

N° d'ordre : 685

50376
1978
169

50376
1978
169

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Claudie VERWAERDE

MISE AU POINT DE METHODES D'ISOLEMENT D'UN COMPLEXE
MITOCHONDRIE - RETICULUM ENDOPLASMIQUE
D'HEPATOCYTE DE RAT



Membres du Jury :

MM.	J. MONTREUIL	Président
	J. KREMBEL	Rapporteur
	J.H. WEIL	} Examineurs
	A. CAPRON	

Présenté le 14 juin 1978

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M. MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (Et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie

M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Géologie
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GERVAIS Michel	Gestion des Entreprises
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NOTELET Francis	Electrotechnique
M. NUSSEMBAUM Maurice	Sciences Economiques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

M^{lle} SPIK Geneviève
M. STANKIEWICZ François
M. STERBOUL François
M. TAILLEZ Roger
M. THERY Pierre
M. TOP Gérard
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WALLART Francis
M. WERNER Georges
M^{me} ZIN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Sciences Economiques
Informatique
Biologie
Electronique
Sciences Economiques
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Chimie
Informatique
Algèbre

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 des publications suivantes :

The use of metrizamide as a density-gradient medium in studies of rat-liver polysomes.

C. DISSOUS, C. LEMPEREUR, C. VERWAERDE et J. KREMBEL.
Eur. J. Biochem. 64, 361 (1976).

Free and membrane-bound polysomes from rat-liver.

I - Improvements of subcellular fractionation.

C. DISSOUS, C. VERWAERDE, C. LEMPEREUR et J. KREMBEL.
Eur. J. Biochem. 83, 5 (1978).

Free and membrane-bound polysomes from rat-liver.

II - Recovery of large free and membrane-bound polysomes.

C. DISSOUS, C. LEMPEREUR, C. VERWAERDE et J. KREMBEL.
Eur. J. Biochem. 83, 17 (1978).

Ainsi que d'une présentation sous forme d'affiche :

Polysomes libres et liés d'hépatocyte de rat : Intérêt de la centrifugation en métrizamide.

C. DISSOUS, C. VERWAERDE, C. LEMPEREUR et J. KREMBEL.
Journées Biochimiques Franco-Belges (Lille, 1976).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I - EXISTENCE DE POLYSOMES LIES	p. 1
II - ROLE DES POLYSOMES LIES	
III - PROBLEMES POSES PAR L'ETUDE DES POLYSOMES LIES	p. 2
IV - LE COMPLEXE MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE EST-IL UN ARTEFACT ?	p. 4
V - AVANTAGES QUE POURRAIT PRESENTER UN TEL COMPLEXE DANS LA CELLULE	p. 7

METHODOLOGIE

A - SOLUTIONS	p. 9
B - PREPARATION DU COMPLEXE MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE	p. 9

- 1) *Par flottaison en saccharose concentré*
 - a) Homogénat
 - b) Complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique
 - c) Lavage de la fraction mitochondriale

- 2) *Par centrifugation différentielle en gradient discontinu*
 - a) Homogénat
 - b) Complexe brut mitochondrie-reticulum endoplasmique
 - c) Elimination des noyaux et des érythrocytes de NCp

C - PROCÉDES DE MARQUAGE

p. 13

1) RNA

2) *Membranes*

D - MESURES DE RADIOACTIVITE

p. 13

E - METHODES BIOCHIMIQUES D'ANALYSE

p. 13

1) *Dosage du RNA*

2) *Dosage des protéines*

3) *Dosage du DNA*

4) *Mesure des activités des enzymes marqueurs*

a) *Glucose-6-phosphatase*

b) *Monoamine oxydase*

c) *Cytochrome c oxydase*

d) *Phosphatase acide*

e) *Catalase*

f) *Uricase*

F - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

p. 18

1) *Inclusion des fractions dans une résine*

a) *Traitement des fractions*

b) *Observation*

2) *Coloration négative*

ISOLEMENT D'UNE FRACTION MITOCHONDRIE- RETICULUM ENDOPLASMIQUE PAR FLOTTAISON EN SACCHAROSE CONCENTRE

I - DEFINITIONS DES CONDITIONS OPTIMALES D'HOMOGENEISATION	p. 22
1) <i>Milieu d'homogénéisation</i>	
a) Ions magnésium	
b) Choix du pH	
2) <i>Conditions d'homogénéisation</i>	
II - PREPARATION D'UNE FRACTION MITOCHONDRIALE PAR FLOTTAISON EN SACCHAROSE CONCENTRE	p. 23
1) <i>Principe</i>	
2) <i>Homogénat</i>	
3) <i>Fractionnement</i>	
III - DONNEES ANALYTIQUES DE CETTE FRACTION MITOCHONDRIALE	p. 30
1) <i>Contenu en RNA, DNA et protéines</i>	
2) <i>Caractérisation des différents organites cellulaires</i>	
3) <i>Nature du RNA présent dans la fraction mitochondriale</i>	
IV - DONNEES MORPHOLOGIQUES	p. 37
V - ETUDE DE L'INTERACTION MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE	p. 37
VI - CONCLUSION	p. 44

COMPLEXE MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE OBTENU PAR CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE EN GRADIENT DISCONTINU

I - INFLUENCE DES IONS SUR LE COMPLEMENT DES ORGANITES EN CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE	p. 47
II - PREPARATION DU COMPLEXE RETICULUM ENDOPLASMIQUE- MITOCHONDRIE	p. 47
III - ANALYSE BIOCHIMIQUE DE LA FRACTION NC _p	p. 51
IV - ELIMINATION DES NOYAUX ET DES ERYTHROCYTES DE LA FRACTION NC _p : OBTENTION DE LA FRACTION C _p	p. 54
1) Par centrifugation différentielle (Méthode 1)	
2) Par flottaison en saccharose concentré (Méthode 2)	
V - TENEUR EN POLYSOMES LIBRES ET EN RNA SOLUBLE DE LA FRACTION C _p	p. 58
VI - OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE LA FRACTION C _p	p. 60
VII - CONCLUSION	p. 66
CONCLUSION	p. 67
RESUME	p. 69

ABREVIATIONS

- mRNA : *Acide ribonucléique messenger*
- Tris : *2-amino-2-hydroxyméthyl-propanediol-1,3*
- Te : *Triéthanolamine*
- EDTA : *Ethylène diamine tétra-acétique acide*
- TCA : *Acide trichloracétique*
- PCA : *Acide perchlorique*
- NCp : *Complexe brut mitochondrie-reticulum endoplasmique*
- Cp : *Complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique purifié*
- cpm : *Coups par minute*
- sac. : *saccharose*
- g_{max} : *accélération au rayon maximal*
- d : *densité en g/cm^3*

INTRODUCTION

I - EXISTENCE DE POLYSOMES LIES

Les polysomes de cellules de mammifère peuvent être distingués morphologiquement et biochimiquement sous deux formes. Une classe de ribosomes existe apparemment libre dans le cytoplasme, tandis que l'autre est associée étroitement au reticulum endoplasmique (1). Le nom de reticulum endoplasmique granulaire ou encore d'ergastoplasme fut donné aux membranes portant des ribosomes.

Le taux de polysomes liés varie énormément d'une cellule à une autre. Cette proportion est en étroite relation avec l'activité sécrétrice de la cellule envisagée (2-3). Ainsi les cellules acini du pancréas (qui exportent des granules de zymogène) ou encore les plasmocytes (qui sont le site de synthèse des immunoglobulines) ont la majorité de leurs ribosomes attachés aux membranes (4). A l'opposé, les cellules embryonnaires et les cellules tumorales dédifférenciées qui ne présentent aucune activité sécrétrice ont un taux de reticulum endoplasmique granulaire très faible. La cellule parenchymateuse de foie de rat est une cellule intermédiaire avec environ 75 % de polysomes liés pour 25 % de polysomes libres (5).

II - RÔLE DES POLYSOMES LIES

Ces observations ont conduit PALADE et SIEKEVITZ à émettre l'hypothèse selon laquelle les polysomes libres seraient responsables de la synthèse des protéines intracellulaires tandis que les protéines destinées à être sécrétées seraient synthétisées au niveau des polysomes liés (6). De nombreux travaux ont permis par la suite d'étayer cette hypothèse. PETERS fut le premier à montrer que l'albumine est synthétisée au niveau des polysomes liés (7). C'est également le cas des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines qui sont des produits de synthèse spécifiques de cette classe de polysomes (8). Les chaînes peptidiques synthétisées seraient alors transportées à l'intérieur

des membranes - au niveau des cisternae - vers l'extérieur de la cellule. Ceci a pu être montré, dans le cas de la production de l'albumine, par PETERS (7) puis par SARGENT et CAMPBELL (9).

Lors d'une stimulation de la croissance d'une cellule, on peut observer, en réponse à la demande accrue de synthèse de protéines, une augmentation du reticulum endoplasmique. D'un autre côté, dans les cellules à activité sécrétrice, la quantité de protéines de sécrétion est seulement légèrement modifiée durant la période de croissance active (10). Le problème n'est donc pas aussi simple qu'il y paraissait au premier abord et, à l'heure actuelle, le concept selon lequel les polysomes liés sont impliqués uniquement dans la synthèse de protéines de sécrétion n'est plus tout à fait absolu. Ainsi, dans le cerveau, organe non sécréteur, une synthèse très active a été démontrée au niveau des polysomes liés aux membranes (11 - 12). Chez les bactéries, ces derniers seraient responsables dans certains cas de la production de protéines intracellulaires (13). Enfin, dans l'hépatocyte, certaines protéines membranaires et même cytoplasmiques sont synthétisées par la fraction liée des polysomes. C'est le cas notamment de la serine deshydratase (14 - 15), de protéines microsomales (16), d'une isoenzyme de la catalase (17), ou encore de certaines protéines mitochondriales insolubles (18 - 19 - 20).

La synthèse de protéines de divers organites au niveau des ribosomes liés aurait pour principal avantage de faciliter leur transport au niveau de leur lieu d'utilisation. Ce mécanisme serait donc identique au processus de décharge vectorielle observé pour les protéines sécrétées.

III - PROBLEMES POSES PAR L'ETUDE DES POLYSOMES LIES

Pour être valable, la préparation des polysomes liés devrait répondre nécessairement aux critères suivants :

- isolement d'une fraction représentative de reticulum endoplasmique, non contaminée par les polysomes libres
- préservation de l'intégrité structurale et fonctionnelle des polysomes liés
- respect de la (les) liaison (s) entre polysomes et membranes.

Il est très difficile de respecter simultanément ces différents critères, et quelle que soit la méthode de fractionnement cellulaire utilisée, elle ne répondra jamais complètement à ces exigences.

Chaque stade du fractionnement est une étape cruciale dans la préparation des polysomes liés. Ainsi, l'intensité et la durée de l'homogénéisation doivent faire l'objet d'un intérêt tout particulier. Elles doivent être suffisantes pour conduire à l'éclatement quantitatif des cellules mais elles ne doivent pas être trop fortes car elles provoquent alors l'altération de certains organites. C'est le cas, notamment, des noyaux et des lysosomes qui libèrent respectivement de la chromatine (qui emprisonne une partie des polysomes liés) et des ribonucléases (qui dégradent profondément les polysomes). Des forces de cisaillement trop fortes peuvent de plus provoquer certaines ruptures du mRNA.

L'étape suivante est certainement celle qui pose le plus de problèmes sur le plan quantitatif. En effet, lors de la préparation des noyaux et des mitochondries, plus de la moitié des polysomes liés se retrouvent au niveau du culot de centrifugation. Pour récupérer une partie de ces polysomes, certains auteurs réalisent deux lavages du culot, les nouveaux surnageants étant alors réunis au premier surnageant (21). Les actions mécaniques mises en jeu par un tel procédé conduisent malheureusement à une dégradation assez forte du mRNA des polysomes. De plus, on aboutit en général à un surnageant de volume important, ce qui constitue un handicap pour les études ultérieures. Pour diminuer les interactions des membranes entre elles d'une part et celles des membranes et des mitochondries d'autre part, ADELMAN et al. réalisent leur fractionnement dans un milieu dépourvu d'ions (22). Ce procédé permet d'obtenir la majorité du RNA cellulaire dans le surnageant mais provoque l'éclatement des lysosomes et ne permet donc plus l'étude des polysomes. Il faut également noter les travaux de VENKATESAN et STEELE (23) puis ceux de RAMSEY et STEELE (24) qui isolent les polysomes liés à partir d'un culot de centrifugation à grande vitesse d'un homogénat. Cette technique permet de travailler sur la presque totalité des polysomes liés mais ceux-ci ne présentent à leur maximum d'adsorbance que 10 ribosomes et sont contaminés par une fraction non négligeable de polysomes libres. Cette voie d'approche est donc à écarter et il est préférable de garder le schéma classique de fractionnement

cellulaire qui aboutit au surnageant post-mitochondrial et à la fraction mitochondriale constituée en partie de mitochondries fortement associées à du reticulum endoplasmique granulaire.

Il est peu probable que cette association importante entre ces deux éléments observée in vitro soit artéfactuelle et on envisage actuellement une signification physiologique à cet état de chose.

IV - LE COMPLEXE MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE EST-IL UN ARTEFACT ?

Le problème qui se pose est donc de savoir si l'association du reticulum endoplasmique avec les mitochondries observée in vitro est le reflet d'une situation qui existe in vivo.

L'observation au microscope électronique d'un hépatocyte de rat apporte des éléments en faveur de cette hypothèse. Comme le montrent les photographies de la PLANCHE I (p. 5), la majorité du reticulum endoplasmique granulaire se présente sous forme de larges empilements qui sont à proximité étroite des mitochondries, généralement dans la zone périnucléaire. Ces éléments longent la membrane externe des mitochondries et parfois entourent complètement celles-ci (voir PLANCHE II, p. 6). La fraction mitochondriale isolée par LEWIS et TATA présente la même morphologie (25). Une continuité entre la membrane externe des mitochondries et le reticulum endoplasmique a été en outre observée chez l'oignon et le foie de rat par FRANKE et KARTENBECK (26) et MORRE et al. (27).

De nombreuses données biochimiques permettent également de penser qu'une telle association existe. La difficulté présentée par la séparation de ces deux éléments est en elle-même une preuve indirecte. Les travaux de BLOBEL et POTTER (5) et ceux de SHORE et TATA (28) ont montré que seuls des procédés très durs, altérant profondément les structures, permettaient d'obtenir le reticulum endoplasmique de façon quantitative.

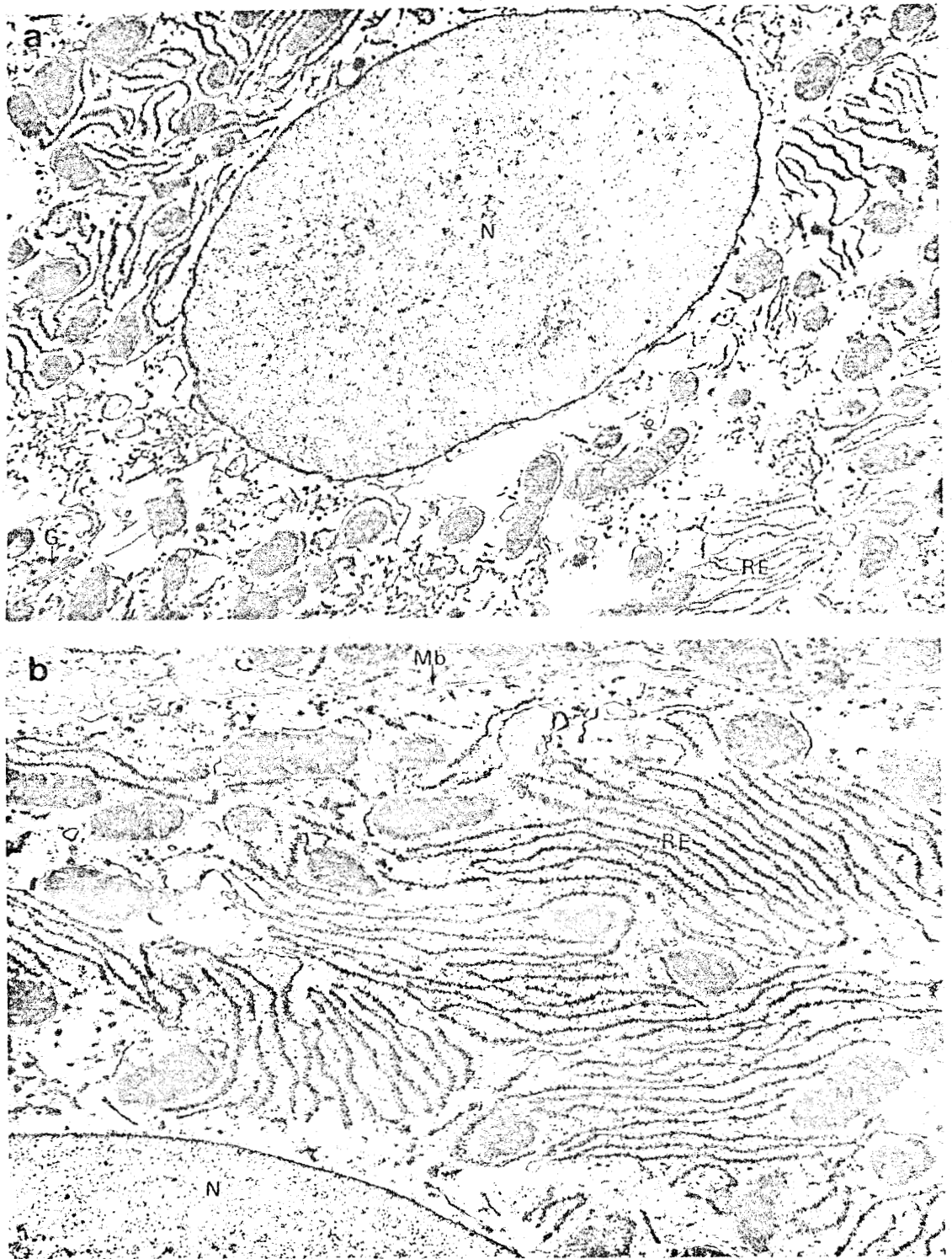


PLANCHE I : Hépatocyte de rat

N : noyau, Mb : membrane plasmique, M : mitochondrie,
RE : reticulum endoplasmique granulaire, G : Golgi

Grossissement : 599 (a), 15 000 (b)

Agrandissement : 2



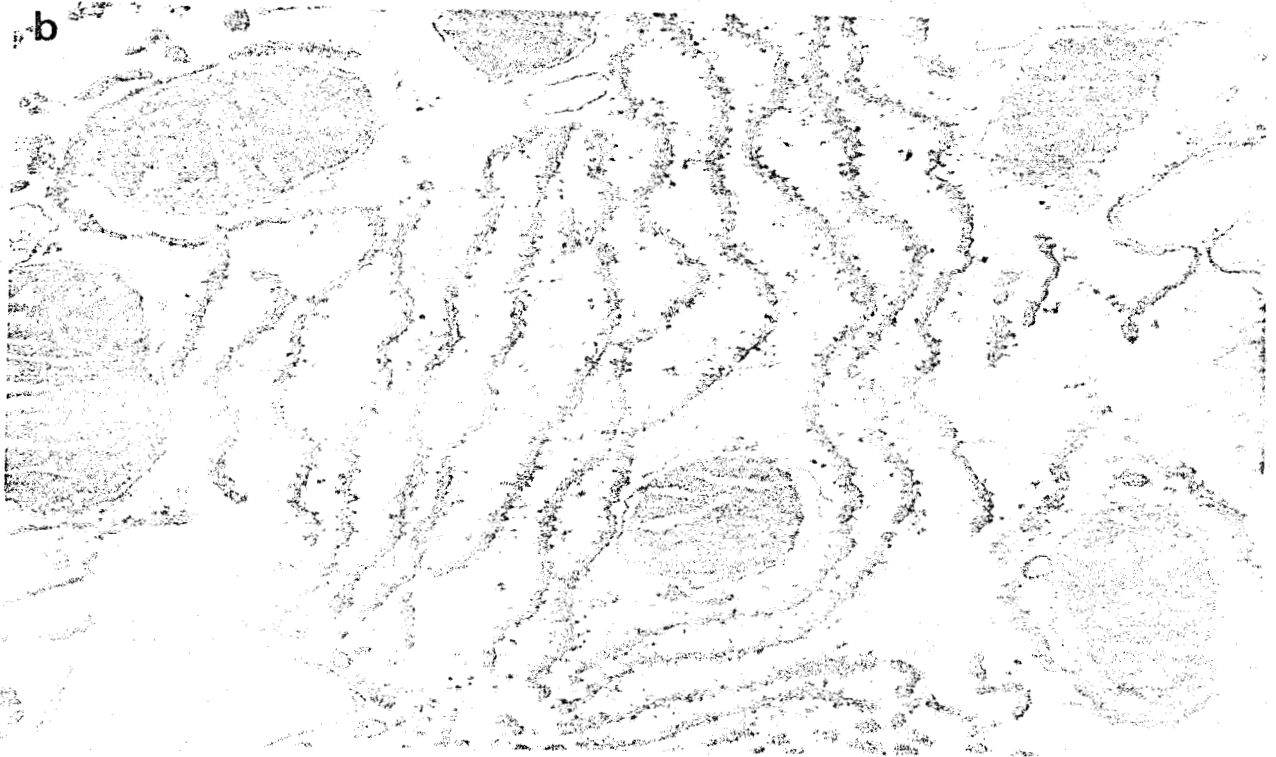


PLANCHE II : *Détails d'une cellule de foie de rat.*

On note la présence de larges empilements de membranes granulaires et leur fréquente association aux mitochondries.

Grossissement : 15 000 (a), 23 000 (b)

Agrandissement : 2



La mitochondrie est un organite assez particulier de la cellule, possédant une certaine autonomie. Elle renferme notamment des molécules de DNA fonctionnelles et, à l'heure actuelle, la synthèse indépendante de protéines dans les mitochondries est un fait bien établi. Néanmoins, le contenu en DNA (0,6 % du DNA cellulaire) est loin d'être suffisant pour permettre la production de toutes les protéines mitochondriales (29). KADENBACH fut le premier, en 1966, à montrer un transfert de protéines synthétisées par la fraction microsomale vers la mitochondrie (30). Depuis, on a pu montrer qu'une partie de la cytochrome c oxydase et que la glutamate deshydrogénase sont synthétisées au niveau des polysomes cytoplasmiques (18 - 20). Il est donc incontestable que des relations de nature physiologique existent entre certaines mitochondries et le reticulum endoplasmique.

V - AVANTAGES QUE POURRAIT PRESENTER UN TEL COMPLEXE DANS LA CELLULE

Il est très séduisant d'expliquer la proximité des mitochondries et du reticulum endoplasmique par une sorte de symbiose dont chacun des éléments tirerait profit.

Ainsi les polysomes liés pourraient tirer parti de cette association en se trouvant près de la source d'énergie de la cellule. En effet, la traduction du mRNA en protéines est un mécanisme très "énergie-dépendant". La présence de molécules riches en énergie est indispensable notamment pour la fixation de l' amino-acyl tRNA ou encore lors de la translocation.

La proximité d'une zone active de biosynthèse protéique pourrait présenter un avantage certain pour les mitochondries. Il est, en effet, raisonnable de penser que les protéines mitochondriales d'origine cytoplasmique sont produites par ces polysomes liés. Cette association faciliterait donc le transfert in vivo de protéines nouvellement synthétisées. D'éventuels pontages entre les membranes et la mitochondrie pourraient permettre un facile transport de ces protéines (26 - 27). Cependant, les travaux de SHORE et TATA tendent à prouver le contraire (28). Ces auteurs ont montré que les mitochondries qui sont associées au reticulum endoplasmique incorporent environ deux fois plus de

protéines cytoplasmiques que celles qui sont entourées de membranes cytoplasmiques. Il reste, néanmoins, à montrer que ces deux populations mitochondriales proviennent des mêmes hépatocytes. A cette fin, des travaux récents faisant intervenir une séparation des cellules de foie de rat en fonction de leur densité pourraient s'avérer très utile (31).

Quelles que soient les interactions qui existent entre ces deux éléments, l'étude du complexe reticulum endoplasmique-mitochondrie est une étape importante à franchir dans la compréhension du métabolisme de la cellule. Elle introduit, en outre, une idée nouvelle, celle de la régulation par compartimentation de la synthèse des protéines.

Notre travail a consisté à isoler un complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique de pureté satisfaisante, en respectant au maximum la structure des polysomes liés et la liaison polysome-membrane. Deux méthodes de préparation ont été mises au point, l'une basée sur la densité des particules, l'autre sur leur coefficient de sédimentation. Elles font intervenir des actions mécaniques minimales et limitent le phénomène d'agrégation possible des organites cellulaires.

METHODOLOGIE

Dans ce chapitre sont regroupées les principales méthodes que nous avons utilisées lors de nos travaux. Cependant, pour certaines expériences, des détails particuliers sont insérés en italique dans le texte sous forme de "PROTOCOLES EXPERIMENTAUX".

A - SOLUTIONS

Toutes les solutions sont réalisées avec de l'eau déminéralisée bidistillée.

Les compositions des solutions principales sont consignées dans le tableau de la page suivante.

B - PREPARATION DU COMPLEXE MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Des rats mâles de souche SPRAGUE-DAWLEY (IFFA CREDO) sont utilisés dans toutes les expériences. Les animaux sont sacrifiés par décapitation et, après exsanguination, leur foie est rapidement prélevé et plongé dans le milieu d'homogénéisation préalablement refroidi à 0°C. Toutes les opérations ultérieures sont réalisées entre 0 et 4°C.

Après plusieurs rinçages dans le milieu d'homogénéisation, les foies sont séchés sur de la gaze stérile et broyés dans l'appareil de Fischer (muni d'une grille avec trous de 1 mm²).

1) *Par flottaison en saccharose concentré :*

a) Homogénat :

Le broyat, pesé dans un bécher contenant un poids connu de milieu A, est homogénéisé dans 1,5 fois son poids de ce milieu à l'aide d'un homogénéiseur manuel de DOUNCE de 40 ml par 2 allers-retour avec le piston lâche (jeu de 0,15 mm) suivis de 5 allers-retour avec le piston serré (jeu de 0,07 mm). L'homogénat ainsi obtenu est filtré sur 4 épaisseurs de gaze et 3 volumes d'une solution de saccharose 2,45 M ($d = 1,31 \text{ g/cm}^3$) réalisé en tampon TKM5 sont ajoutés.

Le mélange est réalisé par inversion répétée du récipient et a une molarité finale en saccharose de 1,89 M.

TABLEAU I

Composition des principales solutions

Solution	Composition	Utilisation
TKM5	Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 à 20°C KCl 25 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ 5 mM	Préparation du complexe par flottaison en saccharose concentré
Milieu A	TKM5 - saccharose 0,25 M	Milieu d'homogénéisation
TKM3	Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 à 20°C KCl 25 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ 3 mM	Préparation du complexe par centrifugation différentielle en gradient discontinu
Milieu B	TKM3 - saccharose 0,25 M	Milieu d'homogénéisation
Te-KM5 Te-KM3	Homologues du TKM5 et du TKM3 où la triéthanolamine-HCl remplace le Tris-HCl	Analyses des fractions en microscopie électronique
TK _x My	Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 à 20°C Concentration variable en K ⁺ (x) et en Mg ⁺⁺ (y)	Lavage de la fraction mitochondriale obtenue en saccharose concentré



b) Complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique :

15 ml d'homogénat (correspondant à 1,5 g de foie) sont déposés au fond d'un tube de rotor SW 25-1 et recouverts de 8 ml de saccharose 1,8 M, 4 ml de saccharose 1,6 M et 1 ml de saccharose 0,25 M réalisés dans le tampon TKM5.

Après centrifugation à 18 000 tours/mn pendant 1 h 30 (46 800 g_{max}), le tube est fractionné par le fond. Les premiers 16 ml correspondent à l'équivalent d'un surnageant post-mitochondrial classique, les 10 ml suivants constituent la fraction mitochondriale, les derniers ml renferment les hématies et les débris cellulaires et sont ajoutés au "surnageant post-mitochondrial" ainsi que le culot de noyaux pour les analyses ultérieures.

c) Lavage de la fraction mitochondriale :

A 3 ml de fraction mitochondriale sont ajoutés 1,8 ml de tampon TKxMy (concentration finale en saccharose : 1,08 M). Les mélanges sont ensuite centrifugés à 15 000 tours/mn pendant 10 mn dans le rotor SW 50-1. Le surnageant est prélevé et un dosage de RNA est réalisé sur les différentes fractions (fraction mitochondriale, culot de centrifugation et surnageant de lavage).

2) *Par centrifugation différentielle en gradient discontinu :*

a) Homogénat :

Le foie est homogénéisé dans 3 volumes de milieu B et filtré sur de la gaze suivant le protocole décrit précédemment.

b) Complexe brut mitochondrie-reticulum endoplasmique : NCp :

Des fractions aliquotes de 8 ml d'homogénat (correspondant à 2 g de foie) sont déposées sur 6 ml de saccharose 0,25 M - 40 % D20 réalisés en tampon TKM3. Après 10 mn de centrifugation à 2000 tours/mn dans le rotor SW 27-1 (7400 g_{max} -mn, taux d'accélération 1 de la centrifugeuse L5 65B (Beckman), 11 ml de surnageant sont aspirés à l'aide d'une seringue et 5 ml de milieu B sont ajoutés sur le culot. Les tubes sont alors bouchés avec des morceaux de parafilm et les culots remis en suspension par inversion répétée.

Après centrifugation à 2000 tours/mn pendant 8 mn, 5 ml de surnageant sont prélevés et 5 ml de milieu B sont ajoutés. Les culots sont remis en suspension de la même manière que précédemment. 4 ml de saccharose 0,25 M - 40 % D20 sont alors poussés à l'aide d'une seringue au fond du tube et les tubes sont centrifugés 10 mn à 2000 tours/mn. 9 ml de surnageant sont prélevés. Les 3 ml restant dans le tube renferment la fraction brute mitochondrie-reticulum endoplasmique.

c) Elimination des noyaux et des érythrocytes de NCp :

- *méthode 1* : Cette méthode est dérivée de celle de HOGEBROOM (32) et similaire à celle de LEWIS et TATA (25).

Chaque fraction NCp est mélangée à 5 ml de saccharose 0,3 M, Tris-HCl 5 mM, pH 7,6 à 20°C, et Mg(CH₃COO)₂ 0,5 mM par inversion douce du tube de centrifugation. 6 ml de saccharose 0,3 M - 40 % D₂O, Tris-HCl 5 mM, Mg(CH₃COO)₂ 0,5 mM sont poussés au fond du tube à l'aide d'une seringue. Les tubes sont ensuite centrifugés à 1500 tours/mn pendant 10 mn (5400 g_{max}-mn, rotor SW 27-1, taux d'accélération 1 de la centrifugeuse L5 65 B). Après centrifugation, nous obtenons les noyaux et les hématies sous forme de culot et le complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique dénommé Cp dans le surnageant. Ce dernier est prélevé à l'aide d'une seringue et réajusté en TKM3.

- *méthode 2* : Elle repose sur le schéma général de la préparation de noyaux en saccharose concentré (33), légèrement modifiée au laboratoire pour éviter au maximum les phénomènes d'agrégation.

Chaque NCp est transféré quantitativement dans un Erlen Meyer taré de 25 ml par rinçage du tube de centrifugation avec 3,3 ml de milieu B (poids final : 5,2 g) et ajusté, par pesée, en saccharose 1,75 M par addition d'une solution de saccharose 2,5 M réalisée en Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, KCl 25 mM, Mg(CH₃COO)₂ 5 mM (qsp 18,3 g).

12 ml du mélange sont déposés sur :

- saccharose 2 M en TKM5 : 1,5 ml

et recouverts de :

- saccharose 1,6 M en TKM5 : 3 ml

- saccharose 0,25 M en TKM5 : 0,5 ml

puis centrifugés dans le rotor SW 27-1 à 25 000 tours/mn pendant 25 mn (29.10^5 g_{\max} -mn). Les hématies, flottant sur le saccharose 1,6 M, sont prélevées et jointes au culot de noyaux, ainsi qu'au coussin de saccharose 2M et au matériel se trouvant à l'interphase saccharose 2M-dépôt pour les analyses ultérieures. La fraction intermédiaire renferme le complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique (fraction Cp).

C - PROCÉDES DE MARQUAGE

1) RNA :

Par injection intrapéritonéale d'acide orotique ($5-^3H$) (27 Ci/mMole), à raison de 1 mCi/kg, 18 heures avant le sacrifice nous obtenons un marquage uniforme du RNA.

2) Membranes :

Le marquage des phospholipides membranaires est obtenu par injection dans la cavité intrapéritonéale du rat de Choline ($1-2-^{14}C$) (20 mCi/mMole) (0,1 mCi/kg) 4 heures avant le sacrifice.

D - MESURES DE RADIOACTIVITE

Des fractions aliquotes sont précipitées par du TCA froid (concentration finale : 5 p. 100). Le précipité acido-insoluble est recueilli sur des disques de papier Whatman GF 83, lavé par du TCA froid à 5 p. 100 et abondamment par de l'eau distillée. Après séchage, les filtres sont introduits dans des fioles de comptage renfermant 10 ml de toluène contenant du Permablend III (Packard) (5,5 g/litre).

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide SL-31 (Intertechnique). Les corrections pour le fond et l'interférence du ^{14}C dans 3H sont ensuite effectuées.

E - METHODES BIOCHIMIQUES D'ANALYSE

1) Dosage du RNA

La méthode que nous utilisons au laboratoire combine une hydrolyse

préalable du RNA et un dosage du ribose des ribonucléotides libérés.

Des fractions aliquotes contenant moins de 1 mg de RNA sont additionnées d'un volume de PCA N stabilisé à 0°C. Après centrifugation à 4°C 10 mn à 3000 g, les culots sont lavés deux fois dans le PCA 0,5 N froid puis dissous dans 2,5 ml de KOH 0,5 N. Après 1 h d'hydrolyse à 37°C, 0,5 ml de HCl 4N sont ajoutés et les tubes sont centrifugés 10 mn à 3000 g.

Les ribonucléotides ainsi libérés sont ensuite dosés par le réactif de BIAL selon la méthode de MOULÉ (34).

2) *Dosage des protéines*

Nous utilisons la méthode de LOWRY et al. (35), la serumalbumine bovine nous servant d'étalon.

3) *Dosage du DNA*

Il est réalisé selon la méthode de GILLES et MYERS en prenant comme étalon le DNA de thymus de veau (36).

4) *Mesure des activités des enzymes marqueurs*

Les mesures d'activité enzymatique sont réalisées sur des fractions fraîchement isolées.

Dans chaque essai, l'aliquote de la fraction est choisie de façon à se placer dans la zone de concentration en enzyme où la vitesse de réaction est initiale.

a) *Glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9) (reticulum endoplasmique)*

Nous utilisons la méthode de BEAUFAY et al. (37).

- *protocole* : L'enzyme est incubée 30 mn à 37° dans un volume final de 1 ml contenant du glucose-6-phosphate 40 mM, de l'histidine-HCl 20 mM, pH 6,5 et de l'EDTA 1 mM. La réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA 8 p. 100 stabilisé à 0°C et les tubes sont centrifugés 10 mn à 5000 g.

Le phosphate inorganique est déterminé selon la technique de FISKE et SUBBAROW (38) de la façon suivante :

à 1,1 ml de surnageant dilué ou non sont mélangés successivement :

- 0,2 ml de molybdate d'ammonium à 8,3 p. 100
- 0,1 ml de mélange destructeur ($HClO_4/H_2SO_4$, v/v)
- 0,2 ml d'une solution d'amidol à 1 p. 100 dans du Na_2SO_3 à 20 p. 100

Après stabilisation de la coloration 1 h à l'obscurité, l'intensité de la coloration est lue à 725 nm contre un témoin blanc non incubé.

- *unité* : Les unités d'activité glucose-6-phosphatasique sont exprimées en μ Moles de Pi libérées par minute.

b) Monoamine oxydase (EC 1.4.3.4) (membrane externe de la mitochondrie)

- *principe* : Le dosage de cette enzyme est réalisé selon la méthode de STAHN et al. (39) et fait intervenir la transformation de la benzylamine en benzaldéhyde. La quantité de benzaldéhyde formée est déterminée par la mesure de la densité optique à 250 nm.

- *protocole* : A 1 ml de tampon phosphate de potassium 0,2 M, pH 7,5 sont ajoutés 0,1 ml de benzylamine sulfate 0,1 M puis, au temps 0, 0,9 ml de suspension cellulaire.

Après incubation 30 mn à 37°C sous agitation, la réaction est arrêtée par refroidissement dans un bain de glace et les tubes sont centrifugés 10 mn à 5000 g.

La lecture se fait à 250 nm contre un témoin blanc dans lequel la suspension cellulaire est remplacée par de l'eau. La quantité de benzaldéhyde formée est calculée à l'aide d'une gamme étalon (solution de benzaldéhyde de 0,02 à 0,2 μ Moles dans 2 ml du tampon d'expérience).

- *unité* : Les résultats sont ramenés en μ Moles de benzylamine sulfate hydrolysées par heure.

c) Cytochrome c oxydase (EC 1.9.3.1) (membrane mitochondriale interne)

- *principe* : L'activité de cette enzyme est mesurée en suivant l'oxydation du cytochrome c par la mesure de la densité optique à 550 nm selon la technique décrite par COOPERSTEIN et LAZAROW (40).
- *protocole* : La réaction est déclenchée par addition de 0,1 ml de suspension cellulaire à 3 ml de cytochrome c 44 μ M réduit par addition de quelques grains de hyposulfite de sodium, tampon phosphate de potassium 30 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM et Triton X-100 0,05 %.

La lecture de la densité optique à 550 nm se fait à intervalles de 20 secondes pendant 3 minutes contre un témoin blanc où la suspension cellulaire est remplacée par de l'eau.

- *expression des résultats* : Cette réaction obéit à une cinétique du 1er ordre. Le tracé du \log_{10} de la densité optique à 550 nm en fonction du temps donne une droite dont la pente est proportionnelle à l'activité enzymatique.

Unité : $\Delta \log \text{min}^{-1} \times 0,031$.

d) Phosphatase acide (EC 3.1.3.2) (lysosomes)

Nous utilisons la méthode décrite par WATTIAUX et DE DUVE (41).

- *protocole* : Une fraction aliquote de 0,1 ml de fraction cellulaire est incubée 30 mn à 37°C dans 0,9 ml de milieu contenant du β -glycérophosphate de sodium 50 mM dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5 à 20°C, et du Triton X-100 0,07 %. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de TCA 10 p. 100.

Après centrifugation à 5000 g pendant 10 mn, le phosphate inorganique est déterminé sur le surnageant comme décrit précédemment. Une légère modification a été apportée au laboratoire par l'utilisation de dodecyl sulfate de sodium (SDS) (0,1 ml de SDS à 1 % dans les 1,1 ml de surnageant dilué) pour éliminer le trouble dû à la présence du Triton X-100.

- *unités* : Il s'agit, comme pour la glucose-6-phosphatase, de μ Moles de Pi libérées par minute.

e) Catalase (EC 1.11.1.6) (peroxysomes)

L'activité de cette enzyme est déterminée selon la méthode de LEIGHTON et al. (42).

- *protocole* : A 0,2 ml de fraction cellulaire (traitée au Triton X-100 à 0,5 p. 100 final) sont ajoutés 0,5 ml d'une solution à 0,07 % de tampon imidazole-HCl 0,033 M, pH 7, contenant de l'eau oxygénée à 30 %. La réaction, réalisée dans un bain de glace, est arrêtée, après un temps variant de 1 à 5 minutes, par addition de 4 ml d'une solution de $TiOSO_4$ (réalisée de la façon suivante : 27 g de $TiOSO_4$ sont ajoutés à 4 litres de H_2SO_4 2N bouillant ; le mélange est filtré sur W42 et le filtrat ainsi obtenu est dilué avec 2 litres de H_2SO_4 2N).
- *expression des résultats* : La quantité de $TiOSO_4$ non oxydé restant est déterminée par la mesure de la densité optique à 405 nm, en prenant pour référence une gamme étalon obtenue avec l' H_2O_2 à concentration variable
Unité : l'unité d'activité est définie comme étant la quantité d'enzyme qui provoque la diminution du \log_{10} de la concentration en H_2O_2 d'une unité par minute dans un volume de 50 ml.

f) Uricase (EC 1.7.3.3) (peroxysomes)

Nous utilisons pour ce dosage une méthode décrite par REID (43).

- *protocole* : A 1 ml de suspension cellulaire sont ajoutés successivement 1 ml de tampon phosphate de potassium 5 mM, pH 7,4, Triton X-100 0,2 % et 1 ml de tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 7,4 contenant 86 μ g d'urate de sodium.

La variation de la densité optique est suivie à 292 nm pendant 5 mn à température ambiante.

- *expression des résultats* : Les résultats sont exprimés en μ Moles d'acide urique hydrolysé par minute.

F - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE *

1) *Inclusion des fractions dans une résine* :

a) *Traitement des fractions* :

- *fixation* : Nous utilisons la méthode de double fixation à la glutaraldéhyde et à l'acide osmique.

Dans le cas des fractions mitochondriales, la fixation se fait en suspension par addition d'une solution à 5 p. 100 de glutaraldéhyde (réalisée dans le milieu d'homogénéisation) (concentration finale : 1 p. 100) pendant 1 h à +4°C.

Après centrifugation, les culots sont post-fixés par de l'acide osmique à 2 p. 100 dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,4, saccharose 0,2 M pendant 1 h à température ambiante.

Pour le complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique obtenu en saccharose concentré, nous réalisons dans certains cas une dialyse de la fraction (1 nuit à + 4°C) entre les deux types de fixation.

Des petits morceaux de foie (1 mm x 1 mm) sont fixés par de la glutaraldéhyde à 2 p. 100 dans le milieu d'homogénéisation 1 h à + 4°C et, après plusieurs rinçages, par OsO₄ à 2 p. 100 dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,4, saccharose 0,2 M pendant 2 h à température ambiante.

* Nous remercions Monsieur le Professeur VIVIER de nous avoir permis de réaliser l'observation de nos fractions dans son laboratoire ainsi que Monsieur Jean-François DEBRUMETZ pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués.

- *déshydratation* : Elle est réalisée, par étapes progressives, en substituant l'eau par de l'éthanol redistillé selon la méthode de GLAUERT et al. (44). La fraction est placée successivement dans :

- éthanol	25 %	2 fois 15 mn
	60 %	" 15 mn
	75 %	" 15 mn
	95 %	" 15 mn
	100 %	3 fois 15 mn

Les fractions sont ensuite passées dans de l'oxyde de propylène à 100 % (2 bains de 30 mn), solvant qui permet une meilleure pénétration ultérieure de la résine.

- *inclusion* : Nous utilisons, comme milieu d'inclusion, un mélange d'Araldite de composition suivante :

- 1 volume d'Araldite
- 1 volume de durcisseur
- 12 gouttes d'accélérateur pour 10 ml de mélange

Les différentes étapes de l'inclusion sont les suivantes :

- 1 bain de mélange Araldite/oxyde de propylène 100 % (1/1) 30 mn
- 1 bain de mélange Araldite/oxyde de propylène 100 % (3/1) 30 mn
- Inclusion par polymérisation à 60°C pendant 60 h dans le mélange d'Araldite

b) Observation :

Les coupes sont obtenues à l'aide d'un ultramicrotome HT-1 PORTER-BLUM muni de couteaux de verre et recueillies sur des grilles en cuivre de 200 trous recouvertes d'une membrane de parlodion. Elles sont ensuite colorées par de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb selon la méthode de VENABLE et al. (45).

Un microscope de marque HITACHI modèle H 4 11E (fonctionnant sous un vide de 10^{-6} cm de Hg et à 50 000 V) a été utilisé pour les observations.

2) *Coloration négative* :

Une goutte de suspension membranaire est déposée sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de parlodion. Après 20 secondes, la grille est essorée uniformément et séchée. Elle est ensuite recouverte par une goutte d'une solution d'acide phosphotungstique à 2 % (ajustée à pH 7 avec NaOH) pendant 10 secondes et essorée uniformément.

G - PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

D-glucose-6-phosphate, β -glycérophosphate, cytochrome c proviennent de la SIGMA chemical company (St Louis, MISSOURI, U.S.A.).

La métrizamide est un don de NYEGAARD et Cie (Oslo, NORVEGE).

Les précurseurs radioactifs sont fournis par CEA (Saclay, FRANCE).

ISOLEMENT D'UNE FRACTION MITOCHONDRIE-
RETICULUM ENDOPLASMIQUE PAR FLOTTAISON EN SACCHAROSE CONCENTRE

Comme nous l'avons souligné dans le chapitre "INTRODUCTION", l'étude du complexe formé par les mitochondries et le reticulum endoplasmique s'avère très intéressante.

LEWIS et TATA furent, en 1973, les premiers à entreprendre des travaux sur une telle fraction. Leur étude reposait essentiellement sur des données morphologiques faisant ressortir l'analogie qui existe entre la fraction mitochondriale obtenue par centrifugation à faible vitesse d'un homogénat et ce qui peut être observé dans une cellule entière. Elle mettait également en évidence la haute résistance de ce complexe aux forces de cisaillement. Quelques années plus tard, SHORE et TATA réalisèrent une étude plus approfondie de cette fraction. Ces auteurs montrèrent notamment une différence de métabolisme entre les mitochondries associées à des fragments de membranes et celles qui ne le sont pas. Ceci semble donc confirmer que l'état morphologique particulier observé soit bien le reflet d'un état physiologique différent.

Cependant, la particularité d'une telle fraction pourrait s'exprimer aussi au niveau du reticulum endoplasmique associé aux mitochondries et plus particulièrement au niveau de polysomes qui y sont attachés. Nous pouvons en effet envisager des différences entre les polysomes liés de ce complexe et ceux obtenus à partir d'un surnageant post-mitochondrial. Ces différences pourraient s'exprimer soit au niveau des produits de synthèse, soit au niveau du mode d'attachement aux membranes, soit encore au niveau de la vitesse de renouvellement de ces polysomes. Un tel type d'étude implique la préservation structurale et fonctionnelle de ces polysomes.

Nous avons entrepris d'isoler un complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique présentant une pureté satisfaisante en évitant au maximum tout procédé entraînant la dégradation du mRNA des polysomes. La centrifugation différentielle est la technique généralement utilisée pour la préparation d'une fraction mitochondriale mais pose le problème de la cosédimentation des différents organites cellulaires. Nous avons donc mis au point une méthode qui repose sur une flottaison du complexe dans des solutions concentrées de saccharose. On obtient ainsi, en une seule étape, une fraction mitochondriale exempte de noyaux.

I - DEFINITION DES CONDITIONS OPTIMALES D'HOMOGENEISATION

1) Milieu d'homogénéisation :

Lors de l'homogénéisation, la cellule est placée dans un milieu artificiel. Ce dernier doit se rapprocher, le plus possible, du milieu cellulaire du point de vue des ions, de la pression osmotique et du pH. La composition du milieu utilisé varie énormément en fonction du type d'étude à laquelle on s'intéresse et d'un auteur à un autre. Mais dans le cas de l'analyse des polysomes libres et liés, elle tend à s'uniformiser et le milieu d'homogénéisation que nous avons utilisé pour nos travaux est celui qui est employé par la majorité des auteurs. Néanmoins, il est important de préciser certains détails :

a) Ions magnésium :

Il est reconnu que l'introduction de magnésium dans le milieu d'homogénéisation est indispensable pour préserver l'intégrité des polysomes, cet ion jouant un rôle dans la structure du RNA (46). Sa concentration est en général de 2,5 à 10 mM. Une concentration beaucoup plus faible pourrait conduire à une désagrégation des polysomes, tandis qu'une concentration plus élevée entraîne la formation d'agrégats notamment entre les membranes, et entre les membranes et les mitochondries (47).

b) Choix du pH :

Bien que les polysomes soient stables dans une zone de pH assez large, ils sont généralement isolés à une valeur de pH de 7,6 car c'est à ce pH qu'ils présentent une activité optimale en biosynthèse protéique. Cependant, certains auteurs déclarent que l'utilisation d'un pH alcalin (28) est indispensable pour préserver l'intégrité structurale des polysomes. Nous avons pu montrer au laboratoire que cette condition n'est pas nécessaire et que des polysomes lourds peuvent être obtenus au pH optimal de 7,6.

2) Conditions d'homogénéisation :

Pour obtenir un homogénat idéal, il faudrait réaliser un éclatement cellulaire total sans altérer les différents organites de la cellule.

Cependant, la rupture des cellules ne se fait que de façon progressive et les organites libérés en début d'homogénéisation sont soumis aux forces de cisaillement nécessaires pour rompre les cellules encore entières. Il faut donc arrêter l'homogénéisation dès que l'éclatement cellulaire maximal est obtenu.

Dans le cas du foie du rat, deux types d'instruments sont utilisés pour rompre ces cellules : l'appareil de POTTER-ELVEHJEM ou l'homogénéiseur de DOUNCE. Nous avons préféré le "DOUNCE", appareil manuel, à l'appareil de POTTER-ELVEHJEM où l'éclatement des lysosomes varie d'une fois à l'autre lorsqu'on essaie d'obtenir un éclatement cellulaire aussi complet que possible.

Pour définir les conditions optimales d'homogénéisation, nous avons procédé à une cinétique faisant intervenir comme variable le nombre de coups de piston donnés. Nous avons choisi, pour critère d'éclatement cellulaire, la proportion de DNA obtenu en préparant les noyaux selon la méthode de BLOBEL et POTTER (5) et pour critère d'altération des organites cellulaires, la rupture de deux des plus fragiles de la cellule : le lysosome et le peroxysome. Les résultats obtenus sont représentés par les courbes de la figure 1 (p. 24). Comme on peut le constater, l'éclatement cellulaire maximal est obtenu en donnant 5 coups de piston serré. A ce stade de l'homogénéisation, 94 à 96 % de DNA pour 5 % de RNA sont retrouvés dans le culot de noyaux purs (voir PLANCHE III, p. 26). Les taux en phosphatase acide et en catalase libérées sont respectivement de 7 et 14 %, pourcentages donc d'une valeur tout à fait acceptable par rapport aux données de la littérature et traduisant une destruction minimale des lysosomes et des peroxysomes. Ces résultats sont reproductibles.

II - PREPARATION D'UNE FRACTION MITOCHONDRIALE PAR FLOTTAISON EN SACCHAROSE CONCENTRE

1) Principe :

Il est basé sur la flottaison du complexe mitochondrie-réticulum endoplasmique dans un milieu concentré en saccharose. Pour réaliser cette flottaison, il faut donc partir d'un homogénat dont la molarité en saccharose soit telle que les mitochondries puissent remonter. Il faut également limiter la flottaison des membranes non associées à ces mitochondries.

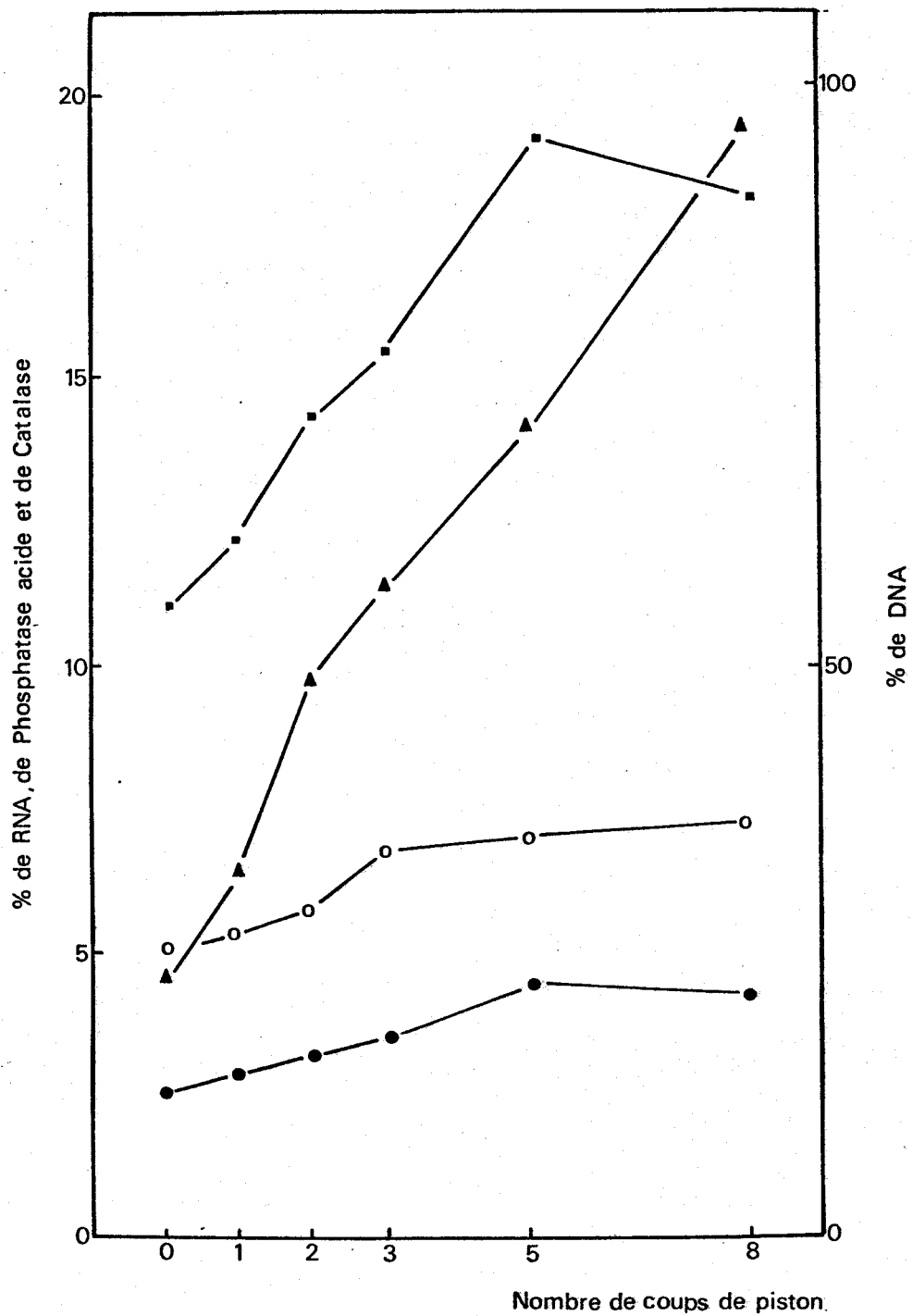


Figure 1 : Taux d'éclatement cellulaire et de destruction d'organites en fonction de l'homogénéisation.

Taux de catalase (▲—▲) et de phosphatase acide (○—○) dans la fraction soluble ; DNA (■—■) et RNA (●—●) dans la fraction nucléaire. Les pourcentages sont exprimés par rapport à l'homogénat.



FIGURE 1 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- A - 8 g de broyat de foie, obtenus à partir de 3 rats, sont dissociés dans 3 volumes de milieu A par 2 allers-retour de piston lâche de l'homogénéiseur de DOUNCE et 3 ml sont prélevés. Les valeurs des dosages obtenues pour cette fraction aliquote sont prises comme origine.
- B - L'homogénéisation est alors poursuivie à l'aide du piston serré. Une fraction aliquote de 3 ml est prélevée après les nombres de coups de piston indiqués.
- C - 1 ml de chaque homogénat sert à préparer la fraction soluble. Après addition de 4 volumes de milieu d'homogénéisation, chaque fraction aliquote est centrifugée 15 mn à 18 000 tours/mn dans le rotor SW 50-1. Les surnageants sont décantés et centrifugés 2 h à 45 000 tours/mn dans le rotor SW 50-1 (243 000 g_{max}) pour obtenir la fraction soluble dans le surnageant.
- D - A 1,1 ml de chaque prélèvement, 2,2 ml d'une solution de saccharose 2,3 M réalisée en Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 à 20°C, KCl 25 mM, Mg(CH₃COO)₂ 5 mM sont ajoutés. 2,5 ml de mélange sont déposés sur 1 ml de saccharose 2,3 M réalisé dans le même tampon et centrifugés 1 h à 37 000 tours/mn dans le rotor SW 50-1. Le culot obtenu renferme les noyaux purs.

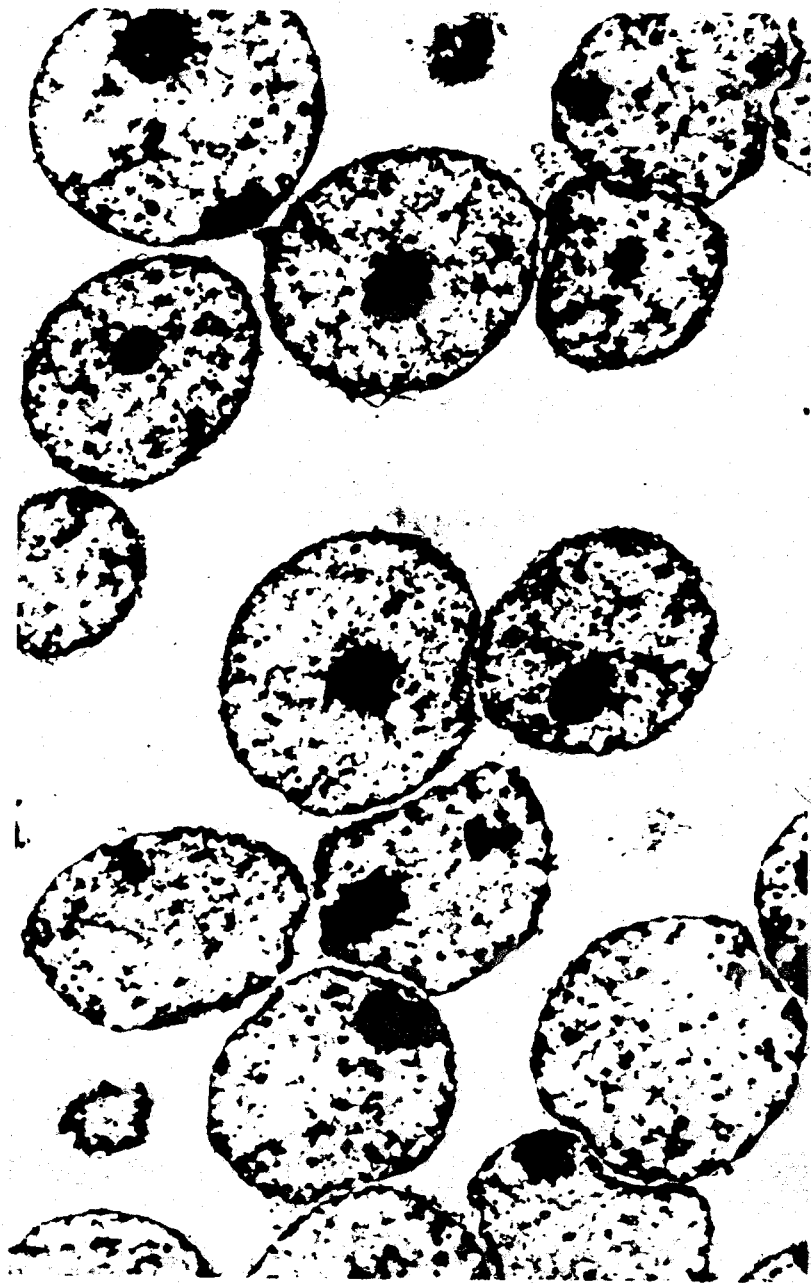


PLANCHE III : *Noyaux obtenus dans le culot de centrifugation
de l'homogénat sur un coussin de saccharose 2,3 M.
Grossissement : 8600 - Agrandissement : 2*



2) Homogénéat :

La difficulté réside dans le choix de la molarité en saccharose de l'homogénéat puisque la densité des mitochondries et celle des membranes se chevauchent ($d = 1,20$ à $1,24$ g/cm³ et $d = 1,14$ à $1,26$ g/cm³, respectivement). Une molarité en saccharose de $1,89$ M ($d = 1,24$ g/cm³) nous a paru être la valeur la plus satisfaisante puisqu'elle est la valeur limite qui permette encore la flottaison des mitochondries.

Pour obtenir l'homogénéat à la molarité en saccharose voulue, deux possibilités sont envisageables : homogénéiser soit directement dans une solution tamponnée de saccharose $1,89$ M, soit dans du saccharose $0,25$ M et amener ensuite l'homogénéat à la molarité voulue à l'aide d'une solution concentrée. Nous avons écarté la première possibilité car l'homogénéisation dans un milieu aussi visqueux s'avère très difficile. Les très fortes forces de cisaillement qui en découlent peuvent provoquer de plus un échauffement local et entraîner certaines cassures du mRNA. L'éclatement cellulaire total n'est obtenu qu'au prix d'une profonde altération des organites. Enfin, il est très difficile d'obtenir une homogénéisation reproductible car une faible variation de molarité d'une solution de saccharose concentré se traduit par un changement important de la viscosité (voir Figure 2, p. 28).

L'homogénéisation est donc pratiquée dans 2 volumes de milieu A dans les conditions définies auparavant et l'homogénéat est amené en saccharose $1,89$ M à l'aide d'une solution $2,45$ M réalisée dans le même tampon.

3) Fractionnement :

Le gradient discontinu de saccharose est réalisé selon le schéma de la figure 3 (p. 29). La flottaison est une technique qui fait intervenir la densité de la particule et celle du milieu. Cependant deux particules de même densité mais non de même taille migreront de façon différente dans le temps. On pouvait donc penser qu'une vitesse et une durée optimales de centrifugation pouvaient être définies, suffisantes pour permettre la flottaison du complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique mais pas assez grandes pour provoquer la remontée totale des petits morceaux de membranes granulaires. Les conditions de centrifugation optimales ont été déterminées à $18\ 000$ tours/mn pour une durée de 1 h 30 dans le rotor SW 25-1 (421.10^4 g_{max}-mn).

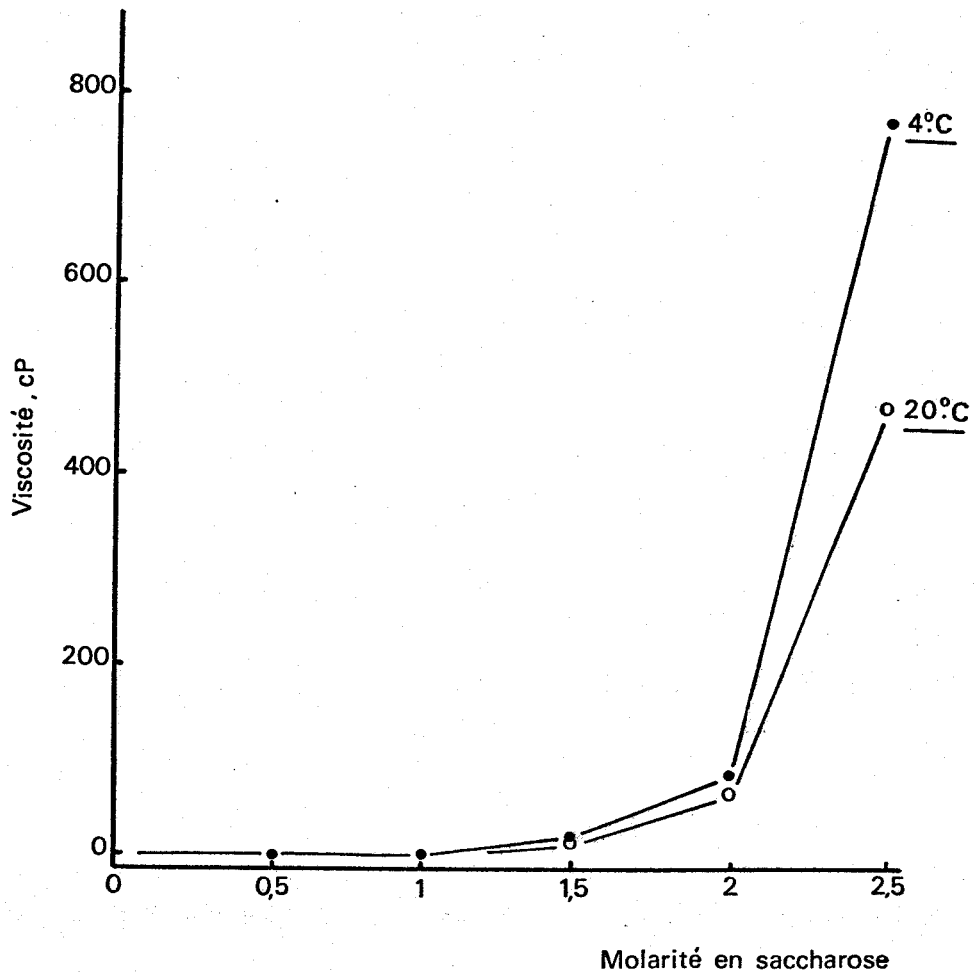


Figure 2 : Variation de la viscosité d'une solution en fonction de la molarité en saccharose.*¹



* tiré de "Handbook of Biochemistry", HERBERT, A. & SOBER, P., Ed. (Chemical Rubber Co, Cleveland) p. J. 248.

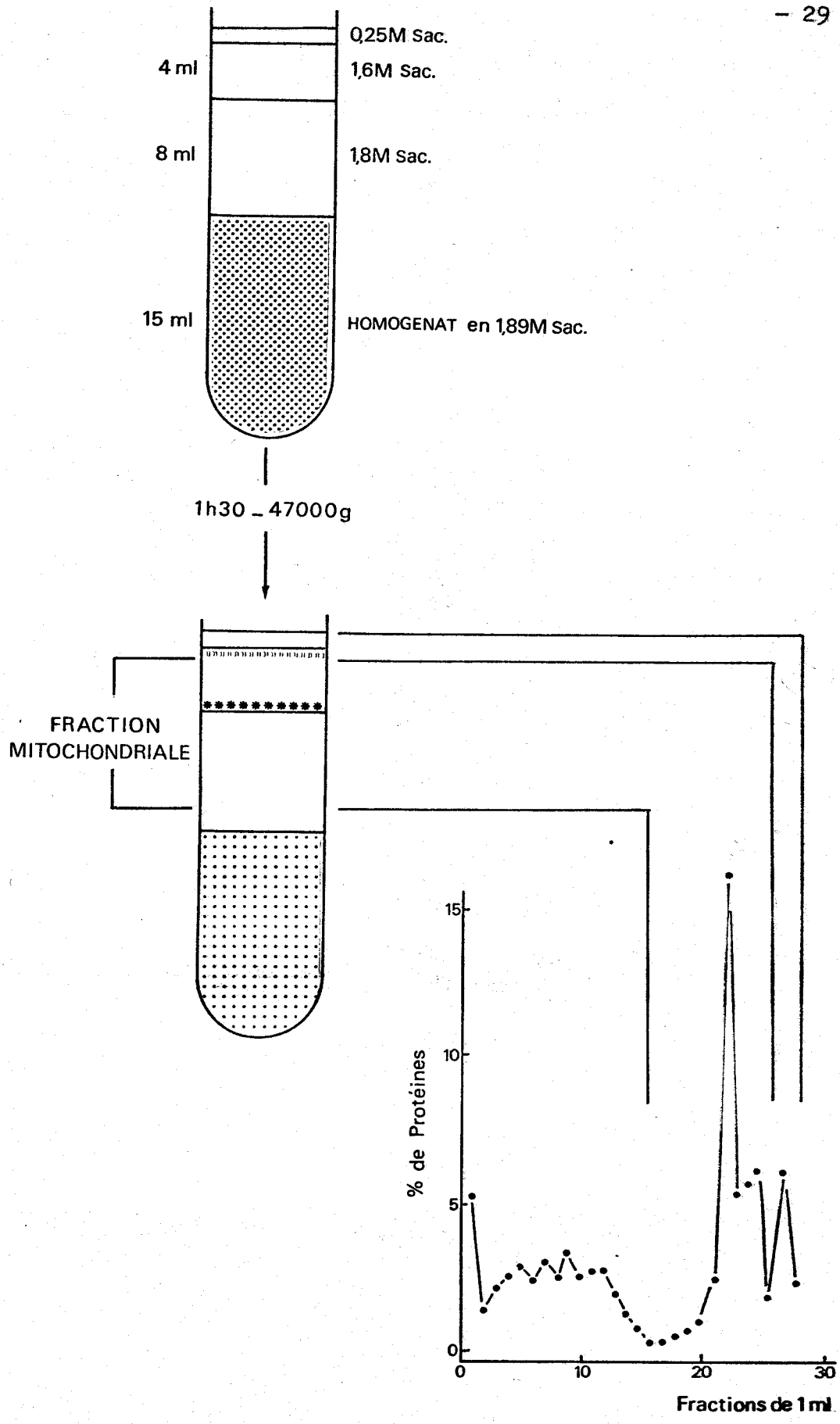


Figure 3 : Schéma de la préparation d'un complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique par flottaison en saccharose concentré.



Après centrifugation, on retrouve à l'interphase des solutions de saccharose 1,8 M-1,6 M une bande de couleur jaune-orangé caractéristique de la fraction mitochondriale. Elle se présente sous forme d'une "crêpe" légèrement tassée, n'adhérant pas à la paroi du tube et qu'on peut remettre facilement en suspension. La couche de saccharose 1,8 M présente un aspect légèrement trouble et jaunâtre. Au niveau de l'interphase saccharose 1,8 M-1,6 M, on retrouve une mince pellicule rougeâtre d'hématies et légèrement en dessous une bande très fine de matériel. Ce matériel a été identifié ultérieurement comme étant composé essentiellement de membranes lisses, de mitochondries légères, de quelques fragments de membranes granulaires. Les noyaux se retrouvent dans le culot.

Afin de déterminer les conditions optimales de fractionnement du gradient de centrifugation, nous avons effectué un dosage de protéines sur des fractions de 1 ml. Ce dosage nous a conduit au profil présenté p. 29. On observe deux minima, l'un au niveau de la 16ème fraction, l'autre au niveau de la 26ème. La zone comprise entre ces deux valeurs contient la fraction mitochondriale que nous avons étudiée. Sa molarité en saccharose est de 1,74 M.

III - DONNEES ANALYTIQUES DE CETTE FRACTION MITOCHONDRIALE

1) Contenu en RNA, DNA et protéines :

Les valeurs obtenues sont consignées dans le TABLEAU II (p. 31). Un pourcentage important de RNA ($\approx 40\%$), voisin de celui d'une fraction classique obtenue par centrifugation différentielle (48), est retrouvé au niveau de cette fraction mitochondriale. Ceci implique donc que des fragments importants de reticulum endoplasmique libres sont remontés avec le complexe lors de la centrifugation. Les valeurs de dosage des protéines sont également semblables à celles obtenues pour un culot de centrifugation à basse vitesse de l'homogénat.

Le DNA est le traceur idéal pour caractériser la présence de noyaux dans une fraction donnée. Le pourcentage faible mais constant de DNA observé dans la fraction étudiée doit être attribué à un entraînement des noyaux par l'édifice important que représente le complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique plutôt qu'à de la chromatine libérée. La densité de cette dernière ($d = 1,20 \text{ g/cm}^3$) aurait pu, en effet, expliquer sa présence au niveau de

TABLEAU II

Valeurs du RNA, du DNA et des protéines dans l'homogénat et dans la fraction mitochondriale (données obtenues à partir de 1,5 g de foie)

	Nbre exp.	Homogénat mg	Fraction mitochondriale mg	%	Rendement
RNA	9	15,86 ± 0,84	6,37 ± 0,87	40,06 ± 3,26	99,95 ± 2,69
DNA	2	2,80 ± 0,11	0,16 ± 0,02	5,50 ± 0,49	99,75 ± 2,05
Protéines	4	350,98 ± 24,94	170,51 ± 20,98	48,77 ± 3,05	99,40 ± 2,21



l'interphase saccharose 1,8 M-1,6 M. La teneur en DNA de cette fraction est d'ailleurs nettement inférieure à celle obtenue par ADELMAN (22). Il faut également noter qu'un faible pourcentage (0,6 % du DNA cellulaire) peut correspondre au DNA mitochondrial (29).

2) Caractérisation des différents organites cellulaires :

Le dosage d'enzymes spécifiques est un moyen très précis et rapide pour caractériser les différents organites cellulaires. En effet, même avec la technique de filtration sur disque de BAUDHUIN, l'analyse quantitative par microscopie électronique reste délicate (49).

C'est ainsi que la glucose-6-phosphatase et la cytochrome c oxydase sont d'excellents marqueurs pour estimer respectivement la répartition du reticulum endoplasmique et celle des mitochondries dans différentes fractions (50-51). Le TABLEAU III (p. 33) nous indique que la fraction mitochondriale isolée renferme une proportion élevée de mitochondries (85 à 90 %) pour une valeur de l'ordre de 47 % de reticulum endoplasmique. Le rapport activité cytochrome c oxydasique/activité glucose-6-phosphatasique est légèrement supérieur à celui trouvé par SHORE et TATA (1,87 pour 1,64) traduisant donc un taux plus faible de membranes cytoplasmiques dans la fraction étudiée. Ce rapport plus élevé peut être attribué au phénomène de cosédimentation des membranes avec les mitochondries qui intervient dans leur méthode de préparation plutôt qu'à une fragmentation moins importante du reticulum endoplasmique. En effet, l'homogénéisation pratiquée par ces auteurs est relativement forte et plus élevée que la nôtre (10 allers-retour de l'appareil de POTTER-ELVEHJEM ; rotation : 1100 tours/mn) et ne peut donc justifier cette différence.

Certains organites cellulaires présentent des densités voisines de celle de la mitochondrie. C'est le cas notamment des lysosomes et des peroxy-somes. Il était donc vraisemblable de retrouver ces deux éléments au niveau de la fraction mitochondriale. La mesure de l'activité de la phosphatase acide, localisée dans les lysosomes (52) et de celle de la catalase, enzyme marqueur des peroxy-somes (53), nous a permis de suivre leur comportement lors du fractionnement. Le TABLEAU III (p. 33) présente les données analytiques obtenues pour ces deux enzymes. L'activité phosphatasique acide est de 43 % dans la fraction mitochondriale. La présence de ces organites constitue un problème majeur car ce sont de véritables réservoirs de ribonucléases qui se caractérisent en outre par leur grande fragilité. Il faut néanmoins noter que

TABLEAU III

Activité de diverses enzymes marqueurs dans l'homogénat et dans la fraction mitochondriale (valeurs obtenues à partir de 1,5 g de foie)

Enzyme	Nbre exp.	Homogénat		Fraction mitochondriale			Rendement
		U	U/mg prot. (x 10 ²)	U	U/mg prot. (x 10 ²)	%	
Glucose-6-phosphatase	4	25,58 ± 0,79	7,29	12,07 ± 2,12	7,08	46,92 ± 5,28	100,07 ± 3,86
Cytochrome c oxydase	5	33,37 ± 3,82	9,51	29,36 ± 4,57	17,2	87,92 ± 3,46	99,75 ± 6,12
Phosphatase acide	3	12,60 ± 0,93	3,59	5,38 ± 0,58	3,16	43,06 ± 1,35	98,99 ± 1,68
Catalase	2	0,77 ± 0,02	0,22	0,09 ± 0,02	0,05	12,05 ± 2,54	98,55 ± 0,20

cette contamination est nettement inférieure à celle de la fraction mitochondriale obtenue par la méthode d'AMAR-CORTESEC et al. couramment utilisée où 48 % de phosphatase acide pour seulement 66 % de cytochrome c oxydase sont retrouvés (21). Contrairement à ces "petits estomacs de la cellule", les peroxysomes sont en majorité restés dans le dépôt. Ce comportement différent provient certainement de leur taille plus petite, le temps de centrifugation utilisé étant insuffisant pour permettre leur remontée.

3) Nature du RNA présent dans la fraction mitochondriale :

Nous avons vu plus haut que notre fraction renfermait 40 % du RNA cellulaire. BLOBEL et POTTER, en 1967, ont déterminé la distribution du RNA de l'hépatocyte de rat comme étant pour 80 % de nature ribosomale, 15 % de nature non-sédimentable et pour 4 à 5 % d'origine nucléaire (5). Le RNA ribosomal se répartit, quant à lui, en 25 % de polysomes libres pour 75 % de polysomes liés (5). Pour clore cette étude biochimique, nous avons donc défini la participation de chacun de ces types de RNA dans la fraction mitochondriale étudiée. Les résultats de cette analyse sont consignés dans le TABLEAU IV (p. 35). 4 % des polysomes libres et 3,9 % du RNA soluble sont retrouvés dans la fraction mitochondriale. En nous basant sur les pourcentages donnés plus haut pour les différents types de RNA cellulaire, ceci représente respectivement 2 % et 1,45 % du RNA de la fraction mitochondriale étudiée. Comme dans le cas des noyaux, la présence des polysomes libres est due à un phénomène d'entraînement alors que la densité élevée de ces polysomes ($d > 1,25 \text{ g/cm}^3$) devrait au contraire entraîner leur sédimentation. Bien que n'étant pas très élevée, cette contamination n'est pas négligeable et rendra l'étude des polysomes liés de cette fraction délicate.

Nous pouvons donc conclure que la fraction isolée renferme 35 % de RNA sous forme de polysomes liés, soit plus de la moitié de cette classe. Cette fraction correspond au RNA qui est généralement perdu lors du fractionnement cellulaire classique.

TABLEAU IV

Taux de polysomes libres et de RNA soluble dans la fraction mitochondriale

POLYSOMES LIBRES

Homogénat	Fraction mitochondriale	
cpm	cpm	%
126 800	5 125	4,04

RNA SOLUBLE

Homogénat	Fraction mitochondriale	RNA soluble de la fraction mitochondriale		
mg de RNA	mg de RNA	mg de RNA	% de l'homogénat	% dans la fraction mitochondriale
15,31	5,96	0,23	1,52	3,90

TABLEAU IV - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

I - Détermination du taux de polysomes libres dans la fraction mitochondriale

A - Un rat, d'environ 80 g, est sacrifié 20 h après l'injection intrapéritonéale de 0,5 mCi d'acide orotique ³H. Le foie est homogénéisé dans 3 volumes de milieu A et l'homogénat est centrifugé 10 mn à 22 500 g_{max}. Le surnageant, prélevé à l'aide d'une seringue, est déposé sur 8 ml de saccharose 1,38 M et 6 ml de saccharose 2 M (réalisés en tampon TKM5) et centrifugé 15 h à 55 000 tours/mn dans le rotor 60 Ti. Le culot obtenu est repris doucement à l'aide d'une baguette de verre dans 0,8 ml de milieu A. La suspension est ensuite centrifugée 8 mn à 1000 tours/mn dans le rotor SW 50-1 pour éliminer d'éventuels agrégats.

B - 0,5 ml de la suspension polysomale ainsi obtenue sont ajoutés lors de l'homogénéisation du foie étudié après usage du piston lâche de l'homogénéiseur de DOUNCE et avant celui du piston serré. La suite des manipulations est en tout point identique à celle décrite dans "METHODOLOGIE".

C - Des fractions aliquotes de l'homogénat et de la fraction mitochondriale sont précipitées, filtrées et l'acido-insoluble est compté comme décrit dans "METHODOLOGIE".

II - Contribution du RNA soluble dans le RNA de la fraction mitochondriale

A - Une fraction mitochondriale est préparée comme décrit dans "METHODOLOGIE". 2 volumes de milieu A sont ajoutés et une fraction aliquote de 12 ml est centrifugée 2 h à 30 000 tours/mn dans le rotor SW 40 Ti.

B - Un dosage du RNA est réalisé sur le culot et le surnageant, sur la fraction mitochondriale et sur l'homogénat.

IV - DONNEES MORPHOLOGIQUES

L'observation de cette fraction mitochondriale après dilution pour obtenir une concentration en saccharose de 1 M confirme les résultats précédemment obtenus à savoir que cette fraction est composée principalement de mitochondries et de membranes granulaires (voir PLANCHE IV, p. 38). La présence de saccharose, à une molarité élevée, entraîne l'aspect "imprécis" des mitochondries. En effet, les membranes internes et externes, ainsi que les crêtes, permettant une facile reconnaissance de ce type d'organites, ne sont pas individualisées. Ce problème a pu être résolu en partie par dialyse contre du milieu A (voir "METHODOLOGIE"). Par ce traitement, la majorité du saccharose est éliminée et on retrouve un aspect presque normal des mitochondries (voir PLANCHE V, p. 39). Les membranes granulaires ont conservé la configuration bilamellaire observée in vivo.

V - ETUDE DE L'INTERACTION MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE

L'association entre les mitochondries et le reticulum endoplasmique laisse entrevoir des perspectives tout à fait nouvelles, comme nous l'avons souligné précédemment, dans l'organisation de la cellule. Pour notre part, nous nous intéressons plus particulièrement à l'isolement des membranes qui entourent les mitochondries. S'il est possible, en effet, d'atteindre ce but, le problème de l'isolement quantitatif des polysomes liés serait alors résolu et surtout une classe de polysomes liés particulière par sa localisation dans la cellule serait isolée.

La fragilité des polysomes et celle de la liaison polysome-membrane ainsi que la présence d'une fraction importante de lysosomes limitent considérablement les moyens que nous pouvons envisager pour arriver à ce résultat. Les actions mécaniques devront être évitées au maximum pour prévenir l'éclatement des lysosomes et le déversement des ribonucléases qui en résulterait. Dans ces conditions, nous devons nous limiter à un lavage unique de la fraction. L'état de cette dernière qui est, comme nous l'avons décrit dans un chapitre précédent, sous forme de suspension, évite les actions mécaniques mises en jeu pour une fraction obtenue sous forme de culot. L'éclatement des lysosomes par choc osmotique peut être également limité en maintenant la molarité en saccharose au-dessus de 1 M.

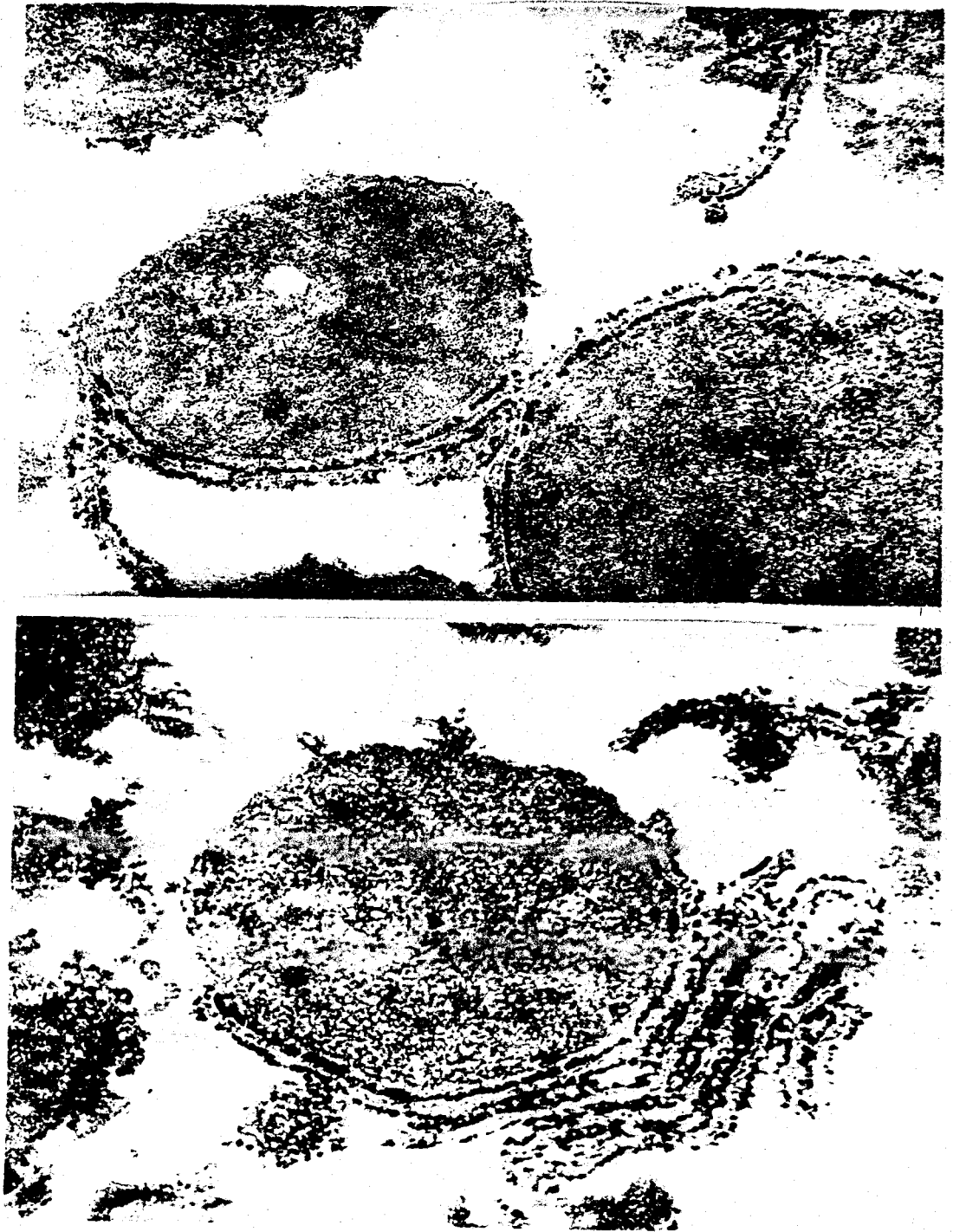


PLANCHE IV : *Fraction mitochondriale obtenue par flottaison en saccharose concentré.*

Grossissement : 37 000 - Agrandissement : 2



PLANCHE V : Fraction mitochondriale obtenue par flottaison en saccharose concentré après dialyse contre du milieu A.

Grossissement : 20 000 (a), 23 000 (b)

Agrandissement : 2



Afin d'apprécier l'influence de la composition du milieu de lavage sur la dissociation du complexe, nous avons choisi comme témoin le lavage de la fraction mitochondriale dans un milieu de même composition ionique que le milieu d'homogénéisation. Les résultats obtenus sont consignés dans le TABLEAU V (p. 41). Dans ces conditions, seuls 16 % du RNA de la fraction sont retrouvés dans le surnageant de lavage, soit environ 5 % du RNA cellulaire. On peut également observer des résultats assez variables d'une expérience à l'autre qui peuvent être dus en partie à un état physiologique différent des rats. Le RNA détachable par ce type de lavage provient dans sa majeure partie de morceaux de membrane peu ou pas attachés aux mitochondries. En effet, l'observation, après coloration négative, des membranes ainsi séparées, nous indique qu'il s'agit de petits fragments de reticulum endoplasmique, de taille nettement inférieure à celle des membranes longeant les mitochondries (voir PLANCHE VI, p. 42). Une partie de ce RNA provient, en outre, des polysomes libres contaminant la fraction mitochondriale.

L'importance des ions, soit dans l'association des membranes entre elles, soit dans celle des membranes aux mitochondries, nous a ensuite conduit à étudier l'effet de leur concentration. Notre étude s'est limitée à l'effet du potassium, du magnésium et du calcium. Aucune modification sensible n'est apportée par une diminution de l'ion K^+ comme l'indiquent les données du TABLEAU V (p. 41). Les valeurs de dosage de RNA du surnageant de lavage sont exprimées en pourcentage de la valeur en RNA de la fraction mitochondriale initiale et par rapport au lavage témoin, compte-tenu des variations observées d'une expérience à l'autre. La diminution de la concentration en magnésium a, par contre, un effet spectaculaire sur la dissociation du complexe. La courbe donnant le taux de RNA retrouvé dans le surnageant de lavage en fonction de la diminution de la concentration en magnésium est de type exponentiel (voir Figure 4, p. 43). Ainsi, lorsque la concentration finale en cet ion dans la solution de lavage n'est que de 0,6 mM, 36 % de RNA en plus de celui du témoin sont détachés. Cependant, une concentration de 1 mM est une valeur limite à utiliser pour conserver l'intégrité structurale des polysomes et ceci pendant un temps très court. Il faut, en effet, pour préserver cette structure, réajuster dès son obtention le surnageant de lavage à une concentration en magnésium plus élevée (minimum 2-3 mM).

TABLEAU V

*Influence de la concentration en potassium sur la dissociation
du complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique*

Composition ionique du milieu de lavage	Numéro d'expérience	% de RNA dans le surnageant de lavage
TK25M5	1	12,89 *
	2	17,90
	3	14,30
	4	9,37
	5	20,12
	6	20,05
	moyenne	15,77 ± 4,32
TK13M5	1	+ 3,51 **
	2	+ 2,17
	3	+ 2,33
	moyenne	+ 2,67 ± 0,73

* Pourcentages exprimés par rapport à la fraction mitochondriale

** Pourcentages exprimés par rapport à la fraction mitochondriale
en prenant pour témoin le lavage dans un milieu TKM5



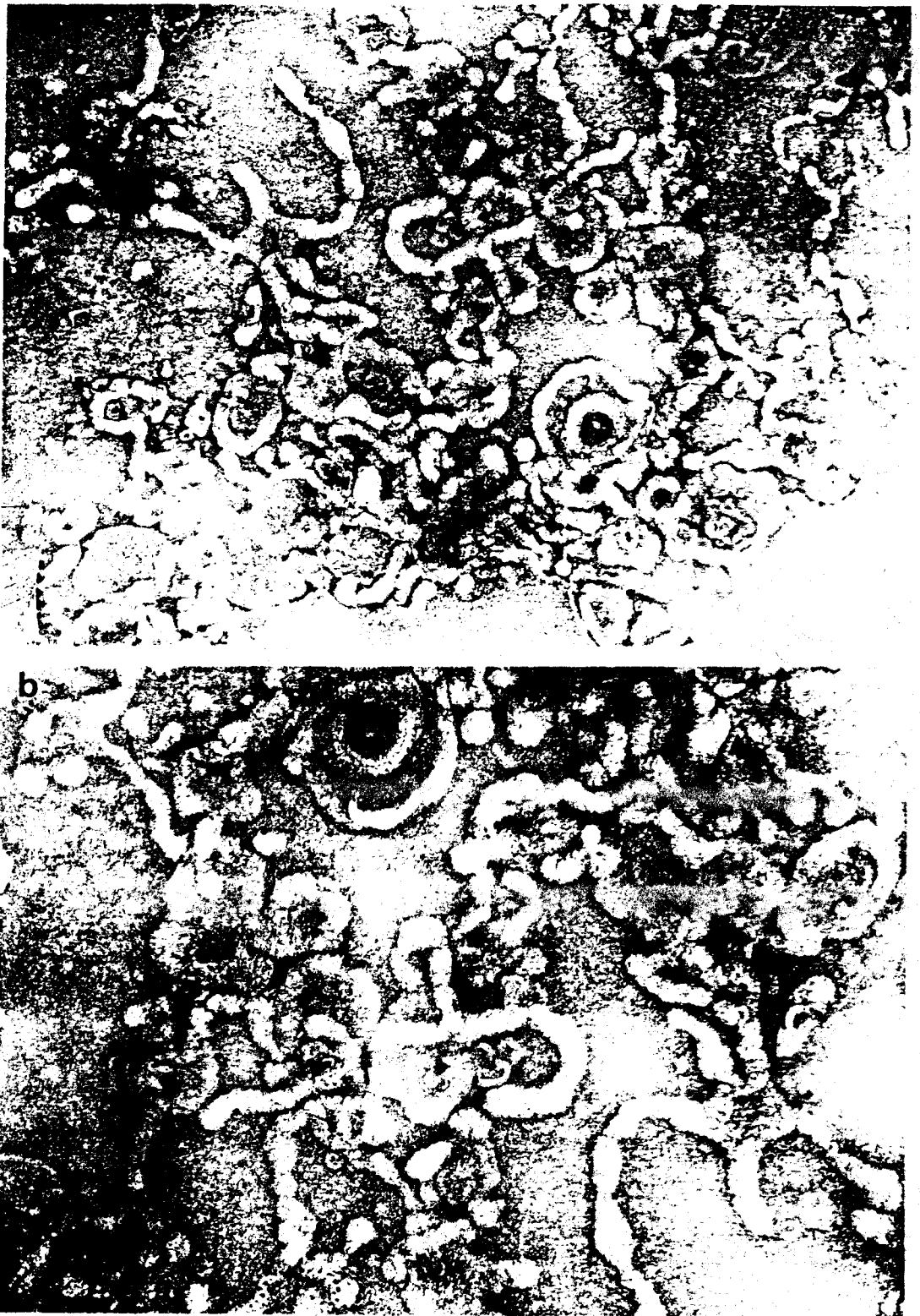


PLANCHE VI : *Coloration négative du matériel présent dans le surnageant de lavage réalisé en tampon TKM5 de la fraction mitochondriale.*

Grossissement : 25 000 (a), 37 000 (b)

Agrandissement : 2



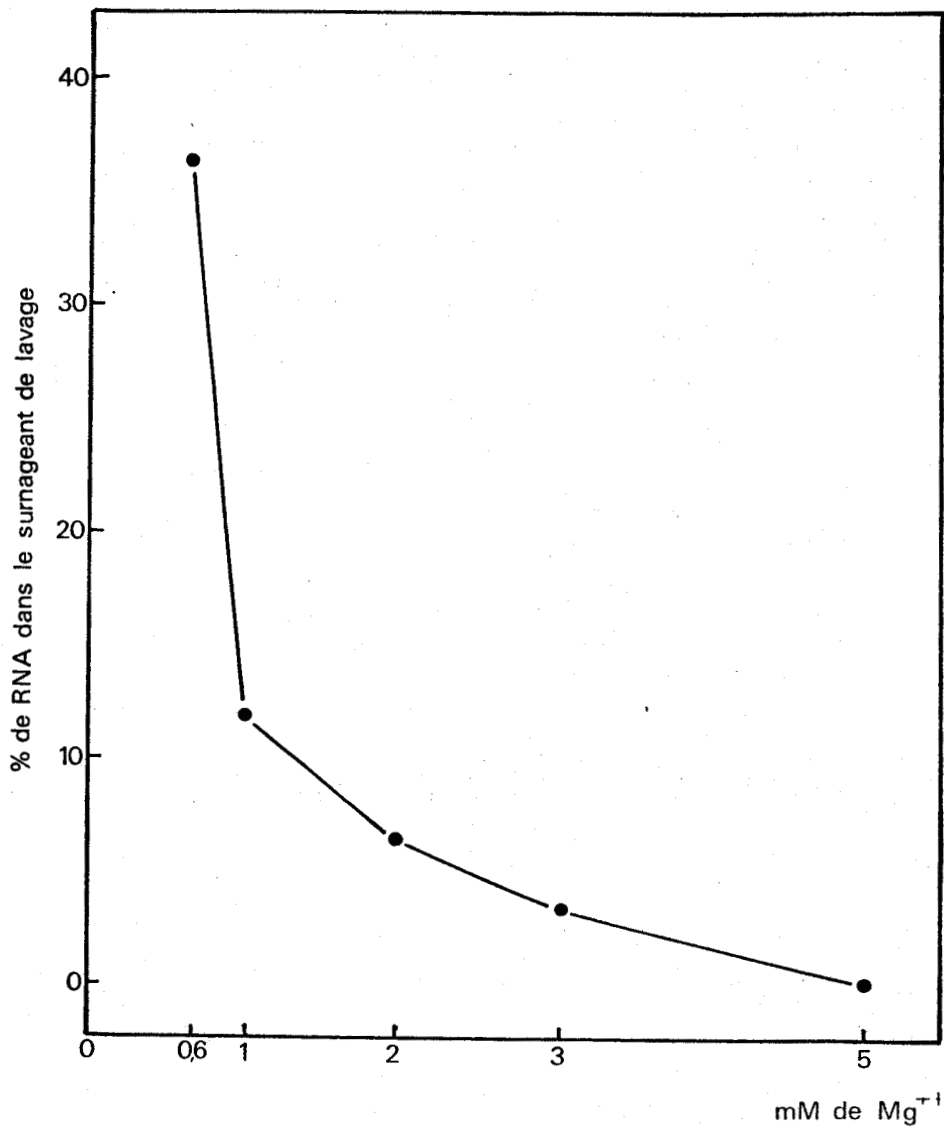


Figure 4 : Taux de RNA dans le surnageant de lavage de la fraction mitochondriale en fonction de la concentration en magnésium.

Les résultats sont exprimés en prenant pour témoin le lavage dans une solution réalisée en tampon TKM5.

Jusqu'ici nous avons modifié, en quelque sorte, l'environnement du complexe ; mais dans la structure-même de ce dernier, des ions autres que l'ion Mg^{++} et l'ion K^+ interviennent. C'est le cas notamment du calcium qui a un pouvoir agrégeant important. Dans la préparation des mitochondries, on fait en général, intervenir un agent chélateur spécifique du calcium, l'EGTA (éthylène glycol-bis-(amino éthyl éther) N, N'-tetra-acétique acide) (54). Par cette méthode, on obtient des mitochondries assez pures comme le montrent les photographies de la PLANCHE VII (p. 45). L'effet de l'addition d'EGTA à une concentration de 1 mM dans la fraction mitochondriale se traduit par une libération de 18 % de RNA par rapport à un témoin sans EGTA mais ceci seulement dans le cas où la concentration en magnésium est de 1 mM. Pour des concentrations plus élevées en Mg^{++} (5 mM par ex.), l'addition d'EGTA est sans effet. Tout se passe donc comme si l'ion Mg^{++} pouvait compenser en partie le déficit en ion Ca^{++} en se substituant à ce dernier. Il est évident que ce couplage Mg^{++} 1 mM-EGTA ne peut être utilisé car il ne permettrait plus la préservation des polysomes mais doit plutôt être considéré comme la démonstration de l'importance des ions dans la structure du complexe.

Nous avons également essayé comme procédé de lavage une nouvelle flottaison du complexe en saccharose concentré selon le même schéma que celui réalisé à partir de l'homogénat (cf. chapitre III 3, p. 27). Nous pensons ainsi éviter le phénomène de cosédimentation des mitochondries et du reticulum endoplasmique inhérent à la technique de centrifugation différentielle. Cette méthode, comparativement à celle employée auparavant, permet d'éliminer environ 14 % du RNA de la fraction mitochondriale. Elle présente cependant l'inconvénient d'entraîner la contamination par des mitochondries de la fraction membranaire récupérée et de maintenir les mitochondries dans des solutions de saccharose concentré.

VI - CONCLUSION

Nos résultats indiquent qu'il est impossible de séparer de façon quantitative le reticulum endoplasmique de mitochondries par des méthodes douces. En effet, dans les meilleures conditions, seuls 50 % du RNA du complexe peuvent être récupérés.

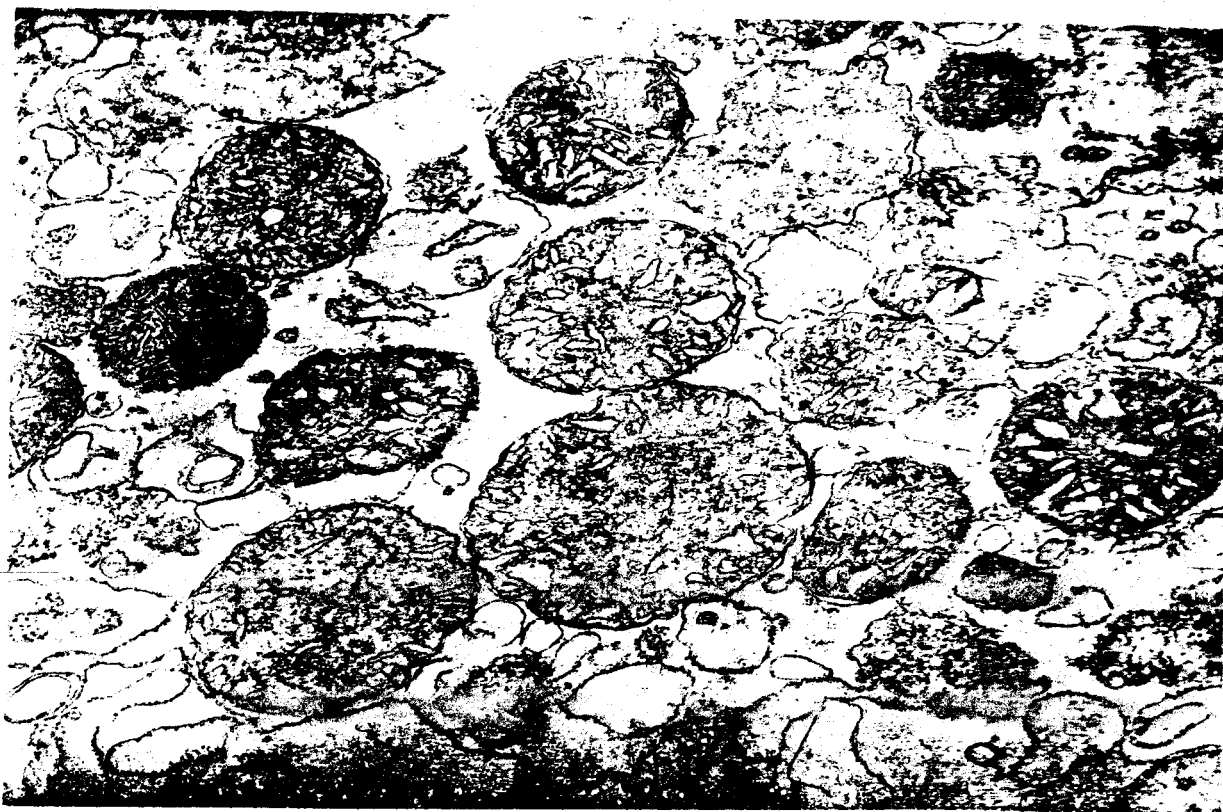


PLANCHE VII : Mitochondries obtenues à partir d'un homogénat en présence d'EGTA 1 mM.

Grossissement : 12 000 - Agrandissement : 2

Pour étudier les polysomes liés de cette fraction, la seule possibilité qui nous reste est donc de traiter la fraction brute mitochondrie-reticulum endoplasmique avec un détergent. Ceci n'est pas envisageable dans le cas présent : ce traitement conduirait à la libération de ribonucléases lysosomales en quantité trop importante pour être inactivées par des inhibiteurs.

Il était donc indispensable, dans un deuxième temps, de mettre au point une méthode de préparation éliminant le plus rapidement possible les lysosomes.

COMPLEXE MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE
OBTENU PAR CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE EN GRADIENT DISCONTINU

I - INFLUENCE DES IONS SUR LE COMPORTEMENT DES ORGANITES EN CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

Les mitochondries et les lysosomes présentent des propriétés de sédimentation très semblables compte-tenu de leur taille et de leur densité voisines. Leur comportement en centrifugation dépend, néanmoins, de l'environnement dans lequel on les place.

Le TABLEAU VI présente les résultats d'une expérience dans laquelle des homogénats ont été préparés en présence ou en absence d'ions et soumis à des conditions de centrifugation différentes (i.e. : 5900 $g_{\max-mn}$ et 53 000 $g_{\max-mn}$). Le contenu en RNA, en monoamine oxydase (localisée dans la membrane externe de la mitochondrie) et en phosphatase acide (enzyme marqueur des lysosomes) a été déterminé sur chaque fraction subcellulaire obtenue après 2 lavages successifs des culots (complexe) réalisés dans des conditions très douces (voir PROTOCOLE EXPERIMENTAL, p. 49).

Selon ces résultats, le comportement des mitochondries est profondément affecté par la présence des ions. Ainsi, dans le tampon TKM3, 70 % des mitochondries et 35 % du RNA sédimentent à une vitesse qui est suffisante pour conduire à la complète sédimentation des noyaux. Par contre, lorsque l'homogénat est préparé dans un milieu tamponné sans K^+ ni Mg^{++} , une centrifugation environ 10 fois plus forte est nécessaire pour obtenir des valeurs identiques en RNA et en mitochondries dans le sédiment de centrifugation. A l'opposé des mitochondries, les lysosomes présentent des propriétés de sédimentation identiques en présence ou en absence d'ions.

Nous avons donc tiré parti de cette observation pour préparer un complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique ne présentant plus qu'une faible contamination par les lysosomes.

II - PREPARATION DU COMPLEXE RETICULUM ENDOPLASMIQUE-MITOCHONDRIE

Le fractionnement utilisé est représenté schématiquement par la figure 5 (p. 50). Une modification a été apportée par l'introduction de coussins de densité légèrement plus élevée que celle du milieu d'homogénéisation. Ceux-ci sont utilisés principalement pour éviter la contamination du culot par des organites qui ne sédimentent pas dans ces conditions de

TABLEAU VI

Influence des ions sur le comportement en sédimentation des organites

Centrifugation		RNA	Monoamine oxydase	Phosphatase acide	
5900 g_{max} -mn.	<i>milieu TKM₃</i>				
	culot	33,8	69,6	20,0	
	surnageant	66,2	30,4	80,0	
	rendement	89,3	92,1	94,8	
	<i>milieu T</i>				
	culot	12,7	23,4	19,0	
	surnageant	84,3	76,6	81,0	
	rendement	94,3	95,0	97,8	
	53 000 g_{max} -mn.	<i>milieu TKM₃</i>			
		culot	45,7	92,0	45,6
surnageant		54,3	7,1	54,4	
rendement		98,0	93,0	96,3	
<i>milieu T</i>					
culot		35,9	80,3	48,9	
surnageant		64,1	19,7	51,1	
rendement		98,0	90,6	99,0	



TABLEAU VI - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A - 4 g de foie sont homogénéisés dans 3 volumes soit de milieu TKM₃ (saccharose 0,25 M réalisé dans le tampon TKM₃), soit de milieu T (saccharose 0,25 M, Tris-HCl 5 mM, pH 7,6 à 20°C).

Des fractions aliquotes de 8 ml (correspondant à 2 g de foie) sont centrifugées soit 8 mn à 2000 tours/mn (5900 g_{max}-mn), soit 8 mn à 6000 tours/mn (53 000 g_{max}-mn) dans le rotor SW 27-1. Les surnageants (5 ml par tube) sont prélevés délicatement à l'aide d'une seringue et 5 ml de milieu d'homogénéisation (contenant des ions ou pas, selon le cas) sont ajoutés. Les tubes sont bouchés par du parafilm et les culots sont remis en suspension par inversion douce répétée. Après une centrifugation de 8 mn dans les mêmes conditions que précédemment, le processus de lavage est répété une fois encore et les surnageants sont rassemblés pour les analyses.

B - Sur chaque surnageant et sur chaque culot, un dosage de RNA, de monoamine oxydase et de phosphatase acide est effectué.

Chaque valeur obtenue est exprimée en pourcentage de la somme des deux fractions. Les rendements sont exprimés par rapport aux valeurs obtenues pour les homogénats.



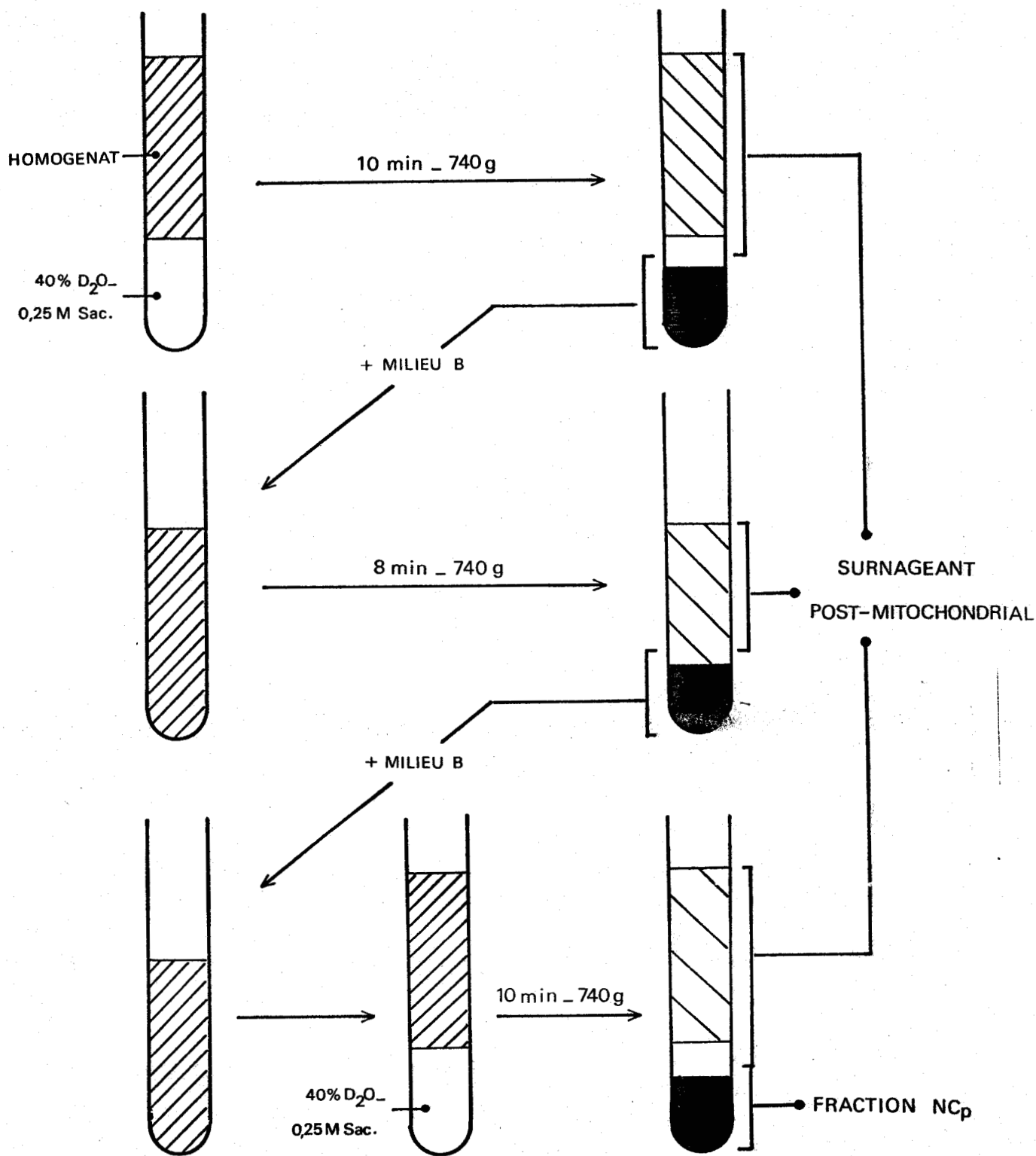


Figure 5 : Représentation schématique de la préparation de la fraction NC_p.

centrifugation. Ces coussins correspondent au milieu d'homogénéisation contenant 40 % de D₂O. Ce soluté a été choisi pour ses propriétés physiques et chimiques particulières. Il permet, en effet, d'augmenter la densité d'une solution sans changement d'osmolarité. Tout choc osmotique auquel sont sensibles notamment les lysosomes est ainsi évité. Il s'agit, de plus, d'un soluté inerte chimiquement.

Comme décrit précédemment, les conditions de centrifugation sont telles que la resuspension du culot se fait simplement par retournement du tube. Les forces de cisaillement mises en jeu étant faibles, nous pouvons réaliser ensuite deux lavages de la fraction mitochondriale. Ceci permet de diminuer la contamination du complexe par les polysomes libres, les petits fragments de membranes et des lysosomes qui sont entraînés par le complexe.

III - ANALYSE BIOCHIMIQUE DE LA FRACTION NC_p

Les données obtenues sont consignées dans le TABLEAU VII (p. 52). Nous trouvons 75 % de cytochrome c oxydase pour 35 % de RNA et 47 % de glucose-6-phosphatase dans la fraction isolée. Les 25 % de mitochondries qui sont restées dans le surnageant post-mitochondrial représentent des mitochondries soit "libres", c'est-à-dire non associées au reticulum endoplasmique, soit complexées à des fragments de membranes moins importants que ceux qui peuvent être observés dans la fraction NC_p (55). Cette fraction NC_p ne renferme, d'autre part, que 18 % de phosphatase acide, ce qui représente une faible contamination par les lysosomes. Nous pouvons donc envisager de neutraliser les effets des ribonucléases contenues dans cette fraction par différents inhibiteurs (i.e. inhibiteur cytoplasmique, haute force ionique, RNA de bas poids moléculaire). Ceci a pu être confirmé puisque des polysomes présentant à leur maximum d'absorbance 15 ribosomes, ont pu être isolés à partir de la fraction Cp (obtenue par purification de NC_p, voir chapitre suivant) (voir Figure 6, p. 53) (56).

Le culot NC_p renferme en plus la majorité des noyaux (97 %) et des hématies (voir TABLEAU VII, p. 52). Une purification ultérieure s'avérait donc indispensable.

TABLEAU VII

Analyse biochimique de la fraction Ncp

	nbre exp.	Homogénat mg ou U	Fraction mg ou U	Ncp %	Rendement
NA g	11	16,7 ± 0,7	5,9 ± 0,4	35,4 ± 2,6	95,8 ± 8,3
NA g	5	3,6 ± 0,1	3,5 ± 3,38	97,6 ± 0,9	96,1 ± 11,9
protéine mg	5	412,1 ± 22,2	143,8 ± 6,2	34,9 ± 1,5	104,3 ± 4,7
Glucose 6 phosphatase U	6	27,2 ± 0,4	13,0 ± 0,9	47,7 ± 3,2	99,0 ± 1,6
phosphatase acide U	5	16,0 ± 0,3	2,9 ± 0,5	18,5 ± 3,3	103,5 ± 5,7
cytochrome c oxydase U	5	46,1 ± 3,9	34,3 ± 2,8	74,4 ± 6,2	105,1 ± 5,1
amylase U	3	7,3 ± 1,2	2,23 ± 0,16	30,6 ± 1,9	97,3 ± 4,0



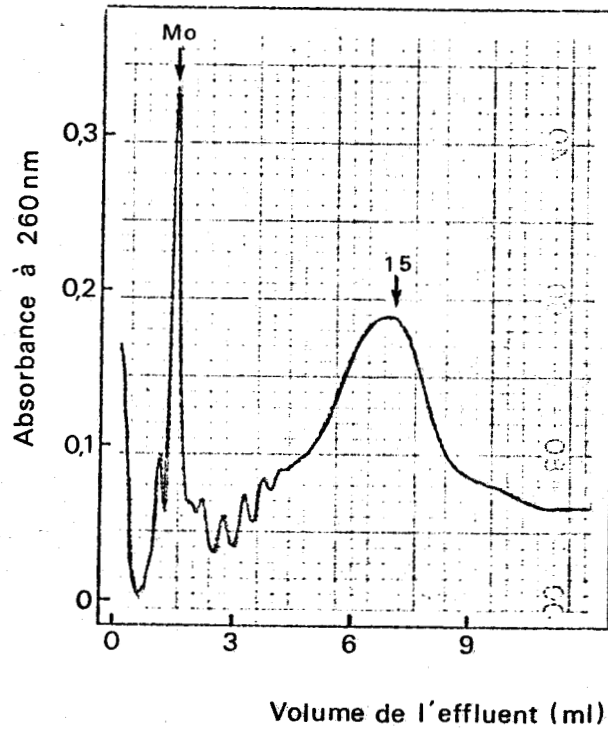


Figure 6 : Profil en gradient isocinétique 15-27,8 % de saccharose des polysomes obtenus par traitement de la fraction Cp au détergent.

Mo : monomère

IV - ELIMINATION DES NOYAUX ET DES ERYTHROCYTES DE LA FRACTION NCp : OBTENTION DE LA FRACTION Cp

1) Par centrifugation différentielle (Méthode 1)

Pour éliminer ces deux contaminants (noyaux et érythrocytes), nous avons utilisé, en premier lieu, une méthode voisine de celle de HOGEBROOM (32) et de celle employée par LEWIS et TATA pour purifier leur fraction mitochondriale (25). Cette méthode est représentée schématiquement par la figure 7 (p. 55).

Chaque culot NCp est repris dans une solution de saccharose contenant 5mM Triéthanolamine-HCl, pH 7,6 à 20°C, et 0,5 mM Mg(CH₃COO)₂. Cette resuspension doit être réalisée très délicatement car, dans ces conditions (1,4 mM Mg(CH₃COO)₂ final), les noyaux ont tendance à gonfler et risquent d'éclater. L'utilisation d'une concentration en magnésium plus faible pourrait conduire à une lyse des noyaux, tandis qu'une concentration plus forte diminue l'efficacité de la séparation et provoque une agrégation des noyaux (46). Une solution de même composition, contenant 40 % D₂O est alors déposée au fond du tube à l'aide d'une seringue et celui-ci est centrifugé à 5400 g_{max}-mn.

A la fin de la centrifugation, nous obtenons deux fractions : un culot assez volumineux (fraction N) qui doit contenir les noyaux, et le surnageant (fraction Cp). Le dosage de RNA de la fraction Cp révèle une forte diminution du contenu en RNA par rapport à NCp ce qui permet d'expliquer l'importance du volume du culot qui doit contenir, en plus des noyaux, des mitochondries et des membranes. En outre, des résultats très variables sont obtenus d'une expérience à l'autre (voir TABLEAU VIII, p. 56).

2) Par flottaison en saccharose concentré (Méthode 2)

Les résultats décevants présentés par la précédente purification nous ont conduits à mettre au point une nouvelle méthode en nous basant sur la densité élevée des noyaux. Elle fait intervenir, comme pour la préparation de noyaux purs à partir d'un homogénat, des solutions concentrées de saccharose. La figure 8 (p. 57) donne la représentation schématique de cette technique.

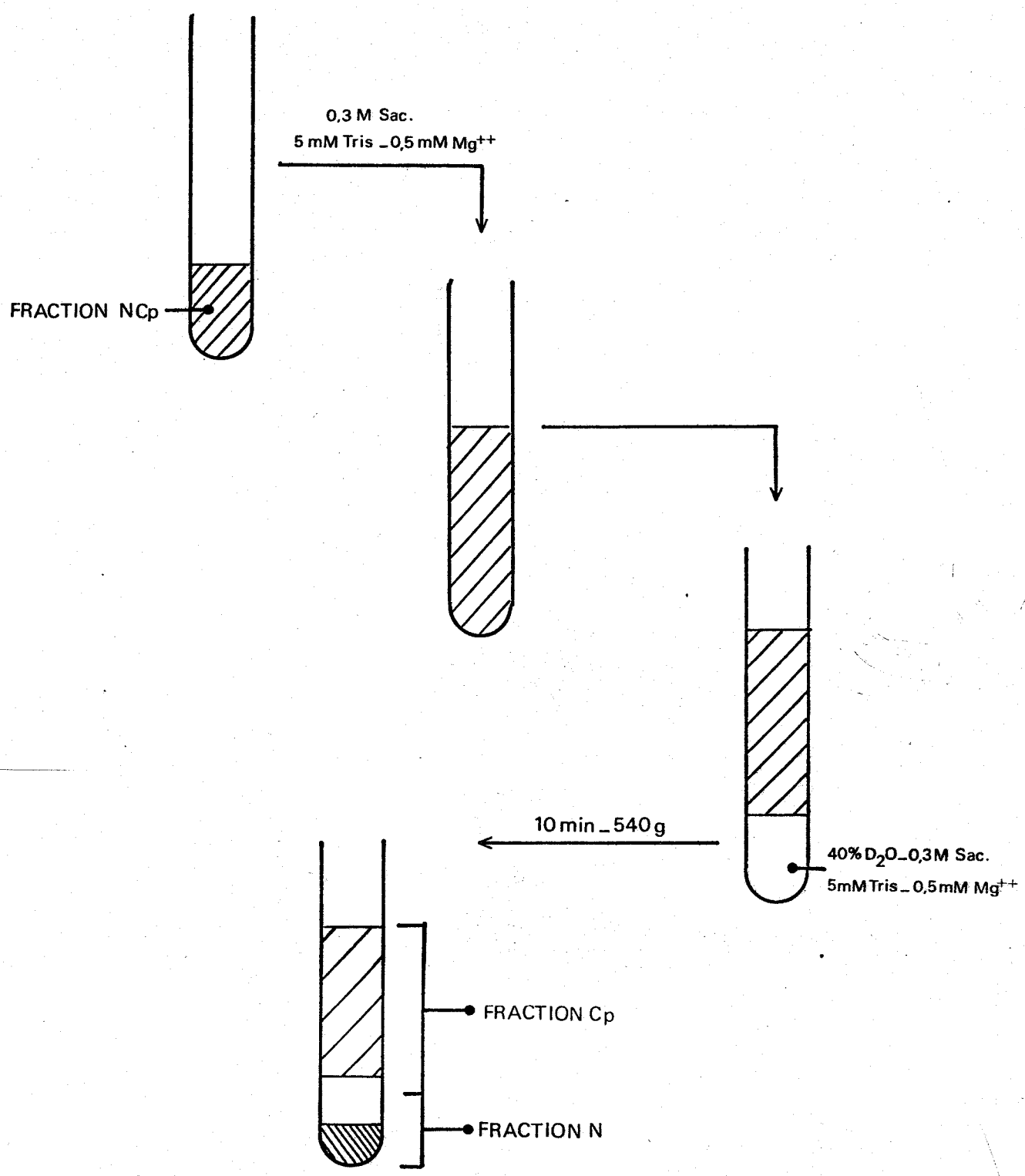


Figure 7 : Elimination des noyaux et des hématies de la fraction NCp selon la méthode 1.



TABLEAU VIII

Dosage de RNA de la fraction Cp préparée selon la méthode 1

Expérience	% de RNA de la fraction Cp	
	/Ncp	/homogénat
1	39,7	14,0
2	48,6	16,4
3	42,5	15,4
4	57,6	19,5
5	37,5	13,3
Moyenne	45,2 ± 8,10	15,7 ± 2,4



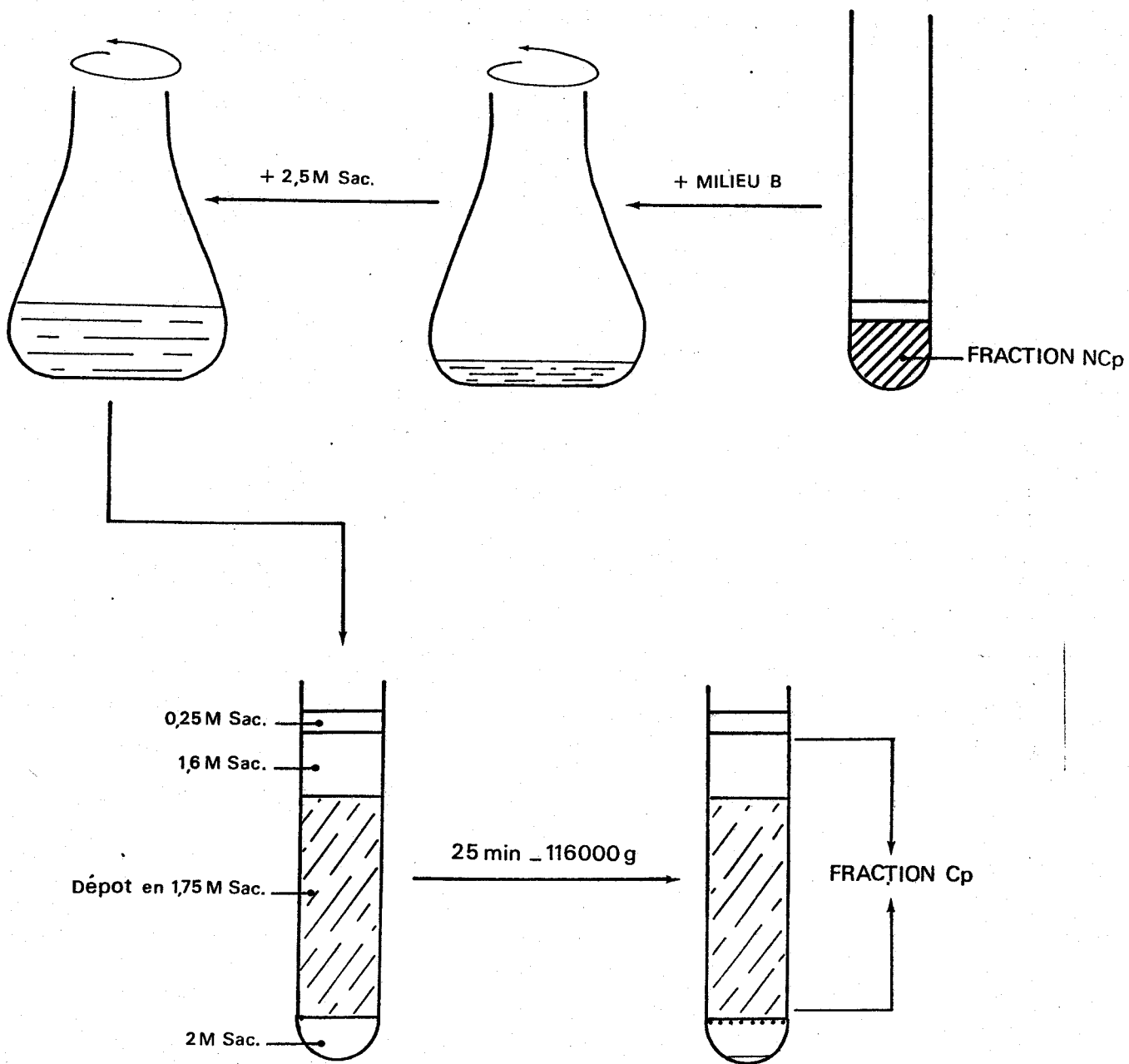


Figure 8 : Purification de la fraction NCp en saccharose concentré (méthode 2).

Après centrifugation, les hématies flottant sur le coussin de saccharose 1,6 M sont aspirées et la fraction suivante, constituant la fraction Cp, est prélevée à l'aide d'une seringue. Le matériel à l'interphase dépôt-saccharose 2 M, le coussin de saccharose 2 M et le culot blanc de noyaux sont mélangés aux érythrocytes pour les analyses ultérieures.

Les données analytiques obtenues par ce type de séparation sont présentées dans le TABLEAU IX (p. 59). La fraction noyaux + hématies qui représente 95 % du DNA de NCp (soit 93 % de l'homogénat) est très peu contaminée par les mitochondries étant donné la faible activité cytochrome c oxydasique de cette fraction. Le contenu en RNA de la fraction N (7,4 %) est légèrement plus élevé que celui trouvé pour une fraction de noyaux purs (i.e. 4 à 5 %, cf. réf. 5) et peut être attribué à une très faible contamination par les fragments de reticulum endoplasmique, provenant vraisemblablement du matériel présent à l'interphase dépôt-saccharose 2 M.

La fraction Cp renferme 28 % du RNA cellulaire pour une quantité importante de mitochondries.

V - TENEUR EN POLYSOMES LIBRES ET EN RNA SOLUBLE DE LA FRACTION Cp

Pour estimer la contamination par des polysomes libres de la fraction Cp, nous n'avons plus utilisé la méthode classique qui consiste à ajouter des polysomes libres marqués par un élément radioactif dans leur RNA. Cette méthode présente, en effet, certains inconvénients. D'une part, on provoque une surcharge en polysomes libres, ce qui pourrait se traduire par une association artefactuelle de ces derniers avec les organites, d'autre part il est évident que les polysomes ajoutés ont une distribution en ribosomes différente de celle de l'homogénat étudié. Ces polysomes qui proviennent de préparations différentes, ont été soumis à plusieurs étapes de purification et sont donc partiellement dégradés.

Au laboratoire, nous avons montré qu'un nouveau milieu de centrifugation, la métrizamide (*) permettait ce genre de détermination qualitative et quantitative (57). En effet, dans un gradient 20-60 p. 100 de métrizamide,

* (N-(2,4,6-tri-iodo-3-N-méthyl-acétylamino-benzoyl)-glucosamine)

TABLEAU IX

Distribution du RNA, du DNA, des protéines (exprimés en mg) et des activités de diverses enzymes marqueurs (exprimées en unités) dans les fractions N et Cp obtenues à partir de la fraction NCp selon la méthode 2

	Nbre exp.	Fraction N		Fraction Cp	
		mg ou U	% de l'homogénat	mg ou U	% de l'homogénat
RNA	8	1,20 ± 0,17	7,4 ± 1,1	4,57 ± 0,22	27,9 ± 1,3
DNA	4	3,34 ± 0,47	93,1 ± 1,3	0,18 ± 0,01	4,9 ± 0,4
Protéines	5	17,33 ± 2,26	4,6 ± 0,4	130,28 ± 6,65	30,3 ± 1,5
Glucose-6-phosphatase	4	0,60 ± 0,10	2,3 ± 0,4	11,90 ± 0,81	44,6 ± 3,0
Cytochrome c oxydase	4	0,22 ± 0,12	0,4 ± 0,2	35,78 ± 2,76	74,0 ± 5,7
Phosphatase acide	5	0,07 ± 0,03	0,4 ± 0,1	2,83 ± 0,15	18,1 ± 0,9

les polysomes libres se présentent, à l'équilibre, sous forme d'un pic de densité 1,29-1,30 g/cm³, bien séparé de tout matériel membranaire et des organites cellulaires. Cette méthode exige néanmoins un marquage radioactif des molécules, la métrizamide absorbant en U.V. Les profils obtenus pour l'homogénat et la fraction Cp dans ce type de gradient sont présentés dans la figure 9 (p. 61). Les fractions 1 à 14 correspondent aux polysomes libres. Une valeur en polysomes libres de 19 % est trouvée dans le cas de l'homogénat, ce qui est en parfait accord avec de nombreux travaux (5). L'analyse de la fraction Cp en métrizamide montre que 0,12 % du RNA cellulaire sont présents dans la région correspondant aux polysomes libres. Ceci représente une contamination de la fraction Cp par 0,6 % des polysomes libres. Cette contamination est négligeable et on peut donc admettre que la fraction Cp ne renferme que des polysomes sous forme liée aux membranes. Le RNA soluble n'intervient, quant à lui, que pour 2 % du RNA du complexe (estimé selon la méthode décrite p. 36).

VI - OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE LA FRACTION Cp

Les mitochondries et les membranes granulaires apparaissent, au microscope électronique, comme les deux composants majeurs de la fraction Cp (voir PLANCHE VIII, p. 63). Ce matériel membranaire, portant de nombreux ribosomes, existe principalement sous forme de larges empilements comparables à ceux observés dans une cellule entière (voir PLANCHE IX, p. 64). Les membranes bilamellaires sont à proximité très étroite des mitochondries, longeant parfois la membrane externe de ces dernières (voir PLANCHE X, p. 65). Certaines expansions de la membrane mitochondriale externe semblent fusionner au reticulum endoplasmique voisin. Les mitochondries ont un aspect normal, non contracté, et ont conservé leur membrane externe intacte. Ceci indique, s'il en était besoin, que les diverses manipulations du complexe ne sont pas destructives.

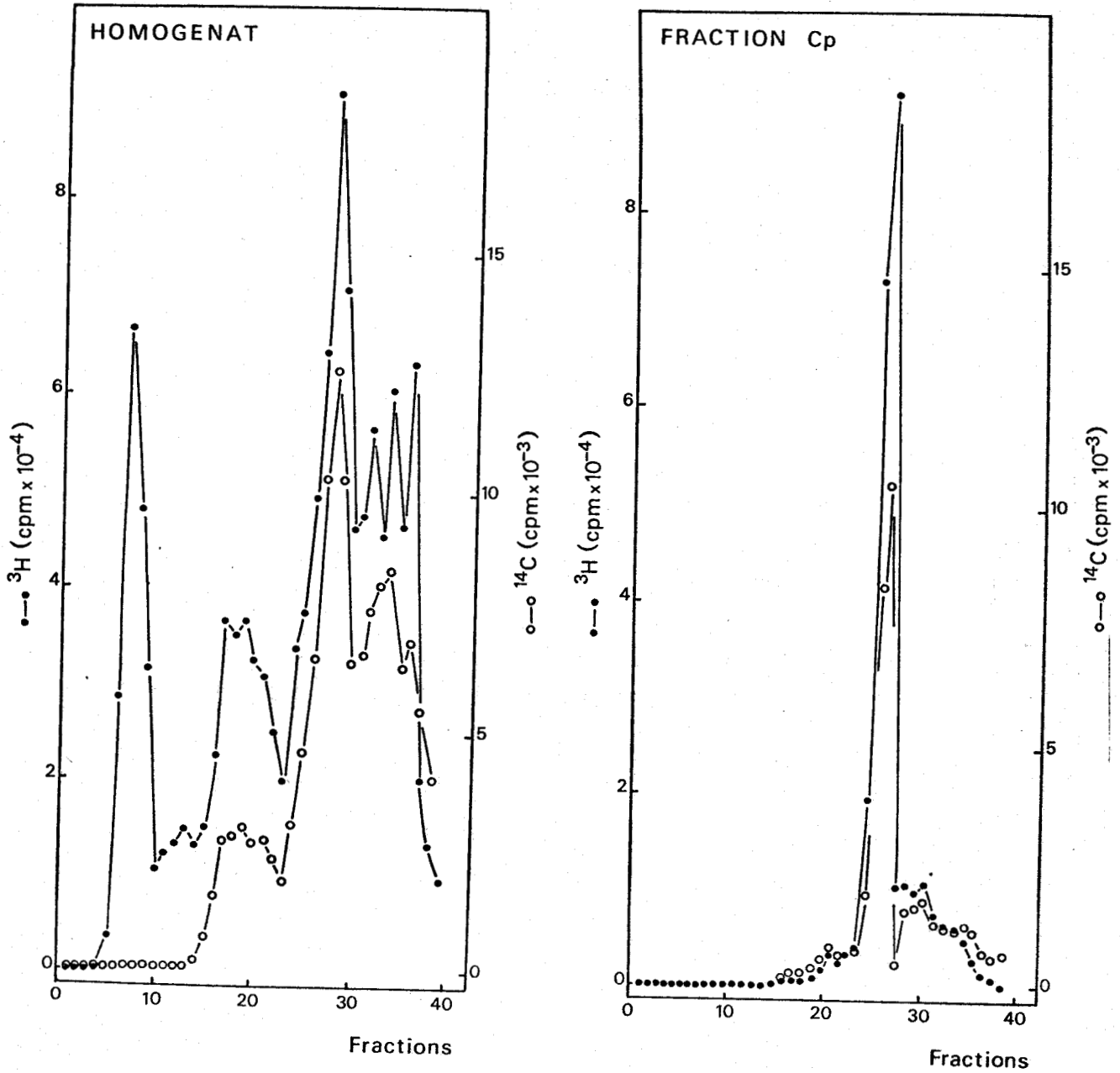


Figure 9 : Analyse en gradient 20-60 p. 100 de métrizamide de l'homogénat et de la fraction Cp.



FIGURE 9 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- A - Un rat ayant reçu une injection intrapéritonéale d'acide orotique ^3H (1 mCi/kg) et une injection de choline ^{14}C (0,1 mCi/kg) respectivement 18 h et 4 h auparavant est sacrifié et une fraction Cp est préparée comme décrit dans "METHODOLOGIE".
- B - Des fractions aliquotes de l'homogénat et de la fraction Cp (correspondant à 13 mg de foie) sont déposées sur un gradient 20-60 p.100 de méthrizamide (volume : 3,8 ml, tubes de rotor SW 50-1) réalisé en Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, à 20°C, KCl 25 mM et $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 3 mM.
- C - Après 8 h de centrifugation à 33 000 tours/mn dans le rotor SW 50-1, des fractions de 0,1 ml sont collectées et la radioactivité est déterminée par filtration et comptage de l'acido-insoluble comme décrit dans "METHODOLOGIE".

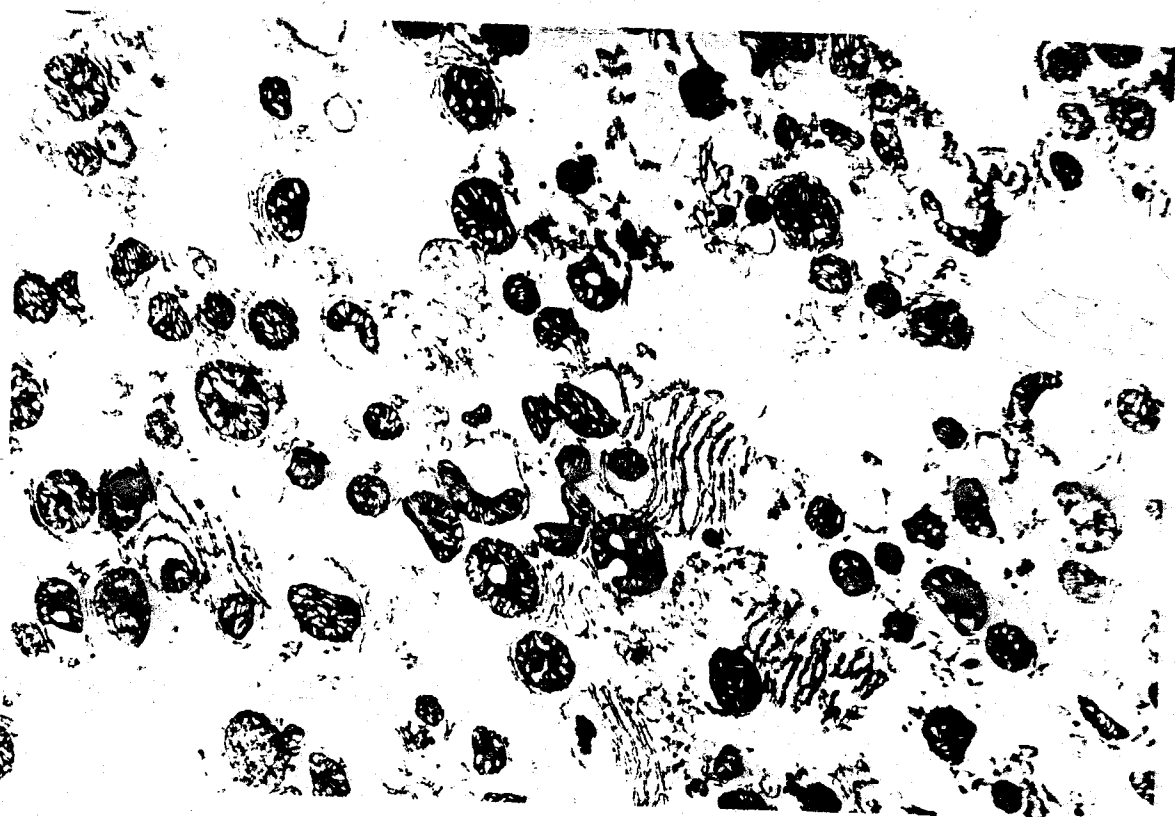


PLANCHE VIII : *Vue d'ensemble de la fraction Cp.*

Grossissement : 4100 - Agrandissement : 2



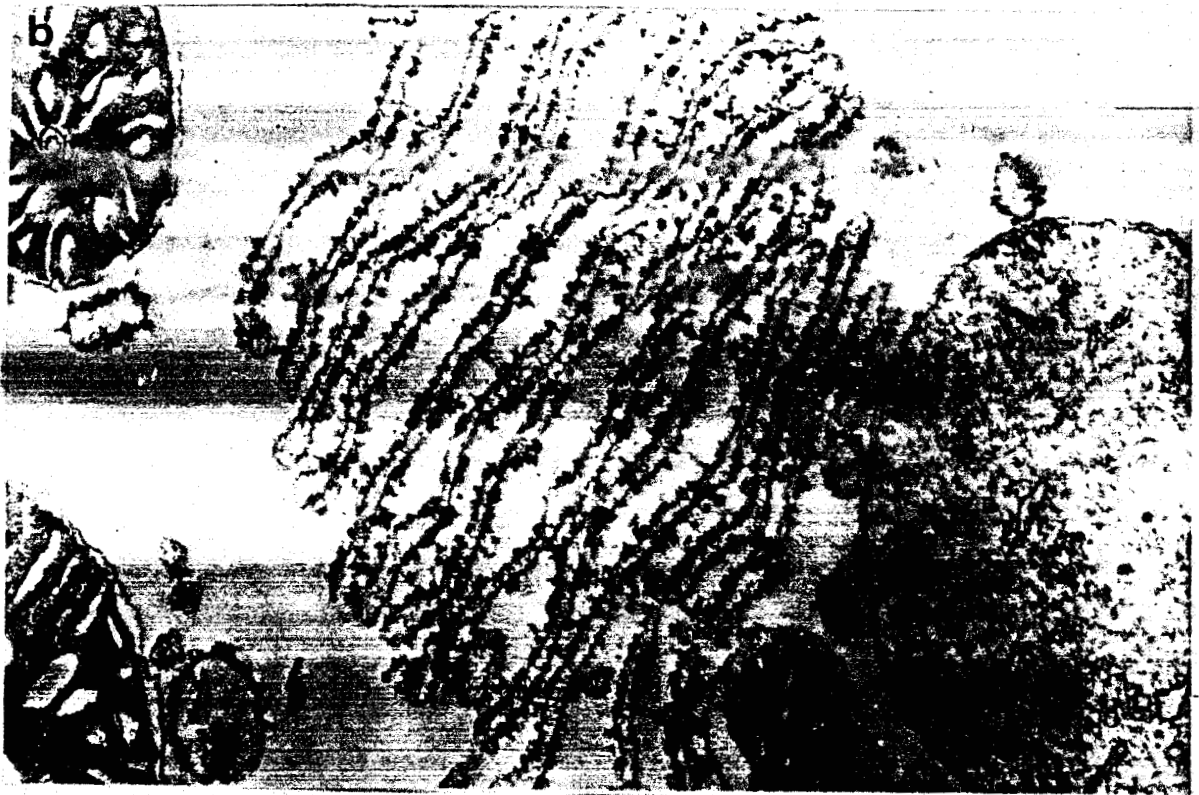
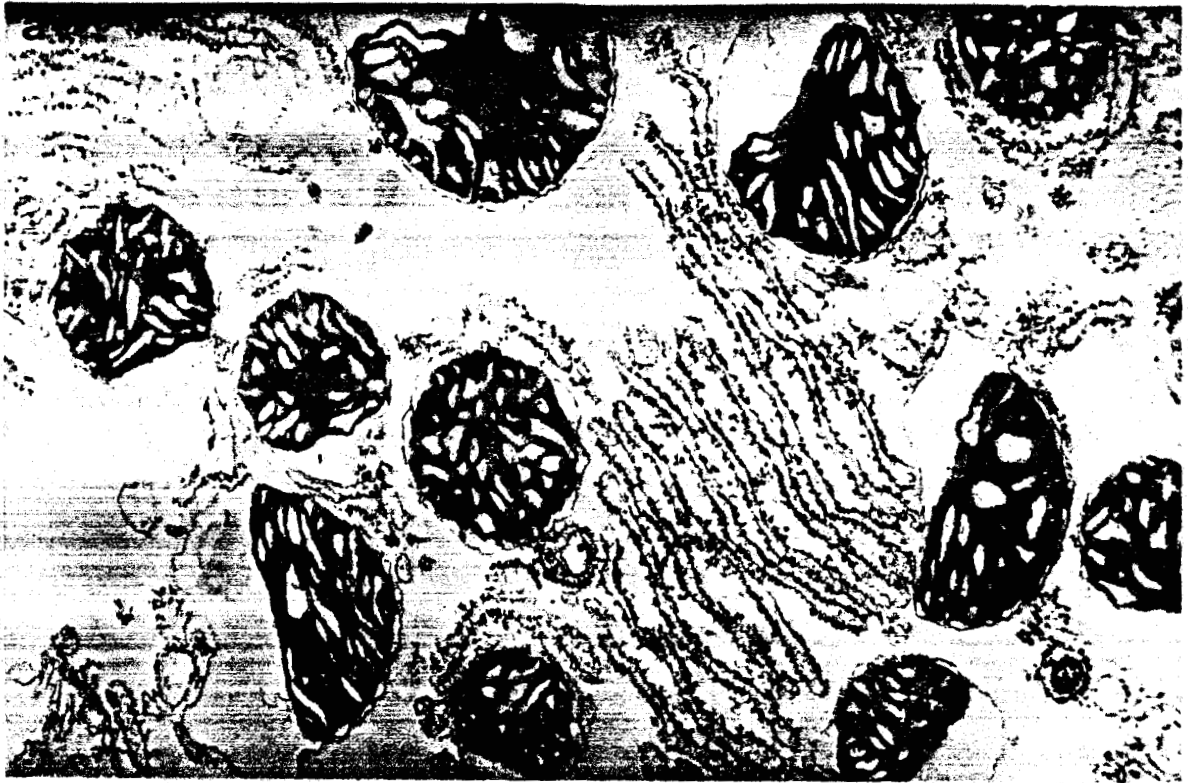


PLANCHE IX : Complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique Cp.

Les membranes granulaires sont présentes sous forme de larges empilements identiques à ceux observés in vivo.

Grossissement : 15 000 (a), 25 000 (b)

Agrandissement : 2

BUS
LILLE



PLANCHE X : *Etroite association entre les mitochondries et les membranes granulaires de la fraction Cp.*

Une certaine continuité semble exister entre la membrane externe des mitochondries et le reticulum endoplasmique en plusieurs endroits (indiqués par les flèches).

Grossissement : 25 000 (a), 36 000 (b)

Agrandissement : 2

BUS
LILLE

VII - CONCLUSION

La méthode que nous avons mise au point permet donc d'obtenir une fraction importante de membranes granulaires, d'aspect identique à celui observé in vivo, sans contamination par les polysomes libres. Elle limite au maximum les phénomènes d'agrégation des membranes et les chocs osmotiques et élimine la majeure partie des lysosomes. On peut ainsi obtenir, à partir de cette fraction, des polysomes liés dont l'intégrité structurale est très satisfaisante.

CONCLUSION

L'étude des spécificités de synthèse des polysomes libres et des polysomes liés, leurs relations de biogénèse et de fonction impliquent l'obtention de ces deux types de polysomes de façon quantitative et qualitative. Le problème de leur étude reste, cependant, toujours posé, notamment dans le cas des polysomes liés. En effet, jusqu'à présent, aucune méthode de fractionnement ne permettait d'obtenir une fraction représentative de polysomes liés ayant conservé leur intégrité structurale et fonctionnelle.

Le reticulum endoplasmique granulaire se compose d'une part de vésicules de taille assez petite, retrouvées dans le surnageant post-mitochondrial, d'autre part de larges fragments bilamellés retrouvés en association avec les mitochondries et sédimentant à basse vitesse. Les polysomes associés à ces derniers, représentant la majorité des polysomes liés, ne peuvent être séparés des membranes sans dégradation de leur RNA messenger. Notre travail a consisté à isoler un complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique en respectant au maximum l'intégrité des polysomes.

La première méthode mise au point, basée sur la densité des particules, conduit à la préparation d'un complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique avec un rendement élevé. Elle rend possible l'étude de l'interaction entre les membranes et les mitochondries ainsi que l'étude des liaisons polysomes-membrane dans lesquelles le mRNA n'intervient pas. Cependant, elle ne permet pas l'isolement, dans un état de préservation suffisante, des polysomes contenus dans cette préparation. La présence d'une fraction importante de lysosomes en est la principale raison.

La méthode suivante de préparation a été conçue pour éliminer le plus rapidement possible ces organites. Elle met à profit la différence de comportement en centrifugation des lysosomes et du complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique dans un milieu ionisé. Elle fait intervenir en outre des actions mécaniques très faibles, évite les chocs osmotiques et limite l'agrégation des divers organites cellulaires. Nous avons montré au laboratoire que des polysomes peuvent être isolés dans un état de préservation très satisfaisant à partir de cette fraction.

Grâce à cette préparation, il devrait être possible d'élucider certaines relations qui existent entre le reticulum endoplasmique et les mitochondries dans la cellule, et d'envisager la synthèse des protéines sous un angle différent, celui de la régulation par compartimentation.

RESUME

Nous avons montré que la principale difficulté rencontrée dans l'étude des polysomes liés réside dans la perte importante en membranes granulaires qui intervient lors de la préparation de la fraction mitochondriale. Toute tentative pour récupérer ces polysomes liés se traduit par une dégradation importante de leur mRNA.

Le but de notre travail a été d'isoler un complexe mitochondrie-reticulum endoplasmique de façon très douce, afin de préserver l'intégrité des polysomes qui y sont présents. Deux méthodes ont été mises au point. La première fait intervenir une flottaison des membranes associées aux mitochondries dans des solutions concentrées en saccharose. La deuxième est basée sur une séparation du complexe par centrifugation différentielle. Les deux fractions ainsi obtenues ont été analysées à l'aide de divers dosages et par la mesure de l'activité de plusieurs enzymes marqueurs. Un contrôle morphologique a, de plus, été réalisé au microscope électronique.

Les résultats que nous avons obtenus permettent d'envisager l'analyse de polysomes liés ayant conservé leur intégrité structurale et fonctionnelle, de façon quantitative.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - PALADE, G.E. (1955)
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 59.
- 2 - PALADE, G.E. (1958)
Microsomal and Protein Synthesis, ROBERTS, R.B., Ed. (Pergamon Press, New York) p. 36.
- 3 - GOLDBERG, B. & GREEN, H. (1964)
J. Cell Biol. 22, 227.
- 4 - PORTER, K.R. (1961)
The Cell, BRACHET, J. & MIRSKY, A.E., Ed. (Academic Press, New York) p. 621.
- 5 - BLOBEL, G. & POTTER, V.R. (1967)
J. Mol. Biol. 26, 279.
- 6 - SIEKEVITZ, P. & PALADE, G.E. (1960)
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 619.
- 7 - PETERS, T. (1962)
J. Biol. Chem. 237, 1136.
- 8 - ASKONAS, B.A. & WILLIAMSON, A.R. (1968)
Biochem. J. 109, 637.
- 9 - SARGENT, J.R. & CAMPBELL, P.N. (1965)
Biochem. J. 96, 134.
- 10 - TATA, J.R. (1973)
Ribosome - Membrane Interaction and Protein synthesis - Karolinska Symp. Res. Methods. Reprod. Endocrinol. 6, 192.
- 11 - ANDREWS, T.M. & TATA, J.R. (1968)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 1050.

- 12 - ANDREWS, T.M. & TATA, J.R. (1971)
Biochem. J. 124, 883.
- 13 - HENDLER, R.W. (1968)
Protein Biosynthesis and Membranes Biochemistry. WILEY, J. & Sons,
Inc., New York, p. 344.
- 14 - PITOT, H.C. & JOST, J.P. (1968)
Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in Mammalian Cells -
SAN PIETRO, A. et al., Ed. (Academic Press, New York), p. 289.
- 15 - IKEHARA, Y. & PITOT, H.C. (1973)
J. Cell Biol. 59, 28.
- 16 - RAGNOTTI, G., LAWFORD, G.R. & CAMPBELL, P.N. (1969)
Biochem. J. 112, 139.
- 17 - SAKAMOTO, T. & HIGASHI, T. (1973)
J. Biochem. (Tokyo) 73, 1083.
- 18 - KADENBACH, B. (1970)
Eur. J. Biochem. 12, 392.
- 19 - GONZALEZ-CADAVID, N.F., ORTEGA, J.P. & GONZALEZ, M. (1971)
Biochem. J. 124, 685.
- 20 - GODINOT, C. & LARDY, H.A. (1973)
Biochemistry, 12, 2051.
- 21 - AMAR-CORTESEC, A., BEAUFAY, H., WIBO, M., THINES-SEMPOUX, D.,
FEYTMANS, E., ROBBI, M. & BERTHET, J. (1974)
J. Cell Biol. 61, 201.
- 22 - ADELMAN, M.R., SABATINI, D.D. & BLOBEL, G. (1973)
J. Cell Biol. 56, 191.

- 23 - VENKATESAN, N. & STEELE, W.J. (1972)
Biochim. Biophys. Acta, 287, 526.
- 24 - RAMSEY, J.C. & STEELE, W.J. (1976)
Biochemistry, 15, 1704.
- 25 - LEWIS, J.A. & TATA, J.R. (1973)
J. Cell Sci. 13, 447.
- 26 - FRANKE, W.W. & KARTENBECK, J. (1971)
Protoplasma, 73, 35.
- 27 - MORRE, D.J., MERRIT, W.D. & LEMBI, C. (1971)
Protoplasma, 73, 43.
- 28 - SHORE, G.C. & TATA, J.R. (1977)
J. Cell Biol. 72, 714.
- 29 - NASS, S., NASS, M.M.K. & HENNIX, 4 (1965)
Biochem. Biophys. Acta, 95, 426.
- 30 - KADENBACH, B. (1966)
Biochim. Biophys. Acta, 134, 430.
- 31 - DROCHMANS, P., WANSON, J.C. & MOSSELMAN, R. (1975)
J. Cell Biol. 66, 1.
- 32 - HOGEBOOM, G.H., SCHNEIDER, W.C. & STRIEBEL, M.J. (1952)
J. Biol. Chem. 196, 111.
- 33 - CHAUVEAU, J., MOULÉ, Y. & ROUILLER, C.H. (1956)
Expl. Cell Res. 11, 317.
- 34 - MOULE, Y. (1953)
Arch. Sci. Physiol. 7, 161.

- 35 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265.
- 36 - GILLES, K.W. & MYERS, A. (1975)
Nature (London) 206, 93.
- 37 - BEAUFAY, H., AMAR-CORTESEC, A., FEYTMANS, E., THINES-SEMPOUX, D.,
WIBO, M., ROBBI, M. & BERTHET, J. (1974)
J. Cell. Biol. 61, 188.
- 38 - FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. (1925)
J. Biol. Chem. 66, 375.
- 39 - STAHN, R., MAIER, K.P. & HANNING, G. (1970)
J. Cell. Biol. 46, 577.
- 40 - COOPERSTEIN, S.J. & LAZAROW, A. (1971)
J. Biol. Chem. 189, 665.
-
- 41 - WATTIAUX, R. & DE DUVE, C. (1950)
Biochem. J. 63, 606.
- 42 - LEIGHTON, F., POOLE, B., BEAUFAY, H., BAUDHUIN, P., COFFEY, J.W.,
FOWLER, S. & DE DUVE, C (1968)
J. Cell Biol. 37, 482.
- 43 - REID, E. (1972)
Subcellular Components, BIRNIE, G.D., Ed. (Butterworths, University
Park Press, Baltimore) p. 93.
- 44 - GLAUERT, A.M., ROGERS, G.E. & GLAUERT, R.H. (1956)
Nature (London) 178, 803.
- 45 - VENABLE, J.H. & GOGGESHALL, R. (1965)
J. Cell Biol. 25, 407.

- 46 - GARRET, R.A. & WITTMAN, H.G. (1973)
Karolinska Symp. Res. Methods. Reprod. Endocrinol. 6, 75.
- 47 - SCHNEIDER, W.C. & HOGEBOOM, G.U. (1951)
Cancer Res. 11, 1.
- 48 - DALLNER, G. (1963)
Acta path. microbiol. Scand., Suppl. 166, 1.
- 49 - BAUDHUIN, P., EVRARD, P. & BERTHET, J. (1967)
J. Cell. Biol. 32, 181.
- 50 - TICE, L.W. & BARNETT, R.J. (1962)
J. Histochem. Cytochem. 10, 754.
- 51 - SCHNAITMAN, C. & GREENWALT, J.W. (1968)
J. Cell Biol. 38, 158.
- 52 - DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. & APPELMANS, F.
(1955)
Biochem. J. 92, 179.
- 53 - BAUDHUIN, P., BEAUFAY, H., RAHMAN-LI, Y., SELLINGER, O.Z.; WATTIAUX, R.,
JACQUES, P. & DE DUVE, C. (1964).
Biochem. J. 92, 179.
- 54 - CHAPPELL, J.B. & HANSFORD, R.G. (1972)
Subcellular Components, BIRNIE, G.D., Ed. (Butterworths, University
Park Press, Baltimore) p. 93.
- 55 - DISSOUS, C., VERWAERDE, C., LEMPEREUR, C. & KREMBEL, J. (1978)
Eur. J. Biochem. 83, 5.
- 56 - DISSOUS, C., LEMPEREUR, C., VERWAERDE, C. & KREMBEL, J. (1978)
Eur. J. Biochem. 83, 17.
- 57 - DISSOUS, C., LEMPEREUR, C., VERWAERDE, C. & KREMBEL, J. (1976)
Eur. J. Biochem. 64, 361.