

ISOLEMENT DES NOYAUX CELLULAIRES

Jean-Claude AUTRAN

Mai 1971

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés
16 rue Nicolas-Fortin, PARIS 13^e

ISOLEMENT DES NOYAUX CELLULAIRES

par Jean-Claude AUTRAN

— Mai 1971 —

Laboratoire de Recherches sur
la Qualité des Blés I.N.R.A.

16, rue Nicolas Fortin. PARIS 13^o

I-ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Lorsqu'on extrait les DNP ou d'autres constituants nucléaires, on est parfois gêné par des composés contaminants, d'origine cytoplasmique. Cela est rare chez les tissus riches en noyaux comme le thymus de veau, pour lesquels les histones peuvent être extraites directement sur le tissu lavé par NaCl 0,14 M. Par contre, chez les tissus riches en cytoplasme (foie, racines, germe de blé,...) des constituants cytoplasmiques se retrouvent dans les extraits de DNP, ce qui implique une purification de celles-ci, avec les inconvénients que cela comporte (perte de certaines fractions, dissociations, allongement de la durée des opérations,...). De plus, même dans une DNP purifiée, on n'est jamais certain que toutes les fractions protéiques sont celles de la DNP native, des réassociations avec des protéines cytoplasmiques ayant pu se produire.

Pour ces raisons, plusieurs auteurs ont essayé de commencer la préparation des DNP par un isolement des noyaux cellulaires, du fait que des noyaux purs et intacts ne peuvent que donner des DNP débarrassées de toute contamination cytoplasmique.

Cependant, si l'isolement des noyaux est préférable dans de nombreux cas, il ne constitue pas une garantie d'obtention de bonnes histones car la préparation de noyaux purs et intacts, et avec un rendement non négligeable n'est pas toujours aisée, en particulier chez les tissus végétaux, et demande parfois un long travail au cours duquel des actions enzymatiques, venant modifier le produit recherché, sont à craindre.

A) Isolement des noyaux cellulaires, en général.

Deux types de méthodes ont été utilisés pour isoler les noyaux:

1°) Isolement en milieu non aqueux:

C'est la technique dite de BEHRENS (1). Elle fait intervenir une lyophilisation du tissu suivie d'homogénéisations dans des solvants hydrophobes (CCl_4 , $\text{CCl}_4 + \text{C}_6\text{H}_6$, $\text{CCl}_4 + \text{C}_6\text{H}_{12}$, toluène, éther de pétrole,...) et de centrifugations.

L'avantage de cette méthode est l'élimination des lipides du tissu ainsi que l'inhibition des actions enzymatiques par le milieu hydrophobe. Selon KAY et al. (2) ce procédé fournit des noyaux propres et intacts, mais UMANA et DOUNCE (3) pensent que l'activité cathopsique des noyaux de foie de rat ainsi préparé est supérieur à celle des noyaux isolés en milieu saccharose.

STERN et MIRSKY (19) dans $\text{C}_6\text{H}_{12} - \text{CCl}_4$ ($d=1,395$).

2°) Isolement en milieu aqueux:

De nombreux procédés ont utilisé l'homogénéisation et la centrifugation des tissus en solutions aqueuses de saccharose. Une revue de ces méthodes a été faite par Allfrey (4).

Le saccharose semble destiné à maintenir une certaine tonicité du milieu et éviter ainsi l'éclatement des noyaux. Les solutions contiennent aussi, selon les auteurs, du CaCl_2 ou du MgCl_2 , vraisemblablement dans le but d'inhiber les nucléases.

L'optimum semble se situer vers 0,88 M sucrose + 1,5 mM CaCl_2 (5). Des tonicités plus faibles (0,18 M sucrose) réduisent la résistance au broyage des parois cellulaires, (de même que des détergents contenant du désoxycholate de Na), mais on peut alors craindre une perte de matériel intranucléaire.

D'autres auteurs ont remplacé le saccharose par de la glycérine (6) à pH 6,8 ou 6,64, tampon phosphate ou véronal.

Enfin, de nombreux travaux font état d'homogénéisations dans l'acide citrique (7)(8)(9) ou l'acide acétique, dilués. Mais selon Vendrely (10) et Davison et Butler (11), la DNP isolée de ces noyaux est dénaturée: elle a perdu une partie des histones riches en lysine.

Dans tous les cas ci-dessus: on homogénéise le tissu dans un solvant à l'aide d'un broyeur (Potter, Turrax, Waring Blender,...).

Les débris cellulaires divers sont éliminés soit par filtration au travers d'une mousseline (dont les mailles laissent passer les noyaux), soit par centrifugation à basse vitesse (70 g). Les noyaux sont alors récupérés par centrifugation à moyenne vitesse (300-700 g selon les tissus), puis purifiés par plusieurs remises en suspensions et centrifugations.

Un autre principe, innové par Chauveau et coll. (12) consiste à broyer le tissu dans une solution de saccharose très concentré (2,2 M), dont la densité est telle que les débris cellulaires et les fragments cytoplasmiques migrent vers la surface tandis que les noyaux seuls vont vers le fond. Cette séparation ne peut cependant être obtenue qu'après une heure de centrifugation à 40.000 g.

Signalons encore que les contaminations cytoplasmiques peuvent être réduites par l'emploi de détergent (Triton X-100 en solution dans sucrose 0,25 M) (13) et que les noyaux peuvent être purifiés aussi par centrifugation dans des solutions denses d'un polymère du sucrose (Ficoll PM 400.000).

En conclusion la littérature offre différentes possibilités d'isolement des noyaux cellulaires, dans lesquelles interviennent des homogénéisations suivies de centrifugations dans des solvants de tonicité et pH déterminés. Cependant, les revues des différentes méthodes d'isolement n'envisagent que rarement le cas des tissus végétaux à partir desquels l'opération est généralement plus délicate.

Nous allons donc étudier de façon plus détaillée le cas des tissus végétaux.

B) Isolement des noyaux cellulaires de tissus végétaux.

La plupart des méthodes signalées ici concernent la préparation des noyaux en vue de l'isolement des histones ou autres protéines nucléaires. Nous n'avons pas effectué de bibliographie complète pour l'isolement des noyaux en vue d'autres préoccupations (activités enzymatiques, métabolisme, cytologie, microscopie).

Il n'y a pas à notre connaissance d'auteur travaillant sur les histones qui ait utilisé l'isolement en milieu hydrophobe (Behrens) ou en milieu acide. La plupart des auteurs travaillent en effet en milieu saccharose ou glycérol. La quasi totalité d'entre eux utilisent la centrifugation différentielle ou / et la filtration des homogénats sur mousseline.

Ainsi: Nakagaki et Kuehl (14) isolent les noyaux de feuilles de tabac par homogénéisation dans du sucrose 0,15 M (contenant des ions Ca^{++} ,

Mg^{++} , du tris, de la gomme arabique, de l'alcool acétylique et tamponné à pH 7,6), puis filtration sur gaze et flanelle puis centrifugation à 350 g, ceci six fois en tout. Le précipité final contient des noyaux bruts, que l'on peut encore purifier par centrifugation sur gradient de sucrose (le noyaux sédimentant entre sucrose 1,5 M et 2 M). Le rendement en noyaux est 0,5 à 1,5 % du poids frais.

Zampetti-Bosseler (15) isolent de même les noyaux de racines d'allium cepa par homogénéisation dans du sucrose 0,25 M (après traitement des cellules par une hemicellulase et une pectinase) puis centrifugation 800 g. Le surnageant est très riche en cytoplasme tandis que le culot est relavé dans le sucrose 0,25 M ce qui donne finalement un précipité de noyaux quasiment purs.

En ce qui concerne le germe de blé, Gofshtein (6) utilise un broyage au mortier des germes (isolés par densité / $C_6H_{12}-CCl_4$) dans du glycérol 40 % tamponné pH 6,8 ou 6,64 puis une centrifugation de la suspension à 60 g, ce qui élimine dans le culot les fragments de tissus, les cellules entières, les membranes, l'amidon. Le surnageant contenant les organites cellulaires mêlés à du cytoplasme est filtré sur mousseline ou flanelle et recentrifugé (60 g).

Le surnageant ainsi purifié est alors centrifugé à 320-340 g ce qui permet de récupérer les noyaux dans le culot. Les noyaux forment une gelée blanc-grisâtre facile à remettre en suspension; le rendement est de 4 % (S.S.) / poids sec d'embryons.

On peut purifier ces noyaux par des lavages supplémentaires dans la solution de glycérol, mais trop de lavages risquent aussi d'abaisser le rendement et d'altérer les noyaux (éclatement) ainsi que d'amoinrir leur coloration cytochimique ultérieure.

Le même auteur (6) rapporte aussi la méthode d'isolement des noyaux de "seedlings" de germe de blé. Le procédé est semblable au précédent sauf que le solvant de purification employé est du glycérol 60 % au lieu de 40 %. Le pH doit demeurer voisin de 6,6-6,8 car au-dessous de 5,6 et au dessus de 7,7 les noyaux obtenus ont un aspect différent (tendance à se gélifier) et une coloration chimique médiocre.

Vasil'eva et coll. (16) améliorent, en l'automatisant, le procédé de Gofshtein d'isolement des noyaux de germe de blé. L'appareil permet l'écrasement des embryons dans le glycérol 40 % pH 6,8, leur filtration sur toile de 500 mesh et le recyclage du refus, dans un courant continu de glycérol-phosphate- $CaCl_2$ -pH 6,8.

Les noyaux, contaminés par de l'amidon et du cytoplasme sont recueillis dans un réservoir, filtrés de nouveau et centrifugés 70 g, ce qui élimine les débris cytoplasmiques et l'amidon. Les noyaux purs sont recueillis par centrifugation à 350 g.

D'autres auteurs ont employé, en la modifiant la célèbre méthode de Chauveau:

Ainsi Boulter et coll. (17), travaillant sur le germe de blé utilisent un broyage dans du sucrose 2 M (contenant CaCl_2 2mM) puis une filtration sur flanelle et centrifugation à 12.000 g. Les noyaux bruts forment un culot, tandis que le cytoplasme demeure surtout dans le surnageant.

Le culot de noyaux est alors remis en suspension dans du sucrose 2,62 M et centrifugé à 30.000 g.

A cette densité, les noyaux migrent vers la surface alors que les débris cellulaires vont dans le culot, que l'on élimine.

En diluant le surnageant à 2 M, les noyaux sont de nouveau recueillis, purifiés, dans le culot.

(L'auteur isole, par la même occasion, les mitochondries du germe en diluant de 2 M à 1 M le premier surnageant et en centrifugeant à 12.000g).

Shéridan et Stern (18) isolent aussi les noyaux de bulbes de *lilium longiflorum* et de *tulipa gesncriana* par une méthode dérivée de celle de Chauveau (2 M sucrose ou 0,5 M sucrose + glycérol 50 %)(avec Mg^{++} , Ca^{++} , KCl, tris pH 6,8). Une centrifugation du tissu broyé dans ce milieu dense, fournit un culot de noyaux directement utilisable pour l'extraction de l'histone.

Les auteurs utilisent une méthode du même type pour les feuilles des deux végétaux précédents (broyage, passage sur mousseline, centrifugation 13.000 g dans sucrose 1 M + glycérol 50 %).

Enfin, Stern et Mirsky (19) emploient une méthode originale, fondée sur l'idée de Chauveau, mais avec un solvant différent: $\text{C}_6\text{H}_{12} + \text{CCl}_4$ $d=1,395$ (au lieu de sucrose 2 M):

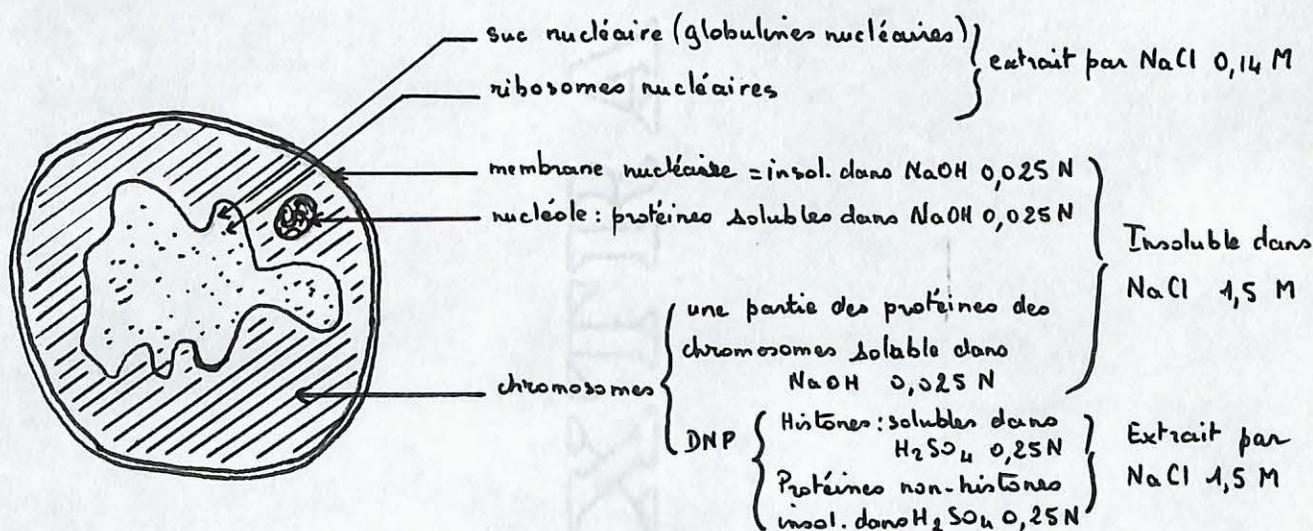
Alors que le cytoplasme constitue le surnageant pour $d=1,395$, les noyaux bruts sédimentent. Mais dans un mélange de densité $d=1,447$, cette fois les noyaux surnagent tandis que l'amidon sédimente. Les noyaux peuvent encore être purifiés en opérant avec des densités de 1,416-1,420.

A partir du germe de blé industriel le rendement en noyaux purs est de 5,2 %.

En conclusion, nous rappellerons que la pureté des noyaux isolés peut être vérifiée par microscopie optique ou électronique. Dans le premier cas, plusieurs colorants des noyaux sont utilisables:

Vert de méthyle, bleu de méthylène, hématoxyline, méthyl grumérite pyronine, fuchsine décolorée (Feulgen).

La plupart des travaux cités précédemment font état de l'isolement des noyaux en vue de l'extraction aisée de l'histone. Mais l'histone n'est pas la seule protéine nucléaire: le schéma suivant résume les différentes protéines et les moyens de les extraire.



Les histones représentent donc les protéines basiques de la DNP, elle-même extraite par NaCl 1,5 M, après lavages par NaCl 0,14 M;

selon Vasil'eva (16), pour l'embryon de blé:

{ globuline	7 %	en % du N total
{ histone	28 %	du noyau
{ protéine non-histone	15 %	
{ protéine acide (nucléole)	10 %	
{ protéine résiduelle	40 %	
	<hr/>	
	100 %	

Cependant, tous les auteurs ne font pas état de l'élimination des globulines nucléaires avant extraction de l'histone.

Ainsi: Zampetti-et Bosseler (15) extraient l'histone « par extraction acide CHCl 0,25 N, à partir des noyaux isolés ».

Si ce procédé est légitime pour de la chromatine (exempte, par définition, de suc nucléaire) ou des tissus lavés par NaCl 0,14 M, (car à cette tonicité les noyaux ont dû éclater et libérer leur suc), il ne nous paraît pas valable pour des noyaux isolés et intacts, la globuline nucléaire venant contaminer l'histone.

II-TRAVAUX PERSONNELS

Par l'isolement des noyaux cellulaires du germe de blé, nous avons voulu atteindre l'histone par un procédé très différent de l'extraction habituelle de la nucléohistone fondée sur la solubilité différentielle. L'identité des histones obtenues par les deux procédés, permettrait de légitimer l'isolement par voie de solubilité auquel on pourrait reprocher la dissociation de la DNP intervenue à haute force ionique.

Les travaux sont encore en cours, mais nous pouvons déjà rapporter l'isolement de noyaux de germes selon la méthode de Vasil'eva (dans la glycérine 40 %) dans un état de pureté satisfaisant (après examen microscopique). Les colorations de suspensions de noyaux sont malheureusement plus délicates que celles de tissus entiers.

Des noyaux isolés, nous avons pu extraire successivement les globulines (suc nucléaire), la DNP, la protéine acide. En électrophorèse, l'histone de DNP s'est avérée pratiquement identique aux histones isolées par ailleurs. Toutefois, cette histone, tout comme les autres histones de germes des G.M.P. ne présente pas les deux bandes lentes, contrairement aux histones de germes de variétés génétiquement définies. Ceci semble normal, puisque le matériel de départ (germe G.M.P.) est le même dans les deux cas, la différence pouvant se concevoir en imaginant que les germes G.M.P., très purs, ont perdu une partie de leurs régions histologiques au cours des traitements subis.

Mais il se trouve que la globuline nucléaire est formée, elle, essentiellement, des deux bandes qui manquent chez l'histone! Cela tendrait à montrer que ces deux bandes sont mal retenues sur l'ADN et que par lavages 0,14 M, elles sont séparées, donc perdues pour la DNP, et d'où leur présence dans la globuline nucléaire.

Ceci amène cependant deux contradictions:

- pourquoi ce phénomène ne se produirait-il pas chez les germes de variétés isolées au moulin Socam ?

- on sait que les fractions les moins retenues sur l'ADN sont les plus riches en lysine, or une histone analysée pour ses acides aminés et possédant des bandes lentes très renforcées, s'est révélée très riche en arginine !

Nous essayons, actuellement, de résoudre le problème en étudiant les histones d'embryons de blés (et non de germes aplatis G.M.P. dont la nature histologique est mal connue) ainsi que de germes industriels N°2 (moins purifiés que ceux analysés jusqu'ici).

Noyaux cellulaires
de germes :



coupe de l'embryon x 700



Noyaux isolés x 2200



Noyaux isolés x 4000

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- (1) BEHRENS M., 1932. Z. Physiol. Chem., 209, 59.
 - (2) KAY et al., 1956. Biochem. J., 62, 160.
 - (3) UMANA et DOUNCE, 1964. Exptl. Cell Res., 35, 277.
 - (4) ALLFREY, 1959. in "The Cell".1, 193, Acad. Press.
 - (5) MAGGIE et al., 1963. J. Cell. Biol., 18, 267.
 - (6) GOFSHTEIN, 1967. Biokhimiya, 32, 5, 959.
 - (7) DOUNCE, 1955. in "The nucleohistones"(CHARGAFF),2, 93-154, Acad. Press.
 - (8) MURRAY K., 1964. Biochemistry, 3, 1, 10.
 - (9) DRIEDGER et al., 1963. Can. J. Biochem. & Physiol., 41, 2507.
 - (10) VENDRELY et VENDRELY, 1966. Protoplasmatologia, 5, 36, 1-88.
 - (11) DAVISON et BUTLER, 1954. B.B.A., 15, 415.
 - (12) CHAUVEAU et al., 1956. Exper. Cell Res. 11, 317-321.
 - (13) HYMA, 1963. Federation Proc., 22, 473.
 - (14) NAKAGAKI et KUEHL, 1967. Nippon Shokubutsu, 33, 3, 187.
 - (15) ZAMPETTI-BOSSELER, 1967. Bull. Soc. Acad. Roy. Belg., 53, 10, 1189.
 - (16) VASIL'EVA et al., 1969. Biokhimiya, 34, 6, 1239-1244.
 - (17) BOULTER et al., 1965. New Phytol. 64, 3, 443.
 - (18) SHERIDAN et STERN, 1967. Exper. Cell. Res., 45, 323.
 - (19) STERN et MIRSKY, 1952. J. Gen. Physiol., 36, 2, 181.
-