

N° d'ordre : 248

50376
1971
133

50376
1971
133

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

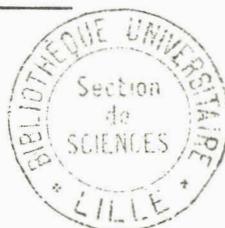
MÉMOIRE PRÉSENTÉ

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES - OPTION BIOCHIMIE

par

Wanda DEFERT - KOBUS

ISOLEMENT ET ÉTUDE PHYSICO - CHIMIQUE DE PARTICULES
DE δ RNP OBTENUES PAR DIFFUSION LIBRE A PARTIR DE
NOYAUX ISOLÉS D'HÉPATOCTES DE RAT



PRÉSENTÉ LE 5 NOVEMBRE 1971 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M.M. J. MONTREUIL : Président
C. PAOLETTI : Rapporteur
J. GUILLAUME : Examineur

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

dont la vie fut un exemple pour moi.

A MON FRERE

en témoignage de ma reconnaissance et de mon affection.

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

Ce travail a été réalisé, sous la direction de Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, dans le Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur Jules DRIESSENS) et dans le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille (Directeur : Professeur Jean MONTREUIL).

Il a pu être mené à bien grâce à l'aide financière :

- de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Convention de Recherche 61-FR-219),

- de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, "Actions Concertées" - Convention CR-66-228,

- de la Ligue Nationale Française de Lutte contre le Cancer (Opération Espoir),

auxquels nous adressons nos plus vifs remerciements.

A LA MEMOIRE DE NOTRE DIRECTEUR

Monsieur le Professeur Jules DRIESENS

Professeur de Cancérologie Générale

Directeur du Centre Régional de Lutte contre le Cancer

Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer

Officier de la Légion d'Honneur

Commandeur de la Santé Publique

Officier des Palmes Académiques

Nous lui sommes infiniment reconnaissante de nous avoir accueillie dans son Etablissement, -l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille-, qu'il a dirigé de main de Maître avec le souci constant de permettre au travail de Recherche de se réaliser dans les meilleures conditions.

Nous lui exprimons, pour son oeuvre, notre très vive admiration et nous garderons un souvenir très vivace de ses qualités humaines et de son dynamisme.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à la
Faculté des Sciences de Lille

Chef du Service de Biochimie Cellulaire
de l'Institut de Recherches sur le
Cancer de Lille

Nous vous remercions vivement d'avoir
bien voulu nous accorder votre confiance en nous donnant
le soin de réaliser ce travail dont le sujet s'est révélé
passionnant.

Vous nous avez communiqué votre enthousiasme
pour la Recherche avec le souci constant de la perfection
dans le travail qui vous caractérise.

Permettez-nous de vous exprimer notre
profonde admiration et de vous témoigner toute notre
gratitude pour nous avoir formée à votre Ecole.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à la
Faculté des Sciences de Lille

Chef du Service de Biochimie Cellulaire
de l'Institut de Recherches sur le
Cancer de Lille

Nous vous remercions vivement d'avoir
bien voulu nous accorder votre confiance en nous donnant
le soin de réaliser ce travail dont le sujet s'est révélé
passionnant.

Vous nous avez communiqué votre enthousiasme
pour la Recherche avec le souci constant de la perfection
dans le travail qui vous caractérise.

Permettez-nous de vous exprimer notre
profonde admiration et de vous témoigner toute notre
gratitude pour nous avoir formée à votre Ecole.

Ce mémoire est, en partie, le fruit d'un travail mené en équipe.

L'étude physico-chimique des dRNP particulières a été réalisée en collaboration avec J.P. KERCKAERT.

La détermination du coefficient de sédimentation des particules de RNP par ultracentrifugation analytique a été effectuée par A. VERBERT dans le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille (Centre de Recherches sur la Cellule).

Les études morphologiques ont été réalisées par E. PUVION dans le Laboratoire de Microscopie Electronique du Service de Biologie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

Nous exprimons à nos collègues et amis nos plus vifs remerciements pour leur aide précieuse et efficace ainsi que pour la sympathie qu'ils ont toujours manifestée à notre égard.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements :

à Monsieur le Professeur Agrégé C. PAOLETTI, Chef du Service de Biochimie et d'Enzymologie à l'Institut Gustave ROUSSY et

à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME, Professeur de Microbiologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, Directeur de l'Equipe de Recherche Associée au C. N. R. S., Chef du Laboratoire de Chimie Bactérielle à l'Institut Pasteur de Lille ;

qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger notre thèse ;

à Monsieur V. KRSMANOVIC, Chargé de Recherches au C. N. R. S., pour nous avoir initiée à l'ultracentrifugation en gradient de densité. Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude pour ses précieux conseils ;

à Madame J. CACHELEUX et à Mademoiselle M.J. CEULENAERE qui nous ont fait bénéficier de leur précieuse et efficace collaboration technique ;

à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire et, en particulier, à :

Monsieur A. GILQUIN, Monsieur et Madame GARET, Photographes ;
Mademoiselle M. DEMAY, Secrétaire.

UNIVERSITE DES SCIENCES

ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU,

PROFESSEURS HONORAIRES

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

M. DEFRETIN René

Biologie Animale - Directeur de l'Institut de
Biologie Maritime de Wimereux

PROFESSEURS TITULAIRES

M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	I.U.T. Lille
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BLAYS Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux Affaires
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Animale
M. FLATRES Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GEHU Jean-Marie	Institut Agricole
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	I.U.T. Lille
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique

M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
M. LEBRUN André	Electronique
M. LINDER Robert	Biologie Végétale
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques
M. PRUDHOMME Rémy	Sciences Economiques et Sociales
M. SAVARD Jean	Chimie Générale
M. SCHALLER François	Biologie Animale
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie et Minéralogie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. LOMBARD Jacques	Sciences Economiques et Sociales
M ^{le} MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés des fonctions)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques et Sociales
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques et Sociales
M. AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BILLARD Jean	Physique
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Calcul Numérique
M. CHOQUET Marcel	I.U.T. Lille
M. CORDONNIER Vincent	Calcul Numérique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean-Paul	Electrotechnique
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées

M. ESCAIG Bertrand	Physique
Mme EVRARD Micheline	I.U.T. Lille
M. FAIDHERBE Jacques	Biologie Animale
M. FONTAINE Jacques	I.U.T. Lille
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie et Aménagement Spatial
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sciences Economiques et Sociales
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRANELLE	Sciences Economiques et Sociales
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY Robert	Biologie (Amiens)
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques et Sociales
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	I.U.T. Lille
M. LHENAFF René	Géographie et Aménagement Spatial
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
Mme MAILLET Monique	Sciences Economiques et Sociales
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Sciences Appliquées
M. MONTEL Marc	Physique
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. MUSSCHE Guy	Sciences Economiques et Sociales
M. NICOLE Jacques	E.N.S.C.L.
M. OUZIAUX Roger	Sciences Appliquées
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mécanique des Fluides
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislav	Radioélectricité
Mme RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques et Sociales
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROYNETTE Bernard	Mathématiques
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune
M. SIMON Michel	Sciences Economiques et Sociales
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie et Aménagement Spatial

M. THOMAS Daniel
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WATERLOT Michel
Mme ZINNJUSTIN Nicole

Chimie Minérale Appliquée
Sciences Appliquées
Sciences Economiques et Sociales
Sciences Appliquées
I.U.T. Béthune
Géologie Générale
Mathématiques

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION

GENERALITES

1^o - LES RNP CELLULAIRES

3

I - LES PARTICULES DE RNP NUCLEAIRES

3

A - LES PARTICULES DE RNP NUCLEOLAIRES

3

1 - IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE

3

a - Morphologie du nucléole

3

b - Particules de RNP nucléolaires

5

2 - IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

6

B - LES PARTICULES DE RNP NUCLEOPLASMIQUES

12

1 - IDENTIFICATION "IN SITU" PAR DES METHODES MORPHOLOGIQUES

12

a - Les grains interchromatiniens

12

b - Les grains périchromatiniens

12

c - Les fibrilles périchromatiniennes et les "Coiled bodies"

14

2 - IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

14

a - Les particules de rRNP

14

b - Les particules de dRNP

16

II - LES PARTICULES DE RNP CYTOPLASMIQUES

23

A - LES PARTICULES DE rRNP

23

1 - ETUDES MORPHOLOGIQUES

23

2 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

25

3 - ROLE BIOLOGIQUE

28

B - LES PARTICULES DE dRNP

28

1 - LES PARTICULES DE dRNP LIBRES

28

2 - LES PARTICULES DE dRNP DES POLYSOMES

36

	Pages
<u>2^e - LES dRNP CELLULAIRES</u>	38
<u>I - LES INFORMOSOMES DE SPIRIN</u>	39
A - <u>DECOUVERTE DES INFORMOSOMES</u>	39
B - <u>PROPRIETES GENERALES DES INFORMOSOMES</u>	40
1 - <u>ANALYSE PAR CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE DE SACCHAROSE</u>	40
2 - <u>ANALYSE PAR CENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE EN CsCl</u>	41
3 - <u>EXPERIENCES D'HYBRIDATIONS</u>	42
4 - <u>EXPERIENCES D'ACTIVATION DES SYNTHESSES PROTEIQUES</u>	43
C - <u>LES FORMES MASQUEES D'ARN_m SONT DES INFORMOSOMES</u>	44
D - <u>L'INFORMOSOME N'EST PAS UN ARTEFACT</u>	45
E - <u>SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DES INFORMOSOMES</u>	46
<u>II - LES INFORMOFERES DE GEORGIEV</u>	47
A - <u>DECOUVERTE DES INFORMOFERES</u>	47
B - <u>PROPRIETES GENERALES DES COMPLEXES dARN-INFORMOFERES</u>	48
1 - <u>ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	48
a - <u>Particules 30 S et complexes de structure "polysome-like"</u>	48
1) <u>Propriétés de sédimentation en gradient de densité de saccharose</u>	48
2) <u>Propriétés de sédimentation en gradient de CsCl</u>	49
3) <u>Action de la RNase</u>	49
4) <u>Action des solutions salines concentrées ou de l'urée</u>	50
b - <u>Fraction ARN des particules : le dARN</u>	50
c - <u>Fraction protéique des particules : l'informofère</u>	51
2 - <u>ETUDES MORPHOLOGIQUES</u>	52
C - <u>ROLE BIOLOGIQUE DES INFORMOFERES</u>	55
<u>III - LES PARTICULES NUCLEAIRES HOMOGENES 40-45 S</u>	56
A - <u>LES PARTICULES DE RNP 40 S DE MOULE ET CHAUVÉAU</u>	56
1 - <u>MISE EN EVIDENCE DES PARTICULES 40 S</u>	56

	Pages
2 - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PARTICULES 40 S</u>	57
a - <u>Etude des particules</u>	57
b - <u>Etude de l'ARN</u>	57
c - <u>Etude des protéines</u>	58
3 - <u>ETUDE MORPHOLOGIQUE DES PARTICULES 40 S</u>	59
4 - <u>ROLE BIOLOGIQUE DES PARTICULES 40 S</u>	59
B - <u>LES PARTICULES 45 S D'ISHIKAWA et al.</u>	60
1 - <u>MISE EN EVIDENCE DE L'ELIMINATION PAR LES NOYAUX DE MATERIEL CONTENANT DES PARTICULES 45 S</u>	60
2 - <u>ETUDE DE LA RADIOACTIVITE ACIDO-INSOLUBLE DE LA TOTALITE DU MATERIEL ELIMINE PAR LES NOYAUX. INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS</u>	60
3 - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PARTICULES 45 S</u>	61
a - <u>Etude des particules</u>	61
b - <u>Etude de l'ARN</u>	61
c - <u>Etude des protéines</u>	61
4 - <u>ROLE BIOLOGIQUE DES PARTICULES 45 S</u>	62
TRAVAUX PERSONNELS	65
<hr/> <hr/>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLAIRE ET DE LA RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES ARN </div>	66
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> 1° - MISES AU POINT TECHNIQUES </div>	66
I - <u>PREPARATION DES ARN</u>	66
A - <u>PROCEDES D'EXTRACTION DES ARN</u>	67
1 - <u>PROCEDE DE SCHMIDT ET THANNHAUSER ET BOULANGER ET MONTREUIL</u>	67
2 - <u>PROCEDE DE SCHMIDT ET THANNHAUSER MODIFIE PAR SINGHAL</u>	67
3 - <u>PROCEDE D'EXTRACTION PAR LE CHLORHYDRATE DE GUANIDINE</u>	67
B - <u>DETERMINATION DU RENDEMENT ABSOLU EN ARN</u>	68

	Pages
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	68
2 - <u>RESULTATS</u>	69
3 - <u>CONCLUSIONS ET DISCUSSION</u>	69
C - <u>ETUDE DE LA PURETE DES ARN</u>	69
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	69
2 - <u>RESULTATS</u>	71
3 - <u>CONCLUSIONS ET DISCUSSION</u>	71
II - <u>HYDROLYSE ALCALINE DES ARN</u>	74
A - <u>DETERMINATION DES CONDITIONS D'HYDROLYSE</u>	74
1 - <u>ACTION DE LA SOUDE DANS DIFFERENTES CONDITIONS D'HYDROLYSE</u>	74
a - <u>Mode opératoire</u>	75
b - <u>Résultats</u>	75
c - <u>Conclusions et discussion</u>	75
2 - <u>ACTION DES ALCALIS SUR LES NUCLEOTIDES AMINES</u>	77
a - <u>Mode opératoire</u>	77
b - <u>Résultats</u>	78
c - <u>Conclusions et discussion</u>	78
B - <u>PURIFICATION DES HYDROLYSATS</u>	80
III - <u>SEPARATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE</u>	81
A - <u>DISSOLUTION DES NUCLEOTIDES</u>	81
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	81
2 - <u>RESULTATS</u>	82
3 - <u>CONCLUSION</u>	82
B - <u>SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES PRODUITS D'HYDROLYSE</u>	82
IV - <u>DOSAGE DES NUCLEOTIDES</u>	84
A - <u>COMPARAISON DES RESULTATS DE DOSAGES PAR LE PHOSPHORE ET PAR SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'ULTRA-VIOLET</u>	84
1 - <u>TECHNIQUES</u>	85
a - <u>Dosage du phosphore nucléotidique par le procédé d'ALLEN</u>	85
b - <u>Dosage des nucléotides par spectrophotométrie dans l'ultra-violet</u>	85

	Pages
2 - <u>RESULTATS</u>	85
3 - <u>CONCLUSION</u>	87
B - <u>DOSAGE SELON LE PROCEDE D'YCAS ET VINCENT : APPLICATION AUX</u> <u>"ARN-GUANIDINE" ET AUX "ARN-SCHMIDT ET THANNHAUSER"</u>	87
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	87
2 - <u>RESULTATS</u>	87
3 - <u>CONCLUSION</u>	
V - <u>RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES NUCLEOTIDES :</u> <u>APPLICATION AUX "ARN-GUANIDINE" ET</u> <u>AUX "ARN-SCHMIDT ET THANNHAUSER"</u>	89
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	89
B - <u>RESULTATS</u>	89
C - <u>CONCLUSIONS</u>	89
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">2° - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DEFINITIF</div>	91
I - <u>PREPARATION DES TISSUS</u>	91
II - <u>HYDROLYSE SODIQUE</u>	92
III - <u>PURIFICATION SUR RESINES A ECHANGE DE</u> <u>CATIONS</u>	93
IV - <u>SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES NUCLEOTIDES</u>	94
V - <u>DOSAGE DES NUCLEOTIDES</u>	94
A - <u>DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'ULTRA-VIOLET</u>	94
B - <u>DOSAGE SELON LE PROCEDE D'YCAS ET VINCENT</u>	95
VI - <u>RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES NUCLEOTIDES</u>	96
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">3° - RESULTATS STATISTIQUES</div>	97
I - <u>MODE OPERATOIRE</u>	97
II - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	98

	Pages
A - <u>COMPOSITION MOLAIRE CENTESIMALE EN NUCLEOTIDES</u>	98
B - <u>RAPPORTS D'ABSORBANCE DES NUCLEOTIDES</u>	98
4^e - APPLICATIONS	101
I - <u>COMPOSITION DES ARN DE DIFFERENTS TISSUS DE RAT</u>	101
II - <u>COMPOSITION DES ARN DE DIFFERENTES FRACTIONS CELLULAIRES</u>	103
A - <u>FOIE DE RAT</u>	103
B - <u>HEPATOME DE RAT</u>	103
ETUDE CRITIQUE SYSTEMATIQUE DES MILIEUX D'HOMOGENEISATION GENERALEMENT UTILISES DANS LE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE	108
I - <u>MODE OPERATOIRE</u>	109
A - <u>PREPARATION DES PARTICULES CYTOPLASMIQUES RADIOACTIVES</u>	109
B - <u>PROCEDE D'ETUDE DE LA DIFFUSION</u>	111
C - <u>MILIEUX D'HOMOGENEISATION ETUDIES</u>	112
II - <u>RESULTATS</u>	113
A - <u>LA DIFFUSION DES CONSTITUANTS PHOSPHORYLES DES NOYAUX VARIE DANS DE LARGES PROPORTIONS SUIVANT LA COMPOSITION DU MILIEU D'ISOLEMENT</u>	113
B - <u>QUELLE QUE SOIT LA COMPOSITION DES SOLUTIONS DE FRACTIONNEMENT QUE NOUS AVONS UTILISEES, NOUS AVONS OBSERVE UNE DIFFUSION DES CONSTITUANTS PHOSPHORYLES DES MITOCHONDRIES</u>	116
C - <u>L'EXPERIMENTATION DES "MICROSOMES" MET EN EVIDENCE LA GRANDE RESISTANCE DE CES PARTICULES</u>	118
III - <u>DISCUSSION</u>	118
IV - <u>CONCLUSION</u>	125

	Pages
ETUDE DES COMPOSES DIFFUSIBLES DES NOYAUX DE FOIE DE RAT	127
1° - MISE EN EVIDENCE D'ARN DE TYPE MESSEGER	127
I - <u>MISE EN EVIDENCE D'UNE DIFFUSION</u> <u>DES ARN NUCLEAIRES</u>	127
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	127
1 - <u>EXTRACTION DES COMPOSES NUCLEAIRES DIFFUSIBLES</u>	127
2 - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES</u>	128
3 - <u>ETUDE MORPHOLOGIQUE DES NOYAUX AVANT ET APRES DIFFUSION</u>	129
B - <u>RESULTATS</u>	129
C - <u>CONCLUSIONS</u>	130
II - <u>MISE EN EVIDENCE D'UNE DIFFUSION SELECTIVE</u> <u>DES ARN NUCLEAIRES</u>	135
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	135
B - <u>RESULTATS</u>	135
C - <u>CONCLUSIONS</u>	138
III - <u>MISE EN EVIDENCE D'ARN DE TYPE MESSEGER</u> <u>DANS LA FRACTION DIFFUSIBLE DES ARN DE</u> <u>FOIE DE RAT</u>	139
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	139
B - <u>RESULTATS</u>	140
C - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	141
2° - MISE EN EVIDENCE DE PARTICULES DE RNP TRANSPORTANT DES ARN DE TYPE MESSEGER	145
I - <u>ETUDE DES FRACTIONS RN₁ ET RN₂</u>	146

	Pages
A - <u>ISOLEMENT</u>	146
B - <u>PROPRIETES</u>	146
1 - <u>ANALYSE CHIMIQUE</u>	146
a - <u>Mode opératoire</u>	146
b - <u>Résultats</u>	146
2 - <u>COMPOSITION EN BASES ET RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES ARN</u>	150
a - <u>Mode opératoire</u>	150
b - <u>Résultats</u>	150
3 - <u>ETUDE MORPHOLOGIQUE</u>	152
a - <u>Techniques</u>	152
b - <u>Résultats</u>	152
C - <u>ORIGINE</u>	157
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	157
2 - <u>RESULTATS</u>	158
3 - <u>CONCLUSIONS ET DISCUSSION</u>	162
II - <u>ETUDE DES PARTICULES DE RNP DE LA</u> <u>FRACTION RN₂</u>	162
A - <u>ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	162
1 - <u>CENTRIFUGATION DE ZONE EN GRADIENT DE SACCHAROSE</u>	162
a - <u>Matériel et méthodes</u>	163
1) <u>Préparation du matériel</u>	163
2) <u>Centrifugation en gradient</u>	163
α) <u>Formation du gradient</u>	163
β) <u>Centrifugation</u>	163
γ) <u>Fractionnement et analyse du gradient</u>	163
b - <u>Résultats</u>	164
1) <u>Isolement en l'absence de magnésium</u>	164
2) <u>Isolement en présence de magnésium</u>	167
3) <u>Isolement en présence d'inhibiteur de la RNase</u>	167
4) <u>Action de l'actinomycine</u>	170
2 - <u>CENTRIFUGATION ANALYTIQUE</u>	174
a - <u>Matériel et méthodes</u>	174
1) <u>Préparation du matériel</u>	174
2) <u>Centrifugation</u>	174

	Pages
b - <u>Résultats et conclusion</u>	175
1) <u>Isolement en l'absence de magnésium</u>	175
2) <u>Isolement en présence de magnésium</u>	175
3 - <u>CENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE EN CHLORURE DE CESIUM</u>	175
a - <u>Matériel et méthodes</u>	177
1) <u>Préparation du matériel</u>	177
2) <u>Centrifugation en gradient</u>	177
α) <u>Formation et centrifugation du gradient</u>	177
β) <u>Fractionnement et analyse du gradient</u>	178
b - <u>Résultats</u>	178
1) <u>Isolement en l'absence de magnésium</u>	178
2) <u>Isolement en présence de magnésium</u>	178
c - <u>Conclusions</u>	178
4 - <u>ACTION DE DIFFERENTS FACTEURS</u>	181
a - <u>Action de la RNase pancréatique</u>	181
1) <u>Mode opératoire</u>	181
2) <u>Résultats</u>	181
3) <u>Conclusions</u>	184
b - <u>Action de la DNase</u>	184
1) <u>Mode opératoire</u>	184
2) <u>Résultats et conclusions</u>	184
c - <u>Action du DOC</u>	184
d - <u>Action de l'EDTA</u>	184
5 - <u>ETUDE DE L'ARN DES PARTICULES</u>	188
a - <u>Détermination de la composition en bases</u>	188
1) <u>Mode opératoire</u>	188
2) <u>Résultats et conclusion</u>	188
b - <u>Détermination du coefficient de sédimentation</u>	188
1) <u>Mode opératoire</u>	188
2) <u>Résultat</u>	190
B - <u>ETUDE MORPHOLOGIQUE</u>	190
1 - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	190
2 - <u>RESULTATS</u>	190
3 - <u>CONCLUSIONS ET DISCUSSION</u>	193

	Pages	
C - <u>ROLE BIOLOGIQUE - DISCUSSION</u>	193	
<table border="1"><tr><td style="text-align: center;">CONCLUSIONS</td></tr></table>	CONCLUSIONS	199
CONCLUSIONS		
<u>ANNEXE TECHNIQUE</u>	201	
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	206	

ABREVIATIONS UTILISEES

A	: Acide adénylique
$\overset{\circ}{\text{A}}$: Angström = 10^{-10} mètre
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomique
APG	: Acide phosphoglycérique
ATCA	: Acide trichloracétique
ATP	: Adénosine 5'-triphosphate
ATPase	: Adénosine 5'-triphosphatase
C	: Acide cytidylique
CPM	: coups par minute
d	: densité
dARN	: ARN dont la composition en bases est homologue de celle de l'ADN
DNase	: Désoxyribonucléase
D.O. _{260 nm}	: Densité optique à 260 nm
DOC	: Désoxycholate de sodium
dRNP	: Ribonucléoprotéine dont l'ARN est du dARN
E. coli	: Escherichia coli
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique
G	: Acide guanylique
Guanidine	: Aminométhanamidine : $\text{NH} = \text{C}(\text{NH}_2)_2$
InDP	: Inositol diphosphate
InMP	: Inositol monophosphate
mC	: 10^{-3} Curie
mn	: Minute
nm	: Nanomètre = 10^{-9} mètre
Pi	: Acide orthophosphorique (phosphore inorganique)
RNase	: Ribonucléase pancréatique
RNP	: Ribonucléoprotéine
rRNP	: Ribonucléoprotéine dont l'ARN est un ARNr
S	: Constante de sédimentation en unité SVEDBERG (10^{-13} seconde)

SDS : Dodecylsulfonate de sodium
t/mn : Tours par minute
Tris : 2-amino-2 (hydroxyméthyl) propane-1,3 diol
U : Acide uridylique
 μg : 10^{-6} gramme
U.V. : Lumière ultra-violette
 Ψ U. : Acide pseudo-uridylique

INTRODUCTION

Nos recherches s'inscrivent dans le cadre général des travaux qui sont entrepris à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille sur les relations entre les acides nucléiques et la cancérogénèse. On admet généralement, à l'heure actuelle, que la cancérisation est provoquée 1^o) soit par l'apparition dans les cellules d'acides nucléiques ou de ribonucléoprotéines anormales, de "monstres moléculaires" d'origine endogène (théorie mutationnaire) ou exogène (théorie virale), 2^o) soit par un dérèglement du métabolisme d'acides nucléiques "normaux" (théorie hormonale, par exemple).

Nos travaux ont été plus spécialement orientés vers la recherche des mécanismes de la régulation de la biosynthèse des acides nucléiques dans le noyau.

Au cours d'une étude critique des procédés de préparation des noyaux cellulaires que nous avons effectuée dès le début de nos recherches, nous avons découvert que certaines solutions dans lesquelles les tissus étaient homogénéisés provoquaient une diffusion, à partir des noyaux, de composés phosphorylés. Dans une seconde série de travaux, nous avons démontré que, parmi ces substances, se trouvaient des acides nucléiques "DNA-like" (dARN). Une troisième série de recherches, effectuées en collaboration avec J.P. KERCKAERT, nous a permis de montrer que ces dARN diffusibles étaient conjugués à des protéines et nous pensons qu'il s'agit de formes de transport d'ARN de type messenger.

Avant d'exposer nos travaux personnels, nous consacrerons un chapitre à la description des particules de RNP cellulaires actuellement connues.

Les résultats que nous avons obtenus et que nous décrivons dans le présent mémoire, ont fait l'objet des publications suivantes :

- 1 - W. DEFERT-KOBUS, E. SEGARD et J. MONTREUIL, Etude de la diffusion des composés phosphorylés des noyaux, des mitochondries et des microsomes dans diverses solutions utilisées pour le fractionnement cellulaire, Bull., Soc. Biol., 1965, 47, 2293
- 2 - W. DEFERT-KOBUS, E. SEGARD et J. MONTREUIL, Etude sur les acides ribonucléiques spontanément diffusibles des noyaux isolés des hépatocytes de Rat. Caractérisation des acides ribonucléiques messagers et de "ribosomes nucléaires", C.R. Acad. Sci., 1966, 263 D, 842
- 3 - W. DEFERT-KOBUS, J.P. KERCKAERT, E. SEGARD et J. MONTREUIL, Etudes sur les acides nucléiques spontanément diffusibles des noyaux isolés des hépatocytes de Rat. II - Caractérisation de deux types de particules sédimentables et mise en évidence de formes conjuguées d'ARN de type messenger, C.R. Acad. Sci., 1968, 266 D, 31
- 4 - E. PUVION, W. DEFERT-KOBUS, J.P. KERCKAERT, F. PUVION, E. SEGARD et J. MONTREUIL, Etudes sur les acides nucléiques spontanément diffusibles des noyaux de foie de Rat. III - Etude morphologique. Démonstration de l'origine nucléolaire des particules diffusibles, C.R. Acad. Sci., 1968, 266 D, 278
- 5 - V. KRSMANOVIC, J.P. KERCKAERT, W. DEFERT-KOBUS et J. MONTREUIL, Etudes par ultracentrifugation en gradient de densité des particules spontanément diffusibles des noyaux de foie de Rat, Arch. Intern. Physiol. Biochim., 1968, 76, 19
- 6 - E. PUVION, W. DEFERT-KOBUS, J.P. KERCKAERT, V. KRSMANOVIC et J. MONTREUIL, Etudes sur les acides nucléiques spontanément diffusibles des noyaux isolés des hépatocytes de Rat. Nouvelle étude morphologique et biochimique des particules diffusibles, C.R. Acad. Sci., 1969, 268 D, 1990
- 7 - J. MONTREUIL, W. DEFERT-KOBUS, J.P. KERCKAERT, E. PUVION, M.C. TIBERGHIEU et V. KRSMANOVIC, Etude physico-chimique, métabolique et morphologique des particules spontanément diffusibles des noyaux isolés du foie de Rat, Arch. Intern. Physiol. Biochim., 1969, 77, 571

GENERALITES

Les RNP cellulaires chez les Eucaryotes

Dans les cellules animales et, d'une manière générale, chez tous les Eucaryotes, la majorité des ARN sont synthétisés dans le noyau. Leur lieu d'activité, par contre, se situe essentiellement dans le cytoplasme où s'effectuent les synthèses protéiques. Cette séparation entre le lieu de synthèse des ARN et le lieu de leur activité pose un problème qui n'existe pas chez les Bactéries.

Une seconde différence d'avec ces dernières est liée au fait que les ARN de type messenger des Eucaryotes, dès leur synthèse, sont associés à des protéines qui, en les protégeant des enzymes, permettent leur transport du noyau vers le cytoplasme. Ceci peut expliquer l'existence, dans la cellule, d'un grand nombre de ribonucléoprotéines (ou RNP) c'est-à-dire de complexes ARN-protéines de taille suffisamment grande pour former des particules. Selon la nature de l'ARN qu'elles contiennent, il existe deux catégories de particules de RNP : les rRNP dont l'ARN est de type ribosomal (ARNr) et les dRNP dont l'ARN est de type messenger (dARN).

Nous avons dressé dans un premier chapitre l'inventaire de toutes les formes de particules de RNP trouvées jusqu'à présent dans la cellule. Nous avons réservé plus spécialement le second chapitre aux dRNP cellulaires qui jouent un rôle important dans le transport de l'information génétique.

1^o - LES RNP CELLULAIRES

Nous les avons classées suivant leur localisation dans la cellule en RNP nucléaires et en RNP cytoplasmiques.

I - LES PARTICULES DE RNP NUCLEAIRES

A - LES PARTICULES DE RNP NUCLEOLAIRES

1 - IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE

a) Morphologie du nucléole

Le nucléole de la cellule hépatique que nous avons prise pour exemple (Fig. 1 ; p. 4), se présente comme un organite d'environ 1 μ

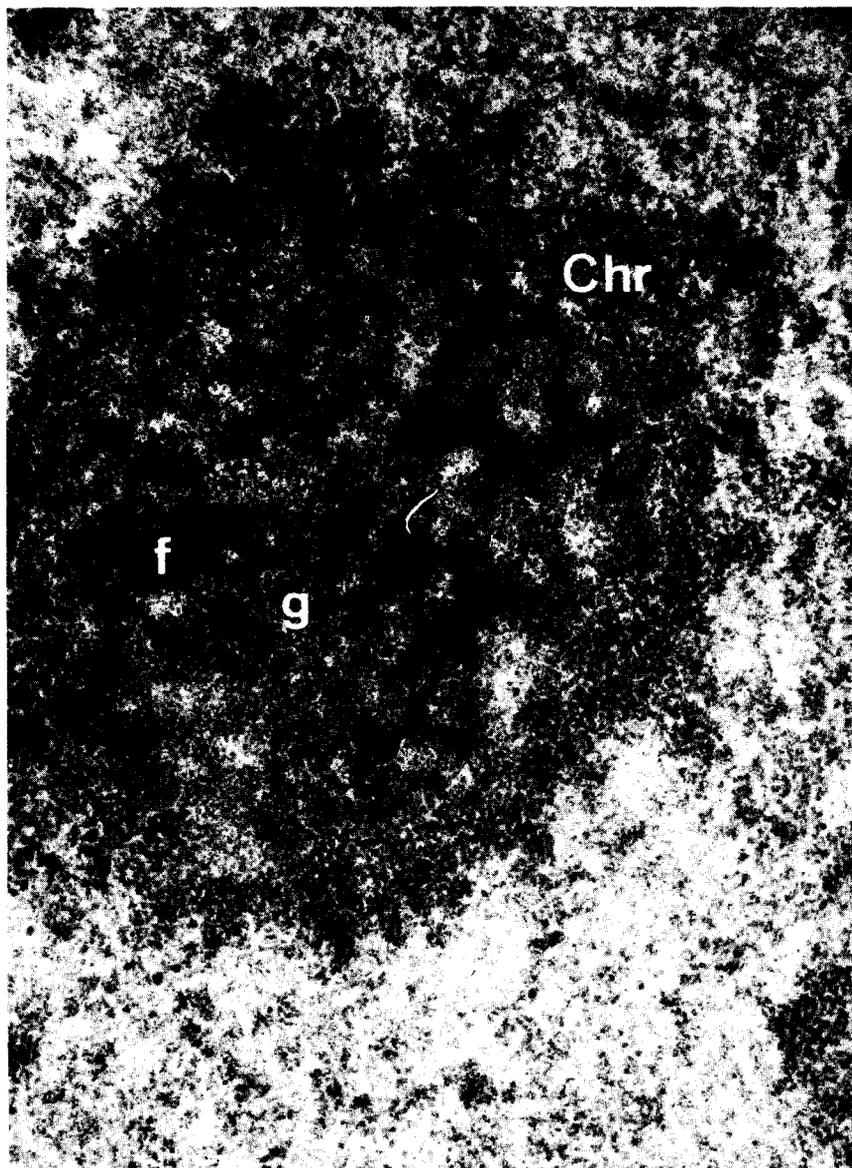


Figure 1

Nucléole de cellule hépatique de Rat (d'après E. PUVION). Double fixation par la glutaraldéhyde et l'acide osmique ; inclusion dans l'Epon ; coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Chr, chromatine périnucléolaire ; f, réseau fibrillaire ; g, granules. x 40 000.



de diamètre constitué d'une couche périphérique de chromatine peu épaisse (la chromatine périnucléolaire) et d'un centre nucléolaire dans lequel deux constituants principaux ont été décrits :

- Une portion filamenteuse de 90 à 180 nm de largeur correspondant au nucléolonéma décrit en microscopie optique (ESTABLE et SOTELO) (1).

- Une portion homogène : la pars amorpha incluse dans les mailles du réseau constitué par le nucléolonéma.

En outre, des études cytochimiques ultrastructurales ont montré, à l'intérieur du corps nucléolaire, la présence de travées chromatiniennes issues de la chromatine périnucléolaire (GRANBOULAN et GRANBOULAN) (2).

b) Particules de RNP nucléolaires

Les études cytochimiques ultrastructurales ont montré, d'une part, que le nucléolonéma était constitué d'un réseau de fines fibrilles réparties en paquets compacts et de granules possédant l'aspect de ribosomes (Fig. 1 ; p. 4) et, d'autre part, que fibrilles et granules sont de nature ribonucléoprotéique (MARINOZZI) (3).

1) Les fibrilles ont une longueur moyenne de 300 à 400 Å et un diamètre d'environ 50 Å.

2) Les granules ont un diamètre moyen de 150 à 200 Å ; ils sont plus ou moins nombreux et répartis uniformément contre les mailles du réseau fibrillaire. A fort grossissement et dans certaines conditions de coloration, les granules se montrent constitués de fibrilles enroulées identiques à celles du réseau. D'ailleurs, des études cinétiques effectuées par autoradiographie ultrastructurale, -marquages brefs par des précurseurs tritiés de l'ARN en présence ou non de faibles doses d'actinomycine D- ont permis de démontrer que les granules dérivait des fibrilles (GEUSKENS et BERNHARD) (4).

Bien que la preuve n'en soit pas encore bien établie, les granules de RNP nucléolaires sont considérés comme des précurseurs des ribosomes (BERNHARD) (5).

2 - IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

De manière à étudier, sur le plan biochimique, les particules de RNP précédemment mises en évidence in situ et pour déterminer le rôle précis du nucléole dans le processus de formation des sous-unités ribosomales, des tentatives d'extraction, à partir de fractions nucléolaires isolées, ont été récemment entreprises.

Essentiellement quatre séries de travaux ont été effectués :

1) WARNER et SOEIRO (6), en 1967, ont isolé des "particules ribosomales naissantes" à partir de nucléoles isolés de cellules HeLa S 3.

- Les nucléoles furent incubés dans un tampon Tris 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,01 M, EDTA 0,01 M contenant du dithiothréitol 0,01 M ; les particules extraites du surnageant de diffusion furent analysées par centrifugation en gradient de saccharose.

- L'examen du profil de sédimentation révèle la présence de deux classes bien distinctes de particules qui sont des RNP 55 S et 80 S.

Les ARN de ces particules ont été extraits par le dodécylsulfonate de sodium (SDS) en présence d'EDTA ; leur analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide montre que les particules 80 S possèdent essentiellement un ARN 45 S et un peu d'ARN 32 S, tandis que les particules 55 S contiennent un ARN 32 S et de l'ARN 5 S.

Les protéines des particules 55 S, étudiées également sur gel de polyacrylamide, se révèlent de composition analogue à celle des protéines de la particule cytoplasmique 50 S.

- L'analyse des composants ARN et protéines permet aux auteurs de suggérer que la particule RNP 55 S est un précurseur de la particule cytoplasmique 50 S, d'autant plus que ces deux types de particules contiennent un ARN 5 S.

Puisque l'ARN 45 S est un précurseur de l'ARN 32 S, les auteurs suggèrent, en outre, que la particule 80 S, -qui contient l'ARN 45 S-, serait elle-même un précurseur de la particule 55 S, -qui contient l'ARN 32 S.

2) IZAWA et KAWASHIMA (7, 8), en 1968 puis en 1969, ont démontré l'existence, dans les nucléoles de cellules de tumeurs d'ascites de Souris, de particules présentant quelques ressemblances avec les ribosomes cytoplasmiques.

- Les nucléoles ont été incubés dans le tampon Tris HCl 0,02 M, pH 7,5, KCl 0,02 M, MgCl₂ 0,002 M contenant de la désoxyribonucléase (DNase) et ensuite lysés par la double action d'un polyanion (polyéthylène sulfonate de sodium à 0,15 p. 100) et d'un détergent anionique (désoxycholate de sodium à 1 p. 100). Les particules de RNP du lysat furent identifiées par centrifugation en gradient de saccharose.

- Certaines des propriétés de ces particules ont été déterminées, par lesquelles nous pouvons citer :

(1) Le coefficient de sédimentation qui est de 80 S.

(2) La composition en bases des ARN : les rapports

$\frac{G + C}{A + U}$ (*) déterminés par spectrophotométrie dans l'ultra-violet d'une part, et selon la méthode d'YCAS et VINCENT (9) d'autre part, sont, dans les deux cas, égaux à 1,8 et voisins de celui des ARN ribosomiaux qui est de l'ordre de 1,7.

(3) La densité relative en chlorure de césium (CsCl) : La zone 80 S se décompose sur gradient de CsCl en trois composants ayant des densités différentes et égales à 1,50, 1,45 et 1,41. Dans les mêmes conditions, les ribosomes ne s'équilibrent qu'à une seule densité égale à 1,56.

Notons, en outre, que ces particules, contrairement aux ribosomes, sont sensibles à de très faibles concentrations de ribonucléase pancréatique (RNase) -0,6 µg/ml- et qu'elles contiennent, comme les ribosomes, des protéines basiques.

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

- Les auteurs suggèrent que les particules de RNP nucléolaires sont des intermédiaires de la formation des ribosomes et qu'elles finissent leur évolution dans la partie extranucléolaire du noyau ou dans le cytoplasme, par élimination de quelques protéines.

3) SHANKAR NARAJAN et BIRNSTIEL (10) en 1969, ont isolé des particules de RNP à partir de nucléoles isolés de foie de Rat.

- Le lysat nucléolaire a été obtenu en deux temps : les nucléoles furent incubés d'abord dans un tampon Tris 0,01 M - pH 7,4, NaCl 0,01 M, EDTA 0,01 M contenant du dithioérythreitol ; puis, le sédiment recueilli par centrifugation, est resuspendu dans le même tampon auquel on a ajouté du désoxycholate de sodium (DOC) et du Brij 58, chacun à une concentration finale de 0,5 p. 100. Les particules de RNP du lysat nucléolaire ont été analysées par centrifugation en gradient de saccharose.

- L'analyse du gradient montre que les particules de RNP sédimentent sous forme d'un pic étalé dans la zone comprise entre 55 et 80 S et dont le maximum se situe à 60 S (il convient de signaler que ces valeurs ont été obtenues en présence d'EDTA). L'ARN extrait de la zone 60 S possède un coefficient de sédimentation 30-32 S.

- Observée au microscope électronique, la zone 60 S apparaît constituée de particules de forme plus ou moins sphérique, d'aspect poreux et apparemment composées de fibrilles. Leur longueur se situe entre 230 et 300 Å et leur largeur varie de 150 à 220 Å.

Par leur structure fibrillaire, elles ressemblent aux particules 50 S cytoplasmiques mais elles sont plus grandes que ces dernières.

Leur morphologie est d'ailleurs très semblable à celle des granules observés dans le nucléole in situ.

- Etant données la valeur du coefficient de sédimentation de leur ARN et les similitudes morphologiques qu'elles présentent vis-à-vis des sous-unités cytoplasmiques 60 S d'une part, et des granules nucléolaires identifiés in situ d'autre part, ces particules de RNP semblent bien être des précurseurs des sous-unités ribosomales.

Le mode de sédimentation de l'ensemble des particules sous la forme d'une large bande, peut aussi rendre compte de l'existence de différentes classes de particules représentant des stades différents de la formation des ribosomes.

4) Enfin, LIAU et PERRY (11, 12), en 1968 puis récemment en 1969, ont mis en évidence, à partir de nucléoles isolés de cellules L, l'existence de plusieurs types de particules de RNP.

- L'extraction a été effectuée en deux temps : les nucléoles furent d'abord resuspendus dans un tampon d'acétate de sodium 0,01 M - pH 7,6, saccharose 0,25 M, $MgCl_2$ 2 mM, KCl 0,01 M contenant du polyvinylsulfate de sodium à raison de 40 $\mu g/ml$; puis, après centrifugation, le sédiment gélatineux obtenu fut remis en suspension dans un tampon Tris HCl 0,01 M - pH 7,4, KCl 0,01 M, $MgCl_2$ 0,5 mM contenant du dithiothreitol 0,02 M. Les RNP extraites de cette manière furent analysées par centrifugation en gradient de saccharose et leurs ARN étudiés par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

- Les propriétés physico-chimiques de ces particules ont été résumées dans le tableau I (p. 10).

Ajoutons que des études cinétiques de marquages suivis de "chasses" (*) en présence d'actinomycine D, ont permis de démontrer que les RNP 110 S sont synthétisées en premier, puis les 78 S et enfin les 62 S.

- Les auteurs ont mis ainsi en évidence, dans le nucléole, l'existence de trois types de particules de RNP qui dérivent les unes des autres dans le sens 110 S \longrightarrow 78 S \longrightarrow 62 S ; le composant 62 S représente donc clairement le stade le plus évolué ; en outre, ses

(*) Technique qui consiste à ajouter, à la suite d'un précurseur marqué, le même précurseur mais "froid" et en plus grande quantité, de manière à stopper l'incorporation du marqueur. L'actinomycine D ne sert, dans ce cas précis, qu'à bloquer toute nouvelle synthèse au niveau du nucléole. Ce procédé permet de suivre l'évolution métabolique d'un composé nouvellement synthétisé.

TABLEAU I

Propriétés physico-chimiques des particules de RNP obtenues à partir de nucléoles isolés de cellules L, comparées à celles des sous-unités ribosomales du cytoplasme.

	Coefficient de sédimentation (S _{20,w}) : + EDTA	Coefficient de sédimentation (S _{20,w}) de l'ARN	d CsCl	Pourcentage en protéines	Rapport $\frac{\text{ARN}}{\text{protéines}}$
Particules de RNP nucléolaires (LIAU et PERRY) (13)	110 78 62	45, 41, 36 et 32 36 et 32 32 et 28	1,46 1,49 1,54	57,0 53,0 44,2	0,75 0,88 1,26
Sous-unités ribosomales cytoplasmiques	60 40	28 18	1,57 1,49	43,4 58,3	1,30 0,71
				Natives : Matures	Natives : Matures
				40,4	1,47
				53,0	0,88



propriétés chimiques sont presque identiques à celles des sous-unités ribosomales "natives" 60 S (voir tableau I ; p. 10).

Tout porte à croire que les trois types de particules de RNP trouvées dans le nucléole représentent des stades successifs de précurseurs ribosomaux.

La synthèse des travaux effectués sur les RNP nucléolaires donne lieu aux commentaires suivants :

(1) Les coefficients de sédimentation des particules de RNP, donnés par les différents auteurs, sont finalement très similaires puisqu'ils se situent à l'intérieur d'une zone allant de 62 S à 110 S, soit de 55 S à 80 S en présence d'EDTA.

(2) La composition en bases des ARN révèle un rapport $\frac{G + C}{A + U}$ de type ribosomal.

(3) Les composants en ARN (45 S, 41 S, 36 S, 32 S et 28 S) sont essentiellement identiques à ceux des précurseurs ribosomaux déterminés par extraction directe dans des études cinétiques de "chasse" en présence d'actinomycine D (DARNELL (14) ; PERRY et al. (15)).

(4) Enfin, le rapport ARN/Protéines est nettement de type ribosomal ; en outre, il augmente de manière continue pendant que la taille des particules décroît ; il semble, par conséquent, que la réduction en taille des ARN s'accompagne d'une perte proportionnellement plus élevée en protéines.

Nous pouvons conclure de l'étude des particules de RNP nucléolaires elles-mêmes, que le nucléole est bien le siège de la biosynthèse des précurseurs des sous-unités ribosomales. Les différentes particules rencontrées représenteraient des stades différents de la formation des précurseurs ribosomaux. Un seul point, dans ces études, reste obscur : aucun auteur n'a décelé la présence, dans le nucléole, du précurseur de la petite sous-unité ribosomale contenant l'ARN 18 S ; il est fort probable que cette particule quitte le nucléole à un stade précoce du processus de formation des ribosomes. Ceci est en accord avec l'apparition rapide de particules portant de l'ARN 18 S dans le cytoplasme (PERRY (16) ; GIRARD, LATHAM, PENMAN et DARNELL (17)).

B - LES PARTICULES DE RNP NUCLEOPLASMIQUES

1 - IDENTIFICATION "IN SITU" PAR DES METHODES MORPHOLOGIQUES

Trois types de particules ont été identifiées jusqu'à présent ; ce sont :

a - Les grains interchromatiniens (GRANBOULAN et BERNHARD) (18)

Ce sont des granules d'un diamètre moyen de 200 à 250 Å qui sont répartis en groupes (Fig. 2 a et b ; p. 13). Ces granules sont reliés par des fibrilles minces et les forts grossissements leur donnent une allure de chaînettes à disposition lâche. Cet aspect n'est en rien comparable à celui des polysomes cytoplasmiques. Les travaux cytochimiques ultrastructuraux ont montré qu'ils sont de nature ribonucléoprotéique et très résistants à la digestion par la RNase (WATSON) (19).

MONNERON et MOULÉ (20) ont tenté d'identifier ces grains interchromatiniens aux particules 40 S isolées selon des méthodes biochimiques, par MOULÉ et CHAUVEAU, à partir de noyaux de foie de Rat (voir chapitre 2^e - Les dRNP cellulaires ; p. 56). Des études morphologiques ont été effectuées sur ces particules 40 S et comparées aux études faites sur les grains interchromatiniens. Les particules 40 S ont un diamètre de 200 à 300 Å ; elles ne sont pas reliées entre elles par des filaments ; néanmoins, comme les grains interchromatiniens, elles résistent à l'action de la RNase seule mais elles sont sensibles aux actions successives de la pronase et de la RNase. Morphologiquement, cette sensibilité s'exprime par une diminution de taille. Ces constatations ont permis aux auteurs de suggérer que les particules de RNP 40 S pourraient correspondre aux grains interchromatiniens.

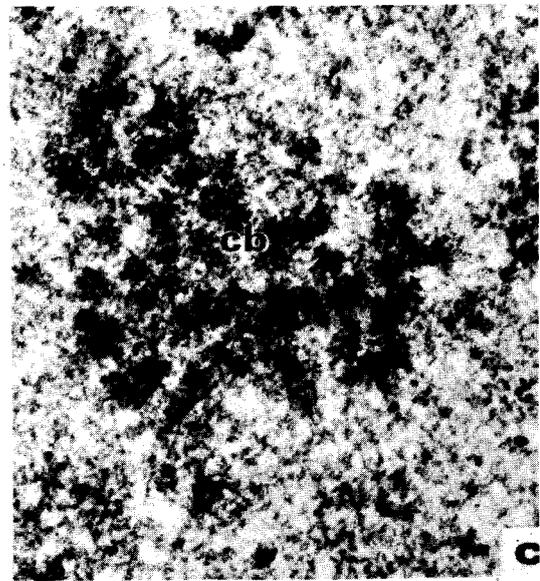
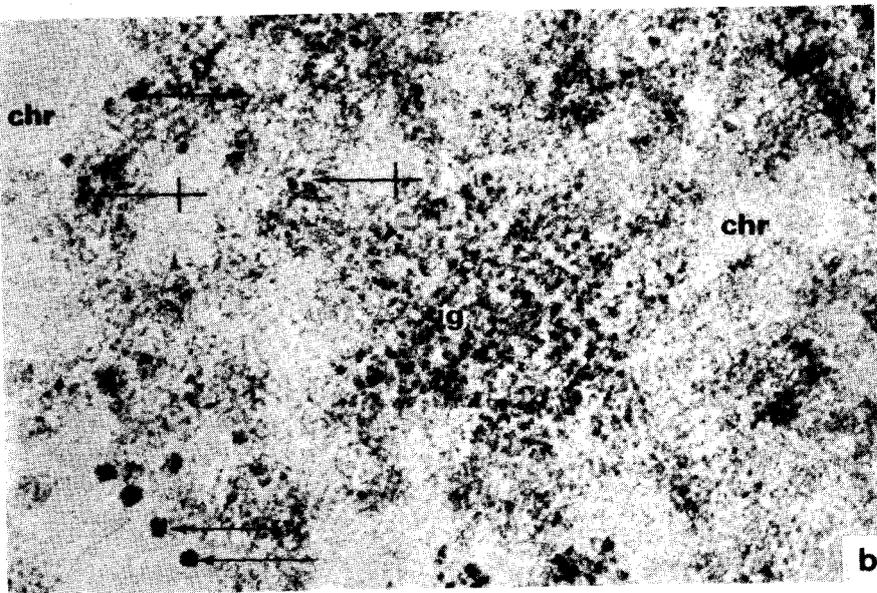
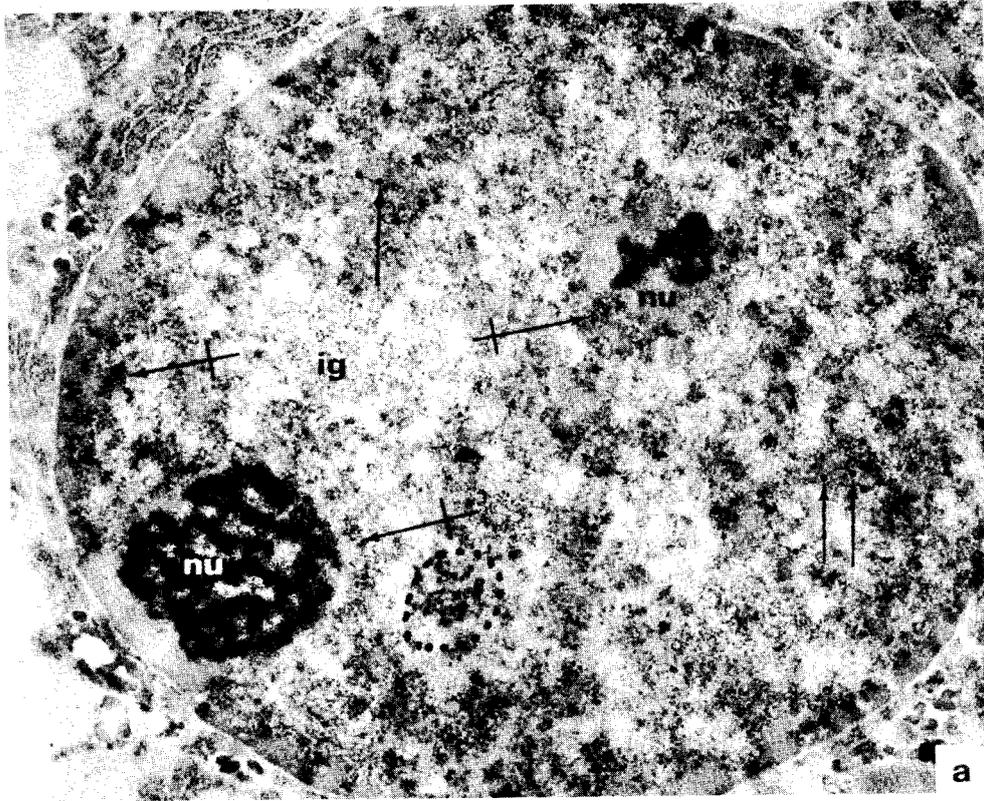
b - Les grains périchromatiniens (WATSON) (21)

Les grains périchromatiniens sont moins nombreux que les grains interchromatiniens (Fig. 2 a et b ; p. 13). Ils ont un diamètre de 400 à 450 Å ; ils apparaissent, en coupe, entourés d'une couronne plus claire d'environ 250 Å d'épaisseur. On les rencontre en périphérie des amas chromatiniens. Les études cytochimiques ultrastructurales les montrent très résistants à la digestion par la RNase, par la DNase et à la combinaison des deux. Mais l'action combinée de la pronase et de la RNase affaiblit

Figure 2

- a) Noyau d'hépatocyte de Rat montrant la répartition de différentes particules de RNP du nucléoplasme. Fixation à la glutaraldéhyde ; inclusion dans l'Epon ; coloration par la méthode à l'EDTA. nu, nucléole ; ig, grains interchromatiniens ; \rightarrow , grains périchromatiniens ; \dashrightarrow , fibrilles périchromatiniennes ; - - - -, "coiled bodies". x 20 000.
- b) Aspect typique d'un groupe de grains interchromatiniens. Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration identiques à celles de a) x 47 000.
- c) "Coiled bodies" (cb). Double fixation : glutaraldéhyde et acide osmique ; inclusion dans l'Epon ; double coloration : acétate d'uranyle et citrate de plomb. x 90 000

(d'après MONNERON et BERNHARD (22)).



leur contraste. L'ensemble de ces constatations a permis de les considérer comme des ribonucléoprotéines (WATSON) (23).

Jusqu'à présent, aucune corrélation n'a été faite entre ces grains périchromatiniens et les particules de RNP identifiées biochimiquement.

c - Les fibrilles périchromatiniennes et les "Coiled Bodies"

Ces deux classes de RNP ont été décrites récemment par MONNERON et BERNHARD (24) grâce à la mise au point d'une technique de coloration préférentielle des RNP (BERNHARD) (25).

(1) Les fibrilles périchromatiniennes

Ce sont des fibrilles situées contre la chromatine et dont le diamètre est de l'ordre de 30 à 50 Å (Fig. 2 b ; p. 13). Ces fibrilles peuvent se présenter irrégulièrement enroulées. Il est parfois possible de distinguer une continuité structurale entre ces fibrilles et les grains interchromatiniens.

(2) Les "Coiled Bodies"

Toujours au moyen de la même technique de coloration, il a été possible de mettre en évidence des agrégats plus ou moins sphériques constitués de filaments enroulés d'un diamètre de 400 à 600 Å (Fig. 2 a et c ; p. 13). Ces agrégats sont très rarement rencontrés. Leur signification, jusqu'à présent, est totalement inconnue.

2 - IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

Les particules identifiées par des méthodes biochimiques peuvent se subdiviser en deux catégories selon la nature de leur ARN.

a - Les particules de rRNP

Ce sont essentiellement les particules précurseurs des sous-unités ribosomales que l'on trouve en transit dans le nucléoplasme.

La quantité de sous-unités qui existent dans le noyau en dehors du nucléole est très petite ; il est donc fort probable

que lorsque les sous-unités nouvellement formées quittent le nucléole, elles ne passent que très peu de temps dans le nucléoplasme (PERRY) (26). Néanmoins, VAUGHAN, WARNER et DARNELL (27) ont montré qu'il était possible d'isoler à partir de la fraction "surnageant nucléaire" de noyaux de cellules HeLa, une classe spéciale de particules de RNP identiques aux sous-unités ribosomales cytoplasmiques.

- Les noyaux furent fractionnés selon la méthode de PENMAN et al. (28). Ils furent lysés dans un tampon de haute force ionique (Tris 0,01 M - pH 7,4, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 0,05 M) contenant de la DNase ; la suspension obtenue fut centrifugée pour donner un sédiment de nucléoles ainsi que la fraction "surnageant nucléaire" contenant les particules de RNP. Celles-ci furent identifiées par sédimentation en gradient de saccharose, de même que leur ARN.

- L'analyse des profils de sédimentation révèle, d'une part, un composé 50 S contenant un ARN 28 S et, d'autre part, un second composé 30 S contenant un ARN 18 S. Les coefficients de sédimentation ont été déterminés par rapport à ceux des sous-unités ribosomales cytoplasmiques isolées dans les mêmes conditions de force ionique.

Les ARN 28 S et 18 S de ces particules ont le même contenu élevé en cytosine et guanine que leurs homologues cytoplasmiques.

Dans des expériences de marquages brefs, on peut voir que la presque totalité de la radioactivité est retrouvée dans les particules nucléaires et que l'activité spécifique de ces dernières est de 20 fois supérieure à celles d'origine cytoplasmique. En outre, des études cinétiques du marquage à l'uridine ¹⁴C suivi de "chasses" prouvent que les ARN des sous-unités nucléaires sont les précurseurs des sous-unités cytoplasmiques.

- L'ensemble de ces résultats tend à prouver qu'il est possible d'isoler à partir de la fraction nucléoplasmique des particules de RNP qui sont les précurseurs des sous-unités cytoplasmiques.

b - Les particules de dRNP

Jusqu'à présent une douzaine de particules de ce type ont été identifiées. Certaines d'entre elles sont très connues et nous ne ferons que les citer ; étant donnée leur importance, elles seront étudiées plus en détail dans le chapitre suivant. Quant aux autres, nous allons en faire rapidement l'inventaire et étudier, pour chacune d'elles :

- Leur mode d'extraction et d'analyse.
- Leurs propriétés physico-chimiques que nous présenterons, pour les mieux connues, sous la forme d'un tableau récapitulatif (Tableau II ; p. 22).
- Leur morphologie, éventuellement.
- Leur rôle biologique.

1) WANG (29), en 1963, a obtenu à partir de noyaux de thymus, une classe de particules de RNP différente de celle qu'on appelait à l'époque les "ribosomes nucléaires".

- Il obtint ces particules à partir de la "fraction protéique résiduelle" de MIRSKY et RIS (30) qui était considérée comme essentielle à l'intégrité morphologique des chromosomes. C'est cette fraction qui, traitée par la DNase et le DOC, donne, après ultracentrifugation, un sédiment constitué essentiellement de RNP .

- Les précurseurs marqués sont très rapidement incorporés à la fois dans les ARN et les protéines de ces particules. Ces dernières sont relativement instables, surtout après digestion à la DNase et semblent être constituées par un complexe : lipides - ADN - ARN - protéines.

- Dispersées dans des solutions aqueuses et examinées au microscope électronique, elles apparaissent sous forme de particules plus ou moins sphériques.

- Les auteurs émettent l'hypothèse que ces particules et l'ARN messager, que l'on peut également préparer à partir de cette même "fraction protéique nucléaire résiduelle", puissent être étroitement associés physiquement et fonctionnellement.

2) MORIYAMA et al. (31), en 1963, ont isolé une substance ribonucléoprotéique, à partir de noyaux de Rats porteurs d'hépatomes ascitiques (AH 130).

- Les noyaux ont été détruits par sonnage ; les produits obtenus ont été analysés par ultracentrifugation en gradient discontinu de saccharose puis par chromatographie sur DEAE cellulose.

- Un composé dont la radioactivité est très élevée et qui possède un maximum d'absorption à 260 nm a été mis en évidence. Les auteurs pensent qu'ils ont isolé un ARN et plus probablement une nucléoprotéine car l'action du phénol à chaud fournit un ARN dans la couche aqueuse et des protéines dans la couche intermédiaire.

- Les auteurs ont démontré, en outre, qu'il s'agit de RNP qui migrent du noyau vers le cytoplasme et qui stimulent l'incorporation d'acides aminés dans les systèmes acellulaires de synthèses protéiques.

3) SAMARINA et al. (32), en 1965, ont isolé, à partir de noyaux de foie de Rat, des particules de RNP auxquelles ils ont donné par la suite, le nom d'"informofères". Les études effectuées sur ces particules sont d'une importance telle qu'elles seront exposées dans le chapitre réservé aux dRNP cellulaires (voir p. 47).

4) MOULE et CHAUVEAU (33), en 1966, ont isolé également, à partir de foie de Rat, des particules nucléaires contenant un ARN rapidement marqué (voir chapitre : 2^o - Les dRNP cellulaires : p. 56).

5) SADOWSKI et HOWDEN (34), en 1968, ont mis en évidence à partir de noyaux de foie de Rat lavés au Triton, une fraction de RNP contenant à la fois des "polysomes intranucléaires" et des "ribosomes intranucléaires" dont les auteurs pensent qu'ils ne seraient qu'une forme dégradée des "polysomes intranucléaires".

- L'extraction de la fraction de RNP a été obtenue par lyse des noyaux en présence de DOC et de la DNase ; du suc cellulaire de

foie de Rat a été ajouté comme inhibiteur de la RNase. Les particules du lysat ont été analysées dans un gradient linéaire de saccharose.

- Peu de caractères physico-chimiques ont été déterminés (voir tableau II ; p. 22). Les auteurs signalent que ces "polysomes intranucléaires" sont distincts des polysomes cytoplasmiques par leur radioactivité plus élevée et par une activité moins intense dans les synthèses protéiques in vivo.

- Observés au microscope électronique, les "ribosomes intranucléaires" apparaissent sous forme de particules d'environ 200 Å de diamètre. On observe, en outre, des fibrilles de 40 à 100 Å de diamètre qui semblent quelquefois saillir des particules. Les "polysomes intranucléaires" ont aussi été observés sous la forme de chaînes ouvertes ou en grappes.

- Les auteurs émettent l'hypothèse que ces "polysomes intranucléaires" pourraient représenter le stade initial d'une population de polyribosomes du noyau qui joueraient un rôle dans le transport intracellulaire des ARN.

6) KÖHLER et ARENDS (35, 36), ont mis en évidence, à partir de noyaux lavés de cellules KB mis en suspension dans la solution de SAMARINA et al. (37) (*), des particules de RNP qu'ils identifient par centrifugation en gradient de saccharose.

- Les caractères physico-chimiques de ces particules sont résumées dans le tableau II (p.22).

- Les auteurs pensent que ces particules de RNP transportent, du noyau vers le cytoplasme, des ARN rapidement marqués différents des ARN ribosomiaux ; elles seraient les précurseurs des particules 45 S extraites, par différents auteurs, de la fraction post-microsomale du cytoplasme (voir le paragraphe B - Les particules de dRNP ; p. 28)

7) PARSONS et Mc CARTY (38), en 1968, ont isolé à partir du nucléoplasme de foie de Rat un complexe ARN messenger-protéines.

(*) Tris 0,01 M - pH 7,8, NaCl 0,14 M, MgCl₂ 1 mM.

- L'extraction fut effectuée de la manière suivante : les noyaux purifiés furent soumis à l'action du sonnage ; après élimination, par centrifugation différentielle, du résidu nucléaire contenant les nucléoles et les membranes, les particules de RNP du surnageant furent identifiées par centrifugation en gradient de saccharose.

- Les caractères physico-chimiques des particules obtenues sont présentées dans le tableau II (p. 22).

Notons, en outre, que soumises à des concentrations salines élevées (NaCl 0,1 M, acétate de sodium 10 mM, pH 5,1), les particules 45 S nucléaires, contrairement aux particules ribosomales cytoplasmiques 45 S, se dissocient complètement ; leur structure ne ressemble donc pas à celle des ribosomes. D'autre part, les protéines de ces RNP 45 S nucléaires, identifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide, sont nettement différentes des protéines ribosomales.

- Selon les auteurs, les protéines des particules 45 S joueraient un rôle dans le transport du noyau vers le cytoplasme et, éventuellement, exerceraient un rôle de régulation au cours de ce transport.

8) ISHIKAWA, KURODA et OGATA (39), en 1969, ont isolé à partir de noyaux de foies de Rat des particules de RNP contenant un ARN rapidement marqué (voir chapitre : 2^e - Les dRNP cellulaires ; p. 60).

9) CARTOUZOU, POIREE et LISSITZKY (40), en 1969, ont isolé à partir de noyaux purifiés de la glande thyroïde de Mouton, des complexes d'ARN rapidement marqués et de protéines.

- Les particules nucléaires furent obtenues selon la technique de SAMARINA et al. (41), à partir de noyaux purifiés par la méthode de CHAUVEAU et al. (42). Trois extractions successives ont été effectuées par incubation des noyaux, sous agitation, dans un tampon Tris HCl 10 mM, pH 7 ou 8 contenant NaCl 140 mM, MgCl₂ 1 mM et en présence d'inhibiteur de la RNase. Les extraits nucléaires furent analysés par centrifugation en gradient linéaire de saccharose.

- Les propriétés physico-chimiques des particules de RNP ainsi identifiées ont été résumées dans le tableau II (p. 22).

Ajoutons que ces particules de RNP sont très sensibles au D.O.C. à concentration finale de 1 p. 100 ; les particules sédimentant de façon hétérogène sont, en effet, transformées en une classe unique de matériel sédimentant à 15 S mais dont la densité en gradient de CsCl reste la même.

Ces particules sont également sensibles à la trypsine qui provoque une augmentation de matériel dans les zones de densité plus élevée ; de faibles doses de RNase produisent l'effet inverse.

- Les particules extraites des noyaux sont très similaires, par leur richesse relative en protéines, à celles que les auteurs ont extraites, d'autre part, du cytoplasme. En conséquence, l'hypothèse fut émise que ces complexes nucléaires contenant du dARN, puissent participer au transport du dARN informationnel du noyau vers le cytoplasme.

10) FAIFERMAN et al. (43), au début de 1970, ont isolé des particules de RNP à partir du nucléoplasme de foie de Rat.

- Le nucléoplasme est obtenu par rupture de noyaux mis à incuber dans le milieu Tris HCl 10 mM - pH 7,6, MgCl₂ 4 mM, sucrose 0,25 M, en présence parfois d'inhibiteur de la RNase, puis soumis à la "French press" ; les particules ainsi obtenues (*) ont été analysées par centrifugation en gradient de densité de saccharose.

- Les propriétés physico-chimiques des particules de RNP 60 S sont reportées dans le tableau II (p. 22).

- En tenant compte de la composition en bases de leur ARN qui est nettement de type dARN et des résultats d'expériences d'hybridations compétitives, les auteurs pensent que leurs particules 60 S pourraient être impliquées dans le transport des ARN messagers du noyau vers le cytoplasme.

(*) Trois types de particules de RNP ont été obtenues : 60 S, 80 S et 110-120 S. Nous ne nous intéresserons ici qu'aux particules 60 S qui, seules, semblent être de nature dRNP.

11) Très récemment, STEVENIN et al. (44) ont mis en évidence, à partir de noyaux purifiés de cerveau de Rat, des particules 80 à 300 S contenant des dARN géants.

- Les noyaux ont été mis en suspension et lysés dans une solution de Tris HCl 10 mM - pH 7,8, KCl 25 mM, MgCl₂ 2,5 mM, NaCl 0,1 M, en présence de 0,2 p. 100 de DOC et d'inhibiteur de la RNase. Les particules de l'extrait nucléaire ainsi obtenu, ont été analysées par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

- Les propriétés physico-chimiques des particules sont résumées dans le tableau II (p. 22).

Ajoutons quelques données en ce qui concerne l'action de la RNase sur les particules préparées alors en l'absence d'inhibiteur de la RNase :

. A force ionique élevée (dans la solution d'extraction, sans inhibiteur) il se produit, un léger déplacement des particules de RNP vers les zones de sédimentation plus faibles mais le profil reste hétérogène ; quant à l'ARN des particules ainsi traitées, il est dégradé et ne sédimente plus que dans la zone 5 - 9 S.

. A plus faible force ionique (le NaCl est supprimé de la solution d'extraction et le MgCl₂ est 1 mM), des particules de RNP 40 à 50 S sont alors obtenues ; elles contiennent également un ARN sédimentant à 5 - 9 S.

- Selon les auteurs, ces particules géantes 8 à 300 S correspondraient à un assemblage, au niveau des chromosomes, de dARN géant néosynthétisé (dARN polycistronique) et de protéines. Ces particules se transformeraient, par action d'une RNase spécifique, en monoparticules avant de passer dans le cytoplasme.

Cette multitude de particules dRNP isolées du noyau et le plus souvent du nucléoplasme de différentes cellules animales semblent, à première vue, être différentes les unes des autres. En fait, si l'on consulte le tableau récapitulatif (Tableau II ; p. 22), on constate entre elles l'existence de nombreux points communs ; Citons, pour exemples,

Propriétés physico-chimiques des

	Coefficient de Sédimentation ($S_{20,w}$)		d CsCl	ARN (p. 100)	Protéine (p. 100)	
	RNP	ARN				
	+ I (a)	+ I				
SADOWSKI et coll. (45)				31	56	
KÖHLER et ARENDS (46)	30	4 à 20 (avec un max. à 7)				
PARSONS et Mc CARTY (47)	45	6 - 10	1,43			
CARTOUZOU, POIREE et LISSITZKY (48)	< 30 à 90		1,41	30	70	
FAIFERMAN et al. (49)	60 mais la D.O. 260nm diminue de 30 à 40 p. 100	60	4-6	1,38	17	82
STEVENIN et al. (50)	40-50 (à faible force ioni- que)	80 à 300	5 - 9 (à faible force ioni- que)	65-70	1,40	

(a) Inhibiteur cytoplasmique de RNase ;

(b) Détermination par spectrophotométrie dans l'ultra-violet ;

(c) Détermination selon le méthode d'YCAS et VINCENT (51).

Articles de dRNP nucléoplasmiques.

ADN p. 100)	<u>ARN</u> Protéines	$\frac{G + C}{A + U}$ U.V. (b)	^{32}P (c)	Action de la RNase	Action de la DNase	Action du DOC	Incorpora- tion rapi- de de pré- cursseurs ra- dioactifs	Haut degré d'hybrida- bilité avec l'ADN
< 4	0,55						+	
				+	-	Extraction en présen- ce de DOC		
		0,96	0,87				+	
	0,4		0,80	+			+	
< 1	0,21	0,77	0,68	+	-	-	+	+
				+	-	Extraction en présence de DOC	+	

leur activité métabolique intense, la nature de leur ARN qui est de type dARN et leurs proportions respectives en ARN et protéines. En conséquence, il sera peut-être bientôt possible d'établir des identités et même des liens entre ces différentes particules. En effet, si les différences observées sont dues, pour une grande part, aux modes d'extraction utilisés et à des dégradations, elles peuvent aussi rendre compte de l'existence de plusieurs stades dans les formes de transport des ARN messagers.

II - LES PARTICULES DE RNP CYTOPLASMIQUES

Elles peuvent être groupées en deux catégories selon la nature de leur ARN.

A - LES PARTICULES DE rRNP

Elles sont essentiellement représentées par les ribosomes qu'on a pu mettre en évidence in situ dans le cytoplasme de toutes les cellules et également identifier morphologiquement et biochimiquement après leur extraction du cytoplasme.

1 - ETUDES MORPHOLOGIQUES

a - Le ribosome in situ

Sur des coupes ultrafines de tissus et de cellules entières, les ribosomes apparaissent, au microscope électronique, comme des granules arrondis, compacts et mesurant environ 150 à 250 Å de diamètre (Fig. 3 ; p. 24). Ils apparaissent parfois isolés dans le cytoplasme mais le plus souvent attachés aux membranes du réticulum endoplasmique soit au niveau de l'ergastoplasme, soit au niveau du feuillet externe de la membrane périnucléaire.

b - Le ribosome après isolement

Il est possible d'isoler les ribosomes à partir du surnageant cytoplasmique post-mitochondrial par l'action de détergents qui ont pour effet de lyser les membranes. Le DOC à concentration finale

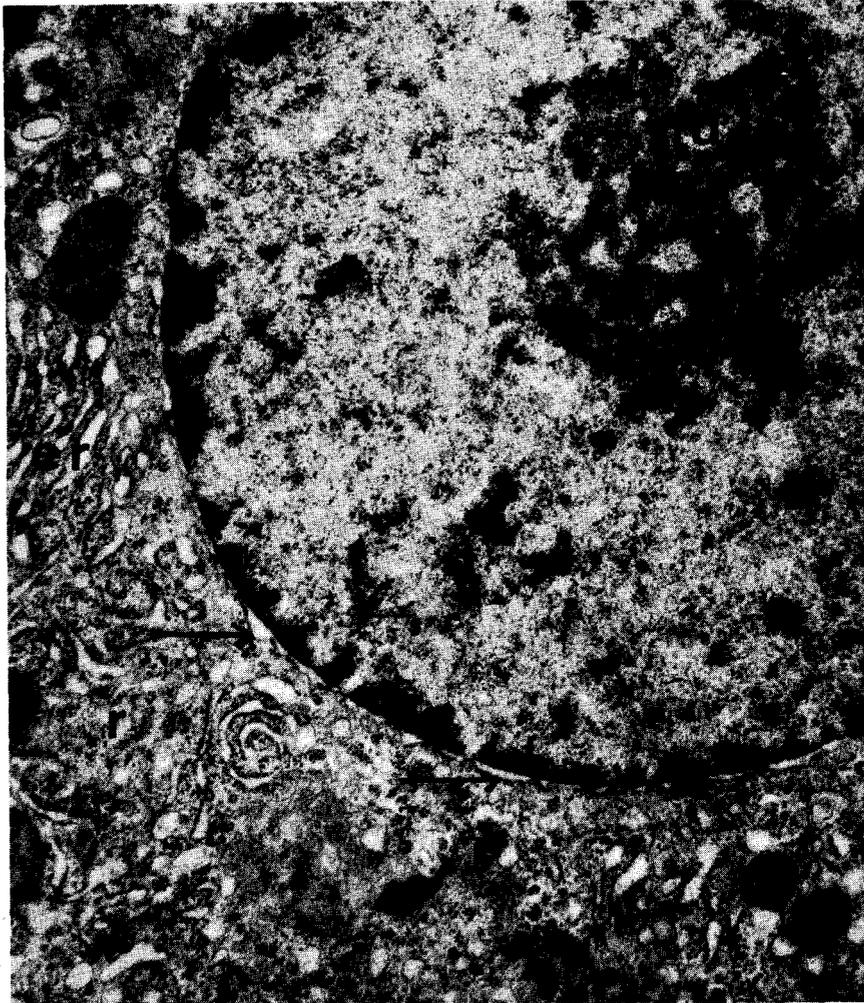


Figure 3

Coupe au niveau d'une cellule hépatique de Rat montrant des ribosomes libres ou attachés aux lamelles ergastoplasmiques et au feuillet externe de l'enveloppe nucléaire (d'après E. PUVION). Fixation, inclusion et coloration identiques à celles de la figure 1 (p. 4). nu, nucléole ; —→ espace périnucléaire ; r, ribosomes libres ; er, ergastoplasme. x 20 000



de 0,5 p. 100 est communément employé ; il permet d'obtenir les polysomes sur lesquels on fait agir la RNase à raison de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, à 37° C pendant 10 mn. Dans ces conditions, les ribosomes sont libérés ; ils peuvent être éventuellement analysés en gradients de densité de saccharose.

L'étude au microscope électronique de préparations de ribosomes isolés a permis une détermination plus exacte de leurs forme et taille. Notons que, chez les Eucaryotes, celles-ci varient peu d'une espèce à l'autre.

En apparence générale, le ribosome se présente comme une ellipsoïde de révolution légèrement allongée dont le rapport des axes est inférieur à 1,5.

L'observation, après fixation et inclusion de culots de ribosomes obtenus dans notre laboratoire (Fig. 4 ; p. 26), nous permet de décrire ceux-ci comme des particules plus ou moins sphériques d'un diamètre moyen de 200 à 250 Å prenant fortement la coloration aux sels de plomb. Cette technique ne permet pas de distinguer leur structure fine. Dans les préparations polysomales, les ribosomes apparaissent assemblés plus ou moins irrégulièrement en courtes chaînettes de 3 à 6 éléments sans qu'il soit possible toutefois de distinguer l'ARN messager.

Actuellement, on sait que la forme détaillée du ribosome est en fait plus complexe. En effet, des observations approfondies au microscope électronique révèlent, en coloration négative, une sorte de sillon qui divise le ribosome en deux portions inégales correspondant aux deux sous-unités (ODINTSOVA, BRUSKOV et GOLUBEVA) (52) ; ces dernières peuvent, en outre, présenter des irrégularités de surface et, notamment, il a été possible de déceler une échancrure au niveau de la grande sous-unité ribosomale (FLORENDO et FOSTER) (53).

2 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Il existe à ce sujet d'excellentes revues générales (PETERMANN (54) ; SPIRIN et GRAVILOVA (55)) ; aussi ne ferons-nous que résumer sous la forme d'un tableau, les principales propriétés des ribosomes et de leurs sous-unités (voir tableau III ; p. 27).

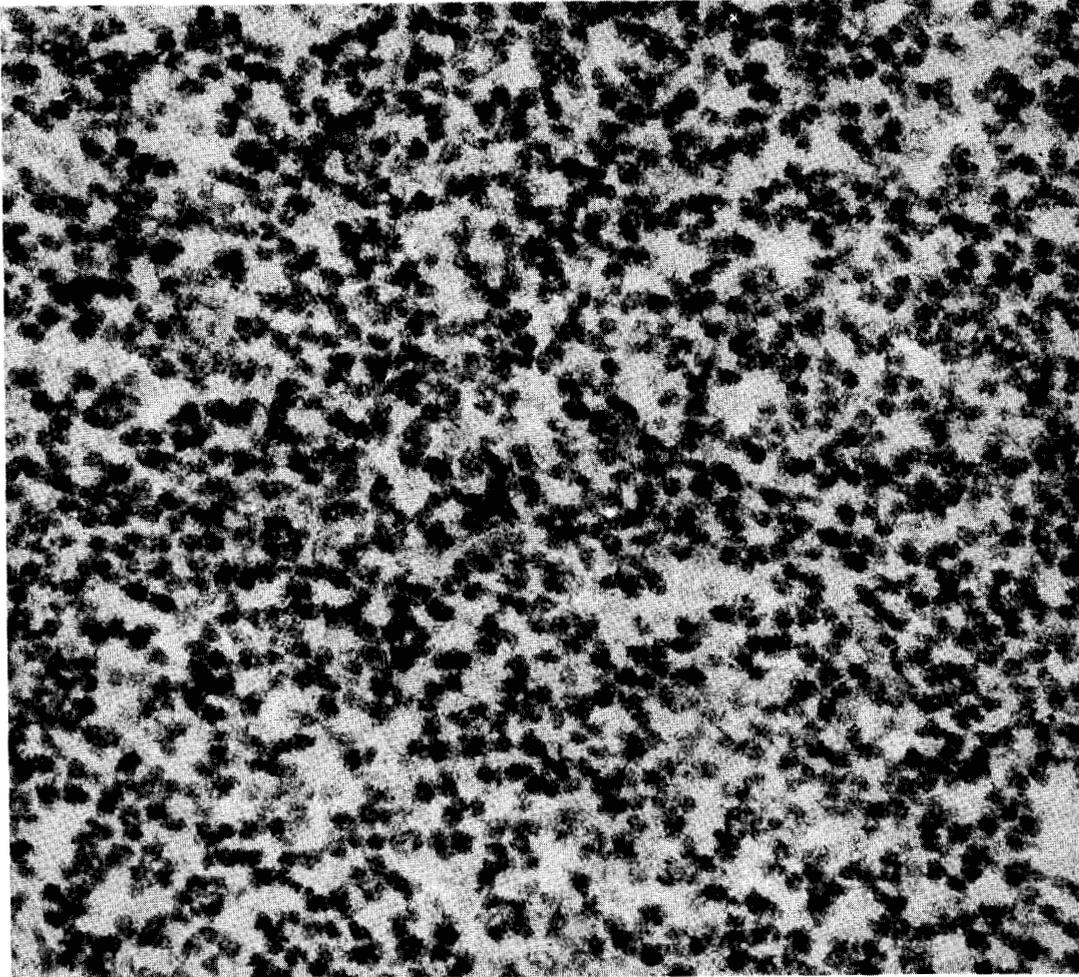


Figure 4

Ribosomes isolés du cytoplasme d'hépatocytes de Rat (d'après F. CANER et E. PUVION). Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration identiques à celles de la figure 1 (p. 4). x 120 000.



TABLEAU III

Principales propriétés physico-chimiques des ribosomes et des sous-unités ribosomales des cellules animales.

	Ribosome	Grande sous-unité	Petite sous-unité
Coefficient de sédimentation ($S_{20,w}$)	80	60	40
P.M.	4 à 5×10^6	3×10^6	$1,7 \times 10^6$
Coefficient de sédimentation de l'ARN ($S_{20,w}$)		28	5
P.M. de l'ARN		$1,7 \times 10^6$	40 000
$\frac{G + C}{A + U}$ (sans ARNm)	1,76	2,04	1,34
$\frac{G + C}{A + U}$		2,03	-
ARN (p. 100)		60	47
Protéines (p. 100)		40	53
$\frac{\text{ARN}}{\text{Protéines}}$	≈ 1	1,50	0,88
d CsCl	1,55	1,57	1,49



Notons seulement que les deux sous-unités ribosomales qui constituent le ribosome se dissocient généralement lorsque la concentration en magnésium devient inférieure à 0,1 - 0,3 mM par mM de phosphate.

3 - ROLE BIOLOGIQUE

Le ribosome est le support des systèmes de synthèse des protéines. Ce problème est brillamment traité par SPIRIN et GRAVILOVA (56).

B - LES PARTICULES DE rRNP

1 - LES PARTICULES DE rRNP LIBRES

Comme dans le cas des particules nucléaires, un grand nombre de particules de ce type ont été identifiées. D'une manière générale, elles ont été distinguées des particules cytoplasmiques de nature ribosomale par le fait que leurs ARN peuvent être rapidement marqués.

Pour chacune d'elles, nous avons étudié :

- Le mode d'extraction.
- Les propriétés physico-chimiques résumées le plus souvent dans un tableau (Tableau IV ; p. 37)
- Le rôle biologique.

1) Dès 1964, BELITSINA et al. (57) trouvent dans le cytoplasme d'embryons de Loche, des particules post-ribosomales transportant un ARN nouvellement synthétisé auxquelles ils donnent le nom d'"infor-mosomes". Etant donnée l'importance de ces particules, nous leur réservons une étude spéciale dans le chapitre des rRNP cellulaires (voir p. 39).

2) JOKLIK et BECKER (58), en 1965, ont isolé à partir du cytoplasme de cellules HeLa infectées par le virus de la vaccine, un complexe de RNP 40-45 S.

- Les cellules ont été homogénéisées dans le tampon Tris 0,01 M - pH 7,4, KCl 0,01 M et $MgCl_2$ 1,5 mM ; les particules de RNP du cytoplasme isolé par centrifugation différentielle, ont été identifiées par centrifugation en gradient de densité de saccharose.

- Peu de propriétés chimiques ont été déterminées ; elles ont été rassemblées dans le tableau IV (p. 37). Les auteurs ont démontré, par des expériences de marquage, que l'ARN messager synthétisé par le virus de la vaccine se retrouvait très rapidement associé avec la petite sous-unité ribosomale de la cellule hôte, l'ensemble sédimentant dans la zone 40-45 S.

- Selon les auteurs, ce complexe ARNm - petite sous-unité ribosomale représenterait la première étape dans la formation des polyribosomes.

3) Mc CONKEY et HOPKINS (59), en 1965, ont isolé à partir du cytoplasme de cellules HeLa S 3, des complexes associés ARNm - sous-unités ribosomales.

- Les cellules furent mises en suspension dans un tampon Tris 0,01 M - pH 7,4, KCl 0,01 M, MgSO₄ 0,003 M contenant 0,5 p. 100 de Brij 58, puis homogénéisées ; après centrifugation différentielle, le surnageant post-mitochondrial fut soumis à l'ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose.

- L'examen du profil de sédimentation révèle la présence d'un composé de coefficient de sédimentation 45 S possédant les particularités suivantes :

. Après un marquage relativement court, il est le seul composant marqué et possède un ARN sédimentant à 15-16 S, de façon légèrement décalée par rapport à l'ARN 18 S témoin de la petite sous-unité ribosomale. Lorsqu'on augmente les temps de marquage, cet ARN 15-16 S se rapproche progressivement de l'ARN 18 S pour, finalement, se confondre avec lui (A ce stade, l'ARN 18 S étant marqué, on ne peut plus distinguer sur le gradient les deux catégories d'ARN). L'ARN des particules 45 S contient donc un ARN hétérogène composé d'ARN sédimentant à 15-16 S et d'ARN ribosomal 18 S.

. L'ARN des particules 45 S possède un degré d'hybridabilité avec l'ADN supérieur à celui des autres particules ribosomales.

Les propriétés physico-chimiques des particules 45 S sont succinctement présentées dans le tableau IV (p. 37).

— Les auteurs pensent qu'il se forme un complexe entre l'ARN messenger et la petite sous-unité ribosomale. Le complexe ainsi formé pourrait représenter aussi bien la première étape dans l'assemblage des polysomes qu'un mécanisme de transport de l'ARN messenger du noyau vers le cytoplasme.

4) HENSHAW, REVEL et HIATT (60), en 1965 également, ont isolé à partir du cytoplasme de foie de Rat, le même type de particules de RNP 45 S.

— Les foies de Rats furent homogénéisés dans une solution de Tris 0,01 M - pH 7,6, KCl 0,01 M, saccharose 0,2 M et acétate de magnésium 0,001 M. La "fraction cytoplasmique" fut isolée des autres constituants cellulaires par centrifugation différentielle et analysée par centrifugation en gradient continu de saccharose, de même que les ARN.

— Peu de propriétés physico-chimiques ont été déterminées (voir tableau IV ; p. 37).

Les auteurs ont surtout cherché à démontrer que les particules 45 S contenaient de l'ARN messenger. Ils ont montré d'une part que l'ARN extrait des particules 45 S était hétérogène ; en effet, bien que cet ARN soit 18 S, une grande partie se dégrade en matériel sédimentant dans la zone de 6 à 14 S dans des conditions où l'ARN ribosomal 18 S n'est pas affecté. D'autre part, ils ont montré que cet ARN 6 à 14 S possède une activité stimulatrice plus élevée pour la synthèse de protéines acellulaires.

— Sur la base de ces résultats, les auteurs émettent l'hypothèse que l'ARN messenger puisse s'associer avec la sous-unité ribosomale 45 S dans le noyau et migrer sous cette forme dans le cytoplasme.

5) RISTOW et HÖHLER (61), en 1967, ont démontré que toutes les particules cytoplasmiques de cellules KB (aussi bien ribosomes que sous-unités ribosomales) sont associées à un ARN présentant un profil de sédimentation hétérogène et possédant les propriétés des ARN messagers.

- Les cellules KB furent homogénéisées dans un tampon Tris 0,01 M - pH 7,2, KCl 0,005 M et $MgCl_2$ 0,003 M ; le surnageant cytoplasmique, obtenu par centrifugation différentielle, fut analysé sur gradient continu de saccharose.

- Les résultats réunis dans le tableau IV (p.37), montrent que toutes les particules cytoplasmiques ribosomales, isolées au préalable, contiennent des ARN rapidement marqués différents des ARN ribosomaux 18 S et 28 S. En effet, les particules 40 S et 60 S possèdent des ARN répartis de façon hétérogène dans tout le gradient avec des maxima à 25 S et entre 4 et 18 S. Les ribosomes 74 S contiennent également des ARN répartis dans tout le gradient ; on observe toujours, en particulier, un ARN sédimentant dans la zone 4 S.

Les auteurs ont également démontré que les ARN des zones plus légères, -qui ne peuvent donc pas être contaminées par les ARN ribosomaux-, stimulent les synthèses protéiques in vitro.

- Les auteurs concluent que toutes les particules ribosomales cytoplasmiques (40, 60 et 74 S) contiennent des ARN à caractère messenger.

6) PERRY et KELLEY (62), en 1968, ont isolé des complexes de RNP à partir d'extraits cytoplasmiques de cellules L.

- Les cellules furent soumises à l'action d'un tampon hypotonique et homogénéisées, ou resuspendues, sous agitation, dans un milieu isotonique contenant 0,05 p. 100 de Triton X-100. Après addition de chlorure d'ammonium (*) à une concentration finale de 0,15 M, les homogénats furent centrifugés pour éliminer les noyaux, les mitochondries et les débris cellulaires. Les RNP du surnageant cytoplasmique furent analysées par centrifugation en gradient linéaire de saccharose et par des mesures de densités relatives en gradient de chlorure de césium.

- Les principales propriétés physico-chimiques des particules de RNP libres obtenues sont rassemblées dans le tableau IV (p. 37).

(*) Le chlorure d'ammonium est un inhibiteur de la RNase.

Ajoutons, d'une part, que l'action du chlorure de lithium 0,55 M en présence d'ions magnésium 0,01 M sur ces RNP, élimine réversiblement les trois quarts de leurs protéines ; dans ces mêmes conditions, les ribosomes ne perdent que très peu de protéines. D'autre part, ces RNP messagères qu'on trouve libres dans le cytoplasme, présentent de nombreux points communs avec les particules extraites directement à partir des polysomes.

- Les auteurs émettent, par conséquent, l'hypothèse que ces particules de RNP trouvées libres dans le cytoplasme transportent l'ARN messager nouvellement synthétisé et qu'elles émergent du noyau avant d'être incorporées dans les polysomes.

7) SAMEC, JACOB et MANDEL (63, 64), en 1967 puis en 1968, ont mis en évidence dans la fraction microsomale de cerveau de Rat, la présence de particules de RNP légères transportant un ARN de type dARN.

- Les particules de RNP ont été obtenues à partir de la fraction microsomale par action du DOC ; elles représentent un matériel peu important en comparaison avec les polysomes. L'analyse des particules et des ARN qu'elles contiennent a été effectuée par ultracentrifugation en gradient de densité de saccharose.

- Les propriétés physico-chimiques de ces particules sont rassemblées dans le tableau IV (p. 37).

- Par leur comportement en ultracentrifugation et par leur densité relative dans le chlorure de césium, ces particules sont semblables aux complexes d'ARN-informofères décrits par SAMARINA et al. (65) dans les noyaux de foie de Rat. Leur présence dans le cytoplasme fait suggérer aux auteurs que de telles particules pourraient être impliquées dans le transport de l'ARN messager du noyau vers le cytoplasme.

8) KAFATOS (66), en 1968, a isolé à partir de l'épiderme d'Insectes (vers à soie géants au moment de la métamorphose), des particules cytoplasmiques transportant un ARN rapidement marqué.

- Le tissu épidermique a été soumis à un choc osmotique par l'emploi d'une solution de tampon HEPES-KOH (*) 0,01 M - pH 7,4, KCl 0,01 M, MgSO₄ 1 mM sans saccharose et à laquelle furent ajoutés des inhibiteurs de RNase. Après homogénéisation et centrifugation différentielle le surnageant post-mitochondrial fut prélevé et soumis, après l'addition de DOC à concentration finale de 0,5 p. 100, à une centrifugation en gradient linéaire de saccharose.

- Les propriétés physico-chimiques des particules marquées dans le cytoplasme après un marquage très court sont rassemblées dans le tableau IV (p. 37).

- Elles sont en faveur du modèle "informosome" pour le transport des ARN messagers.

9) QUIRIN-STRICKER et MANDEL (67), en 1969, ont mis en évidence une population hétérogène de particules de RNP "légères" de constantes de sédimentation inférieures à 40 S et qui existent à l'état libre dans le cytoplasme de foie de Rat.

- Les foies sont homogénéisés dans un milieu contenant du saccharose 0,3 M, MgCl₂ 1,5 mM, KCO₃H 30 mM, K₂HPO₄ 20 mM, KH₂PO₄ 20 mM - pH 7,8 et du polyvinylsulfate de sodium à raison de 40 µg/ml. Après centrifugation, le surnageant post-microsomal est traité par le DOC à une concentration finale de 0,5 p. 100 ; une nouvelle centrifugation fournit un sédiment constitué essentiellement par des particules post-microsomaux qui sont analysées par centrifugation en gradient linéaire de saccharose.

- Les caractères physico-chimiques de ces particules sont rassemblées dans le tableau IV (p. 37).

- D'après les différents résultats obtenus, les auteurs suggèrent que du dARN cytoplasmique indépendant des polysomes est associé à des protéines. La présence de telles particules dans le cytoplasme de foie de Rat serait en faveur de l'hypothèse que le transport de l'ARNm du noyau vers les ribosomes cytoplasmiques s'effectuerait sous la forme d'un complexe ARNm-protéines.

(*) (voir GOOD et al.) (68).

10) CARTOUZOU, POIREE et LISSITZKY (69), en 1969, ont mis en évidence, dans le cytoplasme de cellules de la glande thyroïde de Mouton, l'existence de particules de RNP rapidement marquées, non ribosomales.

- Les tranches de tissu thyroïdien furent homogénéisées dans un tampon Tris-HCl 10 mM - pH 7,6, KCl 10 mM, acétate de magnésium 1 mM et sucrose 0,2 M. Le surnageant post-mitochondrial, traité au DOC à concentration finale de 1 p. 100, fut analysé par centrifugation en gradient de saccharose. Des particules à coefficient de sédimentation hétérogène ont pu être identifiées dans les régions post-ribosomales puis isolées, par ultracentrifugation, à partir de différentes zones du gradient.

- Les propriétés physico-chimiques des particules sont rassemblées dans le tableau IV (p. 37).

Notons, en outre, que les particules de la zone 30 S à 70 S sont très sensibles à la digestion par la trypsine qui a pour effet d'augmenter leur densité, sans doute à cause d'une perte en protéines. Le chlorure de sodium 2,5 M produit un effet similaire, bien que moins prononcé. Par contre la ribonucléase est sans action.

D'autre part, l'ARN extrait de ces particules 30 à 70 S stimule activement les synthèses protéiques in vitro.

- Ces particules cytoplasmiques post-ribosomales sont identiques quant à leur densité, leur composition en ARN et leur sensibilité à la digestion par la trypsine et la RNase, à celles que les auteurs ont isolées également à partir de noyaux purifiés et de polysomes traités par l'EDTA. Il s'agit dans tous les cas de RNP particulièrement riches en protéines. Les auteurs pensent que ces particules jouent d'abord un rôle de transport de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme puis, au niveau des polysomes, un rôle de régulation des synthèses protéiques.

11) HENSHAW et LOEBENSTEIN (70), en 1970, ont mis en évidence dans le cytoplasme d'hépatocytes de Rat, un ARN rapidement marqué, "polydispersé", contenu dans des particules de RNP de taille hétérogène.

- Les foies furent homogénéisés dans une solution de triéthanolamine 0,002 M, MgCl₂ 0,001 M, NaCl 0,01 M amenée à pH 7,4 et contenant du saccharose 0,25 M. La fraction cytoplasmique surnageante

récupérée après centrifugation différentielle, fut analysée par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

— Les principales propriétés physico-chimiques des particules cytoplasmiques ainsi identifiées sont rassemblées dans le tableau IV (p. 37).

— Par la nature de leur ARN qui est de type dARN et leur proportion plus élevée en protéines, ces particules de RNP sont totalement différentes des ribosomes et de leurs sous-unités. Par leur taille et leur densité relative en CsCl, ces particules sont, d'autre part, identiques à celles que les auteurs avaient auparavant extraites des polysomes de foie de Rat par action de l'EDTA (HENSHAW) (71). Les auteurs postulent, par conséquent, que ces complexes ARN-protéines sont du type "informosome" de SPIRIN (72) et qu'elles transportent l'ARNm du noyau vers le cytoplasme où elles s'incorporent dans les polysomes. Les particules de RNP 45 S que les auteurs avaient identifiées en 1965 auraient alors représenté un mélange de sous-unités ribosomales 45 S natives, contaminées par une fraction de ces complexes ARNm-protéines sédimentant aussi dans la zone 45 S (revoir HENSHAW, REVEL et HIATT ; p. 30).

12) Récemment, KEMPF et al. (73, 74) ont confirmé l'existence de particules de RNP du type "informosome" dans le cytoplasme des tumeurs plasmocytaires de la Souris.

— Les tumeurs sont broyées et homogénéisées dans une solution de chlorhydrate de triéthanolamine 0,02 M - pH 7,6, KCl 0,05 M, acétate de magnésium 0,005 M et saccharose 0,25 M ; puis deux centrifugations différentielles successives conduisent à l'obtention d'un sédiment appelé "fraction 200" et contenant les microsomes, les polysomes "libres", les monosomes, une partie des sous-unités ribosomales ainsi que les particules qui sédimentent avec ces structures. Un double marquage par des précurseurs des ARN (^{32}P pendant 24 h et uridine tritiée pendant 5 à 20 mn) permet de différencier toutes ces structures qui sont analysées par sédimentation en gradient de saccharose et surtout par centrifugation isopycnique en gradient de CsCl.

- Les propriétés physico-chimiques de ces particules sont rassemblées dans le tableau IV (p. 37).

Les auteurs ont démontré, en outre, que ces particules pouvaient exister en association avec des ribosomes et un constituant lipoprotéique non membranaire.

- L'aptitude de ce complexe lipo-ribonucléoprotéique à stimuler les synthèses protéiques *in vitro* ayant, d'autre part, été démontrée par KEMPF, POPOVIC et MANDEL (75), les auteurs plaident en faveur d'un rôle spécifique joué par ces complexes dans la biosynthèse des protéines.

2 - LES PARTICULES DE dRNP DES POLYSOMES

Les particules de dRNP libres du cytoplasme se retrouvent intégrées dans les polysomes dont elles ont pu, en effet, être extraites par l'action de l'EDTA. De nombreux travaux ont été effectués à ce sujet, parmi lesquels nous avons déjà mentionné ceux de PERRY (p. 31) et de HENSHAW (p. 35) (voir également CARTOUZOU, ATTALI et LISSITZKY (76); SPIRIN (77); OLSNES (78) et SPOHR *et al.* (79)). Nous n'étudierons pas en détail ces formes d'ARNm associées aux polysomes actifs car elles semblent être identiques aux formes libres. Notons qu'elles présentent, en particulier, la même hétérogénéité de sédimentation en gradient de saccharose et la même densité en gradient de chlorure de césium. Très récemment, SPOHR, GRANBOULAN *et al.* (80) ont étudié leur morphologie en comparaison avec celle des particules libres; les deux types de particules paraissent avoir la même structure (voir description p. 63). Les seules différences qu'on peut, *a priori*, suggérer se trouveraient dans la structure fine des protéines, en rapport avec le rôle de ces dernières dans la régulation des synthèses protéiques au niveau de la traduction.

Bien que très nombreuses, les particules de dRNP cytoplasmiques présentent de nombreuses analogies. En effet, l'observation du tableau récapitulatif (Tableau IV; p. 37) révèle que ces particules possèdent toutes une activité métabolique intense, une composition en bases de type dARN et une faible densité qui sont d'ailleurs autant de

Propriétés physico-chimiques des

	Coefficient de sédimentation ($S_{20,w}$)		d CsCl	ARN (p. 100)
	RNP	ARN		
JOKLIK et BECKER (81)	40 - 45	16 - 18 (ARNm) 18 (ARNr)		
Mc CONKEY et HOPKINS (82)	45	15 - 16		
HENSHAW, REVEL et HIATT (83)	45	\approx 18 mais de nature hétérogène		
RISTOW et KÖHLER (84)	40	hétérogène avec		
	60	max. de 4 à 18 et à 25		
	74	4 à 30		
SAMEC, JACOB et MANDEL (85,86)	20 à 60	18 (ARNr)	1,36	
		8 à 15 (ARN hétérogène)		
PERRY et KELLEY (87)	20 à 65 (en présence de NH_4Cl)	hétérogène avec max. à 10 - 12	1,38 à 1,44	
KAFATOS (88)	20 à 70		1,32 à 1,42	15 à 25
QUIRIN-STRICKER et MANDEL (89)	10 à 40	6 à 12 (en présence d'inhibiteur de RNase)	1,30 - 1,35 à 1,48	10
CARTOUZOU, POIREE et LISSITZKY (90)	zone 15 à 30	4 à 23 avec max. à 10 et 15	1,35	15 à 30
	zone 30 à 50		1,35 à 1,40	
	zone 50 à 70		1,38	
KEMPF et al. (91,92)	< 80		1,40 à 1,55	
HENSHAW et LOBESTEIN (93)	30 à 90	6 à 35	1,35 à 1,45	

(*) Détermination selon la méthode de YCAS et VINCENT (94).

Particules de rRNP cytoplasmiques

Protéines (p. 100)	$\frac{\text{ARN}}{\text{Protéines}}$	$\frac{\text{G + C}}{\text{A + U}}$ $^{32}\text{(P)}$ (*)	Action de la RNase	Incorporation rapide de pré- curseurs radio- actifs	Haut degré d'hybridabili- té avec l'ADN
			+	+	
				+	+
				+	
			+	+	
		0,72	+	+	
			+	+	
75 à 85	0,25			+	
90	0,11	1,0 - 1,1	-	+	
70 à 80	0,25	0,76		+	
			+	+	
			(à faible dose 0,5 μg par ml)	+	
		0,96		+	



points communs avec les particules de dRNP nucléaires. Quelques auteurs ont, en outre, démontré l'identité de ces particules par rapport à celles extraites directement des polysomes ; ils ont également démontré qu'elles activaient les synthèses protéiques. L'analyse de tous ces faits porte à croire qu'il s'agit de formes de transport de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme où elles sont trouvées libres avant d'être incorporées dans les polysomes.

Jusqu'à présent, néanmoins, on peut diviser les particules de dRNP cytoplasmiques en deux catégories : les particules qui sont des complexes ARN-protéines et celles qui sont liées à des particules ribosomales, généralement la petite sous-unité. L'hypothèse d'un ARNm attaché au ribosome peut sembler probable puisque, chez les Bactéries, cette étape s'effectue lors même de la synthèse des ARN sur le moule ADN (NAONO, ROUVIERE et GROS (95) ; REVEL et GROS (96)). Il est d'ailleurs fort possible que, chez les Eucaryotes, la forme liée au ribosome corresponde également à la première étape des synthèses protéiques puisqu'il est maintenant prouvé que l'ARNm se lie d'abord avec la petite sous-unité ribosomale (HEYWOOD (97) ; LEBLEU et al. (98) ; TERAO et OGATA (99) ; HOLDER et LINGREL (100)). Les résultats acquis jusqu'à présent et la prudence ne nous permettent pas encore de trancher sur ce problème.

2^e - LES dRNP CELLULAIRES

Dans le précédent chapitre, nous avons déjà effectué l'étude d'un grand nombre de particules de dRNP identifiées jusqu'à présent dans la cellule. Certaines formes n'ont, consciemment, été que citées ; elles ont fait l'objet de recherches suivies, très approfondies, et nous avons réservé leur étude à ce présent chapitre. Ce sont des particules dont certaines sont universellement connues et qui sont :

- Les informosomes de SPIRIN.
- Les informofères de GEORGIEV.
- Les particules de RNP de MOULE et d'ISHIKAWA découvertes très récemment.

I - LES INFORMOSOMES DE SPIRIN

A - DECOUVERTE DES INFORMOSOMES

C'est en 1964, que BELITSINA et al. (101) démontrent, pour la première fois, dans les extraits cytoplasmiques de jeunes embryons de Loche (Misgurnus fossilis L.), l'existence de particules sédimentant moins vite que les ribosomes, appelées particules post-ribosomales et transportant un ARN nouvellement synthétisé.

Les embryons, pris au stade blastule âgée au gastrule, furent incubés soit en présence d'un précurseur marqué des acides nucléiques (uridine ^{14}C ou adénine ^{14}C), soit avec des acides aminés marqués (leucine ^{14}C et lysine ^{14}C). Les extraits cytoplasmiques furent analysés directement par centrifugation en gradient de saccharose. L'examen des courbes de densité optique et de radioactivité obtenues, révèle la présence de composants rapidement marqués dans une région du gradient plus légère que celle des ribosomes 75-80 S. Les composants marqués sédimentent de façon identique si les embryons ont été, au préalable, incubés avec des précurseurs marqués des ARN ou s'ils l'ont été en présence d'acides aminés marqués. Leurs coefficients de sédimentation s'évaluent de 20-30 S à 60-70 S. Leur répartition dans le gradient est hétérogène ; on y révèle, en effet, la présence de plusieurs pics distincts.

La coïncidence des courbes de radioactivité obtenues dans les deux catégories de marquage, a fait suggérer que ces nouvelles structures pouvaient être des sortes de complexes d'ARN nouvellement formés et de protéines.

L'intérêt soulevé par cette découverte fut d'autant plus grand qu'il ne pouvait s'agir de nucléoprotéines ribosomales puisque, dans les jeunes embryons de Loche, on n'observe pas de synthèse de ribosomes avant la fin de la gastrulation.

Pour préciser la nature nucléoprotéique de ces structures, SPIRIN et al. (102) étudièrent leur densité par centrifugation en CsCl. A cet effet, les embryons de Loche furent traités comme décrit ci-dessus et les particules post-ribosomales obtenues

furent fixées par la formaldéhyde avant d'être analysées par centrifugation à l'équilibre dans un gradient de CsCl (Technique de SPIRIN, BELITSINA et LERMAN (103)). Les résultats obtenus de cette manière ont permis de démontrer que le matériel radioactif des composants post-ribosomaux occupait une région de densité allant de 1,42 à 1,51 et qu'il ne s'agissait donc ni d'ARN libre (dont la densité dans les mêmes conditions est égale à 1,9), ni de particules ribosomales (dont la densité est égale à 1,55). Les particules post-ribosomales sont donc moins denses et, dans la mesure où ces composés ne contiennent que des ARN et des protéines, leur densité révèle un pourcentage en ARN allant de 20 à 40 p. 100 donc une prédominance considérable des protéines par rapport aux ARN. L'ARN nouvellement synthétisé durant ces stades de développement de la Loche n'étant pas de l'ARN ribosomal, les auteurs l'ont considéré comme de l'ARNm et, en conséquence, les particules marquées comme des nucléoprotéines transportant l'ARNm.

A ce nouveau type de particules de RNP post-ribosomales transportant l'ARNm et ayant une densité relativement faible, les auteurs ont donné le nom d'informosomes (SPIRIN, BELITSINA et AJTKHOZHIN (104)).

B - PROPRIETES GENERALES DES INFORMOSOMES

Des études ultérieures effectuées sur les embryons de Loche ou encore des embryons d'Oursin ont permis de déterminer d'une manière plus précise, les différentes propriétés des informosomes.

1 - ANALYSE PAR CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE DE SACCHAROSE

L'analyse d'extraits cytoplasmiques d'embryons de Loche a permis d'observer, dans la zone post-ribosomale du gradient de saccharose, jusqu'à 7 composants marqués ayant des coefficients de sédimentation bien reproductibles d'environ 75 S, 65 S, 55 S, 50 S, 40 S, 30 S et 20 S (voir OVCHINNIKOV et al. (105)). Dans une analyse identique mais effectuée sur l'Oursin (Lytechinus pictus), des résultats analogues ont été obtenus par SPIRIN et NEMER (106) ; les auteurs ont pu, en effet, discerner six classes de particules ayant des coefficients de

sédimentation d'environ 65 S, 55 S, 50 S, 40 S, 30 S et 20 S.

Travaillant sur les extraits cytoplasmiques d'embryons de Loche, SPIRIN (107) a pu, en outre, démontrer que la présence dans le gradient de particules rapidement marquées n'était pas limitée à la zone post-ribosomale mais que, en avant des ribosomes 80 S, on pouvait discerner des composants de coefficients de sédimentation de 90 S, 100 S et 110 S. Les composants pré-ribosomaux ont pu être identifiés à des informosomes.

La déprotéinisation par le phénol de la totalité des composants post-ribosomaux -dont l'ARN était marqué-, suivie d'une analyse par centrifugation en gradient de saccharose, révèle la présence d'ARN marqués dont les coefficients de sédimentation ne coïncident pas avec ceux des ARN ribosomaux non marqués 28 S et 18 S. Chez les embryons de Loche, l'ARN isolé de cette manière est caractérisé par des coefficients de sédimentation de 35 S, 30 S, 26 S, 21 S, 15 S, 10 S, 6 S et 4 S (voir OVCHINNIKOV et al. (108)). La valeur moyenne de cet ARN est donc d'environ 14 S. Une étude identique effectuée sur les composants de la région pré-ribosomale donne, pour les ARN, une valeur moyenne de 34 S.

La vitesse de sédimentation des informosomes semble donc être en rapport avec la taille des ARN qu'ils contiennent. D'ailleurs, une étude effectuée sur l'Oursin par INFANTE et NEMER (109), démontre qu'il existe une proportionalité très étroite entre les coefficients de sédimentation des informosomes isolés et ceux des ARN correspondants.

2 - ANALYSE PAR CENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE EN CsCl

Des études de densité ont été effectuées selon la technique déjà citée précédemment (voir p. 40) : les particules sont fixées à la formaldéhyde avant d'être soumises à une centrifugation à l'équilibre dans un gradient de CsCl.

La répartition dans le gradient des composants post-ribosomaux d'extraits cytoplasmiques d'embryons de Loche -dont l'ARN était marqué-, montre que la principale fraction de radioactivité des particules 50 à 75 S est concentrée dans une bande étroite de densité 1,39. Les particules pré-ribosomales 90 à 110 S offrent exactement le même type de

répartition. Par contre, les particules marquées de faible coefficient de sédimentation et appartenant à la zone post-ribosomale sont réparties différemment : par exemple, les particules 40 S se retrouvent dans une bande majeure dont la densité est égale à 1,36 - 1,37 -au lieu de 1,39- et les particules 30 S sédimentent dans une zone de densité encore plus légère et égale à 1,35. Les auteurs pensent que ces particules de plus faible coefficient de sédimentation peuvent résulter d'une dégradation partielle, par la RNase, de particules plus grandes au cours du processus de préparation du suc cytoplasmique.

Ces résultats confirment ceux acquis précédemment, à savoir que la densité des informosomes ne correspond ni à celle des ribosomes de Loche -d = 1,55- ni même à celle des sous-unités ribosomales 60 S et 40 S -respectivement, d = 1,6 et 1,53- (voir OVCHINNIKOV, BRYSTOVA et SPIRIN (110)).

La caractéristique commune à tous les informosomes est leur densité en CsCl relativement faible. La valeur universelle de leur densité -égale approximativement à 1,4- ainsi que leur localisation dans une bande très étroite du gradient, indiquent un rapport stochiométrique entre les ARN et les protéines. Supposant, en outre, que les informosomes ne contenaient pas d'autres composants, les auteurs ont imaginé une formule empirique donnant le pourcentage du contenu en protéines des informosomes à partir de la valeur de leur densité :

$$\text{Protéines (p. 100)} = \frac{1,85 - d}{0,006} \quad (\text{SPIRIN (111)})$$

La valeur d = 1,4 correspond à une teneur d'environ 80 p. 100 en protéines. Cette valeur étant, en outre, indépendante du coefficient de sédimentation des informosomes, les auteurs pensent que la protéine accompagne uniformément l'ARNm sur toute sa longueur.

3 - EXPERIENCES D'HYBRIDATIONS

L'ARN purifié, provenant des informosomes extraits du cytoplasme d'Oursin, fut analysé par SPIRIN et NEMER (112) pour sa capacité à former des hybrides ADN-ARN.

De l'ADN préparé à partir du sperme d'Oursin fut utilisé et la formation d'hybrides de l'ARN provenant de particules post-ribosomales de la région 20 à 65 S fut comparée à celle de l'ARN ribosomal. La présence d'hybrides avec l'ARN ribosomal n'a pu être détectée ; par contre, une grande proportion (43 p. 100 environ) de l'ARN provenant des particules 20 à 65 S, fut récupérée sous forme d'hybrides ADN-ARN. L'apparente efficacité de la méthode utilisée pour la formation d'hybrides étant de 52 p. 100, il s'ensuit que 83 p. 100 des ARN marqués, obtenus à partir des composés sédimentant entre 20 et 65 S, peuvent être considérés comme des ARNm.

Donc, contrairement à l'ARN ribosomal, l'ARN provenant des informosomes post-ribosomaux s'hybride avec l'ADN avec un degré d'efficacité élevé correspondant à celui des ARNm.

4 - EXPERIENCES D'ACTIVATION DES SYNTHÈSES PROTÉIQUES

L'existence d'ARNm dans les particules post-ribosomales 40 à 65 S d'embryons de Loche a également été mise en évidence par le fait que ces particules peuvent stimuler les synthèses protéiques dans un système acellulaire (voir SPIRIN, BELITSINA et AJTKHOZHIN (113)).

Les propriétés générales des informosomes peuvent se résumer brièvement de la manière suivante :

- (1) Ils sédimentent de façon hétérogène dans des régions pré- et post-ribosomales, entre 20 S et 110 S.
- (2) Leur densité apparente en gradient de CsCl est d'environ 1,4 ; cette valeur correspond à un contenu en protéines d'environ 80 p. 100 qui donne un rapport ARN/protéines égal à 1/4.
- (3) Ils s'hybrident avec l'ADN avec un degré d'efficacité élevé.
- (4) Ils stimulent les synthèses protéiques.
- (5) Enfin, ajoutons qu'ils sont sensibles à la RNase pancréatique et à la pronase.

Il convient de rappeler que ces complexes d'ARNm-protéines de type informosome ont été observés non seulement chez les embryons mais dans un grand nombre de cellules animales différentes. De tels complexes furent, en effet, identifiés dans le cytoplasme de cellules L par PERRY et KELLEY (114), d'épiderme d'Insecte par KAFATOS (115), de glande thyroïde de Mouton par CARTOUZOU, POIREE et LISSITZKY (116), de foie de Rat par HENSHAW et LOEBENSTEIN (117) (se reporter dans le chapitre précédent, au paragraphe : Les particules de dRNP libres : p. 28).

C - LES FORMES "MASQUEES" D'ARNm SONT DES INFORMOSOMES

Dans un certain nombre de cas spéciaux, il apparut qu'une période assez longue pouvait s'écouler entre la synthèse de l'ARNm et son activité dans les synthèses protéiques.

Ainsi, de nombreuses expériences d'ordre biologique (voir revue de SPIRIN (118)) ont démontré l'existence dans les oeufs d'Oursin matures, non fertilisés, la présence d'un ARNm inactif. Cet ARNm d'origine maternelle, stocké dans le cytoplasme des oeufs, fut désigné sous le terme d'"ARNm masqué". La fertilisation ou encore le traitement par la trypsine conduisent à un "démasquage" de l'ARNm et à l'apparition d'une activité dans les synthèses protéiques (voir MONROY et al.) (119). Ces observations ont permis à SPIRIN d'émettre l'hypothèse que l'"ARNm masqué", stocké dans les oeufs, pouvait être un complexe d'ARNm et de protéines. Un peu plus tard, d'ailleurs, MANO (120) démontre que l'activation de ces sortes d'"informosomes" au cours de la fertilisation, était due à l'activité d'une protéase "trypsin-like".

Des expériences biologiques effectuées par NEYFAKH (121) sur des embryons de Loche ont également indiqué qu'il pouvait exister un décalage de quelques heures entre l'émission par les noyaux de l'information génétique et sa réalisation dans le cytoplasme. Par des expériences biochimiques, SPIRIN (122) a réussi effectivement à démontrer que la synthèse protéique, chez les embryons de Loche pris à un stade de développement donné, advenait principalement sur un ARNm synthétisé antérieurement tandis que l'ARN nouvellement synthétisé était localisé dans des structures autres que les polyribosomes en fonctionnement.

Par des analyses de densité en CsCl, il a réussi à démontrer que la majorité de cet ARNm nouvellement synthétisé se trouvait concentrée dans la bande caractéristique des informosomes libres de densité 1,39. Ces résultats lui ont permis d'émettre l'hypothèse que les informosomes libres pouvaient justement correspondre aux formes d'ARNm temporairement bloquées. La protéine de l'informosome ne serait donc pas seulement une forme de protection de l'ARNm contre les dégradations mais aussi une forme concrète de régulation des synthèses protéiques au niveau de la traduction de l'ARNm.

Toutes ces observations et expériences tendent à prouver que les formes "d'ARNm masqué", rencontrées dans les oeufs matures non fertilisés et chez les embryons, sont des informosomes temporairement non traductibles.

D - L'INFORMOSOME N'EST PAS UN ARTEFACT

L'existence d'informosomes in vivo fut sérieusement mise en doute par la découverte que, suite à l'addition de tout ARN libre à l'extrait cytoplasmique de cellules animales, l'on observe la formation d'un complexe de l'ARN avec un facteur protéinique de l'extrait (voir GIRARD et BALTIMORE (123) ; OVCHINNIKOV et al. (124) et OVCHINNIKOV, AVANESOV et SPIRIN (125)). Les complexes ainsi formés se sont révélés être sensibles à la pronase et présenter, par analyse en gradient de CsCl, une densité de l'ordre de 1,4 ; aussi ont-ils pu être considérés comme des complexes "informosome-like". La protéine de l'extrait cytoplasmique réagissant avec les ARN exogènes a même été identifiée par OVCHINNIKOV et al. (126) dans le cas du foie de Rat ; c'est une protéine dont le coefficient de sédimentation est de $9 \frac{1}{2}$ S et qui représente environ 0,3 p. 100 de la totalité des protéines solubles de l'extrait.

A la lumière de ces résultats, le problème s'est donc posé à savoir si les informosomes préexistent réellement dans la cellule ou s'ils ne sont que des artefacts formés au cours de la destruction cellulaire par interaction entre de l'ARN endogène libre et cette classe spéciale de protéines cellulaires.

La question fut résolue par OVCHINNIKOV, AVANESOV et SPIRIN (127). Des expériences d'associations compétitives entre l'ARN

endogène ou exogène (ARN ribosomal de E. coli) et le facteur protéinique furent effectuées et démontrèrent que s'il existe effectivement dans le cytoplasme quelques protéines libres capables de réagir avec des ARN exogènes pour former des complexes "informosome-like", la présence d'informosomes préformés n'en est pas moins réelle. Des études plus poussées ont démontré, en outre, qu'il existait une certaine spécificité dans l'interaction entre ARN et protéines. En effet, les complexes entre protéines et ARN exogène semblent être réversibles tandis que ceux contenant un ARNm apparaissent, au contraire, irréversibles (voir OVCHINNIKOV et AVANESOV (128)).

E - SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DES INFORMOSOMES

D'une manière générale, le rôle attribué aux informosomes dans les cellules animales peut, selon SPIRIN (129), se résumer de la manière suivante :

1 - LES INFORMOSOMES SONT UNE FORME DE TRANSPORT DE L'ARNm du noyau vers le cytoplasme et ensuite vers les polysomes. Il n'est pas exclu, qu'au cours de ce transport, il ne se produise pas de modifications dans le composant protéique.

2 - LES INFORMOSOMES SONT UNE FORME DE PROTECTION DE L'ARNm contre les agents enzymatiques à l'intérieur de la cellule. La sensibilité des informosomes à la ribonucléase pancréatique ne doit pas rejeter la supposition formulée ; en effet, il n'est pas du tout prouvé que les informosomes soient sensibles aux ribonucléases endogènes alors que les ARN eux-mêmes le sont.

Ce rôle de protection, joué par la protéine de l'informosome est d'autant plus important dans l'oeuf et le jeune embryon où, respectivement les ARN maternels et les ARN nouvellement synthétisés, ne sont pas immédiatement utilisés.

3 - LES INFORMOSOMES SONT UNE FORME DE REGULATION DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES AU NIVEAU DE LA TRADUCTION DE L'ARNm. On ne peut exclure l'hypothèse que la protéine de l'informosome puisse être facilement modifiée par certains effecteurs et, en conséquence, réprimer ou permettre la traduction de l'ARNm.

II - LES INFORMOFERES DE GEORGIEV

A - DECOUVERTE DES INFORMOFERES

- Au cours d'études où ils essayaient d'obtenir des précisions au sujet des structures nucléaires contenant du dARN, SAMARINA, ASRIJAN et GEORGIEV (130) découvrirent que la majorité de l'ARNm nouvellement synthétisé, se retrouvait sous la forme de particules de RNP 30 S.

Ces particules furent obtenues à partir de noyaux de cellules de carcinome d'EHRlich ou encore de foie de Rat ayant reçu au préalable une injection intrapéritonéale de ^{32}P . Le milieu d'extraction contient du NaCl 0,14 M, Tris 0,01 M et MgCl_2 0,001 M successivement à pH 7 et 7,8-8. Les second et troisième extraits obtenus à pH 7,8-8 et contenant exclusivement un ARN "DNA-like", furent déposés directement sur un gradient de saccharose et centrifugés. Dans ces conditions, la majeure partie de l'ARNm radioactif est retrouvée sous la forme d'un pic en position 30 S.

La présence de protéines dans ces particules s'est révélée évidente d'après un rapport de D.O. 260/280 relativement bas (1,45-1,5), par une diminution du coefficient de sédimentation après déprotéinisation de l'extrait nucléaire par un traitement au phénol-SDS et par le fait qu'une incorporation de précurseurs marqués des protéines fait apparaître une radioactivité dans la même zone 30 S.

Les auteurs en ont conclu que les particules du pic 30 S étaient des complexes d'ARNm et de protéines.

D'autres propriétés de ces particules ont été déterminées (voir SAMARINA et al. (131, 132, 133)) : en plus de la composition en bases qui est similaire à celle de l'ADN, on peut citer le rapport ARN/Protéines qui est relativement faible et égal à 0,2-0,25 et le pouvoir qu'ont ces particules de se combiner avec une quantité supplémentaire d'ARNm libre (cette réaction est spécifique pour l'ARNm mais pas pour l'ARN ribosomal) ; des études morphologiques ont, en outre, montré que ces particules se présentent en structures compactes de forme discoidale de 180 Å de diamètre et de 80 Å d'épaisseur.

L'ensemble de ces observations ont permis aux auteurs de supposer que l'ARNm nouvellement formé dans le noyau de la cellule se retrouvait en majeure partie, sous la forme de particules de RNP spéciales, d'un type nouveau, ayant un coefficient de sédimentation de 30 S et chargées de transporter l'ARNm des chromosomes aux ribosomes.

— Des études ultérieures, effectuées par SAMARINA et al. (134, 135), ont montré que si les extraits nucléaires de foie de Rat sont préparés comme précédemment mais en présence d'inhibiteur cytoplasmique de la RNase, la répartition du matériel dans le gradient de saccharose se présente alors de façon totalement différente : les complexes contenant l'ARNm occupent une large zone comprise entre 30 S et 200 S. Le traitement avec de faibles quantités de RNase convertit ces complexes de coefficient de sédimentation élevés en particules 30 S. Tout se passe comme si les particules 30 S étaient des monomères d'une structure "polysome-like" plus complexe.

Ces formations, ou plus précisément leurs particules protéiques, d'abord désignées par le terme "informateurs" par SAMARINA, LUKANIDIN et GEORGIEV (136), sont maintenant universellement connues sous le nom d'"informofères" (voir SAMARINA et al. (137)).

B - PROPRIETES GENERALES DES COMPLEXES d'ARN-INFORMOFERES

1 - ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES

a) Particules 30 S et complexes de structure "polysome-like"

1) Propriétés de sédimentation en gradient de densité de saccharose (SAMARINA et al. (138, 139)).

Comme nous venons de le signaler, la totalité du matériel radioactif des extraits nucléaires obtenus en l'absence d'inhibiteur cytoplasmique de la RNase est constituée essentiellement de particules 30 S. En présence d'inhibiteur, ce matériel devient hétérogène et s'étale entre 30 S et 200 S ; généralement, outre le pic 30 S, on peut voir 2 ou 3 pics distincts à 45 S, 55 à 60 S et environ 70 S ; les pics de coefficients de sédimentation plus élevés ne sont pas reproductibles.

La quantité de matériel récupérée dans le pic 30 S est faible ; la majeure partie se trouve, en effet, localisée dans la zone 60 à 80 S. En fait, la répartition de ce matériel est surtout fonction de la qualité de l'inhibiteur de la RNase.

En présence de faibles quantités de RNase, il est possible de convertir presque quantitativement le matériel radioactif lourd -environ 90 à 95 p. 100- de la zone 30 à 150 S en particules homogènes 30 S. Il semble donc fort probable que les complexes lourds consistent en un certain nombre de particules 30 S liées les unes aux autres par un filament d'ARN.

2) Propriétés de sédimentation en gradient de CsCl (SAMARINA et al. (140, 141)).

Les particules prélevées de différentes zones du gradient de saccharose furent fixées à la formaldéhyde selon la technique de SPIRIN (et al. (142)) et sédimentées en gradient de CsCl. La densité des particules polymères des zones 60 S et 100 S fut déterminée et comparée à celle des particules monomères 30 S. Dans tous les cas, la densité est la même et égale à 1,4. En conséquence, le rapport ARN/Protéines dans les structures lourdes est identique à celui des monomères et équivaut à une proportion en protéines d'environ 80 p. 100. Ces résultats confirment, d'une part, la structure "polysome-like" mentionnée précédemment et, d'autre part, indiquent qu'entre les particules 30 S il n'y a pas de longues chaînes de dARN mais que les particules protéiques sont plutôt tassées le long du filament de dARN.

3) Action de la RNase

La RNase pancréatique dégrade une quantité importante de l'ARN des monomères 30 S en composants de faibles coefficients de sédimentation d'environ 4 S ; il n'en résulte pas une destruction de la particule elle-même. Par conséquent, la structure de base de la particule dépend de la fraction protéique (SAMARINA et al. (143)). En outre, des études cinétiques de la digestion par la RNase, effectuées sur les particules entières et sur l'ARN extrait des particules donnent des résultats identiques (SAMARINA et al. (144)). Ces résultats suggèrent que la particule elle-même est formée d'une fraction protéique et que le dARN

se place en surface de ces particules protéiques préformées.

4) Action des solutions salines concentrées ou de l'urée.

Sous l'action de solutions salines concentrées (KCl 0,7 M ou NaCl 2,5 M) ou encore d'urée 4 M, les particules 30 S peuvent être dissociées réversiblement en ARN et protéines. Des indications supplémentaires quant à la structure des particules ont pu être ainsi obtenues.

Les expériences effectuées par SAMARINA et al. (145) démontrent, en effet, que les particules peuvent se dissocier en leurs constituants ARN et protéines et ensuite se reconstituer par assemblage propre, après la disparition de l'agent de dissociation. L'observation au microscope électronique, après coloration à l'acétate d'uranyle ou l'acide phosphotungstique, montre que les particules ainsi reconstituées sont identiques aux particules d'origine. La dissociation sépare les particules en sous-unités protéiques de masse moléculaire relativement faible, leur coefficient de sédimentation étant de 4 à 6 S.

La propriété de dissociation des particules a permis d'envisager l'étude de leur composition protéique (voir plus loin ; p. 51).

b) Fraction ARN des particules : le dARN

1) La composition en bases des ARN extraits en présence d'inhibiteur fut déterminée par SAMARINA et al. (146). Les résultats, déterminés par la méthode de spectrophotométrie dans l'ultra-violet et exprimés en p. 100, donnent des valeurs de G = 23,5, C = 19,1, U = 27,1 et A = 29,3 correspondant à un rapport $G + C/A + U$ égal à 0,79, c'est-à-dire comparable à celui de l'ADN de Rat. Des résultats équivalents mais déterminés selon la méthode d'YCAS et VINCENT (147), ont été obtenus quant à la composition de l'ARN nouvellement formé. La même composition en bases avait été déterminée par SAMARINA et al. (148, 149) pour l'ARN d'extraits nucléaires obtenus sans inhibiteur.

2) Les propriétés de sédimentation des ARNm extraits des particules 30 S et de complexes de différentes tailles furent également étudiées par SAMARINA et al. (150). Les particules 30 S donnent un ARN 8,5 S. Les ARN provenant de particules collectées à partir des zones de gradient 45 S, 60 S et 75 S ont respectivement des coefficients de sédimentation de 14 S, 17 S et 21 S ; les particules provenant de zones plus lourdes allant de 120 à 130 S donnent un ARN hétérogène présentant un maximum à 32 S. Ces résultats montrent qu'il existe une corrélation étroite entre la taille des ARN et le nombre de monomères dans les particules et confirment la structure proposée pour les complexes dARN-informofères.

En outre, des évaluations de masse moléculaire des dARN ont pu être établies à partir des coefficients de sédimentation selon la méthode empirique proposée par SPIRIN (151). Il en résulte que les ARNm qui sédimentent à 8,5 S, 14 S, 17 S, 21 S et 32 S possèdent respectivement des masses moléculaires de 1,36, 4,96, 5,8, 9,27 et 22,45 ($\times 10^{-5}$). Ces données suggèrent l'existence d'une relation très étroite entre la masse moléculaire du dARN et le nombre de monomères des particules. La masse moléculaire du dARN lié à un monomère serait environ égale à 200 000.

c) Fraction protéique des particules : l'informofère

Des analyses de densité en CsCl ont déjà indiqué que la proportion en protéines dans les particules était de 80 p. 100.

Des études de dissociations réversibles par l'urée ont également démontré que la protéine de l'informofère était constituée de sous-unités protéiques 4 à 6 S. Cette capacité de dissociation a été mise à profit pour effectuer des études approfondies sur ces protéines :

1) L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide effectuée sur les protéines des particules 30 S et des complexes polymères a révélé l'existence, dans les deux cas, de trois bandes principales nommées A, B et C accompagnées de quelques composants mineurs. Ces résultats démontrent que la même protéine des formes monomères se retrouve dans les complexes plus lourds et confirment, par conséquent, la structure "polysome-like" mentionnée précédemment. Lorsque le matériel

protéique est spécialement purifié, aucun matériel ne migre vers l'anode ; dans les conditions électrophorétiques utilisées, ce résultat prouve clairement que les protéines de l'informofère ne sont pas très basiques et qu'elles diffèrent, en outre, de celles des ribosomes (SAMARINA et al. (152)).

2) De légères différences ayant été observées par MOLNAR et al. (153) quant à la répartition quantitative du matériel protéique dans les 3 bandes principales A, B et C, KRICHEVSKAJA et GEORGIEV (154) ont réexaminé la question en étudiant l'influence de la réduction de ponts disulfures éventuellement présents dans les protéines par l'action du mercaptoéthanol. L'ensemble des résultats obtenus par électrophorèse en gel de polyacrylamide, ont démontré en fait l'existence d'une seule protéine pouvant passer de la forme réduite (protéine B) à des formes oxydées (protéines A ou C selon l'agencement des ponts disulfures).

3) Des résultats de composition en acides aminés ont d'ailleurs confirmé l'existence de 0,8 p. 100 de cystéine dans les particules 30 S. Ils ont, en outre, démontré que la composition en acides aminés des informofères n'était pas de type basique (KRICHEVSKAJA et GEORGIEV (155)).

4) Des études de mobilité électrophorétique, toujours effectuées en gel de polyacrylamide, ont permis de déterminer approximativement, par application de la technique de SHAPIRO et al. (156), la masse moléculaire des sous-unités protéiques qui fut estimée à 40 000-45 000. Etant donnée la masse moléculaire d'environ 800 000 de la protéine des monomères, il s'ensuit qu'un seul informofère consiste de 15 à 20 sous-unités protéiques identiques (KRICHEVSKAJA et GEORGIEV (157)).

2 - ETUDES MORPHOLOGIQUES

Une analyse morphologique des particules provenant de différentes zones du gradient a été effectuée, suite à une fixation par la formaldéhyde et ombrage au platine ou au palladium (SAMARINA et al. (158)).

Un examen au microscope électronique du pic 30 S révèle la présence des particules habituelles déjà décrites précédemment (voir p. 47). Dans les zones plus lourdes, on observe aussi quelques particules simples mais surtout des agrégats ou des chaînes de particules 30 S. Dans le cas de chaînes, on peut compter le nombre de particules liées les unes aux autres. Il a été possible d'effectuer une analyse des particules collectées à partir de différentes zones du gradient et de montrer que les pics 45 S et 60 S contiennent respectivement des dimères et des trimères de façon prédominante, la zone 70 à 75 S des tétramères et des pentamères ; les complexes les plus lourds contiennent de longues chaînes comprenant jusqu'à 8 à 12 monomères ; on peut observer en outre que les monomères se trouvent disposés d'une manière assez serrée les uns aux autres. Un traitement limité de la RNase convertit tous ces complexes polymères en monomères identiques aux particules 30 S d'origine.

Toutes ces observations permettent d'évoquer une corrélation entre le coefficient de sédimentation et le nombre de particules et de confirmer l'hypothèse quant à la structure des complexes dARN-informofères : les particules lourdes sont bien des complexes "polysomes-like" où les informofères sont étroitement liés les uns aux autres par un filament d'ARN.

SAMARINA et al. (159) ont proposé un schéma hypothétique quant à l'organisation générale des complexes nucléaires contenant le dARN ; nous le reproduisons dans la figure 5 (p. 54).

Les principales propriétés des complexes dARN-informofères dont nous pouvons citer en exemple le coefficient de sédimentation hétérogène en gradient de saccharose, la faible densité en CsCl et la composition en bases "DNA-like" des ARN, évoquent de nombreux points communs avec d'autres particules de dRNP rencontrées dans le nucléoplasme d'autres cellules animales. Les formes les plus proches sont peut-être les "polysomes intranucléaires" de SADOWSKI et HOWDEN (160) rencontrées également dans les noyaux de foie de Rat, ou les complexes 30 S à 90 S identifiés par CARTOUZOU et al. (161) dans les noyaux de la glande thyroïde de Mouton et surtout les particules géantes 80 à 300 S trouvées par STEVENIN et al. (162) dans les noyaux de cerveau de Rat (se reporter dans le premier chapitre, au paragraphe : Les particules de dRNP ; p. 16).

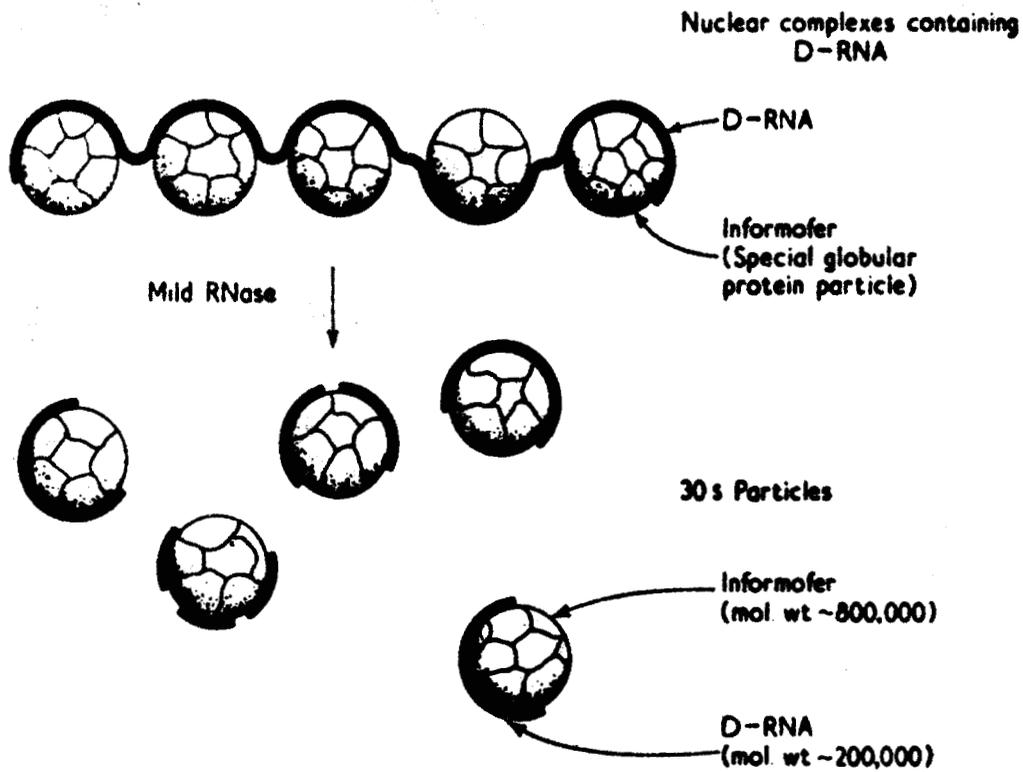


Figure 5

Schéma de la structure des complexes contenant le dARN nucléaire (d'après SAMARINA et al. (163)).

C - ROLE BIOLOGIQUE DES INFORMOFERES

Des considérations surtout hypothétiques sur le rôle des informofères, c'est-à-dire des protéines combinées au dARN, peuvent être formulées de la manière suivante :

1 - LES INFORMOFERES JOUERAIENT UN ROLE ESSENTIEL DANS LE DETACHEMENT DU dARN A PARTIR DU MOULE ADN

Des calculs approximatifs ont permis, en effet, de démontrer que les complexes dARN-informofères les plus lourds (ceux comprenant 18 à 20 monomères), pouvaient contenir un ARN atteignant une masse moléculaire d'environ 4×10^6 (SAMARINA et al. (164)) ; cette valeur correspond à celle des dARN de masse moléculaire élevée nouvellement synthétisés (SCHERRER et al. (165)). En outre, des déterminations effectuées sur des ARN isolés directement à partir de fractions nucléaires, démontrent qu'au moins 80 à 90 p. 100, sinon la totalité, du dARN nucléaire se trouvent inclus dans de tels complexes (GEORGIEV (166)).

Ces résultats tendent à prouver que, dès leur synthèse sur le moule ADN ou juste après, les dARN polycistromiques sont pris en charge par les informofères.

2 - LES INFORMOFERES ASSURERAIENT LE CLIVAGE SPECIFIQUE DE dARN GEANTS EN CHAINES PLUS COURTES

Cette hypothèse, formulée par GEORGIEV (167) vient, récemment, d'être démontrée par NIESSING et SEKERIS (168). Lorsque des ARN "DNA-like" nouvellement synthétisés (50 à 80 S), sont extraits de noyaux de foie de Rat et incubés en présence de faibles concentrations en informofères, il se produit une conversion presque complète des ARN de masse moléculaire élevée en matériel sédimentant principalement à 30 S ; cet ARN 30 S constitue une étape essentielle au cours de la dégradation. Une plus forte concentration en informofères, dégrade l'ARN 30 S en ARN 18 S et ultérieurement en molécules sédimentant entre 16 et 4 S. Ces résultats indiquent que les informofères contiennent une endonucléase spécifique qui serait impliquée, in vivo, dans le clivage d'ARN "DNA-like" de masse moléculaire élevée.

3 - LES INFORMOFERES ASSURERAIENT LA SELECTION ENTRE dARN DESTINES AU CYTOPLASME (ARN_m) ET dARN DETRUIES DANS LE NOYAU

Des expériences d'hybridations compétitives ont montré que les deux classes de dARN nucléaires sont combinées avec les informofères ; il semble donc probable que ces derniers soient impliqués dans la sélection du dARN destiné à être transféré dans le cytoplasme (SAMARINA et al. (169)).

4 - ENFIN, LES INFORMOFERES TRANSPORTERAIENT LES ARN_m VERS LE CYTOPLASME ou tout au moins jusqu'à la membrane nucléaire (MOLNAR et al. (170)).

Tous ces processus de transformations du dARN dans lesquels les informofères semblent impliqués, suggèrent qu'il s'agit de protéines d'un type spécial pouvant jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes au niveau du transport de l'ARN_m.

III - LES PARTICULES NUCLEAIRES HOMOGENES 40-45 S

Des particules nucléaires spéciales, autres que les complexes dARN-informofères, ont pu être isolées par extraction ou incubation de noyaux ; ce sont :

A - LES PARTICULES DE RNP 40 S DE MOULE ET CHAUEAU

1 - MISE EN EVIDENCE DES PARTICULES 40 S

Des particules de RNP de constante de sédimentation 40 S et contenant un ARN rapidement marqué, ont été isolées par MOULE et CHAUEAU (171), par extraction de noyaux de foie de Rat.

Les noyaux de foie de Rat ayant reçu une injection intrapéritonéale d'acide orotique sont isolés selon la technique de CHAUEAU (172) puis extraits, par broyage en mortier à 0° C, dans un tampon contenant du Tris-HCl 50 mM à pH 7,4, MgCl₂ 1 mM et KCl 25 mM, en présence de sable de Fontainebleau. Par la suite, l'extraction des noyaux n'a plus été effectuée par broyage en mortier mais à l'ultra-turax. Obtenue par l'une ou l'autre de ces méthodes, la suspension est soumise à une agitation de 15 mn puis à l'ultracentrifugation différentielle, donnant finalement un

sédiment appelé "Culot Tris" ; ce dernier est remis en suspension dans le tampon d'extraction mais contenant une concentration plus forte en magnésium (MgCl_2 5 mM), puis analysé en gradient de densité de saccharose. L'examen du gradient révèle l'existence d'une population de particules marquées dont le coefficient de sédimentation est d'environ 40 S.

2 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PARTICULES 40 S

a) Etude des particules (MOULE et CHAUVEAU (173))

1) Influence du magnésium

L'obtention des particules est sous la stricte dépendance de la concentration en Mg^{2+} du milieu d'extraction : la concentration optimale du tampon en Mg^{2+} est 1 mM. Pour des molarités supérieures, le pic diminue régulièrement jusqu'à 5 mM ; au delà, il disparaît ; dans ces conditions, le phénomène d'extraction n'aurait pas lieu.

2) Influence du DOC

Les particules sont très sensibles au DOC à 1 p. 100.

3) Composition

Les particules contiennent 11 p. 100 d'ARN et 89 p. 100 de protéines (en poids sec). Le dosage de l'ADN a été négatif.

b) Etude de l'ARN

1) Coefficient de sédimentation

L'ARN extrait des particules par le phénol-SDS à 1 p. 100 sédimente en position 3,4 S, même en présence d'inhibiteur de la RNase. Il diffère, par conséquent, de l'ARN de transfert dont le coefficient de sédimentation, dans les mêmes conditions d'ultracentrifugation analytique, est de 4,2 S (MOULE et CHAUVEAU (174)).

2) Composition en bases

Déterminée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet et selon la méthode d'YCAS et VINCENT (175) et KITAZUME et YCAS (176), la composition en bases de l'ARN des particules est sensiblement la même dans les deux cas et donne un rapport G + C/A + U égal à environ 1 (MOULE et CHAUVEAU (177)). En outre, la composition en bases déterminée selon la

seconde technique est constante quelle que soit la durée du marquage au ^{32}P in vivo. Ces résultats suggèrent l'homogénéité métabolique de l'ARN (MOULÉ ¹ et al. (178)).

D'autre part, l'ARN des particules ne comporte pas de bases méthylées ce qui conforme, d'une part, que ce n'est pas de l'ARN de transfert et prouve, d'autre part, qu'il ne s'agit pas non plus d'ARN de faible masse moléculaire décelés récemment dans les noyaux de foie par LARSEN ¹ et al. (179) et WEINBERG et PENMAN (180).

3) Durée de vie

La demi-vie de l'ARN, dans le noyau, est de $16 \text{ h} \pm 2$ (MOULÉ ¹ et al. (181)).

4) Influence d'inhibiteurs de synthèse

- L'actinomycine D à fortes doses (800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids d'animal) n'inhibe que très partiellement la synthèse de l'ARN des particules in vivo. En outre, la composition en bases reste la même dans la fraction d'ARN qui continue à être synthétisée. Ce résultat apporte un argument supplémentaire en faveur de l'homogénéité de l'ARN trouvé dans les particules (MOULÉ ¹ et al. (182)).

- En présence de puromycine administrée à une dose inhibant la synthèse de l'ensemble des protéines hépatiques à plus de 90 p. 100, la biosynthèse des particules se poursuit normalement ; pendant ce temps, en effet, l'activité spécifique de l'ARN nouvellement synthétisé des particules est identique à celle trouvée chez des animaux témoins. Ces résultats suggèrent qu'il n'y aurait pas obligatoirement de synchronisme entre la synthèse de l'ARN et celle des protéines des particules 40 S, ce qui suppose l'existence d'un "pool" de ces protéines dans le noyau (MOULÉ ¹ et al. (183)).

c) Etude des protéines (SARASIN (184))

1) Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Dissociées par l'urée 6 M, les protéines des particules ont été séparées électrophorétiquement en gel de polyacrylamide. Les densitogrammes obtenus révèlent essentiellement la présence de trois bandes

protéiques A, B et C comme c'est le cas pour les informofères (se reporter à la p. 51).

2) Composition en acides aminés

L'étude de la composition en acides aminés des protéines des particules conduit à un rapport $\frac{\text{acides aminés acides}}{\text{acides aminés basiques}}$ égal à 1,39. Ces particules diffèrent, par conséquent, des ribosomes dont les protéines présentent, globalement, un caractère basique.

3 - ETUDE MORPHOLOGIQUE DES PARTICULES 40 S (MONNERON et MOULÉ (185))

L'observation au microscope électronique de particules 40 S incluses dans l'Epon ou ombrées par l'uranium, révèle la présence d'une population très homogène de particules.

En coloration négative par le silicotungstate de soude, ces particules semblent sphériques et mesurent environ 250 Å de diamètre.

En coloration positive par l'uranyle, on peut distinguer, à fort grossissement, des taches plus denses d'environ 40 Å de diamètre, arrondies, qui semblent correspondre à des sous-structures des particules.

Des études de digestions enzymatiques ont, en outre, démontré que ces particules pouvaient correspondre aux grains interchromatiniens trouvés dans le noyau in situ (se reporter dans le premier chapitre, au paragraphe : les grains interchromatiniens ; p. 12).

4 - ROLE BIOLOGIQUE DES PARTICULES 40 S

Le rôle biologique des particules 40 S n'a pu être déterminé :

(1) Elles sont nettement différentes des ribosomes à la fois par leurs proportions et leurs compositions en ARN et protéines.

(2) Leur composition en protéines les rapprocherait des particules 30 S de SAMARINA et al. (186).

(3) Ajouté à un système acellulaire de E. coli incorporant les acides aminés, l'ARN des particules est sans action sur l'incorporation (MOULÉ et al. (187)). Il ne peut donc être considéré comme messager, le critère de composition en bases étant insuffisant.

B - LES PARTICULES DE RNP 45 S D'ISHIKAWA et al.

1 - MISE EN EVIDENCE DE L'ELIMINATION PAR LES NOYAUX DE MATERIEL CONTENANT DES PARTICULES 45 S

Très récemment (en 1969), des particules de RNP ayant une constante de sédimentation de 45 S et contenant un ARN rapidement marqué, ont été mises en évidence par incubation de noyaux de foie de Rat (ISHIKAWA, KURODA et OGATA (188)).

Les noyaux isolés à partir de foie de Rat marqué à l'acide orotique ^{14}C pendant 40 mn, furent incubés, à 20° C, pendant 5 ou 20 mn, dans un milieu contenant du saccharose 0,88 M, KCl 0,025 M, MgCl_2 0,005 M, Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 et ATP 0,001 M, en présence d'inhibiteur de la RNase. Les noyaux furent sédimentés par centrifugation différentielle ; le surnageant obtenu, contenant la totalité des produits éliminés par les noyaux, fut appelé "released fraction". Analysée par centrifugation en gradient de saccharose, cette fraction révèle la présence de particules rapidement marquées en position 45 S.

2 - ETUDE DE LA RADIOACTIVITE ACIDO-INSOLUBLE DE LA TOTALITE DU MATERIEL ELIMINE PAR LES NOYAUX. INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS (ISHIKAWA et al. (189))

a) Température et durée de l'incubation

La quantité de matériel éliminé par les noyaux est fonction du temps et proportionnelle à la température dans des limites comprises entre 10 et 37° C.

b) Concentration en ATP

L'ATP stimule spécifiquement l'élimination par les noyaux de produits radio-actifs acido-insolubles ; les GTP, CTP et UTP sont moins efficaces et les ADP et AMP n'ont presque pas d'effet.

c) Concentration en cations bivalents

Les cations bivalents s'opposent à l'élimination par les noyaux de radioactivité acido-insoluble. Les métaux alcalino-terreux tels que Mg^{2+} , Ca^{2+} et Ba^{2+} agissent en antagonistes de l'ATP.

d) Le pH du milieu d'incubation

L'élimination par les noyaux de radioactivité acido-insoluble est proportionnelle au pH dans des limites comprises entre 6 et 8.

3 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PARTICULES 45 S

a) Etude des particules (ISHIKAWA et al. (190))

Les particules du pic 45 S ont un rapport ARN/Protéines très faible (environ 0,2) et d'ailleurs une densité en CsCl également très faible et égale à 1,4.

Elles se révèlent très sensibles à l'action de la RNase (1 $\mu\text{g/ml}$) et de l'EDTA (10 mM). Par contre, elles offrent une résistance considérable au traitement par la DNase (1 $\mu\text{g/ml}$) et le DOC à 0,2 p. 100.

Ajoutons qu'en présence de doses très élevées d'inhibiteur de la RNase, le composé 45 S diminue considérablement au profit d'une radioactivité importante qui apparaît dans la zone 80 S.

b) Etude de l'ARN (ISHIKAWA et al. (191, 192))

L'ARN des particules 45 S extrait selon la méthode au phénol-SDS, à chaud, fut analysé par centrifugation en gradient de saccharose ; l'examen du gradient révèle que l'ARN se répartit dans une large zone s'étalant de 6 à 28 S et possédant un maximum à 14-15 S. Ces résultats furent confirmés par l'étude de l'ARN par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

La composition en bases de l'ARN déterminée à la fois par spectrophotométrie dans l'ultra-violet et par la mesure des radioactivités des nucléotides après un court marquage au ^{32}P , donne un même rapport $G + C/A + U$ dont la valeur est égale à 0,85.

c) Etude des protéines (ISHIKAWA et al. (193))

Les protéines des particules de RNP 45 S furent extraites par l'action combinée de l'urée 4 M et du LiCl 2 M. Soumises à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, ces protéines se retrouvent dans les zones de migration lente ; par comparaison, elles sont moins basiques que les histones et les protéines de structure des ribosomes. L'étude

de la composition en acides aminés confirme ce résultat ; en effet, le contenu en acides aminés basiques des protéines des particules 45 S est environ égal à 60 p. 100 de celui des sous-unités ribosomales.

En outre, des études métaboliques ont été effectuées ; elles ont montré que l'activité spécifique des protéines des particules 45 S est deux fois plus élevée, après 1 h de marquage in vivo, que celle des protéines nucléaires totales.

Ces résultats mettent en relief la nature très spéciale des protéines des particules 45 S.

4 - ROLE BIOLOGIQUE DES PARTICULES 45 S

Ces particules de RNP 45 S, contenant des protéines bien spécifiques assez comparables aux informofères de GEORGIEV (voir p. 51), représenteraient la forme principale sous laquelle l'ARNm apparaît durant son transport du noyau vers le cytoplasme. Le caractère "messenger" de l'ARN contenu dans ces particules a été prouvé par son activité stimulative des synthèses protéiques dans un système acellulaire d'E. coli. (ISHIKAWA et al. (194)). Cet ARN semble, en outre, pouvoir se lier aux ribosomes pour former des polysomes actifs (ISHIKAWA et al. (195)).

L'étude des particules de rRNP rencontrées dans le noyau ou le cytoplasme de différentes cellules animales, différenciées ou non, démontre indéniablement entre ces particules l'existence de caractères de parenté prouvant que les différentes formes rencontrées cernent un même type de particules. Le trait commun, universellement rencontré dans ces particules, est leur densité en CsCl relativement faible et égale à 1,4 correspondant à un contenu en ARN très faible et égal à environ 20 p. 100.

Des études approfondies font, néanmoins, apparaître de légères divergences dans les résultats observés. Citons, pour exemples :

(1) Le coefficient de sédimentation des particules.

Il est hétérogène et varie dans des limites généralement comprises entre 20 S et 300 S ; ceci est tout à fait normal puisqu'il est fonction de la taille de l'ARNm, lui-même étant fonction du type cellulaire étudié. Néanmoins, les formes homogènes, appelées parfois "monomères" et correspondant à un degré limite de l'action ménagée par la RNase, varient et sont égales suivant les cas à 30 S, 40 S ou 45 S.

(2) La composition en bases de l'ARN. Elle est toujours à tendance "DNA-like" ; le rapport des bases G + C/A + U varie cependant de 0,7 à 1.

(3) La nature des protéines. Il s'agit dans tous les cas étudiés de protéines spéciales à tendance acide et nettement différentes de celles des ribosomes. Si l'on aborde l'étude fine de leur structure, elles sont constituées les unes de sous-unités ayant un coefficient de sédimentation de 4 à 6 S (cas de l'informofère) ou d'environ 9 S (cas de la protéine de l'informosome).

(4) La morphologie et l'organisation de la structure générale. Les études n'ont pas été jusqu'à présent très poussées et il est difficile de se prononcer dans ce domaine. Si GEORGIEV, se basant sur des observations morphologiques et surtout des déterminations biochimiques, a réussi à donner un schéma hypothétique de l'organisation générale de l'informofère et plus précisément du complexe d'ARN-informofères, aucune micrographie électronique de l'informosome n'a été fournie par SPIRIN. Ce n'est que très récemment que SPOHR, GRANBOULAN et al. (196) ont effectué l'étude morphologique de particules de RNP, isolées du cytoplasme de cellules HeLa, qui semblent appartenir au type informosome ; elles se présentent sous forme de petites particules rondes de 110 à 200 Å de diamètre et qui paraissent formées par l'enroulement continu d'une chaîne à l'aspect perlé de 35 Å d'épaisseur. Cette constitution s'oppose totalement à celle préconisée par GEORGIEV où les informofères sont des protéines globulaires comme surajoutées tout au long du filament de d'ARN (revoir fig. 5 ; p. 54).

Bien que abondamment travaillé depuis ces dernières années, le problème de la nature exacte des particules transportant l'ARNm reste, cependant, irrésolu. Les difficultés rencontrées sont inhérentes

aux systèmes utilisant des cellules animales. On ne peut encore dire si les particules de dRNP rencontrées sont absolument identiques entre elles in vivo, les divergences perceptibles n'étant alors dues qu'aux modalités d'extraction, ou s'il s'agit de particules appartenant à une même famille mais étudiées à un degré d'évolution différent ; l'étude systématique de la protéine des particules de RNP, moins sensible aux dégradations que les ARN, pourrait apporter des arguments plus probants et révéler si ces particules évoluent ou non au cours de leur transport du chromosome au ribosome.

TRAVAUX PERSONNELS

DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLAIRE ET DE LA RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES ARN
--

Le problème de la détermination de la composition molaire en nucléotides des ARN et de leur radioactivité spécifique avait déjà été abondamment travaillé et en grande partie résolu au laboratoire, en particulier, grâce aux travaux de BOULANGER, MONTREUIL et DERUMEZ (se reporter à la thèse de DERUMEZ (197)). Néanmoins, au moment où nous avons commencé nos travaux, les méthodes existantes ne fournissaient pas des résultats rigoureusement reproductibles, fait incompatible avec notre hypothèse de travail qui était la recherche d'éventuelles modifications chimiques ou biochimiques des ARN de différentes fractions cellulaires. Aussi avons-nous été amenée à apporter quelques perfectionnements supplémentaires à ces méthodes qui nous ont conduite à l'obtention de résultats statistiques très satisfaisants.

1 ^e - MISES AU POINT TECHNIQUES
--

I - PREPARATION DES ARN

A la suite de nombreuses études critiques, trois méthodes avaient été retenues pour la préparation des ARN tissulaires : deux d'entre elles, dérivées du procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER ne nécessitaient pas l'isolement préalable des ARN, contrairement à la troisième qui consistait à extraire les ARN par le chlorhydrate de guanidine. Afin de pouvoir les appliquer avec un maximum d'efficacité, il nous a semblé indispensable, d'une part, de déterminer laquelle de ces méthodes donnait le meilleur rendement absolu en ARN et, d'autre part, d'examiner la pureté des fractions obtenues.

Les travaux que nous avons entrepris ont été effectués en collaboration avec R.P. SINGHAL et J.P. KERCKAERT.

A - PROCEDES D'EXTRACTION DES ARN

1 - PROCEDE DE SCHMIDT ET THANNHAUSER (198) ET BOULANGER ET MONTREUIL (199)

Les organes sont rapidement prélevés et broyés à l'aide d'un appareil de FISCHER. La pulpe est recueillie directement dans 10 volumes d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 p. 100 (p : v) maintenue à 4° C. La suspension est homogénéisée pendant 2 à 5 mn avec un appareil de POTTER et ELVEHJEM, puis centrifugée 10 mn à 1 500 g. Le culot de précipitation obtenu est lavé deux fois dans la même solution d'acide trichloracétique. Le résidu acido-insoluble est ensuite lavé trois fois par l'éthanol absolu à 4° C, puis soumis à trois délipidations à reflux dans un mélange d'éthanol et d'éther (v : v).

2 - PROCEDE DE SCHMIDT ET THANNHAUSER MODIFIE PAR SINGHAL (200)

Il s'agit du même procédé que celui décrit ci-dessus mais où les lavages à l'éthanol sont remplacés par des lavages dans l'éther pur qui permet une meilleure élimination de l'acide trichloracétique.

3 - PROCEDE D'EXTRACTION PAR LE CHLORHYDRATE DE GUANIDINE

Ce procédé dérive du protocole décrit par COX et ARNSTEIN (201). Il a été mis au point, au laboratoire, par SINGHAL (202). Les modifications essentielles ont été d'effectuer une double extraction par le chlorhydrate de guanidine (5 M puis 6 M) et d'isoler les ARN par précipitation alcoolique (au lieu de faire passer sur des colonnes de résines à échange de cations). Le protocole expérimental est le suivant :

a) Extraction des ARN. 5 g de tissu sont broyés dans 3 ml du mélange Tris 0,05 M, KCl 0,025 M, MgCl₂ 0,005 M ajusté à pH 6,8 avec de l'acide acétique. Le broyat est recueilli dans un bécher refroidi dans un bain de glace et d'acétone. On ajoute ensuite 5 volumes d'une solution de chlorhydrate de guanidine 5 M contenant 0,033 M d'EDTA (disodique) et ajustée à pH 4,5 par de l'acide chlorhydrique. On homogénéise et on laisse en contact à 0° C pendant 30 mn. Dans le cas où l'on opère sur des fractions cytoplasmiques contenant une quantité très faible d'ARN, on ajoute, après l'homogénéisation, 0,5 volume d'éthanol absolu que l'on mélange par simple agitation

manuelle avec une tige de verre ; on abandonne, dans ce cas, 60 mn à - 5° C. Le précipité formé est ensuite recueilli par une centrifugation, à 0° C, de 60 mn à 10 000 g (dans le cas de substrats pauvres en ARN, on centrifuge à 40 000 g pendant 60 mn). Le surnageant est décanté et le culot de centrifugation est réhomogénéisé dans une solution de chlorhydrate de guanidine 6 M ajustée à pH 7,2, à raison de 1 ml pour 1 g de tissu de départ. Après un repos de 10 mn, on centrifuge 30 mn à 9 000 g. Puis on lave de nouveau le précipité, dans les mêmes conditions, avec le tampon EDTA (disodique) 0,2 M, Tris 0,01 M ajusté à pH 7 avec de la soude, et enfin avec de l'éthanol absolu amené à - 20° C.

L'ARN est ensuite extrait de ce complexe ARN-guanidine insoluble par 5 traitements avec le mélange Tris 0,01 M, EDTA 0,002 M ajusté à pH 7,2, à raison de 1,5 à 2 ml par gramme du tissu de départ. Après chaque extraction (la première de 60 mn et les suivantes de 30 mn), on centrifuge pendant 20 mn, à 2° C, à 9 000 g. On recueille les 5 surnageants qui sont conservés à - 20° C avant d'être rassemblés. La solution finale renferme les ARN libérés.

b) Purification de l'extrait. Cette solution finale est additionnée de 2 p. 100 d'acétate de potassium à 100 p. 100 (p : v). La précipitation est effectuée alors par addition de 2 volumes d'éthanol absolu à - 20° C et le mélange est abandonné 15 heures à cette température. Le précipité blanc floconneux est lavé deux fois par l'éthanol à 75 p. 100 contenant 2 p. 100 d'acétate de potassium et une fois par l'éthanol à 75 p. 100. Toutes les centrifugations sont effectuées à - 20° C pendant 30 mn à 9 000 g.

Le précipité ainsi obtenu est constitué d'ARN macromoléculaire, libre de protéines.

B - DETERMINATION DU RENDEMENT ABSOLU EN ARN

1 - MODE OPERATOIRE

Les ARN provenant de foies de Rats de souche SPRAGUE soumis à un jeûne de 12 h pour réduire le glycogène hépatique, ont été préparés selon les trois procédés décrits ci-dessus. Les trois protocoles expérimentaux ont été menés très quantitativement à partir de trois lots

contenant un même poids du même broyat de foie.

Les ARN ont ensuite été traités en vue du dosage des nucléotides selon le protocole expérimental définitif (voir p. 92). Ils ont été hydrolysés en présence de soude 0,5 N, à 20° C, pendant 24 h. Après purification sur colonnes de Dowex, les hydrolysats furent séparés par électrophorèse sur papier et les nucléotides dosés par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

La somme des 4 nucléotides a été calculée de manière comparative dans les trois procédés, donnant ainsi le rendement absolu en ARN.

2 - RESULTATS

Les résultats correspondant à quatre séries d'extractions sont rassemblés dans le tableau V (p. 70) ; ils peuvent se résumer de la manière suivante :

a) Les quantités d'ARN tissulaires dosées après extraction par les deux méthodes selon SCHMIDT et THANNHAUSER sont identiques.

b) Au contraire, les quantités d'ARN obtenues par extraction directe au chlorhydrate de guanidine sont légèrement plus faibles. Elles présentent, en effet, un déficit moyen de 6 à 7 p. 100 par rapport aux méthodes indirectes.

3 - CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Les méthodes que nous avons choisies pour l'extraction des ARN de foie de Rat donnent toutes les trois des résultats presque identiques au point de vue rendement. Elles pourront, éventuellement, être toutes appliquées à l'étude des ARN tissulaires.

Ces résultats s'opposent à ceux de SINGHAL (203) qui trouvait que la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER qu'il avait personnellement modifiée fournissait un rendement très supérieur en ARN à celle utilisée jusqu'alors et que c'était, en outre, la méthode d'extraction par le chlorhydrate de guanidine qui fournissait le rendement optimum.

C - ETUDE DE LA PURETE DES ARN

1 - MODE OPERATOIRE

La pureté des ARN obtenus selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée et par le chlorhydrate de guanidine a été contrôlée.

TABLEAU V

Quantités d'ARN tissulaires obtenues en fonction de différents procédés d'extraction.

Somme des 4 nucléotides (a)	Extraction directe par le chlorhydrate de guanidine :		Extractions indirectes :	
	Méthode de COX et ARNSTEIN (204) modifiée		Méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (205)	Méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée (b)
Expérience n° 1	103,4		121,2	123,4
Expérience n° 2	145,4		125,4	128,7
Expérience n° 3	114,4		138,0	129,3
Expérience n° 4	113,6		129,4	—
Moyenne	119,2		128,5	127,1

(a) Quantités obtenues à partir d'un même homogénat de foie de Rat.

(b) Au cours des délipidations l'éthanol est remplacé par l'éther.



Les préparations d'ARN de foies de Rat marqués in vivo par le radiophosphore, pendant 24 h, ont été, comme précédemment, hydrolysées et séparées par électrophorèse sur papier. Les électrophorégrammes ont été révélés de façon comparative par l'observation en lumière ultra-violette, l'autoradiographie, le nitrate d'argent ammoniacal et la ninhydrine à 0,1 p. 100 dans l'acétone.

2 - RESULTATS

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 6 (p. 72). Ils peuvent se résumer de la manière suivante :

a) Les extraits obtenus selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée révèlent sur les autoradiogrammes, outre les 4 nucléotides C, A, G et U et l'acide pseudo-uridylique, la présence de nombreux contaminants qui sont :

- 1) les inositols mono- et di-phosphates ;
- 2) l'acide glycérophosphorique et des dérivés d'origine phosphatidique (phosphocholine, phosphocolamine, phosphosérine) ;
- 3) des dérivés protidiques (sérine, phosphothréonine et phosphopeptides) ;
- 4) une fraction d'oligonucléotides qui migre avec l'acide phosphorique.

Ces différents composés ont été caractérisés par SINGHAL (206) par des analyses chromatographiques complémentaires dans les systèmes solvants classiques des acides aminés et des peptides.

b) Les extraits d'ARN obtenus par le chlorhydrate de guanidine montrent, sur les autoradiogrammes, une absence totale de dérivés phosphorylés non nucléotidiques.

3 - CONCLUSIONS ET DISCUSSION

La présence de composés phosphorylés accompagnant les nucléotides de la fraction ARN des tissus traités selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER avait déjà été signalée par de nombreux auteurs. Parmi eux, MONTREUIL et BOULANGER (207) ont caractérisé la présence d'inositol phosphate, DOLY et al. (208) celle des phosphopeptides ; l'acide

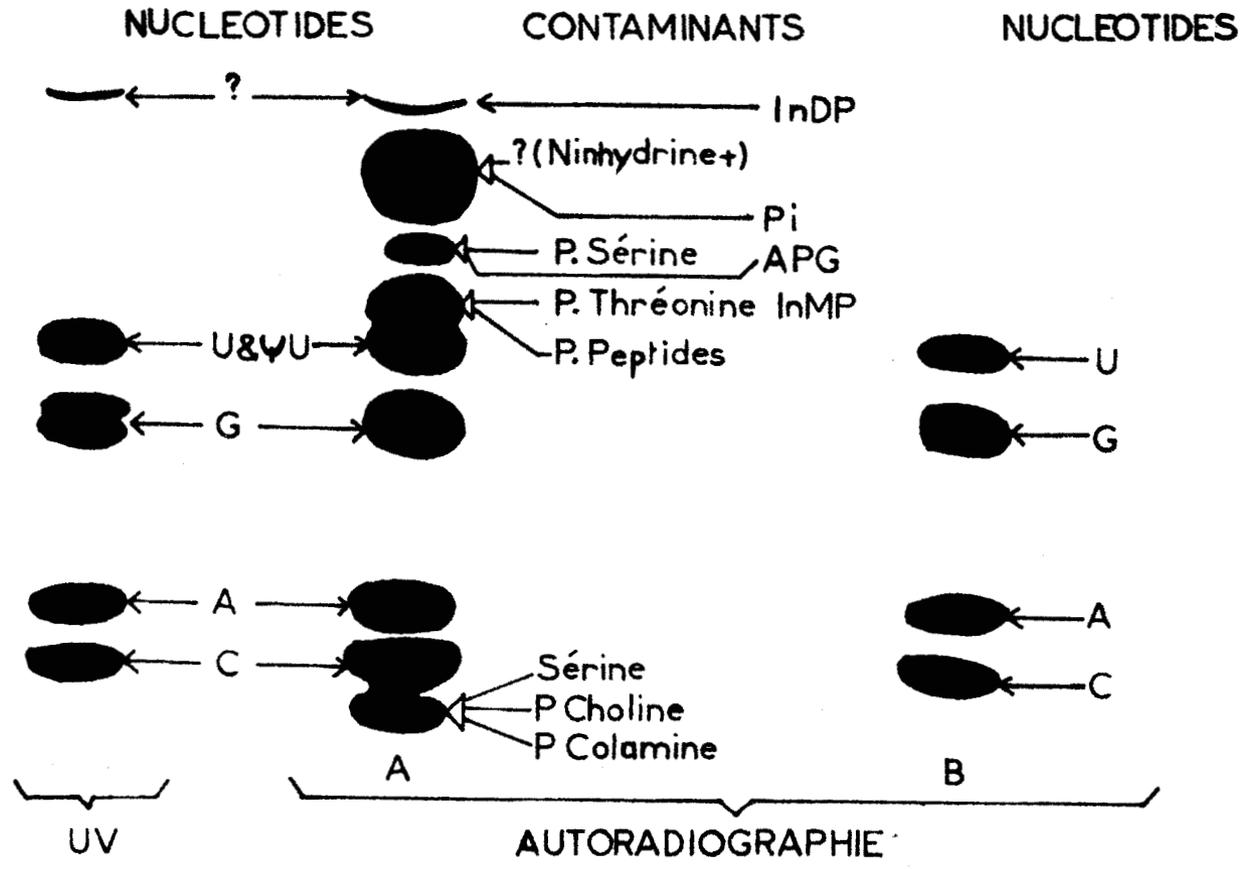


Figure 6

Séparation par électrophorèse (tampon citrate 0,02 M à pH 3,5) de l'hydrolysate alcalin d'un extrait de foie de Rat obtenu par les méthodes de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée (A) et à la guanidine (B) (d'après SINGHAL).



100 mg of ...
 ...
 ...



W11785C1D1P2

W11785C1D1P2

phosphoglycérique accompagné d'une faible quantité d'acide pseudo-uridylique a été mis en évidence par MONTREUIL, DERUMEZ et BOULANGER (209). Nos résultats confirment la présence de tels composés qui se localisent préférentiellement dans les zones de migration des acides uridylique et cytidylique. La plus grande prudence devra donc être observée quant à l'application de cette méthode pour des études métaboliques où le radiophosphore est utilisé comme marqueur.

La méthode d'extraction des ARN tissulaires par le chlorhydrate de guanidine offre, par contre, toute garantie sur les causes d'erreur dues à l'interférence de produits phosphorylés.

L'étude critique concernant la préparation d'ARN tissulaires nous permet de conclure que si les méthodes selon SCHMIDT et THANNHAUSER donnent le meilleur rendement en ARN, le procédé d'extraction par le chlorhydrate de guanidine fournit des préparations d'ARN extrêmement pures. Compte tenu de ces résultats, nous pouvons en tirer quelques considérations d'ordre pratique :

1) Les méthodes selon SCHMIDT et THANNHAUSER seront de préférence utilisées pour des études quantitatives d'ARN et dans la détermination de la composition molaire en nucléotides par spectrophotométrie dans l'ultra-violet. En effet, la présence de substances absorbant la lumière ultra-violette, constituées essentiellement d'acides aminés et migrant à l'emplacement des spots nucléotidiques, n'existe qu'à l'état de traces et ne peut provoquer d'erreurs dans les dosages.

2) La méthode d'extraction par le chlorhydrate de guanidine sera de préférence utilisée dans tous les cas où l'interférence de produits phosphorylés risque de fausser les résultats. Son emploi sera conseillé, en particulier, dans les déterminations de radioactivités spécifiques et pour les études de composition en nucléotides des ARN selon le procédé d'YCAS et VINCENT (210).

II - HYDROLYSE ALCALINE DES ARN

Nos recherches ont porté essentiellement sur les points suivants :

A - DETERMINATION DES CONDITIONS D'HYDROLYSE

La détermination des conditions d'hydrolyse a donné lieu à une somme considérable de travaux. Nous avons porté notre choix sur les méthodes d'hydrolyse partielle des ARN qui libèrent les nucléotides ; d'une part, elles sont plus quantitatives que celles qui libèrent les bases, moins longues et délicates que celles qui assurent la libération des nucléosides et, d'autre part, ce sont les seules qui permettent à la fois des études de composition et des études métaboliques grâce à la présence du phosphore nucléotidique. A l'hydrolyse acide, nous avons préféré l'hydrolyse alcaline qui, parmi les hydrolyses de nature chimique, est spécifique des ARN et permet éventuellement l'hydrolyse directe des mélanges ADN-ARN. De nombreux agents alcalins ont été étudiés dont l'ammoniaque utilisé dès 1918 par LEVENE (211), CALVERY et JONES (212) puis par BOULANGER et MONTREUIL (213) ; mais l'hydrolyse étant incomplète, l'utilisation de l'ammoniaque a été abandonnée. En effet, le problème à résoudre était d'obtenir une hydrolyse quantitative et sans dégradations des nucléotides. Finalement, seules les hydrolyses sodique et potassique ont été retenues.

1 - ACTION DE LA SOUDE DANS DIFFERENTES CONDITIONS D'HYDROLYSE

Dans ses travaux sur la "quantativité" de l'hydrolyse alcaline, DERUMEZ (214) a confirmé que l'hydrolyse de l'ARN commercial de Levure par la soude 0,3 N, à 20° C, pendant 18 h était quantitative et que les effets de ce mode d'hydrolyse étaient identiques à ceux de l'hydrolyse par la soude 1 N, à 37° C pendant 18 h. Ces résultats nous ont incitée à déterminer de façon systématique la composition centésimale des ARN de foie de Rat, extraits par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER, dans différentes conditions d'hydrolyse et avec des concentrations de soude comprises entre 0,3 et 1 N.

a) Mode opératoire

Les foies de Rat sont traités selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER. Les culots de centrifugation, après délipidation par le mélange d'éthanol et d'éther, sont hydrolysés par la soude à des concentrations variables pendant 24 h et à des températures différentes :

NaOH 0,3 N à 20° C et à 37° C

NaOH 0,5 N à 20° C et à 37° C

NaOH 1 N à 20° C et à 37° C

Les hydrolysats sont purifiés sur colonnes de DOWEX puis séparés par électrophorèse sur papier d'ARCHES ; les nucléotides sont dosés par spectrophotométrie dans l'ultra-violet (voir le protocole expérimental définitif ; p. 91).

b) Résultats

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI (p. 76) ; ils peuvent se résumer de la manière suivante :

1) Quelle que soit la température, la composition centésimale en nucléotides des ARN est identique pour les concentrations de soude 0,3 N et 0,5 N ; même avec la soude 1 N à 20° C, les valeurs de dosages restent très comparatives.

2) Seule la soude à concentration 1 N et à 37° C provoque des modifications dans les pourcentages de nucléotides ; on observe, en effet, un déficit très net en acide cytidylique tandis que le taux de l'acide uridylique est augmenté d'une quantité égale ; il en résulte un décroissement du rapport bases puriques/bases pyrimidiques. Ces résultats s'expliquent par une désamination de l'acide cytidylique au cours de l'hydrolyse.

3) Quelles que soient les conditions d'hydrolyse, on n'observe pas, sur les électrophorégrammes, la présence de nucléosides.

c) Conclusions et discussion

1) Les résultats obtenus montrent la possibilité d'utiliser indifféremment l'hydrolyse par la soude 0,3 N ou 0,5 N à 20° C

TABLEAU VI

Composition centésimale en nucléotides des ARN de foie de Rat extraits par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER en fonction des conditions d'hydrolyse.

Concentrations de soude	Température	C	A	G	U	$\frac{\text{Purines}}{\text{Pyrimidines}}$	$\frac{6 \text{ NH}_2}{6 \text{ CO}_2}$	$\frac{G + C}{A + U}$
0,3 N	20° C	30,15	17,58	32,25	19,69	1	0,91	1,67
	37° C	29,32	18,59	32,07	19,86	1,02	0,92	1,60
0,5 N	20° C	29,66	18,89	31,80	19,24	1,03	0,94	1,61
	37° C	29,22	18,30	32,40	19,92	1,02	0,90	1,61
1 N	20° C	30,24	18,14	30,63	20,96	0,95	0,93	1,55
	37° C	27,05	17,23	32,21	22,76	0,97	0,81	1,48



ou 37° C en vue de déterminer la composition molaire des ARN tissulaires. Néanmoins, la soude 0,5 N qui occupe une position moyenne parmi les valeurs convenables sera conseillée pour effectuer l'hydrolyse des ARN, d'autant plus qu'à cette concentration on évitera davantage de courir le risque d'une hydrolyse incomplète.

2) La désamination de l'acide cytidylique en milieu alcalin avait déjà été signalée par de nombreux auteurs et, en particulier, par DERUMEZ (215). Comme nous venons de l'observer, cette propriété risque d'introduire une double erreur, par défaut dans le dosage de l'acide cytidylique, par excès dans le dosage de l'acide uridylique ; aussi avons-nous jugé indispensable d'étudier d'une manière plus précise la stabilité de l'acide cytidylique dans les conditions d'hydrolyse préconisées.

2 - ACTION DES ALCALIS SUR LES NUCLEOTIDES AMINES

Nous avons étudié la désamination de l'acide cytidylique au cours de l'hydrolyse par la soude 0,5 N dont nous avons conseillé l'emploi pour des déterminations de composition molaire des ARN, en comparaison avec l'hydrolyse par la potasse 0,3 N qui reste très couramment utilisée.

a) Mode opératoire

L'acide cytidylique pur du commerce a été utilisé. Nous avons, au préalable, vérifié en effectuant une électrophorèse sur papier qu'il ne contenait pas de produits de dégradation; puis nous avons procédé de la manière suivante : 2 ml de solution aqueuse d'acide cytidylique (5 mg/ml) ont été mélangés à 38 ml de soude ou de potasse pour donner 40 ml de solution finale à la concentration en alcali voulue. Les conditions d'hydrolyse ont été les suivantes :

NaOH 0,5 N à 20° C pendant 24 h

NaOH 0,5 N à 37° C pendant 24 h

KOH 0,3 N à 37° C pendant 18 h

Chaque hydrolyse a, en outre, été effectuée en l'absence ou en présence de sérum albumine, pour reproduire soit les conditions d'hydrolyse d'un ARN pur isolé, soit celles d'ARN présents dans des extraits tissulaires du type SCHMIDT et THANNHAUSER. La sérum albumine a été ajoutée

à raison de 2 mg pour 40 ml d'alcali.

Les hydrolysats sodiques ont été ensuite purifiés sur échangeurs d'ions, séparés par électrophorèse sur papier et dosés selon le protocole expérimental définitif (voir p. 93) à la différence près que les dépôts sur les feuilles d'électrophorèse ont été effectués en longues bandes de 7cm pour que la quantité de produit éventuellement désaminé soit bien perceptible en lumière ultra-violette ; l'élution a été réalisée avec des volumes d'acide chlorhydrique 0,01 N appropriés (30 ml pour l'acide cytidylique et 6 ml pour l'acide uridylique provenant de la désamination).

Les hydrolysats potassiques ont été traités par l'acide perchlorique pour éliminer directement les ions K^+ sous forme de perchlorate de potassium. La solution surnageante, amenée au préalable à pH 7, a été lyophilisée puis dosée après électrophorèse sur papier comme dans le cas de l'hydrolyse sodique.

b) Résultats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau VII (p. 79) ; ils peuvent se résumer de la manière suivante :

1) La soude 0,5 N est plus agressive à 37° C qu'à 20° C ; en effet, dans ces conditions, les désaminations de l'acide cytidylique en acide uridylique sont respectivement égales à environ 5 p. 100 et moins de 2 p. 100.

2) La potasse 0,3 N, à 37° C pendant 18 h ne provoque pas de désamination importante (2 p. 100 environ).

3) Enfin, dans aucun cas, la présence de protéines ne diminue, de manière sensible, le taux de désamination.

c) Conclusions et discussion

Les résultats obtenus montrent qu'il est préférable d'effectuer l'hydrolyse sodique des ARN avec de la soude 0,5 N à 20° C plutôt qu'à 37° C ; En effet, dans ces conditions, le pourcentage de désamination est négligeable puisqu'il n'atteint pas 2 p. 100.

TABLEAU VII

Pourcentage de désamination de l'acide cytidylique pur dans différentes conditions d'hydrolyse.

Conditions d'hydrolyse		Pourcentage d'acide cytidylique désaminé		
		Expérience n° 1	Expérience n° 2	Moyenne
20° C	24 h + S.A. (a)	1,83	1,90	1,86
	24 h + S.A. (b)	1,87	2,10	1,98
NaOH 0,5 N	37° C	5,0	5,4	5,2
	37° C	5,4	5,5	5,45
KOH 0,3 N	37° C	1,47	1,96	1,71
	37° C	2,05	2,4	2,22

(a) : en présence de sérum albumine

(b) : en absence de sérum albumine



La potasse 0,3 N à 37° C pendant 18 h, telle qu'elle est couramment employée, ne provoque pas non plus de désamination importante. Nos résultats sont en accord avec ceux de KLEINSCHMIDT et MANTHEY (216) qui estiment à 2,4 p. 100 la désamination de l'acide cytidylique provoquée par la potasse 0,3 N agissant à 37° C. Ils sont, par contre, en contradiction avec ceux de DERUMEZ (217) qui trouve, d'une part, que la potasse est plus agressive que la soude et, d'autre part, que les protéines jouent un rôle protecteur vis-à-vis des ARN au cours de leur hydrolyse par les alcalis.

L'ensemble de ces expériences montre que l'hydrolyse des ARN doit être effectuée par la soude 0,5 N, à 20° C, pendant 24 h. Dans ces conditions, on obtient une hydrolyse quantitative et sans dégradations. Cette méthode offre, en outre, l'avantage de pouvoir être utilisée aussi bien pour des ARN préparés sans isolement préalable selon la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER que pour l'hydrolyse d'ARN purs isolés par le chlorhydrate de guanidine.

L'hydrolyse par la potasse 0,3 N à 37° C pendant 18 h sera moins conseillée. Elle ne provoque pas de dégradations mais risque d'être moins quantitative ; en effet, l'acidification par l'acide perchlorique qui permet d'éliminer les ions K^+ sous forme d'un précipité de perchlorate provoque un entraînement irréversible de 3 à 5 p. 100 des nucléotides de l'hydrolysate (voir, en particulier, COCITO et LADURON (218)).

B - PURIFICATION DES HYDROLYSATS

La purification des hydrolysats sodiques a été effectuée sur des résines échangeuses de cations comme l'avaient préconisé BOULANGER et MONTREUIL (219) et selon le protocole expérimental mis au point par DERUMEZ (220).

Nous avons seulement étudié la capacité de fixation de soude par les colonnes de DOWEX-50 x 2 ; 25-50 mesh que nous utilisons couramment au laboratoire. Nous avons déterminé que des colonnes de résine

de 2 x 20 cm pouvaient fixer jusqu'à 2,4 g de soude.

III - SEPARATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE

Les solutions d'éluion des nucléotides recueillies après passage sur colonnes de DOWEX sont lyophilisées. Avant de pouvoir être dosés, les résidus secs obtenus doivent être redissous dans un solvant approprié, puis analysés. Si la séparation des nucléotides n'a pas causé de difficulté, nous avons eu à résoudre le problème de la dissolution quantitative des nucléotides.

A - DISSOLUTION DES NUCLEOTIDES

Plusieurs solvants avaient déjà été proposés. Nous avons tout d'abord utilisé l'eau distillée comme le préconisait DERUMEZ (221). Dans ces conditions, néanmoins, nous obtenions une grande dispersion dans les résultats de dosages, causée surtout par un déficit irrégulier et important de l'acide guanylique. Or, il importait avant tout que la récupération des nucléotides fût totale et non sélective. L'acide guanylique étant difficilement soluble dans l'eau, nous avons pensé que l'erreur devait provenir de cette propriété. Pour nous en assurer, nous avons comparé le pouvoir de dissolution des nucléotides dans l'eau et dans l'acide chlorhydrique 0,1 N où, au contraire, l'acide guanylique est parfaitement soluble.

1 - MODE OPERATOIRE

Nous avons passé sur des colonnes de DOWEX 50, des quantités aliquotes d'un mélange des 4 nucléotides purs C, A, G et U, soit 1,5 ml d'une solution témoin contenant 5 mg/ml de chaque nucléotide. Avant leur passage sur colonne, les solutions ont été complétées à 100 ml avec de l'eau distillée. Les éluats ont été lyophilisés puis les résidus secs ont été repris soit par 1,5 ml d'eau distillée, soit par 1,5 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. Les suspensions ainsi obtenues ont été portées à l'étuve à 37° C pendant 15 mn puis centrifugées en tube conique. Des quantités aliquotes des surnageants (20 µl) ont été analysées par électrophorèse sur papier puis dosées par spectrophotométrie dans l'ultra-violet selon le

protocole expérimental définitif (voir p. 94). Nous avons dosé, de la même manière, les nucléotides de la solution témoin.

2 - RESULTATS

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau VIII (p. 83) ; ils peuvent être résumés de la manière suivante :

a) Lorsque les résidus, après la lyophilisation, sont repris par l'HCl 0,1 N, la récupération est totale pour tous les nucléotides.

b) Si les résidus sont repris par de l'eau distillée, on observe un déficit de 20 p. 100 pour l'acide guanylique. Des écarts de cet ordre avaient été constatés au cours de nos multiples dosages sur les ARN tissulaires.

3 - CONCLUSION

La dissolution des résidus provenant de la lyophilisation devra être effectuée par l'acide chlorhydrique 0,1 N. On évitera, de cette manière, une perte à la fois quantitative et sélective des nucléotides.

B - SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES PRODUITS D'HYDROLYSE

Il existe plusieurs méthodes de séparation des nucléotides ; les plus couramment employées, dans les études quantitatives, sont la chromatographie sur papier et l'électrophorèse sur papier. Nous avons choisi d'opérer par électrophorèse sur papier ; non seulement ce procédé est plus rapide et l'identification des nucléotides plus commode (simple observation en lumière ultra-violette) mais il permet d'effectuer les dosages de nucléotides à la fois par détermination du phosphore nucléotidique et par spectrophotométrie dans l'ultra-violet, avantage très appréciable dans le cas d'études comparatives. D'autre part, nous venons de voir que la dissolution des nucléotides, pour être totale, doit être effectuée obligatoirement dans l'acide chlorhydrique 0,1 N ; or, à cette concentration, l'acide chlorhydrique gêne la chromatographie sur papier.

TABLEAU VIII

Récupération (en p. 100) des nucléotides après lyophilisation, en fonction de différents procédés de solubilisation.

	Témoïn		Procédés de solubilisation			
			HCl 0,1 N	Récupération en p. 100	Eau	Récupération en p. 100
C	12,07	12,02	99,59	12,04	99,76	
A	10	10	---	10	---	
G	6,85	6,81	99,42	5,48	80,00	
U	9,07	9,04	99,77	9,20	101,51	

NOTA : 1) Les résultats sont la moyenne de 12 dosages effectués à partir des éluats de 2 colonnes différentes.

2) Les rapports molaires des nucléotides ont été calculés pour 10 moles d'acide adénylique.



Nous avons utilisé la méthode employée au laboratoire : l'électrophorèse est pratiquée dans des cuves en toit, dans le tampon citrate de DAVIDSON et SMELLIE (222) (voir protocole expérimental définitif ; p. 94). La seule modification que nous ayons apportée, consiste à effectuer les dépôts de solution contenant les nucléotides, non en points, mais en bandes : les dépôts se font sur une ligne de départ tracée à 12 cm du bord de la feuille ; à partir de l'une des extrémités, on dépose une goutte d'acide picrique dont la migration indique la position relative des nucléotides, puis un témoin des 4 nucléotides purs C, A, G et U et enfin le produit à doser sur 3 bandes de 4 cm équidistantes de 3 cm. Dans ces conditions, il reste suffisamment de place du côté opposé de la feuille pour la constitution de 4 témoins papier.

Cette manière de procéder nous a permis, d'une part, d'obtenir une meilleure séparation des nucléotides pour une même quantité de produit déposé et, d'autre part, d'effectuer des dépôts éventuellement plus importants, apportant davantage de précision aux résultats de dosages.

La séparation des nucléotides par électrophorèse sur papier permet de déterminer à la fois la composition en nucléotides des ARN et leur radioactivité spécifique. Nous avons essayé de déterminer quelles méthodes de dosages donnaient les meilleurs résultats.

IV - DOSAGE DES NUCLEOTIDES

A - COMPARAISON DES RESULTATS DE DOSAGES PAR LE PHOSPHORE ET PAR SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'ULTRA-VIOLET

Deux méthodes jusqu'alors étaient utilisées pour la détermination de la composition molaire des ARN ; elles étaient fondées, l'une sur la détermination du phosphore nucléotidique, l'autre sur la spectrophotométrie en ultra-violet. Nous avons comparé les résultats des dosages donnés par ces deux procédés sur le tissu hépatique total et sur les fractions cellulaires classiques pour effectuer un choix entre ces deux méthodes.

1 - TECHNIQUES

a) Dosage du phosphore nucléotidique par le procédé d'ALLEN (223)

Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur la transformation du phosphomolybdate en bleus de molybdène en présence d'un réducteur. Pour ce type de dosage, les électrophorèses sont effectuées sur du papier WHATMAN n° 1.

b) Dosage des nucléotides par spectrophotométrie dans l'ultra-violet

Quand les nucléotides doivent être dosés par spectrophotométrie, l'électrophorèse est effectuée sur du papier d'ARCHES. Les nucléotides sont identifiés en lumière ultra-violette et dosés selon le protocole expérimental définitif (voir p. 94).

2 - RESULTATS

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau IX (p. 86). Ils correspondent aux rapports :

$$\frac{\Delta}{P} = \frac{\text{quantité de nucléotides déduite du dosage par spectrophotométrie en ultra-violet}}{\text{quantité de nucléotides déduite du dosage de phosphore}}$$

Nous pouvons constater que tous les rapports $\frac{\Delta}{P}$ aussi bien pour le foie total que pour les différentes fractions cellulaires hépatiques sont uniformément égaux à 1 pour les nucléotides C, A et G prouvant que les quantités relatives de nucléotides récupérées par spectrophotométrie en ultra-violet et par le dosage du phosphore sont, pour ces trois nucléotides, rigoureusement identiques. Il n'en est pas de même pour l'acide uridylique où l'on constate, d'une manière générale, un déficit dans la valeur des rapports $\frac{\Delta}{P}$. Fort probablement, l'acide uridylique est souillé de traces de glycérophosphate comme cela a été démontré sur les autoradiogrammes (voir figure 6 ; p. 72), ce qui provoque un excès dans les valeurs de dosages par le phosphore et une diminution du rapport $\frac{\Delta}{P}$.

TABLEAU IX

Rapport $\frac{\Delta}{P}$ des nucléotides d'ARN provenant de foie de Rat et de différentes fractions cellulaires du tissu hépatique.

Nucléotides	Foie	Noyaux	Mitochondries	"Microsomes" (*)	Suc cytoplasmique
U	0,95	0,95	0,78	0,99	0,85
G	1	1	1,04	1	1,02
C	1,01	0,99	1	1,04	0,99
A	1	1	1	1	1,01

(*) Fraction microsomale de CLAUDE

Nota.- Chaque rapport représente la moyenne de 4 déterminations.



3 - CONCLUSION

Le dosage spectrophotométrique semble préférable au dosage par le phosphore, aussi avons-nous complètement abandonné ce dernier pour des déterminations de composition molaire des ARN.

B - DOSAGE SELON LE PROCEDE D'YCAS ET VINCENT : APPLICATION AUX "ARN-GUANIDINE" ET AUX "ARN-SCHMIDT ET THANNHAUSER"

Nous avons appliqué la méthode selon YCAS et VINCENT (224) et KITAZUME et YCAS (225) (voir le protocole expérimental définitif ; p. 95) à la détermination de la composition molaire d'ARN nouvellement formés, préparés selon le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER et par le chlorhydrate de guanidine pour comparer le mérite des deux méthodes.

1 - MODE OPERATOIRE

Les ARN préparés selon les deux types d'extraction ont été obtenus à partir d'un même homogénat de foies de Rats ayant reçu une injection intrapéritonéale de radiophosphore, 30 mn avant leur sacrifice.

2 - RESULTATS

Les résultats de composition molaire des ARN obtenus selon le procédé de YCAS et VINCENT ont été rassemblés dans le tableau X (p. 88) où ils peuvent être comparés à ceux obtenus, selon les mêmes procédés d'extraction, mais par dosage des nucléotides par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

Nous pouvons constater que si les compositions centésimales des "ARN-guanidine" et des "ARN-SCHMIDT et THANNHAUSER", déterminées par spectrophotométrie sont identiques, au contraire, les compositions centésimales déterminées selon le procédé d'YCAS sont très différentes. En effet, dans le cas des "ARN-guanidine", nous nous rapprochons de la réalité car la composition en nucléotides est voisine de celle des ARN messagers qui portent la majeure partie de la radioactivité ; par contre, les résultats fournis par les "ARN-SCHMIDT et THANNHAUSER" sont plus dispersés et ce résultat s'explique par la présence de composés phosphorylés non nucléotidiques à radioactivité très élevée qui proviennent des phospholipides.

TABLÉAU X

Composition centésimale en nucléotides des ARN i l'un même homogénat de foie de Rat déterminés par différents procédés.

Composition centésimale	C	A	G	U
1 - Déterminée selon le procédé d'ICAS				
a - "ARN-guanidine"	25	26	24	25
b - "ARN-SCHMIDT et THANNHAUSER"	18	19	38	25
2 - Déterminée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet				
a - "ARN-guanidine"	30,2	17,8	33,8	18,2
b - "ARN-SCHMIDT et THANNHAUSER"	30,1	18,3	32,7	18,9



3 - CONCLUSIONS

La détermination de la composition des ARN nouvellement synthétisés résultant de l'étude des radioactivités des nucléotides doit être effectuée sur des hydrolysats d'"ARN-guanidine".

V - RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES NUCLEOTIDES : APPLICATION AUX "ARN-GUANIDINE" ET AUX "ARN-SCHMIDT ET THANNHAUSER"

A - MODE OPERATOIRE

La détermination de la radioactivité spécifique des nucléotides, effectuée selon le protocole expérimental définitif (voir p. 96), a été appliquée à l'étude d'"ARN-SCHMIDT et THANNHAUSER" et d'"ARN-guanidine" provenant de foies de Rat ayant reçu une injection de radiophosphates 1 h et 24 h avant leur sacrifice, à raison de 1 mC par Rat.

B - RESULTATS

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XI (p. 90). Pour des incorporations in vivo de 1 h et 24 h, on constate que les radioactivités spécifiques des acides adénylique et guanylique sont égales dans les deux méthodes. Par contre, des divergences apparaissent pour les acides cytidylique et uridylique par suite de l'interférence de composés phosphorylés non nucléotidiques dont les vitesses d'incorporation sont très élevées ; en effet, pour l'acide cytidylique, la différence est négligeable après 1 heure de marquage, mais la radioactivité spécifique augmente de 12 p. 100 après 24 heures d'incorporation dans les cas où les ARN ont été extraits selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER ; pour l'acide uridylique, l'erreur par excès se manifeste dès la première heure de marquage (23 p. 100) et ne cesse de croître pour atteindre 35 p. 100 après 24 heures.

C - CONCLUSIONS

Seules les radioactivités déterminées à partir d'ARN extraits par la méthode à la guanidine semblent représenter les

TABLEAU XI

Radioactivités spécifiques des nucléotides d'"ARN SCHMIDT et THANNHAUSER" et d'"ARN-guanidine" provenant de foies de Rats ayant reçu une injection de radiophosphate.

	Radioactivités spécifiques (*)			
	Incorporation : 1 h		Incorporation : 24 h	
	SCHMIDT et THANNHAUSER	Guanidine	SCHMIDT et THANNHAUSER	Guanidine
C	240.000	235.000	<u>400.000</u>	357.000
A	371.000	361.000	442.000	432.000
G	198.000	192.000	381.000	370.000
U	<u>441.000</u>	360.000	<u>540.000</u>	400.000
Radioactivité totale	$125 \cdot 10^4$	$115 \cdot 10^4$	$176 \cdot 10^4$	$156 \cdot 10^4$

(*) Exprimées en coups/mn/mg de P



valeurs exactes de l'incorporation du ^{32}P dans les nucléotides. Il sera toutefois possible de tenir compte des activités métaboliques d'ARN préparés selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER en se basant sur les radioactivités spécifiques des acides adénylique ou guanylique qui ne semblent pas être contaminés par des composés phosphorylés, comme l'avaient démontré les études d'autoradiographie.

2° - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DEFINITIF

Sur la base d'expérimentations antérieures et des mises au point personnelles décrites dans les différents paragraphes qui précèdent, nous nous sommes finalement arrêtée au protocole suivant pour les déterminations de la composition molaire et de la radioactivité spécifique des ARN tissulaires.

I - PREPARATION DES TISSUS

Les animaux doivent être soumis à un jeûne de 15 à 18 heures pour réduire le glycogène hépatique. Après le sacrifice, les organes sont prélevés et broyés à l'aide de l'appareil de FISCHER qui débarrasse également le tissu de sa trame conjonctive. Toutes ces opérations doivent être effectuées le plus rapidement possible et à 0° C pour éviter au maximum les dégradations enzymatiques et les phénomènes d'autolyse.

Les opérations qui suivent diffèrent selon le procédé d'extraction utilisé ; nous en avons retenu deux :

1) La méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (226) et de BOULANGER et MONTREUIL (227)

Elle est basée sur l'étude des ARN sans isolement préalable. Dans ce cas, le broyat est plongé dans l'acide trichloracétique froid à 10 p. 100 qui précipite la fraction macromoléculaire, y compris les ARN ; cette dernière est lavée, à 4° C, par l'éthanol ou de l'éther pur,

puis délipidée par un mélange d'éthanol et d'éther à l'ébullition et à reflux (voir détails techniques p. 67).

Nous obtenons, de cette manière, une fraction enrichie en ARN.

2) La méthode de COX et ARNSTEIN (228) modifiée par SINGHAL (229)

Elle est fondée sur l'action dénaturante du chlorhydrate de guanidine sur les protéines. Dans ce cas, le broyat est mélangé à un tampon Tris - $MgCl_2$ - KCl ajusté à pH 6,8, l'ensemble étant refroidi dans un bain de glace et d'acétone. On ajoute une solution de chlorhydrate de guanidine ajustée à pH 4,5. Dans ces conditions de pH et de température, les ions guanidium se combinent avec les ARN pour former des complexes insolubles qui se séparent aisément des protéines qui restent en solution. Après différents lavages, le complexe est dissocié en milieu acide à pH 4,2 - 4,5 et l'ARN est isolé par précipitation éthanolique (voir détails techniques p. 67)..

Nous obtenons, de cette manière, des ARN à l'état pur.

A plusieurs reprises, nous avons pu constater que la méthode selon SCHMIDT et THANNHAUSER devait être de préférence utilisée dans la détermination des compositions molaires d'ARN par spectrophotométrie dans l'ultra-violet et que l'emploi de la méthode par le chlorhydrate de guanidine était indiqué dans la détermination de la composition molaire selon la méthode d'YCAS et dans les études de radioactivités spécifiques.

II - HYDROLYSE SODIQUE

L'étude critique de l'hydrolyse des ARN nous a montré que l'hydrolyse doit être effectuée par de la soude 0,5 N, à 20° C, pendant 24 h (voir p. 74). Cette méthode convient aussi bien à l'hydrolyse d'ARN purs qu'aux ARN préparés sans isolement préalable.

Nous utilisons approximativement 30 ml de soude 0,5 N pour 5 g de tissu frais. Les hydrolysats sont amenés à pH 4-4,5 par addition d'acide formique concentré. Après un repos minimum d'un quart d'heure, le précipité constitué par des protéines et l'ADN insoluble en milieu acide est éliminé par une centrifugation de 2 500 g pendant 20 mn. Le liquide surnageant doit être limpide.

III - PURIFICATION SUR RESINES A ECHANGE DE CATIONS

Outre les nucléotides, le liquide surnageant contient encore des ions minéraux (Na^+ provenant de l'hydrolyse sodique), des peptides, des acides aminés et des composés phosphorés non nucléotidiques. Les ions minéraux sont gênants pour les séparations électrophorétiques et les micromolécules organiques, interfèrent dans les dosages, d'où la nécessité de procéder à une nouvelle purification. De nombreux auteurs et, en particulier, MONTREUIL et BOULANGER (230) et BOULANGER et MONTREUIL (231) ont préconisé l'emploi de résines à échanges de cations qui permettent d'éliminer à la fois les ions Na^+ et la majeure partie des peptides et amino-acides.

Le protocole expérimental concernant la purification sur colonnes de résines échangeuses de cations a été mis au point par DERUMEZ (232).

Nous utilisons le DOWEX 50 x 2, mesh 25-50, sous sa forme acide ; cette dernière est obtenue par le passage, sur la résine, d'une solution d'acide chlorhydrique 2,5 N ; 0,5 l suffisent pour les colonnes mesurant 2 x 20 cm que nous utilisons ; la résine est ensuite lavée soigneusement à l'eau distillée jusqu'à ce que le liquide effluent atteigne un pH voisin de 6.

La solution de nucléotides, diluée au préalable à 100 ml avec de l'eau distillée, est passée sur les colonnes ainsi préparées, à raison de 6 à 8 gouttes par seconde. La résine est ensuite lavée avec 1 l d'eau distillée. L'effluent est recueilli sur chloroforme pour éviter la dégradation des nucléotides, puis immédiatement lyophilisé.

Sur des colonnes de 2 x 20 cm, il est possible de faire passer jusqu'à 2,4 g de soude, comme nous l'avons précédemment déterminé (voir p. 80), à condition de ne pas dépasser 4 mg de phosphore total,

comme l'avait préconisé DERUMEZ (233).

Avant d'effectuer le passage sur colonne, il est donc tout à fait indiqué de doser le phosphore total sur une quantité aliquote de la solution de nucléotides ; ce dosage de phosphore, effectué selon la méthode d'ALLEN (234) permet, en outre, de déterminer approximativement la quantité de phosphore nucléotidique et d'éviter par la suite de multiples essais de concentration au moment des dépôts sur les électrophorogrammes.

IV - SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES NUCLEOTIDES

Les résidus de lyophilisation sont repris obligatoirement par une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N (0,3 à 2 ml suivant la concentration en nucléotides) ; la suspension est portée 15 mn à 37° C, puis centrifugée. Ces conditions permettent à la fois la solubilisation totale de l'acide guanylique sans risques de dégradation des autres nucléotides et l'élimination d'un résidu protéique, insoluble dans ces conditions de pH.

Les dépôts sont effectués en bandes sur du papier d'ARCHES n° 304 (revoir détails techniques p. 82). La quantité optimum de produit à déposer pour chaque nucléotide est d'environ 100 µg. L'électrophorèse est effectuée dans une cuve en toit avec le tampon citrate 0,02 M, pH 3,5 de DAVIDSON et SMELLIE (235). On dépose la feuille côté dépôt dans le godet cathodique de la cuve et on applique une tension de 15 V/cm pendant 6 heures. On laisse sécher les électrophorogrammes à l'air libre et on repère les nucléotides en lumière ultra-violette avec une lampe de type MINERALIGHT.

Les électrophorogrammes obtenus, se prêtent à la fois à des déterminations de composition molaire et aux études de radioactivités spécifiques des ARN.

V - DOSAGE DES NUCLEOTIDES

A - DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'ULTRA-VIOLET

Ce type de dosage est basé sur la propriété qu'ont les nucléotides d'absorber la lumière ultra-violette. Les dosages spectrophotométriques sont très sensibles. Ils sont effectués sur les solutions

d'élu-tion de rectangles de papier dont la surface correspond à l'emplacement des nucléotides. Ces rectangles sont découpés en petits morceaux qui sont introduits dans des flacons auxquels on ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique redistillé 0,01 N pour C, A et U et 0,1 N pour G. On laisse reposer 24 h à la température du laboratoire. Des rectangles de papier de mêmes dimensions sont découpés à côté des nucléotides, dans l'emplacement qui leur a été réservé ; ils serviront comme témoins, permettant d'éliminer l'absorption propre du papier et du solvant. Tous les dosages sont effectués en 3 exemplaires en présence de 4 témoins papier (x 2). Les densités optiques des solutions sont mesurées aux longueurs d'onde 250, 260, 280 et 290 nm ; on en déduit les rapports d'absorbance 250/260, 280/260 et 290/260 dont les valeurs sont caractéristiques de chaque nucléotide ; de cette manière, il est possible de vérifier leur pureté. Les rapports d'absorbance ont été déterminés par des dosages statistiques ; leurs valeurs sont reportées dans le tableau VIII (voir p. 100). Les quantités de nucléotides sont déduites des densités optiques à 260 nm et des coefficients d'extinction molaire donnés par BEAVEN et coll. (236) ; ils sont traduits en pourcentage de nucléotides, par application de la formule :

$$\text{Nucléotide (en p. 100)} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{\epsilon d} \times 100$$

où d = largeur de la cuve en cm.

B - DOSAGE SELON LE PROCÉDE D'YCAS ET VINCENT (237)

Ce type de dosage est basé sur la détermination de la radioactivité des nucléotides marqués par le ^{32}P et peut donner la composition d'un ARN défini, nouvellement synthétisé, même s'il est présent en très faible quantité au sein d'un mélange d'ARN. Il peut se révéler parfois très intéressant de comparer les compositions molaires déterminées par ce procédé à celles obtenues par spectrophotométrie dans l'ultra-violet et qui correspondent à la totalité des ARN.

On effectue le dosage, comme par spectrophotométrie, jusqu'à l'élu-tion puis on prélève une quantité égale de chaque éluat de nucléotides (0,5 ou 1 ml) qu'on introduit dans des flacons contenant 10 ml

du mélange scintillant de BRAY (238). Les flacons sont passés, en présence de témoins, au compteur à scintillation (type Nuclear Chicago). A partir des valeurs de radioactivités totales des nucléotides, on peut calculer directement la composition centésimale des ARN synthétisés pendant le temps de marquage au ^{32}P .

Cette méthode est valable dans la mesure où le marquage des nucléotides dans les ARN s'effectue uniformément.

VI - RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES NUCLEOTIDES

Les mesures de radioactivités spécifiques sont effectuées selon le procédé de BOULANGER et MONTREUIL (239). Partant des électrophorégrammes, on découpe des pastilles, à l'emporte-pièce, à l'emplacement des nucléotides et on en mesure la radioactivité au compteur cloche (type MESCO). Ces pastilles sont ensuite éluées pendant 24 h à la température du laboratoire par 5 ml d'acide chlorhydrique 0,01 N pour C, A et U et 0,1 N pour G. ; les densités optiques des solutions sont mesurées à 260 nm. La radioactivité spécifique est exprimée en coups/mn/mg de phosphore à partir de la formule suivante :

$$\frac{\text{CPM} - \text{Témoins fond}}{A_{260 \text{ nm}}} \times K$$

Le facteur K est calculé à partir des absorptions molaires de chaque nucléotide :

$$K_C = 219,75 ; K_A = 458,50 ; K_G = 380,90 \text{ et } K_U = 322,89$$

On ramène ensuite au jour de l'injection pour 1 mC de radiophosphate injecté.

3° - RESULTATS STATISTIQUES

Nous avons appliqué la méthode de détermination de la composition molaire des ARN, par spectrophotométrie dans l'ultra-violet, à des études de dosages statistiques de nucléotides purs ; ces études nous ont permis d'évaluer la précision des résultats que cette méthode est en mesure de nous fournir.

I - MODE OPERATOIRE

Nous avons préparé une solution à 0,5 p. 100 (p : v) de nucléotides purs du commerce (mélange des isomères 2' et 3'). Au total, 38 dosages ont été effectués par 6 personnes différentes selon le protocole expérimental décrit précédemment (voir p. 94). La composition molaire en nucléotides de la solution est exprimée en p. 100 et nous avons calculé, pour chaque nucléotide, la moyenne des valeurs obtenues, l'écart moyen et l'écart type en appliquant les formules suivantes :

$$(1) \text{ Ecart moyen} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\bar{x}_n - x_n|$$

- n = nombre de dosages

$|\bar{x}_n - x_n|$ = différence absolue entre la valeur moyenne des dosages et la valeur donnée par chaque dosage.

$$(2) \text{ Ecart type} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\bar{x}_n - x_n)^2}$$

Ces valeurs ont été calculées pour 38 dosages et pour 1 à 6 dosages effectués par personne.

En outre, pour environ chaque série de 3 dosages -correspondant au nombre de dosages effectués par électrophorégramme- les

rapports d'absorbance à différentes longueurs d'onde ont été calculés ; il s'agit des rapports D.O. 250/260, 280/260 et 290/260 dont les valeurs sont caractéristiques de chaque nucléotide.

II - RESULTATS ET DISCUSSION

A - COMPOSITION MOLLAIRE CENTESIMALE EN NUCLEOTIDES

Les résultats de la composition centésimale en nucléotides sont réunis dans le tableau XII (p. 99). Leur examen montre que :

1 - Les moyennes obtenues pour chaque nucléotide dans les cas de 2, 3, 4, 5 et 6 dosages par personne sont presque identiques ; la méthode semble, par conséquent, donner des résultats reproductibles.

2 - Les écarts types obtenus également dans les cas de 2, 3, 4, 5 et 6 dosages ne sont pas très importants ; d'emblée, ils sont très proches -dès que 2 dosages par personne sont effectués- de l'écart type obtenu pour 38 dosages. Ces résultats nous montrent qu'il n'est pas nécessaire de multiplier les dosages pour obtenir une bonne précision. Nous avons choisi d'effectuer 6 dosages pour nos déterminations de la composition molaire des ARN.

B - RAPPORTS D'ABSORBANCE DES NUCLEOTIDES

Les résultats correspondant aux rapports d'absorbance des nucléotides ont été rassemblés dans le tableau XIII (p. 100). Le calcul, pour chaque nucléotide, des moyennes des rapports d'absorbance ainsi que des écarts types a permis de comparer les valeurs que nous avons obtenues à celles de CHARGAFF (240). Nous pouvons constater que, à l'exception de 3 valeurs de rapports, les moyennes données par CHARGAFF se situent, compte tenu des écarts types, à l'intérieur des valeurs limites de nos propres rapports. Ces résultats démontrent que les nucléotides dosés après électrophorèse sur papier, par spectrophotométrie dans l'ultra-violet, sont purs et que la séparation est bonne.

TABLEAU XII

Moyenne, écart moyen et écart type calculés à partir des valeurs de nucléotides exprimées en p. 100, après n dosages (n varie de 12 à 38).

	Nucléotides	Nombre de dosages effectués par personne (*)					Nombre total de dosages (38)
		2	3	4	5	6	
1) <u>Moyenne</u>							<u>Moyenne générale</u>
	C	30,88	30,82	30,90	30,97	30,99	30,98
	A	25,67	25,72	25,69	25,72	25,68	25,66
	G	18,93	18,87	18,93	18,97	19,02	19,02
	U	24,38	24,40	24,38	24,23	24,24	24,24
2) <u>Ecart moyen</u>							<u>Ecart moyen général</u>
	C	0,52	0,47	0,44	0,46	0,45	0,44
	A	0,34	0,32	0,33	0,37	0,36	0,36
	G	0,38	0,45	0,52	0,49	0,46	0,44
	U	0,55	0,51	0,48	0,53	0,53	0,52
3) <u>Ecart type</u>							<u>Ecart type général</u>
	C	0,62	0,56	0,53	0,55	0,54	0,53
	A	0,47	0,44	0,44	0,50	0,49	0,48
	G	0,47	0,63	0,75	0,69	0,65	0,64
	U	0,73	0,68	0,64	0,70	0,69	0,68

(*) Les nombres 2, 3, 4, 5 et 6 correspondent respectivement à 12, 18, 24, 30 et 36 dosages.

BUS
VILLE

TABLEAU XIII

Moyennes, écarts moyens et écarts types, calculés à partir des valeurs de rapports d'absorbance des nucléotides, après n déterminations de rapports (n varie de 12 à 20).

Rapports d'absorbance	Nucléotides	n (*)	Moyennes	Ecart moyen	Ecart type	Valeurs de CHARGAFF (241)
1) 250/260	C	17	0,46	0,015	0,018	0,46
	A	20	0,85	0,013	0,02	0,85
	G	17	0,92	0,014	0,016	0,91
	U	16	0,77	0,020	0,023	0,78
2) 280/260	C	13	1,94	0,026	0,03	1,90
	A	15	0,22	0,0095	0,012	0,22
	G	17	0,68	0,010	0,014	0,68
	U	17	0,33	0,011	0,015	0,30
3) 290/260	C	13	1,36	0,014	0,018	1,32
	A	12	0,039	0,006	0,008	0,038
	G	19	0,48	0,0065	0,011	0,48
	U	13	0,037	0,01	0,014	0,03

(*) Nombre de rapports d'absorbance déterminés.



A la suite de ces études statistiques, nous pouvons conclure que la méthode de dosage des nucléotides par spectrophotométrie dans l'ultra-violet -mise au point au laboratoire- donne des résultats reproductibles. En outre, nous sommes assurés de l'absence d'interférences entre les nucléotides. Dans la pratique, 6 dosages à partir de 2 électrophorégrammes, seront effectués pour les déterminations de la composition des ARN. Le calcul des écarts types, établi après un nombre relativement élevé de dosages, nous sera très utile pour détecter les différences significatives de composition en nucléotides entre les ARN provenant de sources variées.

4° - APPLICATIONS

Nous avons appliqué la méthode de détermination de la composition molaire par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à l'étude d'ARN tissulaires et de fractions cellulaires.

I - COMPOSITION DES ARN DE DIFFERENTS TISSUS DE RAT

Les différents organes (foie, cerveau, coeur, pancréas, poumon, rate et rein) ont été rapidement prélevés et plongés immédiatement dans un bain d'acétone et de neige carbonique afin d'éviter au maximum les dégradations. Ils ont été ensuite traités selon le protocole expérimental décrit p. 91. Il convient de préciser que la préparation des ARN a été effectuée par la méthode d'extraction indirecte selon SCHMIDT et THANHAUSER.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XIV (p.102). Nous pouvons constater que les ARN totaux des différents tissus ont une composition très voisine. Il n'y aurait donc pas de spécificité d'organe en ce qui concerne les ARN. Ces résultats confirment ceux de KLEINSCHMIDT et MANTHEY (242), KIT (243) et DERUMEZ (244). L'examen des rapports $\frac{G + C}{A + U}$ révèle néanmoins quelques différences significatives ; par exemple la rate et surtout le pancréas ont une composition

TABEAU X IV

Composition centésimale en nucléotides des ARN totaux de différents tissus de Rat.

	Foie	Cerveau	Coeur	Pancréas	Poumon	Rate	Rein
C	30,52	30,12	30,51	31,47	29,10	30,70	30,89
A	17,98	18,70	19,14	17,57	18,52	17,66	18,60
G	32,07	31,21	30,11	33,73	33	32,80	31,45
U	19,41	19,93	20,24	17,25	19,36	18,81	19,04
$\frac{G+C}{A+U}$	1,67	1,59	1,54	1,87	1,64	1,74	1,65



de type GC beaucoup plus prononcée ; ces organes étant le siège de synthèses protéiques très actives ; il est possible que leur stock de ribosomes soit relativement plus important.

II - COMPOSITION DES ARN DE DIFFERENTES FRACTIONS CELLULAIRES

Les fractions cellulaires (noyaux, mitochondries, "microsomes", suc cellulaire) ont été obtenus par le procédé classique de centrifugation différentielle et ensuite traitées comme dans le cas de tissus totaux.

A - FOIE DE RAT

Les résultats que nous avons obtenus ont été rassemblés dans le tableau XV (p. 104). Il nous montrent que les différentes fractions cellulaires ont une composition identique à celle des ARN totaux, exception faite pour les noyaux. Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs, indépendamment des méthodes d'isolement et d'analyse utilisées (voir MARSHAK (245) ; ELSON et CHARGAFF (246) ; HOTTA et OSAWA (247) ; KIT (248) et DERUMEZ (249)). La composition particulière des ARN nucléaires dont le rapport $\frac{G + C}{A + U}$ (égal à 1,29) s'éloigne nettement du type GC, est certainement due à une proportion plus élevée en ARN de type messenger.

B - HEPATOME DE RAT

Les résultats que nous avons obtenus ont été rassemblés dans le tableau XVI (p. 105). Ils peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - Comme dans le cas du foie normal, on ne constate pas de différence importante -sauf pour les noyaux- dans la composition molaire en ARN des différentes fractions cellulaires.

2 - Les compositions molaires des ARN des mitochondries et des "microsomes" sont très voisines de celles du foie normal. L'observation des rapports $\frac{G + C}{A + U}$ révèle, par contre, une différence assez importante dans la composition des ARN des noyaux de foie normal et d'hépatome (les ARN des noyaux d'hépatome tendent vers le type AU de façon moins prononcée).

TABLEAU XV

Composition centésimale en nucléotides des ARN de différentes fractions cellulaires de foie de Rat.

	Noyaux	Mitochondries	"Microsomes"	Fraction pH 5 (*)
C	28,02	31,29	31,05	29,19
A	19,70	17,91	17,61	18,69
G	28,39	32,06	33,04	32,85
U	23,85	18,70	18,26	19,23
$\frac{G + C}{A + U}$	<u>1,29</u>	1,73	1,78	1,63

(*) Fraction obtenue, par précipitation, en amenant le surnageant cytoplasmique à pH 5 avec de l'acide acétique.



TABLEAU XVI

Composition centésimale en nucléotides des ARN de différentes fractions cellulaires d'hépatome de Rat.

	Noyaux	Mitochondries	"Microsomes"
C	29,84	30,61	31,04
A	18,35	18,03	17,27
G	30,06	32,76	33,52
U	21,72	18,56	18,13
$\frac{G + C}{A + U}$	<u>1,49</u>	1,73	1,82



Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de contaminants d'origine cytoplasmique dans le cas de noyaux d'hépatome dont on sait que la membrane présente des irrégularités de surface et même des invaginations à l'intérieur desquelles on peut observer, au microscope électronique, des fragments importants de cytoplasme. On peut encore invoquer le fait que dans les cellules en voie de prolifération rapide, la majorité des ARN nucléaires se comportent comme des précurseurs des ARN ribosomiques (SCHERRER et al. (250)).

L'ensemble de ces résultats montre que ce n'est ni l'étude de la composition molaire en ARN des tissus totaux, ni même celle des organites cellulaires, qui peut permettre la mise en évidence de différences pathologiques.

En procédant à quelques mises au point de techniques déjà existantes, nous sommes parvenue à établir une méthode simple et surtout très homogène pouvant servir de base à différentes déterminations dans l'étude des ARN provenant de tissus ou de fractions tissulaires. En effet, telle qu'elle est décrite dans le protocole expérimental définitif (voir p. 91), la même méthode peut servir -jusqu'au stade électrophorèse inclus- à la fois à des déterminations de composition molaire par spectrophotométrie dans l'ultra-violet ou selon le principe d'YCAS et VINCENT et à des déterminations de radioactivités spécifiques. Il suffit d'utiliser le mode d'extraction adéquat ; nous avons vu que la préparation des ARN selon le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER était conseillé pour les études de composition molaire par spectrophotométrie et que l'extraction par le chlorhydrate de guanidine était, par contre, préférable dans tous les cas de mesures de radioactivités. C'est une méthode qui offre également toutes garanties comme en témoignent, d'une part, les résultats de rendement et de pureté et, d'autre part, les résultats statistiques que nous avons obtenus. Nous l'avons déjà appliquée avec succès à l'étude de la composition d'ARN et de

fractions cellulaires. Elle nous servira, en outre, dans la troisième partie de notre travail à déterminer, de manière précise, des différences dans les compositions molaires et les radioactivités spécifiques d'ARN provenant de différentes fractions nucléaires.

ETUDE CRITIQUE SYSTEMATIQUE DES MILIEUX D'HOMOGENEISATION
GENERALEMENT UTILISES DANS LE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE.

Les méthodes de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle sont maintenant d'un usage courant. Elles ont été appliquées, en particulier, à l'étude biochimique *in vitro* des relations métaboliques entre les différentes fractions cytoplasmiques. Elles devraient, en outre, permettre de caractériser plus aisément la présence d'acides nucléiques anormaux dans les cellules cancéreuses. Depuis le travail initial de CLAUDE (251), un très grand nombre de procédés ont été décrits. Leur multiplicité et parfois leur complexité démontrent amplement que, parmi ceux-ci, bien peu sont satisfaisants. Les études de la composition chimique et du métabolisme des fractions cytoplasmiques isolées imposent, en toute rigueur, l'obtention d'inclusions pures et intactes, en ce qui concerne, à la fois, leur ultrastructure, leur composition chimique et leur activité métabolique. MONTREUIL *et al.* (252) ont étudié l'intégrité ultrastructurale, au microscope électronique, des fractions cytoplasmiques obtenues par les méthodes classiques de fractionnement cellulaire. Ces études ont montré que les méthodes d'isolement des noyaux par centrifugation différentielle décrites par CHAUVEAU *et al.* (253), par MIRSKY et POLLISTER (254) et par KAY *et al.* (255) étaient susceptibles de fournir rapidement des quantités importantes de ces inclusions. Cependant, l'observation au microscope électronique révèle que, seuls, les noyaux préparés par la méthode de CHAUVEAU *et al.* conservent leur morphologie. Au contraire, les noyaux isolés en milieu citrique et en milieu non-aqueux présentent de graves altérations. On observe, en particulier, une condensation importante de leur contenu et un épaissement de leur membrane qui devient très osmiophile et présente de nombreuses interruptions. On sait, d'autre part, que les mitochondries isolées par les procédés classiques, comme ceux de HOGEBROOM *et al.* (256), ont une morphologie profondément modifiée. Elles sont, en effet, fortement gonflées, optiquement vides et leurs crêtes internes ont disparu (voir par exemple, à ce sujet, ROUILLER (257) et MONTREUIL *et al.* (258)).

Pour nos recherches ultérieures sur la chimie et la biochimie des inclusions cytoplasmiques, il était indispensable de vérifier si ces altérations morphologiques ne s'accompagnaient pas de la perte de certains constituants importants.

Nous avons abordé ce problème en étudiant la diffusion, dans les différents milieux d'homogénéisation classiquement utilisés dans les méthodes de fractionnement cellulaire, de composés phosphorylés préalablement marqués par le phosphore radioactif. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence une diffusion importante des inclusions dans les milieux phosphatés.

I - MODE OPERATOIRE

Nous avons effectué nos expériences de diffusion, dans des milieux d'homogénéisation aqueux et non-aqueux, sur les noyaux, les mitochondries et les microsomes isolés du foie de Rat ayant reçu au préalable une injection de radiophosphate.

A - PREPARATION DES PARTICULES CYTOPLASMIQUES RADIOACTIVES

Les foies de rats Wistar, sacrifiés 16 h après une injection intrapéritonéale de 0,5 mC de phosphate radioactif par animal, sont homogénéisés avec un appareil de POTTER et ELVEHJEM, dans le milieu classique de HOGEBOOM et coll. (259) : solution de saccharose 0,25 M contenant du chlorure de calcium (0,0018 M) et ajustée à pH 7,4. Le protocole expérimental de fractionnement est schématisé dans la figure 7 (p. 110). L'homogénat est soumis à une centrifugation de 10 mn à 250 g. A partir du sédiment obtenu, les noyaux sont isolés par le procédé de CHAUVEAU et al. (260) qui fournit des noyaux morphologiquement intacts (CHAUVEAU (261) ; MONTREUIL et al. (262)). Il n'était donc pas déraisonnable de penser que l'intégrité morphologique des noyaux ainsi préparés devait s'accompagner d'une intégrité biochimique et que ces préparations pouvaient servir de référence dans notre expérimentation. Nous verrons plus loin (Tableau XVII ; p. 114) que les résultats que nous avons obtenus

- Injection aux rats, par voie intrapéritonéale de 0,5 mC de radiophosphate
- Sacrifice des animaux après 16 h d'incorporation
- Homogénéisation des foies dans 10 volumes d'une solution 0,25 M en saccharose et 0,0018 M en chlorure de calcium, ajustée à pH 7,4
- Centrifugation de l'homogénat à 250 g pendant 10 mn.

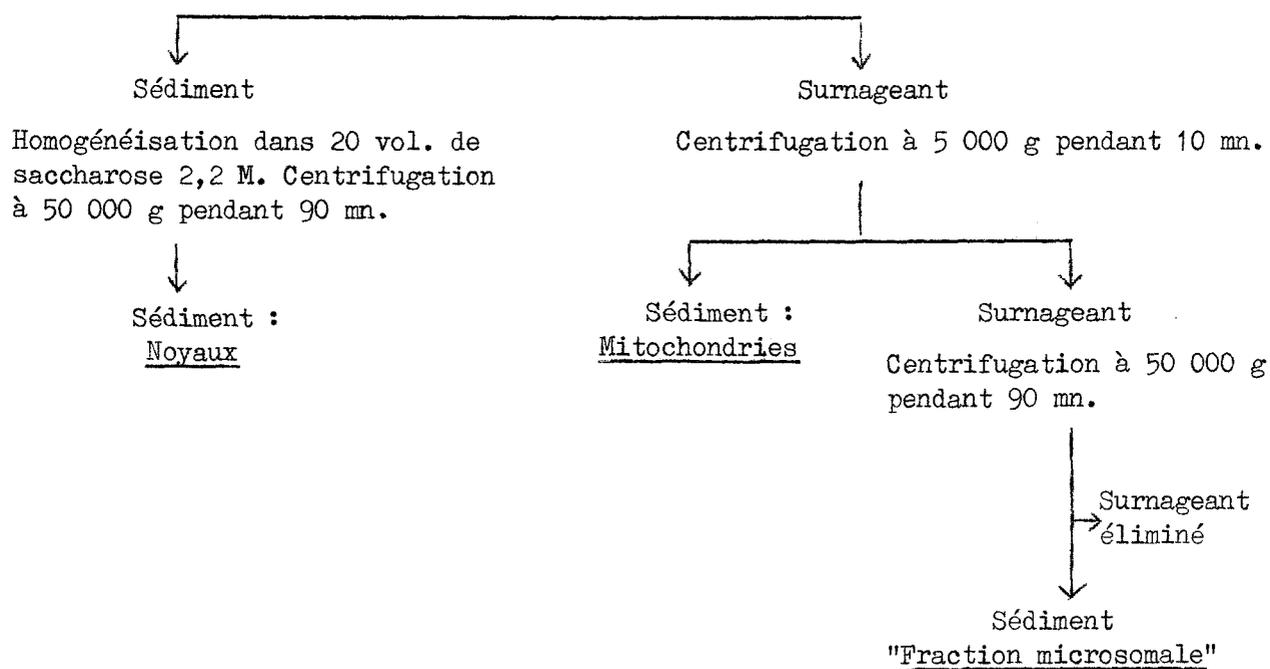


Figure 7

Schéma de fractionnement des particules cytoplasmiques par centrifugation différentielle.

ont confirmé cette hypothèse ; en effet, nous avons observé que la diffusion des constituants phosphorylés du noyau était nulle à + 4° C dans les solutions de saccharose 2,2 M et négligeable dans les solutions 0,25 M. Les mitochondries sont isolées, à partir du liquide surnageant, par une centrifugation de 10 mn à 5 000 g, puis la fraction microsomale, par une centrifugation de 90 mn à 50 000 g.

B - PROCEDE D'ETUDE DE LA DIFFUSION

Pour chaque expérience, les sédiments de chacun des trois types de particules cytoplasmiques isolées à partir d'un foie de Rat sont mis en suspension, par une homogénéisation ménagée, dans 50 ml des différents milieux. Ces derniers sont maintenus à 4° C pendant toute la durée de l'expérimentation.

A des temps variant entre 0 et 24 h, on prélève 5 ml de chacune des suspensions et on élimine les noyaux par une centrifugation de 10 mn à 20 000 g et les mitochondries ou les microsomes, par une centrifugation de 20 mn à 20 000 g. On mesure ensuite la radioactivité de 100 µl des solutions limpides ainsi obtenues.

Nous avons déterminé, de cette manière, la radioactivité du liquide surnageant au temps zéro de l'expérience (R_0) et après des temps variables d'incubation (R_1). En outre, nous avons mesuré la radioactivité totale (R_T) de chacune des suspensions de particules.

Le "coefficient de diffusion" (D) est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$D = \frac{R_1 - R_0}{R_T - R_0} \times 100$$

Ce coefficient représente, en pour cent de la radioactivité totale des inclusions, la radioactivité "diffusible".

C - MILIEUX D'HOMOGENEISATION ETUDIES

Nous avons étudié les milieux suivants :

1 - Milieux aqueux

a - Solutions aqueuses de saccharose à diverses concentrations : 0,25 M (SCHNEIDER et HOGEBOOM) (263), 0,33 M (HOGEBOOM, SCHNEIDER et STRIEBICH) (264), 0,88 M (HOGEBOOM, SCHNEIDER et PALADE) (265) et 2,2 M (CHAUVEAU et al.) (266). Les trois premières solutions contenaient, en outre, du chlorure de calcium (0,0018 M) (SCHNEIDER et PETERMAN) (267).

b - Solutions aqueuses d'acide citrique à 0,2 g (*) 1 g (MIRSKY et POLLISTER) (267) et 5 g p. 100 ml (MARSHAK) (268).

c - Solution aqueuse de saccharose 0,25 M, contenant 1 g d'acide citrique p. 100 (ARNESEN et al.) (269).

d - Solutions de saccharose, à des concentrations variables, tamponnées à pH 7,8 :

- Saccharose 0,15 M, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 25 mM, tampon tris 35 mM (ALLFREY et MIRSKY) (270).

- Saccharose 0,35 M, $MgCl_2$ 10 mM, $PO_4^{HK}_2$ 20 mM, CO_3^{HK} 35 mM, KCl 25 mM (ZAMENIK et KELLER) (271)

- Saccharose 0,35 M + $PO_4^{HK}_2$ 20 mM

e - Sérum de Boeuf. Nous avons choisi d'utiliser ce milieu car il nous paraissait, a priori, satisfaisant pour effectuer des fractionnements dans un milieu "physiologique".

2 - Milieux non aqueux

a - Ether de pétrole (KAY et al.) (272)

b - Mélange de cyclohexane et de tétrachlorure de carbone, de densité 1,32 (KAY et al.) (273)

(*) Une solution d'acide citrique à 0,2 g p. 100 est utilisée par MIRSKY et POLLISTER (274) pour laver les noyaux obtenus par une première centrifugation d'homogénats effectués dans des solutions d'acide citrique à 1 g p. 100 ml.

II - RESULTATS

Nous avons rassemblé dans une série de tableaux les coefficients de diffusion des composés phosphorylés des différentes inclusions cytoplasmiques : noyaux (Tableau XVII ; p. 114 et Tableau XVIII ; p. 115), mitochondries (Tableau XIX ; p. 117) et microsomes (Tableau XX ; p. 119) dans divers milieux d'homogénéisation classiquement utilisés dans la centrifugation différentielle. Les résultats que nous avons obtenus peuvent être résumés de la manière suivante :

A - LA DIFFUSION DES CONSTITUANTS PHOSPHORYLES DES NOYAUX VARIE DANS DE LARGES PROPORTIONS SUIVANT LA COMPOSITION DU MILIEU D'ISOLEMENT

1 - Dans le cas des solutions de saccharose, le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la concentration.

Il est nul avec la solution 2,2 M, tandis qu'il atteint des valeurs de 0,52 - 1,31 et 2, respectivement, avec les solutions de molarité 0,88 - 0,33 et 0,25.

Après 24 heures d'incubation, le coefficient de diffusion est plus important (de 0,9 à 6,2), quelle que soit la concentration en saccharose.

Nota : Il convient cependant de souligner que ce dernier résultat ne diminue en rien les qualités du procédé de CHAUVÉAU puisque les opérations d'isolement des noyaux sont effectuées généralement en moins de 4 heures.

2 - La diffusion des composés phosphorylés du noyau est nulle dans les solutions d'acide citrique à différentes concentrations, même au bout de 30 à 60 minutes d'incubation qui représentent le temps nécessaire pour effectuer l'isolement des noyaux dans ces milieux de fractionnement. Cependant, on évitera de remettre en suspension les noyaux, au cours des lavages, par réhomogénéisation. Le Tableau XVIII (p. 115) montre, en effet, que l'homogénéisation à l'aide d'un appareil de POTTER et ELVEHJEM provoque une diffusion importante des composés nucléaires : on voit qu'une réhomogénéisation des noyaux effectuée

TABLEAU XVII

Coefficient de diffusion (exprimé en p. 100 de la radioactivité totale de l'inclusion), à + 4° C, dans différents milieux d'homogénéisation des composés phosphorylés des noyaux.

Milieux d'isolement	0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	24 h	
Saccharose	(0,25 M	0,25	0,69	0,79	1,30	2,00	6,20
	(0,33 M	0,10	0,15	0,85	0,95	1,31	8,63
	(0,88 M	0	0,40	0,44	0,50	0,52	0,58
	(2,2 M	0	0	0	0	0	0,87
						à	2,3
Acide citrique (*)	(0,2 p. 100	0	0,34	0,39	0,85	0,85	3,80
	(1 p. 100	0	0	0	0	0	0
	(5 p. 100	0	0	0	0,34	0,75	0,75
<u>Milieux saccharosés tamponnés</u>							
- Saccharose 0,15 M, MgCl ₂ 10 mM, KCl 25 mM, tris 35 mM	1,05	3,40	3,68	5,86	6,54	18,70	
- Saccharose 0,35 M, MgCl ₂ 10 mM, K ₂ PO ₄ H 20 mM, KCO ₃ H 35 mM, KCl 25 mM	5,02	10,74	-	13,92	19,65	35,34	
- Saccharose 0,35 M + K ₂ PO ₄ H 0,02 M	4,64	7,09	11,06	17,99	26,81	37,56	
Sérum de Boeuf	non dialysé	6,07	6,44	10,77	11,25	15,06	20,68
	dialysé	8,82	9,36	15,66	16,35	21,90	30,08
<u>Milieux non aqueux</u>							
- Ether pétrole	-	0,96	1,70	2,24	6,5	9,5	
- Cyclohexane/CCl ₄ de d 1,32	-	2,39	4,22	9,51	13,1	18,1	

(*) Dans ce cas particulier, les noyaux isolés par la méthode de CHAUVÉAU et al. sont mis en suspension dans les solutions d'acide citrique par une agitation douce.



TABLEAU XVIII

Coefficient de diffusion (exprimé en p. 100 de la radioactivité totale de l'inclusion), à + 4° C, dans diverses solutions d'acide citrique, des composés phosphorylés des noyaux (a) soumis ou non à une réhomogénéisation de 3 minutes.

Milieux d'isolement	0,25 h	0,50 h	1 h	2 h	4 h	24 h
Acide citrique 0,2 p. 100 (b)						
- Pas d'homogénéisation (c)	0	0,34	0,39	0,85	0,85	3,80
- Homogénéisation (d)	2,66	5,65	6,02	6,70	7,12	8,31
Acide citrique 1 p. 100 (e)						
- Pas d'homogénéisation (c)	0	0	0	0	0	0
- Homogénéisation (d)	-	14,75	16,20	19,76	23,3	25,9
Saccharose 0,25 M + acide citrique (1 p. 100)						
- Pas d'homogénéisation (c)	0	0	0	0	0	0
- Homogénéisation (d)	0	0	1,7	0	0	0

- (a) Isolés par la méthode de CHAUVEAU *et al.* (275)
 (b) Solution de lavage des noyaux utilisée dans la méthode de MIRSKY et POLLISTER (276)
 (c) Dans ce cas, les noyaux sont remis en suspension par une agitation douce
 (d) Effectuée avec un homogénéiseur de POTTER et ELVEHJEM
 (e) Solution d'homogénéisation des tissus utilisée dans la méthode de MIRSKY et POLLISTER



pendant 3 mn et suivie d'une incubation de 30 mn à 0° C dans des solutions d'acide citrique à 0,2 et 1 g p. 100 provoque la diffusion, respectivement, de 5,65 et 14,75 p. 100 de la radioactivité initiale. Au contraire, la diffusion est nulle à partir de noyaux remis en suspension par une agitation douce.

3 - L'addition d'acide citrique aux solutions de saccharose 0,25 M exerce un effet bénéfique puisqu'elle empêche la diffusion des composés phosphorylés des noyaux (Tableau XVII ; p. 114), même après réhomogénéisation de ces derniers avec un appareil de POTTER et ELVEHJEM (Tableau XVIII ; p. 115).

4 - Au contraire, l'addition des sels minéraux, destinés à tamponner les solutions de saccharose, accentue le phénomène de diffusion. Ce dernier est particulièrement important dans le cas de solutions phosphatées dans lesquelles on retrouve, après 4 heures d'incubation, 20 à 27 p. 100 de la radioactivité totale des noyaux.

5 - Les phénomènes de diffusion les plus importants ont été observés avec le sérum de Boeuf.

6 - Les noyaux isolés dans des milieux non aqueux laissent diffuser dans ces derniers une proportion importante de leur radioactivité.

B - QUELLE QUE SOIT LA COMPOSITION DES SOLUTIONS DE FRACTIONNEMENT QUE NOUS AVONS UTILISEES, NOUS AVONS OBSERVE UNE DIFFUSION DES CONS-
TITUANTS PHOSPHORYLES DES MITOCHONDRIES (TABLEAU XIX ; p. 117)

1 - Dans le cas des solutions de saccharose, la diffusion est proportionnelle à la concentration en sucre, contrairement à ce que l'on observe dans le cas des noyaux.

2 - L'addition de sels minéraux aux solutions de saccharose augmente la diffusion.

3 - La diffusion est maximale avec le sérum de Boeuf.

TABLEAU XIX

Coefficient de diffusion (exprimé en p. 100 de la radioactivité totale de l'inclusion), à + 4° C, dans différents milieux d'incubation, des composés phosphorylés des mitochondries.

Milieux d'isolement	0,5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	
Saccharose (0,25 M	0,19	0,26	0,79	1,19	1,34	1,62
	0,33 M	1,62	2,51	3,31	3,47	3,78	6,06
	0,88 M	1,80	5,00	6,65	9,58	11,91	25,75
Saccharose 0,15 M, MgCl ₂ 10 mM, KCl 25 mM tris 35 mM	2,27	3,54	5,09	6,65	7,39	19,38	
Saccharose 0,35 M, MgCl ₂ 10 mM, K ₂ PO ₄ H 20 mM, KCO ₃ H 35 mM, KCl 25 mM	2,83	3,69	4,12	4,32	4,54	10,96	
Saccharose 0,35 M, K ₂ PO ₄ H 0,02 M	4,15	5,34	5,98	7,04	8,63	14,23	
Sérum de Boeuf	3,63	4,98	7,29	8,30	9,72	22,64	



C - L'EXPERIMENTATION SUR LES MICROSOMES MET EN EVIDENCE LA GRANDE RESISTANCE DE CES PARTICULES (TABLEAU XX ; p. 119)

1 - Aucun composé phosphorylé microsomal ne diffuse dans les solutions de saccharose, quelle que soit la concentration de ce dernier.

2 - Au contraire, l'addition de sels minéraux aux solutions de saccharose provoque une diffusion qui reste faible dans le cas du milieu d'ALLFREY et al., mais devient beaucoup plus importante dans le cas des milieux phosphatés.

3 - Contrairement à ce que l'on observe avec les noyaux et les mitochondries, le sérum ne provoque pas de diffusion des composés microsomaux.

III - DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus à la suite de l'étude de la diffusion des constituants phosphorylés des différentes particules cytoplasmiques, dans les solutions classiquement utilisées pour fractionner ces dernières par centrifugation différentielle, nous amènent à formuler les commentaires suivants :

1 - Les travaux de MONTREUIL et al. (277) ont démontré la nécessité du contrôle systématique au microscope électronique de la pureté et de l'intégrité des fractions cellulaires isolées par centrifugation différentielle. Certes, l'observation au microscope électronique reste le seul procédé capable de renseigner sur l'état de pureté des particules cytoplasmiques, mais elle ne peut, en aucun cas, constituer un critère absolu de l'intégrité chimique ou biochimique de ces dernières. L'application d'un procédé d'isolement des inclusions cytoplasmiques doit donc être précédée d'une étude critique systématique de l'influence des milieux de fractionnement portant, à la fois, sur la morphologie et sur l'intégrité chimique ou métabolique des particules. En principe, le choix d'un procédé de fractionnement sera fondé sur le respect de ces deux critères. Toutefois, dans certains cas,

TABLEAU XX

Coefficient de diffusion (exprimé en p. 100 de la radioactivité totale de l'inclusion), à + 4° C, dans différents milieux d'incubation, des composés phosphorylés des microsomes.

Milieux d'isolement	0,5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h
Saccharose (0,25 M	0	0	0	0	0	0
(0,33 M	0	0	0	0	0	0,17
(0,88 M	0	0	0	0	0	0
Saccharose 0,15 M, MgCl ₂ 10 mM, KCl 25 mM, tris 35 mM	0,92	1,73	-	0,81	2,28	3,31
Saccharose 0,35 M, MgCl ₂ 10 mM, K ₂ PO ₄ H 20 mM, KCO ₃ H 35 mM, KCl 25 mM	3,02	3,92	6,79	6,64	7,38	14,77
Saccharose 0,35 M, K ₂ PO ₄ H 0,2 M	0	1,56	1,67	4,57	6,47	9,82
Sérum de Boeuf	0	0	0	0	0	9,39



l'un d'entre eux seulement sera déterminant. En effet, il existe parfois, en particulier dans des expériences portant sur le métabolisme, une relation directe entre l'intégrité morphologique et l'activité enzymatique des inclusions cytoplasmiques. Le critère morphologique sera alors précieux dans le choix ou dans la mise au point de procédés de fractionnement de la cellule. Par exemple, dans le cas des mitochondries, il est démontré depuis longtemps (voir, par exemple, les travaux de HARMAN et FELGELSON (278) de HOGEBOOM et SCHNEIDER (279) ou de FONNESU et SEVERI (280)) que l'activité respiratoire dépend étroitement de la morphologie : les oxydations couplées sont parfois inhibées lorsque les mitochondries sont altérées. Dans d'autres cas, cependant, il n'existe pas de relation entre la morphologie de l'inclusion et son intégrité biochimique. Par exemple, pour effectuer des recherches portant sur la physico-chimie des constituants phosphorylés des noyaux, -des acides nucléiques, en particulier-, les procédés d'isolement utilisant des solutions d'acide citrique seront parfaitement applicables, bien que la morphologie des noyaux soit profondément altérée, puisque ces derniers conservent la totalité de leurs composés phosphorylés.

2 - La composition des milieux d'homogénéisation des tissus et de fractionnement des particules cytoplasmiques est l'un des facteurs déterminant dans le maintien de l'intégrité morphologique et biochimique de ces dernières. Nos expériences montrent, par exemple, le rôle néfaste que jouent des concentrations élevées de sels minéraux qui perméabilisent les membranes de toutes les inclusions cytoplasmiques et provoquent une véritable "fuite" de leurs constituants phosphorylés. Les phosphates, destinés à tamponner les solutions de saccharose, sont particulièrement actifs. Ils augmentent nettement la diffusion des composés phosphorylés des noyaux (Tableau XVII ; p. 114) et les mitochondries (Tableau XIX ; p. 117) et provoquent même celle des constituants des microsomes qui sont, cependant, les plus "stables" des inclusions (Tableau XX ; p. 119). Ces phénomènes auraient parfois peu d'importance s'ils intéressaient la totalité des composés phosphorylés des inclusions cytoplasmiques. Malheureusement, il semble, au contraire, que la diffusion soit sélective et porte sur des "populations"

particulières de constituants. Par exemple, SCHOLTISSEK (281) a montré que l'addition de phosphates à une solution de saccharose 0,25 M provoquait la diffusion d'acides ribonucléiques plus radioactifs que les acides ribonucléiques non diffusibles.

La suite de notre expérimentation nous a permis de confirmer ces résultats et de caractériser la présence d'un ARN diffusible qui présente les caractéristiques des ARN de type messenger (voir p. 139).

La recherche de milieux d'isolement plus "physiologiques" des inclusions cytoplasmiques nous avait conduite à l'emploi de sérum de Boeuf. Les observations au microscope électronique étaient encourageantes puisque la morphologie des fractions, -celle des mitochondries, en particulier-, était préservée. L'utilisation de sérums doit cependant être rejetée car elle provoque une diffusion importante des composés phosphorylés des noyaux (Tableau XVII ; p. 114) et des mitochondries (Tableau XIX ; p. 117) qui est probablement due aux sels minéraux ou à des "perméases" sériques.

3 - La préparation rapide de quantités élevées de noyaux ne présente pas de difficultés s'il s'agit, toutefois, d'étudier leurs constituants phosphorylés. En effet, deux sortes de milieux permettent d'isoler des noyaux purs sans provoquer la diffusion des composés phosphorylés : les solutions concentrées de saccharose et les solutions diluées d'acide citrique.

a - Les solutions de saccharose pur conviennent parfaitement à l'isolement des noyaux. Elles respectent, en effet, leur morphologie et limitent la diffusion des composés phosphorylés au travers de la membrane nucléaire. Cependant, l'emploi de solutions concentrées de saccharose est plus satisfaisant puisque les phénomènes de diffusion décroissent avec la concentration. En outre, quand ils se produisent, ils restent toujours très faibles et l'on peut parfaitement envisager, par exemple, l'utilisation de solutions de saccharose 0,25 M pour effectuer l'homogénéisation des tissus : le coefficient de diffusion

n'exécède pas, en effet, 0,70 au bout d'une heure d'incubation qui représente le temps nécessaire pour réaliser l'homogénéisation des tissus et l'élimination des noyaux et des cellules intactes, par une centrifugation de 10 mn à 250 g. Nos résultats confirment les observations de STERN et MIRSKY (282) et de MIRSKY (283) qui ont montré que les noyaux isolés dans des solutions de saccharose 0,25 M ne perdaient pas d'acides nucléiques, ni de nucléotides acido-solubles. Ils s'éloignent, au contraire, de ceux de ROODYN (284) qui signalait des pertes importantes d'acides ribonucléiques au cours de l'isolement des noyaux par le procédé de CHAUVEAU et al. (285). Le tableau XVII (p. 114) montre, en effet, que le saccharose 2,2 M ne provoque aucune diffusion des composés phosphorylés. Ce milieu semble donc convenir parfaitement à des études portant sur la physico-chimie des acides nucléiques. Nous ne pouvons cependant pas généraliser cette conclusion et l'étendre au cas de noyaux isolés en vue de recherches métaboliques. En effet, selon ALLFREY et al. (286), des concentrations élevées en saccharose inhibent les synthèses des protéines et des bases pyrimidiques à partir des précurseurs.

b - Les solutions d'acide citrique représentent, elles aussi, d'excellents milieux d'isolement des noyaux destinés à l'étude physico-chimique des constituants phosphorylés car on n'observe aucune diffusion de ces derniers : elles offrent, en outre, l'avantage de fournir rapidement des quantités élevées de noyaux purs. Toutefois, la morphologie de ces derniers apparaît très altérée au microscope électronique et ces modifications peuvent expliquer les résultats obtenus par plusieurs auteurs concernant la disparition d'activités enzymatiques et des pertes de protéides atteignant 10 à 55 p. 100 des protéides totaux (voir, en particulier, ALLFREY et al. (287)). SMELLIE et al. (288) et KAY et al. (289) ont même observé une diminution de la teneur en acides nucléiques de noyaux isolés à l'aide de solutions d'acide citrique. Ce dernier résultat est en contradiction avec ceux de ROODYN (290) et les nôtres (voir tableau XVII ; p. 114). Nous pouvons, toutefois, expliquer cette discordance par l'observation que nous avons faite de la grande fragilité des noyaux dans les milieux citriques et qui nous amène à la conclusion suivante : les procédés d'isolement des noyaux à l'aide de

solutions d'acide citrique sont très satisfaisants à la condition de ne pas soumettre les noyaux, au cours des opérations de lavage, à une nouvelle homogénéisation dans un appareil de POTTER et ELVEHJEM, mais de les remettre en suspension par une agitation douce. Le tableau XVIII (p. 115) est, à cet égard, très démonstratif. L'addition de saccharose aux solutions citriques permet d'éviter ce grave inconvénient. Ce phénomène s'explique peut-être par un "tannage" des membranes nucléaires par l'acide citrique qui augmenterait leur fragilité et favoriserait leur rupture sous l'action des homogénéiseurs. Le saccharose jouerait un effet protecteur, probablement en augmentant la viscosité du milieu.

Les solutions saccharosées d'acide citrique représentent donc les milieux de choix pour isoler des noyaux destinés à des recherches "statiques" sur des composés phosphorylés, comme les acides nucléiques. L'association du saccharose et de l'acide citrique permet d'éviter les inconvénients des solutions diluées de saccharose pur (diffusion des constituants phosphorylés du noyau) (voir tableau XVII ; p. 114) et des solutions d'acide citrique pur (diffusion provoquée par des réhomogénéisations) (voir tableau XVIII ; p. 115). En outre, l'inhibition des ribonucléases par l'abaissement du pH préserve l'intégrité moléculaire des acides ribonucléiques.

4 - La préparation des microsomes ne pose pas de problème particulier grâce à la grande "stabilité" de ces inclusions dont aucun des constituants phosphorylés ne diffuse dans les solutions de saccharose, quelle qu'en soit la concentration. On évitera, cependant, d'ajouter des sels minéraux aux solutions de fractionnement.

5 - Aucun des milieux que nous avons étudiés ne permet d'isoler les mitochondries d'une manière satisfaisante et la préparation de ces inclusions soulève un double problème. Le premier est posé par l'observation au microscope électronique qui montre que les mitochondries sont toujours souillées d'ergastoplasme et que leur morphologie est profondément altérée : elles sont, en effet, généralement gonflées et optiquement vides. Le second est d'ordre biochimique :

aucune des solutions de fractionnement que nous avons utilisées ne permet d'éviter la diffusion des constituants phosphorylés des mitochondries (Tableau XIX ; p. 117). Le phénomène est particulièrement important en présence de sels minéraux. Il est plus limité avec les solutions de saccharose et, dans ce cas, la diffusion augmente avec la concentration. L'emploi de solutions diluées de saccharose est donc recommandé pour réaliser l'isolement des mitochondries.

6 - Il n'existe pas de méthode générale de préparation des diverses inclusions cellulaires et il est nécessaire de combiner l'emploi de différents milieux d'isolement. Dans l'état actuel des recherches concernant l'intégrité morphologique et biochimique des particules cytoplasmiques, d'une part, et dans le cas particulier d'études portant sur les constituants phosphorylés, d'autre part, il semble que l'emploi de solutions saccharosées soit le plus satisfaisant. L'homogénéisation des tissus sera effectuée dans des solutions diluées de saccharose (saccharose 0,25 M par exemple) dans lesquelles la diffusion des composés mitochondriaux est minimale. Le temps nécessaire pour effectuer toutes les manipulations de la première centrifugation (30 mn environ), destinée à débarrasser l'homogénat, des noyaux, des débris cellulaires et des cellules intactes, ne provoque, en effet, qu'une faible diffusion des constituants phosphorylés nucléaires.

Les noyaux sont ensuite purifiés par le procédé de CHAUVEAU et al. (291). L'isolement des mitochondries nécessite environ 2 heures au cours desquelles la diffusion des composés phosphorylés reste négligeable dans le saccharose 0,25 M. Toutefois, ces inclusions sont souillées d'une proportion importante d'ergastoplasme. Quant aux microsomes, leur "stabilité" les met à l'abri de toute diffusion, quel que soit le temps de contact avec la solution de saccharose.

IV - CONCLUSIONS

1 - L'étude de la diffusion des composés phosphorylés des inclusions cytoplasmiques vers les solutions classiquement utilisées dans le fractionnement cellulaire nous a permis de montrer que la composition de ces milieux jouait un rôle important dans la perméabilisation des membranes. Sauf dans le cas des mitochondries, les solutions de saccharose pur n'entraînent pas de perte notable de composés phosphorylés ; elles conviennent parfaitement à l'isolement des noyaux et de la "fraction microsomale" de CLAUDE. Au contraire, les solutions de saccharose tamponnées par des sels minéraux, -en particulier par les phosphates-, provoquent, dans les conditions habituelles des fractionnements, une diffusion importante des constituants phosphorylés des trois types d'inclusions cytoplasmiques : noyaux, mitochondries et "microsomes". Les solutions destinées au fractionnement cellulaire doivent donc être choisies avec la plus grande prudence, car les phénomènes de diffusion risquent d'introduire de graves causes d'erreur dans l'interprétation des résultats. Il se produit, en effet, un enrichissement de la "fraction soluble" aux dépens des constituants particuliers.

2 - Ces causes d'erreur seront aggravées si la diffusion est sélective car les pertes "quantitatives" subies par les particules cytoplasmiques s'accompagneront alors de pertes "qualitatives".

C'est pourquoi, nous avons poursuivi nos travaux dans le but d'identifier les produits diffusibles et de préciser éventuellement le caractère sélectif de la diffusion des constituants d'origine particulaire.

Dans le chapitre suivant, nous nous sommes limitée à l'étude de la diffusion des composés phosphorylés des noyaux isolés du foie de Rat dans les solutions phosphatées de saccharose, en posant en hypothèse que la diffusion pourrait bien intéresser une famille d'ARN à marquage rapide selon un mécanisme identique à celui qui a lieu in situ dans la cellule vivante. Les résultats que nous avons obtenus ont entièrement confirmé cette hypothèse et nous ont conduite

à isoler et à identifier, parmi les produits de la diffusion des noyaux du foie de Rat, des dRNP qui pourraient bien représenter la forme de transport des ARN de type messenger du noyau vers le cytoplasme.

ETUDE DES COMPOSES DIFFUSIBLES DES NOYAUX DE FOIE DE RAT

1° - MISE EN EVIDENCE D'ARN DE TYPE MESSENGER

I - MISE EN EVIDENCE D'UNE DIFFUSION
DES ARN NUCLEAIRES

Dans une première série de travaux, nous avons cherché à identifier les composés phosphorés diffusibles du noyau. Il pouvait s'agir, en effet, uniquement de phosphates minéraux de radioactivité spécifique très élevée dont le passage dans les solutions de fractionnement aurait alors introduit une cause d'erreur négligeable par rapport à la diffusion de composés biochimiquement et biologiquement plus importants, comme des acides nucléiques. C'est pourquoi, nous nous sommes attachée à l'étude de la diffusion de ces derniers et, plus particulièrement, à l'étude des ARN dont la caractérisation parmi les produits diffusibles nous semblait, a priori, plus probable que celle des ADN. Nous avons, en outre, étudié la morphologie des noyaux avant et après la diffusion afin de vérifier leur pureté et leur intégrité et pour voir également si le phénomène de diffusion ne s'accompagnait pas de modifications détectables in situ.

A - MODE OPERATOIRE

1 - EXTRACTION DES COMPOSES NUCLEAIRES DIFFUSIBLES

Des noyaux de foie de Rats SPRAGUE, isolés par la méthode de CHAUVEAU et al.(292) (voir p. 110), sont resuspendus dans une solution de saccharose 0,35 M tamponnée à pH 7,8 par du phosphate bipotassique (concentration finale : 0,02 M). Notre choix s'est porté

sur cette solution car la diffusion des composés phosphorylés des noyaux y est maximale (voir tableau XVII ; p. 114). La suspension de noyaux est maintenue à 4° C pendant 4 heures sous agitations manuelles répétées. Elle est ensuite centrifugée à 20 000 g pendant 20 minutes. On obtient ainsi les "noyaux après diffusion" (N_D) et une fraction surnageante F_D qui contient les constituants diffusibles.

2 - IDENTIFICATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

Les ARN ont été mis en évidence par l'identification électrophorétique des ribonucléotides libérés par hydrolyse alcaline suivant le procédé décrit précédemment (voir p. 91) et dont le principe est le suivant :

La solution des composés diffusibles est additionnée d'acide trichloracétique (concentration finale 10 g p. 100 ml). Le précipité est délipidé 3 fois par l'éthanol absolu à froid, puis 3 fois à l'ébullition par un mélange d'éthanol et d'éther (v : v). Le résidu est ensuite hydrolysé pendant 24 h à 20° C par la soude 0,5 N. La solution obtenue est amenée à pH 4,5 par l'addition d'acide formique et le précipité qui apparaît est éliminé par centrifugation. La solution surnageante est débarrassée des ions sodium et des protides par un passage sur une colonne de résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 2 ; mesh 25-50 ; forme acide). Un lavage prolongé à l'eau distillée fournit une solution effluente qui contient les ribonucléotides constituant les ARN. Cette solution est lyophilisée. Le résidu sec est repris dans une quantité convenable d'acide chlorhydrique 0,1 N et la solution obtenue est soumise à l'électrophorèse effectuée dans des cuves "en toit", sur papier d'ARCHES n° 304, dans le tampon citrate 0,02 M de pH 3,5 de DAVIDSON et SMELLIE (293), pendant 6 h, sous une tension de 15 V/cm.

Les électrophorégrammes sont ensuite séchés à la température de la pièce. Les ribonucléotides, repérés en lumière ultra-violette, sont élués dans des volumes déterminés d'acide chlorhydrique 0,1 N. Leur identification et leur dosage sont effectués par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

3 - ETUDE MORPHOLOGIQUE DES NOYAUX AVANT ET APRES DIFFUSION

a - Au microscope à contraste de phase

L'observation directe des noyaux représente le moyen le plus efficace pour vérifier si l'ensemble des noyaux obtenus reste intact au cours de la diffusion.

b - Au microscope électronique

Les noyaux sont fixés pendant 1,5 h, à 4° C, par la glutaraldéhyde à 1,6 p. 100 dans le tampon phosphate de SORENSEN (294) ajusté à pH 7,4. Cette première fixation est suivie d'une post-fixation de 1,5 h dans le O_3 à 1 p. 100 dans le même tampon. Après déshydratation à l'alcool, l'inclusion est réalisée dans l'Epon selon la méthode classique. Les coupes sont observées après imprégnation par l'acétate d'uranyle à 5 p. 100, pendant 20 mn, et par le citrate de plomb, pendant 5 mn, selon la technique de REYNOLDS (295).

B - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - Des acides ribonucléiques nucléaires diffusent au travers de la membrane des noyaux incubés dans des solutions phosphatées de saccharose.

2 - Leur composition centésimale en nucléotides est la suivante :

G : 28,4 p. 100

C : 27,9 p. 100

A : 20,8 p. 100

U : 22,9 p. 100

Elle est voisine de celle des ARN nucléaires totaux :

G : 28,3

C : 28

A : 19,7

U : 24

3 - Observés au microscope à contraste de phase, nos préparations de "noyaux CHAUVEAU" apparaissent très pures (voir fig. 8 a ; p. 131). Les noyaux semblent, en outre, avoir conservé leur intégrité morphologique après l'incubation ; leur membrane, en particulier, reste intacte (voir fig. 8 b ; p. 131).

4 - L'observation au microscope électronique confirme ces résultats. Si on les compare aux noyaux CHAUVEAU "natifs" (voir fig. 9 ; p. 132), les noyaux après diffusion gardent, en effet, une morphologie intacte (voir fig. 10 ; p. 133). Le nucléoplasme reste homogène, la chromatine est sous forme dispersée ; on peut observer la présence de grains interchromatiniens ainsi que des granules de plus grande taille (500-600 Å) correspondant certainement aux grains périchromatiniens. L'enveloppe nucléaire des noyaux après diffusion est toujours composée de ses deux feuilletts ; on observe rarement une effraction de l'enveloppe et l'on constate toujours la présence de ribosomes à la surface du feuillet externe. La modification morphologique essentielle réside au niveau du nucléole ; on voit, en effet, que les "granules nucléolaires" ont en grande partie disparu ; par contre, le réseau fibrillaire apparaît encore très nettement (voir fig. 11 ; p. 134 et comparer à la fig. 1 ; p. 4).

C - CONCLUSIONS

Des macromolécules, comme des acides nucléiques, sont parfaitement capables de traverser les membranes de noyaux perméabilisées par certaines solutions utilisées dans le fractionnement cellulaire et nous avons, en particulier, démontré que des acides ribonucléiques nucléaires "dialysaient" sous l'action de solutions phosphatées de saccharose. On imagine aisément l'importante cause d'erreur que provoque ce phénomène en déterminant, non seulement une perte de matériel nucléaire, mais en outre, un enrichissement, en ce matériel, de la "fraction soluble" du cytoplasme.

L'observation, au microscope électronique, montre que les noyaux restent intacts après la diffusion. La seule modification d'ordre morphologique est la disparition des granules au niveau du nucléole.

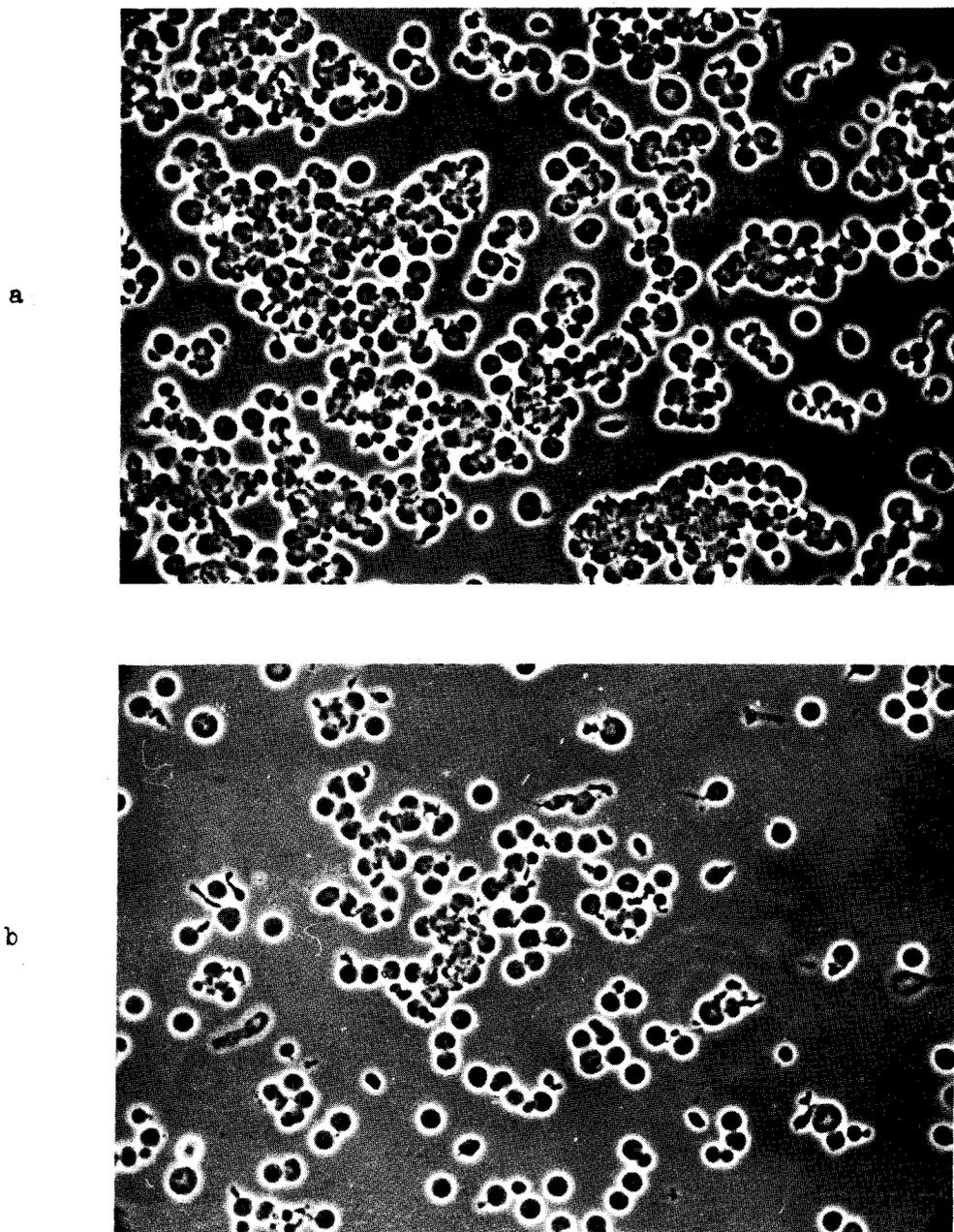


Figure 8

Noyaux d'hépatocytes de Rat préparés selon la méthode de CHAUVEAU et al.

Observation au microscope à contraste de phase.

a) Noyaux "natifs". x 480.

b) Noyaux après incubation dans une solution de saccharose 0,35 M tamponnée à pH 7,8 par du phosphate bipotassique. x 480.





Figure 9

Noyaux d'hépatocytes de Rat préparés selon le procédé de CHAUCHEAU.
Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration identiques
à celles de la figure 1 (p. 4). nu, nucléole. x 16 000.





Figure 10

"Noyaux CHAUVÉAU" après incubation dans une solution de saccharose 0,35 M tamponnée à pH 7,8 par du phosphate bipotassique 0,02 M. Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration identiques à celles de la figure 1 (p. 4). nu, nucléole. x 20 000.



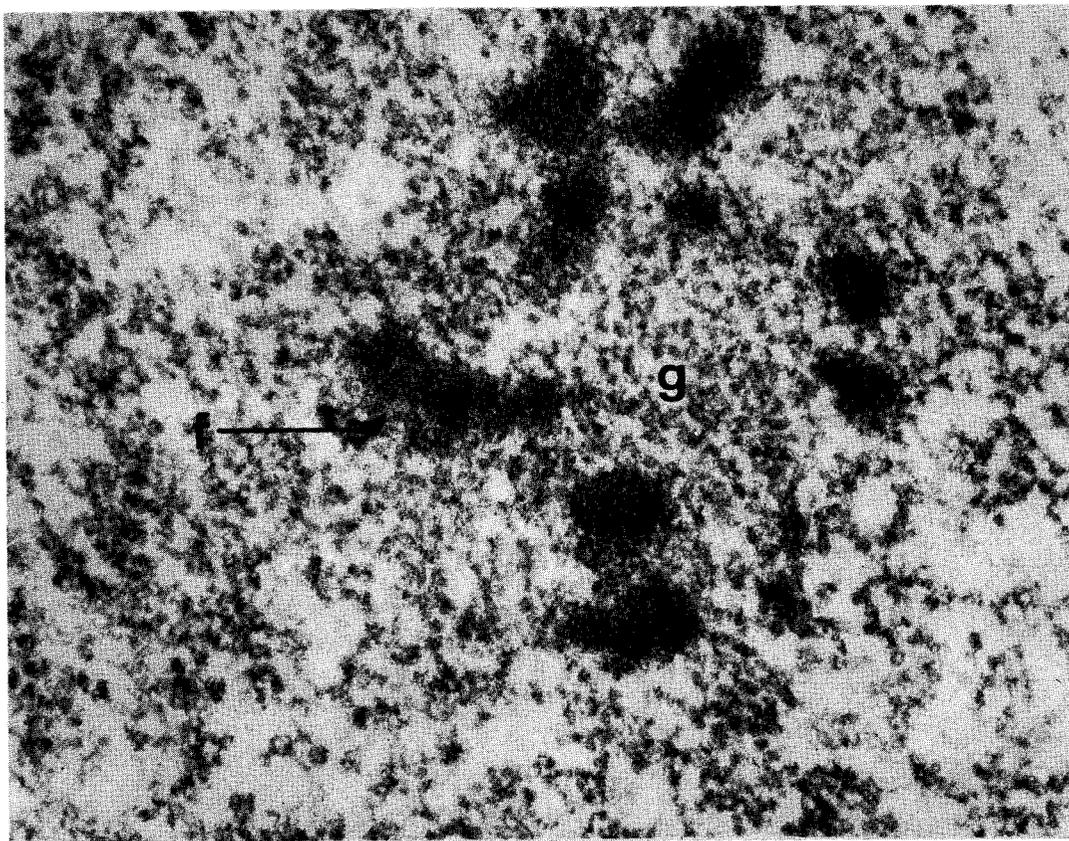


Figure 11

Nucléole de "noyau CHAUVÉAU" après incubation dans une solution phosphatée de saccharose. On voit que la diffusion a fait disparaître sélectivement les "granules nucléolaires" (g) en respectant la "fraction fibrillaire" (f). Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration identiques à celles de la figure 1 (p. 4). x 80 000.



II - MISE EN EVIDENCE D'UNE DIFFUSION SELECTIVE DES ARN NUCLEAIRES

Dans une seconde série de travaux, nous avons étudié le métabolisme des acides ribonucléiques diffusibles et non diffusibles, de manière à vérifier si la diffusion n'intéressait pas une classe particulière d'ARN. Dans ce cas, en effet, les causes d'erreurs dues à ce phénomène s'aggravaient encore par le fait que la perte de constituants nucléaires n'était pas seulement de nature "quantitative" mais aussi de nature "qualitative".

Nous avons abordé le problème de la sélectivité du phénomène en effectuant une étude comparée de l'incorporation de l'acide radiophosphorique dans les fractions diffusibles et non diffusibles des ARN nucléaires.

A - MODE OPERATOIRE

Des Rats SPRAGUE, à jeun depuis 24 heures, reçoivent une injection intrapéritonéale de 1 mC de radiophosphate dans 1 ml de sérum physiologique. Ils sont sacrifiés à des temps échelonnés de 0,25 à 24 h et les noyaux des cellules hépatiques isolés selon le procédé de CHAUVEAU et al. (296), sont soumis au mode opératoire que nous avons décrit plus haut (voir p. 127, 1 -).

Nous avons obtenu, de cette manière, des noyaux "dialysés" (N_D) et la fraction diffusible de ces derniers (F_D) dont les ARN totaux ont été extraits et traités suivant le protocole expérimental que nous avons précisé à la page 128(2 -). La radioactivité spécifique des ribonucléotides a ensuite été déterminée selon le procédé de BOULANGER et MONTREUIL (297) décrit précédemment (voir p. 96).

B - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXI (p. 136) et illustrés par la courbe de la figure 12 (p. 137). Nous pouvons les résumer de la manière suivante :

TABLEAU XXI

Evolution, en fonction du temps d'incorporation in vivo de l'acide radiophosphorique, de la radioactivité spécifique de l'acide adénylique constituant les ARN nucléaires du foie de Rat "diffusibles" (fraction F_D) et "non diffusibles" (fraction N_D) dans une solution phosphatée de saccharose (*).

	Temps d'incorporation <u>in vivo</u> de l'acide radiophosphorique (en heures)							
	0,25	0,5	1	1,5	2	16	24	
Radioactivités spécifiques (**):	:	:	:	:	:	:	:	
ARN "diffusibles"	917	5.394	7.821	7.564	5.457	-	2.880	
ARN "non diffusibles":	410	2.705	3.803	4.211	4.539	2.721	2.508	

(*) voir p. 127 (1 -)

(**) exprimées en cpm x 10⁻³/mg de P d'acide adénylique



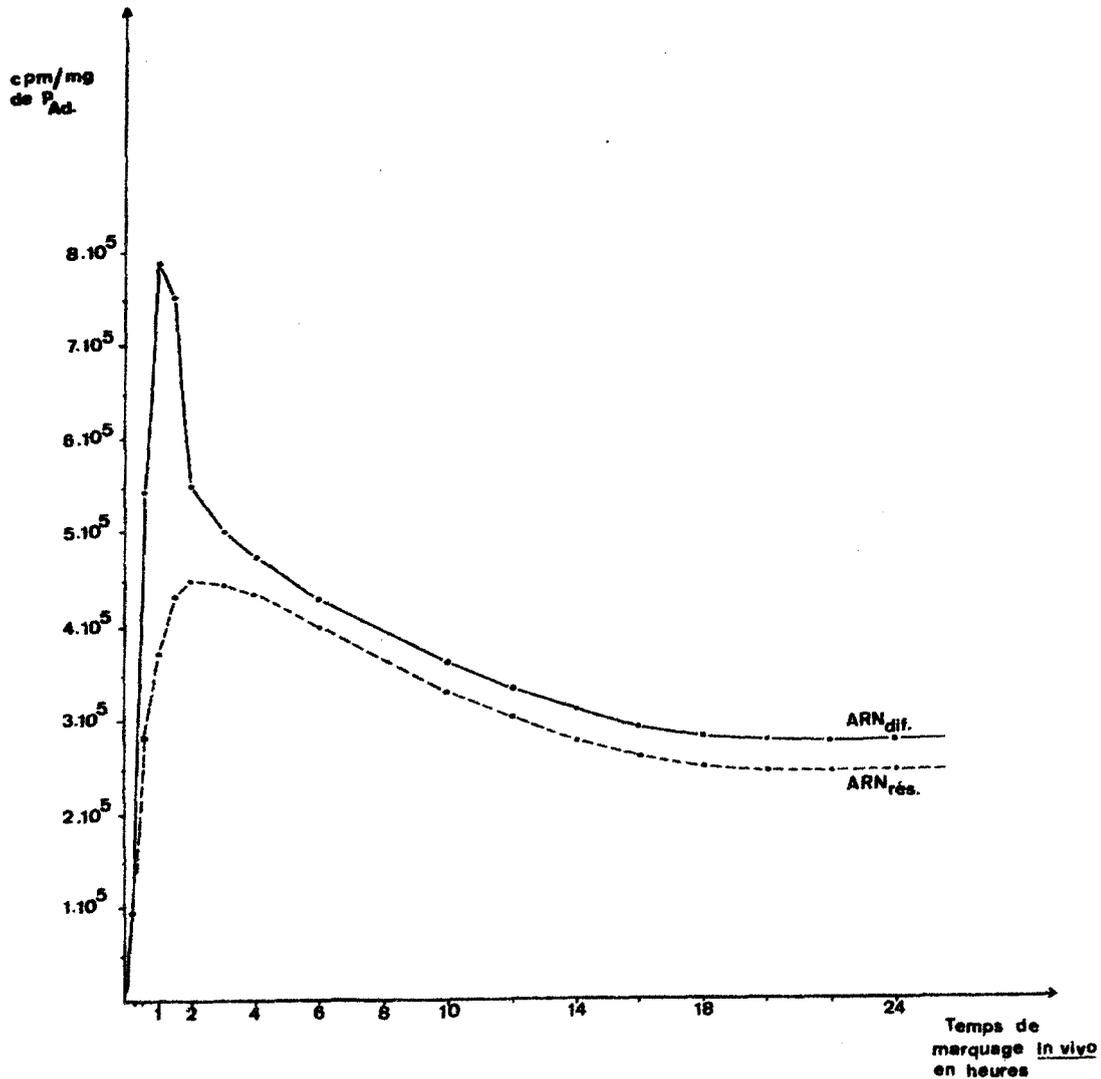


Figure 12

Evolution, en fonction du temps d'incorporation in vivo de l'acide radiophosphorique, de la radioactivité spécifique de l'acide adénylique constituant les ARN nucléaires du foie de Rat "diffusibles" et "non diffusibles" dans une solution phosphatée de saccharose.
 En abscisses : temps d'incorporation ; en ordonnées : cpm/mg de P adénylique.



1 - Les ARN nucléaires diffusibles possèdent une radioactivité spécifique nettement supérieure à celle des ARN nucléaires non diffusibles. Elle est double de cette dernière au début de l'incorporation. Elle lui est pratiquement égale au bout de quelques heures.

2 - La radioactivité spécifique des ARN diffusibles est maximale au bout d'une heure ; celle des ARN non diffusibles l'est plus tardivement (au bout de 2 heures).

C - CONCLUSIONS

Les résultats précédents nous permettent de tirer les deux conclusions importantes suivantes :

1 - La diffusion des ARN nucléaires au travers de la membrane des noyaux sous l'action de solutions phosphatées de saccharose est sélective. Elle concerne, en effet, une famille d'ARN dont la vitesse de renouvellement est plus élevée que celle des ARN non diffusibles.

Toutes nos expériences ayant été effectuées dans les conditions mêmes d'un fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle, on conçoit aisément à quelles graves causes d'erreur peut conduire l'utilisation non contrôlée de certaines solutions classiquement utilisées dans la centrifugation différentielle des inclusions cytoplasmiques.

2 - La fraction "diffusible" possède certaines caractéristiques métaboliques des ARN de type messenger, en particulier une vitesse d'échange élevée des restes "phosphorylés".

Cette observation nous a incitée à poursuivre nos travaux dans une nouvelle direction. Jusqu'à présent, en effet, nos recherches concernaient le dépistage de causes d'erreur dans les procédés de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle. Les résultats que nous avons acquis à ce propos nous ont conduite dans un second temps, à poser en hypothèse que la fraction diffusible des ARN nucléaires pourrait bien renfermer des ARN de type messenger dont elle possédait, comme nous venons de le voir, certaines caractéristiques. Les recherches que nous avons entreprises ont confirmé cette hypothèse.

III - MISE EN EVIDENCE D'ARN DE TYPE MESSENGER DANS LA FRACTION DIFFUSIBLE DES ARN DU FOIE DE RAT

Nous avons poursuivi nos travaux précédents en améliorant, dans un premier temps, le procédé de fractionnement des ARN nucléaires par diffusion car les résultats de la cinétique d'échange du radical phosphoryle dans les ARN diffusibles étaient en contradiction avec ceux de l'étude de la composition centésimale de ces derniers. En effet, les ARN diffusibles étaient de type GC (voir p. 129), tandis que les ARN messagers sont de type AU.

Nous avons pensé que, dans la "fraction diffusible" les ARN messagers pouvaient être accompagnés d'une proportion importante d'ARN de type GC et de "turnover" relativement faible et nous avons posé en hypothèse que ces derniers pouvaient provenir de particules cytoplasmiques, comme des ribosomes adsorbés sur les noyaux, ou de "ribosomes d'origine nucléaire" dont l'existence a été suggérée par plusieurs auteurs (voir, par exemple, BACH et JOHNSON (298) ; BUTLER et GODSON (299) ; GEORGIEV et al. (300) ; NOLL (301) ; WANG (302)). C'est pourquoi, nous avons soumis la "fraction diffusible" F_D à l'ultracentrifugation différentielle.

A - MODE OPERATOIRE

Des Rats SPRAGUE reçoivent, par injection intrapéritonéale, 1 mC de radiophosphate en solution dans 1 ml de sérum physiologique et sont sacrifiés une heure après l'injection. Les noyaux hépatiques sont isolés par le procédé de CHAUVEAU et al. (303) (voir p. 110). Une partie aliquote de la préparation de noyaux est prélevée et sert de témoin de référence. Le reste est incubé dans une solution phosphatée de saccharose dans les conditions que nous avons décrites plus haut (voir p. 127, 1 -). On obtient, de cette manière, des noyaux "dialysés" N_D et la fraction des constituants diffusibles F_D . Cette dernière, soumise à une centrifugation de 1 h à 80 000 g (ultracentrifugeuse SPINCO, modèle L), fournit un sédiment R_N et une solution surnageante S_D .

La composition centésimale et la radioactivité spécifique des ARN des différentes fractions obtenues :

- noyaux "natifs"
- noyaux après incubation (N_D)
- fraction sédimentable de la solution d'incubation (R_N)
- surnageant de la solution d'incubation (S_D)

ont été déterminées en appliquant les procédés que nous avons décrits plus haut (voir p. 127 et 135).

B - RESULTATS

L'application des méthodes précédentes nous a apporté les résultats suivants :

1 - L'ultracentrifugation de la "fraction nucléaire diffusible" permet d'obtenir une "fraction sédimentable" et un surnageant. Tous deux renferment des ARN.

2 - Nous avons rassemblé dans le tableau XXII (p. 142) les résultats concernant la radioactivité spécifique et la composition centésimale des ARN des noyaux "natifs", des noyaux après incubation, de la fraction sédimentable et du surnageant de la solution d'incubation.

On voit que nous avons obtenu, par diffusion, trois populations d'ARN nucléaires différentes par leur composition molaire et par leur radioactivité spécifique.

a - La fraction sédimentable R_N possède la radioactivité spécifique la plus faible. Les ARN qui la composent sont de type GC. Elle possède, au microscope électronique, une morphologie de ribosomes. Il ne semble pas toutefois qu'il puisse s'agir de ribosomes cytoplasmiques dont les ARN sont de type GC plus accusé et possèdent une radioactivité 20 fois moindre.

b - Les ARN restant dans les noyaux après la diffusion (noyaux N_D) ont une radioactivité spécifique inférieure à celle des ARN totaux des noyaux natifs. Ce résultat confirme la disparition d'ARN à marquage rapide. En outre, leur composition en nucléotides est de type GC plus accusé que dans les noyaux natifs. Cette observation est en faveur de

l'élimination des noyaux d'ARN de type AU.

c - La solution des substances diffusibles S_D , obtenue par ultracentrifugation de la fraction diffusible F_D , contient des ARN dont le marquage est le plus rapide. Leur composition centésimale en nucléotides (déterminée par spectrophotométrie dans l'ultraviolet) tend vers le type AU comme le montre la valeur du rapport $G + C/A + U$ qui est égale à 1.

C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1 - L'ultracentrifugation permet, en éliminant une fraction particulaire sédimentable, de purifier la fraction diffusible des noyaux.

2 - Cependant, la radioactivité spécifique des ARN de la solution n'augmente pas toujours sensiblement par rapport à celle des ARN des "noyaux après l'incubation" (noyaux N_D) : comme dans l'expérience précédente (voir tableau XXII ; p. 142), sa valeur est en effet, seulement le double de celle des ARN des noyaux N_D . Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la fraction sédimentable R_N possède elle-même une radioactivité spécifique élevée mais aussi par le fait qu'une partie importante de l'ARN nouvellement synthétisé n'est jamais transférée dans le cytoplasme ; ce phénomène, suggéré dès 1964 par HARRIS (304), a été confirmé par des nombreux auteurs (voir, pour exemples, SHEARER et Mc CARTHY (305) ; ARION et GEORGIEV (306) ; DREWS et al. (307) ; BILLING et al. (308) SOEIRO et DARNELL (309)).

3 - Les ARN constituant la "fraction diffusible" S_D possèdent une composition centésimale dont le rapport $G + C/A + U$ est égal à 1. Il est intéressant de comparer ces valeurs avec celles qu'ont obtenu, par différents procédés, d'autres auteurs pour des préparations d'ARN de type messager de foie de Rat (voir tableau XIII ; p. 144).

Il est admis actuellement que la composition nucléotidique des ARN messagers se rapproche de celle des ADN sur lesquels ils se sont synthétisés. Dans le cas du foie de Rat, cette relation de composition a été démontrée jusqu'à présent par l'application de la méthode "indirecte" de YCAS et VINCENT (310) et de KITAZUME et YCAS (311) qui consiste à calculer la composition centésimale des ARN à partir des radioactivités spécifiques des nucléotides provenant du marquage pendant 30 mn

TABLEAU XXII

Caractéristiques des ARN des différentes fractions nucléaires et cytoplasmiques.

	Noyaux		Fraction diffusible F _D		"Microsomes"
	Natifs	Après diffusion N _D	Fraction sédimentable R _N	Surnageant S _D	
Radioactivité spécifique (*)	3.810	2.500	1.530	4.710	78
Composition centésimale					
G	28,30	29,00	29,65	26,27	33,29
C	28	29,11	30,15	24,13	30,88
A	19,70	18,75	18,65	23,10	17,64
U	24	23,14	21,55	26,50	18,19
$\frac{G + C}{A + U}$	1,26	1,39	1,49	1	1,80

(*) En cpm x 10⁻³/mg de phosphore adénylique.

à 60 mn des ARN totaux du noyau. Les valeurs de rapports $G + C/A + U$ varient, dans ce cas, de 0,83 à 1,45, montrant ainsi l'inversion de la composition nucléotidique de ces ARN qui se rapproche alors de celle des ADN (*).

En fractionnant les ARN par divers procédés, plusieurs auteurs sont parvenus à des conclusions identiques. Par exemple, SIBATANI (312) a caractérisé des ARN à marquage rapide dans la phase phénolique d'extraits tissulaires. KIDSON et KIRBY (313) ont obtenu des résultats analogues en étudiant l'interphase phénol-eau, recueillie par traitement des noyaux dans des mélanges de phénol, de dodécylsulfate de sodium et de 8-hydroxyquinoline ou de phénol et de p.aminosalicylate de sodium. Le principe de ces méthodes a été appliqué par GEORGIEV et al. (314) au foie de Rat et par BEZDEK et SKALKA (315) et MUNRO et KORNER (316) au foie de Lapin. Les résultats obtenus par différents auteurs sont rassemblés dans le tableau XXIII (p. 144).

4 - Il est important de souligner que nous obtenons par spectrophotométrie une valeur du rapport $G + C/A + U$ égale à 1 pour les ARN de la fraction S_D . Jusqu'à présent, en effet, cette valeur n'avait été atteinte par les auteurs qu'à l'aide de la méthode des radioactivités spécifiques d'YCAS et al. (317). Or, la détermination par spectrophotométrie de la composition en nucléotides d'ARN messagers préparés par différents procédés (fractionnement des ARN cellulaires par le phénol ; isolement à partir des polysomes) fournit des valeurs du rapport $G + C/A + U$ qui varient de 1,38 à 1,50. Ces résultats s'expliquent par la présence, dans les préparations d'ARN messagers, de proportions importantes d'ARN de type GC. Nous pouvons donc admettre que les préparations d'ARN de type messenger que nous obtenons possèdent un taux de pureté très élevé.

5 - La fraction sédimentable R_N de la fraction diffusible F_D représente une classe particulière de ribosomes différents des ribosomes cytoplasmiques par leur radioactivité élevée.

(*) Selon YAMANA et SIBATANI (318), la composition des ADN du foie de Rat est la suivante : dG : 20,84,; dC : 21,4 ; dA : 27,9 ; dT : 30,1 ; $dG + dC/dA + dT = 0,73$

TABLEAU XXIII

Composition centésimale des ARN de type messager du foie de Rat déterminée par la méthode "indirecte" d'YCAS et VINCENT (319) et par spectrophotométrie dans l'ultraviolet.

	Méthode "indirecte" d'YCAS et VINCENT						Méthode spectrophotométrique					
	GEORGIEV et al. (320)	MUNRO et KORNER (321)	DERUMEZ (322)	SAMARINA et al. (323)	OTJUKA et TERAYAMA (324)	TSANEV et al. (325)	SCHÜTZ et al. (326)	SIBATANI et al. (327)	SAMARINA et al. (328)	KIMURA et al. (329)	Résultats person- nels	
G	22,4	25,7	26,7	32,7	16,2	24,2	26,0	29,7	24,5	28,2	26,27	
C	22,8	24,6	24	26,6	33,7	23,1	24,6	31,4	33,4	21,8	24,13	
A	23,2	25,6	24,3	18,5	34,3	28,5	23,8	20,5	20,3	25,6	23,10	
U	25	24,1	25	22,2	15,8	24,3	25,6	18,4	21,7	25,4	26,50	
$\frac{G + C}{A + U}$	0,83	1	1,03	1,45	1	0,90	1	1,5	1,38	1	1	



Nous proposons de les appeler "ribosomes nucléaires".

L'origine de ces ribosomes reste pour l'instant une énigme. Ils peuvent, en effet, provenir du noyau par passage au travers de la membrane nucléaire (qui reste morphologiquement intacte après la diffusion), conformément aux hypothèses émises, par exemple, par NOLL (330) ou par GEORGIEV et coll. (331). On peut encore invoquer un mécanisme de "désorption" au cours de l'incubation de ribosomes adsorbés à la surface des noyaux, (visibles au microscope électronique), qui s'associeraient en polysomes, grâce aux ARN messagers diffusibles, par un mécanisme analogue à celui qui a été décrit par BACH et JOHNSON (332).

Les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent ne nous permettent pas de choisir pour l'une ou l'autre de ces hypothèses.

2^e - MISE EN EVIDENCE DE PARTICULES DE RNP
TRANSPORTANT LES ARN DE TYPE MESSEAGER

Les travaux effectués dans le chapitre précédent nous ont permis d'identifier, parmi les composés diffusibles, deux classes d'ARN différant à la fois par leur radioactivité spécifique et par leur composition en bases. Nous avons repris l'étude détaillée de ces deux catégories de fractions qui nous a permis de démontrer que si ces deux dernières, en fait, étaient de nature particulière, seule la fraction correspondant à S_D était originaire du noyau. En conséquence, nous nous sommes limitée ultérieurement à l'étude de cette dernière qui s'est révélée être essentiellement constituée de particules de ribonucléoprotéines 45 S dont nous avons étudié, en détail, les caractères physico-chimiques et morphologiques.

I - ETUDE DES FRACTIONS RN₁ ET RN₂

A - ISOLEMENT

Dans le but de vérifier l'hypothèse que le "surnageant de diffusion" S_D était constitué d'ARN de type messager contaminés par des composés d'origine ribosomale, nous avons tenté d'éliminer ces derniers par une nouvelle ultracentrifugation à 80 000 g pendant 15 heures. Nous avons en fait obtenu une seconde fraction sédimentable contenant des ARN de type messager que nous avons appelée RN₂. Pour éviter toute confusion, la fraction sédimentable contenant les "ribosomes nucléaires" a été appelée RN₁ (au lieu de R_N).

Le protocole expérimental permettant d'obtenir les différentes fractions nucléaires a été résumé dans la figure 13 (p. 147).

B - PROPRIETES

1 - ANALYSE CHIMIQUE

Nous avons déterminé la composition centésimale en phosphore acido-soluble, lipidique, ARN et alcali-insoluble de nos différentes fractions nucléaires.

a - Mode opératoire

Les ARN des fractions N (noyaux avant diffusion), N_D (noyaux après diffusion), RN₁ et RN₂ ont été extraits selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER décrite précédemment (voir p. 67). Au cours de l'extraction (voir le schéma de la figure 14 ; p. 148), nous avons recueilli les surnageants de centrifugation contenant les composés acido-solubles et organo-solubles ; les composés alcali-insolubles de ces fractions, contenus dans le précipité formique, ont également été recueillis à la fin de l'extraction.

Le dosage du phosphore total a été effectué selon la méthode d'ALLEN (333).

b - Résultats

La répartition des composés phosphorylés dans les différentes fractions nucléaires est représentée dans le tableau 24 ; p. 149) ; nous pouvons en tirer les commentaires suivants :

- Injection aux rats, par voie intrapéritonéale, de 1 mC de radiophosphate
- Sacrifice des animaux après 1 heure d'incorporation
- Homogénéisation des foies dans une solution 0,33 M en saccharose et 0,0018 M en chlorure de calcium, ajustée à pH 7,4
- Centrifugation de l'homogénat à 250 g pendant 10 mn.

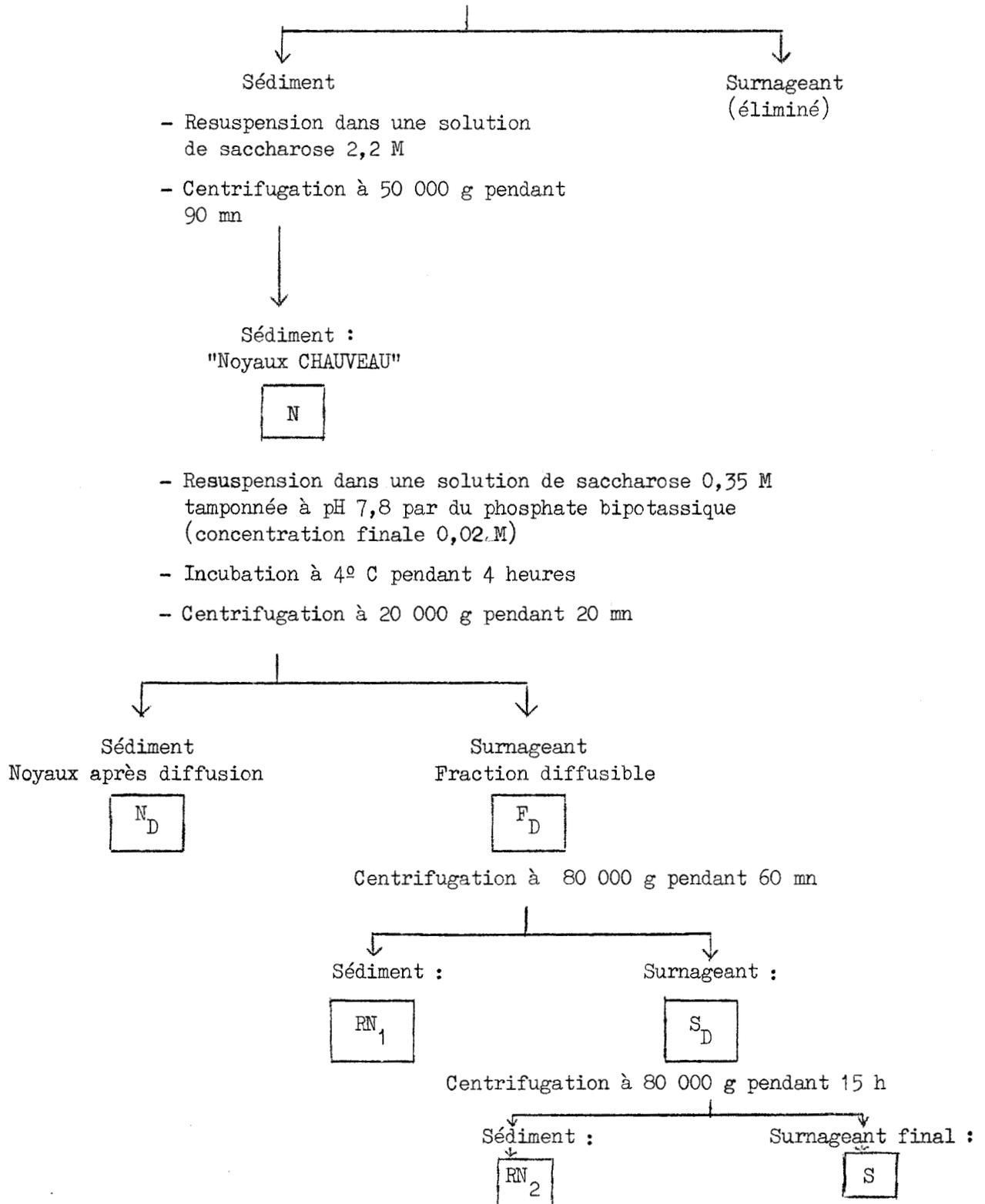


Figure 13

Schéma de la préparation des particules diffusibles.

TABLEAU XXIV

Répartition des composés phosphorylés dans différentes fractions nucléaires (en p. 100 du phosphore total).

	"Noyaux CHAUVEAU"		Fractions diffusibles sédimentables		
	Avant diffusion	Après diffusion	RN ₁	RN ₂	
	N	N _D			
P. acido-soluble	2,3	4,9	9,4	13	
P. lipidique	—éther	3,7	2,9	1,4	0,4
	—alcool- —éther	6,9	6,6	27,3	5,5
P. ARN	18,8	16,2	46,0	62,9	
P. alcali-insoluble	68,3	69,3	15,9	18,4	



1) La comparaison de la composition centésimale en composés phosphorylés des noyaux avant et après diffusion, révèle une diminution en P-lipidique (surtout soluble dans l'éther) ainsi qu'une diminution en P-ARN. Cette dernière observation est en faveur de l'élimination d'ARN par les noyaux ; elle nous apporte donc une preuve supplémentaire quant à la nature des produits diffusibles.

2) Les fractions RN_1 et RN_2 ont sensiblement la même composition en composés phosphorés. Elles diffèrent essentiellement par leur teneur en composés P-lipidiques solubles dans le mélange d'alcool et d'éther ; en effet, la fraction RN_1 en renferme jusqu'à 27 p. 100 tandis que la fraction RN_2 n'en contient que 5 p. 100. La fraction RN_1 est donc plus hétérogène que la fraction RN_2 et très riche en lipides.

2 - COMPOSITION EN BASES ET RADIOACTIVITÉ SPECIFIQUE DES ARN

a - Mode opératoire

La composition centésimale en nucléotides des ARN et la radioactivité spécifique de ces derniers ont été déterminées par application de méthodes spectrophotométriques dans l'ultra-violet. En outre, la recherche d'ARN de type messenger a été effectuée en appliquant le procédé d'YCAS et VINCENT (334).

Ces techniques ont été décrites en détail dans le paragraphe intitulé : Protocole expérimental définitif (p. 91).

b - Résultats

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXV (p.151) ; ils montrent que :

1) La fraction RN_2 est nettement différente de la fraction RN_1 :

- par la radioactivité spécifique de ses ARN qui est environ trois fois plus élevée.

- par la composition centésimale en nucléotides, déterminée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet de ses ARN ; en effet, les valeurs des rapports $G + C/A + U$ sont de 1,49 pour la fraction RN_1 et de 1,06 pour la fraction RN_2 .

TABLEAU XXV

Radioactivité spécifique et composition centésimale en ARN des différentes fractions diffusibles des noyaux.

	Fraction diffusible F _D			"Microsomes"
	Fraction RN ₁	Fraction RN ₂	Surnageant final S	
Radioactivité spécifique (*)	1530	4500	4900	78
Composition des ARN				
a) <u>Spectrophotométrie dans l'U.V.</u>				
G	29,65	26,85	27,38	33,33
C	30,15	24,62	26,97	30,52
A	18,65	22,85	21,79	17,28
U	21,55	25,63	23,81	18,86
$\frac{G + C}{A + U}$	1,49	1,06	1,19	1,76
b) <u>Méthode d'YCAS et VINCENT</u>				
G	27,60	27,66	25,70	21,43
C	23,20	20,96	22,70	24,40
A	24,70	26,70	28,55	25,30
U	24,50	24,66	23,03	28,57
$\frac{G + C}{A + U}$	1,03	0,95	0,94	0,86

(*) En cpm x 10⁻³/mg de phosphore adénylique.



2) Au contraire, la détermination de la composition des ARN en nucléotides par le procédé d'YCAS et VINCENT conduit, pour les deux fractions, à un rapport $G + C/A + U$ voisin de 1.

3 - ETUDE MORPHOLOGIQUE

a - Techniques

Les fractions sédimentables RN_1 et RN_2 ont été observées au microscope électronique : 1) Après inclusion dans les conditions décrites précédemment (voir p. 129, b-); 2) Après ombrage : fixées au formol, des suspensions de ces deux fractions ont été déposées sur grilles puis soumises à un ombrage unidirectionnel au platine sous un angle d'environ 8° ; 3) Des colorations positives ont été effectuées par l'acétate d'uranyle (solution à 2 g pour 100 ml d'acide chlorhydrique 0,01 N) de manière à pouvoir mesurer les dimensions des particules ; 4) En outre, nous avons appliqué à ces dernières la méthode des films protéiques selon KLEINSCHMIDT et ZAHN (335), l'hypophase étant constituée par une solution d'acétate d'ammonium 0,05 M ; les étalements recueillis sur grille ont subi un ombrage rotatif à l'oxyde d'uranium ou au carbone-platine, sous un angle de 8 à 10° .

b - Résultats

Ils peuvent se résumer de la manière suivante :

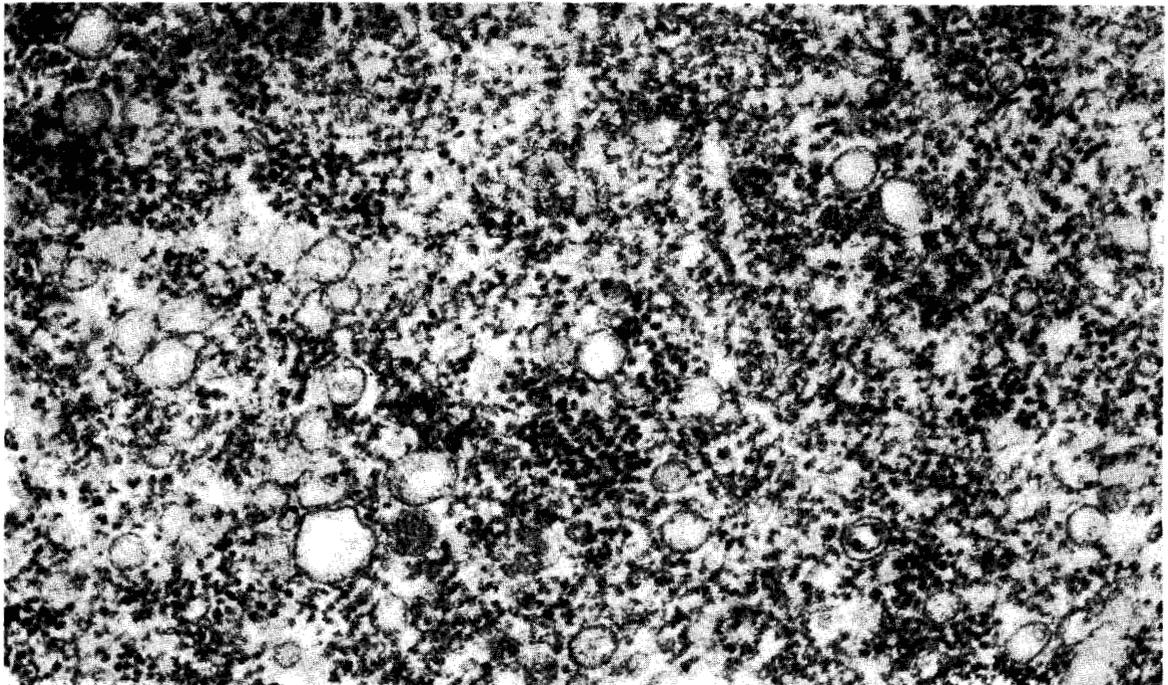
1) Les fractions sédimentables RN_1 et RN_2 sont particulières.

Incluse dans l'Epon, la fraction RN_1 (Fig. 15 a ; p. 153) se présente essentiellement constituée de particules granulaires très contrastées, dont le diamètre moyen est de 200 \AA . A côté de ces particules, on observe la présence de vésicules qui paraissent formées par l'enroulement de membranes.

La fraction RN_2 (Fig. 15 b ; p. 153) est constituée de particules apparemment identiques à celles de la fraction RN_1 , mais on n'observe pas la présence de vésicules.

2) Les colorations positives effectuées par l'acétate d'uranyle, montrent que les particules des fractions RN_1 et RN_2 ont un diamètre moyen d'environ 200 à 250 \AA .

a



b

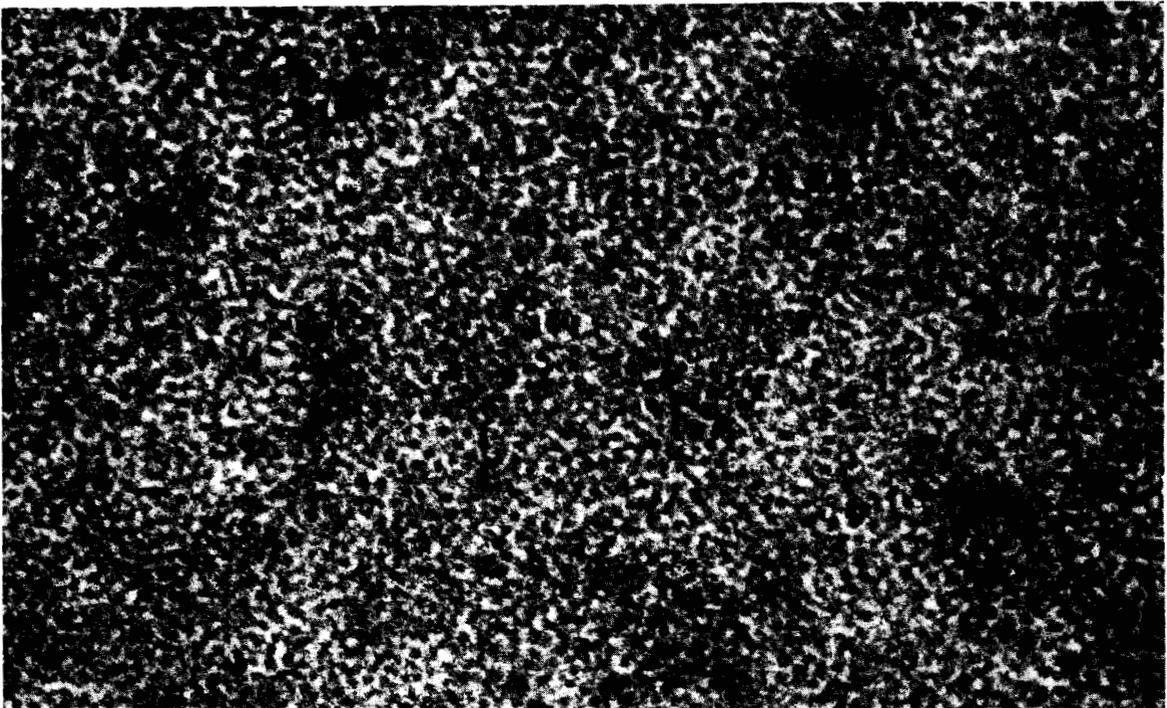


Figure 15

Fractions RN_1 et RN_2 . Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration identiques à celles de la figure 1 (p. 4).

a - Particules RN_1 . On peut observer la présence de vésicules d'allure membranaire. $\times 60\ 000$.

b - Particules RN_2 . $\times 90\ 000$.



3) Après ombrage unidirectionnel, la fraction RN_1 (Fig. 16 a ; p. 155) se présente sous forme de particules de 250 Å à 300 Å. Ces particules apparaissent souvent associées à des filaments. Quant à la fraction RN_2 (Fig. 16 b ; p. 155), elle se révèle constituée de particules sphériques, à surface irrégulière leur donnant un aspect en "chou-fleur" ; leur diamètre varie de 350 Å à 500 Å.

La différence de taille entre les particules de la fraction RN_1 et RN_2 peut s'expliquer par des différences techniques. En effet, des quantités différentes de métal vaporisé peuvent entraîner des variations dans la taille des particules. On peut encore invoquer le fait qu'elles soient d'origine différente, la fraction RN_1 pouvant être contaminée par des ribosomes provenant du feuillet externe de la membrane nucléaire.

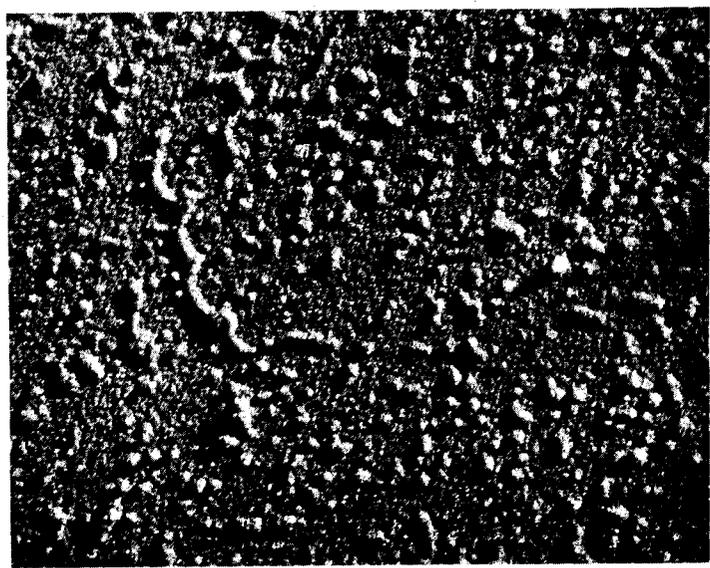
4) Après étalement selon la technique de KLEINSCHMIDT et ombrage, les fractions RN_1 et RN_2 sont constituées toutes deux de particules sphériques, d'environ 470 Å de diamètre, qui existent libres ou associées à des filaments. Toutefois, dans la fraction RN_1 , les particules sont en majorité conjuguées à des filaments de grande longueur (jusqu'à 3 μ) et très ramifiées (Fig. 17 a ; p. 156). Au contraire, dans le cas de la fraction RN_2 , la plupart des particules sont libres et les filaments, généralement plus courts (environ 1 μ) que ceux de la fraction RN_1 , sont associés soit avec plusieurs particules fixées sur toute leur longueur, soit avec une seule particule par l'une de leurs extrémités (Fig. 17 b ; p. 156).

Les études biochimiques et morphologiques que nous avons effectuées sur les fractions RN_1 et RN_2 nous conduisent aux conclusions suivantes :

1) Les deux types de fractions sont particulières et contiennent des ARN à marquage rapide.

2) Elles diffèrent, néanmoins, par leurs caractères de sédimentation, par la composition en nucléotides de leurs ARN et par la radioactivité spécifique de ces derniers. Au point de vue morphologique, si toutes deux sont constituées de granules et de filaments, la fraction RN_2

a



b



Figure 16

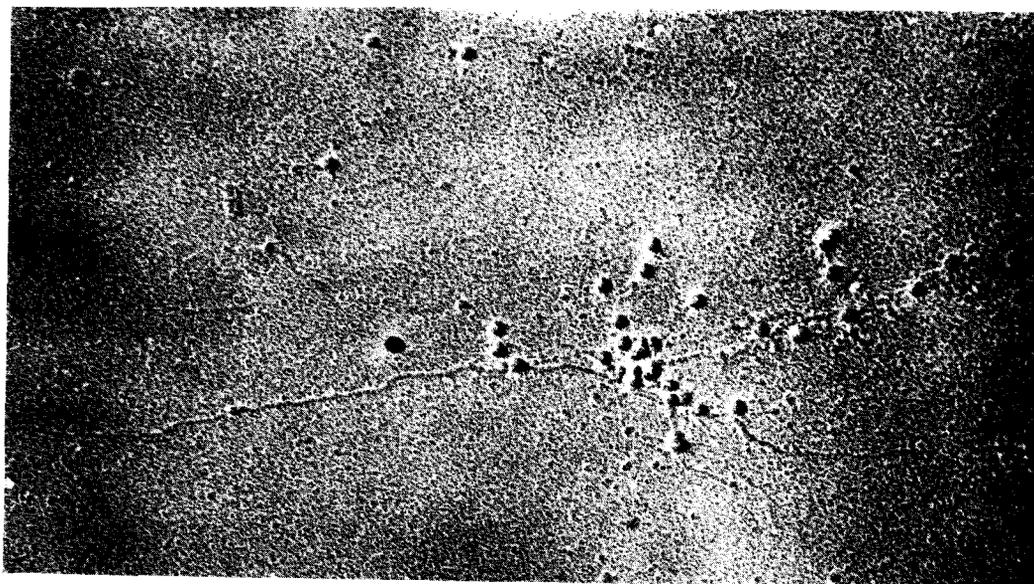
Fractions RN_1 et RN_2 . Ombrage au platine

a - Particules RN_1 . x 60 000.

b - Particules RN_2 . x 80 000.



a



b

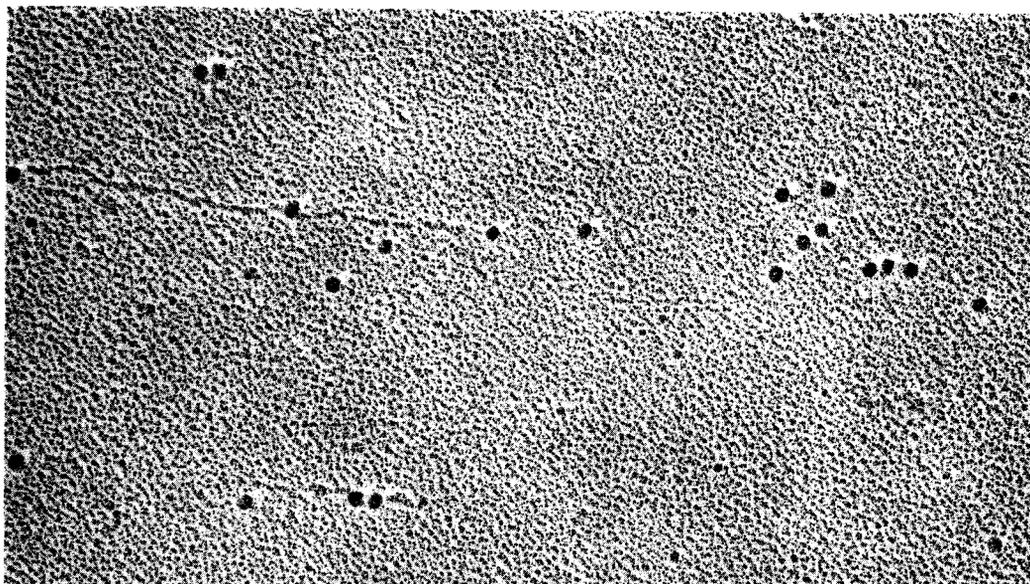


Figure 17

Fractions RN_1 et RN_2 traitées selon le procédé de KLEINSCHMIDT et ZAHN suivi d'ombrage (voir texte p. 152).

a - Fraction RN_1 . Ombrage au carbone-platine. x 40 000.

b - Fraction RN_2 . Ombrage à l'oxyde d'uranium. x 40 000.



apparaît plus homogène.

3) La fraction RN_1 semble en effet hétérogène par la présence, à côté des particules, de vésicules ayant l'aspect de membranes ; ce fait n'est pas sans relation avec la richesse de cette fraction en phosphore lipidique. La différence observée dans la valeur des rapports $G + C/A + U$ déterminée, d'une part, par spectrophotométrie dans l'ultra-violet et, d'autre part, selon le procédé d'YCAS et VINCENT laisse également supposer que l'ARN de la fraction RN_1 est hétérogène.

C - ORIGINE

Nous avons pu constater, à maintes reprises, que la fraction RN_1 était hétérogène. Nous avons voulu, par conséquent, vérifier si les deux fractions RN_1 et RN_2 avaient une origine commune et, en particulier, si elles provenaient toutes deux de l'intérieur du noyau. Pour résoudre ce problème, nous avons comparé la nature des produits diffusibles obtenus à partir de "noyaux CHAUVEAU" à ceux provenant de noyaux de type HYMER et KUFF (336) qui sont débarrassés du feuillet externe de l'enveloppe nucléaire.

1 - MODE OPERATOIRE

Les "noyaux CHAUVEAU" ont été préparés comme décrit précédemment (p. 147).

Les noyaux de type HYMER et KUFF ont été obtenus par resuspension de "noyaux CHAUVEAU" dans la solution d'homogénéisation (saccharose 0,33 M, $CaCl_2$ 0,0018 M) contenant un détergent non ionique, le Triton X 100, à concentration finale de 0,5 p. 100. Les noyaux sont laissés en contact avec le Triton pendant 5 mn, puis centrifugés. Enfin, le Triton est éliminé par lavage des noyaux dans la solution d'homogénéisation.

Les fractions diffusibles ont été obtenues selon le schéma habituel (revoir fig. 13 ; p. 147) et nous avons comparé les propriétés de ces fractions au point de vue composition chimique, radioactivité spécifique et morphologique en utilisant les mêmes méthodes que celles décrites pour l'étude des fractions RN_1 et RN_2 provenant de "noyaux CHAUVEAU".

2 - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

a - Les noyaux décapés par le Triton gardent une morphologie intacte avant et après diffusion.

1) Au microscope à contraste de phase, aucune différence n'est observée en comparaison avec les "noyaux CHAUVEAU".

2) L'observation, au microscope électronique, de noyaux avant la diffusion (Fig. 18 ; p. 159) montre que le feuillet externe de la membrane nucléaire a été enlevé et que les préparations de noyau apparaissent plus pures en comparaison de celles de "noyaux CHAUVEAU". En outre, les zones de chromatine condensée sont plus nettes et, comme dans le noyau in situ, localisées autour du nucléole et en bordure de la membrane nucléaire. Les grains périchromatiniens et interchromatiniens sont nettement visibles.

Après la diffusion, les noyaux apparaissent intacts (Fig. 19 ; p. 160). Dans le nucléoplasme, la chromatine a repris l'aspect dispersé déjà rencontré dans les "noyaux CHAUVEAU" et, comme dans ces derniers, le nucléole présente un éclaircissement du composant granulaire.

b - Si la fraction diffusible RN_2 n'a pas changé d'aspect, on observe, par contre, des modifications importantes au niveau de la fraction RN_1 : le sédiment de centrifugation obtenu devient insignifiant et, après l'inclusion de ce sédiment on n'observe plus, au microscope électronique, la présence de vésicules.

c - La radioactivité spécifique diminue de moitié en ce qui concerne la fraction RN_1 ; celle de la fraction RN_2 reste sensiblement identique.

d - Enfin, l'étude de la répartition des produits phosphorylés (voir tableau XXVI ; p. 161) montre que le pourcentage de phosphore lipidique de la fraction RN_1 diminue considérablement dans le cas de noyaux de type HYMER et KUFF (1,3 p. 100 au lieu de 28,7 p. 100).

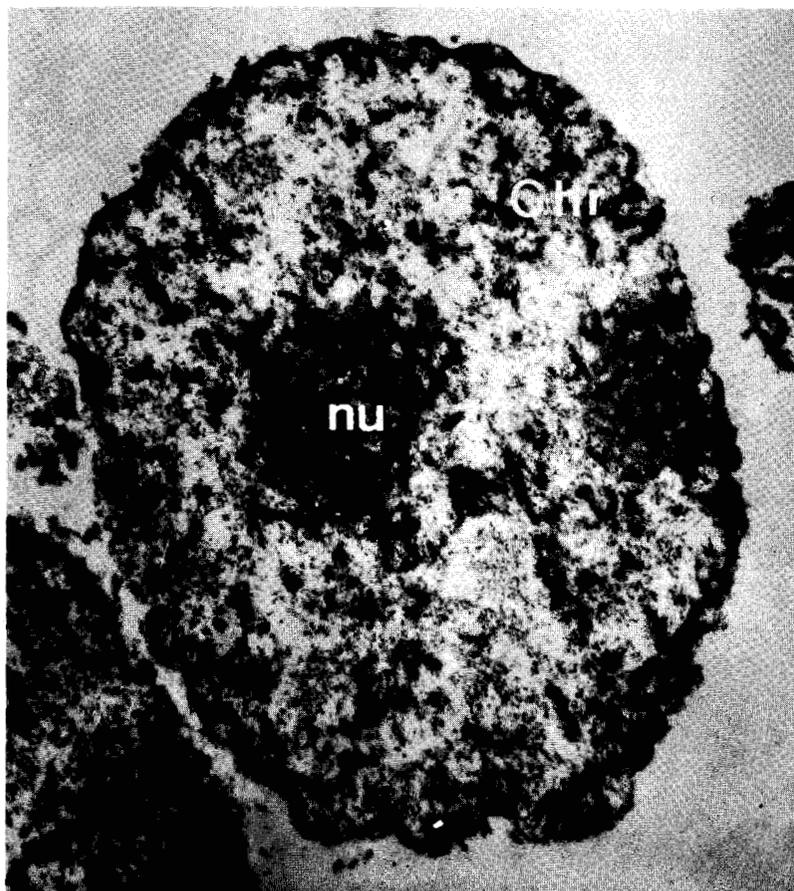


Figure 18

Noyaux d'hépatocytes de Rats préparés selon le procédé de HYMER et KUFF (voir texte ; p. 157).

Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration identiques à celles de la figure 1 (p. 4). nu, nucléole ; chr, chromatine condensée. x 16 000.



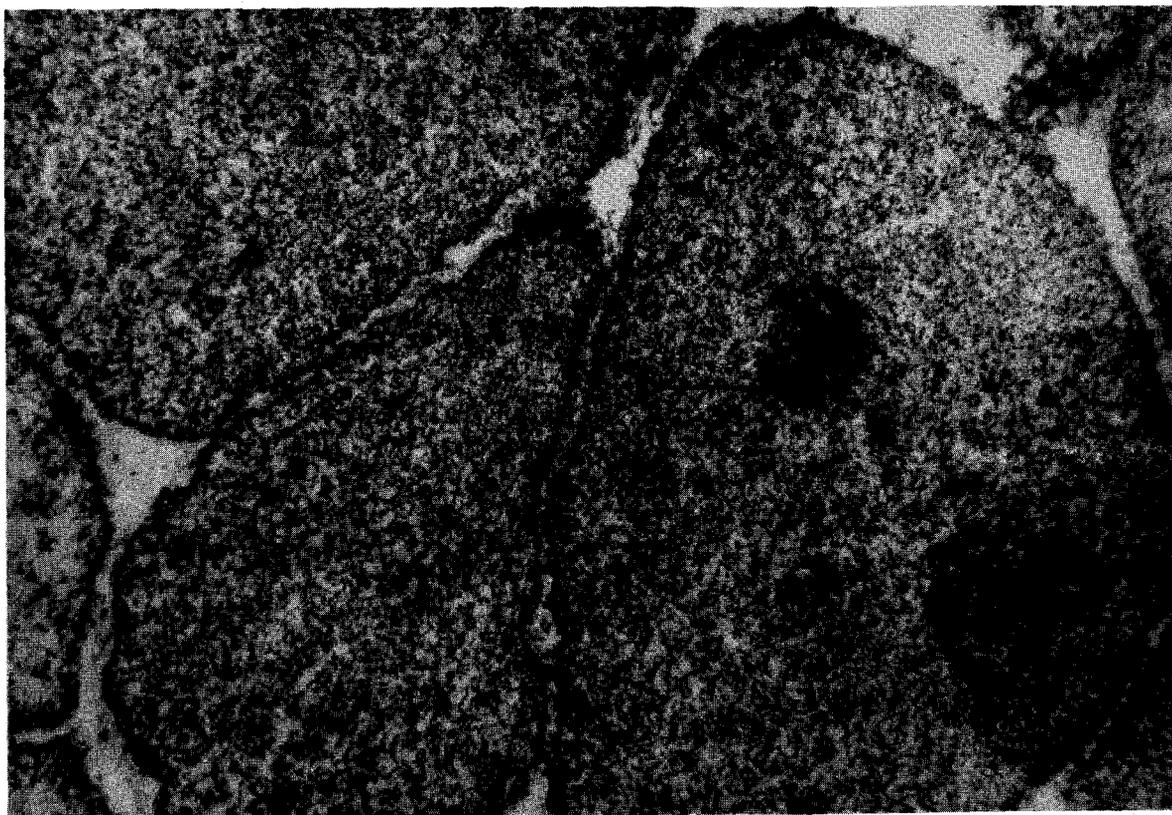


Figure 19

Noyaux de type HYMER et KUFF après incubation dans une solution de saccharose phosphatée. Au niveau du nucléole (nu), on voit que la zone granulaire a, en grande partie, disparu ; seule, persiste la fraction fibrillaire (f). Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration identiques à celles de la figure 1 (p. 4).
x 16 000.



TABLERAU XXVI

Répartition des composés phosphorylés dans les fractions nucléaires RN₁ et RN₂ (en p. 100 du phosphore total) en fonction de différents procédés d'isolement des noyaux.

Procédés d'isolement des noyaux	CHAUVEAU <u>et al.</u> (337)		HYMER et KUFF (338)	
	RN ₁	RN ₂	RN ₁	RN ₂
P. acido-soluble	9,4	13	12,7	18,8
P. lipidique	28,7	5,9	1,3	1,5
P. ARN	46	62,9	84,2	71,9
P. alcali-insoluble	15,9	18,2	1,8	7,8



3 - CONCLUSIONS ET DISCUSSION

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous ont conduit à penser que la fraction RN_1 des "noyaux CHAUVEAU" provenait, tout au moins en partie, de la désorption partielle, au cours de la diffusion, du feuillet externe de la membrane nucléaire. La radioactivité spécifique relativement élevée de cette fraction qui est de 20 fois supérieure à celle des ribosomes cytoplasmiques, peut s'expliquer par la nature particulière de ces ribosomes due à leur localisation sur la membrane nucléaire. On peut les comparer aux "polysomes de la membrane externe" isolés par SADOWSKI et HOWDEN (339) et considérés par ces auteurs comme des précurseurs des polysomes cytoplasmiques.

La fraction RN_1 , présente dans les produits diffusibles des "noyaux CHAUVEAU", se révèle donc comme un contaminant externe au noyau. Pour nos expériences ultérieures, nous avons, par conséquent, utilisé des noyaux "décapés" au Triton selon le procédé d'HYMER et KUFF (340) et nous nous sommes limitée à l'étude de la fraction RN_2 , la seule qui soit d'origine intranucléaire.

II - ETUDE DES PARTICULES DE RNP DE LA FRACTION RN_2

Analysée par ultracentrifugation en gradient de saccharose, la fraction RN_2 s'est révélée être essentiellement constituée de particules de ribonucléoprotéines 45 S (35 S quand l'isolement est effectué en l'absence de magnésium). Nous nous sommes proposée de déterminer les propriétés physico-chimiques et morphologiques de ces particules.

A - ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES

1 - CENTRIFUGATION DE ZONE EN GRADIENT DE SACCHAROSE

La centrifugation de zone permet de séparer physiquement des particules et même des macromolécules caractérisées par des coefficients de sédimentation différents.

a - Matériel et méthodes

1) Préparation du matériel

Les sédiments RN_2 sont obtenus selon le protocole expérimental de la figure 13 (p. 147) mais à partir de noyaux de type HYMER et KUFF (voir p. 157). Ils sont resuspendus dans un volume minimum de milieu de diffusion ne contenant pas de saccharose (on utilise généralement 1 ml de solution pour 1 mg de matériel) puis centrifugés à faible vitesse (5 mn à 2 000 g) pour éliminer le matériel agrégé. Le surnageant est immédiatement déposé à la surface du tube contenant le gradient préformé de saccharose.

2) Centrifugation en gradient

α - Formation du gradient

Nous avons utilisé des solutions de saccharose de concentration variable dans le tampon d'incubation des noyaux. Suivant le cas, nous avons utilisé des solutions à 5 et 20 p. 100, 5 et 25 p. 100 ou 0,3 M et 1 M en saccharose. Les deux solutions de concentrations extrêmes sont placées dans deux cuves cylindriques communicantes. Le mélange obtenu par écoulement de la solution légère dans la cuve contenant la solution lourde, munie d'un dispositif d'agitation mécanique, arrive lentement dans le tube de centrifugation. Il s'ensuit que, au fond du tube, la concentration est celle de la solution lourde ; elle va en décroissant vers le sommet du tube où elle atteint la concentration de la solution légère. On parvient, de cette manière, à obtenir des gradients linéaires.

β - Centrifugation

Dès que la solution à analyser est déposée sur le gradient, on procède à une centrifugation dans des centrifugeuses préparatives (SPINCO, modèles L ou L₂) à l'aide de rotors à godets **oscillants**, permettant une sédimentation horizontale.

- Fractionnement et analyse du gradient

Cette dernière étape permet de déterminer la position des composés dans le tube de gradient. Notre technique consiste à percer le fond du tube (nitrate de cellulose) et à recueillir goutte à goutte le contenu en fractions de volume égal. Sur chacune d'elles nous mesurons

la densité optique à 260 nm (spectrophotomètre de JOBIN et YVON) et nous déterminons la radioactivité acido-insoluble. A cet effet, chaque fraction est précipitée par l'ATCA à concentration finale de 10, p. 100 et filtrée sur des pastilles de fibre de verre découpées à l'emporte-pièce (papier WHATMAN GF 83). La sérumbalbumine est utilisée comme entraîneur à raison de 0,2 mg/ml. Les pastilles sont séchées pendant 2 heures à 37° C puis introduites dans des flacons contenant un mélange scintillant (solution à 0,5 g p. 100 de PPO (*) et 0,05 g p. 100 de POPOP (**)) dans du toluène redistillé). On mesure la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation de type NUCLEAR CHICAGO.

Les densités optiques et les radioactivités de toutes les fractions sont reportées sur des diagrammes.

b - Résultats

1) Isolement en l'absence de magnésium

L'analyse de la fraction RN_2 obtenue à partir de noyaux incubés dans le milieu de diffusion habituel (solution de saccharose phosphatée) met en évidence une population de particules dont la constante de sédimentation, évaluée par rapport à celle des sous unités ribosomales cytoplasmiques, est d'environ 35 S (Fig. 20 ; p. 165). La courbe de radioactivité suit rigoureusement celle de la densité optique mesurée à 260 nm (Fig. 21 a ; p. 166). Dans les zones légères, du gradient, on observe un matériel absorbant la lumière ultra-violette ; il est probablement composé de produits de dégradation.

Un spectre d'absorption, réalisé sur le pic 35 S (Fig. 21 b ; p. 166), montre que la valeur du rapport D.O. 260/280 est relativement faible (il est égal à environ 1,5). Les particules 35 S semblent, par conséquent, être de nature ribonucléoprotéique ; ce résultat sera confirmé par l'étude de leur densité (voir le paragraphe intitulé : Centrifugation à l'équilibre en chlorure de césium ; p. 178, c -).

(*) 2,5-Diphényloxazole

(**) 1,4-bis (2-(5-Phényloxazolyl)) benzène

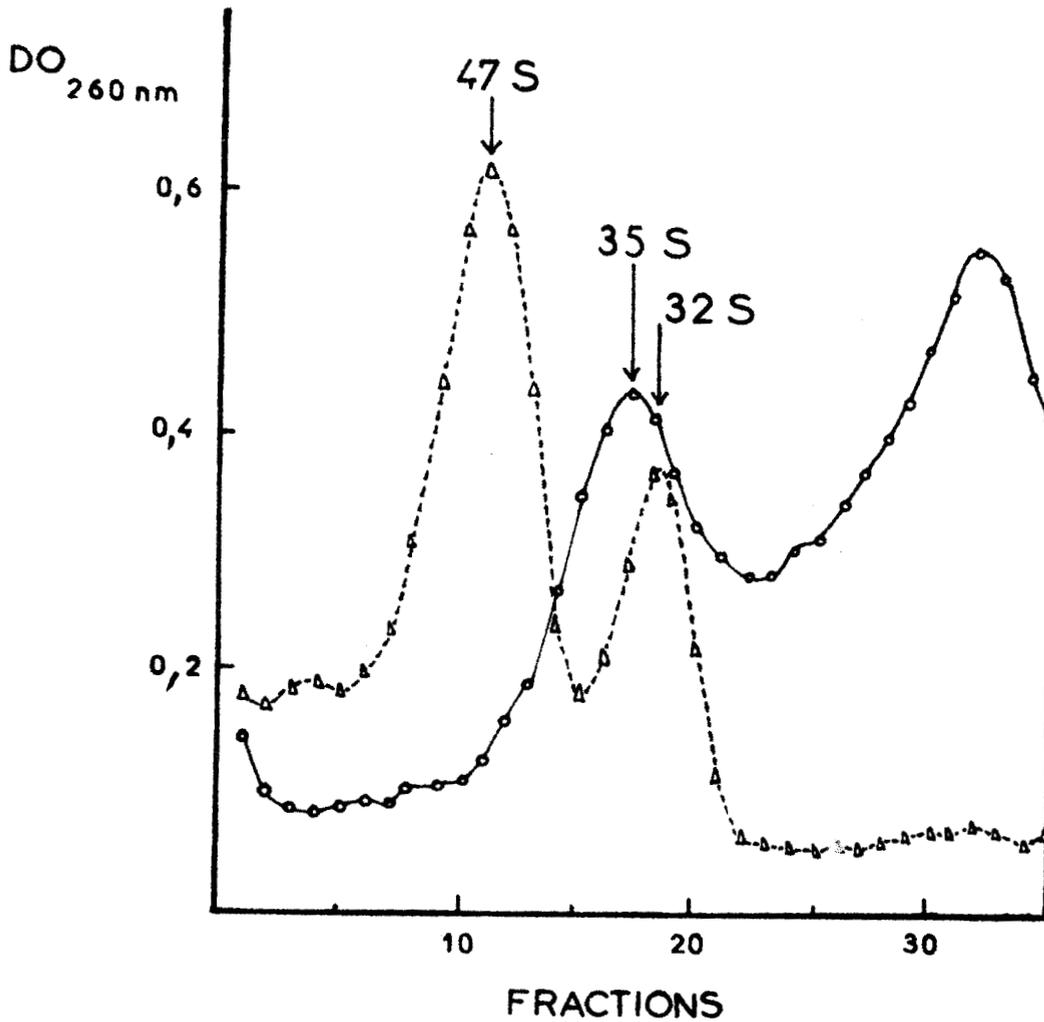


Figure 20

Ultracentrifugation en gradient de saccharose de 5 à 25 p. 100.

Fraction RN₂ de noyaux de foie de Rat isolés selon le procédé de HYMER et² KUFF et incubés dans une solution de saccharose 0,35 M tamponnée à pH 7,8 par du phosphate bipotassique 0,02 M.

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 27 à 20 000 t/mn pendant 14 h à 4° C.

o ——— o ——— o D.O. 260 nm de la fraction RN₂

Δ - - - - Δ - - - - Δ D.O. 260 nm de sous-unités ribosomales de foie de Rat préparées à partir de polysomes dissociés par l'EDTA 0,03 M



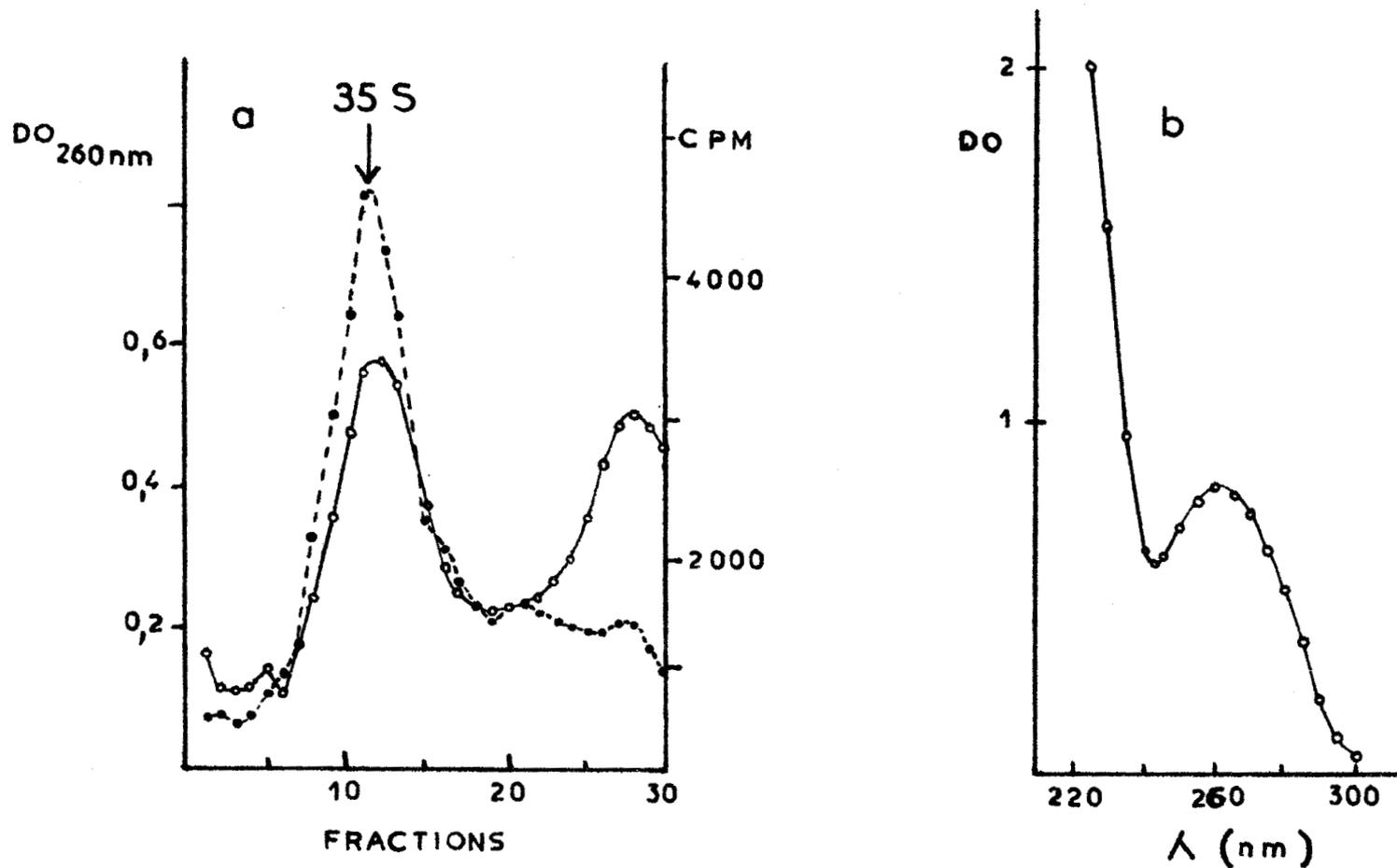


Figure 21

a - Ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p. 100 de la fraction RN₂ préparée dans des conditions identiques à celles de la figure 20 (p. 165), mais à partir de Rats ayant reçu une injection de ³²P (1 mC/Rat).

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 25-1 à 22 000 t/mn pendant 14 h à 4° C.

o-----o-----o D.O. 260 nm

●-----●-----● Radioactivité acido-insoluble

b - Spectre d'absorption en lumière ultra-violette de la fraction 12 de (a).



2) Isolement en présence de magnésium

Quand la fraction RN_2 est obtenue à partir de noyaux incubés dans un milieu contenant du magnésium (solution de ZAMENIK et KELLER (341) ; voir p. 112), le gradient obtenu est légèrement différent (Fig. 22 ; p. 168). L'examen des courbes de densité optique et de radioactivité révèle toujours la présence d'un pic symétrique très net mais qui se trouve situé dans la zone 45 S.

L'emplacement du pic est indépendant de la concentration en magnésium dans les limites étudiées (1, 3 ou 5 mM) (voir fig. 23 ; p. 169). Pour nos études ultérieures, nous avons choisi la concentration 3 mM qui représente une dose moyenne par rapport à celles qu'utilisent différents auteurs pour préserver l'intégrité des RNP. D'un point de vue morphologique, il est également connu que les noyaux ne gardent leur aspect in situ que si la concentration en magnésium est supérieure à 1,2 mM (voir en particulier, MONNERON et MOULE (342)).

Pour vérifier que ce nouveau pic 45 S n'est pas un dimère du précédent, nous avons fait agir la RNase à faible dose (1 μ g/ml), à 42 C, pendant 15 mn. La position du pic n'a pas changé. Les particules isolées en présence de magnésium possèdent, par conséquent, un coefficient de sédimentation plus élevé que celles isolées dans un milieu ne contenant pas de magnésium.

3) Isolement en présence d'inhibiteur de la RNase

Nous avons préparé un inhibiteur de la RNase à partir du cytoplasme de foie de Rat. La fraction contenant l'inhibiteur a été extraite par précipitation au sulfate d'ammonium -35 à 55 p. 100 de saturation- selon le procédé de ROTH (343). Les opérations furent effectuées en présence de β -mercapto-éthanol et la fraction enrichie en inhibiteur fut dissoute dans un tampon phosphate contenant du glyco-colle qui assure la stabilité de l'inhibiteur (SIRAKOV et KOCHAKIAN (344)).

L'addition de cet inhibiteur de la RNase à la solution de diffusion -on utilise de l'inhibiteur extrait à partir de 1 foie pour une quantité de noyaux provenant également de 1 foie-, apporte quelques modifications dans le profil des courbes de densité optique et de radioactivité obtenues après centrifugation de la fraction RN_2

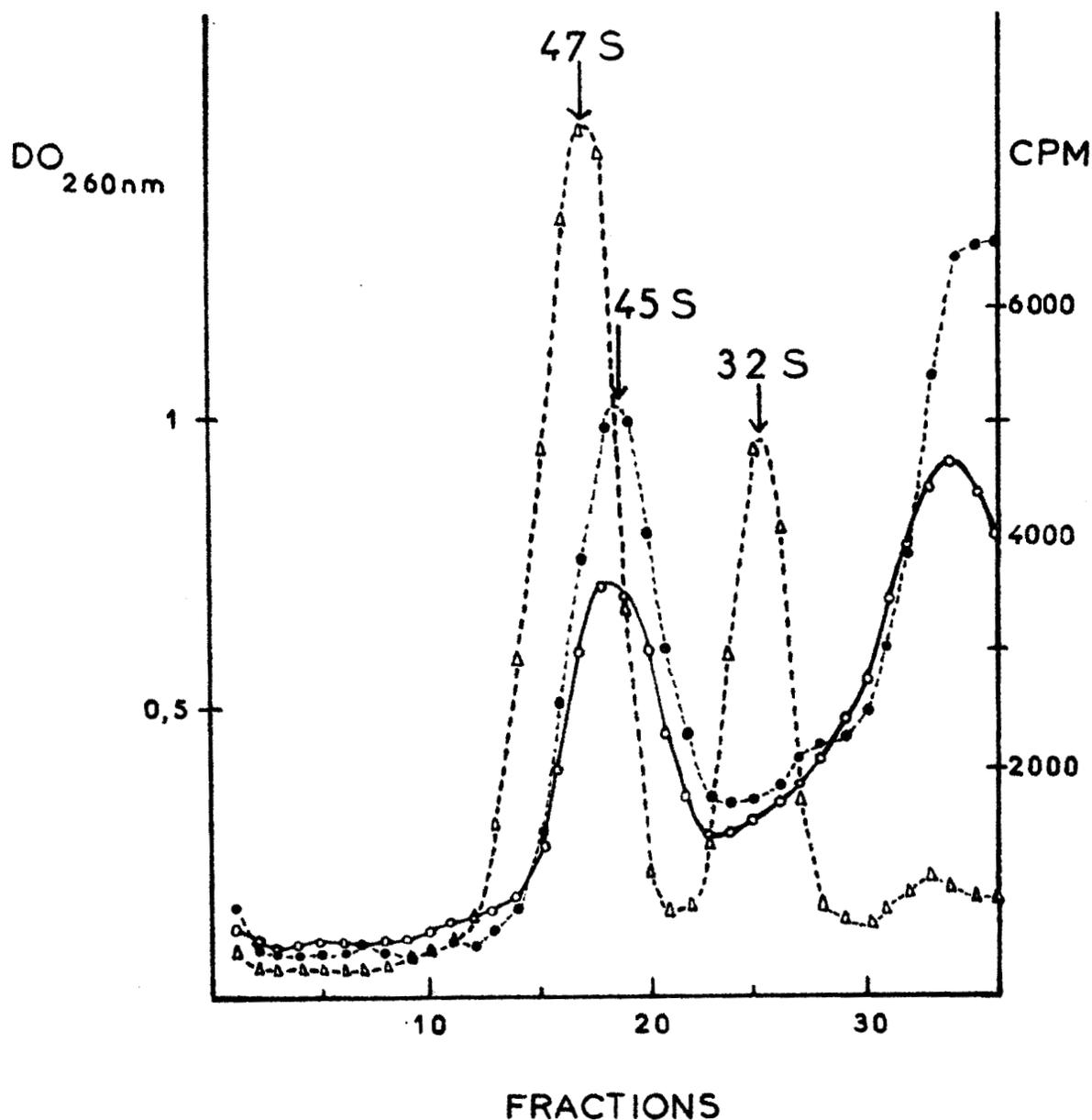


Figure 22

Ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose de 10 à 30 p. 100.

Fraction RN_2 préparée comme décrit dans la figure 21 (a), mais à partir de noyaux incubés dans la solution de ZAMENICK et KELLER contenant du $MgCl_2$ 3 mM.

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 27 à 20 000 t/mn pendant 16 h à 4° C.

- — — — — ○ D.O. 260 nm de la fraction RN_2
- - - - - ● Radioactivité totale de la fraction RN_2
- ▲ - - - - ▲ D.O. 260 nm des sous-unités ribosomales de foie de Rat.



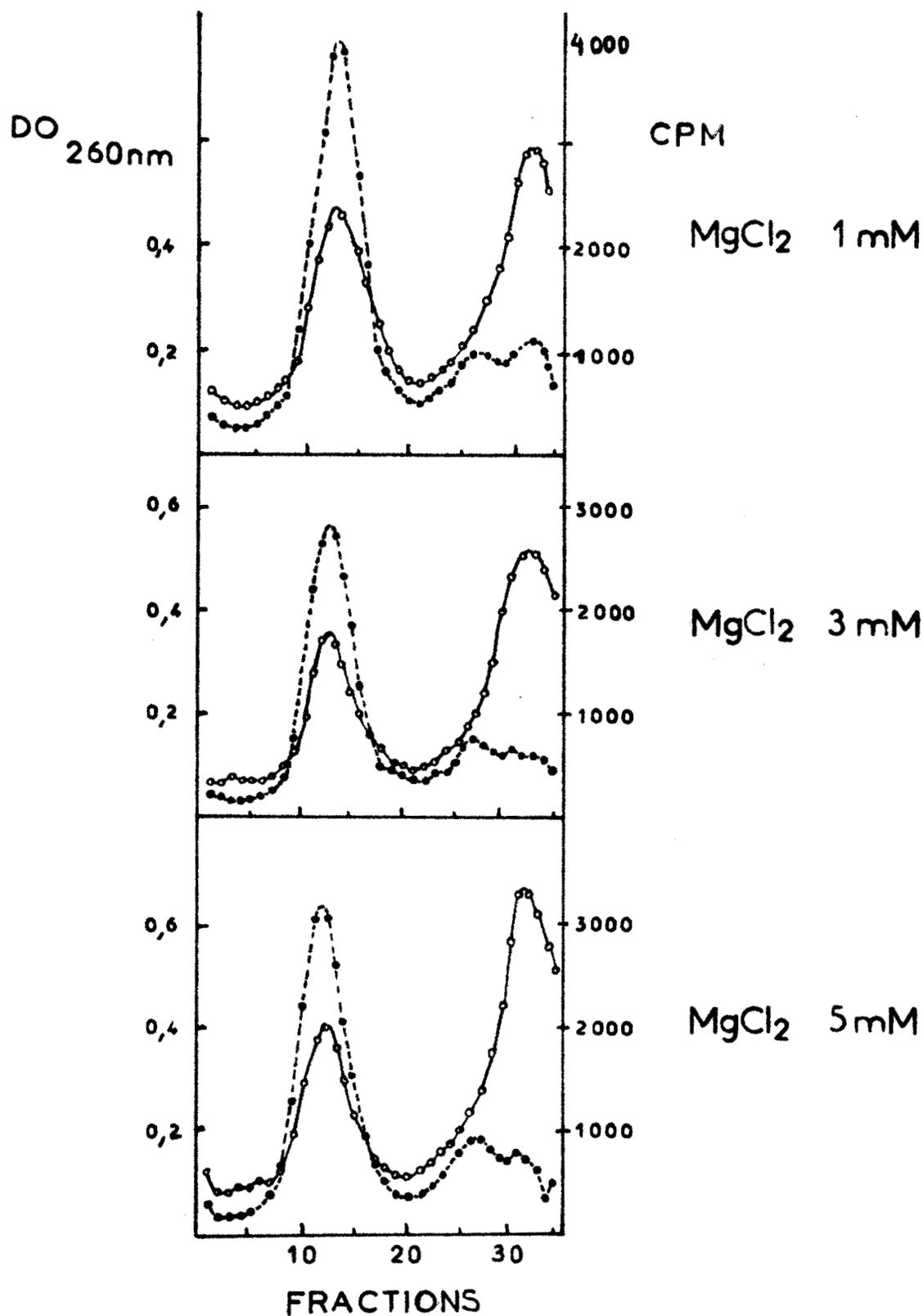


Figure 23

Ultracentrifugation en gradients linéaires de saccharose de 5 à 25 p. 100. Fraction RN₂ de noyaux de foies de Rats marqués au ³²P et incubés dans le milieu de ZAMENIK et KELLER dont la concentration en magnésium varie de 1 à 5 mM.

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 27 à 20 000 t/mn pendant 24 h à 4° C.

○ — — — — — ○ D.O. 260 nm

● - - - - - ● Radioactivité acido-insoluble



en gradient de saccharose. Dans cette expérience, le milieu d'incubation contient du magnésium. En comparaison avec le témoin (Fig. 24 ; p. 171), nous observons toujours la présence du pic 45 S mais, dans la zone légère du gradient, tout le matériel absorbant la lumière ultra-violette a disparu ; celui-ci provenait donc bien, comme nous l'avons supposé précédemment de produits de dégradations par la RNase. Au contraire, dans les zones lourdes, on observe l'apparition d'un matériel radioactif, absorbant la lumière ultra-violette et dont le coefficient de sédimentation semble hétérogène. Ce matériel correspond peut-être à des populations de particules dont la forme 45 S ne serait qu'une sous-unité, d'autant plus que cette zone se révèle sensible à la RNase. L'apparition de ce matériel ne semble pas être un artéfact ; observée au microscope électronique, après coloration négative selon la technique de SHELTON et KUFF (345), cette zone est en effet constituée de particules qui ont un aspect différent de celles préparées en l'absence d'inhibiteur (Fig. 25 ; p. 172) : on observe des agrégats de particules de formes généralement plus irrégulières que celles du pic 45 S (voir fig. 36 ; p. 192).

4) Action de l'actinomycine

L'actinomycine D est un antibiotique qui inhibe la synthèse des ARN en se fixant sur les G de l'ADN. Expérimentant sur des Rats, GOLDBLATT et al. (346) ont démontré que l'injection de 0,25 $\mu\text{g/g}$ de poids d'animal provoquait, après un délai de 1 heure, une inhibition de 50 p. 100 des synthèses d'ARN au niveau de la cellule hépatique. L'inhibition maximale -80 à 90 p. 100- est obtenue avec des doses plus fortes (à partir de 1 $\mu\text{g/g}$ de poids d'animal). L'action de l'actinomycine dure plusieurs heures.

Nous avons injecté ces mêmes doses d'actinomycine à des Rats, 2 heures (*) avant l'injection du radiophosphate et nous avons examiné l'effet produit sur nos particules, en comparaison avec celles de Rats témoins.

Nous pouvons constater (Fig. 26 ; p. 173) que les pourcentages d'inhibition, calculés à partir des radioactivités spécifiques des

(*) C'est le temps nécessaire pour l'élimination, par les noyaux, des ARN métaboliquement actifs (revoir fig. 12 ; p. 137).

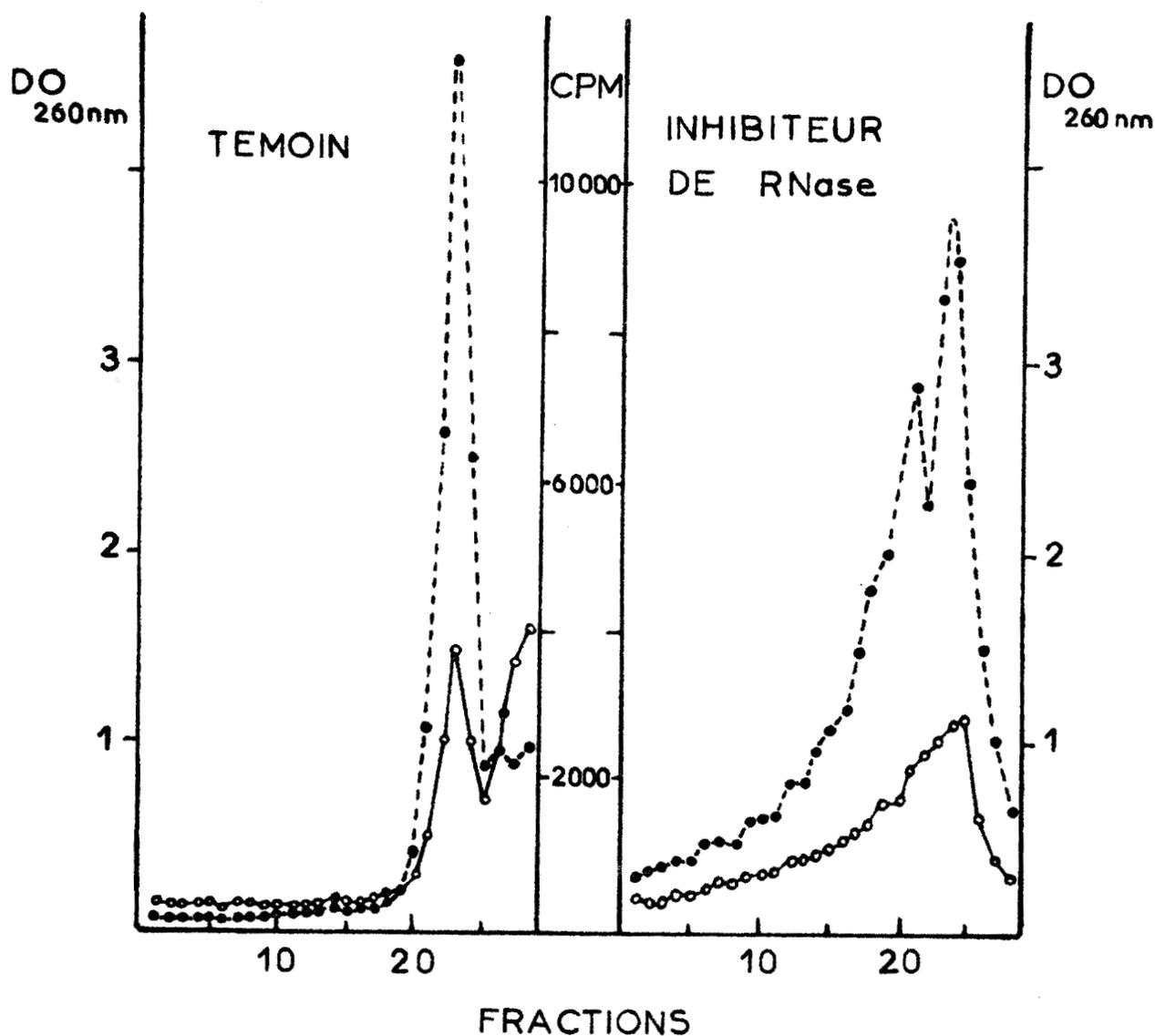


Figure 24

Ultracentrifugation en gradients linéaires de saccharose de 0,3 à 1 M.

Graphique de gauche

Fraction RN₂ de noyaux de foies de Rats marqués au ³²P et incubés dans le milieu de ZAMENIK et KELLER (Témoin).

Graphique de droite

Le milieu d'incubation des noyaux a été additionné d'inhibiteur de la RNase.

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 25-1 à 25 000 t/mn pendant 3 h à 4° C.

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



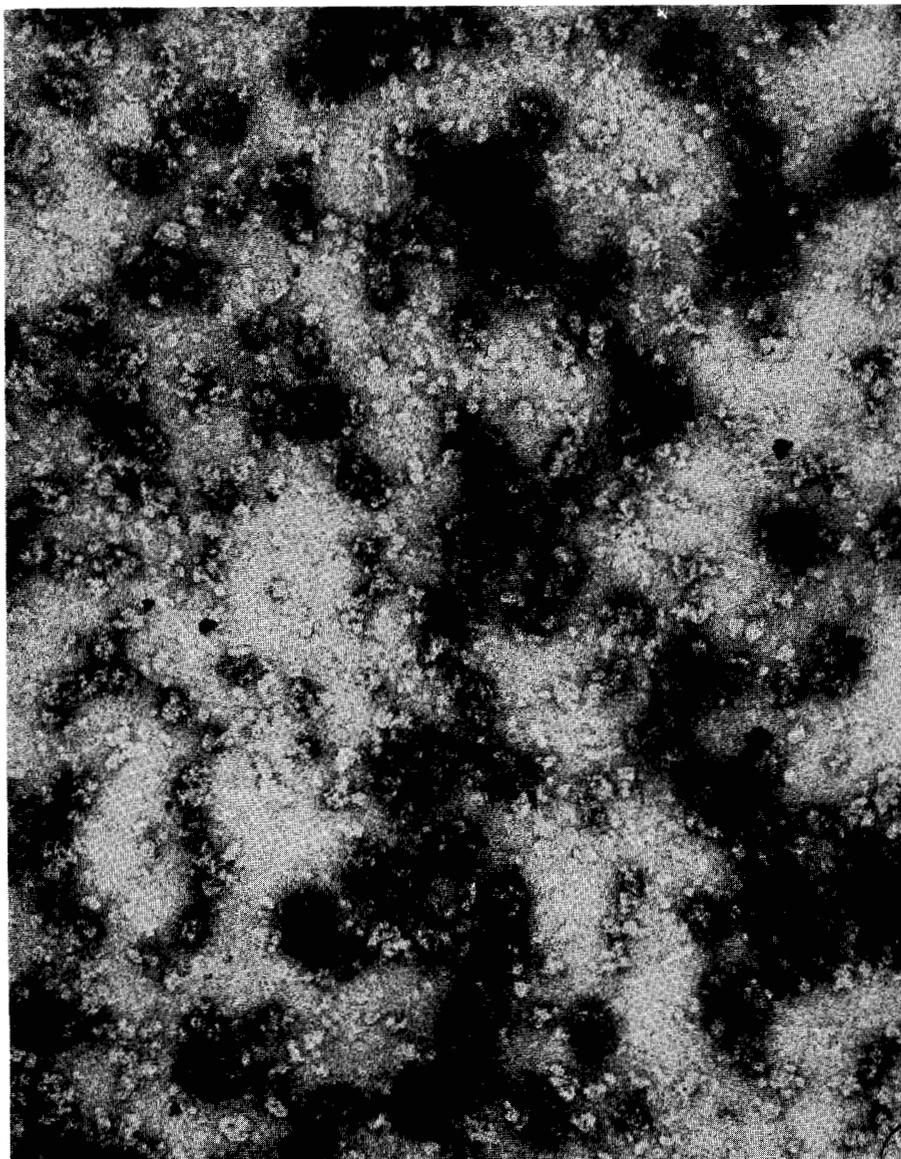


Figure 25

Particules de coefficient de sédimentation hétérogène obtenues après incubation de noyaux de type HYMER et KUFF, en présence d'inhibiteur cytoplasmique de RNase. Coloration négative à l'acétate d'uranyle selon la technique de SHELTON et KUFF (347) x 120 000.

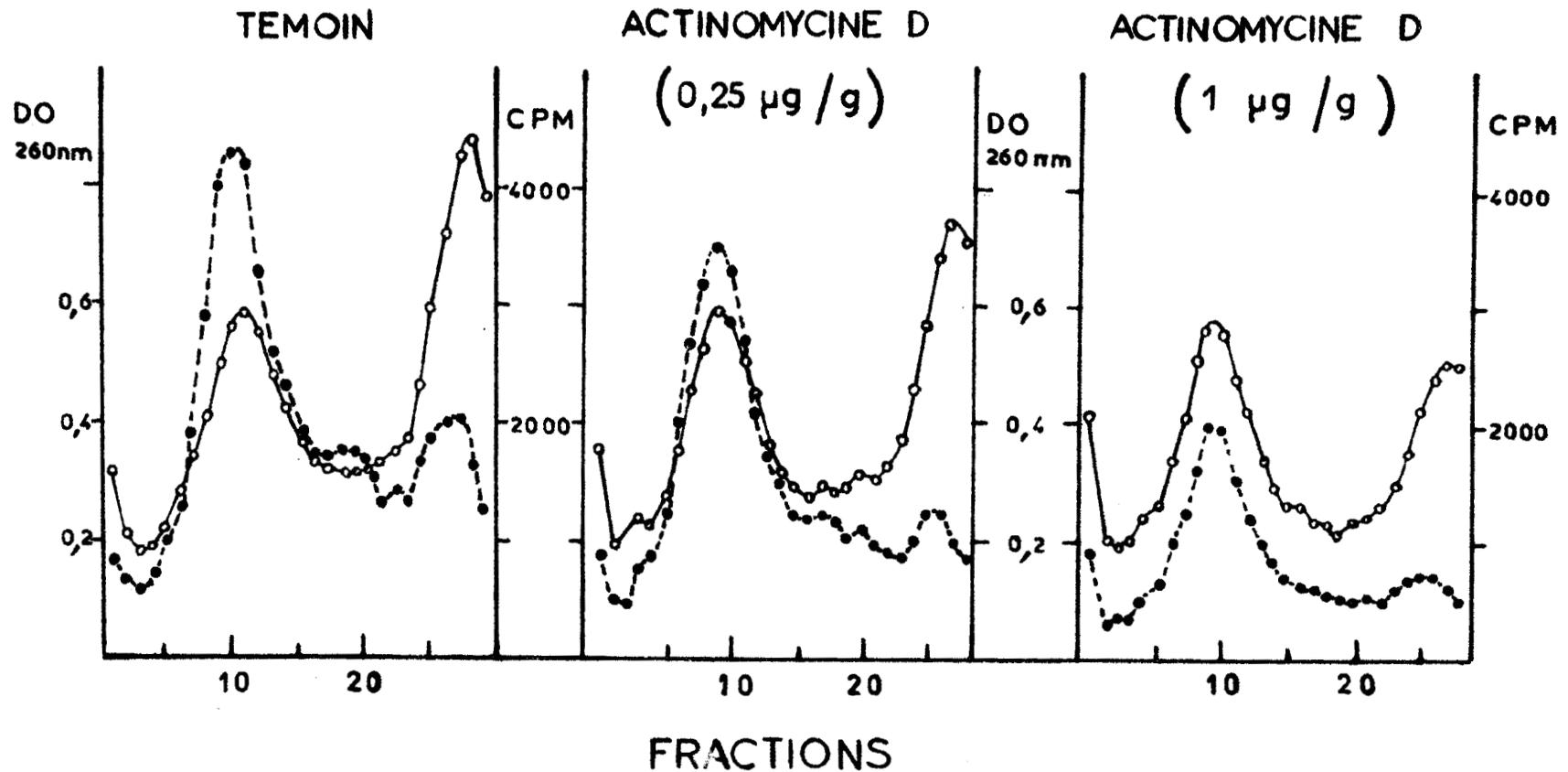


Figure 26

Ultracentrifugation en gradients linéaires de saccharose de 5 à 20 p. 100.

Fraction RN₂ de noyaux de foies de Rats ayant reçu une injection d'actinomycine D à raison de 0,25 µg et 1 µg par g de poids d'animal, 2 h avant l'injection du ³²P. Les noyaux ont été incubés dans le milieu de ZAMENIK et KELLER (MgCl₂ 3 mM).

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCC SW 25-1 à 22 000 t/mn pendant 14 h à 4° C.

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



ARN (nombre de cpm/unité de D.O._{260 nm}), s'élèvent à 30 et 50 p. 100 pour les doses d'actinomycine respectivement égales à 0,25 et 1 $\mu\text{g/g}$ de poids de Rat.

La synthèse de l'ARN de nos particules se révèle donc, par rapport aux ARN totaux de foie de Rat, partiellement insensible à l'action de l'actinomycine D.

2 - CENTRIFUGATION ANALYTIQUE (*)

L'ultracentrifugation analytique nous a permis de déterminer avec précision le coefficient de sédimentation de nos particules.

a - Matériel et méthodes

1) Préparation du matériel

Les sédiments RN₂ obtenus à partir de noyaux incubés, d'une part, dans la solution habituelle de saccharose phosphatée (absence de magnésium) et, d'autre part, dans la solution de ZAMENIK et KELLER (MgCl₂ 3 mM) ont été traités comme décrit p. 163 (voir le chapitre intitulé : Préparation du matériel). Les surnageants obtenus, au lieu d'être déposés sur des gradients de saccharose, sont directement soumis à l'ultracentrifugation analytique.

Dans un but de vérification, nous avons également centrifugé en analytique des particules séparées préalablement en gradient de saccharose. Dans ce cas, nous avons opéré sur une fraction prélevée dans la zone du gradient correspondant au maximum d'absorption des particules. Comme précédemment, les déterminations ont été effectuées sur des particules isolées en présence et en absence de magnésium.

2) Centrifugation

Le principe de l'ultracentrifugation ainsi que les calculs sont exposés dans l'annexe technique (p. 202).

La centrifugation a été effectuée avec une ultracentrifugeuse analytique BECKMAN (modèle E), à la température de 10° C, à 30 000 t/mn, dans une cellule à simple secteur de 12 mm d'épaisseur et à fenêtre de quartz.

(*) L'étude en ultracentrifugation analytique a été réalisée en collaboration avec A. VERBERT dans le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences d'ANNAPPES.

La sédimentation des macromolécules a été suivie simultanément par absorption ultra-violette et par la méthode optique "SCHLIEREN" qui traduit une différence de concentration par un pic.

Une fois la vitesse de régime atteinte, les clichés ont été pris toutes les 8 minutes (voir fig. 27 ; p. 176). Les coefficients de sédimentation sont calculés à partir des mesures faites sur les photographies avec un lecteur de profil NIKON qui permet une précision du millième de millimètre.

b - Résultats et conclusions

Les coefficients de sédimentation obtenus sont ensuite corrigés par rapport à l'eau à 20° C et donnent, dans le cas des fractions RN₂ totales, les valeurs suivantes :

1) Isolement en l'absence de magnésium :

$$S_{20,w}^{1 \text{ mg}} = 36 \text{ S}$$

2) Isolement en présence de magnésium :

$$S_{20,w}^{1 \text{ mg}} = 44 \text{ S}$$

Les coefficients de sédimentation mesurés à partir des particules isolées au préalable par centrifugation en gradient de saccharose nous ont donné des résultats comparables à ces deux valeurs.

Les résultats que nous avons obtenus confirment donc ceux déterminés par centrifugation en gradient de saccharose. En particulier, l'augmentation du coefficient de sédimentation des particules isolées en présence de magnésium ne semble pas être un artéfact.

3 - CENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE EN CHLORURE DE CESIUM

La centrifugation à l'équilibre ou "isopycnique" permet la séparation des particules suivant leur densité. Nous avons appliqué cette technique pour déterminer la densité apparente de nos particules.

Temps (mn)

0

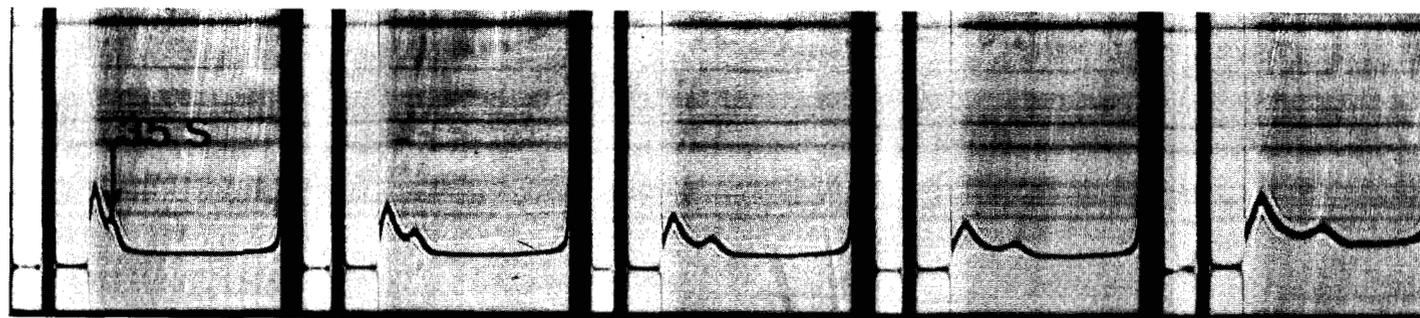
8

16

24

32

a



b

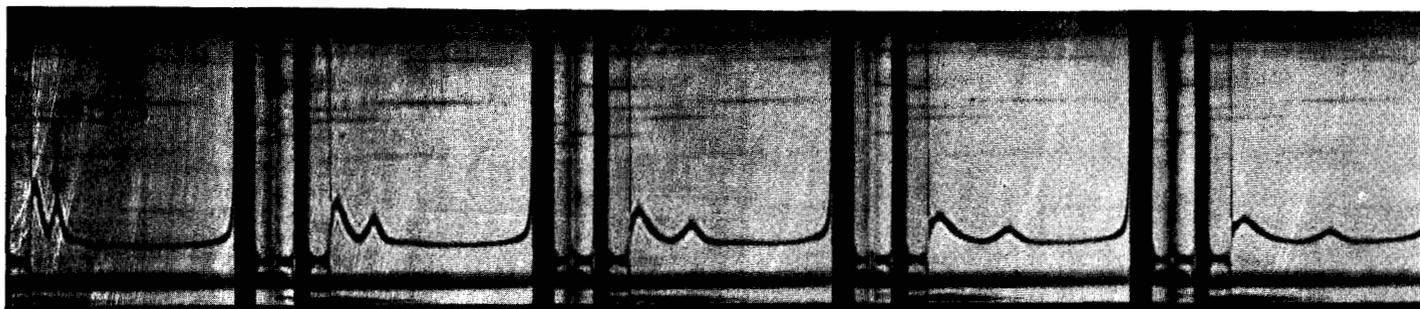


Figure 27

Ultracentrifugation analytique des particules de la fraction RN_2 suivie par la méthode optique "SCHLIEREN" (Sédimentation de la gauche vers la droite).

a) RN_2 dans le tampon phosphate 0,02 M ; pH 7,8 (absence de magnésium)

b) RN_2 dans le milieu de ZAMENIK et KELLER sans sucrose (présence de magnésium)



a - Matériel et méthodes1) Préparation du matériel

Les sédiments RN_2 sont obtenus à partir de noyaux de type HYMER et KUFF (348) selon le protocole expérimental habituel (voir p. 147). Ils sont resuspendus dans le milieu de diffusion sans saccharose, auquel on ajoute du formol à concentration finale de 6 p. 100. On laisse dialyser toute une nuit dans le même tampon. L'adialysable est centrifugé à 2 000 g, pendant 5 mn. Le surnageant obtenu est analysé par centrifugation en chlorure de césium (CsCl).

Dans certains cas, l'analyse a été effectuée directement à partir de la zone 35 S du gradient de saccharose fixée par le formol et dialysée de la même manière que ci-dessus.

2) Centrifugation en gradient α - Formation et centrifugation du gradient

Contrairement à la centrifugation de zone, il n'est pas nécessaire de préformer le gradient. En effet, lorsqu'on centrifuge une solution concentrée d'un sel lourd -en l'occurrence, du CsCl- il apparaît, entre les deux extrémités de la colonne liquide, une variation continue de la concentration du sel. Il se crée, de cette manière, un gradient de densité qui atteint un état d'équilibre au bout d'un certain temps de centrifugation généralement assez long. Si on mélange initialement avec la solution saline une petite quantité de macromolécules dont la densité dans cette solution (densité apparente) est voisine de celle de la solution, elles formeront une bande plus ou moins étroite à une position où leur densité apparente est égale à celle de la solution.

Nous avons utilisé 3,5 ml d'une solution de CsCl de densité 1,420. Cette solution a été effectuée à partir de l'adialysable -qui contient les particules- auquel on a ajouté le CsCl à la densité voulue. L'ensemble a été centrifugé à 35 000 t/mn, pendant 63 heures, dans le rotor SW 39 d'une centrifugeuse SPINCO, modèle L ou L_2 .

Pour diminuer le temps de centrifugation, nous avons parfois préformé les gradients. La technique, dans ce cas, est identique à celle que nous avons utilisée pour les gradients de saccharose (voir p.163, a-). Nous avons effectué nos gradients à partir de deux solutions de CsCl de concentrations extrêmes : 2,5 ml d'une solution de densité 1,298. et 2,03 ml d'une solution de densité 1,598.

Comme dans le cas précédent, les solutions ont été effectuées à partir de l'adialysable. Nous avons centrifugé pendant 18 heures, à 35 000 t/mn (rotor SW 39).

β - Fractionnement et analyse du gradient

La technique d'élution du gradient est la même que pour la centrifugation de zone. Nous avons mesuré la D.O. à 260 nm et pour déterminer la radioactivité totale de chaque fraction, des quantités aliquotes de 0,5 ml ont été prélevées et additionnées de 10 ml du mélange scintillant de BRAY (349) ; les comptages ont été effectués au compteur à scintillation. En outre, la densité des différentes zones du gradient a été déterminée par mesure de l'indice de réfraction qui conduit, grâce aux tables de VINOGRAD et HEARST (350), à la valeur précise de la densité.

b - Résultats

1) Isolement en l'absence de magnésium

La figure 28 (p. 179) représente le gradient en CsCl non préformé de la zone 35 S séparée préalablement en gradient de saccharose. La majeure partie de la radioactivité est retrouvée dans une bande de densité comprise entre 1,35 et 1,40 avec un maximum à 1,37.

L'action de la RNase (5 μ g/ml, à 20° C, pendant 10 mn) provoque une diminution et un léger déplacement du matériel radioactif vers des zones plus légères du gradient. Ce résultat s'explique par une diminution du contenu en ARN des particules.

2) Isolement en présence de magnésium

La figure 29 (p. 180) représente le gradient en CsCl préformé de la fraction RN₂ obtenue à partir de noyaux diffusés dans le milieu de ZAMENIK et KELLER (où le magnésium est 3 mM). La majeure partie de la radioactivité se retrouve également dans une bande de densité dont le maximum se situe à environ 1,37.

c - Conclusions

Les résultats que nous avons obtenus nous amènent à formuler les conclusions suivantes :

1) La densité des particules de la fraction RN₂ est relativement faible. Ce résultat apporte une preuve supplémentaire quant à leur nature nucléoprotéique. Leur densité égale à 1,37 révèle

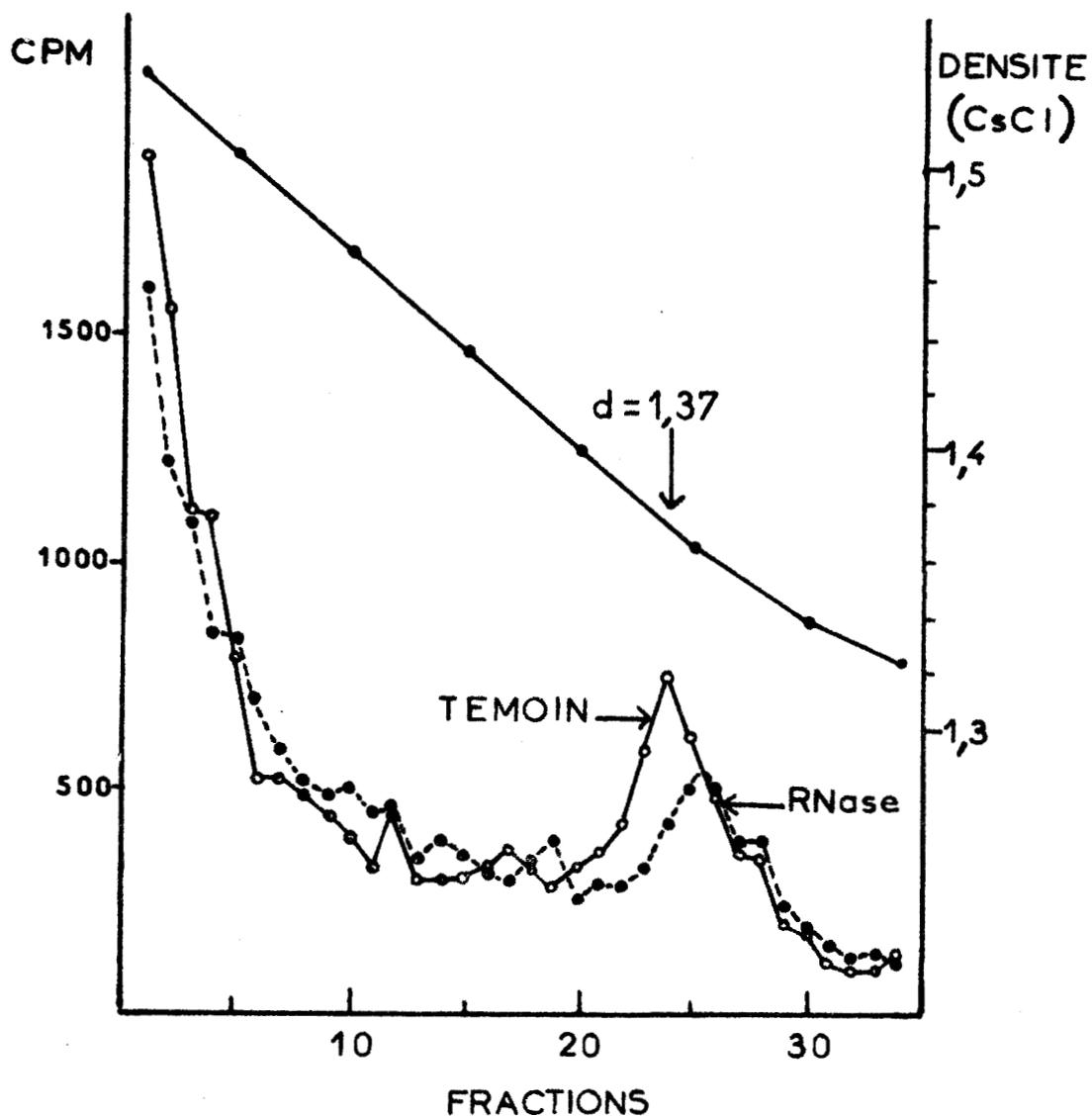


Figure 28

Ultracentrifugation en gradient de CsCl.

Particules ^{35}S de noyaux de foies de Rats marqués au ^{32}P et séparées préalablement en gradient de saccharose.

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 39 à 35 000 t/mn pendant 63 h à 4° C, dans une solution de CsCl dont la densité moyenne est de 1,420.

- — — — — — ○ Courbe de radioactivité des particules ^{35}S
- - - - - - ● Courbe de radioactivité des particules ^{35}S traitées par la RNase (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, à 20° C pendant 10 mn).



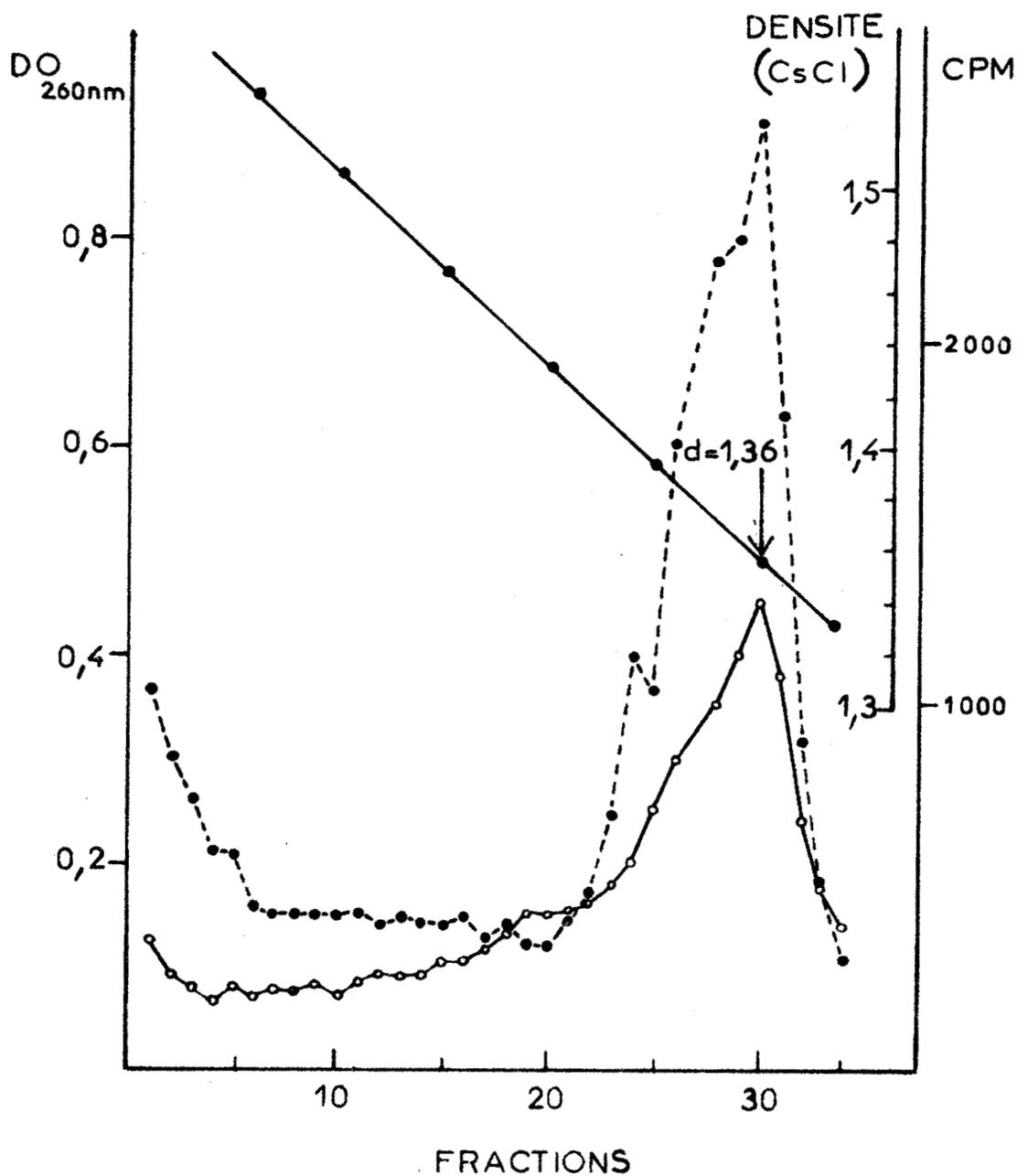


Figure 29

Ultracentrifugation en gradient de CsCl.

Fraction RN₂ de noyaux de foies de Rats marqués au ³²P et incubés dans le milieu de ZAMENIK et KELLER (MgCl₂ 3 mM).

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 39 à 35 000 t/mn pendant 18 h à 4° C, dans un gradient préformé de CsCl de densité 1,298 à 1,598.

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

-par application de la formule de LIAU et PERRY (351) (*)- une faible proportion en ARN (27 p. 100).

2) Si la présence de magnésium dans le milieu de diffusion provoque une augmentation du coefficient de sédimentation, la densité, par contre, ne varie pas. Il est donc fort probable que l'absence de magnésium n'entraîne qu'une modification dans la conformation moléculaire de nos particules.

4 - ACTION DE DIFFERENTS FACTEURS

La fraction RN₂ a été traitée comme nous l'avons décrit à la page 163, sauf que nous avons fait agir des facteurs variés (température, agents de dissociation etc....) avant d'effectuer l'analyse par centrifugation en gradient de saccharose. Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

a - Action de la RNase pancréatique

1) Mode opératoire

Nous avons fait agir la RNase "DNase-free" (WORTHINGTON) à raison de 50 µg/ml d'une part, à 4° C pendant 45 mn et, d'autre part, à 37° C pendant 20 mn. Des contrôles à 4° C et à 37° C ont aussi été effectués.

Dans ces expériences les noyaux ont été incubés en l'absence de magnésium.

2) Résultats

Les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

α - Après l'action de la RNase à 4° C, la radioactivité du pic 35 S diminue environ des 2/3 (voir fig. 30 ; p. 182).

β - Après l'action de la RNase à 37° C, la zone 35 S s'effondre totalement. Néanmoins, une partie de cette dégradation est due uniquement à l'effet de la température car le témoin à 37° C (sans RNase) diminue presque de moitié (voir fig. 31 ; p. 183).

$$(*) \quad \text{Protéines (en p. 100)} = 100 \frac{d_p (d_n - d)}{d (d_n - d_p)}$$

où - d est la densité mesurée

- d_n et d_p les densités des ARN et des protéines égales respectivement à 1,9 et 1,25

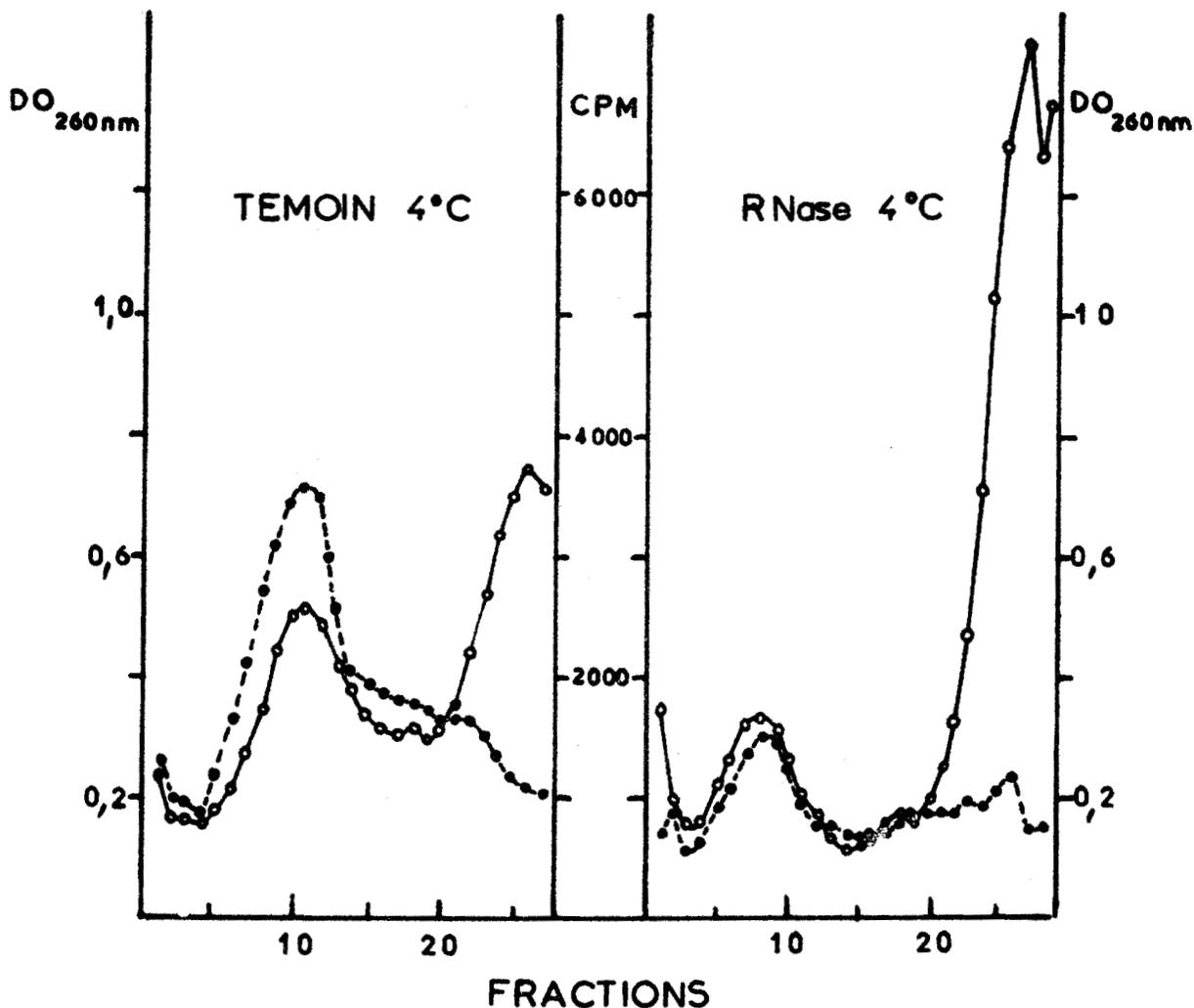


Figure 30

Centrifugation en gradients linéaires de saccharose de 5 à 20 p. 100.
 Action de la RNase (50 µg/ml à 4° C pendant 45 mn) sur les particules de la fraction RN₂ isolée à partir de noyaux de foies de Rats marqués au ³²P et incubés dans la solution habituelle de saccharose phosphatée.
 La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 25-1 à 22 000 t/mn pendant 14 h à 4° C.

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



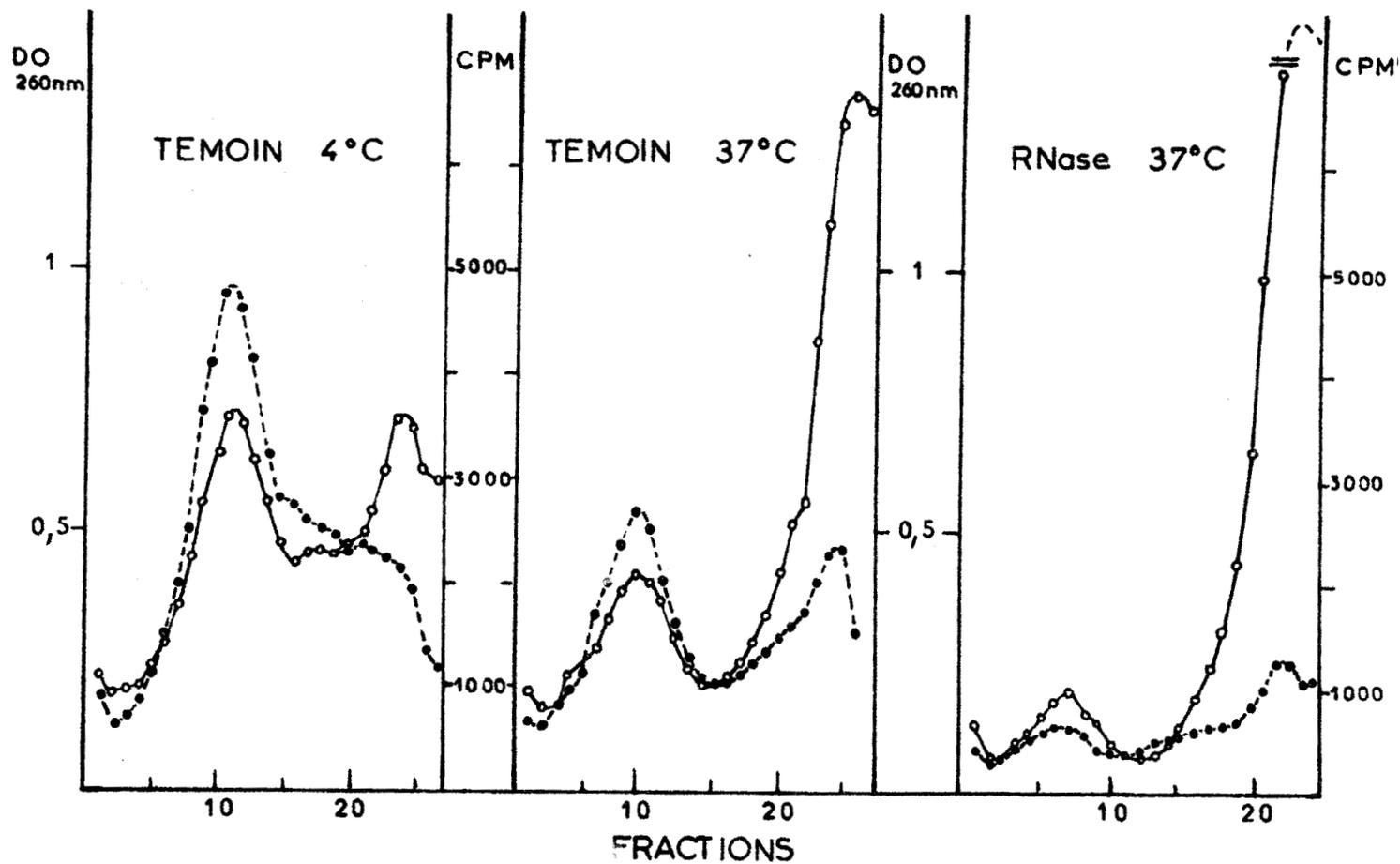


Figure 31

Centrifugation en gradients linéaires de saccharose de 5 à 20 p. 100.

Action de la température (37° C) et de la RNase (50 µg/ml à 37° C pendant 20 mn) sur les particules de la fraction RN₂ isolée dans les mêmes conditions que celles décrites dans la figure 30.

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 25-1 à 22 000 t/mn pendant 14 h à 4° C.

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



3) Conclusions

Les résultats obtenus nous amènent à formuler les conclusions suivantes :

α - Les particules de RNP 35 S sont très sensibles à l'action de la RNase puisque, même à 4° C, on observe une diminution très importante du pic.

β - Il est à souligner que les particules 35 S sont également thermolabiles et qu'il faut éviter d'opérer à 37° C, comme il est souvent mentionné.

b - Action de la DNase

1) Mode opératoire

Nous avons fait agir la DNase à 4° C, pendant 45 mn, à raison de 50 $\mu\text{g/ml}$, en présence d'ions magnésium (10^{-3} M) nécessaires à son action. Des contrôles à 4° C avec et sans magnésium ont également été effectués.

Dans ces expériences, les noyaux ont été incubés en l'absence de magnésium.

2) Résultats et conclusions

L'examen des courbes de densité optique et de radioactivité obtenues, montre que les particules 35 S sont totalement insensibles à la DNase (Fig. 32 ; p. 185). On observe seulement, dans les zones plus légères du gradient, une très légère diminution de la radioactivité. Nous pouvons donc conclure que s'il y a quelque contaminant ADN dans la fraction RN₂, les RNP 35 S elles-mêmes en sont totalement dépourvues.

c - Action du DOC

En présence de DOC à 1 p. 100, les particules 45 S sont complètement dissociées (Fig. 33; p. 186).

d - Action de l'EDTA

Il convient de mentionner que, dans ce cas, les fractions RN₂ ont été obtenues en présence de magnésium. L'EDTA 0,03 M provoque une diminution du coefficient de sédimentation qui passe de 45 S à environ 35 S (Fig. 34 ; p. 187).

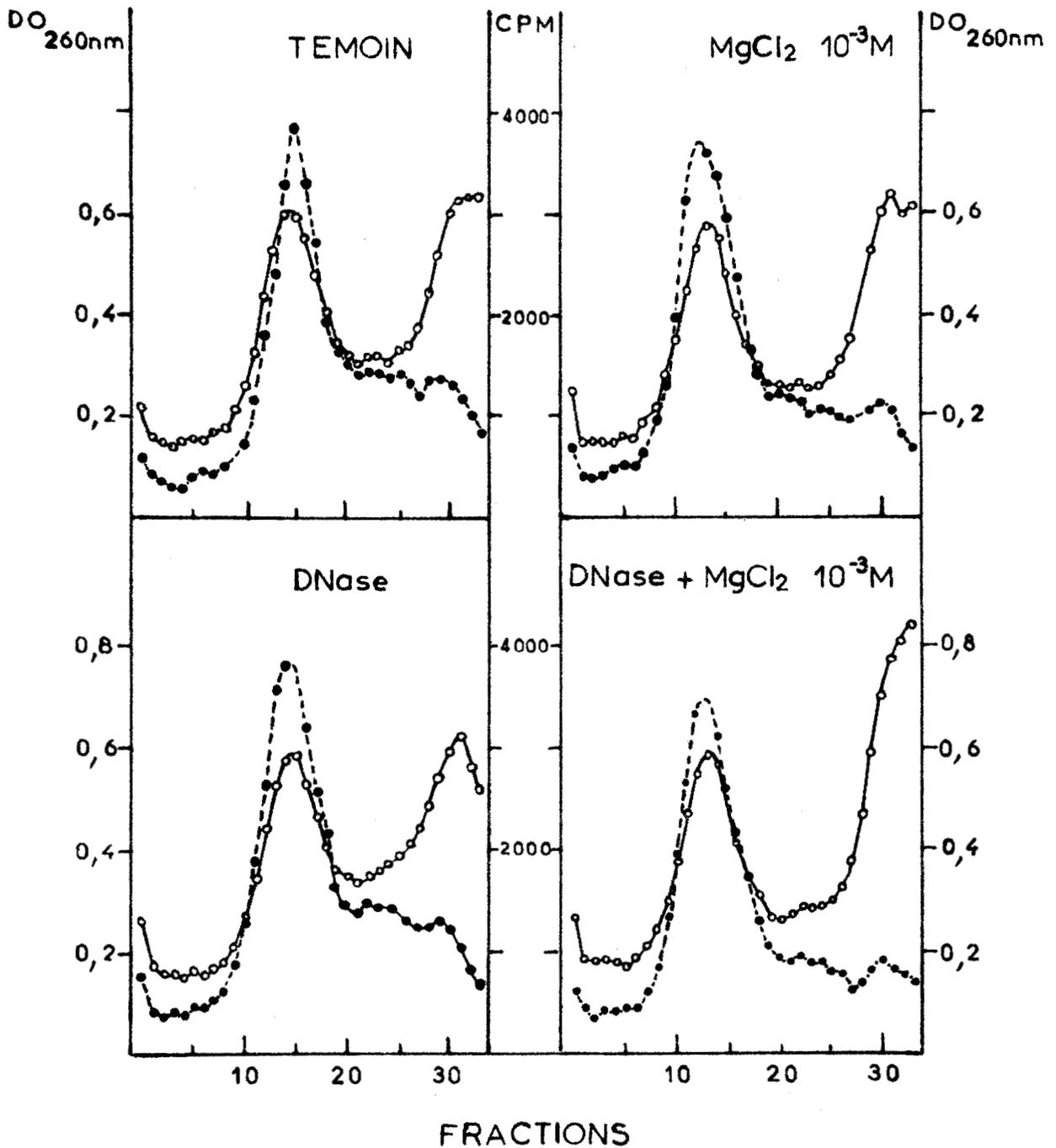


Figure 32

Ultracentrifugation en gradients linéaires de saccharose de 5 à 25 p. 100.

Action de la DNase (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à 4° C pendant 45 mn, en présence de MgCl_2 10^{-3} M) sur les particules de la fraction RN_2 isolée selon la méthode classique. Les noyaux ont été incubés dans la solution habituelle de saccharose phosphatée.

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SW 27 à 20 000 t/mn pendant 15 h à 4° C.

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



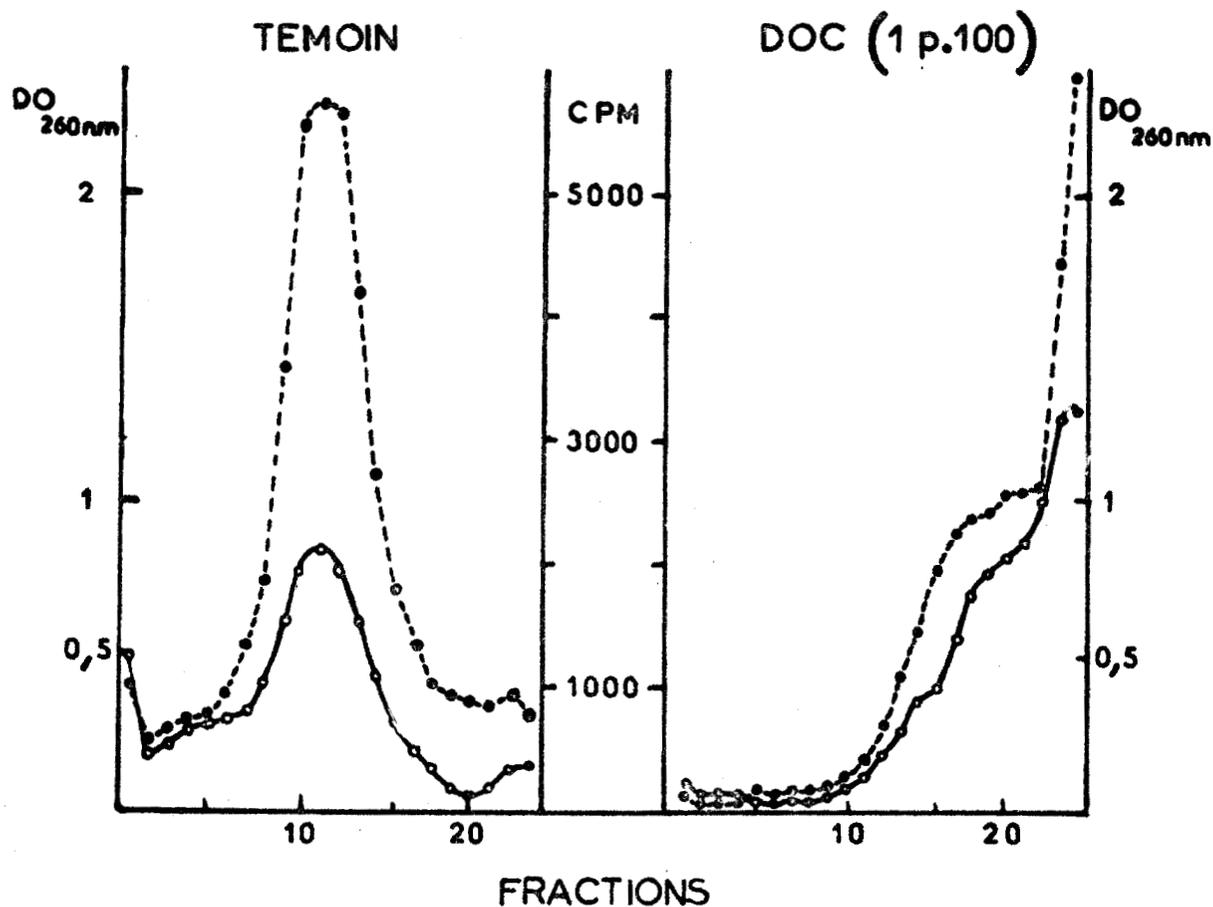


Figure 33

Ultracentrifugation en gradients linéaires de saccharose de 5 à 20 p. 100.

Action du DOC à 1 p. 100 sur les particules de la fraction RN₂ de noyaux de foies de Rats marqués au ³²P et incubés dans le milieu de ZAMENIK et KELLER (MgCl₂ 3 mM).

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 27 à 20 000 t/mn pendant 13 h à 4° C.

○ — — — — — ○ D.O. 260 nm

● - - - - - ● Radioactivité acido-insoluble



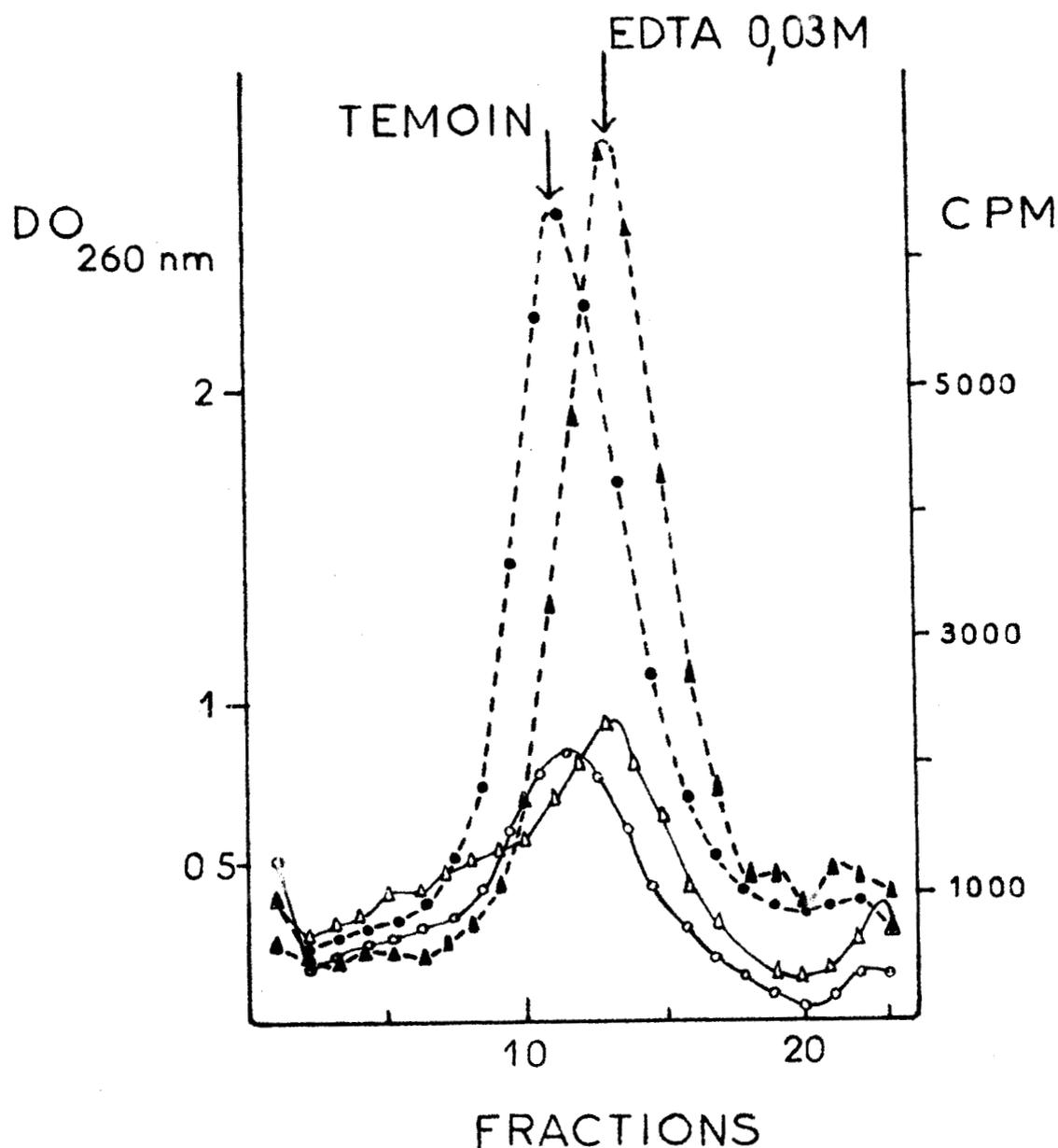


Figure 34

Ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p. 100

La fraction RN₂ a été isolée à partir de noyaux de foies de Rats marqués au ³²P et incubés dans le milieu de ZAMENIK et KELLER, donc en présence de magnésium. Une partie a été resuspendue dans la solution d'incubation sans saccharose, selon le procédé habituel et sert de témoin. L'autre partie a été remise en suspension dans la même solution sans magnésium et à laquelle on a ajouté de l'EDTA 0,03 M.

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 27 à 20 000 t/mn pendant 13 h à 4° C.

○ ——— ○ ——— ○	D.O. 260 nm	} Particules témoin
● ——— ● ——— ●	Radioactivité acido-insoluble	
△ ——— △ ——— △	D.O. 260 nm	} Particules traitées à l'EDTA
▲ ——— ▲ ——— ▲	Radioactivité acido-insoluble	

BUS
LILLE

On retrouve donc, comme on pouvait le prévoir l'EDTA complexant les ions bivalents, le même coefficient de sédimentation que celui de nos particules isolées en l'absence de magnésium. La configuration de ces dernières semble donc être fonction de la composition ionique du milieu.

5 - ETUDE DE L'ARN DES PARTICULES

a - Détermination de la composition en bases

1) Mode opératoire

Nous avons effectué une préparation massive de particules. Les zones 35 S de plusieurs gradients ont été collectées, additionnées d'ATCA à concentration finale de 10 p. 100 et traitées en vue de l'extraction des ARN selon le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER (voir p. 67). La composition centésimale en nucléotides des ARN a été déterminée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet et selon le procédé d'YCAS et VINCENT (voir détails techniques ; p. 94).

2) Résultats et conclusion

Les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans le tableau XXVII (p. 189). Les rapports des bases G + C/A + U, déterminés par spectrophotométrie et selon la méthode d'YCAS, sont respectivement égaux à 1,17 et 1,06. Nous pouvons en conclure que la fraction ARN de nos particules tend vers le type AU sans toutefois atteindre la composition en bases de l'ADN.

b - Détermination du coefficient de sédimentation

1) Mode opératoire

Nous avons isolé des particules 45 S à partir de Rats ayant reçu une injection intrapéritonéale d'acide orotique tritié, à raison de 250 μ C/Rat, 1 h avant le sacrifice. L'ARN de la zone 45 S du gradient a été extrait selon le procédé classique par le phénol-SDS à concentration finale de 0,5 p. 100 dans le tampon Tris-HCl 0,05 M ajusté à pH 7,4. Après précipitation de la phase aqueuse par l'alcool, l'ARN a été dissous dans le tampon acétate de sodium 0,01 M et NaCl 0,1 M ajusté à pH 5 puis analysé en gradient linéaire de saccharose dans le même tampon acétate.

TABLEAU XXVII

Composition centésimale en nucléotides des ARN des particules de RNP 35 S

	G	C	A	U	$\frac{G + C}{A + U}$
Détermination par spectrophotométrie dans l'U.V.	30,2	23,6	26,4	19,6	1,17
Détermination selon le procédé d'YCAS et VINCENT (352)	36,8	14,7	29,7	18,6	1,06

NOTA.- Ces résultats représentent la moyenne de 3 dosages.



Le surnageant post-mitochondrial froid contenant les ribosomes et l'ARN de transfert a été traité de manière identique pour servir de témoin.

2) Résultat

L'examen du gradient de la figure 35 (p. 191) révèle la présence d'un composé radioactif de faible poids moléculaire. En effet, le coefficient de sédimentation, évalué par rapport à celui de l'ARN de transfert, est environ égal à 4 S.

B - ETUDE MORPHOLOGIQUE

1 - MATERIEL ET METHODES

Après ultracentrifugation en gradient de saccharose de la fraction RN₂, nous avons collecté les tubes de la zone 45 S et recentrifugé pendant 2 heures à 130 000 g. Le sédiment obtenu a été traité selon les techniques de morphologie déjà décrites (voir p. 152). Nous avons également effectué des digestions enzymatiques du sédiment après sa fixation par le formol à 10 p. 100.

2 - RESULTATS

1) En coupes, après inclusion dans l'Epon, l'observation au microscope électronique montre la présence d'une population homogène de particules d'allure sphérique de 170 Å à 250 Å de diamètre identiques à celles de la fraction RN₂ (revoir fig. 15 b ; p. 153). Ces particules ne semblent pas présenter de liens entre elles.

2) En coloration négative (technique de SHELTON et KUFF (353)), elles présentent une surface poreuse assez régulière ; leur diamètre est de l'ordre de 200 Å (Fig. 36 ; p.192).

3) Les colorations positives ne nous ont pas permis de révéler à leur niveau de sous structures.

4) Des digestions par la pepsine (0,1 p. 100 dans HCl 0,1 N, à 37° C, pendant 1 heure) provoquent une diminution du contraste des particules qui apparaissent plus floues.

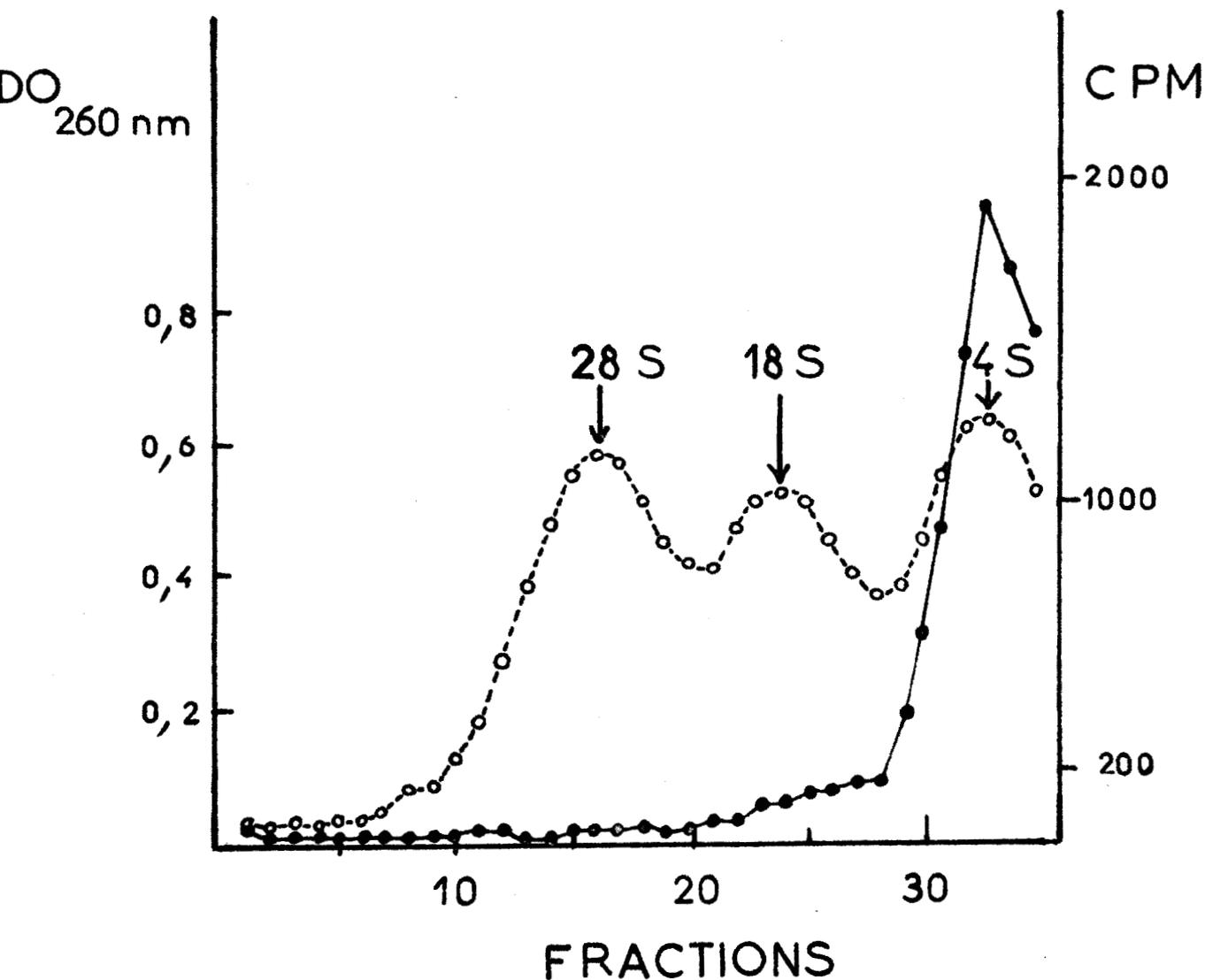


Figure 35

Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p. 100.

ARN des particules 45 S extrait par le phénol-SDS à 0,5 p. 100. Les particules 45 S ont été séparées préalablement par centrifugation en gradient de saccharose de la fraction RN₂ provenant de noyaux de foies de Rats marqués à l'acide orotique ³H (250 µc/Rat²). L'incubation des noyaux a été effectuée dans le milieu de ZAMENIK et KELLER (MgCl₂ 3 mM).

La centrifugation a été effectuée dans un rotor SPINCO SW 27 à 20 000 t/mn pendant 15 h à 4° C.

- — — — — — ○ Radioactivité de l'ARN des particules 45 S.
- - - - - - ● D.O. 260 nm de l'ARN post-mitochondrial (ARN ribosomiaux et ARN de transfert) utilisé comme entraîneur.

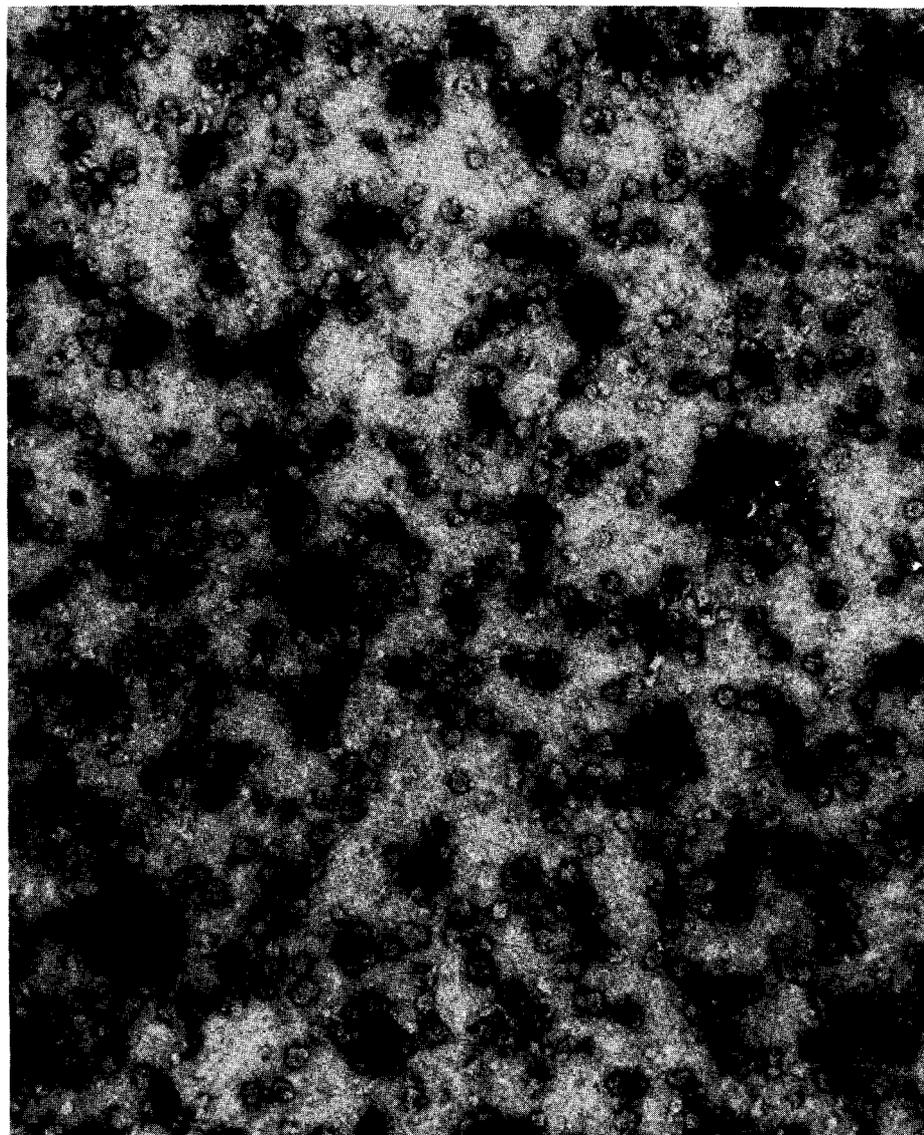
BUS
LILLE

Figure 36

Particules de RNP 45 S vues en coloration négative à l'acétate d'uranyle selon la technique de SHELTON et KUFF (354). x 120 000.

5) La RNase (0,1 p. 100 dans l'eau à pH 6,8, à 37° C, pendant 1 heure) n'a pas d'action nette. Les particules sont toujours présentes.

3 - CONCLUSIONS ET DISCUSSION

1) L'aspect des particules de la zone 45 S n'est pas différent de celui des particules de la fraction RN₂. Ceci tend à prouver que la fraction RN₂ qui représente -tout au moins dans le cas les noyaux décapés par le Triton- la totalité des produits diffusibles, serait essentiellement constituée de particules 45 S.

2) Les particules semblent résister à l'action de la RNase. Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus en biochimie (voir p. 181). On ne peut cependant invoquer le fait que les particules soient fixées au préalable par le formol puisqu'on utilise dans ce cas des doses de RNase 20 fois plus élevées (1 000 µg/ml au lieu de 50 µg/ml). En outre, les opérations étant effectuées à 37° C, l'effet de la température devrait s'ajouter à l'action de la RNase (revoir fig. 31 ; p. 183). Ce résultat peut néanmoins s'expliquer si l'ARN se trouve, comme dans les particules 30 S de GEORGIEV (revoir fig. 5 ; p. 54), en surface de la partie protéique des particules. Cette dernière n'étant pas dégradée, la morphologie des particules reste intacte.

3) L'aspect des particules après l'action de la pepsine correspondrait, par contre, à un début de dégradation de la protéine de nos particules.

C - ROLE BIOLOGIQUE - DISCUSSION

L'existence même de particules de RNP à l'intérieur du noyau est à l'heure actuelle largement démontrée tant par des méthodes morphologiques que des méthodes bio-physico-chimiques (revoir le chapitre intitulé : Les RNP cellulaires ; p. 3). Si, il y a encore une dizaine d'années, on les désignait sous le terme général de "ribosomes nucléaires" -voir, en particulier, WANG (355) et ALLFREY (356)- par analogie aux ribosomes du cytoplasme, on distingue à présent, rappelons-le, deux grandes catégories de RNP qui diffèrent entre elles selon la nature de

leur ARN. Ce sont : 1^o) les rRNP dont l'ARN (ARNr) est du type ribosomal et qui comprennent toute la série des précurseurs ribosomiaux et les sous-unités ribosomales elles-mêmes et 2^o) les dRNP dont l'ARN (dARN) a une composition en bases qui se rapproche de celle de l'ADN.

Avant de vouloir leur attribuer un rôle, il est intéressant de comparer les propriétés des particules que nous avons obtenues à celles des particules appartenant aux classes citées ci-dessus :

a - Nos particules appartiennent-elles à la catégorie des ribosomes ?

Cette possibilité doit être prise en considération. En effet, s'il est exclu que nos particules soient comparables aux précurseurs nucléolaires eux-mêmes dont les coefficients de sédimentation s'étalent de 60 S à 110 S (voir p. 11), elles pourraient, par contre, fort bien correspondre à la petite sous-unité ribosomale "native" qui se trouve en transit dans le nucléoplasme et dont le coefficient de sédimentation, dans le cas du foie de Rat, est de 45 S. Il semble toutefois que l'analogie entre ces deux types de particules se limite à cette propriété, encore que, en l'absence d'ions magnésium ou en présence d'EDTA, nos particules sédimentent à 35-36 S alors que les sous-unités ribosomales acquièrent un coefficient de sédimentation de 32 S (TASHIRO et SIEKEVITZ (357)) ; (revoir également la figure 20 ; p. 165). D'autres différences peuvent être mentionnées ; ce sont :

1) Le coefficient de sédimentation de leur ARN : après extraction au phénol-SDS, l'ARN de nos particules est de 4 S tandis que celui de la petite sous-unité ribosomale est de 18 S (revoir fig. 35 ; p. 191).

2) Leurs proportions respectives en ARN et protéines : les petites sous-unités ribosomales renferment 47 p. 100 d'ARN alors que nos particules n'en contiennent qu'environ 27 p. 100.

3) De cette différence, en dérive une autre, c'est celle de leur densité en CsCl : nos particules ont une densité moyenne de 1,36-1,37 ; elles sont donc relativement légères par rapport aux sous-unités ribosomales 45 S dont la densité est égale à environ 1,5 (voir tableau I ; p. 10).

4) Le rapport en bases G + C/A + U de leur ARN est nettement différent : il est de 1,85 pour la petite sous-unité ribosomale et d'environ 1 -donc de type AU- pour nos particules.

5) L'actinomycine D qui, à faibles doses (0,25 $\mu\text{g/g}$ de poids d'animal), inhibe la presque totalité de la synthèse des ARN ribosomiaux, ne provoque qu'une diminution de 50 p. 100 de la synthèse des ARN de nos particules (revoir fig. 26 ; p. 173).

6) Enfin, contrairement aux sous-unités ribosomales, nos particules sont très sensibles au DOC à 1 p. 100 (revoir fig. 33 ; p. 186).

L'étude comparée des protéines ribosomales à celles de nos particules -actuellement en cours- nous apportera peut-être des preuves supplémentaires de leur manque d'analogies. Néanmoins, les critères obtenus jusqu'à présent sont suffisants pour qu'on ne puisse assimiler nos particules à la série des ribosomes.

b - Nos particules appartiennent-elles à la catégorie des dRNP ?

D'une manière générale, elles s'en rapprochent par leur activité métabolique intense, la nature de leur ARN qui est du type dARN et leur faible densité en CsCl qui révèle, en outre, une forte proportion en protéines. Il est intéressant de comparer nos particules aux formes les plus représentatives isolées par différents auteurs (revoir le chapitre intitulé : Les dRNP cellulaires ; p. 38) et qui sont :

1) Les informosomes de SPIRIN

Ce sont des particules de RNP trouvées à l'origine dans les extraits cytoplasmiques d'embryons de Loche ou d'Oursin.

Nos particules s'en rapprochent par leur faible densité en CsCl ; elles ont, en particulier, la même densité que celle des informosomes sédimentant dans la zone 40 S ($d = 1,36 - 1,37$). Toutes deux sont sensibles à la RNase pancréatique et à la pronase.

Elles diffèrent l'une de l'autre par le fait que les informosomes ont un coefficient de sédimentation très hétérogène qui est fonction de celui des ARNm. Il faut néanmoins rappeler qu'on a à faire à des cellules embryonnaires donc non différenciées, où les ARNm peuvent posséder des tailles très variées.

2) Les dARN-informofères de GEORGIEV

Ce sont des particules de RNP isolées de noyaux de foie de Rat et constituées de l'enchaînement de sous-unités 30 S (revoir fig. 5 ; p. 54).

Nos particules possèdent avec ces "monomères" 30 S quelques caractéristiques communes parmi lesquelles on peut citer une faible densité en CsCl, un spectre d'absorption en lumière ultra-violette identique et une grande sensibilité à la RNase.

Elles diffèrent par le coefficient de sédimentation de leur ARN qui atteint 8 S (au lieu de 4 S) dans le cas des particules 30 S. Cet ARN atteint également un type AU plus prononcé dans le cas des particules 30 S (0,79 au lieu de 1). Etant donnée la différence du coefficient de sédimentation, nos particules 45 S devraient, en outre, correspondre à un dimère des particules 30 S ; or, de faibles doses de RNase (1 µg/ml) sont sans action. Il est par conséquent difficile d'effectuer une comparaison exacte entre ces deux types de particules. En présence d'inhibiteur de RNase, nous n'avons pas non plus obtenu -tout au moins d'une manière aussi nette- les formes "polymères" de GEORGIEV.

3) Les particules 40 S de MOULE

Ces particules ont été obtenues par extraction de noyaux de foie de Rat par le Tris, en présence de magnésium.

Nos particules, comme celles de MOULE, sont très sensibles au DOC à 1 p. 100. Elles possèdent surtout, toutes deux, un ARN ayant des points communs qui sont : 1^o) sa composition en bases (le rapport G + C/A + U est proche de 1 dans les deux cas), 2^o) son coefficient de sédimentation égal à environ 4 S, même lorsque les particules sont isolées en présence d'inhibiteur de RNase et enfin 3^o) sa sensibilité à l'actinomyicine D : dans les deux cas, l'ARN y est partiellement résistant puisqu'on

n'observe qu'une inhibition de 50 p. 100 des synthèses.

Les deux types de particules réagissent par contre différemment aux ions magnésium. Dans le cas des particules MOULE, le pic 40 S diminue jusqu'à une concentration en magnésium égale à 5 mM ; au delà, il disparaît. Nous-mêmes obtenons encore des particules avec du magnésium 10 mM.

4) Les particules 45 S d'ISHIKAWA

Ces particules ont été mises en évidence, très récemment, par incubation de noyaux de foie de Rat dans un tampon Tris, en présence de magnésium et d'ATP.

Elles possèdent un coefficient de sédimentation analogue à celui de nos particules ; ce dernier a, en effet, été évalué plus exactement à 43 S et celui de nos particules, déterminé par ultracentrifugation analytique est égal à environ 44 S. Dans les deux cas, il ne s'agit pas d'un dimère puisque de faibles doses de RNase sont sans action. En présence d'inhibiteur cytoplasmique de RNase, le pic 45 S obtenu par ISHIKAWA diminue au profit de composants sédimentant dans des régions plus lourdes du gradient ; nous observons la même évolution pour nos particules. Enfin, les deux types de particules ont une faible densité en CsCl ; elles sont sensibles à la RNase et, par contre, totalement résistantes à l'action de la DNase.

Les seules différences qu'on puisse détecter se trouvent au niveau de l'ARN des particules. Celles d'ISHIKAWA possèdent un ARN de coefficient de sédimentation hétérogène allant de 6 S à 28 S (au lieu de 4 S) et dont la composition en bases est davantage de type AU (le rapport $G + C/A + U$ est égal à 0,85 au lieu de 1). En outre, ces particules semblent, contrairement aux nôtres, insensibles au DOC à 0,2 p. 100 (au lieu de 1 p. 100) ; ces derniers résultats ne sont donc, en fait, pas comparables.

La comparaison de nos particules avec celles obtenues par différents auteurs nous a permis de mettre en relief de nombreuses analogies mais aussi quelques différences pouvant être dues 1°) au fait que nos particules sont isolées à un stade d'évolution différent. Ainsi il est possible que les formes polymères généralement extraites directement du noyaux soient les précurseurs des nôtres. D'une part, GEORGIEV

(358) affirme que les informofères transportent les ARNm vers le cytoplasme au moins jusqu'à la membrane nucléaire. D'autre part, STEVENIN et al. (359) émettent l'hypothèse que leurs particules géantes extraites des noyaux de cerveau de Rat (voir p. 21) correspondraient à un assemblage de dARN géant néosynthétisé et de protéines. Au contact de l'enveloppe nucléaire, sous l'effet d'un changement de force ionique, ces complexes se transformeraient en monoparticules 40 à 50 S, avant de passer dans le cytoplasme et 2^o) au fait que leur mode d'extraction, en outre, est différent. C'est sans doute l'une des raisons pour lesquelles nos particules sont très proches de celles d'ISHIKAWA qui ont, comme les nôtres, été extraites par incubation de noyaux (et non par extraction). Il faut, en outre, mentionner que cet auteur utilise l'ATP pour accélérer le phénomène de diffusion. Il est possible que l'ATP, sous l'action d'ATPases nucléaires, libère des radicaux phosphates pouvant jouer le même rôle d'activateur que les phosphates minéraux contenus dans nos solutions de diffusion.

En conclusion, nous sommes tentée -comme la plupart des auteurs- d'attribuer à nos particules un rôle de transport de dARN du noyau vers le cytoplasme d'autant plus que le phénomène de diffusion est sélectif et qu'il se produit également lorsqu'on incube nos noyaux dans du suc cytoplasmique frais de foie de Rat. Il nous est donc permis de supposer que le phénomène de diffusion puisse se produire in vivo. Nous ne pouvons néanmoins affirmer qu'il s'agisse réellement d'ARN messagers, les critères de composition en bases et d'activité métabolique intense étant insuffisants.

CONCLUSIONS

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de nos travaux sont les suivantes :

I - Nous avons mis au point, au terme d'un travail effectué en équipe, une méthode générale permettant à la fois des déterminations de composition molaire et de radioactivité spécifique des acides ribonucléiques. Une étude critique du rendement et de la pureté des ARN obtenus nous ont donné entière satisfaction, de même que les résultats statistiques que nous avons obtenus. Cette méthode nous a servi dans la suite de nos travaux à détecter, de manière précise, des différences dans la composition et le métabolisme, de différentes classes d'ARN nucléaires.

II - L'étude critique systématique des différents milieux d'homogénéisation classiquement utilisés dans le fractionnement cellulaire nous a permis de montrer que la composition de ces milieux jouait un rôle important dans la perméabilité des membranes. Si, d'une manière générale, les solutions de saccharose pur conviennent parfaitement à l'isolement d'inclusions cytoplasmiques, celles tamponnées par des sels minéraux, -en particulier par des phosphates-, provoquent une diffusion importante de constituants phosphorylés. La plus grande prudence doit donc être observée dans le choix des solutions destinées au fractionnement cellulaire.

III - L'étude de la nature chimique des produits diffusibles nous a permis de démontrer que les noyaux d'hépatocytes de Rat, décapés par le Triton X 100 et incubés dans des solutions de saccharose tamponnées par des phosphates minéraux éliminaient une fraction constituée essentiellement de particules de nature ribonucléoprotéique dont les principaux caractères sont les suivants :

- 1) Elles possèdent un "turnover" intense.

2) Leur coefficient de sédimentation est respectivement égal à 35 S ou 45 S selon que ces particules sont isolées en l'absence ou en présence d'ions magnésium.

3) Leur densité apparente en gradient de CsCl est relativement faible et égale à 1,36-1,37 ; elle révèle une forte proportion en protéines.

4) La composition en bases de leur ARN tend vers le type AU. Le rapport des bases G + C/A + U déterminé à la fois par spectrophotométrie dans l'U.V. et selon le procédé d'YCAS et VINCENT est, en effet, voisin de 1.

5) Cet ARN possède un coefficient de sédimentation d'environ 4 S.

6) Les particules sont thermolabiles, très sensibles à la RNase pancréatique ; par contre, la DNase n'a pas d'action.

7) Elles sont, contrairement aux ribosomes, complètement dissociées par le DOC à 1 p. 100.

8) L'EDTA 30 mM provoque une diminution de leur coefficient de sédimentation en rapport avec un changement de forme moléculaire.

9) Morphologiquement, elles apparaissent sous la forme de sphères d'un diamètre moyen de 200 à 250 Å.

L'ensemble de ces propriétés nous ont permis de conclure que les particules que nous avons isolées sont différentes des ribosomes. Elles semblent, par contre, appartenir à la catégorie des dRNP cellulaires et jouer un rôle dans le transport des ARN de type dARN du noyau vers le cytoplasme. Les résultats obtenus jusqu'à présent ne nous permettent pas, néanmoins, d'affirmer qu'il s'agit d'ARN messagers. Nos travaux sont actuellement poursuivis pour tenter de démontrer le rôle que jouent ces particules dans l'activation des synthèses protéiques dans les systèmes in vitro.

ANNEXE TECHNIQUE

ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

DETERMINATION DE LA CONSTANCE DE SEDIMENTATION D'UNE MACROMOLECULE

I - PRINCIPE DE L'ULTRACENTRIFUGATION

Lorsqu'une macromolécule se trouve en suspension dans une phase liquide, la force de gravité qui a tendance à la faire sédimenter est contrecarrée par les forces d'agitation thermique correspondant aux mouvements browniens.

La sédimentation spontanée n'est donc pas une valeur mesurable.

L'ultracentrifugation introduit une accélération artificielle linéaire γ (liée à la vitesse angulaire ω et à la distance r de la particule à l'axe de rotation) selon la relation :

$$\gamma = c \cdot \omega^2 \cdot r$$

Si l'accélération est suffisamment élevée, la particule sédimente avec une vitesse liée à sa forme et à sa masse moléculaire.

II - THEORIE DE LA SEDIMENTATION

Soit V le volume de la macromolécule

m_a sa masse

ρ sa densité

ρ_s la densité du solvant

La force à laquelle est soumise la macromolécule sous l'accélération $\gamma = \omega^2 \cdot r$ est

$$F = m_a \cdot \gamma = V \cdot \rho \cdot \omega^2 \cdot r$$

Il faut cependant déduire la poussée d'Archimède ($V \cdot \rho_s$). La force résultante est donc

$$F = (\rho - \rho_s) \cdot V \cdot \omega^2 \cdot r$$

La résistance à cette force est proportionnelle à la vitesse de sédimentation, et vaut

$$R_e = \frac{R.T.}{N.D.} \cdot \frac{dr}{dt}$$

sachant que R = constante des gaz parfaits

T = température absolue

N = nombre d'Avogadro

D = coefficient de diffusion

Lorsque l'état d'équilibre est atteint, la force de sédimentation est égale à la résistance.

$$V (\rho - \rho_s) \cdot \omega^2 \cdot r = \frac{R.T.}{N.D.} \cdot \frac{dr}{dt}$$

Or, le volume de la macromolécule est égal à $V = \frac{M}{N \cdot \rho}$ (M étant la masse moléculaire de la macromolécule).

Donc nous avons

$$\frac{M}{N \cdot \rho} (\rho - \rho_s) \cdot \omega^2 \cdot r = \frac{R.T.}{N.D.} \cdot \frac{dr}{dt}$$

$$(1) \quad M = \left(\frac{R.T.}{D} \cdot \frac{1}{1 - \frac{\rho_s}{\rho}} \right) \cdot \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 \cdot r}$$

Pour une macromolécule donnée, le facteur $\frac{R.T.}{D} \cdot \frac{1}{1 - \frac{\rho_s}{\rho}}$

est constant, et par conséquent, le terme $\frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 \cdot r}$ doit être constant.

Ce rapport entre vitesse et accélération, caractéristique de la macromolécule considérée, est appelé constante de sédimentation. Elle est exprimée en unités SVEDBERG.

$$S = \frac{M}{\frac{R.T.}{D} \cdot \frac{1}{1 - \frac{\rho_s}{\rho}}}$$

1 SVEDBERG = 10^{-13} seconde

III - OBSERVATION DE LA SEDIMENTATION

L'ultracentrifugation analytique BECKMAN (modèle E) possède deux systèmes optiques différents.

A - Le système en lumière visible

Ce système permet de visualiser directement le déplacement du soluté. Il est fondé sur le fait que tout rayon lumineux du visible passant à travers le soluté ou à travers le solvant n'est pas dévié, mais qu'au contraire, tout rayon traversant le gradient de concentration $\frac{dc}{dr}$, qui forme une frontière $\frac{dn}{dr}$ (gradient d'indice), est dévié. La déviation, latérale, est rendue verticale par l'analyseur de Schlieren (fente inclinée), et accentuée par une lentille semi-cylindrique.

En mesurant le déplacement du pic à différents temps (sur des photographies prises à des intervalles de temps déterminés), on peut déduire la vitesse de sédimentation du soluté, la vitesse de rotation du rotor étant fixée.

B - Le système en lumière ultra-violette

Ce système permet de travailler sur de plus faibles quantités de substance, à condition évidemment que celle-ci absorbe en lumière ultra-violette.

L'observation ne peut plus être faite directement, mais uniquement sur les plaques photographiques.

IV - METHODE DE CALCUL

A - Calcul de la constante de sédimentation

La valeur de la constante de sédimentation est déduite à partir de la pente de la courbe donnant $\log r$ en fonction du temps. En effet, de la définition même de $S = \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 r}$, on tire, par l'intégration :

$$\log r = \omega^2 \cdot S \cdot t + \text{constante}$$

La valeur de r est déduite des mesures effectuées directement sur les photographies avec une très grande précision. Nous utilisons le lecteur de profil bidimensionnel NIKON qui permet une précision du millièmètre de millièmètre.

B - Conversion aux conditions standard

La vitesse de sédimentation d'une macromolécule dépend non seulement de sa taille, mais également de la viscosité (η) et de la densité du milieu solvant (voir l'équation 1). Afin d'obtenir des valeurs comparables, il convient de se placer dans les conditions standard. Habituellement, la centrifugation est réalisée à la température de 20° C et dans l'eau. Dans ces conditions, la valeur de la constante de sédimentation est appelée $S_{20,w}$.

Cependant, il n'est pas nécessaire d'effectuer la sédimentation dans ces conditions, car on peut corriger une valeur déterminée dans d'autres conditions par l'équation :

$$(2) \quad S_{20,w} = S_{T,sol} \underbrace{\frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}}}_{(a)} \times \underbrace{\frac{\eta_{T,sol}}{\eta_{T,w}}}_{(b)} \times \underbrace{\frac{(1 - \bar{v}\rho)_{20,w}}{(1 - \bar{v}\rho)_{T,sol}}}_{(c)}$$

- le premier terme (a) corrige la variation de la viscosité de l'eau en fonction de la température.
- le deuxième terme (b) corrige la variation de la viscosité du solvant en fonction de la viscosité de l'eau à la même température.
- le troisième terme (c) apporte une correction due à la poussée d'Archimède en fonction de la température et de la nature du solvant.

Les valeurs de viscosité et de densité du solvant sont données dans des tables (Méthode d'ultracentrifugation analytique, HANS-GEORG-ELIAS-Edition diffusion par BECKMAN).

La température à laquelle est effectuée l'ultracentrifugation doit être maintenue constante tout au long de l'expérience. Le contrôle de la température est réalisé par le R.T.I.C. (Rotor Temperature Indicating and Control unit) préalablement étalonné.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN R.J.L. ; Biochem. J., 1940, 34, 858 (223, 234, 333)
- ALLFREY V.G. ; Exptl. Cell. Res., Suppl. 9, 1963, 183 (356)
- ALLFREY V.G. et MIRSKY A.E. ; Arch. Intern. Phys. Biochem., 1962, 70, 14 (270)
- ALLFREY V.G., MIRSKY A.E. et OSAWA S. ; J. Gen. Physiol., 1957, 40, 451
(286, 287)
- ARION V.Y. et GEORGIEV G.P. ; Doklady Acad. Nauk SSSR, 1967, 172, 216 (306)
- ARNESEN K., GOLDSMITH Y. et DULANEY A.D. ; Cancer Res., 1949, 9, 669 (269)
- BACH M.K. et JOHNSON H.G. ; Nature, 1966, 209, 893 (298, 332)
- BEAUVEN G.H., HOLIDAY E.R. et JOHNSON E.A. ; in "The Nucleic Acids", CHARGAFF E. et DAVIDSON J.N. ed., Acad. Press, 1955, New-York, 1, 493
- BELTSINA N.V., AJTKHOZHIN M.A., GRAVILOVA L.P. et SPIRIN A.S. ;
Biokhimiya, 1964, 29, 363 (57, 101)
- BERNHARD W. ; Nature, 1970, 225, 226 (5)
- BERNHARD W. ; J. Ultrastruct. Res., 1969, 27, 250 (25)
- BEZDEK M. et SKALKKA M. ; Experientia, 1963, 19, 12 (315)
- BILLING R.J., INGLIS A.M. et SMELLIE R.M.S. ; Biochem. J., 1969, 113, 54 (308)
- BOULANGER P. et MONTREUIL J. ; Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 791 (213,
219, 231)
- BOULANGER P. et MONTREUIL J. ; Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 619 (199, 227,
239, 297)
- BRAY G.A. ; Anal. Biochem., 1960, 1, 279 (238, 349)
- BUTLER J.A.V. et GODSON G.N. ; Nature, 1964, 201, 876 (299)
- CALVERY H.O. et JONES W. ; J. Biol. Chem., 1927, 73, 73 (212)
- CARTOUZOU G., ATTALI J.C. et LISSITZKY S. ; European J. Biochem., 1968, 4,
41 (76)
- CARTOUZOU G., POIRÉE J.C. et LISSITZKY S. ; European J. Biochem., 1969, 8,
357 (40, 48, 69, 90, 116, 161)
- CHARGAFF E. ; in "The Nucleic Acids", CHARGAFF E. et DAVIDSON J.N. ed.,
Acad. Press, New-York, 1955, 1, 513 (240, 241)
- CHAUVEAU J. ; C.R. Acad. Sci., 1962, 235, 902 (253, 261, 266, 275, 285, 291,
292, 296, 303, 337)
- CHAUVEAU J., MOULÉ Y. et ROUILLER C. ; Exptl. Cell Res., 1956, 11, 317
(42, 171, 253, 260, 261, 266, 275, 285, 291, 292, 296, 303, 337)

- CLAUDE A. ; Harvey Lectures, série 43, 1950 (251)
- COCITO C. et LADURON P. ; Anal. Biochem., 1964, 7, 429 (218)
- COX R.A. et ARNSTEIN H.R.V. ; Biochem. J., 1963, 89, 574 (201, 204, 228)
- DARNELL J.E. ; Bacteriol. Rev., 1968, 32, 262 (14)
- DAVIDSON J.N. et SMELLIE R.M.S. ; Biochem. J., 1952, 52, 594 (222, 235, 293)
- DERUMEZ P. ; C.R. Acad. Sci., 1964, 259, 1909 (249, 322)
- DERUMEZ P. ; "Etudes sur la composition et le métabolisme des Acides ribonucléiques des Tissus de Rat", Thèse de Doctorat ès Sciences, Faculté des Sciences, Université de Lille, 1966 (197, 214, 215, 217, 220, 221, 232, 244)
- DOLY J., LEDIG M. et MANDEL P. ; Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 449 (208)
- DREWS J., BRAWERMAN G. et MORRIS H.P. ; European J. Biochem., 1968, 3, 284 (307)
- ELSON D. et CHARGAFF E. ; Phosphorus Metabolism, 1952, 2, 329 (246)
- ESTABLE C. et SOTELO J.R. ; Inst. Invest. Cienc. Biol., 1951, 1, 105 (1)
- FAIFERMAN I., HAMILTON M.G. et POGO A.O. ; Biochim. Biophys. Acta, 1970, 204, 550 (43, 49)
- FLORENDO N.T. et FOSTER L.B. ; J. Ultrastruct. Res., 1970, 30, 1 (53)
- FONNESU A. et SEVERI C. ; Brit. J. Exptl. Pathol., 1953, 34, 341 (280)
- GEORGIEV G.P. ; in "Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in Mammalian Cells", SAN PIETRO A. ed., Acad. Press, New-York, 1968, 25 (166, 167, 358)
- GEORGIEV G.P., SAMARINA O.P., LERMAN M.I., SMIRKOV M.N. et SEVERTZOV A.N. ; Nature, 1963, 200, 1291 (300, 314, 320, 331)
- GEUSKENS M. et BERNHARD W. ; Exptl. Cell Res., 1966, 44, 579 (4)
- GIRARD M. et BALTIMORE D. ; Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 1966, 56, 999 (123)
- GIRARD M., LATHAM H., PENMAN S. et DARNELL J.E. ; J. Mol. Biol., 1965, 11, 187 (17)
- GOLDBLATT P.J., SULLIVAN R.J. et FARBER E. ; Cancer Res., 1969, 29, 124 (346)
- GOOD N.E., WINGET G.D., WINTER W., CONNOLLY T.N., IZAWA S. et SINGH R.M.M. ; Biochemistry, 1966, 5, 467 (68)
- GRANBOULAN N. et BERNHARD W. ; C.R. Soc. Biol., 1961, 155, 1967 (18)
- GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P. ; Exptl. Cell Res., 1965, 38, 64 (2)
- HARMAN J.W. et FEIGELSON M. ; Exptl. Cell Res., 1952, 3, 58 (278)
- HARRIS H. ; Nature, 1964, 202, 249 (304)
- HENSHAW E.C. ; J. Mol. Biol., 1968, 36, 401 (71)
- HENSHAW E.C. et LOEBENSTEIN J. ; Biochim. Biophys. Acta, 1970, 199, 405 (70, 93, 117)

- HENSHAW E.C., REVEL M. et HIATT H.H. ; J. Mol. Biol., 1965, 14, 241 (60, 83)
- HEYWOOD S.M. ; Nature, 1970, 225, 696 (97)
- HOGEBOOM G.H. et SCHNEIDER W.C. ; in "The Nucleic Acids", CHARGAFF E. ed., Acad. Press, New-York, 1955 (256, 279)
- HOGEBOOM G.H., SCHNEIDER W.C. et PALADE G.E. ; J. Biol. Chem., 1948, 172, 619 (256, 265)
- HOGEBOOM G.H., SCHNEIDER W.C. et STRIEBICH M.J. ; J. Biol. Chem., 1952, 196, 111 (256, 259, 264)
- HOLDER J.W. et LINGREL J.B. ; Biochim. Biophys. Acta, 1970, 204, 210 (100)
- HOTTA Y. et OSAWA S. ; Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 642 (247)
- HYMER W.C. et KUFF E.L. ; J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 359 (336, 338, 340, 348)
- INFANTE A.A. et NEMER M. ; J. Mol. Biol., 1968, 32, 543 (109)
- ISHIKAWA K., KURODA C. et OGATA K. ; Biochim. Biophys. Acta, 1969, 179, 316 (39, 188, 189, 190, 191)
- ISHIKAWA K., KURODA C. et OGATA K. ; Biochim. Biophys. Acta, 1970, 213, 505 (193)
- ISHIKAWA K., KURODA C., UEKI M. et OGATA K. ; Biochim. Biophys. Acta, 1970, 213, 495 (192, 194)
- ISHIKAWA K., UEKI M., NAGAI K. et OGATA K., ; Biochim. Biophys. Acta, 1970, 213, 542 (195)
- IZAWA M. et KAWASHIMA K. ; Biochim. Biophys. Acta, 1968, 155, 51 (7)
- IZAWA M. et KAWASHIMA K. ; Biochim. Biophys. Acta, 1969, 174, 124 (8)
- JOKLIK W.K. et BECKER Y. ; J. Mol. Biol., 1965, 13, 511 (58, 81)
- KAFATOS F.C. ; Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1968, 59, 1251 (66, 88, 115)
- KAY E.R.M., SMELLIE R.M.S., HUMPHREY G.F. et DAVIDSON J.N. ; Biochem. J., 1956, 62, 160 (255, 272, 273, 289)
- KEMPF J. et MANDEL P. ; C.R. Soc. Biol., 1969, 163, 2723 (73, 91)
- KEMPF J., POPOVIC D. et MANDEL P. ; FEBS Letters, 1970, 9, 141 (75)
- KEMPF J., ZAHND J.P. et MANDEL P. ; European J. Biochem., 1970, 17, 124 (74, 92)
- KIDSON C., KIRBY K.S. et RALPH R.K. ; J. Mol. Biol., 1963, 7, 312 et Cancer Res., 1964, 24, 1604 (313)
- KIMURA K., TOMODA J. et SIBATANI A. ; Biochim. Biophys. Acta, 1965, 108, 540 (329)
- KIT S. ; Arch. Biochem. Biophys., 1960, 88, 1 (243, 248)
- KITAZUME Y. et YCAS M. ; Biochim. Biophys. Acta, 1963, 73, 391 (176, 225, 311)

- KLEINSCHMIDT W.J. et MANTHEY J.A. ; Arch. Biochem. Biophys., 1958, 73, 52
(216, 242)
- KLEINSCHMIDT A.K. et ZAHN R.K. ; Z. Naturforsch., 1959, 14 b, 730 (335)
- KÖHLER K. et ARENDS S. ; C.R. Acad. Sci., 1968, 266, 170 (35)
- KÖHLER K. et ARENDS S. ; European J. Biochem., 1968, 5, 500 (36, 46)
- KRICHEVSKAJA A.A. et GEORGIEV G.P. ; Biochim. Biophys. Acta, 1969, 194,
619 (154, 157)
- LARSEN C.J., GALIBERT F., LELONG J.C. et BOIRON M. ; C.R. Acad. Sci., 1967,
264, 1523 (179)
- LEBLEU B., MARBAIX G., WERENNE J., BURNY A. et HUEZ G. ; Biochem. Biophys.
Res. Commun., 1970, 40, 731 (98)
- LEVENE P.A. ; J. Biol. Chem., 1918, 33, 425 et 1919, 40, 415 (211)
- LIAU M.C. et PERRY R.P. ; J. Cell Biol., 1968, 39, 81 a (11)
- LIAU M.C. et PERRY R.P. ; J. Cell Biol., 1969, 42, 272 (12, 13, 351)
- MANO Y. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 25, 216 (120)
- MARINOZZI V. ; J. Ultrastruct. Res., 1964, 10, 433 (3)
- MARSHAK A. ; J. Gen. Physiol., 1941, 25, 275 (268)
- MARSHAK A. ; J. Biol. Chem., 1951, 189, 607 (245)
- Mc CONKEY E.H. et HOPKINS J.W. ; J. Mol. Biol., 1965, 14, 257 (59, 82)
- MIRSKY A.E. ; Proc. 3 rd Int. Cong. Biochem. BRUSSEL, 1955, Acad. Press ed.,
New-York, 1956, 349 (283)
- MIRSKY A.E. et POLLISTER A.W. ; J. Gen. Physiol., 1946, 30, 101 et 117
(254, 267, 274, 276)
- MIRSKY A.E. et RIS H. ; J. Gen. Physiol., 1951, 34, 475 (30)
- MOLNAR J., SAMARINA O.P. et GEORGIEV G.P. ; Mol. Biologiya (U.S.S.R.), 1968,
2, 795 (153, 170)
- MONNERON A. et BERNHARD W. ; J. Ultrastruct. Res., 1969, 27, 266 (22, 24)
- MONNERON A. et MOULÉ Y. ; Exptl. Cell Res., 1968, 51, 531 (20, 185, 342)
- MONROY A., MAGGIO R. et RINALDI A.M. ; Proc. Natl Acad. Sci., Wash., 1965,
54, 107 (119)
- MONTREUIL J., et BOULANGER P. ; C.R. Acad. Sci., 1950, 231, 247 (230)
- MONTREUIL J. et BOULANGER P. ; C.R. Acad. Sci., 1954, 239, 367 (207)
- MONTREUIL J., DERUMEZ P. et BOULANGER P. ; C.R. Acad. Sci., 1962, 254, 4516
(209)
- MONTREUIL J., DUPONT A., DEMAILLE A. et DRIESSENS J. ; C.R. Soc. Biol., 1960,
154, 1229 (252, 258, 262, 277)

- MONTREUIL J., DUPONT A., DEMAILLE A. et DRIESSENS J. ; C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 2079 (252, 258, 262)
- MORIYAMA A., MITSUHASHI M., OHTSUKA H., OHMURA S. et MIURA Y. ; J. Biochem., 1963, 54, 81 (31)
- MOULÉ Y., ANDRIEU A. et SARASIN A. ; Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1139 (178, 181, 182, 183, 187)
- MOULÉ Y. et CHAUVEAU J. ; C.R. Acad. Sci., 1966, 263, 75 (33, 171, 173)
- MOULÉ Y. et CHAUVEAU J. ; J. Mol. Biol., 1968, 33, 465 (174, 177)
- MUNRO A.J. et KORNER A. ; Nature, 1964, 201, 1194 (316, 321)
- NAONO S., ROUVIERE J. et GROS F. ; Biochim. Biophys. Acta, 1966, 129, 271 (95)
- NEYFAKH A.A. ; Zh. Obshch. Biol., 1959, 20, 202 et Nature, 1964, 201, 881 (121)
- NIESSING J. et SEKERIS C.E. ; Biochim. Biophys. Acta, 1970, 209, 484 (168)
- NOLL H. ; Proc. 19 th An. Symp. Canc. Res., University of Texas, March 1965 (301, 330)
- ODINTSOVA M.S., BRUSKOV V.I. et GOLUBEVA E.V. ; Biokhimija, 1967, 32, 1047 (52)
- OLSNES S. ; European J. Biochem., 1970, 15, 464 (78)
- OTJUKA H. et TERAYAMA H. ; J. Biochem., 1964, 56, 572 (324)
- OVCHINNIKOV L.P., AJTKHOZHIN M.A., BYSTROVA T.F. et SPIRIN A.S. ; Molekul. Biol. (U.S.S.R.), 1969, 3, 449 (105, 108)
- OVCHINNIKOV L.P. et AVANESOV A.C. ; Molekul. Biol. (U.S.S.R.), 1969, 3, n° 5 (128)
- OVCHINNIKOV L.P., AVANESOV A.C. et SPIRIN A.S. ; Molekul. Biol. (U.S.S.R.), 1969, 3, 465 (125, 127)
- OVCHINNIKOV L.P., BYSTROVA T.F. et SPIRIN A.S. ; Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1969, 185, 210 (110)
- OVCHINNIKOV L.P., VORONINA A.S., STEPANOV A.S., BELITSINA N.V. et SPIRIN A.S. ; Molekul. Biol. (U.S.S.R.), 1968, 2, 752 (124, 126)
- PARSONS J.T. et Mc CARTHY K.S. ; J. Biol. Chem., 1968, 243, 5377 (38, 47)
- PENMAN S., SMITH I. et HOLTZMAN E. ; Science, 1966, 154, 786 (28)
- PERRY R.P. ; Natl. Cancer Inst. Monograph, 1965, 18, 325 (16)
- PERRY R.P. ; in "Handbook of Molecular Cytology", LIMA-DE-FARIA A. ed., 1969, 620 (26)
- PERRY R.P., CHENG T.Y., FREED J.J., GREENBERG J.R., KELLEY D.E. et TARTOF K.D. ; Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1970, 65, 609 (15)
- PERRY R.P. et KELLEY D.E. ; J. Mol. Biol., 1968, 35, 37 (62, 87, 114)
- PETERMANN M.L. ; in "The Physical and Chemical Properties of Ribosomes", ELSEVIER ed., New-York, 1964 (54)

- QUIRIN-STRICKER C. et MANDEL P. ; FEBS Letters, 1969, 2, 230 (67, 89)
- REVEL M. et GROS F. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27, 12 (96)
- REYNOLDS E.S. ; J. Cell Biol., 1963, 17, 208 (295)
- RISTOW H. et KÖHLER K. ; Biochim. Biophys. Acta, 1967, 142, 65 (61, 84)
- ROODYN D.B. ; Intern. Rev. Cytol., 1959, 8, 279 ; Biochem. J., 1962, 83, 29
et in "Methods of Separation of Subcellular Structural Components,
Cambridge Univ. Press, 1963, 20 (284, 290)
- ROTH J.S. ; J. Biol. Chem., 1958, 231, 1085 (343)
- ROUILLER C. ; Intern. Rev. Cytol., 1960, 9, 277 (257)
- SADOWSKI P.D. et HOWDEN J.A. ; J. Cell Biol., 1968, 37, 163 (34, 45, 160,
339)
- SAMARINA O.P., ASRIYAN I.S. et GEORGIEV G.P. ; Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1965,
163, 1510 (32, 130, 131, 148)
- SAMARINA O.P., KRICHEVSKAYA A.A. et GEORGIEV G.P. ; Nature, 1966, 210, 1319
(37, 132)
- SAMARINA O.P., KRICHEVSKAJA A.A., MOLNAR J., BRUSKOV V.I. et GEORGIEV G.P. ;
Mol. Biol. (U.S.S.R.), 1967, 1, 129 (133, 149)
- SAMARINA O.P., LUKANIDIN E.M. et GEORGIEV G.P. ; Biochim. Biophys. Acta,
1967, 142, 561 (41, 65, 134, 136, 138, 140)
- SAMARINA O.P., LUKANIDIN E.M., MOLNAR J. et GEORGIEV G.P. ; J. Mol. Biol.,
1968, 33, 251 (135, 137, 139, 141, 143, 144, 146, 150, 152, 158, 159,
163, 164, 169, 186)
- SAMARINA O.P., MOLNAR J., LUKANIDIN E.M., BRUSKOV V.I., KRICHEVSKAYA A.A.
et GEORGIEV G.P. ; J. Mol. Biol., 1967, 27, 187 (145)
- SAMARINA O.P. et ZBARSKII J.B. ; Biokhimiya, 1964, 29, 321 (323, 328)
- SAMEC J., JACOB M. et MANDEL P. ; Biochim. Biophys. Acta, 1968, 161, 377
(64, 86)
- SAMEC J., MANDEL P. et JACOB M. ; J. Neurochem., 1967, 14, 887 (63, 85)
- SARASIN A. ; FEBS Letters, 1969, 4, 327 (184)
- SCHERRER K., MARCAUD L., ZAJDELA F., BRECKENBRIDGE B. et GROS F. ; Bull.
Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 1037 (165, 250)
- SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.J. ; J. Biol. Chem., 1945, 161, 83 (198, 205, 226)
- SCHNEIDER W.C. et HOGEBOM G.H. ; J. Biol. Chem., 1950, 183, 123 (263)
- SCHNEIDER R.M. et PETERMANN M.L. ; Cancer Res., 1950, 10, 751 (267)
- SCHOLTISSEK C. ; Z. Naturforsch., 1960, 15 b, 453 et Angew. Chem., 1964,
76, n° 21 (281)
- SCHOLTISSEK C. ; Nature, 1962, 194, 353 (281)
- SCHÜTZ G., GALLWITZ D. et SEKERIS C.E. ; European J. Biochem., 1968, 4, 149
(326)
- SHANKAR NARAJAN K. et BIRNSTIEL M.L. ; Biochim. Biophys. Acta, 1969, 190,
470 (10)

- SHAPIRO A.L., VINUEVA E. et MAIZEL I.V. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 28, 815 (156)
- SHEARER R.W. et Mc CARTHY B.J. ; Biochemistry, 1967, 6, 283 (305)
- SHELTON E. et KUFF E.L. ; J. Mol. Biol., 1966, 22, 23 (345, 347, 353, 354)
- SIBATANI A., YAMANA K., KIMURA K. et OKAGAKI H. ; Biochim. Biophys. Acta, 1959, 33, 590 (312, 327)
- SIBATANI A., YAMANA K., KIMURA K. et TAKAHASHI T. ; Nature, 1960, 186, 215 (312, 327)
- SINGHAL R.P. ; "Recherches sur les procédés d'étude de la composition et de la structure primaire des acides ribonucléiques", Thèse de Doctorat ès Sciences, Faculté des Sciences, Université de Lille, 1967 (200, 202, 203, 206, 229)
- SIRAKOV L.M. et KOCHAKIAN C.D. ; Biochim. Biophys. Acta, 1969, 195, 572 (344)
- SMELLIE R.M.S., Mc INDOE W.M., LOGAN R., DAVIDSON J.N. et DANSON I.M. ; Biochem. J., 1953, 54, 280 (288)
- SOEIRO R. et DARNELL J.E. ; J. Cell Biol., 1970, 44, 467 (309)
- SÖRENSEN N.A. ; Biochem. Z., 1909, 22, 352 (294)
- SPIRIN A.S. ; in "Progress in Nucleic Acid Research", Acad. Press, New-York, 1963, 1, 301 (151)
- SPIRIN A.S. ; in "Current Topics in Developmental Biology", MOSCONA A.A. et MONROY A.ed., Acad. Press, New-York, 1966, 1, 1 (118)
- SPIRIN A.S. ; European J. Biochem. 1969, 10, 20 (72, 77, 107, 111, 122, 129)
- SPIRIN A.S., BELITSINA N.V. et AJTKHOZHIN M.A. ; Zh. Obshch. Biol., 1964, 25, 321 et Federation Proc., 1965, 24, T 907 (102, 104, 113)
- SPIRIN A.S., BELITSINA N.V. et LERMAN M.I. ; J. Mol. Biol., 1965, 14, 611 (103, 142)
- SPIRIN A.S. et GRAVILOVA L.P. ; in "The ribosome", SPRINGER-VERLAG, BERLIN-HEIDELBERG, NEW-YORK, 1969 (55, 56)
- SPIRIN A.S. et NEMER M. ; Science, 1965, 150, 214 (106, 112)
- SPOHR G., GRANBOULAN N., MOREL C. et SCHERRER K. ; European J. Biochem. 1970, 17, 296 (79, 80, 196)
- STERN H. et MIRSKY A.E. ; J. Gen. Physiol., 1953, 37, 177 (282)
- STEVENIN J., MANDEL P. et JACOB M. ; Bull. Soc. Chim. Biol., 1970, 52, 703 (44, 50, 162, 359)
- TASHIRO Y. et SIEKEVITZ N.P. ; J. Mol. Biol., 1965, 11, 149 (357)

- TERAO K. et OGATA K. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 38, 80 (99)
- TSANEV R.G., DESSEV G.N. et MARKOV G.G. ; Life Sciences, 1966, 5, 987 (325)
- VAUGHAN M.H., WARNER J.R. et DARNELL J.E. ; J. Mol. Biol., 1967, 25, 235 (27)
- VINOGRAD J. et HEARST J.E. ; Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe, 1962, 20,
372 (350)
- WANG T.Y. ; Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 108 et 180 ; 1961, 53, 158
et 1964, 87, 141 (302)
- WANG T.Y. ; Exptl. Cell Res., Suppl. 9, 1963, 213 (29, 355)
- WARNER J.R. et SOEIRO R. ; Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 1967, 58, 1984 (6)
- WATSON M.L. ; J. Cell Biol., 1962, 13, 162 (21)
- WATSON M.L. ; J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 96 (19, 23)
- WEINBERG R. et PENMAN S. ; J. Mol. Biol., 1968, 38, 289 (180)
- YAMANA K. et SIBATANI A. ; Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, 295 (318)
- YCAS M. et VINCENT W.S. ; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1960, 46, 804
(9, 51, 94, 147, 175, 210, 224, 237, 310, 317, 334, 352)
- ZAMENIK P.C. et KELLER E.B. ; J. Biol. Chem., 1954, 209, 337 (271, 341)