

Incorporation d'acides aminés radioactifs dans les membranes des globules lipidiques du lait humain

Amino Acid Incorporation by Human Milk Fat Globules Membranes

M. B. MARTEL et R. GOT

Laboratoire de Biochimie des Membranes, Université Claude-Bernard, 43, Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69621 Villeurbanne (France), 3 octobre 1975.

Summary. Human milk fat globule membranes (MFGM) can incorporate radioactive ^{14}C amino acids in a hot trichloroacetic acid-insoluble material. Aspecific adsorption and bacterial contamination are unlikely. The products of protein synthesis were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate or by action of proteolytic enzymes. Various inhibitors of protein synthesis were assayed. Fragments of rough endoplasmic reticulum or mitochondria could be involved in this incorporation.

Les membranes des globules lipidiques (MGL) du lait humain sont le siège de nombreuses activités enzymatiques caractéristiques des membranes plasmiques, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique¹, aussi avons-nous été amené à y rechercher la présence éventuelle d'une activité d'incorporation d'acides aminés marqués.

Matériel et méthodes. Les membranes des globules lipidiques, obtenues selon une méthode déjà décrite², sont incubées à 37°C, en tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,8, contenant du KCl (25 mM) et du Mg SO₄ (5 mM), en présence d'une solution d'acides aminés radioactifs (0,2 μCi d'un mélange d'acides aminés ^{14}C provenant du C.E.A. par mg de protéine). Les incorporations sont arrêtées par addition d'acide trichloracétique à 10%. Après une hydrolyse de 15 min à 90°C, le milieu est filtré sur filtre Whatman GF/B. La radioactivité restant sur les filtres après un lavage par un mélange méthanol/chloroforme/éther (2/1/1) est déterminée par scintillation liquide.

Résultats et discussion. La cinétique d'incorporation (Figure) montre qu'un plateau est atteint au bout de 2 h. Une dilution isotopique par un facteur 100, réalisée après

1 h d'incubation, maintient constant le taux de radioactivité incorporée; aucun échange ne se produit avec les acides aminés marqués.

Les membranes ayant subi préalablement un traitement dénaturant, ébullition, précipitation par l'acide trichloracétique à 10% ou lavage par NaCl M, ne présentent plus d'activité d'incorporation, ce qui exclut l'éventualité d'une adsorption aspécifique.

Par ailleurs, l'addition d'un système donneur d'énergie³ est sans action sur l'incorporation, qui n'est donc pas due à des polysomes bactériens. D'ailleurs, la non-nécessité de source d'énergie exogène est fréquente dans les fractions membranaires fraîchement préparées, hétérogènes, qui contiennent encore certaines potentialités.

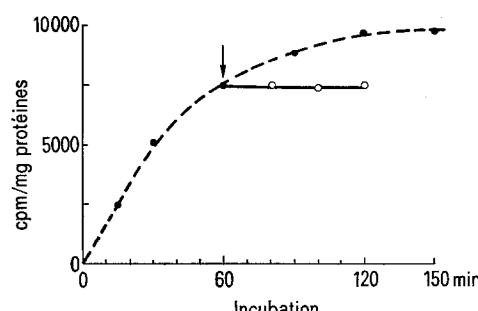
La possibilité d'une contamination bactérienne est également en désaccord avec le fait que sur les nombreux essais effectués, une préparation membranaire sur deux environ était inactive; compte-tenu de la standardisation de la méthode de préparation, une contamination bactérienne, si elle existait, devrait être systématique.

On peut également éliminer l'incorporation dans un matériel lipoïdal, déjà décrite⁴, puisque les filtres sont lavés par un solvant des lipides.

Une hydrolyse par un enzyme protéolytique, la pronase, rend l'essentiel de la radioactivité, non précipitable par l'acide trichloracétique en moins de 10 min. La radioactivité est bien de nature protéique. Toutefois, le fait que la leucine-aminopeptidase n'en libère que 20% en 15 h d'incubation permet d'exclure le simple transfert d'acide aminé radioactif à l'extrémité N-terminale d'une chaîne peptidique préexistante, comme cela a été observé dans les membranes synaptosomales du cerveau de rat⁵ et dans le tissu parathyroïde⁶.

L'analyse électrophorétique en gel d'acrylamide des protéines solubilisées par le dodécylsulfate de sodium fait apparaître 3 pics de radioactivité correspondant à des poids moléculaires voisins de 100 000 et ne concordant pas avec les bandes protéiques révélées par le bleu de Coomassie.

L'effet de diverses substances sur l'incorporation d'acides aminés ^{14}C est résumé dans le Tableau. Il en ressort que le phénomène est sous la dépendance d'acides ribonu-



Cinétique d'incorporation d'acides aminés marqués au ^{14}C dans les membranes des globules lipidiques du lait humain (●----●). La flèche correspond à l'introduction dans le milieu d'incubation de 100 fois plus d'acides aminés non marqués et la courbe (○—○) à l'évolution de la radioactivité dans ces conditions.

Action de diverses substances sur l'incorporation d'acides aminés ^{14}C dans les membranes des globules lipidiques

Addition	Inhibition (%)
Ribonucléase (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	62
EDTA (5 mM)	71
Puromycine (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	28
Cycloheximide (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	30
Chloramphénicol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	40
2,4-dinitrophénol (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	20

¹ M. B. MARTEL-PRADAL et R. GOT, FEBS Lett. 21, 220 (1972).

² M. B. MARTEL, P. DUBOIS et R. GOT, Biochim. biophys. Acta 311, 565 (1973).

³ E. FAIRHURST, D. McILREAVY et P. N. CAMPBELL, Biochem. J. 123, 865 (1971).

⁴ J. L. HAINING, T. FUKUI et B. AXELROD, J. biol. Chem. 235, 160 (1960).

⁵ J. M. GILBERT, J. biol. Chem. 247, 6541 (1972).

⁶ B. KEMPER et J. L. HABENER, Biochim. biophys. Acta 349, 235 (1974).

cléiques et nécessite du magnésium. Les inhibiteurs classiques de la synthèse protéique ont également un action.

Nos résultats présentent une grande analogie avec ceux obtenus par RAMIREZ et al.⁷ sur les membranes synaptosomales du cerveau de rat. Ces auteurs concluent à la présence de deux systèmes de biosynthèse protéique, l'un ergastoplasmique, l'autre mitochondrial. Dans les MGL, on observe un effet des inhibiteurs spécifiques des 2 systèmes, respectivement le cycloheximide et le chloramphénicol, auquel il faut joindre l'inhibition obtenue avec le 2,4-dinitrophénol. L'inhibition obtenue avec cet agent découpant montre qu'une source d'énergie mitochondriale est impliquée, au moins partiellement, dans l'incorporation. Il est intéressant de signaler que les MGL possèdent fréquemment une activité cytochrome oxydase⁸, caractéristique de la membrane interne des mitochondries.

La présence, dans les MGL, d'éléments ergastoplasmiques et mitochondriaux est corroborée par des travaux

de microscopie électronique^{9,10}. Certains globules lipidiques présentent une excroissance contenant des éléments cytoplasmiques qui seraient entraînés par le globule au moment de sa formation et de son expulsion de la cellule épithéliale. Ces membranes granulaires ou mitochondrielles ne se trouveraient, suivant les animaux, que dans 1 à 5% des globules, ce qui est en accord avec les variations individuelles que nous avons observées.

L'hétérogénéité des membranes des globules lipidiques du lait humain, déjà constatée par l'analyse des enzymes marqueurs¹, se trouve ainsi confirmée.

⁷ G. RAMIREZ, I. B. LEVITAN et W. E. MUSHYNSKI, J. biol. Chem. 247, 5382 (1972).

⁸ M. B. MARTEL, résultats non publiés.

⁹ F. B. P. WOODING, J. Cell Sci. 9, 805 (1971).

¹⁰ J. L. LINZELL et M. PEAKER, Physiol. Rev. 51, 564 (1971).

Isolation of (-)-Cryptosporiopsin, a Chlorinated Cyclopentenone Fungitoxic Metabolite from *Phialophora asteris* f. sp. *helianthi*

R. J. J. CH. LOUSBERG¹, Y. TIRILLY² and M. MOREAU²

Organisch Chemisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht, Croesestraat 79, NL-65985 Utrecht (The Netherlands); and Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté des Sciences, Avenue Victor le Gorgeu, F-29283 Brest Cedex (France), 2 October 1975.

Summary. The (–)-enantiomer of cryptosporiopsin, a chlorinated cyclopentenone fungitoxic metabolite, was isolated from *Phialophora asteris* f. sp. *helianthi*. Next to a comparable fungitoxic activity as shown by cryptosporiopsin, the product particularly inhibits growth of *Sclerotinia sclerotiorum*, an important pathogen on sunflower. Two further metabolites were tentatively identified as a stereoisomer of cryptosporiopsin and its dehydrated derivative.

The vascular pathogen causing sunflower yellows was first isolated by HOES³. Further studies resulted in its determination as *Phialophora asteris* f. sp. *helianthi*⁴. We observed that in vitro cultures of the fungus possessed a fungitoxic activity and the present paper describes the isolation and identification of this antifungal metabolite.

Liquid stationary cultures (100 ml of 2% malt extract each) of *P. asteris* f. sp. *helianthi* produced the active substance in varying amounts. Addition of tryptone stimulated the growth, but at the same time strongly inhibited the formation of the toxic metabolite. The biological assay was carried out by measuring the development of *Pythium splendens* in liquid medium (5 ml) containing 1 µl of the test-solution (acetone). Sterilization of the medium was carried out before addition of the test-solution, because of the observed drastic 30-fold decrease of fungitoxic activity of preparations after being kept for 10 min at 120°C.

Optimal toxin production by *P. asteris* f. sp. *helianthi* was observed after 12–15 days of incubation at 22°C. The medium was filtered and the filtrate reduced to 20% of its original volume. The residue was acidified (in HCl) to pH 3, extracted with an equal volume of CHCl₃ and, after centrifugation, the organic layer was collected and rotavaporated. The acetone-soluble part of the viscous residue was chromatographed twice (SiO₂, Merck pre-coated plates 20 × 20 cm; CHCl₃-MeOH 95:5). Variable amounts of the active compound were isolated with a maximal yield of 6–8 mg/l culture medium. The purified product was active towards *Pythium splendens* at a concentration of 5 µg/ml.

The colourless crystalline material (from ether m.p. 135–136°C) thus isolated was pure by thin-layer (Merck Fertigplatten SiO₂; chloroform-methanol 5% and chloroform) and gas chromatography (3% OV-17 on Chromosorb G AW-DMCS, 80–100 mesh; 170° isothermally). GCMS measurements gave identical mass spectra at all positions of the gas chromatographically eluted peak, thus confirming its homogeneity. The most remarkable feature of the mass spectrum was the occurrence of isotope peaks of the molecular ion of *m/e* 264 at *m/e* (M + 2)⁺ and (M + 4)⁺ in the ratio of 9:6:1. Loss of water resulted in a strong fragment ion at *m/e* 246 still possessing the typical isotope peaks in a similar ratio as the molecular ion. Loss of 35 mass units gives a strong fragment ion at *m/e* 229 with an isotope peak at *m/e* 231 in the ratio 9:3. The base peak at *m/e* (M-59)⁺ can be visualized by α-cleavage of a methyl ester group from the molecular ion. The observed isotope peaks and the fragmentation provide substantial evidence for the presence of 2 chloro atoms, a hydroxyl group and possibly a methyl ester group.

¹ The authors are much indebted to Dr. G. M. STRUNZ (Canadian Forestry Service) for valuable suggestions and the generous gift of cryptosporiopsin and to the University of Utrecht for the part-time fellowship to one of us (Y.T.) given.

² Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté des Sciences, Avenue Victor le Gorgeu, F-29283 Brest Cedex, France.

³ J. A. HOES, Phytopathology 62, 1088 (1972).

⁴ Y. TIRILLY and C. MOREAU, Bull. Soc. mycol. Fr., in press (1976).