

BBA 69025

EFFET DE PETITES PROTEINES BASIQUES SUR LES ACTIVITES PHOSPHOHYDROLASE ET PHOSPHOTRANSFERASE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATASE MICROSOMIQUE DES HEPATOCYTES DE SINGE

J.P. BENEDETTO et R. GOT

*Laboratoire de Biologie et Technologie des Membranes, Université Claude Bernard, Lyon I,
43 Bd. du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex (France)*

(Received December 13th, 1979)

Key words: Glucose-6-phosphatase; Monkey hepatocyte; Microsome

Effects of basic proteins of low molecular weight on the phosphohydrolase and phosphotransferase activities of microsomal glucose-6-phosphatase in adult monkey hepatocytes

Summary

The effects of histone 2A and some polycations on microsomal carbamyl-phosphate:D-glucose phosphotransferase and glucose-6-phosphate phosphohydrolase activities (D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.9), have been investigated.

1. Histone 2A and polycations activate the two enzymic activities. At a constant cation concentration, this activation increases with the number of cationic groups per molecule.

2. Activation by histone 2A is related to its fixation on microsomal membranes. This fixation varies with quantities of histones and pH.

3. The nature of the interactions between histones and microsomal membranes is shown to be electrostatic, probably between the cationic groups of histones and the anionic group of membranous lipids.

4. Kinetic analysis reveal that histone 2A increases the maximal reaction velocity but does not affect the apparent Michaelis constant values for the substrates.

5. The role played by the cationic groups of histone 2A on the microsomal glucose 6-phosphatase, is discussed.

Résumé

L'action de petites protéines basiques, plus particulièrement d'histones 2A de thymus de veau, et d'autres polycations sur les activités glucose-6-phosphate

phosphohydrolase (D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.9) et carbamyl-phosphate:D-glucose phosphotransférase des microsomes d'hépatocytes de singe adulte, a été étudiée.

1. Les polycations, dont les histones 2A, exercent un effet activateur sur les deux activités enzymatiques étudiées. Cet effet augmente avec le nombre de groupements cationiques par molécule pour une concentration en cations constante.

2. L'activation par les histones 2A est en corrélation avec sa fixation sur les membranes microsomiques. Cette fixation varie en fonction du pH et de la quantité d'histones présentes.

3. Les interactions histones-membranes microsomiques seraient de nature électrostatique vraisemblablement entre les groupements cationiques des histones et les fonctions anioniques des phospholipides membranaires.

4. L'activation porte uniquement sur la vitesse de catalyse enzymatique sans affecter l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son ou ses substrats.

5. Une interprétation de l'action des groupements cationiques des histones 2A et autres polycations vis-à-vis des deux activités de la glucose-6-phosphatase microsomique est discutée.

Introduction

Des études récentes ont montré que diverses protéines, comme le lysozyme, le cytochrome *c*, la spectrine, l'hémoglobine, l'albumine, la ribonucléase, l'ATPase, etc. . . . [1—10] pouvaient interagir avec les phospholipides de liposomes, entraînant une augmentation de la diffusion d'ions ou de glucose. Il semble que ces protéines, qui sont des polyélectrolytes, agissent essentiellement par leur charge, comme le confirment des effets similaires obtenus avec des polycations tels que la poly(L-lysine) [4,7].

Une approche plus physiologique consiste à déterminer l'action de telles protéines, non plus sur la diffusion de petites molécules à travers des vésicules phospholipidiques artificielles, comme ce fut le cas dans les travaux cités, mais sur un transport dûment caractérisé à travers des membranes biologiques. C'est ainsi que l'effet activateur de petites protéines basiques, sur le transfert de mannose, dans les microsomes d'*Aspergillus niger*, a pu être mis en évidence [11].

Un autre système microsomique met en jeu le transport du glucose 6-phosphate cytosolique, à travers la membrane du reticulum endoplasmique, vers la face non cytoplasmique où se trouve une phosphatase [12]. Le fonctionnement de ce système, qui comporte un transporteur, est donc intimement lié à l'état physique de la membrane à laquelle il est associé.

Le but de ce travail est de montrer que l'action des histones 2A, les plus efficaces des polycations essayés, sur les activités phosphohydrolase et phosphotransférase des microsomes d'hépatocytes de singe, est en relation étroite avec leur interaction au niveau de la membrane.

Matériel et Méthodes

Matériel. Les singes sont des cercopithèques (*Erythrocebus patas*) aimablement fournis par IFFA-Mérieux. Il s'agit d'adultes des deux sexes nourris à

volonté, dont l'état sanitaire est dûment contrôlé.

La fraction microsomique constituant la préparation enzymatique est préparée par centrifugation différentielle et son contenu enzymatique a été caractérisé [13]. Les microsomes sont utilisés immédiatement après leur préparation. En effet, l'utilisation de microsomes conservés une nuit à 0°C ou congelés dans l'azote liquide introduit une certaine dispersion dans les résultats. Au contraire, on observe peu de variation dans les microsomes frais, d'une préparation à l'autre. Tous les résultats présentés sont la moyenne d'au moins trois expériences.

L'histone 2A provient du thymus de veau (Sigma, poudre lyophilisée).

Méthodes. Les activités phosphohydrolase (D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.9) et phosphotransférase ont été déterminées par les dosages classiques, respectivement, du phosphate libéré et du glucose 6-phosphate formé [14]. Les modalités de fonctionnement et les paramètres cinétiques de ces deux activités ayant été préalablement établis [14], les essais sont réalisés à concentration saturante en substrat: glucose 6-phosphate 10 mM (activité phosphohydrolase); carbamyl-phosphate 16 mM, D-glucose 300 mM (activité phosphotransférase). Les protéines sont dosées par la méthode de Hartree [15].

Résultats

Action de divers cations et polycations sur les activités phosphohydrolase et phosphotransférase

Les effets de divers cations et polycations sur les activités phosphohydrolase et phosphotransférase sont donnés dans le Tableau I. Notons que les deux acides aminés basiques utilisés ont leur groupement carboxylique bloqué. L'effet activateur, nul pour le cation NH_4^+ , semble croître avec le nombre de groupements cationiques portés par l'effecteur, la concentration globale en cations restant constante. Les effets sont similaires sur les deux activités

TABLEAU I

EFFET DE CATIONS ET DE POLYCATIONS SUR LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHOHYDROLASE ET LA CARBAMYL-PHOSPHATE:GLUCOSE PHOSPHOTRANSFERASE

Les incubations sont effectuées à pH 6.5 dans 1 ml de tampon Tris-maléate 50 mM, contenant 0.25 mg de protéines microsomiques, durant 10 min. Les concentrations en substrat sont, respectivement, 10 mM pour le glucose 6-phosphate, 16 mM pour le carbamyl-phosphate et 300 mM pour le glucose. La concentration en effecteur a été ramenée à 2 mM en $[\text{NH}_4^+]$. Le premier chiffre donne l'activité spécifique exprimée en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine. Le chiffre entre parenthèses représente l'activité spécifique relative, calculée selon la formule: $100 \times \text{activité spécifique en présence du cation} / \text{activité spécifique du témoin}$.

Effecteur	Phosphohydrolase	Phosphotransférase
Témoin	0.21 ± 0.01 (100)	0.17 ± 0.01 (100)
NH_4Cl	0.21 ± 0.01 (100)	0.17 ± 0.01 (100)
L-Lysine β naphthylamide carbonate	0.21 ± 0.01 (100)	0.17 ± 0.01 (100)
L-Arginine methyl ester	0.24 ± 0.015 (114)	0.18 ± 0.01 (106)
Spermidine	0.26 ± 0.02 (124)	0.18 ± 0.015 (106)
Spermine	0.26 ± 0.02 (124)	0.18 ± 0.02 (106)
Poly(L-lysine) (2320) *	0.30 ± 0.03 (143)	0.19 ± 0.025 (112)
Poly(L-lysine) (27 900) *	0.34 ± 0.03 (162)	0.28 ± 0.03 (133)

* Poids moléculaire.

enzymatiques, quoique plus limités sur la phosphotransférase. De toutes façons, cette activation n'est vraiment nette qu'avec la poly(L-lysine) ayant un poids moléculaire moyen de 27 900. Des essais préliminaires ont montré que l'histone 2A du thymus de veau était plus active que la poly(L-lysine). De plus, il s'agit d'un polyélectrolyte naturel. C'est donc avec cet effecteur que l'étude sera approfondie.

Fixation des histones sur les microsomes

Précisons tout d'abord que les histones de différents types ont donné les mêmes résultats que l'histone 2A.

Les résultats du Tableau I suggèrent une participation des groupements cationiques dans le rôle joué par les polyélectrolytes sur les activités enzymatiques. D'ailleurs, une petite protéine ayant un point isoélectrique acide n'a aucun effet. Afin de préciser les interactions existant entre un polycation et la membrane microsomique, les modalités de fixation de l'histone sont étudiées, en fonction de divers paramètres. Ainsi, la Fig. 1A donne la quantité d'histone fixée en fonction du pH, pour trois valeurs du rapport R = quantité d'histone/protéines microsomiques.

Le pH a peu d'action pour des quantités d'histone nettement plus faibles que la quantité de protéines microsomiques ($R = 0.5$), mais pour $R = 1$ ou $R = 1.5$, un optimum de fixation apparaît à pH 7.5.

Quelque soit le pH, entre 5 et 8.5, la quantité d'histone fixée croît avec le rapport R , jusqu'à une valeur voisine de 2 (Fig. 1B). Au-delà, il y a saturation.

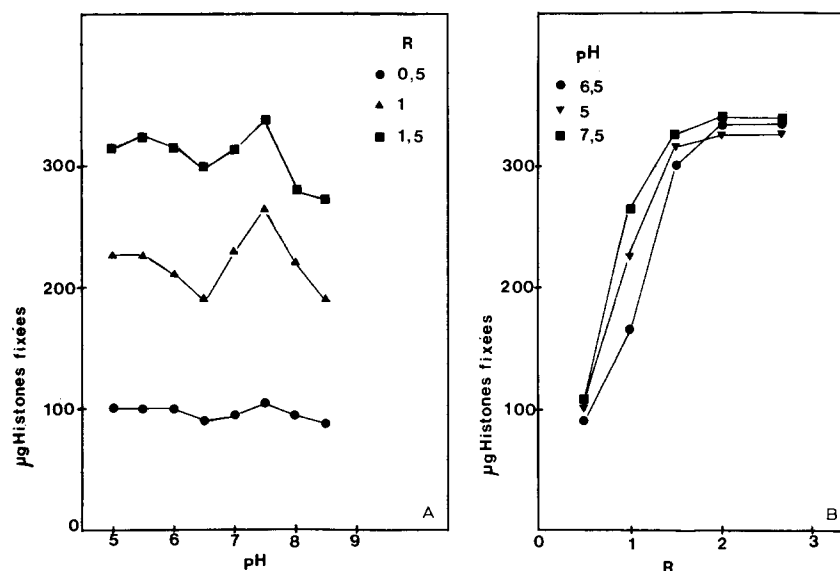


Fig. 1. Fixation de l'histone 2A du thymus de veau sur les membranes microsomiques des hépatocytes de singe. Les incubations sont réalisées pendant 10 min à 37°C en tampon Tris-maléate 50 mM, en présence de 300 µg de protéines microsomiques. Après incubation le milieu est centrifugé 3 min à 100 000 $\times g$ dans une centrifugeuse Airfuge (Beckman) et les protéines sont dosées dans le surnageant. R représente le rapport histone/protéines microsomiques. A. Effet du pH sur la fixation des histones pour trois valeurs de R . B. Effet de la quantité d'histone ajoutée au milieu sur la fixation des histones pour trois valeurs du pH.

D'autre part, les cinétiques de fixation en fonction du temps montrent que la fixation maximale est quasi-instantanée.

Enfin, cette fixation est totalement supprimée par élévation de la force ionique (NaCl 0.3 M), ce qui confirme le caractère ionique des liaisons entre histone et membrane. Dans ces conditions, aucune activation n'est induite par l'histone.

Action du pH sur l'effet activateur des histones

Afin de vérifier s'il existe une relation entre la fixation des polycations et leur effet sur les activités enzymatiques, les courbes d'activités en fonction du pH sont tracées, en présence d'histone. Dans la Fig. 2, on constate que les activités phosphohydrolase (Fig. 2A) et phosphotransférase (Fig. 2B), qui présentent, en l'absence d'histone, un optimum à pH 6.5, ont une grande analogie avec les courbes de fixation d'histones. Ainsi, l'optimum d'activation se situe au même pH que la fixation maximale, pH 7.5, alors qu'un minimum apparaît aux environs de pH 6.5. Dans tous les cas, l'activation croît avec la quantité d'histone fixée; elle est plus importante pour la phosphotransférase. Précisons que la vitesse de réaction en présence d'histone reste linéaire durant 15 min, contre 30 min en l'absence d'effecteur.

Effets des histones sur les paramètres cinétiques des activités phosphohydrolase et phosphotransférase

(a) *Glucose-6-phosphate phosphohydrolase*. La cinétique témoin, réalisée à pH 6.5, donne un K_m apparent de 2.5 mM. Or, en présence d'une quantité d'histone double de la quantité des protéines microsomiques ($R = 2$), ce K_m conserve la même valeur, que ce soit à pH 6.5 ou à pH 7.5, alors que, dans ces

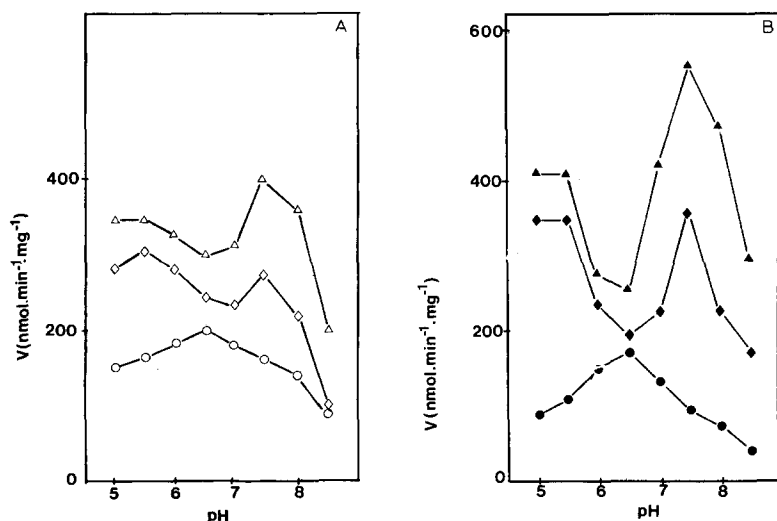


Fig. 2. Effet du pH sur les activités phosphohydrolase (A) (symboles ouvertes) et phosphotransférase (B) (symboles fermés) en l'absence (○, ●) ou en présence d'histone (R : 1, ◇, ◆; 2, △, ▲). Les milieux d'incubation sont les mêmes que dans la Fig. 1, mais contiennent plus soit du glucose 6-phosphate (10 mM), soit du glucose (300 mM) et du carbamyl-phosphate (16 mM).

conditions, la V est multipliée respectivement par un facteur 1.6 et 2.

(b) *Carbamyl-phosphate:D-glucose phosphotransferase*. Des résultats similaires sont obtenus sur l'activité phosphotransférase. Les K_m vis-à-vis du glucose, 61 mM, en concentration saturante en carbamyl-phosphate 16 mM ou vis-à-vis du carbamyl-phosphate, 5.7 mM, en concentration saturante en glucose, 300 mM restent constants en présence d'histone ($R = 2$). Mais les V sont multipliées par des facteurs allant respectivement jusqu'à 3 et 2.3 à pH 7.5.

Discussion

Des résultats rapportés dans ce travail, on peut tirer les conclusions suivantes:

(1). Les polycations ont un effet activateur sur les activités phosphohydrolase et phosphotransférase des membranes microsomiques des hépatocytes de singe. Cet effet ne se manifeste de façon significative qu'à partir d'un certain poids moléculaire, puisque la spermine ou la spermidine ont une action beaucoup plus faible que la poly(L-lysine) de poids moléculaire 27 900, ceci à concentration en NH_4^+ constante.

(2). Comme le montre l'étude effectuée avec l'histone 2A, cet effet est lié à la fixation des polycations sur les membranes, fixation qui varie avec le pH et la quantité de polycations en présence jusqu'à un point de saturation.

(3). Les interactions entre membrane et polycations, abolies par une élévation de la force ionique, sont de nature électrostatique, vraisemblablement entre les groupements cationiques exogènes et les fonctions anioniques des têtes zwitterioniques des phospholipides membranaires.

(4). L'effet activateur est en rapport étroit avec la quantité de polycations fixés.

(5). Cet effet porte uniquement sur la vitesse de catalyse, les K_m restant constants dans tous les cas.

Dans un travail récent, Nordlie et al. [16] mettaient en évidence une stimulation par les polyamines des deux activités de la glucose-6-phosphatase microsomique du foie de rat. Sur plusieurs points, nos résultats ne concordent pas avec les leurs. Certes, dans quelques cas, leurs conditions expérimentales sont différentes (par exemple utilisation de concentrations non saturantes en substrats). Mais, pour ce qui est des modifications des paramètres cinétiques par la poly(L-lysine), ces auteurs obtiennent une diminution importante des K_m vis-à-vis des substrats phosphorylés, alors que celui du glucose reste constant. Si le fait d'utiliser, comme effecteur polycationique, de l'histone au lieu de poly(L-lysine) ne semble pas devoir être pris en considération, il faut néanmoins remarquer que le matériel biologique est différent. La glucose-6-phosphatase microsomique du foie de singe présente, dans certains domaines, un comportement original [14].

Il existe cependant des convergences entre nos conclusions et celles de Nordlie et al. [16]. Ainsi, le résultat essentiel de l'action des polycations est toujours un effet activateur. De plus, il ressort de nos travaux que l'activation n'est pas seulement liée aux groupements cationiques, mais également à la nature du composé qui porte ces groupements et, plus précisément, au nombre

de groupements aminés portés par la molécule de l'effecteur.

Ces résultats sont absolument semblables à ceux obtenus précédemment à propos de l'action de petites protéines basiques sur le transfert de mannose dans les membranes microsomiques d'*Aspergillus niger* [11]. Dans ce système, l'analyse cinétique des phénomènes enzymatiques se produisant sur chaque face de la membrane suggérerait que l'action de l'histone 2A portait au niveau du transport intramembranaire.

References

- 1 Sweet, C. and Zull, J.E. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 173, 94—103
- 2 Juliano, R.L., Kimelberg, H.K. and Papahadjopoulos, D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 241, 894—905
- 3 Kimelberg, H.K. and Papahadjopoulos, D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 233, 805—809
- 4 Kimelberg, H.K. and Papahadjopoulos, D. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1142—1148
- 5 Calissano, P. and Bangham, A.D. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 504—509
- 6 Kaplan, J.H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 290, 339—347
- 7 Gould, R.M. and London, Y. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 290, 200—218
- 8 Papahadjopoulos, D., Cowden, M. and Kimelberg, H. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 330, 8—26
- 9 Lea, E.J.A., Rich, G.T. and Segrest, J.P. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 382, 41—50
- 10 Kitagawa, T., Inoue, K. and Nojima, S. (1976) *J. Biochem.* 79, 1135—1145
- 11 Letoublon, R. and Got, R. (1977) *FEBS Lett.* 80, 343—347
- 12 Nilsson, O.S., Arion, W.J., Depierre, J.W., Dallner, G. and Ernster, L. (1978) *Eur. J. Biochem.* 82, 627—634
- 13 Benedetto, J.P., Martel, M.B. and Got, R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 587, 1—11
- 14 Benedetto, J.P., Martel, M.B. and Got, R. (1979) *Biochimie* 61, 1125—1132
- 15 Hartree, E. (1972) *Anal. Biochem.* 48, 422—427
- 16 Nordlie, R.C., Thomas Johnson, W., Cornatzer, W.E., Jr. and Twedell, G.W. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 585, 12—23