

50376  
1977  
23

N° d'ordre :

50376  
1977  
23

UNIVERSITÉ DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE I

---

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ**

A L'UNIVERSITÉ DE LILLE I  
POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR  
DE TROISIÈME CYCLE EN BIOCHIMIE

par

**Bernard HOFLACK**

---

**ETUDES SUR LES RNA POLYMERASES : MISE EN EVIDENCE  
ET PROPRIETES DE FORMES NOUVELLES  
DE RNA POLYMERASES DANS LES CELLULES KB**



Soutenu le 18 Avril 1977, devant la Commission d'Examen

Président : J. MONTREUIL  
Rapporteur : G. BERNARDI  
Examineurs : J. KREMBEL  
V. KRSMANOVIC

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires suivants :

- Unité de Virologie I.N.S.E.R.M. n° 102 (Directeur :  
Professeur J. SAMAILLE).

- Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des  
Sciences et Techniques de Lille I (Directeur : Professeur J. MONTREUIL).

Nos vives reconnaissances et sympathies vont à tous les membres du groupe chargé de l'étude des RNA polymérase, animé par Monsieur Velibor KRSMANOVIC.

Nous tenons à remercier plus particulièrement Messieurs Alain SERGEANT et André VERBERT qui nous ont directement aidé à conduire ce travail.

Nous assurons de notre reconnaissance et nous adressons, en outre, nos vifs remerciements à la Ligue Nationale Française contre le Cancer qui, en nous accordant une bourse de recherche, nous a permis de mener à terme notre travail de thèse.

TABLE DES MATIERES

---

INTRODUCTION

1

GENERALITES

3

I - <u>LES RNA POLYMERASES-DNA DEPENDANTES DE CELLULES EUCARYOTES /</u>	4
I) <u>EXISTENCE DE FORMES MULTIPLES DE RNA POLYMERASES DANS LES CELLULES EUCARYOTES</u> .....	4
A - NOMBRE ET NOMENCLATURE .....	5
B - HETEROGENEITE DES TROIS CLASSES DE RNA POLYMERASES ...	6
II) <u>LOCALISATION DES RNA POLYMERASES</u> .....	8
III) <u>ROLE</u> .....	9
IV) <u>PROPRIETES DES RNA POLYMERASES EUCARYOTES</u> .....	10
A - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE PARTICULIER DES RNA POLYMERASES III .....	10
B - EFFET DES IONS BIVALENTS SUR LES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES .....	10
C - INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR L'ACTIVITE DES RNA POLYMERASES .....	11
D - TRANSCRIPTION <u>IN VITRO</u> DE DIFFERENTES MATRICES PAR LES RNA POLYMERASES .....	11
E - ACTION DE L' $\alpha$ -AMANITINE .....	12
F - STABILITE DES RNA POLYMERASES .....	13

V) <u>MASSE MOLECULAIRE ET STRUCTURE</u> .....	14
A - MASSE MOLECULAIRE DES TROIS CLASSES DE RNA POLYMERASES	14
B - SOUS-UNITES COMPOSANT LES RNA POLYMERASES .....	14
VI) <u>FACTEURS STIMULANT L'ACTIVITE DES RNA POLYMERASES DE CELLULES EUCARYOTES</u> .....	16
II - <u>/MECANISME ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION/</u>	17
I) <u>LE MECANISME DE LA TRANSCRIPTION</u> .....	17
II) <u>QUELQUES ASPECTS DE LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION</u> .....	18
A - LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE .....	18
B - UN ASPECT DE LA REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE ...	19
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	21
I) CULTURE DE CELLULES KB .....	21
II) EXTRACTION DES RNA POLYMERASES DE CELLULES KB .....	21
A - SOLUTIONS EMPLOYEES .....	21
B - PREPARATION DES NOYAUX DE CELLULES KB .....	22
1°) Noyaux préparés par un tampon aqueux : le TMMT .....	22
2°) Noyaux préparés selon une méthode dérivée de celle de CHAUVEAU .....	22
3°) Noyaux préparés par la méthode de CHAUVEAU et traités par le Triton X-100 .....	23
4°) Noyaux préparés selon la méthode de BERKOWITZ .....	23
C - EXTRACTION DES RNA POLYMERASES .....	23

III) <u>SEPARATION DES RNA POLYMERASES PAR CHROMATOGRAPHIE</u>	
<u>D'ECHANGE D'IONS</u> .....	23
A - COLONNES ET ELUTION .....	25
B - MESURE DE L'ACTIVITE RNA POLYMERASIQUE .....	25
IV) <u>PREPARATION DU DNA</u> .....	26
A - EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA CELLULAIRE .....	26
B - EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA D'ADENOVIRUS 2 .....	27
V) <u>SEDIMENTATION EN GRADIENT DE GLYCEROL DE LA FORME II<sub>x</sub></u> .....	27
VI) <u>SENSIBILITE THERMIQUE DES DIFFERENTES RNA POLYMERASES DE TYPE I</u>	28
VII) <u>PREPARATION DES (<math>\gamma</math> - <math>^{32}</math>P) xTP</u> .....	28
VIII) <u>SYNTHESE DES RNA IN VITRO EN PRESENCE DE (<math>\gamma</math> - <math>^{32}</math>P) xTP</u> .....	29
IX) <u>(<math>\gamma</math> - <math>^{32}</math>P) xTP INCORPORES DANS LES CHAINES DE RNA</u> .....	29
A - EXTRACTION DES RNA SYNTHETISES <u>IN VITRO</u> .....	30
B - MESURE DE LA RADIOACTIVITE INCORPOREE DANS LES CHAINES DE RNA .....	31
1°) Radioactivité du matériel acido-précipitable total .....	31
2°) Radioactivité du matériel acido-précipitable "RNase-résistant"	32

RESULTATS 33

I) <u>FORMES MULTIPLES DE RNA POLYMERASES DANS LES CELLULES KB</u> .....	33
A - ETUDE DE LA REPARTITION DES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES APRES SEPARATION DES NOYAUX PAR UN TAMPON AQUEUX :	
LE TMMT .....	33
1°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25 de l'extrait enzymatique nucléaire .....	33

2°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25 de l'extrait enzymatique cytoplasmique .....	34
3°) Sensibilité à l' $\alpha$ -amanitine des différentes classes de RNA polymérases .....	37
4°) Comportement des RNA polymérases II <sub>X</sub> et II <sub>B</sub> en gradient de glycérol .....	39
5°) Observation des noyaux en microscopie électronique .....	39
<b>B - ETUDE DE LA REPARTITION DES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES APRES SEPARATION DES NOYAUX PAR LA METHODE DE BERKOWITZ .....</b>	<b>42</b>
1°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique nucléaire .....	42
2°) Observation des noyaux en microscopie électronique .....	42
<b>C - NOYAUX PURIFIES PAR UNE METHODE DERIVEE DE CELLE DE CHAUVEAU .....</b>	<b>42</b>
1°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique nucléaire .....	45
2°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique cytoplasmique .....	45
3°) Observation des noyaux en microscopie électronique .....	48
<b>D - NOYAUX PURIFIES TRAITES PAR LE TRITON X-100 .....</b>	<b>48</b>
1°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique nucléaire .....	51
2°) Observation des noyaux en microscopie électronique .....	51
<b>II) <u>MISE EN EVIDENCE DE PLUSIEURS FORMES DE RNA POLYMERASES I ..</u></b>	<b>54</b>
<b>A - RECHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX .....</b>	<b>54</b>
<b>B - RECHROMATOGRAPHIE SUR PHOSPHOCELLULOSE .....</b>	<b>54</b>
<b>C - PROPRIETES DES RNA POLYMERASES I .....</b>	<b>57</b>
1°) Activités des RNA polymérases I en fonction de la force ionique .....	59
2°) Exigence en ions bivalents .....	59
3°) Résistance à l' $\alpha$ -amanitine des RNA polymérases I .....	62



4°) Transcription de différentes matrices .....	62
5°) Sensibilité thermique des RNA polymérase I .....	62
III) <u>ETUDE SUR LA FONCTION THERMOSENSIBLE DE LA RNA POLYMERASE I<sub>B</sub></u> .....	66

DISCUSSION 69

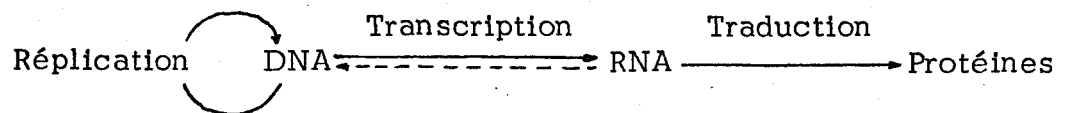
I) <u>HETEROGENEITE DES TROIS CLASSES ENZYMATIQUES</u> .....	69
A - LES RNA POLYMERASES I .....	69
B - LES RNA POLYMERASES II .....	71
C - LES RNA POLYMERASES III .....	72
II) <u>LOCALISATION DES RNA POLYMERASES DANS LA CELLULE</u> .....	72
III) <u>SENSIBILITE THERMIQUE DES RNA POLYMERASES I</u> .....	74

CONCLUSIONS 75

BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

En 1958, F. CRICK (1) a proposé un modèle selon lequel le RNA est synthétisé par copie sur la macromolécule de DNA porteuse de l'information génétique. Lors de la transcription, la RNA polymérase élabore une chaîne de ribonucléotides complémentaire du DNA. Ce polymère conserve l'information génétique, la transporte vers le cytoplasme où elle sera traduite en une suite ordonnée d'acides aminés apportés par les tRNA, formant ainsi les protéines.



Si l'on est actuellement en mesure de décrire assez complètement tous ces phénomènes chez les procaryotes, il reste chez les eucaryotes de nombreux points obscurs.

Un des moyens, pour parvenir à une meilleure compréhension du phénomène de la transcription, est l'étude *in vitro* des RNA polymérases : multiplicité, fonctionnement, interaction avec le DNA matrice, etc.

Notre travail a été orienté vers la mise en évidence de nombreuses formes de RNA polymérases dans les cellules KB, et l'étude de leur localisation dans la cellule. Enfin, nous nous sommes intéressé au phénomène de thermosensibilité que présentent les RNA polymérases I. En effet, le phénomène différent observé selon la nature du DNA peut refléter l'inactivation par la chaleur d'une protéine responsable ou impliquée dans la transcription d'une matrice bicaténaire.

Avant de décrire nos travaux, nous allons exposer brièvement les connaissances acquises sur les RNA polymérases de cellules eucaryotes leur fonctionnement et les différents mécanismes et facteurs régulant leur action.

Les résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet des communications et mémoires suivants :

COMMUNICATIONS

1 - B. HOFACK et A. SERGEANT, Caractérisation partielle de formes multiples de RNA polymérase DNA dépendantes dans les cellules KB, Journées Biochimiques Franco-Belges, Lille, 24-26 Juin 1976.

2 - A.P. VERBERT, B. HOFACK, J.C. D'HALLUIN, A. SERGEANT et V. KRSMANOVIC, Fonction thermosensible de la RNA polymérase I<sub>B</sub> de cellules KB. Réunion de la Société Belge de Biochimie, Bruxelles, 23 Octobre 1976.

PUBLICATIONS

1 - A.P. VERBERT, B. HOFACK, J.C. D'HALLUIN, A. SERGEANT and V. KRSMANOVIC, On the thermosensitive function of KB cell RNA polymerase I<sub>B</sub>, Note aux Archives Internationales de Physiologie et Biochimie, 1976.

2 - B. HOFACK, J.C. D'HALLUIN, S. POPIC, A. VERBERT, A. SERGEANT, G. NICHOLSON and V. KRSMANOVIC, A thermal sensitive function of KB cell DNA-dependent RNA polymerase I<sub>B</sub> involved in RNA chain growth, Mémoire soumis à Biochimie.

GENERALITES

## I - LES RNA POLYMERASES-DNA DEPENDANTES DE CELLULES EUCARYOTES

Pour la première fois, en 1959, une activité RNA polymérisique fut mise en évidence dans des extraits de foie de rat par WEISS et GLADSTONE (2) (3). Cependant, il fallut attendre une dizaine d'années pour que les études sur les RNA polymérisées des cellules eucaryotes puissent prendre l'essor qu'on leur connaît actuellement. En effet, si les RNA polymérisées-DNA dépendantes bactériennes (notamment E. Coli : STEVENS (4), CHAMBERLIN et BERG (5)) sont facilement solubilisées et purifiées, - ce qui permet de faire des progrès rapides et spectaculaires dans la compréhension de leur structure et leur rôle dans la régulation de la transcription (BURGESS (6), MARTIN (7), SETHI (8)) - il n'en est pas de même pour les RNA polymérisées de cellules eucaryotes. Celles-ci sont fortement liées à des complexes constitués de DNA, d'histones, de protéines acides et de RNA et leur solubilisation nécessite des techniques plus élaborées entraînant un rendement plus faible. Il fallut donc, avant d'entreprendre l'étude de la transcription in vitro, mettre au point des techniques de solubilisation et de purification partielle (ROEDER et RUTTER (9), CHAMBON et al. (10), WIDNELL et TATA (11)).

### I) EXISTENCE DE FORMES MULTIPLES DE RNA POLYMERASES DANS LES CELLULES EUCARYOTES

Bien que l'existence d'une seule RNA polymérisée ait longtemps été supposée, il apparut qu'un des mécanismes de régulation de la transcription des différents gènes nécessitait la présence de plusieurs RNA polymérisées ayant des affinités différentes pour le DNA servant de modèle. Cette hypothèse se fondait sur certaines observations :

1°) Les RNA ribosomiques ont une composition différente des autres classes de RNA et les gènes ribosomiques ne représentent qu'un peu moins de 5 p. 100 du génome total (ATTARDI et al. (12), BROWN (13)).

2°) D'autre part, les gènes ribosomiques sont localisés dans le nucléole (PERRY (14), PENMAN et al. (15), RITOSSA et SPIEGELMAN (16), BROWN et WEBER (17), BUSCH et SMETANA (18)) tandis que le reste du DNA est plus dispersé dans le nucléoplasme.

3°) Dans certaines cellules, la synthèse des RNA ribosomiques et des RNA - "DNA like" ont une régulation indépendante (BROWN et LITTNA (19), TATA (20), GUIDICE et MUTOLO (21)).

4°) Enfin, la synthèse des RNA dans les noyaux (WIDNELL et TATA (22), JOHNSON et al. (23)) ou dans les nucléoles (JACOB et al. (24), JOHNSON (25)) est fonction de la présence d'ions bivalents et de la force ionique. En présence de  $Mg^{++}$  et à basse force ionique, les noyaux synthétisent de façon prédominante des RNA riches en GC (rRNA) (WIDNELL et TATA (26), POGO et al. (27)) et l'activité RNA polymérasique est localisée principalement dans le nucléole (MAUL et HAMILTON (28), POGO et al. (29)). Par contre, en présence de  $Mn^{++}$  et à haute force ionique, les noyaux produisent un RNA "DNA like" (WIDNELL et TATA (30), POGO et al. (31)) et l'activité enzymatique est dispersée dans le nucléoplasme (MAUL et HAMILTON (32), POGO et al. (33)).

Il apparaît donc qu'au moins deux RNA polymérases sont présentes dans le noyau.

#### A - NOMBRE ET NOMENCLATURE

Des RNA polymérases stables, solubilisées à partir de noyaux de cellules eucaryotes, ne contenant pas de matrice furent d'abord obtenues par RAMUZ et al. (34) et JACOB et al. (35).

Enfin ROEDER et RUTTER (36) (37) isolent et séparent pour la première fois, par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex, différentes formes de RNA polymérase à partir d'extrait de foie de rat et d'embryons d'oursin. Ils dénombrent trois classes enzymatiques qu'ils nomment I, II, III, suivant leur ordre d'élution au cours de la chromatographie.

Une autre nomenclature est aussi utilisée. Elle est fondée sur l'inhibition de l'activité des différentes classes de RNA polymérase par l' $\alpha$ -amanitine, toxine extraite de l'Amanite Phalloïde (CHAMBON et al. (38) (39), KEDINGER et al. (40) (41), CHAMBON et al. (42)). Les enzymes de classe A ne sont pas affectées par l' $\alpha$ -amanitine (même à des concentrations supérieures à 1 mg/ml). Les enzymes de classe B sont inhibées par de basses concentrations en  $\alpha$ -amanitine (0,1  $\mu$ g/ml), tandis que les enzymes de classe C ne sont sensibles qu'à de hautes concentrations (400  $\mu$ g/ml).

Cependant, aucune de ces nomenclatures ne convient réellement et leur emploi reste complexe et confus. En effet, des activités RNA polymérasiques nouvelles, s'éluant entre les enzymes I et II ont été mises en évidence (ROEDER (43) (44), HOSSENLOP et al. (45), voir nos résultats personnels). D'autre part, les enzymes isolées de la levure présentent des courbes de sensibilité à l' $\alpha$ -amanitine différentes. En effet, les enzymes III (C) de levure ne sont pas inhibées par l' $\alpha$ -amanitine alors que les enzymes I (A) sont inhibées par cette toxine (VALENZUELA et al. (46), SCHULTZ et HALL (47). Il serait donc souhaitable d'adopter une nomenclature fondée sur la structure et la fonction des enzymes plutôt que sur une propriété quelconque des enzymes isolées.

#### B - HETEROGENEITE DES TROIS CLASSES DE RNA POLYMERASES

Les trois classes enzymatiques sont retrouvées dans de nombreux types de cellules. Il faut cependant noter que, si les classes I et II sont constamment retrouvées, il n'en est pas de même pour les RNA polymérase III. Ceci peut-être dû à l'origine du tissu employé (renfermant peu d'enzyme III) ou à la faiblesse de la technologie employée.

## REPARTITION DES RNA POLYMERASES DE CELLULES EUCARYOTES

ORIGINE	RNA POLYMERASES MISES EN EVIDENCE			REFERENCES
Foie de rat	I <sub>A</sub> - I <sub>B</sub> I I <sub>A</sub> - I <sub>B</sub> A	II <sub>A</sub> - II <sub>B</sub> II II B	III III  C	JACOB <u>et al.</u> (48) (49) ROEDER, RUTTER (50) CHESTERTON <u>et al.</u> (51)(52) MANDEL, CHAMBON (53) BLATTI <u>et al.</u> (54), SEIFART <u>et al.</u> (55)
Saccharomyces cerevisiae	I  I	II  II	III	PONTA <u>et al.</u> (56) VALENZUELA <u>et al.</u> (57) SCHULTZ et HALL (58) DEZELEE <u>et al.</u> (59)
Thymus de Veau	AI - AII I I I	BI - BII II II II	III  III III	CHAMBON <u>et al.</u> (60) FURTH et AUSTIN (61) BLATTI <u>et al.</u> (62) WEIL <u>et al.</u> (63) SCHWARTZ <u>et al.</u> (64)
Xenopus : Foie Rein Embryons	I I <sub>A</sub> - I <sub>B</sub> I <sub>A</sub> - I <sub>B</sub> I <sub>A</sub> - I <sub>B</sub>	II II <sub>A</sub> - II <sub>B</sub> II <sub>A</sub> - II <sub>B</sub> II <sub>A</sub> - II <sub>B</sub>	III III III III	ROEDER <u>et al.</u> (65) ROEDER (66) ROEDER (67) ROEDER (68)
Cellules KB	I  I I I I I A <sub>o</sub> A B <sub>o</sub> B	II  II II II II x A B	III  III III III III x A B	SUJDEN et KELLER (69) AUSTIN <u>et al.</u> (70) SERGEANT et KRSMANOVIC (71) Résultats personnels
Cellules HeLa	AI - AII	II B <sub>x</sub> - B <sub>II</sub>	III C I C I I C I I I	PRICE et PENMAN (72) HOSENLOPP <u>et al.</u> (73)
Souris BALB/C	I	II	III <sub>A</sub> - III <sub>B</sub>	SCHWARTZ <u>et al.</u> (74)
Plasmocytome MOPC 315	I	II	III <sub>A</sub> - III <sub>B</sub>	SCHWARTZ <u>et al.</u> (75)



D'autre part, l'hétérogénéité des classes I, II et III a été montrée après chromatographie soit sur DEAE-Sephadex, soit sur phosphocellulose soit sur CM-Sephadex (voir tableau I ; p. 7 ). Chaque classe enzymatique semble renfermer trois sous-classes.

## II) LOCALISATION DES RNA POLYMERASES

Il est actuellement bien admis que les RNA polymérase I sont localisées dans le nucléole (ROEDER et RUTTER (76), JACOB et al. (77)) et que les RNA polymérase II ( $II_A$ ,  $II_B$ ) sont retrouvées dans le nucléoplasme (ROEDER et RUTTER (78)). Une activité nouvelle  $II_x$  est détectée dans les cellules entières (HOSENLOP et al. (79)) mais n'est pas retrouvée dans les noyaux purifiés (ROEDER (80), résultats personnels) : elle pourrait donc avoir une localisation cytoplasmique.

Comme les RNA polymérase I et II, l'enzyme  $III_A$  est présente dans des extraits de noyaux purifiés. Après des fractionnements cellulaires plus poussés, il s'est avéré que la RNA polymérase  $III_A$  est localisée dans la fraction nucléoplasmique (ROEDER et RUTTER (81), LINDEL et al. (82)). La RNA polymérase  $III_B$  est retrouvée dans le cytoplasme, dans les fractions nucléaires non purifiées : elle est absente des fractions nucléaires purifiées (SCHWARTZ et al. (83), résultats personnels) : elle pourrait donc avoir une localisation cytoplasmique. La forme  $III_x$  a été décelée dans les cellules entières (HOSENLOP et al. (84)). Elle est mise en évidence dans les surnageants cytoplasmiques après préparation des noyaux non purifiés. Par contre, elle est retrouvée dans les noyaux purifiés préparés par des tampons hypertoniques (résultats personnels) : elle aurait donc une localisation nucléaire. Le mode de préparation des noyaux est donc important car les fuites de matériel nucléaire vers le cytoplasme sont toujours à envisager.

Remarque : L'existence d'une RNA polymérase C cytoplasmique a été mise en évidence pour la première fois dans des extraits cytoplasmiques de foie de rat (SEIFART et al. (85)). Les derniers travaux publiés sur l'enzyme C (SEIFART et BENECKE (86)) montrent des propriétés analogues à celles de la RNA polymérase  $III_B$ . Les RNA polymérase C et  $III_B$  pourraient en fait, être la même enzyme.

### III) ROLE

La multiplicité des RNA polymérase, leur localisation différente suggèrent que celles-ci, dans la cellule eucaryote, sont responsables de la transcription de gènes bien définis.

En utilisant la sensibilité des RNA polymérase à l' $\alpha$ -amanitine dans les noyaux isolés, leur rôle a été clairement démontré. Il est communément admis que les RNA polymérase I interviennent dans la transcription des gènes codant pour les rRNA (REEDER et ROEDER (87), WEINMAN et ROEDER (88)).

Les RNA polymérase II seraient responsables de la synthèse des RNA nucléaires hétérodisperses (HnRNA) qui seraient les précurseurs des mRNA (ROEDER et RUTTER (89), BLATTI et al. (90), ZYLBER et PENMAN (91), REEDER et ROEDER (92). D'autre part lors de l'infection virale, pendant les périodes précoces et tardives du cycle, les RNA polymérase II cellulaires synthétisent des mRNA viraux (PRICE et PENMAN (93), WEINMANN et al. (94), RYMO et al. (95), JACQUET et al. (96)).

En utilisant la sensibilité des RNA polymérase III à l' $\alpha$ -amanitine dans des noyaux isolés, WEINMANN et ROEDER (97) ont montré que cette classe enzymatique intervient dans la transcription des gènes codant pour les RNA 5 S et pré-4 S (précurseurs des tRNA cytoplasmiques) (PRICE et PENMAN (98), ZYLBER et PENMAN (99)). Des travaux effectués sur la transcription de la chromatine étayent cette hypothèse : MARZLUFF et al. (100) montrent qu'en présence de chromatine, une RNA polymérase insensible à de basses concentrations en  $\alpha$ -amanitine produit des RNA 5 S et 4,5 S. L'intervention d'une activité de type III dans la synthèse d'un RNA viral 5,5 S (Va RNA), au cours de l'infection des cellules KB par l'Adénovirus 2 a été clairement démontrée (WEINMANN et al. (101)). Ce RNA 5,5 S est produit en grande quantité à des temps tardifs du cycle viral (OHE et al. (102)). Bien que sa fonction véritable soit inconnue, il pourrait intervenir soit en stimulant les fonctions virales, soit en inhibant certaines fonctions de la cellule hôte.

#### IV) PROPRIETES DES RNA POLYMERASES EUCARYOTES

##### A - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE PARTICULIER DES RNA POLYMERASES III

Comme l'ont montré SERGEANT et KRSMANOVIC (103), les enzymes III ont un comportement chromatographique différent sur DEAE-Cellulose et DEAE-Sephadex. En effet, sur DEAE-Cellulose, les enzymes III s'éluent à basse force ionique en même temps que les RNA polymérase I (HOSSENLOP et al. (104)). Cette élution simultanée ainsi que la très grande activité des RNA polymérase I, expliquent le fait que la classe enzymatique III n'ait pas été détectée par certains auteurs utilisant cet échangeur d'ions. Sur DEAE-Sephadex, la classe III s'éluie à haute force ionique après les RNA polymérase II.

La différence d'élution des RNA polymérase III sur ces deux échangeurs d'ions portant pourtant les mêmes groupements réactionnels n'est pas expliquée.

##### B - EFFET DES IONS BIVALENTS SUR LES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES

Les RNA polymérase montrent différents optima d'activité selon la présence d'ions bivalents. Le  $Mg^{++}$  et le  $Mn^{++}$  sont les ions les plus couramment utilisés. Les RNA polymérase I et III utilisent indifféremment le  $Mg^{++}$  et le  $Mn^{++}$ . Par contre, l'activité RNA polymérase II est stimulée par la présence de  $Mn^{++}$  (ROEDER et RUTTER (105), SCHWARTZ et al. (106)). Sachant que cette classe enzymatique transcrit préférentiellement le DNA dénaturé, le  $Mn^{++}$  agirait en destabilisant le DNA, faisant ainsi apparaître des régions monocaténares.

### C - INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR L'ACTIVITE DES RNA POLYMERASES

Une des propriétés qui permet de différencier les classes de RNA polymérasés eucaryotes est leur profil d'activation en fonction de la concentration croissante en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

En présence de DNA cellulaire, les RNA polymérasés I atteignent leur pleine activité pour des concentrations de 30 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Les RNA polymérasés II montrent un maximum d'activité pour une concentration de 80 à 100 mM en sulfate d'ammonium. L'étude de l'activité enzymatique des RNA polymérasés III en fonction de la force ionique donne une courbe biphasique possédant deux maxima à 50 - 80 mM et 150 - 200 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (ROEDER et RUTTER (107), SCHWARTZ et al. (108), SERGEANT et al. (109)).

Cependant, ces propriétés ne peuvent être considérées comme des caractéristiques invariables des trois classes de RNA polymérasés. En effet, les effets des ions bivalents et de la force ionique sont fonction de la nature et de l'état de la matrice employée. GISSINGER et al. (110), SCHWARTZ et al. (111) ont montré qu'en utilisant un copolymère synthétique, le poly[d(A-T)], les RNA polymérasés III ne montrent plus qu'un maximum d'activité à 50 - 80 mM en sulfate d'ammonium. D'autre part, en utilisant des DNA plus homogènes comme le DNA d'Adénovirus 2 (ne possède que peu ou pas de coupures monocaténares), SERGEANT et al. (112) ont montré que l'optimum d'activité des trois classes de RNA polymérasés est beaucoup plus bas : 15 à 40 mM.

### D - TRANSCRIPTION IN VITRO DE DIFFERENTES MATRICES PAR LES RNA POLYMERASES (pour références, voir CHAMBON (113)).

En examinant la transcription de diverses matrices en termes d'activité enzymatique, tous les auteurs reconnaissent que les RNA polymérasés I et III sont plus actives en présence de DNA déprotéinisé bicaaténaire alors que les RNA polymérasés II sont 5 à 10 fois plus actives en présence de DNA monocaténaire. D'autre part, quand le poly[d(A-T)] est utilisé comme matrice, les RNA polymérasés I et III ont une activité

beaucoup plus importante que lorsque le DNA cellulaire est employé comme modèle. Aucune modification d'activité n'est observée avec les RNA polymérase II (ROEDER (114), SCHWARTZ et al. (115), ADMAN et al. (116)).

Cependant, ces dernières années, l'accent a été porté sur la qualité de la transcription en examinant notamment la spécificité de déclenchement et la taille des RNA formés. En effet, l'existence de formes multiples de RNA polymérase localisées dans différents territoires de la cellule suggère que l'expression des gènes de la cellule eucaryote peut être régulée en partie par des enzymes distinctes qui pourrait transcrire spécifiquement différents gènes ou différentes classes de gènes. Cependant l'étude de la spécificité de la transcription in vitro soulève de nombreux problèmes :

- La première difficulté réside dans la complexité du génome des cellules eucaryotes (DAVIDSON et BRITTON (117)). De plus, in vivo, seule une faible partie du génome est traduite en RNA fonctionnels. Enfin, lors de la préparation du DNA déprotéinisé, de nombreuses coupures monocaténares peuvent se produire laissant ainsi apparaître des sites non spécifiques de déclenchement de synthèse : une telle matrice ressemble peu à la chromatine (BUTTERWORTH et al. (118), CHAMBERON et al. (119)).

- La seconde difficulté est la mise en évidence d'un RNA donné dans le "pool" des RNA synthétisés.

De telles difficultés peuvent être tournées en employant des systèmes viraux (le DNA peut être obtenu intact et les produits formés sont plus facilement identifiables) ou des préparations de chromatine.

#### E - ACTION DE L' $\alpha$ -AMANITINE

STIRPE et FIUME (120) furent les premiers à observer que dans les noyaux isolés, l'activité des RNA polymérase mesurée en présence de  $Mn^{++}$  et à haute force ionique pouvait être inhibée par l' $\alpha$ -amanitine, toxine isolée de l'Amanite phalloïde (WIELAND (121)). KEDINGER et al. (122), JACOB et al. (123) et LINDELL et al. (124) ont démontré que

de faibles concentrations de cette toxine inhibent l'activité RNA polymérisique de type II. Cette toxine se fixe sur l'enzyme (MEILHAC et al. (125)) et inhibe la synthèse des RNA après son déclenchement (JACOB et al. (126), KEDINGER et al. (127), NOVELLO et al. (128)). L'activité RNA polymérisique de type III n'est pas inhibée par de faibles concentrations de cette toxine mais est totalement sensible à de hautes doses d' $\alpha$ -amanitine (WEINMAN et ROEDER (129)). Les trois sous-classes enzymatiques III montrent les mêmes courbes d'inhibition (SCHWARTZ et al. (130), HOSSENLOP et al. (131)).

Par contre, les RNA polymérases I ne sont pas affectées par cette toxine. Il est donc possible actuellement de différencier les trois classes de RNA polymérases des cellules eucaryotes.

Remarque : Les RNA polymérases extraites de la levure montrent des courbes de sensibilité à l' $\alpha$ -amanitine particulières (SCHULTZ et HALL (132), VALENZUELA et al. (133)). En effet, la RNA polymérase I est sensible à l' $\alpha$ -amanitine alors que l'activité de type III n'est pas inhibée par cette toxine.

#### F - STABILITE DES RNA POLYMERASES

L'activité enzymatique des RNA polymérases se mesure par la faculté d'incorporer des nucléosides triphosphates radioactifs et donc la stabilité n'est donnée que d'un point de vue quantitatif. Si les RNA polymérases II peuvent être conservées facilement, il n'en est pas de même pour les RNA polymérases I. En particulier, la présence de sel semblerait défavoriser la conservation des enzymes I (CHESTERTON et BUTTERWORTH (134), CHAMBON et al. (135)). Les RNA polymérases III semblent la classe la plus instable et la plus difficile à conserver. Il est possible que certaines sous unités nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme soient perdues lors de l'extraction ou rapidement inactivées.

L'addition de sérum albumine à des concentrations de 500  $\mu$ g/ml couplée à la présence de glycérol (25 à 50 p. 100) s'est révélée être un bon moyen d'augmenter la stabilité. La conservation s'effectue dans l'azote liquide pendant plusieurs mois sans perte importante d'activité.

## V) MASSE MOLECULAIRE ET STRUCTURE

### A - MASSE MOLECULAIRE DES TROIS CLASSES DE RNA POLYMERASES

Les premières estimations de la masse moléculaire des trois classes de RNA polymérase furent obtenues par mesure de la vitesse de sédimentation des enzymes en gradient de glycérol ou de saccharose. La RNA polymérase AI ( $I_A$ ) purifiée de thymus de veau (CHAMBON *et al.* (136), KEDINGER *et al.* (137)), de myélome murin (SCHWARTZ et ROEDER (138)) ainsi que les RNA polymérase  $I_A$  et  $I_B$  de foie de rat (SEIFART *et al.* (139), CHESTERTON *et al.* (140)) montrent une constante de sédimentation de 14,5 S. La RNA polymérase II purifiée isolée de ces tissus et des cellules KB (SUGDEN et KELLER (141)) sont légèrement plus lourdes (15,5 S). Les enzymes I et II auraient donc une masse moléculaire de 500 000 daltons environ. Enfin, SERGEANT et KRSMANOVIC (142) puis SKLAR *et al.* (143) ont montré que la RNA polymérase III est la plus lourde (17 S) et ont estimé sa masse moléculaire à 600 000 - 620 000 daltons.

### B - SOUS-UNITES COMPOSANT LES RNA POLYMERASES

Quelques équipes ont réussi à obtenir des quantités suffisantes d'enzyme purifiée pour déterminer par électrophorèse en gel de polyacrylamide, le nombre et la masse moléculaire de ses sous-unités, dissociables en présence de dodecyl-sulfate de sodium.

Le tableau II (p. 15) montre que les trois classes enzymatiques sont constituées de deux grosses sous-unités de plus de 100 000 et d'un nombre variable de petites sous-unités. D'autre part, pour une classe enzymatique donnée, il existe peu de différences quelque soit le tissu examiné. Ces grandes similitudes suggèrent que les trois classes enzymatiques pourraient avoir la même structure (ou une structure voisine) chez tous les eucaryotes.

Enfin, en utilisant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions non dénaturantes, quelques équipes ont montré l'hétérogénéité des classes I, II et III.

TABLEAU II  
SOUS-UNITES COMPOSANT LES RNA POLYMERASES EUCARYOTES

Levure				Foie de Rat			Thymus de Veau				MOPC 315			Xenopus	E. coli		
A	B	I	II	III	C	II	E <sub>1</sub> E <sub>2</sub> E <sub>3</sub> E <sub>4</sub>	Al <sub>b</sub>	Al <sub>a</sub>	BI	BI <sub>a-b</sub>	I	II <sub>a</sub> II <sub>b</sub> II <sub>c</sub> II <sub>d</sub>	III <sub>A1</sub> III <sub>A2</sub> III <sub>B1</sub> III <sub>B2</sub>			
190	185	185	170	160	175	190	220(E <sub>1</sub> ) 214(O <sub>4</sub> ) 180(O <sub>3</sub> ) 165(O <sub>1</sub> ) 140(I)	197	197	214	180	195	240(II <sub>d</sub> ) 205(II <sub>A</sub> ) 170(II <sub>B</sub> ) 140	155 138 89 70 52	165β' 155β	155 138 92 68 52	90α
49		48		82				126	126	140	140	117					
43	44,5	44	41	53				51	44			61 52					
40		41	41	41				44	44			41					
34,5		36	33	34		35	34(12)			34(12)	34(12)	29			43 41	42	39α
27	27	28	28	28		25	25(2)	25(2)	25(2)	25(2)	25(2)	29			34	33	
23	23	24	24	24		25	25(2)	25(2)	25(2)	25(2)	25(2)	27			29	29	
19	16,5	20	18	20			20,5			20	20	19			22	19	
14,5	14,5	14,5	14,5	14,5			16,5(3-4)	16,5(2)	16,5(2)	16,5(3-4)	16,5(3-4)	19			19	19	
12	12	12	12	11								16			16		
10	10																
BUHLER et al (144)	DEZELEE et al (145)	VALENZUELA et al (146)	SEIFART et al (147)	VALENZUELA et al (147)	SEIFART et al (148)	WEAVER et al (149)	KEDINGER et al (150)	KEDINGER et al (151)	KEDINGER et al (153)	KEDINGER et al (152)	SCHWARTZ et ROEDER (154)	BURGESS (158)					

- La masse moléculaire est exprimée en 10<sup>3</sup> daltons.  
- Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de sous-unités présentes.





## VI) FACTEURS STIMULANT L'ACTIVITE DES RNA POLYMERASES DE CELLULES EUCARYOTES

Depuis la découverte du facteur  $\sigma$  par BURGESS et al. (159) et d'autres facteurs chez les procaryotes, de nombreuses investigations furent entreprises pour mettre en évidence des facteurs similaires chez les eucaryotes.

Des facteurs protéiques furent mis en évidence. Ces facteurs stimulent la transcription d'un DNA natif par les RNA polymérase II animales (SUGDEN et KELLER (160), SEIFART et SEKERIS (161), LEE et DAHMUS (162)), les RNA polymérase I animales (FROEHNER et BONNER (163), HIGASHINAKAGAWA et al. (164)), les RNA polymérase I, II, III de levure (HUET et al. (165)).

Certains de ces facteurs ont été purifiés (HUET et al. (166), SEIFART et al. (167)) : ce sont des protéines basiques de faible poids moléculaire. Ils agiraient en stimulant l'allongement des chaînes de RNA CHAMBON (168), SEIFART et al. (169).

Les cellules eucaryotes renferment donc plusieurs RNA polymérase que l'on peut rassembler en trois classes I, II, III. Celles-ci diffèrent par leurs propriétés catalytiques, leur masse moléculaire et leur structure, leur localisation dans la cellule et leur fonction.

## 2 - / MECANISME ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION /

Dans les pages suivantes, nous rappellerons très brièvement les quelques notions générales qu'il convient d'avoir à l'esprit pour mieux comprendre le mécanisme d'action et le rôle des RNA polymérase.

### 1) LE MECANISME DE LA TRANSCRIPTION

La plupart des détails du mécanisme de la transcription ont été amplement décrits à partir des systèmes procaryotes. D'une manière générale, le processus de la synthèse d'un RNA peut se décomposer comme suit :

1°) Fixation de la RNA polymérase sur la matrice avec formation d'un complexe enzyme : DNA.

2°) Déclenchement de la polymérisation.

3°) Allongement des chaînes de RNA et propagation de l'enzyme le long de la matrice : il se forme un complexe enzyme : DNA : RNA naissant.

4°) Arrêt de la synthèse avec libération de l'enzyme et du RNA formé.

Dans ses grandes lignes, le même mécanisme est admis pour les cellules eucaryotes :

- Les travaux de MEILHAC et al. (170) et JUHAZ et al. (171) ont montré qu'un nombre limité d'associations enzyme : DNA est protégé contre l'action de dérivés de la rifamycine. Ceci pourrait traduire la modification conformationnelle de l'enzyme liée à des sites spécifiques de déclenchement de synthèse qui seraient en nombre limité (MEILHAC et CHAMBON (172)).

- In vitro, les enzymes eucaryotes déclenchent la synthèse de RNA par un nucléotide purique. Cependant, elles semblent montrer une certaine spécificité de classe : les RNA polymérase I et III amorcent préférentiellement les synthèses par le GTP, la RNA polymérase II par l'ATP.

- Des complexes enzymes : DNA : RNA naissant ont été aussi mis en évidence dans les cellules eucaryotes. La dénaturation des hybrides DNA : RNA par la chaleur, la formamide ou les basses forces

ioniques montre la nature "pont hydrogène" des liaisons impliquées dans de telles associations (SERGEANT et al. (173)). Le sens 5' → 3' de la synthèse a été montré chez les eucaryotes et la vitesse d'allongement de la chaîne de RNA varie de 15 à 100 nucléotides incorporés par seconde.

## II) QUELQUES ASPECTS DE LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Le contrôle de l'ensemble des RNA fonctionnels dans une cellule eucaryote peut se faire à de multiples niveaux :

1°) Régulation au niveau de la production des RNA faisant intervenir de nombreux facteurs : c'est la régulation transcriptionnelle.

2°) Régulation au niveau de la maturation des RNA néosynthétisés non fonctionnels en RNA ayant un certain rôle biologique : c'est la régulation post-transcriptionnelle.

### A - LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

La modulation de la synthèse des RNA peut se faire :

- par des modifications de l'accessibilité de la matrice faisant intervenir les histones et les protéines non histones de la chromatine. En effet, suivant l'état de phosphorylation de ces protéines, faisant intervenir des systèmes phospho-dephospho régulés par l'AMP<sub>c</sub> celles-ci sont capables ou non de se fixer sur la matrice.

- par activation ou inhibition de l'activité RNA polymérisique. Au cours de ces dernières années, le rôle des hormones dans la régulation de la synthèse des RNA a été mis en évidence et leur action au niveau des noyaux a été souvent montrée. Par exemple, dans des cellules "cibles", les hormones stéroïdes sont capables d'induire une stimulation de la synthèse de mRNA spécifiques (O'MALLEY et al. (174), TALWAR et al. (175)). De même, les hormones non stéroïdes (LH, insuline, etc.) stimulent la synthèse des acides nucléiques dans les cellules "cibles" par l'intermédiaire de nombreux récepteurs.

Ainsi, les interactions harmonieuses entre les nucléotides cycliques, les protéines kinases nucléaires, les différentes protéines se liant aux hormones, les accepteurs nucléaires et d'autres protéines offrent de nombreuses possibilités de régulation de la synthèse des RNA cellulaires.

#### B - UN ASPECT DE LA REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE

Après leur synthèse, les RNA subissent de nombreuses modifications. Nous traiterons sommairement la maturation des RNA nucléaires hétérogènes. Ces HnRNA évoluent rapidement. Par coupures spécifiques (GEORGIEV (176)) ils donnent naissance aux mRNA cytoplasmiques. Une séquence poly A est ajoutée à l'extrémité 3'OH du mRNA (HADJIVASSILIOU et BRAWERMAN (176a)) tandis que l'extrémité 5' est bloquée (pour références voir B. GRIFFIN (177)). Une structure unique a été identifiée à l'extrémité 5' de nombreux mRNA viraux et cellulaires :  $m^7GpppN^m$ . D'autre part, les mRNA possèdent quelques bases méthylées (PERRY et KELLEY (178)). Enfin des protéines spécifiques viennent se fixer sur ces macromolécules (les informofères de GEORGIEV et les informosomes de SPIRIN).

Il est donc vraisemblable que toutes ces modifications ont pour but de protéger l'information génétique contenue dans le mRNA, et de donner aux mRNA une structure qui sera reconnue et traduite efficacement par les ribosomes.

TRAVAUX PERSONNELS

---

## M A T E R I E L E T M E T H O D E S

### I) CULTURE DES CELLULES KB

Les cellules KB sont cultivées en suspension dans le milieu EAGLE modifié par JOKLIK (MEM GIBCO) et additionné de 5 p. 100 de serum de cheval.

### II) EXTRACTION DES RNA POLYMERASES DE CELLULES KB

Les RNA polymérasés sont solubilisées à partir des noyaux de cellules KB selon la méthode de ROEDER et RUTTER (179) modifiée par CHESTERTON (180) et à partir du cytoplasme.

#### A - SOLUTIONS EMPLOYEES

Solution 1	TMMT	Tris-HCl	10 mM ; pH 7,9
		Acétate de Magnésium	10 mM
		β Mercaptoéthanol	10 mM
		Triton X-100	0,2 p. 100
Solution 2	SM	Saccharose	2,2 M )
		MgCl <sub>2</sub>	15 mM ) pH 7,9
Solution 3		Saccharose	0,32 M
		MgCl <sub>2</sub>	2 mM
		Phosphate de potassium	1 mM ; pH 6,8
Solution 4		NaCl	10 mM
		Phosphate de potassium	1 mM ; pH 6,8

Solution 5		Saccharose	0,32 M
		MgCl <sub>2</sub>	1 mM
		Triton X-100	0,3 p. 100
Solution 6	TSMD	Tris - HCl	10 mM ; pH 7,9
		Saccharose	1 M
		MgCl <sub>2</sub>	5 mM
		Dithioérythritol	1 mM
Solution 7	TGED	Tris - HCl	50 mM ; pH 7,9
		Glycérol	25 p. 100
		EDTA	0,1 mM
		Dithioérythritol	0,5 mM

## B - PREPARATION DES NOYAUX DE CELLULES KB

Les cellules KB sont d'abord centrifugées à 700 g pendant 10 mn. Puis, celles-ci sont lavées plusieurs fois par de l'eau physiologique. Enfin elles sont centrifugées à 700 g pendant 10 mn. Toutes les opérations sont effectuées à 0°C.

### 1°) Noyaux préparés par un tampon aqueux : le TMMT

Les cellules sont suspendues dans le TMMT à raison de  $10^8$  cellules par ml. Celles-ci sont homogénéisées (7 courses de piston, 1000 tours/mn. L'homogénat obtenu est centrifugé à 700 g pendant 10 mn. Un culot de noyaux et un surnageant cytoplasmique sont ainsi obtenus. Le surnageant cytoplasmique est ajusté à 25 p. 100 en glycérol.

### 2°) Noyaux préparés selon une méthode dérivée de celle de CHAUVEAU et al. (181)

Les cellules sont reprises dans la solution 2 (15 volumes de solution 2 pour 1 volume de cellules) et homogénéisées (6 courses de piston, 700 tours/mn). L'homogénat est centrifugé 1 h à 50 000 g. Un

culot de noyaux et un surnageant cytoplasmique sont ainsi obtenus. Ce dernier est dilué au demi par le TGED.

3°) Noyaux préparés par la méthode de CHAUVEAU et traités par le Triton X-100.

Les noyaux sont obtenus comme précédemment excepté le tampon 2 qui contient 5 mM de  $MgCl_2$ . Ils sont mis en suspension dans la solution 5 pendant 10 mn puis sont centrifugés à 800 g pendant 10 mn.

4°) Noyaux préparés selon la méthode de BERKOWITZ (182).

Les cellules sont lavées par la solution 3 (50 ml/ $10^8$  cellules). Celles-ci sont centrifugées et remises en suspension dans un même volume de solution 4 pendant 15 mn. La suspension est centrifugée, les cellules sont mises en suspension dans la solution 5 (25 ml/ $10^8$  cellules). La suspension de cellules est homogénéisée au DOUNCE (10 allers et retours de piston). L'homogénat obtenu est centrifugé à 800 g pendant 10 mn. Le culot est remis en suspension dans la solution 5 et homogénéisé de nouveau (5 allers et retours de piston). L'homogénat est centrifugé à 800 g pendant 10 mn.

C - EXTRACTION DES RNA POLYMERASES

La méthode d'extraction des RNA polymérase est résumée dans la figure I (p. 24).

Toutes les opérations sont effectuées à 0°C.

III) SEPARATION DES RNA POLYMERASES PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

La chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex A-25 et sur phosphocellulose Whatman P 1 nous a permis de mettre en évidence les différents types d'activité RNA polymérasique.



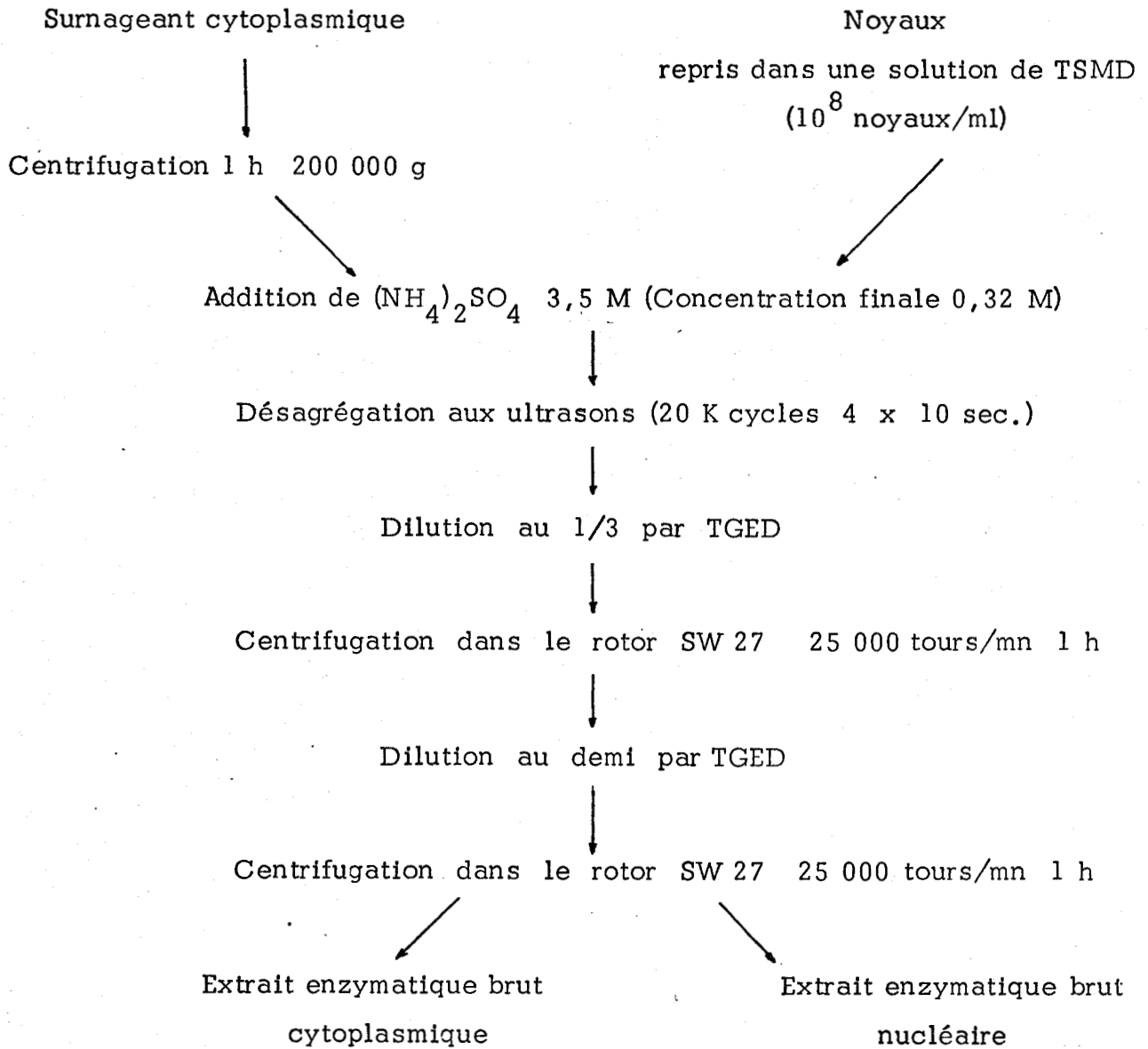


FIGURE 1

Extraction des RNA polymérase des noyaux et du surnageant cytoplasmique des cellules KB

## A - COLONNES ET ELUTION

Les colonnes sont équilibrées par passage de 4 à 5 volumes de colonne de TGED, 40 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de manière à ce que le tampon de départ et l'éluat de la colonne aient le même pH et le même indice de réfraction.

La quantité de protéines à chromatographier est fonction du volume de la colonne. En général 2 mg de protéines par ml de gel sont déposés sur la colonne. Dans ces conditions, la fixation des protéines s'effectue dans les deux centimètres supérieurs de la colonne.

Les protéines non fixées sont éliminées par passage d'un volume de colonne de TGED, 40 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

L'éluion des RNA polymérases s'effectue par le passage d'un gradient linéaire de 40 à 450 mM en sulfate d'ammonium dans le TGED. Pour obtenir une bonne résolution chromatographique, le volume du gradient doit être égal à 8 à 10 fois le volume de la colonne.

Le volume des fractions est déterminé de façon à obtenir environ 150 fractions. Celles-ci sont recueillies dans la sérum-albumine (0,5 mg/ml).

Le profil d'éluion des RNA polymérases est déterminé en mesurant l'activité enzymatique toutes les deux fractions.

L'évolution du gradient est contrôlé par l'augmentation de la conductivité due à la présence de sulfate d'ammonium en quantité croissante.

## B - MESURE DE L'ACTIVITE RNA POLYMERASIQUE

L'activité RNA polymérasique est mesurée par l'incorporation d' $^3\text{H}$ -UMP à 37°C pendant 30 mn dans le milieu de composition suivante :

Tris-HCl	50 mM pH 8
Glycérol	12 p. 100
MgCl <sub>2</sub>	6 mM
MnCl <sub>2</sub>	3 mM
Dithioérythritol	4 mM
Nucléosides triphosphates (ATP, GTP, CTP)	0,7 mM de chaque
UTP froid	0,01 mM
<sup>3</sup> H-UTP	15 µCi/ml
DNA de cellule KB	10 µg/ml
Serum albumine bovine	0,5 mg/ml

Le volume d'enzyme est ajouté de façon à obtenir une concentration finale en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  proche de l'activité des RNA polymérase : dans le cas de la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex par exemple, le volume d'enzyme ajouté est égal au tiers du volume final.

Après incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par refroidissement à 0°C et additionnée de 2 ml d'acide trichloracétique 10 p. 100 contenant du pyrophosphate de sodium 20 mM. Le matériel acido-précipitable est recueilli sur filtre de fibre de verre Whatman GF-83. Chaque filtre est ensuite lavé 12 fois par 2 ml d'acide trichloracétique 2 p. 100 et rincé abondamment par l'éthanol. Après séchage, la radioactivité retenue sur filtre est mesurée par comptage dans le milieu scintillant suivant :

Toluène	1 l
PPO	5 g
POPOP	0,3 g

#### IV) PREPARATION DU DNA

##### A - EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA CELLULAIRE

Le DNA est extrait et purifié selon la méthode de YOUNG et SINSHEIMER (183). Les noyaux de cellules KB sont préparés de la même façon que pour l'extraction des RNA polymérase (méthode par le TMMT, voir p. 22 ). Ils sont remis en suspension dans une solution tampon TEBS.

TEBS	Tris-HCl	10 mM	pH 7,4
	EDTA	1 mM	
	NaCl	300 mM	
	Citrate Trisodique	30 mM	

Le traitement par la pronase se fait à raison de 200 µg/ml en présence de Sarcosinate de Sodium en concentration finale de 0,5 p. 100 (la pronase est préalablement prédigérée pendant 3 heures à 37°C puis chauffée 5 mn à 80°C). La digestion pronasique est poursuivie pendant 3 h à 37°C. Du chlorure de césium est ensuite ajouté à la solution pour obtenir une densité de 1,7. Le DNA est purifié par centrifugation à l'équilibre de densité dans le rotor SW 50/1 à 40 000 t/mn pendant 60 heures à 20°C. Après fractionnement du gradient, le DNA est dialysé contre une solution 0,1 SSC (NaCl 15 mM, citrate trisodique 1,5 mM, pH 7,5) pendant 16 heures. Il est conservé à 4°C dans ce même tampon.

#### B - EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA D'ADENOVIRUS 2

L'Adénovirus 2 est purifié selon la méthode de GREEN et PINA (184). La suspension virale est dialysée 2 heures contre une solution tampon TEBS. L'adialysat est ensuite traité comme précédemment.

#### V) SEDIMENTATION EN GRADIENT DE GLYCEROL DE LA FORME IIx

La forme IIx est d'abord concentrée par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex (colonne de 16 ml). L'élution est effectuée par le TGED, 300 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Après détection de l'activité enzymatique, les fractions contenant la forme IIx sont rassemblées et dialysées contre le tampon suivant :

Tris-HCl	50 mM pH 7,9
EDTA	0,1 mM
Dithioerythritol	0,5 mM
Thioglycerol	10 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40 mM
Serum albumine bovine	0,5 mg/ml

Après dialyse, la forme IIx est déposée sur gradient linéaire de glycérol (10 à 40 p. 100) dans le tampon précédent. La centrifugation s'effectue dans le rotor SW-41, pendant 16 heures à 36 000 tours/mn à 4°C.

#### VI) SENSIBILITE THERMIQUE DES DIFFERENTES RNA POLYMERASES DE TYPE I

La solution enzymatique subit d'abord un préchauffage aux différentes températures. L'activité enzymatique est ensuite testée comme précédemment dans des conditions optimales de force ionique.

#### VII) PREPARATION DES ( $\gamma$ - $^{32}$ P)xTP

Les ( $\gamma$ - $^{32}$ P)xTP ont été préparés selon la méthode de GLYNN et CHAPPELL (185). Nous y avons apporté la modification suivante ; à la fin de la réaction, le mélange est placé dans un Bain-Marie bouillant (CHAMBERLIN et RING (186)). Ce chauffage permet d'arrêter totalement la réaction, mais il ne doit pas excéder 3 mn pour éviter la dégradation des xTP et notamment le GTP.

Le précipité de protéines est éliminé par centrifugation (12 000 g, 15 mn). Le surnageant est purifié sur filtre millipore de porosité 0,22  $\mu$  (unité à usage unique MILLEX). Les solutions contenant les ( $\gamma$ - $^{32}$ P)xTP désirés sont conservées à - 20°C.

Le rendement de la réaction, les différents contrôles sont réalisés selon les méthodes décrites par A. VERBERT (187).

### VIII) SYNTHESE DES RNA IN VITRO EN PRESENCE DE ( $\gamma$ - $^{32}$ P)xTP

Le milieu de synthèse utilisé est le même que celui décrit précédemment (voir p. 26 ). L'un des nucléosides triphosphates (ATP ou GTP) est marqué en  $\gamma$  par le  $^{32}$ P (concentration finale 0,2 mM, activité spécifique d'environ 2 Ci/mM). Le marquage interne du RNA se fait par  $^3$ H-UTP (0,015 mM, 1 Ci/mM).

### IX) ( $\gamma$ - $^{32}$ P)xTP INCORPORES DANS LES CHAINES DE RNA

Les méthodes classiques de mesure de la radioactivité du matériel acido-précipitable (voir p. 26 ) ne sont pas directement adaptables à cette étude. En effet il faut avoir en mémoire les points suivants :

1°) La radioactivité liée à l'extrémité 5' est faible par rapport à celle représentée par les précurseurs marqués nécessaires pour mettre en évidence le phénomène. Il faut donc abaisser le "bruit de fond" à une valeur minimum :

- Ce résultat a été obtenu en éliminant le plus possible le précurseur marqué avant l'étape de rétention sur filtre du produit acido-précipitable. La méthode qui nous est apparue la plus simple et la plus facile à mettre en oeuvre se fonde sur des lavages répétés à l'alcool.

- De plus, la solution de lavage du matériel acido-précipitable retenu sur filtre contient du pyrophosphate de sodium 20 mM. Ceci permet un meilleur déplacement des précurseurs radioactifs qui pourraient être adsorbés sur le filtre.

2°) Les nucléosides triphosphates (l'ATP en particulier) peuvent permettre le transfert de leur groupement phosphate en  $\gamma$  sur des molécules autres que le RNA. Il faut s'assurer que la radioactivité  $^{32}$ P mesurée est bien liée aux RNA.

- Les RNA synthétisés sont extraits par un mélange phénol/SDS. Ceci permet d'éliminer une grande partie des protéines présentes dans le milieu d'incubation.

- D'autre part, la sensibilité à la RNase permet de vérifier la nature ribonucléotidique du matériel ayant incorporé le radiophosphore. Cette méthode simple à mettre en oeuvre nous est apparue comme le meilleur contrôle.

La méthode que nous avons développée et qui s'est avérée la plus fiable est décrite ci-dessous.

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

Après synthèse, la réaction est arrêtée par refroidissement à 0°C et additionnée d'un même volume du mélange suivant :

SDS	0,4 p. 100
EDTA	10 mM

Un mélange de tRNA (E.coli WORTHINGTON) purifié est ajouté comme entraîneur de façon à obtenir une concentration finale de 100 µg/ml.

Les RNA sont extraits par la méthode suivante :

- Addition de 2,5 volumes d'alcool contenant de l'acétate de potassium 80 mM à pH 5,6. Les macromolécules sont précipitées pendant 4 heures à -20°C puis centrifugées pendant 15 mn à 15 000 tours/mn : le surnageant est éliminé

- Le culot est lavé trois fois par le mélange alcool/eau (2 v : 1 v).

- Le culot est redissout dans du SDS 0,2 p. 100, EDTA 5 mM et l'extraction des RNA se fait par addition d'un volume égal de phénol saturé en eau. Après agitation 10 mn

à température ordinaire, le mélange est centrifugé 15 mn à 10 000 tours/mn. La phase aqueuse surnageante est recueillie et les RNA sont précipités par addition de 2,5 volumes d'alcool et refroidissement à - 20°C pendant 4 heures.

- Le culot contenant les RNA, obtenu par centrifugation, (15 mn à 15 000 tours/mn) est séché sous un courant d'air doux et redissout dans le tampon suivant :

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

## B - MESURE DE LA RADIOACTIVITE INCORPOREE DANS LES CHAINES DE RNA

### 1°) Radioactivité du matériel acido-précipitable total

La mesure de l'incorporation des ( $\gamma$  -  $^{32}$ P)xTP se fait par mesure de la radioactivité du matériel acido-précipitable retenu sur filtre de fibre de verre.

La méthode employée est la suivante :

- Les fractions aliquotes sont d'abord incubées pendant 45 mn à 37°C. Ceci a pour but d'éviter l'adsorption probable du  $^{32}$ P libre restant en solution, sur les macromolécules.

En fait ceci ne pourrait être qu'une des causes responsables de l'augmentation considérable du fond de radioactivité.

- Après incubation, chaque fraction aliquote est additionnée d'acide trichloracétique jusqu'à concentration finale de 10 p. 100 (20 mM en pyrophosphate de sodium). De la serum albumine bovine est ensuite ajoutée comme entraîneur pour obtenir une concentration finale de 100 µg/ml.



- Après 5 mn à 0°C, le matériel acido-précipitable est récupéré sur filtre de fibre de verre, lavé 15 fois par 5 ml d'Acide trichloracétique 2 p. 100 (20 mM en pyrophosphate de sodium), 25 fois par 5 ml d'Acide trichloracétique 2 p. 100 et rincé abondamment par l'alcool absolu.

- Après séchage, la radioactivité est déterminée par comptage en milieu scintillant comme précédemment.

2°) Radioactivité du matériel acido-précipitable "RNase-résistant".

Une fraction aliquote est soumise à l'action de la RNase pancréatique (100 µg/ml) (WORTHINGTON) pendant 45 mn à 37°C.

Il a été vérifié que la RNase ne possédait pas d'action phosphatasique sur les ( $\gamma$  -  $^{32}$ P)xTP.

La radioactivité du matériel acido-précipitable "RNase-résistant" est mesurée comme précédemment.

Dans tous les cas, la sensibilité à la ribonucléase est de l'ordre de 85 à 95 p. 100.

La radioactivité incorporée dans les RNA est obtenue par soustraction de la radioactivité du matériel "RNase-résistant" à la radioactivité du matériel acido-précipitable total.

## R E S U L T A T S

Il est actuellement bien démontré que les cellules eucaryotes renferment trois classes de RNA polymérase-DNA dépendantes nommées I (A), II (B) et III (C). Celles-ci diffèrent par leur comportement chromatographique, leur structure et leur fonction, ainsi que par leur sensibilité vis-à-vis de l' $\alpha$ -amanitine (voir p. 10 ). Toutefois, la présence de plusieurs formes enzymatiques dans chaque classe ainsi que la localisation cytoplasmique de certaines RNA polymérase ne sont pas clairement démontrées. Une partie de notre travail a donc été orientée vers la mise en évidence de formes multiples de RNA polymérase dans les cellules KB ainsi que leur répartition entre le noyau et le cytoplasme.

### I) FORMES MULTIPLES DE RNA POLYMERASES DANS LES CELLULES KB

L'étude de la répartition cellulaire des différentes formes de RNA polymérase nécessite l'emploi de techniques de préparation de noyaux adéquates, évitant les fuites de matériel nucléaire vers le cytoplasme et permettant ainsi d'obtenir des fractions nucléaires et des surnageants cytoplasmiques les plus purs possible, ayant conservés leur intégralité d'origine. Ceci nous a conduit à utiliser différentes méthodes de préparation de noyaux.

#### A - ETUDE DE LA REPARTITION DES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES APRES SEPARATION DES NOYAUX PAR UN TAMPON AQUEUX : LE TMMT

1°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25 de l'extrait enzymatique nucléaire.

La DEAE-Sephadex est le seul échangeur d'ions qui, actuellement permet de mettre en évidence en une seule étape les différentes

formes de RNA polymérasés. La Figure 2 (p.35) montre le profil classique obtenu lorsqu'un extrait enzymatique nucléaire est chromatographié sur cet échangeur d'ions.

Lorsque les synthèses de RNA in vitro effectuées sur les fractions, sont réalisées en présence de DNA cellulaire, le profil d'élution montre un pic majeur d'activité : la RNA polymérase I qui s'élue en un pic non homogène à 0,1 M en sulfate d'ammonium. Deux activités RNA polymérasiques de type II (inhibée par l' $\alpha$ -amanitine à 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) nommées  $\text{II}_A$  (cette sous-classe est présente en très faible quantité, mais elle est constamment retrouvée) et  $\text{II}_B$ , s'éluant respectivement à 0,24 M et 0,26 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sont mises en évidence.

L'emploi simultané de l' $\alpha$ -amanitine à basse concentration et du poly[d(AT)] comme matrice (qui stimule l'activité des RNA polymérasés III) permet de révéler la présence de deux formes de RNA polymérasés III :  $\text{III}_A$  (C IIIa) et  $\text{III}_B$  (C IIIb) s'éluant respectivement à 0,3 M et 0,33 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Les noyaux préparés selon cette méthode contiennent donc plusieurs formes de RNA polymérasés I (A) (pic non homogène), deux formes de RNA polymérasés II :  $\text{II}_A$  (B I) et  $\text{II}_B$  (B II), et deux formes de RNA polymérasés III :  $\text{III}_A$  (C IIIa) et  $\text{III}_B$  (C IIIb).

## 2°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique cytoplasmique.

La chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex A-25 de l'extrait enzymatique cytoplasmique (Figure 3, p. 36) permet de déceler des pics d'activité RNA polymérasique non présents dans les extraits enzymatiques nucléaires.

Les synthèses de RNA in vitro effectuées sur les différentes fractions ont été réalisées en présence de DNA cellulaire d'une part et d'autre part en présence d' $\alpha$ -amanitine (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) et de poly[d(A-T)].

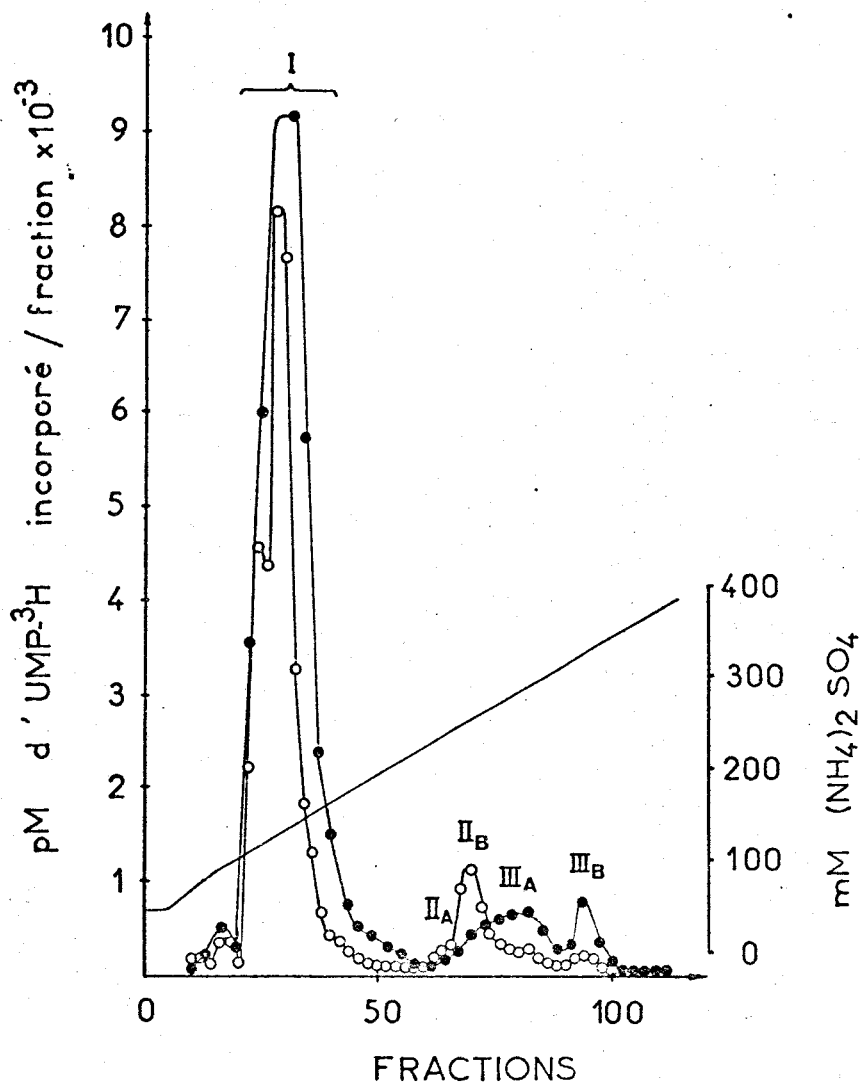


Figure 2

Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25 des RNA polymérase nucléaires (noyaux préparés dans un tampon aqueux, voir p. 22 ) de cellules KB.

L'extrait enzymatique nucléaire contenant 70 mg de protéines est chromatographié sur une colonne de 50 ml de DEAE-Sephadex. Les RNA polymérase sont éluées par un gradient (2 x 250 ml) linéaire de 40 à 425 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le TGED contenant 0,5 mg/ml de sérum albumine. Des fractions de 3,15 ml sont recueillies et l'activité est mesurée à une concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  résultant de la dilution de 50  $\mu\text{l}$  de solution enzymatique dans un volume final de 150  $\mu\text{l}$ . L'incorporation d'UMP- $^3\text{H}$  est mesurée en présence de DNA cellulaire (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( o—o ) et en présence de poly [d(A-T)] (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et d' $\alpha$ -amanitine (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( ●—● ).

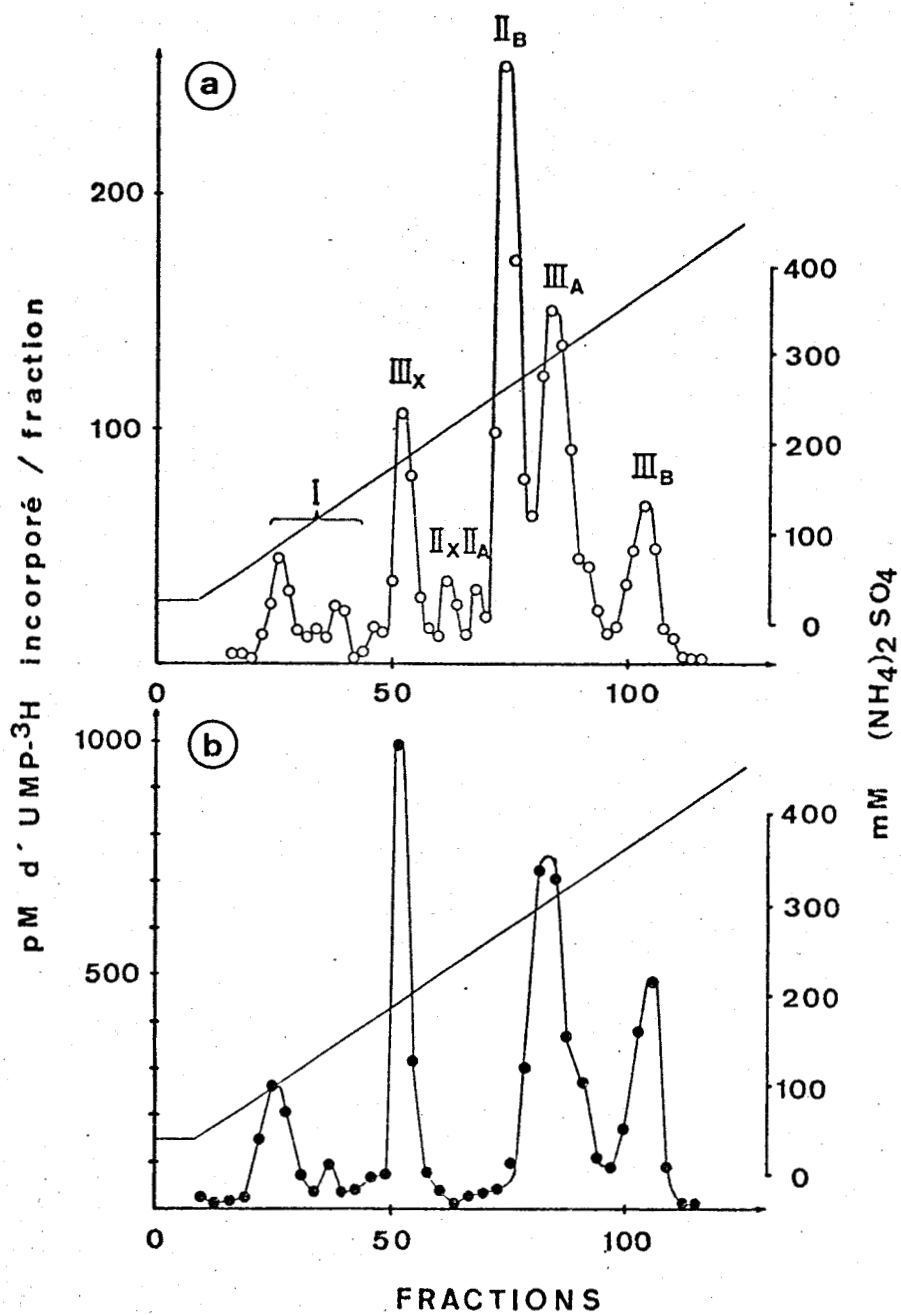


Figure 3

Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25 des RNA polymérase cytoplasmiques des cellules KB (noyaux préparés par les tampons TMMT). L'extrait enzymatique cytoplasmique contenant 35 mg de protéines est chromatographié sur une colonne de 20 ml de DEAE-Sephadex. Les RNA polymérase sont éluées par un gradient (2 x 125 ml) linéaire de 40 à 425 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le TGED contenant de la sérum albumine (0,5 mg/ml). Des fractions de 1,25 ml sont recueillies et leur activité est mesurée dans les conditions de salinité décrites précédemment (figure 2, p. 35). L'incorporation d'UMP-<sup>3</sup>H est mesurée en présence de DNA cellulaire (15 µg/ml) (A o—o) et en présence de poly[d(A-T)] (15 µg/ml) et d'α-amanitine (0,1 µg/ml) (B ●—●).

Les profils d'élution obtenus montrent que les RNA polymérase de type I (non inhibées par l' $\alpha$ -amanitine) s'éluant à 0,1 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ne sont présentes qu'en quantité très faible dans le cytoplasme (0,5 % de l'activité de type I totale). Trois sous-classes de RNA polymérase II, sensibles à l' $\alpha$ -amanitine à basse concentration sont mise en évidence. Elles seront dénommées II<sub>x</sub> (Bx), II<sub>A</sub> (BI) et II<sub>B</sub> (BII). Celles-ci s'éluent respectivement à 0,22 M, 0,24 M et 0,27 M en sulfate d'ammonium. La forme II<sub>A</sub> est, dans ce cas aussi, présente en faible quantité mais elle a été retrouvée dans tous les extraits enzymatiques cytoplasmiques examinés. De même, trois sous-classes de RNA polymérase III ont été obtenues. Leurs activités ne sont pas inhibées par l' $\alpha$ -amanitine à basse concentration (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) et sont augmentées en utilisant le poly[d(A-T)] comme matrice : la RNA polymérase III<sub>x</sub> (CI - CII) s'éluant à 0,2 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avant les RNA polymérase II, les RNA polymérase III<sub>A</sub> (CIIIa) et III<sub>B</sub> (CIIIb) s'éluent à 0,31 et 0,37 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Donc deux activités nouvelles II<sub>x</sub> et III<sub>x</sub> sont décelées dans cet extrait enzymatique cytoplasmique obtenu en préparant les noyaux dans le tampon TMMT.

### 3°) Sensibilité à l' $\alpha$ -amanitine des différentes classes de RNA polymérase

L'effet de l' $\alpha$ -amanitine à des concentrations croissantes sur les RNA polymérase cytoplasmiques de cellules KB est montré dans la figure 4 (p. 38). Comme il l'a été démontré pour d'autres RNA polymérase-DNA dépendantes nucléaires de cellules animales (voir p. 12) l'activité I n'est pas inhibée par l' $\alpha$ -amanitine même à la concentration de 300  $\mu\text{g/ml}$ . Les activités de type II (II<sub>x</sub> et II<sub>B</sub>) montrent des courbes identiques de sensibilité à l' $\alpha$ -amanitine : elles sont totalement inhibées par des concentrations de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Les trois enzymes de type III montrent aussi des courbes identiques de sensibilité à cette toxine : leurs activités sont totalement inhibées par des concentrations supérieures à 300  $\mu\text{g/ml}$ .

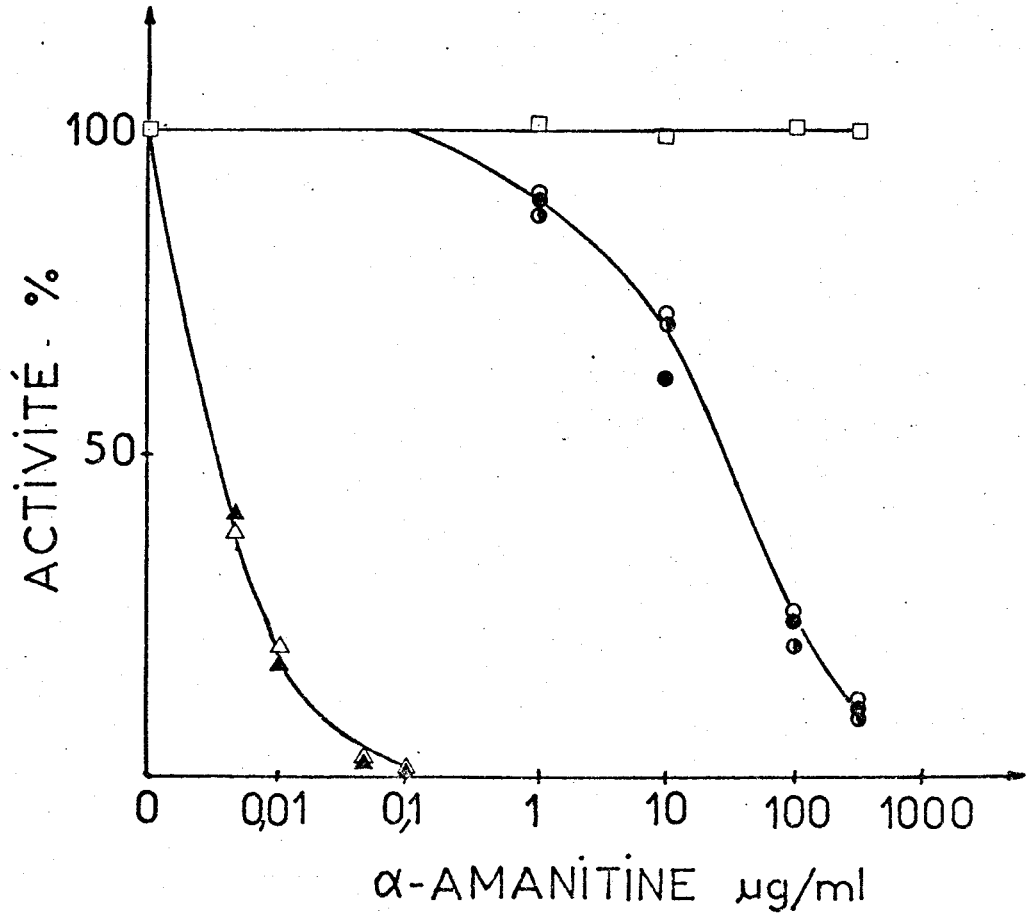


Figure 4

Effet de l'α-amanitine sur l'activité des RNA polymérase cytoplasmiques des cellules KB.

Les RNA polymérase I, II<sub>x</sub>, II<sub>B</sub>, III<sub>x</sub>, III<sub>A</sub>, III<sub>B</sub> ont été obtenues par chromatographie sur DEAE-Sephadex (voir figure 3, p. 36). L'activité des différentes formes enzymatiques est mesurée en présence de DNA cellulaire (15 μg/ml) à une concentration en sulfate d'ammonium résultant de la dilution de 40 μl de solution enzymatique dans un volume final de 150 μl.

- RNA polymérase I □—□
- RNA polymérase II<sub>x</sub> △—△
- RNA polymérase II<sub>B</sub> ▲—▲
- RNA polymérase III<sub>x</sub> ○—○
- RNA polymérase III<sub>A</sub> ●—●
- RNA polymérase III<sub>B</sub> ○—○



#### 4°) Comportement des RNA polymérase II<sub>x</sub> et II<sub>B</sub> en gradient de glycérol

Après concentration sur DEAE-Sephadex et dialyse contre un tampon ne contenant pas de glycérol, les formes II<sub>x</sub> et II<sub>B</sub> sont déposées sur gradient de glycérol.

La figure 5 (p. 40) montre que la forme II<sub>x</sub> sédimente de la même façon que la forme II<sub>B</sub>. Ces deux formes ont donc un coefficient de sédimentation similaire et donc vraisemblablement des masses moléculaires très voisines.

#### 5°) Observation des noyaux en microscopie électronique\*

La fraction nucléaire obtenue par cette méthode a été contrôlée en microscopie électronique. Les images obtenues (figure 6, p. 41) montrent des noyaux vidés d'une grande partie de leur matériel nucléoplasmique ; cependant le nucléole semble bien conservé.

D'autre part, la fraction nucléaire renferme de nombreuses contaminations cytoplasmiques (nombreuses vésicules, membranes etc...).

Les cellules KB renferment donc de nombreuses activités RNA polymérasiques de type I, II et III. La chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex des extraits enzymatiques nucléaires et cytoplasmiques permet de dénombrer les RNA polymérase I (vraisemblablement plusieurs formes s'éluant à des concentrations voisines en sulfate d'ammonium), II<sub>x</sub>, II<sub>A</sub>, II<sub>B</sub>, III<sub>x</sub>, III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub>. Les activités II<sub>x</sub> et III<sub>x</sub> sont mises en évidence dans le surnageant cytoplasmique.

Cependant les noyaux ainsi obtenus n'ont pas gardé leur structure d'origine : si le nucléole est bien conservé (0,5 p. 100 de l'activité I cellulaire est retrouvée dans le cytoplasme) une grande partie du matériel nucléoplasmique a diffusé vers le cytoplasme. En effet 30 p. 100 des RNA polymérase II et III sont retrouvées dans le surnageant cytoplasmique. Ceci nous a conduit à employer des méthodes de préparation de noyaux utilisant des solutions isotoniques contenant du saccharose.

---

\* Les contrôles de microscopie électronique ont été effectués par Monsieur Bruno SAURON, Service de Monsieur BOUTEILLE, que nous remercions.



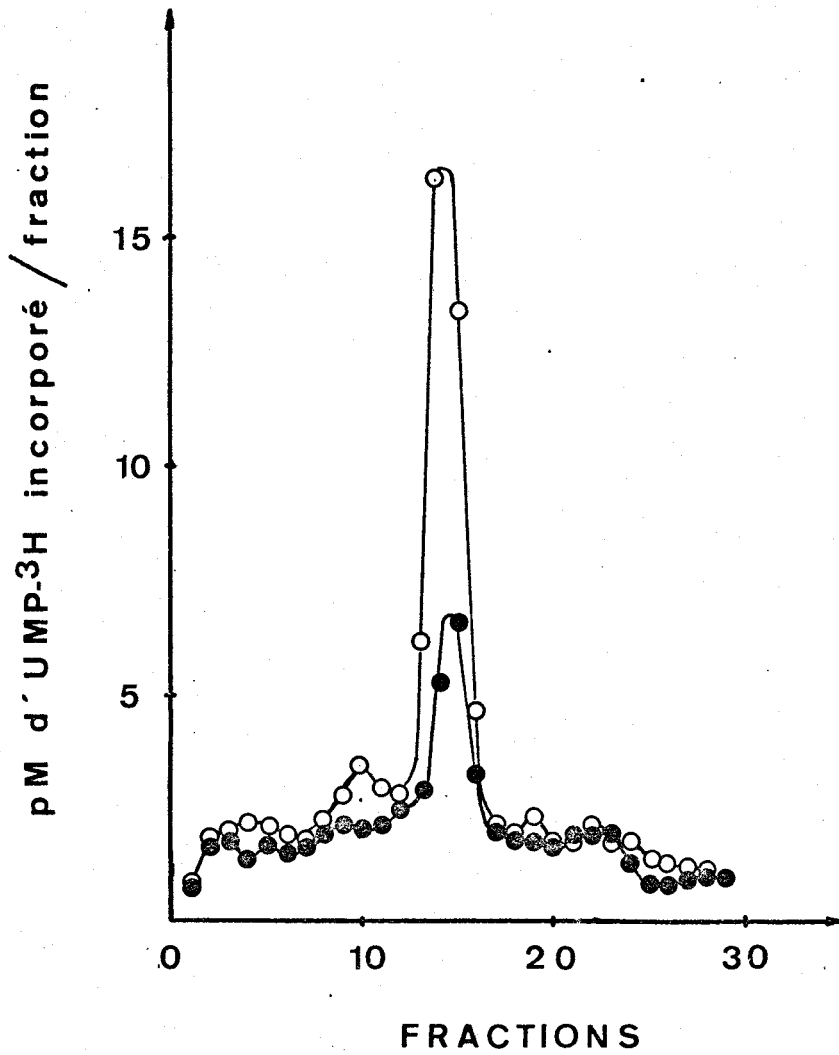


Figure 5

Sédimentation des RNA polymérases II<sub>x</sub> et II<sub>B</sub> en gradient de glycérol.

Après dialyse contre un tampon ne contenant pas de glycérol, les formes II<sub>x</sub> et II<sub>B</sub> (dépôt 1 ml) sont déposées sur des gradients (10 ml) de glycérol de 10 à 40 p. 100 (poids/volume).

La centrifugation s'effectue dans le rotor SW 41 pendant 16 heures à 36 000 tours/mn à 4°C. Des fractions de 250 µl sont recueillies et leur activité enzymatique est mesurée en présence de DNA cellulaire

( ● ——— ● forme II<sub>x</sub>, ○ ——— ○ forme II<sub>B</sub> ).



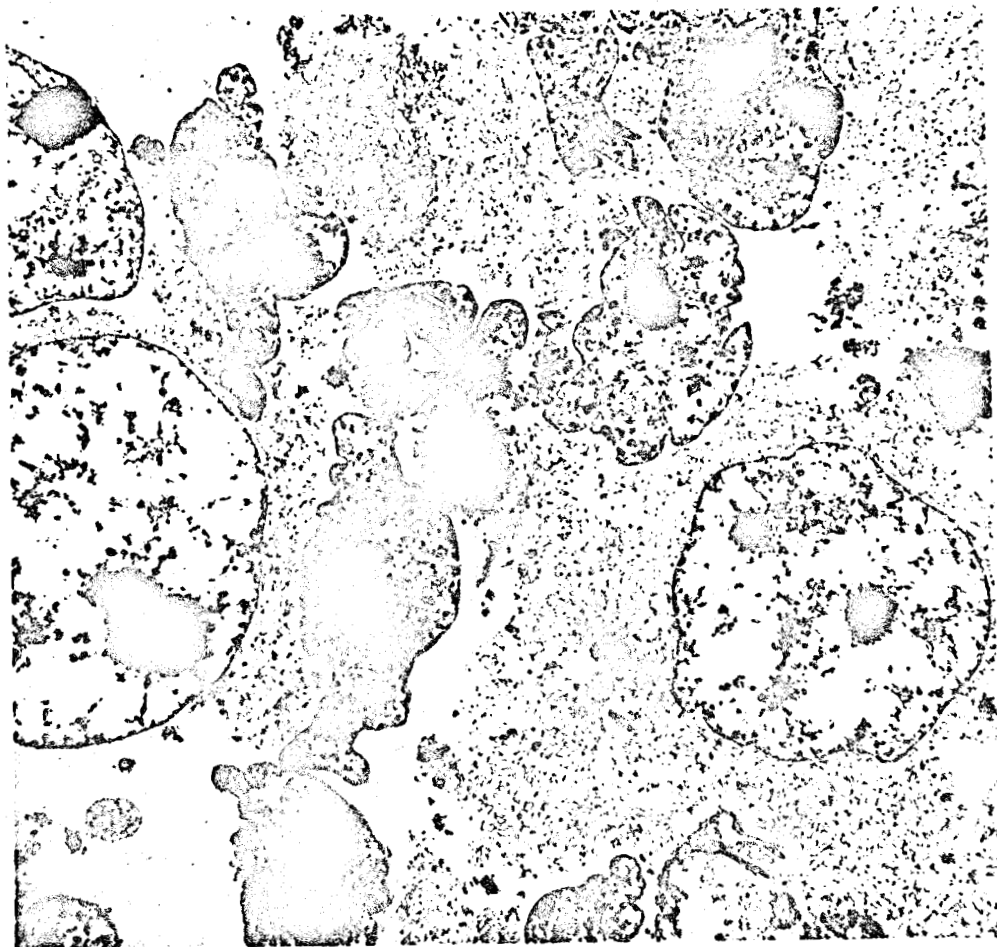


Figure 6

Fraction nucléaire obtenue par la méthode d'extraction de noyaux de cellules KB utilisant les tampons aqueux (TMMT).

B - ETUDE DE LA REPARTITION DES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES  
APRES SEPARATION DES NOYAUX PAR LA METHODE DE  
BERKOWITZ (188)

1°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait  
enzymatique nucléaire

Celle-ci montre deux pics d'activité : les RNA polymérase I et II (figure 7, p. 43). La RNA polymérase I s'élué à 0,13 M en sulfate d'ammonium. Deux formes de RNA polymérase II sont mises en évidence : le type II<sub>A</sub> s'éluant à 0,24 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et le type II<sub>B</sub> s'éluant à 0,26 M en sulfate d'ammonium.

Les RNA polymérase III (III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub>) ne sont présentes qu'en quantité infime.

2°) Observation des noyaux en microscopie électronique

La figure 8, (p. 44) montre les noyaux obtenus par cette méthode. Ceux-ci semblent avoir gardé leur structure d'origine. Cependant, nous pouvons observer des contaminations cytoplasmiques (membranes internes et vésicules). On pourrait s'attendre à ce que les noyaux contiennent plus de RNA polymérase III. La perte de ces formes est vraisemblablement due à l'utilisation d'un tampon contenant de grandes concentrations en NaCl lors de la préparation des noyaux.

C - NOYAUX PURIFIES PAR UNE METHODE DERIVEE DE CELLE DE  
CHAUVEAU et al. (189)

Les tampons aqueux ou isotoniques provoquent des fuites de matériel hors des noyaux lors de leur préparation, (YEN-CHIU LIN et al. 190) nous avons utilisés des solutions hypertoniques contenant de hautes concentrations en ions bivalents. En effet il a été montré (SCHWARTZ, observations non publiées) que les noyaux isolés en présence d'une faible

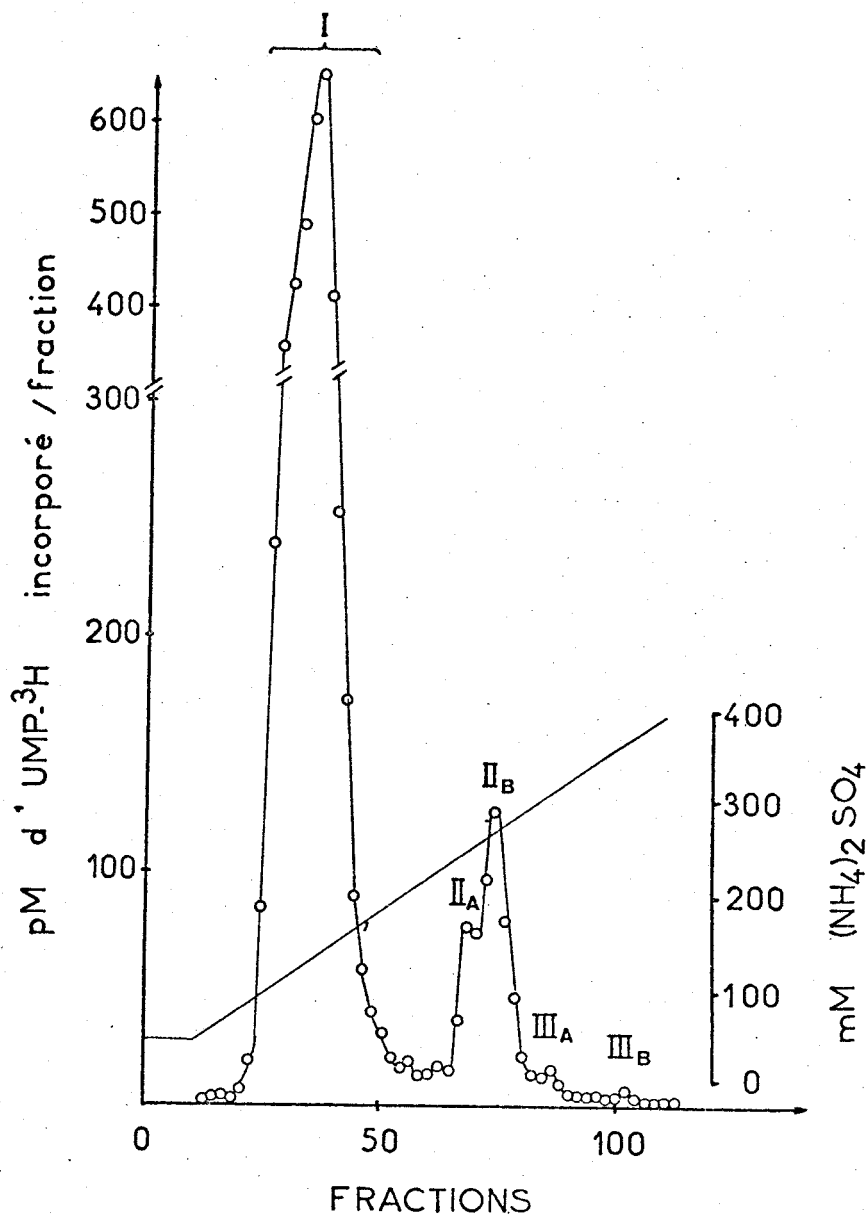


Figure 7

Chromatographie sur DEAE-Sephadex des RNA polymérase nucléaires de cellules KB : noyaux préparés par la méthode de BERKOWITZ.

L'extrait enzymatique contenant 60 mg de protéines est chromatographié sur une colonne de 30 ml de DEAE-Sephadex. Les RNA polymérase sont éluées par un gradient linéaire (2 x 125 ml) de 40 à 425 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Des fractions de 2 ml sont collectées. L'activité enzymatique est mesurée en présence de DNA cellulaire ( o — o ).

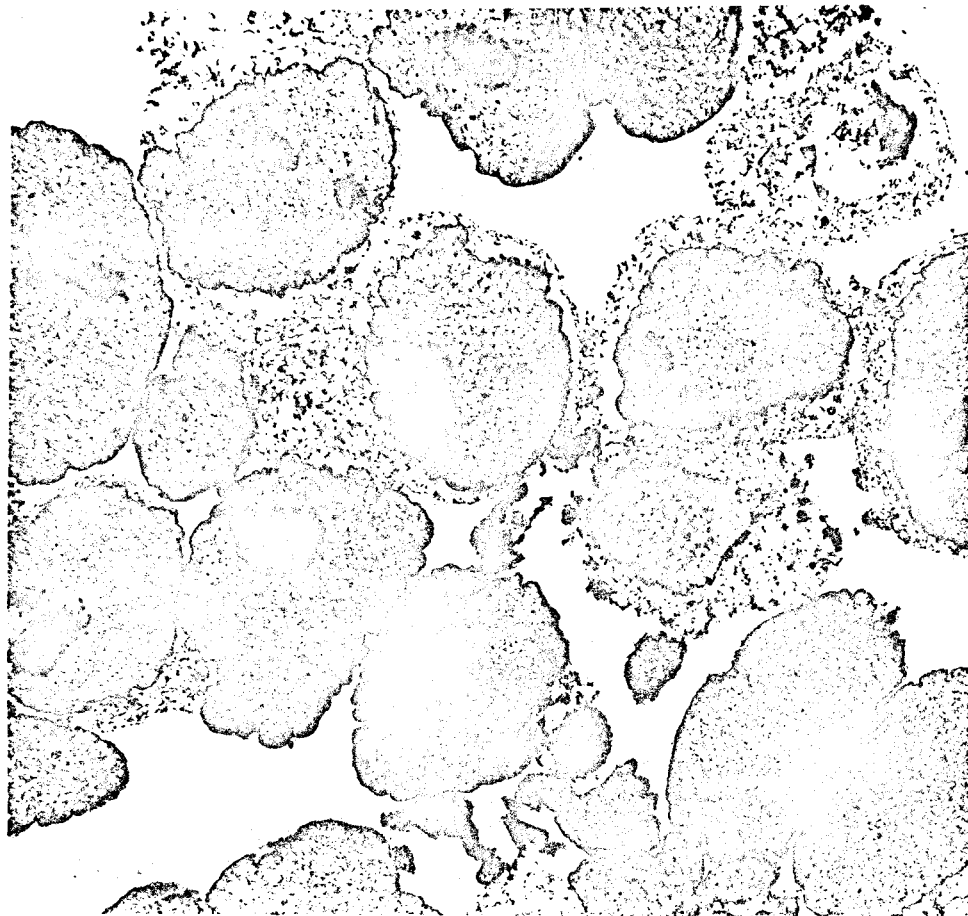


Figure 8

Fraction nucléaire obtenue par la méthode de BERKOWITZ.



concentration en  $Mg^{2+}$  contiennent moins de RNA polymérase II et  $III_A$  que les noyaux isolés en présence d'une grande concentration en  $Mg^{2+}$ .

### 1°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique nucléaire

Les synthèses de RNA *in vitro* effectuées en présence de différentes matrices (Figure 9 a, p. 46), décèlent les formes multiples de RNA polymérase présentes dans les noyaux préparés selon cette méthode.

Les RNA polymérase I s'éluent à environ 0,1 - 0,15 M en sulfate d'ammonium. Le pic obtenu est un pic non homogène.

Deux activités RNA polymérasiques II sont révélées. En effet, elles sont inhibées par l' $\alpha$ -amanitine à la concentration de 0,1  $\mu g/ml$  et leur activité est augmentée quand un DNA dénaturé est utilisé comme matrice. La RNA polymérase  $II_A$  s'éluë à 0,24 M en sulfate d'ammonium, la  $II_B$  s'éluë à 0,26 M en  $(NH_4)_2SO_4$ .

En utilisant le poly[d(A-T)] comme matrice, les RNA polymérase I et une seule forme de RNA polymérase III sont mises en évidence. La RNA polymérase  $III_A$  non inhibée par l' $\alpha$ -amanitine à basse concentration, s'éluë à 0,3 M en sulfate d'ammonium. D'autre part, lorsque l'activité enzymatique des différentes fractions est mesurée en présence d' $\alpha$ -amanitine à 0,1  $\mu g/ml$  et à haute force ionique (figure 9 B, p. 46), le profil d'éluion obtenu fait apparaître la forme enzymatique  $III_x$  qui s'éluë à 0,18 M en  $(NH_4)_2SO_4$ .

### 2°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique cytoplasmique

Le profil d'éluion des RNA polymérase cytoplasmiques (figure 10, p. 47) permet de dénombrer sept pics d'activité RNA polymérasique.

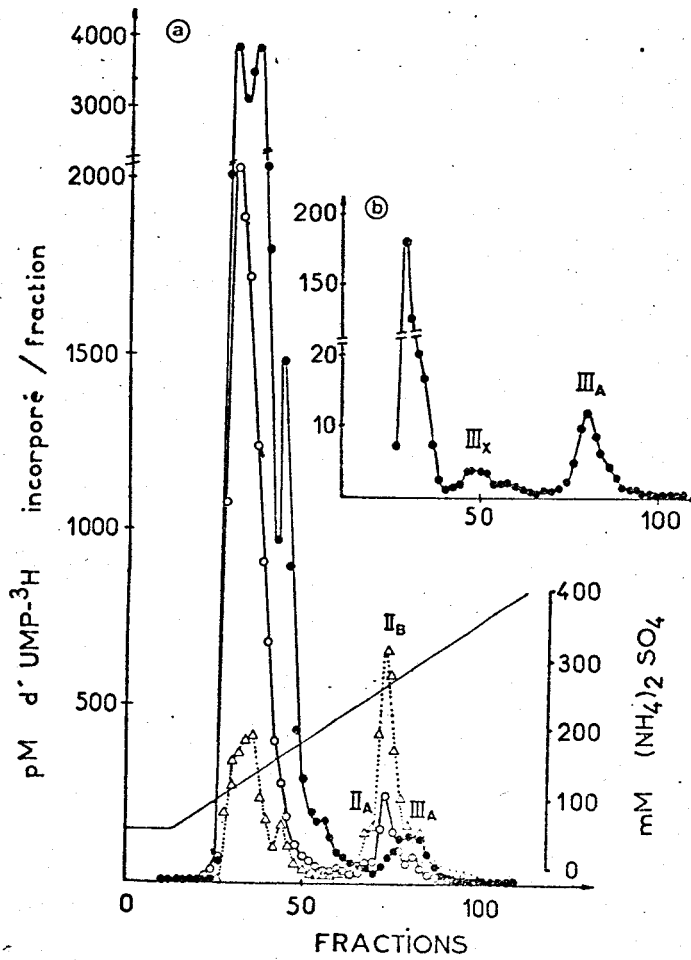


Figure 9

Chromatographie sur DEAE-Sephadex des RNA polymérase nucléaires, noyaux purifiés par une méthode dérivée de celle de CHAUCHEAU.

L'extrait enzymatique contenant 16 mg de protéines est chromatographié sur une colonne de 20 ml de DEAE-Sephadex. Les RNA polymérase sont éluées par un gradient linéaire (2 x 100 ml) de 40 à 425 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le TGED contenant de la sérum albumine (0,5 mg/ml). Des fractions de 1,5 ml sont recueillies. D'une part, l'activité est mesurée à une concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  résultant de la dilution de 50  $\mu\text{l}$  de solution enzymatique dans un volume final de 150  $\mu\text{l}$  (A). L'incorporation d'UMP- $^3\text{H}$  est mesurée en présence de DNA cellulaire 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\circ\text{---}\circ$ , en présence de poly[d(A-T)] (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et d' $\alpha$ -amanitine (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  $\bullet\text{---}\bullet$ , en présence de DNA cellulaire dénaturé 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\Delta\text{---}\Delta$ .

D'autre part, l'activité enzymatique est mesurée à une concentration en sulfate d'ammonium résultant de la dilution de 100  $\mu\text{l}$  de solution enzymatique dans un volume final de 150  $\mu\text{l}$  (B)  $\bullet\text{---}\bullet$ .

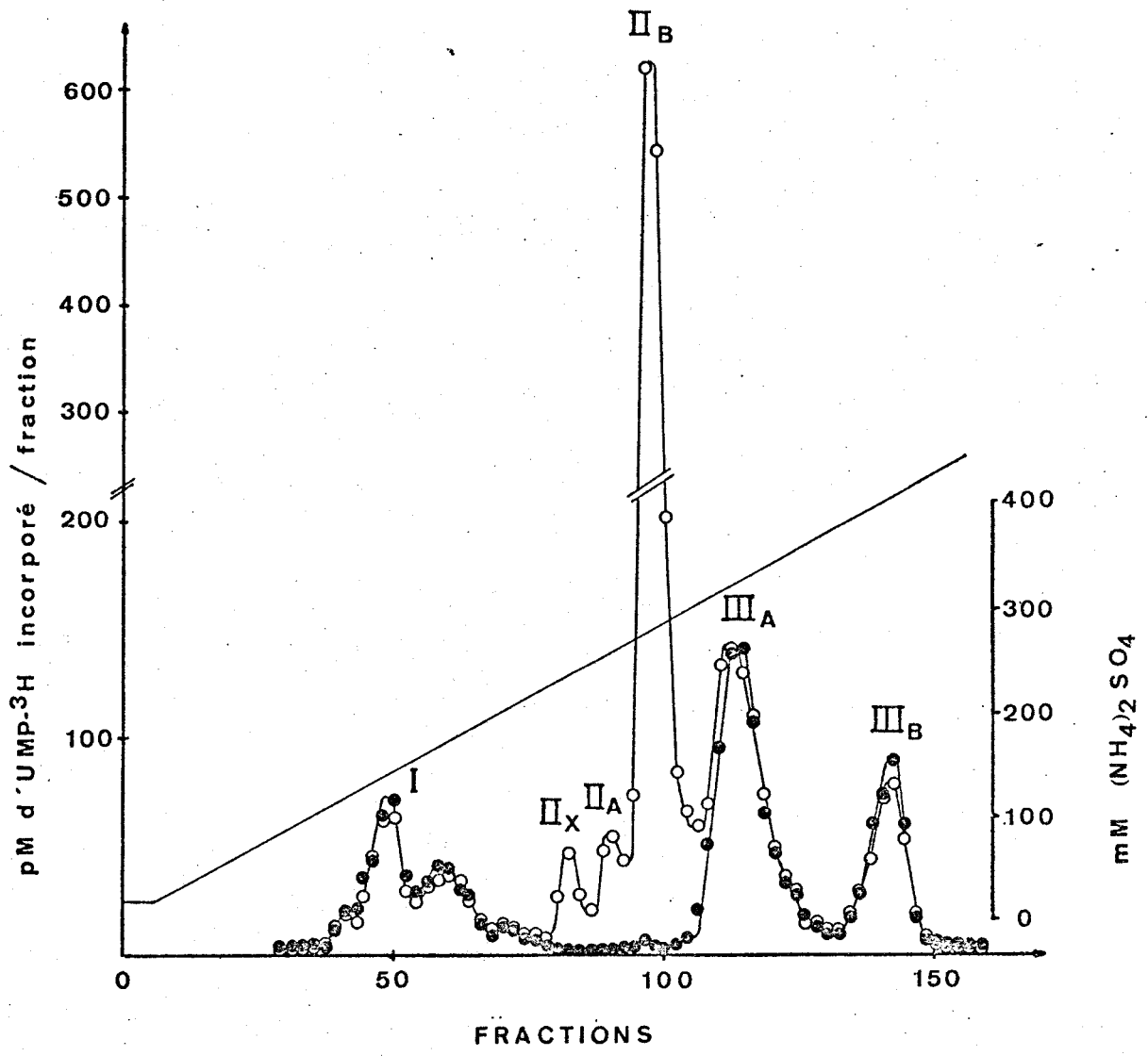


Figure 10

Chromatographie sur DEAE-Sephadex des RNA polymérase cytoplasmiques : noyaux préparés par une méthode dérivée de celle de CHAUVÉAU.

L'extrait enzymatique cytoplasmique contenant 98 mg de protéines est chromatographié sur une colonne de 50 ml de DEAE-Sephadex A-25. Les RNA polymérase sont éluées par un gradient linéaire (2 x 250 ml) de 40 à 425 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le TGED. Des fractions de 3 ml sont collectées. Leur activité a été mesurée à une concentration en sulfate d'ammonium résultant de la dilution de 50  $\mu\text{l}$  de solution enzymatique dans un volume final de 150  $\mu\text{l}$ . L'incorporation d'UMP- $^3\text{H}$  est mesurée en présence de DNA cellulaire (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sans  $\alpha$ -amanitine (o—o) et avec  $\alpha$ -amanitine (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (●—●).





Deux types de RNA polymérase I s'éluant à 0,15 et 0,17 M en sulfate d'ammonium, sont présents en faible quantité dans le surnageant cytoplasmique.

Trois pics d'activités s'éluant à 0,22 M, 0,24 M et 0,27 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , inhibés par de faibles concentrations en  $\alpha$ -amanitine, traduisent la présence des RNA polymérase IIx, II<sub>A</sub> et II<sub>B</sub>.

Cependant nous n'avons pu déceler dans cette fraction cytoplasmique que deux formes enzymatiques III : les RNA polymérase III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub> s'éluant respectivement à 0,31 M et 0,37 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### 3°) Observation des noyaux en microscope électronique

La figure 11 (p. 49) montre les noyaux obtenus par cette méthode. Ceux-ci ont conservés une grande partie de leur matériel nucléoplasmique. Le nucléole montre un centre fibrillaire légèrement retracts du à la concentration importante en  $\text{Mg}^{2+}$  (15 mM). Cependant, l'activité RNA polymérase I est très faible dans le cytoplasme. D'autre part la fraction nucléaire renferme très peu de contaminations cytoplasmiques (débris cytoplasmiques accrochés à la membrane périnucléaire).

Les noyaux observés sont très proches de leur état initial et de pureté satisfaisante.

La préparation de noyaux purifiés permet de mettre en évidence toutes les formes enzymatiques décrites précédemment. De plus, les fuites de matériel hors des noyaux sont limitées. En effet, les RNA polymérase de type III sont retrouvées en quantité moins importante dans le surnageant cytoplasmique (tableau III, p. 50) et l'activité IIIx n'est mise en évidence que dans la fraction nucléaire.

La chromatographie sur DEAE-Sephadex de la fraction nucléaire et du surnageant cytoplasmique montre donc qu'à part les formes IIx et III<sub>B</sub>, les autres formes sont retrouvées en majorité dans le noyau.

### D - NOYAUX PURIFIES TRAITES PAR LE TRITON X-100

Les deux premières méthodes de préparation de noyaux décrites précédemment utilisent des tampons contenant du Triton X-100.

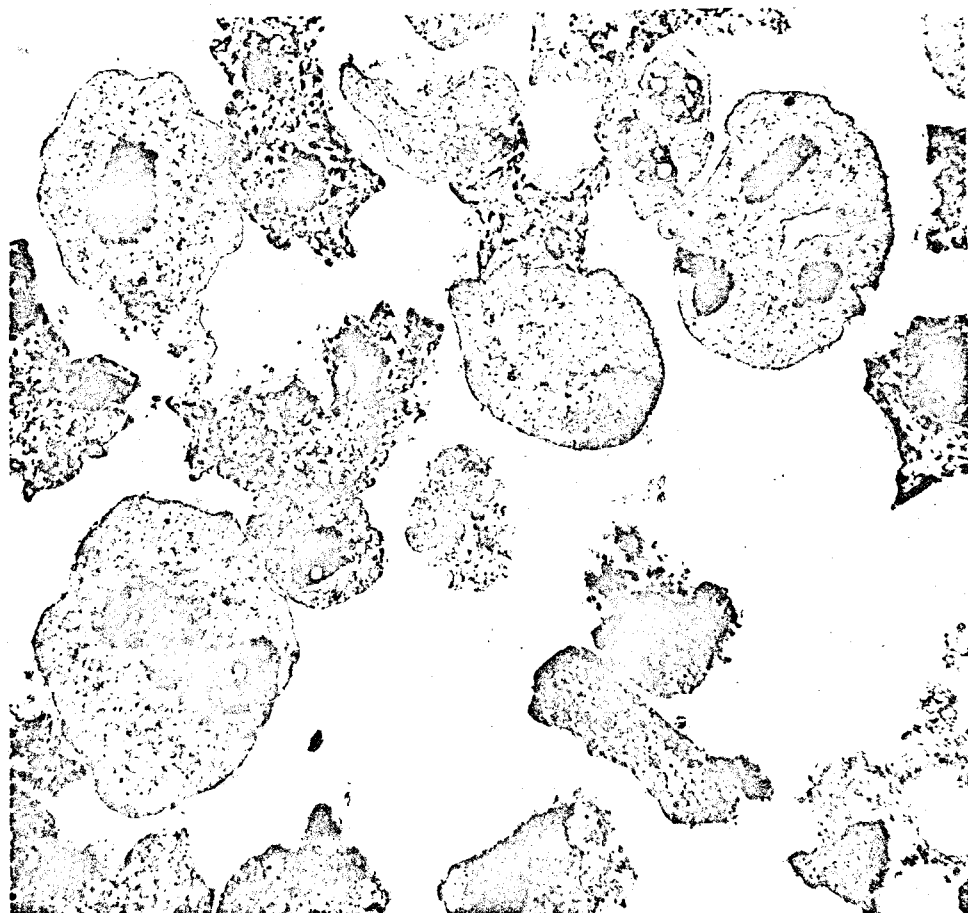


Figure 11

Noyaux de cellules KB obtenus par la méthode dérivée de celle de CHAUCHEAU.

TABLEAU III

COMPARAISON DES ACTIVITES DES RNA POLYMERASES CYTOPLASMIQUES

	POURCENTAGE D'ACTIVITE DES RNA POLYMERASES POLYMERASIQUES						
	I	II <sub>x</sub>	II <sub>A</sub>	II <sub>B</sub>	III <sub>x</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>
Méthode utilisant les tampons aqueux TMMT	3,6	3,6	2,4	28,6	12,5	32,2	11
		34,6			55,7		
Méthode dérivée de celle de CHAUVEAU	13,2	3,6	4,8	46,7	-	21,3	10,2
		57,1			31,5		



Par contre, la dernière méthode utilisée n'emploie pas ce détergent. Il était intéressant de savoir si celui-ci est capable de détacher des membranes périnucléaires des formes mineures de RNA polymérase (IIIx par exemple) qui pourraient alors diffuser vers le cytoplasme.

### 1°) Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique nucléaire

Les profils d'élution obtenus ne montrent pas de différence importante entre les noyaux purifiés traités (figure 12, p. 52 ) et non traités par le Triton (figure 10, p. 47 ). Ils permettent de déceler trois types de RNA polymérase I s'éluant à 0,13, 0,16 et 0,17 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , deux activités enzymatiques de type II : II<sub>A</sub> et II<sub>B</sub> éluées à des molarités de 0,26 et 0,28 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . L'activité enzymatique des fractions mesurée à haute force ionique révèle la présence des RNA polymérase IIIx et III<sub>A</sub> s'éluant à 0,18 M et 0,31 M en sulfate d'ammonium. De plus, les noyaux tritonnés et non tritonnés renferment ces différentes classes enzymatiques dans les mêmes rapports d'activité.

### 2°) Observation des noyaux en microscopie électronique

La figure 13 (p. 53) montre les noyaux obtenus par cette méthode de préparation. Il en ressort que :

- La masse nucléoplasmique est restée concentrée dans dans le noyau.
- Le nucléole et en particulier les centres fibrillaires ne semblent pas altérés. La présence de grandes concentrations en  $\text{Mg}^{++}$  ont donc un effet sur la rétraction de ces centres fibrillaires.
- Enfin le traitement par le triton X-100 a pour effet de décaper la membrane externe du noyau décrochant ainsi tous les restes des membranes intracytoplasmiques pouvant y adhérer. De plus, l'emploi de ce détergent ne semble pas favoriser la fuite de matériel hors du noyau.

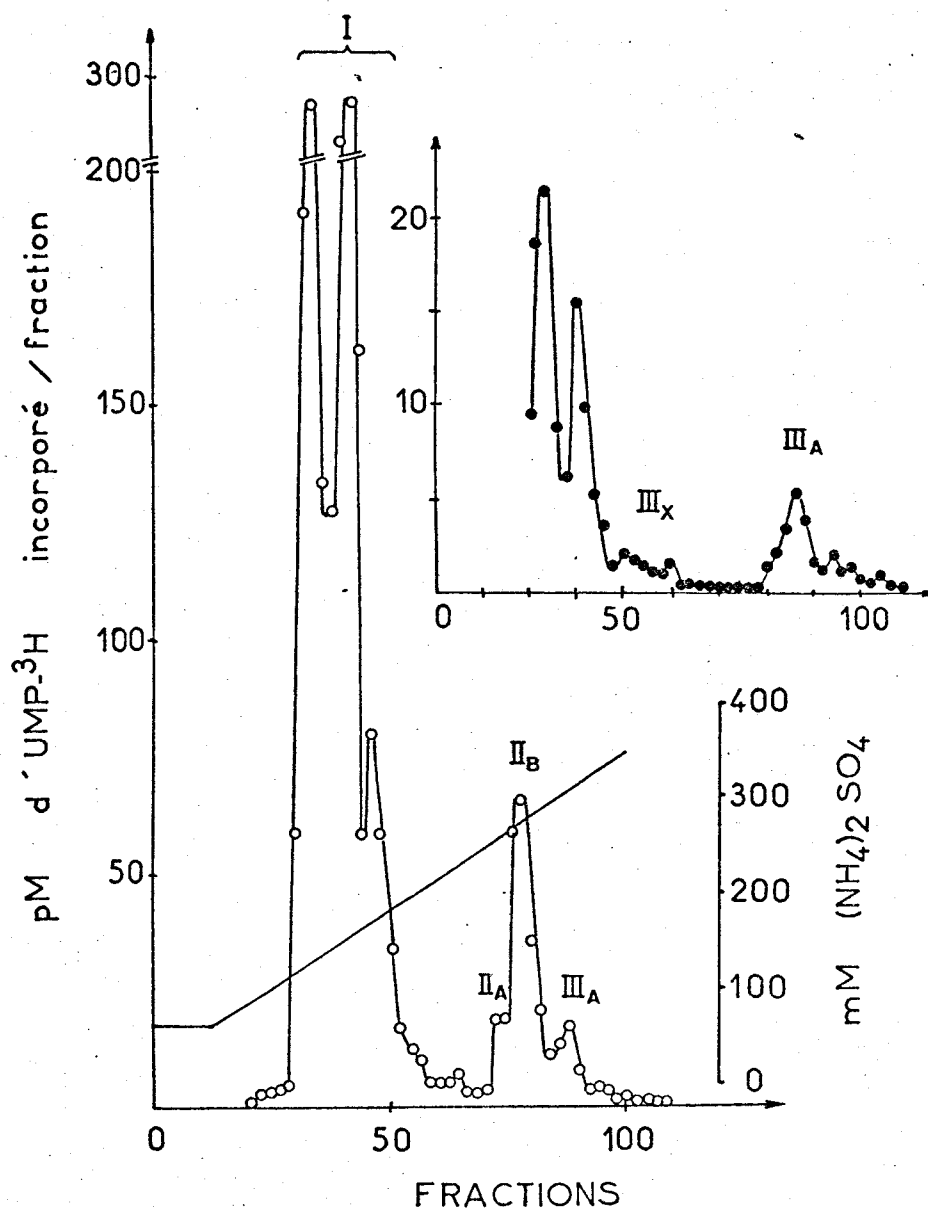


Figure 12

Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique nucléaire obtenu à partir de noyaux purifiés tritonnés.

L'extrait enzymatique contenant 16 mg de protéines est chromatographié sur une colonne de 20 ml de DEAE-Sephadex. Les RNA polymérases sont éluées par un gradient linéaire (20 x 100 ml) de 40 à 425 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le TGED contenant de la serum albumine (0,5 mg/ml). Des fractions de 1,5 ml sont recueillies. L'activité est mesurée en présence de DNA cellulaire (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), d'une part à une concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  résultant de la dilution de 50  $\mu\text{l}$  de solution enzymatique dans un volume final de 150  $\mu\text{l}$  (o—o), d'autre part à une concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  résultant de la dilution de 100  $\mu\text{l}$  de solution enzymatique dans un volume final de 150  $\mu\text{l}$  et en présence d' $\alpha$ -amanitine (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (●—●)

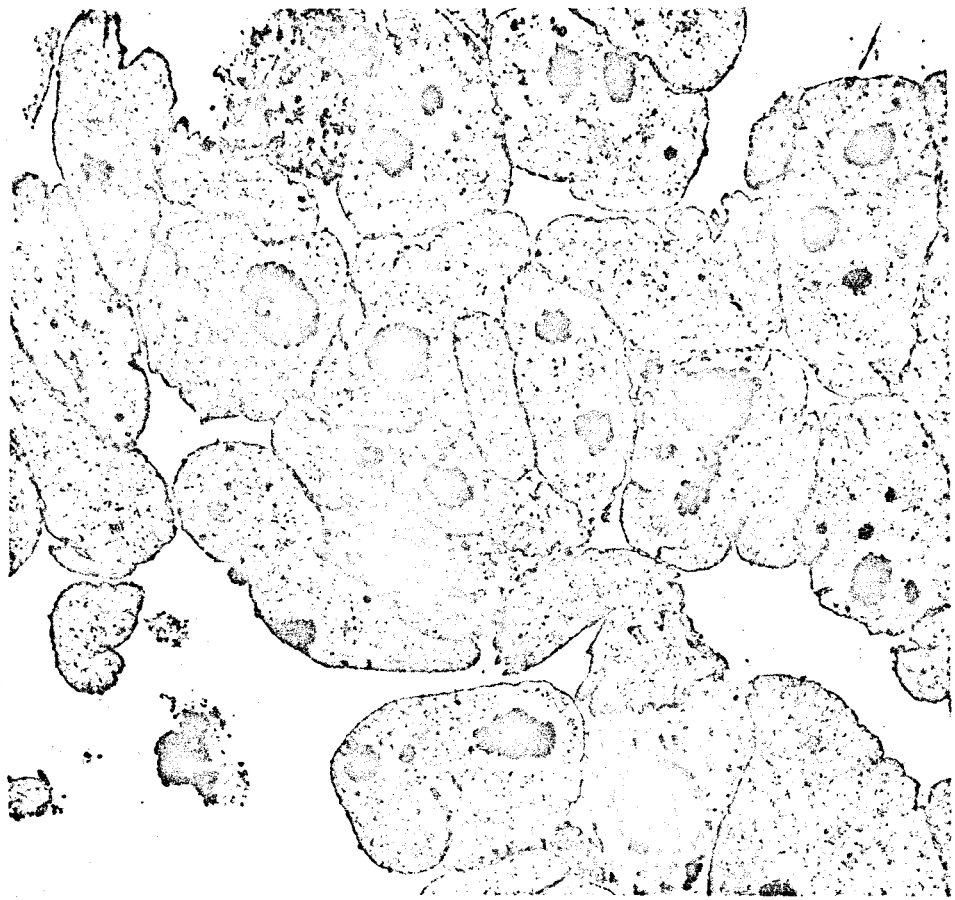


Figure 13

Noyaux des cellules KB purifiés par la méthode de CHAUVÉAU et traités par le Triton X-100.

L'emploi de cette méthode permet donc d'obtenir des noyaux purifiés ayant maintenus leur aspect d'origine et contenant les RNA polymérase nucléaires. Elle se révèle être une méthode de choix pour l'étude de la transcription dans les noyaux isolés.

## II) MISE EN EVIDENCE DE PLUSIEURS FORMES DE RNA POLYMERASES I

L'étude de la répartition cellulaire des différentes classes de RNA polymérase a montré que, quelque soit la méthode de préparation de noyaux employée, l'activité enzymatique de type I s'élue sur DEAE-Sephadex en un pic non homogène : dans le meilleur cas de séparation, trois pics d'activité sont mis en évidence.

### A - RECHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX

Après dialyse de 16 heures contre le tampon TGED ne contenant pas de sulfate d'ammonium, les RNA polymérase I obtenues par chromatographie sur DEAE-Sephadex d'un extrait enzymatique nucléaire sont rechromatographiées sur le même échangeur d'ions (figure 14, p. 55). De nouveau un pic non homogène est obtenu. Il renferme trois activités enzymatiques distinctes s'éluant à 0,09 M, 0,11 M et 0,13 M en sulfate d'ammonium. En outre, les formes  $I_{A_0}$  et  $I_A$  obtenues par chromatographie sur phosphocellulose (voir ci-dessous) peuvent être rechromatographiées sur DEAE-Sephadex (résultats non présentés), la forme  $I_{A_0}$  s'élue à 0,09 M en  $(NH_4)_2SO_4$ , la forme  $I_A$  s'élue à 0,13 M en  $(NH_4)_2SO_4$ . Ceci suggère que la séparation initiale sur DEAE-Sephadex n'est pas le fait d'un artéfact de chromatographie.

### B - RECHROMATOGRAPHIE SUR PHOSPHOCELLULOSE

Après dialyse, les activités I obtenues par chromatographie sur DEAE-Sephadex d'un extrait enzymatique nucléaire, sont rechromatographiées sur phosphocellulose (figure 15, p. 56). L'activité des

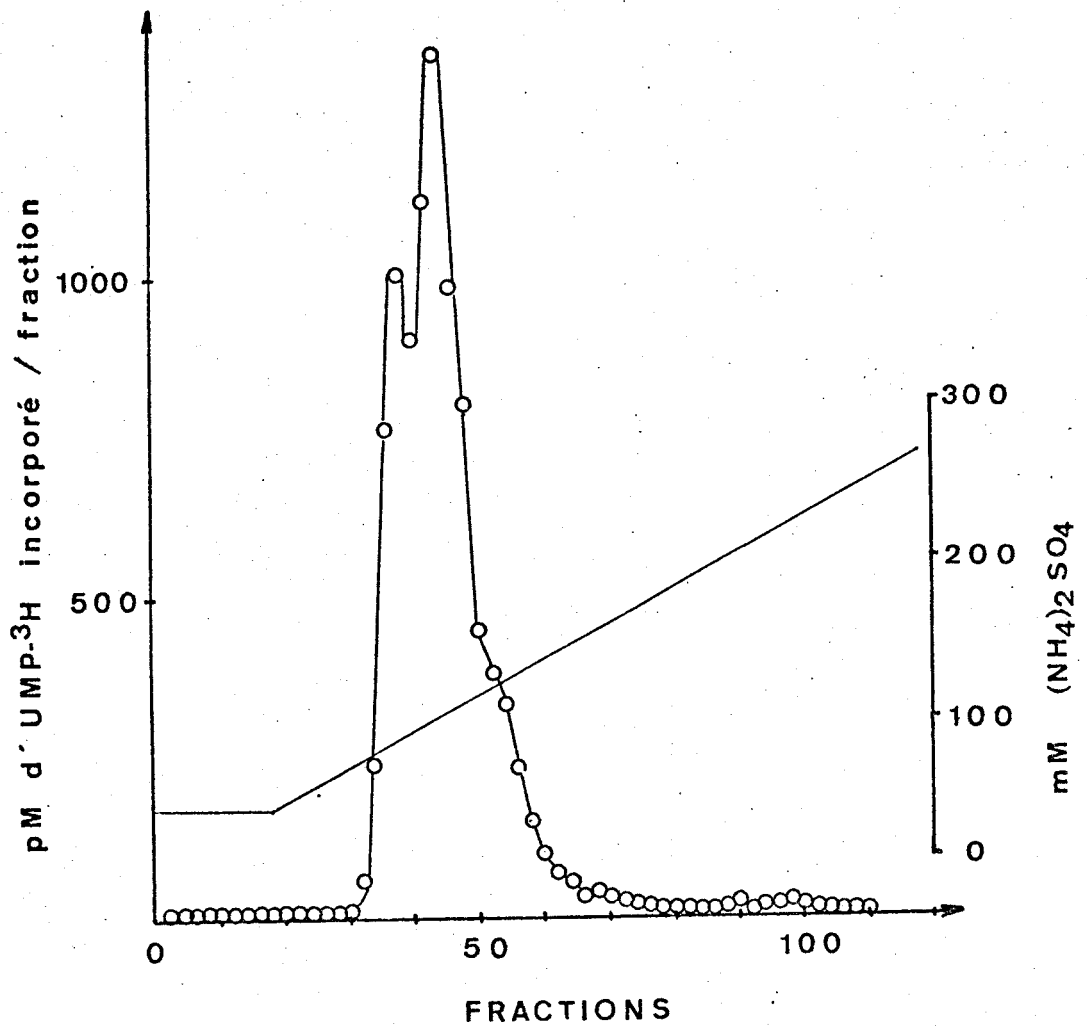


Figure 14

Rechromatographie des RNA polymérase I sur DEAE-Sephadex.

Les RNA polymérase I (22 mg de protéines) de DEAE-Sephadex sont rechromatographiées sur une colonne de 20 ml de DEAE-Sephadex A-25. Elles sont éluées par un gradient linéaire (2 x 100 ml) de 50 à 300 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans le TGED. Des fractions de 1,5 ml sont collectées et leur activité enzymatique est mesurée en présence de DNA cellulaire (15 µg/ml)





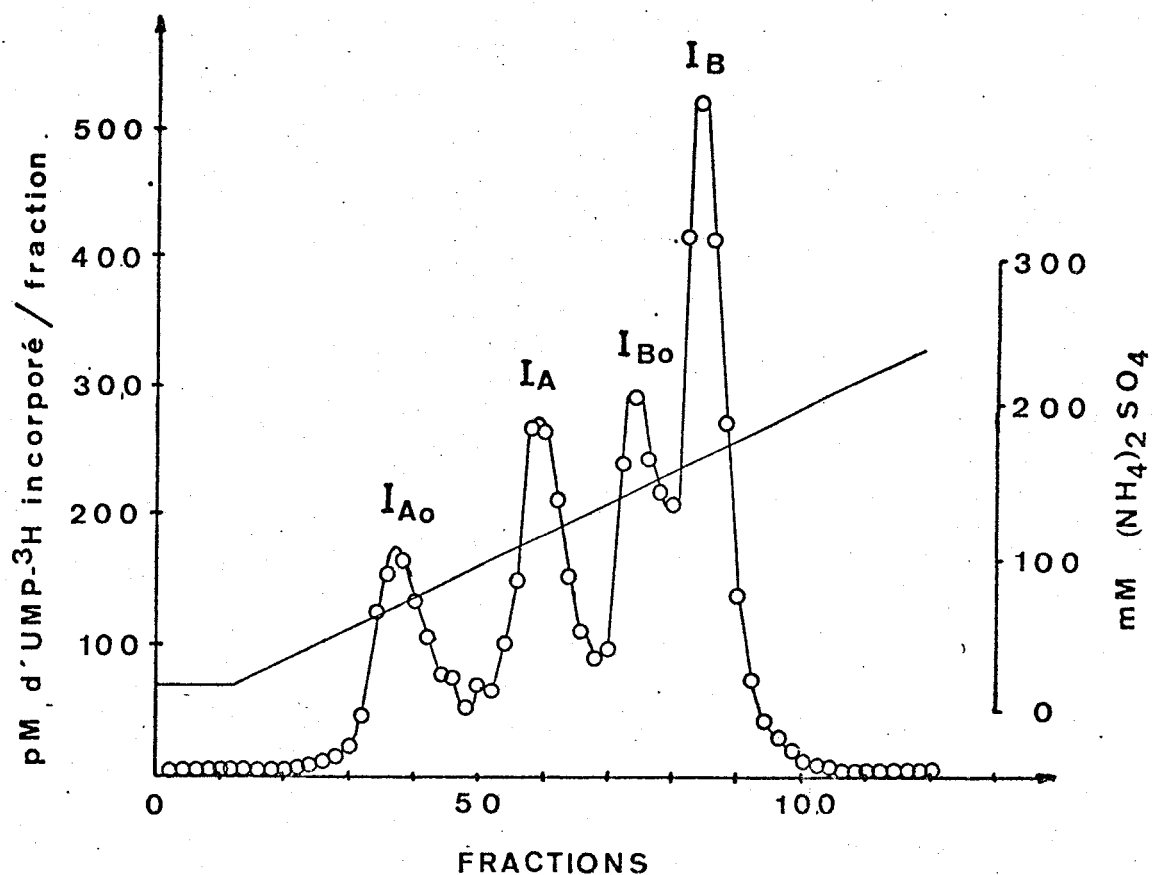


Figure 15

Rechromatographie des RNA polymérase I sur phosphocellulose WP<sub>1</sub>.

Les RNA polymérase I (32 mg de protéines) de DEAE-Sephadex sont rechromatographiées sur une colonne de 20 ml de phosphocellulose. Elles sont éluées par un gradient linéaire (2 x 100 ml) de 50 à 300 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Des fractions de 1,5 ml sont recueillies et leur activité est mesurée en présence de poly[d(A-T)] (15 µg/ml) à une concentration en sulfate d'ammonium résultant de la dilution de 10 µl de solution d'enzyme dans un volume final de 60 µl.

différentes fractions recueillies est mesurée en présence de poly [d(A-T)] (qui stimule aussi les activités des type I) et le profil d'élution obtenu montre 4 pics d'activités qui s'éluent à 0,11 M, 0,17 M, 0,21 M et 0,23 M en sulfate d'ammonium. Ces formes enzymatiques seront nommées  $I_{AO}$ ,  $I_A$ ,  $I_{BO}$ ,  $I_B$  suivant leur ordre d'élution au cours de la chromatographie sur phosphocellulose.

Cependant, ces 4 formes de I ne peuvent être mises directement en évidence par chromatographie sur phosphocellulose. En effet, lorsqu'un extrait enzymatique nucléaire est chromatographié sur phosphocellulose (figure 16, p. 58 ) et que les fractions sont testées en présence d' $\alpha$ -amanitine à haute concentration (400  $\mu$ g/ml), seules les formes  $I_A$ ,  $I_{BO}$  et  $I_B$  sont mises en évidence. De plus, les rapports d'activités de ces enzymes sont différents. Ceci peut être le fait :

- soit de la présence d'un inhibiteur des RNA polymérase I s'éluant sur phosphocellulose au niveau des RNA polymérase  $I_{AO}$  et  $I_A$ . Cet inhibiteur serait donc éliminé au cours de la chromatographie sur DEAE-Sephadex.

- soit de l'action dénaturante de la DEAE-Sephadex ou de la phosphocellulose. Ces échangeurs pourraient détacher de l'enzyme complet des polypeptides et donner ainsi naissance à plusieurs formes enzymatiques de type I.

### C - PROPRIETES DES RNA POLYMERASES I

Outre leur comportement chromatographique (élution à 0,1 M en  $(NH_4)_2SO_4$  sur DEAE-Sephadex), les RNA polymérase I peuvent être caractérisées par :

- l'optimum d'activité en fonction de la force ionique,
- l'exigence en ions bivalents,
- la résistance à l' $\alpha$ -amanitine à haute concentration.

De plus, le taux de transcription de différentes matrices et la sensibilité thermique des 4 formes de RNA polymérase I ont été étudiées.

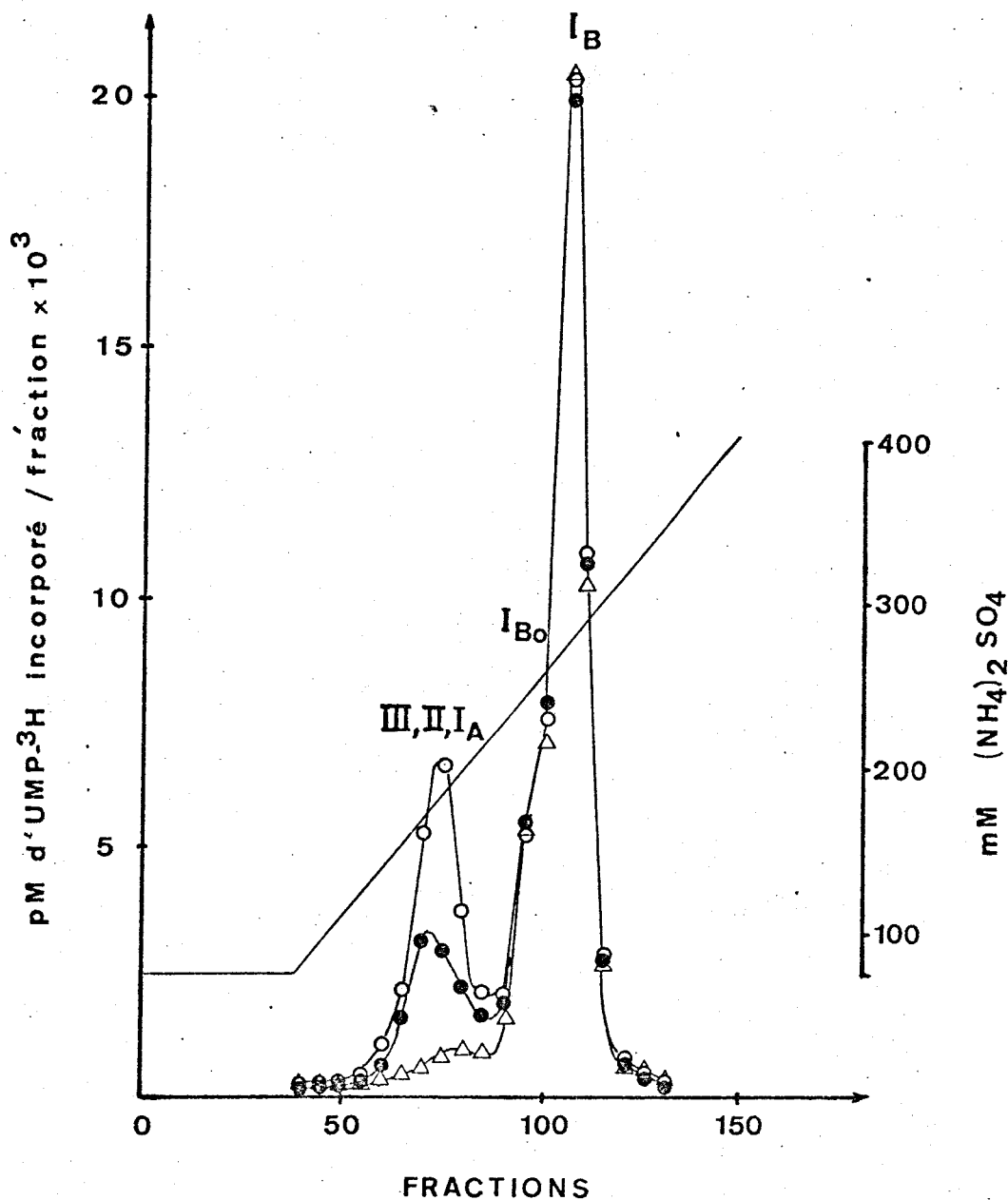


Figure 16

Séparation par chromatographie sur phosphocellulose Whatman P<sub>1</sub> des RNA polymérasés extraites des noyaux de cellules KB.

L'extrait enzymatique nucléaire contenant 900 mg de protéines est chromatographié sur une colonne de 500 ml de phosphocellulose. Les RNA polymérasés sont élués par un gradient linéaire (2 x 1 l) de 70 à 500 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Des fractions de 11 ml sont collectées. L'activité enzymatique est mesurée en présence de DNA cellulaire (15 µg/ml).

- Activité enzymatique sans α-amanitine.
- Activité enzymatique en présence d'α-amanitine (0,8 µg/ml).
- △—△      Activité enzymatique en présence d'α-amanitine (400 µg/ml).



### 1°) Activités des RNA polymérases I en fonction de la force ionique

Une des propriétés qui permet de différencier les classes de RNA polymérases eucaryotes est leur profil d'activité en fonction de la concentration croissante en sulfate d'ammonium en présence de DNA cellulaire.

Comme l'ont démontré de nombreux auteurs (voir p. 11) les RNA polymérases I ont un maximum d'activité entre 20 et 50 mM. En présence de DNA cellulaire, les 4 formes enzymatiques I montrent le même maximum d'activité compris entre 30 et 40 mM en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (figure 17, p. 60).

En outre, comme l'ont montré SERGEANT *et al.* (191) la valeur de cet optimum dépend de l'intégrité du DNA utilisé comme matrice. En présence de DNA d'Adénovirus 2 (DNA possédant très peu de coupures monocaténares) les différentes formes enzymatiques de RNA polymérases I montrent un optimum d'activité déplacé vers de basses forces ioniques.

### 2°) Exigence en ions bivalents

Les profils d'activation des RNA polymérases I par le  $\text{Mn}^{++}$  et le  $\text{Mg}^{++}$  sont rassemblés dans la figure 18 (p. 61). En présence de  $\text{MnCl}_2$ , les 4 formes de I montrent les mêmes profils d'activation : l'optimum d'activité est atteint pour une concentration de 2 mM en  $\text{MnCl}_2$ .

En présence de  $\text{MgCl}_2$ , la RNA polymérase  $\text{I}_{\text{Ao}}$  atteint son activité maximale pour une concentration de 4 mM, les autres formes de I à 6 mM en  $\text{MgCl}_2$ .

Comme il l'a été montré par d'autres auteurs, les RNA polymérases I ne montrent pas de préférence nette pour le  $\text{Mg}^{++}$  ou le  $\text{Mn}^{++}$  sauf la RNA polymérase  $\text{I}_{\text{Ao}}$  qui est légèrement stimulée par le  $\text{MgCl}_2$ .

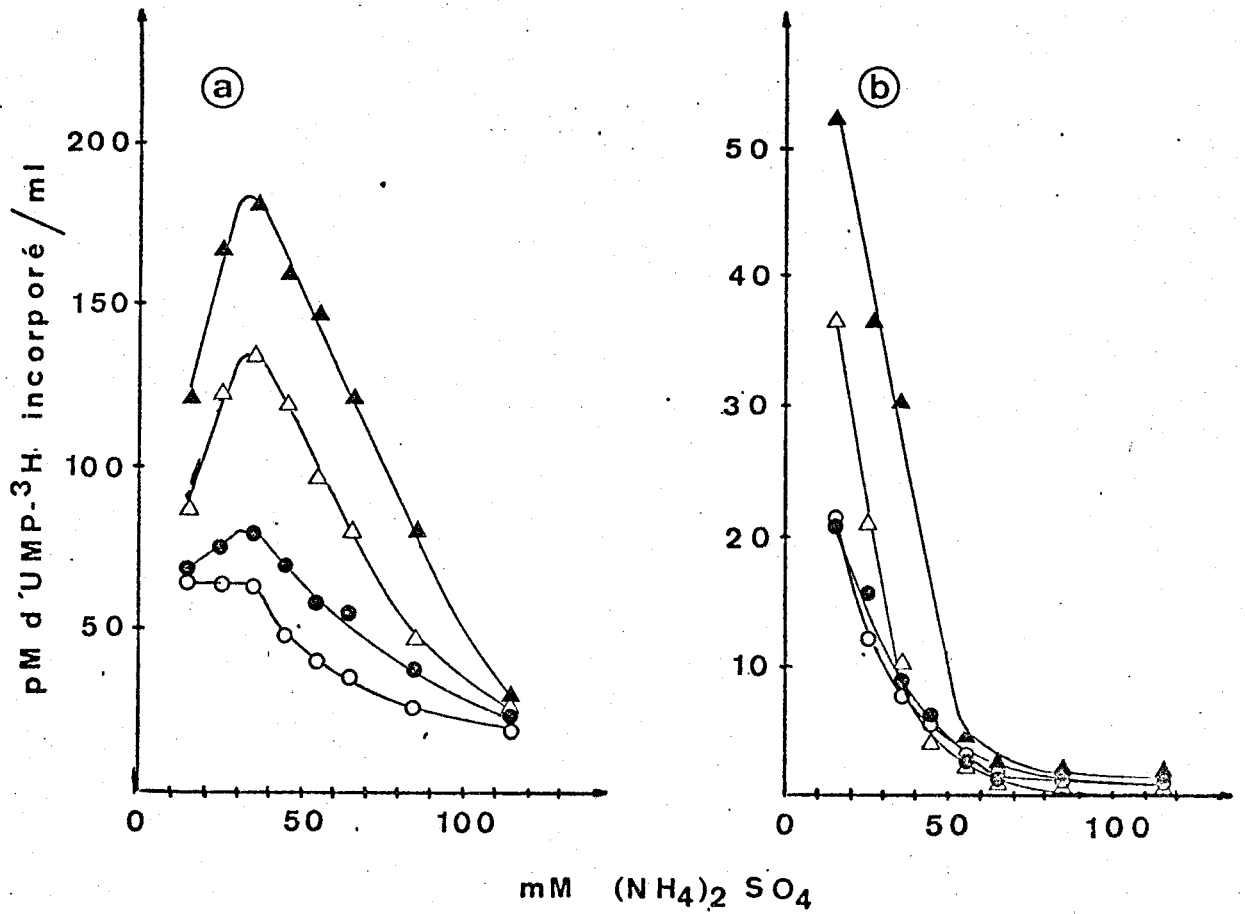


Figure 17

Effet de la concentration en sulfate d'ammonium sur l'activité des RNA polymérase I.

Les enzymes sont obtenues par chromatographie sur DEAE-Sephadex puis sur phosphocellulose (figure 15). L'activité des 4 formes I a été mesurée aux différentes concentrations en sulfate d'ammonium indiquées en présence de DNA de cellule KB (A) en présence de DNA d'Adénovirus 2 (B) dans les conditions décrites p. 26.

RNA polymérase I<sub>A0</sub> ○—○

RNA polymérase I<sub>A</sub> ●—●

RNA polymérase I<sub>B0</sub> △—△

RNA polymérase I<sub>B</sub> ▲—▲

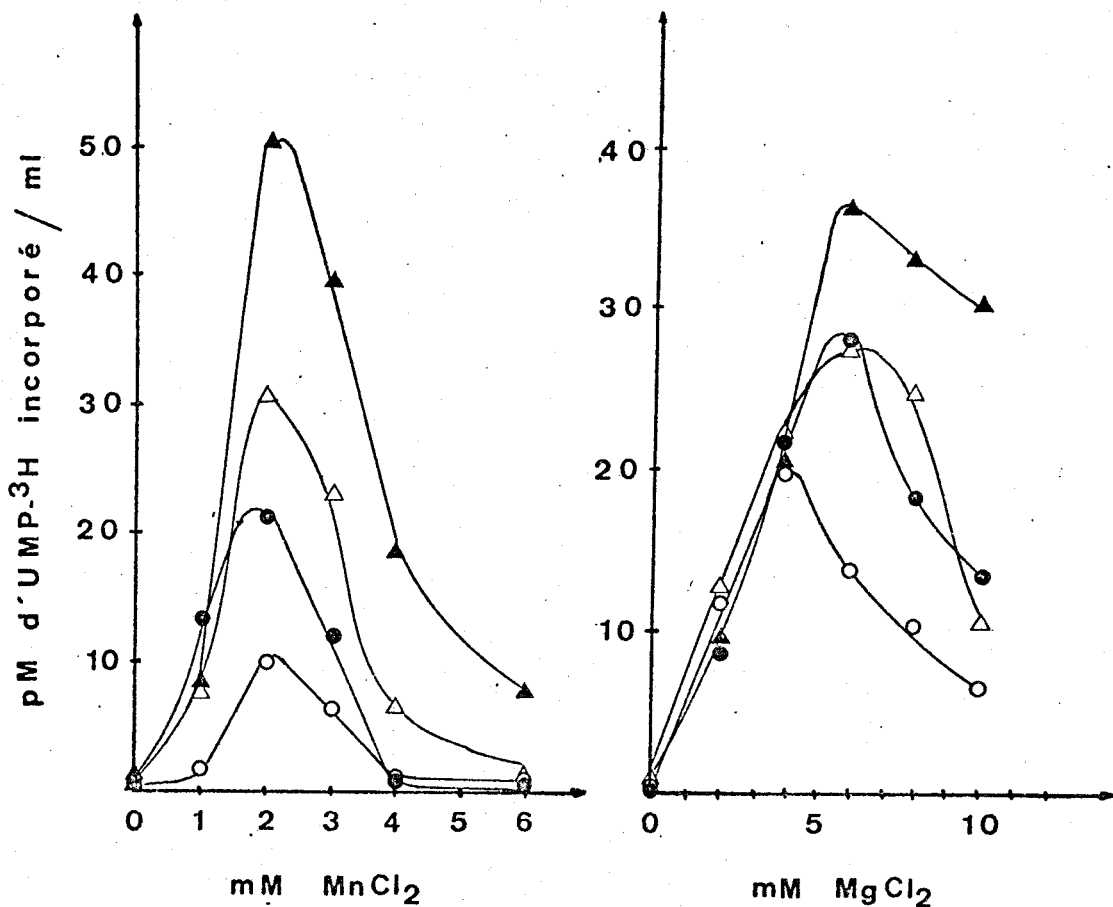


Figure 18

Effet du  $Mn^{++}$  et  $Mg^{++}$  sur l'activité des RNA polymérase I.

Les enzymes sont obtenues comme précédemment (voir figure 15, p. 56). L'activité enzymatique des 4 formes I a été mesurée en présence de différentes concentrations en  $MnCl_2$  et  $MgCl_2$ , de DNA natif de cellules KB (15  $\mu g/ml$ ) et à une concentration en  $(NH_4)_2SO_4$  de 30 mM.

RNA polymérase I<sub>Ao</sub> ○—○  
 RNA polymérase I<sub>A</sub> ●—●

RNA polymérase I<sub>Bo</sub> △—△  
 RNA polymérase I<sub>B</sub> ▲—▲

### 3°) Résistance à l' $\alpha$ -amanitine des RNA polymérases I<sub>A</sub>

Les RNA polymérases I<sub>A0</sub> et I<sub>A</sub> ne sont pas inhibées par l' $\alpha$ -amanitine à haute concentration (400  $\mu$ g/ml) (figure 19, p. 63 ).

Comme le montre la figure 16, p. 58 les formes I<sub>B0</sub> et I<sub>B</sub> n'ont pas leur activité affectée par des concentrations de cette toxine de 400  $\mu$ g/ml.

### 4°) Transcription de différentes matrices

L'activité des quatre formes de RNA polymérases I a été mesurée en présence de DNA natif de cellules KB (ce DNA possède de nombreuses régions monocaténares), de DNA dénaturé de cellules KB (DNA monobrun), de DNA d'Adnéovirus 2 (DNA bicaténaire intact) et d'une matrice synthétique le poly [d(A-T)] . Les résultats présentés dans le tableau IV, p. 64 indiquent que les 4 enzymes I de cellules KB ne peuvent se différencier par leur capacité de transcrire ces différentes matrices. Dans un excès de DNA (15  $\mu$ g/ml), les RNA polymérases I transcrivent mieux un DNA possédant de nombreuses coupures monocaténares qu'un DNA intact ou un DNA monobrun. L'emploi du poly[d(A-T)] comme matrice stimule deux à trois fois les activités RNA polymérasiques de type I.

### 5°) Sensibilité thermique des RNA polymérases I, figure 20, (p. 65).

SHIELDS et TATA (192) et SERGEANT et KRSMANOVIC (193) ont montré que les RNA polymérases I, II et III présentent des profils d'inactivation thermique différents. La sensibilité des RNA polymérases à la chaleur permet donc de distinguer les différentes classes de RNA polymérases.

En présence de DNA natif de cellules KB, les RNA polymérases de type I sont rapidement inactivées par la chaleur et elles montrent

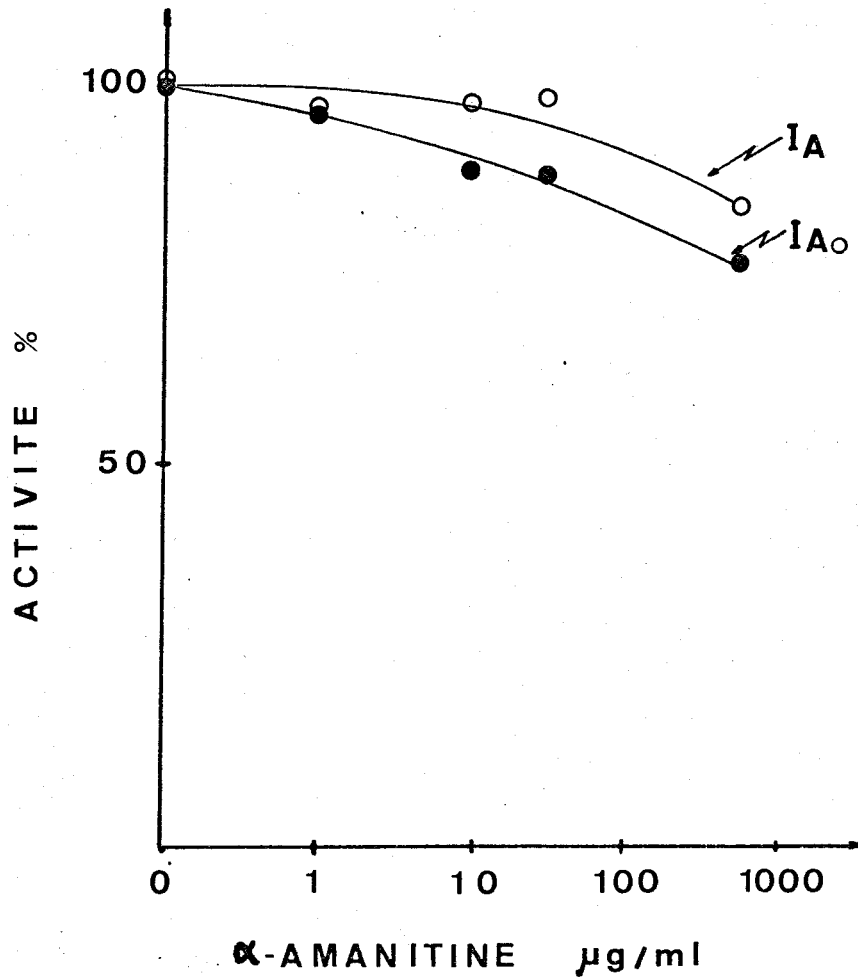


Figure 19

Effet de l' $\alpha$ -amanitine sur l'activité des RNA polymérase  $I_{A_0}$  et  $I_A$  de cellules KB.

Les RNA polymérase  $I_{A_0}$  et  $I_A$  sont obtenues par chromatographie sur phosphocellulose (voir Figure 15, p. 56). L'activité des différentes formes enzymatiques est mesurée dans les conditions décrites p. 26.





TABLEAU IV

## TRANSCRIPTION DE DIFFERENTES MATRICES PAR LES RNA POLYMERASES I

			Activité des RNA polymérase I pM/ml			
Type de matrice utilisée	DNA µg/ml	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> mM	I <sub>Ao</sub>	I <sub>A</sub>	I <sub>Bo</sub>	I <sub>B</sub>
DNA de KB natif	15 µg/ml	30	73,2	99	179,5	231,4
DNA dénaturé de cellule KB	15 µg/ml	30	56,1	72,2	89	115,3
DNA natif d'Ad 2	15 µg/ml	15	45,2	42	63,2	95,4
Poly[d(A-T)]	15 µg/ml	30	236,9	361	402,1	644

L'activité des RNA polymérase I a été mesurée en présence de DNA natif et dénaturé de cellules KB, de DNA natif d'Adénovirus 2 et de poly[d(A-T)] à une concentration en sulfate d'ammonium appropriée à chaque matrice, dans des conditions d'incubation décrites p. 26 excepté la concentration en UTP-<sup>3</sup>H (0,1 mM : 0,3 Ci/mM).

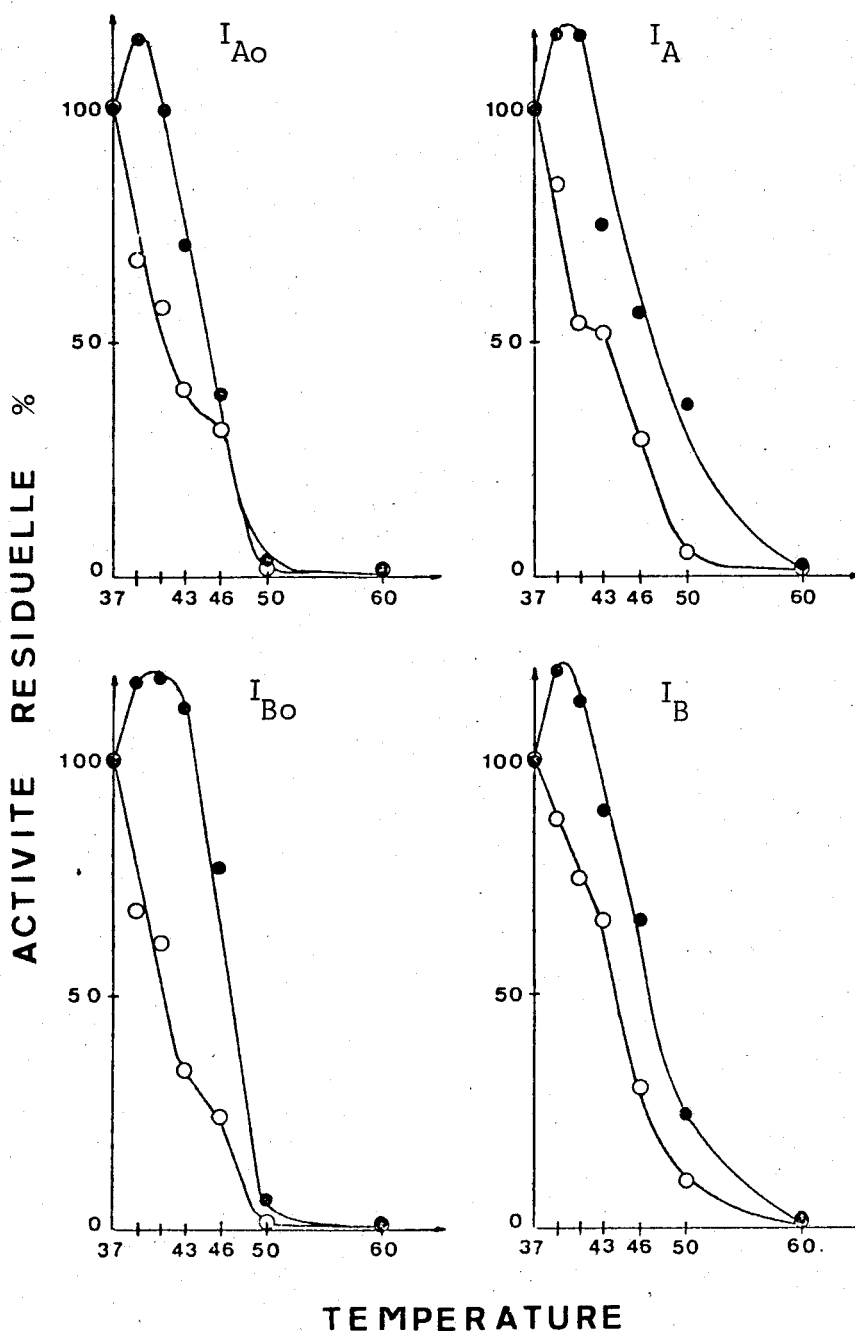


Figure 20

Sensibilité thermique des RNA polymérasés I.

50 µl de solution enzymatique sont chauffées aux différentes températures pendant 10 mn puis sont refroidis dans la glace. L'activité résiduelle est mesurée en présence de DNA natif de cellules KB ( ○ ——— ○ ) et en présence de DNA dénaturé de cellules KB (15 µg/ml) ( ● ——— ● ) à une concentration de 30 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans des conditions d'incubation décrites p. 22 excepté l'UTP qui est à une concentration de 0,05 mM.

des courbes de sensibilité thermique bimodales. La RNA polymérase  $I_B$  semble cependant moins sensible à la chaleur que les autres formes. La demi-inhibition de l'activité enzymatique est obtenue pour une température de 41°C environ pour les formes  $I_{A0}$ ,  $I_A$ ,  $I_{B0}$  et de 45°C pour la forme  $I_B$ . En présence de DNA dénaturé de cellules KB, les différents types de  $I$  montrent des profils d'inactivation par la chaleur identique et la demi-inhibition est obtenue pour une température de 47°C environ. Comme l'ont suggéré SERGEANT et KRSMANOVIC (194), le phénomène différent observé selon la nature de la matrice pourrait refléter l'inactivation par la chaleur de protéines responsables ou impliquées dans la transcription d'une matrice bicaténaire.

Quatre sous-classes de RNA polymérases  $I$  sont donc mises en évidence par chromatographie sur DEAE-Sephadex puis sur phosphocellulose. Ces quatre formes enzymatiques présentent des propriétés analogues quant à :

- leur activité optimale en fonction de la concentration en  $(NH_4)_2SO_4$ ,
- leur exigence en ions bivalents,
- leur résistance à l' $\alpha$ -amanitine,
- leur capacité de transcrire différentes matrices,
- leur sensibilité thermique.

### III) ETUDE SUR LA FONCTION THERMOSENSIBLE DE LA RNA POLYMERASE $I_B$

Bien que cette forme enzymatique soit moins thermosensible que les autres RNA polymérases  $I$ , celle-ci a été choisie pour étudier le phénomène de thermosensibilité car elle peut être obtenue en grande quantité en une seule étape par chromatographie sur phosphocellulose (voir figure 16, p. 58 ). Cette forme est aussi la plus active.

La sensibilité thermique des RNA polymérases peut en fait refléter une action de la chaleur sur des protéines impliquées dans le

déclenchement de la synthèse des chaînes de RNA ou dans leur allongement.

La figure 21 (p. 68) montre les résultats obtenus lorsque les chaînes de RNA sont synthétisées in vitro en présence d'UTP-<sup>3</sup>H (marqueur interne des RNA) et des nucléotides puriques (ATP et GTP) marqués en position  $\gamma$  par la radiophosphore, impliqués dans le mécanisme du déclenchement de la synthèse des RNA. Pour vérifier que le <sup>32</sup>P est bien lié aux RNA, ceux-ci ont été précipités sélectivement par l'éthanol et la solution contenant les RNA a été déprotéinisée par le phénol (voir matériel et méthodes). De plus la sensibilité à la ribonuclease I du matériel acido-précipitable a été contrôlée (90 à 95 p. 100 de la radioactivité liée aux RNA deviennent acido-solubles). En outre, afin d'éviter des déclenchements de synthèse non spécifiques sur des régions monocaténares de la matrice, les synthèses de RNA in vitro ont été effectuées en présence de DNA d'Adénovirus 2 (DNA bicaténaire ne possédant que peu de coupures monocaténares) et dans un excès d'enzyme par rapport à la matrice (ceci ayant pour but de saturer les sites de déclenchement non spécifiques et de favoriser ainsi le début de synthèse sur des régions bicaténares de la matrice).

Le taux de déclenchement de synthèse reste identique ou baisse très peu lorsque l'enzyme a subi un préchauffage à 37°, 43° ou 46°C. En effet même à 46°C, le pourcentage d'incorporation du ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)GTP est supérieur à 90 p. 100.

Par contre lorsque la RNA polymérase I<sub>B</sub> subit un préchauffage aux différentes températures indiquées, le pourcentage d'incorporation d'UMP-<sup>3</sup>H dans les chaînes de RNA décroît rapidement. Celui-ci n'est plus que de 30 p. 100 à 46°C. Il y a donc une baisse de la taille des RNA. Le préchauffage de l'enzyme à des températures comprises entre 37°C et 46°C n'influe pas ou très peu sur des protéines intervenant dans le déclenchement de la synthèse des chaînes de RNA mais agit surtout sur des protéines impliquées ou responsables de l'allongement de ces chaînes.

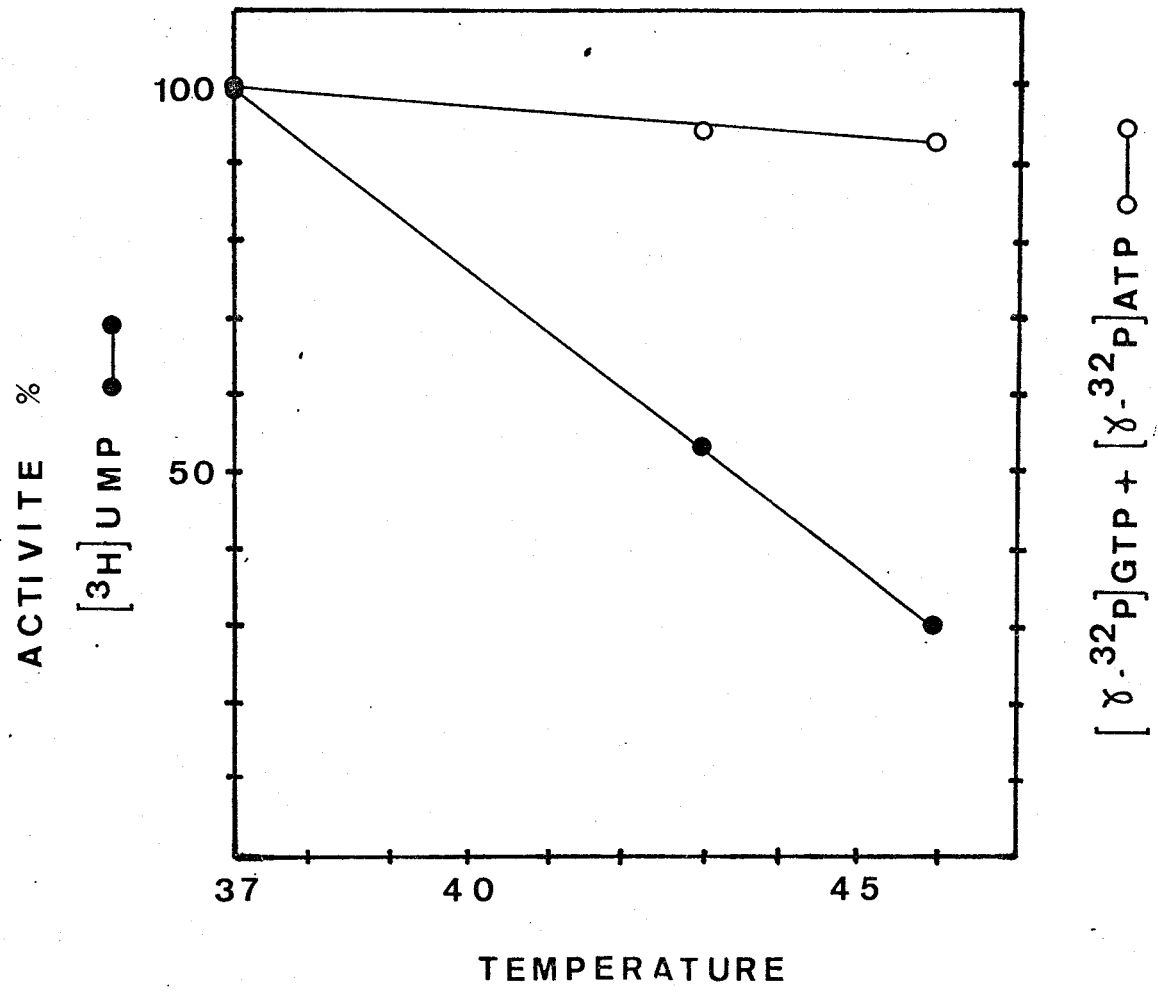


Figure 21

Incorporation de ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP et GTP et <sup>3</sup>H-U<sub>3</sub>MP dans les RNA synthétisés par la RNA polymérase I<sub>B</sub> préchauffée, en présence de DNA natif d'Adénovirus 2.



## DISCUSSION

La solubilisation des activités RNA polymérasiques contenue dans le noyau ou le cytoplasme des cellules KB montre que celles-ci renferment de nombreuses activités enzymatiques qui peuvent être séparées par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex. Elles peuvent être regroupées en trois classes I, II et III.

### I) HETEROGENEITE DES TROIS CLASSES ENZYMATIQUES

#### A - LES RNA POLYMERASES I

L'hétérogénéité chromatographique des RNA polymérasés I a été montrée pour de nombreux tissus (PHILLIPS et FOREST (195), ROEDER (196), voir p. 7 ). D'une façon générale, tous les auteurs retrouvent au maximum deux formes de RNA polymérasés I après chromatographie soit sur DEAE-Sephadex (HOSENLOP et al. (197)), soit sur CM-Sephadex (ROEDER (198)) soit sur phosphocellulose (CHESTERTON et BUTTERWORTH (199)). En outre SCHWARTZ et al. (200) ont montré que cette hétérogénéité se perdait au cours des purifications poussées.

Dans le cas des cellules KB, la chromatographie sur DEAE-Sephadex d'un extrait enzymatique nucléaire montre que, quelque soit la méthode de préparation de noyaux utilisée, les RNA polymérasés I résistantes à l' $\alpha$ -amanitine à haute concentration, s'éluent de façon non homogène à 0,1 M en sulfate d'ammonium. Lorsque celles-ci sont de nouveau chromatographiées sur DEAE-Sephadex, le même phénomène est obtenu et au moins trois sous-classes se distinguent. Après rechromatographie sur phosphocellulose, quatre formes enzymatiques sont mises en évidence : elles s'éluent à 0,11 M ; 0,17 M ; 0,21 M et 0,23 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Ces différentes formes présentent des propriétés analogues :

- Elles sont résistantes à l' $\alpha$ -amanitine à haute concentration
- Elles ont les mêmes optima d'activité en fonction de la force ionique selon le DNA utilisé.
- Elles utilisent indifféremment le  $Mg^{++}$  ou le  $Mn^{++}$ . La forme  $I_A$  montre néanmoins une légère préférence pour le  $Mg^{++}$ . Cependant cette stimulation n'est pas assez importante pour avoir une réelle signification.
- Leur capacité de transcrire différentes matrices est identique. Comme il l'a été montré pour les RNA polymérase I d'autres tissus (ROEDER (201), ROSE et al. (202)), elles transcrivent préférentiellement le DNA natif et leur activité est stimulée lorsque le poly[d(AT)] est utilisé comme matrice.

Cependant lorsqu'un extrait enzymatique nucléaire est chromatographié directement sur phosphocellulose, seules trois formes de RNA polymérase I peuvent être mises en évidence et leur rapport d'activité est différent. Ceci peut être dû :

1°) Soit à la présence d'un inhibiteur des RNA polymérase I qui s'éluerait sur phosphocellulose en même temps que les RNA polymérase  $I_{A_0}$  et  $I_A$  et qui ne serait pas retenu sur DEAE-Sephadex ou s'éluerait après les enzymes I sur DEAE-Sephadex.

2°) Soit à une action dénaturante de la DEAE-Sephadex ou de la phosphocellulose. En effet, HUET et al. (203) ont montré qu'au cours de la chromatographie sur phosphocellulose, la RNA polymérase A de levure pouvait perdre deux sous-unités et donner naissance à une nouvelle forme enzymatique  $A^*$  ayant acquis des propriétés nouvelles. Par contre, les RNA polymérase  $I_{A_0}$ ,  $I_A$ ,  $I_{B_0}$  et  $I_B$  présentent toutes des propriétés analogues et en particulier les RNA polymérase  $I_{A_0}$  et  $I_A$  restent résistantes à l' $\alpha$ -amanitine même à 400  $\mu$ g/ml. De plus, lorsque les formes majeures  $I_{B_0}$  et  $I_B$  sont rechromatographiées sur phosphocellulose, celles-ci ne

donnent pas naissance à de nouvelles formes enzymatiques (résultats non présentés).

3°) Soit à une protéolyse au cours de l'extraction et de la purification. Pour réduire cet artefact toutes les opérations sont effectuées à basse température (0 - 4°C) et en présence de sérum albumine bovine (0,5 mg/ml). D'autres auteurs ( SKLAR et al. (204)) ont montré que les formes multiples de RNA polymérase sont obtenues même en présence de P. M. S. F.\*, inhibiteur des protéases. Ceci suggère que ces différentes formes enzymatiques sont des entités physiologiques et qu'elles ne sont pas le résultat de dégradation.

Cette hétérogénéité des RNA polymérase I pourrait refléter les différents états physiologiques d'un enzyme qui transcrit une seule classe de gènes ou pourrait refléter différentes formes de l'enzyme qui transcrit différentes classes de gènes.

## B - LES RNA POLYMERASES II

L'hétérogénéité des classes II a été montrée par chromatographie sur DEAE-Sephadex chez les Xénopes (ROEDER (205)) et dans les cellules HeLa (HOSSENLOP et al. (206)) et aussi d'un point de vue structural (KEDINGER et al. (207)). Dans ce dernier cas, trois formes B<sub>0</sub>, B<sub>I</sub> et B<sub>II</sub> sont séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide.

Dans les cellules KB, trois formes de RNA polymérase II (II<sub>x</sub>, II<sub>A</sub>, II<sub>B</sub>) sont séparées par chromatographie sur DEAE-Sephadex. Ces trois formes sont inhibées par de basses concentrations en  $\alpha$ -amanitine. L'enzyme II<sub>x</sub> est différente des enzymes B<sub>0</sub>, B<sub>I</sub> et B<sub>II</sub> puisque celles-ci ne sont pas séparées par chromatographie d'échange d'ions. Elle serait voisine de la forme II<sub>A</sub> de Xenope et B<sub>x</sub> de cellules HeLa de part son élution sur DEAE-Sephadex et sa localisation dans la cellule.

\* P. M. S. F. (Phenylmethanesulfonyl fluoride) : fluorure de l'acide toluène sulfonique.



## C - LES RNA POLYMERASES III

L'existence dans les cellules eucaryotes, de la classe enzymatique III a été montrée par de nombreux auteurs (voir p. 6 ).

L'hétérogénéité de cette classe enzymatique a d'abord été montrée par SCHWARTZ et al. (208) : deux RNA polymérase III ( $III_A$  et  $III_B$ ) ont été mises en évidence dans le myelome murin MOPC 315. Enfin HOSSENLOP et al. (209) ont caractérisé dans les cellules HeLa deux nouvelles formes (C I et C II) de RNA polymérase de type III.

Dans les cellules KB, nous avons caractérisé trois formes de RNA polymérase III :  $III_x$ ,  $III_A$ ,  $III_B$ . Elles présentent les mêmes courbes de sensibilité à l' $\alpha$ -amanitine (leur activité est inhibée pour de fortes concentrations de cette toxine). Les RNA polymérase  $III_A$  et  $III_B$  ont un comportement chromatographique identique aux RNA polymérase  $III_A$  et  $III_B$  mises en évidence par SCHWARTZ et al. (210) et aux formes  $C III_a$  et  $C III_b$  décrites par HOSSENLOP et al. (211). Contrairement à ces derniers, nous ne mettons en évidence qu'une forme  $III_x$  sur DEAE-Sephadex. Cependant, il faut remarquer que la forme  $III_x$  présente dans le cytoplasme s'élue en un pic homogène à 0,2 M en  $(NH_4)_2SO_4$  alors que la forme  $III_x$  mise en évidence dans les noyaux s'élue entre 0,17 M et 0,21 M en sulfate d'ammonium. La forme  $III_x$  nucléaire pourrait peut-être contenir deux activités enzymatiques analogues à celles décrites par HOSSENLOP et al. (212). Lors de la diffusion des RNA polymérase  $III_x$  vers le cytoplasme au moment de la préparation de noyaux, une de ces deux activités enzymatiques pourrait être rapidement inactivée.

## II) LOCALISATION DES RNA POLYMERASES DANS LA CELLULE

L'étude de la répartition des différentes RNA polymérase dans la cellule nécessite l'emploi de techniques de préparation de noyaux adéquates. Par exemple, la méthode de BERKOWITZ ne permet pas de retrouver les enzymes III dans des proportions satisfaisantes. Il faut donc éviter les fuites de matériel nucléaire vers la fraction cytoplasmique. Le contrôle de l'intégrité des noyaux au microscope électronique s'avère indispensable dans ce genre d'étude.

Les quatre formes de RNA polymérase I semblent être localisées dans le noyau. Quelque soit la méthode de préparation des noyaux employée, le surnageant cytoplasmique n'en renferme qu'une très faible quantité (0,5 p. 100 des RNA polymérase I cellulaires). Ces formes seraient donc très fortement liées à la chromatine.

Les RNA polymérase II<sub>A</sub> et II<sub>B</sub> sont retrouvées préférentiellement dans les fractions nucléaires. Par contre, la forme II<sub>X</sub> n'est pas détectée dans les noyaux purifiés dans des solutions concentrées en saccharose. Elle pourrait donc avoir une localisation cytoplasmique. Ces résultats sont conformes à ceux de ROEDER (213).

L'étude de la répartition cellulaire des enzymes III fait apparaître particulièrement l'importance de la méthode de préparation des noyaux. En effet, lorsque ceux-ci sont obtenus par homogénéisation dans des tampons aqueux (le TMMT), les RNA polymérase III représentent plus de 50 p. 100 des activités enzymatiques cytoplasmiques et la diffusion de ces enzymes vers le surnageant cytoplasmique est très rapide (résultats non présentés). Par contre, lorsque les noyaux sont purifiés dans des solutions concentrées en saccharose, celles-ci ne représentent plus que 30 p. 100 des RNA polymérase cytoplasmiques. Ce phénomène correspond très bien aux images obtenues au microscope électronique. De plus, il y a un changement dans la répartition cellulaire des enzymes III. La forme III<sub>A</sub> est retrouvée préférentiellement dans les noyaux. Par contre, la forme III<sub>B</sub> semblerait être présente dans le cytoplasme car elle n'est pas mise en évidence dans les noyaux purifiés. Sa présence dans les noyaux non purifiés et préparés dans les tampons aqueux serait due aux nombreuses contaminations cytoplasmiques (ces résultats sont en accord avec ceux de SCHWARTZ *et al.* (214)). La forme III<sub>X</sub> aurait une localisation nucléaire et pourrait diffuser rapidement vers la fraction cytoplasmique. En effet elle est présente dans les noyaux purifiés dans des tampons hypertoniques (et aucune activité III<sub>X</sub> est décelée dans le cytoplasme) et dans le surnageant cytoplasmique des noyaux préparés dans le tampon TMMT. De plus, cette forme enzymatique n'est pas liée à la membrane nucléaire puisque le triton X-100 ne modifie pas la présence de l'activité III<sub>X</sub> dans la fraction nucléaire purifiée.

### III) SENSIBILITE THERMIQUE DES RNA POLYMERASES I

Comme l'ont montré SERGEANT et KRSMANOVIC (215), les RNA polymérase I présentent des courbes de sensibilité thermique différentes selon que la matrice employée est un DNA bicaténaire ou non. Les quatre formes de RNA polymérase I présentent des courbes de sensibilité thermique analogues, quoique la forme I<sub>B</sub> semble moins thermosensible que les autres. L'étude de l'incorporation des nucléosides triphosphates marqueurs du déclenchement de la synthèse des RNA ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP et ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)GTP) et de l'allongement des chaînes (<sup>3</sup>H-UTP) montre que le préchauffage agit de façon prédominante sur des protéines intervenant dans le processus d'allongement des chaînes de RNA sur une matrice bicaténaire homogène telle que le DNA d'Adénovirus 2.

Cependant le mécanisme par lequel le facteur thermosensible de la RNA polymérase I agit sur la croissance des chaînes de RNA est encore difficile à comprendre. Comme l'ont suggéré DEZELEE et al. (216), chez les eucaryotes, la synthèse des RNA ne semble pas être un processus simple. Selon ce groupe, le déclenchement de la synthèse de RNA catalysé par les RNA polymérase I et II de levure s'effectuerait sur des coupures monocaténaires de la matrice. Par contre, la croissance des chaînes se fait sur les parties bicaténaires de la matrice. Bien qu'il y ait quand même un allongement limité lorsque l'enzyme chauffée est employée, la croissance significative des chaînes de RNA ferait intervenir un facteur thermosensible agissant sur la destabilisation locale de la matrice. La destabilisation des deux brins de DNA faciliterait la progression de la RNA polymérase le long de la double hélice.

## C O N C L U S I O N S

---

Les résultats originaux que nous avons obtenus peuvent être résumés de la manière suivante :

I) Les cellules KB renferment trois classes distinctes de RNA polymérase dont l'hétérogénéité peut être démontrée par chromatographie d'échange d'ions.

A - Les RNA polymérase de type I se répartissent en 4 sous-classes nommées  $I_{A_0}$ ,  $I_A$ ,  $I_{B_0}$ ,  $I_B$ . Les sous-classes  $I_{A_0}$  et  $I_{B_0}$  n'avaient jamais été décrites antérieurement. Nous avons effectué une étude complète qui démontre que "nos" formes  $I_{A_0}$  et  $I_{B_0}$  se comportent de la même manière que les formes  $I_A$  et  $I_B$ , vis-à-vis de l' $\alpha$ -amanitine, des variations de force ionique, des ions bivalents ( $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ ) et de l'action de la chaleur. En outre, elles transcrivent, comme les formes "classiques", les matrices (DNA, natifs ou dénaturés, des cellules KB et d'adénovirus 2 ; poly [d(AT)] .

B - Les RNA polymérase II se répartissent en trois formes :  $II_A$ ,  $II_B$  et  $II_x$ . Cette dernière forme est probablement identique à la forme  $B_x$  récemment décrite par CHAMBON dans les cellules HeLa.

C - Les RNA polymérase III présentent, elles aussi, trois formes  $III_A$ ,  $III_B$ ,  $III_x$  qui sont mises en évidence par chromatographie sur DEAE-Sephadex. La forme  $III_x$  que nous avons caractérisée est peut-être l'une de celles que CHAMBON dénomme, dans les cellules HeLa, C I et C II.

II) Les différentes techniques de préparation de noyaux que nous avons employées ont permis :

A - De montrer que le choix de la méthode de fractionnement cellulaire est déterminant dans l'étude des polymérase car il peut être

à l'origine de causes d'erreur : par exemple, des activités d'enzymes nucléaires peuvent se retrouver dans le cytoplasme.

B - De localiser tous ces RNA polymérases dans les cellules KB.

- Les quatre formes de RNA polymérase I, les formes II<sub>A</sub> et II<sub>B</sub> et les formes III<sub>A</sub> et III<sub>X</sub> dans le noyau.

- Les formes II<sub>X</sub> et III<sub>B</sub> exclusivement dans le cytoplasme.

III) L'étude de la thermosensibilité des enzymes de type I nous a permis de démontrer que l'action de la chaleur (41 à 43°C) sur les RNA polymérases I ne modifiait pas le déclenchement de la synthèse des RNA, mais affectait un site ou une protéine particulière des polymérases impliqué dans le processus de dénaturation locale du DNA nécessaire à l'allongement de la chaîne de RNA néosynthétisée.

BIBLIOGRAPHIE

---

	Réf.	Page
ADMAN R., SCHULTZ L.D., HALL B.D. (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>69</u> , p. 1702-1706	116	12
ATTARDI G., HUANG D., KABAT S., (1965), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>54</u> , p. 185	12	5
AUSTIN G.E., BELLO L.J., FURTH J.J., (1973), Biochim. Biophys. Acta, <u>248</u> , p. 3777	70	7
BERKOWITZ D.M., KAKEFUDA T., SPORN M.B., (1969), J. Cell. Biol., <u>42</u> , p. 851-855	182 188	23 42
BLATTI S.P., INGLES C.J., LINDELL T.S., MORRIS P.W., WEAVER R.F., WEINBERG P., RUTTER W.J., (1970), Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol., <u>35</u> , p. 649-658.	54 62 90	7 7 9
BROWN D.D., DAVID I.B., (1968), Science, <u>160</u> , p. 272	13	5
BROWN D.D., LITTNA E., (1964), J. Mol. Biol., <u>8</u> , p. 688	19	5
BROWN D.D., WEBER C.S., (1968), J. Mol. Biol., <u>34</u> , p. 661	17	5
BUHLER J.M., IBORRA F., SENTENAC A., FROMAGEOT P., (1976), J. Biol. Chem., <u>251</u> , p. 1712-1717	144	15
BURGESS R.R., (1971), Ann. Rev. Biochim., <u>40</u> , p. 711	6	4
BURGESS R.R., (1969), J. Biol. Chem., <u>244</u> , p. 6168	158	15



	Réf.	Page
BURGESS R.R., TRAVERS A.A., DUNN J.J., BAUTZ E.K.F., (1969), Nature, <u>221</u> , p. 43	159	16
BUSCH H., SMETANA K., The Nucleolus -Academic Press (1970) p. 160	18	5
BUTTERWORTH P.H.W., COX R.F., CHESTERTON C.J., (1971), Eur. J. Biochem., <u>23</u> , p. 229	118	12
CHAMBERLIN M., BERG P., (1962), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>48</u> , p. 81	5	4
CHAMBERLIN M., RING J., (1972), J. Mol. Biol., <u>70</u> , p. 221	186	28
CHAMBON P., (1975), in Progress in Nucleic Acid Research and Mol. Biol. XV (DAVIDSON J.N., COHN W.E., Eds), p. 613, Academic Press New York and London.	113	11
CHAMBON P., (1974), in The Enzyme X. (BOYER P.D., Ed.), p. 261 - 331. Academic Press, New York.	39 168	6 16
CHAMBON P., GISSINGER F., KEDINGER C., MANDEL J.L., MEILHAC M., NURET P., (1972), Acta Endocrin., <u>168</u> , p. 222	119	12
CHAMBON P., GISSINGER F., KEDINGER C., MANDEL J.L., MEILHAC M., (1974), in "The Cell Nucleus", (BUSCH M., Ed.), p. 270 - 307 Academic Press, New York.	38	6
CHAMBON P., GISSINGER F., MANDEL J.L., KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MEILHAC M., (1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., <u>35</u> , p. 693	10 42 135	4 6 13
	136	14
CHAUVEAU J., MOULE Y., ROUILLER C., (1956), Exptl. Cell. Res., <u>11</u> , p. 317	181 189	22 42
CHESTERTON C.J., BUTTERWORTH P.H., (1971), Eur. J. Biochem., <u>19</u> , p. 232-241	51 134 199	7 13 69





	Réf.	Page
CHESTERTON C.J., BUTTERWORTH P.H., (1971), FEBS Letters, <u>15</u> , p. 181 - 185	52	7
CHESTERTON C.J., HUMPHREY S.M., BUTTERWORTH P.H., (1972), Biochem. J., <u>126</u> , p. 675 - 681	140 180	14 21
CRICK F. H. C., (1958), Symp. Soc. Exp. Biol., The Biological Replication of Macromolecules, XII, p. 138	1	1
DAVIDSON E.H., BRITTEN R.J. (1973), Quart. Rev. Biol., <u>48</u> , p. 565	117	12
DEZELEE S., SENTENAC A., (1973), Eur. J. Biochem., <u>34</u> , p. 31	145	15
DEZELEE S., SENTENAC A., FROMAGEOT P., (1972), FEBS Letters, <u>21</u> , p. 1	59	7
DEZELEE S., SENTENAC A., FROMAGEOT P., (1974), J. Biol. Chem., <u>259</u> , p. 5971-5977	216	74
FROEHNER S.C., BONNER J., (1973), Biochemistry, <u>12</u> , p. 3064-3071	163	16
FURTH J.J., AUSTIN G.E., (1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., <u>35</u> , p. 641	61	7
GEORGIEV G. P., (1969), J. Theor. Biol., <u>25</u> , p. 473	176	19
GISSINGER F., CHAMBON P., (1972), Eur. J. Biochem., <u>28</u> , p. 277-282	151	15



	Réf.	Page
GISSINGER F., CHAMBON P., (1975), in Progress in Nucleic Acid Research and Mol. Biol., XV, (DAVIDSON J.N., COHN W.E., Eds) p. 613, Academic Press New York and London.	152	15
GISSINGER F., KEDINGER C., CHAMBON P., (1974), Biochimie, <u>56</u> , p. 319-333	110	11
GLYNN I. M., CHAPPEL J. B., (1964), Biochem. J., <u>90</u> , p. 147	185	28
GREEN M., PINA M., (1963), Virology, <u>20</u> , p. 199	184	27
GRIFFIN B., (1976), Nature, <u>263</u> , p. 188	177	19
GUIDICE G., MUTOLO U., (1967), Biochim. Biophys. Acta, <u>138</u> , p. 276	21	5
HADJIVASSILIOU A., BRAWERMAN G., (1966), J. Biol. Chem., <u>244</u> , p. 1314	176a	19
HIGASHINAKAGAWA T., ONISHI T., MURAMATSU M., (1972), Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>48</u> , p. 937-944	164	16
HOSSENLOPP P., WELLS D., CHAMBON P., (1975), Eur. J. Biochem., <u>58</u> , p. 237-251	45 73 79 84 104 131 197 206 209 211 212	6 7 8 8 10 13 69 71 72 72 72



	Réf.	Page
HUET J., SENTENAC A., FROMAGEOT P., (1975), in Progress in Nucleic Acid Research and Mol. Biol. XV, (DAVIDSON J.N., COHN W.E., Eds) p. 632, Academic Press New York and London.	165 166	16 16
HUET J., BUHLER J.M., SENTENAC A., FROMAGEOT P., (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>72</u> , p. 3034-3038	203	70
JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUECKI W., MUNRO M.N., (1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., <u>35</u> , p. 681	49	7
JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUNRO H.N., (1968), Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>32</u> , p. 831	35 48	5 7
JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUNRO H.N., (1971), Adv. Enz. Regul., <u>9</u> , p. 169	77	8
JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUNRO H.N. (1970), Nature, <u>225</u> , p. 60	123 126	12 13
JACQUET M., GRONER Y., MONROY G., HURWITZ J., (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>71</u> , p. 3045-3049	96	9
JOHNSON J.D., JANT B.A., SOKOLOFF L., KAUFMAN S., (1969), Biochim. Biophys. Acta, <u>179</u> , p. 526	23	5
JUHASZ P.P., BENECKE B.J., SEIFART K.H., (1972), FEBS Letters, <u>27</u> , p. 30	171	17
KEDINGER C., CHAMBON P., (1972), Eur. J. Biochem., <u>28</u> , p. 283-290	153	18
KEDINGER C., GISSINGER F., CHAMBON P., (1974), Eur. J. Biochem., <u>44</u> , p. 421-436	137 150 207	14 15 71
KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MANDEL J.L., GISSINGER F., CHAMBON P., (1970), Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>38</u> , p. 165-170	40 122 127	6 12 13



	Réf.	Page
KEDINGER C., NURET P., CHAMBON P., (1971), FEBS Letters, <u>15</u> , p. 169-174	41	6
LEE C.Y., DAHMUS M.E., (1973), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>70</u> , p. 1383-1387	162	16
LINDELL T.J., WEINBERG G.F., MORRISS P.W., ROEDER R.J., RUTTER W.J., (1970), Science, <u>170</u> , p. 447	82 124	8 12
MANDEL J.L., CHAMBON P., (1971), FEBS Letters, <u>15</u> , p. 175-180	53	7
MARTIN R.G., (1969), An. Rev. Genet., <u>3</u> , p. 181	7	4
MARZLUFF W.F., HUANG S.R., HUANG R.C., (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>72</u> , p. 1082-1086	100	9
MAUL G.G., HAMILTON T.H., (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>57</u> , p. 1371	28 32	5 5
MEILHAC M., CHAMBON P., (1973), Eur. J. Biochem., <u>35</u> , p. 454	172	17
MEILHAC M., KEDINGER C., CHAMBON P., GOUINDAN V., FAULSTICH M., WIELAND H., (1970), FEBS Letters, <u>9</u> , p. 258	125	13
MEILHAC M., TYSPER Z., CHAMBON P., (1972), Eur. J. Biochem., <u>28</u> , p. 291	170	17
NOVELLO F., FIUME L., STIRPE F., (1970), Biochem. J., <u>116</u> , p. 177	128	13



	Réf.	Page
OHE K., WEISSMAN S.M., COOKE N.R., (1969), J. Biol. Chem., <u>244</u> , p. 5320-5332	102	9
O'MALLEY B.W., ROSENFELD G.C., COMSTOCK J.B., MEANS A.R., (1972), Gene transcription in reproductive tissue (DICZFALUSY E., Ed.), <u>5</u> , p. 381, Karolinska Inst., Stockholm.	174	18
PENMAN S., SMITH I.R., HOLTZMAN E., (1966), Science, <u>154</u> , p. 786	15	5
PERRY R. P., (1962), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>48</u> , p. 1079	14	5
PERRY R.P., KELLEY D.E., (1974), Cell, <u>1</u> , p. 31 - 41	178	19
PHILLIPS J.P., FOREST H.S., (1973), J. Biol. Chem., <u>248</u> , p. 265-269	195	69
POGO A.D., LITTAU V.C., ALLFREY V.G., NIRSKY A.E., (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>57</u> , p. 743	27 29 31 33	5 5 5 5
PONTA H., PONTA U., WINTERSBERGER E., (1971), FEBS Letters, <u>18</u> , p. 204	56	7
PRICE R., PENMAN S., (1972), J. Mol. Biol., <u>70</u> , p. 435-450	72 98	7 9
PRICE R., PENMAN S., (1972), J. Virol., <u>9</u> , p. 621-626	93	9
RAMUZ M., DOLY J., MANDEL P., CHAMBON P., (1965), Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>19</u> , p. 114	34	5



	Réf.	Page
REEDER R. H., ROEDER R.G.,	87	9
(1972), J. Mol. Biol., <u>67</u> , p. 431-441	92	9
RITOSSA F.H., SPIEGELMAN S.,		
(1965), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>53</u> , p. 737	16	5
ROEDER R.G.,	44	6
(1974), J. Biol. Chem., <u>249</u> , p. 249-256	66	7
	67	7
	68	7
	80	8
	114	12
ROEDER R. G.,		
(1974), J. Biol. Chem., <u>235</u> , p. 241-248	43	6
ROEDER R. G.,	196	69
(1974), J. Biol. Chem., <u>249</u> , p. 241-248	198	69
	201	70
	205	71
	213	73
ROEDER R.G., REEDER R.H., BROWN D.D.,		
(1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., <u>35</u> , p. 727	65	7
ROEDER R.G., RUTTER W.J.,	37	6
(1970), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>65</u> , p. 675	50	7
	76	8
	78	8
	81	8
	89	9
	179	21
ROEDER R.G., RUTTER W.J.,	9	4
(1969), Nature, <u>224</u> , p. 234	36	6
	105	10
	107	11



	Réf.	Page
ROSE K. M., RUCH P.A., MORRIS H. P., JACOB S.T., (1976), Biochim. Biophys. Acta, <u>432</u> , p. 60-72	202	70
RYMO L., PARSONS J.T., COFFIN J.M., WEISSMAN C., (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>71</u> , p. 2782-2786	95	9
SCHULTZ L.D., HALL B., (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>73</u> , p. 1029-1033	47 58 132	6 7 13
SCHWARTZ L.B., SKLAR E.F., JAEHNING J.A., WEINMANN R., ROEDER R.G., (1974), J. Biol. Chem., <u>249</u> , p. 5889 - 5897	64 74 75 83 106 108 111 115 130 204 208 210 214	7 7 7 8 10 11 11 12 13 71 72 72 73
SCHWARTZ L.B., ROEDER R.G., (1974), J. Biol. Chem., <u>249</u> , p. 5898 - 5906	138 154 200	14 15 69
SCHWARTZ L.B., ROEDER R.G., (1975), J. Biol. Chem., <u>250</u> , p. 3221 - 3228	155	15
SEIFART K.H., BENECKE B.J., (1975), Eur. J. Biochem., <u>53</u> , p. 293 - 300	86 148	8 15
SEIFART K.H., BENECKE B.J., JUHASZ P.P., (1972), Arch. Biochem. Biophys., <u>151</u> , p. 519 - 532	55 85 139	7 8 14



	Réf.	Page
SEIFART K. H., JUHASZ P.P., BENECKE B.J.,	167	16
(1973), Eur. J. Biochem., <u>33</u> , p. 181 - 191	169	16
SEIFART K.H., SEKERIS C.E.,		
(1969), Eur. J. Biochem., <u>7</u> , p. 408 - 412	161	16
SERGEANT A., KRSMANOVIC V.,	71	7
(1973), FEBS Letters, <u>35</u> , p. 331 - 335	103	10
	142	14
SERGEANT A., KRSMANOVIC V.,	193	62
(1974), Biochimie, <u>56</u> , p. 1293	194	66
	215	74
SERGEANT A., D'HALLUIN J.C., VERBERT A. P.,	109	11
KRSMANOVIC V.,	112	11
(1974), Arch. Ges. Virusforsch., <u>45</u> , p. 294	191	59
SERGEANT A., VERBERT A.P., KRSMANOVIC V.,		
MONTREUIL J.,		
(1969), Arch. Intern. Physiol. Biochim., <u>77</u> , p. 573	173	17
SETHI V.S.,		
(1971), Progress in Biophysics and Molecular Biology		
BUTLER J.A.V. and NOBLE D. Eds. p. 67	8	4
SHIELDS D., TATA J. R.,		
(1973), FEBS Letters, <u>31</u> , p. 209	192	62
SKLAR V.E.F., SCHWARTZ L.B., ROEDER R.G.,	143	14
(1975), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>72</u> , p. 348-352	157	15
SKLAR V.E., ROEDER R.G.,		
(1976), J. Biol. Chem., <u>251</u> , p. 1064 - 1073	156	15
	204	71





	Réf.	Page
STEVENS A., (1961), Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>3</u> , p. 92	4	4
STIRPE F., FIUME L., (1967), Biochem. J., <u>105</u> , p. 779	120	12
SUGDEN B., KELLER W., (1973), J. Biol. Chem., <u>248</u> , p. 3777 - 3788	69 141 160	7 14 17
TATA J. R., (1966), Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., <u>5</u> , p. 191	20	5
TALWAR G. P., JAILKHANI B. L., SOPORI M. L., VENKATESAN S., GROVER A., NARAYANAN P.R., NARASIMHAN C., (1974), Control of Transcription, (BIWAS B.B., MANDAL R.K., STEVENS A., COHN W.E., Eds), p. 333, Plenum, New York.	175	18
VALENZUELA P., HAGER G.L., WEINBERG F., RUTTER W.J., (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>73</u> , p. 1024-1028	46 57 133 146	6 7 13 15
VALENZUELA P., WEINBERG F., BELL G., RUTTER W.J., (1976), J. Biol. Chem., sous presse	147	15
VERBERT A. P., Recherche sur la transcription dans les cellules eucaryotes. Nature des extrêmités 5'-triphosphates des RNA synthétisés <u>in vivo</u> et <u>in vitro</u> par les RNA polymérasés DNA-dependantes Thèse de Doctorat ès Sciences à l'Université de Lille I (1974).	187	28



	Réf.	Page
WEAVER R. F., BLATTI S. P., RUTTER W., (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>68</u> , p. 2994	149	15
WEIL P.A., BLATTI S. P., (1975), Biochemistry, <u>14</u> , p. 1636 - 1642	63	7
WEINMANN R., RASKAS H.J., ROEDER R.G., (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>71</u> , p. 3426-3430	94 101	9 9
WEINMANN R., ROEDER R.G., (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>71</u> , p. 1790-1794	88 97 129	9 9 13
WEISS S. B., (1960), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>46</u> , p. 1020	3	4
WEISS S.B., GLADSTONE L., (1959), J. Ana. Chem. Soc., <u>81</u> , p. 4118	2	4
WIDNELL C.C., TATA J.R., (1964), Biochim. Biophys. Acta, <u>87</u> , p. 531	11 22	4 5
WIDNELL C.C., TATA J.R., (1966), Biochim. Biophys. Acta, <u>123</u> , p. 478	26 30	5 5
WIELAND T.H., (1968), Science, <u>159</u> , p. 946	121	12
YEN CHIU LIN, ROSE K.M., JACOB S.T., (1976), Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>72</u> , p. 114-120	190	42
YOUNG E.T., SINSHEIMER R.L., (1967), J. Mol. Biol., <u>30</u> , p. 147	183	26
ZYLBER E.A., PENMAN S., (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., <u>68</u> , p. 2861-2865	91 99	9 9

