

MISE EN ÉVIDENCE PAR ÉLECTROPHORÈSE DE LIAISONS ENTRE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE NON CENTRIFUGEABLE A GRANDE VITESSE ET DES PROTÉINES CYTOPLASMIQUES

par

D. SZAFARZ

Laboratoire de Physiologie animale, Université Libre de Bruxelles (Belgique)

Des extraits de cellules très variées contiennent tous des particules centrifugeables comportant de l'acide ribonucléique^{1, 2, 3, 4, 5, 6}. Il a pu être démontré que ces liens entre l'acide ribonucléique et les particules existent effectivement dans la cellule et ne constituent pas un arte-fact^{1, 6}. Mais une fraction non négligeable de l'acide ribonucléique, particulièrement importante dans les extraits de cellules en multiplication active^{1, 2, 4, 6, 7} ne se laisse pas centrifuger à 60,000 g, 60 min; cette fraction présente un turnover plus élevé que celui des fractions centrifugeables, ce qui démontre qu'il ne s'agit pas d'acide ribonucléique détaché des particules et conduit à supposer qu'elle joue un rôle physiologique important^{6, 8, 9}.

Nous nous sommes proposé, dans ce travail, d'essayer d'établir si l'acide ribonucléique non sédimenté est sous une forme ionisée dans l'état normal de la cellule, ou s'il présente avec des protéines des liaisons stables analogues à celles existant dans les particules cytoplasmiques ou les virus¹⁰.

Que la question se pose est clairement indiqué par les résultats des recherches électrophorétiques de LONGSWORTH ET MCINNES¹¹, montrant que l'acide ribonucléique est capable d'interaction avec l'ovalbumine à certains p_H et pas à d'autres, et par les expériences de KLECZKOWSKI¹², qui montrent qu'il s'établit des liaisons entre l'acide ribonucléique et toute une série de protéines, pour autant que les p_H réalisés soient intermédiaires entre les points isoélectriques de l'acide nucleique et de la protéine étudiée, liaisons qui se rompent à des forces ioniques élevées.

Ces diverses études ont porté sur des mélanges artificiels d'acide ribonucléique de la levure et de protéines diverses. Les p_H et les forces ioniques utilisés par les auteurs ne répondent que rarement aux conditions physiologiques. Dans notre recherche, nous avons cherché à reproduire les conditions réalisées dans le milieu intracellulaire et nous avons uniquement utilisé des extraits de cellules.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1. Matériel

Comme matériel principal nous avons utilisé des cultures du flagellate sans chlorophylle "*Polytomella coeca*", cultivé sur milieu synthétique¹³. Nous avons également étudié, mais de façon moins

Bibliographie p. 567.

approfondie, l'acide ribonucléique du liquide surnageant d'ultracentrifugation du foie de rat nouveau-né et de l'oviducte de poule en période de ponte, organes faisant tous deux une forte synthèse de protéines.

2. Milieux d'extraction

a. *pour Polytomella*: Afin d'obtenir l'extrait dans un milieu imitant autant que possible les conditions réalisées au sein de la cellule, nous avons choisi la solution de CHAMBERS¹⁴, sorte de "Ringer intracellulaire", dont l'auteur a vérifié qu'elle n'altère pas l'état colloïdal du cytoplasme de divers protistes lorsqu'elle est injectée dans la cellule. Cette solution, dépourvue de Ca^{++} , est tamponnée par du phosphate $M/200$ pour des pH compris entre 6 et 8, par de l'acétate pour des pH inférieurs. Sa composition, en dehors du tampon, est: KCl 0.52%, NaCl 0.175%, citrate de Na 0.25%.

b. *pour le foie de rats nouveau-nés*: Cherchant encore une fois à réaliser un milieu "intracellulaire", nous nous sommes inspiré des connaissances acquises sur la composition ionique du milieu intracellulaire de foie de rat¹⁵. La solution utilisée a la composition suivante: KH_2PO_4 0.019 M , K_2HPO_4 0.064 M , KHCO_3 0.020 M , KCl 0.018 M ; son pH est 7.3.

c. *pour l'oviducte de poule*: Nous nous sommes servi de la même solution que pour le foie de rat.

3. Fractionnement

Les cellules de *Polytomella* sont prélevées en phase exponentielle de croissance, centrifugées à 2000 t/m et lavées au liquide de CHAMBERS tamponné, puis homogénéisées mécaniquement. L'homogénat est centrifugé à 12,000 t/m, le culot éliminé, et le liquide surnageant centrifugé pendant une heure à 40,000 t/m (60,000 g). C'est le liquide surnageant de cette dernière centrifugation qui sera soumis à l'analyse électrophorétique.

Les autres tissus, après homogénéisation au mix-blend, sont centrifugés dans les mêmes conditions que les cellules de *Polytomella*.

4. Analyse électrophorétique

Les liquides surnageants de la centrifugation à 40,000 t/m sont dialysés contre la solution—tampon correspondante.

Une première série d'expériences d'électrophorèse ont été effectuées avec un appareil d'électrophorèse d'après LONGSWORTH¹⁶*. Ces analyses ont été exécutées à 0° C, après des dialyses prolongées. Ces premières expériences ont porté uniquement sur des cellules de *Polytomella*.

La suite des expériences a été poursuivie avec des résultats identiques à l'aide de l'appareil de microélectrophorèse d'après ANTWEILER¹⁷. Cet appareil présente l'avantage de ne nécessiter que de petites quantités du liquide à analyser et un laps de temps relativement court pour effectuer une analyse électrophorétique. Les mesures se font par interférométrie tout le long de la cellule d'électrophorèse; on obtient ainsi la courbe intégrale ($n = f(x)$), donnant l'indice de réfraction ou la concentration en fonction de la distance parcourue, courbe qu'il suffit de différentier pour obtenir la courbe à maxima ($dn/dx = f(x)$) comparable à celle que donne la "Schlierenmethode". Les analyses avec cet appareil ont été effectuées à 12° C environ, la dialyse en microcuvettes spéciales ne dure que deux heures au maximum.

Au cours des expériences réalisées avec l'appareil d'ANTWEILER, nous n'avons pas cherché à déterminer la valeur absolue des mobilités; nous nous sommes contenté de faire des électrophorèses témoins avec de l'acide ribonucléique, dans les mêmes conditions de pH , de force ionique et de concentration que dans les extraits. Nous avons utilisé dans ce but, d'une part, de l'acide ribonucléique hautement polymérisé**, d'autre part de l'acide ribonucléique plus dégradé (SCHWARZ). L'influence du degré de polymérisation de l'acide ribonucléique sur la mobilité semble peu marquée¹⁸ et ne peut rendre caduques les conclusions que nous tirons de nos expériences.

Les expériences ont été effectuées à divers pH , afin de suivre le comportement des liaisons de l'acide ribonucléique dans un large domaine de pH débordant de part et d'autre des limites physiologiques. Nous avons également effectué quelques expériences à des forces ioniques variables et débordant aussi des limites physiologiques.

Chaque extrait soumis à l'analyse électrophorétique a été également analysé pour sa teneur en acide ribonucléique. Celui-ci est extrait selon la méthode de SCHNEIDER et dosé par la méthode à l'orcine¹⁹.

* Nous remercions vivement M. le Professeur V. DESREUX et les différents chercheurs de son service (Chimie physique, Université de Liège) pour la mise à notre disposition de l'appareil d'électrophorèse.

** Nous remercions M. GHYSEN du Laboratoire de Chimie physique, Université de Liège, pour les échantillons d'acide ribonucléique hautement polymérisé.

RÉSULTATS

1. Diagrammes d'électrophorèse à différents p_H (cellules de *Polytomella*)

Des électrophorèses ont été effectuées aux p_H de 5.65, 6.33, 7.00, 7.38 et 8.20. Les diagrammes sont caractérisés par une série de pointes, de mobilités bien définies et variant peu, sinon pas du tout, dans la zone de p_H examinée. Toutes ces pointes ont une mobilité largement inférieure à celle de l'acide ribonucléique libre. A titre d'exemple, nous donnons le diagramme d'une électrophorèse effectuée à p_H 5.65 (Fig. 2); l'extrait étudié contenait 0.39% d'acide ribonucléique. Si cet acide était sous forme libre (ionisée), il occuperait dans le diagramme d'électrophorèse la position indiquée par la courbe en pointillés. Ainsi qu'on peut le voir, aucune trace appréciable d'acide ribonucléique n'a été détectée à cette place. Cette courbe en pointillés a été obtenue à partir d'une solution d'acide nucléique dans le liquide de CHAMBERS tamponné au même p_H .



Fig. 1. Electrophorèse de liquide surnageant de *Polytomella* dans l'appareil de LONGSWORTH.
 $p_H = 7.00$; $\mu = 0.16$

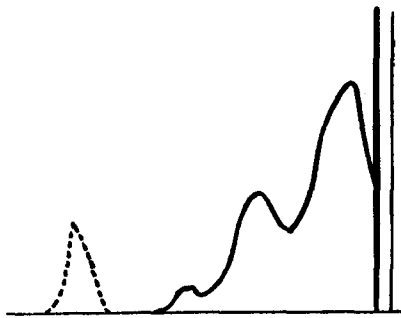


Fig. 2. Electrophorèse de liquide surnageant de *Polytomella* dans l'appareil d'ANTWEILER.
 $p_H = 5.65$; $\mu = 0.16$

Les Fig. 1 et 2 rendent bien compte de la concordance des résultats obtenus avec les deux appareils dont nous nous sommes servi: les deux diagrammes mettent en évidence les mêmes trois séries de pointes et l'absence de pointe décelable correspondant à l'acide ribonucléique libre.

2. Diagrammes d'électrophorèse à différentes forces ioniques (cellules de *Polytomella*)

Nous nous sommes placé à des forces ioniques de 0.08, 0.16 (force ionique du liquide de CHAMBERS et réalisée pour les expériences à différents p_H) et 0.31. Les diagrammes ont une allure différente de ceux faits à force ionique égale à 0.16; mais encore une fois, aucune pointe correspondant à la quantité d'acide ribonucléique dosée n'apparaît (Fig. 3 et 4).

3. Diagrammes d'électrophorèse de tissus autres que *Polytomella*

Les électrophorèses ont été effectuées à p_H 7.3 et à force ionique 0.25. La Fig. 5 montre le diagramme obtenu pour le foie de rat nouveau-né; la courbe en pointillés correspond au diagramme donné par une solution d'acide ribonucléique de mêmes p_H et force ionique et de concentration égale à celle dosée dans l'extrait hépatique (liquide

urnageant d'ultracentrifugation). L'oviducte de poule en période de ponte a donné un extrait trop opaque, aucun ménisque n'a été mis en évidence; néanmoins, nous avons pu vérifier que, aussi dans ce cas, il ne peut être décelé de ménisque qui aurait la mobilité correspondante à celle de l'acide ribonucléique libre.

DISCUSSION

Ces résultats, concordants sur le point de savoir sous quelle forme l'acide ribonucléique de la fraction cytoplasmique à la vitesse de sédimentation la plus basse se présente, montrent nettement que celui-ci est englobé dans des complexes, pour des valeurs du p_H et de la force ionique débordant largement autour de celles réalisées dans la cellule; la nature des liaisons dans lesquelles l'acide ribonucléique intervient reste encore indéterminée, que ce soient des liaisons sel ou des liaisons de complexes analogues à celles décrites par KLECZKOWSKI¹².

Comme d'autre part, dans les tissus étudiés, les autres fractions cytoplasmiques contiennent de l'acide ribonucléique lié à des particules lipido-protéiques déjà connues sous les noms de mitochondries, granules, microsomes, nous sommes amené à conclure que, *nulle part dans le cytoplasme, l'acide ribonucléique n'existe à l'état libre*.

Le complexe "nucléoprotéique" de la fraction cytoplasmique à vitesse de sédimentation la plus basse semble d'autre part ne pas être de nature homogène. En effet, l'acidification progressive de l'extrait conduit à un premier précipité riche en acide ribonucléique, qui se forme à p_H 5.20. Le liquide surnageant à p_H 5.20 contient encore une partie importante de l'acide ribonucléique de l'extrait, dont l'analyse électrophorétique montre qu'elle ne consiste pas en acide nucléique libre. L'acidification plus poussée de la solution ne conduit pas à un précipité d'acide ribonucléique pour des p_H voisins de 5.20; cette fraction "nucléoprotéique" ne précipite qu'à p_H 2.20, c'est-à-dire au voisinage du point iso-électrique de l'acide ribonucléique. Ces deux précipités contiennent la quasi-totalité de l'acide ribonucléique du liquide surnageant de centrifugation à 60 000 g, à savoir 82.3%; le rapport P/N est dans ces deux précipités respectivement de 5% et de 8%. On pourrait ainsi supposer que, dans la fraction non centrifugeable du cytoplasme,

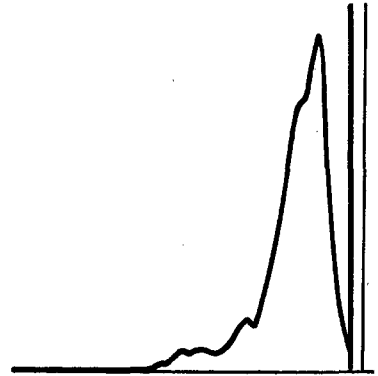


Fig. 3. Electrophorèse de liquide surnageant de *Polytomella* dans l'appareil d'ANTWEILER. $p_H = 7.0$; $\mu = 0.31$



Fig. 4. Electrophorèse de liquide surnageant de *Polytomella* dans l'appareil d'ANTWEILER. $p_H = 7.0$; $\mu = 0.08$

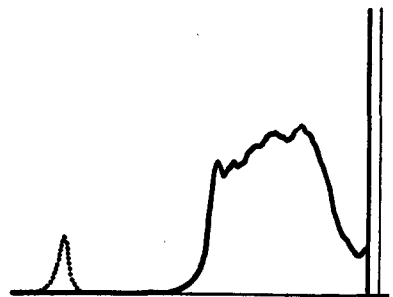


Fig. 5. Electrophorèse de liquide surnageant de foie de rat nouveau-né, dans l'appareil d'ANTWEILER. $p_H = 7.3$; $\mu = 0.25$

l'acide ribonucléique existe sous la forme de deux ribonucléoprotéides différents.

Il est intéressant de noter que les travaux de LONGSWORTH ET MCINNES¹¹ et les constatations que nous avons pu faire nous-même dans les conditions où nous nous sommes placé montrent qu'il ne s'établit de liaison entre l'acide ribonucléique et l'ovalbumine qu'à des p_H relativement bas, tandis que pour les protéines cytoplasmiques, le lien se maintient dans un large domaine de p_H . Il en ressortirait que les protéines du cytoplasme ont des propriétés différentes de celles de l'ovalbumine et que différentes protéines peuvent présenter avec l'acide ribonucléique des liaisons de types variés.

Nous avons également constaté que l'addition à un extrait de *Polytomella* de petites quantités d'acide ribonucléique de levure libre (sous forme ionisée), tant à p_H physiologique qu'à des p_H largement différents, donnait un diagramme d'électrophorèse dans lequel on ne pouvait détecter de ménisque correspondant à cet acide libre. Celui-ci s'est donc lié à des protéines présentes dans l'extrait. Ceci étant, il est évident que l'acide ribonucléique de la cellule ne peut exister à l'état libre, cette dernière disposant d'un excès de protéines susceptibles de fixer de l'acide ribonucléique. Les liaisons qui s'établissent entre ces protéines et l'acide nucléique ne sont pas du type sel ordinaire, ces dernières se dissociant dans un champ électrophorétique à p_H convenablement choisi.

Nous pouvons donc retenir comme conclusion certaine l'existence de complexes nucléoprotéiques dans la fraction non centrifugeable du cytoplasme et l'absence totale, du moins en quantités décelables, de l'acide ribonucléique à l'état libre. Une des formes possibles de ces complexes a un point isoélectrique proche de 5.20, tandis qu'une autre aurait le sien à un p_H beaucoup plus bas. Enfin, les liaisons existant entre l'acide ribonucléique et les protéines cytoplasmiques sont particulièrement stables²⁰; elles ne peuvent être rompues dans un champ électrophorétique, même quand on fait varier les conditions de p_H et de force ionique dans de très larges limites; elles semblent être de nature différente de celles qu'on observe entre l'acide ribonucléique et une protéine banale comme l'ovalbumine; elles ne sont donc vraisemblablement pas électrovalentes.

RÉSUMÉ

La fraction de l'acide ribonucléique cytoplasmique qui ne sédimente pas en une heure sous 60,000 g est liée à des protéines par des liaisons stables analogues à celles existant dans le cas des granules ribonucléoprotéiques (mitochondries, microsomes). Ces liaisons persistent pour des valeurs du p_H et de la force ionique débordant largement en dehors de celles réalisées dans le cytoplasme normal. Les nucléoprotéides étudiés sont vraisemblablement de deux types distincts.

SUMMARY

The fraction of the cytoplasmic ribonucleic acid which does not sediment in one hour at 60,000 g, is bound to proteins by stable bonds, which are analogous to those existing in the ribonucleoprotein granules (mitochondria, microsomes). These bonds are not ruptured for values of p_H and ionic strength which are beyond those existing in the normal cytoplasm. The nucleoproteins studied seem to be of two distinct types.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ribonukleinsäurefraktion aus Cytoplasma, die in einer Stunde bei 60,000 g nicht sedimentiert, ist durch stabile Bindungen an Proteine gebunden; diese Bindungen sind den, in den Cytoplasmateilchen vorkommenden ähnlich. Sie werden auch bei p_H - und Ionenstärke-werten, die viel von denen des normalen Cytoplasmas abweichen, nicht zerstört. Die untersuchten Nukleoproteine gehören wahrscheinlich zwei verschiedenen Typen an.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BRACHET ET R. JEENER, *Enzymologia*, 11 (1944) 196.
- ² R. JEENER ET J. BRACHET, *Enzymologia*, 11 (1944) 222.
- ³ A. CLAUDE, *J. Exptl Med.*, 84 (1946) 51.
- ⁴ H. CHANTRENNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 437.
- ⁵ R. JEENER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 633.
- ⁶ R. JEENER, *Nature*, 163 (1949) 837.
- ⁷ J. BRACHET ET H. CHANTRENNE, *Acta Biol. Belg.*, 2 (1944) 451.
- ⁸ R. JEENER ET D. SZAFARZ, *Arch. Biochem.*, 26 (1950) 54.
- ⁹ R. JEENER ET D. SZAFARZ, *Experientia*, 6 (1950) 60.
- ¹⁰ G. SCHRAMM, *Z. Naturforsch.*, 2b (1947) 112.
- ¹¹ L. G. LONGSWORTH ET D. A. MACINNES, *J. Gen. Physiol.*, 25 (1941-'42) 507.
- ¹² A. KLECZKOWSKI, *Biochem. J.*, 40 (1946) 677.
- ¹³ A. LWOFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 270.
- ¹⁴ R. CHAMBERS, *Biological Symposia*, 10 (1943) 91.
- ¹⁵ O. LOWRY, *Biological Symposia*, 10 (1943) 233.
- ¹⁶ L. G. LONGSWORTH ET D. A. MACINNES, *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (1940) 705.
- ¹⁷ H. J. ANTWEILER, *Kolloid-Z.*, 115 (1949) 130.
- ¹⁸ L. DELCAMBE (Université de Liège), communication personnelle.
- ¹⁹ W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
- ²⁰ E. CHARGAFF ET E. VISCHER, *Ann. Rev. Biochem.*, 17 (1948) 202.

Reçu le 7 octobre 1950