

BBA 76316

ÉTUDE DE LA FIXATION DE FAIBLE AFFINITÉ DU Ca^{2+} PAR LES MEMBRANES EXTERNE ET INTERNE DES MITOCHONDRIES ET PAR LE RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE LISSE ET RUGUEUX DE FOIE DE RAT

RENÉE TOURY*

Laboratoire des membranes biologiques, Université Paris VII, 1 rue Victor Cousin, 75005 Paris (France)

(Reçu le décembre 14, 1972)

SUMMARY

Study of low-affinity Ca^{2+} binding by rat liver inner and outer mitochondrial membrane and rough and smooth endoplasmic reticulum

Two classes of low-affinity Ca^{2+} -binding sites have been shown to exist. One type dissociates as pH rises, thereby increasing the amount of bound Ca^{2+} . The other type, which does not change in number, has an affinity for Ca^{2+} which is dependent on ionic strength. The former is possibly a phospholipid, the latter possibly a protein.

Under our experimental conditions, the inner mitochondrial membrane contained binding sites of the second class only while other membranes contain both types. Rough endoplasmic reticulum contains yet another class of sites at the ribosomal level.

INTRODUCTION

L'existence de trois formes de fixation du Ca^{2+} a été mise en évidence dans les mitochondries de nombreux tissus animaux: la fixation liée à la fourniture d'énergie nécessitant l'oxydation simultanée de substrats respiratoires, ou l'hydrolyse d'ATP, la fixation de haute affinité indépendante de la fourniture d'énergie mais spécifique du Ca^{2+} et la fixation de faible affinité non liée à la fourniture d'énergie et non spécifique du Ca^{2+} (réfs 1–3). Les deux premières font partie d'un système d'accumulation active du Ca^{2+} mettant en jeu un transporteur membranaire spécifique du Ca^{2+} dont les sites représentent la fixation de haute affinité^{4–6}.

La fixation de faible affinité a été moins étudiée. Elle semble localisée sur les membranes mitochondrielles^{3,7} et pourrait être de nature phospholipidique^{3,8,9}. Son rôle n'est pas connu pour l'instant. Certains auteurs avaient d'abord supposé qu'il s'agissait de la première étape de l'accumulation active du Ca^{2+} (réfs 10–12). Or, il a été montré ensuite que l'inhibition par la butacaïne de la fixation de faible affinité n'empêchait nullement l'accumulation du Ca^{2+} liée à l'énergie¹³. Ce pourrait donc être un phénomène indépendant ayant pour conséquence des modifications

* Adresse actuelle: Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Bâtiment 444, Faculté des Sciences 91400 Orsay, France.

structurales des membranes mitochondriales et, par suite, des variations dans les phénomènes de perméabilité dépendant de l'architecture de ces membranes.

Il nous a paru intéressant d'étudier la fixation de faible affinité du Ca^{2+} au niveau des membranes mitochondriales externe et interne isolées, de façon à en déterminer l'importance et la nature. De plus, nous avons étendu notre investigation au réticulum endoplasmique lisse et rugueux afin de vérifier si la fixation de faible affinité du Ca^{2+} pouvait être considérée, non comme un phénomène uniquement mitochondrial, mais comme un phénomène général survenant au niveau de différentes membranes biologiques.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Les membranes externe et interne des mitochondries de foie de rat sont préparées selon la technique précédemment décrite¹⁴. Le réticulum endoplasmique lisse et rugueux est préparé selon la méthode de Declotre et Chauveau¹⁵. Des essais préliminaires ayant montré que les quantités de Ca^{2+} fixées par les membranes étaient les mêmes que les préparations aient lieu en présence ou en absence d'EDTA $5 \cdot 10^{-4}$ M, nous avons omis par la suite d'en ajouter dans le saccharose 0.25 M servant à l'homogénéisation des foies de rat. Les culots de membranes purifiées sont mis en suspension dans de l'eau bi-distillée à raison de 50 mg de protéines par ml environ. Les protéines sont déterminées par la méthode du biuret¹⁶.

La fixation du Ca^{2+} s'effectue dans des tubes à centrifuger par incubation de 0.6 mg de protéines membranaires dans un milieu de volume total 2 ml contenant: 0.06 M de tampon Tris-HCl du pH indiqué et de quantités de CaCl_2 comprises entre 0.05 et 48 μmoles . La solution de CaCl_2 est préparée à partir de $^{45}\text{CaCl}_2$ (C.E.A.) dilué 10 fois avec CaCl_2 (Merck) et contient 24 $\mu\text{moles}/\text{ml}$, soit environ 16.0 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Les tubes sont placés dans un appareil à agitation continue à la température ambiante pendant 15 min, temps au bout duquel la fixation maxima est atteinte.

Les tubes sont ensuite centrifugés au froid à $10500 \times g$ (centrifugeuse Spinco modèle L, rotor 40) pendant 1 h. Le surnageant est éliminé. Les culots sont soigneusement lavés à l'eau bi-distillée, puis dissous dans 1 ml d'acide formique et additionnés de solution de Bray¹⁷. La radio-activité est mesurée à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide Packard. La quantité d'eau présente dans le culot est déterminée par différence entre le poids frais et le poids sec, et les quantités de ^{45}Ca mesurées sont diminuées de celles contenues dans l'eau du culot⁷.

Nous avons vérifié que la fixation du Ca^{2+} sur chaque membrane est proportionnelle à la quantité de protéines utilisées. D'autre part, chaque chiffre mentionné représente la moyenne de 4 à 10 résultats expérimentaux.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Effets de la variation du pH

Les mesures du Ca^{2+} fixé par les différentes membranes quand la concentration en Ca^{2+} du milieu augmente donnent des courbes de saturation typiques, montrant l'existence d'un nombre déterminé de sites de fixation sur chacune d'elles. Comme l'indique le Tableau I, les quantités de Ca^{2+} fixé et le coefficient apparent de fixation dépendent à la fois du type de membrane considéré et du pH du milieu. Le réticulum

FIXATION DE FAIBLE AFFINITÉ DU CALCIUM

609

TABLEAU I
EFFET DU pH SUR LA FIXATION DE FAIBLE AFFINITÉ DU Ca^{2+}

Milieu: Tris-HCl, 0.06 M; protéines, 0.5 mg, volume total, 2 ml, CaCl_2 de 0.1 mM à 20 mM. R.E., réticulum endoplasmique. k_f , concentration en Ca^{2+} à laquelle la saturation de la moitié des sites est obtenue.

Matériel	$pH:$	6.5		7.0		7.5		8.0		8.5	
		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)	
		k_f	(mM)								
Membrane interne	50	1.30	52	1.05	49	0.60	50	0.45	—	—	—
Membrane externe	97	1.75	140	1.75	149	1.85	216	2.00	235	1.90	—
R.E. lisse	110	1.40	135	1.45	150	1.25	186	1.50	250	1.50	—
R.E. rugueux	179	2.45	212	1.50	221	2.10	230	1.70	265	1.35	—

TABLEAU II

EFFET DE LA FORCE IONIQUE A SON OPTIMUM D'ACTION SUR LA FIXATION DE FAIBLE AFFINITÉ DU Ca^{2+}

Milieu: protéines, 0.5 mg, volume total, 2 ml, CaCl_2 de 0.01 mM à 2.0 mM, Tris-HCl: membrane interne, 0.005 M, membrane externe, 0.035 M, réticulum endoplasmique lisse, 0.030 M, réticulum endoplasmique rugueux, 0.001 M. R.E., réticulum endoplasmique. k_f , concentration pour laquelle la saturation de la moitié des sites est obtenue.

Matériel	$pH:$	6.5		7.5		8.0		8.5	
		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)		Ca^{2+} fixé (nmoles/mg protéine)	
		k_f	(mM)	k_f	(mM)	k_f	(mM)	k_f	(mM)
Membrane interne	54	0.24	56	0.08	57	0.09	—	—	—
Membrane externe	115	0.50	141	0.44	—	—	227	0.48	—
R.E. lisse	102	0.42	150	0.50	165	0.35	221	0.38	—
R.E. rugueux	156	0.22	209	0.20	225	0.12	240	0.10	—

endoplasmique lisse et la membrane externe des mitochondries fixent, pour chaque valeur du pH, des quantités semblables de Ca^{2+} avec des coefficients apparents de fixation voisins, ce qui renforce l'hypothèse déjà émise d'une origine commune de ces deux types de membranes^{14,18}. Les quantités nettement plus élevées de Ca^{2+} fixé par le réticulum endoplasmique rugueux laissent supposer l'existence, à côté d'une fixation membranaire, d'une fixation supplémentaire sur les ribosomes, insensible aux variations du pH. Enfin, la membrane interne des mitochondries se caractérise, à la fois, par une faible fixation de Ca^{2+} , et par l'insensibilité totale de ses sites aux variations du pH.

Les effets différents, suivant les types de membranes, de l'élévation du pH sur la fixation du Ca^{2+} , conduisent à penser qu'il existe deux sortes de sites de fixation de faible affinité du Ca^{2+} : les uns, présents dans la membrane externe des mitochondries, le réticulum endoplasmique lisse et la partie membranaire du réticulum endoplasmique rugueux, se dissocient de plus en plus quand le pH s'élève, les autres, présents dans la membrane interne des mitochondries et les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux, sont insensibles aux variations du pH.

Effets de la variation de la force ionique

Les quantités de Ca^{2+} fixé quand la concentration en tampon Tris du milieu varie entre 0.001 M et 0.5 M, montrent un optimum de fixation sur la membrane externe des mitochondries pour la valeur de 0.035 M et sur le réticulum endoplasmique pour la valeur de 0.030 M. Au niveau de la membrane interne des mitochondries et du réticulum endoplasmique rugueux, les quantités de Ca^{2+} fixé sont d'autant plus importantes que la concentration en tampon Tris est plus faible.

Dans les conditions optimales d'action de la force ionique, spécifiques de chaque type de membrane, les quantités de Ca^{2+} fixé ne sont pas modifiées (sauf à pH 7.5, en présence de Tris 0.001 M, sur la membrane interne où il y a démasquage de nouveaux sites), seul le coefficient apparent de fixation est abaissé (Tableau II) dans tous les cas.

DISCUSSION

Les propriétés caractéristiques des deux catégories de sites de faible affinité du Ca^{2+} que nous avons mises en évidence indiquent qu'ils sont de natures différentes. L'existence de deux catégories de sites de fixation de faible affinité du Ca^{2+} , les uns de nature phospholipidique, les autres de nature protéique a été démontrée récemment. En effet, 21% du Ca^{2+} total fixé par des fantômes d'érythrocytes peut être extrait avec la fraction phospholipidique, le reste demeurant dans la fraction protéique^{19,20}, tandis que pour d'autres auteurs 10% seulement des sites des microsomes totaux sont inactivés par l'action de la trypsine²¹. Il semble que la distribution des deux catégories de sites diffère suivant le type de membrane considéré, ainsi que nous l'avons observé au cours de notre travail.

D'autre part, les mesures de fixation du Ca^{2+} par des monocouches de phospholipides isolés ont montré que ce cation se fixe sur les cardiolipides et les acides phosphatidiques²² puis s'adsorbe de plus en plus à mesure que le pH s'élève sur les phosphatidylinositols²³, les phosphatidylséries et les phosphatidyléthanolamines^{22,24}.

Il semble donc permis de supposer que les sites de la première des deux caté-

gories que nous avons mises en évidence, se dissociant de plus en plus quand le pH s'élève, pourraient être de nature phospholipidique, tandis que la propriété de modification de l'affinité de ceux de la seconde catégorie indiquerait plutôt une nature protéique.

Le fait que la membrane interne des mitochondries possèderait uniquement des sites de nature protéique peut sembler surprenant étant donné la quantité proportionnellement importante de cardiolipides qu'elle renferme^{18,25}. Ce résultat peut cependant être expliqué par les expériences de Guarnieri *et al.*²⁶ montrant que les têtes polaires des cardiolipides de cette membrane sont enfermées à l'intérieur de la structure membranaire et inaccessibles aux anticorps spécifiques ajoutés dans le milieu.

RÉSUMÉ

L'existence de deux catégories de sites de fixation de faible affinité du Ca²⁺ a été mise en évidence. Les uns se dissocient de plus en plus quand le pH s'élève permettant une augmentation des quantités de Ca²⁺ fixé, les autres sont invariables en nombre, mais leur affinité pour le Ca²⁺ est dépendante de la force ionique du milieu. Les premiers pourraient être de nature phospholipidique, les seconds de nature protéique.

Dans nos conditions expérimentales, la membrane interne des mitochondries possède uniquement des sites de la seconde catégorie. Les autres membranes renferment simultanément les deux sortes de sites. Le réticulum endoplasmique rugueux possède des sites supplémentaires au niveau des ribosomes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Lehninger, A. L. (1970) *Biochem. J.* 119, 129–138
- 2 Carafoli, E. (1970) *Biochem. J.* 116, 2P
- 3 Reynafarje, B. et Lehninger, A. L. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 584–593
- 4 Carafoli, E. et Lehninger, A. L. (1971) *Biochem. J.* 122, 681–690
- 5 Lehninger, A. L. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 312–318
- 6 Sottocasa, G. L., Sandri, G., Panfili, E., De Bernard, B., Gazzotti, P., Vasington, F. D. et Carafoli, E. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 808–813
- 7 Rossi, C. S., Azzi, A. et Azzone, G. F. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 951–957
- 8 Jacobus, W. E. et Brierley, G. P. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4995–5004
- 9 Scarpa, A. et Azzone, G. F. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 173, 78–85
- 10 Chance, B. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2729–2748
- 11 Chappell, J. B., Cohn, M. et Greville, G. D. (1963) in *Energy linked Functions of Mitochondria* (Chance, B., éd.), pp. 219–231, Academic Press, New York
- 12 Scarpa, A. et Azzone, G. F. (1972) *Eur. J. Biochem.* 12, 328–335
- 13 Mela, L. (1969) *Biochemistry* 8, 2481–2483
- 14 Lévy, M., Toury, R. et André, J. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 135, 599–613
- 15 Decloture, F. et Chauveau, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 491–504
- 16 Robinson, H. W. et Hodgen, C. G. (1940) *J. Biol. Chem.* 135, 707–725
- 17 Bray, G. A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279–285
- 18 Parsons, D. F., Williams, G., Thompson, W., Wilson, D. et Chance, B. (1967) dans *Proc. Round-Table Discussion Mitochondrial Structure and Compartmentation* (Slater, E. C., Tager, J. M., Quagliariello, E. et Papa, S., éds), pp. 29–70, Adriatica Editrice, Bari
- 19 Forstner, J. et Manery, J. F. (1971) *Biochem. J.* 124, 563–571
- 20 Forstner, J. et Manery, J. F. (1971) *Biochem. J.* 125, 343–352
- 21 Cohen, A. et Selinger, Z. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 183, 27–35

- 22 Papahadjopoulos, D. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 163, 240–254
- 23 Quinn, P. J. et Dawson, R. M. C. (1972) *Chem. Phys. Lipids* 8, 1–9
- 24 Rojas, E. et Tobias, J. M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 94, 394–404
- 25 Lévy, M. et Sauner, M. T. (1969) *Chem. Phys. Lipids* 2, 291–295
- 26 Guarnieri, M., Stechmiller, B. et Lehninger, A. L. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7526–7532