

50376
1975
211

50376
1975
211

N° D'ORDRE 329

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

MEMOIRE

présenté à la

Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Jean-Pierre KERCKAERT



ETUDE DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES
DU TYPE INFORMOSOME, DIFFUSIBLES DE NOYAUX
ISOLES D'HEPATOCYTES DE RAT.

Soutenu le 20 JUIN 1975



50376

50376

1975 NOM DU CANDIDAT : Jean-Pierre KERCKAERT

1975

211

211

JURY : PRESIDENT : J. MONTREUIL (Directeur de la recherche)

RAPPORTEUR : Ph. JEANTEUR, M. MONIER, J. KREMBEL

EXAMINATEURS : G. BISERTE

TITRE DE LA THESE : Etude des particules ribonucléoprotéiques du type "Informosome" diffusibles de noyaux isolés d'hépatocytes de Rat.

R E S U M E

L'incubation de noyaux isolés de foie de Rat dans des solutions de saccharose phosphatées provoque la libération de particules ribonucléoprotéiques du type "Informosome" supposées participer au transport du RNA messager du noyau vers le cytoplasme. Nous avons pu montrer que :

1. Ce sont des particules non-ribosomales, contenant 20 % de RNA "DNA-like" rapidement marqué et à teneur variable en poly A.
2. Elles ont une constante de sédimentation de 45S mais se présentent sous des formes plus lourdes en présence d'inhibiteur de RNase.
3. Elles sont très sensibles au désoxycholate, à la RNase et à la température.
4. Leur composition en protéines est caractéristique, comprenant trois constituants majeurs de M.M. 34.000, 36.000 et 39.000.
5. Elles correspondent probablement aux fibrilles périchromatiniennes de BERNHARD.
6. Elles sont antigéniquement identiques aux particules isolées par différents procédés par divers auteurs, mais sont au contraire différentes des m-RNP polyribosomales et des D-RNP cytoplasmiques libres.

Ces résultats suggèrent donc que le mRNA est transporté du noyau vers le cytoplasme sous forme de complexe ribonucléoprotéique et que le passage nucléocytoplasmique s'accompagne d'un échange des constituants protéiques.

Entretien prévu le : vendredi 20 juin 1975

à : 10h30

Lieu : C1

Amphithéâtre : LE CHATELIER



ABREVIATIONS UTILISEES

A	Acide adénylique.
Å	Angström = 10^{-10} mètre.
ATCA	Acide trichloracétique.
AMPc	Adenosine monophosphate cyclique.
ATP	Adenosine S' triphosphate.
C	Acide cytidylique.
C.P.M.	Coups par minute.
d	densité .
DNA	Acide desoxyribonucléique.
DNase	Desoxyribonucléase.
D.O. ₂₆₀	Densité optique à 260nm.
DOC	Désoxycholate de sodium.
D-RNA	RNA dont la composition en bases est homologue de celle du DNA.
D-RNP	Ribonucléoprotéine renfermant un D-RNA.
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique.
G	Acide guanylique.
HnRNA	RNA nucléaire hétérogène.
mC	10^{-3} curie.
mn	minute
mRNA	RNA messenger
M	mole par litre
mM	10^{-3} moles par litre.
nm	nanomètre = 10^{-9} mètre.
poly A	séquence polyadénylique.
poly U	séquence polyuridylique.
RNA	Acide ribonucléique.
RNase	Ribonucléase.
R-RNP	Ribonucléoprotéine dans l'ARN est ribosomal.
S	Constante de sédimentation en unité SVEDBERG (10^{-13} seconde).
SDS	Dodecylsulfonate de sodium.

t/mn tour par minute.
U Acide uridylique.
µg 10⁻⁶ gramme.
U.V. lumière ultra-violette

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.	p.1
GENERALITES.	p.4
1.- LE RNA NUCLEAIRE ET LE RNA MESSEGER.	p.5
<u>I. MISE EN EVIDENCE. DEFINITIONS.</u>	p.5
<u>II. RELATIONS ENTRE HnRNA ET mRNA.</u>	p.6
<u>III. LES SEQUENCES POLYADENYLIQUES.</u>	p.7
<u>A- MISE EN EVIDENCE.</u>	p.7
<u>B- PROPRIETES DU POLY A.</u>	p.7
<u>IV. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA BIOGENESE DU mRNA.</u>	p.8
2.- LES COMPLEXES D-RNA-PROTEINES.	p.12
<u>I. LES D-RNP CYTOPLASMIQUES LIBRES.</u>	p.12
<u>A- MISE EN EVIDENCE</u>	p.12
<u>B- PROPRIETES</u>	p.14
1. Les informosomes d'organismes embryonnaires.	p.14
2. Les informosomes d'organismes adultes.	p.14
<u>II. LES D-RNP LIEES AUX POLYRIBOSOMES.</u>	p.17
<u>A- MISE EN EVIDENCE.</u>	p.17
<u>B- PROPRIETES.</u>	p.17
<u>III. Les D-RNP NUCLEAIRES.</u>	p.19
<u>A- OBTENTION.</u>	p.19

<u>B-PROPRIETES</u>	p.20
1. Sédimentation.	p.20
2. Le RNA.	p.20
3. Les protéines.	p.21
4. Structure.	p.22
<u>IV. SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DES D-RNP.</u>	p.26
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">MATERIEL ET METHODES</div>	p.29
1. LA DIFFUSION.	p.30
<u>I. PREPARATION DES D-RNP DIFFUSEES.</u>	p.31
<u>A-ANIMAUX.</u>	p.31
<u>B.PURIFICATION DES NOYAUX.</u>	p.31
<u>C.LA DIFFUSION. ISOLEMENT DES D-RNP.</u>	p.31
<u>D.DIFFUSION EN PRESENCE D'INHIBITEUR DE RNase.</u>	p.35
<u>II. ETUDE CINETIQUE DE LA DIFFUSION.</u>	p.37
2. ETUDE DU RNA.	p.38
<u>I. ETUDE DE LA TAILLE ET DE LA COMPOSITION DU RNA.</u>	p.38
<u>A- EXTRACTION PAR LE PHENOL-SDS A CHAUD.</u>	p.38
<u>B- COMPOSITION EN BASES.</u>	p.38
1. Hydrolyse alcaline.	p.38
2. Séparation des nucléotides.	p.39
<u>II. RECHERCHE DE SEQUENCES POLYADENYLIQUES.</u>	p.39
<u>A. EXTRACTION DU RNA-POLY A.</u>	p.39
<u>B. RETENTION SUR FILTRE MILLIPORE.</u>	p.40
<u>C. RETENTION SUR COLONNE DE CELLULOSE.</u>	p.40

<u>D. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR POLY U-SEPHAROSE.</u>	p.41
3. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.	p.42
<u>I- EXTRACTION DES PROTEINES.</u>	p.42
<u>II- ELECTROPHORESE EN PRESENCE D'UREE A pH ACIDE.</u>	p.42
<u>A- "DISC-ELECTROPHORESE" A pH 4,5.</u>	p.42
<u>B. ELECTROPHORESE A pH 2,8.</u>	p.42
<u>III. ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS.</u>	p.43
<u>IV. ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE.</u>	p.43
<u>A- PREMIERE DIMENSION A pH 8,6 EN UREE 6M</u>	p.44
<u>B- SECONDE DIMENSION A pH 4,5.</u>	p.44
4. SYNTHESES ACELLULAIRES.	p.45
<u>I- INCORPORATION D'AMINO-ACIDES MARQUES.</u>	p.45
<u>A- PREPARATION DES FRACTIONS.</u>	p.45
1. Polyribosomes.	p.45
2. Préparation de "l'enzyme pH 5"	p.45
3. Préparation du "S 100"	p.46
<u>B- SYNTHESES ACELLULAIRES.</u>	p.46
1. Incubations.	p.46
2. Analyse de la radioactivité incorporée.	p.47
a) Radioactivité TCA insoluble.	p.47
b) Analyse du gradient de saccharose.	p.47
<u>II. ACTIVITE POLY A SYNTHETASIQUE.</u>	p.47

RESULTATS.

p.48

1. ISOLEMENT ET PROPRIETES DES D-RNP DIFFUSIBLES. p.49

I- DIFFUSION EN ABSENCE D'INHIBITEUR DE RNase. p.49

A- INFLUENCE DE LA DUREE ET DE LA TEMPERATURE. p.49

B- INFLUENCE DE L'ATP ET DE L'AMP CYCLIQUE. p.51

C- PROPRIETES DE SEDIMENTATION. p.51

a) Stabilité des D-RNP. p.51

b) Action des nucléases. p.53

c) Sensibilité au desoxycholate. p.53

II- DIFFUSION EN PRESENCE D'INHIBITEUR DE RNase. p.56

A- CINETIQUE DE LA DIFFUSION. p.56

B- SEDIMENTATION. p.56

III- ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE. p.58

A- LES NOYAUX PENDANT LA DIFFUSION. p.58

B- LES PARTICULES DIFFUSEES. p.58

C- RECHERCHE DE L'ORIGINE DES D-RNP DIFFUSEES. p.58

IV- CONCLUSIONS. p.61

2. PROPRIETES DU RNA EXTRAIT DES D-RNP DIFFUSEES. p.63

I- TAILLE DU RNA. p.63

A- D-RNP DIFFUSEES EN ABSENCE D'INHIBITEUR DE RNase. p.63

B- D-RNP DIFFUSEES EN PRESENCE D'INHIBITEUR DE RNase. p.63

II- COMPOSITION DU RNA. p.65

III- RECHERCHES DE SEQUENCES POLYADENYLIQUES. p.65

IV- CONCLUSIONS. p.70

3. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DES PROTEINES DES D-RNP DIFFUSEES.	p.72
<u>I- ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE.</u>	p.72
<u>A- COMPOSITION EN ACIDES-AMINES.</u>	p.72
<u>B- ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.</u>	p.74
1. Electrophorèse en présence d'urée.	p.74
2. Electrophorèse en présence de SDS.	p.74
3. Electrophorèse bidimensionnelle.	p.76
<u>C- CONCLUSIONS.</u>	p.80
<u>II- ETUDE IMMUNOLOGIQUE : RELATION ANTIGENIQUE ENTRE LES D-RNP DIFFUSEES ET DIVERSES FRACTIONS CELLULAIRES.</u>	p.81
<u>A- BUT POURSUIVI.</u>	p.81
<u>B- OBTENTION D'IMMUNSERUM ANTI D-RNP DIFFUSEES.</u>	p.81
1. Mode opératoire.	p.81
2. Résultats.	p.82
<u>C- RELATION ANTIGENIQUE ENTRE LES D-RNP DIFFUSEES ET LES FRACTIONS CYTOPLASMIQUES.</u>	p.82
1. Fractions globales.	p.82
2. Fractions microsomales.	p.86
a) Mode opératoire.	p.86
b) Résultats.	p.86
3. Fraction cytoplasmique soluble (S 100)	p.88
a) Fractionnement par le sulfate d'ammonium.	p.88
α. Mode opératoire.	p.88
β. Résultats.	p.88
b) Fractionnement par gel filtration.	p.88
α. Mode opératoire.	p.88
β. Résultats.	p.88
<u>D- CONCLUSIONS.</u>	p.91
4. ACTIVITES BIOLOGIQUES in vitro.	p.94
<u>I- SYNTHESE PROTEIQUE EN SYSTEME ACELLULAIRE.</u>	p.94

II- FIXATION DES D-RNP AVEC LES RIBOSOMES.

p.100

III- ACTIVITE POLYADENYLATE SYNTHETASE.

p.104

IV- DISCUSSION.

p.104

CONCLUSIONS.

p.107

BIBLIOGRAPHIE.

p.112

INTRODUCTION

Simultanées chez les Procaryotes, la synthèse d'une part et l'expression d'autre part de l'information génétique se trouvent séparées à la fois dans le temps et dans le lieu chez les Eucaryotes. Ainsi, entre la transcription du message en RNA dans le noyau et sa traduction en protéines dans le cytoplasme, s'ajoute une troisième étape dans le problème de la régulation de l'expression génétique : le transport de l'information du noyau vers le cytoplasme.

Peu après que SPIRIN, en 1964, matérialise l'existence de RNA cytoplasmique aux propriétés de messenger par la notion de l'"Informosome", à la suite d'études critiques des procédés de fractionnement cellulaire, l'équipe dirigée par le Professeur J.MONTREUIL à l'I.R.C.L. parvient à mettre en évidence une diffusion de particules ribonucléoprotéiques du type informosome à partir de noyaux isolés.

Notre travail a consisté au sein de cette équipe, à définir physico-chimiquement la nature de ces particules diffusibles et à tenter d'apporter quelques précisions sur leur participation au phénomène du transport du RNA messenger. Dans ce mémoire, nous avons consacré un court chapitre aux définitions et aux connaissances et hypothèses actuelles concernant l'étude des particules mRNA-protéines, avant de rapporter nos résultats personnels qui ont fait l'objet des mémoires suivants :

W.DEFERT-KOBUS, J.P.KERCKAERT, E.SEGARD et J.MONTREUIL
Etudes sur les acides nucléiques spontanément diffusibles des noyaux isolés des hépatocytes de Rat. Caractérisation de deux types de particules sédimentables et mise en évidence de formes conjuguées d'ARN de type messenger.
C.R.Acad.Sci., (1968), 266, 31-33.

E.PUVION, W.DEFERT-KOBUS, J.P.KERCKAERT, F.PUVION, E.SEGARD
et J.MONTREUIL.

Etudes sur les acides nucléiques spontanément diffusibles
des noyaux de foie de Rat. Etude morphologique. Démonstration
de l'origine nucléolaire des particules diffusibles.

C.R.Acad.Sci., (1968), 266, 278-281.

V.KRSMANOVIC, J.P.KERCKAERT, W.DEFERT-KOBUS et J.MONTREUIL.

Etude par ultracentrifugation en gradient de densité des par-
ticules spontanément diffusibles des noyaux de foie de Rat.

Arch.Intern. Physiol. Bioch., (1968), 76, 19.

E.PUVION, W.DEFERT-KOBUS, J.P.KERCKAERT, V.KRSMANOVIC et
J.MONTREUIL.

Etude sur les acides nucléiques spontanément diffusibles
des noyaux isolés des hépatocytes de Rat. Nouvelle étude
morphologique et biochimique des particules diffusibles.

C.R.Acad.Sci., (1969), 268, 1990-1993.

J.MONTREUIL, W.DEFERT-KOBUS, J.P.KERCKAERT, E.PUVION, M.Ch
TIBERGHIE et V.KRSMANOVIC.

Etudes physicochimique, métabolique et morphologique des
particules spontanément diffusibles des noyaux isolés de
foie de Rat.

Arch. Intern. de Physiologie et de Biochimie. (1969), 77, 571.

Soc. Belge de Biochimie-68e réunion, Bruxelles 9 et 10 mai
1969.

J.P.KERCKAERT, E.PUVION, W.DEFERT-KOBUS et J.MONTREUIL.

Etudes sur les acides nucléiques spontanément diffusibles
des noyaux isolés d'hépatocytes de Rat. Nouvelles données
biochimiques et morphologiques.

C.R.Acad.Sci. (1973), 276, 339-402.

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

J.P.KERCKAERT, J.MONTREUIL, M.Ch. DOYENNETTE-TIBERGHIEU,
F.PUVION, M.N.VLAEMINCK, A.VERBERT, A.DEMAILLE et J.DRIESSENS.
Isolement et purification des particules virales du type A
présentes dans le cytoplasme du lymphome médiastinal de la
souris Swiss induit par l'éthyl-uréthane.
C.R.Acad.Sci., (1970), 271 D, p.624.

M.MAITTE, G.SCHMALTZ, J.P.KERCKAERT et J.MONTREUIL.
Nouvelles recherches sur les variations du taux d'ARN
cérébral chez le Rat après stimulation réticulaire.
C.R.Soc.Biol. (1971), 165, 1606-1609.

J.P.KERCKAERT, J.MONTREUIL, M.Ch. DOYENNETTE-TIBERGHIEU,
F.PUVION, M.N.VLAEMINCK, A.DEMAILLE, L.ADENIS et J.DRIESSENS.
Isolement de particules virales intracytoplasmiques du type
"A" à partir du lymphome murin induit par l'éthyl-uréthane.
Int. J.Cancer. (1971), 8, 926-937.

GENERALITES

1.- LE RNA NUCLEAIRE ET LE RNA MESSAGER

I- MISE EN EVIDENCE. DEFINITIONS

L'essentiel de la synthèse du RNA de la cellule animale siège dans le noyau. Physico-chimiquement on peut y distinguer deux types de RNA suivant leur composition en bases :

1. des RNA riches en résidus guanyliques et cytidyliques, dits de type GC ou de type ribosomal qui sont synthétisés en grande partie dans le nucléole et représentent les formes précurseurs des RNA ribosomiaux 28, 18 et 5 S.
2. des RNA riches en résidus adényliques et uridyliques, dits de type AU ou D-RNA parce que leur composition ressemble à celle du DNA.

Mis en évidence et isolé successivement par GEORGIEV (1) et GEORGIEV et MANTIEVA (2) en 1961 et 1962 puis par SCHERRER et al. (1963) (3), (1966) (4), WARNER et al. (1966) (5), ATTARDI et al. (1966) (6) et PENMAN et al. (1968) (7), le D-RNA nucléaire se définit également par un renouvellement rapide et surtout par une taille élevée et variable qui lui vaut la dénomination de HnRNA ou RNA nucléaire hétérogène.

De même que les RNA ribosomiaux et de transfert dérivent de précurseurs de tailles plus élevées, il apparaît maintenant bien établi que le RNA messager qui, par définition, est engagé dans le complexe polyribosomal pour la synthèse protéique, est également le produit du découpage de précurseurs nucléaires plus longs correspondant au HnRNA.

II- RELATIONS ENTRE HnRNA et mRNA *

Le HnRNA constitue environ le tiers du RNA nucléaire total. Il se compose de molécules de tailles variables atteignant plus de 70 S (10^7 daltons). Puisque le mRNA polyribosomal ne dépasse guère 30 S il faut admettre que le HnRNA subit une réduction de taille importante. HARRIS (9) dès 1962 montre qu'une grande partie du RNA nucléaire rapidement marqué est dégradée et demeure dans le noyau. La preuve directe de la relation HnRNA-mRNA est toutefois plus récente et consiste à vérifier l'une des deux hypothèses suivantes :

a- les deux types de RNA codent la synthèse d'une même protéine spécifique, comme une immunoglobuline (STEVENS et WILLIAMSON (1973)(10)), ou une hémoglobine de souris (WILLIAMSON et al. (1973)(11)) ou de canard (RUIZ-CARRILO et al. (1973) (12)).

b- le HnRNA renferme des séquences nucléotidiques identiques à celles du mRNA. Ceci a pu être montré en utilisant la technique d'hybridation DNA-RNA pour le HnRNA de cellule HeLa (SCHERRER et al. (1970)(13)), de cellules transformées par le virus SV 40 (LINDBERG et DARNELL (1970)(14)) ou infectées par le virus du polyome (ACHESON et al. (1971) (15)); d'erythroblastes de canard (IMAIZUMI et al. (1973)(16)). Enfin la mise en évidence de séquences polyadényliques (poly A) communes au HnRNA et au mRNA polyribosomal, qui en permettant le développement d'une nouvelle technologie pour l'isolement et la purification du mRNA, constitue le fait le plus décisif dans cette étude.

* Revue générale : DARNELL et al. (1973) (8)

III- LES SEQUENCES POLYADENYLIQUES

A- MISE EN EVIDENCE.

Bien que la mise en évidence de séquences polynucléotidiques résistant à la ribonucléase et riches en résidus adényliques remonte à plusieurs années (EDMONDS et ABRAMS(1960) (17); (1963)(18); HADJIVASSILIOU et BRAVERMAN (1966)(19);(1967) (20)) elle ne suscite d'intérêt qu'à partir de 1970 lorsque KATES (21) découvre que ces séquences font partie de l'extrémité 3'OH du mRNA viral du virus de la vaccine. Depuis, et très rapidement, une série de travaux démontre l'existence de segments polyadényliques de 100 à 250 résidus, liés de façon covalente au HnRNA et au mRNA polyribosomal de divers types cellulaires (LIMM et CANELLAKIS (1970)(22), DARNELL et al.(1971) (23)(24), EDMONDS et al.(1971)(25), LEE et al.(1971)(26), PHILIPSON et al. (1971)(27). Simultanément diverses méthodes d'isolement du RNA-poly A sont mises au point. Il s'agit soit de chromatographie d'affinité sur colonne de poly dT-cellulose (EDMONDS et al.(1971)(28)) ou de poly U-Sepharose (LINDBERG et PERSSON (1972)(29)), soit de rétention spécifique à force ionique élevée sur filtre en nitrocellulose (BRAVERMAN et al. (1972)(30)) ou sur colonne de cellulose (SULLIVAN et ROBERTS (1971)(31); KITOS et al.(1972)(32); SCHUTZ et al.(1972)(33); DELARCO et GUROFF (1973)(34)).

B- PROPRIETES DU POLY A.

Obtenues à partir du HnRNA et du mRNA par hydrolyse ribonucléasique, les séquences poly A comptent en général entre 50 et 200 nucléotides pour 1 résidu d'adénosine (MENDECKI et al. (1972)(35)) et migrent en électrophorèse sur gel de polyacrylamide un peu moins rapidement que le tRNA 4 S. La digestion par la Ribonucléase T₁ et les exonucléases confirme la localisation en 3'OH.

Après de très courts marquages (moins d'une minute) 90% du poly A radioactif de la cellule entière est contenu dans la fraction HnRNA (JELINEK et al.(1973)(36)). L'action de l'actinomycine D, inhibitrice de la transcription, et la 3' déoxyadénosine (cordycépine) a permis de préciser que le poly A s'ajoute au HnRNA après la transcription et qu'il résiste au découpage intranucléaire pour apparaître ensuite dans le cytoplasme (DARNELL et al.(1971)(37); JELINEK et al.(1973)(38), MENDECKI et al.(1972)(39); PENMAN et al. (1970)(40)).

IV- LES DIFFERENTES ETAPES DE LA BIOGENESE DU mRNA.

On peut résumer schématiquement (voir figure 1,p.9) les connaissances actuelles sur la biogenèse du mRNA de la cellule animale de la manière suivante :

1. Le mRNA est synthétisé dans le noyau sous forme de pré-curseur géant- le HnRNA.
2. Immédiatement après sa synthèse, le HnRNA est allongé à son extrémité 3'OH de 50 à 200 nucléotides adényliques.
3. Le HnRNA est découpé, toujours dans le noyau, par des nucléases spécifiques, pour donner naissance à des chaînes de taille réduite correspondant au mRNA-poly A.
4. Le mRNA-poly A est exporté dans le cytoplasme soit sous une forme de réserve inactive, soit pour être directement incorporé dans les polyribosomes.

Sachant que le poly A caractérise tous les mRNA chez les Eucaryotes, à l'exception du mRNA codant pour les histones (ADESNIK et DARNELL (1972)(41); SCHOCHETMAN et PERRY (1972)(42)), on est tenté de lui attribuer un rôle important dans la biogénèse du mRNA. On peut par exemple penser que ces séquences représentent un site spécifique de reconnaissance pour le découpage endonucléotidique du HnRNA ou sont nécessaires au transport et à la stabilité du mRNA dans le cytoplasme. Ces différentes hypothèses rejoignent l'idée d'une régulation à

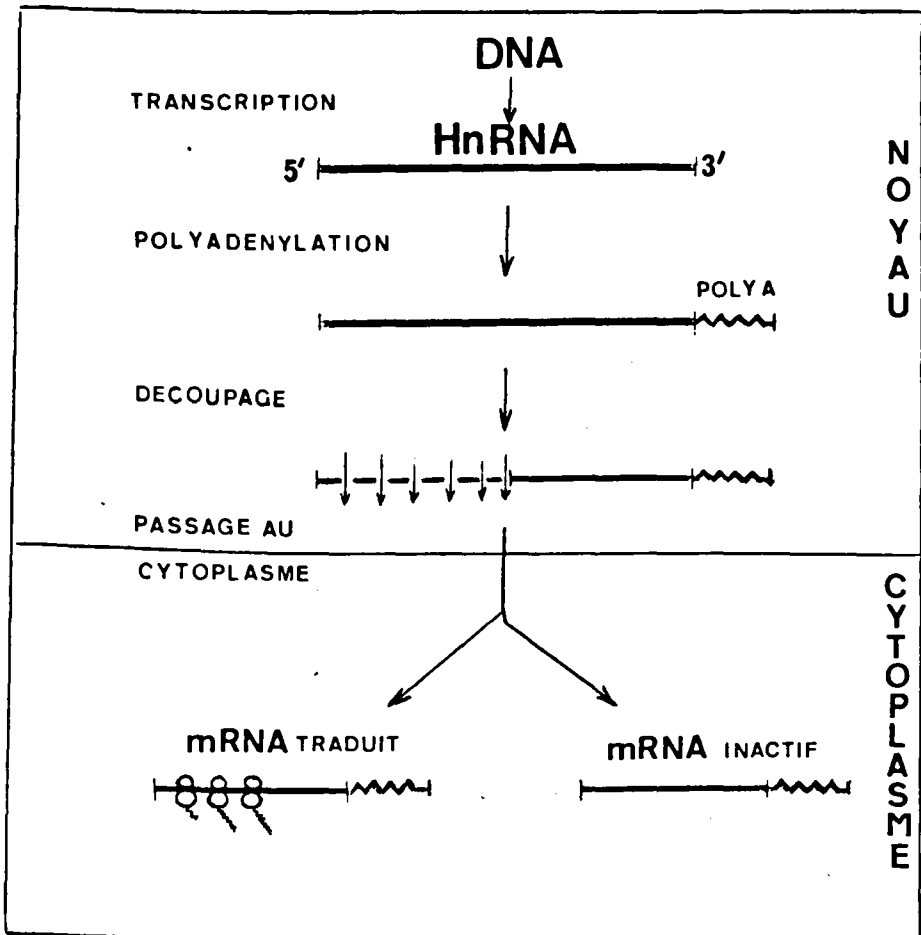


Fig.1. Représentation schématique des différentes étapes de la biogenèse du mRNA.

plusieurs niveaux ou en "cascade" émise déjà en 1968 par SCHERRER et MARCAUD (43), récemment reprise par DARNELL et al. (1973)(44). Le premier stade de régulation se situe au niveau de la transcription où le contrôle s'effectue probablement directement sur le gène. Celui-ci est rendu accessible ou non à la RNA polymérase par les divers constituants protéiques de la chromatine. Le stade suivant, "post-transcriptionnel", concerne les mécanismes intervenant dans la libération des chaînes de HnRNA du site chromosomal, dans l'addition du poly A, dans le découpage endonucléotidique et enfin dans le passage sélectif du mRNA dans le cytoplasme.

Enfin, on peut distinguer un dernier stade, cytoplasmique cette fois, dans l'utilisation du mRNA pour la synthèse protéique.

Outre les problèmes liés directement à la transcription et la traduction du mRNA, se pose une question tout aussi importante pour la compréhension de ces mécanismes de régulation : sous quelles formes, dans quelles structures le mRNA existe-t-il dans la cellule à chacune des étapes précédemment énumérées?

La première indication relative à ce problème est donnée en 1963 par HOAGLAND et ASKONAS (45) qui montrent l'existence dans le cytoplasme de foie de rat d'une fraction composée de RNA et de protéines capable de stimuler l'incorporation d'acides aminés dans la synthèse protéique in vitro.

Toutefois, la notion de complexe RNA "informationnel"-protéines ne se précise et ne se définit nettement qu'à la suite des travaux du groupe de SPIRIN en 1964 (BELITSINA et al.(46), SPIRIN et al.(47)) qui donne à ces complexes le nom d'Informosomes.

Aujourd'hui, la description de ce type de particules s'est étendue à de nombreux types cellulaires et le terme

d'Informosome n'est plus seulement réservé aux particules cytoplasmiques mais s'applique aussi aux complexes RNA de type messenger-protéines, -ou D-RNP-, localisées dans le noyau ou dans les polyribosomes.

2.- LES COMPLEXES D-RNA-PROTEINES *

Plutôt que d'utiliser le terme de mRNP, réservé aux complexes issus des polyribosomes pour lesquels le caractère messager du RNA est implicite, nous utiliserons pour les autres types de particules possédant un RNA non ribosomal, "DNA like" et rapidement marqué, les sigles de D-RNP ou de mRNP ("messenger like" RNA-protéines). Pour faciliter la description des diverses D-RNP nous les avons classées, suivant leur origine, en D-RNP nucléaires, D-RNP cytoplasmiques libres et D-RNP cytoplasmiques liées aux polyribosomes.

En effet, après la découverte par SPIRIN de D-RNP libres dans le cytoplasme de cellules embryonnaires, SAMARINA et al. en 1965 (51) et 1966 (52) isolent à partir de noyaux de cellules animales une population de particules de même type. Puis, en 1968, en dissociant des polyribosomes par l'EDTA, PERRY et KELLEY (53) et HENSHAW (54) montrent que le mRNA se trouve sous la forme de complexes ribonucléoprotéiques.

I- LES D-RNP CYTOPLASMIQUES LIBRES

A- MISE EN EVIDENCE.

Pour faciliter l'étude du D-RNA, on rend généralement son marquage plus sélectif en réduisant ou en supprimant la synthèse du RNA ribosomal. L'actinomycine D qui, à faible dose, bloque la transcription des gènes ribosomiaux (PERRY (1963) (55); GEORGIEV et al. (1963)(56)) est souvent utilisée dans ce but.

* Revues générales : GEORGIEV et SAMARINA (1971)(48)
SPIRIN (1969)(49), (1972)(50)

L'organisme embryonnaire se présente également comme un système expérimental idéal. En effet, au cours des stades précoces de l'embryogenèse, la synthèse ribosomale est nulle (AJTKHOZHIN et al.(1964)(57); BROWN et LITTNA (1964)(58)).

C'est sans doute ce qui a permis à SPIRIN de mettre en évidence des RNP non ribosomales contenant un RNA de type messenger, dans des extraits cytoplasmiques d'embryons de loche (SPIRIN et al.(1964)(59) et d'oursin (SPIRIN et NEMER (1965)(60)).

Ces particules - les informosomes - se présentent en gradient de saccharose comme une population hétérogène qui sédimente en plusieurs fractions distinctes, étalées de 20 à 75 S.

C'est surtout la centrifugation à l'équilibre en chlorure de césium, avec fixation préalable par le formaldéhyde (SPIRIN et al.(1965)(61)), qui permet d'individualiser nettement les informosomes par rapport aux autres composés cytoplasmiques. En effet, le caractère principal des informosomes est leur densité à l'équilibre (1,36 à 1,46) beaucoup plus faible que celle des constituants ribosomiaux (1,5 à 1,6).

La présence de ces particules D-RNP libres a ensuite été abondamment décrite dans les extraits cytoplasmiques d'origine diverse, animale et végétale : PERRY et KELLEY (1968)(62) pour la cellule L; OVCHINNIKOV et al.(1969)(63); MAC CONKEY et HOPKINS (1965)(64), SPOHR et al.(1970)(65) pour la cellule HeLa; HENSHAW et al.(1965)(66), QUIRIN-STRICKER et MANDEL (1969)(67), HENSHAW et LOEBENSTEIN (1970)(68), SUGANO et al.(1971)(69) pour le foie de rat; SAMEC et al.(1966)(70), KEMPF et al.(1972)(71) pour un plasmocytome de souris; CARTOUZOU et al.(1969)(72) pour la thyroïde de mouton; KAFATOS (1968)(73) chez l'insecte; AJTKHOZHIN et al.(1973)(74) et SILVERSTEIN (1973)(75) pour le blé embryonnaire.

B- PROPRIETES

1- Les informosomes d'organismes embryonnaires.

L'analyse par centrifugation en gradient de saccharose des composés à RNA rapidement marqués contenus dans le surnageant post-microsomal d'embryon de loche (OVCHINNIKOV et al. (1969)(76)) fait apparaître plusieurs pics discrets, mais distincts, de 20 à 120 S. Cette distribution hétérogène se retrouve avec l'embryon d'oursin (SPIRIN et al. (1964)(77); SPIRIN et BELITSINA (1965)(78)). Le RNA extrait de chacune de ces fractions montre une forte affinité d'hybridation pour le DNA homologue et il stimule la synthèse protéique in vitro (SPIRIN et NEMER (1965)(79)). Chaque classe d'informosomes 20, 30, 43, 52 et 63 S renferme un RNA de 10, 15, 25, 33 et 38 S respectivement (NEMER et INFANTE (1965)(80); INFANTE et NEMER (1968)(81)).

La densité en chlorure de césium est de l'ordre de 1,4 pour les particules de taille supérieure à 40 S et légèrement plus faible, jusqu'à 1,35, pour les particules de 20 à 40 S. L'embryon de poulet contient également ce type de particules, hétérogènes en taille (30 à 200 S) de densité moyenne en CsCl 1,47 (KNÖCHEL et TIEDEMANN (1972)(82)).

Enfin, traduisant leur nature ribonucléoprotéique, les informosomes sont sensibles à la pronase et au phénol-SDS, incorporent les précurseurs ribonucléiques et les acides aminés marqués et sont retenus sur filtre de nitrocellulose (le RNA ou les protéines seuls ne le sont pas).

2- Les informosomes d'organismes adultes.

Peu après SPIRIN, HENSHAW et al. (1965)(83) et MAC CONKEY et HOPKINS (1965)(84) découvrent l'existence de D-RNP libres dans le cytoplasme de cellule HeLa et de foie de rat.

Il s'agit de particules 40 à 45 S représentant, selon les auteurs, l'association du mRNA avec la petite sous-unité ribosomale.

Pour PERRY et KELLEY (1966)(85), (1969)(86), les D-RNP cytoplasmiques libres de cellule L se partagent sur gradient de CsCl en deux fractions de densité 1,43 à 1,48 et 1,35 à 1,38. La plus dense, qui renferme un RNA 18 S, riche en GC et peu hybridable avec le DNA homologue, représente la petite sous-unité ribosomale. L'autre, moins dense, qui possède un D-RNA hétérogène et facilement hybridable, correspond à l'informosome.

Les D-RNP de cerveau de rat (SAMEC et al. (1968)(87) et de foie de rat (QUIRIN-STRICKER et MANDEL (1969)(88)) sont plus petites : S inférieur à 40 et densité voisine de 1,40.

Bien que ces particules soient étudiées par de nombreux auteurs, on constate que leur analyse physico-chimique demeure sommaire. Ce fait s'explique en grande partie par la difficulté d'obtenir les informosomes à l'état pur, débarrassés notamment des constituants ribosomaux qui les accompagnent en gradient de saccharose.

La centrifugation isopycniqne en CsCl rend possible cette purification, mais pour éviter la dissociation des D-RNP alors soumises à de fortes concentrations en sel, il est nécessaire d'effectuer une fixation préalable par le formaldéhyde ou par le glutaraldéhyde. Ce traitement rend ces particules purifiées malheureusement inutilisables pour toute analyse ultérieure.

Pour résoudre ce problème, KEMPF et al. (1972)(89) proposent un procédé intéressant: En conservant le principe de la purification isopycniqne, les auteurs remplacent le chlorure de césium par un gradient de saccharose dissous dans de l'eau lourde (D_2O). Ils isolent

de cette manière, à partir d'un extrait cytoplasmique de plasmocytome de souris, une fraction contenant les D-RNP dans la zone de densité 1,29 nettement séparée des constituants ribosomiaux. Cette fraction, analysée ensuite en gradient de CsCl, retrouve la densité 1,4, caractéristique des informosomes.

Les systèmes cellulaires infectés par un virus dont le RNA messenger est identifiable sont également utilisés pour caractériser les D-RNP. JOKLIK et BECKER (1965)(90), puis BELITSINA et al.(1968)(91) ont pu mettre en évidence, dans le cytoplasme de cellule HeLa infectée par le virus de la Vaccine, des particules 45 S de densité 1,4 dont le RNA était complémentaire du DNA viral.

De même, différents complexes mRNA viral-protéines ont été décrits dans le cytoplasme de cellules du carcinome ascitique d'Ehrlich infectées par le virus Sendai (VOLKOVA et al. (1969)(92)); de cellules HeLa infectées par le Poliovirus (HUANG et BALTIMORE (1970)(93)) et enfin de cellules L infectées par le Réovirus (CHRISTMAN et al.(1973)(94)).

Dans ce dernier cas, il s'agit de particules 50 S de densité 1,40 et, en se référant aux résultats de SCHOCHTEMAN et PERRY (1972)(95) et de BALTIMORE (1970)(96), CHRISTMAN et al. ont suggéré plusieurs stades de transition aboutissant à la formation des polyribosomes suivant la densité des complexes observés :

1. d=1,40 : mRNP
2. d=1,44 : mRNP-sous-unité ribosomale 45 S
3. d=1,47 : mRNP-monoribosome
4. d=1,54 : mRNP-polyribosome

II- LES D-RNP LIEES AUX POLYRIBOSOMES

A- MISE EN EVIDENCE.

Parmi les divers constituants cellulaires, le polyribosome est la seule fraction où la présence de mRNA est évidente. Sa dissociation par un agent chélatant les ions magnésium, comme l'EDTA ou les pyrophosphates, libère les ribosomes en les dissociant en sous-unités 30 et 50 S, et le mRNA. Très vite il est apparu que le mRNA ainsi libéré se trouve, non pas comme une chaîne polynucléotidique nue, mais sous forme de complexe avec des protéines (WEISBERGER et ARMENTROUT (1966)(97); HUEZ et al.(1967)(98); PERRY et KELLEY (1968)(99); HENSHAW (1968)(100)).

Ces mRNP ont ensuite été caractérisées dans divers tissus par SCHWEIGER et HANNIG (1970)(101), OLSNES (1970)(102) (foie de rat); KUMAR et LINDBERG(1972)(103) (cellule KB); SPHOR et al.(1970)(104) (cellules HeLa); CARTOUZOU et al.(1968)(105) (thyroïde de mouton); TEMMERMAN et LEBLEU(1969)(106), BURNY et al.(1969)(107) (réticulocyte de lapin); MOREL et al. (1971)(108) (érythroblaste de canard).

B- PROPRIETES

Les mRNP libérées par l'action de l'EDTA sur les polyribosomes de foie de rat (HENSHAW (1968)(109), de cellule HeLa (SPHOR et al.(1970)(110)) ou de cellule L (PERRY et KELLEY (1968)(111)), c'est-à-dire de cellules qui produisent une gamme très large de protéines, sédimentent comme les D-RNP cytoplasmiques libres de façon très hétérogène, de 20 à 70 S en général. De même, le RNA isolé s'étale de 8 à 30 S avec un maximum vers 18 S. KUMAR et LINDBERG (1972)(112) obtiennent toutefois des particules mRNP de cellule KB beaucoup plus lourdes, dépassant 200 S, en prenant soin d'éviter les interactions RNA-protéines non spécifiques et les dégradations provoquées par des nucléases contaminantes. Dans ces conditions, 60 à 70%

des m.RNP sédimentent au delà de la sous-unité ribosomale 50 S et plus de 50% de leur RNA dépasse 28 S.

Lorsqu'on analyse sur chlorure de césium les polyribosomes non dissociés, le profil de radioactivité rapidement incorporée par le RNA et le profil de densité optique se superposent en un pic de densité 1,52 à 1,60. Après dissociation par l'EDTA le matériel absorbant l'ultraviolet qui représente les sous-unités ribosomales, s'équilibre comme précédemment vers $d=1,57$, mais le matériel rapidement marqué s'en sépare et se retrouve dans la zone de densité 1,40 à 1,48.

Le desoxycholate (D.O.C.) et les concentrations salines élevées augmentent la densité des particules qui perdent probablement une partie de leurs protéines. De 1,47 la densité passe à 1,55 après traitement au D.O.C, à 1,52 après action de KCl 0,5M et à 1,59 avec KCl 1M (OLSNES (1970)(113)).

L'étude des mRNP polyribosomales est beaucoup plus claire avec les cellules sanguines immatures. En effet, dans le réticulocyte ou l'erythroblaste, l'hémoglobine représente pratiquement la totalité de l'activité de synthèse protéique. Les polyribosomes forment ainsi une population homogène. Ils se composent de 5 à 6 ribosomes liés par le mRNA de l'hémoglobine. La dissociation par l'EDTA conduit en gradient de saccharose à la séparation des sous-unités 30 et 50 S, des mRNP 14 S, du t-RNA 4 S et de l'hémoglobine.

Le RNA extrait des particules 14 S possède exactement les propriétés du mRNA de l'hémoglobine : c'est un RNA 9 S, de type AU, qui in vitro dirige la synthèse de l'hémoglobine (BURNY et al.(1969)(114); TEMMERMAN et LEBLEU (1969)(115)).

La composition protéique des mRNP se révèle extrêmement simple. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS sépare deux protéines majeures de poids moléculaire 78.000 et 52.000 pour les mRNP de réticulocytes de lapin (BLOBEL (1972))

(116) ou 73.000 et 49.000 pour les mRNP d'erythroblastes de canard (MOREL et al. (1971)(117)); à la suite de travaux plus récents, on peut penser que la composition en protéines des mRNP est un peu plus complexe. En effet, MOREL et al. (1973)(118) signalent la présence de composés discrets ayant des P.M compris entre 52.000 et 64.000, d'une part, et entre 86.000 et 120.000, d'autre part. Trois protéines au moins seraient phosphorylées : celles de P.M 73.000, 64.000 et 49.000.

Enfin il est très intéressant de remarquer que les deux protéines majeures 49.000-52.000 et 73.000-78.000 se retrouvent dans plusieurs autres types cellulaires : dans le cerveau d'embryon de poulet (BRYAN et HAYASHI (1973)(119)); dans la cellule L et le foie de rat (BLOBEL (1973)(120) et probablement dans la plupart des cellules eucaryotes.

III- LES D-RNP NUCLEAIRES.

A- OBTENTION.

La mise en évidence de ce troisième type de particules est certainement plus nette et plus commode que celle des D-RNP cytoplasmiques. Les D-RNP nucléaires s'obtiennent, en effet, à partir de noyaux isolés et purifiés ce qui élimine d'emblée la présence de contaminants cytoplasmiques. Plusieurs procédés d'isolement plus ou moins proches de celui décrit initialement par SAMARINA et al. (1965)(121); (1966)(122) sont utilisés. Ce dernier consiste après plusieurs extractions successives de noyaux par une solution de NaCl 0,1M - Tris 0,01M pH 8 - MgCl₂ 0,001M, à isoler sur gradient de saccharose une fraction ribonucléoprotéique homogène 30 S.

ISHIKAWA et al. (1969)(123) en modifiant légèrement la composition du milieu d'extraction, en y ajoutant notamment de l'ATP, obtiennent le même type de particules, bien que leur vitesse de sédimentation soit évaluée à 45 S.

L'extraction des particules par MOULÉ et CHAUVEAU (1966)(124) et (1968)(125) nécessite le broyage des noyaux par homogénéisation en présence de sable ou à l'aide d'un Ultra-Turrax. De la même manière, FAIFERMAN et al. (1970) (126) fracturent les noyaux par compression à la presse FRENCH.

Enfin, il existe des procédés d'extraction plus douce où, au contraire, l'intégrité morphologique du noyau est recherchée. Il s'agit plutôt que d'une extraction, d'une diffusion de noyaux isolés dans une solution de saccharose-phosphate-magnésium de pH 7,8 (DEFERT et al. (1966)(127)) ou de composition plus complexe contenant en particulier du cytosol et de la spermidine (SCHUMM et WEBB (1972)(128)).

Le rendement en D-RNP varie selon le procédé, mais en général il est influencé

1. par la concentration en ions magnésium qui doit rester inférieure à 0,01M,
2. par la présence d'ATP ou d'un système énergétique,
3. par la température d'extraction.

Enfin, pour éviter les dégradations provoquées par des nucléases intranucléaires, il est souvent utile d'ajouter un inhibiteur de ribonucléase.

B- PROPRIETES

1. Sédimentation.

Les propriétés des produits d'extraction ou de diffusion des noyaux isolés dépendent en premier lieu de la présence ou non d'inhibiteur de RNase. En son absence, les profils de sédimentation en gradient de saccharose de la radioactivité incorporée in vivo (^{32}P , Uridine ou acide orotique marqué au ^3H ou ^{14}C) et de densité optique à 260 nm se superposent en un pic homogène entre 30 et 45 S (SAMARINA et al. (1966)(129)),

(1968)(130); MOULÉ et CHAUVEAU (1968)(131); PARSONS et McCARTY (1968)(132); KRSMANOVIC et al.(1968)(133); CARTOUZOU et al. (1969)(134); ISHIKAWA et al.(1969)(135); FAIFERMAN et al.(1970)(136); DUCAMP et JEANTEUR (1973)(137).

L'addition d'inhibiteur cytoplasmique de RNase (ROTH (1958)(138); SHORTMAN (1961)(139)) à la suspension de noyaux, fait apparaître un profil de sédimentation hétérogène. Les constantes de sédimentation des particules varient entre 30 et 300 S (SAMARINA et al.(1968)(140); OLSNES (1970)(141); STEVENIN et al. (1970)(142); NIESSING et SEKERIS (1971)(143)). L'incubation avec de faibles doses de RNase conduit à nouveau aux particules 30-45 S que l'on peut donc considérer comme l'unité monomère (monoparticule) de formes plus grandes (polyparticules) pouvant compter, selon SAMARINA et al.(1968)(144), jusqu'à 30-35 unités.

La densité à l'équilibre en CsCl est sensiblement la même pour les mono- et pour les polyparticules, 1,40, traduisant un taux de 20% de RNA pour 80% de protéines.

La sensibilité des particules vis à vis du désoxycholate, d'abord observée par MOULÉ et CHAUVEAU (1966)(145) puis par KRSMANOVIC et al. (1968)(146), CARTOUZOU et al.(1969)(147), OLSNES (1970)(148), FAIFERMAN et al.(1971)(149) et STEVENIN et JACOB (1972)(150), est une propriété très caractéristique. L'addition du détergent à la concentration de 1% utilisée habituellement dans la préparation des polyribosomes, suffit pour faire disparaître la presque totalité du pic 40-45 S; la radioactivité portée par le RNA se retrouve alors dans la partie supérieure du gradient entre 10 et 15 S et la densité en CsCl augmente très fortement, ce qui indique une perte importante en protéines.

2. Le RNA.

Le RNA extrait des D-RNP nucléaires est rapidement marqué et "DNA like". Sa taille est variable et dépend beaucoup du procédé de préparation des particules qui peut favo-

riser plus ou moins les dégradations enzymatiques ou mécaniques. Dans les meilleures conditions, il s'agit de RNA de 4 à 30 S, le maximum se situant en général vers 8-10 S.

La présence de séquences polyadényliques récemment signalée (SCHUMM et WEBB (1974)(151), RASKAS et BHADURI (1973) (152) DUCAMP et JEANTEUR (1973)(153)) est un solide argument en faveur de sa nature messagère. L'étude la plus démonstrative dans ce sens est réalisée par RASKAS (1971)(154), qui à partir de noyaux de cellules infectées par un Adénovirus montre que les D-RNP libérées renferment un RNA dont la taille, la composition et la teneur en poly A sont identiques au mRNA isolé des polyribosomes synthétisant les protéines virales.

3. Les protéines.

Les D-RNP 30-45 S, au contraire des D-RNP cytoplasmiques sont suffisamment purifiées sur gradient de saccharose pour que l'on puisse étudier leurs protéines.

Les protéines s'obtiennent par dissociation du complexe RNP le plus souvent par l'urée 6 ou 8M, ou encore par KCl ou LiCl 1 à 2M. Elles peuvent ensuite être analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide soit à pH 4,5 en présence d'urée, soit en présence de SDS après traitement au β -Mercaptoéthanol.

A pH 4,5 les protéines ont un comportement basique mais se distinguent nettement des protéines ribosomales et des histones.

Elles se composent en général de trois constituants majeurs qui selon SAMARINA et al. (1968)(155) et KRICHEVSKAYA et GEORGIEV (1969)(156) donnent après réduction des ponts disulfure par le β -Mercaptoéthanol un seul polypeptide de poids moléculaire 40.000. Ce résultat conduit les auteurs à suggérer

que les D-RNP nucléaires sont formées par l'association du D-RNA avec une particule protéique, l'informofère, constituée elle-même de l'assemblage de 15 à 25 unités polypeptidiques identiques de PM 40.000. Cependant, bien que le diagramme électrophorétique paraisse effectivement simple, la plupart des auteurs sont en contradiction avec la notion de l'informofère de GEORGIEV. On observe, en effet, par la technique au SDS-Mercaptoéthanol, à côté de deux ou trois composés prédominants de P.M 32.000 à 40.000, une vingtaine environ de polypeptides allant jusqu'à 120.000 daltons. (NIESSING et SEKERIS (1971)(157); FAIFERMAN et al. (1971)(158); ALBRECHT et VAN ZYL (1973)(159); MATRINGE et JACOB (1972)(160); GALLINARO-MATRINGE et JACOB (1973)(161); PEDERSON (1974)(162)).

4. Structure.

A partir des données biochimiques, en particulier la stabilité et le comportement des D-RNP vis à vis d'agents de dissociation ou de dégradation, deux modèles de structure sont proposés.

Le premier, élaboré par le groupe de GEORGIEV (SAMARINA et al. (1967)(163); (1968)(164); LUKANIDIN et al. (1971)(165)) donne aux D-RNP une structure du type polysomal dans laquelle les protéines assemblées en informofères sont, comme les ribosomes, fixées tout au long de la molécule de D-RNA (voir schéma p.25); le D-RNA se trouve alors localisé à la surface des informofères. Ce schéma repose essentiellement sur les deux observations suivantes :

- 1) après une action ménagée de la RNase, les polyparticules 30-250 S sont converties en monoparticules 30 S.
- 2) en présence de NaCl 2M, les protéines se séparent du D-RNA mais restent assemblées en informofères qui conservent leur vitesse de sédimentation 30 S. La dissociation de l'informofère nécessite un traitement par l'urée 6M.

Pour SAMARINA et al. (1968)(166), cette structure s'illustre encore parfaitement en microscopie électronique. La coloration

négative donne les images de monoparticules 30 S, de leur dimère 45 S, des tétra et pentamères d'environ 70 S et des hepta et octamères de 90 à 100 S, isolés sur gradient de saccharose.

Le second modèle, proposé par l'équipe de JACOB, tient compte, grâce à une analyse très détaillée, de la dissociation progressive des complexes D-RNP sous l'effet de concentrations croissantes de sels de cations monovalents (STEVENIN et al. (1973)(167) et sous l'action du désoxycholate et de la RNase (STEVENIN et JACOB (1972)(168)).

La monoparticule est décrite comme une "chaîne ribonucléoprotéique pouvant prendre une certaine configuration pour former un complexe compact" .(Voir Fig.2, p.25).

Ce modèle explique, en effet, que lorsqu'on prolonge l'action de la RNase, les D-RNP monomères 40 S disparaissent progressivement tout en conservant la même densité en CsCl.

D'autre part, avec les particules traitées par le D.O.C (ayant perdu une grande partie de leurs protéines de sorte que leur densité de 1,46 à 1,64 est supérieure à celle des particules natives), l'hydrolyse par la RNase conduit à la formation de particules 5 à 20 S qui retrouvent la densité (1,40) des particules natives.

Enfin, la densité des particules s'élève progressivement à mesure que la concentration en KCl augmente de 0,4 à 1M. Les protéines se détachent donc, contrairement aux informofères, d'une manière progressive.

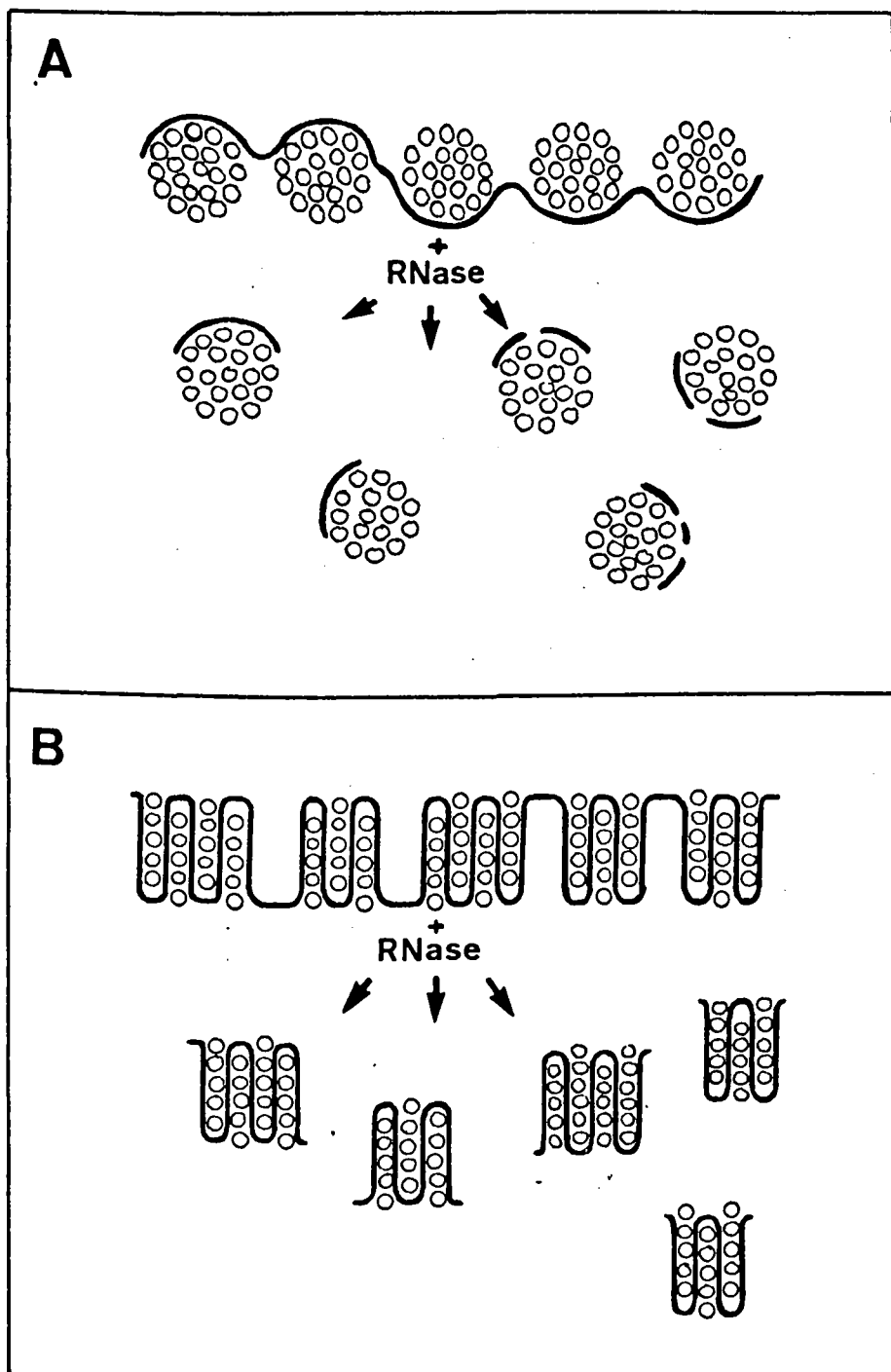


Fig.2. Modèles de structure des D-RNP nucléaires.
 selon (A) SAMARINA et al. (1967)(169)
 et (B) STEVENIN et al. (1973)(170)

IV- SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DES D-RNP.

Même si le rôle du RNA, mRNA ou pré-mRNA, contenu dans les différentes D-RNP est apparent, le fait qu'il soit toujours associé à certaines protéines est jusqu'à présent très difficile à expliquer.

SPIRIN (1969)(171) envisage trois possibilités :

- 1) les informosomes sont une forme de transport du mRNA ou du pré-mRNA, du noyau au polyribosome.
- 2) les informosomes sont une forme de protection du mRNA contre les divers agents cellulaires.
- 3) les informosomes sont une forme de régulation de la synthèse protéique. La présence ou l'absence de certaines de leurs protéines conditionnent l'utilisation ou non du mRNA.

Dans chacune de ces possibilités, la nature et les propriétés des protéines associées au RNA ont une importance primordiale et une autre question fondamentale se pose alors : les protéines sont-elles les mêmes depuis le départ du D-RNA de la chromatine jusqu'à son arrivée dans le polyribosome ou au contraire des modifications ou des échanges interviennent-ils entre les D-RNP nucléaires, les D-RNP cytoplasmiques libres et les mRNP?

Ces deux éventualités sont suggérées tour à tour. D'abord OLSNES (1970)(172) et SCHWEIGER et HANNIG (1970)(173) montrent par électrophorèse la présence de composés identiques dans les D-RNP nucléaires et polyribosomales de foie de rat. Puis LUKANIDIN et al. (1971)(174) et MOREL et al. (1971)(175) font la démonstration inverse en comparant les protéines de mRNP de réticulocytes de lapin et de canard avec celles de D-RNP nucléaires de foie de rat et de canard. Enfin, plus récemment, en utilisant un antisérum anti D-RNP nucléaires, LUKANIDIN et al. (1972)(176) n'observent pas de relation anti-

génique entre les m-RNP polyribosomales et les D-RNP nucléaires.

En ce qui concerne le rôle précis exercé par les protéines dans les différentes D-RNP, on ne dispose encore que de très peu de données expérimentales. Pour les D-RNP nucléaires, NIESSING et SEKERIS signalent deux types d'activité enzymatique :

- 1) une activité endonucléasique spécifique pour le HnRNA (NIESSING et SEKERIS (1970)(177)).
- 2) deux activités de poly A synthétase, l'une dépendant des ions Mn^{++} , l'autre des ions Mg^{++} . (NIESSING et SEKERIS (1973)(178)).

Selon OLSNES et PIHL(1972)(179) les protéines - tout au moins l'une d'entre elles - empêchent le D-RNA des D-RNP nucléaires de se fixer aux ribosomes in vitro. Au contraire, les protéines des mRNP polyribosomales 15 S de réticulocyte sont nécessaires à la fixation du mRNA à la sous-unité ribosomale 40 S lorsque celle-ci a été lavée au préalable par le D.O.C. (LEBLEU et al. (1971)(180)). Ces dernières protéines sont, d'autre part, différentes des facteurs d'initiation (NUDEL et al.(1973)(181)).

Les protéines des D-RNP cytoplasmiques libres semblent également intervenir dans l'utilisation de leur RNA dans la synthèse protéique. En effet, MANO et NAGANO (1970) (182) indiquent que la fertilisation des oeufs d'oursin entraîne l'activation d'une protéase spécifique. Cette protéase démasque ainsi le mRNA maternel présent dans les informosomes et déclenche la synthèse protéique.

Enfin dans l'erythroblaste de canard, le mRNA existe sous forme de D-RNP cytoplasmiques libres 20 S ou de mRNP polyribosomales 15 S et l'analyse électrophorétique des protéines de ces deux types de particules fournit des diagrammes

différents (GANDER et al.(1973)(183)). Il est donc possible comme le suggèrent GANDER et al. que les protéines, certaines étant phosphorylées, sont échangées pour permettre la traduction du mRNA. Le mécanisme de cet échange demeure obscur, mais on peut imaginer soit l'intervention d'une protéase spécifique, comme dans le cas précédent, ou encore, comme pour les protéines chromosomales que la phosphorylation ou la déphosphorylation modifie les interactions protéines-acide nucléique.

MATERIEL ET METHODES

1.- LA DIFFUSION.

L'étude systématique réalisée par MONTREUIL et ses collaborateurs, des critères biochimiques et morphologiques des inclusions obtenues par divers procédés de fractionnement cellulaire a conduit à mettre en évidence une diffusion de composés phosphorylés des fractions cellulaires vers leur milieu d'isolement. Parmi les nombreux milieux étudiés, les solutions tamponnées par des phosphates se sont montrées les plus favorables à ce phénomène de diffusion (DEFERT *et al.* (1965)(184) et c'est la fraction "noyaux isolés" qui est apparue la plus touchée. En effet, lorsqu'on maintient les noyaux isolés en suspension à 4°C pendant 4 heures dans une solution de saccharose 0,35M contenant du phosphate de potassium 0,02M à PH 7,8, 30% environ de la radioactivité ^{32}P incorporée *in vivo* diffuse et se retrouve en solution.

Les multiples analyses biochimiques et morphologiques effectuées par la suite ont permis de conclure, d'une part, que cette fraction diffusible renferme une population homogène de particules ribonucléiques de type informosome (DEFERT (1971) (185) (PUVION (1972)(186) et, d'autre part, d'améliorer au fil de l'expérimentation le procédé d'obtention de ces particules.

I- PREPARATION DES D-RNP DIFFUSEES.

La préparation des particules comprend deux étapes qui sont schématisées dans les figures 3 (p.32) et 5(p.34):

- 1) la purification des noyaux.
 - 2) la diffusion et la purification des D-RNP.
- Toutes les opérations, sauf indication contraire, sont effectuées entre 0°C et 4°C.

A- ANIMAUX.

Nous utilisons pour toute notre expérimentation le foie de rat Wistar mâle. Les animaux âgés de 3 à 4 mois, mis à jeun pendant 18 heures, sont sacrifiés par décapitation. Les foies sont prélevés et rapidement amenés entre 0 et 4°C dans la solution d'homogénéisation.

Les incorporations de radiophosphates sont effectuées in vivo par injection intrapéritonéale de 1 millicurie (0,5ml) par rat.

B- PURIFICATION DES NOYAUX.

Le procédé d'isolement des noyaux de foie de rat est fondé sur la centrifugation isopycnique dans une solution de saccharose hypertonique (2,2M) selon CHAUCHEAU et al. (1956) (187).

Les foies sont d'abord broyés dans 5 volumes de la solution H: Saccharose 0,33M, Acétate de calcium 1,8mM, puis ils ont homogénéisés au POTTER-ELVEJHEM par 5 aller-retours du piston. L'homogénat est centrifugé à 1300 tours par minute pendant 10 minutes. ("International" Rotor.PR2). Le sédiment ainsi obtenu est resuspendu dans du saccharose 2,2M puis ultracentrifugé pendant 90 mn à 18.000 t/mn. (Spinco, rotor 19). Le nouveau sédiment ("Noyaux Chauveau") est enfin traité par une légère homogénéisation dans la solution H à laquelle on ajoute 0,5% de TRITON X100 (HYMER et KUFF (1964)(188)). Les noyaux ainsi "décapés" sont sédimentés à 1300 t/mn et lavés une dernière fois par la solution H pour éliminer le détergent.

Comme le montre la figure 4 (p.33), nous obtenons de cette manière des préparations très satisfaisantes en morphologie et en pureté.

C- LA DIFFUSION. ISOLEMENT DES D-RNP.

Les noyaux purifiés sont resuspendus dans un volume égal à la moitié du volume des foies de départ, de "solution SPM":

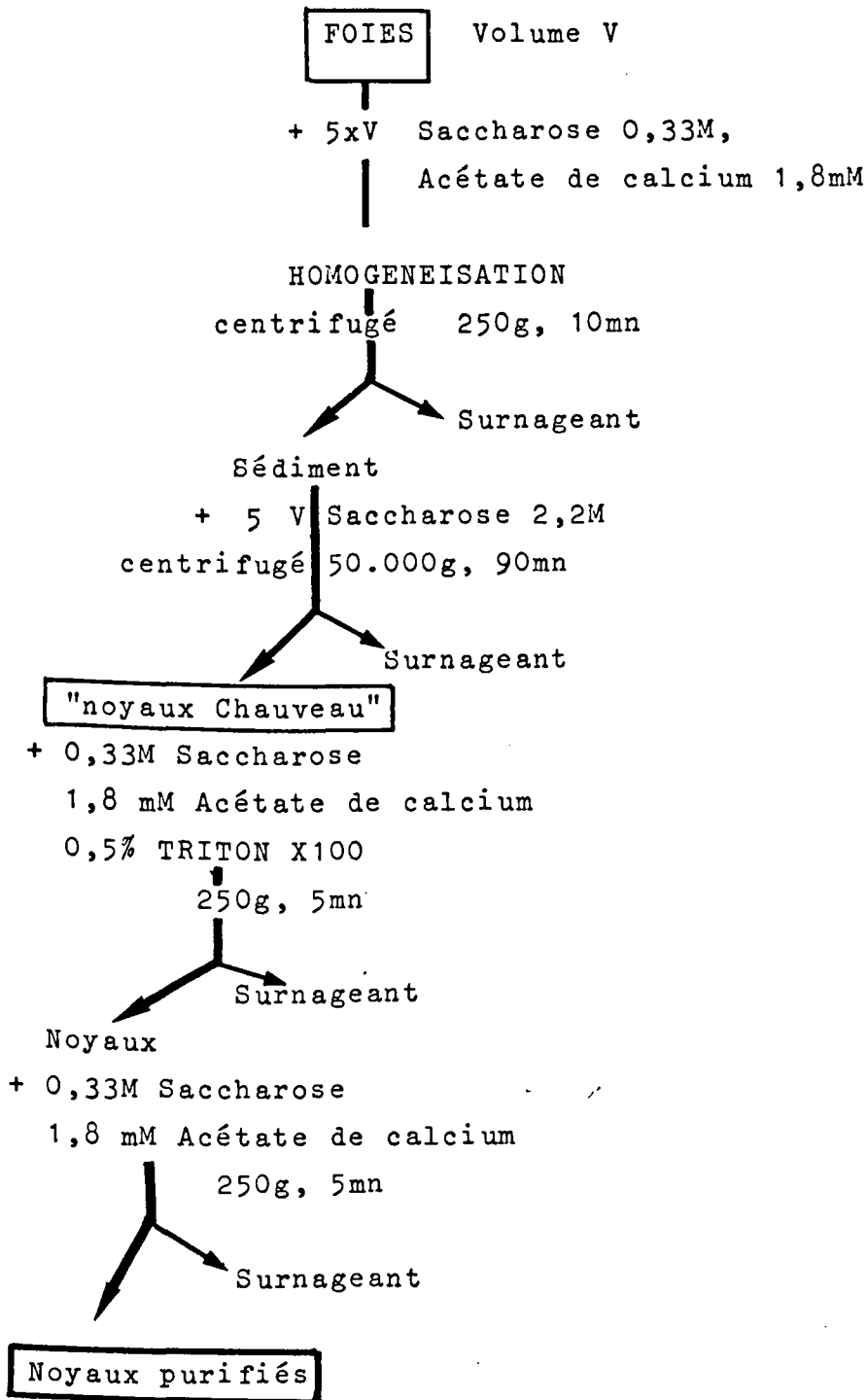


Fig 3. Protocole expérimental de la préparation des noyaux purifiés.

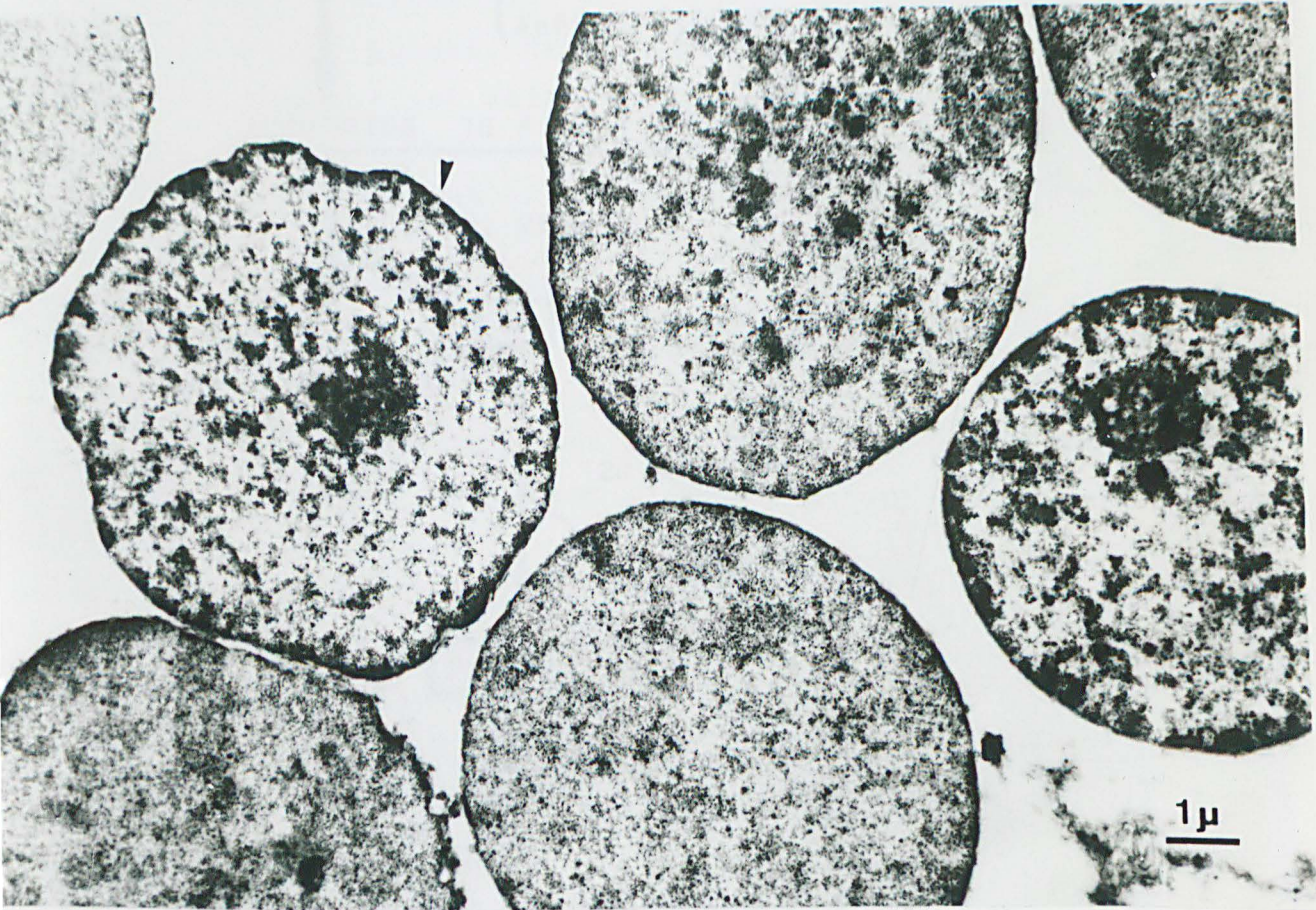


Fig.4. Aspect au microscope électronique d'une préparation de noyaux purifiés traités par le Triton X 100. x 9.000. (D'après PUVION.E.)

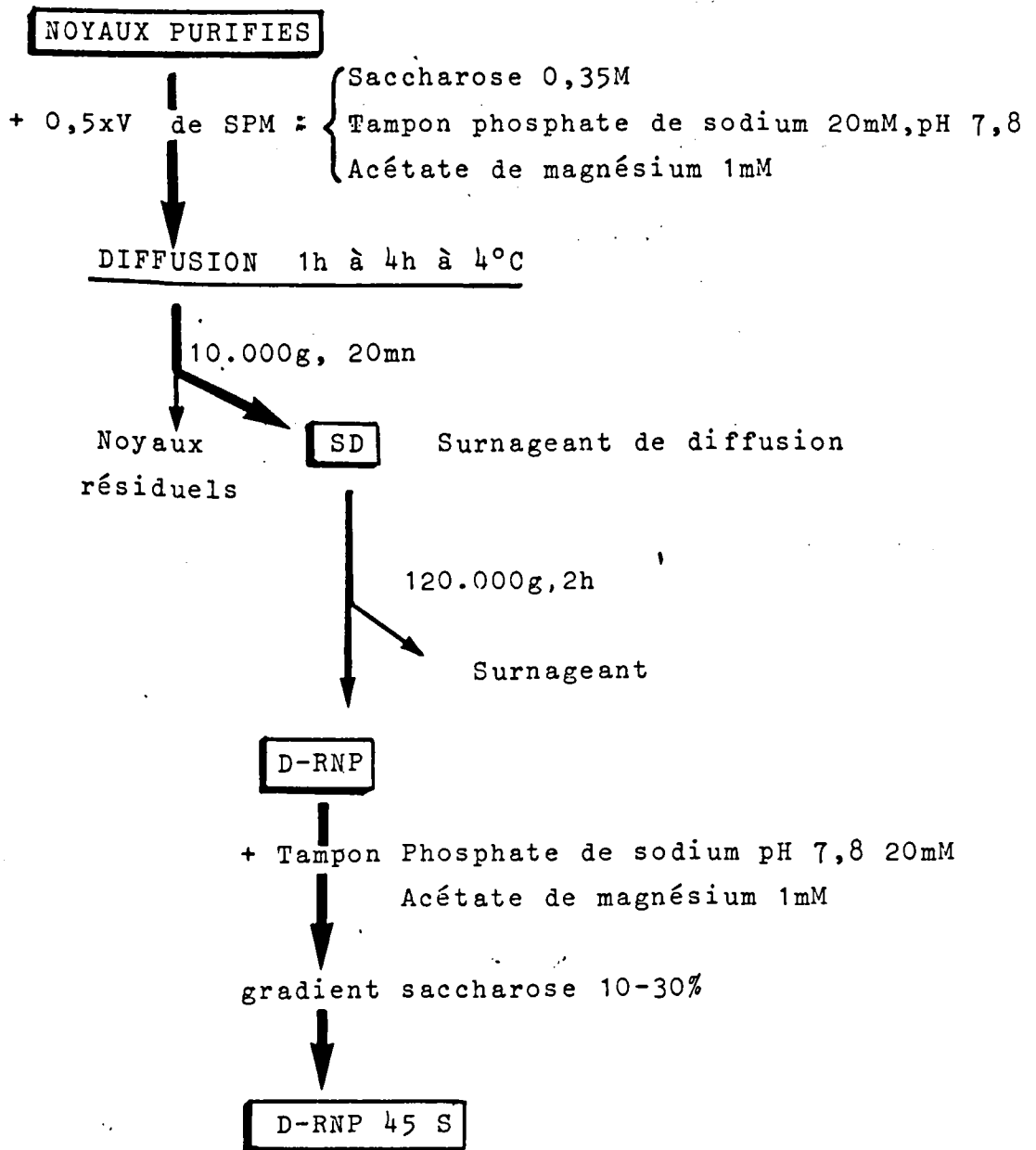


Fig 5. Protocole expérimental de l'isolement des D-RNP diffusées.

Saccharose 0,35M; tampon phosphate de sodium 20 mM à pH 7,8; Acétate de magnésium 1mM.

La suspension est maintenue à 4°C sous agitation périodique pour éviter la décantation, pendant 1 heure.

Après la diffusion, on sépare les "noyaux diffusés" du surnageant de diffusion "SD" par centrifugation à 10.000 t/mn pendant 20 mn (Spinco, SW27) . Enfin, les particules de D-RNP sont concentrées par sédimentation à 45.000 t/mn pendant 2 heures (Spinco R.50Ti) puis elles sont purifiées sur gradient de saccharose tamponné en phosphate 20mM pH 7,8- Acétate de Mg, 1mM.

D- DIFFUSION EN PRESENCE D'INHIBITEUR DE RNase.

Dans certains cas nous avons ajouté à la solution de diffusion SPM un inhibiteur cytoplasmique de RNase préparé selon SHORTMAN (189).

L'inhibiteur contenu dans le premier pic d'élution de la chromatographie sur DEAE cellulose d'un surnageant post-microsomi- que (S100) (voir fig 6, p.36) est équilibré en saccharose-phosphate par passage sur Sephadex G-25 (2,5 x 20 cm) elle-même équilibrée en solution S.P.M.

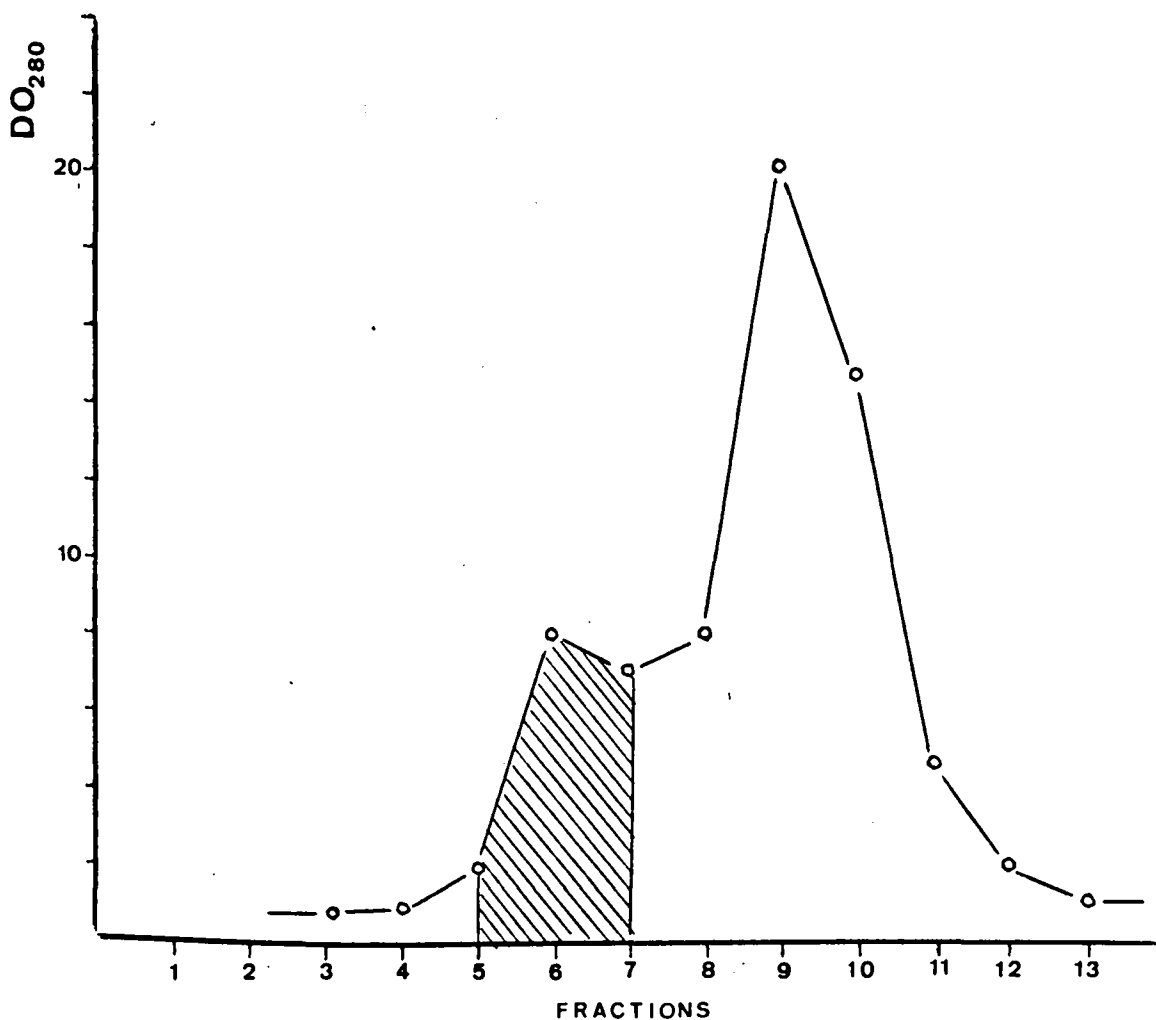


Fig.6. Préparation de l'inhibiteur cytoplasmique de RNase (fractions 5, 6 et 7).

Le cytosol (S100) est fractionné sur colonne de DEAE-cellulose (1,5 x 15 cm) éluée par un gradient de 0,15 à 1,4M NaCl en tampon phosphate de potassium 0,01M , pH 6,4 contenant de l'EDTA 1mM.

Débit d'éluion : 30ml/h. Fractions de 6ml.

II- ETUDE CINETIQUE DE LA DIFFUSION.

L'influence de différents facteurs (temps, température, ATP, AMPc) sur la quantité de produits diffusés a été étudiée dans la diffusion de noyaux marqués in vivo par le ^{32}P pendant 1 heure.

Après resuspension homogène dans la solution SPM les noyaux sont répartis en fractions aliquotes de 2ml dans des tubes à centrifuger coniques. Le surnageant de diffusion SD est séparé des noyaux par centrifugation à 6000t/mn pendant 20mn (JOUAN). La radioactivité diffusée est ensuite déterminée :

a- par comptage direct dans le mélange scintillant de BRAY (1960)(190) de fractions de 100 μl de S.D., les valeurs obtenues correspondent alors à la radioactivité totale diffusée.

b- par précipitation sur filtre de fibre de verre (Whatman GF83) de fractions de 100 μl de S.D. par l'ATCA à 10%, puis comptage des filtres dans le mélange Toluène-POPOP-PPO. On obtient ainsi la radioactivité TCA-insoluble diffusée. Les résultats (moyennes de 3 exemplaires) sont exprimés en pourcentage de radioactivité diffusée par rapport à la radioactivité totale "Noyaux + S.D."

2.- ETUDE DU RNA

I- ETUDE DE LA TAILLE ET DE LA COMPOSITION DU RNA.

A- EXTRACTION PAR LE PHENOL-SDS A CHAUD.

Le RNA est obtenu à partir du surnageant de diffusion par traitement au SDS 0,5% puis précipitation pendant une nuit à -20°C par deux volumes d'éthanol. Le précipité est ensuite dissous dans le mélange : acétate de sodium 0,05M pH 5, NaCl 0,1M, SDS 1% et déprotéinisé par addition d'un volume égal de phénol saturé en eau. Le mélange est agité vigoureusement pendant 10mn à 60°C , puis il est refroidi et centrifugé à 12.000 t/mn pendant 10mn (Spinco SW27). La phase aqueuse est prélevée et conservée. La phase phénolique subit un nouveau traitement pendant 5mn à 60°C après addition d'un volume d'acétate de sodium-NaCl. Les deux phases aqueuses rassemblées sont traitées de même, 3 fois, par addition de phénol frais saturé en eau. Le RNA est enfin précipité de la dernière phase aqueuse par 2,5 volumes d'éthanol à -20°C .

B- COMPOSITION EN BASES.

1- Hydrolyse alcaline.

Le RNA est hydrolysé par la potasse 0,3N pendant 18 heures à 37°C . L'hydrolysate est ensuite acidifié jusqu'à pH 2 par addition d'acide perchlorique 1N et maintenu dans la glace pendant 30mn. Les cristaux de perchlorate de potassium sont éliminés par centrifugation et le surnageant, neutralisé par la potasse à pH 6,5, est laissé 30 mn à 0°C . Le perchlorate est à nouveau sédimenté et la solution surnageante contenant les ribonucléotides est concentrée par évaporation ou lyophilisation.

2- Séparation des nucléotides.

Les nucléotides sont séparés par électrophorèse (cuve en toit) sur papier d'Arches 304, en tampon citrate 0,02M à pH 3,5 (DAVIDSON et SMELLIE (1952)(191)) pendant 6 heures sous une tension de 15 volts par cm.

Les taches visibles en lumière ultra-violette qui correspondent aux quatres ribonucléotides sont découpées. Les nucléotides sont élués par HCl 0,01N (HCl 0,1N pour le guanylique) pour la mesure de leur densité optique en U.V. et de leur radioactivité ^{32}P .

II- RECHERCHE DE SEQUENCES POLYADENYLIQUES.

Nous avons abordé ce problème en appliquant les trois procédés de séparation du RNA-Poly A suivants :

- 1) par rétention sur filtre Millipore selon BRAWERMAN et al. (1972)(192)
- 2) par rétention sur colonne de cellulose selon DELARCO et GUROFF (1973)(193).
- 3) par chromatographie d'affinité sur poly U-Sepharose selon LINDBERG et PERSSON (1972)(194).

Etant donné que les conditions ioniques, le pH et la température jouent un rôle très important dans l'extraction du RNA-poly A, nous avons adopté le procédé du SDS-phénol à pH 9 décrit par BRAWERMAN et al.(1972)(195).

A- EXTRACTION DU RNA-POLY A.

Les D-RNP diffusées en présence d'inhibiteur de RNase sont sédimentées à 120.000g pendant 2 heures pour éliminer les protéines cytoplasmiques apportées par l'inhibiteur de RNase et changer la composition ionique du milieu. Les D-RNP sont alors resuspendues dans du Tris 0,1M pH 9, SDS 0,5%, puis on leur ajoute un volume égal de phénol saturé en eau. Le mélange est vigoureusement agité pendant 5 mn

à température ambiante puis centrifugé 10mn à 10.000g. La phase aqueuse est recueillie et on ajoute à la phase phénolique un volume de Tris 0,1M pH9. Ce mélange est traité comme précédemment et la deuxième phase aqueuse est réunie à la première. On effectue ensuite trois autres extractions avec chaque fois un nouveau volume de phénol saturé en eau. Le RNA est enfin précipité de la dernière phase aqueuse par addition de 2,5 volumes d'éthanol et 0,1 volume de NaCl 1M, pendant une nuit à -20°C.

B- RETENTION SUR FILTRE MILLIPORE.

Le poly A de 100 à 200 nucléotides a la propriété d'être retenu sur filtre de nitrocellulose lorsqu'il est en solution à force ionique élevée (KCl 0,5M). Le RNA marqué in vivo par le ^{32}P pendant 1 heure est dissous dans une solution de Tris 10mM pH 7,6; KCl 0,5M; MgCl_2 1mM. La solution est filtrée lentement (0,5ml par minute) à travers un filtre Millipore HAWP (0,45 μ) à température ordinaire. Le filtre après être rincé 3 fois par 5ml de la solution Tris-Mg-KCl 0,5M, est séché et compté dans le mélange scintillant Toluène-PPO-POPOP. La radioactivité du RNA total (avant filtration) est mesurée par précipitation à l'ATCA 10% sur filtre Millipore également.

C- RETENTION SUR COLONNE DE CELLULOSE.

Comme précédemment le RNA-poly A peut être retenu sur colonne de cellulose en présence de KCl 0,5M. Le RNA dissous dans le tampon Tris 10mM pH 7,4, KCl 0,5M est déposé sur une colonne (pipette "Pasteur") remplie avec 100mg de cellulose MN300 équilibrée dans le même tampon. Le RNA dépourvu de poly A est élué par 3ml de Tris-KCl 0,5M et le RNA-poly A est déplacé par 3ml de Tris 10mM pH 7,4 puis 3ml d'eau. La radioactivité est mesurée comme précédemment.

D- CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR POLY U-SEPHAROSE.

La chromatographie est effectuée sur colonne (0,5x5cm) de poly U-Sepharose (Pharmacia) que l'on traite par 5ml de solution "formamide" : phosphate de potassium 10mM pH 7,5, EDTA 10mM, SDS 0,2%, formamide 90%; puis 5ml de la solution "NaCl" : Tris 50mM pH 7,5, EDTA 10 mM, formamide 25%, NaCl 0,7M. Le RNA dissous dans la solution "NaCl" est déposé sur la colonne que l'on élue en fractions de 1ml avec 6 ml de la solution "NaCl"; puis 6 ml de la solution "formamide". La radioactivité de chaque fraction est déterminée par comptage de l'effet Cerenkov.

3. - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

I- EXTRACTION DES PROTEINES.

Les ribonucléoprotéines (D-RNP 45 S ou polyribosomes) sédimentées par ultracentrifugation sont dissociées dans le mélange urée 6M-LiCl 3M pendant une nuit à 4°C. Le RNA et les agrégats sont éliminés par centrifugation à 10.000g pendant 30mn et les protéines présentes dans le surnageant sont à leur tour précipitées pendant une nuit à 4°C par l'ATCA à 18%. Après centrifugation (10.000g, 30mn) on élimine l'ATCA résiduel du sédiment de protéines par plusieurs lavages avec de l'éther sans peroxydes. Les protéines peuvent être alors solubilisées dans de l'urée 6M ou dans le SDS à 1% suivant le type d'électrophorèse choisi.

II- ELECTROPHORESE EN PRESENCE D'UREE, A pH ACIDE.

A- "DISC-ELECTROPHORESE" A pH 4,5.

La technique utilisée dérive de celles décrites par REISFELD et al. (1962)(196) et LEBOY et al. (1964)(197). Nous l'avons appliquée à des gels cylindriques de 0,5x10 cm constitués d'acrylamide à 10% et de bisacrylamide à 0,15% en présence d'urée 6M.

La migration s'effectue avec le tampon β -alanine 0,35M à pH 4,5 pendant 3 heures sous une intensité de 3mA par gel.

Les protéines sont colorées par le Noir-Amido à 1% dans l'acide acétique à 7,5%. La décoloration des gels est réalisée "électriquement" dans l'acide acétique à 7,5%.

B- ELECTROPHORESE A pH 2,8.

La séparation s'effectue selon PANYIM et CHALKLEY (1969)(198) sur un gel à 17% d'acrylamide contenant de l'urée 2,5M et de l'acide acétique 0,9M qui sert également de tampon

d'électrodes. La migration a lieu pendant 4 heures à 1,5mA par gel.

III- ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS.

Les protéines sont traitées par le mélange SDS 1%- β -Mercaptoéthanol 10% dans un tampon Na_2CO_3 0,05M pendant une nuit à température ordinaire.

L'électrophorèse est réalisée selon WEBER et OSBORN (1969)(199) sur un gel contenant 10% d'acrylamide, 0,25% de bisacrylamide 0,1%, de SDS en tampon phosphate de sodium 0,1M à pH 7,0.

Après une pré-électrophorèse (1h à 3mA par gel), les protéines sont séparées pendant 90mn sous 3mA par gel.

La coloration est effectuée pendant 2 heures par le Bleu de Coomassie (2,5g dans 500ml de méthanol, 100ml d'acide acétique, 400ml d'eau). Les gels sont ensuite décolorés par le mélange méthanol-acide acétique-eau (50-75-875) qui est recyclé sur colonne de charbon actif.

Les poids moléculaires ont été évalués par rapport aux protéines témoins suivantes : cytochrome C (11.400), γ -globuline chaîne L (22.500), ovalbumine (45.000), γ -globuline chaîne H (50.000), catalase (60.000) et albumine bovine (68.000).

IV- ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE.*

Nous avons appliqué la technique de KALTSCHMIDT et WITTMANN (1969)(200) utilisée pour la séparation des protéines ribosomales.

* Nous remercions vivement le Professeur MARCHIS-MOUREN et ses collaborateurs (Faculté des Sciences de Marseille) de nous avoir enseigné les détails de cette technique. Nous remercions également Mr. DELOOT à qui a été confiée la réalisation de l'appareillage dans notre Institut.

A- PREMIERE DIMENSION A pH 8,6 EN UREE 6M.

La première dimension s'effectue sur des gels cylindriques (0,6x19 cm) constitués d'acrylamide 4% et bis-acrylamide 0,133% en présence d'urée 6M.

Les protéines sont dissoutes dans le "gel d'échantillon" (Urée 8M- Acrylamide 4%-bis-acrylamide 0,2%) qui est polymérisé par la lumière. L'électrophorèse est réalisée avec le tampon Tris-Acide Borique-EDTA- de pH 8,6 en présence d'urée 6M pendant 22 heures à 80 volts.

B- SECONDE DIMENSION A pH 4,5.

Le gel de première dimension est mis en dialyse pendant 2 heures dans la solution suivante :

Urée : 480g

acide acétique : 0,74ml

KOH 5N : 2,4ml

Eau q.s.p 1l.

Le gel est ensuite placé horizontalement au sommet d'une plaque (20x20x0,5 cm) constituée d'acrylamide 15%, bis-acrylamide 4,16% en présence d'urée 6M.

La migration s'effectue avec un tampon glycolle-acide acétique de pH 4,5, pendant 24 heures sous 105 volts.

La plaque est ensuite colorée par le Noir-Amido (à 5,5g par litre d'acide acétique à 5%) pendant 15 minutes, puis décolorée dans l'acide acétique à 5%.

4.- SYNTHÈSES ACELLULAIRES.

I- INCORPORATION D'AMINO-ACIDES MARQUÉS.

Nous avons suivi l'incorporation d'acides aminés marqués au ^{14}C dans un système acellulaire de foie de rat préparé selon FALVEY et STAEHELIN (1970)(201). Ce système se compose des 3 fractions suivantes :

- 1) Polyribosomes purifiés
- 2) Fraction "Enzyme pH 5"
- 3) Surnageant haute vitesse : "S100"

A- PREPARATION DES FRACTIONS.

1. Polyribosomes.

Les foies de rat sont homogénéisés dans 2,5 volumes de solution A :

- 0,2M Saccharose
- 0,1M NH_4Cl
- 5mM acétate de magnésium
- 0,02M Tris-HCl pH 7,5
- 1mM Dithiothreitol

L'homogénat est centrifugé à 12.000g pendant 10 mn pour sédimenter mitochondries et noyaux. Les deux tiers supérieurs du surnageant sont traités par le D.O.C. à 1% et des fractions de 20ml sont déposées sur un gradient discontinu constitué de saccharose 0,7M et 2M.

On obtient après 24 heures de centrifugation à 25.000 t/mn (Spinco SW27) un sédiment de polyribosomes purifiés.

2. Préparation de l' "Enzyme pH 5".

Les foies de rat sont homogénéisés dans la solution B :

0,3M Saccharose
 5mM acétate de magnésium
 0,01M Tris-HCl pH 7,5
 1mM Dithiothreitol

Le surnageant post-mitochondrial obtenu comme précédemment est ultracentrifugé pendant 3 heures à 105.000g. Les deux tiers supérieurs du surnageant post-microsomal ainsi obtenu sont dilués par 2 volumes d'eau bidistillée contenant du dithiothreitol 1mM et le pH est amené à 5,1-5,2 par addition d'acide acétique 1N.

Le précipité "Enzyme pH 5" est recueilli par centrifugation à 10.000 g pendant 10mn, puis il est dissous dans la solution A sans saccharose.

3. Préparation du "S100"

L'homogénéisation des foies s'effectue dans la solution A. La fraction "S100" correspond au surnageant post-microsomal (centrifugation à 105.000g pendant 3h).

B- SYNTHESSES ACELLULAIRES.

1. Incubations.

Le milieu d'incubation se compose pour un volume final de 1ml de :

1µmole d'ATP
 0,4µmole de GTP
 10µmoles de phosphoénolpyruvate
 10µg pyruvate kinase (E.C.2.7.1.40, SIGMA)
 0,2 ml "pH 5 Enzyme"
 0,2 ml S100
 10 à 20 unités de densité optique à 260nm de polyribosomes.
 0,5µCi d'acides-amino marqués au ^{14}C .

Les conditions ioniques finales sont ajustées en NH_4Cl 0,15M, Tris 0,02M pH 7,5, dithiothreitol 1mM et acétate de magnésium 5mM. Les incubations sont réalisées à 30°C.

2. Analyse de la radioactivité incorporée.

a. Radioactivité TCA insoluble

Des fractions contenant 1 unité de D.O.₂₆₀ de ribosomes (100 μ l) sont précipitées par l'ATCA à 10% puis hydrolysées à 90°C pendant 10mn. Le précipité est ensuite recueilli sur filtre de fibre de verre, lavé par l'ATCA 5%, l'alcool absolu et enfin par l'éther. Après séchage, les filtres sont introduits dans les fioles de comptage contenant 10ml du mélange scintillant Toluène-PPO-POPOP.

b. Analyse en gradient de saccharose.

Nous avons également suivi l'incorporation d'acides marqués au niveau des ribosomes séparés sur gradient de saccharose. Le milieu d'incubation est alors refroidi dans la glace, déposé (500 μ l) sur un gradient de 15 à 30% de saccharose dans la solution A, et centrifugé à 25.000 t/mn pendant 5h (Spinco SW27). La radioactivité de chaque fraction éluée (1ml) est mesurée dans le mélange scintillant de BRAY.

II- ACTIVITE POLY A SYNTHETASIQUE.

L'incorporation d'ATP ³H a été suivie après incubation des D-RNP dans le système suivant : pour 1ml

Tris 60mM pH 8,3

MnCl₂ 6mM

phosphoenolpyruvate 2,3mg

Pyruvate kinase 30 μ g

ATP 100 μ g

ATP ³H 50 μ Ci

dithiothreitol 1mM

L'incorporation est arrêtée par addition de 10% d'ATCA contenant du pyrophosphate de sodium 0,02M. Le précipité recueilli sur filtre est lavé abondamment par l'ATCA 5% puis par l'alcool absolu. La radioactivité est mesurée dans le mélange scintillant Toluène-PPO-POPOP.

RESULTATS

1.- ISOLEMENT ET PROPRIETES DES D-RNP DIFFUSIBLES*

A partir du protocole général schématisé p.32 et p. 34, nous avons cherché à définir les conditions optimales de rendement et de qualité dans la préparation des particules diffusibles de noyaux isolés de foie de rat. Etant donné que la présence d'inhibiteur cytoplasmique de RNase est dans certains cas indispensable (étude du RNA) et dans d'autres cas, gênante (étude des protéines), nous avons partagé notre étude de la diffusion et des D-RNP diffusibles suivant la présence ou non de l'inhibiteur dans le milieu de diffusion.

I- DIFFUSION EN ABSENCE D'INHIBITEUR DE RNase.

A- INFLUENCE DE LA DUREE ET DE LA TEMPERATURE.

La radioactivité ^{32}P incorporée in vivo pendant une heure, diffusée par les noyaux isolés maintenus dans la solution S.P.M., a été mesurée pour différentes températures d'incubation (4, 10, 20, 30°C) et pour des durées variables (15, 30, 60, 90 et 120 minutes).

On constate d'abord (Fig. 7A, p.50) que la quantité de matériel marqué libéré par les noyaux est proportionnelle au temps et à la température d'incubation. Ainsi, la diffusion à 37°C est nettement plus rapide et plus importante (85% en 30 minutes) qu'à 4°C (30% en 30 minutes). Ces valeurs sont évidemment plus faibles lorsqu'on mesure la radioactivité du matériel précipitable par l'ATCA qui représente davantage les D-RNP diffusées (Fig. 7B, p.50).

* Une partie de ces travaux a été réalisée en collaboration avec Mme. DEFERT.

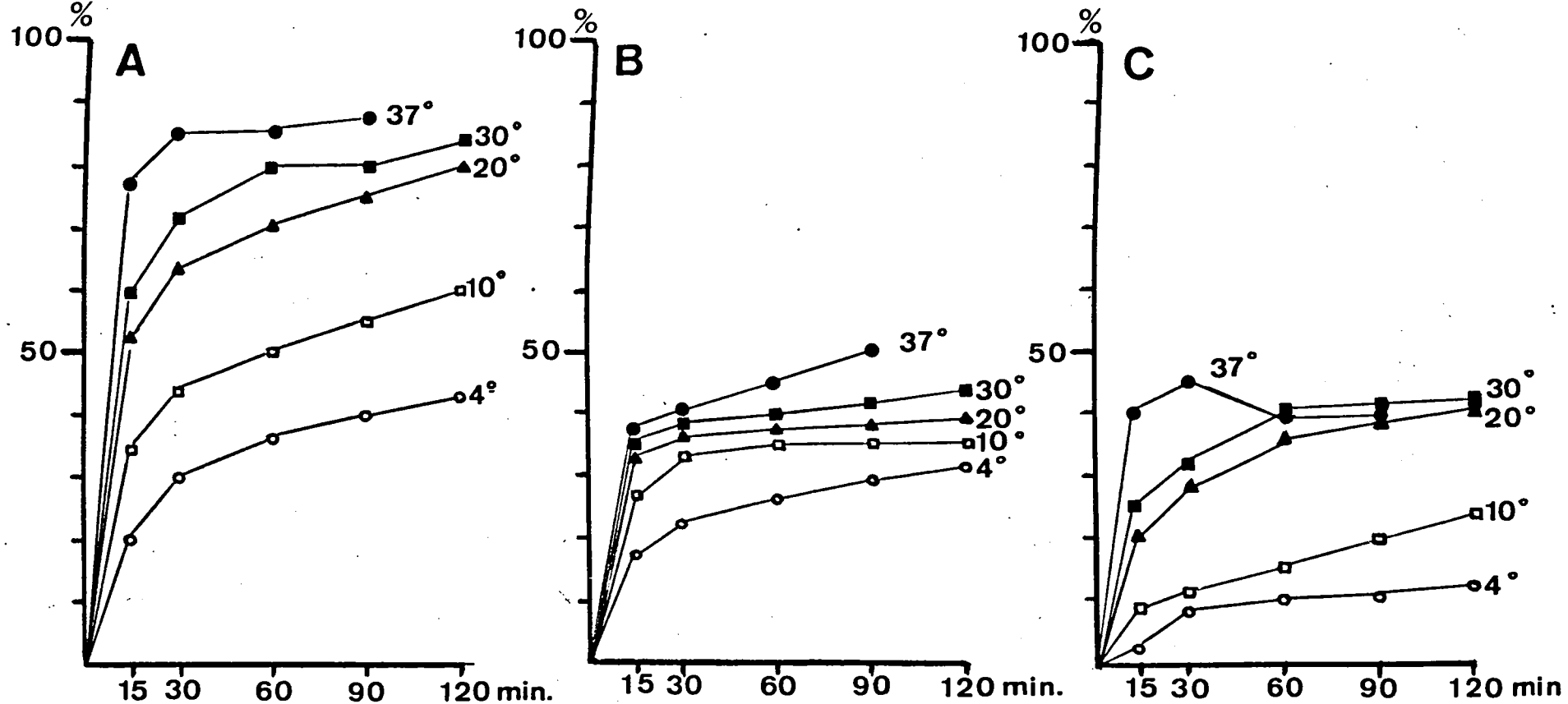


Fig.7. Influence de la durée et de la température de la diffusion sur la quantité de matériel diffusé marqué au ^{32}P (1mCi par rat pendant 1 heure in vivo)

A- Pourcentage de radioactivité totale diffusée.

B- Pourcentage de radioactivité acido-insoluble diffusée.

C- Pourcentage de radioactivité acido-soluble diffusée.

La différence entre radioactivités totale et acido-insoluble permet d'évaluer la quantité de matériel acido-soluble micromoléculaire (Fig.7C, p.50). On peut de cette façon, déduire en comparant les trois diagrammes de la figure7(p.50) que l'augmentation de la température favorise davantage la diffusion des composés micromoléculaires et inversement que la diffusion à basse température est plus spécifique des macromolécules.

L'importante quantité de matériel acido-soluble que l'on observe à 37°C traduit certainement des dégradations enzymatiques, comme nous pourrions le constater plus loin par analyse en sédimentation sur gradient de saccharose.

Nous avons, en conséquence, choisi pour la préparation des D-RNP, la diffusion à 4°C pendant 1 heure.

B- INFLUENCE DE L'ATP ET DE L'AMP CYCLIQUE.

L'addition d'ATP au milieu S.P.M. provoque une augmentation sensible de la diffusion (Fig.8A, p.52). La concentration optimale en ATP est environ 3mM ce qui rejoint les constatations de ISHIKAWA et al.(1969)(202)-(1972)(203). L'AMP cyclique par contre ne semble avoir aucun effet dans la gamme de concentrations de 10^{-6} à 10^{-3} M (Fig.8B, p.52). Nous avons toutefois noté que l'addition de caféine 6,5mM seule (la caféine étant destinée à inhiber l'action des phosphodiesterases sur l'AMPC) entraîne une légère mais reproductible augmentation de la diffusion.

C- PROPRIETES DE SEDIMENTATION.

a- Stabilité des D-RNP.

Le matériel diffusé contenu dans le surnageant de diffusion SD a été généralement concentré par ultracentrifugation à 120.000g pendant une durée que nous avons ramenée de 16 à 2 heures.

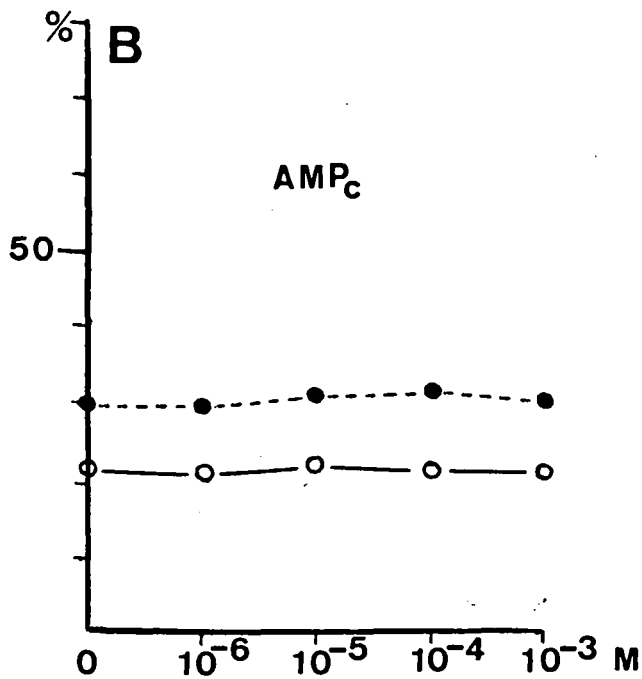
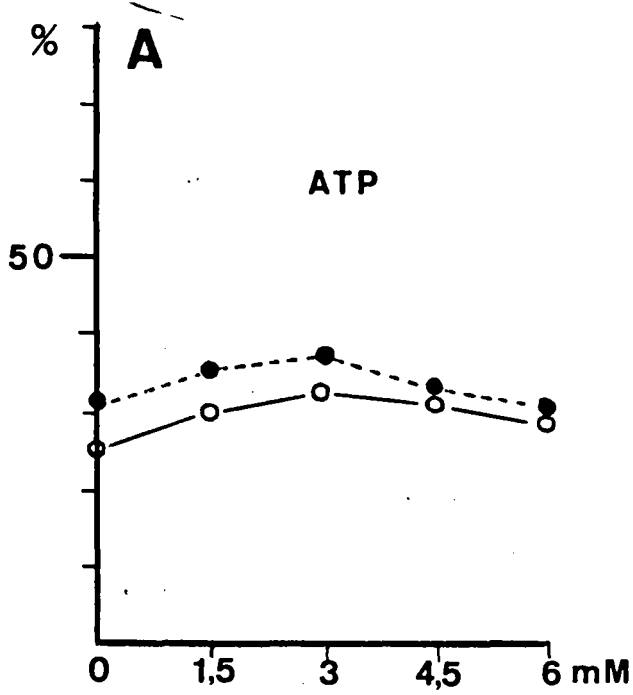


Fig.8. Influence de l'ATP (A) et de l'AMP cyclique (B) sur la quantité de matériel diffusé pendant 1 heure à 4°C.

●-●- % Radioactivité totale diffusée.

○-○- % Radioactivité TCA insoluble diffusée.

En effet, nous avons constaté que :

- 1) pratiquement la totalité des particules 45 S sédimentent en 2 heures
- 2) pour des durées plus longues, les risques de dégradations s'accroissent.

On note sur la figure 9B(p.54) l'apparition au sommet du gradient d'une quantité importante de matériel marqué et absorbant l'ultra-violet, lorsque les RNP ont été sédimentées pendant 16 heures.

Les D-RNP 45 S sont également très sensibles à la température. La figure 10(p.55) indique qu'il suffit de 10 minutes d'incubation à 30°C (fig b) et surtout à 37°C (fig c) pour provoquer une perte significative en particules 45 S. Cette thermosensibilité peut être attribuée à la présence de nucléase effectivement caractérisée par NIESSING et SEKERIS (1970)(204) qui fait partie des D-RNP. Cette nucléase provoquerait la dégradation spécifique du D-RNA (elle n'a pas d'effet sur le R-RNA) et désorganiserait la structure des complexes D-RNA-protéines.

b- Action des nucléases.

L'action de la RNase pancréatique (50µg/ml) tout comme l'incubation à 37°C, pendant 10mn, entraîne la réduction du pic des D-RNP en même temps qu'il se déplace au delà de 45 S vers le fond du gradient (Fig.10 F p.55). L'effet négatif de la DNase à 50µg/ml pendant 45 mn, à 4°C pour éviter la dégradation due à la température, confirme l'absence de DNA parmi les produits diffusés (Fig 10E).

c- Sensibilité au desoxycholate.

L'une des caractéristiques essentielles des D-RNP nucléaires, observée à l'origine par MOULÉ et CHAUVEAU (1966) (205) est leur grande sensibilité au D.O.C. Le détergent, habituellement utilisé dans la préparation des polyribosomes à une concentration d'environ 1%, provoque la disparition complète des D-RNP 45 S. Les particules sont alors transformées en matériel léger que l'on retrouve au sommet du gradient (fig.10D p.55).

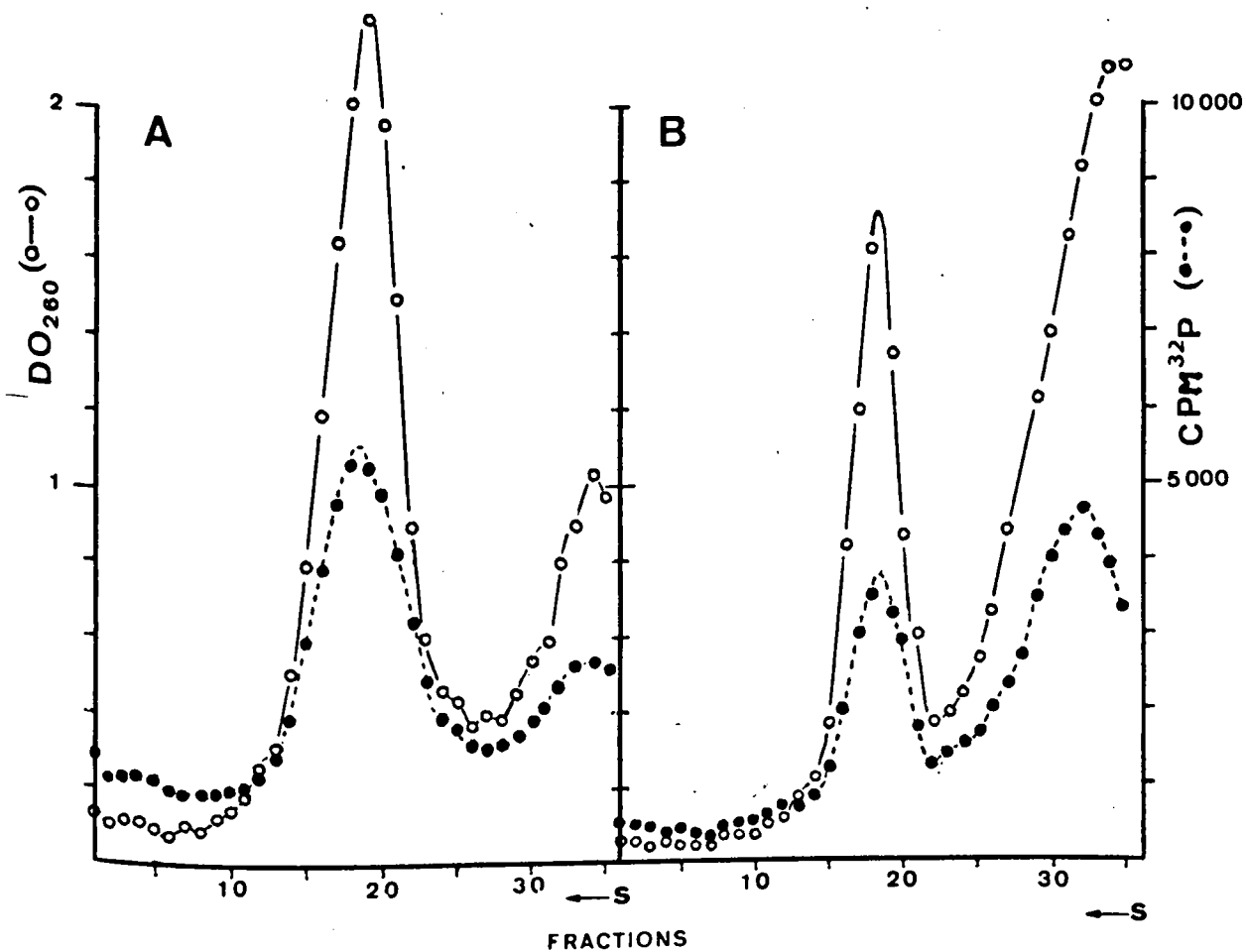


Fig.9. Centrifugation en gradient de saccharose :
 A- D-RNP sédimentées 2h à 120.000g
 B- D-RNP sédimentées 16h à 100.000g
 Gradient de saccharose 5-20% en tampon phosphate 20mM
 pH 7,8 - MgAc 1mM.
 Centrifugation à 20.000t/mn; 16 heures (SW27).
 Fractions de 1ml.

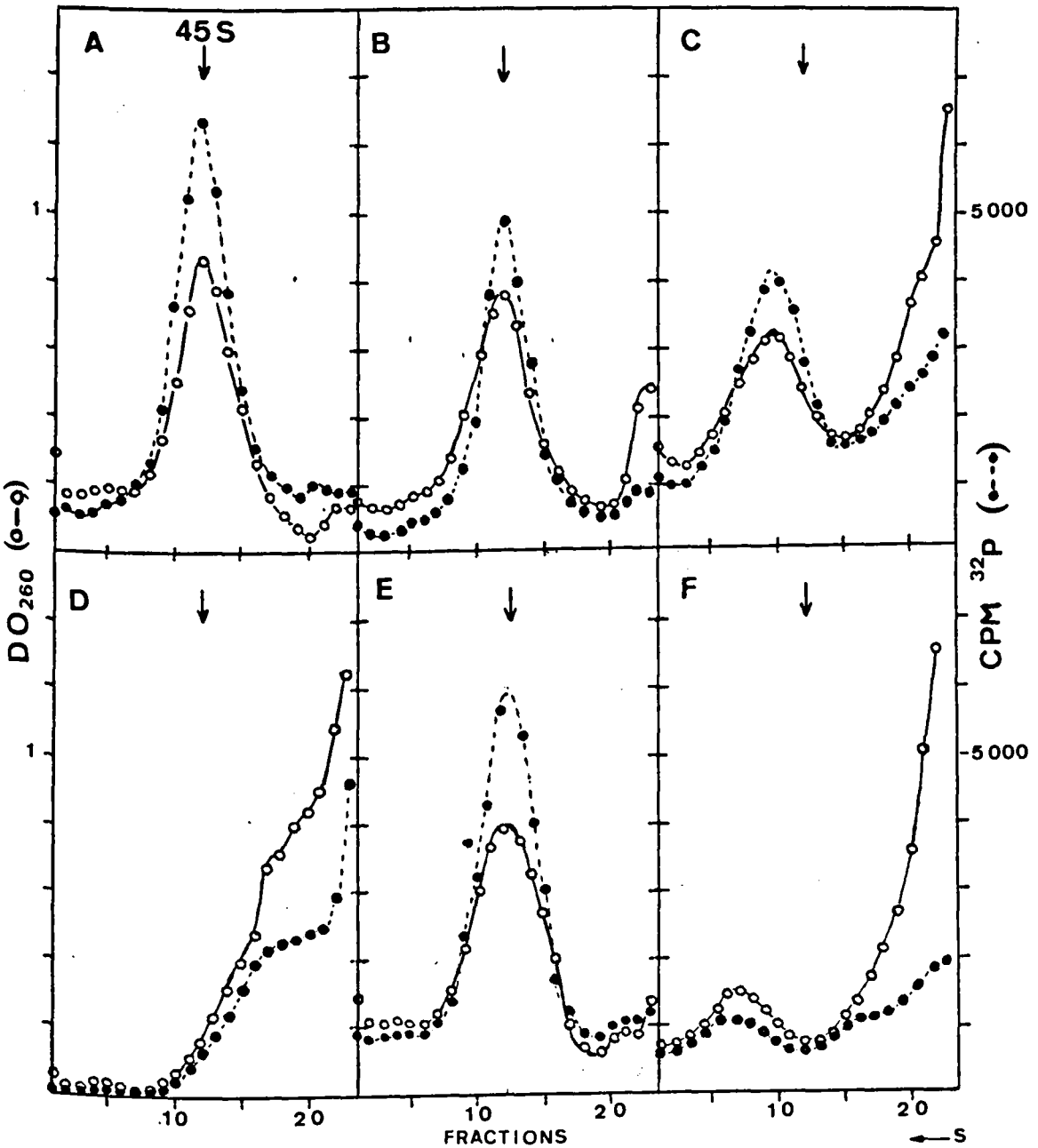


Fig 10. Centrifugation des D-RNP diffusées sur gradient de saccharose 5-20% en tampon phosphate 20mM pH 7,8 MgAc 1mM; 20.000 t/mn, 16h (SW27)

A-	D-RNP témoins	(4°C)
B-	D-RNP incubées 10mn	à 30°C
C-	" "	" 37°C
D-	" "	" 4°C, en présence de DOC 1%
E-	" "	45mn 4°C, en présence de DNase
F-	" "	10mn 37°C, en présence de RNase P

II- DIFFUSION EN PRESENCE D'INHIBITEUR DE RNase.

A- CINETIQUE DE LA DIFFUSION.

Nous avons comparé la radioactivité TCA insoluble libérée en fonction du temps par des noyaux incubés à 4°C dans la solution S.P.M. et par des noyaux incubés dans la même solution additionnée d'inhibiteur cytoplasmique de RNase. On constate (Fig. 11, p. 57) que l'inhibiteur de RNase diminue de façon importante la diffusion qui reste inférieure à 10% en 1 heure. Nous pouvons envisager deux explications à ce phénomène :

- 1) L'inhibiteur de RNase qui est une fraction grossière, contient de nombreux constituants protéiques du cytoplasme et il est probable, comme le suggèrent SCHUMM et al. (1973) (206), que parmi eux existent des facteurs de modulation du passage des RNP du noyau vers le cytoplasme.
- 2) plus simplement, les D-RNP obtenues en présence d'inhibiteur étant de tailles beaucoup plus élevées passent plus difficilement l'enveloppe nucléaire.

B- SEDIMENTATION.

Le matériel diffusé en présence d'inhibiteur de RNase possède un comportement nettement différent en gradient de saccharose (Fig. 12.B, p. 57) de celui des D-RNP 45 S. (Fig. 12 A, p. 57). A côté du pic des particules 45 S qui représente encore une importante fraction de la radioactivité, on observe l'apparition de matériel relativement abondant qui sédimente jusqu'à environ 200 S. Ce profil indique par conséquent, que dans des conditions où le RNA est protégé de l'action des nucléases, les noyaux libèrent une population de particules de tailles diverses dont l'unité structurale de base, obtenue par action de la RNase, correspond à la forme 45 S.

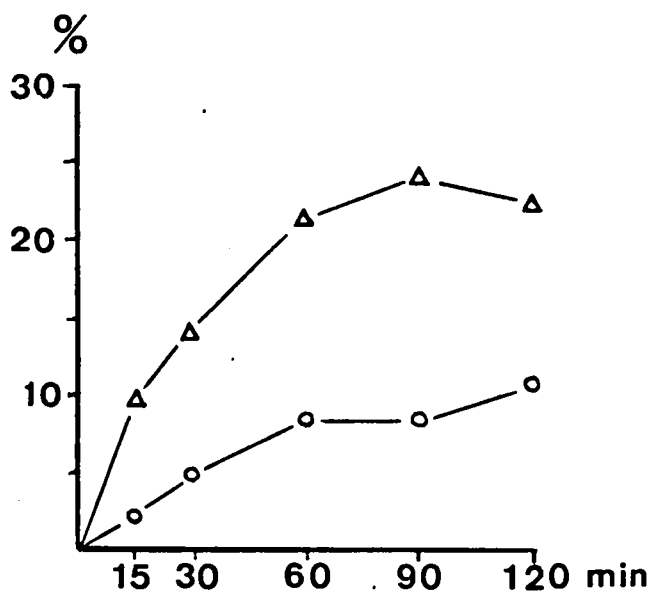


Fig. 11. Influence de l'inhibiteur cytoplasmique de RNase
 % radioactivité TCA insoluble diffusée à 4°C :
 Δ-Δ en solution SPM
 ○-○ en présence d'inhibiteur de RNase.

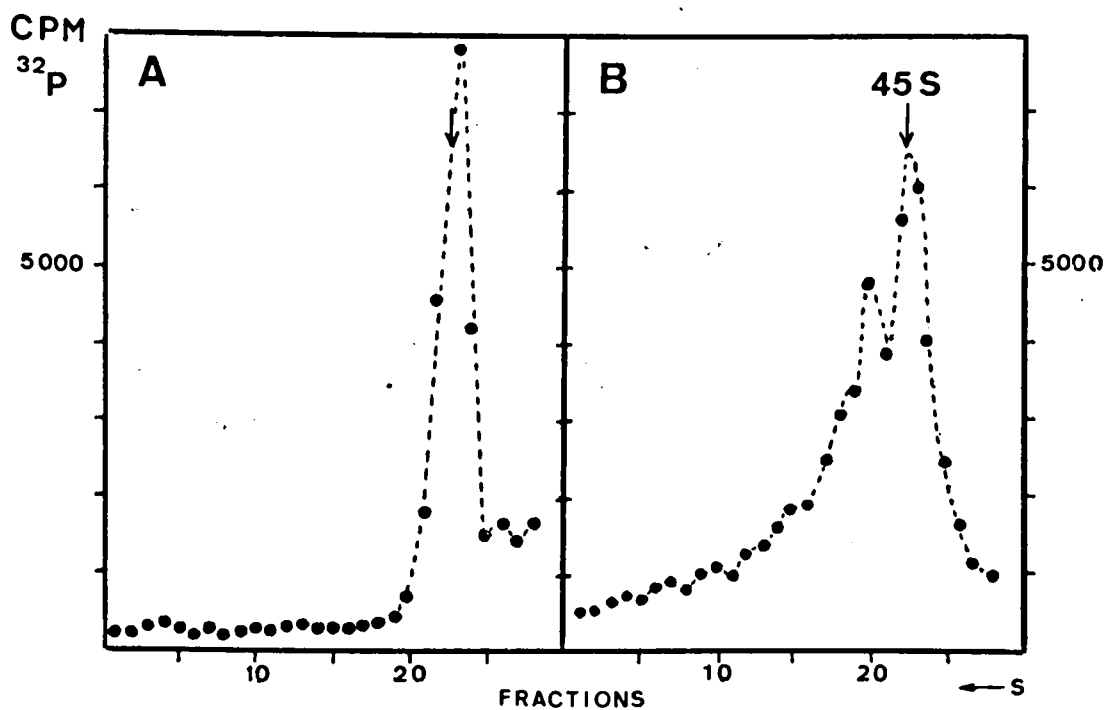


Fig. 12. Centrifugation en gradient de saccharose des D-RNP
 diffusées:
 A- dans la solution SPM
 B- dans la solution SPM en présence d'inhibiteur de RNase
 gradient 15-30%, 25.000t/mn, 3h en SW25-1

III- ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE.*

A- LES NOYAUX PENDANT LA DIFFUSION.

La comparaison de noyaux témoins (Fig 13 A,p. 59) avec des noyaux incubés dans la solution SPM (Fig. 13 B,p.59) fait apparaître certaines modifications morphologiques très nettes.

Le nucléoplasme des noyaux "diffusés" devient plus homogène, la chromatine n'étant plus condensée.

Le changement le plus important se situe au niveau du nucléole. Celui-ci prend en effet, un aspect dispersé et, observé à plus fort grossissement, il ne présente pratiquement plus de granules.

B- LES PARTICULES DIFFUSEES.

Les D-RNP 45 S examinées en coupe et en coloration négative (Fig. 14 A et B,p. 60) sont de nature granulaire. Elles sont plus ou moins sphériques, ayant en moyenne 250 Å de diamètre. Après étalement et ombrage selon la technique de KLEINSCHMIDT et al. (1962)(207), on observe l'existence de filaments de longueur variable, associés à des granules (Fig. 14 C,p.60).

Les D-RNP obtenues par diffusion en présence d'inhibiteur de RNase possèdent également un aspect granulaire mais se trouvent généralement sous la forme de chaînettes (Fig. 14 D, p.60) ou de polyparticules.

C- RECHERCHE DE L'ORIGINE DES D-RNP DIFFUSEES.

Pour établir une relation entre les D-RNP diffusées et les structures ribonucléoprotéiques caractérisables in situ par la coloration préférentielle de BERNHARD (1969)(208),

* Cette étude a été réalisée dans le service de Microscopie électronique de notre Institut, par E.PUVION .(PUVION.E. (1972)(209)).

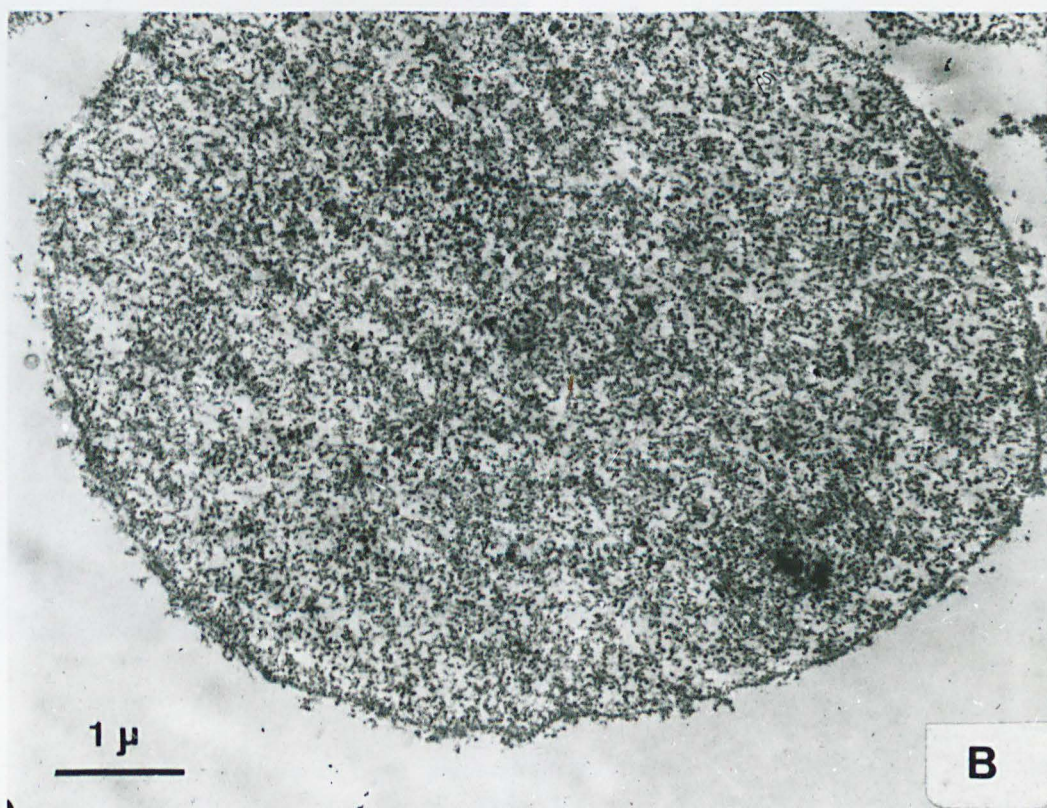
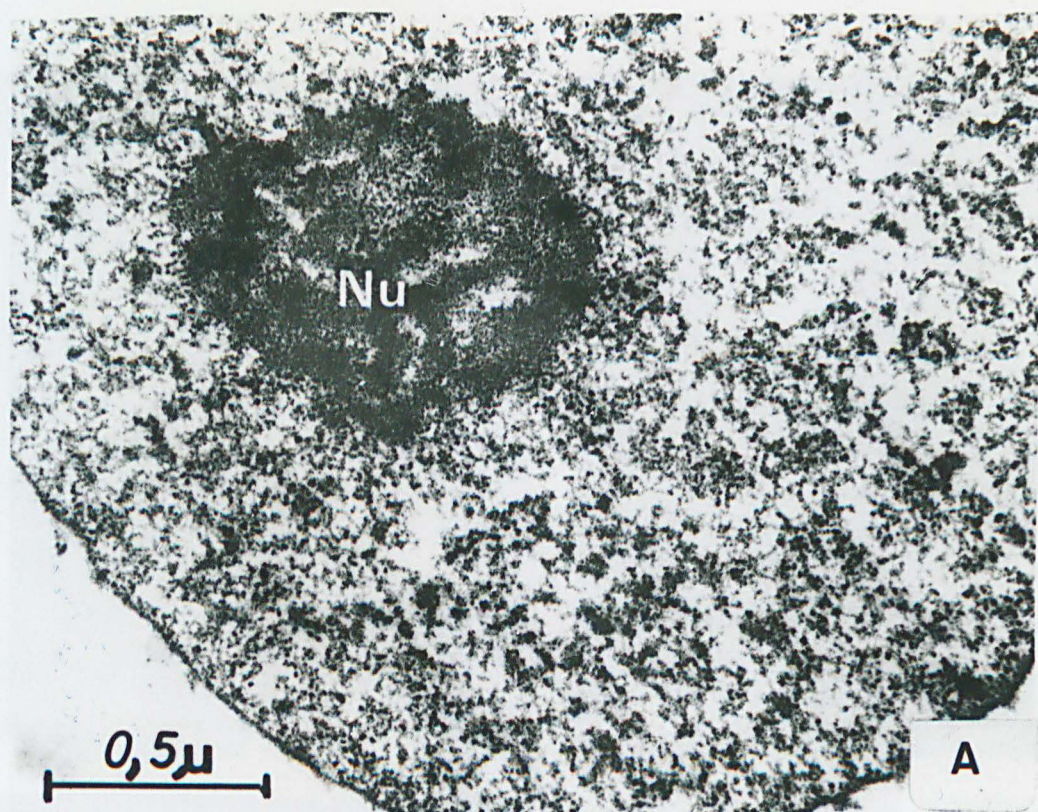


Fig.13. Aspect au microscope électronique de noyaux isolés :
A- avant la diffusion (x 50.000)
B- après la diffusion (x 16.000)
(D'après PUVION.E.)

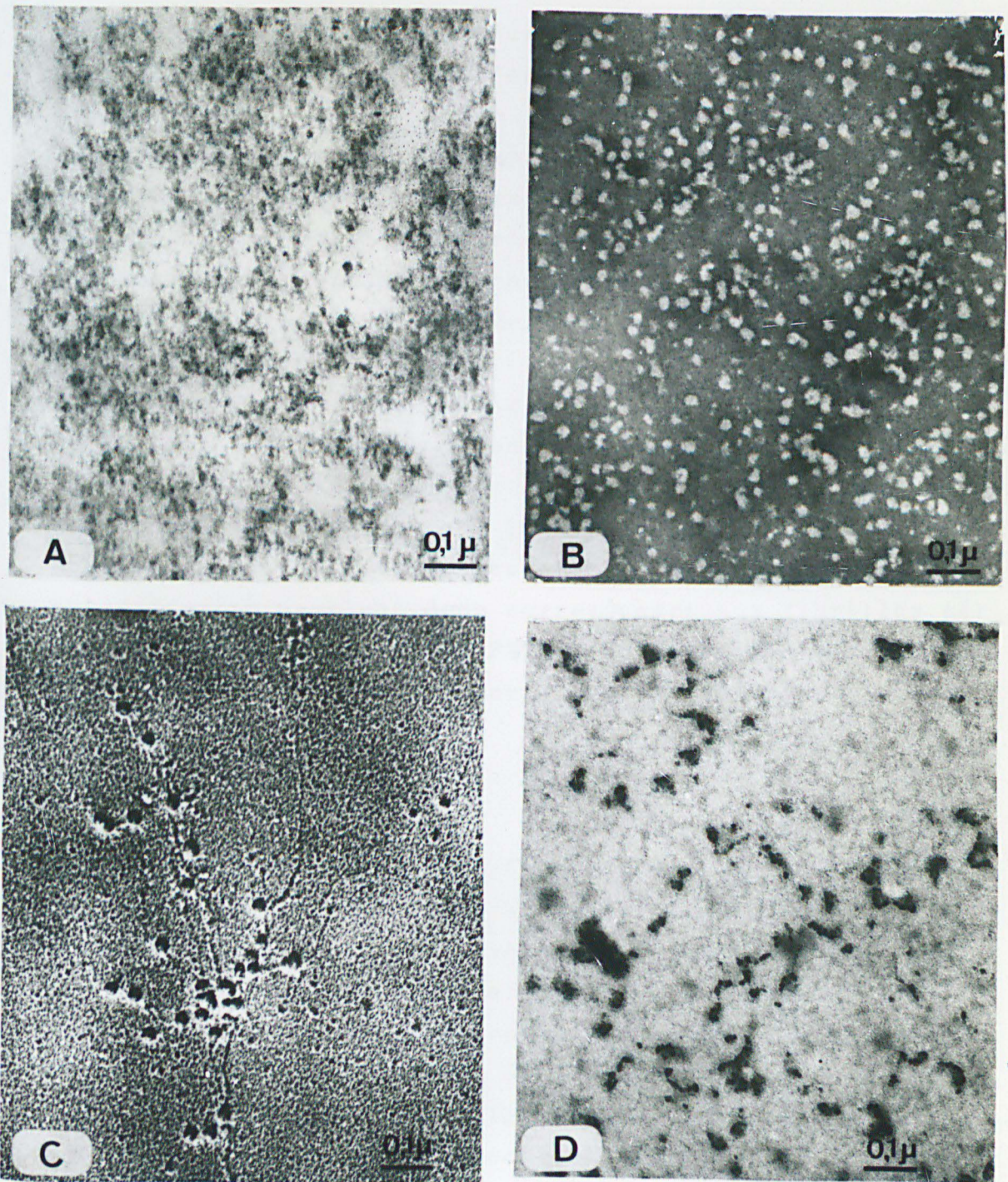


Fig. 14. Aspect au microscope électronique des D-RNP diffusées:
 A. D-RNP 45 S. Coupe après inclusion dans l'Epon (x 72.000)
 B. D-RNP 45 S. Coloration négative à l'acétate d'uranyle (x 72.000).
 C. D-RNP 45 S. Etalement et ombrage rotatif à l'oxyde d'uranium (x 72.000).
 D. D-RNP préparées en présence d'inhibiteur de RNase. Coloration positive à l'acide phosphotungstique et acétate d'uranyle. (x 72.000). (D'après PUVION.E.)

les "noyaux diffusés" (incubés dans la solution SPM) ont été comparés à des noyaux "témoins" (incubés en l'absence de phosphate).

Les noyaux témoins (Fig. 15 A, p. 62) présentent les différents types de RNP classiques : des groupes de grains interchromatiniens; des fibrilles périchromatiniennes qui bordent la chromatine; des grains périchromatiniens visibles à proximité de la chromatine périnucléolaire; les granules et les fibrilles nucléolaires.

Dans les noyaux diffusés (Fig. 15B, p. 62) on retrouve dans le nucléoplasme qui est devenu plus homogène, les grains interchromatiniens et, moins aisément, les grains périchromatiniens, mais on remarque la disparition quasi-totale des fibrilles périchromatiniennes. Les D-RNP que nous isolons par diffusion semblent donc correspondre aux fibrilles périchromatiniennes qui, selon PETROV et BERNHARD (1971)(210), représentent l'expression morphologique du D-RNA.

IV- CONCLUSIONS.

La diffusion se présente donc comme un phénomène dépendant de la température et de l'énergie (ATP). L'AMP cyclique qui pourrait intervenir au niveau du passage de l'enveloppe nucléaire n'a par contre aucun effet.

Les produits diffusés sont rapidement marqués, sédimentent d'une manière homogène à 45 S, et apparaissent au microscope électronique sous la forme de granules d'environ 250 Å de diamètre. En présence d'inhibiteur de RNase les particules sédimentent plus rapidement et montrent au microscope électronique un aspect polyparticulaire.

Les D-RNP 45 S sont très sensibles à la température (37°C), à la RNase et au desoxycholate, ce qui les distingue nettement des particules ribosomales.

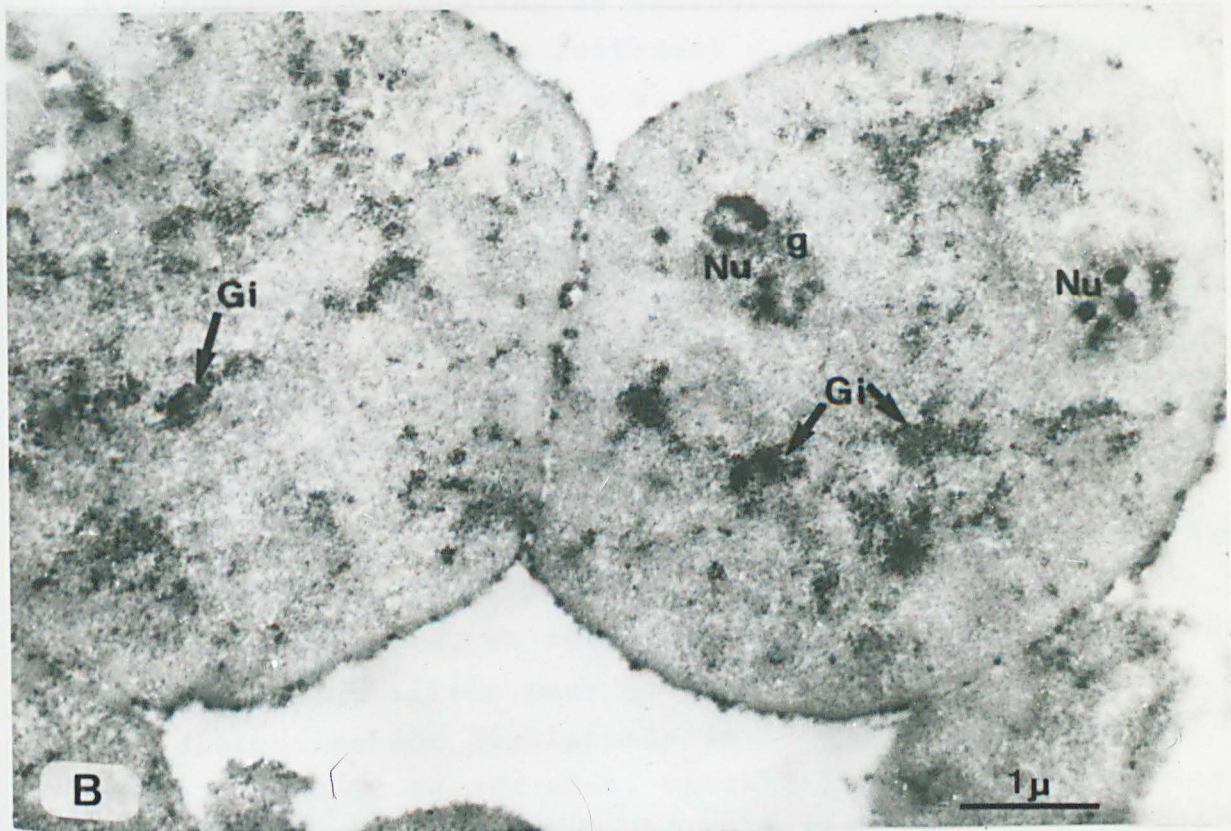
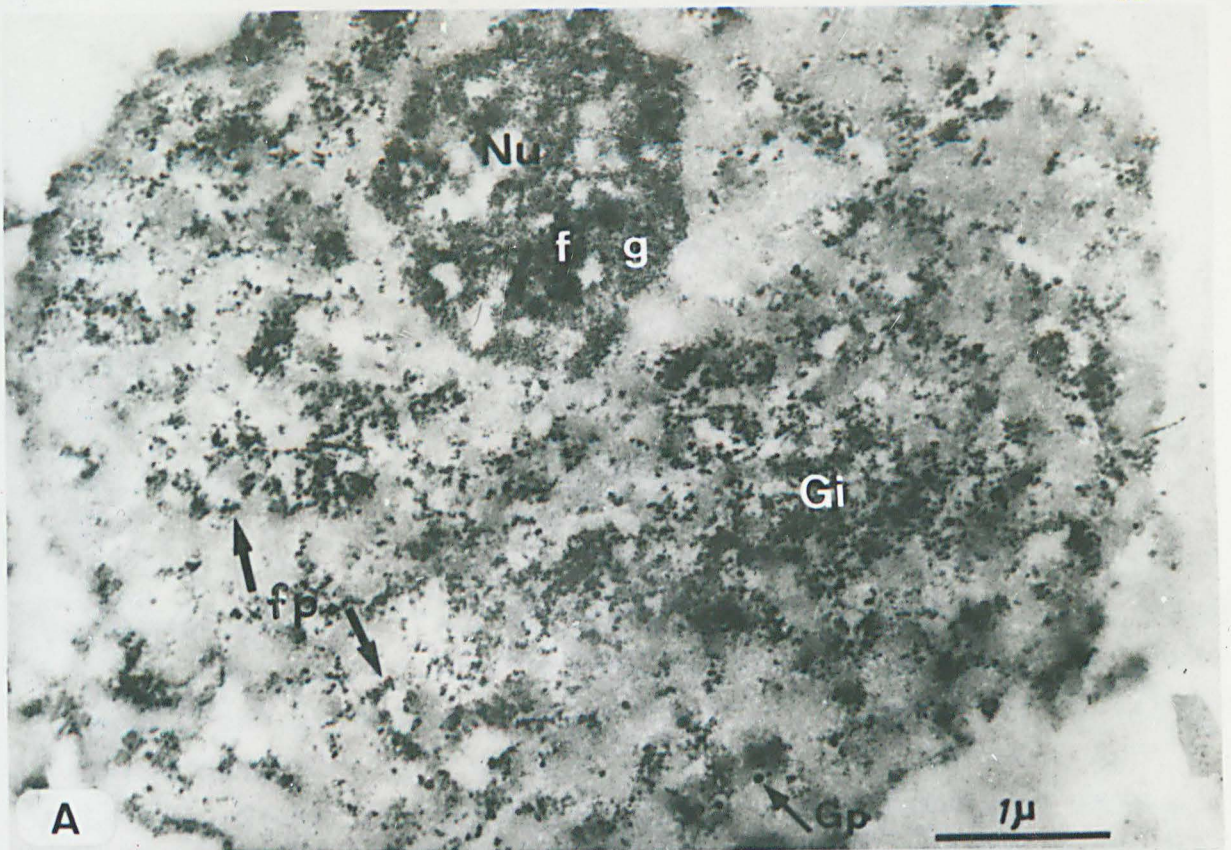


Fig. 15. Aspect au microscope électronique des noyaux colorés par la technique de BERNHARD (1969)(211)
 A- Noyau témoin, non diffusé (x22.000)
 B- Noyaux après diffusion (x18.000)
 Nu : Nucléole; f: fibrilles nucléolaires; g: granules nucléolaires; f_p : fibrilles périchromatiniennes; G_p : grains périchromatiniens; G_i : grains interchromatiniens.
 (D'après PUVION.E.)

2.- PROPRIETES DU RNA EXTRAIT DES D-RNP DIFFUSEES.

I-TAILLE DU RNA.

A- D-RNP DIFFUSEES EN ABSENCE D'INHIBITEUR DE RNase.

Les D-RNP 45 S représentent pratiquement la totalité du matériel diffusé en absence d'inhibiteur (voir Fig 9A p.54). Pour ne pas risquer des dégradations supplémentaires nous avons extrait le RNA directement à partir du surnageant de diffusion.

Le RNA obtenu par déprotéinisation au phénol-SDS à 65°C a été analysé sur gradient de saccharose. La figure 16A (p.64) indique qu'il sédimente lentement sous la forme d'un pic homogène situé entre 4 et 6 S.

B- D-RNP DIFFUSEES EN PRESENCE D'INHIBITEUR DE RNase.

La présence de l'inhibiteur dans le milieu de diffusion permet comme attendu d'obtenir un RNA plus long. On peut, en effet, extraire du surnageant de diffusion un RNA hétérogène qui sédimente jusqu'à 30 S environ, avec un maximum entre 8 et 10 S (Fig.16 B,p.64).

Ce comportement est par conséquent plus proche de celui que montre en principe le D-RNA et le mRNA.

Nous avons observé, en outre, que la sédimentation à 120.000g pendant 2 h, utilisée pour concentrer les D-RNP, provoque une diminution non négligeable de la quantité de RNA supérieur à 8-10 S. Le RNA ainsi extrait (Fig.16 B,p.64) sédimente d'une façon homogène et un peu plus rapidement que le RNA du SD obtenu en absence d'inhibiteur.

Les dégradations "mécaniques" dues à la sédimentation et à la resuspension des polyparticules, paraissent donc moins profondes que celles causées "enzymatiquement" par l'absence de l'inhibiteur.

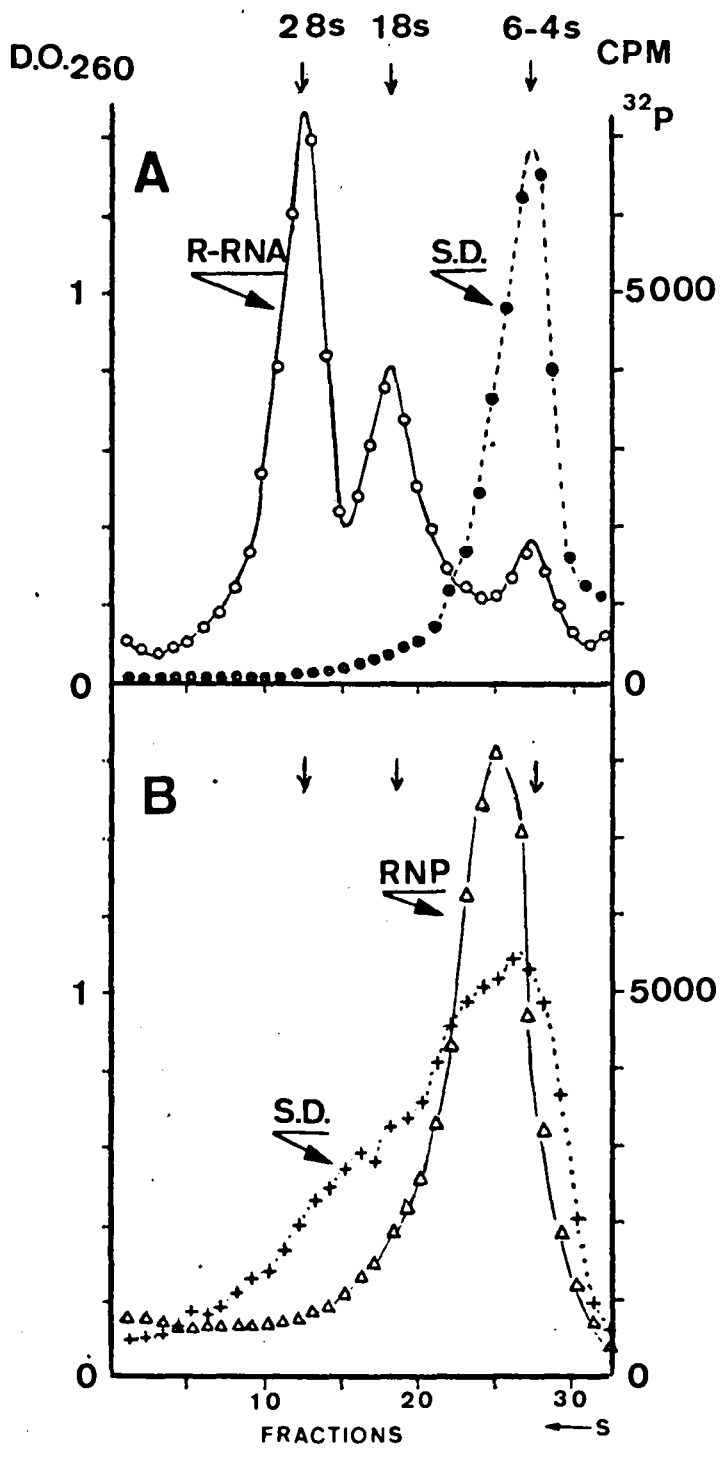


Fig.16. Centrifugation en gradient de densité de saccharose du RNA diffusé :

A. En absence d'inhibiteur de RNase.

B. En présence d'inhibiteur de RNase.

- RNA ribosomal (28, 18 et 5 S)
- RNA extrait du surnageant de diffusion en absence d'inhibiteur.
- +.....+ RNA extrait du surnageant de diffusion en présence d'inhibiteur.
- △—△ RNA extrait des D-RNP sédimentées.

Gradient de saccharose 5-20% - acétate de sodium 0,01M
 pH 5 - NaCl 0,1M. Centrifugation à 22.000t/mn, 15h (SW27)

II- COMPOSITION DU RNA.

La composition en bases du RNA extrait du surnageant de diffusion en présence d'inhibiteur de RNase a été déterminée par la méthode spectrophotométrique et par la méthode de la radioactivité ^{32}P incorporée in vivo pendant 1 heure. Par la méthode spectrophotométrique, on obtient un rapport

$$\frac{\text{G+C}}{\text{A+U}} = 1,1 \quad (\text{C}=20,1; \text{A}=27,6; \text{G}=32,5; \text{U}=19,9) \text{ qui est donc}$$

nettement inférieur à celui des RNA ribosomiaux.

La composition par la méthode de la radioactivité ^{32}P accentue

la prédominance en A+U avec un rapport $\frac{\text{G+C}}{\text{A+U}} = 0,94$ (C=24,5;

A=26,1; G=24,0; U=25,4).

La radioactivité spécifique du RNA diffusé est maximale après une heure d'incorporation in vivo (DEFERT (1971)(212)). De plus, l'actinomycine D injectée à faible dose pour n'inhiber que la synthèse du R-RNA, ne modifie ni la quantité, ni la nature (composition, radioactivité spécifique) du RNA diffusé. Nous pouvons donc conclure qu'il s'agit d'un RNA du type "DNA-like".

III- RECHERCHES DE SEQUENCES POLY ADENYLIQUES.

La présence de segments polyadényliques est une constatation importante, communes aux mRNA (excepté celui codant les histones) et aux HnRNA des Eucaryotes. La mise en évidence de telles séquences dans le D-RNA extrait des D-RNP diffusées peut donc être un argument primordial pour que l'on puisse attribuer à ces particules un "caractère messenger" et un rôle dans le transport de l'information génétique.

Quelle que soit la méthode utilisée pour isoler le RNA-poly A, nous avons d'abord remarqué de nettes variations dans la teneur en poly A entre les différentes préparations. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'une

seule coupure au milieu des chaînes de RNA-poly A suffit pour diviser par deux la radioactivité retenue sur filtre ou sur colonne.

C'est pourquoi, pour chaque expérience, nous avons contrôlé la taille du RNA sur gradient de saccharose. Dans les meilleures conditions d'extraction 4 à 9% du RNA qui se comporte comme dans la figure 16 B (p.64) est retenu sur Millipore ou sur cellulose.

Le tableau I (p.67) indique les valeurs (voisines) obtenues par ces deux procédés et montre qu'après digestion par les RNases pancréatique et T_1 , la fraction résistante ne représente plus que 0,8% de la radioactivité totale. Avec un RNA dégradé (sans doute à cause de l'utilisation d'un inhibiteur de RNase inactif) qui sédimente à 4-6 S comme celui extrait à partir des D-RNP 45 S, nous avons obtenu un taux également très faible de l'ordre de 0,7 à 0,8%, même lorsque la diffusion a été effectuée en présence d'ATP. En effet selon RASKAS et BHADURI (1973)(213) l'addition d'ATP permettrait d'obtenir des séquences poly A plus longues.

Par chromatographie d'affinité (Fig.17, p.68) avec le poly U-sépharose nous avons pu obtenir, pour le RNA diffusé, jusqu'à 21% de teneur en RNA-poly A, alors que le RNA extrait des noyaux dans les mêmes conditions de marquage n'en contient que 12%.

Avec un marquage plus long (15h) les valeurs varient entre 3,6 et 6% pour le RNA diffusé et 16 et 20% pour le RNA nucléaire total (Fig.17, p.68 et Fig.18, p.69).

TABLEAU I

Teneur en RNA-poly A retenu sur filtre ou sur colonne de cellulose du RNA diffusé marqué au ^{32}P pendant 1 heure in vivo.

Exp n°	rétention sur Millipore			rétention sur colonne de cellulose		
	CPM ^{32}P RNA total	CPM ^{32}P RNA fixé	RNA- % poly A	CPM RNA total	CPM RNA fixé	RNA- % poly A
1	31.400	2.700	8,5	10.350	760	7,3
2	37.800	1.550	4,0	37.800	1.450	3,9
+ RNases	33.780	260	0,8			
3	38.400	260	0,7			
+ ATP	34.770	270	0,8			

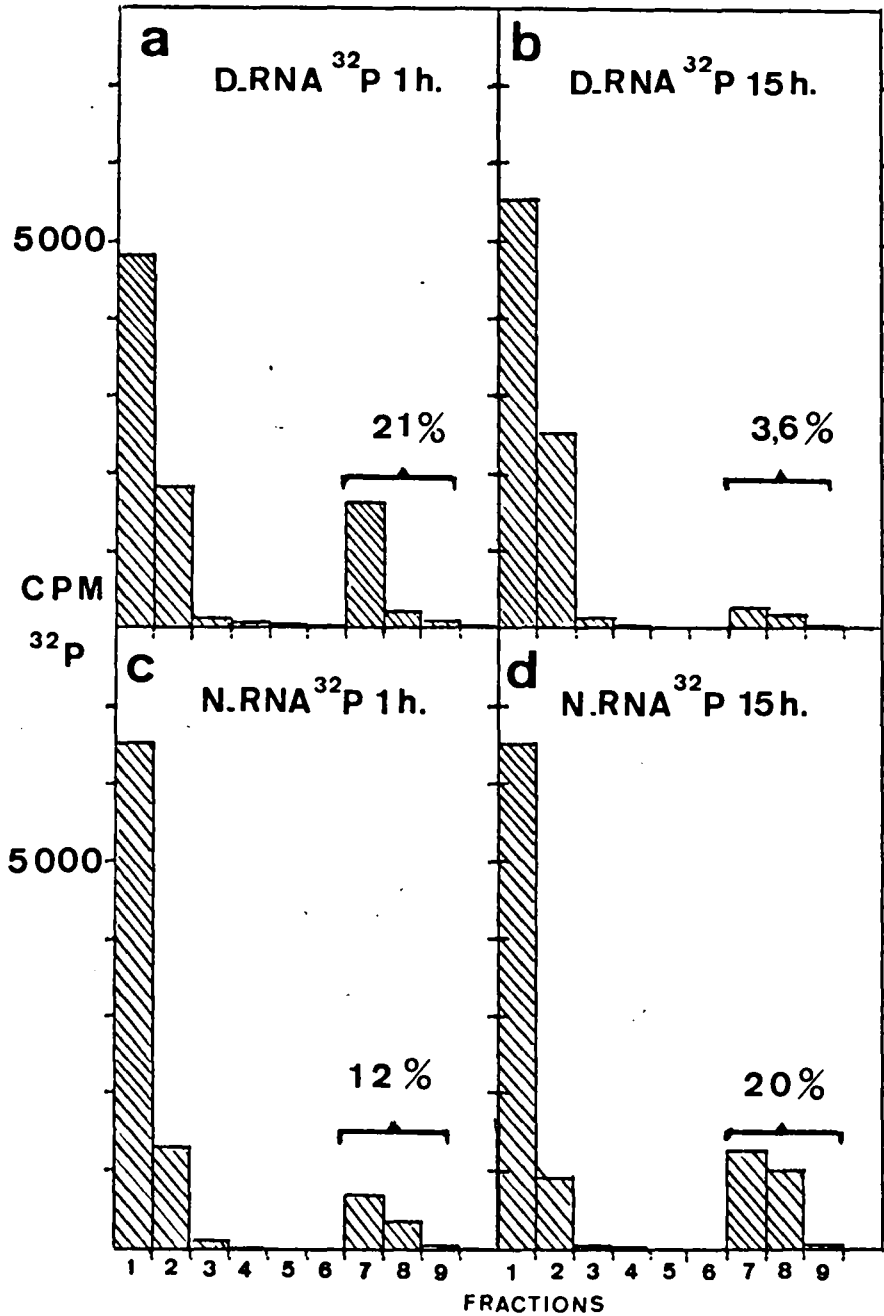


Fig. 17. Chromatographie d'affinité sur poly U-Sepharose du RNA extrait des D-RNP diffusées et de noyaux isolés de foie de rat.

- a. RNA diffusé, marqué in vivo au ^{32}P pendant 1 heure.
 b. " " " " " " 15 heures.
 c. RNA nucléaire, " " " " 1 heure.
 d. " " " " " " 15 heures.

Le RNA-poly A est élué à partir de la fraction n°7 par le tampon formamide 90%.

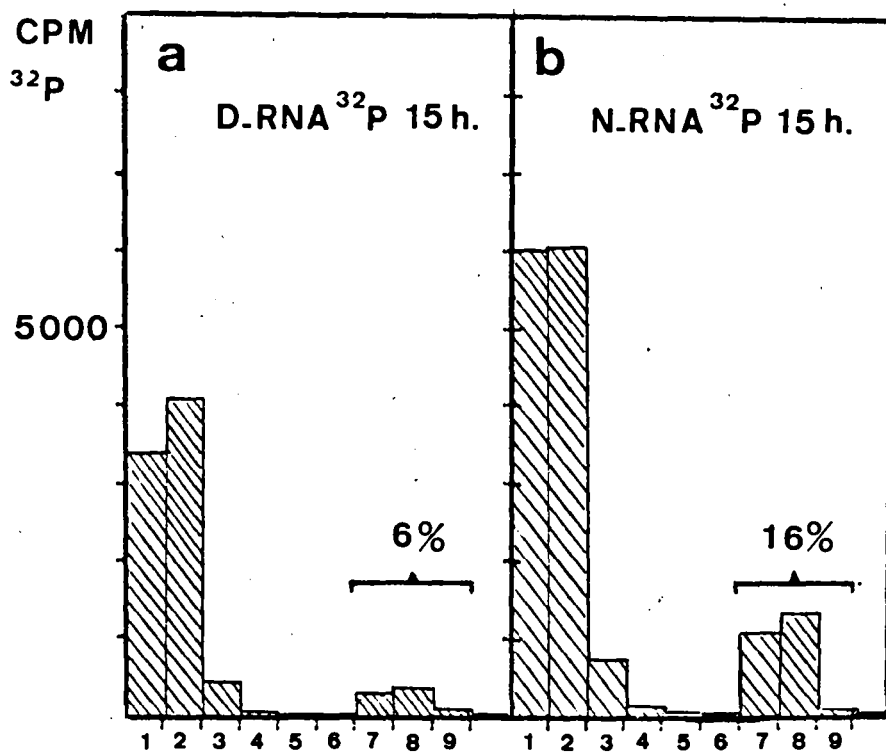


Fig. 18. Chromatographie d'affinité sur poly U-Sepharose du RNA diffusé (a) et du RNA nucléaire (b) marqués in vivo pendant 15 heures par le ^{32}P . Le RNA-poly A est élué à partir de la fraction n°7 par le tampon formamide 90%.

IV- CONCLUSIONS.

Le RNA libéré sous forme de RNP par diffusion des noyaux isolés répond à plusieurs des critères définissant le mRNA. Lorsqu'on prend la précaution d'effectuer la diffusion en présence d'inhibiteur de RNase et d'éviter de sédimenter les DRNP, le RNA

1) sédimente d'une manière hétérogène de 6 à 25 S.
2) est rapidement marqué et possède une composition de type AU.

3) possède entre 4 et 20% de chaînes renfermant du poly A. La taille et la teneur en poly A du RNA sont étroitement liées à la présence et à la qualité de l'inhibiteur de RNase ainsi qu'aux conditions d'extraction par le phénol-SDS. En effet la présence probable d'une endonucléase parmi les protéines formant le complexe D-RNP (NIESSING et SEKERIS (1970)(214)) peut rendre plus difficile l'obtention du D-RNA sous une forme non dégradée.

Le taux relativement faible obtenu sur Millipore ou cellulose, mais qui atteint 20% avec le poly U-sépharose, indique que les séquences polyadényliques sont en majorité de courte longueur. La rétention sur filtre ou sur cellulose qui nécessite des chaînes d'au moins 50 nucléotides, ne dépasse jamais 8 à 9% du RNA total. Le poly U sépharose qui permet de retenir des chaînes beaucoup plus courtes, d'une dizaine de résidus seulement, fournit des valeurs plus élevées.

Jusqu'à présent, il existe très peu d'indications dans la littérature sur la présence de poly A dans le RNA des D-RNP nucléaires. DUCAMP et JEANTEUR (1973)(215) avec des D-RNP nucléaires de cellule HeLa trouvent 5% de teneur en RNA-poly A par affinité sur poly U-sépharose. SCHUMM et WEBB (1974)(216) indiquent la présence de 40% de RNA-poly A pour les D-RNP diffusées de foie de rat en régénération. Ces derniers auteurs suggèrent en outre que la diffusion des D-RNP est un phénomène qui dépend de la longueur des chaînes

polyadényliques. RASKAS et RHO (1973)(217), au contraire, pensent que la libération du mRNA d'Adenovirus 2 par des noyaux isolés de cellule KB infectées, n'est pas conditionnée par la présence de poly A.

3.- ETUDE PHYSICOCHIMIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DES PROTEINES
DES D-RNP DIFFUSEES

Dans cette partie de notre travail, nous ne nous sommes intéressé uniquement qu'aux protéines des monoparticules 45 S. D'abord parce que ces dernières représentent une population homogène, aisément purifiable sur gradient de saccharose et ensuite, parce qu'elles s'obtiennent en l'absence de l'inhibiteur cytoplasmique de RNase, ce qui évite les interactions ou les échanges possibles entre protéines cytoplasmiques et protéines des D-RNP.

I- ETUDE PHYSICOCHIMIQUE.

A- COMPOSITION EN ACIDES AMINES *

La composition en acides aminés a été déterminée sur des hydrolysats chlorhydriques (24, 48 et 72h) à partir des D-RNP 45 S précipitées par l'ATCA 10% et lavées par l'éther et le mélange alcool-éther (v/v), ou à partir des protéines extraites des D-RNP par l'urée 6M-LiCl 3M et précipitées par l'ATCA 18%.

Les analyses effectuées sur plusieurs préparations différentes, rassemblées dans le tableau II (p.73), donnent une composition très voisine de celles obtenues par KRICHEVSKAYA et GEORGIEV (1969)(218) et par SARASIN (1969)(219) pour les D-RNP nucléaires isolées suivant leur procédé respectif. On peut noter que cette composition diffère nettement de celles des histones et des protéines ribosomales.

* Les analyses ont été effectuées par MM. CANER et CHARET sur Autoanalyseur Technicon (Université des Sciences et Techniques de Lille, laboratoire de chimie biologique) et par Mme. BENAÏSSA sur Multichrom BECKMAN (I.R.C.L.) que nous remercions très vivement.

TABLEAU II.

Composition (moles pour cent) en acides aminés des protéines des D-RNP diffusées comparée à celle obtenue par KRICHEV-SKAYA et GEORGIEV (1969)(220)(A) et par SARASIN (1969)(221)(B), et à celle des protéines ribosomales (C)(CRAMPTON et PETERMAN (1959)(222)).

	Préparations n°						
	1	2	3	4	A	B	C
Asp	10,1	10,5	10,4	9,6	10,6	10,4	8,5
Thr	4,1	4,1	4,2	4,5	3,9	4,6	5,3
Ser	7,5	7,4	7,1	7,7	7,6	6,1	5,5
Glu	11,6	10,9	10,7	9,5	10,6	11,9	9,2
Pro	4,6	4,6	4,6	4,6	5,7	4,6	5,1
Gly	16,4	18,3	17,1	15,3	17,1	14,0	7,6
Ala	5,7	5,0	6,0	7,7	5,5	5,5	8,6
Cys	1,0	0,9	0,9	0,6	0,86	0,9	1,0
Val	5,8	5,6	5,3	5,2	4,1	5,7	6,9
Met	2,2	2,3	2,0	2,2	0	2,0	2,2
Ile	3,8	3,8	3,5	3,8	2,4	3,3	5,3
Leu	5,9	5,3	5,4	6,2	4,8	5,2	9,4
Tyr	2,9	3,1	3,6	3,5	4,5	4,0	3,3
Phe	4,4	4,6	4,5	3,5	4,2	5,1	3,9
Lys	6,2	6,2	5,9	7,8	6,5	7,4	9,0
His	2,2	2,4	2,3	2,3	2,6	2,4	2,2
Arg	5,6	5,8	5,9	6,0	7,6	6,2	7,0

B- ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Nous avons utilisé différents types d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide soit en une seule dimension à pH acide en présence d'urée ou en présence de SDS, soit en deux dimensions en présence d'urée (1ère dimension à pH 8,6, seconde dimension à pH 4,5).

Les protéines ont été extraites des particules 45 S purifiées par dissociation dans l'urée 6M-LiCl 3M, puis précipitées par l'ATCA à 18% et lavées et séchées par l'éther.

1. Electrophorèse en présence d'urée.

L'électrophorégramme obtenu à pH 4,5 apparaît tout à fait semblable à celui obtenu par la plupart des auteurs avec le même type de particules d'origine cellulaire différente (KRICHEVSKAYA et GEORGIEV (1969)(223); NIESSING et SEKERIS (1970)(224); MATRINGE et JACOB (1972)(225). On distingue (Fig. 19 5p.75) trois bandes majeures migrant beaucoup moins vite que les protéines ribosomales et on peut noter que l'une d'elles ne pénètre pas dans le gel. Cette fraction serait selon GALLINARO - MATRINGE et JACOB (1974)(226) constituée de protéines phosphorylées. A pH 2,8 (Fig. 19c,p.75) en présence d'urée 2,5M, les protéines des D-RNP 45 S forment également trois bandes majeures qui entrent toutes cette fois dans le gel mais en ayant une mobilité très faible par rapport à celle des histones (Fig. 19d,p.75).

2. Electrophorèse en présence de SDS.

Après réduction des liaisons disulfure par le mercaptoéthanol à 1% et traitement par le SDS à 1%, les protéines se séparent en une dizaine de bandes colorées par le bleu de Coomassie, qui vont de 30.000 à 80.000 daltons (Fig. 19e,p.75). Les 3 constituants majeurs ont un P.M. évalué à 34.000, 36.000 et 39.000 daltons.

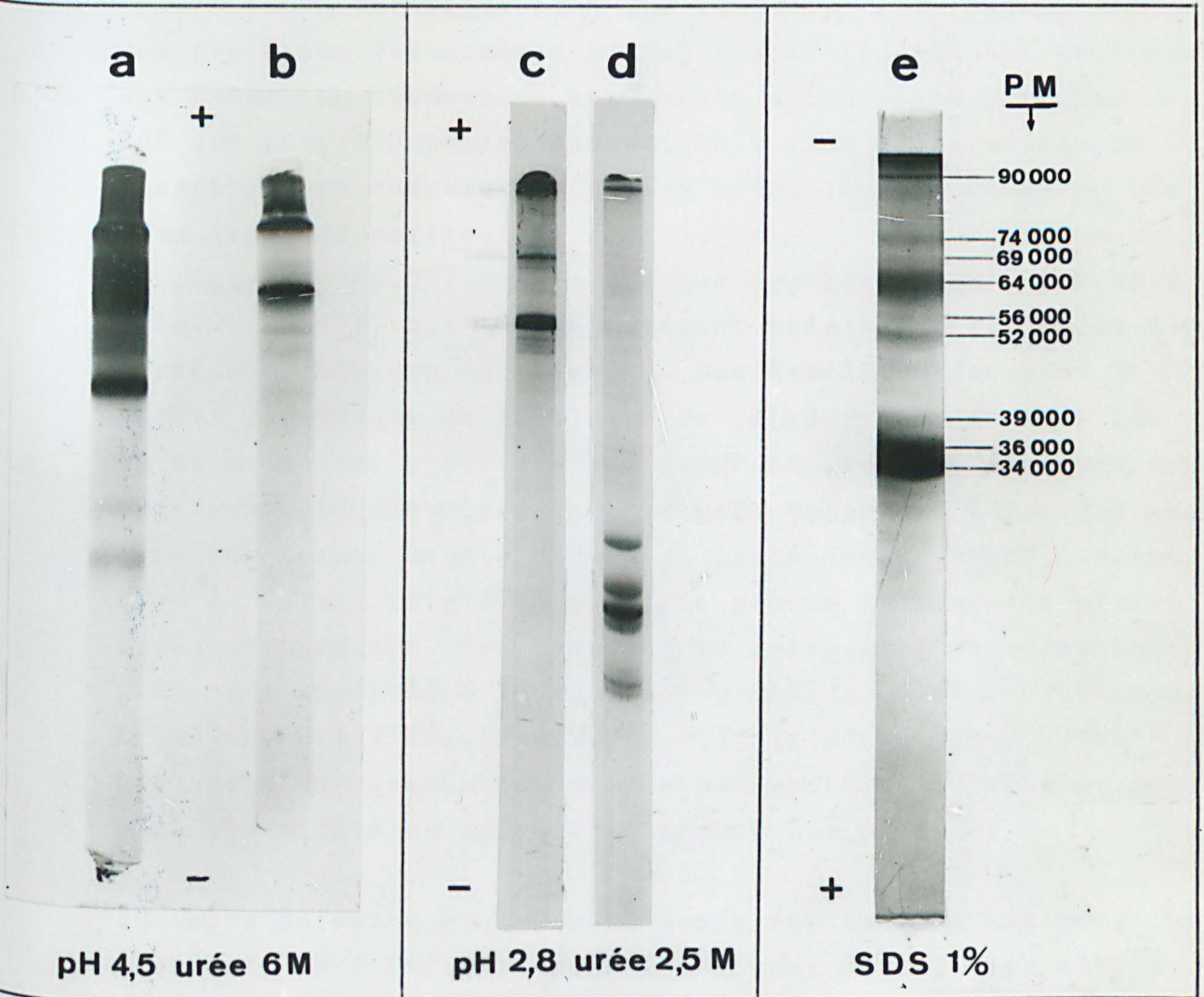


Fig.19. Electrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines extraites des D-RNP diffusées.

- a. Protéines des D-RNP non purifiées, électrophorèse à pH 4,5.
- b. Protéines des D-RNP 45 S purifiées, électrophorèse à pH 4,5.
- c. Protéines des D-RNP 45 S purifiées. Electrophorèse à pH 2,8.
- d. Histones de Rat. Electrophorèse à pH 2,8.
- e. Protéines des D-RNP 45 S. Electrophorèse en présence de SDS.

3. Electrophorèse bidimensionnelle.

Cette technique bien que conçue pour la séparation des protéines ribosomales s'adapte parfaitement aux protéines des D-RNP. La séparation est certes moins bonne pour les D-RNP que pour les polyribosomes, mais elle a l'avantage de permettre une comparaison rapide entre les protéines de ces deux types de particules.

La figure 20 (p.77) montre que les protéines des D-RNP 45 S (Fig.20 A et B) ont un comportement totalement différent des protéines ribosomales (Fig.D). Ces dernières occupent la partie cathodique de la plaque de polyacrylamide alors que la majorité des protéines des D-RNP se groupent dans une zone légèrement anodique, proche du dépôt. Cependant lorsqu'on analyse une quantité plus élevée de protéines de D-RNP (1mg au lieu de 0,1mg) (Fig.20 B,p.77), un groupe de composés plus basiques apparaît. Ces composés se retrouvent en concentration plus importante lorsque les protéines sont extraites des D-RNP non purifiées (Fig.20 Cp.77). Il s'agit donc probablement d'une contamination par des protéines d'origine nucléaire liées plus ou moins étroitement aux D-RNP 45 S.

Au cours de cette étude, nous avons été amené à analyser les protéines de D-RNP diffusées des noyaux de cellules d'hépatome ascitique de ZAJDELA. Les produits diffusés de ces noyaux sédimentent en deux fractions distinctes (Fig.21,p.78) : la plus importante demeure la zone 45 S, l'autre se situe à environ 60 S. Parmi les protéines des particules 45 S d'ascites (Fig.22Ap.79) on reconnaît celles qui sont caractéristiques des particules 45 S de foie normal, localisées à proximité du dépôt, mais on distingue un certain nombre de constituants supplémentaires ayant un comportement ribosomal. Ces derniers se trouvent plus abondants dans les particules 60 S ascitiques (Fig.22 B,p.79) et donnent à l'électrophorégramme une allure typiquement ribosomale (Fig.22Dp.79).

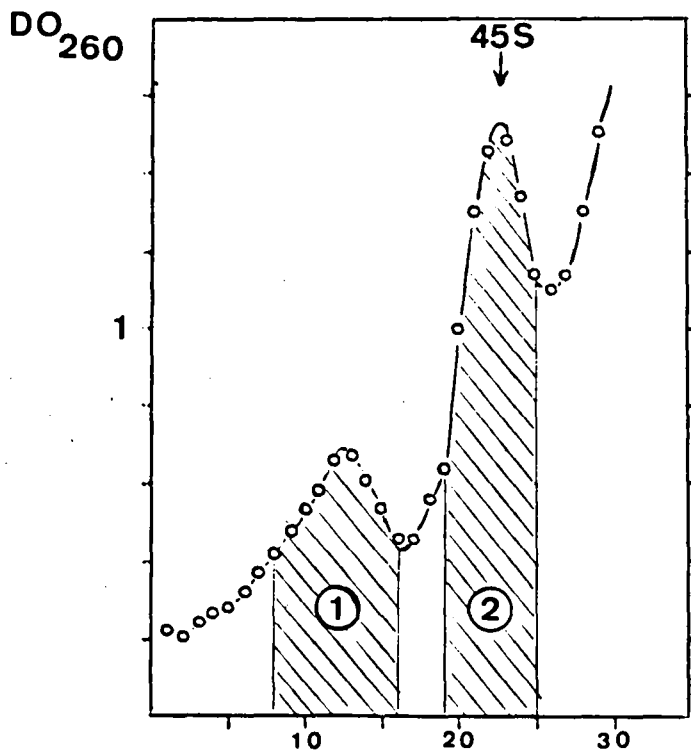


Fig 21. Centrifugation en gradient de densité des D-RNP diffusées de noyaux d'hepatome ascitique
Gradient de saccharose 15-30%; 20.000t/mn; 15h (SW27)

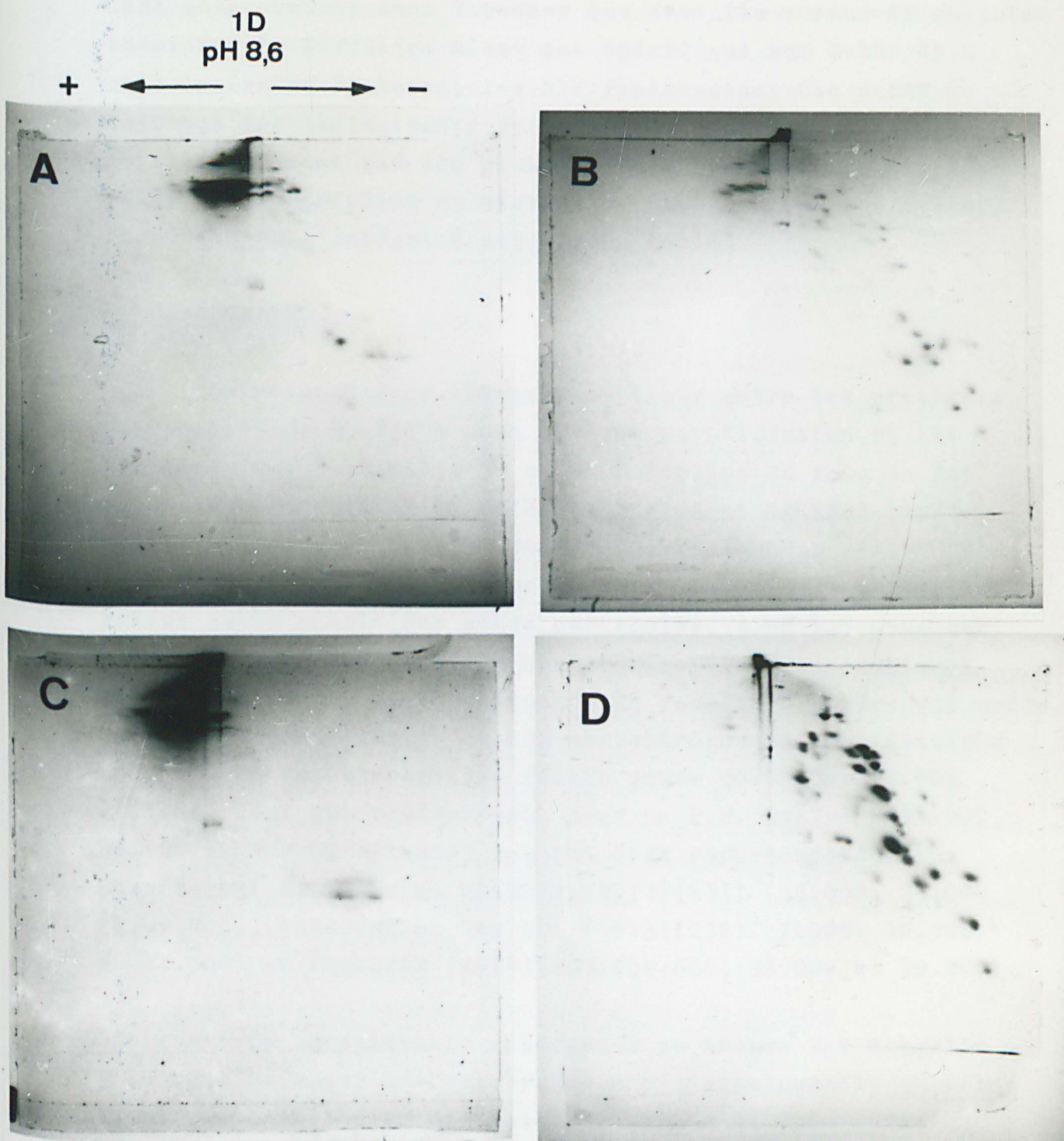


Fig.22. Electrophorèse bidimensionnelle des protéines extraites à partir de :

- A. RNP 45 S (pic 2.Fig 21, p.78) ascitiques.
- B. RNP 60 S (pic 1.Fig 21, p.78) ascitiques.
- C. D-RNP 45 S normales.

Ceci nous conduit donc à penser que dans les noyaux de cellules tumorales la diffusion n'est pas spécifique aux D-RNP 45 S mais intéresse également les RNP ribosomales. Ces R-RNP ne sont pas des contaminants cytoplasmiques des noyaux isolés et elles ne sont pas non plus libérées par fracture des noyaux puisque les contrôles au microscope électronique confirment la pureté et l'intégrité des noyaux isolés.

C- CONCLUSIONS.

La ressemblance électrophorétique entre les protéines des particules 45 S que nous isolons par diffusion et les protéines des particules 30 ou 45 S isolées du foie de rat selon les procédés de GEORGIEV (NIESSING et SEKERIS (1971) (227), ALBRECHT et VANZYL (1973)(228)), de MOULÉ et CHAUVEAU (SARASIN (1969)(229)) ou encore de PEDERSON (1974)(230), fait penser qu'il s'agit des mêmes particules. A pH 4,5 nous retrouvons la même simplicité des profils électrophorétiques, avec seulement trois constituants de caractère légèrement acide.

Par dissociation au SDS-mercaptoéthanol, on identifie une dizaine de polypeptides étalés entre 30.000 et 80.000 daltons. Ceux qui prédominent, avec un P.M. évalué à 34.000, 36.000 et 39.000 daltons, peuvent être rapprochés de ceux décrits par NIESSING et SEKERIS (1971)(231) (36.000, 39.000 et 42.000), ALBRECHT et VAN ZYL (1973)(232)(37.000, 42.500 et 44.500) et PEDERSON (1974)(233)(32.000, 36.000 et 39.000).

L'absence de constituants ribosomiaux se trouve une nouvelle fois confirmée par l'électrophorèse bidimensionnelle du moins en ce qui concerne la diffusion de noyaux de foie normal. Réciproquement, il ne nous a pas été possible d'identifier les constituants des D-RNP 45 S parmi les protéines extraites de polyribosomes totaux*. Compte tenu de la sensibilité de la

* La fraction "polyribosomes totaux" a été isolée selon FALVEY et STAEHELIN (1970)(234), mais en remplaçant le D.O.C. qui pourrait éliminer certaines protéines, par le Triton X100.

technique il apparaît donc que les protéines des D-RNP nucléaires sont différentes de celles des mRNP polyribosomales, contrairement à ce que l'électrophorèse monodimensionnelle (OLSNES (1970)(235)) avait laissé supposer.

II-ETUDE IMMUNOLOGIQUE : RELATION ANTIGENIQUE ENTRE LES D-RNP DIFFUSEES ET DIVERSES FRACTIONS CELLULAIRES.

A-BUT POURSUIVI.

L'existence des D-RNP nucléaires, considérées comme forme de transport de l'information génétique du noyau vers le cytoplasme, pose le problème important suivant : les protéines liées aux complexes nucléaires (certaines d'entre elles ayant une fonction intranucléaire précise) se retrouvent-elles dans les complexes cytoplasmiques libres ou liés aux polyribosomes? la simple comparaison du comportement électrophorétique des protéines des différentes D-RNP ne permet pas de trancher ce problème (Voir p.26), car deux constituants qui migrent exactement de la même façon ne sont pas pour autant identiques. Pour cette raison, une étude immunologique nous a paru plus indiquée. Nous avons donc dans un premier temps tenté d'obtenir un antiserum spécifique contre les D-RNP diffusées. Nous avons examiné ensuite le comportement des autres D-RNP cellulaires vis à vis de cet antiserum.

B-OBTENTION D'UN IMMUNSERUM ANTI D-RNP DIFFUSEES.

1. Mode opératoire.

A partir de plusieurs fractionnements nous avons préparé environ 20mg de D-RNP 45 S (diffusées en absence d'inhibiteur de RNase), purifiées sur gradient de saccharose et concentrées par ultracentrifugation. En ajoutant au sédiment de D-RNP, 5ml de NaCl 0,15M, puis 5ml d'adjuvant de FREUND complet (DIFCO) nous avons obtenu une émulsion stable par mélange vigoureux au mortier. Cette émulsion a été utilisée pour

l'immunisation de lapins en pratiquant 10 injections hebdomadaires de 1ml (2mg de D-RNP) dans la région sousclaviculaire.

2. Résultats.

Nous avons constaté en premier lieu que les D-RNP diffusées de foie de rat sont peu antigéniques pour le lapin. L'antiserum obtenu après la première série de 5 injections, opposé aux D-RNP en immunodiffusion selon la technique d'OUCH-TERLONY ne montre qu'un seul arc de précipitation très peu visible. D'autre part, pour faciliter la diffusion de l'antigène (D-RNP) dans l'agarose, il a été nécessaire de diminuer la concentration du gel jusqu'à 0,5% et d'opérer à 4°C. En effet, à la température ambiante, les D-RNP précipitent en quelques heures, ce qui rend l'immunodiffusion impossible. Les résultats sont plus satisfaisants avec l'antiserum obtenu après la deuxième série d'injections qui met en évidence (Fig.23,p.83) l'identité antigénique entre les D-RNP diffusées et les D-RNP nucléaires isolées selon les procédés de GEORGIEV, d'ISHIKAWA et de MOULÉ .

C- RELATION ANTIGENIQUE ENTRE LES D-RNP DIFFUSEES ET LES FRACTIONS CYTOPLASMIQUES.

1. Fractions globales.

Parmi les quatre fractions cytoplasmiques obtenues selon le protocole schématisé Fig.24(p.84) : surnageant post-mitochondrial (S 10), microsomes (m), surnageant post-microsomal (S 100) et polysomes purifiés (p), seule cette dernière ne précipite pas en immunodiffusion (Fig.25, p.85). La fraction S 100 produit l'arc de précipitation le plus intense, que l'on peut identifier à l'un des arcs formés avec les D-RNP (Fig.25B,p.85).

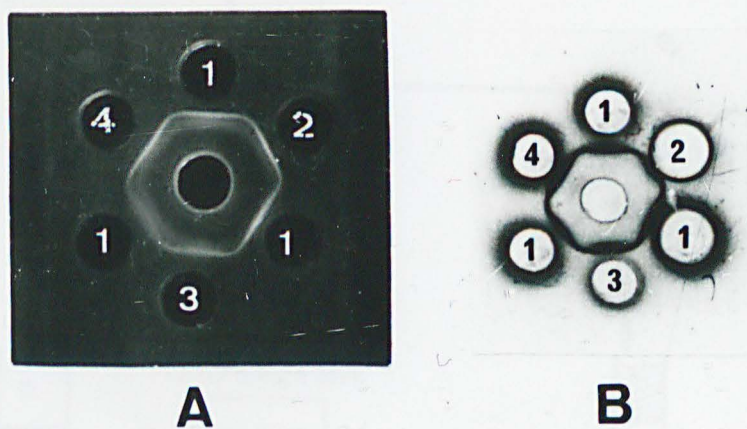


Fig.23. Immunodiffusion contre un antiserum anti D-RNP 45 S

- de :
1. D-RNP diffusées 45 S (1mg/ml)
 2. D-RNP de GEORGIEV (1mg/ml)
 3. D-RNP de ISHIKAWA (1mg/ml)
 4. D-RNP de MOULÉ (1mg/ml)

Diffusion dans l'agarose 0,5% pendant 48h à 4°C.

A. photographie directe.

B. Après coloration à l'Amido-black.

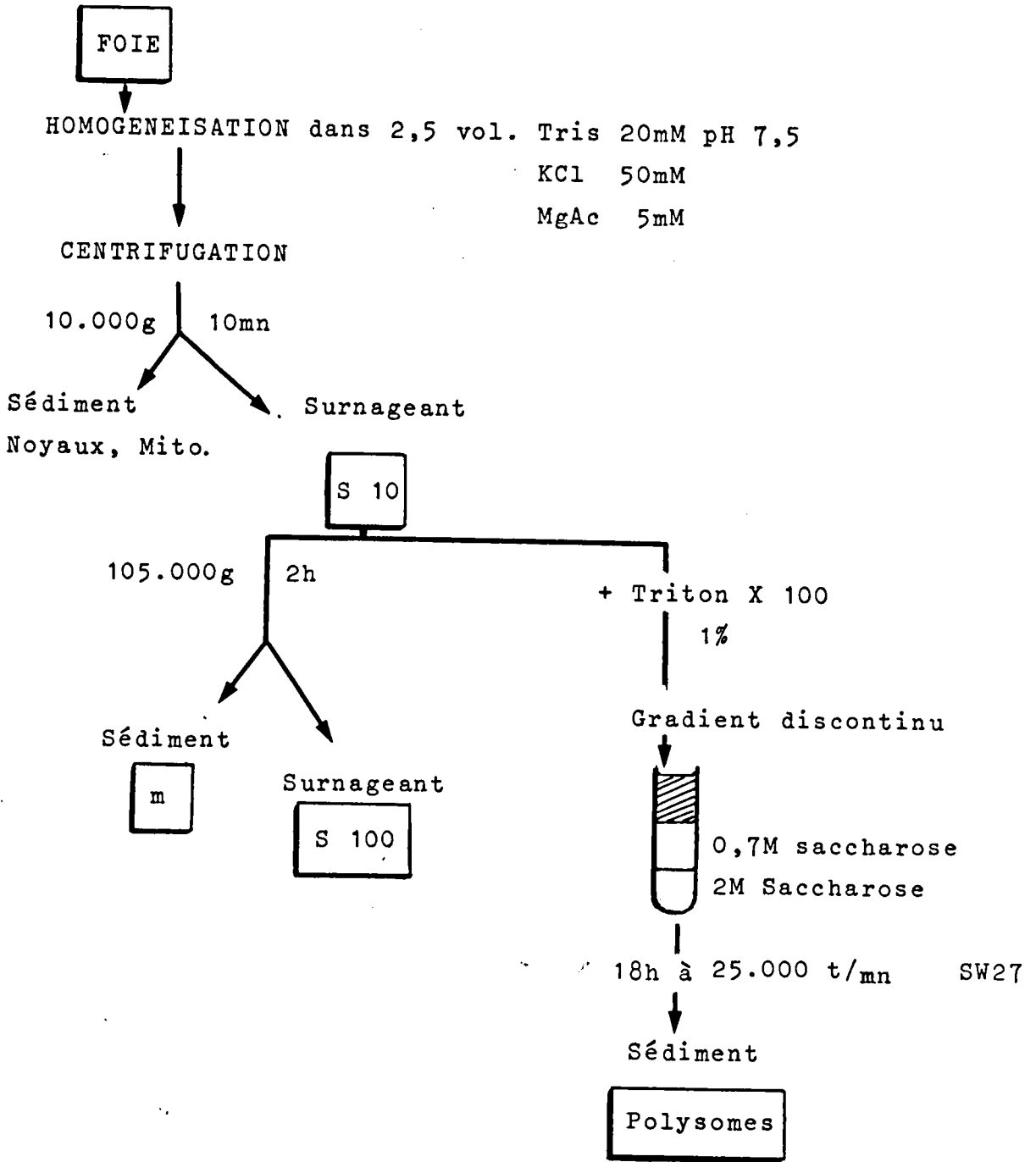


Figure 24 . Schéma de fractionnement du cytoplasme de foie de rat.

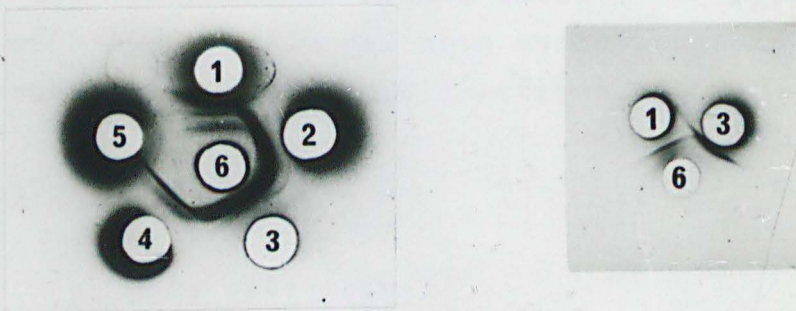


Fig.25. Immunodiffusion de fractions cytoplasmiques contre un antiserum anti D-RNP 45 S.

1. D-RNP 45 S.
2. S 10 (surnageant 10.000g).
3. S 100 (surnageant 100.000g)
4. Microsomes.
5. Polysomes purifiés.
6. Antiserum anti D-RNP.

Diffusion dans l'agarose à 0,5% pendant 48 h à 4°C.

Il apparaît donc :

- 1) que dans les polyribosomes purifiés les protéines des mRNP sont probablement différentes, compte tenu de la sensibilité de la méthode, des protéines des D-RNP nucléaires, ce qui rejoint les résultats de LUKANIDIN et al. (1972)(236).
- 2) que dans le cytoplasme il existe deux fractions, l'une soluble (S 100), l'autre sédimentable (m) qui possèdent la même antigénicité que les D-RNP nucléaires.

Pour définir plus précisément à l'intérieur de ces deux fractions les constituants responsables et en particulier, pour établir une ressemblance ou non entre D-RNP cytoplasmiques libres et D-RNP nucléaires, nous avons poursuivi la même expérimentation sur des sous fractions.

2. Fraction microsomale.

a. Mode opératoire.

La fraction microsomale (m) suspendue dans le tampon Tris-NH₄Cl-MgCl₂ a été soumise à une centrifugation sur gradient de saccharose 15-30%.

En suivant le profil de densité optique nous avons recueilli cinq sous fractions : A, B, C, D et E (Fig.26A, p.87) que nous avons ramenées à 1ml (volume du dépôt sur gradient) par ultrafiltration sur membrane (AMICON, PM 10).

b. Résultats

L'immunodiffusion de chacune de ces sous fractions (Fig.26B, p.87) indique que seule la fraction E produit un arc de précipitation. Cette fraction qui demeure au sommet du gradient, représente des constituants légers de taille inférieure à 10 S environ. Il s'agit donc, très probablement de composés appartenant à la fraction S 100 qui ont accompagné les microsomes au cours de l'ultracentrifugation.

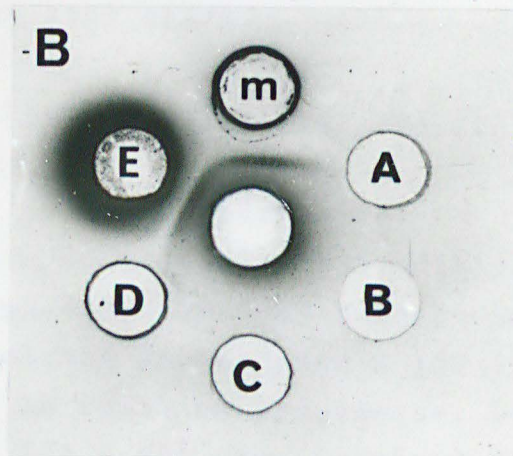
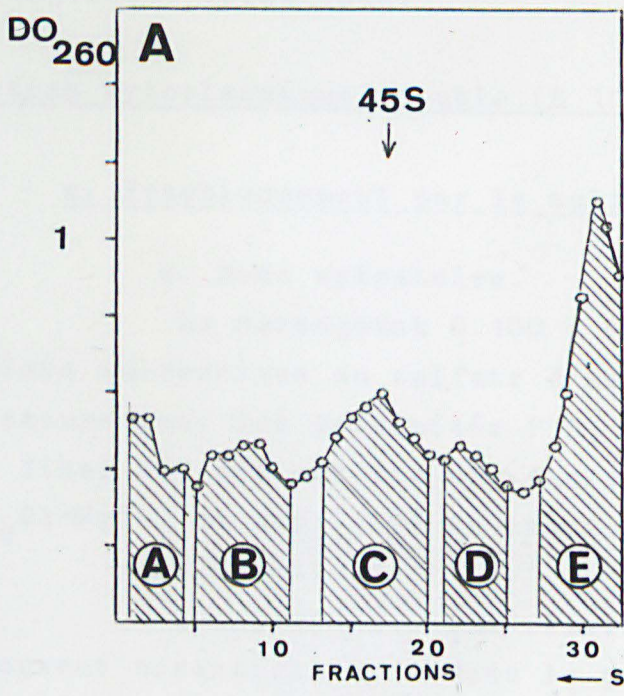


Fig.26. A. Centrifugation en gradient de densité de la fraction microsomale (m).

B. Immunodiffusion contre l'antiserum anti D-RNP 45 S des fractions obtenues sur gradient.

Les autres sous-fractions A, B, C et D dans lesquelles sédimentent, en plus des unités ribosomales, les D-RNP cytoplasmiques libres, apparaissent dépourvues de l'activité antigénique recherchée.

3. Fraction cytoplasmique soluble (S 100).

a. Fractionnement par le sulfate d'ammonium.

α. Mode opératoire.

Le surnageant S 100 a été fractionné par précipitations successives au sulfate d'ammonium à 35%, 55% et 65% de saturation. Les précipités P35, P55, P65 et le surnageant final S65 ont ensuite été dialysés contre la solution Tris-NH₄Cl-MgCl₂ et appliqués en immunodiffusion.

β. Résultats

Les protéines qui réagissent avec l'antiserum se retrouvent essentiellement dans le précipité à 55% de saturation (Fig.27 p.89). Le précipité P65 donne également un arc, mais moins prononcé; le précipité P35 et le surnageant S65 sont sans effet.

b. Fractionnement par gel filtration.

α. Mode opératoire.

Le précipité P55, dialysé contre une solution de Tris 10mM pH 8,3-EDTA 10mM-Mercaptoéthanol 1mM, a été appliqué sur une colonne de Sephadex G 100 (90x2,5cm) équilibrée et éluée avec la solution précédente. Le profil de la transmission (Fig. 28A,p.90) enregistrée à 280nm permet de repérer de manière très reproductible, 9 pics que nous avons concentrés par ultrafiltration (AMICON PM10).

β. Résultats

Les 9 fractions réagissent de manière décroissante à mesure que leur volume d'éluion augmente (Fig.28B,p.90). Ainsi la fraction 1 éluée avec le volume d'exclusion de la

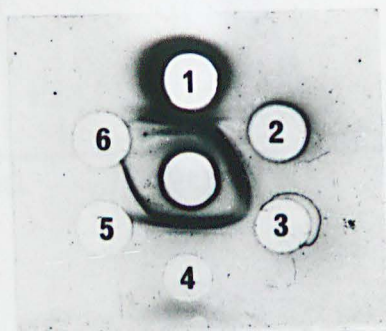


Fig.27. Immunodiffusion contre l'antiserum anti D-RNP 45 S des fractions du surnageant 100.000g (S 100) obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium.

1. D-RNP 45 S.
2. S 100.
3. P 35 précipité à 35% de saturation.
4. P 55 " 55% "
5. P 65 " 65% "
6. S 65 surnageant à 65% "

colonne se révèle plus antigénique. Pour aller plus loin dans la purification nous avons tenté un sous fractionnement de la fraction 1 sur DEAE ou sur CM cellulose. Malheureusement le seul résultat n'a été que de confirmer son hétérogénéité.

D. CONCLUSIONS.

1. Parenté des D-RNP diffusées avec les autres D-RNP nucléaires.

L'identité immunologique que nous avons mise en évidence entre les D-RNP diffusées et les D-RNP de GEORGIEV, d'ISHIKAWA et de MOULÉ - D-RNP obtenues suivant des procédés nettement différents - donne un argument supplémentaire en faveur de la préexistence de ces particules dans le noyau. En effet, on conçoit difficilement que des complexes artificiels, formés par associations non-spécifiques entre RNA et protéines, possèdent les mêmes constituants protéiques (électrophorétiquement et immunologiquement) quelque soit la technique de leur isolement.

2. Différence antigénique entre les D-RNP nucléaires et les D-RNP cytoplasmiques.

Une autre conséquence intéressante de l'utilisation de cette méthode immunologique a été de révéler l'absence de parenté des D-RNP du noyau avec celles du cytoplasme. Ce résultat est en contradiction avec ceux de OLSNES (1970)(237) et de SCHWEIGER et HANNIG (1970)(238) fondés simplement sur la comparaison électrophorétique des protéines des différentes RNP, mais il confirme ceux de MOREL et al. (1971)(239) et de LUKANIDIN et al. (1972)(240). Ces derniers, en utilisant également un immunserum anti-D-RNP nucléaires, ont montré par centrifugation à l'équilibre en CsCl que les mRNP polyribosomales de foie de rat ne fixaient pas les anticorps anti D-RNP nucléaires.

Ces résultats suggèrent par conséquent, que les protéines associées au D-RNA dès sa synthèse ont un rôle intranucléaire uniquement, et qu'elles sont échangées au cours du passage dans le cytoplasme. Cet échange ferait donc partie des nombreux et complexes mécanismes supposés intervenir dans le transport du mRNA.

3. Relation antigénique avec le cytosol.

Nous avons trouvé dans la fraction soluble du cytoplasme (S 100) des composés précipitables par le sulfate d'ammonium à 55% et exclus en gel filtration sur Sephadex G 100, qui réagissent avec l'immunserum anti D-RNP. Nous pouvons donc penser, bien que cela nécessite d'autres vérifications biochimiques, qu'il s'agit des mêmes protéines se trouvant à l'état libre dans le cytosol et complexées au D-RNA dans le noyau.

Cette hypothèse leur donne ainsi un rôle important dans la régulation du transport du D-RNA. En effet, la libération du D-RNA de son site chromatinien, puis les différents événements de son métabolisme qui vont jusqu'à son passage dans le cytoplasme, se trouvent étroitement liés à la présence et à la disponibilité de ces protéines dans le cytoplasme. C'est ce que récemment SCHUMM et al. (1973) (241) semblent conclure. En utilisant un système de noyaux isolés comparable au nôtre, ces auteurs montrent l'influence de certaines protéines cytoplasmiques sur la diffusion des D-RNP nucléaires. Les protéines responsables de cette "modulation" sont contenues dans le cytosol, sont précipitables entre 33 et 66% de saturation en sulfate d'ammonium et elles augmentent d'environ 30% la quantité de D-RNP libérées par le noyau.

Enfin, il serait intéressant de comparer ces protéines "antigéniques" avec les protéines cytoplasmiques qui possèdent une forte affinité pour le D-RNA : les "informosome forming proteins" (I.F.P.) de STEPANOV et al. (1971) (242) ou

les "RNA Binding proteins" de HUANG et BALTIMORE (1970)(243) et plus récemment de EGLY et al.(1974)(244) ou encore les "poly A Binding proteins" de BLANCHARD et al.(1974)(245). Ces différents auteurs montrent, en effet, l'existence dans le cytoplasme de protéines capables de se fixer spécifiquement au D-RNA ou au poly A.

STEPANOV et al.(1971)(246) isolent du cytosol du foie de rat deux constituants protéiques de 8 - 10 S exclus en gel filtration sur Sephadex G200, capables de former avec le RNA des complexes du type informosome. SCHWEIGER et SPITZAUER (1972)(247) montrent d'autre part, que ce sont des protéines (de P.M. 43.000) identiques en électrophorèse à celles que l'on extrait des D-RNP nucléaires.

BLANCHARD et al.(1974)(248) purifient par chromatographie d'affinité sur poly A-Sepharose une fraction protéique de poids moléculaire 150.000, dissociable par le SDS en sous-unités de P.M. 38.000 qui rappellent également les constituants des D-RNP nucléaires.

4.- ACTIVITES BIOLOGIQUES in vitro.

Etant donné les propriétés particulières des D-RNP diffusées, notamment la nature de leur RNA (type AU, rapidement marqué, hétérogène en taille, renfermant des séquences poly A) , nous avons envisagé qu'il s'agissait d'une forme de transport du RNA messenger du noyau vers le cytoplasme. Mais il fallait prouver le critère essentiel d'une mRNA : à savoir la faculté de stimuler la biosynthèse protéique. Nous avons donc recherché une telle activité en introduisant les D-RNP 45 S ou les D-RNP obtenues en présence d'inhibiteur de RNase, déprotéinisées ou non, ou encore leur RNA extrait au phénol-SDS, dans un système acellulaire de foie de rat incorporant les amino-acides marqués. Nous avons d'autre part, tenté de mettre en évidence l'activité polymérasique particulière à ces D-RNP, activité de polyadénylate synthétase décrite par NIESSING et SEKERIS (1972) (249), (1973)(250).

I- SYNTHÈSE PROTÉIQUE EN SYSTÈME ACELLULAIRE.

Le système acellulaire préparé à partir de foie de rat selon FALVEY et STAEHELIN (1970)(251), répond très facilement à l'addition de poly U (400µg/ml) par une augmentation importante de l'incorporation de phénylalanine marquée; en élevant la concentration des ions magnésium du milieu d'incubation jusqu'à 10mM, la stimulation par le poly U atteint un maximum qu'on peut évaluer à 12 fois celle du système dont la synthèse est dirigée par le mRNA endogène (Fig.29, p.95). Par contre, l'addition de D-RNP diffusées dans les mêmes conditions d'incubation ne produit aucun effet sensible. On observe au contraire une légère diminution de l'incorporation par rapport au témoin. Ce phénomène a, par ailleurs, été signalé par MOULÉ et al.(1969)(252).

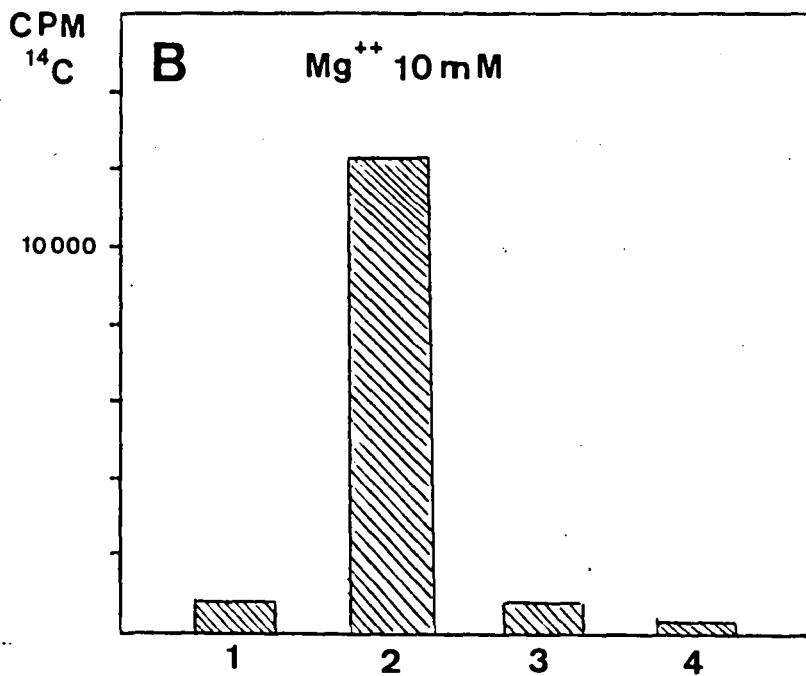
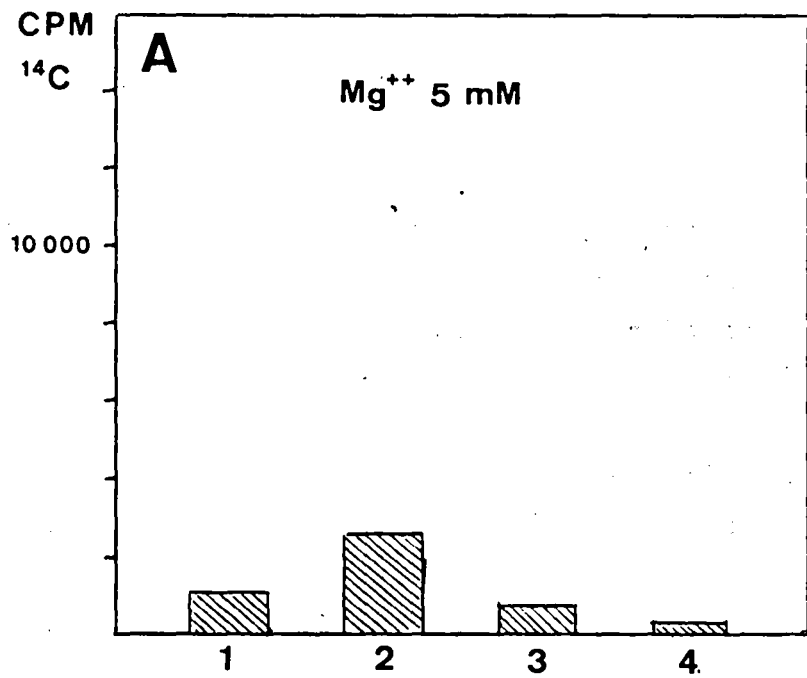


Fig.29. Incorporation d'amino acides ^{14}C en système acellulaire de foie de rat stimulée par le poly U en présence de Mg 5mM (A) ou de Mg 10mM (B)

1. Contrôle (synthèse endogène).
2. Contrôle + Poly U (0,3mg/ml)
3. Contrôle + D-RNP (0,5mg/ml).
4. Contrôle + D-RNP trypsinisées (0,5mg/ml).

Le traitement des D-RNP par la trypsine, dans le but d'éliminer certaines protéines qui pourraient, ainsi que le suggèrent OLSNES et PIHL (1972)(253), empêcher la traduction du RNA, n'élève pas d'avantage le taux d'incorporation des amino-acides.

Lorsqu'on suit l'incorporation en fonction du temps (Fig.30 B p.97), on retrouve l'effet inhibiteur des D-RNP sur la synthèse endogène, et sur la synthèse dirigée par le poly U (Fig. 30 A p.97). L'addition d'ions phosphates, complexant les ions magnésium, en quantité largement supérieure à celle qui peut accompagner les D-RNP (celles-ci sont en effet préparées par diffusion dans un milieu phosphaté) ne suffit pas pour expliquer ce phénomène. Nous pouvons de même, exclure la possibilité selon laquelle les peptides synthétisés en présence de D-RNP, trop petits, ne seraient pas précipités par l'ATCA ni retenus sur filtres de comptage. En effet si au lieu de précipiter les produits marqués, on analyse directement le milieu de synthèse sur gradient de saccharose on parvient à séparer les ribosomes porteurs de chaînes peptidiques nouvellement synthétisées. On observe de cette manière, dans le cas de la synthèse endogène (Fig.31a,p.98) un pic de radioactivité coïncidant avec les monoribosomes 80 S. La radioactivité disparaît lorsque le système a été préalablement incubé pendant 20 minutes (système préincubé) en présence d'amino-acides non marqués (Fig.31d,p.98).

L'addition de poly U au système préincubé entraîne la réapparition de ce pic (Fig.31b,p.98), mais comme précédemment les D-RNP et les D-RNP tryptinés (Fig.31c et p.98 et Fig.32,p.99) se montrent inactives.

Les résultats négatifs obtenus avec les particules 45 S sont probablement dûs au fait que leur RNA est plus ou moins dégradé et ainsi rendu "intraduisible". Mais nous n'avons pas obtenu plus de succès en utilisant les polyparticules préparées en présence d'inhibiteur de RNase, déprotéinisées ou non ni avec le RNA 6-25S extrait dans les conditions d'obtention

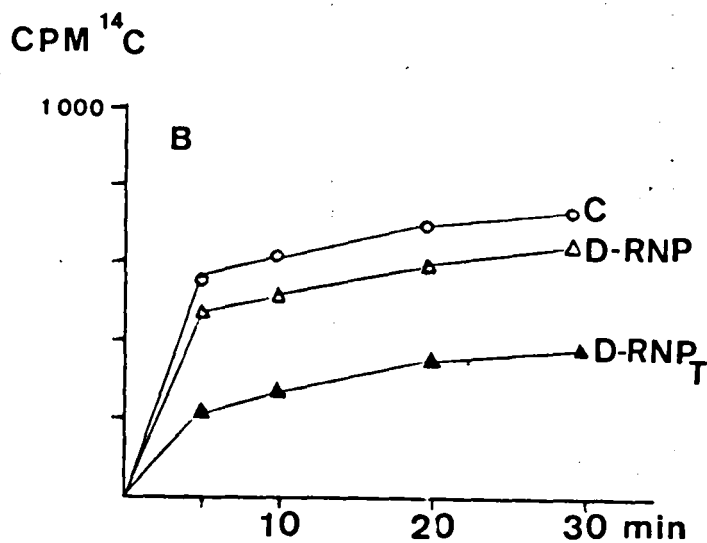
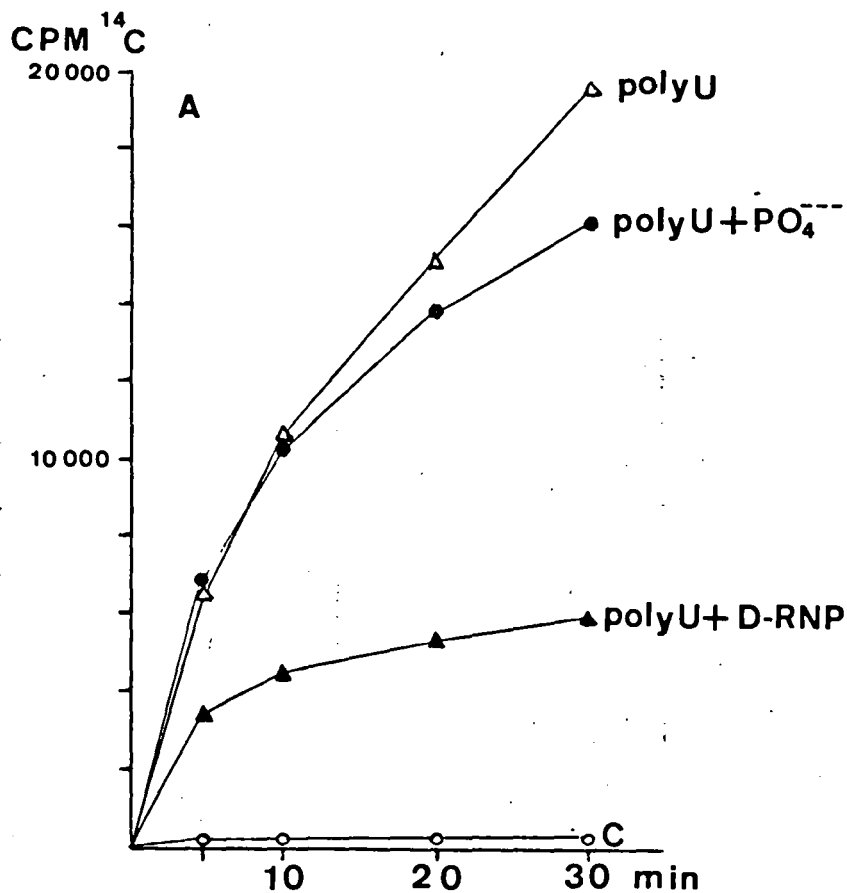
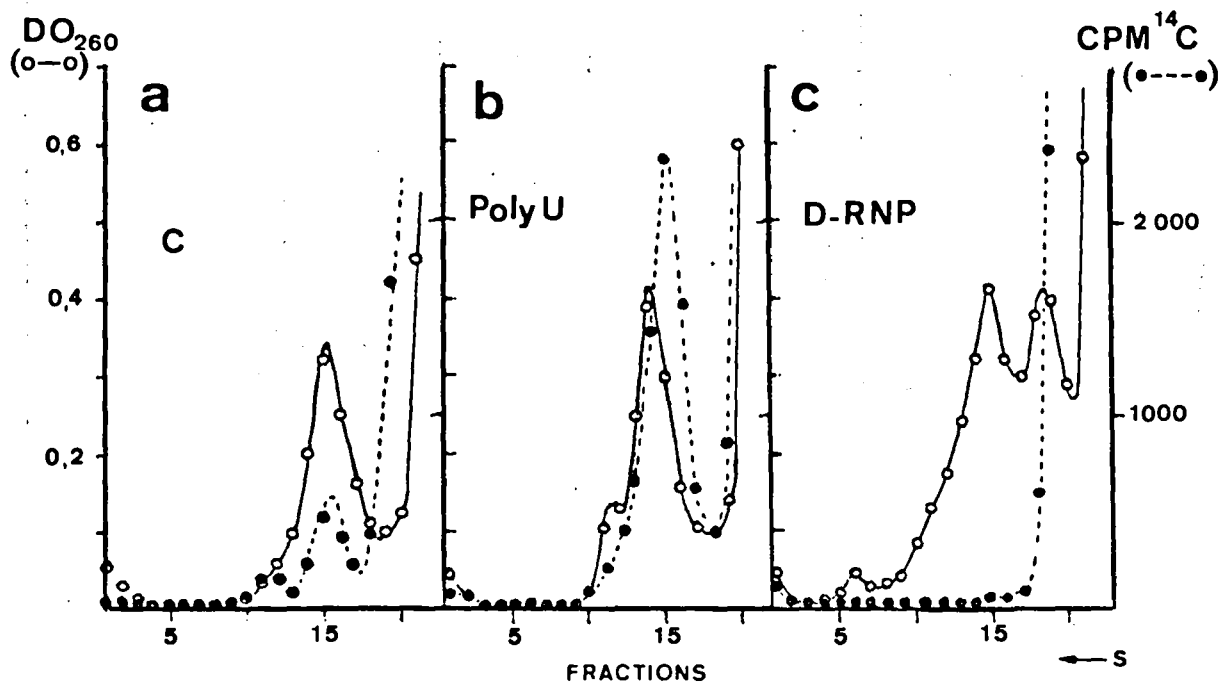


Fig. 30. Incorporation en fonction du temps d'acides-amino marqués en système acellulaire.

A : Incorporation de phenylalanine ^{14}C après addition de poly U, de poly U + ions PO_4^{3-} , de poly U + D-RNP par rapport au contrôle (C).

B : Incorporation d'acides-amino ^{14}C en présence de D-RNP ou de D-RNP trypsinisées (D-RNP_T).



BU
LILLE

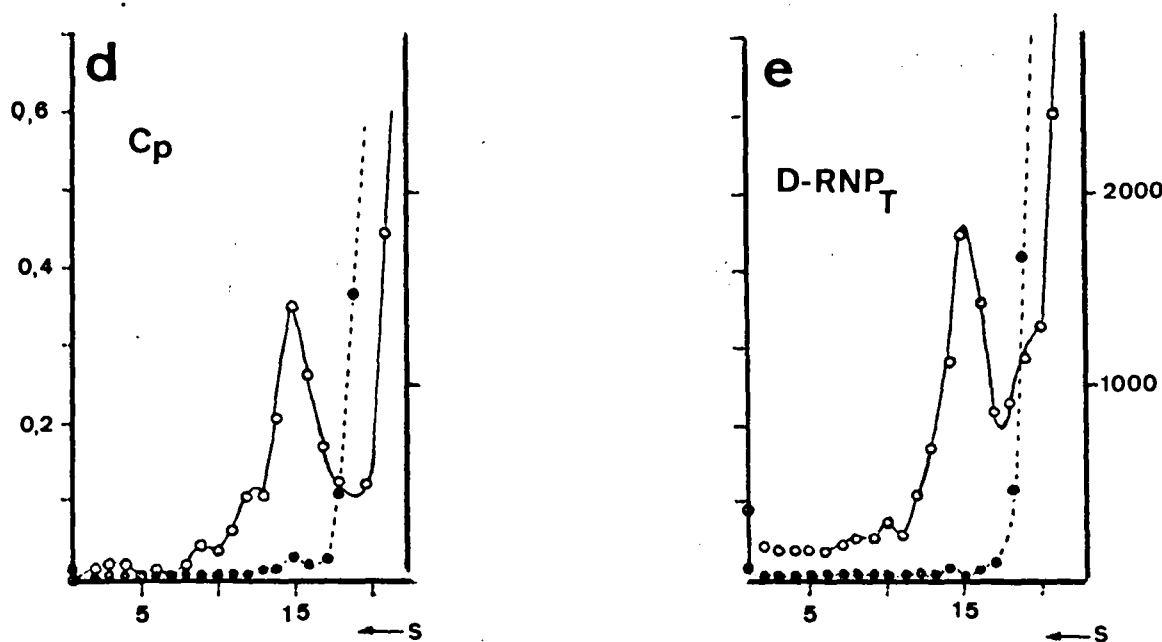


Fig.31. Centrifugation en gradient de saccharose 15-30% (SW27, 25.000 t/mn, 5h) du système acellulaire (500 μ l) d'incorporation d'acides aminés marqués.

- a. Synthèse endogène (C), incubation 60mn.
- b. Synthèse en présence de poly U, incubation 40mn, préincubation 20mn.
- c. Synthèse en présence de D-RNP, incubation 40mn, préincubation 20mn.
- d. Synthèse endogène, incubation 40mn, préincubation 20mn (C_p)
- e. Synthèse en présence de D-RNP trypsinisées (D-RNP_T) incubation 40mn, préincubation 20mn.

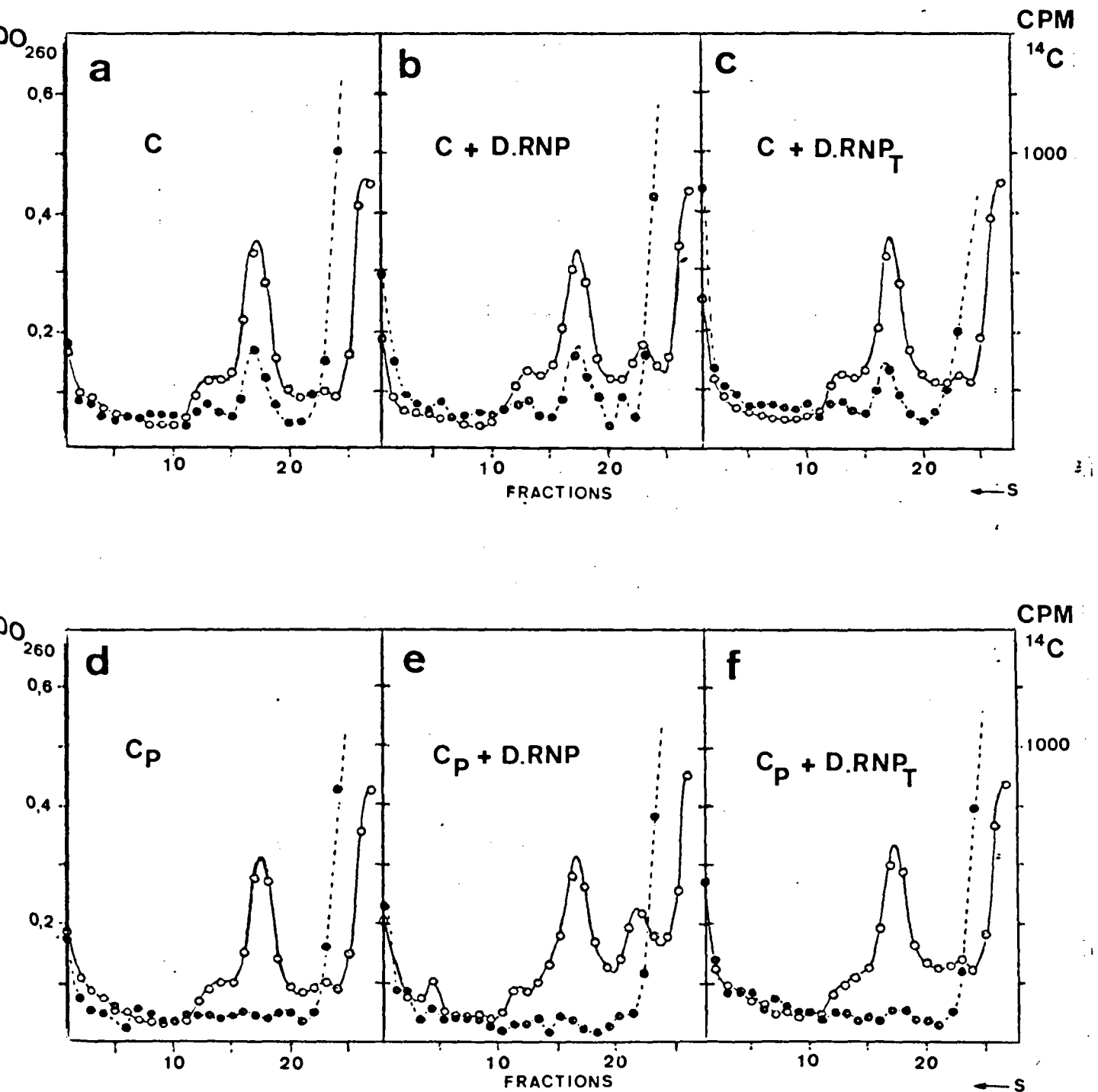


Fig. 32. Centrifugation en gradient de saccharose 15-30% (SW27; 25.000 t/mn; 5h) du système acellulaire d'incorporation d'acides aminés marqués.

Gradients a, b, c : Le système a été incubé 40mn à 30°C a) pour la synthèse endogène contrôle (C), b) en présence de D-RNP, c) en présence de D-RNP traitées par la trypsine (D-RNP_T)

Gradients d, e, f : Le système a été préincubé 20mn puis incubé pendant 40mn à 30°C. d) pour la synthèse contrôle (C_p), e) en présence de D-RNP, f) en présence de D-RNP traitées par la trypsine (D-RNP_T)

des RNA-poly A (Fig.33,p.101). Nous avons toutefois, dans ce dernier cas, observé une légère augmentation de l'incorporation d'amino-acides, mais pour des concentrations élevées en RNA.

II- FIXATION DES D-RNP AVEC LES RIBOSOMES.

Le D-RNA nucléaire est capable de se fixer aux ribosomes in vitro (NAORA et KODAIRA (1969)(254)) et le mRNA polyribosomal peut également se lier à la sous-unité 40S en l'absence de tout autre facteur que les protéines du complexe mRNP (LEBLEU et al.(1971)(255)). Nous avons donc tenté le même type d'expérience avec les D-RNP diffusées. Pour cela nous avons utilisé les D-RNP préparées en présence d'inhibiteur de RNase, marquées par le ^{32}P , que nous avons incubées avec les polyribosomes purifiés en présence de GTP, d'ATP, de phosphokinase et de phosphoénol pyruvate à 25°C pendant 10mn.

Dans ces conditions, la fixation des D-RNP avec les ribosomes se traduirait par l'apparition de matériel radioactif au niveau des constituants ribosomiaux repérés dans le gradient de saccharose par mesure de la densité optique.

On constate (Fig.34,p.102) que les D-RNP et les D-RNP déprotéinisées sont incapables de se combiner avec les ribosomes: la radioactivité présente dans la zone polyribosomale (Fig.c et d,p.102) n'est que très légèrement supérieure à celle que l'on observe pour les D-RNP seules (Fig.b , p.102) incubées dans les mêmes conditions.

Par contre après traitement au D.O.C. à 1%, qui élimine une grande partie des protéines des D-RNP, nous obtenons dans le fond du gradient une quantité importante de matériel marqué (Fig.35,p.103). Ceci pourrait indiquer une fixation du D-RNA avec les polyribosomes lourds, mais l'absence de radioactivité au niveau des ribosomes monomères et dimères ne permet pas de conclure définitivement sur cette expérience.

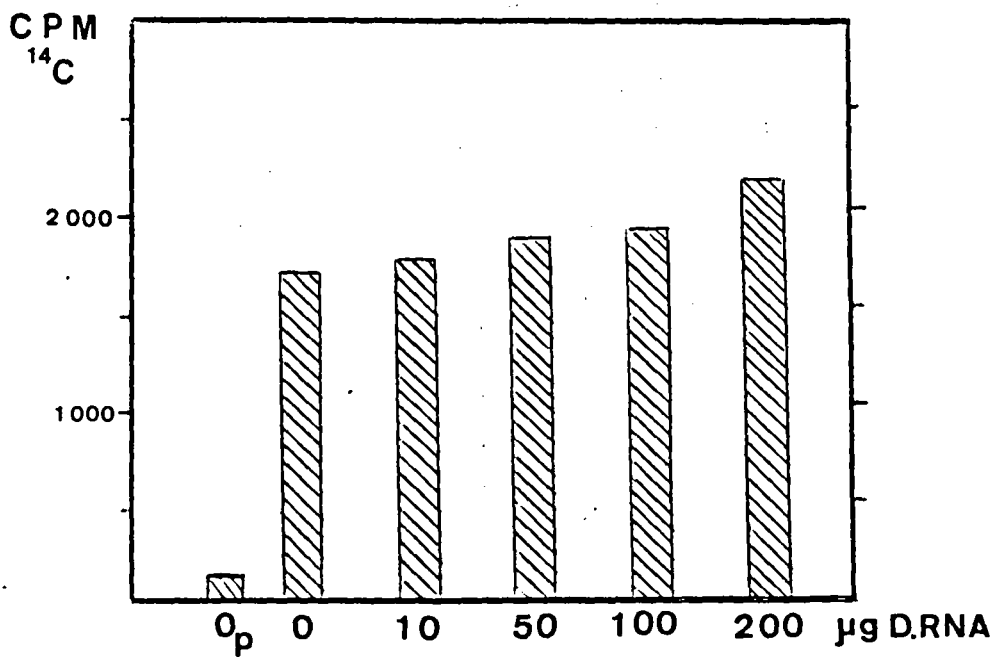


Fig.33. Incorporation d'acides aminés marqués en système acellulaire en présence de D-RNA (de 0 à 200 µg/500 µl) Incubations 30mn à 30°C (préincubation (0_p), 20mn)

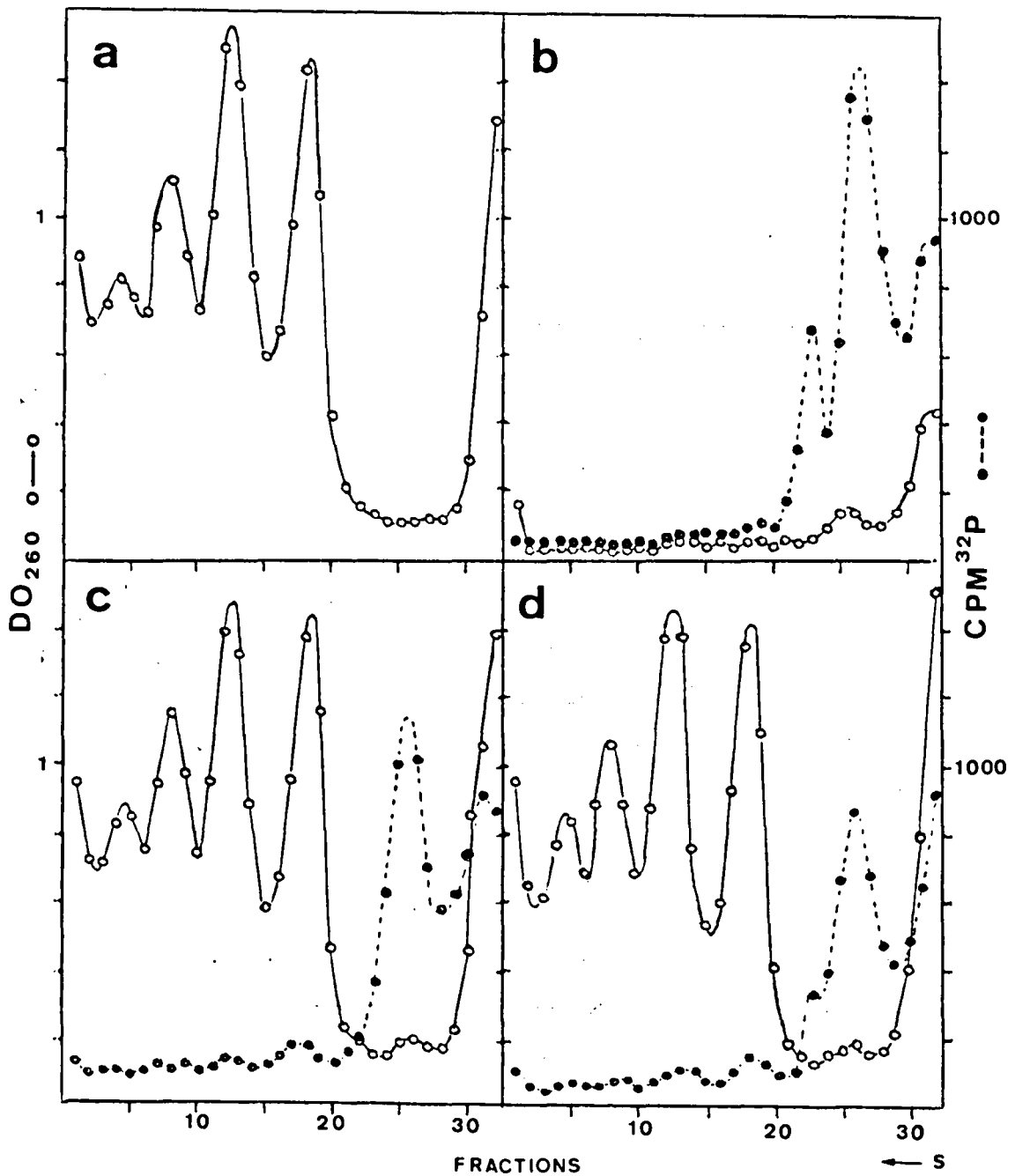


Fig. 34. Centrifugation en gradient de saccharose 15-30% (SW27, 25.000 t/mn, 6h) du système acellulaire de synthèse protéique en présence de D-RNP et de D-RNP préparées en présence d'inhibiteur de RNase, marquées au ³²P (*in vivo* pendant 1h, 1mCi/rat).

- a. Système contrôle (polyribosome).
- b. D-RNP préparées en présence d'inhibiteur.
- c. Système acellulaire en présence de D-RNP 45 S.
- d. Système acellulaire en présence de D-RNP préparées avec l'inhibiteur.

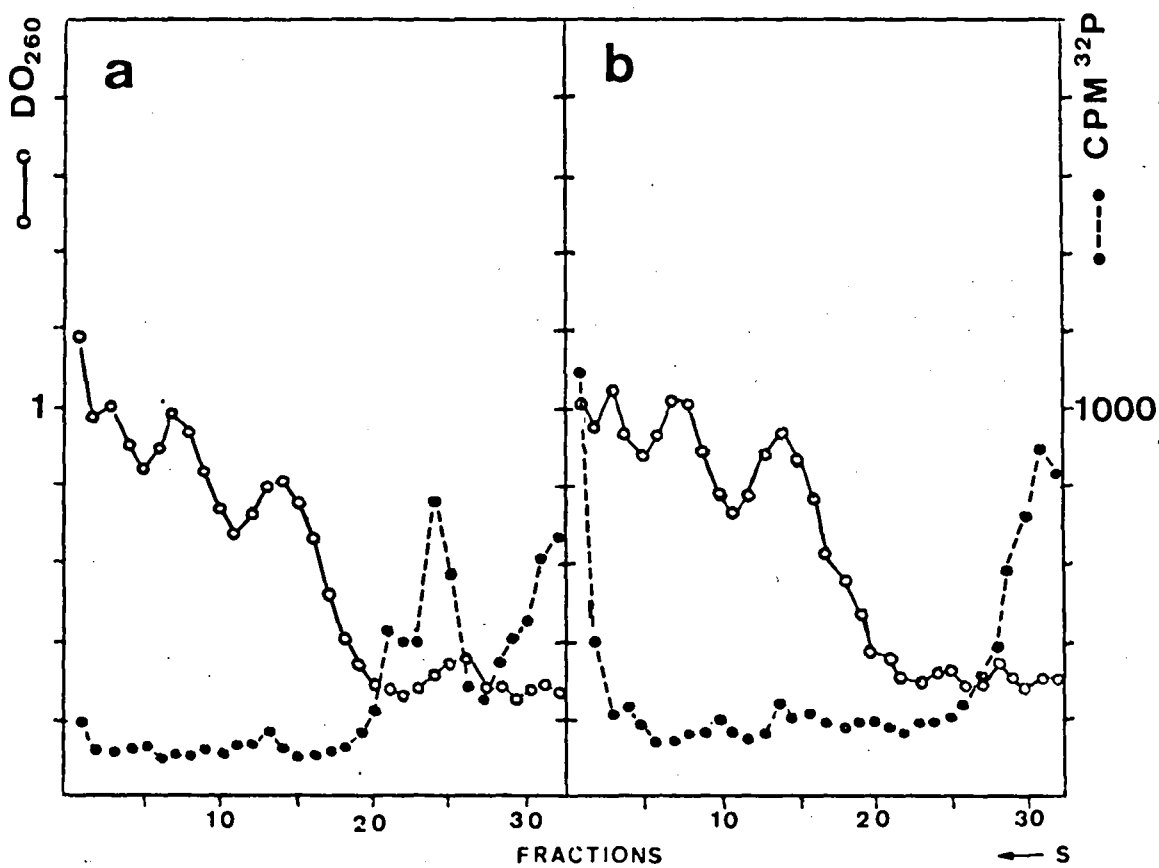


Fig. 35. Centrifugation en gradient de saccharose 15-30% (SW27, 17.000 t/mn, 15h) du système acellulaire de synthèse protéique: (a) en présence de D-RNP ^{32}P préparées avec l'inhibiteur de RNase.

(b) traitées par le D.O.C. à 1%.

III- ACTIVITE POLYADENYLATE SYNTHETASE.

Nous avons retrouvé avec les D-RNP diffusées l'activité polymérasique décrite par NIESSING et SEKERIS (1972) (256), liée aux particules RNA-informofère de GEORGIEV. En effet, on observe (Fig. 36 et tableau III p. 105) que la seule présence de D-RNP sous forme native ou dissociée (Protéines + D-RNA) induit la polymérisation de l'ATP ³H dans certaines conditions ioniques.

IV- DISCUSSION.

Le fait que nous ne soyons pas parvenu à stimuler la synthèse protéique in vitro par les D-RNP diffusées constitue certainement un obstacle pour que l'on puisse leur attribuer définitivement le caractère "messenger". Pour expliquer cet échec nous pouvons toutefois envisager plusieurs possibilités :

- 1) Peut-être le système acellulaire, que nous avons voulu homologue, ne convient-il pas pour ce type de démonstration (manque d'un ou plusieurs facteurs de traduction; conditions ioniques différentes).
- 2) le D-RNA, bien que possédant les caractères physico-chimiques propres au mRNA ("DNA like", poly A) peut être un RNA "non informationnel". Il représenterait alors cette fraction importante du HnRNA, découpée et confinée dans le noyau.
- 3) le D-RNA peut avoir subi des coupures enzymatiques le privant des séquences nécessaires à sa traduction. Cette dernière possibilité nous semble la plus probable lorsque l'on tient compte du fait que la taille et la teneur en poly A sont très étroitement liées aux conditions d'extraction du RNA et de préparation des D-RNP.

L'activité polymérasique portée par les D-RNP, activité qui ne se limite pas qu'à l'ATP mais qui, dans des conditions ioniques différentes (NIESSING et SEKERIS (1973)(257))

TABLEAU III

Incorporation d'ATP ^3H en présence de D-RNP 30mn à 37°C.

		CPM ^3H TCA insoluble
Témoin	Serum albumine 50 μg	132
+	D-RNP 25 μg	520
+	D-RNP 50 μg	1075
+	Protéines extraites des D-RNP 50 μg	152

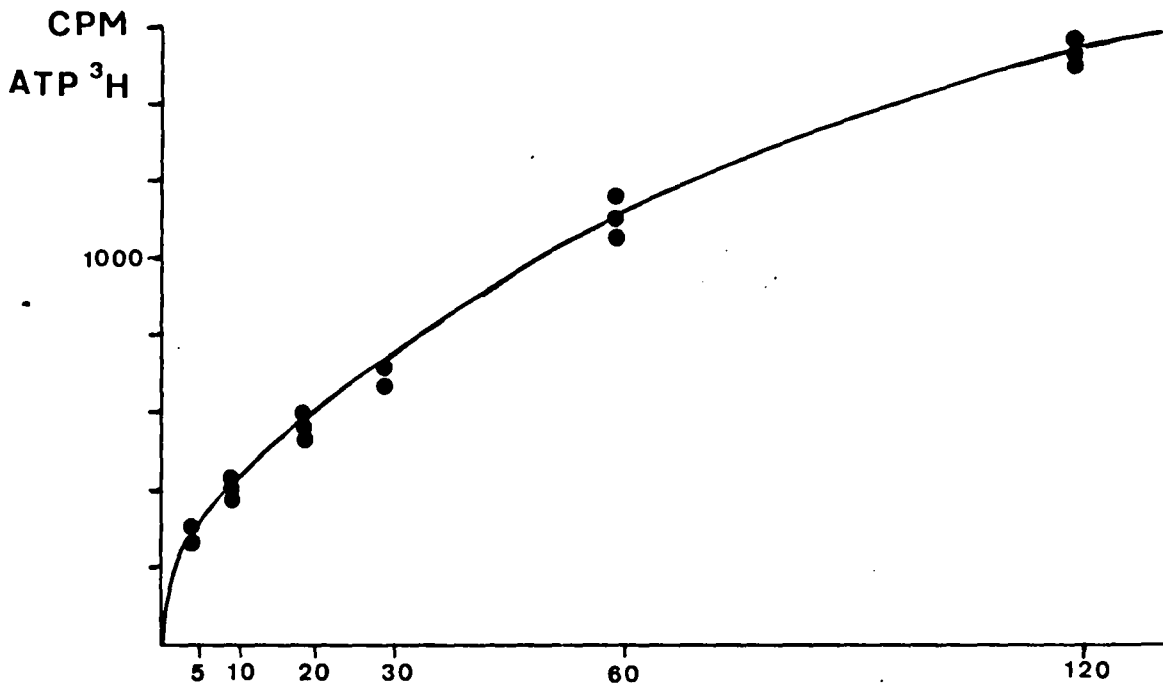


Fig.36. Cinétique d'incorporation d'ATP ^3H in vitro en présence de D-RNP.

Incubations 100 μl à 37°C en présence de 50 μg de RNP.

porte aussi sur les autres nucléosides triphosphates, apparaît comme une propriété remarquable de ces particules. On peut supposer, en effet qu'il s'agit de l'enzyme responsable de la polyadénylation post-transcriptionnelle du HnRNA.

CONCLUSIONS

L'existence du D-RNA sous forme de complexes ribonucléoprotéiques revêt une importance fondamentale dans le problème de la régulation de l'expression génétique chez les Eucaryotes, notamment en ce qui concerne le transport nucléocytoplasmique de l'information. Notre travail, mené à la suite des observations effectuées depuis 1965 dans le Laboratoire du Professeur J.MONTREUIL sur la diffusion de particules du type "Informosome", a consisté à caractériser physico-chimiquement et métaboliquement ces particules dans le but d'apporter des éléments de réponse aux trois questions principales suivantes :

1. Quelle est la nature et quelles sont les modalités du transport des D-RNP observées in vitro par diffusion?
2. Quelles sont les relations entre les D-RNP nucléaires et les D-RNP cytoplasmiques?
3. Quelles sont l'origine et la signification biologique des D-RNP?

1. Le transport du D-RNA in vitro.

Nous avons pu constater, en collaboration avec Mme W.DEFERT, que la quantité de D-RNP libérées par les noyaux isolés et incubés dans la solution de saccharose-phosphate, dépend étroitement de la température d'incubation et de la concentration en ions magnésium. Comme l'ATP, les phosphates chélatent les ions magnésium et peuvent ainsi provoquer des modifications de la structure de la chromatine et faciliter la libération du D-RNA, soit en jouant sur les interactions RNA-chromatine, soit en permettant l'accès de certains enzymes ou facteurs.

Cependant, comme l'indique l'effet de modulation du cytosol sur la diffusion, le transport du D-RNA in vivo obéit certainement à des mécanismes beaucoup plus complexes.

2. Relations entre les différentes D-RNP.

Les D-RNP isolées par diffusion présentent beaucoup d'analogies avec les D-RNP décrites par différents auteurs (voir le chapitre des Généralités) et elles correspondent tout à fait à la définition de l'informosome.

Leurs principaux caractères se résument ainsi :

- 1- Ce sont des particules non-ribosomales, contenant environ 20% de RNA "DNA-like", rapidement marqué et à teneur variable en poly A.
- 2- Elles ont une constante de sédimentation de 45 S mais se présentent sous des formes plus lourdes en présence d'inhibiteur de RNase.
- 3- Elles sont très sensibles au desoxycholate, à la RNase, mais non à la DNase.
- 4- Leur composition en protéines est relativement simple et comprend trois constituants majeurs de M.M. 34.000, 36.000 et 39.000 et de caractère légèrement acide.
- 5- Elles correspondent probablement aux fibrilles périchromatiniennes de BERNHARD.
- 6- Elles sont antigéniquement identiques aux particules isolées selon GEORGIEV, MOULE et ISHIKAWA.

La comparaison physico-chimique avec les D-RNP cytoplasmiques est délicate en raison de la difficulté d'isoler ces dernières mais immunologiquement, nous avons pu obtenir des informations intéressantes. En effet, les D-RNP nucléaires se sont révélées antigéniquement différentes des D-RNP polyribosomales et des D-RNP cytoplasmiques libres. Ce résultat, comme celui de la comparaison électrophorétique des constituants des D-RNP nucléaires et des polyribosomes, indique par conséquent que le passage in vivo du D-RNA, du noyau dans le cytoplasme, s'accompagne d'un échange de protéines.

3. Signification biologique des D-RNP.

En dépit du nombre considérable de travaux qui concernent les D-RNP, le problème de leur signification biologique demeure entier et les différentes possibilités suggérées par SPIRIN (Voir page 26) n'ont pas encore reçu de confirmation expérimentale valable. Ce n'est donc que très schématiquement (Fig 37, p.111), tout en tenant compte d'un maximum de faits expérimentaux, que l'on peut représenter la participation des D-RNP dans la régulation de l'expression génétique.

- 1- Dès sa synthèse, le HnRNA est conjugué à certaines protéines spécifiques qui provoquent ou qui facilitent sa libération du complexe de transcription. Ces protéines existent dans le cytoplasme, possèdent une forte affinité de fixation pour le RNA et certaines activités enzymatiques nécessaires au remaniement de la molécule de HnRNA.
- 2- Ce dernier est en effet allongé à son extrémité 3'OH d'une séquence polyadénylique grâce à l'intervention d'une poly A synthétase, puis il est découpé par une endonucléase spécifique. Le HnRNA passe ainsi de la forme de complexe très lourd à la forme monoparticule 30 à 45 S.
- 3- Ces particules s'engagent ensuite à travers les pores nucléaires pour apparaître dans le cytoplasme. Ce passage est probablement facilité par un échange de protéines qui permet à la particule de modifier sa configuration.
- 4- Dans le cytoplasme, le RNA peut prendre deux formes différentes suivant la nature des protéines qui lui sont associées :
 - sous forme de RNP libre : dans laquelle les protéines ont un rôle de protection et empêchent le RNA de se combiner aux ribosomes.
 - sous forme de RNP liée au polyribosome donc engagé dans la synthèse protéique.

En définitive, cette succession d'événements, même s'ils sont encore purement hypothétiques, traduit bien, par la complexité et la multiplicité des mécanismes impliqués, l'importance de l'existence des complexes D-RNA-protéines dans l'expression génétique.

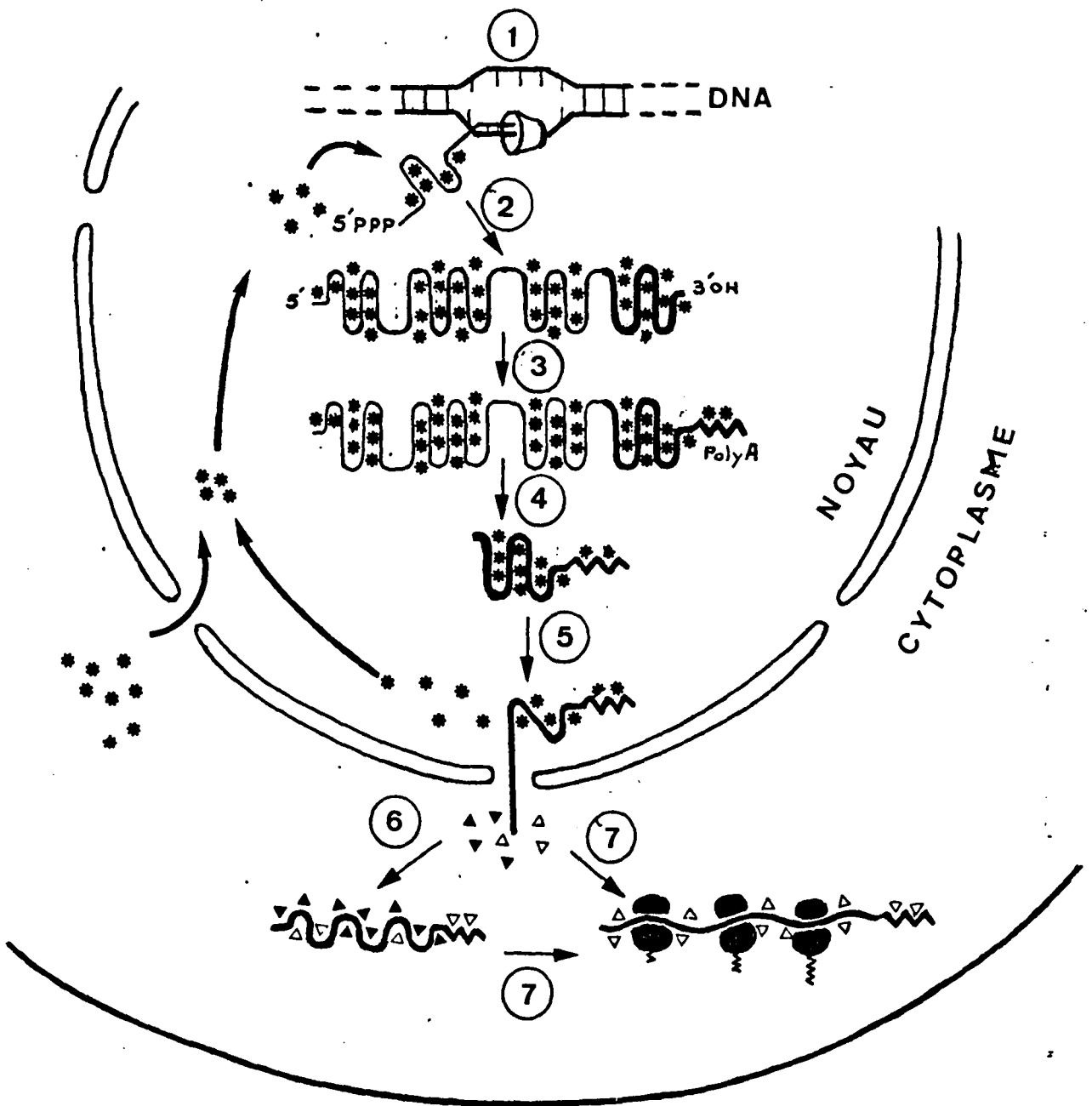


Fig.37. Représentation schématique des différentes étapes du transport du mRNA.

1. Transcription → HnRNA.
2. Libération du HnRNA de la chromatine. Intervention de protéines spécifiques(*) → D-RNP nucléaires (HnRNA-protéines).
3. Addition de poly A → HnRNA-poly A-protéines.
4. Découpage par des endonucléases de la partie non-informative du D-RNA → pré-mRNA-protéines.
5. Passage dans le cytoplasme-échange de protéines(▼△)
6. Le mRNA se trouve sous une forme de réserve non traduite = D-RNP libre.
7. Le mRNA est utilisé dans la synthèse protéique → mRNP

BIBLIOGRAPHIE

ACHESON.N.H., BUETTI.E., SCHERRER.K., WEIL.R.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1971),68, 2231. (15)

ADESNIK.M., DARNELL.J.E.
J.Mol.Biol. (1972),67, 397. (41)

AJTKHOZHIN.M.A., AKHANOV.A.U., DOSCHANOV.K.I.
FEBS Letters . (1973),31, 104. (74)

AJTKHOZHIN.M.A., BELITSINA.N.V., SPIRIN.A.S.
Biokhimiya. (1964), 29, 169. (57)

ALBRECHT.C., VAN ZYL.I.M.
Exptl. Cell Res. (1973), 76, 8. (159, 228, 232)

ATTARDI.G., PARNAS.H., HUANG.M.I.H., ATTARDI.B.
J.Mol.Biol. (1966),20, 145.(6)

BELITSINA.N.V., AJTKHOZHIN.M.A., GRAVILOVA.L.P., SPIRIN.A.S.
Biokhimiya (URSS) (1964),29, 363.(46)

BELITSINA.N.V., OVCHINNIKOV.L.P., SPIRIN.A.S., GENDON.Y.Z.,
CHERNOS.V.I.
Molec.Biol. (USSR), (1968),2, 727. (91)

BERNHARD.W.
J.Ultrastruct.Res. (1969), 27, 250.(208, 211)

BLANCHARD.J.M., BRISSAC.C., JEANTEUR.Ph.
Proc. Nat. Acad.Sci. US. (1974), 71, 1882.(245, 248)

BLOBEL.G.
Biochem.Biophys. Res.Comm. (1972), 47, 88.(116)

BLOBEL.G.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA. (1973), 70, 924.(120)

BRAWERMAN.G., MENDECKI.J., LEE.S.Y.

Biochemistry. (1972),11, 637. (30, 192, 195)

BRAY.G.A.

Anal.Biochem. (1960),1, 279. (190)

BROWN.D.D., LITTNA.E.

J.Mol.Biol. (1964),8, 688. (58)

BRYAN.R.N., HAYASHI.M.

Nature (1973),244, 271. (119)

BURNY.A., HUEZ.G., MARBAIX.G., CHANTRENNE.H.

Biochim.Biophys.Acta (1969),190, 228. (107, 114)

CARTOUZOU.G., AQUARON.R., MANTE.S., LISSITSKY.S.

Eur.J.Biochem. (1968),4, 55. (105)

CARTOUZOU.G., POIREE.J.C., LIZZITZKY.S.

Eur.J.Biochem. (1969),8, 357. (72, 134, 147)

CHAUVEAU.J., MOULE.Y., ROUILLER.C.

Exptl.Cell Res. (1956),11, 3. (187)

CHRISTMAN.J.K., REISS.B., KYNER.D., LEVIN.D.H., KLETT.H.,
ACS.G.

Biochim.Biophys.Acta. (1973),294, 153. (94)

CRAMPTON.C.F., PETERMAN.M.L.

J.Biol.Chem. (1959),234, 2642. (222)

DARNELL.J.E., JELINEK.W.R., MOLLOY.G.R.

Science (1973),181, 1215. (8, 44)

DARNELL.J.E., PHILIPSON.L., WALL.R., ADESNIK.M.

Science (1971),174, 507. (24, 37)

DARNELL.J.E., WALL.R., TUSHINSKI.R.J.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1971),68, 1321.(23)

DAVIDSON.J.N., SMELLIE.R.M.S.

Biochem.J. (1952),52, 594.(191)

DEFERT-KOBUS.W.

"Isolement et étude physico-chimique de particules de D-RNP obtenues par diffusion libre à partir de noyaux isolés d'Hepatocytes de Rat".

Thèse Doctorat Sciences Naturelles Lille. (1971) (185,212)

DEFERT-KOBUS.W., SEGARD.E., MONTREUIL.J.

Bull.Soc.Biol. (1965),47, 2293.(184)

DEFERT-KOBUS.W., SEGARD.E., MONTREUIL.J.

C.R.Acad.Sci. (1966),263 D, 842.(127)

DELARCO.J., GUROFF.G.

Bicchim. Biophys.Res.Com. (1973),50, 486. (34, 193)

DUCAMP.C., JEANTEUR.P.

Biochimie. (1973),55, 1235. (137, 153, 215)

EDMONDS.M., ABRAMS.J.

J.Biol.Chem. (1960),235, 1142.(17)

EDMONDS.M., ABRAMS.R.

J.Biol.Chem. (1963), 238, 1186.(18)

EDMONDS.M., VAUGHAN.M.H., NAKAZATO.H.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1971),68, 1336. (25, 28)

EGLY.J.M., KRIEGER.O., MANDEL.P., KEMPF.J. , PFLEGER.N.,
LAUNAY.J.F.

FEBS.Lett. (1974), 40, 101. (244)

FAIFERMAN.J., HAMILTON.M.G., POGO.A.O.

Biochim.Biophys.Acta. (1970),204, 550. (126, 136)

FAIFERMAN.I., HAMILTON.M.G., POGO.A.O.

Biochim.Biophys.Acta. (1971),232, 285. (149, 158)

FALVEY.A.K., STAEHELIN.T.

J.Mol.Biol. (1970),53, 1. (201, 234, 251)

GALLINARO-MATRINGE.H., JACOB.M.

FEBS Lett. (1973),36, 105. (162)

GALLINARO-MATRINGE.H., JACOB.M.

FEBS.Lett. (1974), 41, 339. (226)

GANDER.E.S., STEWART.A.G., MOREL.C., SCHERRER.K.

Eur.J.Biochem.(1973),38, 443 (183)

GEORGIEV.G.P.

Biokhimiia. (1961), 26, 1095. (1)

GEORGIEV.G.P., MANTIEVA.V.L.

Biochim.Biophys.Acta. (1962),61, 153. (2)

GEORGIEV.G.P., SAMARINA.O.P.

Adv.Cell.Biol. (1971),2, 47. (48)

GEORGIEV.G.P., SAMARINA.O.P., LERMAN.M.I., SMIRNOV.M.N.,
SEVERTZON.A.N.

Nature, (1963),200. 1291. (56)

HADJIVASSILIOU.A., BRAWERMAN.G.

J.Mol.Biol. (1966),20, 1. (19)

HADJIVASSILIOU.A., BRAWERMAN.G.

Biochemistry (1967),6, 1934. (20)

HARRIS.H.

Biochem.J. (1962), 84, 60. (9)

HENSHAW.E.C.

J.Mol.Biol. (1968), 35, 37. (54, 100, 109)

HENSHAW.E.C., LOEBENSTEIN.J.

Biochim.Biophys.Acta. (1970), 199, 405. (68)

HENSHAW.E.C., REVEL.M., HIATT.H.H.

J.Mol.Biol. (1965), 14, 241. (66, 83)

HOAGLAND.M.B., ASKONAS.B.A.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1963), 49, 130. (45)

HUANG.A.S., BALTIMORE.D.

J.Mol.Biol. (1970), 47, 275. (93, 96, 243)

HUEZ.G., BURNY.A., MARBAIX.G.

Biochim.Biophys.Acta. (1967), 145, 629. (98)

HYMER.W.C., KUFF.E.L.

J.Histochem.Cytochem. (1964), 12, 359. (188)

IMAIZUMI.T., DIGGLEMANN.H., SCHERRER.K.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1973), 70, 1122. (16)

INFANTE.A., NEMER.M.

J.Mol.Biol. (1968), 32, 543. (81)

ISHIKAWA.K., KURODA.C., OGATA.K.

Biochim.Biophys.Acta. (1969), 179, 316. (123, 135, 202)

ISHIKAWA.K., UEKI.M., NAGAI.K., OGATA.K.

Biochim. Biophys.Acta. (1972), 259, 138. (203)

JELINEK.W., ADESNIK.M., SALDITT.M., SHEINESS.D., WALL.R.

MOLLOY.G., PHILIPSON.L., DARNELL.J.E.

J.Mol.Biol. (1973), 75, 515. (36, 38)

JOKLIK.W.K., BECKER.Y.

J.Mol.Biol. (1965), 13, 496.(90)

KAFATOS.F.C.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1968), 59, 1251.(73)

KALTSCHMIDT.E., WITTMAN.H.G.

Anal.Biochem. (1969), 36, 401. (200)

KATES.J.

Cold.Spring.Harbor.Symp.Quant.Biol. (1970), 35, 743.(21)

KEMPF.J., EGLY.J.M., STRICKER.C., SCHMITT.M., MANDEL.P.,

FEBS.Lett. (1972), 26, 130. (71, 89)

KITOS.P.A., SAXON.G., AMOS.H.

Biochem.Biophys.Res.Com. (1972), 47, 1426.(32)

KLEINSCHMIDT.A.K., LANG.D., JAGHERTS.D., ZAHN.R.K.

Biochim. Biophys.Acta. (1962), 61, 857.(207)

KNÖCHEL.W., TIEDEMANN.H., FELLMANN.I.

Biochem.Biophys.Acta. (1972), 269, 104.(82)

KRICHEVSKAYA.A.A., GEORGIEV.G.P.

Biochim.Biophys.Acta. (1969), 194, 619.(156, 218, 220, 223)

KRSMANOVIC.V., KERCKAERT.J.P., DEFERT-KOBUS.W., MONTREUIL.J.

Arch.Inter.Physiol.Biochim. (1968), 76, 19.(133, 146)

KUMAR.A. , LINDBERG.U.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1972), 69, 681. (103, 112)

LEBLEU.B., MARBAIX.G., HUEZ.G., TEMMERMAN.J., BURNY.A.,
CHANTRENNE.H.

Eur.J.Biochem. (1971), 19, 264.(180, 255)

LEBOY.P.S., COX.E.C., FLAKS.J.G.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1964), 52, 1367. (197)

LEE.S.Y., MENDECKI.J., BRAWERMAN.G.

Proc. Nat.Acad.Sci.USA. (1971), 68, 1331(26)

LIM.L., CANELLAKIS.E.S.

Nature (1970), 227, 710. (22)

LINDBERG.U., DARNELL.J.E.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1970), 65, 1089. (14)

LINDBERG.U., PERSSON.T.

Eur.J.Biochem. (1972), 31, 246. (29, 194)

LUKANIDIN.E.M., ALTKHOZHINA.W.A., KULGUSKIN.V.V., GEORGIEV.G.P.

FEBS.Lett. (1971), 19, 101. (165)

LUKANIDIN,E.M., GEORGIEV.G.P., WILLIAMSON.R.

FEBS.Lett. (1971), 19, 152. (174)

LUKANIDIN.E.M., OLSNES.S., PIHL.A.

Nature (1972), 240, 90. (176, 236, 240)

Mc CONKEY.E.M., HOPKINS.J.W.

J.Mol.Biol. (1965), 14, 257. (64, 84)

MANO.Y., NAGANO.H.

J.Biochem. (1970), 67, 611. (182)

MATRINGE.H., JACOB.M.

Biochimie. (1972), 54, 1169. (160, 225)

MENDECKI.J., LEE.S.Y., BRAWERMAN.G.

Biochemistry. (1972), 11, 792. (35, 39)

MOREL.C., GANDER.E.S., HERZBERG.M., DUBOCHET.J., SCHERRER.K.

Eur.J.Biochem. (1973), 36, 455. (118)

MOREL.C., KAYIBAND.B., SCHERRER.K.

FEBS.Lett. (1971), 18, 84. (108, 117, 175, 239)

MOULÉ.Y., ANDRIEU.A., SARASIN.A.

Bull.Soc.Chim.Biol. (1969), 51, 1139.(252)

MOULÉ.Y., CHAUVEAU.J.

C.R.Acad.Sci. (1966), 263.D, 75.(124, 145, 205)

MOULÉ.Y., CHAUVEAU.J.

J.Mol.Biol. (1968), 33, 465. (125, 131)

NAORA.H., KODAIRA.K.

Biochim.Biophys.Acta. (1969), 182, 469.(254)

NEMER.M., INFANTE.A.

Fed.Proc. (1965), 24, 283. (80)

NIESSING.J., SEKERIS.C.F.

Biochim.Biophys.Acta. (1970), 209, 484.(143, 177, 204, 214, 224)

NIESSING.J., SEKERIS.C.E.

FEBS.LETT. (1971), 18, 39. (157, 227, 231)

NIESSING.J., SEKERIS.C.E.

FEBS.Lett.(1972), 22, 83.(249, 256)

NIESSING.J., SEKERIS.C.E.

Nature.NB. (1973), 243, 9.(178, 250, 257)

NUDEL.U., LEBLEU.B., ZHAVI-WILLNER.T., REVEL.M.

Eur.J.Biochem. (1973), 33, 314.(181)

OLSNES.S.

Biochim.Biophys.Acta. (1970), 213, 149. (141, 148)

OLSNES.S.

Eur.J.Biochem. (1970), 15, 464.(113, 172, 235, 237)

OLSNES.S.

Eur.J.Biochem. (1971), 23, 248.(102)

OLSNES.S., PIHL.A.

FEBS.Lett. (1972), 20, 181. (179, 253)

OVCHINNIKOV.L.P., AJTKHOZHIN.M.A., BYSTROVA.T.F., SPIRIN.A.S.

Molek.Biol. (USSR) (1969), 3, 449.(76)

OVCHINNIKOV.L.P., BELITSINA.N.N., AVANESOV.A.C., SPIRIN.A.S.

Dokl. Akad.Nauk.SSSR. (1969), 186, 1202. (63)

PANYIM.S., CHALKLEY.R.

Arch.Biochem.Biophys. (1969), 130, 337. (198)

PARSONS.J.T., Mc CARTHY.K.S.

J.Biol.Chem. (1968), 243, 5377. (132)

PEDERSON.T.

J.Mol.Biol. (1974), 83, 163. (161, 233)

PENMAN.S., ROSBASH.M., PENMAN.M.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1970), 67, 1878.(40)

PENMAN.S., VESCO.C., PENMAN.M.

J.Mol.Biol. (1968), 34, 49. (7)

PERRY.R.P.

Exptl.Cell Res. (1963), 29, 400 (55)

PERRY.R.P., KELLEY.D.E.

J.Mol.Biol. (1966), 16, 255. (85)

PERRY.R.P., KELLEY.D.E.

J.Mol.Biol. (1968), 35, 37.(53, 62, 86, 99, 111)

PETROV.P., BERNHARD.W.

J.Ultrastruct.Res. (1971), 35, 386. (210)

PHILIPSON.L., WALL.R., GLICKMAN.G., DARNELL.J.E.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1971), 68, 2806.(27)

PUVION.E.

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

Thèse Doctorat Sciences Naturelles Lille (1972)(186, 209)

QUIRIN-STRICKER.C., MANDEL.P.

FEBS.Lett. (1969), 2, 230 (67, 88)

RASKAS.H.J.

Nature. (1971), 233, 134.(154)

RASKAS.H.J., BHADURI.S.

Biochem. (1973), 12, 920. (152, 213)

RASKAS.H.J., RHO.Y.C.

Nature.NB. (1973), 245, 47. (217)

REISFELD.R.A., LEWIS.U.S., WILLIAMS.D.E.

Nature. (1962), 195, 281. (196)

ROTH.J.S.

J.Biol.Chem. (1958), 231, 1085.(138)

RUIZ-CARRILO.A., BEATO.M., SCHUTZ.G., FELGELSON.P., ALLFREY.V.G.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1973), 70, 3641. (12)

SAMARINA.O.P., ASRIYAN.I.S., GEORGIEV.G.P.

Dokl.Akad.Nauk.SSSR. (1965), 163, 1510.(51, 121)

SAMARINA.O.P., KRICHEVSKAYA.A.A., GEORGIEV.G.P.

Nature. (1966), 210, 1319.(52, 122, 129)

SAMARINA.O.P., LUKANIDIN.E.M., MOLNAR.J., GEORGIEV.G.P.

J.Mol.Biol. (1968), 33, 251. (130, 140, 144, 155, 164, 166)

SAMARINA.O.P., MOLNAR.J., LUKANIDIN.E.M., BRUSKOV.V.I.,
KRICHEVSKAYA.A.A., GEORGIEV.G.P.
J.Mol.Biol. (1967), 27, 187.(163, 169)

SAMEC.J., JACOB.M., MANDEL.M.
Biochim.Biophys.Acta. (1968), 161, 377.(70, 87)

SARASIN.A.
FEBS.Lett. (1969), 4, 327. (219, 221, 229)

SCHERRER.K., LATHAM.H., DARNELL.J.E.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1963), 49, 240.(3)

SCHERRER.K., MARCAUD.L.
J.Cell Physiol. (1968), 72, suppl.1, 181.(43)

SCHERRER.K., MARCAUD.L., ZAJDELA.F., LONDON.E.M., GROS.F.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1966), 56, 1571.(4)

SCHERRER.K., SPOHR.G., GRANBOULAN.N., MOREL.C., GROSCLAUDE.J.,
CHEZZI.C.
Cold.Spring.Harbor.Symp.Quant.Biol. (1970), 35, 539.(13)

SCHOCHETMAN.G., PERRY.R.P.
J.Mol.Biol. (1972), 63, 591.(42, 95)

SCHUMM.D.E., Mc NAMARA.D.J., WEBB.T.E.
Nature.NB. (1973), 245, 201. (241)

SCHUMM.D.E., MORRIS.H.P., WEBB.T.E.
Cancer.Res. (1973), 33, 1821.(206)

SCHUMM.D.E., WEBB.T.E.
Biochem.Biophys.Res.Com. (1972), 48, 1259.(128)

SCHUMM.D.E., WEBB.T.E.
Biochem.J. (1974), 139, 191.(151, 216)

SCHUTZ.G., BEATO.M., FEIGELSON.P.

Biochim.Biophys.Res.Com. (1972), 49, 680.(33)

SCHWEIGER.A , HANNIG.K

Biochim.Biophys.Acta. (1970), 204, 314.(101, 173, 238)

SCHWEIGER.A., SPITZAUER.P.

Biochim.Biophys.Acta (1972), 277, 403.(247)

SHORTMAN.K.

Biochim.Biophys.Acta. (1961), 51, 37.(139, 189)

SILVERTEIN.E.

Biochem. (1973), 12, 951. (75)

SPHOR.G., GRANBOULAN.N., MOREL.C., SCHERRER.K.

Eur.J.Biochem. (1970), 17, 296.(65, 104, 110)

SPIRIN.A.S.

Eur.J.Biochem. (1969), 10, 20.(49, 171)

SPIRIN.A.S.

in "The Mechanism of Protein Synthesis and its regulation".
(1972), p.515. Ed.BOSCH. North Holland. Publishing Company.
Amsterdam .London. (50)

SPIRIN.A.S., BELITSINA.N.V.

Adv.Mol.Biol.(USSR) (1965), 59, 187. (78)

SPIRIN.A.S., BELITSINA.N.V., AJTKHOZHIN.M.A.

Z.Oboschei.Biol. (URSS) (1964), 25, 321.

Traduit dans Fed.Proc. (1965), 24, T.907.(47, 59, 77)

SPIRIN.A.S., BELITSINA.N.V., LERMAN.M.I.

J.Mol.Biol. (1965), 14, 611. (61)

SPIRIN.A.S., NEMER.M.

Science (1965), 150, 214.(60, 79)

STEPANOV.A.S., VORONINA.A.S., OVCHINNIKOV.L.P., SPIRIN.A.S.
FEBS.Lett. (1971), 18, 13. (242, 246)

STEVENIN.J., JACOB.M.
Eur.J.Biochem. (1972), 29, 480.(150, 168)

STEVENIN.J., MANDEL.P., JACOB.M.
Bull.Soc.Chim.Biol. (1970), 52, 703.(142)

STEVENIN.J., ZAWISLAK.R., JACOB.M.
Eur.J.Biochem. (1973), 33, 241. (167, 170)

STEVENS.R.H., WILLIAMSON.A.R.
Nature.NB. (1973), 245, 101.(10)

SUGANO.H., SUDA.S., KAWADA.T., SUGANO.I.
Biochim.Biophys.Acta. (1971), 238, 139.(69)

SULLIVAN.N.L., ROBERTS.W.K.
Fed.Proc .Fed.Amer.Soc.Exp.Biol. (1971), 30, 1302.(31)

TEMMERMAN.J., LEBLEU.B.
Biochim.Biophys.Acta. (1969), 174, 544.(106, 115)

VOLKOVA.M.Y., ZAIDES.V.M., ZASLAVSKY.V.G.
Molec.Biol.(USSR) (1969), 3, 635.(92)

WARNER.J.R., SOEIRO.R., BIRNBOIM.H.S., GIRARD.M., DARNELL.J.E.
J.Mol.Biol. (1966), 19, 349.(5)

WEBER.K., OSBORN.M.
J.Biol.Chem. (1969), 244, 4406.(199)

WEISBERGER.A.S., ARMENTROUT.S.A.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA. (1966), 56, 1612.(97)

WILLIAMSON.R., DREWENKIEWICZ.E., PAUL.J.
Nature.NB. (1973), 241, 66.(11)