

50376

N° d'ordre : 450

1974  
35

50376  
1974  
35

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3<sup>e</sup> CYCLE EN BIOCHIMIE

par

**Claude DISSOUS**

POLYSOMES, RETICULUM ENDOPLASMIQUE  
ET BIOSYNTHESE PROTEIQUE  
DANS L'HEPATOCTE DE RAT



Membres du Jury : MM. J. MONTREUIL

J. KREMBEL

F. GROS

J. GUILLAUME

Président

Rapporteur

Examineurs

Présenté le 15 Mars 1974.

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, R. DEFRETIN

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et  
Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,  
DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC,  
HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT,  
MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE,  
ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU

Professeur

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique

Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique (Lille)
M. PROUVOST Jean	Géologie Minéralogie
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

#### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. DERCOURT Jean-Michel	Sciences de la Terre
M. LEBRUN André	Electronique (Lille)
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. SCHILTZ René	Physique

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BONNOT Ernest	Biologie
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Chimie Minérale
M. DEPREZ Gilbert	I.U.T. Lille
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. SALMER Georges	I.E.E.A.
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCOQ Denis	Mathématiques
M. BREZINSKI Claude	I.E.E.A.
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COQUERY Jean-Louis	Biologie
M. COULON Jean	I.E.E.A.
M. CROSNIER Yves	E.U.D.I.L.
M. COUTURIER Daniel	Chimie
M <sup>le</sup> DACCHARI Monique	Géographie et Aménagement Spatial
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DHAINAUT André	Biologie
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
M. DERIEUX Jean-Claude	Biologie (I.U.T.)
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DUEE Gérard	Sciences de la Terre
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M <sup>me</sup> EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M. FONTAINE Jacques-Marie	I.U.T. Lille
M. FOURNET Bernard	I.U.T. Lille
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques et Sociales
M. HECTOR Joseph	S.E.N. Calais
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	I.E.E.A.
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
M <sup>le</sup> KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie Biologique
M. LAURENT François	Automatique
M <sup>le</sup> LEGRAND Denise	Mathématiques
M <sup>le</sup> LEGRAND Solange	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	Electronique (Lille)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHET Pierre	I.U.T. Lille
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique (I.U.T. Lille)
M <sup>me</sup> N'Guyen Van Chi Régine	Géographie et Aménagement Spatial

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MOTZKIN Joseph	Mathématiques
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. NICOLE Jacques	Chimie (E.N.S.C.L.)
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PERTUZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislav	Physique
M. ROGALSKI Marc	Mathématiques
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Biologie
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. THERY Pierre	Calais
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique (Béthune)
M. WERNER Georges	Informatique (I.U.T. Lille)
M. WATERLOT Michel	Géologie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

*Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de l'Université de LILLE I (Professeur J. MONTREUIL), sous la direction de Monsieur J. KREMBEL, Maître de Conférences.*

*Il a bénéficié de subventions du Centre National de la Recherche Scientifique et du Commissariat à l'Energie Atomique.*

*Certains résultats de ce mémoire ont fait l'objet d'un article,  
à paraître dans European Journal of Biochemistry :*

*"Isopycnic centrifugation of free and membrane-bound polysomes  
from Rat liver".*

*(C. DISSOUS, F. CANER et J. KREMBEL) (sous presse)*

*et d'une communication lors du "Forum des Jeunes", organisé à Strasbourg  
les 12 et 13 octobre 1973 par la Société de Chimie Biologique.*

TABLE DES MATIERES



## AVANT - PROPOS

### INTRODUCTION

<i>L'hypothèse de PALADE et SIEKEVITZ</i>	p. 1
<i>L'attachement des polysomes aux membranes et ses avantages pour la cellule</i>	
<i>Les polysomes "libres" sont-ils des artéfacts ?</i>	p. 2
<i>L'étude des spécificités de synthèse et ses difficultés</i>	p. 3
<i>Synthèse des protéines membranaires</i>	
<i>Relations fonctionnelles et de biogénèse entre polysomes libres et liés</i>	p. 4

### PREPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET DES POLYSOMES

#### LIES AU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

INTRODUCTION	p. 5
A- CARACTERES D'UNE METHODE DE PREPARATION IDEALE	p. 8
B- LE MILIEU D'HOMOGENEISATION	
1°- Concentration en potassium	
2°- Effet des ions $Ca^{++}$	p. 9
3°- Traces d'ions métalliques	
C- HOMOGENEISATION ET SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL	
1°- L'homogénéisation est une procédure subjective	
2°- Améliorer le rendement en polysomes liés	p.11
D- FRACTIONNEMENT DU SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL	p.16
1°- Comparaison de quatre procédures	
2°- Interprétation des résultats	p.17
ACTIVITE DE BIOSYNTHESE PROTEIQUE <u>IN VITRO</u>	
ACTION DES DETERGENTS	p.23

A- ACTIVITE DE BIOSYNTHESE PROTEIQUE <u>IN VITRO</u> DES POLYSOMES LIBRES ET LIES	p.23
1°- Résultats présentés dans la littérature	
2°- Comparaison de l'activité de biosynthèse protéique <u>in vitro</u> des polysomes libres et liés	
B- ACTION DES DETERGENTS SUR LA STRUCTURE POLYSOMALE	p.26
1°- Effets du DOC et du TRITON X-100 sur la densité apparente des polysomes en gradients de chlorure de césium	
2°- Action des détergents et activité de biosynthèse <u>in vitro</u>	p.30
a- polysomes totaux	
b- polysomes libres et polysomes liés	
c- discussion	
C- CONCLUSION	p.35
METABOLISME DU RNA ET DIFFERENCES STRUCTURALES ENTRE POLYSOMES LIBRES ET LIES	
A- METABOLISME DU RNA DES POLYSOMES LIBRES ET LIES	p.37
1°- rRNA	
2°- Incorporation d'acide orotique <sup>3</sup> H dans les mRNA des polysomes libres et liés en présence et en absence de faibles doses d'actinomycine D	
3°- Influence du jeûne sur le taux de renouvellement du RNA polysomal des catégories de polysomes	
4°- Discussion	p.40
a- stabilité des mRNA	
b- effets du jeûne	p.43
B- DIFFERENCES STRUCTURALES ENTRE POLYSOMES LIBRES ET LIES	
1°- Comparaison des densités apparentes en CsCl des polysomes libres et liés	

C- CONCLUSION p.49

LIAISON(S) DES POLYSOMES AUX MEMBRANES  
DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

A- LIAISON DE LA GRANDE SOUS-UNITE A LA MEMBRANE p.50

B- AUTRES MODES DE LIAISON

1°- *Action de la RNase sur la fraction de réticulum  
endoplasmique*

2°- *Comportement des polysomes libres lors de la  
purification*

p.55

3°- *Effets de la congélation et de la décongélation  
sur la répartition des 3 types de polysomes*

p.57

4°- *Effets du jeûne*

p.62

5°- *Discussion*

p.65

C- CONCLUSION

METHODOLOGIE

A- SOLUTIONS p.66

B- FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

1°- *Homogénéat*

2°- *Noyaux*

3°- *Surnageant post-mitochondrial*

4°- *Polysomes totaux*

p.68

5°- *Polysomes libres et Polysomes liés*

C- FRACTION D'INHIBITEUR CYTOPLASMIQUE DE RNase p.69

1°- *Préparation*

2°- *Contrôle d'activité*

a- solutions

b- manipulation

p.71

D- SYSTEMES ACELLULAIRES DE BIOSYNTHESE PROTEIQUE p.71

1°- *Composition des milieux et préparation des fractions*

a- "système ammonium"

α- polysomes

β- fraction "surnageant haute vitesse"

γ- composition du milieu

b- "système potassium" p.73

α- polysomes

β- fraction "surnageant haute vitesse"

γ- composition du milieu

2°- *Détermination de la radioactivité incorporée*

a- arrêt de l'incubation

b- hydrolyse p.75

c- filtration

E- GRADIENTS LINEAIRES DE SACCHAROSE

F- CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

G- MESURES DE RADIOACTIVITE p.77

H- EXTRACTION DU rRNA

1°- *A partir de polysomes*

2°- *A partir d'un surnageant post-mitochondrial ou d'une fraction de réticulum endoplasmique* p.78

I- DOSAGE DU RNA

J- DOSAGE DES PROTEINES

K- MICROSCOPIE ELECTRONIQUE p.79

L- PRODUITS CHIMIQUES ET ENZYMES UTILISES

SYNTHESE ET PERSPECTIVES p.80

SOMMAIRE p.81

BIBLIOGRAPHIE

## ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES

### Dans le texte :

- rRNA : *Acide ribonucléique ribosomal*
- mRNA : *Acide ribonucléique messenger*
- tRNA : *Acide ribonucléique de transfert*
- RNP : *Ribonucléoprotéine*
- Tris : *2-amino-2-hydroxyméthyl-propanediol-1,3*
- DOC : *Désoxycholate de sodium*
- RNase : *Ribonucléase*
- EDTA : *Ethylène diamine tetra-acétique*
- SSC : *"Standard saline citrate"*  
*NaCl 0,15M, citrate trisodique 0,015M*
- SDS : *Dodécyl sulfate de sodium*
- CPM : *Coups par minute*
- TCA : *Acide trichloracétique*
- PCA : *Acide perchlorique*

### Dans les tableaux :

- SPM : *Surnageant post-mitochondrial*
- SHV : *Surnageant haute vitesse*
- ATP : *Adénosine tri-phosphate*
- GTP : *Guanosine tri-phosphate*
- PEP : *Phospho-énol-pyruvate*
- PK : *Pyruvate kinase*

### Dans la figure 2 :

- ① : *Fraction d'inhibiteur cytoplasmique de ribonucléase*
- N,C,M : *Sédiment de noyaux, débris cellulaires et mitochondries*
- Lp : *Couche lipidique*
- Sac. : *Saccharose*
- Mic. : *Microsomes*

- Mb : Membranes granulaires et agranulaires du réticulum endoplasmique
- Mb.li. : Membranes agranulaires
- Mb.gt : Membranes granulaires
- Cyt. : "Cytosol"
- P. : Polysomes et ribosomes
- P.lb. : Polysomes libres
- 10' : Signifie 10 minutes
- d. : Détergent

Dans les autres figures :

- Mo : Monomère

## AVANT - PROPOS

A elle seule, la nature du sujet traité dans ce mémoire vient restreindre l'étendue des moyens de répondre aux exigences de concision et de clarté. Nous formulons l'espoir d'avoir surmonté cette difficulté en concevant notre exposé de la manière décrite ci-dessous.

La découverte de l'existence de ribosomes associés aux membranes du réticulum endoplasmique a fait naître de nombreuses énigmes qui devront être résolues pour que le mécanisme général de la biosynthèse protéique au niveau cellulaire soit élucidé. Le chapitre INTRODUCTION a pour but de les présenter, plutôt que d'être un historique et une revue bibliographique complets.

Notre travail compose, ou parfois illustre, quatre chapitres ayant pour mots-clés : PREPARATION, BIOSYNTHESE PROTEIQUE *in vitro*, METABOLISME et STRUCTURE, LIAISON POLYSOMES-MEMBRANES.

Enfin, la dernière partie est une synthèse des résultats acquis.

Une telle construction permet le report, en fin de mémoire, du chapitre méthodologique. Les "PROTOCOLES EXPERIMENTAUX", insérés dans le texte, en italique, ne rassemblent que les détails techniques particuliers à chaque type d'expérience.

## INTRODUCTION



### *L'hypothèse de PALADE et SIEKEVITZ*

Deux populations ribosomales ont pu être reconnues morphologiquement dans le cytoplasme des cellules parenchymateuses de foie de Rat dès 1955-56 (1-2) : l'une, libre dans le cytoplasme, et l'autre associée à un abondant système de membranes lipoprotéiques que l'on nomma *réticulum endoplasmique*. Les deux catégories de ribosomes furent ensuite observées en microscopie électronique dans la plupart des cellules eucaryotiques, et l'abondance du réticulum endoplasmique mise en corrélation avec le degré d'activité sécrétrice d'un type cellulaire (PALADE, 1958) (3).

Ces quelques faits conduisent PALADE et SIEKEVITZ à émettre, en 1960, l'hypothèse selon laquelle les ribosomes liés aux membranes intracellulaires synthétiseraient les exoprotéines, tandis que les ribosomes libres seraient responsables de la synthèse des protéines retenues dans la cellule (4). Cette théorie était séduisante, et un grand nombre de travaux ultérieurs eurent pour but d'acquiescer des faits expérimentaux susceptibles de l'étayer ou de l'infirmier.

### *L'attachement des polysomes aux membranes et ses avantages pour la cellule*

On conçoit aisément que l'existence de polysomes liés puisse avoir un avantage majeur pour la physiologie de la cellule si les chaînes protéiques synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique peuvent, et doivent, être transportées ailleurs, dans la cellule ou en dehors de la cellule ; les espaces intermembranaires - encore appelées *cisternae* - assurant alors les communications entre les différents organites cellulaires ainsi qu'avec l'extérieur. Les premières données biochimiques s'accordant avec cette supposition furent apportées par PETERS (1962) (5), puis par SARGENT et CAMPBELL (1965) (6) : in vivo, comme in vitro, les chaînes naissantes d'albumine sont localisées à l'intérieur des vésicules

intermembranaires. PETERS (7) montre également que la catalase - un composant des "microbodies" - est synthétisée par les polysomes liés, et BREW (1968) (8) que la synthèse d' $\alpha$ -lactalbumine au niveau du réticulum endoplasmique des cellules de la glande mammaire contrôle la synthèse du lactose.

Ce dernier travail nous montre également qu'un transport ou une excretion rendus possibles ne sont pas les seuls avantages que peuvent présenter pour la cellule la synthèse de protéines au niveau du réticulum endoplasmique, mais qu'un mécanisme de régulation peut-être aussi basé sur cette synthèse.

Nous choisirons comme dernier exemple celui de la biosynthèse des chaînes protéiques "lourdes" et "légères" des immunoglobulines, étudié par WILLIAMSON et ASKONAS (9). Dans ce cas, il est indéniable que la synthèse au niveau du réticulum, confinant les chaînes naissantes dans un espace restreint, favorise beaucoup l'association des chaînes entre elles, c'est-à-dire la formation des ponts disulfure.

#### *Les polysomes "libres" sont-ils des artéfacts ?*

Dans une cellule dont le réticulum endoplasmique granulaire est très développé, un hépatocyte par exemple, les protéines nécessaires à "l'économie interne" de la cellule sont-elles synthétisées également par les polysomes liés, et/ou par des polysomes non associés au réticulum ? En d'autres termes, existe-t-il dans la cellule de foie des polysomes libres, et si oui, synthétisent-ils des protéines que ne fabriquent pas les polysomes liés ? Cette question nous apparaît cruciale pour comprendre l'organisation de la biosynthèse protéique dans une cellule animale différenciée. Et sur ce point, l'hypothèse de PALADE et SIEKEVITZ nous apparaît encore séduisante, car les protéines produites par le réticulum devraient obligatoirement migrer vers des organites intracellulaires comme les lysosomes pour ne pas être excrétées.

Cependant, les observations en microscopie électronique nous montrent des ribosomes apparemment libres dans le cytoplasme, mais nous ne pouvons être sûrs de cette interprétation. Il est possible d'isoler, à partir d'un homogénat de foie deux catégories de polysomes, que nous nommons, de façon opérationnelle, liés et libres, mais il est impossible d'affirmer que des polysomes n'ont pas été dissociés du réticulum au cours de l'éclatement des cellules. Pour affirmer qu'il s'agit bien de deux types polysomiaux distincts, la démonstration que des protéines déterminées sont synthétisées par un type de polysomes ne suffit plus ; il faut prouver que des protéines synthétisées

par une catégorie de polysomes ne le sont pas par l'autre.

### *L'étude des spécificités de synthèse et ses difficultés*

La difficulté majeure de cette étude réside dans le choix des protéines dont il est possible d'étudier la biosynthèse. Le principe de cette étude est de suivre l'incorporation d'un ou plusieurs acides aminés radioactifs dans la protéine purifiée dans diverses conditions. L'obtention d'une protéine à l'état de pureté radiochimique soulève beaucoup de problèmes.

Les travaux de REDMAN (10) (protéines sériques et ferritine), de OGATA et al (sérumalbumine, catalase) (11-12) utilisant la précipitation des protéines néosynthétisées par des antisérums spécifiques ont été très contestés, et les travaux de CAMPBELL (13), SHREIBER et al (14) montrent que les méthodes immunologiques sont insuffisantes dans ce cas précis.

Différents auteurs cependant affirment que la ferritine est synthétisée par la fraction de polysomes libres (15-16), tandis que la sérumalbumine, les glycoprotéines, les immunoglobulines, le collagène, les enzymes pancréatiques, seraient synthétisés spécifiquement par les polysomes liés (17-20). Mais la controverse n'est pas terminée semble-t-il, puisqu'un travail récent conclut que la synthèse de la ferritine s'effectue dans les deux fractions (21). La majorité des auteurs, cependant, s'accordent à penser que les deux fractions ribosomales couramment isolées correspondent à deux populations fonctionnellement spécialisées dans la traduction de différentes classes de mRNA.

### *Synthèse des protéines membranaires*

Si l'on admet que cette conception est correcte, nos idées demeurent obscures en ce qui concerne la composition exacte des "différentes classes de mRNA", et en particulier, le(s) lieu(x) de synthèse des protéines membranaires. Une hypothèse a été émise à ce sujet (22), que nous discuterons plus loin dans le chapitre relatif au(x) mode(s) de liaison des polysomes aux membranes (voir p. ). A notre connaissance, un seul travail a abordé ce problème. Il s'agit de l'étude de la synthèse de la NADPH-cytochrome c réductase, par diverses préparations de polysomes (RAGNOTTI et al, 1969) (23) ; après de nombreuses purifications par filtration sur gel, chromatographie d'échange d'ions, électrophorèses en gel de polyacrylamide, la radioactivité spécifique de la protéine s'avère être identique dans les fractions de polysomes libres et liés.

Il semble donc, au moins dans le cas particulier de cette protéine, que les deux catégories de ribosomes puissent effectuer la synthèse de protéines membranaires.

### *Relations fonctionnelles et de biogénèse entre polysomes libres et liés*

CAMPBELL (24) considère que ce dernier résultat s'accorde tout à fait avec ceux de SCHIMKE (25) et de SIEKEVITZ et PALADE (26) : l'étude du métabolisme des protéines constitutives des membranes du réticulum endoplasmique chez le Rat supporte l'idée que la composition enzymatique de la membrane est dans un état de renouvellement constant, et que des protéines peuvent être fixées et détachées de la membrane préexistante. Pour CAMPBELL, ceci implique que le réticulum agranulaire soit capable de fixer des protéines synthétisées par des polysomes libres.

SABATINI pense que les résultats de SIEKEVITZ et PALADE sont compatibles avec l'idée que le détachement de ribosomes des membranes conduit à la formation de membranes lisses, qui peuvent redevenir granulaires par réattachement fonctionnel de ribosomes (27).

Ces deux hypothèses, bien qu'ayant à leur base des propositions fondamentalement opposées (c'est à dire synthèse non spécifique et synthèse spécifique des protéines membranaires) ne sont pas en fait incompatibles. Elles illustrent en tous cas combien les relations fonctionnelles et de biogénèse entre polysomes libres et liés demeurent problématiques.

La détermination de paramètres comme les stabilités respectives des RNA ribosomaux (28) ou le taux d'entrée des ribosomes néosynthétisés dans les polysomes libres et liés (29) indiquent que les deux classes de ribosomes ont des temps de transit similaires dans le cytoplasme. La démonstration que le mécanisme de traduction implique une dissociation et une réassociation cycliques des 2 sous-unités ribosomales (30) suggère encore l'existence, à l'intérieur de la cellule, d'un état d'équilibre entre les deux populations ; ceci imposerait un échange rapide des sous-unités ribosomales des deux classes. Mais dans quelle mesure l'association des ribosomes aux membranes modifie-t-elle la "dynamique" des protagonistes de la biosynthèse protéique telle que nous la représentons actuellement ?

PREPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET DES POLYSOMES

LIES AU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

## INTRODUCTION

La fraction microsomale de CLAUDE (1941) (31) contient en grande partie les dérivés vésiculés du réticulum endoplasmique de l'hépatocyte intact (32). L'étude des composants membranaires "lisses" ou "granulaires" de la fraction microsomale a fait avancer notre compréhension du rôle du réticulum endoplasmique et de la signification fonctionnelle de l'interaction ribosomes-membranes.

Depuis le fractionnement par centrifugation différentielle de CLAUDE, les procédures employées pour isoler le réticulum endoplasmique se sont multipliées. DALLNER (1963) et REID (1967) ont écrit d'excellents historiques de cette question (33-34).

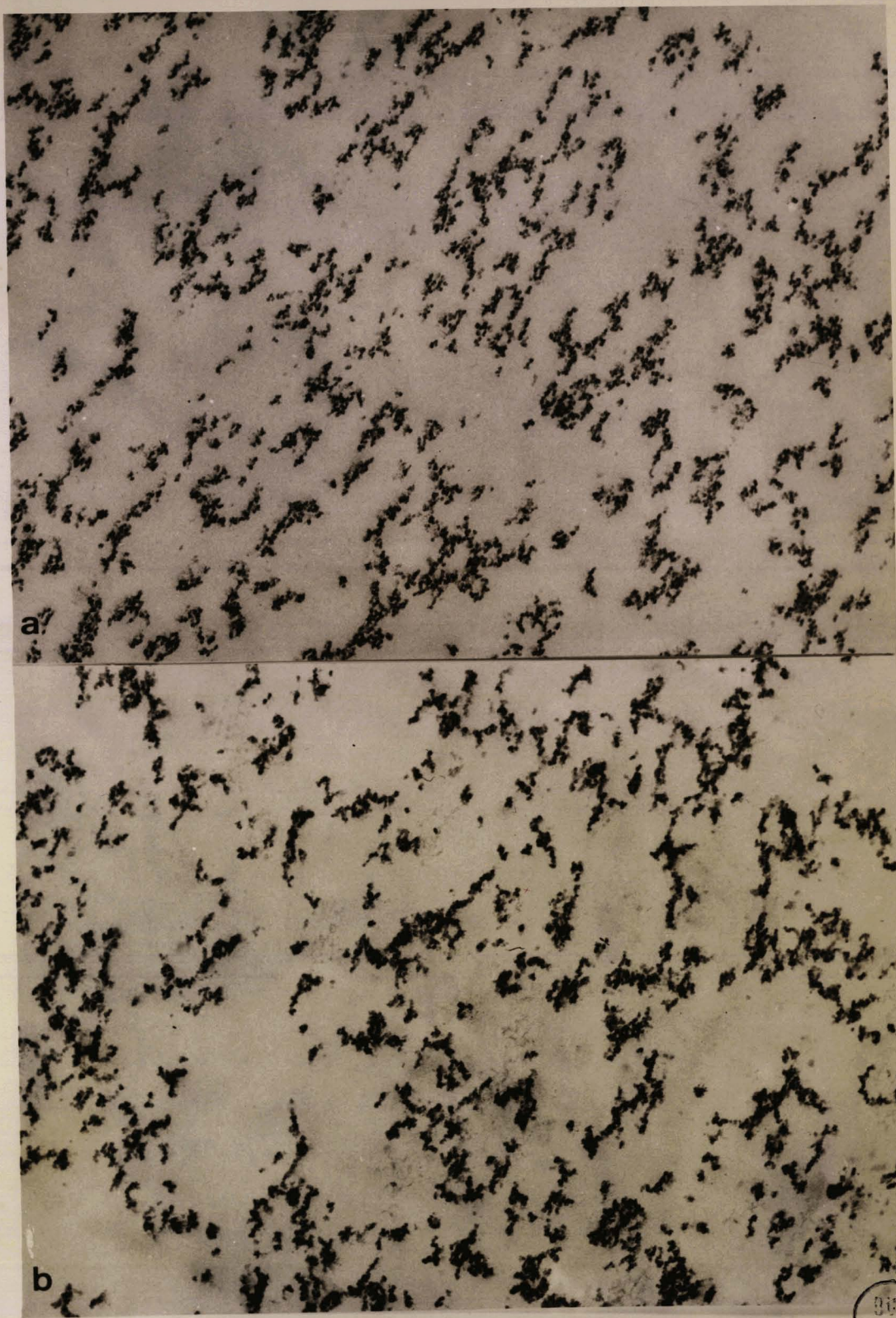
La procédure de PALADE et SIEKEVITZ (1956) (35) fut modifiée pour être appliquée à des tissus très différents (1966-67) (36-38). Elle consiste en une première séparation des noyaux et mitochondries de l'homogénat par une centrifugation à basse vitesse, suivie d'une ultracentrifugation du surnageant post-mitochondrial. Mais l'intérêt croissant que suscitait l'étude de la biosynthèse protéique la fit adopter pour la préparation de ribosomes : le surnageant-post-mitochondrial ou la fraction microsomale sont mis en présence d'un excès de désoxycholate de sodium, de façon à libérer les ribosomes des membranes (39).

D'autres auteurs tentent d'isoler membranes granulaires et agranulaires (FAWCETT, 1964) (40). Les deux types de membranes sont séparés en tirant parti de leur "solubilité" différentielle à des faibles concentrations en désoxycholate (ERNSTER et al, 1962) (41), ou de leur densités différentes (MOULE et al, 1960 ; CHAUVEAU et al, 1962) (42-43). Ce dernier critère est encore à la base de méthodes employant l'isooctane (HALLINAN et MUNRO, 1965 ; HAWTREY-SCHIRREN, 1962) ou le chlorure de césium (DALLNER et al, 1966) qui sont trouvés rendre plus rapide, ou améliorer la séparation des deux types de réticulum endoplasmique (44-46).

Toutes ces méthodes sont inadéquates pour l'étude du système de biosynthèse protéique associé aux membranes.

BLOEMENDAL et al (1964, 1967) (47-48) décrivent la première méthode de préparation des polysomes libres : le surnageant post-mitochondrial est centrifugé à travers un gradient discontinu de saccharose 0,6M-2M. Utilisant une méthode similaire, BLOBEL et POTTER isolent polysomes libres et liés au réticulum endoplasmique (1966) (49), ainsi que TATA (1967) selon une procédure un peu différente (50).

*Le but de ce chapitre n'est pas d'être une étude critique systématique de toutes les méthodes présentées dans la littérature et de leurs variantes. Il s'agit plutôt d'une revue succincte des points méthodologiques importants et des problèmes que pose encore la préparation des polysomes liés d'hépatocyte. Car l'ensemble de ces éléments doit souvent être pris en considération lors de l'interprétation de résultats expérimentaux.*



DOS  
L. 11. 11

PLANCHE I : Coupes de sédiments de polysomes libres (a) et liés (b) observées à un faible grossissement.

Grossissement : 10 260 - Agrandissement : 3



## A- CARACTERES D'UNE METHODE DE PREPARATION IDEALE

Une méthode de préparation idéale des polysomes libres et liés au réticulum endoplasmique devrait répondre aux exigences suivantes :

- i) extraction quantitative des membranes de réticulum endoplasmique sans changements notables de structure ni d'activité.*
- ii) obtention quantitative des ribosomes et polysomes libres et liés, sans dégradation du mRNA, sans contaminations croisées.*
- iii) ni rupture, ni perturbation de la (des) liaison(s) des polysomes aux membranes.*

Les méthodes utilisées à l'heure actuelle ne possèdent pas encore toutes ces caractéristiques. En effet, l'extraction quantitative des membranes n'est pas encore possible, pour les raisons que nous verrons plus loin, et une augmentation des rendements couramment obtenus ne peut se faire sans dégradation de la structure polysomale (voir Figure 1, p. 10). En outre, aucune donnée ne nous permet d'affirmer que les techniques actuelles respectent le 3ème critère. Quelques uns de nos résultats (voir p.55-60) sembleraient plutôt suggérer le contraire.

L'ensemble de ces faits vient donc, dans une certaine mesure, limiter quelquefois la validité de résultats expérimentaux ou la portée de leur interprétation.

## B- LE MILIEU D'HOMOGENEISATION

La composition ionique des milieux d'homogénéisation utilisés pour préparer les polysomes libres et liés tend à s'uniformiser. On trouvera, à ce propos, dans la partie méthodologique (p.67) la composition ionique du milieu que nous utilisons, et qui est aussi celle que l'on rencontre le plus fréquemment dans la littérature. Cependant, il nous apparaît important de souligner les faits suivants :

### *1°- Concentration en potassium :*

Il est reconnu qu'une force ionique relativement haute (0,4-0,6) a un effet stabilisant sur la structure polysomale. En outre, lorsqu'un détergent est employé son action se trouve facilitée. Pourtant, les

concentrations en potassium supérieures à 25mM seront à éviter lors de la préparation de membranes granulaires, car des polysomes peuvent alors être détachés des membranes (voir ADELMAN et al, 1973) (51).

### *2°- Effet des ions $Ca^{++}$ :*

L'introduction de calcium à faible concentration (1 à 3mM) prévient l'éclatement possible de noyaux lors de l'homogénéisation. Elle est souhaitable lorsque l'on veut préparer les polysomes totaux de la cellule. On introduira alors un détergent non-ionique (0,2-0,5 p.100) dans le milieu. Cependant, elle est contre-indiquée lorsque l'on désire préparer les polysomes liés, car les cations mono et surtout divalents favorisent l'aggrégation des membranes entre elles, et notamment l'association du réticulum endoplasmique aux mitochondries, (52).

### *3°- Traces d'ions métalliques :*

Certains auteurs (53) jugent qu'il faut introduire dans le milieu d'homogénéisation de l'EDTA à une concentration équivalente à 5-10% de celle du magnésium, de façon à chélater toutes traces éventuelles d'ions divalents ( $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Pb^{++}$ ). Ces ions sont capables de provoquer des ruptures (non enzymatiques) de liaisons phosphodiester. Jusqu'à présent nous n'avons pu, toutefois, mettre en évidence le caractère indispensable de cette précaution.

## C- HOMOGENEISATION ET SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL

### *1°- L'homogénéisation est une procédure subjective :*

L'éclatement des cellules, qui se réalise le plus souvent dans un homogénéiseur de POTTER demeure une procédure subjective. Pourtant, cette étape du fractionnement cellulaire a une importance majeure car elle influence la qualité de la préparation et surtout le rendement en polysomes liés.

En effet, lors de l'homogénéisation, le réticulum endoplasmique est fragmenté en morceaux de tailles très variables, et d'autant plus petits que l'homogénéisation aura été plus poussée. Lors de la centrifugation différentielle, de larges fragments de réticulum peuvent donc sédimenter avec les noyaux, débris cellulaires et mitochondries. Il existe donc des conditions d'homogénéisation et de centrifugation permettant d'obtenir un rendement optimum en polysomes liés dans le surnageant post-mitochondrial.

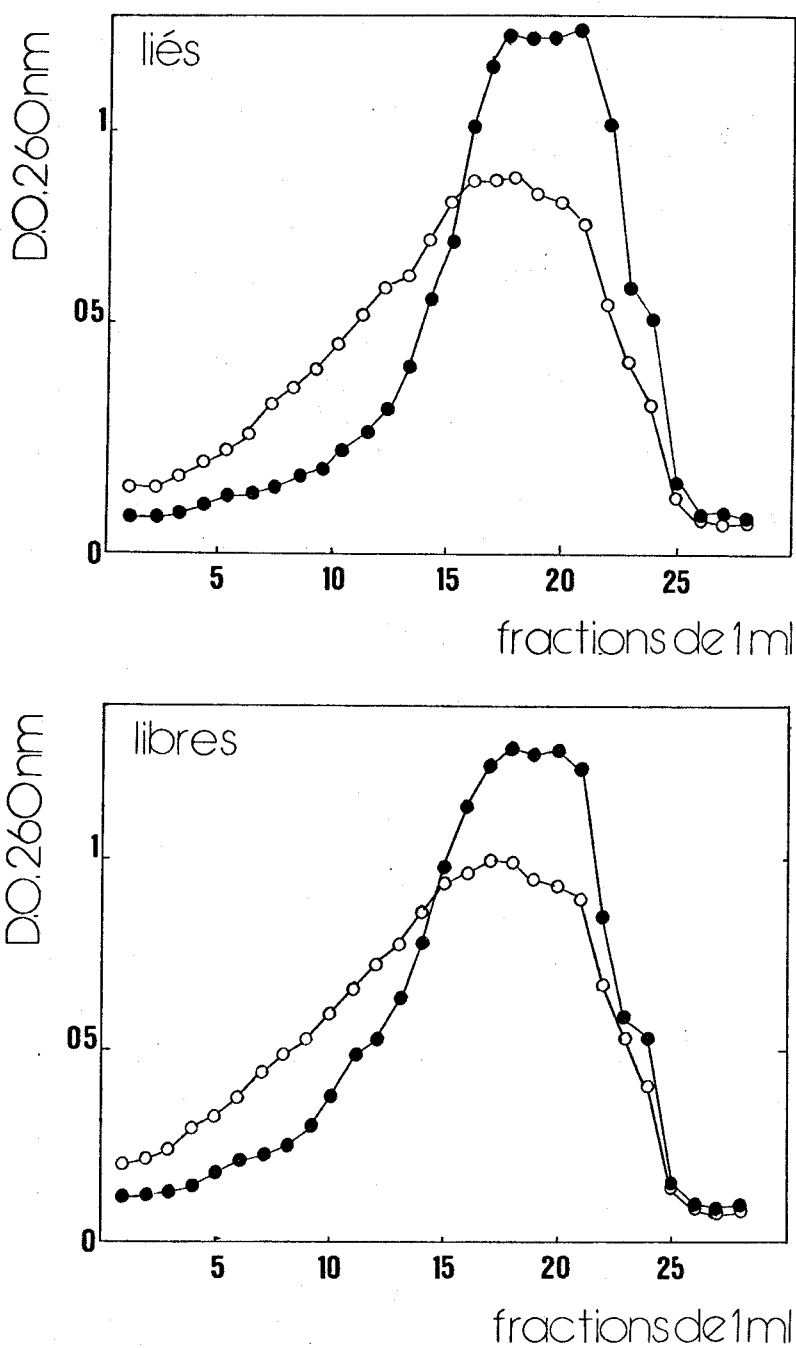


Figure 1 : Ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose des polysomes libres et liés du surnageant post-mitochondrial (○) et de la fraction sédimentant à basse vitesse (●).

## 2° - Améliorer le rendement en polysomes liés :

L'influence de l'intensité de l'homogénéisation et des conditions de centrifugation a été bien étudiée par BLOBEL et POTTER (1967) (54), mais en réalité, les conditions optimums dépendent aussi beaucoup du matériel utilisé. Il faut également se garder de provoquer l'éclatement des noyaux, qui ne se produit pas graduellement, mais assez brusquement à partir d'une certaine durée de l'homogénéisation, comme le montrent les chiffres du TABLEAU I, p.12. La chromatine libérée entraînerait alors une quantité appréciable de ribosomes et polysomes libres.

Il demeure que dans les meilleures conditions, 55 à 60% des ribosomes de la cellule sédimentent avec les noyaux et mitochondries (voir TABLEAU II, p.13). Ceci est dû principalement aux interactions existant entre les membranes du réticulum et les mitochondries, et entre les membranes du réticulum elles-même, qui sont importantes surtout en présence d'ions (52). Environ 30 à 35% du RNA de l'homogénat ( $\approx$  40% des ribosomes de la cellule) est récupérable au cours de deux lavages successifs du culot obtenu après centrifugation à basse vitesse (TABLEAU II, p.13). Les nouveaux surnageants peuvent être réunis au surnageant post-mitochondrial. Mais cette procédure possède deux graves défauts. D'une part, le lavage des noyaux et mitochondries ne peut se faire sans une dégradation notable de la structure polysomale (voir Figure 1, p.10). D'autre part, la dilution du surnageant global ne permet plus l'obtention de grosses quantités de matériel ribosomal, compte tenu de la capacité des rotors.

Le fait le plus décevant est que le réticulum sédimentant à basse vitesse est préférentiellement celui qui entoure les mitochondries dans la cellule, comme l'a montré récemment TATA (55). Sa localisation privilégiée pourrait lui conférer des propriétés particulières.

Pour améliorer le rendement en réticulum endoplasmique dans le surnageant post-mitochondrial, ADELMAN et al (1972) (56) pratiquent l'homogénéisation dans une solution de saccharose dépourvue d'ions. Mais l'éclatement des lysosomes et des noyaux qui en résulte provoque une dégradation poussée du mRNA, si bien que les fractions obtenues ne sont composées que de monosomes.

Dans les travaux que nous rapportons dans ce mémoire, nous avons choisi d'isoler les polysomes avec le minimum de dégradation du mRNA. Ceci impose que les actions mécaniques et nucléasiques soient limitées lors de la préparation, comme le montre le paragraphe suivant.

TABLEAU I

*Influence de l'homogénéisation sur l'intégrité des noyaux.*

	mg de RNA dans 1ml d'homogénat (A)	mg de RNA dans la fraction Nucléaire (B)	$\% = \frac{B \times 100}{A}$
8 allers-retour	1,458	0,151	10,35
de piston	1,402	0,142	10,12
1000 tours/mn	1,470	0,165	11,22
12 allers-retour	1,641	0,063	3,8
de piston	1,375	0,054	3,9
1000 tours/mn	1,577	0,053	3,3

*N.B : Chaque chiffre est la moyenne de 3 déterminations du RNA.*

*Les six homogénéisations sont indépendantes.*

*Les noyaux sont isolés comme décrit dans "METHODOLOGIE".*



TABLEAU II

Répartition du RNA après la centrifugation de l'homogénat  
à basse vitesse (mg de RNA).

Homogénat	S.P.M.	Polysomes sédimentant avec les noyaux et mitochondries	Noyaux et mitochondries	Polysomes récupérables par lavage
97,92	34,61	43,28	20,02	26,21
103,8	36,48	48,25	19,21	39,04
103,6	35,38	49,61	19,11	35,50

*N.B : Les 3 expériences sont indépendantes.*



## TABLEAU II - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- 15g de broyat provenant de 2 foies sont homogénéisés dans 65ml de Milieu A (sans RNA de levure ; voir "METHODOLOGIE", p.67), par 8 allers-retour de piston (1000 tours/mn). L'homogénat filtré sur gaze stérile est réparti dans 3 pots de rotor 60 Ti (3x20ml), et centrifugé 10mn à  $9000g_{av}$ . Le surnageant post-mitochondrial est décanté.

B- L'un des culots obtenus après la centrifugation à basse vitesse est homogénéisé à nouveau dans 20ml de Milieu A, à l'aide d'un piston de verre s'adaptant au tube. Une nouvelle centrifugation de 10mn à  $9000g_{av}$  (9000 tours/mn) conduit à l'obtention d'un culot et d'un surnageant. La même procédure est répétée deux fois encore, et les surnageants de lavage sont réunis. Le sédiment final, transféré quantitativement dans un tube jaugé, est dispersé dans un volume de 15ml à l'aide d'un agitateur-vortex jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.

C- La détermination du taux de polysomes sédimentant avec les noyaux et les mitochondries s'effectue parallèlement sur un autre des 3 culots obtenus en A. Le protocole expérimental est rigoureusement identique à B, à ceci près que les 3 lavages s'effectuent dans le Milieu A contenant du TRITON X-100 à la concentration de  $1p100$  ( $\frac{v}{v}$ ). On peut considérer que le RNA du culot final provient des mitochondries et des noyaux, essentiellement.

D- Les dosages du RNA contenu dans les différentes fractions sont effectués comme il est décrit dans la partie "METHODOLOGIE" (p.78), (Aliquotes : homogénat, 3x0,5ml ; surnageant post-mitochondrial, 3x0,5ml ; surnageants B et C, 3x1ml ; culot C 3x0,5ml).

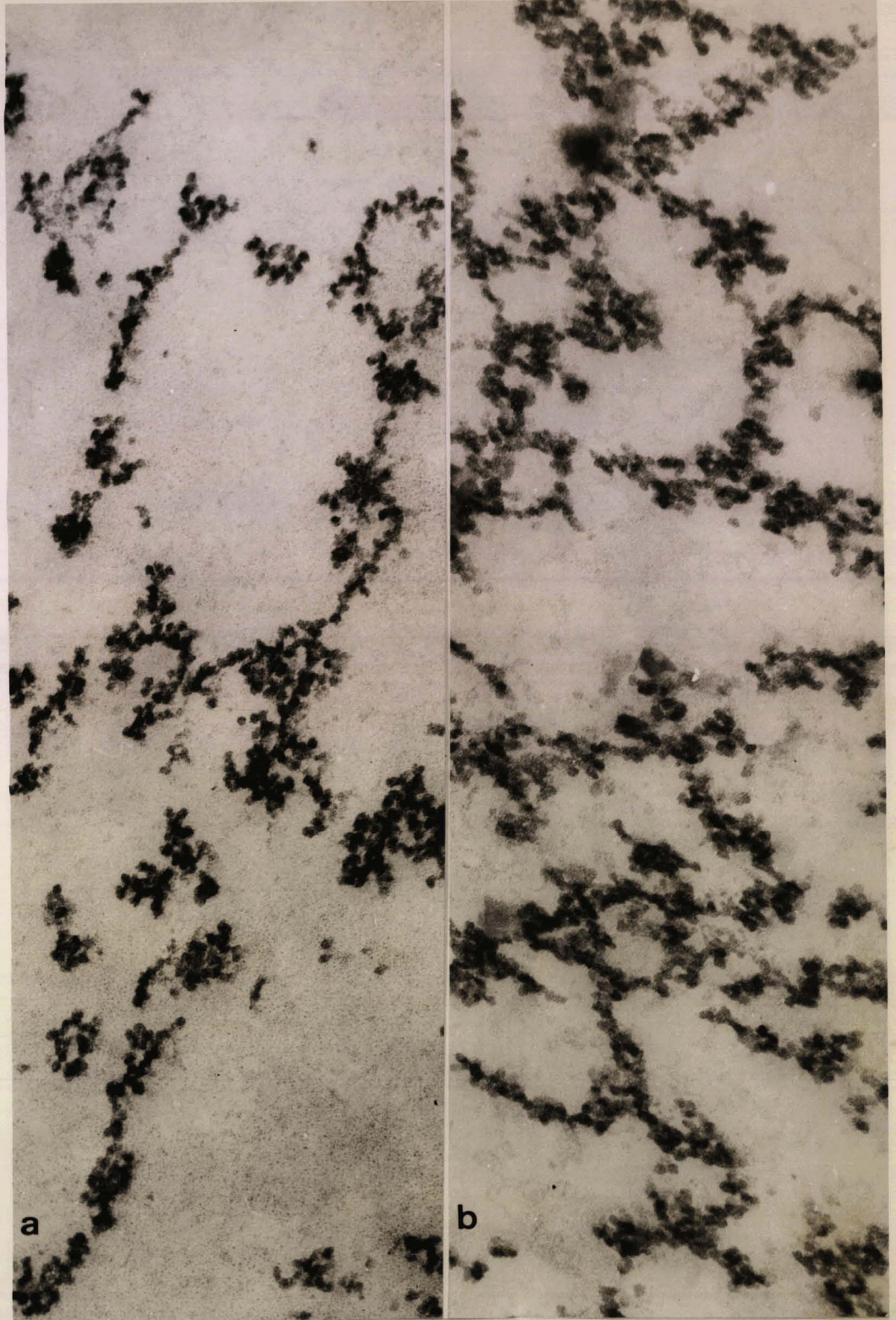


PLANCHE II : Polysomes libres (a) et liés (b).

Grossissement : 31 920 - Agrandissement : 3





## D- FRACTIONNEMENT DU SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL

### 1° - Comparaison de quatre procédures :

Durant les dix dernières années, les auteurs ont employé diverses procédures pour obtenir, à partir du surnageant post-mitochondrial, les polysomes libres et liés. Nous avons comparé les contenus en polysomes de fractions obtenues à partir d'un broyat unique par 4 procédures différentes. Les étapes de celles-ci sont schématisées dans la Figure 2 (p.18).

Selon la méthode A, l'ultracentrifugation du surnageant post-mitochondrial conduit à la fraction microsomale. Celle-ci, resuspendue dans le tampon d'extraction, est déposée sur du saccharose 2M, et donne, après une nouvelle centrifugation, une interphase de membranes (lisses et granulaires) et un sédiment de polysomes libres. L'interphase, prélevée et traitée par un détergent, est déposée à nouveau sur saccharose 2M pour donner après centrifugation un culot de polysomes liés. Les principes de cette procédure ont été utilisés par beaucoup d'auteurs, dont REDMAN et SABATINI notamment (57).

Dans la procédure B, les membranes lisses sont séparées du réticulum granulaire au cours d'une centrifugation du surnageant post-mitochondrial sur un coussin de saccharose 1,3M. Le culot de membranes et de polysomes libres est resuspendu dans la fraction cytosol (prélevée au 1/3 supérieur du tube) et déposée sur du saccharose 2M. La suite du protocole est en tous points identique à celle de A, à ceci près qu'une nouvelle introduction de "cytosol" est pratiquée lors du traitement des membranes par le détergent. Cette méthode est couramment employée par TATA (50).

La procédure C est essentiellement celle de BLOBEL et POTTER (49). Les gradients discontinus sont cette fois composés de saccharose 2M et 1,38M, et les membranes granulaires se trouvent en fin d'extraction, à l'interphase inférieure. La solubilisation par le détergent a lieu en présence de cytosol, comme en B. La procédure originellement décrite par BLOBEL et POTTER comportait l'introduction de saccharose 0,6M, au lieu de 1,38M, dans les gradients discontinus. Nous avons ici choisi d'introduire du saccharose 1,38M de manière à mieux comparer cette procédure à la procédure D, que nous utilisons.

Celle-ci est plus amplement décrite dans "METHODOLOGIE" (p.68). Elle diffère essentiellement de la procédure C par :

- i) *la présence de RNA de levure de bas poids moléculaire, et d'une fraction partiellement purifiée d'inhibiteur de RNase (voir "METHODOLOGIE") dans le milieu d'homogénéisation.*

*ii) l'introduction de cet inhibiteur dans les solutions composant les gradients discontinus. La fraction "cytosol" est remplacée par la fraction d'inhibiteur de RNase lors du traitement des membranes par le détergent.*

La substitution du saccharose 0,6M par du saccharose 1,38M a pour but essentiel d'éviter toute contamination des membranes granulaires par les mitochondries "légères" qui pourraient demeurer dans le surnageant post-mitochondrial.

## *2°- Interprétation des résultats :*

La Figure 3 (p.19) montre les résultats de l'analyse en gradient linéaire de saccharose des différentes fractions obtenues. Il apparaît clairement que la procédure A ne permet pas d'obtenir les ribosomes liés à l'état polysomal.

La procédure B tient compte de la présence d'une activité RNasique associée aux membranes du réticulum (58). Aussi l'addition de "cytosol" (qui contient un inhibiteur cytoplasmique de RNase) vient-elle restreindre la dégradation du mRNA.

On peut attribuer à l'action mécanique (resuspension, seule différence entre B et C) par elle même ou par libération de RNase, la dégradation des polysomes en B, qui n'est pas observée en C.

La procédure C, toutefois, conduit à l'obtention de polysomes moins lourds qu'en D. Au seul vu des graphiques de C, on pourrait conclure, comme l'ont déjà écrit certains auteurs (59), que les polysomes liés synthétisent des chaînes protéiques plus courtes que les polysomes libres.

La répartition dans le gradient des polysomes liés devient tout à fait similaire à celle des polysomes libres lorsque l'on utilise la procédure D.

*Remarque : Il existe un rythme diurnien du taux de RNA et de polysomes dans la cellule hépatique (60). Nous avons observé que ces variations sont plus accusées dans le cas des polysomes libres. C'est en période post-prandiale (3-8h) que les agrégats les plus lourds sont observés, et que les deux types de polysomes ont des répartitions identiques en gradient de saccharose.*

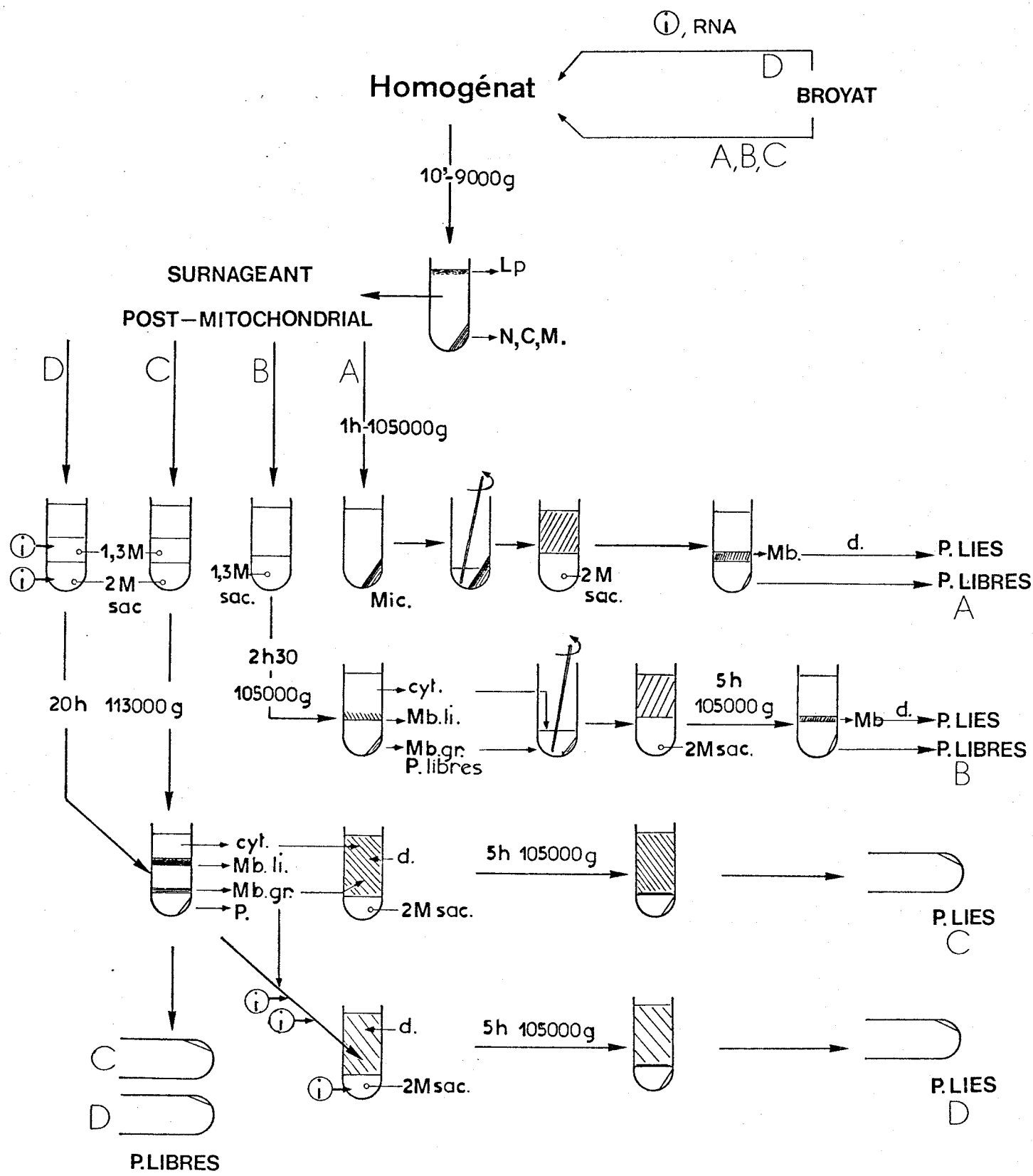


Figure 2 : Diagramme des étapes caractérisant 4 procédures d'extraction des polysomes libres et liés.  
voir "ABREVIATIONS et SYMBOLES UTILISES"



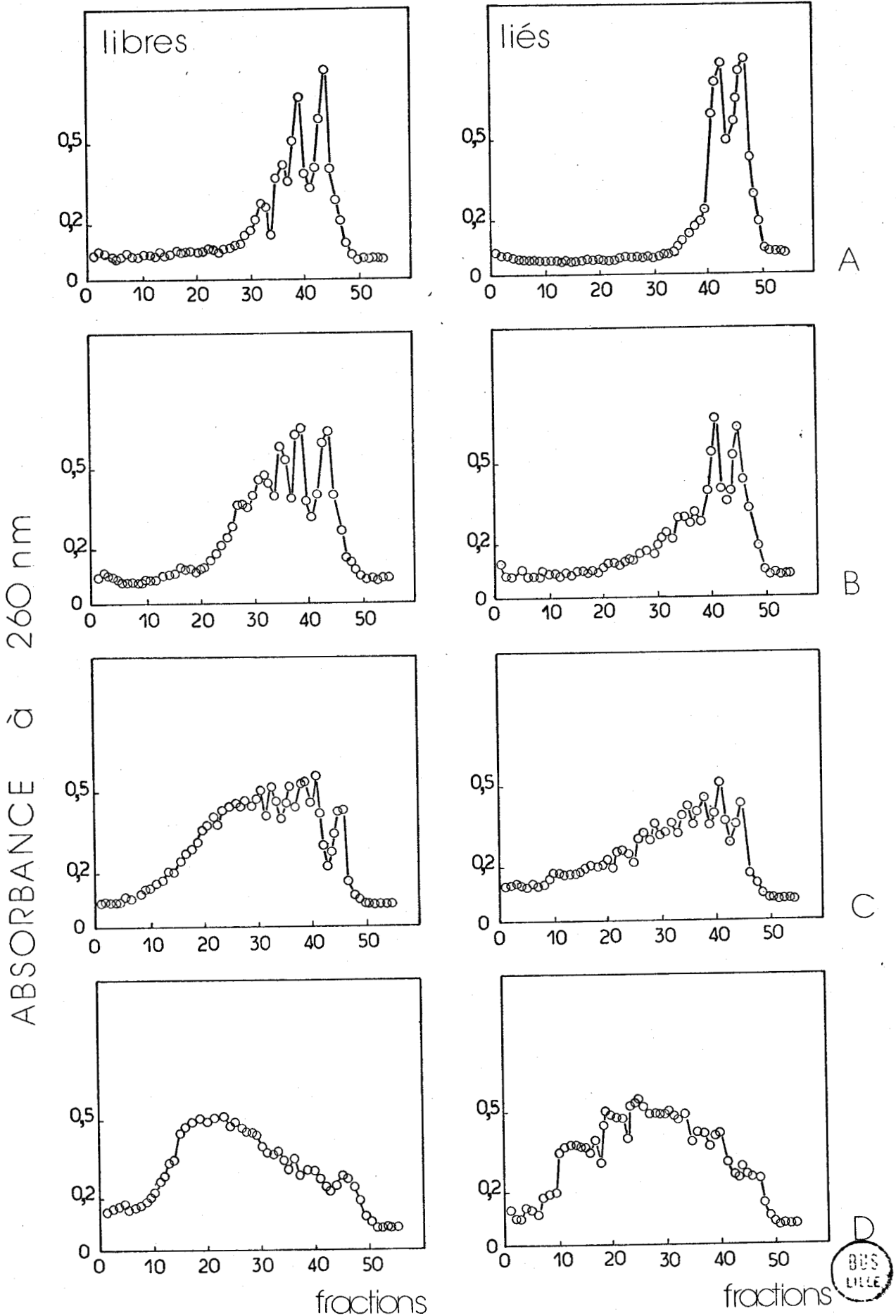


Figure 3 : Ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose des fractions ribosomales obtenues selon les diverses procédures schématisées dans la Figure 2.

## FIGURES 2 ET 3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

*Le broyat de 4 foies est divisé en deux parties :*

I- 20g de broyat sont homogénéisés dans 100ml de  $\text{TKM}_1\text{-DTT}^*$  - saccharose 0,25M, par 8 allers-retour de piston (1 000t/mn) et constituent l'homogénat des procédures A, B, et C.

8g de broyat sont homogénéisés de la même manière dans 40ml de Milieu A\*, en présence de 2  $\mu\text{l/ml}$  d'une fraction d'inhibiteur cytoplasmique de RNase\*. Une centrifugation des homogénats à 9 000g<sub>av</sub> pendant 10mn conduit aux surnageants post-mitochondriaux 1 et 2.

II- 2 pots en nitrate de cellulose de rotor 40 contenant chacun 11ml du surnageant post-mitochondrial 1 sont centrifugés 1h à 105 000g (Procédure A).

III- Dans 4 pots identiques, 7ml du même surnageant post-mitochondrial sont déposés sur 4ml de saccharose 1,3M, et sont centrifugés 2h30 à 105 000g dès l'arrêt de la centrifugation en II (Procédure B).

IV- 15ml de surnageant post-mitochondrial 1 sont déposés sur 8ml de saccharose 1,38M et 6ml de saccharose 2M (Procédure C). 15ml du surnageant post-mitochondrial 2 sont déposés sur le même gradient, à ceci près que les coussins de saccharose contiennent 1  $\mu\text{l/ml}$  d'une fraction d'inhibiteur de RNase\* (Procédure D).

Les deux tubes sont centrifugés 20h à 113 000g<sub>av</sub> dans le rotor 60 Ti.

V- Les culots de microsomes obtenus en II sont lentement dissociés à l'aide d'une baguette de verre, puis 5ml de tampon  $\text{TKM}_1\text{-DTT}^*$  sont ajoutés dans chaque tube. Lorsque les suspensions sont homogènes, on les réunit et on ajuste leur volume à 15,5ml avec le tampon. 2 fractions de 7,5ml sont déposées sur 3,5ml de saccharose 2M (Procédure A).

Les culots de membranes granulaires et polysomes libres obtenus en III sont resuspendus dans 15,5ml du "cytosol" prélevé dans les 4 tubes. La suspension globale est déposée en 2 fractions de 7,5ml sur 3,5ml de saccharose 2M (Procédure B). Tous ces gradients discontinus sont centrifugés 5h à 105 000g dans le rotor 40.

\* voir "METHODOLOGIE"

## FIGURES 2 et 3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL (suite)

VI- Les interphases de membranes granulaires obtenues selon les procédures A et B sont prélevées dans un volume de 6ml dans les 2 cas. Selon la procédure A, on ajoute 9ml de tampon  $TKM_1$ -DTT et 1,5ml de DOC à 11 p100 dans le tampon. Selon la procédure B, on ajoute 7,5ml du cytosol prélevé à la moitié supérieure des deux tubes, 1,5ml de tampon, et 1,5ml de DOC à 11 p100.

Dans les 2 cas, des fractions de 8ml sont déposées sur 3ml de saccharose 2M et centrifugées 5h à 105 000g dans le rotor 40.

VII- Les interphases de réticulum granulaire obtenues selon les procédures C et D sont prélevées à la seringue. Elles ont toutes deux un volume de 8ml. Selon la procédure C, on ajoute 7ml de cytosol prélevé à la partie supérieure du tube, 9,75ml de tampon  $TKM_1$ -DTT et 2,75ml de DOC à 11 p100. Selon la procédure D, on ajoute 60  $\mu$ l de la fraction d'inhibiteur de RNase, 16,75ml de tampon, et 2,75ml de DOC à 11 p100.

Dans les 2 cas, 27ml sont déposés sur 6ml de saccharose 2M. Dans le cas de la procédure D, la fraction d'inhibiteur de RNase est également introduite à raison de 1  $\mu$ l/ml dans le saccharose 2M. Les tubes sont centrifugés 5h à 105 000g dans le rotor 60 Ti.

VIII- Les culots de polysomes resuspendus en tampon  $TKM_1$ -DTT sont analysés en gradients linéaires de saccharose.

N.B. : Toutes les solutions de saccharose composant les gradients discontinus sont en tampon  $TKM_1$ -DTT.

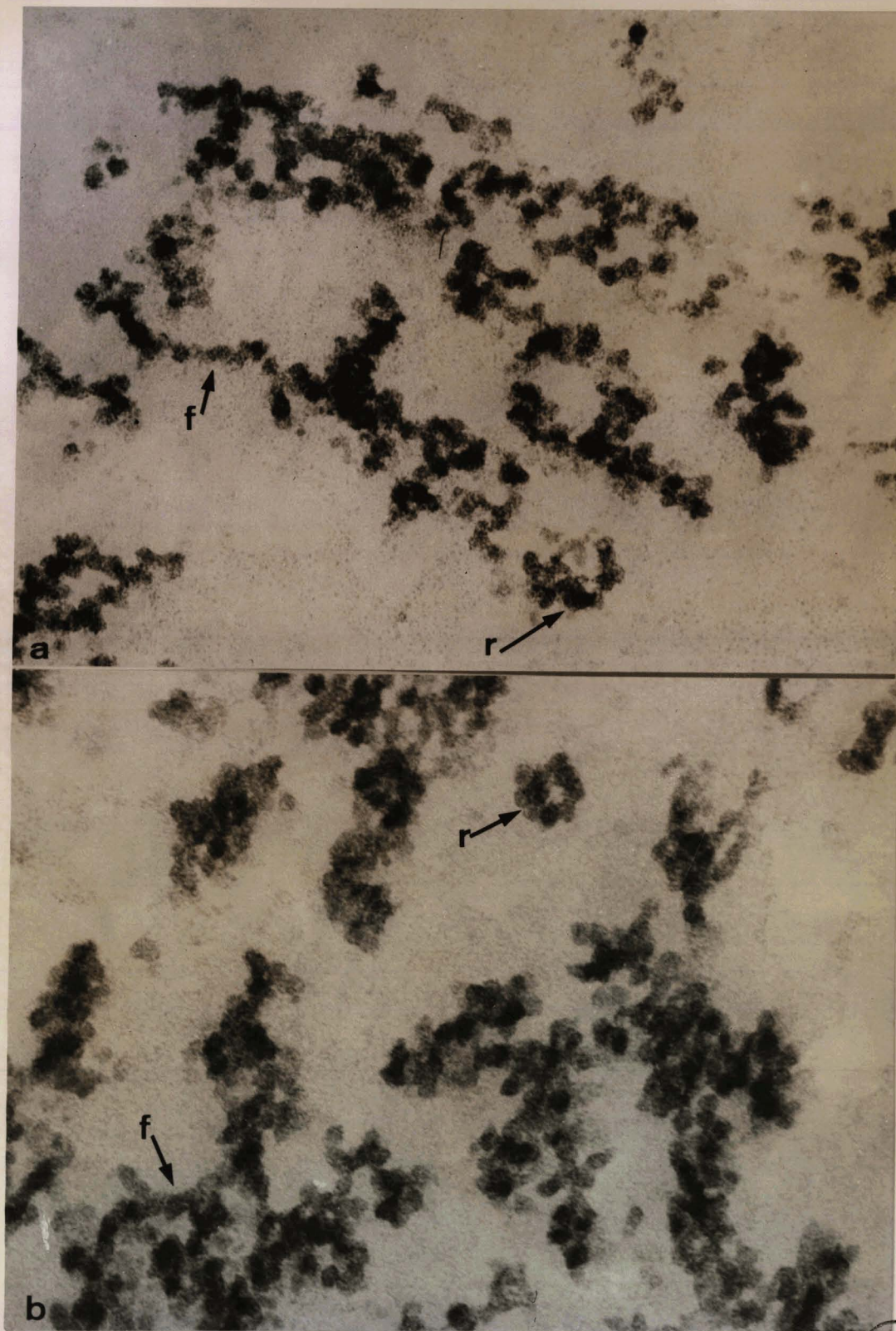


PLANCHE III : Polysomes libres (a) et liés (b).

*On note les morphologies caractéristiques en rosette (r)  
ou en filament (f).*

*Grossissement : 60 420 - Agrandissement : 3*

ACTIVITE DE BIOSYNTHESE PROTEIQUE IN VITRO

ACTION DES DETERGENTS



## A- ACTIVITE DE BIOSYNTHESE PROTEIQUE IN VITRO DES POLYSOMES LIBRES ET LIES

### 1°- Résultats présentés dans la littérature :

Peu après les études morphologiques et la publication des premières méthodes de fractionnement cellulaire, les activités de biosynthèse protéique des polysomes libres et liés furent le sujet de nombreux travaux. Ainsi, dès 1963, HENSHAW, BOJARSKI et HIATT comparent les propriétés de biosynthèse protéique in vitro et in vivo des deux catégories de polysomes, et concluent que les polysomes liés sont très actifs dans les deux systèmes, alors que les polysomes libres, "inertes", peuvent être stimulés in vitro par le poly U (61). Une étude semblable de CAMPBELL et al apporte des résultats identiques (62). Puis, une série de travaux montrent que l'activité de biosynthèse protéique par mg de RNA dans les fractions microsomale ou de réticulum endoplasmique est inférieure à celle des polysomes libres (63-67). Enfin, RAGNOTTI, en 1971, conclut que toutes les fractions possèdent la même activité in vitro (68).

Ces résultats étant peu cohérents, nous avons choisi d'étudier plus particulièrement ce point lors de nos premiers travaux (69).

### 2°- Comparaison de l'activité de biosynthèse protéique in vitro des polysomes libres et liés :

L'activité de biosynthèse protéique in vitro d'une fraction polysomale peut être considérée comme étant une fonction de son intégrité structurale et/ou de son activité in vivo, si l'on suppose toutefois que les conditions optimums d'activité in vitro sont réunies dans le système acellulaire. Nous avons donc mené cette étude parallèlement à celle des méthodes d'obtention des deux fractions, que nous avons décrite dans le chapitre précédent.

Lorsque les polysomes libres et liés sont préparés selon la méthode décrite dans "METHODOLOGIE" (ou voir procédure D, Figure 2, p.18) l'activité de biosynthèse protéique in vitro des deux fractions est identique, comme le montre la Figure 4 (p.24) ; mais il était cependant possible que l'une des deux fractions ne présente pas l'activité à laquelle on pouvait s'attendre, sur la base de son contenu en polysomes. On peut remarquer, en outre, que la plupart des travaux ayant conclu à une activité des polysomes liés inférieure à celle des polysomes libres utilisaient des procédures du type A, B, ou C (voir Figure 2, p.18).

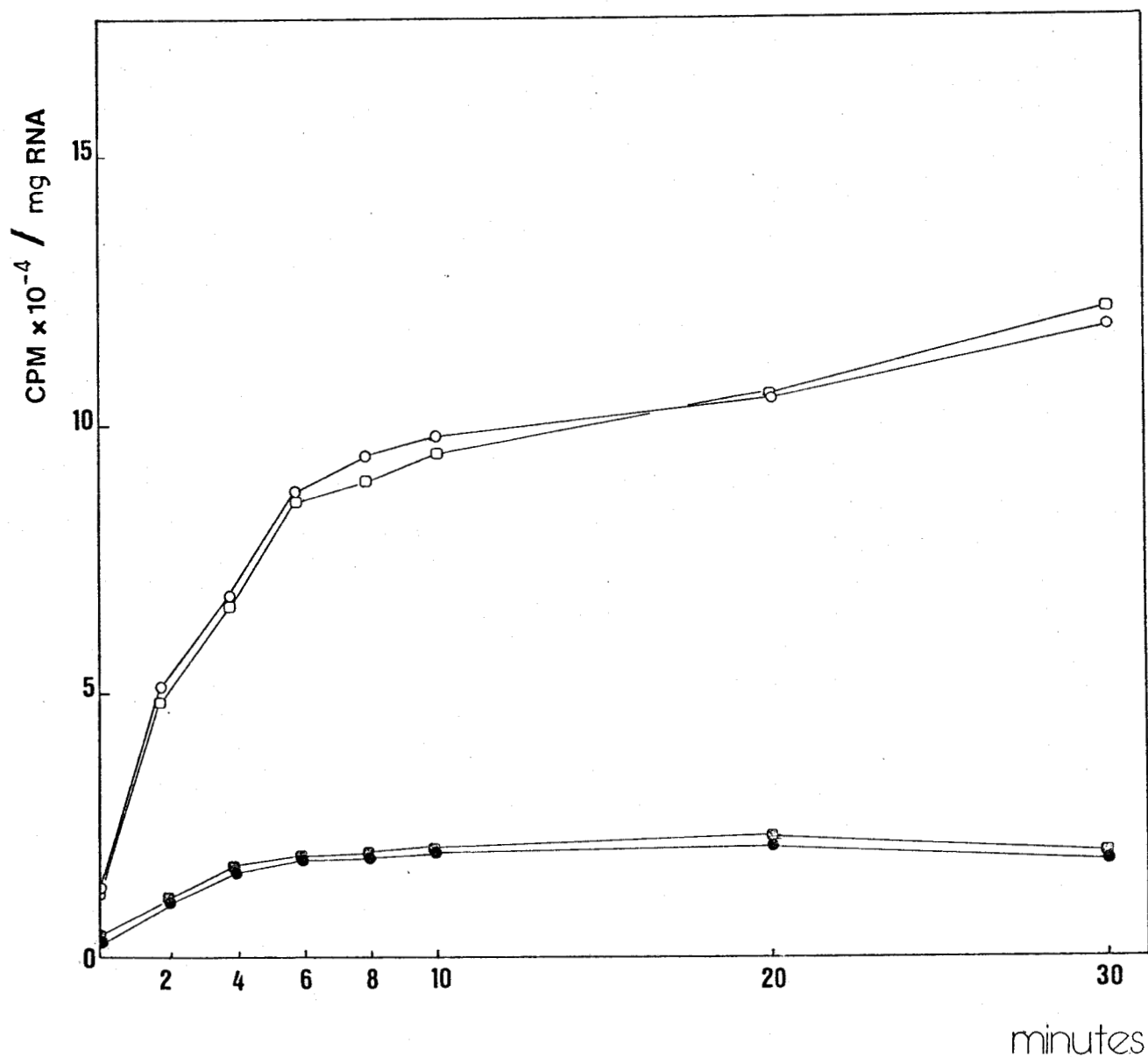


Figure 4 : Cinétiques d'incorporation d'acides-amino  $^{14}\text{C}$  par les polysomes libres et liés (fraction de réticulum endoplasmique)-"système ammonium"-

- polysomes libres
- réticulum endoplasmique
- témoins puromycine correspondants

## FIGURE 4 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- Les fractions de polysomes libres et de réticulum endoplasmique sont préparées à partir de 2 foies.

La fraction "cytosol" est extraite de deux autre foies.

B- Le système acellulaire est réalisé dans un volume final de 1,2ml. La fraction de polysomes liés correspond aux interphases membranaires prélevées dans les gradients discontinus, sans traitement ultérieur. La suspension de polysomes libres, après estimation spectrophotométrique est diluée de façon à obtenir une concentration de 25 à 30 unités d'absorbance à 260nm/ml ; les concentrations finales en RNA dans le système acellulaire sont ainsi généralement de 150 à 200  $\mu\text{g/ml}$ . (Dans le cas de l'expérience dont les résultats sont présentés dans la figure 4, ces concentrations étaient : polysomes liés, 184  $\mu\text{g/ml}$  ; polysomes libres, 192  $\mu\text{g/ml}$ ).

C- Des fractions aliquotes de 0,1ml sont prélevées aux temps choisis. Les temps 0 sont constitués par des témoins non incubés, c'est à dire prélevés à 0°C. Les "témoins puromycine"  $10^{-3}\text{M}$ , concentration finale sont réalisés en introduisant l'antibiotique dans le "mélange d'incubation".

D- 5 parties aliquotes de 0,2ml des fractions polysomales introduites dans le système acellulaire sont utilisées pour le dosage du RNA.

## B- ACTION DES DETERGENTS SUR LA STRUCTURE POLYSOMALE

### 1°- Effets du DOC et du TRITON X-100 sur la densité apparente des polysomes en gradients de chlorure de césium :

Dans le type d'expérience que nous avons décrit dans le paragraphe précédent, la fraction de polysomes liés était une fraction de réticulum endoplasmique granulaire. Cependant, il est souvent nécessaire de solubiliser partiellement les membranes par un détergent, de façon à libérer les polysomes pour les analyser ensuite. Certains auteurs utilisent un détergent ionique, (54) comme le désoxycholate de sodium tandis que d'autres préfèrent utiliser un détergent non ionique (70) ou un mélange des deux en proportions égales (71).

Nous avons comparé les effets de ces détergents sur la densité en CsCl des polysomes obtenus. Des polysomes totaux ou membranaires, préparés en utilisant le DOC ou le TRITON X-100 sont déposés sur des gradients linéaires de saccharose. Après centrifugation, les fractions correspondant aux zones hachurées de la Figure 5 (p.27) sont rassemblées, fixées par la glutaraldéhyde, et déposées en gradients de chlorure de césium comme il est décrit dans "METHODOLOGIE" (p.74).

Les résultats de cette analyse sont présentés dans la Figure 6 (p.28). Il est possible de constater que les polysomes totaux obtenus après un traitement du surnageant post-mitochondrial par le DOC ont une densité supérieure ( $1,565-1,57\text{g/cm}^3$ ) à ceux obtenus par le TRITON X-100. Ces derniers donnent, de façon reproductible, deux pics de densités  $1,550\text{g/cm}^3$  et  $1,530-1,535\text{g/cm}^3$ . Ces résultats suggèrent que le DOC pourrait avoir un effet "déprotéinisant" sur la structure polysomale.

Les polysomes liés ont une distribution hétérogène ( $1,53$  à  $1,57\text{g/cm}^3$ ) après un traitement au DOC, tandis qu'une mince bande, de densité  $1,535\text{g/cm}^3$  est observée lorsqu'on utilise le TRITON X-100.

Nous avons effectué d'autres expériences dans lesquelles des polysomes libres sont traités par le DOC ou par le TRITON X-100, centrifugés à nouveau sur gradients discontinus de façon à éliminer le détergent, déposés sur gradients linéaires de saccharose et enfin analysés en chlorure de césium. Nous avons également constaté que la densité des particules augmentait après traitement par le DOC ( $1,57\text{g/cm}^3$  et plus ; non traités, densité moyenne  $1,55\text{g/cm}^3$ ) alors qu'un traitement par le TRITON X-100 n'avait aucun effet.

Nous avons donc décidé d'employer le TRITON X-100 seul dans toutes les expériences où il est important que la structure polysomale ne soit pas

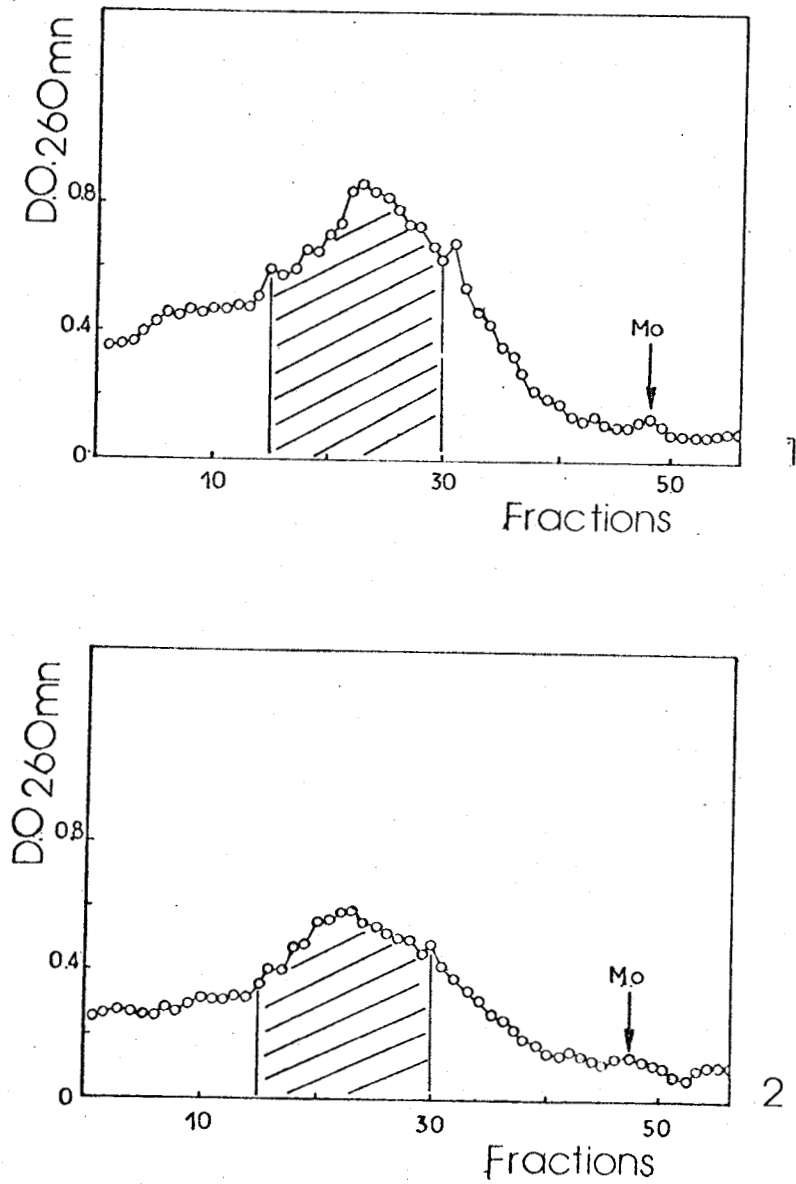


Figure 5 : Polysomes totaux obtenus par traitement du surnageant post-mitochondrial par le DOC (1) et par le TRITON X-100 (2). Gradients linéaires de saccharose 10-50 p100.

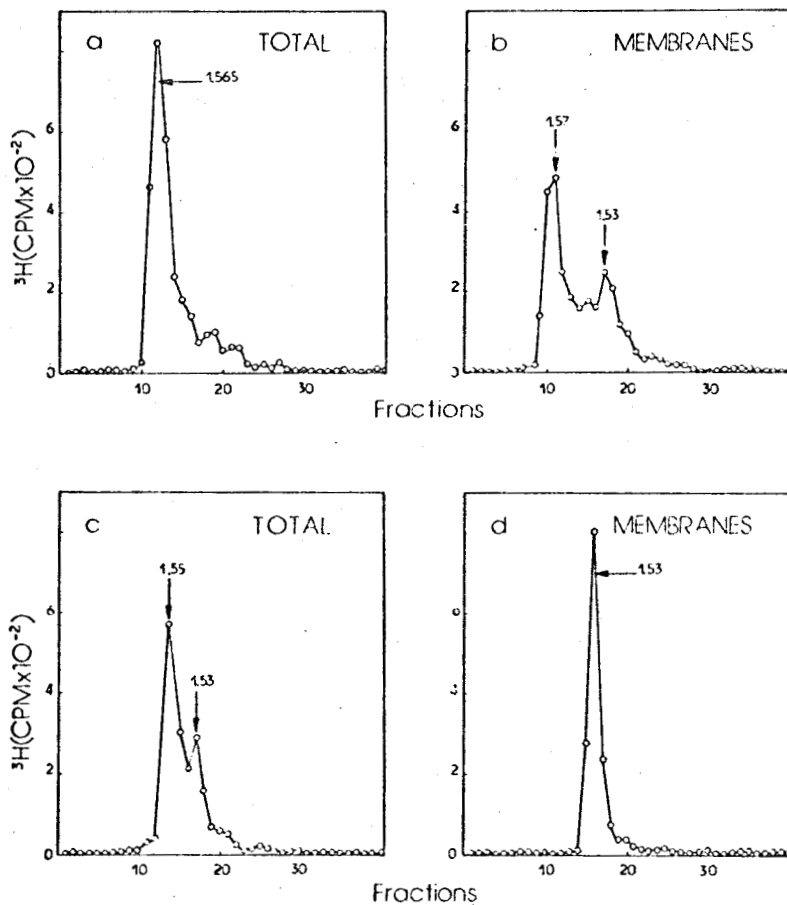


Figure 6 : Effets du DOC et du TRITON X-100 sur le comportement des polysomes en centrifugation isopycniqne.

a et b : traitement par le DOC

c et d : traitement par le TRITON X-100



## FIGURES 5 et 6 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- 5 rats ayant reçu une injection d'acide orotique  $^3\text{H}$  (0,5mCi, 24Ci/mM) 16h auparavant sont sacrifiés et un surnageant post-mitochondrial, préparé comme dans "METHODOLOGIE", est divisé en trois parties.

B- 60ml de ce surnageant servent à préparer les polysomes liés, tandis que deux autres fractions de 30ml sont utilisées pour préparer des polysomes totaux en utilisant le DOC et le TRITON X-100, respectivement.

C- La fraction de réticulum endoplasmique obtenue est divisée en 2 parts de 16ml, qui sont respectivement traitées par le DOC et le TRITON X-100.

D- Les fractions 15 à 30 des gradients linéaires de saccharose sont rassemblées avant fixation dans tous les cas.

altérée. Il faut noter que le choix du TRITON X-100 rend également possible - comme nous le verrons plus loin - l'identification et une estimation des proportions relatives des polysomes libres et liés dans un mélange par centrifugation isopycnique. Cette technique pourrait donc présenter quelques avantages, lors d'études ultérieures.

## 2°- Action des détergents et activité de biosynthèse protéique in vitro :

### a- polysomes totaux :

Beaucoup d'auteurs choisissent un détergent ionique ou non-ionique en fonction de l'activité in vitro des polysomes qu'ils obtiennent. Ainsi, certains pensent que le traitement par le DOC "stimule" l'activité in vitro des fractions polysomales (72).

Nous avons donc comparé tout d'abord l'activité en système acellulaire de polysomes totaux obtenus après addition de DOC ou de TRITON X-100 au surnageant post-mitochondrial. Après plusieurs expériences ayant donné des résultats du type de ceux présentés dans la Figure 7 (p.31), il est possible de conclure que les deux fractions incorporent les acides aminés  $^{14}\text{C}$  en fonction du temps de façon similaire.

### b- polysomes libres et polysomes liés :

Il demeure la possibilité qu'un effet "activateur" du DOC, spécifique d'une catégorie de polysomes, soit difficilement détectable sur un mélange. Nous avons donc étudié en système acellulaire des fractions de polysomes libres, libres traités par le DOC, liés (réticulum endoplasmique granulaire), liés détachés des membranes par le DOC, et totaux, respectivement.

Les courbes-type obtenues constituent la Figure 8 (p.33). Là encore, on peut constater que les cinétiques d'incorporation sont très similaires dans tous les cas.

### c- discussion :

L'action du DOC se traduit par l'obtention de particules dont le rapport  $\frac{\text{Protéines}}{\text{RNA}}$  est plus faible que celui de particules non traitées, mais n'affecte pas leur capacité d'incorporer les acides aminés  $^{14}\text{C}$  in vitro. Ces faits pourraient s'interpréter de 3 façons :

- i) les protéines détachées de la structure polysomale par le DOC ne sont pas des protéines nécessaires à l'activité in vivo.
- ii) ces protéines sont nécessaires à l'activité in vivo, mais



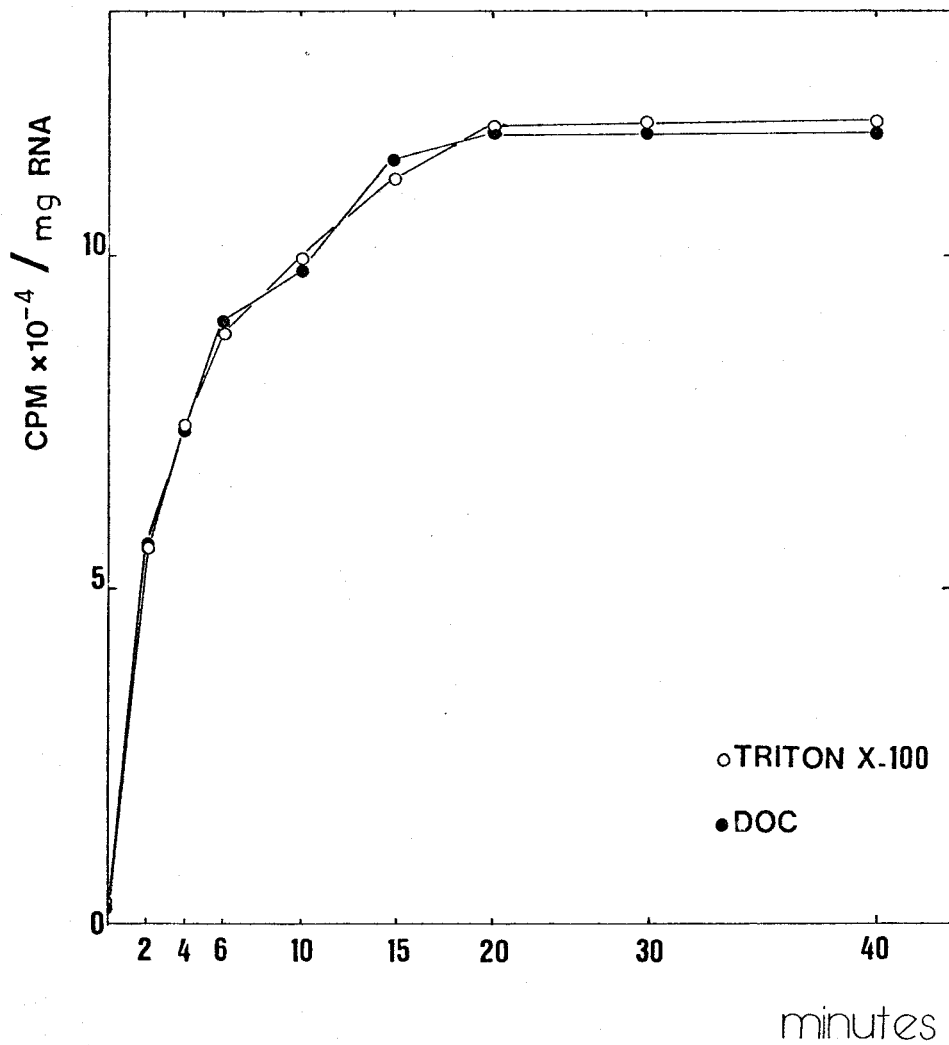


Figure 7 : Cinétiques de biosynthèse protéique *in vitro* par des polysomes totaux obtenus par le DOC et le TRITON X-100.  
Graphiques d'une expérience-type -"système potassium"-



## FIGURE 7 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- Le surnageant post-mitochondrial provenant de 2 foies est divisé en deux parties de 30ml qui seront respectivement traitées par le DOC et le TRITON X-100 : 3ml d'une solution de détergent à 11 p100 dans le tampon  $TKM_1$ -DTT sont lentement ajoutés sous agitation douce. Après 10mn à 0°C, des fractions de 15ml sont déposées sur des gradients discontinus de saccharose.

B- Les volumes finals choisis pour les cinétiques d'incorporation sont de 1,2ml. 0,1ml sont prélevés aux temps choisis.

C- Dès la fin des incubations, 5 fractions aliquotes de 0,2ml de chacune des suspensions polysomales ayant été introduites dans le système acellulaire sont utilisées pour le dosage du RNA.

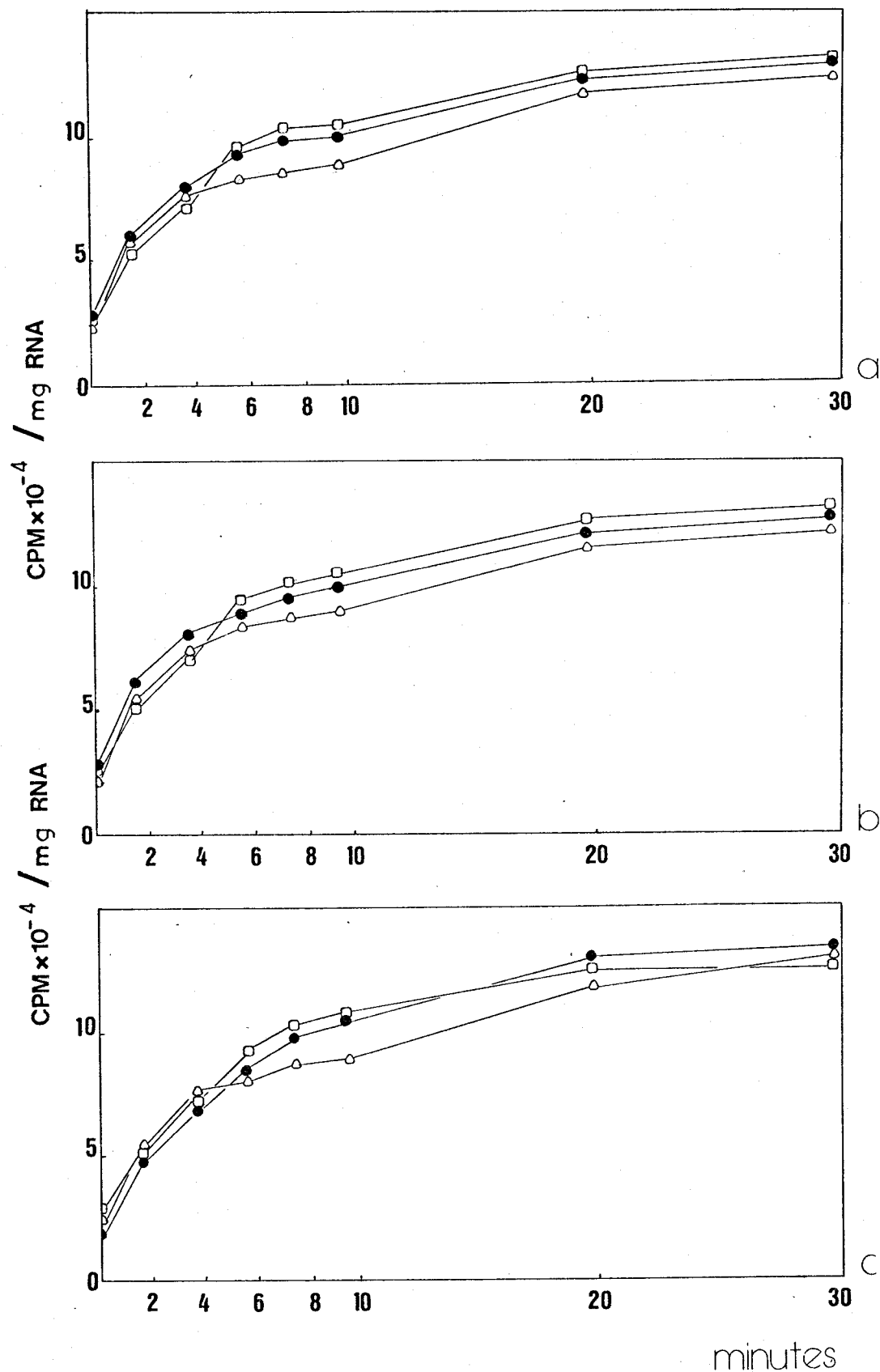


Figure 8 : Effet du DOC sur l'activité de biosynthèse protéique in vitro des polysomes libres et liés.

- Libres
- Liés
- Libres traités par le DOC (a)
- Liés traités par le DOC (b)
- Totaux (c)



## FIGURE 8 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- 2 foies sont utilisés pour préparer la fraction "cytosol" comme il est décrit dans "METHODOLOGIE".

B- 3 foies permettent d'obtenir 60ml de surnageant post-mitochondrial. 14ml de ce surnageant donnent après action du DOC, un culot de polysomes totaux. 3 autres fractions de 15ml permettent d'obtenir 3 culots de polysomes libres et 3 interphases de réticulum endoplasmique granulaire. Ces dernières sont prélevées dans un volume total de 24ml, et les 3 pots sont décantés et nettoyés.

C- Deux sédiments de polysomes libres sont repris chacun dans 4ml de tampon d'extraction, et les suspensions sont transférées dans un erlenmeyer. On dilue ensuite à 46ml avec le tampon, et 4,6ml de DOC à 11 p100 sont lentement ajoutés sous agitation douce.

D- 22ml de la suspension de réticulum endoplasmique sont additionnés de 23,9ml de tampon et de 0,1ml de la fraction d'inhibiteur cytoplasmique de RNase, puis de 4,6ml de DOC à 11 p100.

E- Les solutions obtenues en C et D sont déposées par fractions de 25ml sur 8ml de saccharose 2M dans le tampon  $TNM_1$ -DTT (système ammonium) ou  $TKM_1$ -DTT (système potassium) et centrifugées 5h à 45 000 tours/mn dans le rotor 60 Ti (143 000g<sub>av</sub>).

F- Les cinétiques d'incorporation d'acides aminés  $^{14}C$  par les polysomes totaux, libres, liés (réticulum endoplasmique) sont réalisées immédiatement après les opérations D et E (c'est à dire sans attendre la fin des 5h de centrifugation en E).

G- Volumes finals des incubations : 1,2ml - Prélèvements de 0,1ml.

pas in vitro.

iii) elles sont nécessaires à l'activité in vivo comme in vitro, mais sont aussi présentes dans la fraction "cytosol".

La seconde hypothèse est la seule qui soit étayée par d'autres faits expérimentaux : le DOC est capable de dissocier les complexes RNP (73), et de libérer des ribosomes de la structure polysomale sans fragmentation du mRNA (74). Le DOC pourrait provoquer le détachement de protéines associées au mRNA.

#### C- CONCLUSION

Les polysomes libres et liés d'hépatocyte de Rat ont des activités biologiques identiques en système acellulaire.

Le DOC, utilisé pour libérer les polysomes des membranes, donne des particules hétérogènes en centrifugation isopycniqne. Cet effet n'est pas observé avec le TRITON X-100, détergent non-ionique.

Les deux détergents toutefois, ne modifient pas l'activité de biosynthèse protéique in vitro des polysomes.



BUS  
LILLE

PLANCHE IV : Réticulum endoplasmique (a) et polysomes détachés des membranes par le TRITON X-100 (b).

Grossissement : 10 260 - Agrandissement : 3

METABOLISME DU RNA ET DIFFERENCES STRUCTURALES

ENTRE POLYSOMES LIBRES ET LIES

## A- METABOLISME DU RNA DES POLYSOMES LIBRES ET LIES

### 1°- rRNA :

Depuis 1967 et 1968, les travaux de LOEB et al (28), et de TALAL et al (75) ont montré que les RNA ribosomiaux des deux catégories de polysomes ont des stabilités identiques.

### 2°- Incorporation d'acide orotique $^3\text{H}$ dans les mRNA des polysomes libres et liés en présence et en absence de faibles doses d'actinomycine D :

L'injection d'actinomycine D se traduit par une inhibition de la synthèse des RNA. Toutefois, il est possible d'obtenir un marquage spécifique des mRNA, lorsque l'injection du précurseur radioactif est précédée de l'administration de la drogue à faible dose.

Nous avons réuni ces conditions dans une série d'expériences, et suivi l'incorporation de l'acide orotique  $^3\text{H}$  dans les polysomes libres et liés en fonction du temps. La figure 9 (p.38) présente les résultats obtenus. On constate que la radioactivité incorporée est environ 4 fois supérieure dans le cas des polysomes libres. Ces données, sans en constituer une preuve absolue, suggèrent que la résultante des stabilités des mRNA des polysomes liés est plus grande que celle des polysomes libres.

Ces mêmes faits peuvent être observés en absence d'actinomycine D lorsque l'on extrait le RNA polysomal (libre et lié) par le Tris-SDS (voir "METHODOLOGIE") après les mêmes temps de marquage : l'analyse en gradient linéaire de saccharose montre que la radioactivité trouvée dans la zone 4-15S est beaucoup plus importante dans le cas des polysomes libres.

### 3°- Influence du jeûne sur le taux de renouvellement du RNA polysomal des catégories de polysomes :

Les effets de différents régimes riches en glucides ou en protéines et du jeûne sur les taux de RNA cellulaire, de polysomes, de sous-unités libres dans le cytoplasme ont été étudiés dans le but de comprendre quels sont les mécanismes de régulation de la biosynthèse protéique (60,76). Différents travaux concluent que le taux de polysomes libres décroît plus rapidement durant le jeûne que celui des polysomes liés (77).

*(Ceci pourrait être l'expression des différences de stabilité des mRNA, mais*



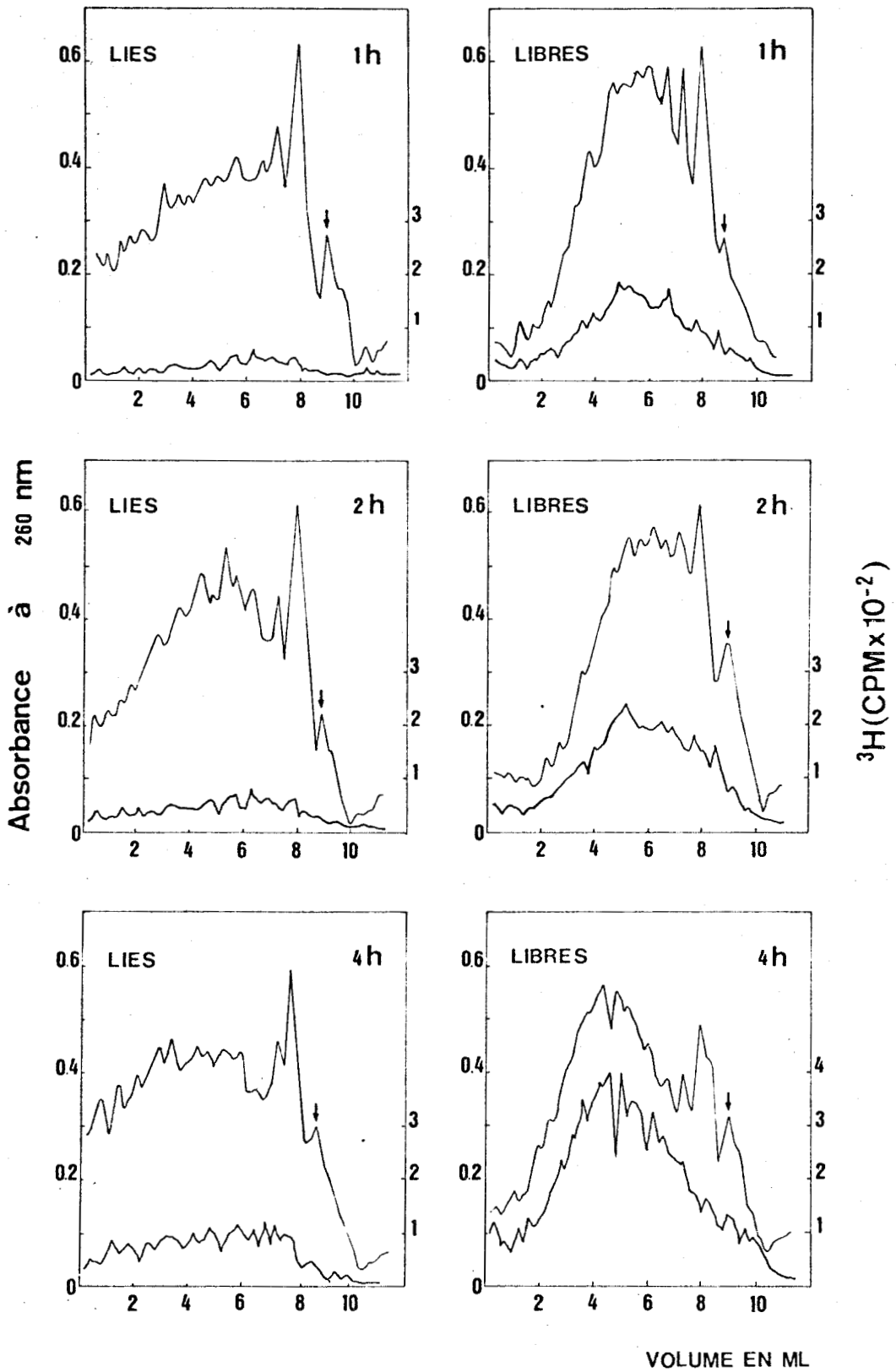


Figure 9 : Cinétique d'incorporation d'acide orotique  $^3\text{H}$  dans les mRNA des polysomes libres et liés après injection d'une faible dose d'actinomycine D.

La flèche indique la position du monomère.



## FIGURE 9 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- 6 rats, pesant tous entre 295 et 305g reçoivent une injection intrapéritonéale d'actinomyicine D (Solution à 1mg/ml dans NaCl 0,9 p100 ; dose : 0,55mg/kg) suivie, 2h30 plus tard d'une injection d'acide orotique  $^3\text{H}$  (0,5mCi dans 0,5ml de NaCl 0,9 p100). L'heure des injections est fixée de telle sorte qu'un sacrifice puisse avoir lieu toutes les deux minutes, et que les temps de marquage soient de 1,2 et 4h (2 rats pour chaque temps).

B- Les polysomes libres et liés sont extraits comme il est décrit dans "METHODOLOGIE". Des fractions de 0,3ml des suspensions polysomales, contenant 15 unités d'absorbance à 260nm sont utilisées pour l'analyse en gradients linéaires de saccharose ; ceux-ci sont fractionnés par 0,2ml.

C- La radioactivité est déterminée par précipitation, filtration et comptage de l'acido-insoluble.

*d'autres données doivent être prises en considération, que nous analyserons plus amplement dans le dernier chapitre).*

Cependant, peu d'éléments sont encore en notre possession en ce qui concerne la régulation de la biosynthèse du RNA des deux catégories de polysomes.

La vitesse de renouvellement du mRNA étant plus grande que celle du rRNA ribosomal, il est possible d'obtenir un marquage préférentiel du mRNA si le précurseur est injecté 1/2h à 1h avant le sacrifice selon la dose administrée. Inversement, un temps de marquage long (20h) se traduira par un marquage préférentiel du rRNA (la demi-durée de vie est de 115 à 120h selon WILSON et HOAGLAND) (78). Nous avons suivi ces principes pour étudier l'influence du jeûne sur la vitesse de renouvellement du RNA des deux catégories de polysomes.

Deux lots de rats (jeûne de 18h, régime normal) reçoivent chacun des injections successives d'acide orotique  $^3\text{H}$  (marquage long, 20h) et d'acide orotique  $^{14}\text{C}$  (marquage court, 1h). Les polysomes libres et liés sont préparés et analysés sur gradients linéaires de saccharose. La figure 10 (p.41) montre que la vitesse de renouvellement des r- et mRNA des deux catégories de polysomes est plus grande dans le cas des animaux soumis au jeûne.

Ces résultats auront leur importance dans l'interprétation d'expériences décrites dans le chapitre suivant.

#### 4° - Discussion :

##### a- stabilité des mRNA :

Un effet inhibiteur de l'actinomycine sur l'allongement des chaînes peptidiques dans les cellules HeLa a été rapporté par PENMAN et al (79). Aussi, tant que les effets de l'actinomycine sur la biosynthèse protéique dans l'hépatocyte de Rat n'auront pas été étudiés, l'interprétation des résultats obtenus (Figure 10) ne peut être que partielle.

Il faut noter, cependant, que dans les expériences de PENMAN et al, la dose d'actinomycine employée bloque toutes les synthèses de RNA. D'autre part, l'observation des cinétiques de marquage en absence d'actinomycine suggère également que les polysomes liés ont des mRNA plus stables que ceux des polysomes libres. En outre, ces résultats s'accordent avec les travaux de WILSON et HOAGLAND démontrant que le mRNA codant pour la synthèse de la sérumalbumine est très stable (77).

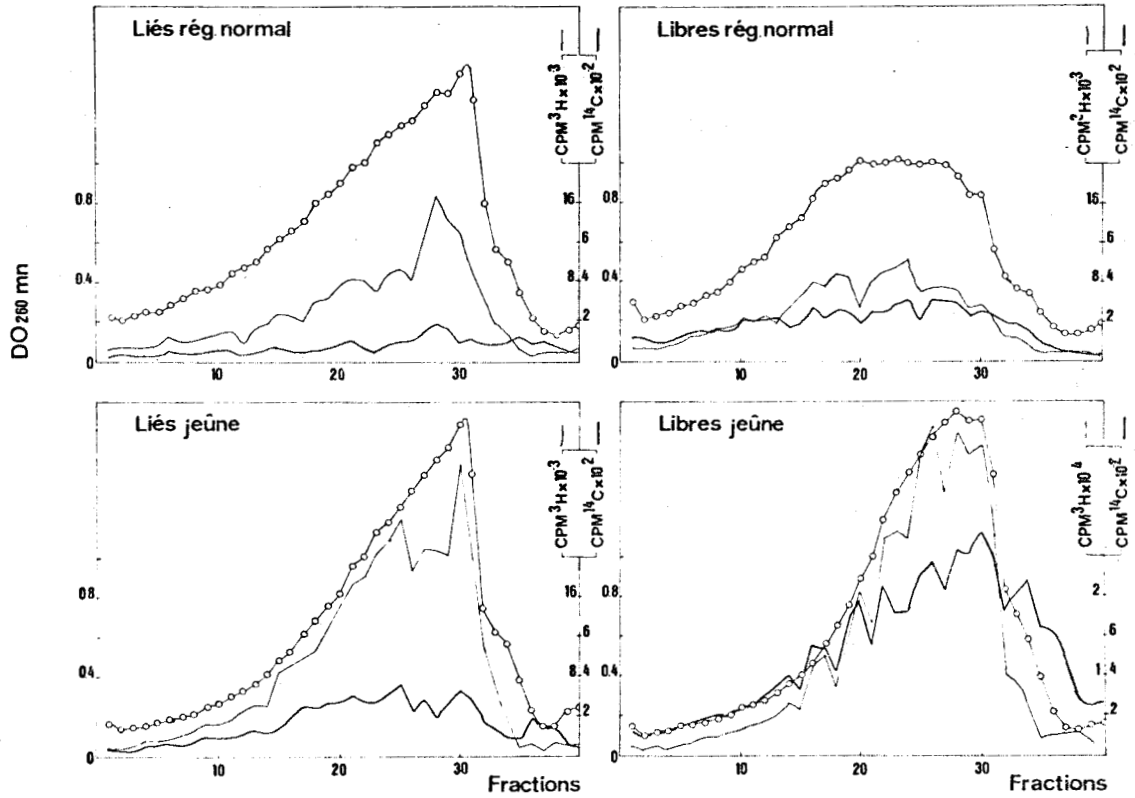


Figure 10 : Influence du jeûne sur le taux de renouvellement du RNA des polysomes libres et liés.

$^3\text{H}$  : marquage long (20h) -  $^{14}\text{C}$  : marquage court (1h).



## FIGURE 10 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- 3 rats sont mis à jeûner 18h pendant que 3 autres sont normalement nourris. Tous reçoivent par voie intrapéritonéale, une injection de 0,5mCi d'acide orotique  $^3\text{H}$  et une injection de 0,1mCi d'acide orotique  $^{14}\text{C}$  respectivement 20h et 1h avant le sacrifice. Les rats soumis au jeûne boivent ad libitum.

B- Les polysomes libres et liés sont isolés par la procédure C, décrite

C- 20 unités d'absorbance à 260nm de chaque suspension polysomale sont disposées sur des gradients linéaires de saccharose 10-50 p100, et centrifugées dans le rotor SW 25-1.

D- Les gradients sont fractionnés par 0,7ml.

#### b- effets du jeûne :

Alors que nous réalisons ces expériences, NORDGREN et STENRAM publiaient une étude semblable à la nôtre, apportant les mêmes résultats (80). D'autres travaux sur les relations existant entre le métabolisme des nucléotides et celui des amino-acides, permettent de penser que la stabilité des RNA est directement en relation avec le taux intracellulaire d' amino-acides (60).

Cependant, ni le travail que nous avons décrit, ni celui de NORDGREN et STENRAM ne permettent de savoir si le renouvellement du mRNA de l'une des deux catégories de polysomes est plus sensible à l'action du jeûne que celui de l'autre.

### B- DIFFERENCES STRUCTURALES ENTRE POLYSOMES LIBRES ET LIES

Nous avons déjà évoqué, dans le chapitre "INTRODUCTION" (p. 4) les arguments expérimentaux permettant de supposer l'existence d'un état d'équilibre entre les deux populations de ribosomes. Cependant, on peut aussi se demander si des modifications structurales doivent intervenir avant que les sous-unités de ribosomes liés puissent s'échanger avec celles des ribosomes libres. D'autre part, les spécificités de synthèse impliquent-elles des différences structurales entre les mRNA des 2 catégories de polysomes ?

L'étude des différences structurales entre polysomes libres et liés peut donc être une première étape dans la compréhension d'éventuelles relations fonctionnelles et de biogénèse qui pourraient exister entre les deux systèmes de biosynthèse protéique.

#### 1°- Comparaison des densités apparentes en CsCl des polysomes libres et liés :

Comme il est décrit dans "METHODOLOGIE", les polysomes sont préparés par une longue centrifugation du surnageant post-mitochondrial sur gradients discontinus de saccharose. Les polysomes liés sont détachés des membranes par le TRITON X-100 (voir chapitre précédent). Les deux fractions polysomales sont déposées sur des gradients linéaires de saccharose (voir Figure 11, p.44) et les fractions correspondant à des polysomes de tailles variables sont fixées par la glutaraldéhyde et déposées sur des gradients préformés de CsCl.

La zone C (pentamères-hexamères) est choisie de façon à exclure toute contamination par des monomères. Au delà de la zone A (décamères environ)

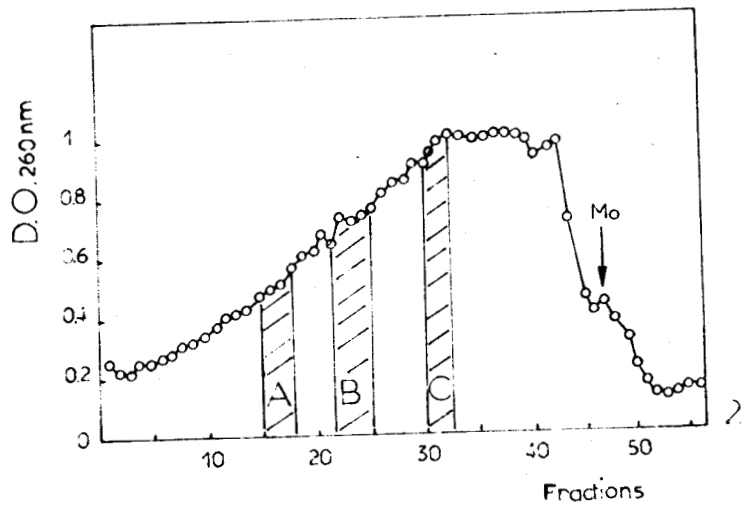
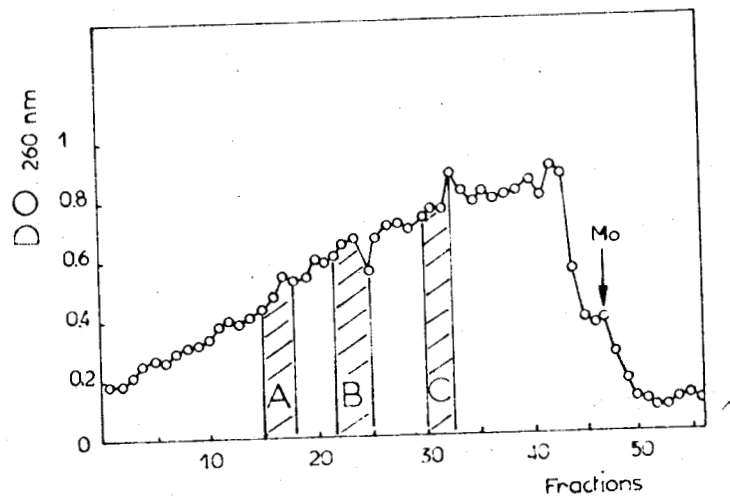


Figure 11 : Ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose des polysaccharides liés (1) et libres (2).

la radioactivité des fractions serait insuffisante pour permettre l'analyse.

Les résultats sont présentés dans la figure 12 (p.46). On peut noter que la fraction détachée des membranes semble être homogène, puisque le même pic, de densité légèrement inférieure à  $1,540\text{g/cm}^3$  est obtenu dans les trois régions du gradient de saccharose.

D'autre part, la fraction libre présente une distribution hétérogène. Une bande majeure est présente dans les trois régions explorées ( $d \approx 1,545\text{g/cm}^3$ ). Un second pic apparaît sous la forme d'un épaulement dans les zones B et C. Il est plus visible en zone A ( $d \approx 1,560\text{g/cm}^3$ ), où l'on observe également un troisième pic, d'une densité identique à celle observée pour les polysomes membranaires ( $\approx 1,535\text{g/cm}^3$ ).

La présence de ce dernier pic est surprenante. Elle pourrait s'expliquer par la libération de polysomes lourds des membranes lors de l'éclatement des cellules, ou traduire des relations fonctionnelles - encore inconnues - entre les deux catégories de polysomes.

Les polysomes de densités  $1,56\text{g/cm}^3$  et  $1,545\text{g/cm}^3$  (que nous avons nommés types I et II respectivement) sont plus représentatifs de la fraction de polysomes libres, puisqu'ils sont trouvés dans les trois régions analysées. Des expériences ultérieures eurent pour but de comprendre la signification de l'hétérogénéité des polysomes.

*N.B. : L'analyse en gradients de CsCl des polysomes sédimentant avec les noyaux et les mitochondries donne des résultats identiques. Toutefois, il faut noter que, pour les raisons que nous avons précédemment exposées (voir Figure 1, p.10), l'analyse des polysomes "lourds" (cf zone A des gradients de saccharose) qui pourraient être présents dans cette fraction s'avère difficile.*

## 2° - Densités des monoribosomes :

Pour obtenir d'autres données concernant l'origine de l'hétérogénéité des polysomes en CsCl, nous avons mesuré la densité des monosomes obtenus par action ménagée de la RNase sur les polysomes libres et liés.

Les monosomes sont purifiés sur gradients linéaires de saccharose avant d'être déposés sur gradients de césium. La figure 13 (p.47) montre les résultats obtenus. Les deux types de ribosomes se placent dans une bande très fine, de densité  $1,550\text{g/cm}^3$ . Nous avons obtenu des résultats identiques lorsque les polysomes des zones A, B, et C sont respectivement soumis à



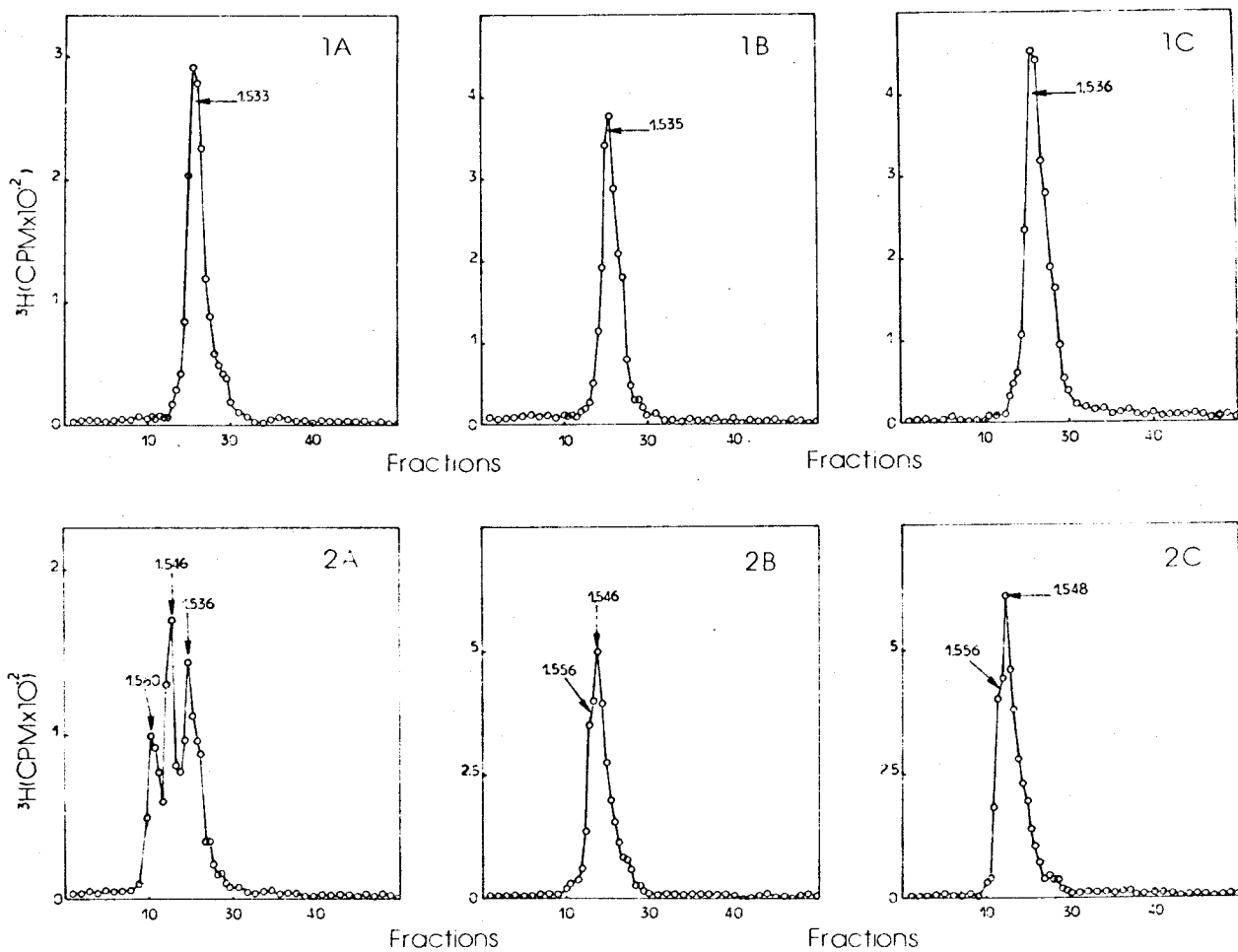
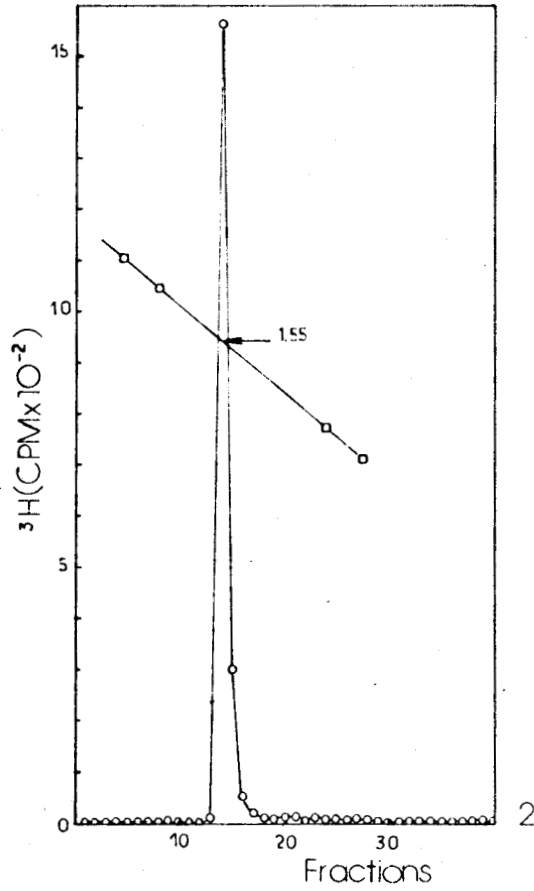
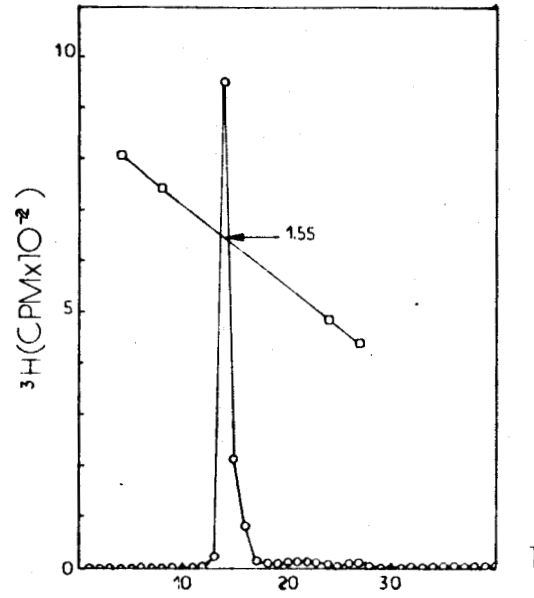


Figure 12 : Centrifugation isopycniqne des polysomes liés (1). et libres (2).

Fractions 1 à 10 et 31 à 50 : 0,1ml ; 11 à 30 : 0,05ml.





BUS  
LILLE

Figure 13 : Centrifugation isopycnic des monosomes obtenus après action ménagée de la RNase sur les polysomes liés (1) et libres (2).

## FIGURE 13 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- Des culots de polysomes libres et liés sont resuspendus en tampon  $TeKM_1$ -DTT\* et dilués de façon à obtenir une concentration de 10 à 15 unités d'absorbance à 260nm/ml. Une solution de ribonucléase pancréatique\*, à 10  $\mu$ g/ml dans le 0,1 SSC, pH 5, est additionnée de manière à obtenir une concentration finale de 0,1  $\mu$ g/ml.

B- Après 10mn à 37°C, les tubes sont refroidis à 0°C et 1ml de chaque suspension ribosomale est déposé sur gradient linéaire de saccharose 10-30 p100 en  $TeKM_1$ -DTT, et centrifugé dans le rotor SW 25-1.

C- 0,2ml de chacune des 56 fractions de 0,5ml obtenues sont dilués à 0,5ml avec le tampon  $TeKM_1$  (sans DTT) et l'absorbance à 260nm est lue au spectrophotomètre ZEISS PMQ-II.

D- Les fractions correspondant au pic de monosomes sont rassemblées et fixées par la glutaraldéhyde (concentration finale, 5 p100). Des fractions aliquotes de 0,2ml sont ensuite déposées sur gradients préformés de CsCl (1,38-1,65g/cm<sup>3</sup>).

E- Les gradients sont fractionnés par 0,1ml. La radioactivité est déterminée comme il est décrit dans "METHODOLOGIE".

\*voir "METHODOLOGIE"

l'action de la RNase, les monosomes obtenus purifiés, et analysés ensuite en gradients de CsCl.

L'hétérogénéité observée au niveau des polysomes n'est donc pas le reflet d'une hétérogénéité ribosomale. Et, si l'on prend en considération le fait que le mRNA est associé à des protéines à l'intérieur même de la structure polysomale (81-82) on pourrait penser que les différentes densités sont dues à des mRNP différentes.

### C- CONCLUSION

*Les mRNA de la fraction de polysomes liés semblent être plus stables que ceux de la fraction de polysomes libres.*

*Le temps de renouvellement des RNA des 2 catégories de polysomes décroît lorsque les animaux sont soumis au jeûne.*

*Les polysomes liés, homogènes en centrifugation isopycnique ( $d = 1,535\text{g/cm}^3$ ) se différencient des polysomes libres, hétérogènes ( $d = 1,560\text{g/cm}^3$  et  $1,545\text{g/cm}^3$  appelés types I et II, respectivement).*

*Les monosomes produits par action ménagée de la RNase sur les polysomes libres et liés ont la même densité ( $d = 1,550\text{g/cm}^3$ ). Ceci suggère que des mRNP différentes distinguent les trois types polysomiaux.*



LIAISON(S) DES POLYSOMES AUX MEMBRANES

DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

## A- LIAISON DE LA GRANDE SOUS-UNITE A LA MEMBRANE

SABATINI et al apportaient en 1966 les premières évidences de l'attachement des ribosomes aux membranes du réticulum endoplasmique par l'intermédiaire de la grande sous-unité (83). Les travaux de REDMAN ensuite (84), puis de BAGLIONI (85), venaient les confirmer.

La figure 14 (p.51) présente les résultats d'une expérience, inspirée des travaux de SABATINI, que nous avons réalisée pour illustrer ce point : l'action de l'EDTA se traduit par le détachement des membranes du RNA 18S, alors que le RNA 28S n'est pas libéré.

Cependant, la nature exacte de la liaison de la sous-unité 60S à la membrane n'est pas connue.

## B- AUTRES MODES DE LIAISON

L'existence possible d'autres modes de liaison a été envisagée. Les travaux de REDMAN (57), montrant que les chaînes protéiques néosynthétisées s'allongent à l'intérieur des vésicules intermembranaires rendent également concevable "l'ancrage" du ribosome sur la membrane par le peptide naissant, sans qu'une liaison directe de la grande sous-unité soit obligatoire. Mais l'existence d'une telle association n'a jamais été clairement prouvée.

En outre, une liaison des polysomes aux membranes par l'intermédiaire du mRNA a été démontrée dans les cellules HeLa par ROSBASH et PENMAN (86), ainsi que dans les cellules de KREBS (FAIFERMAN et al, 73).

### *1°- Action de la RNase sur la fraction de réticulum endoplasmique :*

BLOBEL et POTTER, dès 1967, affirment que ce dernier mode de liaison n'existe pas dans l'Hépatocyte de Rat ; cependant, pour d'autres auteurs, une certaine proportion de ribosomes, détachables des membranes par action ménagée de la RNase, seraient responsables de la synthèse des protéines membranaires. (54,87).

Il faut noter que dans ces travaux, la fraction de réticulum endoplasmique est obtenue par longue centrifugation du surnageant post-mitochondrial sur gradient discontinu de saccharose, ce qui est la méthode la plus courante, et que nous utilisons.

La figure 15 (p.53) montre les résultats d'une action ménagée de

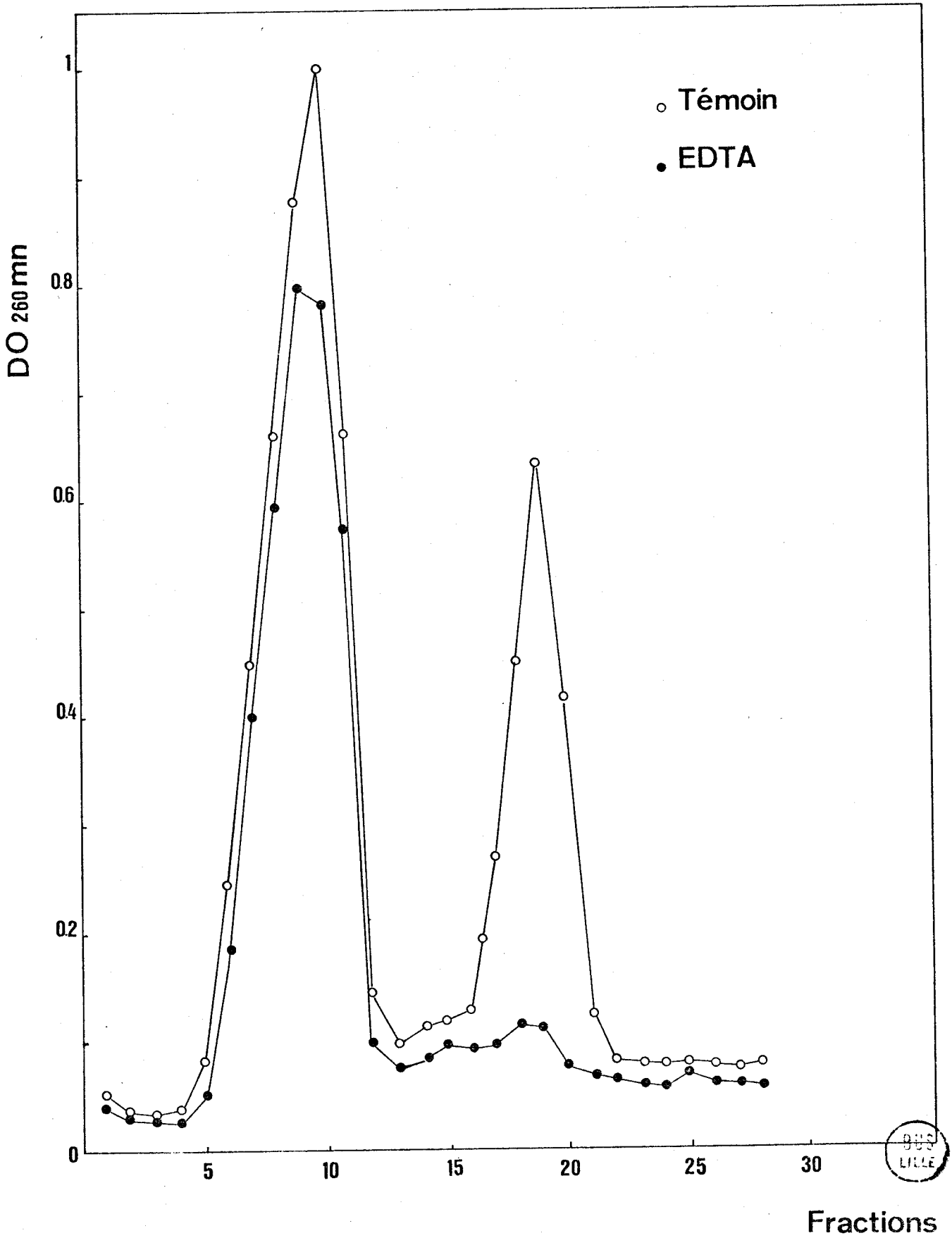


Figure 14 : RNA associé aux membranes avant et après action de l'EDTA.

## FIGURE 14 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- Un surnageant post-mitochondrial est préparé comme il est décrit dans "METHODOLOGIE", à partir d'un foie.

B- 1,1ml de ce surnageant sont additionnés de 96  $\mu$ l d'une solution d'EDTA 0,01M ajustée à pH 7 avec de la potasse 0,5N. Une autre fraction aliquote de 1,1ml est additionnée de 96  $\mu$ l d'eau distillée.

C- 1ml de chaque suspension sont déposés sur gradients linéaires de saccharose 15-30 p100, (gradient témoin en  $\text{TKM}_1$ -DTT ; gradient "EDTA" en  $\text{TKM}_1$ -DTT, EDTA 8mM) et centrifugés 20mn à 24 000 tours/mn dans le rotor SW 25-1. On obtient un culot de membranes granulaires.

D- Les tubes sont décantés, nettoyés et le RNA est extrait des fractions membranaires selon la méthode de NORDGREN et STENRAM (voir "METHODOLOGIE").

E- Les deux fractions obtenues sont dissoutes dans 0,3ml de tampon acétate de sodium 0,01M pH 5, 0,01M NaCl, 0,001M  $\text{MgCl}_2$  et déposées sur gradients linéaires de saccharose 10-50 p100 dans le même tampon. Des fractions de 0,3ml sont collectées.



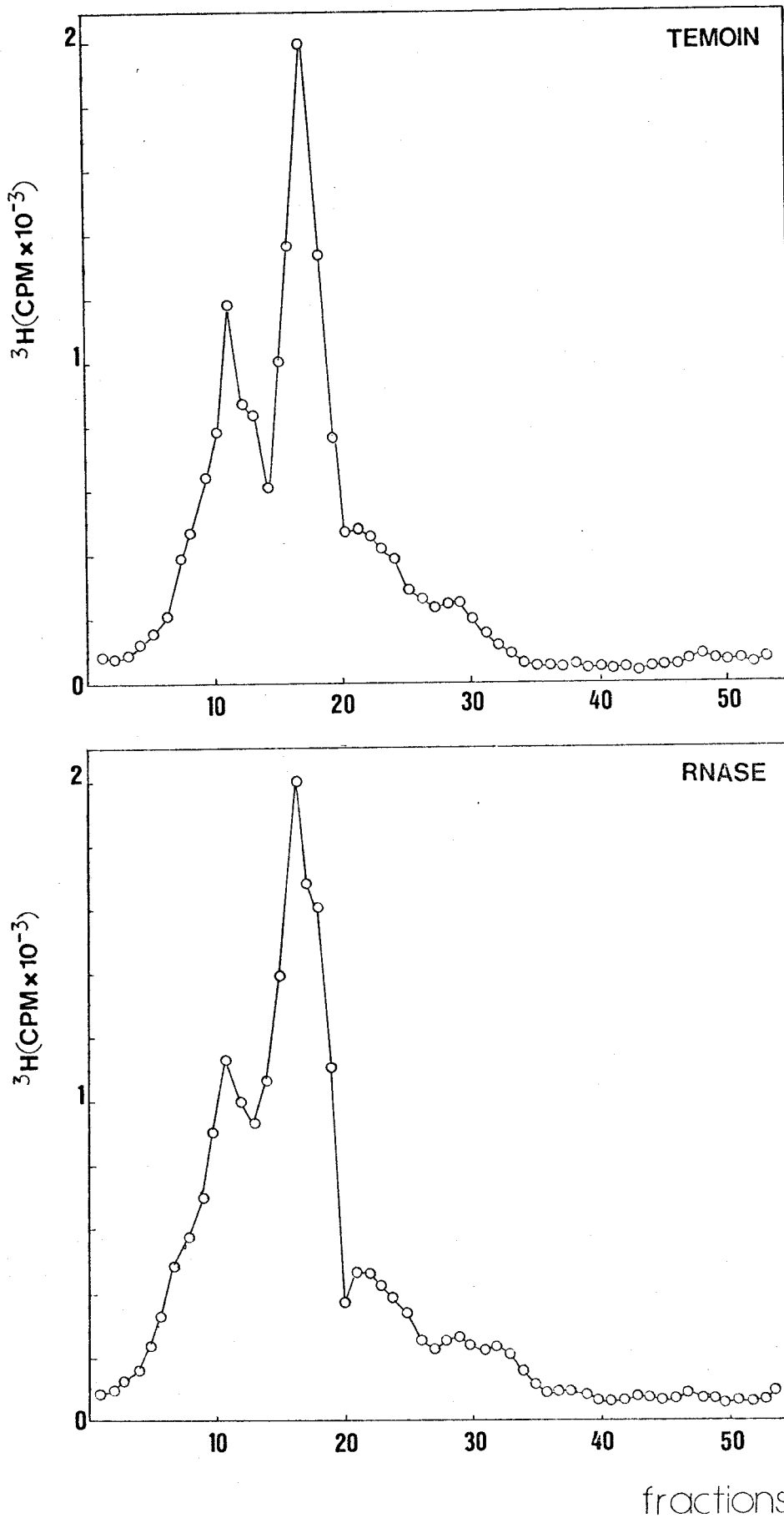


Figure 15 : Action de la RNase sur une fraction de réticulum endoplasmique obtenue après longue centrifugation du surnageant post-mitochondrial sur gradient discontinu.

Centrifugation isopycnique des membranes sur gradient 1-2M de saccharose

## FIGURE 15 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- Une fraction de réticulum endoplasmique est préparée comme il est décrit dans "METHODOLOGIE" \* à partir de 2 foies. Les animaux ont reçu une injection intrapéritonéale de 0,5mCi d'acide orotique  $^3\text{H}$  20h avant le sacrifice.

B- Une fraction aliquote de 0,2ml de la fraction membranaire est additionnée de 0,02ml de tampon  $\text{TKM}_1$ . Une autre fraction de 0,2ml est additionnée de 0,160ml de tampon  $\text{TKM}_1$  et de 0,04ml d'une solution de RNase à 1  $\mu\text{g/ml}$ . Les 2 tubes sont incubés 10mn à 37°C, puis refroidis à 0°C avant d'être déposés sur gradients linéaires de saccharose.

C- Après 20h de centrifugation à 35 000 tours/mn dans le rotor SW 40 Ti, des fractions de 0,2ml sont collectées et la radioactivité déterminée par filtration et comptage de l'acido-insoluble.

\*à ceci près que les solutions de saccharose composant les gradients discontinus ne contiennent pas de dithiothreitol.

la RNase sur la fraction de réticulum endoplasmique que nous obtenons. Les membranes sont soumises à une centrifugation isopycnique en gradient 1-2M de saccharose avant et après action de la RNase : la radioactivité du RNA associé aux membranes demeure inchangée, et aucun culot n'est observé. Il est donc possible de conclure qu'il n'existe pas de polysomes liés par l'intermédiaire du mRNA dans une telle fraction de réticulum endoplasmique, ce qui rejoint les résultats de BLOBEL et POTTER (88).

Il demeure cependant la possibilité que cette liaison existe, mais soit rompue pendant la longue centrifugation sur gradient discontinu de saccharose. En effet, dans ce type de purification, la membrane est immobilisée dans un milieu de densité identique à la sienne, tandis que les polysomes, de densité supérieure, sont soumis pendant un temps très long à la force de sédimentation. L'association polysome-membrane doit donc résister à cette contrainte.

Nous avons donc analysé les fractions de polysomes présentes au niveau de l'interphase de membranes granulaires et au fond du tube (culot de polysomes libres) après des temps variables de centrifugation (3 à 20h).

## *2°- Comportement des polysomes libres lors de la purification :*

Dans chaque cas, les fractions obtenues sont déposées sur gradients linéaires de saccharose, et des zones correspondant à des polysomes de tailles différentes sont fixées par la glutaraldéhyde, et analysées en gradient de CsCl.

La figure 16 (p.56) présente les profils en gradient linéaire de saccharose des fractions polysomales obtenues après 5h de centrifugation du surnageant post-mitochondrial sur gradients discontinus. Si l'on compare ces courbes à celles de la figure 11 (p.11), on peut conclure que les polysomes libres les plus "légers" n'ont pas encore été sédimentés, et qu'en conséquence, la contamination des polysomes liés par les polysomes libres devrait être maximale dans la zone C du gradient linéaire de saccharose.

Ceci est confirmé par l'analyse en gradients de CsCl (Figure 17, p.58) : les polysomes de la région 1C ont une densité de  $1,549\text{g/cm}^3$ , qui est la valeur précédemment observée pour les polysomes libres (voir Figure 12, p.46, Graphique 1C), et les polysomes liés ne sont pas visibles. Dans les zones 1A et 1B (Figure 17, p.58), les polysomes liés sont présents, contaminés par les deux types de polysomes libres.

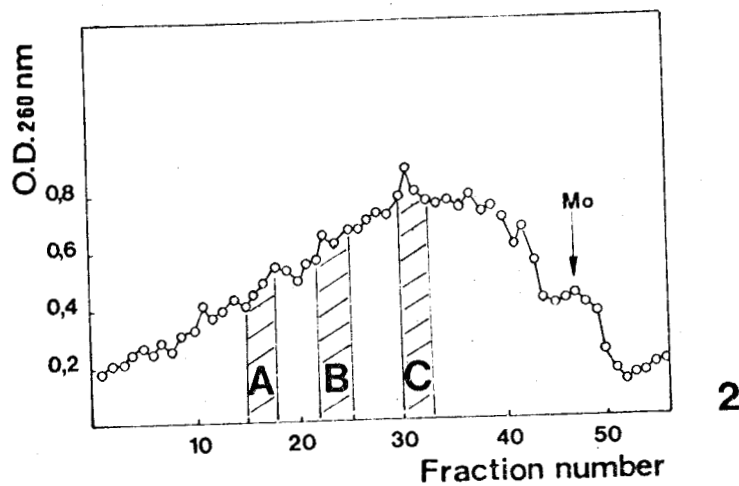
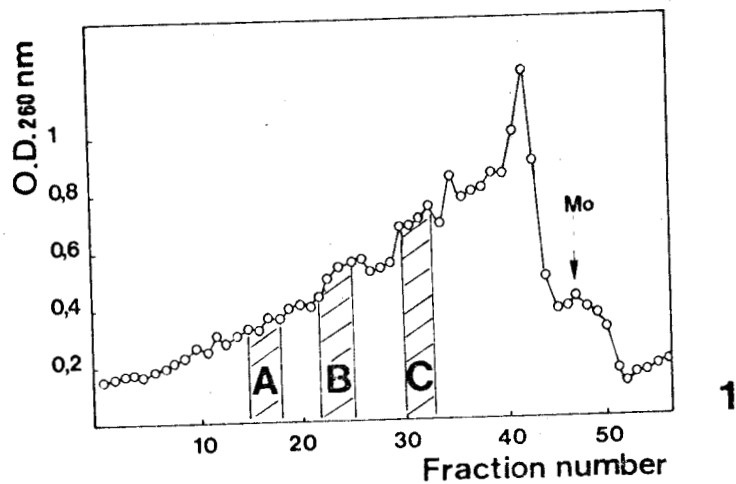


Figure 16 : Fractions polysomales obtenues après 5h de centrifugation du surnageant post-mitochondrial sur gradient discontinu. Matériel situé à l'interphase de membranes granulaires (1) et polysomes libres (2).

BUS  
LILLE

D'autre part, si nous comparons les résultats obtenus avec les deux fractions (Figure 17, 1, et Figure 17, 2), nous constatons que le type II ( $d \approx 1,545\text{g/cm}^3$ ) est le contaminant principal de la fraction de polysomes liés, mais n'est qu'un constituant mineur de la fraction de polysomes libres. Inversement, le type I se trouve en faibles proportions dans la fraction "membranaire", mais représente la quasi-totalité des polysomes libres.

Ainsi, l'analyse en gradients de CsCl montre que les polysomes de type I ( $d \approx 1,56\text{g/cm}^3$ ) se séparent rapidement des membranes alors que 20h de centrifugation sont nécessaires pour que les polysomes de type II atteignent le fond du tube : ceux-ci ont un comportement qui ne dépend pas uniquement de leur coefficient de sédimentation.

Il est important de montrer, à ce point de notre étude, que l'hétérogénéité polysomale observée n'est pas un artéfact, résultant de pertes, ou de l'adsorption de particules sur les parois des tubes. De fréquentes difficultés de cet ordre nous avaient fait rejeter la méthode de fixation par la formaldéhyde, lors d'études préliminaires.

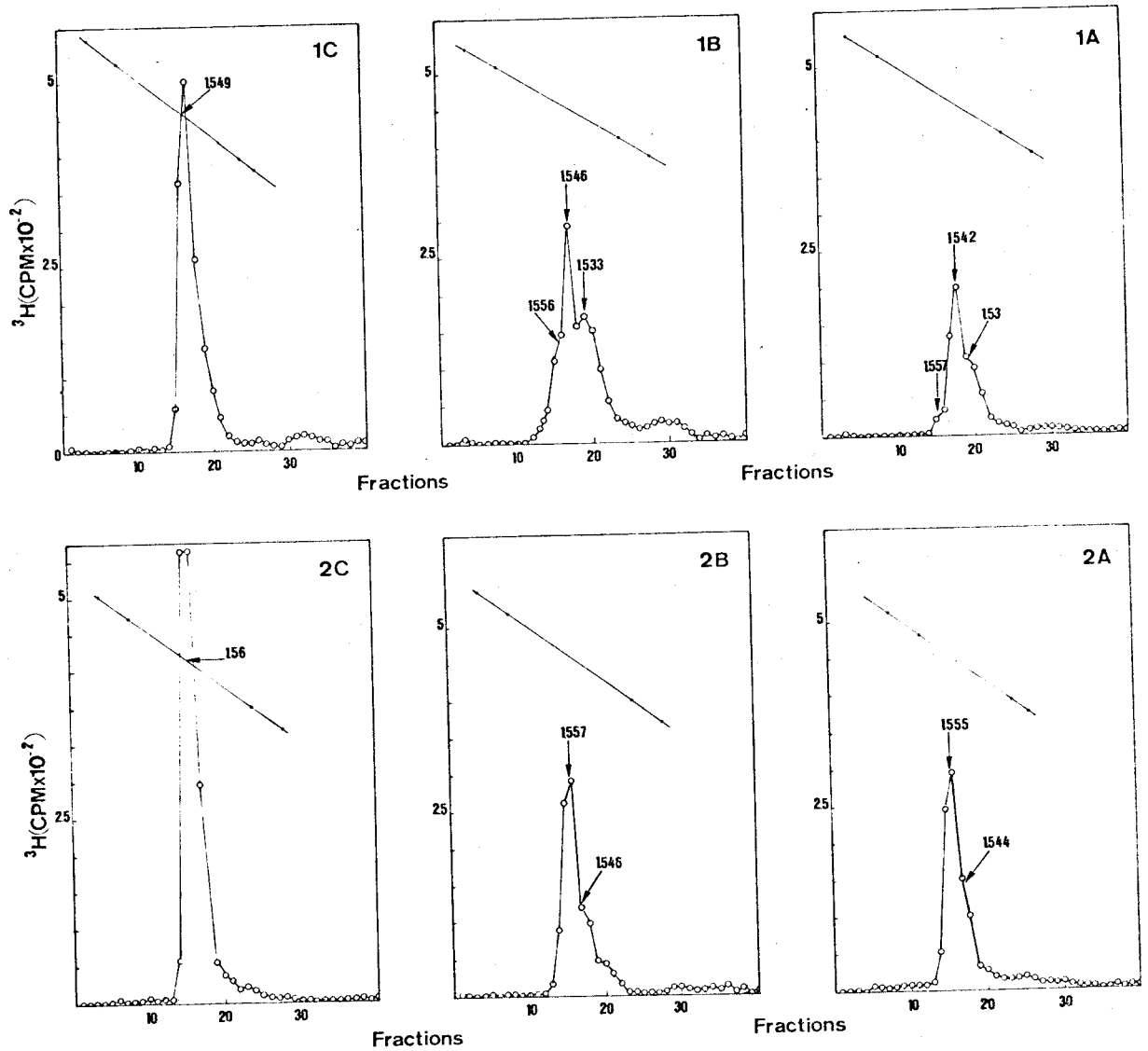
Dans nos expériences, les pertes sont négligeables, puisque 90% au minimum de la radioactivité déposée sur les gradients sont retrouvés dans les fractions. Une hétérogénéité artéfactuelle des polysomes peut être aussi rejetée par les résultats de l'expérience décrite ci-dessous.

### *3° - Effets de la congélation et de la décongélation sur la répartition des 3 types de polysomes :*

Nous avons constaté qu'une congélation, suivie d'une décongélation, ont pour effet de décroître l'activité de biosynthèse protéique in vitro des polysomes. Ceci peut être principalement attribué à la fragmentation du mRNA (voir Figure 18, p.60), car l'activité de synthèse de polyphénylalanine de monoribosomes ne décroît pas de façon significative après un même traitement.

La figure 19 (p.61) présente les résultats de l'analyse en gradients de CsCl de fractions polysomales obtenues après 5h de centrifugation préparative, congélation et décongélation.

Les zones d'hétérogénéité maximale sont déplacées vers la surface du gradient linéaire de saccharose (Figure 19, 1 ; comparer à la Figure 12, 1, p.46). Les zones B et C sont devenues équivalentes. Dans la zone C (comparée à la même zone, Figure 12, 1, p.46) les polysomes membranaires sont maintenant



BUS  
LILLE

Figure 17 : Centrifugation isopycnic des polysomes obtenus Figure 16.



BB'S  
LILLE

PLANCHE V : Fraction de réticulum endoplasmique obtenue après 5h de centrifugation à  $113\ 000g_{av}$  sur gradient discontinu.

Grossissement : 31 920 - Agrandissement : 3

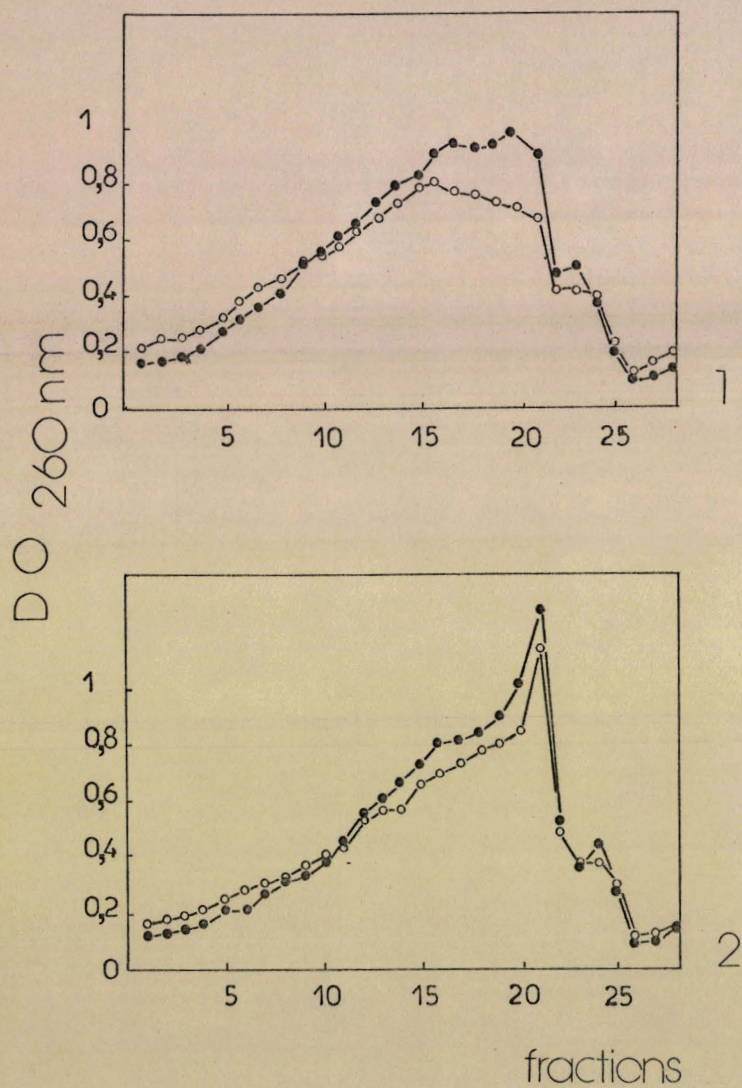


Figure 18 : Répartition des polysomes libres (1) et liés (2) avant (○) et après (●) congélation et décongélation. Gradient linéaire de saccharose 10-50 p100.



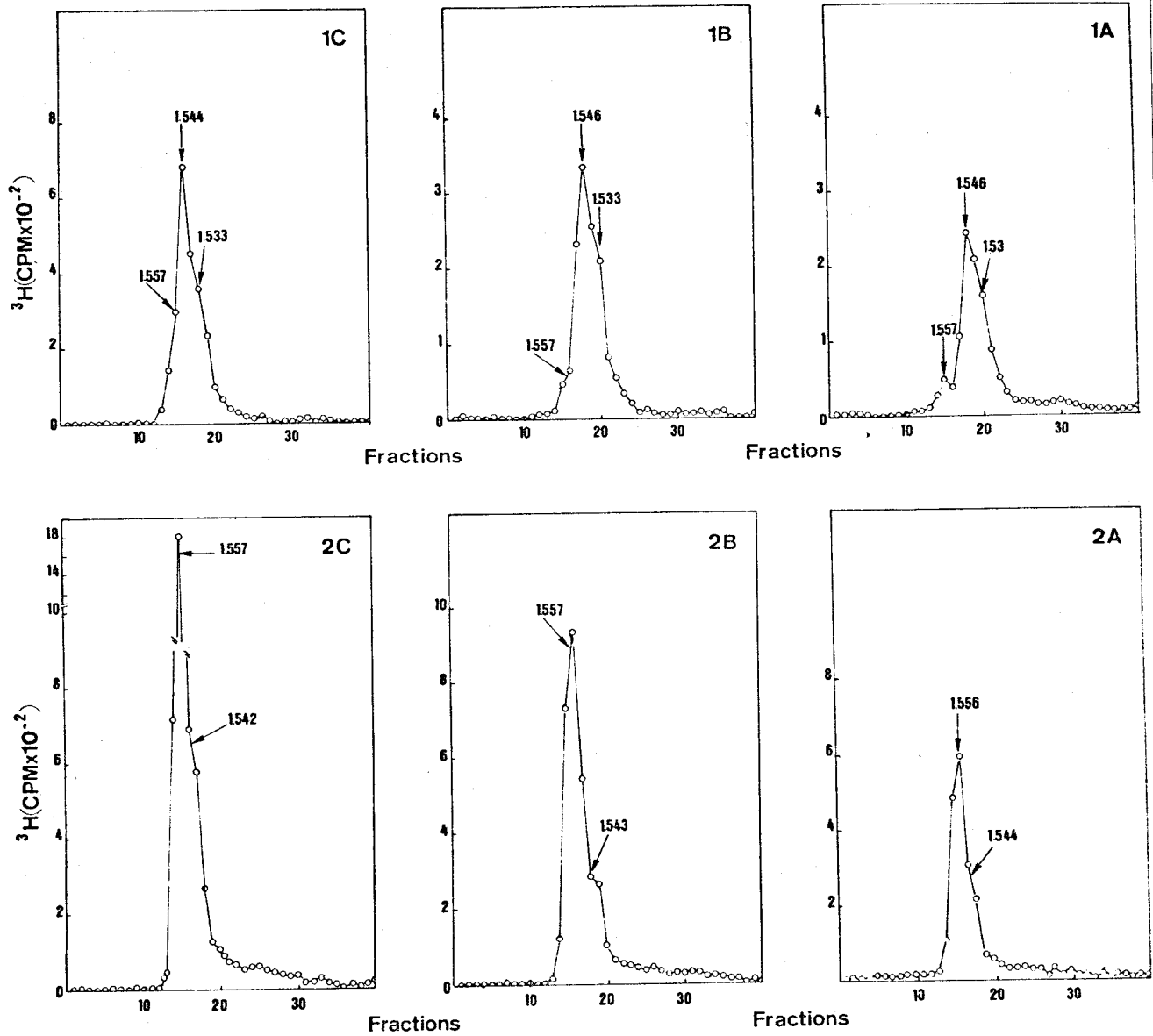


Figure 19 : Effet de la congélation et de la décongélation sur la répartition des différents types de polysomes.  
 Fractions obtenues après 5h de purification sur gradient discontinu.  
 Matériel situé à l'interphase (1) et polysomes libres (2).

visibles. La zone B a "perdu" des polysomes de type I, qui apparaissent en portion plus importante en zone C.

#### 4° - Effets du jeûne :

Nous avons essayé de déterminer également quelle pouvait être l'influence d'une variation de l'état physiologique sur l'hétérogénéité des polysomes.

Un lot de rats, est soumis à un jeûne de 12h, tandis qu'un autre est normalement nourri. Des injections intrapéritonéales d'acide orotique  $^3\text{H}$  et  $^{14}\text{C}$  respectivement, sont pratiquées 16h avant le sacrifice.

Tous les foies sont rassemblés. L'homogénéisation et le fractionnement cellulaire ont donc lieu dans des conditions rigoureusement identiques pour les 2 groupes d'animaux. En outre, selon certains auteurs (89-90), le taux d'inhibiteur cytoplasmique présent dans la cellule décroît pendant le jeûne. Les erreurs qui pourraient résulter de dégradations différentielles des polysomes de l'un et l'autre groupe pendant les manipulations sont donc également évitées.

On peut d'ailleurs constater que dans ces conditions, la répartition des polysomes libres et liés dans les gradients linéaires de saccharose (Figure 20, p.63) sont similaires. Mais la durée du jeûne, relativement courte dans ce type d'expérience, peut aussi expliquer ces résultats.

L'analyse en gradients de CsCl montre que le jeûne n'a aucune influence sur la densité et l'homogénéité des polysomes liés. D'autre part, les rapports  $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$  traduisent les proportions des 2 types de polysomes libres dans les 2 groupes d'animaux\*. On constate que le rapport  $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$

---

\*ou/et des radioactivités spécifiques différentes du RNA des polysomes de type I et II en période de jeûne (cf § A, 3°-, p.37). Toutefois cette possibilité est exclue par le fait que la radioactivité spécifique du RNA des fractions polysomales obtenues après 5h de centrifugation préparative est identique dans toutes les régions des gradients linéaires de saccharose (animaux ayant jeûné pendant 12h).

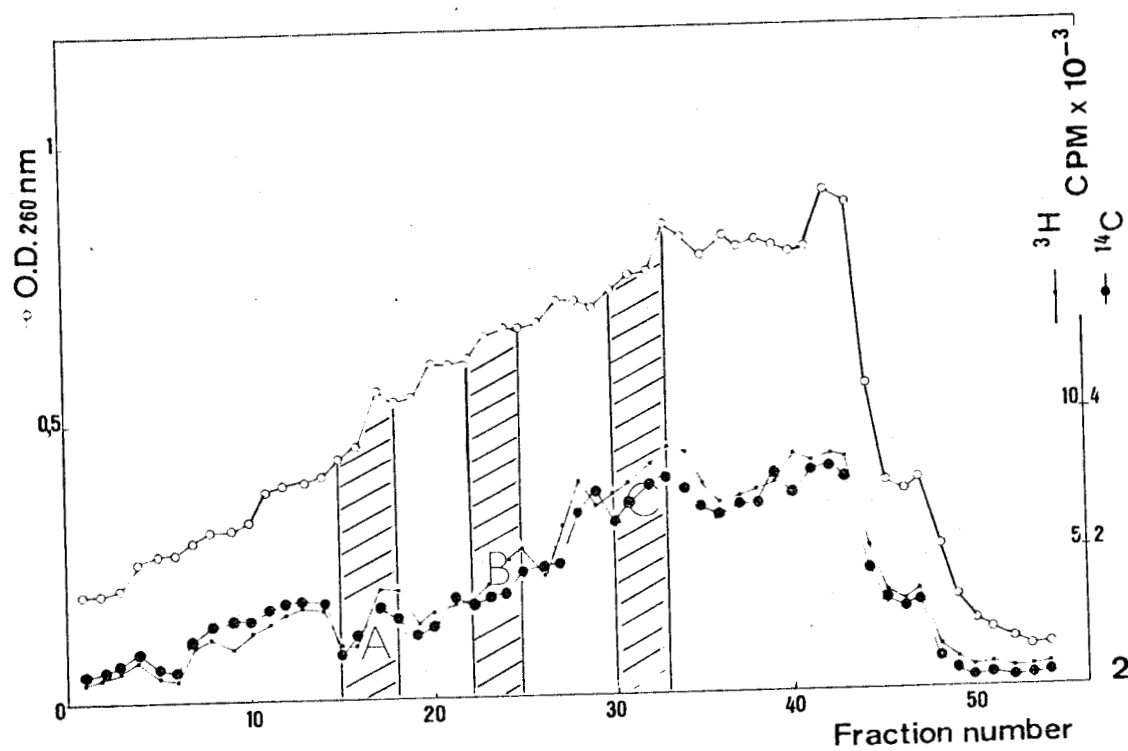
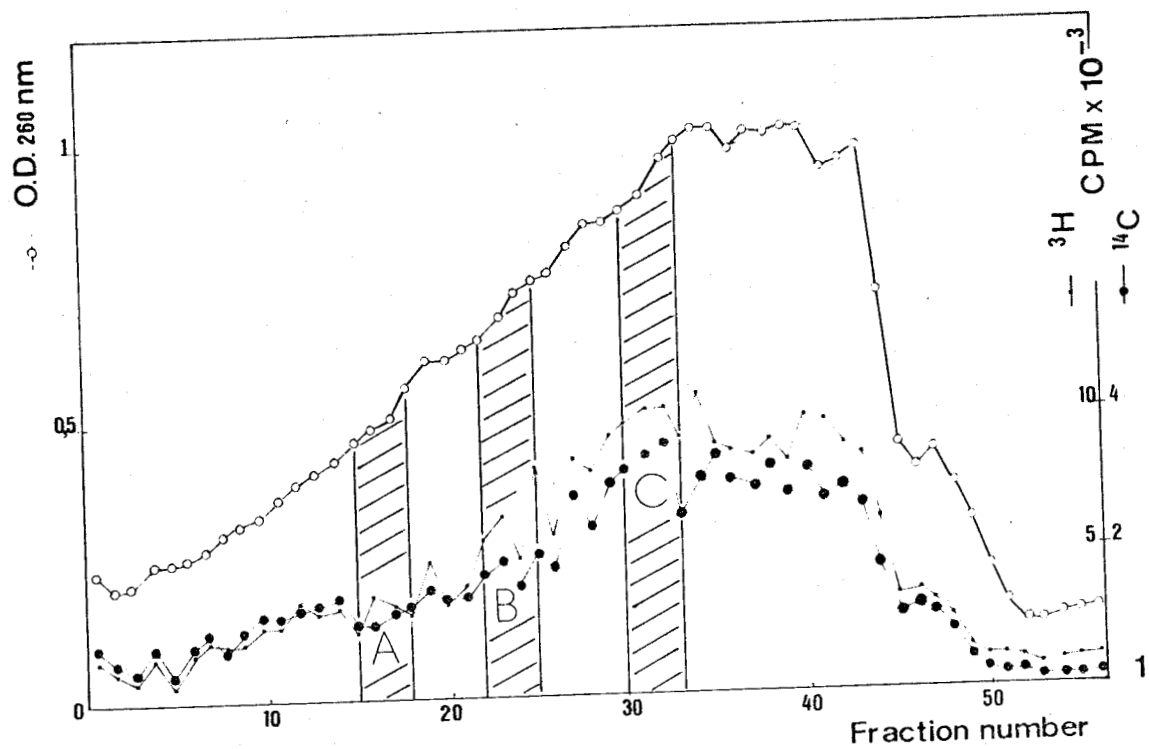


Figure 20 : Effet du jeûne sur les profils de polysomes libres (1) et liés (2).  
 Les zones A, B et C sont analysées en gradient de CsCl. (voir Figure 21).  $^3\text{H}$  : jeûne -  $^{14}\text{C}$  : régime normal.  
 Les polysomes sont préparés comme il est décrit dans "METHODOLOGIE".

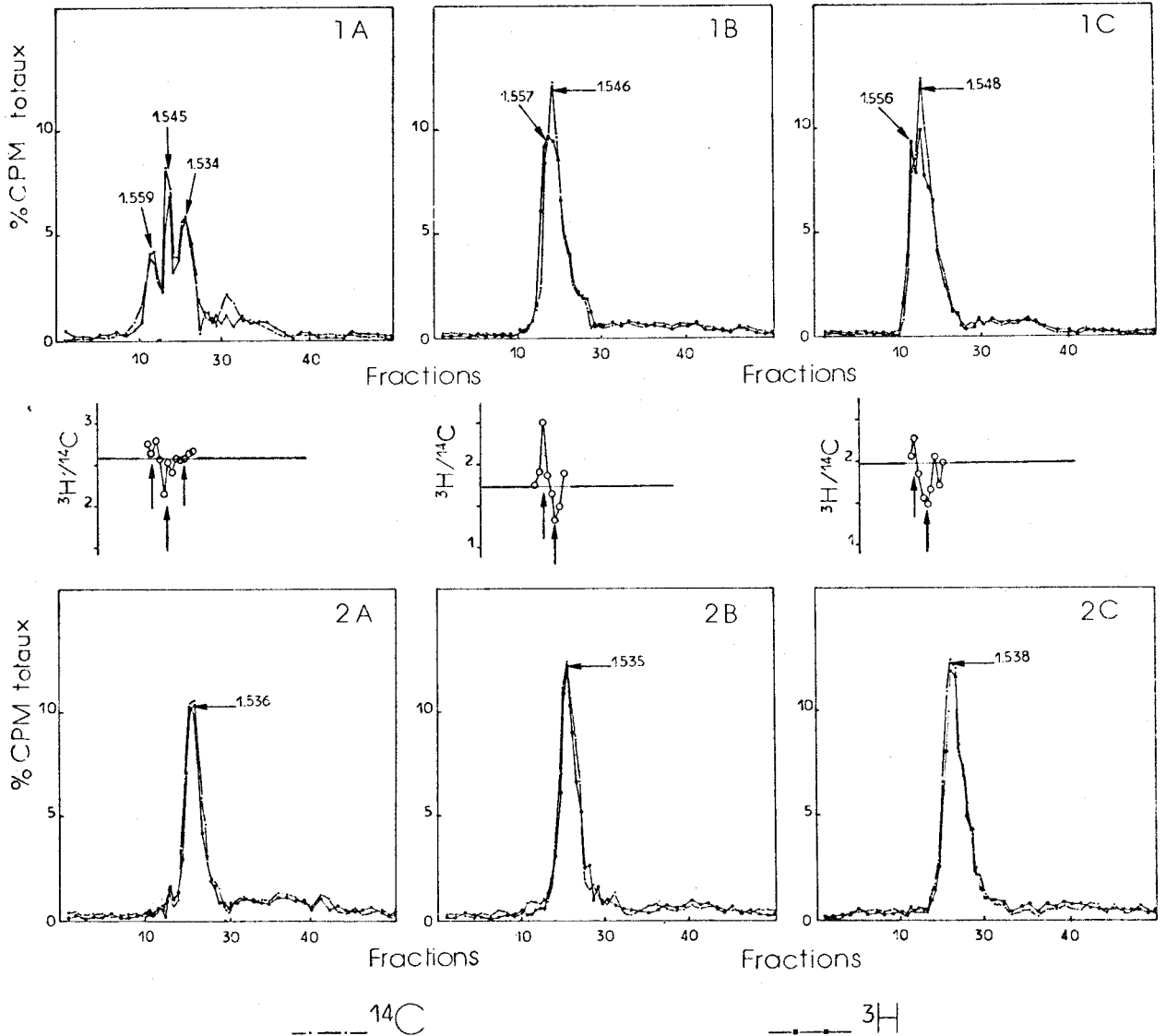


Figure 21 : Centrifugation isopycnique des polysomes libres (1) et liés (2) d'animaux soumis au jeûne ( $^3\text{H}$ ) ou normalement nourris ( $^{14}\text{C}$ ). Les rapports  $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$  correspondent aux gradients 1A, 1B et 1C respectivement. Corrections de quenching effectuées selon la méthode du "rapport de standardisation externe".

BUS  
LILLE

décroit pour les polysomes libres de type II, dans les 3 régions explorées. Il croît légèrement pour les polysomes de type I dans les zones A et C ; la déviation maximale de la valeur moyenne  $\frac{\text{total des C.P.M. } ^3\text{H}}{\text{total des C.P.M. } ^{14}\text{C}}$  est observée en zone C (voir Figure 21, p.64).

Ces résultats suggèrent que les polysomes de type II ( $d \approx 1,545\text{g/cm}^3$ ) deviennent prépondérants lorsque l'induction de la formation des polysomes est favorisée, et que les polysomes de type I sont en quantité plus importante en période de jeûne.

#### 5°- Discussion :

Les polysomes libres de type I et II ont des comportements différents pendant la centrifugation préparative. Ce fait pourrait signifier :

- i) que les polysomes de type II s'adsorbent préférentiellement sur les membranes du réticulum endoplasmique.
- ii) qu'il existe une association entre les polysomes de type II et les membranes ; celle-ci serait rompue pendant la longue centrifugation.

Il est difficilement concevable qu'un phénomène d'adsorption puisse être "spécifique" d'une catégorie de polysomes ; cependant, cette possibilité ne peut être totalement exclue dans l'état actuel de nos connaissances. Dans le cas de la seconde interprétation, le mode de liaison exact des polysomes de type II aux membranes resterait à déterminer.

#### C- CONCLUSION

*L'action ménagée de la RNase ne libère pas de monosomes de la fraction de réticulum endoplasmique obtenue après longue centrifugation.*

*Au cours de la centrifugation préparative, les polysomes de type I se séparent très rapidement de l'interphase membranaire, alors que 20h sont nécessaires pour que les polysomes de type II soient complètement sédimentés.*

*Les polysomes de type II sont prépondérants lorsque les animaux sont normalement nourris.*

## METHODOLOGIE

Des rats mâles de souche WISTAR, pesant 200 à 300g sont utilisés pour toutes les expériences. En règle générale, ils ont libre accès à la nourriture jusqu'à l'heure du sacrifice.

## A- SOLUTIONS

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau déminéralisée bidistillée. Les compositions des solutions principales sont consignées dans le tableau de la page suivante.

## B- FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Les animaux sont sacrifiés par décapitation et leur foie rapidement prélevé est plongé dans le Milieu A préalablement refroidi à 0°C. Toutes les opérations ultérieures ont lieu entre 0 et 2°C.

### 1°- Homogénat :

Après plusieurs rinçages dans le Milieu A, les foies sont séchés sur de la gaze stérile, et broyés dans l'appareil de FISHER. Ils sont ensuite homogénéisés dans 5 volumes de milieu A (contenant 100 µg/ml de protéines de la fraction d'inhibiteur cytoplasmique de RNase, voir p.69) dans un appareil de POTTER-ELVEHJEM par 8 allers-retour de piston (jeu de 0,15mm environ, 1 000 tours/mn) lorsqu'il s'agit de préparer les polysomes libres et liés.

### 2°- Noyaux :

Les noyaux sont préparés selon la méthode de BLOBEL et POTTER (54). 1ml d'homogénat est mélangé à 2ml de saccharose 2,3M dans le tampon TKM<sub>1</sub>-DTT contenant 0,15 p100 de TRITON X-100. L'ensemble est déposé sur 1ml de saccharose 2,3M TKM<sub>1</sub>-DTT, et centrifugé 1h à 37 000 tours/mn dans le rotor SW 50-1. On obtient un culot de noyaux purs.

### 3°- Surnageant post-mitochondrial :

L'homogénat filtré sur 4 épaisseurs de gaze est centrifugé à 9 000g<sub>av</sub> pendant 10mn.

Le surnageant post-mitochondrial est alors prélevé à la seringue.

TABLEAU III

*Principales solutions utilisées*

SOLUTION	COMPOSITION	USAGE
TKM <sub>1</sub> -DTT	Tris-HCl 50mM, pH 7,6 KCl 25mM, MgCl <sub>2</sub> 5mM Dithiothreitol 1mM	Préparation des fractions subcellulaires
Milieu A	TKM <sub>1</sub> -DTT, saccharose 0,25M RNA de levure 2mg/ml	Milieu d'homogénéisation
TKM <sub>4</sub> -DTT	Tris-HCl 30mM, pH 6,8 KCl 70mM, MgCl <sub>2</sub> 3,75mM Dithiothreitol 1mM	Préparation du "cytosol" pour biosynthèse protéique <u>in vitro</u> "système potassium"
Milieu B	TKM <sub>4</sub> -DTT, saccharose 0,25M	
TeKM <sub>1</sub> -DTT	Homologue du TKM <sub>1</sub> où la triéthanolamine-HCl remplace le Tris-HCl	Analyses en gradients de chlorure de césium microscopie électronique
TNM <sub>1</sub> -DTT	Tris-HCl 20mM, pH 7,3 NH <sub>4</sub> Cl 150mM MgCl <sub>2</sub> 4mM Dithiothreitol 1mM	Biosynthèse protéique <u>in vitro</u> "système ammonium"
Milieu I	TNM <sub>4</sub> -DTT, saccharose 0,25M	Préparation du "cytosol"





#### 4° - Polysomes totaux :

Le surnageant post-mitochondrial est additionné sous agitation douce d'un dixième de son volume d'une solution fraîchement préparée de détergent à 11 p100 (DOC,  $\frac{P}{V}$ ) (TRITON X-100,  $\frac{V}{V}$ ) dans le tampon TKM<sub>1</sub>-DTT.

Il est ensuite laissé au repos pendant 10mn à 0°C, avant d'être déposé, par fractions de 15ml, sur des gradients discontinus de saccharose dans le TKM<sub>1</sub>-DTT :

- Saccharose 2M : 6ml
- Saccharose 1,38M : 8ml
- Saccharose 0,5M : 4ml

Les tubes sont ensuite centrifugés dans le rotor 60 Ti pendant 5h à 113 000g<sub>av</sub> (40 000 tours/mn). Puis ils sont rapidement décantés, et leurs parois sont soigneusement essuyées avec du papier filtre. Les polysomes sont ensuite resuspendus dans le tampon adéquat.

#### 5° - Polysomes libres et Polysomes liés :

Le surnageant post-mitochondrial est déposé sur des gradients discontinus de saccharose en tampon TKM<sub>1</sub>-DTT composés de la manière suivante :

- Saccharose 2M : 8ml
- Saccharose 1,38M : 6ml
- Saccharose 0,5M : 4ml

puis centrifugé 20h à 113 000g<sub>av</sub> dans le rotor 60 Ti

*N.B : Toutes les solutions de saccharose composant les gradients discontinus contiennent 50 µg/ml de protéines de la fraction d'inhibiteur de RNase (voir p.69).*

On obtient un culot de polysomes libres.

Les interphases inférieures sont prélevées à la seringue, et diluées par un volume de TKM<sub>1</sub>-DTT. Après une nouvelle addition d'inhibiteur de RNase (concentration finale : 200 µg de protéines par ml), les membranes du réticulum endoplasmique sont partiellement solubilisées par un détergent de façon à libérer les polysomes des membranes (DOC ou TRITON X-100, concentration finale 1 p100).

La solution résultante, parfaitement limpide et de couleur ambrée,

est déposée par fractions de 25ml sur 8ml de saccharose 2M dans le tampon TKM<sub>1</sub>-DTT. Après 5h de centrifugation à 113 000g<sub>av</sub> dans le rotor 60 Ti, on obtient un sédiment de polysomes liés.

## C- FRACTION D'INHIBITEUR CYTOPLASMIQUE DE RNase

### 1°- Préparation :

Un surnageant post-mitochondrial, filtré sur laine de verre, est centrifugé à 176 000g<sub>av</sub> pendant 3h dans le rotor 60 Ti (45 000 tours/mn). Les deux tiers supérieurs du surnageant obtenu sont prélevés à la seringue, dilués par deux volumes de DTT 1mM, et acidifiés à pH 5,1 à 0°C, par une solution d'acide acétique 0,5M. Après centrifugation à 10 000g<sub>av</sub> pendant 10mn dans un rotor SW 25-2, le surnageant est décanté, et ajusté à pH 7 avec de la potasse 1M. Il est ensuite soumis à un fractionnement au sulfate d'ammonium.

Le précipité contenant l'inhibiteur de RNase (40-60 p100 de saturation) est dissous dans un volume minimal de tampon TKM<sub>1</sub>-DTT, et déposé sur une colonne de Séphadex G-25 fine (35cmx1cm), préalablement équilibrée dans le même tampon. La fraction exclue contient environ 50mg/ml de protéines. Elle est stabilisée par addition de 1mg/ml de sérualbumine avant d'être congelée par fractions de 1ml à -20°C.

Elle n'est jamais conservée plus de deux mois.

### 2°- Contrôle d'activité :

La fraction d'inhibiteur cytoplasmique de RNase est soumise à un contrôle systématique d'activité après chaque préparation. La perte d'activité durant le stockage est ensuite suivie par des contrôles périodiques, et les quantités d'inhibiteur introduites lors de la préparation sont corrigées sur cette base.

#### a- solutions :

Les solutions suivantes sont utilisées :

- Tampon Tris-HCl, 0,1M, pH 7,6, KCl 0,060M
- RNase pancréatique à 1 µg/ml dans le 1SSC, pH 5
- RNA de levure, 5mg/ml dans l'eau
- Ethanol à 76 p100 dans HCLN

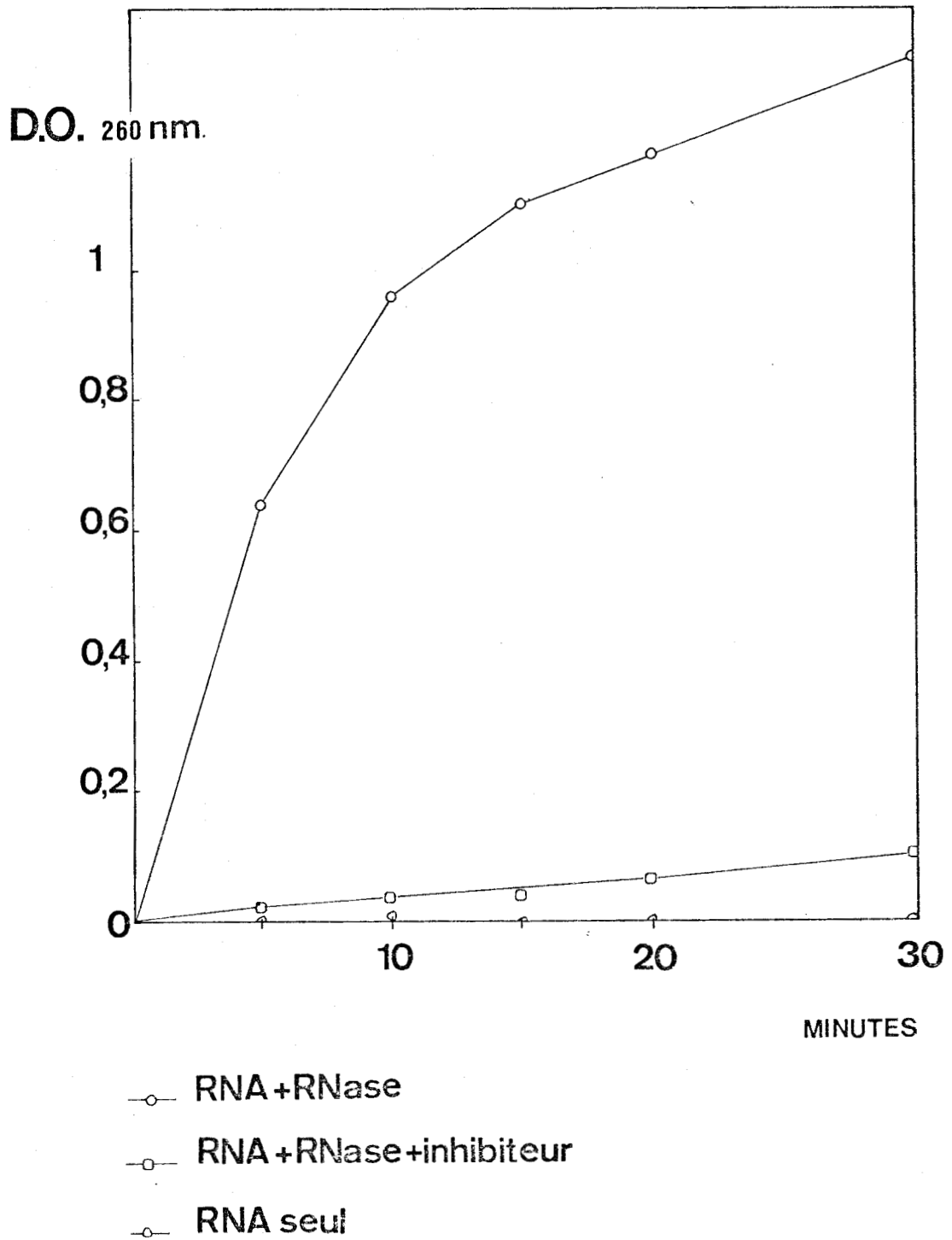


Figure 22 : Contrôle d'activité de la fraction d'inhibiteur cytoplasmique de RNase.

b- manipulation :

Trois cinétiques d'hydrolyse du RNA sont réalisées de la manière décrite ci-dessous.

On compose, à 0°C :

- 1er tube : RNA - RNase
  - 0,2ml de tampon
  - 0,2ml de RNA
  - 0,2ml de RNase
- 2ème tube : RNA - eau
  - 0,2ml de tampon
  - 0,2ml de RNA
  - 0,2ml d'eau
- 3ème tube : RNA - RNase - inhibiteur
  - 0,2ml tampon
  - 0,2ml de RNase
  - 0,2ml de RNA
  - 0,001ml de la fraction d'inhibiteur

Les tubes sont portés à 37°C sous agitation.

Aux temps choisis, des fractions aliquotes de 0,1ml sont prélevées, et additionnées de 0,2ml du mélange *Ethanol - HCl*. Après 15mn à 0°C, les prélèvements sont centrifugés dans une centrifugeuse JOUAN (10mn, vitesse maximum). Les surnageants sont prélevés avec précaution, et dilués 5 fois avec de l'eau bidistillée. Leur absorbance est ensuite lue au spectrophotomètre ZEISS PMQ-II à 260nm (voir Figure 22, p.70).

#### D- SYSTEMES ACELLULAIRES DE BIOSYNTHESE PROTEIQUE

1°- *Composition des milieux et préparation des fractions :*

a- "système ammonium" :

Nous avons adopté, lors de nos premières études de l'activité de biosynthèse protéique in vitro des polysomes libres et liés, un système acellulaire dans lequel l'ion ammonium est l'ion monovalent principal, bien que les polysomes aient été extraits dans le tampon TKM<sub>1</sub>-DTT.

Lorsque l'on désire utiliser ce système, il est donc nécessaire d'éliminer le potassium des fractions subcellulaires. Les procédures de

dialyse, ou filtration sur Séphadex sont inadéquates, car elles entraînent une dégradation des fractions polysomales. Nous avons donc préféré la procédure qui consiste en une double purification sur gradients discontinus.

#### $\alpha$ - polysomes :

Les interphases de membranes granulaires sont obtenues comme au § B, 5°-, p.68, à ceci près que la centrifugation est de 4h à 176 000g dans le rotor 60 Ti. Après prélèvement, elles sont rassemblées et diluées de moitié avec le cytosol prélevé au tiers supérieur des tubes, et du tampon  $\text{TKM}_1$ -DTT. Elles sont déposées à nouveau sur des coussins de saccharose en tampon  $\text{TNM}_1$ -DTT :

- Saccharose 2M : 6ml
- Saccharose 1,38M : 4ml

puis centrifugés à 176 000g pendant 3h. Les nouvelles interphases, rassemblées, constituent la fraction de réticulum granulaire purifié.

Les culots de polysomes libres, obtenus lors de la première centrifugation sont rincés deux fois par 5ml de tampon  $\text{TNM}_1$ -DTT, puis resuspendus dans ce même tampon. Les culots obtenus lors de la seconde centrifugation sont resuspendus en tampon  $\text{TNM}_1$ -DTT et réunis aux premiers.

#### $\beta$ - fraction "surnageant haute vitesse" :

Le surnageant post-mitochondrial provenant d'un ou plusieurs foies broyés puis homogénéisés dans 2 volumes de Milieu I est centrifugé 3h à 176 000g<sub>av</sub> dans un rotor SW 40 Ti. Le "surnageant haute vitesse" est prélevé soigneusement en écartant le tiers inférieur du contenu du tube et la pellicule lipidique de surface.

Des fractions aliquotes de 5ml de ce "cytosol" concentré sont déposés sur des colonnes de Séphadex G-25 fine (35cmx1cm) stabilisées dans le tampon  $\text{TNM}_1$ -DTT. Ce traitement a pour effet d'éliminer les acides aminés et les autres composés de bas poids moléculaire. Une expérience préliminaire, développée dans le D.E.A. de C. DUPUY (91), montre que l'on peut ainsi obtenir 5ml de "cytosol" pratiquement exempt d'acides aminés libres.

#### $\gamma$ - composition du milieu :

Le milieu se réalise en mettant en présence :

- 1 volume de surnageant haute vitesse
- 2 volumes de suspension polysomale

- 2 volumes de "mélange d'incubation"

Le "mélange d'incubation" apporte le système énergétique et les acides aminés en solution dans le tampon  $\text{TNM}_1$ -DTT.

Cependant, l'ion ammonium interdit certaines opérations ultérieures, comme la fixation par un aldéhyde par exemple, indispensable pour l'observation en microscopie électronique, l'analyse en gradients de chlorure de césium, ou encore lorsque l'on veut stopper la réaction à un moment précis pour d'autres analyses. Nous avons donc recherché quelles étaient les conditions optima d'incorporation d'acides aminés  $^{14}\text{C}$  par les polysomes dans un "système potassium".

b- "système potassium" :

$\alpha$ - polysomes :

Les conditions décrites au § B, p.68, sont à adopter.

$\beta$ - fraction "surnageant haute vitesse" :

Sa préparation est la même que pour le "système ammonium", à ceci près que le milieu d'extraction est le Milieu B (p.67). Les colonnes de Séphadex sont stabilisées dans le tampon  $\text{TKM}_4$ -DTT - (pH 6,8).

$\gamma$ - composition du milieu :

Les proportions des 3 composants sont inchangées. Le "mélange d'incubation" a les concentrations ioniques suivantes :

- *Tris-HCl* 10mM, pH 7,3
- *MgCl<sub>2</sub>* 5,25mM
- *KCl* 115mM
- *DTT* 1mM

Le pH final du milieu est de 7,3.

Le tableau de la page suivante présente la composition finale des deux systèmes acellulaires.

2°- Détermination de la radioactivité incorporée :

a- arrêt de l'incubation :

Aux temps désirés, la biosynthèse est stoppée par brusque refroidissement à 0°C. Un prélèvement de 0,1ml est immédiatement dilué à 1,5ml par

TABLEAU IV

*Compositions finales des systèmes acellulaires*

	SYSTEME AMMONIUM	SYSTEME POTASSIUM
Tris-HCl	$2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ (pH 7,3)	$3 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$ (pH 7,3)
MgCl <sub>2</sub>	$4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$4,85 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
NH <sub>4</sub> Cl	0,15M	
KCl		0,07M
DTT	$10^{-3} \text{ M}$	$10^{-3} \text{ M}$
PEP	$10^{-2} \text{ M}$	$10^{-2} \text{ M}$
PK	10 µg/ml	10 µg/ml
ATP	$10^{-3} \text{ M}$	$10^{-3} \text{ M}$
GTP	$4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Acides aminés <sup>14</sup> C (sauf Asn, Gln, Try)	$0,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$0,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
Asn, Gln, Try	$0,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$0,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
SHV	5mg de protéines/ml	5mg de protéines/ml
RNA Polysomal	0,02 - 0,2mg/ml	0,02 - 0,2mg/ml



une solution froide d'EDTA 0,015M ajustée à pH 7 avec de la soude 2N, et contenant également un mélange d'acides aminés non radioactifs (30  $\mu$ M/ml).

Les protéines sont alors précipitées par un volume d'une suspension de célite à 20mg/ml dans le TCA 20 p100 contenant également du tungstate de sodium à 0,25 p100. Après agitation, les tubes sont laissés au repos une nuit à 1°C, afin d'obtenir une précipitation totale.

#### b- hydrolyse :

Afin d'hydrolyser les amino-acyl tRNA, les tubes sont agités et portés au bain-marie à 90°C pendant 20mn. Ils sont ensuite refroidis sous eau courante.

#### c- filtration :

Les précipités de protéines sont collectés par filtration sur des disques de papier Whatman GF83, et l'acido-soluble est éliminé par lavage du filtre : TCA 10 p100, TCA 5 p100, TCA 0,1 p100, Ethanol-Ether (1/1), Ethanol-Ether-Chloroforme (2/2/1), Ether.

Les disques sont ensuite séchés une nuit à 37°C.

Le comptage s'effectue de la même façon que pour les fractions de gradients, (voir § G, p.77).

### E- GRADIENTS LINEAIRES DE SACCHAROSE

Des gradients linéaires de saccharose sont utilisés à des fins analytiques ou préparatives. Le tableau de la page suivante présente les conditions expérimentales les plus fréquentes. Dans le cas particulier des analyses en gradients de chlorure de césium, les culots de polysomes sont resuspendus en tampon  $\text{TeKM}_1$ -DTT. Des fractions aliquotes de 1ml, contenant 50 unités d'absorbance à 260nm sont déposées sur des gradients de saccharose 10-50 p100 en  $\text{TeKM}_1$ -DTT, et centrifugées 2h à 22 500 tours/mn ( $51\,500g_{av}$ ) à 1°C dans le rotor SW 25-1.

Des fractions de 0,5ml sont collectées à 0°C. 0,2ml de chaque fraction sont dilués à 0,5ml avec le tampon  $\text{TeKM}_1$ -DTT, et l'absorbance à 260nm est mesurée au spectrophotomètre ZEISS PMQ-II.

### F- CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

Les fractions de 0,3ml restantes sont rassemblées comme il est



TABLEAU V

*Principaux gradients linéaires de saccharose utilisés  
et conditions de centrifugation*

ANALYSE DE	COMPOSITION DES GRADIENTS SACCHAROSE EN p100	ROTORS			
		SW 40	SW 25-1	SW 25-2	SW 27
Polysomes	10 - 30	40mn 35 000t/mn	1h50 22 500t/mn	1h50 22 500t/mn	2h 24 000t/mn
	10 - 50	40mn 35 000t/mn	2h 22 500t/mn	2h 22 500t/mn	
Monosomes	10 - 30		3h 25 000t/mn	19h30 16 000t/mn	
RNA	5 - 20	13h 28 000t/mn ou 6h 40 000t/mn			
	10 - 50	19h30 34 000t/mn ou 15h 39 000t/mn			



indiqué dans les figures, et fixées par la glutaraldéhyde selon la méthode de BALTIMORE et HUANG (92). Nous avons vérifié qu'une région donnée d'un profil polysomal conserve après fixation le même coefficient de sédimentation en gradient linéaire de saccharose, ce qui exclut la possibilité qu'une dégradation notable des polysomes en monosomes se produise pendant les manipulations.

Des échantillons de 0,2ml sont déposés sur des gradients préformés de CsCl (volume 3,8ml, densités extrêmes 1,38-1,63g/cm<sup>3</sup>), et centrifugés pendant 6h au minimum à 33 000 tours/mn dans le rotor SW 50-1. Des fractions de 0,1ml ou 0,05ml sont collectées, et les densités obtenues après mesure des indices de réfraction.

#### G- MESURES DE RADIOACTIVITE

Des échantillons de 0,1ml des fractions de gradients de saccharose sont introduits en fioles de comptage, avec 0,4ml d'eau distillée et 10ml de liquide de BRAY (60g naphthalène, 4g PPO, 0,2g POPOP, 100ml méthanol, 20ml éthylène glycol, dioxane qsp 1l).

Le matériel acido-insoluble des fractions de gradients de CsCl, ou de saccharose dans certains cas, est précipité par du TCA 5 p100 à 0°C après addition de 200 µg de séralbumine ou de RNA de levure comme entraîneur. Les précipités sont collectés sur des disques de papier Whatman GF83, et lavés par du TCA 5 p100, 0,1 p100, de l'Ethanol-Ether (1/1) et de l'Ether. Après séchage, les disques sont introduits en fioles de comptage contenant 10ml de liquide scintillant (2g PPO, 0,2g POPOP, toluène qsp 1l).

La radioactivité est déterminée par un compteur MARK-I (NUCLEAR-CHICAGO).

#### H- EXTRACTION DU rRNA

##### *1°- A partir de polysomes :*

Un culot de polysomes est resuspendu en tampon Tris 5mM, pH 7,6, SDS 1 p100. Après 5mn à température ambiante, la solution est déposée sur gradient de saccharose 5-20 p100 en tampon Tris 5mM, pH 7,6.

2°- A partir d'un surnageant post-mitochondrial ou d'une fraction de réticulum endoplasmique :

Nous utilisons la technique de NORDGREN et STENRAM (80).

0,5ml de fraction subcellulaire sont mis en présence de 0,25ml de SDS 1,8 p100 contenant également 0,015M en naphthalène disulfonate de sodium, 0,3 p100 de 8-hydroxyquinoléine, et 1 p100 de bentonite.

Après agitation vigoureuse à 0°C, on ajoute 0,75ml de phénol saturé d'eau. On agite à nouveau les tubes pendant 7 à 8mn à température ambiante. Après une centrifugation de 20mn à 4°C (3 000g), la phase aqueuse est prélevée, et on y ajoute 3 volumes d'éthanol froid à 96 p100 saturé en acétate de sodium.

Les tubes sont laissés ensuite 1h à -20°C, puis centrifugés 10mn à 10 000g. Le culot est lavé deux fois dans l'éthanol puis il est dissous dans le tampon acétate 0,01M pH 5, 0,1M NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>.

#### I- DOSAGE DU RNA

Le RNA est dosé selon la méthode de WILSON et HOAGLAND (78) que nous avons légèrement modifiée.

Des fractions aliquotes contenant moins de 1mg de RNA sont additionnées d'un volume de PCA N stabilisé à 0°C. On centrifuge immédiatement, à 4°C, pendant 10mn à 3 000g. Les culots sont lavés deux fois dans le PCA 0,5N froid, puis dissous dans 2,5ml de KOH 0,5N.

Après 1h d'hydrolyse à 37°C, on ajoute 0,5ml de HCl 3N et les tubes sont centrifugés 10mn à 3 000g. Le surnageant possède alors encore une certaine turbidité qui doit être éliminée, sous peine d'obtenir des valeurs erronées (par excès). 1ml de surnageant est déposé sur une micro-colonne de célite (2cmx0,4cm). Le filtrat donne les mêmes valeurs d'absorbance qu'un surnageant centrifugé 20mn à 105 000g. Les rapports  $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$  sont de 1,34 à 1,37, ce qui indique un haut degré de pureté.

#### J- DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines sont dosées selon la méthode de LOWRY et al (93).

## K- MICROSCOPIE ELECTRONIQUE \*

Les culots de polysomes ou de membranes sont fixés par une solution de glutaraldéhyde à 6,25 p100 dans le tampon  $\text{TeKM}_1$ -DTT. Après 20mn à 0°C, les tubes sont décantés et les culots sont rincés 3 fois par le tampon.

Une nouvelle fixation par de l'acétate d'uranyle, suivie d'une inclusion dans l'epon, permet la préparation de coupes qui sont observées au microscope électronique.

## L- PRODUITS CHIMIQUES ET ENZYMES UTILISES

ATP, GTP, sels de sodium, RNA de levure, sont de marque NBC (Cleaveland, Ohio, U.S.A.).

PEP, Pyruvate Kinase (activité spécifique approximative 150 unités/mg), Desoxycholate de sodium proviennent de la SIGMA Chemical Compagny (St Louis, Missouri, U.S.A.).

Le TRITON X-100 (scintillation grade) est un produit BDH Chemicals Ltd (Poole, ENGLAND) et le CsCl un produit E. MERCK (Darmstadt). La glutaraldéhyde à 50 p100 provient de l'Eastman Organic Chemicals (Rochester, U.S.A.), et la Ribonucléase (EC 2.7.7.16, du pancréas de boeuf, sans protéases, 40 unités KUNITZ  $\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de la SOCHIBO S.A., FRANCE.

\* Nous remercions Monsieur Frédéric HILDEBRANDT, de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille pour les observations en microscopie électronique qu'il a bien voulu effectuer sur nos préparations.

SYNTHESE ET PERSPECTIVES

Il semble que dans les cellules eucaryotiques, le réticulum endoplasmique ne soit pas uniquement le site de synthèse des protéines qui doivent être transportées. Ainsi, dans les cellules HeLa et dans les ascites de KREBS, il est aussi le lieu de l'induction de la formation de polysomes : en présence d'acides aminés, le mRNA vient se fixer sur les membranes et une catégorie particulière de polysomes peut être mise en évidence (73,86) ("loosely-associated polysomes").

L'existence d'une telle association reste à démontrer dans les cellules hépatiques. Pour SABATINI, la liaison polysomes-membranes se fait uniquement par l'intermédiaire des sous-unités 60S, mais différents degrés d'interaction peuvent être distingués lorsque l'on soumet la fraction de réticulum endoplasmique à des concentrations en détergent ou à des forces ioniques croissantes (27).

Nos résultats suggèrent qu'une catégorie de polysomes, liés de façon labile aux membranes du réticulum endoplasmique, est obtenue dans la fraction de polysomes libres après la centrifugation préparative. Il apparaît que la procédure la plus couramment utilisée ne permet pas l'obtention d'une préparation membranaire structurellement intacte. L'élimination des polysomes libres qui pourraient contaminer la fraction membranaire doit s'opérer dans des conditions respectant l'intégrité des liaisons faibles entre polysomes et réticulum endoplasmique, pour que ces dernières puissent être mises en évidence et caractérisées. En outre, il est fort probable que les résultats contradictoires obtenus par différents auteurs dans l'étude des spécificités de synthèse soient le reflet de l'hétérogénéité des fractions polysomales préparées.

*Connaître mieux les différents types d'interaction polysomes-membranes est l'étape à franchir pour que deviennent possibles l'obtention des diverses catégories de polysomes, l'étude de leurs spécificités de synthèse, de leurs relations de biogénèse et de fonction.*

## SOMMAIRE

Les polysomes libres et liés au réticulum endoplasmique d'hépatocyte de Rat ont des répartitions similaires en gradient linéaire de saccharose et des activités biologiques identiques en système acellulaire, lorsque les actions mécaniques et nucléasiques sont limitées lors de la préparation.

Le désoxycholate de sodium, détergent ionique souvent utilisé pour détacher les polysomes des membranes, donne des particules hétérogènes en centrifugation isopycnique. Cet effet n'est pas observé avec le TRITON X-100. Les deux détergents toutefois, ne modifient pas l'activité de biosynthèse protéique in vitro des polysomes.

La résultante des stabilités des mRNA des polysomes liés est inférieure à celle des polysomes libres.

Les polysomes liés ont une densité apparente de  $1,535\text{g/cm}^3$  en CsCl alors que les polysomes libres sont composés de deux types ( $1,56\text{g/cm}^3$  et  $1,545\text{g/cm}^3$ , appelés I et II respectivement) n'ayant pas de caractéristiques distinctes en gradient linéaire de saccharose.

L'étude de ces 3 types de polysomes montre que :

1°- Après action ménagée de la RNase, les 3 types de polysomes ne donnent qu'un seul type des monoribosomes de densité  $1,55\text{g/cm}^3$ .

2°- Lors de la séparation des polysomes libres et liés sur gradient discontinu de saccharose, le type II est plus longtemps retenu à l'interphase où se situe le réticulum granulaire.

3°- Le jeûne fait décroître la proportion des polysomes de type II et accroît celle des polysomes de type I.

Ces résultats suggèrent l'existence de mRNP différentes au niveau des trois types de polysomes. Les polysomes de type II, prépondérants lorsque l'induction de la formation des polysomes est favorisée, pourraient être liés de façon très labile aux membranes du réticulum endoplasmique.

BIBLIOGRAPHIE



- 1- FAWCETT, D.W. (1955).  
J. Nat. Cancer Inst. 15, 1475.
- 2- PALADE, G.E., SIEKEVITZ, P. (1956).  
J. Biochem. Biophys. Cytol. 2, 171.
- 3- PALADE, G.E. (1958). Microsomal Particles and Protein synthesis.  
ROBERTS, R.B., Ed. (Pergamon Press, New York) p. 36.
- 4- SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E. (1960).  
J. Biochem. Biophys. Cytol. 7, 619.
- 5- PETERS, T. (1962).  
J. Biol. Chem. 237, 1136.
- 6- SARGENT, J.R., CAMPBELL, P.N. (1965).  
Biochem. J. 96, 134.
- 7- HIGASHI, T., PETERS, T. (1963).  
J. Biol. Chem. 238, 3952.
- 8- BREW, K., VANAMAN, T.C., HILL, R.L. (1968).  
Proc. Natl. Acad. Sei. U.S. 59, 491.
- 9- ASKONAS, B.A., WILLIAMSON, A.R. (1968).  
Biochem. J. 109, 637.
- 10- REDMAN, C.M. (1969).  
J. Biol. Chem. 244, 4308.
- 11- TANAKA, T., OGATA, K. (1971).  
J. Biochem. 70, 693.
- 12- TAKAGI, T., TANAKA, T., OGATA, K. (1969).  
J. Biochem. 65, 651.
- 13- CAMPBELL, P.N., GREENGARD, O., KERNOT, B.A. (1960).  
Biochem. J. 74, 107.
- 14- SCHREIBER, G., ROTERMUND, H.M., MAENO, H. WETGAND, K., LESCH, R. (1969).  
Eur. J. Biochem. 10, 355.
- 15- HICKS, S.J., DRYSDALE, J.W., MUNRO, H.N. (1969).  
Science 164, 584.
- 16- GANOZA, M.C., WILLIAMS, C.A. (1969).  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 63, 1370.
- 17- VASSALI, P., LISOWSKA-BERNSTEIN, B., LAMM, M.E., BENACERRAF, B. (1967)  
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 58, 2422.

- 18- BREVAN, M.J. (1971).  
Biochem. J. 122, 5.
- 19- GOLDBERG, B., GREEN, H. (1967).  
J. Mol. Biol. 26, 1.
- 20- PERMUTT, M.A., KIPNIS, D.M. (1972).  
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 69, 505.
- 21- KONIJN, A.M., BALIGA, B.S., MUNRO, H.N. (1973).  
FEBS Lett. 37, 249
- 22- TAKAGI, T., OGATA, K. (1972).  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 1069.
- 23- RAGNOTTI, G., LAWFORD, G.R., CAMPBELL, P.N. (1969).  
Biochem. J. 112, 715.
- 24- CAMPBELL, P.N. (1970).  
FEBS Lett. 7, 1.
- 25- ARIAS, I.M., DOYLE, D., SCHIMKE, R.T. (1969).  
J. Biol. Chem. 244, 3303.
- 26- KURIYAMA, Y., OMURA, T., SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E. (1969).  
J. Biol. Chem. 244, 2017.
- 27- SABATINI, D., BORGESE, N., ADELMAN, M., KREIBICH, G., BLOBEL, G. (1972).  
Studies on the membrane associated protein synthesis apparatus of eucaryotic cells. Proceedings of the eighth FEBS meeting. (North-Holland/American Elsevier) p. 147.
- 28- LOEB, J.N., HOWEL, R.R., TOMKINS, G.M. (1967).  
J. Biol. Chem. 242, 2069.
- 29- TANAKA, T., TAKAGI, M., OGATA, K. (1970).  
Biochim. Biophys. Acta, 224, 507.
- 30- NOMURA, M., LOWRY, C.V. (1967).  
Proc. Nat. Sci. Acad. U.S.A. 58, 946.
- 31- CLAUDE, A. (1941).  
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 9, 263.
- 32- SCHNEIDER, W.C., HOGEBOOM, G.U. (1951).  
Cancer Res. 11, 1.
- 33- DALLNER, G. (1963).  
Acta path. Microbiol. Scan. Suppl., 166.

- 34- REID, E. (1967).  
Enzyme Cytology. ROODYN, D., Ed. (Acad. Press, New York) p. 321.
- 35- PALADE, G.E., SIEKEVITZ, P. (1956).  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 171.
- 36- CUNNINGHAM, W.P., CRANE, F.L. (1966).  
Expl. Cell Res. 44, 31.
- 37- TENG, C.S., HAMILTON, T.H. (1967).  
Biochem. J. 105, 1091.
- 38- LIM, L., ADAMS, D.H. (1967).  
Biochem. J. 104, 229.
- 39- SIEKEVITZ, P. (1956).  
Expl. Cell Res. Suppl., 7, 90.
- 40- FAWCETT, D.W. (1964).  
Intracellular Membrane Structure. SENDO, S., COWDRY, E.V., Ed. (Acad. Press, New York) p. 15.
- 41- ERNSTER, I., SIEKEVITZ, P., PALADE, G. (1962).  
J. Cell. Biol. 15, 541.
- 42- MOULE, Y., ROUILLER, C., CHAUVEAU, J. (1960).  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 547.
- 43- CHAUVEAU, J., MOULE, Y., ROUILLER, C., SCHNEEBELI, J. (1962).  
J. Cell. Biol. 12, 17.
- 44- HALLINAN, T., MUNRO, H.N. (1965).  
Biochim. Biophys. Acta. 108, 285.
- 45- HAWTREY, A.D., SCHIRREN, V. (1962).  
Biochem. Biophys. Acta. 61, 477.
- 46- DALLNER, G., NILSSON, R. (1966).  
J. Cell. Biol. 31, 181.
- 47- BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., BENEDETTI, E.L. (1964).  
Biochim. Biophys. Acta. 87, 177.
- 48- BLOEMENDAL, H., DE VRIES, M., BENEDETTI, E.L. (1967).  
Biochem. J. 103, 177.
- 49- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1966).  
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 55, 1283.

- 50- TATA, J.R. (1967).  
*Nature, Lond.* 213, 566.
- 51- ADELMAN, M.R., BLOBEL, G., SABATINI, D.D. (1973).  
*J. Cell. Biol.* 56, 191.
- 52- SCHNEIDER, W.C., HOGEBOOM, G.H. (1951).  
*Cancer Res.* 11, 1.
- 53- ARLINGHAUS, R.B., ASCIONE, R. (1972).  
*Protein Biosynthesis in Nonbacterial Systems.*  
LAST, J. A., LASKIN, A.I., Ed. (DEKKER, M., Inc. New York) 2, 49.
- 54- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1967).  
*J. Mol. Biol.* 26, 279.
- 55- LEWIS, J.A., TATA, J.R. (1973).  
*Biochem, Soc. Trans.* 1, 585.
- 56- ADELMAN, M.R., SABATINI, D.D., BLOBEL, G. (1973).  
*J. Cell. Biol.* 56, 206.
- 57- REDMAN, C.N., SABATINI, D.D. (1966).  
*Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 56,
- 58- BONT, W.S., BLOEMENDAL, H. (1967)  
*Arch. Biochem. Biophys.* 119, 36.
- 59- VENKATESAN, N., STEELE, W.J. (1972).  
*Biochim. Biophys. Acta* 287, 526.
- 60- CLIFFORD, A.J., RIUMALLO, J.A., BALIGA, B.S., MUNRO, H.R., BROWN, P.R. (1972).  
*Biochim. Biophys. Acta.* 227, 443.
- 61- HENSHAW, E.C., BOJARSKI, T.B., HIATT, H.H. (1963).  
*J. Mol. Biol.* 7, 122.
- 62- CAMPBELL, P.N., COOPER, C., HICKS, M. (1964).  
*Biochem. J.* 92, 225.
- 63- CAMPBELL, P.N., SERCK-HANSEN, G., LOWE, E. (1965).  
*Biochem. J.* 97, 422.
- 64- CAMPBELL, P.N., LOWE, E., SERCK-HANSEN, G. (1967).  
*Biochem. J.* 103, 280.
- 65- RAGNOTTI, G., CAJONE, F., BERNELLI-ZAZZERA, A. (1970).  
*Expl. Molec. Path.* 13, 295.

- 66- MACDONALD, R.I., KORNER, A. (1971).  
FEBS Lett. 13, 62.
- 67- RAGNOTTI, G., LAWFORD, G.R., CAMPBELL, P.N. (1969).  
Biochem. J. 112, 139.
- 68- RAGNOTTI, G. (1971).  
Biochem. J. 125, 1049.
- 69- DISSOUS, C., D.E.A., Lille. (1972).
- 70- HUNTER, A.R., KORNER, A. (1966).  
Biochem. J. 100, 73.
- 71- ARLINGHAUS, R.B., ASCIONE, R. (1972).  
Protein Biosynthesis in Nonbacterial Systems.  
LAST, J. A., LASKIN, A.I., Ed. (DEKKER, M., Inc. New York) 2, 49.
- 72- HUSTON, R.L., SCHRADER, G.R., HONOLD, G.R., BEECHER, G.R., COOPER, W.K.,  
SAUBERLICH, H.E. (1969).  
Biochim. Biophys. Acta. 209, 220.
- 73- FAIFERMAN, I., CORNUDELLA, L., POGO, A.O. (1971).  
Nat. New Biol. 233, 234.
- 74- OLNES, S., HEIBERG, R., PIHL, A. (1972).  
Biochim. Biophys. Acta. 272, 75.
- 75- TALAL, N., KALTREIDER, H.B. (1968).  
J. Biol. Chem. 243, 6504.
- 76- NORMAN, M., GAMULIN, S., CLARK, K. (1973).  
Biochem. J. 134, 387.
- 77- WILSON, S.H., HILL, A.Z., HOAGLAND, N.B. (1967).  
Biochem. J. 103, 567.
- 78- WILSON, S.H., HOAGLAND, N.B. (1967).  
Biochem. J. 103, 561.
- 79- SINGER, R.H., PENMAN, S. (1972).  
Nature 240, 100.
- 80- NORDGREN, H., STENRAM, V. (1972).  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1832.
- 81- LEE, S.Y., BRAWERMAN, G. (1971).  
Biochemistry 10, 510.
- 82- OLSNES, S. (1971).  
Eur. J. Biochem. 23, 248.

- 83- SABATINI, D.D., TASHIRO, Y., PALADE, G.E. (1966).  
J. Mol. Biol. 19, 503.
- 84- REDMAN, C.M. (1967).  
J. Biol. Chem. 242, 761.
- 85- BAGLIONI, C., BLEIBERG, I., ZAUDERER, M. (1971).  
Nat. New. Biol. 232, 8.
- 86- ROSEBASH, M., PENMAN, S. (1971).  
J. Mol. Biol. 59, 227.
- 87- TAKAGI, T., OGATA, K. (1972).  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 1069.
- 88- BLOBEL, G., POTTER, J.R. (1967).  
J. Mol. Biol. 26, 293.
- 89- ENWONHRU, C.O., STREEBNY, L.M. (1971).  
J. Nutri. 101, 501.
- 90- ONISHI, T. (1970).  
J. Biochem. (Tokyo) 67, 577.
- 91- DUPUY, C., D.E.A., Lille. (1972).
- 92- BALTIMORE, D., HUANG, A.S. (1968).  
Science 162, 572.
- 93- LOWRY, O.W., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951).  
J. Biol. Chem. 193, 265.

