

**PROPRIETES DE NUCLEOLES DEBARRASSEES DE CHROMATINE PERINUCLEOLAIRE,
ISOLES EN MILIEU MgCl₂ A HAUTE FORCE IONIQUE A PARTIR DE CELLULES
D'HEPATOME ASCITIQUE DE RAT**

C.MARTIN-PREVEL et J.P.ZALTA

Laboratoire de Chimie-Biologique Faculté des Sciences, Toulouse, France

Received 15 December 1969

A method is devised for isolation of pure nucleoli, devoid of perinucleolar chromatin, from rat hepatoma in a medium of high ionic strength ($I = 1$, $MgCl_2 = 0.33$ M).

1. Introduction

L'étude des constituants nucléolaires, par exemple du DNA de la chromatine intra-nucléolaire, des RNA, des particules, exige la préparation de nucléoles dépourvus de contaminations nucléoplasmiques. De plus, se pose le problème généralement non résolu, de l'élimination de la chromatine périnucléolaire ainsi que des particules qui lui sont liées. Nous avons atteint ce but en traitant les noyaux par un milieu contenant $MgCl_2$ à une concentration qui correspond à une force ionique élevée $I = 1$ ($MgCl_2$ 0,33 M) en présence d'un tensio-actif non ionique.

2. Matériel et méthodes

Les cellules provenant de l'hépatome ascitique de rat de Zajdela sont récoltées et le RNA nucléolaire est marqué par de l'uridine tritiée par incubation des cellules *in vitro*, puis les noyaux sont isolés selon une méthode déjà décrite [1].

Les noyaux ainsi préparés, en fonction du but poursuivi, peuvent être lavés dans un milieu adéquat, par exemple, dans une solution de $CaCl_2$ $3 \cdot 10^{-3}$ M, saccharose 0,25 M, polyvinylsulfate (PVS) 20 $\mu g/ml$.

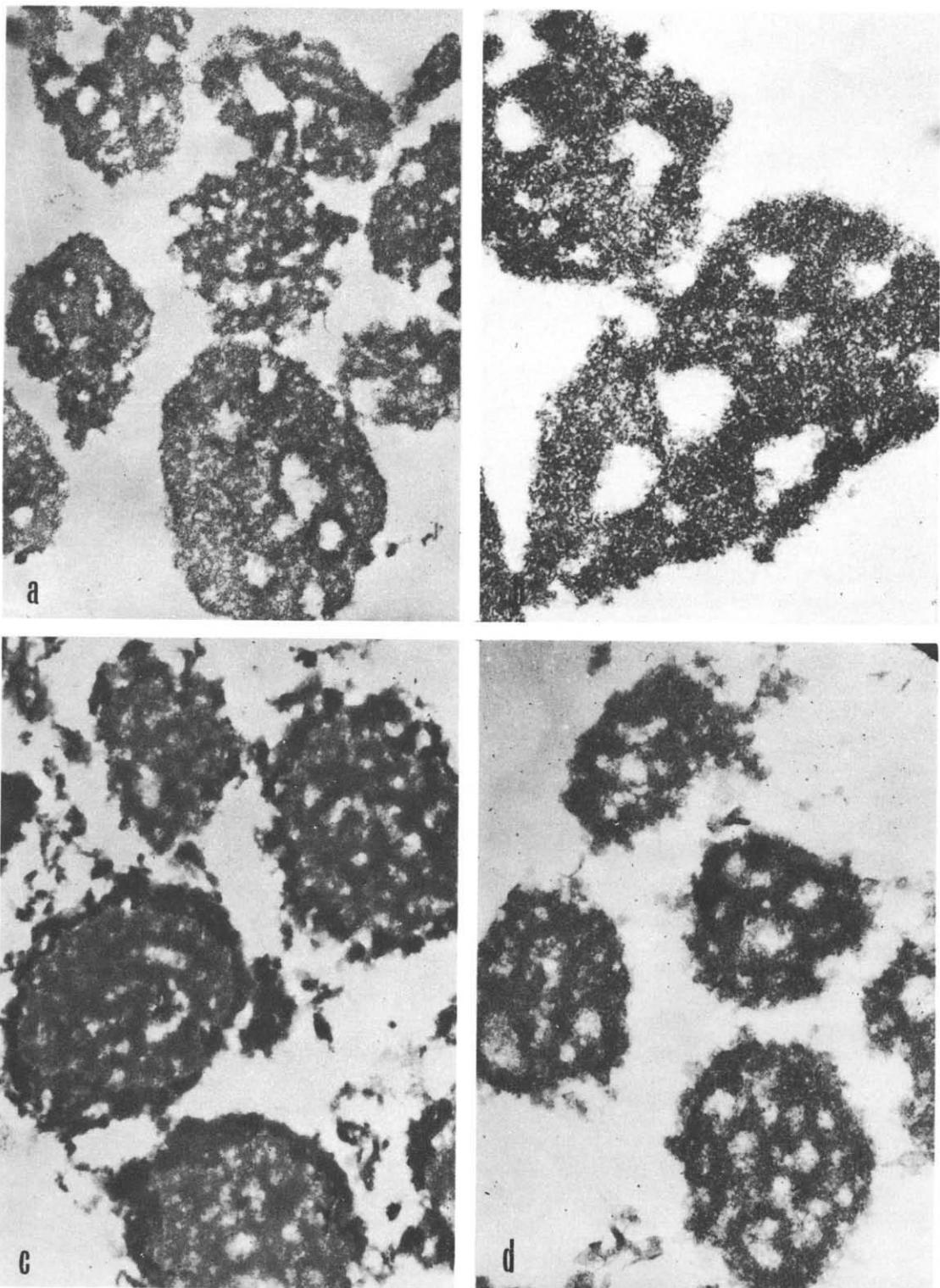
Le culot nucléaire lavé est repris ($1,5 \times 10^8$ noyaux) dans 2 ml de saccharose 0,23 M, contenant du PVS 20 $\mu g/ml$. On ajoute, en opérant dans la glace, 1 ml de la solution suivante: tris-HCl 10^{-2} M, pH 7,4, $MgCl_2$ M, Emkalyx-pluronic F88-1% (tensio-actif constitué d'une

base hydrophobe polypropylénique liée à une partie hydrophile polyoxyéthylénique-Kuhlmann). La suspension devient rapidement visqueuse et au microscope à contraste de phase, on constate que les noyaux éclatent, la chromatine semble se solubiliser. Les nucléoles apparaissent très denses. La suspension est soumise à l'action de l'homogénéiseur Ultra-turrax fonctionnant à basse vitesse (au quart de sa tension normale d'alimentation), pendant environ 45 sec. La viscosité devient alors très faible et les nucléoles sont libres dans le milieu. Cette suspension nucléolaire est déposée sur 15 ml d'une solution de saccharose M, $MgCl_2$ 0,33 M, PVS 20 $\mu g/ml$ (solution S Mg) contenue dans un tube à centrifuger d'un diamètre de 25 mm. On centrifuge en rotor horizontal 20 min à 900 g. A la fin de la centrifugation, on décante par retournement et l'on essuie soigneusement les parois de tube resté retourné avec du papier filtre. Ce culot de nucléoles est lavé par remise en suspension dans un milieu adéquat et recentrifugé.

3. Propriétés des nucléoles ainsi préparés

En microscopie électronique*, les nucléoles pré-

* Nous remercions vivement Monsieur le Docteur Bernhard, Directeur du Laboratoire de Microscopie Electronique de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le cancer à Viliejuif, pour avoir bien voulu procéder à l'examen et au contrôle de nos préparations nucléolaires et pour les conseils qui nous ont été des plus profitables.



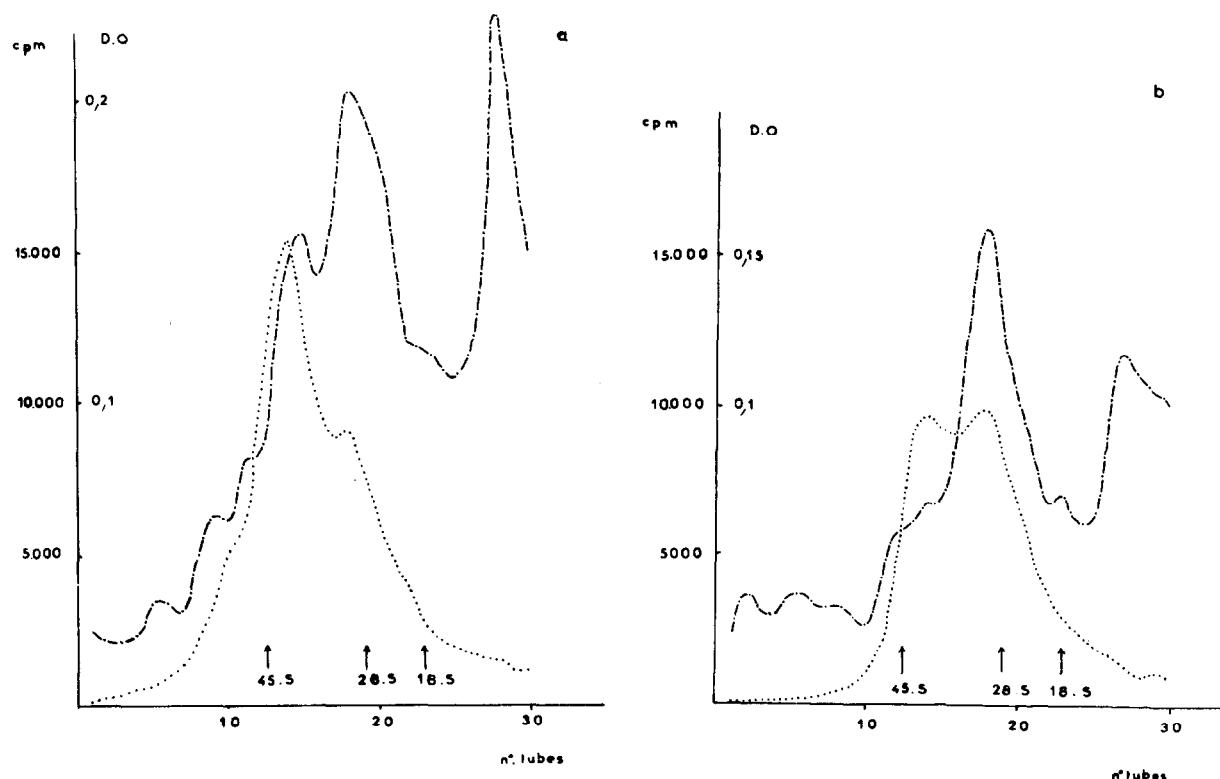


Fig. 1. Profils de sédimentation en gradient de saccharose de RNA extraits de:

- a) nucléoles préparés selon la méthode décrite;
- b) nucléoles préparés selon la méthode de Nakamura [3].

Les RNA sont extraits selon la méthode de Nakamura et al. [3] à partir de nucléoles préparés à partir de cellules marquées par incubation de 30 min à 37°C en milieu de culture 199 contenant de l'uridine ^3H (75 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, activité spécifique 21 Ci/mmol). La solution de RNA est déposée à la surface d'un gradient de 5 ml de solution de saccharose 10–40% [3] dans un tube du rotor Spinco SW 50 et centrifugée 90 min à 48.000 rpm. Le gradient est récolté par fraction de 3 gouttes après percement du fond du tube.

..... D.O.
.... cpm.

Planche I. Fractions de nucléoles purifiés. Fixation glutaraldéhyde, 1,6% tamponnée au phosphate Sörensen 45 min a et b. Nucléoles de cellules d'ascite de rat.

a) Isolement selon la méthode décrite.

Grossissement: 25.000

b) Même technique

Grossissement: 40.000

c et d, nucléoles de foie de rat

c) Nucléoles préparés selon la technique du Nakamura [3]

Grossissement: 30.000

d) Nucléoles préparés selon Nakamura [3] puis traités par le milieu S Mg

Grossissement: 30.000

sentent une architecture assez modifiée et certaines vacuités (planche 1, figures a et b). Les fibrilles sont morphologiquement altérés, la chromatine intranucléolaire n'est plus distinguable. Mais il importe de souligner, que ces préparations sont pratiquement dé-

pourvues de contaminations nucléoplasmiques. De plus, la chromatine périnucléolaire est éliminée. On peut éliminer la chromatine périnucléolaire de nucléoles préalablement isolés selon la technique de Nakamura et al. [3] (planche 1, figure c) en les traitant ensuite selon la technique décrite (planche 1 figure d).

Dans les nucléoles ainsi préparés, le dosage du DNA indique un contenu de 0,25 pg par nucléole, alors que dans les nucléoles préparés selon la méthode de Nakamura [3], on dose 1 pg de DNA par nucléole, la chromatine périnucléolaire comprise. Donc, dans nos préparations, bien que la chromatine intranucléolaire n'apparaisse plus à l'état structuré, le DNA est retenu, au moins en partie dans le nucléole.

Quelle que soit la méthode de préparation des nucléoles, les RNA nucléolaires contiennent une proportion importante de fractions de constante de sédimentation égale ou supérieure à 45 S (fig. 1, a et b). Les nucléoles isolés selon notre technique (fig. 1 a) sont relativement plus riches en RNA 45 S nouvellement synthétisé que ceux isolés selon Nakamura et al. [3] (fig. 1 b). Ceci s'explique probablement par une stabilisation des RNA nucléolaires dans nos conditions de préparation. C'est ainsi que les RNA de nucléoles lavés en solution SMg puis incubés pendant 7 min à 30°C (fig. 2) n'évoluent pratiquement pas. Par contre, après lavage par passage à travers une solution de saccharose M contenant 20 µg/ml de PVS (solution S), on constate, au cours de l'incubation, une transformation des RNA précurseurs qui peut être comparée à celle déjà obtenue par Vesco et al. [4] ainsi que Liau et al. [5].

Notons que l'utilisation de NaCl en solution de haute force ionique ($I = 1$) ne permet pas d'obtenir d'aussi bonnes préparations que celles faites en présence de $MgCl_2$.

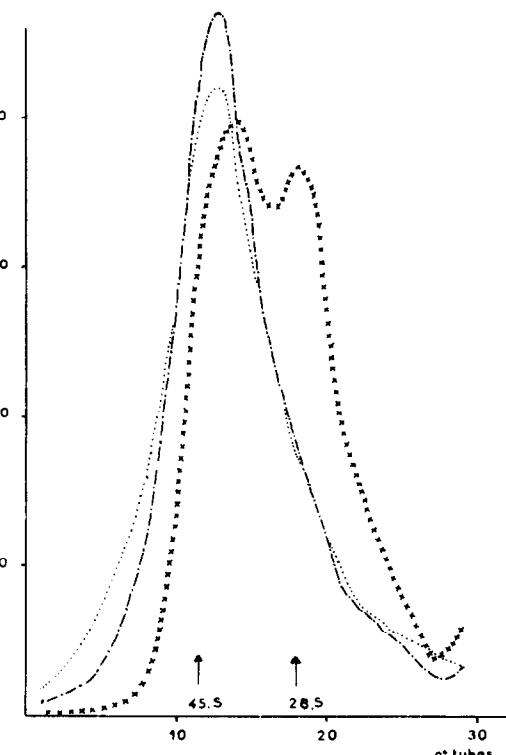


Fig. 2. Devenir du RNA nucléolaire au cours d'incubation des nucléoles *in vitro*. Marquage préalable de cellules pendant 10 min (conditions comme pour fig. 1). Les nucléoles sont préparés selon méthode décrite, lavés dans la solution SMg ou dans la solution S. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 7 min dans le milieu NaCl 0,1 M, $MgCl_2$ 0,01 M, Tris-HCl pH 7,4, 0,01 M (Vesco et al. [4]) contenant 200 µg/ml de RNA ribosomique exogène (Liau et al. [5]). Les RNA sont extraits et analysés comme pour fig. 1. La radioactivité est seule indiquée du fait de la présence de RNA exogène dans le milieu d'incubation.

- RNA extrait des nucléoles témoins non incubés.
- RNA extrait des nucléoles incubés après lavage dans solution SMg.
- xxxxx RNA extrait des nucléoles incubés après lavage dans solution S.

3. Discussion

Diverses méthodes de préparation de nucléoles ont été décrites. Certaines, en présence de DNase, mettent en œuvre une force ionique relativement élevée; par exemple Vesco et Penman [4] utilisent une solution de NaCl de $I = 0,5$. Entre nos mains, aucune de ces méthodes ne donne des fractions aussi pures. Par ailleurs, elles ne permettent pas d'éliminer la chromatine périnucléolaire.

Les RNA nucléoraires sont stables au cours de la préparation des nucléoles et les RNA extraits sont riches en fractions lourdes de 45 S et plus. Cette stabilisation est probablement un effet de la force ionique élevée du milieu de préparation (Liau et al. [5]). Il semble en être de même pour la méthode décrite par Vesco et al. [4]. Notons que récemment Sharma et al. [8] ont montré l'existence, dans le résidu nucléaire d'extraction par NaCl 2 M, de RNA 60 S et 80 S qui pourraient être précurseurs de RNA 45 S.

En dépit de l'altération morphologique de la chromatine intranucléolaire et des particules fibrillaires, dont on sait que ce sont les premiers éléments à présenter un marquage au cours du processus de synthèse des RNA nucléolaires *in vivo* [7], nos préparations présentent, *in vitro*, d'une part, une activité d'incorporation dans les RNA de ribonucléosides monophosphates à partir de ribonucléosides triphosphates [6] et, d'autre part, la capacité de transformation des RNA lourds précurseurs. Ces préparations nucléolaires constituent un matériel expérimental qui ne possède probablement pas les fonctions complètes normales du nucléole, mais permet l'étude du déroulement au moins partiel de certains phénomènes.

Mais surtout, il convient d'insister sur le fait que la pureté des préparations obtenues et l'élimination de la chromatine périnucléolaire nous assurent de l'origine intranucléolaire des éléments que nous étudions. Cette élimination différentielle nous permet d'aborder les rôles respectifs de la chromatine périnucléolaire et de la chromatine intranucléolaire. L'étude du DNA, des systèmes enzymatiques, des particules intranucléolaires est en cours.

Références

- [1] F.Amalric, J.P.Zalta et R.Simard, *Exptl. Cell. Res.* 55 (1969) 370.
- [2] F.Zajdela, *Colloque Franco-Soviétique* (Gauthier-Villars, Paris, 1963) p. 49.
- [3] T.Nakamura, F.Rapp et H.Busch, *Cancer Res.* 27 (1967) 1084.
- [4] C.Vesco et S.Penman, *Biochim. Biophys. Acta* 169 (1969) 188.
- [5] C.Liau, N.C.Craig et R.P.Perry, *Biochim. Biophys. Acta*, 169 (1969) 196.
- [6] F.Amalric, communication personnelle.
- [7] N.Granboulan et P.Granboulan, *Exptl. Cell. Res.* 38 (1965) 604.
- [8] O.K.Sharma, E.J.Hidvegi, F.Marks, A.W.Prestayko, K. Smetana et H.Busch, *Physiol. Chem. Phys.* 1 (1969) 185.