

50376
1975
206

Chantal TRENTESAUX -

50376
1975
206

N° d'ordre 550

THESE 3e CYCLE
BIOCHIMIE



Soutenu le 5 SEPTEMBRE 1975

SCD LILLE 1



D 030 308588 2

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE DE : 3e CYCLE
DISCIPLINE : BIOCHIMIE

N° D'ORDRE
550

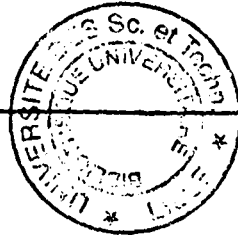
50376
1975
206
NOM DU CANDIDAT : Chantal TRENTESAUX

Nom de Jeune Fille : CHAUVET

JURY : PRESIDENT : J. MONTREUIL
RAPPORTEUR : V. KRSMANOVIC
EXAMINATEURS : J. KREMBEL et A. VERBERT
MEMBRE INVITE : J. SAMAILLE

50376
1975
206

TITRE DE LA THESE : MISE EN EVIDENCE DES RNA POLYMERASES
DNA DEPENDANTES DES CELLULES KB ET RECHERCHE D'ACTIVITES
PHOSPHOKINASIQUES CONTAMINANTES



R E S U M E
=====

Dans une première partie du travail présenté, les RNA polymérase DNA dépendantes ont été extraites des cellules KB. Plusieurs méthodes de caractérisation de ces enzymes ont été employées : la chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions (DEAE-Cellulose D 52 ; DEAE - Séphadex A 25), la sédimentation en gradient linéaire de glycérol. Ces études nous ont permis de mettre en évidence 3 types d'activités RNA polymérasiques : les enzymes I, II et III selon la nomenclature de ROEDER. Nous avons étudié le rôle de la force ionique, des cofacteurs métalliques et du type de DNA utilisé comme matrice, vis à vis de la transcription par les différentes RNA polymérase.

Les extraits enzymatiques ont été également étudiés dans les cellules KB infectées par l'adénovirus 2, les trois classes de polymérase ont été retrouvées, mais aucune nouvelle forme de RNA polymérase n'a été détectée. Dans un second temps, nous avons examiné la présence de 2 activités phosphokinasiques dans les extraits de RNA polymérase à savoir : une phosphotransférase qui échange le radiophosphore en du γ - 32 P ATP ou du γ - 32 P GTP sur du GTP ou de l'ATP - une phosphokinase qui fixe le 32 P sur des macromolécules non ribonucléiques. L'évaluation de ces 2 activités phosphokinasiques s'est avérée très importante pour déterminer la quantité exacte de 32 P XTP incorporée en position 5' terminale des RNA néosynthétisés lors de l'étude du déclenchement de la transcription, in vitro.

Soutenance prévue le : vendredi 5 septembre 1975 à : 10h30

Bâtiment : C1

Amphithéâtre : LE CHATELIER



DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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,
DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FEPIET, KOUGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPLER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LEBRUN André	Electronique

M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BILLARD Jean	Physique du Solide
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	MAES Serge	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANDRE Charles	Sciences Economiques
M.	ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique

BRUYELLE Pierre	Géographie
CARREZ Christian	Informatique
CORDONNIER Vincent	Informatique
CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
COULON Jean	Electrotechnique
e DACCHARI Monique	Géographie
DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
DHAINAUT André	Biologie Animale
DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
DRIEUX Baudouin	Informatique
DUEE Gérard	Géologie Appliquée
DYMENT Arthur	Mécanique
ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
ne EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
FOURNET Bernard	Biochimie
FROELICH Daniel	Chimie Physique
GAMBLIN André	Géographie
GOBLOT Rémi	Algèbre
GOSSELIN Gabriel	Sociologie
GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
HECTOR Joseph	Géométrie
HERMAN Maurice	Physique Spatiale
JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
e KOSMANN Yvette	Géométrie
KREMBEL Jean	Biochimie
LANGRAND Claude	Probabilités
LAURENT François	Automatique
e LEGRAND Denise	Algèbre
e LEGRAND Solange	Algèbre
LENTACKER Firmin	Géographie
LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
LEROY Yves	Electronique
LHENAFF René	Géographie
LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
LOUAGE Francis	Electronique
MACKE Bruno	Physique
MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
ne N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
MAIZIERES Christian	Automatique
MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
PAQUET Jacques	Géologie Générale
PARSY Fernand	Mécanique
PECQUE Marcel	Chimie Physique
PERROT Pierre	Chimie Appliquée
PERTUZON Emile	Physiologie Animale
PONSOLLE Louis	Chimie Physique
POVY Lucien	Automatique
ROGALSKI Marc	Analyse
ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
SIMON Michel	Sociologie
SLIWA Henri	Chimie Organique

SOMME Jean
e SPIK Geneviève
STANKIEWICZ François
THERY Pierre
TOULOTTE Jean-Marc
TREANTON Jean-René
VANDORPE Bernard
VILLETTE Michel
WATERLOT Michel
WERNIER Georges
YVON Jean-Pierre
e ZINN-JUSTIN Nicole

Géographie
Biochimie
Sciences Economiques
Electronique
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Géologie Générale
Informatique
Analyse Numérique
Algèbre

	Page
INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
MECANISME GENERAL DE LA TRANSCRIPTION DU DNA PAR LA RNA POLYMERASE	5
A - Propriétés physico-chimiques des RNA polymérasés	5
1 - Les RNA polymérasés des Procaryotes	5
a) Etude en microscopie électronique et dimensions	5
b) Constante de sédimentation	6
c) Sous-unités et poids moléculaire	6
2 - Les RNA polymérasés des cellules eucaryotes	8
a) Existence de plusieurs Polymérasés et leur localisation	9
b) Existence d'une RNA polymérase mitochondriale	9
c) Isolement et nomenclature	10
d) Propriétés des RNA polymérasés	11
e) Sous-unités et poids moléculaire	13
B - Mécanisme de la transcription	15

I - Formation d'un complexe binaire	
Enzyme - Substrat	15
1 - Association de l'enzyme avec des séquences spécifiques du DNA	15
2 - Spécificité de la matrice	15
3 - Stabilité du complexe	17
a) Influence de la température	17
b) Rôle de la force ionique	17
c) Rôle des ions métalliques	18
d) Intervention de facteurs stabilisants ...	19
II - Propagation de la chaîne	25
1 - Site d'initiation de la synthèse et nature du nucléotide initial	25
2 - Sens de la transcription	25
3 - Formation d'un complexe ternaire DNA-RNA polymérase-RNA naissant	27
4 - La synthèse est-elle asymétrique ?	28
III - Arrêt de la synthèse : TERMINAISON	30
C - Régulation de la transcription	32
a) La régulation transcriptionnelle	32
b) La régulation post-transcriptionnelle ...	33

MATERIEL ET METHODES	34
A - Extraction des RNA polymérase des cellules KB	35
1 - Culture cellulaire	35
2 - Extraction des enzymes	35
a) Isolement des noyaux	36
b) Isolement des RNA polymérase	36
B - Fractionnement des extraits bruts RNA polymérase ...	37
1 - Par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE-Cellulose ou sur colonne de DEAE-Séphadex	37
2 - Par sédimentation sur gradient linéaire de glycérol	39
3 - Synthèse des RNA <u>in vitro</u> par les RNA polymérase des cellules KB	40
- Extraction et purification du DNA utilisé comme matrice	40
- Conditions de synthèse <u>in vitro</u>	41
- Mesure de la radioactivité	42
C - Extraction des RNA polymérase des cellules KB infectées par l'adénovirus 2	43
1 - Infection virale	43
2 - Extraction des RNA polymérase	43
D - Mise en évidence d'enzymes contaminant les extraits des RNA polymérase	43
1 - Préparations des γ - ³² P XTP	44

2 - Mise en évidence de l'activité γ -phospho transférasique	44
3 - Chromatographie des nucléosides triphosphates..	46
RESULTATS	49
A - Mise en évidence d'activités RNA polymérasiques multiples dans les noyaux de cellules KB	50
1 - Caractérisation par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions des RNA polymérases de KB	50
a) Chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose DE 52	50
b) Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex x A 25	52
2 - Sédimentation en gradient de glycérol	56
B - Action de la force ionique sur l'efficacité de trans- cription de la matrice de DNA par les RNA polymé- rases de KB	58
1 - Transcription du DNA de cellules KB	58
2 - Transcription du DNA d'adénovirus 2	58
C - Intervention de cofacteurs métalliques lors de la transcription du DNA par les RNA polymérases de KB	60
1 - En présence de $Mg Cl_2$	60
2 - En présence de $Mn Cl_2$	60
D - Les RNA polymérases des cellules KB infectées par l'adénovirus 2. Résultats préliminaires	62
E - Recherche d'activités enzymatiques contaminantes interférant avec les activités RNA polymérasiques	64

1 - Etude de la phosphotransférase	65
a) Etude cinétique de cette réaction	65
b) Mise en évidence de la γ -phospho- transférase dans les extraits polymé- rasiques purifiés sur DEAE-Sephadex ...	65
c) Dissociation des activités polymé- rique et γ -phosphotransférasique sur gradient de glycérol	68
d) Dissociation sur glycérol des 2 acti- vités à partir des RNA polymérase I et II purifiées sur DEAE-Sephadex	68
2 - Mise en évidence d'une phosphokinase dans les extraits polymérasiques	70
DISCUSSION - CONCLUSIONS	73
BIBLIOGRAPHIE	77

INTRODUCTION

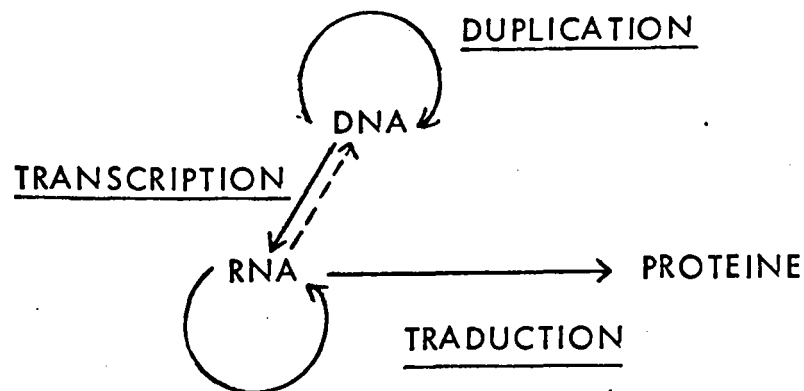
INTRODUCTION

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses équipes de chercheurs se sont efforcées de comprendre comment se transmettait l'information génétique codée dans les molécules de DNA, comment, pour une protéine donnée, le gène correspondant pouvait être sélectionné correctement parmi tous les autres gènes et traduit fidèlement.

L'étude de la structure des macromolécules, acides nucléiques et protéines, a permis de mieux comprendre leurs fonctions.

Le concept de base de cette chaîne de transfert d'informations du DNA jusqu'aux protéines a été appelé par CRICK (1) : "Le dogme central de la biologie moléculaire". Il fut complété plus récemment par les travaux de TEMIN (2) et de TEMIN et MIZUTANI (3).

Ce dogme est résumé par le schéma suivant :



L'information passe d'une manière générale du DNA au RNA (TRANSCRIPTION), puis du RNA aux Protéines (TRADUCTION). Par ailleurs, le DNA comme le RNA peuvent se répliquer eux-mêmes (DUPLICATION). Les flèches en pointillés qui vont du RNA au DNA expriment le fait mis en évidence par TEMIN (4) et par TEMIN et MIZUTANI (5) d'une synthèse de DNA prenant le RNA comme modèle.

Le RNA messenger est le récepteur de l'information génétique conservée par le DNA et son transporteur vers le cytoplasme où, associé aux ribosomes, il pourra déterminer l'ordre d'assemblage des acides aminés apportés par les RNA de transfert, lors de la synthèse des protéines spécifiques.

La transcription du DNA, sous l'action enzymatique de la RNA polymérase, s'avère être une étape primordiale dans le transfert de l'information génétique. Ce phénomène, bien que connu dans ses grandes lignes, pose encore de nombreux problèmes quant aux détails du mécanisme de la biosynthèse des polyribonucléotides, chez les Eucaryotes en particulier.

L'objet de notre travail porte essentiellement sur l'isolement, la caractérisation et le fonctionnement des RNA polymérases des cellules KB in vitro.

Ces études, réalisées dans le laboratoire du Professeur SAMAILLE (Unité INSERM U.102), font partie d'un ensemble de recherches sur la transcription in vitro du DNA par les RNA polymérases des cellules eucaryotes. Ces recherches ont été menées en équipe par Messieurs J.C. D'HALLUIN, A. SERGEANT, A. VERBERT et nous-mêmes sous la direction de Monsieur V. KRSMANOVIC.

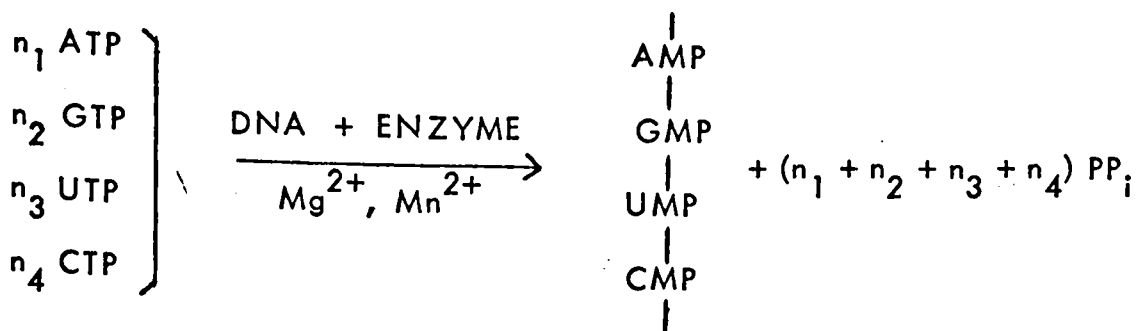
GENERALITES

GENERALITES

La RNA polymérase, caractérisée par WEISS et GLADSTONE (6) et WEISS (7) dans le foie de Rat et par HURWITZ et al. (8) dans les extraits d'E. Coli, catalyse la synthèse des RNA.

Pour donner naissance à une chaîne de polyribonucléotides, la RNA polymérase DNA dépendante requiert la présence :

- d'une matrice de DNA qui lui sert de modèle
- des quatre ribonucléotides triphosphates
- des ions bivalents : magnésium, manganèse.



Cette polymérisation peut être décomposée en différentes étapes :

- Fixation de la RNA polymérase sur le DNA et formation d'un complexe binaire DNA-RNA polymérase.
- Déclenchement de la polymérisation
- Déplacement de l'enzyme le long du DNA suivi de l'allongement de la chaîne polyribonucléotidique et de la formation d'un complexe ternaire DNA-RNA polymérase-RNA néosynthétisés.
- Arrêt de la polymérisation et libération de l'enzyme et du RNA synthétisé.

Dans un premier temps, nous présentons les principales données actuelles concernant les RNA polymérase des cellules procaryotes et eucaryotes. Il faut noter cependant que la RNA polymérase extraite d'E.Coli a été et demeure l'une des plus étudiées. Elle nous permet une approche aisée des systèmes eucaryotiques plus complexes.

MECANISME GENERAL DE LA TRANSCRIPTION DU DNA PAR LA RNA POLYMERASE

La RNA polymérase ou nucléoside triphosphate RNA nucléotidyl transférase (EC 2.7.7.6.) est l'enzyme qui catalyse la polymérisation des quatre nucléosides 5'-triphosphates en présence d'ions Mg^{2+} , Mn^{2+} et du DNA qui sert de matrice.

A - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES RNA POLYMERASES

1 - Les RNA polymérases des Procaryotes

Jusqu'à ces dernières années, les auteurs n'avaient pu mettre en évidence qu'un seul type de RNA polymérase DNA dépendante chez E. Coli. Il fallu attendre les travaux de FUKUDA et al 1974 (9) et IWAKURA et al (10) qui révèlent la présence d'une nouvelle forme de RNA polymérase (Holoenzyme II) possédant une spécificité de matrice semblable à celle de l'holoenzyme I (ou polymérase standard). Ces 2 types d'enzymes diffèrent par leur structure.

a) Etude en microscopie électronique et dimensions

FUCHS et al (11), CRAWFORD et al (12), SLAYTER et HALL (13) ont observé la RNA polymérase I au microscope électronique.

La RNA polymérase I a une forme de cylindre creux de 95 Å de hauteur, 125 Å de diamètre externe, 40 Å de diamètre interne, formé

par l'assemblage de six sous-unités.

KITANO et KAMEYANA (14) confirment cet assemblage de sous-unités et précisent qu'elles sont elles-mêmes formées par l'empilement de 5 à 6 sous-unités secondaires sphéroïdes.

Lors de la transcription, le brin de DNA passerait au travers du trou central. LUBIN (15) met en garde car, estime-t-il, les préparations de FUCHS et al (16) n'étaient pas parfaitement pures. Selon lui, une purification par sédimentation en gradient de densité et digestion enzymatique de la RNA polymérase donne une préparation fonctionnelle où l'enzyme apparaît sous forme de particules "poreuses" très homogènes, d'un diamètre moyen de 105 Å.

b) Constante de sédimentation

RICHARDSON (17, 18), STEVENS et al (19) et COLVILL et al (20) ont montré que la constante de sédimentation de l'enzyme dépendait étroitement de la force ionique.

- à basse force ionique ($\mu < 0,1 \text{ M}$), la RNA polymérase existe sous une forme agrégée réversible qui sédimente avec une constante de 21 à 24 S dont la masse moléculaire avoisine 900.000

- à haute force ionique ($\mu > 0,5 \text{ M}$), l'enzyme est dissociée réversiblement en 2 unités dont la constante de sédimentation est de 13 S et dont la masse moléculaire égale 480.000 (forme monomère de l'enzyme).

D'autres facteurs que la force ionique ont une influence sur l'agrégation de l'enzyme, à savoir l'âge, la température, le substrat, la présence de polynucléotides.

c- Sous-unités et poids moléculaire

Dans un milieu dénaturant, (urée : 8 M ; Sodium dodécyl-sulfate, guanidine hydrochloride, succinylation), BURGESS (21), BURGESS et al (22), WALTER et al (23), ZILLIG et al (24) ont montré que l'enzyme I se dissocie en différentes sous-unités de chaînes peptidiques

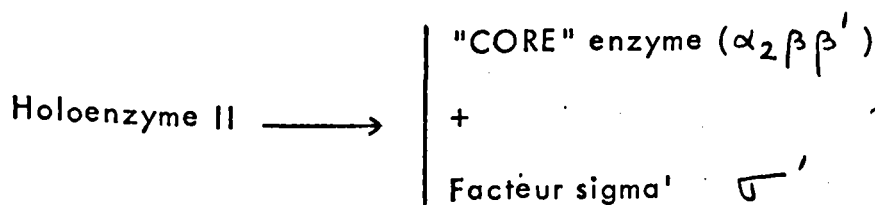
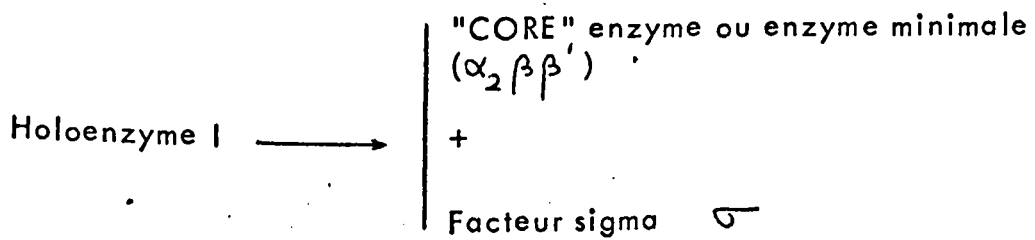
qui peuvent être séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou sur acétate de cellulose dans l'urée 8 M.

De même, l'électrophorèse en milieu dissociant des 2 holoenzymes I et II, précédemment séparées par chromatographie sur colonne de DNA-Cellulose, a permis à FUKUDA et al (25) de mettre en évidence une sous-unité σ' en plus des sous-unités déjà connues

Ces chaînes polypeptidiques possèdent les poids moléculaires suivants :

-	β'	165.000
-	β	155.000
-	η	95.000
-	η'	56.000
-	α	39.000

L'holoenzyme I (490.000 de Poids Moléculaire) et l'holoenzyme II (450.000 de Poids Moléculaire) se décomposent chacune en 2 parties dont l'une appelée "CORE" enzyme ou enzyme minimale est identique aux 2



- L'enzyme minimale ($\alpha_2\beta\beta'$) appelée aussi "CORE" enzyme (de poids moléculaire $400.000 \pm 10\%$) est capable de synthétiser le RNA mais de manière non spécifique.

D'après ZILLIG et al (26), β' serait plus particulièrement responsable de la fixation de l'enzyme à l'ADN, vu son affinité pour l'héparine (polyanion, analogue structural de l'ADN).

La sous-unité β possède un site de fixation pour le facteur σ et serait impliquée dans le processus de déclenchement mais aussi dans celui de la propagation (déplacement de l'enzyme I sur l'ADN) du fait de sa sensibilité à la streptolydigne -inhibiteur spécifique de l'allongement des chaînes de RNA, HEIL et ZILLIG (27)-

- Le facteur sigma (σ) agit de façon catalytique pour déclencher une initiation efficace du RNA sur des sites spécifiques.

- Le 2ème facteur sigma (σ'). Tout comme le facteur σ pour l'holoenzyme I, σ' permettrait à l'holoenzyme II d'initier une transcription spécifique sur une matrice de DNA natif double brin. De plus, σ' permet à l'holoenzyme II de catalyser, sans modèle, la synthèse de poly(A)-poly(U) uniquement à partir d'ATP et d'UTP, alors que l'holoenzyme I est incapable de synthétiser un polyribonucléotide en absence de DNA utilisé comme matrice. IWAKURA et al (28)

2 - Les RNA polymérases des cellules eucaryotes

Chez les Eucaryotes, on admet actuellement l'existence de formes multiples des RNA polymérases. Les études initiales de WIDNELL et TATA (29) ont montré qu'à basse force ionique (en présence de Mg^{2+}) il y a synthèse préférentielle d'un RNA de type ribosomal, alors qu'à haute force ionique (en présence de Mn^{2+}), la synthèse du RNA dont la composition en bases est semblable à celle du DNA, est stimulée.

a) Existence de plusieurs Polymérase et leur localisation

Dans le noyau des cellules eucaryotes, ROEDER et RUTTER (30) ont montré que la RNA polymérase I était principalement, si pas exclusivement, localisée à l'intérieur du nucléole, alors que la RNA polymérase II et vraisemblablement la RNA polymérase III étaient localisées dans le nucléoplasme.

La distinction entre les polymérase II et I + III a pu se faire grâce à une inhibition sélective de la polymérase II par l' α -amanitine (0,8 $\mu\text{g/ml}$), toxine isolée de "Amanita Phalloides" LINDELL et al (31).

- La RNA polymérase I ou nucléolaire : à basse force ionique et en présence d'ions Mg^{2+} , in vitro, la polymérase I synthétise principalement des RNA prédominants en G + C donc de type RNA ribosomal BLATTI et al (32).

- La RNA polymérase II ou nucléoplasmique ; en présence d'ions Mn^{2+} et à haute force ionique, la RNA polymérase II synthétise, in vitro, un RNA nucléaire hétérogène "DNA-like" REEDER et ROEDER (33), ZYLBER et PENMAN (34), qui donne naissance au RNA messager.

- La RNA polymérase III : cette enzyme est également d'origine nucléoplasmique mais résistante à l' α -amanitine à 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Toutefois, à partir de 20 $\mu\text{g/ml}$, l'activité de la RNA polymérase III est réduite de moitié et pour une dose de 400 $\mu\text{g/ml}$, elle est totalement inhibée. Récemment, WEINMANN et ROEDER (35) ont démontré le rôle de cette enzyme dans la synthèse du RNA de transfert et du RNA 5 S.

b) Existence d'une RNA polymérase mitochondriale

KUNTZEL et SCHAFFER (36) ont montré que les mitochondries possédaient leur propre système de transcription. Ils rapportent la présence, dans les mitochondries de Neurospora Crassa, d'une polymérase différente des polymérase nucléaires.

La molécule est apparemment composée d'une simple sous-unité de faible poids moléculaire 80.000 Daltons. Elle n'est pas inhibée par la rifampicine et montre une spécificité pour le DNA mitochondrial.

Elles ont été également isolées dans les mitochondries de foie de rat REID et PARSONS (37), de *Xenopus laevis* WU et DAWID (38), de cellules Hela ATTARDI et al (39).

La transcription du DNA mitochondrial des cellules Hela serait symétrique et se ferait sur une longueur équivalente à la totalité du DNA mitochondrial.

c) Isolement et nomenclature

Les RNA polymérases ont été isolées de différents tissus animaux : foie de rat ROEDER et RUTTER (40), SEIFART (41), thymus de veau KEDINGER et al (42), embryon d'oursin VOIGT et al (43), cellules Hela SUGDEN et SAMBROOK (44), cellules KB KELLER et GOOR (45).

Ces études ont permis de mettre en évidence plusieurs types de RNA polymérases dans les noyaux des cellules eucaryotes.

Leur nomenclature fut quelque peu hétérogène. En effet, suivant les auteurs, elles étaient classées en fonction de leur localisation, de leur ordre d'éluion suivant la force ionique, de leur sensibilité vis-à-vis de l' α -amanitine.

Le tableau ci-après établit une corrélation entre les différentes dénominations.

Classe de l'enzyme	Terminologie	Sous-unités	Localisation	Autres terminologies
A insensible à l' α -amanitine (e)	Enzyme A I	A ₁ A ₂	[nucléolaire (a, b, c, d)	Enzyme I (a)
	Enzyme A II	?		
	Enzyme A III	?	nucléoplasmi- que (d)	Enzyme III (a)
B sensible à l' α -amanitine (e)	Enzyme B I	B ₁ B ₃	nucléoplasmi- que (c, d)	Enzyme II (a)
	Enzyme B II	B ₂ B ₃		

a- ROEDER et RUTTER 1969 (46)

b- CHESTERTON et BUTTERWORTH 1971 (47)

c- JACOB et al 1970 (48)

d- ROEDER et RUTTER 1970 (49)

e- CHAMBON et al 1972 (50)

d) Propriétés des RNA polymérase

Leurs propriétés générales sont résumées dans le tableau 1 en annexe page 12.

Chaque enzyme est caractérisée par différents paramètres :

- La force ionique à laquelle elle s'élué sur DEAE-Séphadex ou DEAE-Cellulose.
- Son activité en présence de cations divalents
- La force ionique correspondant à son optimum d'activité in vitro
- Sa sensibilité vis-à-vis de l' α -amanitine (inhibiteur spécifique de la RNA polymérase II) ou de la rifampicine (inhibiteur spécifique des RNA polymérase procaryotiques.)

Tableau 1

Propriétés des RNA polymérases nucléaires

	I	II	III
Elution sur DEAE-Séphadex	0,08 - 0,15	0,25	0,35
Elution sur DEAE-Cellulose	0,05 - 0,15	0,25	0,08 - 0,15
Molarité en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
$\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ rapport d'activité	1	5 - 50	2 - 3
Optimum de force ionique	0,05	0,1 - 0,15	0 - 0,2
% d'inhibition à :			
- la rifampicine	0	0	0
- l' α -amanitine (0,8 ug/ml)	0	100	0
(400 ug/ml)	0	100	100

e) Sous-unités et poids moléculaire

L'hétérogénéité de la polymérase I a été mise en évidence par ROEDER et RUTTER (51, 52), CHAMBON et al (53) dans les organismes supérieurs.

Deux sous-unités principales de la RNA polymérase II ont également été mises en évidence par WEAVER et al (54), CHESTERTON et BUTTERWORTH (55), KEDINGER et al (56).

Des préparations hautement purifiées de polymérase I ont été obtenues à partir de thymus de veau, de foie de rat, d'embryon d'oursin. Une étude partielle de cette molécule montre qu'elle a une masse moléculaire de 400.000 Daltons, semblable à la forme II de l'enzyme. Cette masse moléculaire a été déterminée par filtration sur gel et par sédimentation.

A partir de préparations purifiées de RNA polymérase A I, CHAMBON et al (57) ont établi que cette enzyme possédait les sous-unités de poids moléculaires suivants : $(197.000)_1$, $(126.000)_1$, $(51.000)_1$, $(44.000)_1$, $(25.000)_2$.

Ces mêmes auteurs ont également montré que les RNA polymérases B I et B II contenaient les sous-unités de poids moléculaires suivants : $(214.000)_1$, $(140.000)_1$, $(34.000)_{1-2}$, $(25.000)_2$, $(16.500)_{3-4}$, et $(180.000)_1$, $(140.000)_1$, $(34.000)_{1-2}$, $(25.000)_2$, $(16.500)_{3-4}$ respectivement.

Récemment, SKLAR et al (58) ont étudié les sous-unités de la RNA polymérase III extraite de plasmocytome de souris. La constante de sédimentation de l'enzyme III (620.000 environ de poids moléculaire) est supérieure à celle de la RNA polymérase II qui est, elle-même, supérieure à celle de la RNA polymérase I.

Les analyses structurales mettent en évidence 2 sous-unités de haut poids moléculaire (138.000 et 155.000), différentes des sous-unités correspondantes des enzymes II et I, et quelques sous-unités de faible poids moléculaire

(29.000 - 19.000). Ces résultats permettent de distinguer les 3 classes d'enzymes d'après leurs données structurales.

De plus, ces études semblent montrer que les 3 classes de RNA polymérases sont des produits de gènes distincts.

B - MECANISME DE LA TRANSCRIPTION

I - Formation d'un complexe binaire Enzyme-Substrat

En présence de DNA, la RNA polymérase forme un complexe binaire dont la stabilité et la formation dépendent de plusieurs facteurs (conformation moléculaire, nature du DNA, etc.)

1 - Association de l'enzyme avec des séquences spécifiques du DNA

Dans le cas des phages, comme les phages α ou T₇, où l'un des brins de DNA est plus riche que l'autre en groupes de bases pyrimidiques SZYBALSKI et al (59) ont montré que de telles séquences introduisaient un élément de discontinuité dans la double hélice du DNA, modifiant sa structure secondaire. La RNA polymérase viendrait se fixer au niveau de ces sites spécifiques de reconnaissance et transcrirait de préférence le brin riche en pyrimidine. Dans le cas des phages λ ou T₄, où les sites pyrimidiques sont distribués sur les deux brins, c'est tantôt l'un, tantôt l'autre des brins qui est transcrit, mais c'est toujours un brin riche en pyrimidine, SZYBALSKI (60). Ce modèle, satisfaisant pour certains, ne peut être retenu totalement.

NAKANA et SAKAGUCHI (61) ont isolé les sites du DNA liés à la polymérase d'E. Coli et en ont établi la composition en bases ; elle ne diffère pas de celle du DNA total (dG + dC = 50 pour cent).

D'autre part, des études faites à partir de polynucléotides synthétiques ont montré que les matrices composées de nucléotides pyrimidiques sont lues beaucoup plus rapidement par les deux enzymes nucléolaire et nucléoplasmique que celles composées de nucléotides puriques, BLATTI et al (62).

2 - Spécificité de la matrice

Les études de spécificité de matrice vis-à-vis de la RNA polymérase exigent l'utilisation d'un DNA de structure bien définie in vitro.

Dans ce sens, MANDEL et CHAMBON (63) ont montré que la RNA polymérase A I animale a une préférence très nette vis-à-vis de la forme I en superhélice du DNA du virus SV₄₀ par rapport aux formes II et III respectivement circulaire et linéaire. Ils suggèrent également, aux vues de leurs résultats, le rôle important que jouent les régions inappariées de la superhélice du DNA au cours de l'initiation par la RNA polymérase A I, et les difficultés de l'enzyme B pour initier une synthèse de RNA sur un DNA double brin intact à bases correctement appariées. Il est donc vraisemblable que la haute efficacité de la matrice du DNA de SV₄₀ (forme I) est liée à la présence de régions inappariées dans cette superhélice.

L'enzyme B n'est pas capable d'ouvrir la double hélice pour initier une synthèse de RNA, contrairement à l'enzyme A I.

La spécificité de transcription peut réclamer d'autres facteurs qui interagissent avec l'enzyme, le DNA ou le complexe enzyme-DNA, ROEDER et al (64).

Jusqu'ici les résultats montrent que ni les enzymes B purifiées à partir de foie de rat ou de thymus de veau, ni l'enzyme A I de thymus de veau ne sont capables de transcrire un DNA linéaire double brin intact, qu'il soit d'origine virale ou cellulaire. Cette incapacité pourrait refléter la perte d'un facteur général d'initiation (semblable au facteur σ d'E.coli) lors de la purification des enzymes, ou pourrait être une propriété des RNA polymérase animales incapables d'initier la synthèse de RNA sur un DNA double brin intact.

Les régions inappariées de la superhélice de DNA du SV₄₀ (forme I) pourraient avoir une signification biologique, à savoir : être les séquences promotrices de l'initiation de la synthèse des RNA in vivo.

Pour que ces hypothèses soient fondées, il faut connaître la configuration du DNA traduit in vivo ; il semblerait, d'après JACKSON et SUGDEN (65) qu'in vivo, seul l'enzyme B interviendrait dans la transcription du génome viral.

3 - Stabilité du complexe

HINKLE et CHAMBERLIN (66,67) ont montré que des sites sélectifs sont utilisés pendant la fixation de la RNA polymérase d'E.coli (holoenzyme) sur le DNA du bactériophage T₇ et participent à la formation d'un complexe hautement stable : holoenzyme - DNA T₇ au niveau du site promoteur.

La formation de ce complexe réclame la présence de la sous-unité qui, vraisemblablement, participe à l'ouverture de la double hélice près du site promoteur, alors que la RNA polymérase "CORE" d'E.coli ne conduit pas à la formation d'un complexe hautement stable avec le DNA de T₇ intact.

La température, la force ionique, les cations divalents, la présence ou non de certains facteurs jouent un grand rôle sur la stabilité du complexe enzyme - DNA.

a) Influence de la température

Des observations suggèrent l'hypothèse d'un appariement de DNA avec l'enzyme par des liaisons correspondant à des énergies relativement faibles, du type liaison hydrogène, liaison de Van der Waals. DUBERT et HIRSCHBEIN (68) renforcent cette hypothèse en montrant la labilité du complexe vis-à-vis d'une augmentation de température (on sait que les structures secondaires et tertiaires sont plus stables à basse température).

b) Rôle de la force ionique

La liaison du complexe DNA - RNA polymérase peut être réversible, ce qui a permis à certains auteurs FUCHS et al (69), WALTER et al (70), de proposer un modèle pour la fixation de l'enzyme sur le DNA.

Il y aurait deux étapes :

- simple fixation de la RNA polymérase sur le DNA dans un premier temps, nécessitant une faible force ionique.

- la seconde étape, la plus longue, correspondrait à une fusion localisée du DNA.

Pour des conditions de force ionique optimale, MANDEL et CHAMBON (71) ont noté que la synthèse des RNA différait selon le type de matrice utilisée. En particulier, contrairement au DNA de thymus de veau, la forme I du DNA de SV₄₀ n'est transcrite qu'à force ionique relativement faible.

En laissant démarrer la réaction à faible force ionique 25 mM (NH₄)₂SO₄, puis en augmentant la concentration saline à 100 mM après 5 minutes, ces auteurs ont observé une synthèse importante. Cette observation démontre que c'est bien l'initiation de la synthèse qui est inhibée à haute force ionique avec le DNA de SV₄₀ forme I comme matrice alors qu'au contraire l'élongation est stimulée par la présence de sel à forte concentration.

Bien que l'association DNA-RNA polymérase soit instable à haute force ionique, il faut noter que la formation d'un court oligonucléotide (3 à 4 nucléotides) suffit à stabiliser l'ensemble, NIYOGI et STEVENS (72)

D'après MANDEL et CHAMBON (73), l'inhibition par augmentation de la force ionique serait liée à une inhibition de la liaison enzyme-DNA ou à une inhibition de l'initiation des chaînes de RNA.

MAITRA et BARASH (74) ont montré que la fonction du sel sur la réaction de la polymérase bactérienne est de détacher le RNA nouvellement formé de l'enzyme et, par conséquent, de poursuivre la réinitiation des chaînes de RNA. Il est donc possible que les sels jouent un rôle semblable sur les polymérases animales.

c) Rôle des ions métalliques

In vitro, la nature du cation divalent présent lors de la synthèse est déterminante. L'ion Mn²⁺ est plus efficace que l'ion Mg²⁺.

Ainsi, l'enzyme A qui transcrit aussi bien le DNA de thymus de veau en présence de Mg²⁺ que Mn²⁺, ne transcrit pratiquement pas la forme I du

DNA de SV₄₀ en présence de Mg²⁺. La transcription de la forme I du DNA de SV₄₀ par l'enzyme A I en présence de Mn²⁺, pourrait être liée à une altération (dénaturation localisée) de la structure de ce DNA en superhélice par l'ion Mn²⁺, permettant ainsi à l'enzyme d'initier non spécifiquement la synthèse de RNA, MANDEL et CHAMBON (75).

Dans le cas de l'enzyme B, il n'y a qu'un seul site d'initiation, KRSMANOVIC et WEISSMAN (76).

En présence de Mn²⁺, la RNA polymérase d'E.coli initie également de manière peu spécifique, BISHOP et ROBERTSON (77).

Le DNA forme I de SV₄₀ pourrait contenir des régions non appariées dues à sa configuration en superhélice, sur laquelle le Mn²⁺ peut agir en modifiant l'étendue de ces régions, alors que l'ion Mg²⁺ a plutôt tendance à la restreindre.

In vivo, les régions inappariées du DNA en superhélice pourraient avoir des significations biologiques, à savoir : donner des séquences promotrices pour l'initiation de la synthèse du RNA. Cependant, la configuration du DNA de SV₄₀, transcrit in vivo, en présence de ces ions, est encore inconnue jusqu'à présent. Il est donc très difficile de définir l'importance biologique des différents effets du Mn²⁺ et du Mg²⁺ sur la transcription, ne connaissant que très peu de chose sur la liaison de ces cations divalents avec le DNA in vivo.

Notons cependant dans le cas de la RNA polymérase bactérienne, que la substitution de Mn²⁺ par Mg²⁺ conduit à des changements de la quantité de nucléotides initiants MAITRA et al (78), de la quantité d'enzyme qui se lie au DNA natif STENBERGER et STEVENS (79), à une diminution de l'asymétrie de la transcription et à une augmentation du décodage du DNA natif du bactériophage T₄ par l'enzyme "CORE" d'E.coli, CHAMBON et al (80).

d) Intervention de facteurs stabilisants

- Les facteurs sigma chez E.coli (σ , σ')

In vitro, il semble que la fixation de la RNA polymérase se fasse quelque peu au hasard sur la double chaîne de DNA. La mise en

évidence du facteur σ par BURGESS et TRAVERS (81) et BURGESS et al (82) et du facteur σ' par FUKUDA et al (83) a permis de clarifier cette première étape ; le facteur σ serait responsable de l'augmentation du nombre de chaînes de RNA initiées sur le DNA de T₄, TRAVERS et BRUGESS (84) ; ce qui amène à penser que ce facteur agit au niveau de l'initiation. De plus, le facteur σ n'est pas une nucléase qui aurait pu opérer des cassures au niveau du DNA, démasquant ainsi de nouveaux sites. L'enzyme "CORE" contient des sites catalytiques, mais ne peut traduire complètement un DNA de phage intact. Le facteur σ ne possède pas d'activité synthétique propre, mais est capable de se lier stoechiométriquement à l'enzyme "CORE" et lui rend sa capacité de transcrire un DNA intact.

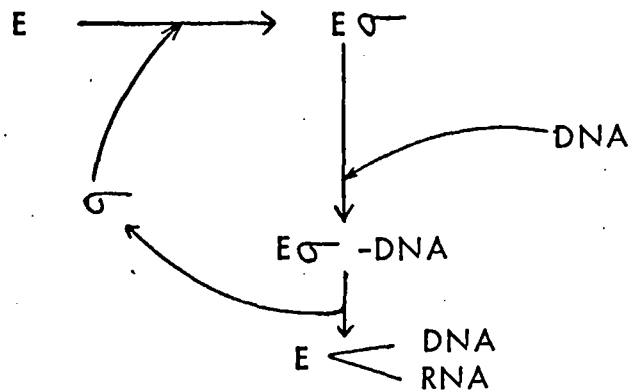
Ces mêmes auteurs, BURGESS et al (85), ainsi que KRAKOW et VON DER HELM (86), BERG et al (87) ont également montré le rôle catalytique du facteur σ . Après démarrage de la réaction, le facteur σ est relâché et diffusé dans le milieu ; il peut s'attacher à nouveau à l'enzyme "CORE" pour initier une nouvelle chaîne de RNA de manière spécifique (voir figure 1 page 21).

La stimulation de l'initiation spécifique par le facteur σ dépend du type et de la qualité de la matrice utilisée. Les conditions de température et de force ionique sont beaucoup plus strictes en présence du facteur sigma.

La transcription par l'enzyme minimale est beaucoup plus faible avec un DNA intact, l'enzyme préférant alors les régions simples brins, GOFF et MINKLEY (88). Il peut cependant transcrire un DNA circulaire, donc initier sur un DNA double brin VOGT (89), SUGIURA et al (90). Le facteur σ ne serait pas indispensable à la fixation de l'enzyme sur la matrice de DNA, DARLIX et al (91).

Outre sa fonction catalytique, le facteur σ peut être responsable de la reconnaissance des sites d'initiation spécifique sur le DNA. Il déstabiliserait les complexes non spécifiques DNA-RNA polymérase.

Figure 1 : Cycle d'utilisation du facteur σ au cours de la transcription
selon TRAVERS et BURGESS (92)



- σ forme initialement un complexe avec l'enzyme minimale
- ce complexe se lie au DNA de manière spécifique et initie la synthèse du RNA
- au cours de l'initiation ou peu de temps après, σ est libéré du complexe et est à nouveau disponible pour se complexer avec une autre molécule d'enzyme minimale.

Le facteur σ' , bien que différent par sa structure du facteur σ , en possède les mêmes fonctions, à savoir : stimulation de la transcription sur certains sites promoteurs de la matrice de DNA, reconstitution d'une polymérase totalement active.

Cependant, le facteur σ' se distingue de la sous-unité σ en conférant à l'holoenzyme II la possibilité de synthétiser un poly(A)-poly(U), sans matrice, à partir d'ATP et d'UTP uniquement, IWAKURA et al (93). L'holoenzyme I est incapable de synthétiser un quelconque polyribonucléotide en absence de DNA. Toutefois, le facteur σ' peut convertir l'enzyme "CORE" dérivé de l'holoenzyme I en holoenzyme II ou poly(A)-poly(U) : polymérase. A la différence de l'holoenzyme I, l'holoenzyme II peut synthétiser un polyadénylate à partir d'un DNA double brin.

- Facteurs protéiques isolés récemment chez les Eucaryotes

Tout comme le facteur σ exerce un contrôle positif lors de la transcription du génome bactérien, il est tentant de supposer l'existence, chez les Eucaryotes, de mécanismes de contrôle semblable.

In vitro, le facteur σ d'E.coli ne possède pas d'effets stimulants sur les enzymes animales, CHAMBON et al (94), FURTH et AUSTIN (95). Aussi plusieurs groupes de chercheurs : SEIFART et SEKERIS (96), STEIN et HAUSEN (97), SEIFART (98), MONDAL et al (99), HIGASHINAKAGAWA et al (100), ont tenté d'isoler un ou plusieurs facteurs spécifiques des systèmes eucaryotiques, capables de réguler le processus de transcription. Ils ont mis en évidence récemment, dans les préparations de foie de rat, de thymus de veau et de noix de coco, une protéine d'origine cytoplasmique ayant une action stimulatrice sur les enzymes nucléoplasmiques. Ce facteur de nature protéique possède un coefficient de sédimentation 3, 3,5 S et un poids moléculaire de 70.000 environ. Cette activité stimulatrice n'est observée qu'en présence d'un DNA double brin comme modèle.

La transcription préférentielle du DNA dénaturé par la polymérase nucléoplasmique, en l'absence de ce facteur implique que cette enzyme n'est

complète qu'avec ce facteur associé. D'autre part, cette stimulation n'est pas due à l'action d'une nucléase qui pourrait causer des coupures monocaténaires dans du DNA natif, et, en conséquence, donner des sites d'initiation supplémentaires sur ce DNA.

Le fait que le facteur se lie à l'enzyme, suggère une reconnaissance spécifique entre l'enzyme, le facteur et la matrice de DNA.

Jusqu'à présent, on n'a pu établir de relation stoechiométrique simple entre le facteur lié à la polymérase et ses effets stimulants sur l'enzyme ; ce qui amène à proposer une action catalytique.

Tout comme le facteur σ , ce facteur est-il capable de promouvoir une initiation de la synthèse du RNA sur des sites spécifiques du DNA ? Le facteur interagit-il avec l'enzyme ou le complexe enzyme-matrice de DNA, en changeant ses propriétés de transcription ? Aucune réponse n'a pu être donnée jusqu'à présent.

Aux vues de ces observations, il apparaît que différentes étapes se produisent entre le temps de fixation de la polymérase sur le DNA et le temps où la première liaison phosphodiester se forme au cours de l'initiation. Cependant, il n'est pas encore possible de décrire les différentes étapes avec précision.

Pour les Procaryotes, BURGESS (101) résume le déroulement des principales étapes de la manière suivante :

- L'enzyme "CORE" se lie au DNA double brin de façon non spécifique, mais réversible. Cette liaison peut être prévenue par les inhibiteurs de liaison du DNA (haute force ionique, héparine) et ne réclame pas le facteur σ .
- L'enzyme se localise sur un site de liaison spécifique. Le facteur σ n'est pas indispensable.
- La séparation du brin est suivie de la formation d'un complexe spécifique stable, au niveau du site d'initiation. Cette étape peut se faire en présence de rifampicine et exige le facteur σ .

- Un changement se produit au niveau de l'enzyme, résultant de la formation d'un complexe de préinitiation, résistant à la rifampicine, mais peu stable. Cette étape peut être stabilisée par le facteur σ . En présence de rifampicine, cette étape se détériore ou redonne l'étape précédente, alors qu'en présence d'héparine, l'enzyme est libérée et peut à nouveau rentrer dans le cycle.
- Le nucléotide triphosphate 5' terminal (en général une purine) se lie à l'enzyme.
- Le second nucléotide triphosphate se lie au premier nucléotide 5' terminal pour former la première liaison phosphodiester, première étape de l'initiation proprement dite de la chaîne de RNA.

II - Propagation de la chaîne

1 - Site d'initiation de la synthèse et nature du nucléotide initial

Chez les Eucaryotes, des études avec des polynucléotides synthétiques ont montré que les matrices composées de nucléotides pyrimidiques sont lues beaucoup plus rapidement par les deux enzymes nucléolaire et nucléoplasmique que celles composées de purines, BLATTI et al (102). Ceci reste valable quelle que soit la nature de la matrice simple ou double brin.

Chez E. coli, la synthèse du RNA initié sur le DNA du bactériophage, en présence de σ , est réduite en des sites spécifiques utilisés in vivo. SUGUIRA et al (103) et TAKANAMI et al (104) ont démontré le rôle de pour une initiation en des sites spécifiques ; ils analysèrent la taille, l'asymétrie, la séquence 5' terminale des RNA synthétisés avec la forme répliquative fd du phage comme matrice. L'holoenzyme, dans ces conditions, initie de manière préliminaire 3 chaînes de RNA différentes, de taille discrète et de séquence initiale semblable à un brin du DNA, alors que l'enzyme minimale transcrit les deux brins et donne des RNA possédant de nombreuses séquences initiales et de taille très hétérogène. Dans tous les cas, il faut noter que la spécificité de la transcription, évaluée par des études sur des matrices de DNA synthétique ou virale, ne peut être semblable à celle exprimée dans la cellule in vivo.

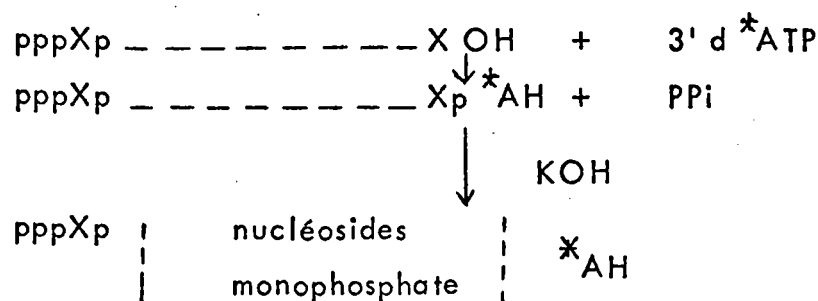
La nature des nucléotides 5' terminaux des RNA synthétisés in vivo et in vitro a été la préoccupation de nombreux auteurs. La présence exclusive de nucléotides puriques (ATP ou GTP) apparaît sans ambiguïté et semble être un phénomène général.

2 - Sens de la transcription

Chez les Procaryotes, le processus de polymérisation des ribonucléotides 5'-triphosphates suit le concept de WATSON et CRICK (105), à savoir : complémentarité des bases de RNA formé avec les bases du brin de

DNA qui sert de matrice. Il convient donc de déterminer le sens de cette croissance: 5' vers 3' ou 3' vers 5'. Plusieurs types d'expériences ont permis de lever cette indétermination.

- SHIGEURA et BOXER (106) en remplaçant l'ATP par l'analogue 3'-désoxyadénosine 5'-triphosphate, dont le groupe hydroxyle du ribose en 3' est remplacé par l'hydrogène, ont montré que cet analogue, bien qu'incorporé, empêchait l'élongation de la chaîne de RNA en voie de synthèse. La liaison 3'-5' phosphodiester ne pouvait se faire. Après hydrolyse alcaline du RNA dont la synthèse a été bloquée, on retrouve pratiquement toute la radioactivité dans la fraction nucléosidique



Le groupe 3' OH libre en position terminale est utilisé pour la croissance de la chaîne. La synthèse s'effectue donc de 5' en 3'.

- MAITRA et HURWITZ, (107) confirment le sens de la transcription de 5' en 3'; ils ont démontré avec la RNA polymérase d'E.coli et différents DNA que la radioactivité était spécifiquement liée à l'extrémité 5' terminale lorsque la synthèse était déclenchée en premier lieu avec des nucléosides triphosphates marqués puis poursuivie avec des nucléosides non marqués.

Chez les Eucaryotes, VERBERT (108) a confirmé le sens de la transcription in vivo dans des cellules de mammifères (Cellules Hela, cellules KB, cellules de foie de rat), en étudiant le nucléoside 5' terminal. Étant donné que l'action de la ribonucléase sur les complexes DNA-RNA, diminue de 30 pour 100 le nombre des nucléotides tétraphosphates, une partie des chaînes terminées par le nucléoside triphosphate est accessible à la ribonucléase; or, l'extrémité où s'effectue l'addition des triphosphates doit se trouver sous la dépendance constante du DNA et de la RNA polymérase. L'addition des nucléosides

triphosphates ne se fait donc pas sur l'extrémité 5'-triphosphate, mais au contraire sur l'extrémité 3'-hydroxyle. Le sens de la transcription procède donc de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. De plus, le premier nucléotide incorporé dans la chaîne de RNA est exclusivement de nature purique. Il pourrait exister une relation entre la nature du nucléotide initial et le type de RNA polymérase, étant donné que les RNA synthétisés par les enzymes de type I débutent préférentiellement par le GTP alors que dans le cas des enzymes de type II c'est principalement l'ATP qui est en position 5' terminale KRSMANOVIC et WEISSMANN (109) et VERBERT et al (110).

3 - Formation d'un complexe ternaire DNA-RNA polymérase-RNA naissant

Au fur et à mesure de la croissance de la chaîne de polyribonucléotides, on assiste à la formation d'un complexe ternaire entre le DNA, la RNA polymérase et le RNA néosynthétisé, dont la stabilité est assurée par des liaisons "pont Hydrogène" entre les bases du DNA et celles du RNA. Cette partie hybridée au DNA est résistante à la ribonucléase pancréatique.

- Cinétique de la synthèse

L'étude de la cinétique d'incorporation de nucléotides marqués au cours de la réaction montre que le taux de synthèse du RNA décroît au bout de 30 minutes à faible force ionique, BREMER et al (111), MAITRA et al (112), RICHARSON (113) et KRAKOW et HORSLEY (114).

BREMER et KONRAD (115) ont montré que l'addition de nucléosides triphosphates ou de DNA à ce moment-là ne provoque pas la reprise de la synthèse, alors qu'elle reprend à la suite d'une nouvelle addition d'enzyme. Ceci suggère que l'arrêt de la synthèse provient de l'inactivation de l'enzyme. La vitesse initiale de la synthèse et le taux final de RNA sont proportionnels à la concentration de la polymérase. Il existerait un rapport constant entre le nombre de molécules de RNA formées et le nombre de molécules de RNA polymérases introduites dans le mélange réactionnel.

Par contre, à haute force ionique, FUCHS et al (116), SO et al (117) ont montré que la synthèse de RNA, au lieu d'atteindre un plateau, peut se poursuivre pendant plusieurs heures et une partie des chaînes de RNA sera libérée. Mais les chaînes ainsi synthétisées ont des constantes de sédimentation variant de 20 à 40 S, plus longues que celles synthétisées in vivo. En présence de hautes concentrations salines, l'enzyme ne reconnaît pas les sites de terminaison.

4 - La synthèse est-elle asymétrique ?

La transcription s'effectuant sur un seul brin de DNA, il convient de savoir si une seule chaîne privilégiée ou les deux pourraient être copiées.

In vivo, les expériences génétiques de CHAMPE et BENZER (118) ont suggéré que pour le RNA de T₄, la matrice était constituée par l'un des deux brins complémentaires du DNA. Les DNA de phages ont été très utiles ; par exemple, le phage Sp 8 ou le phage α ont une composition en bases des deux brins du DNA différente, l'un est riche en purine, l'autre est riche en pyrimidine. Cette composition, suffisamment distincte, permet de les fractionner et de les identifier par leur densité en gradient de chlorure césium (1.756 et 1.762). MARMUR et al (119) ont constaté, après marquage rapide, que le RNA isolé de B. subtilis, infecté par le phage Sp 8, ne s'hybride qu'avec le brin de DNA riche en pyrimidines. Il en est de même pour le phage α infectant B. mégathérium : le RNA synthétisé après l'infection ne s'hybride qu'avec le brin de DNA riche en pyrimidines.

D'autre part, même en large excès, il n'est pas possible d'hybrider plus de 50 pour 100 du RNA avec le DNA chez les bactéries. Mc CARTHY et BOLTON (120).

En outre, tous les RNA cellulaires, stables ou à haute vitesse de renouvellement, sont des molécules monocaténaïres qui ne peuvent s'hybrider entre elles. Ils n'ont donc pas pu être codés par deux chaînes complémentaires de DNA, SAMARINA et al (121).

Cependant, dans des travaux plus récents, COHEN et HURWITZ (122) ont montré que les deux chaînes du DNA et du phage λ servaient de moule in vivo. HAYASHI et al (123) ont rapporté qu'avec une polymérase d'E.coli et avec la forme répliquative d'un phage Φ x 174 circulaire intact, on obtenait une synthèse asymétrique, alors qu'avec des fragments soniqués de Φ x 174, on obtenait une synthèse symétrique ; ce qui laissait penser que la forme circulaire intacte du DNA était nécessaire pour la transcription asymétrique.

COLVILL et al (124) ont pu montrer que le RNA produit in vitro, à partir du DNA de phage α par la polymérase de B.mégathérium est asymétrique et que l'intégrité du DNA n'est pas essentielle à cette asymétrie ; par contre, sa conformation hélicoïdale est nécessaire. Ces mêmes auteurs ont également établi la possibilité d'une synthèse asymétrique de RNA dans un système hétérologue.

On peut admettre actuellement les points suivants :

- in vitro la synthèse asymétrique se produit dans une grande variété de systèmes homologues ou hétérologues.
- la chaîne de DNA qui sert de matrice in vitro, semble, dans certains cas, être la même in vivo. Ceci implique l'existence de sites privilégiés en nombres limités sur le DNA.
Cette sélection du site d'initiation et d'une chaîne de DNA pourrait être gouvernée par des groupes de bases pyrimidiques dans le DNA natif.

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

Il faut, cependant, remarquer que des expériences de ALONI (125) ont montré, dans le cas de cellules infectées par le SV₄₀, une synthèse symétrique du RNA avec l'addition de poly-A du côté 3' ; certaines séquences sont alors rapidement dégradées pour donner le mRNA mature non complémentaire (asymétrique).

III - Arrêt de la synthèse : TERMINAISON

Le mécanisme de la fin de synthèse, libération du RNA néosynthétisé et de l'enzyme, est encore mal connu. Cependant, la taille définie des RNA fait penser à l'existence de signaux de fin de transcription.

Différentes hypothèses ont été émises :

- Selon KRAKOW (126), MAITRA et HURWITZ (127), le RNA synthétisé inhibe la RNA polymérase par fixation compétitive sur le site propre au DNA. Ce mécanisme permettrait de comprendre l'action stimulatrice d'une force ionique élevée ou de la ribonucléase qui, en détachant artificiellement le RNA naissant du complexe, empêcherait cette inhibition.

- Autre hypothèse : une séquence spécifique du DNA servirait de signal de fin de synthèse.

MAITRA (128) a identifié le nucléoside 3'-OH terminal des RNA libérés lors de la réaction de polymérisation in vivo. Il s'agit presque exclusivement d'uridine.

SUMMERS et SZYBALSKI (129) ont montré par ailleurs que l'arrêt de la synthèse se produisait très souvent lors de la transcription in vitro de poly dG-dC ou de poly dA-dT.

- Intervention de protéines spécifiques. ROBERTS (130) a mis en évidence chez E.coli, un facteur protéique, appelé ρ ("rô"), qui a été purifié et qui est la cause de la terminaison de la synthèse et de la libération des molécules de RNA dans une réaction in vitro utilisant comme matrice le DNA du bactériophage λ . Le facteur ρ (exempt de nucléase) diminue la propagation des chaînes de RNA en terminant la synthèse des molécules de RNA en des sites spécifiques de la matrice et n'affecte pas de façon significative l'initiation. Le mécanisme par lequel agit le facteur ρ n'est pas encore éclairci, mais il apparaît qu'il existe des séquences spécifiques de DNA qui fonctionnent comme des signaux de terminaison en présence du facteur ρ .

Cependant, à l'aide de complexe naturel DNA-RNA polymérase-RNA, PETTIJOHN et al (131) ont pu poursuivre la synthèse in vitro, et obtenir des RNA de taille comparable à celle des RNA synthétisés in vivo sans intervention d'aucune autre protéine que celles constituant la polymérase.

- REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Les systèmes de régulation de la biogénèse des RNA jouent un rôle très important dans la régulation de la synthèse protéique proprement dite.

Le contrôle de l'expression génétique peut s'exercer à deux niveaux différents :

1 - Au stade de l'approvisionnement en RNA nécessaire à la biosynthèse protéique, DARNELL et al (132) distinguent 2 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 transcriptionnelle"

2 - Au stade de l'utilisation des RNA. Ce type de régulation que nous ne détaillerons pas s'exerce au niveau de la traduction des RNA.

a) La régulation transcriptionnelle

Une très petite fraction du génome des cellules eucaryotes est transcrite en RNA. Cette portion transcrite serait spécifique pour chaque type de cellule selon PAUL et GILMOUR (133). Il est donc nécessaire de déréguler certains gènes pour qu'ils soient ensuite activés. On peut noter l'intervention de différents facteurs : histones, protéines acides de la chromatine, hormones.

- les histones liées au DNA, masquent la matrice et empêchent la transcription du génome par la RNA polymérase. La dérégulation des gènes contrôlés par les histones se fait, selon SPELSBERG et al (134) par acétylation ou phosphorylation de celles-ci, entraînant une diminution des interactions ioniques et donc une déstabilisation en certains points du DNA ; ce qui permet à la RNA polymérase d'accéder à la matrice et de déclencher

le processus de transcription.

- Les protéines acides de la chromatine. De caractère très acide, ces protéines s'associeraient aux histones et favoriseraient leur détachement du DNA. Leur rôle est encore mal connu.

- Les hormones joueraient également un rôle dans le contrôle de la transcription, par action directe sur le DNA, HAMILTON (135) ou sur des protéines réceptrices de la chromatine TALWAR et al (136), JENSEN et al (137). 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.

b) La régulation Post-Transcriptionnelle

On sait que les RNA ribosomiaux, messagers ou solubles sont issus de molécules de RNA de taille plus élevée, synthétisées dans le noyau. Il existe donc également un contrôle au niveau de ce remaniement. La découverte du segment poly-A du côté 3' et du m RNA LEE et al (138), permet de postuler que celui-ci pourrait être impliqué dans la sélection des RNA nucléaires hétérogènes pour donner le m RNA, ainsi que dans sa stabilité.

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL et METHODES

A - EXTRACTION DES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB

1 - Culture cellulaire

Les cellules KB qui nous ont servi de matériel, ont été adaptées à la culture en suspension à 37°C dans un milieu de culture sans calcium : Minimum Essentiel Medium, JOKLIED modifié (139) distribué par GIBCO.

Ce milieu est additionné de sérum de cheval, décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes, à la concentration de 5 pour 100.

2 - Extraction des enzymes

Les cellules KB utilisées pour l'extraction des enzymes sont à une concentration de 4 à $5 \cdot 10^5$ cellules par ml. Les proportions que nous donnons dans le protocole expérimental, sont calculées pour 4 litres de suspension de culture.

Les cellules sont concentrées par centrifugation à 1500 tours/minute et lavées 2 fois dans du NaCl 0,14 M, et une fois dans le tampon d'extraction des noyaux. *(TMMT : dont la composition est donnée ci-après)

Les RNA polymérase sont extraites des noyaux des cellules KB selon la méthode de ROEDER et RUTTER (140), modifiée par CHESTERTON et al (141). Toutes les opérations se déroulent à 0°C.

Les solutions utilisées sont les suivantes :

* TMMT	Tris-HCl pH 8	10 mM
	Acétate de Mg	10 mM
	β - Mercaptoéthanol	10 mM
	Triton X - 100	0,2 pour 100

TSDM	<u>T</u> ris-HCl pH 8	10 mM
	<u>S</u> ucrose	1 M
	Chlorure de <u>M</u> g	5 mM
	<u>D</u> ithiothréitol	1 mM
* TG MED	<u>T</u> ris-HCl pH 8	10 mM
	<u>G</u> lycérol	25 pour 100
	Chlorure de <u>M</u> g	5 mM
	<u>E</u> DTA	0,1 mM
	<u>D</u> ithiothréitol	1 mM

a - Isolement des noyaux

Le culot cellulaire, une fois lavé, est repris dans 30 ml de tampon TMMT et homogénéisé dans un broyeur de POTTER - ELVEHJEM, en opérant 5 aller-retours à une vitesse moyenne. Par centrifugation à 2.500 rpm pendant 5 minutes dans une Sorvall SS 34, on obtient le culot nucléaire.

b - Isolement des RNA polymérase

Le culot nucléaire est resuspendu dans le tampon de lyse des noyaux TSMD de manière à obtenir un volume final de 11 ml auquel on additionne 1 ml de Sulfate d'ammonium 3,5 M. Cette suspension de noyaux est lysée par les Ultra-sons (20 K cycles, 1 min). L'observation par microscopie optique permet de suivre le pourcentage de désintégration des noyaux.

24 ml de tampon TG MED sont additionnés au lysat nucléaire. Cette suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 30.000 g (16.000 rpm dans la Sorvall SS 34). Le culot de désoxyribonucléoprotéines est éliminé. Après évaluation

du volume de surnageant toutes les protéines sont précipitées par addition de 0,42 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par ml de surnageant. La dissolution du sulfate d'ammonium s'opère sous courant d'azote et sous agitation pendant 30 minutes. La suspension est à nouveau centrifugée pendant 30 minutes à 30.000 g. Le culot de protéines est redissout dans un faible volume (3 à 4 ml) de tampon TGMED, 0,14 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et dialysé pendant une nuit contre ce même tampon. La membrane de dialyse a été portée à ébullition au préalable dans une solution de EDTA/Bicarbonate, afin d'éliminer d'éventuelles impuretés enzymatiques.

La figure 2 page 38 résume les principales étapes de cette extraction.

La solution non dialysable est à nouveau centrifugée à 30.000 g pendant 30 minutes afin d'éliminer les protéines réprecipitées.

Le surnageant contenant les extraits bruts enzymatiques est congelé à -196°C dans l'azote liquide. Dans ces conditions, les enzymes restent stables pendant plusieurs mois.

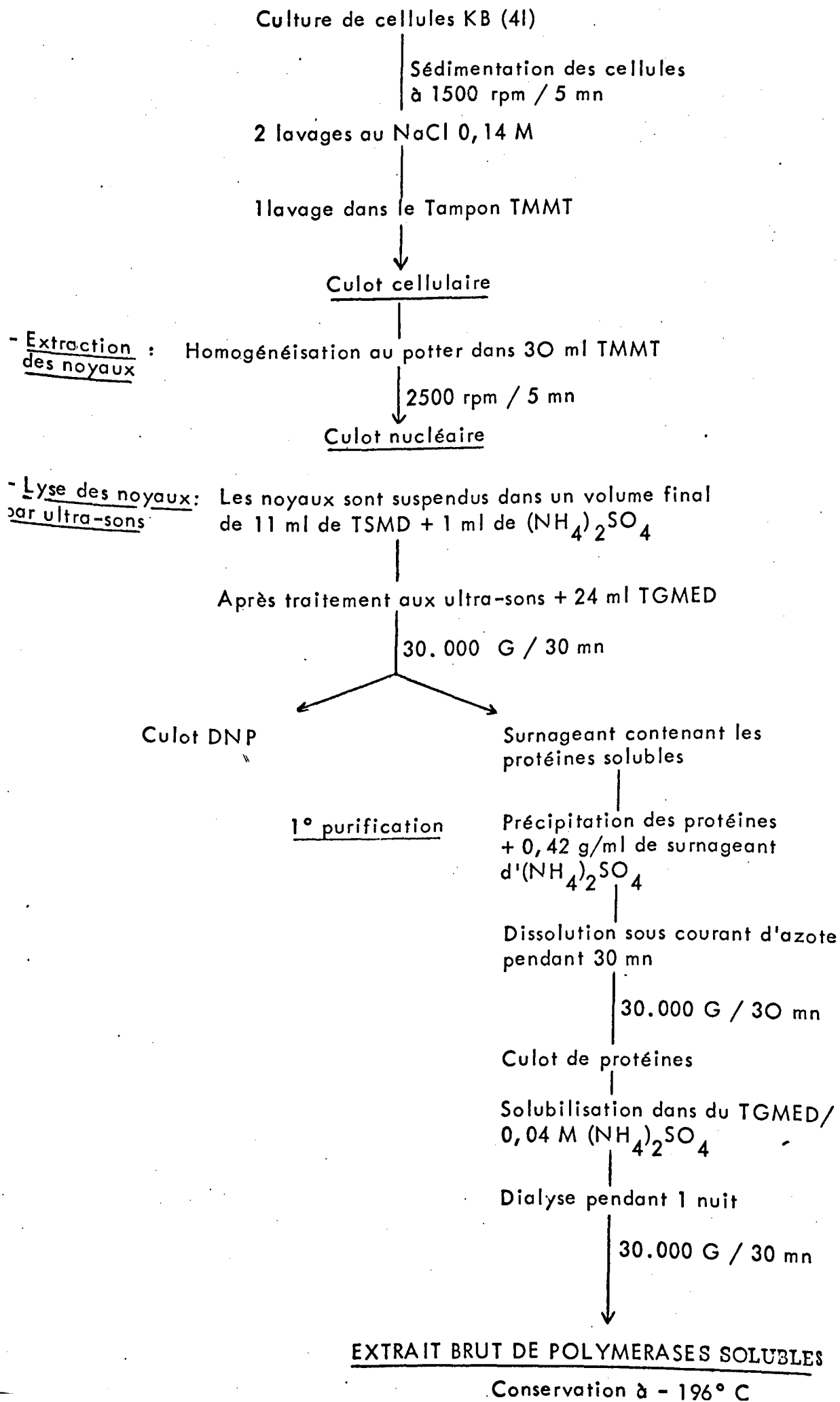
Remarque : Nous appellerons cette fraction enzymatique "extraits bruts" par opposition aux enzymes purifiées sur colonnes échangeuses d'ions, ou sur gradient linéaire de glycérol.

FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS BRUTS RNA POLYMERASIQUES

1 - Par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE-Cellulose ou sur colonne de DEAE-Séphadex

Les RNA polymérases peuvent être purifiées par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions. Les DEAE-Celluloses DE-52 (Whatman, England) ou les DEAE-Séphadex A 25 (Pharmacia, Upsala) ont été activées et régénérées au préalable avant d'être équilibrées dans le tampon TGMED, 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Fig. 2 Schéma général d'extraction des ARN polymérase



30 mg d'extrait brut sont déposés sur une colonne de DEAE-Séphadex A-25 (1 x 15 cm) ou sur une colonne de DEAE-Cellulose DE 52 (1,4 x 7 cm).

Les protéines non fixées sur la colonne, sont éliminées par rinçage de la colonne avec 100 ml de tampon TGMED, 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Les enzymes sont alors éluées par un gradient linéaire de Sulfate d'ammonium dans le tampon TGMED de 0,4 M à 0,5 M (2 x 80 ml). Des fractions de 1,5 ml environ sont recueillies dans une solution de sérum albumine (1 mg par ml de concentration finale). L'activité enzymatique est repérée sur chaque fraction ; les conditions sont décrites dans le paragraphe page

2 Par sédimentation sur gradient linéaire de glycérol

Après 2 heures de dialyse à 4°C contre le tampon Tris

Tris-HCl pH 8	0,05 M
MgCl ₂	5 M
EDTA	0,1mM
Dithiothréitol	1 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 M

les extraits enzymatiques (10 mg de protéines/ml) sont centrifugés en gradient linéaire de glycérol dans ce même tampon. Les gradients de glycérol (10 à 40 %) ont été centrifugés pendant 15 h 30 à 32.000 rpm à 0°C dans le "rotor SW 41" : (dépot de 5 mg de protéines par gradient).

Les gradients de glycérol (10 à 30 %) ont été centrifugés 4 h 30 à 40.000 rpm à 4°C dans le "rotor SW 50" ; (dépot de 3 mg de protéines par gradient).

Dans les deux cas, on dépose le gradient sur un coussin de 1 ml de glycérol à 60 %.

Pour protéger l'activité enzymatique, on ajoute au gradient ainsi que dans le milieu d'incubation, de la sérum-albumine bovine dans des concentrations respectives de 0,5 mg/ml selon la méthode de SUMMERS et al (142) et de CHAMBERLIN et al (143)

3 - Synthèse des RNA in vitro par les RNA polymérase des cellules KB

- Extraction et purification du DNA utilisé comme matrice

Le DNA cellulaire est extrait des cellules KB par traitement par le mélange sarkosyl pronase selon la méthode de YOUNG et SINSHEIMER (144).

Les solutions utilisées sont les suivantes :

TEBS	Tris-HCl pH 7,4	0,01 M	
	EDTA	0,001 M	
	NaCl	0,3 M	2 SSC
	Citrate de Na	0,03 M	
SSC	NaCl	0,015 M	
	Citrate de Na	0,0015 M	

Les cellules KB, lavées dans du NaCl 0,14 M, sont homogénéisées rapidement dans un volume de tampon TEBS égal à 9 fois le volume de culot cellulaire, contenant 0,5 p 100 de Sarkosyl et 0,3 mg/ml de pronase autodigérée.

Dans un premier temps la suspension est incubée à 4°C pendant 30 min. afin d'inactiver les DNases, ensuite elle est portée à 37°C pendant 3 à 4 heures.

Le lysat cellulaire est ajusté avec du Chlorure de Césium en poudre à raison de 1,2725 g/ml de manière à obtenir une densité égale à 1,70.

Après dissolution du Chlorure de Césium, la suspension est centrifugée à 20°C pendant 40 heures à 39.000 rpm dans un rotor SW 65.

Le DNA est recueilli et mis en dialyse pendant une nuit contre un grand volume de tampon 0,1 SSC (1 litre) et conservé ensuite à 4°C

L'intégrité du DNA cellulaire est contrôlée par centrifugation en gradient linéaire de 5 à 20 p 100 de saccharose neutre (Tris pH 7,5 : 0,01 M ; NaCl : 1 M ; EDTA : 1 mM) et de saccharose alcalin (NaOH : 0,2 N ; NaCl : 0,8 M ; EDTA : 1mM). Les gradients sont sédimentés à 50.000 rpm pendant 2 heures à 20°C dans un rotor SW 65.

- Conditions de synthèse in vitro

L'activité RNA polymérisique est estimée par le taux d'incorporation d'³H-UMP dans les RNA synthétisés in vitro, par chaque fraction d'élution de colonne ou de gradient.

Cette synthèse s'effectue à 37°C pendant 1 heure dans un volume final de 0,15 ml contenant 0,05 ml d'enzyme et 0,1 ml du milieu de synthèse suivant :

Tris-HCl pH 8	50	mM
MgCl ₂	6	mM
MnCl ₂	3	mM
DTT	4	mM
ATP, GTP, CTP	0,4	mM
5'-H ³ UTP	0,015	mM
activité spécifique (1Ci/mM)Amersham		
DNA $\left\{ \begin{array}{l} \text{natif} \\ \text{monocaténaire} \end{array} \right.$	0,01	mg/ml

La concentration en Sulfate d'ammonium est égale au 1/3 de la concentration optimale d'élution (cette force ionique correspond à l'optimum d'activité de chaque enzyme).

Le DNA monocaténaire est obtenu par chauffage du DNA 5 minutes à 100°C, puis refroidi brusquement dans un mélange eau-glace.

L' α -amanitine, généreusement offerte par Monsieur le Professeur WIELAND, est utilisée à raison de 0,8 μ g/ml.

- Mesure de la radioactivité

La synthèse est arrêtée par addition de 2ml d'acide trichloracétique à 10 p 100 contenant 0,02 M de pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) en présence de 0,1 mg de sérum albumine bovine comme entraîneur de précipitation des RNA.

Après 15 minutes de précipitation à 0°C, le matériel acido-précipitable est recueilli sur filtre de fibre de verre Whatman GF/C, lavé 12 fois par 5 ml d'acide trichloracétique à 2 p 100 et séché par 2 rinçages à l'éthanol absolu.

Les filtres sont ensuite séchés dans une étuve à 56°C pendant 15 min. et placés dans les fioles à scintillation contenant 5 ml de liquide scintillant de composition suivante :

PPO	5 g
POPOP	0,3 g
Toluène	qsp 1 Litre

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide type INTERTECHNIQUE SL 30.

L'activité enzymatique est exprimée en cpm (coups par minute) ^3H -UMP incorporé dans la fraction de RNA précipités.
(1 pico mole d'UMP correspond approximativement à 10^3 cpm).

C - EXTRACTION DES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB INFECTEES
PAR L'ADENOVIRUS 2

1 - Infection virale

La souche d'adénovirus 2 qui sert à infecter les cellules KB est la souche prototype de "l'Américain Type Culture Collection"

La concentration cellulaire est maintenue entre 2 et $5 \cdot 10^5$ cellules par ml. Pour l'infection, les cultures cellulaires sont centrifugées pendant 15 minutes à 500 g à température ambiante.

Les cellules sont ensuite remises en suspension à une concentration de 10^7 cellules par ml dans un milieu additionné de 1 % de sérum de veau foetal (GIBCO) puis infectées à une multiplicité de 10 particules infectieuses par cellule.

La suspension est agitée pendant 1 heure à 37°C de façon à permettre l'absorption virale. Les cellules sont ensuite diluées à $2 \cdot 10^5$ cellules par ml dans du milieu F₁₃ contenant 5 % de sérum de cheval préalablement chauffé à 37°C .

2 - Extraction des RNA polyméras

Après 6 heures ou 18 heures d'infection, les cellules sont recueillies par centrifugation à 500 g pendant 5 minutes à 0°C .

Le culot cellulaire est lavé 2 fois par un tampon Tris 0,01 M pH 8,1, NaCl 0,15 M.

Les RNA polyméras des cellules KB infectées par adénovirus 2 sont extraites par les mêmes méthodes que celles qui sont décrites précédemment pour les RNA polyméras des cellules KB non infectées.

D - MISE EN EVIDENCE D'ENZYMES CONTAMINANT LES EXTRAITS DES
RNA POLYMERASES

Dans le but de déterminer la nature du nucléotide 5' terminal

VERBERT (145) a choisi de ne pas purifier les RNA polymérases au delà de la séparation sur DEAE Séphadex, afin d'éviter la perte de facteurs protéiques pouvant jouer un rôle dans le déclenchement de la synthèse.

Par contre, il était nécessaire de prendre garde aux activités enzymatiques contaminantes, capables d'interférer et de fausser les résultats.

Nous avons soupçonné la présence d'une activité " γ -phosphotransférasique" qui, au cours de l'incubation nécessaire à la synthèse des RNA, transfère et échange le groupement (γ -³²P) d'un nucléotide sur un autre. Il fallait donc évaluer cette activité afin d'introduire les corrections nécessaires.

Nous avons également révélé la présence d'une protéine kinase qui transfère le groupement (γ -³²P) sur des protéines.

1 - Préparations des γ -³²P XTP

La méthode de GLYNN et CHAPPELL (146) a été quelque peu modifiée afin de l'utiliser sans purification ultérieure. Le principe de cette méthode a été résumé dans la figure 3 page 45 . Cette méthode est décrite en détail dans la thèse d'Etat de A. VERBERT (147) ainsi que toutes les analyses de pureté et de rendement des γ -³²P XTP obtenus. Cependant, il faut remarquer que l'on n'est jamais arrivé à synthétiser du γ -³²P CTP.

2 - Mise en évidence de l'activité γ -Phosphotransférasique

Le transfert du groupement γ -³²P se traduit par l'apparition, au cours de la réaction de synthèse du RNA, de nucléosides 5'-triphosphates autres que celui introduit initialement dans le milieu réactionnel. (Ce milieu est le même que celui décrit précédemment page 41 en remplaçant un des XTP par un γ -³²P XTP).

Le taux des nouveaux nucléotides radioactifs peut être évalué à tout moment de la réaction en soumettant une fraction du mélange réactionnel à la chromatographie décrite ci-dessous.

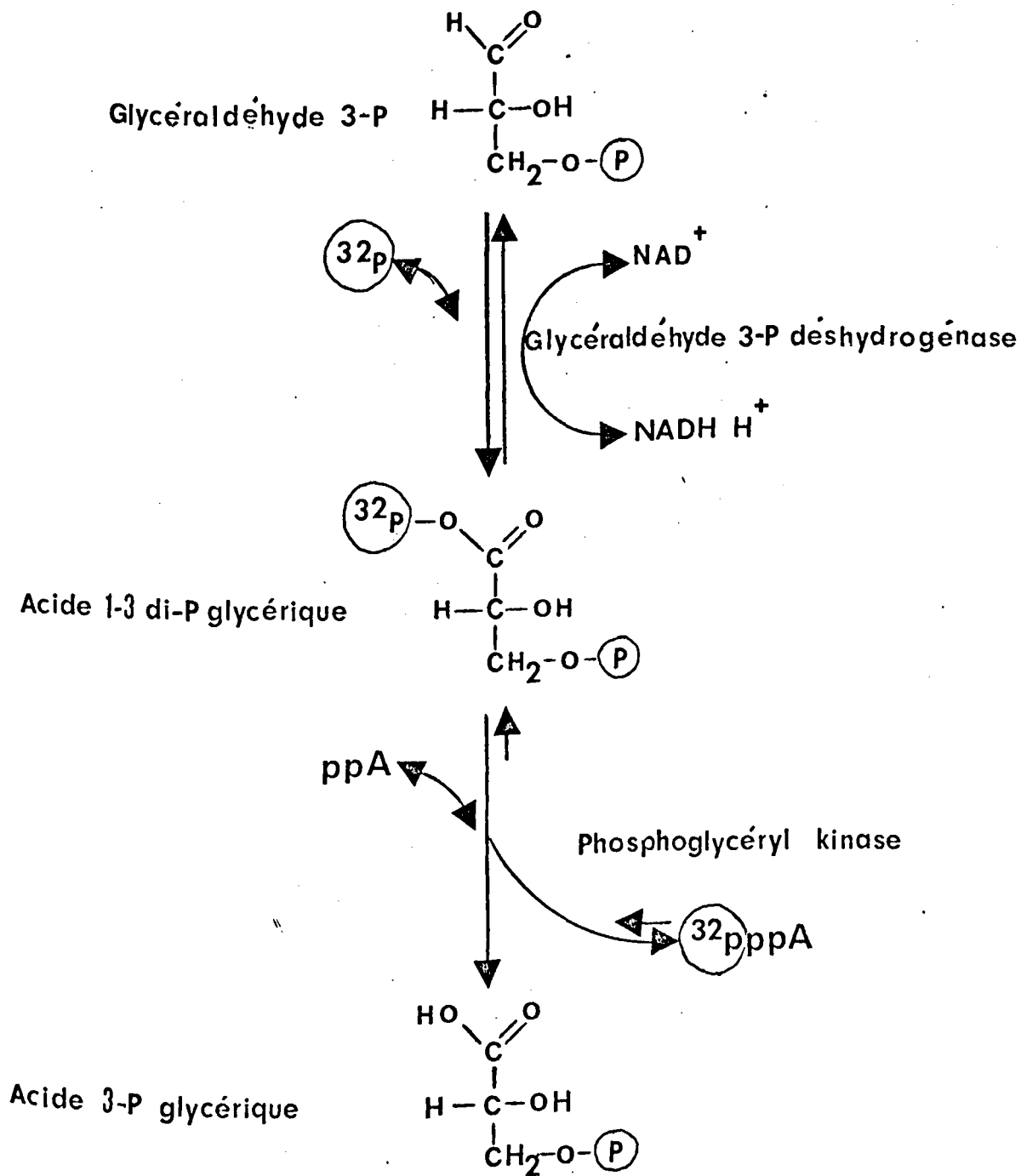


Figure n° 3 : Principe de la synthèse du $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP selon la méthode de GLYNN et CHAPPELL (148).

3 - Chromatographie des nucléosides triphosphates

Nous avons utilisé la chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 de ROBERTSON et ZINDER (149) dans le système solvant suivant:

- Phosphate de sodium	0,1 M pH 6,8	1000 ml
- Sulfate d'ammonium		600 g
- n-Propanol		20 ml

Pourquoi avons nous choisi cette méthode ?

La méthode électrophorétique ne sépare pas bien les XTP et le radiophosphore qui possèdent approximativement la même charge globale.

De plus , par chromatographie, nous pouvons séparer à la fois GTP, ATP et ^{32}P . Le tampon, contenant du phosphate, permet la migration du ^{32}P avec le front du solvant. voir Fig. 4 page 47

Lorsque le front du solvant atteint presque l'extrémité de la feuille, on arrête la chromatographie, on sèche le chromatogramme, on le découpe ensuite en bandes de 5 cm de largeur le long du trajet de migration. La radioactivité de chaque bandelette est déterminée selon la méthode de CERENKOV (150) c'est-à-dire par comptage dans l'air et sur le canal "Tritium".

Connaissant les R_F des nucléosides 5'-triphosphates et sachant que l'acide phosphorique migre avec le front du solvant, on peut calculer le taux de conversion entre les nucléosides triphosphates (voir Fig. 5 , page 48

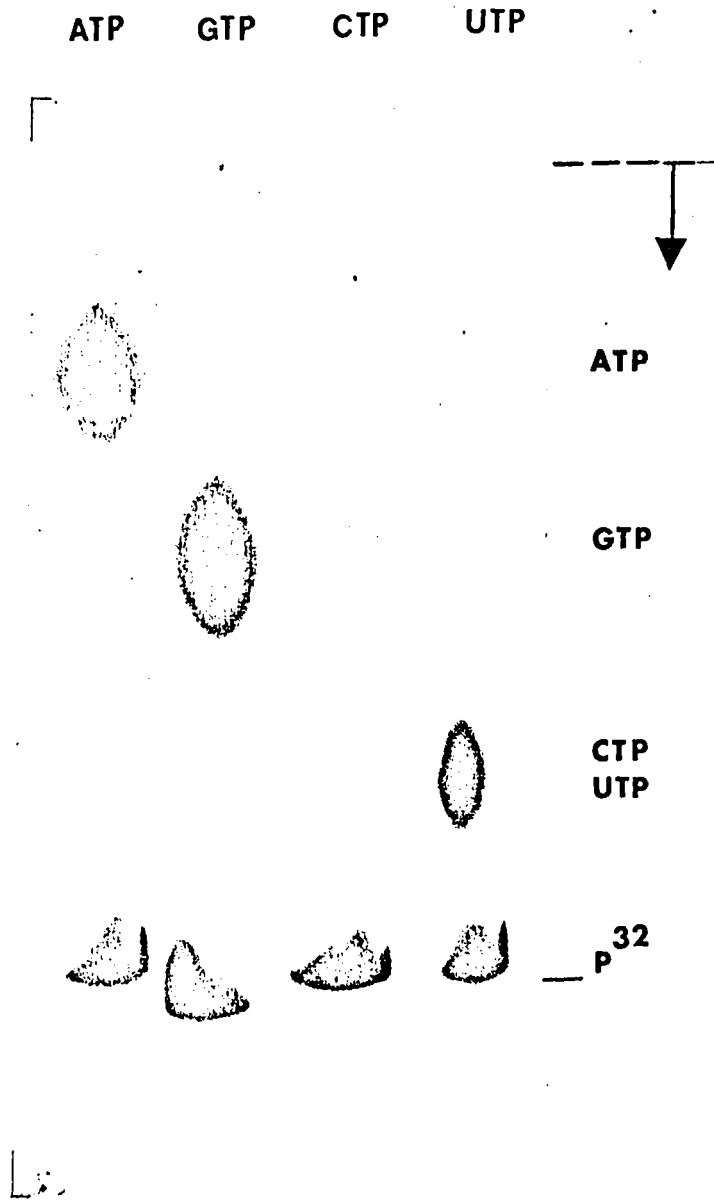


Figure n° 4

Séparation des γ -³²P XTP par chromatographie descendante sur papier
Whatman n° 1

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.

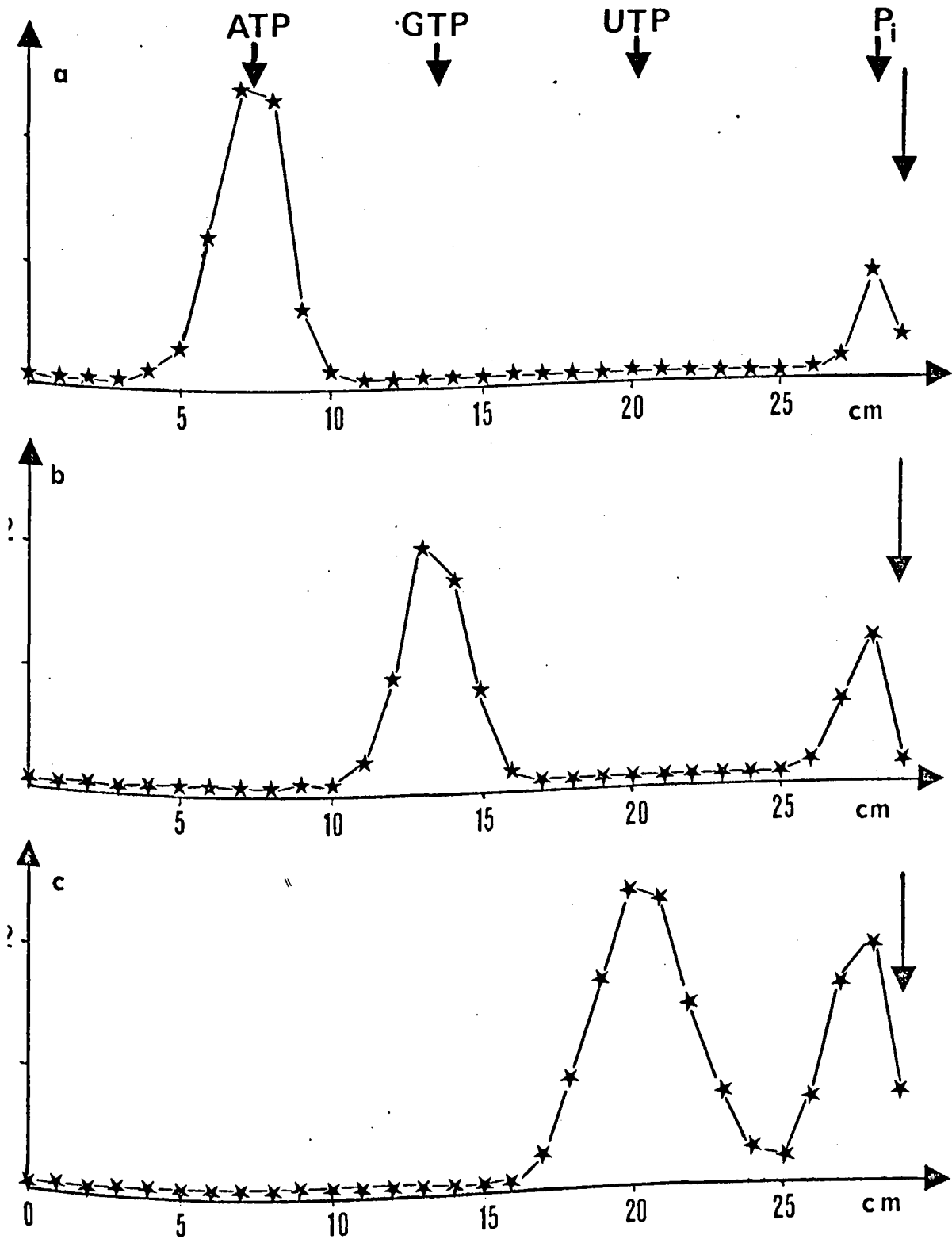


Figure n° 5

Répartition de la radioactivité entre les divers nucléotides et le radio-phosphore au cours d'une incubation avec un extrait de RNA polymérase I au temps 0 minute.

L'incubation a lieu en présence de γ - ^{32}P ATP (figure a) ou de γ - ^{32}P GTP (figure b) ou de γ - ^{32}P UTP (figure c), la séparation est obtenue par chromatographie sur papier (voir Fig. 4 p 47)

la flèche indique le front de migration du solvant.

RESULTATS

A - MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES MULTIPLES
DANS LES NOYAUX DE CELLULES KB

Pour caractériser les différentes RNA polymérase, nous avons choisi d'utiliser la chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions (DEAE-Séphadex A 25, DEAE-Cellulose DE 52) ou la sédimentation en gradient linéaire de glycérol.

1 - Caractérisation par chromatographie sur colonnes
échangeuses d'ions des RNA polymérase de KB

a) Chromatographie sur colonne de DEAE-
Cellulose DE 52

L'élution, par un gradient linéaire de 0 à 0,5 M en sulfate d'ammonium, d'une colonne de DEAE cellulose DE 52 ayant fixé l'extrait brut RNA polymérasique, nous a permis de mettre en évidence deux pics d'activité enzymatique (voir Fig. 6 page 51).

- Le premier pic élué à une concentration voisine de 100 mM en sulfate d'ammonium correspond à une activité de type RNA polymérase I.

- Le deuxième pic élué à une concentration voisine de 250 mM en sulfate d'ammonium correspond à une activité de type RNA polymérase II.

Ces deux activités RNA polymérasiques se différencient très nettement par leur sensibilité vis-à-vis de l' α -amanitine à 0,8 μ g/ml. L'activité de type I est résistante alors que celle de type II est totalement sensible à cette toxine. Cette propriété sera très souvent utilisée comme un bon critère de distinction entre les activités RNA polymérasiques.

Il convient également de noter que ces deux enzymes ont des réponses différentes vis-à-vis de la matrice de DNA : la RNA polymérase I est beaucoup plus active (environ 2 fois) avec un DNA, cellulaire

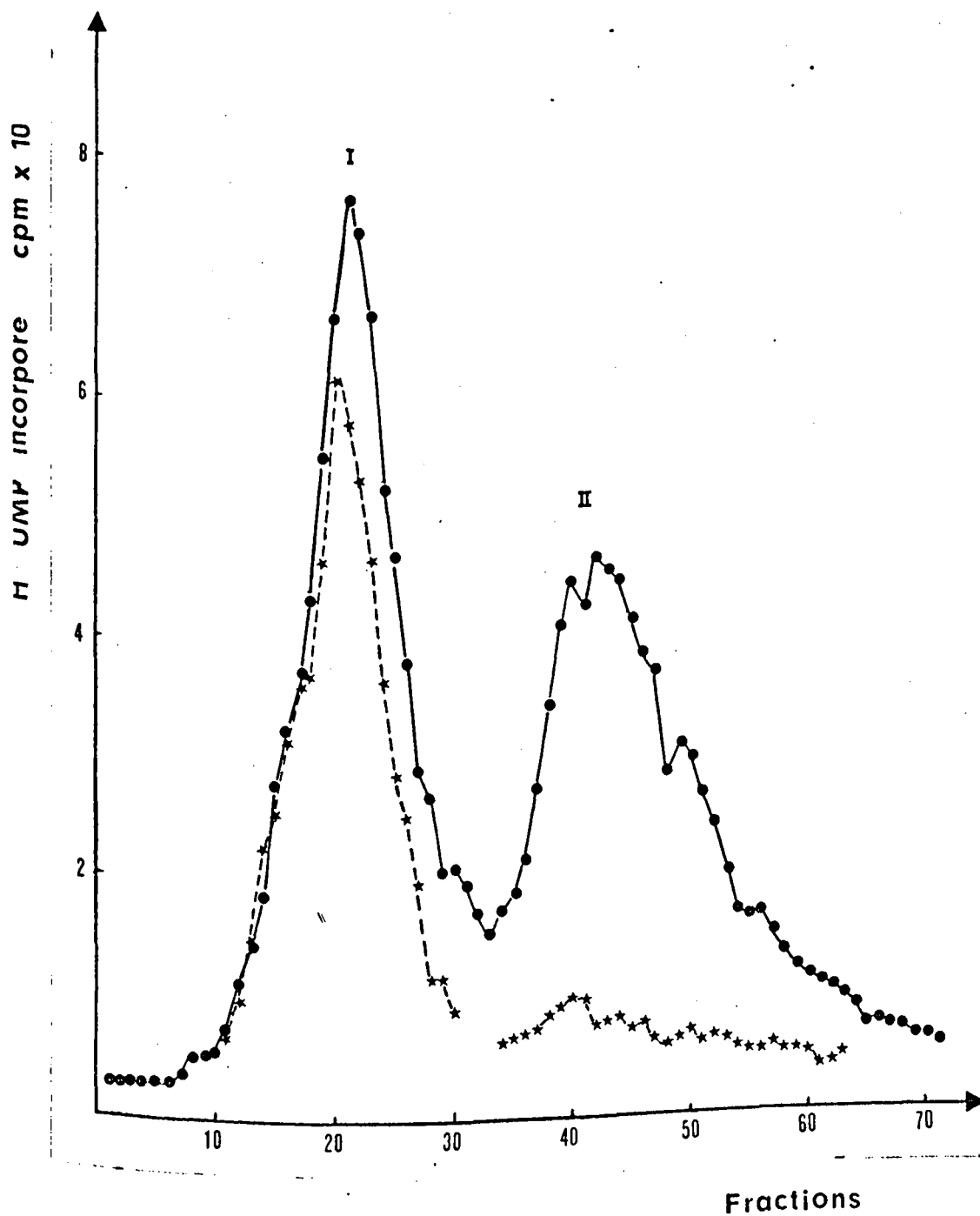


Figure n° 6

Profil d'élution des RNA polymérase de cellules KB sur DEAE-Cellulose DE-52. 50 μ l de chaque fraction sont soumis à un essai enzymatique dans 100 μ l de milieu réactionnel

● — ● en présence de DNA natif (10 μ g / ml)

* - - * en présence de DNA natif + 0,8 μ g / ml d' α -amanitine

Les enzymes sont éluées de la colonne par un gradient de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 40 à 500 mM .

natif, alors que la RNA polymérase II présente peu d'activité avec ce type de DNA. La figure 7 page 53 nous montre que l'activité de la RNA polymérase II croît avec le degré de dénaturation du DNA. La dénaturation thermique ou la déstabilisation du DNA à basse force ionique (H_2O distillée) augmentant le nombre de chaînes monocaténaïres, favorisent la transcription par la RNA polymérase II.

b) Chromatographie sur colonne de DEAE-Séphadex A 25

La chromatographie des extraits bruts de RNA polymérases sur DEAE-Séphadex A 25 nous permet d'identifier trois types d'activité enzymatique. La figure 8 page 54 nous montre :

- un premier pic correspondant à la RNA polymérase I, élue vers 100 mM en $(NH_4)_2SO_4$.
- un deuxième pic dissymétrique correspondant aux RNA polymérases II et III, élues entre 200 et 300 mM en $(NH_4)_2SO_4$.

Les activités RNA polymérasiques de type II et III ne peuvent être dissociées en deux pics dans ces conditions. Toutefois, la dissymétrie du deuxième pic et l'épaule correspondant à une élution de 300 mM en $(NH_4)_2SO_4$, nous ont amené à soupçonner l'existence de la RNA polymérase III. En effet, en présence d' α -amanitine à 0,8 $\mu g/ml$, nous observons une partie du pic totalement sensible, alors que la seconde moitié correspondant à l'éluat de 300 mM en $(NH_4)_2SO_4$, est résistante.

Nous sommes donc bien en présence de deux types enzymatiques différents : la RNA polymérase II sensible à l' α -amanitine et la RNA polymérase III résistante à cette toxine.

Nous avons voulu vérifier si la RNA polymérase III était principalement accumulée dans le noyau. Pour confirmer ceci, d'une manière simple, nous avons extrait les RNA polymérases sur des cellules entières et sur un mélange de cellules et de noyaux dans les proportions : 1/3 + 2/3. Nous avons purifié les différents extraits bruts sur colonne de DEAE-Séphadex et nous avons repéré les différentes activités. En comparant les figures 9 A et 9 B page 55, nous n'observons aucune modification, pas

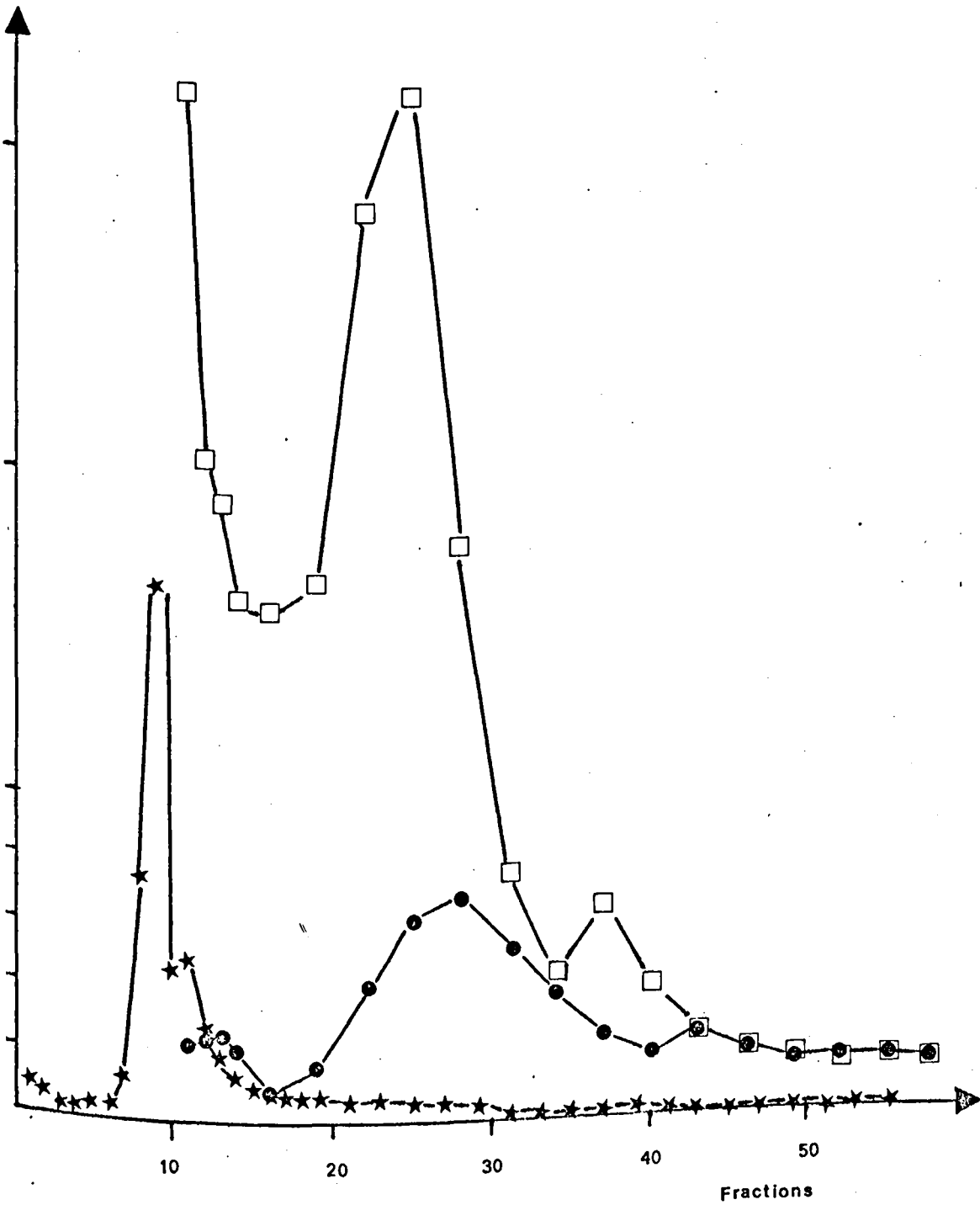


Figure n° 7

Profil d'élution des RNA polymérase de cellules KB sur DEAE-Cellulose DE-52

Activité enzymatique en présence de

- * — * DNA cellulaire natif $10 \mu\text{g/ml}$
- — ● DNA de thymus de veau dénaturé par chauffage à 100°C pendant 5 min. ($10 \mu\text{g/ml}$)
- — □ DNA de thymus de veau dissout dans l'eau distillée ($10 \mu\text{g/ml}$)

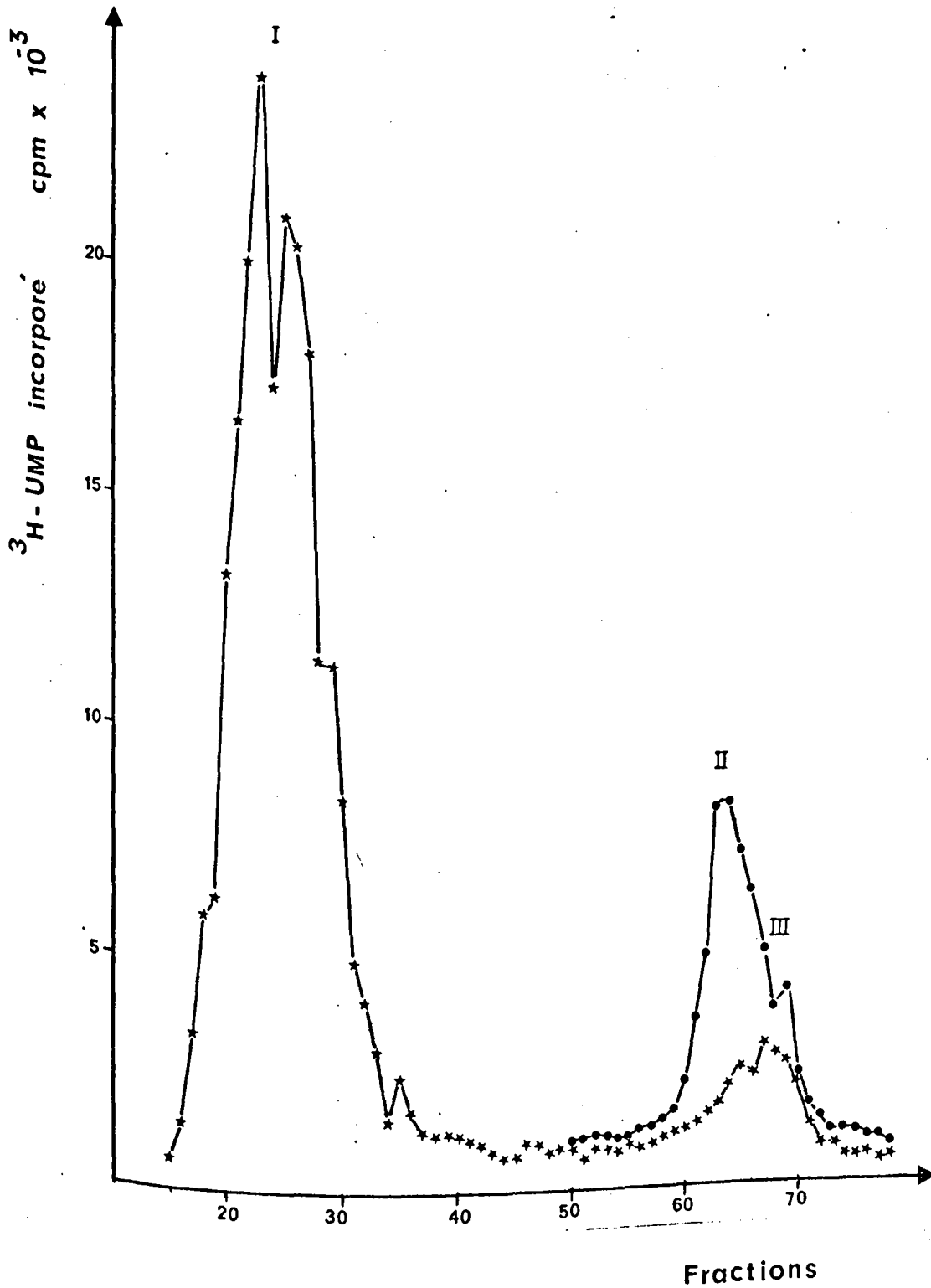


Figure n° 8

Profil d'éluion des RNA polymérasés de cellules KB sur DEAE-Sephadex A-25

Activité enzymatique en présence de :

- — ● DNA cellulaire natif (10 μ g/ ml)
- * — * DNA cellulaire natif + 0,8 μ g/ml d' α -amanitine

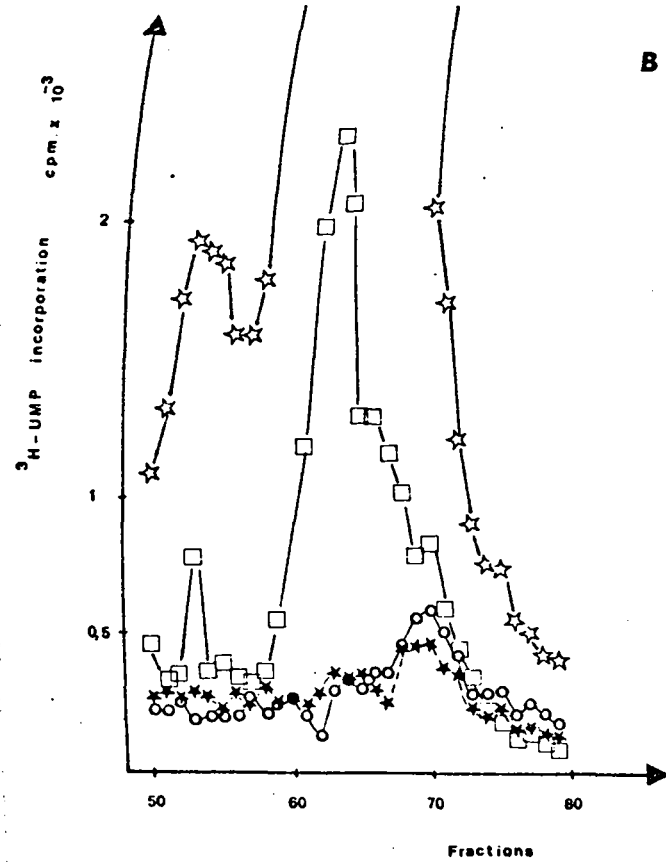
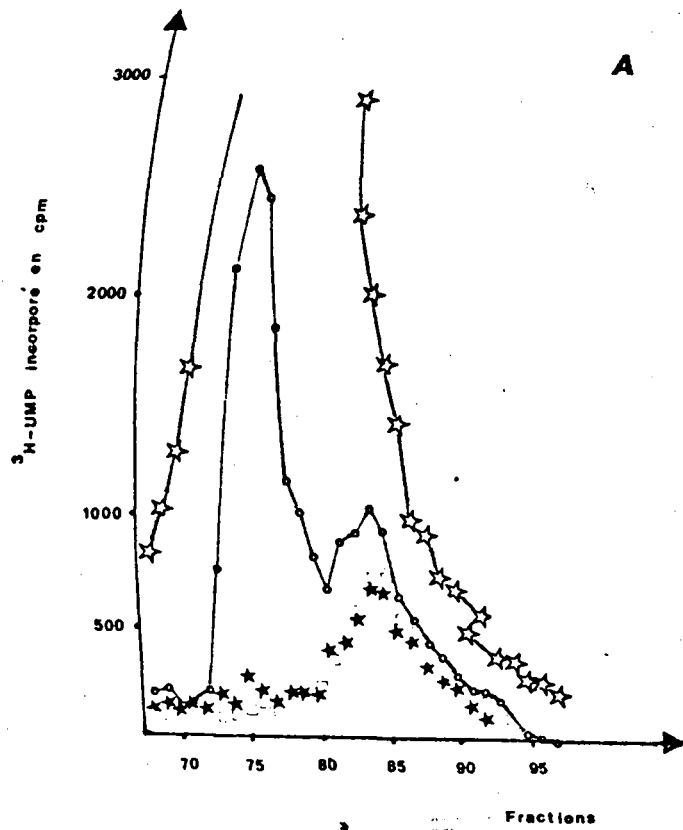


Figure n° 9

Profil d'éluion sur DEAE Séphadex A 25 des RNA polymérasés II et III extraites
à partir du mélange cellules-noyaux (A)

à partir des cellules entières (B)

Activité en présence de :

- | | | | |
|-------|--|-------|--------------|
| ☆ — ☆ | DNA dénaturé de KB | ☆ — ☆ |] (10 µg/ml) |
| ○ — ○ | DNA natif de KB | □ — □ | |
| ★ — ★ | DNA natif de KB + 0,8 d'α-amanitine | ★ — ★ | |
| □ — □ | DNA dénaturé de KB + 0,8 d'α-amanitine | ○ — ○ | |

même d'ordre quantitative au niveau du deuxième pic, résistant à l' α -amanitine. Cette activité est bien d'origine nucléaire, de type RNA polymérase III.

2 - Sédimentation en gradient de glycérol

Par centrifugation des extraits bruts des RNA polymérases des cellules KB, en gradient linéaire de glycérol 10 à 40 pour 100, nous avons pu également distinguer 3 types de RNA polymérases.

Les activités RNA polymérasiques contenues dans chaque fraction du gradient ont été mesurées dans des conditions de force ionique, de matrice de DNA correspondantes aux optima de fonctionnement de chaque enzyme.

La figure 10 page 57 nous montre 3 pics :

- Un pic léger de constante de sédimentation de 14,5 S qui transcrit le DNA cellulaire natif à basse force ionique (33 mM en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Cette activité est résistante à l'action de l' α -amanitine et correspond à une activité de type polymérase I.
- Un second pic d'activité, de constante de sédimentation de 15,5 S qui transcrit préférentiellement le DNA dénaturé à une force ionique plus élevée de l'ordre de 120mM. Cette activité est totalement sensible à l' α -amanitine et correspond à la polymérase II.
- Le troisième pic d'activité, dont la constante de sédimentation est de 17 S est mis en évidence à haute force ionique (200 mM environ), en présence de DNA cellulaire natif. Cette enzyme est résistante à l' α -amanitine et correspond à la RNA polymérase III.

Les valeurs des constantes de sédimentation sont en accord avec celles données par CHAMBON et al (151)

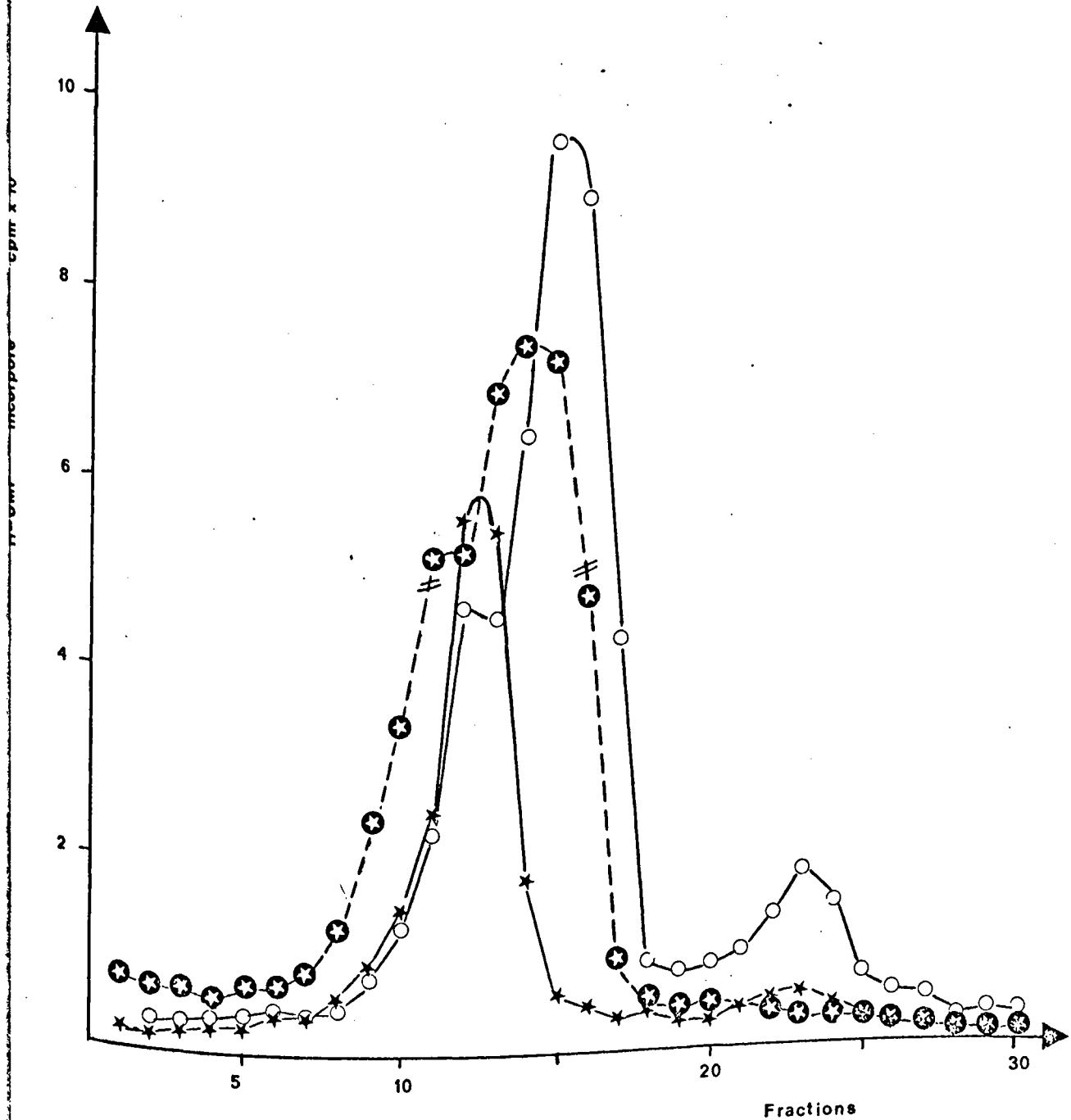


Figure n° 10

Sédimentation en gradient de glycérol (10 à 40 p. 100) d'un extrait RNA polymé-
rasique de cellules KB .

Activité enzymatique mesurée en présence de :

- — ○ DNA natif de KB (20 µg/ml) à 33 mM en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,8 µg/ml d'α-amanitine
- ★ - - - ★ DNA dénaturé de KB (50 µg/ml) à 120 mM en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- ★ — ★ DNA natif de KB (10 µg/ml) à 200 mM en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,8 µg/ml d'α-amanitine

B - ACTION DE LA FORCE IONIQUE SUR L'EFFICACITE DE TRANSCRIPTION DE LA MATRICE DE DNA PAR LES RNA POLYMERASES DE KB

1 - Transcription du DNA de cellules KB

En présence de DNA cellulaire natif, les activités optimales de 3 RNA polymérasés de KB, isolées sur colonne de DEAE-Séphadex, diffèrent en fonction de la force ionique comme le montre la figure 11 page 59 .

Les optima pour les RNA polymérasés I et II se situent entre 10 et 60 mM et entre 80 et 120 mM en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ respectivement.

La polymérase III, quant à elle, présente un optimum d'activité pour une gamme de force ionique beaucoup plus large se situant entre 70 et 250 mM en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (L'activité de la RNA polymérase III est toujours estimée en présence d' α -amanitine à 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ afin d'éliminer toute interférence avec la RNA polymérase II).

En présence de DNA cellulaire dénaturé par la chaleur, nous observons des profils d'activités identiques.

2 - Transcription du DNA d'adénovirus 2

Les activités des RNA polymérasés I, II et III de KB, en présence d'un DNA plus homogène, tel que le DNA d'adénovirus comme matrice, se situent dans des limites plus restreintes de 10 à 40 mM en sulfate d'ammonium - Figure 11 page 59 -

Il est intéressant de remarquer que les 3 enzymes possèdent approximativement une activité optimale à 20 mM en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de MANDEL et CHAMBON (152) concernant la transcription du DNA forme I de SV₄₀ par la RNA polymérase de thymus de veau.

La présence d'interruptions monocaténares dans le DNA d'adénovirus 2 contribue à un déplacement de l'optimum de fonctionnement des RNA polymérasés I, II, et III vers les forces ioniques plus élevées, D'HALLUIN (153).

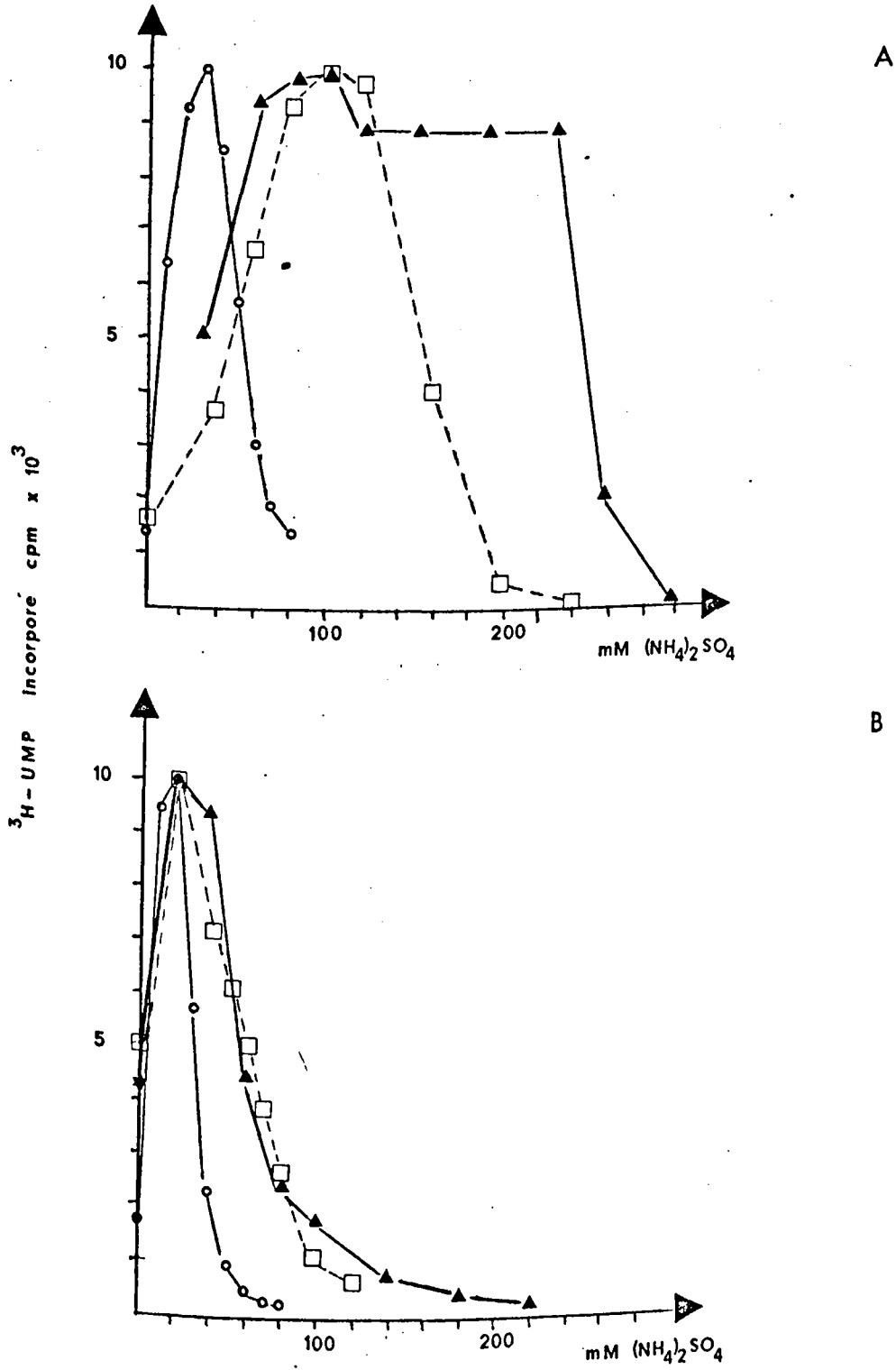


Figure n° 11

Action de la concentration en sulfate d'ammonium sur les RNA polymérase I, II et III de cellules KB en présence de 50 µg/ml de DNA cellulaire natif Fig.A - ou de 5 µg/ml de DNA d'adénovirus 2 intact -Fig.B-

- — ○ Polymérase I
- - - - □ Polymérase II
- ▲ — ▲ Polymérase III

C - INTERVENTION DE COFACTEURS METALLIQUES LORS DE LA TRANSCRIPTION DU DNA PAR LES RNA POLYMERASES DE KB

1 - En présence de $MgCl_2$

- Avec un DNA de KB comme matrice, la RNA polymérase I montre un optimum d'activité pour des concentrations en $MgCl_2$ de 2 à 8 mM alors que la RNA polymérase II présente un optimum de 2 à 12 mM en $MgCl_2$. Quant à la RNA polymérase III, elle fonctionne d'une manière optimum à partir de 2 mM en $MgCl_2$.

- En présence de DNA d'adénovirus 2 comme matrice, les activités des 3 RNA polymérases sont différentes pour les mêmes optima de concentration (voir figure 12 page 61).

La RNA polymérase III est 2 fois plus active avec le DNA d'adénovirus 2 qu'avec le DNA de KB comme matrice, pour les mêmes concentrations en Mg^{++} ; inversement les polymérases I et II sont moins actives en présence de DNA d'adénovirus 2 comme matrice.

2 - En présence de $MnCl_2$

L'optimum de fonctionnement des RNA polymérases varie entre 1 et 3 mM en Mn^{2+} . Néanmoins, les activités optimales sont dépendantes du type de DNA et de l'enzyme. (voir figure 12 page 61)..

- Avec la RNA polymérase I, le DNA de KB est mieux transcrit que le DNA d'adénovirus.

- La polymérase II est 3 fois plus active que les 2 autres RNA polymérases, avec l'ion Mn^{++} quel que soit le type de matrice.

- Quant à la polymérase III, elle est plus active avec le DNA d'adénovirus qu'avec le DNA de KB.

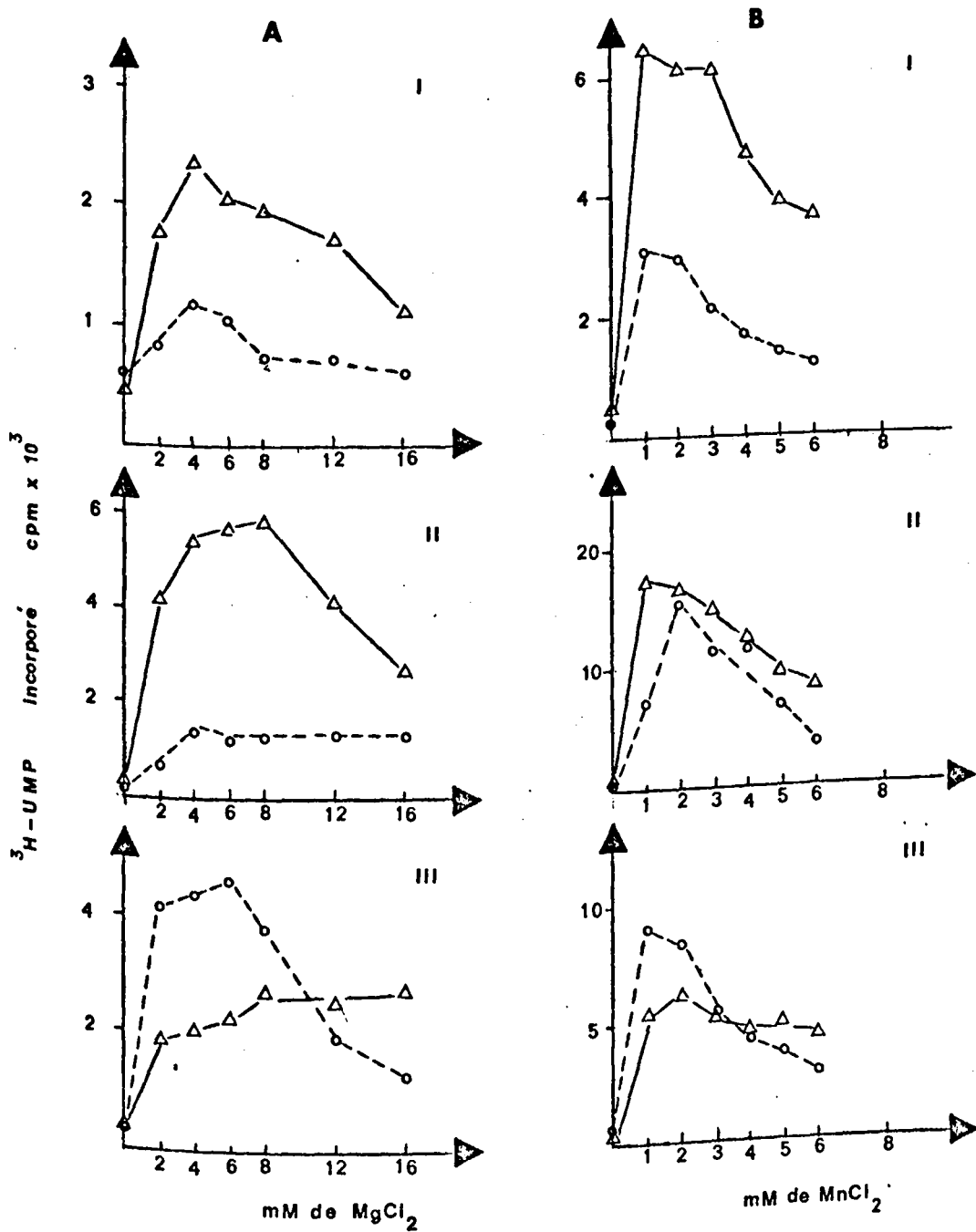


Figure n° 12

ion de la concentration en ions Mg^{++} (Fig.A), Mn^{++} (Fig.B) en présence de DNA de (10 μ g/ml) et de DNA d'adénovirus 2 (5 μ g/ml)

Activité de la Polymérase I

Activité de la Polymérase II

Activité de la Polymérase III

à 33 mM en $(NH_4)_2SO_4$ pour le DNA de KB
à 20 mM en $(NH_4)_2SO_4$ pour le DNA d'adénovirus 2

à 100 mM en $(NH_4)_2SO_4$ pour le DNA de KB
à 20 mM en $(NH_4)_2SO_4$ pour le DNA d'adénovirus 2

à 200 mM en $(NH_4)_2SO_4$ pour le DNA de KB + 0,8 γ d' α -amanitine
à 20 mM en $(NH_4)_2SO_4$ pour le DNA d'adénovirus 2 + 0,8 γ d' α -amanitine

D - LES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB INFECTEES PAR L'ADENOVIRUS 2
RESULTATS PRELIMINAIRES

Le génome viral possède-t-il son propre système de transcription ou est-il transcrit par le système RNA polymérasique de la cellule hôte avec lequel pourrait coopérer des facteurs protéiques d'origine virale ?

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons extrait les RNA polymérases des cellules KB après 6 heures d'infection par l'adénovirus 2. Nous avons comparé les extraits enzymatiques des cellules avant et après infection par le virus en utilisant les mêmes procédés de caractérisation. La figure 13 page 63 nous montre en parallèle les profils d'élution sur colonne de DEAE-Séphadex, de ces RNA polymérases avant et après infection. Nous ne pouvons déceler aucune différence. Le profil d'élution sur DEAE-Séphadex ne permet pas de mettre en évidence une forme enzymatique nouvelle ou différente, ce qui écarte la première hypothèse émise à savoir la présence d'une RNA polymérase virale.

Nous avons également comparé leur comportement aux différentes forces ioniques et aux différentes concentrations en cations bivalents. Nous n'avons mis en évidence aucune différence de fonctionnement. Les optima d'activité en présence de Mg^{++} ou de Mn^{++} sont identiques aux optima obtenus avec les RNA polymérases cellulaires.

DNA KB comme matrice	Mg^{++}	Mn^{++}
RNA polymérase I	2 - 8 mM	1 - 3 mM
RNA polymérase II	2 - 8 mM	1 - 3 mM

Nos résultats sont en accord avec ceux de AUSTIN et al (154) qui montrent également l'absence d'un système RNA polymérasique viral propre. D'autre part, les travaux de WEINMANN et al (155) ont montré le rôle de la RNA polymérase II dans la synthèse des mRNA viraux précoces et tardifs, ainsi que le rôle de la RNA polymérase III dans la synthèse du 5,5 S RNA tardif dont le rôle n'a pu être élucidé jusqu'à présent.

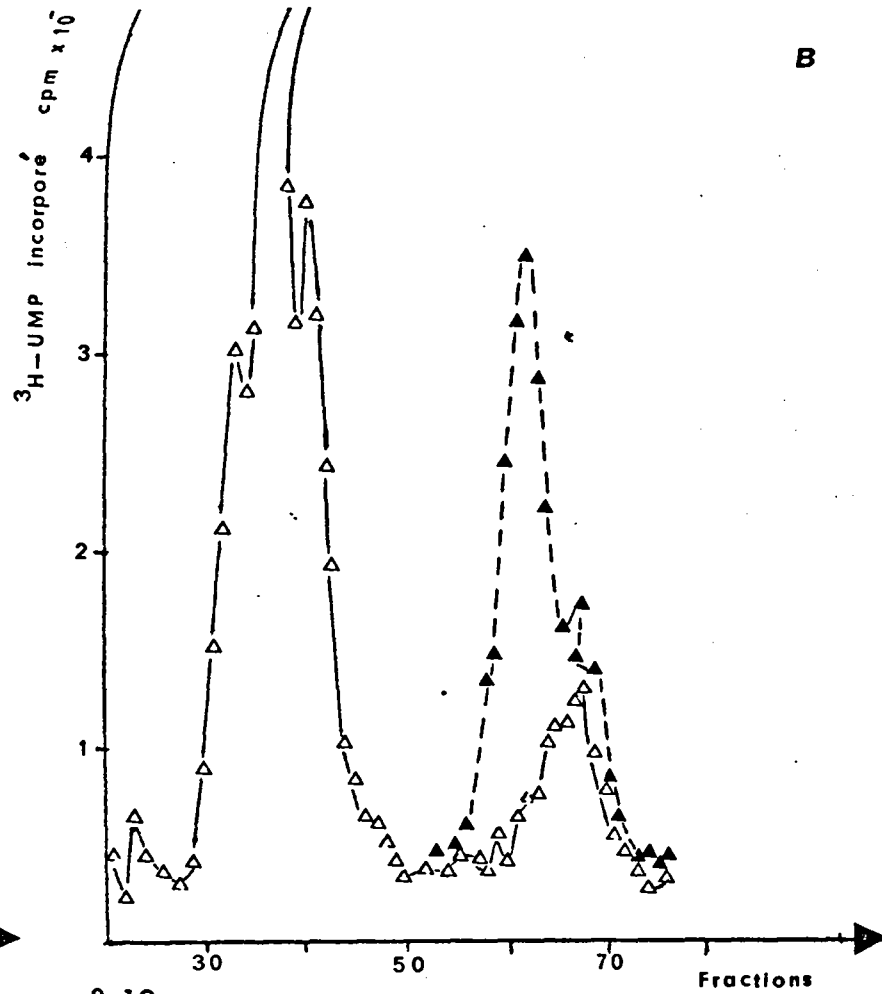
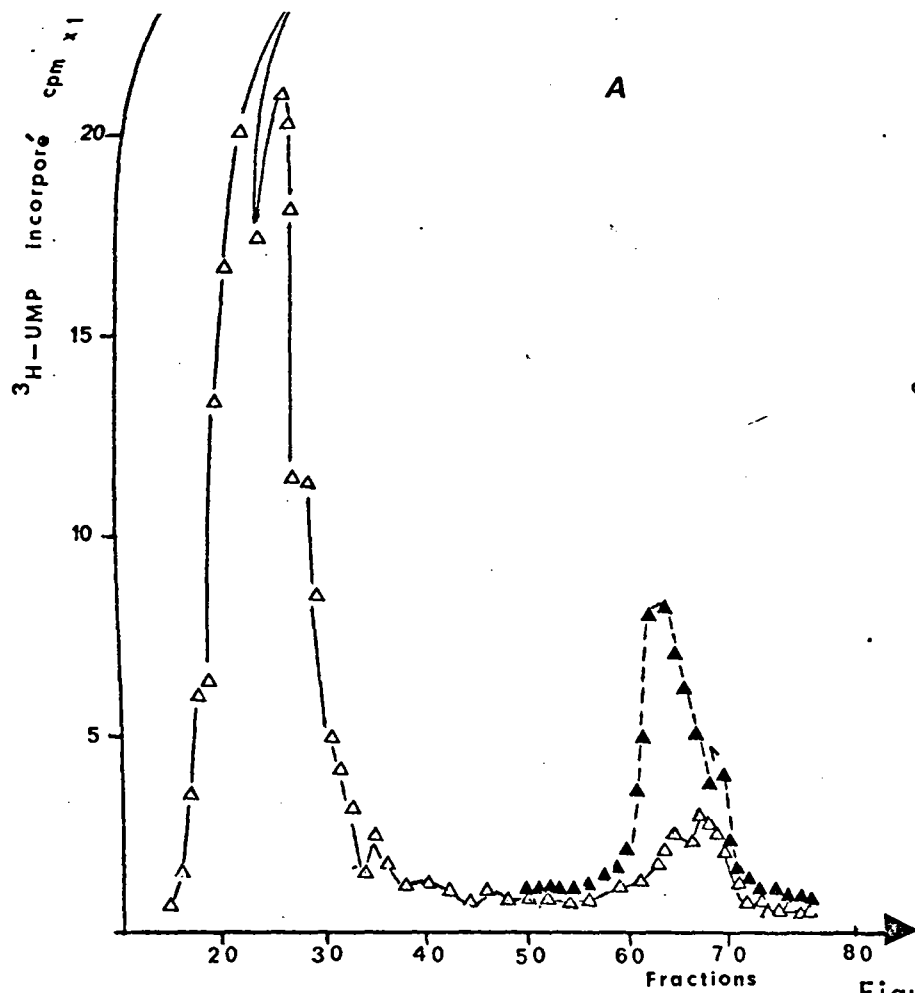


Figure n° 13

Profil d'élution sur DEAE Séphadex A 25 des RNA polymérase de cellules KB avant (A) et après (B) infection par l'adénovirus 2

Activité enzymatique en présence de - DNA natif (10 γ /ml)

▲---▲

- DNA natif + 0,8 γ d' α -amanitine

▲—▲

E - RECHERCHE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES CONTAMINANTES INTERFERANT AVEC LES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES

Lors des études préliminaires sur le déclenchement de la synthèse par les RNA polymérases partiellement purifiées, nous avons soupçonné la présence d'enzymes contaminantes et en particulier une γ phosphotransférase et une phosphokinase.

En effet, 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 γ MAITRA et al (156). Le marquage ne subsiste qu'en position 5' terminale puisque la liaison phosphodiester entre les nucléosides est effectuée par la fonction phosphate qui n'est pas marquée.

Après incubation des extraits RNA polymérasiques avec du γ -³²P ATP ou du γ -³²P GTP, nous avons remarqué la formation de quantités non négligeables de γ -³²P GTP ou de γ -³²P ATP à partir de GTP ou d'ATP. Il était donc vraisemblable qu'une γ -phosphotransférase, transférait le radiophosphore marqué en γ du γ -³²P ATP sur du GTP ou du γ -³²P GTP sur de l'ATP.

Le repérage et la quantification de cette activité s'avéraient indispensables pour déterminer la nature du nucléotide 5' terminal et pour effectuer les corrections nécessaires.

Après digestion par la RNase pancréatique des RNA néosynthétisés, nous avons observé une activité résiduelle, non négligeable, de γ -³²P acido précipitable. Cette fixation de radiophosphore sur des macromolécules non ribonucléotiques nous permet de mettre en évidence une phosphokinase présente dans les extraits RNA polymérasiques. Cette phosphokinase transfère le radiophosphore en γ des γ -³²P XTP présents dans le milieu de synthèse in vitro, sur des macromolécules autres que des RNA.

1 - Etude de la phosphotransférase

a) Etude cinétique de cette réaction

Etant donné que la réaction de fonctionnement des RNA polymérase, in vitro, dure 60 minutes, il fallait vérifier si cet échange était constant dans le temps.

Les RNA polymérase I et II isolées sur DEAE-Séphadex ont été incubées avec du γ -³²P ATP ou du γ -³²P GTP et nous avons analysé, aux temps 5, 20, 45, 60 minutes, les quantités de γ -³²P GTP apparues à partir de γ -³²P ATP et inversement. En soumettant une fraction de chaque mélange réactionnel à la chromatographie sur papier précédemment décrite (voir page 46) nous avons pu calculer la quantité de chaque nouveau nucléotide 5'-triphosphate apparu.

La figure 14 page 66 nous montre que cette réaction d'échange est linéaire pour une durée de 60 minutes. Nous avons également remarqué que pratiquement seuls les nucléotides puriques étaient impliqués dans cette réaction de transfert, alors que les nucléotides pyrimidiques sont peu affectés par cette réaction d'échange.

b) Mise en évidence de la γ -phosphotransférase dans les extraits polymérasiques purifiés sur DEAE-Séphadex

Dans un premier temps, nous nous sommes préoccupés de savoir si cette activité γ -phosphotransférase était liée à l'activité RNA polymérasique.

Nous avons évalué, pour chaque fraction d'élution de DEAE-Séphadex, la quantité de γ -³²P ATP apparue à partir de γ -³²P GTP. Chaque fraction a été soumise à une analyse chromatographique des nucléosides γ -³²P triphosphates néoformés après incubation en présence de γ -³²P GTP dans les conditions optimales de fonctionnement des RNA polymérase.

La figure 15 page 67 montre que cette activité γ -phosphotransférase est présente dans toutes les fractions, mais dans des proportions différentes. Cette activité n'est donc pas associée à une activité RNA polymérasique donnée.

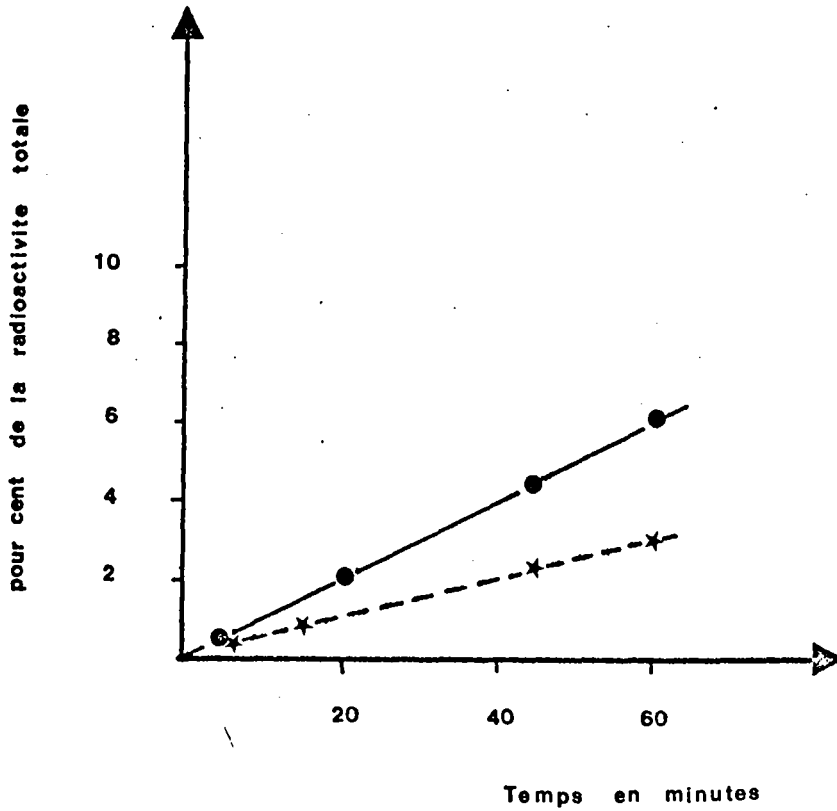


Figure n° 14

Cinétique de l'activité γ phosphotransférase contenue dans les extraits de RNA polymérase I ●—● et dans les extraits de polymérase II de cellules KB *—*

L'activité est évaluée en fonction du γ -³²P ATP formé après 60 min., à partir de γ -³²P GTP ajouté initialement au milieu réactionnel. (On obtient un profil semblable avec le GTP formé à partir du γ -³²P ATP)

Les valeurs sont exprimées en pour 100 de la radioactivité totale.

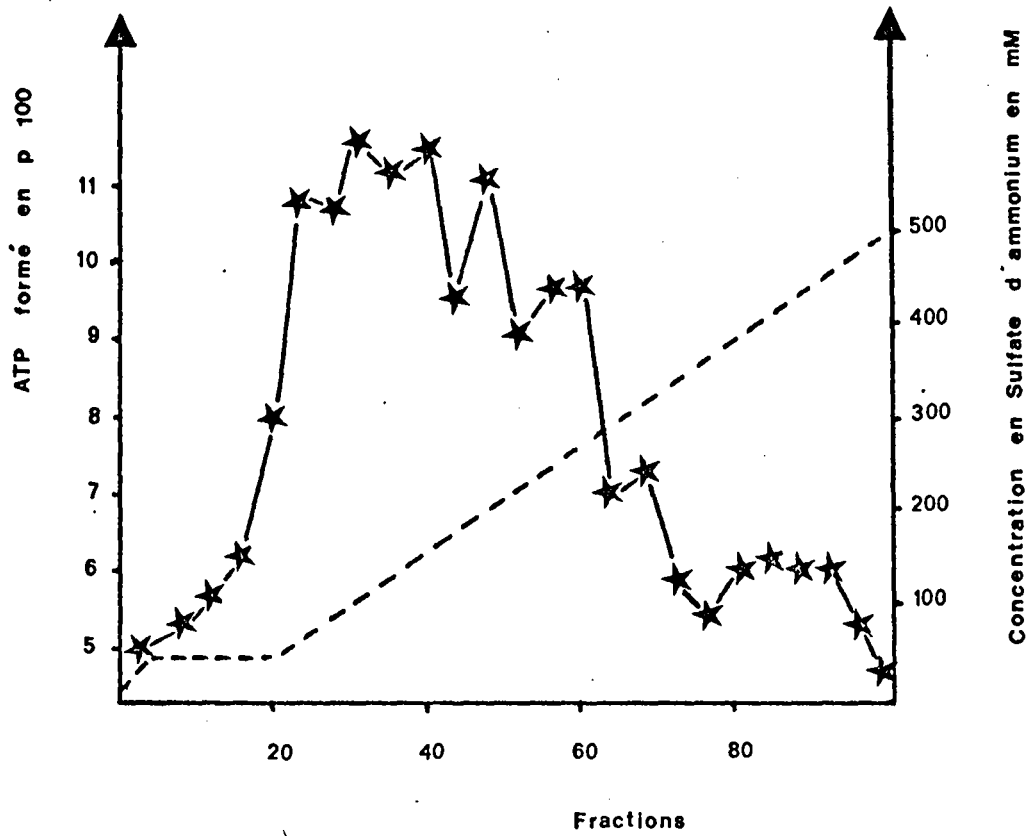


Figure n° 15

Profil de l'activité γ -phosphotransférase dans les fractions d'élution de colonne de DEAE-Séphadex A-25



Fractions contenant les activités RNA polymérasiques I, II et III

Concentration en Sulfate d'ammonium

Pourcentage de γ -³²P ATP formé à partir du γ -³²P GTP

L'activité est mesurée à partir du γ -³²P GTP, dans les conditions d'incubation des RNA polyméras.

Toutefois, nous avons remarqué que les extraits polymérasiques de Type I s'avéraient plus contaminés par cette activité que ceux de Type II.

c) Dissociation des activités polymérasiques et γ -phosphotransférasique sur gradient de glycérol

Après purification des extraits RNA polymérasiques bruts par sédimentation en gradient linéaire de glycérol, nous avons repéré l'activité RNA polymérasique par précipitation à l'ATCA 10 % des RNA néoformés marqués à l'UTP-³H.

Nous avons également évalué le taux de transfert du γ -³²P ATP ou du γ -³²GTP sur du GTP ou de l'ATP non marqué présent dans le milieu de synthèse, par chromatographie sur papier. Le graphique de la figure 16 A page 69 nous donne les proportions de cet échange et nous montre que les activités RNA polymérasiques et γ -phosphotransférasiques sont nettement dissociées.

d) Dissociation sur glycérol des deux activités à partir des RNA polymérases I et II purifiées sur DEAE-Séphadex

Les RNA polymérases I et II, après purification sur DEAE-Séphadex, ont été soumises à une centrifugation en gradient linéaire de glycérol afin de séparer l'activité γ -phosphotransférasique de l'activité RNA polymérasique, et d'apprécier si les différentes étapes de purification diminuaient cette activité.

La figure 16B page 69 nous montre qu'il existe encore une activité γ -phosphotransférasique résiduelle, dissociée de l'activité RNA polymérasique.

Les différentes étapes de purification éliminent les activités contaminantes, mais augmentent également les risques de perte de facteurs protéiques intervenant lors de la régulation de la transcription in vivo.

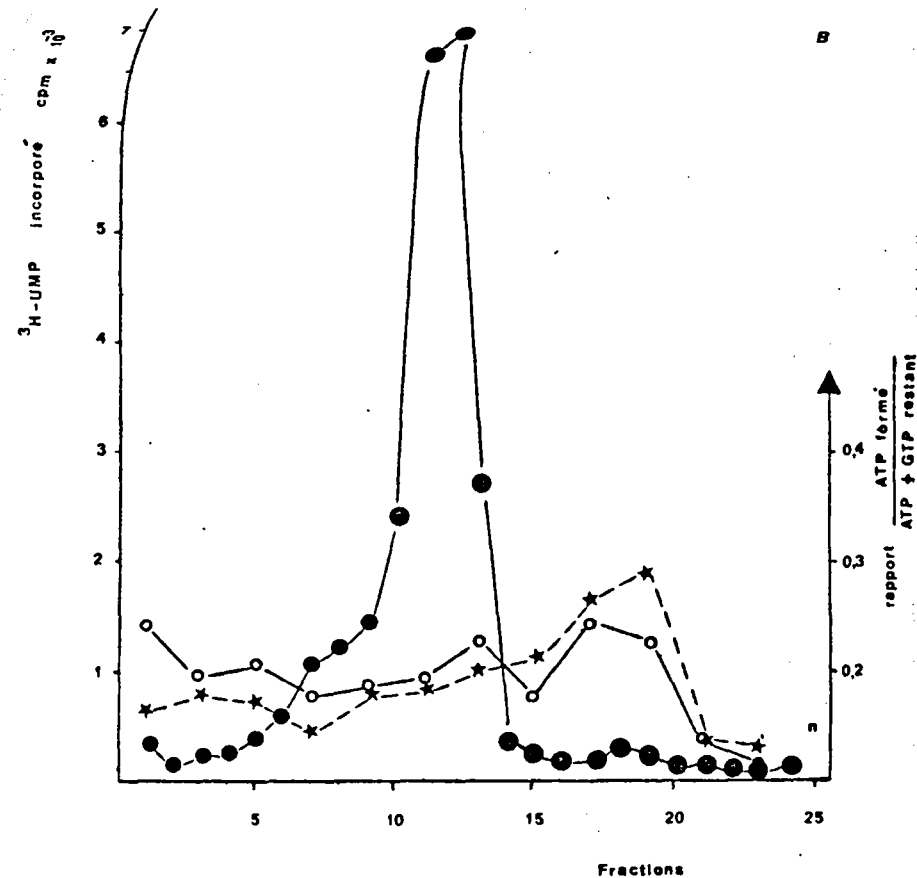
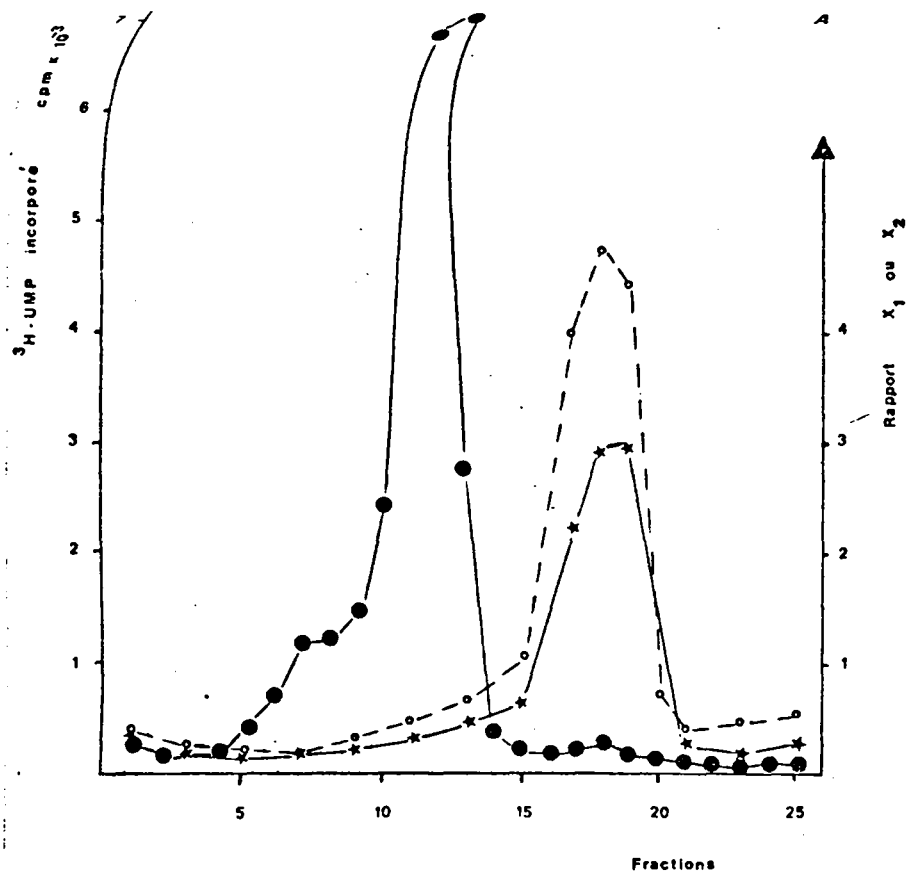


Figure n° 16

Mise en évidence sur gradient de glycérol de l'activité γ phosphotransférase présente dans :

A - Les extraits bruts RNA polymérasiques

B - Dans les extraits de Polymérase I et II purifiés sur DEAE Séphadex A 25

Activité RNA polymérasique ($^3\text{H-U-M-P incorporé}$) ●—●

Activité γ phosphotransférase exprimée par le rapport

Activité γ phosphotransférase liée à la Polymérase I (*---*) ou à la Polymérase II (o—o)

$$(o—o)_{X_1} = \frac{\text{ATP formé}}{\text{ATP} + \text{GTP restant}} ; (*---*)_{X_2} = \frac{\text{GTP formé}}{\text{ATP} + \text{GTP restant}}$$

2 - Mise en évidence d'une phosphokinase dans les extraits polymérasiques

Lors de la précipitation de l'ATCA des RNA néosynthétisés par les RNA polymérasés préalablement sédimentés sur gradient de glycérol, nous avons remarqué plusieurs pics radioactifs acido-précipitables.

La figure 17 page 71 nous donne la répartition de la radioactivité TCA précipitable. Nous observons 3 pics :

- Un premier pic vers le fond du gradient correspond vraisemblablement à des agrégats de RNA polymérasés qui sont donc plus lourds.

- Un second pic coïncide avec l'activité RNA polymérasique déterminée par incorporation d'UTP-³H. Ce pic correspond à l'incorporation de γ -³²P ATP ou de γ -³²P GTP en position 5' terminale des RNA néoformés.

- Un troisième pic vers la surface du gradient ne correspond à aucune incorporation d'UTP-³H, il est cependant acido-précipitable. De plus, l'incorporation d'ATP-³H ou de GTP-³H est nulle, il ne peut donc s'agir d'une activité poly-A ou poly-G à cette position du gradient.

Il est donc permis de penser à une contamination des extraits RNA polymérasiques par une protéine kinase, qui transfère le phosphore ³² sur des macromolécules autres que les RNA.

Cette incorporation de radiophosphore dans d'autres molécules que les RNA, peut expliquer la présence de pics radioactifs autres que celui correspondant à l'activité RNA polymérasique.

En effet, la digestion par la RNase pancréatique, après synthèse des RNA in vitro, met en évidence une incorporation de radiophosphore dans des macromolécules résistantes à la RNase.

Cette incorporation de ³²P, à l'aide d'une phosphokinase, est une nouvelle source d'erreur lorsque l'on détermine la quantité de ³²P acido-pré-

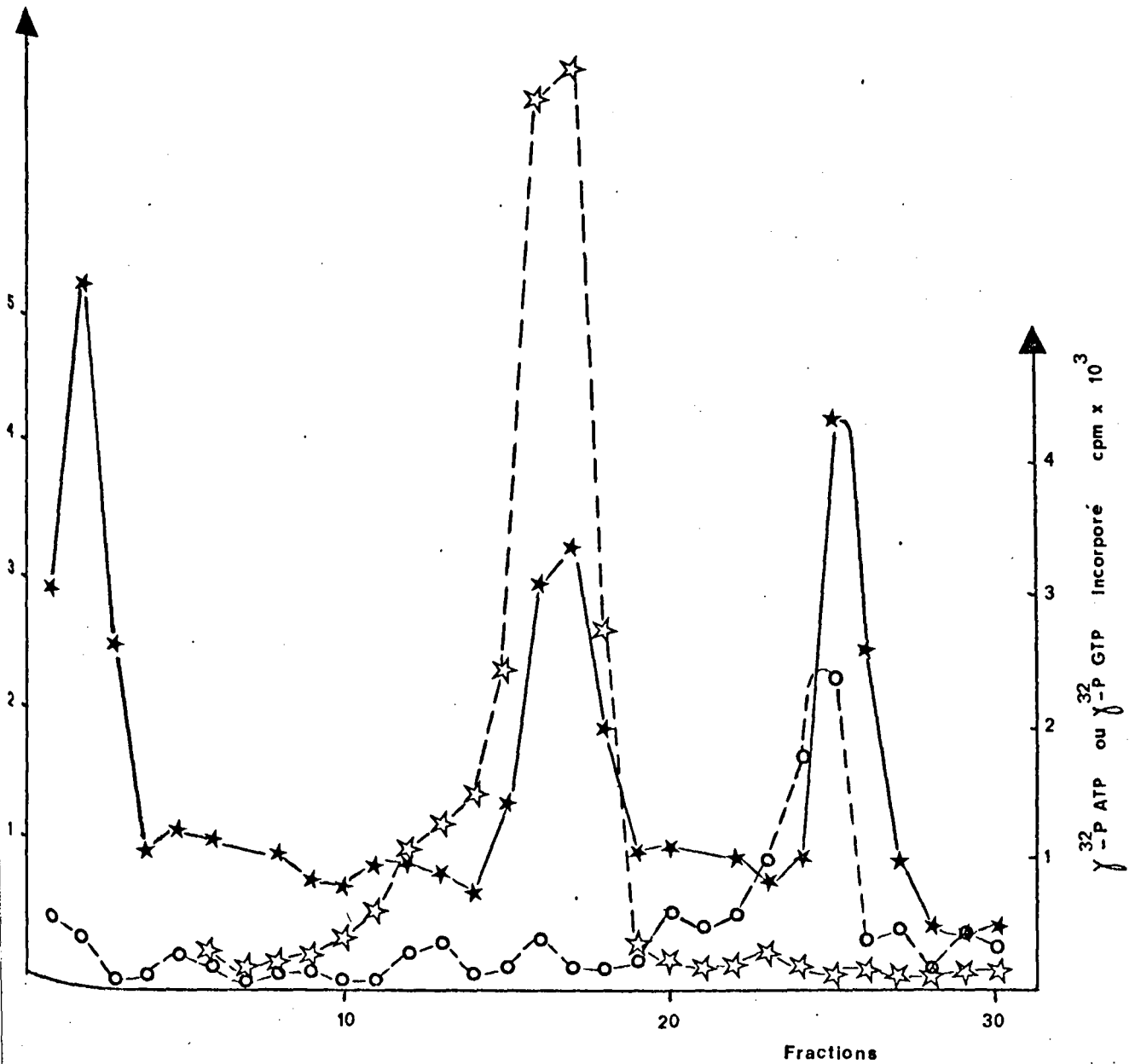


Figure n° 17

Mise en évidence sur gradient de glycérol de l'activité phosphokinase présente dans les extraits bruts RNA polymérasiques

- ☆ --- ☆ Activité RNA polymérasique correspondant à la radioactivité ³H-UMP TCA précipitable.
- ★ ——— ★ Activité phosphokinase correspondant à la radioactivité γ-³²P ATP TCA précipitable
- - - - - ○ γ-³²P GTP TCA précipitable

pitabile, incorporée dans les RNA néosynthétisés.

Cette observation a conduit VERBERT (157) à purifier ses RNA par extraction phénolique, chromatographie sur gel de Sephadex et à contrôler la sensibilité à la RNase A, du matériel acido-précipitable afin de déterminer avec plus de certitude la nature du nucléotide 5' terminal.

Toutefois, nous constatons que les deux activités RNA polymérisiques et phosphokinasiqne sont très bien séparées par centrifugation en gradient de glycérol. Cette activité phosphokinasiqne se révèle aussi bien avec le γ -³²P ATP qu'avec le γ -³²P GTP. Il faut noter cependant que l'activité γ -³²P GTP est légèrement décalée vers le fond du gradient. Ceci s'explique par la présence très voisine de la γ -phosphotransférase qui vient interférer avec l'activité phosphokinasiqne.

DISCUSSION - CONCLUSIONS

DISCUSSION - CONCLUSIONS

L'étude des RNA polymérase DNA dépendantes des cellules KB, nous a permis de mettre en évidence les points suivants:

1 - Caractérisation de 3 activités RNA polymérasiques par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions.

La caractérisation des RNA polymérase par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions, nous a permis de montrer que le choix du support jouait un rôle très important. En effet, outre la RNA polymérase I et II, la RNA polymérase III a pu, rapidement, être isolée sur colonne de DEAE-Sephadex alors que la présence de cette enzyme sur DEAE-Cellulose fut longtemps ignorée.

SEIFART et al (158) avaient noté la présence d'une RNA polymérase de type C, sur DEAE-Cellulose, masquée par une RNA polymérase de type A. Les travaux de BUTTERWORTH et al (159) et de SERGEANT et KRSMANOVIC (160) ont fait apparaître une différence de comportement de l'enzyme de type III en fonction de l'échangeur d'ions. Ces auteurs en ont établi sa constante de sédimentation: de l'ordre de 17 S, par conséquent plus élevée que celle de la RNA polymérase II (15,5 S).

A des doses d' α -amanitine de l'ordre de 400 μ g/ml, la RNA polymérase III est inhibée à 100 pour 100, alors que la RNA polymérase I est résistante. Connaissant les propriétés de ces différentes enzymes, il est aisé de dissocier les 3 activités quelque soit le type d'échangeur d'ions.

2 - L'efficacité de la transcription par les RNA polymérase est liée à l'intégrité structurale de la matrice de DNA.

La RNA polymérase I transcrit préférentiellement le DNA natif alors que la RNA polymérase II est plus active en présence de DNA

présentant des régions monocaténaïres par suite d'une dénaturation thermique ou d'une déstabilisation à basse force ionique (DNA dans l'eau distillée). La RNA polymérase II peut alors initier un plus grand nombre de chaînes de RNA. Il faut remarquer également la stimulation par l'ion Mn^{++} , quelle que soit la matrice, de la transcription par la RNA polymérase II : le manganèse déstabilise la matrice de DNA et facilite le déclenchement sur ces régions monocaténaïres, de la transcription par la RNA polymérase II.

La RNA polymérase I quant à elle, préfère initier la synthèse de RNA sur des matrices double brin, présentant peu de cassures ou de régions dénaturées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par MANDEL et CHAMBON (161), à partir des RNA polymérases de thymus de veau ou de foie de rat en présence de différents types de matrices.

3 - Lors de l'infection des cellules KB par l'adénovirus 2 le virus n'introduit pas de RNA polymérases virales.

L'étude comparée des RNA polymérases des cellules KB, avant et après infection par l'adénovirus 2, ne nous a pas permis de mettre en évidence une RNA polymérase virale. En effet, les profils d'éluion de ces enzymes sont identiques; l'information contenue dans le génome viral est donc transcrite par une ou plusieurs RNA polymérases de la cellule hôte.

On peut se demander si ces polymérases agissent seules ou si elles coopèrent avec un facteur protéique synthétisé lors de la phase précoce de l'infection virale.

Ces résultats vont dans le même sens que les travaux de WEINMANN et al (162), qui ont établi le rôle des RNA polymérases cellulaires dans la transcription du génome viral; la RNA polymérase II synthétise les RNA, viraux de type messenger, précoces et tardifs alors que la RNA polymérase III joue un rôle dans la synthèse du 5,5 S RNA viral.

Les études préliminaires du comportement des enzymes des cellules KB avant et après infection par l'adénovirus 2, ne nous ont pas permis de mettre en évidence des différences d'activité en fonction de la concentration en

ions bivalents Mn^{++} , Mg^{++} , ni aucune affinité préférentielle pour un type de DNA .

Ces résultats ne nous permettent pas d'infirmier l'hypothèse de facteurs protéiques d'origine virale coopérant avec les RNA polymérases cellulaires ; les différentes étapes de purification ont peut-être éliminé certaines protéines capables de jouer un rôle lors de la transcription du génome viral.

En effet, les expériences de D'HALLUIN et al (163) qui n'entrent pas dans le cadre de ce mémoire, suggèrent l'existence d'une protéine virale, précoce, contribuant à la spécificité de la transcription du DNA d'adéno-virus 2, par les RNA polymérases des cellules infectées par ce virus.

4 - Présence dans les extraits RNA polymérasiques de deux activités phosphokinasiques à savoir une phosphotransférase et une phosphokinase .

L'étude du nucléotide 5' terminal nécessitait de connaître avec certitude, la quantité réelle de $\gamma^{32}P$ XTP incorporée en bout de chaîne des RNA néoformés. Il fallait éliminer toute incorporation de radiophosphore non spécifique. C'est la raison pour laquelle, nous avons voulu connaître les activités contaminantes risquant d'interférer avec l'activité RNA polymérasique.

En effet, la présence de $\gamma^{32}P$ GTP et de $\gamma^{32}P$ ATP dans les RNA néosynthétisés à partir de $\gamma^{32}P$ ATP uniquement, nous a fait soupçonner l'existence d'une γ phosphotransférase échangeant le ^{32}P en γ du $\gamma^{32}P$ ATP sur du GTP et vice versa .

De plus , l'analyse du matériel acido-précipitable nous permet de détecter une incorporation de radiophosphore sur d'autres molécules que des RNA . Outre l'activité γ phosphotransférasique, il existe une phosphokinase fixant du radiophosphore sur des macromolécules non ribonucléiques .

La connaissance de ces 2 types d'activité, coexistant dans les préparations enzymatiques de RNA polymérases, nous permet d'opérer les corrections nécessaires et d'évaluer les quantités réelles de $\gamma^{32}P$ GTP ou de $\gamma^{32}P$ ATP incorporées en position 5' terminale des RNA synthétisés in vitro par les

RNA polymérase partiellement purifiées.

L'étude du déclenchement de la synthèse par les extraits enzymatiques peu purifiés, contraint à être prudent à l'égard des contaminations possibles, mais il permet une meilleure comparaison avec les résultats acquis in vivo. Ils ont conduit à montrer une relation possible entre le type RNA polymérase et la nature du nucléotide initial à savoir une prédominance GTP 5' terminal dans les RNA synthétisés par la RNA polymérase I tandis que la RNA polymérase II débute la synthèse des RNA par l'incorporation d'ATP en position 5' terminale. VERBERT et al (164).

Le fait d'avoir choisi des préparations RNA polymérasiques partiellement purifiées, s'avère être judicieux : nous possédons les éléments permettant de corriger les fixations de radiophosphore non spécifiques et nous limitons les risques de perte d'éléments intervenant dans les mécanismes de déclenchement de la transcription du génome cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

ALONI Y.

Nature New Biol. 1973 , 243 , 2

(125)

ATTARDI G., ALONI Y., ATTARDI B., OJALA D., PICA MATTOCIA L.,
ROBBERSON D.L., STORRIE B.,

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 599

(39)

AUSTIN G.E., BELLO L.J., FURTH J.J.,

Biochim. Biophys. Acta 1973 , 324 , 488

(154)

BERG D., BARRETT K., HINKLE D., Mc. GRATH J., CHAMBERLIN M.,

Fed. Proc. 1969 , 28 , 659

(87)

BISHOP J.O., ROBERTSON F.W.,

Biochem. J. 1969 , 115 , 353

(77)

BLATTI S.P., INGLES C.J., LINDELL T.J., MORRIS P.W., WEAVER R.F.

WEINBERG F., RUTTER W.J.,

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 649

(32 , 62 , 102)

BREMER H., KONRAD M.W.,

Nat. Acad. Sci. U.S. 1964 , 51 , 801

(115)

BREMER H., KONRAD M.W., GAINES K., STENT G.,

J. Mol. Biol. 1965 , 13 , 540

(111)

BURGESS R. R.,
J. Biol. Chem. 1969, 244, 6168
(21)

BURGESS R. R.,
Ann. Rev. Biochem. 1971, 40, 711
(101)

BURGESS R. R., TRAVERS A. A.,
Fed. Proc. 1970, 29, 1164
(81, 85)

BURGESS R. R., TRAVERS A. A., DUN J. J., BAUTZ E. K. F.,
Nature 1969, 221, 43
(22, 82)

BUTTERWORTH P. H. W., AUSTOKER D. L., CHESTERTON C. J., BEBEE T. J. C.:
9 th FEBS Meeting in Budapest 1974
(159)

CERENKOV P. A.
Byull. Akad. Nauk. URSS (1937) 4, 5 et revue technique publiée par la
firme Intertechnique : "CERENKOV COUNTING"
(150)

CHAMBERLIN M., McGRATH J., WASKELL J.,
Nature 1970, 228, 227
(143)

CHAMBON P., GISSINGER F., KEDINGER C., MANDEL J. L.,
MEILHAC M., NURET P.,
Karolinska Symp. Res. Methods Reprod. Endocrinol. 5 th, 1972, 222
(50)

CHAMBON P., GISSINGER F., KEDINGER C., MANDEL J.L.,
MEILHAC M., NURET P.,
Acta Endocrin. 1972 , 168 , 222
(57)

CHAMBON P., GISSINGER F., MANDEL J.L., KEDINGER C.,
GNIAZDOWSKI M., MEILHAC M.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 693
(53 , 80 , 94 , 151)

CHAMPE S.W., BENZER S.,
Proc. Nat. Acad. Sci. US 1962 , 48 , 532
(118)

CHESTERTON C.J., BUTTERWORTH P.H.W.
Febs Letters 1971 , 12 , 301
(47)

CHESTERTON C.J., BUTTERWORTH P.H.W.,
Eur. J. Biochem. 1971 , 19 , 232
(55)

CHESTERTON C.J., HUMPHREY S.M., BUTTERWORTH P.H.W.,
Biochem. J. 1972 , 126 , 675
(141)

COHEN S.W., HURWITZ J.,
Proc. Nat. Acad. Sci. US 1967 , 57 , 1759
(122)

COLVILL A.J.E., KANNER L.C., TOCCHINI-VALENTINI G.P.,
SARNAT M.T., GEIDUSCHECK E.P.,
Proc. Nat. Acad. Sci. US 1965 , 53 , 1140
(124)

DUBERT J.M., HIRSCHBEIN L.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1969 , 34 , 149
(68)

FUCHS E., MILLETTE R.L., ZILLIG W., WALTER G.,
Eur. J. Biochem. 1967 , 3 , 183
(69 , 116) -

FUCHS E., ZILLIG W., HOFSHNEIDER P.H., PREUSS A.,
J. Mol. Biol. 1964 , 10 , 546
(11 , 16)

FUKUDA R., IWAKURA Y., ISHIHAMA A.,
J. Mol. Biol. 1974 , 83 , 353
(9 , 25 , 83)

FURTH J.J., AUSTIN G.E.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 641
(95)

GLYNN I.M., CHAPPELL J.B.,
Biochem. J. 1964 , 90 , 147
(146 , 148)

GOFF C.G., MINKLEY E.G.,
First Lepetit Colloquium on RNA Polymérase, SILVESTRI L., Ed. 1970,
North Holland, p. 124
(88)

HAMILTON T.H.,
Science 1968 , 161 , 649
(135)

HAYASHI M., HAYASHI M.N., SPIEGELMAN S.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1964 , 51 , 351
(123)

HEIL A., ZILLIG W.,
FEBS Letters 1970 , 11 , 165
(27)

HIGASHINAKAGAWA T., ONISHI T., MURAMATSU M.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972 , 48 , 937
(100)

HINKLE D.C., CHAMBERLIN M.J.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 65
(66)

HINKLE D.C., CHAMBERLIN M.J.,
J..Mol. Biol. 1972 , 70 , 187
(67)

HURWITZ J., BRESLER A., DIRINGER R.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1960 , 3 , 15
(8)

IWAKURA Y., FUKUDA R., ISHIHAMA A.,
J. Mol. Biol. 1974 , 83 , 369
(10 , 28 , 93)

JACKSON A.H., SUGDEN B.,
J. Virol. 1972 , 10 , 1086
(65)

JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUNRO H.N.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1970 , 38 , 765
(48)

JENSEN E.V., ZUZUKI T., NUMATA M., SMITH S., DE SOMBRE E.R.,
Steroids 1963 , 13 , 417
(137)

JOKLIK W.,
Milieu minimum essentiel, de la firme GIBCO, distribué par FLOBIO,
rue de Lambrechts, Courbevoie

KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MANDEL J.L., GISSINGER F.,
CHAMBON P.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1970 , 38 , 165
(42)

KEDINGER C., NURET P., CHAMBON P.,
FEBS Letters 1971 , 15 , 169
(56)

KELLER W., GOOR R.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1971 , 35 , 671
(45)

KITANO Y., KAMEYANA T.,
J. Biochem. 1969 , 65 , 1
(14)

KRAKOW J.S.,
J. Biol. Chem. 1966 , 241 , 1830
(126)

KRAKOW J.S., HORSLEY W.J.,
J. Biol. Chem. 1967 , 242 , 4796
(114)

KRAKOW J.S., VON DER HELM K.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 ,
(86)

KRSMANOVIC V., WEISSMAN S.M.,
Arch. Internat. Physiol. Biochem. 1973 , 81 , 189
(76 , 109) *

KUNTZEL H., SCHAFER K.P.,
Nature New Biol. 1971 , 231 , 265
(36)

LEE Y., MENDECKI J., BRAWERMAN G.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1971 , 68 , 1331
(138)

LINDELL J., WEINBERG F., MORRIS P.W., ROEDER R.G., RUTTER W.J.,
Science 1970 , 170 , 447
(31)

LUBIN M.,
J. Mol. Biol. 1969 , 39 , 219
(15)

MAITRA U.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1970 , 41 , 1255
(128)

MAITRA U., BARASH F.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1969 , 64 , 779
(74)

MAITRA U., HURWITZ J.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1965 , 54 , 815
(107)

MAITRA U., HURWITZ J.,
J. Biol. Chem. 1967 , 242 , 4897
(127)

MAITRA U., NKATA Y., HURWITZ J.,
J. Biol. Chem. 1967 , 242 , 4908
(78 , 112)

MAITRA U., NOVOGRODSKY A., BALTIMORE D., HURWITZ J.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1965 , 18 , 801
(156)

MANDEL J.L., CHAMBON P.,
C. R. des Sc. de la Soc. Biol. 1971 , 165 , 509
(71)

MANDEL J.L., CHAMBON P.,
Eur. J. Biochem. 1974 , 41 , 367
(63 , 73 , 75 , 152 , 161)

MARMUR J., GREENSPAN C.M., PALECEK E., KAHAN F.M.,
LEVINE J., MANDEL M.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1963 , 28 , 191
(119)

Mc CARTHY B.J., BOLTON E.I.,
J. Mol. Biol. 1964 , 8 , 184
(120)

MONDAL H., MANDAL R.K., BISWAS B.B.,

Eur. J. Biochem. 1972 , 25 , 463

(99)

NAKANA E., SAKAGUCHI K.,

J. Biochem. 1969 , 65 , 147

(61)

NIYOGI S.K., STEVENS A.,

J. Biol. Chem. 1965 , 240 , 2593

(72)

PAUL J., GILMOUR R.S.,

J. Mol. Biol. 1968 , 34 , 305

(133)

PETTIJOHN D.E., STONINGTON O.G., KOSSMAN C.R.,

Nature 1870 , 228 , 235

(131)

REEDE R.H., ROEDER R.G.,

J. Mol. Biol. 1972 , 70 , 433

(33)

REID B.D., PARSONS P.,

Proc Nat. Acad. Sci. U.S. 1971 , 68 , 2830

(37)

RICHARDSON J.P.,

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1966 , 55 , 1616

(18)

RICHARDSON J.P.,
J. Mol. Biol. 1966 , 21 , 115
(113)

RICHARDSON J.P.,
Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 1969 , 8 , 75
(17)

ROBERTS J.W.,
Nature 1969 , 224 , 1168
(130)

ROBERTSON H.D., ZINDER N.D.,
J. Biol. Chem. 1969 , 244 , 5790
(149)

ROEDER R.G., REEDER R.H., BROWN D.D.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 727
(64)

ROEDER R.G., RUTTER W.J.,
Nature 1969 , 224 , 234
(46 , 51)

ROEDER R.G., RUTTER W.J.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1970 , 65 , 675
(30 , 40 , 140)

ROEDER R.G., RUTTER W.J.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1970 , 65 , 65
(49 , 52)

SAMARINA O.P., LERMAN M.I., TUMANJAN U.G.,
ANANIEVA L.N., GEORGIEV G.P.,
Biokhimiya 1965 , 30 , 880
(121)

SEIFART K.H.,
Lepetit Colloquia on Biology and Medicine : "RNA Polymerase and
Transcription", SILVESTRI L., Ed. 1970 , North Holland, p. 233
(41)

SEIFART K.H.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 719
(98)

SEIFART K.H., BENECKE B.J., JUHASZ P.P.,
Arch. Biochem. Biophys. 1972 , 151 , 519
(158)

SEIFART K.H., SEKERIS C.E.,
Eur. J. Biochem. 1969 , 7 , 408
(96)

SERGEANT A., KRSMANOVIC V.,
FEBS Letters 1973 , 35 , 331
(160)

SHIGEURA R.T., BOXER G.E.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1964 , 17 , 758
(106)

SKLAR V.E.F., SCHWARTZ L.B., ROEDER R.G.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1975 , 72 , 348
(58)

SLAYTER H.S., HALL C.E.,
J. Mol. Biol. 1966 , 21 , 113
(13)

SO A.G., DAVIE E.W., EPSTEIN R., TISSIERES A.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1967 , 58 , 1739
(117)

SPELSBERG T.C., TANKERSLEY S., HNILICA L.S.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1969 , 62 , 1218
(134)

STEIN H., HAUSEN P.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 709
(97)

STENBERGER N., STEVENS A.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1966 , 24 , 937
(79)

STEVENS A., EMERY A.J.Jr., STENBERGER N.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1966 , 24 , 929
(19)

SUGDEN B., SAMBROOK J.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 , 663
(44)

SUGIURA M., OKAMOTO T., TAKANAMI M.,
Nature 1970 , 225 , 598
(90 , 103)

SUMMERS W.C., SIEGEL R.B.,
Nature 1970 , 228 , 1160
(142)

SUMMERS W.C., SZYBALSKI W.,

Virology 1968 , 34 , 9

(129)

SZYBALSKI W.,

Canadian Conf. (Pergamon Oxford) 1969 , 8 , 183

(60)

SZYBALSKI W., KUBINSKI H., SHELDRIK P.,

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1966 , 31 , 123

(59)

TAKANAMI M., OKAMOTO T., SUGIURA M.,

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 , 35 ,

(104)

TALWAR G.P., SEGAL S.T., EVANS A.,

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1964 , 52 , 1059

(136)

TEMIN H.M.,

Virology 1963 , 20 , 577

(2 , 4)

TEMIN H.M., MIZUTANI S.,

Nature 1970 , 226 , 1211

(3 , 5)

TRAVERS A.A., BURGESS R.R.,

Nature 1969 , 222 , 537

(84 , 92)

VERBERT A.

Thèse de Doctorat ès Sciences à l'Université de Lille I (1974) : Recherches sur la transcription dans les cellules eucaryotes. Nature des extrémités 5'-triphosphates des RNA synthétisés in vivo et in vitro par les RNA polymérase DNA-dépendantes.

(108 , 145 , 147 , 157)

VERBERT A., SERGEANT A., KRSMANOVIC V.,

Biochimie 1974 , 56 , 1103

(110 , 164)

VOGT V.,

Nature 1969 , 223 , 854

(89)

VOIGT H.P., KAUFMANN R., MATTHAEI H.,

FEBS Letters 1970 , 10 , 257

(43)

WALTER G., SEIFERT W., ZILLIG W.,

Biochem. Biophys. Res. Comm. 1968 , 30 , 240

(23)

WALTER G., ZILLIG W., PALM P., FUCHS E.,

Eur. J. Biochem. 1967 , 3 , 194

(70)

WATSON J.D., CRICK F.H.C.,

Nature 1953 , 171 , 737

(105)

WEAVER R.F., BLATTI S.P., RUTTER W.J.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1971 , 68 , 2994
(54)

WEINMANN R., RASKAS H.J., ROEDER R.G.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1974 , 71 , 3426
(155 , 162)

WEINMANN R., ROEDER R.G.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1974 , 71 , 1790
(35)

WEISS S.B.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1960 , 46 , 1020
(7)

WEISS S.B., GLADSTONE L.,
J. Amer. Chem. Soc. 1959 , 81 , 4118
(6)

WIDNELL C.C., TATA J.R.,
Biochem. Biophys. Acta 1964 , 87 , 531
(29)

WU C.W., DAVID I.,
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 1972 , 31 , 924
(38)

YOUNG E.T., SINSHEIMER R.L.,
J. Mol. Biol. 1967 , 30 , 147
(144)

ZILLIG W., FUCHS E., PALM P., RABUSSAY D., ZECHEL K.,
Lepetit Colloquia on Biology and Medicine : "RNA Polymerase and
Transcription", SILVESTRI L., Ed. 1970, North Holland, p. 151
(24)

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

ZYLBER E.A., PENMAN S.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1971 , 68 , 2861
(34)

