

## SÉPARATION DES PARTICULES RIBONUCLÉOPROTÉIQUES (Hn-RNP) DES NOYAUX DE CELLULES L, EN DEUX CLASSES, PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE EN GRADIENTS DE MÉTRIZAMIDE

Jean-François HOUSSAIS

*Institut du Radium-Fondation Curie, Section de Biologie - Bât. 110, Faculté des Sciences d'Orsay, 115 rue Georges Clémenceau, F-91 Orsay, France*

Received 20 June 1975

### Summary

Separation of nuclear Hn-RNP particles into two density classes, following isopycnic centrifugation in metrizamide gradients, is reported. One class (density 1.31 g/ml) is rapidly labelled, and contains polydisperse heterogeneous high molecular weight particles, easily diffusible from intact nuclei under certain conditions. The other class (density 1.18 g/ml) is of lower molecular weight, not diffusible, and needs apparently a longer time to be labelled and/or to accumulate inside the nuclei.

### 1. Introduction

Les RNA hétérogènes (Hn-RNA) localisés dans les noyaux des cellules de mammifères [1–4] sont associés à des protéines. L'ensemble forme des particules ribonucléoprotéiques (Hn-RNP) de taille très hétérogène, avec des coefficients de sédimentation de 15 S à plus de 200 S [5–9]. La présence dans les molécules de Hn-RNA, de séquences de bases analogues à celles des RNA messagers cytoplasmiques (m-RNA), suggère que ces RNA nucléaires pourraient être les précurseurs des RNA messagers [10–13]. On ne sait cependant pas clairement si toutes les particules nucléaires Hn-RNP sont des formes de maturation des m-RNA, ou si plusieurs classes de Hn-RNP co-existent, l'une contenant les vrais précurseurs des RNA messagers cytoplasmiques, les autres contenant des produits de transcription du génome, qui ne quitteront pas le noyau [13–16]. Il est montré dans cette étude, que les particules nucléaires Hn-RNP peuvent être séparées en 2 classes, après centrifugation en gradient de métrizamide: (a) une classe de densité 1,31 g/ml environ, constituée de particules à marquage rapide, de grande taille, diffusant facilement des noyaux sous l'action de certains détergents; (b) une seconde classe de particules plus petites, de densité 1.18 g/ml, non diffusibles, nécessitant

apparemment des temps de marquage plus longs pour être bien mises en évidence dans les noyaux.

### 2. Méthodes

#### 2.1. Culture des cellules et marquage des RNA

Les cellules C11D LM (TK<sup>-</sup>) sont cultivées en suspension dans le milieu Eagle-Dulbecco (Gibco, Long Island N.Y.) avec 10% de sérum de veau, et de la bromodésoxyuridine 30 µg/ml de milieu [17]. Les autres conditions expérimentales (addition d'actinomycine D, marquage des RNA par l'uridine radioactive) ont également été décrites précédemment [17].

#### 2.2. Isolement des noyaux, et préparation des surnageants nucléaires

Les cellules, après récolte puis lavage dans une solution saline (Phosphate buffered saline), sont resuspendues dans 15 volumes de la solution I (Tris-HCl 0.04 M pH 7.5 NH<sub>4</sub>Cl 0.02 M acétate de magnésium 0.003 M et sucrose 0.25 M). Les cellules sont cassées à 0–4°C, par addition du détergent non-ionique Nonidet P 40 0.5%, et 10 allers-retours dans un homogénéiseur manuel en Teflon. Ce traitement provoque la rupture de l'ensemble des cellules; un peu de maté-

riel cytoplasmique reste cependant encore attaché aux noyaux libérés. Après centrifugation à 1000 g, les noyaux sont remis en suspension dans la solution I (même volume que précédemment), et traités par un second détergent, soit le Triton X-100 1% [18], soit le Célanol [19] (Célanol 252, Rhône-Progil, France) 0.05%, puis homogénéisation manuelle (10 à 20 allers-retours). Ce second traitement solubilise la plupart des membranes cytoplasmiques résiduelles. Après observation par microscopie en contraste de phase, les noyaux sont centrifugés dans le sucrose 0.4 M à 1800 g. Le culot de noyaux purifiés est resuspendu dans la solution II (triéthanolamine 0.02 M pH 7.5, NaCl 0.1 M, KCl 0.025 M et acétate de magnésium 0.0025 M), et cassés par sonication à la fréquence maximum (10 Kc) pendant une minute (Raytheon Oscillator model DF 101). La rupture des noyaux est vérifiée par microscopie optique. Le sonicat est centrifugé (centrifugeuse Sorvall réfrigérée) pendant 15 minutes à 30 000 g. Le matériel chromatinien et nucléolaire est éliminé, et le surnageant 30 000 g repris. Le surnageant nucléaire ainsi obtenu, constitue le matériel utilisé dans cette étude.

### 2.3. Centrifugation en gradients de densité

Les solutions de Métrizamide (2-(3-acétamido-5-N-méthyl-acétamido-2,4,6-tri-iodobenzamido)-2-déoxy-D-glucose) peuvent atteindre, avec une viscosité relativement peu élevée, des densités suffisantes pour séparer par centrifugation isopycnique les particules ribonucléoprotéiques non fixées préalablement [20]. La métrizamide (Nyegaard and Co. A/S) est mise en solution dans TKM (Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, KCl 0.025 M et acétate de magnésium 0.0025 M) à la concentration 41 gr% (poids/volume). Cette solution est distribuée dans les tubes de 5 ml du rotor SW 50; le surnageant nucléaire 30 000 g (0.7 ml) dans la solution II, est placé au dessus; la centrifugation (centrifugeuse Beckman L 50) est effectuée à 4°C, et 30 000 tours/min. pendant 65 heures. La densité des fractions recueillies est calculée à partir de la mesure de l'indice de réfraction. Le gradient de densité obtenu n'est pas linéaire (voir figures). On peut tirer avantage de la forme de la courbe de densité, pour très bien séparer des régions de densité voisine. Les conditions expérimentales de centrifugation en gradient de CsCl, après fixation des particules ribonucléoprotéiques par

le formaldéhyde, sont celles décrites antérieurement [17].

## 3. Resultats

### 3.1. Séparation des particules nucléaires en 2 classes, après centrifugation isopycnique en gradients de métrizamide

#### 3.1.1. Les particules Hn-RNP marquées par l'uridine radioactive en absence d'actinomycine D

(i) Les RNA nucléaires hétérogènes nouvellement synthétisés, présents dans les particules du surnageant nucléaire, peuvent être mis en évidence par des marquages courts (de 10 min. à 1 heure), en absence d'actinomycine D [5-9]. Les RNA des cellules Cl1D ont été marqués par la [<sup>14</sup>C]uridine pendant 1 heure; les noyaux et les surnageants 30 000 g ont été préparés, et les particules Hn-RNP séparées dans un gradient de métrizamide (voir Méthodes). Le résultat obtenu (fig.1, A<sub>0-1</sub>) met en évidence un pic principal dans la zone de densité 1.31 g/ml, et l'ébauche d'un second pic à la densité 1.18 g/ml environ, dont il sera question plus loin. Les mêmes particules, préalablement fixées, migrent en gradient de CsCl (fig.2) à la densité 1.42 g/ml, densité des particules Hn-RNP dans ces conditions [9]; il n'y a pas de matériel marqué migrant dans la zone de densité des ribosomes (1.50-1.55 g/ml) (fig.2).

(ii) Si le marquage est prolongé pendant 8 heures (fig.1, A<sub>0-8</sub>), on constate la présence nette du second pic dans la région de densité 1.18 g/ml. La densité de ce matériel est différente de celle des ribosomes qui, dans ces conditions expérimentales, forment en gradient de métrizamide, un pic à la densité 1.25 g/ml, mais est très proche de la densité des m-RNP, située aussi aux environs de 1.18 g/ml (courbes non montrées). Cette seconde classe de particules nucléaires nécessite donc apparemment un temps plus long pour être marqué.

#### 3.1.2. Les particules Hn-RNP marquées par l'uridine radioactive, en présence d'actinomycine D

Le marquage des RNA nucléaires en présence d'actinomycine D (0.04 µg/ml), et la séparation des particules Hn-RNP en gradient de métrizamide, ont eu pour but d'éliminer complètement de l'analyse les RNA ribosomiaux, et de rechercher si l'actinomycine D ajoutée pendant des temps longs aux cultures de

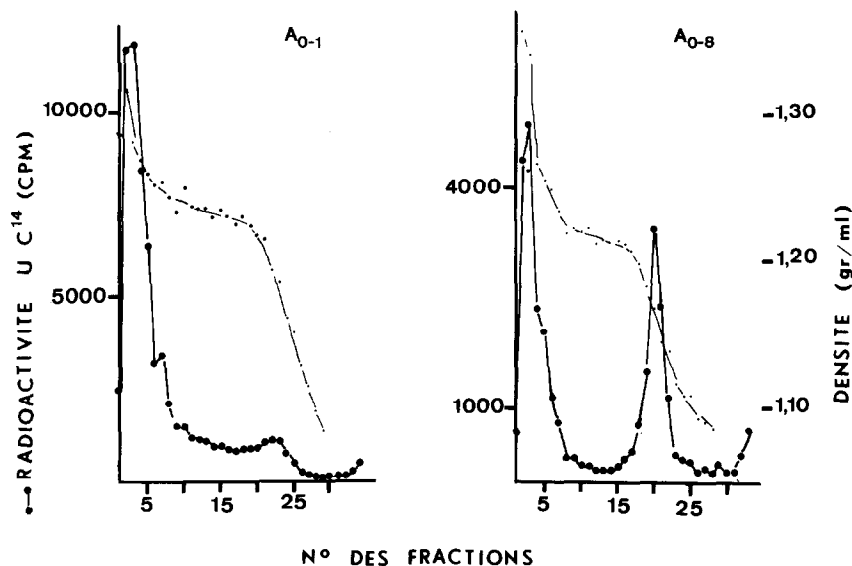


Fig.1. Profil de densité en gradients de métrizamide, des particules nucléaires Hn-RNP, marquées par la [ $^{14}\text{C}$ ]uridine pendant 1 heure ( $A_{0-1}$ ) et 8 heures ( $A_{0-8}$ ). Les surnageants 30 000 g (voir Méthodes) sont mis sur une solution de métrizamide à 41 g%; la centrifugation est effectuée à 4°C pendant 65 heures avec le rotor SW 50, à 30 000 tours/min.

cellules Cl1D [17] diminuait ou non préférentiellement la synthèse de l'une des 2 classes de particules nucléaires.

(i) La figure 3 montre les résultats obtenus, lorsque les cellules ont été cultivées pendant 5 heures (fig.3,  $A_{5-5}$ ) et 8 heures (fig.3,  $A_{8-8}$ ), avec l'actinomycine D. Le matériel du pic 1.31 g/ml apparaît le premier marqué; le matériel du pic 1.18 g/ml n'apparaît qu'après un marquage plus long. On retrouve ainsi les résultats observés en absence d'actinomycine D.

(ii) Les particules Hn-RNP synthétisées dans les noyaux de cellules Cl1D cultivées en présence d'actinomycine D pendant des temps longs [17] ont été examinées. La figure 4 donne les résultats différents obtenus dans 2 expériences indépendantes. Dans les 2 cas, les cellules ont été en contact avec l'actinomycine D pendant 28 heures, et les RNA marqués pendant 8 heures, de la 20<sup>ème</sup> à la 28<sup>ème</sup> heure [17]. Dans les 2 expériences (fig.4) on retrouve le pic du matériel marqué à la densité 1.18 g/ml. Par contre il y a absence complète du matériel marqué à la densité 1.31 g/ml, dans une expérience (fig.4 II). Les particules Hn-RNP correspondant au matériel séparé en 2 pics dans la figure 4 I, avaient en gradient de sucrose, un profil de sédimentation caractéristique des particules de grande

taille, avec des coefficients de sédimentation étalés jusqu'à plus de 200 S. Par contraste, les particules nucléaires ne contenant que le matériel migrant à la densité 1.18 g/ml dans la figure 4 II, avaient en gradients de sucrose un profil de sédimentation correspondant à des particules de taille plus petite,

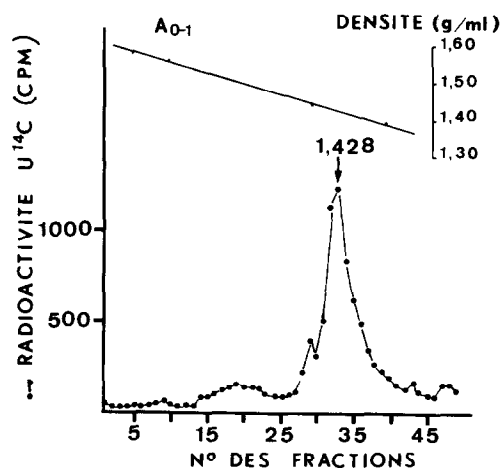


Fig.2. Profil de densité en gradient de CsCl, des particules nucléaires Hn-RNP marquées par la [ $^{14}\text{C}$ ]uridine pendant 1 heure.

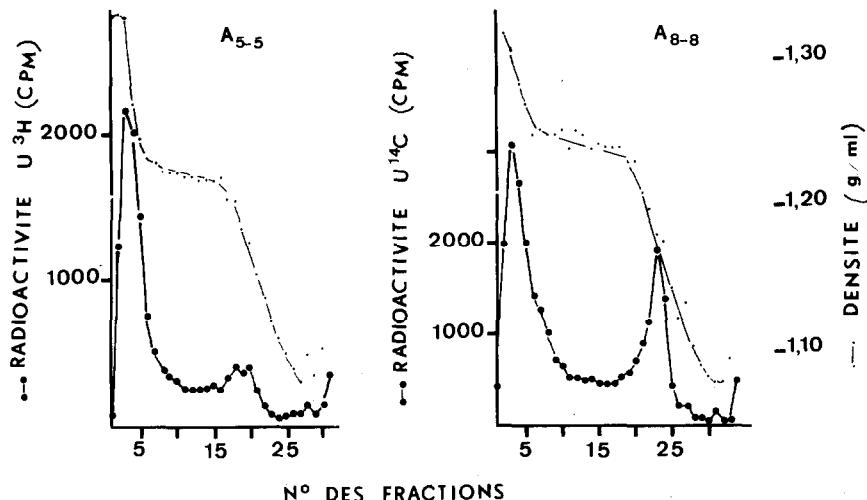


Fig.3. Profils de densité en gradients de métrizamide des particules nucléaires Hn-RNP marquées par l'uridine radioactive pendant 5 heures ( $A_{5-5}$ ) et 8 heures ( $A_{8-8}$ ) en présence d'actinomycine D. L'actinomycine D ( $0.04 \mu\text{g/ml}$ ) est ajoutée 30 min. avant le marquage. Les autres conditions expérimentales sont celles de la figure 1.

ne dépassant pas 50 S, avec un maximum entre 20 et 35 S (courbes non montrées). Le matériel du pic de densité  $1.31 \text{ g/ml}$  en métrizamide, semble donc bien correspondre aux particules nucléaires hétérogènes de grande taille, à marquage rapide [5-9]. Le matériel contenu dans le pic  $1.18 \text{ g/ml}$  est actuelle-

ment étudié. Une action sélective de l'actinomycine D sur la synthèse des 2 classes de particules nucléaires ne peut pas être clairement établie dans ces expériences (fig.4 I, II). Les observations présentées dans le paragraphe suivant (Paragr. 3.2.) suggèrent une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de matériel de

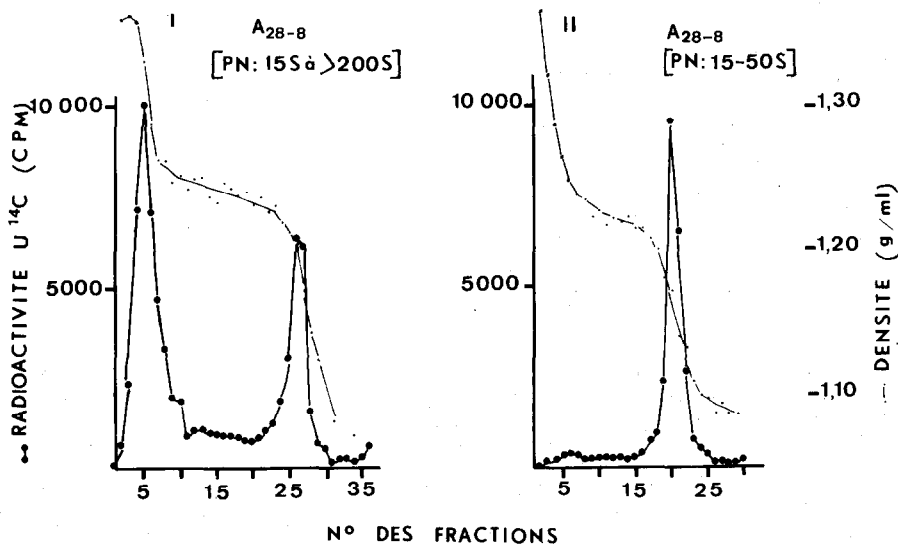


Fig.4. Profils de densité en gradients de métrizamide, des particules nucléaires des noyaux de cellules C11D cultivées pendant 28 heures en présence d'actinomycine D ( $0.04 \mu\text{g/ml}$ ). (I) Profil de densité de particules Hn-RNP de grande taille (de 15 S à plus de 200 S). (II) Profil de densité de particules Hn-RNP ayant des coefficients de sédimentation inférieurs à 50 S, en gradient de sucrose.

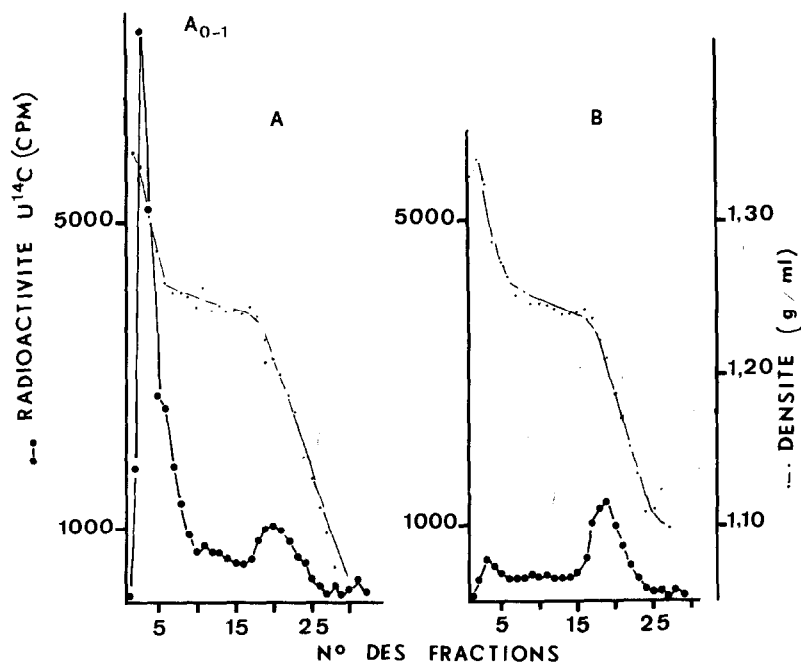


Fig.5. Action des détergents sur l'extraction des particules nucléaires Hn-RNP; profils de densité en gradients de métrizamide. Le marquage des RNA est effectué pendant 1 heure; après rupture des cellules (voir Méthodes), centrifugation puis resuspension des noyaux en 2 parts égales. L'une est traitée par le Triton X-100 1%; l'autre par le Célanol 252 0.05%. Les noyaux sont recueillis et cassés (voir Méthodes) et les surnageants mis sur la solution de métrizamide et centrifugés (voir fig.1). (A) Particules nucléaires des noyaux traitées par le Triton X-100 (B) Particules nucléaires des noyaux traités par le Célanol 252.

densité 1.31 g/ml dans les noyaux de l'expérience de la figure 4 II.

### 3.2. Extraction différentielle des particules nucléaires Hn-RNP, par les détergents

Quelques expériences avaient suggéré que les lavages trop répétés, et l'homogénéisation prolongée des noyaux en présence de détergent (plus particulièrement le Célanol 252) pourraient provoquer, en absence de rupture des noyaux, l'extraction des particules Hn-RNP de densité 1.31 g/ml. Cette éventualité a été testée de la façon suivante: les RNA ont été marqués pendant 1 heure, et les noyaux libérés après lyse des cellules par le Nonidet P-40. La suspension de noyaux a été séparée en 2 parts égales, et l'une traitée par le Triton X-100, l'autre par le Celanol 252. Après centrifugation, les noyaux ont été cassés et les surnageants 30 000 g mis sur la solution de métrizamide (voir Méthodes). La

figure 5 montre les résultats obtenus après centrifugation: (a) le surnageant 30 000 g des noyaux traités par le Triton X-100 (fig.5A) contient les 2 catégories de Hn-RNP, avec prédominance du matériel marqué dans le pic de densité 1.31 g/ml (conditions semblables à celles de la figure 1 A<sub>0-1</sub>); (b) le surnageant des noyaux traités par le Célanol (fig.5B) ne contient que le matériel migrant aux densité 1.18 g/ml. Sur la base de la radioactivité, on voit que la quantité de particules Hn-RNP présentes dans le pic de densité 1.18 g/ml est demeurée inchangée (fig.5A et 5B). Il pourrait être intéressant de rapprocher ces résultats, d'une observation faite en microscopie électronique par J. P. Zalta (communication personnelle) selon laquelle le traitement des noyaux de cellules de Foie par le Célanol 251 [19] peut entraîner l'extraction du matériel particulaire ribonucléoprotéique habituellement situé dans les régions interchromatiniennes des noyaux.

#### 4. Discussion

La centrifugation en gradient de métrizamide, permet de séparer 2 classes de particules nucléaires: (a) l'une de densité 1.31 g/ml, constituée de Hn-RNP de grande taille, correspondant aux particules hétérogènes étudiées après des temps de marquage courts [5-9]; l'autre de densité 1.18 g/ml, formée de particules de petite taille, bien mises en évidence après des temps de marquage plus longs. Ces résultats ne précisent cependant pas, les relations qui pourraient ou non exister entre ces 2 classes. Actuellement, deux possibilités peuvent être envisagées: (1) une relation de précurseurs à produits: la plus grande taille des particules de densité 1.31 g/ml, la rapidité de leur marquage, le retard de l'apparition de la radioactivité dans le pic de densité 1.18 g/ml, la taille de ces particules, seraient des arguments en faveur de cette hypothèse; (2) l'existence de 2 ensembles indépendants de particules Hn-RNP, l'un restant dans le noyau (densité 1.31 g/ml), l'autre étant exporté vers le cytoplasme (densité 1.18 g/ml); les arguments en faveur de cette seconde éventualité seraient les différences de densité en métrizamide et de sensibilité aux détergents. Il convient de remarquer en outre, que les différences qui portent sur la taille et les temps apparents de marquage ne sont pas incompatibles avec cette dernière hypothèse [13-15].

Les détergents permettent d'extraire sélectivement, à partir de noyaux apparemment intacts, les particules hétérogènes de grande taille; les 2 classes de particules Hn-RNP sembleraient donc avoir des localisations intra-nucléaires différentes. Les méthodes biochimiques associées aux observations en microscopie électronique pourraient préciser ce point. Des particules ribonucléoprotéiques de petite taille (30 ou 45 S) ont été obtenues par diffusion, après lavage répété des noyaux dans une solution saline [5,21-23]. Ce caractère d'extractibilité différencie cette particule du matériel de densité 1.18 g/ml, et l'apparenterait, en première approximation, aux particules hétérogènes (15 S à plus de 200 S) de densité 1.31 g/ml en métrizamide. L'isolement des 2 classes de particules nucléaires de densité 1.31, et 1.18 g/ml en gradients de métrizamide, devrait faciliter l'étude comparative de leurs constituants: protéines, et RNA (polyadénylation, et recherche des séquences messagères).

#### Remerciements

L'auteur remercie ses collègues, Dr B. Szafarz pour avoir attiré son attention sur l'intérêt d'un nouveau milieu de centrifugation, et Dr F. Zajdela pour les discussions intéressantes concernant l'isolement et la structure des noyaux des cellules de mammifères.

Ce travail a bénéficié de crédits de la Fondation Curie-Institut du Radium, et de la R.C.P. No 281 du C.N.R.S..

#### Bibliographie

- [1] Harris, H. (1962) *Biochem. J.* 84, 60-61.
- [2] Houssais, J. F. et Attardi, G. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 616-623.
- [3] Soeiro, R., Birboim, H. C. et Darnell, J. E. (1966) *J. Mol. Biol.* 19, 362-372.
- [4] Scherrer, K., Mercaud, L., Zajdela, F., London, I. M. et Gros, F. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 1571-1578.
- [5] Samarina, O. P., Lukanidin, E. M., Molnar, J. et Georgiev, G. P. (1968) *J. Mol. Biol.* 33, 251-263.
- [6] Moulé, Y. et Chauveau, J. (1968) *J. Mol. Biol.* 33, 465-481.
- [7] Stevenin, J., Mandel, P. et Jacob, M. (1970) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 703-720.
- [8] Niessing, J. et Sekeris, C. E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 247, 391-403.
- [9] Pederson, T. (1974) *J. Mol. Biol.* 83, 163-183.
- [10] Williamson, R., Drewienkiewicz, C. E. et Paul, J. (1973) *Nature New Biol.* 241, 66-68.
- [11] Imaizumi, T., Diggelmann, H. et Scherrer, K. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1122-1126.
- [12] Ruiz-Carillo, A., Beato, M., Schutz, G., Feigelson, P. et Allfrey, V. G. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3641-3645.
- [13] McKnight, G. S. et Schimke, R. T. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4327-4331.
- [14] Price, R. P., Ransom, L. et Penman, S. (1974) *Cell* 2, 253-258.
- [15] Quinlan, T. J., Billings, P. B. et Martin, T. E. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2632-2636.
- [16] Davidson, E. H. et Britten, R. J. (1973) *Quart. Rev. Biol.* 48, 565-613.
- [17] Osborne-Rivet, L. et Houssais, J. F. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 427-438.
- [18] Blobel, G. et Potter, V. R. (1966) *Science* 154, 1662-1665.
- [19] Zalta, J. et Zalta, J. P. (1973) in: *Methods in Cell Biology* (Prescott, D. ed.) Vol. 6, pp. 317-324, Acad. Press N.Y.
- [20] Rickwood, D. et Birnie, G. D. (1975) *FEBS Lett.* 50, 102-110.

- [21] Niessing, J. et Sekeris, C. E. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 209, 484–492.
- [22] Ishikawa, K., Kuroda, C. et Ogata, K. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 213, 505–512.
- [23] Schweiger, A. et Mazur, G. (1975) *FEBS Lett.* 54, 39–43.