que l'adénosine tétraphosphate et se retrouvent un peu en arrière de l'ATP (voir fig.14; p.57).

Ces résultats apportent une raison supplémentaire pour justifier l'emploi du tampon de pH 5,7 qui permet de distinguer sans ambiguïté les ions phosphates libres de l'adénosine tétraphosphate (ppppA).

2 - RIBOSE-PHOSPHATE

Au cours des diverses opérations de purification des acides nucléiques et d'hydrolyse de ces derniers, pouvait se produire une dégradation des nucléotides en ribose-phosphate. Il fallait donc nous assurer que le pic radioactif occupant la position présumée du nucléotide tétraphosphate n'était pas un ribose phosphate. C'est pourquoi nous avons préparé du ribose-5-phosphate afin d'étudier son comportement électrophorétique.

a - Préparation du ribose-5-phosphate

L'hydrolyse des nucléotides puriques par l'acide chlorhydrique 1N à 100°C libère les bases et le ribose phosphate. L'adénosine 5'-monophosphate, l'adénosine 5'-diphosphate, l'adénosine 5'-triphosphate et l'adénosine 5'-tétraphosphate sont hydrolysés dans ces conditions en tubes scellés et les produits d'hydrolyse sont soumis à l'électrophorèse en tampon de pH 5,7.

b - Révélation du ribose-5-phosphate

Le ribose-5-phosphate a été mis en évidence en tirant parti des fonctions α -glycols révélées par la méthode au periodate/benzidine (MONTGOMERY et WU) (194).

L'électrophorégramme est trempé 2 à 3 fois dans la solution suivante fraîchement préparée :

Periodate de sodium 0,1 M	100 cm ³
Acétone	900 cm ³

Après séchage à l'air libre, la feuille de papier est trempée dans une seconde solution préparée juste avant l'emploi :

Benzidine à 15 p.100 dans l'acétone contenant 0,001M d'acide acétique par litre.

L'emplacement des molécules portant les fonctions α -glycols se révèle par l'apparition de tâches blanches sur un fond bleu.

c - Résultats

A pH 5,7 deux tâches principales ont été mises en évidence (voir fig. 15 ; p. 61).

- La première, de comportement "neutre", correspond au ribose ;

- La seconde, de comportement "anodique", située entre les nucléosides monophosphates (charge : - 1,4) et diphosphates (charge : - 2,4), correspond au ribose-5-phosphate (qui possède deux charges négatives).

En conclusion en supposant que le ribose 2- ou 3-phosphate possède le comportement électrophorétique du ribose 5-phosphate, l'électrophorèse se révèle satisfaisante pour séparer le nucléoside tétraphosphate de l'acide ³²P-orthophosphorique et du ribose-monophosphate éventuellement formés par dégradation des nucléotides ou des chaînes polyribonucléotidiques.

D - ANALYSE DES COMPOSES MIGRANT DANS LA ZONE DES NUCLEOSIDES TRI- OU TETRAPHOSPHATES.

L'addition d'une base ou d'un nucléoside tritié dans le milieu de culture des cellules permet d'obtenir un marquage de ces mêmes bases dans les ARN. Cependant ce marquage n'est pas totalement sélectif. L'incorporation d'adénine tritiée, en particulier, produit un marquage simultané de l'adénine et de la guanine des ARN (cf. résultats; p. 80).

Il était donc nécessaire de pouvoir analyser les nucléosides polyphosphates après qu'ils aient été séparés des nucléosides monophosphates au cours de la première électrophorèse à pH 5,7.

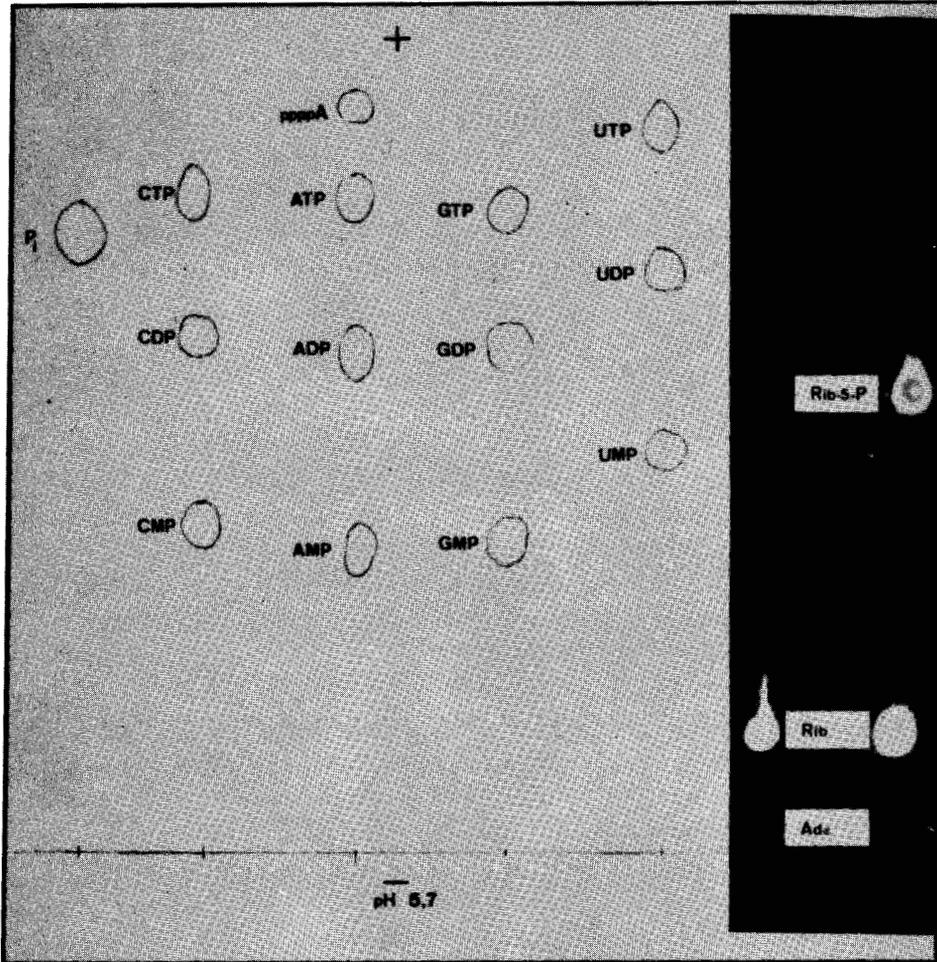


Figure n° 15 : Electrophorèse à pH 5,7 (tampon citrate de sodium/acide citrique) sur papier Arches 304, des nucléotides et du ribose phosphate.

L'électrophorèse est conduite pendant 10 h 30 sous une tension de 300 V.

1 - EXTRACTION DES PRODUITS

Après avoir mesuré la radioactivité de chaque bande découpée de l'électrophorégramme et repéré la position des produits, les papiers contenant les nucléosides tri- ou tétraphosphates (ppXp ou pppXp) sont retirés des flacons de comptage. Ils sont ensuite rincés deux à trois fois avec du toluène pour éliminer les traces de PPO et de POPOP, puis séchés.

Les produits sont ensuite élués des papiers par agitation dans une solution d'ammoniaque 0,01N selon la méthode préconisée par WATANABE et AUGUST (195). Après 12 heures, les papiers sont séparés par centrifugation et l'éluat est concentré à sec par lyophilisation.

En outre, les contrôles suivants doivent être systématiquement effectués :

- Vérifier que les produits ne sont pas dissous dans le liquide scintillant en s'assurant que la radioactivité du pilulier est nulle après en avoir retiré les papiers.

- Contrôler que le toluène de rinçage ne retient pas de produits radioactifs.

- S'assurer que tous les produits sont bien élués des papiers. Pour cela, après séparation de l'éluat, les papiers sont séchés et leur radioactivité mesurée. Dans tous les cas, il s'est avéré que la radioactivité résiduelle était nulle.

2 - PRINCIPE DE L'ANALYSE

Les composés tri- ou tétraphosphates élués sont un mélange de nucléotides guanyliques et adényliques (cf. résultats, p. 84). La radioactivité de ces composés étant liée aux bases, l'analyse de la composition en guanine et adénine du mélange permet de connaître les proportions de chacun des nucléotides correspondants.

3 - HYDROLYSE ACIDE

A l'extrait sec précédemment obtenu, sont ajoutés des témoins "froids" ATP et GTP et l'hydrolyse est menée dans 100 μ l d'acide chlorhydrique 1N, à 100°C pendant une heure. Cette réaction libère quantitativement les bases puriques (KIRBY)(196).

4 - SEPARATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE

Une séparation satisfaisante des bases peut être obtenue par électrophorèse sur papier si le tampon est suffisamment acide pour obtenir une ionisation différente des bases (voir fig 12 ; p. 51).

A pH 2,5, cette condition est réalisée et les charges portées par chaque base sont respectivement :

Cytosine	+ 0,96
Adénine	+ 0,92
Guanine	+ 0,35
Uracile	0

L'électrophorèse est réalisée sur papier Arches 304 dans le tampon de composition suivante : 30 ml d'acide formique + 2000 ml d'eau, le mélange étant ensuite ajusté à pH 2,5 par addition d'une solution d'ammoniaque 1 N.

La migration électrophorétique est réalisée pendant 12 H sous une tension de 220 V. Un électrophorégramme effectué dans ces conditions est représenté dans la figure 16 (p. 64).

Il convient de noter que ce type de séparation s'adapte fort bien à l'analyse des bases puriques et nucléotides pyrimidiques obtenus par l'hydrolyse acide des nucléotides, puisque l'adénine, la guanine, l'acide cytidylique et l'acide uridylique sont nettement séparés.

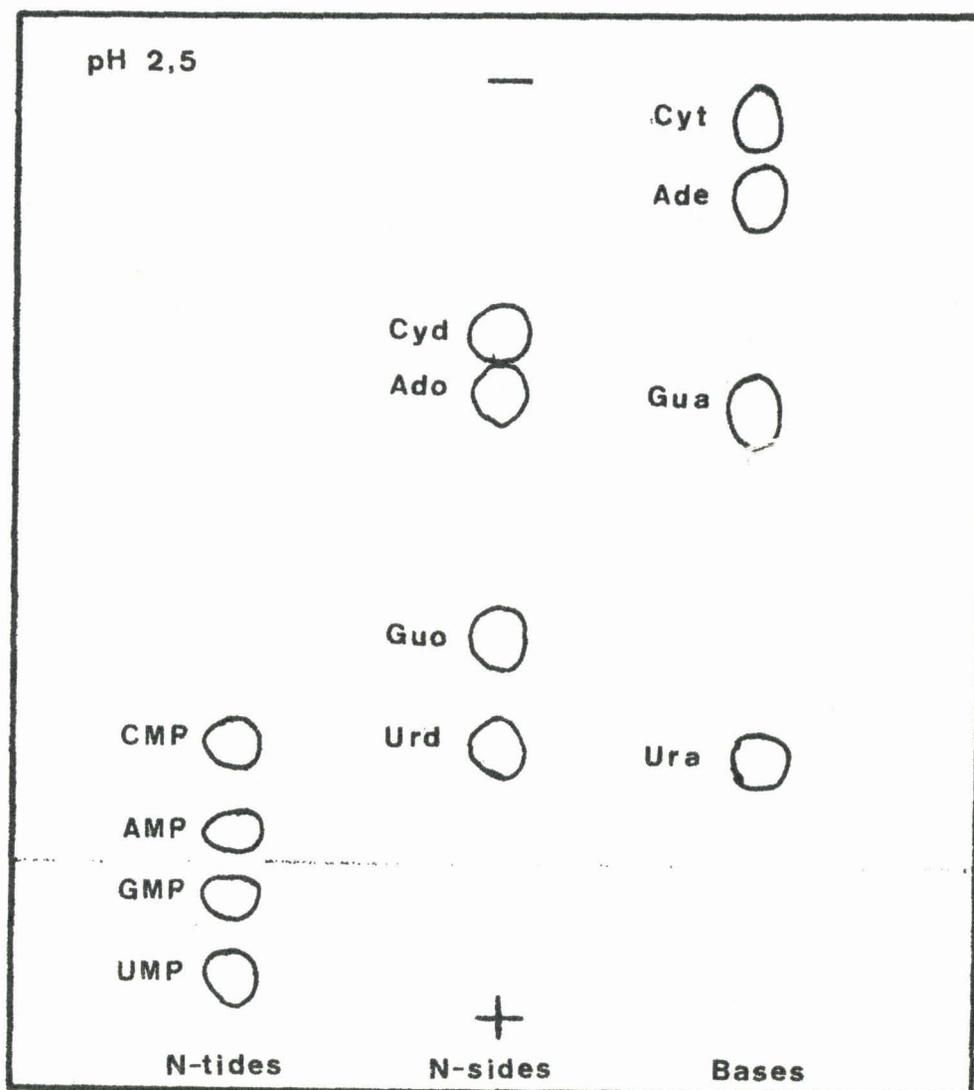


Figure n° 16 : Electrophorèse à pH 2,5 (tampon formiate d'ammonium) sur papier Arches 304 des nucléosides monophosphates, nucléosides et bases.

L'électrophorèse est conduite pendant 12 H sous une tension de 220 V. Acide cytidylique (CMP), acide uridylique (UMP) guanine (Gua) et adénine (Ade) sont nettement séparés.

RESULTATS

L'isolement d'hybrides ADN-ARN naissant à partir des cellules de Mammifères nous a offert le moyen de mettre en évidence le nucléotide 5'terminal des chaînes d'ARN en cours de synthèse et d'en déduire le sens de la transcription in vivo chez les Eucaryotes.

Dans le cas des cellules Hela, ce complexe avait été obtenu par KRSMANOVIC et al. (197) et nous avons repris la même méthode pour l'extraire des cellules KB.

Dans le cas du foie de Rat, les travaux entrepris dans notre laboratoire par KRSMANOVIC et SERGEANT (198) nous ont permis d'isoler un hybride ADN-ARN naissant **répondant** aux trois critères proposés par KRSMANOVIC :

1 - Isolement de fractions ne contenant que l'ADN et l'ARN associé à celui-ci et démonstration de l'absence d'ARN libre dans des préparations hautement purifiées.

2 - Sensibilité partielle à la RNase et sensibilité totale aux alcalis.

3 - Détachement de l'ARN du complexe par dénaturation thermique ou par la formamide.

I - IDENTIFICATION DES COMPLEXES ADN-ARN DANS LES NOYAUX DES HEPATOCYTES DE RAT ET ETUDE DE LEUR STABILITE (*)

A - EXTRACTION DES COMPLEXES

Les acides nucléiques des noyaux de foie de Rat marqués par le radiophosphore 32 (2mCi/rat) sont extraits par le mélange SDS-chloroforme-alcool isoamylique (cf. Matériel et Méthodes, p.42)?

B - PURETE DU COMPLEXE

L'examen de ceux-ci par centrifugation en gradient de sulfate de césium (Cs_2SO_4) (densité moyenne : 1,535) permet de distinguer deux populations d'ARN marqué : l'une, hétérogène s'équilibrant autour

* Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec A. SERGEANT.

du milieu du gradient (densité : 1,60) dans une région intermédiaire entre celle de l'ARN ribosomal (densité : 1,67) et celle de l'ADN (densité : 1,475) ; l'autre, restant associée au pic de l'ADN (Fig. 17 ; p. 67).

Ces observations ont été confirmées par l'analyse directe des acides nucléiques dans un gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100. Dans ce cas aucun pic de radioactivité n'apparaît dans les zones du gradient correspondant aux ARN ribosomaux "28S" et "18S" (Fig. 18 ; p. 68).

C - ACTION DE LA POTASSE ET DE LA RNase

La radioactivité de la zone hétérogène est totalement sensible à l'action de la potasse et de la RNase.

Après action des alcalis, il apparaît que 50 à 60 p.100 de la radioactivité associée au pic d'ADN est due au marquage de celui-ci, le reste représentant l'ARN. Cette fraction d'ARN résiste à l'action de la RNase à raison de 15 à 20 p.100 (Fig. 19 ; p. 69).

D - ACTION DE LA CHALEUR ET DE LA FORMAMIDE ET LONGUEUR DES CHAINES D'ARN

L'ARN lié à l'ADN peut être dissocié par l'action de la chaleur ou de la formamide dans les conditions préconisées par HAYASHI et HAYASHI (199). Il est alors possible de calculer la constante de sédimentation des chaînes d'ARN libérées par centrifugation sur un gradient linéaire de saccharose.

Chaînes totales \longrightarrow : 4 à 9 S - 80 à 400 nucléotides.

Portion des chaînes liées à l'ADN: 3 S - 40 nucléotides environ.

Ces résultats plaident en faveur d'une stabilisation du complexe, réalisée principalement par les liaisons "pont hydrogène" existant au niveau des séquences résistantes à la RNase (SERGEANT et al.) (200).

E - CONCLUSIONS

L'analyse par gradient de Cs_2SO_4 des acides nucléiques des hépatocytes de rat permet d'identifier une population d'ARN

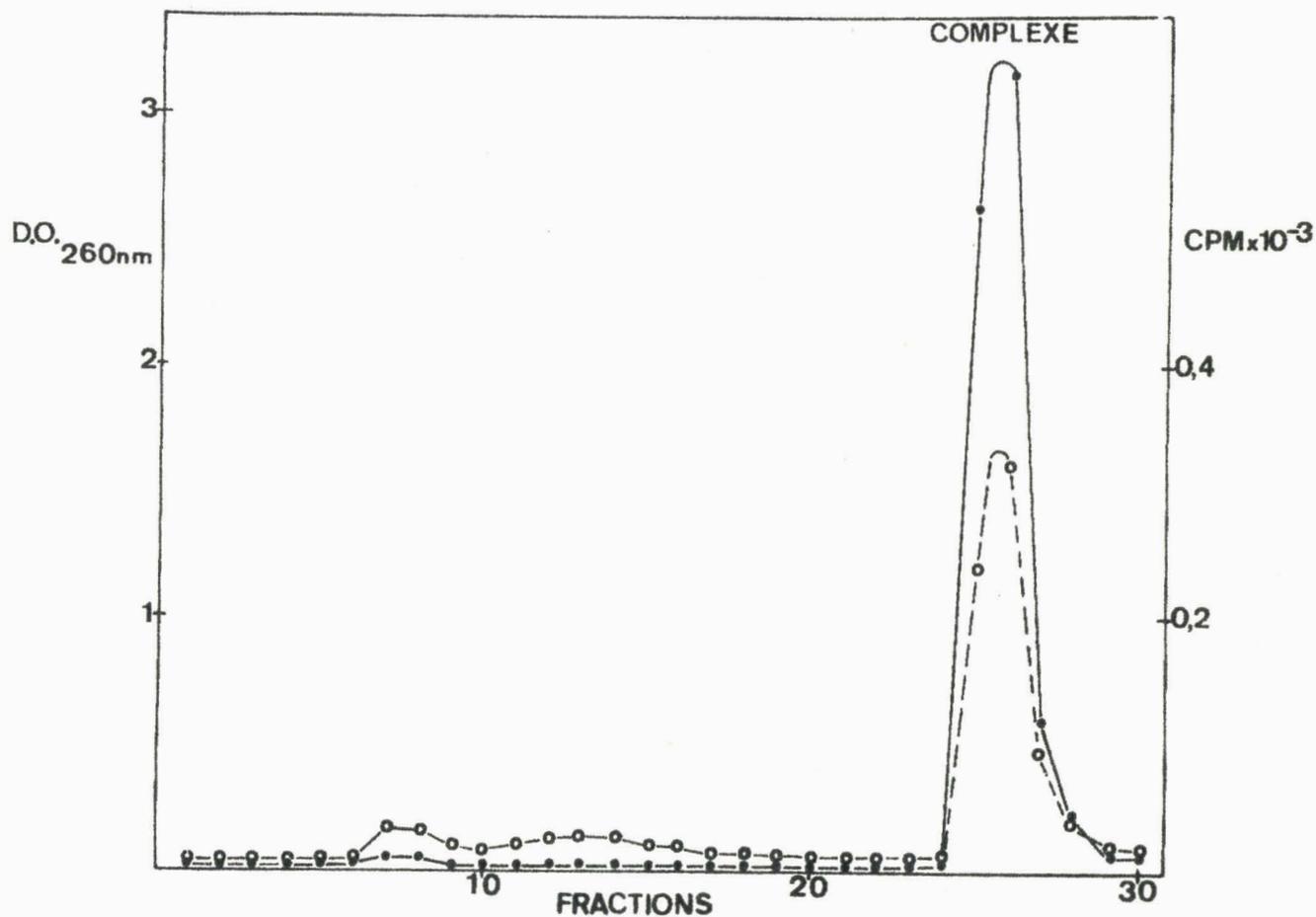


Figure n° 17 : Centrifugation en gradient de Cs_2SO_4

Acides nucléiques de noyaux de foie de Rat marqués au ^{32}P (2 mC/Rat) pendant 14 h et centrifugés pendant 72 h à 33.000 t/mn (rotor Spinco SW 25) dans une solution de Cs_2SO_4 dont la densité moyenne est de 1,535.

39

D.O. 260 nm ● — ● — ● — ●
Radioactivité ○ - - ○ - - ○ - - ○



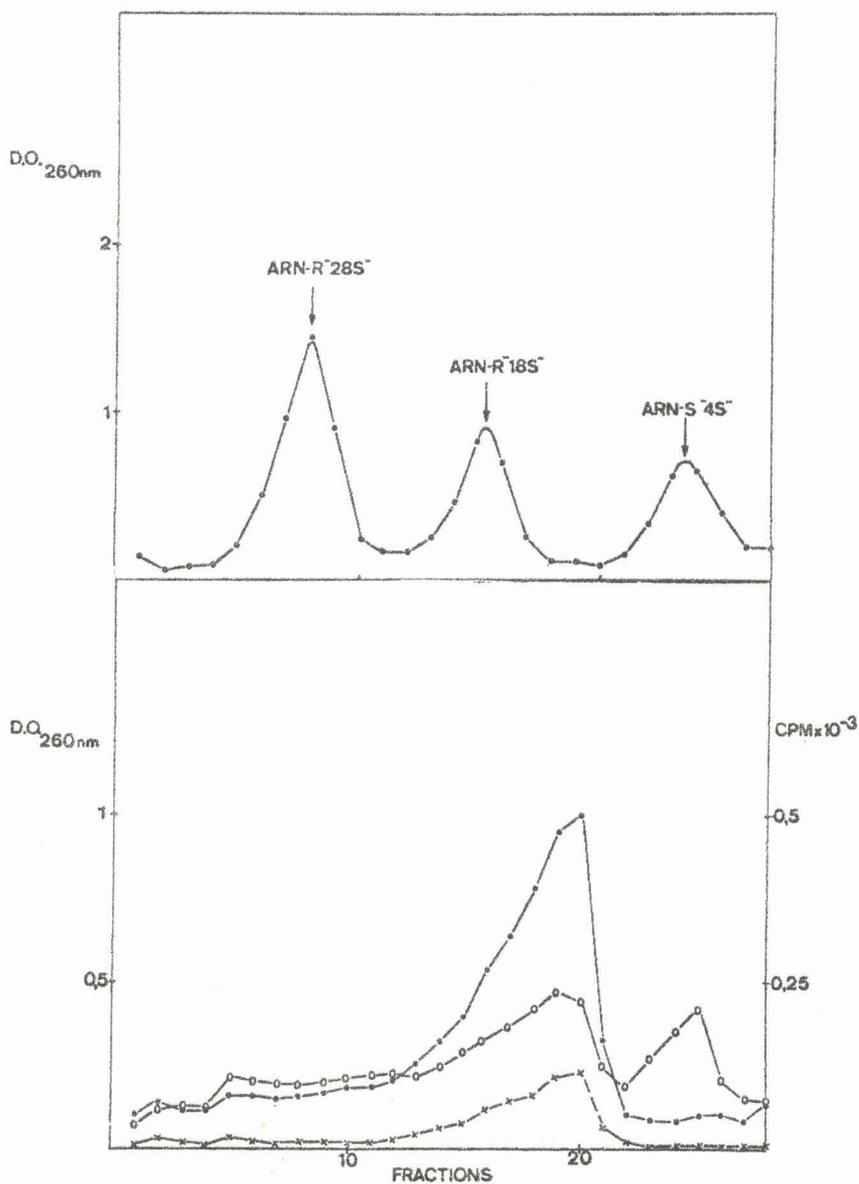


Figure n° 18 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100.

Graphique supérieur : Acides nucléiques cytoplasmiques non marqués.

●—●—● D.O. 260 nm

Graphique inférieur : Mêmes acides nucléiques que la figure 17 p. 67

La centrifugation est effectuée dans un rotor Spinco SW 25 à 22.000 t/mn pendant 16 h à + 4°C.

●—●—● D.O. 260 nm

○—○—○ Radioactivité

x—x—x Radioactivité résiduelle après action de la potasse due au marquage de l'ADN.



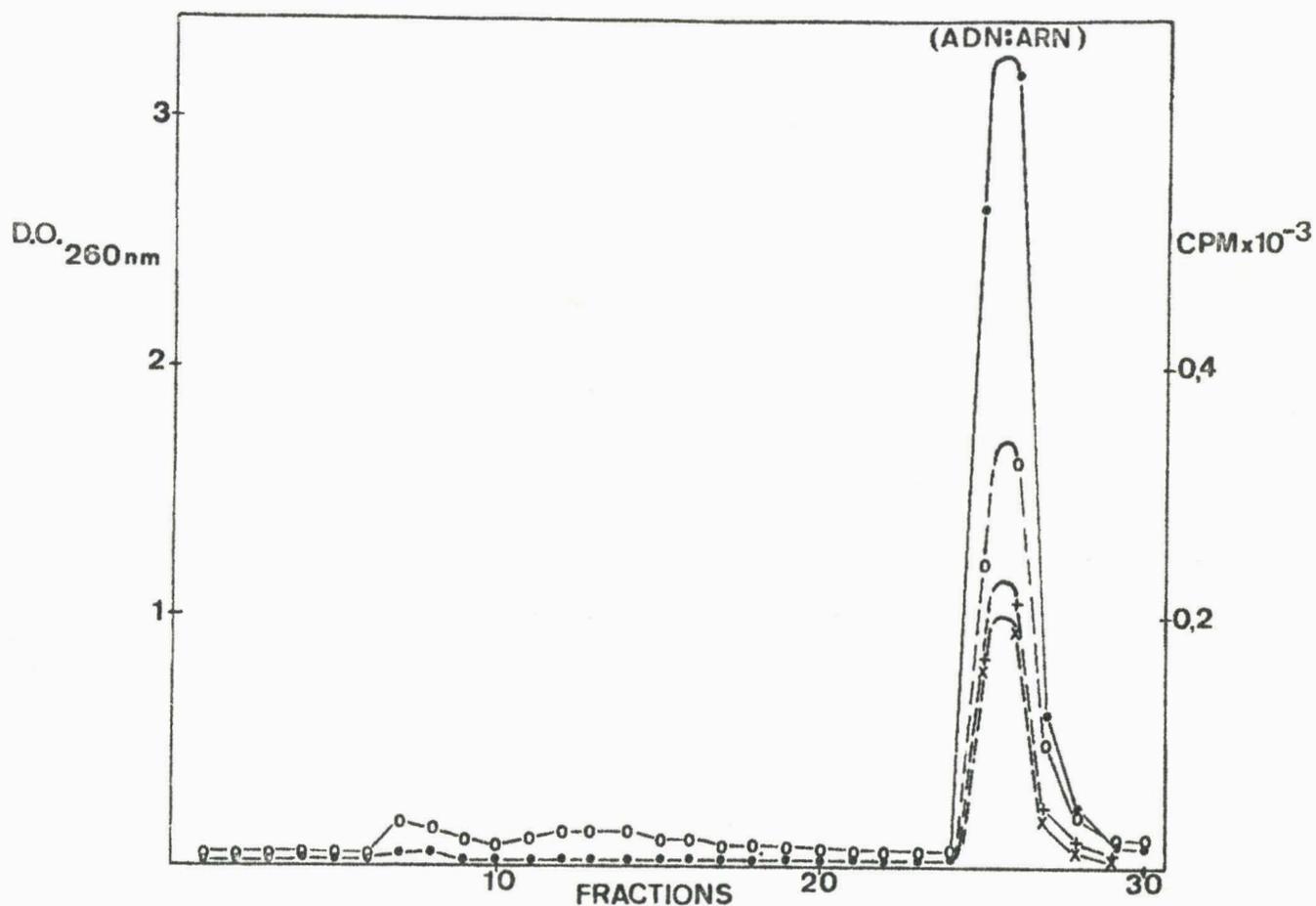


Figure n° 19 : Mêmes acides nucléiques et mêmes conditions de centrifugation que dans la figure 17 (p. 67).

- D.O. 260 nm
- Radioactivité totale
- ×---×---× Radioactivité résiduelle après hydrolyse par la potasse, due au marquage de l'ADN.
- +---+---+ Radioactivité résistante à la RNase, (ARN lié à l'ADN par ponts "hydrogène").

associé à l'ADN, partiellement sensible à la RNase, détachable par dénaturation thermique ou à la formamide. Ces résultats nous permettent de conclure que nous avons isolé un complexe ADN-ARN.

II - ETUDE CHIMIQUE DU COMPLEXE EXTRAIT DES HEPATOCYTES DE RAT.

A - COMPOSITION EN BASES

L'hydrolysat alcalin de l'ARN associé à l'ADN est analysé par électrophorèse en tampon citrate de sodium/acide citrique de pH 3,5 et la composition en bases est déterminée par la radioactivité des nucléotides monophosphates marqués par le radiophosphore 32 (YCAS et VINCENT) (201); Fig. 20, p. 71 .

L'ARN naissant possède une composition en bases du type GC (voir tableau. IV, p. 72). Le rapport $\frac{G + C}{A + U} = 1,28$ correspond à la valeur obtenue pour des ARN nucléaires totaux (ELSON et al.) (202).

B - ETUDE DE L'EXTREMITÉ 5'-TRIPHOSPHATE TERMINALE

In vitro, la synthèse des ARN se fait par addition des nucléosides triphosphates sur l'extrémité 3'-hydroxyle du polyribonucléotide naissant (BREMER et KONRAD) (203). Il était donc intéressant de vérifier si les ARN en cours de synthèse des hépatocytes de Rat présentaient les mêmes propriétés et possédaient notamment un nucléoside-5'-triphosphate terminal (voir fig. 21, p. 73).

La constante de sédimentation montre que les chaînes d'ARN liées à l'ADN contiennent 80 à 400 nucléotides. La proportion de nucléoside tétraphosphate libéré par hydrolyse alcaline serait donc très faible. Les caractères de pureté du complexe exposés précédemment nous montrent que la contamination par les ARN cytoplasmiques n'est pas très importante ^{et} que, en outre, ces ARN possèdent un nucléoside monophosphate en position 5'-terminale (MADISON) (204). Cette observation nous a permis d'éviter la purification du complexe ADN-ARN par une centrifugation en gradient de sulfate de césium et de raccourcir de 4 jours la durée de l'expérience afin d'éviter une dégradation importante du matériel.

Dans l'hydrolysat alcalin, nous avons caractérisé, outre

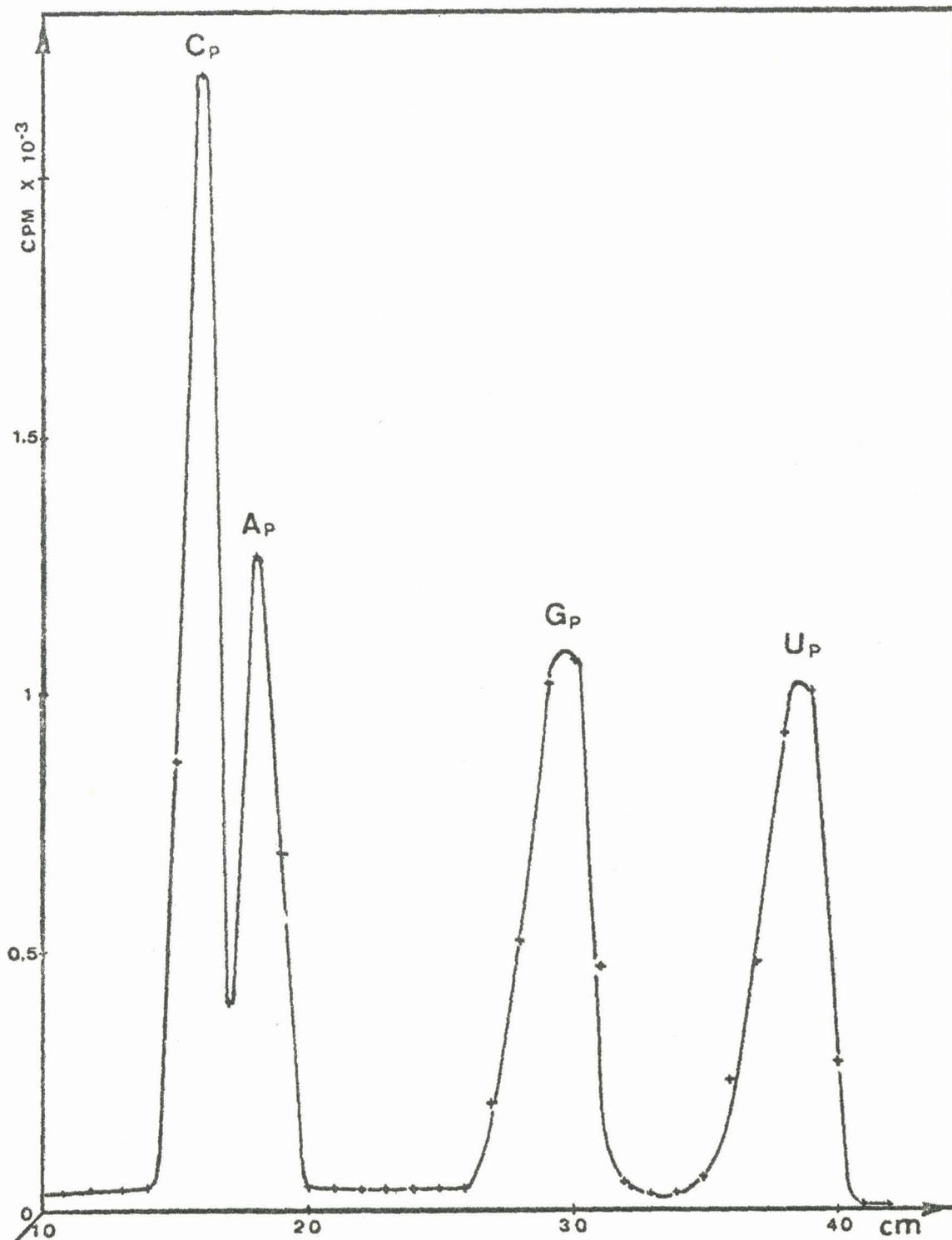


Figure n° : Profil de migration des nucléosides monophosphates libérés par l'hydrolyse alcaline du complexe ADN/ARN naissant du foie de Rat.

(Analyse faite par électrophorèse à pH 3,5 sur papier Arches 304).

TABLEAU IV : Composition en bases de l'ARN naissant
associé à l'ADN dans le foie de Rat.

Base	Radioactivité liée au nucléotide phosphate	Composition centé- simale (en p.100).
Cytosine	3 250 c.p.m.	28
Adénine	2 140 c.p.m.	18,6
Guanine	3 250 c.p.m.	18
Uracile	2 890 c.p.m.	25,4
$\frac{G + C}{A + U}$		1,27

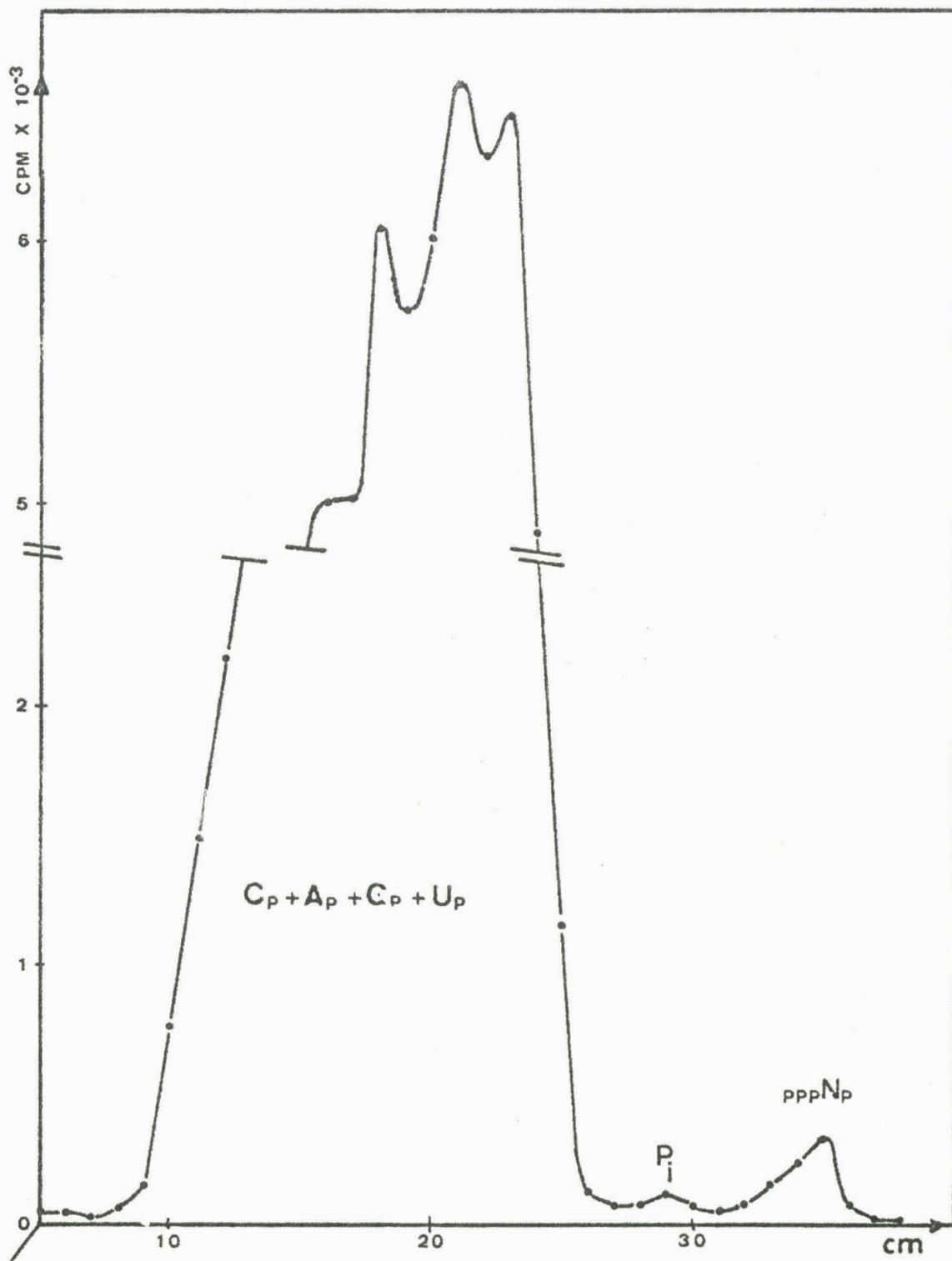


Figure n° 21 : Mise en évidence d'un composé de type pppN_p dans l'hydrolysât alcalin de l'ARN associé à l'ADN.

Analyse faite par électrophorèse à pH 5,7 sur papier Arches 304.



des nucléosides monophosphates, des traces d'acide phosphorique libre et un composé qui migre un peu plus rapidement que l'adénosine tétraphosphate ajouté comme témoin interne. La vitesse de migration de ce composé radioactif permet de croire qu'il s'agit effectivement d'un nucléoside tétraphosphate. C'est pour identifier ce composé que nous avons utilisé par la suite des cellules HeLa et des cellules KB dont les ARN pouvaient être marqués plus sélectivement par l'incorporation de bases tritiées (cf. résultats p. 76).

C - DETERMINATION DU SENS DE LA TRANSCRIPTION PAR ACTION DE LA RNase SUR LES CHAINES D'ARN EN COURS DE SYNTHÈSE

Le complexe ADN/ARN dissous dans le tampon 2SSC est divisé en deux fractions aliquotes contenant une quantité égale d'acides nucléiques :

- La première est traitée comme précédemment pour mettre en évidence le pppNp.
- La seconde est préalablement traitée par la ribonucléase pancréatique qui ne laisse intact que l'ARN hybridé avec l'ADN par des liaisons "pont hydrogène". L'hydrolyse alcaline menée de la même façon sur les chaînes résistantes à la RNase, permet de libérer le nucléoside tétraphosphate.

L'étude du profil de migration de l'hydrolysate alcalin en électrophorèse à pH 5,7 des deux fractions aliquotes (fig. 22, p. 75 et Tab. V, p. 76) permet de faire plusieurs remarques :

Le rapport de la radioactivité spécifique des nucléosides monophosphates (6 600 cpm après RNase et 28 800 dans le contrôle) permet d'évaluer que 20 à 25 p.100 des ARN sont résistants à la RNase.

Dans les deux cas, nous observons l'existence d'un nucléoside tétraphosphate, cependant l'action de la RNase a éliminé une certaine proportion (33 p.100) de ce composé. L'extrémité 5'-triphosphate, partiellement sensible à la RNase, ne serait pas toujours engagée dans l'hybride ADN-ARN, il nous est donc possible d'affirmer que la synthèse s'effectue -tout au moins d'une manière prépondérante- dans le sens 5' → 3'.

Nous devons toutefois considérer ce résultat comme préliminaire puisque ces expériences ont été effectuées sur des complexes ADN-ARN non purifiés par centrifugation isopycnique en sulfate de césium.

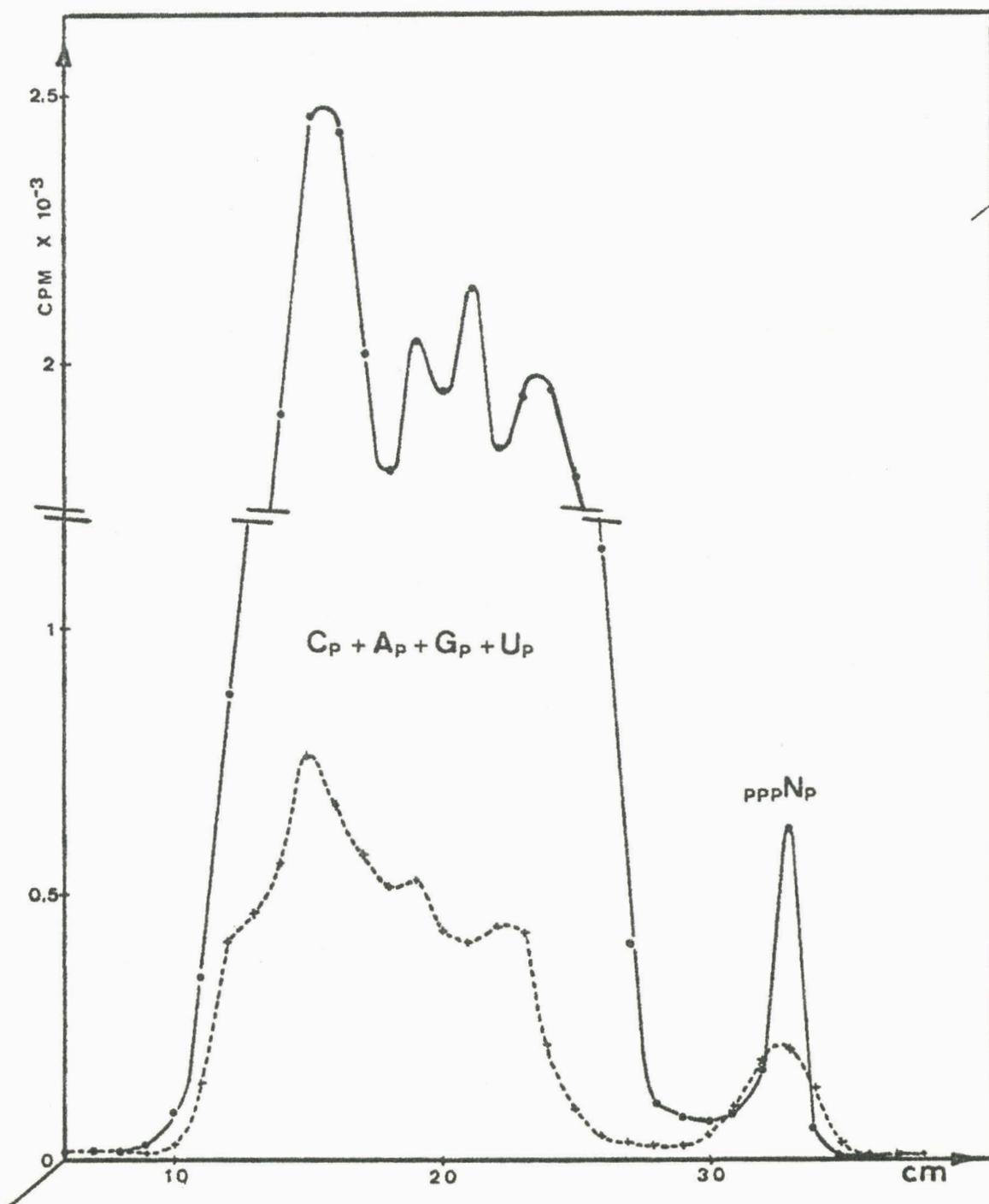


Figure n° 22 : Mise en évidence d'un composé de type pppNp dans l'hydrolysat alcalin de l'ARN associé à l'ADN.

Analyse faite par électrophorèse à pH 5,7 sur papier Arches 304.

●—●—●—● complexe ADN-ARN total

+---+---+ complexe ADN-ARN après action de la RNase (L'ARN résistant à l'action de la RNase est lié à l'ADN par pont "hydrogène").

TABLEAU V : Action de la RNase sur l'ARN associé à l'ADN

	ARN naissant	Portion d'ARN naissant résistant à la RNase
Radioactivité des nucléosides monophosphates	28 000 c.p.m.	6 600 c.p.m.
Radioactivité du composé de type pppNp	900 c.p.m.	600 c.p.m.



Bien que la contamination par des ARN libres soit faible (voir fig. 17 p. 67), il est possible qu'elle fausse certaines conclusions si ces ARN portent encore une extrémité 5'-triphosphate. En effet, dans ce cas, la diminution de la quantité de nucléoside tétraphosphate par action de la RNase pourrait être attribuée à la perte de ces ARN libres. Il n'en reste pas moins vrai que l'action de la RNase peut être considérée comme une purification de l'hydride ADN-ARN et que la persistance de nucléoside tétraphosphate renforce l'hypothèse d'un complexe naturel entre l'ADN et l'ARN néosynthétisé.

III - ETUDE DE L'EXTREMITÉ 5' DES ARN DES COMPLEXES EXTRAITS DE CELLULE HELA ET DE CELLULE KB.

A - COMPOSITION EN BASES DE L'ARN ASSOCIÉ A L'ADN

L'hydrolysate alcalin de l'ARN associé à l'ADN est analysé par électrophorèse en tampon citrate de sodium/acide citrique de pH 3,5 et la composition en bases est déterminée par la radioactivité des nucléosides monophosphates marqués par le radiophosphore (fig. 23 ; p. 78) et Tableau VI ; p. 79).

B - ETUDE DE L'EXTREMITÉ 5'-TRIPHOSPHATE

De nombreux travaux (voir p. 19) montrent que la synthèse des ARN débute, in vitro, par l'incorporation d'un nucléoside triphosphate purique. Pour étendre cette hypothèse à la synthèse in vivo nous avons étudié successivement la présence de nucléosides tétraphosphates dans les hydrolysats alcalins des ARN néosynthétisés associés à l'ADN, après marquage successif ou simultané des bases.

1) MARQUAGE PAR INCORPORATION DE GUANINE TRITIÉE.

a) Spécificité du marquage.

L'addition de guanine tritiée au milieu de culture, 14 heures avant l'extraction des complexes, permet de marquer presque exclusivement la guanine. En effet, l'analyse d'une ^{fraction} aliquote des hydrolysats alcalins a révélé, dans tous les cas, un marquage de la guanosine-(2')

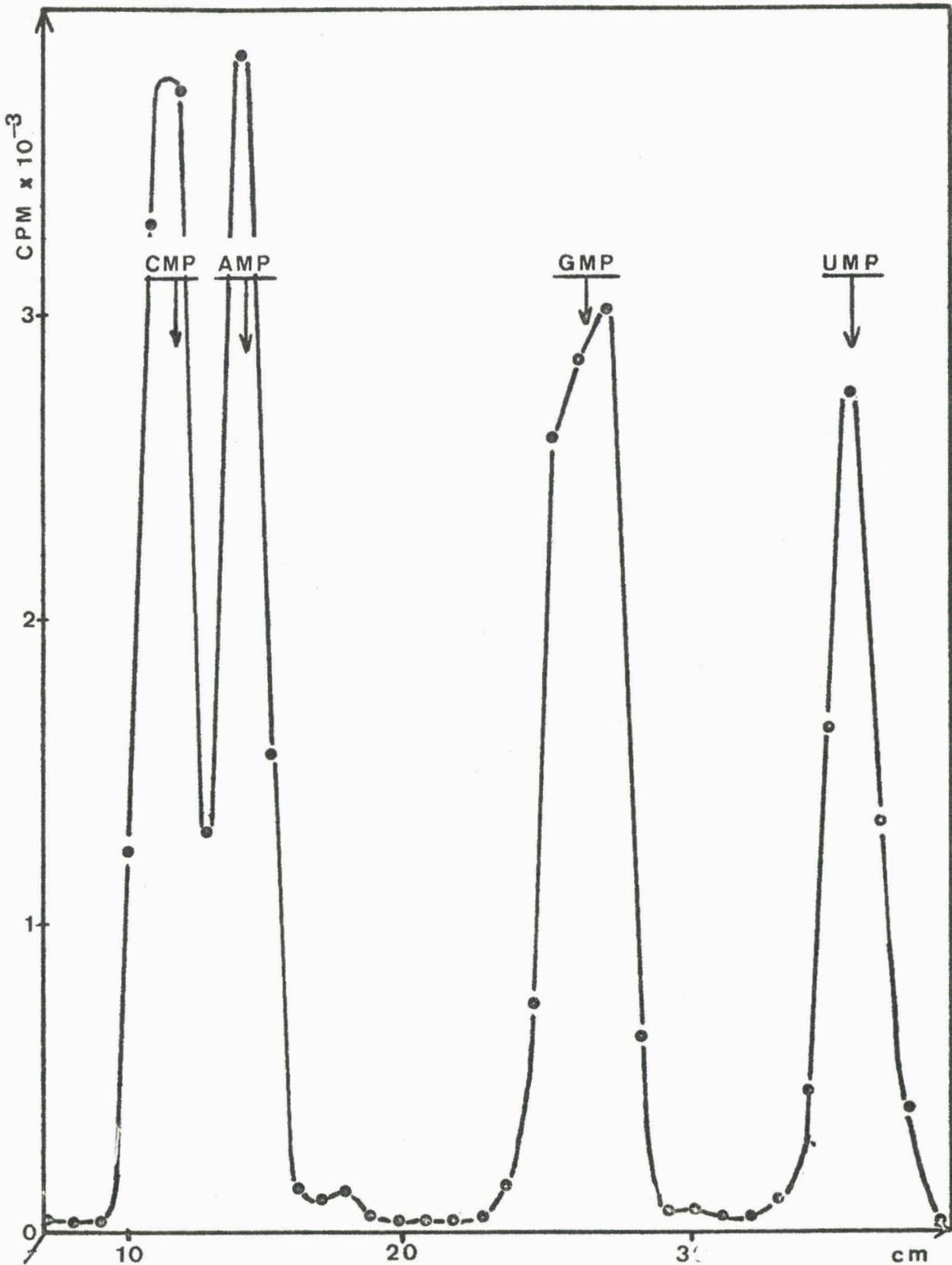


Figure n° 23 : Analyse de la composition en bases des ARN des complexes ADN-ARN extraits de cellules KB par électrophorèse à pH 3,5 (tampon citrate de sodium/acide citrique) sur papier Arches 304. L'électrophorèse est conduite pendant 10h30 sous une tension de 700 V.

BUS
LILLE

TABLEAU VI : Composition en bases de l'ARN associé à l'ADN dans les cellules KB.

Base	Radioactivité liée au nucléotide monophosphate	Composition centésimale
Cytosine	6 120 c.p.m.	28,95 p.100
Adénine	4 300 c.p.m.	20,34 p.100
Guanine	6 200 c.p.m.	29,33 p.100
Uracile	4 520 c.p.m.	21,38 p.100
$\frac{G + C}{A + U}$		1,40

3'-monophosphate avoisinant 95 p.100 de la radioactivité totale (voir fig. 24 p. 81).

b) Mise en évidence d'un nucléoside tétraphosphate

L'hydrolysât alcalin auquel sont ajoutés 25 µg de témoins pppA et ppppA, est analysé par électrophorèse sur papier à pH 5,7. Pour les deux types de cellules, une tache radioactive migrant un peu plus rapidement que le témoin ppppA est mise en évidence. Une seconde tache se trouve aussi localisée légèrement en arrière de la précédente (voir fig. 25 p. 82)

La position de ces produits par rapport aux témoins permet de leur attribuer le nombre de charges correspondant au nucléoside 5'-triphosphate, 3'-monophosphate (pppGp) et au nucléoside 5'-diphosphate, 3'-monophosphate (ppGp) issu de la dégradation du précédent. En outre, leur faible radioactivité par rapport à l'ensemble des nucléosides monophosphates s'accorde avec la présence d'un seul résidu polyphosphorylé par chaîne d'ARN.

Enfin, il faut noter une présence plus importante de ppGp dans les cellules KB. Cela peut être du à une variation des conditions d'extraction mais peut correspondre aussi à des conditions différentes de la déphosphorylation in vivo des extrémités 5'-triphosphates entre les cellules KB et les cellules HeLa. Cette différence a déjà été notée par FORGET et WEISSMAN (205) et HATLEN et al. (206) lors de leurs études de l'extrémité 5' des ARN 5S de ces cellules.

2) MARQUAGE PAR INCORPORATION D'ADENINE TRITIÉE.

a) Spécificité du marquage

L'adénine tritiée, ajoutée au milieu de culture des cellules, subit in vivo une transformation partielle en guanine. Le marquage est moins sélectif comme le montre l'analyse de la répartition de la radioactivité entre les nucléosides monophosphates effectuée systématiquement à chaque expérience par électrophorèse à pH 3,5 (voir fig. 26, p. 83). La répartition s'établit en moyenne comme suit : 25 p.100 d'acide guanylique, 75 p.100 d'acide adénylique. Les nucléotides pyrimidiques ne sont pratiquement pas marqués.

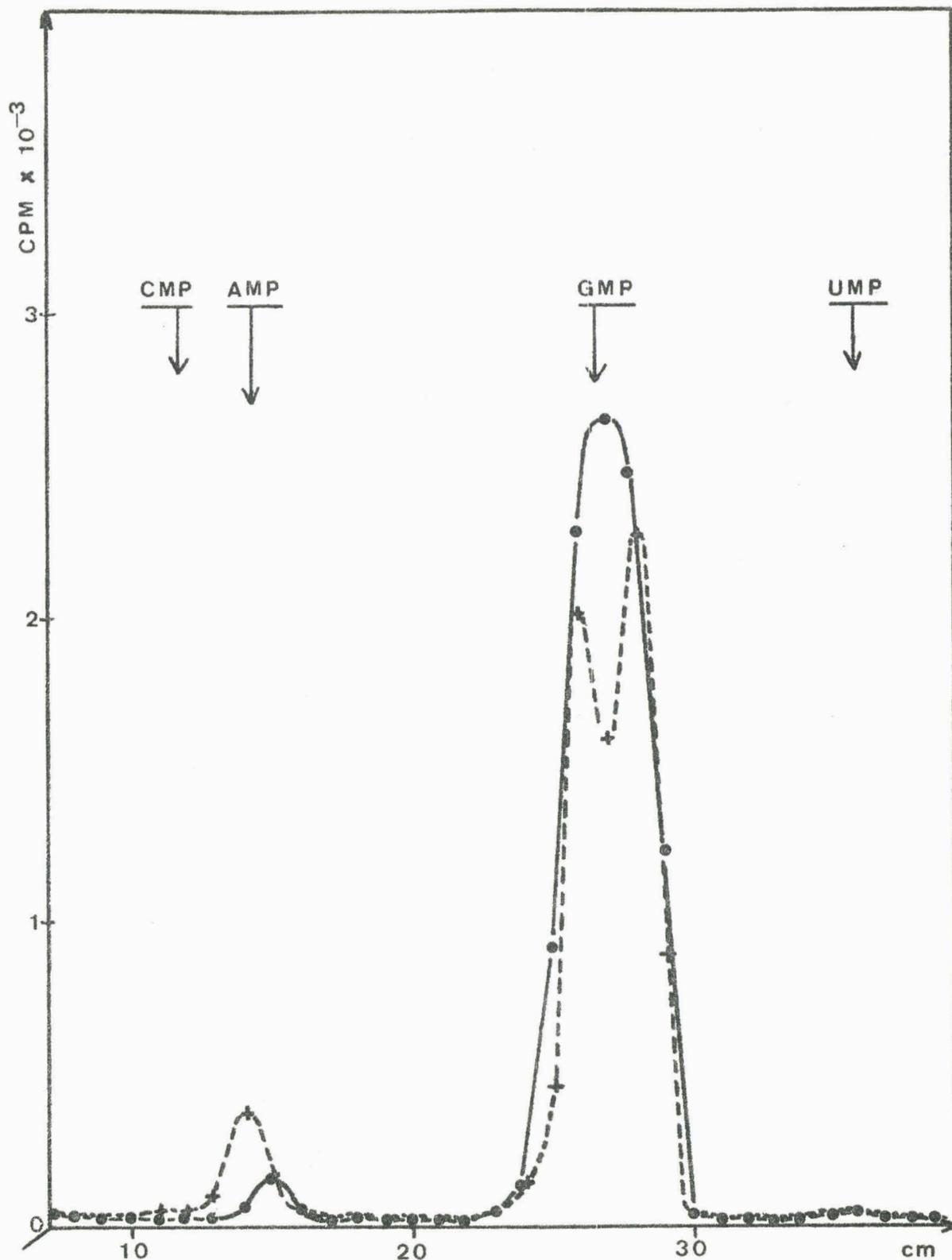


Figure n° 24 : Répartition de la radioactivité après incorporation de Guanine ³H.

dans les cellules HeLa : + - - - + - - - +
 dans les cellules KB : o - - - o - - - o

L'analyse est réalisée par électrophorèse à pH 3,5 sur papier Arches 304 (10 h 30, 700 V) des nucléosides monophosphates libérés par hydrolyse alcaline des complexes ADN-ARN.

Voir tableau VII, p. 86 :

HeLa Exp. I = GMP : 94,85 p.100, AMP : 5,15 p.100
 Exp. II = GMP = 91,9 p.100, AMP : 8,1 p.100

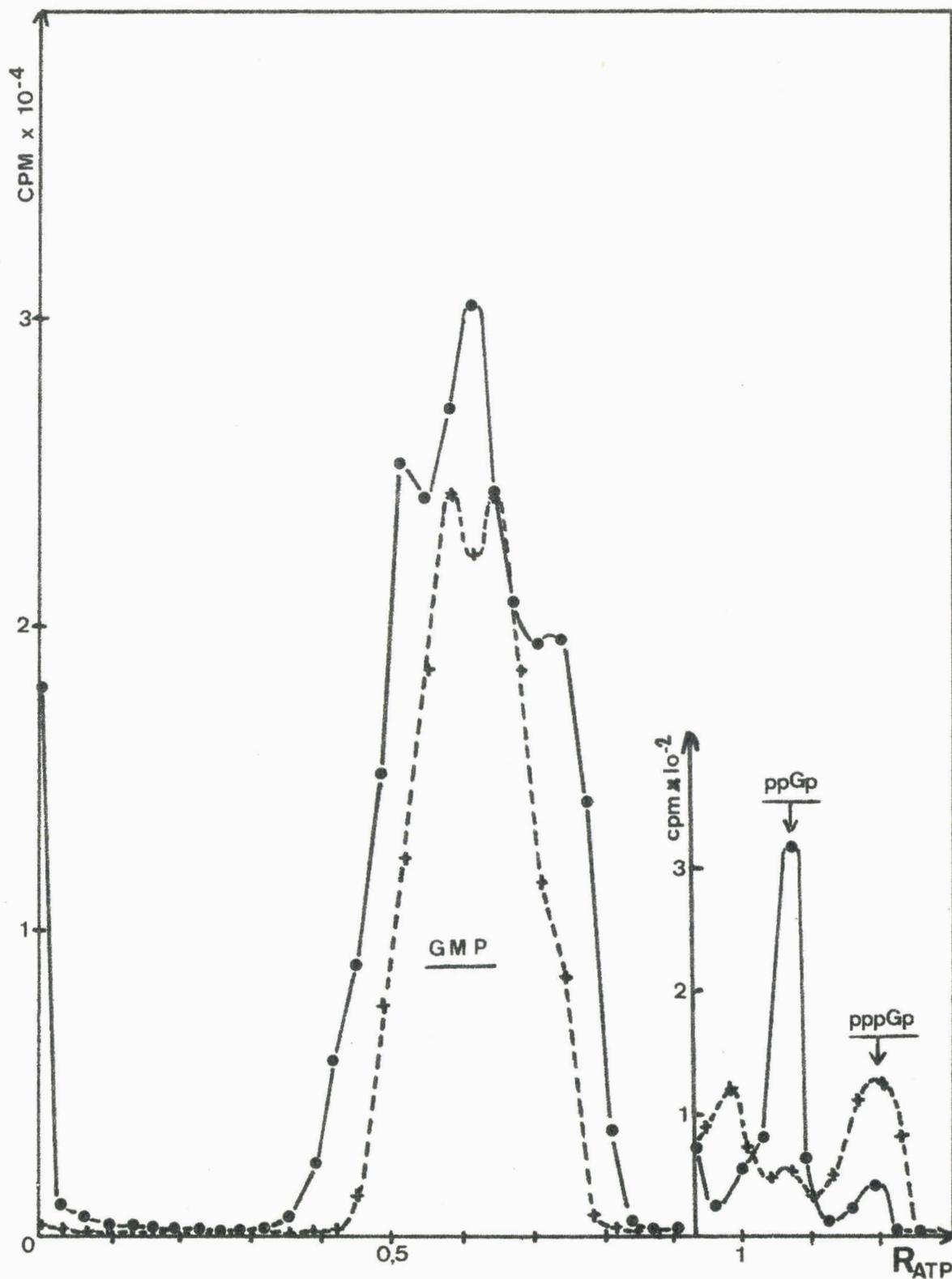


Figure n° 25 : Mise en évidence de composé pppGp et ppGp dans l'hydrolysate alcalin des ARN associés à l'ADN (après incorporation de Guanine ^3H)

dans les cellules HeLa : + - - - + - - - +
 dans les cellules KB : ● — — — ● — — — ●

L'analyse est réalisée par électrophorèse à pH 5,7 (tampon citrate de sodium/acide citrique) sur papier Arches 304.

R_{ATP} : Les distances de migration ont été mesurées par rapport à la distance parcourue par l'ATP (utilisé comme témoin interne) prise comme unité.

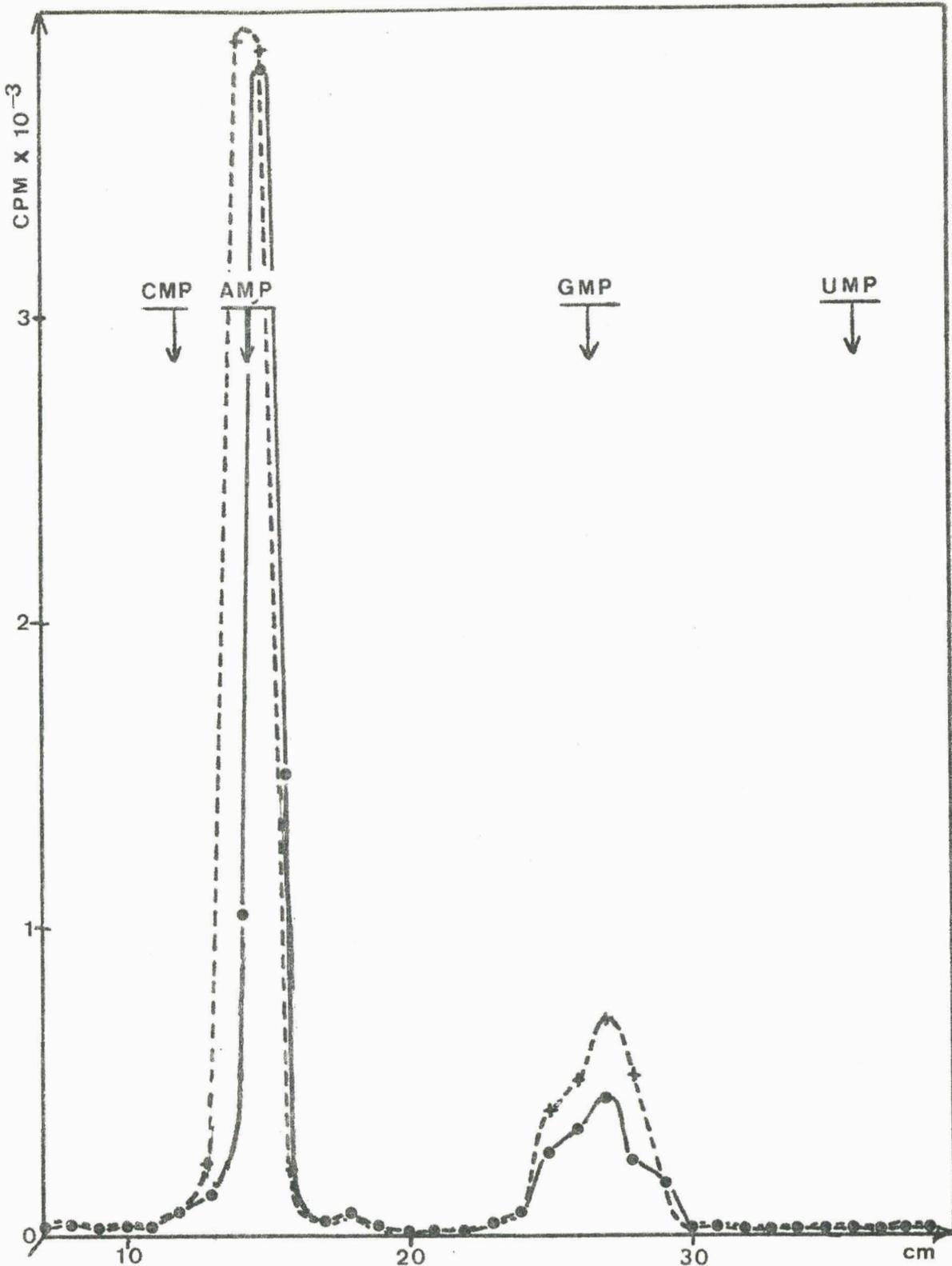


Figure n° 26 : Répartition de la radioactivité après incorporation d'Adénine ^3H .

dans les cellules HeLa : +---+---+
 dans les cellules KB : o-----o-----o

L'analyse est réalisée par électrophorèse à pH 3,5 sur papier Arches 304 (10 h 30, 700 V) des nucléosides monophosphates libérés par hydrolyse alcaline des complexes ADN-ARN.

Voir Tableau VII p. 86 :

HeLa	Exp. I	: GMP : 35 p.100	AMP : 65 p.100
	Exp. II	: GMP : 22 p.100	AMP : 88 p.100
KB		: GMP : 18 p.100	AMP : 82 p.100

Cette non-spécificité du marquage n'est pas un inconvénient car il est possible d'en tirer profit puisqu'elle permet un marquage simultané des deux bases puriques.

b) Mise en évidence des nucléosides polyphosphates :

Comme dans le cas précédent, -et dans les deux types de cellules-, l'analyse des hydrolysats alcalins par électrophorèse à pH 5,7 révèle la présence de nucléosides tri- et tétraphosphates en deçà et au delà du témoin pppA (voir fig.27 , p.85).

c) Identification de ces nucléosides polyphosphates.

Puisque, dans ce cas, la radioactivité est due aux deux bases puriques, il est nécessaire de déterminer les proportions de chaque nucléoside polyphosphate, adénylique ou guanylique.

α - Calcul de ce rapport dans les cellules HeLa :

L'expérience, menée dans les mêmes conditions avec la guanine tritiée, permet de connaître la valeur du rapport (ppGp + pppGp)/Gp qui peut être extrapolée au marquage par l'adénine tritiée. Connaissant la radioactivité que l'on peut attribuer aux composés polyphosphates de la guanosine, il est possible, connaissant la radioactivité totale de ces composés, d'en déduire la radioactivité due à l'adénosine tri- et tétraphosphate (ppAp et pppAp).

Ces calculs résumés dans le tableau VIIp.86 , ont été faits pour deux séries d'expériences. Ils conduisent dans les deux cas à la même conclusion : le GTP se trouve à l'extrémité 5' de 80 p.100 (environ) des chaînes d'ARN néoformés, l'ATP représentant 20 p.100 de cette extrémité.

β - Détermination de ce rapport par analyse directe

dans les cellules KB; Après électrophorèse à pH 5,7, les produits localisés dans la zone des tri- et tétraphosphates sont élués des papiers (voir Matériel et Méthodes, p. 60) et hydrolysés par l'acide chlorhydrique 1N, à 100°C pendant 1 heure. L'analyse, par électrophorèse à pH 2,5 (voir fig. 28, p.87), des bases puriques ainsi libérées permet de connaître la radioactivité qui est due, respectivement, aux composés

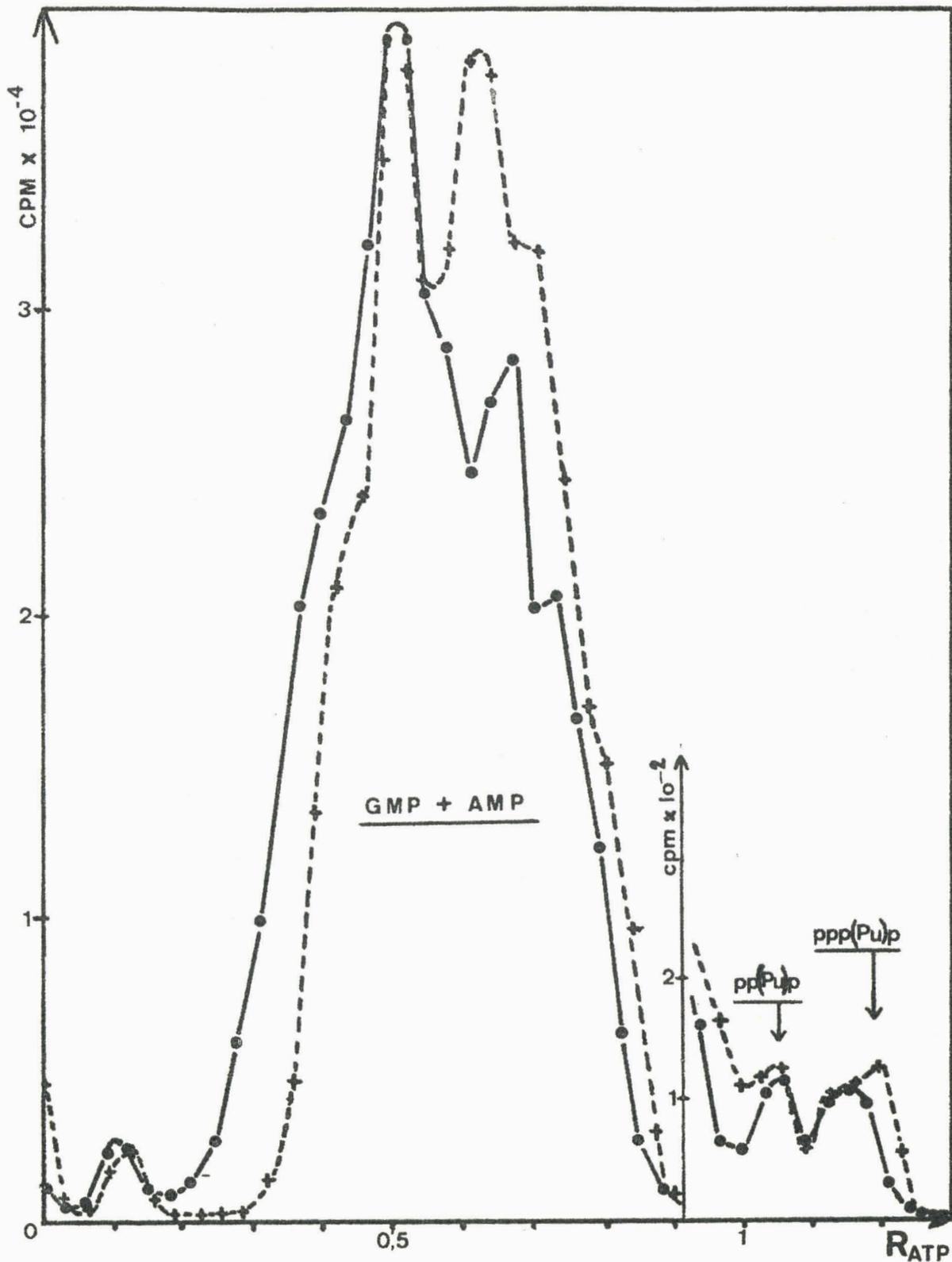


Figure n° 27 : Mise en évidence de composés tri- et tétra-phosphates dans l'hydrolysate alcalin des ARN associés à l'ADN (après marquage simultané des deux bases puriques).

dans les cellules HeLa + - - - +
 dans les cellules KB ● — — — ●

L'analyse est réalisée par électrophorèse à pH 5,7 sur papier Arches 304 pendant 10 h 30 à 300V.

RATP : Distance de migration relative à l'ATP (témoin interne).

TABEAU VII : Distribution de la radioactivité entre les nucléosides mono-phosphates et les nucléosides tri- et tétraphosphates dans les hydrolysats alcalins des ARN des complexes après marquage par la guanine-³H et l'adénine-³H.

Pourcentage de GTP et d'ATP à l'extrémité 5' de ces ARN.

	CELLULES HELA				CELLULES KB
	I		II		Marquage Ade- ³ H
	Marquage Gua- ³ H	Marquage Ade- ³ H	Marquage Gua- ³ H	Marquage Ade- ³ H	
Nucléosides monophosphates (cpm)	446.600	2.263.000	73.000	205.760	447.190
Gp (a) (cpm)	423.600	792.000	67.100	45.400	80.495
ppGp + pppGp (cpm)	1.096	(b) 2.050	287	(b) 194	(c) 217
$\frac{ppGp + pppGp}{Gp} \times 100$ (a)	0,259	(0,259)	0,428	(0,428)	0,270
Ap (cpm)	23.000	1.471.000	5.900	160.360	366.695
ppAp + pppAp (cpm)		1.247		164	(c) 361
$\frac{ppAp + pppAp}{Ap} \times 100$		0,085		0,102	0,098
$\frac{ppGp + pppGp}{\sum Np} \times 100$	0,076	(0,076)	0,126	(0,126)	0,079
$\frac{ppAp + pppAp}{\sum Np} \times 100$		0,017		0,021	0,020
Proportion de chaînes débutant du côté 5' par	pppG	82 p.100	86 p.100	80 p.100	
	pppA	18 p.100	14 p.100	20 p.100	

- 1) Selon la distribution de la radioactivité révélée par l'analyse des nucléosides monophosphates par électrophorèse à pH 3,5, d'une fraction aliquote de l'hydrolysat alcalin.
- 2) Estimation faite à partir de l'expérience menée parallèlement avec marquage de la guanine.
- 3) Calcul direct par analyse de la composition en Adénine-³H et Guanine-³H après hydrolyse acide des composés tri- et tétraphosphates séparés par électrophorèse à pH 5,7.

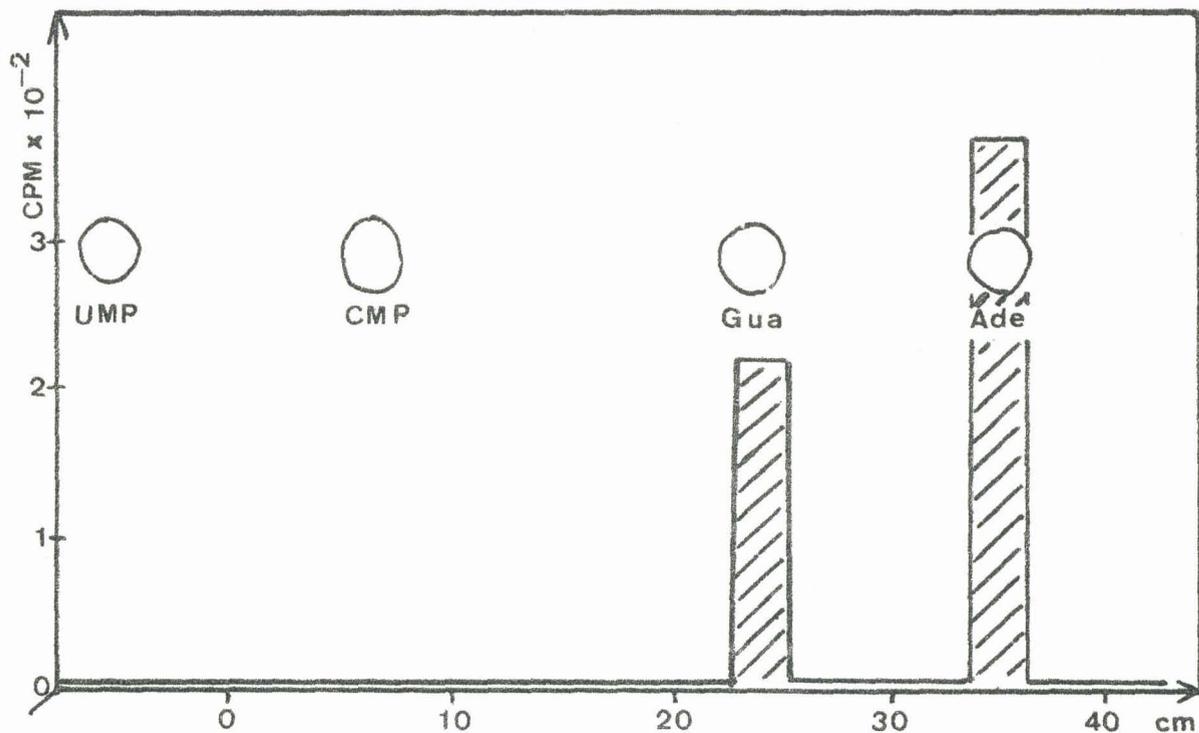


Figure n° 28 : Analyse de la composition en bases des composés tri- et tétraphosphates libérés par hydrolyse alcaline des ARN associés à l'ADN (après incorporation d'Adénine ³H dans les cellules KB.

Après hydrolyse acide de ces composés (préalablement séparés par électrophorèse à pH 5,7), la Guanine et l'Adénine libérées sont séparées par électrophorèse à pH 2,5 (tampon formiate d'ammonium) pendant 12 h sous une tension de 220 V.

Voir Tableau VII p. 86. (c)



tri- et tétraphosphates de la guanine, d'une part, et de l'adénine, d'autre part.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau VII (p. 86). Ils conduisent à une conclusion semblable à celle que nous avons tirée des expériences effectuées sur les cellules HeLa : 80 p.100 environ des chaînes d'ARN néosynthétisées portent, en position 5'-terminal la guanosine triphosphate.

3) MARQUAGE DES BASES PYRIMIDIQUES

Avant de conclure que les ARN néosynthétisés in vivo portent une extrémité 5'-triphosphate exclusivement de type purique, il était indispensable de répéter les mêmes expériences en utilisant des produits radioactifs capable de marquer les bases pyrimidiques.

a) Spécificité du marquage

La non-spécificité du marquage a été, cette fois encore, exploitée. Effectuée systématiquement à chaque expérience, l'électrophorèse à pH 3,5 d'une fraction aliquote de l'hydrolysate alcalin révèle que l'addition d'uridine tritiée au milieu de culture des cellules permet de marquer simultanément et à peu près également les deux nucléotides pyrimidiques (voir fig. 29, p. 89).

b) Analyse de l'hydrolysate alcalin par électrophorèse de pH 5,7

L'analyse de l'hydrolysate alcalin par électrophorèse à pH 5,7 ne met en évidence aucun pic de radioactivité dans les zones de migration correspondant aux nucléoside-(5'-di et) 5'-triphosphate (2') 3'-monophosphates, et ceci pour les deux types de cellules.

Cependant il existe un composé faiblement radio actif migrant au delà des nucléosides monophosphates, dont il convenait de connaître la nature. (voir fig. 30, p. 90).

Ce composé migre moins loin que ppGp et ppAp et plus loin que les nucléoside -(2') 3'-monophosphates. Il est donc logique de le considérer comme étant un résidu pCp ou (et) pUp provenant de l'hydrolyse alcaline de chaînes d'ARN portant une extrémité 5'-monophosphate. Ces ARN pouvant être dus à une rupture des chaînes lors des divers traitements ou à une contamination par des ARN libres.

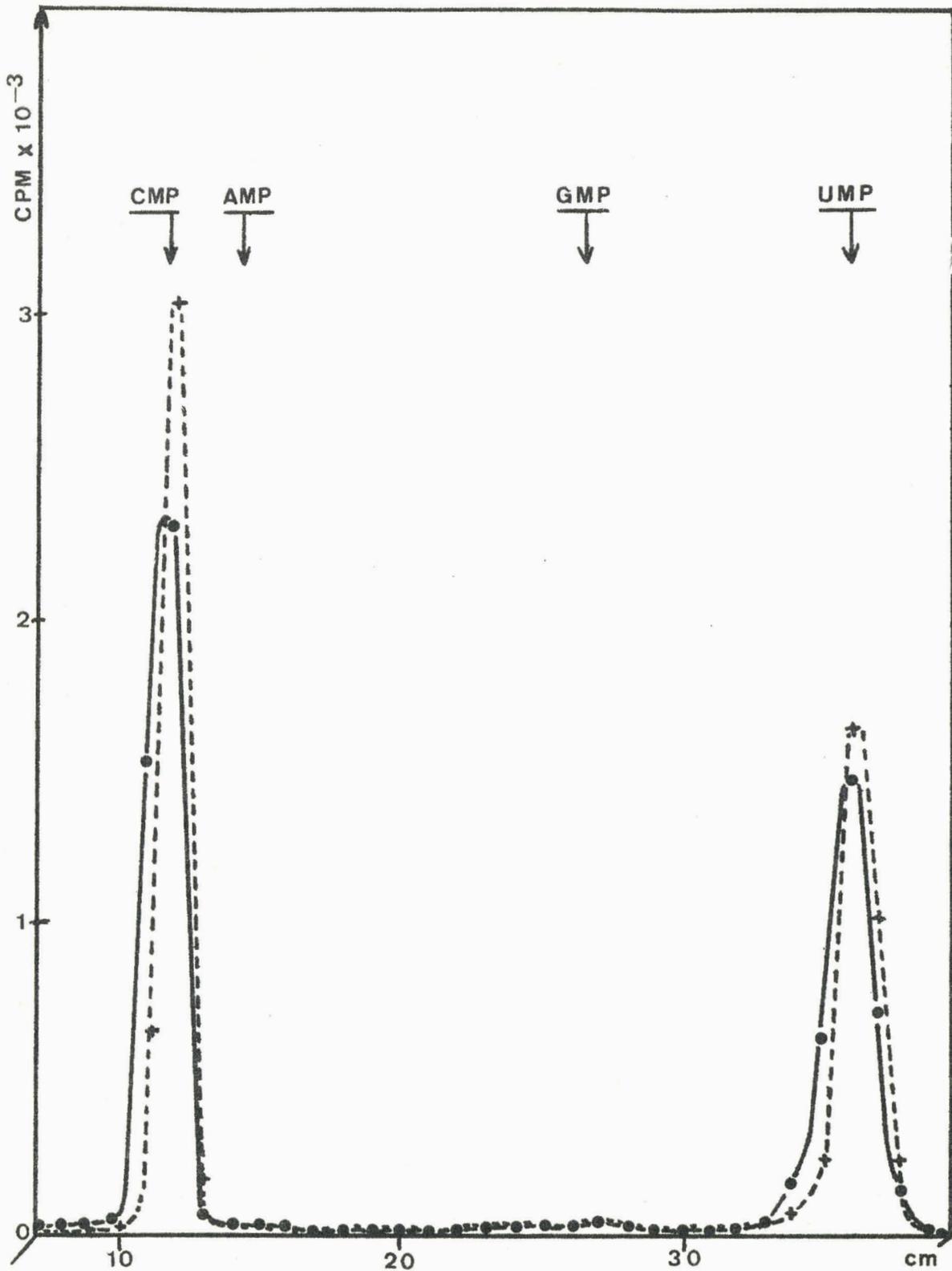


Figure n° 29 : Répartition de la radioactivité après incorporation d'Uridine ³H

dans les cellules HeLa + - - - + - - - +
 dans les cellules KB ● - - - ● - - - ●

L'analyse est réalisée par électrophorèse à pH 3,5 sur papier Arches 304 (10 h 30, 700 V.) des nucléosides monophosphates libérés par hydrolyse alcaline des complexes ADN-ARN.

Marquage simultanée des deux composés pyrimidiques.

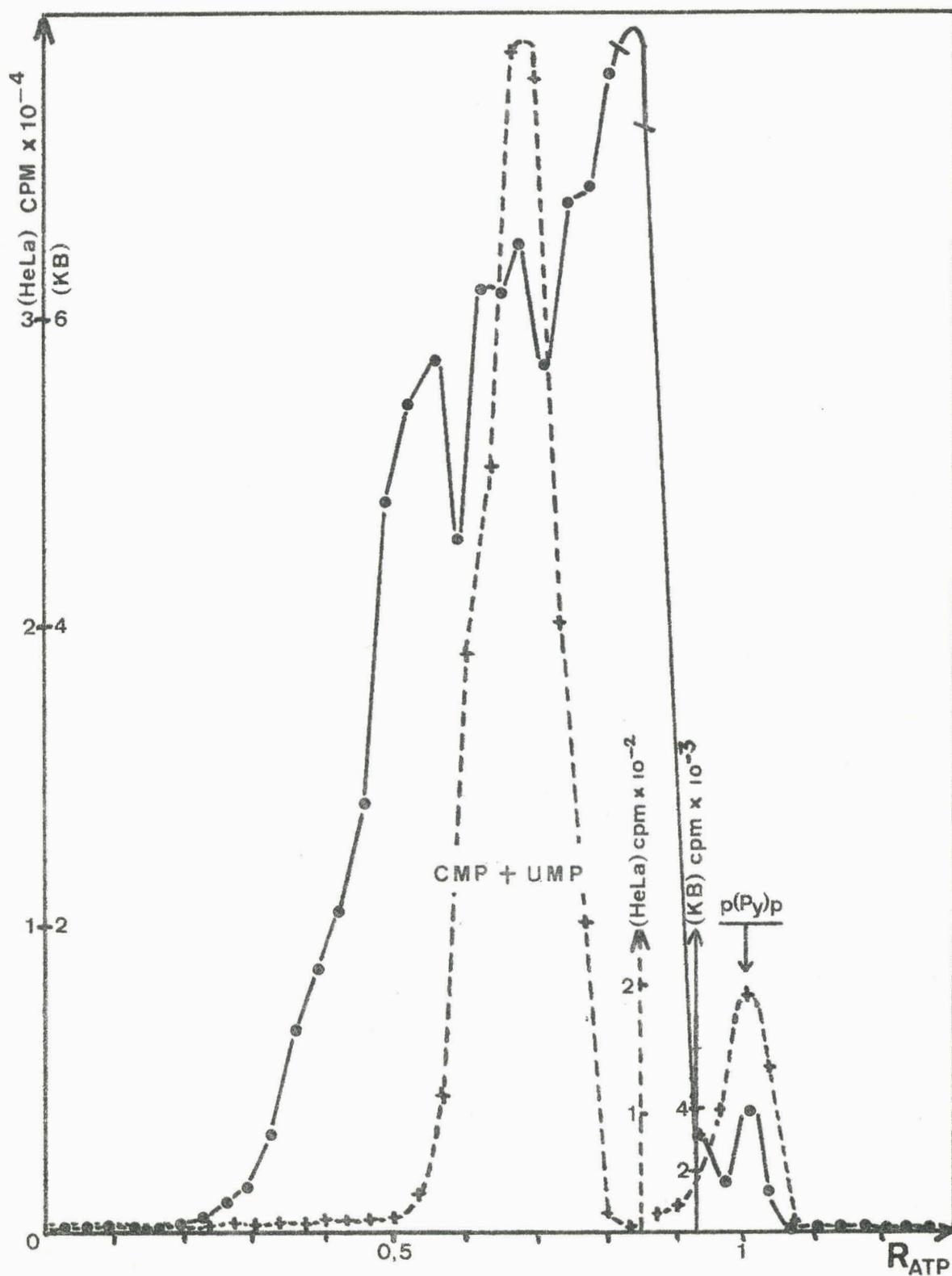


Figure n° 30 : Analyse de l'hydrolysat alcalin des ARN associés à l'ADN (après marquage simultanée des deux bases pyrimidiques).

dans les cellules HeLa : +---+---+
 dans les cellules KB : ●—●—●

Aucun composé radioactif n'est mis en évidence dans la zone de migration des nucléosides tri- et tétraphosphates ($R_{ATP} = 1,06$ et $1,18$ respectivement) même en très faible proportion (cf. largeur du pic de nucléosides monophosphates dans les cellules KB).

Pour en vérifier la nature, ces produits ont été élués des papiers. Puis, après concentration, leur comportement électrophorétique a été réexaminé à pH 5,7 en présence des témoins internes suivants : ppC, ppU, pppC, et pppU. L'électrophorèse a été effectuée pendant 1,5 heure sous une différence de potentiel de 3000 V (60 V/cm).

La figure 31(p. 92) montre que toute la radioactivité se retrouve entre les témoins nucléoside-5'-diphosphates et 5'-triphosphates pyrimidiques. La position de ces composés radioactifs est tout à fait compatible avec les charges électriques portées par les nucléoside-5'-monophosphate (2') 3'-monophosphates. En aucun cas il ne peut s'agir de nucléoside 5'-diphosphate (2') 3'-monophosphates qui, possédant un groupement phosphate ionisé supplémentaire, auraient migré plus loin que les témoins 5'-triphosphates.

L'aspect dédoublé de ce pic suggère la présence d'un mélange des deux composés pCp et pUp.

Aussi bien la position sur l'électrophorégramme que l'analyse ultérieure permettent de conclure qu'il s'agit effectivement de composés 5'-monophosphate (2') 3'-monophosphates (pCp et pUp) et non de composés 5'-diphosphate (2') 3'-monophosphate provenant de la dégradation d'une extrémité 5'-triphosphate pyrimidique.

4) CONCLUSIONS

Les graphiques de la figure 32 (p. 93) rassemblent les résultats de l'analyse des ARN associés in vivo aux ADN dans les cellules HeLa et dans les cellules KB après différents marquages des quatre bases.

Il nous est possible d'affirmer que seul un nucléotide purique se trouve à l'extrémité 5'-triphosphate des ARN néosynthétisés dans ces deux types de cellules d'Eucaryotes. Environ 80 p.100 de ces chaînes d'ARN débutent par le GTP et seulement 20 p.100 par l'ATP.

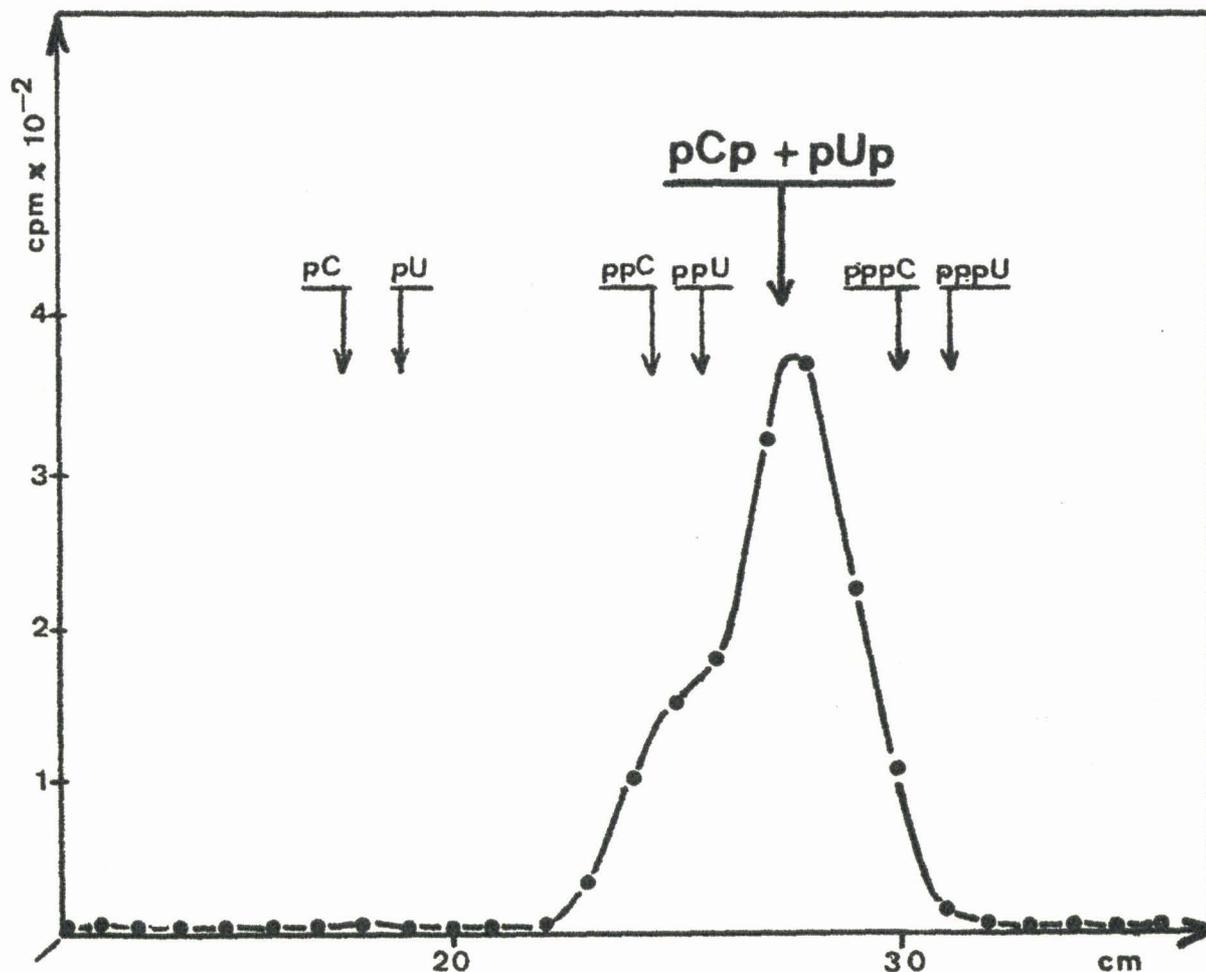


Figure n° 31 : Comportement électrophorétique du(es) composé(s) pyrimidique(s) de $R_{ATP} = 1,01$ (voir fig. 30, p. 90) libéré par hydrolyse alcaline des complexes ADN-ARN après marquage des bases pyrimidiques.

Après extraction, ce(s) composé(s) a(ont) été soumis à nouveau à une électrophorèse de pH 5,7 en présence de témoins internes ppU, ppC, pppU et pppC (pendant 1 h 30 sous une tension de 300 V).

La position et l'aspect dédoublé du pic radioactif confirme la présence du mélange des deux composés pCp et pUp.

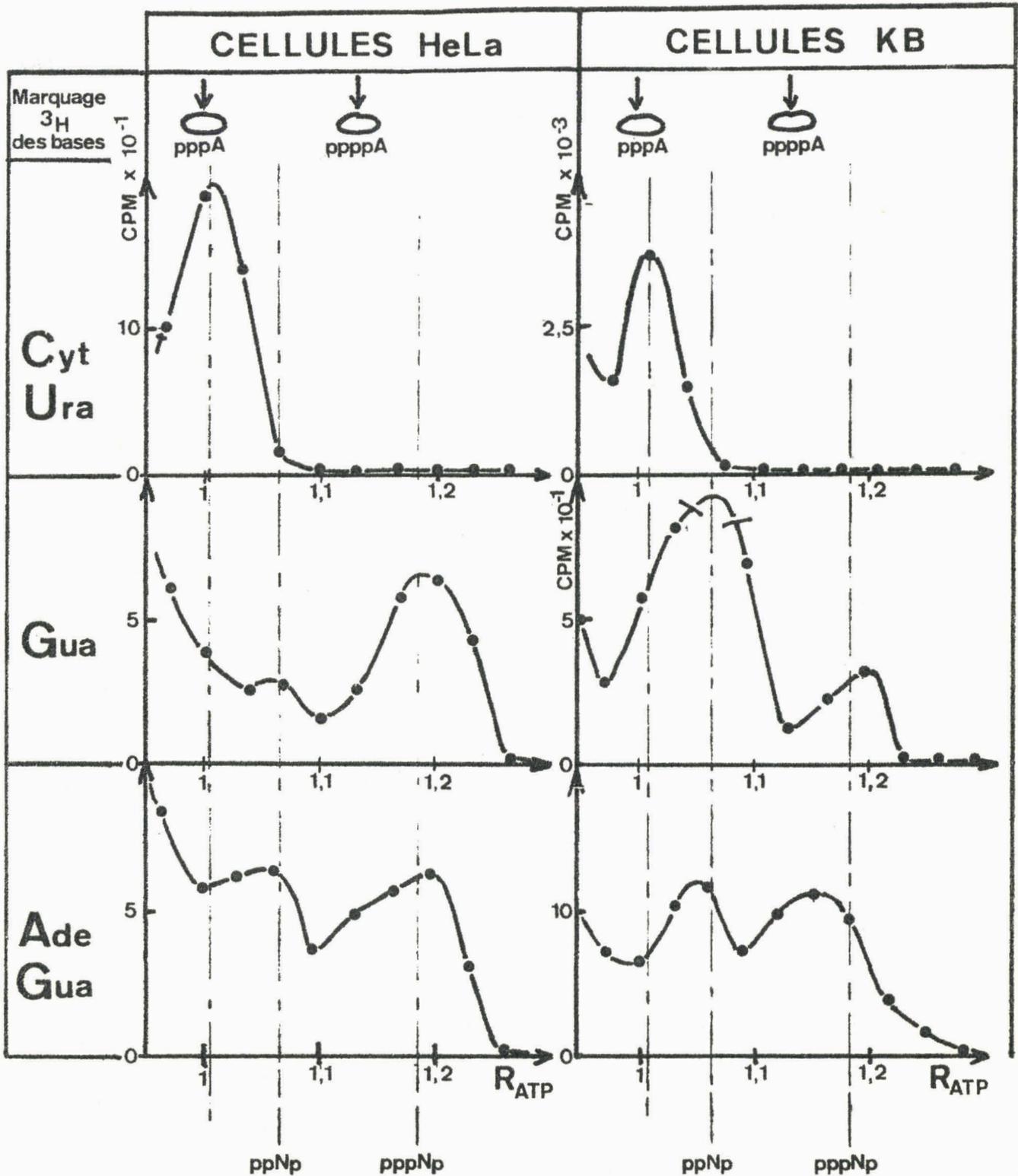


Figure n° 32 : Comparaison du comportement électrophorétique à pH 5,7 des différents composés polyphosphates libérés par hydrolyse alcaline des ARN des complexes ADN-ARN dans les cellules HeLa et cellules KB selon la base marquée.

DISCUSSION

Reprenant les travaux effectués par LEVIS et al. (207) sur les cellules HeLa, nous les avons étendus aux cellules KB.

Collaborant aux travaux entrepris par KRSMANOVIC et SERGEANT (208), nous avons tenté de mettre en évidence un complexe ADN-ARN à partir des hépatocytes de Rat et nous y sommes parvenus. Disposant alors d'ARN en cours de synthèse, nous nous sommes particulièrement attachés à mettre en évidence le nucléotide 5'-terminal et à en déduire le sens de transcription in vivo dans ces cellules de Mammifères.

1 - Nous avons isolé, par action du mélange SDS-chloroforme-alcool isoamylique suivie d'une centrifugation en gradient de sulfate de césium, une fraction d'ADN contenant un ARN partiellement sensible à la RNase et totalement hydrolysable par les alcalis.

Nous avons montré que la stabilité de ce complexe était sous la dépendance principale des liaisons "pont hydrogène" (SERGEANT et al.)(209).

2 - La dénaturation par la chaleur ou par la formamide, avant et après action de la RNase, nous a permis de fixer entre 80 et 400 nucléotides la longueur des chaînes d'ARN en cours de synthèse et à 40 nucléotides environ, la portion d'ARN hybridé ou sous la dépendance d'ARN polymérase.

3 - L'extrait brut des acides nucléiques obtenu par le mélange SDS-chloroforme/alcool isoamylique contient peu d'ARN libre comme le révèle l'analyse en gradient de sucrose de 5 à 20 p.100 (voir p. 68). Il nous est donc possible d'avoir une idée de la taille de ces ARN grâce au rapport :

$$\frac{\text{activité spécifique des nucléosides monophosphates}}{\text{activité spécifique du nucléoside tétraphosphate}}$$

Ce rapport varie entre 125 et 400 pour les ARN d'hépatocytes de Rat. Il est en bon accord avec les résultats obtenus par mesure de la constante de sédimentation (voir p. 66), mais il est en désaccord avec les travaux de HYATT (210) qui mettent en évidence des ARN géants

rapidement marqués. Il est fort probable que la taille réduite de ces ARN soit due aux ruptures de chaînes provoquées par la désintégration du radiophosphore. Cette opinion est d'ailleurs renforcée par le fait que le marquage par les bases tritiées permet d'obtenir des chaînes plus longues (rapport supérieur à 1000).

Dans le cas des chaînes résistantes à l'action de la RNase, ce rapport diminue jusqu'à la valeur de 40. Ce résultat nous permet de tirer deux conclusions :

a - La longueur moyenne des chaînes engagées dans l'hybride ADN-ARN est de 40 nucléotides. Cette valeur est en accord avec la constante de sédimentation de 3S déterminée par ultracentrifugation en gradient de saccharose des chaînes détachées de l'hybride après action de la RNase (SERGEANT)(211).

b - La diminution simultanée du nombre de nucléosides tétraphosphates (de 900 cpm à 600 cpm) n'étant pas aussi importante que le raccourcissement des chaînes (de 125 à 40), il semble que le nombre de chaînes courtes soit plus grand que celui des chaînes longues. Il nous est donc permis d'émettre l'hypothèse que, in vivo comme in vitro (BREMER et KONRAD)(212), la vitesse de croissance de l'ARN diminue au fur et à mesure de la polymérisation. Il convient, cependant, de considérer ce résultat comme préliminaire puisque ces études ont été menées sur le complexe brut.

4 - Les travaux menés pour la mise en évidence du nucléotide 5'-terminal nous offriraient un moyen élégant d'étudier le sens de la transcription :

a.- Comme le suggèrent les analyses des complexes ADN-ARN en gradient de sulfate de césium et de saccharose, la contamination par des ARN libres est faible. Il est donc possible de considérer comme négligeable les ARN libres portant une extrémité 5'-triphosphate qui seraient extraits en même temps que les complexes ADN-ARN par la méthode de LEVIS et al. (213). De ce fait, puisque l'action de la RNase diminue de 30 p.100 le nombre des nucléosides tétraphosphates, une partie des chaînes terminées par le nucléoside triphosphate est accessible à la RNase. Or, l'extrémité où s'effectue l'addition des triphosphates doit se trouver constamment sous la dépendance de l'ADN et de l'ARN polymérase (voir p. 25). L'addition des nucléosides triphosphates ne se

fait donc pas sur l'extrémité 5'-triphosphate mais au contraire sur l'extrémité 3'-hydroxyle. Le sens de la transcription procède donc de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

b - Le présent travail a révélé, dans les hydrolysats alcalins des ARN néosynthétisés non encore détachés de l'ADN modèle, la présence de nucléoside-5'-diphosphate (2') 3'-monophosphates et de nucléoside-5'-triphosphate (2')-3'-monophosphates, exclusivement de type purique. Tous les auteurs s'accordent à penser que les nucléoside-5'-diphosphate (2') 3'-monophosphates proviennent de la dégradation (accidentelle ^{ou} in vivo) de l'extrémité 5'-triphosphate. Nous pouvons donc affirmer que, dans les cellules HeLa et dans les cellules KB, les ARN naissants portent exclusivement une extrémité 5'-triphosphate purique. En outre, c'est le GTP qui occupe de façon prédominante l'extrémité 5' (80 p.100 de GTP contre 20 p.100 d'ATP).

Si la croissance de la chaîne polyribonucléotidique s'effectuait de 3' vers 5', l'addition des 4 nucléosides triphosphates se faisant au "hasard" de la séquence nucléotidique de l'ADN, il devrait se retrouver dans l'hydrolysat alcalin les 4 nucléosides tétraphosphates (dans les proportions suivant lesquelles ils se répartissent dans la chaîne d'ARN, ce qui n'est pas le cas. En conséquence, nous pouvons conclure que la transcription se fait dans le sens 5' → 3' chez les Eucaryotes.

En résumé, l'étude des ARN en cours de synthèse dans les cellules de Mammifères nous a permis d'identifier la présence d'un nucléoside 5'-triphosphate terminal, exclusivement de type purique et essentiellement le GTP dans les cellules HeLa et dans les cellules KB, et de déterminer que la transcription de l'ADN en ARN se faisait in vivo par croissance de la chaîne polyribonucléotidique de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

Actuellement, de nombreux points demeurent encore obscurs dans le phénomène de la transcription in vivo, notamment sur la nature des signaux qui commandent le début de la synthèse de l'ARN. Nous ne connaissons pratiquement rien sur le mécanisme du contrôle de la transcription chez les Eucaryotes. Aussi sommes nous décidés à orienter nos travaux futurs vers les problèmes suivants :

a - Les découvertes récentes, chez les Eucaryotes, de

différentes ARN-polymérase (nucléolaire et nucléoplasmique) nous incitent à explorer l'extrémité 5' des ARN impliqués dans des complexes ADN-ARN isolés séparément du nucléole ou du nucléoplasme.

b - L'obtention de ces hybrides naturels contenant des classes d'ARN plus homogènes pourrait nous permettre d'étudier la séquence oligoribonucléotidique de l'extrémité 5' dans l'espoir d'y trouver une homogénéité liée à un "codage" du déclenchement de la synthèse.

c - Dans le cas du foie de Rat, nous avons été limité par l'emploi du radiophosphore. La mise au point d'un marquage externe des ARN, après extraction des hybrides naturels, nous permettrait d'identifier les extrémités 5' et 3' et par conséquent de déterminer si la transcription se fait uniquement de 5' → 3'. Cependant il conviendra auparavant de compléter les travaux présentés dans ce mémoire par l'étude de l'extrémité triphosphate des ARN associés à l'ADN dans un complexe hautement purifié.

d - GEORGIEV (21) suggère que l'intégration d'un ARN viral dans le génôme provoque une cancérisation de la cellule parce que l'ARN-polymérase ne subit plus le système de régulation de l'hôte, système situé dans la partie proximale des cistrons. Il nous semble donc intéressant d'appliquer nos méthodes à des cellules cancérisées, car, selon cette hypothèse, l'extrémité 5' des ARN naissants devrait être notablement modifiée.

e - Enfin, ayant en possession le système cellulaire contenant l'ARN en voie de synthèse, il sera sans doute possible d'envisager l'étude de son association ^{avec} des protéines spécifiques et de sa capacité à stimuler les biosynthèses protéiques dans des systèmes acellulaires.

CONCLUSIONS

- 1 - L'identification d'un ARN associé à l'ADN a été effectuée par la mise en évidence d'un complexe ADN-ARN dont la fraction ARN est partiellement sensible à la RNase et totalement hydrolysable par la potasse dans des préparations très purifiées et dépourvues d'ARN libre.
- 2 - Dans une seconde série d'expériences, après avoir détaché l'ARN du complexe par dénaturation thermique et par la formamide, nous avons obtenu des composés de constante de sédimentation variant de 4 S à 9 S. Ces propriétés correspondent à des chaînes d'ARN de 80 à 400 nucléotides.
- 3 - La fraction de la molécule d'ARN résistante à l'action de la RNase possède une constante de sédimentation de 3 S et serait donc formée d'une quarantaine de nucléotides qui correspondraient à la zone d'appariement avec l'ADN.
- 4 - Dans une troisième série d'expériences, nous avons mis en évidence le ribonucléoside 5'-triphosphate terminal de la chaîne d'ARN naissant associé à l'ADN dans les noyaux de foie de Rat et étudié sa sensibilité à la RNase.
- 5 - Dans une autre série d'expériences, nous avons démontré que ce ribonucléoside 5'-triphosphate terminal était exclusivement de type purique et qu'il s'agissait essentiellement du GTP (80 p.100) dans les cellules HeLa et dans les cellules KB.
- 6 - Enfin, nous avons déterminé que, dans ces deux types de cellules d'Eucaryotes, la croissance de la chaîne polyribonucléotidique s'effectuait in vivo de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

BIBLIOGRAPHIE



	Réf.	pages
ANTHONY D.D., GOLDTHWAIT D.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1966), <u>56</u> , 1026.	55	18
AVADHANI N.G., BUETOW D.E., Nature, (1970) <u>228</u> , 242.	176	38
AVADHANI N.G., ROE D.H., BUETOW D.E., F.E.B.S. Letters, (1970) <u>7</u> , 217	175	38
BAUTZ E.K.F., BAUTZ F.A., Nature, (1970) <u>226</u> , 1219.	54	17
BERG P., KORNBERG R.D., FAUCHER H., DIECKMANN M. Biochem. Biophys. Res. Commun., (1965), <u>18</u> , 932.	41	14
BILLETER M.A., DAHLBERG J.E., GOODMAN H.M., HINDLEY J. WEISSMAN C., Nature, (1969), 224, 1083.	74	20
BISHOP D.H.L., MILLS D.R., SPIEGELMAN S., Biochem., (1968), <u>7</u> , 3744.	88	21
BLATTNER F.R., THOMAS C.A., Abstr. 7th Internat. Congr. Biochem. Tokyo, 1967.	40	14
BORKOWSKA I., WINZERITH H., MANDEL P., C.R. Acad. Sci. Paris, (1964), <u>258</u> , 6561.	168	38
BRAY G.P., Anal. Biochem., (1960), <u>1</u> , 279.	185	49
BREMER H., KONRAD M.W., Natl. Acad. Sci. U.S., (1964), <u>51</u> , 801.	110 212	24 95
BREMER H., KONRAD M.W., GAINES K., STENT G., J. Mol. Biol., (1965), <u>13</u> , 540.	7 65 67 106 113 183 203	6 19 20 24 28 45 70
BROWN D.M., TODD A.R., J. Chem. Soc., (1952), p. 52.	188	50
BURGESS R.R., J. Biol. Chem. (1969), <u>244</u> , 6168.	19a	9
BURGESS R.R., TRAVERS A.A., DUNN J.J., BAUTZ E.K.F., Nature, (1969), <u>221</u> , 43.	19b 21 43	9 9 14
BYRNE R., LEVIN I.G., BLADEN H.A., NIERENBERG W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1964), <u>52</u> , 140.	124	31
CARTOUZOU G., POIREE J.C., LISSITZKY S., Eur. J. Biochem., (1969), <u>8</u> , 357.	139	32

	Réf.	pages
CHAMBON P., GISSINGER F., MANDEL J.L.Jr.,	32	13
KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MEIHLAC M.,	77	20
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology	97	22
<u>35</u> , (1970), "RNA transcription" (sous presse)		
CHAMBON P., RAMUZ M., DOLY J.,	26	12
Biochem. Biophys. Res. Commun., (1965), <u>21</u> , 156.	48	15
CHAMBON P., RAMUZ M., MANDEL P., DOLY J.,	42	14
Biochim. Biophys. Acta, (1968), <u>157</u> , 504.		
CHAUVEAU J., MOULE Y., ROULLER C.,	180	42
Exptl. Cell. Res., (1956), <u>11</u> , 317.		
COHEN S.W., HURWITZ J.,	117	29
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1967), <u>57</u> , 1759.		
COLVILLE A.J.E., VAN BRUGGEN E.F.J., FERNANDEZ-MORAN H.	15	9
J. Mol. Biol., (1966), <u>17</u> , 302.		
COUTELLE C., RYSKOV A.P., GEORGIEV G.P.,	156	36
F.E.B.S. Letters, (1970), <u>12</u> , 21.		
CRAWFORD L.V., CRAWFORD E.M., RICHARDSON J.P.,		
SLAYTER H.S.,	9	7
J. Mol. Biol., (1965), <u>14</u> , 593.		
CRESTFIELD A.M., SMITHIN K.C.S., ALLEN F.W.,	181	43
J. Biol. Chem., (1955), <u>216</u> , 185.		
CRICK F.H.C.,	3	1
Symp. Soc. Exp. Biol., The Biological Replication of		
Macromolecules, XII, 138, (1958).		
DAHLBERG J.E.,	79	21
Nature, (1968), <u>220</u> , 548.		
DAVIDSON J.N., SMELLIE R.M.S.,	190	53
Biochem. J., (1952), <u>52</u> , 594.		
DEFERT-KOBUS W., KERCKAERT J.P., SEGARD E.,		
MONTREUIL J.,	137	32
C.R. Acad. Sci. Paris, (1968), <u>266</u> , 31.		
DE WACHTER R., VERHASSEL J.P., FIERS W.,	82	21
Biochim. Biophys. Acta, (1968), <u>157</u> , 195.		
DE WACHTER R., VERHASSEL J.P., FIERS W.,	83	21
F.E.B.S. Letters, (1968), <u>1</u> , 93.	102	23
DUBERT J.M., HIRSCHBEIN L.,	51	17
Biochem. Biophys. Res. Commun., (1969), <u>34</u> , 149.	53	17
DUNN J.J., BAUTZ E.K.F.,	59	18
Biochem. Biophys. Res. Commun., (1969), <u>36</u> , 925.		
ELSON D., CHARGAFF E.,	202	70
Biochim. Biophys. Acta, (1955), <u>17</u> , 362.		

	Réf.	pages
FUCHS E., MILLETTE R.L., ZILLIG W., WALTER G., Eur. J. Biochem., (1967), <u>3</u> , 183.	46 60	15 18
FUCHS E., ZILLIG W., HOFSCHEIDER P.H., PREUSS A., J. Mol. Biol., (1964), <u>10</u> , 546.	8 13	7 7
FORGET B.G., WEISSMAN S.M., Science, (1967), <u>158</u> , 1695.	92 205	21 80
GEORGIEV G.P., J. Théorétiqueal Biol., (1969), <u>25</u> , 473.	152 214	34 97
GAITSKHOKI V.S., GACHAVA M.M., KAZAKOVA T.B., MARKOSYAN K.A., RAKHIMBEKOVA L.S., Biokhimiya, (1970), <u>35</u> , 336.	177	38
GILBERT W., MULLER-HILL B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1966), <u>56</u> , 1891.	153	34
GILBERT W., MULLER-HILL B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1967), <u>58</u> , 2715	154	34
GLITZ D.G., Biochemistry, (1968), <u>7</u> , 927.	84	21
GOLDSTEIN A., KIRSCHBAUM J., ROMAN A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1965), <u>54</u> , 1669.	71	20
GOLDTHWAIT D.A., ANTHONY D.D., WU C.W., Lepetit Colloquia on Biology and Medicine:RNA polymerase and transcription, (1970), p.10.	56 63 94	18 19 22
HANES C.S., ISHERWOOD F.A., Nature, (1949), <u>164</u> , 1107.	192	58
HARVEY E.B., Biol. Bull., (1936), <u>71</u> , 101.	142	33
HATLEN L.E., AMALDI F., ATTARDI G., Biochemistry, (1969), <u>8</u> , 4989.	91 95 206	21 22 80
HAYASHI M.N., HAYASHI M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1966), <u>55</u> , 635.	161 184 199	36 48 66
HEIL A., ZILLIG W., F.E.B.S. Letters, (1970), <u>11</u> , 165.	25	12
HENSHAW E.C., J. Mol. Biol. (1968), <u>36</u> , 401.	148	33
HYATT H.H., J. Mol. Biol., (1962), <u>5</u> , 217.	210	94
INFANTE A.A., NEMER M., J. Mol. Biol., (1968), <u>32</u> , 543.	145	33

	Réf.	pages
ISHIKAWA K., KURODA C., OGATA K., Biochim. Biophys. Acta, (1969), <u>179</u> , 316.	136	32
JACOB F., Science, (1966), <u>152</u> , 1470.	37	14
JORGENSEN S.E., BUCH L.B., NIERLICH D.P., Science, (1969), <u>164</u> , 1067.	90	21
KAY E.R., Nature, (1964), <u>202</u> , 390.	167	38
KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MANDEL J.L. Jr., GISSINGER F., CHAMBON P., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1970), <u>38</u> , 165.	30	13
KIRBY K.B., Biochim. Biophys. Acta, (1963), <u>76</u> , 391.	196	62
KITANO Y., KAMEYANA T., J. Biochem., (1969), <u>65</u> , 1.	11	7
KONRAD M.W., STENT G.S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1964), <u>51</u> , 647.	160	36
KRAKOW J.S., Communication à la "United States - Japan Science Seminar" Tokyo, Avril 1970, (cf. Science,(1970), <u>170</u> 351.	45	15
KRAKOW J.S., J. Biol. Chem., (1966), <u>241</u> , 1830.	118	29
KRAKOW J.S., HORSLEY W.J., J. Biol. Chem., (1967), <u>242</u> , 4796.	75 109	20 24
KRSMANOVIC V., D.E.A. Fac. Sci. Lille, (1968), Isolement et iden- tification des complexes ADN-ARN dans les cellules de Mammifères.	197	65
KRSMANOVIC V., SEGARD E., MONTREUIL J., Arch. Internat. Physiol. Biochim.,(1968), <u>76</u> , 379.	173	38
KUNTZEL H., SCHÄFER K., Nature, (1971) - sous presse.	35	13
KUWANO M., SCHLESSINGER D., APIRION D., J. Mol. Biol., (1970), <u>51</u> , 75.	64	19
LESNAW J.A., REICHMANN M.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1970), <u>66</u> , 140.	89	21
LEVENE P.A., SIMMS H.S., J. Biol. Chem., (1925), <u>65</u> , 519.	189	51
LEVIN D.H., ACS G., SILVERSTEIN S.C., Nature, (1970), <u>227</u> , 603.	76	20

	Réf.	pages
LUBIN M., J. Mol. Biol., (1969), <u>39</u> , 219.	12	7
LEVIS A.G., KRSMANOVIC V., ERRERA M., Biochim. Biophys. Acta, (1967), <u>145</u> , 577.	172 182 207 213	38 43 94 95
LIAU M.C., PERRY R.P., J. Cell. Biol., (1969), <u>42</u> , 272.	132	32
LJLL U.I., HARTMANN G.R., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1970), <u>39</u> , 930.	22	12
MADISON J.T., Ann. Rev. Biochem., (1968), <u>37</u> , 131.	98 204	22 70
MAITRA U., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1970), <u>41</u> , 1255.	120	30
MAITRA U., COHEN S.N., HURWITZ J., Cold Spring Har. Symp. Quant. Biol., (1966) <u>31</u> , 113.	99	22
MAITRA U., HURWITZ J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1965), <u>54</u> , 815.	66 114	19 28
MAITRA U., HURWITZ J., J. Biol. Chem., (1967), <u>242</u> , 4897.	119	29
MAITRA U., NAKATA Y., HURWITZ J., J. Biol. Chem., (1967), <u>242</u> , 4908.	100 107	23 24
MANDEL P., BORKOWSKA I., Biochim. Biophys. Acta, (1964), <u>91</u> , 683.	166	38
MANO Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1966), 25, 216.	151	34
MANO Y., NAGANO H., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1966), 25, 210.	150	34
MARKHAM R., SMITH J.D., Research, (1951), <u>4</u> , 344.	187	50
MARMUR J., GREENSPAW C.M., PALECEK E., KAHAN F.M., LEVIN J., MANDEL M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, <u>28</u> , 191.	115	29
MATSUKAGE A., MURAKAMI S., KAMEYAMA T., Biochim. Biophys. Acta, (1969), <u>179</u> , 145.	39	14
Mc CARTHY B.J., BOLTON E.I., J. Mol. Biol., (1964), <u>8</u> , 184.	116	29
Mc CONKEY E.H., HOPKINS J.W., J. Mol. Biol., (1965), <u>14</u> , 257.	146	33
MEAD C.G., J. Biol. Chem., (1964), <u>239</u> , 550.	165	37

	Réf.	Pages
MILLER O.L. Jr., BEATTY B.R., Science, (1969), <u>164</u> , 955.	4 157	3 36
MILLER O.L. Jr., HAMKALO B.A., THOMAS C.A. Jr., Science, (1970), <u>169</u> , 392.	5 158	4 36
MONTGOMERY R., WU Y.C., J. Biol. Chem., (1963), <u>238</u> , 3547.	194	59
MONTREUIL J., Thèse de Doctorat-ès-Sciences, Fac. Sciences, Uni- versité de LILLE, (1952).	193	58
MOULE Y., CHAUVEAU J., C. R. Acad. Sci., (1966), <u>263D</u> , 75.	134	32
MUELLER K., BREMER H., J. Mol. Biol., (1969), <u>43</u> , 89.	68	20
NAKANA E., SAKAGUCHI K., J. Biochem.; (1969), <u>65</u> , 147.	38	14
NAONO S., ROUVIERE J., GROS F., Biochim. Biophys. Acta, (1966), <u>129</u> , 271.	126	31
NIYOGI S.K., STEVENS A., J. Biol. Chem., (1965), <u>240</u> , 2593.	49	15
OKAMOTO T., SUGIURA M., TAKANAMI M., Biochemistry, (1970), <u>9</u> , 18.	70	20
PARSONS J.T., Mc CARTY K.S., J. Biol. Chem., (1968), <u>243</u> , 5377.	135	32
PERRY R.P., KELLEY D.E., J. Mol. Biol. (1968), <u>35</u> , 37.	147	33
PERRY R.P., SRINIVASAN P.R., KELLEY D.E., Science, (1964), <u>145</u> , 504.	129 141	32 32
PREUSS H., ZILLIG W., Biochim. Biophys. Acta, (1967), <u>140</u> , 540.	18	9
REVEL M., GROS F., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1967), <u>27</u> , 12.	127	31
RICHARDSON J.P., J. Mol. Biol., (1966), <u>21</u> , 115.	14 17 108	9 9 24
RICHTER G., SENGER H., Biochim. Biophys. Acta, (1965), <u>95</u> , 362.	169	38
ROBERTS J.W., Nature, (1969), <u>224</u> , 1168.	122	30
ROBERTSON H.D., ZINDER N.D., J. Biol. Chem., (1969), <u>244</u> , 5790.	78	21

	Réf.	pages
ROBLIN R., J. Mol. Biol. (1968), <u>31</u> , 51.	80	21
ROBLIN R., J. Mol. Biol. (1968), <u>36</u> , 125.	81	21
ROEDER R.G., RUTTER W.J., Nature, (1969), <u>224</u> , 234.	27	13
ROEDER R.G., RUTTER W.J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1970), <u>65</u> , 675.	28	13
RUET A., SENTENAC A., FROMAGEOT P., F.E.B.S. Letters, (1970), <u>11</u> , 169.	62	19
RYSKOV A.P., GEORGIEV G.P., F.E.B.S. Letters, (1970), <u>8</u> , 186.	93 96	21 22
RYSKOV A.P., MANTIEVA V.L., AVAKIAN E.R., GEORGIEV G.P. F.E.B.S. Letters, (1971), <u>12</u> , 141.	155	36
SALAS M., HILLE M.B., LAST J.A., WAHBA A.J., OCHOA S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1967), <u>57</u> , 387.	101	23
SAMARINA O.P., ASRIYAN I.S., GEORGIEV G.P., Dokl. Acad. Nank. U.R.S.S., (1965), <u>163</u> , 1510.	133	32
SAMARINA O.P., LUKANIDIN E.M., MOLNAR J., GEORGIEV G.P. J. Mol. Biol.;(1968), <u>33</u> , 251.	149	33
SCHERRER K., LATHAM H., DARNELL J.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1963), <u>49</u> , 240.	128 140	32 32
SCHULMAN H.M., BONNER D.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1962), <u>48</u> , 53.	164	37
SEIFART K.M., Lepetit Colloquia on Biology and Medecine:RNA polymerase and transcription (1970), 233.	29	13
SENTENAC A., RUET A., FROMAGEOT P., F.E.B.S. Letters, (1968), <u>2</u> , 53.	61	18
SENTENAC A., RUET A., FROMAGEOT P., European J. Biochem., (1968), <u>5</u> , 385.	69	20
SERGEANT A., D.E.A. Bioch., Fac. Sciences, Université de LILLE, (1970).	178 198 208 211	39 69 94 95
SERGEANT A., VERBERT A., KRSMANOVIC V., MONTREUIL J., Archives Intern. Physiol. Biochim., (1969), <u>77</u> , 573.	174 179 200 209	38 39 66 94
SHANKAR K., BIRNSTIEL M.L., Biochim. Biophys. Acta, (1969), <u>190</u> , 470.	131	32

	Réf.	pages
SHIGEURA H.T., BOXER G.E., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1964), <u>17</u> , 758.	112	25
SLAYTER H.S., HALL C.E., J. Mol. Biol., (1966), <u>21</u> , 113.	10	7
SPIEGELMAN S., HALL B.D., STORCK, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1961), <u>47</u> , 1135.	159	36
SPIRIN A.S., BELITSINA N.V., AJTKHOZHIN M.A., Zh. Abstch. Biol., (1964), <u>25</u> , 321.	143	33
SPIRIN A.S., NEMER M., Science, (1965), <u>150</u> , 214.	144	33
STEAD N.W., JONES O.W., Biochim. Biophys. Acta, (1967), <u>145</u> , 679.	52	17
STENT G., Science, (1964), <u>144</u> , 816.	123 125	31 31
STEVENIN J., MANDEL P., JACOB M., Bull. Soc. Chim. Biol., (1970), <u>52</u> , 703.	138	32
STEVENS A., EMERY A.J., STERENBERGER N., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1966), <u>24</u> , 929.	16	9
STONINGTON O.G., PETTIJOHN D.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1971), <u>68</u> , 6.	163	37
SUGIURA M., OKAMOTO T., TAKANAMI M., J. Mol. Biol., (1969), <u>43</u> , 299.	73 104	20 23
SUGIURA M., OKAMOTO T., TAKANAMI M., Nature, (1970), <u>225</u> , 598.	44	14
SUMMERS W.C., SZYBALSKI W., Virology, (1968), <u>34</u> , 9.	121	30
SZYBALSKI W., Communication à la "F.E.B.S. Summer School", Mars 1971, Hintermoos (Autriche).	105	23
SZYBALSKI W., KUBINSKI H., SHELDRIK P., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., (1966), <u>31</u> , 123.	36	13
TADA M., TADA M., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1969), <u>35</u> , 27.	72 103	20 23
TEMIN H.M., Virology, (1963), <u>20</u> , 577.	1	1
TEMIN H.M., MIZUTANI S., Nature, (1970), <u>226</u> , 1211.	2	1
TONGUR V.S., WLADYTCHENSKAYA N.S., KOTCHKINA W.M., J. Mol. Biol. (1968), <u>33</u> , 451.	162	37

	Réf.	pages
TRAVERS A.A., BURGESS R.R., Nature, (1969), <u>222</u> , 537.	50	16
VANDENBERGHE A., VAN STYVENDAELE B., FIERS W., Eur. J. Biochem. (1969), <u>7</u> , 174.	85	21
VAN SLYCKE D.D., J. Biol. Chem., (1922), <u>52</u> , 525.	191	56
VOIGT H.P., KAUFMANN R., MATTHAEI H., F.E.B.S. Letters, (1970), <u>10</u> , 257.	31	13
YCAS M., VINCENT W.S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1960), <u>46</u> , 804.	186 201	49 70
WALTER G., ZILLIG W., PALM P., FUCHS E., Eur. J. Biochem., (1967), <u>3</u> , 183.	47	15
WARNER J.R., SOEIRO R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1967), <u>58</u> , 1984.	130	32
WATANABE M., AUGUST J.T., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1968), <u>59</u> , 513.	86 87 195	21 21 62
WATSON J.D., CRICK F.H.C., Nature, (1953), <u>171</u> , 737.	111	25
WATSON J.D., RALPH R.K., Biochim. Biophys. Acta, (1967), <u>138</u> , 89.	171	38
WEISS S.B., GLADSTONE L., J. Am. Chem. Soc., (1959), <u>81</u> , 4118.	6	6
WILKINSON B.R., KIRBY K.S., Biochem. J., (1966), <u>99</u> , 780.	170	38
WINTERSBERGER E., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1970), <u>40</u> , 1179.	34	13
WINTERSBERGER E., WINTERSBERGER U., F.E.B.S. Letters, (1970), <u>6</u> , 58.	33	13
WU C.W., GOLDTHWAIT D.A., Biochem. (1969), <u>8</u> , 4450.	57	18
WU C.W., GOLDTHWAIT D.A., Biochem., (1969), <u>8</u> , 4458.	58	18
ZILLIG W., FUCHS E., PALM P., RABUSSAY D., ZECHEL K. Lepetit Colloquia on Biology and Medecine, RNA poly- merase and transcription, (1969), 151.	20	9
ZILLIG W., ZECHEL K., RABUSSAY D., SCHACHNER M., SETHI V.S., PALM P., SEIFERT W., HEIL A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1970), <u>35</u> . "RNA transcription" (sous presse).	23 24	12 12