

50376  
1978

N° d'ordre : 671

50376  
1978  
9

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

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

par

Colette LEMPEREUR

SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES  
D'HEPATOCTYTE DE RAT PAR CENTRIFUGATION  
EN SACCHAROSE OU EN METRIZAMIDE



Membres du Jury MM.	J. MONTREUIL	Président
	J. KREMBEL	Rapporteur
	D.H. HAYES	} Examineurs
	A. CAPRON	

Présenté le 24 février 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 FERIET,  
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 Appliqué
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 <sup>le</sup> SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLEZ Roger	Biologie
M. THERY Pierre	Electronique
M. TOP Gérard	Sciences Economiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILLETTE Michel	Mécanique
M. WALLART Francis	Chimie
M. WERNER Georges	Informatique
M <sup>me</sup> ZIN-JUSTIN Nicole	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.

Les travaux décrits dans ce mémoire font partie des publications suivantes :

*The use of métrizamide as a density-gradient médium 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. (sous presse).

*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. (sous presse).

Certains résultats ont également fait l'objet 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 (1976).

TABLE DES MATIERES



## INTRODUCTION

LES DEUX CATEGORIES DE POLYSOMES	p. 1
ISOLEMENT DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE	p. 2
A) <u>Difficultés rencontrées</u>	
B) <u>Les différentes stratégies adoptées</u>	p. 3
1°) <i>Méthode de BLOBEL et POTTER</i>	
2°) <i>Méthode d'ADELMAN</i>	
3°) <i>Méthode de VENKATESAN et STEELE</i>	
4°) <i>Méthode de DISSOUS <u>et al</u></i>	
LES LIAISONS POLYSOMES-MEMBRANES ET LE PROBLEME DE LA SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES	p. 4
ETUDE CRITIQUE DES METHODES EXISTANTES DE SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES EN SACCHAROSE	
I - CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE DES MEMBRANES SUR GRADIENTS DISCONTINUS DE SACCHAROSE	p. 7
A) <u>Principe</u>	
B) <u>Etude critique</u>	
1°) <i>Contamination de l'interphase membranaire par les             polysomes libres</i>	
a) <i>Sédimentation non quantitative des polysomes libres</i>	
b) <i>Rétention de polysomes libres par les membranes</i>	

2°) Contamination des polysomes libres par les polysomes liés	p.15
3°) Intégrité structurale des polysomes	p.18
C) <u>Conclusion</u>	p.18
II - FLOTTAISON DES MEMBRANES	p.19
III - CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE	p.20
IV - CENTRIFUGATION DE VELOCITE EN GRADIENT CONTINU DE SACCHAROSE	
V - CONCLUSION	p.21
SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES EN METRIZAMIDE	
I - PROPRIETES ET UTILISATION DE LA METRIZAMIDE	p.22
A) <u>Propriétés physico-chimiques et intérêts</u>	
B) <u>Les applications de la métrizamide</u>	p.25
II - ANALYSE DU SURNAGEANT POST-LYSOSOMAL EN GRADIENT DE METRIZAMIDE	p.26
A) <u>Centrifugation isopycnique des différentes RNP polysomales</u>	
1°) Polysomes et monosomes	
2°) Sous-unités et mRNP	p.28
a) Dissociation des polysomes par l'EDTA	
b) Dissociation des polysomes par l'action du KCl et de la puromycine	
3°) Discussion	p.33

B) <u>Analyse du surnageant post-lysosomal</u>	p.38
III - SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES EN METRIZAMIDE	p.40

A) <u>Application du gradient linéaire de métrizamide à la mesure des contaminations croisées entre les fractions polysomales</u>	
B) <u>Purification des membranes par flottaison</u>	p.41
C) <u>Conclusion</u>	p.44

SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET  
LIES EN SACCHAROSE

I - ISOLEMENT QUANTITATIF DES POLYSOMES LIBRES ET LIES D'UN SURNAGEANT POST-LYSOSOMAL	p.45
---	------

A) <u>Principe</u>	
B) <u>Détermination des conditions optimales de la première centrifugation</u>	p.48
1°) <i>Distribution du RNA et des phospholipides dans les fractions</i>	
2°) <i>Analyse des fractions en gradient de métrizamide</i>	
C) <u>Intégrité structurale des polysomes</u>	p.51
D) <u>Conclusion</u>	

II - PURIFICATION DES MEMBRANES GRANULAIRES D'UN SURNAGEANT POST-LYSOSOMAL	p.53
--	------

A) <u>Principe</u>	
B) <u>Etude analytique des fractions</u>	p.56

- 1°) Détermination du contenu en RNA et en phospholipides  
des fractions p.56
- 2°) Analyse en gradient de métrizamide p.61
- C) Conclusion.

## METHODOLOGIE

### I - TECHNIQUES DE MARQUAGE IN VIVO p.62

#### A) RNA

- 1°) Marquage uniforme
- 2°) Marquage long
- 3°) Marquage préférentiel des rRNA
- 4°) Marquage court
- 5°) Marquage spécifique du mRNA

#### B) Protéines p.63

#### C) Phospholipides membranaires

### II - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

#### A) Surnageant post-mitochondrial

#### B) Surnageant post-lysosomal p.64

#### C) Polysomes libres purifiés

### III - FRACTION D'INHIBITEUR CYTOPLASMIQUE DE RNase

### IV - TECHNOLOGIE DES GRADIENTS p.65

A) <u>Saccharose</u>	p.65
B) <u>CsCl</u>	p.66
C) <u>Métrizamide</u>	
1°) <i>Analyse en gradient préformé</i>	
2°) <i>Stabilité de la pente des gradients préformés pendant la centrifugation</i>	p.67

V - DOSAGE DU RNA

VI - ESTIMATION DU GLYCOGENE

VII - MESURES DE RADIOACTIVITE p.69

VIII- PRODUITS UTILISES

CONCLUSION p.70

BIBLIOGRAPHIE

## ABREVIATIONS

- rRNA : Acide ribonucléique ribosomal
- mRNA : Acide ribonucléique messager
- tRNA : Acide ribonucléique de transfert
- RNP : Ribonucléoprotéine
- RNase : Ribonucléase
- Tris : 2 - amino - 2 - hydroxyméthyl - propanediol - 1,3
- Te : Triéthanolamine
- EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique
- DTT : Dithiothreitol
- TCA : Acide trichloracétique
- PCA : Acide perchlorique
- CPM : Coups par minute
- U DO : Unité d'absorbance à 260nm
- SPM : Surnageant post-mitochondrial
- SPL : Surnageant post-lysosomal
- $\mathcal{G}_{av}$  : Accélération au rayon moyen

## INTRODUCTION

## LES DEUX CATEGORIES DE POLYSOMES

Dès 1955 FAWCETT identifia dans la cellule parenchymateuse de foie de rat deux populations de polysomes cytoplasmiques distinctes morphologiquement : l'une libre dans le cytoplasme et l'autre étroitement associée à un réseau important de membranes appelé réticulum endoplasmique (1).

Les travaux de PALADE et SIEKEVITZ (1955-1960) mirent en relation l'abondance du réticulum endoplasmique et l'activité sécrétrice de différents types cellulaires (2). Ces auteurs proposèrent alors l'hypothèse selon laquelle les polysomes libres synthétiseraient les protéines destinées à rester à l'intérieur de la cellule, tandis que les polysomes liés seraient le siège de la synthèse des protéines d'excrétion (3). Cette théorie s'est vue peu à peu confirmée par de nombreuses études biochimiques concernant soit la liaison ribosome-membrane (voir p. 5), soit la nature des protéines synthétisées par les deux catégories de polysomes.

L'existence d'une synthèse préférentielle de la sérumalbumine et des immunoglobulines par les polysomes liés fût assez rapidement démontrée et admise (4, 5). Cependant les travaux relatifs au mécanisme de biosynthèse des protéines non secrétées, comme la ferritine par exemple, ont donné des résultats contradictoires (6-8). Ceux-ci ont vraisemblablement pour cause la difficulté d'obtenir sans contamination réciproque des fractions représentatives de polysomes libres et liés.

Toutefois, pour de multiples raisons, la fonction des polysomes liés au réticulum endoplasmique ne saurait se limiter à la synthèse des protéines excrétées. En effet il existe du réticulum granulaire dans des cellules possédant peu ou pas



d'activité sécrétrice. En outre, la croissance et le développement cellulaires s'accompagnent généralement d'une prolifération active du système membranaire. Enfin, dans l'hépatocyte par exemple, la quantité de protéines excrétées ne représente qu'une faible proportion des protéines synthétisées journallement.

## ISOLEMENT DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

### A) Difficultés rencontrées

En 1967 BLOBEL et POTTER ont établi la distribution des RNAs dans la cellule de foie de rat : le RNA ribosomal représente 80% du RNA total, le RNA nucléaire 4 à 5% et le RNA non sédimentable 15%. 25% des ribosomes sont libres dans le cytoplasme et 75% sont associés aux membranes (9).

Ces auteurs ont montré que le rendement en réticulum endoplasmique dans le surnageant post-mitochondrial augmente avec l'intensité de l'homogénéisation. Cependant les membranes du réticulum ne peuvent jamais être obtenues quantitativement (30% au maximum) même si d'importantes forces de cisaillement sont appliquées au matériel cellulaire.

Dans les travaux de BLOBEL et POTTER, le milieu d'homogénéisation contient les ions nécessaires à la préservation de la structure et de l'activité biologique des ribosomes. Or la présence d'ions monovalents et divalents favorise l'association des organites cellulaires entre eux. Toutefois, en absence d'ions, seulement 50% du RNA associé aux membranes sont obtenus dans un surnageant post-mitochondrial (10).

La principale difficulté provient donc du fait qu'une fraction importante de réticulum cosédimente avec les mitochondries. L'examen microscopique d'un hépatocyte intact révèle la présence de grands fragments membranaires bilamellés ; ceux-ci peuvent constituer des empilements parfois étroitement associés aux mitochondries. LEWIS et TATA ont montré que ces structures sédimentent à très basse vitesse en conservant leur aspect morphologique (11).

A l'heure actuelle, le problème que pose l'isolement quantitatif, à l'état pur, des membranes du réticulum n'est donc

pas résolu. Selon le but recherché, différentes stratégies seront adoptées mais chacune d'entre elles ne permet d'envisager que de façon partielle, l'étude de la structure et de la fonction des polysomes liés.

#### B) Les différentes stratégies adoptées

- 1°) *Isolement, en présence d'ions, des membranes granulaires d'un surnageant post-mitochondrial. Etude qualitative des liaisons polysomes-membranes.*

La méthode de BLOBEL et POTTER (9) peut être utilisée pour fractionner la cellule hépatique après une homogénéisation plus ou moins forte du tissu. Les membranes granulaires seront isolées en faible quantité (5 à 20% du RNA cellulaire) et la séparation des polysomes libres et liés par longue centrifugation sur gradient discontinu de saccharose peut susciter de nombreuses critiques (voir p. 7).

De plus, la fraction de réticulum purifié étant non représentative, seules certaines études qualitatives des liaisons pourront être envisagées.

- 2°) *Isolement, en absence d'ions, d'un échantillon plus représentatif des membranes granulaires de la cellule. Etude des liaisons ribosomes-membranes.*

La méthode d'ADELMAN (12), conçue pour isoler en proportion plus grande le réticulum endoplasmique de la cellule, permettra d'entreprendre l'étude structurale des liaisons ribosomes-membranes dans lesquelles le RNA messenger n'intervient pas. En effet l'intégrité de celui-ci ne peut être respectée car une libération importante de RNase est provoquée par l'éclatement des lysosomes.

- 3°) *Obtention, en présence d'ions, des polysomes libres et liés avec un rendement élevé. Etude des spécificités de synthèse.*

VENKATESAN et STEELE préparent des fractions de polysomes libres et liés avec un très bon rendement (90% et 86% respectivement) (13). La séparation des deux catégories de

polysomes est effectuée par simple centrifugation différentielle de l'homogénat. Cette méthode, modifiée ensuite par RAMSEY et STEELE (14), permet une assez bonne préservation du RNA messenger.

Le principe de la mesure des contaminations croisées des deux fractions polysomales peut cependant faire l'objet de certaines remarques (voir p.40). En outre, ces contrôles n'ont été réalisés que sur des animaux ayant été soumis à une période de jeûne.

4°) *Fractionnement, en présence d'ions, permettant l'isolement de la quasi-totalité du réticulum en deux fractions membranaires distinctes. Etude des spécificités de synthèse. Etude qualitative des liaisons polysomes-membranes et des relations biogénèse-fonction.*

DISSOUS et al ont mis au point au laboratoire une nouvelle méthode de fractionnement. La quasi-totalité des polysomes liés peut être isolée avec une haute préservation de l'intégrité du RNA messenger (15). En effet, l'homogénéisation et les manipulations du matériel cellulaire sont réalisées dans des conditions très douces de façon à limiter au maximum l'éclatement des lysosomes.

Deux fractions membranaires, présentant les caractères morphologiques observés in vivo, sont alors obtenues. L'une est constituée des fragments bilamellés du réticulum endoplasmique en association avec les mitochondries tandis que l'autre, contenue dans le surnageant post-lysosomal, renferme surtout des vésicules de taille variable.

L'étude de ce surnageant post-lysosomal a fait précieusement l'objet de notre travail.

LES LIAISONS POLYSOMES-MEMBRANES ET LE PROBLEME DE LA SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES

La majorité des connaissances actuelles, concernant les liaisons ribosomes-membranes dans l'hépatocyte de rat, découle des travaux de SABATINI et de son équipe (16). Les ribosomes sont liés aux membranes du réticulum endoplasmique par l'intermédiaire

de leur grande sous-unité et la chaîne peptidique naissante, s'allongeant à l'intérieur de l'interstice membranaire, peut être excrétée facilement.

Les études d'ADELMAN et al en 1973 ont ensuite complété ces données. Utilisant la méthode de préparation précédemment mentionnée (voir p.3), ces auteurs ont pu montrer que 40% des ribosomes sont détachables par une augmentation de la concentration en KCl alors que 90% peuvent être libérés si la haute force ionique est associée à l'action de la puromycine (17).

Ces résultats n'ont toutefois pu exclure l'existence d'autres types de liaisons plus labiles et notamment similaires à celles mises en évidence dans d'autres cellules. En effet ROSBACH et PENMAN (cellules Hela) (18) et FAIFERMAN (cellules de KREBS) affirment qu'une liaison des ribosomes aux membranes s'effectue par l'intermédiaire du RNA messenger. En 1975 DISSOUS et KREMBEL ont pu montrer, qu'une action ménagée de la RNase sur une fraction membranaire d'hépatocyte préparée dans des conditions très douces, conduit à la libération de ribosomes liés (19).

MECHLER et VASSALI ont émis l'hypothèse selon laquelle les sites d'attachement des ribosomes seraient présents sur les membranes en nombre limité, particulièrement dans une cellule à croissance rapide (20). A l'intérieur d'une même structure polysomale il serait donc possible d'identifier des ribosomes attachés directement et indirectement au réticulum endoplasmique.

Ce schéma pourrait être valable pour tous les types de cellule : le peptide naissant s'orienterait soit vers l'intérieur des membranes en servant d'ancrage au ribosome (cellules sécrétrices), soit en direction du cytoplasme (cellules non sécrétrices) (21)

L'existence de liaisons faibles semblant de plus en plus probable, le problème de la séparation des polysomes libres et liés revêt une nouvelle importance. Les méthodes de purification du réticulum endoplasmique, consistant en une centrifugation isopycniqne très longue des membranes, doivent être révisées.

Notre travail a consisté en la mise au point d'autres techniques permettant d'isoler, à partir du surnageant

post-lysosomal, les deux catégories de polysomes en respectant l'intégrité du RNA messenger et les liaisons polysomes-membranes.

ETUDE CRITIQUE DES METHODES EXISTANTES

DE SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES

ET LIES EN SACCHAROSE

Dans le chapitre d'introduction, nous avons pu montrer que le problème majeur posé par l'étude des polysomes liés au réticulum endoplasmique reste, quelque soit la stratégie adoptée, la séparation des polysomes libres et liés.

IBBETSON et FREEDMAN ont pu montrer que l'application de la chromatographie de tamisage moléculaire à cette séparation présente peu d'intérêt (22). L'ultracentrifugation préparative reste à ce jour la seule technique utilisable.

Différents procédés ont été décrits dans la littérature ; ils font intervenir soit la différence de densité entre les polysomes libres et les membranes, soit la différence de coefficient de sédimentation entre ces deux éléments. L'isolement des deux catégories polysomales sera effectué par centrifugation isopycnique ou centrifugation de zone, ou même encore par centrifugation différentielle.

### I - CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE DES MEMBRANES SUR GRADIENTS DISCONTINUS DE SACCHAROSE

#### A) Principe

Cette méthode, généralement attribuée à BLOBEL et POTTER, a connu une utilisation importante durant ces vingt dernières années, en particulier pour la purification des membranes granulaires de foie de rat. Le procédé consiste à centrifuger un surnageant post-mitochondrial sur un gradient discontinu composé de deux couches de saccharose (2M et 1-1,5M). Pendant la centrifugation, les membranes migrent pour s'immobiliser ensuite à l'endroit où le milieu possède une densité identique à la leur. Seuls les polysomes libres peuvent pénétrer la couche de saccharose 2M pour former un sédiment (voir fig.1<sub>A</sub>, p. 8).

#### B) Etude critique

1°) *Contamination de l'interphase membranaire par les polysomes libres.*

Dans la technique de BLOBEL et POTTER, ce sont les différences de densité entre les polysomes libres et les membranes

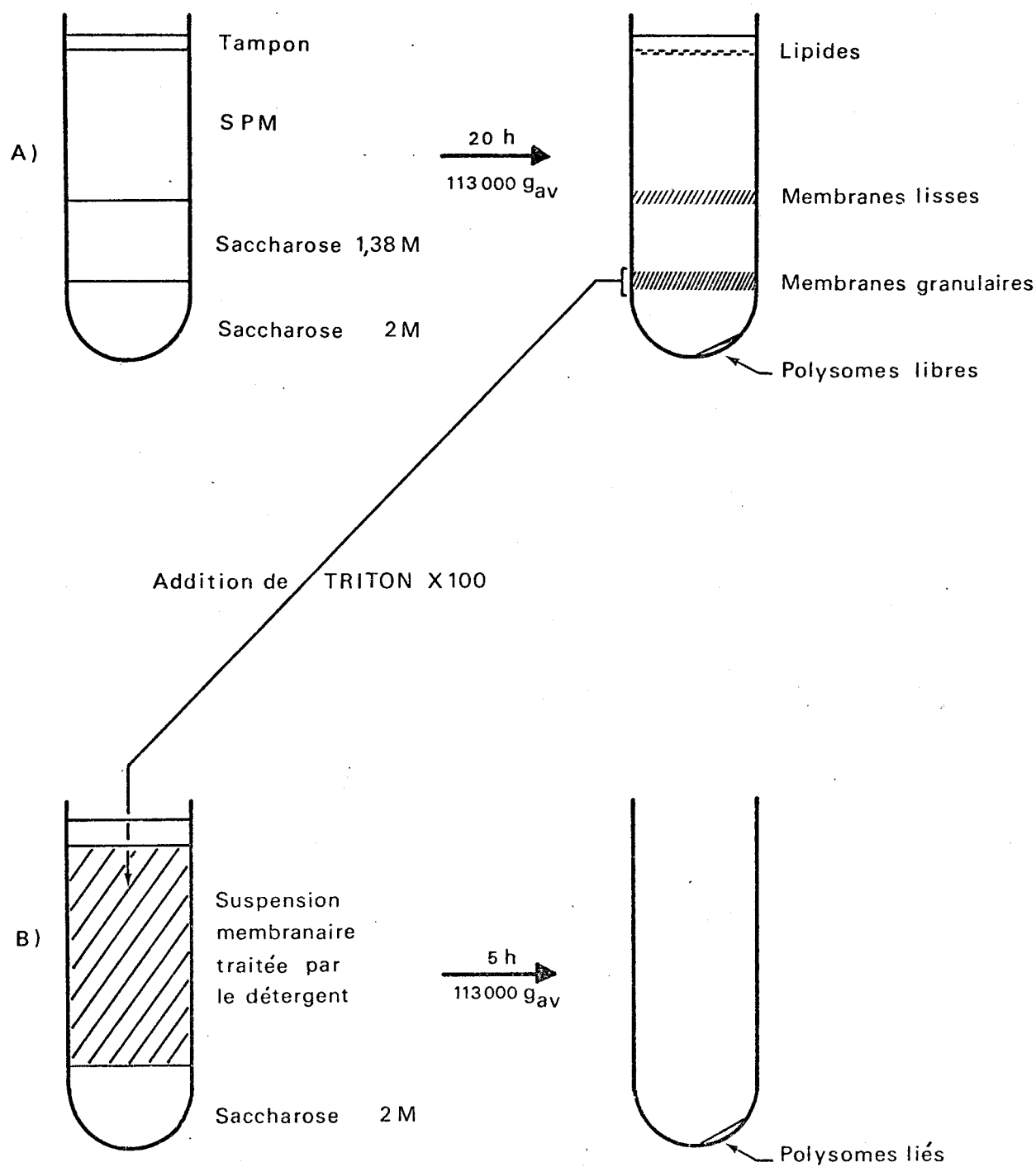


Figure 1 : A- Séparation des polysomes libres et des membranes par centrifugation sur gradient discontinu de saccharose.

B- Obtention des polysomes liés.



## FIGURE 1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Toutes les solutions de saccharose sont réalisées dans le tampon TKM<sub>1</sub>-DTT et renferment 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire et 50 µg/ml de protéines de la fraction d'inhibiteur de RNase. \*

A- Le surnageant post-mitochondrial est déposé par fractions de 15ml sur des gradients discontinus composés de 6ml de saccharose 2M et 8ml de saccharose 1,38M.

La centrifugation s'effectue pendant 20h à 113 000g<sub>av</sub> dans le rotor 60 Ti.

B- A la sortie des tubes, les interphases membranaires inférieures sont prélevées à la seringue et diluées par un volume de tampon TKM<sub>1</sub>-DTT. Après une nouvelle addition d'inhibiteur de RNase (concentration finale : 200 µg de protéines par ml), les membranes sont partiellement solubilisées par le TRITON X-100 à la concentration finale de 1 p100.

La suspension est déposée par fractions de 25ml sur 6ml de saccharose 2M. Après 5h de centrifugation à 113 000g<sub>av</sub> dans le rotor 60 Ti, on obtient un sédiment de polysomes liés purifiés.

\* : Voir méthodologie p 63.

qui conditionnent en premier lieu l'efficacité de la séparation.

On peut considérer que la densité maximale des membranes granulaires correspond à celle du saccharose 2M. Les ribosomes et les polysomes libres possédant une densité comprise entre celles du saccharose 2M et 2,2M, un certain degré de contamination est donc inévitable.

a) Sédimentation non quantitative des polysomes libres.

La figure 2 (p.11) montre le résultat d'une séparation sur gradient discontinu des polysomes libres et des membranes. Dans cette expérience, la présence de saccharose 2,2M empêche la formation d'un sédiment de polysomes libres. L'analyse de la répartition dans le gradient d'un témoin interne de polysomes libres purifiés nous indique que, même après une très longue centrifugation (20h ;  $157\ 000g_{av}$ ), une quantité appréciable de polysomes libres est retrouvée à l'interphase 1,5M-2M et contamine les membranes granulaires.

D'autre part, en absence de saccharose 2,2M et dans des conditions identiques de centrifugation, une partie des polysomes libres reste toujours présente dans la couche de saccharose 2M. Nous avons analysé cette fraction en gradient continu de saccharose et le profil polysomal obtenu montre que le maximum d'absorbance correspond à des polysomes de petite taille (comparativement aux polysomes sédimentés) (voir fig.3, p.13).

Pour pallier à la non-sédimentation de cette fraction "légère" de polysomes libres, il est possible de réduire la taille du coussin de saccharose 2M (12). Celui-ci doit cependant rester suffisamment important de manière à éviter une agrégation des membranes contre les parois du tube.

b) Rétention de polysomes libres par les membranes.

Dans la méthode originale de BLOBEL et POTTER, le surnageant post-mitochondrial est déposé sur un gradient discontinu de saccharose 0,5M-2M. La faible molarité en saccharose de la couche intermédiaire défavorise la séparation car dans ces conditions, l'ensemble des membranes peut rapidement former une barrière et de mauvais rendements en polysomes libres sont alors

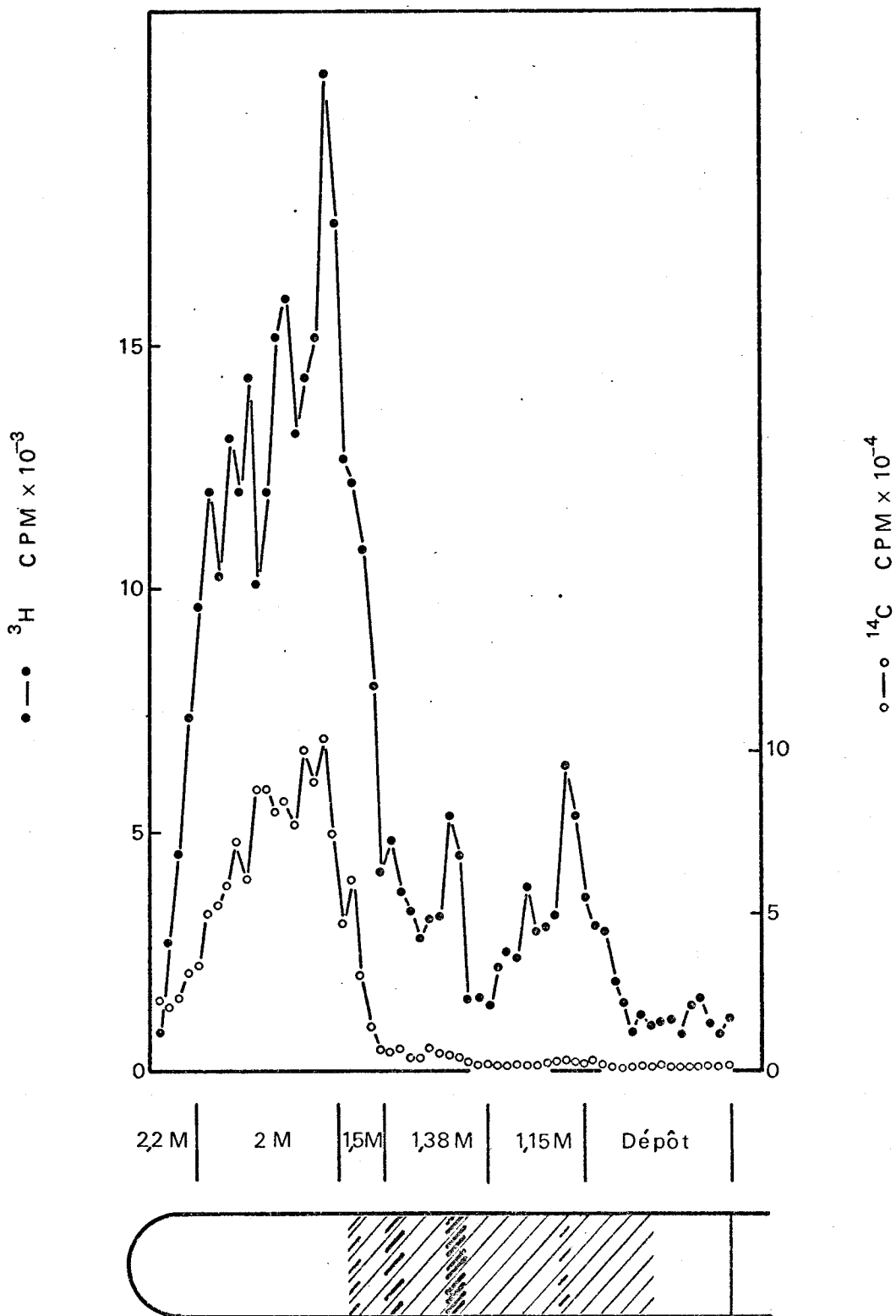


Figure 2 : Analyse de la séparation des polysomes libres et liés en gradient discontinu de saccharose.

Les zones hachurées dans le gradient représentent les membranes visibles à l'oeil nu.

## FIGURE 2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- A- Un surnageant post-mitochondrial est préparé à partir du foie d'un rat ayant reçu une injection de 0,5mCi d'acide orotique  $^3\text{H}$  16h avant le sacrifice.
- B- Un sédiment de polysomes libres dont le RNA est marqué à l'acide orotique  $^{14}\text{C}$  (un rat ; 0,2mCi ; 3 jours) est obtenu selon la technique décrite dans le chapitre "METHODOLOGIE" (p. 64).
- C- Une fraction aliquote de 3ml du surnageant post-mitochondrial  $^3\text{H}$  est additionnée de 0,3ml de la suspension de polysomes libres  $^{14}\text{C}$  réalisée dans le tampon  $\text{TKM}_1\text{-DTT}$  ( 1 U DO,  $10^6$  CPM).
- D- 3ml du mélange sont déposés sur un gradient discontinu de saccharose dans le tampon  $\text{TKM}_1\text{-DTT}$  composé de :
- 1ml de saccharose 2,2M
  - 3ml de saccharose 2M
  - 1ml de saccharose 1,5M
  - 2ml de saccharose 1,38M
  - 2ml de saccharose 1,15M
- E- Après une centrifugation de 20h à 35 000 tours/mn en rotor SW40 Ti, des fractions de 0,2ml sont collectées et la radioactivité est déterminée par filtration et comptage de l'acido-insoluble.

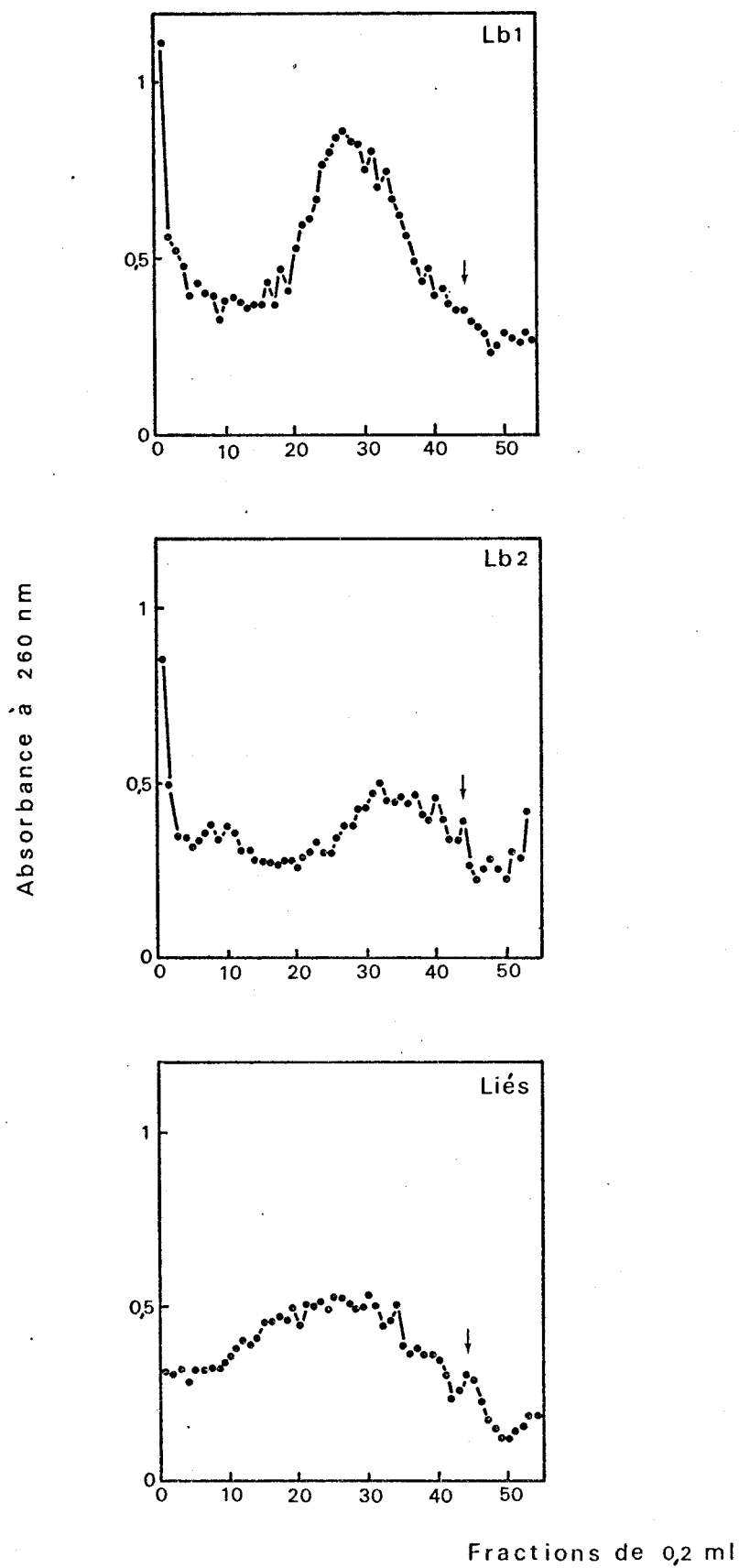


Figure 3 : Analyse en gradient linéaire de saccharose des fractions de polysomes libres (Lb1, Lb2) et liés. La flèche indique la position du monomère.

## FIGURE 3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- A- 2x15ml de surnageant post-mitochondrial sont centrifugés sur gradients discontinus de saccharose (voir fig.1<sub>A</sub>, p. 8).
- B- Après centrifugation, l'injection de saccharose 2,2M dans le fond des tubes permet de récupérer les interphases de membranes et les couches de saccharose 2M renfermant les polysomes libres légers (Lb 2). Deux culots de polysomes libres (Lb 1) sont alors obtenus.
- C- Les fractions de polysomes légers sont rassemblées et diluées par un volume de tampon TKM<sub>1</sub>-DTT. Elles sont ensuite déposées sur 3ml de saccharose 2M et centrifugées pendant 3h à 113 000g<sub>av</sub> dans le rotor 60 Ti.
- D- Le traitement par le détergent des membranes et la purification des polysomes liés sont réalisés dans les conditions décrites précédemment (voir fig.1<sub>B</sub> protocole expérimental).
- E- Les sédiments de polysomes libres et liés sont resuspendus chacun dans 0,5ml de tampon TKM<sub>1</sub>-DTT. 0,4ml de suspension sont déposés sur gradient linéaire 10-50 p100 de saccharose et centrifugés dans le rotor SW40 Ti pendant 40mn à 35 000 tours/mn.

constatés.

Les résultats de la figure 4 (p. 16) illustrent ce phénomène de rétention et montrent par ailleurs que l'ajustement d'un surnageant post-mitochondrial en saccharose 1M avant sa centrifugation sur saccharose 2M, facilite la sédimentation des polysomes libres.

Il est donc préférable d'augmenter la concentration en saccharose de la couche médiane (1M ou supérieure à 1M). L'introduction de saccharose 1,38M permet d'obtenir deux bandes membranaires distinctes. La plus légère est enrichie en membranes agranulaires tandis que les membranes granulaires sont réparties dans le saccharose 1,38M et à l'interphase 1,38M-2M.

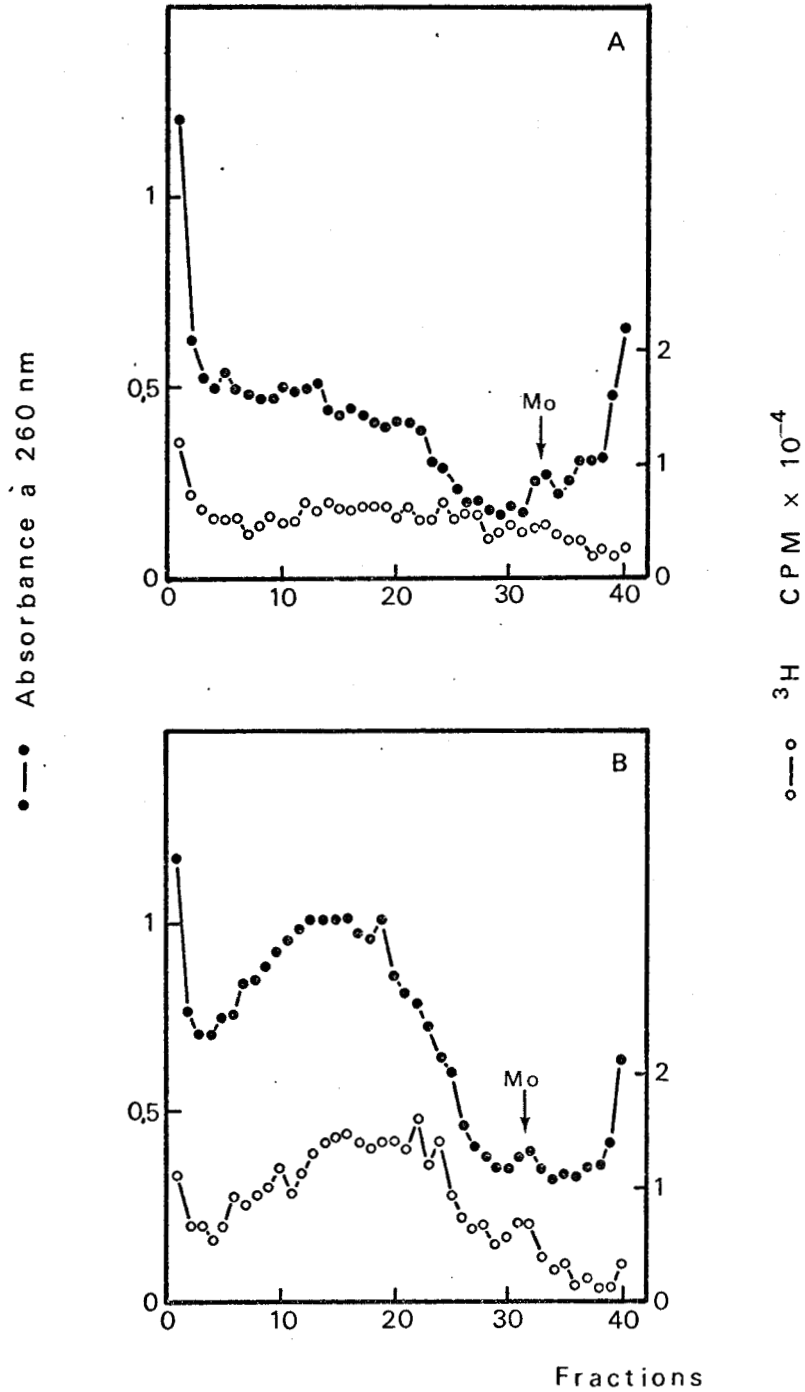
La taille de la (des) couche (s) intermédiaire (s) doit être choisie de façon à permettre une bonne séparation et limiter au maximum l'agrégation des membranes granulaires. Toutefois la sédimentation des polysomes libres doit rester possible sans qu'il soit nécessaire d'allonger la durée de la centrifugation.

L'ampleur de la contamination des membranes par les polysomes libres peut être variable dans cette méthode (Pour des raisons qui seront évoquées plus loin, elle est d'ailleurs assez difficile à déterminer). La proportion de polysomes libres présente dans l'interphase membranaire augmente en fonction de la quantité de surnageant post-mitochondrial (ou de la quantité de membranes) fractionnée (23). L'agrégation des membranes, qui peut alors se produire durant la centrifugation, est susceptible de provoquer la rétention de polysomes libres. De plus, étant donné qu'un surnageant post-mitochondrial contient généralement peu de membranes granulaires (environ 5 à 10% du RNA cellulaire) le degré de contamination de celles-ci par les polysomes libres peut facilement atteindre une valeur élevée (20-30%).

## *2°) Contamination des polysomes libres par les polysomes liés.*

Cette contamination ne peut avoir pour origine que le détachement de polysomes initialement liés aux membranes.

Selon BLOBEL et POTTER la liaison des ribosomes aux



Mo = Monomère

BUS  
LILLE

Figure 4 : Rétention de polysomes libres par les membranes

A- Centrifugation du SPM (0,25M saccharose) sur saccharose 2M et 0,5M.

B- Centrifugation du SPM ajusté en saccharose 1M sur saccharose 2M.



## FIGURE 4 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- A- 15ml de surnageant post-mitochondrial sont additionnés de 0,2ml d'une suspension de polysomes libres dont le RNA est marqué à l'acide orotique  $^3\text{H}$  (1 U DO ;  $6 \cdot 10^5$  CPM) et déposés sur un gradient discontinu de saccharose composé de 6ml de saccharose 2M et 8ml de saccharose 0,5M.
- B- Une fraction aliquote de 15ml de surnageant post-mitochondrial est ajustée à une concentration en saccharose de 1M par addition de 8ml d'une solution de saccharose 2,4M. 0,2ml de la suspension de polysomes libres  $^3\text{H}$  sont ajoutés à la préparation. Le tout est ensuite déposé sur 6ml de saccharose 2M.
- C- Les tubes sont centrifugés dans le rotor 60 Ti pendant 20h à  $113\,000g_{av}$  et les sédiments de polysomes libres obtenus sont resuspendus dans 0,5ml de tampon  $\text{TKM}_1$ -DTT. 0,4ml de chaque suspension polysomale sont déposés et centrifugés en gradient linéaire 10-50 p100 de saccharose (SW40 Ti ; 40mn ; 35 000 tours/mn).
- D- Des fractions de 0,3ml sont collectées. Après mesure de l'absorbance à 260nm, les fractions sont introduites en fioles de comptage et la radioactivité est déterminée.

membranes est résistante à la longue centrifugation. Cependant O'TOOLE, préparant une fraction membranaire dans des conditions douces, montre que 20% des ribosomes sont détachés de cette fraction sous l'effet des forces de centrifugation (24).

D'autre part, s'il est possible d'identifier différents modes de liaisons des polysomes aux membranes, ou si le schéma proposé par MECHLER et VASSALI est valable pour l'hépatocyte de rat (voir chapitre INTRODUCTION, p. 5), on peut facilement concevoir que des activités RNasiques soient responsables d'une libération de ribosomes.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun moyen de contrôle précis pour mesurer une telle contamination.

### 3°) *Intégrité structurale des polysomes.*

Lorsqu'on purifie les membranes par longue centrifugation sur gradient discontinu de saccharose, l'agrégation de celles-ci peut être difficilement évitée.

Des phénomènes, tels que les modifications structurales et la dégradation des polysomes qui peuvent déjà se produire lors de la concentration des particules en une mince bande, risqueront alors d'être fortement amplifiés lors de la resuspension des membranes.

BLOBEL et POTTER ont montré que le traitement par un détergent des membranes s'accompagne de la libération d'une activité RNasique. La préservation du RNA messenger des polysomes liés nécessite l'inhibition de cette activité par un inhibiteur de RNase présent dans le cytosol (25).

La figure 3 (p.13) présente les résultats de l'analyse en gradient continu de saccharose d'une fraction de polysomes liés préparée dans les conditions antérieurement définies par DISSOUS (26). On peut trouver au maximum du profil de l'absorbance de la fraction environ 8 ribosomes par RNA messenger.

### C) Conclusion

La centrifugation isopycniqne des membranes sur gradients

discontinus de saccharose doit être nécessairement très longue pour que soient réduites à leur valeur minimale les contaminations croisées entre les polysomes libres et liés. Cependant une altération structurale des fractions subcellulaires peut avoir lieu pendant cette centrifugation : agrégation des membranes, rupture de liaisons faibles et exposition prolongée à la (aux) RNase (s) latente (s).

L'introduction d'inhibiteur de RNase lors de la préparation est indispensable mais elle ne permet pas toutefois de respecter totalement l'intégrité des polysomes. En effet si l'on considère qu'un RNA messager de sérumalbumine peut porter 19 ribosomes (27), il est très probable que les polysomes présents à l'origine dans la cellule possèdent, en moyenne, une taille plus importante que celle des polysomes obtenus par cette méthode.

## II - FLOTTAISON DES MEMBRANES

Cette technique, dont le principe est également basé sur la différence de densité entre les particules, a été utilisée par MECHLER et VASSALI pour séparer les polysomes libres et liés, présents dans un surnageant post-nucléaire préparé à partir de cellules en culture (28).

Ce surnageant est additionné d'une solution concentrée de saccharose et ajusté à une densité supérieure à celle des membranes mais inférieure ou égale à celle des polysomes libres. Seule la flottaison des membranes peut s'effectuer sous les forces de centrifugation et ces auteurs ont ainsi pu obtenir des fractions de polysomes libres et de membranes d'une pureté satisfaisante, ceci en des temps et avec des vitesses de centrifugation relativement faibles.

En adoptant des conditions identiques, nous n'avons pu reproduire une telle séparation à partir d'un surnageant post-mitochondrial de foie de rat. Par ailleurs, nous avons pu constater qu'une augmentation des forces de centrifugation n'avait aucun effet notable.

Un degré de granulation plus important des membranes granulaires est très certainement à l'origine de leur flottaison difficile. Cette hypothèse est parfaitement en accord avec la

présence, dans l'hépatocyte de rat, d'une proportion de ribosomes liés nettement supérieure à celle observée dans une cellule en culture.

Cette méthode présente en outre un inconvénient majeur : compte tenu de la capacité des rotors, elle limite considérablement la quantité de matériel cellulaire fractionnée.

### III - CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

Cette technique fait intervenir la différence de coefficient de sédimentation entre les particules et fut souvent utilisée autrefois pour séparer les polysomes libres et les membranes d'une fraction microsomale. Le sédiment de membranes doit être resuspendu et recentrifugé plusieurs fois si l'on veut réduire à sa valeur minimale la contamination par les polysomes libres. De plus, une dégradation poussée des polysomes se produit lors des lavages successifs (26).

Cependant, VENKATESAN et STEELE ont récemment décrit une méthode de préparation des polysomes libres et liés d'hépatocyte de rat par centrifugation différentielle d'un homogénat (13). La totalité du réticulum endoplasmique est sédimentée avec les noyaux et les mitochondries, et les polysomes liés sont isolés après un traitement par les détergents. Les contaminations réciproques des deux types de polysomes sont considérées comme négligeables par ces auteurs (4 à 5%). Toutefois, ces valeurs concordent peu avec les essais effectués au laboratoire. En outre, l'agrégation des membranes, qui se produit inévitablement lors de leur sédimentation, interdit toute étude ultérieure des liaisons polysomes-membranes.

### IV - CENTRIFUGATION DE VELOCITE EN GRADIENT CONTINU DE SACCHAROSE

Le principe de cette méthode est basé sur la différence de vitesse de migration entre les particules, celle-ci étant principalement fonction de leur coefficient de sédimentation.

ROSBACH et PENMAN ont pu obtenir un sédiment de membranes purifiées après centrifugation sur un gradient continu de saccharose (15-30%) d'un surnageant post-nucléaire préparé

à partir de cellules en culture (18).

Pour les études concernant l'hépatocyte de rat, cette technique présente surtout des applications analytiques, parmi lesquelles on peut noter la mise en évidence par DISSOUS et KREMBEL de ribosomes détachables par action de la RNase sur une fraction membranaire purifiée. Par centrifugation à travers un gradient continu de saccharose (1,15-1,38M) ils ont pu séparer très nettement les membranes des ribosomes libérés (19).

#### V - CONCLUSION

Aucune des techniques existantes ne permet de préparer une fraction membranaire dépourvue de contamination par les polysomes libres et dont l'état structural n'est pas modifié.

Pour envisager l'étude des spécificités de synthèse des polysomes libres et liés et déterminer la nature exacte des liaisons ribosomes-membranes dans l'hépatocyte de rat, il était donc nécessaire de mettre au point de nouvelles méthodes de séparation des deux classes polysomales.

SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES

EN METRIZAMIDE

La métrizamide (NYEGAARD et Co) est un produit de synthèse dont l'utilisation comme milieu de centrifugation peut s'expliquer par ses propriétés physico-chimiques particulières.

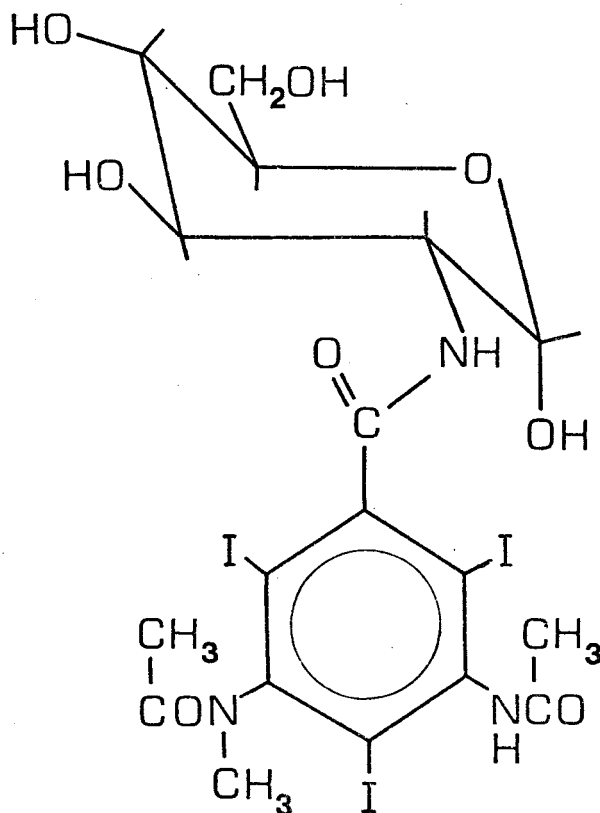
Nous décrirons donc celles-ci brièvement avant de passer en revue les travaux relatifs à ses principales applications.

L'analyse du surnageant post-lysosomal en gradient de métrizamide nous permettra par la suite de dégager l'intérêt de ce milieu pour la séparation des polysomes libres et des membranes.

## I - PROPRIETES ET UTILISATION DE LA METRIZAMIDE

### A) Propriétés physico-chimiques et intérêts

La métrizamide est le nom trivial du 2 - (3 - acétamido - 5 - N - méthyl - acétamido - 2, 4, 6 - triiodo-benzamido) - 2 - desoxy - D glucose. Les propriétés physico-chimiques et la stabilité de ce composé dépendent directement de sa structure.



STRUCTURE MOLECULAIRE DE LA METRIZAMIDE

La métrizamide est un dérivé du glucose très soluble dans l'eau et les solutions obtenues sont stables à température basse et à l'abri de la lumière (pour éviter une libération d'iode).

Les molécules de métrizamide, pouvant former des agrégats importants en milieu aqueux, possèdent un degré d'hydratation très faible ; les particules sont en conséquence fortement hydratées et leur densité apparente diminue considérablement. Ce phénomène d'hydratation facilite la centrifugation isopycnique qui peut alors être réalisée dans des solutions moins denses donc moins visqueuses.

Grâce à l'absence de groupements ionisés, la métrizamide présente une propriété avantageuse par rapport au CsCl. En effet, si la force ionique élevée des solutions de CsCl rend indispensable la fixation du matériel biologique avant la centrifugation, un tel traitement des particules n'est pas nécessaire en métrizamide. De plus aucune interaction (irréversible) ne s'effectue entre la métrizamide et les composants cellulaires.

La présence de trois atomes d'iode, portés par le noyau aromatique de la molécule, confère à une solution de métrizamide une densité supérieure à celle d'une solution de saccharose de même concentration. Les deux solutions possèdent cependant une viscosité semblable (voir fig.5, p.24).

La métrizamide, en milieu aqueux, présente une osmolarité inférieure à celle du saccharose ou du CsCl. La faible différence de pression osmotique existant entre le milieu de centrifugation et le milieu cellulaire, est favorable à l'étude des cellules entières et organites entourés d'une membrane. De plus la métrizamide est un soluté non pénétrant.

Toutes ces propriétés font que la métrizamide peut se substituer avantageusement aux milieux de centrifugation préexistants. Il est en effet possible de réaliser une centrifugation isopycnique, souvent difficile en saccharose à cause de la viscosité élevée des solutions, de particules non fixées contrairement au CsCl. La centrifugation en métrizamide permet également de respecter l'activité biologique des fractions puisqu'elles ne subissent ni chocs osmotiques, ni interactions chimiques.

La métrizamide présente cependant quelques inconvénients.



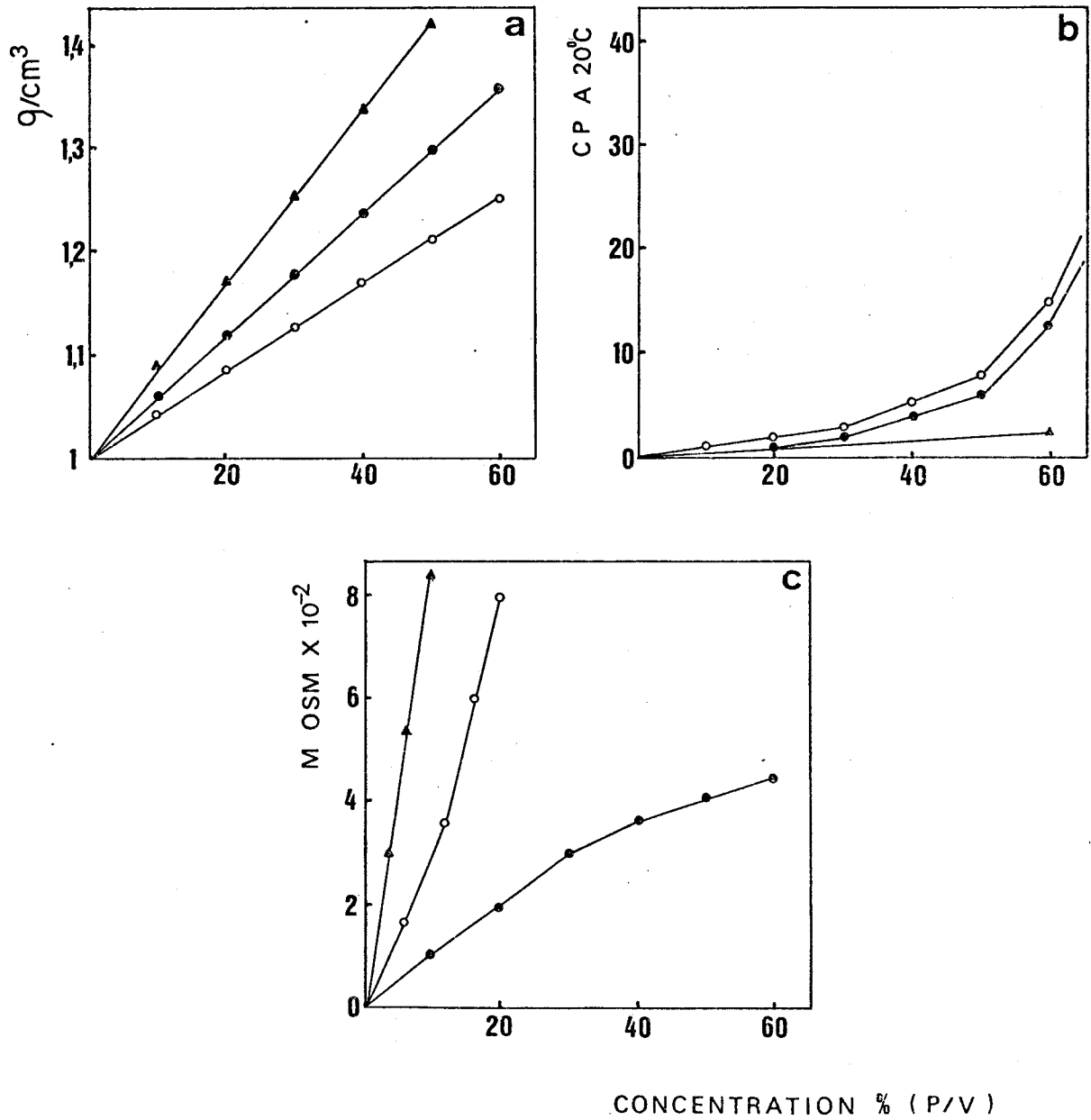


Figure 5 : Comparaison des courbes de densité (a), viscosité (b), osmolarité (c) d'après RICKWOOD et BIRNIE (29).

- Métrizamide
- ▲ CsCl
- Saccharose



La présence d'un groupement aromatique iodé ( $\lambda_{\max}=242\text{nm}$ ) empêche l'analyse directe des fractions du gradient par spectrophotométrie. Ce soluté provoque aussi un phénomène d'affaiblissement lumineux lors des mesures de radioactivité.

### B) Les applications de la métrizamide

Dès 1973, la métrizamide a connu de vastes applications s'étendant de l'isolement des cellules entières à la séparation des protéines libres.

Les premiers travaux effectués ont consisté à déterminer la densité des différents composants cellulaires dans ce milieu. La majorité des résultats est consignée dans une revue générale de RICKWOOD et BIRNIE parue en 1975 (29).

MUNTHER KAAS et SEGLEN ont pu séparer les cellules parenchymateuses des cellules non parenchymateuses d'un foie de rat perfusé à la collagénase (30). La métrizamide permet donc la préparation d'un lot homogène de cellules.

La purification des virus peut être réalisée en métrizamide car la cosédimentation des débris cellulaires avec les virus est fortement diminuée. Une fraction de virions intacts (stomatite vésiculaire) a également pu être isolée en métrizamide.

De nombreux auteurs ont étudié le comportement des différents organites cellulaires en métrizamide. MATHIAS et WYNTER ont utilisé ce milieu de centrifugation pour séparer les noyaux de cellules de cerveau suivant leur activité de transcription, et les noyaux d'hépatocyte de rat en fonction de leur degré de ploïdie (31).

Les lysosomes et les mitochondries cosédimentent de façon générale lors d'une centrifugation différentielle d'un homogénat. L'isolement de ces deux types d'organites, impossible à réaliser en saccharose, peut être effectué par centrifugation isopycnique en métrizamide. En effet, les lysosomes possèdent une densité en métrizamide plus faible que les mitochondries (32).

La métrizamide présente par ailleurs un intérêt important pour l'étude des protéines et complexes nucléoprotéiniques. Le phénomène d'hydratation des particules peut être mis en évidence par comparaison des densités d'un DNA natif en CsCl

( $d = 1,710\text{g/cm}^3$ ) et en métrizamide ( $d = 1,12\text{g/cm}^3$ ). D'autre part la centrifugation isopycnique du RNA, jusqu'alors possible uniquement en  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ , est maintenant réalisable facilement en métrizamide ( $d = 1,17\text{g/cm}^3$ ) (33). Les protéines purifiées possèdent une densité supérieure à celle des acides nucléiques (d moyenne :  $1,27\text{g/cm}^3$ ) (34).

Le comportement des RNP va donc dépendre de leur rapport RNA/protéines mais il sera également influencé par leur conformation. Celle-ci varie d'ailleurs en fonction de la force ionique du gradient (35).

Dans le but de séparer les polysomes libres et liés d'un surnageant post-lysosomal d'hépatocyte de rat, nous avons tout d'abord étudié la centrifugation isopycnique des différentes RNP polysomales, ceci dans des conditions ioniques respectant leur activité biologique.

## II - ANALYSE DU SURNAGEANT POST-LYSOSOMAL EN GRADIENT DE METRIZAMIDE

Nous avons analysé séparément le comportement à l'équilibre des polysomes et des monosomes, ainsi que celui des sous-unités ribosomales et des mRNP obtenues après dissociation des polysomes.

La détermination de la densité de ces particules nous a ensuite permis de les localiser à l'intérieur du gradient lors de l'analyse du surnageant post-lysosomal.

### A) Centrifugation isopycnique des différentes RNP polysomales

#### 1°) *Polysomes et monosomes.*

Nous avons réalisé la centrifugation isopycnique en gradient préformé de métrizamide (20-60 p100) d'une fraction de polysomes libres purifiés selon la technique décrite dans le chapitre "METHODOLOGIE".

Des monosomes, obtenus par action ménagée de la RNase pancréatique sur ces polysomes, ont été analysés d'une manière

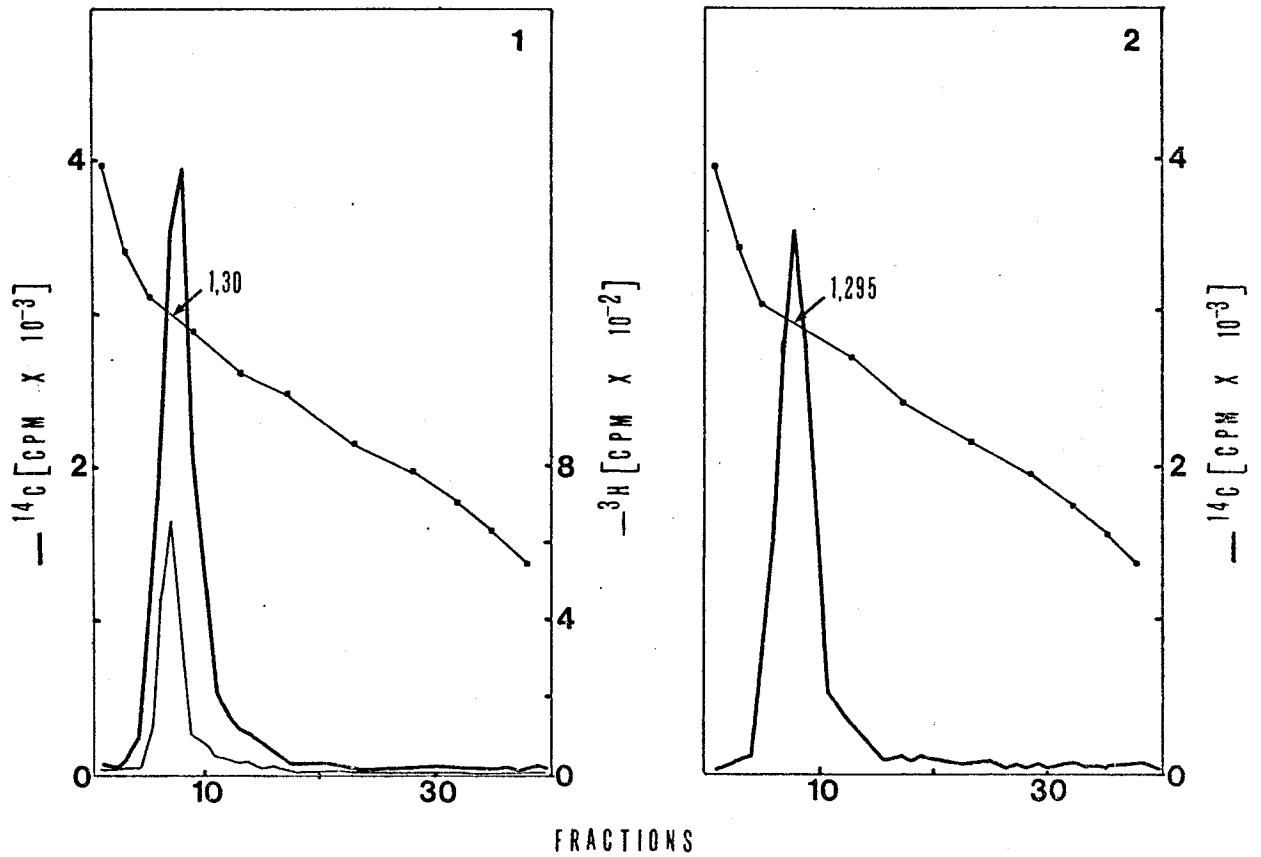


Figure 6 : Centrifugation isopycniqne en gradient préformé  
20-60 p100 de métrizamide :

- 1- Polysomes (rRNA  $^{14}\text{C}$ , mRNA  $^3\text{H}$ )
- 2- Monosomes obtenus par action ménagée de la RNase  
sur ces mêmes polysomes (20 U DO/ml polysomes ;  
0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase ; 10mn à  $30^\circ\text{C}$ ).

identique.

Comme le montre la figure 6 (p.27), les polysomes forment un pic d'une densité moyenne de  $1,30\text{g/cm}^3$ , également très proche de celle des monosomes ( $d= 1,295\text{g/cm}^3$ ).

## 2°) Sous-unités et mRNP.

Nous avons effectué la sédimentation à l'équilibre des sous-unités ribosomales et des mRNP obtenues après dissociation des polysomes, soit par l'action de l'EDTA, soit par l'action du KCl et de la puromycine.

### a) Dissociation des polysomes par l'EDTA

Les polysomes sont dissociés par l'action de l'EDTA et les sous-unités, purifiées par centrifugation en gradient linéaire de saccharose, sont ensuite déposées sur des gradients préformés de métrizamide. A titre de contrôle, l'analyse des sous-unités est également réalisée en gradients de CsCl. Leurs densités respectives sont alors déterminées dans chacun des milieux.

La quantité d'EDTA nécessaire à la libération des sous-unités ribosomales est fonction de la quantité de polysomes. Dans ces expériences, une concentration de 20mM en EDTA est utilisée pour le traitement d'une suspension polysomale contenant 20 U DO/ml. Une concentration en Mg de 2mM doit être également maintenue pendant la purification et l'analyse des sous-unités, afin d'éviter une déprotéinisation ou encore un changement de conformation des particules en absence de Mg (voir profils de la figure 7, p.29; les sous-unités "Mg 0" sont "allégées").

Les densités obtenues sont respectivement en métrizamide et en CsCl de  $1,23$  et  $1,57\text{g/cm}^3$  pour la grande sous-unité, et de  $1,20$  et  $1,54\text{g/cm}^3$  pour la petite sous-unité (voir fig.8, p.31).

On observe cependant dans la figure 9<sub>A</sub>, une mauvaise séparation de la grande et de la petite sous-unité lorsque les polysomes dissociés sont analysés directement en métrizamide. De plus les mRNP présentent une distribution hétérogène, compa-

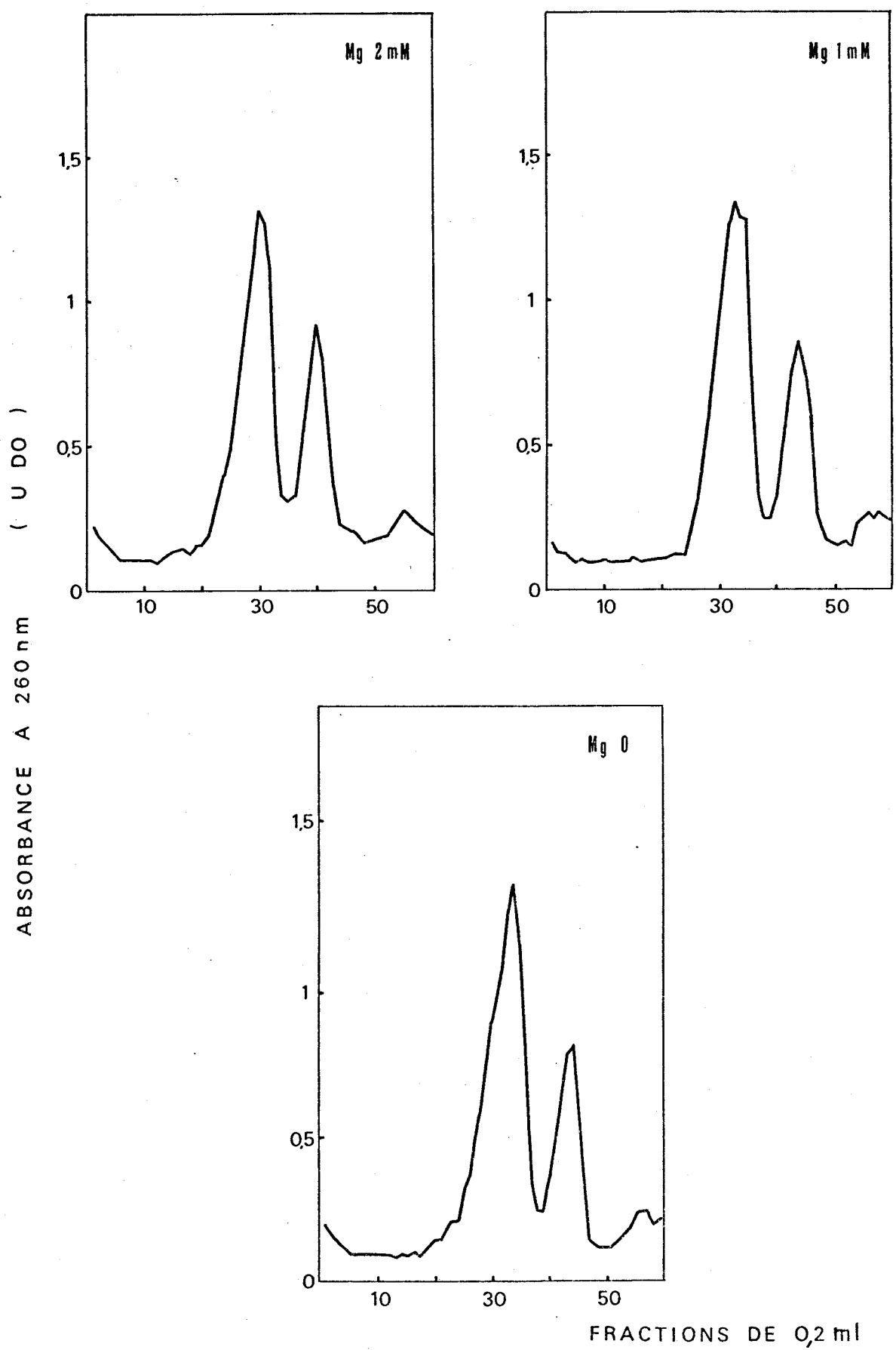


Figure 7 : Influence des ions  $Mg^{++}$  sur le comportement des sous-unités EDTA en gradient de saccharose.



## FIGURE 7 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- Deux culots de polysomes libres sont rincés puis resuspendus dans le tampon TeK (50mM Te pH 7,6, 25mM KCl)

B- Une fraction aliquote de la suspension est prélevée et la mesure de l'absorbance à 260nm permet ensuite d'ajuster la concentration en polysomes à 25 U DO/ml.

C-A0,5ml de la suspension sont ajoutés

- soit 0,125ml de TeKM<sub>10</sub>-EDTA (50mM Te pH 7,6, 25mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM EDTA) de façon à obtenir les conditions de dissociation suivantes : (20 U DO/ml polysomes, 50mM Te pH 7,6, 25mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM EDTA).

- soit 0,125ml de TeKM<sub>5</sub>-EDTA de manière à obtenir une concentration en Mg<sup>++</sup> de 1mM.

- soit 0,125ml de TeK EDTA pour réaliser la dissociation en absence de Mg<sup>++</sup>.

D- 0,5ml de chaque suspension polysomale traitée par l'EDTA sont centrifugés en gradients 10-30 p100 de saccharose (SW40 Ti ; 35 000 tours/mn ; 8h).

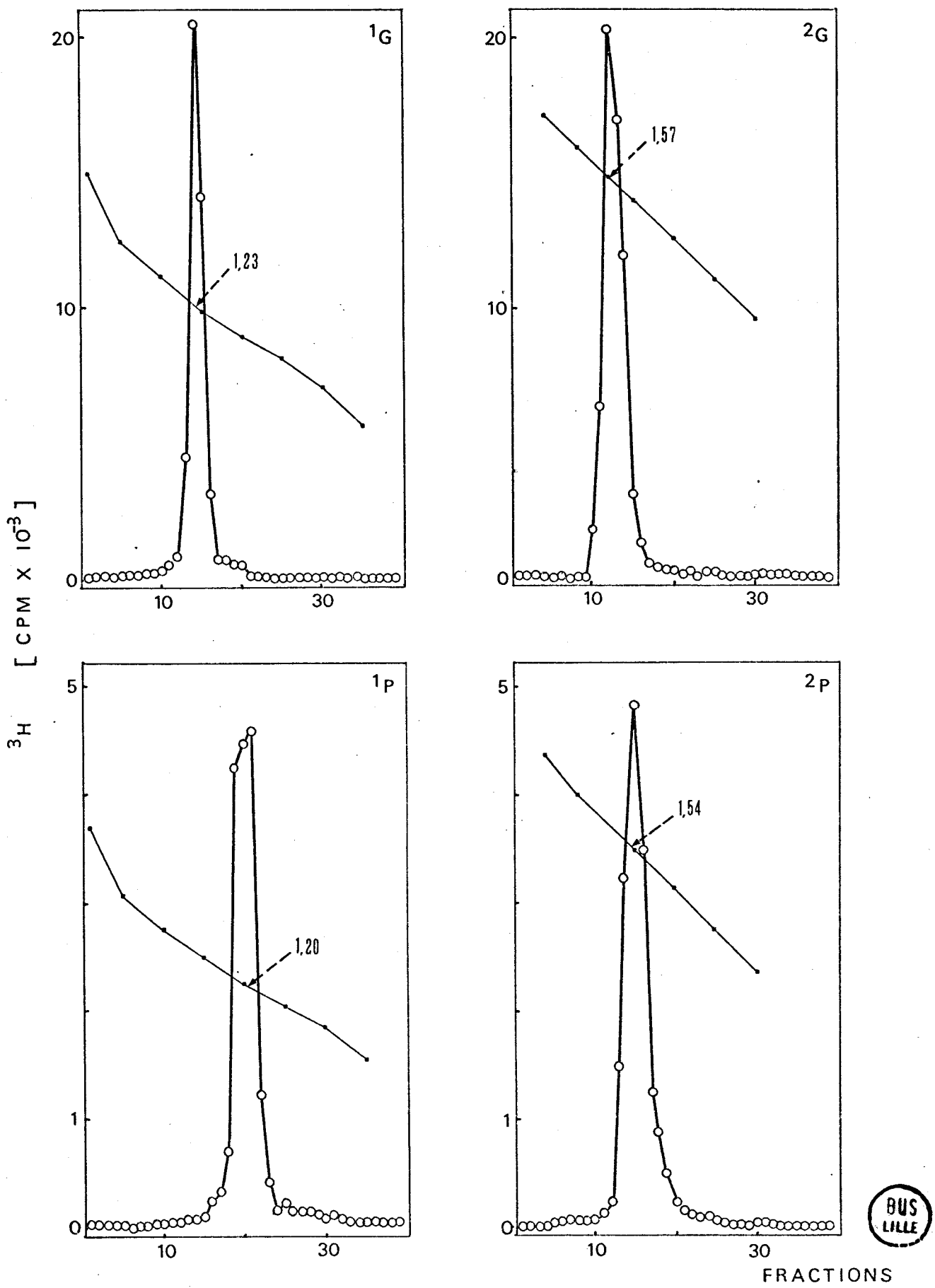


Figure 8 : Centrifugation isopycniqne des "sous-unités EDTA" en métrizamide (1) et en CsCl (2).

G : grande sous-unité                      P : petite sous-unité



## FIGURE 8 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- A- Deux culots de polysomes libres sont préparés à partir des foies de deux rats qui ont subi chacun une injection d'acide orotique (0,2mCi) 16h avant leur sacrifice.
- B- La dissociation des polysomes en sous-unités par l'action de l'EDTA s'effectue en présence de  $Mg^{++}$  2mM selon un protocole identique à celui de l'expérience de la figure 7.
- C- 1ml de la suspension traitée à l'EDTA est centrifugé en gradient linéaire de saccharose 10-30 p100 (rotor SW25-1, 18 000 tours/mn, 16h).
- D- Après fractionnement (0,5ml) et lecture de la densité optique, des fractions aliquotes de 0,1ml sont prélevées dans les tubes 24 à 32 et 37 à 44 puis rassemblées pour former respectivement les fractions  $F_I$  (grandes sous-unités) et  $F_{II}$  (petites sous-unités).
- E- 0,2ml de  $F_I$  et  $F_{II}$  sont déposés séparément sur gradients 20-60 p100 de métrizamide.
- F- 27  $\mu$ l de glutaraldéhyde à 50 p100 sont ajoutés à 0,25ml de  $F_I$  et  $F_{II}$  (concentration finale 5 p100). 0,22ml de chaque fraction traitée sont déposés sur gradient de CsCl.
- G- Les gradients de métrizamide et de CsCl sont ensuite centrifugés dans le rotor SW50-1 à 33 000 tours/mn pendant 6h (CsCl) ou 12h (métrizamide).

-rable à celle obtenue en saccharose. La majeure partie des mRNP cosédimente avec les sous-unités (p.34).

b) Dissociation des polysomes par l'action du KCl et de la puromycine

Nous avons réalisé la centrifugation isopycnique en métrizamide d'une fraction de polysomes soumise à une force ionique élevée en présence de puromycine. Les sous-unités obtenues après dissociation des polysomes, possèdent des densités semblables à celles des sous-unités EDTA (grande :  $1,23\text{g/cm}^3$ ; petite :  $1,21\text{g/cm}^3$ ). La figure 9<sub>B</sub> nous montre que les mRNP KCl présentent, comme les mRNP EDTA, une hétérogénéité de densité (p.34).

3°) Discussion.

Polysomes et monosomes d'hépatocyte de rat ont une densité presque identique en métrizamide et comparable à celle des monosomes de myoblastes en culture ( $\bar{d} = 1,305\text{g/cm}^3$ ) (35).

Nous avons vu précédemment qu'une fraction membranaire, préparée par centrifugation isopycnique en gradient discontinu de saccharose, est principalement contaminée par les ribosomes libres. L'obtention d'un pic unique renfermant polysomes et monosomes, semble alors être d'un intérêt important pour la séparation des polysomes libres et liés d'un surnageant post-lysosomal en métrizamide.

Nous avons observé par ailleurs une cosédimentation du glycogène avec les polysomes. Toutefois le polysaccharide, atteignant plus rapidement sa position d'équilibre, peut être ensuite éliminé grâce à une courte centrifugation sur un coussin de métrizamide à 40 p100 (voir tableau I et fig.10, p.36).

BUCKINGHAM et GROS ont montré qu'en présence de Mg 3mM, la sous-unité 60S libre dans les myoblastes en culture ( $\bar{d} = 1,315\text{g/cm}^3$ ) est plus dense que la sous-unité 40S ( $\bar{d} = 1,23\text{g/cm}^3$ ) (35). Bien qu'analysées dans des conditions presque semblables, les sous-unités ribosomales, préparées à partir des polysomes de foie de rat, sont moins denses et surtout beaucoup moins séparées en gradient de métrizamide. Cette variation peut être due à l'origine même des particules. On peut en effet penser que des

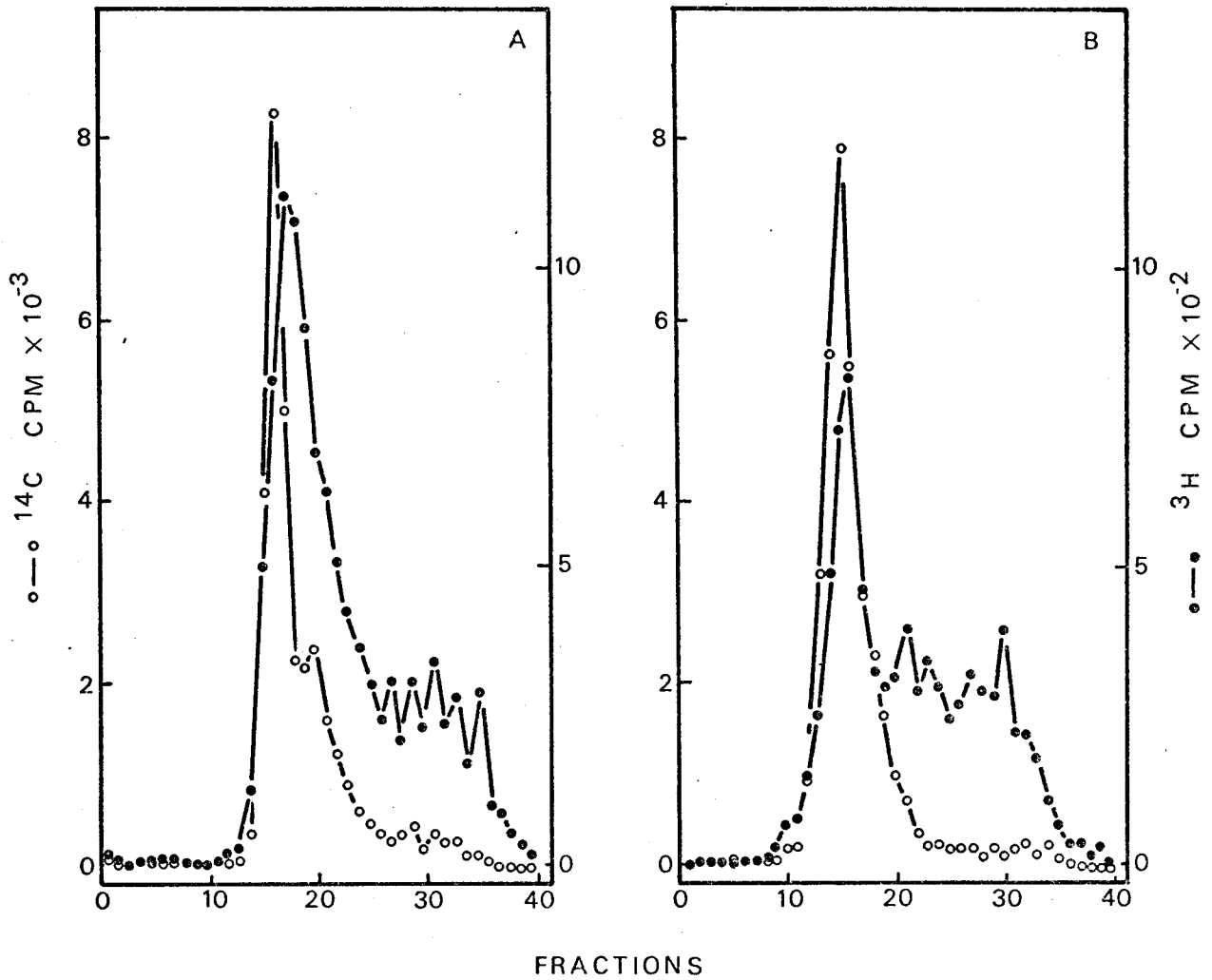


Figure 9 : Analyse en gradient de méthrizamide 20-60 p100 des sous-unités ribosomales et mRNP

A- obtenues après action de l'EDTA

B- obtenues après action du KCl et de la puromycine.

## FIGURE 9 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

L'expérience est réalisée à partir de deux culots de polysomes libres (I) dont le RNA messenger est marqué à l'acide orotique  $^3\text{H}$  (0,5 mCi/rat ; marquage spécifique du mRNA sous actinomycine) et deux culots de polysomes libres (II) marqués à l'acide orotique  $^{14}\text{C}$  dans leurs RNA ribosomiaux (0,1 mCi/rat ; marquage préférentiel du rRNA).

A - Dissociation des polysomes par l'action de l'EDTA : un culot de polysomes I est resuspendu dans 0,5 ml de tampon TK (50 mM Tris pH 7,6 ; 25 mM KCl). A 0,3 ml de la suspension (20 UDO/ml), on ajoute 33  $\mu\text{l}$  d'une solution d'EDTA 200 mM (20 UDO polysomes/20 mM EDTA).

Un sédiment de polysomes II est traité d'une manière identique. Les suspensions de polysomes I et II sont mélangées et 0,2 ml sont déposés sur gradients 20-60 p 100 de métrizamide.

B - Dissociation des polysomes par l'action du KCl et de la puromycine :

Les conditions ioniques de dissociation sont les suivantes : (30 UDO/ml polysomes ; 50 mM Tris pH 7,6 ; 500 mM KCl ; 2 mM  $\text{MgCl}_2$  ; 1 mM DTT ; 1 mM puromycine). Les suspensions de polysomes I et II sont mélangées et incubées à 0°C (15 mn) puis à 37°C (10 mn). 0,2 ml sont ensuite déposés sur gradients 20-60 p 100 de métrizamide.

Les gradients sont centrifugés 12 h à 33 000 tours/mn dans le rotor SW50-1. La radioactivité est déterminée dans les fractions (0,1 ml) par filtration et comptage de l'acido-insoluble.

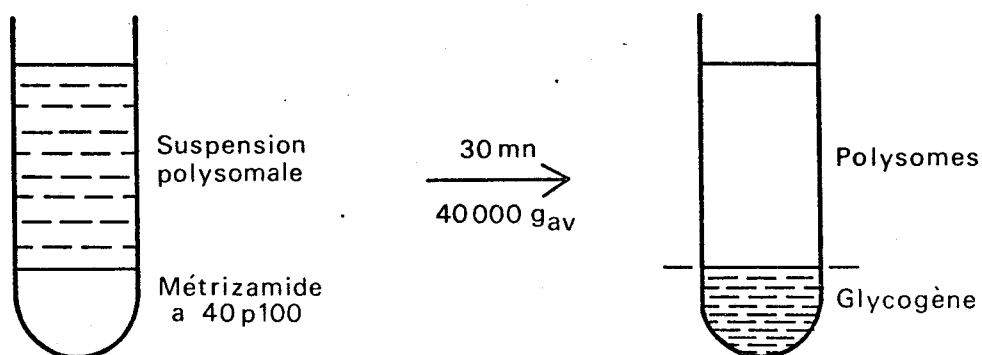


Figure 10 : Elimination du glycogène présent dans une suspension polysomale.

TABLEAU I

REPARTITION DES GLUCIDES ET DU RNA  
dans le coussin de métrizamide  
à 40 p100 et la suspension polysomale purifiée.

Fraction	Glucides		RNA	
	mg	%	CPM	%
Coussin de métrizamide	3,61±0,21	87,4±0,9	6366±76	26,2±0,7
Suspension polysomale	0,52±0,2	12,6±0,6	18200±300	73,8±0,8

Les valeurs ont été obtenues lors de cinq purifications indépendantes de la même suspension polysomale.

Les taux de récupération sont respectivement de 98±5% et 96±2% pour les glucides et le RNA.

## FIGURE 10 et TABLEAU I PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- Un culot de polysomes libres (rRNA  $^3\text{H}$ ) est resuspendu dans 4ml de tampon  $\text{TKM}_1$ -DTT. 3ml de la suspension (5 U DO/ml) sont déposés sur 1ml d'une solution de métrizamide à 40 p100 réalisée dans le même tampon et centrifugés pendant 30mn à 21 000 tours/mn dans le rotor SW50-1.

Le coussin de métrizamide et la suspension polysomale sont collectés séparément.

B- Les mesures de radioactivité et le dosage du glycogène sont effectués selon les techniques décrites dans "METHODOLOGIE".

sous-unités, préalablement engagées puis libérées d'une structure polysomale, possèdent une composition en protéines différente de celle des sous-unités libres dans le cytoplasme.

Ces derniers auteurs ont pu isoler de ces mêmes cellules une fraction de dRNP ( $d = 1,205 \text{g/cm}^3$ ) exempte de matériel ribosomal. La distribution hétérogène des mRNP d'hépatocyte de rat peut s'expliquer par la diversité des protéines synthétisées dans cette cellule. Des raisons semblables à celles évoquées pour les sous-unités sont encore valables pour distinguer les mRNP des dRNP.

#### B) Analyse du surnageant post-lysosomal

Nous avons analysé en gradient de métrizamide trois surnageants post-lysosomaux marqués différemment et la répartition de la radioactivité a permis, dans chacun des cas, de déterminer la position des différents composants dans le gradient (voir fig.11, p.39).

La présence de RNA ribosomal et de RNA messenger (SPL 1) peut être observée dans le pic de densité  $1,30 \text{g/cm}^3$  correspondant aux polysomes libres, ainsi que dans le milieu du gradient où les membranes, formant une zone opaque, sont visibles à l'oeil nu. Celles-ci peuvent également être identifiées grâce à un marquage des phospholipides (SPL 3).

Un troisième pic de densité plus faible renferme une proportion importante de choline  $^{14}\text{C}$  qui peut être attribuée à la présence des lipoprotéines solubles et/ou à celle de membranes lisses. Le RNA présent en surface des gradients est exclusivement de petite taille (4-6S) (36). Celui-ci acquiert une radioactivité spécifique importante même en présence d'actinomycine (SPL 1), car cet antibiotique n'inhibe pas ou peu sa synthèse (37).

Enfin l'analyse du SPL 2 confirme la localisation des polysomes dans le gradient. Le profil de la radioactivité, correspondant à l'incorporation de Leucine  $^3\text{H}$  dans les chaînes protéiques naissantes, suit parfaitement celui du RNA ribosomal. Les protéines radioactives libérées ainsi que les tRNA Leu  $^3\text{H}$  sont alors contenus dans le pic de surface.

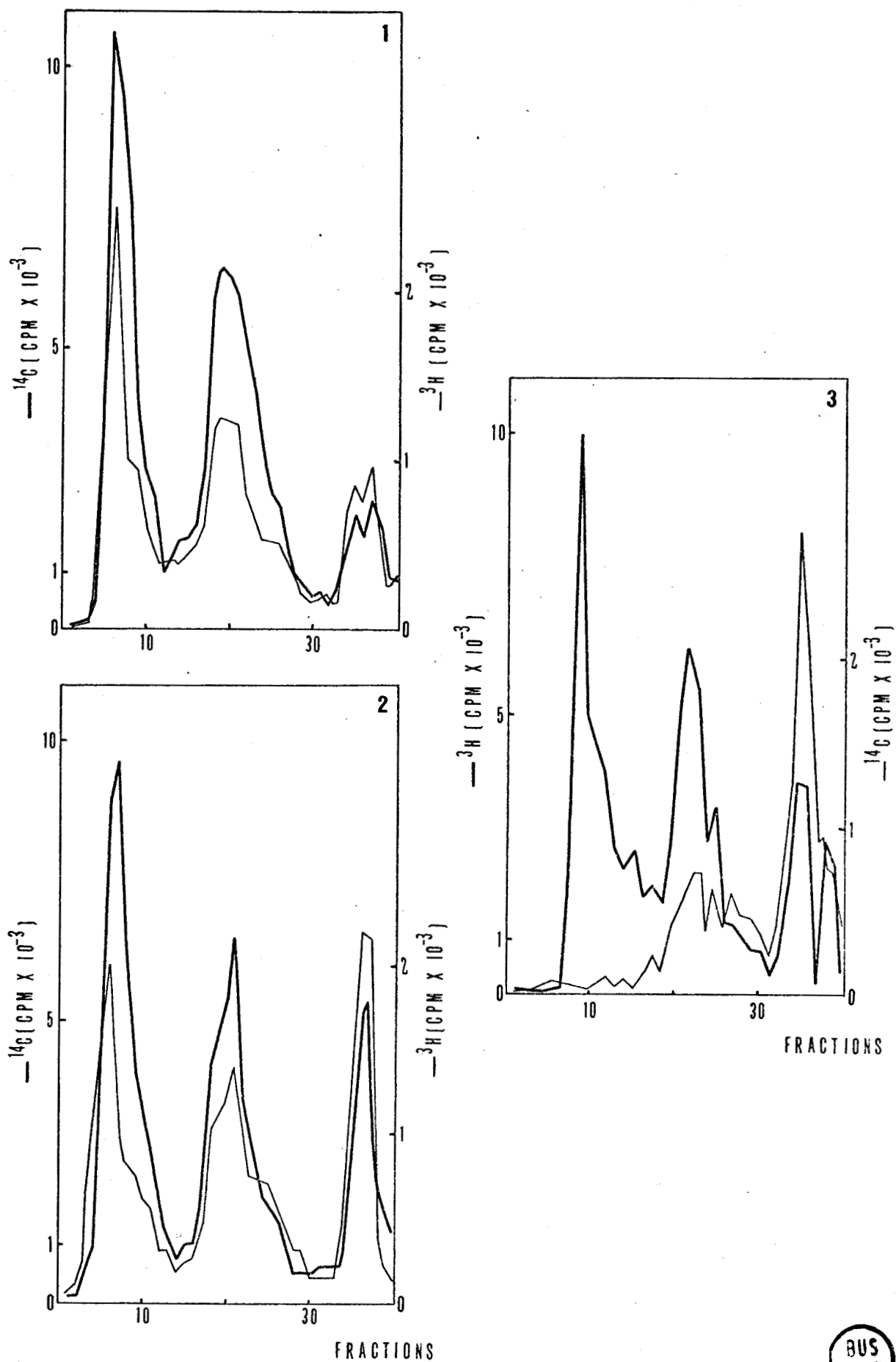


Figure 11 : Analyse du SPL en gradient 20-60 p100 de méthrizamide  
 1- rRNA  $^{14}\text{C}$  et mRNA  $^3\text{H}$   
 2- rRNA  $^{14}\text{C}$  et protéines naissantes  $^3\text{H}$   
 3- rRNA  $^3\text{H}$  et phospholipides  $^{14}\text{C}$



La centrifugation en métrizamide permet d'isoler à partir d'un surnageant post-lysosomal trois fractions principales : les polysomes libres, les membranes et la "phase soluble".

Les membranes possèdent une densité variable de 1,16 à 1,24g/cm<sup>3</sup>, comparable à celle obtenue par AAS pour des membranes microsomales (1,14 - 1,26g/cm<sup>3</sup>) (32). Elles se distinguent nettement des polysomes libres.

### III - SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIÉS EN METRIZAMIDE

L'analyse du surnageant post-lysosomal nous a montré qu'une très bonne séparation des deux catégories polysomales peut être réalisée en métrizamide. L'utilisation de ce milieu de centrifugation présente donc un intérêt important pour l'étude du contenu en polysomes libres et liés d'une fraction subcellulaire ainsi que la purification d'une fraction de réticulum endoplasmique.

#### A) Application du gradient linéaire de métrizamide à la mesure des contaminations croisées entre les fractions polysomales

Si l'ampleur de la contamination d'une fraction de polysomes libres par les membranes peut être aisément déterminée grâce à un marquage des phospholipides, la présence de polysomes libres dans les membranes ne peut être détectée d'une manière aussi directe.

La majorité des auteurs utilisent pour mesurer une telle contamination un traceur radioactif (polysomes libres purifiés) qui est introduit avant que soit réalisée la séparation des deux catégories polysomales.

Cette technique devrait cependant être d'une application plus restreinte. En effet, la taille des polysomes libres contaminants variera selon la méthode utilisée pour isoler les membranes : purifiées par longue centrifugation sur gradient discontinu de saccharose, les membranes seront surtout contaminées

par des polysomes libres "légers" (voir p.10) ; obtenues par centrifugations de zone répétées ou encore par centrifugation différentielle, elles le seront par des polysomes très "lourds" (voir p.20).

Le "marqueur interne" de polysomes libres devrait donc en théorie présenter une distribution (en gradient linéaire de saccharose) identique à celle des polysomes libres présents dans le mélange étudié, et en conséquence avoir été préparé sans aucune dégradation, ce qui est difficilement réalisable.

La centrifugation analytique en gradient linéaire de métrizamide constituera un excellent moyen d'estimation des taux de contamination réciproque lorsque ceux-ci pourront être influencés par le coefficient de sédimentation des particules.

L'utilisation d'un "marqueur interne" (polysomes libres ou membranes purifiés) sera limitée à l'étude des séparations ne faisant intervenir que la densité des particules et à la mesure des contaminations résultant d'associations artefactuelles.

#### B) Purification des membranes par flottaison

Les données acquises lors des expériences décrites dans les paragraphes précédents nous ont permis de réaliser également la purification des membranes d'un surnageant post-lysosomal par flottaison.

Le surnageant post-lysosomal est ajusté à une concentration finale de 50 p100 en métrizamide. La densité étant intermédiaire entre celles des membranes et des polysomes libres, ces deux types de particules migrent lors de la centrifugation dans des directions opposées. Les membranes flottent à travers une couche de métrizamide à 48 p100 et forment ainsi une interphase nettement séparée des polysomes libres.

La figure 12<sub>A</sub> (p.42) nous montre les résultats d'une expérience dans laquelle le surnageant post-lysosomal dont les phospholipides sont marqués par la choline <sup>14</sup>C est additionné d'une très faible quantité de polysomes libres <sup>3</sup>H purifiés.

Après une heure de centrifugation, la radioactivité <sup>14</sup>C est retrouvée presque quantitativement dans l'interphase de

← Direction de la centrifugation

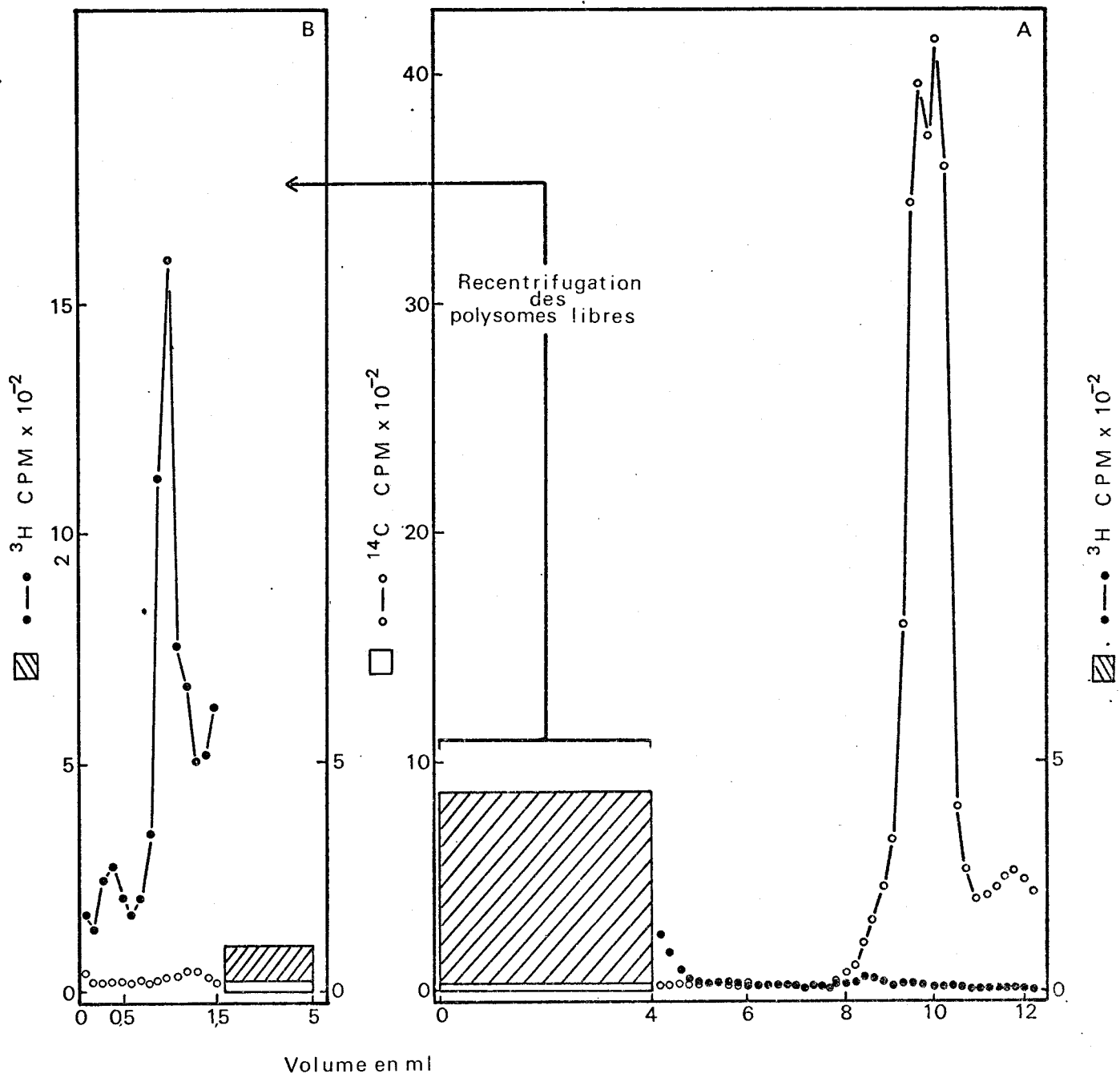


Figure 12 : Séparation des polysomes libres et liés en métrizamide  
 A- Flottaison des membranes  
 B- Purification des polysomes libres



## FIGURE 12 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- Un surnageant post-lysosomal est préparé à partir d'un rat qui a reçu une injection de choline  $^{14}\text{C}$  à la dose de 0,1mCi/kg 4h avant le sacrifice

- A 2ml de ce surnageant on ajoute 0,2ml d'une suspension de polysomes libres  $^3\text{H}$  purifiés (6 U DO/ml ; marquage du rRNA = 9 000 CPM/DO).

- 1,5ml du mélange sont additionnés de 2,5ml d'une solution de métrizamide à 80 p100 (concentration finale : 50 p100) et introduits au fond d'un tube de SW40 Ti. Le dépôt est recouvert de 6ml de métrizamide à 48 p100, 1,5ml de saccharose 1,3M et 0,5ml de tampon.

- Après une centrifugation de 45mn à 35 000 tours/mn à 0°C, le dépôt est collecté (fraction unique) puis le reste du gradient est fractionné (0,2ml).

- Les radioactivités  $^3\text{H}$  et  $^{14}\text{C}$  sont déterminées dans chaque fraction après filtration et comptage de l'acido-insoluble.

B- La zone correspondant au dépôt de la centrifugation précédente est diluée de façon à obtenir une concentration en métrizamide de 48 p100.

- Elle est redéposée sur 1ml de métrizamide à 50 p100 et centrifugée pendant 12h à 45 000 tours/mn dans le rotor SW50-1 à 0°C.

- La radioactivité est mesurée dans les 15 premières fractions (0,1ml) et dans le reste du dépôt.

membranes . La contamination de celles-ci par les polysomes libres est négligeable. Les membranes atteignant beaucoup plus rapidement que les polysomes libres, leur position à l'équilibre, la centrifugation doit être stoppée après un temps court si l'on veut éviter leur agrégation.

Dans l'expérience de la figure 12<sub>B</sub> (p.42) les fractions correspondant aux polysomes libres ont été rassemblées puis re-centrifugées sur un coussin de métrizamide à 50 p100. La très faible quantité de choline <sup>14</sup>C retrouvée dans le gradient atteste qu'une flottaison quantitative des membranes a pu être obtenue lors de la première centrifugation.

### C) Conclusion

Le gradient 20-60 p100 de métrizamide est un excellent moyen analytique de détermination du contenu en polysomes libres et liés d'une fraction subcellulaire.

La purification rapide des membranes par flottaison est également possible en métrizamide grâce à la viscosité faible et à la densité importante des solutions. Cette dernière méthode peut être utilisée lorsque le matériel biologique possède une radio-activité spécifique suffisamment importante (voir p.25). Elle semble particulièrement indiquée lorsqu'on veut ensuite extraire les RNAs associés aux membranes.

SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET

LIES EN SACCHAROSE

Nous avons souligné dans le premier chapitre les difficultés rencontrées lors de la séparation en saccharose, par les méthodes existantes, des polysomes libres et liés.

Nous reconsidérons à présent ce problème, et nous décrivons des techniques permettant d'améliorer de façon sensible l'intégrité structurale et la pureté des deux catégories polysomales.

## I - ISOLEMENT QUANTITATIF DES POLYSOMES LIBRES ET LIES D'UN SURNAGEANT POST-LYSOSOMAL

### A) Principe

Celui-ci est illustré par le schéma de la figure 13 (p. 46).

Le surnageant post-lysosomal est déposé sur un gradient discontinu de saccharose et centrifugé pendant un temps juste suffisant pour obtenir la pénétration de l'ensemble des membranes dans les couches de saccharose.

La majeure partie des polysomes libres légers, des monosomes et des sous-unités ribosomales (représentant le contaminant principal des membranes isolées selon la méthode de BLOBEL et POTTER (voir p. 10)) peut être prélevée en même temps que la phase soluble.

La séparation des membranes et des polysomes libres de taille importante est ensuite effectuée par centrifugation isopycnique. La concentration en membranes du surnageant post-lysosomal (voir p. 15) ainsi que la composition du gradient discontinu permettent de réduire la durée de cette dernière centrifugation et de limiter l'agrégation des membranes.

Seule une pénétration quantitative des polysomes libres dans le saccharose 2M est recherchée et non plus leur sédimentation. La présence de saccharose 2,2M empêche d'ailleurs la formation d'un sédiment tout en permettant l'élimination partielle du glycogène (environ 50%).

Le surnageant de la première centrifugation et les coussins de saccharose dense de la seconde étape sont réunis avant

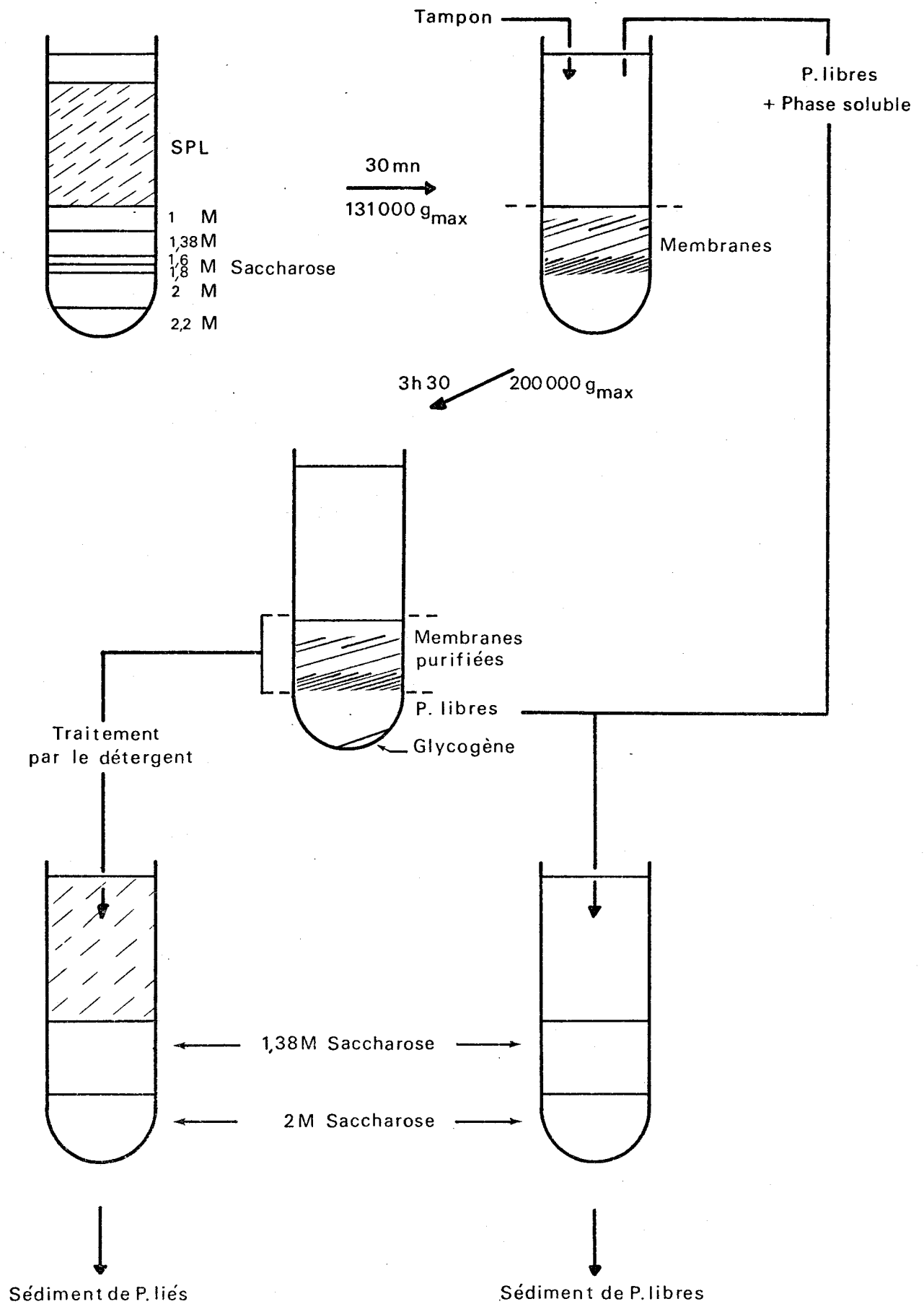


Figure 13 : Isolement des polysomes libres et liés d'un SPL.



### FIGURE 13 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les solutions de saccharose sont réalisées dans le tampon TKM<sub>2</sub>-DTT (50mM Tris HCl pH 7,6, 70mM KCl, 5mM Mg (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 1mM DTT) et renferment 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire et 2mg/ml de protéines de surnageant cytoplasmique.

A- Des fractions aliquotes de 15ml de surnageant post-lysosomal (ajusté à une concentration en KCl de 70mM) sont déposées sur des gradients discontinus de saccharose composés de :

- 2ml de saccharose 2,2M
- 4ml de saccharose 2M
- 1ml de saccharose 1,8M
- 1ml de saccharose 1,6M
- 3ml de saccharose 1,38M
- 4ml de saccharose 1M

B- Après une centrifugation de 30mn à 27 000 tours/mn dans le rotor SW27, les 15ml supérieurs sont prélevés à la seringue et remplacés par un volume identique de tampon.

C- Les tubes sont centrifugés à nouveau pendant 3h30 à 45 000 tours/mn dans le rotor 60 Ti.

Les coussins de saccharose dense (5,7ml inférieurs) sont collectés et additionnés aux surnageants obtenus lors de la première centrifugation (le tout constitue la fraction "polysomes libres").

Les 10ml suivants renferment les membranes purifiées.

Le culot de glycogène est éliminé.

D- Les polysomes libres et liés (obtenus après traitement par le détergent des membranes) sont purifiés sur des coussins de saccharose 2M et 1,38M dans des conditions déterminées par DISSOUS et al (38).

de réaliser la purification des polysomes libres.

B) Détermination des conditions optimales de la première centrifugation

Nous avons étudié la séparation des polysomes libres et liés d'un surnageant post-lysosomal marqué dans les RNA ( $^3\text{H}$ ) et les phospholipides ( $^{14}\text{C}$ ).

Différents essais ont été réalisés dans lesquels nous avons fait varier la durée de la première centrifugation de 15 à 30mn, la seconde étape de purification des membranes demeurant identique dans tous les cas.

1°) *Distribution du RNA et des phospholipides dans les fractions.*

Les mesures de radioactivité nous indiquent qu'une augmentation de la durée de la première centrifugation de 15 à 30mn a pour effet d'enrichir l'interphase membranaire purifiée en RNA et en phospholipides (voir tableau II, p. 49). Les valeurs trouvées pour cette fraction correspondent très bien à la répartition supposée pour les deux classes de polysomes. Cependant, ceci ne peut être vérifié qu'en chiffrant les taux de contaminations réciproques.

2°) *Analyse des fractions en gradient de métrizamide.*

Les profils de radioactivité présentés dans la figure 14 (p. 50) correspondent à l'analyse en gradient 20-60 p100 des fractions de membranes et de polysomes libres obtenues dans les 3 expériences.

Nous pouvons observer que la quantité de polysomes libres contaminant les membranes varie peu lorsqu'on prolonge la première centrifugation de 15 à 30mn. Celle-ci représente toujours moins de 1% du RNA de la cellule soit au maximum 5,5% des polysomes libres de l'homogénat. Ces derniers sont retrouvés presque quantitativement dans la fraction de polysomes libres (17% du RNA cellulaire) (voir tableau III, p. 52).

TABLEAU II

SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES D'UN  
SURNAGEANT POST-LYSOSOMAL :

Détermination des conditions optimales de centrifugation.  
Distribution du RNA et des phospholipides.

Durée de la 1 <sup>e</sup> centrifugation	Fraction	RNA		Phospholipides	
		CPM <sup>3</sup> H x10 <sup>-6</sup>	% de H	CPM <sup>14</sup> C x10 <sup>-6</sup>	% de H
	SPL	15,11	46,4	1,63	27,4
15mn	P. Libres	11,46	36,7	0,58	10,0
	Membranes	3,03	9,7	1,02	17,4
	Taux de récupération		96		98
20mn	P. Libres	10,92	35,3	0,53	9,2
	Membranes	3,43	11,1	1,05	18,2
	Taux de récupération		95		97
30mn	P. Libres	10,57	31,8	0,36	6,5
	Membranes	4,77	14,4	1,16	20,9
	Culot de Glycogène	0,08	0,2		
	Taux de récupération		102		93

Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 déterminations.

(H = Homogénat)



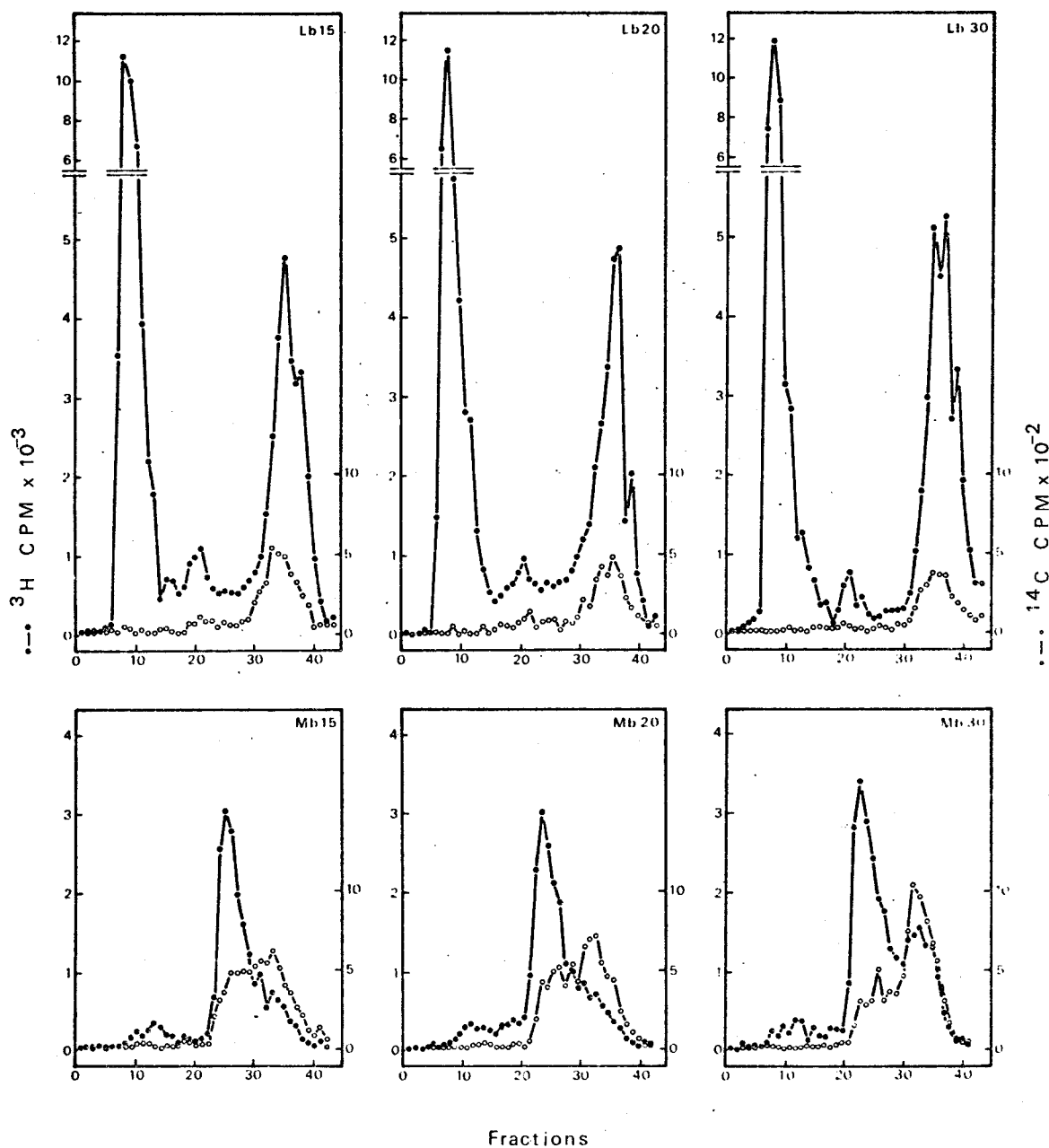


Figure 14 : Analyse en gradient de métrizamide 20-60 p100 des fractions de polysomes libres (Lb) et de membranes (Mb) obtenues après une première centrifugation de 15, 20 ou 30mn.

Parallèlement, les membranes du réticulum endoplasmique granulaire sont obtenues en proportion croissante ; il faut cependant remarquer que le pourcentage plus élevé de phospholipides dans l'interphase membranaire est également dû à la présence de membranes de densité faible. Celles-ci pénètrent difficilement les couches de saccharose lorsqu'on réalise des centrifugations plus courtes (15 ou 20mn).

Ces analyses nous montrent d'autre part que la contamination des polysomes libres par les membranes est négligeable. En effet la majeure partie de la choline  $^{14}\text{C}$  contenue dans la fraction de polysomes libres, est incorporée dans les lipoprotéines solubles. La radioactivité  $^3\text{H}$  détectée au centre du gradient correspond vraisemblablement à des complexes mRNA - protéines et des sous-unités ribosomales libres.

Nous pouvons donc conclure, à la vue de ces résultats, qu'une durée de 30mn est optimale pour la première centrifugation.

#### C) Intégrité structurale des polysomes

L'utilisation de cette technique a permis la séparation des polysomes libres et liés en respectant leur intégrité structurale.

En effet ces polysomes, lorsqu'ils sont analysés en gradient linéaire de saccharose, présentent un maximum d'absorbance à 15 ribosomes par RNA messenger.

Les données relatives à ces expériences ne sont pas incluses dans ce mémoire car l'obtention de polysomes liés très lourds a également nécessité la mise au point de techniques d'inhibition des activités RNAsiques membranaires lors du traitement des membranes par les détergents (voir ref.38).

#### D) Conclusion

Cette méthode constitue un excellent moyen de séparation des deux classes polysomales. L'utilisation de centrifugations de courte durée permet d'une part de purifier l'ensemble des membranes d'un surnageant post-lysosomal sans qu'aucun phénomène d'agrégation ne se produise, d'autre part de limiter

TABLEAU III

SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES D'UN  
SURNAGEANT POST-LYSOSOMAL : Répartition des  
polysomes libres déterminée par analyse en  
gradient de métrizamide.

Polysomes libres  
(en % du RNA cel-  
-lulaire) trouvés  
dans les fractions de :

Durée de la 1 <sup>e</sup> centrifugation	P. Libres	Membranes	Polysomes libres dans les membranes (%)
15mn	18,5	0,8	4,4
20mn	17,6	0,9	4,8
30mn	17	0,9	5,5

% = Somme des radioactivités mesurées dans les fractions 1 à 14 incluses du gradient de métrizamide / radioactivité totale du gradient x pourcentage par rapport à l'homogénat de la radioactivité présente dans la fraction analysée.



au maximum le détachement possible des polysomes liés de façon labile aux membranes (voir p.18).

## II - PURIFICATION DES MEMBRANES GRANULAIRES D'UN SURNAGEANT POST-LYSOSOMAL

Dans les travaux que nous avons décrits dans le chapitre précédent, nous nous sommes attachés à séparer à partir d'un surnageant post-lysosomal, l'ensemble du réticulum endoplasmique des polysomes libres. Le traitement de la fraction membranaire par les détergents permet ensuite d'isoler la totalité du RNA ribosomal associé aux membranes.

Cependant, les membranes contenues dans un surnageant post-lysosomal (ou post-mitochondrial classique) sont très hétérogènes. Mise à part la distinction que l'on peut établir entre le réticulum agranulaire et granulaire, il demeure possible, dans les conditions ioniques préservant l'activité biologique des polysomes, d'observer une distribution bimodale en densité des membranes rugueuses. Celle-ci fût mise en évidence par TATA en 1967 (39) qui démontra que les deux fractions diffèrent par leur rapport RNA/phospholipides et leur activité en biosynthèse protéique.

Selon les principes auparavant définis, nous avons recherché les conditions nécessaires à l'isolement des membranes les plus denses sans contamination par les polysomes libres.

### A) Principe

La purification des membranes nécessite, comme précédemment, deux centrifugations successives, mais l'élimination des polysomes libres lourds a lieu cette fois avant celle des polysomes légers (Fig.15, p.54).

L'ensemble des membranes est tout d'abord séparé des polysomes libres de coefficient de sédimentation important par centrifugation isopycnique sur gradient discontinu de saccharose. Le surnageant obtenu ("phase soluble") renferme la phase soluble et quelques sous-unités ribosomales. Les polysomes libres lourds sont présents dans la couche de saccharose 2M.

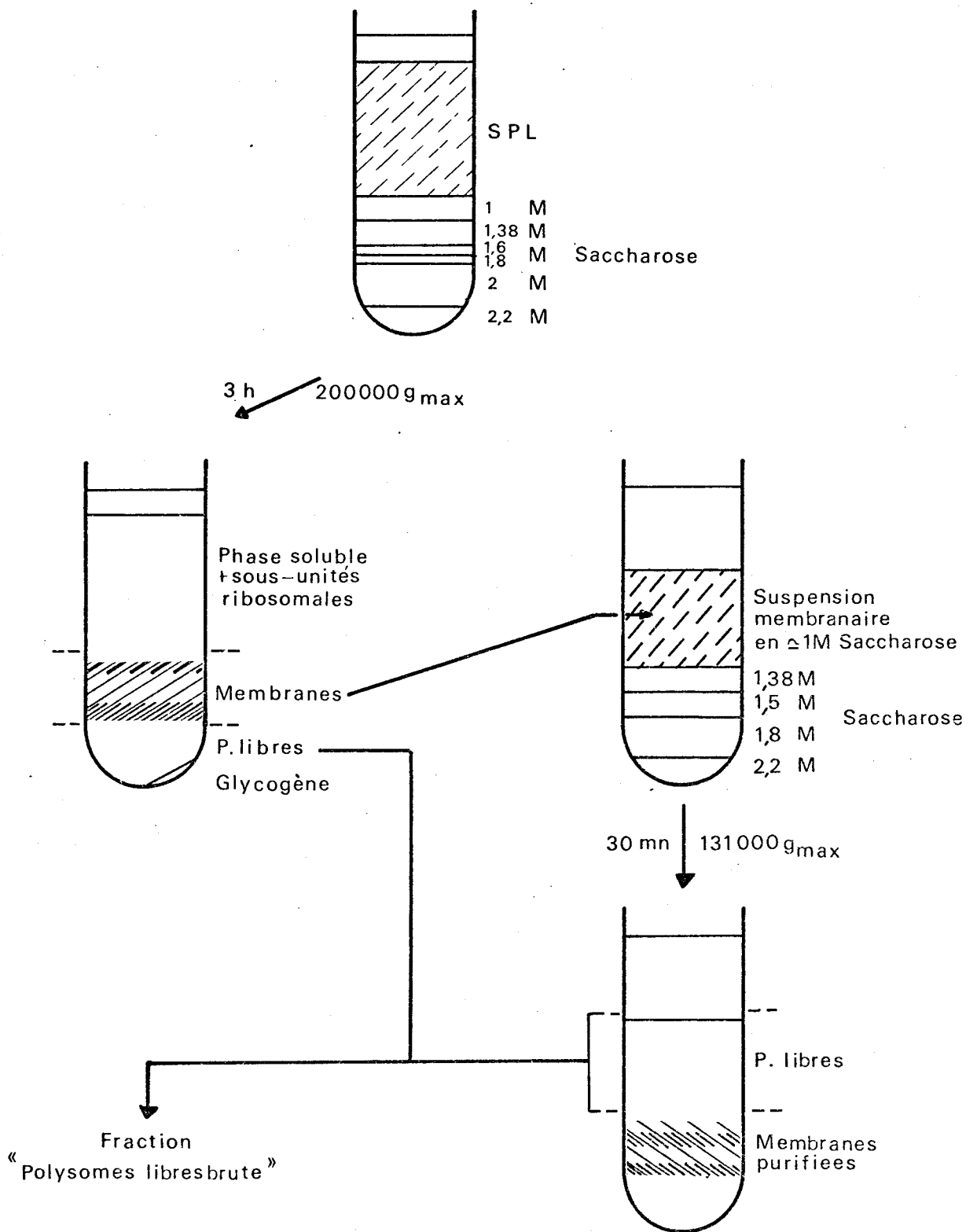


Figure 15 : Purification des membranes granulaires d'un SPL.



## FIGURE 15 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A- 15ml du SPL (ajusté à une concentration en KCl de 70mM) sont déposés sur un gradient discontinu de saccharose réalisé en TKM<sub>2</sub>-DTT et composé de :

- 2ml de saccharose 2,2M
- 4ml de saccharose 2M
- 1ml de saccharose 1,8M
- 1ml de saccharose 1,6M
- 3ml de saccharose 1,38M
- 3ml de saccharose 1M

B- Après une centrifugation de 3h à 45 000 tours/mn dans le rotor 60 Ti, on récupère les coussins de saccharose dense (5,7ml) puis l'interphase de membranes (11ml). Le reste du gradient renferme la phase soluble.

C- Les membranes sont ensuite redéposées sur un nouveau gradient discontinu de saccharose formé de

- 2ml de saccharose 2,2M
- 4ml de saccharose 1,8M
- 3ml de saccharose 1,5M
- 3ml de saccharose 1,38M

et centrifugées à 27 000 tours/mn dans le rotor SW27 pendant 30mn.

D- Les membranes granulaires purifiées sont obtenues dans un volume de 13ml et le surnageant est réuni aux coussins de saccharose dense pour constituer la fraction de "polysomes libres brute".

L'interphase de membranes est prélevée puis ajustée à une concentration en saccharose voisine de 1M. Certains auteurs ont montré qu'une dilution, réalisée dans ces conditions, ne provoque pas l'altération de la structure des membranes (40). La suspension est ensuite recentrifugée sur un nouveau gradient discontinu pendant un temps juste suffisant pour permettre aux membranes les plus granuleuses de pénétrer les coussins de saccharose. Leur purification est alors facilitée par la viscosité et la densité élevée de la suspension qui freinent la migration des polysomes libres légers et des membranes moins denses.

Ces particules, réunies aux polysomes lourds obtenus lors de la première étape, constituent la fraction "polysomes libres brute".

#### B) Etude analytique des fractions

##### 1°) *Détermination du contenu en RNA et en phospholipides des fractions.*

L'isolement des membranes a été réalisé à partir de surnageants post-lysosomaux dont les RNA ( $^3\text{H}$ ) et les phospholipides ( $^{14}\text{C}$ ) sont radioactifs.

Les résultats des dosages de RNA (voir tableau IV, p.57) et les mesures de radioactivité (voir tableau V, p.58) nous indiquent que l'interphase de membranes renferme 50 à 55% du RNA associé au réticulum endoplasmique et 30% environ de la radioactivité  $^{14}\text{C}$  incorporée dans les phospholipides membranaires d'un surnageant post-lysosomal. Ces pourcentages ont été estimés à partir des valeurs obtenues pour l'ensemble des membranes dans les expériences précédentes (voir p.49).

Dans un second temps l'analyse de la fraction "polysomes libres brute" nous a permis de déterminer la quantité de RNA soluble contenue dans cette fraction. La valeur trouvée (7,1%) compense parfaitement le déficit enregistré dans la "phase soluble" (voir tableau VI, p.59) (valeur totale du RNA soluble : 14,4%).

D'autre part, les polysomes libres purifiés représentant 16 à 17% du RNA de l'homogénat, il est possible d'évaluer dans cette fraction, la participation du RNA membranaire dans la

TABLEAU IV

DISTRIBUTION DU RNA  
dans les trois fractions obtenues lors de la  
purification des membranes granulaires.

Fraction	RNA en mg			% moyen de RNA par rapport à l'homogénat
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
Homogénat	16,5	17,2	17,6	100
SPL	7,4	7,9	8,0	45,4
"Polysomes libres brute"	5,0	5,7	5,9	31,5
Membranes granu- -laires purifiées	0,9	1,2	1,4	6,7
Phase soluble	1,3	1,2	1,3	7,3
Taux de récupé- -ration en %	97,3	102,5	107,5	



TABLEAU V

DISTRIBUTION DES RADIOACTIVITES  $^3\text{H}$  (RNA)  
ET  $^{14}\text{C}$  (phospholipides) dans les fractions obtenues  
lors de la purification des membranes granulaires.

Fraction	RNA		Phospholipides	
	CPM $^3\text{H} \times 10^{-6}$	% de H	CPM $^{14}\text{C} \times 10^{-5}$	% de H
Homogénat (H)	23,64		25,58	
SPL	11,30	47,8	8,91	28,7
"Polysomes libres brute"	7,15	30,6	6,01	20,3
Membranes granu- -laires purifiées	1,92	8,2	1,89	6,4
Phase soluble	2,11	9,0	0,61	2,0
Taux de récupération (%)	98,9		95,5	

Chaque valeur est la moyenne des déterminations réalisées  
à partir de 3 surnageants post-lysosomaux différents.



TABLEAU VI

ANALYSE DE LA FRACTION DE "POLYSOMES  
LIBRES BRUTE" obtenue lors de la purification  
des membranes granulaires.

Fraction	RNA en mg			% moyen de RNA par rapport à l'homogénat
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
"Polysomes libres brute"	5,0	5,7	5,9	31,5
<u>Expérience A</u>				
RNA sédimentable	3,8	4,3	4,4	24,4
RNA soluble	1,1	1,2	1,2	7,1
<u>Expérience B</u>				
Sédiment de Polysomes libres	2,6	3,0	3,1	16,7
Surnageant	2,2	2,6	2,9	14,8

Expérience A : La fraction est centrifugée 12h à 30 000 tours/mn dans le rotor SW50-1.

Expérience B : La fraction est déposée sur 1ml de saccharose 1,8M et centrifugée 20h à 35 000 tours/mn dans le rotor SW50-1.



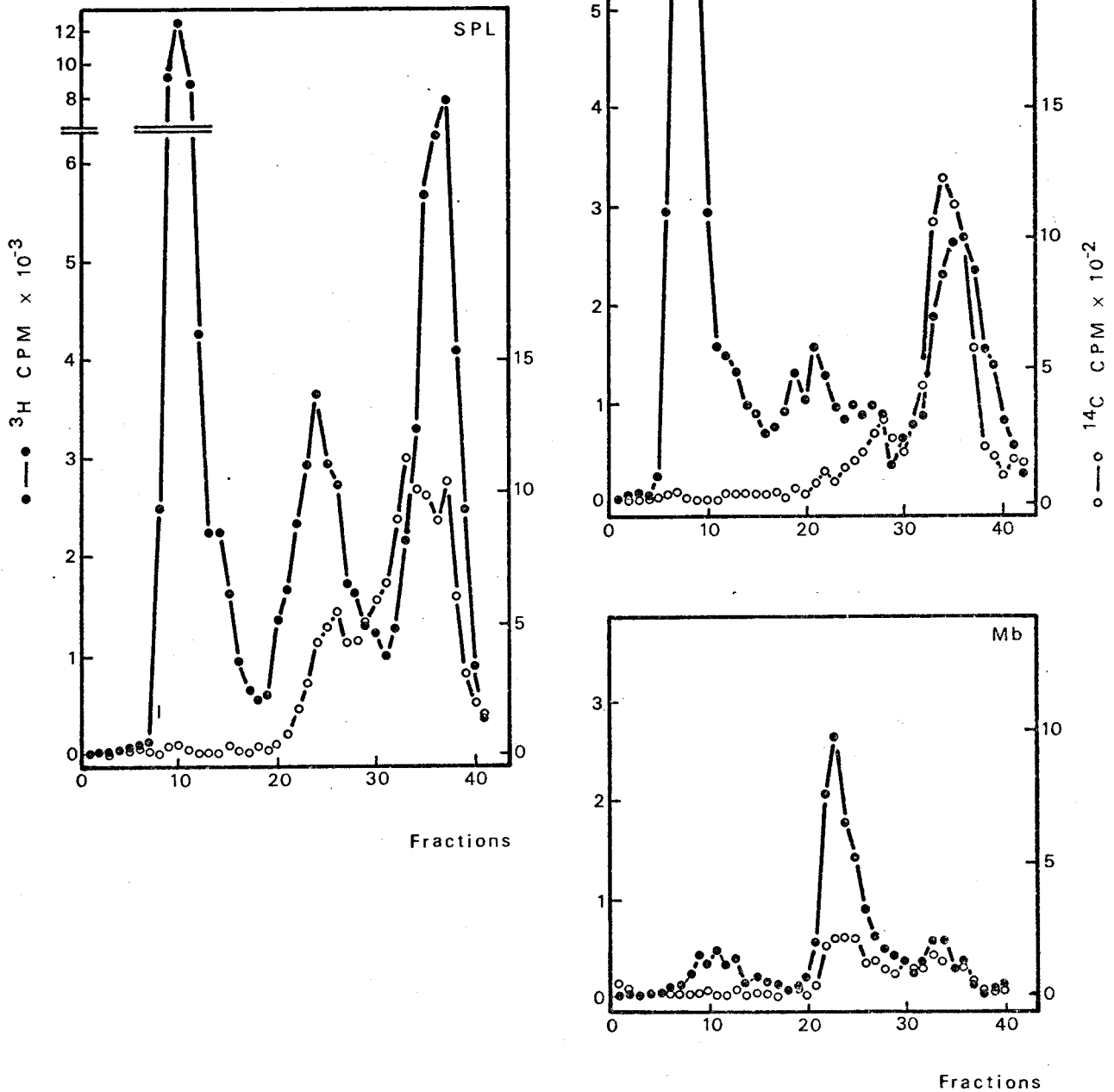


Figure 16 : Analyse en gradient de métrizamide 20-60 p100 du SPL, de la fraction "polysomes libres brute" (Lb) et des membranes (Mb).  
L'équivalent de 20mg de foie est déposé sur chaque gradient.

valeur du RNA sédimentable (7 à 8% du RNA cellulaire).

Le rapport RNA/phospholipides élevé dans l'interphase de membranes montre que nous avons isolé préférentiellement le réticulum endoplasmique granulaire du surnageant post-lysosomal. Ceci a pu être ensuite confirmé par les résultats de l'analyse en métrizamide de cette fraction.

### 2°) Analyse en gradient de métrizamide.

Les membranes isolées par cette technique, se stabilisent lors de leur centrifugation isopycnique en gradient de métrizamide, dans une zone étroite de densité moyenne  $1,20\text{g/cm}^3$ . Le degré de contamination par les polysomes libres n'excède pas 1,1% du RNA total de l'homogénat (soit dans cette expérience 6 % des polysomes libres totaux) (voir fig.16, p.60).

La fraction de "polysomes libres brute" renferme des fragments de réticulum endoplasmique de densité plus faible ( $d = 1,16-1,17\text{g/cm}^3$ ) dont le rapport RNA/phospholipides est beaucoup moins important que celui des membranes purifiées.

### C) Conclusion

Par cette méthode les membranes du réticulum endoplasmique contenues dans un surnageant post-lysosomal et qui possèdent un degré de granulation important, peuvent être obtenues avec un très faible taux de contamination par les polysomes libres. Après traitement par les détergents, les polysomes associés à ces dernières ont pu être isolés dans le même état d'intégrité que celui observé pour les polysomes liés à la totalité du réticulum endoplasmique (38).

## METHODOLOGIE



Des rats de souche SPRAGUE-DAWLEY (Iffa Credo) pesant au maximum 100g sont utilisés. Ils sont normalement nourris jusqu'à l'heure du sacrifice.

## I - TECHNIQUES DE MARQUAGE IN VIVO

### A) RNA

La dose d'acide orotique  $^3\text{H}$  ou  $^{14}\text{C}$  injecté varie selon le type de marquage réalisé de 1 à 5mCi/kg.

#### 1°) *Marquage uniforme.*

L'animal est sacrifié 16h après avoir subi l'injection de l'isotope. Dans ces conditions, les polysomes sont uniformément marqués.

#### 2°) *Marquage long.*

Cette technique est utilisée lorsqu'on veut préparer une fraction de polysomes dont le RNA possède une haute radioactivité spécifique. Après une durée de marquage très longue (2 à 3 jours) le RNA ribosomal est fortement marqué.

#### 3°) *Marquage préférentiel des rRNA.*

Après 16h de marquage, on injecte une quantité importante (15 à 20  $\mu\text{g}$  par animal) d'acide orotique froid (chassage du radioisotope). Les animaux sont sacrifiés 2h après cette injection.

#### 4°) *Marquage court.*

La durée du marquage est réduite à 20mn maximum. Le mRNA possède alors la plus forte radioactivité spécifique.

#### 5°) *Marquage spécifique du mRNA.*

L'actinomycine D administrée à faible dose inhibe la

synthèse du RNA ribosomal (41).

L'injection d'actinomycine D (0,55mg/kg) est suivie 2h30 plus tard par celle de l'isotope. L'animal est sacrifié après 2 à 4h de marquage.

Le mRNA est marqué spécifiquement.

#### B) Protéines

Nous rendons les chaînes protéiques naissantes radio-actives par injection de Leucine  $^3\text{H}$ . La durée du marquage ne doit pas dépasser 10mn.

#### C) Phospholipides membranaires

La choline  $^{14}\text{C}$  est incorporée dans les phospholipides membranaires. Le sacrifice a lieu 4h après l'injection (dose : 0,1mCi/kg).

### II - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Toutes les solutions de saccharose sont préparées dans le tampon TKM<sub>1</sub>-DTT (Tris-HCl 50mM, pH 7,6 ; KCl 25mM ; MgCl<sub>2</sub> 5mM ; Dithiothreitol 1mM).

#### A) Surnageant post-mitochondrial

Les animaux sont sacrifiés par décapitation et leur foie rapidement prélevé est plongé dans le Milieu A (saccharose 0,25M) préalablement refroidi à 0°C. Toutes les opérations ultérieures ont lieu entre 0 et 2°C.

Les foies sont rincés dans le Milieu A, séchés sur de la gaze stérile puis broyés dans l'appareil de FISCHER. Ils sont ensuite homogénéisés dans 5 volumes du même milieu (contenant en plus 100µg/ml de protéines de la fraction d'inhibiteur cytoplasmique de RNase (p.64) et 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire purifié) dans un appareil de POTTER et ELVEHJEM (8 allers-retour de piston ; jeu de 0,15mm ; 1 000 tours/mn).

L'homogénat filtré sur 4 épaisseurs de gaze est centrifugé à  $9\ 000g_{av}$  pendant 10mn. Le surnageant post-mitochondrial est prélevé à la seringue.

#### B) Surnageant post-lysosomal

Celui-ci constitue une des 4 fractions principales obtenues après fractionnement d'un homogénat selon une nouvelle méthode récemment mise au point au laboratoire (15).

#### C) Polysomes libres purifiés

Le surnageant post-mitochondrial est déposé sur un gradient discontinu de saccharose composé de

- 8ml de saccharose 2M
- 6ml de saccharose 1,38M
- 4ml de saccharose 0,5M

puis centrifugé 20h à  $113\ 000g_{av}$  dans le rotor 60 Ti. On obtient un culot de polysomes libres.

Remarque : Les solutions de saccharose composant le gradient discontinu renferment  $50\ \mu\text{g/ml}$  de protéines de la fraction d'inhibiteur de RNase.

### III - FRACTION D'INHIBITEUR CYTOPLASMIQUE DE RNase

Un surnageant post-mitochondrial, filtré sur laine de verre, est centrifugé à  $176\ 000g_{av}$  pendant 3h dans le rotor 60 Ti ( $45\ 000$  tours/mn). Les 2/3 supérieurs du surnageant obtenu sont prélevés à la seringue, dilués par deux volumes de DTT  $1\text{mM}$  et acidifiés à pH 5,1 à  $0^\circ\text{C}$  par addition d'une solution d'acide acétique  $0,5\text{M}$ . Après centrifugation à  $10\ 000g_{av}$  pendant 10mn dans le rotor SW25-2, le surnageant est décanté et ajusté à pH 7 avec de la potasse  $1\text{M}$ . Il est ensuite soumis à un fractionnement au sulfate d'ammonium.

Le précipité contenant l'inhibiteur de RNase (40-60 p100 de saturation) est dissout dans un volume minimal de tampon  $\text{TKM}_1$ -DTT (voir p.63) et déposé sur une colonne de Sephadex G-25 fine ( $35\text{cm} \times 1\text{cm}$ ) préalablement équilibrée dans le tampon.

La fraction exclue contient environ 50mg/ml de protéines. Elle est stockée par fractions de 1ml à  $-20^{\circ}\text{C}$  après addition d'un volume de glycérol.

La fraction d'inhibiteur n'est jamais conservée plus de deux mois. Un contrôle systématique de son activité est effectuée après sa préparation ainsi qu'avant chacune de ses utilisations (conditions décrites par DISSOUS (26)).

#### IV - TECHNOLOGIE DES GRADIENTS

Ce paragraphe ne traite que de l'utilisation des gradients continus de saccharose, de CsCl et de métrizamide. Les solutions composant les gradients sont toujours préparées dans les conditions ioniques du dépôt. Les vitesses et les durées des centrifugations sont précisées dans les protocoles relatifs aux différentes expériences.

##### A) Saccharose

Nous avons utilisé des gradients linéaires de saccharose à des fins analytiques et préparatives.

Les gradients analytiques (10-30 p100 et 10-50 p100 P/V ; Volume : 11,5ml) sont centrifugés dans le rotor SW40 Ti et les gradients préparatifs (10-30 p100 ; 26ml) dans le rotor SW25-1.

Après centrifugation, les gradients analytiques sont collectés par le fond des tubes par fractions de 0,2ml auxquelles sont additionnés 0,3ml d'eau bidistillée. L'absorbance à 260nm est mesurée au spectrophotomètre ZEISS PMQ-II. Lorsque des mesures de radioactivité doivent être effectuées, les fractions diluées sont ensuite introduites en fioles de comptage.

Dans le cas des gradients préparatifs, les fractions ont un volume de 0,5ml. Des parties aliquotes de chacune d'elles (0,2ml) sont prélevées puis diluées par addition de 0,3ml d'eau bidistillée. Après mesure de la densité optique, les fractions correspondant aux pics d'absorbance sont rassemblées pour être ensuite analysées soit en CsCl, soit en métrizamide.

### B) CsCl

La préparation et l'analyse des particules s'effectue dans des solutions tamponnées par la triéthanolamine - HCl car le matériel déposé doit être fixé préalablement par la glutaral-déhyde selon la méthode de BALTIMORE et HUANG (42).

Des échantillons de 0,2ml sont déposés sur gradients préformés (Volume : 3,8ml ; densités extrêmes : 1,38 - 1,63g/cm<sup>3</sup>).

La pente des gradients et la densité des particules sont déterminées par la mesure des indices de refraction des différentes fractions (0,1ml).

### C) Métrizamide

Le pourcentage des solutions de métrizamide exprime, comme celui des solutions de saccharose, le rapport P/V, si P est la quantité en g de soluté introduite et V le volume en ml de la solution finale. Il est nécessaire de mentionner ce détail car certains auteurs réalisent leurs solutions de métrizamide en dissolvant progressivement une quantité x de métrizamide dans 100ml de tampon pour obtenir une solution à x p100 de métrizamide. La méthode que nous utilisons a pour principal avantage de permettre une totale reproductibilité des solutions.

#### 1°) *Analyse en gradient préformé.*

Nous avons utilisé des gradients linéaires de métrizamide (20-60 p100 ; densités extrêmes : 1,10 - 1,32g/cm<sup>3</sup> ; Volume : 3,8ml) centrifugés dans le rotor SW50-1 à 33 000 tours/mn.

Dans tous les cas, les particules analysées sont radio-actives. Les mesures de radioactivité sont effectuées par filtration et comptage de l'acido-insoluble (voir p.69) contenu dans les différentes fractions (0,1ml).

Les mesures des indices de refraction permettent de déterminer la densité des particules dans le gradient. La formule suivante relie la densité  $\rho$  à l'indice de refraction  $\eta$

$$\rho_{5^{\circ}\text{C}} = 3,453 \eta_{20^{\circ}\text{C}} - 3,601 \quad (29)$$

2°) *Stabilité de la pente des gradients préformés pendant la centrifugation.*

6 gradients 20-60 p100 centrifugés dans les mêmes conditions (rotor SW50-1 ; 33 000 tours/mn ; 2h) présentent des pentes sensiblement identiques (voir fig.17, p.68).

Nous pouvons observer que la linéarité du gradient est surtout conservée en son milieu. En effet, le gradient s'incurve légèrement aux extrémités.

Ces déformations imposent un contrôle systématique de la pente après centrifugation.

#### V - DOSAGE DU RNA

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

Le RNA est hydrolysé pendant 1h à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 0,5ml d'HCl 4N et les tubes sont centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment.

Les ribonucléotides présents dans le surnageant sont dosés par colorimétrie par le réactif de BIAL à l'orcinol chlorhydrique en présence de  $\text{CuCl}_2$  (43). A 2ml d'hydrolysats sont ajoutés 2ml de réactif (500mg d'orcinol, 7mg de  $\text{CuCl}_2$ , HCl concentré qsp 100ml). Le mélange est porté à 100°C pendant 20mn puis refroidi sous un courant d'eau froide.

La quantité de RNA est déterminée par la mesure de l'absorbance à 665nm. Des RNAs purifiés de foie de rat servent de référence.

#### VI - ESTIMATION DU GLYCOGENE

0,9ml d'éthanol absolu sont ajoutés à 0,1ml de fraction et les tubes sont placés à -20°C pendant 2h. Ils sont ensuite centrifugés 10mn à 3 000g et le sédiment obtenu est lavé 2 à 3 fois par de l'éthanol à 75 p100.

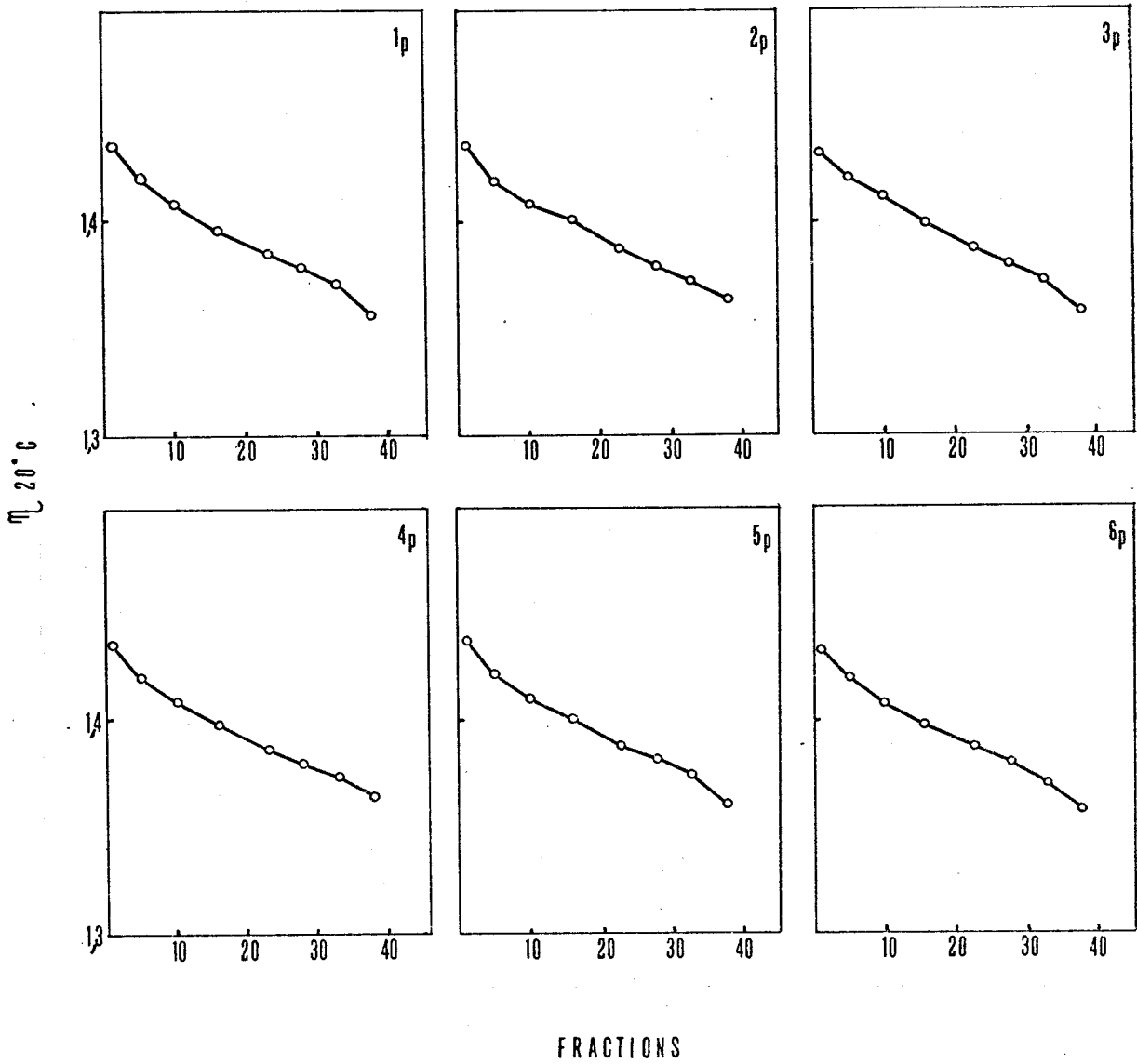


Figure 17 : Comparaison des différentes pentes obtenues après centrifugation de gradients préformés.



Les sucres sont ensuite dosés selon la méthode de TILLMANS et PHILIPPI (réactif à l'orcinol sulfurique) (44,45).

#### VII - MESURES DE RADIOACTIVITE

Les fractions de gradients de saccharose sont introduites en fioles de comptage et additionnées de 10ml de liquide scintillant (PCS - NUCLEAR CHICAGO)

Le matériel acido-insoluble des fractions de gradients de CsCl ou de métrizamide, est précipité par du TCA 5 p100 à 0°C en présence d'un entraîneur (50 µg de séralbumine ou de RNA de levure). Le précipité récupéré sur filtre en fibre de verre Whatman GF83, est ensuite lavé par du TCA 5 p100, du TCA 0,1 p100, de l'éthanol-éther (V/V), et de l'éther. Les filtres séchés sont introduits dans des fioles de comptage renfermant 10ml de liquide scintillant (5,5g de Permablend III (Packard), toluène qsp 1l).

#### VIII - PRODUITS UTILISES

La métrizamide nous a été généreusement offerte par NYEGAARD et Co A.S. (Oslo, Norway).

Le CsCl est un produit E. MERCK (Darmstadt, Germany) et le saccharose ultra-pur un produit SERLABO (France).

L'actinomycine D et la puromycine proviennent de SIGMA Chemicals Compagny (St Louis, Missouri, U.S.A.), la glutaral-déhyde de l'Eastman Organic Chemicals (Rochester, U.S.A.) et la ribonucléase (EC 2.7.7.16, du pancréas de boeuf, sans protéases, 40 unités KUNITZ mg<sup>-1</sup>) de la SOCHIBO S.A., France. Le TRITON X-100 (scintillation grade) un produit BDH Chemicals Ltd (Poole, England).



## CONCLUSION

L'étude de la structure et de la spécificité de fonction des polysomes libres et liés d'hépatocyte de rat nécessite leur isolement de façon quantitative en respectant leur intégrité structurale et fonctionnelle.

Une nouvelle méthode de fractionnement de la cellule hépatique, mise au point récemment au laboratoire, permet d'obtenir la quasi-totalité du réticulum endoplasmique avec une bonne préservation du RNA messager. Les fragments bilamellés du réticulum associés aux mitochondries sédimentent à basse vitesse, tandis que les vésicules membranaires de taille variable sont contenues dans le surnageant post-lysosomal. L'étude de la séparation des polysomes libres et liés de ce surnageant post-lysosomal a fait l'objet de notre travail.

Les méthodes existantes de séparation des deux classes de polysomes consistent généralement en une centrifugation isopycnique de longue durée des membranes, sur gradient discontinu de saccharose. Nous avons pu montrer, dans une première partie de notre travail, que ces techniques ne permettent pas d'obtenir des fractions membranaires dépourvues de contamination par les polysomes libres et dont l'état structural n'est pas modifié.

L'introduction de la métrizamide, comme milieu de centrifugation, s'est avérée être d'un intérêt important pour l'analyse du contenu en polysomes libres et liés des fractions subcellulaires. En effet, les polysomes libres et les membranes possédant des densités différentes en métrizamide, il est possible de les séparer très nettement par centrifugation isopycnique dans ce milieu. La purification des membranes par flottaison peut également être réalisée rapidement en métrizamide grâce à la viscosité faible et à la densité importante des solutions. Ce dernier procédé convient particulièrement à la préparation des RNAs associés aux membranes.

D'autre part, la mise au point de nouvelles techniques de séparation des polysomes libres et liés en saccharose a permis l'isolement quantitatif des polysomes libres et des membranes ainsi que la purification des membranes granulaires du surnageant post-lysosomal. Le détachement artefactuel des polysomes liés aux membranes et l'agrégation de ces dernières sont considérablement

limités par l'utilisation de centrifugations de courte durée. Les fractions membranaires isolées sont pratiquement exemptes de contamination par les polysomes libres et l'intégrité du RNA messenger associé aux membranes peut être préservée.

Grâce au développement de ces méthodes, il devrait être possible d'envisager de façon nouvelle les "aspects dynamiques" de la compartimentation cellulaire.

**RESUME**

Nous avons montré lors d'une étude critique que les principales difficultés rencontrées dans les travaux concernant les relations de biogénèse entre les deux catégories de polysomes cellulaires et leur spécificité de synthèse, étaient surtout d'ordre méthodologique. En particulier la séparation des polysomes libres et liés en respectant l'intégrité du RNA messager restait un obstacle important à surmonter.

Les résultats présentés dans ce mémoire apportent plusieurs réponses à ce problème. Par l'utilisation d'un nouveau milieu de centrifugation, les deux classes de polysomes peuvent être séparées quantitativement à l'échelle analytique. La centrifugation isopycnique en métrizamide constitue en outre un excellent moyen de détermination du taux de contamination croisée des fractions polysomales purifiées.

A l'échelle préparative, le développement de nouvelles techniques d'isolement des polysomes libres et des membranes par centrifugation en gradient discontinu de saccharose, nous a permis d'obtenir quantitativement et avec un minimum de contamination, les deux types de polysomes en préservant leur intégrité structurale et fonctionnelle.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- FAWCETT, D.W. (1955).  
J. Nat. Cancer Inst. 15, 1475.
- 2- PALADE, G.E. (1958). Microsomal Particles and Protein synthesis. ROBERTS, R.B., Ed. (Pergamon Press, New York) p.36.
- 3- SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E. (1960).  
J. Biochem. Biophys. Cytol. 7, 619.
- 4- VASSALI, P., LISOWSKA-BERNSTEIN, B., LAMM, M.E., BENACERRAF, B. (1967).  
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 58, 2422.
- 5- PERMUTT, M.A., KIPNIS, D.M. (1972).  
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 69, 505.
- 6- HICKS, S.J., DRYSDALE, J.W., MUNRO, H.N. (1969).  
Science 164, 584.
- 7- GANOZA, M.C., WILLIAMS, C.A. (1969).  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 63, 1370.
- 8- HONIJN, A.M., BALIGA, B.S., MUNRO, H.N. (1973).  
FEBS Lett. 37, 249.
- 9- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1967).  
J. Mol. Biol. 26, 279.
- 10- DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R., APPELMANS, F. (1955).  
Biochem. J. 60, 604.
- 11- LEWIS, J.A., TATA, J.R. (1973).  
J. Cell. Sci. 13, 447.
- 12- ADELMAN, M.R., SABATINI, D.D., BLOBEL, G. (1973).  
J. Cell. Biol. 56, 191.
- 13- VENKATESAN, N., STEELE, W.J. (1972).  
Biochim. Biophys. Acta. 287, 526.
- 14- RAMSEY, J.C., STEELE, W.J. (1976).  
Biochemistry, 15 (8), 1976.
- 15- DISSOUS, C., VERWAERDE, C., LEMPEREUR, C., KREMBEL, J.  
Eur. J. Biochem., sous presse.
- 16- SABATINI, D.D., TASHIRO, Y., PALADE, G.E. (1966).  
J. Mol. Biol. 19, 503.

- 17- ADELMAN, M.R., SABATINI, D.D., BLOBEL, G. (1973).  
J. Cell. Biol. 56, 206.
- 18- ROSBACH, M., PENMAN, S. (1971).  
J. Mol. Biol. 59, 227.
- 19- DISSOUS, C., KREMBEL, J. (1976).  
C. R. Acad. Sc. Paris, t282, série D, 313.
- 20- MECHLER, B., VASSALI, P. (1975).  
J. Cell. Biol. 67, 25.
- 21- TATA, J.R. (1973).  
Karolinska Symposia. N°6 : Protein synthesis in reproductive tissue.
- 22- IBBETSON, A.L., FREEDMAN, R.B. (1975).  
Biochem. Soc. Trans. 3, 197.
- 23- LOWE, D., REID, E., HALLINAN, T. (1970).  
FEBS Lett. 6, 114.
- 24- O'TOOLE, K. (1974).  
Biochem. J. 138, 305.
- 25- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1966).  
Biochemistry, 55, 1283.
- 26- DISSOUS, C., Thèse de 3e cycle, Lille (1974).
- 27- SARGENT, J.R., CAMPBELL, P.N. (1965).  
Biochem. J. 96, 134.
- 28- MECHLER, B., VASSALI, P. (1975).  
J. Cell. Biol. 67, 1.
- 29- RICKWOOD, D., BIRNIE, G.D. (1975).  
FEBS Lett. 50, 2, 102.
- 30- MUNTHE-KAAS, A.C., SEGLEN, P.O. (1974).  
FEBS Lett. 43, 3, 252.
- 31- MATHIAS, A.P., WYNTER, C.V.A. (1973).  
FEBS Lett. 33, 1, 18.
- 32- AAS, M. (1973).  
9<sup>th</sup> Internat. Congr. Biochem., Stockholm, 31.
- 33- BIRNIE, G.D., RICKWOOD, D. and HELL, A. (1973).  
Biochim. Biophys. Acta. 331, 283.



- 34- RICKWOOD, D., HELL, A., BIRNIE, G.D., GILHUUS-MOE, C.C. (1974).  
Biochim. Biophys. Acta. 342, 367.
- 35- BUCKINGHAM, M.E., GROS, F. (1975).  
FEBS Lett. 53, 355.
- 36- DISSOUS, C., LEMPEREUR, C., VERWAERDE, C., KREMBEL, J. (1976).  
Eur. J. Biochem. 64, 361.
- 37- PERRY, R.P., KELLEY, D.E. (1968).  
J. Cell. Physiol. 72, 235.
- 38- DISSOUS, C., LEMPEREUR, C., VERWAERDE, C., KREMBEL, J.  
Eur. J. Biochem., sous presse.
- 39- TATA, J.R. (1967).  
Biochem. J. 105, 783.
- 40- BONT, W.S., GEELS, J., HUIZINGA, A., MEKKELHOLT, K.,  
EMMELOT, P. (1972).  
Biochim. Biophys. Acta. 262, 514.
- 41- MURTY, C.N., SIDRANSKI, H. (1972).  
Biochim. Biophys. Acta. 281, 69.
- 42- BALTIMORE, D., HUANG, A.S. (1968).  
Science. 162, 572.
- 43- MOULE, Y. (1953).  
Arch. Sci. Physiol. 7, 161.
- 44- TILLMANS, J., PHILIPPI, K. (1929).  
Biochem. Z. 215, 36.
- 45- MONTREUIL, J., SPIK, G. (1968).  
Microdosage des glucides. Monographie N°1 du Laboratoire de  
Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille.