

BBA 76942

## ACTIVITÉ $\gamma$ -GLUTAMYLTRANSFERASE DANS LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE HUMAIN

ODILE AZZOPARDI et MAX-FERNAND JAYLE

*Laboratoire de Biochimie, UER Biomédicale des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06 (France)*

(Reçu le 26 septembre, 1974)

(Manuscrit revisé reçu le 20 janvier, 1975)

### SUMMARY

#### *$\gamma$ -Glutamyltransferase activity in the human red blood cell membrane*

A  $\gamma$ -glutamyltransferase activity is found in the human red blood cell membrane.

Membrane isolation was carried out according to the method of Dodge et al. (Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, J. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 119-130) (modified) and proteins were solubilized either with 1% sodium deoxycholate or 5 mM EDTA or 10 mM of its disodium salt, under various conditions of time and temperature. The  $\gamma$ -glutamyltransferase activity of the membrane preparations was investigated using two substrates,  $\gamma$ -L-glutamyl-p-nitroanilide and  $\gamma$ -L-glutamyl- $\alpha$ -naphthylamide.

The specific enzymatic activities of the various preparations, expressed in munits per mg of protein, were found to have similar values under similar technical conditions. The chelating agents seem to allow a more specific isolation than the detergent.

The presence of a  $\gamma$ -glutamyltransferase activity in the erythrocyte membrane is discussed in relation to the membrane association of this enzyme in other tissues.

---

### INTRODUCTION

La  $\gamma$ -glutamyltransférase (EC 2.3.2.2) a été mise en évidence dans de nombreux tissus (rein, pancréas, foie, rate, intestin, cerveau, poumon, muscle cardiaque et squelettique) et la détermination de son activité sérique a été mise à profit en biochimie clinique, essentiellement en pathologie hépatobiliaire et dans les maladies pancréatiques et cardiaques. En ce qui concerne les érythrocytes, la présence en état d'équilibre dynamique [1] du glutathion, substrat de la  $\gamma$ -glutamyltransférase, nous a incités à rechercher une activité de cette enzyme dans la membrane érythrocytaire, une telle association membranaire ayant déjà été mise en évidence dans certains tissus de l'homme et de l'animal [2, 3] et, récemment, dans la membrane érythrocytaire du lapin [4].

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Isolement des membranes érythrocytaires*

Les membranes sont préparées selon la méthode de Dodge et coll. [5] modifiée. Un pool de globules rouges humains, prélevés sur héparinate de lithium et lavés trois fois dans du sérum physiologique, est hémolysé dans 6 vol. de tampon phosphate 0.005 M, pH 5.8; le mélange est mis à 4 °C pendant 1 h et agité de temps en temps; après centrifugation, le culot est lavé dans le même volume de tampon jusqu'à obtention d'un surnageant incolore. On déplace alors l'hémoglobine liée aux membranes en traitant le culot par un même volume de tampon phosphate 0.01 M (pH 8.0) et, après un contact d'une heure à 4 °C et centrifugation, on lave les membranes avec du tampon phosphate 0.005 M, pH 8.0. Toutes les solutions utilisées pour cette préparation sont préalablement portées à 4 °C.

### *Solubilisation des protéines membranaires*

Le culot membranaire est repris dans 1.5 ml de tampon Tris · HCl, 0.1 M, pH 9.0, refroidi à 4 °C et contenant: soit 1 % de désoxycholate de sodium, selon Orlowski et Meister [6]; soit 5 mM d'EDTA; soit 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA.

Les mélanges sont agités doucement durant l'incubation dont la durée et la température ont été variables selon les essais: 20 h à 4 °C ou 2 h à la température du laboratoire. Après centrifugation, les surnageants sont soumis au dosage des protéines et à la détermination de l'activité enzymatique.

### *Dosage des protéines*

Le dosage est fait selon la technique de Lowry et coll. [7] avec, pour étalon, de l'albumine bovine (Miles Laboratories).

### *Détermination de l'activité enzymatique*

Deux substrats sont utilisés pour déterminer l'activité  $\gamma$ -glutamyltransférase des extraits membranaires.

(1) Méthode à la  $\gamma$ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide [8] commercialisée par Boehringer\*. Le mélange d'incubation contient:  $\gamma$ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide, 4 mM; glycyl-glycine, 40 mM; tampon Tris, 185 mM, pH 8.25. On ajoute 0.2 ml d'extrait membranaire à 3 ml de mélange d'incubation; la réaction se fait à 25 °C; on calcule la valeur de l'activité d'après la moyenne des élévations d'extinction par minute à 405 nm.

(2) Méthode à la  $\gamma$ -L-glutamyl- $\alpha$ -naphthylamide: nous utilisons la méthode de Orlowski et Szewczuk [9] en ajoutant de la glycyl-glycine (20 mM) au milieu de réaction.

Pour chacune des deux méthodes, des essais parallèles sont faits en remplaçant l'extrait membranaire par la solution tampon ayant servi à sa solubilisation et contenant, selon le cas, du désoxycholate, de l'EDTA ou du Na<sub>2</sub>EDTA; ces essais ont pour but de rechercher une hydrolyse des substrats de nature non enzymatique. Les résultats sont exprimés en munités (1 munité = 0.001 unité); une unité est la quantité d'enzyme nécessaire pour former par minute une  $\mu$ mol de *p*-nitroaniline ou d' $\alpha$ -

\* Boehringer Mannheim GMBH,  $\gamma$ -GT 15794.

naphthylamine dans les conditions des méthodes utilisées. L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en munités par mg de protéine.

## RÉSULTATS

Les deux méthodes de détermination de l'activité  $\gamma$ -glutamyltransférase sont parfaitement applicables aux préparations de membranes érythrocytaires obtenues dans les conditions décrites; il y a proportionnalité entre les produits formés et le temps d'incubation, de même qu'entre les vitesses de réaction et la concentration de l'enzyme. Les essais témoins réalisés dans les mêmes conditions que les réactions mais sans extrait membranaire montrent que, des deux substrats, seule la  $\gamma$ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide est hydrolysée en présence de désoxycholate, d'EDTA et de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; il est évidemment tenu compte de cette hydrolyse non enzymatique dans l'expression de l'activité  $\gamma$ -glutamyltransférase.

Le Tableau I mentionne quelques-uns de nos résultats; les Essais 3A et 3B sont faits à partir d'un volume équivalent d'un même pool d'hématies; il en est de même pour les Essais 4A, 4B et 4C d'une part et pour les Essais 5A, 5B et 5C d'autre part. Quelles que soient les modalités de la solubilisation des protéines, une activité  $\gamma$ -glutamyltransférase a été mise en évidence dans toutes nos préparations de membranes érythrocytaires; les résultats sont sensiblement les mêmes avec l'un et l'autre des substrats. L'EDTA et le  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  semblent permettre une plus grande spécificité d'isolement; un contact des extraits avec le  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  à 4 °C pendant 20 h donne l'activité spécifique la plus élevée. Il convient de noter que le propos de ce travail ayant été la recherche qualitative de l'activité  $\gamma$ -glutamyltransférase dans les membranes de globules rouges humains, nos résultats sont probablement en-deçà de la valeur réelle de cette activité. Reynolds et Trayer [10] ont solubilisé 90 % des protéines de la membrane de l'érythrocyte humain par contact durant 96 h à 20 °C avec une solution aqueuse d'EDTA 5 mM à pH 7.5, alors que nous avons utilisé ce chélateur pendant un temps plus bref et dans un tampon dont la force ionique et le pH conviennent davantage à l'activité de l'enzyme. Les mêmes auteurs signalent une diminution du pourcentage de protéines dissoutes en présence d'ions  $\text{Na}^+$ ; si nous avons effectivement obtenu, par le  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , des préparations légèrement moins riches en protéines que celles obtenues par l'EDTA, la plus grande activité enzymatique des premières nous a amenés à considérer l'influence de ces produits sur cette activité et nous avons constaté qu'un sérum sanguin humain additionné de 5 mM d'EDTA ou de 10 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  montre, après 2 h de contact à la température du laboratoire, par le test Boehringer, une activation de l'enzyme sérique de 13 et 21 % respectivement.

## DISCUSSION

Ce travail met en évidence la présence d'une activité  $\gamma$ -glutamyltransférase dans la membrane de l'érythrocyte humain. Dissociable par un détergent ou un chélateur, on peut situer cette enzyme, selon la classification de Shin et Carraway [11], parmi les enzymes membranaires périphériques; l'effet des chélateurs suggère des interactions ioniques dans la liaison de l'enzyme à la membrane.

L'absence de  $\gamma$ -glutamyltransférase dans le globule rouge humain a été rapportée par certains auteurs [12-14] mais Rouser et coll. [15] signalent sa présence,

TABLEAU I  
RÉSULTATS OBTENUS AVEC QUELQUES-UNES DE NOS PRÉPARATIONS DE MEMBRANES ERYTHROCYTAIRES

Essai No.	Solubilisation des membranes Tampon Tris · HCl contenant:	Durée et température d'incubation	Protéines mg/ml	Protéines totales (mg)	Activité $\gamma$ -glutamyltransférase munités/ml	Activité totale (munités)	Activité spécifique (munités/mg de protéine)
1	Désoxycholate 1 %	20 h à 4 °C	0.735	1.10	12.5	18.7	17
2	Na <sub>2</sub> EDTA 10 mM	20 h à 4 °C	0.387	0.58	11.7	17.6	30.3
3A	Désoxycholate 1 %	20 h à 4 °C	0.87	1.30	16	24	18.5
3B	EDTA 5 mM	2 h à 20 °C	0.24	0.36	5	7.5	20.8
4A	Désoxycholate 1 %	2 h à 20 °C	0.38	0.57	6	9	15.8
4B	EDTA 5 mM	2 h à 20 °C	0.118	0.177	2.2	3.3	16.6
4C	Na <sub>2</sub> EDTA 10 mM	2 h à 20 °C	0.085	0.127	2	3	23.5
5A	Désoxycholate 1 %	2 h à 20 °C	0.40	0.60	6.8	10.2	17
5B	EDTA 5 mM	2 h à 20 °C	0.12	0.18	2.4	3.6	20
5C	Na <sub>2</sub> EDTA 10 mM	2 h à 20 °C	0.10	0.15	2.6	3.9	26

sans toutefois indiquer la méthode utilisée. C'est dans l'hémolysat d'érythrocytes humains que Jackson [16] a mis en évidence une activité  $\gamma$ -glutamyltransférase en présence de glutathion, la présence d'hémoglobine empêchant l'utilisation de substrats synthétiques chromogènes. Dans un travail récent, Palekar et coll. [4] ont démontré la présence, dans la membrane érythrocytaire du lapin, de cette même activité en utilisant le glutathion comme substrat, alors qu'ils ne la constatent pas en présence de  $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide qui réagit avec l'enzyme du rein de lapin. Nos préparations de membranes d'érythrocytes humains ont une activité  $\gamma$ -glutamyltransférase vis-à-vis de ce dernier substrat comme d'un autre chromogène, la  $\gamma$ -glutamyl- $\alpha$ -naphthylamide.

La présence d'une activité  $\gamma$ -glutamyltransférase dans les membranes cellulaires au niveau de différents tissus [2, 3, 17-20] soulève la question de sa signification physiologique. A la suite de leurs travaux sur le rein, Orlowski et Meister [21, 22] ont envisagé l'hypothèse que cette enzyme dont tous les acides aminés sauf la proline sont des accepteurs [6, 23, 24] pourrait participer avec le glutathion, dans un " $\gamma$ -glutamyl-cycle", au transport d'acides aminés. Quant à l'enzyme érythrocytaire, selon Palekar et al. [4], il pourrait intervenir avec la  $\gamma$ -glutamyl-cyclotransférase dans la dégradation du glutathion dont le produit terminal érythrocytaire serait la 5-oxoproline.

La présence de  $\gamma$ -glutamyltransférase liée à la membrane érythrocytaire repose la question de l'origine de la  $\gamma$ -glutamyltransférase sérique jusque-là attribuée au foie [25] et, pour une moindre part, au pancréas [26]; si le processus de vieillissement du globule rouge commence par la fragmentation de la membrane cellulaire sans perte du contenu cellulaire [27], il serait possible que, au moins en partie et à l'état normal, la  $\gamma$ -glutamyltransférase sérique provienne de la membrane érythrocytaire. La recherche de formes isozymiques et, le cas échéant, leur comparaison avec celles mises en évidence dans le sérum sanguin humain normal et pathologique pourraient donner des indications intéressantes [28].

## RÉSUMÉ

Une activité gamma-glutamyltransférase est mise en évidence dans la membrane du globule rouge humain.

L'isolement des membranes est réalisé selon la méthode de Dodge et coll. modifiée et la solubilisation des protéines membranaires effectuée en présence de désoxycholate de sodium à 1 %, de 5 mM d'EDTA ou de 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, dans des conditions différentes de durée et de température. L'activité  $\gamma$ -glutamyltransférase des préparations membranaires est recherchée à l'aide de deux substrats, la  $\gamma$ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide et la  $\gamma$ -L-glutamyl- $\alpha$ -naphthylamide.

Les activités enzymatiques spécifiques des diverses préparations, exprimées en munités par mg de protéine, ont, pour des conditions opératoires semblables, des valeurs assez voisines. Les chélateurs semblent permettre une plus grande spécificité d'isolement que le détergent.

La présence d'une activité  $\gamma$ -glutamyltransférase dans la membrane du globule rouge est rapprochée de l'association membranaire de cette même enzyme au niveau d'autres tissus.

## RÉFÉRENCES

- 1 Dimant, E., Landsberg, E. et London, I. M. (1955) *J. Biol. Chem.* 213, 769-771
- 2 Glossmann, H. et Neville, D. M. J. (1972) *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 19, 349
- 3 Auricchio, S., Ciccimarra, F., Vengnente, A., Andria, G. et Vetrella, M. (1973) *Pediat. Res.* 7, 95-99
- 4 Palekar, A. G., Tate, S. S. et Meister, A. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 71, 293-297
- 5 Dodge, J. T., Mitchell, C. et Hanahan, J. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 119-130
- 6 Orlowski, M. et Meister, A. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 338-347
- 7 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 8 Orlowski, M. et Meister, A. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 73, 679-681
- 9 Orlowski, M. et Szewczuk, A. (1961) *Acta Biochim. Polon.* 8, 189-200
- 10 Reynolds, J. A. et Trayer, H. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7337-7342
- 11 Shin, B. C. et Carraway, K. L. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1436-1444
- 12 Szewczuk, A. et Orlowski, M. (1960) *Clin. Chim. Acta* 5, 680-688
- 13 Gibinski, K. (1966) *Rev. Int. Hépatol.* 16, 1249-1268
- 14 Sitzmann, F. C. et Bierschenk, M. (1972) *Pädiatr. Pädiol.* 7, 145-151
- 15 Rouser, G., Jelinek, B. et Samuels, A. J. (1956) *Fed. Proc.* 15, 342
- 16 Jackson, R. C. (1969) *Biochem. J.* 111, 309-315
- 17 Albert, Z., Orlowski, M. et Szewczuk, A. (1961) *Nature* 191, 767-768
- 18 Kokot, F., Kuska, J. et Grzybek, H. (1965) *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 13, 549-554
- 19 Greenberg, E., Wollaeger, E. E., Fleisher, G. A. et Engstrom, G. W. (1967) *Clin. Chim. Acta* 16, 79-89
- 20 Takebayashi, J. (1973) *Rinsho Byori* 21, 181-184 dans *Chem. Abstr.* (1973) 79, 3341 m
- 21 Orlowski, M. et Meister, A. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 67, 1248-1255
- 22 Meister, A. (1973) *Science* 180, 33-39
- 23 Hanes, C. S., Hird, F. J. R. et Isherwood, F. A. (1950) *Nature* 166, 288-292
- 24 Hanes, C. S., Hird, F. J. R. et Isherwood, F. A. (1952) *Biochem. J.* 51, 25-28
- 25 Kokot, F., Kuska, J., Grzybek, H. et Cekanski, A. (1965) *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 13, 586-592
- 26 Naftalin, L., Child, V. J., Morley, A. et Smith, D. A. (1969) *Clin. Chim. Acta* 26, 297-300
- 27 Gomperts, B. D. (1969) dans *The Biological Basis of Medicine* (Bittar, E. E. et Bittar, N., eds), Vol. 3, p.120, Academic Press, London and New York
- 28 Azzopardi, O. et Jayle, M. F. (1973) *Clin. Chim. Acta* 43, 163-169