

576  
974  
70



\*0300074315\*

N° d'ordre : 310

50376  
1974  
70

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE  
pour l'obtention  
DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES  
OPTION : BIOCHIMIE

par

**André VERBERT**



**RECHERCHES SUR LA TRANSCRIPTION  
DANS LES CELLULES EUCARYOTES.  
NATURE DES EXTREMITES 5' -TRIPHOSPHATES  
DES RNA SYNTHETISES IN VIVO ET IN VITRO  
PAR LES RNA POLYMERASES DNA-DEPENDANTES**

Soutenu le 27 Juin 1974, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Président : J. MONTREUIL  
Rapporteur : P. CHAMBON  
Directeur du travail : V. KRSMANOVIC  
Examineurs : { F. CHAPEVILLE  
                  J. KREMBEL

There are times in every science when the outline of future progress seems predictable, straightforward, and perhaps a little boring. Inevitably, this leads many of its practitioners to wonder whether they are in the right field. Quietly, and occasionally not very quietly, some leave the security of their teachable dogma for the freedom of the confusion surrounding unexplainable phenomena.

James D. WATSON

Extrait de la préface au volume XXXV de  
"Cold Spring Harbor Symposia on Quantative  
Biology", 1970.

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

- Laboratoire de Chimie Biologique (Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

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

- Institut de Recherches sur le Cancer de Lille - Institut Jules DRIESSENS- (Professeur Gérard BISERTE).

- Unité de Virologie Moléculaire de l'I. N. S. E. R. M. de Lille (Professeur Jean SAMAILLE).

Je remercie très vivement leurs Directeurs.

A MA FEMME,

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS,

A MAMIE ET A TOUTE MA FAMILLE,

A tous ceux qui, tout au long de mes études, ont contribué  
à me donner le goût de connaître et la joie de découvrir.

A tous ceux qui, dans les divers laboratoires, m'ont offert  
leur Amitié.

A Bora,

Ce travail a vu le partage de multiples soucis et de nombreuses joies qui ont été la source et le ciment de notre Amitié.  
Bora, Merci.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

Au moment de présenter cette thèse, je me remémore les premiers enseignements de Biochimie que vous m'avez donnés... depuis, votre enthousiasme a toujours animé ces années d'aventure en Biologie Moléculaire.  
Vous m'avez accordé votre confiance, je veux, aujourd'hui, vous en remercier très sincèrement.

A Monsieur le Professeur Jean SAMAILLE,

Toutes les possibilités de travail que vous m'avez offertes en m'acceptant dans votre Laboratoire de Virologie m'ont permis de "foncer" comme vous m'y avez souvent encouragé.  
Croyez en ma véritable gratitude et mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Pierre CHAMBON,

Vous avez accepté d'être le rapporteur de ce travail. Votre renom dans le domaine des RNA polymérases animales me fait ressentir cet honneur avec beaucoup de fierté.  
Je vous en suis très reconnaissant.

A Monsieur le Professeur François CHAPEVILLE,

Vous me faites l'honneur de bien vouloir juger cette thèse, je vous en remercie vivement.

A Monsieur le Professeur Jean KREMBEL,

Je voudrais saisir l'occasion qui m'est offerte pour vous remercier du renfort scientifique que vous avez apporté à notre équipe lilloise, et, plus personnellement, de la solide amitié que vous avez bien voulu m'accorder.

Cette thèse est le fruit d'un travail d'équipe et je tiens à exprimer mes très sincères remerciements à :

Monsieur Alain SERGEANT,

Compagnon de route pendant ces années, sa collaboration de tous les jours m'a été infiniment précieuse, notamment lors de l'extraction des hybrides naturels DNA:RNA et de la purification des RNA polymérases de cellules KB.

Mademoiselle Dominique CROIX,

Qui a eu le courage d'aborder l'étude du nucléotide initial dans les hybrides naturels purifiés.

Madame Sabine QUIEF-LEMAIRE,

Qui m'a fait bénéficier de sa grande compétence technique lors du travail réalisé à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

Madame Chantal TRENTESEAU-CHAUVET,

Qui m'a apporté sa précieuse collaboration dans l'extraction des RNA polymérases et la mise au point des techniques de caractérisation des RNA synthétisés in vitro.

Monsieur Jean-Claude D'HALLUIN,

A qui je dois les préparations de DNA viral et cellulaire. Sa haute compétence technique et sa rude gentillesse rendent sa collaboration très agréable.

Je remercie également :

Monsieur le Professeur WIELAND (Heidelberg) qui a généreusement offert l' $\alpha$ -amanitine.

Monsieur le Docteur CRICCHIO (Gruppo Lepetit, Milan) qui a gracieusement fourni le dérivé AF/013 de la rifamycine.

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, R. DEFRETIN

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU

Professeur

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. DERCOURT Michel (Jean)	Sciences de la Terre
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique
M. LEBRUN André	Electronique (Lille)
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
Me LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LINDER Robert	Botanique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. POUZET Pierre	Informatique (Lille)
M. PROUVOST Jean	Géologie Minéralogie

..../....

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
M. DERIEUX Jean-Claude	Biologie (I.U.T.)
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DUEE Gérard	Sciences de la Terre
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
Me EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M. FONTAINE Jacques-Marie	I.U.T. Lille
M. FOURNET Bernard	I.U.T. Lille
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	S.E.N. Calais
M. HERMAN Maurice	Physique
M. JOURNAL Gérard	Sciences Appliquées
Mle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LANGRAND Claude	Mathématiques
M. LAURENT François	Automatique
Mle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mle LEGRAND Solange	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	Electronique (Lille)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHET Pierre	I.U.T. Lille
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique (I.U.T. Lille)
Me N'Guyen Van Chi Régine	Géographie et Aménagement Spatial
M. YAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MOTZKIN Joseph	Mathématiques
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. NICOLE Jacques	Chimie (E.N.S.C.L.)
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PERTUZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
M. ROGALSKI Marc	Mathématiques
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Biologie
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SOMME Jean	Géographie

.../...

PROFESSEURS TITULAIRES (suite)

M. SCHILTZ René	Physique
Me SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BONNOT Ernest	Biologie
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Chimie Minérale
M. DEPREZ Gilbert	I.U.T. Lille
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LACOSTE Louis	Biologie
Me LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
M <sup>le</sup> MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. SALMER Georges	I.E.E.A.
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCO Denis	Mathématiques
M. BREZINSKI Claude	I.E.E.A.
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COQUERY Jean- Marie	Biologie
M. COULON Jean	I.E.E.A.
M <sup>le</sup> DACCHARI Monique	Géographie et Aménagement Spatial
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DHAINAUT André	Biologie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

Mle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques et Sociales
M. THERY Pierre	Calais
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique (Béthune)
M. WERNER Georges	Informatique (I.U.T. Lille)
M. WATERLOT Michel	Géologie
M. YVON Jean-Pierre	Mathématiques
Me ZINN Justin Nicole	Mathématiques

INTRODUCTION

GENERALITES

LES RNA POLYMERASES DNA-DEPENDANTES DE CELLULES  
EUCARYOTES

p. 7

● I - LES FORMES MULTIPLES DE RNA POLYMERASES

EUCARYOTES

p. 7

A - DECOUVERTE

p. 7

B - NOMBRE ET NOMENCLATURE

p. 8

C - ROLE ET LOCALISATION INTRACELLULAIRE

p. 10

● II - PRINCIPALES PROPRIETES DES RNA POLYMERASES

EUCARYOTES

p. 10

A - MASSE MOLECULAIRE ET SOUS-UNITES

p. 10

B - STABILITE

p. 12

C - EXIGENCE EN IONS BIVALENTS ET CONDITIONS DE FORCE

IONIQUE

p. 12

D - SENSIBILITE A L'  $\alpha$ -AMANTINE

p. 13

E - RESISTANCE A LA RIFAMPICINE

p. 13

F - SPECIFICITE DU DNA UTILISE COMME MATRICE

p. 13

LE PROCESSUS GENERAL DE LA TRANSCRIPTION

p. 15

● I - ETAPE D'INTERACTION DNA : RNA POLYMERASE

p. 16

A - LE PROCESSUS

p. 16

B - SPECIFICITE DES SITES DE FIXATION ET STABILITE

p. 17

1 - Séquences spécifiques du DNA

p. 17

2 - Intervention du facteur sigma

p. 18

3 - Conditions ioniques et présence des nucléosides triphosphates	p.	18
4 - Stabilisation du complexe lors de la synthèse	p.	19
● <u>II - DECLENCHEMENT DE LA SYNTHÈSE</u>	p.	19
<u>A - NATURE DU NUCLEOTIDE INITIAL</u>	p.	20
<u>B - LA SEQUENCE 5'-TERMINALE</u>	p.	22
<u>C - DEPHOSPHORYLATION DE L'EXTREMITÉ 5'-TRIPHOSPHATE</u>	p.	23
● <u>III - LA SYNTHÈSE PROPREMENT DITE</u>	p.	24
<u>A - SENS DE LA SYNTHÈSE</u>	p.	25
<u>B - FORMATION DU COMPLEXE TERNAIRE DNA : RNA</u> <u>POLYMERASE : RNA</u>	p.	27
1 - Les hybrides naturels extraits de cellules procaryotes	p.	27
2 - Les hybrides naturels extraits de cellules eucaryotes	p.	29
<u>C - VITESSE D'ALLONGEMENT DE LA CHAÎNE</u>	p.	31
● <u>IV - ARRET DE LA SYNTHÈSE</u>	p.	31
REGULATION DE LA BIOGENESE DES RNA CHEZ LES EUCARYOTES		
● <u>I - REGULATION "TRANSCRIPTIONNELLE"</u>	p.	34
<u>A - INTERVENTION DES HISTONES</u>	p.	34
<u>B - INTERVENTION DES PROTEINES ACIDES DE LA CHROMATINE</u>	p.	34
<u>C - INTERVENTION DU RNA CHROMOSOMAL</u>	p.	35
<u>D - INTERVENTION DES HORMONES</u>	p.	35
● <u>II - REGULATION "POST TRANSCRIPTIONNELLE"</u>	p.	36
<u>A - FORMES CONJUGUEES DANS LE NOYAU</u>	p.	36
1 - Particules RNP, précurseurs ribosomiaux	p.	36
2 - Particules RNP, précurseurs des messagers	p.	37
<u>B - FORMES CONJUGUEES DANS LE CYTOPLASME</u>	p.	39
1 - Précurseurs ribosomiaux	p.	39

2 - Précurseurs des messagers	p.	39
● <u>III - CONCLUSIONS ET MODELES</u>	p.	40
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> MATERIEL ET METHODES </div>		
	p.	45
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> ETUDES FAITES <u>IN VIVO</u> </div>		
● <u>I - MARQUAGE DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	p.	47
<u>A - MARQUAGE DES HEPATOCYTES DE RAT</u>	p.	47
<u>B - CULTURE ET MARQUAGE DES CELLULES</u>	p.	47
<u>C - MARQUAGE DES CELLULES EN PRESENCE D'ACTINOMYCINE D</u>	p.	48
● <u>II - ISOLEMENT DES NOYAUX DE FOIE DE RAT</u>	p.	49
● <u>III - EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	p.	49
● <u>IV - FRACTIONNEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	p.	51
<u>A - FRACTIONNEMENT DES AN. PAR SEDIMENTATION EN</u> <u>GRADIENT DE <math>Cs_2SO_4</math></u>	p.	51
<u>B - PRECIPITATION SUR FILTRE DES COMPLEXES DNA : RNA</u>	p.	53
● <u>V - TRAITEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	p.	53
<u>A - ACTION DES ALCALIS</u>	p.	53
1 - Mode d'action	p.	53
2 - Mode opératoire	p.	53
<u>B - ACTION DE LA RIBONUCLEASE P</u>	p.	53
1 - Principe	p.	53
2 - Mode opératoire	p.	55
● <u>VI - ANALYSE DES HYDROLYSATS ALCALINS</u>	p.	55
<u>A - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN BASES</u>	p.	55

<u>B - MISE EN EVIDENCE DU NUCLEOSIDE TETRAPHOSPHATE (pppNp)</u>	p.	56
<u>C - DISCUSSIONS DE LA METHODE</u>	p.	59
1 - Migration du témoin $^{32}$ pppGp	p.	59
2 - Présence éventuelle d'ion phosphate	p.	61
3 - Présence éventuelle de ribose phosphate	p.	62
4 - Contamination des électrophorèses par des éléments de radicyse	p.	63
5 - Présence éventuelle d'oligonucléotides	p.	63
<u>D - ETABLISSEMENTS DES PROFILS DE MIGRATION DES NUCLEO-</u> <u>TIDES RADIOACTIFS SE PARES PAR ELECTROPHORESE</u>	p.	63
● <u>VII - ANALYSES SECONDAIRES DU NUCLEOSIDE TETRAPHOSPHATE</u>	p.	64
<u>A - ELUTION DES PRODUITS</u>	p.	64
<u>B - DETERMINATION DE LA NATURE DU NUCLEOSIDE TETRA-</u> <u>PHOSPHATE</u>	p.	64
<u>C - NATURE POLYPHOSPHORIQUE DES COMPOSES DE R<sub>ATP</sub> &gt; 1,15</u>	p.	65
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">ETUDES FAITES <u>IN VITRO</u></div>	p.	68
● <u>I - EXTRACTION DES RNA-POLYMERASES DE CELLULES KB</u>	p.	68
● <u>II - SEPARATION DES DIVERSES RNA POLYMERASES</u>	p.	70
● <u>III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES DNA MATRICES</u>	p.	72
● <u>IV - PREPARATION DES [<math>\gamma</math> - <math>^{32}</math>P] xTP</u>	p.	72
<u>A - PRINCIPE</u>	p.	73
<u>B - METHODE</u>	p.	73
<u>C - ANALYSE DES [<math>\gamma</math> - <math>^{32}</math>P] xTP</u>	p.	75
1 - Absence d'activité enzymatique après traitement à 100°C	p.	75
2 - Mesure de l'activité spécifique	p.	75
3 - Rendement de la réaction	p.	76
4 - Contrôle de la spécificité de la réaction vis-à-vis de la position du groupement phosphate marqué	p.	76
a) Action de la phosphodiesterase	p.	78
b) Hydrolyse alcaline des RNA synthétisés <u>in vitro</u>	p.	78
c) Absence d' [ $\alpha$ - $^{32}$ P] AMP	p.	78

● <u>V - ETUDE DE L'ACTIVITE <math>\gamma</math> - PHOSPHOTRANSFERASIQUE PRESENTE</u>	
<u>DANS LES EXTRAITS DE RNA POLYMERASES</u>	p. 78
<u>A - MISE EN EVIDENCE ET ETUDE CINETIQUE</u>	p. 79
<u>B - L'ACTIVITE <math>\gamma</math> - PHOSPHOTRANSFERASIQUE EST-ELLE LIEE</u>	
<u>A L'ACTIVITE RNA : POLYMERASIQUE ?</u>	p. 82
<u>C - CORRECTIONS NECESSAIRES DUES A L'ACTIVITE</u>	
<u><math>\gamma</math> - PHOSPHOTRANSFERASIQUE</u>	p. 82
● <u>VI - SYNTHÈSE DES RNA IN VITRO</u>	p. 82
<u>A - MILIEU DE SYNTHÈSE</u>	p. 82
<u>B - ACTION DU DERIVE AF/013 DE LA RIFAMYCINE</u>	p. 84
● <u>VII - EXTRACTION DES RNA SYNTHETISES IN VITRO</u>	p. 84
<u>A - PREMIERE METHODE</u>	p. 84
<u>B - SECONDE METHODE</u>	p. 84
● <u>VIII - SEPARATION DES RNA SUR COLONNE DE SEPHADEX G-75</u>	p. 85
● <u>IX - ANALYSES DES RNA SYNTHETISES IN VITRO</u>	p. 86
<u>A - ACTION DE LA PRONASE</u>	p. 86
<u>B - ACTION DE LA RNase PANCREATIQUE</u>	p. 86
<u>C - DETECTION DE SEQUENCES POLYPURIQUES</u>	p. 88
● <u>X - MESURE DE L'INCORPORATION DES [<math>\gamma</math>-<sup>32</sup>P] xTP DANS LES</u>	
<u>CHAINES DE RNA ACIDO-PRECIPTABLES RETENUES SUR</u>	
<u>FIBRE DE VERRE</u>	p. 88

RESULTATS

p. 91

ETUDES REALISEES IN VIVO

p. 93

● I - L'EXTREMITE 5'-TRIPHOSPHATE DES RNA NEOSYNTHETISES

DANS LES NOYAUX DE FOIE DE RAT

p. 93

A - L'EXTREMITE 5'-TRIPHOSPHATE DES RNA DES COMPLEXES

NON PURIFIES

p. 93

1 - Composition en bases des RNA

p. 93

2 - Etude de l'extrémité 5'-triphosphate des RNA totaux des complexes  
non purifiés

p. 95

3 - Etude de l'extrémité 5'-triphosphate de la fraction de RNA résistant  
à la RNase

p. 95

B - L'EXTREMITE 5'-TRIPHOSPHATE DES RNA DES HYBRIDES NA-

TURELS DNA : RNA PURIFIES EN GRADIENT DE SULFATE DE  
CESIUM

p. 100

1 - Taux de nucléoside tétraphosphate dans les RNA libres

p. 100

2 - Etude de l'extrémité 5'-triphosphate des RNA de l'hybride purifié

p. 100

a) Taux des pppNp dans la totalité des RNA associés

p. 101

b) Taux des pppNp dans la fraction résistante à la RNase

p. 101

● II - L'EXTREMITE 5'-TRIPHOSPHATE DES RNA EXTRAITS DE CELLULES

HeLa ET KB

p. 101

A - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN BASE

p. 103

B - MARQUAGE PAR INCORPORATION DE GUANINE TRITIEE

p. 103

1 - Spécificité de marquage

p. 103

2 - Mise en évidence des nucléosides polyphosphates

p. 103

3 - Nature de ces composés polyphosphates

p. 108

4 - Action de la phosphodiesterase du venin de Serpent

p. 108

C - MARQUAGE PAR INCORPORATION D'ADENINE TRITIEE

p. 108

1 - Spécificité de marquage

p. 108

2 - Mise en évidence des nucléosides polyphosphates

p. 110

a) Calcul du rapport d'ATP et GTP 5'-terminal dans les cellules		
HeLa	p.	110
b) Détermination du rapport d'ATP et GTP 5'-terminal dans		
les cellules KB	p.	110
3 - Action de la phosphodiesterase de venin de Serpent	p.	112
<u>D - MARQUAGE DES BASES PYRIMIDIQUES</u>	p.	112
1 - Spécificité de marquage	p.	112
2 - Analyse de l'hydrolysat alcalin par électrophorèse de pH 5,7	p.	112
● <u>III - TAUX DES DIFFERENTS NUCLEOSIDES 5'-TERMINAUX DANS LES</u>		
<u>RNA SYNTHETISES EN PRESENCE D'ACTINOMYCINE</u>	p.	113
<u>A - SPECIFICITE DE MARQUAGE</u>	p.	115
<u>B - TAUX DES NUCLEOSIDES 5'-TERMINAUX DANS LES CELLULES</u>		
<u>TEMOINS</u>	p.	115
<u>C - TAUX DES NUCLEOSIDES 5'-TERMINAUX DANS LES CELLULES</u>		
<u>TRAITEES A L'ACTINOMYCINE D</u>	p.	115
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">ETUDES REALISEES <u>IN VITRO</u></div>	p.	118
● <u>I - EXTREMITES 5'-DES RNA SYNTHETISES EN PRESENCE DU DNA</u>		
<u>EXTRAIT DE CELLULES KB</u>	p.	118
● <u>II - EXTREMITES 5' DES RNA SYNTHETISES EN PRESENCE DE</u>		
<u>L'ADENOVIRUS 2</u>	p.	120
<u>A - ETUDE REALISEE AVEC LES RNA POLYMERASES DE TYPE I</u>	p.	122
<u>B - ETUDE REALISEE AVEC LES RNA POLYMERASES DE TYPE II</u>	p.	122
1 - Etude cinétique effectuée avec le DNA natif de l'Adénovirus 2	p.	122
2 - Etude cinétique effectuée avec le DNA dénaturé de l'Adénovirus 2	p.	122
3 - Remarque sur le RNA synthétisés à 0°C	p.	126
4 - Action du dérivé AF/013 de la rifamycine	p.	126
● <u>III - RESULTATS OBTENUS PAR LA TECHNIQUE DE RETENTION SUR</u>		
<u>FILTRE DES CHAINES DE RNA ACIDO-PRECIPITABLES</u>	p.	126

DISCUSSION

p. 130

● I - EXTREMITE 5' DES COMPLEXES RNA : DNA EXTRAITS DE

NOYAUX DE FOIE DE RAT

p. 131

● II - NATURE DES NUCLEOSIDES 5'-TRIPHOSPHATES DANS LES RNA

EXTRAITS DE CELLULES HELA ET KB

p. 133

● III - ETUDE DU NUCLEOTIDE INITIAL DES RNA SYNTHETISES IN VITRO

PAR LES POLYMERASES I ET II DE CELLULES KB

p. 135

CONCLUSIONS

p. 138

## ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES

---

Å	Angström = $10^{-10}$ mètres.
Ade	Adénine
Ado	Adénosine
c. p. m.	Coups par minute
Cyd	Cytidine
Cyt	Cytosine
DTT	Dithiothréitol
dN	Désoxyribonucléoside (dA - dC - dG - dT)
DNA	Acide désoxyribonucléique
DNase	Désoxyribonucléase
D. O. <sub>260</sub>	Densité optique à 260 nm
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
Gua	Guanine
Guo	Guanosine
mCi	$10^{-3}$ curie
NMP	Nucléoside monophosphate (AMP - CMP - GMP - UMP)
Np	Nucléoside 3'-monophosphate (Ap - Cp - Gp - Up)
NDP	Nucléoside diphosphate (ADP - CDP - GDP - UDP)
NTP	Nucléoside triphosphate (ATP - CTP - GTP - UTP)
nm	Nanomètre : $10^{-9}$ mètre
P <sub>i</sub>	Acide orthophosphorique (phosphore inorganique)
PP <sub>i</sub>	Groupement pyrophosphate
pN	Nucléoside 5'-monophosphate (pA - pC - pG - pU)
ppNp ou ppXp	Nucléoside 5'-diphosphate, 3'-monophosphate
pppNp ou pppXp	Nucléoside 5'-triphosphate, 3'-monophosphate
ppppA	Adénosine 5'-tétraphosphate
Pu	"Purique"
Py	"Pyrimidique"
RNA	Acide ribonucléique
mRNA	Acide ribonucléique messenger
rRNA	Acide ribonucléique ribosomal

tRNA	Acide ribonucléique de transfert
RNase	Ribonucléase pancréatique (E. C. 2.7.7.16)
Rib	Ribose.
Rib-5-P	Ribose 5-phosphate
SDS	Dodecylsulfonate de sodium (Duponol)
SSC	Solution 0,15 M en NaCl et 0,015 en citrate trisodique
S	Constante de sédimentation en unité SVEDBERG (10-13 sec)
t/mn	Tours par minute
Tris	Amino-2 hydroxyméthyl-2 propanediol 1,3
Ura	Uracile
Urd	Uridine
$\mu$ Ci	$10^{-6}$ curie
$\mu$ g	$10^{-6}$ gramme.

INTRODUCTION

Les connaissances acquises depuis de nombreuses années sur la structure des macromolécules essentielles permettent de comprendre, au moins dans ses grandes lignes, le rapport entre leurs fonctions et leur structure.

L'information nécessaire à la synthèse des protéines spécifiques se transmet, dans la majorité des cas, selon le schéma proposé en 1958 par CRICK (1)



Quoique ce modèle ait été depuis complété et précisé (CRICK - 2 -), il n'en reste pas moins vrai que la synthèse des chaînes polypeptidiques résulte des diverses interactions stéréospécifiques (appariement des bases, structure tertiaire) et séquentielles (codage) entre les différents types de macromolécules : DNA, RNA messenger, ribosomes, RNA de transfert et protéines.

Quel que soit le type de RNA, il apparaît que la polymérisation des nucléosides triphosphates en une chaîne de RNA complémentaire du DNA, sous l'action enzymatique de la RNA polymérase, est une étape cruciale dans le transfert de l'information génétique et dans le contrôle de son expression.

Bien que l'on soit en mesure de tracer, en lignes générales, un tableau assez cohérent de la séquence des événements relatifs à la transcription, il reste de nombreux points obscurs, et surtout chez les Eucaryotes, quant aux mécanismes et à la régulation de cette synthèse.

C'est l'étude de l'une des premières étapes de la transcription qui a fait l'objet de notre travail. Guidé par l'idée que la connaissance d'une structure pouvait nous conduire à comprendre une fonction, nous avons abordé l'étude du déclenche-

ment de la synthèse des RNA chez les Eucaryotes, par la connaissance du nucléotide initial.

Avant de décrire les résultats de nos travaux, menés tant in vivo que in vitro, nous exposerons succinctement nos connaissances actuelles sur la transcription en nous limitant, chaque fois que cela sera possible, aux données acquises chez les Eucaryotes.

Notre travail a fait l'objet des publications suivantes :

- 1) A. VERBERT, A. SERGEANT, V. KRSMANOVIC et J. MONTREUIL  
Guanosine 5'-triphosphate (GTP) en position 5'-terminale des RNA en cours de synthèse dans les cellules HeLa et de foie de Rat.  
Arch. Internat. Physiol. (1969) 77, 580.
- 2) A. SERGEANT, A. VERBERT, V. KRSMANOVIC et J. MONTREUIL  
Stabilité du complexe DNA-RNA du foie de Rat.  
Arch. Internat. Physiol. (1969), 77, 573.
- 3) André VERBERT, Alain SERGEANT, Vélihor KRSMANOVIC et Jean MONTREUIL  
Etude de l'extrémité 5'-triphosphate des RNA néoformés dans les hépatocytes de Rat et dans les cellules HeLa. Démonstration du sens 5'→3' de la transcription in vivo.  
C.R. Acad. Sci. Paris (1971) 273 D, 1531.
- 4) A. VERBERT, A. SERGEANT and V. KRSMANOVIC  
Specific RNA chain initiation by purine nucleoside triphosphate in HeLa and KB cells. Predominant occurrence of GTP at 5' terminus. Evidence for 5'→3' transcription in vivo.  
7th Meeting. Eur. Biochem. Soc. in Varna (1971) Abstract n° 485, p. 196.
- 5) V. KRSMANOVIC et A. VERBERT  
Etude du nucléotide initial des RNA nucléolaires et nucléoplasmiques dans les cellules KB.  
Arch. Internat. Physiol. (1973) 81, 188.

6) J. C. D'HALLUIN, A. SERGEANT, A. VERBERT, C. CHAUVET et  
V. KRSMANOVIC.

Systèmes de transcription du génome de l'Adénovirus. Protéines précoces et  
transcription du DNA viral.

R. C. Acad. Sci. (1973), D-276, p. 2415.

7) A. VERBERT, A. SERGEANT et J. C. D'HALLUIN.

RNA polymérase I, II et III de cellules KB et le premier nucléotide purique utili-  
sé dans la synthèse du RNA in vitro.

Arch. Internat. Physiol., (1973), 81, 601.

8) A. SERGEANT, J. C. D'HALLUIN, A. VERBERT, et V. KRSMANOVIC

Effect of ionic strength on Adenovirus 2 DNA transcription by KB cell DNA-  
dependent RNA polymerase I, II, and III.

(soumis à publication).

9) A. VERBERT, A. SERGEANT et V. KRSMANOVIC

5'-triphosphate termini of RNAs made in vivo and in vitro by HeLa and KB cell  
DNA-dependent RNA polymerases.

(soumis à publication).

Nous avons, en outre, collaboré à d'autres travaux qui ne s'inscrivent  
pas dans le cadre de ce mémoire.

10) J. P. KERKAERT, J. MONTREUIL, M. C. DOYENNETTE, P. PUVION,  
MN. VLAEMINCK, A. VERBERT, A. DEMAILLE et J. DREISSENS.

Isolement et purification des particules virales du type A présentes dans le cyto-  
plasma du lymphome médiastinal de la souris Swiss induit par l'éthyl-uréthane.

R. C. Acad. Sci. Paris, 1970, 271-D, 624.

11) A. VERBERT et R. CACAN.

Description d'un procédé électrophorétique de séparation de l'AMP cyclique de ses métabolites. Application à la détermination de l'activité adénylcyclasique. Biochimie (1972), 54, 1491.

12) D. LEGER, G. SPIK, A. VERBERT, C. DUPIRE, J. MONTREUIL et  
M. H. LOUCHEUX.

Détermination de la masse moléculaire et de la structure monocaténaire de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaine.

Abstr. C-66, XIème Journées Biochimiques Latines (Salamanque) 1973.

GENERALITES

LES RNA POLYMERASES DNA DEPENDANTES  
DES CELLULES EUCARYOTES

Pour la première fois, en 1959, WEISS et GLADSTONE ( 3 ), ( 4 ) détectaient une activité RNA polymérasique dans des extraits de noyaux de foie de Rat. Cependant, la décennie suivante a vu le développement des études sur la RNA polymérase extraite de cellules procaryotes et notamment d' E. coli (STEVENS - 5 CHAMBERLIN et BERG - 6 -). En effet, à la différence de l'enzyme bactérienne, l'enzyme de cellules eucaryotes se trouve fortement associée à la chromatine. Il a fallu les efforts de plusieurs équipes (voir notamment WIDNELL et TATA - 7 - 8 -, CHAMBON et al. - 9 -, ROEDER et RUTTER - 10 -) pour parvenir à solubiliser cette enzyme et l'obtenir avec un bon rendement et une pureté suffisamment grande. C'est donc près de dix ans après la découverte de WEISS et GLADSTONE que les études sur les RNA polymérases animales connaissent enfin l'essor qui permettra de mieux comprendre le mécanisme de la biosynthèse des RNA dans les organismes supérieurs.

I - LES FORMES MULTIPLES DES RNA POLYMERASES EUCARYOTES

A - DECOUVERTE

La qualité des RNA synthétisés dans des nucléoles (JACOB et al. - 11-) ou des noyaux isolés (WIDNELL et TATA - 12 -) dépend notablement de la présence des ions bivalents du magnésium ou du manganèse et de la concentration saline. En présence de magnésium, le RNA formé est de type ribosomal (taux élevé en G + C), tandis que le RNA synthétisé à haute force ionique et en présence de manganèse est surtout riche en A + U, de type rRNA. Bien que l'existence d'une seule polymérase fonctionnant différemment ou transcrivant des régions différentes de la chromatine, ait été longtemps supposée, il est apparu bon nombre d'expériences

(localisation intranucléaire différente, régulation indépendante) suggérant l'existence de différents types de RNA polymérase à fonction définie et agissant dans des conditions particulières.

### B - NOMBRE ET NOMENCLATURE

A partir d'embryons d'Oursin et d'hépatocytes de Rat, ROEDER et RUTTER ( 13 ) ( 14 ) ont isolé et séparé par chromatographie sur colonne DEAE-Sephadex, trois enzymes qu'ils dénommèrent I, II et III, selon leur ordre d'élution.

Depuis, de nombreuses équipes ont réussi à obtenir ces formes multiples de RNA polymérase à partir de différentes cellules eucaryotes. Leurs résultats sont rassemblés dans le tableau I (p. 9).

La nomenclature de ces enzymes n'a pas encore été uniformisée car des critères différents ont été utilisés selon les équipes. KEDINGER et al. ( 15 ) ont proposé de nommer les polymérase selon leur résistance (groupe A) ou leur sensibilité (groupe B) à l' $\alpha$ -amanitine. JACOB ( 16 ) préconise de garder la nomenclature utilisée par ROEDER et RUTTER (c'est-à-dire I, II, III; IV étant une activité enzymatique non retenue par la DEAE-Sephadex ), nommant les sous-espèces par les lettres A, B, etc... Les deux nomenclatures sont actuellement utilisées et donnent les correspondances suivantes :

enzyme de type I :    IA / IB  $\longleftrightarrow$  AI / A II  
enzyme de type II :    II A / II B  $\longleftrightarrow$  BI / B II  
enzyme de type III :    III  $\longleftrightarrow$  A III  
et l'enzyme IV .

Il convient de noter que les enzymes I et II sont constamment retrouvées par tous les auteurs tandis que les enzymes de type III et IV ne sont isolées que dans certaines conditions et ne paraissent pas être détectées dans tous les types cellulaires.

TABLEAU I :  
RNA polymérasés extraites de cellules Eucaryotes.

Cellules Eucaryotes	Type de polymérasés			Références
	I	II	III	
Foie de Rat	I	II	III	ROEDER et RUTTER (17)
	IA/IB	IIA/IIIB	III	JACOB <u>et al.</u> (18)
	I	II		CHESTERTON et BUTTERWORTH (19)
	I	II		SEIFART et SEKERIS (20)
	A	B		MANDEL et CHAMBON (21)
	I	II		KELLER et GOOR (22)
Foie de Xénope	I	II		ROEDER <u>et al.</u> (23)
Thymus de Veau	AI/AII	BI/BII		CHAMBON <u>et al.</u> (24)
	I	II		BLATTI <u>et al.</u> (25)
	I	II	III	FURTH et AUSTIN (26)
	I	II		STEIN et HAUSEN (27)
Embryon d'Oursin	I	II	III	ROEDER et RUTTER (28)
Embryon de Xénope	I	II	III	ROEDER (29)
Ovocyte de Xénope	I	II		TOCCHINI-VALENTINI et CRIPPA (30)
Cellule HeLa	I			SUGDEN et SAMBROOK (31)
Cellule KB	I	II		SUGDEN et KELLER (32)
	I	II	III	SERGEANT et KRSMANOVIC (33)
Tumeur ascitique de Rat	I	II		FROEHNER et BONNER (34)
Levure	A	B	C	PONTA <u>et al.</u> (35)
	A	B		DEZELEE <u>et al.</u> (36)
Feuille de maïs	I	II		STRAIN <u>et al.</u> (37)



## C - ROLE ET LOCALISATION INTRACELLULAIRE

Il semble actuellement bien établi que les enzymes du type I (AI/AII) sont d'origine nucléolaire (ROEDER et RUTTER - 38 -, JACOB et al. - 39 -) et responsables de la transcription des gènes ribosomiaux, et peut être aussi des gènes codant pour le rRNA 5 S et les protéines ribosomiales (ROEDER et RUTTER -

Les conditions requises pour la synthèse de RNA riche en A + U dans les noyaux isolés sont proches des conditions de fonctionnement des RNA polymérases de type II. Localisées dans le nucléoplasme, ces enzymes pourraient être impliquées dans la biosynthèse des RNA- "DNA like" précurseurs des RNA messagers.

Le rôle de la RNA polymérase III, localisée dans le nucléoplasme, est actuellement mal défini. Elle serait nécessaire à la transcription des tRNA et d'autres espèces de RNA de petites tailles (RUTTER et al. - 40 -). Ces auteurs résument la situation actuelle en émettant l'hypothèse que les polymérases I et III sont impliquées dans la transcription des gènes nécessaires à la mise en place du "système de traduction" (rRNA, tRNA, et protéines ribosomiales) tandis que les polymérases II sont employées à la biosynthèse des précurseurs de RNA messagers (RUTTER et al. - 41 -, ROEDER - 42 -).

## II - PRINCIPALES PROPRIETES DES RNA POLYMERASES EUCARYOTES

### A - MASSE MOLECULAIRE ET SOUS-UNITES

Tous les auteurs s'accordent à donner aux RNA polymérases eucaryotes une masse moléculaire comprise entre 450 000 et 650 000, résultats obtenus à partir de leur vitesse de sédimentation en gradient de glycérol ou selon leur comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide. Quelques équipes (voir tableau II, p.11) ont pu obtenir des quantités suffisamment importantes d'enzymes purifiées pour déterminer le nombre et la masse moléculaire de leurs sous-unités dissociables par le dodécyl-sulfonate de sodium. Le tableau II souligne la présence de deux grosses sous-unités et d'un nombre variable de sous-unités plus petites. Actuellement, aucune fonction particulière n'a été reliée à l'une de ces sous-unités.

TABLEAU II :

Comparaison entre les masses moléculaires des sous-unités de différentes RNA polymérases (a).

CELLULE	Thymus de Veau				Foie de Rat	Tumeur ascitique de Rat	Cellule HeLa et KB	Levure	E. Coli
TYPE	AI	BI	BII	II	II	IA	II	B	
M.M.:									
200.000	197.000 (1)	214.000 (1)	180.000 (1)	190.000 (1)	190.000 (1)		220.000 (1)		
			140.000 (1)	(170.000)	(170.000)	170.000 (1)	(170.000)	180.000 (1)	165.000 $\beta'$
	126.000 (1)		144.000 (1)	150.000 (1)	150.000 (1)	125.000 (1)	140.000 (1-2)	150.000 (1)	155.000 $\beta$
100.000									
						69.000 (1-2)			90.000 $\sigma$
	51.000 (1)					49.000 (1)			
	44.000 (1)					44.000 (1)			
		34.000 (1-2)	34.000 (1-2)	35.000 (1)	35.000 (1)	37.000 (1-2)	35.000 (1)	39.000	39.000 $\alpha_2$
	25.000 (2)	25.000 (2)	25.000 (2)	25.000 (1)	25.000 (1)		(25.000)	28.000	
	16.500 (2)	16.500 (3-4)	16.500 (3-4)					19.000	
10.000									
REFERENCE	KEDINGER et al. (43)			WEAVER et al. (44)		FROEHNER et BONNER (45)	SUGDEN et KELLER (46)	DEZELEE et SENTENAC (47)	BURGESS (48)

(a) Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de sous-unités.

La sous-unité (170 000) n'est pas constamment retrouvée.



## B - STABILITE

L'enzyme de type II semble pouvoir être conservée le plus facilement en gardant une activité spécifique élevée. Il faut cependant garder en mémoire que l'activité se mesure par la faculté d'incorporer des nucléosides triphosphates radioactifs en chaînes de RNA et que la stabilité n'est donnée que d'un point de vue quantitatif. Il est notamment possible que certaines sous-unités des enzymes nécessaires à un fonctionnement correct et spécifique des RNA polymérases soient perdues au cours de l'extraction ou rapidement inactivées. En règle générale, la stabilité "quantitative" est augmentée par la présence de sérum albumine en concentration assez importante (1 mg/ml) et par la conservation à basse température (azote liquide) en présence de 25 à 40 p. 100 de glycérol.

## C - EXIGENCE EN IONS BIVALENTS ET CONDITIONS DE FORCE IONIQUE

Les RNA polymérases animales montrent différents optima d'activité selon la présence d'ions  $Mg^{++}$  ou  $Mn^{++}$  et selon la concentration en sulfate d'ammonium. Les enzymes nucléolaires utilisent indifféremment le magnésium ou le manganèse, tandis que les enzymes de type II sont beaucoup plus actives en présence de manganèse. Jusqu'à présent, la plupart des auteurs s'accordent à reconnaître des forces ioniques optimales particulières à chaque type de polymérase, notamment 30 mM en sulfate d'ammonium pour le type I, de 80 à 120 mM pour le type II, tandis que la polymérase III garde un optimum d'activité jusqu'à 200 mM (ROEDER et RUTTER - 49 -, PONTA et al. - 50 -, SERGEANT et KRSMANOVIC - 51 -). Cependant, il est important de souligner que ces optima d'activité ont été mesurés en présence de DNA cellulaires, DNA qui sont plus ou moins fragmentés et présentent des ruptures monocaténares. En utilisant des DNA plus homogènes (tels ceux de l'Adenovirus et du SV 40), il s'avère que la concentration en sulfate d'ammonium nécessaire à une activité maximale est beaucoup plus basse (de l'ordre de 15 à 40 mM pour les trois polymérases) qu'avec des DNA cellulaires (AUSTIN et al. - 52 -, SERGEANT et KRSMANOVIC - 53 -, MANDEL et CHAMBON - 54 -, SERGEANT et al. - 55 -).

#### D - SENSIBILITE A L' $\alpha$ -AMANITINE

STIRPE et FIUME ( 56 ) furent les premiers à observer que l'activité RNA polymérasique mesurée dans des noyaux isolés à haute force ionique et en présence de manganèse, pouvait être inhibée par l'  $\alpha$ -amanitine, cyclo-polypeptide toxique extraite du champignon vénéneux Amanita phalloïdes (WIELAND - 57 -). Comme le suggéraient ces résultats, l'  $\alpha$ -amanitine s'est révélé être un inhibiteur spécifique de l'activité RNA polymérasique de type II (KEDINGER et al. - 58 -, LINDELL et al. - 59 -, JACOB et al. - 60 -), en se fixant sur l'enzyme même. Inhibant la synthèse des RNA même après son déclenchement, l'  $\alpha$ -amanitine se lie vraisemblablement à une sous-unité impliquée dans le processus d'allongement de la chaîne de RNA.

#### E - RESISTANCE A LA RIFAMPICINE

Tandis que l'enzyme bactérienne est insensible à la présence d'  $\alpha$ -amanitine, la rifampicine, inhibiteur des RNA polymérasés procaryotes, n'a pas d'action sur les RNA polymérasés animales (à l'exception des enzymes mitochondriales). Cependant, MEILHAC et al. ( 61 ) ( 62 ) ont montré que certains dérivés de la série des rifamycines pouvaient inhiber le fonctionnement des polymérasés animales. Ces auteurs démontrent que dans des conditions appropriées de préincubation, un nombre limité d'associations DNA-enzyme est protégé contre l'action de ces dérivés et notamment de l'AF/013. Ces sites privilégiés pourraient correspondre aux vrais sites du déclenchement de la synthèse.

#### F - SPECIFICITE DU DNA UTILISE COMME MATRICE

Regardant la spécificité de transcription des divers DNA en termes d'activité enzymatique, tous les auteurs reconnaissent aux polymérasés de type I, la possibilité de transcrire mieux le DNA natif, tandis que l'activité de la polymérase de type II est beaucoup plus grande si le DNA est dénaturé.

Cependant, ces dernières années, l'accent est porté sur la qualité de la transcription en examinant notamment la spécificité du déclenchement, la taille des RNA transcrits et leur propriété d'hybridation. Dans les cellules eucaryotes, le DNA sous forme de complexes désoxyribonucléoprotéiques, porte de 1 000 à plus

de 10 000 fois plus de gènes que le DNA d'E. coli (HOLLIDAY - 63 -). Cette remarque contient toute la prudence dont doit s'entourer l'expérimentateur avant de considérer un DNA "déprotéinisé" comme matrice pour la transcription.

Les critères à considérer vis à vis d'une transcription spécifique peuvent se situer à trois niveaux:

Premièrement, la spécificité doit être reliée aux informations portées par le génome et les activités doivent être rapportées à la nature homologue ou non du DNA matrice.

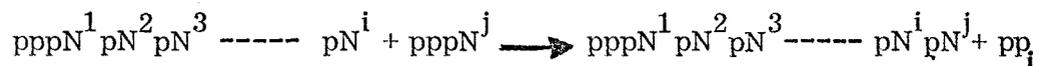
Deuxièmement, débarrassé de ses protéines le DNA utilisé in vitro ressemble peu à celui de la chromatine (BUTTERWORTH et al. - 64 -, CHAMBON et al. - 65 -).

Enfin, l'intégrité même du DNA purifié doit être mise en cause : la présence d'extrémités dénaturées, de cassures ou de portion monocaténares étant responsable de déclenchements non spécifiques de la synthèse.

Pour conclure ce chapitre sur les caractéristiques générales des activités RNA polymérasiques extraites de cellules eucaryotes, il convient d'être prudent avant de considérer ces propriétés comme intrinsèques des enzymes (GISSINGER et al - 66 -), et ne leur conférer qu'une valeur relative en fonction de la nature, de l'état et de la concentration du DNA employé comme matrice.

LE PROCESSUS GENERAL DE LA TRANSCRIPTION

Le processus général de la synthèse des RNA à partir des quatre ribonucléosides triphosphates (ATP, CTP, GTP, UTP), utilisant le DNA comme modèle et par action enzymatique des RNA polymérases DNA dépendantes, suit le schéma établi par BREMER et al. (67).



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

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

Tout au long de ces étapes se pose le problème du contrôle de la transcription tant du point de vue qualitatif (contrôle de l'expression de certaines gènes plutôt que d'autres, différenciation) que du point de vue quantitatif (contrôle de l'activité et du taux de transcription des gènes).

Les mécanismes de la transcription ont surtout été analysés avec les enzy-

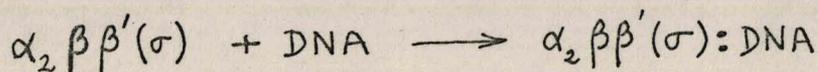
mes extraites de cellules procaryotes, aussi exposerons-nous les résultats acquis avec ces enzymes, mais chaque fois que nous le pourrons, nous mentionnerons les données connues pour les RNA polymérase de cellules eucaryotes.

## I - ETAPE D'INTERACTION DNA-RNA POLYMERASE

### A - LE PROCESSUS

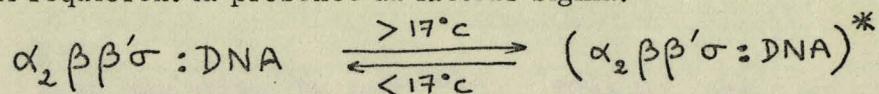
La séquence d'évènements précédant le déclenchement de la synthèse, étudiée in vitro avec l'enzyme d'E. coli comprenant quatre sous-unités  $\alpha_2 \beta \beta'$  et le facteur  $\sigma$  peut être résumée de la façon suivante (BURGESS - 68 -, BAUTZ - 69 -) :

1 - La RNA polymérase se fixe sur le DNA de façon non spécifique et réversible



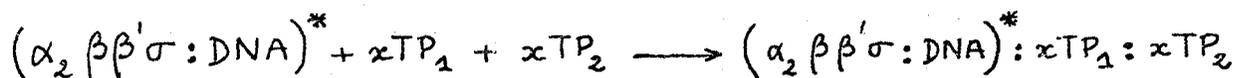
Seules des restrictions spatiales semblent limiter le nombre de molécules capables de s'associer au DNA.

2 - Dans des conditions appropriées qui favorisent généralement une fusion locale du DNA, il y a formation, en sites particuliers de celui-ci, de complexes stables qui requièrent la présence du facteur sigma.

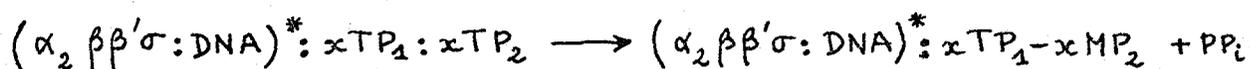


La formation de ce complexe "hautement" stable implique vraisemblablement un changement de conformation qui affecte à la fois la structure du DNA et celle de l'enzyme. Il semble que les molécules qui ne sont pas associées aux vrais sites de fixation ne parviennent pas à prendre cette nouvelle conformation spatiale. Elles sont alors sensibles à la rifampicine et peuvent être détachées du DNA par l'héparine (analogue structural compétiteur de la fixation). Ces sites spécifiques sont en nombre limité, VINOGRAD et al. ( 70 ) les ont estimés à 1 toutes les 600 paires de bases.

3 - L'étape suivante requiert la présence du premier, et peut-être aussi du second nucléotide qui sera incorporé dans la chaîne de RNA.



C'est avec la formation du premier lien phosphodiester que se fait le déclenchement proprement dit de la synthèse et à sa suite, l'allongement de la chaîne par additions successives des nucléotides.



## B - SPECIFICITE DES SITES DE FIXATION ET STABILITE

### 1 - Séquences spécifiques du DNA

Depuis SZYBALSKI ( 71 ) l'existence de régions du DNA contenant plus d'une dizaine de nucléotides identiques adjacents a été signalée dans de nombreux DNA. In vitro, la polymérase se fixe préférentiellement sur des séquences riches en bases pyrimidiques (SHISHIDO et IKEDA - 72 -), or, c'est précisément le brin de DNA complémentaire du plus grand nombre de RNA spécifiques du phage  $\lambda$  qui possède le plus de séquences riches en bases pyrimidiques (SZYBALSKI - 73 -, TAYLOR et al. - 74 -). Ces observations conduisent à un modèle où de telles séquences introduiraient un élément de discontinuité dans la double hélice du DNA en modifiant sa structure secondaire, et seraient les sites spécifiques de reconnaissance pour l'attachement de la RNA polymérase. De cette manière, seraient déterminés à la fois, le brin de DNA qui doit être transcrit et le point de départ de fonctionnement de l'enzyme.

Cette hypothèse particulièrement satisfaisante pour interpréter d'une manière physico-chimique le "promoteur" génétique de JACOB ( 75 ) ne peut cependant pas être soutenue totalement. Différents auteurs (NAKANA et SAKAGUCHI - 76 -, MATSUKAGE et al. - 77 -, BLATTNER et al. - 78 -) ont isolé les sites d'association de la polymérase d'E. coli avec divers DNA (E. coli, phage T4, phage T5), mais n'ont pu mettre en évidence de séquences spécifiques ; cependant, certaines parties du promoteur doivent y être contenues puisque les RNA sont correctement transcrits.

Chez les Eucaryotes, l'accessibilité au DNA pourrait être aussi sous le contrôle des protéines de la chromatine.

### 2 - Intervention du facteur sigma

Nous avons vu que le facteur sigma était indispensable à la formation d'un complexe stable entre le DNA et l'enzyme. Etudiant la séquence 5'-terminale des RNA transcrits in vitro, SUGIURA et al. ( 79 ) ont montré que, démunie du facteur  $\sigma$ , l'enzyme peut encore transcrire le DNA, mais perd sa capacité de sélectionner les sites propres au déclenchement de la polymérisation. Au contraire, le facteur  $\sigma$  limite le fonctionnement de l'enzyme à certains sites spécifiques ("initiation sites"). Ce facteur permettant à l'enzyme de commencer à transcrire un opéron donné, agirait donc comme un contrôle "positif" de la synthèse, en opposition au contrôle "négatif" exercé par le répresseur.

Le facteur  $\sigma$  ne ferait pas partie intégrante de l'enzyme, mais viendrait s'y joindre, lors de la fixation sur le DNA, pour lui conférer la spécificité voulue. Une fois la polymérisation commencée, le RNA ayant atteint une longueur de 40 nucléotides environ (KRAKOW - 80 -), ce facteur se séparerait à nouveau de l'enzyme et pourrait être réutilisé dans une nouvelle opération de fixation spécifique.

### 3 - Conditions ioniques et présence des nucléosides triphosphates

La formation d'un complexe RNA polymérase:DNA nécessite des conditions de dénaturation locale du DNA. C'est pourquoi une faible force ionique et une température supérieure à 17°C sont requises.

A haute force ionique et en absence de synthèse, l'enzyme est incapable de s'associer stablement au DNA, cependant, ANTHONY et al. ( 81 ) ont montré que la présence des nucléosides triphosphates pouvait stabiliser ce complexe contre sa dissociation par le sulfate d'ammonium 0,4 M. En fait, deux nucléotides suffisent et les nucléotides puriques sont plus efficaces que les nucléotides pyrimidiques. (GOLDTHWAIT et al. - 82 -). Ces résultats sont en accord avec le fait que, d'une part, l'enzyme possède un site préférentiel d'association des ribonucléosides triphosphates puriques (WU et GOLDTHWAIT - 83 - - 84 -), et que d'autre part, le nucléotide initial est toujours de type purique (voir page 20 ).

Il convient cependant de préciser que ceci a été récemment contesté par Mc CONNELL et BONNER ( 85 ) qui n'ont pu reproduire les résultats précédents avec des nucléotides hautement purifiés. Ils attribuent cette stabilisation à la présence d'oligonucléotides néoformés ou déjà présents dans les produits de départ.

#### 4 - Stabilisation du complexe lors de la synthèse

La stabilisation du complexe s'accroît dès la formation de la première liaison phosphodiester. DUNN et BAUTZ ( 86 ) ont d'ailleurs montré que, in vitro, avec le DNA du phage T4, cette stabilisation était plus efficace lorsque cette première liaison se faisait entre un nucléotide purique et un nucléotide pyrimidique, d'ailleurs le RNA synthétisé débute principalement par la séquence pppApU ---.

Cette stabilisation devient totale dès que la polymérisation est commencée. Formé à basse force ionique, le complexe DNA : RNA polymérase devient alors fonctionnel en présence des quatre ribonucléosides 5'-triphosphates. Cependant, une fois la synthèse induite, il faut accroître la force ionique de l'ordre de 0,4 si l'on veut poursuivre la polymérisation dans des conditions optimales (FUCHS et al. - 87 -). Cette augmentation de la force ionique détache, en outre, la RNA polymérase non spécifiquement liée et non fonctionnelle, c'est-à-dire non stabilisée.

Dans ce complexe ternaire, l'enzyme recouvre une partie du DNA. Mettant à profit cette propriété, SENTENAC et al. ( 88 ) ont excisé ce complexe par action de la DNase et calculé que la portion de DNA imbriquée dans le complexe est constituée d'environ 75 nucléotides. Ils ont montré que le facteur "sigma" était déjà absent du complexe ternaire RNA polymérase : DNA : RNA naissant (RUET et al. - 89 -).

## II - DECLENCHEMENT DE LA SYNTHÈSE

Que l'étude de la biosynthèse des RNA soit abordée in vivo ou in vitro, la connaissance du premier nucléotide incorporé dans les chaînes de RNA nous apparaît d'une particulière importance. In vivo, la séquence 5'-terminale est la structure reflétant la fonction de déclenchement de la synthèse mais est aussi un excellent "marqueur" pour suivre quelques étapes du remaniement ("processing") ou du

renouvellement ("turn-over") des RNA néosynthétisés. In vitro, c'est un des moyens pour connaître en terme qualitatif les activités des RNA polymérases.

Comme nous le verrons ci-après, la nature particulière du nucléotide initial ne doit pas être sans signification dans le mécanisme intime du déclenchement de la biosynthèse des RNA.

#### A - NATURE DU NUCLEOTIDE INITIAL

La formation de la chaîne polyribonucléotidique se fait par addition de nucléoside 5'-triphosphates à l'extrémité 3'-hydroxyle du polymère (BREMER et al. - 90 -, MAITRA et HURWITZ - 91 -) (cf. page 25 ), la persistance des phosphoryles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  en extrémité 5' permet de mettre en évidence la nature de ce nucléotide.

Sur les tableaux III et IV (p. 21 et 22), où figure la nature des nucléotides 5'-terminaux, des RNA synthétisés in vitro ou in vivo, la présence exclusive de nucléotides puriques (ATP ou GTP) apparaît sans ambiguïté et semble être un phénomène général.

La signification de ce fait est encore incertaine. Il peut être interprété comme une conséquence de la nature pyrimidique des sites privilégiés de fixation de l'enzyme sur le DNA, pour autant que celle-ci soit toujours démontrée. Il n'est pas improbable que la polymérase implique elle-même la nature purique des nucléotides initiaux. GOLDTHWAIT et al. ( 92 ) ont montré que la polymérase d'E. coli possédait des sites d'association des nucléosides triphosphates, les uns fixant préférentiellement les nucléotides puriques et impliqués dans le déclenchement de la synthèse, les autres fixant également les quatre nucléotides nécessaires à l'allongement de la chaîne de RNA. De plus, la stabilisation du complexe DNA : enzyme est maximale lorsque le premier lien phosphodiester est créé avec un nucléotide initial purique (DUNN et BAUTZ - 93 -).

En résumé, les diverses interactions DNA : Enzyme nécessaires au déclenchement de la synthèse se trouvent favorisées, vraisemblablement en terme d'énergie, par la mise en jeu des nucléotides de type purique.

Extrémités 5'-triphosphates de RNA synthétisés in vitro par les RNA polymérases DNA-dépendantes.

RNA synthétisés <u>in vitro</u> avec la RNA polymérase de :	utilisant comme modèle le DNA de :	Extrémité 5'-triphosphate	Références
<u>E. Coli</u>	Phage T <sub>4</sub>  Phage T <sub>7</sub> Phage Φ <sub>80</sub> Phage λ Phage Fd	pppA et pppG  pppG pppG pppA pppA pUpGp pppA pUpAp	BREMER <u>et al.</u> (94) MUELLER <u>et BREMER</u> (95) SENTENAC <u>et al.</u> (96) OKAMOTO <u>et al.</u> (97) LEBOWITZ <u>et al.</u> (98) SIGIURA <u>et al.</u> (99)
<u>E. Coli</u>	<u>E. Coli</u> Thymus de Veau	pppA et pppG pppA et pppG	GOLDSTEIN <u>et al.</u> (100) MAITRA <u>et HURWITZ</u> (101) TADA <u>et TADA</u> (102)
T <sub>3</sub>	T <sub>3</sub>	pppG	MAITRA <u>et HUANG</u> (103)
<u>Azotobacter Vinelandii</u>	Phage T <sub>2</sub> Phage T <sub>4</sub> Thage T <sub>7</sub> Thymus de Veau	pppA et pppG	KRAKOW <u>et HORSLEY</u> (104)
Thymus de Veau			
Type A	Thymus de Veau	pppG (prédominant) et pppA	CHAMBON <u>et al.</u> (105)
	SV 40 (Forme I)		MANDEL <u>et CHAMBON</u> (106)
Type B	Thymus de Veau	pppG (prédominant)	CHAMBON <u>et al.</u> (107)
		pppG et pppA (prédominance déterminée par les conditions d'incubation)	MEILHAC <u>et CHAMBON</u> (108) GISSINGER <u>et al.</u> (109)
	SV 40 (Forme I)	pppG et pppA	MANDEL <u>et CHAMBON</u> (110)
Cellules CV	SV 40 "		
Type I		pppG	KRSMANOVIC <u>et</u>
Type II		pppA	WEISSMAN (110 a)
Foie de Rat			
Type B	Foie de Rat Thymus de Veau	pppG prédominant pppA pppG (?)	SEIFART (111) EDWARD <u>et SMUCKLER</u> (112)
Myélome de la souris			
Type B	Thymus de Veau	pppA pppG (?)	LENTFER <u>et LEZIUS</u> (113)
Levure			
Type B	DNA de levure	pppG (prédominant)	DEZELEE <u>et SENTENAC</u> (114)



TABLEAU IV :

Extrêmités 5'-triphosphates de RNA synthétisés in vivo.

RNA des phages virus et cellules procaryotes	Extrêmités 5'-triphosphates	Références
Phage f <sub>2</sub>	ppp <b>A</b> ppp <b>G</b>  ppp <b>G</b> pGpGpU ---- N <sub>74</sub>	TAKANAMI (115) DAHLBERG (116) ROBERTSON et ZINDER (117) LING (118)
Phage R <sub>17</sub>	ppp <b>G</b> p(Pu)p(Py)p--- ppp <b>G</b> pGpGpUp----- N <sub>117</sub>	ROBLIN (119) ADAMS <u>et al.</u> (120)
Phage M S <sub>2</sub>	ppp <b>G</b> ppp <b>G</b> pGpGpUp----- N <sub>132</sub>	GLITZ (121) DE WACHTER <u>et al.</u> (122)
Phage R <sub>23</sub>	ppp <b>G</b>	WATANABE et AUGUST (123)
Phage Qβ	ppp <b>G</b>	WATANABE et AUGUST
Virus de la grippe	ppp <b>A</b>	YOUNG et CONTENT (124)
Virus de la nécrose du tabac	pp <b>A</b> pGpUp	LESNAW et REICHMANN (125)
<u>E. Coli</u>	ppp <b>G</b> -- et ppp <b>A</b> ppp <b>G</b> ---/ppp <b>A</b> --- = 1 ppp <b>G</b> /ppp <b>A</b> = 2 à 3	JORGENSEN <u>et al.</u> (126) KRSMANOVIC et SUMMERS (Résultats non publiés)
RNA de cellules Eucaryotes	Extrêmités 5'-triphosphates	Références
rRNA 5 S de cellules Hela	ppp <b>G</b> pUp-- (76 à 87 p.100)	HATLEN <u>et al.</u> (127)
rRNA 5 S de cellules KB	(pp)p <b>G</b> pUp--	FORGET et WEISSMAN (128)
d-RNA de hauts poids moléculaires de noyau de Foie de Rat	ppp X-- et ppX--  ppp <b>A</b>	RYSKOV et GEORGIEV (129)  RYSKOV <u>et al.</u> (130)
m-RNA d'insecte	(pp)p <b>A</b> pApApCp---	ILAN et ILAN (131)

Qu'il soit dû au DNA ou à l'enzyme, ce fait est remarquable.

### B - LA SEQUENCE 5'-TERMINALE

La présence de sites spécifiques de fixation de l'enzyme et d'un seul type de nucléotide initial, ont encouragé des équipes à chercher une séquence 5'-terminale unique pour y trouver la réponse à quelques mécanismes moléculaires généraux du déclenchement de la synthèse. Ces séquences uniques n'ont pas été mises en évidence jusqu'à présent, cependant, SUGIURA et al. (132) ont montré, avec la polymérase d'E. coli, qu'elles pouvaient être réduites à quelques unes si la synthèse avait lieu en présence du facteur sigma.

La variété des séquences 5'-terminales soutient mal l'hypothèse d'une structure spécifique du DNA représentant en termes physico-chimiques le "promoteur". A cet égard, il convient de noter que l'équipe de SZYBALSKI apporte peut-être une explication à cette divergence. Ils ont observé (BLATTNER et al. - 133-) et à leur suite SCHÄFER et al. (134), que le site de fixation spécifique de la polymérase ("promotor site"), était distant de quelques centaines de nucléotides du site de déclenchement de la synthèse ("Start signal site"). Ils ont suggéré que la région comprise entre ces deux sites pouvait être une région de stockage ("storage stretch") où les polymérases s'aligneraient afin d'assurer une production rapide de copies multiples de RNA.

### C - DEPHOSPHORYLATION DE L'EXTREMITE 5'-TRIPHOSPHATE

Tandis que les RNA nouvellement formés possèdent encore le groupement triphosphate 5'-terminal, les RNA cellulaires stables - tRNA et rRNA, à l'exception toutefois d'une partie des rRNA 5 S (HATLEN et al. - 135 -, DARNELL - 136 -), possèdent une extrémité 5'-monophosphate (MADISON - 137 -, LANE et TAMAOKI - 138-).

Il se pose donc la question de la déphosphorylation de cette extrémité et/ou de la perte de fragments polynucléotidiques 5'-terminaux.

A partir d'E. coli, MAITRA et HURWITZ (139) ont récemment précisé l'action d'enzymes capables de libérer le phosphate en  $\gamma$  des nucléotides 5'-termi-

naux. Ces enzymes qu'ils avaient appelés "GTP terminus enzyme" et "ATP terminus enzyme" (MAITRA et al. - 140 -), pourraient être impliquées dans une régulation post-transcriptionnelle des RNA bactériens qu'il reste à établir. En ce qui concerne les RNA messagers, de nombreuses observations indiquent que la transcription (voir page 25), la traduction (SALAS et al. - 141 -) et la dégradation (KUWANA et al. - 142 -), procèdent toutes dans le sens 5' vers 3'.

Chez les Eucaryotes, la perte de l'extrémité triphosphate se produit sans doute rapidement et vraisemblablement dans le noyau (voir notamment le chapitre sur la régulation). C'est probablement l'une des raisons pour lesquelles peu d'extrémités 5'-triphosphates ont été mises en évidence dans les cellules animales.

La déphosphorylation n'est sans doute pas la seule cause de la perte des extrémités 5'-triphosphates puisque bon nombre de RNA possèdent une extrémité 5'-monophosphate pyrimidique (LANE et TAMAOKI - 143 -). Il ne s'agit pas toujours de RNA stables et il peut s'agir de RNA en cours de remaniement, tel le RNA 45 S (BUSCH - 144 -). La destruction des fragments 5'-terminaux peut résulter de coupures endonucléasiques nécessaires au remaniement des RNA ; il n'est pas non plus impossible qu'ils soient dégradés dès le début de la synthèse par la ribonucléase H (HAUSEN et STEIN - 145 -), afin de rendre immédiatement les sites de déclenchement accessibles pour une nouvelle synthèse.

### III - LA SYNTHÈSE PROPREMENT DITE

L'information génétique est portée par les deux brins du DNA, cependant, même en large excès, il n'est pas possible d'hybrider plus de 50 p. 100 du RNA avec le DNA chez les Bactéries (Mc CARTHY et BOLTON - 146 -). En outre, tous les RNA cellulaires, stables ou à haute vitesse de renouvellement, sont des molécules monocaténares qui ne peuvent s'hybrider entre elles ; ils n'ont donc pas pu être codés par deux chaînes complémentaires de DNA.

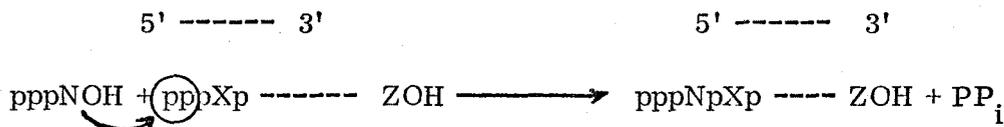
Ainsi, les deux brins du DNA peuvent servir de matrice à la biosynthèse des RNA, mais pour un tronçon donné, une seule fibre est transcrite.

A - SENS DE LA SYNTHÈSE

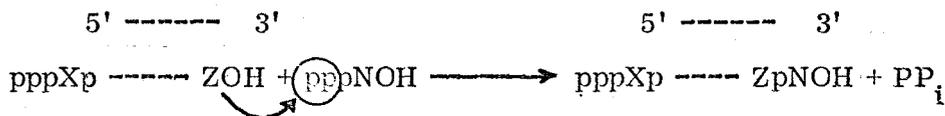
La croissance de la chaîne polyribonucléotidique se fait par addition des nucléosides triphosphates, dans l'ordre prescrit par la séquence du DNA selon l'appariement des bases, par réactions successives d'estérification.

L'addition des nucléosides triphosphates sur le RNA en croissance peut se concevoir de deux manières :

- croissance dans le sens  $3' \longrightarrow 5'$  :



- croissance dans le sens  $5' \longrightarrow 3'$  :



Deux considérations importantes, qui guideront nos conclusions personnelles peuvent être faites à l'examen de ces formules :

1) Dans le premier cas ( $3' \longrightarrow 5'$ ) (voir fig. 1 p. 26)

- le nucléoside 5'-triphosphate terminal est de nature variable selon le dernier triphosphate incorporé,

- la séquence 5'-terminale doit être sous la dépendance de la RNA polymérase.

2) Dans le second cas ( $5' \longrightarrow 3'$ ) (voir fig. 1 p. 26)

- le nucléoside 5'-triphosphate doit être le même tout au long de la synthèse,

- la séquence 3'-hydroxyle terminale est imbriquée dans le complexe DNA : RNA polymérase.

Parmi tous les travaux qui ont permis de déterminer le sens de la trans-



cription, nous citerons les plus probants. Ils s'accordent à proposer un sens unique de transcription de 5' vers 3'.

Utilisant la RNA polymérase de Micrococcus Lysodeikticus, SHIGEURA et BOXER (147) ont montré que le 3'-dATP inhibait la synthèse des RNA puisque la liaison 3'  $\longrightarrow$  5' phosphodiester ne pouvait pas se faire. En outre, dans le produit d'hydrolyse alcaline du RNA, dont la synthèse a été bloquée, toute la radioactivité est pratiquement présente dans la fraction nucléosidique, l'addition des nucléosides triphosphates se fait donc sur l'extrémité 3'-hydroxyle.

Le sens chimique de la synthèse des RNA in vitro a été démontré par BREMER et KONRAD (148), en soulignant que l'ATP 5'-terminal de la chaîne n'est spécifiquement marqué que si l'incorporation de l'ATP-<sup>3</sup>H est faite dès le début de la synthèse.

Utilisant des nucléosides 5'-triphosphates dont le groupement phosphate en  $\gamma$  est marqué par le radiophosphore, MAITRA et HURWITZ (149) ont montré que la radioactivité était spécifiquement liée à l'extrémité 5'-terminale lorsque la synthèse était tout d'abord déclenchée avec des nucléosides triphosphates, marqués puis poursuivie avec des nucléotides non marqués.

#### B - FORMATION D'UN COMPLEXE TERNAIRE DNA : RNA POLYMERASE : RNA

Avec la croissance de la chaîne se forme un complexe ternaire entre la RNA polymérase, le DNA et le RNA naissant (BREMER et KONRAD - 150 -, SENTENAC et al. - 151 -). Des hybrides naturels entre DNA et RNA ont pu être isolés à partir de cellules procaryotes et eucaryotes. MILLER et al., en 1969-(152) 1970 (153), sont parvenus à observer au microscope électronique, ces complexes représentant le "gène en action" (voir p. 28, fig. 2).

##### 1) Les hybrides naturels extraits de cellules procaryotes

Après des tentatives non fructueuses de SPIEGELMAN et al. (154), KONRAD et STENT (155), un hybride DNA : RNA a pu être caractérisé par HAYASHI et HAYASHI (156) à partir d'E. coli infecté par le phage  $\phi$ X-174. Ils

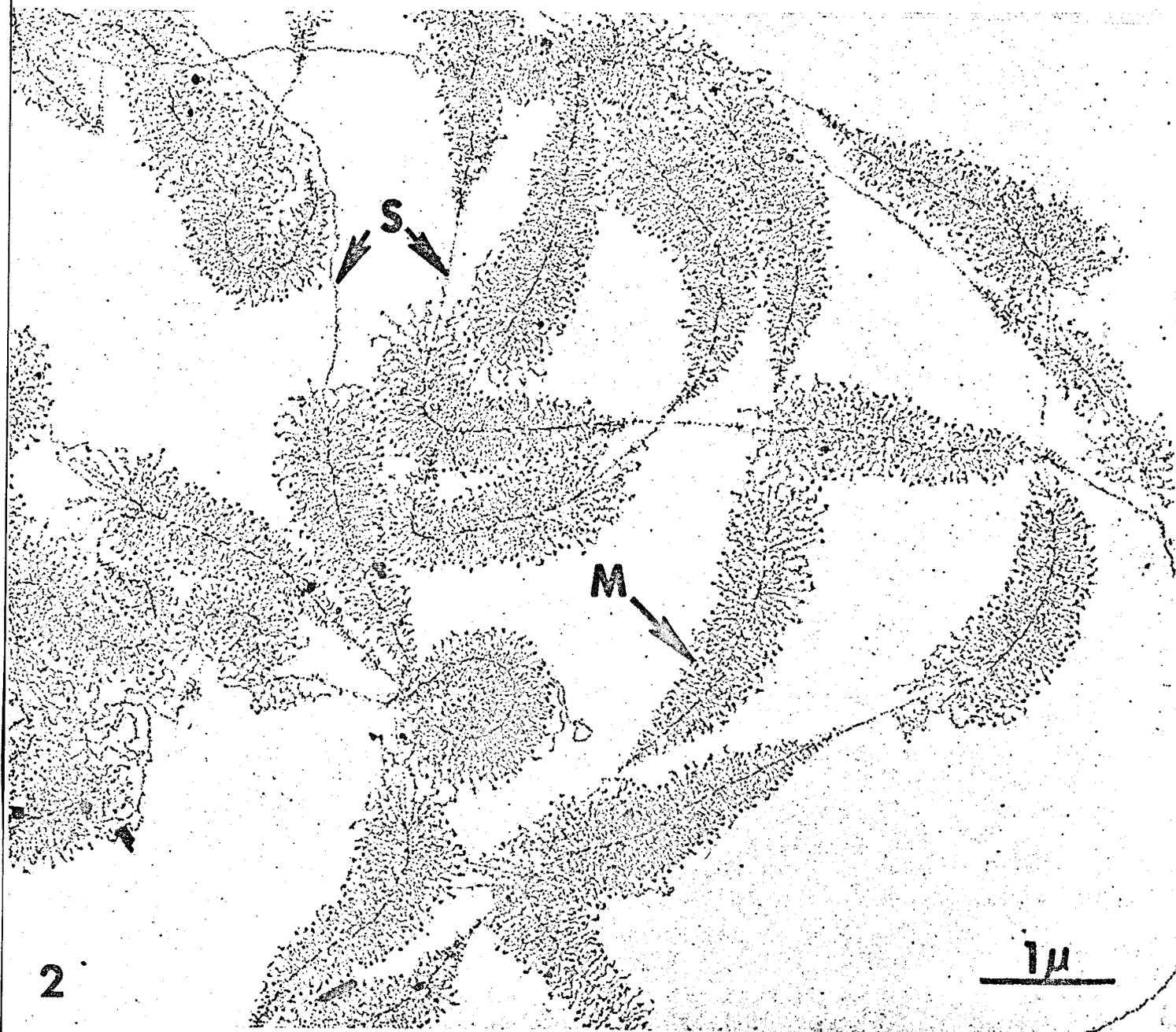


Figure n° 2 :

Observation au microscope électronique des RNA en cours de synthèse, in vivo, dans les ovocytes d'amphibiens (Triturus viridescens) (MILLER et al. - 157 -)

"S" : DNA (portion non transcrite)

"M" : RNA en cours de transcription.



montrèrent que le RNA associé au DNA était résistant à l'action de la ribonucléase, et que le complexe se dissociait sous l'action de la chaleur ou de la formamide (rupture des ponts "hydrogène"). La longueur du brin de RNA hybridé fut évaluée à une cinquantaine de nucléotides (3 à 3,5 S).

Chez E. coli, Staphylococcus aureus et Micrococcus lysodeikticus, TONGUR et al. (158) ont mis en évidence un complexe identique dont la structure est préservée par une protéine qu'ils soupçonnent être la RNA polymérase elle-même. Le RNA peut être détaché de l'hybride par chauffage ou sous l'action de l'urée 6 M, son coefficient de sédimentation moyen est de 7,5 S. La quantité de RNA représente 10 à 15 p. 100 du DNA et 2 à 4 p. 100 de la totalité des RNA cellulaires. Sa composition en bases ressemble plus à celle du RNA total qu'elle ne reflète celle du DNA.

Enfin, STONINGTON et PETTIJOHN (159) ont isolé le DNA d'E. coli sous la forme d'une structure compacte (3200 S) contenant de petites quantités de RNA nouvellement synthétisé et de protéines caractérisées comme étant la RNA polymérase.

## 2) Les hybrides naturels extraits de cellules eucaryotes

A partir de la fraction microsomale (sédimentation sous 105 000 g) de Neurospora crassa, SCHULMAN et BONNER (160) ont extrait un complexe DNA : RNA par le mélange de désoxycholate de sodium et de chloroforme-alcool isoamylique. En se fondant sur les courbes de dénaturation thermique, sur la centrifugation en gradient de chlorure de césium (diminution de densité du complexe après l'action de la RNase) et sur la sensibilité à la DNase, les auteurs pensent qu'il s'agit d'un hybride contenant deux brins de DNA et un brin de RNA.

Un complexe DNA : RNA a aussi été isolé par MEAD (161) par une méthode semblable à partir de Drosophila melanogaster. Le rapport DNA/RNA est, dans ce cas, égal à deux.

Dans les cellules de l'hépatome ascitique, MANDEL et BORKOWSKA (162) ont utilisé le SDS suivant le procédé de KAY (163), et le phénol (BORKOWSKA et

al. - 164-). Ils obtiennent par chromatographie sur colonne MAK (méthyl-albumine-Kieselguhr) deux fractions contenant à la fois le DNA, qu'ils dénomment hybrides naturels et qui ont des propriétés métaboliques différentes.

RICHTER et SENGER ( 165 ) ont étudié un complexe DNA : RNA isolé de Chlorella après un marquage court par le radiophosphore. La composition en bases du RNA néosynthétisé suggère, selon les auteurs, qu'une seule chaîne de DNA sert de modèle à la polymérisation des ribonucléotides.

WILKINSON et KIRBY ( 166 ) ont, semble-t-il, obtenu un complexe DNA : RNA à partir du foie de Rat sain et hépatomateux, au moyen de 4-amino-salicylate de sodium et du phénol. Ce complexe est légèrement sensible à la RNase. Par une méthode semblable, WATSON et RALPH ( 167 ) ont isolé un RNA associé au DNA dans le cas de cellules de Sarcome 180.

Dans le cas de cellules He La, faisant appel au mélange SDS-chloroforme-alcool isoamylique, LEVIS, KRSMANOVIC et ERRERA ( 168 ) ont pu mettre en évidence un RNA rapidement marqué associé au DNA.

Dans notre laboratoire, KRSMANOVIC, SEGARD et MONTREUIL ( 169 ) sont parvenus à isoler un complexe DNA : RNA du foie de Rat par une méthode semblable. L'action de la force ionique, la dissociation par la chaleur et la formamide, la résistance partielle à la RNase ont montré l'action prépondérante des liaisons ponts "hydrogène" dans la stabilité de ce complexe (SERGEANT et al. - 170-).

AVADHANI et al. ( 171 ) ont isolé et montré qu'un tel complexe DNA : RNA existait chez Euglena gracilis. En outre, ce complexe stimule fortement l'incorporation des amino-acides dans un système acellulaire d'E. coli (AVADHANI et al. - 172).

Enfin, GAITSKHOKI et al. ( 173 ) ont isolé de mitochondries d'hépatocytes de Rat des complexes DNA : RNA qui stimulent aussi la synthèse protéique dans un système acellulaire de foie de Rat. Les auteurs distinguent deux types de complexes

selon la stabilité des liaisons DNA-RNA lors du passage sur colonne MAK.

#### C - VITESSE D'ALLONGEMENT DE LA CHAÎNE

La vitesse de croissance des chaînes de RNA mesurée in vitro ou la vitesse estimée in vivo, varie d'une quinzaine à une centaine de nucléotides par seconde (BREMER et KONRAD - 174 -, BREMER - 175 -, BREMER et BERRY - 176 -).

Il faut plusieurs minutes pour synthétiser des RNA de hauts poids moléculaires, ce qui laisse présumer de la nécessité de copies simultanées des gènes pour obtenir une réponse suffisamment rapide à un "stimulus".

#### IV - ARRET DE LA SYNTHÈSE

L'existence de RNA de tailles bien définies implique l'existence de signaux de fin de transcription. Ces signaux peuvent être portés par certaines séquences spécifiques du DNA, selon un mécanisme semblable à celui de fin de lecture du RNA messenger. Ils peuvent aussi être réalisés par l'intervention de protéines spécifiques : C'est la suggestion faite par ROBERTS ( 177) qui, en comparant les RNA transcrits in vivo et in vitro par la RNA polymérase d'E. coli, a mis en évidence un facteur protéique (facteur  $\rho$ ) qui contribue à la précision de l'arrêt de la synthèse. Cependant, à l'aide de complexe naturel DNA : RNA polymérase : RNA, PETTIJOHN et al. ( 178 ) ont pu poursuivre la synthèse in vitro et obtenir des RNA de tailles comparables à celles des RNA faits in vivo sans intervention d'aucune autre protéine que celles constituant la polymérase.

REGULATION DE LA BIOGENESE DES RNA  
CHEZ LES EUCARYOTES

La raison primordiale de la régulation de la transcription est qu'elle permet, par voie de conséquence, de contrôler la biosynthèse protéique.

De nombreux supports expérimentaux sont venus étayer l'hypothèse émise en 1961 par JACOB et MONOD (179) sur la régulation de la transcription dans les cellules bactériennes (voir Fig. 3 p. 33). La plupart des informations concernant cette régulation sont issues des études portant sur les RNA messagers des bactéries et c'est par extrapolation que le système a été étendu aux gènes responsables d'autres espèces de RNA.

Cette extrapolation ne peut pas être faite aussi facilement vers les systèmes eucaryotes où, d'une part, le DNA se trouve sous forme de complexes nucléo-protéiques localisés dans un noyau, et où, d'autre part, l'organisation multicellulaire vient compliquer le schéma. L'arsenal des méthodes génétiques qui se sont développées pour élucider le système de régulation chez les bactéries n'existe pas pour les systèmes eucaryotes. C'est par le biais de méthodes biochimiques que les diverses étapes de la régulation chez les Eucaryotes ont pu être abordées.

Avant d'exposer brièvement les notions acquises jusqu'à présent sur la régulation de la biogénèse des RNA dans les systèmes eucaryotes, il convient de rappeler qu'il existe deux niveaux majeurs où le contrôle de l'expression génétique est possible :

1° - Au stade de l'approvisionnement en RNA nécessaires à la biosynthèse protéique : DARNELL *et al.* (180) distinguent deux possibilités. L'une concerne la production des RNA, c'est la régulation "transcriptionnelle" ; l'autre intéresse le nombre de molécules qui, après remaniement, seront effectivement impliquées dans le processus de biosynthèse protéique, "c'est la régulation post-transcrip-

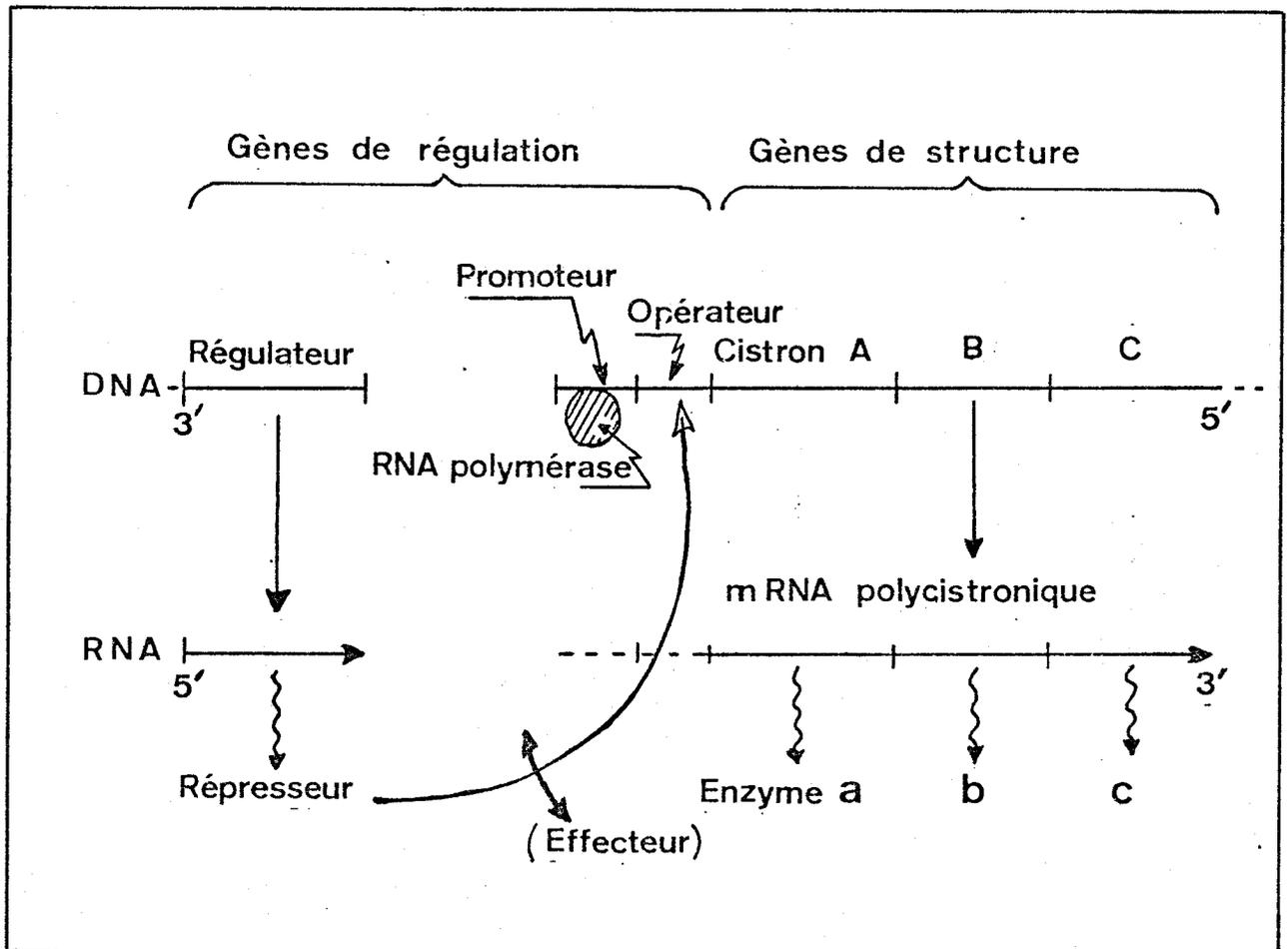


Figure n° 3 :

Modèle pour la régulation de la transcription chez les Procaryotes selon JACOB et MONOD (181).

Dans le cas d'un système inductible, l'effecteur est un inducteur qui, en s'associant au répresseur, l'empêche de se lier à l'opérateur.

Dans le cas d'un système répressible, l'effecteur est un co-répresseur qui, en s'associant au répresseur, lui permet de se lier à l'opérateur.

tionnelle".

2° - Au stade de l'utilisation des RNA. Il s'agit surtout d'une modulation de l'activité de la traduction que nous ne traiterons pas ici.

## I - REGULATION "TRANSCRIPTIONNELLE"

Un point important à souligner est que près de 90 p. 100 du DNA des cellules eucaryotes n'est pas transcrit et que les parties transcrites sont spécifiques de chaque tissu (PAUL et GILMOUR - 182 -). Comme le génome est également représenté dans toutes les cellules, il apparaît que le problème principal est plus de déréguler certains gènes que de les activer.

### A - INTERVENTION DES HISTONES

Depuis 1960 les histones sont de plus en plus soupçonnées d'intervenir dans la régulation de la synthèse des RNA. Cependant, la compréhension du rôle des histones dans leur interaction avec le DNA est loin d'égaliser la connaissance que l'on a de leur structure chimique. Les histones sont des protéines basiques de 100 à 200 amino-acides que l'on peut regrouper en cinq familles principales (voir notamment DE LANGE et SMITH - 183 -).

C'est en s'associant fortement au DNA que les histones "masquent" le DNA à la transcription. En effet, in vitro, seules quelques portions du DNA de la chromatine sont transcrites, alors que près de 50 p. 100 sont transcrits si les histones en sont détachées. Selon SPELSBERG et al. ( 184 ), l'effet des histones s'exercerait plutôt en inhibant le rôle de matrice du DNA qu'en provoquant une exclusion des polymérase. La dérégulation des gènes contrôlés par les histones se ferait par acétylation ou phosphorylation de celles-ci, qui en affaiblissant l'interaction ionique, provoquerait la destabilisation locale du DNA nécessaire à la mise en place et au déroulement du processus de transcription.

### B - INTERVENTION DES PROTEINES ACIDES DE LA CHROMATINE

Outre les histones, la chromatine contient toute une série de protéines dont le caractère acide est dû à leur composition en amino-acides et aussi à leur

taux élevé en résidus phosphorylés (1 p. 100 de phosphore). Peu de précisions sont connues sur leurs fonctions (voir HNILICA - 185-, STELLWAGEN et COLE - 186 -). En s'associant aux histones, elles favoriseraient leur détachement du DNA. En fait, ces protéines acides englobent de nombreuses classes de protéines dont le rôle pourrait être très divers : des protéines de structure du chromosome, des "enzymes de dérégulation" (acétylase ou phosphorylase), des récepteurs d'hormones stéroïdiques, et peut être aussi de véritables répresseurs ou dérégulateurs. (SIRLIN - 187 -).

#### C - INTERVENTION DU RNA CHROMOSOMAL

BONNER et al. ( 188 ) ont isolé de la chromatine un RNA d'un type particulier (ChRNA) dont le rôle serait semblable à celui de certaines protéines acides, c'est-à-dire de déplacer les histones du DNA et de le rendre accessible à la transcription. D'après le groupe de BONNER et HUANG, ce RNA possède des propriétés particulières qui le classent à part dans les RNA nucléaires. En effet, il a une taille d'une cinquantaine de nucléotides et possède 9 à 10 p. 100 de nucléotides dihydropyrimidiques. Cependant, seul ce laboratoire a pu isoler le RNA chromosomal dont l'existence est mise en doute par plusieurs auteurs (voir notamment SZESZAK et PIHL - 189 -).

#### D - INTERVENTION DES HORMONES

Nous venons de voir une série d'hypothèses concernant la dérégulation positive ou négative du DNA qui intervient en réponse à des événements "extérieurs". Dans les systèmes pluricellulaires, le génome de la plupart des cellules doit être accessible à un contrôle plus lointain de l'organisme entier et c'est là notamment le rôle des hormones. Très peu d'éléments sont actuellement connus sur l'action des hormones au niveau du contrôle "transcriptionnel" de l'expression du génome. Cette action pourrait être directe sur le DNA (HAMILTON - 190 -) ou s'exercer sur des protéines réceptrices de la chromatine (TALWAR et al. - 191 -; JENSEN et al. - 192 -). L'action hormonale pourrait se faire par le relais de l'AMP cyclique dont l'intervention dans les mécanismes de phosphorylation favoriserait la dérégulation du DNA.

## II - REGULATION "POST-TRANSCRIPTIONNELLE"

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

C'est au niveau du remaniement ("processing") de ces molécules pour aboutir à des formes directement impliquées dans le processus de la biosynthèse protéique que se situe la régulation "post-transcriptionnelle".

### A - FORMES CONJUGUEES DANS LE NOYAU

#### 1 - Particules ribonucléoprotéiques, précurseurs ribosomiaux

Les ribosomes sont des RNP formés principalement par l'association de protéines à deux types de RNA, le RNA 28S et le RNA 18S. Cependant, dans le nucléole, c'est une molécule géante 45S de RNA de type ribosomal qui est synthétisée, et sera clivée ensuite.

La relation entre RNA ribosomal et précurseur a pu être clairement démontrée par leurs similitudes de composition en bases, leur analogie de structure et parce qu'ils contiennent les mêmes séquences spécifiques (LINDBERG et DARNELL - 193 -, SOIERO et al. - 194 -, MADEN - 195 -, JEANTEUR et al. - 196 -). Ce RNA 45S est associé à des protéines pour former une particule RNP 80S dont les modifications ultérieures pour former le ribosome sont résumées par la Fig. 4, (p. 37).

#### 2 - Particules ribonucléoprotéiques, précurseurs des messagers

Les précurseurs des RNA messagers sont des molécules de hauts poids moléculaires (5000 à 50000 nucléotides) dont la composition en bases est proche de celle du DNA (SCHERRER et al. - 197 -, SCHERRER et MARCAUD -198 -) d'où leur appellation de "dRNA" ou "DNA-like RNA". Pour des temps de marquage courts, toute la radioactivité se trouve liée à ces RNA nucléaires mais ce matériel ne s'accumule pas en grande quantité. La polydispersité de leur taille les

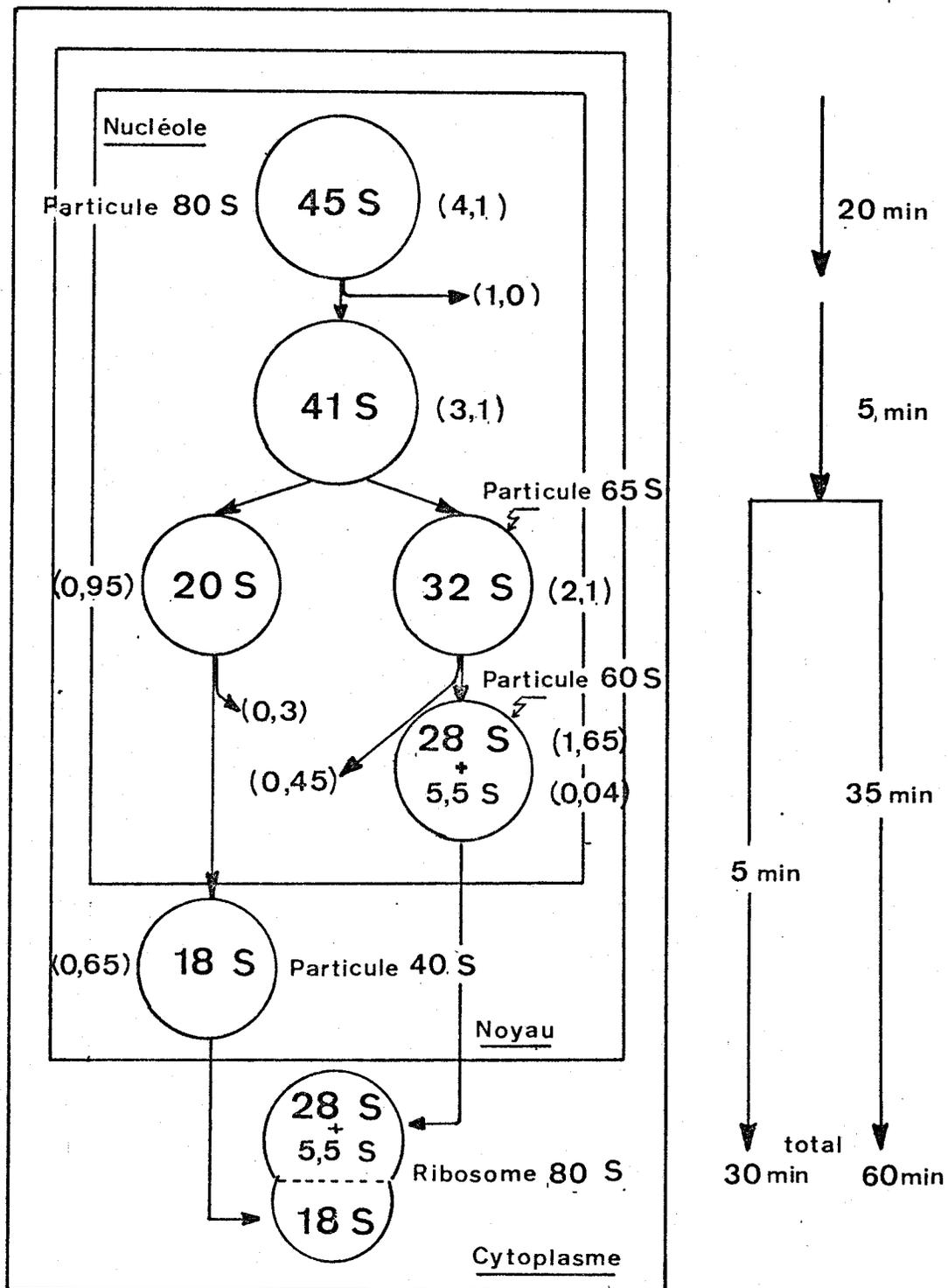


Figure n° 4 :

Remaniement du précurseur des rRNA pour donner naissance à la particule ribosomiale dans le cas de cellule HeLa (WEINBERG et PENMAN - 199-)

Les valeurs des coefficients de sédimentation (en svedberg) et des masses moléculaires (en millions de daltons) se réfèrent aux RNA.

Les temps nécessaires à ces remaniements sont indiqués en marge.

Le rRNA 5S, non mentionné, s'intègre dès la formation de la particule 80S.



a fait appeler aussi "RNA nucléaires hétérogènes" (HnRNA).

La question a été soulevée de savoir si les RNA messagers provenaient réellement de ces précurseurs "géants". Parmi toutes les expériences qui tendent à soutenir l'existence de cette relation, deux semblent apporter les meilleures preuves : d'une part, la mise en évidence de séquences spécifiques du mRNA viral dans les HnRNA de cellules transformées (LINDBERG et DARNELL - 200 -, WALL et DARNELL - 201 -, TONEGAWA et al. - 202 -) et, d'autre part, la propriété exceptionnelle qu'ont en commun HnRNA et mRNA de posséder une séquence polyadénylique à l'extrémité 3'-OH (HADJIVASSILIOU et BRAVERMAN - 203 -, LEE et al. - 204 -). Cette séquence de quelques 200 nucléotides adényliques est additionnée nucléotide par nucléotide sur l'extrémité 3'-OH des HnRNA quand leur synthèse est terminée (DARNELL et al. - 205 -). La présence de "poly A" semble être indispensable à l'élaboration du mRNA et à son transport dans le cytoplasme, car la cordycépine (inhibiteur de la synthèse de "poly A") n'empêche pas la synthèse de HnRNA, mais affecte l'apparition ultérieure de mRNA dans les polysomes (MENDECKI et al. - 206 -, ADESNIK et al. - 207 -).

SAMARINA et al. ( 208 ) ont montré que les dRNA synthétisés dans le noyau de foie de Rat se combinaient dès leur synthèse à des particules de protéines spécifiques : les "informofères". Ces protéines joueraient un rôle de protection mais aussi de régulation dans la dégradation ultérieure des RNA. Elles pourraient aussi avoir une action plus directe sur la transcription en jouant un rôle semblable à celui qui est exercé par les ribosomes chez les Procaryotes. Ces d-RNP sont ensuite clivées et une partie seulement (moins de la moitié) passe dans le cytoplasme, le reste étant dégradé dans le noyau.

Des structures analogues ont été mises en évidence dans différents laboratoires, soit à partir d'extraits de noyaux de foie de Rat (MOULE et al. - 209 -, PARSONS et Mc CARTY - 210 -, ISHIKAWA et al. - 211 -), ou sous forme de particules spontanément diffusibles de ces noyaux (DEFERT-KOBUS et al. - 212 -). Des particules RNP semblables ont été étudiées à partir d'autres tissus : cerveau de Rat, (STEVENIN et al. - 213 -) ; thyroïde de Mouton (CARTOUZOU et al. - 214 -).

## B - FORMES CONJUGUEES DANS LE CYTOPLASME

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

### 1 - Précurseurs ribosomiaux

SCHERRER et al. ( 215 ) et PERRY et al. ( 216 ) ont observé que le précurseur 45S des rRNA était dégradé à plus de 50 p. 100 dans le noyau, et que seuls passaient dans le cytoplasme les RNA 28S et 18S sous la forme de particules 60-65S et 40-45S pour former les nouveaux ribosomes.

### 2 - Précurseurs des messagers

Chez les organismes embryonnaires, des cellules énucléées peuvent poursuivre le processus de la division cellulaire et continuent donc à synthétiser des protéines (HARVEY - 217 -). On peut penser que le mRNA existe dans le cytoplasme sous une forme de réserve. Il revient à SPIRIN et al. (218) d'avoir, les premiers, en 1964, mis en évidence des associations de protéines et d'RNA de type messenger dans l'embryon de Misgurnus fossilis. Ces particules de ribonucléoprotéines sont de tailles très différentes (20S à 110S), mais possèdent toutes, outre la propriété fondamentale d'être une association mRNA ; protéines, des propriétés physico-chimiques précises, différentes des ribosomes et des polysomes (densité : 1,40 ; pourcentage de protéines : 80 p. 100). Rappelant leur rôle de transporteur de l'information génétique, ces particules furent nommées "informosomes". SPIRIN et NEMER (219), puis INFANTE et NEMER (220) ont caractérisé des structures identiques dans des cellules embryonnaires diverses.

Dès lors, de nombreux auteurs s'attachèrent à identifier des particules semblables dans des organismes différenciés. Ces particules furent caractérisées dans des extraits cytoplasmiques de cellules HeLa (Mc CONKEY et HOPKINS - 221 -, PERRY et KELLEY - 222 -) et de foie de Rat (HENSHAW et LAREAU - 223 -, SAMARINA et al. - 224 -).

Des rôles divers peuvent être attribués à ces ribonucléoprotéines de ty-

pe "informosome". Représentant une forme de protection contre les actions des nucléases, elles seraient une forme de stockage de l'information génétique. Des travaux de MANO et NAGANO ( 225 - 226 ) ont montré que l'activation des RNA maternels (porteurs de l'information génétique) présents dans le cytoplasme des cellules embryonnaires se fait par l'action d'une protéase agissant contre la trypsine ("trypsin-like factor").

De récents travaux de BRAWERMAN ( 227 ) montrent qu'il existe une relation entre la stabilité du mRNA, la longueur de la séquence "poly A" et les protéines qui s'y trouvent solidement attachées.

Enfin, il est vraisemblable que ces protéines associées aux mRNA puissent jouer un rôle dans le contrôle de la traduction, soit en masquant le mRNA (protéines labiles), soit en permettant l'attachement des polysomes au reticulum endoplasmique (protéines stables liées à la séquence "poly A").

### III - CONCLUSIONS ET MODELES

A partir de ces données biochimiques plusieurs modèles ont été proposés.

Deux modèles ont été donnés en 1969, qui essaient de tenir compte des particularités du génome des Eucaryotes, notamment de la redondance de nombreuses séquences du DNA et de la dispersion des gènes codant pour une même chaîne métabolique dans tout le génome.

Le modèle de BRITTEN et DAVIDSON ( 228 ) semble le plus élaboré. Il fait appel à plusieurs relais dans la réponse à un stimulus. Un gène récepteur du stimulus ("sensor gene") permet à un gène "intégrateur" d'envoyer un signal (les auteurs proposent un RNA) à des sites récepteurs dont l'action permettra ou non le déclenchement de la synthèse (voir Fig. 5, p. 41).

A la différence du modèle précédent, le modèle de GEORGIEV ( 229 ) propose une action directe des protéines de régulation (ce pourrait être d'autres agents tels des récepteurs hormonaux) sur des sites spécifiques du DNA. Moins élaboré quant aux étapes précédant la transcription, il inclut une régulation "post-transcriptionnelle" due au remaniement des RNA néosynthétisés (voir Fig. 6 p. 42).

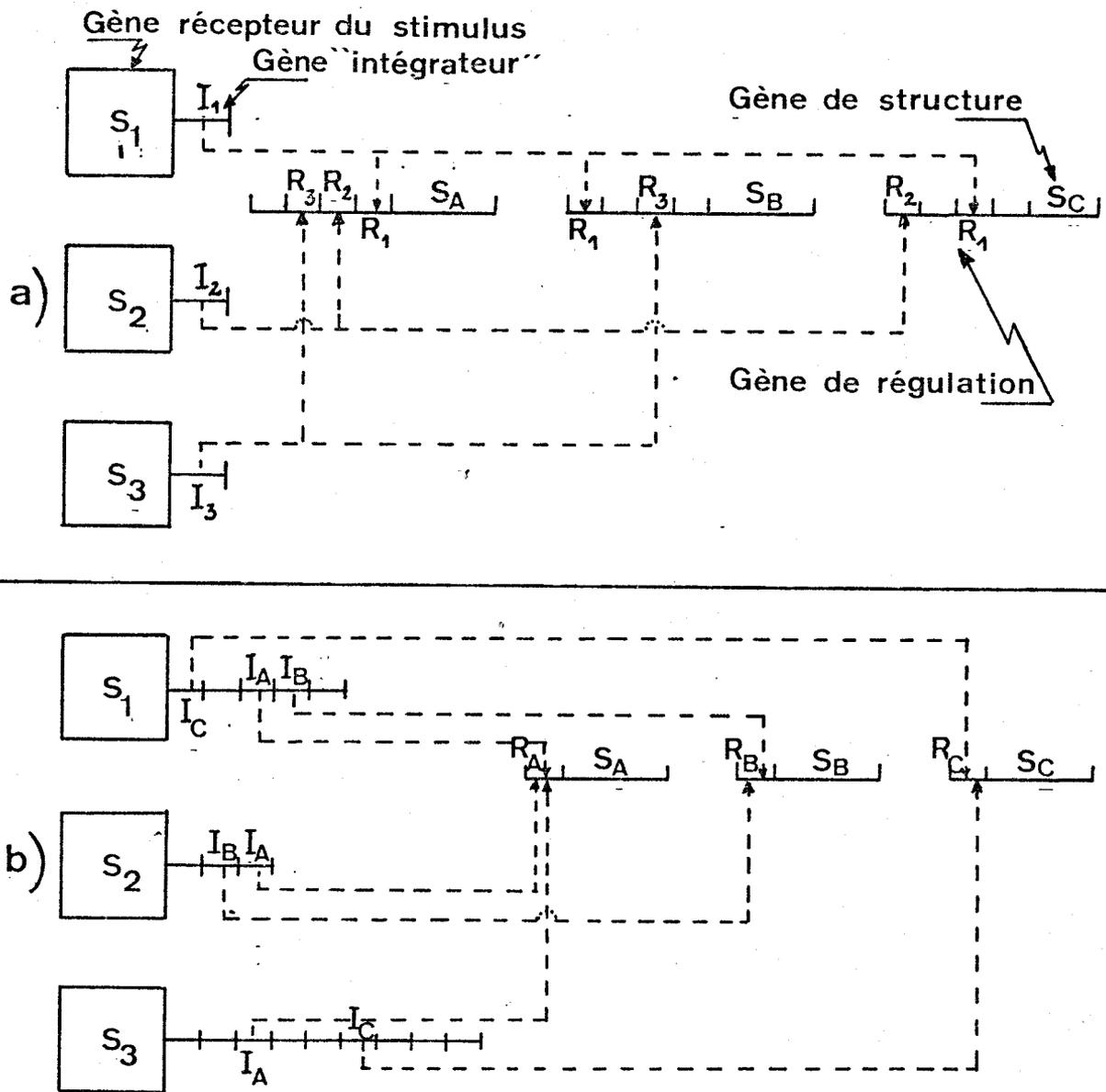


Figure n° 5 :

Modèles proposés par BRITTEN et DAVIDSON ( 230 ) pour la régulation de la transcription chez les Eucaryotes.

La transcription des "gènes de structure" ( $S_A, S_B, S_C$ ) nécessite la dérégulation des "gènes de régulation" (R) soumis au contrôle simultané de différents "gènes intégrateurs" (I) dont l'action se déclenche en réponse à divers stimuli ("gènes récepteurs des stimuli",  $S_1, S_2, S_3$ ).

Cas a : Plusieurs gènes de régulation identiques (répétés dans tout le génome) peuvent être contrôlés par un gène intégrateur commun.

Cas b : Un même gène de régulation est soumis au contrôle de plusieurs gènes intégrateurs.



Ces modèles permettent d'expliquer les nombreuses séquences répétitives trouvées dans le DNA de cellules eucaryotes.

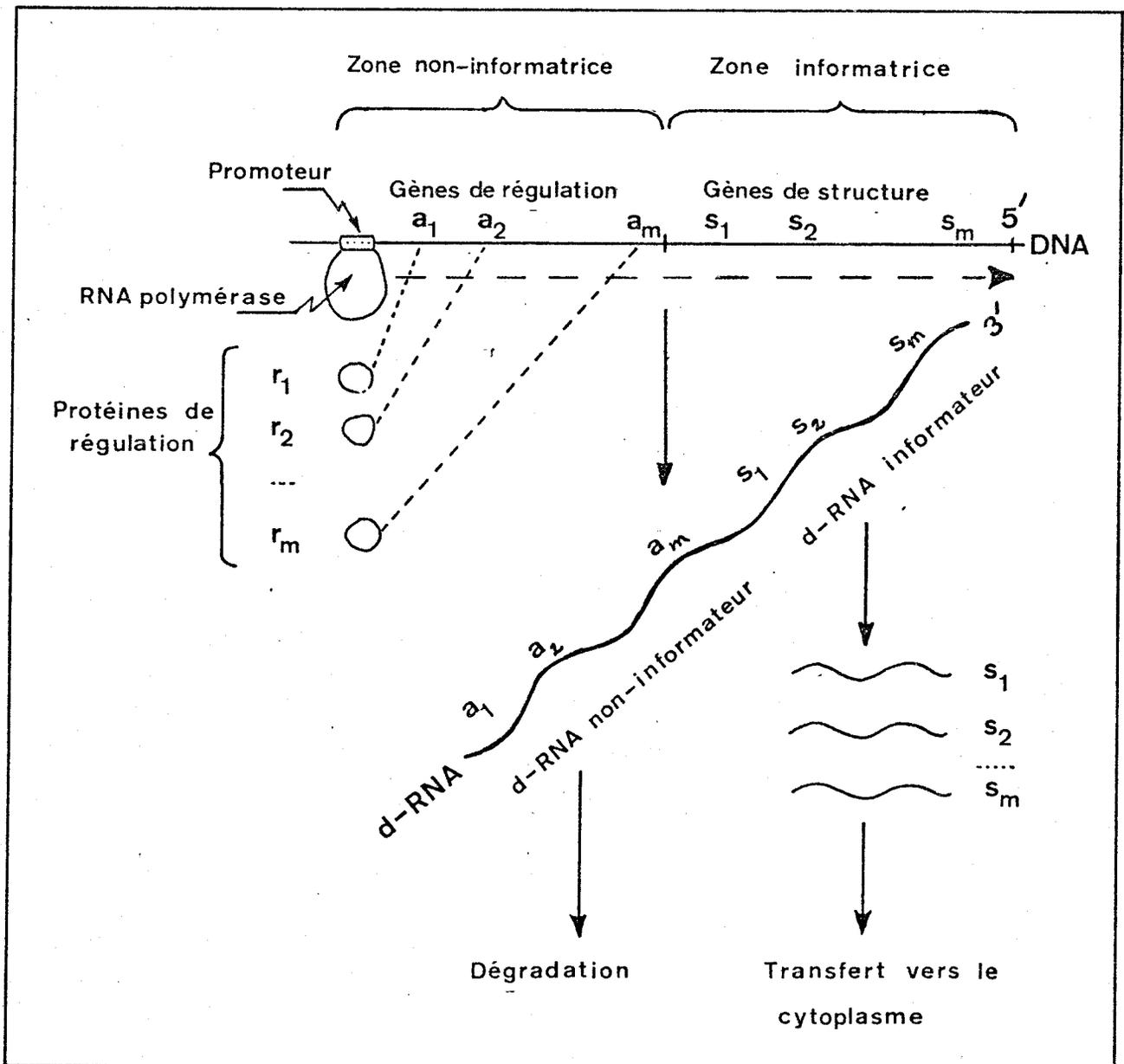


Figure n° 6 :

Modèle proposé par GEORGIEV (231) de la régulation de la transcription des RNA messagers chez les Eucaryotes.

La dérégulation du DNA est soumise au contrôle simultané de protéines de régulation.



Enfin, tenant compte du rôle du "poly A" (non connu en 1969) et considérant comme implicite une régulation précédant le déclenchement de la synthèse, DARNELL ( 232 ) propose deux modèles possibles, proches de celui de GEORGIEV. Il situe deux modes de régulation, soit au niveau de la transcription (au signal d'arrêt notamment), soit à diverses étapes du remaniement des pré-curseurs des RNA messagers (voir Fig. 7, p. 44).

Actuellement, le problème n'est pas encore de discuter quel modèle est le plus proche de la réalité, car il reste à accumuler des faits expérimentaux pour les étayer ou pour les infirmer.

C'est parce qu'une transcription "correcte" débute par un déclenchement "correct" de la synthèse des RNA que nous avons entrepris l'étude d'une étape de ce déclenchement par le biais de la connaissance du nucléotide initial des RNA néosynthétisés in vivo et in vitro par les RNA polymérases DNA-dépendantes de cellules eucaryotes.

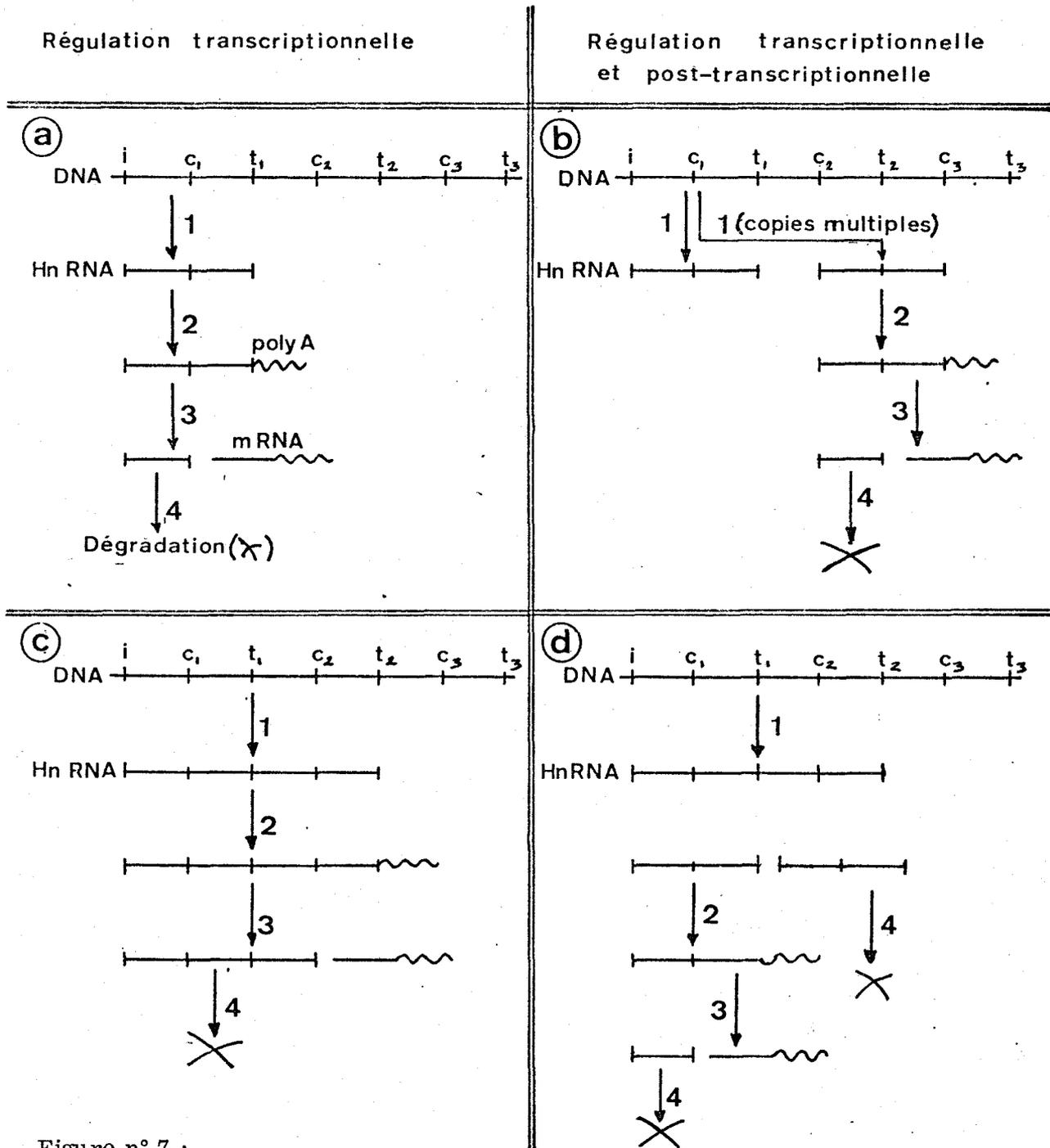


Figure n° 7 :

Quatre modèles de la régulation des RNA messagers dans les cellules eucaryotes selon DARNELL ( 233).

Les symboles : "i" début de la transcription ; "c" point de coupure possible des RNA ; "t" fin de transcription possible.

Les étapes de la biogénèse : "1" transcription ; "2" addition de poly-A ; "3" coupure de la portion portant le mRNA ; "4" dégradation des régions de RNA non utilisées.

Cas a : Le HnRNA porte un seul mRNA. Régulation au niveau des sites "i" portés par le DNA.

Cas b : Le HnRNA porte plusieurs possibilités de mRNA mais seul celui en 3' deviendra un mRNA fonctionnel. Régulation au niveau des sites "i" et "t" portés par le DNA.

Cas c : Copies multiples de HnRNA portant un seul mRNA, seule une fraction donnera naissance à des mRNA fonctionnels.

Cas d : Le HnRNA porte plusieurs possibilités de mRNA, le signal de coupure qui déterminera le mRNA est porté par le RNA.

BUS LILLE

MATERIEL ET METHODES

Dans ce chapitre, nous exposerons les techniques que nous avons utilisées ou mises au point pour la détection et l'identification du nucléoside 5'-triphosphate des RNA synthétisés in vivo et in vitro par des RNA polymérase animales.

Afin d'alléger le chapitre réservé à l'argumentation de nos résultats, nous avons préféré insérer la discussion des techniques au cours de leur description.

ETUDES REALISEES IN VIVO

Nos travaux sur la nature du nucléotide initial ont été menés sur les RNA cellulaires extraits selon la méthode de LEVIS et al. ( 234 ), car elle permet d'obtenir notamment les RNA naissants associés au DNA.

Ils ont été entrepris sur les cellules HeLa, les cellules KB et les hépatocytes de Rat. Dans ce dernier cas, l'étude a été poursuivie sur la détection des extrémités 5'-triphosphates dans les hybrides naturels DNA : RNA purifiés <sup>(x)</sup>.

I - MARQUAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

A - MARQUAGE DES HEPATOCYTES DE RAT

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

B - CULTURE ET MARQUAGE DES CELLULES

Les cultures de cellules nous ont été fournies par les Services du Laboratoire de Radiobiologie de l'Université Libre de Bruxelles (cellules HeLa), de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (cellules HeLa), et de l'Unité de Virologie de Lille (cellules KB).

Les cellules ont été cultivées à 37°C, soit en couches monocellulaires (HeLa et KB) dans des boîtes de ROUX contenant 80 ml de milieu minimum EAGLE ( 235 ), additionné de 10 p. 100 de sérum de Veau, soit en suspension (KB) dans le milieu EAGLE modifié par JOKLIK ( 236 ) et additionné de 5 p. 100 de serum

---

<sup>(x)</sup> Ce travail fut l'objet du Diplôme d'Etudes Approfondies de Mademoiselle Dominique CROIX.

de Cheval.

Nous avons utilisé des cellules âgées de 36 heures afin d'avoir un nombre suffisant de cellules en phase exponentielle de croissance. Dans ces conditions, une boîte de ROUX contient en moyenne  $2 \text{ à } 4 \times 10^7$  cellules, et la concentration du milieu de culture en suspension est environ  $5 \times 10^5$  cellules par ml.

Le marquage des cellules est effectué pendant 14 h par addition au milieu de culture de :

- |    |                                                                       |                |
|----|-----------------------------------------------------------------------|----------------|
|    | 5 $\mu$ Ci/ml de (8 - $^3\text{H}$ ) Guanine                          | (3 à 10 Ci/mM) |
| ou | 5 $\mu$ Ci/ml de (2,8 - $^3\text{H}$ ) ou (2 - $^3\text{H}$ ) Adénine | (3 à 10 Ci/mM) |
| ou | 5 $\mu$ Ci/ml de (5 - $^3\text{H}$ ) Uridine                          | (19 Ci/mM)     |
| ou | 5 $\mu$ Ci/ml de ( $^{32}\text{P}$ ) orthophosphate sans entraîneur,  |                |

provenant du C. E. A. (France) ou de R. C. Amersham (Angleterre).

Après l'incorporation, le matériel est refroidi par le mélange glace-eau, le milieu radioactif est éliminé puis remplacé par du milieu EAGLE préalablement maintenu à 4°C. Les cellules sont détachées des boîtes de ROUX par agitation douce, en présence de billes de verre de 2 mm de diamètre et/ou collectées par centrifugation à basse vitesse (5 min à 2000 t/min.).

Le sédiment cellulaire est ensuite lavé une fois dans le milieu EAGLE puis centrifugé à nouveau.

#### C - MARQUAGE DES CELLULES EN PRESENCE D'ACTINOMYCINE D

L'inhibition spécifique de la synthèse des rRNA est obtenue en ajoutant au milieu de culture 0,08  $\mu\text{g/ml}$  d'actinomycine D, comme il a été prescrit par PERRY et KELLEY (237). Dans ce cas, le marquage ne dure que 3,5 h, l'actinomycine étant ajoutée une demi-heure avant l'addition des précurseurs radioactifs.

## II - ISOLEMENT DES NOYAUX DE FOIE DE RAT

Les foies sont lavés dans une solution à 0,25 M en saccharose à 4°C, broyés finement et homogénéisés à 0°C dans 20 volumes d'une solution 2,2 M en saccharose et 3,3 mM en acétate de calcium (CHAUVEAU et al. - 238 -). L'homogénat est centrifugé dans le rotor 21 de l'ultra-centrifugeuse préparative Spinco L2-65B à 20 000 t/mn pendant 60 mn à 4°C. Cette méthode permet d'obtenir un sédiment de noyaux de haute pureté.

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

Le résumé des opérations est relaté dans la Fig. 8 (p. 50).

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

Tris/HCl	0,01 M	pH 7,4
Na Cl	0,3 M	
Citrate de sodium	0,03 M	
EDTA	0,001 M	pH 7,4
Bentonite	1 mg/ml.	

Les noyaux (ou les cellules) sont lysés par addition de dodécyl-sulfonate de sodium (SDS) recristallisé (CRESTFIELD et al. - 239 -) jusqu'à une concentration de 1 p. 100 (solution stock de SDS 10 p. 100 dans l'éthanol à 50 p. 100). Après une agitation de 15 minutes à 4°C, le lysat est additionné d'un volume égal du mélange chloroforme/alcool isoamylique (35 : 10) (v : v) et l'agitation poursuivie pendant 45 minutes à 4°C. Ensuite, le lysat est centrifugé 10 minutes à 10 000 g et la phase aqueuse est extraite une seconde fois par le mélange chloroforme/alcool isoamylique, sous agitation pendant 15 mn à 4°C (LEVIS et al. - 240 -). Les fibres contenant le DNA et le RNA sont recueillies à partir de la phase aqueuse finale par addition d'un volume égal d'éthanol absolu et enroulées sur des baguettes de verre.

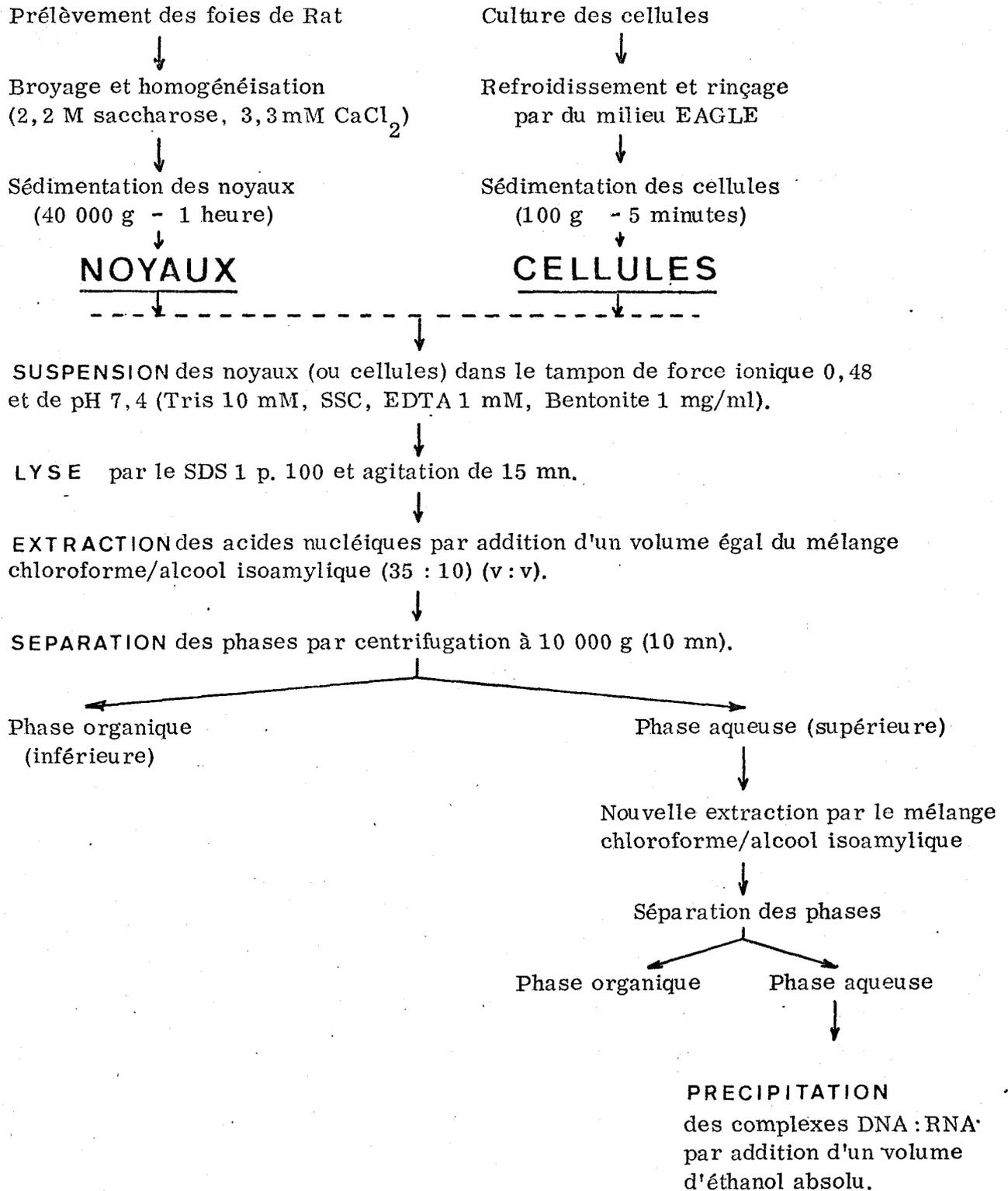


Figure n° 8 :

Extraction des complexes DNA:RNA.

Toutes les opérations sont menées à + 4°C.

Les acides nucléiques peuvent être conservés pendant une semaine dans l'éthanol à 67 p. 100, à - 20°C.

#### IV - FRACTIONNEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES

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

La solution de  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  (densité moyenne : 1,535) contenant du Tris/HCl 10 mM et de l'EDTA 1 mM est ajustée à pH 7,4 par de la potasse 0,3 N. Les gradients de 3,5 ml contenant 400 à 800  $\mu\text{g}$  d'acides nucléiques bruts sont centrifugés dans le rotor SW 39 de l'ultracentrifugeuse Spinco L2-65B à 33 000 t/mn pendant 72 heures à 20°C. Après analyse du gradient, les fractions contenant les hybrides DNA:RNA (voir Fig. 9, p. 52) sont rassemblées.

##### B - PRECIPITATION SUR FILTRE DU COMPLEXE DNA:RNA

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

NaCl	0,3 M
Citrate trisodique	0,03 M

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

NaCl	0,3 M
Citrate trisodique	0,03 M
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,02 M

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

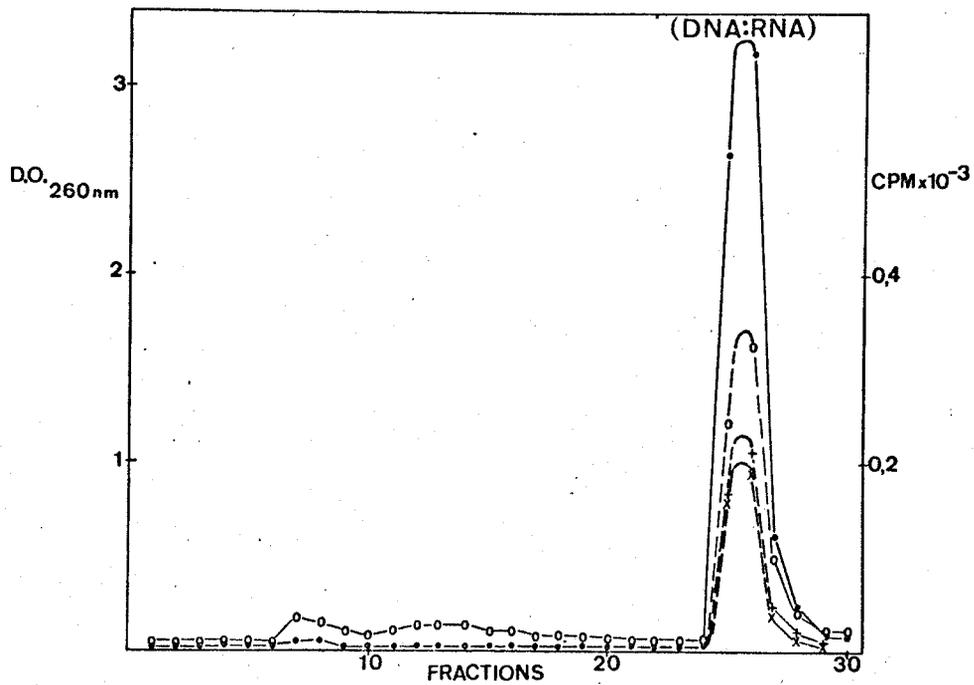


Figure n° 9 :

Acides nucléiques de noyaux de foie de Rat marqués au  $^{32}\text{P}$  (2 mC : Rat) pendant 14 heures et centrifugés pendant 72 heures à 33 000 t/mn (rotor Spinco SW 25) dans une solution de  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  dont la densité moyenne est de 1,535.

- D. O. 260 nm
- Radioactivité totale
- x-----x-----x Radioactivité résiduelle après hydrolyse par la potasse, due au marquage du DNA.
- +-----+-----+ Radioactivité résistante à la RNase (RNA lié au DNA par ponts "hydrogène").

## V - TRAITEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES

### A - ACTION DES ALCALIS

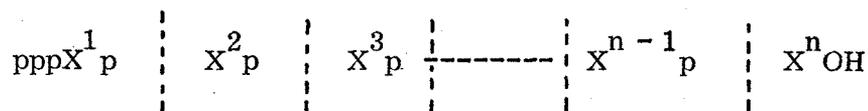
#### 1 - Mode d'action

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



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

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



#### 2 - Mode opératoire

L'hydrolyse alcaline est effectuée par action de la potasse 0,3 N (BREMER et al. - 241 -) ou de l'hydroxyde de lithium 0,33 N (GEBICKI et FREED - 242-) à 37°C pendant 16 heures. Nous avons choisi ces conditions d'hydrolyse car elles évitent la déphosphorylation appréciable des nucléosides tétraphosphates tout en permettant l'hydrolyse totale des RNA (ADAMS et al. - 243 -, CROIX - 244 -). La réaction est arrêtée par refroidissement à 0°C.

### B - ACTION DE LA RIBONUCLEASE PANCREATIQUE

#### 1 - Principe

La RNase pancréatique coupe spécifiquement les liaisons des nucléotides pyrimidiques des RNA monocaténares. Elle libère donc des oligonucléotides composés d'enchaînements de nucléotides puriques possédant en position 3'-terminale un nucléotide pyrimidique. Elle est, en outre, inactive sur le RNA engagé dans l'hybride DNA:RNA par des liaisons "pont hydrogène" comme il est schématisé dans la Fig. 10, p. 54).

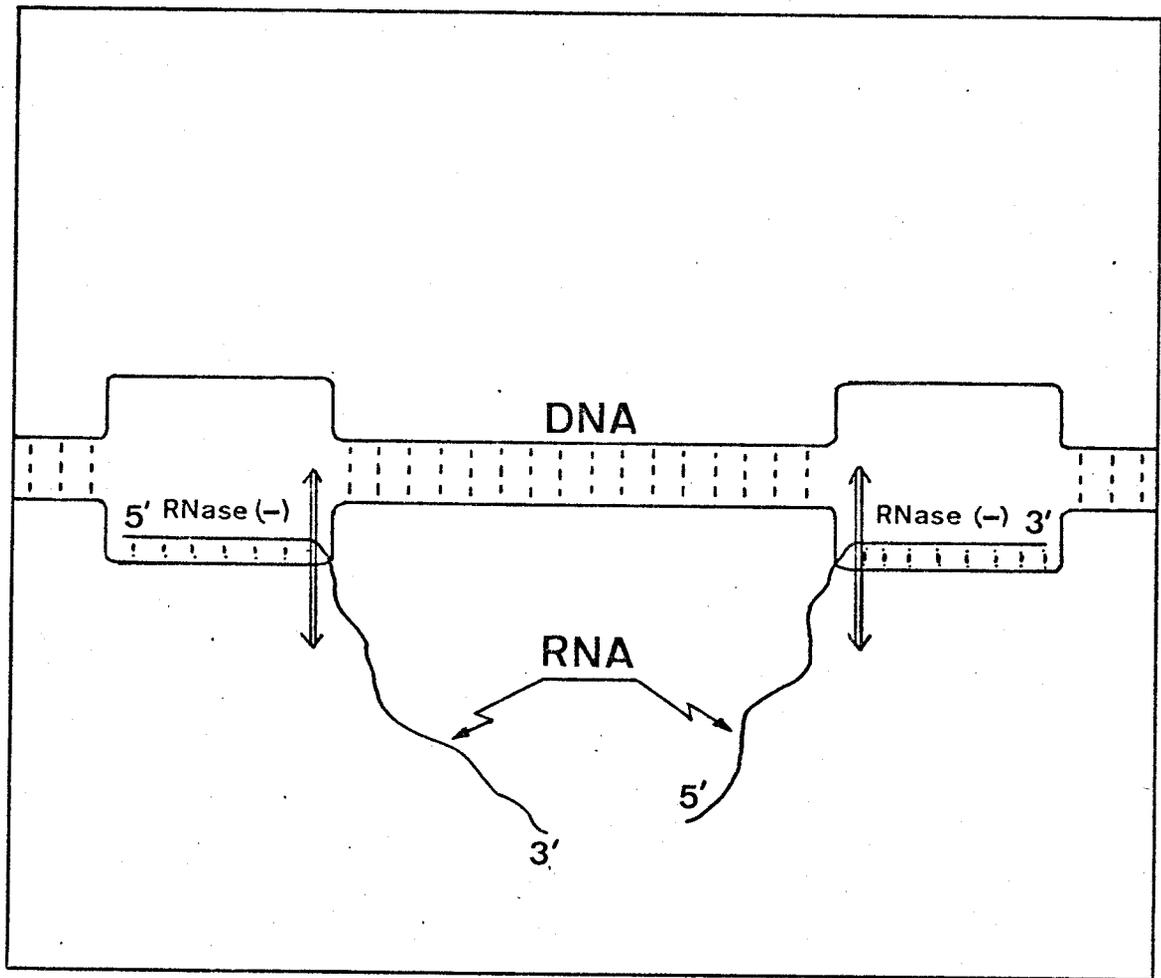


Figure n° 10 :

Action de la ribonucléase pancréatique sur les hybrides DNA:RNA.

A gauche : La partie 5' des RNA est résistante à l'action de la ribonucléase.

A droite : La partie 5' des RNA est sensible à l'action de la ribonucléase.

## 2 - Mode opératoire

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

## VI - ANALYSE DES HYDROLYSATS ALCALINS

Après hydrolyse des acides nucléiques par la potasse, le DNA est précipité par addition d'acide perchlorique jusqu'à une concentration finale de 0,2 N (15 mn à 0°C). Le DNA est éliminé par centrifugation et le surnageant est amené à pH 6,5 par addition de potasse et laissé 15 minutes à 0°C pour permettre la formation du précipité de perchlorate de potassium éliminé ensuite par centrifugation. Le surnageant contenant les ribonucléotides est concentré par lyophilisation ou directement soumis aux analyses ultérieures.

Dans le cas d'une hydrolyse par l'hydroxyde de lithium, le DNA est éliminé comme précédemment, mais le surnageant est neutralisé par LiOH. La solution de nucléotides est concentrée à sec par lyophilisation et le résidu est lavé deux fois par le mélange éther : isopropanol (2:1, v:v) pour extraire le perchlorate de lithium (GEBICKI et FREED - 245 -). Le précipité résiduel contient les nucléotides, il peut être repris dans un volume minimum d'une solution ammoniacale à 5 p. 100. Cette méthode s'adapte particulièrement aux "micro-analyses" que nous devons faire.

## A - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN BASES

La séparation des nucléosides (2') 3'-monophosphates libérés par hydrolyse alcaline des RNA, est réalisée par électrophorèse sur papier (Arches 304 ou

Whatman 1 de 56 cm de long) dans le tampon classique de DAVIDSON et SMELLIE ( 246 ) de pH 3,5 et de composition suivante :

citrate trisodique	5 mM
acide citrique	15 mM.

La migration électrophorétique est poursuivie jusqu'à ce que le marqueur d'acide picrique ait atteint le bout de la feuille (en général 10 heures à 800 V).

Dans ces conditions, l'ordre croissant des vitesses de migrations anodiques est CMP, AMP, GMP et UMP (voir Fig. 11, p. 57) conformément à ce que le calcul des charges permettait de prévoir (voir Fig. 12, p. 58 et Tableau V, p. 58)

Les travaux d'YCAS et VINCENT ( 247 ) ont établi que le marquage des RNA par le radiophosphore s'effectuait uniformément et au hasard. Ce principe permet de connaître la composition en bases des RNA par la détermination de la radioactivité des nucléosides monophosphates.

#### B - MISE EN EVIDENCE DU NUCLEOSIDE TETRAPHOSPHATE (pppNp)

Lorsque nous avons commencé ce travail, nous nous sommes attaché à trouver une méthode simple (unidimensionnelle) et rapide de mise en évidence du nucléoside 5'-triphosphate (2') 3'-monophosphate (pppNp) dans les hydrolysats alcalins de RNA.

Misant sur le nombre de charges négatives dû aux groupements phosphates, nous nous sommes tourné vers l'électrophorèse. Dans les conditions de pH entre 2 et 4, la vitesse de migration des nucléotides étant sous la principale dépendance du degré de dissociation des fonctions amines des bases, on observe un chevauchement des zones de migration des nucléosides mono, di ou triphosphates (voir fig. 11, p. 57). Il était donc prévisible qu'un nucléoside tétraphosphate migrerait avec les nucléosides diphosphates et triphosphates et serait alors difficilement identifiable.

Il fallait choisir un pH rendant la migration essentiellement dépendante du nombre de phosphates. Les courbes de la Fig. 12 nous indiquent qu'à un pH

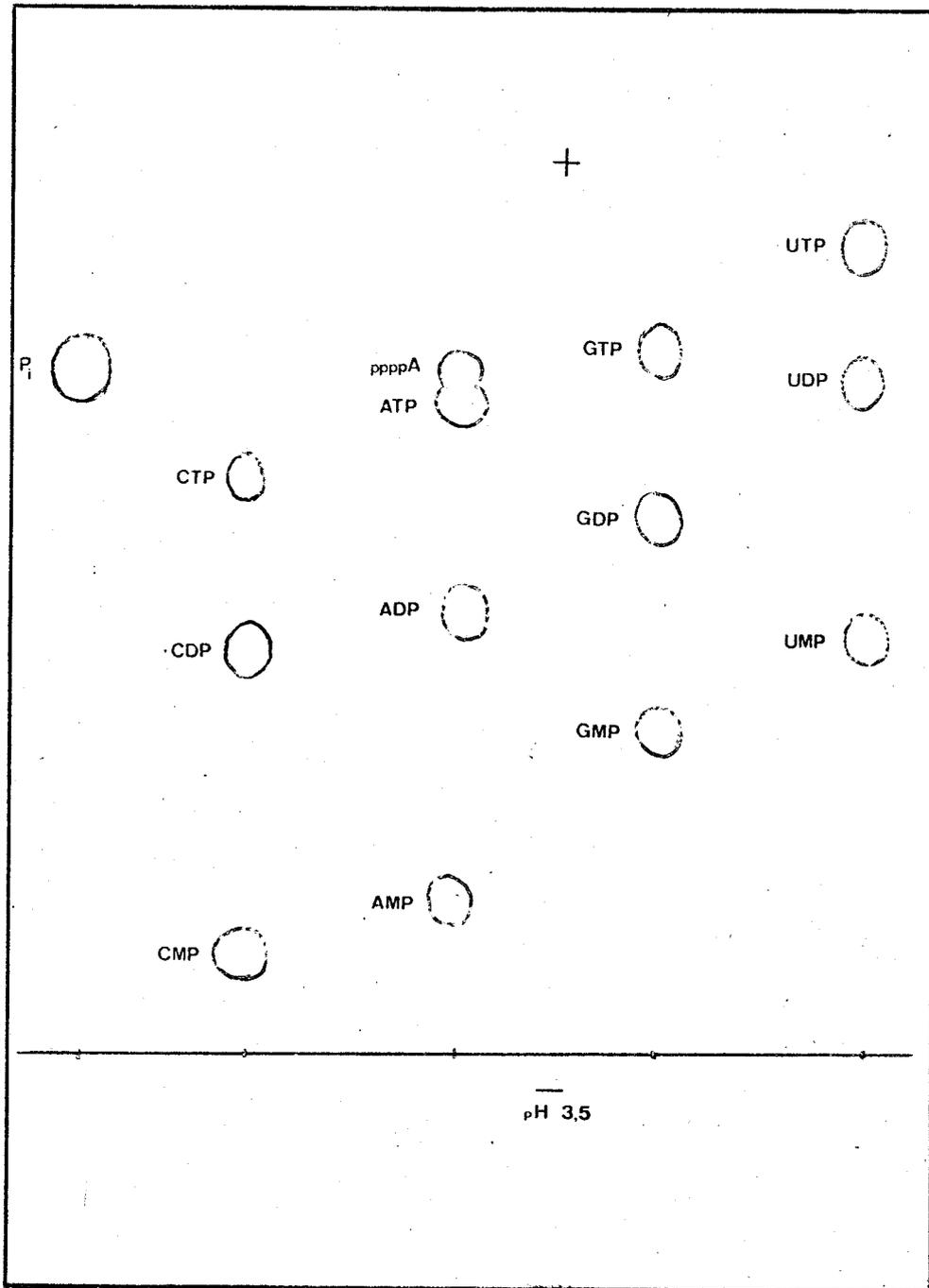


Figure n° 11 :

Electrophorèse sur papier (pH 3,5) des nucléosides mono-, di- et triphosphates.

L'électrophorèse est effectuée sous une tension de 700 V pendant 4 heures (cuve en toit).



Valeurs des pK des différentes fonctions portées par les nucléosides monophosphates.

Charge globale de ces nucléosides monophosphates à pH 3,5 et à pH 5,7.

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

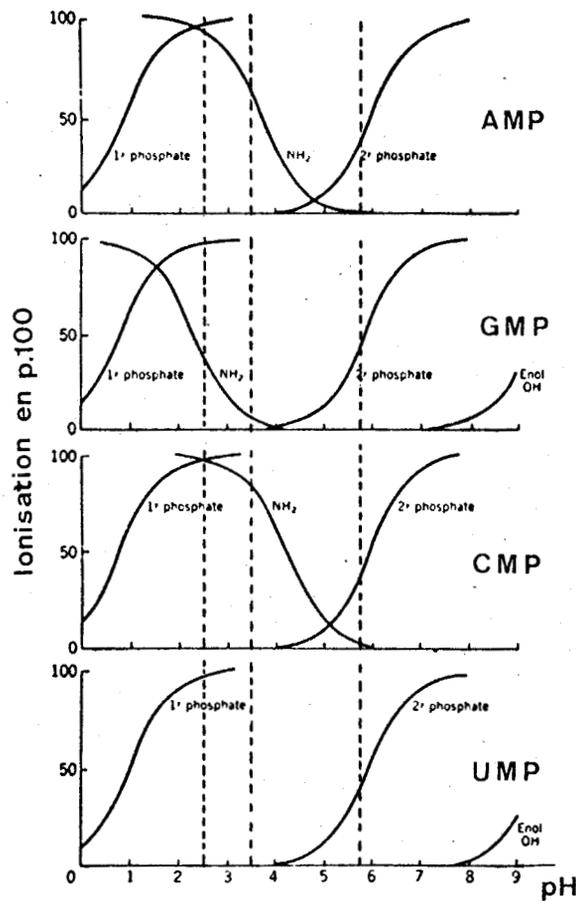


Figure n° 12 :

Courbes de dissociation des fonctions ionisables des acides adénylique, guanylique, cytidilique et uridylique. selon SMITH (248).



voisin de 6, les fonctions amines n'interviennent plus dans la charge du nucléotide et que seules les fonctions acides primaires (pK voisin de 1) et secondaires (pK voisin de 6) sont ionisées.

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

Citrate trisodique	15 mM
Acide citrique	3,5 mM

Les électrophorèses sont réalisées sur papier (Arches 304 ou Whatman 1, 56 cm de long) ou sur couche mince de cellulose (Macherey-Nagel, 20 cm de long). La migration dure jusqu'à ce que le marqueur acide picrique ait atteint le milieu de la feuille.

En bon accord avec les valeurs calculées (voir Tableau V, p. 58) de leurs charges globales, la Fig. 13 (p. 60) montre que les nucléotides migrent relativement bien en groupe selon leur nombre de phosphates. La migration un peu plus rapide des nucléotides pyrimidiques est vraisemblablement due à une adsorption différente sur le support. Exprimées par rapport à la migration de l'ATP ( $R_{ATP}$ ), les vitesses de migration sont environ de :

0,6	pour les nucléosides monophosphates
0,85	pour les nucléosides 5'-diphosphates
1	pour les nucléosides 5'-triphosphates.

Le ppppA tout d'abord utilisé comme témoin de migration a un  $R_{ATP}$  voisin de 1,15.

## C - DISCUSSIONS

### 1 - Témoin nucléoside 5'-triphosphate, 3'-monophosphate

L'estimation des charges portées par le nucléoside 5'-triphosphate, 3'-monophosphate nous avait conduit à estimer qu'il devait migrer au-delà du nucléoside 5'-tétraphosphate de synthèse. La poursuite de notre travail in vitro

---

<sup>(x)</sup> Nous remercions Monsieur Gérard BARBRY pour sa contribution "involontaire" mais précieuse à la mise au point de ce tampon.

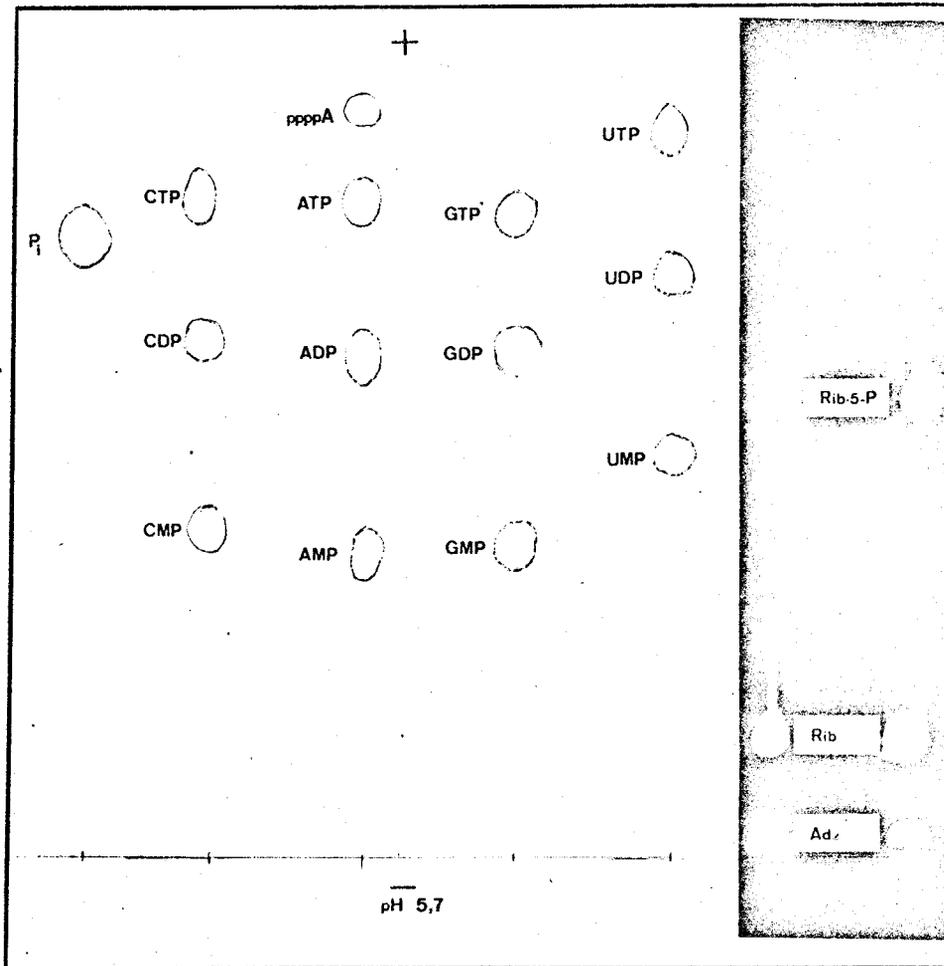


Figure n° 13 :

Electrophorèse sur papier (pH 5,7) des nucléotides et du ribose phosphate.

L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 300 V pendant 10 h 30 (cuve en toit).



(voir page 68 ), nous a permis d'obtenir les véritables témoins par hydrolyse alcaline des RNA synthétisés en présence du nucléoside 5'-triphosphate dont le groupement phosphate en  $\gamma$  est marqué par le radiophosphore. Leur vitesse de migration relative à l'ATP est de l'ordre de 1,2 (voir Fig. 27, p. 106).

## 2 - Présence éventuelle d'ions phosphates

La présence d'ion phosphate libre accompagnant les hydrolysats d'acides nucléiques pouvait être une source d'erreur lors du marquage par le radiophosphore. Le comportement électrophorétique des ions phosphates fut examiné avec des solutions contenant des ions de différentes origines (sels mono, di et trisodiques ; ions phosphates provenant des solutions vieilles de triphosphates partiellement dégradés en nucléosides diphosphates et monophosphates).

Les ions phosphates sont mis en évidence par la formation d'un composé phospho-molybdique. Après électrophorèse, les feuilles sont séchées à l'air libre et les ions phosphates sont révélés par pulvérisation du réactif de HANES et ISHERWOOD ( 249 ) :

Molybdate d'ammonium à 8 p. 100 (p : v)	125 ml
Acide perchlorique pur	50 ml
Acide chlorhydrique 1 N	100 ml
Eau distillée q. s. p.	1 000 ml.

L'emplacement des ions phosphates est marqué par l'apparition (après 1 à 2 minutes) de tâches jaunes de phosphomolybdate d'ammonium.

Les résultats peuvent être résumés comme suit :

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

- A pH 5,7 au contraire, les ions phosphates libres migrent plus lentement que l'adénosine tétraphosphate et se retrouvent un peu en arrière de l'ATP (voir Fig. 13, p. 60).

Ces résultats justifient pleinement l'emploi du tampon de pH 5,7 qui permet de distinguer sans ambiguïté les ions phosphates libres de l'adénosine tétra-

phosphate (ppppA).

### 3 - Présence éventuelle de ribose-phosphate

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

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

Le ribose-5-phosphate a été mis en évidence en tirant parti des fonctions  $\alpha$ -glycols révélées par la méthode au périodate/benzydine (MONTGOMERY et WU - 250 -). L'emplacement des molécules portant les fonctions  $\alpha$ -glycols se révèle par l'apparition de taches blanches sur un fond bleu.

A pH 5,7, deux taches principales ont été mises en évidence (voir Fig. 13, p. 60).

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

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

#### 4 - Contamination des électrophorèses par des éléments de radiolyse

La présence de produits de radiolyse pouvait être la source d'une radioactivité contaminant la zone des nucléosides polyphosphates. Cette éventualité a pu être écartée par les analyses secondaires (voir p. 64 ) notamment celles visant à caractériser les bases liées au nucléosides polyphosphates.

#### 5 - Présence éventuelle d'oligonucléotides

Bien que le calcul des charges (SMITH - 251 -) rende peu vraisemblable une migration d'oligonucléotides alcali-résistants dans la zone des nucléosides polyphosphates, nous avons soumis à l'électrophorèse de pH 5,7 des di-, tri-, et oligonucléotides provenant d'hydrolyse ribonucléasique de RNA radioactifs. Tous ces produits ont une mobilité relative ( $R_{ATP}$ ) de 0 à 0,85, ce qui exclut toute interférence dans la zone des nucléosides polyphosphates.

#### D - ETABLISSEMENT DES PROFILS DE MIGRATION DES NUCLEOTIDES RADIOACTIFS SEPARES PAR ELECTROPHORESE

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

0,5 g de diméthyl POPOP (1,4-bis-(2-(5 phényloxazolyl)) benzène)

5 g de PPO (2-5 diphényloxazol)

toluène q. s. p. 1 litre.

Dans le cas d'électrophorèse sur couche mince, la cellulose est grattée hors du support (par rectangle de 0,5 x 3 cm, le long du trajet de migration) et collectée dans des flacons de comptage contenant le même milieu scintillant.

## VII - ANALYSES SECONDAIRES DU NUCLEOSIDE TETRAPHOSPHATE (pppNp)

Les analyses secondaires ont eu deux buts : le premier de certifier l'authenticité des nucléosides 5'-triphosphates 3'-monophosphates, le second de préciser la proportion des nucléosides tétraphosphates de différentes natures. Elles ont lieu après la première séparation par électrophorèse à pH 5,7 et élution de la zone correspondant aux nucléosides polyphosphates.

### A - ELUTION DES PRODUITS

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

Les produits sont ensuite élués des papiers par agitation dans une solution d'ammoniaque 0,01 N selon la méthode préconisée par WATANABE et AUGUST ( 252 ). Les papiers sont éliminés par centrifugation et l'éluat est concentré à sec par lyophilisation.

En outre, les contrôles suivants doivent être systématiquement effectués :

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

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

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

### B - DETERMINATION DE LA NATURE DU NUCLEOSIDE TETRAPHOSPHATE

Les composés tri-ou tétraphosphates élués sont un mélange de nucléotides guanyliques et adényliques (cf. résultats, p. 101 ). La radioactivité de ces composés étant liée aux bases, l'analyse de la composition en guanine et adénine

du mélange permet de connaître les proportions de chacun des nucléotides correspondants.

A l'extrait sec précédemment obtenu, sont ajoutés des témoins "froids" ATP et GTP et l'hydrolyse est menée dans 100  $\mu$ l d'acide chlorhydrique 1 N, à 100°C pendant une heure. Cette réaction libère quantitativement les bases puriques (KIRBY - 252 -).

Une séparation satisfaisante des bases peut être obtenue par électrophorèse sur papier si le tampon est suffisamment acide pour obtenir une ionisation différente des bases (voir Fig. 12, p. 58).

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

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

L'électrophorèse est réalisée sur papier Arches 304 ou Whatman 1, dans un tampon de formiate d'ammonium 0,3 M, de pH 2,5. La migration dure 12 h sous une tension de 220 V. Un électrophorégramme obtenu dans ces conditions est présenté dans la Fig. 14 (p. 66).

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

#### C - NATURE POLYPHOSPHATE DES COMPOSES DE R<sub>ATP</sub> >1,15

La phosphodiesterase de venin de Serpent (E. C. 3.1.4.1.) coupe les liaisons phosphodiesters en  $\alpha$  et  $\beta$  des nucléotides (ZELLER - 254 -) et transforme les nucléosides 5'-triphosphates en nucléosides 5'-monophosphates. Cette réaction peut être appliquée à la détermination de la structure des nucléosides 5'-triphosphates, 3'-monophosphates (YOUNG et CONTENT - 255 -) qui sont a-

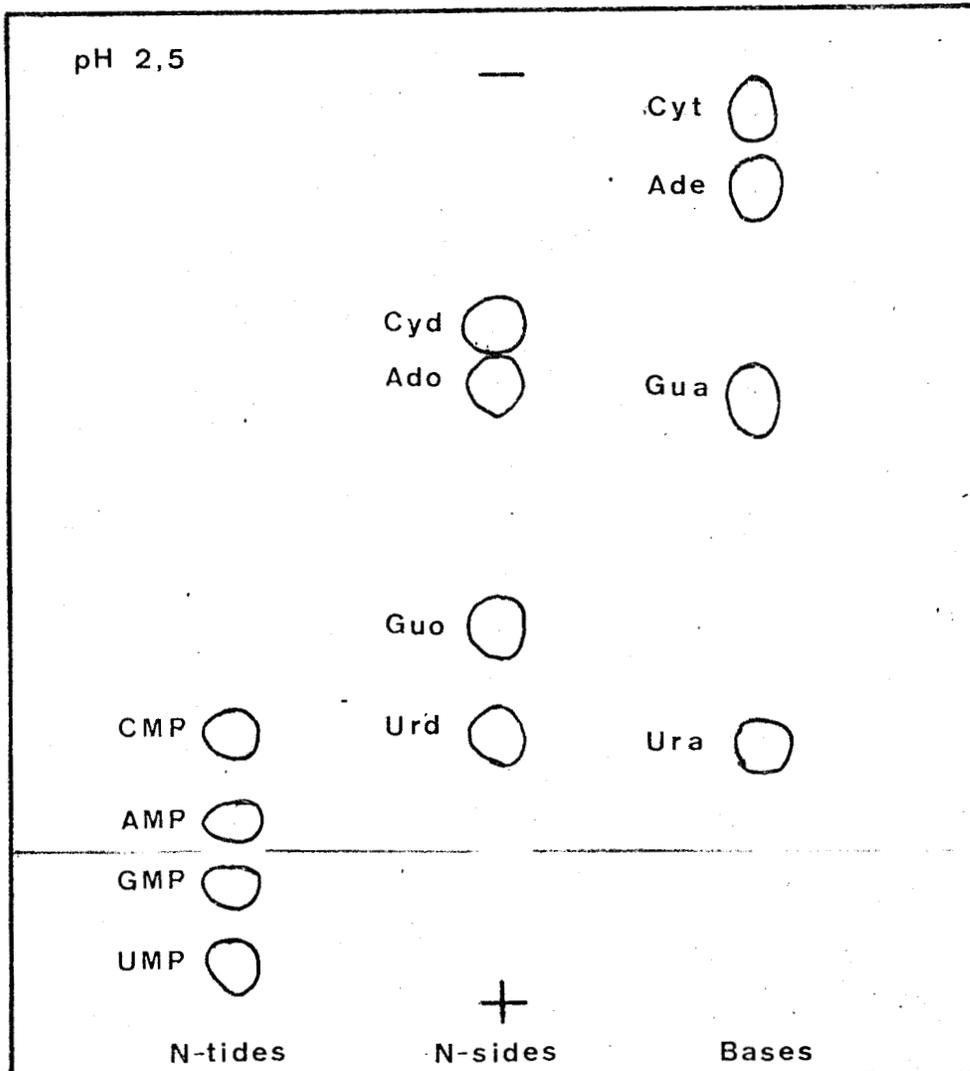


Figure n° 14 :

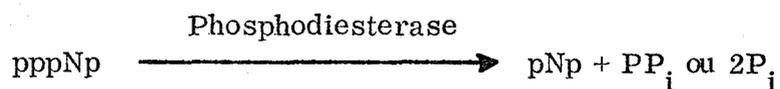
Electrophorèse sur papier (pH 2,5) des nucléosides monophosphates, nucléosides et bases.

L'électrophorèse est effectuée sous une tension de 220 V pendant 12 h (cuve en toit).

Acide cytidylique (CMP), acide uridylique (UMP), guanine (Gua) et adénine (Ade) sont nettement séparés.



lors transformés en nucléosides 5'-, 3'-diphosphates.



Le résidu sec de nucléosides polyphosphates est repris dans 50  $\mu$ l du tampon suivant : Tris-HCl 0,08 M pH 7,4  
MgCl<sub>2</sub> 0,02 M

et divisé en deux parts identiques. L'une est gardée comme témoin, l'autre est traitée par 50  $\mu$ g de phosphodiesterase de venin de Serpent, en présence de 0,05  $\mu$ M de GTP pour ajuster le rapport enzyme/substrat. La réaction a lieu à 37°C pendant une heure.

Le témoin et l'échantillon traité sont soumis à nouveau à l'électrophorèse de pH 5,7. La dégradation du GTP en GMP permet de contrôler l'action effective de l'enzyme (voir Tableau XII ; p. 109). Des essais faits avec des nucléosides triphosphates radioactifs ont permis de vérifier que dans nos conditions, la phosphodiesterase de venin de Serpent ne montrait pas d'activité 5'- ou 3'-nucléotidasique qui aurait pu les dégrader totalement en nucléosides.

ETUDES REALISEES IN VITRO

L'étude du premier nucléotide incorporé dans les chaînes de RNA a été faite avec les RNA polymérases de cellule KB en utilisant comme matrice le DNA cellulaire ou le DNA de l'Adénovirus 2, et comme précurseurs les nucléosides 5'-triphosphates dont l'un est marqué sur le groupement phosphate en  $\gamma$ .

I - EXTRACTION DES RNA POLYMERASES DE CELLULES KB<sup>(x)</sup>

Les RNA polymérases sont extraites de noyaux de cellules KB selon la méthode de ROEDER et RUTTER ( 256 ) modifiée par CHESTERTON et al. ( 257 ). La suite des opérations effectuées à 0°C est résumée dans la fig. 15 (p. 69).

Les solutions utilisées sont les suivantes :

- Solution TMMT :	Tris-HCl	10 mM	pH 8
	Acétate de Mg	10 mM	
	$\beta$ - mercaptoéthanol	10 mM	
	Triton X-100	0,2 p. 100	
- Solution TSMD :	Tris-HCl	10 mM	pH 8
	Saccharose	1 M	
	Mg Cl <sub>2</sub>	5 mM	
	Dithiothréitol	1 mM	
- Solution TGMED :	Tris-HCl	50 mM	pH 8
	Glycérol	25 p. 100	
	Mg Cl <sub>2</sub>	5 mM	
	EDTA	0,1 mM	
	Dithiothréitol	1 mM	

(x) Au Laboratoire, l'extraction des RNA polymérases a été plus particulièrement confiée à Madame Chantal TRENTESEAUX-CHAUVET et à Monsieur Alain SERGEANT, que nous remercions.

**CELLULES KB**

$10^9$  cellules dans 10 ml de solution TMMT

↓  
Homogénéisation

↓  
Centrifugation (750 g x 10 min)

↓  
**NOYAUX** repris dans la solution TSMD (5 ml final)

↓  
et additionné de 5 ml de sulfate d'ammonium (3,5 M)

↓  
désagrégation aux ultrasons (20 Kcycles, 1 min)

↓  
**LYSAT** additionné de 12 ml de TGMED

↓  
Centrifugation

→ Culot de DNP

**PROTEINES DU SURNAGEANT**

sont précipitées par addition de sulfate d'ammonium à raison de 0,42 g/ml

↓  
précipitation sous atmosphère d'azote (2 heures)

↓  
centrifugation (30 000 g x 30 min)

→ Surnageant

**CULOT DE PROTEINES**

redissous dans 1,5 ml de TGMED contenant du sulfate d'ammonium 40 mM

↓  
dialyse contre cette même solution (16 heures)

↓  
centrifugation (30 000 g x 30 min)

↓  
surnageant contenant l' **EXTRAIT ENZYMATIQUE BRUT**

↓  
conservation dans l'azote liquide

Figure n° 15 :

Extraction des RNA polymérase de cellules KB.  
Toutes les opérations sont menées à 4°C.

## II - SEPARATION DES DIVERSES RNA POLYMERASES

Les RNA polymérases sont séparées par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE-Sephadex (type A-25, Pharmacia; colonne de 1,2 cm de diamètre et 25 cm de long). Le DEAE-Sephadex est équilibré dans la solution tampon TGMED. Après dépôt de 60 mg de protéines environ, la colonne est rincée par 30 ml de TGMED, puis l'élution s'effectue par le passage d'un gradient linéaire de 40 mM à 500 mM en sulfate d'ammonium dans le TGMED (volume total : 250 ml). Des fractions de 2 ml sont recueillies dans une solution concentrée de sérum albumine pour obtenir une concentration finale de 1 mg/ml.

La réaction enzymatique est réalisée à 37°C pendant 30 minutes, dans le milieu suivant :

Tris-HCl	50 mM	pH 8
Mg Cl <sub>2</sub>	6 mM	
Mn Cl <sub>2</sub>	3 mM	
Diothiothéitol	4 mM	
ATP, GTP, CTP	0,4 mM de chaque	
<sup>3</sup> H - UTP	0,015 mM (1 Ci/mM)	

en présence de 5 µg/ml de DNA cellulaire.

Le volume d'enzyme ajouté est égal au tiers du volume final, ce qui permet de mesurer les activités enzymatiques aux concentrations en sulfate d'ammonium proches de l'optimum (voir p. 12 ), puisque l'enzyme I s'élue pour une concentration voisine de 100 mM en sulfate d'ammonium, l'enzyme II vers 250 mM, et l'enzyme III vers 300 mM. La figure 16 (p.71) représente la séparation classiquement obtenue des trois types de RNA polymérases de cellules KB.

Gardant en mémoire le fait que le facteur sigma est perdu par une trop grande purification de l'enzyme bactérien (il a fallu 8 ans pour le mettre en évidence), nous avons choisi pour notre étude sur le déclenchement de la synthèse, de ne pas purifier les RNA polymérases au-delà de la séparation sur DEAE-Sephadex. Ce choix contraint à être prudent à l'égard des contaminations possi-

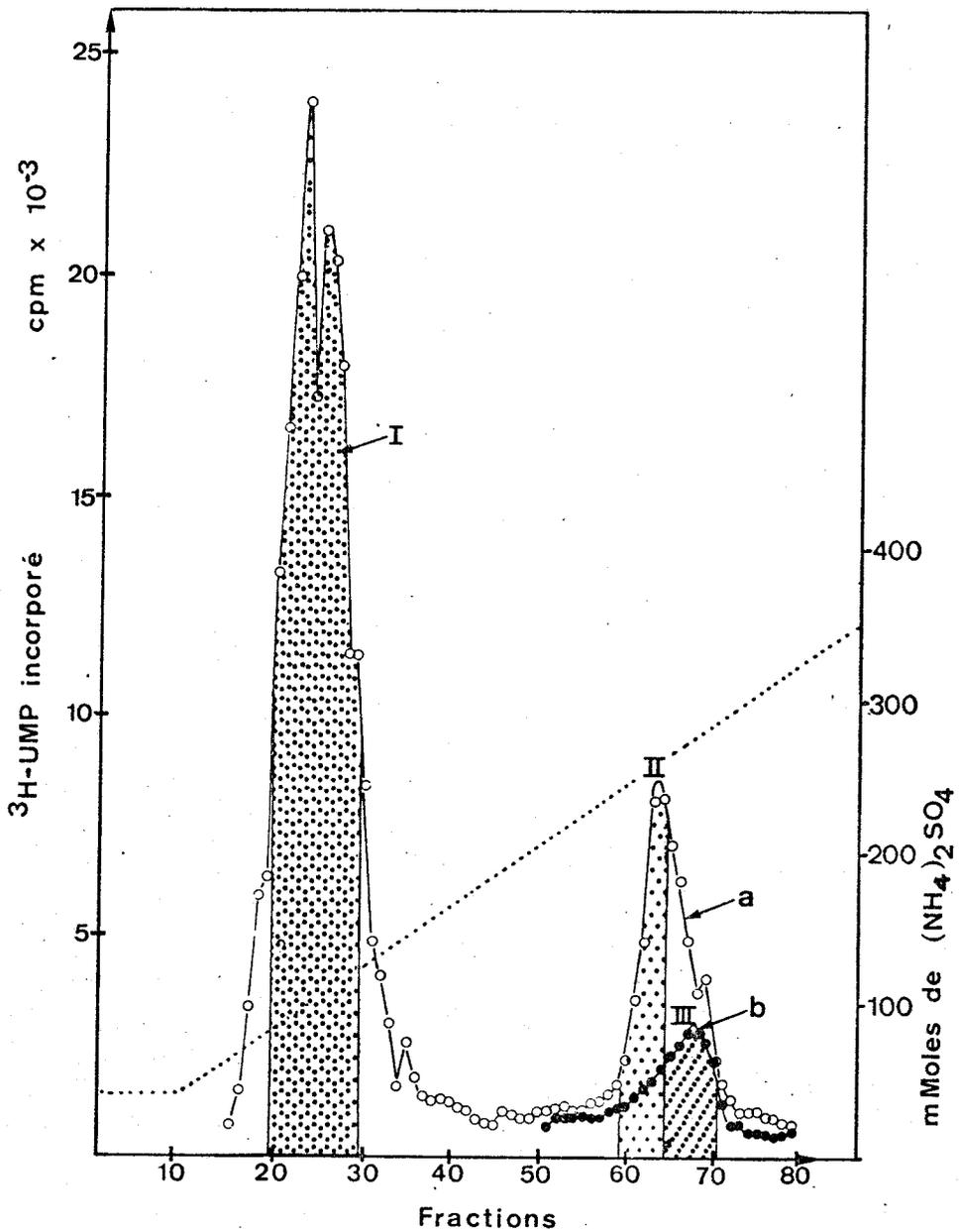


Figure n° 16 :

Séparation des RNA polymérase extraites de cellules KB par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-25.

Les enzymes sont éluées par un gradient en sulfate d'ammonium de 40 mM à 500 mM (volume total de 160 ml, fractions de 1,5 ml environ).

- Activité mesurée avec le DNA natif de cellule KB.
- Activité mesurée avec le DNA natif de cellule KB, en présence d'  $\alpha$  - amanitine (0,8  $\mu$ g/ml).

Voir SERGEANT et KRSMANOVIC ( 258).



bles, mais il nous est apparu comme étant une approche différente, et peut-être intéressante, de cette étude.

### III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES DNA MATRICES<sup>(x)</sup>

Extraction et purification du DNA cellulaire:

Les noyaux de cellules KB sont préparés de la même façon que pour l'extraction des RNA polymérases, et remis en suspension dans la solution tampon TEBS (Tris-HCl 10 mM, de pH 7,4, EDTA 1 mM, NaCl 300 mM, citrate trisodique 30 mM). Le traitement par la pronase se fait à raison de 300 µg/ml, pendant 3 heures à 37°C, en présence de sarcosinate de sodium à une concentration finale de 0,5 p. 100. (la pronase est préalablement autodigérée pendant 3 heures à 37°C, puis chauffée 5 minutes à 80°C). Après action de la pronase, du chlorure de césium en poudre est ajouté à la solution pour obtenir une densité de 1,7. Le DNA est purifié par centrifugation à l'équilibre de densité dans un rotor SW-50/1 à 40 000 t/mn pendant 60 heures, à 20°C. Après fractionnement du gradient, le DNA est dialysé contre la solution 0,1 SSC (NaCl 150 mM, citrate trisodique 15 mM, pH 7,5) pendant 16 heures. Il est conservé à 4°C dans ce même tampon.

Extraction et purification du DNA de l'Adenovirus 2 :

Après purification de l'Adenovirus 2 selon le procédé décrit par GREEN et PINA ( 259 ), la suspension virale est dialysée pendant deux heures contre la solution tampon TEBS. Le DNA est ensuite extrait et purifié de la même façon que pour le DNA cellulaire.

### IV - PREPARATION DES ( $\gamma$ - <sup>32</sup>P ) xTP

Le marquage sélectif de l'extrémité 5'-triphosphate des RNA est obtenu lorsque la synthèse est effectuée en présence des quatre ribonucléosides 5'-triphosphates dont l'un -judicieusement choisi- est marqué par le radiophosphore sur le groupement phosphate en  $\gamma$  (MAITRA et al. - 260 -). Le marquage ne subsiste qu'en position 5'-terminale puisque la liaison phosphodiester entre les nucléo-

---

(x) Les DNA cellulaires et d'Adenovirus 2 ont été préparés selon la méthode de YOUNG et SINSHEIMER ( 261 ) par Monsieur Jean-Claude D'HALLUIN ( 262 ) que nous remercions.

sides est assurée par la fonction phosphate en  $\alpha$  qui n'est pas marquée.

L'étude du nucléotide initial nécessite la possibilité d'avoir à sa disposition, à tout moment, des ( $\gamma - ^{32}\text{P}$ ) x TP. Etant donné le coût élevé de ces produits, et leur courte demi-vie (14 jours), il nous est apparu indispensable de les préparer au laboratoire. Des méthodes variées existent, mais elles nécessitent généralement une technique élaborée pour des rendements variables. Nous sommes redevable au Professeur Pierre CHAMBON de nous avoir conseillé la méthode de GLYNN et CHAPPELL (263). Elle est simple, ne nécessite que des produits commerciaux, donc disponibles à tout moment, et parfaitement adaptée à notre problème.

#### A - PRINCIPE

Le principe de la méthode revient à une réaction d'échange entre le "radiophosphate inorganique" et le phosphate en  $\gamma$  de l'ATP. Cet échange est rendu possible par la mise en jeu de deux réactions équilibrées "empruntées" à la chaîne d'EMDEN-MEYERHOF à l'étape d'oxydation du glycéraldéhyde 3-phosphate en acide 3-phosphoglycérique (voir Fig. 17 p. 74).

L'équilibre de la seconde réaction est fortement déplacé vers la formation d'ATP, par conséquent l'échange entre le  $^{32}\text{Pi}$  libre et le  $^{31}\text{P}$  en  $\gamma$  de l'ATP se fait en faveur de la formation du ( $\gamma - ^{32}\text{P}$ ) ATP, l'ADP restant en quantité catalytique.

#### B - METHODE

Nous avons quelque peu modifié le milieu réactionnel décrit par GLYNN et CHAPPELL pour nous donner la possibilité de l'utiliser, sans purification ultérieure poussée, dans les milieux de synthèse des RNA. En outre, nous avons étendu la méthode à la préparation du ( $\gamma - ^{32}\text{P}$ ) GTP et du ( $\gamma - ^{32}\text{P}$ )UTP. Le milieu de réaction contient les produits suivants :

Tris-HCl	50 mM	de pH 8
MgCl <sub>2</sub>	6 mM	
NaOH	7 mM	
Dithiothréitol	1 mM	

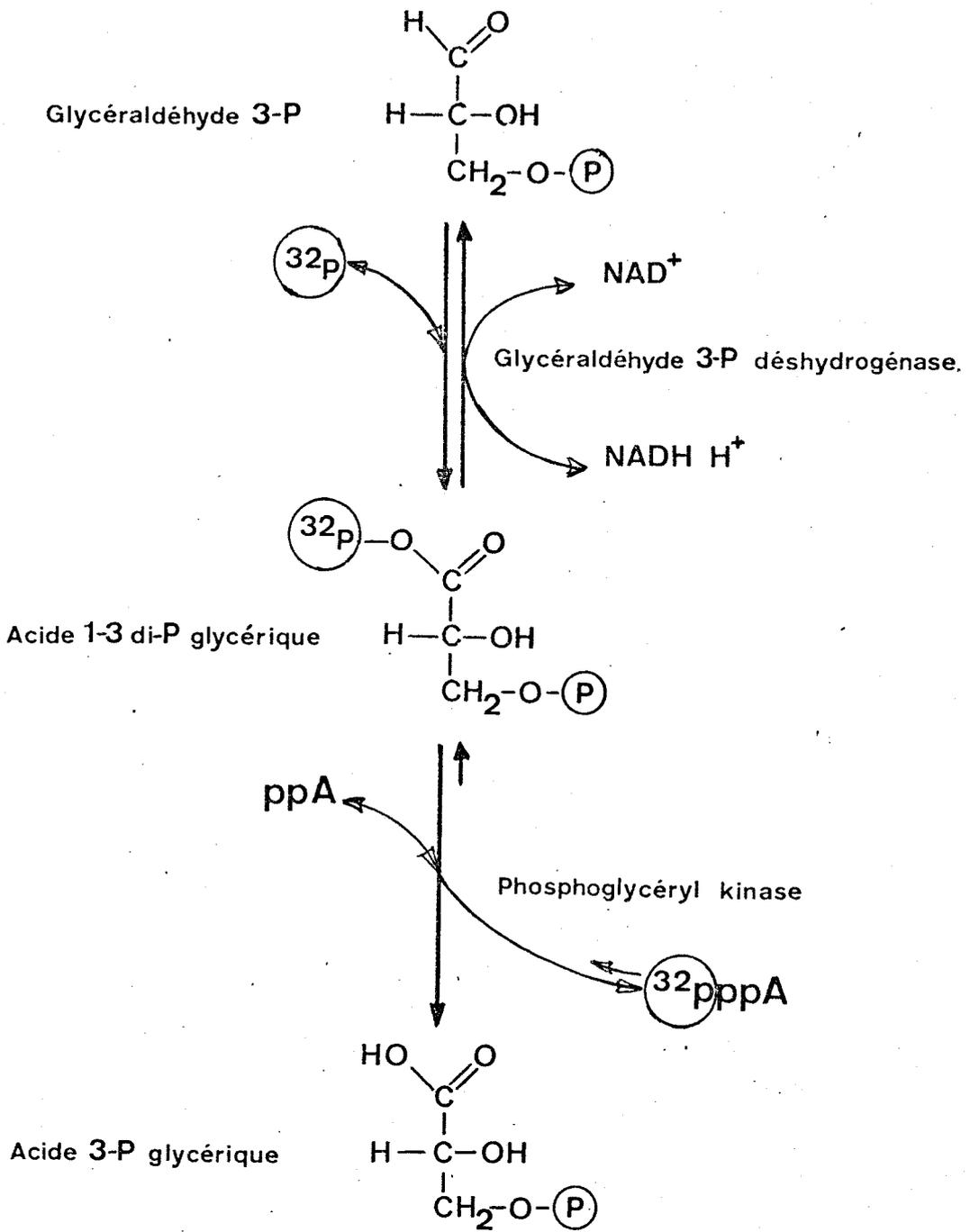


Figure n° 17 :

Principe de la synthèse du ( $\gamma$  -  $^{32}\text{P}$ ) ATP selon la méthode de GLYNN et CHAPPELL ( 264).



EDTA 0,1 mM  
Glycéraldéhyde 3-P 1 mM  
Glycéraldéhyde 3-P déshydrogénase (E. C. 1. 2. 1. 12) de muscle de Lapin contenant le NAD (BOEHRINGER) : 20 unités/ml  
Phosphoglycéryl kinase de levure (E. C. 2. 7. 2. 3. ; BOEHRINGER) 100 µg/ml  
ATP ou GTP ou UTP (SIGMA) 1,2 mM.  
<sup>32</sup>P-orthophosphate (sans entraîneur, CEA) 5 à 10 mCi/ml selon l'activité spécifique désirée.

Dès l'addition du radiophosphate, le mélange est porté à 37°C pendant 30 minutes. La réaction est ensuite arrêtée en maintenant le mélange dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes (CHAMBERLIN et RING - 265 -). Le précipité de protéines dénaturées est ensuite éliminé par centrifugation (12.000 g, 15 min), le surnageant conservé à - 20°C.

#### C - ANALYSE DES ( γ - <sup>32</sup>P) x TP

##### 1 - Absence d'activité enzymatique après traitement à 100°C

Comme les ( γ - <sup>32</sup>P) xTP sont utilisés sans autre purification dans les milieux de synthèse, il est indispensable de vérifier qu'aucune activité enzymatique (déshydrogénase et kinase) ne persiste après traitement par la chaleur. Ce point a été contrôlé par l'expérience suivante : avant l'addition du radiophosphate, le mélange réactionnel est soumis 5 minutes à 100°C, puis le radiophosphate est ajouté. Aucune radioactivité ne se trouve incorporée dans les nucléotides même après une heure d'incubation à 37°C.

##### 2 - Mesure de l'activité spécifique

Connaissant la concentration du nucléoside triphosphate et le nombre de millicuries de radiophosphate mis en réaction, l'activité spécifique peut être calculée si le rendement (pour cent de radioactivité liée au nucléotide par rapport à la radioactivité totale) de la réaction est connu. Il était donc nécessaire de séparer les nucléosides triphosphates et le phosphate libre. Nous avons utilisé la chromato-

graphie descendante sur papier Whatman 1, dans le système-solvant suivant :  
(ROBERTSON et ZINDER - 266 -) :

Phosphate de sodium	0,1 M de pH 6,8
Sulfate d'ammonium	60 p. 100 (p:v)
n-propanol	2 p. 100 (v:v).

La chromatographie est poursuivie jusqu'à ce que le front du solvant atteigne presque l'extrémité de la feuille. Après séchage, une bande de 5 cm de largeur de part et d'autre du trajet de migration est découpée centimètre par centimètre. La radioactivité de chaque bandelette est déterminée selon la méthode de CERENKOV ( 267 ) (comptage dans l'air, canal du tritium).

Les  $R_F$  des nucléosides 5'-triphosphates sont de l'ordre de 0,27 pour l'ATP, de 0,47 pour le GTP et de 0,70 pour l'UTP et le CTP. L'acide phosphorique migre avec le front (voir Fig. 18, p. 77).

### 3 - Rendement de la réaction

Cette méthode permet, d'une manière habituelle, d'échanger plus de 85 p. 100 du radiophosphate initial avec le phosphate en  $\gamma$  de l'ATP. Le rendement s'est avéré assez bon pour le GTP (77 p. 100 environ) et moyen pour l'UTP (un peu plus de 50 p. 100) (voir Tableau VI, p. 77 ).

Il convient de signaler que, dans nos conditions, le (  $\gamma$  -  $^{32}\text{P}$  ) CTP n'est pratiquement pas obtenu. Nous n'avons pas d'explication pour ce phénomène si ce n'est que la moindre réactivité -dans les réactions d'échange- du groupement phosphate en  $\gamma$  du CTP a été notée par d'autres auteurs (ROY et BISHOP - 268 -, NAKAMURA et SUGINO - 269 -).

### 4 - Contrôle de la spécificité de la réaction vis-à-vis de la position du groupement phosphate marqué :

Bien que la possibilité de marquage des nucléosides triphosphates sur le groupement phosphate en  $\alpha$  soit peu probable par le type de la réaction mise en jeu, il était nécessaire de le vérifier. En effet, la présence même en faible proportion (par exemple 1 p. 1000 pour une chaîne de 1000 nucléotides) d' (  $\alpha$  -  $^{32}\text{P}$  ) xTP

TABLEAU VI :

Rendement moyen de la synthèse des différents ( $\gamma$  -  $^{32}$ P) xTP.

	ATP	GTP	CTP	UTP
RENDEMENT moyen en p.100	86,1	77,2	—	51,3
Nb. d' exp.	23	23	3	3

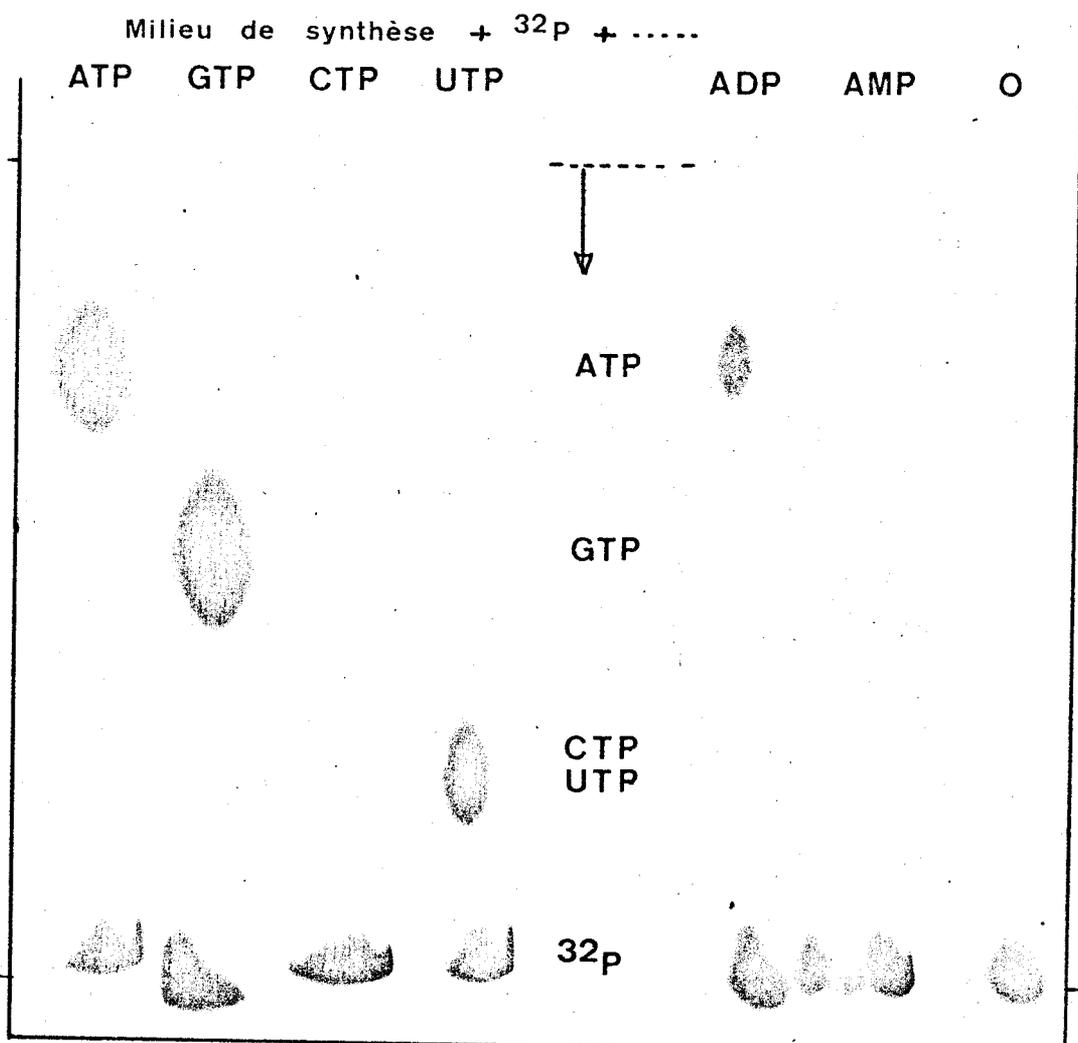


Figure n° 18 :

Séparation des ( $\gamma$  -  $^{32}$ P) xTP par chromatographie descendante sur papier.

Système solvant : Phosphate de sodium 0,1 M pH 6,8 ; sulfate d'ammonium 60 p.100 (p:v) ; n-propanol 2 p.100 (v:v).

Chromatographie et autoradiogramme réalisés après synthèse faite en présence des différents nucléotides ("O" indique le témoin sans nucléotide).



créerait un marquage interne de la molécule de RNA qui fausserait tous les résultats relatifs au nucléotide initial.

Ce contrôle a été fait de trois manières :

a) Action de la phosphodiesterase sur les ( $\gamma$  -  $^{32}$ P) x TP

Comme nous l'avons vu précédemment (p. 65 ) la phosphodiesterase de venin de Serpent transforme les nucléosides 5'-triphosphates en nucléosides 5'-monophosphates. Si aucun groupement phosphate n'est marqué en  $\alpha$  , le nucléoside 5'-monophosphate libéré ne doit pas être radioactif.

L'analyse des nucléosides avant et après action de la phosphodiesterase, réalisée par électrophorèse à pH 5,7, n'a mis en évidence aucune radioactivité significative (inférieure à 1/10.000 ème de la radioactivité totale) dans la région des nucléosides 5'-monophosphates.

b) Hydrolyse alcaline des RNA synthétisés *in vitro*

L'électrophorèse à pH 5,7 des hydrolysats alcalins des RNA synthétisés en présence de ( $\gamma$  -  $^{32}$ P)GTP ne met en évidence aucune radioactivité (inférieure à 2 fois le fond moyen de l'appareil de comptage) au niveau des nucléosides monophosphates, ce qui confirme que la radioactivité des RNA est uniquement liée à l'extrémité 5'-triphosphate.

c) Absence de ( $\alpha$  -  $^{32}$ P) AMP

Nous avons vérifié que la méthode décrite par GLYNN et CHAPPEL n'était pas transposable à la synthèse ( $\alpha$  -  $^{32}$ P) AMP, en substituant, dans le milieu de réaction, l'AMP à l'ATP.

La figure 16 démontre que la contamination des ( $\gamma$  -  $^{32}$ P) x TP par des ( $\alpha$  -  $^{32}$ P) x TP, provenant de ( $\alpha$  -  $^{32}$ P) x MP néosynthétisés dans le milieu, est hautement improbable.

V - ETUDE DE L'ACTIVITE  $\gamma$ -PHOSPHOTRANSFERASIQUE PRESENTE DANS

LES EXTRAITS DE RNA POLYMERASES

Ayant choisi de ne pas utiliser d'enzymes "trop" purifiées (voir p. 70 )

nous devons prendre garde aux activités enzymatiques contaminantes. Nous avons rapidement soupçonné la présence d'une activité "  $\gamma$ -phosphotransférasique" qui, au cours de l'incubation nécessaire à la synthèse des RNA, transfère et échange le groupement (  $\gamma$  -  $^{32}$ P) d'un nucléotide sur un autre. Il était donc indispensable de tenir compte de cette activité pour déterminer la nature du nucléotide 5'-terminal.

#### A - MISE EN EVIDENCE ET ETUDE CINETIQUE

Ce transfert du groupement (  $\gamma$  -  $^{32}$ P) se traduit par l'apparition, au cours de la réaction de synthèse des RNA, de nucléosides 5'-triphosphates autres que celui initialement inclus dans le mélange réactionnel. Le taux des nouveaux nucléotides radioactifs peut être évalué à tout moment de la réaction en soumettant une fraction aliquote du mélange réactionnel à la chromatographie précédemment décrite (voir p. 76 ).

La figure 19 (p. 80 ) montre la nouvelle répartition de la radioactivité entre les nucléosides triphosphates après une heure d'incubation.

Ce transfert du groupement (  $\gamma$  -  $^{32}$ P) a été étudié entre nucléotides de concentrations différentes. Les résultats montrent que la réaction tend à "égaliser" les activités spécifiques entre les divers nucléotides et non pas à égaliser les quantités de radioactivité portée par chaque nucléotide.

La figure 20 (p. 81 ), exprimant l'apparition du nouveau nucléoside 5'- $\gamma$   $^{32}$ P-triphosphate en fonction du temps, permet de tirer les principales conclusions suivantes :

- 1° - La vitesse de réaction est linéaire pendant au moins une heure.
- 2° - La réaction d'échange des groupements  $\gamma$ -phosphates se fait surtout entre les deux nucléotides puriques, elle est un peu plus rapide à partir du (  $\gamma$  -  $^{32}$ P)ATP.
- 3° - L'activité  $\gamma$ -phosphotransférasique affecte peu les nucléotides pyrimidiques qui ne sont pratiquement pas marqués par ces réactions d'échange.

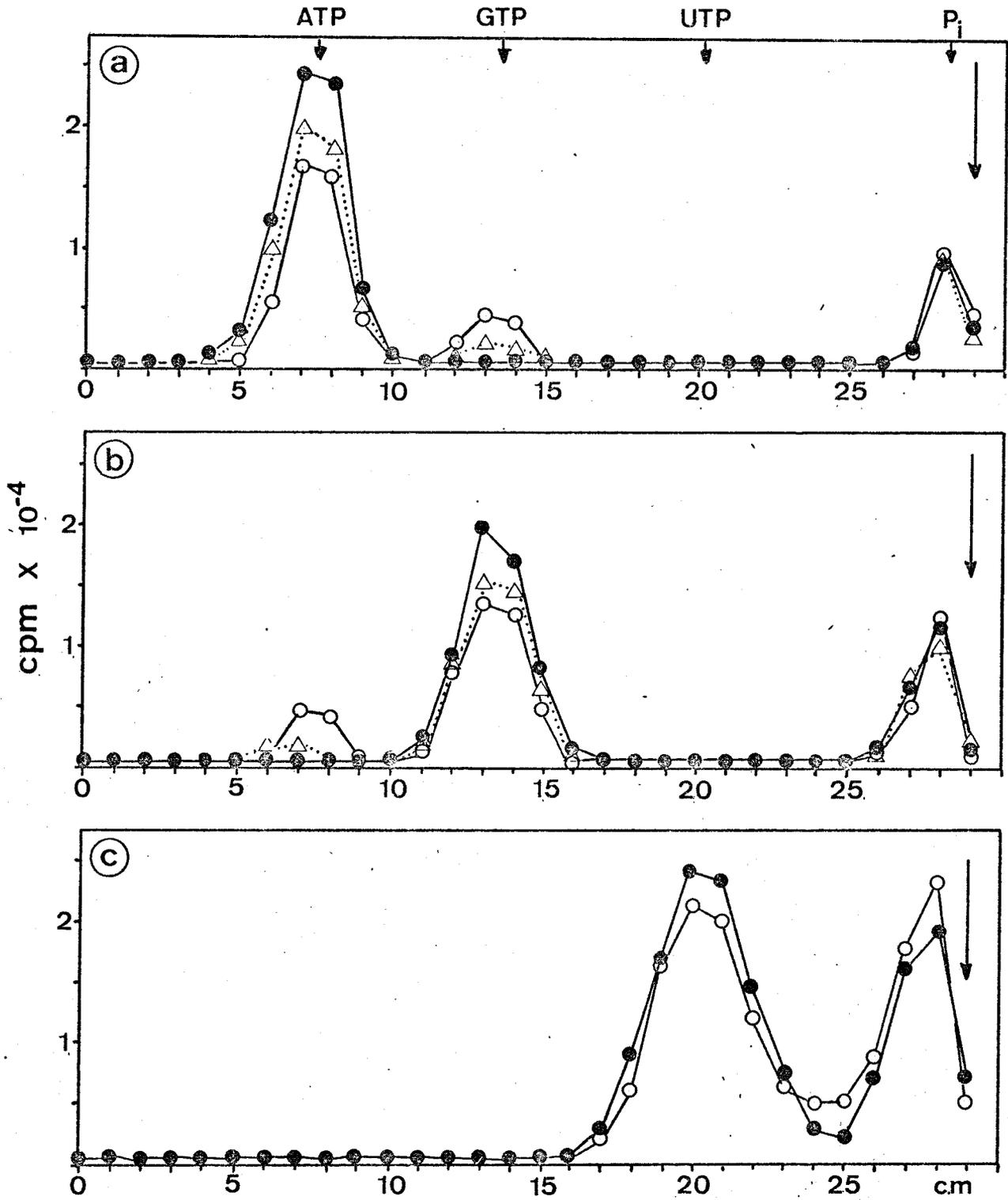


Figure n° 19 :

Répartition de la radioactivité entre les divers nucléotides et le radiophosphore au cours d'une incubation avec un extrait de RNA polymérase de type I (un profil semblable serait obtenu avec un extrait de RNA polymérase de type II).

(●—●—●) 0 min ; (△.....△.....△) 20 min ; (○—○—○) 60 min.

L'incubation a lieu en présence de  $\gamma$  - <sup>32</sup>P ATP (graphique "a") ou de  $\gamma$  - <sup>32</sup>P GTP (graphique "b") ou de  $\gamma$  - <sup>32</sup>P UTP (graphique "c") et la séparation est obtenue par chromatographie sur papier (voir fig. 18, p. 77).

La flèche indique le front du solvant.



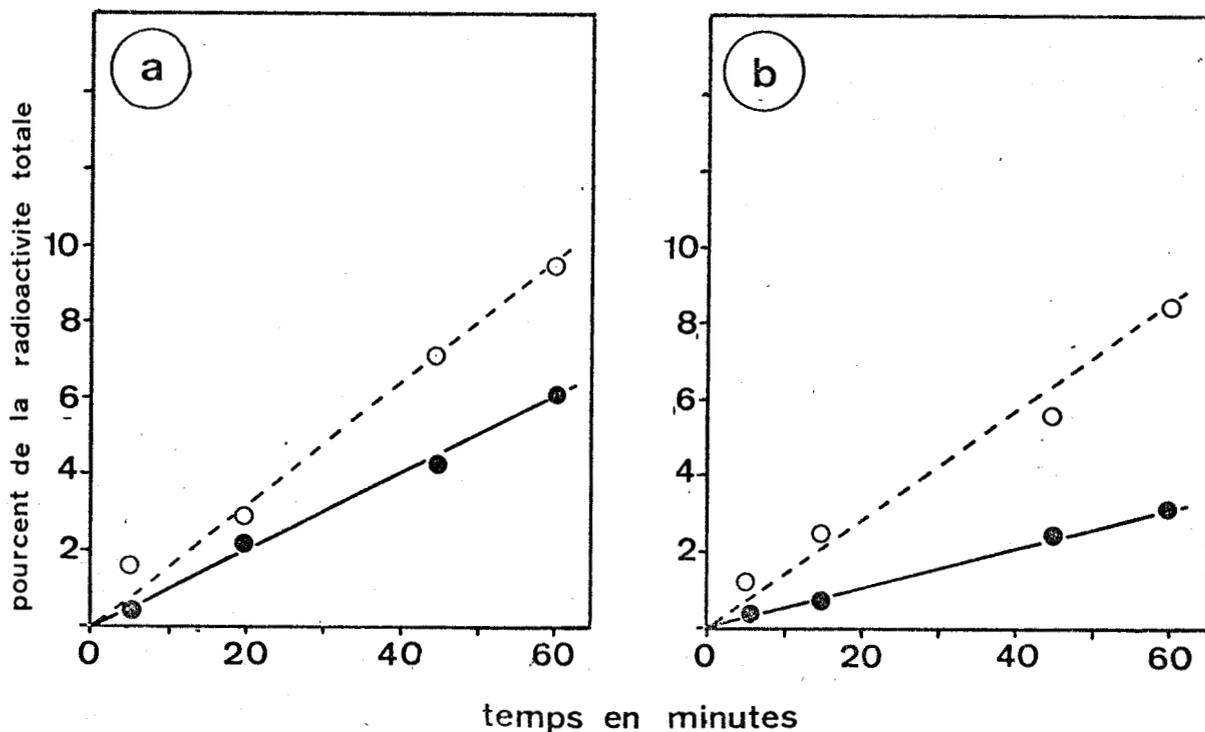


Figure n° 20 :

Cinétique de l'activité  $\gamma$  - phosphotransférasique contenue dans les extraits de RNA polymérase I (graphique "a") et dans les extraits de RNA polymérase II (graphique "b").

(●—●—●) ( $\gamma - ^{32}\text{P}$ ) ATP formé après 60 mn, à partir de ( $\gamma - ^{32}\text{P}$ ) GTP ajouté initialement à l'incubat.

(○---○---○) ( $\gamma - ^{32}\text{P}$ ) GTP formé, après 60 mn, à partir du ( $\gamma - ^{32}\text{P}$ ) ATP ajouté initialement à l'incubat.

Les radioactivités sont exprimées en p. 100 de la radioactivité totale.

## B - L'ACTIVITE $\gamma$ -PHOSPHOTRANSFERASIQUE EST-ELLE LIEE A L'ACTIVITE RNA POLYMERASIQUE ?

Après fractionnement d'un extrait brut de RNA polymérase sur colonne de DEAE-Sephadex (voir p. 70 ), l'activité  $\gamma$ -phosphotransférase a été mesurée, pour chaque fraction, par analyse chromatographique des nucléosides ( $\gamma$  -  $^{32}$ P)-triphosphates néoformés. Les résultats présentés sur la figure 21 (p. 83 ) indiquent que cette activité est présente, à des taux différents dans chaque fraction et qu'elle n'est pas liée directement à une activité RNA polymérase donnée. Cependant les extraits RNA polymérasiques de type I se sont avérés plus contaminés par cette activité que les extraits de type II.

## C - CORRECTIONS NECESSAIRES DUES A L'ACTIVITE $\gamma$ -PHOSPHOTRANSFERASIQUE

Puisque cette activité ne dépend pas de l'activité RNA polymérase, il nous a été nécessaire de la mesurer pour chaque réaction de synthèse de RNA. Sachant la réaction linéaire jusqu'à 60 minutes et connaissant par analyse chromatographique le taux de conversion entre les nucléosides triphosphates puriques, il est possible de corriger la radioactivité spécifique du nucléotide 5'-terminal et par là de connaître son véritable taux d'incorporation à l'extrémité 5' des chaînes de RNA néosynthétisés.

Pour la plupart des expériences le taux moyen d'activité  $\gamma$ -phosphotransférase a généralement créé le transfert d'environ 10 à 20 p. 100 de la radioactivité d'un nucléotide purique sur l'autre (un peu plus avec les extraits contenant la polymérase I que la polymérase II).

Il faut noter qu'une activité semblable a été détectée par ROY et BISHOP ( 270 ) dans certains virus dont l'enveloppe retient des composants membranaires de la cellule hôte.

## VI - SYNTHÈSE DES RNA IN VITRO

### A - MILIEU DE SYNTHÈSE

Le milieu de synthèse des RNA est identique à celui utilisé pour la détection de l'activité RNA polymérase (voir p. 70 ), l'un des nucléosides triphos-

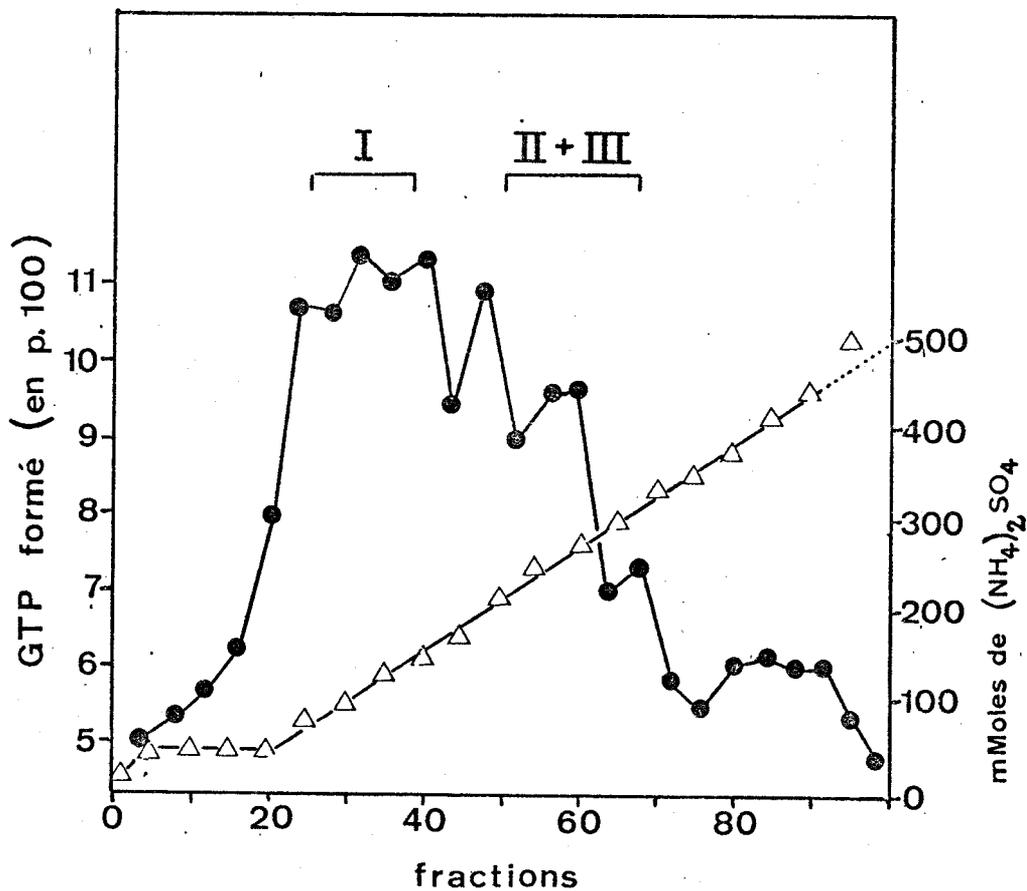


Figure n° 21 :

Profil de l'activité  $\gamma$  - phosphotransférase dans les fractions d'élution de colonne de DEAE Sphadex.

L'activité est mesurée à partir de ( $\gamma$  - <sup>32</sup>P) ATP, dans les conditions d'incubation des RNA polyméras.

I      II+III : Fractions contenant les activités RNA polymérasiques.

△ — △ — △ : Concentration en sulfate d'ammonium

● — ● — ● : Pourcentage de ( $\gamma$  - <sup>32</sup>P) GTP formé à partir de ( $\gamma$  - <sup>32</sup>P) ATP.



phates étant remplacé par la même concentration du même nucléotide marqué par le radiophosphore en position  $\gamma$  (activité spécifique de 4 à 8 Ci/mM). Le marquage interne des RNA par l'  $^3\text{H}$ -UTP se fait avec une basse concentration de ce nucléotide (0,015 mM) ; nous avons préféré, dans la plupart des cas, éviter ce marquage pour maintenir les 4 nucléotides à la même concentration non-limitante (0,4 mM) et éviter ainsi toute restriction ou modulation du déclenchement de la synthèse par influence de la concentration des nucléosides triphosphates.

#### B - ACTION DU DERIVE AF/013 DE LA RIFAMYCINE

Le dérivé AF/013 de la rifamycine peut être utilisé pour détecter les déclenchements non spécifiques de la synthèse (MEILHAC *et al.* - 271- ; voir aussi p. 13 ). Pour cela, avant l'addition des nucléosides triphosphates, l'enzyme doit être mise en présence du DNA, pendant 10 minutes à 37°C ("préincubation"). Ensuite, le dérivé AF/013 est ajouté au milieu réactionnel pour obtenir une concentration finale de 400  $\mu\text{g/ml}$  (solution stock à 40 mg/ml, dans le diméthylformamide), et immédiatement après, la synthèse est déclenchée par l'addition des nucléosides triphosphates (MEILHAC et CHAMBON - 272 -).

#### VII - EXTRACTION DES RNA SYNTHETISES IN VITRO

Après synthèse, la réaction est arrêtée par addition d'EDTA (concentration finale 5 mM) de SDS (concentration finale 0,2 p. 100) et refroidissement à 0°C. Un mélange de tRNA (E. coli, WORTHINGTON) est ajouté comme entrafeur à raison de 75  $\mu\text{g/ml}$ .

#### A - PREMIERE METHODE D'EXTRACTION DES RNA

Les RNA sont extraits par addition d'un volume égal de phénol saturé en eau. Après agitation de 10 minutes à température ordinaire, la phase aqueuse est recueillie par centrifugation.

#### B - SECONDE METHODE D'EXTRACTION DES RNA

La technique précédente présente les deux inconvénients suivants : d'une part, l'extraction se fait en présence des sels contenus dans le milieu réactionnel

ce qui peut favoriser l'adsorption de RNA dans l'interphase protéique, d'autre part, la phase aqueuse contient encore la majeure partie des nucléotides non-incorporés. Nous avons donc préféré la méthode suivante :

- 1 - Arrêt de la synthèse comme précédemment.
- 2 - Précipitation des macromolécules par addition de 2,5 volumes d'alcool (contenant de l'acétate de potassium 80 mM, pH 5,6) à - 20°C pendant au moins 4 heures.
- 3 - Lavage du précipité par le mélange Alcool:Eau (2:1 ; v:v).
- 4 - Dissolution du précipité dans 300 à 500  $\mu$ l d'une solution aqueuse de SDS 0,2 p. 100 contenant de l'EDTA 5 mM.
- 5 - Extraction par un volume égal de phénol saturé en eau comme précédemment.

#### VIII - SEPARATION DES RNA SUR COLONNE DE SEPHADEX G-75

Les RNA sont séparés des nucléosides triphosphates non incorporés par tamisage moléculaire sur colonne de Sephadex G-75. Ce degré de réticulation du gel permet d'exclure les RNA de taille supérieure à une centaine de nucléotides (voir Fig. 32 ; p. 121 ).

La solution tampon d'élution est composée de :

Tris-HCl	10 mM	pH 7,9
Phosphate de sodium	10 mM	pH 7,9
EDTA	1 mM	

Dimensions de la colonne : 30 cm x 1,2 cm de diamètre.

L'éluat est recueilli par fractions de 2 ml.

Des échantillons de 0,5 ml sont prélevés de chaque fraction et précipités par l'acide trichloracétique (concentration finale de 10 p. 100) contenant du pyrophosphate de sodium 20 mM, puis collectés sur filtre de fibre de verre (GF/C, WHATMAN). Les filtres sont lavés 6 fois par 5 ml d'acide trichloracétique 2 p. 100, rincés 2 fois par de l'alcool absolu, séchés et la radioactivité incorporée dans le matériel acido-précipitable est détectée par comptage en milieu scintillant.

## IX - ANALYSES DES RNA SYNTHETISES IN VITRO

L'utilisation de RNA polymérase partiellement purifiées contraint à contrôler si la radioactivité est uniquement incorporée à l'extrémité 5' des RNA néosynthétisés. Le matériel acido-précipitable a donc été soumis aux analyses suivantes :

- Contrôle de la résistance à la pronase pour éliminer la fraction de radioactivité incorporée dans les protéines sous l'action d'une protéine kinase éventuellement présente.

- Etude de la sensibilité à la RNase pour démontrer l'authenticité des RNA marqués et connaître ainsi la radioactivité qui pourrait être incorporée ailleurs que dans ces RNA (protéines, phospholipides, polyphosphates).

- Détection de séquences polypuriques dues notamment à l'action d'une polyriboadényl synthétase.

### A - ACTION DE LA PRONASE

Les fractions de RNA exclues du gel de Sephadex G-75 sont rassemblées et une fraction aliquote est soumise à l'action de la pronase (200 µg/ml) en présence de 0,5 p. 100 de sarcosinate de sodium. Après une demi-heure de traitement à 4°C, puis 3 heures à 37°C, la radioactivité du matériel resté acido-précipitable est évaluée comme précédemment.

D'une manière générale, la résistance à la pronase a été de l'ordre de 85 à 90 p. 100.

### B - ACTION DE LA RNase PANCREATIQUE

Une autre fraction aliquote est soumise pendant 45 minutes à 27°C à l'action de la RNase P (WORTHINGTON) à raison de 10 µg/ml.

La sensibilité à la ribonucléase a été, dans tous les cas, de l'ordre de 90 à 95 p. 100 et jamais inférieure à 90 p. 100 (Tableau VII, p. 87 ). En outre, il a été vérifié par action sur les ( $\gamma$  -  $^{32}$ P) x TP, que la ribonucléase ne possédait pas d'action phosphatasique dans ces conditions.

TABLEAU VII :

Exemple de sensibilité à la Ribonucléase P du matériel acido-précipitable après synthèse des RNA in vitro.<sup>(a)</sup>

	POLYMERASE I Incorporation de		POLYMERASE II Incorporation de	
	$\gamma$ ATP	$\gamma$ GTP	$\gamma$ ATP	$\gamma$ GTP
Matériel acido-précipitable total (cpm)	743	1 763	631	233
Résistance à la RNase (10 $\mu$ g/ml) p. 100	15	15	26	8
Résistance à la RNase selon LEE et al. (273) p. 100	2	2,5	4,1	3,5
Résistance à la RNase (cpm)	43	83	35	10
Résistance à la RNase (cpm)	5,8	4,7	5,6	4,3

(a) Après extraction (voir p. 84 2ème méthode) les RNA exclus de la colonne Sephadex G-75 sont divisés en trois fractions aliquotes et soumis aux différents traitements. La radioactivité du matériel resté acido-précipitable est ensuite déterminée.



### C - DETECTION DE SEQUENCES POLYPURIQUES

La détection de séquences polypuriques a été tentée par application de la méthode décrite par LEE et al. ( 274 ). Après dialyse d'une fraction aliquote des RNA contre la solution suivante :

Tris-HCL	50 mM	pH 7,6
KCl	50 mM	
Mg Cl <sub>2</sub>	1 mM,	

l'adialysat est soumis à l'action de la RNase P, pendant 20 minutes à 30°C, à raison de 1 µg/ml. Dans ces conditions les séquences polypuriques ne sont pas dégradées. La radioactivité du matériel resté acido-précipitable est détectée comme précédemment.

Si les valeurs de radioactivité sont suffisamment significatives, la quantité de séquences polypuriques ne représente que quelques "pourcent" du RNA total (voir Tableau VII, p. 87 ).

En conclusion de ces analyses, nous pouvons affirmer que plus de 90 p. 100 de la quantité de radioactivité exclue des colonnes de Sephadex G-75 est liée à l'extrémité 5'-triphosphates des RNA synthétisés in vitro.

### X - MESURE DE L'INCORPORATION DES ( γ - <sup>32</sup>P ) x TP DANS LES CHAINES DE RNA ACIDO-PRECIPIABLES RETENUES SUR FILTRE DE FIBRE DE VERRE

La méthode que nous venons de décrire s'est révélée très efficace pour déterminer l'extrémité 5' des RNA synthétisés in vitro par les polymérases partiellement purifiées. Elle présente cependant l'inconvénient d'être longue et de nécessiter de nombreux contrôles, elle convient mal à une étude systématique de la nature du nucléotide 5'-terminal.

Les techniques de rétention sur filtre des RNA acido-précipitables employées par la majorité des auteurs ne sont pas applicables à notre cas. En effet, les RNA polymérases partiellement purifiées se trouvent du fait même peu concentrées et, pour être significatives, les synthèses de RNA doivent être réalisées

avec de grands volumes d'extrait enzymatique (de l'ordre de 1 ml de milieu réactionnel final). La conséquence immédiate de ce fait est qu'il est nécessaire d'utiliser de grandes quantités de ( $\gamma$  -  $^{32}$ P) xTP qu'il est impossible d'éliminer totalement des filtres et qui crée un fond de radioactivité sur lequel disparaît la radioactivité due au marquage de l'extrémité 5'.

Après de nombreux essais, nous nous sommes arrêté à la méthode suivante, qui nous a donné une bonne reproductibilité des résultats :

- 1 - La synthèse, l'arrêt de la réaction et la précipitation par l'alcool se font comme précédemment décrit (voir p. 85 ).
- 2 - Le précipité alcoolique est lavé deux fois par le mélange alcool : eau (2:1, v:v), puis dissous dans 1 ml de la solution suivante :  
Tris-HCl 10 mM pH 7,9, Phosphate de sodium 10 mM pH 7,9,  
EDTA 1 mM.
- 3 - La solution est divisée en deux parties égales dont l'une est traitée pendant 45 minutes à 27°C par la RNase P à raison de 10  $\mu$ g/ml : on connaitra ainsi la radioactivité non liée aux RNA.
- 4 - Les RNA sont ensuite extraits par le phénol comme décrit précédemment.
- 5 - Les solutions aqueuses sont séparées en 3 fractions aliquotes identiques et additionnées d'acide trichloracétique jusqu'à la concentration finale de 10 p. 100 (20 mM en pyrophosphate de sodium). Après une minute à 0°C, 100  $\mu$ g/ml de sérum-albumine sont ajoutés comme entraîneur. Le matériel acido-précipitable (en 5 mn à 0°C) est récupéré sur filtre, lavé 20 fois par 5 ml d'acide trichloracétique à 2 p. 100, rincé abondamment par l'alcool absolu et mis à sécher. La radioactivité est ensuite déterminée comme précédemment.

En évitant les passages sur colonne de Séphadex, cette technique quoique

laborieuse, permet de traiter simultanément plusieurs milieux de synthèse. Nous l'avons employée parallèlement à l'autre méthode, dans l'étude sur la nature du nucléotide initial en fonction du temps de synthèse ; elles nous ont donné des résultats compatibles (voir Résultats ; p. 126 ).

RESULTATS

Les résultats que nous rapportons dans ce chapitre portent sur l'étude du premier nucléotide incorporé dans les chaînes de RNA synthétisées d'une part, in vivo, dans les noyaux de foie de Rat et dans les cellules KB ou HeLa et, d'autre part, in vitro, par les RNA polymérases extraites de cellules KB.

ETUDES REALISEES IN VIVO

I - L'EXTREMITE 5'-TRIPHOSPHATE DES RNA NEOSYNTHESES DANS LES  
NOYAUX DE FOIE DE RAT

Les acides nucléiques de noyaux de foie de Rat marqués pendant 14 heures par le radiophosphore, sont extraits selon la méthode de LEVIS et al. ( 275 ). Les études effectuées au Laboratoire par KRSMANOVIC et al. ( 276 ), SERGEANT et al. ( 277 ) ont montré que ces acides nucléiques contenaient une forte proportion (voir Fig. 9, p. 52 ) d'hybrides naturels entre le DNA et le RNA. Ces hybrides ont été caractérisés par SERGEANT ( 278 ). Leurs RNA, détachables du DNA par l'action de la chaleur ou de la formamide, ont une taille de 4 à 9 S. La fraction de RNA directement hybridée au DNA -résistante à l'action de la ribonucléase- possède une taille moyenne de 3 S soit environ 40 nucléotides.

La figure 9 (p. 52 ) montre que ces complexes DNA:RNA sont relativement peu contaminés par des RNA libres. Cette remarque nous a permis, dans un premier temps, de rechercher la présence d'extrémités 5'-triphosphates dans les complexes DNA:RNA non purifiés par le sulfate de Césium. Ceci nous permettait de raccourcir considérablement la durée de l'expérience et d'éviter ainsi une dégradation du matériel due notamment à la désintégration du radiophosphore (ROSENTHAL et FOX - 279 -).

A - L'EXTREMITE 5'-TRIPHOSPHATE DES RNA DES COMPLEXES NON PURIFIES

1 - Composition en bases des RNA

L'hydrolysat alcalin des RNA associés au DNA est analysé par électrophorèse en tampon citrate de sodium/acide citrique de pH 3,5 et la composition en bases est déterminée par la radioactivité des nucléosides monophosphates marqués par le radiophosphore (YCAS et VINCENT - 280 -) (Fig. 22, p. 94 ).

Ces RNA possèdent une composition en bases (rapport G+C / A+U = 1,27)

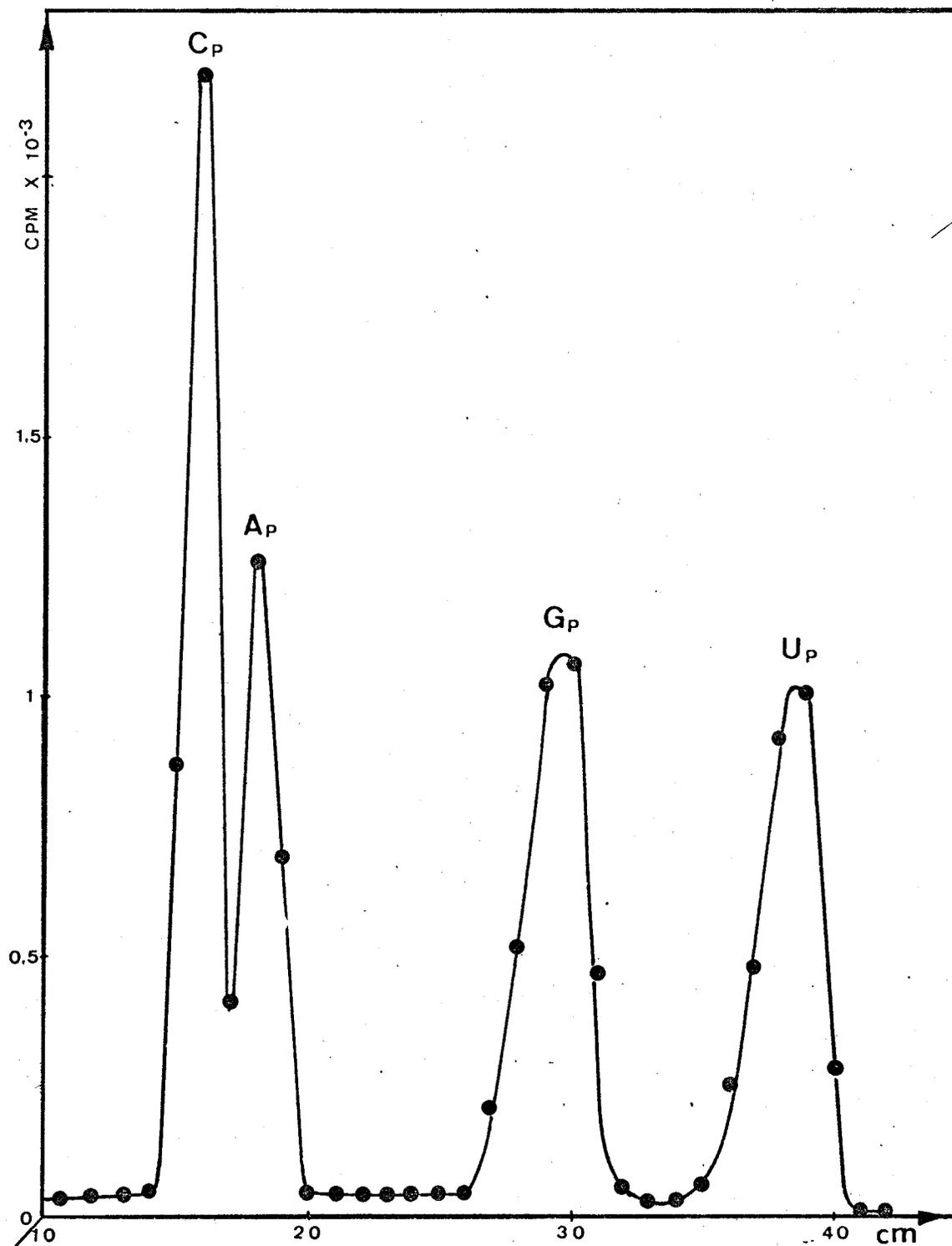


Figure n° 22 :

Répartition de la radioactivité entre les nucléosides monophosphates libérés par hydrolyse alcaline des RNA extraits de noyaux de foie de Rat (marquage <sup>32</sup>P pendant 14 heures).

Analyse faite par électrophorèse sur papier (pH 3,5), cuve en toit.



correspondant à la valeur obtenue pour les RNA nucléaires totaux (ELSON et al. - 281 -, DEFERT et al. - 282 -) (voir Tableau VIII, p. 96 ).

### 2 - Etude de l'extrémité 5'-triphosphate des RNA totaux des complexes non purifiés

Dans l'hydrolysate alcalin des RNA totaux des complexes non purifiés nous avons caractérisé, par électrophorèse à pH 5,7, outre des nucléosides monophosphates, un composé de faible radioactivité (de 1 à 3 p. 100 en moyenne) qui migre un peu plus rapidement que l'adénosine 5'-tétraphosphate ajouté comme témoin interne (Fig. 23, p. 97 ). La vitesse de migration de ce composé ( $R_{ATP}$  voisin de 1,2) nous permettait de croire qu'il s'agissait du nucléoside 5'-triphosphate 3'-monophosphate (pppNp) provenant de l'extrémité 5'. (Cette hypothèse sera confirmée par la suite lors de notre étude sur les RNA extraits de cellules KB et HeLa).

### 3 - Etude de l'extrémité 5'-triphosphate de la fraction de RNA résistant à la ribonucléase

Après extraction, les fibres d'acides nucléiques sont dissoutes dans la solution 2 SSC et dialysées contre cette même solution contenant du phosphate de sodium 20 mM de pH 7,5. Après dialyse, la solution est divisée en deux fractions contenant une quantité égale d'acides nucléiques.

- La première est traitée comme précédemment pour mettre en évidence le pppNp.

- La seconde est préalablement traitée par la ribonucléase pancréatique qui ne laisse intact que le RNA hybridé au DNA par des liaisons "pont hydrogène". L'hydrolyse alcaline menée de la même façon sur les chaînes résistantes à la RNase, permet de libérer le nucléoside tétraphosphate.

L'étude du profil de migration de l'hydrolysate alcalin en électrophorèse à pH 5,7 des deux fractions aliquotes (Fig. 24, p. 98 et Tableau IX, p. 99 ) permet de faire plusieurs remarques :

Le rapport de la radioactivité spécifique des nucléosides monophosphates permet d'évaluer que 13 à 25 p. 100 des RNA sont résistants à la RNase.

Dans les deux cas, nous observons l'existence d'un nucléoside tétraphos-

TABLEAU VIII :

Composition centésimale de divers RNA extraits de foie de Rat

	RNA nucléaires Totaux		RNA des complexes non purifiés	RNA associés au DNA (complexes purifiés)	RNA des complexes résistant à la RNase
	ELSON <u>et al.</u> ( 283 )	DEFERT <u>et al.</u> ( 284 )			
CMP	29,7	28	28	24,4	22,1
AMP	20,2	19,7	18,6	22,6	23,6
GMP	26,2	28,3	21	31,3	40,1
UMP	23,9	24	25,4	21,7	14,2
$\frac{G + C}{A + U}$	1,27	1,26	1,27	1,26	1,65



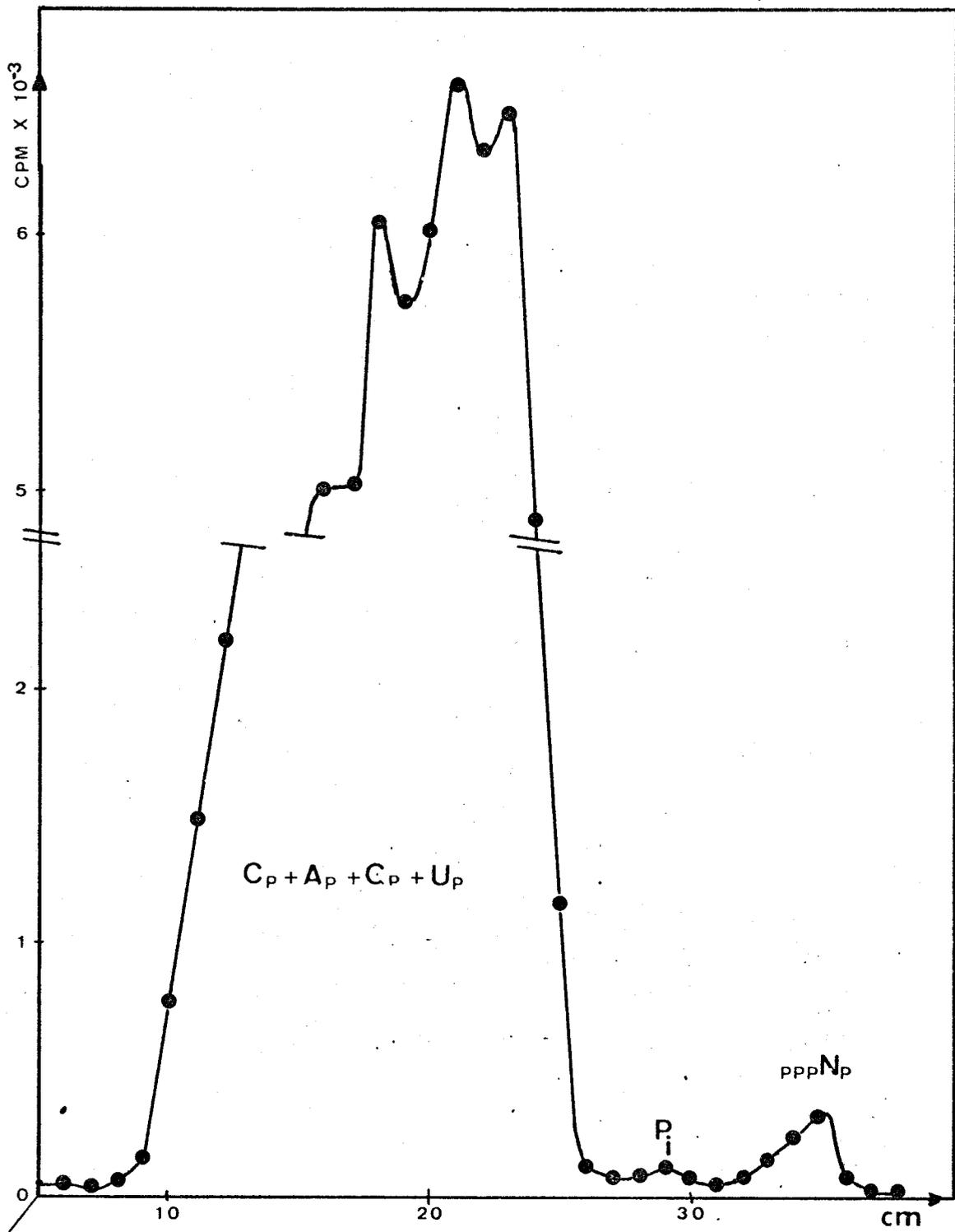


Figure n° 23 :

Mise en évidence d'un composé de type pppN<sub>p</sub> dans les hydrolysats alcalins des RNA extraits de noyaux de foie de Rat (marquage <sup>32</sup>P), 14 h.

Analyse faite par électrophorèse sur papier (pH 5,7), cuve en toit.



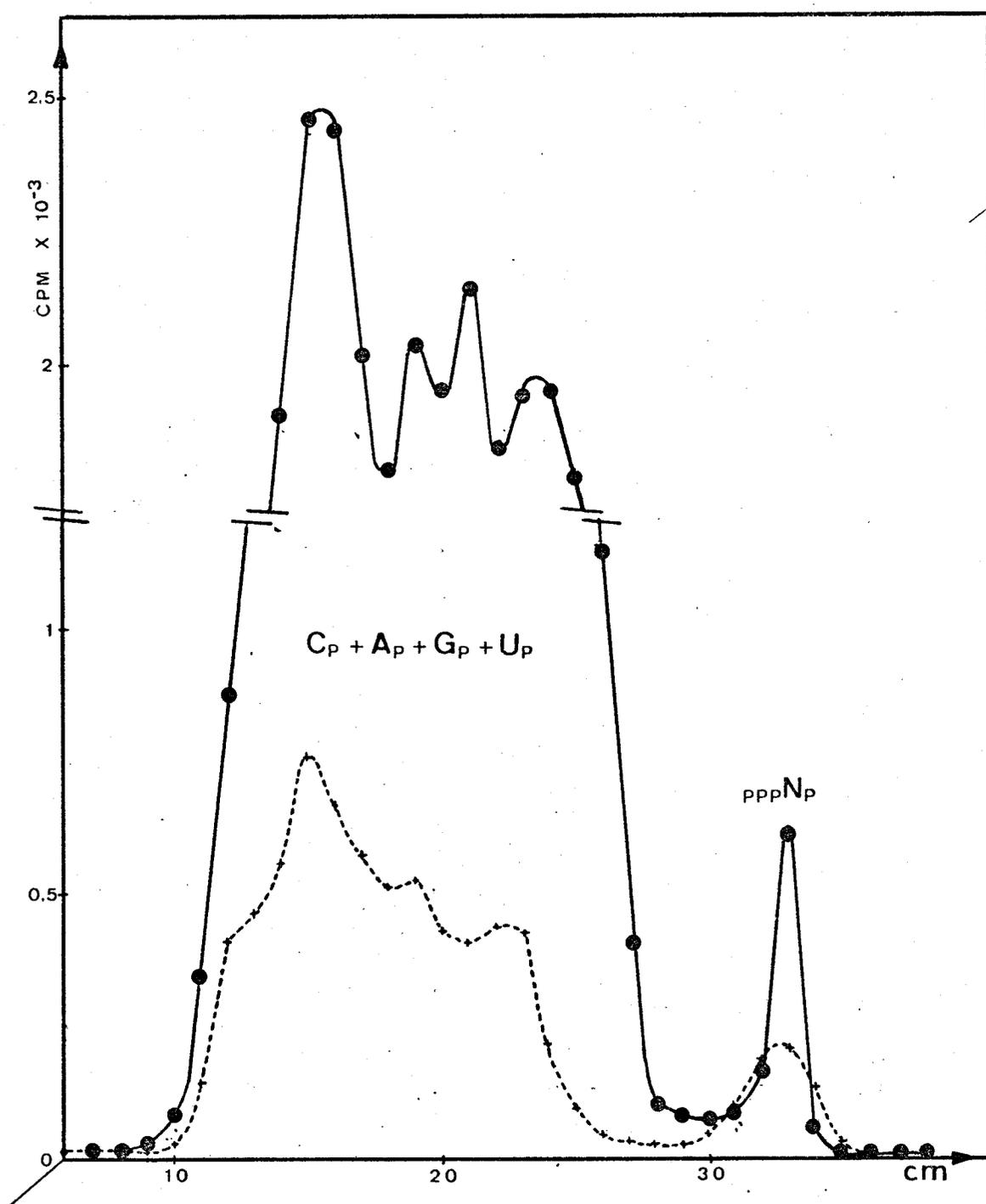


Figure n° 24 :

Mise en évidence d'un composé de type pppN<sub>p</sub> dans les hydrolysats des complexes DNA:RNA non purifiés, extraits de noyaux de foie de Rat (marquage <sup>32</sup>P, 14 h).

(●—●—●) complexe DNA:RNA total non purifié

(+-----+-----+) complexe DNA:RNA après action de la ribonucléase, le RNA résistant à la ribonucléase est associé au DNA par pont "hydrogène".

Analyse faite par électrophorèse sur papier (pH 5,7), cuve en toit.



TABLEAU IX :

Taille moyenne des chaînes des RNA associés au DNA, avant et après action de la Ribonuclease.

	Radioactivité des nucléosides mono-phosphates (en c. p. m.)	Radioactivité des nucléosides tétra-phosphates (en c. p. m.)	Taille moyenne des chaînes : Nombre moyen de nucléosides monophosphates pour un nucléoside tétraphosphate
Complexe non purifié	67. 600	1. 680	161
Complexe "RNase - résistant"	8. 770	920	38
→ Résistance à la RNase (en p.100)	13	55	
Complexe non purifié	28. 000	900	125
Complexe "RNase résistant"	6. 600	600	44
→ Résistance à la RNase (en p.100)	23,6	66,6	
Exp. 1	52. 300	1. 900	110
Exp. 2	16. 000	700	92
Exp. 3	75. 000	3. 000	100
Complexe purifié	60. 000	2. 400	100
Complexe "RNase résistant"	7. 000	970	29
→ Résistance à la RNase (en p.100)	11,7	40,4	



phate, cependant l'action de la RNase a éliminé une certaine proportion (33 à 45 p. 100) de ce composé. L'extrémité 5'-triphosphate, partiellement sensible à la RNase, ne serait pas toujours engagée dans l'hybride. Estimant qu'après 14 heures de marquage la radioactivité spécifique des 4 groupements phosphates est équivalente, il est possible d'attribuer une taille moyenne d'une quarantaine de nucléotides à la fraction de RNA résistante à la ribonucléase.

## B - L'EXTREMITE 5'-TRIPHOSPHATE DES RNA DES HYBRIDES NATURELS

### DNA : RNA PURIFIES EN GRADIENT DE SULFATE DE CESIUM

Lors de l'extraction des complexes DNA : RNA par la méthode de LEVIS *et al.* ( 285 ), la contamination par des RNA libres est relativement faible. Cependant, si ces RNA possèdent une extrémité 5'-triphosphate, ceci explique la sensibilité partielle à la ribonucléase. Il nous est donc apparu indispensable de déterminer le taux d'extrémités 5'-triphosphates présentes dans les hybrides DNA : RNA purifiés par équilibre de sédimentation en gradient de sulfate de Césium. Ce travail a été entrepris avec Mademoiselle Dominique CROIX ( D. E. A. , 1972).

#### 1 - Taux de nucléoside tétraphosphate dans les RNA libres

Les acides nucléiques sont centrifugés en gradient de sulfate de Césium (densité moyenne : 1,535). Après fractionnement du gradient, les RNA libres, s'équilibrant à la densité de 1,60 environ, sont hydrolysés par la potasse puis soumis à l'analyse par électrophorèse de pH 5,7. Lorsque la proportion de nucléosides tétraphosphates a été détectable, elle a été évaluée à moins de 1 pour 1200 nucléosides monophosphates. Par rapport à l'ensemble des extrémités 5'-triphosphates contenues dans les complexes non purifiés, ce taux ne représente que 5 à 12 p. 100. La sensibilité des extrémités 5' à la RNase dans le cas des complexes non purifiés n'est donc pas totalement expliquée par la présence éventuelle de RNA libres.

#### 2 - Etude de l'extrémité 5'-triphosphate des RNA de l'hybride purifié

##### a) Taux de nucléosides tétraphosphates dans la totalité des RNA associés au DNA

Après purification en gradient de sulfate de Césium, les hybrides DNA : RNA sont hydrolysés par l'hydroxyde de lithium. L'électrophorèse à pH 5,7 de cet

hydrolysats révèle un profil semblable à celui précédemment décrit pour les complexes non purifiés (voir Fig. 25, p. 102). La proportion de nucléosides tétraphosphates est de l'ordre de 1 pour 100 nucléosides monophosphates (voir Tableau IX, p. 99 ).

b) Taux de nucléosides tétraphosphates dans la fraction de RNA résistante à la ribonucléase

Après purification, les hybrides DNA : RNA sont dialysés contre le tampon 2 SSC contenant 20 mM de phosphate de sodium pH 7,5, et divisés en deux parties rigoureusement identiques (la répartition se fait par prises successives de 100  $\mu$ l pour assurer une équirépartition des acides nucléiques). Une partie est soumise à l'action de la ribonucléase, l'autre est utilisée comme contrôle. Les hydrolysats alcalins des fractions acido-précipitables sont analysés par électrophorèse de pH 5,7. Tandis que près de 90 p. 100 de la radioactivité totale des RNA sont éliminés par la ribonucléase, la quantité de nucléoside tétraphosphate ne diminue que de 60 p. 100 (voir Tableau IX, p. 99).

Dans ce cas, la proportion d'extrémités 5'-triphosphates présente dans les chaînes de RNA résistantes à la ribonucléase est de l'ordre de 1 pour 30 nucléotides, ce qui est en accord avec les résultats précédemment obtenus avec les complexes non purifiés.

II - L'EXTREMITÉ 5'-TRIPHOSPHATE DES RNA EXTRAITS DE CELLULES HeLa

et KB

L'utilisation de cellules en cultures nous permet d'utiliser des bases traitées comme précurseurs radioactifs. Ceci présente plusieurs avantages :

- 1° - Marquages spécifiques des bases.
- 2° - Caractérisation possible de la nature du nucléotide 5'-terminal.
- 3° - Effet de radiolyse moins prononcé : selon ROSENTHAL et FOX ( 286 )

la désintégration d'un atome tritium ne provoque de rupture de chaîne de RNA que dans 30 p. 100 des cas, alors que la désintégration d'un atome de radiophosphore crée à chaque fois une rupture de chaîne.

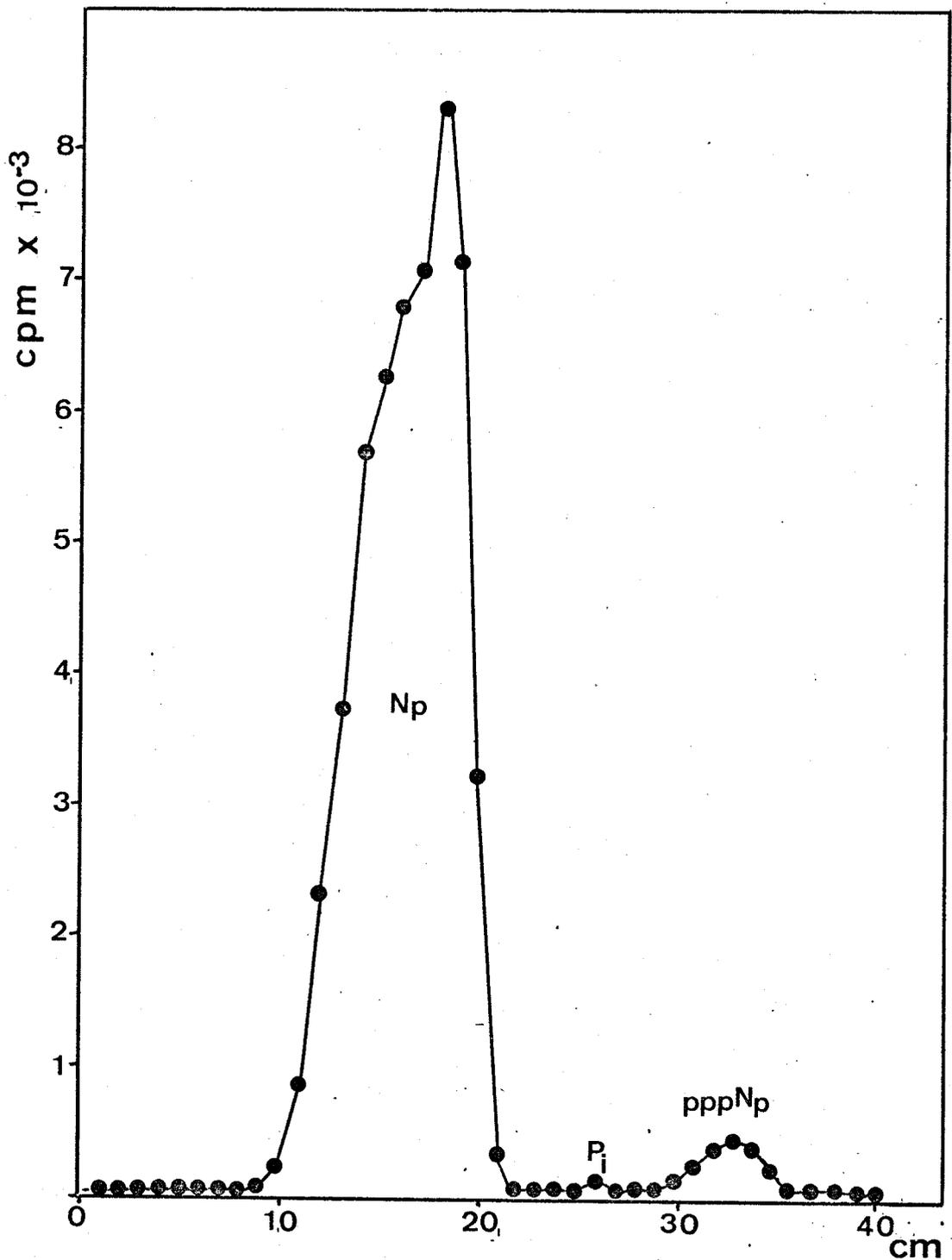


Figure n° 25 :

Mise en évidence d'un composé de type pppNp dans les hydrolysats alcalins des RNA associés au DNA dans les hybrides naturels DNA : RNA purifiés par centrifugation en gradient de  $Cs_2SO_4$ .

Analyse faite par électrophorèse sur papier (pH 5,7), à haut voltage (6000 V).



Nous avons effectué l'étude de la nature du nucléoside 5'-triphosphate des DNA extraits de cellules KB et HeLa selon la méthode de LEVIS et al. ( 287 ). Les résultats obtenus avec ces deux types de cellules ont été tout à fait comparables, aussi les traiterons nous ensemble.

#### A - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN BASES DES RNA

Le marquage des cellules a été effectué par addition de radiophosphate au milieu de culture à raison de 5  $\mu$ Ci/ml. Le tableau X (p. 104 ) rapporte cette composition pour les différentes durées de marquage utilisées : 14 h, 3,5 h en présence ou non d'actinomycine D.

Le rapport G+C / A+U = 1,4 et 1,5 est en accord avec la composition des RNA cellulaires totaux.

En présence d'actinomycine, le rapport G+C / A+U = 0,83 est effectivement celui attendu lorsque la synthèse des RNA ribosomiaux est inhibée.

#### B - MARQUAGE PAR INCORPORATION DE GUANINE TRITIÉE PENDANT 14 H.

##### 1 - Spécificité du marquage

L'addition de guanine tritiée au milieu de culture, 14 heures avant l'extraction des complexes, permet de marquer presque exclusivement la guanine. En effet, l'analyse d'une fraction aliquote des hydrolysats alcalins a révélé, dans tous les cas, un marquage de la guanosine-(2') 3'-monophosphate avoisinant 95 p. 100 de la radioactivité totale (voir Fig. 26, p. 105 et Tableau X, p. 104 ).

##### 2 - Mise en évidence des nucléosides polyphosphates

Après électrophorèse à pH 5,7, la distribution de la radioactivité révèle que plus de 99 p. 100 de celle-ci est liée aux nucléosides monophosphates (voir Fig. 27, p. 106 et Tableau XI, p. 107 ). Cependant, outre les nucléosides monophosphates, deux composés de faible radioactivité (de 0,23 à 0,40 p. 100 de la radioactivité totale) sont détectés. Le produit le plus rapide (I) a la même mobilité que le témoin (  $\gamma$  -  $^{32}$ P)pppGp, tandis que le second (II) a une mobilité comprise entre celle du GTP et du pppGp.

TABLEAU X :

Répartition de la radioactivité entre les nucléosides monophosphates des RNA, selon le précurseur radioactif employé <sup>(a)</sup>.

Type de cellules et conditions de marquage	Distribution de la radioactivité (en p.100)			
	Cp	Ap	Gp	Up
<b>Cellules HeLa :</b>				
<sup>3</sup> H) Guanine (14 h)	-	5,2	94,8	-
<sup>3</sup> H) Adénine (14 h)	-	65,0	35,0	-
<sup>3</sup> H) Uridine (14 h)	48,5	1,0	1,5	49,0
<b>Cellules KB :</b>				
<sup>3</sup> H) Guanine (14 h)	-	3,1	96,9	-
<sup>3</sup> H) Adénine (14 h)	-	82,0	18,0	-
<sup>3</sup> H) Uridine (14 h)	52,8	1,1	1,6	44,5
<sup>32</sup> P) Orthophosphate (14 h)	28,9	20,4	29,3	21,4
<sup>3</sup> H) Guanine (3,5 h)	-	1,9	98,1	-
<sup>3</sup> H) Adénine (3,5 h)	-	96,1	3,9	-
<sup>32</sup> P) Orthophosphate (3,5 h)	28,5	17,8	31,3	22,4
<sup>32</sup> P) Orthophosphate (3,5 h) + Actinomycine D	24,8	22,8	20,6	31,8

(a)

La radioactivité liée à chaque nucléoside monophosphate est déterminée par électrophorèse à pH 3,5 d'une fraction aliquote de l'hydrolysate alcalin des RNA.



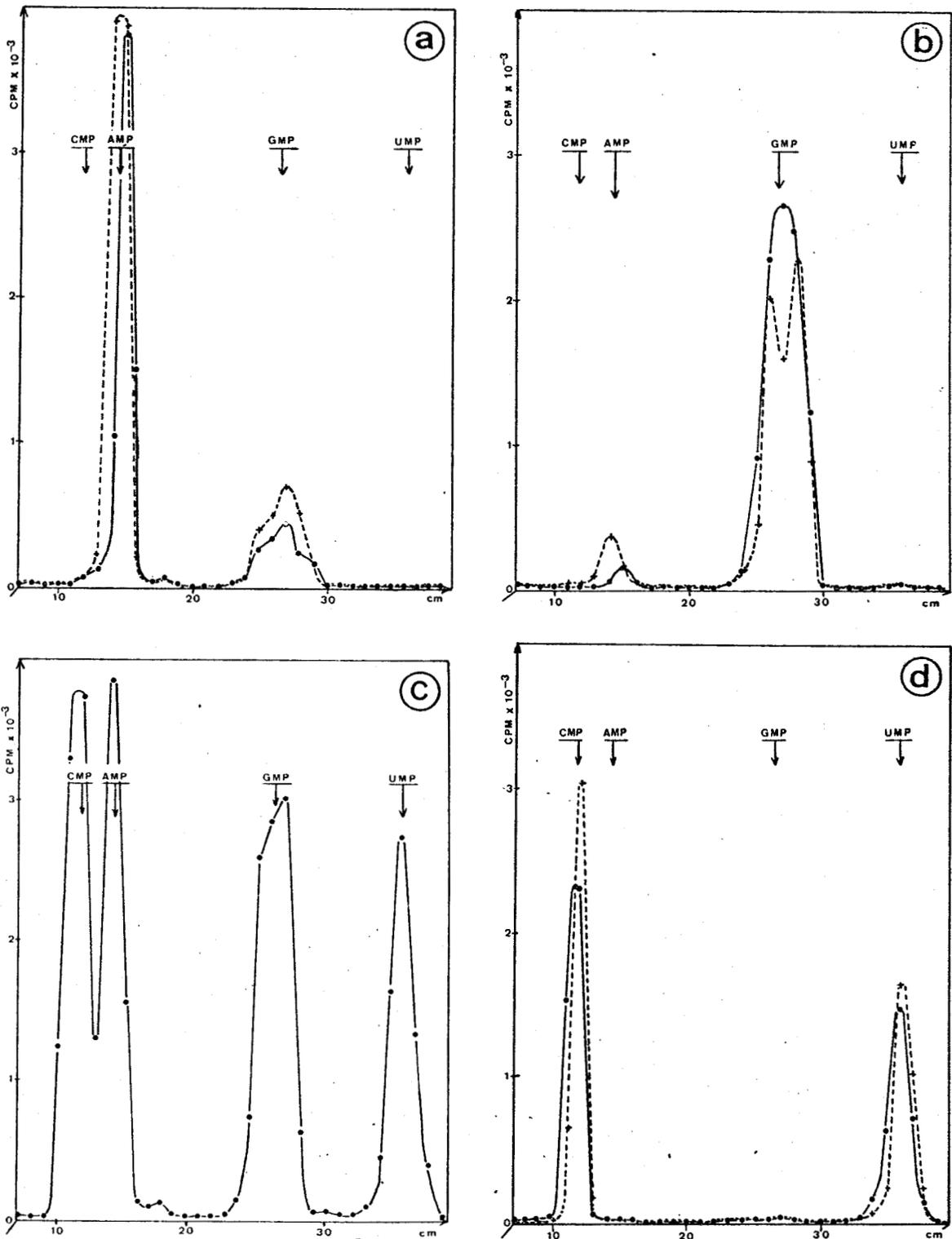


Figure n° 26 :

Répartition de la radioactivité entre les nucléosides monophosphates libérés par hydrolyse alcaline des RNA extraits de cellules HeLa (+ - - - + - - - -) ou KB (● — ● — ●).

Analyse faite par électrophorèse sur papier (pH 3,5) cuve en toit.

- Graphique "a" : marquage par l'adénine tritiée pendant 14 h.
- Graphique "b" : marquage par la guanine tritiée pendant 14 h.
- Graphique "c" : marquage par le radiophosphore pendant 14 h.
- Graphique "d" : marquage par l'uridine tritiée pendant 14 h.



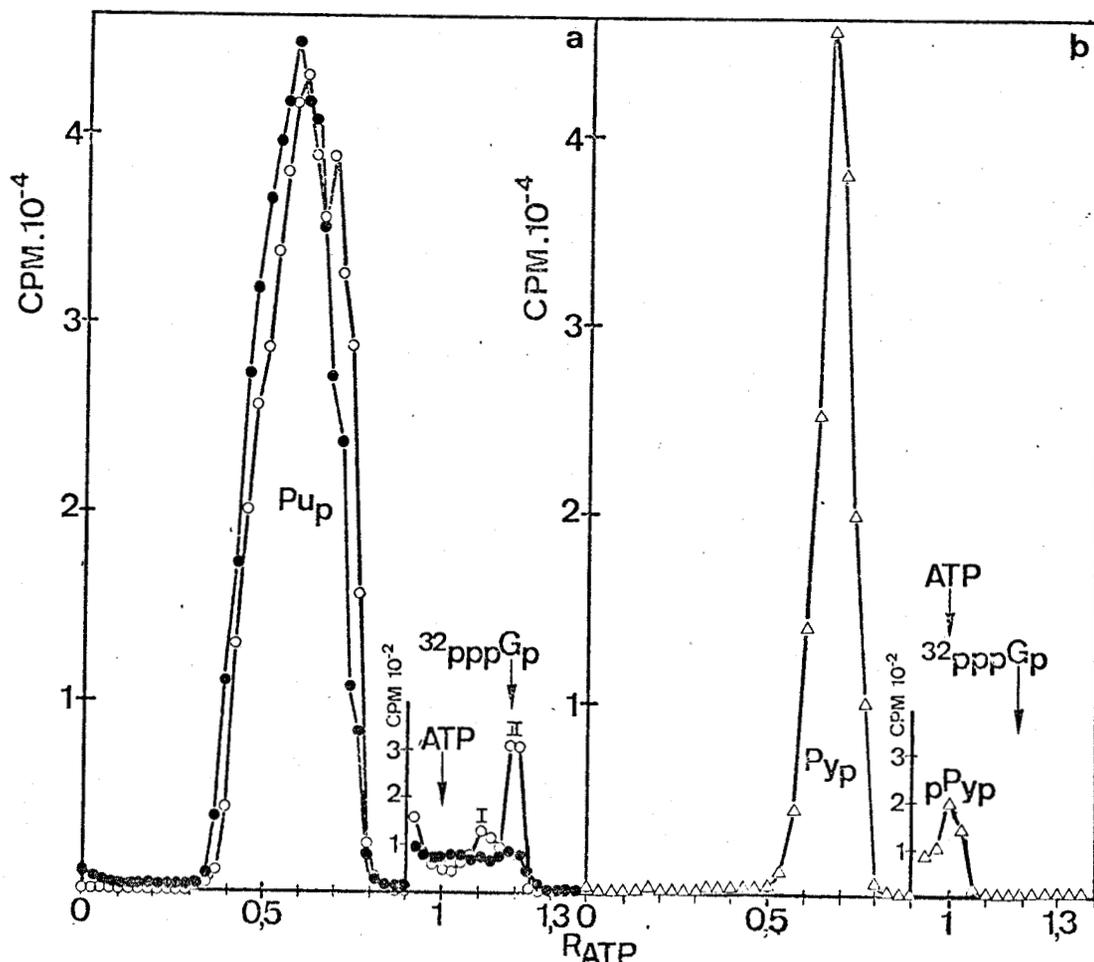


Figure n° 27 :

Répartition typique de la radioactivité après séparation électrophorétique (pH 5,7, sur papier, 4000 V) des hydrolysats alcalins de RNA extraits de cellule HeLa après un marquage de 14 h, en présence de Guanine tritiée (○—○—○) ou d'Adénine tritiée (●—●—●) ou d'Uridine tritiée (△—△—△).

Les vitesses de migration sont exprimées en prenant l'ATP comme référence (R<sub>ATP</sub>)

Le marqueur (γ - <sup>32</sup>P) pppGp a été préparé à partir de RNA synthétisés in vitro, par la RNA polymérase I en présence de (γ - <sup>32</sup>P) GTP.

Répartition de la radioactivité entre les nucléosides monophosphates et les nucléosides tri-et tétra-phosphates dans les hydrolysats alcalins de RNA cellulaires (a).

Conditions expérimentales		Gp <sup>(b)</sup> (cpm)	pppGp + ppGp (cpm)	Ap <sup>(b)</sup> (cpm)	ppAp + ppAp (cpm)	pppGp + ppGp <sup>(d)</sup>		pppAp + ppAp <sup>(d)</sup>		Proportion de chaînes débutant par (en p. 100)	
						Np	Np	GTP	ATP		
						x 100	x 100				
<u>Cellules HeLa</u>											
<sup>3</sup> H) Guanine	14 h	423.417	1.096	23.225	-	0,076	-	<b>82</b>	-		
<sup>3</sup> H) Adénine	14 h	792.140	2.052	1417.117	1.245	-	0,017	-		18	
<u>Cellules KB :</u>											
<sup>3</sup> H) Adénine	14 h	80.494	217 <sup>(c)</sup>	366.694	361 <sup>(c)</sup>	0,079	0,020	<b>80</b>		20	
<sup>3</sup> H) Guanine	(3,5 h)	131.910	700	-	-	0,162	-	<b>82</b>		-	
<sup>3</sup> H) Adénine	(3,5 h)	-	-	171.706	362	-	0,035	-		18	
<sup>3</sup> H) Guanine	(3,5 h)	102.948	366	-	-	0,073	-	<b>21</b>		-	
et Actinomycine D											
<sup>3</sup> H) Adénine	(3,5 h)	-	-	149.306	1.801	-	0,275	-		<b>79</b>	
et Acti nomycine D											

(a) La répartition de la radioactivité est calculée après séparation électrophorétique à pH 5,7

(b) Evaluation faite selon la répartition de la radioactivité entre Ap et Gp (voir Tableau X, p. 96).

(c) Calcul direct par analyse de la teneur en (<sup>3</sup>H) Adénine et (<sup>3</sup>H) Guanine après hydrolyse acide des composés tri-et tétraphosphates (voir Fig. 28, p. 111).

(d) Np représente la radioactivité totale qu'auraient les 4 nucléosides monophosphates dans le cas d'un marquage simultané (voir Tableau X, marquage par le radiophosphore).



### 3 - Nature de ces composés polyphosphates

L'électrophorèse à pH 2,5 des produits d'hydrolyse acide de ces composés révèle que toute leur radioactivité est liée à la guanine.

### 4 - Action de la phosphodiesterase de venin de Serpent

Afin de connaître si ces composés sont contaminés par du GTP libre, ils ont été soumis à l'action de la phosphodiesterase de venin de Serpent. Après action enzymatique, il y a réduction de la mobilité électrophorétique, donc perte de groupements phosphates. Le produit formé a une mobilité correspondant à celle de composé de type pNp (voir Tableau XII, p. 109 ). Aucune radioactivité n'est détectable dans la zone correspondant au nucléoside monophosphate, alors que le GTP "froid" ajouté comme témoin a été effectivement dégradé en GMP.

Ces résultats indiquent que l'hydrolyse alcaline des RNA marqués par la Guanine tritiée révèle une proportion, faible mais caractéristique, de guanosine 5'-triphosphate 3'-monophosphate.

Enfin, il faut noter une présence plus importante de ppGp dans les cellules KB. Cela peut être dû à une variation des conditions d'extraction, mais peut correspondre aussi à des conditions différentes de la déphosphorylation in vivo des extrémités 5'-triphosphates entre les cellules KB et les cellules HeLa. Cette différence a déjà été notée par FORGET et WEISSMAN ( 288 ) et HATLEN et al. ( 289 ) lors de leurs études de l'extrémité 5' des RNA 5S de ces cellules.

## C - MARQUAGE PAR INCORPORATION D'ADENINE TRITIÉE PENDANT 14 H.

### 1 - Spécificité du marquage

L'adénine tritiée, ajoutée au milieu de culture des cellules, subit in vivo une conversion partielle en guanine. Le marquage est donc moins sélectif comme le montre l'analyse de la répartition de la radioactivité entre les nucléosides monophosphates effectuée systématiquement à chaque expérience par électrophorèse à pH 3,5 (voir Fig. 26, p. 105 ).

Dans les RNA, l'acide guanylique se trouve marqué pour 20 à 35 p. 100 de la radioactivité totale. Les nucléotides pyrimidiques ne sont pratiquement pas marqués (Tableau X, p. 104 ).

Cette non-spécificité du marquage n'est pas un inconvénient et il est pos-

TABLEAU XII :

Action de la phosphodiesterase de venin de Serpent sur les nucléosides polyphosphates<sup>(a)</sup>

		Zone des nucléosides polyphosphates	Zone des pNp	Zone des pN	
Marquage des Bases Puriques	Expérience Contrôle	cpm	176	48	-
		pourcentage	79,5	20,5	-
	Action de la phosphodiesterase	cpm	26	224	-
		pourcentage	10,4	89,6	-
Marquage des Bases pyrimidiques	Expérience Contrôle	cpm	-	375	-
		pourcentage	-	100	-
	Action de la phosphodiesterase	cpm	-	384	-
		pourcentage	-	102	-

MS  
LIFE

(a) Les nucléosides polyphosphates (avant ou après action de la phosphodiesterase) sont soumis à l'électrophorèse de pH 5,7 et la radioactivité de chaque zone est ensuite déterminée. Les nucléosides 5'-triphosphates, ajoutés comme témoin interne, sont convertis en nucléosides 5'-monophosphates.

sible d'en tirer profit puisqu'elle permet un marquage simultané des deux bases puriques.

## 2 - Mise en évidence des nucléosides polyphosphates

Comme dans le cas précédent, -et dans les deux types de cellules-, l'analyse des hydrolysats alcalins par électrophorèse à pH 5,7 révèle la présence de nucléosides tri- et tétraphosphates (voir Fig. 27, p. 106 ) dont la radioactivité relative aux nucléosides monophosphates est plus faible que dans le cas du marquage de la guanine (0,14 à 0,17 p. 100 au lieu de 0,23 à 0,40 p. 100).

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

### a) Calcul du rapport d'ATP et GTP 5'-terminal dans les cellules HeLa

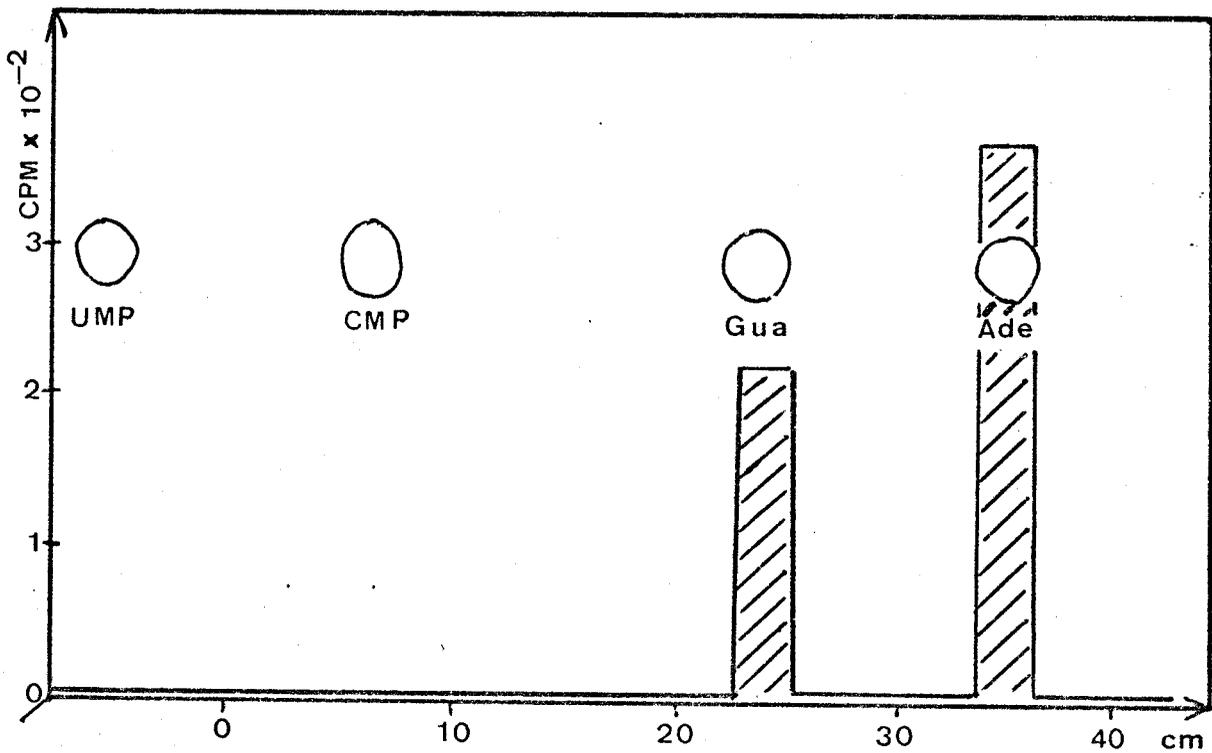
L'expérience, menée dans les mêmes conditions avec la guanine tritiée, permet de connaître la valeur du rapport  $(ppGp + pppGp)/Gp$  qui peut être extrapolée au marquage par l'adénine tritiée. Connaissant ainsi la radioactivité que l'on peut attribuer aux composés polyphosphates de la guanosine, il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

Ces calculs sont résumés dans le tableau XI (p. 107 ).

Ils conduisent, pour les cellules HeLa et KB, à la même conclusion : le GTP se trouve à l'extrémité 5' de 80 p. 100 (environ) des chaînes d'ARN néoformés, l'ATP représentant 20 p. 100 de cette extrémité.

### b) Détermination du rapport d'ATP et GTP 5'-terminal par analyse directe dans les cellules KB

Après électrophorèse à pH 5,7, les produits localisés dans la zone des tri- et tétraphosphates sont élués des papiers (voir Matériel et Méthode, p. 65 ) et hydrolysés par l'acide chlorhydrique 1 N, à 100°C pendant 1 heure. L'analyse, par électrophorèse à pH 2,5 (voir Fig. 28, p. 111 ), des bases puriques ainsi libérées permet de connaître la radioactivité qui est due, respectivement, aux composés tri-et tétraphosphates de la guanine, d'une part, et de l'adénine, d'autre part.



217 cpm pour 80.494 (Gp)  
soit

$$\frac{\text{pppGp} + \text{ppGp}}{\text{Gp}} \times 100 = 0,27$$

361 cpm pour 366.694 cpm total (Ap)  
soit

$$\frac{\text{pppAp} + \text{ppAp}}{\text{Ap}} \times 100 = 0,098$$

Figure n° 28 :

Analyse de la composition en bases des composés tri- et tétraphosphates libérés après hydrolyse alcaline des RNA extraits de cellules KB après un marquage de 14 h par l'adénine tritiée (voir Tableau XI, c, p. 107).

Après hydrolyse acide de ces composés (préalablement séparés par électrophorèse à pH 5,7), la guanine et l'adénine libérées sont séparées par électrophorèse sur papier à pH 2,5.



Ces résultats sont rassemblés dans le Tableau XI (p. 107 ).

Ils conduisent à une conclusion semblable à celle que nous avons tirée des expériences effectuées sur les cellules HeLa : 80 p. 100 environ des chaînes d'RNA néosynthétisées portent, en position 5'-terminal, la guanosine triphosphate.

### 3 - Action de la phosphodiesterase du venin de Serpent sur les composés polyphosphates

L'action de la phosphodiesterase du venin de Serpent transforme les nucléosides polyphosphates en nucléosides diphosphates (pPup) (voir Tableau XII, p. 109 ) ; l'absence de nucléosides monophosphates élimine la possibilité d'une contamination par des nucléosides 5'-triphosphates.

### D - MARQUAGE DES BASES PYRIMIDIQUES PENDANT 14 HEURES

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

#### 1 - Spécificité du marquage

La non-spécificité du marquage a été, cette fois encore, exploitée. Effectuée systématiquement à chaque expérience, l'électrophorèse à pH 3,5 d'une fraction aliquote de l'hydrolysat alcalin révèle que l'addition d'uridine tritiée au milieu de culture des cellules permet de marquer simultanément et à peu près également les deux nucléotides pyrimidiques (voir Fig. 26, p. 105 , et tableau X, p. 104 ).

#### 2 - Analyse de l'hydrolysat alcalin par électrophorèse de pH 5,7.

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

Cependant, il existe un composé faiblement radioactif, migrant au-delà des nucléosides monophosphates, dont il convenait de connaître la nature (voir Fig. 27, p. 106 ).

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

Pour en vérifier la nature, ces produits ont été élués des papiers. Puis, après concentration, leur comportement électrophorétique a été réexaminé à pH 5,7 en présence des témoins internes suivants : ppC, ppU, pppC, et pppU.

La figure 29 (p. 114 ) montre que toute la radioactivité se retrouve entre les témoins nucléosides 5'-diphosphates (ppPy) et 5'-triphosphates pyrimidiques (pppPy). La position de ces composés radioactifs est tout à fait compatible avec les charges électriques portées par les nucléosides 5'-monophosphates (2') 3'-monophosphates (pPyp). Il ne peut pas s'agir de nucléoside 5'-diphosphate (2') 3'-monophosphates (ppPyp, provenant de la dégradation de pppPyp éventuel) qui, possédant un groupement phosphate ionisé supplémentaire, auraient migré plus loin que les témoins 5'-triphosphates. De plus, la phosphodiesterase n'a pas d'action sur ces composés (voir Fig. 29, p. 114 et Tableau XII, p. 109 ) ce qui élimine totalement cette éventualité et confirme leur structure présumée comme étant pPyp.

### III - TAUX DES DIFFERENTS NUCLEOSIDES 5'-TERMINAUX DANS LES RNA SYNTHETISES EN PRESENCE D'ACTINOMYCINE D

Les résultats présentés ci-dessus montrent que seuls les deux nucléosides triphosphates puriques sont utilisés pour déclencher la synthèse des RNA, et en majorité le GTP.

Etant donné que, chez les Eucaryotes, il existe un précurseur unique des RNA ribosomiaux (voir Généralités ; p. 36 ), nous nous sommes demandé si sa synthèse débutait par l'incorporation de GTP ou d'ATP. L'actinomycine D, à faible dose, inhibe spécifiquement la synthèse de ce précurseur de haut poids moléculaire (SCHERRER et al. - 290 -), aussi, en comparant les taux relatifs de GTP et ATP 5'-terminal dans les RNA synthétisés en absence ou en présence d'actinomycine D, il était possible de répondre à cette question.

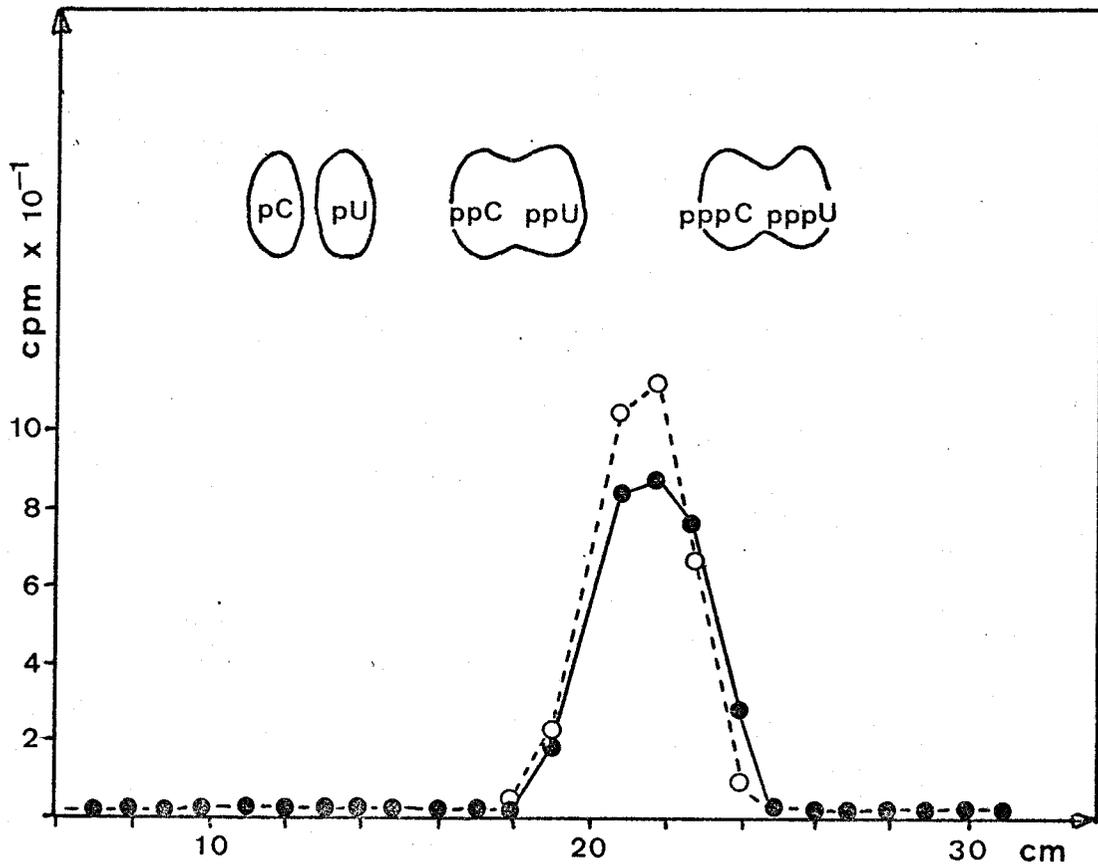


Figure n° 29 :

Comportement électrophorétique du(es) composé(s) pyrimidique(s) de  $R_{ATP}$  voisin de 1 (voir Fig. 27, b) libéré(s) par hydrolyse alcaline des RNA extraits de cellules KB après marquage des bases pyrimidiques.

- (●—●—●) électrophorèse contrôle à pH 5,7 de ces composés en présence de témoins.
- (○----○----○) électrophorèse à pH 5,7 de ces composés après action de la phosphodiesterase de vein de Serpent.

#### A - SPECIFICITE DE MARQUAGE

Les cellules KB ont été marquées pendant 3,5 h, soit par l'(<sup>3</sup>H) Guanine ou l'(<sup>3</sup>H) Adénine, une demi-heure après l'addition de l'actinomycine (0,08 µg/ml) (PERRY et KELLEY - 291 -). Pour ce temps, la spécificité de marquage est relativement bien respectée, puisque plus de 95 p. 100 de la radioactivité reste liée à la base utilisée comme précurseur (voir Tableau X ; p. 104 ).

#### B - TAUX DES NUCLEOTIDES 5'-TERMINAUX DANS LES CELLULES MARQUEES PENDANT 3,5 H (CELLULES TEMOINS)

La Figure 30 (p. 116 ) montre que dans les RNA extraits après 3,5 h de marquage, le rapport entre les deux extrémités 5'-triphosphates puriques reste sensiblement identique à celui observé après 14 h de marquage : le GTP 5'-terminal apparaît en majorité (82 p. 100) contre 18 p. 100 d'ATP 5'-terminal (voir Tableau XI, p. 107 ).

#### C - TAUX DES NUCLEOTIDES 5'-TERMINAUX DANS LES CELLULES TRAITEES A L'ACTINOMYCINE D.

Comme le montre la Figure 30 (p. 116 ), il est observé une diminution considérable du taux de pppGp qui descend en-dessous de celui du pppAp. La majorité des chaînes débute par l'ATP (79 p. 100) et seulement 21 p. 100 possèdent le GTP en position 5'-terminal (voir Tableau XI, p. 107 ).

La diminution du nombre de chaînes portant le GTP par rapport aux cellules témoins, semble bien être en relation avec l'absence de synthèse des précurseurs des rRNA. Ces résultats sont d'autre part, en faveur d'un déclenchement par l'ATP de la synthèse des RNA nucléoplasmiques (non affectés par l'actinomycine) (voir Discussions, p. 135 ).

Il est possible de tirer deux conclusions principales, de ces travaux réalisés in vivo :

- Les RNA néosynthétisés possèdent une extrémité 5'-triphosphate qui est en majorité le GTP.

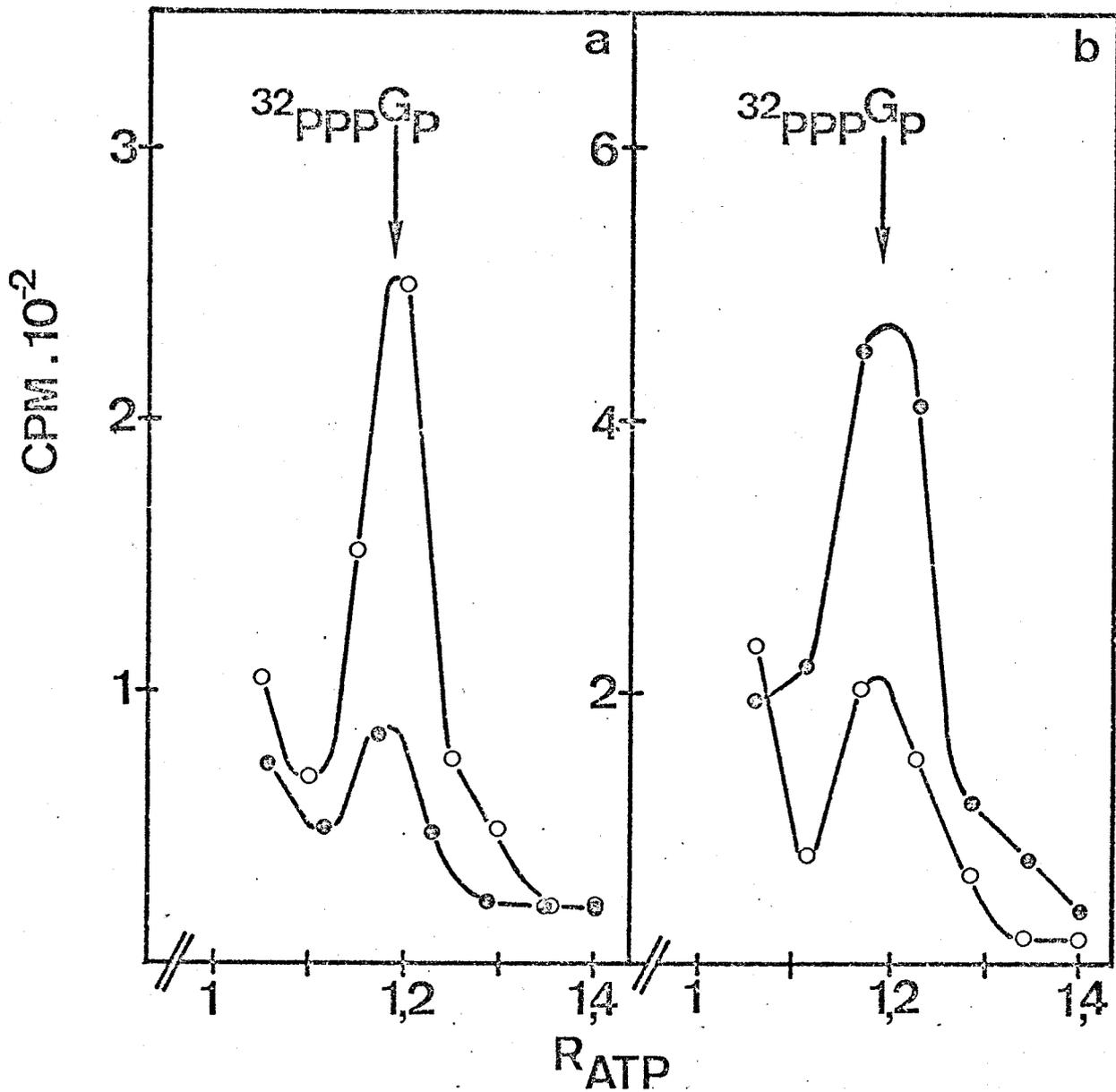


Figure n° 30 :

Répartition de la radioactivité des nucléosides polyphosphates ( $R_{ATP}$  de 1 à 1,4) libérés par hydrolyse alcaline des RNA extraits de cellule KB après un marquage de 3,5 heures en absence (graphique "a") ou en présence d'actinomycine D (graphique "b").

(○—○—○) marquage par la guanine tritiée

(●—●—●) marquage par l'adénine tritiée.

Les graphiques sont standardisés pour une même quantité de radioactivité liée aux nucléosides monophosphates.

Analyse faite par électrophorèse à pH 5,7 sur couche mince de cellulose.



- Il pourrait exister une relation entre la nature du premier nucléotide incorporé dans les chaînes de RNA et le type des polymérases impliquées dans leur synthèse, puisque le produit majeur des RNA polymérases nucléolaires possède le GTP en position 5', tandis que la majorité des RNA nucléoplasmiques débutent par l'ATP.

ETUDES REALISEES IN VITRO

L'étude que nous avons entreprise sur la nature du nucléotide initial des RNA synthétisés in vitro avait deux buts :

- d'une part, aborder le fonctionnement des RNA polymérase des Eucaryotes d'un point de vue plus qualitatif que la seule mesure de l'activité spécifique,

- d'autre part, examiner la relation entre le type de polymérase et la nature du nucléotide initial que suggéraient les résultats obtenus in vivo.

Nous rapportons ci-après un ensemble d'expériences portant sur l'analyse du taux relatif des deux extrémités 5'-triphosphates puriques dans les RNA synthétisés par les RNA polymérase nucléolaires (type I) et nucléoplasmiques (type II) extraites de cellules KB. Cette analyse porte sur les RNA néosynthétisés dont la taille (supérieure à 80 nucléotides) entraîne l'exclusion des colonnes de Sephadex G-75 et dont la nature a été vérifiée par leur sensibilité à la RNase notamment (voir Matériels et Méthodes, p. 86 ).

I - EXTREMITES 5' des RNA SYNTHETISES EN PRESENCE DU DNA EXTRAIT

DE CELLULES KB

La Figure 31 (p. 119 ) montre que le ( $\gamma$  -  $^{32}$ P)GTP et le ( $\gamma$  -  $^{32}$ P)ATP sont tous deux présents à l'extrémité 5' des RNA synthétisés en une heure par les RNA polymérase de cellules KB. Le nombre de chaînes portant le GTP est prédominant (en moyenne 70 p. 100) dans les RNA synthétisés par les RNA polymérase de type I, tandis que l'ATP se trouve en position 5'-terminale de la majeure partie des RNA synthétisés par les RNA polymérase de type II (en moyenne plus de 70 p. 100).

Faisant fonctionner les RNA polymérase de type II en présence de DNA dénaturé (c'est-à-dire dans le cas où l'activité spécifique est maximale) nous n'a-

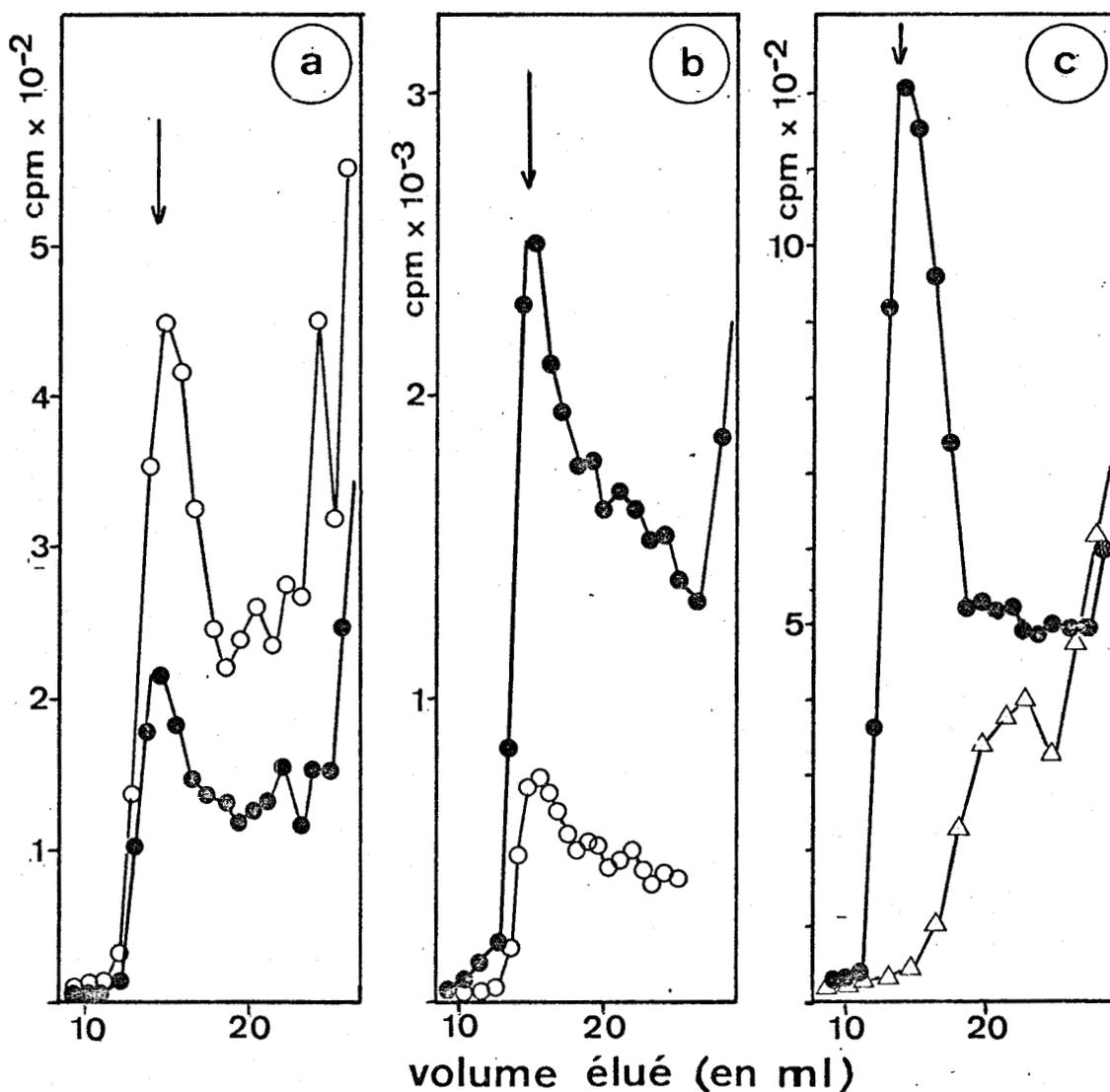


Figure n° 31 :

Profil d'éluion de colonne Sephadex G-75, des RNA synthétisés in vitro en présence de DNA cellulaire :

- par les RNA polymérase de type I (graphique "a", DNA natif)
- par les RNA polymérase de type II (graphique "b", DNA natif)
- (graphique "c", DNA dénaturé).

Les RNA sont extraits selon la méthode I décrite p. 84 , après avoir été synthétisés pendant 60 mn :

- en présence de  $[\gamma - ^{32}P]$  ATP ●—●—●
- ou - en présence de  $[\gamma - ^{32}P]$  GTP ○—○—○
- ou - en présence de  $[\gamma - ^{32}P]$  UTP ▲—▲—▲

La flèche indique le volume d'exclusion.

Pour une même expérience, les conditions et quantités de substrats sont identiques.



vons pratiquement pas obtenu de chaînes de RNA portant le ( $\gamma$  -  $^{32}$ P)UTP en position 5'-terminale, à l'exception de chaînes incluses dans le gel de Sephadex G-75 (Fig. 31, p. 119 ). Etant donnée leur faible taille (inférieure à 75 nucléotides) nous avons considéré ces RNA comme "abortifs" et non représentatifs d'une véritable activité de synthèse.

De ces premiers résultats, il apparaît que les RNA polymérases extraites de cellules KB n'utilisent que des nucléosides 5'-triphosphates puriques pour déclencher la synthèse des RNA et que la nature du nucléotide initial semble être en relation avec le type de la polymérase utilisée. Cependant, de ces constatations, deux points nous ont préoccupés et nécessitaient un examen plus approfondi :

1° - La plupart des auteurs ont observé une prédominance du GTP 5'-terminal indépendamment du type de polymérase (voir Tableau III, p. 21).

2° - Le nombre de cassures, de portions monocaténares que porte inmanquablement le DNA cellulaire en font un modèle compliqué pour l'étude du déclenchement de la synthèse. A cet égard de récents travaux de GISSINGER et al. ( 292 ) sont probants.

Ces deux remarques nous ont poussé à étendre nos recherches en utilisant un DNA plus simple. Nous avons choisi le DNA extrait de l'Adenovirus 2 dont l'obtention était aisée au Laboratoire de Virologie.

## II - EXTREMITES 5' des RNA SYNTHETISES EN PRESENCE DU DNA DE L'ADENO-

### VIRUS 2

Dans un premier temps, nous avons répété les expériences précédentes en remplaçant le DNA cellulaire par la même concentration en DNA d'Adenovirus 2 (10  $\mu$ g/ml). Nous avons obtenu des résultats semblables (voir Fig. 32, p.121 et Tableaux XIII et XIV, p. 123 et 125 ), c'est-à-dire une prédominance de GTP 5'-terminal avec la polymérase I et d'ATP 5'-terminal avec la polymérase II.

Cependant, in vitro, il convient d'être très prudent avant de relier cette prédominance à une spécificité réelle des RNA polymérases. De nombreux facteurs

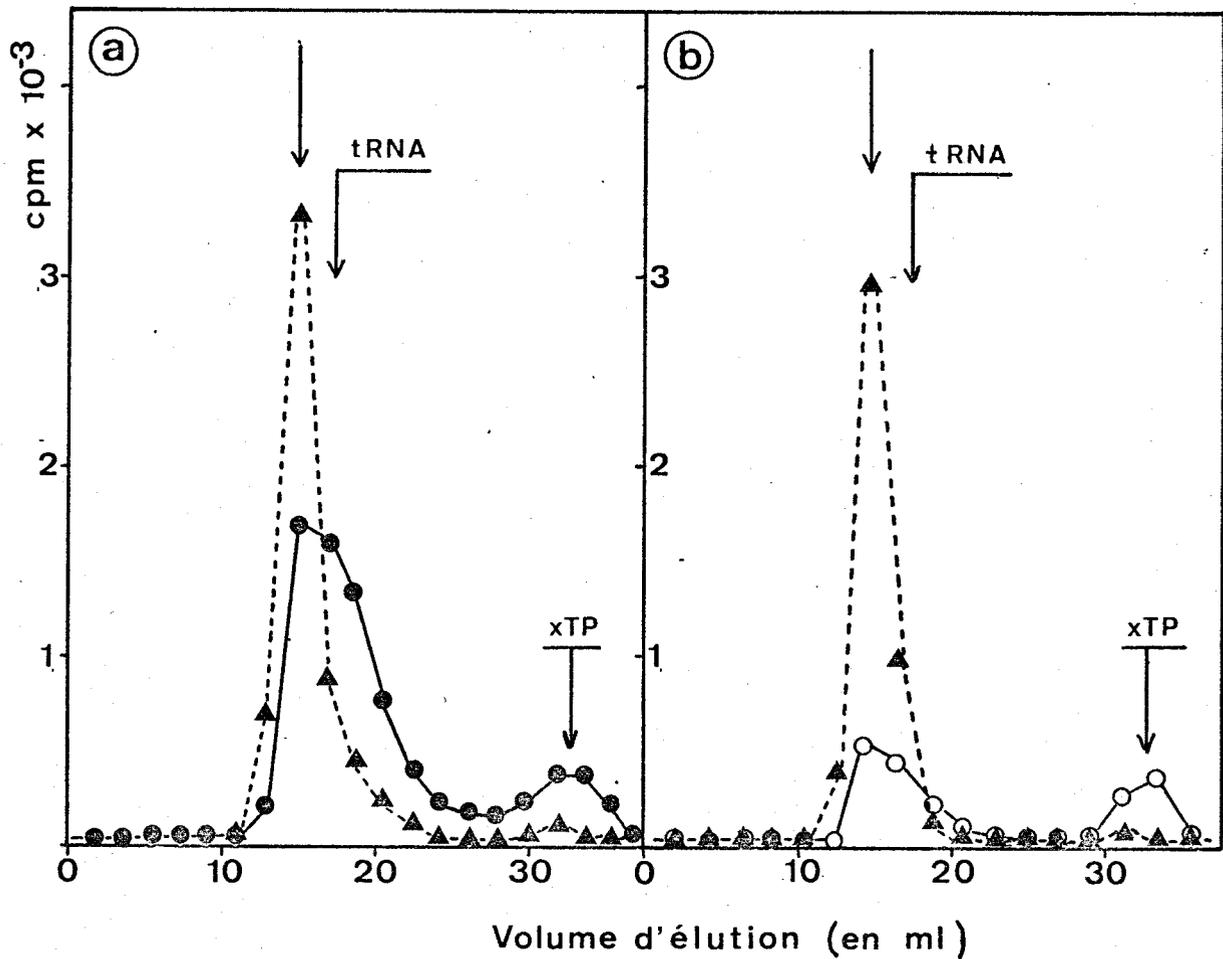


Figure n° 32 :

Profil d'élution de colonne de Sephadex G-75, des RNA néosynthétisés par les RNA polymérasés de type II en présence du DNA natif de l'Adénovirus 2.

Les RNA sont extraits selon la méthode II décrite p. 84 après avoir été synthétisés pendant 60 mn :

- en présence de  $[\gamma-^{32}\text{P}] \text{ ATP}$  ● — ● — ●
- en présence de  $[\gamma-^{32}\text{P}] \text{ GTP}$  ○ — ○ — ○
- en présence de  $[\text{}^3\text{H}] \text{ UTP}$  ▲ — ▲ — ▲

Les conditions et quantités de substrats sont identiques pour les deux graphiques. La flèche indique le volume d'exclusion.



peuvent intervenir, tels que la "qualité" de la RNA polymérase, l'intégrité moléculaire du DNA, ou les conditions de fonctionnement. Nous avons choisi d'examiner la variation du taux relatif d'ATP et de GTP 5'-terminal en fonction du temps de synthèse.

#### A - ETUDE REALISEE AVEC LES RNA POLYMERASES DE TYPE I

Le Tableau XIII (p. 123 ) et la Figure 33 (p. 124 ) montrent qu'à tous les temps examinés entre 0 et 60 minutes la majorité des RNA synthétisés par les polymérases de type I possèdent le GTP en position 5'.

Il convient de noter que le temps "zéro" correspond en fait à une incubation de quelques minutes à la température de 0°C, -le temps nécessaire pour mélanger l'enzyme au milieu réactionnel et répartir en diverses aliquotes-. Le matériel extrait par le phénol est exclu des gels de Sephadex G-75 et, comme les RNA synthétisés, à 37°C, il est sensible à la RNase.

#### B - ETUDE REALISEE AVEC LES RNA POLYMERASES DE TYPE II

Nous avons surtout examiné l'extrémité 5' des RNA synthétisés par la polymérase II, puisque notre désaccord avec les auteurs résidait sur ce point.

##### 1 - Etude cinétique effectuée avec le DNA natif de l'Adenovirus 2

Le tableau XIV (p. 125 ) indique que les deux nucléosides triphosphates puriques sont utilisés par la polymérase de type II pour déclencher la synthèse des RNA. Cependant, la situation est différente si les temps d'incubation sont inférieurs à 30 minutes environ -le GTP 5'-terminal y est prédominant- ou supérieurs à 30 min. -déclenchement préférentiel de l'ATP (voir Fig. 33, p. 124 ). Cette remarque est valable que l'incubation ait lieu en présence de sulfate d'ammonium à la concentration de 50 mM ou de 80 mM.

##### 2 - Etude cinétique effectuée avec le DNA dénaturé de l'Adenovirus 2

Avec le DNA dénaturé, que la polymérase II utilise préférentiellement, le nombre de chaînes portant le GTP en position 5' reste prédominant quel que soit le temps de synthèse entre 0 et 60 minutes (voir Tableau XIV, p. 125 et Fig. 33, p. 124 ).

TABLEAU XIII:

Nucléotides initiaux des RNA synthétisés par les RNA polymérase de type I<sup>(a)</sup>

RNA synthétisés en présence du :	Conditions Mg <sup>++</sup> 6 mM ; Mn <sup>++</sup> 3 mM		Proportion de chaînes débutant par ; (en p. 100)		
	Sulfate d'ammonium (en mM)	Température	Temps (en min.)	GTP	ATP
DNA natif de cellules KB	33	37°C	60	66	34
DNA natif de l'Adenovirus 2	33	37°C	5	81	19
	33	37°C	20	80	20
	33	37°C	60	59	41
	33	0°C	3 - 5	76	24

(a) La méthode d'extraction et de séparation des RNA est décrite p. 84 (2ème méthode).  
Les pourcentages d'extrémités 5'-triphosphates sont corrigés selon l'activité  
spécifique des [ $\gamma$  - <sup>32</sup>P] xTP et le taux moyen d'activité  $\chi$ -phosphotransférase.



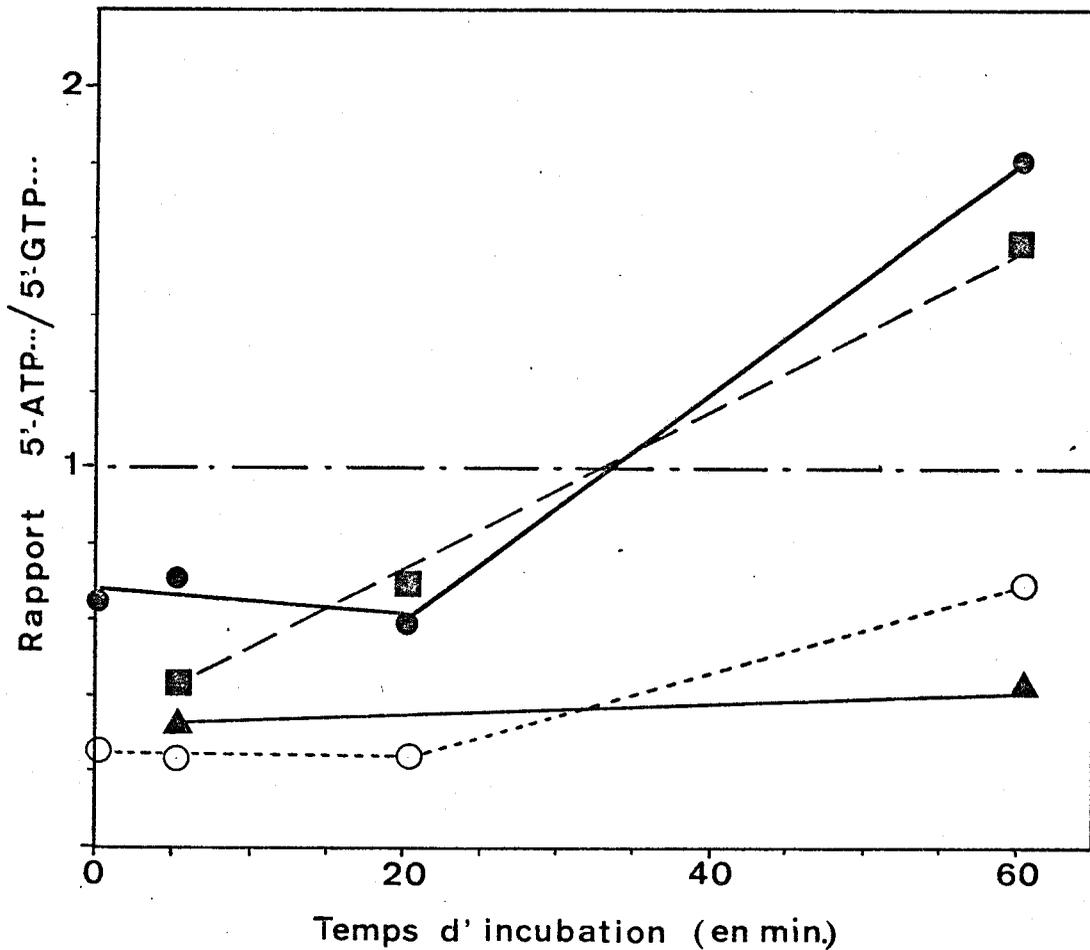


Figure n° 33 :

Evolution en fonction du temps d'incubation, du rapport entre la quantité de RNA portant une extrémité 5'-ATP et ceux portant une extrémité 5'-GTP.

RNA synthétisés par les RNA polymérase de type I

○-----○-----○ en présence du DNA natif de l'adénovirus 2 et de sulfate d'ammonium 35 mM.

RNA synthétisés par les RNA polymérase de type II

●-----●-----● en présence du DNA natif de l'adénovirus 2 et de sulfate d'ammonium 50 mM

■-----■-----■ en présence du DNA natif de l'adénovirus 2 et de sulfate d'ammonium 80 mM

▲-----▲-----▲ en présence du DNA dénaturé de l'adénovirus 2 et de sulfate d'ammonium 50 mM.

TABLEAU XIV

Nucléotides initiaux des RNA synthétisés par les RNA polymé-  
rases de type II (a).

RNA synthétisés en présence du	Conditions Mg <sup>++</sup> 6 mM ; Mn 3 mM			Proportion de chaînes débutant par (en p. 100)	
	Sulfate d'am- monium (en mM)	Température	Temps (en mn)	GTP	ATP
DNA natif de cellule KB	80	37°C	60	28	<b>72</b>
DNA natif de l'Adénovirus 2	50	37°C	5	<b>58</b>	42
	50	37°C	20	<b>60</b>	40
	50	37°C	60	35	<b>65</b>
DNA natif de l'Adénovirus 2	80	37°C	5	<b>70</b>	30
	80	37°C	20	<b>60</b>	40
	80	37°C	60	38	<b>62</b>
DNA natif de l'Adénovirus 2 (préincubation de 10 mn) (b)	50	37°C	5 + DMF	<b>71</b>	29
	50	37°C	5 + AF/013	<b>64</b>	36
DNA dénaturé de l'Adénovirus 2	50	37°C	5	<b>73</b>	27
	50	37°C	60	<b>69</b>	31
DNA natif de l'Adénovirus 2	50	0°C	3 - 5	<b>76</b>	24

(a) La méthode d'extraction et de séparation des RNA est décrite p. 84 (2ème méthode).  
Les pourcentages d'extrémités 5'-triphosphates sont corrigés selon l'activité spé-  
cifique de ( $\gamma$  - <sup>32</sup>P) x TP et le taux moyen d'activité  $\gamma$ -phosphotransférasique.

(b) Voir : Action du dérivé AF/013 de la rifamycine, p. 84.



### 3 - Remarques sur les RNA synthétisés à 0°C

Comme précédemment, des RNA comportant au moins 80 nucléotides sont synthétisés dans les premières minutes d'incubation à 0°C. Ils débutent préférentiellement par le GTP et sont sensibles à la RNase.

### 4 - Action du dérivé AF/013 de la rifamycine

Dans des conditions définies de préincubation, certaines associations spécifiques entre le DNA et l'enzyme sont protégées de l'action inhibitrice du dérivé AF/013 de la rifamycine (MEIHLAC *et al.*, - 293-). Pour distinguer une éventuelle spécificité de déclenchement de la synthèse vis-à-vis de la participation d'un des nucléosides triphosphates puriques, nous avons examiné la variation du taux relatif de GTP et ATP en position 5'-terminale des RNA synthétisés, par les RNA polymérases résistantes à l'effet du dérivé AF/013. La quantité totale des chaînes de RNA synthétisés en présence de cet inhibiteur atteint environ 55 p. 100 du nombre de chaînes synthétisées dans l'échantillon de contrôle. Dans les deux cas, le GTP 5'-terminal reste prédominant -rappelons qu'il s'agit d'incubation de 5 minutes-, cependant la proportion d'ATP 5'-terminal est plus élevée lorsque la synthèse est restreinte à des sites spécifiques par l'action du dérivé AF/013 (voir Tableau XIV, p. 125 et Fig. 34, p. 127 ).

## III - RESULTATS OBTENUS PAR LA TECHNIQUE DE RETENTION SUR FILTRE DES CHAINES DE RNA ACIDO-PRECIPITABLES

La technique de rétention sur filtre du matériel acido-précipitable que nous avons adaptée à nos conditions (voir Matériel et Méthodes, p. 89 ) nous a apporté des résultats semblables à ceux obtenus par la technique plus élaborée de séparation par chromatographie de gel filtration.

Le GTP 5'-terminal est prédominant, quel que soit le temps d'incubation, dans les RNA synthétisés par les RNA polymérases de type I (voir Fig. 35, p. 128). Il faut noter que la quantité d'extrémité 5' ne croît pas en fonction du temps. Il est donc possible que, dans nos conditions, il n'existe pas de réutilisation des RNA polymérases pour de nouveaux déclenchements de la synthèse.

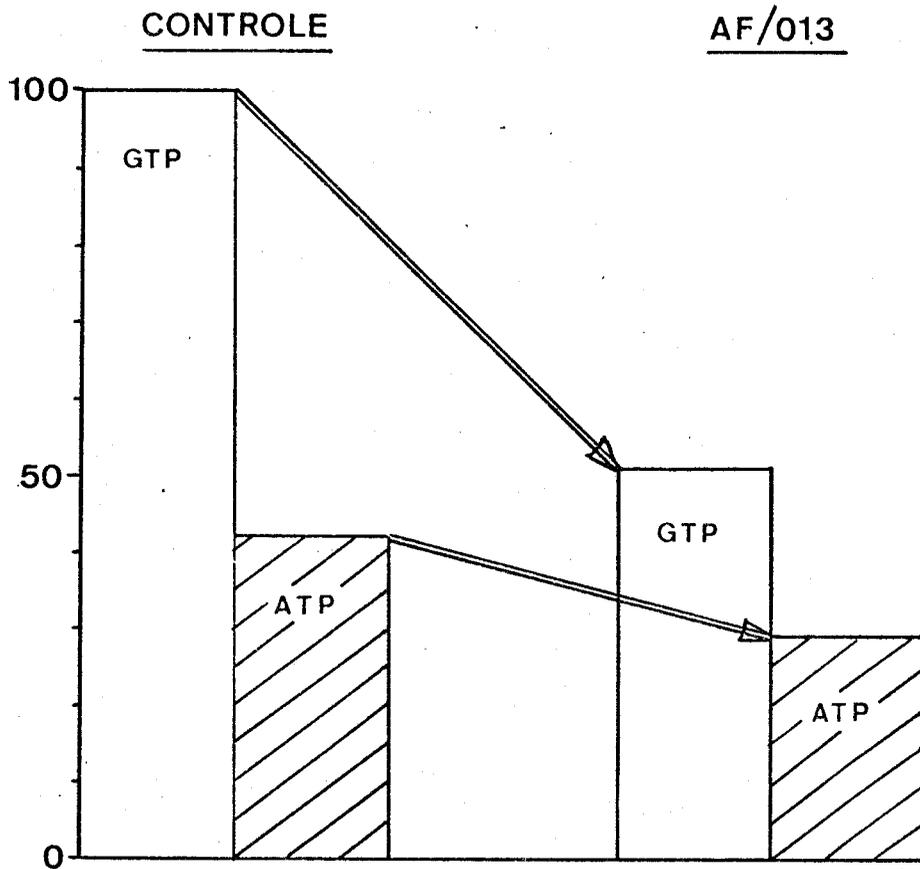


Figure n° 34 :

Effet du dérivé AF/013 de la rifamycine sur la nature et la proportion des nucléosides initiaux des RNA synthétisés en 5 minutes par les RNA polymérase de type II en présence du DNA natif de l'Adénovirus 2.



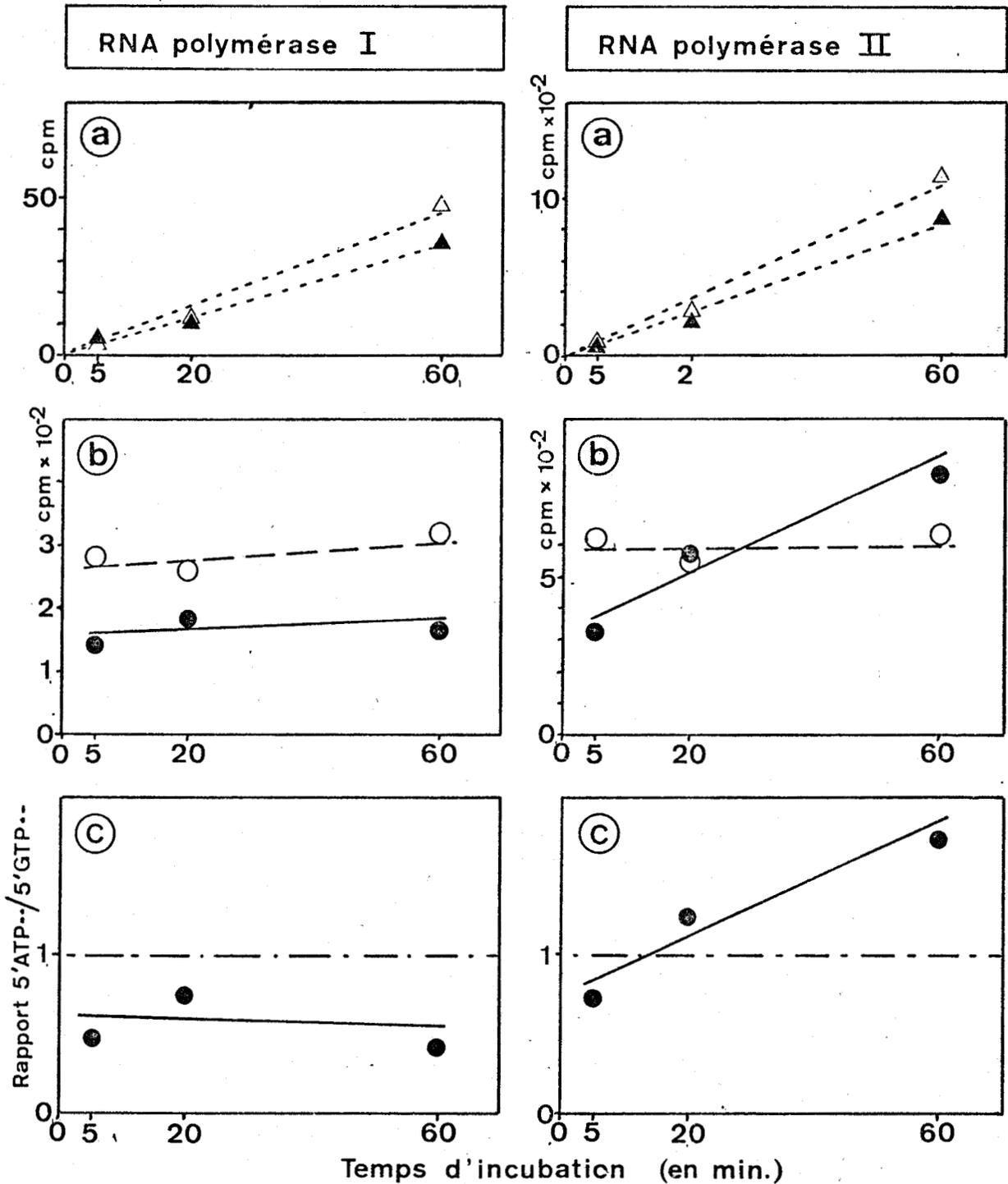


Figure n° 35 :

Etude cinétique des RNA synthétisés *in vitro* par les RNA polymérases de type I (colonne de gauche) et de type II (colonne de droite).

Graphique "a" : incorporation d' <sup>3</sup>H-UTP simultanément au [γ - <sup>32</sup>P] GTP Δ---Δ---Δ  
ou au [γ <sup>32</sup>P] ATP ▲---▲---▲

Graphiques "b" : ○---○---○ incorporation de [γ <sup>32</sup>P] GTP  
●---●---● incorporation de [γ <sup>32</sup>P] ATP



Les résultats sont obtenus par la technique de rétention sur filtre décrite p.88

Graphique "c" : Evolution du rapport entre les quantités de RNA portant l'ATP 5'-terminal et le GTP 5'-terminal. (Les calculs sont faits à partir des graphiques b et c).

Quant à la polymérase de type II, tandis que l'extrémité GTP se maintient à un taux constant, on assiste à un accroissement de la quantité de chaînes portant l'ATP en position 5' tout au long des 60 minutes de synthèse.

DISCUSSION

Formés à partir de nucléosides triphosphates, les RNA néosynthétisés ont une extrémité 5' qui possède encore les trois groupements phosphates du nucléotide initial. Chez les Eucaryotes, peu de RNA ayant une extrémité 5'-triphosphate ont été caractérisés : HATLEN et al. ( 294 ) ont montré qu'une fraction des RNA 5 S de cellules KB possédait le GTP en position 5'-terminale. Leur résultat est en accord avec ceux de FORGET et WEISSMAN ( 295 ) et DARNELL ( 296 ). Quant aux RNA de hauts poids moléculaires, seule l'équipe de GEORGIEV rapporte qu'ils présentent une extrémité 5'-triphosphate et vraisemblablement l'ATP (RYSKOV et al. - 297 -). Récemment, DARNELL ( 298 ) n'est pas parvenu à caractériser de telles extrémités triphosphates dans les HnRNA (RNA nucléaires hétérogènes).

Cette faible quantité de résultats est vraisemblablement due au fait que, chez les Eucaryotes, le remaniement ("processing") des RNA intervient très rapidement après leur synthèse. Ce remaniement entraîne la perte de l'extrémité 5' des précurseurs des RNA messagers (voir p. 36 ) et des RNA ribosomiaux. Le précurseur 45 S des rRNA ne serait pas lui-même le tout premier produit des gènes ribosomiaux puisque BUSCH ( 299 ) y trouve le CMP méthylé à l'extrémité 5' et que LOENING ( 300 ) a mis en évidence des précurseurs de plus grande taille (46 à 47 S).

#### I - EXTREMITES 5' DES RNA DES COMPLEXES DNA : RNA EXTRAITS DE NOYAUX DE FOIE DE RAT

La méthode d'extraction des RNA selon LEVIS et al. ( 301 ) permet d'obtenir des RNA néosynthétisés encore hybridés au DNA. C'était donc le moyen de détecter ces extrémités 5'-triphosphates dans les RNA de cellules eucaryotes puisque nous avons une chance de les obtenir non encore remaniés.

L'analyse des hydrolysats alcalins de RNA marqués pendant 14 h nous a permis de mettre en évidence une certaine proportion de nucléosides 5'-triphos-

phates 3'-monophosphates, dont l'obtention nous confirmait d'ailleurs la présence de RNA néosynthétisés.

La taille de ces RNA, calculée par le rapport entre la radioactivité spécifique des nucléosides monophosphates et celle des nucléosides tétraphosphates, varie entre 100 et 400 nucléosides. Ces valeurs sont en accord avec la taille de ces RNA déterminée, après leur dissociation du DNA, par leur constante de sédimentation en gradient de saccharose (4 à 9 S) (SERGEANT et al. - 302 -). Cette taille est faible par rapport aux RNA de hauts poids moléculaires qui ont été caractérisés dans les noyaux. S'il est possible d'attribuer cette réduction de taille à des ruptures lors de l'extraction, la présence d'extrémités 5'-triphosphates nous suggère qu'il peut s'agir d'une extraction préférentielle des RNA néosynthétisés dont la taille encore faible assure une hybridation stable avec le DNA.

L'action de la ribonucléase nous offre un moyen simple pour déterminer si l'extrémité 5' est totalement imbriquée dans l'hybride DNA:RNA (voir p. 54 ). La taille des RNA résistants à la ribonucléase (calculée par le rapport des activités spécifiques) est de l'ordre de 30 à 40 nucléotides. Cette valeur est à nouveau en accord avec la taille de ces chaînes déterminée par leur constante de sédimentation en gradient de saccharose (environ 3 S) (SERGEANT et al. - 303 -).

Ainsi, comme dans le modèle proposé par HAYASHI et HAYASHI ( 304 ), cette séquence de RNA hybridé au DNA pourrait représenter la fraction de RNA impliquée dans le complexe ternaire DNA:RNA polymérase:RNA naissant et sur l'extrémité 3' OH de laquelle se fait l'addition des nucléosides triphosphates. Dans ce cas, l'extrémité 5'-triphosphate peut être accessible à l'action de la ribonucléase. Cependant, les résultats que nous avons obtenus ne donnent pas de solution de "tout ou rien", mais montrent qu'une certaine proportion des chaînes (de 30 à 60 p.100 selon les cas) perd l'extrémité 5'-triphosphate sous l'action de la ribonucléase :

- d'une part : si l'on considère que de très courtes chaînes (inférieures à 40 nucléotides) étaient sous le complexe ternaire DNA:RNA polymérase:RNA lors de l'extraction, ceci expliquerait la résistance partielle

à la ribonucléase et il serait alors possible de conclure à un sens de la transcription de 5' vers 3'.

- d'autre part : cette résistance partielle à la ribonucléase ne permet pas d'exclure totalement un autre sens, ni un autre modèle pour la transcription. A cet égard, il nous apparaît surprenant que le RNA résistant à la ribonucléase soit aussi riche en guanine. Ce résultat suggère qu'il est hybridé à des séquences polypyrimidiques du DNA dont on connaît le rôle dans la détermination des sites de déclenchement de la synthèse.

## II - NATURE DES NUCLEOSIDES 5'-TRIPHOSPHATES DANS LES RNA EXTRAITS DE CELLULES HeLa et KB

Les expériences que nous avons poursuivies sur les RNA de cellules KB et HeLa ont eu deux buts principaux : d'une part, authentifier ces nucléotides 5'-terminaux par une série d'analyses secondaires, d'autre part, déterminer leur nature et leur taux respectif.

Les nucléosides polyphosphates libérés par hydrolyse alcaline des RNA ont été caractérisés comme suit :

- ils ont une mobilité électrophorétique, à pH 5,7, de l'ordre du nucléotide ( $\gamma$  -  $^{32}$ P)pppGp témoin.
- ils sont liés à une base (caractérisée par hydrolyse acide) ce qui élimine la présence éventuelle de contaminants de radiolyse.
- leurs mobilités électrophorétiques les excluent du groupe des oligonucléotides alcali-résistants.
- ils possèdent des groupement  $\gamma$  et  $\beta$  phosphates sensibles à l'action de la phosphodiesterase du venin de Serpent qui les transforme en composés du type pNp.

Ces caractéristiques nous apparaissent suffisantes pour affirmer qu'il s'agit effectivement de composés du type pppNp ou ppNp.

Après un marquage des cellules HeLa ou KB d'une durée de 3,5 h ou 14 h, les extrémités 5'-triphosphates des RNA sont exclusivement de type purique et en majorité le GTP. Si la croissance de la chaîne polyribonucléotidique s'effectuait de 3' vers 5', l'addition des 4 nucléosides triphosphates se faisant au hasard de la séquence nucléotidique du DNA, il devrait se retrouver dans l'hydrolysate alcalin les 4 nucléosides tétraphosphates (dans les proportions suivant lesquelles ils se répartissent dans la chaîne de RNA), ce qui n'est pas le cas. En conséquence, nous pouvons conclure que la transcription se fait dans le sens 5' → 3' chez les Eucaryotes.

La présence de nucléosides pyrimidiques diphosphates (p Py p) dans les hydrolysats alcalins peut être expliquée par le fait que, durant le remaniement des RNA, certaines molécules peuvent apparaître avec une extrémité pyrimidique monophosphate comme il a été montré dans certains cas (LANE et TAMAOKI - 305 -).

Tenant compte de la radioactivité totale des RNA, la radioactivité de l'extrémité 5'-triphosphate représente 0,1 p. 100 c'est-à-dire une extrémité pour une chaîne de 1000 nucléotides. Si l'on considère que, partant de cellules entières, la majeure partie des RNA extraits représente les RNA stables -80 à 90 p. 100 selon PERRY et KELLEY (306) et SOIERO et al. (307) -, cela signifie que la majorité du marquage de l'extrémité 5' serait due à une fraction de 10 à 20 p. 100 des RNA, ce qui correspond à des chaînes de 100 à 200 nucléotides portant l'extrémité 5'-triphosphate. Cette valeur est à rapprocher de la longueur moyenne des chaînes de RNA associés au complexe DNA:RNA purifié, mais n'ayant pas purifié ces complexes dans ce cas, nous ne pouvons l'affirmer. Il n'en reste pas moins qu'il existe dans la cellule, une population non négligeable de courtes chaînes de RNA portant une extrémité 5'-triphosphate qui ne sont pas détectées par les techniques habituelles de marquage interne des chaînes étant donnée leur faible importance en terme de masse dans l'ensemble des RNA cellulaires.

Dans les cellules KB cultivées en présence d'actinomycine D, à la dose inhibant spécifiquement la synthèse des rRNA, on observe une diminution notable du

taux de GTP 5'-terminal. La quantité résiduelle de GTP peut être due à la présence des rRNA 5S (HATLEN et al. - 308 -, DARNELL - 309 -) dont la synthèse se poursuit dans ces conditions. (PERRY et KELLEY - 310 -). Si, en dépit de cette synthèse résiduelle, le taux de GTP est diminué, c'est donc que dans les cellules non soumises à l'actinomycine, le rRNA 5S n'est pas la seule source de GTP 5'-terminal et que, par conséquent, il y a bien une relation entre l'absence de synthèse du précurseur des rRNA et la diminution du taux de GTP 5'-terminal.

Dans ces mêmes conditions, la présence d'ATP 5'-terminal semble se maintenir au même taux. Ce taux ( $\text{pppAp} + \text{ppAp} / \leq \text{Np}$ ) passe effectivement de 0,035 à 0,275, mais cette augmentation n'est qu'apparente puisque l'actinomycine inhibe la synthèse de 80 à 90 p.100 des RNA ; ramené à des valeurs comparables de RNA, ce taux semble peu varier sous l'action de l'actinomycine.

Ces résultats suggèrent que les RNA nucléoplasmiques, qui continuent à être synthétisés en présence d'actinomycine, possèdent l'ATP en position 5'-terminale. Ce résultat est en accord avec celui de RYSKOV et al. ( 311 ) qui trouvent l'ATP en position 5' des RNA géants de nature "DNA-like". En outre, ILAN et ILAN ( 312 ) ont suggéré qu'une fraction des RNA messagers extraits de polysomes d'insectes possédait encore l'ATP en position 5'-terminale. Pour notre part, nous avons tenté de mettre en évidence de telles extrémités dans les mRNA extraits de polysomes de cellules KB, mais nous n'y sommes jamais parvenus.

### III - ETUDE DU NUCLEOTIDE INITIAL DES RNA SYNTHETISES IN VITRO PAR LES RNA POLYMERASES I ET II DE CELLULES KB

In vivo, il apparaît une certaine relation entre la nature du nucléotide initial des RNA et le type de la RNA polymérase qui a contribué à leur synthèse, puisque le produit majeur des gènes ribosomiaux débute sa synthèse par le GTP tandis qu'une proportion importante des RNA nucléoplasmiques possède l'ATP en position 5'-terminale.

Avec ces données comme hypothèse, il nous est apparu intéressant d'étudier la spécificité du déclenchement de la synthèse des RNA faits in vitro, par le biais de la connaissance du nucléotide initial.

Les résultats que nous avons obtenus sont, d'une certaine manière, en

accord avec les données acquises in vivo, mais ils ouvrent de nombreux points de discussion.

1° - Tout d'abord, il convient d'être prudent avant de faire une relation entre un système étudié in vivo et in vitro, et nous avons précisément choisi de ne purifier que partiellement les RNA polymérases pour éviter de trop nous éloigner du système fonctionnant in situ. A cet égard, TRAVERS et BUCKLAND ( 313 ) ont récemment comparé la RNA polymérase purifiée à celle que l'on trouve dans les extraits bruts d'E. coli : il semble y avoir fort peu de points communs entre les deux.

2° - Nos résultats ne sont pas tous en accord avec ceux d'autres auteurs (voir Tableau III, p. 21 ). Est-ce dû à une spécificité d'espèces, à la différence de pureté des enzymes ? Nous ne pouvons y répondre, d'autant plus que l'intégrité et la nature du DNA peuvent être aussi en cause.

3° - Les RNA synthétisés par les RNA polymérases de type I possèdent préférentiellement le GTP en position 5'-terminale. Ce résultat est compatible avec les observations relatées in vivo et les données acquises par la plupart des auteurs. Cependant, on sait que les points de rupture ("nick") du DNA peuvent créer des sites de déclenchement non spécifiques de la synthèse. L'allure de la cinétique d'apparition des extrémités 5'-terminales nous suggère que ces RNA sont synthétisés dès les premières minutes et peut être même avant que la température ait atteint l'optimum de 37°C. Cette synthèse observée à 0°C semble ne requérir que peu d'énergie, ce qui est notamment compatible avec un déclenchement de la synthèse en des extrémités dénaturées du DNA.

4° - Les résultats obtenus avec les RNA polymérases de type II montrent aussi qu'une fraction des RNA est synthétisée dès le début de l'incubation en utilisant préférentiellement le GTP comme nucléotide initial. Ce déclenchement par le GTP semble, comme précédemment, résulter de la mise en jeu de faibles énergies : elle a lieu à basse température, elle reste prédominante avec le DNA dénaturé. Par contre, le déclenchement de la synthèse par l'incorporation d'ATP semble procé-

der d'un mécanisme différent puisque le taux d'ATP 5'-terminal croît avec le temps. Ce déclenchement continu de la synthèse pourrait provenir de la dénaturation locale de nouveaux sites qui seraient démasqués progressivement au cours du temps, par la progression même des polymérases par exemple. A cet égard, l'effet du dérivé AF/013 de la rifamycine, quoique légèrement en faveur d'un déclenchement spécifique par l'ATP, n'est pas assez net pour soutenir ce point. Il faut noter qu'il ne permet d'examiner que les cinq premières minutes de la synthèse.

Ainsi donc, la comparaison de la spécificité de la synthèse in vitro à celle déterminée in vivo est rendue difficile par les nombreuses causes de déclenchement non spécifique que nous ne maîtrisons pas encore. GISSINGER et al. ( 314 ) ont d'ailleurs montré que même avec des enzymes purifiées, il était difficile de parler de propriétés intrinsèques des RNA polymérases, mais que ces propriétés devaient toujours être reliées à la concentration du DNA, à son intégrité, et aux conditions ioniques du milieu d'incubation. Ils indiquent notamment qu'avec les polymérases de type II, le déclenchement préférentiel de la synthèse avec l'ATP dépend essentiellement de la présence de l'ion manganèse.

Si, dans notre cas, nous avons observé une certaine similitude entre nos résultats obtenus in vivo et in vitro, ces derniers ont soulevé plus de problèmes que nous n'avions cru en examiner tout d'abord.

CONCLUSIONS

1° - Les RNA extraits de noyaux de foie de Rat sous forme d'hybrides DNA:RNA portent une extrémité 5'-triphosphate, ce qui renforce l'idée que ces RNA sont naissants. Ils ont une taille de 100 à 400 nucléotides et sont hybridés au DNA sur une portion d'une quarantaine de nucléotides. L'action de la ribonucléase suggère, avec certaines réserves, que ces RNA peuvent être hybridés par leurs extrémités 3'OH et qu'alors, leur synthèse procède de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

2° - Une proportion des RNA extraits de cellules HeLa ou KB possèdent encore une extrémité 5'-triphosphate. Celle-ci est toujours de type purique et s'avère être essentiellement le GTP (80 p.100). L'absence de nucléosides pyrimidiques 5'-triphosphates implique que la croissance de la chaîne polyribonucléotidique s'effectue in vivo de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

3° - La comparaison du taux de GTP et d'ATP 5'-terminal dans des cellules témoins et dans des cellules soumises à l'actinomycine indique que la synthèse du produit majeur des gènes ribosomiaux débute par le GTP tandis qu'une proportion importante des RNA nucléoplasmiques ont commencé leur synthèse par l'incorporation d'ATP.

4° - Ces résultats suggèrent qu'il pourrait exister une relation entre la nature du nucléotide initial des RNA et le type de RNA polymérase impliqué dans leur synthèse : les RNA synthétisés par les RNA polymérases nucléolaires (type I) débutant préférentiellement par le GTP, tandis que les RNA synthétisés par les RNA polymérases nucléoplasmiques (type II) débutent plutôt par l'ATP.

5° - Cette relation a été examinée in vitro avec les RNA polymérases extraites de cellules KB. Utilisant le DNA cellulaire dans une première série d'expériences, les résultats obtenus soutiennent cette hypothèse. Dans une seconde sé-

rie d'expériences, une étude cinétique a été entreprise en utilisant le DNA de l'Adenovirus 2 comme modèle. Quoique la prudence soit de rigueur vis-à-vis de système in vitro où tous les paramètres ne peuvent être contrôlés, les résultats confirment la relation suggérée par les expérimentations effectuées in vivo, et montrent qu'il existe, notamment avec les RNA polymérases de type II, une différence quantitative et qualitative entre le déclenchement de la synthèse par le GTP et par l'ATP.

- BIBLIOGRAPHIE -

	Réf.	Pages
ADAMS J. M., SPAHR P. F., CORY S. Biochemistry, (1972) <u>11</u> , 976	120 243	22 53
ADESNIK M., SALDITT M., THOMAS W., DARNEL J. E. J. Mol. Biol. (1972) <u>71</u> , 21	207	38
ANTHONY D. D., ZESZOTEK E., GOLDTHWAIT D. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. (1966) <u>56</u> , 1026	81	18
AUSTIN G. E., BELLO L. J., FURTH J. J. Biochim. Biophys. Acta (1973) <u>423</u> , 501	52	12
AVADHANI N. G., ROE D. H., BUETOW D. E. F E B S Letters (1970) <u>7</u> , 217	171	30
AVADHANI N. G., BUETOW D. E. NAture (1970) <u>228</u> , 242	172	30
BAUTZ E. K. F. F E B S Letters (1973) <u>36</u> , 121	69	16
BLATTI S. P., INGLES C. J., LINDELL T. J., MORRIS P. W., WEAVER R. F., WEINBERG F., RUTTER W. J. C S H S Q B (1970) <u>35</u> , 649	25	9
BLATTNER I. R., DAHLBERG J. E., BOETTINGER J. K., FIANDT M., SZYBALSki X. Nature New Biol. (1972) <u>237</u> , 232	133	23
BLATTNER F. R., THOMIS C. A. Abstr. 7 th Intern. Congr. Biochim. TOKYO 1967	78	17
BONNER J., DAHMUS M. D., FAMBROUGH D., HUANG R. C., MARUSHIGE K., TUAN D. Y. H. Science (1968) <u>159</u> , 47	188	35
BORKOWSKA I., WINZERITH H., MANDEL P. C.R. Acad. Sci. Paris 1964, <u>258</u> , 6561	164	30
BRAWERMAN G., Conférence à l'Unité de Virologie (U 102) Juin 1973	227	40
BREMER H. Mol. Gen. Genetics (1967) <u>99</u> , 362	175	31

	Réf.	Pages
BREMER H., BERRY L. Nature New Biol. (1971), <u>234</u> , 81	176	31
BREMER H., KONRAD M.W., GAINES K. STENT G.	67 90 94	15 20 21
J. Mol. Biol (1965) <u>13</u> , 540	148 150 241	27 27 53
BREMER H., KONRAD M.W. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964) <u>51</u> , 807	174	31
BRITTEN R.J., DAVIDSON E.H. Science (1969) <u>165</u> , 349	228 230	40 41
BURGESS R.R. J. Biol. Chem. (1969) <u>244</u> , 6168	48	11
BURGESS R.R. Ann. Rev. Biochem. (1971) <u>40</u> , 711	68	16
BUSCH Communication personnelle (1971) 2nd Meeting ECBO - Lac Balaton (Hongrie)	144 299	24 131
BUTTERWORTH P.H.W., COX R.F., CHESTERTON C.J. Eur. J. Biochem. (1971), <u>23</u> , 229	64	14
CARTOUZOU G., POIREE J.C., LISSITZKY S. Eur. J. Biochem. (1969) <u>8</u> , 357	214	38
CERENKOV P.A. Byull. Akad. Nauk. URSS (1937) <u>4</u> , 5 et revue technique publiée par la firme Intertechnique : "CERENKOV COUNTING"	267	76
CHAMBERLIN M., BERG P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S (1962), <u>48</u> , 81	6	7
CHAMBERLIN M., RING J. J. Mol. Biol. (1972) <u>70</u> , 221	265	75
CHAMBON P., GISSINGER F., MANDEL J.L., KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MEIHLAC M. C S H S Q B (1970) <u>35</u> , 693	9 24 105 107	7 9 21 21

	Réf.	Pages
CHAMBON P., GISSINGER F., KEDINGER C. MANDEL J. L., MEILHAC M., NURET P. Acta Endocrin. (1972) Suppl. <u>168</u> , 222	65	14
CHAUVEAU J., MOULE Y., ROUILLER C. Exptl. Cell. res. (1956) <u>11</u> , 317	238	49
CHESTERTON C. J., BUTTERWORTH P. H. W. F E B S Letters (1971) <u>15</u> , 169	19	9
CHESTERTON C. J., HUMPHREY S. M. BUTTERWORTH P. H. W. Biochem. J. (1972) <u>126</u> , 675	257	68
CRESTFIELD A. M., SMITHIN K. C. S., ALLEN F. W. J. Biol. Chem. (1955) <u>216</u> , 185	239	49
CRICK F. H. C. Symp. Soc. Exp. Biol. The biological Replication of Macromolecules (1958) XII, 138	1	2
CRICK F. H. C. Nature (1970) <u>227</u> , 561	2	2
CROIX D. D. E. A. à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (1972) : Etude du sens de la transcription dans les cellules Eucaryotes à l'aide des hybrides naturels DNA : RNA	244	53
DAHLBERG J. E. Nature (1968) <u>220</u> , 548	116	22
DARNELL Communication Personnelle (1974)	136 296 298 309	23 131 131 135
DARNELL J. E., JELINEK W. R., MOLLOY G. R. Science (1973) <u>181</u> , 1215	180 205 232 233	32 38 43 44
DAVIDSON J. N., SMELLIE R. M. S. Biochem. J. (1952) <u>52</u> , 594	246	56
DEFERT W., SEGARD E., MONTREUIL J. C. R. Acad. Sc. Paris (1966) <u>263</u> , 842	282 284	95 96

	Réf.	Pages
DEFERT-KOBUS W., KERCKAERT J.P., SEGARD E. C.R. Acad. Sci. Paris (1968) <u>266</u> , 31 et MONTREUIL J.	212	38
DELANGE R.J., SMITH E.L. Ann. Rev. Biochem. (1968) <u>37</u> , 411	183	34
DE WACHTER R., VANDENBERGHE A. MERREGAERT J., CONTRERAS R., FIERS W. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1971) <u>68</u> , 585	122	22
DEZELEE S., SENTENAC A., FROMAGEOT P. F E B S Letters (1972) <u>21</u> , 1	36	9
DEZELEE S., SENTENAC A. Eur. J. Biochem. (1973). <u>34</u> , 41	47 114	11 21
D'HALLUIN J. C. Thèse d'Ingénieur du C.N.A.M. (1974) : Un aspect de la transcription du DNA de l'Adénovirus 2, <u>in vitro</u> par les RNA polymerases de cellules KB.	262	72
DUNN J.J., BAUTZ E.K.F. Biochem. Biophys. Res. Comm : (1969) <u>36</u> , 925	86 93	19 20
EAGLE H. Science (1959) <u>130</u> , 432	235	47
EDWARD A., SMUCKLER M.D. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1972), <u>49</u> , 473	112	21
ELSON D., CHARGAFF E. Biochem. Biophys. Acta (1955) 17, 362	281 283	95 96
FORGET B.G., WEISSMAN S.M. Science, (1967) <u>158</u> , 1695	128 288 295	22 108 131
FROEHNER S.C., BONNER J. Biochemistry (1973) 12, 3064	34 45	9 11
FUCHS E., MILLETTE R.L., ZILLIG W. WALTER G. Europ. J. Biochem. (1967) <u>3</u> , 183	87	19
FURTH J.J., AUSTIN G.E. C S H S Q B (1970) <u>35</u> , 641	26	9
GAITSKHOKI V.S., GACHAVA M.M., KAZAKOVA T.B MARKOSYAN K.A., RAKHIMBEKOVA L.S. Biokhimiya (1970) <u>35</u> , 336	173	30

	Réf.	Pages
GEBICKI J.M., FREED S.	242	53
Anal. Biochem. (1966) <u>14</u> , 253	245	55
GEORGIEV G.P.	229	40
J. Theoret. Biol. (1969) <u>25</u> , 473	231	42
GISSINGER F., KEDINGER C., CHAMBON P.	66	14
Sous Presse	109	21
	292	120
	314	137
GLITZ D.G.	121	22
Biochemistry (1968) <u>7</u> , 927		
GLYNN I.M., CHAPPELL J.B.	263	73
Biochem. J. (1964) <u>90</u> , 147	264	74
GOLDSTEIN A., KIRSCHBAUM J. ROMAN A.	100	21
Proc. Natl. Accad. Sci. U.S. (1965) <u>54</u> , 1669		
GOLDTHWAIT D.A., ANTHONY D.D., WU C.W.	82	18
Lepetit colloquia on Biology and Medicine "RNA-poly- merase and transcription "	92	20
Ed. L. SILVESTRI North Holland (1970) p. 10		
GREEN M., PINA M.	259	72
Virology (1963) <u>20</u> , 199		
HADJIVASSILIOU A., BRAWERMAN G.	203	38
J. Biol. Chem. (1966) <u>244</u> , 1314		
HAMILTON T.H.	190	35
Science (1968) <u>161</u> , 649		
HANES C.S., ISHERWOOD F.A.	249	61
Nature (1949) <u>164</u> , 1107		
HARVEY E.B.	217	39
Biol. Bull. (1936 ) <u>71</u> , 101		
HATLEN L.E., AMALDI F., ATTARDI G.	127	22
Biochemistry (1969) <u>8</u> , 4989	135	23
	289	108
	294	131
	308	135
HAUSEN P., STEIN H.	145	24
Eur. J. Biochem. (1970) <u>14</u> , 278		

	Réf.	Pages
HAYASHI M.N., HAYASHI M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1966) <u>55</u> , 635	156	27
HAYASHI M.N., HAYASHI M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1968) <u>61</u> , 1107	304	132
HENSHAW E.C. J. Mol. Biol. (1968) <u>36</u> , 401	223	39
HNILICA L.S. Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. (1967) <u>7</u> , 25	185	35
HOLLIDAY R. Symp. Soc. Gen. Microbiol. (1970) <u>20</u> , 359	63	14
ILAN J. ILAN J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1973) <u>70</u> , 1355	131 312	22 135
INFANTE A.A., NEMER M. J. Mol. Biol. (1968) <u>32</u> , 543	220	39
ISHIKAWA K., KURODA C., OGATA K. Biochim. Biophys. Acta (1969) <u>179</u> , 316	211	38
JACOB F. Science (1966) <u>152</u> , 1470	75	17
JACOB F., MONOD J. J. Mol. Biol. (1961) <u>3</u> , 318	179 181	32 33
JACOB S.T. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. (1973) <u>13</u> , 93	16	8
JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUNRO H.N. Biochim. Biophys. Acta (1968) <u>157</u> , 421	11	7
JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUNRO H.N. Advan. Enzyme. Regul. (1971) <u>9</u> , 169	18 39	9 10
JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUNRO H.N. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1970) <u>38</u> , 765	60	13
JEANTEUR P., AMALDI F., ATTARDI G. J. Mol. Biol. (1968) <u>33</u> , 757	196	36
JENSEN E.V., SUZUKI T., NUMATA M., SMITH S., De SOMBRE E.R. Steroids (1969) <u>13</u> , 417	192	35

	Réf.	Pages
JOKLIK W. Milieu minimum essentiel, de la Firme GIBCO distribué par FLOBIO, rue de Lambrechts, Courbevoie	236	47
JORGENSEN S.E., BUCH L.B., NIERLICH D.P. Science (1969) <u>164</u> , 1067	126	22
KAY E.R. Nature (1964) <u>202</u> , 390	163	29
KEDINGER C., GISSINGER F., CHAMBON P. Sous presse	43	11
KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MANDEL J.L. GISSINGER F., CHAMBON P. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1970) <u>38</u> , 165	58	13
KEDINGER C., NURET P., CHAMBON P. F E B S Letters (1971) <u>15</u> , 175	15	8
KELLER W., GOOR R. C S H S Q B (1970) <u>35</u> , 727	22	9
KIRBY K.B. Biochim. Biophys. Acta (1963) <u>76</u> , 391	253	65
KONRAD M.W., STENT G.S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964) <u>51</u> , 647	155	27
KRAKOW J. Communication à la "United States- Japan Science Coopération Seminar " TOKYO 1970 (voir Science (1970) <u>170</u> , 351	80	18
KRAKOW J.S., HORSLEY W.J. J. Biol. Chem. (1967) 242, 4796	104	21
KRSMANOVIC V., SEGARD E., MONTREUIL J. Arch. Internat. Physiol. Biochim. (1968) <u>76</u> , 379	169 276	30 93
KRSMANOVIC V., WEISSMAN S.M. Arch. Internat. Physiol. Biochim. (1973) <u>81</u> , 189	110 a	21
KUWANO M., SCHLESSINGER D., APIRION D. J. Mol. Biol. (1970) <u>51</u> , 75	142	24
LANE B.G., TAMAOKI T. J. Mol. Biol. (1967) <u>27</u> , 335	138 143 305	23 24 134
LEBOWITZ P., WEISSMAN S.M., RADDING C. J. Biol. Chem. (1971) <u>246</u> , 5120	98	21

	Réf.	Pages
LEE S. Y., MENDECKI J., BRAWERMAN G. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1971) <u>68</u> , 1331	204 273 274	38 87 88
LENTFER D., LEZIUS A. Eur. J. Biochem. (1972) <u>30</u> , 278-284	113	21
LESNAW J. A., REICHMANN M. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1970) <u>66</u> , 140	125	22
LEVIS A. G., KRSMANOVIC V., ERRERA M. Biochim. Biophys. Acta (1967) <u>145</u> , 577	168 234 240 275 285 287 301	30 47 49 93 100 103 131
LINDBERG U., DARNELL J. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1970) <u>65</u> , 1089	193 200	36 38
LINDELL T. J., WEINBERG F., MORRIS P. W. ROEDER R. G., RUTTER W. J. Science (1970) <u>170</u> , 447	59	13
LING V. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1971) <u>42</u> , 82	118	22
LOENING U. Communication au 2 <sup>ème</sup> Meeting ECBO - Lac Balaton - Hongrie - 1971	300	131
Mc CARTHY B. J., BOLTON E. I. J. Mol. Biol. (1964) <u>8</u> , 184	146	24
Mc CONKEY E. H., HOPKINS J. W. J. Mol. Biol. (1965) <u>14</u> , 257	221	39
Mc CONNELL D., BONNER J. Eur. J. Biochem. -(1973) <u>38</u> , 111	85	19
MADEN B. E. H. Progr. Biophys. Mol. Biol. (1971) <u>22</u> , 129	195	36
MADISON J. T. Ann. Rev. Biochem. (1968) <u>37</u> , 131	137	23
MAITRA U., COHEN S. N., HURWITZ J. C S H S Q B (1966) <u>31</u> , 113	140	24

	Ref.	Pages
MAITRA U., HUANG H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1972) <u>69</u> , 55	103	21
MAITRA U., HURWITZ J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1965) <u>54</u> , 816	91 101 149	20 21 27
MAITRA U., HURWITZ J. J. Biol. Chem. (1973) <u>248</u> , 3893	139	23
MAITRA U., NOVOGRODSKY A., BALTIMORE D. HURWITZ J. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1965) <u>18</u> , 801	260	72
MANDEL P., BORKOWSKA I. Biochim. Biophys. Acta (1964) <u>91</u> , 683	162	29
MANDEL J.L., CHAMBON P. F E B S Letters (1971) <u>15</u> , 175	21	9
MANDEL J.L., CHAMBON P. Eur. J. Biochem. (1974) <u>41</u> , 367	54 106 110	12 21 21
MANO Y. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1966) <u>25</u> , 216	226	40
MANO Y., NAGANO H. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1966) <u>25</u> , 210	225	40
MATSUKAGE A., MURAKAMI S., KAMEYAMA T. Biochim. Biophys. Acta (1969) <u>179</u> , 145	77	17
MEAD C.G. J. Biol. Chem. (1964) <u>239</u> , 550	161	29
MEILHAC M., CHAMBON P. Eur. J. Biochem. (1973) <u>35</u> , 454	62 108 272	13 21 84
MEILHAC M., TYSPER Z., CHAMBON P. Eur. J. Biochem. (1972) <u>28</u> , 291	61 271 293	13 84 126
MENDECKI J., LEE C., BRAWERMAN G. Biochemistry (1972) <u>11</u> , 792	206	38
MILLER O.L. Jr, BEATTY B.R. Science (1969) <u>164</u> , 955	152	27

	Ref.	Pages
MILLER O.L. Jr, HAMKALO B.A., THOMAS C.A. Jr Science (1970) <u>169</u> , 392	153	27
MILLER O.L. Jr, BEATTY B.R., HAMKALO B.A. THOMAS C.A. Jr C.S.H.S.Q.B (1970) <u>35</u> , 505	157	28
MONTGOMERY R., WU Y. J. Biol. Chem. (1963) <u>238</u> , 3547	250	62
MOULE Y., CHAUVEAU J. C.R. Acad. Sci. Paris (1966) <u>263 D</u> , 75	209	38
MUELLER K., BREMER H. J. Mol. Biol. (1969) <u>43</u> , 89	95	21
NAKAMURA H., SUGINO Y. J. Biol. Chem. (1966) <u>241</u> , 4917	269	76
NAKANA E., SAKAGUCHI K. J. Biochem. (1969) <u>65</u> , 147	76	17
OKAMOTO T., SUGIURA M., TAKANAMI M. Biochemistry (1970) <u>9</u> , 18	97	21
PARSONS J.T., Mc CARTY K.S. J. Biol. Chem. (1968) <u>243</u> , 5377	210	38
PAUL J., GILMOUR R.S. J. Mol. Biol. (1968) <u>34</u> , 305	182	34
PERRY R.P., KELLEY D.E. J. Mol. Biol. (1968) <u>35</u> , 37	222	39
PERRY R.P., KELLEY D.E. J. Cell. Physiol. (1969) <u>72</u> , 235	237 291 306 310	48 115 134 135
PERRY R.P., SRINIVASAN P.R., KELLEY D.E. Science (1964) <u>145</u> , 504	216	39
PETTIJOHN D.E., STONINGTON O.G. KOSSMAN C.R. Nature (1970) <u>228</u> , 235	178	31
PONTA H., PONTA U., WINTERSBERGER E. F.E.B.S Letters (1971) <u>18</u> , 204	35 50	9 12

	Ref.	Pages
RICHTER G., SENGER H. Biochim. Biophys. Acta (1965) <u>95</u> , 362	165	30
ROBERTS J.W. Nature (1969) <u>224</u> , 1168	177	31
ROBERTSON H.D., ZINDER N.D. J. Biol. Chem. (1969) <u>244</u> , 5790	117 266	22 76
ROBLIN R. J. Mol. Biol. (1968) <u>36</u> , 125	119	22
ROEDER R.G. J. Biol. Chem. (1974) <u>249</u> , 249	29 42	9 10
ROEDER R.G., RUTTER W.J. Nature (1969) <u>224</u> , 234	10 13 17 49	7 8 9 12
ROEDER R.C., RUTTER W.J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1970) <u>65</u> , 675	14 28 38 256	8 9 10 68
ROEDER R.G., REEDER R.H., BROWN D.D. C.S.H.S.Q.B. (1970) <u>35</u> , 727	23	9
ROSENTHAL P., FOX M. J. Mol. Biol. (1970) <u>54</u> , 441	279 286	93 101
ROY P., BISHOP D. Biochim. Biophys. Acta (1971) <u>235</u> , 101	268 270	76 82
RUET A., SENTENAC A., FROMAGEOT P. F E B S Letters (1970) <u>11</u> , 169	89	19
RUTTER W.J., MORRIS P.W., GOLDBERG M. PAULE M., MORRIS R.W. The Biochemistry of Gene Expression in Higher organisms. Ed. J.K. Pollak and J.W. Lee Australie and New England Book Co (1973) p. 89	40 41	10 10
RYSKOV A.P., FARASHYAN V.R., GEORGIEV G.P. Molekulyarnaya Biologiya (1972) <u>6</u> , 300	130 297 311	22 131 135
RYSKOV A.P., GEORGIEV G.P. F E B S Letters (1970) <u>8</u> , 186	129	22

	Ref.	Pages
SALAS M., HILLE M.B., LAST J.A. WAHBA A.J., OCHOA S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1967) <u>57</u> , 387	141	24
SAMARINA P., ASRIYAN I.S., GOERGIEV G.P. Dokl. Acad. Nauk. URSS (1965) <u>163</u> , 1510	208	38
SAMARINA O.P., LUKANIDIN E.M., MOLNAR J. GEORGIEV G.P. J. Mol. Biol. (1968) <u>33</u> , 251	224	39
SCHÄFER R., KRAMER R., ZILLIG W. CUDNY H. Eur. J. Biochem. (1973) <u>40</u> , 367	134	23
SCHERRER K., LATHAM H., DARNELL J.E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1963) <u>49</u> , 240	197 215 290	36 39 113
SCHERRER K., MARCAUD L. Bull. Soc. Chim. Biol. (1965) <u>47</u> , 1967	198	36
SCHULMAN H.M., BONNER D.M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1962), <u>48</u> , 53	160	29
SEIFART K. Communication personnelle au F E B S. Summer School - Hintermoos - Autriche (1971)	111	21
SEIFART K.H., SEKERIS C.E. Eur. J. Biochem. (1969) <u>7</u> , 408	20	9
SENTENAC A., RUET A., FROMAGEOT P. Eur. J. Biochem. (1968) <u>5</u> , 385	96	21
SENTENAC A., RUET A., FROMAGEOT P. F E B S Letters (1968) <u>2</u> , 53	88 151	19 27
SERGEANT A. Thèse Doctorat 3 <sup>ème</sup> Cycle- Université de Lille(1972)	278	93
SERGEANT A., D'HALLUIN J.C., VERBERT A.P. KRSMANOVIC V. Soumis à publication	55	12
SERGEANT A., KRSMANOVIC V. F E B S Letters (1973) <u>35</u> , 331	33 51 53 258	9 12 12 71

	Réf.	Pages
SERGEANT A., VERBERT A., KRSMANOVIC V.	170	30
MONTREUIL J.	277	93
Archives Intern. Physiol. Biochim. (1969), <u>77</u> , 573	302	132
	303	132
SHIGEURA H.T., BOXER G.E.	147	27
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1964) <u>17</u> , 758		
SHISHIDO K., IKEDA Y.	72	17
J. Biochem. (1970) <u>68</u> , 881		
SIRLIN J. L.	187	35
Biology of RNA, Academic Press (1972) p. 128		
SMITH J.D.	248	58
dans "Nucleic Acids " Chargaff E. et Davidson J.N.	251	63
Ed. Acad. Press (1955) <u>1</u> , 267		
SOIERO R., VAUGHAN M.H., WARNER J.R.	194	36
DAFNELL J.E.	307	134
J. Cell. Biol. (1968) <u>39</u> , 112		
SPELSBERG T.C., TANKERSLEY S.	184	34
HNILICA L.S.		
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1969) <u>62</u> , 1218		
SPIEGELMAN S., HALL B.D., STORCK	154	27
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1961) <u>47</u> , 1135		
SPIRIN A.S., BELITSINA N.V., AJTKHOZHIN M.A.	218	39
Zh. Abstch. Biol. (1964) <u>25</u> , 321		
SPIRIN A.S., NEMER M.	219	39
Science (1965) <u>150</u> , 214		
STEIN H., HAUSEN P.	27	9
C.S.H.S.Q.B. (1970) <u>35</u> , 709		
STELLWAGEN R.H., COLE R.D.	186	35
Ann. Rev. Biochem. (1969) <u>38</u> , 951		
STEVENIN J., MANDEL P., JACOB M.	213	38
Bull. Soc. Chim. Biol. (1970) <u>52</u> , 703		
STEVENS A.	5	7
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1961) <u>3</u> , 92		
STIRPE F., FIUME L.	56	13
Biochem. J. (1967) <u>105</u> , 779		

	Réf.	Pages
STONINGTON O.G., PETTIJOHN D.E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1971) <u>68</u> , 6	159	29
STRAIN G.C., MULLINIX K.P., BOGORAD L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1971) <u>68</u> , 2647	37	9
SUGDEN B., KELLER W. J. Biol. Chem. (1973) <u>248</u> , 3777	32 46	9 11
SUGDEN B., SAMBROOK J. C S H S Q B (1970) <u>35</u> , 663	31	9
SUGIURA M., OKAMOTO T., TAKANAMI M. Nature (1970) <u>225</u> , 598	79	18
SUGIURA M., OKAMOTO T., TAKANAMI M. J. Mol. Biol. (1969) <u>43</u> , 299	99 132	21 23
SZESZAK F., PIHL A. F E B S Letters (1972) <u>20</u> , 177	189	35
SZYBALSKI W., KUBINSKI H., SHELDRIK P. C S H S Q B (1966) <u>31</u> , 123	71 73	17 17
TADA M., TADA M. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1969) <u>35</u> , 27	102	21
TAKANAMI M. C S H S Q B (1966) <u>31</u> , 611	115	22
TALWAR G.P., SEGAL S.T., EVANS A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964) <u>52</u> , 1059	191	35
TAYLOR K., HRADECNA Z., SZYBALSKI W. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1967) <u>57</u> , 1618	74	17
TOCCHINI-VALENTINI G.P., CRIPPA M. C S H S Q B (1970) <u>35</u> , 737	30	9
TONEGAWA S., WALTER G., BERNARDINI A. DULBECCO R. C S H S Q B (1970) <u>35</u> , 823	202	38
TONGUR V.S., WLADYTCHENSKAYA N.S. J. Mol. Biol. (1968) <u>33</u> , 451	158	29
TRIVERS . BUCKLAND Nature New Biol. (1973) <u>243</u> , 257	313	136

	Réf.	Pages
VINOGRAD J., LEBOWITZ J., RADLOFF R. WATSON R., LAIPIS P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1965) <u>53</u> , 1104	70	16
WALL R., DARNELL J.E. Nature New. Biol. (1971) <u>232</u> , 73	201	38
WATANABE M., AUGUST J.T. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1968) <u>59</u> , 513	123 252	22 64
WATSON J.D., RALPH R.K. Biochim. Biophys. Acta (1967) <u>138</u> , 89	167	30
WEAVER R.F., BLATTI S.P., RUTTER W. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1971), <u>68</u> , 2994	44	11
WEINBERG R.A., PENMAN S. J. Mol. Biol. (1970) <u>47</u> , 169	199	37
WEISS S.B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1960) <u>46</u> , 1020	4	7
WEISS S.B., GLADSTONE L. J. Am. Chem. Soc. (1959) <u>81</u> , 4118	3	7
WIDNELL C.C., TATA J.R. Biochim. Biophys. Acta (1964) <u>87</u> , 531	7	7
WIDNELL C.C., TATA J.R. Biochim. Biophys. Acta (1966) <u>123</u> , 478	8 12	7 7
WIELAND T.H. Science (1968) <u>159</u> , 946	57	13
WILKINSON B.R., KIRBY K.S. Biochem. J. (1966) <u>99</u> , 780	166	30
WU C.W., GOLDTHWAIT D.A. Biochemistry (1969) <u>8</u> 4450	83	18
WU C.W., GOLDTHWAIT D.A. Biochemistry (1969) <u>8</u> , 4458	84	18
YCAS M., VINCENT W.S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1960) <u>46</u> , 804	247 280	56 93

	Ref.	Pages
YOUNG R.J., CONTENT J.	124	22
Nature New Biol. (1973) <u>230</u> , 140	255	65
YOUNG E.T., SINSHEIMER R.L.	261	72
J. Mol. Biol. (1967) <u>30</u> , 147		
ZELLER G.A.	254	65
Arch. Biochem. (1957) <u>28</u> , 138		

