

BBA 79020

PRESENCE DE GLYCOSYLTRANSFERASES A ACCEPTEURS CHROMATINIENS DANS LES MEMBRANES NUCLEAIRES D'HEPATOCYTES DE SINGE

G. BERTHILLIER, J.P. BENEDETTO et R. GOT

*Laboratoire de Biologie et Technologie des Membranes, Université Claude Bernard, Lyon I,
43 Bd. du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex (France)*

(Received May 27th, 1980)

Key words: Glycosyltransferase; Nuclear membrane; Chromatin; (Monkey hepatocyte)

The presence of glycosyltransferases on chromatin acceptors in monkey liver nuclear membranes

Summary

Nuclei were prepared from monkey hepatocytes by centrifugation of the homogenate on a cushion of 2.3 M sucrose, during 45 min at 100 000 $\times g$. The yield was $2.2 \cdot 10^7$ nuclei per g of liver, and 70% of the homogenate DNA was recovered in these nuclei. An electron microscopic study as well as a biochemical analysis of marker enzymes showed that the nuclei are not contaminated by other subcellular fractions, especially endoplasmic reticulum. A mannosyltransferase and an *N*-acetylglucosaminyltransferase, working on endogenous glycoproteic acceptors, are present in the nuclei for 1.4 and 6.5% of the homogenate activities, respectively.

The nuclei are hydrolysed by DNAase I. The suspension, adjusted in 1.9 M sucrose, was centrifuged for 2 h at 100 000 $\times g$, under a buffer layer. Purified nuclear membranes were collected at the interface. These membranes did not contain any more endoplasmic reticulum enzyme activities, but the mannosyl and *N*-acetylglucosaminyltransferase activities were still present. They essentially work on an exogenous chromatin acceptor, prepared by lysis of the nuclei. The eventual role of these glycosyltransferases in the glycosylation of non-histone proteins is discussed.

Résumé

Les noyaux d'hépatocytes de singe sont préparés par 45 min de centrifugation de l'homogénat à $100\,000 \times g$ sur une couche 2.3 M en saccharose. $2.2 \cdot 10^7$ noyaux sont obtenus par g de foie, contenant plus de 70% du DNA de l'homogénat. Une étude en microscopie électronique ainsi qu'une analyse d'activités enzymatiques caractéristiques des différentes fractions sub-cellulaires montrent que ces noyaux sont peu contaminés, en particulier par le reticulum endoplasmique. Des glycosyltransférases catalysant le transfert, à des accepteurs glycoprotéiques endogènes, de mannose et de *N*-acétylglucosamine, sont présentes dans ces noyaux, dans des proportions représentant, respectivement, 1.4 et 6.5% des activités de l'homogénat.

Après action de DNAase I sur les noyaux, des membranes nucléaires purifiées sont recueillies par 2 h de centrifugation à $100\,000 \times g$, à l'interface entre le tampon et une solution 1.9 M en saccharose. Ces membranes, qui ne contiennent pratiquement plus d'activités enzymatiques endoplasmiques, possèdent toujours une activité de transfert de mannose et de *N*-acétylglucosamine, se manifestant essentiellement sur accepteur exogène chromatinien. Le rôle joué éventuellement par ces glycosyltransférases sur la glycosylation des protéines non-histones est discuté.

Introduction

Des glycosyltransférases ont été mises en évidence dans pratiquement tous les organites cellulaires et systèmes membranaires des cellules eucaryotes. En particulier, ces enzymes ont été détectées dans les noyaux d'une moisisseure, *Dictyostelium discoideum* [1], de levure [2] et de foie de rat [3]. Toutefois, au moins chez cet organisme supérieur, la localisation sub-nucléaire de ces enzymes n'a pas été évoquée. De même, si diverses hypothèses ont été émises, les accepteurs glycoprotéiques endogènes de ces glycosyltransférases n'ont pas été identifiés.

Le but de ce travail est de montrer que les membranes périnucléaires des hépatocytes de singe contiennent une mannosyltransférase et une *N*-acétylglucosaminyltransférase qui fonctionnent avec des accepteurs présents dans la chromatine.

Matériel et Méthodes

Matériel

Les singes sont des cercopithèques (*Erythrocebus patas*) aimablement fournis par IFFA-Mérieux. Il s'agit d'adultes des deux sexes nourris à volonté. Les foies sont prélevés stérilement et immédiatement transportés au laboratoire dans la glace fondante. Ils sont alors dilacérés et lavés, à 0°C, dans le tampon de broyage Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM; KCl 25 mM; MgCl₂ 5 mM; 0.25 M en saccharose. Puis les morceaux sont repris dans deux fois leur poids de tampon.

Préparation des noyaux

La méthode utilisée est adaptée de celle de Blobel et van Potter [4]. Compte

tenu de la texture très fibreuse du foie de singe, un broyage mécanique préalable, dans une moulinette à persil, s'est avéré indispensable. L'homogénéisation elle-même est réalisée par trois passages de 20 s dans l'homogénéiseur verre-Teflon de Potter (dégagement 0.15 mm) à 1500 rev./min. Après filtration sur une couche de gaze, l'homogénat est amené à 1.8 M en saccharose par addition de saccharose 2.3 M, tamponné comme ci-dessus; 28 ml de la suspension sont alors déposés sur une couche de 9 ml de ce tampon, dans des tubes de rotor SW-27 (Beckman). Après 45 min de centrifugation à 100 000 × g, les noyaux sont rassemblés sous forme de culots qui sont lavés deux fois avec le tampon pH 7.5, 0.25 M en saccharose.

Préparation des membrane nucléaires

La méthode est adaptée de celle de Monneron et d'Alayer [5]. Les noyaux préparés comme précédemment sont repris dans le tampon pH 7.5; 50 mM en MgCl₂ et incubés en présence de DNAase I (Sigma), à raison de 1 mg pour 4 · 10⁸ noyaux, 30 min à 30°C. Le milieu est ensuite ajusté à 1.9 M en saccharose et 0.3 M en MgCl₂; 14 ml sont déposés au fond d'un tube de rotor SW-27 (Beckman) et recouverts par 22 ml du tampon pH 7.5, 0.3 M en MgCl₂. Après 2 h de centrifugation à 100 000 × g, les membranes nucléaires rassemblées à l'interface sont collectées, lavées par le tampon et recentrifugées 45 min à 300 000 × g.

Préparation de la chromatine [6]

Les noyaux sont repris dans le milieu de lyse: EDTA 0.2 mM, phényl-méthanesulfonyl fluorure 0.2 mM, pH 7. Après 30 min à 0°C, le lysat est centrifugé 10 min à 1000 × g. La chromatine reste en solution, alors que les débris membranaires se retrouvent dans le sédiment.

Les microsomes sont préparés selon une méthode précédemment décrite [7].

Dosages enzymatiques

Les enzymes marqueuses dosées dans les différentes fractions sont réper-

TABLEAU I
ENZYMES UTILISÉS COMME MARQUEURS DES FRACTIONS CELLULAIRES

Numéro (EC)	Nom	Substrat	Concentration en substrat (mM)	pH	Référence
1.3.99.1	Succinate:cytochrome c oxydoréductase	succinate cytochrome c	0.33 0.02	7.4	8
1.6.99.3	NADH:cytochrome c oxydoréductase	NADH cytochrome c	0.15 0.02	7.2	9
1.6.99.1	NADPH:cytochrome c réductase	NADPH cytochrome c	0.15 0.02	7.4	9
1.4.3.4	Monoamine oxydase	benzylamine	3	8	10
1.1.1.49	Glucose-6-phosphate deshydrogénase	glucose 6-phosphate	0.07	7.9	11
3.6.1.3	Adenosine triphosphatase	Tris-ATP	2.5	7.6	12
1.1.1.37	Malate deshydrogénase	oxaloacétate	0.37	7.4	13
3.1.3.9	Glucose-6-phosphatase	glucose 6-phosphate	10	6.5	14

toriées dans le Tableau I. Les conditions optimales de dosage avaient été préalablement précisées [7].

La mannosyltransférase (EC 2.4.1.48) est dosée sur accepteur endogène dans un milieu contenant, pour un volume final de 0.35 ml: tampon 3-(*N*-morpholino)propanesulfonique acide (pH 7.0), 0.15 M; MnCl₂, 10 mM; GDP-[U-¹⁴C]mannose (The Radiochemical Centre, Amersham, 173 mCi/mmol) 0.31 μM; extrait enzymatique 100–200 μl (0.1 mg de protéine). Après incubation à 30°C, la réaction est arrêtée par addition de 1 ml d'acide trichloracétique à 20%. Une filtration sur filtre Whatman GF/B est suivie d'un lavage par le mélange méthylal/méthanol 4 : 1 (v/v) *. Après séchage du filtre, la radioactivité retenue est mesurée avec 10 ml du mélange scintillant dans un compteur Tricarb (Packard).

La *N*-acétylglucosaminyltransférase (EC 2.4.1.51) est dosée sur accepteur endogène dans un milieu contenant, pour un volume de 0.35 ml, tampon 2-(*N*-morpholino)éthanesulfonique acide (pH 6.5), 0.15 M; MnCl₂, 5 mM; UDP-*N*[U-¹⁴C]acétylglucosamine (The Radiochemical Centre, Amersham, 300 mCi/mmol) 5.4 μM. Le processus d'incubation, d'arrêt de la réaction, de récupération de la radioactivité transférée est le même que ci-dessus.

Les produits de dégradation des nucléoside-diphosphate-sucres provenant de l'action éventuelle de pyrophosphatasées (EC 3.6.1.21) sont identifiés de la façon suivante: dans des milieux d'incubation identiques à ceux du transfert, la réaction est arrêtée par 20 μl d'EDTA 87.5 mM et un dépôt de 50 μl est effectué immédiatement sur papier Whatman no 3 préalablement lavé par une solution d'EDTA (pH. 7), 10 mM [15]. Le développement du chromatogramme est réalisé durant 20 h à 20°C dans le solvant acétate de sodium M pH 3.8/ethanol 2 : 5 (v/v) en présence de témoins mannose, mannose 1-phosphate, GDPmannose, *N*-acétylglucosamine et UDP-*N*-acétylglucosamine. Après séchage, les zones des échantillons correspondant aux témoins sont découpées et analysées pour leur teneur en radioactivité.

Microscopie électronique

La qualité de préparation des noyaux est vérifiée en microscopie à contraste de phase et en microscopie électronique. Pour cette dernière technique, les culots de noyaux sont fixés par 1 h d'incubation à 4°C dans le mélange glutaraldéhyde à 4%/tampon cacodylate de sodium (pH 7.4), 0.4 M/eau distillée 2 : 1 : 1 (v/v/v). Après un lavage d'une nuit dans le mélange tampon cacodylate (pH 7.4), 0.4 M/saccharose 0.4 M/eau distillée 1 : 2 : 1 (v/v/v), les culots sont découpés en petits blocs et soumis à trois lavages d'une heure avec la même solution. Une post-fixation osmiée d'une heure à 0°C est ensuite effectuée par le mélange OsO₄ à 2%/tampon cacodylate (pH 7.4), 0.4 M/saccharose 0.6 M 2 : 1 : 1 (v/v/v). Après une déshydratation rapide par des solutions d'alcool éthylique de degré croissant, les échantillons sont imprégnés, puis inclus

* Plus de 50% de la radioactivité fixée sur le filtre passe dans la phase organique. Ce résultat, confirmé par une extraction selon Folch et al. [26], suggère la présence d'intermédiaires polyisopréniques. Leur étude est en cours, ce qui fera l'objet d'une publication ultérieure.

dans un mélange d'Epon-Araldite. Les coupes ultra-fines sont contrastées par une double coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb et observées au microscope.

Dosages chimiques

Les protéines sont dosées par la méthode de Hartree [16] et le DNA par la méthode de Burton [17] après extraction acide à chaud [18].

Résultats

De façon très reproductible, on obtient environ $2.2 \cdot 10^7$ noyaux purifiés par g de foie, contenant plus de 70% du DNA de l'homogénat. Le contrôle des préparations de noyaux, réalisé par microscopie électronique à transmission montre qu'il n'y a pas ou peu de contaminations cytoplasmiques (Fig. 1, planche A) et que l'intégrité des structures nucléaires est conservée (Fig. 1, planche B).

L'analyse biochimique confirme ces premières observations. Les activités enzymatiques caractéristiques des mitochondries, des membranes plasmiques, de la phase cytoplasmique soluble, ainsi que la NADH- et la NADPH-cytochrome c réductase ne se retrouvent dans les noyaux qu'en très faible proportion, avec une activité spécifique nettement inférieure à celle de l'homogénat (Tableau II). Au contraire, les deux glycosyltransférases, dosées sur accepteur endogène et la glucose-6-phosphatase présentent des activités spécifiques supérieures à celles de l'homogénat avec un taux de récupération allant de 1.1% pour la glucose-6-phosphatase à 6.5% pour la *N*-acétylglucosaminyltransférase.

La présence, dans ces noyaux purifiés, de glucose-6-phosphatase, enzyme appartenant classiquement au réticulum endoplasmique, amène à envisager une contamination par ces membranes. Toutefois, il faut considérer que les deux oxydoréductases, également caractéristiques du réticulum endoplasmique, sont pratiquement absentes de ces noyaux; de plus, la présence de glucose-6-phosphatase a déjà été signalée dans les membranes nucléaires du foie de mammifères [19,20]. En fait, il semble que la présence de cette activité dépende de la méthode plus ou moins douce de préparation. D'ailleurs, la glucose-6-phosphatase est pratiquement absente des membranes nucléaires, où l'on retrouve encore un pourcentage très faible des deux oxydo-réductases (Tableau II). Au sujet des transférases, un problème particulier se pose. En effet, la détermination des activités de transfert est effectuée sur accepteurs glycoprotéiques endogènes. Or, dans certaines préparations membranaires, une perte importante des activités de transfert par rapport au noyau apparaissait, perte nettement plus importante pour le mannose. Aussi, les chiffres du Tableau II ne sont donnés qu'à titre indicatif pour les deux glycosyltransférases. En fait, cette mauvaise récupération de l'activité nucléaire dans les membranes n'est pas liée aux enzymes, mais à la perte de substrats accepteurs. En effet, si l'on rajoute de la chromatine (évidemment dépourvue d'activité de transfert) aux milieux d'incubation, on augmente considérablement le

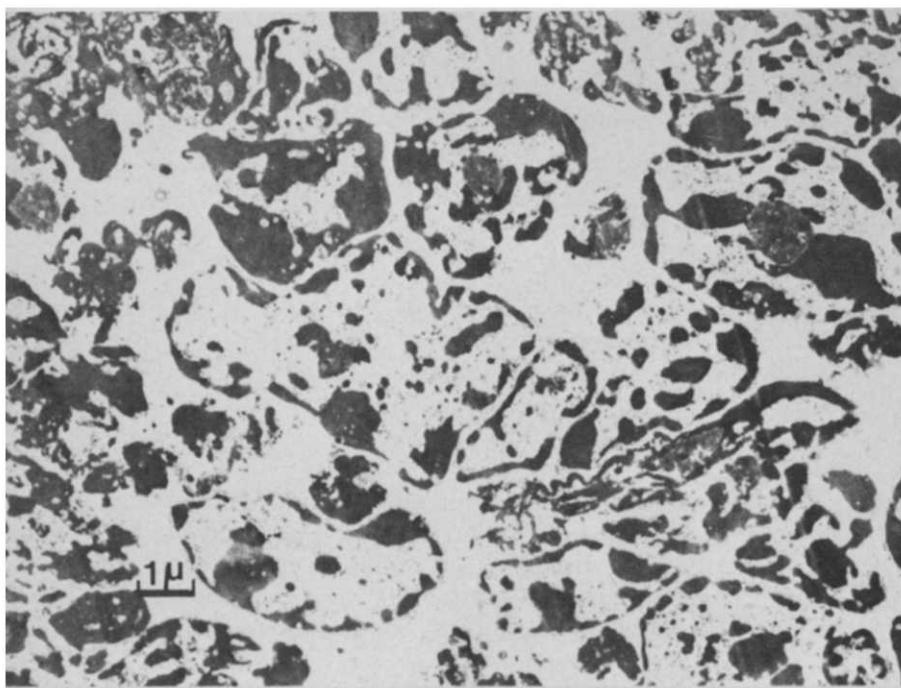


PLANCHE A

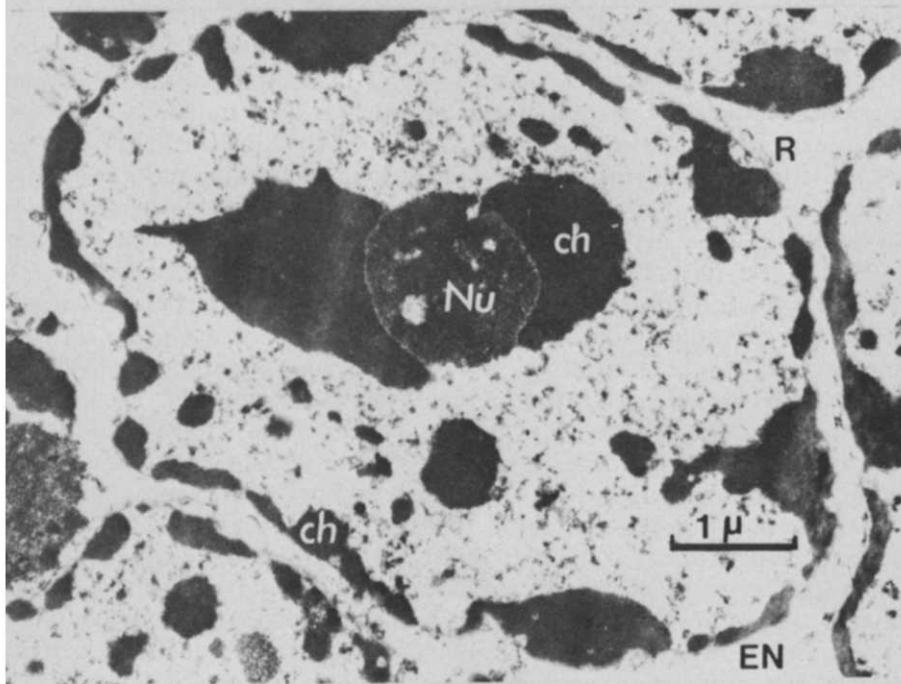


PLANCHE B

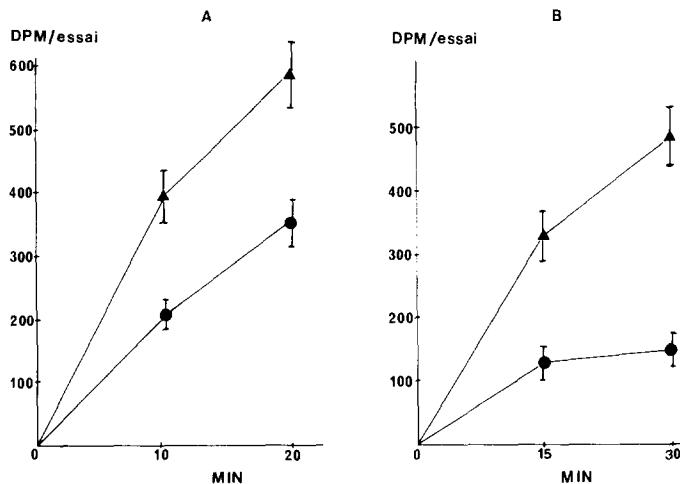


Fig. 2. Cinétiques d'incorporation de $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ mannose (A) et de $N\text{-}[U\text{-}^{14}\text{C}]$ acetylglucosamine (B), dans des accepteurs glycoprotéiques chromatiniens, catalysée par les membranes nucléaires des hépatocytes de singe. Les milieux d'incubation (cf. Matériel et Méthodes) contiennent 320 µg de protéines chromatiniennes. ●—●, sur accepteurs endogènes; ▲—▲, sur accepteurs chromatiniens. Chaque point représente la moyenne de quatre expériences différentes, encadrée par les valeurs extrêmes correspondantes.

transfert de mannose ou de *N*-acetylglucosamine comme le montrent les cinétiques de la Fig. 2.

Les modalités de fonctionnement des deux glycosyltransférases sont données dans le Tableau III. Si l'on incube, dans ces conditions, des microsomes dont la qualité a été contrôlée [7], il est intéressant de noter que les activités de transfert sur accepteurs endogènes sont de 10 à 20 fois plus faibles que celles des membranes nucléaires, avec une activation pratiquement nulle en présence d'accepteurs chromatiniens (Tableau IV).

Ajoutons enfin qu'aucune activité pyrophosphatase n'a été mise en évidence dans les noyaux purifiés ou les membranes nucléaires, dans les conditions d'incubation propres aux glycosyltransférases.

Discussion

Il apparaît donc que les membranes périnucléaires d'hépatocytes de singe contiennent une mannosyltransférase et une *N*-acetylglucosaminyltransférase. Ces deux activités avaient déjà été mises en évidence dans les membranes nucléaires de levure [2]. Toutefois, la pureté des membranes utilisées dans ce travail avait été essentiellement démontrée par les dosages de RNA, de DNA et de RNA polymérase-DNA dépendante. En particulier, aucune recherche

Fig. 1. Planche A. Section ultrafine réalisée dans un culot de noyaux de foie de singe exempt de contamination cytoplasmique. Grossissement, $\times 6000$. Planche B. Vue détaillée d'un noyau de la même préparation que ci-dessus. L'enveloppe nucléaire (EN) est conservée et montre des ribosomes (R) sur sa face externe. Des amas de chromatine (Ch) sont bien visibles à la périphérie. Il en existe également associés au nucléole (Nu). Grossissement, $\times 16\,000$.

TABLEAU II

RÉPARTITION DU DNA ET D'ACTIVITÉS ENZYMATIQUES CARACTÉRISTIQUES DANS LES NOYAUX ET LES MEMBRANES NUCLÉAIRES D'HÉPATOCYTES DE SINGE

Le premier chiffre donne le pourcentage par rapport à l'homogénat total, le chiffre entre parenthèses représente le taux (en mg) ou l'activité (exprimée en nmol · min⁻¹) rapportés au mg de protéine. Les valeurs sont la moyenne de quatre expériences.

Constituant	Homogénat	Noyaux	Membranes
DNA	100 (0.005)	71 (0.3 ± 0.05)	0
Succinate:cytochrome c réductase	100 (330 ± 40)	0.005 (2 ± 1)	0
Malate déshydrogénase	100 (2.2 ± 0.5)	0.32 (0.8 ± 0.2)	0.001 (0.04 ± 0.005)
Monoamine oxydase ($\times 10^{-3}$)	100 (22.5 ± 3)	0	0
NADH:cytochrome c réductase	100 (63.5 ± 5)	0.23 (16 ± 3)	0.08 (120 ± 45)
NADPH:cytochrome c réductase	100 (17.5 ± 2)	0.4 (8 ± 2.5)	0.04 (15 ± 4)
Glucose-6-phosphatase	100 (80 ± 10)	1.1 (102 ± 16)	0
Mg ²⁺ adenosine triphosphatase	100 (430 ± 40)	0.26 (125 ± 50)	0.04 (400 ± 150)
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	100 (8 ± 1.5)	0	0
Mannosyltransférase ($\times 10^3$)	100 (0.36 ± 0.1)	1.4 (0.56 ± 0.15)	0.07 (0.38)
<i>N</i> -Acétylglucosaminyltransférase ($\times 10^3$)	100 (0.032 ± 0.004)	6.5 (0.24 ± 0.05)	2 (1.5)

TABLEAU III

CARACTÉRISTIQUES DE FONCTIONEMENT DES GLYCOSYLTANSFÉRASES NUCLÉAIRES

	Mannosyltransférase	<i>N</i> -Acétylglucosaminyltransférase
pH optimum	7	6.5
Température optimale	30°C	30°C
K _m (GDP-mannose)	0.17 μM	—
K _m (UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine)	—	2.5 μM
Concentration optimale en Mn ²⁺	10 mM	5 mM
Action de l'EDTA 5 mM	100% d'inhibition	100% d'inhibition
Effect du Triton X-100 0.2% (v/v)	100% d'inhibition	100% d'inhibition

TABLEAU IV

GLYCOSYLTANSFÉRASES MICROSOMIQUES DU FOIE DE SINGE

Les résultats sont exprimés en pmol · min⁻¹ et rapportés au mg de protéines microsomiques. Les valeurs sont la moyenne de quatre expériences.

	Mannosyl-transférase	<i>N</i> -Acétyl-glucosaminyl-transférase
Activité sur accepteurs endogènes	0.030 ± 0.010	0.065 ± 0.016
Activité en présence de 320 μg d'accepteurs chromatiniens	0.034 ± 0.012	0.068 ± 0.018

de contamination éventuelle par le réticulum endoplasmique n'était signalée. Or, la localisation cellulaire principale de ces deux transférases se situe justement dans les membranes endoplasmiques qui ont, de plus, une relation étroite avec les membranes nucléaires. Pour acquérir la certitude de l'existence de glycosyltransférases dans les membranes nucléaires, il faut absolument lever l'hypothèque d'une contamination cytoplasmique. L'analyse enzymatique que nous avons effectuée semble répondre à cette condition, puisque les membranes périnucléaires sont pratiquement dépourvues de trois activités enzymatiques, caractéristiques du réticulum endoplasmique et retrouvées précédemment dans une fraction microsomique du foie de singe [7]. Il faut également prendre en considération le facteur d'enrichissement de la *N*-acétylglucosaminyltransférase vis à vis de l'homogénat et des noyaux (6-fois), alors que celui de la mannosyltransférase reste sensiblement égal à 1 et ce malgré la perte du substrat accepteur. A ce propos, cette divergence dans la récupération des deux activités de transfert au niveau des membranes nucléaires semble peu compatible avec une contamination. En effet, les deux glycosyltransférases présentent la même localisation endoplasmique et fonctionnent avec des accepteurs endogènes identiques; on voit mal comment les membranes nucléaires seraient contaminées spécifiquement par la *N*-acétylglucosaminyltransférase et pas par la mannosyltransférase. Il faut également insister sur la très faible activité retrouvée au niveau des microsomes dans les conditions du fonctionnement optimum avec les membranes nucléaires.

Mais c'est le rôle joué par la chromatine en tant qu'accepteur de mannose et de *N*-acétylglucosamine qui est le plus intéressant. Ainsi, les accepteurs chromatiniens semblent spécifiques des glycosyltransférases nucléaires, puisqu'ils ne sont l'objet d'aucun transfert de la part des microsomes. Il s'agit là d'une indication précieuse sur le rôle biologique des transférases nucléaires: glycosyler des protéines chromatiniques, vraisemblablement des protéines non histones.

En effet, la présence de sucres dans les protéines non-histones à déjà été montrée soit par analyse chimique [21-23], soit par marquage à l'aide de glucosamine tritiée [24], soit par fixation de lectine [25]. Il est plausible de postuler que la glycosylation de ces protéines s'effectue au niveau de la membrane périnucléaire.

La poursuite de ce travail s'effectue selon deux objectifs: d'une part, étudier les mécanismes des transferts de sucres avec intervention éventuelle d'intermédiaires polyisopréniques et identifier les accepteurs, d'autre part, préciser le rôle de la glycosylation des protéines non-histones et apprécier dans quelle mesure cette modification post-traductionnelle intervient dans leur fonction.

References

- 1 Rogge, H., Neises, M., Passow, H., Grunz, H. et Risse, H.J. (1975) in *New Approaches to the Evaluation of Abnormal Embryonic Development* (Neubert, D. et Merker, H.J., eds.), pp. 772-791, Georg Thieme, Stuttgart
- 2 Palamarczyk, G. et Janczura, E. (1977) FEBS Lett. 77, 169-172
- 3 Richard, M., Martin, A. et Louisot, P. (1975) Biochim. Biophys. Res. Commun. 64, 108-114
- 4 Blobel, G. et van Potter, R. (1966) Science 154, 1662-1665
- 5 Monneron, A. et d'Alayer, J. (1978) J. Cell Biol. 77, 211-231

- 6 Noll, M., Thomas, J.O. et Kornberg, R.D. (1975) *Science* **187**, 1203—1206
- 7 Benedetto, J.P., Martel, M.B. et Got, R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **587**, 1—11
- 8 Horvat, A. et Touster, O. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 725—740
- 9 Hogeboom, G.H. (1949) *J. Biol. Chem.* **177**, 847—858
- 10 Tabor, C.W., Tabor, H. et Rosenthal, S.H. (1954) *J. Biol. Chem.* **208**, 645—661
- 11 Löhr, G.W. et Waller, H.D. (1965) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), pp. 744—751, Academic Press, New York
- 12 Harris, J.R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 55—104
- 13 Ochoa, S. (1955) *Methods Enzymol.* **1**, 735—739
- 14 Swanson, M.A. (1950) *J. Biol. Chem.* **184**, 647—649
- 15 Freilich, L.S., Richmond, M.E., Repucci, A.C., Jr. et Silbert, J.E. (1975) *Biochem. J.* **146**, 741—743
- 16 Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.* **48**, 422—427
- 17 Burton, K. (1956) *Biochem. J.* **62**, 315—323
- 18 Munro, H.N. et Fleck, A. (1969) *Analyst* **91**, 78—88
- 19 Kartenbeck, J., Jarasch, E.D. et Franke, W.W. (1973) *Exp. Cell Res.* **81**, 175—194
- 20 Gunderson, H.M. et Nordlie, R.C. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 601—607
- 21 Tuan, D., Smith, S., Folkman, J. et Merler, E. (1973) *Biochemistry* **12**, 3159—3165
- 22 Ljiljanac, S. et Kovijka, K. (1973) *Int. J. Biochem.* **4**, 345—348
- 23 Yeoman, L.C., Jordan, J.J., Busch, R.K., Taylor, C.W., Savage, H.E. et Busch, H. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3256—3262
- 24 Stein, G.S., Roberts, R.M., Davis, J.L., Head, W.J., Stein, J.L., Thrall, C.L., van Veen, J. et Wallach, D.W. (1975) *Nature* **258**, 639—641
- 25 Rizzo, W.E. et Bustin, M. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7062—7067
- 26 Folch, J., Lees, M. et Sloane Stanley, G.H. (1957) *J. Biol. Chem.* **226**, 497—509