

Mesure de la synthèse protéique *in vivo* à l'aide du ^{14}C Lysyl-tRNA^{lys} dans le foie d'agneau en croissance

par M. FERRARA *, M. ARNAL, G. FAUCONNEAU

Laboratoire d'Etude du Métabolisme azoté
* Station de Recherches sur la Viande,
I.N.R.A., Theix, Saint-Genès-Champagnelle,
63110 Beaumont.

Summary. *Measurement of protein synthesis in vivo in the growing lamb liver using ^{14}C Lysyl-tRNA^{lys}.*

The distribution of intravenously administered ^{14}C lysine was followed in the extracellular and intracellular pools of the lamb liver and in the crude aminoacyl-tRNA extracted from them at the same time. The evolution of the specific radioactivity of lysine in these three pools suggested that lysyl-tRNA^{lys} was acylated with amino acid derived from the extracellular and intracellular pools. The rate of protein synthesis calculated with specific radioactivity of lysine released from aminoacyl-tRNA was intermediate between those obtained with the extracellular and intracellular pools and indicated that determination of specific radioactivity of amino acid released from aminoacyl-tRNA was important for correct assessment of protein turnover.

Introduction.

Les méthodes de mesure de la synthèse protéique *in vivo* dans un tissu ou un organe, qui sont basées sur l'utilisation d'acides aminés radioactifs et qui tiennent compte de la radioactivité spécifique (RAS) du précurseur, considèrent l'évolution de la radioactivité protéique en fonction de la RAS de l'acide aminé utilisé, celle-ci étant mesurée soit dans le pool tissulaire (Reboud *et al.*, 1966 ; Vandermeers, Vandermeers-Piret et Christophe, 1967 ; Arnal, Fauconneau et Pech, 1971), soit dans le pool extracellulaire (plasma) (Obled, Arnal et Fauconneau, 1975).

Le pool tissulaire composé des acides aminés libres extra et intracellulaires n'est pas un compartiment homogène d'autant plus que le pool intracellulaire est hétérogène (Kipnis, Reiss et Helmreich, 1961 ; Portugal, Elwyn et Jeffay, 1970) et qu'il existe une « compartimentation fonctionnelle » de ces acides aminés (Righetti, Payson-Little et Wolf, 1971 ; Mortimore, Woodside et Henry, 1972). La simplification dans les mesures qui consiste à assimiler à un seul compartiment des compartiments qui ne doivent pas être rapidement en équilibre peut conduire à des estimations incorrectes.

Pour de nombreux auteurs (Hider, Fern et London, 1969 ; Van Venrooij et Van Loon-Klaassen, 1973 ; Khairallah et Mortimore, 1976) la synthèse protéique utilise directement le pool des acides aminés libres extracellulaires sans équilibre préalable avec le pool intracellulaire.

L'emploi de la RAS du pool précurseur direct de la synthèse protéique (acide aminé fixé au tRNA) devrait permettre la vérification de cette hypothèse et la détermination plus exacte des vitesses de synthèse protéique. Dans ce but nous avons étudié l'évolution dans le foie d'agneau de la RAS de la lysine fixée au tRNA^{lys} après une injection intraveineuse de lysine ¹⁴C.

Matériel et méthodes.

1. — Animaux et prélèvements.

Nous avons utilisé des agneaux mâles âgés de 15 jours. Séparés de leur mère 6 à 12 h après la naissance ces animaux sont nourris exclusivement à l'aide d'un lait de remplacement (16 p. 100 de matière sèche) (Ferrara, 1976). Aux temps suivants après l'injection intraveineuse de lysine ¹⁴C (U) (30 μ Ci/kg) : 2, 5, 10 et 15 mn, les animaux sont sacrifiés par groupe de trois. Le foie sans la vésicule biliaire (150 g environ) est rapidement prélevé et découpé en morceaux dans du sérum physiologique froid (+ 4 °C). Une part importante de cet organe (70-75 p. 100) est alors immédiatement broyée en présence de phénol, le reste étant congelé dans l'azote liquide et conservé à - 20 °C afin de mesurer la radioactivité protéique et la RAS de la lysine libre tissulaire selon la méthode décrite par Arnal, Fauconneau et Pech, 1971. Le sang prélevé sur héparine à l'abattage est centrifugé à 4 °C (5 mn à 3 000 g). Le plasma recueilli est utilisé pour la détermination de la RAS de la lysine libre plasmatique.

2. — Extraction des AAcyI-tRNA.

Le pool des acides aminés liés aux tRNA, étant de faible taille (ce pool de lysine représente environ 0,5 p. 100 du pool de lysine libre tissulaire dans le foie d'agneau, Ferrara, 1976), la méthode d'extraction des AAcyI-tRNA utilisée doit éviter toute contamination de ce pool par des acides aminés libres d'origine cellulaire différente. Nous avons successivement testé trois techniques (Ferrara, 1976). La première basée sur une extraction phénolique à froid des acides nucléiques suivie d'une dissolution des tRNA dans NaCl M, entraîne une contamination du pool des acides aminés fixés aux tRNA ; le glycogène présent dans nos extraits capte les acides aminés libres et les libère (au moins partiellement) en présence de NaCl M. La deuxième technique est basée sur la précipitation des protéines et des acides nucléiques par l'acide trichloroacétique (TCA) 10 p. 100, milieu dans lequel la liaison ester entre l'acide aminé et le tRNA est stable pendant plusieurs heures. Les acides aminés libres et le glycogène sont ainsi éliminés et les tRNA sont déchargés par dissolution du précipité dans une solution alcaline. Cette dernière étape s'accompagne en fait d'une hydrolyse partielle des liaisons peptidiques d'où une contamination du pool de lysine fixée au tRNA^{lys} par de la lysine d'origine protéique. La méthode retenue pour isoler les AAcyI-tRNA schématisée à la figure 1 dérive de la technique d'extraction des tRNA décrite par

Pétrissant (1973) ; elle comporte l'emploi de l'isopropanol pour séparer les tRNA des autres acides nucléiques.

Le rendement de cette technique peut être apprécié par l'introduction d'une quantité connue de ^{14}C -lysyl-tRNA^{lys} dans une préparation témoin au cours de l'homogénéisation du tissu et la détermination de la radioactivité liée au tRNA à la fin de l'opération. Il est approximativement de 40 p. 100. La ^{14}C lysine étant supposée se comporter comme la lysine froide, le mauvais rendement de cette technique d'extraction du lysyl-tRNA^{lys} n'est pas préjudiciable à la détermination correcte de la RAS de cet acide aminé.

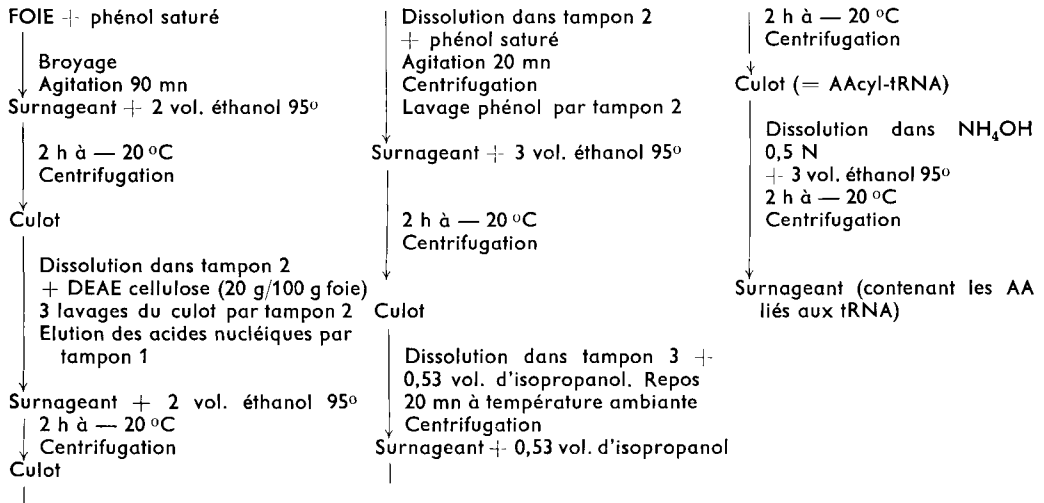


FIG. 1. — Extraction des aminoacyl-tRNA du foie d'agneau.

Composition des tampons : Phénol saturé, pour 1 l : 500 ml tampon acétate de Na 0,1 M, pH 5,2, NaCl M, EDTA $5 \cdot 10^{-3}$ M ; 100 ml H₂O ; 400 ml phénol.

- tampon 1 : acétate de Na 0,5 M, pH 5,2 ; MgCl₂ 50 mM, NaCl M
- tampon 2 : tampon 1 dilué 10 fois
- tampon 3 : acétate de Na 0,3 M, pH 7.

3. — Dosage de la lysine fixée au tRNA^{lys}.

La lysine, détachée du tRNA^{lys} par hydrolyse de la liaison ester en présence de NH₄OH 0,5 N, est dosée par la méthode décrite par Beaucamp et Walter (1973) qui associe une dilution isotopique et une réaction de charge spécifique du tRNA par la lysyl-tRNA synthétase. La courbe étalon est établie à l'aide de 4 solutions de lysine et la concentration en lysine de chaque échantillon est déterminée par la méthode des droites parallèles en utilisant une analyse de covariance (Ferrara, 1976).

— Charge *in vitro* du tRNA^{lys} : la lysine provenant du tRNA étant marquée au ^{14}C la dilution isotopique est réalisée avec de la lysine ^3H . La charge *in vitro* est effectuée à l'aide du milieu réactionnel suivant : pour un volume final de 0,1 ml : ATP 1 μMole , BSA : 10 μg , GSH : 0,25 μMole , Mg⁺⁺ : 1,5 Mole, KCl : 3 μMoles , Tris :

5 μ Moles, tRNA : 100 μ g, protéines enzymatiques : 96 μ g, acide aminé ^3H : 0,75 nMole, acide aminé froid : quantité variable.

L'extrait enzymatique est obtenu à partir de foie de bœuf à l'aide de la méthode décrite par Beck, Hentzen et Ebel (1970). La concentration des protéines en mg/ml est déterminée d'une part en appliquant la relation de Layne ($\text{mg/ml} = (\text{DO}_{280} \times 1,55) - (\text{DO}_{260} \times 0,76)$), et d'autre part en utilisant la méthode décrite par Ehresmann, Imbault et Weil (1973). La réaction de charge du tRNA est réalisée à 37 °C, elle est stoppée au bout de 30 mn par addition de 50 μ l de TCA 10 p. 100. Le précipité est filtré sur membrane millipore (0,22 μ) puis lavé avec 2 ml de TCA 10 p. 100. Pour éviter le quenching d'autoabsorption, très important avec du ^3H , le filtre n'est pas compté directement mais il est placé dans un flacon à scintillation contenant 1 ml d'une solution de NaOH 0,1 M provoquant la décharge du lysyl-tRNA^{lys}. Après un séjour de 2 h à 65 °C le filtre est lavé par de l'eau distillée et le filtrat obtenu additionné de 10 ml d'« Instagel ». L'acide aminé marqué pouvant se fixer de manière aspécifique au tRNA et aux protéines du milieu réactionnel il est indispensable de corriger les résultats par des valeurs témoins obtenues à partir d'un milieu réactionnel dépourvu d'ATP, condition excluant l'estérification du tRNA.

Résultats et discussion.

Alors que la RAS de la lysine libre plasmatique décroît très rapidement entre 2,5 et 15 mn après l'injection du marqueur, la RAS de la lysine fixée au tRNA diminue jusqu'au temps de 5 mn, augmente entre 5 et 10 mn puis décroît (fig. 2). Les valeurs de la RAS de la lysine libre tissulaire varient peu entre les temps 2, 5 et 10 mn ; cette RAS diminue très rapidement entre 10 et 15 mn.

La RAS de la lysine libre intracellulaire est calculée à partir des RAS plasmatique et tissulaire en admettant que la valeur de l'espace extracellulaire est de 24 p. 100 du poids frais (Airhart, Vidrich et Khairallah, 1974) et qu'il est en équilibre instantané avec le plasma. Cette RAS, très faible dans les minutes qui suivent l'injection, augmente fortement jusqu'au temps 10 mn, puis décroît rapidement. L'espacement de nos points expérimentaux ne nous permet cependant pas d'exclure la possibilité que cette RAS atteigne son maximum dans ce compartiment avant le temps 10 mn.

La radioactivité incorporée dans les protéines du foie est maximale dès 5 mn après injection du marqueur puis reste constante jusqu'au temps 15 mn (fig. 3) alors que la RAS du lysyl-tRNA^{lys} augmente entre 5 et 10 mn. Cette absence de corrélation (de 5 à 10 mn) entre l'évolution de la radioactivité protéique et celle de la RAS du lysyl-tRNA^{lys} pourrait s'expliquer par l'existence de 2 pools de tRNA^{lys} dont un ne servirait pas à la synthèse protéique.

Chez *S. aureus*, Bumsted *et al.* (1968) ont en effet montré que parmi les 3 tRNA^{gly} isoaccepteurs seuls deux d'entre eux servent à la synthèse protéique. Dans cette hypothèse la valeur de la RAS du lysyl-tRNA^{lys}, intermédiaire entre celle du plasma et celle de l'intracellulaire dans les minutes qui suivent l'injection, peut s'interpréter en considérant que la fraction de tRNA^{lys} servant à la synthèse protéique est alimentée par l'espace extracellulaire alors que la fraction « inerte » est desservie par le pool intracellulaire. Dans cette hypothèse nos données indiquent que le pool de tRNA^{lys}

« inerte » représente au minimum 50 p. 100 du tRNA^{lys} total. Une proportion aussi importante nous paraît peu probable.

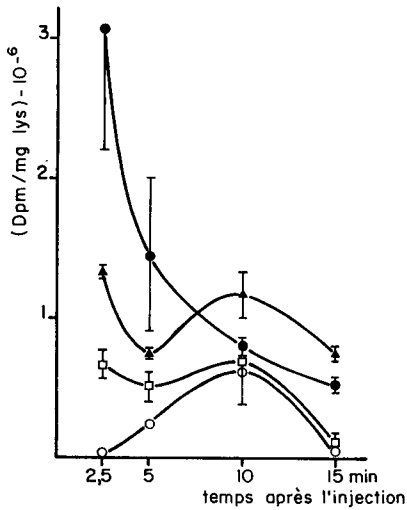


FIG. 2.

FIG. 2. — Evolution de la RAS de la ¹⁴C lysine libre plasmatique et tissulaire et de la ¹⁴C lysine fixée au tRNA^{lys}.

La RAS de la ¹⁴C lysine du pool intracellulaire est obtenue par calcul : valeur de l'espace extracellulaire = 24 p. 100 du poids frais (Airhart, Vidrich et Khairallah, 1974).

- RAS lysine plasmatique ; ▲ RAS lysine fixée au tRNA^{lys} ;
- RAS lysine tissulaire ; ○ RAS lysine intracellulaire ;
- T Ecart-type.
- ⊥

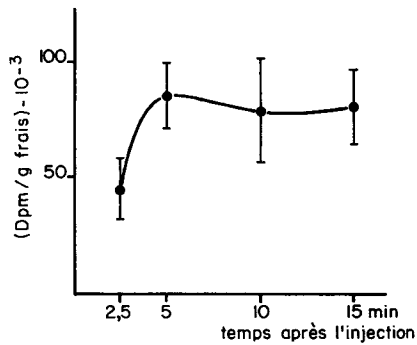


FIG. 3.

FIG. 3. — Evolution de la radioactivité incorporée dans les protéines hépatiques.

D'ailleurs, l'évolution biphasique de la RAS du lysyl-tRNA^{lys} de foie sur laquelle s'appuie cette hypothèse n'a pas été trouvée par Airhart, Vidrich et Khairallah (1974) après une injection intrapéritonéale de ¹⁴C Val. Ce mode d'injection assurant un apport plus progressif et plus lent qu'une injection intraveineuse a peut-être pu masquer ce phénomène. Néanmoins, Ove, Obenrader et Lansing (1972) ont décrit l'évolution de la RAS du leucyl-tRNA^{leu} dans le foie de rat après une injection intraveineuse de ¹⁴C Leu et ne signalent aucune augmentation de la RAS entre 0,5 et 15 mn. Ils ont toutefois noté 2 vitesses de décroissance : un rapide entre 0,5 et 2 mn et une plus lente qui pourrait résulter de l'existence d'un plateau atteint en 2 mn de la RAS intracellulaire. Il est possible d'expliquer cette absence de corrélation entre l'évolution de la radioactivité protéique et celle de la RAS du lysyl-tRNA^{lys} en considérant que les valeurs des RAS obtenues au temps 10 mn sont des artéfacts liés aux conditions expérimentales. Cette expérience fut en effet réalisée en 2 temps : 4 agneaux furent abattus en juin 1974 et 8 autres en mars 1975. Les 3 animaux du temps 10 mn appartiennent

au groupe d'animaux abattus en juin 1974. Compte tenu de l'existence de rythmes circannuels (Reinberg, 1969) il est possible que ces animaux soient « métaboliquement » différents de ceux abattus en mars 1975. Toutefois, au temps 5 mn il n'y a pas de différence notable entre les animaux du lot 1975 et celui du lot 1974 ; de plus cette différence entre lots n'apparaît ni au niveau du plasma, ni à celui de l'incorporé. Le dosage de la lysine par dilution isotopique ne semble pas devoir être mis en cause d'autant plus qu'à 10 mn nous observons une légère augmentation de la RAS de la lysine tissulaire dosée après chromatographie sur colonne selon la méthode de Moore, Spackman et Stein (1958).

Les valeurs et l'évolution de la RAS de la lysine fixée au tRNA^{lys}, très différentes de celles de la lysine libre plasmaticque et intracellulaire, indiquent que ce pool pré-curseur de la synthèse protéique est dans le foie d'agneau vraisemblablement alimenté par les compartiments intra et extracellulaires. Ce résultat est en accord avec ceux d'Airhart, Vidrich et Khairallah (1974), et Khairallah et Mortimore (1976) obtenus sur le foie de rat, et ceux de Van Venrooij, Moonen et Van Loon-Klaassen (1974) sur la cellule Hela.

TABLEAU 1

Comparaison des Ks obtenus à partir de différents pools pré-curseurs

Les nombres affectés d'une lettre différente sont significativement différents. $P < 0,05$ Test F (Snedecor et Cochran, 1971).

Origine de la lysine libre	Lysine plasmaticque	Lysine tissulaire	Lysine fixée au tRNA ^{lys}
Ks. 10 ³ (mg/min/g tissu)	7,9 ^a	27,5 ^b	16,8 ^c

La comparaison des valeurs de la constante de vitesse de synthèse (Ks) des protéines hépatiques calculées (comme décrit précédemment Arnal, Ferrara et Fauconneau, 1976) à partir de la RAS de 3 pools de lysine, montre (tabl. 1) que le Ks obtenu à partir de la RAS de la lysine plasmaticque est nettement inférieur à celui obtenu à partir du lysyl-tRNA^{lys}, la valeur calculée à partir de la RAS de la lysine tissulaire étant plus élevée. Ce résultat confirme celui obtenu par Khairallah et Mortimore (1976) dans le foie de rat perfusé *in situ*. Il est en faveur du modèle de la synthèse protéique proposé par ces auteurs ainsi que par Van Venrooij, Moonen et Van Loon-Klaassen (1974) selon lesquels l'aminocyclation des tRNA se ferait au niveau de la membrane cellulaire à partir d'un pool de membrane constitué d'un mélange d'acide aminé extra et intracellulaire. La contribution de chacun de ces pools d'acide aminé libre à la synthèse protéique peut être différente selon le tissu étudié et l'acide aminé choisi dont le métabolisme peut varier d'un tissu à l'autre. Ainsi dans le muscle squelettique, les acides aminés ramifiés (Val, Leu, Ileu) sont rapidement catabolisés, la lysine étant au contraire moins rapidement dégradée dans ce tissu que dans le foie. Dans le cœur la contribution du pool des acides aminés libres intracellulaires à la synthèse pro-

téique semble prépondérante pour Morgan *et al.* (1971) qui ont utilisé la phénylalanine marquée au ^{14}C alors que pour Martin *et al.* (1973) employant la leucine ^{14}C , la synthèse protéique est alimentée plutôt par le pool des acides aminés libres plasmatiques.

La détermination correcte de l'intensité de la synthèse de l'ensemble des protéines d'un tissu nécessite l'utilisation de la RAS du pool précurseur direct de cette synthèse, les AACyl-tRNA.

Reçu en mai 1977.

Accepté en août 1977.

Remerciements. — Nous tenons à remercier MM. J. Prugnaud et J. Grizard, respectivement pour l'analyse des acides aminés et l'interprétation statistique des résultats.

Références

- AIRHART J., VIDRICH A., KHAIRALLAH E. A., 1974. Compartmentation of free amino acid for protein synthesis in rat liver. *Biochem. J.*, **140**, 539-548.
- ARNAL M., FAUCONNEAU G., PECH R., 1971. Etude de la synthèse protéique *in vivo* : mesure de l'activité anabolisante de divers tissus du rat en croissance à l'aide de la L-lysine ^{14}C (U). *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **11**, 245-264.
- ARNAL M., FERRARA M., FAUCONNEAU G., 1976. Synthèse protéique *in vivo* pendant le développement de quelques muscles de l'agneau, 393-401. In *Inter. Symp. on Nuclear techniques in animal production and health as related to the soil-plant system*, Inter. Atomic Energy Agency, Vienna.
- BEAUCAMP K., WALTER H. E., 1973. Amino acid determination in the nanomole range by tRNA charging and isotope dilution technique. *FEBS letters*, **39**, 37-41.
- BECK G., HENTZEN D., EBEL J. P., 1970. Essais de mise en évidence d'une régulation hormonale au niveau des RNA de transfert. I. — Etude comparative des RNA de transfert des foies de poules immatures et de poules en ponte. *Biochem. biophys. Acta*, **213**, 55-67.
- BUMSTED R. M., DAHL J. L., SÖLL D., STROMINGER J. L., 1968. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Further study of the glycyl-tRNA active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. biol. Chem.*, **243**, 779-782.
- EHRESMANN B., IMBAULT P., WEIL J. H., 1973. Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and RNA's. *Analyt. Biochem.*, **54**, 454-463.
- FERRARA M., 1976. Synthèse protéique *in vivo* dans le muscle d'agneau au cours du développement. Détermination de la synthèse protéique du foie à l'aide du ^{14}C lysyl-tRNA ^{15}S . Thèse de 3^e cycle, Strasbourg.
- HIDER R. C., FERN E. B., LONDON D. R., 1969. Relationship between intracellular amino acids and protein synthesis in the extensor digitorum longus muscle of rats. *Biochem. J.*, **114**, 171-178.
- KHAIRALLAH E. A., MORTIMORE G. E., 1976. Assessment of protein turnover in perfused rat liver. Evidence for amino acid compartmentation from differential labeling of free and tRNA bound valine. *J. biol. Chem.*, **251**, 1375-1384.
- KIPNIS D. M., REISS G., HELMREICH E., 1961. Functional heterogeneity of the intracellular amino acid pool in mammalian cells. *Biochem. biophys. Acta*, **51**, 519-524.
- MARTIN A. F., PRIOR G., ZAK R., 1973. Early kinetics of labeling of aminoacyl-tRNA and intracellular free amino acid pool in rat heart. *Fed. Proc.*, **32**, 532.
- MOORE S., SPACKMAN D. H., STEIN H. H., 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Analyt. Chem.*, **30**, 1185-1190.
- MORGAN H. E., EARL D. C. N., BROADUS A., WOLPERT E. B., GIBER K. E., JEFFERSON L. S., 1971. Regulation of protein synthesis in heart muscle. Effect of amino acid levels on protein synthesis. *J. biol. Chem.*, **246**, 2152-2162.

- MORTIMORE G. E., WOODSIDE K. H., HENRY E., 1972. Compartmentation of free valine and its relation to protein turnover in perfused rat liver. *J. biol. Chem.*, **247**, 2776-2784.
- OBLED C., ARNAL M., FAUCONNEAU G., 1975. Synthèse protéique *in vivo* dans divers tissus du rat en croissance en fonction du rythme alimentaire. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **15**, 73-93.
- OVE P., OBENRADER M., LANSING A., 1972. Synthesis and degradation of liver proteins in young and old rats. *Biochem. biophys. Acta*, **277**, 211-221.
- PÉTRISSANT G., 1973. Contribution à l'étude des méthionines tARN chez les mammifères. Thèse Doct. Sc., Paris.
- PORTUGAL F. H., ELWYN D. H., JEFFAY H., 1970. Free lysine compartments in rat liver cells. *Biochem. biophys. Acta*, **215**, 339-347.
- REBOUD J. P., MARCHIS-MOUREN G., PASERO L., COZZONE A., DESNUELLE P., 1966. Adaptation de la vitesse de biosynthèse de l'amylase pancréatique et du chymotrypsinogène à des régimes riches en amidon ou en protéines. *Biochem. biophys. Acta*, **117**, 351-367.
- REINBERG A., 1969. Biorythmes et chronobiologie. *Presse méd.*, **77**, 877.
- RIGHETTI P., PAYSON-LITTLE E., WOLF G., 1971. Reutilization of amino acid in protein synthesis in Hela cells. *J. biol. Chem.*, **246**, 5724-5732.
- SNEDECOR G. W., COCHRAN W. G., 1971. *Méthodes statistiques*. A. C. T. A. ed., Paris.
- VANDERMEERS A., VANDERMEERS-PIRET M. C., CHRISTOPHE J., 1967. Synthèse protéique *in vivo* dans le pancréas et le foie du rat normal, carencé en lysine et en thréonine, ou récupérant de cette carence. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **49**, 759-778.
- VAN VENROOIJ W. J., VAN LOON-KLAASSEN L., 1973. Intracellular amino acid protein synthesis in Hela cells. *Mol. biol. Rep.*, **1**, 167-171.
- VAN VENROOIJ W. J., MOONEN H., VAN LOON-KLAASSEN L., 1974. Source of amino acids used for protein synthesis in Hela cells. *Eur. J. Biochem.*, **50**, 297-304.
-