

PHYSIOLOGIE CELLULAIRE ANIMALE. — *Rôle de l'ARN dans l'inactivation du chromosome lors de la métaphase*. Note (\*) de Francis Vasseur, François Fontaine, François Strozyk et Marc-Marie Deminatti, transmise par Maurice Durchon.

Des chromosomes métaphasiques isolés, non fixés, ont été utilisés comme matrice dans un système de transcription *in vitro*. Dans ces conditions, aucune synthèse d'ARN n'a pu être décelée par autoradiographie. Par contre, on observe une transcription après un des traitements suivants : mélange méthanol-acide acétique, acide chlorhydrique 0,2 N, chlorure de sodium 0,35 M ou ribonucléase pancréatique. La transcription est la plus intense après action de la ribonucléase. Ce résultat pose le problème du rôle de l'ARN dans l'inactivation fonctionnelle du chromosome lors de la mitose.

*Unfixed, isolated metaphase chromosomes were used as template in an in vitro RNA synthesis assay. In these conditions, no RNA synthesis was observed by autoradiography. Transcription was effective after treatment with methanol-acetic acid, HCl 0,2 N, NaCl 0,35 M or pancreatic RNase. Transcription is the most important after treatment with RNase. This result points out the problem of the role of RNA in inhibition of chromosome during mitosis.*

I. INTRODUCTION. — Les facteurs qui interviennent dans l'inactivation génique de la chromatine lors de la métaphase sont mal connus. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer cette caractéristique : soit une action inhibitrice des histones [1], ou de certaines protéines non histoniques, soit une activité réduite des ARN polymérases ([2], [3]).

Afin de préciser les déterminants de cette inactivation, nous avons étudié le comportement du chromosome métaphasique dans un système de transcription *in vitro*, après divers traitements plus ou moins spécifiques qui extraient du matériel chromosomique. Dans ces conditions, alors que la transcription exprime la levée de l'inactivation de l'ADN, l'intensité de la transcription permet d'établir une relation entre le matériel extrait et son rôle dans l'inactivation fonctionnelle de l'ADN chromosomique.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les chromosomes métaphasiques isolés de cellules KB, selon une technique à pH 3 décrite antérieurement [4], sont déposés sur des lames histologiques (fig. 1).

Chaque série expérimentale comprend des lames de chromosomes non fixés et des lames sur lesquelles nous avons effectué soit une fixation au mélange méthanol-acide acétique (3 : 1 v/v), soit un traitement avec HCl 0,2 N ou au NaCl 0,35 M, soit un traitement enzymatique par la RNase ou DNase. On fait agir les enzymes, HCl ou le NaCl à 37°C, pendant 1 h en chambre humide. La solution de DNase I (Worthington) est à 40 µg/ml dans le tampon tris/HCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,5. La solution de RNase A (Worthington), à 100 µg/ml est préparée dans le tampon de conservation des chromosomes [4].

La synthèse d'ARN *in vitro* se fait en étalant sur les lames le milieu de Sederoff [5], sans spermidine ni serum albumine bovine, en présence de 4 nMoles d'uridine triphosphate tritiée (activité spécifique : 15 ci/mMole, CEA Saclay). Après 1 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, les lames sont plongées 5 mn dans différentes solutions de lavage : trois bains de 2 × SSC contenant du pyrophosphate de sodium 10 mM (pH 7,0), deux bains d'éthanol respectivement à 70 et à 95 %.

Une contre-épreuve, consistant en un traitement par la RNase, a été faite après synthèse.

Après séchage des lames, la synthèse est appréciée par autoradiographie avec l'émulsion Kodak NTB 2 (Eastman-Kodak). Les temps d'exposition (6 ou 12 jours) sont identiques pour chaque série de lames comprenant témoins et essais. Chaque série est effectuée au moins 10 fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats.

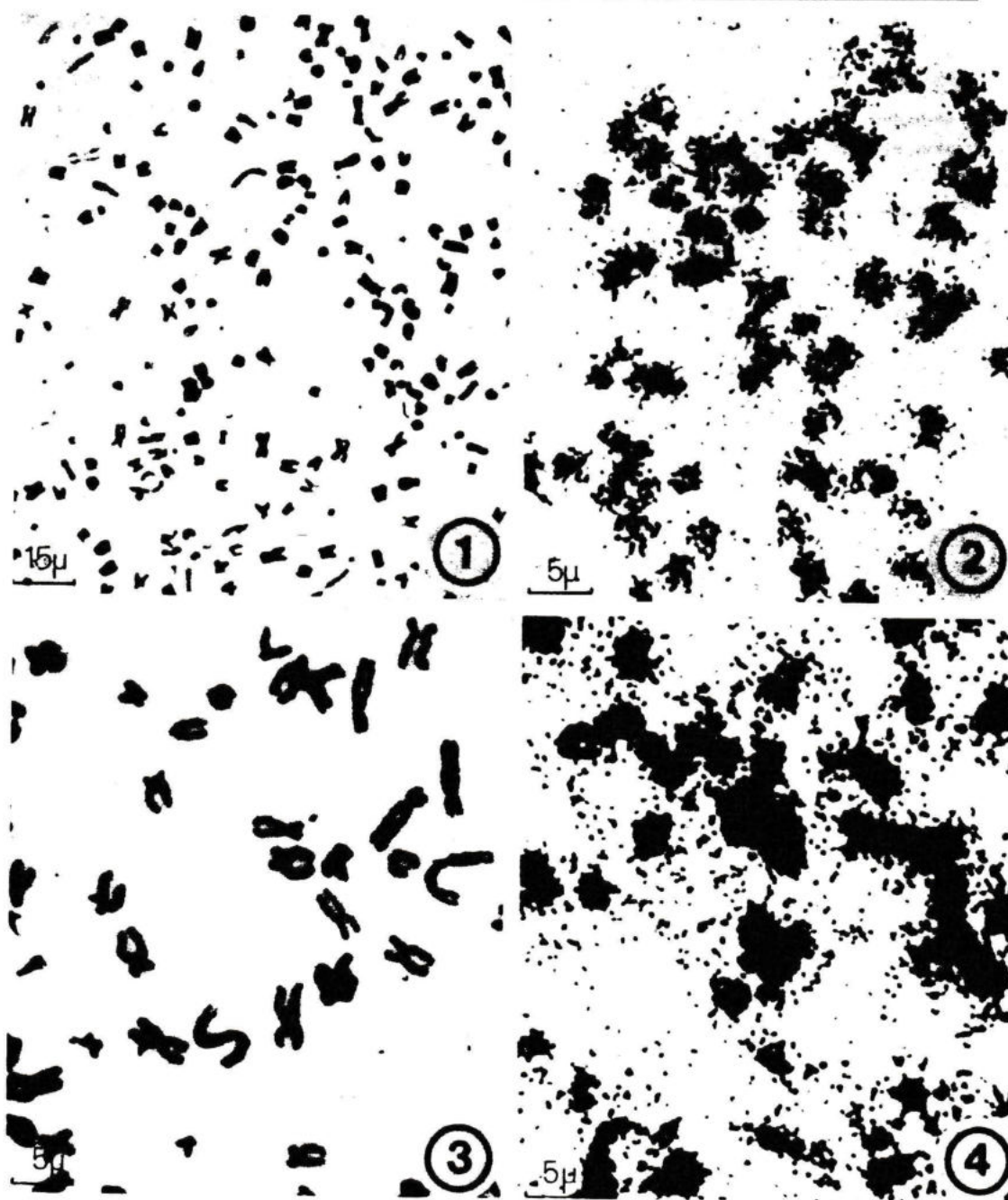


Fig. 1. – Chromosomes isolés à pH acide. Autoradiographies de chromosomes isolés de cellules KB : synthèse d'ARN *in vitro*, en présence d'ARN-polymérase d'*E. coli* et des quatre nucléotides : GTP, ATP, CTP et UTP-<sup>3</sup>H.

Fig. 2. – Chromosomes isolés fixés au mélange méthanol-acétique (3 : 1). Les chromosomes sont recouverts de grains d'argent indiquant qu'il y a eu synthèse d'ARN.

Fig. 3. – Chromosomes isolés non fixés. Il n'y a aucune incorporation du précurseur radioactif, ce qui indique l'inactivité du chromosome métaphasique.

Fig. 4. – Chromosomes isolés, non fixés, traités à la RNase pancréatique avant la synthèse. Noter l'intense radioactivité indiquant que la synthèse d'ARN est importante.



III. RÉSULTATS. — Lorsque les chromosomes isolés et non fixés sont éprouvés dans le système de transcription *in vitro*, aucune synthèse d'ARN n'est décelée même après 1 h d'incubation à 37°C (fig. 3). Si les chromosomes sont fixés avant la synthèse *in vitro* on observe une importante radioactivité (fig. 2). Des résultats analogues sont obtenus par les traitements avec HCl 0,2 N ou au NaCl 0,35 M appliqués avant la synthèse *in vitro* sur des chromosomes non fixés (tableau). On note cependant une radioactivité moins importante dans ces conditions.

TABLEAU

*Expériences de synthèse d'ARN in vitro sur des chromosomes métaphasiques isolés.*

Divers traitements ont été effectués avant ou après l'application de la solution de synthèse 1 h à 37°C.

Traitements avant la synthèse	Traitements après la synthèse	Radioactivité au niveau des chromosomes
0. ....	0	0
HCl 0,2 N. ....	0	+
	RNase	0
NaCl 0,35 M. ....	0	++
	RNase	0
Méthanol-acide acétique (3:1). ....	0	+++
	RNase	0
RNase. ....	0	++++
	RNase	0
DNase I. ....	0	0
Tampon de conservation des chromosomes.	0	0

Pour analyser l'effet d'un traitement plus spécifique, nous avons soumis les chromosomes métaphasiques non fixés à l'action préalable de la RNase pancréatique dissoute dans le milieu de conservation des chromosomes. On remarque alors une importante radioactivité sur les chromosomes métaphasiques (fig. 4).

Afin de vérifier d'une part que la matrice de la synthèse est bien l'ADN chromosomique, et d'autre part que le produit synthétisé est de l'ARN, nous avons aussi traité des préparations de chromosomes isolés respectivement par la DNase I avant la transcription ou par la RNase pancréatique après la transcription. Dans ces deux conditions, aucune radioactivité n'est décelée sur les chromosomes (tableau), confirmant ainsi le rôle de matrice de l'ADN et la nature du produit synthétisé.

IV. DISCUSSION. — Nos résultats montrent que l'inactivation fonctionnelle de l'ADN chromosomique au cours de la métaphase, déjà décrite par divers auteurs ([2], [3], [6]), peut être levée par la fixation au mélange méthanol-acide acétique [2].

Nos observations après traitement par des solutions acides qui extraient les histones [1] (fixation au mélange méthanol-acide acétique, ou traitement avec HCl 0,2 N) laissent à penser que ces histones pourraient jouer un rôle déterminant dans l'inactivation fonctionnelle de l'ADN lors de la métaphase. Dans cette hypothèse, on peut toutefois exclure le rôle des histones H<sub>1</sub>, puisque celles-ci sont perdues lors de l'isolement des chromosomes métaphasiques à pH acide [7].

Les résultats obtenus après traitement par du NaCl 0,35 M qui extrait de nombreuses protéines de la chromatine sont également en faveur d'un rôle inactivant de ces protéines extraites. Mais nous devons admettre le manque de spécificité des traitements par le NaCl 0,35 M ou par les solutions acides.

Par contre la levée de l'inactivation par le traitement spécifique à la RNase est un argument en faveur du rôle inhibiteur de l'ARN que contient le chromosome [8]. Soulignons qu'afin de s'assurer de la spécificité de ce traitement, en évitant tout effet parasite de la solution tampon dans laquelle est utilisée la RNase, les traitements ont été effectués en dissolvant la RNase dans le milieu de conservation des chromosomes, lequel même à 37°C, pendant 1 h n'altère ni la morphologie ni la composition des chromosomes ([4], [9]).

Dans ces conditions, la levée de l'inactivation de l'ADN ne peut être attribuée qu'au seul traitement par la ribonucléase. Des expériences de reconstitution ont été tentées avec le l'ARN synthétique (poly A), mais la fixation sur les chromosomes n'a pu être mise en évidence. Le manque de spécificité de cet ARN synthétique n'est pas à exclure. Cependant, le fait que l'ARN chromosomique est hydrolysé par la RNase pancréatique, implique qu'il n'est pas hybridé à l'ADN, ce qui expliquerait peut-être l'échec des expériences de reconstitution. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Pederson et Bhorjee [10] qui ont montré la présence dans le chromosome, de molécules d'ARN de petite taille, liées à l'ADN de manière covalente et non hybridées à l'ADN. Selon ces auteurs, la reconstitution avec ces molécules d'ARN purifiées, est impossible à réaliser, probablement à cause de la nature de leur liaison à l'ADN.

Il est difficile de savoir, dans l'état actuel des recherches, de quelle manière intervient l'ARN chromosomique. Son rôle peut être structural, et son départ induirait des modifications conformationnelles de la chromatine, permettant la transcription de l'ADN. Son rôle peut être plus direct, par fixation sur l'ADN lui-même, sa dégradation démasquant des sites de transcription. Enfin, on peut envisager que certaines protéines non-histoniques en relation avec cet ARN, interviendraient dans le processus d'inactivation de l'ADN métaphasique. Toutefois, le fait que l'ADN des chromosomes métaphasiques fixés ou non fixés, soit sensible à l'action de la DNase I, et colorable au mélange de Giemsa, indique qu'il reste accessible à certains substrats.

*En conclusion*, ces résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle lors de la métaphase, la conformation spatiale particulière de l'ADN en rapport avec des molécules d'ARN, serait responsable de l'inactivité fonctionnelle du chromosome métaphasique.

(\*) Remise le 19 octobre 1981, acceptée le 21 décembre 1981.

- [1] A. T. SUMNER, H. J. EVANS et R. A. BUCKLAND, *Exp. Cell Res.*, 81, 1973, p. 214.
- [2] B. B. COHEN et D. L. DEANE, *J. Cell Sc.*, 20, 1976, p. 215.
- [3] S. MATSUI, H. WEINFELD et A. SANDBERG, *J. Cell Biol.*, 80, 1979, p. 451.
- [4] M. DEMINATTI, J. L. LAÏ, X. DESBIENS et N. JACQUELOOT, *C. R. Soc. Biol.*, 169, 1975, p. 981.
- [5] R. SEDEROFF, R. CLYNES, M. PONCZ et S. HACHTEL, *J. Cell Biol.*, 57, 1973, p. 583.
- [6] D. W. KING et M. L. BARNHISEL, *J. Cell Biol.*, 33, 1967, p. 265.
- [7] J. L. LAÏ et M. DEMINATTI, *Ann. Genet.*, 20, 1977, p. 25.
- [8] J. BRACHET, *Biochemical Cytology*, Academic Press, New York, 1957, p. 145.
- [9] M. DEMINATTI, J. B. SAVARY et J. L. LAÏ, *Ann. Genet.*, 19, 1976, p. 91.
- [10] T. PEDERSON et J. S. BHORJEE, *J. Mol. Biol.*, 128, 1979, p. 451.

Laboratoire de Génétique Faculté de Médecine, 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex.