

# HÉTÉROGÉNÉITÉ DES GRANULES CYTOPLASMIQUES DU FOIE DE SOURIS\*

par

HUBERT CHANTRENNE

*Laboratoires de Morphologie animale et de Physiologie cellulaire. Faculté des Sciences.  
Université de Bruxelles (Belgique)*

## INTRODUCTION

Les travaux de CLAUDE<sup>1, 2, 3, 4</sup>, BRACHET et JEENER<sup>5</sup>, SCHNEIDER<sup>6</sup>, HOGEBOOM, CLAUDE et HOTCHKISS<sup>7</sup> ont montré que l'acide ribonucléique et divers enzymes sont associés aux particules cytoplasmiques qu'on isole par centrifugation à grande vitesse d'extraits de foie de mammifères.

CLAUDE<sup>4</sup> distingue deux sortes de granules : les "grosses granules" et les "microsomes". Les grosses granules s'obtiennent en centrifugeant à 2000 g pendant 25 minutes un extrait préalablement débarrassé des débris cellulaires et des noyaux par trois brèves centrifugations à 1500 g. Les "microsomes" s'obtiennent en centrifugeant à 18000 g pendant 90 minutes l'extrait débarrassé des "grosses granules". Les grosses granules et les microsomes diffèrent par leur composition et leur teneur en divers enzymes<sup>4, 7</sup>. Selon CLAUDE, les grosses granules seraient des mitochondries ou des grains de sécrétion.

Certaines observations de CLAUDE<sup>4</sup> et notre propre expérience de ce matériel nous donnaient à penser que les granules n'ont probablement pas des dimensions uniformes : nous nous sommes proposés de rechercher dans quelle mesure on peut considérer que les granules se répartissent en deux formations distinctes.

Nous avons déterminé la vitesse de sédimentation de l'acide ribonucléique dans différentes conditions de centrifugation. Nos résultats indiquent que l'acide ribonucléique est associé à des particules douées de vitesses de sédimentation très diverses.

Par centrifugation fractionnée, nous avons isolé arbitrairement 5 fractions de granules et nous avons déterminé leur teneur en acide ribonucléique, en phosphore liposoluble, en phosphatase alcaline (glycérophosphate) et en adénosinepyrophosphatase, par rapport à leur teneur en azote.

Les chiffres mettent en évidence des différences marquées de composition entre les cinq fractions. Les teneurs en azote, en phosphore liposoluble et en enzymes s'ordonnent d'une façon suggestive quand on les exprime en fonction de la richesse en acide ribonucléique.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Matériel*

Foies de souris adultes. Les animaux utilisés n'avaient plus reçu de nourriture depuis 12 à 15 heures.

\* Travail effectué avec l'appui du Fonds National de la Recherche Scientifique.

L'animal était anesthésié à l'éther et décapité; on prélevait le foie et on le refroidissait aussitôt à 0°. Le foie était alors pesé, broyé à la chambre froide dans un mortier froid contenant 2 ml d'un tampon froid et quelques grains de sable. On ajoutait ensuite assez de tampon pour obtenir un volume de suspension égal à 10 fois celui de l'organe. On centrifugeait la suspension à 1460 g pendant 7 minutes; le culot était éliminé, et le liquide soumis à une nouvelle centrifugation de 7 minutes à 1460 g. Le liquide surnageant de la seconde centrifugation constitue l'extrait que nous étudions. L'examen microscopique ne permet d'y déceler ni débris cellulaires, ni noyaux.

Toutes les opérations décrites ci-dessus étaient effectuées dans la chambre froide (+ 2°).

#### *Centrifugation*

Nous disposons de trois centrifugeuses dont les caractéristiques sont indiquées ci-dessous:

	I	II	III
Vitesse	3000 tours/minute	9000 tours/minute	55000 tours/minute
Rayon au fond des tubes	14.5 cm	6.25 cm	3.0 cm
Force centrifuge au fond des tubes	1460 g	5700 g	101000 g
Hauteur de la colonne liquide	3 cm	2 cm	1.2 cm

Toutes les centrifugations à 1460 g et à 5700 g ont été effectuées en chambre froide (+ 2°) les ultracentrifugations (dans une toupie d'HENRIOT et HUGUENARD) à la température du laboratoire (17 à 20°); lorsque l'ultracentrifugation durait une heure, la température de la toupie atteignait 25 à 27° en fin d'expérience.

Après chaque centrifugation, on éliminait autant que possible la pellicule de graisse qui se forme à la surface du liquide, puis on prélevait la majeure partie du liquide surnageant à l'aide d'une pipette, en évitant d'aspirer la couche de liquide (env. 3 mm) au contact immédiat du culot. Ensuite cette couche de liquide était éliminée.

Pour laver les culots, on les remettait en suspension en les agitant dans un volume de tampon égal au volume d'extrait dont ils provenaient; on centrifugeait alors dans des conditions identiques à celles de la centrifugation qui avait permis d'isoler le culot, et on éliminait complètement le liquide de lavage.

#### *Dosage de l'azote*

Méthode de KJELDAHL, appareil de MARKHAM<sup>9</sup>. Titration à l'aide d'une microburette de LINDERSTRÖM-LANG. Quantité d'azote par prise: 10 à 50 · 10<sup>-6</sup> g.

Tous les dosages, y compris la minéralisation, ont été effectués en triple.

Concordance: 1 à 2 %.

#### *Dosage de l'acide ribonucléique\**

A l'aide d'une pipette à constriction, on prélève 300 à 500 µl de la suspension à analyser et on les introduit dans un petit tube à centrifuger; on ajoute un volume égal d'une solution à 20 % d'acide trichloracétique, on laisse une heure à la glacière, on centrifuge et on rejette le liquide surnageant. On lave deux fois le précipité avec une solution à 10 % d'acide trichloracétique, puis deux fois à l'alcool et une fois à l'éther. On dessèche le précipité dans le vide. On traite le précipité par 300 µl d'une solution M/5 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pendant 30 minutes à 100°. On recueille l'extrait qui contient l'acide ribonucléique, dans un petit tube taré; on procède à une seconde extraction de 15 minutes à 100°; on ajoute le second extrait au premier et on complète avec de l'eau jusqu'à un volume donné (par exemple 0.8 ml) par pesée à 2 mg près\*\*.

On dose l'acide ribonucléique dans cet extract par la méthode de BARRENSCHEEN et PEHAM<sup>10</sup>. Les valeurs indiquées sont calculées par comparaison avec une solution d'acide nucléique de la levure B.D.H. dont on a déterminé la concentration d'après la teneur en phosphore et la formule de LEVENE.

Dans chaque série de mesures on a inclus deux dosages de la solution de référence afin d'être à l'abri d'erreurs que peuvent amener de petites différences dans les conditions du chauffage ou dans la concentration de la solution d'orcine.

Tous les dosages ont été effectués en triple.

Concordance: 1 à 4 %.

\* Méthode de DAVIDSON et WAYMOUTH<sup>11</sup> modifiée par R. JEENER (Communication personnelle).

\*\* SCHNEIDER<sup>11</sup> a mis au point récemment une méthode d'extraction des acides nucléiques par de l'acide trichloracétique chaud. Des essais comparatifs nous ont montré que l'extraction de l'acide ribonucléique des extraits de foie par l'acide trichloracétique chaud, ou par le phosphate de sodium chaud, donnent des résultats qui concordent parfaitement.

*Dosage du phosphore liposoluble*

Extraction selon SCHNEIDER<sup>11</sup>. Minéralisation dans l'acide perchlorique. Dosage du phosphore par la méthode microanalytique de BERENBLUM et CHAIN<sup>12</sup> technique modifiée par WIAME<sup>13</sup>.

*Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline*

Dans de petits tubes à essais, on introduit 400  $\mu\text{l}$  de la suspension enzymatique et 400  $\mu\text{l}$  d'une solution contenant 575 mg de glycocolle, 585 mg NaCl et 300 mg de  $\text{MgCl}_2$  cristallisé pour 100 ml d'eau; enfin on ajoute 400  $\mu\text{l}$  d'une solution à 2,5 % de glycérophosphate de sodium (dans les témoins le glycérophosphate est remplacé par de l'eau). Le pH de la solution de glycocolle et celui de la solution de glycérophosphate sont ajustés préalablement à 9,0. Les tubes bouchés sont mis en thermostat à 38°.

Après un temps d'incubation déterminé, on prélève 100  $\mu\text{l}$  de solution, ajoute un volume égal d'une solution à 20 % d'acide trichloracétique, on laisse une demi-heure à la glacière, on centrifuge et on dose le phosphate par la méthode de BERENBLUM et CHAIN<sup>12, 13</sup>.

Pour les préparations étudiées, l'expérience a montré que la libération du phosphate est linéaire pendant les quatre premières heures au moins, et que la quantité de phosphate libéré en un temps donné est proportionnelle à la concentration de l'extrait enzymatique. Nous avons adopté pour mesure de l'activité de la phosphatase la quantité de P inorganique libéré en trois heures dans les conditions indiquées ci-dessus.

*Détermination de l'activité de l'Adénosinepyrophosphatase*

Méthode de DUBOIS et POTTER<sup>14</sup>.

A.T.P. préparé selon une nouvelle méthode que CORI a eu l'amabilité de nous communiquer et qui comporte une extraction de muscle par  $\text{HgCl}_2$  suivie d'une purification de l'A.T.P. sous forme de sel de Hg et de Ba.

Des essais d'orientation nous ont permis de choisir une concentration d'enzyme telle que la libération de phosphate reste linéaire pendant au moins 30 minutes, et soit proportionnelle à la quantité d'extrait enzymatique présent.

Dosage du phosphate par la méthode de BERENBLUM et CHAIN<sup>12, 13</sup>. Nous avons adopté pour mesure de l'activité de l'apyrase la quantité de P inorganique libéré en 15 minutes à 38° dans des conditions décrites par DUBOIS et POTTER.

**RÉSULTATS***Sédimentation de l'acide ribonucléique*

BECHHOLD et SCHLESINGER<sup>8</sup> ont montré que la concentration d'une suspension de particules douées d'une vitesse de sédimentation définie, varie au cours de la centrifugation selon la loi

$$\ln \frac{C}{C_0} = - \frac{R \omega^2}{h \eta} k t$$

dans laquelle:

$C_0$  = concentration au temps 0;  $C$  = concentration au temps  $t$ ;  $R$  = rayon de la centrifugeuse au fond des tubes;  $\omega$  = vitesse angulaire;  $\eta$  = viscosité du milieu;  $k$  = vitesse de sédimentation dans un champ unitaire (pour des particules sphériques et indéformables):

$$k = \frac{2}{9} (\sigma_p - \sigma_m) \rho^2$$

où  $\sigma_p$  et  $\sigma_m$  représentent le poids spécifique des particules et du milieu et  $\rho$  le rayon des particules).

Cette loi n'est valable qu'à condition que le liquide centrifugé reste homogène au cours de la centrifugation, et que le dépôt soit assez compact pour que toute particule qui l'a atteint ne puisse plus se remettre en suspension.

Dans nos expériences, ces deux conditions étaient remplies: le liquide n'était à l'abri ni des vibrations mécaniques ni des courants de convection, nous pouvons donc considérer<sup>8</sup> qu'il était soumis à un brassage continu; dans aucun cas, nous n'avons

observé de limites de sédimentation. Les culots des centrifugations à 5700 g et 101000 g ont l'aspect d'un gel qui adhère au fond du tube, et qui est à ce point compact qu'on peut retourner le tube et même le rincer sans déplacer le culot. Pour remettre le dépôt en suspension, il faut le disperser en petits fragments dans le tampon et agiter longuement le liquide en l'aspirant et en le refoulant à de nombreuses reprises à travers l'extrémité effilée d'une pipette. Aussi pouvons-nous considérer qu'au cours de la centrifugation toute particule qui atteint le culot s'y incorpore et ne retourne pas dans le liquide surnageant.

La formule de SCHLESINGER est donc applicable. A l'aide de cette formule nous avons calculé la vitesse de sédimentation de l'acide ribonucléique dans diverses conditions de centrifugation, à partir de la teneur en acide nucléique du liquide surnageant.

Nous avons préparé les extraits de foie dans trois tampons différents, car au cours d'une recherche antérieure<sup>16</sup> nous avions constaté que la nature du tampon a une influence sur la vitesse de sédimentation de l'acide nucléique. CLAUDE<sup>4</sup> a fait des constatations analogues.

Les résultats montrent que la vitesse de sédimentation de l'acide nucléique varie au cours de la centrifugation. Cela signifie que l'acide nucléique du cytoplasme est associé à des particules douées de vitesses de sédimentation très diverses, donc à des particules qui diffèrent considérablement par leurs dimensions, leur forme ou leur densité.

Cette hétérodispersion se manifeste aussi bien dans les extraits isotoniques (NaCl 0.85 %) que dans le phosphate dilué M/150 ou concentré M/15.

TABLE I

UN EXTRAIT DE FOIE DE SOURIS DANS UN TAMPON DE PHOSPHATE M/150 PH 7.2 A ÉTÉ CENTRIFUGÉ 25 MINUTES À 1460 g. LE LIQUIDE SURNAGEANT A ÉTÉ CENTRIFUGÉ À 5700 g POUR DES DURÉES VARIABLES. ON A DOSÉ L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE PRÉSENT DANS LE LIQUIDE SURNAGEANT

Durée de la centrifugation	Acide nucléique par ml	$\log_{10} \frac{C}{C_0}$	Vitesse de sédimentation
0	254γ	0	—
5 min.	237	1.969	$145 \cdot 10^{-12} \text{ cm} \cdot \text{dyne} \cdot \text{sec}^{-2}$
10	225	1.948	122
16	218	1.934	97
25	210	1.918	76
35	206	1.910	58

TABLE II

UN EXTRAIT DE FOIE DE SOURIS DANS LE MÊME TAMPON DE PHOSPHATE M/150 PH 7.2 A ÉTÉ SOUMIS À DES CENTRIFUGATIONS DE DURÉES DIVERSES À 101000 g. ON A DOSÉ L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DANS LE LIQUIDE SURNAGEANT

Durée de la centrifugation	Acide nucléique par ml	$\log_{10} \frac{C}{C_0}$	Vitesse de sédimentation
0	91 γ	0	—
5 min.	54.5	1.778	$20.5 \cdot 10^{-12} \text{ cm} \cdot \text{dyne} \cdot \text{sec}^{-2}$
10	38.7	1.628	17.2
20	28.2	1.491	11.8
30	20.0	1.342	10.1

TABLE III

UN EXTRAIT DE FOIE DE SOURIS DANS UN TAMPON DE PHOSPHATE M/15 PH 7.2 A SUBI TROIS CENTRIFUGATIONS SUCCESSIVES A DES VITESSES DIFFÉRENTES. ON A DOSÉ L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DANS LE LIQUIDE SURNAGEANT DE CHACUNE DES CENTRIFUGATIONS

Centrifugation	Acide nucléique restant dans le liquide surnageant	Réduction de la concentration	Vitesse de sédimentation
0 20 min à 1460 g	(100) 94	0.94	$140 \cdot 10^{-12} \text{ cm/d} \cdot \text{sec}^{-2}$
50 min à 5700 g	86	0.915	$40 \cdot 10^{-12}$
30 min à 101000 g	30	0.349	$7 \cdot 10^{-12}$

TABLE IV

UN EXTRAIT DE FOIE DANS UNE SOLUTION A 0.85 % DE NaCl DANS UN TAMPON DE PHOSPHATE M/150 PH 7.2 A SUBI UNE SÉRIE DE CENTRIFUGATIONS SUCCESSIVES SELON LE SCHÉMA FIG. I. ON A DOSÉ L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DANS LE LIQUIDE SURNAGEANT DE CHACUNE DES CENTRIFUGATIONS

Centrifugation	Acide nucléique restant dans le liquide surnageant	Réduction de la concentration	Vitesse de sédimentation
0	100 %	—	$166 \cdot 10^{-12} \text{ cm} \cdot \text{dyne} \cdot \text{sec}^{-2}$
2 + 30 min à 1460 g	85.3	0.853	$48.3 \cdot 10^{-12}$
+ 2 + 6 min à 5700 g	80.4	0.943	$7.0 \cdot 10^{-12}$
+ 2 + 60 min à 5700 g	74.0	0.920	$10 \cdot 10^{-12}$
+ 2 + 6 min à 101000 g	38.8	0.525	$0.46 \cdot 10^{-12}$
+ 2 + 60 min à 101000 g	30.0	0.772	

### Centrifugations fractionnées

#### I. Isolement de trois fractions

Un extrait de foie de souris dans un tampon de phosphate M/150 pH 7.2 a été centrifugé 20 minutes à 1460 g. Le sédiment lavé est gris beige et opaque, il constitue la fraction *a*. Le liquide surnageant est centrifugé à 5700 g pendant 50 minutes. Le culot lavé constitue la fraction *b*; ce culot est plus compact et plus transparent que *a*. Le liquide surnageant est centrifugé à 101000 g pendant 30 minutes. Le culot lavé est rose orange, tout à fait transparent, il constitue la fraction *c*.

On a dosé l'azote total et l'acide ribonucléique et déterminé l'activité de la phosphatase alcaline dans ces trois fractions :

Fraction	$\gamma$ ac. nucléique mg azote	mg azote mg ac. nucléique	Phosphatase	
			$\gamma$ Phosphore mg azote	$\gamma$ Phosphore mg ac. nucléique
<i>a</i>	239	4.18	131	549
<i>b</i>	510	1.96	153	300
<i>c</i>	844	1.19	57	68

## II. Isolement de 5 fractions

L'extrait de foie a été fractionné comme l'indique le schéma (Fig. 1). On a dosé l'azote total, l'acide ribonucléique, le phosphore liposoluble et déterminé l'activité de la phosphatase alcaline et de l'adénosinepyrophosphatase dans les cinq fractions.

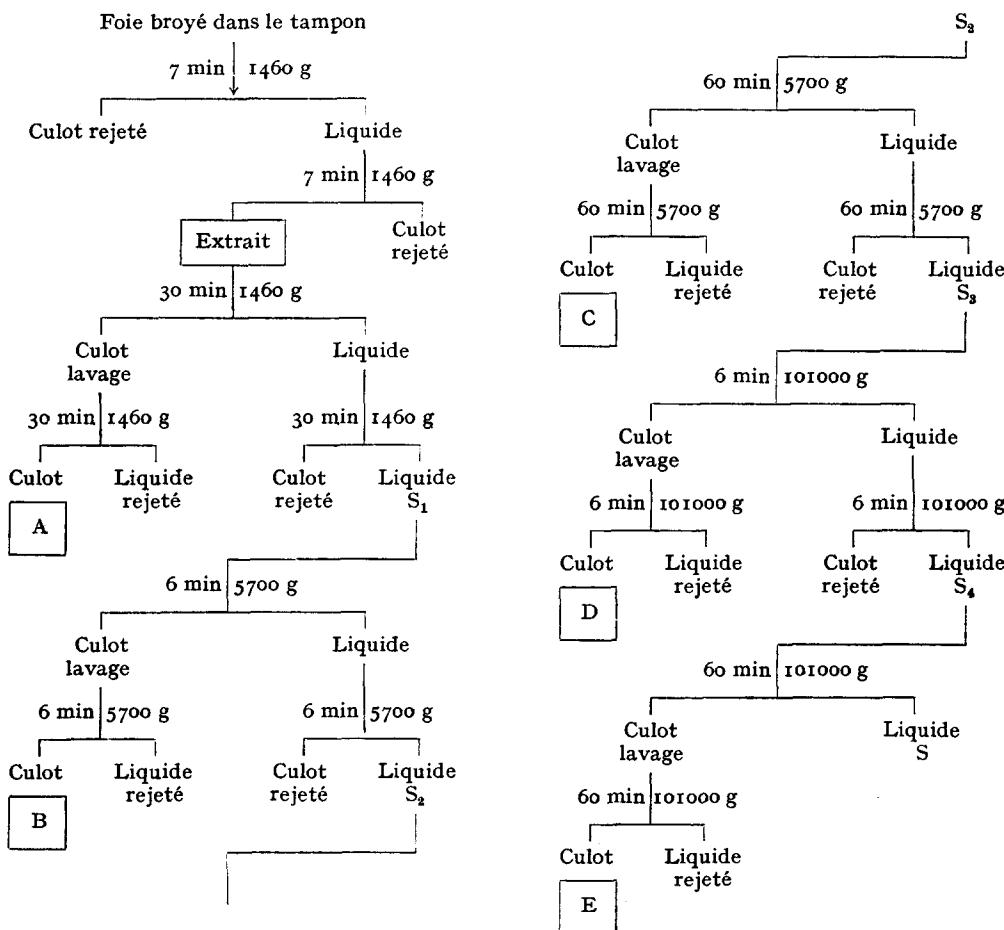


Fig. 1. Schéma du fractionnement

### EXTRAIT PRÉPARÉ DANS UN TAMPON DE PHOSPHATE M/150 PH 7.2

Fraction	$\gamma_{vac. nucl.}$ mg azote	$\frac{mg \text{ azote}}{mg \text{ ac. nucl.}}$	$\gamma P$ liposoluble		Phosphatase $\gamma P$ libéré		Apyrase $\gamma P$ libéré	
			par mg N	par mg ac. nucl.	par mg N	par mg ac. nucl.	par mg N	par mg ac. nucl.
A	91	11.0	42	460	56	615	480	5270
B	161	6.21	43	270	71	441	530	3290
C	320	3.13	69	220	100	313	525	1640
D	285	3.51	41	140	73	256	240	842
E	1025	0.98	17	17	1	1	30	29

EXTRAIT PRÉPARÉ DANS UNE SOLUTION A 0.85 % de NaCl DANS UN TAMPON DE PHOSPHATE M/150 PH 7.2

Fraction	$\gamma$ ac. nucl. mg azote	mg azote mg ac. nucl.	$\gamma$ Pliposoluble		Phosphatase $\gamma$ P libéré		Apyrase $\gamma$ P libérée	
			par mg N	par mg ac. nucl.	par mg N	par mg ac. nucl.	par mg N	par mg ac. nucl.
A	46.3	21.6	62.5	1320	80.7	1710	385	8140
B	84.0	11.9	48.0	721	113	1350	327	3910
C	165	6.06	84.2	511	181	1100	278	1690
D	392	2.55	72.1	184	148	379	179	457
E	720	1.39	33.8	47	4	6	113	157

Afin de les rendre plus éloquentes, nous avons représenté graphiquement ces résultats. Dans la Figure 2 les teneurs en acide nucléique, en phosphore liposoluble, et l'activité des enzymes ont été exprimées par rapport à l'azote total; dans la Figure 3, on a exprimé ces mêmes grandeurs en fonction de la teneur en acide nucléique.

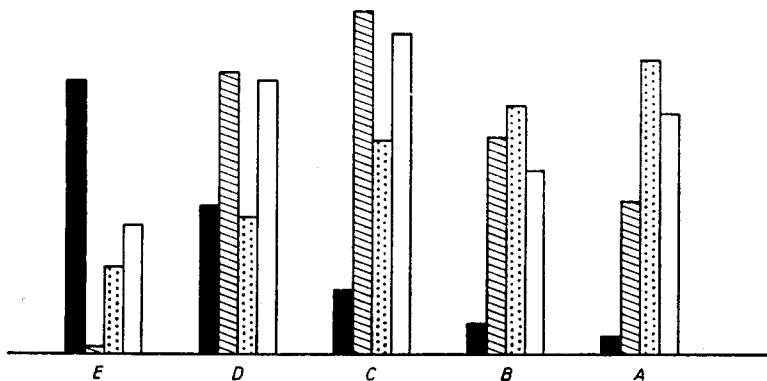
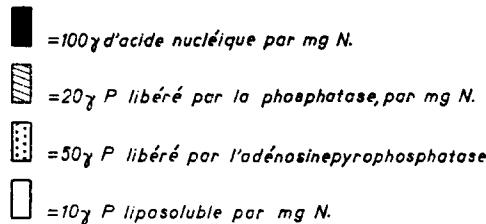


Fig. 2. Teneurs des différents groupes de granules A, B, C, D, E en acide ribonucléique, phosphore liposoluble, phosphatase alcaline et adénosinepyrophosphatase, rapportées à leur teneur en azote total

La Figure 2 révèle la grande hétérogénéité des particules cytoplasmiques, elle montre que les cinq groupes de granules que nous avons isolés arbitrairement par centrifugation fractionnée diffèrent tous par leur composition et leur richesse en enzymes.

La Figure 3 montre que si on exprime les quantités des divers constituants non plus rapport à l'azote total, mais par rapport à l'acide nucléique, ces quantités s'ordonnent d'une façon vraiment frappante, et sont d'autant plus grandes que les granules sédimentent plus rapidement.

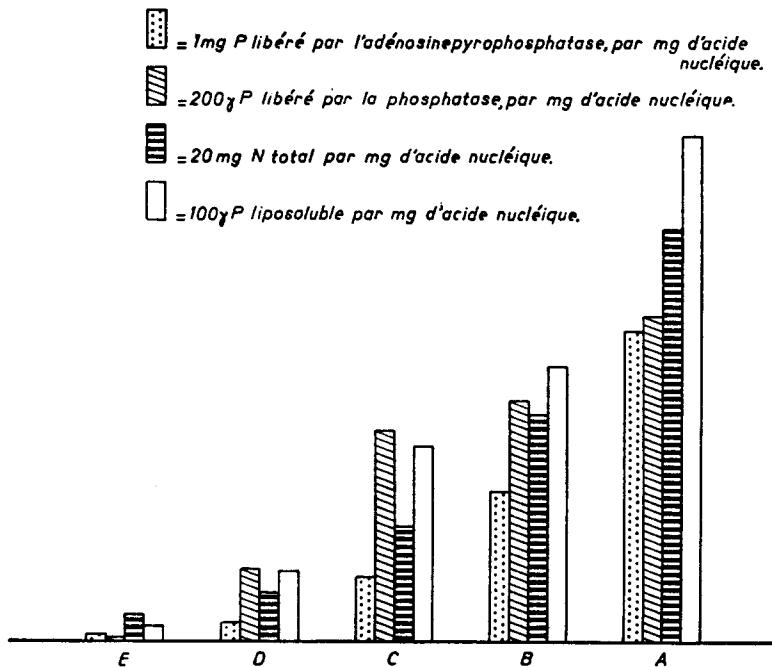


Fig. 3. Teneurs des différents groupes de granules A, B, C, D, E en azote total, phosphore liposoluble, phosphatase alcaline et adénosinepyrophosphatase, rapportées à leur teneur en acide ribonucléique

#### Aspect des différentes fractions

##### a. Culots

Le culot A est beige et opaque, B est compact, plus translucide que A; C est transparent et rosé, D et E ont l'aspect d'une gelée parfaitement transparente, rose orange.

##### b. Suspensions

Les suspensions obtenues en agitant les différents culots au contact du tampon sont fortement opalescentes, surtout pour les fractions A, B et C; l'opalescence de D est moins intense. Les suspensions de E paraissent jaunâtres et optiquement vides, à la lumière du jour; un éclairage latéral puissant y fait apparaître une opalescence.

##### c. Aspect ultramicroscopique

La suspension de A est formée de particules sphériques de dimensions diverses; certaines forment de petits amas ou des chaînes courtes, la plupart sont isolées. On distingue de plus quelques objets ponctuels plus brillants.

Si on a utilisé du sable lors du broyage du tissu, on voit aussi dans la fraction A de petits fragments de quartz: ils ont l'aspect de petits miroirs bousculés par l'agitation moléculaire et qui pirouettent dans la solution en lançant des éclairs très brillants. Ce sont eux qu'on aperçoit d'abord quand on examine la suspension.

B ressemble à A, mais les particules sphériques sont plus petites, on ne peut distinguer leur forme sphérique qu'au plus fort grossissement, les points brillants sont très rares, et il n'y a plus de particules de quartz.

C: à première vue, tout le champ de l'ultramicroscope paraît gris; sous un bon éclairage, ou perçoit un foisonnement intense, le fond gris se résout en particules, ou peut-être en amas de particules très petites, agitées d'un mouvement brownien extrêmement rapide.

D. Fond gris uniforme; on ne distingue plus les particules individuellement; on en perçoit cependant le mouvement d'ensemble quand on provoque un écoulement du liquide entre lame et lamelle.

E. Rien qu'un fond gris très peu lumineux.

L'examen des différentes fractions à l'ultramicroscope montre donc que les granules de la fraction E sont si petits qu'ils échappent à l'observation; ceux de la fraction A ont des dimensions largement microscopiques, on en distingue parfaitement la forme et les contours. Entre ces deux extrêmes, on trouve des granules ayant toutes les dimensions intermédiaires.

Les différences de vitesse de sédimentation traduisent donc des différences de taille et pas (seulement) des différences de densité. Il semble que toutes les tailles soient représentées.

#### DISCUSSION

I. CLAUDE a isolé deux groupes de particules cytoplasmiques: les „gros granules” et les „microsomes”; en adoptant d'autres conditions de centrifugation, nous avons isolé cinq fractions différentes. Il semble qu'on puisse répartir les granules en autant de groupes qu'on voudra, et rien dans nos expériences ni dans nos observations n'indique qu'il existe de démarcations bien nettes entre différents groupes de granules.

En nous basant sur l'analyse de la centrifugation de BECHHOLD et SCHLESINGER<sup>8</sup> nous avons calculé la répartition dans les cinq fractions que nous avons définies (Fig. 1) de particules qui formeraient une suspension parfaitement hétérodisperse, c'est-à-dire dans laquelle toutes les vitesses de sédimentation seraient représentées. On peut y parvenir par application répétée de la formule de SCHLESINGER à chaque centrifugation effectuée (y compris les lavages et les centrifugations intermédiaires) et à chaque vitesse de sédimentation. Nous avons effectué ce calcul pour des vitesses de sédimentation échelonnées de  $10^{-12}$  à  $40000 \text{ cm}^2/\text{dyne}\cdot\text{sec}^2$ . La Figure 4 rassemble les résultats de ce calcul. Les courbes expriment le pourcentage de la quantité primitive de chaque espèce de particules qui se trouvera dans les différentes fractions. (Afin de rendre la figure plus claire et de grouper tous les résultats en un même graphique, nous avons dû représenter la vitesse de sédimentation en coordonnées logarithmiques). Ces courbes de distribution des particules ne donnent l'image de

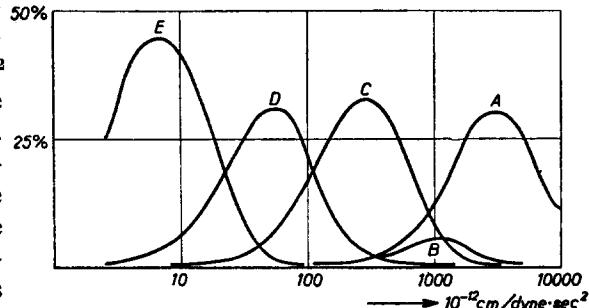


Fig. 4. Répartition théorique dans les cinq fractions définies plus haut de particules formant une suspension hétérodisperse. Les courbes expriment le pourcentage de chaque espèce de granules (définies par leur vitesse de sédimentation) qui se trouvera dans chacune des fractions A, B, C, D, E. Calcul selon BECHHOLD et SCHLESINGER<sup>8</sup>

la composition relative des cinq fractions que si les particules de toutes les espèces sont représentées en nombre égal dans l'extrait. Rien ne nous permet évidemment d'affirmer qu'il en soit ainsi. Quoi qu'il en soit, ce graphique indique pour chaque vitesse de sédimentation les quantités relatives des granules de l'espèce correspondante qu'on peut s'attendre à trouver dans chacune des fractions; il indique donc le degré de séparation pour chaque vitesse de sédimentation.

La formule de SCHLESINGER montre d'autre part qu'en multipliant les lavages et les centrifugations intermédiaires, on sépare de mieux en mieux les différentes fractions.

Par exemple, la concentration de particules correspondant à  $k = 75 \cdot 10^{-12}$  est réduite au  $1/10$  de sa valeur après 6 minutes de centrifugation à  $10100$  g dans l'appareil que nous utilisons. Une nouvelle centrifugation du liquide surnageant réduira encore dix fois la concentration de ces particules et l'amènera donc au  $1/100$  de sa valeur primitive.

Dès même, des lavages répétés des culots élimineront rapidement les particules à faible vitesse de sédimentation.

En multipliant les lavages et les centrifugations intermédiaires, on peut donc isoler d'une suspension parfaitement hétérodisperse des fractions assez bien délimitées et offrant une homogénéité relative.

Nous ne croyons donc pas qu'il y ait lieu de considérer les différents groupes de granules qu'on peut isoler par centrifugation fractionnée comme des formations cellulaires fondamentalement différentes. L'aspect des "gros granules" de CLAUDE est très différent de celui des "microsomes"; mais si on isole cinq fractions au lieu de deux, on constate que l'aspect des culots et l'aspect ultramicroscopique des granules varient progressivement d'une fraction à l'autre.

Il ne nous paraît pas possible en tout cas de supposer qu'il existe deux types bien distincts de granules: de gros granules qui contiendraient des enzymes et de petits qui n'en contiendraient pas. Nous voyons en effet que non seulement la teneur en enzymes par rapport à l'azote total, mais aussi les quantités *relatives* des différents enzymes et des divers constituants varient d'une fraction à l'autre. Dès lors, pour expliquer les différences de composition des cinq fractions par des mélanges de granules de types différents, il faudrait supposer qu'il existe autant de types de granules que de constituants étudiés.

D'autre part, les différences de concentration en enzymes et en constituants (par rapport à l'azote total) qu'on observe d'une fraction à l'autre, sont beaucoup plus petites que celles qu'on observerait si chaque enzyme était associé à des granules doués d'une vitesse de sédimentation définie et unique (voir courbes de distribution Fig. 4); il faut donc admettre que chaque enzyme se rencontre en association avec des particules douées de vitesses de sédimentation diverses.

L'image que nous suggèrent nos résultats est donc celle d'une grande hétérogénéité des particules cytoplasmiques. Il importe cependant de souligner que cette hétérogénéité est essentiellement d'ordre quantitatif: différences de vitesse de sédimentation (taille et densité), différences de composition et de teneur en enzymes. Mais derrière cette hétérogénéité quantitative subsiste une parenté, qui fut d'ailleurs déjà soulignée par CLAUDE<sup>1,4</sup>.

Lorsqu'on utilise pour chaque essai un foie de souris, on trouve d'une expérience à l'autre des fluctuations notables des teneurs en enzymes dans les différentes fractions. Par exemple, nous avons observé que la plus grande richesse en phosphatase alcaline (exprimée par rapport à l'azote) se situe soit à la fraction B soit à la fraction C; l'adénosinepyrophosphatase peut présenter un maximum d'activité à la fraction B. Mais une

observation reste constante : c'est que l'acide nucléique est d'autant plus abondant dans les granules qu'ils sont plus difficilement séémentables, c'est-à-dire plus petits.

Si on exprime l'activité des enzymes, la teneur en azote et en P liposoluble par rapport à l'acide ribonucléique présent, on voit les chiffres s'ordonner d'une manière très frappante : très bas pour la fraction formée des particules les plus petites, ils s'élèvent régulièrement quand on considère des particules de plus en plus grosses\*. Tout se passe comme si les granules des différentes fractions représentaient différents degrés de développement de complexes lipoprotéiques qui croîtraient ; comme si des protéines et des enzymes s'élaboraient autour d'un germe très riche en acide ribonucléique. Les variations des proportions des différents constituants et enzymes apparaîtraient alors comme des „dysharmonies de croissance” de ces particules.

Nous ne voulons voir dans cette interprétation de nos résultats qu'une simple hypothèse de travail qui devra être éprouvée par des recherches ultérieures. Elle est apparentée aux interprétations de la signification des granules proposées par BRACHET et JEENER<sup>5</sup>, BRACHET<sup>15</sup>, CLAUDE<sup>1</sup>, MOOG et STEINBACH<sup>17</sup>, elle les prolonge et les englobe.

Notons que cette interprétation viendrait expliquer aussi une constatation faite précédemment par J. BRACHET et nous-même<sup>16</sup> : dans les œufs vierges et les embryons jeunes, l'acide ribonucléique n'est pas séémenté en 10 minutes à 60000 g ; au cours du développement, une fraction de plus en plus importante de l'acide ribonucléique devient séémentable dans ces mêmes conditions. Nous avions exprimé ces résultats en disant que l'acide ribonucléique d'abord „libre” se combine au cours du développement à des particules séémentables. Il se pourrait en fait, que l'acide ribonucléique soit associé à de petites particules qui croîtraient au cours du développement.

C'est à des expériences nouvelles qu'il appartient de trancher ces questions. Le très intéressant travail de F. MOOG et STEINBACH<sup>17</sup> sur la variation de la teneur en phosphatase des granules de l'embryon de poulet au cours du développement, indique la voie à suivre.

2. Dans le présent travail, nous nous sommes attaché à déterminer la composition, la teneur en deux enzymes et quelques constituants des différentes fractions isolées ; nous n'avons pas cherché à déterminer la façon dont la quantité totale d'enzymes ou de constituants se répartit entre les différentes fractions, ainsi que cela fut fait dans de nombreux travaux. Les activités fermentaires que nous trouvons dans les granules les plus petits sont généralement plus faibles que celles que nous trouvons dans les plus gros, mais elles leur restent comparables. Cependant comme les plus gros granules représentent dans la cellule une masse beaucoup plus considérable que les plus petits, il est certain que la plus grande masse d'enzymes est associée à des granules gros ou moyens ainsi que le montrent des travaux nombreux, notamment ceux de CLAUDE<sup>4</sup> et collaborateurs<sup>6, 7</sup>.

C'est un réel plaisir pour nous d'exprimer aux Professeurs J. BRACHET et R. JEENER nos vifs remerciements pour les critiques et les suggestions que nous leur devons.

#### RÉSUMÉ

Dans les extraits de foie de souris, l'acide ribonucléique, les phospholipides, la phosphatase alcaline et l'adénosinepyrophosphatase sont associés à des particules de dimensions très diverses.

Cinq groupes de granules ont été isolés par centrifugation fractionnée ; ils diffèrent les uns des autres par leur composition et leur teneur en enzymes.

\* Toutefois dans les extraits faits dans un tampon de phosphate M/150, on trouve toujours (4 expériences) un excès d'azote total par rapport à l'acide nucléique à la fraction C. Mais même alors la relation tient pour les enzymes et les phospholipides.

Contrairement à l'opinion généralement admise, il ne semble pas qu'on puisse classer les particules en deux catégories dont l'une contiendrait des granules porteurs de ferments et l'autre des granules dépourvus d'enzymes.

Plus les granules sont petits, plus ils contiennent d'acide ribonucléique (par mg d'azote).  
Suit une discussion de ces résultats et des interprétations qu'ils suggèrent.

### SUMMARY

In mouse liver extracts, ribonucleic acid, phospholipids, alkaline phosphomonoesterase and adenosinepyrophosphatase are bound to particles of many different sizes.

Five groups of granules have been separated by differential centrifugation. They differ in composition and in enzyme content.

The results do not agree with the generally accepted view according to which the particles could be classified into two groups, the one composed of granules containing enzymes, the other of enzyme free granules.

The smaller the granules are, the more nucleic acid they contain (per mg nitrogen).  
These results and their possible implications are discussed.

### ZUSAMMENFASSUNG

In Mäuseleberextrakten sind die Ribonucleinsäure, die Phospholipide, die alkalische Phosphatase und die Adenosinpyrophosphatase mit Teilchen von sehr verschiedenen Dimensionen assoziiert. Fünf Gruppen Teilchen wurden durch fraktioniertes Zentrifugieren isoliert; sie unterschieden sich voneinander durch ihre Zusammensetzung und ihren Enzymgehalt.

Im Gegensatz zu der allgemein gangbaren Auffassung wird nicht der Eindruck erhalten, dass man die Teilchen in zwei Kategorien einteilen kann, von denen die eine die Teilchen enthält, die Enzymträger sind und die andere enzymarme Teilchen.

Je kleiner die Teilchen, desto mehr Ribonucleinsäure enthalten sie (pro mg Stickstoff).

Es folgt noch eine Diskussion dieser Resultate und der Interpretationen, zu denen die Resultate Anlass geben.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> A. CLAUDE, *Biol. Symposia*, 10 (1943) III.
- <sup>2</sup> A. CLAUDE, *Research Conference on Cancer*, 1945, p. 223.
- <sup>3</sup> A. CLAUDE, *Science*, 97 (1943) 451.
- <sup>4</sup> A. CLAUDE, *J. Exp. Med.*, 84 (1946) 51, 61.
- <sup>5</sup> J. BRACHET ET R. JEENER, *Enzymologia*, 11 (1943) 196.
- <sup>6</sup> W. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 585.
- <sup>7</sup> G. HOGEBOOM, A. CLAUDE ET R. HOTCHKISS, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 615.
- <sup>8</sup> M. SCHLESINGER, *Kolloid Z.*, 67 (1934) 135. Voir aussi H. BECHHOLD ET M. SCHLESINGER, *Biochem. Z.*, 236 (1931) 387.
- <sup>9</sup> R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 36 (1942) 790.
- <sup>10</sup> H. K. BARRENSCHEEN ET A. PEHAM, *Z. physiol. Chem.*, 272 (1942) 81.
- <sup>11</sup> W. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
- <sup>12</sup> I. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
- <sup>13</sup> J. WIAME, *Thèse*, Bruxelles, 1945.
- <sup>14</sup> K. P. DUBOIS ET V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 150 (1943) 185.
- <sup>15</sup> J. BRACHET, *Embryologie Chimique*, Paris, 1944, p. 463.
- <sup>16</sup> J. BRACHET ET H. CHANTRENNE, *Acta Biologica Belgica*, 2 (1944) 451.
- <sup>17</sup> F. MOOG ET H. B. STEINBACH, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 28 (1946) 209.
- <sup>18</sup> J. N. DAVIDSON ET C. WAYMOUTH, *Biochem. J.*, 38 (1944) 39.

Reçu le 13 Mai 1947