

BBA 75422

PHOSPHOPROTEINES DES MEMBRANES PLASMIQUES ISOLEES
DE FOIE DE RATPHOSPHORYLATION PAR LE $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

CHRISTIANE BLAT ET LOUISE HAREL

Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Villejuif (France)

(Reçu le 21 Octobre, 1969)

SUMMARY

Phosphoproteins of plasma membranes from rat-liver cells. Phosphorylation by $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

Recently we have characterized in phosphoproteins of plasma membranes from rat-liver cells three different sorts of phosphorylated groups: alkali-unstable phosphoserine and phosphothreonine, acid-unstable phosphohistidine and acylphosphate group unstable in hydroxylamine.

It is shown here that the three groups were phosphorylated when the membranes were incubated with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, during 30 sec. The degree of phosphorylation depended on conditions of incubation: 90 % of the incorporated radioactivity was in acylphosphate phosphoproteins when the membranes were incubated at 0° with a low concentration of Mg^{2+} . When the membranes were incubated at 25° with Mg^{2+} (5 mM) only 43 % of the incorporated radioactivity was hydroxylamine-unstable, 41 % was acid-unstable and 16 % alkali-unstable.

Chase experiments have shown that the turnover of phosphate of the acylphosphate group was faster than that of phosphate of phosphohistidine. In contrast the phosphate of phosphoserine and phosphothreonine appeared to be relatively stable.

Phosphorylation of acylphosphate and phosphohistidine phosphoproteins was especially Na^+ -, K^+ -dependent and was inhibited by ouabain as is $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-dependent ATPase}$ of the membranes.

Our observations are consistent with the hypothesis that acylphosphate-bound phosphoproteins are related in the Na^+-K^+ active transport across cell membranes. Our results suggest that ATP may not be the immediate precursor of phosphate of phosphoserine and phosphohistidine. In this case phosphorylation of these groups would be indirectly dependent on K^+ and ouabain.

INTRODUCTION

Nous avons mis en évidence récemment dans les protéines des membranes plasmiques isolées de foie de rat¹, 3 groupes de résidus phosphorylables: des résidus à liaison acylphosphate dont la liaison phosphate est hydrolysée spécifiquement par l'hydroxylamine, des résidus phosphosérine et phosphothréonine dont la liaison phos-

phate est hydrolysée en milieu alcalin et des résidus phosphohistidine dont la liaison phosphate est hydrolysée en milieu acide. Les résultats obtenus précédemment montraient la rapidité de la phosphorylation des résidus à liaison phosphate alcalinolabile et acidolabile qui présentaient, 0.5 h après l'injection de ^{32}P aux animaux, une radioactivité maximale. Dans les mêmes conditions les résidus à liaison acylphosphate étaient très peu marqués. Cependant ce dernier résultat pouvait être la conséquence d'une hydrolyse de la liaison phosphate au cours de la préparation des membranes.

Les travaux de SKOU², POST *et al.*³, NAGANO *et al.*⁴, HOKIN *et al.*⁵ ont montré que les ions Na^+ stimulent la phosphorylation des protéines d'une préparation d'ATPase qui contient généralement un mélange de microsomes et de fragments de membrane plasmique de rein ou de cerveau. Les ions K^+ activent la déphosphorylation de ces protéines et l'ouabaine, inhibiteur spécifique de la pompe Na^+-K^+ , diminue la phosphorylation observée en présence de Na^+ . Ces résultats ont incité les auteurs²⁻¹⁰ à penser que certaines phosphoprotéines et plus particulièrement les phosphoprotéines à liaison acylphosphate des membranes pourraient être des intermédiaires intervenant dans le transport du Na^+ et du K^+ .

Il nous a semblé intéressant d'étudier *in vitro* la phosphorylation des différents groupes phosphorylables des protéines de membranes plasmiques, isolées de foie de rat, ce travail n'ayant pas encore été fait à notre connaissance.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé des rats mâles Wistar (souche Commentry) âgés de 3-4 mois, mis à jeun 18 h avant le sacrifice. En général 10 animaux étaient sacrifiés par expérience.

Les membranes plasmiques de foie étaient préparées comme précédemment¹ selon la technique de EMMELOT *et al.*¹¹. Après purification par centrifugation sur gradient de saccharose, les membranes étaient lavées à 0° dans une solution de bicarbonate de sodium (1 mM), additionnée ou non d'EDTA (0.3 mM).

Après centrifugation, les membranes étaient remises en suspension dans une solution de NaCl ou de KCl isotonique et incubées en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique et filtré sur Millipore avant utilisation. Les conditions d'incubation sont indiquées dans les commentaires des tableaux.

Détermination de la radioactivité des différents résidus protéiques phosphorylables

Les réactions sont arrêtées à 0° par addition de 0.1 vol. d'acide perchlorique à 60 % (poids/volume). L'acidoinsoluble est lavé à 0° à l'acide trichloracétique à 10 % contenant de l'ATP (0.6 mM) et du phosphate minéral (0.8 mM). Sur l'acidoinsoluble on détermine successivement la radioactivité des différents résidus phosphorylés.

Le précipité est remis en suspension dans du tampon acétate 0.1 M (pH 5.4) et traité par l'hydroxylamine selon la technique déjà décrite¹. La suspension est ensuite précipitée à 0° avec 0.1 vol. d'acide perchlorique à 60 % et centrifugée. La radioactivité trouvée dans le surnageant correspond à celle des résidus à liaison acylphosphate.

Le culot est ensuite lavé à 0° à l'acide trichloracétique à 10 % pour éliminer toute contamination radioactive, puis il est soumis à une hydrolyse acide (15 min à 95° en présence d'acide perchlorique à 5 %). La radioactivité mesurée sur le sur-

nageant après centrifugation correspond à la radioactivité des résidus à liaison phosphate acidolabile. Cependant ce traitement peut hydrolyser 15 % du phosphate des résidus à liaison phosphate alcalinolabile. L'acidoinsoluble est encore lavé à 0° à l'acide trichloracétique à 10 % puis traité à l'alcool pour extraire les lipides qui pourraient gêner le dosage des protéines. Le culot est enfin solubilisé en milieu alcalin (18 h à 37° en milieu NaOH 0.6 M) pour le dosage de la radioactivité des résidus à liaison phosphate alcalinolabile. Sur cette fraction on dose aussi les protéines par la technique de Lowry modifiée par FISZER¹².

Dans nos conditions expérimentales, les phospholipides des membranes ne sont pas marqués et nous n'avons pas pu mettre en évidence d'acides nucléiques ni par le marquage ni par le dosage des nucléotides, seules les protéines sont marquées, la radioactivité totale des 3 groupes de résidus phosphorylables représente plus de 95 % de la radioactivité totale incorporée dans les protéines des membranes.

Les radioactivités trouvées lorsque l'albumine est incubée à la place des membranes et traitée dans les mêmes conditions, ont été systématiquement soustraites de celles obtenues avec les membranes.

Le phosphate est dosé par la technique de MACHEBOEUF ET DELSAL¹³.

Identification des acides aminés phosphorylés

Phosphosérine et phosphothréonine. Après l'arrêt des réactions par l'acide perchlorique à 0°, l'acidoinsoluble est traité par l'hydroxylamine, soumis à l'hydrolyse acide à 95° et traité à l'alcool comme il est décrit dans le paragraphe précédent. Les protéines, additionnées de phosphosérine et de phosphothréonine non marquées, sont soumises à une hydrolyse acide ménagée (48 h à 37°, HCl 12 M). L'hydrolysate est analysé par ionophorèse sur papier selon la méthode déjà décrite¹.

Phosphohistidine et phospholysine. Après précipitation des membranes à 0° par l'acide perchlorique, l'acidoinsoluble est traité par l'hydroxylamine puis par l'alcool et soumis à une hydrolyse alcaline (18 h à 37°, KOH 1 M). L'hydrolysate est ensuite traité et analysé par ionophorèse sur papier¹.

Les bandes de papier sont révélées à la ninhydrine et mises sous film Kodirex pour déterminer l'emplacement des composés radioactifs.

RÉSULTATS

Phosphorylation des phosphoprotéines des membranes

Influence des ions Mg^{2+} . Les membranes sont incubées pendant 30 sec en présence de Na^+ et de $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ (Tableau I), puis précipitées par l'acide perchlorique et les radioactivités des résidus phosphorylés sont déterminées.

On constate que les différentes phosphoprotéines des membranes sont phosphorylées en 30 sec (Tableau I). A 0° les phosphoprotéines à liaison acylphosphate sont nettement plus marquées que les autres phosphoprotéines. L'élévation de la température à 25° augmente d'une manière générale la phosphorylation de tous les résidus phosphorylables mais plus particulièrement celle des résidus à liaison phosphate acidolabile et alcalinolabile.

Lorsque les membranes sont incubées en absence de Mg^{2+} la phosphorylation des phosphoprotéines à liaison acylphosphate est nettement supérieure à celle des autres phosphoprotéines (Tableau I). En particulier à 0°, 90 % de la radioactivité

TABLEAU I

INFLUENCE DU Mg^{2+} SUR LA PHOSPHORYLATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

Les membranes (environ 0.3 mg de protéine) sont incubées pendant 30 sec en présence de tampon glycylglycine 50 mM (pH 7.4), de tampon phosphate de sodium 3 mM (pH 7.4), de NaCl 115 mM, de $MgCl_2$ 5 mM dans les essais (+ Mg^{2+}). De plus dans les essais à 0° la concentration en $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ est de 0.1 mM (environ $4 \cdot 10^6$ coups/min par μmole), dans les essais à 25° elle est de 1 mM (environ $1 \cdot 10^6$ coups/min par μmole).

| Conditions | <i>pmoles de P incorporées par mg protéines</i> | | |
|------------------|---|--|---|
| | <i>Résidus à liaison acylphosphate</i> | <i>Résidus à liaison phosphate acidolabile</i> | <i>Résidus à liaison phosphate alcalinolabile</i> |
| 0°, — Mg^{2+} | 32 | 3.2 | 1 |
| — Mg^{2+} | 62 | 15 | 17 |
| 25°, — Mg^{2+} | 120 | 43 | 7.3 |
| — Mg^{2+} | 251 | 236 | 93 |

totale incorporée dans les protéines des membranes se trouvent dans les résidus à liaison acylphosphate. Lorsque les membranes sont incubées en présence de Mg^{2+} (5 mM), la phosphorylation de toutes les phosphoprotéines augmente. Cependant, la phosphorylation des résidus à liaison phosphate acidolabile et alcalinolabile est multipliée respectivement par 5 et par 15 en présence de Mg^{2+} alors que celle des résidus à liaison acylphosphate n'est que doublée.

Ainsi l'addition d'ions Mg^{2+} stimule de manière différente la phosphorylation des diverses phosphoprotéines des membranes plasmiques.

Identification des acides aminés phosphorylés in vitro. Nous avons vérifié qu'après incubation des membranes en présence de $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$, la phosphosérine, la phosphothréonine et la phosphohistidine des protéines membranaires sont marquées.

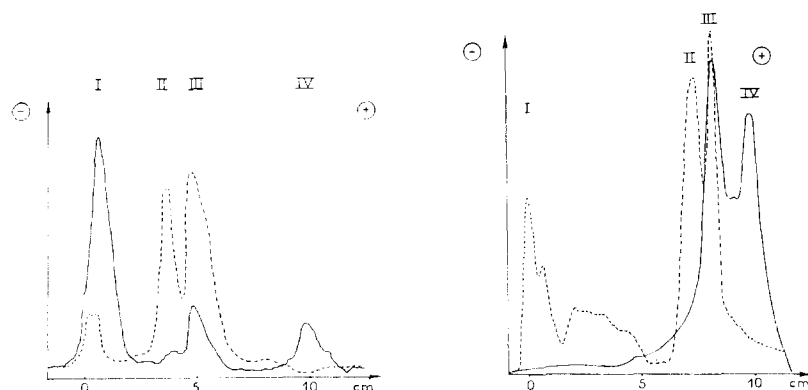


Fig. 1. Diagramme obtenu après exploration au "chromoscan" de la bande de papier révélée à la ninhydrine et de son autoradiographie après ionophorèse sur papier de l'hydrolysé acide des protéines des membranes. I, phosphopeptide; II, phosphothréonine; III, phosphosérine; IV, ^{32}P . -----, ninhydrine; ———, radioactivité.

Fig. 2. Diagramme obtenu après exploration au "chromoscan" de la bande de papier révélée à la ninhydrine et de son autoradiographie après ionophorèse sur papier de l'hydrolysé alcalin des protéines des membranes. I, origine de l'ionophorèse; II, phospholysine; III, phosphohistidine; IV, ^{32}P . -----, ninhydrine; ———, radioactivité.

Les membranes sont incubées à 25° pendant 30 sec en présence de [γ - ^{32}P]ATP, de Na^+ et de Mg^{2+} (5 mM). Elles sont ensuite précipitées par l'acide perchlorique, traitées à l'hydroxylamine et hydrolysées soit en milieu acide soit en milieu alcalin selon les techniques décrites ci-dessus.

La phosphosérine et la phosphothréonine sont mises en évidence par ionophorèse sur papier de l'hydrolysate acide¹. La Fig. 1 représente les diagrammes densitométriques de la bande de papier révélée à la ninhydrine et de son autoradiographie.

Au pic de phosphosérine (Pic III) correspond un pic de radioactivité. La phosphothréonine (Pic II) est moins marquée. Dans ces conditions d'hydrolyse ménagée, des phosphoprotéines ne sont pas hydrolysées. Elles migrent peu (Pic I). Le Pic IV est du $^{32}\text{P}_i$ provenant pour l'essentiel d'une hydrolyse partielle de la phosphosérine et de la phosphothréonine.

La phosphohistidine est mise en évidence par ionophorèse sur papier de l'hydrolysate alcalin¹. La Fig. 2 montre les diagrammes densitométriques de la bande de papier révélée à la ninhydrine et de l'autoradiographie. On constate que le Pic III de la phosphohistidine coïncide avec un pic de radioactivité alors que la phospholysine (Pic II) n'est pas marquée. Entre le Pic III de la phosphohistidine et le Pic IV du $^{32}\text{P}_i$, il existe un composé radioactif faiblement marqué et qui correspond vraisemblablement au Pic X mis en évidence *in vivo*¹.

Influence de la température sur la cinétique d'incorporation du phosphate dans les protéines des membranes

Nous avons remarqué des différences importantes dans les variations de la phosphorylation des 3 groupes de résidus phosphorylables, en fonction de la température d'incubation. Nous avons étudié à 0° et à 25° la cinétique (entre 5 et 60 sec) d'incorporation du ^{32}P dans les phosphoprotéines membranaires. Les membranes sont incubées en présence de Na^+ , de Mg^{2+} et de [γ - ^{32}P]ATP dans les conditions décrites dans le commentaire de la Fig. 3.

L'élévation de la température de 0 à 25° augmente la vitesse de phosphorylation de toutes les phosphoprotéines. Cependant aux temps courts (5 sec) la vitesse de phosphorylation des résidus phosphohistidine est particulièrement augmentée puisqu'elle est multipliée par 15, tandis que, dans les mêmes conditions, la vitesse de phosphorylation de la phosphosérine et de la phosphothréonine est multipliée par 6 environ et celle des résidus à liaison acylphosphate est multipliée par 2.5. Les variations de la température modifient la répartition de la radioactivité dans les 3 groupes de résidus phosphorylables. Ainsi l'activité des enzymes phosphorylant les résidus à liaison phosphate acidolabile est beaucoup plus sensible aux variations de la température que celles des autres kinases.

Vitesse de renouvellement du phosphate des phosphoprotéines des membranes plasmiques

Il était intéressant de suivre le renouvellement du phosphate des groupes phosphorylables par des expériences de "chasse". Les membranes sont incubées à 25° en présence de Na^+ , Mg^{2+} et de [γ - ^{32}P]ATP (0.1 mM). Dans certaines expériences on ajoute, au cours de l'incubation, de l'ATP non marqué en concentration finale 10 mM, les réactions sont ensuite arrêtées par l'acide perchlorique. La radioactivité incorporée dans les différents groupes de protéines est déterminée.

Lorsque les membranes sont incubées en présence d'une forte concentration en

Mg^{2+} (5 mM) et d'une concentration limite d'ATP (0.1 mM), la concentration du milieu d'incubation en ATP diminue rapidement, conséquence de l'activité ATPasique élevée des membranes en présence de cette concentration en Mg^{2+} . De même la radioactivité des phosphoprotéines à liaison acylphosphate diminue très rapidement entre 5 et 30 sec (Fig. 4) puis reste stable entre 30 et 90 sec (Fig. 5A) comme s'il existait deux types de résidus à liaisons acylphosphates qui se renouvellent à des vitesses différentes.

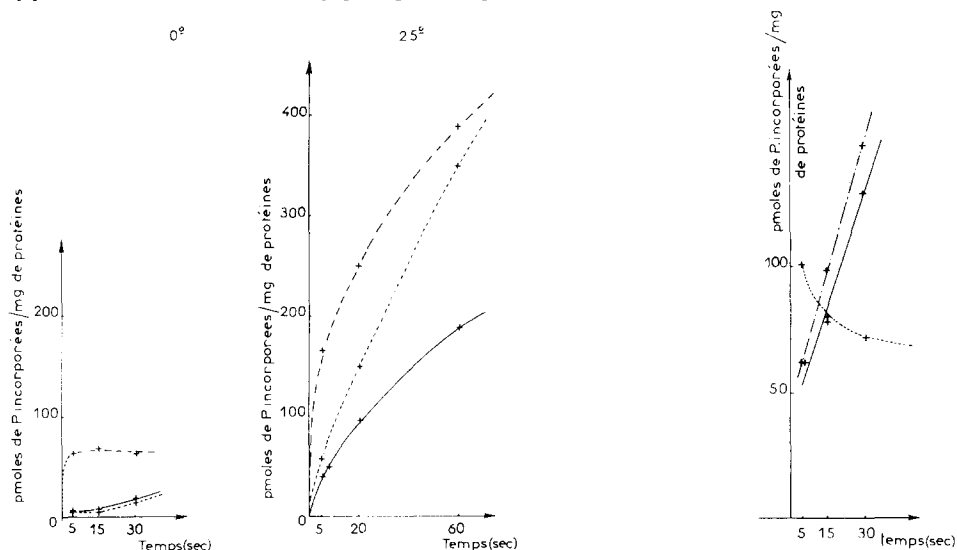


Fig. 3. Cinétique de la phosphorylation des phosphoprotéines des membranes à 0° et à 25°. Les membranes (environ 0.3 mg de protéine) sont incubées en présence de tampon glycylglycine 50 mM (pH 7.4), de tampon phosphate de sodium 3 mM, de NaCl 115 mM, de $MgCl_2$ 5 mM. A 0° la concentration du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est de 0.1 mM (environ $4 \cdot 10^6$ coups/min par μmole), à 25° elle est de 1 mM (environ $1 \cdot 10^6$ coups/min par μmole). —, résidus à liaison acylphosphate; — — —, résidus à liaison phosphate alcalinolabile; ·····, résidus à liaison phosphate acidolabile.

Fig. 4. Cinétique de la phosphorylation des phosphoprotéines des membranes à 25° en présence de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP (0.1 mM) (environ $4 \cdot 10^6$ coups/min par μmole). Le milieu d'incubation est le même que celui décrit sous la Fig. 3. ·····, résidus à liaison acylphosphate; —, résidus à liaison phosphate alcalinolabile; — — —, résidus à liaison phosphate acidolabile.

Dans ces mêmes conditions d'incubation, entre 5 et 30 sec, alors que la radioactivité des phosphoprotéines à liaison acylphosphate diminue, celle des phosphoprotéines à liaison phosphate acidolabile et alcalinolabile augmente en fonction du temps. Ces résultats ont été vérifiés plusieurs fois et suggèrent que l'ATP n'est pas le précurseur immédiat de la phosphorylation des phosphoprotéines à liaison phosphate acidolabile et alcalinolabile. Cette hypothèse sera discutée plus loin.

Lorsque de l'ATP non radioactif est ajouté à la concentration de 10 mM après 5 sec d'incubation des membranes en présence d'ATP marqué (0.1 mM), la radioactivité des phosphoprotéines à liaison acylphosphate est diminuée de 80 % par rapport à celle des témoins incubés pendant le même temps (5 + 3 sec) en présence d'ATP marqué non dilué (Fig. 5A).

Si l'ATP non marqué est ajouté après 30 sec d'incubation des membranes en présence d'ATP marqué, la radioactivité des phosphoprotéines à liaison phosphate acidolabile diminue de 35 % en 60 sec (Fig. 5B). Celle des phosphoprotéines à liaison

phosphate alcalinolabile varie peu (Fig. 5C). Alors que dans les mêmes conditions la radioactivité des phosphoprotéines à liaison acylphosphate est diminuée de plus de 60 %.

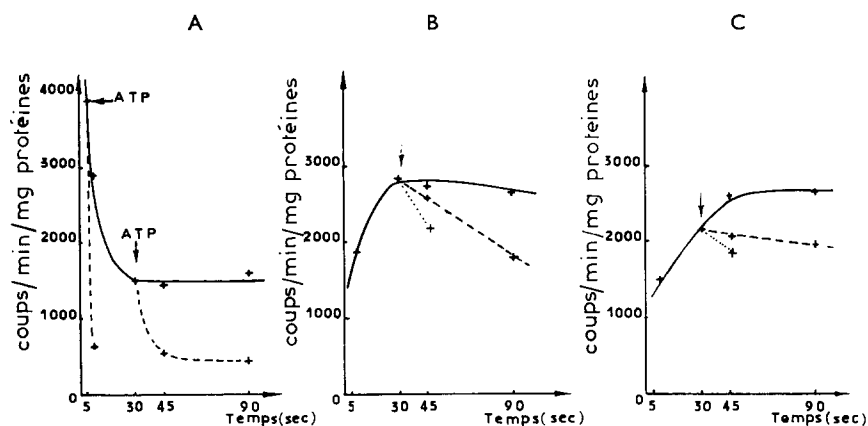


Fig. 5. Expériences de "chasse". Les membranes sont incubées à 25° en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (0.1 mM) (environ $4 \cdot 10^6$ coups/min par μmole). Le milieu d'incubation est le même que celui décrit sous la Fig. 3. Aux temps indiqués par les flèches on ajoute de l'ATP non marqué (en concentration finale 10 mM) additionné ou non de KCl (en concentration finale 50 mM). On mesure la radioactivité des résidus à liaison acylphosphate (A), des résidus à liaison phosphate acidolabile (B) et des résidus à liaison phosphate alcalinolabile (C). -----, radioactivité après addition d'ATP non marqué; ······, radioactivité après addition de KCl et d'ATP non marqué.

Ces résultats soulignent la grande rapidité du renouvellement du phosphate des phosphoprotéines à liaison acylphosphate. Le phosphate des phosphoprotéines à liaison phosphate acidolabile se renouvelle également mais moins rapidement que celui des phosphoprotéines à liaison acylphosphate et beaucoup plus rapidement que celui des phosphoprotéines à liaison phosphate alcalinolabile.

Influence des ions Na^+ , K^+ et de l'ouabaïne sur la phosphorylation des protéines des membranes

Nous avons étudié l'influence des ions Na^+ , K^+ et de l'ouabaïne sur la phosphorylation des protéines membranaires et sur l'ATPase qui requiert des ions Na^+ et K^+ pour être active (ATPase Na^+-K^+), pour essayer de mettre en évidence une corrélation entre ces deux activités. L'ouabaïne inhibiteur de la pompe Na^+-K^+ devrait inhiber l'activité ATPasique dépendant du Na^+ et du K^+ comme la phosphorylation des protéines.

Nous avons vérifié que l'ouabaïne inhibe l'ATPase Na^+-K^+ . Si les membranes sont incubées en absence d'ions Na^+ (Milieu II, Tableau II) 74 μmoles de P_i sont libérées par mg de protéines et par h (Tableau II). Si les membranes sont incubées en présence d'ions Na^+ (Milieu I) 84.5 μmoles de P_i sont libérées par mg de protéines et par h. Autrement dit la présence de Na^+ a augmenté l'activité ATPasique des membranes. Cette augmentation a été attribuée à l'activité de l'ATPase dépendant du Na^+ et du K^+ (ref. 14). On peut voir sur le Tableau II que l'addition d'ouabaïne (1 mM) au milieu contenant Mg^{2+} , Na^+ et K^+ annule l'activité ATPasique dépendant du Na^+ et du K^+ . Ces résultats confirment ceux de EMMELOT ET BOS¹⁴.

Les effets du Na^+ , du K^+ et de l'ouabaine sur la phosphorylation des protéines à liaison acylphosphate ont été étudiés à 0° ou à 25° en présence de quantités variables de Mg^{2+} (Tableau III). Lorsque les ions Na^+ sont remplacés par les ions K^+ , la phosphorylation des phosphoprotéines à liaison acylphosphate diminue dans tous les cas. De même l'ouabaine en présence de Na^+ inhibe l'incorporation du phosphate dans ces protéines.

L'influence des ions Na^+ , K^+ et de l'ouabaine sur la phosphorylation des phosphoprotéines à liaison phosphate acidolabile et alcalinolabile a été étudiée à 25° en présence de quantités variables de Mg^{2+} . L'ouabaine, dans toutes les expériences, inhibe nettement la phosphorylation de la phosphohistidine (Tableau IV) et beaucoup moins nettement celle de la phosphosérine (Tableau V). Lorsque le Na^+ du milieu d'incubation est remplacé par du K^+ la phosphorylation des résidus à liaison phosphate acidolabile (Tableau IV) est fortement diminuée, celle des résidus à liaison phosphate alcalinolabile est moins réduite dans ces conditions (Tableau V). Par contre,

TABLEAU II

ACTIVITÉ ATPasique DES MEMBRANES PLASMIQUES

Les membranes (environ 0.4 mg de protéines) sont incubées pendant 15 min à 37° dans un volume total de 1.4 ml. Milieu I: NaCl 66 mM, KCl 34 mM, MgCl_2 5 mM, Tris 25 mM (pH 7.3), ATP disodique 10 mM. Milieu II: KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, Tris 50 mM (pH 7.3), ATP disodique 10 mM. L'ouabaine est ajoutée à la concentration de 1 mM.

| Milieu | $\mu\text{moles de phosphate hydrolysées par mg de protéines et par h}$ |
|---------------------|---|
| Milieu I | 84.5 |
| Milieu II | 74.4 |
| Milieu I + ouabaine | 71 |

TABLEAU III

INFLUENCE DES IONS Na^+ , K^+ ET DE L'OUABAINÉ SUR LA PHOSPHORYLATION DES PHOSPHOPROTÉINES À LIAISON ACYLPHOSPHATE

Les membranes (environ 0.3 mg de protéines) sont incubées pendant 30 sec en présence de tampon glycylglycine 50 mM (pH 7.4). On ajoute: dans les milieux Na^+ , du tampon phosphate de sodium 3 mM (pH 7.4) et du NaCl 115 mM; dans les milieux K^+ , du tampon phosphate de K^+ 3 mM (pH 7.4) et du KCl 115 mM. Dans les essais à 0° et à 25° en absence de Mg^{2+} la concentration du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est de 0.1 mM (environ $4 \cdot 10^6$ coups/min par μmole), et dans les essais à 25° en présence de Mg^{2+} la concentration de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est de 1 mM (environ $1 \cdot 10^6$ coups/min par μmole). Concentration de l'ouabaine 1 mM.

| Temp. | Exp. No. | Concentration de Mg^{2+} (M) | $\mu\text{moles de P}$ incorporées par mg de protéines | | Inhibition due au K^+ (%) | $\mu\text{moles de P}$ incorporées par mg de protéines | | Inhibition due à l'ouabain. (%) |
|-------|-------------|---|--|--------------|--|--|----|--|
| | | | Na^+ | K^+ | | $\text{Na}^+ + \text{ouabaine}$ | | |
| 0° | I | $5 \cdot 10^{-5}$ | 19.5 | 9 | 54 | 9 | 54 | |
| | II | $5 \cdot 10^{-5}$ | 23.5 | 18 | 23 | 18.5 | 21 | |
| 25° | III | 0 | 34.5 | 20 | 42 | 25.5 | 26 | |
| | IV | $5 \cdot 10^{-3}$ | 251 | 162 | 36 | 163 | 35 | |

TABLEAU IV

INFLUENCE DES IONS Na^+ , K^+ ET DE L'OUABAÏNE SUR LA PHOSPHORYLATION DES PHOSPHOPROTÉINES À LIAISON PHOSPHATE ACIDOLABILE

Les membranes (environ 0.3 mg de protéines) sont incubées pendant 30 sec à 25° dans les mêmes conditions expérimentales que celle décrites sous le Tableau III. Dans les essais en présence de MgCl_2 $5 \cdot 10^{-5}$ M la concentration du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est de 0.1 mM (environ $4 \cdot 10^6$ coups/min par μmole), et dans les essais en présence de MgCl_2 5 mM la concentration du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est de 1 mM (environ $1 \cdot 10^6$ coups/min par μmole).

| Exp. No. | Concentration de Mg^{2+} (M) | pmoles de P incorporées par mg de protéines | | Inhibition due au K^+ (%) | pmoles de P incorporées par mg de protéines | | Inhibition due à l'ouabaine (%) |
|-------------|---|---|--------------|--|---|----|--|
| | | Na^+ | K^+ | | $\text{Na}^+ + \text{ouabaine}$ | | |
| I | $5 \cdot 10^{-5}$ | 53 | 31 | 43 | 41 | 23 | |
| II | $5 \cdot 10^{-5}$ | 19 | 6.4 | 66 | 9.6 | 49 | |
| III | $5 \cdot 10^{-3}$ | 236 | 154 | 35 | 100 | 58 | |

TABLEAU V

INFLUENCE DES IONS Na^+ , K^+ ET DE L'OUABAÏNE SUR LA PHOSPHORYLATION DES PHOSPHOPROTÉINES À LIAISON PHOSPHATE ALCALINOLABILE

Les membranes (environ 0.3 mg de protéines) sont incubées pendant 30 sec à 25° dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites sous le Tableau IV.

| Exp. No. | Concentration de Mg^{2+} (M) | pmoles de P incorporées par mg de protéines | | Inhibition due au K^+ (%) | pmoles de P incorporées par mg de protéines | | Inhibition due à l'ouabaïne (%) |
|-------------|---|---|--------------|--|---|--|--|
| | | Na^+ | K^+ | | $\text{Na}^+ + \text{ouabaïne}$ | | |
| I | 0 | 4.5 | 4 | 11 | 3.9 | | 13 |
| II | $5 \cdot 10^{-5}$ | 45 | 33 | 26 | 39 | | 13 |
| III | $5 \cdot 10^{-3}$ | 88 | 70 | 20 | 58 | | 34 |

après 30 sec d'incubation des membranes dans le milieu sodique, l'addition de K^+ n'entraîne pas une déphosphorylation importante de ces phosphoprotéines pendant les 15 sec qui suivent (Figs. 5B, 5C). Dans cette expérience la "rephosphorylation" des protéines par l'ATP radioactif avait été éliminée par addition simultanée d'ATP non marqué.

Ainsi la phosphorylation de toutes les protéines et particulièrement celle des résidus à liaison acylphosphate et à liaison phosphate acidolabile est plus élevée en présence de Na^+ que de K^+ et est inhibée par l'ouabaïne, comme l'activité ATPasique dépendant du Na^+ et du K^+ .

DISCUSSION

Nous montrons que, dans les membranes plasmiques de foie de rat, des kinases phosphorylent *in vitro* en quelques secondes, par l'intermédiaire de l'ATP, non seulement des protéines à liaison acylphosphate, à renouvellement rapide, mais aussi des protéines à liaisons phosphates acidolabile et alcalinolabile, beaucoup plus stables. Le degré de phosphorylation des différentes protéines dépend essentiellement des con-

ditions d'expériences. Dans certaines conditions, en particulier à 0° et sans addition de Mg^{2+} , seuls les résidus à liaison acylphosphate sont phosphorylés. Si l'incubation des membranes est faite à 25° et en présence de Mg^{2+} (5 mM) les résidus phosphohistidine sont presque autant marqués que les résidus à liaison acylphosphate. Ainsi la phosphorylation des phosphoprotéines à résidus phosphohistidine ne pouvait pas être observée par de nombreux auteurs^{3-5,7,9} qui incubaient leur préparation à 0° ou en présence de Mg^{2+} en concentration inférieure à 5 mM. Par contre nos résultats sont à rapprocher de ceux obtenus très récemment par SKOU ET HILBERG¹⁶ montrant qu'on pouvait mettre en évidence dans les microsomes de cerveau deux sortes de phosphoprotéines dont les liaisons phosphates se renouvellent à des vitesses différentes simplement en faisant varier la concentration en Mg^{2+} du milieu d'incubation des microsomes.

Certaines des phosphoprotéines membranaires, en particulier les phosphoprotéines à liaison acylphosphate, pourraient être impliquées dans le transport des ions Na^{+} et K^{+} à travers la membrane. En effet les expériences de "chasse" montrent que leur phosphore a un renouvellement très rapide, compatible avec un rôle de transporteur. De plus la phosphorylation des résidus à liaison acylphosphate est réduite en moyenne de 40 % lorsque les ions Na^{+} sont remplacés par les ions K^{+} en concentration égale; cette réduction est inférieure à celle obtenues par NAGANO *et al.*⁴, et POST *et al.*³. Cependant ces auteurs ont travaillé avec des microsomes ou des préparations non purifiées de membranes provenant de cerveau ou de rein, de porc ou de cobaye. Les différences observées dépendent peut-être de l'organe ou de l'animal étudié, comme semblent l'indiquer les résultats de BADER *et al.*¹⁵. D'autre part, il existe vraisemblablement, dans les membranes plasmiques, différents enzymes, ATPases ou phosphokinases, dont l'activité indépendante du Na^{+} et du K^{+} est éliminée dans les conditions où ont travaillé d'autres auteurs: POST *et al.*³ laissent vieillir à 2° leur préparation d'"ATPase", NAGANO *et al.*⁴ ajoutent de l'iodure de sodium au cours de l'isolement des microsomes. Après ces traitements 80 % environ de l'activité ATPasique résiduelle dépend du Na^{+} et du K^{+} . Dans nos conditions 13 % de l'activité ATPasique des membranes purifiées dépend du Na^{+} et du K^{+} . Nous avons constaté comme EMMELOT ET BOS¹⁴ que l'ouabaine inhibe entièrement cette activité. Nous montrons de plus que l'ouabaine diminue la phosphorylation des résidus à liaison acylphosphate. L'ensemble de ces résultats militent en faveur de l'hypothèse suivant laquelle les phosphoprotéines à liaison acylphosphate interviendraient dans le transport des ions Na^{+} et K^{+} (réfs. 4, 5, 8, 9).

La phosphorylation des phosphoprotéines à phosphohistidine est également inhibée par addition d'ouabaine ou lorsque les ions Na^{+} du milieu d'incubation sont remplacés par les ions K^{+} (inhibition de 48 % en moyenne). Ces faits laissent supposer que ces phosphoprotéines pourraient être aussi des intermédiaires dans le transport des ions à travers la membrane. Toutefois nos résultats tendant à montrer que l'ATP n'est pas le précurseur immédiat des phosphoprotéines à liaison phosphate acidolabile et alcalinolabile vont à l'encontre de cette hypothèse. En effet, lorsque les membranes sont incubées en présence d'une quantité limite d'ATP la radioactivité des phosphoprotéines à liaison acylphosphate diminue après 5 sec d'incubation, ce qui s'explique par un épuisement du milieu en ATP. Par contre dans ces conditions, la radioactivité des autres phosphoprotéines augmente en fonction du temps comme si l'ATP n'était pas le précurseur immédiat du phosphate de ces phosphoprotéines. Dans le but de

vérifier que le phosphate provenant de l'hydrolyse de l'ATP ne pouvait pas être ce précurseur, nous avons incubé des membranes pendant 30 sec en présence d'une concentration de $H_3^{32}PO_4$ équivalente à celle du $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ et de même radioactivité spécifique. La radioactivité de tous les résidus était nettement diminuée, en particulier celle des résidus à liaison phosphate acidolabile était diminuée par un facteur de 10, lorsque l'ATP était remplacé par le phosphate. Celle des résidus à liaison alcalinolabile était négligeable. Le phosphate minéral n'est donc pas le précurseur du phosphate de ces phosphoprotéines. Ces dernières sont phosphorylées à partir d'un autre intermédiaire que nous n'avons pas pu déceler.

En ce qui concerne les phosphoprotéines à liaison phosphate alcalinolabile elles ne semblent pas être impliquées dans le transport des ions Na^+ et K^+ , puisque la vitesse de renouvellement de leur phosphate est faible et qu'elle est peu diminuée par l'ouabaine ou par le remplacement du Na^+ du milieu d'incubation par le K^+ .

En conclusion il existe dans les protéines des membranes plusieurs types de résidus phosphorylables dont les vitesses de phosphorylation varient différemment selon les conditions d'expériences. Cependant seule la phosphorylation des résidus à liaison acylphosphate semble être directement liée à l'activité ATPasique dépendant du Na^+ et du K^+ et aux transports de ces ions à travers la membrane.

REMERCIEMENTS

Nous remercions A. Kepes pour ses discussions fructueuses.

Ce travail a été effectué avec la collaboration technique de M. de Monti et a bénéficié de l'aide financière apportée par le Commissariat à l'Energie Atomique en ce qui concerne la fourniture de molécules marquées.

RÉSUMÉ

Nous avons mis récemment en évidence dans les protéines des membranes plasmiques de foie de rat 3 groupes de résidus phosphorylables: résidus à liaison acylphosphate, résidus à liaison phosphate acidolabile et résidus à liaison phosphate alcalinolabile. Nous montrons que ces 3 groupes sont phosphorylés lorsque les membranes sont incubées pendant 30 sec, en présence de $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$. Le degré de phosphorylation de ces résidus dépend des conditions d'incubation. Si l'incubation a lieu à 0° sans addition de Mg^{2+} , 90 % de la radioactivité incorporée dans les protéines se trouvent sur les résidus à liaison acylphosphate. Par contre si l'incubation a lieu à 25° et en présence de Mg^{2+} (5 mM), 43 % seulement de la radioactivité incorporée sont liés aux résidus à liaison acylphosphate, 41 % se trouvent sur les résidus à liaison phosphate acidolabile et 16 % sur les résidus à liaison phosphate alcalinolabile.

Les expériences de chasse montrent que le renouvellement du phosphate des résidus à liaison acylphosphate est beaucoup plus rapide que celui de la phosphohistidine, lui-même beaucoup plus rapide que celui du phosphate de la phosphosérine et de la phosphothréonine.

La phosphorylation des phosphoprotéines à liaison acylphosphate et à résidus phosphohistidine est toujours plus élevée en présence de Na^+ qu'en présence de K^+ à concentration égale en cation. Elle est inhibée par l'ouabaine (1 mM) comme l'activité ATPasique qui dépend du Na^+ et du K^+ .

Certaines données nous incitent à penser que l'ATP n'est pas le précurseur immédiat du phosphate de la phosphohistidine et de la phosphosérine. Si cette hypothèse était vérifiée, seule la phosphorylation des résidus à liaison acylphosphate pourrait être directement liée à l'activité ATPasique dépendant du Na^+ et du K^+ et aux transports de ces ions à travers la membrane.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. BLAT ET L. HAREL, *Biochim. Biophys. Acta*, 173 (1969) 23.
- 2 J. C. SKOU, *Physiol. Rev.*, 45 (1965) 596.
- 3 R. L. POST, A. K. SEN ET A. S. ROSENTHAL, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1437.
- 4 K. NAGANO, N. MIZUNO, M. FUJITA, Y. YASHIMA, T. NAKAO ET N. NAKAO, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 239.
- 5 L. E. HOKIN, P. S. SASTRY, P. R. GALSWORTHY ET A. YODA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 177.
- 6 W. SCHONER, R. BEUSCH ET R. KRAMER, *European J. Biochem.*, 7 (1968) 102.
- 7 S. FAHN, G. J. KOVAL ET R. W. ALBERS, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 1993.
- 8 H. BADER, A. K. SEN ET R. L. POST, *Biochim. Biophys. Acta*, 118 (1966) 106.
- 9 R. BLOSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 1957.
- 10 K. AHMED ET J. D. JUDAH, *Biochim. Biophys. Acta*, 93 (1964) 603.
- 11 P. EMMELOT, C. J. BOS, E. L. BENEDETTI ET PH. RÜMKE, *Biochim. Biophys. Acta*, 90 (1964) 126.
- 12 B. FISZER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 403.
- 13 M. MACHEBOEUF ET J. L. DELSAL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 25 (1943) 116.
- 14 P. EMMELOT ET C. J. BOS, *Biochim. Biophys. Acta*, 120 (1966) 369.
- 15 H. BADER, R. L. POST ET G. H. BOND, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 41.
- 16 J. C. SKOU ET C. HILBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 185 (1969) 198.

Biochim. Biophys. Acta, 203 (1970) 271-282