

PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES LEGERES DANS LE CYTOPLASME DE FOIE DE RAT

C. QUIRIN-STRICKER * et P. MANDEL

*Centre de Neurochimie du C.N.R.S., Faculté de Médecine,
Strasbourg, France*

Reçu le 4 janvier 1969

We have shown the existence in rat liver of free light cytoplasmic particles containing a stable, rapidly labelled RNA. These particles differ from the 45 S ribosomal fraction by several characters.

The buoyant density and sedimentation properties suggest that these particles are similar to dRNA ribonucleo-protein particles released from polysomes and to those present in rat liver nuclei.

1. Introduction

Des particules ribonucléoprotéiques (RNP) contenant du dRNA associé à des protéines (informosomes ou dRNP) ont été décrites d'abord dans des homogenates d'embryons d'oursin et de poisson [1,2], puis dans le surnageant postmitochondrial de vers à soie [3], d'embryons d'oursin [4], de cellules L [5] ainsi que dans le noyau, les polysomes hépatiques [6,7] et les microsomes du cerveau de rat [8]. Les résultats présentés dans cette note concernent une population hétérogène de particules RNP "légères" de constantes de sédimentation inférieures à 40 S et qui existent à l'état libre dans le cytoplasme de foie de rat. La teneur de ces particules en protéines et en RNA, la composition en bases de ce RNA rapidement marqué, la densité à l'équilibre dans du CsCl, permettent de les distinguer nettement des sous-unités ribosomiques 45 S.

2. Matériel et méthodes

Des rats mâles, adultes, de souche Wistar, maintenus 15 heures au jeûne avant le sacrifice, reçoivent soit une injection intraveineuse, soit intrapéritonéale de 4 mc d'uridine-³H/rat et sont sacrifiés après 40 ou 240 min.

* Attachée de Recherche au C.N.R.S.

Le foie est homogénéisé dans 2,5 fois son volume de milieu H contenant 0,3 M de saccharose, 1,5 mM MgCl₂, 30 mM KCO₃H, 20 mM K₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄ pH 7,8 et du polyvinylsulfate de sodium 40 µg/ml. Après élimination des noyaux et des mitochondries (15 min à 20.000 × g) et des microsomes (75 min à 105.000 × g), la partie supérieure du surnageant postmicrosomal est traitée au DOC 0,5% concentration finale. Une centrifugation de 180 min à 105.000 × g fournit un culot constitué essentiellement par des particules postmicrosomaux, ainsi que quelques ribosomes monomères et dimères. Le RNA et les protéines sont dosés respectivement par la méthode à l'orcinol et par celle de Lowry.

3. Résultats

Le fractionnement d'une suspension de particules postmicrosomaux de foie de rat sur un gradient linéaire de saccharose (5–25%) fournit un profil de densité optique qui permet de distinguer trois zones. Le coefficient de sédimentation des particules de ces trois zones établi par ultracentrifugation analytique correspond à 65, 45 et 23 S respectivement (fig. 1A). Les pics 65 et 45 S correspondent probablement à des particules subribosomiques précurseurs des ribosomes. Après un marquage à l'uridine-³H pendant

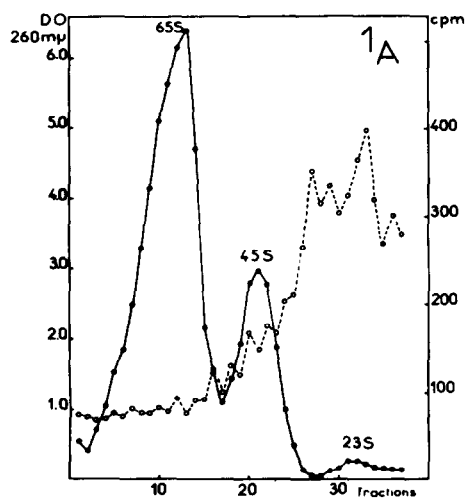


Fig. 1A

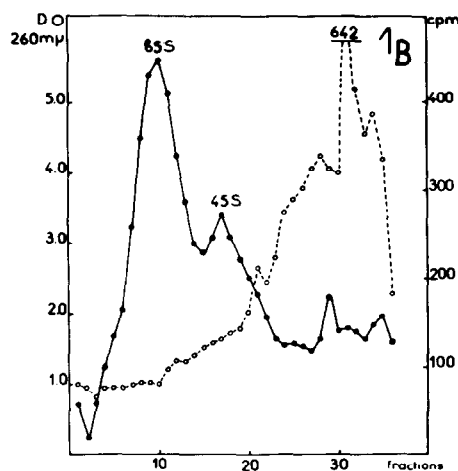


Fig. 1B

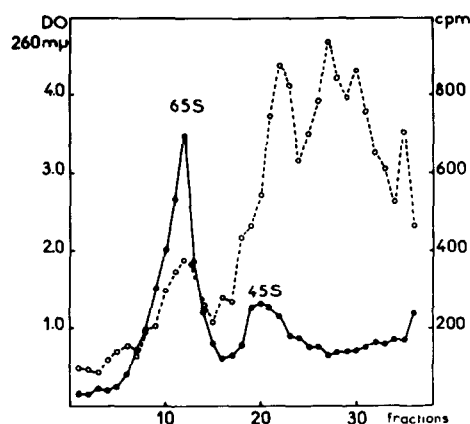
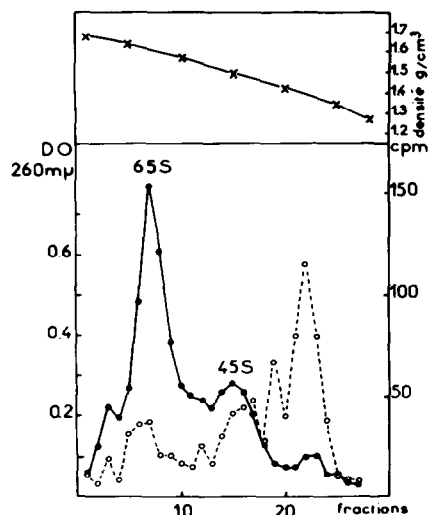


Fig. 2



Figs. 1 et 2. Profil de sédimentation des particules postmicrosomiques en gradient de saccharose 5–25% dans le tampon H 14 heures à 21.000 tours/min (rotor SW 25–2). Les rats ont été sacrifiés 40 min (fig. 1) et 4 heures (fig. 2) après une injection de 4 mc d'uridine- ^3H /rat. Fig. 1: les particules ont été déposées avant (A) et après action de la ribonucléase (B) (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 20 min à 3°C). ●—● Densité optique à 260 μ corrigée pour l'absorption due à la ferritine. ○—○ Radioactivité totale du matériel acido-insoluble.

Fig. 3. Profil de sédimentation des particules postmicrosomiques en gradient préformé de CsCl (1,20–1,70 g/cm^3 , 16 heures à 45.000 tours/min, rotor SW 65, 10°C). Les particules ont été précédemment fractionnées sur gradient de saccharose puis centrifugées 5 heures à 50.000 tours/min (R 65), fixées au formol 6% 20 heures et dialysées contre le tampon triéthanolamine 0,01 M pH 7,4, KCl 0,025 M et MgCl_2 0,0015 M. Les rats ont été sacrifiés 40 min après une injection de 4 mc d'uridine- ^3H /rat. ●—● Densité optique des particules 65 S et 45 S ajoutées comme marqueurs. ○—○ Radioactivité des particules légères provenant de 2 gradients de saccharose semblables à ceux des figs. 1 et 2 après élimination des dernières fractions. x—x Densité de la solution de CsCl.

40 min ou 4 heures, le matériel radioactif est polydisperse et l'activité spécifique la plus élevée se situe dans la zone du matériel qui sédimente entre 10 et 40 S (fig. 1A et 2). L'évaluation a été faite d'après Martin et Ames [9] en prenant comme référence les RNP 65 S.

Les rapports d'absorption $260\text{ m}\mu/280\text{ m}\mu$ sont de 1–1,2 pour la fraction à constantes de sédimentation inférieures à 40 S, et de 1,8–2,1 pour les sous-unités ribosomiques 45 S. Les particules subribosomiques 45 S contiennent 65 pour cent de protéines et 35 pour cent de RNA, les particules légères de 10 à 40 S, acido-précipitables, 90 pour cent de protéines et 10 pour cent de RNA. Notons cependant qu'une fraction des protéines des particules légères pourrait être le résultat d'un phénomène d'adsorption. On ne détecte pas de DNA dans la région de ces particules. L'analyse de la distribution des bases du RNA extrait de ces dernières particules après un marquage au ^{32}P pendant 2, 12 ou 24 heures, fournit un rapport $G + C/A + U$ égal à 1,0–1,1, plus voisin de celui du DNA (0,80) que de celui du rRNA (1,65) ou du tRNA (1,6) de foie de rat.

En présence de l'inhibiteur naturel de la ribonucléase de foie de rat, le RNA extrait des dRNP sédimente dans un gradient de saccharose entre 6–12 S alors que le RNA extrait des particules 45 S donne un seul constituant de 18 S. De plus, les particules légères hétérogènes à faibles constantes de sédimentation sont relativement peu sensibles à la ribonucléase. Un traitement à la ribonucléase (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant 20 min à 3°C) n'entraîne pas de réduction du matériel radioactif acido-précipitable (fig. 1B).

Dans un gradient de CsCl, les sous-unités ribosomiques 65 S et 45 S forment dans l'UV deux bandes d'absorption et leurs densités à l'équilibre sont respectivement 1,58–1,60 et 1,53–1,50 g/cm^3 . Après un marquage à l'uridine- ^3H pendant 40 min ou 4 heures, la majeure partie de la radioactivité a une distribution polydisperse et coïncide avec de faibles traces de matériel absorbant dans l'UV. Ce matériel hétérogène dont l'activité spécifique est très élevée présente une densité à l'équilibre, dans du CsCl, de 1,30–1,35 à 1,48 g/cm^3 (fig. 3). Des résultats semblables sont obtenus avec ou sans traitement du surnageant postmicrosomal au DOC.

4. Discussion

Nos résultats suggèrent que du dRNA cytoplasmique, indépendant des polysomes, est associé à des protéines. Une fraction de ces structures particulières cosédimente dans un gradient de saccharose avec les sous-unités ribosomiques 45 S mais elle s'en distingue par la densité à l'équilibre dans du CsCl, la teneur et la nature du RNA.

Parallèlement à nos travaux, Kempf et Mandel [10] ont montré que des particules analogues isolées de la fraction postmicrosomal d'un plasmocytome stimulait la synthèse acellulaire de protéines en présence de ribosomes d'origine animale.

Les particules que nous décrivons dans le surnageant postmicrosomal peuvent être rapprochées de celles trouvées par Samarina et al. [6] dans les noyaux de cellules hépatiques ainsi que de celles libérées des polysomes à l'aide d'EDTA par Henshaw [7] et des microsomes de cerveau de rat par Samec et al. [8].

La mise en évidence par nos méthodes de fractionnement de telles particules dans le cytoplasme de foie de rat serait en faveur de l'hypothèse que le transport du mRNA du noyau vers les ribosomes cytoplasmiques s'effectuerait sous la forme d'un complexe mRNA-protéines.

La caractérisation des protéines de ces dRNP pourrait apporter un argument décisif en vue de l'hypothèse formulée. Ce travail est en cours.

Références

- [1] A.S.Spirin et M.Nemer, *Science* 150 (1965) 214.
- [2] A.S.Spirin, N.V.Belitsina et M.A.Ajtkhozshin, *Zh. Obsch. Biol.* 25 (1964) 321.
- [3] F.C.Kafatos, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59 (1968) 1251.
- [4] A.A.Infante et M.Nemer, *J. Mol. Biol.* 32 (1968) 543.
- [5] R.P.Perry et D.E.Kelley, *J. Mol. Biol.* 35 (1968) 37.
- [6] O.P.Samarina, E.M.Lukanidin, J.Molnar et G.P.Georgiev, *J. Mol. Biol.* 33 (1968) 254.
- [7] E.C.Henshaw, *J. Mol. Biol.* 36 (1968) 401.
- [8] J.Samec, M.Jacob et P.Mandel, *J. Neurochem.* 14 (1967) 887.
- [9] R.G.Martin et B.N.Ames, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1372.
- [10] J.Kempf et P.Mandel, *Life Sci.*, in press.