



**HAL**  
open science

# Réticulum endoplasmique : anatomie d'une membrane biologique

A. Amar-Costesec

► **To cite this version:**

A. Amar-Costesec. Réticulum endoplasmique : anatomie d'une membrane biologique. *Reproduction Nutrition Development*, 1989, 29 (6), pp.621-638. <hal-00899095>

**HAL Id: hal-00899095**

**<https://hal.science/hal-00899095v1>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

## Réticulum endoplasmique : anatomie d'une membrane biologique

A. Amar-Costesec

*Université de Louvain, International Institute of Cellular and Molecular Pathology et laboratoire de chimie physiologique, 75, avenue Hippocrate, Bruxelles, Belgique*

(14<sup>e</sup> réunion du groupe Développement INRA, Clermont-Ferrand, 25-27 mai 1988)

**Résumé** — Le réticulum endoplasmique (RE) est un système membranaire formé de centaines de constituants protéiques et lipidiques, impliqués dans des fonctions essentielles de la physiologie cellulaire. Dans cette revue, je décris brièvement les travaux dont les résultats ont façonné nos idées sur l'organisation moléculaire du RE. L'examen au microscope électronique de coupes fines de cellules a conduit à la conception dualistique (lisse-rugueux) du RE. On a tenté, par diverses techniques, de séparer les 2 entités et de leur attribuer des fonctions distinctes. Le fait que le renouvellement des enzymes se produit suivant des modèles individuels suggère l'existence d'un RE en « mosaïque ». Enfin, l'analyse en gradient de densité des microsomes de foie de rat conduit à concevoir un RE formé de 3 domaines biochimiquement distincts, où la disposition transmembranaire des protéines intégrales détermine leur distribution latérale. Je passe en revue les données actuelles sur la topographie transverse des protéines du RE et sur leur mode de biosynthèse et d'insertion dans la membrane et je compare ces données aux prédictions du modèle.

**réticulum endoplasmique — modèle — séquences topogéniques — protéines membranaires — topographie — taux de renouvellement — ribophorine**

**Summary** — **Endoplasmic reticulum : anatomy of a biological membrane.** Endoplasmic reticulum (ER) is a large membranous network containing a wide variety of lipid and protein constituents which play important roles in cellular physiology. In this review, selection of experimental results are presented which have shaped our concepts of the molecular organization of ER. The morphological approach — electron microscope examination of ultra-thin sections of a variety of cells — led to the dualistic distinction between rough ER and smooth ER. Consequently, various attempts were made to separate the 2 entities and to demonstrate that they are endowed with distinct functional properties. Studies on the biogenesis of ER showed that enzymes associated with this organelle turn over independently, which was interpreted in terms of ER being biochemically organized as a mosaic. The results of isopycnic centrifugation of rat liver microsomes led us to conclude that the ER is comprised of three biochemically distinct domains and that the distribution of integral proteins in the lateral plane of the membrane (lateral topography) is primarily determined by their transmembrane disposition. Data on the transverse topography and the mode of biogenesis of ER enzymes are confronted with the predictions of this model.

**endoplasmic reticulum — model — topogenic sequences — membrane protein — topography — turnover — ribophorin**

## INTRODUCTION

Le réticulum endoplasmique (RE) des hépatocytes est une vaste structure membranaire, occupant plusieurs  $m^2$  par g de foie (Loud, 1968; Weibel *et al.*, 1969; Wibo *et al.*, 1971; Bolender & Weibel, 1973; Rohr *et al.*, 1976; Blouin *et al.*, 1977; Bolender *et al.*, 1978) et composée de certaines d'espèces moléculaires différentes assurant des fonctions essentielles de la physiologie cellulaire. Chacune des voies métaboliques énumérées dans le Tableau I met en œuvre plusieurs constituants : au moins 7 pour la synthèse protéique, dont un récepteur composé de 2 sous-unités (Tajima *et al.*, 1986) et une enzyme, la peptidase du signal, comportant 7 sous-unités (Evans *et al.*, 1986); une douzaine d'enzymes pour la biosynthèse des phospholipides à choline, éthanolamine et sérine (Bell & Coleman, 1980; Dawidowicz, 1987), une vingtaine d'enzymes pour celle du cholestérol (Chesterton, 1968; Trzaskos *et al.*, 1982; Reinhart *et al.*, 1987).

La coexistence sur une même membrane d'un tel nombre de protéines, impliquées dans des processus métaboliques si différents, soulève le problème de l'organisation du RE à l'échelle moléculaire. Comment les enzymes appartenant à une même voie métabolique parviennent-elles à fonctionner séquentiellement ? Nos connaissances sont encore trop fragmentaires pour qu'une réponse définitive puisse être apportée à cette question. Aussi, me contenterai-je, dans cette revue, de retracer les progrès accomplis dans la compréhension des relations entre structure et fonction au sein du RE.

## LISSE OU RUGUEUX : UNE CONCEPTION DUALISTIQUE DU RE

L'examen au microscope électronique de coupes de tissus (Palade, 1956; Palade & Siekewitz, 1956) a conduit à une conception essentiellement dualistique du RE. Le microscope révèle en effet 2 types de structures : d'une part, des alignements parallèles de citernes aplaties portant des ribosomes (RE rugueux); d'autre part, et en continuité avec le RE rugueux, des tubules et vésicules dépourvus de ribosomes (RE lisse) (Fig. 1). Dans les hépatocytes, l'espace entre les 2 membranes du RE rugueux a une épaisseur relativement constante, ce qui lui confère une apparence rigide contrastant avec l'aspect contourné du RE lisse.

Cette remarquable dualité d'aspect suggère des différences de fonction et par conséquent de composition protéique. On pourrait à la limite supposer que RE lisse et RE rugueux sont 2 organites différents. Aussi, a-t-on cherché à mettre au point des méthodes visant à les séparer l'un de l'autre aussi complètement que possible (Rothschild, 1963; Dallner *et al.*, 1963; revues in Dallner & Ernster, 1968; Depierre & Dallner, 1975). Il fallut pourtant se rendre à l'évidence : sauf dans le cas de la synthèse protéique, propriété exclusive du RE rugueux, il n'est pas possible d'associer une fonction à une seule des 2 entités microsomiales, qu'il s'agisse des biosynthèses du cholestérol (Reinhart *et al.*, 1987), de la chaîne oligosaccharidique des glycoprotéines (Ravoet *et al.*, 1981) ou des glycérophospholipides (Bell & Coleman, 1980; Dawidowicz, 1987).

**Tableau I.** Multiplicité des fonctions du RE et liste partielle des constituants impliqués.**Biosynthèse des protéines de la membrane du RE et du réticuloplasme, des protéines sécrétées et lysosomiales, des protéines du complexe de Golgi (?) et de la membrane plasmique**

- Récepteur de la particule de reconnaissance du signal (sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ )
- Récepteur du peptide signal
- Sites de fixation des ribosomes (?)
- Sites de translocation des polypeptides

**Modifications co- et post-traductionnelles des protéines néo-synthétisées**

- Peptidase du signal
- Oligosaccharyltransférase
- Protéine disulfure isomérase

**Biosynthèse de la chaîne oligosaccharidique des glycoprotéines**

- Assemblage d'un dolichol pyrophosphoryl oligosaccharide
  - UDP-N-acétylglucosamine: dolichol phosphate: N-acétylglucosamine phosphotransférase
  - UDP-N-acétylglucosamine: dolichol pyrophosphoryl N-acétylglucosamine : N-acétylglucosaminyltransférase
  - GDP-mannose : dolichol phosphate: mannosyltransférase
  - UDP-glucose : dolichol phosphate: glucosyltransférase
- Elagage du dolichol pyrophosphoryl oligosaccharide
  - Glucosidases
  - Mannosidases

**Biosynthèse des glycérophospholipides et des plasmalogènes**

- Enzymes des voies métaboliques du *sn*-glycérol 3-phosphate et de la dihydroxyacétone phosphate
  - Glycérophosphate (dihydroxyacétone phosphate) acyltransférase
  - Acide lysophosphatidique acyltransférase
  - Diacylglycérol choline phosphotransférase
  - Diacylglycérol éthanolamine phosphotransférase
  - Acyl dihydroxyacétonephosphate oxydoréductase

**Biosynthèse du cholestérol**

- HMG CoA réductase
- Lanostérol 14-déméthylase
- Stéroïde 14-réductase
- Stéroïde 8-isomérase

**Biosynthèse et métabolisme des acides gras**

- NADH cytochrome  $b_5$  réductase
- Cytochrome  $b_5$
- Stéaroyl CoA désaturase et autres désaturases
- Acide gras élongase

**Biosynthèse d'esters**

- Esters de CoA et d'acides gras
  - Acide gras CoA ligase
- Esters de cholestérol et d'acides gras
  - Acyl CoA: cholestérol acyltransférase
- Esters de rétinol et d'acides gras
  - Acyl CoA: rétinol acyltransférase

- Esters d'acides biliaires et de taurine ou de glycine
  - Acide cholique CoA ligase

#### **Métabolisme de substances endogènes (cholestérol, stéroïdes) et des xénobiotiques**

- NADPH cytochrome P-450 réductase
- Cytochrome P-450 (plus de 12 isozymes dans le foie de rat)

#### **Glucuroconjugaison de la bilirubine, des acides biliaires, des stéroïdes et des métabolites de xénobiotiques**

- UDP-glucuronosyltransférases (au moins 4 isozymes dans le foie de rat)
- Glucosyltransférase
- Xylosyltransférase

#### **Maintien de la glycémie**

- Glucose 6-phosphate translocase
- Glucose 6-phosphatase

#### **Conversion du cholestérol en acide cholique**

- Cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase (une forme de cytochrome P-450)

#### **Hydratation des arènes oxydes formées par les réactions dépendant des cytochromes P-450**

- Epoxyde hydrolase

#### **Hydratation des oxydes de cholestérol et de stéroïdes formés par peroxydation**

- Cholestérol 5,6 oxyde hydrolase

#### **Dégradation oxydative de la protoporphyrine IX**

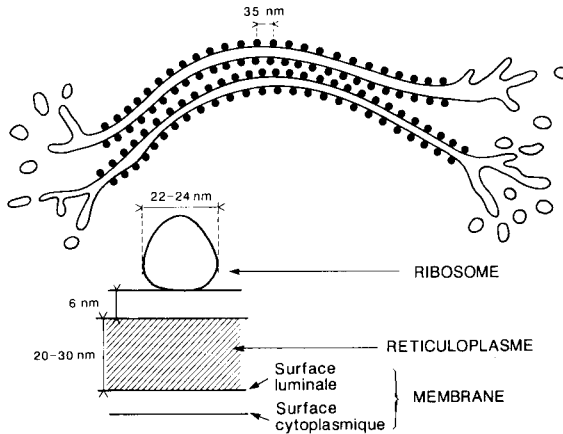
- Hème oxygénase

### **LES CONSTITUANTS PROTÉIQUES DU RE SE RENOUVELLENT INDIVIDUELLEMENT**

Une série d'études a été consacrée à l'aspect cinétique de la synthèse des enzymes du RE : leur «turn over». Les mérites et les limitations de cette approche expérimentale ont été abondamment discutés (Bock *et al.*, 1971; Arias *et al.*, 1969; Kiehn & Holland, 1970; Borgese *et al.*, 1980). Les valeurs absolues des demi-vies ( $t_{1/2}$ ) mesurées sont probablement sujettes à caution. Ces études ont néanmoins montré que les constituants protéiques du RE se renouvellent à des vitesses

propres à chacun : 4 j pour l'estérase (Akao & Omura, 1972b), 2-3 j pour l'ensemble des protéines microsomiales, 3-4 h pour la stéaroyl CoA désaturase (Gellhorn & Benjamin, 1966; Oshino & Sato, 1972), l'HMG CoA réductase (Edwards & Gould, 1972) et la cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase (Gielen *et al.*, 1975).

Le RE possède 2 chaînes de transport d'électrons, responsables du métabolisme des xénobiotiques ou de celui des lipides (Figs. 2 et 3). Les demi-vies des constituants de la première chaîne sont du même ordre de grandeur que celles de la moyenne des protéines du RE : 40 h pour l'isozyme du cytochrome P-450 inductible

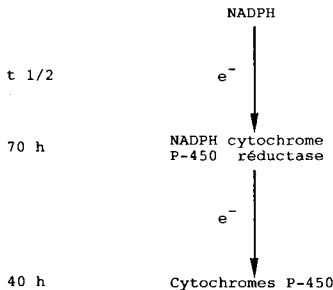


**Fig. 1.** Une représentation très simplifiée montrant 2 citernes du RE avec leurs portions lisses et rugueuses. Le schéma du bas donne quelques définitions et dimensions. Le plus grand diamètre du ribosome est  $23,2 \pm 1,5$  nm; la distance de centre à centre entre 2 ribosomes contigus est  $34,5 \pm 3,6$  nm (Ojakian *et al.*, 1977).

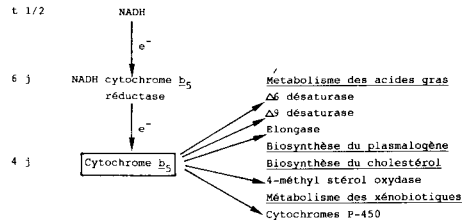
par le phénobarbital (Fujii-Kuriyama *et al.*, 1978), 70 h pour la NADPH cytochrome P-450 réductase (Kuriyama *et al.*, 1969). Par contre, ceux de la seconde chaîne — à l'exception de la stéaroyl CoA désaturase, déjà citée — ont des demi-vies plus longues : 6 j (NADH cytochrome *b5* réductase) (Okada & Omura, 1978) et 4 j (cytochrome *b5*) (Kuriyama *et al.*, 1969).

A la suite de ces observations, le RE est apparu comme *a mosaic in which each patch or tessera represents a specific group of enzymes and in which, accordingly, all tesserae are not biochemically equivalent to one another* (Omura *et al.*, 1967).

De nombreuses tentatives ont été faites pour établir expérimentalement la microhétérogénéité du RE, en particulier l'organi-



**Fig. 2.** Demi-vie des protéines de la voie des mono-oxygénases. Les accepteurs et les connexions avec l'autre chaîne microsomiale de transport d'électrons ne sont pas représentés. La stoechiométrie des réactions n'est pas indiquée.



**Fig. 3.** Demi-vie des protéines de la chaîne microsomiale de transport d'électrons fonctionnant à partir du NADH cytosolique. Les enzymes de cette chaîne sont responsables de la synthèse des acides gras polyinsaturés.

sation des chaînes de transport d'électrons microsomiales en complexes multimoléculaires (revue *in* Yang, 1977). On a essayé de fragmenter le RE à la taille des complexes et de séparer les fragments par centrifugation (revue *in* Depierre & Dallner, 1975), immunoprécipitation et immunoadsorption (Kawajiri *et al.*, 1977). On a également tenté d'observer les complexes au microscope électronique en utilisant des anticorps marqués à la ferritine (Morimoto *et al.*, 1976; Matsuura *et al.*, 1978, 1979). Ces travaux n'ont pas conduit aux conclusions espérées. La tendance actuelle est de considérer que les oxydo-réductases ne sont pas organisées en complexes et que les cytochromes, en particulier, jouissent d'une assez grande liberté de mouvement dans le plan latéral de la membrane (Estabrook *et al.*, 1981).

## RE ET MICROSOMES

Une difficulté dans l'étude du RE est due au fait que l'organite isolé à partir d'homogénats tissulaires a perdu sa structure en citernes. En effet, l'homogénéisation du tissu provoque la vésiculation du RE sans, cependant, entraîner de modification réversible de son architecture. Les polysomes sont fixés à la face externe des vésicules rugueuses (correspondant à la face cytoplasmique du RE rugueux). Les protéines du réticuloplasme se retrouvent à l'intérieur des vésicules. Après cryofracture, la densité et la répartition des particules entre faces P et E sont les mêmes dans les microsomes isolés que dans le RE *in situ* (Losa *et al.*, 1978).

Cela traduit bien l'extrême plasticité de cet organite dont une des fonctions essentielles est précisément de donner naissance à des vésicules. Le RE a d'ailleurs

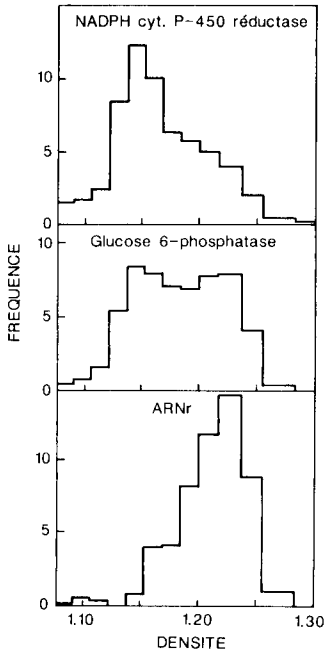
été isolé sous forme de microsomes (Claude, 1938) avant même d'avoir été identifié dans les cellules. Les vésicules microsomiales ont un diamètre moyen de 140 nm (Wibo *et al.*, 1971).

## L'ANALYSE DES MICROSOMES PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

La centrifugation en gradient de densité a tenu une grande place dans l'étude biochimique du RE; pendant près de 2 décennies, on a cru possible de séparer les vésicules lisses des vésicules rugueuses. La centrifugation des microsomes en gradient analytique (Amar-Costesec *et al.*, 1969; Beaufay *et al.*, 1974) montre pourquoi cet espoir est vain. La densité d'équilibre des vésicules microsomiales — notamment celle des vésicules rugueuses — a un caractère polydispersé marqué : les distributions s'étalent sur toute la hauteur du gradient (Fig. 4).

Les constituants du RE présentent 3 types de distribution de densité (Fig. 4 et Tableau II). Les enzymes dites du groupe b se distribuent comme la NADPH cytochrome P-450 réductase : elles forment un pic à la densité 1,14, qui est la densité modale des vésicules lisses. Les enzymes du groupe c se distribuent comme la glucose 6-phosphatase et forment 2 épaulements aux densités 1,14 et 1,23. Enfin, les constituants du groupe d, en particulier l'ARN et les ribosomes, ont une distribution de densité symétrique par rapport à celle de la flavoprotéine, avec un pic à 1,23.

Au cours d'expériences associant analyses biochimique et stéréologique, Wibo *et al.* (1971) ont montré que le caractère polydispersé de la densité d'équilibre des microsomes est en relation avec la charge en ribosomes des vésicules (Fig. 5). En



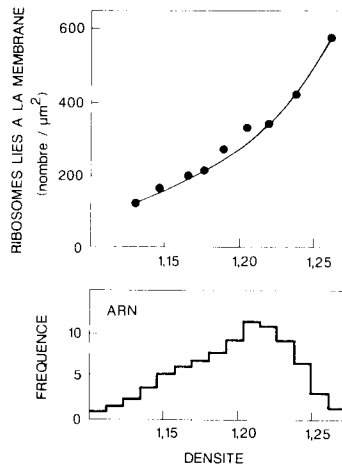
**Fig. 4.** Distributions de densité des constituants du RE. Une fraction subcellulaire, contenant l'ensemble des organites subcellulaires, à l'exception des noyaux (granules cytoplasmiques) a été centrifugée à travers un gradient linéaire de saccharose- $H_2O$ . L'équilibre isopycnique est atteint après 140 min de centrifugation à 40 000 rpm dans le rotor E-40. On recueille 15 sous-fractions dont on mesure la densité et les propriétés biochimiques. La distribution de densité de l'ARNr est essentiellement celle des ribosomes. Les caractéristiques du rotor E-40 ainsi que le mode de représentation des résultats sont décrits dans Beaufay & Amar-Costesec (1976). D'après Amar-Costesec & Beaufay (1981).

d'autres termes, la position d'une vésicule au sein du gradient est essentiellement déterminée par le nombre de ribosomes qu'elle porte par unité de surface.

En se basant sur les données morphologiques, on s'attendrait à ce que le RE rugueux donne naissance à une population homogène de vésicules rugueuses. On

pourrait donc conclure que les vésicules ayant une charge intermédiaire en ribosomes (celles qui s'équilibrent entre le pic de densité 1,14 et celui de densité 1,23) sont le résultat d'une dégranulation partielle au cours de l'homogénéisation.

Nous avons au moins deux raisons de penser qu'il n'en est rien. Bien que notre milieu d'homogénéisation ne contienne pas de  $Mg^{2+}$  dont l'effet stabilisateur sur la jonction ribosome-membrane est bien établi, nous trouvons qu'après centrifugation différentielle d'un homogénat, la répartition de l'ARN entre fractions nucléaire, mitochondriale, microsomiale et cytosolique est comparable à celle obtenue avec un milieu renfermant du  $Mg^{2+}$  (Blobel & Potter,



**Fig. 5.** La position d'une vésicule au sein du gradient est essentiellement déterminée par sa charge en ribosomes. Des microsomes ont été centrifugés à l'équilibre dans les conditions décrites dans la légende de la Fig. 4 pour les granules cytoplasmiques. Dans les 15 sous-fractions obtenues, on a compté les ribosomes par stéréologie (graphique du haut, Wibo *et al.*, 1971) et on a mesuré la teneur en ARNr. Le pic d'ARNr est à la densité 1,21 au lieu de 1,23 dans la Fig. 4 car les granules cytoplasmiques contiennent une population de vésicules très rugueuses qui, lorsqu'on prépare les microsomes, est écartée avec la fraction mitochondriale.

**Tableau II.** Classification en groupes des constituants du RE en fonction de leur distribution en gradient de densité.

<i>Constituants</i>	<i>Groupe</i>	<i>Références</i>
NADPH cytochrome P-450 réductase		1, 2
Cytochrome P-450		2
Aminopyrine déméthylase		1, 2
NADH cytochrome $b_5$ réductase		1
Cytochrome $b_5$	b	2
Epoxyde hydrolase		3
Cholestérol $7\alpha$ -hydroxylase		4
HMG CoA réductase		4
Hème oxygénase		5
Glucose 6-phosphatase		1, 2
Estérase		1, 2
Nucléoside diphosphatase		1, 2
UDP-glucuronosyltransférase		2
N-acétylglucosamine phosphoryltransférase		6
N-acétylglucosaminyltransférase	c	7
Mannosyltransférase		6
Glucosyltransférase		6
$\beta$ -glucuronidase		2
Arylsulfatase C		8
Récepteur de la particule de reconnaissance du signal (sous-unités $\alpha$ et $\beta$ )		10
ARNr		1, 2, 9
Ribosomes		9
Sites de translocation des polypeptides		11
Sites de fixation des ribosomes, <i>in vitro</i>	d	11
Ribophorines I et II		12
Acyl CoA cholestérol acyltransférase		13, 14
Signal peptidase		15

(1) Amar-Costesec *et al.*, 1969; (2) Beaufay *et al.*, 1974; (3) Amar-Costesec (résultats non publiés); (4) Mitropoulos *et al.*, 1978; (5) Brunyeel, Beaufay & Amar-Costesec (résultats non publiés); (6) Ravoet *et al.*, 1981; (7) Van Den Eynde *et al.*, 1985; (8) Guimard & Amar-Costesec (résultats non publiés); (9) Wibo *et al.*, 1971; (10) Lauffer *et al.*, 1985; (11) Amar-Costesec *et al.*, 1984; (12) Marcantonio *et al.*, 1984; (13) Venkatesan *et al.*, 1980; (14) Soni & Amar-Costesec (résultats non publiés); (15) Amar-Costesec *et al.*, 1989.

1967). D'autre part, on peut, après détachement des ribosomes par lavage des microsomes avec des solutions d'agents chélateurs, fixer une quantité de ( $^3\text{H}$ )-ribosomes correspondant à 107  $\mu\text{g}$  d'ARNr/mg de protéine, sur des sites à haute affinité ( $K_a = 10^8 \text{ M}^{-1}$ ). Cette quantité est équivalente à celle qui se trouvait sur les membranes avant dégranulation (97  $\mu\text{g}$  d'ARNr/mg de protéine) (Amar-

Costesec *et al.*, 1984). Le nombre de sites libérés au cours de l'homogénéisation du foie et du fractionnement semble donc modeste.

La position d'une vésicule au sein du gradient étant déterminée en premier lieu par sa charge en ribosomes, la distribution de densité de l'ARN reflète celle des ribosomes dans le plan latéral de la mem-

brane. Il en va de même pour les autres constituants du RE, et les expériences de centrifugation en gradient de densité nous apprennent que les constituants b, c et d se répartissent inégalement entre les portions lisse et rugueuse du RE.

### LA DISTRIBUTION LATÉRALE DES CONSTITUANTS DU RE EST DÉTERMINÉE PAR LEUR MODE D'INSERTION TRANSMEMBRANAIRE

On peut faire apparaître une corrélation entre la répartition des enzymes dans le

plan de la membrane (topographie latérale), telle que nous la déduisons des données de la centrifugation isopycnique, et leur mode d'insertion transmembranaire (topographie transversale) (Tableau III). Si l'on fait provisoirement abstraction des protéines d, cette corrélation peut s'énoncer de la manière suivante : les protéines dont la chaîne polypeptidique est largement exposée du côté cytoplasmique de la membrane ont une distribution latérale de type b; les enzymes du réticuloplasme, ou ceux dont la chaîne polypeptidique est orientée du côté luminal, ont une distribution de type c. Afin de rendre cette corrélation plus

**Tableau III.** Relation entre la disposition transmembranaire des protéines du RE et leur appartenance aux groupes b et c.

Constituants*	Topographie latérale	Topographie transverse** (%)	Références	
Epoxyde hydrolase	b	435/455	96	1, 2
Cytochrome P-450 induit par le phénobarbital		471/491	96	3
induit par la prégnénolone		477/504	95	4
16 $\alpha$ -carbonitrile		634/678	94	5
NADPH cytochrome P-450 réductase <sup>1</sup>		277/300	92	6
NADH cytochrome b5 réductase <sup>1</sup>		100/133	75	7
Cytochrome b5		578/887	65	8
HMG CoA réductase <sup>2</sup>				
UDP-glucuronosyltransférase	c			
induite par le phénobarbital		19/529	4	9
induite par le méthylcholanthrène		19/529	4	10
active sur les hydroxy-3 androgènes		20/530	4	11
active sur la testostérone		20/530	4	12
Estérases			0	13, 14
Nucléoside diphosphatase			0	15

\* sauf mention contraire, il s'agit de protéines de foie de rat; <sup>1</sup> foie de bœuf; <sup>2</sup> cellules d'ovaire de hamster chinois.

\*\* Colonne de gauche : rapport du nombre de résidus d'acides aminés émergeant de la membrane du côté cytosolique au nombre total de résidus; colonne de droite : ce rapport est exprimé en pourcentage.

(1) Falany *et al.*, 1987; (2) Porter *et al.*, 1986; (3) Fujii-Kuriyama *et al.*, 1982; (4) Gonzales *et al.*, 1985; (5) Porter & Kasper, 1985; (6) Ozols *et al.*, 1985; (9) Mackenzie, 1986a; (10) Iyanagi *et al.*, 1986; (11) Mackenzie, 1986b; (12) Mackenzie, 1987; (13) Akao & Omura, 1972a; (14) Robbi & Beaufay, 1983; (15) Kuriyama, 1972.

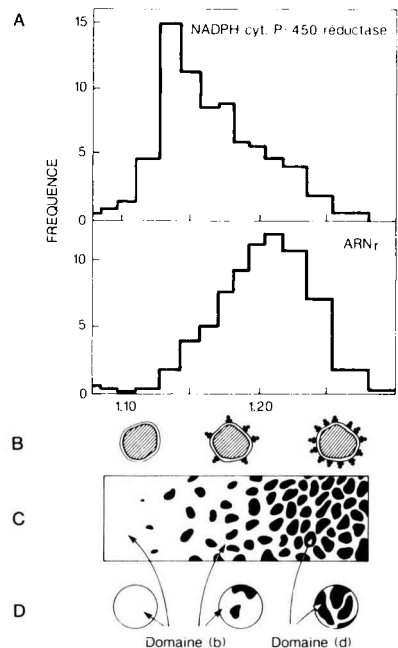
perceptible, j'ai, dans le Tableau III, exprimé en pourcentage le nombre de résidus d'acides aminés «cytoplasmiques» par rapport au nombre total de résidus. Ces nombres sont obtenus à partir de la séquence primaire et de l'indice d'hydropathie de polypeptide, qui permet de situer la position du segment d'ancrage dans la membrane. De plus, la topographie transmembranaire de la plupart des enzymes figurant dans le Tableau II a été établie par diverses approches expérimentales : tests de latence structurale en présence de détergents, attaque protéolytique ménagée de vésicules microsomiales intactes, action de réactifs non perméants, examen au microscope électronique de vésicules microsomiales après réaction avec des anticorps marqués à la ferritine.

### UN MODÈLE DÉCRIVANT L'ARRANGEMENT DES PROTÉINES DU RE

La corrélation entre topographies latérale et transmembranaire m'a suggéré un modèle d'organisation de la membrane du RE (Amar-Costesec, 1978a et b; revues générales *in* Amar-Costesec, 1979; Amar-Costesec & Beaufay, 1981; Beaufay *et al.*, 1981) dans lequel les enzymes de la face luminale (groupe c) sont réparties de manière à peu près uniforme dans le plan latéral de la membrane. Au contraire, il existerait une restriction à la mobilité latérale des enzymes de la face cytoplasmique (groupe b). Le pic formé à la densité 1,14 par les enzymes b étant symétrique de celui formé à la densité 1,23 par l'ARN, cette restriction serait en rapport avec la présence des ribosomes : leur jonction à la membrane ferait obstacle à la diffusion des protéines b. Mais le ribosome ne peut pas, à lui seul, constituer l'obstacle, car sa plus grande dimension est d'environ

23 nm (Fig. 1), alors que le domaine d «gèle» une surface de membrane correspondant à un cercle de 52 à 57 nm de diamètre par ribosome (Amar-Costesec & Beaufay, 1981). L'obstacle à la diffusion des protéines b reflète l'existence d'agrégats de protéines membranaires (protéines d) ou d'un changement de phase des phospholipides de la bi-couche.

Selon ce modèle, le RE rugueux serait une structure fortement dissymétrique, avec une face luminale où les enzymes,



**Fig. 6.** Organisation des domaines b et d à la surface cytoplasmique du RE. (A) Distributions de densité de la flavoprotéine et de l'ARNr. (B) Les vésicules microsomiales s'alignent le long du gradient de densité en fonction de leur charge en ribosomes par unité de surface. (C) Arrangement des protéines membranaires de la surface cytoplasmique du RE, déduit des distributions montrées en (A). Les protéines d forment des agrégats entre lesquels les protéines b se déplacent latéralement. (D) La surface des vésicules microsomiales est supérieure à la surface d'un agrégat de protéines d.

sous forme d'entités moléculaires individuelles ou de complexes, pourraient diffuser sans rencontrer d'obstacles majeurs et une face cytoplasmique ou les protéines b ne pourraient se déplacer qu'entre les agrégats de protéines d (Fig. 6).

## IDENTIFIER LES PROTÉINES D

La découverte de protéines d a étayé le modèle proposé. Rappelons que dans notre système expérimental, un constituant d se caractérise par une distribution en gradient de densité superposable à celle de l'ARN (Fig. 4). La présence des ribosomes indique qu'une fonction essentielle du domaine d — sinon la seule — est la synthèse de certaines classes de protéines (Tableau I). Le transfert de la chaîne oligosaccharidique des glycoprotéines étant un événement cotraductionnel, nous avons d'abord pensé aux transférases de la voie du dolichol phosphate. Molnar *et al.* (1969) avaient observé que la mannosyltransférase ne se trouve que dans les microsomes rugueux. Nos résultats ont montré que les enzymes qui synthétisent les dérivés monoglycosylés du dolichol phosphate par transfert de mannose, glucose, N-acétylglucosamine phosphate (Ravoet *et al.*, 1981) ou N-acétylglucosamine (Van den Eynde *et al.*, 1985) sont présentes aussi bien dans les portions lisses que dans les portions rugueuses du RE. A quelques réserves près (voir la discussion *in* Ravoet *et al.*, 1981), les transférases que nous avons étudiées se classent parmi les constituants c.

En revanche, les sites à haute affinité fixant les ribosomes *in vitro* en l'absence de synthèse protéique, les sites de translocation à travers la membrane du RE des polypeptides synthétisés *in vitro* (Amar-

Costesec *et al.*, 1984), les ribophorines I et II (Marcantonio *et al.*, 1984) et la peptidase du signal (Amar-Costesec *et al.*, 1989) présentent des distributions de type d (Tableau IV).

Les constituants que nous venons d'énumérer, à l'exception des ribophorines (Kreibich *et al.*, 1978), sont tous impliqués dans la synthèse protéique. Bien que la fonction des ribophorines reste à établir, le fait qu'il en existerait un hétérodimère par ribosome (Marcantonio *et al.*, 1984) suggère un rôle dans la jonction ribosome-membrane. Il est surprenant de constater que les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur de la particule de reconnaissance du signal, qui jouent un rôle important dans l'adressage des polysomes au RE (Meyer & Dobberstein, 1980; Gilmore *et al.*, 1982), ne présentent pas de distribution de type d (Tajima *et al.*, 1986). En revanche, à la suite de Venkatesan *et al.* (1980), nous avons montré que l'acyl CoA:cholestérol acyltransférase, une enzyme catalysant la formation d'esters de cholestérol et d'acides gras, possède une distribution de densité de type d (Soni & Amar-Costesec, résultats non publiés), ce qui indique que les constituants d n'ont pas pour fonction exclusive la synthèse protéique.

## L'ASYMÉTRIE S'ÉTABLIT AU MOMENT DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES DU RE

J'ai résumé dans le Tableau IV l'essentiel de nos connaissances sur la biosynthèse des protéines du RE. Celles-ci sont synthétisées selon 3 modes différents.

Les protéines de la chaîne de transport d'électrons transitant par le cytochrome  $b_5$  constituent un cas particulier : synthèse par des polysomes cytosoliques libres, in-

sersion post-traductionnelle par une séquence se trouvant à l'extrémité carboxy-terminale du polypeptide. Ce mode de synthèse par les polysomes libres s'apparente à celui des protéines nucléaires, mitochondriales, chloroplastiques, péroxysomiales et cytosoliques. L'extrémité carboxy-terminale de ces 3 protéines b constitue-t-elle un signal d'adressage au RE?

Les autres protéines du RE sont synthétisées par des polysomes liés aux membranes rugueuses mais selon 2 modes différents. La séquence topogénique des protéines b est un peptide signal amino-terminal qui sert de séquence d'insertion cotraductionnelle; l'essentiel du polypeptide reste du côté cytoplasmique de la membrane.

Les protéines c sont synthétisées avec une séquence signal amino-terminale transitoire; la translocation cotraductionnelle intéresse la plus grande partie du polypeptide, la séquence d'insertion transmembranaire (stop transfert) se trouvant vers l'extrémité carboxy-terminale. Autre différence entre protéines b et c : seules ces dernières sont glycosylées, ce qui est compatible avec la localisation du site actif de l'oligosaccharyltransférase du côté luminal de la membrane (revue *in* Beaufay *et al.*, 1985); seuls les polypeptides exposant la séquence consensus N-X-S/T du côté luminal peuvent être glycosylés.

Comment se situent les protéines d dans ces comparaisons ? Nos connaissances se limitent aux seules ribophorines I et II dont la séquence primaire (Crimaudo *et al.*, 1987; Harnik-Ort *et al.*, 1987) et le mode de biosynthèse (Rosenfeld *et al.*, 1984) ont été établis. En fait, elles présentent l'ensemble des caractéristiques des protéines c. La seule différence notable est que les ribophorines ont un domaine cytoplasmique plus important que celui des glucuronosyltransférases : 150 rési-

dues pour la ribophorine I de foie de rat (Harnik-Ort *et al.*, 1987), 70 pour la ribophorine II de foie humain (Crimaudo *et al.*, 1987) et seulement 19–20 pour les UDP-glucuronosyltransférases, mais la disposition transmembranaire est très semblable.

Comment expliquer que des protéines dont le mode de biosynthèse et d'insertion sont aussi proches connaissent des destinations différentes, les unes (UDP-glucuronosyltransférases) diffusant dans toute la membrane alors que les autres restent confinées dans le domaine d ? Comment, d'une manière plus générale, expliquer que certaines protéines (NADPH cytochrome P-450 réductase, cytochromes P-450, UDP-glucuronosyltransférases) puissent quitter le domaine d où elles ont été synthétisées?

D'un point de vue biosynthétique, les protéines du RE se classent donc en 4 catégories :

- le cytochrome  $b_5$  et les oxydo-réductases associées;
- le cytochrome P-450, sa réductase et l'époxyde hydrolase;
- les enzymes périphériques, résidentes permanentes du réticuloplasme;
- les protéines intégrales des domaines c et d. Cette observation, loin de remettre en cause nos conceptions sur l'organisation du RE en 3 domaines biochimiquement distincts, est une incitation à poursuivre l'étude des séquences topogéniques des protéines de cet organe.

## CONCLUSION

Au cours des dernières décades, les progrès dans la compréhension de l'organisation des membranes sont venus de l'étude

Tableau IV. Relation entre topographie latérale et mode de biosynthèse des protéines du RE.

Séquences topogéniques	Modifications co-ou post-traductionnelles	Constituants	Topographie latérale	Références
Séquence d'insertion à l'extrémité C-terminale	Myristoylation du résidu N-terminal Acétylation du résidu N-terminal —	NADH cytochrome $b_5$ réductase (1, 2) Cytochrome $b_5$ (1) Stéaroyl CoA désaturase (1)	b b b	1-3 3-5 6
Séquence signal N-terminale (séquence d'insertion)	Acétylation du résidu N-terminal	NADPH cytochrome P-450 réductase Cytochrome P-450 Epoxyde hydrolase	b b b	3-5, 7 8-10 3, 11
Séquence signal N-terminale transitoire	N-glycosylation N-glycosylation	Estérase pl 5,0 Estérase pl 6,1	c(1) c(1)	16 17
Séquence signal N-terminale transitoire + séquence d'insertion transmembranaire du côté C-terminal	N-glycosylation N-glycosylation	UDP-glucuronosyltransférase Ribophorines I et II	c d	12-15 18-20

(1) Synthétisés par les polysomes libres.

(2) Protéines périphériques.

(3) Le mode d'insertion transmembranaire de la  $b_5$  réductase n'est pas établi avec certitude.(1) Borgese *et al.*, 1980; (2) Borgese & Gaetani, 1980; (3) Okada *et al.*, 1982; (4) Harano & Omura, 1977; (5) Okada *et al.*, 1979; (6) Thiede & Strittmatter, 1985; (7) Gonzalez & Kasper, 1980a; (8) Fujii-Kuriyama *et al.*, 1979; (9) Negishi *et al.*, 1976; (10) Bar-Nun *et al.*, 1980; (11) Gonzalez & Kasper, 1980b; (12) Mackenzie, 1986a; (13) Mackenzie, 1986b; (14) Iyanagi *et al.*, 1986; (15) Mackenzie, 1987; (16) Robbi & Beaufay, 1986; (17) Robbi & Beaufay, 1987; (18) Rosenfeld *et al.*, 1984; (19) Cri-maudo *et al.*, 1987; (20) Hamik-Ort *et al.*, 1987.

multidisciplinaire des structures les plus simples, comme la membrane des globules rouges. L'étude du RE avec ses centaines de constituants protéiques et lipidiques différents est une entreprise de très longue haleine. En revanche, le fait que certaines voies métaboliques — synthèse protéique, métabolisme des xénobiotiques, synthèse des phospholipides — fassent l'objet d'investigations poussées est un avantage appréciable pour une meilleure connaissance de cet organite. L'importance fonctionnelle du RE justifie les efforts consentis pour l'étudier. Nos connaissances portent surtout sur les domaines b et c. Nous avons identifié, par électrophorèse bidimensionnelle à haute résolution, une vingtaine de polypeptides susceptibles d'appartenir au domaine d (Arroyo, Willard-Gallo, Beaufay & Amar-Costesec, résultats non publiés). Il reste à en définir la fonction, la disposition transmembranaire et à découvrir la nature des interactions responsables de la création de domaines au sein d'une matrice membranaire fluide.

## REMERCIEMENTS

J'exprime ma gratitude au Dr H. Beaufay qui a fait de nombreuses suggestions pour améliorer le contenu du manuscrit et à Mlle M. Garbaza-Kaufmann pour son travail d'édition. Les travaux sur les microsomes ont été financés par la Programmation de la Politique scientifique, Service du Premier Ministre de l'État belge (pôles d'attraction interuniversitaires, convention n° 7 et actions de recherche concertées, conventions n° 82/87-39 et n° 88/93-122), par le Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (conventions n°s 2.4540.80, 2.4540.84 et 2.4549.88) et par le Fonds National de la Recherche Scientifique (convention n° 1.5.182.85F).

## RÉFÉRENCES

- Akao T. & Omura T. (1972a) Acetanilide-hydrolyzing esterase of rat liver microsomes. I. Solubilization, purification and intramicrosomal localization. *J. Biochem.* 72, 1245-1256
- Akao T. & Omura T. (1972b) Acetanilide-hydrolyzing esterase of rat liver microsomes. II. Turnover studies. *J. Biochem.* 72, 1257-1259
- Amar-Costesec A. (1978a) The molecular organization of endoplasmic reticulum in liver : a plausible model to account for the enzymic heterogeneity. *Arch. Internat. Physiol. Biochim.* 86, 193-194
- Amar-Costesec A. (1978b) The distribution of enzymes in the plane of endoplasmic reticulum membranes of rat liver. *Arch. Internat. Physiol. Biochim.* 86, 843-844
- Amar-Costesec A. (1979) Hétérogénéité enzymatique du réticulum endoplasmique. In : *Mises au Point de Biochimie Pharmacologique* (Siest G. & Heusghem C., eds) 2<sup>e</sup> série, Masson, Paris, 94-122
- Amar-Costesec A. & Beaufay H. (1981) A structural basis of enzymic heterogeneity within liver endoplasmic reticulum. *J. Theor. Biol.* 89, 217-230
- Amar-Costesec A., Beaufay H., Feytmans E., Thines-Sempoux D. & Berthet J. (1969) Subfractionation of rat liver microsomes. In : *Microsomes and Drug Oxidations* (Gillette J.R., Conney A.H., Cosmides G.J., Estabrook R.W. & Fouts, J.R., eds). Academic Press, New York, 41-58
- Amar-Costesec A., Todd J.A. & Kreibich G. (1984) Segregation of the polypeptide translocation apparatus to regions of the endoplasmic reticulum containing ribophorins and ribosomes. I. Functional tests on rat liver microsomal subfractions. *J. Cell Biol.* 99, 2247-2253
- Amar-Costesec A., Dublet B. & Beaufay H. (1989) Translocation and proteolytic processing of nascent polypeptide chains : two functions associated with the ribosomal domain of the endoplasmic reticulum. *Biol. Cell* 65, 99-108
- Arias I.M., Doyle D. & Schimke R.T. (1969) Studies on the synthesis and degradation of

- proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver. *J. Biol. Chem.* 244, 3303-3315
- Bar-Nun S., Kreibich G., Adesnik M., Alterman L., Negishi M. & Sabatini D.D. (1980) Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77, 965-969
- Beaufay H. & Amar-Costesec A. (1976) Cell fractionation techniques. In : *Methods in Membrane Biology* (Korn E.D., ed.). Plenum Press, New York, London, pp. 1-100
- Beaufay H., Amar-Costesec A., Thines-Sempoux D., Wibo M., Robbi M. & Berthet J. (1974) Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. III. Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and differential centrifugation in density gradients. *J. Cell Biol.* 61, 213-231
- Beaufay H., Amar-Costesec A. & De Duve C. (1981) The topology of enzymes in microsomes from liver. In : *Mitochondria and Microsomes* (Lee C.P., Schatz G. & Dallner G., eds). Addison-Wesley Publishing Company, Reading (Mass.), pp. 629-653
- Beaufay H., Ravoet A.M., Godelaine D. & Amar-Costesec A. (1985) Subcellular membrane topology of glycosyltransferases involved in N-glycosylation of proteins. In : *Aspects Cellulaires et Pathologiques du Métabolisme des Glycoconjugués — Cellular and Pathological Aspects of Glycoconjugate Metabolism* (Dreyfus H., Massarelli R., Freysz L. & Rebel G., eds). Colloque INSERM/CNRS 1984, Les Editions INSERM 1985, 47-66
- Bell R.M. & Coleman R.A. (1980) Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 459-487
- Blobel G. & Potter V.R. (1967) Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. I. Distribution as related to total cellular RNA. *J. Mol. Biol.* 26, 279-292
- Blouin A., Bolender R.P. & Weibel E.R. (1977) Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* 72, 441-455
- Bock K.W., Siekevitz P. & Palade G.E. (1971) Localization and turnover studies of membrane nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 246, 188-195
- Bolender R.P. & Weibel E.R. (1973) A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment. *J. Cell Biol.* 56, 746-761
- Bolender R.P., Paumgartner D., Losa G., Muelener D. & Weibel E.R. (1978) Integrated stereological and biochemical studies on hepatocytic membranes. I. Membrane recoveries in subcellular fractions. *J. Cell Biol.* 77, 565-583
- Borgese N. & Gaetani S. (1980) Site of synthesis of NADH-cytochrome  $b_5$  reductase, an integral membrane protein, in rat liver cells. *FEBS Lett.* 112, 216-220
- Borgese N., Pietrini G. & Meldolesi J. (1980) Localization and biosynthesis of NADH-cytochrome  $b_5$  reductase, an integral membrane protein, in rat liver cells. III. Evidence for the independent insertion and turnover of the enzyme in various subcellular compartments. *J. Cell Biol.* 86, 38-45
- Chesterton C.J. (1968) Distribution of cholesterol precursors and other lipids among rat liver intracellular structures. Evidence for the endoplasmic reticulum as the site of cholesterol and cholesterol ester synthesis. *J. Biol. Chem.* 243, 1147-1151
- Claude A. (1938) A fraction from normal chick embryo similar to the tumor producing fraction of chicken tumor I. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 39, 398-303
- Crimaudo C., Hortsch M., Gausepohl H. & Meyer D.I. (1987) Human ribophorins I and II : the primary structure and membrane topology of two highly conserved rough endoplasmic reticulum-specific glycoproteins. *EMBO J.* 6, 75-82
- Dailey H.A. & Strittmatter P. (1981) The role of COOH-terminal anionic residues in binding cytochrome  $b_5$  to phospholipid vesicles and biological membranes. *J. Biol. Chem.* 256, 1677-1680
- Dallner G. & Ernster L. (1968) Subfractionation and composition of microsomal membranes : a review. *J. Histochem. Cytochem.* 16, 611-632
- Dallner G., Orrenius S. & Bergstrand A. (1963) Isolation and properties of rough and smooth vesicles from rat liver. *J. Cell Biol.* 16, 426-430
- Dawidowicz E.A. (1987) Dynamics of membrane lipid metabolism and turnover. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 43-61
- Depierre J.W. & Dallner G. (1975) Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 411-472

- Edwards P.A. & Gould R.G. (1972) Turnover rate of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase as determined by use of cycloheximide. *J. Biol. Chem.* 247, 1520-1524
- Estabrook R.W., Masters B.S.S., Capdevila J., Prough R.A., Werringloer J. & Peterson J.A. (1981) Cytochromes and flavoproteins of the microsomal membrane : past hypotheses and current concepts regarding structure-function relationships. In : *Mitochondria and Microsomes* (Lee C.P., Schatz G., Dallner G., eds). Addison-Wesley Publishing Company, Reading (Mass.), pp. 683-705
- Evans E.A., Gilmore R. & Blobel G. (1986) Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 581-585
- Falany C.N., McQuiddy P. & Kasper C.B. (1987) Structure and organization of the microsomal xenobiotic epoxide hydrolase gene. *J. Biol. Chem.* 262, 5924-5930
- Fujii-Kuriyama Y., Mikawa R., Tashiro Y., Sakai M. & Maramatsu M. (1978) *Seikagaku* 50, 870 (en japonais)
- Fujii-Kuriyama Y., Negishi M., Mikawa R. & Tashiro Y. (1979) Biosynthesis of cytochrome P-450 on membrane-bound ribosomes and the subsequent incorporation into rough and smooth microsomes in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 81, 510-519
- Fujii-Kuriyama Y., Mizukami Y., Kawajiri K., Sogawa K. & Maramatsu M. (1982) Primary structure of cytochrome P-450 : coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 2793-2797
- Gellhorn A. & Benjamin W. (1966) The effect of insulin on monounsaturated fatty acid synthesis in diabetic rats. The stability of the informational RNA and of the enzyme system concerned with fatty acid desaturation. *Biochim. Biophys. Acta* 116, 460-466
- Gielen J., Van Cantfort J., Robaye B. & Renson J. (1975) Rat-liver cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. 3. New results about its circadian rhythm. *Eur. J. Biochem.* 55, 41-48
- Gilmore R., Blobel G. & Walter P. (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J. Cell Biol.* 95, 463-469
- Gonzales F.J. & Kasper C.B. (1980a) Phenobarbital induction of NADPH-cytochrome c (P-450) oxidoreductase messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 19, 1790-1796
- Gonzales F.J. & Kasper C.B. (1980b) *In vitro* translation of epoxide hydratase messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 1254-1258
- Gonzales F.J., Nebert D.W., Hardwick J.P. & Kasper C.B. (1985) Complete cDNA and protein sequence of a pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile-induced cytochrome P-450. A representative of a new gene family. *J. Biol. Chem.* 260, 7435-7441
- Harano H. & Omura T. (1977) Biogenesis of endoplasmic reticulum membrane in rat liver cells. II. Discharge of the nascent peptides of NADPH-cytochrome c reductase and cytochrome *b*<sub>5</sub> on the cytoplasmic side of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biochem.* 82, 1551-1557
- Harnik-Ort V., Prakash K., Marcantonio E., Colman D.R., Rosenfeld M.G., Adesnik M., Sabatini D.D. & Kreibich G. (1987) Isolation and characterization of cDNA clones for rat ribophorin I : complete coding sequence and *in vitro* synthesis and insertion of the encoded product into endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* 104, 855-863
- Iyanagi T., Haniu M., Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y., Watanabe D., Shively J.E. & Anan K.F. (1986) Cloning and characterization of cDNA encoding 3-methylcholanthrene inducible rat mRNA for UDP-glucuronosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 261, 15607-15614
- Kawajiri K., Ito A. & Omura T. (1977) Subfractionation of rat liver microsomes by immunoprecipitation and immunoadsorption methods. *J. Biochem.* 81, 779-789
- Kiehn E.D. & Holland J.J. (1970) Membrane and nonmembrane proteins of mammalian cells. Synthesis, turnover and size distribution. *Biochemistry* 9, 1716-1728
- Kreibich G., Ulrich B.L. & Sabatini D.D. (1978) Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. I. Identification of ribophorins I and II, membrane proteins characteristic of rough microsomes. *J. Cell Biol.* 77, 464-487
- Kuriyama Y. (1972) Studies on microsomal nucleoside diphosphatase of rat hepatocytes. Its

- purification, intramembranous localization and turnover. *J. Biol. Chem.* 247, 2979-2988
- Kuriyama Y., Omura T., Siekevitz P. & Palade G.E. (1969) Effects of phenobarbital on the synthesis and degradation of the protein components of rat liver microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 244, 2017-2026
- Lauffer L., Garcia P.D., Harkins R.N., Coussens L., Ullrich A. & Walter P. (1985) Topology of signal recognition particle receptor in endoplasmic reticulum membrane. *Nature* 318, 334-338
- Liscum L., Finer-Moore J., Stroud R.M., Luskey K.L., Brown M.S. & Goldstein J.L. (1985) Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 260, 522-530
- Losa G., Weibel E.R. & Bolender R.P. (1978) Integrated stereological and biochemical studies on hepatocytic membranes. III. Relative surface of endoplasmic reticulum membranes in microsomal fractions estimated on freeze-fracture preparations. *J. Cell Biol.* 78, 289-308
- Loud A.V. (1968) A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 37, 27-46
- Mackenzie P.I. (1986a) Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. Sequence and expression of cDNA encoding a phenobarbital-inducible form. *J. Biol. Chem.* 261, 6119-6125
- Mackenzie P.I. (1986a) Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. cDNA sequence and expression of a form glucuronidating 3-hydroxyandrogens. *J. Biol. Chem.* 261, 14112-14117
- Mackenzie P.I. (1987) Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. Identification of cDNAs encoding two enzymes which glucuronidate testosterone, dihydrotestosterone and  $\beta$ -estradiol. *J. Biol. Chem.* 262, 9744-9749
- Marcantonio E.E., Amar-Costesec A. & Kreibich G. (1984) Segregation of the polypeptide translocation apparatus to regions of the endoplasmic reticulum containing ribophorins and ribosomes. II. Rat liver microsomal subfractions contain equimolar amounts of ribophorins and ribosomes. *J. Cell Biol.* 99, 2254-2259
- Matsuura S., Fujii-Kuriyama Y. & Tashiro Y. (1978) Immunoelectron microscope localization of cytochrome P-450 on microsomes and other membrane structures of rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 78, 503-519
- Matsuura S., Fujii-Kuriyama Y. & Tashiro Y. (1979) Quantitative immunoelectron-microscopic analyses of the distribution of cytochrome P-450 molecules on rat liver microsomes. *J. Cell Sci.* 36, 413-435
- Meyer D.I. & Dobberstein B. (1980) A membrane component essential for vectorial translocation of nascent proteins across the endoplasmic reticulum: requirements for its extraction and reassociation with the membrane. *J. Cell Biol.* 87, 498-502
- Mitropoulos K.A., Venkatesan S., Balasubramaniam S. & Peters T.J. (1978) The submicrosomal localisation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase, cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase and cholesterol in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 82, 419-429
- Molnar J., Tetas M. & Chao H. (1969) Subcellular site of glycoprotein synthesis in liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 684-690
- Morimoto T., Matsuura S., Sasaki S., Tashiro Y. & Omura T. (1976) Immunoelectron microscope studies on localization of NADPH-cytochrome c reductase on rat liver microsomes. *J. Cell Biol.* 68, 189-201
- Negishi M., Fujii-Kuriyama Y., Tashiro Y. & Imai Y. (1976) Site of biosynthesis of cytochrome P-450 in hepatocytes of phenobarbital treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 1153-1160
- Ojakian G.K., Kreibich G. & Sabatini D.D. (1977) Mobility of ribosomes bound to microsomal membranes. A freeze-etch and thin-section electron microscope study of the structure and fluidity of the rough endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 72, 530-551
- Okada Y. & Omura T. (1978) Synthesis and turnover of microsomal and mitochondrial NADH-cytochrome  $b_5$  reductases in rat liver. *J. Biochem.* 83, 1039-1048
- Okada Y., Sabatini D.D. & Kreibich G. (1979) Site of synthesis of rat liver cytochrome  $b_5$  and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Cell Biol.* 83, 437a
- Okada Y., Frey A.B., Guenther T.M., Oesch F., Sabatini D.D. & Kreibich G. (1982) Studies on the biosynthesis of microsomal membrane proteins. Site of synthesis and mode of insertion of cytochrome  $b_5$ , cytochrome  $b_5$  reductase, cytochrome P-450 reductase and epoxide hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 122, 393-402
- Omura T., Siekevitz P. & Palade G.E. (1967) Turnover of constituents of the endoplasmic re-

- ticulum membranes of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 242, 2389-2396
- Oshino N. & Sato R. (1972) The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 369-377
- Ozols J., Korza G., Heinemann F.S., Hediger M.A. & Strittmatter P. (1985) Complete amino acid sequence of steer liver microsomal NADH-cytochrome  $b_5$  reductase. *J. Biol. Chem.* 260, 11953-11961
- Palade G.E. (1956) The endoplasmic reticulum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 85-98
- Palade G.E. & Siekevitz P. (1956) Pancreatic microsomes. An integrated morphological and biochemical study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 671-690
- Porter T.D. & Kasper C.B. (1985) Coding nucleotide sequence of rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase cDNA and identification of flavin-binding domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82, 973-977
- Porter T.D., Beck T.W. & Kasper C.B. (1986) Complementary DNA and amino acid sequence of rat liver microsomal, xenobiotic epoxide hydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 248, 121-129
- Ravoet A.M., Amar-Costesec A., Godelaine D. & Beaufay H. (1981) Quantitative assay and subcellular distribution of enzymes acting on dolichyl phosphate in rat liver. *J. Cell Biol.* 91, 679-688
- Reinhart M.P., Billheimer J.T., Faust J.R. & Gaylor J.L. (1987) Subcellular localization of the enzymes of cholesterol biosynthesis and metabolism in rat liver. *J. Biol. Chem.* 262, 9649-9655
- Robbi M. & Beaufay H. (1983) Purification and characterization of various esterases from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 137, 293-301
- Robbi M. & Beaufay H. (1986) Biosynthesis of rat-liver pl-5.0 esterases in cell-free systems and in cultured hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 158, 187-194
- Robbi M. & Beaufay H. (1987) Biosynthesis of rat liver pl-6.1 esterase, a carboxylesterase of the cisternal space of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 248, 545-550
- Rohr H.P., Oberholzer M., Bartsch C. & Keller M. (1976) Morphometry in experimental pathology (methods, baseline data and application). *Int. Rev. Exp. Pathol.* 15, 233-325
- Rosenfeld M.G., Marcantonio E.E., Hakimi J., Ort V.M., Atkinson P.H., Sabatini D. & Kreibich G. (1984) Biosynthesis and processing of ribophorins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 99, 1076-1082
- Rothschild J. (1963) The isolation of microsomal membranes. *Biochem. Soc. Symp.* 22, 4-31
- Tajima S., Lauffer L., Rath V.L. & Walter P. (1986) The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J. Cell Biol.* 103, 1167-1178
- Thiede M.A. & Strittmatter P. (1985) The induction and characterization of rat liver stearyl-CoA desaturase mRNA. *J. Biol. Chem.* 260, 11459-14463
- Trzaskos J.M., Bowen W.D., Fischer G.J., Billheimer J.T. & Gaylor J.L. (1982) Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from lanosterol: a progress report. *Lipids* 17, 250-256
- Van Den Eynde B., Beaufay H., Godelaine D. & Amar-Costesec A. (1985) Assay and topology of UDP-acetylglucosaminolichylpyrophosphorylacetylglucosamine - acetylglucosaminyl - transferase in rat liver. *Arch. Internat. Physiol. Biochim.* 93, B117-B118
- Venkatesan S., Mitropoulos K.A., Balasubramaniam S. & Peters T.J. (1980) Biochemical evidence for the heterogeneity of membranes from rat liver endoplasmic reticulum. Studies on the localization of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *Eur. J. Cell Biol.* 21, 167-174
- Weibel E.R., Staubli W., Gnagi H.R. & Hess F.W. (1969) Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell Biol.* 42, 68-91
- Wibo M., Amar-Costesec A., Berthet J. & Beaufay H. (1971) Electron microscope examination of subcellular fractions. III. Quantitative analysis of the microsomal fraction isolated from rat liver. *J. Cell Biol.* 51, 52-71
- Yang C.S. (1977) The organization and interaction of monooxygenase enzymes in the microsomal membrane. *Life Sci.* 21, 1047-1058