

50376
1972
109

50376
1972
109

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

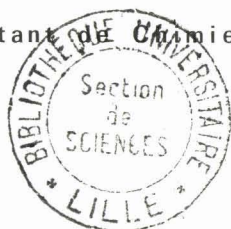
pour obtenir

le titre de Docteur de Troisième Cycle en Biochimie

par

Alain SERGEANT

Assistant de  Biologique



ETUDES DES COMPLEXES DNA-RNA DANS

DES CELLULES DE MAMMIFERES . ISOLEMENT,

IDENTIFICATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Membres du Jury : MM. J. MONTREUIL, Président
J. GUILLAUME, Examineur
J. KREMBEL, Examineur
V. KRSMANOVIC, Rapporteur

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

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

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



030 023380 4

A Bora, en gage de
notre sincère amitié.

Nous exprimons nos vifs remerciements :

- à Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL qui nous a permis de réaliser ce travail dans son Laboratoire,
- à Monsieur le Professeur Maurice ERRERA qui nous a fait l'honneur d'accepter notre collaboration,
- à Messieurs A. VERBERT et S. DESREUMAUX, pour leur participation efficace dans ce travail d'équipe.

Nous tenons aussi à remercier :

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

ABREVIATIONS UTILISEES

°	
Å	Angström = 10^{-10} mètre
DNA	Acide désoxyribonucléique
RNA	Acide ribonucléique
mRNA	Acide ribonucléique messenger
D RNA	Acide ribonucléique "DNA-like".
mI-RNA	Acide ribonucléique "messenger-like".
tRNA	Acide ribonucléique de transfert
rRNA	Acide ribonucléique ribosomique
c.p.m.	Coups par minute
dN	Désoxyribonucléoside (dA-dC-dG-dT)
DNase	Désoxyribonucléase
D.O. 260 nm	Densité optique à 260 nanomètres
E.D.T.A.	Acide éthylène diamine tétraacétique
mCi	10^{-3} curie = $222 \cdot 10^7$ désintégrations par minute.
NMP	Nucléoside monophosphate (AMP-CMP-GMP-UMP)
NTP ou pppN	Nucléoside 5'-triphosphate (ATP-CPT-GTP-UTP)
nm	nanomètre = 10^{-9} mètre
Pi	Acide orthophosphorique (phosphore inorganique)
PPi	Groupelement pyrophosphate
pppNp ou pppXp	Nucléoside 5'-diphosphate-3'-monophosphate
ppppA	Adénosine 5'-tétraphosphate
PES	Polyéthylène sulfonate d'ammonium
RNase P	Ribonucléase pancréatique (E.C. 2.7.7.16).
SDS	Dodécylsulfonate de sodium

SSC	"Standart Saline Citrate" = 0,15 M en NaCl et 0,015 M en citrate trisodique (forme ionique ≠ 0,24)
S	Constante de sédimentation en unité SVEDBERG (10^{-13} sec)
t/mn	Tours par minute
Tris	Amino-2-hydroxyméthyl-2-propanidiol 1,3
uCi	10^{-6} curie
µg	10^{-6} gramme

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1

GENERALITES

6

MECANISME ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DU DNA
PAR LA RNA POLYMERASE

7

I - <u>PROCESSUS GENERAL DE TRANSCRIPTION DU GENOME EN RNA</u>	7
A - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA RNA POLYMERASE</u>	8
1 - <u>LA RNA POLYMERASE D'E.COLI</u>	8
a - <u>Observation au microscope électronique</u>	8
b - <u>Structure quaternaire</u>	12
c - <u>Constante de sédimentation</u>	13
2 - <u>LA RNA POLYMERASE DES EUCARYOTES</u>	13
B - <u>FIXATION DE L'ENZYME SUR LE DNA</u>	15
1 - <u>FORMATION DU COMPLEXE DNA-RNA POLYMERASE</u>	15
a - <u>Attachement de l'enzyme sur les séquences spécifiques du DNA</u>	15
b - <u>Influence des histones</u>	17
c - <u>Intervention du facteur "sigma"</u>	17
2 - <u>STABILITE DU COMPLEXE BINAIRE DNA-RNA POLYMERASE</u>	19

II - <u>EUCARYOTES</u>	34
III - <u>CONCLUSIONS</u>	36
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> TRAVAUX PERSONNELS </div>	38
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> MATERIEL ET METHODES </div>	39
I - <u>MARQUAGE METABOLIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES PAR DES PRECUR- SEURS RADIOACTIFS</u>	39
A - <u>MARQUAGE DES CELLULES EN CULTURE</u>	39
B - <u>MARQUAGE DES HEPATOCYTES DE RAT</u>	40
II - <u>ISOLEMENT DES NOYAUX DE FOIE DE RAT</u>	40
III - <u>EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	41
A - <u>EXTRACTION DES COMPLEXES DNA-RNA</u>	41
1 - <u>EXTRACTION PAR LE MELANGE SDS/CHLOROFORME/ALCOOL ISOAMYLIQUE</u>	41
2 - <u>EXTRACTION PAR LE MELANGE SARCOSINATE DE SODIUM/PONASE</u>	41
B - <u>EXTRACTION DES RNA CYTOPLASMIQUES SELON LA METHODE DE BERGERON ET COLL. (182)</u>	42
IV - <u>FRACTIONNEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	
A - <u>SEDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITE DE SULFATE DE CAESIUM</u>	

B - <u>SEDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITE DE SUCROSE</u>	44
V - <u>TRAITEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	44
A - <u>LECTURE DE LA DENSITE OPTIQUE</u>	44
B - <u>ACTION DES ALCALIS</u>	45
C - <u>DIGESTIONS ENZYMATIQUES</u>	45
1 - <u>LA RIBONUCLEASE (RNase)</u>	45
2 - <u>LA DEOXYRIBONUCLEASE (DNase I)</u>	45
3 - <u>LA PRONASE</u>	45
D - <u>DENATURATION DU COMPLEXE PAR LA CHALEUR ET PAR LA FORMAMIDE</u>	46
E - <u>DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE</u>	46
VI - <u>SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES RIBONUCLEOTIDES</u>	47
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin: 10px 0;">RESULTATS</div>	
I - <u>IDENTIFICATION DES COMPLEXES DNA-RNA DANS LES NOYAUX DES HEPATOCYTES DE RAT</u>	48
A - <u>ISOLEMENT DE FRACTIONS CONTENANT LE DNA ET LE RNA</u>	48
B - <u>MISE EN EVIDENCE DE L'ASSOCIATION DNA-RNA</u>	49
1 - <u>ACTION DE LA POTASSE ET DE LA RIBONUCLEASE</u>	49
2 - <u>ACTION DE LA DNase I</u>	49
3 - <u>DETACHEMENT DU RNA PAR DENATURATION THERMIQUE</u>	55
C - <u>CONCLUSIONS</u>	63

<u>II - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES DNA-RNA</u> <u>DANS LES CELLULES D'EUCARYOTES</u>	63
A - <u>COMPOSITION NUCLEOTIDIQUE DU RNA ASSOCIE AU DNA</u>	63
B - <u>ETUDE DE L'EXTREMITE 5' DU RNA ASSOCIE AU DNA</u>	63
1 - <u>Recherche de composés de type pppNp dans les hydrolysats alcalins du complexe extrait des noyaux d'hépatocytes de Rat</u>	66
2 - <u>Etude de l'extrémité 5' des RNA des complexes extraits des cellules Hela et KB</u>	68
3 - <u>Conclusions</u>	68
C - <u>STABILITE DU COMPLEXE DNA-RNA</u>	68
1 - <u>Complexe extrait par le mélange SDS/chloroforme/alcool isomylique</u>	73
2 - <u>Utilisation du mélange sarcosinate de sodium/pronase</u>	73
3 - <u>Conclusions</u>	78
DISCUSSION	81
CONCLUSION	87
BIBLIOGRAPHIE	87

INTRODUCTION

L'origine nucléaire de la presque totalité des RNA cytoplasmiques est actuellement définitivement démontrée. L'étude par les précurseurs radioactifs de la synthèse des RNA dans les cellules de mammifères, a révélé que la radioactivité apparaît en premier lieu dans le noyau, puis dans le cytoplasme (PERRY (1); PERRY (2); SRINIVASAN et coll. (3)).

La disparition du marquage des RNA cytoplasmiques après énucléation, consolide la thèse selon laquelle la synthèse des RNA est normalement absente dans le cytoplasme (GOLDSTEIN (4); PRESCOTT (5)). La synthèse des RNA dans les cellules de mammifères a lieu dans le nucléole pour les RNA ribosomiques (rRNA). Ce processus implique la transcription des gènes de rRNA produisant un précurseur de haut poids moléculaire : le RNA 45 S dont la transformation, par l'intermédiaire des rRNA 35 S et 18 S, fournit les rRNA 28 S et 18 S.

Les RNA messagers récepteurs et transporteurs de l'information génétique du DNA vers le lieu de la synthèse des protéines spécifiques, sont synthétisés sur la chromatine extranucléolaire et arrivent dans le cytoplasme sous la forme de particules ribonucléoprotéiques (HENSHAW et coll.)(6).

Quels sont les mécanismes intimes de la biosynthèse des polyribonucléotides ?

En 1959, WEISS et GLADSTONE isolent une préparation enzymatique des noyaux de foie de Rat ayant la propriété de catalyser in vitro l'incorporation des nucléoside-5'-monophosphates à partir des nucléoside-5'-triphosphates dans les molécules de RNA. Cette incorporation est inhibée par la DNase (WEISS)(7). Depuis, des préparations enzymatiques ayant des propriétés identiques ont été isolées de noyaux de thymus, de cellules de HeLa, de bactéries. L'enzyme responsable de la polymérisation des ribonucléotides est appelée RNA-polymérase, son activité dépend étroitement de la présence des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates, du DNA et de cations divalents (Mn^{++} et Mg^{++}). HUANG et BONNER (8) démontrent que l'enzyme de nature protidique

est fixée fortement sur le DNA formant ainsi un complexe binaire. Le produit de la réaction est un polyribonucléotide dont la séquence est entièrement déterminée par moulage sur le DNA, mettant en jeu la complémentarité des bases (GEIDUSCHEK et coll.)(9).

Parallèlement au complexe binaire DNA-RNA polymérase, il existe un complexe ternaire comportant le DNA, la RNA polymérase et le polyribonucléotide naissant. Le groupe de MILLER (10) et DAVIS et al.(11) sont parvenus à observer ces complexes ternaires au microscope électronique (voir fig. 1, p. 3 ; fig. 2, p. 4 ; fig. 3, p. 5). Ce sont l'extraction et l'étude in vivo de cette toute première étape de la transcription du DNA par la RNA polymérase qui ont fait l'objet de notre travail.

Nos efforts ont plus particulièrement portés sur l'étude des propriétés physico-chimiques des complexes naturels DNA-RNA extraits des cellules de mammifères, ceci en étroite collaboration avec A. VERBERT et sous la direction de V. KRSMANOVIC.

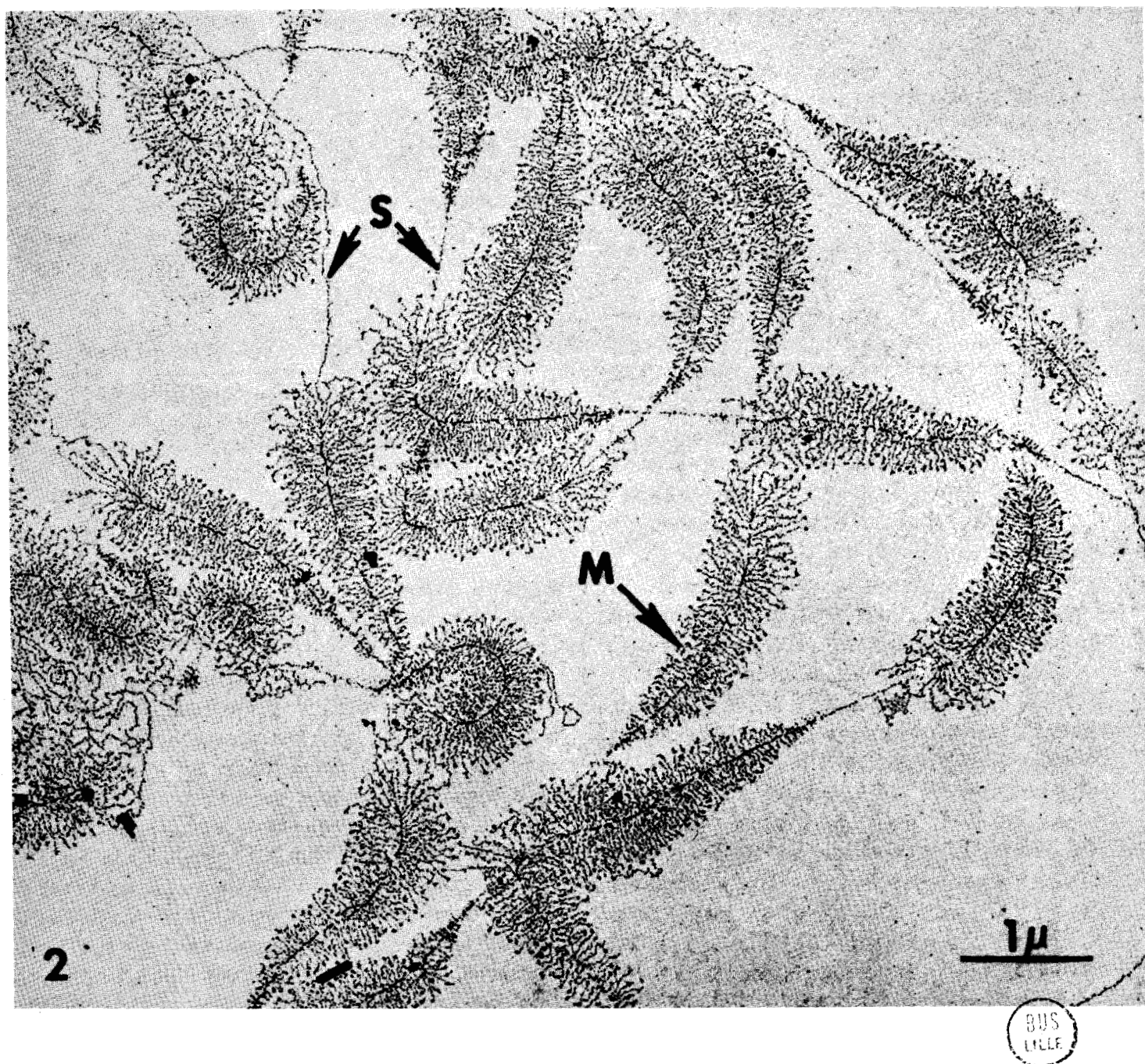
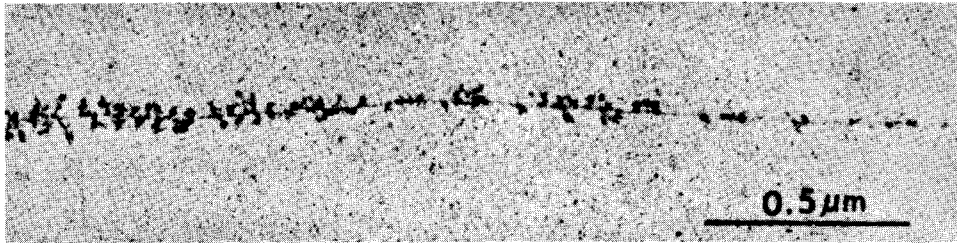
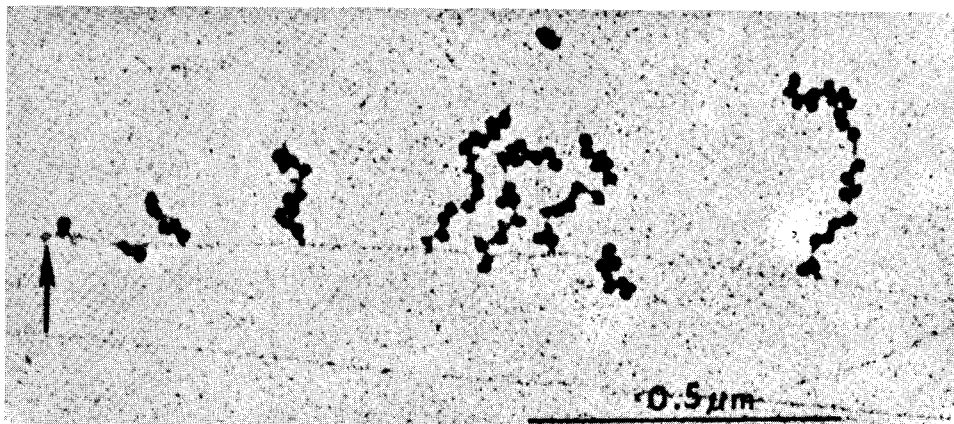


Figure n° 1 : Observation au microscope électronique des RNA en cours de synthèse, in vivo, dans les ovocytes d'amphibiens (Triturus viridescens) (MILLER et al.) (12).



a - Gènes des r-RNA (complexe DNA-RNA polymérase-r-RNA)



b - Gènes structuraux (complexe DNA-RNA polymérase-m RNA-ribosomes)



Figure n° 2 : Observation au microscope électronique de gènes d'E. coli en cours de transcription (MILLER et al.) (13).

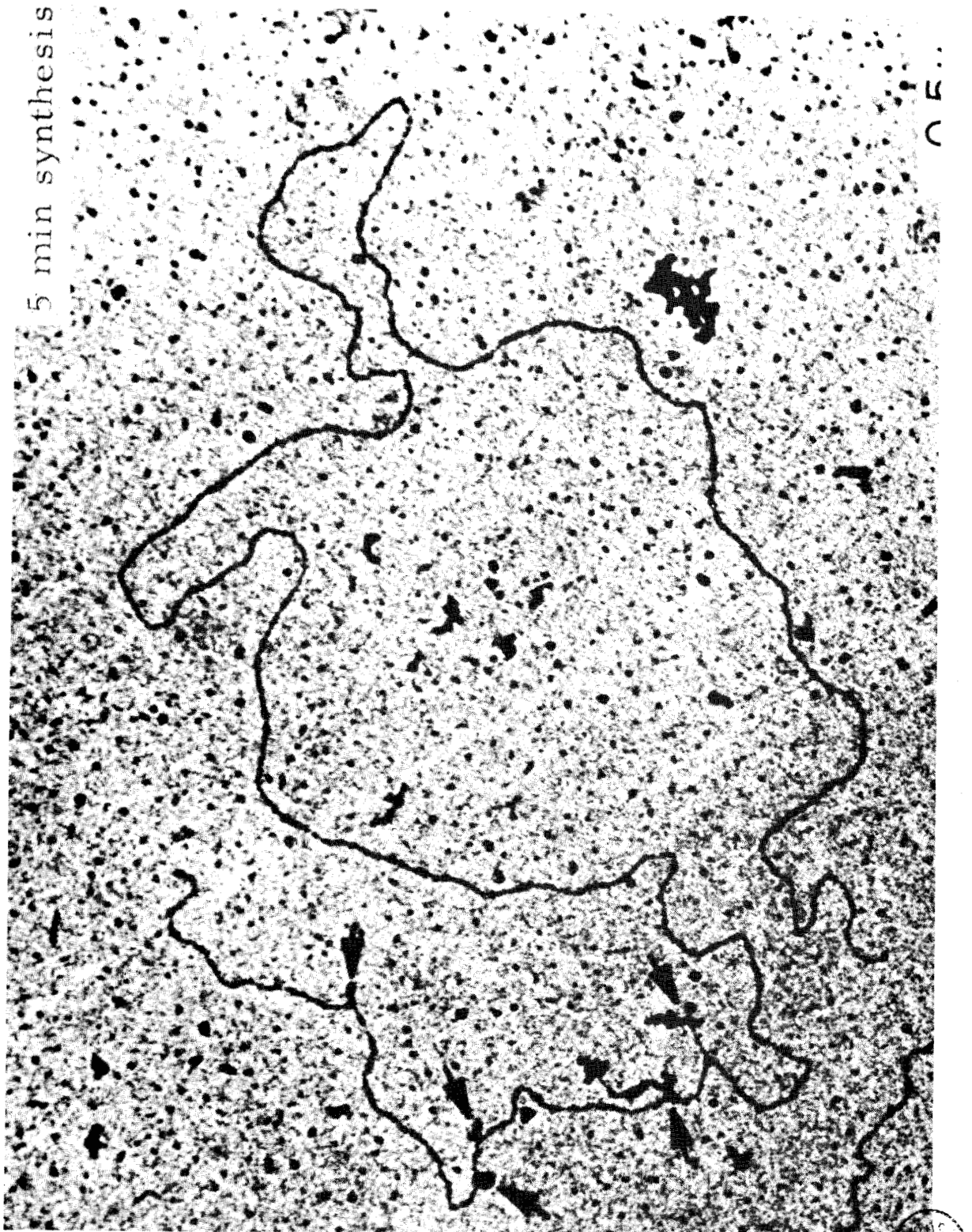


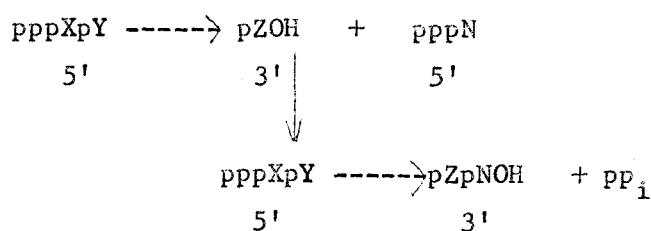
Figure n° 3 : Observation au microscope électronique de la transcription du DNA du phage T₇ (DAVIS et HYMAN)(14).

GENERALITES

MECANISME ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION
DU DNA PAR LA RNA POLYMERASE

I - PROCESSUS GENERAL DE TRANSCRIPTION DU GENOME EN RNA

Il est bien établi aujourd'hui que la synthèse des RNA dans la cellule vivante est catalysée par la RNA polymérase. Les expériences que l'on effectue in vitro avec cette enzyme en présence du DNA, des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates et des ions bivalents (Mg^{++} et Mn^{++}) permettent d'identifier la naissance de polyribonucléotides dont la synthèse est présentée par le schéma suivant (BREMER et coll.)(15).



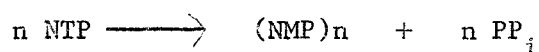
La biosynthèse des RNA se fait en plusieurs étapes :

- 1 - Fixation de la RNA polymérase sur le DNA et formation d'un complexe DNA-RNA polymérase.
- 2 - Initiation de la synthèse des chaînes de RNA.
- 3 - Déplacement de l'enzyme le long du DNA et formation d'un complexe DNA-RNA polymérase - RNA naissant.
- 4 - Arrêt de la polymérisation et libération de l'enzyme et du RNA nouvellement synthétisé.

Après avoir résumé l'état et les propriétés physico-chimiques de la RNA polymérase, nous parlerons des différentes étapes de la biosynthèse des RNA et de sa régulation.

A - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA RNA POLYMERASE

La RNA polymérase (nucléoside-triphosphate ; RNA nucléotidyl transférase, EC 2.7.7.6.) est l'enzyme qui assure la polymérisation des ribonucléotides en catalysant la réaction suivante :



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

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

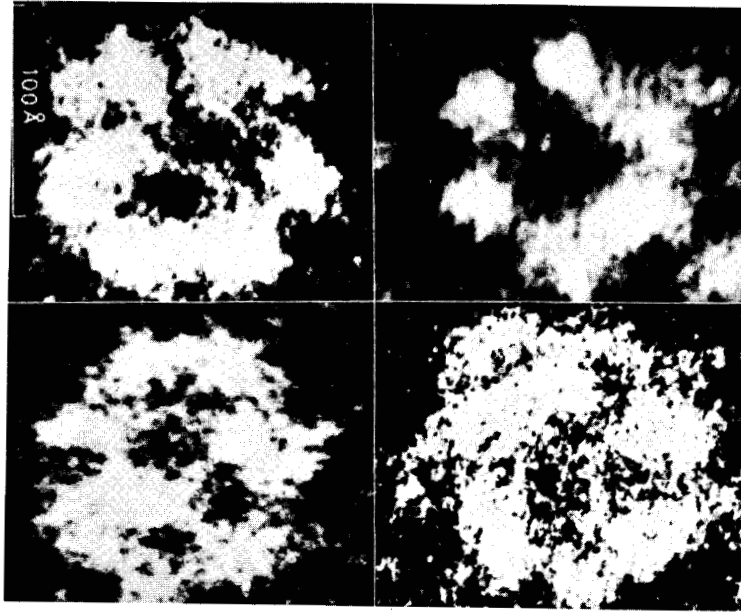
1 - LA RNA POLYMERASE D'E. COLI

a - Observation au microscope électronique

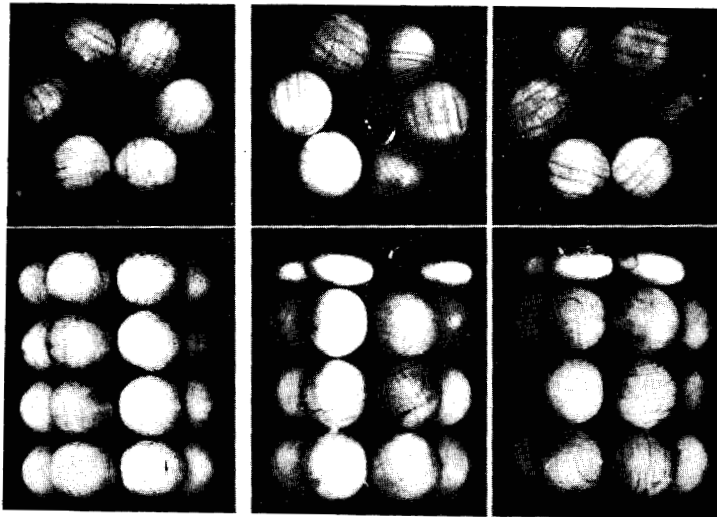
La structure de la RNA polymérase et la géométrie de sa conjugaison ou DNA ont été observées au microscope électronique par plusieurs équipes (FUCHS et al. (16) ; CRAWFORD et al. (17) ; SLAYTER et al. (18)).

Ces chercheurs ont reproduit les photos montrant les six sous-unités liées entre elles sous la forme d'un cylindre de 95 Å de hauteur, de 125 Å de diamètre externe et de 40 Å de diamètre interne.

L'étude de la RNA polymérase 22 S de E. coli (KITANO et KAMEYANA)(19) montre que l'enzyme est formée de 22 à 24 subunités sphéroïdes empilées en forme de cylindre creux de 135 Å de diamètre et de 155 Å de hauteur (fig. 4, p. 9). La fixation de l'enzyme sur le DNA modifie sa structure (fig. 5, p. 10). Lors de la transcription, le brin de DNA passerait au travers du trou central (fig. 6, p. 11).



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



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



Figure n° 4 : Etude au microscope électronique de la RNA polymérase 22 S d'E. coli (KITANO et KAMEYAMA)(20).

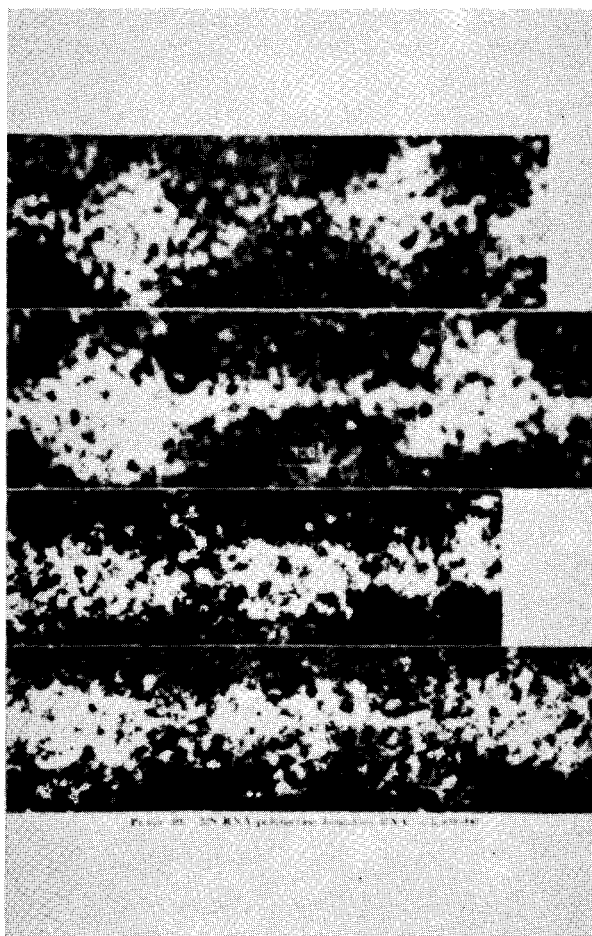


Figure n° 5 : Photographie de l'observation au microscope électronique de la RNA polymérase 22 S d'E. coli fixée au DNA.

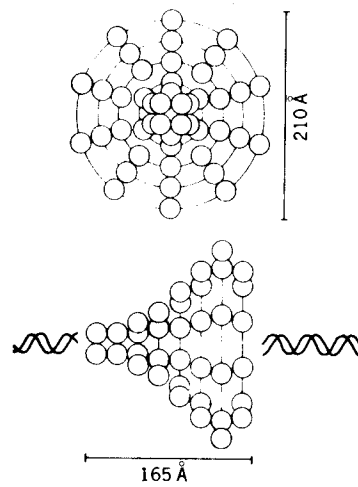


FIG. 5. Schematic representation of 22S RNA polymerase bound to DNA.

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

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

Figure n° 6 : Représentation schématique de la RNA polymérase d'E. coli fixée au DNA.



b - Structure quaternaire

Ce sont principalement les travaux de BURGESS (21), BURGESS et al. (22) et ZILLIG et al. (23) qui ont permis de détailler la structure quaternaire de l'enzyme.

Par chromatographie sur colonne de phospho-cellulose, BURGESS et al. (24) ont pu séparer l'enzyme en deux fractions : le facteur sigma (σ) et l'enzyme minimum (qu'ils ont appelée "core enzyme").

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

La sous-unité σ , masse moléculaire = 90.000

La sous-unité β , masse moléculaire = 150.000

La sous-unité β' , masse moléculaire = 155.000

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

La formule stoechiométrique de l'enzyme complète ou "holoenzyme" serait $(\alpha_2, \beta, \beta')\sigma$, ce qui serait en accord avec une masse moléculaire de 480.000 environ.

Ces résultats ont été confirmés par des expériences récentes de LILL et HARTMANN (25) et de ZILLIG et al. (26). Ils ont pu reconstituer, à partir des sous-unités, l'enzyme complète et fonctionnelle. Il convient de noter que les sous-unités τ et ω , primitivement décrites, ne sont pas retrouvées constamment dans les préparations et semblent être considérées comme des artefacts.

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

- La particule β' présente une grande affinité pour l'héparine (polyanion analogue structural du DNA) et serait plus particulièrement responsable de la fixation de l'enzyme sur le DNA (ZILLIG et al.) (27).

- La particule β possède un site de fixation pour le facteur σ

mais est aussi sensible à l'action de la streptolydigue (inhibiteur spécifique de l'allongement de la chaîne de RNA). Elle serait à la fois impliquée dans le processus de déclenchement par son intervention dans la fixation du facteur σ et dans le processus de propagation de la synthèse par son rôle dans le déplacement de l'enzyme sur le DNA (HEIL et ZILLIG)(28).

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

c - Constante de sédimentation

RICHARDSON (29), COLVILLE et al. (30) et STEVENS et al. (31) ont montré que le fonctionnement de l'enzyme dépend étroitement de la force ionique. Chez E. coli, à basse force ionique, elle existe sous une forme qui sédimente avec une constante de 21 à 24 S dont la masse moléculaire avoisine 900.000. A force ionique élevée, l'enzyme est dissociée réversiblement en deux unités dont le coefficient de sédimentation égale 13 S (RICHARDSON)(32), (PREUSS et ZILLIG)(33).

Plus récemment, BERG et CHAMBERLIN (34) ont complété l'étude de l'action de la force ionique sur la constante de sédimentation de la RNA polymérase d'E. coli ("Strain B").

- A haute force ionique, l'enzyme "minimum" sédimente avec une constante de 12,6S tandis que l'holoenzyme (enzyme "minimum" + facteur "sigma") à un coefficient de sédimentation de 15 S.

- A basse force ionique aussi bien l'enzyme "minimum" que "l'holoenzyme" forment des agrégats. L'enzyme minimum forme des agrégats ayant un coefficient de sédimentation maximum de 44 - 48 S ce qui indique la présence d'agrégats de composition variable : dimères, trimères jusqu'à hexamères). L'holoenzyme dans ce cas a un coefficient de sédimentation de 23 S ce qui indique qu'elle ne donne au maximum qu'un dimère.

2 - LA RNA POLYMERASE DES EUCARYOTES

Dans le noyau cellulaire, la RNA polymérase a tout

d'abord été décrite comme existant sous deux formes en équilibre : une forme liée au DNA (the "aggregate RNA polymerase") et une forme libre (the "soluble RNA polymerase") (CHAMBON et al.) (35). Etudiant les noyaux isolés, POGO et al. (36) ont montré qu'à basse force ionique (en présence de Mg^{++}) la biosynthèse des RNA apparaît dans le nucléole, le RNA transcrit étant de type GC (r-RNA), tandis que à haute force ionique (en présence de Mg^{++}) la transcription se fait dans le nucléoplasme produisant un RNA de type AU ("DNA like RNA").

Les résultats plus récents de nombreux auteurs démontrent qu'il existe deux types de polymérase au sein du noyau cellulaire :

a - La RNA polymérase nucléolaire ou polymérase I ou polymérase A dont l'activité in vitro est optimale à basse force ionique et en présence d'ions Mg^{++} . Dans ce cas le RNA synthétisé est de type ribosomique (riche en GC). L'enzyme est insensible à l'action de l' α -amanitine.

b - La RNA polymérase nucléoplasmique ou polymérase II ou polymérase B dont l'activité in vitro est optimale à force ionique élevée et en présence d'ions Mn^{++} : dans ce cas le RNA synthétisé est de type messenger (DNA like). L'enzyme est sensible à l'action de l' α -amanitine.

De telles enzymes ont été isolées chez différents animaux : embryon d'Oursin (ROEDER et RUTTER) (37), foie de Rat (ROEDER et RUTTER) (38), (SEIFART) (39), de Veau (KEDINGER et al.) (40) et placenta humain (VOIGT et al.) (41). Les masses moléculaires de ces différentes enzymes qui peuvent être séparées en différentes sous-unités avoisinent généralement 400.000 (CHAMBON et al.) (42).

Enfin, il est intéressant de noter qu'une RNA polymérase a été extraite des mitochondries de levure (WINTERSBERGER et al.) (43) et de Neurospora crassa (KUNTZEL et SCHAFER) (44). Sa masse moléculaire, beaucoup plus faible que celle de l'enzyme extraite du noyau est d'environ 65.000.

B - FIXATION DE L'ENZYME SUR LE DNA

1 - FORMATION DU COMPLEXE DNA-RNA POLYMERASE

a - Attachement de l'enzyme sur des séquences spécifiques du DNA

Etant donné que la plupart des RNA synthétisés in vitro ainsi que ceux en cours de synthèse in vivo contiennent préférentiellement une purine à l'extrémité 5' , le groupe de SZYBALSKI s'est demandé si les points d'initiation sur le DNA contiennent des séquences de pyrimidines suffisamment étendues pour être mises en évidence par les méthodes physico-chimiques (SZYBALSKI et coll.)(45). Leurs travaux permettent de conclure que dans le cas de différents organismes ce sont les séquences riches en pyrimidines ("pyrimidine-rich clusters") qui pourraient être les sites d'initiation de la transcription. Dans la plupart des cas, il s'agit, suivant les mêmes auteurs, de séquences contenant surtout la désoxycytidine.

Se fondant sur ces observations, ils proposent un modèle dans lequel chaque séquence riche en pyrimidines introduit un élément de discontinuité dans le DNA, modifiant sa structure secondaire et servant ainsi comme site spécifique de reconnaissance pour la fixation initiale de la RNA polymérase. Autrement dit, ces sites représenteraient le "promoteur" génétique (JACOB)(46) exprimé en langage physico-chimique.

Ces conclusions sont en accord avec les travaux de SUMMERS et SZYBALSKI (47) qui montrent que respectivement l'initiation et l'arrêt de la sy thèse du RNA sont très fréquents quand le poly dG.dC ou le poly dA.dT sont transcrits in vitro.

Toutefois, aucune preuve directe n'existe actuellement qui permette de dire que les "pyrimidine clusters" sont le signal d'initiation de la transcription. Ainsi NAKANO et SAKAGUCHI (48) ont isolé les sites de fixation de la RNA polymérase d'E. coli sur le DNA du phage λ en traitant le complexe DNA-RNA polymérase par la désoxyribonucléase pancréatique et la phosphodiesterase de venin. Ils en ont établi la composition en bases et trouvent qu'elle ne diffère pas de celle du DNA intact du phage λ (Tableau I, p. 16).

MATSUKAGE et coll. (49) ont trouvé que la somme de G + C

T A B L E A U I

Composition en base du DNA λ total et des sites de fixation de la RNA polymérase (NAKANO et coll.)(50)

	DNA λ en p.100	Sites de fixation en p.100
Adénine	24,9	25,4
Thymine	26,0	27,0
Guanine	23,4	21,0
Cytosine	25,7	26,2



aux sites de fixation de la RNA polymérase 22 S d'E. coli sur le DNA d'E. coli est de 50,1 p.100. BLATTNER et THOMAS (51) ont obtenu les mêmes résultats avec le DNA de T 5.

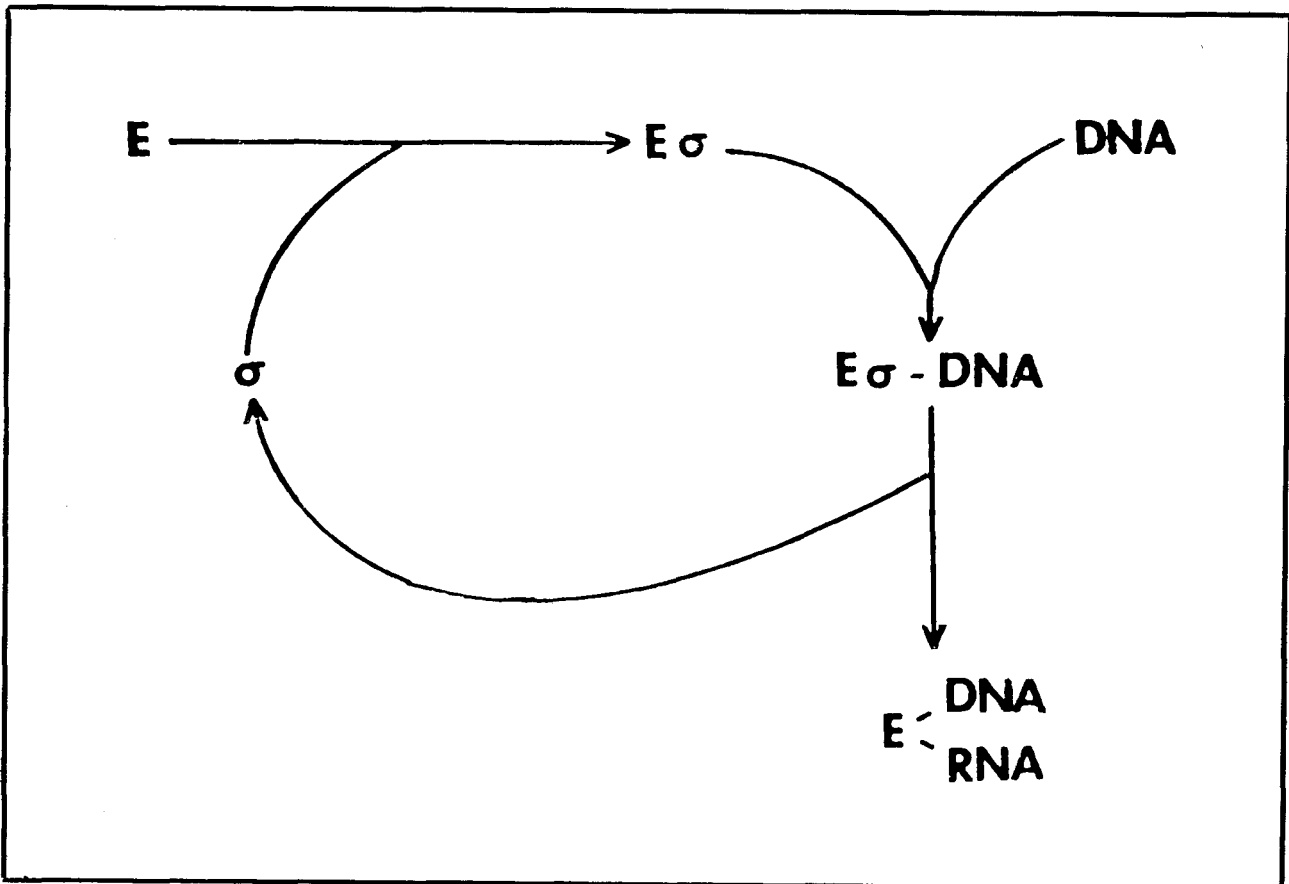
b - Influence des histones

La fixation de la RNA polymérase sur le DNA bicaténaire se fait dans les régions dénaturées dont une chaîne est rendue accessible à l'enzyme par des propriétés moléculaires spécifiques (BERG et al.)(52). L'accroissement de l'activité de la RNA polymérase lors de la dissociation des désoxynucléohistones par le polyéthylène sulfonate de sodium (CHAMBON et al.)(53), suggère que ces régions dénaturées, sites préférentiels de fixation de l'enzyme, peuvent être aussi démunies d'histones.

c - Intervention du facteur "sigma".

La polymérase peut, en présence de DNA se fixer aux sites spécifiques de déclenchement de la synthèse ou "promoteurs" mais aussi sur des portions de DNA tout à fait au hasard. La fixation spécifique aux sites "promoteurs" s'appelle la "préinitiation" et se trouve sous la dépendance du facteur "sigma". C'est à BURGESS et al. (54) que l'on doit la découverte du facteur "sigma". SUGIURA, OKAMOTO et TAKANAMI (55) ont montré que la polymérase dépourvue du facteur "sigma" peut transcrire le DNA mais elle perd la capacité de sélectionner les sites promoteurs. Dans ce cas, les deux chaînes du DNA sont transcrites mais à un taux plus bas qu'en présence de " σ ". Quand le facteur "sigma" est présent, la spécificité et l'asymétrie de la transcription sont restaurées. Le facteur "sigma" agirait comme contrôle "positif" de la transcription, à l'inverse du contrôle "négatif" exercé par le répresseur.

Ce facteur ne ferait pas partie intégrante de l'enzyme mais viendrait s'y joindre, lors de la fixation sur le DNA, pour lui conférer la spécificité voulue. Une fois la polymérisation commencée, le RNA ayant atteint une longueur de 40 nucléotides environ (KRAKOW) (56), il se séparerait à nouveau de l'enzyme et pourrait être réutilisé dans une nouvelle opération de fixation spécifique de l'enzyme (voir fig. 7, p. 18).



BUS
LILLÉ

Figure n° 7 : Cycle d'utilisation du facteur "sigma" au cours de la transcription (TRAVERS et BURGESS)(57).

Le facteur "sigma", associé à la RNA polymérase, intervient dans la sélection des sites de déclenchement de la transcription. La polymérisation commencée, il se dissocie du complexe DNA-enzyme-RNA naissant et peut être utilisé à nouveau.

2 - STABILITE DU COMPLEXE BINAIRE DNA-RNA POLYMERASE

a - Influence de la force ionique

Bien que le complexe DNA-RNA polymérase soit peu dissociable, la liaison est réversible. FUCHS et al. (58), WALTER et al. (59) ont proposé une hypothèse selon laquelle la fixation de l'enzyme s'effectuerait en deux étapes :

- La première serait une simple fixation de la RNA polymérase sur le DNA nécessitant une basse force ionique ;
- La seconde, plus lente, correspondrait à une "fusion" localisée du DNA et serait responsable de la phase de latence que l'on observe quand la synthèse du RNA est mesurée à basse température.

En 1965, CHAMBON et al. (60) observaient qu'une forte augmentation de la force ionique avant l'addition des nucléosides triphosphates inhibait la synthèse ultérieure du RNA. Ceci s'explique par l'impossibilité de former, dans ces conditions, un complexe DNA-enzyme car la RNA polymérase se dissocie alors en sous-unités 11 - 13 S.

Il existerait une relation entre ces deux phénomènes.

Bien que l'association DNA-RNA polymérase soit instable aux forces ioniques élevées, il faut noter que la formation d'un court oligonucléotide (3 à 4 nucléotides) suffit à stabiliser l'ensemble (NIYOGI et al.)(61), et dans ce cas une augmentation de la force ionique permet de détacher la RNA polymérase fixée non spécifiquement (SENTENAC et coll.)(62).

b - Influence de la température

La formation du complexe binaire nécessite in vitro, une température physiologique. La stricte dépendance de la température indique qu'au niveau de l'enzyme le DNA serait dénaturé sur une courte longueur (TRAVERS)(63).

c - Spécificité des sites de fixation

La fixation de la RNA polymérase sur des séquences riches

en bases pyrimidiques, permet de penser que la stabilité du complexe liée à la nature des liaisons entre l'enzyme et le DNA doit dépendre fortement des séquences nucléotidiques du DNA (voir p.15)

d - Stabilisation du complexe par les nucléoside-5'-triphosphates

A haute force ionique, en absence de synthèse, l'enzyme se détache du DNA. Cependant la présence de nucléoside-5'-triphosphates empêche cette dissociation (ANTHONY et GOLDTHWAIT)(64). En fait GOLDTHWAIT et al. (65) ont montré que deux nucléosides triphosphates suffisaient à stabiliser le complexe si l'un de ces nucléosides triphosphates était de type purique. Ces résultats sont en accord avec leurs études de spectroscopie de fluorescence (WU et GOLDTHWAIT)(66) et d'équilibre de dialyse (WU et al.)(67) qui avaient mis en évidence, sur l'enzyme, un site de fixation préférentiel des nucléoside-5'-triphosphates puriques.

C - DEBUT DE LA POLYMERISATION DES RIBONUCLEOTIDES

1 - NATURE DU PREMIER NUCLEOTIDE

La formation de la chaîne polyribonucléotidique se fait par addition de nucléoside-5'-triphosphates à l'extrémité 3' hydroxyle du polymère (BREMER et al.)(68). La persistance des phosphoryl α , β et γ à l'extrémité 5' permet de mettre en évidence la nature du nucléotide 5' terminal (fig. 8, p. 21). Les résultats acquis jusqu'à présent sont rassemblés dans les tableaux II et III (pages 22 et 23).

D'ores et déjà, il nous est possible de dire que tant, in vitro que in vivo, l'initiation de la transcription se fait exclusivement par un nucléotide purique, ce nucléotide étant probablement pppGp dans le nucléole et pppAp dans le nucléoplasme (KRSMANOVIC et WEISSMAN)(69).

2 - IDENTIFICATION DES SITES DE DECLENCHEMENT DE LA POLYMERISATION

Nous avons vu précédemment que la RNA polymérase se fixe

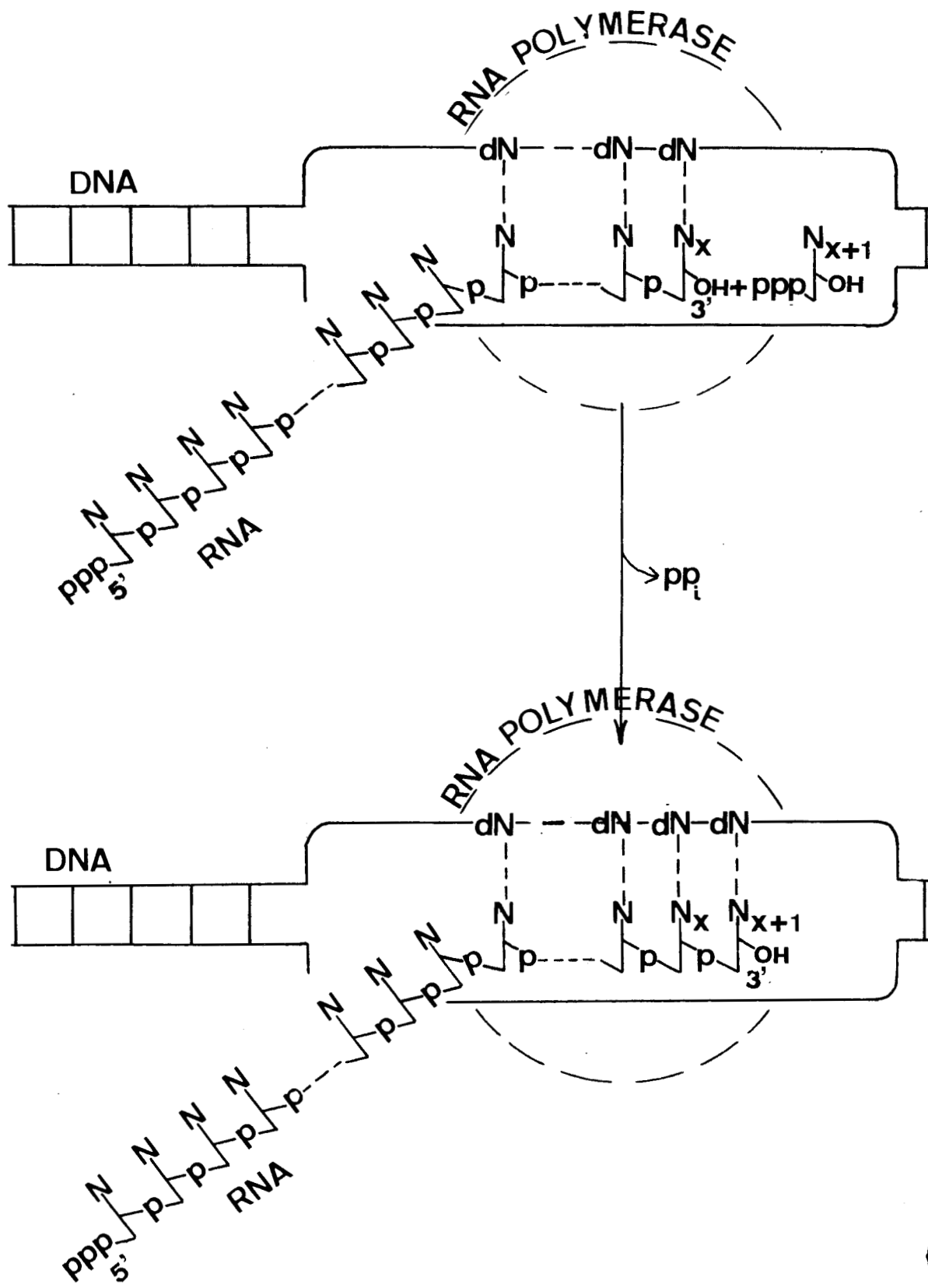


Figure n° 8 : Polymérisation de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' des ribonucléoside-5'-triphosphates par la RNA polymérase sous la direction du DNA.

T A B L E A U I I

Extrémités 5' terminales des RNA synthétisés in vitro.

RNA synthétisés <u>in vitro</u>		Extrémité 5' terminale	Références
avec la RNA polymérase de :	utilisant comme modèle le DNA de :		
<u>E. coli</u>	Phage T ₄	pppA-- (prédominant de 0 à 4 mn) pppG-- (prédominant de 4 à 20 mn)	BREMER <u>et al.</u> (70) (1965) MULLER <u>et al.</u> (71) (1969)
	Phage T ₇	pppG--	SENTENAC <u>et al.</u> (72) (1968)
	Phage O 80	pppA-- et pppG--	OKAMOTO <u>et al.</u> (73) (1970)
<u>E. coli</u>	<u>E. coli</u>	pppA-- et pppG--	GOLDSTEIN <u>et al.</u> (74) (1965)
<u>E. coli</u>	Thymus de Veau	pppA-- et pppG--	TADA <u>et al.</u> (75) (1969)
	Phage fd (forme réplivative)	[pppA _p UpGp-- pppG _p UpAp-- pppG _p UpUp--	SUGIURA <u>et al.</u> (76) (1969)
β réplivase	Phage Qβ RNA	pppG _p GpGp----X ₁₇₆	BILLETER <u>et al.</u> (77) (1969)
<u>Azotobacter vinelandii</u>	Phage T ₂ Phage T ₄ Phage T ₇ Thymus de Veau	pppA-- et pppG-- (pppG _{en} majorité avec le DNA dénaturé)	KRAKOW <u>et al.</u> (78) (1967)
Réovirus	RNA bicaténaire du Réovirus	pppG-- et ppG-- pppG _p Up-- et ppG _p --	LEVIN <u>et al.</u> (79) (1970) BANERJEE <u>et al.</u> (80) (1971)
Thymus de Veau - nucléolaire	Thymus de Veau	pppG--	
-nucléoplas-mique	Thymus de Veau	pppG] pppG pppA] pppA = 3	CHAMBON <u>et al.</u> (81) (1970)
Nucléoplas-mique de foie de Rat	Foie de Rat	pppG] pppG pppA] pppA = 2	SEIFART (communication (1971) personnelle)
Rein de Singe - nucléolaire	Cellules CV ₁	pppG--	
-nucléoplas-mique		pppA--	KRSMANOVIC et WEISSMAN (résultats non publiés) (1971)

T A B L E A U III

Nucléotide 5' terminal des ARN nouvellement synthétisés in vivo.

RNA	Extrémité 5' terminale	Références
f ₂	pppG--	ROBERTSON <u>et al.</u> (82) (1969)
R ₁₇	pppG _p (PU) _p (Py) _p --	DAHLBERG (83) (1968)
MS ₂	pppG _p G _p G _p Up--	ROBLIN <u>et al.</u> (84)(85) (1968)
	pppG _p --	DE WACHTER <u>et al.</u> (86) (1968)
Qβ	pppG _p --	GLITZ (87) (1968)
R ₂₃	pppG _p --	VANDENBERGHE (88) (1969)
Qβ "self-replicating variant "V ₂	ppp(G _p) ₄ (A _p) ₂ (C _p) ₂ --	WATANABE <u>et al.</u> (89) (1968)
Virus de la nécrose du tabac (TNV)	ppA _p G _p Up--	WATANABE <u>et al.</u> (90) (1968)
Virus de l'Influenza	pppA _p --	BISHOP <u>et al.</u> (91) (1970)
<u>E. coli</u>	pppG _p --	LESNAW <u>et al.</u> (92) (1970)
	pppA _p --	YOUNG <u>et al.</u> (93) (1971)
	pppG _p -- } pppG = 1 pppA _p -- } pppA	JORGENSEN <u>et al.</u> (94) (1969)
5 S de HeLa	pppG _p Up-- (76 à 87 p.100)	HATLEN <u>et al.</u> (95) (1969)
5 S de KB	(pp) _p G _p Up--	FORGET <u>et al.</u> (96) (1967)
m1-RNA de foie de Rat	pppX _p -- et ppX _p --	RYSKOW <u>et al.</u> (97) (1970)
RNA nucléaires de foie de Rat	pppX _p --	VERBERT <u>et al.</u> (98) (1971)
RNA nucléaires { HeLa	pppG _p (84 p.100)pppA _p (16 p.100)	VERBERT <u>et al.</u> (99) (1971)
{ KB	pppG _p (80 p.100)pppA _p (20 p.100)	
KB { - nucléole	pppG _p	KRSMANOVIC et WEISSMAN
{ - nucléoplasme	pppA _p	(résultats non publiés) (1971)

sur le DNA en des sites spécifiques liés à une séquence donnée. Cette séquence, riche en bases pyrimidiques, devait avoir son reflet dans le RNA néosynthétisé possédant une séquence 5'-terminale riche en bases puriques. Cette hypothèse sans être infirmée ne peut pas être complètement soutenue devant la diversité des séquences 5' terminales observées. (voir les tableaux II et III, p. 22 et 23).

D - DEPLACEMENT DE L'ENZYME LE LONG DU DNA

1 - FORMATION D'UN COMPLEXE DNA-POLYMERASE- RNA NAISSANT

Avec la progression de la RNA polymérase le long du DNA, la croissance de la chaîne ribonucléotidique s'accompagne de la formation d'un hybride DNA-RNA dont la stabilité serait assurée par les liaisons "pont hydrogène" entre une fibre de DNA et la chaîne ribonucléotidique naissante (BREMER et KONRAD). La stabilité de la liaison DNA-polymérase est augmentée sitôt la formation de quelques liaisons phosphodiester. Les travaux de HAYASHI et al. (100), NOVAK et DOTY (101) et FRASER et al. (102), montrent clairement que in vitro, l'ARN naissant impliqué dans le complexe ternaire est hybridé sur une distance d'environ 50 nucléotides avec le DNA et donc résistant à l'action de la RNase P. Cette zone d'appariement est recouverte par la polymérase. Mettant à profit cette propriété SENTENAC et coll. (103) ont isolé cette zone par action de la DNase.

2 - SEQUENCE 5' TERMINALE DU RNA

La connaissance de la nature de la séquence 5' terminale a attiré de nombreux auteurs car il était tentant d'essayer d'y trouver un des codons d'initiation de la synthèse des protéines (AUG-GUG). Les résultats des tableaux II et III, p. 22 et 23, montrent une grande diversité dans la séquence 5' terminale, avec cependant une certaine prédominance des bases puriques. Cette remarque a d'ailleurs été mise à profit pour tenter de déterminer des sites privilégiés de début de synthèse sur le DNA. Faisant fonctionner in vitro la RNA polymérase d'E. coli SUGIURA et al. (104) ont

trouvé que trois espèces différentes de RNA débutant par les séquences pppApUpG--, pppGpUpA---, pppGpUpU---, sont synthétisées sous la direction du DNA de la forme répliquative du phage fd. En absence du facteur "sigma", ils remarquent une diversité beaucoup plus grande dans la séquence 5' terminale, diversité qui se réduit aux trois espèces précédemment observées si le facteur "sigma" est réassocié à l'enzyme. Il se confirme donc bien que ce facteur empêche un déclenchement, au hasard de la synthèse.

3 - DEPHOSPHORYLATION DU NUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATE TERMINAL

Tandis que les RNA nouvellement formés possèdent encore le groupement triphosphate 5'-terminal, les RNA cellulaires stables (r-RNA, t-RNA) possèdent un monophosphate 5'-terminal (MADISON)(105). Il se pose donc la question du rôle de ce nucléotide, de la signification et du mode de sa déphosphorylation ultérieure. MAITRA *et al.* (106) ont mis en évidence à partir d'homogénats bactériens, deux enzymes capables de libérer le phosphoryle γ des chaînes de RNA commençant par un résidu de GTP ou d'ATP.

4 - SENS DE LA POLYMERISATION

Dans le processus de polymérisation des ribonucléoside-5'-triphosphates, la séquence du RNA est déterminée par la complémentarité des bases avec le brin de DNA transcrit suivant la conception de WATSON et CRICK (107).

Les études concernant le sens chimique de la synthèse du RNA *in vitro* ont pu montrer que la croissance de la chaîne ribonucléotidique se fait de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', c'est à dire que la polymérisation du RNA à partir des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates se fait par l'estérification du groupe hydroxyle-3'-terminal du polyribonucléotide naissant fixé sur l'ADN par la fonction 5'- α -phosphate du nucléotide adjacent, avec la libération des 5'- β - α -phosphates sous forme de pyrophosphates inorganiques (SHIGEURA et BOXER)(108) ; (BREMER et KONRAD)(109) et (MAITRA et HURWITZ)(110).

5 - ASYMETRIE DE LA TRANSCRIPTION

Dans le processus de synthèse du RNA, il semble qu'une seule chaîne de DNA soit copiée (transcription asymétrique). En effet, dans le cas du DNA des phages SP 8 et SPP₁, seule la chaîne la plus riche en pyrimidine est complémentaire du RNA nouvellement formé (MARMUR et coll.)(111); (RIVA)(112). D'autre part, si le DNA bactérien est hybridé, avec un large excès de RNA, il n'est pas possible d'obtenir plus de 50 p. 100 de DNA hybridé (Mc CARTHY et BOLTON)(113). En plus, tous les RNA cellulaires, y compris le m-RNA sont des molécules monocaténares qui ne peuvent pas s'hybrider entre elles. Les travaux plus récents de COHEN et HURWITZ (114) ont démontré que les deux chaînes du DNA du phage λ servent de moule in vivo. On en déduit que la synthèse asymétrique du RNA implique les copies des deux filaments du DNA moule, bien que, pour un tronçon donné, une seule fibre soit copiée.

E - ARRÊT DE LA TRANSCRIPTION

De même que pour l'initiation, il est probable que l'arrêt de la transcription soit dû à une séquence spécifique du DNA. SUMMERS et SZYBALSKI (115) ont montré que l'arrêt de la synthèse du RNA est très fréquent quand le poly dA.dT est transcrit in vitro.

C'est le besoin de comprendre deux différences importantes entre transcription in vitro et in vivo qui ont amené ROBERTS (116) à isoler un facteur de terminaison de la transcription. En effet, contrairement à ce qui se passe in vivo, in vitro le RNA synthétisé n'est pas détaché du DNA à la fin de la transcription (BREMER et KONRAD)(117) et la taille des chaînes de RNA nouvellement formées est hétérogène et anormalement élevée (CHAMBERLIN et BERG)(118); (RICHARDSON)(119). Ces deux observations sont explicables en considérant l'enzyme comme incapable de lire la ponctuation d'arrêt sur le DNA.

En partant de cette hypothèse, ROBERTS (120) a isolé d'un extrait d'E. coli, un facteur qui provoque l'arrêt de la transcription aux sites spécifiques et le détachement du RNA transcrit. Ce facteur appelé "Rho" (ρ) est une protéine d'environ 200 000 de masse moléculaire.

Le mécanisme d'action du facteur "Rho" n'est pas encore bien connu. ROBERTS (121) note qu'il pourrait se fixer au DNA au niveau du signal d'arrêt et ainsi bloquer la progression de la polymérase. Des travaux récents de RICHARDSON permettent de penser qu'il pourrait agir en formant un complexe avec l'ARN transcrit provoquant ainsi son détachement. Enfin DARLIX et al. (122) ont publié la similitude d'action du facteur σ et du facteur ρ in vitro :

- fixation sur la polymérase lui conférant la spécificité de terminaison,
- détachement du facteur ρ et utilisation pour un nouvel arrêt.

Il faut noter qu'à côté des sites d'arrêt de la transcription reconnus grâce au facteur "Rho", l'ADN porterait une ponctuation qui provoquerait la libération de la polymérase.

D'après BERG et CHAMBERLIN (123), l'enzyme minimum libéré après arrêt de la polymérisation du RNA pourrait se retrouver sous deux formes dans le noyau :

- 1 - l'enzyme minimum pourrait s'associer avec un facteur "sigma" pour former un nouvel holoenzyme fonctionnel (15 S),
- 2 - l'enzyme minimum pourrait s'associer avec d'autres enzymes minimum pour former des agrégats représentant la forme de stockage (12,6 S à 44-48 S).

II - REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

A - REGULATION CHEZ LES PROCARYOTES

L'activité de la RNA-polymérase in vitro est de loin inférieure à celle qu'elle possède in vivo. L'hypothèse avancée par STENT (124) et par BREMER et KONRAD (125) introduit une participation des ribosomes dans la coordination de la synthèse et du fonctionnement du m-RNA. Le groupe de NYRENBERG (BYRNE et coll.)(126) a pu mettre en évidence in vitro la présence d'un complexe dans lequel le DNA est attaché aux ribosomes au moyen du m-RNA. Plus récemment MILLER et al. (127) ont publié les photographies de microscopie électronique de complexes DNA-m-RNA -ribosomes chez E. coli (fig. 9, p. 28).

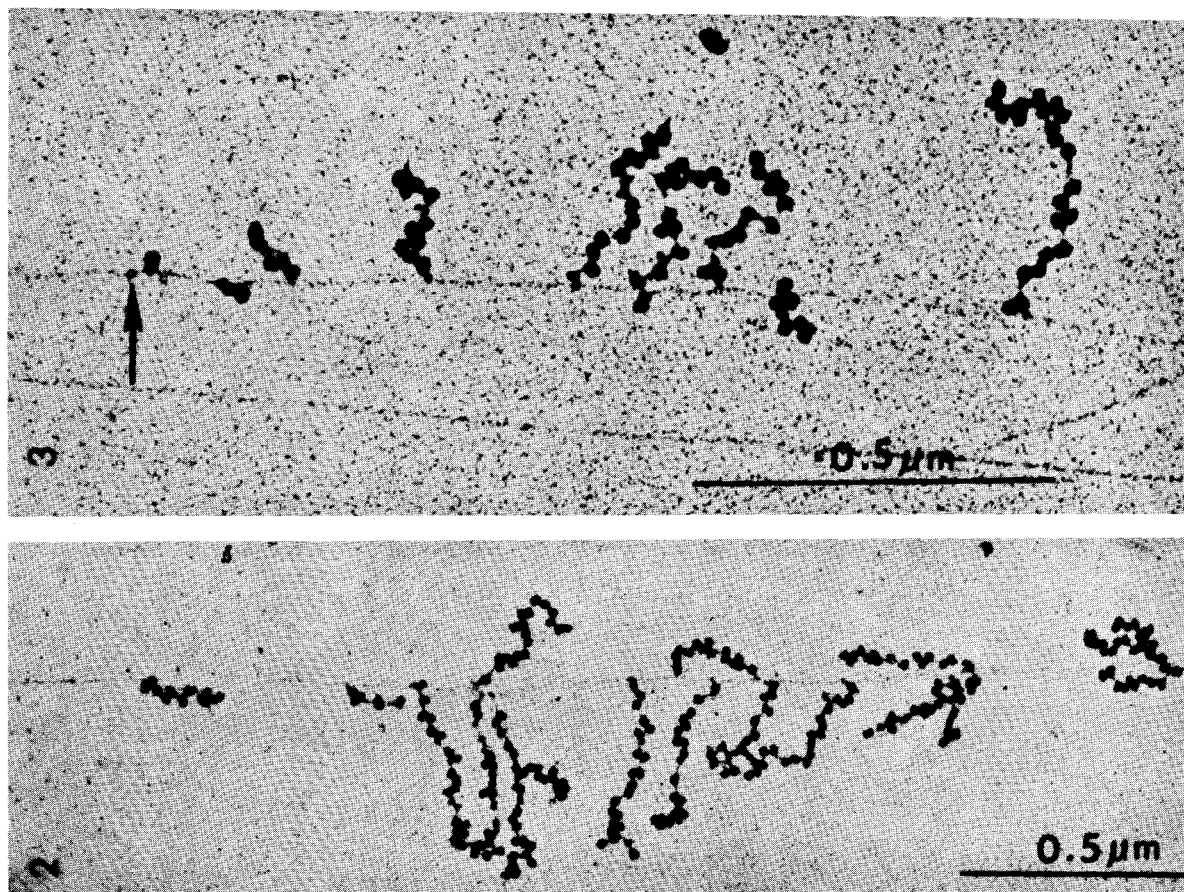


Figure n° 9 : Observation au microscope électronique des complexes DNA-mRNA-ribosomes extraits de cellules d'E. coli lysées par choc osmotique (MILLER et al.)(128)



SHIN et MOLDAVE (129) et MORRIS et GOULD (130) ont montré que l'addition de ribosomes de E. coli ou de foie de Rat conduit à la fois à un accroissement de la quantité et du poids moléculaire du RNA synthétisé in vitro, puisque la stimulation a lieu en absence de la synthèse protéique, les mêmes auteurs concluent que les ribosomes contribuent d'une manière directe à la libération du m-RNA de son moule. Il semble aussi que, in vivo, les ribosomes puissent stimuler la synthèse du m-RNA en absence de la synthèse protéique. GROS et ses collaborateurs (NAONO et al.)(131) ont étudié la relation existant in vivo entre le nombre de ribosomes par cellule d'E. coli et le taux de synthèse et de dégradation du m-RNA. En diminuant le nombre de ribosomes par l'appauvrissement du milieu de culture en Mg^{++} , il a été possible de conclure que la disponibilité en ribosomes était un facteur limitant la transcription. Si on considère que non seulement la transcription mais aussi la traduction du m-RNA se fait dans le sens 5' — 3' (SALAS et coll) (132) ;(THACH et coll.)(133) il vient à l'esprit la possibilité que le message puisse être traduit sur le m-RNA naissant (non encore détaché du DNA). En effet, DAS et coll. (134) dans le cas d'E. coli, montrent que les ribosomes s'attachent au m-RNA naissant. LEIVE et KOLLIN (135) suggèrent que le message commence à être traduit avant la transcription complète du m-RNA.

En ce qui concerne le mécanisme de la fixation de l'extrémité 5' du m-RNA avec les ribosomes, on connaît peu de choses. Pourtant, c'est à REVEL et GROS (136) qu'appartient le mérite d'avoir découvert une protéine particulière nommée facteur C, associée au DNA et nécessaire à la fixation du m-RNA sur la petite sous-unité ribosomique (30 S).

Selon A. TRAVERS (137) la sélection des gènes à transcrire dépendrait de la variation de la RNA polymérase :

- a - modification de certaines sous-unités de la polymérase au cours de la transcription
- b - synthèse de nouvelles polymérases après le début de la transcription.
- c - synthèse de nouveaux facteurs "sigma" après initiation de la transcription.

B - REGULATION CHEZ LES EUCARYOTES

Récemment GEORGIEV (138) a émis une hypothèse de régulation de la transcription chez les eucaryotes. Il fournit pour cela le schéma d'organisation structurale de l'opéron. L'opéron, unité élémentaire de transcription comprise entre un site promoteur et un site de terminaison, comprendrait deux zones (fig. 10, p. 31):

- a - une zone réceptrice des protéines de régulation (polymérase, répresseurs et histones) située à proximité du site promoteur (partie proximale).
- b - une zone contenant les gènes de structure et les gènes régulateurs située dans la partie distale de l'opéron.

Le produit de la transcription d'un tel opéron serait un D-RNA (ml DNA) ou un r-RNA dont la partie correspondant à la zone de régulation sur le DNA serait dégradée dans le noyau et le reste transféré dans le cytoplasme sous forme de RNP (SPIRIN et coll. (139) ; SAMARINA et coll. (140) ; HENSHAW et coll. (141) ; Mc CONKEY et HOPKINS (142) ; SPIRIN et NEMER (143) ; INFANTE et NEMER (144) ; SAMARINA et coll. (145) ; SAMARINA et coll. (146) ; SAMARINA et coll. (147) ; MOULE et CHAUVEAU (148) ; DEFERT-KOBUS et al. (149) ; ISHIKAWA et coll. (150) ; STEVENIN et al. (151) ; CARTOUZOU et al. (152) ; PERRY et KELLEY (153)).

La spécificité des RNA transcrits selon cette hypothèse dépendrait uniquement de la zone réceptrice des protéines de régulation. En effet, nous pouvons distinguer deux cas principaux :

- a - un site accepteur de régulation est commun à de nombreux opérons. Dans ce cas, la régulation de la transcription de ces opérons est contrôlée par une seule protéine et le RNA synthétisé n'est pas très spécifique.
- b - La zone de régulation porte de nombreux sites différents pour un opéron donné. Dans ce cas, la régulation est très fine et conduit à la synthèse d'un RNA polycistronique hautement spécifique comportant une extrémité 5' de régulation très importante.

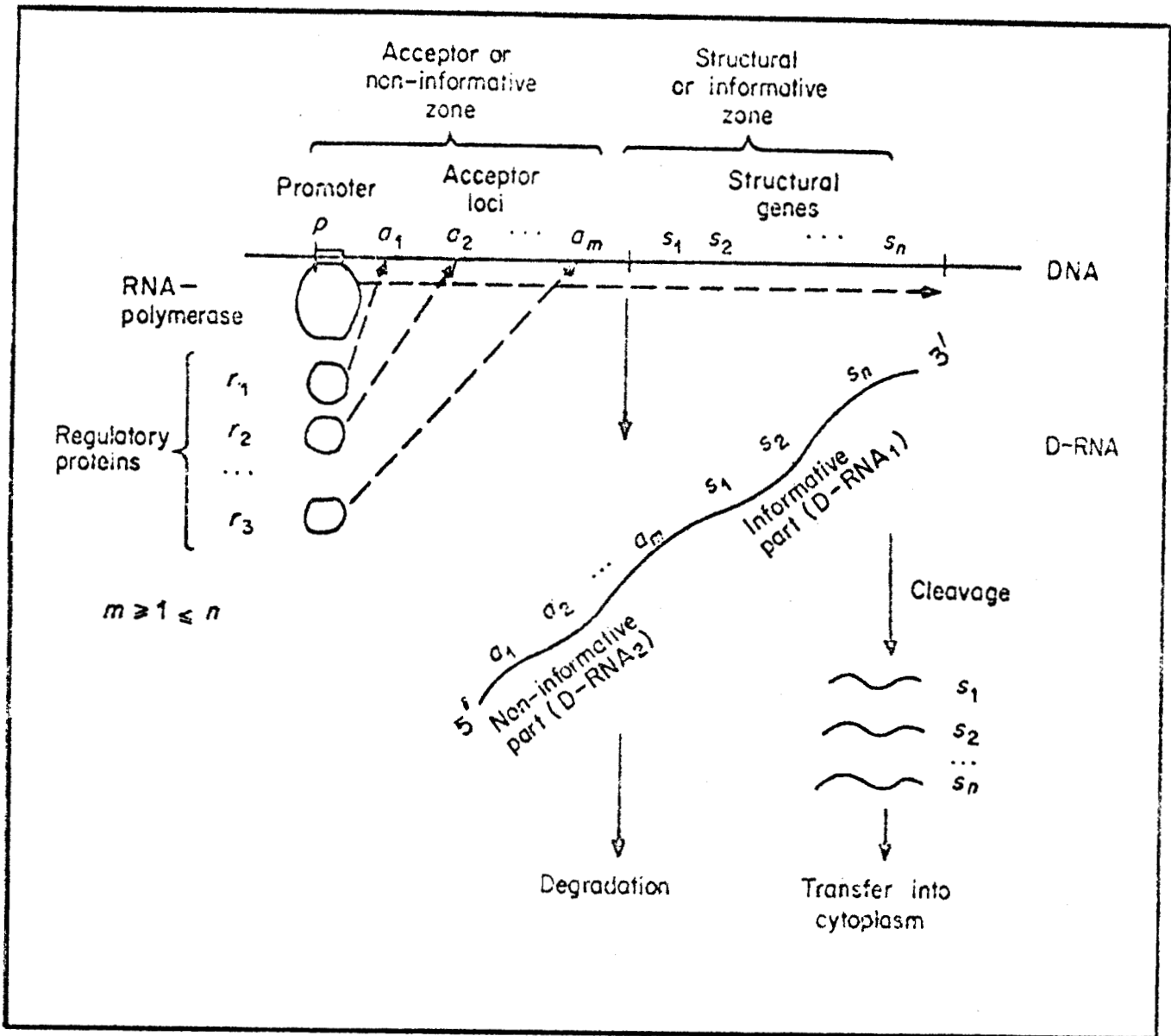
BUS
LILLE

Figure n° 10 : Modèle proposé par GEORGIEV (voir p. 30 et réf. 154) de la régulation de la transcription chez les Eucaryotes.

LES COMPLEXES NATURELS DNA-RNA

L'étude in vivo des complexes DNA-RNA se formant de façon temporaire lors du déplacement de la RNA polymérase le long du DNA (voir p. 24), représente une manière intéressante d'étudier au niveau moléculaire les détails de la polymérisation du RNA contre le DNA modèle.

De nombreux auteurs ont consacré leurs travaux à extraire de telles structure in vivo. Après avoir parlé de leurs expériences, nous exposerons brièvement les buts de nos travaux concernant l'étude de la synthèse des RNA in vivo.

I - PROCARYOTES

Quand il fut découvert que le DNA et le RNA de séquence nucléotidique complémentaire pouvaient être amenés in vitro à former des molécules hybrides, il ne sembla pas trop osé de supposer que de la même façon les bases puriques et pyrimidiques du RNA naissant restaient liées par des liaisons "pont hydrogène" à leur DNA modèle produisant in vivo un hybride DNA-RNA transitoire.

L'isolement d'un tel hybride a été signalé en 1961 par SPIEGELMAN, HALL et STORK (155). Ici, des bactéries infectées par des bactériophages marqués au ^{32}P furent exposées brièvement à l'uridine tritiée à un stade précoce de la croissance intracellulaire du phage et furent lysées par le mélange détergent SDS-chloroforme-alcool isoamylique. Les auteurs se fondèrent sur la cosédimentation d'une petite fraction de DNA marquée à l'uridine ^3H et au ^{32}P dans un gradient de densité au chlorure de caesium, pour déduire la présence d'un hybride naturel DNA-RNA. D'autres expériences révélèrent que cette petite bande de DNA était un artéfact (KONRAD et STENT)(156). Ces auteurs déduisent de leurs expériences que le fait de n'avoir pu extraire un hybride naturel est du au traitement détergent qui en dénaturant les protéines (polymérases) libère le RNA naissant du DNA modèle. Ils suggèrent que la RNA polymérase lie le RNA au DNA.

HAYASHI et HAYASHI (156a) ont repris ces travaux et obtenu un complexe DNA-RNA à partir de E. coli infectée par le phage ϕ X-174, en traitant les bactéries infectées par le mélange SDS-phénol-chloroforme. Il s'agit d'un hybride entre la forme répliquative du DNA ϕ X-174 (RF-DNA) et le mRNA phagique. Cette structure résistante aux hautes forces ioniques (gradient de sulfate de caesium) a été étudiée en détail. Elle possède toutes les propriétés des molécules bicaténaïres dont les chaînes sont associées par des liaisons pont hydrogène. Les chaînes de RNA associées au DNA sont résistantes à l'action de la RNase P et peuvent être détachées du DNA par action de la chaleur à basse force ionique ou de la formamide. Dans ce cas elles séparent avec une constante de sédimentation de 3 à 3,5 S. Ce complexe n'est pas un artéfact puisque le RNA rapidement marqué mélangé au DNA du phage après 70 heures de centrifugation dans le gradient de sulfate de caesium est quantitativement séparé du pic de DNA.

Se fondant sur les résultats de BREMER et KONRAD (157) et SPIEGELMAN et al. (158), les auteurs ayant obtenu un hybride DNA-RNA après action des détergents émettent l'hypothèse que la RNA-polymérase pourrait échapper à la déprotéinisation et être responsable de la formation du complexe. Toutefois, ils n'ont pu mettre en évidence la présence de protéine dans ce complexe.

A partir de bactéries non infectées (E. coli, S. aureus, et M. lysodeicticus), TONGUR et coll. (159) ont obtenu des préparations de DNA isolées par le mélange phénol-chloroforme contenant une fraction de RNA résistant à l'action de la RNase. Le RNA peut être dissocié du complexe par dénaturation thermique à basse force ionique ou par la formamide. Après action de la pronase ou de la trypsine, la partie résistante à la RNase diminue. Ces auteurs suggèrent qu'une protéine (la polymérase) participerait à la stabilisation du RNA sur le DNA et que seulement la moitié du RNA résistant à la RNase serait fixée sur le DNA au moyen de liaisons "pont hydrogène".

Récemment ROUVIERE et al. (160) à partir d'E. coli lysés par action du lysozyme ont isolé une fraction membranaire contenant des hybrides DNA-mRNA-ribosomes associés à la membrane. Se fondant sur le fait que la RNA polymérase interviendrait dans l'association naturelle entre le RNA naissant et le DNA, ils ont tenté de mettre en évidence une activité polymérasique dans leur fraction et y sont parvenus.

STONINGTON et PETTIJOHN (161) ont isolé un complexe DNA-RNA-protéine à partir d'E. coli traité par le mélange lysozyme/désoxycholate. Ce complexe a une constante de sédimentation de 3200 S ce qui laisse supposer que tout le génome d'E. coli y est inclus. Le RNA du complexe est en partie du type rRNA et en majorité du type mRNA. La protéine du complexe a été isolée et analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Elle est composée principalement par les subunités β , β' et α de la polymérase, sans facteur sigma ce qui est en accord avec le fait que le facteur "sigma" est détaché de l'enzyme une fois terminée l'initiation.

Il ressort enfin de leur étude que le complexe est instable à basse force ionique (PETTIJOHN et al.)(162)(163)(164).

Enfin DAVIS et HYMAN (165) ont isolé et photographié en microscopie électronique des complexes DNA-RNA-protéines formés in vitro en utilisant un milieu réactionnel contenant le DNA du phage T₇ et la RNA polymérase d'E. coli (fig 11, p. 35). Ils concluent à la présence d'une protéine en se fondant sur le fait que le RNA est détaché du complexe après traitement par des agents déprotéinisants (SDS) ou acylants des protéines tel que le diéthyl pyrocarbonate (SUMMERS)(166).

II - EUCARYOTES

A partir de la fraction microsomale (sédiment 105.000 g) de Neurospora Crassa, SCHULMAN et BONNER (167) ont obtenu un complexe DNA-RNA par une extraction effectuée par le mélange de désoxycholate et de chloroforme-alcool isoamylique. En se fondant sur les courbes de dénaturation thermiques, sur la centrifugation dans le gradient de CsCl (diminution de densité du complexe après action de la RNase) et sur la sensibilité à la DNase, les auteurs pensent qu'il s'agit d'un hybride contenant deux brins de DNA et un brin de RNA.

Un complexe DNA-RNA a aussi été isolé par MEAD (168) à l'aide d'une méthode semblable à partir de Drosophila melanogaster. Le rapport $\frac{\text{DNA}}{\text{RNA}}$ de ce complexe est de 2 et le DNA et le RNA du complexe sont sensibles à la DNase et à la RNase.

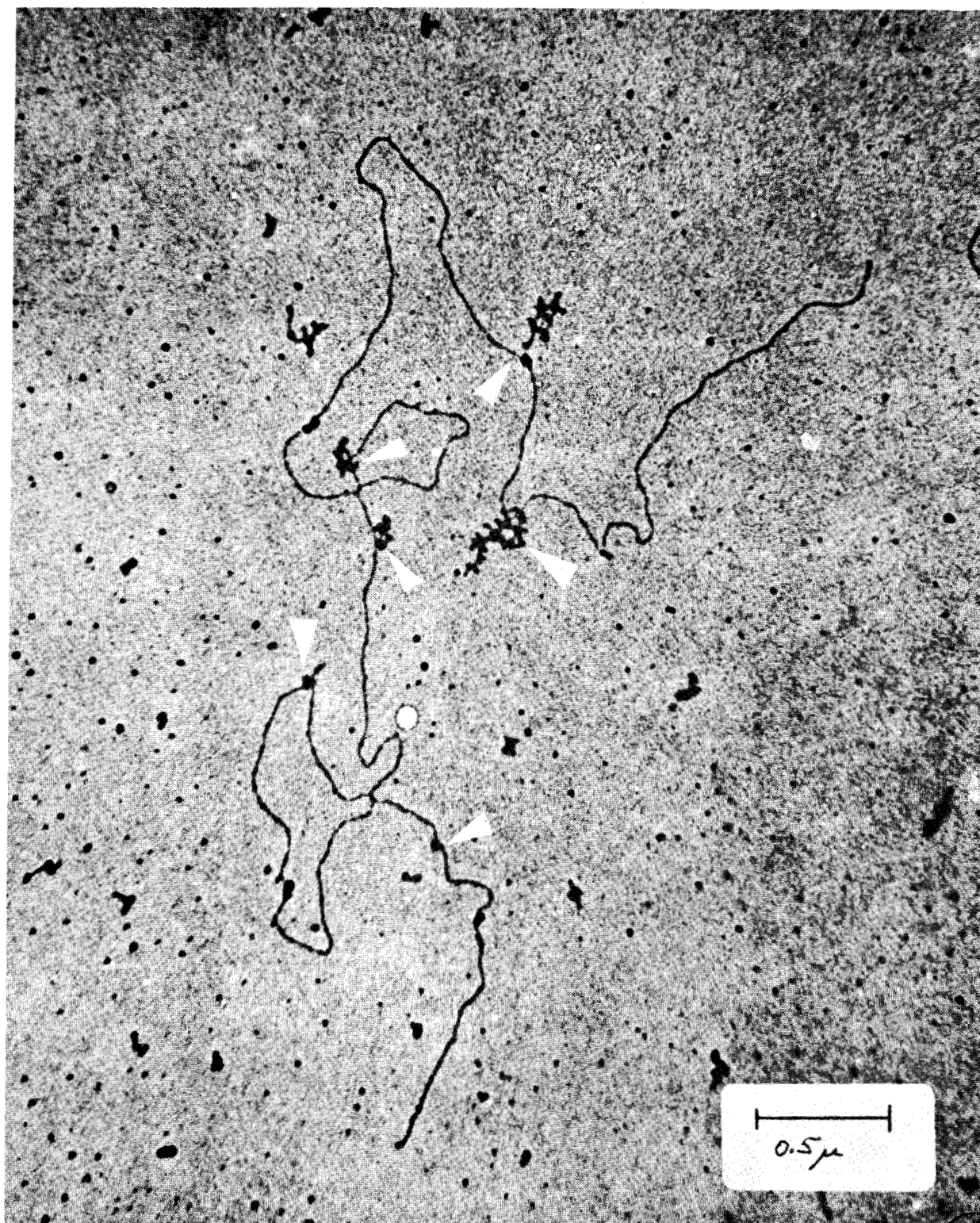


Figure n° 11 : Observation au microscope électronique du RNA transcrit sur la DNA du phage T₇ par la polymérase d'E.coli après 30 mn d'incubation (DAVIS et HYMAN)(169).

Dans le cas des cellules de l'hépatome ascitique, MANDEL et BORKOWSKA (170) ont utilisé le SDS suivant le procédé de KAY (171) et le phénol (BORKOWSKA et coll.)(172). Ils obtiennent par chromatographie sur MAK, deux fractions contenant à la fois le DNA et le RNA, qu'ils dénomment hybrides naturels et qui ont des propriétés métaboliques différentes. WILKINSON et KIRBY (173) ont, semble-t-il, obtenu un complexe DNA-RNA à partir du foie de Rat et de l'hépatome, au moyen du 4-amino-salicylate et du phénol. Ce complexe est légèrement sensible à la RNase. A l'aide d'une méthode semblable, WATSON et RALPH (174) ont isolé un RNA associé au DNA dans le cas de cellules du Sarcome 180. Le RNA résiste partiellement à l'action de la RNase P et est totalement sensible à l'action des alcalis.

Dans le cas des cellules de HeLa, par une méthode faisant appel au SDS chloroforme-alcool isoamylique, LEVIS, KRSMANOVIC et ERRERA (175) ont pu mettre en évidence un RNA rapidement marqué associé du DNA. Le RNA détaché de ce complexe a une constante de sédimentation de 4 - 6 S, ce qui correspond à des chaînes de 80 à 160 nucléotides. Enfin, ces auteurs ont démontré que dans le cas des cellules de HeLa la transcription et la répllication s'excluent mutuellement.

ROE et al. (176) ont extrait des hépatocytes de Rat un complexe DNA-RNA-protéine, stimulant l'incorporation des amino-acides dans un système protéinosynthétisant acellulaire.

TOKARSKAYA et al. (177) ont isolé des embryons de graines en germination un complexe naturel DNA-RNA extrait par le mélange SDS-phénol-chloroforme. Le RNA est détaché du DNA par dénaturation thermique.

ZSEZAK et PIHL (178) ont observé que environ 0,1 p.100 du DNA de la chromatine de foie de Rat existait sous forme d'hybride DNA-RNA en utilisant la ribonucléase H, enzyme qui dégrade spécifiquement le RNA des hybrides DNA-RNA.

III - CONCLUSIONS

Le problème qui se pose après l'étude de cette série de travaux est de savoir si la présence de la polymérase est nécessaire pour le maintien du complexe DNA.-RNA. En effet :

- 1 - La résistance à la ribonucléase de tous les hybrides isolés peut être due à l'empêchement stérique créé par la présence de la polymérase aux sites de polymérisation des ribonucléosides.
- 2 - Le fait que tous les hybrides sont extraits par des mélanges de détergents et de déprotéinisants peut être un argument en faveur de la présence de la polymérase en considérant toutefois qu'elle intervienne réellement dans la stabilité du complexe.
- 3 - La dissociation des complexes par la chaleur à basse force ionique ou par la formamide n'est pas un argument définitif en faveur de l'appariement par "ponts hydrogènes" entre le DNA et le RNA, au niveau des parties résistantes à la RNase.

Afin de tenter de participer à lever une partie de l'ambiguïté des résultats acquis par les différents auteurs sur les complexes DNA-RNA isolés in vivo chez les eucaryotes, nous avons fondé nos travaux sur l'isolement d'un hybride à partir des noyaux d'hépatocytes de Rat, la caractérisation d'une telle structure nous permettant d'aborder l'étude de la stabilité du complexe DNA-RNA et en collaboration avec A. VERBERT le sens de la transcription génétique in vivo.

TRAVAUX PERSONNELS

 MATERIEL ET METHODES

 I - MARQUAGE METABOLIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES PAR
DES PRECURSEURS RADIOACTIFS

 A - MARQUAGE DES CELLULES EN CULTURE

Les cellules Hela et les cellules KB qui nous ont servi de matériel ont été cultivées à 37°C en couches monocellulaires, dans des boîtes de ROUX contenant 80 ml du milieu suivant (milieu 0 10) :

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

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

Le marquage des cellules intactes est effectué en présence de :

5 µCi de	³ H-8-guanine	par ml de milieu de culture
5 µCi de	³ H-8-adénine	par ml de milieu de culture
5 µCi de	³ H-5-uridine	par ml de milieu de culture
4 µCi de	³² P-orthophosphate	par ml de milieu de culture,

pendant 16 heures dans le milieu indiqué ci-dessus, pour les études de la nature de l'extrémité 5'.

Dans le cas de l'étude de la stabilité du complexe, le marquage des cellules intactes est effectué en présence de :

50 μC ^3H -5-uridine par ml de milieu de culture
50 μC ^{14}C -adénine par ml de milieu de culture

Après l'incorporation, le matériel est refroidi par le mélange glace-eau, le milieu radio-actif est éliminé puis remplacé par du milieu EAGLE (milieu 0 10 sans sérum de Veau) préalablement maintenu à 4°C. Le détachement des cellules est effectué par agitation de la boîte de ROUX en présence de billes de verre de 2 mm de diamètre, dans le milieu EAGLE.

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

B - MARQUAGE DES HEPATOCYTES DE RAT

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

II - ISOLEMENT DES NOYAUX DE FOIE DE RAT

Les foies sont lavés dans une solution 0,25 M en saccharose à 4°C, broyés finement et homogénéisés à 0°C dans 20 volumes d'une solution 2,2 M en saccharose et 3,3 mM en acétate de calcium (CHAUVEAU et al.)(179). L'homogénat est centrifugé dans le rotor 21 de l'ultracentrifugeuse préparative Spinco L2-65B à 20.000 t/mn pendant 60 mn à 4°C. Cette méthode permet d'obtenir un sédiment de noyaux de haute pureté.

III - EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

A- EXTRACTION DES COMPLEXES DNA-RNA

1 - EXTRACTION PAR LE MELANGE SDS/CHLOROFORME /ALCOOL ISOAMYLIQUE

Le sédiment contenant 3 à 5 . 10^7 noyaux par ml (ou 2 à 3 . 10^7 cellules) est suspendu dans un tampon contenant :

Tris 0,01 M, PH 7,4

NaCl 0,3 M

Citrate de Na 0,03 M

EDTA 0,001 M, pH 7,4

Bentonite 1 mg/ml, de force ionique élevée et de pH voisin de la neutralité afin de préserver la structure secondaire du DNA et ne pas risquer de détruire les hybrides DNA-RNA, dont la quantité in situ doit être très faible. Ces conditions de déprotéinisation ne sont pas suffisantes pour détacher les protéines très spécifiques présentes aux points de transcription (polymérase) et qui sont difficilement dissociables.

Les noyaux sont lysés par addition de dodécyl sulfonate de sodium (SDS) recristallisé (CRESTFIELD et coll.) (180) jusqu'à une concentration finale de 1 p. 100 (solution stock de SDS 10 p. 100 dans l'éthanol 50 p. 100). Après une agitation de 15 mn à 4°C, le lysat est additionné d'un volume égal du mélange chloroforme/ alcool isoamylique (35 :10) (v:v) et l'agitation poursuivie pendant 45 mn à 4°C. Après 45 mn, le lysat est centrifugé 10 mn à 20.000 g et la phase aqueuse est extraite une seconde fois par le mélange chloroforme/alcool isoamylique, sous agitation pendant 15 mn à 4°C (LEVIS et coll.) (181) Les fibres contenant le DNA et le RNA sont recueillies à partir de la phase aqueuse finale par addition d'un volume égal d'éthanol absolu et enroulées sur des baguettes de verre. Les acides nucléiques peuvent être conservés pendant une semaine dans l'éthanol à 67 p. 100 et à - 20°C.

2 - EXTRACTION PAR LE MELANGE SARCOSINATE DE SODIUM/PRONASE

Le sédiment nucléaire ou cellulaire est suspendu dans le

tampon TEBS^(*) contenant 1 p.100 de dodécyl sarcosinate de sodium et 90 µg de pronase par ml. La lyse du matériel et la déprotéinisation sont conduites sous agitation douce pendant 30 mn à 4°C et 90 mn à température ambiante.

La solution d'acides nucléiques est finalement soumise à une purification en gradient de sulfate de caesium (voir III-A).

B - EXTRACTION DES RNA CYTOPLASMIQUES SELON LA METHODE DE BERGERON ET COLL. (162)

Deux rats mâles âgés de trois mois, mis à jeûner pendant 18 heures sont sacrifiés par décapitation. Les foies sont prélevés et homogénéisés 3 mn dans un appareil de type POTTER-ELVEHJEM avec 10 volumes de saccharose à 15.000 g. Le surnageant additionné de deux volumes d'éthanol absolu est abandonné 2 heures à - 20°C. Les culots obtenus après centrifugation de 10 mn à 10.000 g sont repris par 15 ml de tampon :

Tris 0,05 M, pH 7,4

SDS 1 p.100

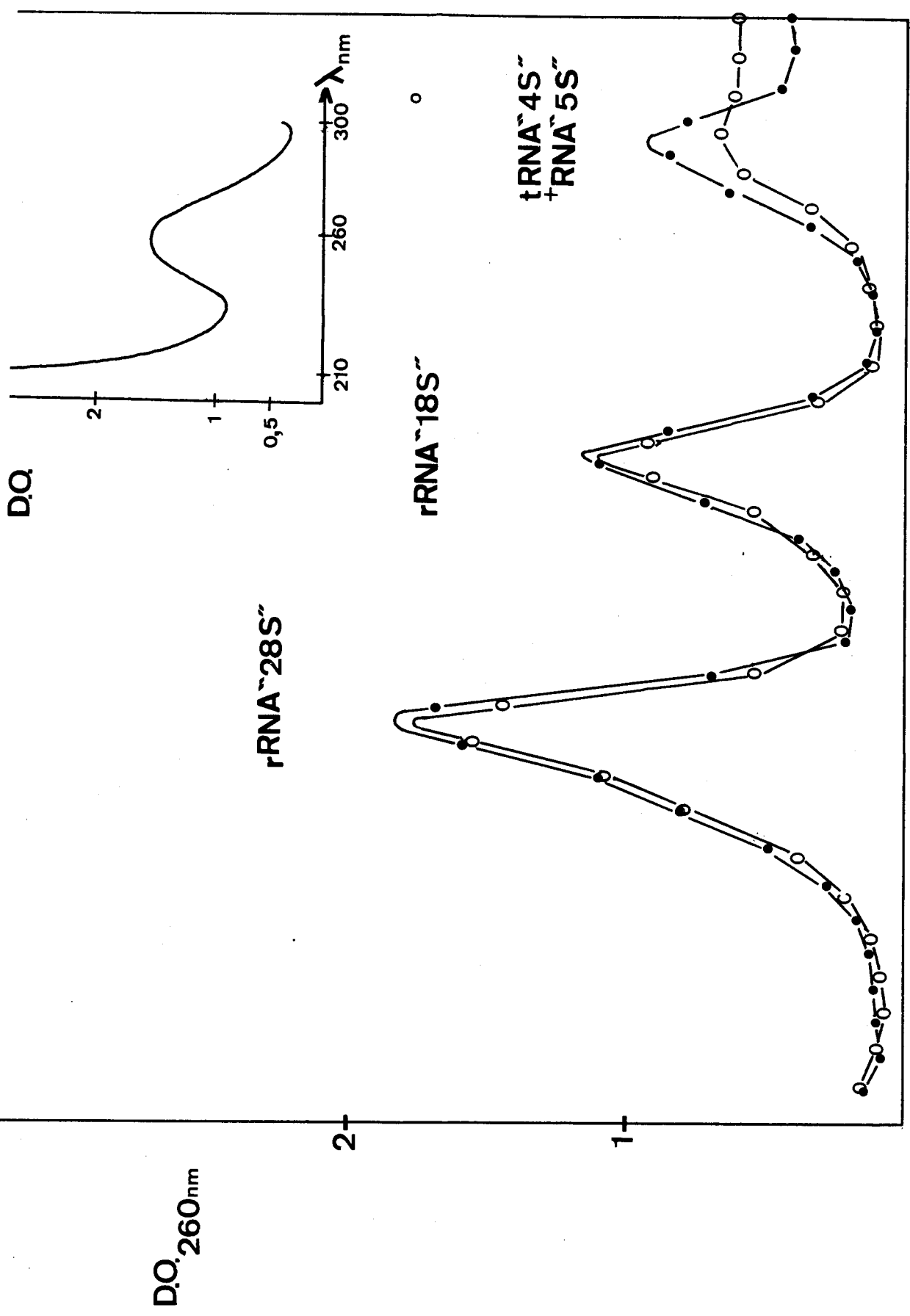
Hydroxyquinoléine 0,1 p.100

Naphtalène disulfonate de sodium 0,1 p.100

Les RNA sont extraits par le phénol à 0°C équilibré en Tris et en SDS (composition du mélange : 85 ml de phénol redistillé + 15 ml de Tris 0,05 M (pH 7,4) contenant 1 p.100 de SDS). Trois extractions successives de 45 mn chacune sont faites à 0°C. Les phases aqueuses recueillies après centrifugation sont ajustées à 0,1 M par NaCl 3 M et précipitées par deux volumes d'éthanol absolu à - 20°C pendant 2 heures. Les RNA sont purifiés par dissolution dans le tampon acétate 0,01 M (pH 5)-NaCl 0,1 M et précipités par deux volumes d'éthanol absolu à - 20°C pendant 2 heures (3 précipitations successives).

L'analyse des RNA sur gradient de sucrose de 5 à 20 p.100 est rassemblée dans la figure 12 (p.43).

(*) TEBS : Tris 0,01 M (pH 7,4) - EDTA 10^{-3} M (pH 7,4) - NaCl 0,15 M - Citrate de sodium 0,015 M



FRACTIONS

Figure n° 12 : ARN cytoplasmiques de foie de Rat centrifugés pendant 16 h à 24.000 t/mn et à 4°C.

●—● D.O. 260 nm ○—○ D.O. 260 nm après action de la DNase.



IV - FRACTIONNEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES

A - SEDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITE DE SULFATE DE CAESIUM

La solution de Cs_2SO_4 (densité moyenne = 1,535) contenant du Tris/HCl 10 mM et de l'EDTA 1 mM est ajustée à pH 7,4 par KOH 0,3 N. Les gradients de 3,5 ml contenant 400 à 800 µg d'acides nucléiques bruts sont centrifugés dans le rotor SW 39 (*) à 33.000 t/mn pendant 72 heures à 20°C ou à 35.000 t/mn pendant 60 heures dans le rotor SW 40. A la fin de la centrifugation, chaque gradient est divisé en fractions égales, chaque fraction étant diluée à 1 ml.

B - SEDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITE DE SUCROSE

Des quantités de 300 à 400 µg d'acides nucléiques sont dissoutes dans 1 ml de tampon Tris/HCl 0,01 M, pH 7,4 NaCl 0,3 M-EDTA 0,001 M, pH 7,4-citrate de sodium 0,03 M et déposées sur un gradient linéaire de saccharose 5 à 20 p.100 dans le même tampon. Dans le cas de fractions provenant des gradients de Cs_2SO_4 , celles ci sont d'abord dialysées 24 heures contre une solution de 2 x SSC (citrate de sodium 0,03 M-NaCl 0,3 M), la solution étant renouvelée une fois. Quand le matériel à déposer a été dénaturé par la chaleur ou par la formaldé, le gradient linéaire de sucrose est préparé dans le tampon 0,1 SSC (NaCl 0,015 M-citrate de sodium 0,00015 M). Les centrifugations sont effectuées dans le rotor SW 25 de la Spinco à 24.000 t/mn pendant 16 heures à + 4°C. Des fractions de 1 ml sont collectées à la fin de chaque centrifugation.

V - TRAITEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES

A - LECTURE DE LA DENSITE OPTIQUE

La lecture de la densité optique des fractions de chaque gradient est effectuée à 260 nm.

(*) Spinco L2-65B.

B - ACTION DES ALCALIS

L'hydrolyse par KOH 0,3 N est effectuée à 37°C pendant 16 heures. La réaction est arrêtée par refroidissement rapide à 0°C.

C - DIGESTIONS ENZYMATIQUES

1 - LA RIBONUCLEASE (RNase)

La ribonucléase pancréatique (polyribonucléotide-2-oligonucléotido-transférase, EC 2.7.7. U (Sigma)) dissoute dans le tampon citrate de sodium 0,015 M, NaCl 0,15 M, pH 5 (SSC), à raison de 5mg/ml, est chauffée à 80°C pendant 10 mn pour éliminer toute trace de déoxyribonucléase. Ainsi préparée, la ribonucléase est utilisée à raison de 10 µg/ml, la concentration en acides nucléiques n'excédant pas 40 µg/ml. L'hydrolyse est effectuée pendant 45 mn à 27°C dans une solution de citrate de sodium 0,03 M - NaCl 0,3 M (2 x SSC) ajustée à pH 7,4 (force ionique 0,48). Dans le cas de fractions provenant de gradients de sucrose et de sulfate de caesium, les échantillons sont ajustés à une force ionique de 0,48 par 20 x SSC. La réaction est stoppée par refroidissement rapide à 0°C. Quand la détermination de la radioactivité est faite sur les échantillons traités par la RNase, la réaction est arrêtée directement par addition d'acide trichloracétique 10 p.100.

2 - LA DEOXYRIBONUCLEASE (DNase I)

La DNase I est utilisée dans une solution à pH 7,4 de Tris 0,01 M, MgCl₂ 0,001 M et NaCl 0,3 M, additionnée de 1 mg/ml de bentonite. L'hydrolyse est effectuée pour 10 µg/ml de DNase, pendant 45 mn à 37°C.

3 - LA PRONASE

La pronase dissoute dans une solution de SSC à pH 7,4 à raison de 5 mg/ml est chauffée à 37°C pendant 3 heures pour éliminer toute trace possible de RNase. Ainsi préparée, la pronase est utilisée à la concentration de 50 µg/ml pendant 45 mn à 37°C.

D - DENATURATION DU COMPLEXE PAR LA CHALEUR ET PAR LA FORMAMIDE

HAYASHI et HAYASHI (183).

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

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

Dans le cas de fractions provenant des gradients de sucrose ou de sulfate de caesium, le matériel est d'abord dialysé pendant 24 heures contre une solution de 0,1 SSC, la solution étant renouvelée une fois.

E - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE

Les acides nucléiques de chaque fraction sont précipités par l'acide trichloracétique 10 p.100 en présence de 100 µg de sperme de saumon comme entraîneur. Après 15 mn à 0°C, le matériel précipité est collecté et lavé par 5 ml d'acide trichloracétique (environ 0,03 p.100) par filtration sur des filtres de 25 mm (HA 0,45 µ) ou sur des filtres de papier Whatman GF 83. Les filtres sont séchés dans une étuve à 37°C pendant 60 mn, et placée dans des fioles contenant 10 ml du milieu scintillant suivant :

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

Le comptage de la radioactivité d'échantillons liquides (0,5 à 1 ml) est effectuée dans 10 ml de la solution de BRAY (184), dont la composition est la suivante :

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

Les piluliers de comptage subissent un précomptage afin d'éliminer tout flacon dont la radioactivité à froid est supérieure à 20 cpm.

VI - SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES RIBONUCLEOTIDES

Les acides nucléiques dissous dans une solution de NaCl 0,3 M et de citrate de sodium 0,03 M (2 x SSC) sont dialysés pendant une nuit à 4°C contre deux litres de tampon orthophosphate disodique 0,02 M (contenant du NaCl 0,3 M et du citrate de sodium 0,03 M) ajusté à pH 7,5 par l'acide orthophosphorique.

L'adialysat est précipité par l'acide trichloracétique 10 p.100 pendant 10 mn à 0°C et filtré sur papier Whatman GF 83. Le filtre est lavé abondamment par l'acide trichloracétique dilué (0,03 p.100) et placé dans 1 ml de KOH 0,3 N à 37°C pendant 16 heures. Après avoir éliminé l'ADN par acidification à froid (acide perchlorique 0,3 N de concentration finale) l'extrait est amené à pH 7 par l'addition de KOH. Le précipité de perchlorate de potassium est éliminé par centrifugation et le surnageant contenant les ribonucléotides est concentré par lyophilisation.

L'extrait est analysé par électrophorèse sur papier Arches 304, 55 cm x 55 cm, dans le tampon citrate de sodium 0,02 M à pH 3,5 à 800 volts pendant 7,5 h pour la détermination de la composition nucléotidique ou à pH 5,7 à 300 volts pendant 10,5 heures pour la détermination des nucléoside-3'-monophosphate-5'-triphosphates (VERBERT et al.)(185).

Après la migration des produits d'hydrolyse et le séchage de la feuille, l'électrophorégramme est découpé en 40 bandes de papier (1 x 8 cm), numérotées de 0 à 40 de la cathode vers l'anode. Chaque bande est ensuite découpée en 10 fragments égaux qui sont introduits dans les flacons de comptage contenant le liquide scintillant.

RESULTATS

Reprenant les conditions expérimentales décrites par KRSMANOVIC (186), nous nous sommes attaché à isoler des complexes naturels DNA-RNA à partir des hépatocytes de Rat, répondant aux trois critères suivants :

1 - Isolement de fractions ne contenant que le DNA et le RNA associé à celui-ci et démonstration de l'absence de RNA libre dans ces préparations.

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

3 - Détachement du RNA du complexe par dénaturation thermique ou par la formamide et mise en évidence de la nature polyribonucléotidique de ce RNA.

Ensuite nous avons entrepris une étude de l'état et des propriétés physico-chimiques de ces complexes afin de donner une image de la première étape de la transcription génétique.

I - IDENTIFICATION DES COMPLEXES DNA-RNA DANS LES NOYAUX DES HEPATOCYTES DE RAT

A - ISOLEMENT DE FRACTIONS CONTENANT LE DNA ET LE RNA

Les acides nucléiques des noyaux de foie de Rat marqués au ^{32}P (2 mC/rat) sont extraits par le mélange SDS-chloroforme-alcool isoamylique (voir matériel et méthodes, p. 4).

L'examen de ceux-ci par centrifugation en gradient de sulfate de caesium (Cs_2SO_4) (densité moyenne = 1,535) permet de distinguer deux populations de RNA radioactif : l'une hétérogène s'équilibre autour du milieu du gradient (densité = 1,60) dans une région intermédiaire entre celle du RNA ribosomique (densité = 1,67 et celle du DNA

(densité = 1,475), l'autre, restant associée au pic de DNA (fig.13, p. 50). Ces observations ont été confirmées par analyse directe des acides nucléiques dans un gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100. Dans ce cas, aucune radioactivité libre n'apparaît dans les zones du gradient correspondant aux RNA ribosomiques "28" et "18 S" (fig. 14, p. 51).

Si le pic de DNA obtenu après centrifugation en gradient de Cs_2SO_4 est réexaminé dans un gradient linéaire de sucrose de 5 à 20 p.100, aucune radioactivité notable non associée au DNA n'apparaît dans le gradient (fig. 15, p.52) ce qui démontre l'absence d'ARN libre dans ces préparations.

Ceci nous permet de considérer que nous avons isolé une fraction de DNA contenant du RNA et dépourvue de RNA libre.

B - MISE EN EVIDENCE DE L'ASSOCIATION DNA-RNA

1 - ACTION DE LA POTASSE ET DE LA RIBONUCLEASE

La radioactivité de la zone hétérogène dans le gradient de Cs_2SO_4 est totalement sensible à l'action de la potasse et de la ribonucléase pancréatique. Après action des alcalis, il apparaît que 50 à 60 p.100 de la radioactivité associée au pic de DNA sont dus au marquage de celui-ci, le reste représentant le RNA. Cette fraction de RNA résiste à l'action de la RNase à raison de 15 à 20 p.100 (fig. 16, p. 53)(Tableau IV, p. 54). L'existence d'un RNA partiellement sensible à la RNase, associé au pic de DNA après une purification poussée nous autorise à considérer qu'il s'agit d'un complexe DNA-RNA. La résistance d'une partie du RNA à l'action de la RNase laisse supposer que le RNA associé au pic de DNA soit apparié partiellement au DNA par des liaisons "pont hydrogène" à l'endroit où doit se trouver fixée la polymérase. Toutefois, dans nos conditions de déprotéinisation, rien ne nous permet de l'affirmer.

2 - ACTION DE LA DNase I

Après action de la DNase I, toute la radioactivité associée au pic de DNA (gradient de sulfate de caesium) se retrouve à la surface d'un gradient linéaire de saccharose associée aux oligodéoxy-



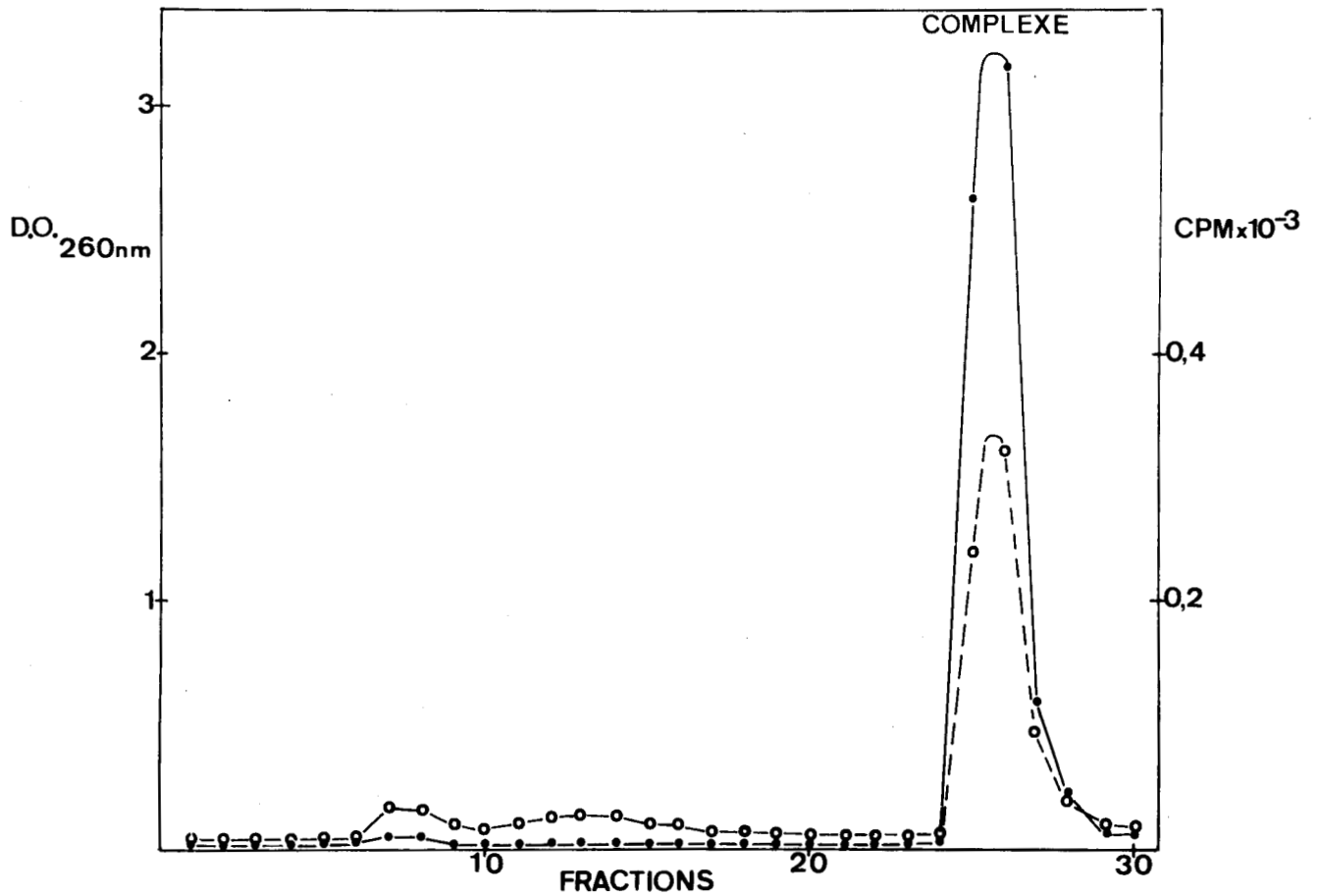


Figure n° 13 : Centrifugation en gradient de Cs_2SO_4
 Acides nucléiques de noyaux de foie de Rat marqués au ^{32}P (2 mC/rat)
 pendant 14 h et centrifugés pendant 72 h à 33.000 t/mn dans une solu-
 tion de Cs_2SO_4 dont la densité moyenne est de 1,535

●—● D.O. 260 nm
 ○—○ Radioactivité



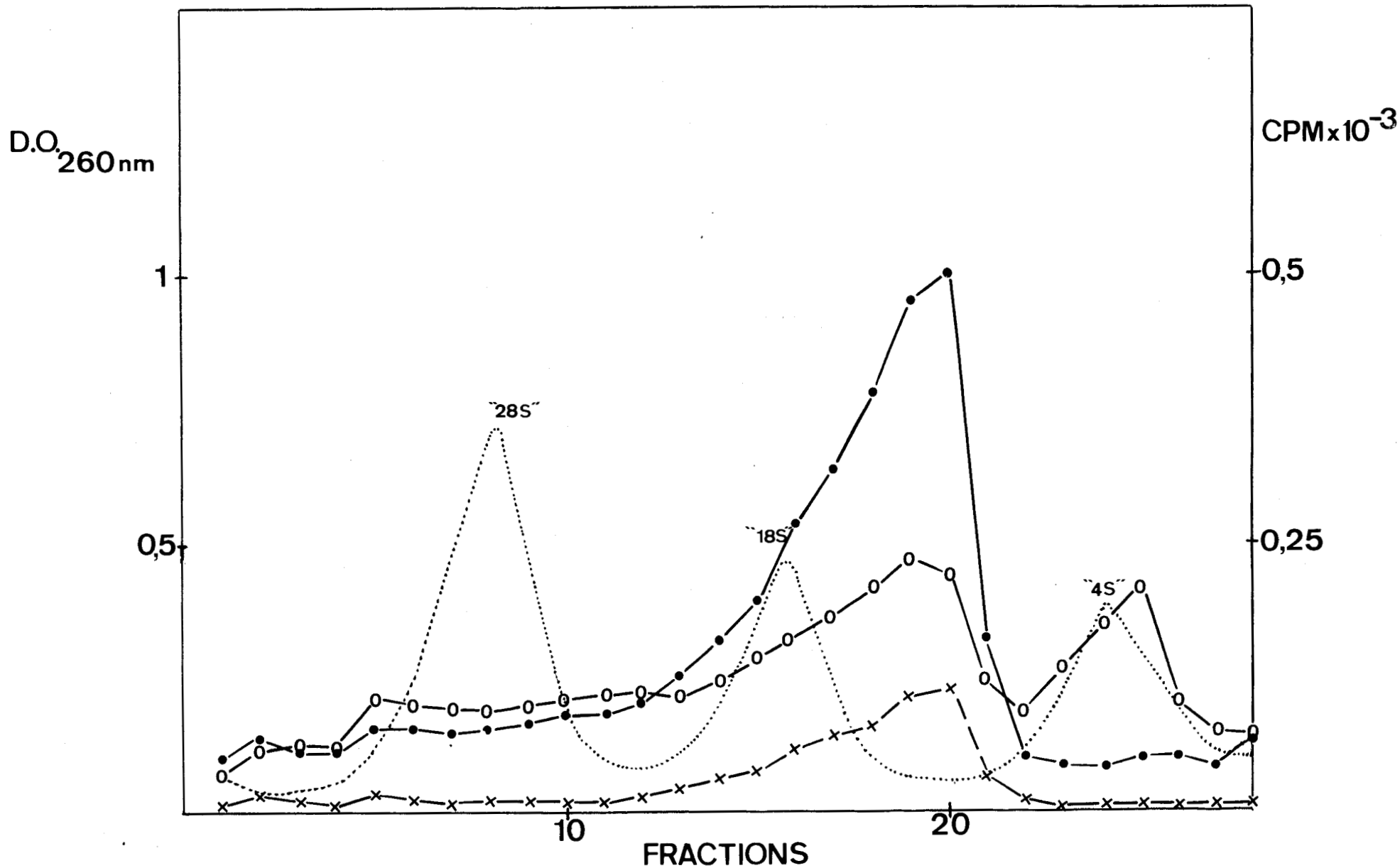


Figure n° 14 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100.

Mêmes acides nucléiques que la figure 13 (p.43). La centrifugation est effectuée dans un rotor Spinco SW 25 à 22.000 t/mn pendant 16 h à 4°C en présence d'acides nucléiques cytoplasmiques non marqués.

●—● D.O. 260nm ○—○ Radioactivité

x—x Radioactivité résistante au KOH



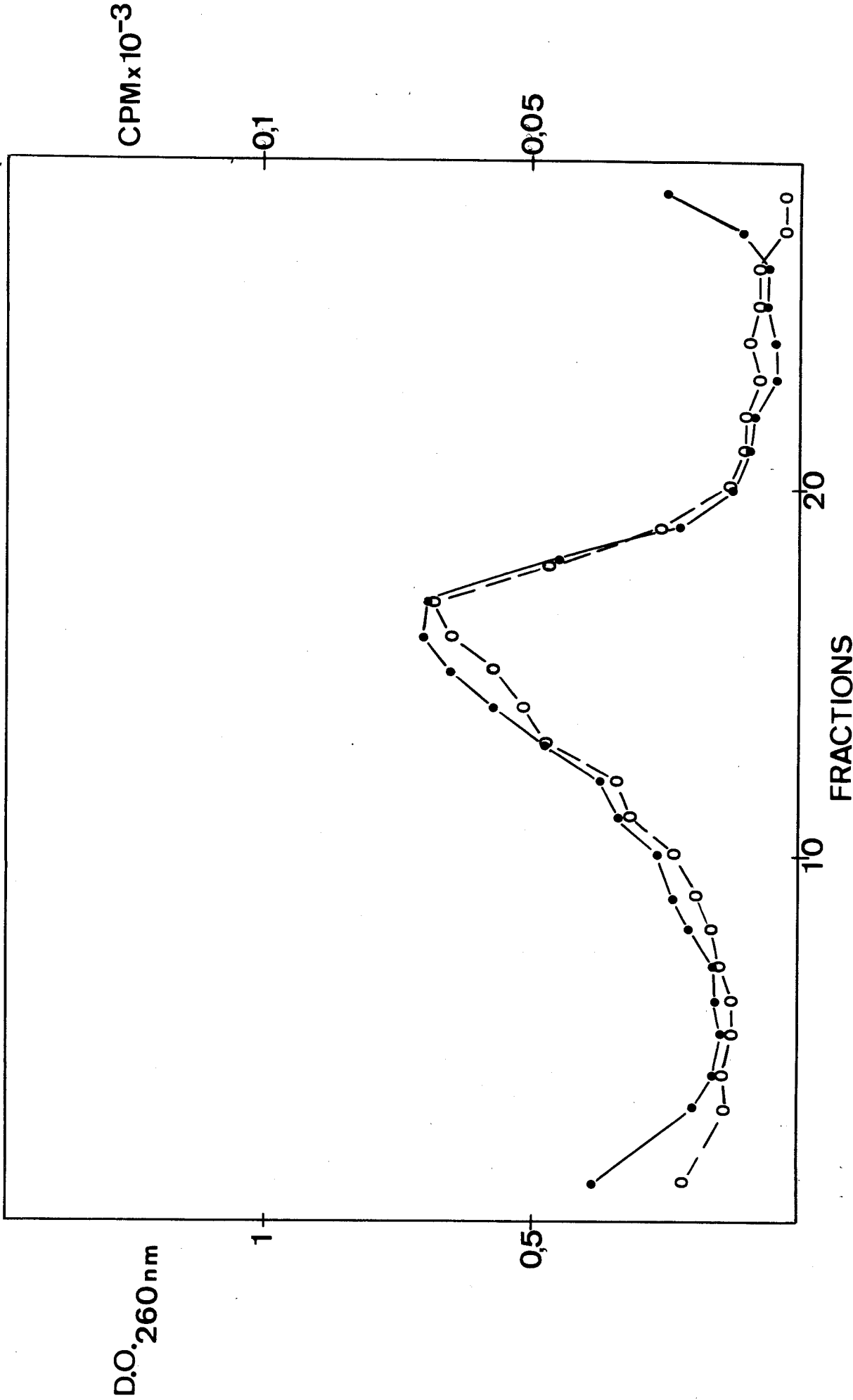


Figure n° 15 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100.

Le pic d'ADN isolé par centrifugation en gradient de Cs_2SO_4 est centrifugé à 24.000 t/mn pendant 16 h à 4°C dans un rotor Spinco SW 25.

●—● D.O. 260 nm

○—○ Radioactivité



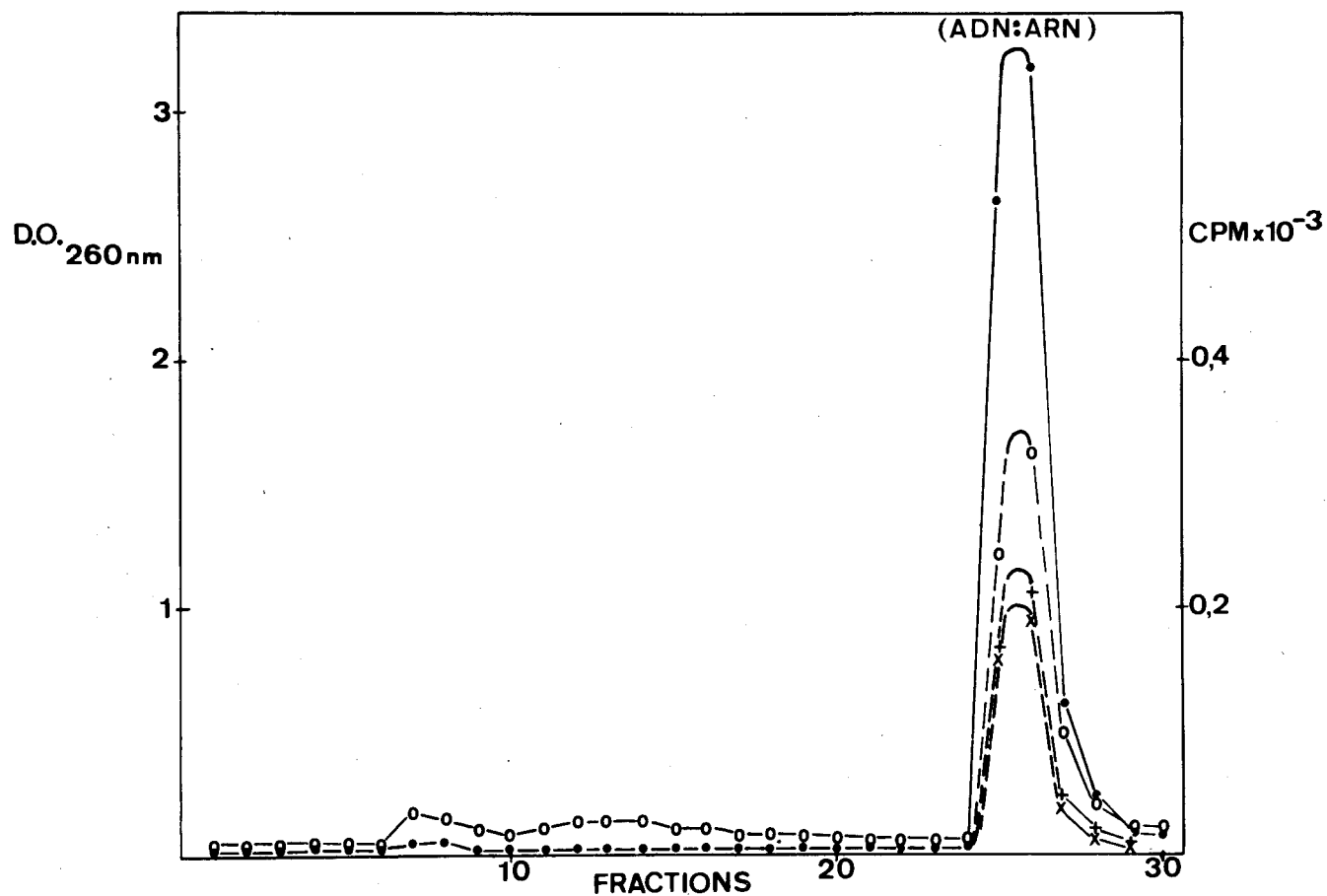


Figure n° 16 : Mêmes acides nucléiques et mêmes conditions de centrifugation que dans la figure 13 (p 43).

●—● D.O. 260 nm

○—○ Radioactivité contrôle

x—x Radioactivité résistante à l'hydrolyse par KOH

+—+ Radioactivité résistante à la RNase.



T A B L E A U I V

Analyse de la radioactivité associée au pic de DNA
dans le gradient de Cs_2SO_4

	Fractions n° 25 + 26 + 27
Radioactivité contrôle (C) (c m)	640
Radioactivité après RNase (R) (cpm)	415
Radioactivité après KOH (K) (cpm)	377
Radioactivité due au RNA = C - K (cpm)	263
Radioactivité résistante à la RNase = R - K (cpm)	38
Marquage du DNA	59 p.100
Marquage du RNA	41 p.100
Fraction de RNA résistante à la RNase	15 p.100



ribonucléotides libérés par hydrolyse enzymatique (fig. 17, p. 56). Ce résultat appuie l'hypothèse d'une association naturelle DNA-RNA.

3 - DETACHEMENT DU RNA PAR DENATURATION THERMIQUE

Le RNA associé au DNA (Pic de DNA dans le gradient de Cs_2SO_4) peut être détaché par dénaturation du complexe par la chaleur ou par la formamide (voir matériel et méthodes, p. 46) (HAYASHI et HAYASHI) (186a) et séparé du DNA par centrifugation dans un gradient linéaire de sucrose de 5 à 20 p.100. Dans ce cas, il apparaît une population hétérogène de RNA dont la majeure partie sédimente dans la région 4 à 9 S, ce qui correspond à des chaînes d'environ 80 à 400 nucléotides (fig. 18, p. 57; fig. 19, p. 58 ; fig. 20, p. 59). Sachant que la proportion de RNA résistant à l'action de la RNase est d'environ 15p.100, on peut admettre que le fraction RNase résistante contient en moyenne 30 à 40 nucléotides. Cette hypothèse se trouve confirmée par l'étude de la constante de sédimentation de la fraction résistante à cet enzyme.

Le complexe traité par la RNase pancréatique et dénaturé par la chaleur ou par la formamide (HAYASHI et HAYASHI)(187) est analysé dans un gradient linéaire de sucrose de 5 à 20 p.100. La fraction de RNA détachée du complexe et séparée du DNA sédimente dans la région de 3 S, ce qui correspond à un poids moléculaire de 15.500, c'est-à-dire à 40 nucléotides environ (fig. 21, p. 60).

L'intégrité macromoléculaire du RNA total et de la partie RNase résistante, caractérisée par leur constante de sédimentation, dépend de la durée des expérimentations (désintégration du ^{32}P). Lorsque la fraction de DNA contenant le complexe isolée par centrifugation en gradient de Cs_2SO_4 , est soumise aux traitements permettant de détacher le RNA associé au DNA (dénaturation thermique ou par la formamide) et centrifugée à nouveau dans un gradient de Cs_2SO_4 , la fraction de RNA libérée s'équilibre dans la zone du gradient de densité allant de 1,60 à 1,67. Si cette zone est analysée en gradient continu de sucrose, le RNA sédimente dans la région 2 à 3 S du gradient (fig. 22, p. 61 ; fig. 23, p. 62). Cette diminution de la taille des chaînes est vraisemblablement due aux cassures provoquées par la désintégration du ^{32}P .

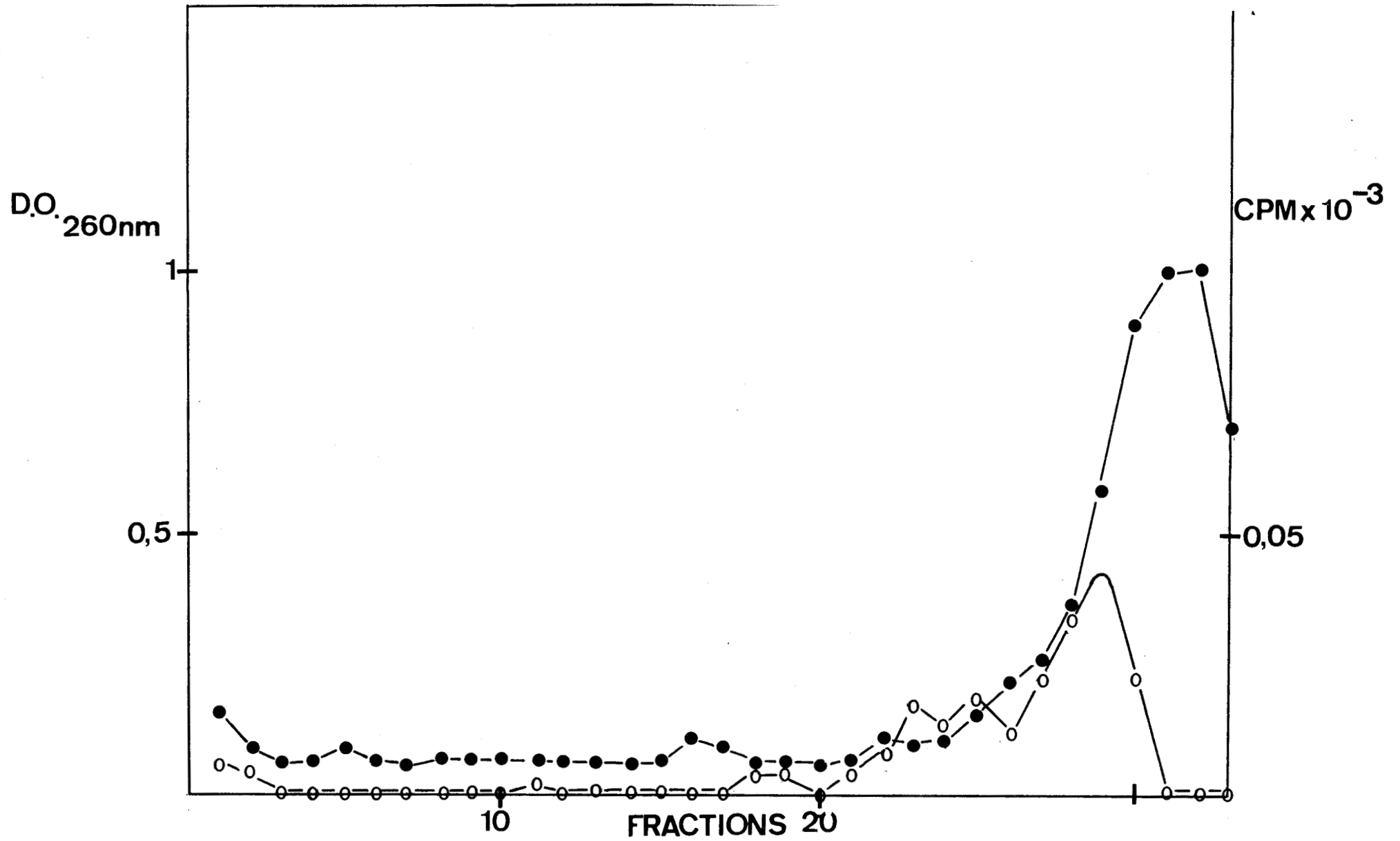


Figure n° 17 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100

Action de la DNase sur le complexe DNA-RNA. La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 24.000 t/mn pendant 16 heures à 4°C.



●—● D.O. 260 nm

○—○ Radioactivité

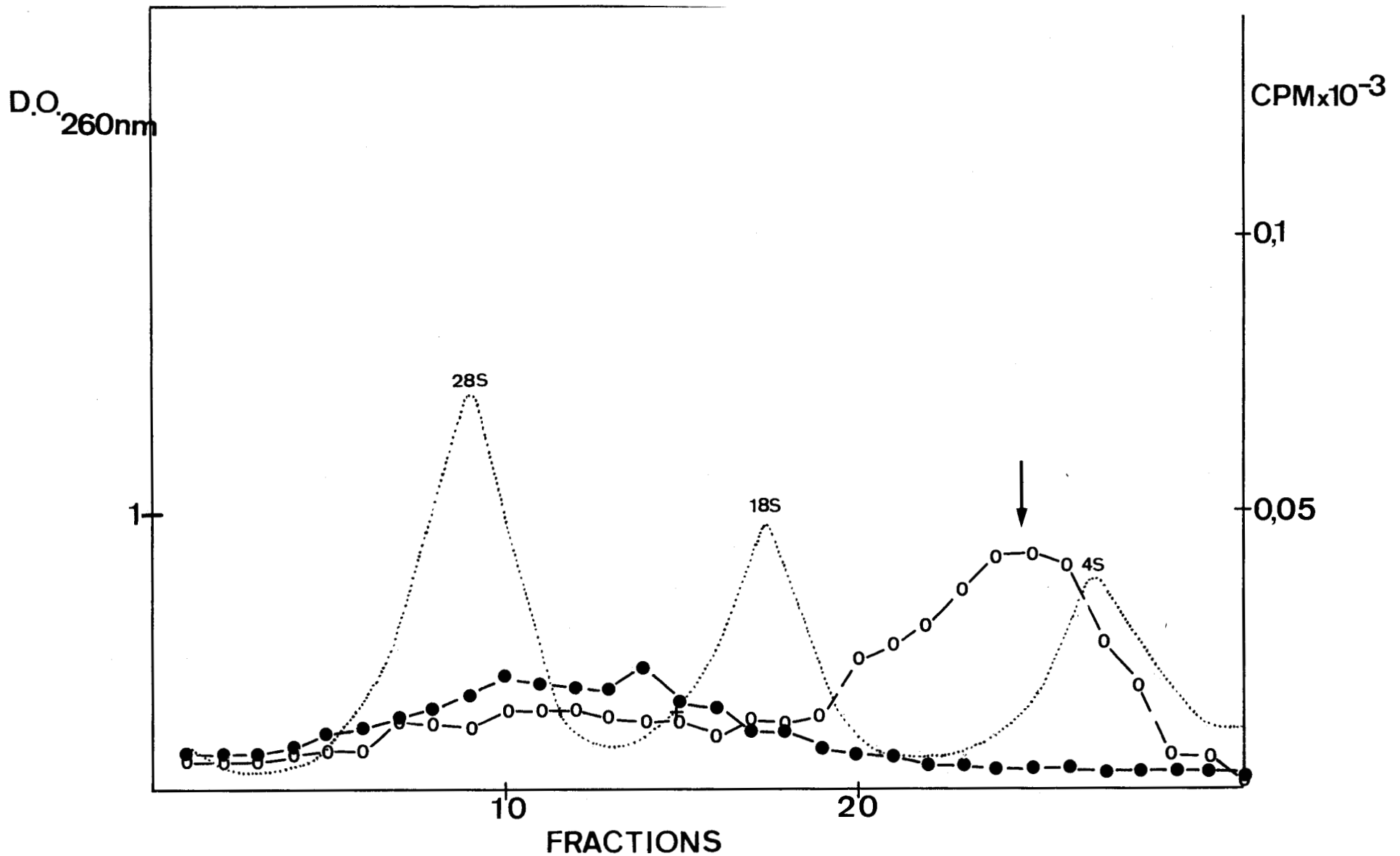


Figure n° 18 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100.

Dissociation thermique du RNA à partir du complexe DNA-RNA préalablement purifié par un gradient de Cs_2SO_4 . La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 22.000 t/mn pendant 14 h à 4°C.

- D.O.260nm
- Radioactivité
- RNA cytoplasmique

315
LIFE

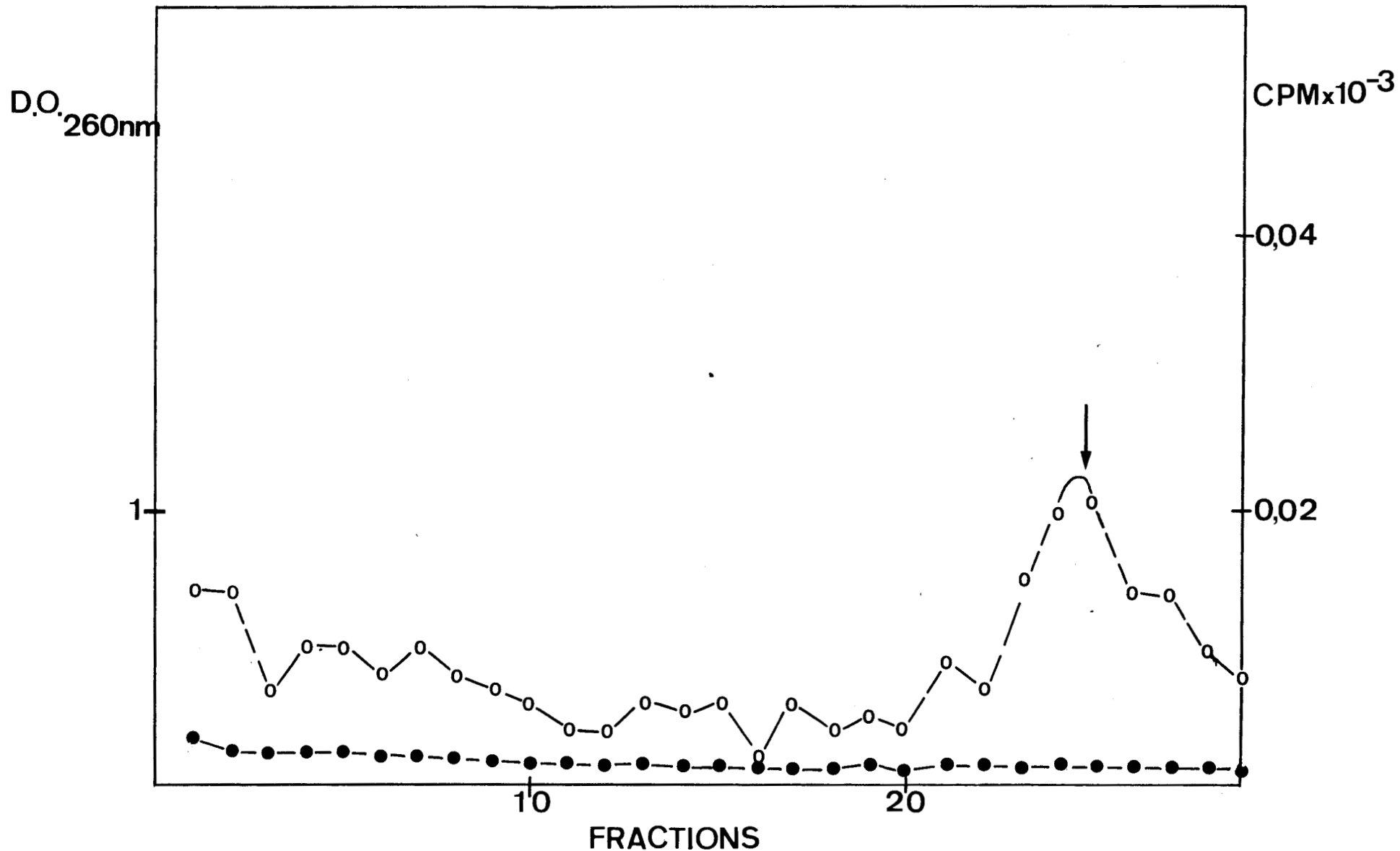


Figure n° 19 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100.

Le RNA est dissocié par la formamide 80 p.100 à partir du complexe DNA-RNA préalablement purifié par un gradient linéaire de saccharose. La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 22.000 t/mn pendant 14 heures à 4°C.

●—● D.O. 260nm
 ○—○ Radioactivité



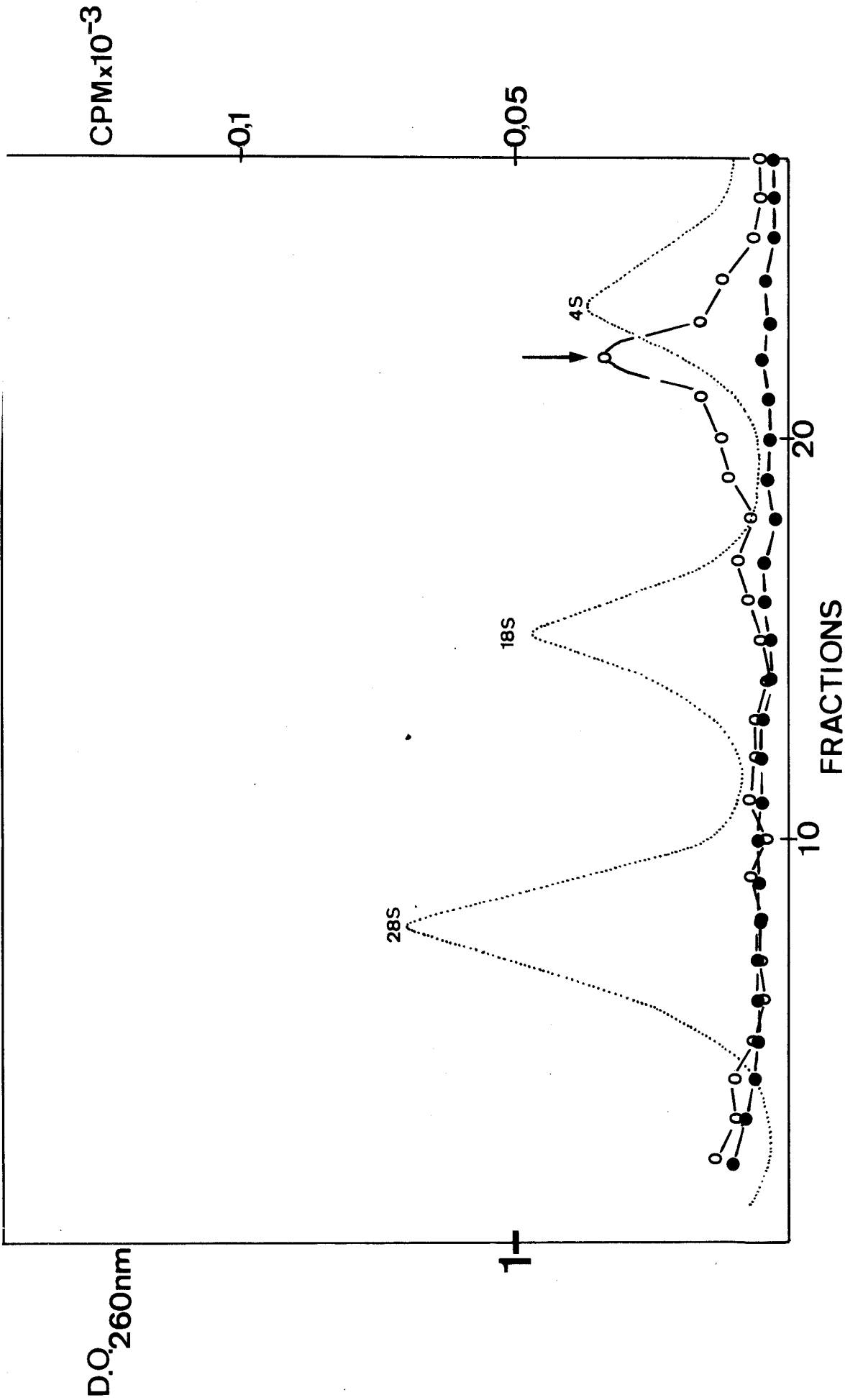


Figure n° 20 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100

RNA dissocié par la formamide 80 p.100 à partir du complexe DNA-RNA purifié préalablement par un gradient de Cs_2SO_4

O—O Radioactivité

La centrifugation est effectuée dans un rotor à 24.000 t/mn pendant 16 h à 4°C en présence d'acides nucléiques non marqués.....

●—● D.O. 260nm



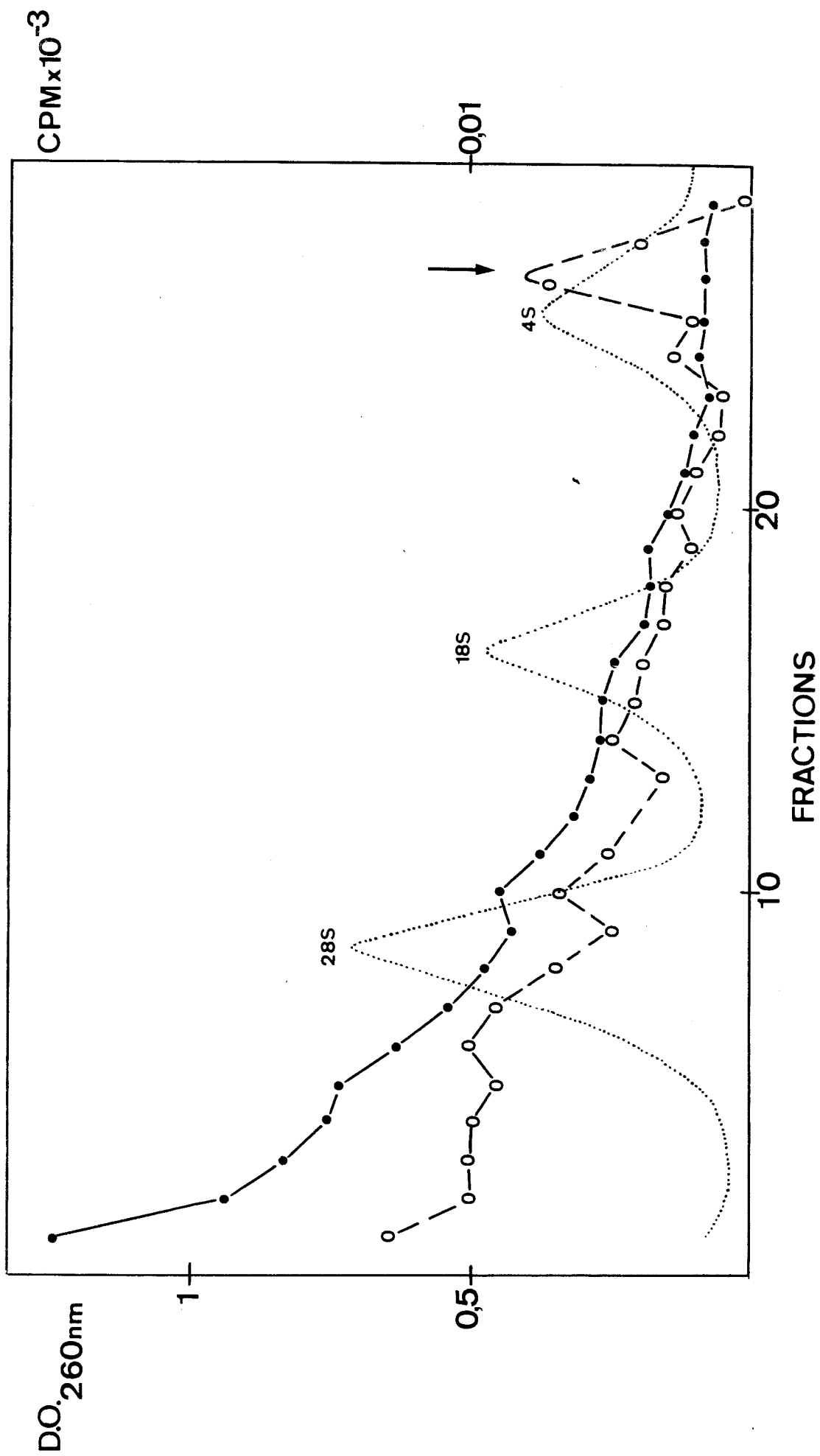


Figure n° 21 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100

La fraction de RNA résistante à la RNase est dissociée par la chaleur du complexe DNA-RNA préalablement purifié par gradient de Cs₂SO₄.

○—○ Radioactivité ●—● D.O. 260nm

La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 24.000 t/mn pendant 16 h à 4°C en présence d'acides nucléiques non marqués.....



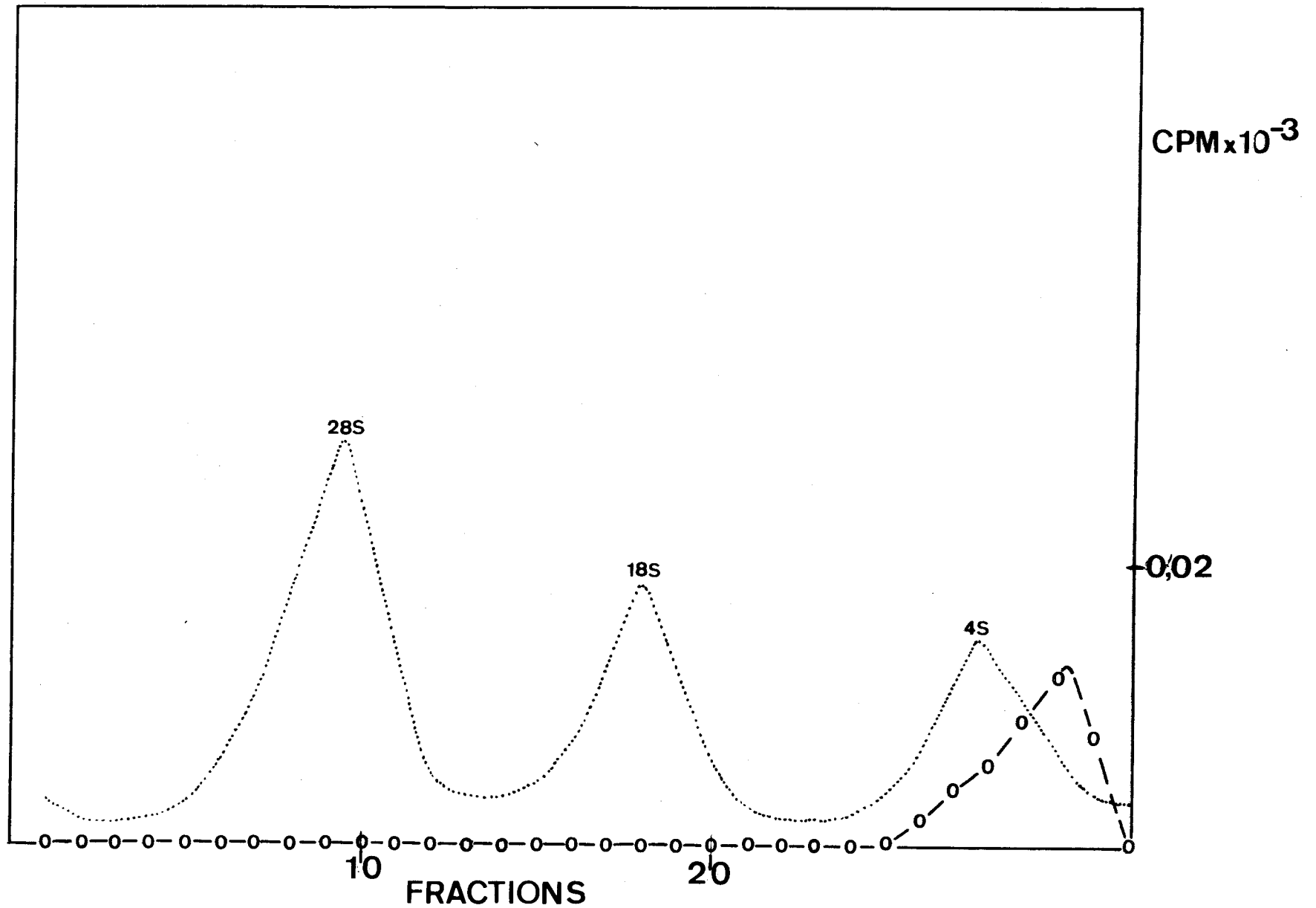


Figure n° 22 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100.

Le RNA total dissocié par la formamide 80 p.100 du complexe DNA-RNA préalablement purifié par gradient de Cs_2SO_4 , séparé du DNA par centrifugation en gradient de Cs_2SO_4 et examiné en gradient linéaire de saccharose en présence de RNA non marqué.....

○—Radioactivité

La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 24 000 t/mn pendant 16 h à 4°C



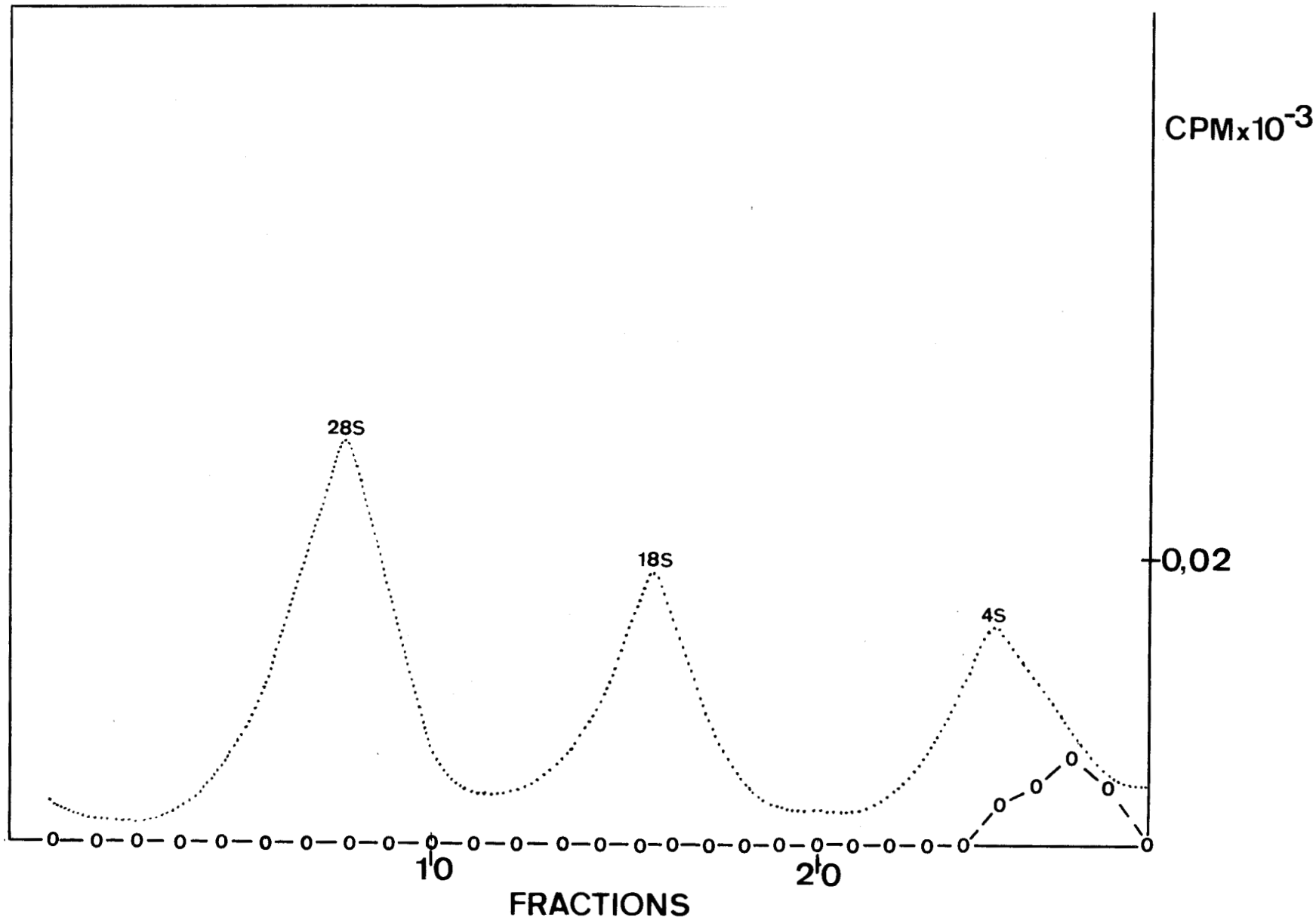


Figure n° 23 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100.

L'ARN résistant à l'action de la RNase est dissocié par la formamide 80 p.100 du complexe DNA-RNA préalablement purifié par gradient de Cs_2SO_4 , séparé du DNA par centrifugation en gradient de Cs_2SO_4 et examiné en gradient linéaire de saccharose en présence de RNA non marqués.....

●—● D.O. 260nm

○—○ Radioactivité

La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 24.000 t/mn pendant 16 h à 4°C.



C - CONCLUSIONS

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que nous avons isolé une fraction de DNA contenant un RNA de nature macromoléculaire associé au DNA dont une partie résiste à l'action de la RNase P. L'isolement de telles structures représentait un matériel de choix nous permettant d'étudier certaines modalités de la transcription.

II - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES

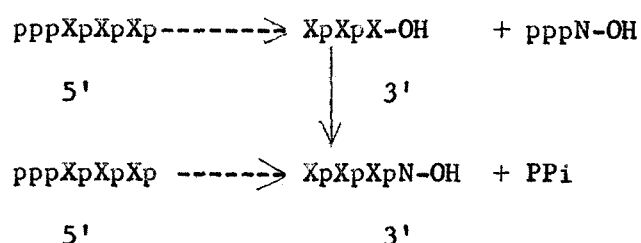
DNA-RNA DANS LES CELLULES D'EUCARYOTES

A - COMPOSITION NUCLEOTIDIQUE DU RNA ASSOCIE AU DNA (*)

L'hydrolysate alcalin du RNA associé au DNA (pic d'ADN en gradient de Ca_2SO_4) est analysé par électrophorèse en tampon citrate à pH 3,5 et la composition centésimale déterminée par la radioactivité (voir Matériel et Méthodes : p.48). Le RNA associé au DNA possède une composition de type GC et le rapport $\frac{G + C}{A + U}$ est proche de celui obtenu à partir des RNA nucléaires totaux (Tableau V, p. 64 ; fig. 24, p. 65) (ELSON *et al.*) (188) ; (DEFERT-KOBUS) (189).

B - ETUDE DE L'EXTREMITE 5' DU RNA ASSOCIE AU DNA (*)

In vitro, la synthèse du RNA se fait par addition de résidus nucléotidiques sur l'extrémité 3'-hydroxyle du polyribonucléotide naissant :



En effet, dans le cas du RNA synthétisé en présence du DNA du phage T_4 et de la RNA polymérase d'E. coli, il a été

(* Ce travail a été réalisé en collaboration avec S. DESREUMAUX et A. VERBERT.

T A B L E A U V

Composition en bases du RNA associé au DNA comparé aux
RNA nucléaires dans les noyaux d'hépatocytes de Rat.

Bases	Composition centésimale en p.100		
	RNA nucléaires		RNA associé au DNA
	ELSON et al. (190)	DEFERT (191)	VERBERT (192)
Cytosine	29,7	28	28
Adénine	20,2	19,7	18,6
Guanine	26,2	28,3	18
Uracile	23,9	24	25,4
$\frac{(G + C)}{(A + U)}$	1,27	1,26	1,27



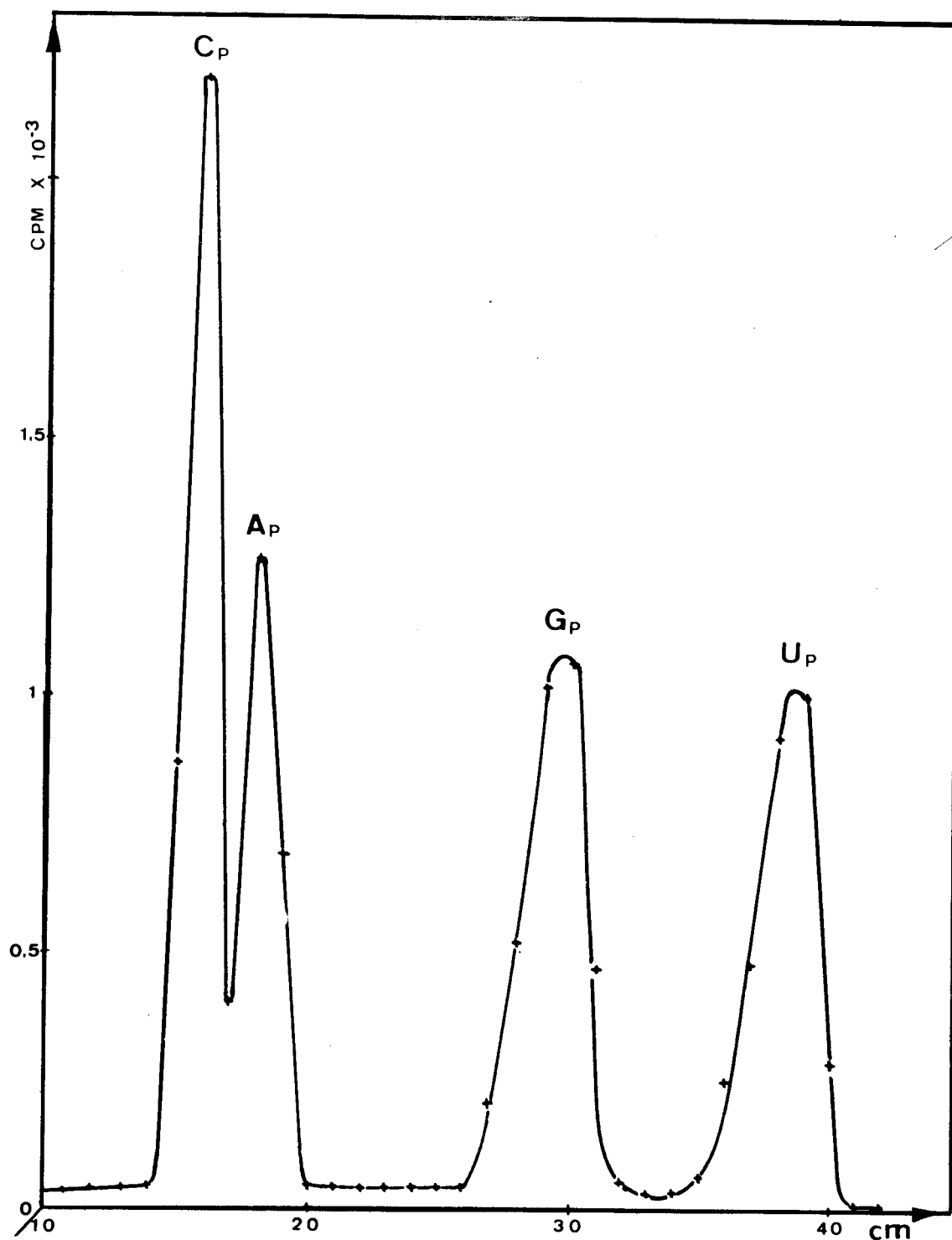


Figure n° 24 : Profil de migration des nucléosides mono-phosphates libérés par l'hydrolyse alcaline du complexe DNA-RNA naissant du foie de Rat.

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

démonstré que l'extrémité 3'-hydroxyle appartient à la partie résistante à la RNase associée au DNA en un complexe DNA-RNA. L'allongement de la chaîne de RNA se fait donc dans le sens de 5'— 3' (BREMER et KONRAD)(193). De plus, l'initiation des chaînes de RNA se fait préférentiellement par les nucléotides puriques (Tableaux II, p. 22 et Tableau III, p. 23).

Il était intéressant de vérifier la nature de l'extrémité 5' du RNA associé au DNA dans le cas du complexe obtenu in vivo.

1 - Recherche de composés de type pppNp dans les hydrolysats alcalins du complexe extrait des noyaux d'hépatocytes de Rat.

Des travaux effectués par KRSMANOVIC et coll. (194) laissent supposer la présence de nucléoside-5'-triphosphate-3'-monophosphates (pppXp) dans les hydrolysats alcalins du RNA associé au DNA dans les hépatocytes de Rat (fig. 25, p. 67). Toutefois la séparation insuffisante entre les nucléosides polyphosphates et le phosphore inorganique à pH 3,5 et l'absence de témoin tétraphosphate ne permettaient pas de trancher.

Sachant que les RNA cytoplasmiques stables (rRNA et tRNA) possèdent un nucléoside monophosphate à l'extrémité 5' (voir page 25) et que la contamination en RNA libres du matériel non purifié par centrifugation en gradient de Ca_2SO_4 est très faible, nous avons utilisé la même méthode en omettant la purification. Ceci nous a permis de raccourcir la durée de l'expérience de quatre jours de façon à diminuer la dégradation du matériel dû à la désintégration du radiophosphore.

En plus, nous avons modifié les conditions de séparation électrophorétique des produits d'hydrolyse (VERBERT et coll.) (195). A cet effet, les hydrolysats alcalins ont été soumis à une électrophorèse à pH 5,7. Dans ces conditions, l'ordre croissant des vitesses de migration anodique des composés phosphorylés est le suivant : nucléosides monophosphates, ribose phosphate, acide phosphorique, nucléosides triphosphates, adénosine tétraphosphate (ppppA)(*). Ce procédé nous a permis d'éliminer l'interférence de ^{32}P libre au niveau du pic de pppNp.

(*) L'adénosine tétraphosphate nous a été aimablement envoyée par Monsieur le Professeur LIEBECQ que nous remercions vivement.

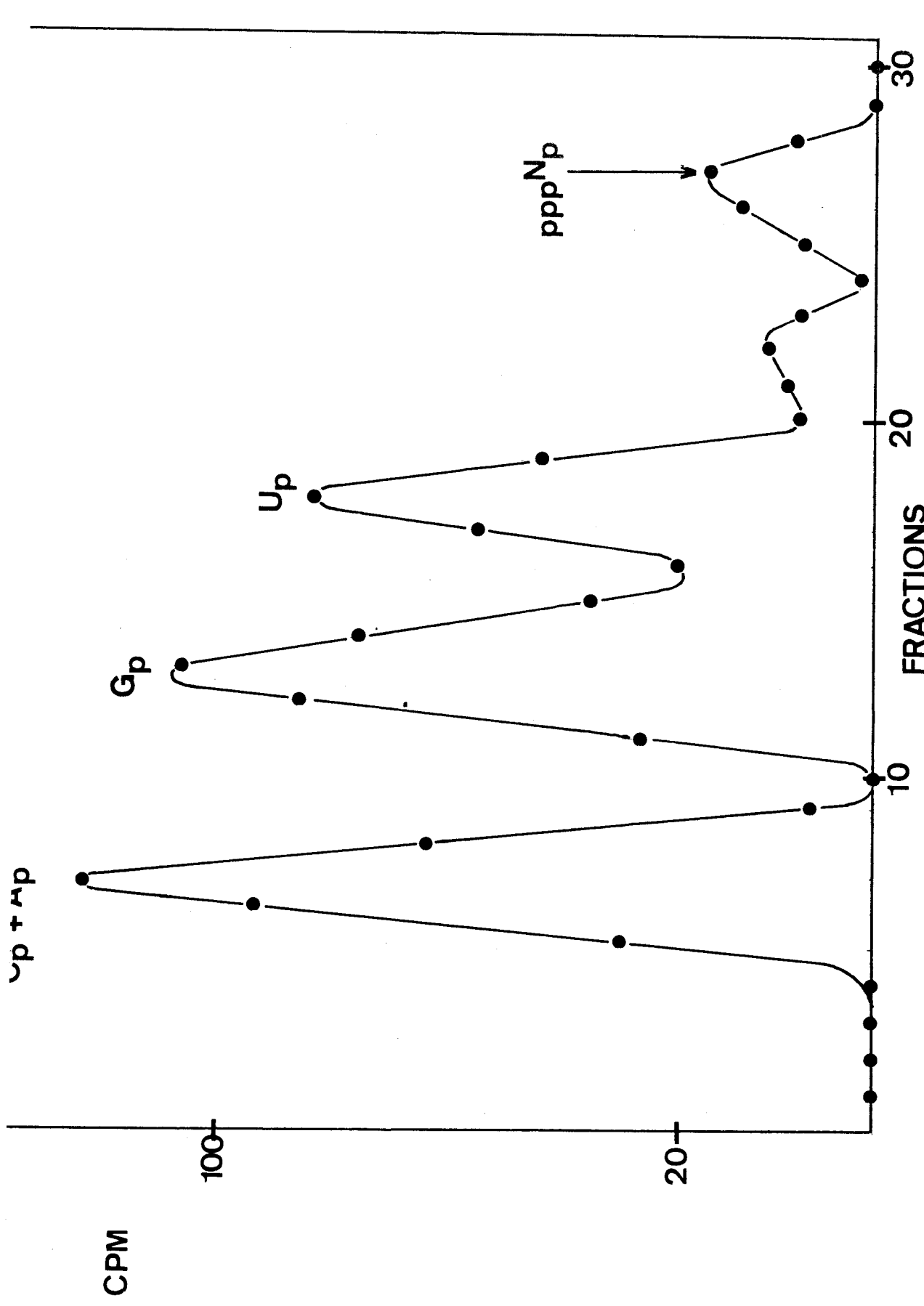


Figure n° 25 : Mise en évidence d'un composé de type polyphosphate dans l'hydrolysat alcalin du RNA associé au DNA dans les hépatocytes de Rat.

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



Dans les hydrolysats alcalins nous avons caractérisé outre des nucléosides monophosphates et des traces d'acide phosphorique un composé qui migre un peu en avant de l'adénosine tétraphosphate (fig. 26, p. 69). Nous pouvons en conclure que dans le cas des hépatocytes de Rat, les RNA en cours de synthèse contiennent un nucléoside-triphosphate en position 5'-terminale.

2 - Etude de l'extrémité 5' des RNA des complexes extraits des cellules HeLa et KB

Les hydrolysats alcalins des complexes DNA-RNA extraits des cellules HeLa et KB sans purification sur gradient de Co_2SO_4 après marquage par l'adénine et la guanine tritiées, ont été analysés par électrophorèse à pH 5,7 dans les mêmes conditions que précédemment. Comme dans le cas des hépatocytes de Rat, nous avons mis en évidence des composés de type pppXp dans ces hydrolysats. Il s'agit de pppGp et pppAp. Une étude plus poussée nous a permis de conclure qu'il s'agit principalement de pppGp (Tableau VI, p. 70).

L'incorporation des bases pyrimidiques tritiées ne permet pas de détecter la présence de composés radioactifs dans la zone correspondant aux nucléosides tétraphosphates sur les électrophorogrammes (fig. 27, p. 71).

3 - Conclusions

L'existence d'un composé de type pppXp à l'extrémité des RNA associés au DNA dans ces cellules Eucaryotiques, nous permet de penser que ces RNA sont naissants. L'initiation par des nucléosides triphosphates puriques et principalement par pppG plaide en faveur d'une transcription de 5' vers 3' (voir paragraphe Discussions p. 81).

C - STABILITE DU COMPLEXE DNA-RNA

Le fait que de nombreux auteurs aient pu extraire un complexe naturel DNA-RNA par l'action combinée de déprotéinisants et de détergents tels que le phénol, le chloroforme, le SDS laissait supposer que la RNA polymérase n'intervenait pas dans la sta-

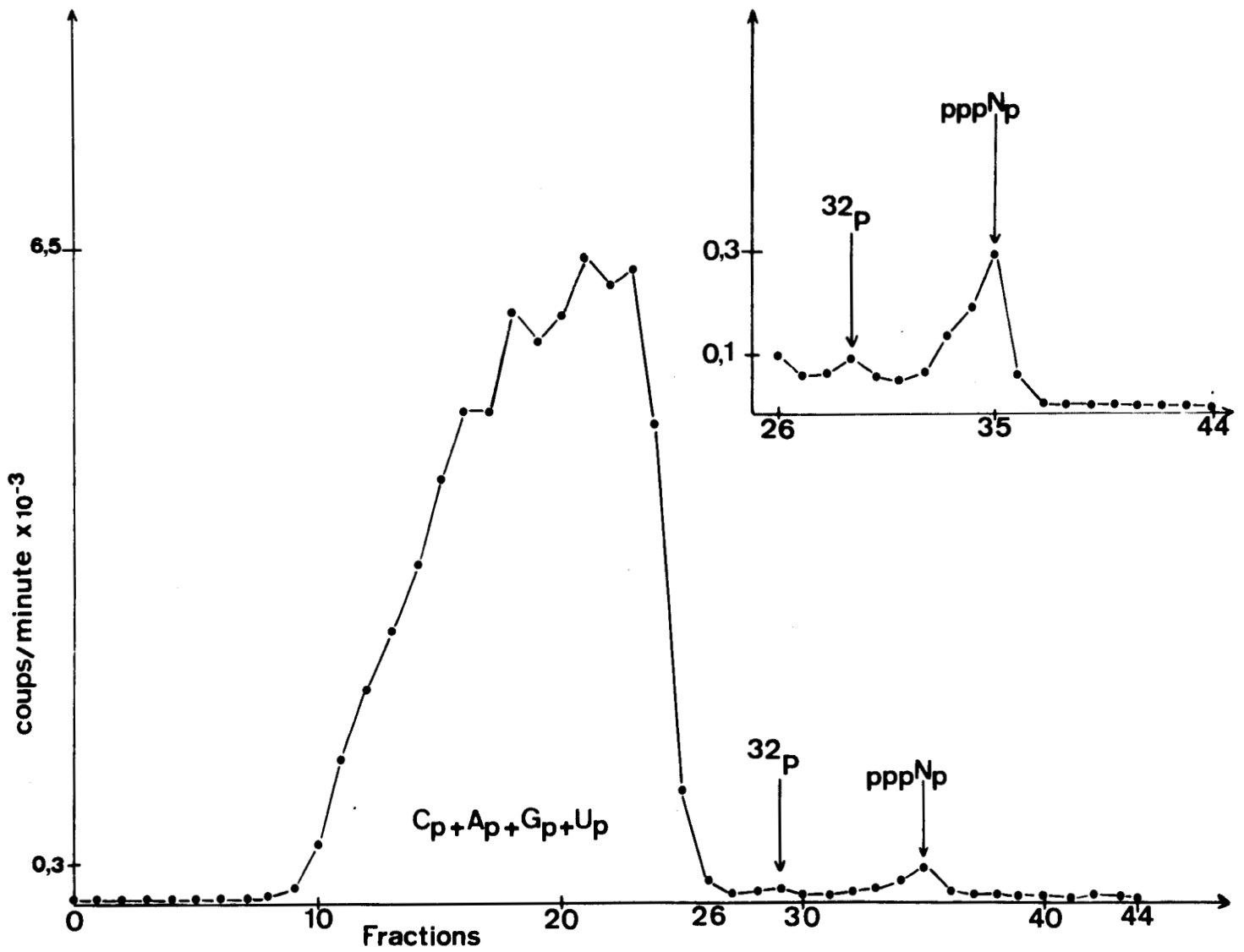


Figure n° 26 : Electrophorèse à pH 5,7, tampon citrate de Na 0,02 M.

Mise en évidence d'un composé de type pppNp dans l'hydrolysât alcalin du RNA associé au DNA dans les hépatocytes de Rat.

●—● Radioactivité



T A B L E A U VI

Pourcentage de GTP et d'ATP à l'extrémité 5' des RNA des complexes DNA-RNA après marquage par l'adénine ^3H et la guanine ^3H dans les cellules Hela et KB.

		Cellules Hela		Cellules KB
		Exp. I	Exp. II	Exp. I
Proportion de chaînes débutant du côté 5' par	pppG	82 _{p.100}	86 _{p.100}	80 _{p.100}
	pppA	18 _{p.100}	14 _{p.100}	20 _{p.100}



bilisation des hybrides DNA-RNA. Cependant comme le font remarquer justement HAYASHI et HAYASHI (196), les méthodes utilisées sont très douces et ne permettent pas de conclure à une bonne déprotéinisation du matériel (voir matériel et méthodes, p. 41'). D'ailleurs la taille de la polymérase ainsi que la spécificité de sa fixation sur le DNA in vivo sont telles que tout permet de penser qu'elle puisse résister à l'action des déprotéinisants.

Le rôle de la force ionique dans la stabilité du complexe DNA-RNA a été pour la première fois évoqué par LEVIS et coll. (197) et KRSMANOVIC (198). En effet ces auteurs notent que le complexe DNA-RNA isolé à partir des noyaux de cellules de Hela incubés in vitro est stable à l'action du SDS à haute force ionique (0,34) et instable à la même action à basse force ionique (0,02). Ils ont en outre remarqué que la sensibilité aux protéases ou à la haute force ionique (5,5) des complexes DNA-RNA obtenus par certains auteurs après extraction par les détergents pourrait provenir de la labilisation des liaisons "pont hydrogène" produite lors du passage à basse force ionique du matériel au cours des traitements biochimiques. Enfin d'autres auteurs ont obtenu des résultats dans leurs études de la transcription in vitro et in vivo qui nous ont amené à penser que la force ionique devait jouer un rôle important dans la stabilité du complexe que nous avons isolé.

Ainsi HAYASHI et HAYASHI (199) traitant par la RNase le complexe DNA-RNA intra-cellulaire obtenu à partir d'E. coli infecté par le phage ϕ X-174, obtiennent deux résultats différents selon la force ionique employée : le complexe est résistant à la RNase à 25°C pendant une heure dans le 2 x SSC (force ionique = 0,48) alors que dans le 0,1 SSC (force ionique = 0,024) pendant trois heures à 37°C, il est totalement sensible à la RNase.

TONGUR et coll. (200) traitent le complexe (extrait à partir d'E. coli et purifié par action de la RNase pancréatique) par la pronase dans un tampon Tris/HCl 0,02 M, pH 8 (force ionique = 0,02) pendant 8 heures à 37°C. Dans ce cas le RNA du complexe devient sensible à la RNase pour 50 p.100.

NOVAK et DOTY (201) ont démontré la résistance du complexe ternaire DNA-RNA polymérase-RNA à l'action de différentes protéases pendant la transcription in vitro dans un tampon de force ionique 0,3.

Ces remarques nous ont conduit à entreprendre l'étude de l'influence de la force ionique, ainsi que sa contribution à l'action des enzymes protéolytiques (pronase) sur la stabilité du complexe DNA-RNA isolé des noyaux d'hépatocytes de Rat.

1 - Complexe extrait par le mélange SDS/chloroforme/alcool isoamylique

Si les acides nucléiques extraits par la méthode citée p. 41 sont mis à incuber (à 37°C ou à 40°C) en absence de pronase dans un tampon citrate de sodium-NaCl de force ionique de l'ordre de 0,024 (0,1 SSC à pH 7,4) et analysés en gradient de Cs_2SO_4 , on remarque une diminution d'environ 80 p.100 de la quantité de RNA associé au DNA. La faible proportion de RNA qui reste associé au DNA dans ces conditions semble être affectée en présence de pronase (Tableau VII, p. 74).

Par contre, si le complexe est incubé (à 4°C ou à 37°C) en présence de pronase dans un tampon citrate de sodium-NaCl de force ionique de l'ordre de 0,48 (2 x SSC à pH 7,4) et examiné dans un gradient linéaire de sucrose de 5 à 20 p.100, on observe que la quantité de RNA associé au DNA n'est pas modifiée (fig. 28, p. 75).

Le fait qu'à haute force ionique et en présence de pronase la quantité de RNA associé au DNA reste inchangée nous a encouragé à utiliser une méthode d'extraction faisant intervenir simultanément la force ionique et l'action des enzymes protéolytiques.

2 - Utilisation du mélange sarcosinate de sodium/pronase

a - Nous avons utilisé les cellules Hela et KB et des précurseurs plus spécifiques que le radiophosphore afin d'atténuer le marquage du DNA et l'effet de radiolyse.

Après purification par centrifugation en gradient de Cs_2SO_4 du matériel extrait par le mélange sarcosinate de sodium/pronase (voir matériel et méthodes p. 42), nous obtenons un profil de sédimentation identique à celui obtenu dans le cas des hépatocytes de Rat (fig. 29, p. 76). La radioactivité due au DNA est très faible et l'action de la RNase P fait apparaître une partie du RNA qui résiste à l'action de cet enzyme (Tableau VIII, p. 77). Nous pouvons

T A B L E A U VII

Action de la force ionique sur le complexe DNA-RNA
isolé par le mélange SDS/chloroforme/alcool isoa-
mylique après purification en gradient de Cs_2SO_4 .

Forces ioniques			Noyaux d'hépatocytes de Rat marqués au ^{32}P	RNA associé au DNA (*) p.100
0,48	37°C	$\frac{C - K}{D.O. 260nm}$	130	100 p.100 p.100
	4°C	$\frac{C - K}{D.O. 260nm}$	96	
0,024	37°C	$\frac{C - K}{D.O. 260nm}$	22	20 p.100
	4°C	$\frac{C - K}{D.O. 260nm}$	26	23 p.100
	pronase à 37°C	$\frac{C - K}{D.O. 260nm}$	4	34 p.100

(*) Ramené à la force ionique 0,48 considérée comme 100 p.100.



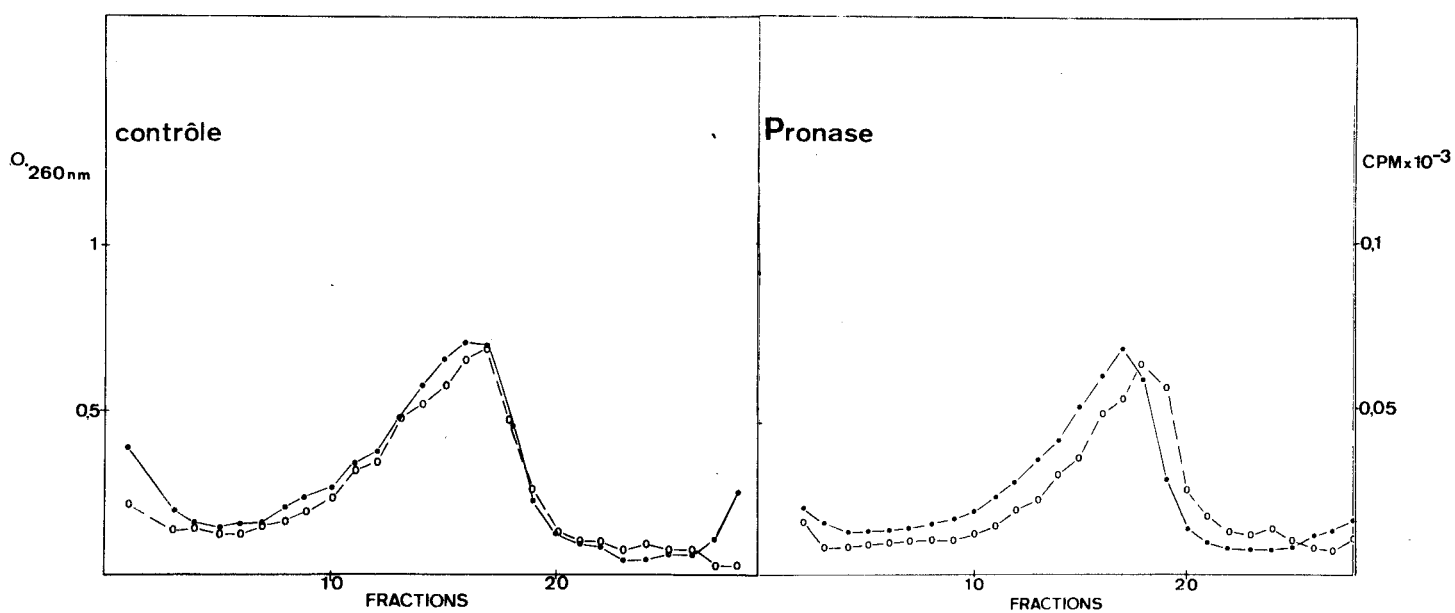


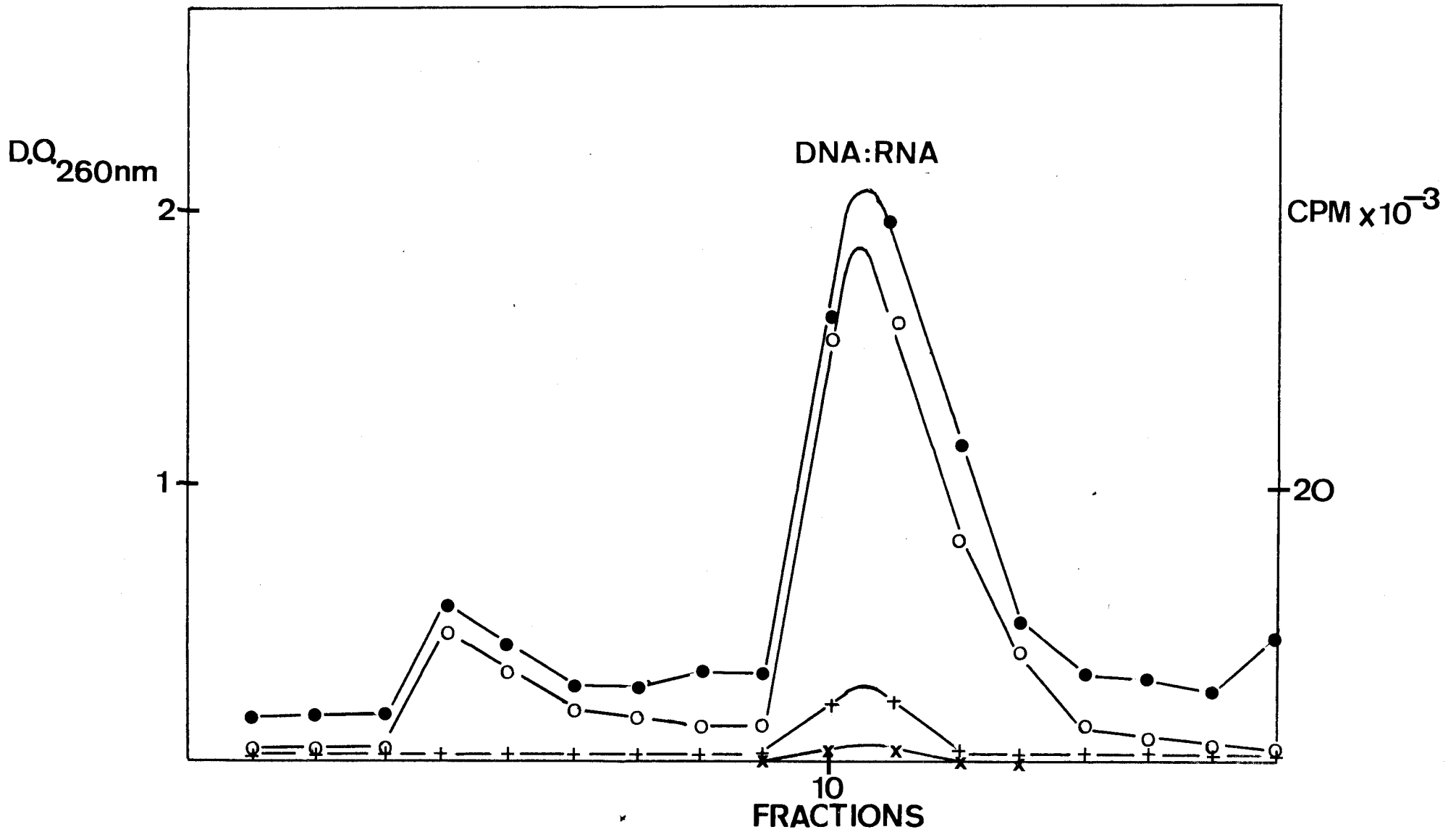
Figure n° 28 : Centrifugation en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100.

Le pic de DNA contenant le complexe DNA-RNA isolé par purification par gradient de Cs_2SO_4 est incubé en présence de pronase et à une force ionique de 0,48.

La centrifugation est effectuée dans un rotor SW 25 à 24.000 t/mn pendant 16 heures à 4°C.

●—● D.O. 260 nm
○—○ Radioactivité





Figure^o 29 : Centrifugation en gradient de Cs₂SO₄

Acides nucléiques de cellules de Hela extraits par le mélange sarcosinate de sodium/pronase (marquage 30' par la ³H 5-uridine)

●—● D.O. 260 nm

○—○ Radioactivité

+—+ Radioactivité résistante à la RNase

x—x Radioactivité résistante à l'hydrolyse par KOH



T A B L E A U V I I I

Analyse de la radioactivité associée au pic de DNA dans
le gradient de Cs_2SO_4 .

Radioactivité contrôle (C) (cpm)	80.000
Radioactivité après RNase P (R) (cpm)	10.000
Radioactivité après KOH (K) (cpm)	2.000
Radioactivité due au RNA C - K	78.000
Radioactivité résistante à la RNase = R - K	8.000
Marquage du DNA	2,5 p.100
Marquage du RNA	97,5 p.100
Fraction de RNA résistant à la RNase	10 p.100



dire que nous avons grâce à cette méthode extrait un complexe DNA-RNA qui répond aux critères que nous avons définis p.48 .

b - Afin de déterminer le rôle de la force ionique dans la stabilisation du complexe DNA-RNA, nous avons fait varier la force ionique dans le milieu d'extraction. Les résultats que nous avons obtenu sont rassemblés dans le Tableau IX, p. 79.

Il ressort de ces résultats que la force ionique optimale est de 0,48 (TEBS). A force ionique basse (0,24) la quantité de RNA associé au DNA diminue jusqu'à approcher une valeur nulle pour les forces ioniques proches de 0,04 (fig. 30, p. 80).

3 - Conclusions

Ces résultats plaident en faveur d'une stabilisation du complexe réalisée principalement par les liaisons "pont hydrogène" existant au niveau des séquences résistant à l'action de la RNase P.

T A B L E A U IX

Extraction du complexe par le mélange sarcosinate de sodium/pronase.

Action de la force ionique sur la quantité de RNA associé au DNA.

Forces ioniques		Exp. I KB Uridine ³ H	Hela			RNA associé au DNA (p.100)
			Exp. II Uridine ³ H	Exp. III Uridine ³ H	Exp. IV Adénine ¹⁴ C	
0,72	(*) $\frac{C - K}{K}$		5,8			94 _{p.100}
	X (**)		94 p.100			
0,60	$\frac{C - K}{K}$			5,6		94 _{p.100}
	X			94 p.100		
0,48	$\frac{C - K}{K}$	6,4	7,4		1,07	100 _{p.100}
	X	100 p.100	100 p.100		100 p.100	
0,24	$\frac{C - K}{K}$	3,1	4	1,15	0,94	45 _{p.100}
	X	44,6 p.100	50 p.100	40 p.100	20 p.100	
0,05	$\frac{C - K}{K}$	0,49			0,058	9 _{p.100}
	X	8,7 p.100			8,3 p.100	

(*) $\frac{C - K}{K} = \frac{\text{cpm RNA}}{\text{cpm DNA}}$

(**) X = p.100 de RNA associé au DNA ramené à la force ionique 0,48 (100 p.100).



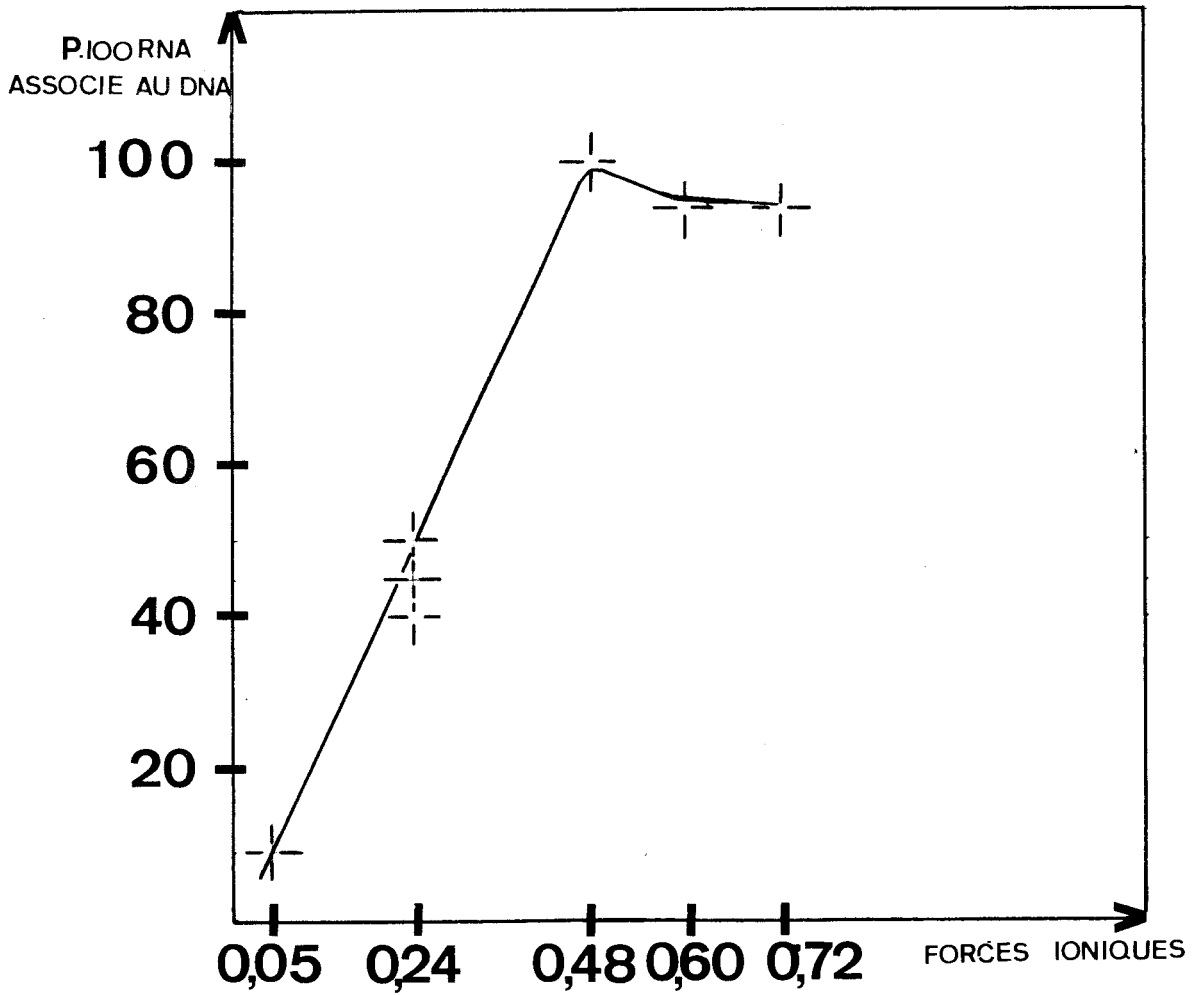


Figure n° 30 : Courbe de dissociation du complexe DNA-RNA en fonction de la force ionique.

DISCUSSION

Reprenant les travaux effectués par KRSMANOVIC (202) sur les cellules de Hela, nous avons tenté de mettre en évidence un complexe DNA-RNA dans les noyaux des hépatocytes de Rat, et nous y sommes parvenu. En effet :

1 - Nous avons isolé par la méthode d'extraction par le mélange SDS/chloroforme/alcool isoamylique associée à la centrifugation en gradient de sulfate de caesium, une fraction de DNA contenant un RNA qui est partiellement sensible à l'action de la RNase et qui est totalement hydrolysable par les alcalis.

L'extrait brut des acides nucléiques obtenus par l'extraction par le SDS/chloroforme contient peu d'ARN libre et nous avons, en outre, vérifié que le RNA associé au DNA après purification en gradient de sulfate de caesium n'était pas dû à une contamination du DNA par les RNA nucléaires. En effet, nous avons analysé, en gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p.100 (voir page 49), le pic de DNA obtenu en gradient de sulfate de caesium et observé qu'il était parfaitement homogène.

D'autre part LEVIS et coll. (203) craignant que le complexe DNA-RNA isolé des cellules de Hela par le procédé que nous avons appliqué ne soit, en fait, qu'une association artificielle entre le DNA et le RNA au cours de l'extraction des acides nucléiques, ont mélangé les RNA marqués à l'uridine ³H aux cellules de Hela non marquées. Après extraction des acides nucléiques et purification en gradient de sulfate de caesium, ils ont observé que la radioactivité correspondant aux RNA était nettement séparée du pic de DNA. Nous avons utilisé ce résultat pour conclure que nous avons, nous aussi, extrait des hépatocytes de Rat un complexe naturel DNA-RNA.

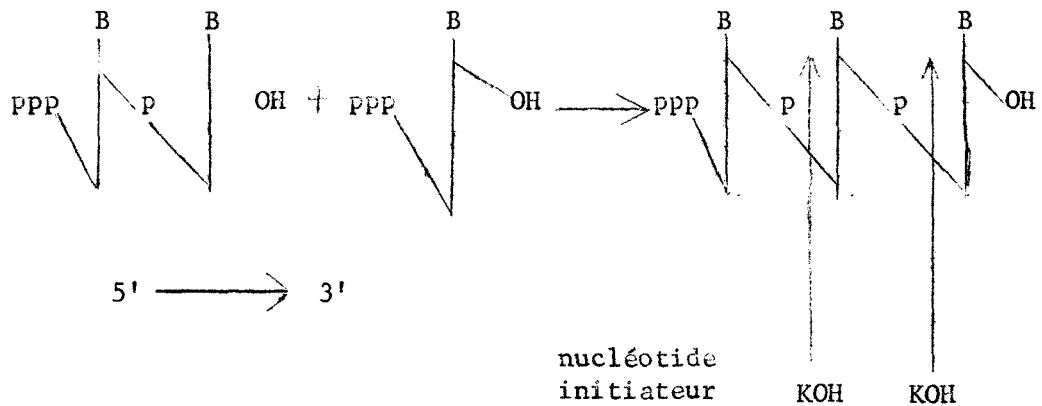
2 - Nous avons confirmé ce résultat en détachant le RNA du complexe DNA-RNA par dénaturation thermique et par la formamide et étudié quelques unes de ses propriétés. Nous sommes parvenus à la conclusion que la taille des molécules de RNA associées au DNA varie entre 80

et 400 nucléotides (4 S à 9 S) comme le montrent les profils d'ultracentrifugation. La taille réduite du RNA suggère que la méthode que nous utilisons est responsable de la cassure d'une partie des chaînes de RNA et ne nous permet pas de mettre en évidence les "RNA géants" rapidement marqués qui sont synthétisés dans le noyau cellulaire. D'autre part, nous avons démontré que la désintégration du ^{32}P provoque des cassures dans les chaînes de RNA (voir p. 55). Enfin, MUNOZ et MANDEL (204) ont démontré qu'à basse force ionique et à 37°C des nucléases, probablement adsorbées sur la polymérase ou sur la chromatine, étaient libérées et provoquaient une dégradation partielle des RNA en cours de synthèse. Cependant, la présence de nucléosides tétraphosphates dans l'hydrolysate alcalin du RNA associé au DNA (voir plus loin, p. 82) montre qu'une certaine proportion de chaînes de RNA demeure intacte. Ce fait nous permet de penser qu'il sera possible d'étudier la séquence nucléotidique au niveau de l'extrémité 5' des RNA naissants associés au DNA.

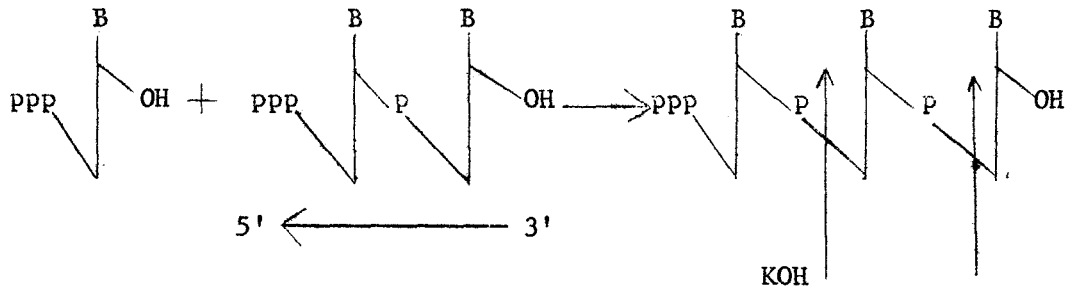
3 - L'examen en gradient linéaire de saccharose du complexe traité par la RNase et dénaturé par la formamide nous a permis de mettre en évidence une population de RNA sédimentant dans la région de 3 S, ce qui nous permet de conclure que le RNA naissant est associé au DNA par environ 40 nucléotides (partie résistante de la RNase). Un résultat semblable a été obtenu dans le cas du complexe DNA-RNA intracellulaire du phage ϕ X - 174 (HAYASHI et HAYASHI) (205).

4 - La mise en évidence de composés du type pppNp dans l'hydrolysate alcalin du complexe DNA-RNA nous offrait le moyen d'étudier le sens de la transcription génétique in vivo. En considérant que l'initiation de la transcription in vitro s'effectue par l'incorporation préférentielle d'un seul nucléoside 5'-triphosphate, deux hypothèses étaient possibles :

a - Ou bien la croissance de la chaîne polyribonucléotidique se fait de 5' vers 3', dans ce cas le nucléotide initiateur est en position 5' -terminale et nous devons trouver, dans les hydrolysats alcalins du RNA associé au DNA, un seul nucléoside tétraphosphate conformément au schéma ci-après :



b - Ou bien la croissance de la chaîne polyribonucléotidique se fait de 3' vers 5'. Dans ce cas l'addition des nucléoside-5'-triphosphates sur l'extrémité 5' se faisant au "hasard", nous devons trouver dans l'hydrolysats alcalin du complexe DNA-RNA les quatre nucléosides tétraphosphates :



Dans l'hydrolysats alcalin des RNA naissants des hépatocytes de Rat nous avons trouvé un nucléoside-5'-triphosphate-3'-monophosphate ; dans les cas des cellules Hela et KB, ce composé a été identifié comme étant exclusivement de type purique et pour 80 p.100 le pppGp et 20 p.100 le pppAp. A la lumière de résultats récents (voir Tableau II, p. 22 et Tableau III, p. 23), il est raisonnable de penser que le pppGp représente l'initiation nucléolaire et le pppAp l'initiation nucléoplasmique.

Cela nous permet de préciser que la transcription in vivo chez les eucaryotes se fait de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Dans ce cas l'extrémité 3' hydroxyle est appariée au DNA et doit résister à l'action de la RNase P.

5 - Actuellement, il est admis que le mécanisme de la transcription du génome en RNA se fait par ouverture de la double hélice de DNA suivie par un appariement entre les bases du brin de DNA transcrit et les bases de la chaîne croissante de RNA selon la conception de WATSON et CRICK (206).

Au cours des dernières années, plusieurs auteurs ont conclu à la participation directe d'une protéine (RNA-polymérase) dans le phénomène de polymérisation des ribonucléotides au cours de la transcription. Ils se sont fondés sur le fait que le RNA du complexe DNA-RNA qu'ils avaient isolé était détaché par action de la pronase ou du SDS. SPIEGELMAN et coll. (207) et BREMER et KONRAD (208) n'ont pu mettre en évidence le complexe DNA-RNA en extrayant leur matériel par le SDS dans un tampon de force ionique 0,02.

KRSMANOVIC (209) a démontré que le complexe DNA-RNA isolé des noyaux de cellules de Hela incubés in vitro se dissociait en présence de SDS dans une solution de force ionique de l'ordre de 0,02.

TONGUR et coll. (210) ont identifié, in vivo, un complexe DNA-RNA dont l'intégrité est rompu par action de la pronase dans une solution de force ionique 0,02.

Dans tous les cas, les traitements biochimiques ont été effectués dans un tampon de basse force ionique (0,02). Nous verrons plus loin (voir p. 85) que d'après nos résultats ce fait est très important. Nos données expérimentales nous permettent de penser que c'est en majorité par interaction directe (liaisons "pont hydrogène") que se fait la transcription.

1°) Si l'interaction entre un brin de DNA et la chaîne croissante de RNA est directe et ne fait donc pas intervenir la polymérase, le complexe binaire DNA-RNA doit résister à la déprotéinisation et à l'action de la RNase. Or, nous avons isolé une telle structure par déprotéinisation avec le mélange SDS/chloroforme/alcool isoamylique, partiellement résistante à l'action de la RNase. Toutefois les agents déprotéinisants utilisés étant doux nous ne pouvions conclure à une parfaite déprotéinisation du matériel, et la polymérase pouvait encore être présente dans nos préparations. Afin d'éliminer cette objection nous avons utilisé pour la suite de notre travail une méthode d'extraction faisant intervenir les enzymes protéolytiques.

2°) On sait que le DNA natif est formé de deux chaînes polynucléotidiques opposées face à face par leurs bases, et reliées entre elles par des liaisons labiles "pont hydrogène" susceptibles d'être détruites par différents traitements (chaleur ; pH ; force ionique ; formamide). Par exemple, le DNA est dénaturé à température ambiante dans une solution dont la concentration en ions est inférieure à 10^{-4} M.

Nous avons mis à profit ces propriétés du DNA pour confirmer l'hypothèse que la transcription se faisait par interaction directe entre le DNA et le RNA. En effet, le complexe DNA-RNA que nous avons isolé possède les mêmes propriétés que le DNA natif :

- Nous avons pu détacher le RNA du complexe par dénaturation thermique et par la formamide.

- Nous avons observé qu'une force ionique de l'ordre de 0,02 provoquait le détachement d'environ 80 p.100 du RNA associé au DNA dans le cas des hépatocytes de Rat.

- En outre, le complexe DNA-RNA est résistant à la pronase à haute force ionique (0,48).

- Nous avons mis à profit cette dernière observation pour extraire le complexe DNA-RNA des cellules Hela et KB par le mélange sarcosinate de sodium/pronase dans un tampon de force ionique 0,48. Cet hybride est conforme aux critères énoncés p. 48, ceci après une déprotéinisation très poussée.

- En faisant varier la force ionique du tampon d'extraction par le mélange sarcosinate de sodium/pronase nous avons démontré que dans des conditions de force ionique basse (0,05) la presque totalité du RNA associé au DNA était détaché.

- Enfin, nous avons pu dresser une courbe de stabilité du complexe en fonction de la force ionique.

D'après nos résultats, il est vraisemblable que l'instabilité du complexe DNA-RNA obtenu par certains auteurs soit due à la labilisation des liaisons "pont hydrogène" produite à cause du passage à basse force ionique (0,02) du matériel au cours des traitements biochimiques.

D'autre part, HAYASHI et HAYASHI (211) utilisant le ^{35}S

pour tenter de marquer la polymérase ou les protéines accompagnant les régions de transcription, ne retrouvent pas de radioactivité appréciable au niveau du complexe DNA-RNA.

6 - Nos résultats associés à ceux d'autres auteurs sont compatibles avec l'hypothèse qui fait intervenir les liaisons "pont hydrogène" comme facteur principal du maintien de l'intégrité du complexe DNA-RNA.

Nous pensons orienter nos travaux vers :

a - tentative d'isolement de complexes par une méthode permettant d'obtenir simultanément le DNA, le RNA et la RNA polymérase (voir STONINGTON et PETTIJOHN)(212);

b - étudier le complexe isolé du nucléole ;

c - grâce au complexe nucléolaire, étudier les modalités de la méthylation des r-RNA, et l'association séquentielle des protéines ribosomiques sur les chaînes naissantes des r-RNA contenues dans ce complexe ;

d - étudier les polymérases I et II chez les Eucaryotes.

CONCLUSIONS

1 - L'identification d'un RNA associé au DNA a été effectuée par la mise en évidence d'un complexe homogène DNA-RNA dont la fraction RNA est partiellement sensible à la RNase et totalement hydrolysable par la potasse dans des préparations très purifiées et dépourvues de RNA libre.

2 - Dans une seconde série d'expériences, nous avons détaché le RNA du complexe par dénaturation thermique et par la formamide et obtenu des composés de constante de sédimentation variant de 4 S à 9 S. Ces propriétés correspondent à des chaînes de 80 à 400 nucléotides.

3 - La fraction de la macromolécule de RNA résistante à l'action de la RNase possède une constante de sédimentation de 3 S environ et serait donc formée de 40 nucléotides environ qui se trouvent dans la zone d'appariement avec le DNA.

4 - Nous avons mis en évidence le ribonucléoside-5'-triphosphate-3'-monophosphate terminal de la chaîne de RNA naissant associé au DNA dans les noyaux d'hépatocytes de Rat.

5 - L'induction de la transcription dans le cas des cellules HeLa et KB se fait par l'incorporation exclusive des nucléotides puriques (GTP 80 p.100 et ATP 20 p.100) et vraisemblablement GTP dans le nucléole et ATP dans le nucléoplasme. La transcription chez ces Eucaryotes se fait principalement de 5' vers 3'.

6 - La transcription du génome en RNA se ferait principalement par interaction directe entre le brin de DNA transcrit et la chaîne croissante de RNA par l'intermédiaire de liaisons "pont hydrogène" entre les bases du DNA et les bases des ribonucléotides selon la théorie de WATSON et CRICK, sans faire intervenir directement la RNA-polymérase.

BIBLIOGRAPHIE

- ANTHONY D.D., GOLDWAIT D.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1966), 56, 1026 (64)
- BANERJEE A.K., WARD R., SHATKIN A.J., Nature New-Biology, (1971), 230, 169 (80)
- BILLETTER M.A., DALBERG J.E., GOODMAN H.M., HINDLEY J., WEISSMAN C., Nature, (1969), 224, 1083 (77).
- BISHOP D.H.L., MILLS D.R., SPIEGELMAN S., Biochem., (1968), 7, 3744 (91).
- BERGERON-BOUVET C., MOULE Y., Biochim. Biophys. Acta, (1966), 123, 617 (182).
- BERG D., CHAMBERLIN M., Biochem., (1970), 9, 5055, (34)(123).
- BERG P., KORNBERG R.D., FAUCHER H., DIECKMANN M., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1965), 18, 932, (52).
- BLATTNER F.R., THOMAS C.A., Abst. 7th Internat. Congr. Biochem., Tokyo, (1967), 4, (51).
- BORKOWSKA I., WINZERITH H., MANDEL P., C.R. Acad. Sci. Paris, (1964), 258, 6561, (172).
- BRAY G.A., Anal. Biochem., (1960), 1, 279, (184).
- BREMER H., KONRAD N.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1964), 51, 801, (117)(125)(157)(193)(208).
- BREMER H., KONRAD M.W., GAINES K., STENT G., J. Mol. Biol., (1965), 13, 540, (15)(68)(70)(109).
- BURGESS R.R., J. Biol. Chem., (1969), 244, 6168, (21).
- BURGESS R.R., TRAVERS A.A., DUNN J.J., BAUTZ E.K.F., Nature, (1969), 221, 43, (22)(24)(54).
- BYRNE R., LEVIN J.G., BLADEN H.A., NIERENBERG W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1964), 52, 140, (126).
- CARTOUZOU G., POIREE J.C., LISSITZKY S., Eur. J. Biochem., (1969), 8, 357,(152).
- CHAMBERLIN M., BERG P., J. Mol. Biol., (1964), 8, 297, (118).
- CHAMBON P., GISSINGER R.,MANDEL J.L. Jr., KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MEICHLAC M., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, (1970), 35, 693, (42).
- CHAMBON P., RAMUZ M., DOLY J., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1965), 21, 156, (35)(53)(60).

- CHAUVEAU J., MOULE Y., ROUILLER C., *Exptl. Cell. Res.*, (1956), 11, 317, (179).
- COHEN S.W., HURWITZ J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, (1967), 57, 1759, (114).
- COLVILLE A.J.E., VAN BRUGGEN E.F.J., FERNANDEZ-MORAN H., *J. Mol. Biol.*, (1966), 17, 302, (30).
- CRAWFORD V., CRAWFORD E.M., RICHARDSON J.P., SLAYEER H.S., *J. Mol. Biol.*, (1966), 14, 593, (17).
- CRESTFIELD A.M., SMITHIN K.C.S., ALLEN F.W., *J. Biol. Chem.*, (1955), 216, 185, (180).
- DAHLBERG J.E., *Nature*, (1968), 220, 548, (83).
- DARLIX J.L., SENTENAC A., FROMAGEOT P., *F.E.B.S. Letters*, (1971), 13, 165, (122).
- DAS H.K., GOLDSTEIN A., LOWNEY L., *J. Mol. Biol.*, (1967), 24, 231, (134).
- DAVIS R.W., HYMAN R. W., *Cold Spring Harbor Symp. Quantitative Biology*, (1970), 35, 269, (11)(14)(165)(169).
- DEFERT KOBUS W., *Thèse Doc. Sci., Fac. Sci. Lille*, (1971), 189)(191).
- DEFERT-KOBUS W., KERCKAERT J.P., SEGARD E., MONTREUIL J., *C.R. Acad. Sci., Paris* (1968), 266, 31, (149).
- DE WATCHER R., VERHASSEL J.P., FIERS W., *Biochim. Biophys. Acta*, (1968), 157, 195, (86).
- DE WATCHER R., VERHASSEL J.P., FIERS W., *F.E.B.S. Letters*, (1968), 1, 93.
- ELSON D., CHARGAFF E., *Biochim. Biophys. Acta*, (1955), 17, 362, (188)(190).
- FORGET B.G., WEISSMAN S. M., *Science*, (1967), 158, 1695, (96).
- FRASER M.J., RABIN E.Z., ALLE N.G., *Can. J. Biochem.*, (1970), 48, 501, (102).
- FUCHS E., MILLETE R.L., ZILLIG W., WALTER G., *Eur. J. Biochem.*, (1967), 3, 184, (58).
- FUCHS E., ZILLIG W., HOFSCHEIDER P.H., PREUSS A., *J. Mol. Biol.*, (1964), 10, 546, (16).
- GEIDUSCHEK E.P., NAKAMOTO T., WEISS S.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, (1961), 47, 1405, (9).
- GEORGIEV G.P., *J. Theoretical Biol.*, (1969), 25, 473, (138)(154).
- GLITZ D.G., *Biochemistry*, (1968), 7, 927, (87).

- GOLDSTEIN A., KIRSCHBAUM J., ROMAN A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1965), 5, 1669, (74).
- GOLDSTEIN C., MICOU J., CROCKER T.T., Biochim. Biophys. Acta, (1960), 45, 82 (4).
- GOLDHWAIT D.A., ANTHONY D.D., WU C.W., Le petit Colloquia on Biology and Medicine : RNA polymerase and transcription, (1970), p.10, (65).
- HATLEN L.E., AMALDI F., ATTARDI G., Biochemistry, (1969) 8, 4989, (95).
- HAYASHI M.N., HAYASHI M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1966) 55, 635, (100) (156a)(183)(196)(199)(211).
- HAYASHI M.N., HAYASHI M., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., (1968), 61, 1107, (186a)(187)(205).
- HEIL A., ZILLIG W., F.E.B.S. Letters, (1970), 11, 165, (28).
- HENSHAW E.C., REVEL M., HIATT H.A., J. Mol. Biol., (1965), 14, 241, (6)(141).
- HUANG R.C., BONNER J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1962), 48, 1216, (8).
- INFANTE A.A., NEMER M., J. Mol. Biol., (1968), 32, 543, (144).
- ISHIKAWA K., KURODA C., OGATA K., Biochim. Biophys. Acta, (1969), 179, 316, (1).
- JACOB F., Science, (1966), 152, 1470, (46).
- JORGENSEN S.E., BUCH L.B., NIERLICH D.P., Science, (1969), 164, 1067, (94).
- KAY E.R., Nature, (1964), 202, 390, (171).
- KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MANDEL J.L. Jr., GLISSINGER F., CHAMBON P., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1970), 38, 165, (40).
- KITANO Y., KAMAYAMA T., J. Biochem., (1969), 65, 1, (19)(20).
- KONRAD M.W., STENT G.S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1964), 51, 647, (156).
- KRAKOW J.S., Science, (1970), 170, 351, (56).
- KRAKOW J.S., HORSLEY W.J., J. Biol. Chem., (1967), 242, 4796, (78).
- KRSMANOVIC V., D.E.A. Fac. Sci. Lille, (1968), (186).
- KRSMANOVIC V., Thèse Doct. Univ. Fac. Sci., Lille, (1967), (198)(202)(209).
- KRSMANOVIC V., DESREUMAUX S., SERGEANT A., SEGARD E., MONTREUIL J., Arch. Internat. Physiol. Biochim., (1968), 76, 378, (194).

- KRSMANOVIC V., WEISSMAN S.M., sous presse, (69).
- KUNTZEL H., SCHAFER K., Nature New Biology, (1971), 231, 265, (44).
- LEIVE L., KOLLIN V., J. Mol. Biol., (1967, 24, 247, (135)).
- LESNAW J.A., REICHMANN M.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1970), 66, 140, (92).
- LEVIN D.H., ACS G., SILVERSTEIN S.C., Nature, (1970), 227, 603, (79).
- LEVIS A.G., KRSMANOVIC V., ERRERA M., Biochim. Biophys. Acta, (1967), 145, 577, (175)(181)(197)(203).
- LILL U.I., HARTMANN G.R., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1970), 39, 930 (25).
- Mc CARTHY B.J., BOLTON E.I., J. Mol. Biol., (1964), 8, 184, (113).
- Mc CONKEY E.H., HOPKINS J.W., J. Mol. Biol., (1965), 14, 257, (142).
- MADISON J.T., Ann. Rev. Biochem. (1968) 37, 131, (105).
- MAITRA U., HURWITZ J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1965) 54, 815, (110).
- MAITRA U., COHEM S.N., HURWITZ H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., (1966), 31, 113, (106).
- MANDEL P., BORKOWSKA I., Biochim. Biophys. Acta, (1964), 91, 683, (170).
- MARMUR J., GREENSPAW C.M., PALECEKE., KAHAN F.M., LEVINE J., MANDEL M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., (1963), 28, 191, (111).
- MATSUKAGE A., MUKAKAMI S., KAMEYAMA T., Biochim. Biophys. Acta, (1969), 179, 145, (49).
- MEAD D.G., J. Biol. Chem., (1964), 239, 550, (168).
- MILLER O.L. Jr., BEATTY B.R., HAMKALO B.A., THOMAS C.A. Jr., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., (1970), 35, 505, (10)(12)(13)(127)(128)..
- MORRIS M.E., GOULD H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1971), 68, 481, (130).
- MOULE Y., CHAUVEAU J., C.R. Acad. Sci., (1966), 263D, 75, (148).
- MULLER K., BREMER H., J. Mol. Biol., (1969), 39, (71).
- MUNOZ D., MANDEL P., C.R. Soc. Biol., (1968), 162, 2283, (202).
- NAKANO E., SAKAGUCHI K., J. Biochem., (1969, 65, 147, (48)(50).
- NAONO S., ROUVIERE J., GROS F., Biochim. Biophys. Acta, (1966) 125, 271, (131).

- NIYOGI S.K., STEVENS A., J. Biol. Chem., (1965), 240, 2593, -61).
- NOVAK L.R., DOTY P., J. Biol. Chem., (1968), 243, 6068, (101)(201).
- OKAMOTO T., SUGIURA M., TAKANAMI M., Biochemistry, (1970), 9, 18, (73).
- PERRY R.P., Exptl. Cell. Res., (1960), 20, 216, (1).
- PERRY R.P., ERRERA M., HELL A., DURWALD J., J. Biophys. Biochem. Cytol., (1961), 11, 1, (2).
- PERRY R.P., KELLEY D.E., J. Mol. Biol., (1968), 35, 37, (153).
- PETTLJOHN D.E., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1969), 34, 541, (152).
- PETTLJOHN D.E., CLARKSON K., KOSSMAN C.R., STONINGTON O.G., J. Mol. Biol., (1970), 228, 235, (164).
- POGO A.O., LITTAU V.C., ALFREY V.G., MIRSKY A.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1967), 57, 743, (36).
- PRESCOTT D.M., Exptl. Cell. Res., (1960), 19, 29, (5).
- PREUSS H., ZILLIG W., Biochem. Biophys. Acta, (1967), 140, 540, (33).
- QASBA P.K., ZILLIG W., Europ. J. Biochem., (1968), 7, 315
- REVEL M., GROS F., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1967), 27, 12, (136).
- RICHARDSON J.P., J. Mol. Biol., (1968), 21, 115, (29)(32)(119);
- RIVA S.C., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1969), 34, 824, (112).
- ROBERTS J.W., Nature, (1969), 224, 1168, (116)(120)(121).
- ROBERTSON H.D., ZINDER N.D., J. Biol. Chem., (1969), 244, 5790, (82).
- ROBLIN R., J. Mol. Biol., (1968), 31, 51, (84).
- ROBLIN R., J. Mol. Biol., (1968), 36, 125, (85).
- ROE D.H., AVADHANI N.C., BUETON D.E., Biochim. Biophys. Acta, (1971), 246, 430, (176).
- ROEDER R.G., RUTTER W.J., Nature, (1969), 224, 234, (37).
- ROEDER R.G., RUTTER W.T., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1970), 65, 675, (38).
- ROUVIERE J., LEDERBERG S., GRANBOULLAN P., GROS F., J. Mol. Biol., (1969), 46, 413, (160).
- RYSKOV A.P., GEORGIEV G.P., F.E.B.S. Letters, (1970), 8, 186, (97).
- SALAS M., SMITH M.A., STANLEY M.N. Jr. MAHBA A.J., OCHOA S., J. Biol. Chem., (1965), 240, 3922, (132).

- SAMARINA O.P., ASRIYAN I.S., GEORGIEV G.P., Dokl. Akad. Nauk. URSS, (1965), 163, 1510, (140).
- SAMARINA O.P., KRICHEUSKAYA A.A., GEORGIEV G.P., Nature, (1966), 210, 1319, (14)
- SAMARINA O.P., KRICHEUSKAYA A.A., MOLNAR J., GEORGIEV G.P., Mol. Biol. URSS, (1967) 1, 251, (147).
- SAMARINA O.P., LUKANIDIN E.M., MOLNAR J., GEORGIEV G.P., J. Mol. Biol., (1968) 33, 251, (147).
- SCHULMAN H.M., BONNER D.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1962), 48, 53, (167)
- SEIFART K.M., Lepetit Colloquia on Biology and Medicine, (1970), 233, (39).
- SENTENAC A., RUET A., FROMAGEOT P., F.E.B.S. Letters, (1968), 2, 53, (103).
- SENTENAC A., RUET A., FROMAGEOT P., Eurp. J. Biochem., (1968), 5, 385, (62)(72)
- SHIGEURA H.T., BOXER G.E., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1964), 17, 758, (108)
- SHIN D., MCLDAVE K., J. Mol. Biol., (1966), 21, 231, (129).
- SLAYTER H.J., HALL C.E., J. Mol. Biol., (1966), 21, 113, (18).
- SPIEGELMAN S., HALL B.D., STORCK, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1961), 47, 1135, (155)(158)(207).
- SPIRIN A.S., BELITSINA N.V., AJTKHOZHIN M.A., Zh. Abstch. Biol., (1964), 25, 321, (139).
- SPIRIN A.S., NEMER M., Science, (1965), 150, 214, (143).
- SRINIVASAN P.R., MILLER-FAURES A., BRUNFAUT M., ERREKA M., Biochem. Biophys. Acta, (1963), 72, 209, (3).
- STEAD N.W., JONES O.W., Biochim. Biophys. Acta, (196), 145, 679
- STENT G., Science, (1964), 144, 816, (124).
- STEVENIN J., MANDEL P., JACOB M., Bull. Soc. Chim. Biol., (1970), 52, 703, (151)
- STEVENS A., EMERY A.J., STERENDERGER N., Biochim. Biophys. Res. Commun., (1966) 24, 929, (31).
- STONINGTON O.G., PETTIJOHN D.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., (1971), 68, 6; (161)(212).
- SUGIURA M., OKAMOTO T., TAKANAMI M., J. Mol. Biol., (1969), 43, 299, (76)(104).
- SUMMERS W C., Ann Biochem., (1970), 33, 459, (166).

- SUMMERS W.C., SZYBALSKI W., *Virology*, (1968), 34, 9, (47)(115).
- SZYBALSKI W., KUBIŃSKI H., SHELDRIK P., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1966), 31, 123, (45).
- TADA M., TADA M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1969), 35, 27, (75).
- THACH R.E., CECERE M.A., SUNDARARAJAN J.A., DOTY P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, (1965), 54, 1167, (133).
- TOKARSKAYA V.I., NELIPOUITCH P.A., NIKOLAEVA T.G., *Molekulyamaya Biologiya*, (1968), 2, 420, (177).
- TONGUR V.S., WAADYTCHENSKAYA N.S., KOTCHKINA W.N., *J. Mol. Biol.*, (1968), 33, 451, (159)(200)(210).
- TRAVERS A.A., *Nature New Biology*, (1971), 229, 69, (63)(137).
- TRAVERS A.A., BURGESS R.R., *Nature*, (1969), 222, 537, (57).
- VANDENBERGHE A., VAN STYVENDAELE B., FIERS W., *Eur. J. Biochem.*, (1969), 7, 174, (88).
- VERBERT A., *Thèse Doct. 3ème Cycle*, (1971), (194).
- VERBERT A., SERGEANT A., KRSMANOVIC V., MONTREUIL J., *Arch. Internat. Physiol. Biochim.*, (1969), (185)(195).
- VERBERT A., SERGEANT A., KRSMANOVIC V., *Abstr. Commun 7th Meet. Eur. Biochem. Soc.*, (1971), p. 196, (99).
- VERBERT A., SERGEANT A., KRSMANOVIC J., MONTREUIL J., *C.R. Acad. Sci. Paris*, (1971), 273 D, 1531, (98).
- VOIGT H.P., KAUFMANN R., MATTHAEI H., *F.E.B.S. Letters*, (1970), 10, 257, (41).
- WALTER G., ZILLIG N., PALM P., FUCHS E., *Eur. J. Biochem.*, (1967), 3, 183, (59).
- WATANABE M., AUGUST J.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, (1968), 59, 513, (89) (90).
- WATSON J.D., CRICK F.H.S., *Nature*, (1953a), 171, 737, (107)(206).
- WATSON J.D., RALPH R.K., *Biochim. Biophys. Acta*, (1967), 138, 89, (174).
- WEISS S.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, (1960), 46, 1020, (7).
- WILKINSON B.R., KIRBY K.S., *Biochem. J.*, (1966), 99, 780, (173).
- WINTERSBERGER E., WINTERSBERGER U., *F.E.B.S. Letters*, (1970), 6, 58, (43).

WU C.W., GOLDTHWAIT D.A., Biochem., (1969), 8, 4450, (66).

WU C.W., GOLDTHWAIT D.A., Biochem., (1968), 8, 4458, (67).

YOUNG R.J., CONTENT J., Nature, (1971), 230, 140, (93).

ZILLIG W., FUCHS E., PALM P., RABUSSAY D., ZECHEL K., Lepetit Colloquia on Biology and Medecine, RNA polymerase and transcription, (1969), 151, (23).

ZILLIG W., ZECHEL K., RABUSSAY D., SCHACHNER M., SETHI V.S., PALM P., SAIFERT W., HEIL A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., (1970), 35, 47, (26)(27).

ZSEZAK F., PIHL A., Biochim. Biophys. Acta, (1971), 247, 363, (178).

