

50376 1979 174



présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Claude DISSOUS

Attaché de Recherche C.N.R.S.



AMÉLIORATION DES MÉTHODES D'ISOLEMENT DES POLYSOMES DE L'HÉPATOCYTE DE RAT APPLICATION À L'ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE D'UN ENZYME LYSOSOMAL : α -L FUCOSIDASE

Présentée le 15 juin 1979, devant la Commission d'Examen

Président : Rapporteurs :

1

Examinateurs :

J. MONTREUIL J. KREMBEL J.R. TATA M. JACOB J.P. ZALTA K. SCHERRER A.L. HAENNI

A mes parents. A ma famille. A mes amis.

Y

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (L.A. CNRS n° 217 ; Professeur J. MONTREUIL) sous la direction de Monsieur J. KREMBEL, Maître de Conférences. Il a bénéficié de subventions accordées par le C.N.R.S., le C.E.A., et l'I.N.S.E.R.M..

Que Messieurs J.MONTREUIL et J. KREMBEL trouvent ici l'expression de toute ma gratitude pour la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de ce travail.

Aux éminents spécialistes qui me font le grand honneur de juger ce mémoire : Melles A.L. HAENNI, M. JACOB, Messieurs K. SCHERRER, J.R. TATA, J.P. ZALTA, je voudrais apporter ici un témoignage de mon admiration et de ma profonde reconnaissance.

Que tous les membres -anciens ou présents- de l'"équipe des polysomes" ainsi que tous ceux qui, de près ou de loin m'ont apporté leur concours acceptent mes remerciements les plus sincères, et soient assurés de toute mon amitié. Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications suivantes :

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

C. DISSOUS, C. LEMPEREUR, C. VERWAERDE et J. KREMBEL Eur. J. Biochem. (1976) <u>64</u>, 361-367

Free and membrane-bound polysomes from rat liver
1- Improvements of subcellular fractionation
C. DISSOUS, C. VERWAERDE, C. LEMPEREUR et J. KREMBEL
Eur. J. Biochem. (1978) 83, 5-15

Free and membrane-bound polysomes from rat liver 2- Recovery of large free and membrane-bound polysomes C. DISSOUS, C. LEMPEREUR, C. VERWAERDE et J. KREMBEL Eur. J. Biochem. (1978) 83, 17-27

Biosynthesis of lysosomal proteins : intracellular sites of synthesis of $\alpha = L$ fucosidase

C. DISSOUS, A. CHERON, J.F. ANSART, et J. KREMBEL

Soumis au J. Mol. Biol.

Autres publications :

Isopycnic centrifugation of free and membrane-bound polysomes from rat liver
C. DISSOUS, F. CANER et J. KREMBEL
Eur. J. Biochem. (1974) 44, 161-170

Mise en évidence d'une liaison ribosome-membrane sensible à l'action très ménagée de la RNase

C. DISSOUS et J. KREMBEL

C. R. Acad. Sc. Paris (1976) 282, 313-316

Isolement et purification des fractions membranaires chez les ovocytes de Perinereis cultifera Grube

F. CANER, M. PORCHET, A. DHAINAUT, C. DISSOUS

C. R. Acad. Sc. Paris (1977) <u>284</u>, 2019-2922

Subcellular fractionation of Sarcocystis tenella endozoïtes J.F. DUBREMETZ, C. DISSOUS Journal of Parasitology, sous presse

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

La fonction majeure de l'association des ribosomes aux membranes	р.	1
Relations fonctionnelles ou de biogénèse entre les deux catégories de polysomes	р.	2
L'hypothèse du "signal"	p.	3
Les spécificités de synthèse	p.	4
Les liaisons des polysomes aux membranes	p.	5
Compartimentation cellulaire de la biosynthèse protéique	р.	8
CHAPITRE I - LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE GRANULAIRE DE L'HEPATOCYTE DE RAT : problèmes d'isolement et de purification		
A- ISOLEMENT DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE	р.	11
B- SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES DU SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL	р.	19
lº- Centrifugation sur gradient discontinu de saccharose	••	
 a- Comparaison de quatre procédés de purification des polysomes 		
b- Sédimentation non quantitative des polysomes libres	р.	23
 Rétention des polysomes libres par les membranes 		

	 Sédimentation non quantitative des polysomes libres de petite taille 	p. 23
	c- Contamination des polysomes libres par les poly- -somes liés	p. 25
	2°- Autres méthodes de séparation des poly- -somes libres et liés	p. 27
	a- Centrifugation différentielle	
	b- Centrifugation de zone	p. 28
	c- Flottaison des membranes	
CHAPITRE I EN METRIZA	I - SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES MIDE	
A- CENTRIF POLYSOM	UGATION ISOPYCNIQUE DES DIFFÉRENTES RNP ALES	p. 29
	lº- Polysomes et monosomes	p. 31
	2°- Sous-unités et mRNP	-
B- ANALYSE	DU SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL	p. 36
C- APPLICA	TIONS DE LA CENTRIFUGATION EN METRIZAMIDE	
	l°- Application du gradient linéaire de métrizamide à la mesure des contamina- -tions croisées entre les fractions polysomales	p. 39
	2°- Purification des membranes par flot- -taison	

D- CONCLUSION

4

p. 41

CHAPITRE III - PREPARATION DES DIFFERENTES CLASSES DE POLYSOMES DE L'HEPATOCYTE DE RAT

A-	FRACTIONNEMENT CEL	LLULAIRE).	44
	l°- Condit	ions d'homogénéisation		
	a- Choix du m	nilieu		
	b- Homogénéis	sation du tissu hépatique		
	2º- Influer des org	nce des ions sur le comportement ganites en centrifugation dif-		
	-férent	tielle).).	48
	3°- Fractic	onnement par la méthode des		
	gradie	nts discontinus p).	50
	a- Principe			
	b- Répartitio	on de différents constituants dans les		52
	Tractions		·•	52
	c- Répartitio subcellula	on des ribosomes dans les fractions aires		
	d- Observatio	on au microscope électronique p).	54
	e- Discussion	n et conclusion p).	60
B-	ISOLEMENT DES POLY ENDOPLASMIQUE	YSOMES LIBRES ET LIES AU RETICULUM) .	62
	lº- Effet (sur l'a	de hautes concentrations en Mg ⁺⁺ activité des nucléases cellulaires		
	2º- Traiter en prés	ment des membranes par un détergent sence de Mg ⁺⁺ 50mM p).	64
	3°- Facteur	rs influençant l'intégrité des		

polysomes

4º- Séparation des polysomes libres et des membranes	p.	70
5°- Isolement des polysomes de la fraction C	p.	74
6°- Isolement des polysomes liés à la mem- -brane nucléaire	p.	76
a- Principe	p.	77
b- Résultats	p.	79
C- POLYSOMES TOTAUX DU TISSU HÉPATIQUE		
D- DISCUSSION	p.	81
l°- Analyse des polysomes et critères d'in- -tégrité du mRNA		
2°- Effet de différents inhibiteurs de nucléases	p.	83
CHAPITRE IV - FONCTION DES DIFFERENTES CLASSES DE POLYSOMES : étude de la biosynthèse de l' α -l fucosidase lysosomale		
A- TRADUCTION DES mRNAs DES DIFFERENTES FRACTIONS DE POLYSOMES EN SYSTEME ACELLULAIRE DE RETICULOCYTES	p.	86
l°- Contrôle de l'efficacité du système de réticulocytes traité par la nucléase de Micrococcus		
2°- Traduction des mRNAs des différentes fractions de polysomes	р.	89
B- ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DE L' α -L FUCOSIDASE	p.	93

.

C- FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

3°- Phospholipides membranaires

c- Marquage court et marquage spécifique du mRNA

2°- Protéines

b- Marquage préférentiel du rRNA

a- Marquage long

CHAPITRE V - MATERIEL ET METHODES

lº- RNA

B- INCORPORATION DE RADIOISOTOPES <u>IN VIVO</u>

A- GENERALITES

C- DISCUSSION

- 5° Isolement des "précurseurs" supposés des sous-unités de l'α-L fucosidase, après traduction <u>in vitro</u> du RNA des différen tes fractions de polysomes p.106
- 4° Fixation des Fab ¹²⁵I spécifiques de l' α -L fucosidase sur les polysomes isolés de différentes fractions subcellulaires p.104
- 3° Anticorps anti-α-L fucosidase et stratégie
 adoptée pour l'étude de la biosynthèse de
 l'α-L fucosidase

l°- Purification de l' α -L fucosidase

2°- Contrôles de pureté

p. 95

p.109

p.116

p.117

l°- Techniques conventionnelles	p.117
a- Isolement d'un surnageant post-mitochondrial (SPM)	
b- Polysomes libres	p.118
c- Fraction d'inhibiteur cytoplasmique de RNase	
2º- Fractionnement du tissu hépatique	
a- Homogénat	
b- Fractionnement par centrifugation différentielle	p.119
c- Fractionnement par la méthode des gradients discontinus	
* Fractions NC, et C	
* SPL et fraction L	p.120
* Fraction N et C	
d- Préparation des polysomes	p.121
* Préparation du cytosol	
* Préparation des fractions subcellulaires	
* Purification partielle des membranes du SPL	
* Séparation des polysomes libres et liés du SPL	p.122
* Traitement des membranes par les détergents	
* Isolement des polysomes de la fraction C	p.123
* Polysomes liés à la membrane nucléaire	
* Polysomes de l'homogénat non fractionné	p.124

D- EXTRACTION DU RNA

E-	PREPARATION DE RNA ³ H DE BAS POIDS MOLECULAIRE	p.125
F-	CENTRIFUGATION EN GRADIENTS DE DENSITE	
	lº- Centrifugation de zone en gradient de saccharose	
	2°- Centrifugation isopycnique	p.126
	a- CsCl	
	b- Métrizamide	
G-	METHODES D'ANALYSE ET DE DOSAGE	p.127
	1°- Dosage du RNA	
	2°- Dosage du DNA	
	3°- Dosage des protéines	p.128
	4°- Mesure de l'activité des enzymes marqueurs	
	a- Glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9) (réticulum endoplasmique)	
	b- Phosphatase acide (EC 3.1.3.2) (lysosomes)	
	c- Monoamine oxydase (EC 1.4.3.4) (membrane externe des mitochondries)	p.129
	d– Cytochrome c oxydase (EC 1.9.3.1) (membrane interne des mitochondries	•
	e- Catalase (EC 1.11.1.6) (peroxysomes)	
	f- Uricase (EC 1.7.3.3) (peroxysomes)	p.130

H- SYSTEME ACELLULAIRE DE RETICULOCYTES DE LAPIN

I –	PURIFICATION DE L' $lpha$ -L FUCOSIDASE DU FOIE DE RAT	p.131
J-	PREPARATION D'ANTICORPS ANTI α -L FUCOSIDASE	p.132
	l°- Obtention des antisérums	
	2°- Purification des IgG	
	a- Précipitation par le sulfate d'ammonium	
	b- Chromatographie sur DEAE et CM cellulose	p.133
	3°- Préparation des fragments Fab	
	4°- Purification des IgG et des fragments Fab spécifiques de l'α-L fucosidase	
К-	FIXATION DES Fab ¹²⁵ I SPECIFIQUES DE L' α -L FUCOSI- -DASE SUR LES POLYSOMES	p.134
	l°- Marquage de la fraction Fab par l' ¹²⁵ I	
	2°- Purification des Fab ¹²⁵ I spécifiques de l' $lpha$ -L fucosidase	p.135
	3°- Mesure de la quantité de Fab ¹²⁵ I fixés par les différentes fractions de poly -somes	•
L-	ISOLEMENT DES PRODUITS DE SYNTHESE <u>IN VITRO</u> , "PRE- -CURSEURS" SUPPOSES DE L' α -L FUCOSIDASE	p.136
M-	ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE	p.137
N-	DETERMINATION DE LA RADIO-ACTIVITE	p.138
0-	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	p.139
P-	PRODUITS UTILISES	

ABREVIATIONS

- U A ₂₆₀	:	Unité d'absorbance à 260nm : quantité de matériel présen- -te dans lml de solution d'absorbance l à 260nm, lorsque le parcours optique est de lcm
- cpm	:	Coups par minute
- t/mn	:	Tours par minute
- g _{av}	:	Accélération au rayon moyen
- g _{max}	:	Accélération au rayon maximum
- mRNA	:	Acide ribonucléique messager
– rRNA	:	Acide ribonucléique ribosomal
- tRNA	:	Acide ribonucléique de transfert
- RNP	:	Ribonucléoprotéine
- RNase	:	Ribonucléase
- SPL	:	Surnageant post-lysosomal
- SPM	:	Surnageant post-mitochondrial
- SPN	:	Surnageant post-nucléaire
– DTT	:	Dithiothreitol
- DOC	:	Désoxycholate de sodium
- SDS	:	Dodécyl sulfate de sodium
- Tris	:	2-amino-2-hydroxyméthyl-propanediol-1,3
– EDTA	:	Ethylène diamine tétra-acétique
– EGTA	:	Ethylène glycol tétra-acétique
- PCA	:	Acide perchlorique
- TCA	:	Acide trichloracétique

Abréviations utilisées pour désigner la composition des solutions utili--sées pour le fractionnement cellulaire

- S : Saccharose

- T : Tris-HCl, pH 7,6

- Te : Triéthanolamine-HCl, pH 7,6

- K : KC1

- M : Mg(CH₃COO)₂

- N : NH₄Cl

– D : *DTT*

- 0,255 T₅₀K₂₅M₅d₁ désigne une solution de saccharose 0,25M dans le tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,6, KCl 25mM, Mg(CH₃COO)₂ 5mM, DTT 1mM

* est un renvoi au chapitre Matériel et Méthodes.

INTRODUCTION

De l'hypothèse de PALADE et SIEKEVITZ à l'hypo--thèse du "signal" de BLOBEL, vingt années de recherches sur la structure et la fonction du réticulum endoplasmique se sont écoulées... La synthèse des protéines d'excrétion ne représen--te très probablement qu'un aspect du rôle du réticulum endoplasmique dans les cellules euca--ryotes.

La fonction majeure de l'association des ribosomes aux membranes

Deux populations ribosomales ont pu être reconnues morphologi--quement dans le cytoplasme des cellules parenchymateuses de foie de Rat dès 1955 - 56 (1-2) : l'une, libre dans le cytoplasme, et l'autre associée à un abondant système de membranes lipoprotéiques que l'on nomma réticulum endoplasmique.

L'existence d'une corrélation entre l'abondance du réticulum endoplasmique et le degré d'activité secrétrice d'un type cellulaire donné (PALADE, 1958) (3), conduisit PALADE et SIEKEVITZ à émettre, en 1960, l'hypothèse selon laquelle les ribosomes liés aux membranes intracellu--laires synthétiseraient les exoprotéines, tandis que les ribosomes libres seraient responsables de la synthèse des protéines retenues dans la cellule (4). Cette théorie était séduisante, et un grand nombre de travaux établirent de manière définitive le rôle du réticulum endoplasmique dans les processus de secrétion. Cependant, il existe du réticulum endoplasmi--que dans les cellules eucaryotes possédant peu ou pas d'activité secré--trice comme les cellules nerveuses par exemple. En outre, la croissance et le développement cellulaire s'accompagnent généralement d'une prolifé--ration active du système membranaire.

On conçoit donc mieux que l'existence de polysomes liés puisse avoir un avantage majeur pour la physiologie de la cellule si les chaînes protéiques synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique peuvent, et doivent, être transportées ailleurs, dans la cellule ou en dehors de la cellule ; les espaces intermembranaires – encore appelés <u>cisternae</u> – assurant alors les communications entre les différents compar--timents cellulaires ainsi qu'avec l'extérieur.

A ce sujet, PALADE suggérait plus récemment que dans les cel--lules non secrétrices, les chaînes néosynthétisées par les ribosomes liés au réticulum endoplasmique puissent migrer vers des vésicules intracellu--laires, notamment les lysosomes, et être ainsi retenues dans la cellule (5). Le transfert des chaînes protéiques naissantes au travers des feuil--lets lipidiques deviendrait alors la fonction majeure de l'association des ribosomes aux membranes, mais les données expérimentales sont encore insuf--fisantes à l'heure actuelle pour étayer complètement cette hypothèse. En effet, si quelques études ont montré que, dans l'hépatocyte de Rat, cer--taines protéines mitochondriales (glutamate deshydrogénase (6), malate deshydrogénase (7), cytochrome c (8, 9, 10)) ou peroxysomales (catalase) (11) sont synthétisées par le réticulum endoplasmique granulaire, il s'agit cependant de prouver que le mécanisme de transfert de ces protéines est similaire à celui des protéines secrétées.

Relations fonctionnelles ou de biogénèse entre les deux caté--gories de polysomes

De même que de nombreux travaux eurent pour but d'attribuer à chaque type de polysomes la synthèse de certaines classes de protéines, d'autres tentèrent de mettre en évidence d'éventuelles différences struc--turales ou métaboliques entre les composants des deux systèmes de biosyn--thèse qui auraient pu expliquer tout ou partie des mécanismes de sélection des mRNAs.

La majorité de ces études ont envisagé la possibilité d'échange des sous-unités ribosomales entre les deux fractions. Les expériences basées sur l'analyse de cinétiques de marquage <u>in vivo</u> ont apporté, dans leurs détails, des résultats souvent contradictoires (11-16). Dans aucun cas cependant, on ne peut trouver de données en accord avec l'existence de deux populations "cloisonnées" de ribosomes. Le même type de conclusion s'impose au vu des nombreuses expériences de reconstitution <u>in vitro</u> (17-22) ou des analyses structurales du rRNA (23). Dans plusieurs cas, l'électrophorèse des protéines ribosomales a montré que la sous-unité 60S des polysomes libres possède une protéine supplémentaire (17, 24), mais deux autres études concluent à une similitude totale (25, 26). BLOBEL, enfin, montre qu'un facteur protéique présent dans le cytosol, les mono--somes et polysomes libres, est capable de provoquer le détachement des monomères liés aux membranes, mais pas celui des polysomes liés (27).

Ceci suggère qu'après la terminaison de la synthèse de la chaîne peptidique, les ribosomes liés peuvent être détachés des membranes par un facteur de dissociation pour rejoindre l'ensemble des ribosomes libres dans le cyto--plasme.

Un certain nombre de travaux ont également étudié, de façon directe ou indirecte, la possibilité d'échange d'autres composants des deux systèmes. Ainsi, les plus anciens comparèrent les différences d'efficacité <u>in vitro</u> des deux catégories de polysomes et aboutirent à des conclusions très opposées, traduisant essentiellement l'imperfection des techniques employées pour isoler les polysomes (28-34). D'autres comparèrent les proprié--tés <u>in vitro</u> des deux systèmes (35), et notamment leur sensibilité aux anti--biotiques (36, 37). Deux travaux enfin, indiquent que polysomes libres et liés n'utilisent pas les mêmes leucyl-tRNA (38) ou la même réserve d'aminoacides (39).

Il semble donc que les mêmes sous-unités ribosomales puissent traduire indifféremment toutes les catégories de mRNAs. Toutefois, la pos--sibilité que d'autres composants soient spécifiques de chaque type de polysomes ne peut être exclue. L'ensemble des travaux mentionnés ci-dessus n'apportait aucun éclaircissement sur les mécanismes de sélection des mRNAs, avant qu'il ne soit proposé qu'une séquence contenue dans le mRNA lui-même provoque indirectement l'association des ribosomes aux membranes.

L'hypothèse du "signal"

Au moins dans le cas des protéines secrétées, les bases molé--culaires du passage des polypeptides au travers des couches lipidiques du réticulum endoplasmique peuvent maintenant s'expliquer de façon plus rationnelle dans l'hypothèse du "signal" de BLOBEL <u>et al</u> (40, 41). Une séquence additionnelle hydrophobe, située à l'extrémité N-terminale (le "signal") permet l'introduction de la chaîne peptidique dans les membranes et sa décharge vectorielle dans les <u>cisternae</u>. Celle-ci est apparemment hydrolysée avant que le processus d'allongement de la chaîne soit terminé.

Cette hypothèse peut également expliquer comment un mRNA par--ticulier peut être "choisi" pour être traduit par les ribosomes liés. Le mécanisme d'induction de la traduction serait identique pour tous les mRNAs, qu'ils possèdent ou non la séquence "signal". Le ribosome inducteur, libre dans le cytoplasme, pourrait s'associer aux membranes dès que la

chaîne naissante, porteuse de sa séquence hydrophobe, émerge suffisamment du ribosome. Si la séquence additionnelle est absente, l'attachement du ribosome à la membrane ne se produit pas. Toutefois, la présence de la séquence "signal", bien que nécessaire, n'est pas obligatoirement suf--fisante pour assurer l'association du ribosome à la membrane. Quand le nombre de sites récepteurs présents sur les membranes devient un facteur limitant, la traduction des mRNAs contenant la séquence "signal" peut s'effectuer par des ribosomes libres.

Les spécificités de synthèse

Dans un certain nombre de situations déterminées, l'ensemble des propositions rassemblées dans l'hypothèse du "signal" permet de mieux interpréter les différences fonctionnelles mises en évidence entre poly--somes libres et liés. Ainsi, on peut observer fréquemment qu'une protéine donnée n'est pas exclusivement synthétisée par les polysomes liés, mais qu'une partie de la synthèse (5 à 25%) est effectuée par les polysomes libres. Si la nature d'un mRNA donné n'implique pas obligatoirement sa traduction par les ribosomes associés aux membranes, la mise en évidence d'un certain taux de synthèse de la protéine étudiée par les polysomes libres peut, hormis certaines raisons qui seront discutées plus loin, avoir des causes physiologiques.

Cependant, on peut également constater que certaines protéines du cytosol sont synthétisées dans une proportion relativement élevée par les ribosomes liés. Tel est le cas de l'arginase (42) ou de la ferritine (43-44) dont pratiquement la moitié de la synthèse s'effectue sur le ré--ticulum endoplasmique, des protéines ribosomales de levure (23) ou de la tubuline du cervelet de Rat (45). Tel est encore le cas de la sérine dehydratase, enzyme hépatique soluble dont on peut induire la synthèse chez le Rat et qui est préférentiellement synthétisée par les polysomes liés (46). Il conviendrait, sans aucun doute, de préciser l'importance de différents facteurs méthodologiques pour faciliter l'interprétation de ces résultats. Mais il demeure que ces derniers pourraient traduire l'existence de mécanismes encore mal connus.

Les données acquises sur la biosynthèse des protéines membra--naires sont également très fragmentaires. L'étude du métabolisme des protéines constitutives des membranes du réticulum endoplasmique chez le

Rat supporte l'idée que la composition enzymatique de la membrane est dans un état de renouvellement constant, et que des protéines peuvent être fixées et détachées de la membrane préexistante (47, 48). Quelques travaux semblent indiquer d'autre part que les polysomes liés pourraient jouer un rôle important dans la formation des membranes du réticulum endoplasmique (49-51). On peut toutefois remarquer que les protéines membranaires peuvent. très schématiquement, être "classées" en trois groupes, selon leur loca--lisation par rapport aux couches lipidiques. On peut ainsi distinguer des protéines "intrinsèques", insérées de manière transverse ou à une profon--deur variable dans les membranes, des protéines situées à la face interne des vésicules, et des protéines de surface, exposées vers le cytoplasme. Il n'est pas inconcevable que les protéines périphériques puissent être synthétisées par les polysomes libres, et s'associer ensuite aux membranes. Un travail de LODISH et SMALL montre qu'un tel processus peut exister dans les réticulocytes (52). Et, comme l'indiquait BLOBEL en tentant d'élargir la signification biologique de l'hypothèse du "signal" (53), le mécanisme de décharge vectorielle des chaînes néosynthétisées au niveau du réticu--lum endoplasmique pourrait être, d'autre part, responsable de l'insertion de la plupart des protéines qualifiées d'"intrinsèques" ainsi que des protéines localisées sur la face interne des membranes.

Il n'est pas interdit de penser que la synthèse de certaines protéines membranaires pourrait, par voie de conséquence, introduire un degré d'hétérogénéité dans la nature des interactions des polysomes aux membranes. Cette idée demeure purement spéculative, mais alors même que semble se préciser notre connaissance des associations des polysomes aux membranes, aucune donnée expérimentale ne peut encore l'exclure.

Les liaisons des polysomes aux membranes

Dans le modèle d'association des polysomes aux membranes qui est présenté dans la figure 1_a pour les cellules secrétrices, et en par--ticulier pour l'hépatocyte de Rat, la structure polysomale interagit avec la membrane par l'intermédiaire des grandes sous-unités ribosomales, et des chaînes peptidiques naissantes en progression vers le <u>lumen</u>. Ces dernières renforcent la liaison du ribosome avec la membrane au fur et à mesure de leur croissance, en provoquant un ancrage de plus en plus résis--tant.







1 c

1a

1b



FIGURE 1 : Représentation des modèles ayant été proposés pour décrire différents types d'associations des polyso--mes aux membranes dans les cellules eucaryotes

Le modèle l_a représente un type d'association à fonction secrétrice. Le schéma l_b a été proposé par MECHLER et VASSALI (55) pour interpréter les résultats obtenus pour les cellules myelomateuses de Souris. Le schéma l_c présente l'ensemble des interactions ribosomes-membranes qui pourraient résulter de la bio--synthèse d'une protéine intrinsèque orientée transversalement (53). La figure l_d pourrait correspondre à l'association polysomes-membranes dans les cellules non secrétrices (59). Dans les modèles l_a et l_b , la chaine naissante est - comme en l_c - supposée s'introduire dans la membrane par l'intermédiaire d'une séquence signal, qui est hydrolysée avant que la lecture du mRNA ne soit terminée, mais ces étapes ne sont pas figurées sur le schéma. Les ribosomes dont la chaîne naissante ne possède pas une longueur suffisante peuvent ne pas interagir directement avec la membrane. Ils ne sont alors reliés à celle-ci que par l'intermédiaire du mRNA et des ribosomes déjà ancrés sur la membrane. Cette situation (Fig.1_b) a été décrite pour les cellules de myelome de Souris par MECHLER et VASSALI (54, 55) : les ribosomes détachables par l'action ménagée de la RNase portent des chaînes protéiques naissantes d'une longueur 2 à 3 fois in--férieure à celles des ribosomes restant liés. Le schéma 1_a dérive essen--tiellement des travaux réalisés par SABATINI et son équipe sur des pré--parations dans lesquelles l'intégrité du mRNA n'était pas respectée (56). Il tient compte également du fait que les sous-unités 60S peuvent se fixer <u>in vitro</u> sur des membranes dégranulées. Ces données sont insuffisantes pour exclure la possibilité que dans l'hépatocyte de Rat, 1 ou 2 ribosomes situés du côté 5' du mRNA soient, comme dans le cas des cellules de my--elome, liés de façon indirecte (voir ref.57, 58).

D'une manière identique, et comme nous l'avons mentionné plus haut, il n'est pas inconcevable que d'autres types d'interactions des polysomes aux membranes puissent résulter de la synthèse de protéines particulières. BLOBEL proposait notamment le schéma 1_c comme modèle de biosynthèse d'une protéine membranaire "intrinsèque" orientée transversa--lement. Alors que les ribosomes situés du côté 5' sont liés aux membranes comme dans les modèles précédents, les ribosomes terminant la lecture du mRNA ne sont plus reliés à la membrane que par l'intermédiaire de la chaîne peptidique et du RNA messager. Ceci implique évidemment l'existence d'un mécanisme de blocage de la chaîne peptidique et de rupture de l'association sous-unité 60S - membrane.

La figure 1_d a été proposée par TATA (59) pour expliquer cer--tains résultats obtenus pour des tissus non secréteurs. La structure polysomale n'est liée aux membranes que par l'intermédiaire des grandes sous-unités, et les chaînes naissantes sont supposées croître sur la mem--brane sans s'y associer fortement, avant d'être déchargées vers le cyto--plasme. L'existence d'un tel modèle demeure très difficile à prouver expérimentalement.

La possibilité d'une association de l'extrémité 3'OH du mRNA à la membrane a été envisagée, sans recevoir de confirmation expérimentale définitive. L'action de la verrucarine, un inhibiteur de l'induction de la biosynthèse protéique, sur des fibroblastes conduit à une dégranulation des

membranes, mais une quantité importante du RNA rapidement marqué demeure associée aux membranes (60). Cependant, dans la majorité des systèmes étudiés, une grande proportion du mRNA poly A⁺ est détachée des membranes dans les conditions ioniques permettant la dissociation de la structure polysomale (61, 62). Le RNA poly A⁺ restant semble associé aux membranes, mais ceci n'est souvent qu'une interprétation. L'étude effectuée par HARRISON sur des cellules de myelome, montre que le mRNA des immunoglobulines (carac--térisé par son produit) est détaché des membranes après traitement par le KCl et la puromycine (63). En toute hypothèse, le fait que les deux caté--gories de polysomes possèdent des RNA messagers poly A⁺ suggère que le seg--ment nucléase - résistant n'est pas seul responsable de l'association mRNA membrane, si elle existe.

Le rôle exact de la membrane dans les associations polysomesmembranes demeure assez obscur. L'existence, sur les membranes du réticulum endoplasmique, de sites récepteurs pour les ribosomes est depuis longtemps postulée, et des expériences de reconstitution in vitro ont montré que les membranes granulaires pouvaient fixer des ribosomes après détachement des ribosomes préexistants, et avec une meilleure efficacité que des membranes agranulaires traitées de manière identigue (22). Les tentatives les plus récentes de caractérisation de la (des) protéine (s) pouvant être impli--quée (s) dans le site récepteur émanent du groupe de SABATINI (64, 65). Deux protéines, appelées ribophorines I et II (P.M. 65 000 et 63 000) présentes dans le réticulum granulaire, mais absentes dans le réticulum lisse, peuvent être pontées au ribosome par la glutaraldéhyde ou le methyl 4-mercapto butyrimidate. D'autres travaux ont également envisagé la possibilité que plusieurs molécules de cytochrome P450 pourraient consti--tuer le site récepteur de certains ribosomes (66, 67), sans obtenir toute--fois de démonstration définitive.

Compartimentation cellulaire de la biosynthèse protéique

L'ensemble des questions relatives à la signification biologi--que du réticulum endoplasmique, peut être abordé sous l'angle de la com--partimentation cellulaire de la biosynthèse protéique. Ainsi, on peut considérer que le rôle du réticulum endoplasmique est de compartimenter les protéines destinées à être secrétées, en les concentrant à l'intérieur des vésicules intermembranaires. Ce concept peut être étendu aux protéines devant subir des modifications post-traductionnelles de toute nature

(protéolyse, glycosylation, formation de ponts disulfure, etc...). Ceci ne pourrait être qu'une question de mots, s'il ne s'agissait également de con--sidérer que la synthèse d'une protéine donnée, ou d'une classe de proté--ines donnée, n'est pas distribuée de façon uniforme dans la cellule. Les différents aspects du rôle du réticulum endoplasmique dans la compartimen--tation cellulaire ont été discutés en détail dans une revue générale de SHORE et TATA (68), reprenant en partie la suggestion antérieure que l'une des fonctions des associations polysomes-membranes serait de permettre une distribution topographique de différentes populations de polysomes synthé--tisant différentes classes de protéines (59). A l'heure actuelle, l'une des indications les plus tangibles de l'existence d'une telle compartimen--tation cellulaire est due à ces mêmes auteurs (69). La synthèse des pro--téines mitochondriales est répartie de facon différente dans deux frac--tions de réticulum endoplasmique isolées du foie de Rat. Nous présenterons dans ce mémoire d'autres données expérimentales concernant la biosynthèse de l' α -L'fucosidase pouvant conduire à la même conclusion (voir p.93)

CHAPITRE I

.

-

LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE GRANULAIRE DE L'HEPATOCYTE DE RAT : PROBLÈMES D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION



PLANCHE I : Observation en microscopie électronique du tissu hépatique (observation de J. F. DUBREMETZ)

A : Vue d'ensemble de l'hépatocyte ; B et C : empilements de réticulum en--doplasmique De l'ensemble des données exposées dans le chapitre précédent, il ressort que l'étude du réticulum endoplasmique en tant qu'organite multifonctionnel ne saurait être menée à bien en choisissant comme modèle un type cellulaire dont l'activité de biosynthèse protéique est essentiellement orientée vers la secrétion. De même, l'étude d'une cellule non secrétrice tendrait très probablement à montrer une autre image, également restreinte, du rôle du réticulum endoplasmique. Dès lors, une cellule à potentialités multiples semble être un matériel plus adapté. L'hépatocyte représente le cas typique d'une cellule dont l'activité métabolique intense assure les fonctions les plus diverses. Mais, en contre partie, l'étude d'une cellule complexe où la majorité des organites cellulaires sont représentés pose des problèmes méthodologiques accrus.

A- ISOLEMENT DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Dans le cas particulier de l'hépatocyte de Rat, l'isolement d'un échantillon représentatif de réticulum granulaire purifié se révèle être une difficulté apparemment insurmontable, lorsqu'il s'agit d'étudier l'appareil de biosynthèse protéique associé aux membranes. D'un point de vue purement théorique, une méthode de préparation idéale des polysomes libres et liés au réticulum endoplasmique devrait en effet répondre aux exigences suivantes :

> a) Isolement quantitatif des membranes du réticulum endoplas--mique sans changements notables de structure, ni d'acti--vité.

b) Obtention quantitative des ribosomes et polysomes libres et



FIGURE 2 : Facteurs influençant le rendement en réticulum granu--laire et son intégrité lors d'un fractionnement cel--lulaire.

Les flèches interrompues traduisent des relations dépendantes du temps.

Une préparation de réticulum endoplasmique destinée à l'étude de la fonction des associations polysomesmembranes peut être jugée selon quatre critères principaux : rendement en membranes granulaires, inté--grité du mRNA, des associations polysomes-membranes, taux de contamination réciproque entre les diffé--rentes catégories de polysomes. Les forces de cisaillement, provoquant la fragmentation du réticulum, favorisent son isolement, mais peuvent aussi, en rompant d'autres organites, libérer des activités nucléasiques nuisant à l'intégrité du mRNA, donc des acsociations polysomes-membranes. En présence des ions nécessaires à la préservation de la structure polysomale, les interactions existant entre les orga--nites - qui tendent à réduire le rendement en réticulum granulaire purifié - se trouvent favorisées. Les forces de centrifugation utilisées peuvent également, dans certains cas, produire une agrégation des organites et/ou nuire à l'intégrité des associations ribosomes-membranes, par elles-mêmes, ou par la pression hydrostatique (70) qu'elles engendrent. liés, sans dégradation du mRNA, sans contaminations croisées. c) Ni rupture, ni perturbation de la (des) liaison (s) des polysomes aux membranes.

Ces différents critères sont loin d'être satisfaits simultanément à l'heure actuelle, et la figure 2 tente d'en expliquer, de manière schématique, les raisons principales.

Dès 1950-55, les travaux concernant le fractionnement cellu--laire de l'hépatocyte de Rat par centrifugation différentielle rejetaient la possibilité d'introduire des ions dans le milieu d'homogénéisation, car ceux-ci, "agglutinant" les organites, rendaient vaine, ou défavorisaient beaucoup, toute tentative de séparation (voir ref.71). Ceci explique (en partie**) pourquoi des solutions de saccharose exemptes d'ions, ou très légèrement tamponnées, sont utilisées dans la plupart des travaux néces--sitant un fractionnement cellulaire. L'addition d'agents chélateurs est d'ailleurs très fréquemment pratiquée lorsqu'il s'agit de préparer des fractions mitochondriales.

L'hétérogénéité en taille des fragments de réticulum endoplas--mique présents dans l'homogénat constitue également un obstacle à leur obtention quantitative par centrifugation différentielle. Ainsi, dans le fractionnement classique de DE DUVE (1955) (72), encore utilisé à l'heure actuelle (voir AMAR-COSTESEC <u>et al</u>, ref.73), la quantité de réticulum endoplasmique isolé dépend beaucoup de l'intensité des forces de cisail--lement appliquées au matériel cellulaire, car celles-ci doivent provoquer une fragmentation suffisante du réticulum endoplasmique pour qu'il soit séparable des autres organites (noyaux, mitochondries, lysosomes, peroxy--somes). D'un point de vue enzymatique, la pureté des membranes isolées dépendra également (hormis les conditions exactes de centrifugation) de l'intensité des homogénéisations répétées, car il faut se garder autant que possible de provoquer la rupture d'autres organites ; et, si l'on con--sidère que les procédés d'homogénéisation manquent de bases théoriques, la subjectivité de ce genre de manipulation apparaît évidente.

** La présence d'ions est également souvent considérée comme gênante lors de la détermination des activités d'enzymes "marqueurs".

TABLEAU 1

Comparaison des rendements en réticulum endoplasmique obtenus en absence d'ions par ADELMAN <u>et al</u> (75) (A) et AMAR-COSTESEC <u>et al</u> (73) (B)

Dans la méthode d'ADELMAN <u>et al</u>, (A) le SPM est fractionné par centrifugation sur gradient discontinu de saccharose pour obtenir les fractions de membranes lisses, granulaires, et de polysomes libres. Nous avons additionné les valeurs correspondant aux membranes granulaires à celles obtenues pour les membranes agra--nulaires (celles-ci représentent 5% du RNA total) pour que la comparaison des rendements des deux métho--des soit plus aisée. Il demeure cependant que la fraction "microsomale" obtenue par centrifugation dif--férentielle par AMAR-COSIESEC <u>et al</u> (B) contient une partie des polysomes libres, le reste étant retrouvé dans le surnageant. Dans le cas de la référence 75 (A), les données sont calculées en % de la somme des valeurs trouvées dans les différentes fractions, tandis qu'en B, les pourcentages sont exprimés par rap--port à la somme des 2 premières fractions (Noyaux et surnageant post-nucléaire). La cytochrome oxydase est un enzyme "marqueur" de la membrane interne des mitochondries.

	A	V alence and the second s	В	
FRACTION	RNA (%)	Cytochrome oxydase (%)	RNA (%)	Cytochrome oxydase (%)
Noyaux	7,7	4,0	19,0 <u>+</u> 4,8	20,2+5,8
Mitochondries	20,4	85,4	4,4+2,1	66,1+6,1
Membranes granulaires et agranulaires	33,9	0,3		
Ribosomes libres	17,8	0,05		
Microsomes			54,9+8,3	4,2+2
Surnageant	19,8	0,81	23,6+9,8	

Dans un fractionnement de ce type, les critères d'intégrité du mRNA, donc des associations polysomes-membranes (peut être même de certaines associations ribosomes-membranes), et d'activité biologique (c'est à dire capacité pour les ribosomes à traduire un polynucléotide naturel ou synthé--tique <u>in vitro</u>) sont peu satisfaits. La nécessité d'introduire des cations mono et divalents dans le milieu d'homogénéisation pour préserver la struc--ture et l'activité biologique des polysomes est une contrainte supplémen--taire qui vient restreindre encore la possibilité d'isoler une proportion satisfaisante de réticulum endoplasmique. Ainsi, dès 1967, **BLOBEL** et POTTER avaient montré qu'en présence des ions nécessaires à la préservation de la structure des polysomes, la quantité maximale de réticulum endoplas--mique granulaire que l'on peut fragmenter par homogénéisation (sans se soucier de l'intégrité des autres organites) et isoler dans un surnageant post-mitochondrial, n'excède pas 50% (74).

Attribuant initialement l'impossibilité d'obtenir de façon quantitative le réticulum endoplasmique à la présence des ions, d'une part, et à une cosédimentation de l'ergastoplasme avec les noyaux d'autre part, ADELMAN et al ont étudié d'autres possibilités d'isoler le réticulum granu--laire, choisissant de sacrifier l'activité biologique au profit du rende--ment (75). Le schéma de fractionnement proposé consiste à préparer, en absence d'ions et en saccharose 1,6M, un surnageant post-nucléaire qui est ensuite dilué pour permettre la sédimentation des mitochondries. La quanti--té de RNA lié aux membranes du surnageant post-mitochondrial demeure cependant voisine de celle isolée par la méthode classique des centrifuga--tions différentielles successives (voir Tableau 1). Ces auteurs expliquent cet échec partiel par l'existence d'interactions très fortes entre le réti--culum endoplasmique et les mitochondries. Une contamination des membranes par des peroxysomes, et l'éclatement d'une proportion notable de lysosomes (consécutif au choc hypotonique) constituent deux défauts majeurs de cette méthode. Les ribosomes isolés possèdent en outre une faible activité bio--logique in vitro, et l'intégrité du mRNA n'est pas respectée. Toutefois, le principal intérêt de cette méthode est qu'elle permet de fractionner une quantité assez importante de tissu. L'essentiel des connaissances acquises sur la nature des associations ribosomes-membranes dans l'hépatocyte de Rat dérive d'ailleurs des travaux effectués sur des préparations de ce type.

L'ensemble de ces considérations explique pourquoi la majorité des travaux se rapportant à la fonction des interactions polysomes-



PLANCHE II : Différents aspects de la proximité topographique du réticulum endoplasmique et des mitochondries observés dans l'hépatocyte intact (observation de J. F. DUBREMETZ)



membranes ont concerné la fraction mineure de réticulum endoplasmique (5 à 25% du RNA cellulaire, soit en moyenne 1/5 du réticulum granulaire) obtenue dans un surnageant post-mitochondrial préparé en présence d'ions. La possibilité qu'une telle fraction ne constitue pas un échantillon sta--tistiquement représentatif du réticulum de la cellule (c'est à dire ne résulte pas uniquement d'une fragmentation "au hasard" du réticulum) a été quelquefois évoquée dans la littérature, mais assez rarement prise en con--sidération jusqu'à ces dernières années lors de l'interprétation de résultats concernant la synthèse préférentielle par un type de polysomes d'une protéine donnée. Cette incertitude, mais aussi des considérations purement pratiques (faibles quantités de réticulum isolées) sont à l'ori--gine des méthodes dans lesquelles l'homogénat est délibérément centrifugé à haute vitesse, conduisant à la sédimentation de la presque totalité du réticulum endoplasmique avec les organites de taille importante, tandis que le surnageant constitue la source de polysomes libres (24, 34, 76, 77). Sans évoquer ici le problème des taux réels de contamination réciproque des deux fractions polysomales isolées, ni celui de l'intégrité des mRNAs des deux fractions, on peut remarquer que le traitement par des détergents de fractions de réticulum endoplasmique contaminées par d'autres organites, en permettant l'isolement des polysomes liés, constitue un moyen de résou--dre en partie les difficultés rencontrées pour fractionner l'hépatocyte. car une étude plus rigoureuse des spécificités de synthèse par différents types de polysomes de classes de protéines données devient alors possible.

En 1973, LEWIS et TATA montrent que le réticulum sédimentant à basse vitesse est constitué principalement d'empilements de membranes granulaires, résistants à l'homogénéisation, se distinguant ainsi du réti--culum endoplasmique vésiculisé que l'on peut obtenir dans le surnageant post-mitochondrial (78). Ces observations sont complétées en 1978 par SHORE et TATA qui montrent que des conditions très drastiques (incompati--bles avec la préservation de la structure du réticulum endoplasmique) doivent être employées pour rompre les associations réticulum-mitochondries (79). Ces auteurs ont proposé un schéma de fractionnement permettant d'iso--ler les polysomes libres et liés, dont nous avons eu connaissance alors que nous terminions la mise au point de quelques unes des techniques que nous décrirons dans le chapitre III. Nous avons conçu le fractionnement cellulaire d'une manière un peu différente, aussi entreprendrons-nous, chaque fois qu'il sera possible, une comparaison des résultats obtenus.



FIGURE 3 : Diagramme des étapes caractérisant quatre procédés ayant été utilisés par différents auteurs pour isoler les polysomes libres et liés



Abréviations : LP : lipides ; N, C, M : sédiment de noyaux, débris cellulaires et mitochondries ; Mic : microsomes ; Mb : membranes granulaires et agranulaires ; Mb.li : membranes lisses ; Mb.gr : mem--branes granulaires ; Cyt : cytosol ; i : fraction d'inhibiteur de RNase ; P : polysomes et ribosomes ; d : détergent ; sac : saccharose.
B- SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES DU SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL

lº- Centrifugation sur gradient discontinu de saccharose

Si l'isolement d'un échantillon représentatif de réticulum endoplasmique granulaire purifié demeure problématique, la séparation des polysomes libres et des membranes d'un surnageant post-mitochondrial est la source d'autres difficultés techniques qui, à notre sens, n'ont été résolues que très partiellement.

Depuis 1964, cette séparation a été effectuée, le plus souvent, sur des gradients discontinus de saccharose. Cependant, la pureté et l'in--tégrité des fractions obtenues peuvent varier, dans une large mesure, en fonction des conditions exactes utilisées. Il est sans doute approprié d'illustrer ce fait en comparant différentes variantes méthodologiques, avant d'entreprendre une étude critique succinte.

a- Comparaison de quatre procédés de purification des polysomes

Les étapes successives, caractérisant quatre procédés différents ayant été utilisés durant les quinze dernières années, sont schématisées dans la figure 3. La figure 4 montre les résultats de l'analyse en gradient linéaire de saccharose des fractions obtenues, lorsque ces quatre méthodes sont appliquées à un surnageant post-mitochondrial unique.

Selon la méthode A, l'ultracentrifugation du surnageant postmitochondrial conduit à la fraction microsomale. Celle-ci, resuspendue dans le tampon d'homogénéisation, est déposée sur du saccharose 2M, et donne, après une nouvelle centrifugation, une interphase de membranes lisses et granulaires, et un sédiment de polysomes libres. L'interphase, prélevée et traitée par un détergent, est déposée à nouveau sur du saccharose 2M, et centrifugée pour obtenir un sédiment de polysomes liés. Ce protocole expé--rimental a été utilisé par de nombreux auteurs dont REDMAN et SABATINI notamment (80).

Dans le procédé B, les membranes lisses sont séparées du réti--culum endoplasmique granulaire, au cours d'une centrifugation du surnageant post-mitochondrial sur un coussin de saccharose 1,3M. Le culot de réticulum



FIGURE 4 : Ultracentrifuga--tion en gradient linéaire de saccharose des fractions ribosomales obtenues selon les quatre procédés schéma--tisés dans la figure 3

Toutes les solutions contiennent T50K25M5d1. 28g de broyat sont homogénéisés dans 140ml de 0,255 par 8 allers-retour de piston (1 000t/mn) dans un homogénéiseur de POTTER-ELVEHJEM. Une centrifugation de 10mn à 9 000gay conduit au surnageant post-mitochondrial (SPM). 2x7ml sont centrifugés 1h à 105 000g_{max} en rotor 40 (Å) puis 4x7ml sont déposés sur 4ml de 1,3S et sont centrifugés 2h30mn à 105 000g_{max} dans le même rotor (B). 15ml de SPM sont déposés sur 8ml de 1,38S et 6ml de 2S (Č) tandis qu'une autre fraction aliquote de même volume est déposée sur un gradient identique, à ceci près que les coussins de saccha--rose contiennent lµl/ml d'une fraction d'inhibiteur de RNase * (D). Les deux tubes sont centrifugés 20h à 113 000qay dans le rotor 60 Ti.Les culots de microsomes (A) sont resuspendus dans 15,5ml de tampon. Les culots de membranes granulaires et de polysomes libres (B) sont resuspendus dans 15,5ml du "cytosol" prélevé dans les 4 tubes ; 2x7,5ml de chaque suspension sont déposés sur 3,5ml de 2S et centrifugés 5h à 105 000g_{max} dans le rotor 40. Les interphases de membranes granulaires obtenues pour A et B sont pré--levées dans un volume de 6ml. En A, on ajoute 9ml de tampon et 1,5ml de DOC à 11 p100. En B, on ajoute 7,5ml du cytosol (prélevé à la moitié supérieure des 2 tubes), 1,5ml de tampon et 1,5ml de DOC à 11 pl00. Dans les deux cas, des fractions de 8ml sont déposées sur 3ml de 25 et centrifugées 5h à 105 000gmax dans le rotor 40. Les interphases de réticulum granulaire obtenues pour C et D sont prélevées dans un volume de 8ml. En C, on ajoute 7ml de cytosol, 9,75ml de tampon et 2,75ml de DOC à 11 p100. En D, on ajoute 60 µl de la fraction d'inhibiteur de RNase *, 16,75ml de tampon et 2,75ml de DOC à 11 p100. Dans les deux cas, 27ml sont déposés sur 6ml de 25 mais en D, le 25 contient l µl/ml d'inhibiteur de RNase *. Les tubes sont centrifugés 5h à 105 000g_{max} dans le rotor 60 Ti. Les culots de polysomes resus--pendus dans le tampon sont analysés en gradient linéaire 10-50 pl00 de saccharose.



granulaire et de polysomes libres est resuspendu dans la fraction "cytosol" (prélevée au 1/3 supérieur du tube) et déposé sur du saccharose 2M. La suite du protocole est en tous points identique à celle de A, à ceci près qu'une nouvelle introduction de cytosol est pratiquée lors du traitement des membranes par le détergent. Cette méthode a été employée par TATA (81).

Dans la méthode C, les gradients discontinus sont cette fois composés de saccharose 2M et 1,38M, et les membranes granulaires sont pré--levées, après centrifugation, à l'interphase inférieure. La solubilisation des membranes par un détergent a lieu en présence de cytosol, comme en B. Ce procédé, qui a été très fréquemment utilisé, est une forme modifiée de celui décrit par BLOBEL et POTTER (74), qui comportait, à l'origine, l'introduction de saccharose 0,5M (au lieu de 1,38M) dans les gradients discontinus. Il est également possible d'ajouter aux coussins de saccharose une fraction partiellement purifiée de l'inhibiteur de RNase du cytosol. Cette variante est utilisée en D.

L'analyse en gradient linéaire de saccharose (Fig.4) montre que le procédé A ne permet pas de préserver l'intégrité du mRNA. Le pro--cédé B tient compte de la présence d'une activité RNasique associée aux membranes du réticulum endoplasmique ; aussi l'addition de cytosol vientelle restreindre la dégradation du mRNA (82,83, 84). On peut attribuer à la sédimentation des membranes, suivie de leur resuspension, la dégrada--tion des polysomes en B qui n'est pas observée en C. Le procédé C, toutefois, conduit à l'obtention de polysomes moins lourds qu'en D, où la répartition dans le gradient des polysomes liés se rapproche de celle des polysomes libres. On peut estimer que le maximum du profil d'absorbance correspond à des polysomes ayant 6-8 ribosomes par mRNA.

On conçoit aisément que l'étude de préparations dans lesquelles l'intégrité du mRNA était plus ou moins respectée, ait pu être à l'origine de certaines controverses du type de celle née de travaux ayant comparé l'activité de biosynthèse protéique <u>in vitro</u> des deux catégories de poly--somes (28-34). Il est aussi très probable que d'autres résultats contra--dictoires soient – au moins en partie – le reflet de taux variables de contamination réciproque des deux classes de polysomes. Nous analyserons, dans le paragraphe suivant, les facteurs pouvant influencer la pureté ou la sédimentation quantitative des fractions polysomales.



Fractions

ti e

FIGURE 5 : Influence de la composition du gradient discontinu de saccharose sur le rendement en polysomes libres

> A- Centrifugation du SPM sur 2S et 0,5S B- Centrifugation du SPM sur 2S et 1,3S

(Mo= monomère)

• |

15ml de SPM contenant 0,2ml d'une suspension de polysomes libres (1 U A260 ; 6x10⁵cpm³H) sont déposés sur un gradient discontinu de saccharose composé de 6ml de 25 et 8ml de 0,55 (A) eu 6ml de 25 et 8ml de 1,35 (B). Après une centrifugation de 20h à 113 000gav, les sédiments de polysomes libres obtenus sont resuspendus dens 0,5ml de 750K25M5 et 0,4ml de cheque suspension sont déposés sur gradient liné--aire de saccharose (10-50 p100) (SW40 Ti, 40mn, 35 000t/mn). Des fractions de 0,3ml sont collectées ; leur absorbance à 260nm et leur radio-activité sont mesurées.

b- Sédimentation non quantitative des polysomes libres

 α - Rétention des polysomes libres par les membranes.

Dans la méthode originale de BLOBEL et POTTER (74), le surna--geant post-mitochondrial était deposé sur un gradient discontinu composé de saccharose 0,5M et 2M. La faible molarité en saccharose de la couche médiane défavorise la séparation, car dans ces conditions, l'ensemble des membranes peut rapidement former une barrière gênant la sédimentation des polysomes libres. Les résultats de la figure 5 mettent en évidence ce phé--nomène de rétention et montrent également que l'augmentation de la con--centration en saccharose de la couche médiane facilite la sédimentation des polysomes libres. Il ne semble pas que ceci soit uniquement la raison pour laquelle, dans de nombreux travaux, la concentration en saccharose de la couche intermédiaire est supérieure à 1M. En effet, l'introduction de saccharose 1,3M-1,5M permet d'obtenir deux bandes membranaires distinctes, et de purifier les membranes dont la densité est la plus élevée. Cependant, de longues centrifugations étant nécessaires pour avoir une sédimentation optimale des polysomes libres (voir paragraphe suivant), une agrégation des membranes est fréquemment observée. L'ampleur de la contamination ré--sultant d'une rétention de polysomes libres dans ces agrégats peut être variable, et augmente en fonction de la quantité de surnageant postmitochondrial fractionnée ou de la concentration en membranes de ce dernier (85).

β - Sédimentation non quantitative des polysomes libres de petite taille.

La figure 6 montre le résultat d'une centrifugation sur gradient discontinu d'un surnageant post-mitochondrial (RNA ³H) dans lequel un témoin interne de polysomes libres purifiés (RNA ¹⁴C) a été introduit. On peut constater que même après une très longue centrifugation (20h, 157 000g_{av}) il n'est pas possible d'observer de séparation nette entre les polysomes libres et les membranes.

La fraction de polysomes libres ne pouvant traverser complète--ment la couche de saccharose 2M a été, dans certaines études, récupérée et analysée indépendamment des polysomes sédimentés. Mais comme le même phéno--mène existe lorsque la fraction de réticulum granulaire est traitée par un détergent et centrifugée sur gradient discontinu de saccharose (pour obtenir



FIGURE 6 : Analyse de la séparation des polysomes libres et des membranes en gradient discontinu de saccharose

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

BUS

Toutes les solutions contiennent T50K25M5d1. Un sédiment de polysomes libres dont le RNA a été marqué par l'acide orotique 14C (1 rat ; 0,2mCi ; 3 jours) est obtenu après centrifugation d'un SPM selon le procédé D décrit dans la figure 3 (p.18). Un SPM est préparé à partir du foie d'un rat ayant reçu une injection de 0,5mCi d'acide orotique ³H, 16h avant le sacrifice. 3ml de SPM ³H sont additionnés de 0,3ml de la suspension de polysomes libres (1 U A260 ; 10⁶cpm). 3ml du mélange sont déposés sur un gradient discontinu composé de lml de 2,2S, 3ml de 2S, 1ml de 1,5S, 2ml de 1,38S, 2ml de 1,15S. Après une centrifugation de 20h à 35 000t/mn en rotor SW40 Ti, des fractions de 0,2ml sont collectées et la radioactivité acido-insoluble est déterminée. Les polysomes qui étaient liés aux membranes), deux fractions de polysomes liés ont du être également considérées (REID <u>et al</u>) (86, 87). De l'ensemble des travaux ayant adopté cette stratégie, il semble difficile de dégager une signification fonctionnelle à ces différentes fractions. On peut d'ail--leurs noter que dans l'expérience de la figure 6, la fraction de polysomes libres ¹⁴C qui a sédimenté à travers le saccharose 2M lors de sa prépara--tion, n'est plus séparée des membranes lors de sa recentrifugation ; et lorsqu'on sait que dans les conditions utilisées ici, une dégradation des polysomes se produit pendant la centrifugation (voir Chapitre III), il semble difficile d'envisager autrement que de façon purement opérationnelle une distinction entre polysomes "légers" et "lourds". Cependant le fait qu'une plus grande activité RNasique ait été trouvée en association avec la fraction de polysomes libres "légers" mérite d'être mentionné (88).

Pour pallier à la sédimentation non quantitative des polysomes libres de petite taille, il est possible de réduire la taille du coussin de saccharose 2M (75) ; ceci favorise cependant l'agrégation des membranes contre les parois du tube. Une autre possibilité consiste à substituer au saccharose 2M du saccharose 1,8M (Fig.7). Mais les sédiments de polysomes peuvent alors être contaminés par des membranes ou par des protéines non ribosomales (89), surtout si la centrifugation est très longue.

c- Contamination des polysomes libres par les polysomes liés

Lorsque les gradients discontinus comportent du saccharose 2M, ce type de contamination ne peut avoir pour origine qu'un détachement de polysomes initialement liés aux membranes. Il existe peu de données expé--rimentales démontrant sans équivoque qu'un tel phénomène existe dans le cas d'une longue centrifugation des membranes d'hépatocyte de Rat. Cepen--dant, 0'TOOLE, préparant une fraction membranaire dans des conditions douces, montre que 20% des ribosomes peuvent être détachés de cette frac--tion sous l'effet des forces de centrifugation (90). SARMA a présenté des résultats analogues pour le foie de Souris (87).

La pression hydrostatique intense, à laquelle sont soumises les membranes pendant la centrifugation, peut endommager leur structure. Ainsi, BRONFMAN et BEAUFAY ont montré que certaines protéines peuvent être détachées des membranes sous l'effet de la pression (70). On peut égale--ment supposer que de la même manière, un détachement de ribosomes puisse se produire. D'un point de vue purement mécanique, on peut aussi remarquer





FIGURE 7 : Sédimentation non quantitative des polysomes libres "légers" à travers le saccharose 2M

Un SPM (0,255, T₅₀K₂₅M₅d₁) est centrifugé pendant 15mn à 26 500t/mn dans le rotor SW27. La moitié supé--rieure du surnageant est prélevée, additionnée de Triton X100 (concentration finale 1 p100) et déposée par fractions de 5ml sur des gradients discontinus composés de 3ml de 1,385 et 3ml de 25 (A) ou 1,85 (E). Après une centrifugation de 20h à 45 000t/mn dans le rotor 50Ti, les sédiments sont resuspendus et ana--lysés en gradient isocinétique de saccharose [#].

BUS Ulle que lors d'une centrifugation sur gradient discontinu, les membranes granu--laires s'immobilisent à un endroit où la densité du milieu est intermé--diaire entre celle du ribosome et celle des membranes. Les interactions ribosomes-membranes doivent résister à deux forces de directions opposées : les ribosomes tendent à sédimenter, alors que les membranes tendent à flot--ter.

Certains ribosomes pourraient également être détachés des mem--branes sous l'action de nucléases endogènes. La présence de ribosomes liés de façon indirecte à la membrane (par l'intermédiaire du mRNA) a été mon--trée dans les cellules de myelome (55), mais l'existence de ce type d'in--teraction dans l'hépatocyte de Rat a été d'abord infirmée (91), puis mise en évidence en faible proportion (57, 58). En réalité, les problèmes métho--dologiques que nous avons évoqués dans ce chapitre, gênent considérablement ce genre d'investigation, et aucune conclusion définitive ne peut encore être tirée.

2°- Autres méthodes de séparation des polysomes libres et liés

La séparation des polysomes libres et des membranes granulaires peut être effectuée autrement que par longue centrifugation sur gradient discontinu de saccharose. Les travaux ayant utilisé ces techniques – ou une combinaison de celles-ci – ont été énumérés dans la revue générale de Mc INTOSH et 0'TOOLE (92). Nous nous limiterons à discuter ici des avan--tages et des inconvénients que peuvent présenter l'application de ces techniques dans le cas de l'hépatocyte de Rat.

a- Centrifugation différentielle

Il est possible de tirer parti des différences de coefficient de sédimentation entre les membranes et les polysomes libres pour les séparer par centrifugation différentielle. Plusieurs études, qui ont été évoquées plus haut (24, 34, 76, 77), ont choisi de préparer, en une seule étape, deux fractions respectivement enrichies en chacune des deux classes de polysomes par centrifugation de l'homogénat total. Cependant, comme les coefficients de sédimentation des deux types de particules (membranes et polysomes libres) se recouvrent, et que d'autre part la sédimentation de polysomes Libres par "entraînement" semble inévitable, l'emploi d'une telle stratégie suppose qu'un certain taux de contamination réciproque puisse être toléré. Elle interdit toute étude ultérieure de liaisons polysomesmembranes et en outre, du point de vue de l'intégrité des fractions polyso--males obtenues, il apparaît (voir Chapitre III) que la sédimentation des membranes par centrifugation à haute vitesse, constitue un obstacle à la préservation du RNA messager des polysomes liés.

b- Centrifugation de zone

La centrifugation de vélocité en gradient continu de saccharose, exploitant également les différences de vitesses de migration entre les particules, ne peut offrir, dans le cas particulier de l'hépatocyte de Rat, que des applications analytiques. De plus, celles-ci doivent être restrein--tes aux études dans lesquelles les polysomes libres de la fraction sont de petite taille (voir ref.69 par exemple).

c- Flottaison des membranes

Le principe de cette technique consiste à faire migrer dans des directions opposées les polysomes libres et les membranes, en utilisant un milieu dont la densité est intermédiaire entre celles des deux types de particules. Elle a été rarement employée dans le cas de l'hépatocyte de Rat (mais voir ref.37). La nécessité d'ajuster la fraction subcellulaire à une densité élevée limite considérablement la quantité de matériel fractionnée, compte tenu de la capacité des rotors. Certaines expériences réalisées au laboratoire ont montré qu'il est très difficile d'obtenir une flottaison quantitative des membranes granulaires en saccharose, mais que la métriza--mide permet d'atteindre ce but (voir Chapitre II).

CHAPITRE II

SEPARATION DES POLYSOMES LIBRES ET LIES EN METRIZAMIDE

La métrizamide, N - (2 - 4 - 6 - triiodo - 3 - N - methyl acetylamino - benzoyl) - glucosamine, est un nouveau milieu utilisé depuis 1973 pour la centrifugation de particules biologiques à cause de son iner--tie chimique et de ses propriétés physiques originales. Les applications possibles de ce milieu sont rassemblées et décrites dans l'ouvrage corres--pondant à la référence (93). Peu de travaux ont étudié le comportement des particules ribosomales dans ce milieu. Les sous-unités ribosomales natives ainsi que celles dérivées des polysomes par l'action de l'EDTA ont toutes, selon HINTON et al (94), une densité de 1,28g/cm³, mais occa--sionnellement un composant mineur de densité 1,35g/cm³ est observé. Selon les mêmes auteurs, les particules RNP de type messager ayant des coeffi--cients de sédimentation de 20 à 505 se répartissent en deux pics de den--sité 1,13g/cm³ et 1,28g/cm³ (95). Enfin une particule RNP cytoplasmique contenant le mRNA de la myosine a pu être isolée par BUCKINGHAM et GROS à partir de myoblastes en culture (96). Nous avons cherché à résoudre par l'utilisation de la métrizamide certaines des difficultés techniques ren--contrées dans l'étude de la fonction des interactions polysomes-membranes. Nous avons pu préciser un certain nombre de conditions expérimentales dans lesquelles la métrizamide se révèle être un outil analytique très utile complétant avantageusement les milieux de centrifugation préexistants. Les expériences mettant en évidence ces possibilités nouvelles sont décrites dans ce chapitre.

A- CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE DES DIFFÉRENTES RNP POLYSOMALES

Nous avons analysé le comportement à l'équilibre des polysomes et monosomes ainsi que celui des sous-unités ribosomales et des mRNP obte-



FIGURE 8 : Centrifugation isopycnique des polysomes libres en métrizamide

Des polysomes libres dont le rRNA est marqué * par l'acide orotique 14C(-o-) (2 U A₂₆₀) sont mélangés avec une fraction analogue dont le mRNA est marqué * par l'acide orotique 3H(-o-) (4 U A₂₆₀) dans un volume final de 0,3ml. 0,2ml sont déposés sur un gradient linéaire 20-60 pl00 de métrizamide (Te₅₀K₂₅M₅₀l) et centrifugés 7h à 35 000t/mn en rotor SW50-1 à 2°C. Des fractions de 0,1ml sont collec--tées, dont la radio-activité acido-insoluble est déterminée. Quand la suspension polysomale contient du glycogène (rats nourris normalement), la distribution de celui-ci suit exactement celle des polyso--mes. -nues après dissociation des polysomes.

1º - Polysomes et monosomes

Les polysomes libres d'hépatocyte de Rat préparés selon la technique décrite précédemment (voir Fig.3, D, p.18), ont une densité appa--rente de 1,295 à 1,30g/cm³ lorsqu'ils sont centrifugés en gradient préfor--mé 20-60 p100 de métrizamide. La figure 8 montre que si l'on mélange des polysomes dont le rRNA est marqué (¹⁴C) avec d'autres polysomes dont le mRNA est marqué (³H), les profils de radio-activité se superposent. Ce résultat, ainsi que le taux de récupération de la radio-activité déposée (>95%) suggère que le milieu iodé est relativement exempt d'activités RNasiques et confirme des données préalablement publiées, ayant montré que la métrizamide ne modifie pas la structure polysomale (94). Il faut égale--ment noter que lorsque le glycogène est présent dans la suspension polyso--male (rats normalement nourris) sa distribution suit exactement celle des polysomes. Cependant, le polysaccharide atteint beaucoup plus rapidement sa position à l'équilibre (moins d'une heure à 150 000g_{av}). Ainsi, une suspen--sion polysomale peut être purifiée par une courte centrifugation sur un coussin de métrizamide à 40 p100 (voir Tableau II). Cette méthode pourrait se révéler intéressante, en particulier dans le cas de certaines études structurales.

Des monosomes, obtenus par action ménagée de la RNase pancréa--tique sur les polysomes libres, ont été également analysés en gradient 20-60 p100 de métrizamide. Ils ont une densité identique à celle des poly--somes (d= 1,295g/cm³).

2°- Sous-unités et mRNP

Nous avons effectué la sédimentation à l'équilibre des sousunités ribosomales et des mRNP obtenues après dissociation des polysomes par l'EDTA. 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 égale--ment 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 poly--somes. Dans ces expériences, une concentration de 20mM en EDTA est utilisée

TABLEAU 2

Elimination du glycogène contaminant une fraction polysomale par une courte centrifugation sur un coussin de métrizamide à 40 pl00

Une fraction de polysomes libres dont le rRNA est marqué par l'acide orotique 3 H, est préparée comme il est décrit dans la figure 3 (D). 3ml de suspension polysomale (20 U A₂₆₀/ml ; Ie₅₀K₂₅M_{5d1}) sont déposés sur lml de métrizamide à 40 pl00 dans le même tampon. Après une centrifugation de 30mn à 21 000t/mn (40 000g_{av}) dans le rotor SW50-1, le coussin de métrizamide (lml) et la suspension polysomale (3ml) sont collectés séparément, et les sucres sont dosés après élimination de la métrizamide *. Les valeurs extrê-mes d'une série de 5 centrifugations indépendantes de la même suspension polysomale sont présentées. Les taux de récupération sont de 98±5% et 96±2% pour le glycogène et la radio-activité, respectivement. Il faut noter cependant, que la présence d'une trop grande quantité de saccharose dans la suspension polysomale initiale, peut gêner, voire rendre impossible, toute séparation.

FRACTION	SUC	RES	RNA		
	mg	(⁰ ′)	СРМ	(%)	
Coussin de métrizamide	3,40-3,82	86,4-88,2	6290-6442	25,5-27,0	
Suspension polysomale	0,51-0,54	12,0-13,2	17600-18500	73,0-74,6	

pour le traitement d'une suspension polysomale contenant 20 U A₂₆₀/ml. Une concentration en Mg⁺⁺ de 2mM est également maintenue pendant la purifica--tion et l'analyse des sous-unités afin d'éviter une déprotéinisation trop poussée et de maintenir les particules dans une conformation compacte.

Comme le montre la figure 9, la petite sous-unité EDTA a une densité de 1,20g/cm³ tandis que la grande sous-unité possède une densité supérieure (d= 1,23g/cm³). Les densités mesurées en CsCl pour les mêmes particules sont respectivement de 1,54g/cm³ et 1,59g/cm³.

L'analyse des sous-unités obtenues par dissociation des poly--somes en présence de KCl et de puromycine, donne des résultats similaires (petite sous-unité : d= 1,21g/cm³ ; grande sous-unité : d= 1,23g/cm³). Lorsque des polysomes dissociés sont analysés directement en gradient 20-60 p100 de métrizamide, on observe cependant une séparation incomplète des deux sous-unités quel que soit le mode de dissociation employé (Fig.10). Nous avons pu constater que la résolution peut être améliorée si l'on utili--se un gradient discontinu (composé de métrizamide à 37 et 41 p100) ou un gradient linéaire 10-30 p100 réalisé en D₂0. Cependant la conclusion de ces expériences est que le saccharose demeure le milieu de choix pour la sépa--ration des sous-unités ribosomales. On peut toutefois noter que lorsque du glycogène contamine les particules ribosomales, il peut être séparé effica--cement des sous-unités.

Les expériences réalisées en double marquage, dont les résul--tats sont présentés dans la figure 10, montrent également qu'indépendam--ment de la méthode utilisée pour obtenir la dissociation des polysomes, les complexes mRNA-protéines se distribuent de manière hétérogène dans les gradients de métrizamide (densité de 1,12 à 1,23g/cm³). Comme l'indiquent les figures 10 et 11, les mRNP polysomales recouvrent les sous-unités en métrizamide comme en saccharose. Nous avons pu vérifier que l'analyse des particules après fixation par la formaldéhyde donnait des résultats simi--laires, excluant ainsi la possibilité qu'une réassociation artefactuelle des sous-unités et des mRNP se soit produite dans le gradient de métriza--mide. Il s'avère donc que la centrifugation en gradient de métrizamide ne peut résoudre le problème de l'isolement quantitatif de mRNP polysoma--les exemptes de sous-unités.



FIGURE 9 : Centrifugation isopycnique des sous-unités ribosomales préparées en présence d'EDTA

BUS

Une fraction de polysomes libres dont le rRNA est marqué par l'acide crotique ³H est préparée comme il est décrit dans la figure 3 (D). Les polysomes sont resuspendus dans le tampon Te₅₀K₂₅ pour obtenir une concentration de 25 U A₂₆₀/ml. On ajoute ensuite 0,25 volume de Te₅₀K₂₅M₁₀E₁₀₀, et des fractions ali--quotes de lml sont déposées sur des gradients linéaires 10-30 pl00 (p/v) de saccharose (Te₅₀K₂₅M₂E₂₀). Après la centrifugation (18 000t/mn, 16h, rotor SW25-1, 4°C), les fractions correspondant à chacune des sous-unités sont rassemblées, et des parties aliquotes de 0,2ml sont déposées sur des gradients préfor--més (20-60 pl00, volume : 3,8ml) de métrizamide et centrifugées 12h à 33 000t/mn dans le rotor SW50-1. A titre de contrôle, la densité de chacune des 2 sous-unités est également mesurée en gradient préfor--mé de CsCl après fixation par la glutaraldéhyde * (voir texte).



FIGURE 10 : Centrifugation isopycnique des polysomes libres dis--sociés par l'EDTA (A) ou le KCl et la puromycine (B)

2 U A₂₆₀ de polysomes dont le rRNA est marqué * (acide orotique ¹4C) (-o-) sont mélangés à 4 U A₂₆₀ de polysomes dont le mRNA est marqué préférentiellement * (acide orotique ³H) (-o-), avant d'être disso--ciés en sous-unités et mRNP par l'EDTA ou le KCl et la puromycine *.



FIGURE 11 : Analyse en gradient liné--aire de saccharose de polysomes dissociés par l'action de l'EDTA

Une fraction de polysomes libres dont le mRNA est marqué par l'acide orotique ³H en présence d'actinomycine D (0,55mg/Kg) *, est analysée en gradient linéaire de sac--charose (10-30) pl00) après dissociation par l'EDTA (7,5 U A260). Après 3h20mn de centrifugation à 39 060t/mn dans le rotor SW40 Ti à 4°C, des fractions de 0,2ml sont collectées.

B- ANALYSE DU SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL

Nous avons analysé en gradient 20-60 p100 de métrizamide des surnageants post-mitochondriaux marqués différemment et la répartition de la radio-activité a permis de déterminer la position des différents compo--sants dans le gradient (voir Fig.12).

La présence de RNA ribosomal et de RNA messager peut être observée dans le pic de densité 1,30g/cm³ correspondant aux polysomes libres (Fig.12A) ainsi que dans le milieu du gradient où les membranes, formant une zone opaque, sont visibles à l'oeil nu. Celles-ci peuvent être également identifiées grâce à un marquage des phospholipides (Fig.12C)._Le marquage des protéines pendant une très courte durée (Fig.12B) permet éga--lement de confirmer la localisation des polysomes libres. Le troisième pic, près de la surface du gradient, coïncide avec une bande colorée de protéines solubles. La présence, dans cette région, de radio-activité 14Ccholine peut être attribuée à des lipoprotéines solubles et/ou aux membra--nes lisses, mais nous n'avons pas cherché à déterminer exactement la posi--tion respective des membranes granulaires et agranulaires. Cependant. d'après les analyses dont les résultats sont présentés dans les figures 12 et 13, il est possible de conclure que pratiquement toutes les membranes granulaires sont présentes dans le pic central, c'est à dire réparties dans la zone de densité 1,16-1,24g/cm³. En effet, la bande la plus légère ne contient presque exclusivement que des RNAs de bas poids moléculaires. La figure 14 montre d'ailleurs qu'après solubilisation des membranes par un détergent, un pic de polysomes peut être obtenu, qui s'immobilise dans le gradient de métrizamide à la densité attendue (1,30g/cm³).

C- APPLICATIONS DE LA CENTRIFUGATION EN METRIZAMIDE

Les données présentées ci-dessus, permettent d'envisager pour la centrifugation en métrizamide, quelques applications dans l'étude de la fonction des associations polysomes-membranes. Nous avons montré qu'une très bonne séparation des polysomes libres et des membranes peut être obte--nue. Il s'ensuit que l'analyse du contenu en polysomes libres et liés d'une fraction subcellulaire, voire la purification de fractions de réticu--lum endoplasmique, deviennent possibles ; ces deux points seront commentés dans les paragraphes suivants.



FIGURE 12 : Analyse du surnageant post-mitochondrial en gradient de métrizamide

(A) Analyse du mélange (1V/2V) d'un SPM (rRNA 14C) et d'un SPM (mRNA ³H) *. (B) SPM dont le rRNA est marqué par l'acide orotique 14C et les chaînes protéiques naissantes par la leucine ³H. (C) rRNA ³H et marquage court des phospholipides membranaires par la choline 14C. (-o-) Radio-activité du rRNA ; (-o-) autres marquages. Des fractions aliquotes de 0,2ml sont déposées sur gradients linéaires 20-60 p100 de métrizamide. Centrifugation de 7-12h à 34 000t/mn dans le rotor SW50-1 à 4°C. La forme exacte des pics varie légerement d'une expérience à l'autre (comparer les profils obtenus pour le rRNA) mais la séparation en 3 fractions principales est reproductible. Il faut également noter que dans les conditions ci-dessus, polysomes libres et membranes ont atteint leur position d'équilibre mais pas les protéines solubles. Celles-ci ont des densités variant de 1,25g/cm³ è 1,50g/cm³ en métrizamide.

37



FIGURE 13 : Analyse du RNA extrait de fractions obtenues après centrifugation du surnageant post-mitochondrial en métrizamide

Polysomes libres (A), phase soluble (B)

2 SPM, marqués respectivement par l'acide orotique 14C (rRNA) (-o-) et l'acide orotique 3H (mRNA) (-o-) sont mélangés (1V/2V) avant d'être centrifugés en métrizamide comme dans la figure 12 (A). Les fractions 13-28, contenant les membranes, sont traitées par un détergent (voir Fig.14). Les fractions 2-12, correspondant aux polysomes libres, sont rassemblées ainsi que celles correspondant à la phase soluble (31-40). Le RNA est extrait et analysé sur des gradients linéaires 5-20 pl0C de saccharose *.



FIGURE 14 : Centrifugation isopycnique des membranes du surnageant post-mitochondrial après so--lubilisation par un déter--gent

Une fraction membranaire, obtenue par centrifugation en gra--dient linéaire de métrizamide du mélange de 2 SPM marqués différemment (voir Fig.13) est ajustée à une concentration finale de 1 pl00 en Triton X100. Une partie aliquote de 0,2ml. est analysée en gradient 20-60 pl00 de métrizamide. (-o-)rRNA ¹⁴C, (-e-) mRNA ³H, (-e-) densité des fractions.

38

1° - Application du gradient linéaire de métrizamide à la mesure des contaminations croisées entre les fractions polysomales

Les difficultés rencontrées lors de la séparation des polysomes libres et des membranes en saccharose, ainsi que les incertitudes qu'elles peuvent entraîner dans l'interprétation de certains résultats expérimentaux, ont été évoquées dans le chapitre précédent, et l'on peut remarquer que rares sont les travaux ayant essayé de préciser l'importance des contamina--tions réciproques de fractions polysomales isolées. Si la préparation de polysomes libres, après un marquage court des phospholipides membranaires <u>in vivo</u>, peut être un moyen de vérifier l'absence de membranes dans cette fraction, la présence de polysomes libres dans les membranes ne peut être détectée de manière aussi directe. L'utilisation d'une seconde méthode de séparation est nécessaire.

La centrifugation isopycnique en gradient linéaire de métri--zamide nous apparaît être actuellement le meilleur moyen d'estimation des taux de contaminations réciproques de fractions polysomales isolées, et surtout de la contamination des membranes par les polysomes libres. Nous avons utilisé cette technique lors des expériences décrites dans le cha--pitre III ; toutefois si l'on considère que la recentrifugation d'une fraction membranaire purifiée peut éventuellement provoquer la rupture de certaines associations polysomes-membranes, il demeure possible que le taux de contamination effectivement mesuré soit surestimé.

2°- Purification des membranes par flottaison

Nous avons pu vérifier que la purification des membranes d'un surnageant post-mitochondrial par flottaison en métrizamide était possible, en fractionnant le mélange d'un surnageant post-mitochondrial dont les phospholipides ont été marqués par la choline ¹⁴C et de polysomes libres ³H. Pour des raisons de clarté, nous présentons ici ces expériences bien qu'elles n'aient pu être effectuées qu'après la mise au point des techni--ques d'isolement quantitatif des polysomes libres que nous décrirons dans le chapitre suivant.

Une fraction de polysomes libres brute est préparée comme il est décrit dans Matériel et Méthodes à partir de rats ayant reçu une



Volume en ml

FIGURE 15 : Séparation des polysomes libres et des membranes du réticulum endoplasmique par flottaison en métriza--mide

La flèche indique la direction de la centrifugation

Une fraction de polysomes libres brute est préparée * à partir de 2 rats de 100g ayant reçu 0,5mCi d'acide orotique ³H par voie intrapéritonéale 3 jours avant le sacrifice. Une partie aliquote correspondant à lg de tissu est ajustée en 1,85 T50K70M5d1 (RNA de levure 2mg/ml) par addition d'une solution 2,55. 2 fractions de 22ml sont déposées sur lm1 de 2,25 T50K70M5d1 et recouvertes de 12ml de 1,65 et 2ml de 0,255 T50K70M5d1. Les tubes sont centrifugés dans le rotor SW27 pendant 3h à 27 000t/mn. Le dépôt est prélevé et dilué au 1/2 par du tampon et du cytosol pour obtenir une concentration de 2mg/ml de proté--ines du cytosol. Les particules RNP sont sédimentées dans le rotor 60 Ti pendant 4h à 60 000t/mn puis resuspendues dans le tampon T $_{50}K_{70}M_5d_1$. La suspension obtenue est utilisée comme marqueur interne de polysomes libres dans la suite de l'expérience.

Un SPL est préparé à partir d'un rat de 100g ayant reçu une injection de choline ¹⁴C 4h avant le sacri--fice (0,1mCi/Kg) puis ajusté en T₅₀K₇₀M₅d₁. A 2ml de SPL, en ajoute 0,2mJ de la suspension de polysomes libres ³H purifiés (6 U A₂₆₀/ml ; 9 000cpm/U A₂₆₀). 1,5ml du mélange sont additionnés de 2,5ml de métri--zamide à 60 pl00 dans le tampon T₅₀K₇₀M₅d₁ et introduits dans un tube de SW40 Ti. Le dépôt est recou--vert de 6ml de métrizamide à 48 pl00, 1,5ml de 1,3S et 0,5ml de tampon. Après une centrifugation de 45mn à 35 000t/mn à 2°C, le dépôt est collecté (fraction unique) puis le reste du gradient est fraction--né (0,2ml). Les radio-activités ³H et ¹⁴C sont déterminées dans chaque fraction après filtration de l'acido-insoluble et solubilisation des filtres dans le Soluène 350 ^{**}. La fraction de polysomes libres (les 5ml du fond du tube) contient 95% de la radio-activité ³H retrouvée. La fraction de membranes ren--ferme 94% de la radio-activité ¹⁴C retrouvée.

injection d'acide orotique ³H, trois jours avant le sacrifice. Une telle fraction contient l'ensemble des RNP cytoplasmiques non associées au réti--culum endoplasmique et quelques fragments de membranes lisses (essentiel--lement dérivées de l'appareil de Golgi ; voir Chapitre III). Ces dernières sont éliminées lors d'une centrifugation de flottaison en saccharose et la fraction de particules RNP obtenue est ensuite diluée pour être séparée de la phase soluble par centrifugation différentielle. Les particules RNP purifiées sont additionnées au surnageant post-lysosomal (choline ¹⁴C) et le mélange est ajusté à une concentration finale de 50 p100 en métriza--mide. La densité du milieu étant intermédiaire entre celles des membranes et des polysomes libres, les deux types de particules migreront, lors de la centrifugation, dans des directions opposées. Les membranes flottent à travers une couche de métrizamide à 48 p100 et forment ainsi une inter--phase nettement séparée des polysomes libres. La figure 15 nous montre les résultats d'une telle expérience. Après une heure de centrifugation la radio-activité choline ¹⁴C est retrouvée presque quantitativement dans l'interphase de membranes et la contamination de celles-ci par les polyso--mes libres est négligeable.

Les caractéristiques de cette méthode (rapidité, pureté des fractions) l'indiquent tout particulièrement pour l'étude des interactions des polysomes aux membranes.

D- CONCLUSION

Pour des raisons pratiques (coût du produit, absorbance UV), la centrifugation en métrizamide ne peut trouver que des applications analytiques ou semi-préparatives. L'utilisation de matériel biologique radio-actif est obligatoire, à moins que les traitements ultérieurs (extraction du RNA, par exemple) ne permettent d'éliminer efficacement le milieu iodé.

Polysomes libres et membranes granulaires peuvent être net--tement séparés par centrifugation isopycnique en métrizamide, et cette technique est utilisable pour mesurer les contaminations réciproques de fractions polysomales. Il est également possible de purifier très rapi--dement par flottaison une fraction de réticulum endoplasmique ; ceci lève l'un des principaux obstacles rencontrés dans l'étude des associations des polysomes aux membranes.

CHAPITRE III

PREPARATION DES DIFFERENTES CLASSES DE POLYSOMES DE L'HEPATOCYTE DE RAT

Si l'on prend en compte la somme des difficultés méthodologi--ques que nous avons évoquées précédemment, les possibilités d'étude de la fonction des associations polysomes-membranes dans l'hépatocyte de rat ap--paraissent excessivement restreintes. On peut concevoir que certaines des caractéristiques majeures du réticulum endoplasmique aient pu transparaître de travaux effectués sur un petit échantillon de membranes dont l'intégrité était peu préservée. Mais il semble improbable que des progrès sensibles soient effectués, et que l'on puisse entrevoir la diversité structurale et fonctionnelle du réticulum endoplasmique sans que ces difficultés techni--ques soient résolues au moins partiellement.

L'existence d'associations très fortes entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries constituant le principal obstacle à l'obtention d'une proportion substantielle de membranes granulaires purifiées, on pourrait considérer que la recherche de moyens de dissociation de ces interactions doive faire l'objet d'efforts particuliers. Mais, dans l'hypothèse où les interactions constatées <u>in vitro</u> traduisent une situation existant <u>in vivo</u>, l'isolement d'une fraction de réticulum endoplasmique en association avec les mitochondries, indépendamment de celle que l'on peut obtenir dans un surnageant post-mitochondrial, permet d'accéder à certains aspects de la compartimentation cellulaire, si l'intégrité du mRNA et des associations polysomes-membranes est respectée. Des conditions de dissociation non destructive des interactions réticulum-mitochondries pourraient être recherchées ultérieurement s'il s'avérait que l'étude des liaisons polysomes-membranes nécessite réellement l'élimination des mito--chondries.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre, montre qu'en adoptant cette stratégie, il est possible d'isoler de manière quasiquantitative et avec un haut degré d'intégrité, les fractions polysomales

43

 $\beta \eta \varsigma$





5g de foie broyé sont homogénéisés dans 15ml de 0,25S $T_{5G}K_{25}H_{5}$ (A) ou de 0,25S $T_{20}K_{25}H_{3}$ (B) ou de 0,25S $T_{5K_{15}H_{1}}$ (C). Les homogéneis sont centrifugés pendant 10m & 17 506 g_{max} . Les surnagents pest-mitochendriaux obtenus sont maintenus pendant 6h à 0°C et leur composition ionique est uniformisés ($T_{50}K_{25}H_{5}$). On ajoute ensuite 0,11 volume de Triton X-100 à 20 pl60 et des parlies aliquotes de 5ml sont déposées sur des gradients discontinus composés de 3ml de 25 $T_{50}K_{25}H_{5}$ et 3ml de 1,385 $T_{50}K_{25}H_{5}$. Les tubes sont centri--fugés pendent 20h à 45 000t/mn dans le rotor 50 fi. Les sédiments sont resuspendus en $T_{50}K_{25}H_{5}$ et analysés en gradient isocinétique de saccharese. Les différences d'absorbaice ensurebles entre les 3 profils ne traduisent pas des rendements différents dans les sédiments de polysones mais une non-reproductibilité de l'efficacité de resuspension. Ce problème n'existe plue lorsque les gradients discontinus de purification des polysomes contiennent du cytosol. de différents compartiments cellulaires.

A- FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Nous décrirons tout d'abord les différentes améliorations ap--portées au fractionnement de l'hépatocyte de Rat. Celles-ci sont principa--lement basées sur l'observation qu'en présence des ions nécessaires à la préservation de la structure et de l'activité des polysomes, les lysosomes conservent en centrifugation différentielle le même comportement qu'en absence d'ions. En conséquence, nous avons pu minimiser la contamination des fractions de réticulum endoplasmique par les lysosomes, facilitant ainsi l'isolement ultérieur des polysomes.

1º - Conditions d'homogénéisation

a- Choix du milieu

La composition du milieu d'homogénéisation le plus fréquemment utilisé est 0,255 T₅₀K₂₅M₅. De façon à limiter au maximum l'agrégation possible des organites en présence d'ions, nous avons recherché dans quelle mesure la force ionique du milieu et en particulier sa concentra--tion en Mg⁺⁺ pouvaient être réduites, sans qu'il en résulte d'apparentes modifications du profil polysomal.

Dans l'expérience de la figure 16, on effectue à partir d'un broyat unique de tissu, trois homogénéisations dans des conditions ioni--ques différentes. Les surnageants post-mitochondriaux correspondant sont maintenus 6 heures à 0°C puis traités par un détergent en présence de $T_{50}K_{25}M_5$. Les polysomes sont isolés et analysés ensuite en gradient iso--cinétique de saccharose. Les résultats montrent que le profil d'absor--bance obtenu pour l'homogénat 0,25S $T_{20}K_{25}M_3$ ne diffère pas de façon si--gnificative de celui des polysomes préparés en $T_{50}K_{25}M_5$. Nous avons donc adopté le milieu 0,25S $T_{20}K_{25}M_3$ lors des expériences ultérieures.

b- Homogénéisation du tissu hépatique

On conçoit facilement que la manière d'effectuer l'homogéné--isation soit d'une importance primordiale, puisqu'elle conditionne l'in--tégrité des organites donc la pureté des fractions, ainsi que la repro-



FIGURE 17 : Intégrité de différents organites pendant l'homogéné--isation dans un appareil de DOUNCE

Quantités de catalase (-A-), phosphatase acide (-o-) présentes dans la fraction cytosol, quantités de RNA (-o-) et de DNA (-a-) présentes dans la fraction nucléaire. Les valeurs sont exprimées en % du contenu de l'homogénat. 8g de foie broyé sont d'abord dissociés par 2 coups de piston lâche dans 24ml de 0,255 T20K25M3. Un échantillon de 3ml est prélevé ; les valeurs obtenues pour celui-ci sont prises comme origine. L'homogénéisation est poursuivie avec un piston serré, et des fractions aliquotes sont préle--vées après le nombre de coups de piston indiqué en abscisse. Iml de chaque échantillon est dilué avec 4 volumes du milieu d'homogénéisation et centrifugé successivement pendant 15mn à 18 000t/mn, puis 2h à 45 000t/mn (rotor SW50-1) pour obtenir la fraction cytosol. Les noyaux sont préparés selon la méthode de BLOBEL et POITER (74). 1,1ml d'homogénat sont mélangés à 2,2ml de 2,3S T₅₀K25M5 et 2,5ml de mélange sont déposés sur 1ml de 2,3S T₅₀K25M5 et centrifugés 1h à 37 000t/mn dans le rotor SW50-1.



-ductibilité de l'ensemble du fractionnement cellulaire.

De nombreux auteurs homogénéisent le tissu préalablement décou--pé en morceaux de taille variable, dans un appareil de POTTER-ELVEHJEM ; le nombre d'allers-retour de piston et la vitesse de rotation de celui-ci étant standardisés. D'autres obtiennent un éclatement cellulaire quantita--tif en alternant des homogénéisations successives avec des centrifugations à basse vitesse (71-73). La standardisation de ces opérations n'est que relative car les résultats obtenus peuvent dépendre de la taille des frag--ments de tissu homogénéisés et des forces appliquées pour déplacer le piston dans l'homogénéiseur. Nous avons d'ailleurs pu constater qu'il est difficile d'obtenir, dans l'homogénéiseur de POTTER-ELVEHJEM, un éclate--ment cellulaire quantitatif sans que moins de 20% de l'activité phospha--tasique acide totale soit retrouvée dans la phase soluble.

Nous avons préféré utiliser une presse de tissu - qui permet de broyer l'organe de façon reproductible et d'éliminer la majeure partie du tissu conjonctif - et un homogénéiseur de DOUNCE. Bien que l'utilisa--tion du piston serré permette d'obtenir plus rapidement une rupture quantitative des cellules, l'expérience montre que les risques d'éclate--ment des lysosomes peuvent être limités dans ce type d'appareil, parti--culièrement lorsqu'on emploie le piston lâche. Apparemment plus subjec--tif, le procédé d'homogénéisation "manuelle" donne en réalité de meil--leurs résultats, surtout si la rupture des cellules est contrôlée par microscopie en contraste de phase. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les auteurs précédemment cités ont récemment abandonné l'homogéné--iseur de POTTER-ELVEHJEM pour l'appareil de DOUNCE (voir ref.97).

Les données de la figure 17 ont pour objet de préciser les conditions d'homogénéisation qui ont été utilisées dans les travaux que nous décrirons ensuite. Dans cette expérience des échantillons sont pré--levés à différents temps de l'homogénéisation pour que l'évolution des taux de catalase et de phosphatase acide dans la phase soluble, de RNA et de DNA dans la fraction nucléaire puisse être suivie. Les courbes montrent qu'un éclatement cellulaire quantitatif peut être obtenu sans trop endommager les lysosomes. L'augmentation progressive de la quantité de catalase mesurée dans la phase soluble, reflète la présence d'une iso--enzyme cytoplasmique (98), mais aussi une plus grande susceptibilité des peroxysomes aux forces de cisaillement. L'intégrité de ceux-ci, comme on pourra le voir plus loin, est cependant bien préservée (voir Tableau 4

TABLEAU 3

Effet des ions sur le comportement des organites en centrifugation différentielle

4g de foie sont homogénéisés dans 3 volumes de 0,25S Te ou de 0,25S Te₂₀K₂₅M₃. Des fractions aliquotes de 8ml sont fractionnées par centrifugation différentielle dans les conditions indiquées. Les sédiments sont lavés et les surnageants sont rassemblés. Dans chaque cas, les quantités de RNA, de monoamine oxydase, de phosphatase acide sont déterminées et exprimées en % de la somme des valeurs obtenues pour les deux fractions. Dans cette expérience, aucune influence des ions sur l'activité des enzymes mar--queurs n'a pu être constatée.

Milieu	Fraction	RNA %	Monoamine oxydase %	Phosphatase acide %
0,255 Te ₂₀ K ₂₅ M ₃	Sédiment (5900gxmn)	33,8	69,6	20,0
	Surnageant	66,2	30,4	80,0
	Taux de récupération	89,3	92,1	94,8
0,255 Te ₅	Sédiment (5900gxmn)	12,7	23,4	19,0
	Surnageant	84,3	76,6	81,0
	Taux de récupération	94,3	95,0	97,8
0,255 Te ₂₀ K ₂₅ M ₃	Sédiment (53000gxmn)	45,7	92,0	45,6
	Surnageant	54,3	7,1	54,4
	Taux de récupération	98,0	93,0	96,3
0,255 Te ₅	Sédiment (53000gxmn)	35,9	80,3	48,9
	Surnageant	64,1	19,7	51,1
	Taux de récupération	98,0	90,6	99,0

p.51). D'une manière générale, une série de contrôles a montré qu'à la fin de l'homogénéisation, le cytosol contient 7 à 10% de la phosphatase acide de l'homogénat et 12 à 15% de la catalase. 94 à 96% du DNA peuvent être retrouvés dans une fraction nucléaire, purifiée en une seule étape par la méthode de BLOBEL et POTTER (74).

2°- Influence des ions sur le comportement des orga--nites en centrifugation différentielle

Si l'on compare les résultats publiés par AMAR-COSTESEC <u>et al</u> (73) à ceux de LEWIS et TATA (78), on constate qu'en absence d'ions, envi--ron 20% du RNA cellulaire sédimente à très basse vitesse, tandis qu'en présence d'ions cette quantité atteint dans les mêmes conditions une valeur de 40 à 50%, qui est difficilement réduite par une réhomogénéisation du sédiment. Ces différences pourraient être interprétées comme étant la con--séquence d'un effet "agglutinant" des ions sur les organites. Les expé--riences que nous décrirons dans ce paragraphe sont peu compatibles avec cette idée.

Des homogénats, préparés en absence ou en présence d'ions, sont soumis à des centrifugations différentielles. Chaque sédiment est lavé deux fois suivant le principe adopté dans la méthode classique (71-73), mais en essayant d'éviter autant que possible la fragmentation du réticulum endo--plasmique pendant ces manipulations.

La distribution du RNA et de deux enzymes marqueurs (monoamine oxydase et phosphatase acide pour les mitochondries et les lysosomes, res--pectivement) est déterminée dans les fractions obtenues. Comme le montre le tableau 3, en présence d'ions, la majeure partie des mitochondries (environ 70%) et plus de 30% du RNA sédimentent avec les noyaux (5 900gxmh). Dans les mêmes conditions de centrifugation, plus de 75% des mitochondries sont présentes dans le surnageant lorsque le milieu ne contient pas d'ions. On peut remarquer toutefois, que le comportement des lysosomes demeure inchangé. De plus, on peut noter que dans cette expérience, où la fragmen--tation du réticulum endoplasmique n'a pas été recherchée, environ 36% du RNA sédimente en absence d'ions lors d'une centrifugation de 53 000gxmn. Il apparaît donc improbable, que les modifications du comportement de sédi--mentation du réticulum endoplasmique et des mitochondries résultent d'une "agglutination" artefactuelle de ces organites par les ions. Il semble plus



FIGURE 18 : Représentation schématique du fractionnement cel--lulaire

Lorsque la préparation du SPM est omise, on obtient la fraction C_{II} (voir Tableau 4).

vraisemblable que la présence de cations puisse préserver, voire renforcer, des interactions existant <u>in vivo</u> entre les organites. En particulier, ces résultats peuvent s'expliquer si l'on suppose que la structure en "empile--ments" du réticulum granulaire est moins conservée en absence d'ions, et que les membranes sont alors plus facilement fragmentées par homogénéisa--tion.

3°- Fractionnement par la méthode des gradients discontinus

Dans une série d'expériences préliminaires, nous avons frac--tionné l'homogénat - préparé en 0,255 T₂₀K₂₅M₃ - par centrifugation dit--férentielle, en choisissant des valeurs de 5 900gxmn et 225 000gxmn pour obtenir respectivement un surnageant post-nucléaire, puis un surnageant post-lysosomal. Cependant, différentes analyses réalisées sur les fractions montraient que le sédiment obtenu à basse vitesse pouvait parfois contenir des polysomes libres ; d'autre part, la cosédimentation d'une proportion notable de membranes granulaires avec les lysosomes ne pouvait être évitée. Nous avons donc essayé de résoudre ces difficultés en modifiant le procédé de fractionnement.

a- Principe

La figure 18 résume les étapes successives du fractionnement que nous avons finalement adopté, et dont on trouvera une description dé--taillée dans le chapitre Matériel et Méthodes.

La méthode consiste à centrifuger l'homogénat à basse vitesse pour obtenir un surnageant post-nucléaire ; une fraction importante des mitochondries et du réticulum endoplasmique cosédimente alors avec les noyaux (fraction NC_I). La recentrifugation du surnageant post-nucléaire à une vitesse plus élevée conduit à la sédimentation d'une seconde fraction de mitochondries et de réticulum endoplasmique (fraction C_{II}). L'étape suivante a pour objet d'éliminer les lysosomes du surnageant post-mitochon--drial. Le réticulum endoplasmique et les mitochondries de la fraction NC_I sont séparés des noyaux par une centrifugation en saccharose concentré, et constituent la fraction C_I. Nous avons regroupé, pour l'analyse, les deux fractions C_I et C_{II} en une seule fraction, nommée de façon opération--nelle "complexe réticulum endoplasmique-mitochondries" ou fraction C.

0 77 e t 4 : Distribution du RNA, d \circ la phosphatase acide, de la cytochrome oxydase l'uricase dans les fractions subcellulaires TABLEAU

-rontes fractions, et correspondent à des moyennes et à leur écant-type. La détermination de la quantité de cytochrome oxydase présente L'homogénat est fractionné par la méthode des gradients discontinus (voir Matériel et Méthodes et Fig.15) en omettant la préparation de la fraction C_{II}, ainsi que l'élimination des noyaux. Les données sont exprimées en % de la somme des valeurs trouvées dans les diffédans le 5PL a été effectuée sur le sédiment ôbtenu après 2h de centrifugation à 105 000g_{av} pour pormettre une estimation plus précise. On pout également noter que lorsque l'homogénet est fractionné par centrifugation différentielle classique, on peut obtenir des frac-tions équivalentes du point de vue de leur contenu en phosphatase acide et en cytochreme oxydase, mais 22 à 25% du RNA sont alors trouvés dans la fraction correspondant à C_{II}L.

	Nombre				Taux de
·	d'exp.	N	F RACI LUNS	IdS	récupération
	11	35,4 <u>+</u> 2,6	LIL 18,6 ± 3,5	46,0 ± 3,1	95,8 ± 8,3
ept	σ	18,5 ± 3,3	65,7 ÷ 5,8	15,8 ± 4,0	103,5 ± 5,7
	Γ	74,4 ± 6,2	25,0 ± 6,2	0,6 <u>+</u> 0,ì	105,1 ± 5,1
	б	30,6 ± 1,9	59,6 ± 1,7	9,7 ± 0,3	97,3 + 4,0

L'utilisation de gradients discontinus permet un lavage plus efficace des sédiments et réduit également la quantité de membranes granu--laires sédimentant, avec la majeure partie des lysosomes, entre 33 400gxmn et 225 000gxmn.

> b- Répartition de différents constituants dans les fractions subcellulaires

Les tableaux 4 et 5 présentent la distribution de différents constituants dans les fractions obtenues lorsque le schéma de la figure 18 est suivi de manière partielle ou totale.

Le tableau 4 correspond à une série d'expériences dans lesquel--les le surnageant post-nucléaire est directement centrifugé à 22 $500g_{max}$ pendant 10mn. Le RNA est principalement trouvé dans le premier sédiment avec la majorité des mitochondries, ainsi que dans le surnageant final. La fraction intermédiaire est riche en lysosomes et en peroxysomes, et contient le reste des mitochondries. Cette distribution peut être obtenue avec une reproductibilité satisfaisante, et les principales variations enregistrées concernent la répartition des mitochondries entre les deux sédiments. Cependant, la quantité de RNA retrouvée dans la fraction inter--médiaire demeure élevée (18%), ce qui justifie l'isolement de la fraction C_{II}.

Le tableau 5 présente les données analytiques obtenues pour les fractions subcellulaires lorsque les opérations décrites dans la figure 18 sont effectuées dans leur ensemble. La fraction C contient près de 60% de l'activité glucose-6-phosphatasique de l'homogénat, ainsi que 40% du RNA. La fraction riche en lysosomes renferme 55% de la phosphatase acide mais seulement 6% du RNA cellulaire. Le surnageant post-lysosomal corres--pond à 45% du RNA cellulaire mais seulement 25% de la glucose-6-phospha--tase. Ainsi, le réticulum endoplasmique est isolé principalement avec les mitochondries.

c- Répartition des ribosomes dans les fractions subcellulaires

D'autres analyses montrent que la quasi-totalité du RNA nonsédimentable est présente dans le surnageant post-lysosomal. Celui-ci con--tient en moyenne 13% du RNA cellulaire sous forme soluble alors que la fraction C en renferme moins de 1% (voir Tableau 6).
	de 6g de foi	ie				
L'activi cytochro nombre d ct lac préparée 1'intégr	té des enzymes marqueurs me c réduit /mn pour la c 'expériences réalisées es por contrifugation direc tet contrifugation direc ité du mRNA ne peut être oir texte).	est exprimée en µ moles sytochrome oxydase. La di et 8 pour Le RNA, 5 pour troter qu'une fraction N te da 1'homogénat à 1700 préservée, probablement	de phosphate inorganique l' stribution en % des différ les protéines et la phosph Les protéinet à la scame gmax pendant 20mm et deux : è cause du tessement trop :	béré /mn pour les phos ints constituants est i tass acide, 4 pour le tass acide, 4 pour le cos fractions N et C ob sevages du sédiment. Da isportant des particule	phatases, et en µ moles ndiquée entre parenthès DNA, la glucose 6 phospi tenues ci-cessous, peut ns ces conditions cepen os sédimentant le plus re	de s. Le citase étre ant, pide-
Fraction	RNA mg (%)	DNA mg (%)	Protéines mg (%)	Phosphatase acide U (%)	Glucose 6- phosphatase U (%)	Cytachrome axydase U (%)
Homogénat	50,1 ± 2,1	10,91 ± 0,40	1236,2 ± 66,5	48,0 ± 0,8	$81,7 \pm 1,1$	138,4 ± 11,8
Fraction N	$3,6 \pm 0,5$ (7,4 \pm 1,1)	$10,02 \div 1,48 \\ (93,1 \div 1,3)$	$59,0 \pm 16,8$ (4,6 $\pm 0,4$)	$0,2 \pm 0,1$ (0,4 \pm 0,1)	$1, 8 \pm 0, 3 \\ (2, 3 \pm 0, 4)$	$0,7 \pm 0,4$ $(0,4 \pm 0,2)$
Fraction C	$9,7 \pm 1,7$ (40,3 $\pm 2,1$)	$0,70 \pm 0.19$ (6,4 $\pm 1,1$)	$506,3 \pm 26,3$ $(38,9 \pm 1,1)$	$13,2 \pm 2,1$ (28,3 $\pm 3,3$)	46,9 ± 2,5 (58,6 ± 2,6)	121,7 ± 14,1 (84,2 ± 2,5)
Fraction L	$3,0 \pm 0,4$ (6,2 \pm 0,8)	a,06 ± 0,03 (0,5 ± 0,2)	$93,8 \pm 13,4$ $(7,3 \pm 1,0)$	$25,9 \pm 1,4$ (55,5 $\pm 4,0$)	$9,9 \pm 0,6$ (12,3 $\pm 0,7$)	21,9 ± 5,6 (15,1 ± 2,4)
SPL	$22,8 \pm 1,2$ (46,9 $\pm 2,6$)		$634, 3 \pm 20, 7$ (49, 2 \pm 1, 5)	$7,5 \pm 1,0$ (16,1 \pm 2,0)	$21,4 \pm 2,1$ (26,8 $\pm 2,6$)	$0,5 \pm 0,3$ $(0,3 \pm 0,1)$
Taux de récu- -pération en %	97,3 ± 4,1	98,6 ± 12,2	104,3 + 4,7	97,8 ± 4,6	98,1 ± 0,7	104,4 + 4,9

53

5 : Données analytiques obtenues pour les fractions subcellulaires isolées à partir

TABLEAU

La centrifugation en gradient linéaire de métrizamide permet également de juger des proportions respectives de polysomes libres et liés dans les différentes fractions (voir Tableau 6 et Fig. 19). Dans l'homogénat, les polysomes libres représentent 18 à 19% du RNA total, qui sont presque exclusivement retrouvés dans le surnageant post-lysosomal. On peut calculer à partir des résultats obtenus dans les tableaux 5 et 6 qu'environ 15% du RNA est associé aux membranes dans le surnageant post-lysosomal.

d- Observation au microscope électronique

L'observation de la fraction C montre qu'elle est principale--ment composée de fragments de réticulum endoplasmique hétérogènes en taille et de mitochondries (Planche III). Des membranes bilamellées portant de nombreux ribosomes apparaissent souvent sous forme d'empilements. Ces carac--téristiques morphologiques rèjoignent tout à fait celles décrites par LEWIS et TATA (78). On peut également trouver certains fragments de réticu--lum granulaire longeant ou entourant la membrane mitochondriale externe. Comme en témoignent les photographies des planches I et II, ces structures ressemblent beaucoup à celles existant dans l'hépatocyte intact(p. 10 et 16).

De petites vésicules de réticulum rugueux ou lisse sont égale--ment observées dans la fraction C. Lorsque les fractions C_I et C_{II} sont examinées séparément, une grande similitude apparaît entre les deux frac--tions. Nous n'avons pas entrepris d'analyse morphométrique détaillée, mais comme le montre la planche IV, la fraction C_{II} contient une assez grande proportion de mitochondries dont la membrane externe semble étroitement associée à un fragment unique de réticulum endoplasmique. On peut encore trouver des empilements d'ergastoplasme mais leur nombre et leur taille sont plus réduits et les compartiments intra-vésiculaires sont fréquemment dilatés.

Le réticulum endoplasmique et les mitochondries prédominent également dans la fraction L, mais la morphologie des dérivés de l'ergas--toplasme est assez différente (Planche V, a, b). Des vésicules rugueuses ou lisses, de taille variable, ayant rarement une association apparente avec les mitochondries, peuvent être observées aussi bien à la partie supérieure qu'à la partie inférieure du sédiment.

Le surnageant post-lysosomal contient un ensemble très hétéro--gène de membranes dans lequel on peut identifier des vésicules lisses, 6 : Distribution des polysomes libres et du RNA soluble dans les fractions subcel--lulaires isolées TABLEAU

H= homogénat ; P.lb.= polysomes libres

ure quantité régligeable de polycomes libres n'est pas analysée. Les quantités de polycomes libres indiquées dans le tableau sont exprimées en % de la somme des quantités trouvées dans les différentes fractions (A) ou en % de la radio-activité totale de l'homogénat (B). Dans ce dernier cas, les chiffres sont calculés à partir de la radio-activité totale de l'homogénat et de la quantité de polysomes 4g de foie sont fractionnés par la méthode des gradients discontinus après marquage long du RNA* (20h). Des parties aliquotes de l'homo--génat et des différentes fractions cont analysées en gradient de métrizamide. Des fractions de 0,1ml sont collectées et leur radiolibres trouvée dans chaque fraction, en tenant compte du taux de récupération. La quantité de RNA correspondant aux polysemes libres dans le SPL (C) a été déterminée par dosage de RNA contenu dans un sédiment de polysomes libres après centrifuçation de lml de SPL sur 2ml de 15 Tesp(Y₂M₅ pondent 20h à 45 000t/mn dans le rotor SW5O-1. La quantité de RNA soluble (D) a été déterminée dans le surnageant obtenu après 20h de centrifugation à 105 0009. La fraction C est réhamegénéisée après dilution par 4 volumes de D,255 Tes avant cen-trifugation. En D, les chiftes correspondent à la moyenne de 3 expériences et à son écart-type. -activité est déterminée. La radio-activité correspondant aux polysomes libres (fractions 1-14) est calculée. La fraction N, contenant

Fraction	- d	. (A)	Radio-act	ivité de H nt aux P 1h (R)	RNA correspondant aux P.1h. (f)	RNA soluble (D)
		(;			(% ce H)	(% de H)
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2		
Homogénat			18,8	19,3		
Fraction C	0,9	1,4	0,1	0,2		0,8±0,5
Fraction L	2,0	2,2	0,3	0,4		
SPL	97 , 1	96,4	18,1	18,3	17,5	13,1 - 1,4
raux ue recu-	99,4	98,2				



FIGURE 19 : Analyse de l'homogénat et de différentes fractions subcellulaires en gradient de métrizamide

RNA ³H (-e-), choline 14C (-o-). Des fractions aliquotes correspondent à 6,5mg de foie (fraction C) ou 13mg (autres fractions) sont déposées sur gradients linéaires 20-60 pl00 de métrizamide, et centrifugées pendant 8h à 33 000t/mn dans le rotor SW50-1. Des fractions de 0,1ml sont collectées. Les fractions 1-14 correspondent aux polysomes libres.





PLANCHE III : Aspects morphologiques de la fraction C en mi--croscopie électronique (observation de C. VERWAERDE) Les traits horizontaux représentent 0,5µm en A et B et 0,25µm en C et D



PLANCHE IV : Observation en microscopie électronique de la frac--tion C_{II} (observation de C. VERWAERDE)



PLANCHE V : Microscopie électronique de la partie supérieure (A), de la partie inférieure (B) du sédiment riche en lysosomes (fraction L) et des membranes du surnageant post-lysosomal (C, D) (observation de C. VERWAERDE)

Les traits horizontaux représentent lµm

des dérivés de l'appareil de Golgi, et des membranes granulaires (Planche V, c, d).

e- Discussion et conclusion

Les données expérimentales que nous avons acquises montrent clairement que la composition du milieu d'homogénéisation peut modifier le comportement des mitochondries et du réticulum endoplasmique en centrifu--gation différentielle ; cependant, dans les conditions ioniques compati--bles avec la préservation de la structure des polysomes, le réticulum endoplasmique conserve un certain nombre des traits morphologiques le carac--térisant <u>in vivo</u> et la distribution des lysosomes dans les fractions sub--cellulaires n'est pas affectée.

En utilisant une méthode améliorée de fractionnement celluée -laire nous avons pu isoler quatre fractions principales. L'étude de la répartition de divers constituants montre que l'isolement d'une proportion importante du réticulum endoplasmique avec les mitochondries est la carac--téristique principale qui différencie le fractionnement cellulaire adopté d'un fractionnement classique par centrifugation différentielle en absence d'ions. Les interactions existant entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries permettent d'obtenir une grande partie du réticulum endo--plasmique sans contamination par les polysomes libres. De plus, le taux de nucléases des fractions majeures (fraction C, surnageant post-lysosomal) peut être réduit en préparant une fraction riche en lysosomes. Le procédé que nous avons utilisé se distingue essentiellement de ceux de LEWIS et TATA (78) et de SHORE et TATA (79) par ces deux aspects.

Comme il apparaîtra dans les paragraphes suivants, l'intégrité du mRNA est préservée pendant le fractionnement cellulaire. Hormis la nécessité d'éviter la rupture des lysosomes pendant l'homogénéisation et les manipulations suivantes, le choix des conditions de centrifugation est d'une importance primordiale. Ainsi, une fraction NC, équivalente à la somme des fractions NC_I et C_{II} , peut être préparée directement à partir de l'homogénat en utilisant les conditions de centrifugation permettant l'obtention de la fraction C_{II} . Cependant nous avons pu constater qu'il en résulte une dégradation assez importante, voire poussée, des polysomes. Ce fait n'est apparemment pas en relation avec une rupture des organites car une répartition similaire des enzymes marqueurs et notamment de la phosphalase acide peut être obtenue. En outre, les conditions de centrifu-



FIGURE 20 : Inhibition des nucléases cellulaires par les hautes concentrations en Mg⁺⁺ en absence (-o-) ou en présen--ce (-o-) d'une fraction partiellement purifiée de l'inhibiteur cytoplasmique de RNase

Un extrait brut, contenant la majorité des nucléases cellulaires, est incubé en présence de RNA ³H de bas poids moléculaire *. Chaque tube contient 56.10³ cpm de RNA, 0,2ml d'extrait de nucléases, 0 ou 20µl de la fraction partiellement purifiée d'inhibiteur cytoplasmique de RNase, dans un volume final de 0,6ml. Les conditions ioniques sont T50K25M5_50. Après une incubation de 15mn à 37°C, les tubes sont refroidis et les concentrations en ions et en inhibiteur cytoplasmique sont uniformisées en ajoutent 60µl d'un tam--pon de compensation et 20µl d'eau ou d'inhibiteur cytoplasmique. 2 volumes d'éthanol à 76 pl00 contenant de l'HCl IN sont alors ajoutés et après IH à 0°C, les tubes sont centrifugés pendant 15mn à 10 000g. Des parties aliquotes de 0,1ml des surnageants sont introduits en fioles de comptage contenant 10ml de PCS (Amersham) -gation sont également critiques lors de la concentration des membranes du surnageant post-lysosomal sur gradients discontinus (voir purification partielle des membranes du surnageant post-lysosomal, p.121). Ces obser--vations ont quelque analogie avec celles de RAGNOTTI qui avait montré dès 1971, que les polysomes de la fraction microsomale sont moins dégradés lorsque les membranes sont recueillies sur un coussin de saccharose dense plutôt que sédimentées (99). Cependant, il demeure impossible de préciser si ces effets ont une cause purement mécanique ou s'ils sont également en relation avec l'action de nucléases.

B- ISOLEMENT DES POLYSOMES LIBRES ET LIES AU RETICULUM ENDO--PLASMIQUE

l°- Effet de hautes concentrations en Mg⁺⁺ sur l'activité des nucléases cellulaires

La probabilité de pouvoir isoler à partir des fractions sub--cellulaires les différentes classes de polysomes avec un minimum de dégra--dation dépend avant tout de la préservation de l'intégrité du mRNA pendant le fractionnement cellulaire. Au commencement du travail que nous décrivons ici, nous avons supposé que l'intégrité du mRNA était conservée dans les fractions isolées. Cependant, dans une série d'expériences préliminaires, nous n'avons pu constater aucune amélioration du profil d'absorbance des polysomes en gradient de saccharose lorsque ceux-ci sont isolés à partir du surnageant post-lysosomal après traitement par un détergent selon un protocole expérimental classique (voir Fig.3, D, p. 18). Nous avons in--terprété ce résultat comme suggérant que la (les) nucléase (s) libérée (s) lors du traitement par le détergent était (aient) insuffisamment inhibée (s) dans ces conditions.

Dans le but de définir de meilleures conditions d'inhibition des nucléases, nous avons entrepris une série d'essais <u>in vitro</u>, dans lesquels un extrait brut contenant la majeure partie des nucléases cellulaires est incubé en présence de RNA radio-actif et d'inhibiteurs de RNAse connus ou présumés. De hautes concentrations en Mg⁺⁺ ayant été considérées comme "stabilisant" les polysomes (100), nous avons envisagé la possibilité que cet ion puisse inhiber les nucléases. La figure 20 montre les résultats d'une étude cinétique dans laquelle des concentrations en Mg⁺⁺ de 5 à 50mM





Un SPL est préparé comme il est décrit dans Matériel et Méthodes à partir de foies dont le RNA et les phospholipides sont respectivement marqués par l'acide orotique ³H et la choline ¹⁴C. La fraction est ajustée en T₅₀K₂₅N₅d]. Des parties aliquotes sont traitées par le Triton X-100 l pl00 (C, D) ou 2 pl00 (E, F) en présence de Mg (CH₃COO)₂ SmM (C, E) ou 50mM (D, F). 0,2ml sont déposés sur des gradients liné--aires 20-60 pl00 de métrizamide préparés en T₅₀K₂₅N₅d₁ (A, C, E) ou en T₅₀K₂₅N₅₀d₁ (B, D, F). Les gra--phiques A et B correspondent à la fraction non traitée par le Triton X-100.

sont utilisées seules ou en combinaison avec une quantité constante d'une fraction partiellement purifiée de l'inhibiteur cytoplasmique de RNase. Une inhibition de plus en plus importante de l'activité de l'extrait cellulaire peut être observée pour des concentrations en Mg⁺⁺ croissantes. L'inhibiteur cytoplasmique de RNase n'est apparemment pas inactivé dans ces conditions car une plus forte inhibition de l'hydrolyse du RNA est obtenue en sa pré--sence.

Les expériences suivantes ont donc eu pour but de déterminer dans quelle mesure il était possible d'utiliser ces données lors de l'iso--lement des polysomes.

2°- Traitement des membranes par un détergent en présence de Mg⁺⁺ 50mM

Il était indispensable de vérifier tout d'abord qu'en présence d'une forte concentration en Mg⁺⁺, il demeure possible de détacher quanti--tativement les polysomes des membranes en solubilisant ces dernières par un détergent.

Un surnageant post-lysosomal, dont le RNA et les phospholipides sont radio-actifs, est analysé en gradient de métrizamide avant ou après traitement par le Triton X-100 en présence de Mg⁺⁺ 5 ou 50mM. La comparai--son des figures 21, A et 21, B indique qu'une forte concentration en Mg⁺⁺ permet la formation de complexes artéfactuels entre les polysomes libres et los membranes. Cependant, aucune différence significative n'est consta--tée lorsque le surnageant post-lysosomal est traité par le Triton X-100 (Fig.21, C et 21, D), et dans les deux cas étudiés (Mg⁺⁺ 5 ou 50mM) une concentration de 2% en détergent s'avère nécessaire pour que la quantité de phospholipides cosédimentant avec les polysomes devienne négligeable (Fig. 21, E et 21, F).

3° - Facteurs influençant l'intégrité des polysomes

Nous avons utilisé une fraction de membranes granulaires partiellement purifiée à partir du surnageant post-lysosomal pour étudier l'influence des conditions de traitement des membranes par un détergent, ainsi que culle de la composition des gradients discontinus de saccharose permettant la purification des polysomes.



FIGURE 22 : Influence de différents facteurs sur l'intégrité des polysomes

Des parties aliquotes d'une fraction partiellement purifiée de membranes granulaires * obtenue à partir d'un SPL sont traitées par le Triton X-100 2 pl00 dans différentes conditions et les polysomes sont purifiés sur des gradients discontinus composés de 3ml de 1,35 $T_{50}K_{25}H_{5d1}$ et 3ml de 25 $T_{50}K_{25}H_{5d1}$. Ces coussins de saccharose contiennent ou non du RNA de bas poids moléculaire et/ou du cytosol. À : fraction traitée en $T_{50}K_{25}H_{5d1}$ en présence de 2mg/ml de RNA de levure purifié. B : fraction traitée en $T_{50}K_{25}H_{50}d_1$ en présence de 2mg/ml de RNA de levure. C, D, E, F : fraction traitée en $T_{50}K_{25}H_{50}d_1$ en présence de 2mg/ml de protéines de la fraction cytosol. En A, B et C, les coussins de saccharose ne contiennent pas d'inhibiteur. En D, 2mg/ml de RNA dans le 1,35 et lmg/ml de RNA dans le 25. En E, 2mg/ml de protéines cytoplasmiques dans les deux couches. En F, 2mg/ml de RNA et 2mg/ml de protéines cyto--plasmiques dans le 1,35, 2mg/ml de protéines du cytosol dans le 25. Le nombre de ribosomes présent par molécule de mRNA au sommet du profil d'absorbance a été déterminé par la méthode de MORION (101). L'expé--rience est conçue de manière à ce que la surface déterminée par le tracé soit le reflet direct du rende--ment en polysomes dans la suspension finale.

BUS Ulle La figure 22 montre le résultat d'une expérience dans laquelle les polysomes libres sont détachés des membranes en présence de Mg⁺⁺ 5 ou 50mM, puis purifiés par centrifugation sur des gradients discontinus de saccharose contenant ou non différents inhibiteurs de RNase. Le fait d'aug--menter la concentration en Mg⁺⁺ lors de la solubilisation des membranes (comparer les Fig.22, A et 22, B) améliore de façon significative le profil polysomal, et cet effet peut être combiné à colui de l'inhibiteur cytoplas--mique de RNase pour obtenir de très lourds polysomes (Fig.22, C).

L'introduction de RNA de bas poids moléculaire dans les solu--tions composant les gradients discontinus apporte peu de modifications, mais la présence de cytosol dans les coussins de saccharose accroît très sensiblement le rendement en polysomes dans la suspension analysée. D'autres données (non incluses) indiquent que 1,5 à 2mg/ml de protéines cytoplasmi--ques permettent d'obtenir les meilleurs résultats (voir Fig.22, E et 22, F).

Nous avons également essayé de préciser l'importance de la nature et de la concentration du détergent employé. Une fraction de membra--nes granulaires partiellement purifiée est solubilisée en présence de Mg⁺⁺ 50mM et de cytosol par le Triton X-100 ou le DOC ou par un mélange des deux détergents dans des proportions différentes. Les polysomes sont puri--fiés sur des gradients discontinus contenant ou non du cytosol. Comme on peut en juger à l'examen de la figure 23, la présence de cytosol dans les coussins de saccharose améliore dans tous les cas les résultats obtenus. L'utilisation de DOC seul ne semble pas favoriser l'isolement de polysomes lourds. Toutefois, ce détergent peut être employé en combinaison avec le Triton X-100 si sa concentration demeure faible ; ainsi le profil 23, F (Triton X-100 2 p100, DOC 0,5 p100) diffère peu de celui de la figure 23, E (Triton X-100 2 p100).

Il faut également remarquer que dans les expériences des figu--res 22 et 23, le milieu d'homogénéisation utilisé pour préparer le sur--nageant post-lysosomal contient 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire. Celui-ci permet de limiter la fragmentation du mRNA pendant le fraction--nement cellulaire, comme le montre la figure 24. Mais nous avons pu cons--tater par ailleurs que l'introduction de cytosol dans le milieu d'homo--généisation n'a pas d'effet.

différentes combinaisons de détergent sur le profil polysomal obtenu С 00000 00 T 0 Volume of effluent (ml) Volume of effluent (ml) 0 0.3 6 0.2 0.3 0.2 5 0 0 ¢ $^{3}_{H}$ Les points représentent la distribution du RNA 0.3 0.2 C C 0 0.3 0.2 6 0 c co Volume of effluent (ml) Volume of effluent (ml) C C 0.3 0.3 0.2 0 0.2 0 0 u. 4 : Effet de <u>0</u> С 0.3 0.2 0 0.3 0.2 33 at 260nm 900Bd102dA 805 ULLE

(nim\sfnuos)_H^s - ^{s-}Of

Une fraction de membranes granulaires partiellement purifiée est préparée à partir du SPL comme il est décrit dans Matériel et Méthodes, de RNA de levure et de 25 T50K25M5d1 dans 1,3 pl00 ; D, (A, B, C, D) ou 2mg/ml de protéines du cytosol (0,5mCi/rat). La fraction est X-100 1 P100, D0C ajustée en T50K25M5d1 et des parties aliquotes sont traitées par le Triton X-100 et/ou le D0C en présence de 2mg/m1 Zmg/ml de protéines du cytosol. Les polysomes sont purifiés par centrifugation sur 3ml de 1,35 T50K25M5dl et 3ml le rotor 50 Ti. A, E : Triton X-100 2 p100 ; B, F : Triton X-100 2 p100, D0C 0,5 p100 ; C, G : Triton H : D0C 1,3 p100. Les coussins de saccharose ne contiennent aucun inhibiteur de RNase (A, B, C, D) ou à partir de rats ayant reçú une injection intrapéritonéale d'acide orotique $^{3\mathrm{H}}$ 20 h avant le sacrifice C, ⊞) , т,

FICURE

L'addition de DOC seul à une solution contenant Mg (CH3CGO)2 50mM conduit à la formation d'un précipité. Celui-ci est éliminé par centri--fugation à basse vitesse (D, H). En présence de Triton X-100, ce précipité ne se forme pas. Dans les meilleures conditions (profils E et F) le matériel n'ayant pas sédimenté représente 15% de la radio-activité sédimentable. Les sédiments ent été resuspendus avec une efficacité de 85%, si bien que la fraction analysée contient environ 70% des ribosemes de la frac-

-tion initiale.



.

R.

FIGURE 24 : Effet du RNA de levure purifié dans le milieu d'homo--généisation

Un SPL est préparé comme il est décrit dans Matériel et Méthodes en absence (A) ou en présence (B) de 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire. Les membranes granulaires sont partiellement purifiées, et les polysomes sont isolés comme il est décrit dans la figure 23, E. Ceux-ci sont analysés en gradient iso--cinétique de saccharose dans le rotor SW40 Ti à 2°C (50mn à 35 000t/mn)





FIGURE 25 : Représentation schématique de la méthode de sépara--tion des polysomes libres et des membranes du sur--nageant post-lysosomal

> Les mêmes tubes sont centrifugés successivement dans un rotor à godets mobiles (SW27), puis dans un rotor à angle fixe (60 Ti).

4°- Séparation des polysomes libres et des membranes

Dans une autre série d'expériences, les conditions précédemment définies pour le traitement des membranes par le détergent ont été appli--quées à des fractions membranaires obtenues selon la méthode classique, après une longue centrifugation sur gradient discontinu (voir Fig.3, D), sans que l'on puisse observer une amélioration très sensible du profil d'absorbance des polysomes liés. Nous avons donc recherché un moyen de séparer plus rapidement les deux catégories de polysomes.

Le procédé adopté (voir schéma de La Fig.25) diffère des métho--des précédemment publiées (69, 74, 75, 102) par les aspects suivants. La composition des gradients discontinus est modifiée pour éviter au maximum l'agrégation des membranes et la rétention de polysomes libres. Le surna--geant 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. Dans ces con--ditions, 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 (74)) peut être prélevée et remplacée par du tampon. La séparation des membranes et des polysomes libres de taille plus importante est ensuite effectuée par cen--trifugation dans un rotor angulaire. 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 for--mation d'un sédiment tout en permettant l'élimination partielle du glyco--gène. Une centrifugation de courte durée (3h30mn) suffit à obtenir La séparation des polysomes libres et des membranes. Le surnageant de la première centrifugation et les coussins de saccharose dense de la seconde étape sont réunis pour constituer la "fraction de polysomes libres brute", qui peut être purifiée sur gradient discontinu en même temps que les poly--somes de la fraction membranaire traitée par un détergent.

Le tableau 7 montre comment se distribuent les phospholipides et le RNA dans les fractions obtenues après séparation des polysomes libres et liés du surnageant post-lysosomal. Les quantités de radio-activité trouvées dans les différentes fractions sont en bon accord avec les estima -tions précédentes (voir Tableaux 5 et 6, p. 53 et55). La fraction membra--naire purifiée contient un peu moins de 15% du RNA ³H de l'homogénat,

TABLEAU 7

Répartition du RNA et des phospholipides dans les fractions subcellulaires

Un homogénat est fractionné après marquage du RNA par l'acide orotique ³H pendant 20h et des phospholi--pides par la choline ¹⁴C *. Pour déterminer la quantité de RNA sédimentable, des parties aliquotes de la fraction de polysomes libres brute et de la fraction membranaire isolée à partir du SPL sont traitées par le Triton X-100 à 2 pl00 et centrifugées pendant 20h à 50 000t/mn dans le rotor 50 Ti sur un coussin de lml de 1,85 T₅₀K₂₅M₅. Dans cette expérience une estimation de la proportion de glycogène sédimentant au travers de la couche de 2,2S lors de la séparation des polysomes libres et liés du SPL a été effec--tuée de la manière suivante : des parties aliquotes de SPL et de la fraction de polysomes libres brute sont centrifugées sur 3ml de 2S T₅₀K₂₅M₅ et 3ml de 1,38S T₅₀K₂₅M₅ dans le rotor 50 Ti pendant 20h à 50 000t/mn pour obtenir les polysomes libres. Les sucres sont ensuite dosés dans les 2 sédiments ainsi que dans celui de glycogène par la technique de TILLMANS et PHILIPPI, après lh d'incubation à 37°C dans KOH 0,5N, précipitation alcoolique et lavages. 40% du glycogène pouvant sédimenter au travers du 2S est obtenu dans le sédiment de glycogène. Il faut également noter qu'à la différence de la "fraction de réticulum endoplasmique sédimentant rapidement" isolée par SHORE et TATA (69), la fraction C isolée dans ce travail n'est pas contaminée par le glycogène. Ce dernier est retrouvé exclusivement dans la fraction L et dans le SPL.

FRACTION	RI	NA	P.hospha	olipides
C	2pm3Hx10-6	% du total	cpm ¹⁴ Cx10 ⁻⁶	% du total
Homogénat	34 , 87		5,42	
N	2,36	7,1	0,15	2,7
С	13,76	41,4	3,18	57,2
L	1,70	5,1	0,71	12,7
Polysomes libres	s "brute"			
total	10,57	31,8	0,36	6,5
sédimentable	e 6,38	19,2		
Membranes				
total	4,77	14,4	1,16	20,9
sédimentable	e 4,45	13,4		
Sédiment de glycogène	0,08	0,2	négligeable	



FIGURE 26 : Analyse en gradient linéaire de métrizamide de la "fraction de polysomes libres brute" et de la frac--tion de membranes purifiées. (-•-) RNA ³H ; Choline ¹⁴C (-•-)

Les deux fractions sont obtenues à partir du SPL selon le procédé schématisé dans la figure 25 et qui est plus amplement décrit dans le chapitre méthodologique. Dans chaque cas, l'équivalent de 20mg de tissu est déposé sur gradient 20-60 pl00 de métrizamide préparé en T₅₀K₂₅M₅d₁. Le pic correspondant aux fractions 19 à 24 (densité moyenne : 1,21g/cm⁻³) pourrait correspondre à des particules mRNP (voir ref.96) mais nous n'avons pas cherché à vérifier cette supposition.





FIGURE 27 : Analyse en gradient isocinétique de saccharose des polysomes libres et liés isolés du surnageant postlysosomal



Polysomes libres et liés sont séparés et purifiés à partir du SPL comme il est décrit dans Matériel et Méthodes. A : polysomes détachés des membranes ; B : polysomes libres ; C : la "fraction de polysomes libres brute" est traitée par le Triton X-100 2 pl00 et le DOC 0,3 pl00 comme la fraction de membranes. alors que les polysomes libres en représentent 19%. La centrifugation en gradient de métrizamide des fractions obtenues à partir du surnageant postlysosomal (voir Fig.26) indique qu'environ 1% des polysomes libres conta--minent la fraction de membranes. La quantité de réticulum endoplasmique présente dans la "fraction de polysomes libres brute" peut être considérée comme négligeable, car on ne trouve pratiquement pas de choline ¹⁴C dans la région correspondant aux membranes granulaires dans le gradient de métri--zamide (densité : 1,16-1,24g/cm³). De plus, la quantité de polysomes libres purifiés n'augmente pas de façon décelable après un traitement de la fraction par un détergent (voir Fig.27).

L'analyse en gradient isocinétique de saccharose des deux classes de polysomes isolées à partir du surnageant post-lysosomal montre que dans les deux fractions, 14 à 15 ribosomes par mRNA sont présents au maximum des profils d'absorbance (Fig.27). Les principales différences sont observées à la partie supérieure des gradients, où le monomère prédomine dans la fraction liée aux membranes, tandis que le dimère et le trimère sont trouvés en quantité plus importante dans la fraction de polysomes libres.

5°- Isolement des polysomes de la fraction C

La technique employée pour solubiliser les membranes du surna--geant post-lysosomal n'est pas entièrement satisfaisante lorsqu'il s'agit d'isoler les polysomes de la fraction C. Nous avons entrepris une série d'essais pour résoudre ce problème mais en maintenant constantes les con--centrations en protéines de la fraction cytosol (environ 2mg/ml), en RNA de bas poids moléculaire (2mg/ml), en Mg (CH₃COO)₂ (50mM), ainsi que celle de la fraction C traitée (équivalent de 90mg de tissu /ml de suspension finale).

Les premières expériences ont montré que l'utilisation de deux détergents (Triton X-100 2 p100, DOC 0,5 p100) est préférable à celle du Triton X-100 seul car elle permet une meilleure préservation du RNA mes--sager. De plus, comme le montre la figure 28, le fait d'augmenter la force ionique au moment du traitement par le détergent accroît de façon significative le rendement en polysomes (comparer les Fig.28, A, B et C). Si des résultats similaires peuvent être obtenus en employant des concen--trations de 100mM en KCl ou de 150mM en NH₄Cl (Fig.28, B et 28, C), nous



FIGURE 28 : Analyse en gradient exponentiel isocinétique de sac--charose des polysomes de la fraction C

Une fraction C, préparée comme il est décrit dans Matériel et Méthodes, est traitée par le Triton X-100 2 pl00 et le DOC 0,5 pl00 en présence de Mg (CH₃COO)₂ 50mM (A), KCl 100mM et Mg (CH₃COO)₂ 50mM (B), NH₄Cl 150mM et Mg (CH₃COO)₂ 50mM (C), NH₄Cl 150mM, KCl 100mM et Mg (CH₃COO)₂ 50mM (D). Dans tous les cas, 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire et 2mg/ml de protéines cytoplasmiques sont présents lors du traitement. En A, B et C, les coussins de saccharose sont composés de 3ml de 1,3S T₅₀K₂₅M₅₀I et 3ml de 2S T₅₀K₂₅M₅₀I. En D, 1,3S T₅₀K₂₅N₁₅₀M₅₀I et 2S T₅₀K₂₅M₅₀I. Dans tous les cas, les gradients discontinus contiennent 2mg/ml de RNA de levure dans le 1,3S et 2mg/ml de protéines du cytosol dans le 1,3S et le 2S. Lorsque les conditions décrites pour D sont utilisées, le quantité de radio-activité sédimentable retrouvée dans le sédiment de polysomes est de 80-82% et l'efficacité de resuspension est de 80-85% (3 déterminations).

75

avons pu constater que des molarités en KCL supérieures à 150mM induisent une dissociation de la structure polysomale (graphiques non inclus) alors que la présence simultanée de KCL 100mM et NH₄CL 150mM ne provoque pas cet effet.

Toutefois, quelle que soit la concentration en ions monovalents au moment du traitement par les détergents (KCL 100mM ou NH₄CL 150mM ou KCL 100mM plus NH₄CL 150mM), la quantité de monoribosomes obtenus demeure appréciable. Cette dégradation a vraisemblablement pour origine une cosé--dimentation de nucléases avec les polysomes car les résultats peuvent être améliorés en augmeniant la force ionique de la couche de saccharose 1,3M lors de la centrifugation sur gradient discontinu ; cependant, seul NH₄⁺ (et non K⁺) peut être utilisé.

La figure 28, D correspond aux polysomes isolés après traite--ment de la fraction C par le Triton X-100 et le DOC (à des concentrations respectives de 2 p100 et 0,5 p100) en présence de Mg $(CH_3COO)_2$ 50mM, KCl 100mM, NH₄Cl 150mM et purification sur un gradient discontinu dont la couche supérieure contient du NH₄Cl à la concentration de 150mM. On peut constater que l'importance des monomères est alors beaucoup plus réduite au profit d'une augmentation de la quantité de polysomes lourds. Comme pour les polysomes isolés du surnageant post-lysosomal, environ 15 riboso--mes par molécule de mRNA sont présents au sommet de la courbe d'absor--bance.

6° - Isolement des polysomes liés à la membrane nucléaire

Les premières observations au microscope électronique de l'hépatocyte intact ont permis de mettre en évidence sur la membrane nuclé--aire des éléments ultrastructuraux identiques aux [«]grains de PALADE[»](103). L'existence d'une continuité entre le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire externe a été plusieurs fois observée ultérieurement, et dès 1964, il est bien établi que le réticulum endoplasmique est une extension de l'enveloppe nucléaire (voir ref.104).

Les deux types de structures peuvent donc, par voie de consé--quence être considérés comme faisant partie d'un système membranaire unique, mais il demeure que les ribosomes liés à la membrane nucléaire pourraient représenter le cas typique d'une population polysomale associant une locali-

-sation topographique déterminée à une spécialisation dans la synthèse de certaines protéines. Nous avons donc isolé cette fraction dans le but de comparer ses produits de synthèse <u>in vitro</u> à ceux des autres catégories de polysomes (voir Chapitre IV).

a- Principe

CHAUVEAU <u>et al</u> ont, dès 1956, tiré parti du fait que les noyaux sont les organites les plus denses de la cellule hépatique (cas de l'animal à jeun) pour les isoler avec un haut degré de pureté par centrifu--gation en saccharose concentré (2,2M) (105). Plusieurs variantes de cette méthode, plus commodes d'un point de vue pratique, ont été publiées ulté--rieurement (voir par exemple ref.91 et 106).

L'une des caractéristiques des noyaux isolés selon ces dif--férents procédés est que leur membrane externe, portant des ribosomes, est conservée. Celle-ci peut être solubilisée par des détergents nonioniques, comme le Triton X-100, laissant l'intérieur des noyaux apparem--ment intact (ZALTA <u>et al</u>, 107), et cette possibilité a été exploitée fréquemment pour isoler en saccharose concentré des noyaux sans membrane externe (108, 109), cu plus simplement pour isoler les polysomes liés au réticulum endoplasmique cosédimentant en saccharose dilué avec les noyaux (voir ref.13 et 110 par exemple). Une fraction de ribosomes liés à la membrane nucléaire a été isolée par SADOWSKI et HOWDEN (111) après trai--tement par le Triton X-100 de noyaux préparés en saccharose concentré.

Nous avons adopté le même principe en le complétant par les données acquises lors de l'isolement des autres catégories de polysomes. L'homogénat est préparé comme précédemment et les lysosomes sont éliminés du sédiment obtenu à basse vitesse (40 à 50% des lysosomes sont présents dans le sédiment 7 000gxmn d'un homogénat à 25%). Les noyaux, contaminés par des mitochondries et du réticulum endoplasmique, sont resuspendus dans le milieu d'homogénéisation et mélangés à du saccharose 2,5M pour obtenir une concentration de 1,85M. La suspension est ensuite centrifugée sur un coussin de saccharose 2,3M.

Les noyaux purifiés sont traités par le Triton X-100 à 0,2 p100 en présence de cytosol, de RNA de levure et de Mg (CH₃COO)₂ 50mM pour détacher les polysomes liés à la membrane externe. Ceux-ci sont ensuite centrifugés sur gradient discontinu de saccharose comme les frac-



Volume en ml

FIGURE 29 : Analyse des poly--somes liés à la membrane nu--cléaire en gradient isociné--tique de saccharose

Les graphiques correspondent à deux analyses d'une même suspension ef--fectuées à des sensibilités dif--férentes de l'enregistreur.

Les noyaux sont préparés comme il est décrit dans Matériel et Méthodes à partir de 40g de tissu. Ils sont resuspendus et dilués dans 65ml de tampon $T_{50}K_{25}H_5$ contenant 15ml de cytosol. La concentration en Mg++ est ajus--tée à 50mM et on ajoute 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire. La suspension est alors traitée par le Triton X-100 (concen--tration finale 0,2 p100) et les noyaux sont sédimentés dans le rotor SW27 pendant 10mm à 15 000t/mn. Les surnageants sont déposés sur gradient discontinu de saccharose^{*} après une nouvelle addition de Triton X-100 (con--centration finale 2 pl00) et centrifugés dans le rotor 60 Ti pendant 16h à 55 000t/mn. Les polysomes sont analysés en gradient iso--cinétique de saccharose. L'équivalent de 4g de tissu est déposé sur chaque gradient. En A, le tracé inférieur correspond à la ligne de base obtenue par enregistrement de l'absorbance d'un gradient témoin.

-tions de polysomes isolées à partir du surnageant post-lysosomal.

b- Résultats

La figure 29 montre le résultat d'analyses en gradient de saccharose des polysomes obtenus. Le profil d'absorbance présente certains traits caractéristiques parmi lesquels on peut noter l'importance du mono--mère (47% de la surface délimitée par le profil, voir Tableau 8) et une distribution assez uniforme des polysomes dans le gradient comparativement à celle des polysomes des autres fractions. L'importance du monomère pour--rait traduire une certaine dégradation des polysomes pendant le fraction--nement mais nous n'avons pu, jusqu'à présent, améliorer ces résultats. On peut noter d'autre part que les expériences de biosynthèse protéique <u>in vitro</u> (voir Chapitre IV, p. 90) ne permettent pas de mettre en évidence une accumulation particulière de produits de bas poids moléculaire.

C- POLYSOMES TOTAUX DU TISSU HÉPATIQUE

MORTON <u>et al</u> ont proposé en 1975 un procédé de purification des polysomes totaux du foie de Rat consistant à traiter par le DOC L'ho--mogénat préparé en présence d'une haute concentration en Mg⁺⁺ (100), mais il nous faut mentionner qu'en appliquant à plusieurs reprises la technique décrite par ces auteurs, nous n'avons pu - pour des raisons indéterminées reproduire leurs résultats. Dans le meilleur des cas en effet, le maximum de la courbe d'absorbance correspondait à des polysomes formés de 9 ribo--somes par molécule de RNA messager.

La méthode précedemment décrite pour isoler les polysomes de la fraction C s'est avérée permettre également l'isolement en une seule étape de l'ensemble des polysomes du tissu, à condition toutefois que la solubilisation des membranes par les détergents soit effectuée en présence d'une faible quantité d'héparine (25 UI/mL).

La figure 30 montre les résultats d'une expérience dans laquelle les polysomes totaux de l'homogénat ont été préparés selon cette méthode à partir de rats normalement nourris (A) ou ayant jeûné pendant 18h (B). On peut remarquer, dans le cas des animaux soumis au jeûne, une réduction de la taille des polysomes associée à une augmentation de la quantité de monomère et de dimère dans la fraction polysomale. De l'ensem-



Volume en ml

FIGURE 30 : Analyse des polysomes totaux de l'homogénat

A- Rats normalement nourris

B- Rats ayant jeûné pendant 18h

5g de tissu broyé sont homogénéisés dans 15ml de 0,25S T₂₀K₂₅M₃d₁ contenant 2mg/ml de RNA de levure puri--fié. L'homogénat est dilué par un volume de cytosol, les concentrations ioniques sont ajustées à T₅₀K₁₀₀N₁₅₀M₅₀d₁ et on ajoute 25 UI/ml d'héparine. Après traitement par le Triton X-100 à 2 p100, le ma--tériel nucléaire est éliminé par centrifugation à basse vitesse, et on ajoute 0,5 p100 de DOC. Les poly--somes sont ensuite purifiés comme dans le cas de la fraction C avant d'être analysés sur gradient iscei--nétique de saccharose.

80

-ble des expériences effectuées, nous pouvons conclure que les milieux d'homogénéisation 0,25S $T_{50}K_{25}M_{50}d_1$ et 0,25S $T_{20}K_{25}M_3d_1$ peuvent être employés indifféremment pourvu que la concentration en Mg⁺⁺ soit ajustée à 50mM avant le traitement par les détergents.

D- DISCUSSION

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre appelle un certain nombre de commentaires que l'on peut ordonner selon deux axes principaux.

1° - Analyse des polysomes et critères d'intégrité du mRNA

L'analyse des polysomes en gradient de saccharose est le moyen le plus fréquemment utilisé pour juger de l'intégrité du mRNA dans les frac--tions subcellulaires isolées. La manière d'exploiter les données acquises lors de telles analyses est cependant peu codifiée, si bien que le mot "intégrité" peut quelquefois perdre son sens ou ne conserver qu'une signi--fication toute relative.

Ainsi par exemple, l'importance de la quantité de monoribo--somes trouvée dans un profil d'absorbance est souvent prise comme indice de la préservation du mRNA ; mais en réalité, aucune conclusion ne peut être tirée tant que la quantité de RNA présente dans la fraction polyso--male analysée n'a pas été chiffrée par rapport à la quantité de RNA sédimentable de la fraction brute. La nature du gradient choisi peut égale--ment influencer les résultats. Si certains gradients linéaires de saccha--rose - et en particulier le gradient 10-50 pi00 - sont apparemment plus "résolutifs", en ce sens qu'ils permettent une meilleure visualisation des polysomes au-delà de l'octamère, le maximum de la courbe d'absorbance ne correspond pas obligatoirement au type de polysomes existant dans la sus--pension à la plus haute concentration.

Les analyses présentées dans ce chapitre ont été effectuées en utilisant des gradients isocinétiques de saccharose. L'intégrité du mRNA est définie par la quantité de RNA de la fraction polysomale analysée (exprimée par rapport à la quantité de RNA sédimentable de la fraction

TABLEAU 8

Répartition en gradient isocinétique de saccharose des polysomes isolés à partir de l'homogénat et de différentes fractions subcellulaires

Les données présentées dans le tableau ci-dessous ont été obtenues par intégration des surfaces déterminées par les profils d'absorbance sans tenir compte des recouvrements réciproques entre les différentes zones considérées. La ligne de base est obtenue par analyse d'un gradient témoin centrifugé dans des conditions identiques. Les chiffres corres--pondent à la moyenne des valeurs obtenues pour le nombre d'expériences indiqué.

FRACTION	Nombre d'exp.	1/2-2 somes	3-8 somes	>8 somes
Homogénat	3	15,9	26,1	58
Ċ	5	15,5	13,4	71,1
Liés aux membranes du SPL	5	26,4	19,3	54,3
Libres	5	21,3	22,2	56,4
Liés à la membrane nucléaire externe	2	47,9	22,6	29,5

% de l'absorbance totale

brute) ainsi que par la taille des polysomes présents au maximum de la courbe d'absorbance. Ces données peuvent être complétées par des mesures d'intégration de différentes zones du profil obtenu, comme le montre le tableau 8. On peut constater que le taux le plus important de polysomes lourds est trouvé dans la fraction C alors que les fractions de polysomes libres et liés aux membranes du surnageant post-lysosomal en contiennent des proportions voisines de celles obtenues à partir de l'homogénat.

2°- Effet de différents inhibiteurs de nucléases

Nous avons pu montrer que, dans certaines conditions, le tissu hépatique de Rat peut être homogénéisé et fractionné en utilisant un milieu conventionnel sans qu'il en résulte une dégradation importante des polysomes. Mais l'isolement de ces derniers à partir des fractions subcel--lulaires nécessite une inhibition efficace des nucléases lors du traite--ment par les détergents et la centrifugation sur gradient discontinu de saccharose.

Les expériences que nous avons effectuées montrent que l'inhibiteur cytoplasmique de RNase n'est pas systématiquement actif à toutes les étapes du fractionnement. Ceci n'est pas surprenant si on prend en compte les travaux de GAGNON <u>et al</u> (112) concernant la spécificité de celui-ci vis à vis de différentes nucléases cellulaires : l'inhibiteur cytoplasmique de RNase n'a pas d'action sur la 3⁻ phosphodiestérase des lysosomes, et a peu d'effet sur l'activité RNasique acide. Ainsi, le fait que l'introduction de cytosol dans le milieu d'homogénéisation ne semble apporter aucune protection de la structure polysomale alors que le RNA de bas poids moléculaire permet d'éviter une certaine dégradation du mRNA pourrait traduire une action préférentielle de ces enzymes lors de la préparation des fractions subcellulaires.

On pourrait également se rapporter à ce même travail pour tenter d'expliquer les résultats obtenus lors des essais comparatifs pré--sentés dans la figure 31. Dans cette expérience, les polysomes d'une fraction C (préparée selon la technique décrite dans Matériel et Méthodes) sont isolés dans les conditions ioniques et de pH adoptées par SHORE et TATA (69) (T₂₀₀K₅₀M₁₀, pH 8,5) ou selon la technique précedemment décrite dans ce chapitre. On peut constater que dans les conditions de pH élevé, l'inhibition des nucléases est insuffisante pour permettre le traitement





Une fraction C, préparée comme il est décrit dans Matériel et Méthodes à partir de 4g de foie, est resuspendue en 0,255 T₅K₂₅M₅ et divi--sée en trois parties qui sont traitées par le Triton X-100 dans un volume final identique. A- Les conditions ioniques sont ajustées à T200^K50^M10, P^H 8,5, et 1'on ajoute 2 P100 de Triton X-100. Les polysomes sont purifiés sur un gradient discontinu de saccharose préparé Tsok2sMsd1 contenant Zmg/m1 de protéinés du cytosol. C- La fraction ést traitée dans les mômes conditions qu'en B, mais en utilisant Les conditions ioniques TsoK100N150M50d1, pM 7,6. Les polysomes sont purifiés comme il est décrit dans la figure 20, D. Pour A, B, C les sédiments sont resuspendus en T₅₀K25Ms et analysés en gradient isocinétique de saccharoso. 2 pl00 en présence de cytosol et de 2mg/ml de RNA de levure. Les polysomes sont purifiés sur un gradient discontinu préparé en

de la fraction par un détergent et la purification des polysomes selon la méthode classique de longue centrifugation sur gradient discontinu. Il est possible que ce résultat soit, au moins en partie, la conséquence du fait que la RNase mitochondriale possède, en absence de cytosol, un maximum d'activité à pH 8,5 (112).

CHAPITRE IV

FONCTION DES DIFFERENTES CLASSES DE POLYSOMES :

ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE DE

 $L'\alpha$ -L FUCOSIDASE LYSOSOMALE

Dans le chapitre d'introduction, nous avons évoqué les différen--tes questions que suscite l'organisation de la biosynthèse protéique dans la cellule et en particulier la spécialisation fonctionnelle de différentes "catégories" ou "classes" possibles de polysomes. Ainsi, alors que le rôle du réticulum endoplasmique dans les processus de secrétion est maintenant bien établi, il semble très probable qu'une meilleure connaissance des méca--nismes de synthèse des protéines non excrétées, et en particulier celles constituant les organites cellulaires, permettra de mieux cerner l'unité ou la diversité des fonctions des interactions polysomes-membranes. Ce chapitre présente les expériences que nous avons effectuées dans le but de déterminer le (les) site(s) intracellulaire(s) de synthèse de l' α -L fucosidase lysoso--male.

A- TRADUCTION DES mRNAS DES DIFFERENTES FRACTIONS DE POLYSOMES EN SYSTEME ACELLULAIRE DE RETICULOCYTES

Nous montrerons tout d'abord que l'analyse des produits de synthèse <u>in vitro</u> des différentes fractions de polysomes est compatible avec l'idée que les polysomes libres et liés aux membranes du RE représentent deux catégories de polysomes fonctionnellement spécialisées.

1°- Contrôle de l'efficacité du système de réticulo--cytes traité par la nucléase de Micrococcus

Le système de réticulocytes est connu depuis longtemps comme l'un des systèmes acellulaires les plus actifs pour la traduction de mRNAs de sources diverses, mais son utilisation n'était pas toujours satisfai-

TABLEAU 9

Contrôle de l'efficacité du système acellulaire de réticulocytes traité par la nucléase de Micrococcus

Le lysat de réticulocytes est préparé comme il est décrit dans Matériel et Méthodes et partagé en deux fractions, dont l'une est traitée par la nucléase de Micrococcus. Les tubes contiennent, dans un volume final de 115µl, 100µl de lysat (traité ou non traité), 0 ou 1 U A₂₆₀ de RNA. La radio-activité spécifique de la méthionine utilisée est de 745 Ci/mmole. Après lh d'incubation à 30°C, des parties aliquotes de 3µl sont prélevées et la radio-activité est déterminée *****.

RNA desMethionine 35 S incorporée en cpmx10polysomesLysat non traitéLysat traité

	2,173	0,091
libres	2,316	1,753
liés aux membranes du SPL	2,727	1,647


FIGURE 32 : Analyse en gel de polyacrylamide-SDS des produits synthétisés dans un système de réticulocytes traité ou non traité par la nucléase de Micrococcus

A, B, C : lysat non traité ; D, E, F, G, H : lysat traité. A, D : sans addition de RNA ; B, E, G : RNA des polysomes libres ; C, F, H : RNA des polysomes liés aux membranes du SPL.

Des parties aliquotes des échantillons correspondant à l'expérience du tableau 9 sont dialysées en puits d'acrylamide * contre le tampon Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8. La radio-activité acido-précipitable des échan--tillons dialysés est déterminée et des parties aliquotes contenant 50 000cpm (A, B, C, E, F) ou 100 000cpm (G, H) sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (gradient 10-18 p100). En D, on dépose 2 fois la quantité de protéines de réticulocytes déposées en A. Les gels sont colorés par le bleu de Coomassie *, décolorés puis séchés sur papier Whatman 1 et mis en contact avec le papier RP-Royal-X omat pendant une semaine à température ambiante. Les flèches indiquent la position présumée da l'albumine.

 $\mathcal{B}U$

-sante, à cause de l'incorporation importante due aux mRNAs endogènes. PELHAM et JACKSON (113) ont proposé en 1976 de préincuber le système en présence de nucléase de Micrococcus (active en présence d'ions Ca⁺⁺) de façon à dégrader les mRNAs endogènes. Un excès d'EGTA est ensuite ajouté pour complexer le Ca⁺⁺ et inactiver la nucléase pendant la traduction des mRNAs exogènes.

La figure 32 montre les résultats que nous avons obtenus en utilisant cette méthode. Le traitement du lysat par la nucléase de Micro--coccus permet de supprimer totalement les produits de synthèse propres au réticulocyte. Elle permet également une traduction plus efficace des fractions de mRNAs exogènes (voir Figure 32 et Tableau 9). La comparaison des produits synthétisés par deux catégories de polysomes se trouve faci--litée. Ainsi, par exemple, l'existence d'une synthèse préférentielle de l'albumine par la fraction de polysomes liés au réticulum endoplasmique, qui n'apparaît pas de façon très évidente lorsqu'on utilise un lysat non traité (comparer Figure 32, B, polysomes libres et C, polysomes liés aux membranes du surnageant post-lysosomal), est très fortement suggérée par l'analyse des produits de synthèse dans le cas du lysat préincubé en pré--sence de la nucléase (E et F, G et H).

PELHAM et JACKSON, dans leur article mentionné plus haut (113), notaient que les produits de traduction d'une fraction de mRNAs de foie de Rat étaient essentiellement de bas poids moléculaire. On peut cependant remarquer que dans l'expérience de la figure 32, le nombre de produits de bas poids moléculaire est relativement restreint et que des chaînes pro--téiques d'un poids moléculaire supérieur à celui de l'albumine ont été synthétisées. Nous interprétons ce résultat comme étant le reflet de l'inté--grité du mRNA des fractions de polysomes préparées selon la méthode décrite dans le chapitre précédent.

2°- Traduction des mRNAs des différentes fractions de polysomes

Dans l'expérience de contrôle de la figure 32, où des fractions de polysomes libres d'une part, et liés aux membranes du surnageant postlysosomal d'autre part ont été utilisées, il n'apparaît, parmi l'ensemble des polypeptides synthétisés par les deux fractions, qu'un nombre relati--vement faible de chaînes protéiques possédant des migrations identiques. Dans une autre série d'expériences, nous avons analysé en gel de poly-



90



20----

an senter i

РМ×10⁻³

-duits synthétisés <u>in vitro</u> à partir du RNA isolé de diffé--rentes fractions de polysomes

FIGURE 33 : Comparaison des pro-

Lb : libres ; Li : liés aux membranes du SPL ; C : liés aux membranes de la fraction C ; N_1 et N_2 : liés à la membrane nucléaire.

Des échantillons de RNA isolés à partir de poly--somes libres, liés aux membranes du surnageant post-lysosomal, liés aux membranes de la fraction C, et liés à la membrane nucléaire (2 préparations différentes) sont incubés en système acellulaire de réticulocytes *. A la fin de l'incubation, des parties aliquotes (50 000cpm) sont prélevées, di--luées dans lml d'eau et précipitées par le TCA à 5 pl00. Après lavage *, les précipitées sont solu--bilisés dans le tampon d'échantillon et analysés en gel de polyacrylamide-SDS (gradient 10-18 pl00). La détection des produits est effectuée par fluo--rographie (exposition de 24h à -70°C).

BUS

-acrylamide-SDS les chaînes protéiques synthétisées in vitro à partir du mRNA des différentes fractions de polysomes. La figure 33 présente les ré--sultats d'une électrophorèse des produits synthétisés par les polysomes libres, liés aux membranes du surnageant post-lysosomal, liés aux membranes de la fraction C et liés à la membrane nucléaire. Une grande similitude peut être observée entre les produits synthétisés par les différentes frac--tions de polysomes liés, tandis que le diagramme obtenu dans le cas des polysomes libres semble nettement différent. Un fait remarguable est que la fraction de polysomes liés à la membrane nucléaire, bien que présentant un profil d'absorbance en gradient de saccharose très significativement différent de celui des autres fractions de polysomes liés (voir Figure 29, p. 78 et Tableau 8, p. 82) conduit à l'obtention d'une fraction de mRNA dont les produits de traduction peuvent être difficilement distingués de ceux des autres fractions de polysomes liés. Une interprétation possible de ce fait serait que les mRNAs traduits sur la membrane nucléaire portent moins de ribosomes que ceux présents dans les autres fractions de membra--nes, si tant est que la distribution en électrophorèse des produits syn--thétisés in vitro reflète effectivement le contenu en mRNA des fractions.

On peut constater à l'examen du tableau 10 que les mRNAs des différentes fractions de polysomes ne sont pas traduits <u>in vitro</u> avec la même efficacité. Ainsi, alors que le mRNA des polysomes libres ou liés aux membranes du surnageant post-lysosomal permet l'incorporation de mé--thionine ³⁵S à des taux similaires, la traduction du mRNA des autres fractions de polysomes liés est moins importante. Dans le travail que nous décrivons ici, nous n'avons pas entrepris une recherche systématique de conditions de biosynthèse protéique <u>in vitro</u> qui permettraient éventuel--lement de supprimer tout ou partie des différences observées dans les données du tableau 10. En conséquence, d'un point de vue purement logique, la possibilité demeure que, dans les conditions qui ont été utilisées, des différences qualitatives existant entre le contenu en mRNA des fractions de polysomes liés ne soient pas mises en évidence.

Les résultats du tableau 10 et de la figure 33 peuvent égale--ment s'expliquer en considérant que les différences d'incorporation observées affectent statistiquement l'ensemble des mRNAs de chaque frac--tion ; les différentes fractions de polysomes liés possèderaient dans cette hypothèse un grand nombre de mRNAs en commun.

Mais quelle que soit l'interprétation exacte de ces données,

TABLEAU 10

Traduction des mRNAs des différentes fractions de polysomes en système acellulaire de réticulocytes

RNA isolé Methionine ³⁵S incorporée en des polysomes cpmx10⁻⁶/ U A₂₆₀ de RNA

de l'homogénat non fractionné7,539libres9,334liés aux membranes du SPL9,219liés aux membranes de la fraction C_I4,273liés aux membranes de la fraction C_{II}4,730liés à la membrane nucléaire
préparation 16,537
6,255

on peut envisager que le contenu en mRNAs des fractions de polysomes liés puisse différer, au moins d'un point de vue quantitatif, pour quelques mRNAs. Il apparaît également de façon claire que, pour être fructueuse, l'étude des spécificités de synthèse de fractions isolées de polysomes doit être abordée dans le cadre de modèles précis. Nous avons choisi d'étudier la biosynthèse d'un enzyme lysosomal, car à notre connaissance, aucun tra--vail n'a jamais tenté d'élucider le mécanisme de biosynthèse des protéines lysosomales.

B- ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DE L' α -L FUCOSIDASE

La principale difficulté devant être surmontée lors de la dé--termination des sites intracellulaires de biosynthèse de protéines cons--tituant les organites cellulaires, réside dans le fait que celles-ci ne représentent souvent qu'une infime partie de la totalité des protéines cellulaires. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des protéines lyso--somales. Ainsi, différentes analyses morphométriques ont pu estimer que le volume cellulaire occupé par les lysosomes était de l'ordre de quelques $\mu l (2,4 à 4)/g$ de tissu (114, 115) et l'activité spécifique relative des enzymes lysosomaux (qui excède difficilement 5 dans une fraction L préparée par centrifugation différentielle classique (72, 73) devrait selon BEAUFAY (116) être d'environ 150 dans une fraction lysosomale complètement purifiée. Un travail récent, visant à approcher ce maximum théorique en purifiant la fraction L de DE DUVE et al (72) par centrifugation isopycnique en métrizamide conduit à estimer que l'ensemble des protéines lysosomales pourrait repré--senter 1 à 1,4% des protéines totales du tissu (117).

A l'heure actuelle les seules techniques disponibles pour entre--prendre l'étude de la biosynthèse de protéines cellulaires données sont de nature immunologique et leur utilisation s'est accrue dans les dernières années. Celles-ci nécessitent évidemment la préparation d'antisérums spé--cifiques, c'est à dire, dans la majorité des cas, la purification préa--lable de la protéine étudiée.

Peu d'enzymes lysosomaux du foie de Rat peuvent être obtenus suffisamment purs pour permettre la préparation d'antisérums monospécifi--ques. Nous avons choisi de prendre comme modèle l' α -L fucosidase qui peut être préparée rapidement avec un très haut degré de pureté par chromato-

BUS ULLE

TABLEAU 11

Purification de l' α -L fucosidase lysosomale du foie de Rat

585g de foie (112g de protéines) sont homogénéisés dans le milieu 0,255 T₅₀K₂₅M₃ et une fraction purifiée de fucosidase est préparée comme il est décrit dans Matériel et Méthodes à partir d'une fraction C₁L. L'éluat de la colonne d'affinité est ajusté à une concentration en EDTA de ZOMM (pH 6) puis centrifugée dans le rotor 60 Ti pendant 12h à 60 000t/mn à 2°C. Le sédiment est resuspendu dans le tampon EDTA 20mM, pH 6, M9504 lmM, 5-mercapto ethanol lmM. L'unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse lµmole de paranitro-phenyl-a-L fucopyrannoside par mn à 37°C.

Fraction	Volume en ml	Protéines en mg	Activité spécifique U/mg de protéines	Facteur de purification	Rendement en %
CIIL	820	15 192	0,0026	Г	100
Extrait soluble de C _{II} L	377	640	0,0524	20,19	85,0
Précipité (NH ₄)2 ⁵⁰ 4 (63% sat.)	39	299	0,110	42,3	83,2
Fucosidase	0,1	0,440	23-224	8 846	26,0

-graphie d'affinité. Cet enzyme est en outre important dans le métabolisme des substances biologiques contenant le L fucose, comme par exemple les glycoprotéines, les oligosaccharides et les glycolipides (118). La défi--cience héréditaire en cet enzyme, caractérisée par l'accumulation neuro--viscérale des composés à fucose, est connue sous le nom de fucosidose (119).

l°- Purification de l' α -L fucosidase

Nous avons purifié l'enzyme en utilisant la méthode décrite par OPHEIM et TOUSTER (120) qui fait intervenir l'affinité de l'enzyme pour l'Agarose- ϵ -aminocaproyl fucosylamine. Cette technique possède l'avantage d'être à la fois efficace et rapide, minimisant ainsi les effets possibles des autres hydrolases lysosomales sur l' α -L fucosidase. Le diagramme d'élu--tion de l'enzyme du support d'affinité est présenté dans la figure 34.

Les données que nous avons obtenues lors des différentes étapes de la purification sont rassemblées dans le tableau 11. Celles-ci sont tout à fait similaires à celles publiées par OPHEIM et TOUSTER bien que nous ayons pris en compte dans le tableau 11 la concentration de l' α -L fucosidase par centrifugation, étape qui n'avait pas été effectuée par ces auteurs.

La détermination de l'activité enzymatique de l'homogénat étant généralement peu précise, nous avons calculé le facteur de purification par rapport à la fraction $C_{\prod}L$. Cependant, on peut estimer que celle-ci contient environ 60% de l'activité totale de l'homogénat, ce qui conduit à un rende--ment proche de 16% et un facteur de purification global de l'ordre de 39 000. Ce dernier chiffre est très révélateur quant à l'efficacité de la méthode employée ; il est tout à fait compatible avec l'ensemble des ana--lyses de OPHEIM et TOUSTER ayant montré que la préparation d' α -L fucosidase obtenue était exempte de toute autre activité glycosidasique.

2° - Contrôles de pureté

La pureté de l' α -L fucosidase a pu être contrôlée par électro--phorèse sur différents supports et dans différentes conditions. L'électro--phorèse sur acétate de cellulose permet de mettre en évidence une seule bande protéique (migrant vers l'anode) qui coïncide avec un pic unique d'activité enzymatique. L'activité α -L fucosidasique étant détruite au-delà



FIGURE 34 : Isolement de l' α -L fucosi--dase

A- Chromatographie d'affinité sur Agarose- ϵ -aminocaproyl fuco--sylamine

Un extrait soluble de la fraction $C_{II}L$ est préparé à partir de 500g de foie comme il est décrit dans Matériel et Méthodes. Il est soumis à une précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ (63% sat.) et le précipité est solubilisé dans le tampon BFI *. La solution est déposée sur une colonne de Sépharose 4B connectée au support d'affinité. La suite des opérations est exactement celle décri--te dans Matériel et Méthodes. Le graphique présente l'enregis--trement de la densité optique et la mesure de l'activité enzymatique au cours des 3 phases de la préparation : chroma--tographie de la solution initiale en tampon HFI et lavage du support d'affinité ; lavage de ce dernier par le tampon BFI ; élution de l' α -L fucosidase par le fucose 0,1M dans le tampon BFI. Des fractions de 0,4ml sont collectées au cours de l'élu--tion.

B- Electrophorèse en milieu non dénaturant de l' α -L fucosidase La solution d'enzyme élué du support d'affinité est ajustée en EDTA 20mM, pH 6, puis centrifugée dans le rotor 60 Ti *. Le sédiment est repris par 100µl de tampon EDTA 2mM, pH 7, MgSO₄ O,1mM, β -mercaptoethanol 0,1mM. 2 parties aliquotes de 10ug sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 5 plOO (plaque de 0,5mm d'épaisseur et de 13cm de longueur) contenant du tampon phosphate 200mM, pH 7,4. Après 36h de migration à 20°C (tampon phosphate 10mM, pH 7,4;5mA), une bande de gel est colorée par le bleu de Coomassie tandis que l'autre est découpée en tranches de 1mm qui sont incubées dans la solution de substrat * pour détecter l'activité α -L fucosidasique.



2



В

С

FIGURE 35 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de l' α -L fucosidase

A- Les différentes fractions possédant l'activité enzymatique après élution d'une colonne d'Agarose- ϵ aminocaproyl fucosylamine sont rassemblées. 2 parties aliquotes de 2ml sont prélevées dont l'une est fixée par la formaldéhyde à 5 pl00 (2). Les deux fractions sont dialysées pendant 72h contre de l'eau distillée puis lyophilisées. Dans les deux cas, 15µg de protéines sont analysés en gel de polyacrylamide -SDS * (gradient 10-18 pl00 ; gel de l5cm de longueur et de lmm d'épaisseur).

8- Agrandissement de la photographie A₁

C- 10 et 30µg d' α -L fucosidase provenant de la préparation utilisée dans l'expérience de la figure 34, B, sont analysés en gel de polyacrylamide-SDS (gradient 10-30 pl00, gel de 20cm de longueur et l,5mm d'épaisseur). L'enzyme purifié, en solution dans le tampon EDTA 2mM, pH 7, MgSO₄ 0,1mM, β -mercaptoe--thanol 0,1mM, est additionné d'un volume de tampon Tris-HCl 125mM, pH 6,8, DTI 0,2M, SDS 4 pl00, sucrose 20 pl00, puis chauffé pendant 2mn dans un bain-marie bouillant. Après 72h de migration (8mA) le gel est coloré par le bleu de Coomassie. Les flèches indiquent la position dans le gel de différentes protéines "marqueurs".



de pH 8, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant doit être effectuée dans des conditions spécialement adaptées. Toutefois la mobilité électrophorétique de l'enzyme est très faible à pH 5 (migration vers la cathode) et à pH 7 (migration vers l'anode) dans les gels de polyacryla--mide à 7 ou 5% et les meilleurs résultats sont obtenus à pH 7,4 (gel à 5%, voir figure 34). Dans ces conditions, une seule bande protéique est observée qui possède l'activité enzymatique.

OPHEIM et TOUSTER (120) ont pu déterminer par ultracentrifu--gation analytique que l' α -L fucosidase possède un poids moléculaire de 217 000, résultat qu'ils considèrent comme compatible avec l'existence d'un tétramère constitué de sous-unités d'un poids moléculaire de 55 000 (mesuré par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS). Ils n'ont pu cependant préciser si l'enzyme était formé de sous-unités différentes.

Comme le montre la figure 35, l'électrophorèse en milieu dénaturant permet de mettre en évidence que les sous-unités de l'enzyme ont un poids moléculaire de 51 à 61 500. On peut également constater que lorsqu'on prend soin d'éliminer les sels aussi complètement que possible, un certain degré d'hétérogénéité peut être observé (comparer Figure 35, A, B et C). Le fait que le résultat de l'analyse soit peu affecté après un temps relativement long de dialyse (comparer Figure 35, A₁ et A₂) fait apparaître comme assez improbable l'idée que cette hétérogénéité soit la conséquence de la présence de traces d'hydrolases dans l'enzyme purifié. La préparation de fucosidase purifiée est en outre remarquable--ment stable puisqu'elle peut être conservée pendant plusieurs semaines à 4°C sans perte notable d'activité. La possibilité demeure cependant, qu'en dépit de la rapidité de la méthode de purification, la structure de l'enzyme ait été modifiée pendant la préparation.

Au cours des nombreux contrôles effectués par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, nous n'avons pu mettre en évidence la pré--sence de contaminants protéiques, même lorsque des quantités assez importantes (30-50µg) d'enzyme ont été analysées. La pureté de l'enzyme nous a donc semblé satisfaisante pour envisager la production d'anti--sérums chez le lapin.

> 3°- Anticorps anti- α -L fucosidase et stratégie adoptée pour l'étude de la biosynthèse de l' α -L fucosidase



А

В

С





FIGURE 36 : Anticorps anti- α -L fucosidase

A- Immunodiffusion d'un sérum anti-fucosidase (1) et d'un sérum témoin (2) contre la fraction C_{II}L (3) 500µl d'antisérum ou de sérum témoin (lapins traités de la même manière mais l'émulsion injectée ne con--tient pas de fucosidase) * sont mis à diffuser pendant 48h à 20°C contre 190µl de fraction C_{II}L (conte--nant du Triton X-100 à 1 p100 et du DOC à 0,1 p100) dans une plaque de gélose (Indubiose A37 à 1 p100 dans le tampon phosphate 10mM, pH 7,4, NaCl 150mM, NaN3 3mM, Triton X-100 à 1 p100, DOC à 0,1 p100). La plaque est colorée par le bleu de Coomassie.

B- Immunodiffusion d'un sérum anti-fucosidase (1) et de fractions d'IgG immunes (2) ou non immunes (3) contre l'a-L fucosidase purifiée (4) 20µl (1µg) d'enzyme sont mis à diffuser contre 20µl d'antisérum, 20µl (150µg) d'IgG immunes ou non im--munes, pendant 48h à 20°C. La gélose à 1 p100 contient du tampon Tris-HCl 5mM, pH 7,4.

C- Immunoélectrophorèse en gélose de l'a-L fucosidase purifiée 14µg d'enzyme, en solution dans le tampon EDTA 2mM, pH 7, MgSO₄ 0,1mM, β -mercaptoéthanol 1mM, sont sou--mis à une électrophorèse en gélose (Indubiose A37 à 1 p100 dans le tampon phosphate 200mM, pH 7,4 ; 2,5cmx7,5cm). Le sérum utilisé pour la diffusion a été concentré 5 fois.





FIGURE 37 : Représentation schématique des opérations effec--tuées pour étudier la biosynthèse de l'α-L fuco--sidase Nous avons appliqué la méthode de VAITUKAITIS <u>et al</u> (121) qui permet d'obtenir des antisérums en utilisant des faibles doses d'antigènes. A titre d'ultime précaution, l'enzyme purifié a été soumis à une chroma--tographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G200 (voir Matériel et Méthodes) avant d'être injecté.

La fucosidase est présente dans l'homogénat en quantité in--suffisante pour que les anticorps anti-enzyme puissent être détectés par la technique de double immunodiffusion d'OUCHTERLONY. En revanche, un arc de précipitation est mis en évidence lorsqu'on oppose à l'anti--sérum la fraction $C_{||}L$ (Figure 36, A) ou l' α -L fucosidase purifiée (Figure 36, B). Si cette dernière est préalablement soumise à une élec--trophorèse en gélose, la diffusion des protéines de l'antisérum entraîne également l'apparition d'un seul arc de précipitation (Figure 36, C).

La figure 37 présente de manière schématique la stratégie que nous avons adoptée pour étudier la biosynthèse de l'enzyme lysosomal. La majeure partie des interactions non spécifiques existant entre les molécules d'IgG et les polysomes, pouvant être éliminée par l'utilisation de fragments Fab (122, 123, 124). Mc LAUGHIN et PITOT (125) ont montré qu'une estimation des proportions relatives des polysomes synthétisant une protéine donnée, peut être effectuée après réaction des fragments Fab marqués par l'¹²⁵I avec les chaînes protéiques naissantes. Nous avons exploité cette possibilité et mesuré pour les différentes fractions de polysomes la quantité de Fab ¹²⁵I spécifiques fixés sur les chaînes protéigues naissantes. D'autre part, des données qualitatives peuvent être obtenues après traduction in vitro des mRNAs des différentes frac--tions de polysomes mais la principale difficulté est alors de sélection--ner parmi l'ensemble des produits synthétisés, ceux correspondant à la protéine étudiée. La chromatographie d'affinité nous a permis de résou--dre ce problème.

Nous avons donc isolé les IgG de l'antisérum (IgG immunes) et à partir de celles-ci, purifié les IgG spécifiques de l' α -L fucosi--dase par chromatographie sur colonne de Biogel P300-fucosidase. A partir des fragments Fab immuns, obtenus après digestion par la papaïne de la fraction d'IgG immunes et purification sur CM-cellulose, on peut préparer les Fab immuns ¹²⁵I et, par chromatographie d'affinité, les Fab spécifi--ques de l' α -L fucosidase marqués ou non par l'¹²⁵I.



Volume en ml

FIGURE 38 : Chromatographie de la fraction d'IgG immunes sur colonne de Biogel P300-fucosidase

500µg de la fraction d'IgG immunes sont chromatographiés sur 5ml de Biogel P300-fucosidase stabilisés en tampon Tris 0,24, pH 8, NaCl 0,5M, NaN3 3mM sans recyclage. La colonne est lavée par le tampon phosphate 10mM, pH 7,4, NaCl 150mM, NaN3 3mM, puis les anticorps spécifiques de l' α -L fucosidase sont élués par le tampon glycocolle-HCl 0,2M, pH 2,8, NaCl 0,5M. La chromatographie de 500µg d'IgG non immunes dans les mêmes conditions ne permet pas de mettre en évidence une élution de protéines à la sensibilité maximale de l'enregistreur. Le protocole décrit dans Matériel et Méthodes (incluant un recyclage de la fraction à basse force ionique avant le lavage à haute force ionique) permet d'augmenter légèrement la quantité d'anticorps fixés, mais a surtout pour but d'assurer une bonne reproductibilité de la chromatographie.





FIGURE 39 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des IgG spécifiques de l' α -L fucosidase et des frag--ments Fab anti- α -L fucosidase

A- Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de la fraction d'IgG spécifiques de l'a-L fucosidase Des IgG immunes, obtenues à partir du sérum par relargage au $(NH_4)_2SO_4$ et chromatographie sur DEAE et CM cellulose, sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de Biogel P300-fucosidase^{*}. La fraction est concentrée contre l'aquacide II_a et dialysée contre le tampon Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, avant d'être analysée en gel de polyacrylamide-SDS (gradient 10-18 p100 ; gel de 1mm d'épaisseur et de 15cm de longueur).

B- Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des fragments Fab anti- α -L fucosidase

lOµg de Fab immuns, obtenus après digestion par la papaIne d'une fraction d'IgG anti-fucosidase et purification sur CM cellulose^{*}, sont dialysés contre le tampon Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, puis analysés en gel de polyacrylamide-SDS comme il est décrit en A.



La figure 38 présente un exemple de profil d'élution obtenu lors de la chromatographie d'IgG immunes sur colonne de Biogel P300fucosidase. Le diagramme permet une estimation approximative de la propo--sition que représentent les IgG spécifiques de l' α -L fucosidase par rap--port à l'ensemble de la fraction d'IgG (environ 10%). La chromatographie des fragments Fab ou Fab ¹²⁵I sur le même support donne des résultats similaires.

Dans la figure 39, A, l'électrophorèse en gel de polyacryla--mide-SDS des IgG spécifiques de l' α -L fucosidase permet de visualiser après coloration par le bleu de Coomassie plusieurs bandes réparties en deux zones qui correspondent aux poids moléculaires attendus pour les chaînes lourdes et légères des IgG. Lorsque le même type d'analyse est effectué sur des fragments Fab (Figure 39, B), deux bandes protéiques majeures ayant des poids moléculaires de 30 000 et 25 000 sont mises en évidence, que l'on peut interpréter comme représentant respectivement les fragments de chaînes lourdes et les chaînes légères des IgG.

4°- Fixation des Fab ¹²⁵I spécifiques de l'α-L
fucosidase sur les polysomes isolés de diffé -rentes fractions subcellulaires

Des quantités croissantes de ribosomes sont incubées en pré--sence d'un excès de fragments Fab 125 I spécifiques de l' α -L fucosidase, ou de fragments Fab 125 I non immuns (voir Matériel et Méthodes). La cen--trifugation des suspensions sur gradient discontinu de saccharose permet ensuite de séparer les ribosomes des fragments Fab non fixés. Les résul--tats obtenus à partir des différentes fractions de polysomes sont pré--sentés dans le tableau 12.

On peut constater que les taux de fixation les plus impor--tants sont obtenus pour les fractions C_1 et C_{11} , tandis que les chaînes protéiques naissantes des polysomes libres fixent environ deux fois moins d'anticorps. Il est également intéressant de noter que les valeurs cor--respondant aux différentes fractions de polysomes liés aux membranes ne sont pas identiques, et que les polysomes liés aux membranes du surna--geant post-lysosomal fixent moins de Fab que les polysomes totaux du tissu. La quantité de RNA sédimentable que représente chaque fraction peut être utilisée pour calculer des pourcentages de synthèse, l'homogé--nat servant de référence. Il apparaît alors que la majeure partie de la

TABLEAU 12

Fixation des Fab spécifiques de l' α -L fucosidase sur les polysomes isolés de différentes fractions subcellulaires

La détermination de la quantité de Fab ¹²⁵I fixés par les polysomes est effectuée exactement comme il est décrit dans Natériel et Méthodes. La radio-activité trouvée pour les cinétiques témoins (Fab ¹²⁵I non immuns) est déduite de la radio-activité mesurée dans le cas des Fab ¹²⁵I spécifiques. Les chiffres correspondent à la moyenne de 2 expériences. Les pourcentages de synthèse correspondant à chaque catégorie de polysomes sont calculés par rapport à l'homogénat à partir des données analytiques obtenues lors des expériences présentées dans le chapitre III.

Fraction	cpm ¹²⁵ I/mg de RNA .	RNA sédimentable en % du RNA cellulaire	% de synthèse /homogénat
Homogénat	54 180	80,0	100
Libres	32 370	19,0	12,7
с ^I	63 400	28,8	37,8
C ^{II}	68 560	11,7	16,6
Membranes du SPI	51 840	13,6	14,6

biosynthèse de l' α -L fucosidase est effectuée par des polysomes liés aux membranes.

De tels résultats sont, de nouveau, compatibles avec l'exis--tence de deux "classes" de polysomes fonctionnellement spécialisées, mais l'interprétation que l'on peut donner du fait qu'une petite partie de la synthèse de l'enzyme soit trouvée en association avec les polysomes libres demeure incertaine, surtout si l'on se souvient que la composition exacte en sous-unités de l'enzyme n'est pas connue. Les résultats du tableau 12 doivent donc être complétés par des données d'ordre qualitatif. Les expé--riences entreprises dans ce but sont présentées dans le paragraphe sui--vant.

> 5°- Isolement des "précurseurs" supposés des sousunités de l' α -L fucosidase, après traduction <u>in vitro</u> du RNA des différentes fractions de polysomes

De nombreux auteurs ont employé l'immunoprécipitation, parfois en combinaison avec des techniques traditionnelles de chromatographie pour isoler, à partir d'un système acellulaire, un produit particulier de tra--duction. Cependant, des difficultés sont très fréquemment rencontrées pour limiter la quantité de protéines entrainées non spécifiquement dans les immunoprécipités. On conçoit aisément que ces difficultés soient accrues lorsque le produit recherché n'est qu'un composant très discret du mélange.

Nous avons effectué une série d'essais où l'immunoprécipita--tion (directe ou indirecte) s'est révélée totalement inadéquate, avant d'employer la technique décrite dans Matériel et Méthodes. Celle-ci con--siste en un recyclage de l'échantillon sur un immunoadsorbant (Biogel P300-Fab spécifiques de l' α -L fucosidase). Celui-ci peut être lavé par une solution tampon de haute force ionique, avant d'éluer de façon clas--sique les produits fixés. L'éluat est ensuite chromatographié sur une microcolonne de Protéine A-Sepharose-IgG spécifiques, de façon à concen--trer les produits pour l'électrophorèse, tout en effectuant une seconde purification éventuelle. Dans les conditions de préparation des échantil--lons pour l'électrophorèse en milieu dénaturant, (SDS 4 p100, DTT 0,1M, 90°C), les produits sont élués de ce support d'affinité. L'ensemble sup--port plus éluat est ensuite déposé sur le gel de polyacrylamide.



FIGURE 40 : Enregistrement densitométrique du fluorogramme de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des chaînes polypeptidiques de l'α-Lfucosidase synthé--tisées in vitro (densitomètre VITATRON)

5 U A260 de RNA extrait des polysomes totaux du tissu sont incubées dans 0,5ml de lysat de réticulocy--tes*. 37,8x10⁶opm sont incorporés dans l'ecido-précipitable. 35x10⁶opm sont chromatographiés sur immunoadsorbont, et l'électrophorèse des produits isolés est effectuée comme il est décrit dans Matériel et Méthodes. La durée d'exposition du fluorogramme est de 10 jours à -70°C.

La Sepharose-protéine A-IgG spécifiques a été préparée par recyclage des IgG spécifiques de la fucosi--dase sur le support stabilisé en tampon phosphate 10mM, pH 7,4, NaCl 150mM, Nonidet P4O 0,5 pl00, NaN3 3mM. Après lavage par le tampon Tris 0,24, pH 8, NaCl 0,7M, Nonidet 0,5 pl00, NaN3 3mM, puis par le tampon initial, les microcolonnes sont préparées.

107

Lb C_{I} C_{II} Li

a 62,4→ b 56,2→ c 50,7→

Α





FIGURE 41 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des précurseurs supposés de l'α-L fucosidase isolés après traduction <u>in vitro</u> des RNAs de différentes fractions de polysomes

l U A_{260} de RNA extrait à partir des polysomes libres (Lb), liés aux membranes du SPL (Li), liés aux membranes de la fraction C_I ou de la fraction C_{II} est incubée dans un système de réticulocytes. L'iso--lement des chaînes polypeptidiques de l'enzyme et l'électrophorèse sont effectués exactement comme il est décrit dans Matériel et Méthodes. Les résultats présentés dans la figure proviennent d'un même gel de polyacrylamide et du même fluorogramme exposé pendant 6 semaines à -70°C. Un agrandissement de la photo A est présenté en B, et en C, un enregistrement densitométrique de la zone du fluorogramme corres--pondant à la photo B. En B, la zone délimitée par les tirets correspond à la migration de l'enzyme pu--rifié.

BUS

La figure 40 montre que la purification des produits de tra--duction des mRNAs de l'ensemble des polysomes du tissu conduit à l'obten--tion de trois produits dont les poids moléculaires sont compris dans (ou très proche de) l'intervalle qu'occupent les sous-unités de l'enzyme actif (50700-61 500). En effet, une bande majeure (poids moléculaire légèrement supérieur à 62 000, produit a) se sépare de deux autres bandes de plus faible intensité (poids moléculaires : 56 000 et 51 000, produits b et c). Un polypeptide de petite taille (24 000) est également observé de façon reproductible, qui très probablement n'est pas un composant de l'enzyme actif, car aucun polypeptide de cette taille n'est visible après électrophorèse de l'enzyme purifié (voir Figure 35). Lorsque les animaux sont soumis à un jeûne de 24h, on obtient des résultats semblables.

Le fait de pouvoir mettre en évidence, dans les produits de traduction <u>in vitro</u> des mRNAs, trois chaînes peptidiques étant "reconnues" par les anticorps spécifiques de l' α -L fucosidase suggère fortement (mais n'est pas une preuve absolue, voir discussion) que l'enzyme possède trois sous-unités différentes. En tout état de cause, ce résultat conduit à envisager l'éventualité que différents mRNAs codant pour la fucosidase ne soient pas uniformément répartis dans les différentes fractions de polysomes.

Nous avons donc effectué le même type d'expérience à partir des produits de traduction <u>in vitro</u> des RNAs provenant des fractions de polysomes libres, liés aux membranes du SPL, liés aux membranes des fractions C_1 et C_{11} . Comme le montre la figure 41, les produits du RNA des polysomes libres contiennent principalement le produit c. Les produits a et c sont obtenus à partir de la fraction C_1 , tandis que les trois produits sont observables pour la fraction C_{11} . Dans le cas de la fraction de membranes du SPL, on met en évidence a et b, mais le produit c est pratiquement absent. Deux expériences de ce type ont été effectuées qui ont donné des résultats similaires.

C- DISCUSSION

L'étude de la biosynthèse d'une protéine donnée par différentes fractions de polysomes peut être envisagée selon deux aspects : détermi--nation du taux de synthèse de la protéine par chaque fraction, comparai--son des produits de traduction du mRNA considéré avec la protéine authen-

-tique. La majorité des travaux ayant abordé ce genre de problème ont com--paré la migration électrophorétique du (des) produit(s) de traduction im--munoprécipitable(s) par un antisérum spécifique à celle de la (des) protéine(s) mature(s) ; les données quantitatives sont obtenues par mesure de la radio-activité des immunoprécipités ou de la bande protéique excisée de la plaque de gel de polyacrylamide après électrophorèse. Certaines difficultés d'interprétation peuvent toutefois être rencontrées si des produits sont entraînés non spécifiquement dans les immunoprécipités, ou si les différentes fractions de mRNA que l'on compare ne sont pas traduites <u>in vitro</u> avec la même efficacité. En outre, lorsque la protéine étudiée ne représente qu'une faible proportion des produits de traduction, les données quantitatives que l'on peut obtenir n'ont qu'une signification limitée.

Ces considérations nous ont conduit à entreprendre l'étude de la biosynthèse de l' α -L fucosidase selon deux approches différentes : fixation des fragments Fab ¹²⁵I spécifiques de l'enzyme sur les chaînes protéiques en voie de synthèse des différentes fractions de polysomes d'une part, étude des produits de synthèse <u>in vitro</u> d'autre part. Cellesci ont en commun le fait que leur succès est conditionné avant tout par la spécificité des anticorps anti-enzyme. A cet égard, toutes les pré--cautions ont été prises dans le protocole expérimental que nous avons suivi. Il faut également souligner que l'utilisation de la méthode de VAITUKAITIS (121) pour obtenir les antisérums réduit fortement les chances pour que des protéines présentes en très faible proportion dans la pré--paration d'enzyme (éventuels contaminants qui n'auraient pas été détec--tés lors des contrôles par électrophorèse en gel de polyacrylamide) puissent induire la production d'anticorps (126).

La méthode consistant à estimer les proportions relatives de polysomes synthétisant une protéine donnée par mesure de la fixation de fragments Fab¹²⁵I sur les chaînes protéiques naissantes est encore récente, et n'a pas été appliquée pour un très grand nombre de protéines. Bien qu'elle permette d'obtenir des résultats reproductibles, il est possible que certaines causes d'erreur existent, qui n'aient pas été décelées jusqu'à présent. En particulier, dans le cas d'une protéine composée de plusieurs sous-unités non identiques, les pourcentages de synthèse que l'on peut attribuer à chaque fraction de polysomes n'ont de précision réelle que si les différentes sous-unités ont un nombre similaire de sites antigéniques. Pour exploiter les résultats que nous

obtenons pour l' α -L fucosidase (voir Tableau 12), nous devons supposer que cette condition est satisfaite. D'autre part, il faut se souvenir que la répartition dans les fractions subcellulaires des chaînes naissantes de la protéine étudiée peut être différente de la répartition du (des) mRNA(s) considéré(s), si une ou plusieurs fractions contiennent une certaine pro--portion de mRNA non traduit, ou si un mRNA donné n'est pas traduit<u>in vivo</u>avec la même efficacité dans les différentes fractions.

D'une manière analogue, l'interprétation des résultats obtenus lors de l'analyse des produits synthétisés in vitro doit supposer que les produits identifiés correspondent à des chaînes protéiques complètes. La terminaison précoce de la synthèse de la protéine, par "manque d'activité" du système acellulaire, où à cause d'une dégradation des mRNAs est un phé--nomène qu'on peut parfois rencontrer. Dans les nombreux travaux utilisant la traduction de mRNAs in vitro, cette incertitude peut être généralement levée, du fait que la protéine étudiée n'est souvent composée que d'une seule chaîne polypeptidique. La comparaison des migrations respectives en gel de polyacrylamide du produit synthétisé in vitro et de la protéine isolée permet alors d'établir que le produit de traduction possède un poids moléculaire au moins égal à celui de la protéine. Si le même type d'argument expérimental peut être avancé dans ce travail pour le produit a. dont le poids moléculaire est légèrement supérieur au poids moléculaire extrême de l'enzyme purifié (62 400 et 61 500, respectivement), la comi--gration des produits b (56 000) et c (50 700) avec l'enzyme purifié (50 700-61 500) n'est pas suffisante pour exclure la possibilité que b et c soient des "sous-produits" de a. On peut cependant remarquer que la ré--partition des produits dans les différentes fractions subcellulaires (voir Figure 41) est peu compatible avec l'idée que 1 ou 2 des 3m chaînes protéiques isolées du système acellulaire seraient des fragments de la chaîne la plus lourde.

Le manque d'informations concernant la composition exacte en sous-unités de l' α -L fucosidase vient limiter, dans l'immédiat, l'inter--prétation du travail que nous avons effectué, puisqu'un certain nombre de conclusions qui pourraient découler de la comparaison précurseursproduits ne peuvent être tirées. En contre-partie, les résultats que nous avons acquis ont un caractère double, puisque dans ce contexte, ils ac--quièrent également des implications d'ordre structural. Les données concernant La composition en sous-unités de l' α -L fucosidase isolée de sources diverses demeurent contradictoires, et il est très fréquent que

l'enzyme isolé d'un matériel biologique déterminé soit successivement trouvé composé d'un seul type de sous-unités, ou de deux sous-unités non identiques, par différents auteurs. Ainsi, un travail récent indique que $l'\alpha$ -L fucosidase du foie humain ne peut être séparée en deux bandes en gel de polyacrylamide-SDS que lorsque la protéine réduite est S-carboxy--methylée avant l'électrophorèse, et conclut que l'enzyme est composé de 2 sous-unités non identiques, chacune étant présente en double exemplaire dans la molécule active. (ALHADEFF et ANDREWS-SMITH, 127). On peut cepen--dant noter que l'examen des résultats présentés par ces auteurs ne permet pas d'éliminer la possibilité que l'enzyme soit formé de 3 sous-unités différentes, dont l'une est présente en double exemplaire. Dans le cas de l' α -L fucosidase du foie de Rat, OPHEIM et TOUSTER n'avaient observé qu'une bande large, d'un poids moléculaire moyen de 55 000 (120). Il est possible, dans le présent travail, de soupçonner l'existence de sousunités différentes au vu des résultats de l'électrophorèse en présence de SDS (voir Figure 35), mais l'alkylation de la protéine réduite avant l'électrophorèse (résultats non présentés) ne nous a pas permis d'amélio--rer la résolution. La chromatographie sur immunoadsorbant des produits synthétisés in vitro à partir du RNA polysomal suggère cependant, que la molécule d'enzyme pourrait être formée de 3 sous-unités différentes.

La mesure de la fixation des Fab ¹²⁵I spécifiques de l' α -L fucosidase sur les chaînes protéiques naissantes des différentes frac--tions de polysomes indique que la majeure partie (plus de 80%) de la synthèse de l'enzyme s'effectue au niveau des membranes. Dans l'état actuel de nos connaissances, ceci n'est pas surprenant si l'on considère que la fucosidase est une glycoprotéine, et que les chaînes naissantes doivent migrer vers le compartiment intravésiculaire pour subir ce genre de modifications post-traductionnelles. L'analyse des produits du système acellulaire montre cependant que les polysomes libres ne synthétisent en fait que 1 des 3 produits mis en évidence. Ce résultat pourrait permettre de penser que l'enzyme possède au moins une sous-unité non glycosylée. Toutefois, le même produit est également trouvé après traduction du RNA des fractions C₁ et C₁₁. Ce résultat peut être interprété de trois façons :

> 1- Des polysomes libres dans le cytoplasme, <u>in vivo</u>, sont retrouvés artéfactuellement associés sur les membranes des fractions C_1 et C_{11} .

2- Le mRNA codant pour le produit c'est associé aux membranes. Les chaînes polypeptidiques ne croissent pas vers les cisternae, mais vers le cytoplasme.

3- La destinée "utile" du produit c est de migrer vers l'inté--rieur des vésicules intermembranaires en étant traduit par des ribosomes tiés au réticulum endoplasmique ; mais, au moins dans le cas du Rat normalement nourri, une certaine proportion des polysomes traduisant ce mRNA ne peut s'associer aux mem--branes (par exemple à cause d'un nombre limité de récepteurs, voir chapitre d'introduction) et la synthèse du produit c est, de ce fait, effectuée également par des polysomes libres.

Cette dernière hypothèse implique l'existence sur les mem--branes, de sites récepteurs spécifiques de certains mRNAs, ou fait in--tervenir la notion d'aptitude d'un mRNA donné à entrer en compétition avec d'autres pour être traduit au niveau des membranes. Dans le cas par--ticulier de la fucosidase, elle conduirait à la conclusion qu'une partie de la sous-unité c de l'enzyme puisse être synthétisée sans atteindre sa destination finale. Une telle situation, bien qu'elle soit envisagée par--mi l'ensemble des propositions de la "signal hypothesis" (voir Introduc--tion), demeure néanmoins difficile à concevoir pour une cellule diffé--renciée, physiologiquement normale. Cependant, aucun argument expérimen--tal ne nous permet d'éliminer cette possibilité dans l'immédiat.

Les deux premières hypothèses ont pour conséquence commune qu'une des chaînes protéiques de l'enzyme serait synthétisée par des polysomes libres. Dans le cadre général de la biosynthèse des protéines lysosomales, ceci suppose l'existence d'un mécanisme post-traductionnel permettant le passage de protéines au travers des membranes. Un tel mé--canisme, nécessitant l'existence de sites récepteurs spécifiques sur les membranes, en des points précis de la cellule, a été récemment proposé pour expliquer le passage de la catalase et de l'uricase dans les peroxysomes (128).

Il est très difficile de distinguer, d'un point de vue opérationnel, une association artéfactuelle de polysomes aux membranes d'une association faible, ayant une fonction biologique. La répartition du RNA entre les différentes fractions de polysomes isolées dans le présent travail est tout à fait en accord avec de nombreux travaux

antérieurs (voir Chapitre III). Ceci ne permet pas, cependant, d'éliminer la possibilité que dans les conditions ioniques classiques (que nous avons utilisées), des polysomes "libres" in vivo soient trouvés associés aux membranes. Lors de la mise au point des techniques de fractionnement cel--lulaire que nous avons décrit dans le chapitre III, nous avons mesuré la contamination en polysomes libres des fractions de membranes par cen--trifugation de celles-ci en métrizamide, mais également en utilisant un "marqueur interne" de polysomes libres radio-actifs (résultats non présen--tés). Cette dernière technique peut donner des résultats variables selon La manière dont l'expérience est conduite, mais nous avons pu constater que même dans les conditions les plus défavorables (radio-activité spéci--fique des polysomes introduits peu importante ; introduction de ceux-ci avant l'homogénéisation), la fraction C, contient toujours moins de 10% de la radio-activité initialement ajoutée, tandis que la fraction C en contient moins de 3%. Il est donc peu probable que l'observation du produit c dans les produits synthétisés à partir du RNA de ces deux frac--tions soit le reflet d'une contamination par des polysomes libres.

Un modèle d'association des polysomes aux membranes dans lequel les chaînes peptidiques en cours de synthèse croissent à la face cytoplasmique des membranes a été proposé pour les tissus non secréteurs (voir Introduction, Figure 1, p. 6). Cependant, aucun argument expéri--mental n'a permis, jusqu'à présent de supposer l'existence d'un tel modèle dans l'hépatocyte de Rat. Dans le cas particulier de la protéine étudiée dans ce travail, l'association polysome-membrane n'aurait aucune fonction réelle, ou n'aurait qu'une fonction obscure, si le même mRNA était traduit simultanément sur les membranes et dans le cytoplasme.

Il nous paraît donc raisonnable de proposer, comme alterna--tive à l'hypothèse discutée plus haut (hypothèse 3), l'hypothèse selon laquelle le mRNA codant pour le produit c est associé transitoirement aux membranes. Après que la synthèse de la protéine ait été induite sur quelques ribosomes, le polyribosome deviendrait libre dans le cytoplasme.

Mais quelle que soit l'interprétation exacte de la synthèse du produit c par les fractions de polysomes libres et liés aux membranes des fractions C_1 et C_{11} , l'ensemble des résultats que nous avons obtenus montre que les contenus en mRNA des différentes fractions de polysomes que nous avons isolées diffèrent d'un point de vue qualitatif et quanti--tatif. La majeure partie de la biosynthèse de l' α -L fucosidase est

effectuée par les polysomes liés au réticulum endoplasmique, mais les poly--somes libres participent également à cette synthèse.

D- CONCLUSION

L'étude de la biosynthèse de l' α -L fucosidase lysosomale fait apparaître clairement que l'échantillon de réticulum endoplasmique clas--siquement isolé d'un surnageant post-mitochondrial n'est pas représenta--tif de l'ensemble du réticulum endoplasmique de la cellule. Des méthodes améliorées de fractionnement cellulaire permettant de considérer la quasitotalité du réticulum endoplasmique font entrevoir que le contenu en mRNA des différentes fractions de réticulum endoplasmique peut différer d'un point de vue qualitatif et quantitatif. L'étude d'un nombre accru de pro--téines données devrait permettre de préciser l'importance de l'hétéro--généité fonctionnelle du réticulum endoplasmique.

D'une manière analogue, il semble souhaitable que l'étude des liaisons des polysomes aux membranes soit envisagée pour des mRNAs déterminés. Ainsi, les données obtenues pour la fucosidase montrent qu'un mRNA donné peut être présent à la fois dans les polysomes libres et dans les polysomes liés aux membranes. Des expériences ultérieures devraient permettre de préciser dans quelle mesure ces résultats traduisent l'exis--tence d'une fonction particulière de l'association polysome-membrane.

CHAPITRE V

MATERIEL ET METHODES

A- GENERALITES

Toutes les solutions sont préparées en utilisant de l'eau bidistillée stérile. Pour toutes les expériences dans lesquelles les polysomes sont isolés, la verrerie est immergée dans la soude alcoolique pendant 3 à 4h, rincée à l'eau désionisée, et stérilisée pendant un minimum de 2h dans une étuve stabilisée à 200°C. Les instruments métalliques ainsi que les tubes en matière plastique sont nettoyés dans le SDS à 5% et rincés successivement par du méthanol et de l'eau bi-distillée stérile.

B- INCORPORATION DE RADIOISOTOPES <u>IN VIVO</u>

1º- RNA

Les doses injectées sont généralement de 1mCi d'acide oroti--que ¹⁴C/Kg (34mCi/mmole) ou de 5mCi d'acide orotique ³H/Kg (27Ci/mmole).

a- Marquage long

L'animal est sacrifié 16-20h après avoir reçu l'injection intrapéritonéale de l'isotope à moins qu'il ne soit nécessaire d'obtenir une plus forte radio-activité spécifique des polysomes (voir légendes des figures). Dans ce cas, la durée du marquage peut être prolongée jusqu'à 2 à 3 jours.

b- Marquage préférentiel du rRNA

Après 16h de marquage, on injecte une quantité d'acide

orotique non radio-actif 10 fois supérieure à la dose reçue précédemment. Les animaux sont sacrifiés 2h après cette injection.

c- Marquage court et marquage spécifique du mRNA

La durée du marquage peut être réduite à 10mn (rats de 80g) ou 20mn (rats de 120g) pour obtenir un marquage préférentiel des mRNAs. Il faut remarquer cependant que dans ces conditions, la radio-activité spé--cifique du mRNA des polysomes liés demeure faible. Aussi, dans certaines expériences (voir légendes des figures) nous avons appliqué la méthode consistant à inhiber, préalablement à l'injection de l'isotope, la syn--thèse des rRNAs (129). Une injection intrapéritonéale d'actinomycine D (très précisément 0,55mg/Kg) est suivie 2h30 plus tard par celle de l'isotope (5mCi d'acide orotique ³H/kg). L'animal est sacrifié 2 à 4h après la dernière injection.

2°- Protéines

Le marquage des chaines protéiques naissantes est obtenu par injection intrapéritonéale de 1mCi/Kg de leucine ³H (100Ci/mmole). Le temps de marquage est de 10mn pour un rat de 100g.

3° - Phospholipides membranaires

La choline ¹⁴C (20mCi/mmole) est utilisée pour marquer les phospholipides membranaires. Le sacrifice a lieu 2 à 4h après l'injection intrapéritonéale de l'isotope (dose : 0,1mCi/Kg).

C- FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Toutes les opérations sont effectuées à 0--2°C

l°- Techniques conventionnelles

a- Isolement d'un surnageant post-mitochondrial (SPM)

Des rats mâles de souche Sprague-Dawley, pesant 100 à 120g, sont sacrifiés par décapitation et leur foie rapidement prélevé est plongé dans le milieu d'homogénéisation (0,255 T₅₀K₂₅M₅d₁) préalablement refroidi à 0°C. Les foies sont rincés dans le même milieu, lavés et séchés sur de la gaze stérile. Ils sont ensuite broyés dans une presse de tissu et homo--généisés dans 5 volumes de milieu dans un appareil de POTTER-ELVEHJEM (8 allers-retour de piston, jeu de 0,15mm à 0°C, 1 000t/mn).

L'homogénat filtré sur gaze est centrifugé à 9 000g_{av} pendant 10mn dans le rotor 60 Ti. Le SPM est prélevé à l'aide d'une seringue.

b- Polysomes libres

Le SPM est déposé par fractions de 15ml sur des gradients discontinus de saccharose composés de 6ml de 2S, 8ml de 1,38S et 4ml de 0,5S. Toutes ces solutions contiennent $T_{50}K_{25}M_5d_1$ et 50 µg/ml de protéines de la fraction d'inhibiteur de RNase. Les tubes sont centrifugés pendant 20h à 113 000g_{max} dans le rotor 60 Ti.

c- Fraction d'inhibiteur cytoplasmique de RNase

Un SPM filtré sur laine de verre, est centrifugé à 176 000g_{av} pendant 3h dans le rotor 60 Ti (45 000t/mn). Le surnageant est prélevé, dilué par 2 volumes de DTT 1mM et acidifié à pH 5,1 à 0°C par addition d'une solution d'acide acétique 0,5M. Après une 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 1M. Il est ensuite soumis à un fractionnement par le sulfate d'ammonium.

Le précipité contenant l'inhibiteur de RNase (40-60% de satu--ration) est dissous dans le tampon $T_{50}K_{25}M_5d_1$ et déposé sur une colonne de Sephadex G-25 fine (35cmx1cm; dépôt 5ml) préalablement équilibrée dans le tampon. La fraction exclue contient environ 50mg/ml de protéines. Elle est stockée par fractions de 1ml à -20°C après addition de 1 volume de glycérol.

2° - Fractionnement du tissu hépatique

a- Homogénat

Les foies lavés dans le milieu A (0,255 $Te_{20}K_{25}M_3$) sont séchés et broyés comme il a été décrit plus haut. La quantité de broyat désirée

(généralement 8g), introduite dans un homogénéiseur de DOUNCE est dissociée à l'aide d'une baguette de verre, puis homogénéisée par 6 à 7 allers-retour de piston lâche, suivis de 1 à 2 allers-retour de piston serré.

b- Fractionnement par centrifugation différentielle

Des parties aliquotes correspondant à 2g de foie sont intro--duites en tubes de rotor SW27-1. Dans le cas des données présentées dans le tableau 3 (p.47), la centrifugation est de 8mn à 2 000t/mn (5 900g_{max} xmn) ou de 8mn à 6 000t/mn (53 000g_{max}xmn) et les sédiments sont lavés deux fois de la manière suivante. Les surnageants sont aspirés avec pré--caution et remplacés par le même volume du milieu d'homogénéisation. Les tubes sont bouchés par du "Parafilm" et les sédiments sont resuspendus par inversion répétée du contenu du tube suivie de 2 à 3 secousses. La suspension est alors centrifugée comme précédemment.

Dans une série d'expériences (voir texte du Chapitre III et Tableau 4 p.51), les fractions NC_I, C_{II}L et PLS ont été préparées par centrifugation différentielle classique en utilisant les valeurs de $5 \ 900g_{max} xmn$ (2 000t/mn, 8mn ; 2 lavages du sédiment) et 200 $000g_{max} xmn$ (10 500t/mn, 10mn).

c- Fractionnement par la méthode des gradients discontinus

* Fractions NC_T et C_{TT}

Des fractions aliquotes de 8ml de l'homogénat en milieu A sont déposées sur 6ml de milieu A-D₂O (milieu A contenant 40% (V/V) de D₂O). Après une centrifugation de 10mn à 2 000t/mn dans le rotor SW27-1 (7 400g_{max}xmn) les surnageants sont prélevés (11ml par tube) et le sédi---ment est resuspendu comme décrit plus haut dans 5ml de milieu A. Les tubes sont à nouveau centrifugés 8mn à 2 000t/mn. Les surnageants sont aspirés et chaque sédiment est resuspendu dans 5ml de milieu A sous lesquels 4ml de milieu A-D₂O sont alors déposés à l'aide d'une seringue. Après une centrifugation de 10mn à 2 000t/mn, la fraction NC₁ a sédimenté et les surnageants rassemblés constituent le surnageant post-nucléaire (SPN).

Ce dernier est déposé par fractions de 13ml sur 1ml de milieu A-D₂O et centrifugé pendant 20mn à 3 000t/mn (33 400g_{max}xmn) dans le rotor SW27-1. Le surnageant est décanté et le sédiment est resuspendu dans 5ml de milieu A. 12mn de centrifugation à 3 000t/mn (20 000g_{max}xmn) conduisent à l'obtention du sédiment C_{II} et le surnageant trouble et blan--châtre est décanté et joint au précédent. Cette étape de lavage permet de réduire de 50% l'activité phosphatasique acide de la fraction C_{II} en modi--fiant très peu son contenu en RNA puisque moins de 1% du RNA cellulaire sont présents dans le surnageant. Cependant, lorsqu'un second lavage est effectué, la quantité de phosphatase acide ne décroît plus de manière significative.

Le surnageant obtenu à ce stade est, pour des raisons de simplification, appelé SPM bien qu'il contienne encore environ 15% des mitochondries de l'homogénat. La fraction C_{II} est resuspendue dans le milieu A et mélangée à la fraction C_I (voir ci-dessous) pour être ana--lysée.

* SPL et fraction L

Des fractions de 28ml de SPN ou de SPM sont déposées sur 6ml de milieu B (0,255 Te₅) contenant 40% (V/V) de D₂O et centrifugées pendant 10mn à 11 000t/mn (225 000g_{max}xmn) dans le rotor SW27 pour donner la fraction C_{II}L ou la fraction L et le SPL. Lorsque l'ensemble du fractionnement est effectué, le SPM a une densité équivalente à celle du saccharose 0,45M environ.

* Fraction N et CT

Chaque sédiment NC_I (provenant de 2g de foie) est repris dans 3,3ml de milieu A et transféré dans un erlenmeyer taré. Le récipient est soumis à une rotation vigoureuse sur la glace pilée et son contenu est pesé (5,2g environ) avant d'ajouter 13,1g de 2,5S $Te_{50}K_{25}M_5$. On mélange à nouveau par un mouvement rotatif. La suspension finale a un volume de 15ml et une concentration en saccharose de 1,75M.

Des fractions de 12ml sont déposées sur 1,5ml de 2S $Te_{50}K_{25}M_5$ et recouvertes de 3ml de 1,6S $Te_{50}K_{25}M_5$ et 0,5ml de milieu A. Les tubes sont centrifugés à 25 000t/mn pendant 25mn dans le rotor SW27-1. Les hématies (flottant sur le 1,6S) sont prélevées puis la fraction C_I est aspirée. Les noyaux (interphase inférieure, saccharose 2M et sédiment) sont joints aux hématies pour constituer la fraction N. La fraction C est

définie comme l'ensemble des fractions C_{T} et C_{TT} .

d- Préparation des polysomes

* Préparation du cytosol

Celui-ci est préparé à partir de rats mâles Sprague-Dawley de 3 mois (200-250g). Les foies sont broyés et homogénéisés comme il est décrit dans le paragraphe 2_a dans 2 volumes de milieu B contenant 1mM de DTT. L'homogénat est centrifugé pendant 10mn à 16 000t/mn dans le rotor JA-20 de la centrifugeuse J 21B. Le surnageant filtré sur laine de verre est centrifugé pendant 2h à 60 000t/mn (ou l'équivalent en gxmn) dans le rotor 60 Ti. Le surnageant final est aspiré, filtré sur Millipore (taitle des pores : 0,45µm) et ses concentrations ioniques sont alors ajustées à $T_{50}K_{25}M_5d_1$.

* Préparation des fractions subcellulaires

Elle est effectuée exactement comme il est décrit dans le paragraphe 2_c, à partir de rats mâles pesant 100-120g, à ceci près que les solutions contiennent 1mM de DTT et 2mg/ml de RNA de levure purifié et que la Triéthanolamine est remplacée par le Tris. Lors de l'isolement de la fraction C_I, les sédiments sont repris dans 3,3ml de cytosol avant d'ajouter le saccharose 2,5M.

* Purification partielle des membranes du SPL

Dans une série d'expériences décrites dans le chapitre III, les membranes du SPL ont été partiellement purifiées en déposant des frac--tions de 27ml de SPL sur des gradients discontinus composés de 1ml de 1,8S, 2ml de 1,6S, 2ml de 1,5S, 1ml de 1S et 1ml de 0,5S. Toutes ces solu--tions sont obtenues par dilution d'une solution mère 2,5S T₅₀K₂₅M₅d₁ et contiennent 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire.

Les tubes sont centrifugés dans le rotor SW27 (en utilisant le taux d'accélération maximum de la centrifugeuse L5 65B) pendant très exactement 9mn dès que la vitesse de 26 500t/mn est atteinte. La centrifu--gation est alors arrêtée en utilisant le frein.

Le surnageant est aspiré à la seringue, en laissant les

coussins de saccharose dense (7ml) dans le tube. Ceux-ci sont transférés, après une agitation douce, dans une éprouvette et les parois du tube sont rincés par 1 à 2ml de T₅₀K₂₅M₅d₁ en évitant la resuspension du sédiment de glycogène. La fraction de membranes ainsi obtenue contient environ 12% de l'activité glucose 6-phosphatasique de l'homogénat et 11 à 12% du RNA cel--lulaire (données de 2 expériences effectuées en omettant l'introduction de RNA de levure dans les solutions). 30% du RNA de la fraction sont sédi--mentables. L'analyse des fractions en gradient de métrizamide montre que 55 à 60% du contenu en polysomes libres du SPL sont laissés dans le surna--geant. L'observation au microscope électronique indique que le surnageant contient des polysomes libres, du réticulum agranutaire et des dérivés de l'appareil de Golgi ; quelques fragments de réticulum endoplasmique granu--laire de très petite taille sont aussi détectés.

* Séparation des polysomes libres et liés du SPL

La concentration en KCL du SPL est ajustée à 70mM et des fractions de 15mL sont déposées sur des gradients discontinus composés de 2ml de 2,2S, 4ml de 2S, 1ml de 1,8S, 1ml de 1,6S, 3ml de 1,38S et 4ml de 15. Ces solutions sont obtenues par dilution d'une solution de 2,55 et contiennent T₅₀K₇₀M₅d₁, 2mg/ml de RNA de levure purifié et 2mg/ml de pro--téines de la fraction cytosol. Après 30mn de centrifugation à 27 000t/mn dans le rotor SW27, les 15ml supérieurs (contenant les polysomes libres de petite taille) sont aspirés et remplacés par un volume identique de tampon. Les tubes sont alors bouchés, et recentrifugés pendant 3h30 à 45 000t/mn dans le rotor 60 Ti. les 5,7ml inférieurs, contenant les poly--somes libres, sont collectés après avoir percé le fond du tube, en les déplaçant par un même volume d'huile de paraffine. Ils sont joints à la fraction prélevée lors de la première centrifugation. Les 10ml suivants, contenant les membranes purifiées sont traités par un détergent comme il est décrit plus loin. Les polysomes libres sont ensuite purifiés par cen--trifugation sur 8ml de 1,3S $T_{50}K_{25}M_5d_1$ (contenant 2mg/ml de RNA de Levure purifié et 2mg/ml de protéines de la fraction cytosol) et 6ml de 2S $T_{50}K_{25}M_5d_1$ pendant 15h à 55 000t/mn dans le rotor 60 Ti.

* Traitement des membranes par les détergents

Les membranes partiellement purifiées équivalant à 2g de foie sont ajustées en $T_{50}K_{25}M_{50}d_1$, dans un volume final de 18ml. Elles
contiennent également 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire et 2mg/ml de protéines de la fraction cytosol. 0,11 volumes de Triton X-100 à 20 p100 sont alors ajoutés et la suspension est clarifiée par inversion répétée. Par analogie avec le traitement de la fraction C (voir ci-dessous), 0,3 p100 de DOC sont ensuite additionnés bien que ceci ne soit pas absolument nécessaire (voir Chapitre III). Des parties aliquotes de 4,5ml sont dépo--sées sur 3ml de 1,35 $T_{50}K_{25}M_5d_1$ contenant 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire et 2mg/ml de protéines du cytosol et 3ml de 25 $T_{50}K_{25}M_5d_1$ contenant 2mg/ml de protéines du cytosol. Les gradients sont centrifugés pendant 20h à 50 000t/mn dans le rotor 50 Ti.

Les polysomes des fractions de membranes purifiées sont isolés de la même manière, à ceci près que la concentration en KCl est de 70mM. Les membranes traitées par les détergents sont déposées par frac--tions de 18ml (équivalent de 1g de tissu) sur 8ml de 1,3S $T_{50}K_{25}M_5d_1$ (2mg/ml de RNA de levure, 2mg/ml de protéines du cytosol) et 6ml de 2S $T_{50}K_{25}M_5d_1$ (2mg/ml de protéines du cytosol). Les tubes sont centrifu--gés pendant 15h à 55 000t/mn dans le rotor 60 Ti. Dans certaines expé--riences (voir Chapitre III), la fraction brute de polysomes libres a été traitée et purifiée de la même manière.

* Isolement des polysomes de la fraction C

Pour une partie aliquote de 4ml de fraction C (équivalant à 0,5g de foie), on ajoute 0,5ml de $T_{50}K_{25}N_{1500}M_5$ puis 0,2ml de KCl 2M et la suspension est agitée par inversion. Le processus d'agitation est ensuite répété après chacune des additions suivantes : 0,3ml de Mg $(CH_3COO)_2$ 0,833M, 0,6ml de Triton X-100 à 20 p100, 0,14ml de DOC à 20 p100. Les polysomes sont purifiés sur 3ml de 1,3S $T_{50}K_{25}N_{150}M_5d_1$ contenant 2mg/ml de RNA de levure et 2mg/ml de protéines du cytosol et 3ml de 2S $T_{50}K_{25}M_5d_1$ contenant 2mg/ml de protéines du cytosol. La centrifugation est de 20h à 50 000t/mn dans le rotor 50 Ti.

* Polysomes liés à la membrane nucléaire

40g de foie broyé sont homogénéisés dans 160mL de milieu A contenant 2mg/mL de RNA de levure purifié. L'homogénat est centrifugé pen--dant 8mn à 1 500t/mn dans le rotor JA-20. Les sédiments sont remis en suspension dans le milieu A et lavés 2 fois dans le volume initial. Ils sont alors réunis dans un volume de 30ml et l'on ajoute 70ml de 2,5S $T_{50}K_{25}M_5d_1$. Des fractions de 25ml sont déposées sur 12ml de 2,3S $T_{50}K_{25}M_5d_1$ et centrifugées pendant 2h à 27 000t/mn dans le rotor SW27. Les noyaux sont mis en suspension et dilués par 65ml de 0,25S $T_{50}K_{25}M_5d_1$ contenant 15ml de cytosol. La concentration en Mg^{*+} est ajustée à 50mM et on ajoute 2mg/ml de RNA de bas poids moléculaire. La suspension est alors traitée par le Triton X-100 à 0,2 p100 et les noyaux sont sédimentés dans le rotor SW27 pendant 10mn à 25 000t/mn. Les surnageants sont décantés et les polysomes sont purifiés comme il a été décrit plus haut pour les fractions isolées à partir du SPL.

* Polysomes de l'homogénat non fractionné

Ceux-ci sont préparés comme il est décrit dans la légende de la figure 30 (p.80).

D- EXTRACTION DU RNA

Le RNA polysomal est extrait par la méthode de PERRY et al (130). Les polysomes sont resuspendus dans le tampon Tris-acétate 10mM. pH 7,4, NaCl 150mM, EDTA 2mM, SDS 0,5 p100. 10ml de suspension sont agités pendant 5mn à température ambiante avec 20ml de mélange de phénol et de chloroforme (V/V) saturé en tampon acétate de sodium 10mM, pH 6, NaCl 100mM, EDTA 2mM. Après une centrifugation de 10mn à 10 000g, la phase aqueuse est prélevée et le RNA contenu dans la phase phénolique et l'interphase est extrait à nouveau par 10ml du tampon acétate et 10ml de chloroforme. Les phases aqueuses sont réunies et agitées à nouveau avec 10ml de mélange phénol-chloroforme. La phase aqueuse est prélevée et le RNA est précipité par addition de 2 volumes d'éthanol contenant 4 p100 (V/V) d'acétate de sodium 0,5M pH 6. Après 15 à 20h à -20°C, le précipi--té est lavé 2 à 3 fois dans l'éthanol à 75 p100 contenant de l'acétate de sodium 0,1M, puis séché sous un courant d'azote et solubilisé dans le tampon acétate 10mM pH 6, NaCl 0,1M, EDTA 1mM, sarcosinate de sodium 0,1 p100 pour être analysé sur gradient linéaire de saccharose (5-20 p100) préparé dans le même tampon.

Un protocole identique est suivi lorsque l'ARN est extrait à partir des polysomes pour être traduit dans le système de réticulocytes,

à ceci près que l'extraction est effectuée en présence de Tris-acétate 0,1M, pH 9, acétate de sodium 0,1M, EDTA 2mM. Le précipité éthanolique est lavé 2 à 3 fois dans l'acétate de sodium 3M pH 6 puis dans l'alcool à 70 p100 contenant de l'acétate de sodium 0,1M. Il est séché sous azote et solubilisé dans le tampon Tris-acétate 5mM pH 7,6 avant d'être stocké dans l'azote liquide.

E- PREPARATION DE RNA ³H DE BAS POIDS MOLECULAIRE

Celui-ci est obtenu à partir de cellules KB cultivées pendant 20h en présence de 0,5mCi d'uridine 3 H/lifre de milieu. Les cellules lavées dans le milieu de Eagle sont resuspendues dans 10 volumes de Tris-HCl 10mM, pH 7,4, NaCl 10mM, MgCl₂ 1mM. Après 10mn à 0°C, les cellules sont rompues dans un homogénéiseur de DOUNCE, par 10 allers-retour de piston serré. Le surnageant post-nucléaire (6 400gxmn) est déposé sur les gradients discon--tinus composés de 2mL de 1,8S et 1mL de 15 (Tris-HCl 10mM pH 7,4, NaCl 10mM, MgCl₂ 1mM) et centrifugés pendant 2h à 50 000t/mn dans le rotor 50 Ti. Le RNA des sédiments de polysomes est extrait par la méthode de PERRY <u>et al</u> (voir paragraphe D). Il est ensuite solubilisé dans le tampon T₅, pH 7,4 (20U A₂₆₀ de RNA par ml) et hydrolysé par la RNase pancréatique (0,1µg/ml) pendant 10mn à 37°C et extrait une nouvelle fois comme précédem-ment.

La radio-activité spécifique du RNA final est de 15x10⁴ cpm/U A₂₆₀. Son utilisation dans un système du type de celui décrit par SHORTMAN (131) permet de détecter les activités nucléasiques dans des frac--tions subcellulaires contenant du RNA et/ou une quantité importante de composés absorbant l'UV et solubles dans l'éthanol/HCL (voir légende de la Figure 20). Lorsqu'il est réincubé en présence de 0,1µg/ml de RNase pan--créatique à 37°C, la radio-activité libérée dans le surnageant éthanol/HCL est une fonction linéaire du temps, et ceci même pour les temps inférieurs à 5mn.

F- CENTRIFUGATION EN GRADIENTS DE DENSITE

1°- Centrifugation de zone en gradient de saccharose

Les polysomes sont analysés en gradient exponentiel convexe 15-26 p100 (p/p) de saccharose $(T_{50}K_{25}M_5)$ d'un volume de 12,5ml. Les gra--dients sont obtenus en utilisant un dispositif du type de celui décrit par NOLL (132). Le volume de mélange est de 11ml. Les tubes sont centrifugés pendant 45mn à 35 000t/mn à 2°C. Le fractionneur de gradient ISCO 614 et l'absorptiomètre UA5 permettent d'enregistrer la densité optique à 254nm en continu.

Dans certaines expériences (voir Chapitre I et II) nous avons utilisé des gradients linéaires de saccharose, formés dans un appareil du type de celui décrit par BRITTEN et ROBERTS. Ces gradients sont fraction--nés manuellement après avoir percé le fond des tubes. Les détails parti--culiers à chaque expérience sont donnés dans les légendes des figures.

2° - Centrifugation isopycnique

a- CsCl

L'analyse des particules RNP en gradients de CsCl est effectuée selon la méthode de BALTIMORE et HUANG (133). Les échantillons à analyser sont préparés dans des solutions tamponnées par la Triéthanolamine-HCl. Ils sont fixés par la glutaraldéhyde (concentration finale 5 p100) à 0°C et 0,2ml sont déposés immédiatement sur des gradients linéaires préformés de CsCl (volume : 3,8ml ; densités extrêmes : 1,38-1,63g/cm³). Après une centrifugation de 8-12h, des fractions de 0,1ml sont collectées et l'indice de réfraction des fractions est mesuré, ainsi que leur radio-activité acido-insoluble (voir paragraphe M).

b- Métrizamide

Les analyses sont effectuées sans fixation préalable du maté--riel biologique dans les conditions décrites dans les légendes des figu--res. Le gradient 20-60 p100 de métrizamide possède des densités extrêmes de 1,10 et 1,32g/cm³. La mesure de l'indice de réfraction des fractions permet de déterminer la densité des particules dans le gradient au moyen de la formule suivante :

$$\rho_{5^{\circ}C}$$
 = 3,453 $\eta_{20^{\circ}C}$ - 3,601

Lors de certaines expériences, une estimation de la quantité de glycogène contenue dans les fractions a été effectuée. L'élimination

de la métrizamide est alors obtenue de la manière suivante : l'échantillon à doser est additionné de 9 volumes d'éthanol absolu et les tubes sont placés à -20°C pendant 2h. Ils sont ensuite centrifugés à basse vitesse et les sédiments sont lavés 2 à 3 fois par de l'éthanol à 75 p100.

G- METHODES D'ANALYSE ET DE DOSAGE

1°- Dosage du RNA

Des fractions aliquotes contenant au maximum 1mg de RNA sont additionnées de 1 volume de PCA N stabilisé à O°C. On centrifuge immédia--tement 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 pen--dant 1h à 37°C, la réaction est stoppée par addition de 0,5ml de HCl 4N et les tubes sont centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment. Les sédiments sont conservés pour le dosage du DNA (voir paragraphe sui--vant).

Les ribonucléotides présents dans le surnageant sont dosés par colorimétrie par le réactif de BIAL à l'orcinol chlorhydrique en pré--sence de CuCl₂. A 2ml d'hydrolysat sont ajoutés 2ml de réactif (500mg d'orcinol, 7mg de CuCl₂, 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 mesure de l'absorbance à 665nm. Des RNAs purifiés de foie de rat servent de référence.

2°- Dosage du DNA

Celui-ci est réalisé selon la méthode de GILLES et MYERS (134) sur les échantillons ayant subi l'hydrolyse alcaline (voir dosage du RNA).

Les sédiments sont hydrolysés 2 fois par 1ml de PCA 10 p100 pendant 20mn à 70°C (\pm 1°C). 1ml d'hydrolysat est mélangé à 2ml de réactif à la diphénylamine (DPA) (1g DPA, 40ml d'acide acétique glacial, 1ml d'H₂SO₄ concentré, H₂O qsp 50ml). On ajoute 0,1ml d'une solution de paral--déhyde (0,156ml de paraldéhyde, H₂O qsp 100ml). Les tubes sont bouchés et après 24h à température ambiante, la densité optique est mesurée à 600nm. Du DNA de thymus de veau (dans lequel l'absence de protéines a été contrôlée préalablement par un dosage selon LOWRY <u>et al</u> (135) sert de référence.

3°- Dosage des protéines

Celui-ci est effectué selon la méthode de LOWRY <u>et al</u> (135) en utilisant la sérumalbumine bovine comme référence.

Dans le cas particulier des préparations d' α -L fucosidase, la quantité de protéines est déterminée par fluorimétrie après réaction avec la fluorescamine.

4°- Mesure de l'activité des enzymes marqueurs

Les dosages sont effectués sur des fractions fraîchement iso--lées en prenant soin que l'activité mesurée soit proportionnelle à la concentration en enzyme.

a- Glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9) (réticulum endoplasmique)

Nous utilisons la méthode de BEAUFAY et al (136).

La fraction à doser est incubée dans un volume final de 400µl en présence d'imidazole-HCl 20mM pH 6,5, d'EDTA 1mM et de glucose-6P 40mM pendant 30mn à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 1ml de TCA à 10 p100 stabilisé à 0°C et les tubes sont centrifugés à basse vitesse. Le phosphate inorganique est déterminé selon la technique de FISKE et SUBBAROW (137). Les unités d'activité glucose-6-phosphatasique sont expri--mées en µ moles de phosphate inorganique libérées par mn.

b- Phosphatase acide (EC 3.1.3.2) (lysosomes)

L'activité est mesurée selon la méthode de WATTIAUX et DE DUVE (138). 0,1ml de fraction cellulaire sont incubés pendant 30mn à 37°C en présence de 0,9ml de β -glycerophosphate de sodium 50mM dans le tampon acétate de sodium 50mM pH 5 contenant 0,07 p100 de Triton X-100. La réac--tion est arrêtée par addition de 1ml de TCA 10 p100.

Les tubes sont centrifugés à basse vitesse et la quantité de

phosphate inorganique est déterminée dans le surnageant comme pour la glucose-6-phosphatase. Les unités d'activité sont exprimées en µ moles de phosphate inorganique libérées par mn.

c- Monoamine oxydase (EC 1.4.3.4) (membrane externe des mitochondries)

Le dosage de cet enzyme est effectué selon la méthode de STAHN <u>et al</u> (139) et fait intervenir la transformation de la benzylamine en benzaldéhyde. La quantité de benzaldéhyde formée est déterminée par mesure de la densité optique à 250nm. 0,2ml de fraction cellulaire sont incubés en présence de 0,2ml de tampon phosphate de potassium 0,2M, pH 7,5, et de 0,2ml de benzylamine-HCl 0,1M. Après une incubation de 30mn à 37°C sous agitation, la réaction est arrêtée par refroidissement dans un bain de glace et addition de 0,2ml de TCA 15 p100. Les tubes sont centrifugés et la densité optique des surnageants est mesurée. Les résultats d'activité sont exprimés en n moles de benzylamine hydrolysées par mn.

d- Cytochrome c oxydase (EC 1.9.3.1) (membrane interne des mitochondries)

Des échantillons de 0,1ml de fractions subcellulaires sont additionnés à 3ml de cytochrome c 44 μ M (réduit par l'hyposulfite de so--dium) dans le tampon phosphate 30mM pH 7,4. L'activité est mesurée à température ambiante par la perte d'absorbance du cytochrome c à 550nm et les résultats sont exprimés en μ moles de cytochrome c oxydé par mn en utilisant un coefficient d'extinction de 18,5mM⁻¹ cm⁻¹

e- Catalase (EC 1.11.1.6) (peroxysomes)

Des parties aliquotes des fractions subcellulaires sont diluées par 4 volumes d'une solution contenant 5 p100 de Triton X-100, 1,65 p100 de serumalbumine bovine, 10 p100 de NaCl. 100µl de la fraction diluée sont incubés à 0°C avec 0,5ml de la solution de substrat (0,07ml d'imidazole-HCl 33mM, pH 7, 100µl de H_2O_2 à 110 volumes, H_2O qsp 100ml). Après 5mn la réac--tion est arrêtée par addition de 2ml d'une solution de TiOSO₄ (3,375g de TiOSO₄ sont ajoutés à 500ml d' H_2SO_4 2N bouillant ; le mélange est filtré sur papier Whatman 42 et le filtrat est dilué avec un volume égal d' H_2SO_4 2N). La quantité de TiOSO₄ non oxydé restant est déterminée par mesure de la densité optique à 405nm, en prenant pour référence une gamme étalon obtenue avec l' H_2O_2 à concentration variable.

L'unité d'activité est définie comme étant la quantité d'enzyme qui provoque la diminution d'une unité par mn du \log_{10} de la concentration en H₂O₂ dans un volume de 50ml.

f- Uricase (EC 1.7.3.3) (peroxysomes)

L'activité de cet enzyme est dosée par la méthode de REID (140) A 1ml de suspension cellulaire on ajoute successivement 1ml de tampon phos--phate de potassium 5mM, pH 7,4, contenant 0,2 p100 de Triton X-100, et 1ml d'une solution d'urate de sodium ($86\mu g/ml$) dans le même tampon. La variation de densité optique à 260nm est suivie pendant 5mn à température ambiante, et les résultats sont exprimés en μ moles d'acide urique hydro--lysées par mn.

H- SYSTEME ACELLULAIRE DE RETICULOCYTES DE LAPIN

Celui-ci est préparé à partir de lapins blancs néozélandais pesant 2,5kg, anémiés selon la technique décrite dans la référence (141). Le sang est prélevé par ponction cardiaque, au moyen d'une seringue de 50ml contenant 750 UI d'héparine, et immédiatement refroidi à 0°C. Après filtration sur gaze, les réticulocytes sont sédimentés (500g ; 10mn ; rotor JA-20) et relavés dans un milieu contenant NaCl 130mM, MgCl, 7,4mM, KCl 5mM. La suite du protocole est exactement celle décrite par PELHAM et JACKSON (113). Les cellules sont lysées par addition d'un volume d'eau stérile et centrifugées pendant 15mn à 15 000t/mn dans le rotor JA-20. Le lysat est ensuite incubé pendant 15mn à 20°C dans les conditions finales suivantes : créatine kinase 40µg/ml, hème 20 µM, créatine phosphate 10mM, chacun des 19 acides aminés (sauf méthionine) 0,05mM, KCL 100mM, Mg (CH₃COO)₂ 0,5mM, CaCl₂ 1mM, nucléase de Micrococcus 9µg/ml. L'incubation est stoppée par refroidissement à 0°C, et l'on ajoute de l'EGTA 0,1M, pH 7,4, pour obtenir 2mM final. Le lysat ainsi traité est stocké par fractions de 0,5ml dans l'azote liquide. Au moment de l'emploi, on ajoute à 100µl de lysat 6µl de méthionine 35 S (1 000Ci/mmole), 4µl de tRNA de germe de blé à 5mg/ml et 10 μ l de RNA (1 U A $_{260}$). La radio-activité in--corporée est proportionnelle à la quantité de RNA jusque 1,5 U A_{260} pour

100µl de lysat. L'incubation est de 1h à 30°C.

I- PURIFICATION DE L' α -L FUCOSIDASE DU FOIE DE RAT

250 à 500g de foie provenant d'un lot de rats de même sexe sont homogénéisés dans 3 volumes de milieu A et l'homogénat est dilué pour obte--nir une concentration de 16 p100. Une fraction NC_I est préparée par cen--trifugation dans le rotor JA-14 de la centrifugeuse J-21B, puis une frac--tion C_{II}L dans le rotor JA-10. Celle-ci est lavée une fois dans le milieu 0,255 Te₅K₂₅E₂ (6mL/g de foie). Elle est réhomogénéisée dans le tampon maléate 10mM, pH 6, MgSO₄ 1mM, β -mercaptoéthanol 1mM (1,4mL/g de tissu) par 20 allers-retour de piston serré dans un homogénéiseur de DOUNCE. La suspen--sion est centrifugée à 40 000g_{max} pendant 20mn. 85 à 90% de l'activité enzymatique de la fraction C_{II}L initiale sont obtenus dans le surnageant. Les opérations suivantes sont exactement celles décrites par OPHEIM et TOUSTER (120)

Le surnageant est décanté et soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium (63% de saturation à pH 6) à 0-2°C. Le sédiment obtenu est dissous dans le tampon maléate 10mM, MgSO₄ 1mM, β -mercaptoéthanol (67µL/g de foie) et déposé sur une colonne de Sepharose-4B (10-15ml de gel ; seringue de 50ml) conectée à une colonne composée de 3ml de Biogel P10, recouverts par 6ml d'Agarose- ϵ -aminocaproyl-fucosylamine (seringue de 10mL) ; les 2 colonnes sont stabilisées dans le tampon maléate 10mM, pH 6, NaCl 0,7M, MgSO₄ 1mM, β -mercaptoéthanol 1mM (tampon HFI). La colonne de Sepharose 4B est lavée par 30mL de cette solution et les 2 colonnes sont déconnectées. Le support d'affinité est ensuite lavé par 200ml de tampon HFI, puis par 40ml de maléate 10mM, pH 6, NaCl 0,15M, MgSO₄ 1mM, β -mercap--toéthanol 1mM (tampon BFI). L'enzyme est ensuite élué par 20ml de fucose 0,1M dans le tampon BFI.

Pour la mesure de l'activité de l' α -L fucosidase, 0,1ml de fraction à doser sont additionnés de 0,4ml de paranitrophenyl- α -L fucopy--rannoside 2mM dans le tampon acétate 62,5mM, pH 6, contenant 250µg/ml de sérumalbumine bovine. Lorsqu'il s'agit de fractions purifiées, la réac--tion est arrêtée par 0,5ml de tampon alcalin (glycine 0,133M, NaCl 67mM, Na₂CO₃ 83mM, ajusté à pH 10,7 avec NaOH) et la densité optique à 400nm est mesurée contre un témoin non incubé. Dans le cas de fractions brutes, la réaction est arrêtée par addition de 0,1ml de TCA 20 p100 et une partie aliquote de l'acido-soluble est ensuite additionnée de 1 volume du réactif alcalin.

L'enzyme est ensuite chromatographié sur une colonne de Sepha--dex G-200 (40cmx2,2cm ; débit : 7ml/h) stabilisée dans le tampon EDTA 20mM, pH 6, MgSO₄ 1mM, β -mercaptoéthanol 1mM. Les fractions possédant le maximum d'activité sont rassemblées et centrifugées dans le rotor 60 Ti pendant 12h à 60 000t/mn à 2°C.

J- PREPARATION D'ANTICORPS ANTI α -L FUCOSIDASE

1º- Obtention des antisérums

Nous avons utilisé la méthode de VAITUKAITIS <u>et al</u> (121). A 400µg d'enzyme purifié dissous dans 2ml de NaCl 0,15M, on ajoute 10mg de Bacillus butyricum lyophilisé et 2ml d'adjuvant complet de FREUND. Le mélange est agité très vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une émulsion stable.

Des lapins néozélandais de 2,5 à 3Kg dont la fourrure a été rasée sur toute la région dorsale, reçoivent chacun 2ml d'émulsion (soit 200µg d'enzyme) en 40 à 50 injections par voie intradermique, puis 1ml de vaccin anticoquelucheux Perthydral (Institut Pasteur) par voie souscutanée dans la cuisse. Après 3 semaines, des prélèvements de sang sont effectués chaque semaine et la présence d'anticorps est contrôlée par la méthode d'immunodiffusion d'OUCHTERLONY.

2°- Purification des IgG

a- Précipitation par le sulfate d'ammonium

La manipulation est effectuée à 0-2°C. Le sérum est dilué par 1 volume de tampon phosphate 10mM, pH 7,2, NaCl 15mM (tampon PS). On ajoute une solution 3,8M de $(NH_4)_2SO_4$ pour obtenir une concentration finale de 1,6M. Le précipité obtenu après centrifugation est dissous dans le tampon PS, le volume final de la solution étant égal à celui du sérum dilué. Une deuxième précipitation est effectuée de la même manière que précédemment. Le précipité est repris dans le tampon PS, le volume final de la solution étant égal à la moitié de celui du sérum initial. La solution est dialysée pendant 24h contre le tampon PS. L'insoluble est éliminé par centrifugation à basse vitesse et le surnageant est filtré sur Millipore (0,45µm).

b- Chromatographie sur DEAE et CM cellulose

Des colonnes d'un diamètre de 1,5cm, composées de 10cm de CM cellulose recouverts de 10cm de DEAE cellulose, sont utilisées. Elles sont stabilisées en tampon PS. Des parties aliquotes de 30ml sont chromatogra--phiées et la fraction non retenue est collectée. Celle-ci est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité (voir paragraphe J, 4°).

3°- Préparation des fragments Fab

Nous avons utilisé la méthode décrite par Mc LAUGHIN etPITOT (125). La fraction IgG est introduite dans un boudin de dialyse et concen--trée par l'aquacide II_a pour obtenir une concentration de 40mg de proté--ines par ml environ. La fraction est ensuite dialysée contre du tampon phosphate 0,1M, pH 7, contenant de la cystéine 10mM et de l'EDTA 2mM.

A 60mg de la fraction d'IgG purifiées, on ajoute 1,25mg (50µl) de papaine (Sigma ; 2 x cristallisée ; 21 U/mg). Après une incubation de 18h à 37°C, la solution est déposée sur une colonne de Sephadex G-25 (35cmx2cm) stabilisée dans le tampon acétate de sodium 0,1M, pH 5,5, à température ambiante. Les fractions possédant une absorbance à 280nm supé--rieure à 0,5 sont rassemblées, et déposées sur une colonne de carboxy--methyl cellulose (35cmx2cm) équilibrée en tampon acétate de sodium 0,1M, pH 5,5. Les protéines sont éluées par le même tampon en utilisant un débit de 20ml/h. La densité optique à 280nm de l'effluent est enregistrée en continu à l'aide d'un spectrophotomètre ISCO. Les fractions correspon--dant au premier pic sont rassemblées et le pH est ajusté à 7,2. La solu--tion de protéines est alors soumise à une précipitation par le sulfate d'ammonium (65% de saturation), et le précipité obtenu est solubilisé et dialysé contre du tampon phosphate 50mM (pH 7,6) contenant du NaCl 0,15M. La concentration finale des Fab est de 2mg/ml.

> 4°- Purification des IgG et des fragments Fab spécifiques de l' α -L fucosidase

Les IgG ainsi que les fragments Fab spécifiques de l' α -L fuco--sidase ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de Biogel P 300-fucosidase. Le Biogel P 300, préalablement gonflé dans l'eau distillée, est activé par la glutaraldéhyde à 5 p100 dans le tampon phos--phate 50mM, pH 7, pendant 15h à température ambiante. Le gel est lavé sur verre fritté par 20 volumes de tampon phosphate, puis par 100 volumes d'eau distillée.

150µg de fucosidase sont agités pendant 24h à 4°C avec 5ml de gel activé dans un volume final de 10ml en présence de tampon phosphate 50mM, pH 7,4, NaCl 0,15M. Le gel est ensuite agité pendant 12h dans l'étha--nolamine 1M, pH 7, avant d'être abondamment lavé par de l'eau distillée. Il est ensuite lavé alternativement par le tampon Tris-HCl 0,2M, pH 8, NaCl 0,5M et le tampon glycocolle 0,2M, pH 2,8, NaCl 0,5M (2 à 3 cycles). Il est enfin stabilisé dans le tampon phosphate 50mM, pH 7,4, NaCl 150mM, NaN₃ 3mM.

Les IgG ou Fab (environ 1mg) sont déposés sur 5ml de Biogel P 300-fucosidase (seringue de 10ml). Le montage utilisé comprend un "recychrome" LKB, un absorptiomètre enregistreur ISCO et un collecteur de fractions. L'échantillon est recyclé pendant 3h environ (au minimum 3 cycles). La colonne est alors lavée par 2 volumes du tampon initial. puis par 20 volumes de tampon Tris-HCl 0,2M, pH 8, NaCl 0,5M, NaN_z 3mM, enfin de nouveau par 5 volumes du tampon phosphate initial. Les anticorps sont alors élués par le tampon glycocolle-HCl 0,2M, pH 2,8, NaCl 0,5M. Les fractions correspondant au pic d'absorbance sont immédiatement ras--semblées et le pH est ajusté à 7,4. Les fractions d'IgG ou de Fab spécifiques sont ensuite dialysées contre le tampon phosphate 50mM. pH 7,4, NaCl 150mM. Pour la préparation du support d'affinité Biogel P 300-Fab, la fraction de Fab spécifiques de l' α -L fucosidase est concen--trée contre l'aquacide II avant d'être fixée sur le Biogel activé.Le protocole de fixation est en tous points identique à celui décrit plus haut pour le Biogel P 300-fucosidase.

Avant d'être réutilisé, le support d'affinité est lavé par le tampon phosphate 50mM, pH 7,4, NaCl 150mM puis par une solution fraî--chement préparée d'urée 8M.

K- FIXATION DES Fab ¹²⁵I SPECIFIQUES DE L' α -L FUCOSIDASE SUR LES POLYSOMES

1°- Marquage de la fraction Fab par 1'¹²⁵I

Nous avons utilisé le protocole décrit par Mc LAUGHIN et PITOT

(125).

6mg de Fab totaux en solution dans le tampon phosphate 50mM, pH 7, NaCl 150mM, sont additionnés de 300μg de lactoperoxydase, de 1,8mCi de Na 125 I (80μl) dans un volume final de 2ml. 0,24ml d'H₂O₂ 0,1mM sont alors lentement ajoutés (5mn) à température ambiante sous agitation. Après 30mn, 0,908g de (NH₄)₂SO₄ sont introduits dans le milieu réactionnel (65% de saturation en (NH₄)₂SO₄). Le précipité formé après un repos de 30mn est centrifugé et solubilisé dans 1ml de tampon phosphate 50mM, pH 7,6, NaCl 150mM et déposé sur une colonne de DEAE cellulose (2ml) équilibrée dans le même tampon. La colonne est lavée par 3ml de tampon et l'ensemble de l'effluent est collecté directement dans un boudin de dialyse. La solu--tion est ensuite dialysée pendant 48h (3 changements de tampon) contre le tampon phosphate 50mM, pH 7,6, NaCl 150mM. La radio-activité spécifique des Fab iodés obtenus est d'environ 10⁸cpm par mg de protéines.

2°- Purification des Fab ¹²⁵I spécifiques de l' α -L fucosidase

Les Fab ¹²⁵I spécifiques de l' α -L fucosidase sont purifiés par chromatographie d'affinité sur Biogel P 300-fucosidase selon le protocole décrit précédemment. Cependant, des solutions préparées stérilement sont utilisées de manière à permettre l'obtention d'une fraction de Fab ¹²⁵I spécifiques exempte de nucléases. Dans le cas des Fab non immuns, ceux-ci sont purifiés par chromatographie d'affinité sur une colonne de Biogel P 300-IgG de chèvre anti IgG de lapin.

3°- Mesure de la quantité de Fab ¹²⁵I fixés par les différentes fractions de polysomes

Les fractions de polysomes sont resuspendues dans le tampon $T_{50}K_{25}M_5$ et ajustées à une concentration de 20 U A_{260} /ml. On ajoute 0,1µg de RNase pancréatique par ml et les suspensions sont incubées pendant 20mn à 0°C. 0,38ml de KCl 2M sont alors ajoutés et le volume final est ajusté à 10ml avec le tampon $T_{50}K_{25}M_5$. Chaque suspension est déposée sur 20ml de 0,45 $T_{50}K_{25}M_5$ et centrifugée pendant 2h30 à 27 000t/mn dans le rotor SW27. Les tubes sont pincés fortement à leur base, les surnageants sont décantés et le fond des tubes est découpé à l'aide de ciseaux forts. Les sédiments sont repris dans l'eau distillée et la suspension est ajustée en Tris-acétate 50mM, pH 7,4.

Des quantités de monoribosomes variant de O à 20 U A₂₆₀ sont incubées dans un volume final de 0,8ml avec 50µl de Fab immuns spécifiques ou non immuns iodés (5µg, environ $5x10^5$ cpm) pendant 18h à 0°C. Les suspensions sont déposées sur 7ml de 0,25S $T_{50}K_{25}N_{150}M_5$ contenant 0,02 p100 de Triton X-100 et 1ml de 1S $T_{50}K_{25}M_5$. Les tubes sont centrifugés pendant 4h à 50 000t/mn dans le rotor 50 Ti. Les sédiments sont repris par 1ml d'eau distillée et les suspensions sont centrifugées à basse vitesse. Des fractions aliquotes sont prélevées pour le dosage du RNA et la détermination de la radio-activité.

L- ISOLEMENT DES PRODUITS DE SYNTHESE <u>IN VITRO</u>, "PRECURSEURS" SUPPOSES DE L' α -L FUCOSIDASE

Après l'incubation, les échantillons de système acellulaire de réticulocytes sont dilués à 5ml avec le tampon phosphate 50mM, pH 7,4, NaCl 150mM, Nonidet P 40 0,5 p100, NaNz 3mM contenant de la méthionine 20mM et centrifugés pendant 1h à 45 000t/mn dans le rotor SW50-1. Les surnageants sont alors soumis à une chromatographie d'affinité sur Biogel P 300-Fab spécifiques, ou Biogel P 300-Fab "site" ou Biogel P 300-Fab "non site" selon le protocole décrit plus haut pour la préparation des anticorps spécifiques, à ceci près que les solutions utilisées contiennent 0,5 p100 de Nonidet P 40. Des colonnes contenant 1,5ml de gel (diamètre 0,6cm) sont employées. Un volume de 4ml est collecté lors de l'élution. L'éluat est ajusté à pH 7 avec du Tris 2M et dilué à 10ml avec de l'eau distillée. Il est ensuite rechromatographié sur une colonne de Sepharose 4B-Protéine A-IgG spécifiques anti-fucosidase (15-20µl; pipette capillaire Corning de 50µl). Le gel est lavé par quelques ml du tampon phosphate puis par le tampon Tris-HCl 5mM, pH 6,8. Il est transféré quantitativement - à débit libre - dans un cathéter chirurgical en polyéthylène Biotrol de 0,96mm de diamètre extérieur, dans lequel un tampon de laine de verre a été préalablement introduit.

Pour l'électrophorèse, on fait alors passer du tampon Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, SDS 4 p100, bleu de bromophénol 0,02 p100, saccharose 10 p100, DTT 0,1M et le cathéter est fermé à l'aide d'une pince de Mohr dès que l'ensemble du support d'affinité est coloré. Une seconde pince est

ensuite apposée 5mm au-dessus de la surface du gel de Sepharose. Le cathéter est coupé à ses extrémités, laissant les pinces de Mohr en place, et l'en--semble est immergé dans l'eau bouillante pendant 3mn. Après refroidissement le contenu du cathéter est transféré directement dans l'un des puits de la plaque de gel d'acrylamide au moyen d'un piston de seringue Hamilton, celuici poussant le tampon de laine de verre.

M- ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS est effectuée selon la méthode de LAEMMLI (142). Des gels de 1mm d'épaisseur (15cmx15cm -16 dépôts) sont généralement utilisés. Le gel de séparation est constitué d'un gradient linéaire 10-18 p100 d'acrylamide et le gel de concentration contient 5 p100 d'acrylamide.

Lorsque des parties aliquotes de système acellulaire sont analysées, les sels contenus dans l'échantillon sont éliminés par dialyse en puits d'acrylamide selon le principe suivant. Une solution d'acrylamide à 30 p100 (tampon Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8) est polymérisée dans une boîte de pétri, un support pour inclusions muni du nombre désiré de gélules d'araldite formant couvercle. Le gel ainsi formé est démoulé, puis à demi immergé dans le tampon Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8. Les échantillons (10-20µl) sont introduits dans les puits et on ajoute un volume égal de tampon Tris-HCl à deux ou trois reprises au fur et à mesure que l'échantillon se concentre. Après 2h environ, les échantillons sont prélevés, additionnés d'un volume de tampon Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, SDS 4 p100, DTT 0,2M, sucro--se 20 p100 et chauffés 2mn dans un bain-marie bouillant.

Dans d'autres expériences, les échantillons sont traités selon le mode opératoire décrit par SHIELDS et BLOBEL (143) à ceci près que les précipités de protéines sont lavés dans l'éthanol/éther (V/V) et séchés sous azote avant d'être solubilisés dans le tampon d'échantillon.

Après 15-20h de migration (5-8mA), le gel est immergé dans le TCA à 50 p100 (2-3 bains) pendant 1-2h. Il est ensuite coloré sous agita--tion constante par le bleu de Coomassie à 0,2 p100 dans le TCA à 50 p100 (8mn), décoloré par l'acide acétique à 7 p100 et séché sous vide sur papier Whatman 1.

La détection des bandes radio-actives par autoradiographie ou

fluorographie est effectuée en utilisant le papier Royal-X omat (Kodak). Dans le cas particulier de la fluorographie, la technique de LASKEY et MILLS (144) est appliquée. Les gels colorés par le bleu de Coomassie sont traités successivement par le DMSO (2x30mn), le PPO (2-5 diphényloxazole) à 20 p100 (P/P) dans le DMSO (3h) et l'eau distillée (1 nuit). Le gel séché sur papier Whatman I est mis en contact avec le papier Royal-X omat préalablement exposé à un éclair de lumière orange diffuse (filtre Kodak Wratten 21 plus papier Whatman I). L'exposition est effectuée à température ambiante (auto--radiographie) ou à -70°C (fluorographie).

L'électrophorèse de l' α -L fucosidase en milieu non dénaturant est effectuée dans les conditions décrites dans la légende de la figure 34 (p. 96).

N- DETERMINATION DE LA RADIO-ACTIVITE

La radio-activité est déterminée dans un compteur à scintilla--tion liquide SL31 (Intertechnique).

Pour les échantillons aqueux, on utilise le PCS (phase combining system, Amersham) ou l'Aqualuma (Lumac). 0,3ml des fractions de gradients de saccharose sont introduits en fioles de comptage, dilués par 0,5ml d'eau et additionnés de 10ml de PCS. Le taux d'affaiblissement lumineux de la série d'échantillons peut être considéré comme constant à condition que le comptage soit effectué dans les quelques heures qui suivent la préparation. Lorsque l'Aqualuma est employé, la dilution des fractions n'est pas néces--saire et l'on ajoute 5ml de liquide scintillant (fioles de 6ml). Dans ce cas, l'efficacité de comptage est identique dans toutes les fractions.

La radio-activité acido-précipitable - fractions de gradients de saccharose (cf légendes des figures), fractions de CsCl ou de métriza--mide, fractions subcellulaires - est mesurée après filtration des échantil--lons acidifiés sur filtre de fibre de verre (Whatman GF83). L'échantillon est précipité par le TCA à 5 p100, en présence de 50µg de sérumalbumine bovine si nécessaire (gradients analytiques). La filtration est effectuée après 1h à 0°C et l'acido-soluble est éliminé par lavage du filtre avec du TCA à 5 p100 froid (2-4°C) suivi d'un rinçage à l'eau distillée.

Après séchage les filtres sont solubilisés pendant une nuit à 37°C dans 0,25ml de Soluène 350 (Packard) contenant 5 p100 (V/V) d'H $_2$ O $_2$.

10ml de Permablend III (Packard) en solution dans le toluène (5,5g/l) sont alors ajoutés. La solubilisation des échantillons n'est omise que lors de simples marquages lorsque la quantité de matériel précipité est faible.

La radio-activité des produits synthétisés <u>in vitro</u> dans le système de réticulocytes est déterminée de la manière suivante : des parties aliquotes de 2µl sont prélevées et introduites dans des tubes contenant 1ml d'eau. On ajoute 0,5ml d'une solution contenant NaOH 1M, H₂O₂ 0,5M, méthio--nine non radio-active à 1mg/ml. Les tubes sont incubés pendant 15mn à 37°C, et les protéines sont précipitées par 1ml de TCA à 25 p100. Les pré--cipités sont collectés sur disques de fibre de verre et introduits après séchage dans des fioles contenant 5ml de Lipoluma (Lumac).

O- MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les fractions contenant des organites cellulaires de grande taille sont fixées par la glutaraldéhyde à 1 p100 dans le milieu d'homo--généisation pendant 1h à 4°C. Les fractions membranaires obtenues à par--tir du SPL sont fixées en suspension par la glutaraldéhyde à 2 p100 pen--dant 1h à 4°C et centrifugées pendant 1h30 à 105 000g. Les sédiments sont alors fixés à nouveau par $0_{s}0_{4}$ à 2 p100 dans le tampon cacodylate 0,1M, pH 7,4, saccharose 0,1M. Les échantillons sont deshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes et dans l'oxyde de propylène. Ils sont inclus dans l'araldite et des coupes fines sont récupérées sur des grilles de cuivre, recouvertes d'une membrane de parlodion. Les coupes sont colorées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb selon REYNOLDS (145) et examinées au microscope électronique (Hitachi).

P- PRODUITS UTILISES

Le Tris (Trizma base), la triéthanolamine, le dithiothreitol, la créatine phosphokinase, la créatine phosphate, la cycloheximide, l'acti--nomycine D et le RNA de levure sont des produits SIGMA. Le RNA de levure est purifié par dialyse contre de l'eau distillée, extraction phénolique répétée, précipitation éthanolique et lavages par l'éthanol puis l'éther.

L'éthanolamine, l'acrylamide, le CsCl, le désoxycholate de Na

et le SDS proviennent de MERCK. Le SDS est purifié par recristallisation dans l'éthanol.

La glutaraldéhyde, le bis-acrylamide sont des produits de l'Eastman Organic Chemicals.

Le Triton X-100 est un produit BDH, l'aquacide II_a un produit CALBIOCHEM.

La nucléase de Micrococcus a été obtenue chez BOEHRINGER et l'Agarose- ϵ -aminocaproyl-fucosylamine ainsi que les IgG de chèvre anti-IgG de lapin chez MILES.

Du saccharose ANALAR, repurifié sur charbon actif, a été uti--lisé ainsi que du saccharose exempt de RNase provenant de SERLABO.

La ribonucléase (du pancréas de boeuf, sans protéases, 40 U KUNITZ/mg) est un produit SOCHIBO.

La métrizamide nous a été gracieusement offerte par la firme NYEGAARD et Co.

L'acide orotique ¹⁴C et ³H, La choline ¹⁴C, La leucine ³H proviennent du C.E.A. (Saclay, France). La méthionine ³⁵S, le Na ¹²⁵I sans entraîneur sont des produits du Radiochemical Centre (Amersham, England).

BIBLIOGRAPHIE

j

į

- 1- FAWCETT, D.W. (1955) J. Nat. Cancer Inst. <u>15</u>, 1475-1477
- 2- PALADE, G.E., SIEKEVITZ, P. (1956)
 J. Biochem. Biophys. Cytol. <u>2</u>, 171-176
- 3- PALADE, G.E. (1958) Microsomal particles and Protein synthesis. ROBERTS, R.B., Ed. (Pergamon Press, New York) p.36
- 4- SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E. (1960)
 J. Biochem. Biophys. Cytol. <u>7</u>, 619-630
- 5- PALADE, G. (1975) Science <u>189</u>, 347-358
- 6- GODINOT, C., LARDY, H.A. (1973) Biochemistry <u>12</u>, 2051-2060
- BINGHAM, R.W., CAMPBELL, P.N. (1972)
 Biochem. J. 126, 211-215
- 8- GONZALEZ-CADAVID, N.F., BRAVE, M., CAMPBELL, P.N. (1968)
 Biochem. J. <u>107</u>, 523-529
- 9- GONZALEZ-CADAVID, N.F., SAEZ DE CORDOVA, C. (1974) Biochem. J. <u>140</u>, 157-167
- 10- KADENBACH, B. (1970) Eur. J. Biochem. <u>12</u>, 392-398
- 11- BAGLIONI, C., BLEIBURG, I., ZAUDERER, M. (1971) Nat. New. Biol. <u>232</u>, 8-12
- 12- LOEB, J.N., HOWELL, R.R., TOMKINS, G.M. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2069-2074

- 13- MECHLER, B., VASSALI, P. (1975) J. Cell. Biol. <u>67</u>, 1-15
- 14- TANAKA, T., TAKAGI, M., OGATA, K. (1970) Biochim. Biophys. Acta <u>224</u>, 507-517
- 15- SABATINI, D.D., TASHIRO, Y., PALADE, G.E. (1966) J. Mol. Biol. <u>19</u>, 503-524
- 16- HULSE, J.L., WETTSTEIN, F.D. (1972) Biochim.Biophys. Acta 269, 265-275
- BORGESE, N., BLOBEL, G., SABATINI, D.D. (1973)
 J. Mol. Biol. <u>74</u>, 415–438
- 18- NOLAN, R.D., MUNRO, H.N. (1972) Biochim. Biophys. Acta <u>272</u>, 473-480
- 19- PITOT, H.C., SHIRES, T.K. (1973) Fed. Proc. 32, 76-79
- 20- ROLLESTON, F.S., NAK, D. (1973) Biochem. J. 131, 851-853
- 21- SHIRES, T.K., EKREN, T.E., NARURKAR, L.M., PITOT, H.C. (1973) Nature 242, 198-201
- 22- ROLLESTON, F.S. (1972) Biochem. J. <u>129</u>, 721-731
- 23- MAGER, W.H., PLANTA, R.J. (1975) Biochim. Biophys. Acta <u>402</u>, 105-112
- FRIEDLANDER, B.R., WETTSTEIN, F.O. (1970)Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>39</u>, 247-253
- 25- HANNA, N., GODIN, C. (1974) Biochim. Biophys. Acta <u>374</u>, 342-349

- 26- LEWIS, J.A., SABATINI, D.D. (1977)
 Biochim. Biophys. Acta. <u>478</u>, 331-349
- 27- BLOBEL, G. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>68</u>, 1-7
- 28- Mc DONALD, R., KORNER, A. (1971) FEBS Lett. 13, 62-64
- 29- PAIN, J.M., LANOIX, J., BERGERON, J.J.M., CLEMENS, M.J. (1974) Biochim. Biophys. Acta <u>353</u>, 487-498
- 30- TATA, J.R., WILLIAMS-ASHMAN, H.G. (1967) Eur. J. Biochem. <u>2</u>, 336-374
- 31- RAGNOTTI, G., LAWFORD, G.R., CAMPBELL, P.N. (1969) Biochem. J. 112, 139-147
- 32- TAKAGI, M., OGATA, K., (1968)
 Biochem. Biophys, Res. Commun. <u>33</u>, 55-66
- 33- BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., DEVRIES, M., BENEDETTI, E.L. (1967) Biochem. J. 103, 177-182
- 34- VENKATESAN, N., STEELE, W.J. (1972) Biochim. Biophys. Acta <u>287</u>, 526-537
- 35- SHAFRITZ, D.A., ISSELBACHER, K.J. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>46</u>, 1721-1727
- 36- GLAZER, R.I., SARTORELLI, A.C. (1972)
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>46</u>, 1418–1424
- **37-** KOFFER, A. (1974) FEBS Lett. 46, 326-332
- 38- ILAN, J., SINGER, M. (1975)
 J. Mol. Biol. <u>91</u>, 39-51

- **39-** FERN, E.B., GARLICK, P.J. (1976) Biochem. J. <u>156</u>, 189-192
- 40- BLOBEL, G., DOBBERSTEIN, B. (1975)
 J. Cell. Biol. <u>67</u>, 835-851
- 41- BLOBEL, G., DOBBERSTEIN, B. (1975)J. Cell. Biol. 67, 852-862
- 42- TANAKA, T., OGATA, K. (1971)J. Biochem. 70, 693-697
- 43- REDMAN, C.M. (1969)J. Biol. Chem. 244, 4308-4315
- 44- HICKS, S.J., DRYSDALE, J.W., MUNRO, H.N. (1969) Science 164, 584-585
- 45- FLOOR, E.F., GILBERT, J.M., THADDENS, Jr., S.N. (1976) Biochim. Biophys. Acta 442, 285-296
- 46- PITOT, H.C., SLADEK, N., RAGLAND, W., MURRAY, R.K., MAYER, G.,
 SOLING, H.D., JOST, J.P. (1969)
 MICROSOMES and DRUG OXIDATION (GILETTE, J.R., CONNEY, A.H., COSMIDES,
 G.J., EASTABROOK, R.A., FOUTS, J.R., MANNERING, G.J., Eds) p.59-79,
 Academic press, New York
- 47- ARIAS, I.M., DOYLE, D., SCHIMKE, R.T. (1969)
 J. Biol. Chem. 244, 3303-3307
- 48- KURIYAMA, Y., OMURA, T., SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E. (1969)
 J. Biol. Chem. <u>244</u>, 2017–2022
- 49- OMURA, T., KURIYAMA, Y. (1971)J. Biochem. <u>69</u>, 651-658
- 50- ELDER, J.H., MORRE, D.J. (1976) J. Biol. Chem. <u>251</u>, 5054-5068

- 51- REDMAN, C.M., CHERIAN, M.G. (1972) J. Cell. Biol. <u>52</u>, 231–245
- 52- LODISH, H.F., SMALL, B. (1975) J. Cell. Biol. <u>65</u>, 51-64
- 53- BLOBEL, G. (1977) International Cell Biology (BRINKLEY, B.R., PORTER, K.R., Eds) p.318-325, Rockefeller University press, New York
- 54- MECHLER, B., VASSALI, P. (1975) J. Cell. Biol. 67, 16-24
- 55- MECHLER, B., VASSALI, P. (1975) J. Cell. Biol. <u>67</u>, 25-37
- 56- ADELMAN, M.R., SABATINI, D.D., BLOBEL, G. (1973) J. Cell. Biol. 56, 206-229
- 57- TANAKA, T., OGATA, K. (1972)
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1069-1073
- 58- DISSOUS, C., KREMBEL, J. (1976)
 C. R. Acad. Sc. Paris <u>282</u>, Série D, 313-316
- 59- TATA, J.R. (1973) Karolinska Symposia n°6 : Protein Synthesis in reproductive tissue (DICZFALUSY, E., Ed.) p.192-224
- 60- ADESNIK, M., DARNELL, J.E. (1972)J. Mol. Biol. 67, 397-406
- 61- MILCAREK, C., PENMAN, S. (1974) J. Mol. Biol. <u>89</u>, 327-338
- 62- CARDELLI, J., LONG, B., PITOT, H.C. (1976)J. Cell. Biol. <u>80</u>, 47-58

- 63- HARRISON, T.M., BROWNLEE, G.G., MILSTEIN, C. (1974) Eur. J. Biochem. <u>47</u>, 621-627
- 64- KREIBICH, G., ULRICH, B.L., SABATINI, D.D. (1978)J. Cell. Biol. <u>77</u>, 464-487
- 65- KREIBICH, G., FREIENSTEIN, C.M., PEREYRA, B.N., ULRICH, B.L., SABATINI, D.D. (1978)
 J. Cell. Biol. <u>77</u>, 488-506
- 66- OHLSSON, R., JERGIL, B. (1977) Eur. J. Biochem. <u>72</u>, 595-603
- 67- TAKAGI, M. (1977) J. Biochem. 82, 1077-1084
- 68- SHORE, G.C., TATA, J.R. (1977) Biochim. Biophys. Acta <u>472</u>, 197-236
- 69- SHORE, G.C., TATA, J.R. (1977) J. Cell. Biol. <u>72</u>, 726-743
- 70- BRONFMAN, M., BEAUFAY, H. (1973) FEBS Lett. 36, 163-168
- 71- DE DUVE, C., BERTHET, J. (1954) Int. Rev. Cytol. 3, 225-240
- 72- DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R., APPELMANS, F. (1955) Biochem. J. <u>60</u>, 604-611
- 73- AMAR-COSTESEC, A., BEAUFAY, H., WIBO, M., THINES-SEMPOUX, D., FEYTMANS, E., ROBBI, M., BERTHET, J. (1974) J. Cell. Biol. 61, 201–212
- 74- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1967) J. Mol. Biol. 26, 279-292

- 75- ADELMAN, M.R., BLOBEL, G., SABATINI, D.D. (1973) J. Cell. Biol. <u>56</u>, 191–205
- 76- BOSHES, R.A. (1970)
 J. Cell. Biol. <u>46</u>, 477-490
- 77- RAMSEY, J.C., STEELE, W.J. (1976) Biochemistry <u>15</u>, 8, 1704-1712
- 78- LEWIS, J.A., TATA, J.R. (1973)J. Cell. Sci. 13, 447-459
- 79- SHORE, G.C., TATA, J.R. (1977)
 J. Cell. Biol. <u>72</u>, 714-725
- 80- REDMAN, C.N., SABATINI, D.D. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. <u>56</u>, 608-613
- 81- TATA, J.R. (1967) Nature, Lond. 213, 566-569
- 82- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1966) Biochemistry 55, 1283-1288
- 83- BONT, W.S., REZELMAN, G., MEISNER, I., BLOEMENDAL, H. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 119, 36-40
- 84- SUGANO, H., WATANABE, I., OGATA, K. (1967)J. Biochem. 61, 6, 778-786
- 85- LOWE, D., REID, E., HALLINAN, T. (1970) FEBS Lett. 6, 114-116
- 86- REID, I.M., SARMA, D.S.R., SIDRANSKY, H. (1971) Lab. Invest. 25, 141-148
- 87- SARMA, D.S.R., REID, I.M., VERNEY, E., SIDRANSKY, H. (1972) Lab. Invest. <u>27</u>, 39-47

- ARORA, D.J.S., ROBERT, P. (1974)
 Biochim. Biophys. Acta <u>374</u>, 350-358
- 89- ROBINSON, G.B. (1969) FEBS Lett. <u>4</u>, 190-192
- **90-** 0'TOOLE, K. (1974) Biochem. J. 138, 305-307
- 91- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1967) J. Mol. Biol. 26, 293-301
- 92- Mc INTOSH, P.R., O'TOOLE, K. (1976) Biochim. Biophys. Acta. 92, 313-319
- 93- Biological separations in iodinated density gradient media (1975) (RICKWOOD, D., Ed.) Information Retrieval limited, London and Washington DC
- 94- HINTON, R.H., MULLOCK, B.M., GILHUUS-MOE, C.C. (1974) Méthodological Developments in Biochemistry, Vol 4, Subcellar Studies (REID, E. Ed) LONGMAN, London
- 95- MULLOCK, B.M., HINTON, R.H. (1973) Biochem. Soc. Trans. 1, 25-29
- 96- BUCKINGHAM, M.E., GROS, F. (1975) FEBS Lett. 53, 355-359
- 97- ROBBI, M., BERTHET, J., TROUET, A., BEAUFAY, H. (1978) Eur. J. Biochem. <u>84</u>, 333-340
- 98- HOLMES, R.S., MASTERS, C.J. (1972) Arch. Biochem. Biophys. <u>148</u>, 217-225
- **99-** RAGNOTTI, G. (1971) Biochem. J. <u>125</u>, 1049-1058

- 100- MORTON, B.E., NWIZU, C., HENSHAW, E.C., HIRSCH, C.A., HIATT, H.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 395, 28-40
- 101- MORTON, B.E. (1974) Anal. Biochem. <u>58</u>, 642-645
- 102- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1967) J. Mol. Biol. <u>28</u>, 539–542
- 103- PORTER, K.R. (1961)
 The ground substance observed from electron microscopy. The cell,
 vol 2 (BRACHET, J., MIRSKY, A.E., Eds) Acad. Press, N.Y. p. 621-646
- 104- PORTER, K.R., BONNEVILLE, M.A. (1964) An introduction to the fine structure of cells and tissues (LEA et FEBIGER, Eds.) Philadelphie
- 105- CHAUVEAU, J., MOULE, Y., ROUILLER, C. (1956) Exptl. Cell. Res. <u>11</u>, 317-321
- 106- WIDNELL, C.C., TATA, J.R. (1964) Biochem. J. 92, 313-319
- 107- ZALTA, J.P., ROZENCWAJG, R., CARASSO, N., FAVARD, P. (1962)
 C. R. Acad. Sc. Paris <u>255</u>, 412–415
- 108- BLOBEL, G., POTTER, V.R. (1966) Science 154, 1662-1666
- 109- SADOWSKI, P.D., STEINER, J.W. (1968)
 J. Cell. Biol. 37, 147-162
- 110- NOLL, M., BURGER, M.M. (1974) J. Mol. Biol. 90, 215-236
- 111- SADOWSKI, P.D., HOWDEN, J.A. (1968)
 J. Cell. Biol. 37, 163-181

- 112- GAGNON, C., LALONDE, C., DE LAMIRANDE, G. (1974) Biochim. Biophys. Acta. 353, 323-333
- 113- PELHAM, H.R.B., JACKON, R.J. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 247-256
- 114- LOUD, A.V. (1968) J. Cell. Biol. 37, 27-46
- 115- LEIGHTON, F., POOLE, B., BEAUFAY, H., BAUDHUIN, P., COFFEY, J.W., FOWLER, S., DE DUVE, C. (1968) J. Cell. Biol. <u>37</u>, 482-513
- 116- BEAUFAY, H. (1972) Lysosomes (DINGLE, J.T., Ed.) North-Holland, Amsterdam p. 8
- 117- WATTIAUX, R., WATTIAUX-DE CONNINCK, S., RONVEAUX-DUPAL, M.F., DUBOIS, F. (1978) J. Cell. Biol. <u>78</u>, 349-368
- 118- AMINOFF, D., FURUKAWA, K. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1659-1669
- 119- VAN HOFF, F., HERS, H.G. (1968) Eur. J. Biochem. 7, 34-44
- 120- OPHEIM, D.J., TOUSTER, 0. (1977) J. Biol. Chem. 252, 739-743
- 121- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E., ROSS, G.T. (1971) J. Clin. Endocr. <u>33</u>, 888-891
- 122- HOLME, G., BOYD, S.L., SEHON, A.H. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>45</u>, 240-245
- 123- HOLME, G., DELOVITCH, Y., BOYD, S.L., SEHON, A.H. (1971) Biochim. Biophys. Acta. 247, 104-108

- 124- IKEHARA, Y., PITOT, H.C. (1973) J. Cell. Biol. <u>59</u>, 28-33
- 125- Mc LAUGHIN, C.A., PITOT, H.C. (1976) Biochemistry 15, 3541-3550
- 126- AFCHAIN, D. (1976) Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Lille I
- 127- ALHADEFF, J.A., ANDREWS-SMITH, G.L. (1979) Biochem. J. 177, 753-756
- 128- GOLDMAN, B.M., BLOBEL, G. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>75</u>, 5066-5070
- 129- MURTY, C.N., SIDRANSKI, H. (1972) Biochim. Biophys. Acta. <u>281</u>, 69-78
- 130- PERRY, R.P., LA TORRE, J., KELLEY, D.E., GREENBERG, J.R. (1972) Biochim. Biophys. Acta. 262, 220-226
- 131- SHORTMAN, K. (1961)Biochim. Biophys. Acta. 51, 37-43
- 132- NOLL, H. (1969) Techniques in Protein Biosynthesis, Vol 2 (CAMPBELL, P.N., SARGENT, J.R., Eds) Academic Press, London & New york p. 122
- 133- BALTIMORE, D., HUANG, A.S. (1968) Science 162, 572-574
- 134- GILLES, K.W., MYERS, A. (1975) Nature 206, 93
- 135- LOWRY, O.W., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

- 136- BEAUFAY, H., AMAR-COSTESEC, A., FEYTMANS, E., THINES-SEMPOUX, D., WIBO, M., ROBBI, M., BERTHET, J. (1974) J. Cell. Biol. <u>61</u>, 188-200
- 137- FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. (1925)J. Biol. Chem. <u>66</u>, 375-380
- 138- WATTIAUX, R., DE DUVE, C. (1950) Biochem. J. <u>63</u>, 606-608
- 139- STAHN, R., MAIER, K.P., HANNING, G. (1970) J. Cell. Biol. <u>46</u>, 577–585
- 140- REID, E. (1972) Subcellular components (BIRNIE, G.D., Ed.) Butterworths University Park Press, Baltimore p. 93
- 141- LINGREL, J.B. (1972) Protein Biosynthesis in Non Bacterial systems (LAST, J.A., LASKIN, A.I., Eds) Dekker p. 234
- 142- LAEMMLI, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
- 143- SHIELDS, D., BLOBEL, G. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3753-3756
- 144- LASKEY, R.A., MILLS, A.D. (1975) Eur. J. Biochem. 56, 335-341
- 145- REYNOLDS, E.S. (1963) J. Cell. Biol. <u>17</u>, 208-212



م. ج

.1