

ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE D’AFFINITE DE FRACTIONS MEMBRANAIRES SPECIALISEES, A PARTIR DE MICROSOMES D’HEPATOCYTES DE CHAT

G. AZZAR et R. GOT

Laboratoire de Biologie et Technologie des Membranes, Université Claude Bernard, Lyon I, 69621 Villeurbanne, France

Received 28 September 1978

Microsomal glucokinase is solubilized by incubation in the presence of several metabolites. After solubilization of the enzymes, the membranes present free sites for specific binding of glucokinase, therefore, they can be purified by affinity chromatography on Sepharose-ATP-glucokinase. This method yields membranous vesicles which contain, in addition to glucokinase, uridylyl-transferase, phosphoglucomutase, sialyl-transferase and adenylate cyclase. Galactosyl-transferase, glucose-6-phosphatase and NADPH cytochrome *c* reductase are absent. It appears that functionally related enzyme from UDP-glucose biosynthesis are aggregated onto specific patches of the membrane, most likely from Golgi apparatus.

1. Introduction

Les hépatocytes de chat contiennent une forte activité glucokinase au niveau des microsomes [1]. Cette activité enzymatique peut être facilement libérée de la membrane par simple incubation en présence de métabolites comme le glucose-6-phosphate ou l’ATP, ou, moins spécifiquement mais plus quantitativement par le pyrophosphate [2]. Sur les sites ainsi disponibles, l’enzyme peut se réassocier après élimination de l’effecteur. D’autre part, cette glucokinase, une fois solubilisée, est purifiée de façon très efficace, par chromatographie d’affinité sur Sepharose-ATP [3].

Le but de ce travail est de mettre à profit en deux caractéristiques pour essayer d’isoler, à partir d’une fraction microsomique totale, des vésicules membranaires présentant une spécialisation enzymatique. Des microsomes sont traités par le pyrophosphate; la glucokinase libérée est fixée sur Sepharose-ATP. Les microsomes traités sont alors mis en contact avec le complexe Sepharose-ATP-glucokinase afin de retenir spécifiquement les vésicules membranaires comportant un site de fixation de glucokinase non occupé.

2. Matériel et méthodes

La fraction microsomique est préparée par centri-

fugation différentielle selon une méthode déjà décrite [1]. On y retrouve 30–40% de l’activité glucokinase totale de l’homogénat. Cette fraction n’est pas contaminée par la phase soluble. Outre le reticulum endoplasmique, on y retrouve environ 50% de l’appareil de Golgi et 40% des membranes plasmiques; les contrôles morphologiques y font apparaître trois types d’éléments: vésiculaires, tubulaires et granulaires. Tous les essais sont effectués sur des membranes préparées extemporanément. La libération de la glucokinase est obtenue en incubant des microsomes frais pendant 30 min à 37°C, en présence de pyrophosphate 7.5 mM. Dans ces conditions, 70–75% de la glucokinase membranaire passent en solution [2], démasquant autant de sites de fixation au niveau des membranes. Le culot de microsomes traités est conservé pour la suite des opérations. Le pyrophosphate est éliminé par 2 h de dialyse, sous agitation, en chambre froide et la glucokinase soluble est mise en contact, en cuve, avec du Sepharose sur lequel a été fixé de l’ATP par l’intermédiaire d’un bras, le γ méthyl ester de glutamate [3]. Après 10 min d’agitation à température ambiante, toute la glucokinase est liée. Les vésicules microsomiques traitées sont alors mises en contact, dans les mêmes conditions, avec le complexe insoluble Sepharose-ATP-glucokinase. Après 10 min, la suspension est mise en colonne, l’effluent est récupéré et la matrice est lavée par le tampon Tris-HCl pH 7.5

(20 mM) puis l'élution est réalisée, comme pour la glucokinase seule, par KCl 2 M.

Des essais similaires sont effectués avec des microsomes frais, non traités, contenant toute leur activité glucokinase, soit sur du Sepharose-ATP, soit sur du Sepharose-ATP-glucokinase.

Les activités enzymatiques sont dosées comme précédemment [1,4]. Un dosage radioisotopique est utilisé pour l'adénylate cyclase (The Radiochemical Centre, Amersham). Les phospholipides sont extraits par la méthode de Folch et al. [5] et le phosphore lipidique est dosé selon Bartlett [6]. Les protéines sont dosées par la méthode de Hartree [7] sur un précipité trichloracétique à 10%, lavé par un mélange méthylal : méthanol (4/1) et redissous dans la soude N.

3. Résultats

Le passage de microsomes traités sur le complexe insoluble Sepharose-ATP-glucokinase permet de séparer deux fractions membranaires: l'une, F₁, n'est pas retenue, alors que l'autre, F₂, ne peut être éluee que par une forte concentration en KCl qui a pour effet de rompre la liaison ATP-glucokinase [3]. Les activités enzymatiques de ces deux fractions et des microsomes totaux sont rapportées dans le tableau 1. La fraction F₂ contient 5-10% des protéines des microsomes de départ et 70% de l'activité glucokinase, chiffre qui correspond à la quantité d'enzyme initiale-

ment solubilisée, c'est-à-dire aux sites de fixation membranaires effectivement libérés. Le reste de la glucokinase se retrouve dans F₁: il s'agit là des vésicules membranaires qui avaient conservé leur glucokinase et qui, de ce fait, ne présentaient pas d'affinité pour la matrice elle-même chargée en glucokinase. L'activité spécifique, dans F₂ par rapport aux microsomes de départ est multipliée par un facteur supérieur à 10. Une répartition similaire est observée pour l'uridylyltransférase et l'adénylate cyclase, avec des facteurs d'enrichissement également élevés. La sialyltransférase se répartit de façon sensiblement égale dans F₁ et F₂ où elle a une activité spécifique multipliée par 5. La galactosyltransférase, autre enzyme marqueur de l'appareil de Golgi présente un comportement différent puisqu'elle se retrouve exclusivement dans F₁. Il en est de même pour la glucose-6-phosphatase et la NADPH-cytochrome *c* reductase, enzymes caractéristiques du reticulum endoplasmique. Précisons que l'on enregistre une perte d'activité de plus de 50% pour ces deux enzymes, lors de l'incubation des microsomes à 37°C en vue de la libération de la glucokinase. Quant à la phosphoglucomutase, on en retrouve uniquement dans F₁ en quantité voisine de la glucokinase, moins de 30% de l'activité initiale. Enfin, le rapport pondéral phospholipide/protéine est voisin de 1 dans F₂ pour 0,4 dans F₁, ce qui correspond donc à un enrichissement considérable en phospholipides dans F₂.

Le passage de microsomes intacts sur Sepharose-

Tableau I
Activités spécifiques de divers enzymes dans les microsomes totaux d'hépatocytes de chat et dans les fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur Sepharose-ATP-glucokinase

Enzymes	Fractions		
	MT	F ₁	F ₂
Glucokinase	49 × 10 ⁻⁴	30 × 10 ⁻⁴	527 × 10 ⁻⁴
Galactosyltransférase	17 × 10 ⁻⁴	29 × 10 ⁻⁴	0
Sialyltransférase	16 × 10 ⁻⁴	13 × 10 ⁻⁴	86 × 10 ⁻⁴
NADPH-cytochrome <i>c</i> reductase	10 × 10 ⁻³	21 × 10 ⁻³	0
Glucose-6-phosphatase	17 × 10 ⁻³	16 × 10 ⁻³	0
Adénylate cyclase	7.7 × 10 ⁻⁶	6.4 × 10 ⁻⁶	69 × 10 ⁻⁶
Phosphoglucomutase	49 × 10 ⁻³	36 × 10 ⁻³	0
Uridylyltransférase	5.4 × 10 ⁻³	4.7 × 10 ⁻³	38 × 10 ⁻³

Les activités sont exprimées en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine. MT, microsomes totaux; F₁ fraction non retenue sur la colonne; F₂, fraction retenue

ATP est réalisé dans le but de vérifier s'il est possible de fixer directement les membranes par leur glucokinase. On retient effectivement sur la matrice des vésicules membranaires présentant un profil enzymatique analogue à celui de F_2 avec, en plus, de la phosphoglucomutase en quantité identique à celle de la glucokinase. Mais le rendement de la purification est nettement moins bon puisque 70–75% de ces activités passent directement dans l'effluent. Il est vraisemblable que la reconnaissance de l'ATP sur Sepharose par la glucokinase elle-même intégrée dans une structure membranaire se fait plus difficilement que la glucokinase par son site récepteur membranaire.

Enfin, après passage de microsomes intacts sur le complexe Sepharose–ATP–glucokinase, seulement 10–15% des activités trouvées dans F_2 (plus la phosphoglucomutase) restent liées à la matrice. Ce résultat confirme la spécificité de liaison de la fraction membranaire F_2 , conséquence de l'affinité entre la glucokinase et son site de fixation sur la membrane; il suggère, d'autre part, qu'il existe, à l'état natif, un faible pourcentage de sites membranaires de la glucokinase non occupés.

4. Discussion

Il est peu probable que les enzymes participant à des systèmes organisés soient entièrement localisés au hasard dans les membranes. Ainsi, dans la membrane interne des mitochondries, la chaîne respiratoire et les phosphorylations oxydatives sont formées de complexes bien définis que l'on peut d'ailleurs isoler par des méthodes appropriées. La présence de complexes similaires dans les membranes microsomiques n'a pas encore été clairement démontrée. Winqvist et Dallner [8] ont recherché l'existence de tels complexes en centrifugeant des vésicules microsomiques dans un gradient de saccharose en présence de désoxycholate de sodium. Ils ont pu démontrer ainsi que des enzymes ayant des relations fonctionnelles, comme par exemple les systèmes transporteurs d'électrons, sont rassemblés dans des zones membranaires bien déterminées.

La méthodologie que nous avons mise en oeuvre nous a permis d'isoler, par sa spécificité, des vésicules membranaires qui sont très caractéristiques, en particulier par l'absence totale de deux enzymes marqueurs, parmi les plus classiques, du reticulum endoplasmique,

la glucose-6-phosphatase et la NADPH-cytochrome *c* reductase. De plus, cette technique s'est avérée parfaitement reproductible. La glucokinase, qui est à la base de cette purification, a peu de chance d'être impliquée dans la glycolyse; par contre, elle pourrait être le premier enzyme d'une voie de biosynthèse d'UDP-glucose, ce qui nous a incité à rechercher la présence des deux autres enzymes participant à cette biosynthèse, la phosphoglucomutase et l'uridylyltransférase. Si ce dernier enzyme se retrouve effectivement, dans des proportions analogues à la glucokinase, la phosphoglucomutase est absente des vésicules purifiées. En fait, il est apparu que cet enzyme est solubilisé par le pyrophosphate en même temps que la glucokinase. Lors de la fixation de celle-ci sur Sepharose–ATP, la phosphoglucomutase qui n'a pas d'affinité pour l'ATP reste dans la phase soluble et est éliminée. Dans le cas où on utilise des microsomes non traités, on retrouve bien la phosphoglucomutase dans les membranes purifiées, au même titre que la glucokinase et l'uridylyltransférase.

Ainsi, ces vésicules, qui contiennent ces trois enzymes présentant une relation fonctionnelle étroite, seraient spécialisées dans la synthèse d'UDP-glucose. La présence de sialyltransférase ainsi que le taux de phospholipides suggèrent que ces vésicules seraient d'origine golgienne et se différencieraient de celles contenant la galactosyltransférase. Un système de biosynthèse d'UDP-glucose a déjà été mis en évidence dans l'appareil de Golgi du foie de rat [4]. Le fait que ces vésicules aient également une activité adénylate cyclase n'est pas incompatible avec leur appartenance à l'appareil de Golgi puisqu'on sait que cet organe possède effectivement cet enzyme [9].

Références

- [1] Azzar, G., Rougier, M., Berthillier, G. et Got, R. (1976) *Biochimie* 58, 285–295.
- [2] Azzar, G. et Got, R. (1977) *Biochimie* 59, 303–309.
- [3] Azzar, G. et Got, R. (1975) *J. Chromatog.* 104, 470–473.
- [4] Berthillier, G. et Got, R. (1977) *Biochimie* 59, 85–89.
- [5] Folch, J., Lees, M. et Sloan Stanley, G. H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- [6] Bartlett, G. R. (1958) *J. Biol. Chem.* 234, 466–468.
- [7] Hartree, E. (1972) *Anal. Biochem.* 48, 422–427.
- [8] Winqvist, L. et Dallner, G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 436, 399–412.
- [9] Cheng, H. et Farquhar, M. G. (1976) *J. Cell. Biol.* 70, 660–670.