

BBA 71015

Réseau endoplasmique hépatique et biosynthèse du cholestérol

Etant donné que l'architecture des membranes cellulaires met en jeu des associations moléculaires entre protéines phospholipides et cholestérol, et que le cholestérol est synthétisé dans le foie par le réseau endoplasmique, il est intéressant d'étudier de ces deux points de vue, constitutif et fonctionnel, les fractions endoplasmiques lisse et rugueuse de la cellule hépatique.

Les microsomes hépatiques sont préparés, à partir de rats mâles Wistar de 150 g, par centrifugation différentielle en milieu saccharose 0.88 M selon CHAUVEAU¹. Le haut rendement—9.5 mg d'N microsomial par g de foie frais—est obtenu grâce à un lavage du culot noyaux *plus* mitochondries. Les deux classes microsomiales sont séparées sur gradient de saccharose selon CHAUVEAU ET DECLOITRE²: rotor Spinco SW 25, 40 h à 25 000 tours/min. Les microsomes lisses sont prélevés entre les bornes de densité 1.13 et 1.21 et les microsomes rugueux entre les bornes 1.21 et 1.25. La pureté des fractions est contrôlée en microscopie électronique et par caractérisations biochimiques.

TABLEAU I

CONSTITUTION BIOCHIMIQUE DES MICROSOMES HÉPATIQUES

(a): mg/g de foie frais; (b) μ g/mg d'N protéique.

<i>Microsomes*</i>	<i>N protéique</i>	<i>P phospholipidique</i>		<i>Cholestérol</i>		<i>Rapport molaire phospholipides/ cholestérol</i>
	(a)	(a)	(b)	(a)	(b)	
Totaux	5.62	0.87	155	1.45	259	7.7
Lisses	1.81	0.33	192	1.05	580	3.9
Rugueux	3.57	0.42	117	0.35	98	14.9

* Déduction faite des ribosomes.

Le Tableau I présente les données d'analyse relatives aux constituants protéines et lipides. D'après l'N protéique (déduction faite des ribosomes liés), le réseau endoplasmique rugueux est deux fois plus développé que le réseau lisse. La densité plus faible des microsomes lisses relève de leur plus forte teneur en lipides: relativement à l'N, près de 2 fois plus de phospholipides et 6 fois plus de cholestérol dans les microsomes lisses que dans les rugueux. Le rapport molaire phospholipides/cholestérol est spécifique de chaque classe: 4 pour les microsomes lisses et 15 pour les rugueux. Les fractions microsomiales analysées dans ce travail comportent, à côté des membranes mêmes, des protéines et des lipoprotéines non structurales présentes dans les tubules et vésicules du réseau endoplasmique. La plus forte teneur en lipides, et surtout en cholestérol, des microsomes lisses pourrait relever, au moins en partie, de leur contenu intravésiculaire. Les données de ERNSTER, SIEKEVITZ ET PALADE³ montrent que le traitement au déoxycholate 0.26 % des microsomes totaux, qui solubilise de l'ordre de 40 % des protéines et 25 % des phospholipides, aboutit à des membranes caractérisées, relativement aux microsomes originaux, par une concentration de phospholipides doublée.

Entre autres unités fonctionnelles du réseau endoplasmique, on peut considérer des ensembles organisés équipés des enzymes participant de façon coordonnée à une même fonction, anabolique ou catabolique. Nous avons retenu, étant donné son importance dans le foie, la biosynthèse du cholestérol, et avons étudié *in vivo* sa localisation sur les deux classes de membranes microsomiales, lisses et rugueuses. Précisons qu'il s'agit des étapes conduisant du squalène au cholestérol.

Après injection intrapéritonéale du précurseur $[2-^{14}\text{C}]$ mévalonate, on suit dans les deux fractions la cinétique d'incorporation du marqueur dans le squalène et les divers stéroïdes intermédiaires de biosynthèse, ainsi que dans le cholestérol lui-même. Sur colonne d'acide silicique, le squalène est isolé par l'éluant hexane-benzène 6 %, les esters de cholestérol par l'hexane-benzène 18 % et les stérols par l'hexane-benzène 60 %. Ces derniers sont séparés, sur plaque d'acide silicique- AgNO_3 selon DITULLIO, JACOBS ET HOLMES⁴, en déhydrolanostérol, lanostérol, lathostérol, desmostérol et cholestérol.

Ayant appliqué des quantités définies du mélange de stérols, on mesure la radio-activité ^{14}C de chacun d'entre eux par la combinaison scintillation liquide-radio-détection sur chromatoplaque et on établit son évolution en fonction du temps jusqu'à 1 h après l'administration du $[^{14}\text{C}]$ mévalonate.

D'après le Tableau II (a) il apparaît que, à l'intensité près (fonction de leur quantité absolue non déterminée car très faible), les intermédiaires successifs sont marqués selon la même cinétique dans les deux classes de microsomes. On en conclut que les membranes endoplasmiques lisses et rugueuses de la cellule hépatique synthétisent le cholestérol par la même voie, celle du lathostérol (réf. 5) et à la même vitesse.

TABLEAU II

ACTIVITÉ ^{14}C DU CHOLESTÉROL ET DE SES PRÉCURSEURS DANS LES MICROSOMES HÉPATIQUES APRÈS INJECTION INTRAPÉRITONÉALE DE $[2-^{14}\text{C}]$ MÉVALONATE

Activités coups/min rapportées à 1 μC de mévalonate par 100 g de rat.

Temps (min)	(a) Activités rapportées au mg d'N protéique									
	Squalène Microsomes		Lanostérol Microsomes		Desmostérol Microsomes		Lathostérol Microsomes		Cholestérol Microsomes	
	lisses	rugueux	lisses	rugueux	lisses	rugueux	lisses	rugueux	lisses	rugueux
5	1200	670	217	30	13	8	33	20	29	18
20	440	320	1270	266	170	49	600	120	2380	546
60	16	10	—	—	—	—	—	—	2540	560
(b) Activité spécifique du cholestérol (coups/min par μmole)										
	Microsomes					Plasma				
	totaux		lisses		rugueux					
5	41		25		65		—			
20	1700		1740		1690		700			
60	1940		1900		1900		1860			
6 h	1696		1637		1557		1610			
12 h	1195		1147		1095		1130			

Les ensembles enzymatiques participant à la biosynthèse du cholestérol seraient identiques dans les deux classes de membranes, mais avec des densités de distribution propres à chacune d'elles. Si les deux membranes synthétisent chacune pour son compte leur propre cholestérol de structure, le cholestérol destiné au métabolisme général de l'organisme provient essentiellement des membranes endoplasmiques lisses du foie.

Le Tableau II (b) présente l'activité spécifique du cholestérol dans le foie et dans le plasma. Bien que, dès 20 min après l'injection du mévalonate, on observe l'équilibre entre les deux classes microsomiales, au temps 5 min le cholestérol est 2 fois moins actif dans les microsomes lisses que dans les microsomes rugueux; ceci pourrait résulter d'une dilution du cholestérol nouvellement synthétisé par le cholestérol des lipoprotéines non structurales, présentes en plus grande quantité dans les vésicules lisses. L'équilibre observé dès 1 h entre le plasma et le foie résulte des échanges rapides entre le cholestérol plasmatique et le cholestérol synthétisé par les membranes du réseau endoplasmique hépatique.

En conclusion, les données présentées dans cette note sur le réseau endoplasmique de l'hépatocyte adulte montrent que la biosynthèse du cholestérol procède dans les deux fractions lisse et rugueuse selon la même cinétique mais que le réseau lisse, relativement plus riche en enzymes que le réseau rugueux, synthétise la majeure partie du cholestérol hépatique.

*Centre de Recherches sur la Cellule Normale et Cancéreuse,
Villejuif (France)*

ANNICK PASCAUD
PIERRE AULIAC
MARC PASCAUD

1 J. CHAUCHEAU, *Ann. Nutr. Aliment.*, 14 (1960) 37.

2 J. CHAUCHEAU ET F. DECLOITRE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, à paraître.

3 L. ERNST, P. SIEKEVITZ ET G. E. PALADE, *J. Cell Biol.*, 15 (1962) 541.

4 N. W. DITULLIO, C. S. JACOBS ET W. L. HOLMES, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 354.

5 D. STEINBERG, *Metabolism of Lipids as Related to Atherosclerosis*, Ch. C. Thomas, Springfield, Ill., 1963, p. 207.

Reçu le 27 novembre, 1967

Biochim. Biophys. Acta, 150 (1968) 326-328

BBA 71016

The rates of action of K^+ and ouabain on the sodium pump in squid axons

It is now known that in nerve and red blood cells there are at least two modes of operation of the sodium pump^{1,2}. In one mode internal Na^+ is exchanged for external K^+ and in the other internal Na^+ is exchanged for external Na^+ . Both processes are dependent on metabolic energy and are inhibited by the cardiac glycoside ouabain. Na^+-Na^+ exchange is only seen in partially-poisoned squid axons¹ and in the unpoisoned axon 50-90 % of the resting Na^+ efflux is dependent on external K^+ . For a proper understanding of the pump mechanism, it is important to know whether

Abbreviations: 10 K(Na)ASW, artificial sea water (composition in mM: NaCl, 460; KCl, 10; $MgCl_2$, 55; $CaCl_2$, 11; $NaHCO_3$, 2.5); 0 K(Na)ASW, contains no KCl; 100 K(Na)ASW, contains in mM: NaCl, 400 and KCl, 100.

Biochim. Biophys. Acta, 150 (1968) 328-330