

ETUDE DES NUCLEOPROTEINES

(Application au grain de blé)

- Eléments bibliographiques -

J. Cl. AUTRAN

Janvier 1969

ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES
SUR

L'ETUDE DES NUCLEOPROTEINES
(APPLICATION AU GRAIN DE BLE)

Sommaire :

INTRODUCTION page 2

I - GENERALITES SUR LES ACIDES NUCLEIQUES ET LES
 NUCLEOPROTEINES " 6

II - PROPRIETES DES NUCLEOPROTEINES " 14

III - EXTRACTION DES NUCLEOPROTEINES " 25

 A - Difficultés de l'extraction " 25

 B - Cas des tiseus animaux " 27

 C - Cas des tiseus végétaux " 34

IV - FRACTIONNEMENT DES NUCLEOPROTEINES EN ACIDES
 NUCLEIQUES ET EN PROTEINES " 41

 A - CAS DES TISSUS ANIMAUX " 41

 B - CAS DES TISSUS VEGETAUX " 44

V - METHODES D'ETUDE DES PROTEINES ASSOCIEES AUX ACIDES
 NUCLEIQUES " 46

 A - CAS des tiseus animaux " 46

 B - Cas des tiseus végétaux " 50

VI - DETERMINATION QUANTITATIVE DES NUCLEOPROTEINES
 GRACE AU DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES " 53

AVANT-PROPOS

Cette étude bibliographique constitue la phase préparatoire d'un travail de laboratoire sur le sujet suivant: "Etude de la répartition histologique des nucléoprotéines dans le grain de blé".

Le travail envisagé doit être accompli dans le cadre d'un Diplôme d'Etudes Approfondies de Physiologie Végétale Appliquées à la Faculté des Sciences de Paris, sous la direction de Monsieur le Professeur Ulrich.

INTRODUCTION

Le but de cette étude bibliographique est de préparer à une étude de la fraction nucléique dans les différentes régions histologiques du grain de blé.

Cependant, la littérature n'a révélé que fort peu de travaux en rapport étroit avec ce sujet précis. En conséquence, et afin de permettre l'amorçage du travail en laboratoire, la bibliographie aura un champ plus étendu.

En fait, nous ferons d'abord quelques rappels sur les acides nucléiques et les nucléoprotéines. Nous essayerons ensuite de faire le point sur l'ensemble des méthodes d'extraction et d'étude des nucléoprotéines de toutes origines. Enfin, nous résumerons les méthodes ayant déjà été appliquées aux tissus végétaux et en particulier au grain de blé. Les lignes suivantes vont d'ailleurs fournir plus de détail sur l'esprit dans lequel ce travail est envisagé.

I) Justification d'une étude des nucléoprotéines :

Les nucléoprotéines constituent un sujet actuellement très étudié. D'une part, on s'est aperçu que les acides nucléiques jouent un rôle fondamental dans la transcription du code génétique et dans la synthèse des protéines; d'autre part, on a découvert plus récemment que les protéines jouent également un rôle important dans ces mêmes domaines.

L'analyse biochimique des composés nucléiques semble donc revêtir un caractère fondamental, mais un intérêt pratique existe également si les tissus étudiés ont une valeur technologique. Ainsi, une meilleure connaissance des nucléoprotéines permettrait peut-être une meilleure sélection génétique des blés ou bien, par exemple, permettrait d'apprécier l'état de conservation d'une céréale.

2) Différentes façons d'envisager l'étude :

Il y a 100 ans exactement que MIESCHER isola une "nucléine" à partir des noyaux de cellules de pus. Depuis ce temps, les connaissances précises sur les composés nucléiques ont évolué avec une relative lenteur et ce n'est que depuis peu que quelques conceptions solides ont été dégagées.

Durant un siècle, on s'est surtout attaché à découvrir et à mieux connaître ces composés nucléiques, par exemple:

- leur répartition dans la cellule vivante
- leur rôle (synthèse protéique, code génétique).
- leur structure macromoléculaire.

Comme il a été admis que des composés nucléiques semblables existaient dans tous les tissus vivants, l'étude a pu se concentrer sur les organes et les cellules qui en contenaient beaucoup ou sur ceux dont l'extraction était facile. C'est pourquoi la majorité des recherches ont porté sur des organes comme:

- le thymus de veau
- la levure
- les spermatozoïdes de poisson
- les tumeurs

etc...

qui possèdent justement ces qualités. L'étude de ces tissus a donc été faite moins pour les tissus eux-mêmes que pour les composés nucléiques que l'on en extrayait.

En conséquence, une étude systématique des composés nucléiques pour l'ensemble des tissus vivants a rarement été envisagée et si l'on connaît maintenant bien les acides nucléiques de certains tissus, il en est d'autres pour lesquels on ne sait pratiquement rien.

3) Cas des végétaux et en particulier du grain de blé :

Parmi les nombreux travaux sur les composés nucléiques, relativement peu se sont intéressés aux tissus végétaux. Ceci peut s'expliquer partiellement par le fait qu'un corps est facile à étudier si sa mise en solution est aisée. Or les végétaux

contiennent fréquemment des fractions difficiles à solubiliser.

Parmi les tissus végétaux, ce sont surtout les tissus jeunes ou doués d'une intense activité biologique, comme les méristèmes, les coléoptiles, les embryons, qui ont été l'objet d'une étude. Par contre, les organes de réserve, comme les graines, ont été délaissés.

Or, lorsqu'on étudie les composés nucléiques, s'il est naturel de s'adresser aux organes qui en sont riches, l'esprit de notre étude est différent: nous ne cherchons pas à découvrir quelque chose de nouveau quant aux composés nucléiques eux-mêmes; nous voulons compléter l'étude du grain de blé et grâce aux composés nucléiques, trouver de nouvelles données physiologiques et génétiques.

Nous devons donc étudier systématiquement les différentes parties du grain de blé, ou du moins différents produits de mouture du grain (gros sons, fins sons, amande centrale, amande périphérique, germe,...), qu'ils soient riches ou pauvres en composés nucléiques. C'est là la difficulté car si les fractions riches comme le germe ont été étudiées fréquemment, les fractions pauvres comme l'endosperme sont moins connues au point de vue de leurs composés nucléiques et par suite, il faudra mettre au point des méthodes convenables d'étude.

Voilà pourquoi le champ de cette étude a dû être élargi. La littérature n'ayant pas révélé suffisamment de données quant au grain de blé, nous avons rassemblé aussi les méthodes relatives aux autres tissus végétaux et aussi parfois à certains tissus animaux, pensant rencontrer dans cet ensemble, des méthodes susceptibles de s'adapter au blé, ce que l'expérience nous apprendra.

Enfin, dernier point, nous avons parlé jusqu'ici de "composés nucléiques". Nous verrons en fait qu'on peut s'intéresser soit aux acides nucléiques, soit aux protéines qui leur sont associées. Dans notre cas, les acides nucléiques ne nous seront utiles que lors des déterminations quantitatives. Généralement, notre étude sera consacrée aux nucléoprotéines.

En effet, ce travail est accompli en relation avec Monsieur BOURDET, Directeur du Laboratoire d'Etudes de la Qualité des Blés dont le principal axe de recherches est l'étude des protéines du blé. En conséquence, la fraction protéique de la nucléoprotéine sera étudiée de préférence.

C'est pourquoi nous avons adopté le plan suivant:

I - Généralités sur les acides nucléiques et les nucléoprotéines.

II - Les protéines associées aux acides nucléiques: propriétés générales.

III - Extraction des nucléoprotéines

- A partir de tissus animaux
- A partir de tissus végétaux.

IV - Fractionnement des nucléoprotéines en acides nucléiques et en protéines

- Cas des tissus animaux
- Cas des tissus végétaux.

V - Méthodes d'étude des protéines associées aux acides nucléiques:

- Cas des tissus animaux
- Cas des tissus végétaux

VI - Déterminations quantitatives des nucléoprotéines grâce au dosage des acides nucléiques

- Cas des tissus animaux
- Cas des tissus végétaux

VII - Conséquences physiologiques et génétiques chez le blé.

Conclusion : programme de recherches envisagé.

CHAPITRE PREMIER

GENERALITES SUR LES ACIDES NUCLEIQUES
ET LES NUCLEOPROTEINES

I - DEFINITIONS :

Les acides nucléiques sont des molécules géantes répandues dans toutes les cellules vivantes. Ils sont formés par l'enchaînement d'unités simples ou nucléotides comportant chacun une base purique ou pyrimidique, un sucre à 5 atomes de carbone et un groupement phosphoryle. Le pentose peut être, selon le cas, le ribose (acides ribonucléiques ou ARN) ou le désoxyribose (acides désoxyribonucléiques ou ADN).

La distinction entre ARN et ADN tient principalement à la nature du pentose qui entre dans leur composition, mais aussi à la nature des bases. Les ARN contiennent les 4 bases principales: adénine, guanine, cytosine et uracile, alors que les ADN renferment les 4 bases principales: adénine, guanine, cytosine et thymine.

D'après cette définition, on voit qu'un ARN est une macromolécule au sein de laquelle on pourrait isoler un enchaînement tel que :

ADENINE - RIBOSE - PHOSPHATE
CYTOSINE - RIBOSE - PHOSPHATE
GUANINE - ~~URACILE~~ - PHOSPHATE
URACILE - RIBOSE - PHOSPHATE
GUANINE - RIBOSE - PHOSPHATE

De même, on pourrait isoler, à partir d'un ADN, un enchaînement tel que celui représenté ci-dessous:

ADENINE - DESOXYRIBOSE - PHOSPHATE
CYTOSINE - DESOXYRIBOSE - PHOSPHATE
GUANINE - DESOXYRIBOSE - PHOSPHATE
THYMINE - DESOXYRIBOSE - PHOSPHATE
CYTOSINE - DESOXYRIBOSE - PHOSPHATE

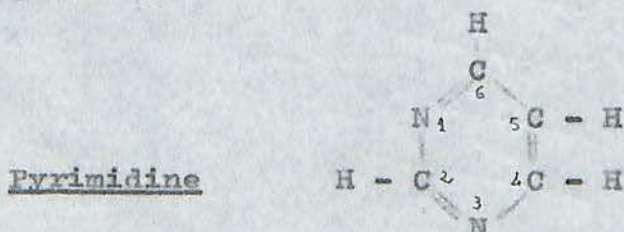
Le produit résultant de l'union d'une base et d'un pentose est un oside, qui, dans le cas présent est appelé nucléoside.

Le produit obtenu par estérification d'un nucléoside par l'acide phosphorique est un nucléotide. L'estérification de l'acide phosphorique par les nucléosides qui sont des polyalcools n'est qu'un cas particulier de la réaction classique d'estérification des acides par les alcools, qui aboutit à la formation d'esters.

II - BASES PURIQUES ET BASES PYRIMIDIQUES :

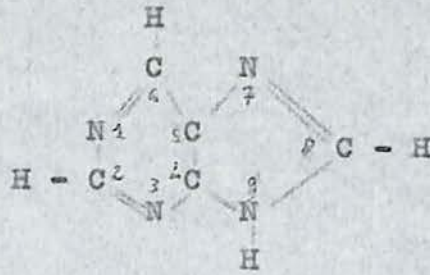
Les bases puriques ou pyrimidiques entrant dans la constitution des acides nucléiques sont des bases organiques complexes dérivant de 2 noyaux fondamentaux, la purine et la pyrimidine.

Le plus simple de ces 2 noyaux est la pyrimidine; c'est une base azotée comportant 2 atomes d'azote et 4 atomes de carbone, le tout formant un cycle hétérogène ou hétérocycle de 6 atomes:



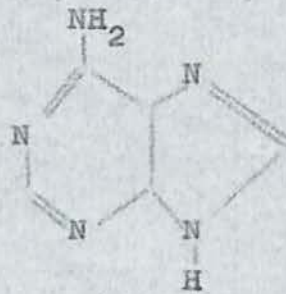
Les bases puriques ont une structure légèrement plus compliquée: elles dérivent de la purine, noyau hétéro-bicyclique comportant en tout 9 atomes dont 5 de carbone et 4 d'azote:

Purine

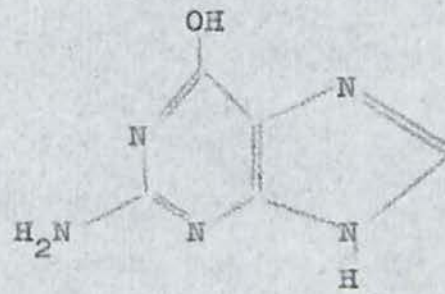


I) Bases puriques:

Les 2 types d'acides nucléiques contiennent les mêmes bases puriques: l'adénine et la guanine. Ces bases dérivent d'un noyau commun: la purine.



Adénine
ou 6-aminopurine



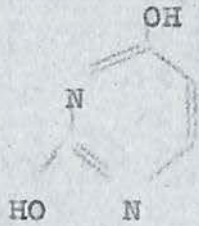
Guanine
ou 2-amino-6-hydroxypurine

2) Bases pyrimidiques:

Elles dérivent de la pyrimidine:

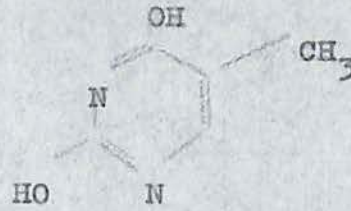


Cytosine ou 2-hydroxy-6-aminopyrimidine (se trouvant, de même que toutes les autres pyrimidines, en équilibre avec la forme cétonique).



Uracile

ou 2-6-dihydroxypyrimidine



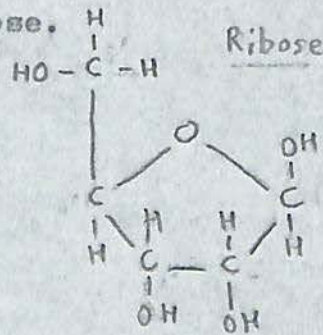
Thymine

ou 5-méthyluracile

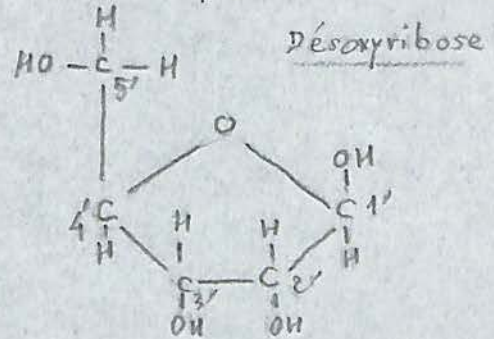
Les 5 bases citées sont celles que l'on rencontre le plus communément dans les acides nucléiques. A côté, on rencontre aussi des bases beaucoup plus rares, telles que : la 5-méthyl cytosine, la 5-hydroxyméthyl cytosine, la 6-méthyl-amino purine, la méthyl guanine, etc...

III - LES NUCLEOSIDES :

Les nucléosides résultent de l'union d'une base avec un sucre à 5 atomes de carbone qui est soit le ribose ou β -D-ribofurannose, soit le désoxyribose ou β -D-2-désoxyribofurannose.



Ribose



Désoxyribose

Les nucléosides sont donc selon le cas, des béta-D-ribofurannosides ou des béta-D-2-désoxyribofurannosides.

A partir des ARN, il sera possible d'obtenir des nucléosides résultants de la combinaison du ribose avec les 4 bases principales; on aura ainsi: l'adénosine, la guanosine, la cytidine, l'uridine. A partir des ADN, on aura: la désoxyadénosine, la désoxyguanosine, la désoxycytidine, la désoxythymidine.

IV LES NUCLEOTIDES :

Les nucléotides résultent de la phosphorylation des

nucléosides. On conçoit donc que selon la position du groupement phosphoryle sur le sucre, on obtiendra, pour une même base et pour un même sucre, deux nucléotides isomères dans le cas du désoxyribose (selon que le groupement phosphoryle est fixé en C.3' ou en C.5') et trois nucléotides isomères dans le cas du ribose (selon que le groupement phosphoryle est fixé en C.2' C.3' ou C.5').

Les nucléotides constituent les maillons des chaînes d'acides nucléiques. Lorsque l'enchaînement ne comporte pas plus de 10 nucléotides, on parle d'oligonucléotide. Par contre, des enchaînements plus importants, pouvant aller jusqu'à des poids moléculaires de plusieurs millions, sont appelés "polynucléotides". Tous les acides nucléiques isolés à partir de tissus animaux ou végétaux appartiennent à cette catégorie.

V - LES ACIDES RIBONUCLEIQUES :

Ce sont des polynucléotides, constitués par l'enchaînement d'un grand nombre de nucléotides, comportant chacun:

BASE - RIBOSE - PHOSPHATE

C'est le groupement phosphoryle qui assure la liaison entre 2 nucléotides consécutifs: on a établi qu'il existait une liaison phosphodiester entre le C.3' d'un ribose et le C.5' du ribose suivant.

Selon leur masse moléculaire et la fonction qu'ils assument, on distingue à l'heure actuelle 3 classes fondamentales d'ARN.

I) Les ARN de transfert: (t-ARN).

Ce sont des enchaînements de 80 nucléotides et par conséquent des molécules de masse moléculaire 25000, ainsi appelés car ils servent à transporter les acides aminés activés au cours de la synthèse des protéines. Il existerait un t-ARN spécifique du transfert de chaque amino-acide. Il est possible également que chaque organisme possède un assortiment particulier de t-ARN, si bien que leur diversité est considérable.

2) Les ARN messagers :

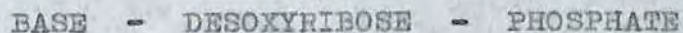
Ces substances ont été découvertes et ainsi nommées par Jacob et Monod, car ce sont les vecteurs du code génétique d'information servant à la synthèse des protéines: ils sont donc porteurs d'un message, qui permet la synthèse de protéines spécifiques. La masse moléculaire de ces ARN messagers serait variable selon la longueur de la protéine qu'ils ont à synthétiser. Ils sont métaboliquement instables car, sitôt leur message transmis, ils disparaissent.

3) Les ARN macromoléculaires :

On range sous cette rubrique tous les ARN qui n'appartiennent pas aux deux premières catégories et que l'on connaît depuis une cinquantaine d'années pour les avoir isolés à partir de la levure. Leur masse moléculaire serait supérieure à 500 000 et ils seraient localisés à l'intérieur de la cellule dans les organites cellulaires appelés ribosomes.

VI - LES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES :

Ce sont des polynucléotides constitués par l'enchaînement d'un grand nombre de mononucléotides du type:



Les ADN isolés à partir de nombreuses sources (thymus de veau, germe de blé, bactériophages,...) ont un poids moléculaire de l'ordre de 6 000 000. Ils se présentent toujours sous forme de masse blanchâtre fibreuse, se dissolvant dans l'eau en donnant une solution extrêmement visqueuse.

On a constaté que les teneurs en adénine et thymine, d'une part, en guanine et cytosine, d'autre part, sont identiques. Cette constatation est fondamentale et a permis à Watson et Crick en 1953 de proposer leur schéma de structure bicaténaire des ADN. Ce schéma permet d'expliquer d'une part la possibilité d'auto-duplication de la molécule, d'autre part, la matérialisation du code d'information génétique à l'aide des séquences de paires de bases, propriétés qui permettent aux ADN de réaliser à l'échelle moléculaire, ce que les gènes réalisent sous nos yeux à l'échelle microscopique.

VII - LES NUCLEOPROTEINES :

Il ne semble pas que les acides nucléiques constituent des unités isolées dans la cellule vivante. On a été amené rapidement à penser qu'ils devaient être associés à des protéines d'un type particulier et constituer ainsi des hétéroprotéines nommées nucléoprotéines.

Mais, comme le souligne CHARGAFF (1), "à côté de cette définition de manuel - une combinaison entre une protéine et un acide nucléique -, il demeure un océan d'incertitudes". On s'est en effet interrogé longtemps pour savoir de façon certaine si les nucléoprotéines représentent des entités chimiques réellement existantes, ayant une signification par elles-mêmes, ou s'il s'agit d'artefacts de préparation, de combinaisons fortuites au moment du broyage des tissus et de la précipitation d'un haut polymère anionique (acide nucléique) et de molécules polycationiques (protamines et histones).

Cependant, les 20 dernières années de recherches ont montré, en particulier:

- la constance de la composition en acides aminés de diverses protamines
 - la similitudes des histones extraites de tissus très divers
 - la composition rigoureuse et caractéristique de la partie protidique d'un virus, laquelle est nécessaire, tout comme la partie nucléique, à l'activité biologique,
- autant de faits qui tendent à prouver l'existence réelle des nucléoprotéines et à réfuter l'idée selon laquelle elles ne seraient que des combinaisons fortuites. (2).

S'il persiste encore un doute quant à la signification de certaines nucléoprotéines, on peut dire néanmoins que la plupart des auteurs sont d'accord sur leur existence réelle dans les tissus et en général, les controverses ne persistent plus que sur le fait suivant: doit-on considérer telle ou telle préparation comme une nucléoprotéine native - c'est-à-dire

existant réellement à l'état natif dans les tissus avant toute précipitation - ou bien comme une protéine dénaturée - c'est-à-dire représentant la protéine native ayant additionné au cours de la précipitation d'autres protéines dites "protéines additionnelles" existant indépendamment d'elles dans les tissus avant la précipitation. (2).

VIII - ABREVIATIONS :

Dans toute la suite, nous employerons couramment les abréviations suivantes:

AN	acides nucléiques
ARN	acide ribonucléique
ADN	acide désoxyribonucléique
NP	nucléoprotéine
RNP	ribonucléoprotéine
DNP	désoxyribonucléoprotéine

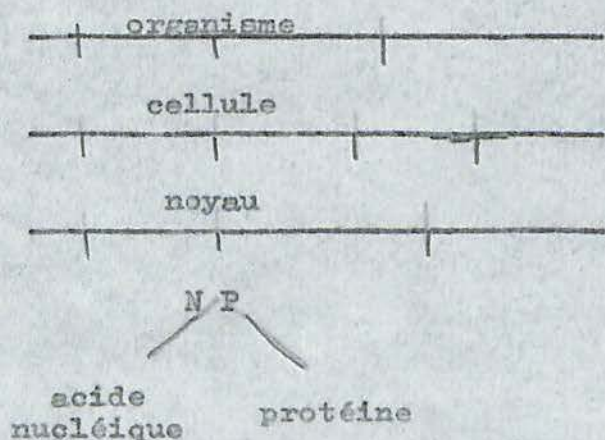
CHAPITRE II

PROPRIETES DES NUCLEOPROTEINES

I - GENERALITES :

Les nucléoprotéines sont des constituants universels des noyaux cellulaires. Elles y jouent sans doute un rôle décisif dans la division cellulaire.

Une particule nucleoprotéique est une unité compliquée; elle est plus simple que n'importe quel organite cellulaire tel que le noyau lui-même, mais plus complexe que n'importe quelle macromolécule bien définie. Dans la hiérarchie d'élaboration d'un organisme, les nucléoprotéines se situent entre les noyaux et certaines macromolécules.



La compréhension complète de la structure et du rôle des nucléoprotéines pourrait fournir des pistes importantes quant à la compréhension de l'organisation d'une cellule vivante car des nucléoprotéines ont été également trouvées dans certaines particules du cytoplasme.

Une nucléoprotéine se compose de 2 constituants macromoléculaires: AN et protéine. Dans leur assemblage, il y a aussi de l'eau et une certaine quantité d'autres "impuretés" micromolé-

culaires, telles que les ions organiques. Comme ni le nombre, ni la structure de chacune de ces unités ne sont connus, une particule nucléoprotéique peut difficilement être qualifiée de macromolécule.

En outre, il y a des raisons de croire que certaines de ces préparations de NP isolées diffèrent des NP natives: Alors que la substance isolée est plus ou moins statique, la NP de la cellule vivante, surtout en voie de division cellulaire, est dynamique; c'est pourquoi les acides nucléiques, d'une part, les protéines, d'autre part, sont beaucoup mieux connus que le complexe nucléoprotéique lui-même. (3).

II - NOMENCLATURE DES NUCLEOPROTEINES :

A) D'après le type de l'acide nucléique :

Une première classification des NP en DNP et RNP peut s'établir selon que l'acide nucléique est un ADN ou un ARN. Cette distinction a le mérite de correspondre à une répartition intracellulaire car la majeure partie de l'ARN se trouve dans le cytoplasme alors que le noyau renferme une partie d'ARN pour environ 9^e une d'ADN. Cependant, bien que simple et utile, cette classification ne met pas en évidence les différentes catégories de protéines composant les NP.

B) D'après le type de la protéine :

Certaines NP sont formées par une association d'AN et de protéines fortement basiques: ce sont :

a) Les nucléoprotamines, constituants des noyaux de spermatozoïdes de certains poissons.

b) Les nucléohistones, dont le type est la désoxyribonucléohistone du thymus ou thymonucléohistone.

D'autres AN sont associés à des protéines à caractère basique beaucoup moins marqué; ils constituent ainsi :

c) Les "nucléoprotéines proprement dites" (4), ou "nucléoprotéines résiduelles" (5).

Cette 2^e classification fait apparaître les différents groupes protéiques, mais a aussi l'avantage de distinguer les

2 catégories d'AN, car les nucléoprotamines et les nucléohistones sont presque toujours des DNP (donc généralement des constituants de noyaux cellulaires, tandis que les NP proprement dites correspondent le plus souvent à des RNP.

Cependant, les critères de cette classification sont assez discutables:

Ainsi, le groupe des nucléoprotamines est très spécial alors que les histones représentent un groupe très large.

D'autre part, l'existence de plusieurs fractions d'histones de propriétés éloignées, rend arbitraire la distinction protamine-histone. MURRAY (6) pense que la distinction protamine-histone est comparable à la ~~fixation~~ distinction de 2 fractions différentes d'histones et qu'il serait plus logique de les considérer comme des protéines homologues et de les regrouper sous le terme de "protéines basiques du noyau".

Enfin, l'existence d'un groupe de protéines sans caractère basique marqué est discutée. Si certains auteurs affirment l'existence de ce groupe et même son importance capitale, d'autres pensent que leur présence dans les préparations n'est due qu'à un manque de purification des histones ou des protamines. (5).

C) Difficultés d'établir une classification générale :

Il apparaît que la caractérisation précise des NP est un problème encore mal résolu, ou du moins, qui n'a été bien résolu que chez quelques tissus vivants. En particulier, la distinction protamine-histone est certainement à revoir, car si elle constitue une classification valable pour les premières NP découvertes historiquement, elle ne peut prétendre englober tous les cas particuliers découverts ultérieurement. Peut-être une classification en fonction des contenus en acides aminés, ou par exemple, du taux arginine/lysine, serait préférable.

En conséquence, à cause de toutes ces incertitudes, pour ce qui concerne notre étude sur le grain de blé, nous nous limiterons aux termes de DNP et RNP, étant entendu que des précisions quant à la nomenclature pourront être apportées, s'il y a lieu, dans des travaux ultérieurs.

III - ETUDE DES DIFFERENTES CATEGORIES DE NUCLEOPROTEINES :

A) LES NUCLEOPROTAMINES :

Elles correspondent à des associations par des liaisons du type salin, de protéines très simples (protamines) avec des ADN de noyaux cellulaires de spermatozoïdes de certains poissons (saumon, hareng, ...) et de quelques rares oiseaux (7). On ne les trouve même pas dans les autres organes de ces animaux ce qui permet de penser que la spermatogénèse commence avec des cellules à histones et finit avec des cellules à protamines.

On ne les a jamais isolées dans les tissus végétaux, c'est pourquoi nous n'y insisterons pas; nous signalerons seulement, pour mémoire, quelques propriétés. (8):

- Les protamines sont constituées par un petit nombre d'acides aminés différents (6 à 9) et caractérisées par leur haute teneur en azote, due au/ taux très élevé d'arginine (qui est souvent la seule base hexonique rencontrée).

- La teneur en arginine est généralement constante (50 %) et le rapport P/arg. est souvent voisin de 1, sauf si la protamine contient de la lysine, ce rapport étant alors inférieur à 1. Ceci permet de penser que la liaison AN-protéine est du type salin et qu'elle a lieu entre les restes phosphoryle des AN et les groupements basiques de l'arginine, ou éventuellement de la lysine.

- Elles ne contiennent pas (ou très peu) d'acide dicarboxylique et jamais d'acide aminé aromatique. La teneur en acide aminé neutre varie selon l'espèce animale.

- Le rapport protamine/AN est caractéristique de l'espèce.

- Une formule générale des arginines peut être ainsi donnée:



(N = acide aminé neutre)

B) LES NUCLEOHISTONES :

Isolées par KOSSEL, à la fin du XIX^e siècle à partir des érythrocytes nucléés d'oiseaux et des thymocytes de mammifères

elles ont été décelées par la suite dans la plupart des noyaux des cellules somatiques animales.

Il y a une dizaine d'années (8) on ignorait leur présence dans les cellules végétales. Actuellement, cette ignorance a été comblée: on a décelé en particulier des histones dans le germe de blé (9) et dans l'embryon de riz (10)

Les histones ressemblent aux protamines pour plusieurs propriétés: toutes deux sont:

- basiques
- très hétérogènes
- dépourvues en cystine, cystéine, tryptophane.

Cependant, leur poids moléculaire (de l'ordre de 15 000) est bien supérieur à celui des protamines (2 000 à 5 000), de sorte qu'à l'inverse des protamines, elles ne dialysent pas et qu'on peut les considérer comme de vraies protéines, les protamines n'étant que de gros polypeptides. De plus, les histones contiennent tous les acides aminés ordinaires (sauf les 3 manquants) tandis que les protamines n'en contiennent que 3-10 au maximum.

Les histones sont solubles dans les acides et les solutions neutres mais sont précipitées par $\text{NH}_4 \text{OH}$.

Leur point isoélectrique se situe entre 10 et 11

Leur teneur en azote est de 17-19 %.

Par rapport à un même tissu, les solutions obtenues sont très hétérogènes, ce qui a suggéré que les préparations d'histones purifiées étaient toujours formées d'un mélange de plusieurs constituants électrophorétiquement distincts. L'existence de ces diverses catégories d'histones rend illusoire la distinction protamine-histone. (6).

D'après STEDMAN & STEDMAN (11), on pourrait classer ces protéines selon leur mobilité électrophorétique, en α , β , γ , comme chez les autres types de protéines.

PHILLIPS (12) considère diverses fractions d'histones en fonction du rapport lys/arg., par exemple:

- fraction "riche en lysine" $r > 4$
- fraction "moyennement riche en lysine" $r = 4$
- fraction "riche en arginine" $r < 1$

Bien que cette classification présente encore des inconvénients (6), les termes "riche en lysine", "riche en arginine",...se généralisent et la valeur du taux lys/arg semble commode pour définir avec précision une fraction déterminée d'histone.

c) LES NUCLEOPROTEINES "PROPREMENT DITES" :

Dans les préparations de nucléoprotéines, on a parfois observé, à côté des AN et des histones (ou des protamines), la présence de protéines sans caractère basique marqué. Certains auteurs pensent qu'il s'agit d'un autre groupe de protéines associées aux AN. Par contre, d'autres croient qu'il s'agit d'un artefact.

En effet, comme la préparation de NP implique en général un broyage préalable des tissus, on peut s'attendre à ce que "les unités fibreuses colloïdales" (5), que sont les particules nucléoprotéiques, adsorbent toutes sortes d'autres molécules, cytoplasmiques ou de toute autre origine.

De même, il est possible que lors de l'emploi d'une solution d'extraction de force ionique élevée, on ait une rupture partielle des liaisons AN-protéine et que par la suite, ces liaisons se reforment entre l'AN et d'autres protéines, formant ainsi un complexe artificiel (13), c'est-à-dire une NP dénaturée.

Il est donc vraisemblable que de tels artefacts se forment lors des extractions de NP, même si de grandes précautions sont prises. Mais la question de savoir si toutes les protéines non basiques trouvées sont dues à une dénaturation, ou si une partie d'entre elles sont natives, reste généralement sans réponse.

Dans quelques cas, cependant, l'existence de protéines "résiduelles" a été montrée:

Ainsi, MIRSKY, après plusieurs extractions acides en vue d'ôter toutes les protéines d'une NP, constate qu'il existe une fraction de "protéine résiduelle" demeurant solidement fixée à la fraction AN. Mais, le même phénomène est constaté à partir de noyaux isolés de tissus, sans aucun broyage. L'existence de protéines non basiques (car résistant à une extraction acide) n'est donc pas due, dans ce cas, à un artefact. (5)

D'autre part, MIRSKY a constaté que l'explèvement de l'histone ne change pas beaucoup l'apparencé des chromosomes au microscope. Mais si la protéine résiduelle est ensuite dégradée (par la trypsine), l'ADN polymérisé est libéré, formant un gel et provoquant la destruction de la structure du chromosome. La configuration morphologique du chromosome est donc due à la combinaison DNA-protéine résiduelle, ce qui montre bien l'existence de cette dernière aux côtés de l'histone.

Avec des marquages au carbone I4 on a trouvé que les protéines résiduelles sont métaboliquement plus actives que les histones (5). Parmi les 4 fractions isolées par l'emploi de différents solvants d'extraction, on a trouvé que 2 de ces fractions pourraient être liées à l'ARN du noyau, tandis que les 2 autres seraient, aux côtés des histones, associées aux ADN.

Cependant, en général, ces protéines résiduelles ont été peu étudiées et les résultats obtenus ne sont pas très fragmentaires.

On sait seulement qu'elles sont moins basiques que les histones et qu'elles contiennent du tryptophane. On ne sait pas si tous les ADN sont liés à de telles protéines. On ne connaît pas leur importance par rapport aux histones. On a seulement constaté qu'il était très difficile, dans certains cas, d'enlever totalement les protéines d'un AN.

Enfin, les protéines résiduelles ne sont pas les seuls exemples, car des protéines neutres et même acides ont été découvertes chez certains virus. On ne peut donc plus parler ici de liaison de type salin entre l'AN et la protéine.

On peut donc conclure que cette catégorie de protéines constitue un domaine très mal connu et cependant d'une grande importance dans le rôle et la structure des NP.

IV - PROPRIETES PHYSIQUES DES NUCLEOPROTEINES :

Elles sont encore mal définies. Cette incertitude est due aux difficultés d'isolement de ces substances facilement dénaturables. Ainsi, la fragilité particulière des RNP animales et la difficulté d'isoler les NP végétales ont occasionné un retard dans ces domaines, par rapport aux DNP animales et aux NP virales, beaucoup mieux connues. (4)

A) Propriétés de solubilité des nucléoprotéines:

Ce sont les propriétés les plus importantes en ce qui nous concerne puisqu'elles dominent les différents procédés d'extraction. De la réussite ou de l'échec de cette première phase d'étude, dépend toute la suite.

La plupart des auteurs s'accordent à penser que les DNP sont solubles, soit dans l'eau très pure, soit dans des solutions de force ionique élevée (au moins de l'ordre de la molarité). (4), (14), (15). Par contre, les DNP présentent un minimum de solubilité pour des solutions salines 0,14 M environ, c'est-à-dire les concentrations salines qui sont physiologiques pour les cellules dans lesquelles elles se trouvent.

En effet, comme ces DNP constituent par exemple les chromosomes, elles ne se trouvent jamais à l'état dissous dans la cellule. C'est comme si, selon Kurt STERN, "la nature avait pris des dispositions particulières pour les empêcher d'entrer en solution". (16).

Par contre, Les RNP sont surtout solubles dans les solutions isotoniques: 0,14 M NaCl, en moyenne. (4), (14), (15). Ces caractéristiques de solubilité seront amplement mises à profit dans les techniques d'extraction des NP: voir chapitre III.

Les solutions de NP sont très visqueuses et la viscosité augmente encore si la protéine est détachée de l'AN. La prise en masse a lieu rapidement, même pour des solutions très diluées.

Une sédimentation constante a été mesurée (26-31 S), mais les variations de viscosités intrinsèques montrent que les solutions de NP ne sont pas homogènes.

On s'est en effet assuré que les composants protéiques peuvent se lier avec plusieurs AN, soit de façon permanente, soit de façon transitoire, au cours du fonctionnement normal de la cellule vivante, produisant ainsi occasionnellement des systèmes complexes et très larges. En plus des ruptures et des réarrangements anormaux au cours de l'extraction, un tel phénomène pourrait expliquer l'hétérogénéité des solutions de NP. (18)

Les agents de précipitation des protéines précipitent aussi les NP; par exemple, les sels de métaux lourds, les alcools, les acides, ... (4).

En particulier, on peut récupérer une NP de sa solution en amenant le pH au point isoélectrique de la protéine, ce qui provoque sa précipitation. (4).

B) Cristallisation des nucléoprotéines:

En dehors du cas de nombreux virus végétaux qui cristallisent, la seule NP de tissus animaux qui cristallise de ses solutions, par l'emploi de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, est la nucléotropomyosine du muscle de carpe (4).

C) Absorption des radiations ultra-violettes:

Le ~~xxxxxx~~ spectre d'absorption des NP est le résultat de l'absorption propre à chacun de ses constituants; l'AN et la protéine. Cependant, l'absorption des protéines à 260 nm est négligeable. En effet, même à son maximum d'absorption (280 nm), une solution de sérumalbumine absorbe 40 fois moins qu'une solution d'AN, de concentration égale, à 280 nm. (4), (2).

Le spectre des NP est donc pratiquement identique à celui des AN: maximum à 260 nm; minimum vers 230 nm. Tout au plus observe-t-on une inflexion de la courbe vers 280 nm.

D) Propriétés moléculaires des nucléoprotéines:

Comme une particule nucléoprotéique n'est pas une macromolécule définie, il n'y a pas de sens à parler de son poids moléculaire. On sait que ces particules sont grandes à côté des protéines ordinaires: des "poids particuliers" de 5-15 millions et même plus ont été estimés. (18).

L'incohérence des résultats est due à l'impossibilité d'obtenir des préparations homogènes. Alors que de nombreux virus constituent des entités chimiques qui ont pu être bien précisées, l'emploi de techniques d'ultracentrifugation et de diffraction des rayons X ne s'est pas révélé aussi fructueux quant à la détermination précise de la forme et du poids des particules de NP animales ou végétales.

Au microscope électronique, par contre, les particules intactes de NP apparaissent comme des baguettes courbes d'environ 4300 Å de long sur 250-300 Å de large (DNP de sperme d'oursin). (18). Quelques RNP végétales ont des formes à peu près sphériques tandis que d'autres ressemblent à des baguettes courbées.

Il a déjà été fait allusion au manque de connaissances quant à la structure du complexe nucléoprotéique.

On peut cependant se représenter une NP comme une particule composée d'un "noyau" ou d'un "coeur" d'AN et de nombreuses unités protéiques attachées à lui. Le "coeur" nucléaire est grand tandis que les particules protéiques qui l'entourent sont petites. Cependant, le poids total de la protéine dans la particule est du même ordre que celui du "coeur" nucléaire. (3).

Dans de rares cas, on a pu déterminer les proportions relatives d'AN et de protéine. Ainsi, pour la NP de sperme d'oursin, on a trouvé 36 % d'ADN, à peu près autant d'histone et aussi, la présence d'une autre protéine non basique. (3). D'après ZUBAY & DOTY (19), la NP de thymus serait formée de protéine (50 % de la masse) et d'ADN. Les formes les plus récentes envisagées sont: un "coeur" central d'ADN en hélice, les protéines étant engagées dans les spires. (3).

La nature de la liaison AN-protéine est mal connue. Pour des protéines de point isoélectrique élevé comme les protamines et les histones, une liaison de type salin entre les groupements acides forts de l'AN et la lysine, l'arginine ou l'histidine de la protéine, est concevable.

Mais de telles combinaisons ne peuvent se former

qu'assez rarement avec les protéines non basiques de la cellule, car le p_H y est situé le plus souvent du côté alcalin du point isoélectrique de ces protéines. Dans ce cas, ce seraient surtout les carboxyles des acides aminés dicarboxyliques des protéines qui assureraient la liaison avec les bases de l'acide nucléique. (16). KIRBY (20) a envisagé l'action de métaux bivalents, liés d'une part à la protéine, de l'autre à l'AN; en outre, des ponts hydrogène peuvent contribuer à assurer la liaison.

Généralement, cette liaison est considérée comme fragile; elle est rompue par l'alcool, le chlorhydrate de guanidine, ou l'ébullition dans du NaCl à 10 %. (16). Ces corps sont d'ailleurs employés pour séparer l'AN de la protéine. Cependant, comme on constate aussi (5) qu'il est très difficile de débarrasser complètement un AN de sa protéine on peut penser qu'il existe plusieurs types de liaisons: les unes, du type salin, avec des fractions basiques de protéines, les autres, de nature moins connue, avec ce qu'on a nommé à juste titre "protéines résiduelles", ces dernières étant les plus résistantes.

Toute étude des NP doit tenir compte de l'existence et de l'importance, au niveau de la cellule vivante, de toutes ces liaisons. Car on peut se demander si l'acharnement mis par les chimistes à obtenir des AN totalement privés de protéines, justifié sur un plan strictement analytique, ne diminue pas les chances d'observer des effets biologiques de ces substances. Il est en effet possible que de faibles quantités de protéines spécifiques puissent protéger ou activer les AN des organismes vivants. (21).

CHAPITRE III

EXTRACTION DES NUCLEOPROTEINES

L'extraction des NP peut être entreprise dans le but soit d'obtenir des substances dans un état aussi proche que possible de leur état naturel, soit de déterminer leur taux dans un milieu donné.

Dans un cas, il importe de maintenir tout au long de la préparation, l'intégrité des molécules nucléiques, parfois au détriment du rendement: ce sera surtout dans cette optique que le chapitre III sera traité, l'étude des particules extraites faisant l'objet du chapitre IV.

Dans l'autre cas, au contraire, il est nécessaire d'effectuer une récupération complète de certains constituants nucléoprotéiques: P, bases, sucres, protéines, au détriment des structures moléculaires complètement bouleversées. Ce problème sera envisagé dans le chapitre V.

A) DIFFICULTES D'EXTRAIRE LES NUCLEOPROTEINES A L'ETAT NATUREL :

L'extraction de macromolécules à partir de tissus animaux ou végétaux est infiniment plus difficile que l'extraction de constituants élémentaires du type N, S, P. En effet, si aucun traitement ne peut modifier les propriétés de ces derniers éléments, l'extraction de complexes macromoléculaires doit, par contre, respecter entièrement l'arrangement spatial et l'intégrité des principales fonctions chimiques de ces corps.

Si ces conditions ne sont pas satisfaites, on obtient des préparations plus ou moins dénaturées. Or les facteurs de dénaturation sont nombreux:

I) Facteurs chimiques: l'urée, le formol, les traces de métaux, les peroxydes,...

En conséquence, les réactifs chimiques utilisés doivent être très purs: en particulier, le phénol doit être fraîchement distillé et l'éther ne doit pas contenir de peroxydes.

2) Facteurs physiques et physico-chimiques:

Températures trop élevées, variations excessives de p_H , de force ionique,...

3) Dégradations mécaniques des NP:

Les AN et les NP sont des particules dont la longueur est de l'ordre du micron et dont la largeur n'est parfois que de l'ordre du millième de micron. On conçoit donc qu'elles soient très fragiles vis à vis des agents mécaniques d'extraction. Il faudra donc éviter des broyages trop violents ou prolongés, des agitations trop intenses, des surpressions hydrodynamiques.

4) Dégradations enzymatiques:

Si l'on veut extraire des NP aussi intactes que possible, il importe d'empêcher pendant la préparation, toute action enzymatique. Or, des nucléases ou des protéases étant présentes dans les tissus vivants, il est nécessaire de les inhiber. On peut, par exemple:

- travailler à basse température.
- fixer ces enzymes sur des adsorbants (bentonite).
- employer des poisons enzymatiques (As, F⁻, citrates,...) ou des complexants (EDTA,...).

De plus, comme certains métaux catalysent l'activation des enzymes, il faut ^{éviter} les contacts des NP avec les surfaces métalliques (broyeurs,...)

Compte tenu de toutes ces difficultés, il apparaît que l'extraction des NP intactes est délicate. De plus, une méthode d'extraction est souvent établie pour un tissu donné et peut ne pas s'appliquer à d'autres tissus. La difficulté d'établir des méthodes générales a ainsi amené l'apparition d'un grand nombre de méthodes. C'est pourquoi nous avons classé les procédés d'extraction en 2 catégories:

- Les méthodes prévues pour l'extraction de NP à partir de tissus animaux. Ce sont, de loin, les plus nombreuses.

- Les méthodes d'extraction à partir de tissus végétaux. Elles sont beaucoup plus rares, surtout lorsqu'il s'agit de tissus de réserve, à métabolisme ralenti.

Nous ne savons pas, a priori, si certaines de ces méthodes seront applicables avec succès aux différentes fractions histologiques du grain de blé. Mais nous avons fait cependant le point des principales techniques existantes, pensant qu'en nous inspirant de certaines d'entre elles (végétales ou éventuellement, animales), nous obtiendrons des résultats positifs, sur le grain de blé.

Cette étude séparée des méthodes animales et végétales nous permettra aussi de montrer le retard qui existe entre les techniques et les connaissances dans le domaine végétal et le domaine des animaux et microorganismes.

B) EXTRACTION DES NUCLEOPROTEINES A PARTIR DE TISSUS ANIMAUX :

Elle peut être pratiquée soit directement sur le tissu broyé ou haché, soit après isolement des composants subcellulaires qui contiennent ces NP. D'après LINDE et BRANTMARK, (22), bien que des NP nucléaires aient pu être isolées du thymus de veau sans isolement préalable des noyaux, dans la plupart des cas il est préférable (si cela se peut) de préparer les noyaux, nucléoles, ribosomes, lorsqu'on veut isoler des NP nucléaires, nucléolaires, ribosomales,...

Cependant, comme ces techniques sont très délicates et généralement hors des moyens dont nous disposons, nous les signalerons rapidement:

I) Isolement des composants subcellulaires:

a) Isolement des noyaux: L'opération se fait par centrifugation des cellules dans une solution de saccharose 2,1-2,2 M (Méthode de Chauveau). (22). Des noyaux ont pu ainsi être isolés à partir du foie de rat. L'emploi de polysaccharides à haut poids moléculaire a permis de généraliser la méthode à

d'autres tissus: rate, rein, poumon, intestin, cerveau de rat, embryon de poulet, d'oursin, tumeurs, etc...

b) Isolement des ribosomes:

Les tissus sont mis en suspension dans un milieu isotonique en présence de K^+ et de Mg^{++} . On débarrasse la suspension des noyaux, mitochondries, débris divers, par centrifugation à 12 000-20 000 g. Les microsomes sont alors récupérés par centrifugation à 100 000 g. Les ribosomes sont alors obtenus en traitant la fraction microsomiale par du désoxycholate ou un autre détergent. Cette méthode a été appliquée en particulier au foie de rat (22) et aux réticulocytes de lapin (23).

c) Isolement des chromosomes, des nucléoles, de la chromatine:

Nous ne le citons que pour mémoire, car ces méthodes impliquent des techniques extrêmement délicates telles que des cultures de tissus avec blocage de la division cellulaire au stade métaphase, etc...

d) Extraction des NP à partir de ces organites cellulaires:

Grâce à la répartition intracellulaire préférentielle des ADN et des ARN, l'isolement de fractions subcellulaires constitue déjà un grand pas dans la voie de l'extraction des NP. (4)

On se contente même souvent de cet isolement et on prépare alors les AN ou les protéines, directement à partir des préparations de NP que constituent les fractions subcellulaires isolées. (21). (23).

Si on veut une purification plus poussée, il suffit d'appliquer à ces fractions subcellulaires, les méthodes d'extraction des NP à partir des tissus (voir § 3, ci-dessous).

En résumé, ce procédé est très long, délicat et exige un matériel coûteux (centrifugations à 100 000 g). On l'a utilisé pour extraire sans les altérer, les ADN à partir des noyaux ou les ARN à partir des ribosomes. Si ce procédé n'est pas utilisable, on devra alors préparer les tissus de façon à rendre l'extraction des NP possible, mais tout en essayant de

préservé au maximum leur structure. C'est ce que nous allons voir maintenant:

2) Préparation des tissus:

Elle doit faciliter l'extraction ultérieure, tout en évitant des dégradations mécaniques ou enzymatiques:

Généralement, on procède à un découpage ou à un broyage des tissus, directement dans le solvant d'extraction qui, nous le verrons, peut être de l'eau ou une solution saline.

Par exemple, on broie du pancréas de boeuf ou de porc avec 2/3 de son poids d'eau glacée (23)(24). On agite 1 heure.

JOHNS (25) homogénéise 100 g. de thymus de veau avec 700 ml de NaCl 0,9 %, dans l'ATO MIX MSE, 2mm à vitesse maximum.

Pour éviter les actions enzymatiques, on utilise fréquemment du citrate de Na, avec le solvant d'extraction: ainsi, on broie et on homogénéise dans une solution NaCl 0,15 M et citrate 0,05 M (ou 0,1 M). (26). On peut aussi broyer les tissus congelés dans la neige carbonique (broyeur Peugeot BB)(14) puis décongeler dans NaCl 0,14 M + citrate de Na 0,05 M (14). L'homogénéisation peut se faire à l'aide d'un broyeur à palettes Virtis ou Turrax (14).

Dans le cas de cellules de levure, on peut broyer dans du citrate N/10 ou bien employer les ultra-sons pour rompre les membranes cellulaires.

Enfin, pour des bactéries, on procédera à un broyage au mortier en présence de poudre de verre (14), afin de provoquer la rupture de la membrane ou de la capsule. On peut aussi appliquer des ultra-sons, ou bien, rendre la membrane perméable par des sels biliaires ou par lyophilisation. (26).

3) Extraction des nucléoprotéines :

Depuis la préparation historique par MIESCHER de la "nucléine" à partir des noyaux de cellules de pus, de nombreux procédés de préparation ont été mis au point. Ils mettent tous à profit la solubilité différentielle des NP. (voir p. 21).

a) Extraction des désoxyribonucléoprotéines:

Il y a deux façons de réaliser cette opération:

On peut ~~général~~ extraire préalablement les RNP par un solvant de celles-ci (NaCl 0,14 M) et extraire ensuite les DNP en traitant par l'eau ou une solution saline concentrée le tissu débarrassé, en principe, de RNP. (1^o méthode).

Dans la 2^o méthode, il suffit de traiter le tissu directement par un solvant des DNP.

La 1^o méthode s'applique surtout aux tissus riches en RNP lesquelles pourraient gêner l'extraction des DNP. Cependant, dans les 2 cas, on aboutit à une solution de DNP dans l'eau ou dans une solution saline concentrée. Pour récupérer les DNP, il suffit, soit par addition de sel, soit par dilution, d'amener la force ionique de la solution à une valeur correspondant au minimum de solubilité des DNP (0,12-0,15 M NaCl), les quelles précipitent alors. Voici quelques exemples d'utilisation:

1^o méthode: lavages isotoniques préalables du tissu:

LINDH & BRANDMARK (22) recommandent de purifier le tissu par 4-5 homogénéisations dans NaCl 0,14 M. Pendant ce processus, les particules RNP nucléaires et cytoplasmiques sont mises en suspension et après centrifugation, elles resteront dans le surnageant car elles ne sédimenteront pas dans le champ de pesanteur modéré employé pour collecter l'homogénat. Il est noté que les tampons citrates améliorent la solubilité des ribosomes et diminuent l'activité protéolytique en chélatant les ions Mg^{++} et en contrôlant le pH.

Dans une 2^o phase, les DNP sont alors extraites soit par un milieu de haute force ionique: NaCl ~~XXXXX~~ ou chlorure de guanidine (27), soit par un milieu de $I=2$ M très faible force ionique (eau distillée) (19). Dans les 2 cas, les DNP sont précipitées en ramenant la ~~saxkxk~~ force ionique du milieu à une valeur moyenne: 0,14 M NaCl ou chlorure de guanidine.

D'après CRAMPTON & coll., la thymonucléohistone est extraite par l'eau, puis précipitée par une solution de NaCl 0,15 M. (4).

D'après PAOLETTI & TRUHAUT, les tissus broyés sont ~~0,15 M (4)~~

homogénéisés dans NaCl 0,15 M + citrate Na 0,05 M. On centrifuge et on lave les culots 5-6 fois avec cette même solution pour éliminer les RNP. Les culots sont repris par NaCl M ou sont vigoureusement homogénéisés dans l'eau. (14). Dans les 2 cas, les DNP passent en solution. Elles sont alors précipitées en ramenant la concentration à 0,15 M.

Il est signalé que la formation de gels est fréquente au cours de ces préparations. Elle est vraisemblablement due à l'existence de liaisons intramoléculaires entre les histones, d'où formation d'agréats. On peut cependant en éviter l'apparition en prenant les précautions suivantes: (14)

- maintenir la concentration en DNP toujours inférieure à 800 γ / ml.
- éviter les précipitations par le NaCl.
- homogénéiser rapidement les culots dans l'eau.

L'extraction de DNP de thymus, selon GULLAND & coll. (26) se fait par élimination préalable de l'ARN par 2 lavages par NaCl 0,9 %. On extrait ensuite la thymonucléohistone par NaCl concentré (10 %).

2^o méthode: extraction directe.

GRAMPTON & coll. préconisent l'extraction de la thymonucléohistone par l'eau, puis précipitation par addition de NaCl jusqu'à atteindre 0,15 M. (4).

Par contre, SIGNER & SCHWANDER (26), utilisent une extraction par NaCl 1M, suivie d'addition de 6 volumes d'eau, pour précipiter la DNP de thymus.

Pour conclure sur ces modes de préparation des DNP, nous dirons que:

- la mise en solution des DNP par l'eau semble respecter l'intégrité de l'édifice moléculaire, mais favorise l'action des nucléases; inversement, la dissolution des DNP dans des milieux de force ionique élevée où les nucléases sont inhibées, s'accompagne d'une dissociation du complexe nucléo-protéique et d'une dépolymérisation partielle des ADN.

On se trouve alors en présence d'un mélange d'ADN et de protéines en solution. En ramenant la force ionique à 0,14 M, le complexe NP se reforme suivant des liaisons différentes des liaisons originales présentes dans les NP natives. (14).

- la raison de l'emploi de NaCl 0,14 M pour préparer les DNP est à remettre en question car il a été montré que la solubilité minimale des complexes ADN-protéine est obtenue pour NaCl 0,12 M. De plus, même à 0,12 M, environ 20 % des DNP restent non précipitées et les complexes précipités diffèrent de ceux qui sont demeurés en solution. (22). En conséquence, les lavages isotoniques prolongés, d'une part, et les dissolutions et précipitations répétées des DNP, risquent d'entraîner une grande perte de DNP.

b) Extraction des ribonucléoprotéines:

L'ouvrage de F.W. ALLEN (28) constitue un recueil de techniques d'isolement des RNP à partir de sources très variées: foie, pancréas, muscle, cerveau, tumeurs, divers tissus de mammifères, embryon de poulet, levure, bactéries, virus, etc... Ne pouvant ici passer en revue toutes ces techniques, nous nous bornerons à en souligner les caractères généraux.

Grâce à l'insolubilité des DNP, on traite le plus souvent les homogénats de tissus par des solutions salines 0,14 M, ce qui permet d'isoler sélectivement les RNP. Celles-ci sont alors précipitées de leurs solutions, soit en amenant le p_H au point isoélectrique des protéines, soit par addition d'alcool, soit par relargage avec des sels neutres $((NH_4)_2 SO_4)$.

Voici, par exemple, une méthode typique d'extraction des RNP: celle de PARSONS (29), sur la RNP de *Clostridium perfringens*:

25 g. de cellules lyophilisées sont extraites avec 375 ml de NaCl 0,14 M, pendant 24 h. à 0-5° C. Les débris cellulaires sont étés par centrifugation à 0° C. L'extrait est dialysé (contre de l'eau ordinaire, puis contre de l'eau distillée). On précipite ensuite la RNP avec 1 volume de méthanol à -10° C. La précipitation est complète au bout de 18-24 h.

Le précipité qui est recueilli par centrifugation, peut être solubilisé dans l'eau. On peut alors purifier la RNP en amenant le pH à 5 (avec HCl 0,1 N); le précipité formé est redissous dans l'eau en ajoutant NaOH 0,1 N (jusqu'à pH 6,8). Le NaCl formé est éliminé par dialyse.

Une purification plus poussée peut être obtenue en précipitant la RNP par une solution de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à $\frac{1}{2}$ saturation.

De nombreuses méthodes suivent ce type d'extraction. POLLISTER & MIRSKY travaillent ainsi sur la RNP de thymus de veau (4); de même, KERR & SERAIDARIAN pour la RNP de pancréas (4).

KHOUVINE (30) extrait les RNP de levure (préalablement séchée à l'acétone) avec des solutions diluées de Na H CO_3 .

CHAO & SCHACHMAN (31) extraient des cellules broyées de levure avec différents solvants. Ils ont noté que selon le solvants, des pertes dues à l'action des enzymes, à l'agrégation ou au contraire, à la dissociation des particules, avaient lieu. Ainsi, l'eau distillée ou l'eau additionnée de saccharose 0,025-0,75 M entraîne la perte des particules 80 S. L'agrégation des particules a lieu avec des solutions NaCl ou KCl 0,1 à 0,15 M, mais peut être réduite par la présence de CaCl_2 ou MgCl_2 . Enfin, le citrate 0,001 M, l'EDTA 0,001M, le phosphate 0,1 M, provoquent des dissociations. Aussi, les auteurs ont opéré leur extraction à l'aide du tampon suivant: K_2HPO_4 0,0025 M, KH_2PO_4 0,0025 M, MgSO_4 0,001 M, CaCl_2 $7,5 \cdot 10^{-4}$ M.

ELSON (32) qui travaille sur Escherichia Coli, emploie également différents tampons pour disperser les cellules broyées. En particulier, TRIS 0,001 M, CaCl_2 0,001 M. Il précipite ensuite la RNP à l'aide d'acétate de Ba et d'alcool. On note que la présence de désoxycholate de Na favorise la précipitation par les sels de Ba. Après 6 stades de purification, mettant en jeu des relargages au sulfate d'ammonium et des dialyses, l'auteur obtient une RNP purifiée.

STANLEY (4) obtint une RNP cristallisée à partir d'une préparation de virus de la mosaïque du tabac, grâce à un fractionnement salin et une purification par relargage.

Enfin, pour conclure ce bref aperçu des techniques d'extraction des RNP animales, nous ferons les remarques suivantes:

- De nombreuses méthodes modernes reposent sur l'obtention préalable des microsomes par ultracentrifugation. (14) (23). Mais nous ne les avons pas citées, pour les raisons exposées précédemment (p. 27).

- Les RNP (et surtout les RNP animales) sont très fragiles. Aussi leur extraction donne-t-elle souvent des résultats peu reproductibles (14). Cependant, certains auteurs comme PETERMAN & HAMILTON (14) ont extrait du foie de veau, un facteur dialysable stabilisant les RNP et permettant de les extraire facilement. Il a également été montré que le Mg jouait un rôle très important dans la stabilisation de nombreuses RNP.

- Certaines méthodes décrites sont spécifiques d'un tissu donné. Par contre, d'après ALLEN (23), la découverte d'un facteur stabilisant des RNP (lesquelles seraient soumises à des réactions de dissociation et d'association en fonction des changements de pH, de force ionique et de concentration en Mg du solvant) permet d'envisager la production de RNP à partir de nombreux tissus, avec une méthode unique.

- Les RNP extraites sont généralement d'origine ribosomiale. Leur séparation d'avec les RNP nucléaires ou nucléolaires n'est généralement possible que par ultracentrifugation.

- La lyophilisation préalable des tissus permet d'accroître la perméabilité cellulaire et de faciliter ainsi l'extraction des RNP.

C) EXTRACTION DES NUCLEOPROTEINES A PARTIR DE TISSUS VEGETAUX :

Il a déjà été constaté que le domaine végétal est beaucoup moins étudié que le domaine animal. La différence est très significative quant aux méthodes d'extraction des NP.

En effet, la plupart des ouvrages classiques de biochimie n'étudient pas les NP végétales et les méthodes d'extraction citées sont toutes relatives aux animaux ou aux micro-organismes.

Après une prise de connaissance de la littérature "végétale", il apparaît que, contrairement au domaine animal,

- il est difficile de dégager des méthodes générales, car les auteurs font appel à des principes divers et parfois contradictoires.

- à l'exception des travaux très récents, on note rarement l'emploi de méthodes fines telles que la séparation des composants subcellulaires, l'étude physique des macromolécules, etc... Au contraire, les méthodes présentent un caractère relativement artisanal de sorte que les auteurs donnent rarement des précisions sur la nature exacte des NP extraites.

Ainsi, il y a une douzaine d'années, on n'avait encore jamais identifié d'histone végétale (8). Actuellement, on en connaît un certain nombre, mais les données ne sont que très fragmentaires.

En conséquence, nous ne pourrions pas adopter le même plan que lors de l'étude des tissus animaux et au lieu de considérer séparément les DNP et les RNP, nous classerons les méthodes de la façon suivante:

- tissus végétaux divers
- tissus de réserve, graines, céréales.
- le grain de blé.

I) Méthodes d'extraction des NP à partir de divers tissus végétaux :

OLIVERA et coll. extraient des NP qu'ils identifient à des nucléohistones, à partir de plantes de pois, à l'aide d'un tampon NaCl 0,01 M, TRIS 0,001 M, pH 7,5 - 0° C. (33)

IOFFE & al. séparent plusieurs fractions protéiques à partir de plants de mauve ou de graines de légumineuses, après délipidation préalable (Soxhlet). Les protéines sont alors extraites en majorité par de l'eau et sont fractionnées par des modifications successives du pH. Les fractions précipitées à des pH allant de 8,3 à 12,4 peuvent être considérées comme des histones végétales. (34)

Mc MULLEN (35) extrait une RNP de latex d'hévéa avec une solution NaCl 0,5 M ou 2 M à 5° C. (ou NaCl 2M à 95-100° C). La RNP est précipitée par l'alcool puis purifiée par des précipitations répétées à pH 3,5.

KOSHIYAMA (36) obtient, par précipitations acides répétées à partir de solutions aqueuses et alcooliques de soja, une fraction "caséine" contenant 3,06 % de RNA. Par fractionnement sur Séphadex, une RNP contenant 7,17 % de RNA/protéine est obtenue.

2) Méthodes d'extraction des NP à partir de tissus de réserve; de graines et de céréales:

IWAI (37) isole une nucléohistone à partir d'embryon de riz:

L'embryon de riz, recueilli à partir de son de riz est lavé à l'eau puis séché à l'air et broyé. Il est alors lavé par NaCl 0,14 M. Le résidu, extrait par NaCl 1-1,5 M contient les nucléohistones. Celles-ci sont précipitées par addition de 6 volumes d'eau. En répétant l'opération, on obtient une NP purifiée, avec un rendement de 0,1 %.

DI CARLO & al. étudient la farine de soja (38): 1kg. de farine est mis en suspension dans 4 l. d'eau froide. Après addition de 125 ml de NaOH 40 %, le mélange est agité 1 h. à 10-15° C puis clarifié par traitement à la bentonite. Enfin, après addition d'acide acétique, le mélange est centrifugé à 2500 rpm. A partir du surnageant, les auteurs séparent les acides nucléiques.

ELIAS (39) prépare une DNP à partir d'embryon de seigle: Les embryons sont mis en suspension dans 500 ml d'éther de pétrole et agités 16 h. La substance délipidée est alors homogénéisée dans NaCl 0,14 M puis centrifugée; le culot, exempt de RNP est alors extrait par NaCl 2M. La DNP est précipitée de sa solution par addition de 1,5 volume d'alcool absolu.

LALAND (40) signale que la séparation ADN/ARN de seigle est difficile à cause de la solubilité partielle des DNP dans NaCl 0,14 M.

Enfin, certains auteurs ont noté la présence de NP dans certaines fractions isolées à partir de graines de céréales. Bien que le but de ces auteurs n'était pas d'étudier les NP, il est évident que le fractionnement tel qu'ils l'ont conduit permet déjà un isolement d'une fraction nucléoprotéique.

Ainsi, KONDO & MORITA (41) notent que l'isolement de la fraction glutéline de riz non glutineux permet d'obtenir une fraction contenant 2,65 % d'AN. Par contre, la glutéline de riz glutineux ne serait pas une NP.

De même, AYRAPPA (42) constate que des nucléoprotéines du grain d'orge se retrouvent en quantité dans la fraction soluble dans les solutions salines. L'auteur, qui a ensuite essayé différentes concentrations salines pour extraire les NP constate que les solutions NaCl 1 M à divers pH, extraient facilement les DNP et les RNP. Par contre, l'eau distillée n'extrait que de faibles quantités de RNP et ceci, uniquement à pH 8. Ce fait contredit les résultats obtenus chez les NP animales.

3) Méthodes d'extraction des NP à partir du grain de blé:

Pendant longtemps, les recherches ont été limitées exclusivement au germe de blé, lequel contient évidemment des quantités importantes d'acides nucléiques. Ce n'est que plus tard que le reste du grain a été étudié; mais si les NP y sont beaucoup moins abondantes, les résultats de leur étude pourront peut-être apporter des conclusions intéressantes au point de vue de la génétique ou de la physiologie végétale.

a) Etudes concernant le germe de blé :

Nous ne citerons que pour mémoire les préparations de composés nucléiques, désormais historiques, à partir du germe de blé par OSBORNE & HARRIS (43), par LEVENE & LAFORGE (44), par CLARKE & SCHRYVER (45). Ces méthodes ne nous seront pas très utiles, car d'une part, elles visent à obtenir des acides nucléiques et non des NP, d'autre part, elles se soucient peu de préserver les structures macromoléculaires, ce qui est primordial pour nous.

Par la suite, de nombreux travaux ont porté sur le germe de blé, mais ce fut pour en extraire les acides nucléiques : FEULGEN & al. (46), GLITZ & DEKKER (47), STOLETOV (48) (49), BELOZERSKIJ (50), FURSOV (51), MARKOWSKI (52), TITTENSOR (53), ou bien pour en étudier les nucléotides ou les ARN solubles: LANZANI (54), LANE (55), LANE & ALLEN (56), KAY (57), TORTI (58), BABILIO (59). Cependant, les méthodes employées ne nous sont encore pas d'une grande utilité car les extractions ne sont pas envisagées sous le même angle que le notre. En particulier, l'isolement d'un AN ne se fait pas toujours après isolement préalable de la NP, ou du moins, ces 2 phases ne sont pas nettement séparées dans la plupart des travaux.

Voici quelles sont les rares méthodes ayant étudié les nucléoprotéines du germe de blé:

LUSENA (60) améliore la méthode historique d'OSBORNE et HARRIS, dans le but d'obtenir un ARN, après séparation préliminaire de la RNP: il est noté que la protéine du germe de blé est extraite de façon optimale par agitation du germe (1 partie) avec l'eau (10-15 parties), pendant 10 mn à température ordinaire. 61 % de l'azote total du germe sont ainsi extraits. (Mais un germe frais donne plus de protéine qu'un germe conservé 2 mois à 5° C.). La solution de NP est alors acidifiée. On constate que le maximum de précipitation a lieu pour pH 4. Des purifications sont ensuite obtenues par dissolutions à pH 6,5 et précipitations à pH 4. Le produit obtenu contient 21 % d'ARN, soit 2,2 % du germe.

LIPSHITZ & CHARGAFF (61) isolent une DNP du germe de blé de la façon suivante:

300 g. de germe de blé sont agités pendant 8h. dans de l'éther de pétrole. La substance ainsi délipidée partiellement est agitée violemment (mixer) pendant 5 mn dans une solution NaCl 0,1 M - citrate 0,05 M - pH 7,5 puis centrifugée (15 mn à 3600 g), lavée puis encore centrifugée, et cela 6 fois. On peut alors vérifier que les eaux de lavage ne contiennent pas d'ADN.

Le résidu de lavage est alors extrait est alors extrait par 650 ml de NaCl 10 %. La solution, qui contient la DNP

est alors dialysée contre 6 l. de solution saline-citrate 0,15 M pendant 40 h. La DNP précipite. On peut alors la purifier par 3 séries de dialyse + dissolution dans NaCl M.

b) Etudes concernant le grain de blé entier ou ses régions histologiques :

La faible teneur de l'amande du grain de blé en composés nucléiques a eu pour conséquence un très faible nombre de travaux sur ce sujet.

Comme pour d'autres céréales, plusieurs auteurs ont remarqué qu'une forte proportion des NP du grain pouvaient être extraites par des solutions salines. C'est ce que pensent AYRKPAA (42) et MIHAILOVIĆ et al. (62).

MATSUBITA (63) constate, après extraction de la farine par différents solvants, que les AN se retrouvent soit dans les fractions extraites par NaCl 0,9 % + citrate 0,01 M, ou mieux, par NaCl 5 %, soit dans les résidus d'extraction à l'alcool 70 %, (glutélines).

KONDO & MORITA (41) pensent que la gluténine de blé non glutineux est une NP, alors que ce ne serait pas le cas de la gluténine de blé glutineux.

BOURDET & HERARD (64), BOURDET (65), BOURDET & FEILLET (66), FEILLET (67) ont constaté qu'après fractionnement de la farine selon une méthode du type d'OSBORNE améliorée, les AN se retrouvaient en majeure partie dans la fraction globuline (malgré la faible proportion de celle-ci dans la farine) et aussi en quantité importante, dans la fraction gluténine. La quantité d'AN dans les globulines atteint en moyenne 9,6 % ce qui (compte tenu également de la richesse en acides aminés basiques de ces protéines) a permis aux auteurs de suggérer que les globulines pouvaient s'apparenter à des histones végétales.

Ainsi, bien que toutes ces méthodes n'aient pas pour but principal d'isoler des NP, leurs résultats sont néanmoins de grande valeur lors de la mise au point d'une méthode d'extraction "volontaire" des NP.

On sait donc qu'une grande partie des NP de grain de blé peut être obtenue par extraction à l'aide de solutions salines. C'est ce que pensent LALAND & al. (40) lorsqu'ils suggèrent qu'une préparation de DNP est facile à obtenir avec le blé (contrairement au cas du seigle) grâce à leur insolubilité apparente dans NaCl 0,14 M.

Au sujet de la répartition histologique des NP dans le grain de blé - qui doit être en principe l'aboutissement de notre étude - il n'y a pas de travaux qui abordent franchement cette question, sauf peut-être quelques travaux russes comme celui de FURSOV (68). Ce dernier étudie la localisation de substances organiques dans le grain (AN, protéines acides et basiques, polysaccharides), au cours du repos du grain et de sa germination.

Un dernier travail peut être signalé.: c'est celui de VASIL'EVA (69) qui concerne le fractionnement des protéines du grain de blé en 5 fractions: globulines (30 %), histones (28 %) protéines "non-histones" (15 %), protéines acides (10 %), et autres protéines (18 %).

En conclusion, il apparaît que la littérature nous fournit bien peu de données quant à la résolution de notre problème d'extraction des NP du grain de blé. C'est pourquoi l'étude bibliographique devait être élargie aux tissus de végétaux autres que les céréales et même aux tissus animaux.

CHAPITRE IV

FRACTIONNEMENT DES NUCLEOPROTEINES

EN ACIDES NUCLEIQUES ET EN PROTEINES

Notre but est l'étude des protéines associées aux acides nucléiques. Or, jusqu'ici, nous avons cherché les moyens d'isoler le complexe nucléoprotéique intact, à partir de tissus. Nous devons donc maintenant voir comment à partir de ces NP on pourrait isoler la fraction protéique, en évitant encore, si possible, toute dégradation, de façon à obtenir, dans leur état natif, les protéines associées aux acides nucléiques.

Cependant, la littérature montre que les travaux sur les acides nucléiques sont beaucoup plus fréquents que sur les protéines qui leur sont associées. Aussi les auteurs pensent-ils généralement à isoler et purifier des préparations d'AN, travaux qui ne nous sont utiles que si leur première phase est un isolement préalable du complexe nucléoprotéique, ce qui n'est pas toujours le cas.

A l'inverse de nombreux travaux qui, à partir des NP préparent les AN par déprotéinisation, nous devons, pour notre étude, chercher à recueillir la fraction protéique à partir des NP préalablement extraites.

Toutefois, il est des cas exceptionnels où l'extraction de la protéine peut se faire sans préparation préliminaire de la NP, mais directement à partir des tissus et généralement par extraction acide. Nous tiendrons donc compte de ces travaux intéressants dans le § concernant les tissus végétaux.

A) SEPARATION DES PROTEINES A PARTIR DES NUCLEOPROTEINES ANIMALES :

Nous avons vu (p. 23) que la structure des complexes nucléoprotéiques était mal connue. A cause des risques de dépolymérisation, de dissociation, de dénaturation, il est difficile

de déterminer, à partir des composés extraits, la nature exacte de la NP native. On conçoit alors que l'extraction totale et exclusive de la fraction protéique à partir de la NP ne soit pas un problème simple.

1) Cas des nucléoprotamines:

C'est un cas favorable, car on a affaire à des molécules simples, dont la structure est assez bien connue; comme il s'agit d'une association d'acides nucléiques (ADN) avec des protéines basiques par une liaison du type salin, la scission est aisée, par exemple: par NaCl 10 % (8) (7).

Le rapport Protamine/AN est caractéristique de l'espèce. Il s'établit de sorte que l'association AN + protéine soit neutre, ce qui montre que les nucléoprotamines sont de véritables sels d'ADN et de protamine. Ce rapport est relativement voisin de 1. Dès 1897, MIESCHER avait en effet constaté que le mélange en % équimolaires d'AN et de protamine était neutre et que le sel obtenu possédait des propriétés analogues à celles de la "nucléine" qu'il avait isolée. (4).

2) Cas des nucléohistones:

Ce sont également des complexes caractérisés par une liaison électrostatique entre l'ADN et les bases hexoniques de l'histone. Les caractères basiques de celle-ci, moins intenses que ceux des protamines, sont cependant assez nets pour permettre une salification. (4).

L'extraction des histones doit donc commencer par la dissociation des nucléoprotéines à l'aide de solutions acides ou salines. Ainsi, par traitement acide, les ponts salins sont brisés, l'AN est libéré et l'histone reste en solution. Elle peut alors être précipitée par NH_4OH , l'acide picrique, l'alcool. (7) ou divers acides dilués: H_2SO_4 , H_3PO_4 , HCl, acide citrique. (8).

On peut aussi extraire les histones en traitant les nucléohistones par divers acides dilués: H_2SO_4 , H_3PO_4 , HCl, acide picrique, ... (8). Par exemple, la méthode de BUTLER (voir 8) consiste à solubiliser les histones par HCl 0,2 N, ce qui, vraisemblablement ne doit pas modifier notablement leur structure.

Les histones sont alors précipitées de leurs solutions acides, soit par relargage aux sels neutres, soit par l'acétone, soit par augmentation du pH jusqu'aux environs de 10.

NEELIN (70) préconise, à partir du foie ou de la rate de poussin, une extraction par HCl dilué (pH 1,7). Il note qu'une extraction à l'acide citrique se traduit par une perte d'histones riches en lysine, tandis qu'une extraction à pH plus bas que 1,5-1,7 risque d'entraîner davantage de composés étrangers aux histones.

JOHNS extrait de la façon suivante les histones de thymus de veau: l'extrait salin (contenant les NP) est traité par l'acide perchlorique 5 % (0,75 N); l'histone est alors précipitée par addition d'acide trichloracétique jusqu'à une concentration finale de 18 %, lavée à l'acétone, puis séchée sous vide. (25)(71).

Un autre procédé (71) consiste à extraire les NP par une solution éthanol-HCl 1,25 N, puis dialyser l'extrait contre l'éthanol.

D'après CRAMPTON (4), la thymonucléohistone \times , extraite par l'eau est précipitée par l'addition de NaCl 0,15 M puis dissociée par une solution de NaCl 2,6 M. L'addition de 2 volumes d'éthanol précipite alors l'ADN tandis que l'histone reste en solution.

GULLAND & coll. et KAY & al. (26) utilisent des méthodes de déprotéinisation. La protéine est ainsi éliminée sous forme de gel, grâce à l'emploi de CHCl_3 (méthode de SEVAG), ou de dodécylsulfate, les AN restant alors en solution.

LINDH & BRANTMARK (15) suggèrent que l'ADN peut être précipité à partir d'une préparation de DNP par traitement avec $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + éthanol (ou + acide). La solution peut être alors désalée par dialyse et les histones, récupérées par lyophilisation. L'emploi d'alcool peut cependant dénaturer les protéines et il semble que cette dénaturation soit sélective, touchant surtout les histones riches en arginine. L'éthanol partage cette qualité avec l'acétone, laquelle peut laisser des résidus insolubles de composition différente de celle de l'histone principale.

3) Cas des protéines non basiques:

Le mode de liaison de ces protéines avec les acides nucléiques est mal connu. La labilité de la liaison, rompue par simple ébullition dans NaCl 10 %, par le chlorhydrate de guanidine ou par l'alcool, exclut la possibilité d'une liaison de covalence. (4)

Les protéines non basiques associées aux ARN pourront par exemple être séparées en précipitant l'ARN par le chlorhydrate de guanidine, les protéines restant en solution, puis purifiées par des extractions alcooliques, ou encore en utilisant la méthode de déprotéinisation de SEVAG (26).

Par contre, les protéines non basiques (dites résiduelles) associées aux ADN, semblent plus difficiles à extraire. De plus, leur caractère non basique rend difficile leur distinction avec des protéines contaminantes.

BUTLER (72) propose pour cela d'utiliser une colonne de carboxyméthyl cellulose ~~à~~ légèrement alcaline, qui retiendrait les histones mais pas les protéines non basiques.

En résumé, il apparaît que l'extraction de protéines basiques ~~seules~~ seules est relativement simple. Par contre, dans un mélange de plusieurs types de protéines, parmi lesquelles il y a des protéines résiduelles, toute séparation nette est difficile à obtenir. Ou bien l'on a des préparations natives mais contaminées; ou bien les préparations sont plus pures mais dénaturées. (15).

B) SEPARATION DES PROTEINES A PARTIR DES NUCLEOPROTEINES VEGETALES :

I) Extraction directe d'une histone à partir du tissu:

Cette extraction est possible, dans certains tissus, grâce aux propriétés basiques des histones: un acide dilué suffit pour extraire les histones d'un tissu de façon quasi sélective.

Ainsi, IWAI (37) extrait directement l'histone à partir d'embryon de riz lavé à l'acétone et l'éther, par extraction avec HCl 0,25-0,5 N. La protéine est alors récupérée

par dialyse contre l'eau. L'auteur signale aussi une méthode de préparation de l'histone d'une algue *Chlorella*. Elle est semblable à la méthode précédente sauf que l'histone est récupérée par précipitation avec 2 volumes d'éthanol, à pH 10.

Un tel procédé qui ne peut être valable que pour des tissus contenant peu de protéines contaminantes est cependant exceptionnel. Généralement, les auteurs l'appliquent sur des préparations de noyaux: DICK (73) avec les racines de fève, NAKAGAKI (74) avec les feuilles de tabac, ou des préparations de chromatine: FAMBROUGH (75) (76) sur le pois,

2) Extraction à partir de préparations de NP :

Les exemples suivants peuvent être cités:

IWAI (37) extrait les protéines à partir de la NP d'embryon de riz, à l'aide d'HCl 0,2-0,5 N. L'extrait qu'il suffit de neutraliser, contient les histones en solution.

BUTLER (72) signale que des histones peuvent être extraites du germe de blé par "digestion" à l'aide d'acides dilués, mais que l'extrait pouvait contenir bien d'autres substances ne provenant pas des chromosomes. L'auteur note que les méthodes prévues pour les tissus animaux risquent de ne pas s'appliquer aux végétaux car les complexes nucléoprotéiques peuvent avoir des structures diverses.

COHN & QUATRANO ont extrait des histones à partir de jeunes racines d'*Allium cepa*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*. (77).

IOFFE (34) ont obtenu des histones végétales à partir de graines de légumineuses et de plants de mauve, par précipitation à leur point isoélectrique, dans une solution de NP.

Il apparaît donc que de telles méthodes ont été peu appliquées aux végétaux si l'on exclut le cas d'isolement préalable des constituants subcellulaires.

Nous devons donc vraisemblablement faire appel à des techniques employées sur des tissus animaux ou bactériens si les rares idées que la littérature nous apportent ne donnent pas de résultats positifs.

CHAPITRE V

METHODES D'ETUDE DES PROTEINES

ASSOCIEES AUX ACIDES NUCLEIQUES

Après avoir obtenu des préparations de protéines nucléiques d'un tissu, nous désirerions être renseignés sur leur hétérogénéité, sur l'existence, la caractérisation et l'isolement de leurs différentes fractions. Par la suite, pour être complets, l'idéal serait d'isoler des fractions formées d'une seule espèce chimique (pic d'éluion ou bande électrophorétique) susceptibles d'être étudiées au point de vue de leur forme, poids moléculaire, composition en acides aminés, ... car le biochimiste ne considère que son but est atteint, que lorsque tous ces renseignements sont connus.

L'étude de ces protéines doit donc commencer par un fractionnement dans le but d'obtenir des préparations plus homogènes car si des techniques fines sont appliquées à des protéines hétérogènes comme les histones, les résultats ne seront pas reproductibles et seule une valeur moyenne sera connue.

A) CAS DES TISSUS ANIMAUX :

I) Méthodes de fractionnement:

a) Méthodes chromatographiques:

Les très nombreux travaux peuvent être facilement classés en 5 ou 6 types de méthodes.

La plus employée semble être la chromatographie sur carboxyméthyl cellulose (CMC). Il n'est pas possible d'entrer dans le détail des travaux lesquels, surtout à partir du thymus de veau, de séparer les histones en des fractions de plus en plus fines, par la recherche d'éluants nouveaux: NaCl, HCl, tampon acétate, ... Les fractions isolées se distinguent par leur teneur en lysine ou en arginine et par le rapport arg/lys.

La chromatographie sur Amberlite IRC-50 a été aussi très utilisée (22), (72), (85), (86). Des progrès récents ont été obtenus en utilisant la colonne sous forme Na^+ , avec élution au chlorure de guanidine..

Quelques auteurs ont employé la chromatographie de gel-filtration, sur Sephadex (78), (79), (87), (88), (89). Les résultats ont été très intéressants lorsque le couplage de la chromatographie sur CMC et sur Sephadex est réalisé.

On peut citer également la chromatographie sur papier (90), (91) et la chromatographie sur hydroxyapatite (92).

b) méthodes de précipitation fractionnée:

Il a été prétendu que le fractionnement des histones par précipitation fractionnée avait toujours échoué (7). Certains auteurs (voir 15) ont cependant obtenu des résultats (distinction des S et des P histones) en amenant le pH des solutions vers 10,5-11.

c) Méthodes d'extraction fractionnée:

Introduite par JOHNS (84) cette méthode d'extraction par éthanol-HCl, s'est révélée très précieuse. Étendue plus tard avec de nouveaux agents d'extraction (PCA, TCA) elle a permis de fractionner les histones en 6 groupes: f_{1a} , f_{1b} , f_{2a1} , f_{2a2} , f_{2b} , f_3 , selon la terminologie employée pour les séparations sur CMC.

d) Méthodes d'électrophorèse:

Ce sont elles qui ont donné les meilleurs résultats. L'électrophorèse à frontières mobiles a été peu employée (93), (92). Par contre, l'électrophorèse de zone est très largement utilisée: Il s'agit soit de gel de polyacrylamide (94)(95)(96)(97)(98)(99)(100), soit de gel d'amidon (101)(102)(103)(104)(105)(106)(107), soit d'une combinaison de chromatographie sur Sephadex et d'électrophorèse en gel d'amidon: (108)(109).

D'après LINDH & BRANTMARK (22), le gel de polyacrylamide est plus avantageux que le gel d'amidon (en ce qui concerne les protéines basiques) car ce dernier possède des groupes carboxyles pouvant interférer avec les groupes basiques des

protéines.

Pour conclure sur ces méthodes de fractionnement, nous signalerons les méthodes d'électrophorèse préparative (II0)(III)(II2) ainsi que l'utilisation possible d'agents précipitants organiques et en particulier, le sel de Reinecke (22)(II3). Ce sel dont les utilisations sont très diverses (préparation, précipitation, purification, concentration, cristallisation, estimation quantitative des protéines basiques) est susceptible d'apporter une solution à certains de nos problèmes.

2) Méthodes d'étude des fractions isolées:

Lorsque des fractions sont isolées en quantités très faibles, telles les bandes électrophorétiques, on ne peut généralement pas pratiquer d'études plus fines. L'analyse électrophorétique n'a donc pour but principal qu'un examen qualitatif de la diversité ou de l'homogénéité d'une solution.

Par contre, lorsque des fractions peuvent être préparées en quantités non négligeables, des examens ultérieurs sont possibles. Malheureusement ces types de fractionnements conduisent rarement à des préparations homogènes alors que les bandes électrophorétiques correspondent vraisemblablement à des espèces chimiques définies. On conçoit donc l'importance de méthodes "préparatives" qui pourraient fournir des fractions en principe homogènes, en quantités non négligeables.

Sur de telles fractions, voici les études qui pourraient être menées:

a) Composition en acides aminés:

C'est un moyen de définir avec précision un type de protéine donné. Actuellement, des appareils automatiques permettent des dosages rapides (Auto-analyseur Technicon: méthode de Moore & Stein).

Cette méthode a été très employée, mais généralement sur des préparations plus ou moins hétérogènes. C'est pourquoi la composition en acides aminés a permis de déceler la tendance d'une préparation protéique à être du type histone

par exemple, de même qu'elle permet de classer les protéines basiques en fonction de leur teneur en arginine ou en lysine. La plupart des auteurs ont utilisé cette méthode pour caractériser leurs fractions protéiques, en particulier DELARUE & al (II4), MURRAY (6), BUSCH (II5).

b) Poids moléculaire:

Des méthodes utilisant la sédimentation, la viscosité, la diffusion de la lumière, ont permis de calculer le poids moléculaire des histones animales comme celles du thymus ~~ax~~, celles du pancréas de boeuf ou celles d'érythrocytes de poulet.

Ainsi, CHAMPAGNE & MAZEN ont trouvé des PM de l'ordre de 18 000 à 24 000 selon la méthode employée (érythrocytes). (II6)

PHILLIPS (II7) a trouvé des valeurs de 25 000 (thymus). tandis que KINKADE & COLE ont trouvé 21 000 pour l'une des fractions d'histone de thymus (II8)

Enfin, à l'aide de Sephadex G 200, VENDEHELY & coll (I09) ont évalué à 100 000 les masses moléculaires de certaines NP de thymus, ce qui fut confirmé par ultracentrifugation.

Signalons que BUTLER (72) donne la liste des PM de nombreuses fractions d'histones qu'il a isolées à partir de thymus de veau.

c) Configuration moléculaire:

BRADBURY & CRANE-ROBINSON (II9) font le point des méthodes employées et des résultats obtenus pour la détermination de la structure des histones. Ainsi, la diffraction des rayons X, la spectroscopie infra-rouge, la dispersion rotatoire de la lumière ont permis d'avoir quelques idées quant à la structure hélicoïdale de l'histone,, la disposition relative histone-ADN, le mode de liaison histone-ADN.

HYDE (I20) rend compte de quelques travaux effectués au microscope électronique sur de la chromatine dans le but de mettre en évidence la forme et la structure en hélice des histones.

RAUKAS (I21) a employé la diffusion de la lumière pour connaître la structure de quelques nucléoprotamines.

D) CAS DES TISSUS VÉGÉTAUX :

Les exemples d'études des protéines nucléaires végétales sont infiniment plus rares. Voici les seuls exemples que la littérature nous ^{ait} fournis :

IWAI (57) a pratiqué la chromatographie sur CMC pour les histones d'embryon de riz et de chlorella, selon la technique de JOHNS (84). Les fractions sont étudiées pour leur absorption UV à 278 nm, par application de la méthode colorimétrique de FOLIN modifiée par LOWRY & al. IWAI compare alors le nombre et la position des pics obtenus avec ceux d'un diagramme d'histone de thymus, ainsi que les différentes compositions en acides aminés des pics.

Une chromatographie sur Amberlite IRC-50 est aussi pratiquée par IWAI, avec des colonnes à pH 7,0. En conclusion, l'auteur pense que les histones d'embryon de riz et de thymus sont relativement voisines, tandis que l'histone de chlorella contient une fraction riche en lysine prédominante.

BUTLER (72) a étudié les histones de germe de Blé (I22) par chromatographie sur CMC et par électrophorèse en gel d'amidon. Les résultats ont montré que les fractions obtenues différaient nettement de celles d'histone de mammifère. Il est noté que l'extrait de germe de blé entier contenait des protéines d'origine non nucléaires et que par contre, certains constituants normaux des histones semblaient manquer.

D'après JOHNS (I23), les analyses du germe de blé par BUTLER confirment les travaux antérieurs de STEDMAN, en confirmant que l'histone de germe de blé est moins riche que le thymus en constituants riches en arginine.

L'auteur rappelle que des observations similaires avaient été faites par MURRAY sur l'histone d'embryon de pois. De même, BIRNSTIEL & FLAMM ont trouvé que la chromatine d'embryon de pois et celle de cultures de tissu de tabac se composait surtout d'histones riches en lysine. Ces observations suggèrent à l'auteur que les histones végétales doivent conte-

nait une plus grande proportion de constituants riches en lysine et pauvres en arginine que l'histone de thymus.

OLIVERA (I24) étudie la nucléohistone de plante de pois par électrophorèse et essaie de découvrir les interactions ADN-histone, par mesure des mobilités électrophorétiques.

NAKAGAKI FRACTIONNE DES HISTONES DE NOYAUX DE feuilles de tabac, par électrophorèse sur acétate de cellulose Separax(I25) et trouve une quantité prédominante d'histones riches en lysine.

GOFSHTEIN (I26) fractionne les histones de germe de blé en 10-11 composants par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

FAMBROUGH (I27, I28, I29) utilise l'électrophorèse préparative, la chromatographie sur Amberlite ^{CG} XRS-50, le dosage des acides aminés et des groupements N-terminaux, pour étudier les similitudes entre l'histone de pois et celle de thymus.

KOSHIYAMA & al. utilisent la chromatographie sur DEAE cellulose et le fractionnement sur Sephadex, pour identifier certaines protéines de soja.

De nombreux auteurs, qui avaient découvert des NP dans les tissus ont pu les identifier à des histones, après étude de la composition en acides aminés de la fraction holoprotéique. C'est le cas de KONAREV ~~RXNRXRXRXRZRX~~ pour le pois (I30), de BELOZERSKIJ & ABILEV (I31) pour le germe de blé, de PEROV (I32) pour le soja, le tournesol, le pois, de BOURDET (65), BOURDET & FEILLET (66), FEILLET (67) pour la fraction globuline de farine de blé, et de KONDO & MORITA (41) pour la gluténine de blé et de riz non glutineux.

Enfin, il faut signaler que l'étude fine des fractions isolées a été très rarement entreprise, contrairement au cas des tissus animaux: on peut citer cependant le cas de WOLFE (I32) qui a effectué des mesures de sédimentation-diffusion chez les protéines ribosomales d'embryon de blé. Un poids moléculaire de $29\ 000 \pm 2\ 500$ a été trouvé, tandis que l'osmométrie avec membranes à grande vitesse a donné seulement 24 500.

On peut citer aussi un cas d'étude au microscope

électronique de noyau de pois: HYDE (I20).

Ce rapide survol de l'ensemble des méthodes d'étude des protéines associées aux acides nucléiques nous montre combien le domaine végétal est moins exploré que le domaine animal. Car si nous avons consacré aux 2 domaines des chapitres de grandeurs comparables, il faut dire qu'en fait, nous n'avons donné que quelques exemples d'étude des tissus animaux, alors que nous avons généralement signalé la plupart des renseignements que nous possédons en matière de tissus végétaux.

On peut donc constater que dans c'est dans le domaine animal que se sont développées et que se sont appliquées les nombreuses méthodes existant pour étudier les protéines basiques, tandis que chez les végétaux, les exemples d'application sont plus rares et les tissus étudiés forment une classe restreinte.

Il n'y a pourtant pas de raison majeure à penser que la plupart de ces méthodes sont inapplicables aux végétaux. Vraisemblablement, à condition bien sûr, de trouver des adaptations à chaque cas, des résultats positifs peuvent être attendus.

En particulier, le domaine végétal manque d'études de structure, de dimension et de forme de ses protéines. Et cependant, un effort dans ce domaine permettrait sans doute de faire progresser rapidement les questions de métabolisme végétal et de rôle des histones dans les cellules, tant de phénomènes qui sont souvent admis chez les végétaux, par analogies avec les découvertes du domaine animal, sans pour cela avoir été bien établis dans les cellules végétales.

CHAPITRE VI

DETERMINATIONS QUANTITATIVES DES NUCLEOPROTEINES

GRACE AU DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

Nous désirons connaître la teneur d'un tissu en composés nucléiques, c'est-à-dire en AN et, si possible, en protéines nucléiques de manière à avoir une idée de la teneur du tissu en NP et aussi, du taux d'AN dans les NP.

Pour cela nous allons étudier comment doser les AN. Les méthodes sont classiquement connues et le dosage ne devrait pas présenter de difficultés majeures pour nous à condition de bien adapter les méthodes aux tissus étudiés.

Par contre, nous verrons que l'évaluation des NP ou de la fraction protéine d'une NP est difficile à cause de l'incertitude qui règne sur la structure et la composition des NP de nombreux tissus.

I - CAS DES TISSUS ANIMAUX :

C'est à partir de ces tissus que les méthodes classiques ont été élaborées, alors que les méthodes utilisées pour les tissus végétaux ne sont souvent que des adaptations.

A) METHODES D'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES UTILISEES AU COURS DES TECHNIQUES DE DOSAGE :

I) Analyse spectrophotométrique:

Les AN en solution absorbent fortement la lumière UV entre 230 et 290 nm. Cette propriété est due à la structure cyclique et aux doubles liaisons conjuguées des bases puriques et pyrimidiques. Elle n'est donc pas spécifique des AN mais se retrouve dans toutes les substances qui contiennent ces bases et notamment dans les nucléosides et les nucléotides.

Bien qu'il existe un premier maximum d'absorption à 220 nm, en fait, les spectrophotomètres courants ne distinguent que le maximum principal (258-259 nm) et le minimum à 230 nm. Au delà de 260 nm, la chute de densité optique est rapide et celle-ci devient pratiquement nulle à partir de 300 nm.

Le rapport de la DO maximale à la DO pour différentes longueurs d'onde sert de critère de pureté car si des substances contaminantes absorbent l'UV, leur maximum ne se situe pas à 260 nm. Les rapports de DO d'un AN impur sont donc abaissés. Cette méthode est utilisée pour les protéines et le phénol qui ont des maxima respectifs à 280 et 270 nm.

Comme il n'est pas possible de rapporter la DO au poids sec d'AN, ni au PM vrai, le coefficient d'extinction molaire d'un AN est défini comme la DO d'une solution contenant un atome-gramme de P nucléique par litre, à 260 nm. (I33)

2) Analyse chimique:

a) Dosage d'azote: On l'effectue selon la méthode de KJELDAHL mais en ajoutant du perhydrol au cours de la minéralisation. Celle-ci est assez laborieuse car l'azote intacyclique des bases est difficile à minéraliser.

b) Dosage de phosphore: De nombreuses méthodes existent. Elles sont toutes fondées sur la transformation complète des phosphates en phosphomolybdates les quels sont ensuite quantitativement réduits en un complexe molybdique bleu que l'on dose au spectrophotomètre.

c) Dosage du ribose et de l'ARN: En milieu acide concentré, le ribose se déshydrate en donnant le furfural (alors que dans les mêmes conditions, le désoxyribose conduit à l'acide lévulinique non cyclisable en furfural. Le furfural peut réagir avec des composés aromatiques (acétate d'aniline, p-bromophénylhydrazine) ce qui permet le dosage spectrophotométrique du furfural et des ARN. Plus récemment, des méthodes simplifiées ont été mises au point avec l'orcinoïl, la cystéine ou le phloroglucinoïl.

Ainsi, les ARN sont le plus souvent dosés par la méthode à l'orcinoïl chlorhydrique-CuCl₂. (I34).

La DO est déterminée au spectrophotomètre à 665 nm. Il est nécessaire de tracer une courbe étalon avec un ARN standard. On ne peut pas étalonner avec une solution de ribose, car il n'y a pas de rapport constant entre le ribose nucléique total et le ribose qui entre en réaction avec l'orcéinol. De plus, comme la courbe d'étalonnage varie selon la nature de l'ARN, l'idéal est d'étalonner avec un ARN de même nature que celui que l'on dose.

d) Dosage du désoxyribose et de l'ADN:

La méthode la plus communément retenue est celle de DISCHE (I35) fondée sur la réaction à la diphénylamine. BURTON (I36) en a augmenté la sensibilité par emploi d'acétaldéhyde. Il suffit d'abandonner la préparation d'ADN en milieu perchlorique avec le réactif pendant 16 h. et l'on dose alors au spectrophotomètre à 600 nm. Une courbe étalon doit être tracée avec de l'ADN pur.

Cette méthode est simple, sensible et très reproductible. Elle ne présente pas d'interférence avec l'ARN.

e) Dosage de l'ADN dans l'ARN et vice-versa:

Le dosage d'impuretés désoxyribonucléiques dans l'ARN ne présente pas de difficulté particulière car il existe des méthodes spécifiques et très sensibles de dosage de l'ADN: méthode de BURTON (I36) ou de WAYNE (I37).

En revanche, il n'existe aucun procédé pratique de dosage spécifique de l'ARN dans l'ADN. (I34).

B) METHODES DE DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES DANS LES TISSUS ANIMAUX:

1) Traitement préalable des tissus:

Le plan suivant est habituellement suivi: (I38)

- broyage à froid des tissus dans l'acide trichloracétique 10 % (TCA) ou l'acide perchlorique 4,5 % (PCA).
- lavage des tissus au TCA ou PCA pour entraîner les nucléotides et composés intermédiaires du métabolisme (phase ~~xx~~ acido-soluble); les AN demeurant insolubles.
- lavage à l'eau puis à l'alcool pour éliminer toute trace d'acide.

- délipidation, soit par l'éther, soit par le mélange éthanol-éther, ce qui conduit à une poudre sèche privée de ses lipides et d'une partie de ses phosphoprotéines.

2) Principe des méthodes d'extraction en vue du dosage des AN:

3 techniques principales sont habituellement retenues dans la littérature:

a) Technique de Schneider: Elle consiste à hydrolyser simultanément ARN et ADN sur la poudre sèche délipidée, soit par PCA 0,5 N, 20 mn à 70° C, soit par TCA 5%, 15 mn à 90° C. Sur l'hydrolysats unique sont effectués des dosages colorimétriques du ribose par l'orcoine, du désoxyribose par la diphenylamine. Généralement, il n'est pas possible de doser le P ou l'absorption spécifique UV du fait de l'interférence des composés phosphorés et des acides aminés libérés dans l'hydrolysats. (139)

b) Technique d'Ogur et Rosen: (140): La poudre sèche délipidée est traitée à 4° C par l'acide perchlorique N, 16 h. Dans ces conditions, seul l'ARN devrait être totalement hydrolysé. L'ADN est ensuite dégradé par le même acide employé cette fois à chaud (70° C, 30 mn).

Cependant, la séparation des 2 AN n'est pas complète (ARN non totalement hydrolysé à froid, ADN parfois sensible à l'action des acides à froid), de sorte que cette technique est généralement rejetée pour les tissus animaux.

c) Technique de Schmidt-Thannhauser:

Elle consiste à pratiquer une hydrolyse différentielle sur chaque AN, l'ARN étant attaqué et dissous en premier; sur chaque hydrolysats séparé, on effectue une détermination analytique spécifique.

L'ARN est très sensible à l'action des alcalis: un traitement prolongé par la soude N l'hydrolyse complètement à l'état de monoribonucléotides lesquels, contrairement à l'ARN ne précipitent plus en milieu acide. Ainsi, sur le surnageant de centrifugation, on peut effectuer un dosage du ribose, un dosage du P (provenant des ARN et des phosphoprotéines) et une mesure d'absorption UV à 260 nm.

Par contre, l'ADN, "moins sensible, est dissous mais seulement très partiellement dégradé à l'état de polydésoxyribonucléotides de PM relativement élevé et encore quantitativement précipitables par les acides concentrés à froid; une telle précipitation entraîne parallèlement à l'ADN les protéines et de nombreuses substances qui leur sont liées notamment lipides et esters phosphoriques. Une hydrolyse de ce précipité en milieu acide à chaud permet alors d'obtenir les constituants désoxyribonucléiques dégradés à l'exclusion de la majorité des protéines et des complexes protéiques séparés sous forme de précipité. (141)

3) Quelques résultats de dosages:

La teneur en AN est variable d'un tissu à l'autre. La concentration en ADN d'un tissu est étroitement liée à la cellularité de ce tissu. Il est admis que la teneur en ADN par cellule diploïde est une constante d'espèce qui se situe pour l'homme et les mammifères entre 5 et 7 picogrammes. Cette teneur ne varierait qu'avec la ploïdie des cellules et serait indépendante des conditions physiologiques. (Les spermatozoïdes de mammifères, haploïdes, ne contiennent que 3 pg. d'ADN.)

La détermination de la concentration en ADN d'un tissu reste le meilleur moyen biochimique d'évaluation du nombre de cellules qu'il contient.

La concentration en ARN est très variable; elle est liée à l'activité métabolique des tissus; elle augmente quand ceux-ci sont le siège de multiplications cellulaires accélérées et de synthèses protéiniques.

II - CAS DES TISSUS VÉGÉTAUX :

Les ouvrages classiques de biochimie et d'analyse biochimique ne s'intéressent que peu à ce cas, de sorte que pour avoir un aperçu de la question, il faut se référer aux travaux de chercheurs à qui le problème s'est posé et qui ont dû créer à partir des méthodes animales, des adaptations pour les tissus végétaux qu'ils étudiaient.

Nous traiterons donc successivement le cas des tissus végétaux en général, ensuite celui des céréales et enfin, nous parlerons des travaux sur le grain de blé.

1) Dosage des AN dans les tissus végétaux:

HOLDGATE & GOODWIN (142) ont entrepris une étude critique des méthodes de dosage des AN dans les tissus végétaux.

Les 3 techniques principales ont été étudiées, comparées quant à leur facilité d'emploi et leurs résultats, pour de nombreux tissus végétaux: bourgeons, tissus de seigle, tissus embryonnaires, feuilles de pommier en croissance,...

Les auteurs font aussi le point des modes opératoires utilisés par les chercheurs pour résoudre les problèmes posés par chaque type de tissu. Il est montré que les meilleures conditions d'extraction des AN doivent être trouvées, par l'expérience sur chaque tissu examiné et que chaque technique peut permettre d'obtenir des résultats corrects avec certains tissus; cependant, il semble que ce soit celle d'Ogur et Rosen qui donne les résultats les moins quantitatifs avec les tissus végétaux.

CHEPPEY (143) étudie les méthodes de dosage des AN dans les tissus de réserve; arachide, haricot, maïs. Il adopte la méthode de SMILLIE & KROTKOV (144), mais insiste sur le fait qu'une purification doit être effectuée pour éliminer totalement les nucléotides, car le dosage du phosphore donne des résultats anormalement élevés par rapport à l'absorption UV.

INGLE (145) pense que le procédé SCHMIDT-THANNHAUSER est la seule méthode convenable pour extraire les AN de tissus végétaux. En effet, le procédé SCHNEIDER ne peut être appliqué à cause de l'interférence des sucres présents dans les végétaux avec la réaction à l'orcine tandis que des doutes sont émis quant à l'extraction des ARN par un acide à froid (OGUR & ROSEN).

2) Dosage des AN dans les céréales:

Dans ses travaux sur l'orge, KYRAPAA TROUVE que la différenciation ADN/ARN n'est satisfaisante ni selon OGUR & ROSEN, si selon SCHMIDT-THANNHAUSER. Les acides nucléiques ~~xxxxxx~~ sont dosés d'après les quantités de P trouvées par absorption UV, sur la base de 9,6 % de P dans les ARN et 9,9 % de P dans les ADN. Pour les AN totaux, il suffit d'utiliser le coefficient

9,7. Les AN totaux sont extraits uniquement à chaud et à 90° C plutôt que 70° C, pour permettre une élimination facile de la turbidité. L'ADN étant mesuré selon DISCHE, on peut déterminer l'ARN par différence. (42)

D'après MATSUSHITA (63), la méthode de SCHMIDT-THANHAUSER ne convient pas à l'embryon de riz car le dosage des pentoses donne des résultats trop élevés.

La méthode SCHNEIDER est inapplicable car la chaleur provoque la dissolution de l'amidon, ce qui rend la solution sirupeuse.

Enfin, la méthode OGUR & ROSEN semble convenable à condition de faire des corrections quand le RNA est dosé à partir de l'absorption UV.

L'auteur a dosé les ARN de plusieurs graines à l'aide du phosphore-ARN en utilisant le facteur 10,69.

3) Dosage des AN dans le grain de blé:

MIRAILOVIĆ & al. constatent comme les autres chercheurs, que la méthode Schmidt-Thannhauser donne des résultats différents selon que l'on dose le P ou les pentoses. La méthode Schneider a l'inconvénient de provoquer une dissolution de l'amidon à chaud. La méthode Ogur et Rosen permet seulement un dosage de l'ARN, dans le grain mûr, à condition de faire des corrections lors des mesures d'absorption pour tenir compte des impuretés protéiques. (62)

JENNINGS & MORTON dosent l'ADN par l'intermédiaire du désoxyribose (méthode de Webb & Levy) et l'ARN par différence entre les AN totaux et l'ADN. Les AN totaux sont trouvés par dosage du P, sachant que le DNA en contient 9,9 % et le RNA 9,4 %. (146).

MATSUSHITA (63) utilise la méthode Ogur & Rosen pour doser le RNA du grain de blé au cours de la maturation.

BOURDET (65), BOURDET & PHILLET (66) et PHILLET (67), ont dosé les AN du grain de blé ainsi que des fractions protéiques qu'ils ont isolées: albumines, globulines, gliadines, glutélines et gluten.

Ils ont constaté que l'application directe de la méthode Ogur & Rosen amenait une solubilisation d'une partie de l'ADN à froid. Ils ont donc supprimé cette phase et ont déterminé les 2 types d'AN sur l'extrait perchlorique obtenu après épuisement à chaud des préparations en milieu 0,5 N.

L'ADN a été dosé selon la méthode de DISCHE telle qu'elle est décrite par BURTON, les résultats étant calculés à partir d'une courbe étalon d'ADN de thymus purifié.

L'ARN n'a pu être déterminé spécifiquement à cause de l'interférence des pentosanes dans le dosage des pentoses.

Les AN totaux ont été dosés par spectro. UV à 260 nm des extraits perchloriques 0,5 N, les résultats étant rapportés à une courbe étalon établie à partir d'ARN de levure purifié.

Il est noté que l'interférence des protéines solubilisées partiellement au cours de l'extraction à chaud, demeure limitée et n'affecte pas de façon significative les résultats.

4) quelques résultats de dosages des AN dans le grain de blé:

MATSUSHITA (63) a calculé que le blé mûr contenait 463mg d'ARN pour 100 grains et que le rapport ARN/protéine était de l'ordre de 1 %.

MIHAJLOVIC & al. (62) ont trouvé dans 100 g. de blé des valeurs de 62 à 105 mg d'ARN.

BOURDET (65) a dosé le phosphore nucléique dans le grain de blé, la farine, le gluten, et dans les fractions protéiques. Le RNA du grain entier a été évalué à 180 mg % MS. Le P-ADN, dont la valeur était déterminée pour la première fois, est de l'ordre de 2,5 mg % soit environ 13 % du P-nucléique total.

Dans les fractions protéiques, il a été constaté que le P-nucléique se retrouvait en grande partie dans les globulines (et aussi dans les glutélines). Dans les globulines, le P-nucléique représente 70-84 % du P total (dont 45 % d'ARN et 30 % d'ADN). Dans les glutélines, le P-nucléique représente 40 % du P total (dont 31 % pour le P-ARN et 7 % pour le P-ADN.

III - EVALUATION QUANTITATIVE DES NUCLEOPROTEINES :

A l'aide des méthodes d'estimation des AN, nous pouvons connaître le taux d'AN dans un tissu ou dans une préparation de NP. Le problème est encore d'évaluer la quantité de protéines associées à ces AN.

Le problème semble simple à résoudre si la NP peut être scindée parfaitement en AN et en protéine, car un dosage d'AN et un dosage d'azote suffisent à déterminer les quantités des 2 constituants de la NP.

Par contre, si des protéines résiduelles demeurent liées aux AN, l'évaluation est plus difficile, à moins de doser l'azote total et d'en déduire l'azote purique et pyrimidique (connu d'après le taux d'AN).

De même, si la NP n'est pas parfaitement pure, en particulier, s'il y a des protéines contaminantes difficiles à distinguer des protéines nucléiques, l'évaluation quantitative semble malaisée.

Chez les tissus végétaux, peu de travaux se sont intéressés à ces questions. On peut cependant citer celui de BELOZERSKIJ & ABELEV (50) qui a trouvé que l'histone du germe de blé renfermait 30 % du N total.

BONNER & coll. ont trouvé qu'environ 80 % de l'ADN (I47) de la chromatine d'embryon de pois était lié sous forme de nucléohistone tandis que 20 % n'était pas complexé par une histone.

KOSHIYAMA & NOBUYOSCHI après fractionnement des ^{nucéo-}protéines du soja sur Sephadex G-100 ont trouvé que l'un des pics contenait 7,17 % de RNA par rapport aux protéines et pouvait être ainsi considéré comme une NP. (I48).

BOURDET (65), BOURDET & FEILLET (66) et FEILLET (67) ont évalué à 9,6 % le taux d'AN dans les globulines de la farine de blé. Compte tenu de la forte teneur en acides aminés basiques des globulines, ces résultats ont suggéré aux auteurs que cette fraction protéique ressemblait à une histone végétale.

CHAPITRE VII

RENSEIGNEMENTS GENETIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

APPORTES PAR UNE ETUDE DES COMPOSES NUCLEIQUES DU BLE

D'assez nombreux travaux ont étudié le rôle des AN dans les plantes supérieures, en particulier au point de vue de la synthèse protéique et des phosphorylations oxydatives ou photosynthétiques. Ces travaux portent le plus souvent sur des organes en pleine activité métabolique mais négligent les organes de réserve lesquels sont moins riches en composés nucléiques et d'où l'extraction est plus difficile.

I - DOMAINE DE LA PHYSIOLOGIE VEGETALE :

I) Période de maturation du grain:

D'après JENKINGS & MORTON (146), on constate après la fécondation, une division cellulaire intense, correspondant à une augmentation rapide des quantités d'ADN et d'ARN dans le grain. Après 14 jours environ, le taux de division cellulaire baisse (sauf dans la couche d'aleurone où des divisions cellulaires se poursuivent lentement) car les quantités d'ADN restent constantes.

Les auteurs ont trouvé que la quantité totale d'ARN par grain augmentait, dans l'endosperme, jusqu'au 19^e jour. Cette période correspond à une synthèse active des protéines soluble dans le pyrophosphate. Après le 19^e jour, il y a à la fois baisse relative des ARN et des protéines solubles dans le pyrophosphate mais augmentation rapide des protéines solubles dans l'acide acétique.

Il est signalé que les protéines synthétisées devaient être écartées rapidement des sites de synthèses et accumulées dans des compartiments spéciaux de l'endosperme.

Les synthèses qui ont lieu dans l'endosperme sont reflétées dans les changements du nombre de composés présents, en

particulier les acides nucléiques et l'acide phytique. Il semble aussi que les dernières synthèses ont pour but de créer une source potentielle de groupements phosphoriques en vue de la germination.

2) Période de germination du grain:

Jusqu'aux travaux de KONDO & MORITA sur la gluténine de riz (149), les protéines des graines étaient regardées principalement comme des protéines de réserve; donc le fait que les protéines des graines contiennent des AN était presque inconcevable (63). Il a donc été nécessaire de revoir les conceptions anciennes au sujet des fonctions de ces protéines.

D'après MATSUSHITA (63), la fonction des composés nucléiques du grain est soit de pourvoir aux besoins de la germination, soit d'être les constituants des protéines actives qui jouent le rôle d'agents de transfert au cours des processus de germination.

L'auteur pense que toutes les graines contiennent des acides nucléiques mais que le manque de connaissance qu'on a vient des difficultés de dosage dans ces tissus. Il est signalé que les céréales contiennent peu d'AN dans leurs graines et que, par contre, les légumineuses en contiennent plus.

CHERRY (150) pense que les AN de réserve sont des réserves de nucléotides pour la croissance de la plantule. Les travaux de l'auteur ont montré une corrélation entre le métabolisme nucléaire et la germination de la graine. En particulier, on constate une baisse du taux de RNA dans le grain et une baisse du RNA en comparaison du DNA (baisse du rapport RNA/DNA).

Des études plus précises ont montré que la décroissance du RNA était précédée d'une croissance rapide pendant les tous premiers jours de la germination et que l'activité des mitochondries et de certains enzymes évoluait parallèlement au RNA.

II - DOMAINE DE LA GENETIQUE :

MIRALLOVIC (62) (151) pense que la quantité d'AN dans le grain de blé dépend non seulement de la variété mais aussi

des méthodes agronomiques (fertilisants N, P, ...). Le taux d'AN ne peut donc être spécifique d'une variété de blé car il n'est pas constant.

BOURDET & HERARD (64) ont suggéré que le taux DNA/RNA représentait peut-être une valeur caractéristique de chaque variété de blé. Ce problème est d'une importance théorique et pratique considérable, en particulier dans la production céréalière, la sélection variétale et l'industrie de la meunerie.

Mais d'après MIHAJLOVIC & al., bien que le taux ADN/ARN ait des valeurs allant de 0,36 à 2,90, il ne peut être spécifique d'une variété car 2 ou plusieurs variétés ont des taux identiques. L'auteur a alors cherché la cause de la non spécificité de ce rapport et a pensé que l'origine était peut-être la variation du RNA pendant la maturation avec l'apport de fertilisants azotés ou phosphorés.

Peut-être est-il permis de penser que si les caractères variétaux ne sont pas en corrélation avec les taux d'AN, des résultats sont à attendre d'une étude des protéines associées à ces AN. On peut espérer que les fractionnements par électrophorèse ou chromatographie, des histones du grain de blé apporteront des éléments nouveaux à cette importante question.

CONCLUSION

Cette étude bibliographique nous a permis de prendre connaissance avec certains aspect du problème "nucléoprotéines".

La revue des méthodes d'extraction et d'étude des NP nous a donné quelques idées pour aborder le travail de laboratoire et nous a aussi signalé les difficultés que nous rencontrerons.

Il est apparu que le domaine végétal est nettement plus pauvre en techniques d'études et en résultats. C'est pour-quoi nous avons dû nous intéresser au domaine animal, afin d'accroître nos chances de résoudre les problèmes que posent les NP du grain de blé.

L'ensemble de cette étude nous a suggéré le plan de travail suivant:

I) Extraction des NP aussi natives que possible:

- travail sur le grain de blé entier, broyé.
- extraction par des solutions salines de concentra-tions diverse, pour obtenir soit le maximum de NP, soit une bonne séparation des RNP et DNP.

2) Identification de ces NP grâce aux méthodes d'évalua-tion des AN.

- trouver des conditions optimales d'application d'une méthode classique (Ogur et Rosen vraisemblablement)
- étudier le problème du dosage de l'ARN.

3) Séparer les AN des protéines, à partir des NP

- essayer de connaître le taux d'AN dans les NP
- recherche des protéines résiduelles, détermina-tion quantitative, extraction.
- étude de la composition en acides aminés des protéines basiques et résiduelles.
- problèmes d'extraction acide directe des histones

4) Etude des protéines associées aux AN:

- fractionnement : CMC, Amberlite,...
 - fractionnement sur Sephadex.
 - électrophorèse.
 - recherche de caractères susceptibles de différencier les blés au point de vue génétique, ou au point de vue de leur utilisation technologique ultérieure.
 - recherches de renseignements nouveaux au sujet de la physiologie du grain: maturation, dormance, germination, emploi de fertilisants.
-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) CHARGAFF E. & DAVIDSON J.N. ? 1955-1960. The Nucleic acids, 3 vol. New-York, Academic Press.
- (2) PRIVAT DE GARILHE M., Les acides nucléiques, 1966, coll. "Que-sais-je ?", 1966.
- (3) JIRGENSONS B. 1962, Natural Organic macromolecules. Chap? 18 "Nucleoproteins", p. 288. Perg. Press.
- (4) JAVILLIERS X, Traité de Biochimie Générale, 1959, Tome I, Vol. 2, p. II22: "Les nucléoprotéines".
- (5) JIRGENSONS B. 1962, Natural Organic Macromolecules, p. 296.
- (6) MURRAY K., 1964, "Histone Nomenclature" in "The NUCLEOHISTONES", (BONNER & TS'0, Holden Day Inc.) p. 15.
- (7) JIRGENSONS B. 1962, Natural Organic Macromolecules, p. 291.
- (8) JAVILLIERS. Traité de biochimie générale, 1959, "Les protamines" p. 840.
- (9) JOHNS E.W., 1964, "Studies on lysine-rich histones" in "THE NUCLEOHISTONES" (Bonner & Ts'o), p. 52.
- (10) IWAI K. 1964, "Histones of rice embryo and of chlorella" in "THE NUCLEOHISTONES" (Bonner & Ts'o), p. 59.
- (11) STEDMAN E. & STEDMAN E., Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B. 235, 565, 1951.
- (12) PHILLIPS D.M.P. Prog. Biophys. Chem., 12, 211, 1962.
- (13) COMBARD & VANDERPLANCKE & VENDRELY (I.R.S. Cancer, Villejuif) Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 50, n° 2.
- (14) PAOLETTI C. & TRUHAUT R., Techniques de laboratoires: I - 2. (J. Loiseleur). Préparation des NP, p. II73.
- (15) LINDH & BRANTMARK, Preparation and analysis of basic proteins, in "Methods of biochemical analysis" (David GLICK). p. 84.
- (16) COURTOIS & PERLES, Précis de chimie biologique: Les NP. p. 391.
- (17) PAOLETTI & TRUHAUT: Techniques de laboratoire. Tome I, Fasc. 2, Extraction des AN et des NP. p. II68.

- (18) JIRGENSONS B. p. 289.
- (19) ZUBAY G. & DOTY P., J. Mol. Biol. I, I, 1959.
- (20) KIRBY K.S., Biochem. J. 66, 495, 1957.
- (21) PAOLETTI & TRUHAUT : "Extraction des NP. p. II68.
- (22) LINDH & BRANTMARK: M. B. A. p. 81.
- (23) ALLEN F.W. "Ribonucleoproteins and ribonucleic acids" 1962, Elsevier; p. 127.
- (24) ALLEN F.W. RNP & RNA, p. 18, 19, 20.
- (25) JOHNS E.W. Studies on Histones. Biochem. J. 55, 22, 1964.
- (26) JAVILLIERS. p. 1092.
- (27) RASMUSSEN P.S., MURRAY K., LUCK J.M., Biochemistry, I, 79, 1962.
- (28) ALLEN F.W. "RNP & RNA", 1962, Elsevier, p. I-192.
- (29) PARSONS C.H. Jr., Arch. Biochem. Biophys. 47, (1953), 76.
- (30) KHOUVINE Y. Bull. Soc. Chim. Biol. 34, (1952), 1050.
- (31) CHAO, FU-CHUAN & CHACHMAN. Arch. Biochem. Biophys. 61, (1956), 220.
- (32) ELSON D. Biochim. Biophys. Acta, 36, (1959) 362.
- (33) OLIVERA B.M. & coll. Electrophoretic investigations of nucleohistones. BC-A, 62, 8, 9383, 1965.
- (34) IOFFE K.G. & al. A general preparative method for the successive extraction of proteins and peptides from the seeds of leguminous and mallow plants. BC-A 69, 65095, 1968.
- (35) Mc MULLEN A.I. Biochem J. 72 (1959) 682.
- (36) KOSHIYAMA & IGUCHI. RNP and RNA in soybean casein fraction. BC-A, 62, 12, 14959, 1965.
- (37) IWAI (voir BONNER & TS'0, p. 59)
- (38) DI CARLO & al. Soybean Nucleic Acid. Arch. Biochem. Biophys. 55, 253, (1955).
- (39) ELIAS
- (40) LALAND & al. Isolement d'ADN à partir de seigle et de blé. Acta chem. Scand. (1950), 4 n° 6, pp. 885-91.
- (41) KONDO & MORITA, Nucleic Rice Glutenin. Bull. Res. Inst. Food. Sc. Kyoto Univ. n° 15, p. 1, 1954.
- (42) KYRPAK T. On the presence of NP and lipoprot. In the salt-soluble fraction protein of barley. Acta Chem. Scand. II, 1565-76, 1957.
- (43) OSBORNE & HARRIS : voir ALLEN (RNP & RNA) p. 7
- (44) LEVENE & LAFORGE ; voir ALLEN (RNP & RNA) p. II
- (45) CLARKE & SCHRYVER : voir ALLEN (RNP & RNA) p. 13.

- (46) FEULGEN & al. Isolement de l'ADN du germe de blé. 1937. (B 23)
- (47) GLITZ & DEKKER RNA from wheat germ. BC-A, 59, 12, 1422I, 1963.
- (48) STOLETOV & coll. AN of seed embryos. BC-A, 64, 4, 704I, 1966.
- (49) stoletov & coll. AN of seeds embryos. BC-A, 62, 2, 1967, 1965.
- (50) BELOZERSKIJ & al. Vest. Moskow, Univ. SSSR, 1955, 6, 9, 103-8.
- (51) FURSOV & INUYSHIN. Tsitologiya, 4, 574, 1962.
- (52) MARKOWSKI & al. BC-A 69, n° 5, 33507 y, 1968.
- (53) TITTENSOR & al. BC-A 68, n° 6, 46169 u, 1968.
- (54) LANZANI & al. BC-A 66, n° 9, 72528p, 1967
- (55) LANE B.G., BC-A 62, n° 7, 8039, 1965.
- (56) LANE & ALLEN. The terminal residues of wheat germ ribonucleates. Biochim. Biophys. Acta. 47, 1961, 36.
- (57) KAY C.M. & coll. BC-A 64, n°4, 5344, 1966.
- (58) TORTI G. & al. BC-A 68, n°5, 36678v, 1968.
- (59) BASILIO & coll. BC-A 65, n° 2, 2517, 1966.
- (60) LUSENA C.V. Preparation of RNP and RNA from wheat germ. Cereal Chem. 28, n°5, 400-408, 1951.
- (61) LIPSHITZ & CHARGAFF Preparation of the DNP and fractionation of the DNA of wheat germ. BBA, 19, n°2, 256-66, 1956.
- (62) MIHALLOVIC & al. RNA in ripe grain of different varieties of wheat. Bull. Ac. Serbe, 27, 1962.
- (63) MATSUSHITA S. Studies on the Nucleic Acids in plants. Memoirs of the Research Institute for Food Science, KYOTO University. n° 14, March 1958.
- (64) BOURDET & HERARD, Association des protéines et de différentes formes du phosphore dans le gluten. Ann. Technol. Agric. 4, 363, 1966
- (65) BOURDET A. Quantitative estimation of certain phosphorus compounds in flours. US Department of Agric. 1960-65.
- (66) BOURDET & FEILLET. Distribution of phosphorus compounds in the protein fractions of various types of wheat flours. Cereal Chem. 44, n° 5, p. 457, 1967.
- (67) FEILLET P. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques agronomiques et technologiques. Ann. Technol. Agric. vol. 14, 1965, HS I.
- (68) FURSOV V.I. Localisation of organic substances in wheat grain. BC-A, 59, n° 90, 1189I, 1963.
- (69) VASIL'EVA N.A. Proteins fractions and cell nuclei of wheat seeds. BC-A 68, 13, 112199g.

- (70) NEELIN J.M. Histones from chicken erythrocytes nuclei.
(voir BONNER & TS'0) p. 66.
- (71) JOHNS E.W. Studies on lysine-rich histones.
(voir Bonner & Ts'o) p. 52
- (72) BUTLER J.A.V. Fractionation and Characteristics of histones
(voir Bonner & Ts'o) p. 36.
- (73) DICK C. Isolation of nuclei and histones from roots of *V. faba*.
BC-A 68, n°9, 75700r, 1968.
- (74) NAKAGAKI Y & al. BC-A 69, n° 7, 49793z, 1968
- (75) FAMBROUGH & al. BC-A 68 n° 8, 66342y, 1968
- (76) FAMBROUGH & al. BC-A 69, n° 7, 49222n, 1968
- (77) COHN & QUATRANO. BC-A 63, n°I, 92I, 1965.
- (78) JOHNSON & al.
- (79) PHILLIPS & coll.
- (80) KLYSZEJKO
- (81) KLYSZEJKO
- (82) PELLETIER
- (83) KURILYAK
- (84) JOHNS & al. Biochem. J. 1960, 77,p. 63I.
- (85) BUSTIN
- (86) STELLWAGEN
- (87) HNILIKA
- 88) HNILIKA
- (89) SAUTIERE
- (90) BAUER
- (91) BAUER
- (92) FAULHABER
- (93) Mc CLURE
- (94) BAUER
- (95) DEBABOV
- (96) DRIEDGER
- (97) MACPHERSON
- (98) NEIDLE
- (99) ORD
- (100) VANDEWOUDE
- (101) BELLAIR
- (102) PATEL
- (103) DMOCHOWSK I
- (104) HNILICA
- (105) JOHNS

- (106) JOHNS
- (107) LINDSAY
- (108) VANDERPLANCKE
- (109) VENDRELY
- (110) MURRAY K. *Annal. Biochem.* 3, 415 (1962)
- (111) RACUSEN & al. *Annal. Biochem.* 7, 62 (1964)
- (112) MAIZEL J.V., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 382, 1964
- (113) LINDE & BRANTMARK
- (114) DELARUE & BOHJON
- (115) BUSCH H. & MAVIOGLU H. Peptides of fraction 2A (voir Bonner & Ts'o, p. 79).
- (116) CHAMPAGNE
- (117) PHILLIPS
- (118) KINKADE & COLE
- (119) BRADBURY & ~~RANKER~~ CRANE-ROBINSON (voir Bonner & Ts'o, p. 117)
- (120) HYDE B.B. A structural component of chromatine; voir Bonner & Ts'o, p. 163.
- (121) RAUKAS
- (122) JOHNS & BUTLER. *Biochem. J.* 84, 436, 1962.
- (123) JOHNS : voir BONNER & TS'O p. 52.
- (124) OLIVERA
- (125) NAKAGAKI
- (126) GOFSHTEIN
- (127) FAMBROUGH
- (128) FAMBROUGH
- (129) FAMBROUGH
- (130) KONAREV V.G. BC-A, 62, 11, 13522, 1965.
- (131) BELOZERSKIJ & ABELEV. *Vest. Moskov. Univ. Ser. fiz. mat. estestv. Nauk. SSSR* 1955, 6, 103-8,
- (132) WOLFE F.H. & al. BC-A 68, 12, 101855s, 1968
- (133) PAOLETTI & TRUHAUT / *Techn. de Labo.* p. 1187
- (134) PAOLETTI & TRUHAUT : *Techn. de Labo* p. 1194
- (135) DISCHE Z. & SCHWARZ K. Mikromethode zur Bestimmung verschiedener Pentosen nebeneinander bei Gegenwart von Hexosen. *Mikro Chemie Acta*, 1937, 2, 13.
- (136) BURTON K. *Biochem. J.* 1956, 62, 315.
- (137) DE WAYNE R. J. *Biol. Chem.* 1958, 233, 483.
- (138) PAOLETTI & TRUHAUT *Techn. de Labo.* p. 1226.
- (139) SCHNEIDER W.C. J. *Biol. Chem.* 161, 293, 1945.

- (I40) OGUR & ROSEN Arch Biochem. 25, 262, 1950
- (I41) SCHMIDT & THANNHAUSER J. Biol. Molek. Chem. 161, 83, 1945.
- (I42) HOLDGATE & GOODWIN Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids. Phytochemistry 1965, 4, 831-43.
- (I43) CHERRY J.H. Nucleic acid Determination in Storage Tissues of Higher Plants. Plant Physiol. 1962, 37, 670-8.
- (I44) SMILLIE & KROTKOV The estimation of AN in some algae & higher plants. Can. J. Botany, 38, 31-49, 1960.
- (I45) INGLE J. The extraction and estimation of nucleotides and AN from plant material. Phytochem. 1963, 2, 353-370.
- (I46) JENNINGS & MORTON Changes in AN ... of developing wheat grain. Aust. J. Biol. Sci. 16, 2, 1962.
- (I47) BONNER & coll. WA, I, n° 5, 570, 1963.
- (I48) KOSHIYAMA & NOBUYOSCHI BC-A 62, 12, 14959, 1965
- (I49) KONDO & MORITA Nucleic acids in rice glutenin. Bull. Res. Inst. Food. Sci. Kyoto. Univ. n° 15, p. 1, 1964.
- (I50) CHERRY J.H. 1962 Plant Physiol. 37, 670-8.
- (I51) MIHALLOVIC & al. Dynamics of various forms of P. in wheat during ontogenesis. Bull. Acad. Serbe Sci et Arts. tome XXXIII, n° 10, 1964.
-