

2 - 4 - 4
L'ARN intra et extra-lutoïdique
 B. Marin

Intra- and extra- lutoïd RNA

It is possible to state categorically that RNA is present in the intra-lutoïd fraction of latex. This is so because :

- 1 - Thorough washing of a lutoïd sediment (EDTA) is insufficient to eliminate RNA from the sediment.*
- 2 - When lutoïds are treated with an antistabilising agent, RNA is liberated simultaneously with acid phosphatase.*
- 3 - Analysis by centrifuging on a saccharose gradient shows that a close relationship exists between the positions occupied by RNA and acid phosphatase respectively.*
- 4 - Lutoïd RNA cannot be hydrolysed by a ribonuclease except insofar as the lutoïds have lost their stability.*

Lutoïd RNA is heterogeneous. 50 to 60% of the total may consist of low molecular weight RNA which migrates rapidly during electrophoresis. However, a varying proportion of ribosomal RNA has definitely been shown to exist. Its electrophoretic mobility has enabled it to be unambiguously identified as a cytoplasmic ribosomal RNA.

In addition, ribosomes are present in the lutoïd fraction and possess the same sedimentation and mobility characteristics as the cytoplasmic ribosomes.

Although the presence of RNA in the lutoïd fraction is quite definite, the meaning of its presence there remains unclear. It has been impossible to demonstrate the existence of lutoïd associated protein synthesis, but it does, however, seem quite probable that the heterogeneity of the intra-lutoïd RNA population is the result of a degradation process which actually takes place within this fraction of which it might be a function.

★

La présence d'acides ribonucléiques dans le latex d'*Hevea brasiliensis* Müll.-Arg. (Kunth) a été soulignée depuis longtemps par maints auteurs, notamment par A.I. McMullen (1959 et 1962) et J. Tupy (1969) entre autres. Cet ARN est essentiellement présent dans le sérum mais il existe aussi associé aux particules de

A.I. McMULLEN - *Biochem. J.*, 72, 545-549, (1959).

A.I. McMULLEN - *Biochem. J.*, 85, 191-195, (1962).

J. TUPY - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, 468-475, (1969).

caoutchouc et dans la fraction jaune (B. Marin, 1974 ; B. Marin et P. Trouslot, 1975). A.I. McMullen (1959) a expliqué en partie la présence d'ARN dans la couche de caoutchouc : l'ARN du latex posséderait une certaine affinité pour les particules polyisopréniques, ce qui laisserait supposer que cet ARN n'est en rien constitutif de ces particulés. Quant à la présence d'ARN dans les lutoïdes, la plupart des auteurs s'accordent à indiquer qu'il s'agit là d'une contamination inhérente à la préparation même de cette fraction cellulaire. Mais, en fin de compte, ce ne sont que des hypothèses qu'aucun fait expérimental ne vient étayer, d'autant plus que des travaux récents (B. Marin, 1974 ; B. Marin, P. Trouslot et S. Pujarnisclé, 1974 ; B. Marin et P. Trouslot, 1975) tendent au contraire à démontrer l'existence d'ARN dans cette fraction jaune et plus particulièrement dans les lutoïdes.

Un certain nombre d'expériences faites sur ce sédiment lutoïdique permettent de conclure à la présence d'ARN dans le compartiment lysosomal du latex d'*Hevea brasiliensis* :

- il ne suffit pas de laver intensément le sédiment lutoïdique pour en éliminer l'ARN même en présence d'EDTA, ce qui infirme l'hypothèse d'une adsorption totale de l'ARN trouvé dans le sédiment lutoïdique ;
- que le sédiment lutoïdique soit traité ou non par un agent destabilisant donné (traitements mécaniques ou chimiques) connu pour labiliser les organites qu'il contient, l'ARN n'est libéré que dans la mesure où l'activité phosphatase acide est solubilisée ;
- on observe une relation étroite entre l'ARN du sédiment lutoïdique et l'activité phosphatase acide (elle serait même linéaire) et cela quelle que soit la densité des lutoïdes analysés par centrifugation en gradient de concentration de saccharose, ce qui suppose la présence d'ARN dans les lutoïdes de cette fraction jaune ;
- on peut ajouter encore que l'ARN de la fraction lutoïdique ne peut être hydrolysé par la ribonucléase pancréatique que dans la mesure où les lutoïdes de ce sédiment ont été destabilisés, l'ARN se trouvant alors accessible à la ribonucléase pancréatique.

Tous ces résultats permettent d'affirmer sans ambiguïté l'existence d'ARN dans le compartiment lysosomal du latex d'*Hevea brasiliensis*.

Les conditions expérimentales sont particulièrement favorables pour isoler l'ARN de ce compartiment cellulaire et en analyser la nature, ce qui jusqu'à présent n'avait jamais été fait.

L'ARN a donc été extrait de ce compartiment cellulaire en utilisant des méthodes d'isolement jugées satisfaisantes pour le préparer sous sa forme native (B. Marin, 1969 ; B. Marin, 1974 ; B. Marin et J.B. Vieira da Silva, en préparation).

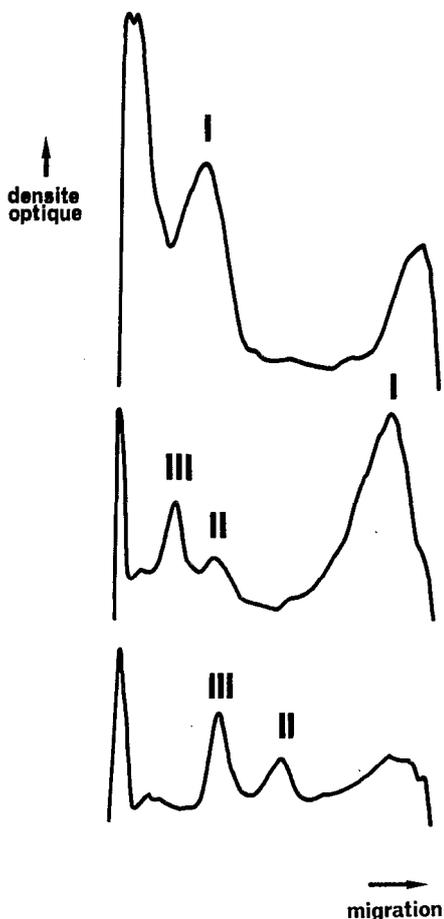
B. MARIN - Thèse spécialité, mention Biologie végétale, U.S.T.L., 113 p., (1974).

B. MARIN et P. TROUSLOT - *Planta*, 124, 31-41, (1975).

B. MARIN, P. TROUSLOT et S. PUJARNISCLE - *Biochem. J.*, 143, 479-481, (1974).

B. MARIN - *Mémoire O.R.S.T.O.M.*, 65 p., (1969).

B. MARIN et J.B. VIEIRA DA SILVA - en préparation.



A
B
C

Du sodium-dodecyl-sulfate a été employé à une concentration suffisamment élevée, de 1 à 2%, pour inhiber toute activité ribonucléasique lysosomale (B. Marin, 1975b). L'ARN obtenu a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 2,4%, faite en milieu Tris-acétate, en présence d'EDTA 1 mM et de SDS à une concentration finale de 0,1%, selon la technique de U.E.Loening (U.E.Loening, 1967, 1968 a et b) modifiée par B. Marin (1974).

L'ARN isolé est hétérogène (Figure 1), il est constitué essentiellement par une population de molécules de faible poids moléculaire migrant très rapidement (B. Marin, 1974). Toutefois, la présence d'ARN ribosomal a été notée.

Figure 1
Séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide de l'ARN lutoïdique
L'électrophorèse de l'ARN lutoïdique est réalisée sur un gel de polyacrylamide préparé à 2,4% (voir B. Marin, 1974). La quantité d'ARN déposée à la surface du gel correspond à 20 μ l

de tampon d'électrophorèse contenant 20% de saccharose. La lecture du gel est faite en ultraviolet au bout d'un temps d'électrophorèse de 40 mn (A), de 100 mn (B) et de 200 mn (C).

Cette figure souligne l'hétérogénéité de l'ARN extrait de la fraction lutoïdique : l'essentiel de cet ARN est constitué par une population de molécules de faible poids moléculaire (pic I). Les pics II et III représentent les deux composantes de l'ARN ribosomal trouvé dans ce compartiment cellulaire.

B. MARIN - Rapport d'activité O.R.S.T.O.M., 35 p., (1975 b).

U.E. LOENING - *Biochem. J.*, 102, 251-257, (1967).

U.E. LOENING - A Joyce-Loebl reprint, (1968 a).

U.E. LOENING - *Chromatographic and electrophoretic techniques*, 2, p. 437-442, W. Heilmann. Med. Books Ltd, London, (1968 b).

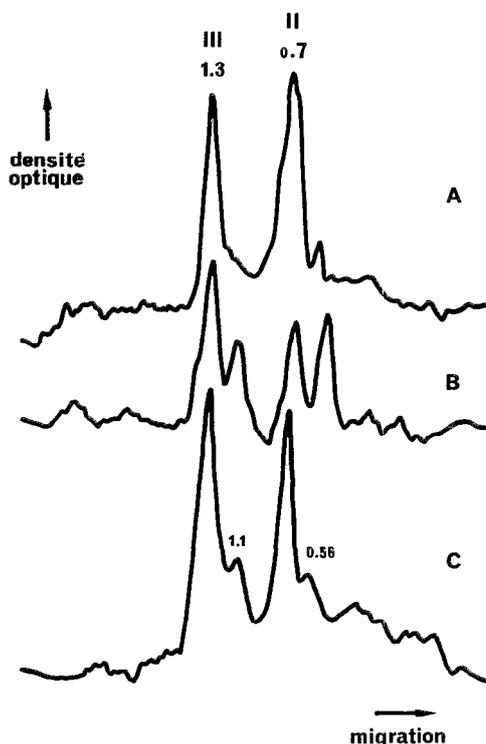


Figure 2

Caractérisation des deux composantes de l'ARN ribosomal lutoïdique

L'ARN ribosomal lutoïdique est comparé aux ARN ribosomaux présents dans une graction enrichie en chloroplastes isolée de feuilles de plantules de *Raphanus sativus* (B. Marin, 1974). Il s'identifie aux composantes 0,7 M et 1,3 M caractéristiques des ARN cytoplasmiques. (A) - ARN isolé de ribosomes lutoïdiques ; (B) - ARN isolé des ribosomes présents dans une graction enrichie en chloroplastes préparé à partir de jeunes plantules de *Raphanus sativus*. ; (C) - Mélange des ARN ribosomaux lutoïdique et chloroplastique.

Ce qui peut surprendre, c'est le caractère relativement dégradé de cet ARN lutoïdique : les ARN de faible poids moléculaire peuvent représenter de 60 à 90% de l'ARN total. Cette proportion est éminemment variable. L'incubation de cette fraction cellulaire dans un bain-marie thermostaté à 37° C pendant quatre à dix heures contribue à l'augmenter considérablement. Il ne faut pas oublier que ces lutoïdes contiennent tout un ensemble d'enzymes propres à dégrader ces macromolécules notamment une ribonucléase et une phosphodiesterase acide qui ne demandent qu'à être activées pour fonctionner (B. Marin, 1975.b). Ceci expliquerait la composition nucléotidique de cet ARN lutoïdique qui se rapproche de celle d'un ARN ribosomal, voire d'une population d'acides nucléiques riches en ARN ribosomal, le contenu en G + C étant de 60,1% (B. Marin, 1974). Ainsi, l'hétérogénéité observée dans cette population de macromolécules pourrait résulter de la fonction même de ces lutoïdes. Mais il est difficile de l'affirmer : les méthodes de préparation des fractions cellulaires et d'extraction de leur ARN pour aussi bonnes qu'elles soient entraîneront inévitablement une dégradation plus ou moins accentuée de ces macromolécules. C'est une observation maintes fois rapportée dans la littérature (voir U.E. Loening et J. Ingle, 1967, ou F. Vedel et M. d'Aoust, 1970 par exemple).

U.E. LOENING et J. INGLE - *Nature*, 215, 363-367, (1967).

F. VEDEL et M. D'AOUST - *Plant Physiol.*, 46, 81-85, (1970).

D'autre part, tant par sa composition nucléotidique globale que par sa motilité électrophorétique (Figure 2), l'ARN ribosomal trouvé dans le compartiment lutoïdique s'identifie à un ARN ribosomal cytoplasmique (B. Marin, 1974 ; B. Marin, en préparation). Bien que des études plus approfondies sur l'homologie entre les composantes respectivement présentes dans les compartiments sérique et lutoïdique n'aient pas encore été faites, notamment l'analyse comparative des hydrolysats obtenus avec différentes ribonucléases, tout permet de penser que cet ARN ribosomal provient du sérum.

Les ribosomes du compartiment lutoïdique (Figure 3) et leurs sous-unités obtenues en les dissociant en présence de chlorure de magnésium, de chlorure de potassium ou d'EDTA sédimentent de la même façon que leurs équivalents sériques (B. Marin, en préparation). Des analyses faites par centrifugation en gradient de

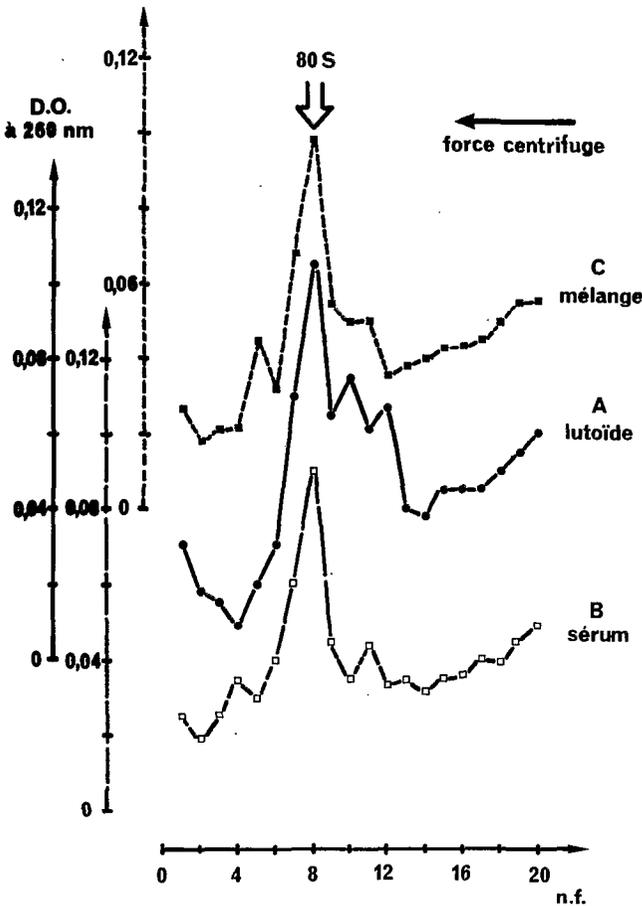


Figure 3

Analyse comparative des ribosomes présents dans les compartiments lutoïdique et sérique du latex d'*Hevea brasiliensis*

La fraction ribosomale isolée, soit des lutoïdes, soit du sérum, reprise dans 0,1 à 0,5 ml de tampon adéquat, est déposée sur un gradient de concentration de saccharose 10-34%, puis centrifugée pendant trois heures dans un rotor Spinco SW-25.1 à 12 500 tr/mn à 40°C.

- (A) - Fraction ribosomale lutoïdique ;
- (B) - Fraction ribosomale sérique ;
- (C) - Mélange équiparti de ces deux fractions ribosomales.

Les ribosomes extraits de ces deux compartiments sédimentent de la même façon (C).

concentration de saccharose selon la méthode de P.I. Payne et D. Boulter (1969) ou en présence de chlorure de lithium selon celle de T. Scott-Burden et A.O. Hawtrey (1969) indiquent que tous ces ribosomes s'avèrent liés à une structure membranaire (B. Marin, en préparation). Or, la seule membrane présente dans ce compartiment, c'est la membrane lutoïdique. L'existence de ribosomes dans le compartiment lysosomal pourrait donc résulter d'une interaction entre les ribosomes sériques et la membrane lysosomale. L'affinité de la membrane lutoïdique pour ces ribosomes selon une technique aussi sophistiquée que celle de L. Schiaffonati et al. (1975) n'est pas connue. Il est indispensable de la définir. Les observations faites en présence d'EDTA ou de ribonucléase pancréatique restent alors, dans le cadre de cette hypothèse, à expliquer. Une ébauche de réponse peut être apportée en faisant remarquer que l'ARN présent dans une structure ribosomale intacte n'est pas dégradé, ce qui confirmerait en partie l'idée que les ribosomes de ce compartiment ne sont pas dissociés dans les conditions expérimentales utilisées. Toutefois, la mise en évidence d'une synthèse protéique propre à ce compartiment lutoïdique n'a pas encore pu être démontrée (S. Pujarnisclé, 1973).

Si la présence d'ARN dans un compartiment lysosomal est certaine à la suite des travaux effectués sur les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, la signification de son existence dans ce compartiment nous échappe encore et demeure obscure. Il est difficile de faire la part des choses. Tout comme P.I. Payne et D. Boulter (1974), nous pensons qu'un processus de dégradation se déroule au niveau de ce compartiment. Les lysosomes constitueraient le lieu privilégié de la dégradation des ARN cellulaires. Seul, un matériel comme le latex d'*Hevea brasiliensis* permet de mener à bien une telle étude (P. Matile, 1975 ; P.I. Payne, 1975). La plupart des lysosomologistes éminents s'accordent à penser que sa continuation est fondamentale pour une meilleure compréhension du phénomène.

★

P.I. PAYNE et D. BOULTER - *Planta*, 84, 263-271, (1969).

T. SCOTT-BURDEN et A.O. HAWTREY - *Biochem. J.*, 115, 1063-1069, (1969).

L. SCHIAFFONATI, F. CAJONE et A. BERNELLI-ZAZZERA - *J. Membrane Biol.*, 21, 11-24, (1975).

S. PUJARNISCLE - Communication personnelle (1973).

P.I. PAYNE et D. BOULTER - *Planta*, 117, 251-258, (1974).

P. MATILE - Communication personnelle, (1975).

P.I. PAYNE - Communication personnelle, (1975).