

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MÉMOIRE

présenté à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Edmond PUVION

Recherches ultrastructurales sur les protéines basiques nucléaires de la cellule hépatique de rat et sur la diffusion libre de particules ribonucléoprotéiques à partir des noyaux isolés



PRÉSENTÉ LE 26 AVRIL 1972 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. M. DURCHON, Président
E. VIVIER, Rapporteur
J. MONTREUIL, Examineur
W. BERNHARD, Membre invité

Ce travail a été réalisé sous les directions conjointes de Monsieur le Professeur J. DRIESSENS et de Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, dans les Services de Biologie Cellulaire et de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

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

- du Centre National de la Recherche Scientifique,
- de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Convention de Recherche 61-FR-219),
- de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, "Actions Concertées" (Convention CR-66-228),
- de la Ligue Nationale Française de Lutte contre le Cancer (Opération Espoir),

auxquels nous adressons nos plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur J. DRIESSENS nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son INSTITUT. Il nous a formé à la Recherche et a constamment stimulé nos travaux. Nous avons pu toujours bénéficier de sa grande Humanité.

C'est à Lui que nous devons de présenter aujourd'hui nos résultats.

Que cette thèse qui est dédiée à sa mémoire soit le témoignage de notre très grande reconnaissance et de la profonde admiration que nous portons à son Oeuvre.

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL nous a introduit à l'INSTITUT de RECHERCHES sur le CANCER de LILLE. Son enseignement clair et vivant, son enthousiasme pour les techniques les plus modernes, sa haute compétence nous ont sans cesse stimulé. Qu'il veuille bien trouver dans ce mémoire l'expression de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Docteur W. BERNHARD, notre Parrain de Recherche, nous a ouvert les portes de son laboratoire ; il n'a cessé de nous prodiguer ses conseils durant la réalisation de nos travaux et la rédaction de ce mémoire. Nous avons pu profiter de sa haute compétence scientifique et de ses grandes qualités humaines. Nous le prions d'accepter l'expression de notre vive gratitude et de notre profond et respectueux attachement.

Monsieur le Professeur M. DURCHON a bien voulu accepter de corriger et de juger ce travail. Nous avons toujours bénéficié auprès de lui d'un excellent accueil, de conseils avisés et de la chaleur des contacts humains qu'il rend possible autour de lui. Nous le prions d'accepter le témoignage de notre très vive gratitude.

Monsieur le Professeur E. VIVIER nous a fait le grand honneur de s'intéresser à notre travail et de juger ce mémoire. Nous le prions d'accepter nos très vifs remerciements.

Ce mémoire est, en partie, le fruit d'un travail mené en équipe. Nous adressons, à cet égard, nos plus vifs remerciements à Madame W. DEFERT-KOBUS et à Messieurs J.P. KERCKAERT et P. BLANQUET.

Nous remercions vivement Madame DEGHILAGE, Madame MOULIN et Monsieur R. DHENNIN pour leur précieuse collaboration technique, ainsi que tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire et en particulier à Monsieur A. GILQUIN, Madame et Monsieur GARET, Photographes ; Mademoiselle A. MOSTAERT, Secrétaire.

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU,

PROFESSEURS HONORAIRES

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

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

M. DEFRETIN René
Biologie Animale - Directeur de
l'Institut de Biologie Maritime
de Wimereux

PROFESSEURS TITULAIRES

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

M. POUZET Pierre	I.U.T. Lille
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

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

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie et Minéralogie
M. DEVRANNE Pierre	Chimie Minérale
M. LOMBARD Jacques	Sciences Economiques et Sociales
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTARIDL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés des fonctions)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques et Sociales
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques et Sociales
M. AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BILLARD Jean	Physique
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale

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

M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune
M. SIMON Michel	Sciences Economiques et Sociales
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie et Aménagement Spatial
M. THOMAS Daniel	Chimie Minérale Appliquée
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Sciences Appliquées
M. VILLETTE Michel	I.U.T. Béthune
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme ZINNJUSTIN Nicole	Mathématiques

T A B L E des M A T I E R E S

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

	Pages
G E N E R A L I T E S	
I - MORPHOLOGIE ET CYTOCHIMIE ULTRASTRUCTURALES DU NUCLEOLE	4
A - Morphologie	4
B - Cytochimie ultrastructurale	6
II - ETUDE CHIMIQUE DES RIBONUCLEOPROTEINES NUCLEOLAIRES	10
A - Synthèse de l'ARN ribosomal	10
B - Les ribonucléoprotéines nucléolaires	13
III - LES RIBONUCLEOPROTEINES NUCLEAIRES EXTRANUCLEO- LAIRES MISES EN EVIDENCE <u>IN SITU</u>	18
A - Les grains interchromatiniens	18
B - Les grains périchromatiniens	20
C - Les granules de Balbiani	22
D - Les fibrilles périchromatiniennes	22
E - Les corps pelotonnés	23
IV - LES PARTICULES DE RIBONUCLEOPROTEINES ISOLEES	24
A - Les particules de rRNP	24
B - Les particules de dRNP	25
1 - ARN-informofères de GEORGIEV	25
2 - Particules de MOULÉ et CHAUVEAU	28
3 - Particules d'ISHIKAWA <u>et al.</u>	30

I - <u>MATERIEL et METHODES GENERALES</u>	35
A - TECHNIQUES MICROSCOPIQUES	35
1 - Observation des matériels au microscope électronique	35
2 - Coupes semi-fines	36
3 - Techniques de cytochimie ultrastructurale	36
4 - Techniques de colorations négatives et positives	37
5 - Techniques d'étalement et d'ombrage	38
B - TECHNIQUES DE MICROSPECTROPHOTOMETRIE	40
C - TECHNIQUE D'ISOLEMENT DES FRACTIONS NUCLEAIRES ET NUCLEOLAIRES	42
1 - Isolement des noyaux	42
2 - Isolement des nucléoles	43
3 - Observation des fractions	43
4 - Résultats obtenus	43
D - ISOLEMENT DES RIBONUCLEOPROTEINES NUCLEOLAIRES	43
II - <u>RECHERCHES SUR LA MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES BASIQUES DU NOYAU</u>	48
A - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE REVELATION DES GROUPEMENTS DE POINT ISOIONIQUE ELEVE A L'ECHELLE ULTRASTRUCTURALE. APPLICATION A LA REVELATION PREFERENTIELLE DES PROTEINES BASIQUES.	49

1 - Introduction	49
2 - Matériels et Méthodes	50
3 - Résultats	56
4 - Discussion	60
B - MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES BASIQUES NUCLEAIRES DE LA CELLULE HEPATIQUE DE RAT	63
1 - Méthode	64
2 - Résultats	65
a - Protéines du nucléole normal	67
b - Protéines basiques du nucléole lésé par action de l'actino- mycine D	68
3 - Discussion	70
III - <u>RECHERCHES SUR LA DIFFUSION DE PARTICULES RIBONU- CLEOPROTEIQUES DANS DES FRACTIONS NUCLEAIRES ISOLEES</u>	75
A - METHODES	77
B - ETUDE DES NOYAUX AU COURS DE LA DIFFUSION	78
C - ETUDE DES FRACTIONS RN ₁ ET RN ₂	83
D - ETUDES MORPHOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DES PARTICULES DE LA FRACTION RN ₂	87
E - COMPARAISON ENTRE LES PARTICULES 45 S DIFFUSEES ET D'AUTRES TYPES DE PARTICULES NUCLEAIRES EXTRAITES	92
F - RECHERCHES SUR L'ORIGINE INTRANUCLEAIRE DES PARTICULES DIFFUSEES	97
G - DISCUSSION	99

1 - Aspects nucléolaires constatés dans les noyaux diffusés	99	
2 - Structures des ribonucléoprotéines	100	
3 - Origine des particules diffusées	101	
 IV - <u>DISCUSSION GENERALE</u>	 103	
1 - Protéines basiques nucléaires non liées à l'ADN	103	
a - Existence d'un pool intranu- cléaire de protéines ribosomales	103	
b - Existence de protéines basiques liées à l'ARN dans le nucléole	104	
c - Les corps pelotonnés	106	
d - Régulation de l'association ARN-protéines dans les nucléoles	106	
 2 - Transport de l'information du noyau vers le cytoplasme	 108	
a - Comparaison des particules obte- nues par diffusion, à d'autres particules extraites des noyaux	108	
b - Le dARN	113	
c - Transfert du mARN du noyau vers le cytoplasme	114	
d - Signification biologique des particules de dRNP nucléaires obtenues par diffusion	115	
 V - <u>CONCLUSIONS</u>	 118	
 <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>B I B L I O G R A P H I E</td></tr></table>	B I B L I O G R A P H I E	 121
B I B L I O G R A P H I E		

ABREVIATIONS UTILISEES

A	Ampère
Å	Angström = 10^{-10} mètre
ADN	Acide desoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
d	densité
dARN	ARN dont la composition en bases est homologue de celle de l'ADN
DNase	Desoxyribonucléase
D.O.	Densité optique
dBNP	Ribonucléoprotéine dont l'ARN est du dARN
E.D.T.A.	Acide éthylène diamine tétraacétique
GMA	Glycolméthacrylate ou 2-hydroxyéthylméthacrylate
M	Molaire
mM	Millimolaire
mARN	ARN messenger
mn	minute
nm	nanomètre = 10^{-9} mètre
pg	picogramme = 10^{-12} grammes
RNAse	Ribonucléase
RNP	Ribonucléoprotéine
rRNP	Ribonucléoprotéine dont l'ARN est ribosomal
S	Constante de sédimentation en unité SVEDBERG (10^{-13} seconde)
t/mn	tour par minute
TRIS	2-amino-2(hydroxyméthyl) propane-1,3 diol
U.V.	Lumière ultra-violette

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

Nos recherches s'inscrivent dans l'ensemble des travaux qui sont entrepris à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille sur l'étude des mécanismes de la régulation de la biosynthèse des acides nucléiques dans le noyau.

Il est maintenant admis que, dans les conditions normales, les ARN nucléaires des Eucaryotes sont toujours associés à un composant protéique. Des travaux récents (SOEIRO et al., 1968 a ; SPOHR et al., 1970 ; GEORGIEV et al., 1971 ; SCHERRER et al., 1971) ont montré que ce composant joue un rôle, non seulement dans la protection des ARN contre l'action des RNAses cellulaires, mais aussi dans le transport des ARN du noyau vers le cytoplasme et dans la régulation des différentes étapes de l'expression du génome.

La résolution des problèmes de structure et d'organisation macromoléculaire apparaît donc essentielle à une meilleure compréhension des fonctions métaboliques. Dans cette perspective, nous avons cherché à mettre au point une technique de révélation ultrastructurale des protéines et préférentiellement des protéines basiques que nous avons ensuite localisées au niveau des structures nucléaires. La mise en évidence d'une liaison des protéines basiques à l'ARN nouvellement synthétisé au niveau du nucléole peut être d'une grande importance dans l'étude de la régulation du transport vers le cytoplasme des ARN nucléolaires et de l'ARN messenger, de nombreux travaux ayant montré que le nucléole pouvait être le centre des mécanismes de régulation du transport de tous les ARN du complexe ribosomal (HARRIS, 1971). Nous avons abordé ce dernier problème par l'étude de la diffusion de ribonucléo-protéines dans des fractions nucléaires isolées. Bien que

cette diffusion soit provoquée artificiellement, elle se rapproche plus des conditions physiologiques que l'extraction obtenue par broyage des noyaux. Nous avons pu, de cette manière, caractériser une catégorie de particules que nous avons essayé d'identifier aux structures révélées in situ.

Les résultats que nous avons obtenus et que nous exposons dans ce mémoire, ont fait l'objet des publications suivantes :

- 1 - E. PUVION, W. DEFERT-KOBUS, J.P. KERCKAERT, F. PUVION, E. SEGARD et J. MONTREUIL
Etudes sur les acides nucléiques spontanément diffusibles des noyaux de foie de Rat. III - Etude morphologique.
C.R. Acad. Sci., 1968, 266 D, 278-281

- 2 - J. MONTREUIL, W. DEFERT-KOBUS, J.P. KERCKAERT, E. PUVION, E. SEGARD et V. KRSMANOVIC
Etude des ARN spontanément diffusibles des noyaux isolés de foie Rat.
Communication IX Journées biochimiques latines Monaco, 1968

- 3 - E. PUVION, W. DEFERT-KOBUS, J.P. KERCKAERT, V. KRSMANOVIC et J. MONTREUIL
Etude sur les acides nucléiques spontanément diffusibles des noyaux isolés des hépatocytes de Rat. Nouvelle étude morphologique et biochimique des particules diffusibles.
C.R. Acad. Sci., 1969, 268 D, 1990-1993

- 4 - J. MONTREUIL, W. DEFERT-KOBUS, J.P. KERCKAERT,
E. PUVION, M.Ch. TIBERGHIEU et V. KRSMANOVIC
Etude physico-chimique, métabolique et morphologique des
particules spontanément diffusibles des noyaux isolés
du foie de Rat.
Arch. Intern. Physiol. Biochim., 1969, 77, 571-573
- 5 - P. BLANQUET, E. PUVION et J. DRIESSENS
Localisation ultrastructurale, avec contrôle micros-
pectrophotométrique, des sialo-glycoconjugués de la
membrane plasmique cellulaire par la méthode fondée
sur la capture de l'hydroxyde de fer colloïdal.
C.R. Acad. Sci., 1970, 271 D, 96-99
- 6 - E. PUVION et P. BLANQUET
Mise en évidence ultrastructurale des groupements
de point isoionique élevé. Application à la révélation
des protéines basiques.
J. Microscopie, 1971, 12 (2) 171-184

Avant d'entreprendre la relation de nos recherches, il nous a semblé indispensable de retracer les principales connaissances acquises sur les ribonucléo-protéines nucléaires avec le souci constant d'établir des relations entre les données purement biochimiques d'une part et la morphologie d'autre part.

G E N E R A L I T E S

I - MORPHOLOGIE ET CYTOCHIMIE ULTRASTRUCTURALES DU NUCLEOLE.A - MORPHOLOGIE

Les premières observations du nucléole au microscope électronique, effectuées sur des coupes de matériel fixé à l'acide osmique et inclus dans le méthacrylate (BORYSKO et BANG, 1951 ; BERNHARD et al., 1952 ; BERNHARD et al., 1955) ont confirmé l'existence d'une structure filamenteuse au niveau de cet organite, structure qui avait été décrite quelque temps auparavant en microscopie classique (ESTABLE et SOTELO, 1951) et qui fut retrouvée en microscopie à contraste de phase (GONZALEZ-RAMIREZ, 1959). A l'échelle ultrastructurale, le nucléole apparaît en effet constitué d'un peloton filamenteux de largeur variable (450 Å à 2000 Å), inclus dans une substance plus ou moins homogène constituée de très fins filaments et de granules. Par analogie avec les observations d'ESTABLE et SOTELO effectuées en microscopie optique, le peloton filamenteux a été appelé : nucleolonema et la substance homogène : pars amorpha.

La mise au point de nouveaux matériels d'inclusion ainsi que l'emploi des fixateurs aldéhydiques associés à des imprégnations des coupes plus variées (SWIFT, 1959 ; MARINOZZI et GAUTIER, 1962 ; MARINOZZI, 1964 ; ZOBEL et BEER, 1965), ont permis de mieux

détailler l'ultrastructure générale du nucléole et de caractériser quatre composants :

- Une substance compacte et amorphe organisée en réseau dans laquelle sont incluses les fibrilles de 80 Å de diamètre.

- Des granules d'un diamètre moyen de 150 Å à 200 Å.

- Un constituant amorphe, ressemblant à celui qui constitue la matrice du réseau fibrillaire, mais moins dense et particulièrement net au niveau des nucléoles de cellules en culture (SCHOEFL, 1964). Ce composant a parfois été appelé centre fibrillaire, du fait de sa texture et de sa localisation dans les anses du réseau fibrillaire.

- Le quatrième constituant, révélé par la double fixation aldéhyde-acide osmique, correspond à la chromatine associée au nucléole, étudiée en microscopie optique par CASPERSSON (1950). Cette chromatine forme une couronne de plus ou moins grande épaisseur et souvent discontinue, autour du nucléole.

Les deux constituants particuliers : granules et fibrilles, peuvent se répartir différemment suivant le type cellulaire. Chez les plantes, la partie centrale du nucléole est généralement fibrillaire alors que la périphérie est granulaire (RODKIEWICZ, 1959 ; HYDE et al., 1965). Une disposition analogue a été décrite dans les nucléoles de glandes salivaires de chironome et de drosophile (JACOB et SIRLIN, 1964 ; STEVENS, 1964).

Dans les nucléoles des cellules de mammifères, la séparation des granules et des fibrilles en zones distinctes n'est pas aussi nette. Par exemple, dans le foie et le pancréas de Rat, les granules se répartissent plus ou moins uniformément (MARINOZZI, 1964), alors que dans les cellules du ganglion spinal, ils se groupent en zones plus ou moins importantes toujours bien délimitées.

L'aspect réticulé typique du nucléole qui lui est donné par le réseau fibrillaire, n'est pas toujours net ; le nucléole peut en effet apparaître compact et parfois essentiellement granulaire (DAVIES, 1960 ; SMETANA et al., 1966), les zones fibrillaires et granulaires pouvant prendre des proportions relatives très différentes parfois même au niveau des divers nucléoles d'un même noyau. Le nucleolonema est donc, en fait, un terme qui ne désigne qu'un aspect de la structure du nucléole, celui qui lui est donné par le réseau fibrillo-granulaire et qui apparaît plus nettement en microscopie optique ; il ne correspond pas à une entité morphologique et chimique définie (IZARD et BERNHARD, 1962).

B - CYTOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE

Après la mise en évidence morphologique des quatre constituants nucléolaires, les travaux se sont immédiatement portés sur leur identification chimique. Ces études ont été entreprises au moyen de digestions enzymatiques et d'extractions chimiques effectuées, soit sur des blocs de tissus préalablement fixés au formol puis inclus pour l'observation au microscope électronique (SWIFT, 1963), soit sur des ultracoupes de matériaux inclus dans des plastiques hydrosolubles (LEDUC et BERNHARD, 1967).

Une digestion à la RNase fait disparaître les granules du nucléole ainsi que les fibrilles du réseau bien que celui-ci soit encore très contrasté. Lorsque l'action de la RNase est précédée ou suivie d'une digestion à la pepsine, seuls la chromatine périnucléolaire et les amas de chromatine intranucléolaire sont encore visibles (MARINOZZI, 1963 ; MARINOZZI et BERNHARD, 1963 ; MARINOZZI, 1964 ; SMETANA et al., 1968). La pepsine éclaircit le nucléole et on constate que les fibrilles et les granules apparaissent plus nettement, en même temps que le contraste du réseau diminue. Lorsque le traitement à la pepsine est prolongé, les fibrilles sont, contrairement aux granules, de moins en moins visibles.

L'ARN nucléolaire se localise donc au niveau des granules et des fibrilles. Celles-ci sont incluses dans une substance amorphe de nature protéique, et l'ensemble des granules, des fibrilles et de la matrice protéique constitue le réseau.

A fort grossissement, après une imprégnation au plomb des coupes de tissu fixé par un aldéhyde qui révèle préférentiellement les ribonucléoprotéines, les granules apparaissent eux-mêmes constitués de fibrilles pelotonnées d'un diamètre (50 Å à 100 Å) identique à celui des fibrilles du réseau. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu dans les études cytochimiques effectuées sur des fractions de nucléoles isolés soumis à des digestions enzymatiques ou à des extractions chimiques au moyen de solutions salines (SMETANA et BUSCH, 1963 ; SMETANA et BUSCH, 1964 ; HYDE et al., 1965 ; SHANKARANARAYAN et al., 1966). Dans ces expériences, les grossissements élevés montrent que les granules sont constitués d'une zone périphérique dense entourant une région centrale plus claire, comme s'ils représentaient des coupes transversales de très fins tubules.

Dans certains cas, des structures tubulaires ont été observées au niveau des fibrilles du réseau. Ces constatations rendent probable l'existence d'une interdépendance des deux structures renfermant l'ARN nucléolaire ; des formes de passage de l'une à l'autre ont en outre été décrites (MARINOZZI et BERNHARD, 1963).

On sait depuis longtemps que le nucléole est associé à des amas plus ou moins importants de chromatine (VIGIER, 1900). C'est CASPERSSON (1950) qui appela cette chromatine "Nucleolus Associated Chromatin" ou "hétérochromatine" et lui conféra un rôle important dans le métabolisme cellulaire. En microscopie électronique, la chromatine associée au nucléole a été révélée grâce à l'emploi des fixateurs aldéhydiques et des imprégnations à l'acétate d'uranyle. La quantité de chromatine associée est variable suivant les cellules ; elle est importante dans les cellules glandulaires, telles que les cellules du pancréas exocrine, alors qu'elle est réduite dans certaines souches de cellules cultivées in vitro (HeLa - KB). La présence de chromatine à l'intérieur du corps nucléolaire a été longtemps mise en doute, bien que certaines observations en microscopie optique en suggéraient l'existence, notamment au niveau des nucléoles des noyaux de glandes salivaires de diptères (MULNARD, 1956 ; NASH et PLAUT, 1965 ; GHOSH et al., 1969).

Ce sont les techniques de microscopie électronique qui ont permis d'établir, sans doute possible, l'existence de la chromatine intranucléolaire. Elle a d'abord été observée sous forme d'amas localisés entre les mailles du réseau fibrillo-granulaire, dans les nucléoles d'un grand nombre de cellules. Grâce à l'application des techniques de cytochimie ultrastructurale combinées aux techniques d'autoradiographie à haute résolution, GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P. (1964) ont révélé l'existence, dans des

cellules de rein de singe cultivées in vitro, de travées de chromatine issues de la chromatine périnucléolaire et s'enfonçant à l'intérieur du corps nucléolaire. L'observation de coupes sériées indique clairement que les travées de chromatine intranucléolaire sont des digitations de la chromatine associée et qu'elles forment avec celle-ci un ensemble unique, doué d'activité de synthèse. L'abondance de la chromatine intranucléolaire varie d'un type cellulaire à l'autre et dans une même population, d'une cellule à l'autre.

Ces travées de chromatine intranucléolaire se localisent entre les mailles du réseau fibrillo-granulaire, et non dans l'axe du réseau comme l'ont prétendu certains auteurs (LETTRE et SIEBS, 1961 ; GOSH et al., 1969).

Dans les nucléoles isolés, il a été possible de déceler des fibrilles de chromatine ténues et dispersées au coeur même du réseau fibrillo-granulaire (SMETANA et BUSCH, 1964 ; PAWELETZ et al., 1967 ; UNUMA et al., 1967 ; RECHER et al., 1970). De plus, au niveau des centres fibrillaires décrits notamment dans des nucléoles de cellules cultivées in vitro, certains travaux cytochimiques (RECHER et al., 1969) mentionnent la présence de fibrilles de 50 Å de diamètre résistant à la double digestion pepsine-RNase et qui, de ce fait, pourraient représenter une forme d'ADN intranucléolaire à l'état dispersé et inclus dans une matrice protéique.

En conclusion, on peut différencier trois formes d'ADN nucléolaire : l'ADN périnucléolaire, l'ADN intranucléolaire condensé, localisé entre les mailles du réseau fibrillo-granulaire et l'ADN intranucléolaire dispersé, observé à l'état de fibrilles dans le nucleolo-
nema.

La morphologie ultrastructurale du nucléole de la cellule hépatique de rat est illustrée par les planches 1 et 2. Ce nucléole se caractérise par une répartition homogène de ses constituants particuliers et par une faible proportion de chromatine intranucléolaire. Nous avons exceptionnellement réussi à mettre en évidence un réseau de chromatine intranucléolaire (Pl. 2, Fig. b et c).

II - ETUDE CHIMIQUE DES RIBONUCLEOPROTEINES NUCLEOLAIRES.

A - SYNTHESE DE L'ARN RIBOSOMAL

L'ARN ribosomal est synthétisé au niveau du nucléole. Les preuves de cette synthèse sont nombreuses et regroupent des travaux biologiques et biochimiques (voir PERRY, 1967 ; GEORGIEV, 1967 ; BUSCH, 1970). Parmi ces derniers il faut surtout mentionner les résultats fournis par l'emploi d'actinomycine D comme inhibiteur total ou sélectif des synthèses d'ARN, les déterminations de la composition en bases des différents ARN isolés et les expériences d'hybridation de certaines classes d'ARN avec les ADN nucléolaires. La mise au point de techniques d'isolement de nucléoles a en outre permis l'identification biochimique des ARN nucléolaires et la mise en évidence d'une synthèse d'ARN dans les nucléoles isolés (RO et BUSCH, 1964).

- L'étude des profils des gradients de densité de saccharose des ARN extraits des nucléoles isolés révèle trois grandes classes d'ARN ayant des coefficients de sédimentation respectifs de 28 S, 30 - 35 S et 45 S,

auxquelles s'ajoute une classe relativement moins importante dans la zone 4 à 7 S (PERRY, 1955 ; PERRY, 1966 ; MURUMATSU et BUSCH, 1967).

Au moyen d'électrophorèses effectuées en gel d'acrylamide, on a pu obtenir une meilleure définition et caractériser des ARN ayant des coefficients de sédimentation intermédiaires : 41 S, 36 S, 24 S et 20 S (WEINBERG et al., 1967 ; WEINBERG et PENMAN, 1970).

Ainsi, par rapport au compartiment nucléaire non nucléolaire, le compartiment nucléolaire est plus riche en ARN 45 S et 35 S et beaucoup moins riche en ARN 18 S (BUSCH et al., 1966). La quantité d'ARN nucléolaires 45 S et 32 - 35 S compte pour environ 3 p. 100 de la quantité d'ARN cellulaire totale (HOLTZMAN et al., 1966).

- Les études effectuées à la fois à partir de l'analyse des nucléotides en lumière ultraviolette et de l'incorporation du phosphore radioactif ont montré que les 3 grandes classes d'ARN nucléolaires ont des compositions en bases très voisines caractérisées par un plus grand nombre de bases guanine et cytosine puisque le rapport $\frac{A + U}{G + C}$ oscille autour de 0,55 (MURAMATSU et al., 1966).

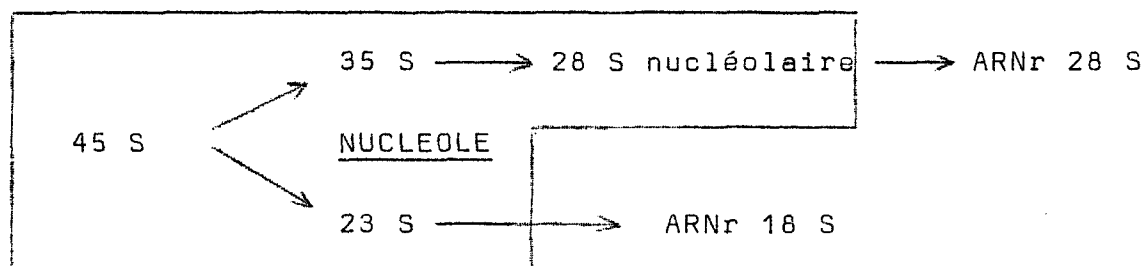
- L'actinomycine D entraîne, à faible dose, une inhibition préférentielle du métabolisme des ARN nucléolaires et, à forte dose, le blocage total de la synthèse des acides ribonucléiques. Dans la plupart des travaux, l'action de l'actinomycine D succède à une période de marquage de 10 à 20 mn ; elle entraîne alors le blocage de toute nouvelle synthèse de molécules d'ARN nucléolaire. On constate, en fonction du temps d'action de l'actinomycine D (SCHERRER et al., 1963 ; GIRARD et al., 1964), une baisse de la

radioactivité et de la densité optique de la zone 45 S, puis de la zone 35 S des gradients ; enfin, après 40 mn environ d'action de l'actinomycine D, seule la zone correspondant à l'ARN 28 S est caractérisable en densité optique et en radioactivité.

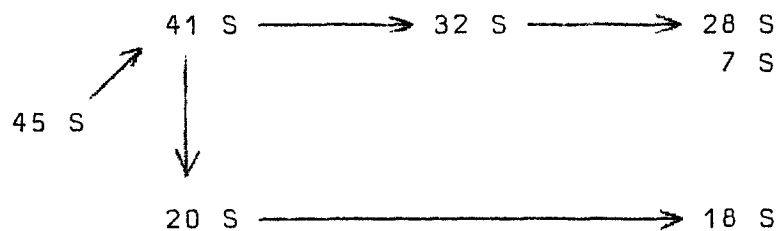
L'ensemble de ces résultats ont permis d'établir que l'ARN 28 S dérive de l'ARN 35 S lequel dérive de l'ARN 45 S.

- Les études d'hybridation entre l'ADN nucléolaire et les ARN ribosomaux ont montré que l'ADN nucléolaire code à la fois l'ARN ribosomal 28 S et l'ARN ribosomal 18 S. Les deux cistrons responsables chacun de la synthèse d'un des ARN ribosomaux sont très proches l'un de l'autre (BROWN et WEBER, 1968 ; QUAGLIAROTTI et RITOSSA, 1968) et synthétisent l'ARN 45 S nucléolaire ainsi que, très certainement, des molécules plus longues de coefficients de sédimentation de 65 S, 85 S et 100 S mises en évidence récemment dans des cellules d'hépatomes de NOVIKOFF (SHARMA et al., 1969).

En conclusion, il est possible de schématiser le mode de formation des ARN ribosomaux 18 S et 28 S à partir de l'ARN nucléolaire 45 S de la façon suivante (STEELE et BUSCH, 1968 ; BUSCH, 1970) :



Pour WEINBERG et PENMAN (1970) qui ont caractérisé les ARN intermédiaires 41 S, 36 S, 32 S, 24 S et 20 S, le schéma proposé est le suivant :



- L'ARN nucléolaire 4 - 7 S ne représente que 5 à 10 p. 100 de l'ARN nucléolaire total. Il se caractérise des autres ARN présents dans le nucléole, par un taux de synthèse plus lent et par sa composition en bases puisqu'il est riche en acide urydilique.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide ont permis de séparer cette zone d'ARN 4 - 7 S en ARN ayant des vitesses de migration différentes. La fonction de ces ARN de faible poids moléculaire est encore inconnue. BUSCH (1970) suggère qu'ils ne sont pas destinés à migrer vers le cytoplasme puisqu'on ne les y retrouve pas, mais qu'ils peuvent jouer un rôle dans un mécanisme de contrôle des synthèses au niveau du nucléole.

B - LES RIBONUCLEOPROTEINES NUCLEOLAIRES

Plusieurs travaux ont montré qu'il est possible d'extraire, à partir de nucléoles isolés, des ribonucléoprotéines qui ont été étudiées du point de vue de leur contenu en ARN et en protéines. Les différentes classes d'ARN nucléolaires ont ainsi été retrouvées au niveau de particules ribonucléoprotéiques ayant des coefficients de sédimentation

variables suivant le mode d'extraction.

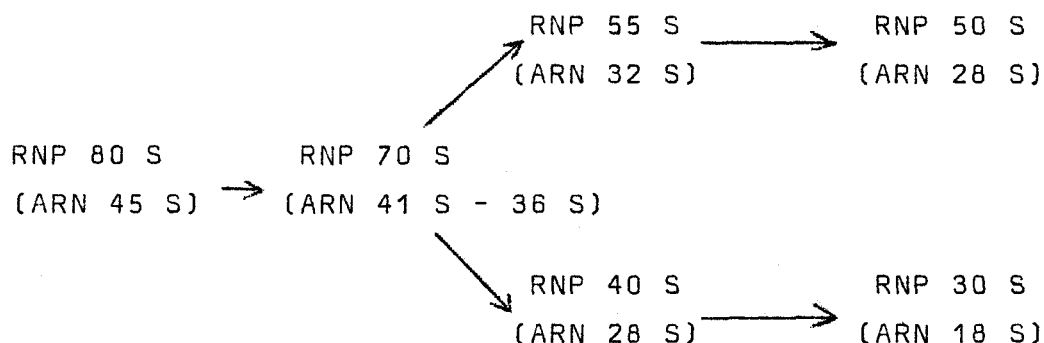
L'extraction des ribonucléoprotéines est réalisée par suspension des sédiments de nucléoles isolés dans un milieu tamponné (le plus souvent tampon TRIS pH 7,4), de force ionique variable et contenant ou non un inhibiteur d'activité nucléasique : le polyvinylsulfate (PVS), de l'E.D.T.A. et un agent réducteur des ponts disulfures : le dithioerythritol.

Les particules de ribonucléoprotéines se retrouvent, en gradients de saccharose, dans une zone s'étendant de 50 S à 80 S, présentant un maximum à 60 S (SHANKARANARAYAN et BIRNSTIEL, 1969), ou se décomposant en plusieurs zones marquées chacune par un maximum. Ainsi WARNER et SOEIRO (1967) identifient, à partir des nucléoles de cellules HeLa, deux zones de coefficient de sédimentation 55 S et 80 S contenant respectivement l'ARN nucléolaire 32 S et l'ARN 45 S. A partir des nucléoles de cellules L, LIAU et PERRY (1969) distinguent 3 zones de coefficients de sédimentation 62 S, 78 S et 110 S qui, en présence d'E.D.T.A., présentent respectivement les coefficients de sédimentation 55 S, 65 S et 80 S. La fraction 55 S contient surtout l'ARN 32 S, la fraction 65 S un mélange d'ARN 36 S et 32 S et la fraction 80 S, un mélange de 45 S, 36 S et 32 S.

Dans les expériences de SHANKARANARAYAN et BIRNSTIEL (1969), la zone 50 S - 80 S, présentant un maximum à 60 S, contient essentiellement l'ARN 30 - 32 S.

Ainsi, il semble que les ribonucléoprotéines nucléolaires possédant un coefficient de sédimentation moyen de 60 S, renferment essentiellement les ARN nucléolaires 35 S et 28 S. L'ARN 45 S semble associé à des particules sédimentant dans la zone 80 S.

Les relations existant entre les différentes particules de ribonucléoprotéines ont été résumées de la façon suivante (BUSCH, 1970) :



Les seules observations ultrastructurales des particules extraites ont été réalisées par SHANKARANA-RAYAN et BIRNSTIEL (1969) et KOSHIBA et al. (1971) sur les particules de la zone 60 S, au moyen de colorations négatives et positives.

Les particules ont une structure poreuse et les grossissements élevés les montrent composées de fibrilles. Elles mesurent de 150 Å à 220 Å de largeur sur environ 230 Å à 300 Å de longueur. Elles apparaissent ainsi plus grandes que les sous-unités ribosomales cytoplasmiques 50 S, mais leur taille et leur structure fine les rapprochent beaucoup des granules ribonucléoprotéiques du nucléole in situ.

D'une façon générale, les particules extraites par les différents auteurs se caractérisent par un contenu en protéines plus important que celui de la sous-unité ribosomale 50 S mais qualitativement identique par électrophorèses comparatives (WARNER et SOEIRO, 1967), notamment en ce qui concerne les protéines basiques (IZAWA et KAWASHIMA, 1967). Le rapport protéine étant plus élevé,

leur densité est plus faible et varie selon les auteurs de 1,41 à 1,50. Elles diffèrent, en outre, des particules cytoplasmiques par leur plus grande sensibilité à la digestion à la RNase (IZAWA et KAWASHIMA, 1967) et leur indifférence vis à vis des ions Mg^{++} et selon certains auteurs, de l'E.D.T.A. (SHANKARANARAYAN et BIRNSTIEL, 1969). Très récemment, BACHELLERIE et al. (1971) ont extrait des nucléoles de cellules ascitiques de Zajdela, des ribonucléoprotéines possédant des coefficients de sédimentation de 35 S, 55 S, 75 S et 95 S. Les particules lourdes supérieures à 65 S renferment essentiellement l'ARN 45 S et l'ARN 32 S. Les particules plus légères renferment l'ARN 28 S.

Dans le chapitre consacré à l'ultrastructure du nucléole, nous avons mentionné la présence dans cet organite, de deux types de ribonucléoprotéines morphologiquement distinctes : les fibrilles et les granules, associés au sein d'une matrice protéique pour former le réseau nucléolaire. Des études ont donc été faites pour essayer de localiser les différents ARN nucléolaires au niveau de ces deux composants.

- Le composant fibrillaire étant marqué en premier après une action courte des précurseurs radioactifs de l'ARN, on considère que c'est à son niveau que se localise l'ARN précurseur 45 S (BERNHARD et GRANBOULAN, 1968). Les expériences de SHANKARANARAYAN et al. (1966) sur des nucléoles ségrégatifs après action de l'actinomycine D associée ou non à l'action de la thioacétamide et durant lesquelles la détermination des quantités d'ARN nucléolaires extraites étaient comparées à des mesures planimétriques des zones fibrillaires et granulaires, ont montré que la zone fibrillaire contenait l'ARN nucléolaire 6 S.

Les ribonucléoprotéines fibrillaires comprennent donc une population hétérogène d'ARN puisque en plus de ceux liés à la production des ARN ribosomiaux, elles comportent l'ARN nucléolaire 6 S.

- Les expériences de SHANKARANARAYAN et al., (1966) relatées plus haut montrent que l'augmentation de la surface occupée par les zones granulaires, dans les nucléoles lésés après action de l'actinomycine D, se traduit par une augmentation de la quantité d'ARN 28 S et une baisse de la quantité d'ARN 6 S. Dans les cellules traitées à l'actinomycine D puis à la thioacétamide, le nucléole est entièrement granulaire ; dans ce cas, les extractions ne fournissent que l'ARN nucléolaire 28 S.

Les granules nucléolaires renferment donc l'ARN nucléolaire 28 S ainsi que les ARN dérivés de la transformation de l'ARN 45 S précurseur comme l'ont montré les études effectuées sur les particules isolées.

Cette hétérogénéité du compartiment granulaire est confirmée par les observations effectuées après incubation de cellules cultivées dans un milieu contenant de la toyocamycine (MONNERON et al., 1970). Cet antibiotique provoque une inhibition complète de la transformation, en ARN 28 S et 18 S, de l'ARN 45 S formé en sa présence. Ce blocage n'entraîne pas, morphologiquement, une augmentation des zones occupées par les fibrilles, ni une disparition des granules, ce qui laisse supposer la présence au niveau de ces derniers, de classes d'ARN de coefficient de sédimentation supérieur à 28 S.

III - LES RIBONUCLEOPROTEINES NUCLEAIRES EXTRANUCLEOLAIRES

MISES EN EVIDENCE IN SITU (voir Fig. 1).

A - LES GRAINS INTERCHROMATINIENS

Ils s'observent dans les noyaux de toutes les cellules animales, normales ou pathologiques, en groupes uniques ou multiples. A l'intérieur de ces amas, les grains interchromatiniens sont souvent associés en chapelets ou en chaînettes (GRANBOULAN et BERNHARD, 1961). La technique de coloration préférentielle des ribonucléoprotéines, mise au point par BERNHARD (1969) (PALEKAR et BERNHARD, 1968) a permis de montrer que cette disposition des grains s'explique par la présence de fibrilles les reliant entre eux (MONNERON et BERNHARD, 1969). La forme des grains est grossièrement sphérique ou plus ou moins angulaire ; ils présentent un diamètre moyen de 200 Å à 250 Å. Le caractère essentiel des grains interchromatiniens est leur grande résistance à la digestion à la RNase (MONNERON et BERNHARD, 1969). Des études cytochimiques effectuées sur des coupes de culots de noyaux inclus dans le glycolméthacrylate ont montré que les granules sont sensibles à la pronase. En effet, après une digestion de 10 mn par cette enzyme, les grains présentent une structure hétérogène et il devient possible de distinguer à leur niveau, des particules denses d'un diamètre inférieur à 100 Å. Les actions successives de la RNase et de la pronase ne les font pas disparaître complètement mais provoquent une diminution de contraste et l'apparition d'un contour plus flou (MONNERON et MOULÉ, 1968).

Il semble que les grains interchromatiniens fassent partie d'un réseau que l'on peut mettre en évidence

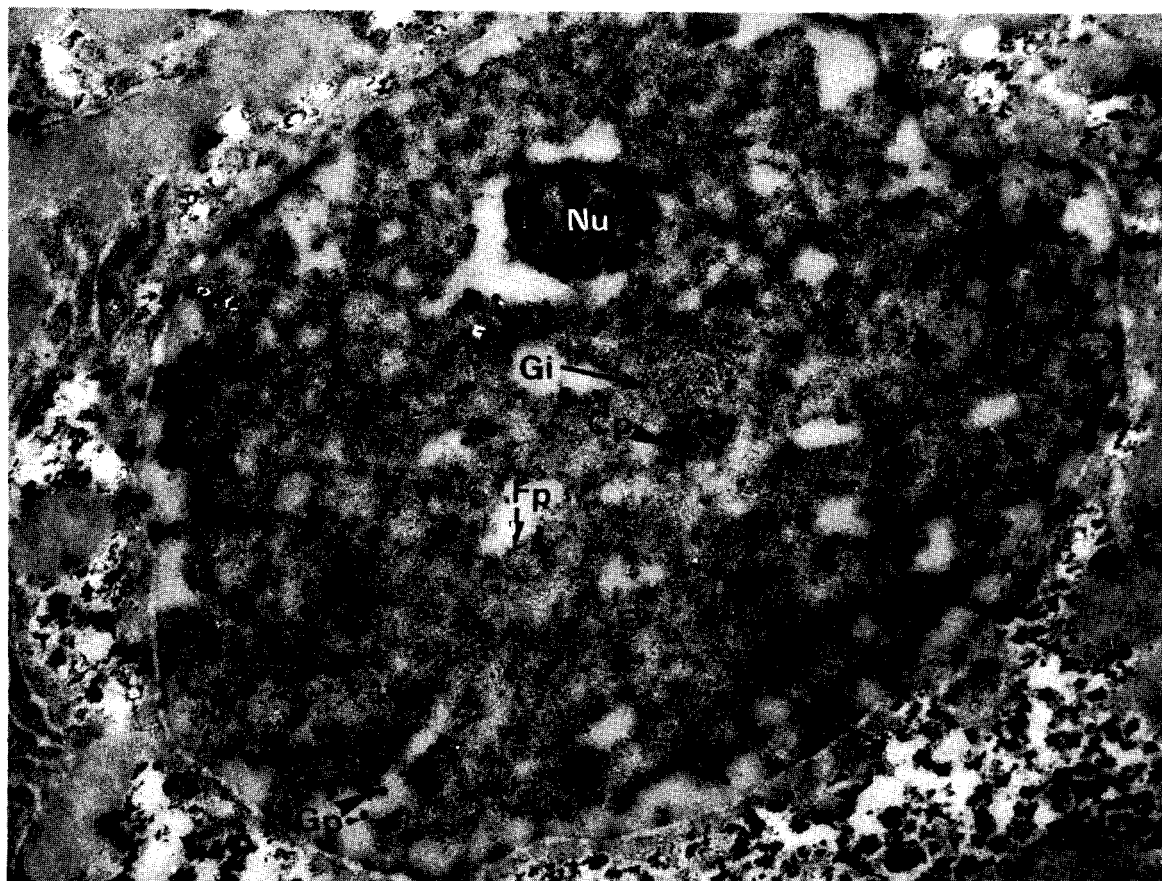
BUS
LILLE

Figure 1

Noyau de cellule hépatique de Rat coloré par la technique de révélation préférentielle des RNP (BERNHARD, 1969) fixation glutaraldehyde.

- Gp grains périchromatiniens
- Gi grains interchromatiniens
- Fp fibrilles périchromatiniennes
- Cp corps pelotonné
- Nu nucléole

en extrayant les desoxyribonucléoprotéines. En effet, des solutions salines diluées et concentrées, appliquées à des noyaux isolés de tumeur de WALKER et de foie de Rat, extraient environ 90 p. 100 de l'ADN et 60 p. 100 de l'ARN. Lorsqu'on applique à ces noyaux extraits une coloration des ribonucléoprotéines par le bleu de toluidine, on révèle dans le nucléoplasme, un réseau coloré s'appuyant sur le nucléole et sur la membrane nucléaire (SMETANA et al., 1963). Au microscope électronique, (SHANKARANARAYAN et al., 1967) ce réseau est constitué de fibres de 60 Å à 100 Å de diamètre et de particules de 120 Å à 220 Å que les auteurs identifient aux grains interchromatiniens. Là encore les digestions enzymatiques révèlent la résistance de ces grains à la RNase mais permettent de constater leur disparition après les actions de la pepsine et de la RNase.

En conclusion, les grains interchromatiniens sont des ribonucléoprotéines caractérisées par un ARN bien protégé par une coque protéique. Leur rôle est encore inconnu. SHANKARANARAYAN et al. (1967), en se basant sur le fait que les grains interchromatiniens font partie d'un réseau présentant une continuité avec le nucléole, suggèrent que la transformation des ARN nucléolaires 28 S et 23 S, respectivement en ARN ribosomiaux 28 S et 18 S se fait à leur niveau.

B - LES GRAINS PERICHROMATINIENS

Ces grains, rencontrés de manière constante dans tous les noyaux (WATSON, 1962) se distinguent des précédents par leur localisation, leur taille et leur nombre. De forme sphérique, ils présentent un diamètre moyen de 400 Å à 450 Å sur des coupes de matériel fixé aux aldéhydes

et à l'acide osmique. Ils sont facilement identifiables grâce à la présence d'un halo clair qui les entoure et les sépare du nucléoplasme environnant ; ce halo mesure environ 250 Å d'épaisseur (MONNERON et BERNHARD, 1969). Les grains périchromatiniens se localisent en périphérie des amas de chromatine dense mais néanmoins, après coloration régressive des ribonucléoprotéines selon BERNHARD (1969), il a été possible d'en observer au centre de ces amas. Ils sont aussi fréquemment observés dans les espaces clairs de forme cylindrique faisant communiquer les pores nucléaires avec le nucléoplasme (JEZEQUEL et MARINOZZI, 1963). Les grains périchromatiniens sont moins nombreux que les grains interchromatiniens ; WATSON et ALDRIDGE (1961) en dénombrèrent de 500 à 2000 par noyau, plus récemment il a été possible d'en démontrer environ 2 fois plus (MONNERON et BERNHARD, 1969). Après coloration selon BERNHARD (1969), les grains périchromatiniens apparaissent constitués de fibrilles ténues enroulées sur elles mêmes, d'environ 30 Å de diamètre, qui, dans certains cas, peuvent sortir du grain. Comme les grains interchromatiniens, les grains périchromatiniens résistent à la digestion enzymatique à la RNAse et à l'extraction par l'acide chlorhydrique froid à 10 p. 100, mais ces deux actions diminuent leur colorabilité par l'acétate d'uranyle ou par l'indium.

L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que les grains périchromatiniens sont de nature ribonucléoprotéique bien que certaines constatations (perte apparente de contraste après digestion à la DNase) (WATSON, 1962) aient pu suggérer qu'ils renfermaient aussi de l'ADN.

Les grains périchromatiniens se localisent fréquemment près des pores nucléaires où on a pu constater (MONNERON, 1967) que leur structure et leur contraste se modifiaient au fur et à mesure qu'ils s'en rapprochent.

Leur taille et leur contraste sont d'autant plus réduits qu'ils sont plus proches des pores ; il semble même que certains se désintègrent en fibrilles ténues, alors que d'autres s'allongent dans l'axe du pore (MONNERON et BERNHARD, 1969). Ces aspects, joints au fait que les granules périchromatiniens sont constitués de fibrilles semblant prendre naissance au contact des amas chromatinien, permettent de leur attribuer un rôle dans le transport de l'ARN du noyau vers le cytoplasme (MONNERON et BERNHARD, 1969).

C - LES GRANULES DE BALBIANI

Ils ont été mis en évidence dans les noyaux des cellules de glandes salivaires de diptères (STEVENS, 1964) au niveau des "puff" d'ARN. Les granules de Balbiani mesurent au niveau du "puff", de 400 Å à 500 Å, ils semblent associés à de courts filaments de 180 Å à 220 Å de diamètre de l'enroulement desquels ils semblent dériver. Les études cytochimiques confirment la nature ribonucléoprotéique des granules de Balbiani. En dehors des "puff", ces granules sont répartis au hasard dans le nucléoplasme, mais en plus grand nombre près de l'enveloppe nucléaire et fréquemment au contact de celle-ci, où même engagés dans les pores nucléaires ; dans ce dernier cas, ils s'allongent pour prendre la forme de bâtonnets pouvant atteindre 1 700 Å de longueur (STEVENS et SWIFT, 1966).

D - LES FIBRILLES PERICHROMATINIENNES (MONNERON et BERNHARD, 1969).

Ce sont des fibrilles de 30 Å à 50 Å de diamètre, certaines pouvant atteindre 200 Å de diamètre,

localisées à la périphérie d'un grand nombre de masses chromatinienne éclaircies après l'application de la technique de BERNHARD (1969). En général, les fibrilles péri-chromatiniennes apparaissent enroulées irrégulièrement et certaines d'entre elles semblent donner naissance à des granules. Elles présentent parfois une continuité structurale avec les grains interchromatiniens et les grains péri-chromatiniens. Les études cytochimiques indiquent qu'elles sont de nature ribonucléoprotéique et qu'elles présentent une plus grande sensibilité vis à vis de la digestion enzymatique à la RNase que les grains inter et péri-chromatiniens.

Du fait même de leur contact direct avec les masses chromatinienne compactes où semble se localiser la transcription, ces fibrilles pourraient représenter l'expression morphologique d'un ensemble hétérogène de différentes classes d'ARN associés à un manchon de nature protéique.

E - LES CORPS PELOTONNES

Ce sont des agrégats uniques de 0,3 μ à 0,5 μ de diamètre, plus ou moins sphériques et constitués de filaments enroulés dont le diamètre varie de 400 Å à 600 Å.

A fort grossissement, ces filaments apparaissent formés d'un faisceau de fibrilles ténues de 50 Å d'épaisseur, tordues irrégulièrement le long de l'axe du faisceau. Ces structures se localisent dans les espaces interchromatiniens. Les études cytochimiques ont permis de confirmer leur nature ribonucléoprotéique (MONNERON et BERNHARD, 1969).

IV - LES PARTICULES DE RIBONUCLEOPROTEINES ISOLEES

Les particules identifiées par les méthodes biochimiques peuvent être classées en deux catégories : les ribonucléoprotéines ribosomales (rRNP) et les ribonucléoprotéines à ARN de type dARN (dRNP) selon la composition en bases de leur ARN.

A - LES PARTICULES DE rRNP

Elles ont été identifiées après passage de lysats nucléaires sur gradients de saccharose.

Des particules de coefficient de sédimentation 60 S à 80 S ont été obtenues à partir des noyaux de cellules HeLa, lysés dans un tampon TRIS puis centrifugés de façon à éliminer le sédiment nucléaire renfermant notamment les nucléoles. L'analyse des profils de sédimentation des gradients révèle une zone 60 S à 80 S présentant un maximum net à 50 S et renfermant un ARN 28 S. Cet ARN a la même composition élevée en bases guanine et cytosine que son homologue cytoplasmique et les expériences de marquages suivis de "chasses" ont montré qu'il en est le précurseur ; sa radioactivité spécifique est d'ailleurs 20 fois supérieure (VAUGHAN et al., 1967).

- Dans la même expérience, en plus du composant 50 S, les profils de sédimentation révèlent un composant 30 S renfermant un ARN 18 S ayant les caractéristiques de l'ARN 18 S cytoplasmique.

B - LES PARTICULES DE dRNP

Un grand nombre de travaux mentionnent l'existence dans le noyau, de particules renfermant un ARN de type dARN. La plupart des études réalisées ont été purement biochimiques, peu d'entre elles ont analysé les particules sur le plan morphologique et les ont comparées aux structures ribonucléoprotéiques de la cellule. Nous avons rassemblé dans le tableau I, les principales données physicochimiques de la plupart de ces particules de dRNP et nous nous bornerons à n'étudier en détail que les travaux les plus importants effectués sur certaines d'entre elles et dont la présence dans le noyau a permis d'établir des hypothèses sur le transport de l'ARN vers le cytoplasme.

1 - Les ARN-informofères de GEORGIEV

Les ARN-informofères ont été isolés à partir de noyaux de cellules du carcinome d'Ehrlich et de noyaux de foie de Rat, extraits à pH 7,8 - 8 dans un milieu salin tamponné.

L'analyse des gradients de saccharose révèle que la majeure partie du mARN se retrouve dans une zone présentant un maximum net en position 30 S. L'étude des densités optiques à 260 et 280 nanomètres, ainsi que celle de l'incorporation d'acides aminés marqués, montrent que le pic 30 S renferme aussi des protéines. Le mARN se retrouve donc associé à des particules protéiques sédimentant dans la zone 30 S des gradients.

. Lorsqu'on ajoute un inhibiteur d'action de la RNase dans le milieu d'extraction, (SAMARINA et al.,

TABLEAU I

Principales propriétés physico-chimiques des différentes particules de dRNP extraites des noyaux.

	Coefficient de Sédimentation	Densité en CsCl	Contenu en ARN (p. 100)	Contenu en protéines (p. 100)	ARN Prot.	Rapport de Bases
	Des parti- cules de RNP					$\frac{G + C}{A + U}$ 32P UV
SADOWSKI <u>et al.</u> 1968			31	56	0,55	
KOHLER <u>et ARENDS</u> 1968	30 4 à 20 (max. à 7)					
PARSONS <u>et Mc CARTY</u> 1968	45 6 - 10	1,43				0,87 0,96
FAIFERMAN <u>et al.</u> 1970	60 4 - 6	1,38	17	82	0,21	0,68 0,77
STEVENIN <u>et al.</u> 1970	40 - 50	1,40				
CARTOUZOU <u>et al.</u> 1969	30 à 90 5 - 9	1,41	30	70	0,4	

1968) le matériel ribonucléoprotéique obtenu sur gradient de saccharose est plus hétérogène. En plus du pic 30 S, on distingue alors deux ou trois pics supplémentaires dans les zones 45 S, 60 S et 70 S du gradient, la zone totale de matériel s'étalant jusqu'à 200 S.

. Lorsque le matériel ribonucléoprotéique extrait en présence d'inhibiteur de RNase et sédimentant dans la zone 30 - 200 S, est traité par la RNase, il est presque quantitativement converti en matériel sédimentant dans la zone 30 S du gradient. Le matériel lourd se comporte donc comme s'il était constitué de plusieurs unités 30 S réunies les unes aux autres par un filament d'ARN.

. L'ARN extrait des particules 30 S présente un coefficient de sédimentation de 8,5 S. Les ARN provenant des zones 45 S, 60 S et 75 S du gradient ont respectivement les coefficients de sédimentation 14 S, 17 S et 28 S alors que les zones plus lourdes renferment un ARN hétérogène présentant un maximum à 32 S. Il existe donc une corrélation entre la taille des ARN et le nombre des particules monomères 30 S qui y sont liées. Les ARN extraits présentent un rapport des bases $\frac{G + C}{A + U} = 0,79$, caractéristique du dARN.

Des observations en microscopie électronique ont été effectuées après ombrages sur des particules provenant des différentes zones du gradient de sédimentation.

Les particules du pic 30 S présentent une structure compacte de forme discoïdale, dont les dimensions moyennes sont de 180 x 180 x 80 Å.

Les zones les plus lourdes du gradient sont essentiellement constituées d'agrégats ou de chaînes de particules ayant les caractéristiques des particules 30 S. Les zones 45 S et 60 S contiennent respectivement des associations doubles et triples (dimères et trimères) ; la zone 70 à 75 S, des tétramères et des pentamères ; les zones plus lourdes pouvant présenter des associations de 8 à 12 monomères.

L'ensemble des résultats obtenus ont conduit SAMARINA et al., (1968) à formuler des hypothèses sur leur rôle biologique :

- Les informofères prennent en charge les dARN dès leur synthèse sur le moule ADN.

- Ils assureraient le clivage des dARN géants venant d'être synthétisés, en chaînes plus courtes, ce qui laisse supposer la présence d'une endonucléase spécifique au niveau des informofères.

- Les informofères représenteraient la forme de transport du mARN vers le cytoplasme ou au moins jusqu'à la membrane nucléaire.

2 - Les particules ribonucléoprotéiques de MOULÉ et CHAUVEAU (1968).

Ces particules ont été extraites des noyaux de foie de Rat isolés puis broyés dans un tampon TRIS HCl 50 mM pH 7,4 contenant $MgCl_2$ 1 mM et HCl 25 mM, au moyen de sable ou de l'ultraturax. L'ultracentrifugation de la suspension obtenue donne un sédiment appelé "culot tris" qui est resuspendu dans la solution d'extraction, contenant une concentration plus forte en ions Mg^{2+} , puis analysé en

gradient de densité de saccharose. L'examen du gradient révèle l'existence d'une population de particules ayant un coefficient de sédimentation de 40 S.

L'ARN extrait des particules présente un coefficient de sédimentation de 3,4 S et un rapport des bases $\frac{G + C}{A + U}$ voisin de 1 (MOULÉ et al., 1969). Il se distingue de l'ARN de transfert par l'absence de bases méthylées.

L'analyse de la composition en acides aminés des protéines des particules conduit à un rapport $\frac{\text{Acides Aminés Acides}}{\text{Acides Aminés Basiques}}$ de 1,39, elles présentent donc globalement, un caractère acide (SARAZIN, 1969).

Les particules de ribonucléoprotéines ont été étudiées en détail à l'échelle ultrastructurale et leurs caractéristiques morphologiques et cytochimiques comparées aux structures ribonucléoprotéiques du noyau in situ (MONNERON et MOULÉ, 1968).

Après inclusion dans l'Epon, le culot de particules 40 S se montre constitué d'une population homogène de particules sphériques de 180 Å à 250 Å de diamètre. La même homogénéité se retrouve après coloration négative sur des suspensions de particules déposées sur grilles.

Les colorations positives à l'acétate d'uranyle permettent de distinguer des sous-structures granulaires de 40 Å de diamètre au niveau des particules.

Les particules 40 S diminuent de taille et leur contraste s'affaiblit lorsqu'elles sont traitées par les actions combinées de la pronase et de la RNase, ce qui confirme leur nature ribonucléoprotéique ; mais elles se

montrent très résistantes à la digestion à la RNase seule. L'ensemble des résultats fournis par les études morphologiques rapprochent les particules 40 S des grains interchromatiniens décrits plus haut.

La signification biologique des particules 40 S est encore inconnue de même que celle des grains interchromatiniens avec lesquels elles présentent de nombreuses analogies morphologiques et cytochimiques.

L'ARN qu'elles contiennent est sans action sur l'incorporation des acides aminés dans un système acellulaire de Escherichia coli et ne semble donc pas avoir de caractère informationnel.

3 - Les particules ribonucléoprotéiques 45 S d'ISHIKAWA et al. (1969 et 1970 a-b-c)

Elles ont été décelées après incubation pendant 20 mn à 20° C de noyaux isolés de foie de Rat dans un milieu salin tamponné, contenant du saccharose 0,88 M.

Le surnageant obtenu après incubation des noyaux a été centrifugé sur gradient de saccharose ; il contient des particules de coefficient de sédimentation 45 S. Ces particules sont riches en protéines ($\frac{\text{ARN}}{\text{Prot}} = 0,2$) et leur densité en chlorure de césium est égale à 1,4. Elles sont très sensibles à l'action de la RNase.

Après extraction, l'ARN se répartit en gradient de saccharose, dans une zone s'étalant de 6 S à 28 S et présentant un maximum à 14 - 15 S. Le rapport des bases

$\frac{G + C}{A + U}$ est égal à 0,85.

Les protéines ont été extraites, puis comparées aux protéines ribosomales et aux histones dans leur comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide. Elles migrent lentement et sont moins basiques que les histones et les protéines de structure des ribosomes.

L'ARN de ces particules est capable de stimuler les synthèses protéiques dans un système acellulaire d'Escherichia coli et peut se lier aux ribosomes pour former des polysomes actifs. De cette façon, il présente les caractéristiques d'un ARN messenger. Ces particules pourraient donc représenter une forme de transport du mARN vers le cytoplasme (ISHIKAWA et al., 1970 c).

P R O B L E M E S P O S E S

Cette revue des principaux travaux effectués sur les ribonucléoprotéines nucléaires, nous permet d'établir clairement les problèmes qui restent à résoudre.

Parmi les différentes ribonucléoprotéines caractérisées par les techniques morphologiques et cytochimiques ultrastructurales, seuls les granules et les fibrilles du nucléole ont été suffisamment étudiés pour que l'on puisse établir leur liaison métabolique et comprendre leur signification ; par contre on connaît peu les grains interchromatiniens, périchromatiniens, les corps pelotonnés et les fibrilles périchromatiniennes. Mis à part les corps pelotonnés, des formes de passage semblent exister morphologiquement entre ces différentes catégories de ribonucléoprotéines. En ce qui concerne les ribonucléoprotéines nucléolaires, il est maintenant admis qu'elles renferment les ARN précurseurs des ARN ribosomiaux. La question qui se pose est de savoir si les ribosomes sont tout ou en partie édifiés dans le nucléole, c'est-à-dire si cet organite est le siège de l'assemblage des protéines ribosomales à l'ARN ribosomal nouvellement synthétisé. Les facteurs de régulation de cet assemblage ARN-protéines et du transport vers le cytoplasme des ribonucléoprotéines sont très peu connus. Sur le plan morphologique, il n'a encore jamais été démontré dans les cellules de mammifères de passage de matériel granulaire au niveau des pores de l'enveloppe nucléaire ; seule la présence de fibrilles probablement issues des grains périchromatiniens a été décrite (MONNERON et BERNHARD, 1969).

Parallèlement, de nombreuses particules ribonucléoprotéiques ont été extraites par les biochimistes. Leur étude physico-chimique a permis de définir la nature de leurs constituants mais leur signification est encore hypothétique. Elles présentent entre elles certains caractères communs qui les distinguent des particules cytoplasmiques, notamment leur densité (voisine de 1,4) correspondant à un contenu en protéines d'environ 80 p. 100 ; cette richesse en protéines apparaît caractéristique des particules nucléaires.

Les études morphologiques effectuées sur les particules extraites par les biochimistes sont rares et peu poussées, de sorte qu'il n'est pas possible d'établir de relations précises entre elles et les particules caractérisées in situ. La mise en évidence de telles relations apparaît pourtant primordiale à une meilleure compréhension de leur signification fonctionnelle.

I - MATERIELS et METHODES GENERALES

A - TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

1 - Observation des matériels au microscope électronique

- Les fixateurs suivants ont été utilisés : formol 10 p. 100, glutaraldéhyde 1,5 p. 100, tétroxyde d'osmium 2 p. 100, dans le tampon phosphate de Sörensen à pH 7,4. Les déshydratations ont été effectuées dans l'éthanol par bains successifs de concentrations croissantes. Les inclusions ont été réalisées dans l'Epon, selon la technique de LUFT (1961).

- Pour certains matériels : cellules HeLa, glandes salivaires de larves de chironomes, bactéries, l'inclusion dans l'Epon a été précédée d'une inclusion dans une solution de gélose chaude à 5 p. 100. Cette inclusion en gélose a par ailleurs facilité la fabrication de coupes au cryostat utilisées pour les études cytochimiques.

- Les inclusions de protéines pures ont été réalisées par mélange à volume égal des solutions de ces protéines dans des solutions d'agarose à 10 p. 100.

- Les fractions nucléaires et nucléolaires ont été fixées après resuspension dans le milieu d'homogénéisation, par le glutaraldéhyde ou par le formol. Elles ont été ensuite centrifugées pour constituer un culot qui a été post-fixé ou non à l'acide osmique puis inclus.

2 - Coupes semi-fines

Elles ont été réalisées sur matériel inclus dans l'Epon. Les coupes, d'une épaisseur de 0,5 à 1 μ , sont recueillies au moyen d'anneaux en plastique et déposées sur des lames d'histologie. Elles sont alors colorées pendant 5 mn à 60° C par un mélange à volume égal de bleu de méthylène (solution à 1 p. 100 dans le borax à 1 p. 100) et de bleu azur II (solution aqueuse à 1 p. 100).

3 - Techniques de cytochimie ultrastructurale

a - Digestions enzymatiques des coupes ultrafines

Les digestions enzymatiques sont effectuées sur des coupes de matériel inclus, après fixation au glutaraldehyde ou au formol pendant des temps variables, dans le glycol-méthacrylate (GMA) selon la technique de LEDUC et BERNHARD (1967).

Les digestions se font par flottage des coupes sur les solutions enzymatiques :

- pepsine : solution à 0,5 p. 100 dans
HCl $\frac{N}{10}$
- ribonucléase : solution à 0,1 p. 100 dans
l'eau distillée pH 6,8
- desoxyribonucléase : solution à 0,1 p. 100
dans l'eau distillée pH 6,8
contenant MgCl₂ 0,003 M.

Des coupes témoins subissent, parallèlement, un traitement identique sur les mêmes solvants ne renfermant pas l'enzyme.

b - Coupes effectuées au cryostat

Le matériel est fixé au formol à 10 p. 100. Après rinçage pendant une nuit à 4° C dans le tampon phosphate de pH 7,4, il est refroidi rapidement à - 20° C, puis coupé à cette température au moyen d'un cryostat de Pearse (Cryostat Bright). Les coupes de 20 à 40 μ d'épaisseur sont recueillies dans le tampon phosphate pH 7,4 renfermant 10 p. 100 de diméthylsulfoxyde.

Après traitement par les solutions enzymatiques, les coupes sont sédimentées par centrifugation en tubes coniques (4000 t/mn), centrifugeuse Jouan, pendant 1 mn). Le sédiment est alors lavé, deshydraté et inclus dans l'Epon.

c - Pour la mise en évidence des ribonucléoprotéines, nous avons utilisé la technique de BERNHARD (1969) dans les conditions suivantes (inclusion dans l'Epon) :

- Acétate d'uranyle en solution aqueuse à 5 p. 100, 2 à 3 mn,
- Solution aqueuse fraîche d'E.D.T.A. 0,2 M pH 7, 15 à 20 mn,
- Citrate de plomb, 1 mn.

4 - Techniques de colorations négatives et positives

a - La technique de coloration négative que nous avons employée est celle de SHELTON et KUFF (1966). La suspension de particules préalablement fixées eu formol, est déposée sur grilles électrolytiques recouvertes de

formvar consolidé par une mince couche de carbone. Avant d'être colorées, les grilles sont rincées dans la même solution que celle qui a servi à suspendre les particules mais ne renfermant pas de saccharose.

Comme colorant nous avons choisi le silicotungstate de sodium à 1 p. 100 dans l'eau pH 7 ou l'acétate d'uranyle à 0,5 p. 100 dans l'eau.

b - La technique de coloration positive que nous avons utilisée est celle de MILLER et al. (1970). La coloration est obtenue par passages successifs dans l'acide phosphotungstique (solution à 1 p. 100 dans l'alcool à 70 °) et dans l'acétate d'uranyle (solution à 1 p. 100 dans l'alcool à 70°). Les grilles, après rinçage, sont séchées par immersion dans l'alcool absolu, puis dans l'acétate d'isoamyle.

5 - Techniques d'étalement et d'ombrage

a - Technique de KLEINSCHMIDT et al. (1962). Nous avons utilisé cette technique dans les conditions suivantes :

. Hypophase : solutions d'acétate d'ammonium de concentrations faibles (inférieures à 0,05 M) : nous avons généralement employé une solution à 0,02 M.

. Solution d'étalement : Les particules sont suspendues dans l'acétate d'ammonium 0,1 M à une concentration moyenne d'environ 0,25 à 0,5 mg/ml (3 à 5 unités de densité optique mesurée à 260 nm). A cette suspension on ajoute le cytochrome C à la concentration finale de 0,01 p. 100.

. Ombrage : les grilles déposées à la surface de la zone d'étalement sont séchées à l'air après immersion dans l'éthanol absolu puis dans l'acétate d'isoamyle. Elles sont alors ombrées en rotation (50 t/mn environ), au moyen d'une projection d'oxyde d'uranium (environ 30 mg à 12 cm de l'objet), de platine ou de platine-carbone, sous un angle d'environ 8°. Ces ombrages ont été effectués dans l'ombreur Edwards sous un vide d'environ 5×10^{-5} mm de mercure.

b - Dépôt de suspensions sur grilles

Nous avons effectué des dépôts de suspensions de particules ribonucléoprotéiques, sur grilles électrolytiques recouvertes de formvar consolidé par une mince couche de carbone.

La suspension ayant une concentration en acides nucléiques d'environ 100 μ /ml, est fixée par une solution de formol dans le tampon phosphate de Sørensen à pH 7,4 de telle façon que la concentration finale du fixateur dans la suspension n'excède pas 10 p. 100.

La durée de la fixation est variable, depuis 1 h jusqu'à 12 h. Le dépôt est effectué en laissant tomber une goutte de suspension sur une grille déposée sur papier filtre.

L'ombrage est réalisé sous un angle d'environ 10° par projection de platine-carbone ou de platine.

B - TECHNIQUES DE MICROSPECTROPHOTOMETRIE

1 - Déterminations quantitatives du contenu en acides nucléiques

Elles ont été réalisées sur le microspectrophotomètre Zeiss U.M.S.P. 1 au moyen d'un balayage de l'objet par un faisceau (0,5 μ de diamètre) de lumière de longueur d'onde donnée.

a - Préparation du matériel

Le matériel (noyaux ou nucléoles isolés) est fixé pendant une demi-heure dans le formol 10 p. 100 tamponné à pH 7,4. Après rinçage dans le tampon de fixation, des frottis sont effectués sur lames de quartz et séchés à l'air.

b - Digestions enzymatiques

Des digestions ont été effectuées à la RNase par immersion des lames dans la solution d'enzyme à 0,1 p. 100 dans l'eau ajustée à pH 6,8. La digestion dure 2 h à 37° C, elle est suivie d'un rinçage bref dans l'acide trichloracétique à 5 p. 100 et à 4° C (SWIFT, 1963).

c - Principe des déterminations

Nous avons employé la méthode de détermination à deux longueurs d'ondes telle qu'elle a été décrite par SANDRITTER (1968). L'extinction totale de l'objet est mesurée à 265 nm puis à 280 nm. En outre, la détermination de l'extinction non spécifique est basée sur la formule de RAYLEIGH d'après l'extinction totale de l'objet à 313 nm. Selon la formule de RAYLEIGH, l'extinction non spécifique est inversement proportionnelle à la 4e puissance de la

longueur d'onde. En considérant selon SANDRITTER que l'extinction de l'objet à 313 nm (E 313) est entièrement non spécifique, les extinctions non spécifiques à 280 nm (E 280) et à 265 nm (E 265) sont respectivement :

$$E_{280} \text{ non spécifique} = E_{313} \times \left(\frac{313}{280}\right)^4$$

$$E_{265} \text{ non spécifique} = E_{313} \times \left(\frac{313}{265}\right)^4$$

Compte tenu des extinctions non spécifiques et des coefficients d'extinctions spécifiques des acides nucléiques et des protéines pour chacune des longueurs d'onde, la formule de SANDRITTER s'exprime de la façon suivante :

$$Q = \left[0,92 \times E_{265} - 0,75 \times E_{280} - 0,25 \times E_{313} \right] \times S$$

dans laquelle :

Q représente la quantité d'acides nucléiques exprimée en pg,

E 265, l'extinction totale de l'objet à 265 nm

E 280, l'extinction totale de l'objet à 280 nm

E 313, l'extinction totale de l'objet à 313 nm

S, la surface de l'objet en microns carrés.

d - Détermination des quantités respectives d'ADN et d'ARN

De façon à différencier l'ADN de l'ARN, nous avons procédé sur le même objet à une première détermination de la quantité totale d'acides nucléiques, puis après digestion à la RNase, à une deuxième détermination. Le repérage des objets est effectué en bloquant la lame porte-objet

dans une position donnée, et en photographiant le champ au microscope à contraste de phase.

2 - Mesure de l'extinction sur une seule ligne

Nous avons enregistré, dans certains cas, l'absorption d'un faisceau de lumière monochromatique traversant un objet sur une ligne dont la direction a été fixée de façon à passer aux endroits repérés. Nous avons choisi pour cela un faisceau de $0,32 \mu$ de diamètre. Dans le cas de l'enregistrement de l'absorption due aux acides nucléiques, la traversée de l'objet a été effectuée aux longueurs d'onde de 313, 280 et 265 nm. Après conversion logarithmique et application de la formule de SANDRITTER, les courbes d'extinction sont tracées, ainsi que la courbe des concentrations en acides nucléiques.

C - TECHNIQUE D'ISOLEMENT DES FRACTIONS NUCLEAIRES ET NUCLEOLAIRES

1 - Isolement des noyaux

De nombreuses techniques d'isolement de noyaux de foie de Rat ont été mises au point (voir BUSCH, 1970). Les plus couramment employées dérivent de la technique originale de CHAUVEAU et al. (1956), dans laquelle le foie est homogénéisé dans des solutions de saccharose renfermant l'ion Ca^{2+} . La présence d'ions divalents est indispensable pendant l'isolement des noyaux précédant celui des nucléoles (MURUMATSU et al., 1963). Notre but étant d'obtenir une fraction très pure, débarrassée de tout contaminant membranaire, nous avons appliqué une méthode employant le

détergent non ionique Triton X 100, à une concentration suffisante (0,5 p. 100) pour enlever la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (BLOBEL et POTTER, 1966) (voir Fig. 2 ; p. 44).

L'étude de la diffusion des particules ribonucléoprotéiques de fractions nucléaires isolées a été réalisée sur des noyaux type "CHAUVEAU" conservant intacte leur enveloppe nucléaire ainsi que sur des noyaux débarrassés du feuillet externe de cette enveloppe (HYMER et KUFF, 1964). Ces derniers ont été obtenus par resuspension, pendant 15 mn, des noyaux type "CHAUVEAU", dans une solution de saccharose 0,33 M contenant CaCl_2 0,0018 M et le Triton X 100 à la concentration de 0,5 p. 100.

2 - Isolement des nucléoles

Nous avons utilisé la méthode de sondage des noyaux pour rompre l'enveloppe nucléaire (MURAMATSU et al., 1963). Les temps et les vitesses de centrifugation sont ceux décrits par SADOWSKI et STEINER (1968).

3 - En cours d'isolement, l'observation des fractions et les comptages destinés au calcul du rendement sont effectués après coloration des suspensions dans du saccharose 0,25 M auquel on ajoute (1/1) une solution d'azur C à 0,5 p. 100 dans le saccharose 0,25 M.

4 - Les résultats obtenus par l'application de ces techniques d'isolement, sont illustrés par les planches 3 et 4.

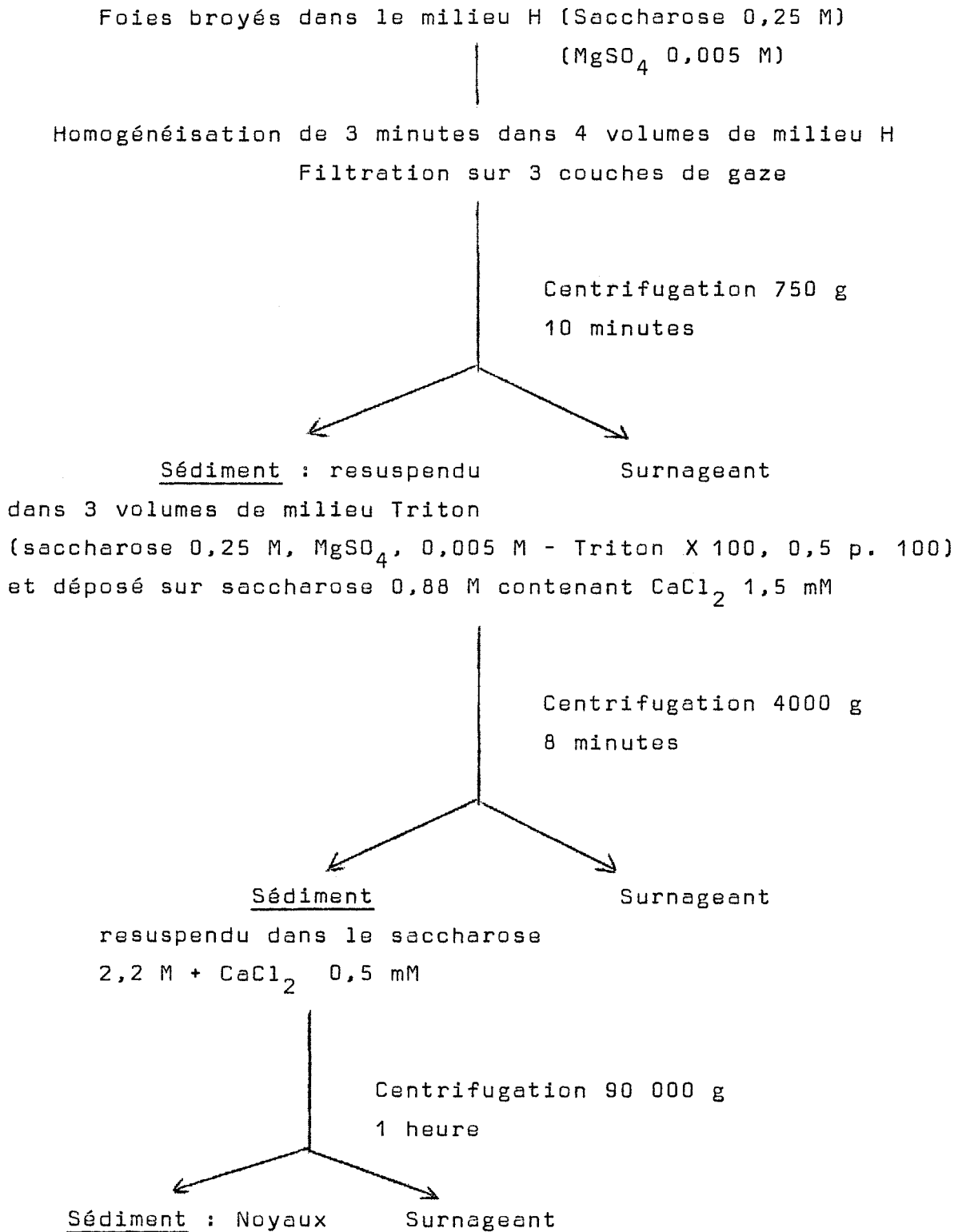


Figure 2

Schéma de la préparation de la fraction nucléaire.

Le rendement moyen obtenu a été de 33 p. 100 par rapport à l'homogénat en ce qui concerne les noyaux et de 50 p. 100 par rapport au nombre moyen de nucléoles présents dans la fraction nucléaire en ce qui concerne la fraction nucléolaire (2,2 nucléoles par noyau en moyenne). La fraction nucléolaire est très pure. Le temps de sonnage employé (1 mn 10 sec par fraction de 20 ml dans le sonicateur Raytheon DF 101 ajusté à un courant de sortie de 1,1 A) a permis de conserver une quantité normale d'acides nucléiques dans les nucléoles. En effet, les déterminations microspectrophotométriques nous ont fourni les résultats suivants, par nucléole :

ADN 0,330 pg < 0,340 pg < 0,350 pg 33 mesures

ARN 0,331 pg < 0,330 pg < 0,336 pg 33 mesures

Le rapport moyen $\frac{ARN}{ADN} = 0,97$ est très voisin de ceux obtenus par déterminations chimiques sur des fractions de nucléoles isolés par MURAMATSU et al. (1965) et par DESJARDINS et al. (1965).

D - ISOLEMENT DES RIBONUCLEOPROTEINES NUCLEOLAIRES

Nous avons repris la technique d'isolement de SHANKARANARAYAN et BIRNSTIEL (1969) qui nous a permis d'obtenir 2 suspensions de ribonucléoprotéines nucléolaires (surnageants 1 et 2) à partir de fractions de nucléoles isolés suivant la technique déjà décrite (voir Fig. 3 ; p. 46).

Les surnageants 1 et 2 ont été rassemblés et centrifugés pendant 2 heures à 105 000 g. Ils ont fourni un sédiment qui a été resuspendu dans le tampon TRIS, NaCl, E.D.T.A. (pH 7,4) de départ, mais ne renfermant pas de dithiothreitol, et déposé sur un gradient de saccharose

Nucléoles isolés à partir de 60 g de foie de Rat suspendus dans 1,5 ml du tampon suivant :
 TRIS (0,01 M pH 7,4), NaCl (0,01 M), E.D.T.A. (0,01 M) contenant 0,01 M de dithiothreitol.

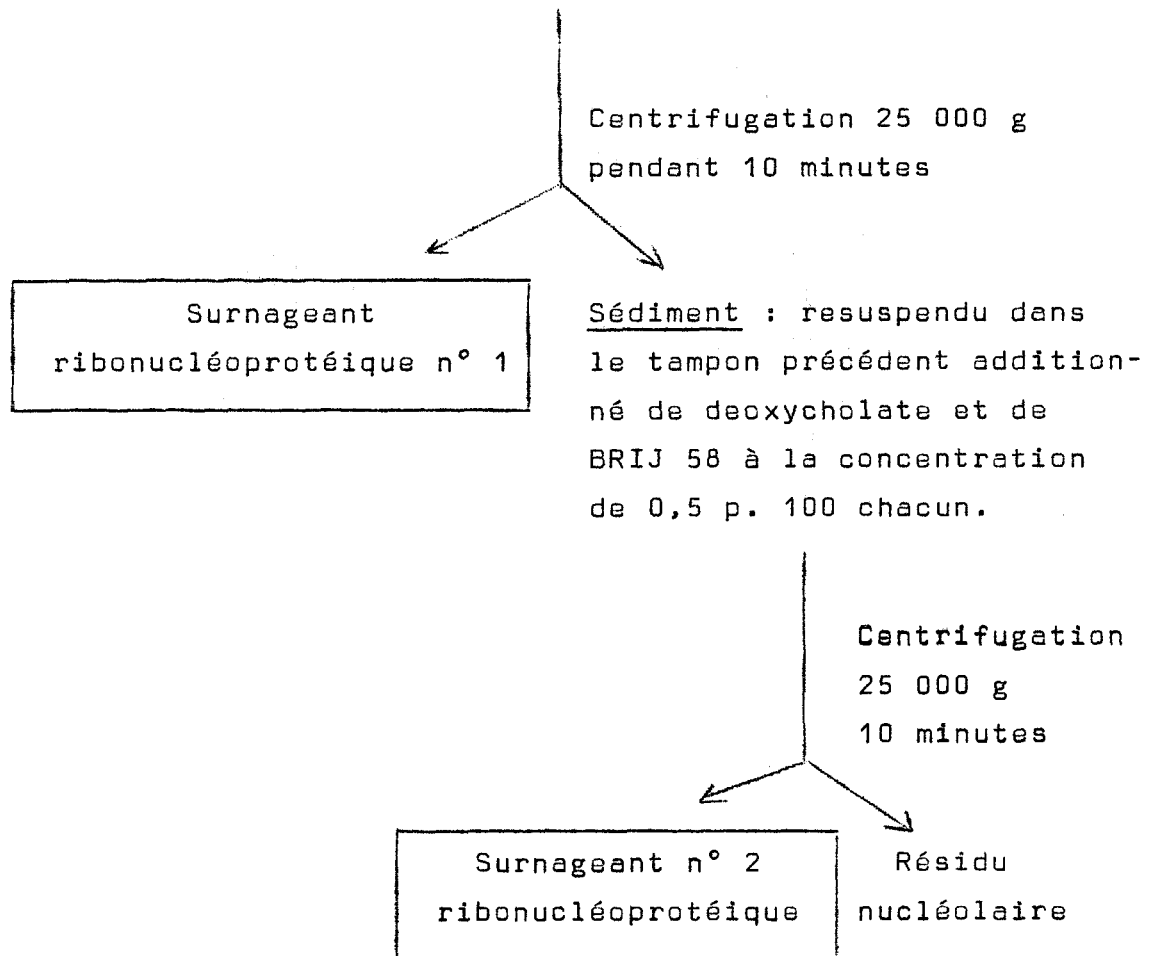


Figure 3

Schéma de l'extraction des granules nucléolaires à partir de la fraction nucléolaire.

10 - 30 p. 100 dans le même tampon. Une centrifugation de 15 heures à 20 000 t/mn a été effectuée dans le rotor SW₂₇ Spinco. Les fractions ont été recueillies manuellement, après avoir percé le fond du tube, et la densité optique a été mesurée à 260 nanomètres sur des fractions de 1 ml.

II - RECHERCHES SUR LA MISE EN EVIDENCE

DES PROTEINES BASIQUES DU NOYAU

Il n'existe actuellement aucune technique cytochimique suffisamment spécifique pour révéler à l'échelle ultrastructurale les protéines basiques. Les tentatives qui ont été faites dans ce domaine concernent essentiellement les imprégnations argentiques. MARINOZZI (1963) a montré qu'une solution de nitrate d'argent colorait préférentiellement les nucléoprotéines après fixation des tissus à l'acroleine. Plus récemment, Mac RAE et MEETZ (1970) ont adapté à l'observation ultrastructurale la technique au nitrate d'argent ammoniacal de BLACK et ANSLEY (1966); cette technique comme la précédente révèle les nucléoprotéines. Les mécanismes chimiques de ces réactions sont inconnus. MARINOZZI (1963) attribue la coloration des histones de la chromatine à la présence dans ces protéines d'une quantité importante d'histidine dont le groupe imidazole réagit avec le groupe éthylénique de l'acroleine. L'argent se dépose après réduction par le groupe aldéhyde resté libre, de l'acroleine. MARINOZZI a constaté que les fibres de collagène se coloraient par cette technique d'imprégnation argentique. En outre, l'utilisation de l'argent présente un inconvénient : la coloration est donnée par un dépôt de granules d'environ 200 Å de diamètre souvent groupés en amas de 500 Å de diamètre. Ces dimensions ne correspondent pas à celles du substrat réactif et les structures sont souvent complètement masquées.

Nous avons donc cherché à mettre au point une technique de révélation plus spécifique, en nous basant sur les principes de coloration par le Fast-green en microscopie optique.

La démonstration de la spécificité de notre technique de coloration a été faite sur un matériel varié comprenant des fractions nucléolaires isolées. Les nucléoles isolés nous ont paru réaliser un matériel de choix puisque l'absence de membrane favorise la pénétration des solutions de coloration.

A - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE REVELATION DES GROUPEMENTS DE POINT ISOIONIQUE ELEVE A L'ECHELLE ULTRASTRUCTURALE. APPLICATION A LA REVELATION PREFERENTIELLE DES PROTEINES BASIQUES.

1 - Introduction

La présence de groupes latéraux ionisables COOH et NH_2 confère aux protéines leur caractère amphotère. En effet, ces radicaux peuvent exister sous une forme ionisée ou non, la proportion entre ces deux formes étant sous la dépendance du pH du milieu. Lorsque celui-ci devient basique, la quantité des groupes acides ionisés augmente alors que celle des groupes basiques diminue ; les protéines tendent alors à acquérir une charge globale négative. A un pH suffisamment basique, seules les protéines très basiques conservent une électropolarité positive suffisante pour les rendre encore capables de fixer les colorants acides. C'est cette propriété qui a été utilisée par ALFERT et GESCHWIND (1953) pour mettre au point leur technique de coloration des protéines basiques à pH 8 - 8,1, par le Fast-green FCF. Inversement un colorant acide utilisé à pH acide colore les protéines totales.

En microscopie électronique, l'identification des groupes chimiques peut se faire par les métaux lourds

employés comme cations ou comme micelles (ZOBEL et BEER, 1965). En nous basant sur le fait que ces cations ou micelles possèdent une charge électrique, nous avons envisagé que leur liaison aux structures biologiques est de nature électrostatique. Les résultats positifs obtenus au moyen de solutions d'un colloïde électropositif de fer, dans la révélation des groupes acides et particulièrement des mucopolysaccharides de la surface cellulaire (CURRAN et al., 1965 ; GASIC et BERWICK, 1963 ; SWIFT et ADAMS, 1962 ; BLANQUET et al., 1970), nous ont amené à étudier la capture par les protéines, d'une solution d'un colloïde électronégatif à base de fer. Cette solution colloïdale avait déjà été utilisée, dans certaines conditions de pH par GASIC et al. (1968) pour révéler les protéines totales présentes au niveau de la surface cellulaire de cellules d'ascites de souris issues d'un adénocarcinome mammaire.

La mise au point de cette technique, réalisée en collaboration avec BLANQUET P., comportait, d'une part, la stabilisation de la solution colloïdale dans une gamme de pH suffisamment étendue pour qu'elle puisse être adaptée à la fois à la révélation des protéines totales (pH acide) et des protéines basiques (pH basique), et d'autre part, la vérification de sa spécificité pour les protéines basiques, par des contrôles cytochimiques et des colorations de structure de nature connue (PUVION E. et BLANQUET P., 1971).

2 - Matériels et méthodes

a - Principe d'obtention du colloïde électronégatif.

Nous devons rappeler, d'une manière schématique, quelques propriétés des sols hydrophobes.

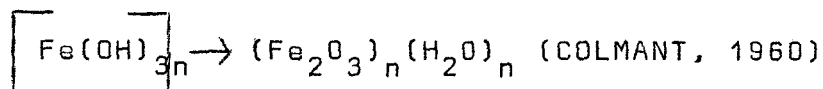
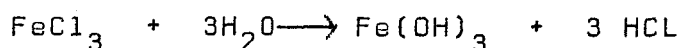
Les sols ou solutions colloïdales sont constitués de micelles dispersées dans un solvant ou liquide intermicellaire. Le sol étant électriquement neutre, des charges égales et de signes opposés sont présentes dans le liquide intermicellaire. Les particules colloïdales se meuvent dans un champ électrique, elles sont donc chargées. Chaque particule se trouve en effet entourée d'une double couche électrique : la couche la plus interne est riche en charges provenant du corps constituant la particule, la couche la plus externe, riche en charges de signe opposé à celles de la précédente. Lorsque la particule est en mouvement sous l'effet d'un champ électrique, elle entraîne avec elle une partie de la double couche électrique qui l'entoure. Le potentiel présent au niveau de cette couche adhérente est le potentiel de la surface électrocinétique de la particule.

Les ions antagonistes de la partie externe de la double couche électrique présentent une distribution d'équilibre entre leurs propres mouvements browniens qui tendent à les éloigner de la particule et les forces de Coulomb qui tendent à les en rapprocher. Cela détermine une distance moyenne entre la surface de la particule et les ions antagonistes. Cette distance moyenne est très sensible à la concentration et à la valence des électrolytes présents dans le milieu intermicellaire. Lorsqu'on ajoute un électrolyte dans ce milieu, le potentiel électrocinétique diminue ce qui s'explique par un raccourcissement de la double couche électrique. En même temps, la stabilité de la solution colloïdale baisse. Cette stabilité est la résultante, d'une part, des forces d'attraction de Van der Waals des particules entre elles et, d'autre part, des forces de répulsion. Lorsque ces dernières diminuent (abaissement du potentiel électrocinétique), la stabilité baisse et tend vers la floculation.

L'addition d'électrolyte dans le liquide intermicellaire provoque un échange d'ions au niveau de la couche électrique externe, cet échange étant en faveur des ions de plus grande valence. Si l'addition d'électrolyte est suffisante, le potentiel électrocinétique peut passer, dans certains cas, par la valeur 0 et il peut ensuite apparaître un nouveau potentiel de signe opposé. Il y a dans ce cas, inversion de la charge du colloïde.

En ce qui concerne les solutions colloïdales de fer, le colloïde électropositif se forme par hydrolyse du chlorure ferrique. Cette hydrolyse donne naissance à des molécules d'hydroxyde ferrique. La particule colloïdale est constituée de nombreuses molécules d'hydroxyde ferrique réunies entre elles par départ d'eau aux dépens de leurs groupes OH.

Schématiquement la réaction peut s'écrire :



Cette solution colloïdale est purifiée par dialyse.

L'obtention du colloïde électronégatif s'effectue par addition à la solution du colloïde électropositif, d'un électrolyte présentant l'ion négatif ferrocyanhydrique à 4 valences. HAZEL et AYRES (1931) ont en effet montré que les solutions colloïdales d'oxyde ferrique fixent préférentiellement cet ion. L'addition suffisante de ferrocyanure de potassium provoque l'inversion du potentiel électrocinétique.

L'addition à cette nouvelle solution colloïdale d'acide faible et de base faible (acide citrique - phosphate disodique) a permis de la stabiliser dans une gamme de pH s'étendant de 4,5 à 12.

b - Matériel

Nous avons effectué des essais in vitro sur des solutions et suspensions de protéines pures, acides et basiques. Les protéines suivantes ont été utilisées :

- protéines acides : gélatine - collagène du tendon - albumine de sérum de boeuf,
- protéines basiques : lysozyme du blanc d'oeuf, histones totales de thymus de veau.

Le matériel biologique sur lequel nous avons appliqué notre technique de coloration a été le suivant :

- Foie de rat Wistar,
- Cellules HeLa,
- Glandes salivaires de larves de chironomes,
- Escherichia coli,
- Nucléoles de cellules hépatiques, isolés selon la technique décrite précédemment.

c - Préparation de la solution colloïdale électropositive

Elle a été préparée en ajoutant une solution de chlorure ferrique à un volume 10 fois supérieur d'eau bouillante, de façon à obtenir une concentration finale de 1,73 g de fer par litre et un pH de 1,8 (50 ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique 0,4 M que l'on plonge ensuite dans 600 ml d'eau bouillante) (SWIFT et ADAMS, 1962 et BLANQUET et al., 1970).

d - Préparation de la solution colloïdale
électronégative

Nous avons inversé la charge de l'hydroxyde de fer colloïdal en lui ajoutant une solution de ferrocyanure de potassium, comme l'ont montré HAZEL et AYRES (1931), puis nous avons stabilisé cette solution colloïdale électronégative, pour une gamme de pH variant de 4,5 à 12. Une solution concentrée de chlorure ferrique est ajoutée à un volume au moins 10 fois supérieur d'eau bidistillée bouillante afin d'obtenir une solution d'hydroxyde de fer colloïdal ayant une concentration finale de 2,12 g de fer par litre (50 ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique 0,5 M sont plongés dans 600 ml d'eau bidistillée bouillante). Cette solution est dialysée, pendant 7 jours, contre 10 volumes d'eau distillée (2 changements par jour) puis ajoutée à un volume égal d'acide chlorhydrique 0,0012 N de façon à amener son pH à une valeur de 3,5 environ. (GASIC et al., 1968). La solution ainsi obtenue est mélangée goutte à goutte, à volume égal, sous agitation, et à + 4° C, à une solution aqueuse de ferrocyanure de potassium 8 mM. A cette solution colloïdale de teinte brun-foncé, on ajoute un volume équivalent de phosphate disodique $\frac{M}{35}$, puis, après quelques secondes d'agitation, une quantité d'acide citrique cristallisé suffisante pour abaisser son pH à une valeur de 4,2 ; ce pH est enfin ramené rapidement à 9 avec de la soude 0,5 N. Toutes ces opérations se font à + 4° C. La solution finale, dont l'électronégativité a été vérifiée par électrophorèse en veine liquide, est stable et peut être stockée plusieurs mois à 4° C. Juste avant l'emploi, elle est ajustée au pH désiré par de l'acide citrique cristallisé ou de la soude 0,1 N.

Le traitement par les solutions colloïdales est effectué en agitation constante pendant une nuit à 4° C ;

il est précédé et suivi d'un lavage dans une solution de même pH, effectuée en ajustant avec de la soude 0,1 N le pH d'une solution de phosphate disodique $\frac{M}{35}$ et d'acide citrique $\frac{M}{15}$.

Ce traitement par les solutions colloïdales est précédé d'une fixation des matériels dans le formol pendant 2 h à 4° C. La fixation est suivie d'un rinçage pendant une nuit dans le tampon de fixation.

Les différentes réactions (contrôles cytochimiques - action des enzymes, DNase et RNase - action des solutions colloïdales) sont effectuées sur des coupes de matériels effectuées au cryostat.

Ces coupes sont ultérieurement incluses dans l'Epon. En ce qui concerne les nucléoles isolés, les différentes réactions ont été effectuées par resuspension des fractions nucléolaires, sans coupe au cryostat.

e - Préparation des solutions et suspensions de protéines.

. La gélatine a été utilisée en solution aqueuse à 20 p. 100.

. Une solution aqueuse d'agarose à 10 p. 100 a été dissoute à chaud dans une solution :

- d'histone à 5 p. 100 dans HCl 0,1 N,
- d'albumine à 5 p. 100 dans l'eau,
- de lysozyme à 5 p. 100 dans l'eau.

. Le collagène a été inclus directement en gélose à 5 p. 100.

f - Contrôles cytochimiques

La spécificité de la technique de révélation des groupements de point isoionique élevé a été contrôlée sur des fractions de nucléoles isolés au moyen des réactions suivantes :

- Action sur les groupements NH_2
 - . Ninhydrine : en solution à 0,5 p. 100 dans l'alcool absolu.
2 h à 37° C.
 - . Acide nitreux : solution préparée selon LILLIE (1958)
5 mn à température ordinaire.
- Action sur les groupements acides.
Estérification au moyen de la solution de FISCHER et LILLIE (1957) pendant 6 h à 60° C.

3 - Résultats

a - Résultats obtenus sur les protéines dissoutes ou suspendues en gélose (Pl. 5 ; Fig. a).

Après application de la solution du colloïde électronégatif de pH 4,5, toutes les suspensions de coupes acquièrent la teinte rouille de la solution. Après application de la solution de colloïde électronégatif de pH 10,5, seules les solutions d'histones et de lysozyme dans la gélose sont colorées. L'observation au microscope électronique (Pl. 5 ; Fig. b - c - d) confirme ces résultats. Dans le cas de toutes les protéines, sauf le collagène, on observe après action de la solution de pH 4,5, des plages de particules de 40 Å environ. En ce qui concerne le collagène, ces

particules se répartissent sur les fibres pour former des stries transversales groupées plus ou moins nettement en bandes alternant avec des bandes plus claires. La distance séparant les centres de deux bandes colorées est d'environ 650 Å (Pl. 5 ; Fig. b).

Après application de la solution du colloïde électronégatif de pH 10,5, les plages de particules colloïdales ne s'observent qu'au niveau des protéines basiques : lysozyme et histones.

b - Coloration des histones de la chromatine

La coloration des histones est subordonnée à une digestion préalable des structures à la DNase. En effet, sur nucléoles isolés, la couronne de chromatine péri-nucléolaire et la chromatine intranucléolaire ne sont colorées que si l'action de la solution du colloïde électronégatif est précédée d'une digestion à la DNase (Pl. 6 ; Fig. a - b - d). De même, dans le noyau de foie de Rat, les histones ne sont colorées qu'après action de la DNase (Pl. 10 ; Fig. a et b et Pl. 9 ; Fig. a).

De la même manière, nous avons coloré les histones des chromosomes de cellules HeLa (Pl. 11 ; Fig. b) et les chromosomes géants des noyaux de glandes salivaires de larves de chironomes (Pl. 12 ; Fig. a et b). Dans ce dernier cas la coloration intéresse aussi des granules répartis essentiellement dans le nucléoplasme bordant l'enveloppe nucléaire.

c - Coloration des fractions nucléolaires isolées

En dehors d'une coloration des histones des

chromatines périnucléolaire et intranucléolaire, nous n'avons pas observé de coloration du réseau même lorsque l'action du colloïde électronégatif est précédé d'une double digestion DNase-RNase (Pl. 6 ; Fig. f).

d - Révélation des protéines basiques non liées à l'ADN

Dans le cytoplasme des différents matériels étudiés, on observe un dépôt léger et homogène de particules colloïdales. Ce dépôt s'accroît au niveau des ribosomes, notamment en bordure des lamelles ergastoplasmiques (Pl. 9 ; Fig. a et c). Dans le cytoplasme de foie de Rat nous avons constaté que cette coloration n'est pas influencée par une digestion préalable à la RNase.

- Dans les nucléoles in situ, nous avons constaté dans 30 p. 100 des cas environ, une coloration du réseau (Pl. 10 ; Fig. b). Dans tous les autres cas, le réseau n'est pas coloré (Pl. 11 ; Fig. a), que l'action de la solution colloïdale soit précédée ou non d'une digestion à la RNase.

- Nous avons pu vérifier sur Escherichia coli (Pl. 12 ; Fig. c) que les actions successives de la DNase et de la solution colloïdale ne coloraient que des granules répartis dans les zones extranucléaires et correspondant certainement aux ribosomes.

e - Résultats des contrôles cytochimiques

Les actions de ces contrôles sur la coloration par des solutions de colloïde électronégatif de pH 4,5 et 10,5 ont été comparées à leurs actions sur la coloration par une solution de colloïde électropositif. Les résultats sont schématisés dans le tableau II, p. 59. Ils permettent de

TABLEAU II

Tableau récapitulatif de l'effet des réactions cytochimiques sur les colorations, par différentes solutions colloïdales, des fractions nucléolaires isolées.

Après DNase	Ninhydrine	Désamination	Estérification	Témoin
Solution de colloïde électro-négatif pH 10,5	Coloration très faible Pl. 6 Fig. e	Aucune coloration Pl. 7 Fig. c	Coloration identique à celle du témoin Pl. 7 Fig. a	Coloration zone périnucléolaire et en bordure du réseau Pl. 8 Fig. a - b
Solution de colloïde électro-positif	Coloration très légèrement affaiblie	Coloration identique à celle du témoin	Aucune coloration Pl. 7 Fig. b	Coloration uniforme de tout le nucléole Pl. 6 Fig. c
Solution de colloïde électro-négatif pH 4,5	Coloration très faible Pl. 10 Fig. c	Coloration très faible	Coloration identique à celle du témoin Pl. 18 Fig. a	Coloration forte de la zone périnucléolaire et en bordure du réseau

BUS
VILLE

constater que les particules électronégatives sont retenues par les groupements basiques NH_2 ; inversement les particules colloïdales électropositives sont retenues par les groupements acides.

4 - Discussion de ces résultats

a - Choix du fixateur

Nous avons choisi la fixation au formol qui est la plus répandue dans les études cytochimiques ultrastructurales. Le formol bloque, théoriquement, les groupes amines des protéines en milieu légèrement alcalin, en formant des réactions d'addition ou des ponts méthyléniques entre chaînes protéiques voisines (FRENCH et EDSALL, 1945). En fait, ce blocage est en grande partie réversible lorsque la fixation est effectuée à température basse (4°C) et suivie d'un lavage prolongé (PEARSE, 1960).

b - Coloration des protéines ~~in vitro~~

Les résultats obtenus sont conformes au principe de la coloration énoncé dans l'introduction. Une spécificité de la coloration envers les protéines basiques est amenée par l'emploi d'un pH basique (10,5) légèrement inférieur au P.I. de ces protéines qui, dans le cas des histones et de la lysozyme, est compris entre 10,5 et 11.

En ce qui concerne les fibres de collagène natif, nous avons observé à pH 4,5, une coloration de stries transversales groupées pour former des bandes colorées alternant avec des bandes plus claires. La distance de 650 Å, séparant les centres de deux bandes colorées successives, correspond à la période des fibres de collagène natif qui est de 640 Å à 700 Å, selon leur état d'hydratation. Nos résultats confirment donc l'existence de groupements basiques au

niveau des stries transversales des fibres de collagène (facilement révélées par l'acide phosphotungstique). En effet, les travaux de nombreux auteurs, parmi lesquels KUHN et al. (1956) ont montré que l'acide phosphotungstique réagit surtout avec les groupements basiques de l'arginine et de la lysine.

c - Rôle des digestions enzymatiques

La capture des particules colloïdales électronégatives par les histones de la chromatine nécessite une digestion préalable de l'ADN. En effet celui-ci, lorsqu'il est présent, entre en compétition avec les particules colloïdales de même signe et les empêche de se fixer sur les groupes basiques des histones. Ce résultat est tout à fait comparable à celui obtenu en histologie classique pour la coloration des histones par le Fast-green qui nécessite aussi une extraction préalable de l'ADN (ALFERT et GESCHWIND, 1953).

L'extraction enzymatique de l'ADN favorise en outre la libération des groupes NH_2 des histones, liés, dans la proportion de 80 p. 100, aux groupes O-phosphoryle de la molécule d'ADN (WALKER, 1965 et LEWIN, 1969).

Un raisonnement identique pourrait laisser supposer que la coloration des protéines basiques de structure des ribosomes (PETERMANN, 1964 ; SPIRIN, 1969 a) puisse être favorisée par une extraction de l'ARN. Nous n'avons pas constaté cela après digestion à la RNase. Ce résultat en apparence contradictoire peut s'expliquer par la petite taille des ribosomes. En effet, le diamètre moyen relativement élevé des particules colloïdales (40 Å) permet de supposer que les ribosomes ne peuvent présenter qu'une coloration superficielle atteignant vite la saturation, même en présence d'un potentiel électropositif faible ; la digestion enzymatique à la RNase n'aurait alors aucune action sur l'intensité de la coloration.

d - Contrôles cytochimiques

Les résultats obtenus au cours des différents contrôles confirment l'intervention des groupements NH_2 dans la capture des particules négatives par les protéines. En effet, l'effacement de ces groupements par la ninhydrine ou par l'acide nitreux supprime la fixation des particules colloïdales électronégatives. Par contre, l'estérification, effectuée à titre de vérification, en supprimant les groupements acides, n'a aucun effet sur la capture de ces particules colloïdales. Nous avons constaté que l'action de l'acide nitreux est très rapide et empêche toute coloration, ce qui semble indiquer que les groupements NH_2 réactifs appartiennent essentiellement à la lysine (DEITCH, 1961 et LILLIE, 1958). Le léger affaiblissement de la coloration par la solution de colloïde électropositif après action de la ninhydrine, peut s'expliquer par la perte de radicaux acides due à l'hydrolyse de certaines protéines au cours de cette action (PUCHTLER et SWEAT, 1962).

e - Coloration des structures cellulaires

Les structures contenant des protéines basiques : chromatine, chromosomes, ribosomes cytoplasmiques, ont fixé les particules colloïdales. A titre de vérification, le noyau bactérien, privé d'histones, n'a pas été coloré.

En ce qui concerne la coloration du corps nucléolaire, on peut s'étonner de l'absence de coloration au niveau du réseau, étant donné les résultats biochimiques signalant l'existence de protéines basiques dans cet organite (BUSCH, 1965 ; GROGAN et al., 1966 ; MUNDELL, 1968). En effet, nous n'avons pas observé de coloration du réseau dans les nucléoles isolés, alors que seulement 30 p. 100 des nucléoles in situ présentent cette coloration. La mise en évidence des protéines basiques nucléolaires fait l'objet du chapitre suivant.

L'ensemble des résultats obtenus sur ces différents matériels nous permet d'affirmer que la technique que nous avons mise au point révèle, à l'échelle ultrastructurale, les protéines totales et préférentiellement les protéines basiques, dans certaines conditions :

- Facilitation de la pénétration des particules colloïdales dans les tissus par l'emploi de coupes au cryostat.

- Tenir compte de la présence des groupements acides n'appartenant pas aux protéines et pouvant entrer en compétition avec les particules colloïdales.

- Choix du pH de la solution colloïdale qui, dans le cas de la révélation des protéines basiques, doit être suffisamment élevé (10,5) et être le plus proche possible de leur P.I..

B - MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES BASIQUES NUCLEAIRES DE LA CELLULE HEPATIQUE DE RAT

Dans un premier temps, nous avons cherché à révéler les protéines basiques nucléolaires et extranucléolaires du noyau de la cellule hépatique de rat normal. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les protéines basiques des nucléoles lésés par action de l'actinomycine D, dans le but d'éclaircir certains problèmes de structure liés au métabolisme des ARN nucléolaires.

L'actinomycine D, en effet, inhibe la synthèse de l'ARN "ADN-dépendant" par l'intermédiaire d'un blocage des fonctions de l'ARN-polymérase. Les études stéréochimiques ont montré que cet antibiotique se lie à la

molécule hélicoïdale de l'ADN, dans le sillon mineur, au niveau d'une base guanine, provoquant ainsi une obturation inhibant l'action de l'ARN polymérase (REICH et GOLDBERG, 1964). Ce mode d'action de l'actinomycine D explique pourquoi cet antibiotique, lorsqu'il est employé à doses faibles, inhibe préférentiellement la synthèse de l'ARN ribosomal qui, riche en bases guanine, se synthétise sur un ADN homologue relativement plus vite saturé par l'actinomycine D.

Sur le plan morphologique, les études effectuées sur un large éventail de matériels, décrivent les lésions progressives du nucléole des cellules traitées. Ces lésions sont typiques et consistent en une séparation et une redistribution des composants nucléolaires d'où le nom de ségrégation nucléolaire qui leur ont été donné (JEZEQUEL et BERNHARD, 1964 ; SCHOEFL, 1964 ; STEVENS, 1964 ; SIMARD et BERNHARD, 1966 ; SVOBODA et HIGGISON, 1968). La signification de cette redistribution est inconnue, certains auteurs y voient la conséquence de modifications de structure au niveau de l'ADN intranucléolaire (GOLDBLATT et SULLIVAN, 1970 ; RECHER, 1971 ; GOLDBLATT et al., 1969 ; SIMARD et BERNHARD, 1966 ; SIMARD, 1968).

1 - Méthode

Ces études ont été réalisées sur des fractions de nucléoles isolés ainsi que sur des coupes au cryostat de foie de Rat, ultérieurement incluses dans l'Epon. Tous les matériels ont été fixés au formol. L'acide thioglycolique a été utilisé comme agent réducteur des ponts disulfures dans les conditions suivantes : solution à 0,2 M ajustée avant emploi à pH 8 par la soude 0,1 N. (Action de 4 h à 37° C). Ce traitement est suivi d'un rinçage bref dans l'acide acétique à 1 p. 100.

La pepsine a été utilisée comme enzyme protéolytique dans les conditions suivantes : solution à 0,01 p. 100

dans HCl 0,1 N - digestion 5 minutes à 37° C.

L'actinomycine D a été administrée aux rats par voie intrapéritonéale, à la dose de 1 mg par kg de poids, en solution dans du sérum physiologique.

Des sacrifices échelonnés depuis 1/2 h jusqu'à 3 h après l'injection ont permis de suivre l'évolution précoce de la lésion nucléolaire.

Les études cytochimiques ont été réalisées sur noyaux et nucléoles isolés selon la technique déjà décrite ainsi que sur le noyau in situ.

2 - Résultats

a - Protéines du nucléole normal

- Lorsqu'on fait agir sur des fractions de nucléoles isolés, non digérés à la DNase, des solutions de colloïdes électronégatifs de pH croissants de 4,5 à 10,5, on observe une coloration de la couronne périnucléolaire dont la densité diminue avec les pH croissants. Au delà de pH 8,5, le dépôt de particules colloïdales est presque nul (Pl. 13 ; Fig. a - b - c - d).

- Lorsque la coloration est précédée d'une digestion à la DNase, quel que soit le pH de la solution colloïdale, l'intensité de la coloration reste identique de même que sa localisation périnucléolaire et dans le corps nucléolaire, en bordure des travées du réseau (Pl. 14 ; Fig. a).

- Après action de l'acide thioglycolique, les solutions de colloïdes électronégatifs de pH 4,5 colorent

tout le corps nucléolaire (Pl. 15 ; Fig. a et b). La réduction des ponts disulfures influe donc sur la révélation des protéines nucléolaires totales.

- Après action de la pepsine seule, le réseau nucléolaire se colore par une solution de colloïde électro-négatif de pH 10,5. Ce résultat a été acquis aussi bien sur fractions de nucléoles isolés (Pl. 16 ; Fig. b - c) que sur les nucléoles in situ (Pl. 17 ; Fig. a - b - c).

- Si l'action de la solution de coloration est précédée d'une double digestion pepsine + DNase, à la coloration du réseau nucléolaire s'ajoute celle de la chromatine (Pl. 16 ; Fig. b ; Pl. 18 ; Fig. a et b).

- Coloration des RNP nucléolaires

La technique d'extraction que nous avons décrite dans les méthodes générales nous a fourni deux surnageants d'extraction qui ont été déposés sur un gradient de saccharose et centrifugés. Le profil de sédimentation ainsi obtenu révèle l'existence d'une zone large, s'étalant de 45 S à 80 S environ et présentant un maximum à 60 S. Au delà de 80 S, on retrouve une zone hétérogène s'étalant jusqu'à environ 100 S (Fig. 4 ; p. 67).

L'observation ultrastructurale des ribonucléoprotéines extraites, effectuée sur le sédiment obtenu par recentrifugation des deux surnageants d'extraction, révèle leur caractère granulaire. Ces granules ont en moyenne 150 Å à 200 Å de diamètre ; ils peuvent être ovoïdes, ils mesurent alors 350 Å de long sur 110 Å de large. Les grossissements élevés les montrent constitués de l'enroulement de fibrilles de 30 à 45 Å de diamètre environ (Pl. 19 ; Fig. a - b - c). Le résidu d'extraction se montre essentiellement fibrillaire et constitué de fragments de réseau nucléolaire et d'amas chromatiniens (Pl. 19 ; Fig. d).

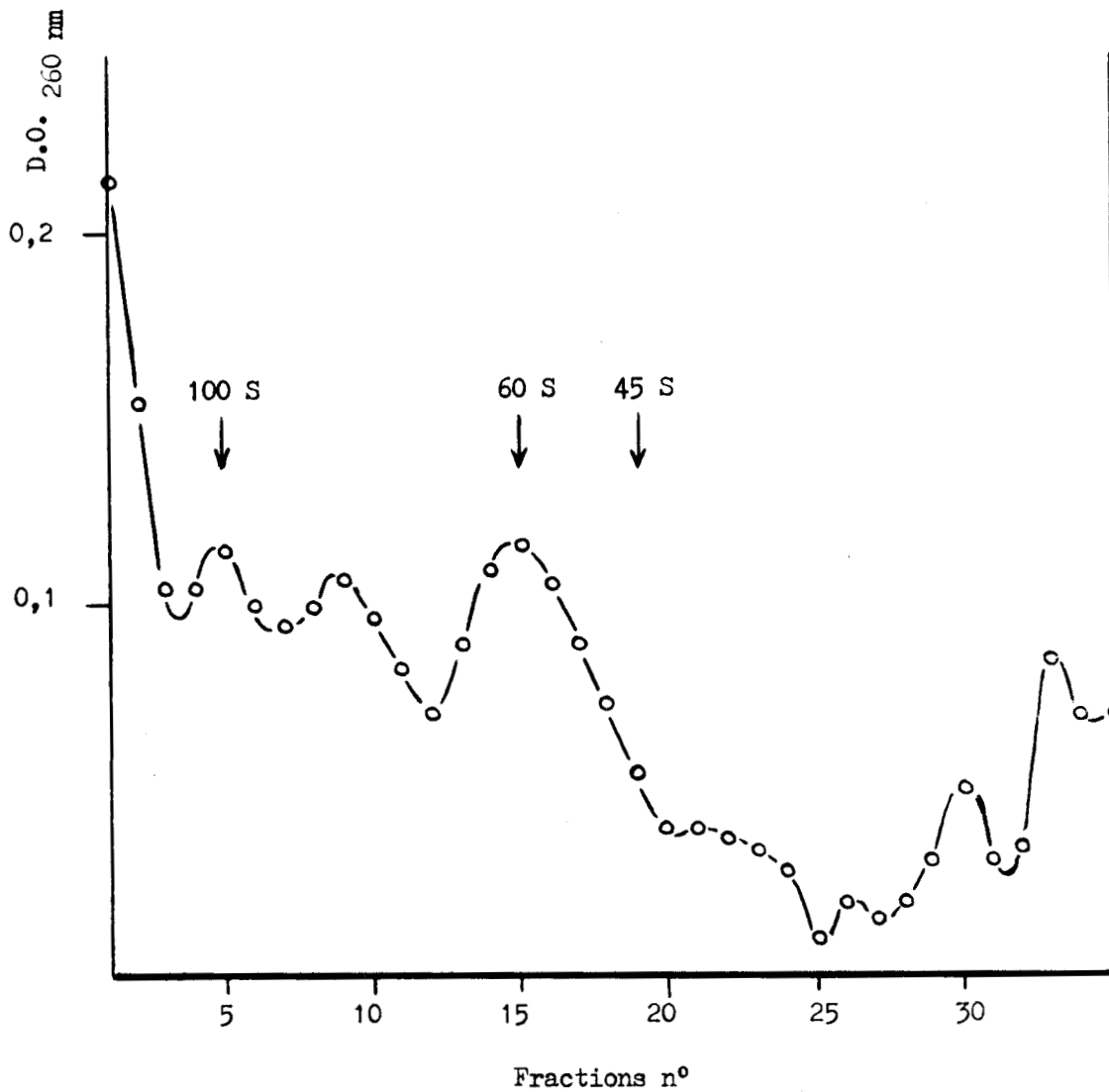


Figure 4

Granules nucléolaires extraits resuspendus dans le tampon d'extraction (TRIS 0,01 M pH 7,4 ; NaCl 0,01 M ; E.D.T.A. 0,01 M) et déposés sur gradient de saccharose de 10 à 30 p. 100. Ultracentrifugation de 15 h à 20 000 t/mn (Spinco Rotor SW 27).

Après action d'une solution de colloïde électronégatif de pH 10,5, les ribonucléoprotéines nucléolaires extraites se colorent d'une manière identique, que l'action du colloïde ait été ou non précédée d'une digestion à la RNase (Pl. 20 ; Fig. a et b).

b - Protéines basiques du nucléole lésé par action de l'actinomycine D

- Nous avons suivi les lésions provoquées par une seule injection d'actinomycine D, depuis une demi-heure jusqu'à 3 heures après l'injection. Les résultats obtenus sont conformes à ceux décrits par la plupart des auteurs. La ségrégation nette des constituants du nucléole en plages fibrillaires denses, fibrillaires claires et granulaires a été obtenue deux heures et trois heures après l'injection. Ceci nous a amené à isoler les noyaux et les nucléoles des cellules hépatiques des rats traités, 2 h 30 après l'injection d'antibiotique. La morphologie des fractions obtenues est illustrée Pl. 23.

La pureté des fractions est bonne. Les nucléoles isolés conservent la morphologie typique des nucléoles ségrégatifs ce qui confirme les observations de HARRIS et al. (1968). Après inclusion dans le glycol-méthacrylate, nous avons constaté une hétérogénéité des compartiments granulaires, caractérisée par la juxtaposition d'une zone granulaire dense et d'une zone granulaire plus claire (Pl. 24 ; Fig. a).

- Nous avons observé après action de la pepsine puis de la RNase une résistance plus ou moins grande des différents compartiments nucléolaires ségrégatifs. Les plages fibrillaires sont très résistantes, les plages granulaires denses moyennement résistantes, les

plages granulaires claires faiblement résistantes, les plages fibrillaires claires sont complètement digérées (Pl. 24 ; Fig. a - b). Un tel résultat a été obtenu par plusieurs auteurs (SCHOEFL, 1964 ; JEZEQUEL et BERNHARD, 1964 ; RECHER et al., 1971).

- Après action de la solution de colloïde électronégatif de pH 10,5, que ce soit sur les fractions nucléolaires isolées (Pl. 25 ; Fig. a - b - c - d) ou sur les nucléoles in situ (Pl. 26 ; Fig. a - b), on observe une coloration hétérogène du corps nucléolaire caractérisée par la présence de plages très colorées, moyennement colorées et non colorées.

Dans le noyau in situ, la coloration des histones de la chromatine est subordonnée à une digestion préalable à la DNase (Pl. 26 ; Fig. c - d).

c - Protéines basiques du nucléoplasme

Nous nous sommes intéressé essentiellement aux protéines basiques non liées à l'ADN.

Après digestion des cellules hépatiques à la pepsine et coloration par la solution de colloïde électro-négatif de pH 10,5, nous avons observé en plus de la coloration du réseau nucléolaire décrite plus haut, la coloration d'une structure sphérique de $0,4 \mu$ de diamètre. Cette structure apparaît constituée d'un réseau lâche dont les éléments, d'allure grossièrement cylindrique, présentent un diamètre variable de 200 Å à 400 Å (Pl. 21 ; Fig. b et c ; Pl. 22 ; Fig. b). Cette structure a toujours été rencontrée en un seul exemplaire par coupe de noyau

et jamais au contact direct du nucléole. La morphologie et la localisation de ces organites permettent de les identifier aux corps pelotonnés (Pl. 21 ; Fig. a ; Pl. 22 ; Fig. a).

3 - Discussion

a - Noyau des cellules hépatiques normales

- Révélation des protéines nucléolaires totales. Action de l'acide thioglycolique.

On sait que le nucléole est riche en protéines. Celles-ci représentent 70 à 90 p. 100 du poids sec de l'organite (BERNHARD et GRANBOULAN, 1968). Du point de vue biochimique l'étude de leur composition a montré que la majorité d'entre elles sont acides (70 p. 100) (GROGAN et al., 1966). Or si l'on traite les nucléoles par une solution de colloïde électronégatif de pH 4,5 on n'observe pas de coloration du corps nucléolaire. Ce résultat ne peut s'expliquer que par une difficulté de pénétration des particules colloïdales jusqu'aux groupes réactifs. Parmi les facteurs susceptibles de s'opposer à la migration des particules colloïdales il faut citer :

= Le travail des forces de friction s'opposant à l'énergie de diffusion des particules. En fait, si ce facteur existe, son influence est minime puisque les particules colloïdales électropositives, de taille sensiblement identique à celle des particules électronégatives, pénètrent complètement le corps nucléolaire.

= L'existence de la chromatine périnucléolaire, pouvant provoquer la formation d'une barrière de potentiel. En fait après digestion à la DNase, cette barrière, représentée par les charges positives des groupes

basiques des histones, n'empêche pas la pénétration, vers le centre du nucléole, des particules électropositives de la solution colloïdale d'hydroxyde de fer.

= L'encombrement stérique des protéines du réseau fibrillo-granulaire semble être, en fait, l'obstacle à la coloration par la solution colloïdale.

Les résultats positifs que nous avons obtenus, après réduction des ponts disulfures sont en faveur de cette dernière hypothèse et semblent confirmer la présence d'une quantité importante de ponts disulfures dans les protéines nucléolaires comme l'ont signalée plusieurs travaux (SANDRITTER et KRYGIER, 1953 ; ZAGURY, 1957 ; ALBERTINI, 1959 ; LIAU et PERRY, 1969). Ces protéines pourraient correspondre aux protéines résiduelles difficilement extractables. On sait que celles-ci s'associent très tôt à l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé. En effet, CHOI et al. (1968) ont montré que l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé ne se retrouve pas dans les sous-fractions obtenues après extraction par des solutions salines mais reste dans la fraction résiduelle non extractable.

Après action de l'acide thioglycolique, les nucléoles isolés conservent apparemment intacts leurs chromatines péri et intranucléolaires (Pl. 14 ; Fig. b - c). Dans le corps nucléolaire, le réseau fibrillaire est dense, par contre, les granules nucléolaires sont quantitativement réduits. Cette perte des granules après réduction des ponts disulfures confirme l'hypothèse de LIAU et PERRY (1969) selon laquelle les granules sont liés aux sous-structures par l'intermédiaire de ces ponts.

- Révélation des histones nucléolaires

Après action de la DNase et incubation dans

la solution colloïdale de pH 10,5, la couronne périnucléolaire est colorée (Pl. 14 ; Fig. a). Dans le corps nucléolaire, il a été possible de colorer des travées correspondant à la chromatine intranucléolaire (Pl. 6 ; Fig. b). Nous avons en outre observé un dépôt de particules moins important, en bordure du réseau fibrillo-granulaire et notamment autour des espaces clairs correspondant aux vacuoles. Ce dépôt, moins dense qu'au niveau des larges travées de chromatine intranucléolaire, peut correspondre aux histones de la chromatine intranucléolaire éparse mise en évidence par RECHER et al. (1970) et SHANKARANARAYAN et al. (1966 b).

L'aspect général de cette coloration peut évoquer une fixation non spécifique des particules colloïdales ; en fait nous ne pouvons retenir cette éventualité étant donné les résultats obtenus au moyen des réactions cytochimiques. En effet, la coloration ne s'observe que lorsque les nucléoles sont digérés à la DNase (Pl. 13 ; Fig. d) et ne se produit pas après désamination.

- Protéines basiques non liées à l'ADN

Dans le nucléole, après une action courte de la pepsine, les fibrilles et les granules ribonucléoprotéiques du réseau se révèlent beaucoup plus nettement (Pl. 15 ; Fig. c ; Pl. 16 ; Fig. a). Cette constatation confirme les résultats acquis par de nombreux auteurs sur la richesse de la matrice du réseau en protéines acides (MARINOZZI et BERNHARD, 1963 ; MARINOZZI, 1964 ; BERNHARD et GRANBOULAN, 1968) et sur la plus grande résistance des composants particulières à cette digestion.

La révélation des protéines basiques du réseau est subordonnée à une action courte de la pepsine ce qui s'explique par l'abondance des groupements acides de la matrice qui tendent à repousser les particules colloïdales de même signe. Nous avons en outre constaté que la structure des protéines du réseau constituait elle aussi un facteur limitant la coloration. En effet nous avons obtenu après action de l'acide thioglycolique, une coloration faible par la solution colloïdale de pH 10,5.

La coloration des ribonucléoprotéines nucléolaires extraites, ainsi que la coloration du réseau après extraction par la pepsine, nous permettent d'affirmer que les protéines basiques révélées sont localisées sur les particules ribonucléoprotéiques et sont donc associées à l'ARN nucléolaire.

Dans le nucléoplasme, après une digestion courte à la pepsine, la coloration par la solution colloïdale de pH 10,5 se caractérise par un dépôt léger et homogène de particules colloïdales sur tout le nucléoplasme. Nous ignorons si ce dépôt correspond à la présence de protéines basiques ou s'il est non spécifique ; il semble en tout cas moins important au niveau des zones d'hétérochromatine (Pl. 17 ; Fig. a - b - c).

Les corps pelotonnés révélés par notre technique apparaissent constitués d'éléments filamenteux dont le diamètre est un peu inférieur à celui des corps pelotonnés révélés par la technique à l'E.D.T.A. (MONNERON et BERNHARD, 1969) (Pl. 21 ; Fig. a ; Pl. 22 ; Fig. a). Cette réduction peut s'expliquer par la disparition sous l'action de la pepsine, d'un constituant protéique acide.

b - Répartition des protéines basiques dans les nucléoles de cellules hépatiques de rats traités à l'actinomycine D.

Deux constatations doivent être soulignées :

- La répartition des protéines basiques n'est pas homogène.

- Contrairement à ce qui a été observé au niveau du nucléole normal, les nucléoles lésés par l'actinomycine D se colorent toujours par la solution de colloïde électronégatif de pH 10,5. Cette coloration n'est ni subordonnée à une courte digestion préalable à la pepsine ni à l'action de l'acide thioglycolique.

La première constatation est à rapprocher de l'existence des zones diversement résistantes à la double digestion pepsine + RNase. Dans la mesure où la pepsine digère préférentiellement les protéines acides, les compartiments résistants sont plus riches en protéines basiques, cette hypothèse est entièrement confirmée par notre technique de révélation de ces dernières. Nous pouvons donc affirmer la présence de protéines basiques en concentration plus forte que dans le nucléole normal, au niveau des compartiments fibrillaires et granulaires denses.

La deuxième constatation peut s'expliquer par une modification des concentrations relatives des zones nucléolaires en protéines acides et basiques. Lors de la ségrégation, on constate en effet, une condensation du nucléole qui se répercute sur la concentration des éléments particulaires. Il est possible, en outre, que la structure des protéines de la matrice englobant les éléments particuliers soit modifiée et permette ainsi la pénétration des particules colloïdales jusqu'aux groupements NH_2 des protéines basiques.

III - RECHERCHES SUR LA DIFFUSION DE PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES DANS DES FRACTIONS NUCLEAIRES ISOLEES

A partir d'une étude critique des différents milieux d'homogénéisation utilisés dans le fractionnement des composants cellulaires, DEFERT-KOBUS et al. (1965) ont montré que les phosphates utilisés pour tamponner les solutions de saccharose provoquent une perte des constituants phosphorés des différentes inclusions cellulaires isolées. Cette perte est particulièrement nette dans les fractions nucléaires et mitochondriales et non négligeable dans la fraction microsomale.

La perte de composés phosphorés provenant des noyaux isolés a été étudiée en détail par ces auteurs (DEFERT-KOBUS et al., 1966) qui ont pu montrer qu'elle était sélective et intéressait une famille d'ARN à vitesse de renouvellement rapide, comparée à celle des ARN restant localisés dans les noyaux.

Par ultracentrifugation du milieu d'incubation des noyaux, DEFERT-KOBUS et al. (1968) ont isolé deux fractions sédimentables RN₁ et RN₂ dont les caractéristiques physico-chimiques ont été étudiées. Le schéma d'obtention des sédiments RN₁ et RN₂ à partir de noyaux isolés incubés dans une solution de saccharose phosphaté est illustré par la figure 5, p. 76.

Nous avons étudié sur le plan morphologique et cytochimique toutes les étapes de cette diffusion dont le mécanisme nous a paru intéressant puisqu'il permet d'une manière artificielle, voisine des conditions physiologiques, d'étudier le transport hors du noyau d'une catégorie d'ARN nucléaires. Ce mode d'obtention de ribonucléoprotéines

Noyaux "type CHAUVEAU" resuspendus dans une solution de saccharose 0,35 M tamponnée à pH 7,8 par du phosphate bipotassique à la concentration finale de 0,02 M. Incubation à 4° C pendant 4 h.

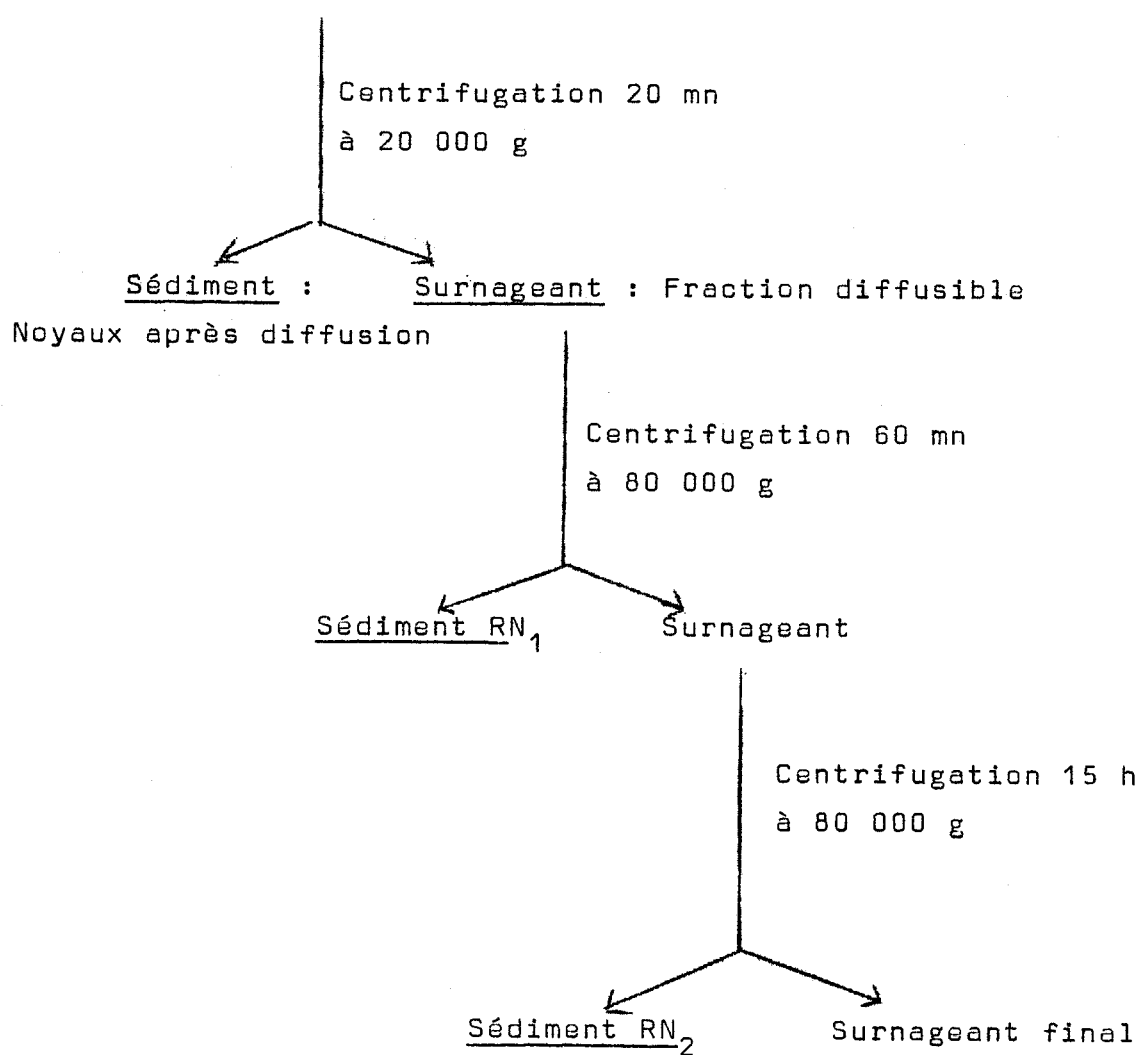


Figure 5

Schéma de la préparation des fractions ribonucléoprotéiques diffusibles.

nucléaires se distingue ainsi de l'extraction avec rupture de l'enveloppe nucléaire utilisée par la plupart des auteurs.

A - METHODES

1 - Milieux d'incubation des noyaux

Deux milieux d'incubation ont été utilisés en fonction de la présence ou non d'ions Mg^{2+} :

- . Milieu 1 : saccharose 0,35 M tamponné à pH 7,8 par du phosphate bipotassique à la concentration finale de 0,02 M.
- . Milieu 2 : Milieu de ZAMENIK et KELLER (1954) corrigé en ce qui concerne la concentration en $MgCl_2$.

Saccharose	0,35 M
$MgCl_2$	3 mM
$PO_4 H K_2$	20 mM
$CO_3 H K$	35 mM
KCL	25 mM

Les temps d'incubation des noyaux dans ces milieux n'a jamais excédé 4 heures à 4° C.

2 - Techniques de microscopie électronique

Les techniques morphologiques employées ont été détaillées dans le chapitre II.

En ce qui concerne la cytochimie, certaines digestions enzymatiques ont été effectuées sur les fractions

ribonucléoprotéiques obtenues à partir des noyaux, de la façon suivante :

- . DNase : Digestion de 30 mn à 25° C à la concentration de 50 μ /ml sur fractions non fixées.
- . RNase : Digestion de 30 mn à 25° C à la concentration de 50 μ /ml sur fractions non fixées.

Dans le cas des études morphologiques des composants d'une zone donnée d'un gradient de sédimentation, cette zone est collectée et fixée par addition d'un volume égal de formol à 20 p. 100 (pour inclusion dans le GMA) ou de glutaraldehyde à 3 p. 100 (pour inclusion dans l'Epon) dans le milieu qui a servi à dissoudre le saccharose du gradient. La fixation est de 1 h à 4° C, elle est suivie d'une centrifugation de 2 h à 130 000 g de façon à obtenir un sédiment qui sera ou non post-fixé à l'acide osmique.

3 - Extraction des particules ARN-informofères de GEORGIEV

Elles ont été extraites suivant la technique de SAMARINA et al. (1968) mais en l'absence d'inhibiteurs de RNase. Le milieu d'extraction, employé successivement à pH 7 et pH 8, contient NaCl 0,1 M - MgCl₂ 0,001 M - TRIS 0,01 M. L'analyse des extraits a été réalisée sur gradients de saccharose 10 - 30 p. 100 ultracentrifugés 15 h à 20 000 t/mn dans le rotor Spinco SW 25-1.

B - ETUDE DES NOYAUX AU COURS DE LA DIFFUSION

La morphologie des noyaux incubés pendant des temps variables dans les deux milieux d'incubation a

été comparée à celle des noyaux témoins incubés pendant des temps identiques dans des milieux de même composition mais ne renfermant pas de phosphates.

1 - Noyaux témoins

La pureté de la fraction nucléaire "type CHAUVEAU" est bonne ; on observe cependant la présence d'un peu de réticulum endoplasmique restant accroché à la membrane externe de l'enveloppe nucléaire et de très rares mitochondries, (Pl. 27 ; Fig. a - b - c). Ces noyaux ont un nucléoplasme homogène. Les nucléoles sont denses. La membrane externe de l'enveloppe nucléaire se décolle en certains endroits de la surface nucléaire ; on observe à son niveau de nombreux ribosomes (Pl. 28 ; Fig. a).

La pureté de la fraction nucléaire "type HYMER-KUFF" est meilleure que celle de la précédente (Pl. 28 ; Fig. b - c - d). Les contaminants cytoplasmiques ont disparu en même temps que la membrane externe des noyaux. Le nucléoplasme présente une morphologie plus proche de celle du noyau in situ, la condensation de la chromatine marginale et périnucléolaire est en effet plus marquée. Cette différence déjà signalée par MONNERON et MOULÉ (1968) et DAUTA-MENTRE (1964) est certainement due à la présence de calcium dans le milieu de resuspension des noyaux soumis à l'action du Triton. Les noyaux type "CHAUVEAU" ont été en effet centrifugés dans du saccharose 2,2 M ne renfermant pas d'ions divalents.

2 - Noyaux incubés dans les milieux phosphatés (Pl. 29 ; Fig. a - b - c - d).

Quel que soit le type de noyaux employés, l'incubation pendant 3 à 4 heures dans l'un ou l'autre des

milieux, provoque les mêmes variations morphologiques. Les membranes nucléaires ne sont pas rompues et, au microscope à contraste de phase, les noyaux restent sphériques. Au microscope électronique, par contre, les noyaux apparaissent déformés et tassés, probablement à cause de la centrifugation nécessaire à la formation du sédiment d'inclusion. Nous avons estimé grossièrement à moins de 5 p. 100 le nombre des noyaux lésés au niveau de leur enveloppe. Le nucléoplasme, après incubation en présence de phosphates est plus homogène que celui des noyaux témoins. La lésion morphologique la plus nette se situe au niveau des nucléoles, qui, en comparaison de ceux des noyaux témoins, présentent un aspect dispersé. Les grossissements élevés permettent d'observer une disparition importante des granules ; par contre, le compartiment fibrillaire reste dense bien que disposé d'une manière plus lâche.

Nous avons constaté que cette lésion nucléolaire est progressive. Après une heure d'incubation, les constituants nucléolaires présentent déjà un aspect dispersé, néanmoins, le réseau fibrillaire est dense et les granules, réunis en plages, sont nettement visibles.

Le même aspect est rencontré après 2 heures d'incubation.

Au bout de 3 heures le centre du nucléole apparaît occupé uniquement par le réseau fibrillaire ; les granules sont nettement répartis en périphérie.

Au bout de 4 heures et demies, nous avons observé les modifications les plus importantes. A la place du nucléole, il ne subsiste que quelques fragments du réseau fibrillaire, les granules ayant complètement disparu (Pl. 30 ; Fig. a - b - c).

3 - Déterminations microspectrophotométriques

Elles ont été réalisées sur des noyaux "CHAUVEAU" témoins et incubés 4 h dans le milieu 1. Les quantités moyennes d'ADN et d'ARN par noyau ont été calculées. Les résultats exprimés en picogrammes d'acides nucléiques sont les suivants, pour un intervalle de confiance de 5 p. 100 :

	Noyaux Témoins	Noyaux incubés en présence de phosphates
ADN	8,8 \leftarrow_m \leftarrow 9,3	8,8 \leftarrow_m \leftarrow 9,1
ARN	2,0 \leftarrow_m \leftarrow 2,5	1,3 \leftarrow_m \leftarrow 2,04

Les variations des concentrations en acides nucléiques des compartiments nucléolaires ont été enregistrées par passages d'un faisceau monochromatique de $0,32 \mu$ de diamètre. Le résultat obtenu est illustré par la figure 6, p. 82).

La concentration en ARN nucléolaire diminue en moyenne de 50 p. 100 dans les noyaux incubés.

Les photographies effectuées en lumière ultra-violette (Pl. 30 ; Fig. d et Pl. 31 ; Fig. a - b - c) montrent que la zone nucléolaire des noyaux incubés en présence de phosphates est difficilement repérable. Nous avons aussi constaté par ce moyen que l'absence morphologique d'hétérochromatine périnucléolaire n'est qu'apparente

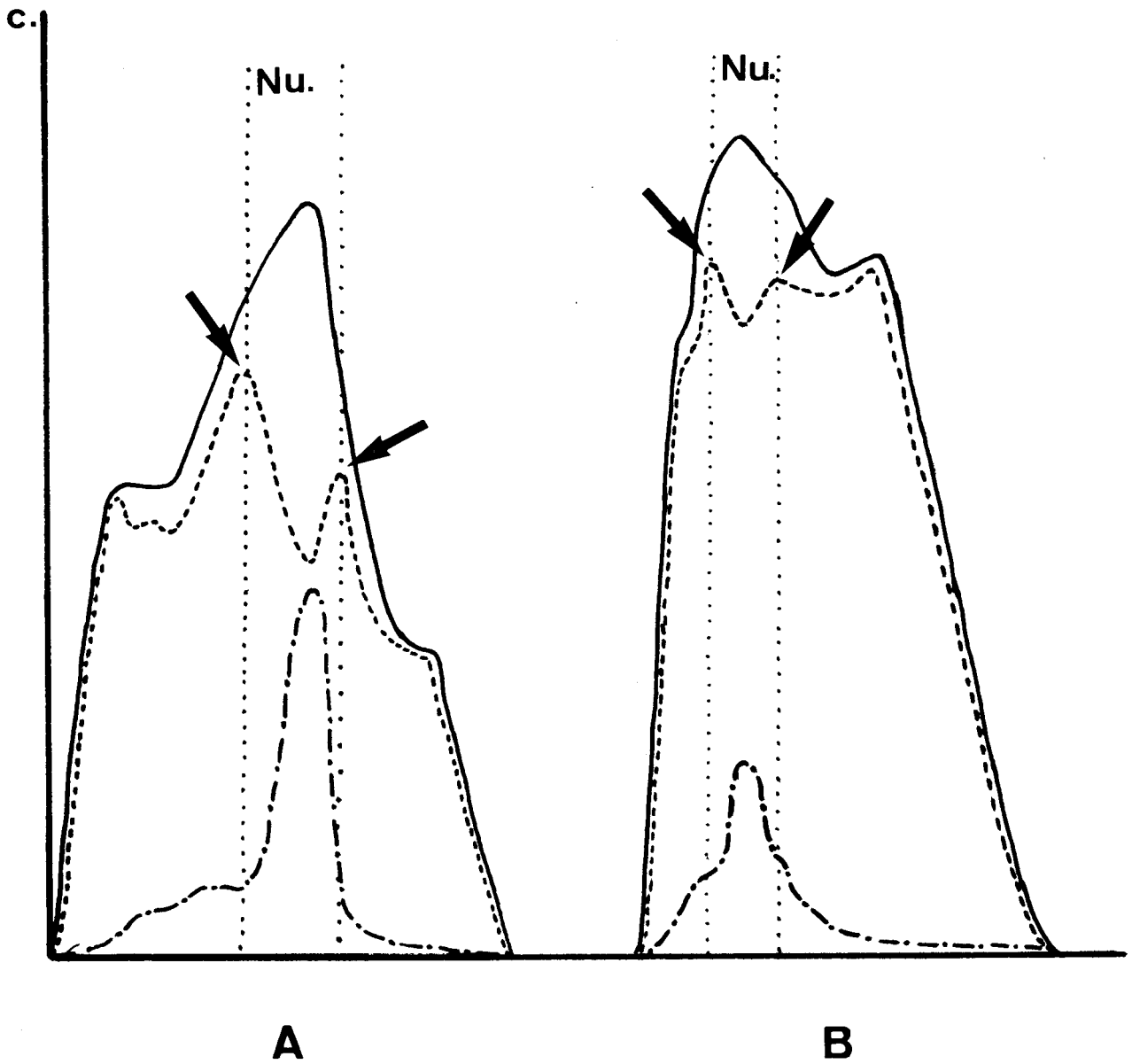


Figure 6

Enregistrement des concentrations en acides nucléiques au niveau du nucléole (Nu) des noyaux témoins (A) et diffusés (B).

————— ARN + ADN

- · - · - ARN

- - - - - ADN

Les flèches positionnent la couronne de chromatine périnucléolaire.

puisque'elle est révélée à 260 nm et qu'elle se traduit effectivement par un pic d'absorption.

Les résultats fournis par la détermination microspectrophotométrique du contenu des noyaux témoins en acides nucléiques sont légèrement inférieurs aux déterminations biochimiques effectuées par MURAMATSU et al. (1963) sur des noyaux type "CHAUVEAU", néanmoins, le rapport moyen $\frac{ARN}{ADN}$ est très voisin de 0,25, proportion rapportée par ces auteurs. Dans les noyaux incubés 4 h en présence de phosphates, le contenu total en ARN est réduit de 25 p. 100.

C - ETUDE DES FRACTIONS RN₁ et RN₂

1 - RN₁

Des différences apparaissent entre les sédiments RN₁ en fonction du type de noyaux mis en diffusion.

a - Le sédiment RN₁ provenant des noyaux "CHAUVEAU" est hétérogène (Pl. 32 ; Fig. a) et constitué de granules plus ou moins sphériques de 150 à 250 Å de diamètre et de vésicules claires de taille variable. En certains endroits, des granules sont accrochés à la surface externe des vésicules.

- Les ombrages unidirectionnels (Pl. 32 ; Fig. b - c) après dépôt de suspensions sur grilles, révèlent la présence de particules de forme irrégulière de 250 Å à 350 Å de diamètre et de structures fibreuses de longueur variable.

- Les ombrages par rotation (Pl. 32 ; Fig. d ; Pl. 33 ; Fig. a), après étalement selon la technique

de KLEINSCHMIDT, permettent d'observer la présence de particules sphériques de 300 Å à 400 Å, isolées ou accrochées à des filaments de longueur variable, plus ou moins ramifiés. Le diamètre des fibres varie de 100 Å à 300 Å.

- Les résultats obtenus après étalements de suspensions traitées par les enzymes (Pl. 33 ; Fig. b - c) sont difficilement interprétables du fait de leur non-reproductibilité et des difficultés rencontrées au cours de l'étalement. Néanmoins, nous avons constaté, après digestion à la DNase, une diminution du nombre des fibres.

Dans le cas de grilles mises à flotter, avant ombrage, sur une goutte de DNase, il nous a semblé, dans certains cas, que les filaments accrochés aux granules étaient partiellement digérés.

Les colorations positives (Pl. 34 ; Fig. a - b - c) révèlent le constituant fibreux et le constituant granulaire du sédiment RN₁. Au niveau des granules, présentant après l'application de cette technique un diamètre de 200 à 250 Å, il n'a pas été possible de déceler de sous-structures.

En coloration négative, les granules apparaissent compacts et présentent une surface régulière (Pl. 34 ; Fig. d).

b - Le sédiment RN₁ obtenu à partir de la diffusion des noyaux "HYMER et KUFF" est quantitativement très réduit. En coupe il est essentiellement granulaire et présente toutes les caractéristiques des sédiments RN₂ que nous allons décrire.

2 - RN₂

Aucune différence n'a été observée dans la morphologie des sédiments RN₂ obtenus par diffusion de l'un ou l'autre type de noyaux. Ce sédiment est très homogène (Pl. 34 ; Fig. e) et constitué entièrement de particules de 150 à 250 Å. Les vésicules et débris membranaires ont disparu.

Les ombrages unidirectionnels (Pl. 35 ; Fig. a) révèlent des granules sphériques d'un diamètre moyen de 300 Å ; par contre, on n'observe plus de structures fibreuses.

Après étalement sur films protéiques, (Pl. 35 ; Fig. b - c - d - e), l'aspect est nettement différent de celui de la fraction RN₁ ; il est beaucoup moins fibrillaire. Toutefois, on observe à côté de granules isolés d'un diamètre de l'ordre de 300 Å, des filaments de longueur variable, d'un diamètre moyen de 80 Å environ, associés à une ou plusieurs particules sur toute leur longueur ou par une de leurs extrémités. Certaines associations de granules suggèrent une structure polysomale.

Nous avons parfois observé la présence de granules d'un diamètre supérieur (600 Å) accrochés à l'une des extrémités d'un filament (Pl. 35 ; Fig. c).

Après coloration négative, les granules apparaissent, comme ceux du sédiment RN₁, peu pénétrés par l'agent contrastant et de forme régulière.

Les colorations positives n'ont pas révélé de sous-structures, les filaments ne sont pas colorés par cette technique.

3 - Discussion

L'enlèvement du feuillet externe de l'enveloppe nucléaire des noyaux du type "HYMER et KUFF" entraîne la disparition des vésicules et des membranes des sédiments RN₁. Ceux-ci sont d'ailleurs quantitativement très réduits, par rapport à ceux obtenus à partir de la diffusion des noyaux de type "CHAUVEAU".

Cette constatation indique que le sédiment RN₁ est en grande partie constitué de fragments du feuillet externe de l'enveloppe nucléaire, détachés au cours de la diffusion, ainsi que des ribosomes cytoplasmiques encore attachés à ce feuillet. Ceci est confirmé par les déterminations biochimiques effectuées sur la répartition des composés phosphorés dans les fractions RN₁ et RN₂, et sur la radioactivité spécifique et la composition en bases des ARN contenus dans les deux fractions sédimentables.

En effet, les fractions RN₁ et RN₂ obtenues à partir des noyaux "CHAUVEAU" présentent une différence importante dans leur contenu en composés phospholipidiques. Ceux-ci représentent 29 p. 100 du phosphore total dans la fraction RN₁ et seulement 5 p. 100 dans la fraction RN₂ (PUVION et al., 1968). Cette richesse en composés phospholipidiques de la fraction RN₁ s'explique par la présence des membranes vésiculaires.

En ce qui concerne la composition en bases et la radioactivité spécifique des ARN, des différences nettes apparaissent entre les deux fractions :

- La radioactivité spécifique des ARN est 3 fois plus élevée dans les RN₂.

- Le rapport des bases $\frac{G + C}{A + U}$ qui est très voisin de 1 pour les ARN de la fraction RN₂, est de 1,49 pour ceux de la fraction RN₁ (DEFERT-KOBUS et al., 1968).

Ces résultats s'expliquent si la fraction RN₁ est souillée par des ARN ribosomiaux.

Sur le plan morphologique, à côté des particules granulaires, les ombrages unidirectionnels révèlent des fibres d'un diamètre de 100 à 300 Å pouvant être d'origine chromatinienne. Ces fibres se retrouvent après étalement sur films protéiques et leur diamètre est de l'ordre de celui des fibres de chromatine (KAYE, 1969 et BRAM et RIS, 1971). Une grande partie de ces fibres disparaît d'ailleurs après étalement d'une fraction traitée à la DNase.

Le sédiment RN₂ est morphologiquement homogène. Les étalements sur films protéiques le montrent constitué de granules isolés ou associés à des filaments dont le diamètre et l'aspect sont ceux des molécules d'acides nucléiques déroulées. Bien que les tentatives d'étalements de fractions préalablement digérées par les nucléases aient échoué, nous pensons que ces filaments sont des molécules d'ARN, du fait de l'insensibilité de cette fraction vis à vis de la digestion à la DNase constatée lors des études biochimiques effectuées à partir de centrifugations en gradients de densité (DEFERT-KOBUS, 1971).

D - ETUDES MORPHOLOGIQUE ET PHYSICOCHEMIE DES PARTICULES DE LA FRACTION RN₂

Les résultats précédents ayant démontré que la majeure partie des constituants de la fraction RN₁

ont une origine extranucléaire, nous nous sommes limité à l'étude de la fraction RN₂, obtenue à partir de la mise en diffusion des noyaux débarrassés de leur membrane externe.

Les travaux physico-chimiques ont surtout porté sur la détermination du coefficient de sédimentation et de la densité des particules composant cette fraction. En gradients de densité saccharose, les particules sédimentent dans des zones différentes du gradient, selon que l'incubation des noyaux a été réalisée dans le milieu 1 (saccharose 0,35 M, phosphate bipotassique 0,02 M) ou dans le milieu 2 (milieu de ZAMENIK et KELLER renfermant MgCl₂ à la concentration de 3 mM).

Dans le premier cas, comparativement aux constantes de sédimentation des sous-unités ribosomales, les particules de la fraction RN₂ se retrouvent dans une zone présentant un maximum net à 35 S.

Dans le deuxième cas, elles se retrouvent dans une zone dont le maximum atteint 45 S (voir Fig. 7 ; p. 89).

L'étude en gradients de chlorure de césium de la densité des particules des pics 35 S et 45 S a permis de constater que la diminution du coefficient de sédimentation des particules diffusées en l'absence de magnésium était due à une modification de la conformation moléculaire de celles-ci et non à un changement dans leur composition ; en effet, les particules des pics 35 S et 45 S présentent la même densité de 1,37 (déterminée par centrifugation à l'équilibre en chlorure de césium) (DEFERT-KOBUS, 1971). Nous n'avons d'ailleurs pu déceler de différences morphologiques après colorations négatives.

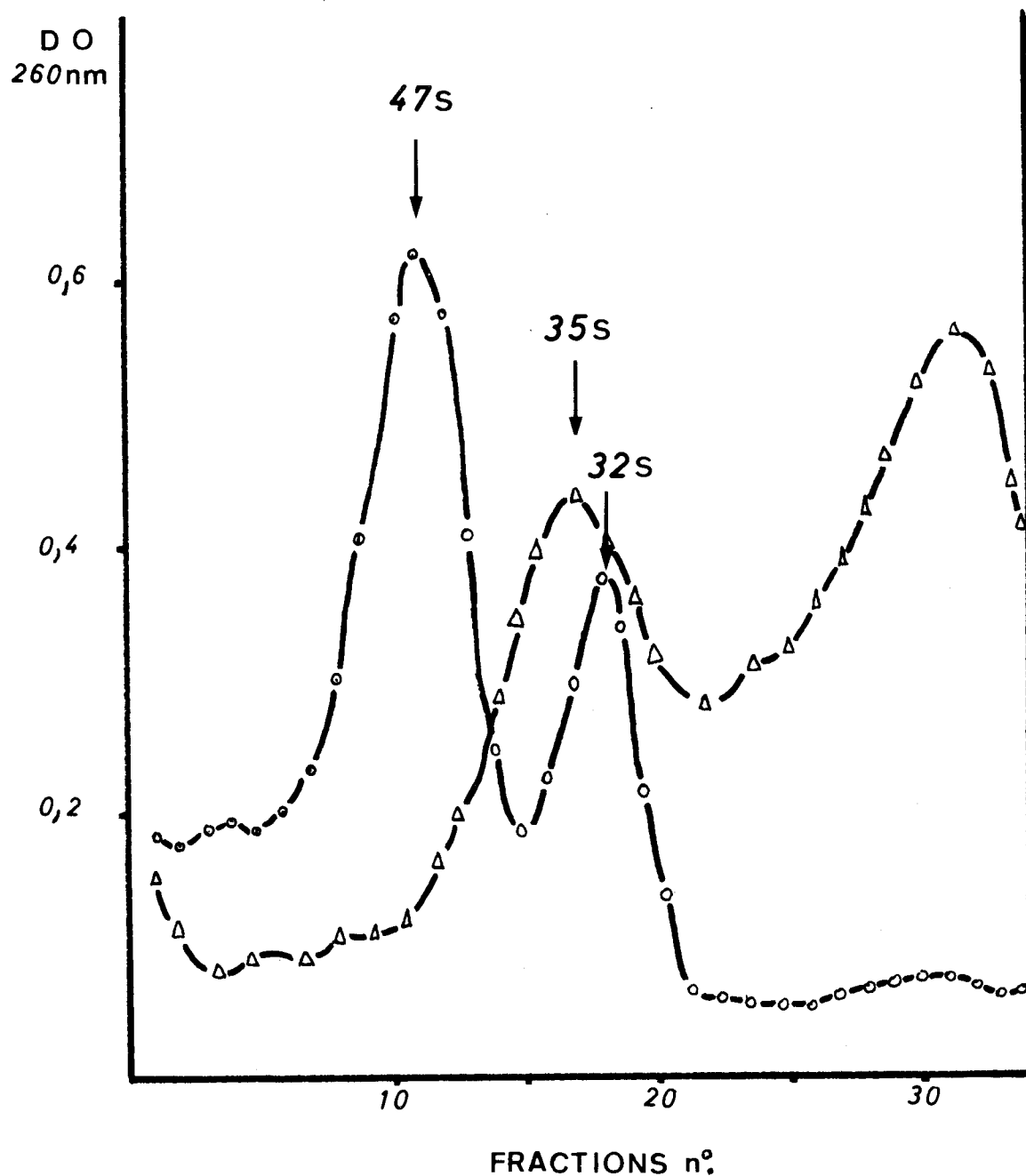


Figure 7

Ultracentrifugation en gradient de saccharose de 5 à 25 p. 100 de la fraction RN_2 de noyaux de foie de rats isolés et incubés dans le milieu 1 (saccharose 0,35 M - phosphate bipotassique 0,02 M pH 7,8).

Centrifugation en rotor Spinco SW 27 à 20 000 t/mn 14 h à 4° C.

—○— D. optique à 260 nm de sous-unités ribosomales de foie de rat.
 —△— D. optique à 260 nm de la fraction RN_2 .



1 - Le sédiment obtenu par recentrifugation de la zone 45 S des gradients (voir Méthodes) apparaît essentiellement granulaire. Les granules de forme sphérique mesurent de 150 à 220 Å de diamètre. Après fixation unique au glutaraldehyde suivie d'une coloration des coupes au citrate de plomb, ces granules sont très contrastés (Pl. 36 ; Fig. a et b).

2 - Les colorations négatives des particules (Pl. 36 ; Fig. c ; Pl. 37 ; Fig. a) démontrent l'homogénéité de la fraction qui apparaît par cette technique, essentiellement granulaire. Les particules sont sphériques et mesurent 200 à 250 Å de diamètre. Certaines apparaissent légèrement ovoïdes, elles mesurent alors le plus fréquemment 170 Å de largeur sur 270 Å de longueur. Les grossissements élevés montrent qu'elles sont peu pénétrées par l'agent contrastant. Leur surface est quelque peu irrégulière. Les colorations positives n'ont pas permis de révéler l'existence de sous-structures à leur niveau (Pl. 37 ; Fig. b).

3 - Après étalement selon la technique de KLEINSCHMIDT (Pl. 37 ; Fig. c et d), les ombrages révèlent l'existence, à côté de particules libres, de particules réparties sur de courts filaments de longueur variable, excédant rarement 2 microns.

4 - Etude cytochimique sur coupes après inclusion dans le GMA.

Après inclusion dans le glycol-méthacrylate et double coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, les particules apparaissent organisées en réseau lâche, leur contour est moins bien défini (Pl. 38 ; Fig. a).

L'action de la pepsine (Pl. 38 ; Fig. c) entraîne une diminution importante du contraste général du réseau granulaire. Il n'est plus possible de distinguer les granules. Les grossissements élevés permettent d'observer à leur place des grains de 50 à 100 Å de diamètre, faiblement contrastés.

Après action de la RNase, on observe un pâlissement des granules, leur contour devient plus flou ; néanmoins ils ne disparaissent pas (Pl. 38 ; Fig. b).

L'aspect observé après double action pepsine puis RNase (Pl. 38 ; Fig. d) est pratiquement identique à celui donné par la pepsine seule. La diminution du contraste est très nette, il n'est plus possible de distinguer les particules, bien qu'elles ne soient pas complètement effacées.

5 - Discussion

La morphologie des particules 45 S est identique à celle des particules du sédiment RN₂ ; après étalement sur film protéique monomoléculaire, les aspects sont les mêmes.

Le résultat des digestions enzymatiques est en faveur de la nature ribonucléoprotéique des particules. Celles-ci sont d'ailleurs très sensibles à la digestion à la pepsine. Après digestion à la RNase, par contre, les particules bien que plus floues et moins contrastées, sont encore présentes. Ces résultats sont en faveur d'une richesse importante en protéines, ce qui confirme les déterminations biochimiques qui estiment à seulement 27 p. 100 le contenu en ARN des particules (DEFERT-KOBUS, 1971). Sur le plan physico-chimique, les particules se montrent très sensibles à l'action de la RNase puisque le pic radioactif

correspondant à la zone 45 S s'effondre totalement après une digestion de 20 mn à 37° C (50 µg de RNase par ml).

E - COMPARAISON ENTRE LES PARTICULES 45 S DIFFUSEES ET D'AUTRES TYPES DE PARTICULES NUCLEAIRES EXTRAITES

Parmi les particules nucléaires extraites par de nombreux auteurs et ayant été peu étudiées sur le plan morphologique, les ARN-informofères (SAMARINA et al., 1967 ; 1968) présentent des caractères physicochimiques voisins de ceux des particules diffusées (voir Généralités) ; nous avons pensé que l'étude morphologique comparative de ces deux types de ribonucléoprotéines permettrait de mieux comprendre leur signification fonctionnelle. Dans le but de diminuer les dégradations éventuelles de l'ARN au cours de la diffusion et pour nous rapprocher des conditions d'extractions de SAMARINA et al., nous avons étudié la diffusion dans le milieu habituel (milieu d'incubation 2) auquel nous avons ajouté un inhibiteur cytoplasmique de RNase obtenu selon les procédés de ROTH (1958) et de SIRAKOV et KOCHAKIAN (1969) (inhibiteur provenant de 1 foie pour une quantité de noyaux provenant de 1 foie).

Nous avons en outre repris, en coloration négative, l'étude morphologique des granules nucléolaires extraits déjà décrits dans le chapitre III, de façon à vérifier leur présence éventuelle dans le milieu de diffusion.

1 - Etude des particules ARN-informofères de GEORGIEV

Le profil du gradient de sédimentation (Fig. 8 ; p. 93) se caractérise par la présence de 2 zones :

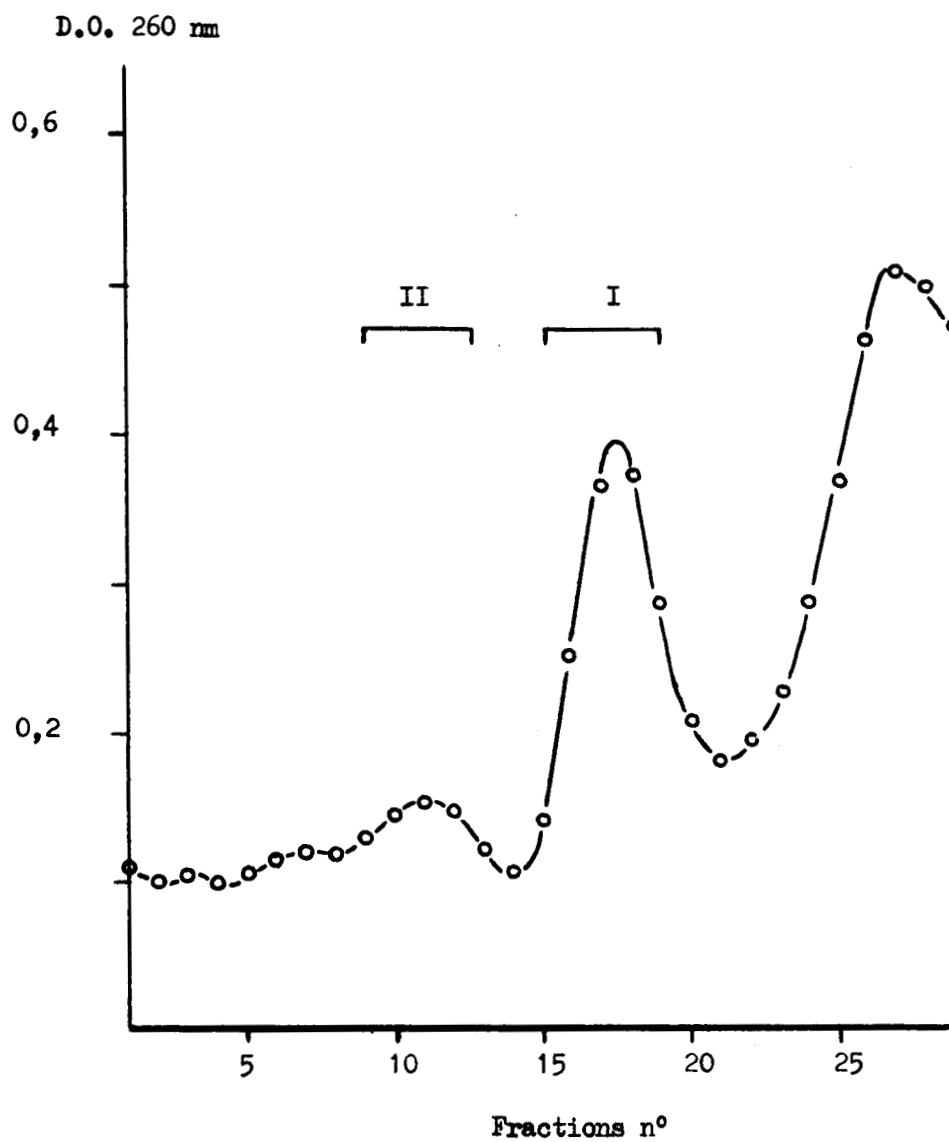


Figure 8

Particules ARN-informofères de GEORGIEV déposées sur gradient de saccharose de 10 à 30 p. 100.
Centrifugation 15 h à 20 000 t/mn (Rotor Spinco SW 25/1).



une zone bien délimitée (Zone I) présentant un maximum très net dans la région 30 S du gradient, une zone plus large et plus hétérogène (Zone II), dans la partie la plus lourde du gradient, s'étalant de 45 S à 60 S environ.

. Après inclusion (Pl. 39 ; Fig. a et b), le sédiment obtenu par recentrifugation du matériel de la zone I se montre homogène et constitué de particules sphériques, denses, organisées en un réseau irrégulier. Ces particules mesurent en moyenne 140 à 200 Å de diamètre. Les grossissements élevés ne permettent pas de distinguer de sous-structures à leur niveau.

. Les colorations négatives (Pl. 39 ; Fig. c et d) confirment l'homogénéité de cette zone. Les particules présentent, par cette technique, un diamètre moyen de 220 Å. Les grossissements plus élevés permettent de voir qu'elles sont peu pénétrées par l'agent contrastant.

L'aspect général de la zone II (Pl. 40 ; Fig. a) après colorations négatives, est nettement différent de celui de la zone I. Alors que précédemment les particules se répartissaient à peu près uniformément, sans qu'il soit possible de distinguer entre elles des associations nettes, dans le cas de la zone II, on observe des associations en groupes ou en chaînettes de 2, 3 ou 4 particules d'apparence irrégulière.

Leur diamètre moyen est comparable à celui des particules de la zone I, mais leur forme est souvent plus allongée, elles mesurent alors en moyenne 380 Å sur 190 Å.

Après ce type d'extraction, les noyaux sont tous fragmentés ou complètement détruits (Pl. 41 ; Fig. a). Le résidu se compose d'amas chromatiniens épars, de débris membranaires et de fragments de noyaux dans lesquels il est possible de distinguer des nucléoles et des groupes de grains interchromatiniens.

2 - Après coloration négative (Pl. 40 ; Fig. b et c), les particules nucléolaires extraites apparaissent sphériques et de taille variable, les diamètres s'échelonnent de 170 Å à 330 Å. On distingue fréquemment des associations de 2 ou 3 particules, ce qui donne à l'ensemble un aspect très différent de celui observé avec les particules de GEORGIEV et avec les particules diffusées. A un grossissement plus élevé, on observe que l'agent contrastant pénètre profondément les granules nucléolaires et révèle nettement une structure fibrillaire constituée par l'enroulement en peloton d'un filament de 40 Å de diamètre environ. Cette observation confirme celle effectuée après inclusion (voir chapitre III).

3 - Diffusion en présence d'inhibiteur de RNase

Les profils des densités optiques et des radioactivités diffèrent de ceux obtenus sur la fraction RN₂ issue d'une incubation des noyaux dans le milieu de diffusion privé d'inhibiteur de RNase (témoin) (voir Fig. 9 ; p. 96). On remarque en effet par rapport au témoin, la disparition du matériel présent dans la zone légère du gradient, ce qui permet de supposer qu'il provenait de la dégradation de fractions plus lourdes. En outre, on constate l'apparition d'un matériel absorbant radioactif s'étalant de façon hétérogène au delà de 45 S.

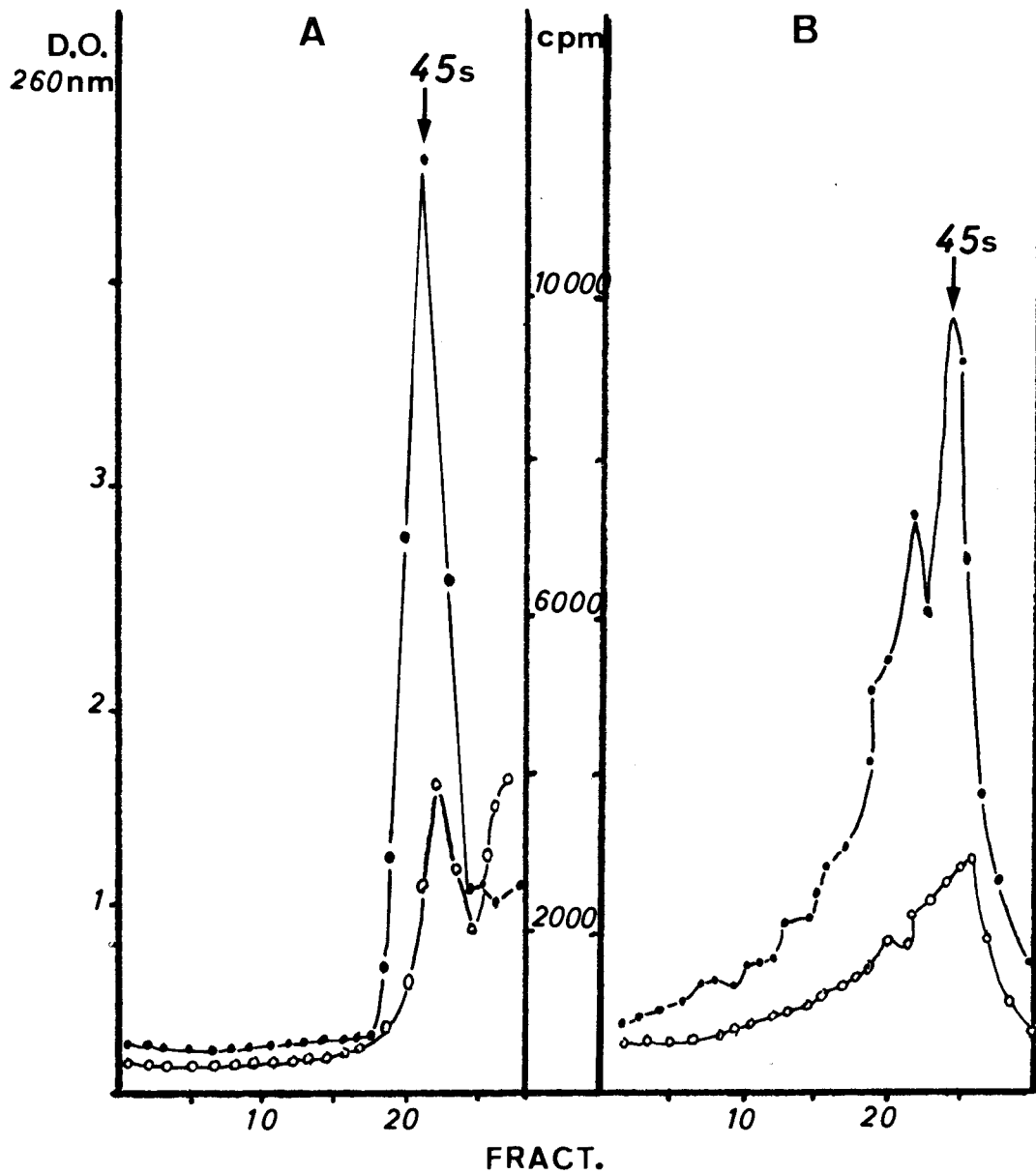


Figure 9

Ultracentrifugation en gradients linéaires de saccharose de 0,3 à 1 M dans le rotor Spinco SW 25/1 à 25 000 t/mn 3 h à 4° C.

Graphique A : Fraction RN₂ de Noyaux de foies de rats marqués au ³²P (1 mC/rat - 1 h) et incubés dans le milieu n° 2.

Graphique B : Le milieu d'incubation a été additionné d'inhibiteur de RNase.

● ——— ● Radioactivité acido-insoluble.
 —○—○— Densité optique à 260 nm.

Après inclusion (Pl. 41 ; Fig. b et c), le sédiment obtenu par recentrifugation de la zone lourde du gradient (supérieure à 45 S) est homogène et granulaire. Les granules d'un diamètre moyen de 240 Å ont, à grossissements élevés, une forme moins régulière que ceux constituant le pic 45 S. Certains semblent en partie constitués de fibrilles pelotonnées d'environ 50 Å de diamètre.

Les colorations négatives (Pl. 42 ; Fig. a) confirment l'irrégularité de structure des particules. Elles sont mieux pénétrées par l'agent contrastant que celles du pic 45 S et semblent être de texture fibrillaire. La répartition des particules n'est plus homogène et beaucoup d'entre elles sont associées en groupes plus ou moins importants ou en courtes chainettes bien révélées après coloration positive (Pl. 42 ; Fig. b et c).

F - RECHERCHES SUR L'ORIGINE INTRANUCLEAIRE DES PARTICULES DIFFUSEES

Nous avons voulu déterminer à quel type de ribonucléoprotéines caractérisables in situ appartenaient les particules diffusées ; nous avons, dans ce but, comparé les noyaux témoins aux noyaux diffusés après coloration préférentielle des ribonucléoprotéines selon BERNHARD (1969). Nous avons en outre étudié l'influence de faibles doses d'actinomycine D sur la diffusion des particules, de façon à révéler une participation éventuelle des ARN nucléolaires. Les injections d'antibiotique ont été faites, par voie intrapéritonéale, 3 h avant le sacrifice des rats, à la dose de 0,25 µg par g de poids de l'animal.

1 - Noyaux témoins (Pl. 43 ; Fig. a et b)

Les différents types de ribonucléoprotéines sont révélés. Les ribonucléoprotéines fibrillaires et granulaires du nucléole sont très contrastées. Le nucléoplasme est très chargé et on distingue nettement les groupes de grains interchromatiniens ainsi que les fibrilles péri-chromatiniennes en bordure des zones de faible densité correspondant à la chromatine. Des grains péri-chromatiniens sont nettement visibles notamment en bordure de la chromatine périnucléolaire.

2 - Noyaux "diffusés" (Pl. 43 ; Fig. c ; Pl. 44 ; Fig. a et b).

Après diffusion, l'aspect général du nucléoplasme est nettement différent. Des amas granulaires épars sont colorés ; les grossissements moyens permettent de constater qu'ils correspondent aux grains interchromatiniens qui, seuls, ont acquis un contraste analogue à celui observé dans les noyaux témoins.

Les grains péri-chromatiniens sont moins contrastés et surtout plus difficilement repérables du fait de l'aspect homogène du nucléoplasme. Les fibrilles péri-chromatiniennes ont presque complètement disparu. Au niveau du nucléole, les ribonucléoprotéines fibrillaires sont entourées d'une zone claire non colorée. Les granules ont complètement disparu.

3 - Action de l'actinomycine D (Pl. 44 ; Fig. c ; Pl. 45 ; a - b - c - d).

Après diffusion, la morphologie du nucléole est peu modifiée ; les compartiments fibrillaires et

granulaires sont toujours présents. La densité des granules nucléolaires reste inchangée. Après application de la technique à l'E.D.T.A., les constituants ribonucléoprotéiques du nucléole sont bien colorés, notamment les granules nucléolaires. L'aspect du nucléoplasme est identique à celui des noyaux diffusés non traités à l'actinomycine D, les seuls constituants ribonucléoprotéiques bien colorés étant les grains interchromatiniens.

G - DISCUSSION

1 - Aspects nucléolaires constatés dans les noyaux "diffusés"

Nous avons constaté au cours de la diffusion que le nucléole prenait graduellement un aspect diffus et qu'il perdait une grande partie de ses granules ribonucléoprotéiques. Cette observation est confirmée par les études microspectrophotométriques. La composition des milieux de diffusion peut être responsable au moins en partie de ces aspects. En effet, on sait que la morphologie des noyaux isolés est très sensible à la présence des ions divalents dans les milieux d'homogénéisation ou de resuspension. Bien que dans le milieu de diffusion n°2, les ions Mg^{2+} soient en concentration suffisante (3 mM) pour préserver une bonne morphologie du nucléole (MONNERON et MOULE, 1968), il faut compter avec les 20 mM d'ions phosphates qui tendent à les complexer.

Il est possible qu'au cours de la diffusion se produise une dégradation de l'ARN nucléolaire. CHAKRAVORTY et BUSCH (1967) ont en effet montré que l'activité de la RNase nucléolaire est importante et que cette enzyme est en grande partie libre et non liée à un inhibiteur comme elle l'est dans le nucléoplasme ; le fait que les nucléoles de noyaux de foie de rat traités à l'actinomycine D



conservent un compartiment granulaire apparemment intact après la diffusion pourrait alors s'expliquer puisque l'activité de la RNase nucléolaire est alors réduite au 1/3 ou même au 1/6 de celle présente dans un nucléole normal (SIEBERT et al., 1968). Les nucléoles résultant de la ségrégation peuvent aussi présenter une plus grande résistance envers la composition du milieu d'incubation des noyaux, du fait d'une liaison plus étroite entre l'ARN et les protéines des particules (DARNELL, 1968) ou du fait d'un changement structural de la matrice du réseau (Chapitre II).

De toute façon, il ne semble pas que la participation du nucléole à la diffusion des particules ribonucléoprotéiques soit directe. En effet, les particules diffusées présentent une morphologie très différente de celle des granules nucléolaires. D'autre part, les résultats obtenus à partir de la diffusion de noyaux de cellules hépatiques de rats traités à l'actinomycine D ne sont pas en faveur d'une telle participation. La dose faible d'antibiotique que nous avons injectée provoque une inhibition de 50 p. 100 des synthèses d'ARN (GOLDBLATT et al., 1969) et bloque totalement la synthèse des ARN nucléolaires (GEUSKENS et BERNHARD, 1966). Nous avons constaté, sur le plan biochimique que la composition en bases des ARN diffusés reste inchangée ($\frac{G + C}{A + U} = 1$); cette population d'ARN est donc homogène et indépendante des ARN ribosomiaux.

2 - Structure des ribonucléoprotéines

Après coloration négative, les particules diffusées présentent des caractères communs à d'autres particules obtenues par extraction et notamment aux ARN-informofères.

Les images d'associations de granules et de filaments obtenues après étalement sur films protéiques monomoléculaires sont difficiles à interpréter. Il est possible que l'acétate d'ammonium contenu dans la solution d'étalement favorise la dissociation, au moins partielle, des éléments d'une particule sphérique compacte telle qu'elle est observée après ombrage unidirectionnel ou après coloration négative. Dans ce cas la particule apparaîtrait constituée de l'enroulement d'une molécule d'acide nucléique, sur laquelle se répartissent des granules sphériques de nature protéique. L'observation, sur certaines photographies, de particules de taille plus importante reliées à l'extrémité d'un filament pourrait être le résultat d'une dissociation incomplète de la particule. Il doit être noté que SPOHR et al. (1970) ont observé, dans la fraction cytoplasmique de cellules HeLa, des particules de 110 Å à 200 Å (après coloration négative) formées par l'enroulement d'un filament présentant des petits nodules répartis sur sa longueur. Ces particules représenteraient des complexes mARN-protéine.

Les résultats obtenus après digestions enzymatiques et notamment la résistance relative des particules à l'action de la RNase sont en faveur d'une telle interprétation, la forme de la particule dépendant surtout de son composant protéique.

3 - Origine des particules diffusées

La diffusion s'accompagne d'une perte des fibrilles périchromatiniennes des noyaux. Ces fibrilles semblent représenter l'expression morphologique de l'ARN chromosomique nouvellement synthétisé. En effet, PETROV et BERNHARD (1971) ont montré que leur nombre augmente dans les noyaux des cellules soumises à une stimulation des synthèses d'ARN (par la cortisone et la réalimentation

faisant suite à une période de jeûne). Inversement, l'injection d' α -amanitine, agent de blocage spécifique de l'ARN polymérase extranucléolaire, provoque une réduction importante des fibrilles périchromatiniennes (PETROV, 1971 ; PETROV et SEKERIS, 1971). Par autoradiographies ultrastructurales effectuées sur des cellules de rein de singe de la lignée BSC₁ marquées pendant 2 mn à l'uridine tritiée, FAKAN et BERNHARD (1971) ont montré que la radioactivité nucléaire se localisait, en plus du compartiment fibrillaire nucléaire, en bordure des masses chromatinienne condensées, c'est-à-dire au niveau des fibrilles périchromatiniennes ; cette constatation renforce encore l'hypothèse de la présence à ce niveau du dARN.

Les résultats des études physico-chimiques réalisées sur l'ARN des particules diffusées sont en faveur de son appartenance à la classe des dARN. Leur composition nucléotidique est de type AU sans toutefois atteindre la valeur théorique $\frac{G + C}{A + U} = 0,73$ calculée d'après celle des ADN totaux. De plus, les ARN des particules se marquent plus rapidement que les ARN restant dans les noyaux après la diffusion. En effet, la radioactivité spécifique des ARN diffusibles, déjà très importante au bout d'une demi-heure, atteint son maximum en une heure de marquage par l'acide radiophosphorique ; alors que les ARN non diffusibles présentent un maximum de radioactivité spécifique après 2 heures de marquage par le même précurseur.

IV - DISCUSSION GENERALE

Les recherches que nous avons effectuées sur la localisation des protéines basiques non liées à l'ADN du noyau et du nucléole et sur les ribonucléoprotéines diffusées de fractions nucléaires isolées, s'inscrivent dans l'ensemble des travaux portant sur l'assemblage des particules ribosomales précurseurs et sa régulation, et sur le transport des ARN du noyau vers le cytoplasme.

1 - Protéines basiques nucléaires non liées à l'ADNa - Existence d'un pool intranucléaire de protéines ribosomales

Les expériences de marquage des protéines au moyen d'acides aminés radioactifs ont permis de révéler l'existence dans le nucléole, d'une partie des protéines ribosomales. WARNER (1966) a montré qu'après un marquage bref, la radioactivité est retrouvée au niveau des ribosomes cytoplasmiques dans un délai de 30 à 120 mn, ce qui suppose que l'assemblage ARN-protéine s'effectue hors du cytoplasme, dans le nucléole, dès la synthèse de l'ARN ribosomal (WARNER et SOEIRO, 1967). Ces protéines ribosomales intranucléolaires représenteraient 60 p. 100 des protéines ribosomales totales.

En stoppant toute nouvelle synthèse protéique par le cycloheximide, après (WARNER et al., 1966) ou avant (WILLEMS et al., 1969 ; CRAIG et PERRY, 1970) un marquage bref de l'ARN par l'uridine radioactive, on note l'apparition dans le cytoplasme, de sous-unités ribosomales renfermant respectivement les ARN marqués 18 S et 28 S.

Ces sous-unités sont capables de former des ribosomes fonctionnels (WARNER et al., 1966). Ainsi en l'absence de synthèses protéiques, les ARN ribosomiaux peuvent s'associer aux protéines ribosomiales ; il existe donc un pool de protéines ribosomiales libres préformées (MADEN, 1971).

b - Existence de protéines basiques liées à l'ARN dans le nucléole

En microscopie optique, des études histo-chimiques réalisées au moyen de colorations spécifiques des protéines basiques ont permis dans certains cas de colorer les nucléoles (BLOCH et HEW, 1960 ; COWDEN, 1963 ; BOLUND et RINGERTZ, 1966). Par l'application de techniques de microfluorescence, MAISEL et LYTLE (1966) ont montré que les nucléoles de cellules de rein de singe cultivées in-vitro réagissent avec une globuline du sérum humain. La présence obligatoire pour la fixation de cette globuline, de son composant acide sialique, a amené les auteurs à établir que le composant nucléolaire fixé est une protéine basique "histone-like".

Certains résultats indiquent qu'au moins une partie des protéines basiques nucléolaires ainsi mises en évidence en microscopie optique sont liées à l'ARN nucléolaire. COWDEN (1963) a en effet montré que la coloration par le Fast-green des protéines basiques des nucléoles des ovocytes d'Amphioxus est dense dans les stades précoces caractérisés par une importante synthèse d'ARN nucléolaire, et décroît ensuite parallèlement au taux de synthèse de l'ARN. De même, SUSKIND (1965) signale que l'incorporation de lysine tritiée dans les nucléoles de cellules HeLa décroît après extraction de l'ARN et est inhibé par un prétraitement des cellules à l'actinomycine D.

Plus récemment, les études chimiques sur les protéines du nucléole et des ribosomes ont permis la mise en évidence dans ces deux structures, de protéines basiques de comportement électrophorétique identique (MUNDELL, 1968 ; IZAWA et KAWASHIMA, 1969). Pour CHOI et al., (1968), ces protéines basiques seraient en partie responsables de la liaison des granules nucléolaires aux sous-structures.

Nos recherches à l'échelle ultrastructurale ont révélé des protéines basiques au niveau des particules ribonucléoprotéiques du nucléole mais ne nous ont pas permis de déceler de différences sur le mode d'association de ces protéines à l'ARN, au niveau des ribosomes cytoplasmiques et des granules nucléolaires. En effet, la présence de groupes phosphates de l'ARN à la surface des particules peut influencer sur leur coloration par une solution de colloïde électronégatif. Ces groupes phosphates ne représentent sur le ribosome cytoplasmique que 20 p. 100 des groupes accessibles sur l'ARN libre (SPIRIN, 1969 b) ; ceci explique en partie l'absence apparente d'action de la RNase sur la coloration des ribosomes cytoplasmiques. Nous avons pu vérifier, sur les granules nucléolaires extraits, que la RNase ne renforce pas la coloration par augmentation de la quantité de particules colloïdales retenues sur les granules. Un travail récent de SMITH et STUART (1971) signale pourtant l'existence probable d'arrangements ARN-protéines différents dans les ribosomes cytoplasmiques et les granules nucléolaires après application d'une imprégnation à l'argent. En effet, le dépôt de grains d'argent au niveau des granules nucléolaires ne se produit plus après extraction de leur ARN, ce qui n'est pas le cas au niveau des ribosomes cytoplasmiques.

c - Les corps pelotonnés

L'existence de protéines basiques dans les corps pelotonnés et dans les nucléoles pose le problème de l'existence d'une éventuelle relation fonctionnelle entre ces deux structures.

Nous avons constaté que les corps pelotonnés sont fréquemment situés à proximité du nucléole, la distance les séparant du périmètre nucléolaire excédant rarement 1 μ . Il est possible que les corps pelotonnés appartiennent au groupe des corps nucléaires bien que ces derniers aient une morphologie souvent très différente (MONNERON et BERNHARD, 1969). Néanmoins, il est intéressant de signaler que les corps nucléaires se rencontrent fréquemment dans des cellules présentant une hyperactivité physiologique ou provoquée, donc dotées d'un système nucléolaire développé (BOUTEILLE et al. 1967). De plus, KIERSZENBAUM (1969) a décrit l'existence de connections reliant le nucléole aux corps nucléaires dans des cellules tumorales de glandes salivaires humaines ; cet auteur en conclut que les corps nucléaires sont constitués de matériel détaché du corps nucléolaire. La mise en évidence récente d'un renouvellement de protéines au niveau des corps nucléaires (BOUTEILLE, 1971 ; DUPUY-COIN, 1971) suggère qu'ils puissent être liés au métabolisme des protéines ribosomales.

d - Régulation de l'association ARN-protéines conduisant à la formation des particules ribosomales précurseurs dans les nucléoles

Ce problème est très difficile à traiter puisqu'il est lié au métabolisme de l'ARN nucléolaire.

Il n'est pas dans notre intention de discuter ici des mécanismes responsables de la répression ou de l'expression des gènes nucléolaires, mais de l'influence des protéines dans la régulation de la formation des sous-unités ribosomales.

Il semble exister une coordination entre la synthèse de l'ARN ribosomal et celle des protéines. L'arrêt des synthèses protéiques par le cycloheximide par exemple, entraîne une modification du métabolisme de l'ARN ribosomal (JACKSON et STUDZINSKI, 1968 ; HIGASHI et al., 1968) pouvant se traduire par une baisse de la synthèse de l'ARN nucléolaire 45 S (CRAIG et PERRY, 1970).

Le manque de certains acides aminés dans le milieu de culture de cellules cultivées in vitro peut provoquer une perturbation dans l'équilibre de la formation des sous-unités ribosomales et dans le métabolisme de l'ARN nucléolaire (MADEN et al., 1969), se traduisant par un excès de l'une ou l'autre des sous-unités ribosomales.

Les protéines jouant ce rôle de régulation font certainement partie du pool ultranucléaire ou intranucléolaire des protéines ribosomales. Très récemment PEDERSON et KUMAR (1971) ont montré que la régulation de la formation des ribosomes dans le nucléole s'effectue au niveau de l'ARN précurseur 45 S et qu'elle est sous la dépendance de certaines protéines ribosomales. GRANICK et GRANICK (1971) ont montré que l'absence d'arginine dans le milieu provoquait une dissociation de la structure nucléolaire. Cette action serait due à un manque en protéines basiques devant se lier à l'ARN nouvellement synthétisé.

L'actinomycine D employée à faibles doses entraîne une baisse du taux de marquage des protéines

ribosomales nucléolaires, CRAIG et PERRY (1971) ont montré qu'il ne s'agissait pas d'une inhibition de leur synthèse mais plutôt d'une dégradation plus rapide de ces protéines du fait de leur non-stabilisation par l'ARN nucléolaire. La révélation, dans les nucléoles de cellules traitées à l'actinomycine D, d'une répartition différente des protéines et notamment des protéines basiques est susceptible d'orienter de nouvelles recherches sur des modèles permettant d'établir les relations existant entre la structure et la fonction.

2 - Transport de l'information du noyau vers le cytoplasme

a - Comparaison des particules obtenues par diffusion, à d'autres particules extraites des noyaux

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, un certain nombre de particules ribonucléoprotéiques ont été extraites des noyaux. Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études morphologiques, ce qui nous permet de les comparer aux particules que nous avons obtenues par diffusion de fractions nucléaires isolées. Cette confrontation facilitera la discussion de leur signification fonctionnelle. Le tableau III p. 109 résume les principales propriétés physico-chimiques des particules obtenues par diffusion.

a) - Particules 40 S de MOULÉ (MONNERON et MOULÉ, 1968)

Sur le plan morphologique, nos particules présentent de nombreuses analogies avec les particules de

TABLEAU III

Principales propriétés physico-chimiques des particules ribonucléoprotéiques obtenues par diffusion à partir de noyaux isolés (d'après DEFERT et KERCKAERT).

	Coefficient de Sédimentation	Densité en CsCl	Contenu en ARN (p. 100)	Contenu en protéines (p. 100)	ARN Prot.	Rapport des bases
Des parti- cules RNP	de l'ARN					$\frac{G + C}{A + U}$ 32P UV
Diffusion dans le milieu n° 2 sans inhibiteur de RNase	45 S 4 S	1,37	27	73	0,37	1 (1 h)
Diffusion dans le milieu n° 2 en présence d'inhibi- teur cytoplasmique de RNase	Population: hétérogène: de 20 S à 90 S envi- ron					0,85

BUS
ILLE

MOULÉ. Leur taille, de 150 Å à 220 Å après inclusion dans l'Epon, est très voisine de celle des particules 40 S observées dans les mêmes conditions (180 Å à 250 Å).

D'autres caractères les rapprochent :

- Leur aspect en réseau lâche après inclusion dans le glycol-methacrylate.
- Leur aspect après colorations négatives et, en particulier, leur résistance à la pénétration du colorant.
- Leur comportement vis à vis des digestions enzymatiques : affaiblissement net de leur contraste après action de la RNase et résistance partielle à la double action pepsine + RNase.
- Bien que nous n'ayons pu mettre en évidence à leur niveau, après colorations positives, la présence de sous-structures, la digestion pepsique provoque la disparition des granules de 150 Å et l'apparition de grains de 50 Å à 100 Å de diamètre, de contraste faible. MONNERON et MOULÉ obtiennent un résultat identique après action de la pronase.

Sur le plan physico-chimique, les analogies résident surtout au niveau de l'ARN des particules. Dans l'un et l'autre cas, il s'agit d'un ARN de faible poids moléculaire (3 à 4 S), ayant une composition en bases se rapprochant de celle des ARN chromosomiques ($\frac{G + C}{A + U}$ voisin de 1), et dont la synthèse est, au moins en partie, résistante à l'action de l'actinomycine D (MOULÉ et al., 1969). L'extraction des particules 40 S de MOULÉ est sensible à la concentration des ions Mg^{2+} du milieu et, au-delà de 5 mM, il n'est plus possible de les obtenir ; par contre nos particules diffusent encore des noyaux en présence

d'une concentration en ions Mg^{2+} égale à 10 mM (DEFERT-KOBUS, 1971) ; il faut néanmoins tenir compte, dans notre cas, de l'action complexante des ions phosphates présents en concentration relativement élevée.

Les études morphologiques conduites par MONNERON et MOULÉ (1968) ont amené ces auteurs à penser que leurs particules 40 S dériveraient des grains interchromatiniens. Nos propres expériences sur les particules 45 S diffusées tendent à montrer qu'elles dérivent des fibrilles périchromatiniennes. Ces origines différentes des 2 types de particules pourraient néanmoins expliquer les analogies morphologiques et physico-chimiques existant entre elles, dans la mesure où des relations ont été observées in situ entre grains interchromatiniens et fibrilles périchromatiniennes (MONNERON et BERNHARD, 1969). Très récemment, FAKAN et BERNHARD (1971) ont montré au moyen d'autoradiographies ultrastructurales que les grains interchromatiniens ne sont certainement pas du même type que les particules 40 S de MOULÉ. En effet, alors que les particules 40 S renferment un ARN rapidement marqué, les grains interchromatiniens des cellules de rein de singe de la lignée BSC₁ cultivées in vitro, ne se marquent pas, ou très peu, après une incubation des cellules pendant 1 h dans un milieu renfermant de l'uridine tritiée, suivie d'une "chasse" de 3 h.

β) - Particules ARN-informofères de GEORGIEV

La morphologie des particules 45 S diffusées est très comparable à celle des monomères de GEORGIEV. Dans les deux cas, l'aspect est identique après inclusion dans l'Epon. Les particules du pic 45 S ont un diamètre légèrement supérieur après colorations négatives, mais elles

présentent la même morphologie ; celle de particules sphériques peu pénétrées par l'agent contrastant. Sur le plan physico-chimique, ces deux types de particules présentent aussi des similitudes : faible densité en CsCl, spectre d'absorption identique en lumière ultraviolette et sensibilité à la digestion à la RNase.

Les différences les plus caractéristiques portent sur le coefficient de sédimentation (30 S pour les monomères de GEORGIEV) et sur l'ARN. Dans le cas des particules 45 S diffusées, l'ARN présente un coefficient de sédimentation de 4 S alors qu'il est de 8 S dans les monomères. En plus, l'ARN des monomères est de type ADN plus prononcé puisque le rapport des bases $\frac{G + C}{A + U}$ atteint 0,79.

Il est cependant important de noter que lorsque la diffusion est effectuée en présence d'inhibiteur de RNase, on observe l'apparition d'une zone plus lourde en gradient de sédimentation. Cette zone renferme des particules présentant les mêmes caractéristiques morphologiques que celles des polymères de GEORGIEV (assemblages de plusieurs particules). En outre, l'étude de la composition de ces fractions supérieures à 45 S effectuée actuellement par Madame DEFERT-KOBUS, révèle la présence d'ARN de masse moléculaire plus élevée et de composition en bases de type ADN plus marqué ($\frac{G + C}{A + U} = 0,85$) (Tableau III ; p. 109).

8) - Avec les structures ribonucléoprotéiques de SADOWSKI (LAWFORD et al., 1967 ; SADOWSKI et HOWDEN, 1968).

Ces auteurs ont extrait des noyaux de foie de Rat, une fraction ribonucléoprotéique caractérisée

morphologiquement par l'association, en grappes ou en chaînettes, de particules de 200 Å de diamètre (LAWFORD et al., 1967). Des filaments de 40 Å à 100 Å de diamètre semblent unir ces particules. Certaines des associations granules-filaments décrites par ces auteurs, ressemblent aux images que nous obtenons après étalement sur film protéique de la fraction RN₂. Les agrégats particuliers en grappes ou en chaînettes sont aussi très semblables à ceux que nous avons décrits après coloration positive de la fraction lourde, obtenue en présence d'inhibiteur de RNase.

Peu de caractères physico-chimiques ayant été déterminés par les auteurs, il est difficile de savoir si ces ribonucléoprotéines présentent d'autres points communs avec les particules 45 S diffusées.

b - Le dARN

De nombreuses expériences ont montré que la majorité du dARN, de coefficient de sédimentation hétérogène s'étalant de 20 S à 100 S, était métabolisé dans le noyau et n'était pas transféré dans le cytoplasme (WARNER et al., 1966 b ; SOEIRO et al., 1968 b ; voir DARNELL, 1968). Une grande partie du dARN est donc dégradée dans le noyau (HARRIS, 1963 a et 1963 b ; SCHERRER et al., 1963 ; SCHERRER et Mc CARTHY, 1967). Les expériences d'hybridation compétitive de l'ADN avec le dARN nucléaire et avec le mARN cytoplasmique, ont montré que celui-ci n'est compétitif que d'une partie du dARN (GEORGIEV, 1966). Ce résultat a amené GEORGIEV à poser en hypothèse l'existence de 2 classes de dARN : le dARN₁ précurseur du mARN et le dARN₂ restant dans le noyau où il est dégradé sur place. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer les relations existant entre le dARN et le mARN (DARNELL, 1968) :

- une partie seulement de chaque molécule de dARN donnera le mARN,

- une fraction seulement des molécules de

dARN synthétisées est entièrement, ou en partie, transférée vers le cytoplasme pour donner le mARN.

c - Transfert du mARN du noyau vers le cytoplasme

La mise en évidence dans le cytoplasme de cellules d'origines diverses, de particules ribonucléoprotéiques renfermant un ARN ribosomal associé à un ARN de type dARN ont conduit de nombreux auteurs à penser que le mARN est transporté dans le cytoplasme, associé à la petite sous-unité ribosomale (JOKLIK et BECKER, 1965 ; Mc CONKEY et HOPKINS, 1965 ; HENSHAW et al., 1965 ; HENSHAW, 1966) sous la forme de particules 40 - 45 S. Cette hypothèse pouvait expliquer les travaux de HARRIS (1960 ; 1963 a et b) et HARRIS et al., (1969) sur des hétérocaryons. En fait, PERRY et KELLEY (1966) ont montré que ces particules 40 - 45 S ont une densité, mesurée en gradients de CsCl, plus faible que celle de la petite sous-unité ribosomale.

Le mARN migre donc vers le cytoplasme, soit sous forme d'un ARN hybride, constitué d'ARN ribosomal et de mARN (HADJOLOV, 1967) associés à un composant protéique, soit sous forme d'une particule mARN-protéine. C'est cette dernière hypothèse qui semble la plus vraisemblable depuis les travaux de SPIRIN et al. (1969 b) et la mise en évidence des informosomes dans des extraits cytoplasmiques d'embryons de poissons.

Dans les cellules de mammifères, de telles particules mARN-protéines ont été mises en évidence dans le cytoplasme (SAMEC et al., 1968 ; QUIRIN et MANDEL, 1969 ; CARTOUZOU et al., 1969 ; HENSHAW et LOEBENSTEIN, 1970 ; SPOHR et al., 1970) et dans le noyau (voir Généralités).

d - Signification biologique des particules de dRNP nucléaires obtenues par diffusion

L'ensemble de nos résultats physico-chimiques et morphologiques peuvent se résumer de la façon suivante :

- La diffusion des particules se traduit morphologiquement par une perte importante des fibrilles périchromatiniennes du noyau et par la disparition d'une partie des ribonucléoprotéines nucléolaires.

- Ces particules présentent de nombreuses analogies avec les particules ARN-informofères de GEORGIEV et avec celles de MOULÉ.

- L'ARN des particules est de type dARN et présente un coefficient de sédimentation de 4 S. Sa composition en bases reste inchangée après action de l'actinomycine D.

- L'emploi d'inhibiteur de RNase dans le milieu de diffusion provoque l'apparition d'une fraction ribonucléoprotéique de coefficient de sédimentation supérieur à 45 S et renfermant des ARN de plus grande masse moléculaire.

Le coefficient de sédimentation de l'ARN des particules diffusées est inférieur à celui de l'ensemble des dARN, dont la radioactivité, après une heure de marquage au radiophosphate, se situe dans la zone 25 - 30 S des gradients. Des ARN de faible poids moléculaire (voisins de 4 S) ont été identifiés dans les particules de MOULÉ et dans le pic ribonucléoprotéique b de FAIFERMAN et al. (1970), obtenu par extraction du nucléoplasme de noyaux de cellules hépatiques de Rat.

- Par les nombreux caractères communs existant entre les particules diffusées et celles de GEORGIEV, il est possible que les particules diffusées correspondent aux monomères décrits par SAMARINA et al. (1968). L'ARN 4 S qu'elles renferment peut représenter des fragments d'une molécule plus longue les reliant entre elles. Dans ce cas, nos conditions de diffusion représenteraient l'accroissement d'un phénomène biologique se produisant in vivo, puisque les dARN informofères sont supposés être les formes de transport du mARN.

- Il est possible aussi que les particules diffusées fassent partie de cette classe de dARN non transférés dans le cytoplasme et restant dans le noyau où ils sont dégradés.

Selon GEORGIEV (1969) cette classe d'ARN représenterait la fraction non informationnelle du dARN et proviendrait de la transcription de la zone accepteur de l'opéron. Les expériences préliminaires, réalisées par KERCKAERT sur un système acellulaire de foie de Rat incorporant les acides aminés, semblent confirmer cette dernière hypothèse. En effet, l'ARN des particules 45 S semble incapable de stimuler une synthèse protéique. Le même résultat négatif a été obtenu par MOULÉ et al. (1969) avec l'ARN des particules 40 S, aussi bien dans un système acellulaire de foie de Rat que de Escherichia coli.

Comme le signalent GEORGIEV (1966) et SCHERRER et Mc CARTHY (1967), ces ARN non informationnels pourraient avoir des fonctions de régulation au niveau de la transcription et au cours des différentes étapes qui la suivent si on se réfère à l'hypothèse de la régulation en cascade de l'expression du génome (SCHERRER et al., 1971). Les modifications du nucléole, observées dans les

noyaux après la diffusion peuvent être interprétées comme l'expression d'un rôle au moins indirect de cet organe dans le transport des ARN. Bien que la plupart des auteurs s'accordent à dire que le mARN migre vers le cytoplasme sans association à l'ARN ribosomal, on ne peut exclure la possibilité que les sous-unités ribosomales nucléaires ou l'un de leurs composants ne puissent jouer un rôle de régulation ou d'adaptation au cours d'une des phases de la chaîne s'étendant de la transcription à l'entrée du mARN dans le cytoplasme (SPOHR et al., 1970 ; HARRIS, 1971).

V - CONCLUSIONS

Nos recherches nous ont amené à mettre au point une technique de révélation des protéines basiques à l'échelle ultrastructurale dont l'application nous a permis de préciser la cytochimie du noyau de la cellule hépatique de Rat.

A - La révélation des protéines basiques au microscope électronique, fondée sur la mise en évidence des groupements de point isoionique élevé par capture à leur niveau d'un colloïde électronégatif de fer, nous a permis, par l'emploi de digestions à la DNase, de révéler préférentiellement les histones. Dans certaines conditions et notamment en tenant compte de l'interférence des groupements acides étrangers, nous avons révélé les protéines basiques non liées à l'ADN. Cette méthode nécessite l'emploi de coupes effectuées au cryostat, sur lesquelles agit la solution de coloration. La généralisation des techniques récentes de coupes ultra-fines à congélation permettra sans doute une meilleure utilisation de cette technique.

B - Nous avons révélé la présence de protéines basiques au niveau des ribonucléoprotéines nucléolaires. Celles-ci se colorent, par notre technique, de la même façon que les ribosomes cytoplasmiques, ce qui renforce la thèse de l'association, dans le nucléole, des ARN ribosomaux aux protéines ribosomales. En plus des mécanismes moléculaires de répression et d'expression des gènes de l'organisateur nucléolaire, le fait que les protéines et en particulier les protéines ribosomales puissent jouer un rôle de régulation dans le métabolisme des ARN nucléolaires, nous

permet de supposer que les protéines basiques, associées à l'ARN dès sa synthèse dans le nucléole, participent aux différentes étapes de cette régulation et notamment à la stabilisation des ribonucléoprotéines et à leur transport vers le cytoplasme. Ces protéines peuvent en effet être responsables des forces maintenant les complexes macromoléculaires fibrillaires et granulaires en équilibre avec la chromatine intranucléolaire dont l'importance a été signalée à propos de lésions du métabolisme des ARN nucléolaires. Cette hypothèse s'appuie sur l'étude cytochimique des nucléoles lésés par action de l'actinomycine D au cours de laquelle nous avons observé une modification des concentrations en protéines basiques des compartiments fibrillaires et granulaires ségrégatifs. Cette modification est liée à l'arrêt des synthèses d'ARN, à la rétraction de la chromatine intranucléolaire et peut-être au retard du transport vers le cytoplasme des ARN synthétisés avant action de l'antibiotique.

C - La mise en évidence de protéines basiques au niveau des corps pelotonnés permet de poser le problème des relations éventuelles de ces ribonucléoprotéines avec le nucléole.

D - Le transport de ribonucléoprotéines nucléaires vers le cytoplasme a été abordé artificiellement dans des fractions nucléaires isolées incubées en présence de phosphates. Cette étude nous a permis de caractériser une catégorie de dRNP issues des fibrilles périchromatiniennes. Ces particules pourraient représenter une forme de transport du dARN informationnel vers le cytoplasme ou une forme de ribonucléoprotéines non informationnelles pouvant jouer un rôle de régulation dans le métabolisme des ARN nucléaires. Les expériences effectuées actuellement sur des systèmes

acellulaires incorporant in vitro les acides aminés ainsi que l'emploi de conditions de diffusion se rapprochant des conditions physiologiques, devraient permettre de résoudre le problème de la signification fonctionnelle de ces dRNP.



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

- 1 - ALFERT M. et GESCHWIND I.I., 1953 - A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 39, 991-999.
- 2 - ALBERTINI L., 1959 - Etude cytophotométrique des protéines-SH nucléolaires de la racine de Jacinthe ; répartition précise de ces composés au sein du nucléole. C.R. Acad. Sci., 298, 3976-3978.
- 3 - BACHELLERIE J.P., MARTIN-PREVEL C. et ZALTA J.P., 1971 - Cinétique de l'incorporation d'uridine (³H) dans des fractions subnucléolaires de cellules d'hépatome ascitique du Rat. Biochimie, 53, 383-389.
- 4 - BERNHARD W., 1959 - Ultrastructural aspects of nucleocytoplasmic relationship. Exptl. Cell Res., Suppl. 6, 17-50.
- 5 - BERNHARD W., 1969 - A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res., 27, 250-265.
- 6 - BERNHARD W., BAUER A., GROPP A., HAGUENAU F. et OBERLING C., 1955 - L'ultrastructure du nucléole de cellules normales et cancéreuses. Exptl. Cell Res., 9, 88-100.
- 7 - BERNHARD W., GRANBOULAN N., 1968 - The nucleolus in Vertebrate cells, in The Cell Nucleus. DALTON and HAGUENAU (ed.) Academic Press, New-York London, 81-149.
- 8 - BERNHARD W., HAGUENAU F. et OBERLING C., 1952 - L'ultrastructure du nucléole de quelques cellules animales, révélée par le microscope électronique. Experientia, 8, 58-59.

- 9 -- BLACK M.M. et ANSLEY H.R., 1966 - Histone specificity revealed by ammoniacal silver staining. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 177-187.
- 10 - BLANQUET P., PUVION E. et DRIESSENS J., 1970 - Localisation ultrastructurale, avec contrôle microspectrophotométrique, des sialoglycoconjugués de la membrane plasmique cellulaire par la méthode fondée sur la capture de l'hydroxyde de fer colloïdal. *C.R. Acad. Sci.*, 271 (D), 96-99.
- 11 - BLOBEL G. et POTTER V.R., 1966 - Nuclei from Rat liver : Isolation method that combines purity with high yield. *Sciences*, 154, 1662-1665.
- 12 - BLOCH D.P. et HEW H.Y., 1960 - Changes in nuclear histones during fertilization and early embryonic development in the pulmonate SNAIL *Helix aspersa*. *Biophys. Biochem. Cytol.*, 8, 69-81.
- 13 - BOLUND L. et RINGERTZ N.R., 1966 - Intracellular distribution of histone-like proteins in *Tetrahymena pyriformis*. *Exptl. Cell Res.*, 44, 606-613.
- 14 - BORYSKO E. et BANG F.B., 1951 - Structure of the nucleolus as revealed by the electron microscope. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 89, 468-471.
- 15 - BOUTEILLE M., 1971 - Etude quantitative par autoradiographie ultrastructurale de la migration de protéines dans le noyau. Colloque Annuel de la Société Française de Microscopie Electronique Caen 1971. *J. Microscopie*, 11, 32.
- 16 - BOUTEILLE M., KALIFAT S.R. et DELARUE J., 1967 - Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases. *J. Ultrastruct. Res.*, 19, 474-486.

- 17 - BRAM S. et RIS H., 1971 - On the structure of nucleohistone. *J. Mol. Biol.*, 55, 325-336.
- 18 - BROWN D.D. et WEBER C.S., 1968 - Gene linkage by RNA-DNA hybridization. II - Arrangement of the redundant gene sequences for 28 S and 18 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, 34, 681-697.
- 19 - BUSCH H., 1965 - Histones and other nuclear proteins. BUSCH (ed.) Academic Press, New-York London.
- 20 - BUSCH H., DESJARDINS R., GROGAN D., HIGASHI K., JACOB S.T., MURAMATSU M., RO T.S. et STEELE W.J., 1966 - Composition of nucleoli isolated from Mammalian cells. *J. Natl. Cancer Inst. Monog.*, 23, 193-212.
- 21 - BUSCH H., MURAMATSU M., ADAMS H.R., SMETANA K., STEELE W.J. et LIAU M.C., 1963 - Isolation of nucleoli. *Exptl. Cell Res. Suppl.* 9, 150-163.
- 22 - BUSCH H. et SMETANA K., 1970 - The nucleolus. Academic Press (ed.) New-York London.
- 23 - CARTOUZOU G., POIREE J.C. et LISSITZKY S., 1969 - Rapidly labelled Ribonucleic Acid-protein Complexes of the Thyroid Tissue. *European. J. Biochem.*, 8, 357-369.
- 24 - CASPERSSON T.D., 1950 - Cell growth and cell function. A cytochemical study. Norton (ed.), New-York.
- 25 - CHAKRAVORTY A.K. et BUSCH H., 1967 - Alkaline ribonuclease and ribonuclease inhibitor in nuclear and nucleolar preparations from normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.*, 27, 780-792.

- 26 - CHAUVEAU J., MOULÉ Y. et ROUILLER C., 1956 - Isolation of pure and unaltered liver nuclei : morphology and biochemical composition. Exptl. Cell Res., 11, 317-321.
- 27 - CHOI Y.C. et BUSCH H., 1969 - Effects of actinomycin D on the oligonucleotide composition of nucleolar 45 S RNA of Novikoff hepatoma ascites cells. Biochim. Biophys. Acta., 174, 766-769.
- 28 - CHOI Y.C., SMETANA K. et BUSCH H., 1968 - Studies on RNA isolated from nucleolar fractions of Novikoff hepatoma cells by sequential extractions with dilute and concentrated salt solutions. Exptl. Cell Res., 53, 582-602.
- 29 - COLMANT P., 1960 - Chimie générale et abrégé de chimie minérale. Masson et Cie (éd.) Paris, 506.
- 30 - COWDEN R.R., 1963 - Cytochemical studies of oocyte growth in the lancelet Branchiostoma caribaeum Z. Zellforsch., 60, 399-408.
- 31 - CRAIG N.C. et PERRY R.P., 1970 - Aberrant intranucleolar maturation of ribosomal precursors in the absence of protein synthesis. J. Cell Biol., 45, 554-564.
- 32 - CRAIG N. et PERRY R.P., 1971 - Persistent cytoplasmic synthesis of ribosomal proteins during the selective inhibition of ribosomal RNA synthesis. Nature, 229, 75-80.
- 33 - CURRAN R.C., CLARK A.E. et LOVELL D., 1965 - Acid mucopolysaccharides in electronmicroscopy. The use of the colloidal iron method. J. Anat., 99, 427-435.

- 34 - DARNELL J.E., 1968 - Ribonucleic acids from Animal cells. *Bacter. Reviews*, 32, 262-290.
- 35 - DAUTA-MENTRÉ P., 1964 - Action des ions calcium et potassium sur la morphologie ultrastructurale des noyaux isolés de rein de Rat. *J. Microscopie*, 3, 607-626.
- 36 - DAVIES J.M.G., 1960 - The ultrastructure of Mammalian Nucleolus. In "The cell Nucleus" Mitchell (ed.) Butterworth London, 3-21.
- 37 - DEFERT-KOBUS W., 1971 - Isolement et étude physico-chimique de particules de rRNP obtenues par diffusion libre à partir de noyaux isolés d'hépatocytes de Rat. Thèse doctorat Sciences Naturelles. Lille.
- 38 - DEFERT-KOBUS W., KERCKAERT J.P., SEGARD E. et MONTREUIL J., 1968 - Etude sur les acides nucléiques spontanément diffusibles des noyaux isolés d'hépatocytes de Rat. Caractérisation de deux types de particules sédimentables et mise en évidence de formes conjuguées d'ARN de type messenger. *C.R. Acad. Sci.*, 266, 31-33.
- 39 -- DEFERT-KOBUS W., SEGARD E. et MONTREUIL J., 1965 - Etude de la diffusion des composés phosphorylés des noyaux, des mitochondries et des microsomes dans diverses solutions utilisées pour le fractionnement cellulaire. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, XLVII, 2293-2306.

- 40 - DEFERT-KOBUS W., SEGARD E. et MONTREUIL J., 1966 -
Etude sur les acides ribonucléiques spontanément diffusibles des noyaux isolés des hépatocytes de Rat. Caractérisation des acides ribonucléiques messagers et de "ribosomes nucléaires". C.R. Acad. Sci., 263, 842-845.
- 41 - DEITCH A.D., 1961 - An improved Sakaguchi reaction for microspectrophotometric use. J. Histochem. Cytochem., 9, 477-483.
- 42 - DESJARDINS R., SMETANA K. et BUSCH H., 1965 - A large scale procedure for isolation of nucleoli from Rat liver. Exptl. Cell Res., 40, 127-137.
- 43 - DUPUY-COIN A.M., 1971 - Renouvellement des protéines dans les corps nucléaires ("Nuclear bodies") étudié par autoradiographie ultrastructurale. Colloque annuel de la Société Française de Microscopie Electronique Caen 1971. J. Microscopie, 11, 49.
- 44 - ESTABLE C. et SOTELO J.R., 1951 - Una nueva estructura celular : el Nucleolonema. Publ. Inst. Invest. Sci. Biol., 1, 105-126.
- 45 - FAIFERMAN I., HAMILTON M.G. et POGO A.O., 1970 - Nucleoplasmic Ribonucleoprotein particles of Rat liver. I - Selective degradation by nuclear nucleases. Biochim. Biophys. Acta, 204, 550-563.
- 46 - FAIFERMAN I., HAMILTON M.G. et POGO A.O., 1971 - Nucleoplasmic Ribonucleoprotein particles of Rat liver. II - Physical properties and action of dissociating agents. Biochim. Biophys. Acta, 232, 685-695.

- 47 - FAKAN S. et BERNHARD W., 1971 - Localisation of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Explt. Cell Res.*, 67, 129-141.
- 48 - FIRKET H. et GRANBOULAN P., 1963 - Electron microscope autoradiographs of tritiated uridine incorporation. *J. Roy. Microscop. Soc.*, 81, 227-228.
- 49 - FISCHER E.R. et LILLIE R.D., 1957 - The effect of methylation on basophilia. *J. Histochem. Cytochem.*, 2, 81-87.
- 50 - FRANKE W.W. et SCHEER U., 1970 - The ultrastructure of the nuclear envelope of amphibian oocytes : a reinvestigation. II - The immature oocyte and dynamic aspects. *J. Ultrastruct. Res.*, 30, 317-327.
- 51 - FRENCH D. et EDSALL J.T., 1945 - The reactions of formaldehyde with amino-acids and proteins. *Adv. in protein Chemistry*, 2, 277-335.
- 52 - GASIC G. et BERWICK L., 1963 - Hale stain for sialic acid containing mucins. Adaptation to electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 19, 223-230.
- 53 - GASIC G.J., BERWICK L. et SORRENTINO M., 1968 - Positive and negative colloidal iron as cell surface electron stain. *Laboratory Investigation*, 18, 63-71.
- 54 - GEORGIEV G.P., 1966 - Nuclear ribonucleic acids. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Davidson and Cohn (ed.), Academic Press, New-York - London, 6, 259-345.

- 55 - GEORGIEV G.P., 1969 - On the structural organization of operon and the regulation of RNA synthesis in Animal cells. J. Theoret. Biol., 25, 473-490.
- 56 - GEORGIEV G.P., LUKANIDIN E.M. et RYSKOV A.P., 1971 - On the mechanisms in the biosynthesis and transport of messenger RNA in Eukaryotes. Abstr. Commun. 7th Meet. Biochem. Soc. VARNA 1971, p. 17.
- 57 - GEUSKENS M. et BERNHARD W., 1966 - Cytochimie ultrastructurale du nucléole. III - Action de l'actinomycine D sur le métabolisme du RNA nucléolaire. Exptl. Cell Res., 44, 579-598.
- 58 - GHOSH S., LETTRE R. et GHOSH I., 1969 - On the composition of the nucleolus with special reference to its filamentous structure. Z. Zellforsch., 101, 254-265.
- 59 - GIRARD M., PENMAN S. et DARNELL J.E., 1964 - The effect of actinomycin on ribosome formation in HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 51, 205-211.
- 60 - GOLDBLATT P.J. et SULLIVAN R.J., 1970 - Sequential morphological alterations in hepatic cell nucleoli induced by varying doses of actinomycin D. Cancer Res., 30, 1349-1356.
- 61 - GOLDBLATT P.J., SULLIVAN R.J. et FARBER E., 1969 - Morphologic and metabolic alterations in hepatic cell nucleoli induced by varying doses of actinomycin D. Cancer Res., 29, 124-135.

- 62 - GONZALEZ-RAMIREZ J., 1959 - Etudes sur l'ultrastructure du nucléole. I - Cellules des organes hématopoïétiques normaux et pathologiques. Revue d'Hématologie, 14, 333-343.
- 63 - GRANBOULAN N. et BERNHARD W., 1961 - Cytochimie ultrastructurale. Exploration des structures nucléaires par digestion enzymatique. C.R. Soc. Biol., 155, 1767-1779.
- 64 - GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P., 1964 - Cytochimie ultrastructurale du nucléole. I - Mise en évidence de chromatine à l'intérieur du nucléole. Exptl. Cell Res., 34, 71-87.
- 65 - GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P., 1965 - Cytochimie ultrastructurale du nucléole. II - Etude des sites de synthèse du RNA dans le nucléole et le noyau. Exptl. Cell Res., 38, 604-619.
- 66 - GRANICK S. et GRANICK D., 1971 - Nucleolar necklaces in Chick embryo myoblasts formed by lack of arginine. J. Cell Biol., 51, 636-642.
- 67 - GROGAN D.E., DESJARDINS R. et BUSCH H., 1966 - Protéines nucléolaires du foie de Rat et de la tumeur de Walker. Cancer Res., 26, 775-779.
- 68 - HADJIOLOV A.A., 1967 - An endomessenger hypothesis on the mechanism of information transfer in Animal cells. J. Theoret. Biol., 16, 229-250.

- 69 - HARRIS C., REDDY J. et SVOBODA D., 1968 - Isolation and ultrastructure of nucleoli altered in vivo. Exptl. Cell Res., 51, 268-274.
- 70 - HARRIS H., 1960 - The relationship between the synthesis of protein and the synthesis of ribonucleic acid in the connective tissue cell. Biochem. J., 74, 276-279.
- 71 - HARRIS H., 1963 a - Rapidly labelled ribonucleic acid in the cell nucleus. Nature, 198, 184-185.
- 72 - HARRIS H., 1963 b - Nuclear ribonucleic acid. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Davidson and Cohn (ed.), Academic Press, New-York - London, 6, 19-59.
- 73 - HARRIS H., 1971 - The expression of genetic information : a study with hybrid Animal cells. The Harvey Lectures 1969-1970. Academic Press, New-York - London, 1-32.
- 74 - HARRIS H., SIDEBOTTOM E., GRACE D.M. et BRAMWELL M.E., 1969 - The expression of genetic information : a study with hybrid Animal cells. J. Cell Sci., 4, 499-525.
- 75 - HAZEL F. et AYRES G.H., -1931 - Migration studies with ferric oxide sols. II - Negative sols. J. Phys. Chem., 35, 3148.
- 76 - HENSHAW E.C., 1966 - Messenger RNA in Mammalian Cells. The cell Nucleus. Metabolism and radiosensitivity. Taylor and Francis (ed.) London, 53-63.

- 77 - HENSHAW E.C. et LOEBENSTEIN J., 1970 - Rapidly labeled polydisperse RNA in rat liver cytoplasm. Evidence that it is contained in ribonucleoprotein particles of heterogeneous size. *Biochim. Biophys. Acta*, 199, 405-420.
- 78 - HENSHAW E.C., REVEL M. et HIATT H.H., 1965 - A cytoplasmic particle bearing messenger ribonucleic acid in Rat liver. *J. Mol. Biol.*, 14, 241-256.
- 79 - HIGASHI K., MATSUHISA T., KITAO A. et SAKAMOTO Y., 1968 - Selective suppression of nucleolar RNA metabolism in the absence of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 166, 388-393.
- 80 - HOLTZMAN E., SMITH I. et PENMAN S., 1966 - Electron microscopic studies of detergent treated HeLa cell nuclei. *J. Mol. Biol.*, 17, 131-135.
- 81 - HYDE B.B., SHANKARANARAYAN K. et BIRNSTIEL M.L., 1965 - Observations on fine structure in pea nucleoli, in situ and isolated. *J. Ultrastruct. Res.*, 12, 652-667.
- 82 - HYMER W.C. et KUFF E.L., 1964 - Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X 100. *J. Histochem. Cytochem.*, 12, 359-363.
- 83 - ISHIKAWA K., KURODA C. et OGATA K., 1969 - Release of ribonucleoprotein particles containing rapidly labeled ribonucleic acid from Rat liver nuclei. Effect of adenosine 5'-triphosphate and some properties of the particles. *Biochim. Biophys. Acta*, 179, 316-331.

- 84 - ISHIKAWA K., KURODA C. et OGATA K., 1970 a - Messenger ribonucleoprotein complexes released from rat liver nuclei by ATP. II - Chemical and metabolic properties of the protein moiety of messenger ribonucleoprotein complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 213, 505-512.
- 85 - ISHIKAWA K., KURODA C., UEKI M. et OGATA K., 1970 b - Messenger ribonucleoprotein complexes released from Rat liver nuclei by ATP. I - Characterization of the RNA moiety of messenger ribonucleoprotein complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 213, 495-504.
- 86 - ISHIKAWA K., UEKI M., NAGAI K. et OGATA K., 1970 c - Incorporation of nuclear rapidly labeled RNA into polysomes in the reconstructed system of Rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 213, 542-544.
- 87 - IZARD J. et BERNHARD W., 1962 - Analyse ultrastructurale de l'argentophilie du nucléole. *J. Microscopie* 1., 421-433.
- 88 - IZAWA M. et KAWASHIMA K., 1967 - RNA synthesis in the nucleoli of Mouse ascites tumor cells in relation to nucleolar components. *Biochim. Biophys. Acta*, 155, 51-62.
- 89 - IZAWA M. et KAWASHIMA K., 1969 - Some properties of ribonucleoprotein particles in the isolated nucleoli of Mouse Ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 124-136.

- 90 - JACKSON L.G. et STUDZINSKI G.P., 1968 - Autoradiographic studies of the effects of inhibitors of protein synthesis on RNA synthesis in HeLa cells. *Exptl. Cell Res.*, 52, 408-418.
- 91 - JACOB J. et SIRLIN J.L., 1964 - Electron microscope studies on salivary gland cells. The nucleus of Smittia parthenogenetica (chironomidae) with special reference to the Nucleolus and the effects of actinomycin thereon. *J. Ultrastruct. Res.*, 11, 315-328.
- 92 - JEZEQUEL A.M. et BERNHARD W., 1964 - Modifications ultrastructurales du pancréas exocrine de Rat sous l'effet de l'actinomycine D. *J. Microscopie*, 3, 279-296.
- 93 - JEZEQUEL A.M. et MARINOZZI V., 1963 - A propos de certains composants granulaires du noyau révélés par la fixation aux aldehydes. *J. Microscopie*, 2, 34.
- 94 - JOKLIK W.K. et BECKER Y., 1965 - Studies on the genesis of polyribosomes. I - Origin and signifiante of the subribosomal particles. *J. Mol. Biol.*, 13, 496-510.
- 95 - KAYE J.S., 1969 - The ultrastructure of chromatin in nuclei of interphase cells and in spermatids. *Handbook of Molecular Cytology*. North-Holland Publishing Company Amsterdam-London, 362.

- 96 - KEMPF J. et MANDEL P., 1969 - Caractères des RNA synthétisés en présence d'actinomycine D dans le plasmocytome de la souris. Bulletin Soc. Chimie Biol., 51, 1121-1138.
- 97 - KESSEL R.G., 1964 - Electron microscopy on oocytes of an echinoderm, Thyrene briareus, with special reference to origin and structure of the annulate lamellae. J. Ultrastruct. Res., 10, 498-514.
- 98 - KESSEL R.G., 1966 - An electron microscope study of nuclear-cytoplasmic exchange in oocytes of Ciona intestinalis. J. Ultrastruct. Res. 15, 181-196.
- 99 - KIERSZENBAUM A.L., 1969 - Relationship between nucleolus and nuclear bodies in human mixed salivary tumors. J. Ultrastruct. Res., 29, 459-469.
- 100 - KLEINSCHMIDT A.K., LANG D., JAGHERTS D. et ZAHN R.K., 1962 - Preparation and length measurement of the total DNA content of T₂ bacteriophage. Biochim. Biophys. Acta, 61, 857-863.
- 101 - KÖHLER K. et ARENDS S., 1968 - Particles of nuclear origin carrying rapidly labelled RNA. European J. Biochem., 5, 500-506.
- 102 - KOPAC M.J. et MATEYKO G.M., 1964 - Nucleolar chromosomes : structures, interactions and perspectives. Advan. Cancer. Res., 8, 121-190.

- 103 - KOSHIBA K., SMETANA K. et BUSCH H., 1970 - On the ultrastructural cytochemistry of nuclear pores in Novikoff hepatoma cells. *Exptl. Cell Res.*, 60, 199-209.
- 104 - KOSHIBA K., THIRUMALACHARY C., DASKAL Y. et BUSCH H., 1971 - Ultrastructural and biochemical studies on ribonucleoprotein particles from isolated nucleoli of thioacetamide-treated Rat liver. *Exptl. Cell Res.*, 68, 235-246.
- 105 - KUHN K., HOFFMAN U. et GRASSMANN W., 1956 - Querstreifung und Perjodat Silberurotropin Reaction bei verschiedenen Kollagenarden. *Z. Naturforsch.* 11, 551-558.
- 106 - KUME F., MARUYAMA S., D'AGASTINO A.N. et CHIGA M., 1967 - Nucleolar changes produced by mithramycin in Rat hepatic cells. *Exptl. Mol. Pathol.*, 6, 254-260.
- 107 - LAWFORD G.R., SADOWSKI P. et SCHAFTER H., 1967 - Use of a ribonuclease inhibitor from Rat liver supernatant fraction in the preparation of polyribosome-like particles from isolated Rat liver nuclei. *J. Mol. Biol.*, 23, 81-87.
- 108 - LEDUC E.H. et BERNHARD W., 1967 - Recent modifications of the glycol-methacrylate embedding procedure. *J. Ultrastruct. Res.*, 19, 196-199.
- 109 - LETTRÉ R. et SIEBS W., 1961 - Some studies of the nucleolus of cells cultivated in vitro. *Pathologie et Biologie*, 9, 819-823.

- 110 - LETTRE R., SIEBS W. et PAWELETZ N., 1966 - Morphological observations on the nucleolus of cells in tissue culture, with special regard to its composition. J. Natl. Cancer Inst. Monog. n° 23, 107-124.
- 111 - LEWIN S., 1969 - Ionic linkages in protein interactions. J. Theoret. Biol., 23, 279-284.
- 112 - LIAU M.C., et PERRY R.P., 1969 - Ribosome precursor particles in nucleoli. J. Cell Biol., 42 272-283.
- 113 - LILLIE R.D., 1958 - The Nile blue reaction of peptic gland zymogen granules : the effect of methylation and alkalidemethylation. J. Histochem. Cytochem., 6, 130-132.
- 114 - LISON L., 1960 - Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes. Gauthier-Villards, (éd.) Paris (2 volumes).
- 115 - LUFT J.H., 1961 - Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 409-414.
- 116 - Mc CONKEY E.H. et HOPKINS J.N., 1965 - Subribosomal particles and the transport of messenger RNA in HeLa cells. J. Mol. Biol., 14, 257-270.
- 117 - Mc RAE E.K. et MEETZ G.D., 1970 - Electron microscopy of the ammoniacal silver reaction for histones in the erythropoietic cells of the chick. J. Cell Biol., 45, 235-245.

- 118 - MADEN B.I.H., 1971 - The structure and formation of ribosomes in animal cells. Progress in Biophysics and Molecular Biology, Butler and Noble (ed.) Pergamon Press Oxford, 22, 129-177.
- 119 - MADEN B.I.H., VAUGHAN M.H., WARNER J.R. et DARNELL J.E., 1969 - Effects of valine deprivation on ribosome formation in HeLa cells. J. Mol. Biol., 45, 265-275.
- 120 - MAISEL J.C. et LYTLE R.I., 1966 - Affinity of animal cell nucleoli for normal serum. Preliminary characterization of serum and cell components J. Cell Biol., 29, 461-473.
- 121 - MAND Y., 1966 - Role of a Trypsin-like protease in "informosomes" in a trigger mechanism of activation of protein synthesis by fertilization in sea urchin eggs. Bioch. Biophys. Res. Comm., 25, 216-221.
- 122 - MARINOZZI V., 1963 - The role of fixation in electron staining. J. Roy. Microscop. Society, 81, 141-154.
- 123 - MARINOZZI V., 1964 - Cytochimie ultrastructurale du nucléole. RNA et protéines intranucléolaires. J. Ultrastruct. Res., 10, 433-456.
- 124 - MARINOZZI V. et BERNHARD W., 1963 - Présence dans le nucléole de deux types de ribonucléoprotéines morphologiquement distinctes. Exptl. Cell Res., 32, 595-598.

- 125 - MARINOZZI V. et GAUTIER A., 1962 - Fixations et colorations. J. Ultrastruct. Res., 7, 936-951.
- 126 - MILLER O.L., HAMKALO B.A. et THOMAS C.A., 1970 - Visualization of bacterial genes in action. Science, 169, 392-395.
- 127 - MONNERON A., 1967 - Etude des grains périchromatiniens. J. Microscopie, 6, 71 a.
- 128 - MONNERON A. et BERNHARD W., 1969 - Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrastruct. Res., 27, 266-288.
- 129 - MONNERON A., BURGLEN J. et BERNHARD W., 1970 - Action of toyocamycin on nucleolar fine structure and function. J. Ultrastruct. Res., 32, 370-389.
- 130 - MONNERON A. et MOULÉ Y., 1968 - Etude ultrastructurale de particules ribonucléoprotéiques nucléaires isolées à partir du foie de Rat. Exptl. Cell Res., 51, 531-554.
- 131 - MOULÉ Y., ANDRIEU A. et SARASIN A., 1969, Particules ribonucléoprotéiques 40 S des noyaux de foie de Rat. II - Propriétés du RNA de ces particules. Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1139-1156.
- 132 - MOULÉ Y. et CHAUVEAU J., 1968 - Particules ribonucléoprotéiques 40 S des noyaux de foie de Rat. J. Mol. Biol., 33, 465-481.

- 133 - MULNARD J., 1956 - Présence d'inclusions Feulgen positives dans les nucléoles larvaires de quelques diptères. Arch. Biol., 67, 485-498.
- 134 - MUNDELL R.D., 1968 - Studies on nucleolar and ribosomal basic proteins and their relationship to nucleolar function. Exptl. Cell Res., 53, 395-400.
- 135 - MURAMATSU M., 1967 - Isolation, composition and function of nucleoli of tumors and other tissues. Methods in Cancer Research 4, 303-359.
- 136 - MURAMATSU M., HODNETT J.L. et BUSCH H. 1966 - Base composition of fractions of nuclear and nucleolar ribonucleic acid obtained by sedimentation and chromatography. J. Biol. Chem., 241, 1544-1550.
- 137 - MURAMATSU M., SMETANA K. et BUSCH H., 1963 - Quantitative aspects of isolation of nucleoli of the Walker carcinosarcoma and liver of the Rat. Cancer Res., 23, 510-518.
- 138 - NASH D. et PLAUT W., 1965 - On the presence of DNA in larval salivary nucleoli in Drosophila melanogaster. J. Cell Biol., 27, 682-686.
- 139 - OBERLING Ch. et BERNHARD W., 1960 - Le Nucleole. Dans "The morphology of the cancer cells". The cell J. Brachet et AE Mirsky (ed.) 5, 421-427.

- 140 - PALEKAR S. et BERNHARD W., 1968 - Coloration préférentielle de structures cellulaires contenant du RNA. *J. Microscopie*, 7, 48 a.
- 141 - PARSONS J.T. et Mc CARTY K.S., 1968 - Rapidly labelled messenger ribonucleic acid-protein complex of Rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.*, 243, 5377-5384.
- 142 - PATRIZI G. et MIDDELKAMP J.N., 1969 - In vivo and in vitro demonstration of nuclear bodies in vaccinia infected cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 28, 275-287.
- 143 - PAWELETZ N., SIEBS W. et LETTRÉ R., 1967 - Untersuchungen zur argentaffin reaction des nukleolus. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, 76, 577-605.
- 144 - PEARSE A.G.E., 1960 - Histochemistry theoretical and applied. 2 nd edit. Churchill, London.
- 145 - PEDERSON T. et KUMAR A., 1971 - Relationship between protein synthesis and ribosome assembly in HeLa cells. *J. Mol. Biol.*, 61, 655-668.
- 146 - PERRY R.P., 1965 - The nucleolus and the synthesis of ribosomes. *J. Natl. Cancer Inst. Monograph*. 18, 325-340.
- 147 - PERRY R.P., 1966 - On ribosome biogenesis. *J. Natl. Cancer Inst. Monograph*. 23, 527-545.

- 148 - PERRY R.P., 1967 - The nucleolus and the synthesis of ribosomes. In Progress in nucleic Acid research and molecular biology, Davidson and Cohn (ed.), Academic Press New-York. . 6, 219-257.
- 149 - PERRY R.P. et ERRERA M., 1960 - The influence of nucleolar ribonucleic acid metabolism on that of the nucleus and cytoplasm in Cell Nucleus Mitchell (ed.), Butterworths London 24-49.
- 150 - PERRY R.P., HELL A. et ERRERA M., 1961 - The role of the nucleolus in ribonucleic acid and protein synthesis. I - Incorporation of cytidine into normal and nucleolar inactivated HeLa cells. Biochim. Biophys. Acta, 49, 47-57.
- 151 - PERRY R.P. et KELLEY D.E., 1966 - Buoyant densities of cytoplasmic ribonucleoprotein particles in mammalian cells: distinctive character of ribosome subunits and the rapidly labeled components. J. Mol. Biol., 16, 255.
- 152 - PETERMANN M.L., 1964 - The physical and chemical properties of ribosomes. Elsevier publishing Company (ed.) Amsterdam, London, New-York.
- 153 - PETROV P., 1971 - Action de l' α -amanitine sur le RNA extranucléolaire. Communication Colloque Société Française de Microscopie Electronique Caen. J. Microscopie, 11, 86.
- 154 - PETROV P. et BERNHARD W., 1971 - Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleo-protein components of the interphase nucleus. J. Ultrastruct. Res., 35, 386-402.

- 155 - PETROV P. et SEKERIS C.E., 1971 - Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron Microscopic observation. *Exptl. Cell Res.*, 69, 393-401.
- 156 - PUCHTLER H. et SWEAT F., 1962 - Some comments on the ninhydrin-schiff reaction. *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 365.
- 157 - PUVION E., DEFERT-KOBUS W., KERCKAERT J.P., PUVION-DUTILLEUL F., SEGARD E. et MONTREUIL J., 1968 - Etude sur les acides nucléiques spontanément diffusibles des noyaux du foie de Rat. Etude morphologique. *C.R. Acad. Sci.*, 266, 278-281.
- 158 - QUAGLIAROTTI G. et RITOSSA F., 1968 - On the arrangement of genes for 28 S and 18 S ribosomal RNAs in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 36, 57-69.
- 159 - QUIRIN-STRICKER C. et MANDEL P., 1969 - Particules ribonucléoprotéiques légères dans le cytoplasme de foie de Rat. *FEBS Letters*, 2, 230-232.
- 160 - RECHER L., BRIGGS L.G. et PARRY N.T., 1971 - A reevaluation of nuclear and nucleolar changes induced in vitro by actinomycin D. *Cancer Res.*, 31, 140-151.
- 161 - RECHER L., WHITESCARVER J. et BRIGGS L., 1969 - The fine structure of a nucleolar constituent. *J. Ultrastruct. Res.*, 29, 1-14.
- 162 - RECHER L., WHITESCARVER J. et BRIGGS L., 1970 - A cytochemical and radioautographic study of human tissue culture cell nucleoli. *J. Cell Biol.*, 45, 479-492.

- 163 - REICH E. et GOLDBERG I.H., 1964 - Actinomycin and nucleic acid function. Progress in nucleic acid Research and molecular Biology, Davidson and Cohn (ed.), Academic Press New-York, 3, 183-230.
- 164 - RO T.S. et BUSCH H., 1964 - In vitro labelling of RNA of isolated nucleoli with UTP ¹⁴C. Biochem. Biophys. Res. Comm. 14, 149-155.
- 165 - RODKIEWICZ B., 1959 - The nucleolus structure in some plant cells. Exptl. Cell Res., 18, 407-410.
- 166 - ROTH J.S., 1958 - Ribonuclease. VII - Partial purification and characterization of a ribonuclease inhibitor in Rat liver supernatant fraction. J. Biol. Chem., 231, 1085-1095.
- 167 -- SADOWSKI P.D. et HOWDEN J.A., 1968 - Isolation of two distinct classes of polysomes from a nuclear fraction of Rat liver. J. Cell Biol., 37 (1) 163-181.
- 168 - SADOWSKI P.D. et STEINER J.W., 1968 - Electron microscopic and biochemical characteristics of nuclei and nucleoli isolated from Rat liver. J. Cell Biol., 37, 147-161.
- 169 - SAMARINA O.P., LUKANIDIN E.M., MOLNAR J. et GEORGIEV G.P., 1968 - Structural organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA. J. Mol. Biol., 33, 251-263.
- 170 - SAMARINA O.P., MULNAR E.J., LUKANIDIN E.M., BRUSKOV V.I., KRIHEVSKAYA A.A. et GEORGIEV G.P., 1967 - Reversible dissociation of nuclear ribonucleoprotein particles containing mRNA into RNA and proteins. J. Mol. Biol., 27, 187-191.

- 171 - SAMEC J., JACOB M. et MANDEL P., 1968 - Occurrence of light particles carrying DNA-like RNA in the microsomal fraction of adult rat brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 161, 377-385.
- 172 - SANDRITTER W., 1958 - Ultravioletmikrospektrophotometry. In *Handbuch der Histochemie*. Fischer (ed.), Stuttgart. 1, 220-238.
- 173 - SANDRITTER W. et KRYGIER A., 1953 - Zytrophotometrische Bestimmungen von proteingebundenen Thiolen in der Mitose und Interphase von HeLa Zellen. *Z. Krebsforsch.* 62, 596-610.
- 174 - SARASIN A., 1969 - Particules ribonucléoprotéiques 40 S des noyaux de foie de Rat. Propriétés des protéines de ces particules. *FEBS Letters* 4, 327-330.
- 175 - SCHEER U., 1970 - The ultrastructure of the nuclear envelope of amphibian oocytes : a reinvestigation. *J. Cell Biol.*, 45, 445.
- 176 - SCHERRER K., LATHAM H. et DARNELL J.E., 1963 - Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 49, 240-248.
- 177 - SCHERRER K., MOREL C. et SPOHR G., 1971 - The cascade regulation hypothesis of gene expression in Eukaryotic cells : a reevaluation in light of recent evidence on mRNA formation. *Abstr. Commun. 7th Meet. Eur. Biochem. Soc.*, Varna, 17.

- 178 - SCHOEFL G.I., 1964 - The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus. *J. Ultrastruct. Res.*, 10, 224-243.
- 179 - SHANKARANARAYAN K. et BIRNSTIEL M.L., 1969 - Biochemical and ultrastructural characteristics of ribonucleoproteins particles isolated from Rat liver cell nucleoli. *Biochem. Biophys. Acta*, 190, 470-485.
- 180 - SHANKARANARAYAN K.S., STEELE W.J. et BUSCH H., 1966 a - Evidence that the granular and fibrillar elements of nucleoli contain 28 S and 6 S RNA respectively. *Exptl. Cell Res.*, 43, 483-492.
- 181 - SHANKARANARAYAN K., MURAMATSU M., SMETANA K. et BUSCH H., 1966 b - Ultrastructural studies on RNA and DNA components of isolated nucleoli of Walker 256 carcinosarcoma. *Exptl. Cell Res.*, 41, 81-98.
- 182 - SHANKARANARAYAN K., STEELE W.J., SMETANA K. et BUSCH H., 1967 - Ultrastructural aspects of the ribonucleoprotein network in nuclei of Walker tumor and Rat liver. *Exptl. Cell Res.*, 46, 65-77.
- 183 - SHARMA O.K., HIDVEGI E.J., MARKS F., PRESTAYKO A.W., SMETANA K. et BUSCH H., 1969 - Isolation and characterization of 60 S and 85 S RNA from nuclear fractions of Novikoff hepatoma cells. *Physiol. Chem. Physico.*, 1, 185-209.
- 184 - SHEARER W. et Mc CARTHY B.J., 1967 - Evidence for ribonucleic acid molecules restricted to the cell nucleus. *Biochemistry*, 6, 283-289.

- 185 - SHELTON E. et KUFF E.L., 1966 - Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells. *J. Mol. Biol.*, 22, 23-31.
- 186 - SIEBERT G., VILLALOBUS J., RO T.S., STEELE W.J., LINDENMAYER G., ADAMS H. et BUSCH H., 1966 - Enzymatic studies on isolated nucleoli of Rat liver. *J. Biol. Chem.*, 241, 71-78.
- 187 - SIMARD R., 1966 - Specific nuclear and nucleolar ultra-structural lesions induced by proflavin and similarly acting antimetabolites in tissue culture. *Cancer Res.*, 26, 2316-2328.
- 188 - SIMARD R., 1968 - Problèmes de structure et de fonction nucléolaire. Thèse Sciences Nat., Paris.
- 189 - SIMARD R. et BERNHARD W., 1968 - Le phénomène de la ségrégation nucléolaire : spécificité d'action de certains antimétabolites. *Int. J. Cancer*, 1, 463-479.
- 190 - SIMARD R. et BERNHARD W., 1967 - A heat sensitive cellular function located in the nucleolus. *J. Cell Biol.*, 34, 61-76.
- 191 - SIMARD R. et DUPRAT A.M., 1969 - Action de l'actinomycine D sur les ribonucléoprotéines nucléaires de cellules d'amphibiens en différenciation. *J. Ultrastruct. Res.*, 29, 60-75.
- 192 - SIRAKOV L.M. et KOCHARIAN C.D., 1969 - The stability of ribonuclease inhibitor from guinea-pig liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 195, 572-575.
- 193 - SIRLIN J.L. et JACOB J., 1962 - Function, development and evolution of the nucleolus. *Nature*, 195, 114-117.

- 194 - SMETANA K. et BUSCH H., 1963 - On the ultrastructure of the Walker 256 carcinosarcoma. *Cancer Res.* 23, 1600-1603.
- 195 - SMETANA K. et BUSCH H., 1964 - Studies on the ultrastructure of the nucleoli of the Walker tumor and Rat liver. *Cancer Res.*, 24, 537-557.
- 196 - SMETANA K., LANE M. et BUSCH H., 1966 - Studies on nucleoli of leukemic agranulocytes and plasmacytes in multiple myeloma. *Exptl. Mol. Pathol.*, 5, 236-244.
- 197 - SMETANA K. et POTMESIL M., 1968 - Ring-shaped nucleoli in liver cells of rats after treatment with actinomycin D. *Zeitsch. für Krebsforsch.*, 92, 62-69.
- 198 - SMETANA K., STEELE W.J. et BUSCH H., 1963 - A nuclear ribonucleoprotein network. *Exptl. Cell Res.*, 31, 198-202.
- 199 - SMETANA K., UNUMA T. et BUSCH H., 1968 - Ultrastructural studies on nucleic acids of granular components in Novikoff hepatoma cells. *Exptl. Cell Res.*, 51, 105-122.
- 200 - SMITH J.W. et STUART R.J., 1971 - Silver staining of ribosomal proteins. *J. Cell Sci.*, 9, 253-269.
- 201 - SOEIRO R., VAUGHAN M.H. et DARNELL J.E., 1968 a - The effect of puromycin on intranuclear steps in ribosome biosynthesis. *J. Cell Biol.*, 36, 91-101.

- 202 - SOEIRO R., VAUGHAN M.H., WARNER J.R. et DARNELL J.E.,
1968 b - The turn-over of nuclear DNA-like
RNA in HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 39, 112-118.
- 203 - SPIRIN A.S., 1969 a - Structure of the ribosome.
Progress in Biophysics and Molecular Biology,
Butler and Noble (ed.) Pergamon Press Oxford
19, 135-174
- 204 - SPIRIN A.S., 1969 b - The second sir Hans KREBS lecture.
Informosomes. *Europ. J. Biochem.*, 10, 20-35.
- 205 - SPOHR G., GRANBOULAN N., MOREL C. et SCHERRER K., 1970 -
Messenger RNA in HeLa cells : an investigation
of free and polyribosome-bound cytoplasmic
messenger ribonucleoprotein particles by
Kinetic labelling and electron microscopy.
Europ. J. Biochem., 17, 296-318.
- 206 - STEELE W.J. et BUSCH H., 1966 - Studies on the ribonucleic
acid components of the nuclear ribonucleo-
protein network. *Biochim. Biophys. Acta*,
129, 54-67.
- 207 - STENRAM U. et WILLEN R., 1968 - Effects of proflavine on
ultrastructure and RNA and protein synthesis
in the liver of Rats. *Exptl. Cell Res.*, 50,
505-514.
- 208 - STEVENIN J., MANDEL P. et JACOB M., 1970 - Forme
particulaire du rRNA géant dans les noyaux de
cerveau de Rat. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52,
703-720.
- 209 - STEVENS B.J., 1964 - The effect of actinomycin D on
nucleolar and nuclear fine structure in the
salivary gland cell of Chironomus thummi.
J. Ultrastruct. Res., 11, 329-353.

- 210 - STEVENS B.J. et SWIFT H., 1966 - RNA transport from nucleus to cytoplasm in Chironomus salivary glands. J. Cell Biol., 31, 55-77.
- 211 - SUSKIND R.G., 1965 - Autoradiographic and cytochemical evidence for synthesis of a lysin containing ribonucleoprotein in nucleoli inhibited by actinomycin D. J. Cell. Biol., 24, 309-316.
- 212 - SVOBODA D. et HIGGINSON J., 1968 - A comparison of ultrastructural changes in Rat liver due to chemical carcinogens. Cancer Res., 28, 1703-1733.
- 213 - SWIFT H., 1959 - Studies on nuclear fine structure. Brookhaven Symp. Biol., 12, 139-152.
- 214 - SWIFT H., 1963 - Cytochemical studies on nuclear fine structure. Exptl. Cell Res., suppl. 9, 54-67.
- 215 - SWIFT H. et ADAMS B.J., 1962 - Simple methods for nucleic acid and acid mucopolysaccharide localization in electron micrographs. Proceeding of the fifth international Congress for electron Microscopy. Breesse (ed.), Academic Press New-York. 2, 1-4.
- 216 - TAMAOKI T., 1966 - The particulate fraction containing 45 S RNA in L cell nuclei. J. Mol. Biol., 15, 624.
- 217 - TAMAOKI T. et MUELLER G.C., 1965 - The effect of actinomycin D and puromycin on the formation of ribosomes in HeLa cells. Biochim. Biophys. Acta, 108, 73-80.

- 218 - TANDLER C.J., 1966 - Detection and origin of nucleolar components : a model for nucleolar RNA function. J. Natl. Cancer Inst. Monograph. 23, 181-190.
- 219 - UNUMA T. et BUSCH H., 1967 - Formation of microspherules in nucleoli of tumor cells treated with high doses of actinomycin D. Cancer Res. 27, 1232-1243.
- 220 - UNUMA T., ARENDELL J. et BUSCH H., 1968 - High resolution autoradiographic studies of the uptake of ^3H -5-uridine into condensed and dispersed chromatin of nuclei and granular and fibrillar components of nucleoli of Novikoff hepatoma ascites cells. Exptl. Cell Res., 52, 429-438.
- 221 - UNUMA T., SMETANA K. et BUSCH H., 1967 - A morphological study on the chromatin areas associated with the nucleolus. Exptl. Cell Res., 48, 665-671.
- 222 - VAUGHAN M.H., WARNER J.R. et DARNELL J.E., 1967 - Ribosomal precursor particles in the HeLa cell nucleus. J. Mol. Biol., 25, 235-251.
- 223 - VIGIER P., 1900 - Le nucléole : Morphologie, Physiologie. Thèse Médecine, Paris.
- 224 - WALKER I.O., 1965 - Electrometric and spectrophotometric titration of histone and deoxyribonucleo-histone. J. Mol. Biol., 14, 381-398.

- 225 - WARNER J.R., 1966 - The assembly of ribosomes in HeLa cells. *J. Mol. Biol.*, 19, 383-398.
- 226 - WARNER J.R. et SOEIRO R., 1967 - Nascent ribosomes from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 58, 1894-1990.
- 227 - WARNER J.R., GIRARD M., LATHAM H. et DARNELL J.E., 1966 - Ribosome formation in HeLa cells in the absence of protein synthesis. *J. Mol. Biol.*, 19, 373-382.
- 228 - WATSON M.L., 1962 - Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of Rat and Mouse. *J. Cell Biol.*, 13, 162-165.
- 229 - WATSON M.L. et ALDRIDGE W.G., 1961 - Methods for the use of indium as an electron stain for nucleic acids. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11, 257-272.
- 230 - WEINBERG R.A. et PENMAN S., 1970 - Processing of 45 S nucleolar RNA. *J. Mol. Biol.*, 47, 169-178.
- 231 - WEINBERG R.A., LOENIG U., WILLEMS M. et PENMAN S., 1967 - Acrylamide gel electrophoresis of HeLa cell nucleolar RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 58, 1088-1095.
- 232 - WILLEMS M., PENMAN M. et PENMAN S., 1969 - The regulation of RNA synthesis and processing in the nucleolus during inhibition of protein synthesis. *J. Cell Biol.*, 41, 177-187.

- 233 - WOODS P.S. et TAYLOR J.H., 1959 - Studies of ribonucleic acid metabolism with tritium labelled cytidine. Laboratory Investigation, 8, 309-318.
- 234 - YOTSUYANAGI Y., 1960 - Mise en évidence au microscope électronique des chromosomes de la levure par une coloration spécifique. C.R. Soc. Biol., 250, 1522-1524.
- 235 - ZAGURY D., 1957 - Existence d'un complexe liporibonucléoprotéique à groupement sulfhydryle au sein du nucléole. C.R. Soc. Biol., 242, 1825-1827.
- 236 - ZAMENIK P.C. et KELLER E.B., 1954 - Relation between phosphate energy donors and incorporation of labelled amino-acids into proteins. J. Biol. Chem., 209, 337-354.
- 237 - ZOBEL C.R. et BEER M., 1965 - The use of heavy metal salts as electron stains. Intern. Rev. Cytol., 18, 363-400.

