

Note

Mise en évidence de glycosyltransférases dans les hépatocytes d'un téléostéen, le labre (*Labrus bergylta*)

GISÈLE BERTHILLIER, JACQUES FROT-COUTAZ ET RENÉ GOT

*Laboratoire de Biochimie des Membranes, Université Claude Bernard de Lyon I,
Villeurbanne 69621 (France)*

(Reçu le 14 mai 1973; accepté après modification le 4 septembre 1973)

Dans un précédent travail¹, nous avions montré que les microsomes des hépatocytes d'un téléostéen apode, le congre (*Conger vulgaris*) contenaient des glycosyltransférases fonctionnant avec des accepteurs endogènes, ce qui permettait de supposer que, comme chez les mammifères, le foie était le siège de la biosynthèse des glycoprotéines sériques. Nous avons poursuivi cette étude en étendant nos investigations à un autre téléostéen, le labre (*Labrus bergylta*).

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. — Les animaux ont été péchés dans la baie de Concarneau (Sud Finistère). Ils sont assommés et les foies sont prélevés immédiatement, lavés et dilacérés dans le tampon de broyage.

Méthodes. — Les protéines ont été dosées par la méthode du biuret sur un précipité par l'acide trichloracétique à 10% (concentration finale), lavé par un mélange chloroforme-méthanol (2:1) et redissous dans une solution M d'hydroxyde de sodium².

Les fractionnements cellulaires par la méthode différentielle en saccharose 0,25M et par celle selon Dallner³ ont été décrits dans un précédent travail¹.

La glucose 6-phosphatase (D-glucose 6-phosphate phosphohydrolase, E.C.3.1.3.9) a été dosée par la méthode de Schachter *et al.*⁴ L'électrophorèse à haut voltage permet de séparer le D-glucose libéré du substrat phosphorylé [CB 43 (F) C.E.A. 52 Ci/mole]. La 5'-nucléotidase (5'-ribonucléotide phosphohydrolase, E.C.3.1.3.5) a également été dosée par la méthode de Schachter *et al.*⁴. Le substrat utilisé est l'AMP ¹⁴C (C.E.A. n° 3776, 240 Ci/mole) qui est, comme précédemment, séparé de l'adénosine libérée par électrophorèse à haut voltage. Les modalités de dosage des glycosyltransférases sur accepteur endogène ont été décrites précédemment¹. Les dosages de la cytochrome c oxydase (ferrocyanochrome c:oxygène-oxydo-réductase, E.C.1.9.3.1), de la succinate:cytochrome c oxydoréductase (E.C.1.3.99.1) et de la phosphatase acide monoester (orthophosphorique phosphohydrolase, E.C.3.1.3.2) ont été décrits dans un précédent article¹.

La NADPH-cytochrome c réductase⁴ (E.C.1.6.99.1) a été dosée par addition de 10 à 100 μ l de la préparation à doser à 3 ml du milieu réactionnel constitué de tampon phosphate 85mM (39 % de KH_2PO_4 et 61 % de Na_2HPO_4) pH 7, de NADPH 0,15mM, de cytochrome c 20 μ M et de cyanure de potassium 0,5mM; on suit l'augmentation d'absorption à 550 nm. La NADH-cytochrome c réductase⁴ (E.C. 1.6.99.3) est dosée dans le même milieu réactionnel, NADPH 0,15mM étant remplacé par NADH 0,15mM. Dans le but de vérifier si l'enzyme est sensible à la roténone, le même dosage est effectué en incubant pendant 5 min à 30° en présence de 2 μ l d'une solution alcoolique de roténone à 25 %.

La glucose 6-phosphate déshydrogénase⁵ (D-glucose 6-phosphate:NADP oxydoréductase, E.C.1.1.1.49) est dosée par addition de 20 à 100 μ l de la préparation à doser à 3 ml du milieu réactionnel constitué de tampon Tris [tris(hydroxyméthyl)-aminométhane] 50mM pH 7,5, de NADP 0,55mM et de glucose 6-phosphate 65 μ M. La transformation du NADP en NADPH est enregistrée à 340 nm.

Pour le dosage des ATPases (ATP phosphohydrolase, E.C.3.6.1.3.), on dose l'ADP formé par la méthode de Avigad et Englard⁶ : à 3 ml du milieu réactionnel constitué de tampon Tris 20mM pH 8, contenant du phosphoenolpyruvate 3mM, de la pyruvate kinase (0,6 unité), du NADH 0,15mM, de la déshydrogénase lactique (5 unités), du chlorure de magnésium 0,5mM et du chlorure de sodium 50mM, on ajoute 20 à 100 μ l de la préparation à doser. On enregistre la diminution d'absorption à 340 nm qui correspond à l'activité ATPasique dépendante du magnésium. Le même essai en présence de chlorure de potassium 5mM donne l'activité ATPasique dépendante du magnésium et activée par le sodium et le potassium. Ces deux séries de cinétiques, effectuées en présence d'ouabaïne (G-strophanthine) 0,4mM permettent de déterminer l'action du l'ouabaïne sur ces ATPases.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des dosages enzymatiques concernant les fractions subcellulaires obtenues selon la méthode différentielle en saccharose 0,25M (voir Tableau I) sont exprimés en pourcentage de l'activité récupérée dans les trois fractions. Nous n'avons pu exprimer les résultats en pourcentage de l'activité trouvée dans l'homogénat car cette récupération est variable suivant l'enzyme considérée : elle s'étend de 60 % à 200 % et plus, un chiffre intermédiaire étant obtenu pour les transférases. Ces variations importantes sur le plan de la récupération enzymatique sont certainement liées au très grand degré d'impureté de l'homogénat, qui entraîne de grosses difficultés de dosage à ce niveau. De toute façon, pour toutes les enzymes dosées, le plus fort pourcentage de répartition s'accompagne d'un facteur de purification supérieur à 1.

Ce tableau montre que la fraction « mitochondries » (culot obtenu à 18 000 g) contient la quasi totalité de la cytochrome oxydase et de la succinate-cytochrome c réductase, enzymes caractéristiques des mitochondries. Toutefois, une part non négligeable des microsomes (culot 105 000 g) sédimente également avec cette fraction (30 à 40 % si on en juge par la répartition de la NADPH-cytochrome c réductase et de la glucose 6-phosphatase).

TABLEAU I

RÉPARTITION DE DIVERSES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DANS LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DU FOIE DE LABRE^a

Enzymes	Fractions subcellulaires		
	Culot (18 000 g)	Culot (105 000 g)	Surnageant (105 000 g)
Cytochrome oxydase	97 (60)	3 (8,8)	0
Succinate-cytochrome c réductase	78 (0,48)	22 (0,6)	0
NADPH-cytochrome c réductase	30 (1,04)	58 (8,8)	12 (0,26)
Glucose 6-phosphatase	40 (17)	52 (760)	8 (17)
NADH-cytochrome c réductase	58 (16)	40 (44)	2 (0,26)
ATPase-Mg ⁺⁺	63 (12)	7 (3,4)	30 (4,8)
5'-Nucléotidase	13,4 (1,43 · 10 ⁻³)	13,6 (4,8 · 10 ⁻³)	73 (4,2 · 10 ⁻³)
Phosphatase acide	44 (2 · 10 ³)	17 (2,5 · 10 ³)	33 (0,99 · 10 ³)
Glucose 6-phosphate déshydrogénase	0	1 (4,4)	99 (6,6)
Galactosyltransférase	68 (4,55)	32 (7,25)	0
N-Acétylglucosaminyltransférase	0	100 (12,3)	0
Mannosyltransférase	70 (9,1)	30 (12,7)	0

^aLes résultats représentent la répartition des activités en pourcentage de l'activité totale récupérée. Les chiffres entre parenthèses expriment les activités spécifiques en c.p.m. min⁻¹ mg⁻¹ pour les transférases et en μmoles min⁻¹ mg⁻¹ pour toutes les autres enzymes.

La phosphatase acide, enzyme caractéristique des lysosomes, se répartit dans les trois fractions : mitochondriale, microsomique et soluble, comme dans le cas du congre¹.

L'activité ATPasique se retrouve essentiellement dans le culot obtenu à 18 000 g. Cependant, l'activation de cette enzyme (de l'ordre de 67 %) par le sodium et le potassium, n'existe que dans le culot obtenu à 105 000 g. D'autre part, cette dernière fraction contient une grande partie de la glucose 6-phosphatase et de la NADPH-cytochrome c réductase, avec un facteur de purification important. De plus, elle présente une activité NADH-cytochrome c réductase non sensible à la roténone, ce qui est caractéristique des microsomes, alors que la fraction sédimentant à 18 000 g contient une activité de ce type inhibée à 50 % par la roténone. Enfin, les enzymes mitochondrielles citées plus haut apparaissent en faible quantité dans les microsomes totaux, qui ne sont pratiquement pas contaminés par la glucose 6-phosphate déshydrogénase, enzyme soluble.

La N-acétylglucosaminyltransférase semble exclusivement microsomique. La méthode de Dallner³ (Tableau II), qui permet de séparer les membranes granulaires des membranes lisses, montre que l'essentiel de cette activité de transfert (qui représente 80 % de l'activité microsomique initiale) se retrouve dans les membranes agranulaires. Dans le cas du congre¹, cette enzyme est également microsomique, mais se répartit entre les deux types de membranes. La signification de cette différence n'apparaît pas clairement, mais il est certain qu'une meilleure connaissance du type

de liaison glucide-peptide existant dans les glycoprotéines considérées permettrait de progresser dans la compréhension d'un tel phénomène.

TABLEAU II

RÉPARTITION DE DIVERSES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES^a DANS LES FRACTIONS MICROSMIQUES OBTENUES PAR LA MÉTHODE DE DALLNER³

Enzymes	Membranes granulaires (rough microsomes)	Membranes agranulaires (smooth microsomes)
NADPH-cytochrome c réductase	47 (3,8)	53 (3,3)
Glucose 6-phosphatase	82 (4,8)	18 (1,1)
<i>N</i> -Acétylglucosaminyltransférase	10 (0,67)	90 (4,5)

^aLes résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité totale récupérée. Les chiffres entre parenthèses donnent les activités spécifiques en c.p.m. $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ pour la transférase et en $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ pour les deux autres enzymes.

Quant aux activités mannosyltransférase et galactosyltransférase, elles se répartissent entre les fractions obtenues à $18\ 000\ g$ et à $105\ 000\ g$. Or, bien qu'insuffisamment purifiée, la fraction dite mitochondriale est contaminée par, au plus, 40 % des microsomes, si l'on tient compte des activités glucose 6-phosphatase et NADPH-cytochrome c réductase. Ce taux est très inférieur à celui des activités de transfert du D-mannose et du D-galactose qu'on retrouve au même niveau, qui est de 70 %. Il est donc plausible d'émettre l'hypothèse d'une localisation à la fois microsomique et mitochondriale de ces enzymes. D'ailleurs, certains travaux ont montré que, dans le foie de rat^{7,8}, le cortex cérébral de rat⁹ et dans les cellules en culture¹⁰, il existe des activités de transfert des sucres spécifiques aux mitochondries, confirmant ainsi l'autonomie de ces organites cellulaires.

En définitive, c'est dans cette répartition de la mannosyltransférase et de la galactosyltransférase qu'apparaissent des divergences avec les résultats obtenus chez le congre¹, où les trois glycosyltransférases se localisaient dans les microsomes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à exprimer leurs remerciements à MM. Nguyen Van Thoai et Le Gal qui ont bien voulu les accueillir au laboratoire maritime de Concarneau.

RÉFÉRENCES

- 1 M. B. MARTEL-PRADAL, G. BERTHILLIER ET R. GOT, *Carbohydr. Res.*, 24 (1972) 479-485.
- 2 J. FROT-COUTAZ ET R. GOT, *Biochimie*, 53 (1971) 595-601.
- 3 G. DALLNER, *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl.*, 166 (1963).
- 4 H. SCHACHTER, I. JABBAL, R. HUGGIN, L. PINTERIC, E. J. MCGUIRE ET S. ROSEMAN, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 1090-1100.
- 5 G. W. LOHR ET H. D. WALLER, dans H. U. BERGMEYER (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 1965, p. 744-751.

- 6 G. AVIGAD ET S. ENGLARD, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 1511-1513.
- 7 H. B. BOSMANN ET S. S. MARTIN, *Science*, 164 (1969) 190-192.
- 8 S. S. MARTIN ET H. B. BOSMANN, *Exp. Cell. Res.*, 66 (1971) 59-64.
- 9 H. B. BOSMANN, *Nature New Biology*, 234 (1971) 54-56.
- 10 M. W. MYERS ET H. B. BOSMANN, *FEBS Letters*, 26 (1972) 294-296.