

BBA 67717

## RECHERCHE DE LA FIXATION SUBCELLULAIRE DE LA PROCOLLAGÈNE-PROLINE-HYDROXYLASE DU FOIE D'EMBRYON DE POULET

G. HELFRE, J. FARJANEL, P. DUBOIS<sup>b</sup>, J. FONVIEILLE et J. FREY<sup>a</sup><sup>a</sup> *Laboratoire de Biochimie, U.E.R. de Médecine de Saint-Etienne, 30, rue Ferdinand Gambon 42100 Saint-Etienne et* <sup>b</sup> *Laboratoire d'Histologie et Embryologie de l'U.E.R. Médicale Lyon Sud-Ouest (France)*

(Reçu le 1er septembre, 1975)

### Summary

*Research on subcellular localization of procollagen proline hydroxylase from chick embryo liver*

Subcellular fractionation by differential centrifugation was used to study procollagen proline hydroxylase (EC 1.14.11.2) localization from chick embryo liver. The fractions have been characterized by marker enzymes and electron microscopy. By these methods, it was observed that procollagen-proline-hydroxylase is concentrated in the microsomal fraction which is sedimented at  $145\,000 \times g$  in 250 mM sucrose.

---

### Introduction

L'hydroxylation de la proline peptidique est une étape importante de la biosynthèse du collagène. L'enzyme responsable de cette hydroxylation ou procollagène-proline-hydroxylase (EC 1.14.11.2) a longtemps été considéré comme un enzyme soluble [1,2]. Plus récemment, Guzman et Cutroneo [3,4] ont montré qu'à partir d'homogénats de divers tissus de rat, il était possible de localiser cet enzyme dans des culots d'ultracentrifugation à  $105\,000 \times g$  et que l'activité de l'enzyme contenu dans ces culots était augmentée en présence de Triton X-100 à 0.1%. Ces auteurs se sont attachés à montrer la localisation particulière de la procollagène-proline-hydroxylase sans pour autant préciser la nature de ces particules, par des marqueurs enzymatiques par exemple. Cette précision a été apportée par le travail de Harwood et al. [5] qui ont montré que la procollagène-proline-hydroxylase des fibroblastes de tendon et de sternum d'embryons de poulet était concentrée dans les fractions subcellulaires du réticulum endoplasmique reconnues par l'uridine diphosphatase et l'acide ribo-

nucléique. L'aspect morphologique de cette localisation a été examiné par Olsen et al. [6] qui ont montré, par l'utilisation d'anticorps spécifiques marqués à la ferritine, que la procollagène-proline-hydroxylase apparaissait à l'intérieur des citernes du réticulum endoplasmique. Parallèlement à ces travaux, nous avons poursuivi une étude de la localisation de la procollagène-proline-hydroxylase dans les fractions subcellulaires de foie d'embryons de poulet [7].

Nous avons utilisé le tissu hépatique car il s'avère le mieux connu pour la localisation des marqueurs enzymatiques. De plus, l'embryon de poulet se révèle un matériel intéressant, car nous avons pu noter que le foie d'embryon de poulet contient une activité de procollagène proline-hydroxylase environ 5 fois plus élevée que celle de foie de rat. Il s'avère également important d'utiliser l'embryon de poulet, étant donné que le substrat naturel décrit au Chapitre Matériels et Méthodes est préparé à partir d'embryons de poulet. Les travaux que nous présentons dans ce mémoire apportent des arguments à la présence de la procollagène-proline-hydroxylase dans les membranes de la fraction microsomique.

## Matériels et Méthodes

### *Réactifs*

Pour le dosage d'un certain nombre de marqueurs enzymatiques, nous utilisons les réactifs suivants: le cytochrome *c* (réf. 15143), le glucose-6-phosphate (réf. 15134), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (réf. 15502) qui proviennent des Etablissements Boehringer.

Les réactifs pour le dosage de la phosphatase acide sont conditionnés par les Etablissements Boehringer, les réactifs pour le dosage de la lactico-déshydrogénase par méthode colorimétrique sont conditionnés par Wako et les réactifs pour le dosage de la 5'-nucléotidase sont de Sigma.

### *Animaux*

Le fractionnement cellulaire a été effectué sur des embryons de poulet Leghorn ou Sussex de 18 jours. Des essais comparatifs n'ont pas mis en évidence une influence de la race sur les activités enzymatiques. L'âge optimum de 18 jours a été choisi en fonction d'études cinétiques préliminaires [8].

### *Préparation du substrat de la procollagène-proline-hydroxylase*

Le substrat est préparé selon la technique de Hutton et al. [9]. Il s'agit d'un procollagène contenant des molécules de proline tritiée. Il est obtenu à partir d'embryons de poulet de 8–9 jours. Les embryons sont décapités et broyés au potter à faible vitesse (250 tours/minute) dans un tampon Krebs-Ringer modifié à raison de 2 ml/g d'embryons en présence de  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl 1 mM. Cet agent chélatant du fer est ajouté afin de bloquer la procollagène-proline-hydroxylase présente dans l'homogénat.

L'homogénat est incubé pendant 30 min à 37°C afin de permettre la chélation du fer par l' $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl, puis durant 2 h en présence de [4-<sup>3</sup>H] proline (16 Ci/mM, C.E.A. Saclay, réf. TMM 95) à raison de 80  $\mu$ Ci par g de tissu frais.

Après incubation, l'homogénat est centrifugé pendant 20 min à 2000  $\times g$ . Le collagène soluble du culot est extrait 3 fois pendant 12 h par de l'acide acétique

à 3% à raison de 2 ml par g de tissu; après centrifugation, les extraits sont dialysés contre de l'eau distillée. Cette préparation contient du collagène acido-soluble et des polypeptides collagéniques non hydroxylés, synthétisés durant l'incubation, appelés protocollagène.

### Fractionnement cellulaire

Les embryons sont décapités, les foies sont immédiatement prélevés et plongés dans une solution saccharose 250 mM, chlorure de magnésium 10 mM, Tris-maléate 10 mM, pH 7, refroidie entre 0 et 4°C. Toutes les opérations qui vont suivre sont effectuées à 4°C. Les foies sont lavés avec cette solution, puis broyés dans la même solution à raison de 0.15 g de tissu frais par ml de tampon. Le broyage est effectué au potter avec un piston en téflon à une vitesse de 3100 tours/minute et 5–6 aller et retour pendant une min. Après centrifugation à  $600 \times g$  pendant 10 min, le culot est remis en suspension dans du tampon, à raison de 10 fois son volume, et rebroyé pendant une minute. Après une nouvelle centrifugation à  $600 \times g$  pendant 10 min, on rassemble les surnageants qui contiennent environ 70% de l'activité totale de la procollagène-proline-hydroxylase. Il faut remarquer qu'il n'a pas été possible d'obtenir une meilleure extraction car si l'on augmente le temps de broyage, ou si l'on y adjoint des agents solubilisants comme le Triton X-100, on ne diminue pas de façon notable la quantité de procollagène-proline-hydroxylase présente dans le culot, mais on retrouve des quantités accrues d'enzyme dans la phase cytoplasmique soluble. Le surnageant à  $600 \times g$  est fractionné par des centrifugations successives selon le schéma représenté sur la Fig. 1. A chaque étape, les culots de centrifugation sont lavés deux fois avec le milieu d'extraction, les surnageants sont rassemblés.

Les centrifugations à 600, 7000 et 15 000  $\times g$  sont effectuées avec une centrifugeuse MSE High Speed 18 (rotors 6  $\times$  100 et 8  $\times$  50). Les centrifugations à 145 000  $\times g$  sont effectuées avec une ultracentrifugeuse Beckman L 50 (rotor 42-1, 40 000 tours/minute).

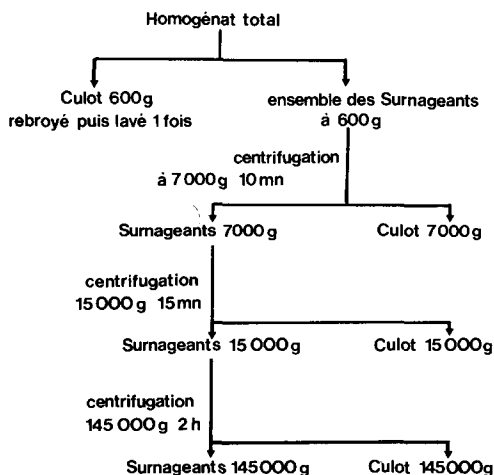


Fig. 1. Schéma de fractionnement cellulaire.

Afin de séparer les membranes plasmiques des membranes du réticulum endoplasmique, nous avons également effectué des fractionnements en saccharose 880 mM. Dans ce cas, le broyage est effectué en tampon tris-maléate 10 mM, pH 7, chlorure de magnésium 10 mM, saccharose 880 mM. Le surnageant à  $20\,000 \times g$  est centrifugé successivement 1 h à  $105\,000 \times g$  et 2 h à  $145\,000 \times g$ .

#### *Mesure de l'activité de la procollagène-proline-hydroxylase*

Les extraits enzymatiques sont pré-incubés pendant 5 min à 38°C en présence des activateurs et des co-substrats de la réaction (acide ascorbique 1 mM,  $\text{Fe}^{2+}$  0.1 mM,  $\alpha$ -cétoglutarate 0.5 mM). La réaction est alors initiée par l'addition du substrat marqué (environ 150 000 dpm), maintenu à 38°C et homogénéisé au potter avant l'emploi. Le volume final de l'incubation est 2 ml. Après 30 min d'incubation à 38°C, la réaction est arrêtée par l'addition de 200  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique à 50%. Chaque essai est effectué en double, chaque série d'incubations comporte un échantillon appelé "témoin substrat" incubé dans les mêmes conditions mais ne contenant pas l'enzyme. Après inhibition de la réaction enzymatique, les essais sont stockés à -25°C en attendant le dosage des produits de la réaction.

Les extraits enzymatiques se trouvent sous un volume de 100 à 1000  $\mu\text{l}$ , pour lequel on a préalablement vérifié que l'enzyme n'était pas saturant vis-à-vis d'un lot de substrat donné.

Dans le cas des mesures d'activité sur des fractions membranaires, la préparation enzymatique est prétraitée pendant 15 min, à température ambiante par du Triton X-100 à une concentration finale de 2 pour mille. Nous avons préalablement vérifié, sur une fraction soluble de procollagène-proline-hydroxylase, que le Triton X-100 n'avait pas d'effet inhibiteur jusqu'à une concentration de 3 pour mille mais qu'au delà l'activité mesurée décroissait légèrement.

L'activité proline hydroxylase se manifeste par la formation d'une molécule d'eau pour chaque molécule de proline hydroxylée, l'hydrogène en position *trans* fixé sur le carbone 4 de la proline étant éliminé sous forme d'une molécule d'eau. Si l'on utilise de la proline tritiée en 4, on obtient de l'eau tritiée dont la quantité formée sera proportionnelle à l'activité enzymatique. Après incubation, l'eau contenue dans l'échantillon est lyophilisée en utilisant l'appareil décrit par Hutton et al. [9]. Un aliquot de 1 ml est prélevé et compté, en scintillation liquide, en présence de 13 ml de liquide de Bray au moyen d'un compteur de scintillation Packard Tri-Carb. Les résultats sont exprimés en dpm d'eau tritiée après soustraction des dpm du "témoin substrat".

Nous avons vérifié le parallélisme entre la quantité d'eau tritiée et la quantité d'hydroxyproline tritiée formée à partir du substrat marqué sur la proline.

#### *Mesure des marqueurs enzymatiques*

Afin de caractériser les différentes fractions cellulaires, nous avons utilisé des marqueurs enzymatiques indiqués dans le tableau I avec référence à leurs méthodes de dosage. Pour chaque fraction, nous avons vérifié les conditions optimales d'incubation et utilisé un volume d'extraits pour lequel la concentration enzymatique n'était pas saturante.

L'activité réelle de la 5'-nucléotidase est déterminée en soustrayant, à la quantité d'orthophosphate libéré en présence d'adénosine-5'-monophosphate,

TABLEAU I

Enzymes	Localisation	Référence technique
Cytochrome <i>c</i> oxydase (EC 1.9.3.1)	membrane interne mitochondries	Appelmans, Wattiaux et De Duve [10]
Phosphatase acide (EC 3.1.3.2)	lysosomes	Andersch et Szczypinski [11]
Glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9)	microsomes	Swanson et Swanson [12]
NADPH cytochrome <i>c</i> reductase (EC 1.6.2.-)	microsomes	Omura, Siekevitz et Palade [13]
5'-Nucléotidase (EC 3.1.3.5)	membrane plasmique	Dixon et Purdom [14]
Déshydrogénase lactique (EC 1.1.1.27)	phase cytoplasmique soluble	Cabaud et Wroblewski [15]

la quantité d'orthophosphate libéré en présence de  $\beta$ -glycérophosphate.

La nécessité de doser l'activité enzymatique totale de chaque fraction nous a conduits à effectuer les dosages en présence de Triton X-100 pour solubiliser ces fractions. Les conditions de solubilisation par le Triton X-100 ont été vérifiées en fonction de la concentration en protéines et de la stabilité de l'activité enzymatique. Les concentrations suivantes ont été utilisées: 0.1 pour mille pour la mesure de la cytochrome oxydase, 0.5 pour mille pour la phosphatase acide et 0.2 pour mille pour la NADPH cytochrome *c* réductase. Le dosage de l'activité de la glucose-6-phosphatase et de la 5'-nucléotidase, par la mesure du phosphate libéré, rend impossible l'utilisation du Triton X-100, car ce composé produit un trouble lors de la réaction colorimétrique. Dans ce cas, la solubilisation est effectuée par broyage au potter à 3100 tours/minute pendant 30 s avec 5–6 aller et retour.

### *Dosage des protéines*

Les activités spécifiques des différents enzymes sont exprimées par rapport à la concentration en protéine mesurée par la méthode de Weichselbaum [16] étalonnée sur de la sérum albumine. Cette technique utilisant la coloration par le biuret en présence de cholate de sodium permet de doser les protéines de fractions insolubles plus facilement que la méthode de Lowry. Nous avons contrôlé cette méthode par des dosages d'azote sur les mêmes échantillons.

### *Microscopie électronique*

Les culots de fractions sont fixés par le glutaraldéhyde 2.5% en tampon phosphate de sodium 0.1 M, pH 7.4 et laissés en contact pendant 1 h à 4°C. Après lavage, les préparations sont postfixées par l'acide osmique à 1% dans le même tampon. Les inclusions sont faites à l'araldite et les coupes effectuées sur ultra microtome Ultratome III LKB. Les colorations sont faites à l'acétate d'uranyle et citrate de plomb et les observations effectuées sur microscope électronique JEM 100 B.

## Résultats

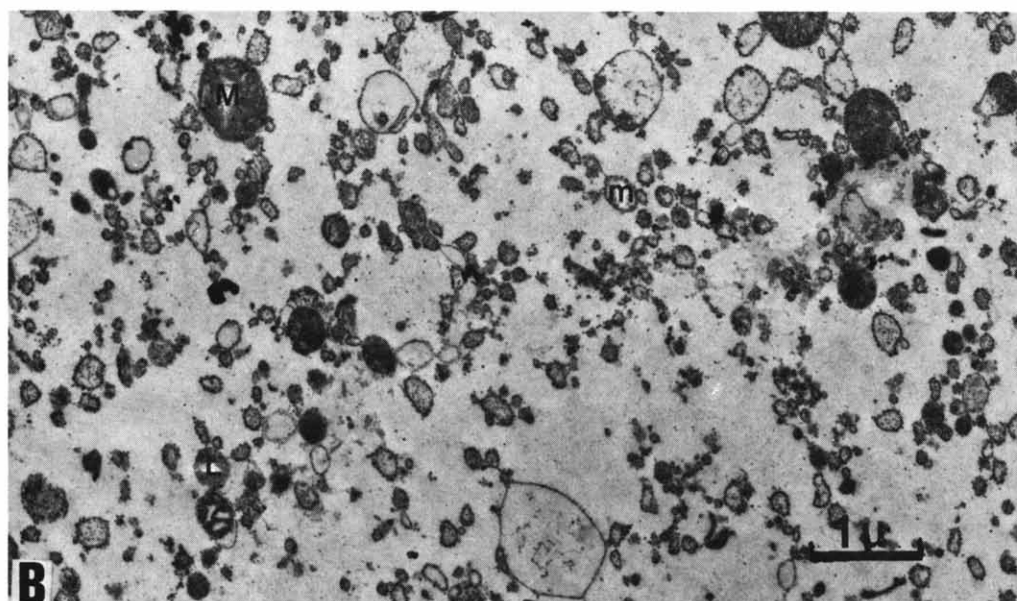
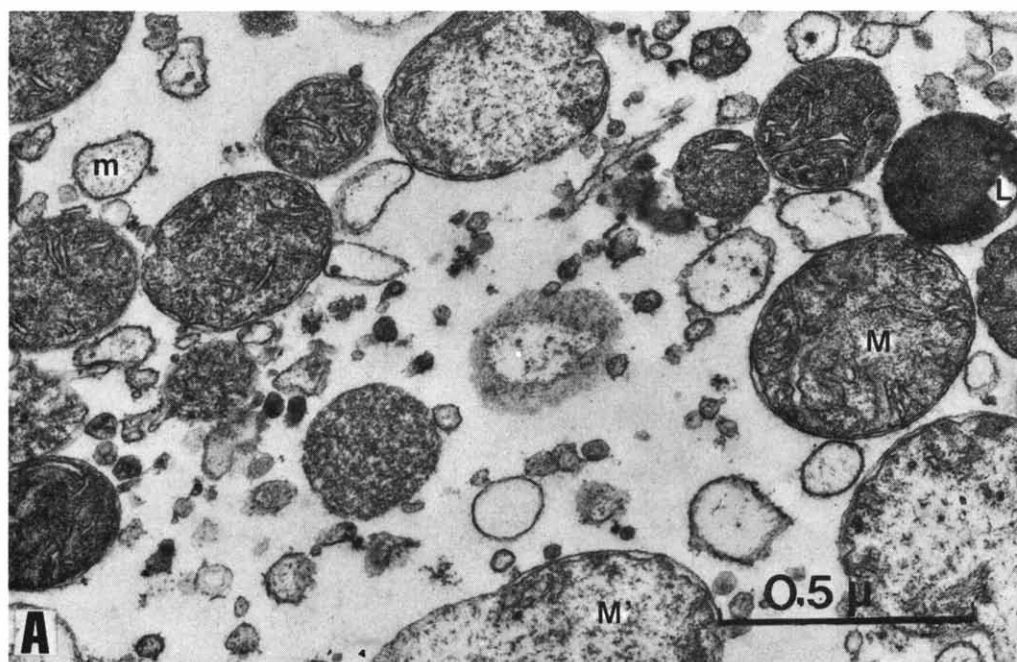
### *A, Fractionnement en saccharose 250 mM*

Les résultats du fractionnement en saccharose 250 mM sont portés sur le

TABLEAU II  
ACTIVITES SPECIFIQUES ENZYMATIQUES DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE FOIE CENTRIFUGEES EN SACCHAROSE 250 mM.

Enzymes	Homogénat total	Fractions subcellulaires				Expression des résultats	
		Culot 600 × g	Culot 7000 × g	Culot 15 000 × g	Culot 145 000 × g		
Cytochrome oxydase	112	34.4	200	151.8	42.9	0	nmol cytochrome c oxydé/mn/mg de protéines
Phosphatase acide	33	16	55	460	76	14	nmol paranitrophénol apparu/mn/mg de protéines
NADPH cytochrome c réductase	3.3	1.1	4.2	13.3	25.9	0.7	nmol cytochrome c réduit/mn/mg de protéines
Procollagène-proline hydroxylase	1794	1250	1500	1722	10915	75	dpm/30 mn/mg de protéines
Glucose-6-phosphatase	98	42	208	459	639	18	nmol phosphate libéré/mn/mg de protéines
5'-Nucléotidase	431	281	506	682	2677	0	nmol phosphate libéré/h/mg de protéines
Déshydrogénase lactique	4.2	0.65	0.63	1.45	0.56	11.25	μmol de pyruvate consommé/mn/mg de protéines

tableau II. Il indique l'activité spécifique de la procollagène-proline-hydroxylase et des enzymes marqueurs dans l'homogénat total et les différentes fractions subcellulaires. Les différents culots de centrifugation ont été examinés en microscopie électronique. La Fig. 2 comporte les microphotographies des culots obtenus à  $7000 \times g$ ,  $15\,000 \times g$  et  $145\,000 \times g$ . La figure 2A montre que le culot à  $7000 \times g$  renferme essentiellement des mitochondries, avec



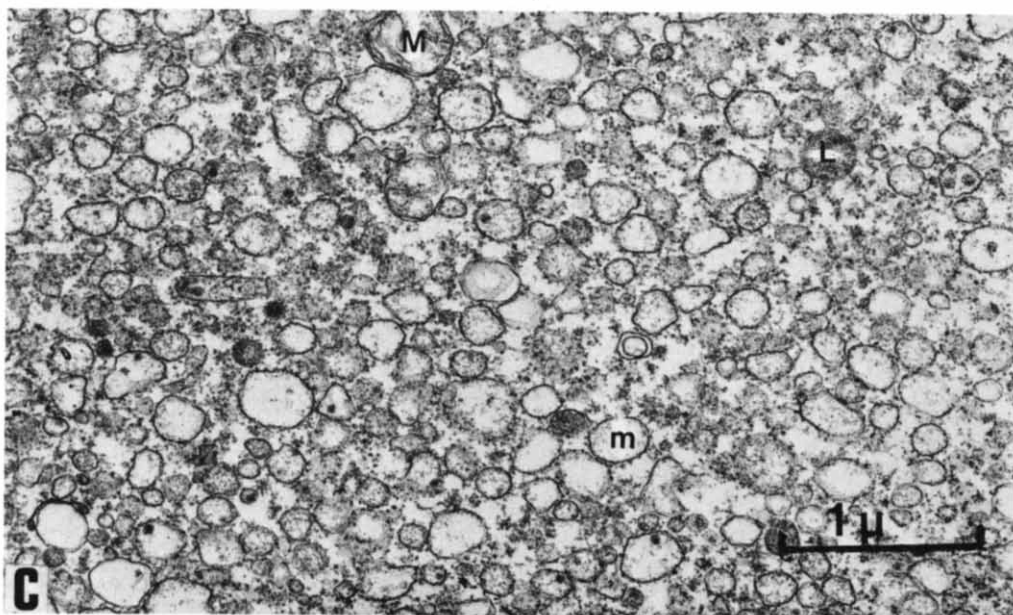


Fig. 2. Microphotographies électroniques des culots de centrifugation en saccharose 250 mM: (A) culot à  $7000 \times g$ , grossissement 67 500; (B) culot à  $15\,000 \times g$ , grossissement 13 050; (C) culot à  $145\,000 \times g$ , grossissement 26 100.

cependant une légère contamination par des particules d'aspect lysosomique et des éléments de nature microsomique. Le culot à  $15\,000 \times g$  (Fig. 2B) est beaucoup plus hétérogène; il est constitué de quelques mitochondries, de particules denses, sans doute de nature lysosomique et de microsomes. L'observation, en microscopie électronique, du culot à  $145\,000 \times g$  (Fig. 2C) montre qu'il s'agit d'une préparation de microsomes assez pure. On ne note dans cette fraction que de très rares mitochondries.

Dans ces fractions, l'activité de la procollagène-proline-hydroxylase a été mesurée en présence et en l'absence de Triton X-100. Les résultats correspondant à l'effet du triton sont portés sur le tableau III.

TABLEAU III

Activité totale en dpm (eau tritiée)	Avec Triton	Sans Triton
Homogénat total	2 867 130	421 636
Culot		
$600 \times g$	879 688	112 788
$7000 \times g$	34 970	3 527
$15\,000 \times g$	21 712	3 105
$145\,000 \times g$	1 376 222	196 603
Surnageant		
$145\,000 \times g$	389 567	378 224



TABLEAU IV

Enzymes	Fractions subcellulaires			Expression des résultats
	Saccharose 250 mM	Saccharose 880 mM		
	Culot 145 000 × <i>g</i>	Culot 105 000 × <i>g</i>	Culot 145 000 × <i>g</i>	
5'-nucléotidase	477	562	5 977	nmol phosphate libéré/h/mg de protéines
Procollagène-proline-hydroxylase	1 717	1 944	712	dpm/30 mn/mg de protéines
NADPH cytochrome <i>c</i> réductase	15.5	18.2	7.3	nmol cytochrome <i>c</i> réduit/mn/mg de protéines

### *B, Fractionnement en saccharose 880 mM*

Ce fractionnement cherche à séparer les microsomes et les membranes plasmiques. L'activité de la procollagène-proline-hydroxylase est seulement confrontée ici aux marqueurs enzymatiques 5'-nucléotidase et NADPH cytochrome *c* réductase. Les activités spécifiques des enzymes contenus dans ces fractions sont représentées dans le tableau IV qui permet de comparer les culots à 105 000  $\times g$  et 145 000  $\times g$  en saccharose 880 mM au culot 145 000  $\times g$  en saccharose 250 mM obtenus à partir d'un même homogénat initial.

### Discussion

La comparaison, dans les différentes fractions subcellulaires de l'activité spécifique de la procollagène-proline-hydroxylase (tableau II) montre que l'enzyme se trouve concentré dans les fractions membranaires et notamment celle qui sédimente à 145 000  $\times g$ . La liaison de la procollagène-proline-hydroxylase à des structures de membranes est confirmée par l'augmentation de l'activité mesurée dans les différents culots sous l'action du Triton X-100 (tableau III) ainsi que l'avaient déjà montré Guzmán et Cutroneo [3] à propos du foie de rat.

La nature des fractions subcellulaires est précisée par la mesure des marqueurs enzymatiques. On observe que l'activité spécifique de la procollagène-proline-hydroxylase s'accroît dans les fractions en même temps que la NADPH cytochrome *c* réductase, la glucose-6-phosphatase et la 5'-nucléotidase. Il s'agit donc de membranes pouvant être identifiées par les marqueurs enzymatiques comme appartenant aux microsomes ou aux membranes plasmiques. Le contrôle des fractions en microscopie électronique confirme les résultats des dosages enzymatiques. Il faut noter, dans ces fractions, la présence de cytochrome oxydase et de phosphatase acide, ce qui indique une contamination du culot à 145 000  $\times g$  par des fragments de mitochondries et des lysosomes.

Afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus par Harwood et al. [5], nous avons calculé les activités spécifiques relatives en rapportant l'activité spécifique de chaque fraction à celle de l'homogénat total pour les différents

enzymes étudiés. Ce rapport, en uniformisant les résultats, met l'accent sur la fixation de la procollagène-proline-hydroxylase dans les culots membranaires et plus particulièrement dans le culot qui sédimente à  $145\,000 \times g$ . Dans ce culot, l'activité spécifique de la procollagène-proline-hydroxylase est 6 fois plus grande que dans l'homogénat initial, elle est donc même plus élevée que celle observée par Harwood et al. [5] qui avaient noté un rapport de 3.6. On observe également la très faible proportion d'activité totale de cet enzyme dans le surnageant à  $145\,000 \times g$  (rapport de 0.04).

Des précisions sur la fixation de la procollagène-proline-hydroxylase, dans la fraction microsomique ou dans la fraction des membranes plasmiques, ont pu être apportées par les centrifugations en saccharose 880 mM. Par cette méthode, on voit que l'activité spécifique de la procollagène-proline-hydroxylase suit celle de la NADPH cytochrome *c* réductase qui se trouve concentrée dans le culot à  $105\,000 \times g$  tandis que l'activité spécifique de la 5'-nucléotidase (marqueur de la membrane plasmique) est beaucoup plus élevée dans le culot à  $145\,000 \times g$ . Ces résultats apportent donc des arguments à la fixation de la procollagène-proline-hydroxylase dans la fraction microsomique.

Dans ces différentes expériences, étant donné qu'il n'y a pas parallélisme exact des activités spécifiques entre la procollagène-proline-hydroxylase et les marqueurs microsomiques (glucose-6-phosphatase et NADPH cytochrome *c* réductase), on pourrait penser que les fractionnements successifs ont seulement éliminé des inhibiteurs dont la présence avait été notée par Farjanel [17]. En effet, l'élimination de tels inhibiteurs pourrait augmenter l'activité spécifique d'un enzyme qui ne témoignerait pas alors d'une concentration particulière à une fraction. Afin de préciser ce point de discussion, nous avons calculé, sur une dizaine de mesures, dans des fractions différentes, les coefficients de corrélation entre l'activité spécifique de la procollagène-proline-hydroxylase et celle des différents marqueurs enzymatiques. L'examen de ces résultats portés sur le tableau V montre qu'une corrélation mesurée par le coefficient de corrélation linéaire (*r*) est statistiquement très significative entre la procollagène-proline-hydroxylase et les deux marqueurs microsomiques NADPH cytochrome *c* réductase et glucose-6-phosphatase, que la corrélation n'est pas significative avec le marqueur de la membrane plasmique (5'-nucléotidase) ni avec ceux des lysosomes (phosphatase acide), des mitochondries (cytochrome oxydase) ou de la phase cytoplasmique soluble (déshydrogénase lactique). Nous pensons que si l'augmentation de l'activité spécifique de la procollagène-pro-

TABLEAU V

Coefficients de corrélation linéaire entre l'activité spécifique de la procollagène-proline-hydroxylase et celles des marqueurs enzymatiques.

Enzymes	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
NADPH Cytochrome <i>c</i> reductase	13	0.66	$0.02 > P > 0.01$
Glucose-6-phosphatase	10	0.65	$0.05 > P > 0.02$
5'-Nucléotidase	9	0.21	$P > 0.05$
Phosphatase acide	10	0.09	$P > 0.05$
Cytochrome oxydase	10	-0.17	$P > 0.05$
Déshydrogénase lactique	10	-0.39	$P > 0.05$

line-hydroxylase était seulement due à l'élimination d'inhibiteurs, nous n'obtiendrions pas une telle corrélation entre cet enzyme et la NADPH cytochrome *c* réductase ou la glucose-6-phosphatase. En effet, il est peu vraisemblable que des inhibiteurs agissent de la même façon sur les trois enzymes. On peut donc conclure que, dans le foie d'embryons de poulet, la procollagène-proline-hydroxylase se trouve préférentiellement fixée dans la fraction microsomique.

En regard de ces résultats, il n'est cependant pas possible de préciser le mode de fixation de l'enzyme. On peut considérer que cette fixation appartient à l'un ou l'autre des mécanismes suivants: soit que la procollagène-proline-hydroxylase, qui a une très forte affinité pour son substrat, se trouve liée au complexe polysome-membrane par l'intermédiaire des chaînes polypeptidiques en cours de synthèse, soit que cet enzyme est inclus dans le compartiment délimité par les membranes contenues dans la fraction microsomique. Ces deux interprétations sont en accord avec l'observation morphologique de Olsen et al. [6] d'une présence de la procollagène-proline-hydroxylase à l'intérieur des citernes du reticulum endoplasmique. Il se peut même que, dans ce compartiment, les liaisons soient assez labiles, ce qui pourrait expliquer la libération d'une certaine quantité d'enzyme par rupture d'une partie des citernes lors de broyages très énergiques.

## Résumé

Le fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle a été utilisé pour étudier la localisation de la procollagène-proline-hydroxylase (EC 1.14.11.2) du foie d'embryons de poulet. Les fractions obtenues ont été contrôlées par des marqueurs enzymatiques et par microscopie électronique. Par ces méthodes, on a pu observer que la procollagène-proline-hydroxylase se trouve concentrée dans la fraction microsomique qui sédimente à  $145\,000 \times g$  en milieu saccharose 250 mM.

## Remerciements

Nous remercions la Fondation pour la Recherche Médicale Française pour l'aide apportée à ce travail.

## Bibliographie

- 1 Hutton, J.J. et Udenfriend, S. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56, 198—202
- 2 Kivirikko, K.I. et Prockop, D.J. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 611—618
- 3 Guzman, N.A. et Cutroneo, K.R. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 1263—1270
- 4 Cutroneo, K.R., Guzman, N.A. et Sharawy, M.M. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5989—5994
- 5 Harwood, R., Grant, M.E. et Jackson, D.S. (1974) *Biochem. J.* 144, 123—130
- 6 Olsen, B.R., Berg, R.A., Kishida, Y. et Prockop, D.J. (1973) *Science* 182, 825—827
- 7 Helfre, G. (1975) Recherche de la localisation subcellulaire de la procollagène-proline-hydroxylase, 114 pages, thèse no 431, Lyon
- 8 Helfre, G., Farjanel, J., Fonvielle, J. et Frey, J. (1974) *Experientia* 30, 995
- 9 Hutton, J.J., Tappel, A.L. et Udenfriend, S. (1966) *Anal. Biochem.* 16, 384—394
- 10 Appelmans, F., Wattiaux, A. et De Duve, C. (1955) *Biochem. J.* 59, 438—445
- 11 Andersch, M.A. et Szczypinski, A.J. (1947) *Amer. J. Clin. Pathol.* 17, 571—580
- 12 Swanson, M. et Swanson (1955) in *Methods in Enzymology*, (Colowick, P. et Kaplan, N.O., eds) Vol. 2, p. 541, Academic Press, New York

- 13 Omura, T., Siekevitz, P. et Palade, G.E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2389—2396
- 14 Dixon, T.F. et Purdom, M. (1954) *J. Clin. Pathol.* 7, 341—348
- 15 Cabaud, P.G. et Wroblewski, F. (1958) *Amer. J. Clin. Pathol.* 30, 234—236
- 16 Weichselbaum, T.A. (1946) *Amer. J. Clin. Pathol. Tech. Suppl.* 10, 40--48
- 17 Farjanel, J. (1972) Contribution à l'étude de l'hydroxylation de la proline du protocollagène par la peptidyl proline hydroxylase, 129 pages, thèse no 134 Lyon