

BBA 65728

## INFLUENCE D'UNE CARENCE EN PROTÉINES SUR L'ACTIVITÉ DES RIBONUCLEASES ET SUR CELLE DE LEUR INHIBITEUR DANS LE FOIE DE RAT

C QUIRIN-STRICKER, M GROSS\* ET P MANDEL

*Centre de Neurochimie du C N R S et Institut de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, Strasbourg (France)*

(Reçu le 4 décembre, 1967)

## SUMMARY

*Effect of protein deprivation on the activity of rat liver ribonucleases and their inhibitor*

The activities of different ribonucleases of rat liver in rats maintained on a protein-free diet were investigated

It was shown that during protein deprivation: the activities of both "free" and "latent" ribonucleases are not significantly changed when tested at pH 5, on the other hand, the activities of both "free" and "latent" ribonucleases are increased 5-fold and 2-3-fold, respectively, when tested at pH 8, concomitantly the activity of the ribonuclease inhibitor is decreased

An interpretation for these results has been suggested

## INTRODUCTION

Au cours d'une étude du métabolisme des RNA du foie de rats privés d'un apport protéique alimentaire, nous avons mis en évidence: (1) un accroissement de la biosynthèse des différents types de RNA (mRNA, tRNA, rRNA), (2) une réduction de la quantité de RNA hépatique<sup>1,2</sup>. Nous avons noté en particulier une baisse considérable du taux des polysomes avec accroissement de celui des monosomes, ce qui semble bien être dû à une diminution importante du mRNA durant la carence azotée<sup>3</sup>. D'ailleurs, seule une intensification de la dégradation des RNA peut expliquer le fait que, malgré l'accroissement de la synthèse, la teneur des divers RNA diminue. Dans le présent travail, nous montrons l'existence d'une corrélation entre la dégradation des mRNA et des rRNA démontrée antérieurement<sup>2</sup> d'une part, l'accroissement de l'activité de la ribonucléase basique libre et la réduction de l'effet des inhibiteurs cytoplasmiques de cette ribonucléase d'autre part.

Abréviations PCMB, parachloromercurobenzoate de sodium

\* Boursière de la California Corporation for Biochemical Research Adresse permanente Institut de Chimie Générale et Biologique, Académie de Médecine, Łodz, Pologne

## TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

*Détermination de l'activité de la ribonucléase acide et basique (forme libre et totale)*

Les foies de rats normaux et de rats carencés en protéines pendant 3 ou 4 semaines<sup>4</sup> sont broyés au moyen d'un homogénéiseur de Potter à piston en téflon de manière à obtenir un homogénat à 10% dans du saccharose 0.25 M.

Le substrat utilisé pour la mesure de l'activité de la ribonucléase est une solution de RNA de levure à 1% (Schwarz-Fould Springer) purifié d'après la méthode de BRAWERMAN ET HADJIVASSILIOU<sup>5</sup>. Cette solution est dialysée pendant 24 h contre l'EDTA 0.0015 M afin d'enlever les ions métalliques contaminants.

La mesure de l'activité ribonucléasique est basée sur la libération d'oligonucléotides acido-solubles à partir de RNA de levure purifié; elle a été effectuée selon la méthode de WATTIAUX ET DE DUVE<sup>6</sup> et VANDERMEERS-PIRET, CAMUS ET CHRISTOPHE<sup>7</sup> modifiée. Les incubations ont lieu à 37° pendant 30 min, délai pour lequel la dégradation du RNA est linéaire chez les témoins et chez les carencés. On arrête l'hydrolyse par addition d'une solution comprenant 10 parties d'éthanol glacé à 75% dans du HCl 1 M et une partie d'acétate d'uranyle 0.75% dans de l'acide perchlorique 2.5 M. On réalise parallèlement pour chaque série des déterminations au temps zéro par précipitation immédiate sans incubation à 37°. Les tubes d'incubation sont maintenus au froid pendant 30 min. Après 30 min de centrifugation à  $2000 \times g$ , on détermine la densité optique à 260 m $\mu$  de 0.2 ml de surnageant dilué à 3 ml avec de l'H<sub>2</sub>O.

(1) *Essai de l'activité de la ribonucléase acide et basique libre*. Le mélange réactionnel pour la détermination de l'activité de la ribonucléase acide libre comprend: 0.2 ml de RNA à 1%, 0.2 ml de tampon acétate de sodium 1 M (pH 5), 0.25 ml de saccharose 1 M et 0.35 ml d'H<sub>2</sub>O. Celui nécessaire à la détermination de l'activité de la ribonucléase basique est identique au précédent à l'exception du tampon acétate 1 M (pH 5), qui est remplacé par le tampon Tris-HCl 0.2 M (pH 8).

A 0.2 ml de chacun de ces mélanges réactionnels, on ajoute 0.2 ml d'homogénat préparé à partir de foies de rats normaux d'une part et de foies de rats carencés en protéines d'autre part.

(2) *Essai de l'activité de la ribonucléase acide et basique totale*. Les milieux réactionnels utilisés sont identiques à ceux utilisés pour les ribonucléases libres, à l'exception du saccharose qui est remplacé par un détergent: le Triton X 100 à 2% (v/v) à raison de 0.1 ml par incubation.

A 0.2 ml de chacun des mélanges réactionnels, on ajoute 0.2 ml d'homogénat dilué et on suit le même mode opératoire que celui indiqué pour le dosage de la ribonucléase libre sauf que la dilution de l'homogénat se fait dans du Triton X 100 à 0.01% (v/v).

(3) *Essai de la ribonucléase latente*. Pour tester l'activité de la ribonucléase latente, on utilise le parachloromercurobenzoate de sodium (PCMB) à une concentration finale de  $1.85 \cdot 10^{-3}$  M dans le même milieu d'incubation que celui utilisé pour la ribonucléase basique libre.

*Mesure de l'activité de l'inhibiteur naturel de la ribonucléase*

Pour étudier l'effet de l'inhibiteur de la ribonucléase contenu dans le surnageant de foie de rats, nous préparons celui-ci ainsi que le RNA substrat d'après la technique décrite par SHORTMAN<sup>8</sup>. Le foie est broyé dans 4 vol. de saccharose 0.44 M. Après 2

centrifugations à  $81\,000 \times g$  pendant 60 min, on réalise différentes dilutions du surnageant dans l'EDTA 0.0005 M (10 à 30 fois).

L'évaluation de la quantité d'inhibiteur de la ribonucléase nécessite un RNA hautement purifié. C'est pourquoi la solution de RNA de levure à 3% est dialysée contre 20 vol. d'EDTA 0.01 M puis contre du NaCl 0.15 M et de l'H<sub>2</sub>O bidistillée. On l'ajuste à une concentration 1% puis la solution est conservée à  $-20^{\circ}$ .

La solution mère de ribonucléase pancréatique cristalline (Sigma) à 40  $\mu\text{g/ml}$  dans de la gélatine 0.1%, préparée selon SHORTMAN<sup>8</sup>, est conservée à  $-20^{\circ}$ . Le jour de l'utilisation, elle est diluée jusqu'à une concentration de 0.10 à 0.15  $\mu\text{g/ml}$ .

Dans un volume final de 0.6 ml, le mélange d'incubation contient: 0.2 ml de tampon véronal 0.03 M (pH 7.8), 0.2 ml de solution de RNA à 1%, 0.1 ml de surnageant de foie à diverses dilutions dans l'EDTA et 0.1 ml de ribonucléase (0.010  $\mu\text{g}$  à 0.015  $\mu\text{g}$ ).

On procède ensuite suivant le même mode opératoire que celui indiqué pour la mesure de l'activité de la ribonucléase acide et basique libre. En plus des déterminations au temps zéro, on réalise parallèlement pour chaque série d'animaux soumis au régime complet ou au régime carencé des déterminations de l'activité de la ribonucléase pancréatique cristalline avec le même substrat, dans les mêmes conditions, mais en absence de surnageant de foie.

## RÉSULTATS

### (1) Effet de la carence protéique sur l'activité des ribonucléases acides et basiques, formes "libres" et "totales"

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau I.

Nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative dans l'activité de la ribonucléase acide mesurée directement (ribonucléase libre) ou après action du Triton X 100 (ribonucléase totale) entre les rats témoins et les rats carencés en protéines. Par contre, la ribonucléase basique "libre" et la ribonucléase basique "totale" des foies de rats privés de l'apport azoté ont une activité beaucoup plus élevée que celle de la

TABLEAU I

EFFET DU JEUNE PROTÉIQUE SUR L'ACTIVITÉ DES RIBONUCLÉASES "LIBRES" ET "TOTALES" DU FOIE DE RAT

Les valeurs représentent la moyenne de 10 expériences. Les activités ribonucléasiques sont exprimées en unités d'absorption à 260 m $\mu$ .

	<i>Témoin</i>	<i>Jeûneur</i>	<i>Valeur relative au témoin = 100</i>	<i>Test t de Fisher</i>
Ribonucléase acide libre	0.184 $\pm$ 0.048*	0.208 $\pm$ 0.049	113	$P > 0.05$
Ribonucléase basique libre	0.029 $\pm$ 0.005	0.144 $\pm$ 0.019	496	$P < 0.001$
Ribonucléase acide totale (+ Triton X 100)	0.758 $\pm$ 0.202	0.649 $\pm$ 0.125	86	$P > 0.05$
Ribonucléase basique totale (+ Triton X 100)	0.115 $\pm$ 0.031	0.266 $\pm$ 0.062	231	$P < 0.001$
Ribonucléase basique libre + ribonucléase latente (+ PCMB)	0.153 $\pm$ 0.026	0.149 $\pm$ 0.029	97	$P > 0.05$

\* Erreur standard

ribonucléase basique correspondante du foie de rat normal. Ainsi l'activité de la ribonucléase basique libre et totale des foies de rats jeûneurs est respectivement 5 et 2, 4 fois supérieure à celle des foies de rats témoins. L'augmentation de cette activité pourrait être due soit à l'accroissement de la quantité d'enzymes, soit à la réduction ou à l'absence de "l'inhibiteur". Ce dernier est inactivé par les réactifs qui bloquent les groupements sulphydrilés<sup>11</sup>. Nous avons choisi le PCMB pour libérer la ribonucléase alcaline du complexe enzyme-inhibiteur afin d'évaluer le taux de ribonucléase alcaline dont l'activité a été bloquée par l'inhibiteur. Il ressort des valeurs consignées dans le Tableau I que la ribonucléase basique de l'homogénat de foie de rats témoins en présence de PCMB est 5 fois supérieure à l'activité de cette même ribonucléase en l'absence de PCMB. Dans l'homogénat de foie de rats carencés en protéines, les deux activités, en présence et en absence de PCMB, sont identiques. De plus, chez les rats carencés, l'activité de la ribonucléase alcaline, en présence de PCMB, est égale à celle correspondante des témoins. Ces résultats sont donc en faveur d'une réduction de l'inhibiteur de la ribonucléase dans le foie des rats jeûneurs.

Notons encore que l'on trouve dans la littérature des valeurs fort différentes du rapport ribonucléase alcaline/ribonucléase acide<sup>8-10</sup>. Ceci peut être dû à la contamination par des ions métalliques du RNA utilisé comme substrat pour la ribonucléase. Dans nos conditions expérimentales, avec une préparation purifiée de RNA, ce rapport est de 0.15 pour le foie de rat normal et de 0.69 pour le foie de rat carencé en protéines.

(2) *Détermination de l'activité de l'inhibiteur de la ribonucléase hépatique chez les rats normaux et carencés*

L'inhibiteur de la ribonucléase dans le foie de rat a été étudié par SHORTEMAN<sup>8</sup> et par ROTH<sup>11</sup>. Les travaux plus récents de ce dernier<sup>12</sup> montrent que la ribonucléase basique intracellulaire existe peu sous la forme libre mais qu'elle est liée pour une

TABLEAU II

EFFET DE LA CARENCE PROTÉIQUE SUR L'INHIBITEUR DE LA RIBONUCLÉASE HÉPATIQUE

Les valeurs représentent la moyenne de 5 expériences. (Nous avons constaté des variations importantes suivant les expériences, alors que B/A (Colonne C) reste sensiblement constant.) L'activité ribonucléasique est exprimée en unités d'absorption à 260 mμ.

Rats testés	Dilution du surnageant	Activité de la ribonucléase pancréatique		B/A × 100 C	Inhibition (%)
		Absence de surnageant hépatique A	Présence de surnageant hépatique B		
Témoins	10 fois	0.215	0.014	6.5 ± 1.05*	93.5
Jeûneurs	10 fois	0.202	0.047	23.3 ± 1.70	76.7
Témoins	20 fois	0.214	0.048	22.4 ± 1.37	77.6
Jeûneurs	20 fois	0.203	0.088	43.5 ± 2.73	56.5
Témoins	30 fois	0.214	0.108	50.5 ± 2.37	49.5
Jeûneurs	30 fois	0.202	0.158	78.2 ± 4.87	21.8

\* Erreur standard

grande part à l'inhibiteur dans le surnageant et pour une faible part aux sous-unités ribosomales.

Dans les essais concernant l'inhibiteur, nous avons comparé l'activité de la ribonucléase pancréatique cristalline, en présence de surnageant contenant l'inhibiteur, à l'activité de la ribonucléase en absence d'inhibiteur.

Comme l'avait décrit SHORTMAN<sup>8</sup>, la réduction de l'activité ribonucléasique en présence de quantités croissantes de surnageant de foie s'inscrit dans une courbe de forme exponentielle. L'activité ribonucléasique en présence de l'inhibiteur (Tableau II, Colonne C) est d'autant plus grande que la dilution de l'extrait contenant celui-ci est plus élevée. Nous constatons, d'après le Tableau II, que le pouvoir inhibiteur du surnageant de foie envers la ribonucléase pancréatique est nettement diminué chez les rats carencés en protéines. La réduction de l'activité inhibitrice chez ces derniers est de 18% pour une dilution du surnageant de 1 à 10, de 28% pour une dilution de 1 à 20 et de 56% pour une dilution de 1 à 30 pour laquelle l'activité de l'inhibiteur est la plus faible et chez les témoins et chez les carencés.

#### DISCUSSION

Nos résultats indiquent une diminution de l'inhibiteur de la ribonucléase dans le foie des rats carencés en protéines.

Plusieurs travaux suggèrent une corrélation étroite entre la richesse en RNA et l'augmentation de l'activité ribonucléasique d'un tissu<sup>13-16</sup>. Cependant SHORTMAN<sup>17</sup> a montré que dans le foie en régénération, parallèlement à l'accroissement du RNA, l'activité de la ribonucléase totale cytoplasmique diminue et celle de l'inhibiteur augmente. Plus récemment, CHAKRAVORTY ET BUSCH<sup>18</sup> ont observé des résultats similaires dans les noyaux de tumeurs. Dans le cas du foie des rats soumis à une carence protéique, le taux de RNA change également en sens inverse de l'activité ribonucléasique; l'augmentation de la quantité de ribonucléase basique, jointe à une diminution de l'inhibiteur peut expliquer le taux réduit de RNA cellulaire alors que la synthèse est accrue. Ces résultats sont à rapprocher de ceux observés lorsqu'on administre du *N,N'*-diéthylène-*N''* phénéthylphosphoramide à des rats porteurs de tumeur Walker 256 (bibl. 19). Chez ces animaux, l'administration de *N,N'*-diéthylène-*N''* phénéthylphosphoramide entraîne une diminution de la croissance de la tumeur parallèlement à une réduction du RNA et un accroissement de l'activité ribonucléasique du tissu. Des changements similaires en RNA et ribonucléase sont observés dans les feuilles âgées de pommiers<sup>20</sup>. En somme, la diminution du RNA tissulaire total et le faible taux de polysomes observés lors de la carence protéique pourraient avoir pour origine une dégradation plus intense du rRNA et du mRNA due à l'activité accrue de la ribonucléase basique en rapport avec la teneur plus faible en inhibiteur.

On sait qu'au cours de la carence azotée, certaines protéines bénéficient d'une biosynthèse préférentielle alors que la synthèse d'autres protéines est considérablement diminuée. Ainsi, l'inhibiteur protéique de la ribonucléase pourrait être rangé dans la deuxième catégorie alors que la ribonucléase basique figurerait parmi la première.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Melle ODILE LALLEMAND pour sa collaboration technique.

Ce travail a été effectué grâce à l'aide matérielle de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique et de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

## RÉSUMÉ

L'activité des différentes ribonucléases hépatiques a été étudiée chez le rat au cours d'une carence en protéines

Sous l'effet de la carence protéique: l'activité des ribonucléases "libre" et "latente", déterminée à pH 5, n'est pas modifiée de façon significative, par contre, déterminée à pH 8, l'activité des ribonucléases "libre" et "latente" est augmentée respectivement de 5 et de 2-3 fois, parallèlement, on note une diminution importante de l'activité de l'inhibiteur de la ribonucléase.

Une interprétation des résultats est suggérée

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 C QUIRIN-STRICKER ET P MANDEL, *Bull Soc Chim Biol*, 50 (1968) 31
- 2 P MANDEL ET C QUIRIN-STRICKER, *Life Sci*, 6 (1967) 1299
- 3 P MANDEL, C QUIRIN, M BLOCH ET M JACOB, *Life Sci*, 5 (1966) 325
- 4 P MANDEL, M JACOB ET L MANDEL, *Bull Soc Chim Biol*, 32 (1950) 80
- 5 A HADJIVASSILIOU ET G BRAWERMAN, *Biochim Biophys Acta*, 103 (1965) 211
- 6 R. WATTIAUX ET C DE DUVE, *Biochem J*, 63 (1956) 606
- 7 M C VANDERMEERS-PIRET, J CAMUS ET J CHRISTOPHE, *Bull Soc Chim Biol*, 48 (1966) 525.
- 8 K SHORTMAN, *Biochim Biophys Acta*, 51 (1961) 37
- 9 G DE LAMIRANDE ET C ALLARD, *Ann N Y Acad Sci*, 81 (1959) 570
- 10 J S ROTH, *J Biol Chem*, 208 (1954) 181.
- 11 J S ROTH, *J Biol Chem*, 231 (1958) 1085
- 12 T UTSUNOMIYA ET J S ROTH, *J. Cell Biol*, 29 (1966) 395
- 13 L LEDOUX, A PILERI, F VANDERHAEGE ET S BRANDLI, *Nature*, 180 (1957) 1048
- 14 S. BRODY, *Biochim Biophys Acta*, 24 (1957) 502
- 15 E BRESNICK, J SAGE ET K LANCLOS, *Biochim Biophys Acta*, 114 (1966) 631
- 16 J J VILLALOBOS, W J STEELE ET H BUSCH, *Biochem. Biophys Res Commun*, 17 (1964) 723
- 17 K SHORTMAN, *Biochim Biophys Acta*, 61 (1962) 50
- 18 A K CHAKRAVORTY ET H BUSCH, *Cancer Res*, 27 (1967) 789
- 19 R W WANNEMACHER JR, J B ALLISON, D CHU ET M L CROSSLEY, *Proc Soc Exptl Biol Med*, 111 (1962) 708.
- 20 B KESSLER ET N ENGELBERG, *Biochim Biophys Acta*, 55 (1962) 70

*Biochim. Biophys Acta*, 159 (1968) 75-80