

PRESENCE D'ENZYMES MARQUEURS DES MEMBRANES PLASMIQUES, DE L'APPAREIL DE GOLGI ET DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LES MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES DE LAIT MATERNEL

M.B. MARTEL-PRADAL et R. GOT

*Equipe de Recherche, CNRS N° 66, U.E.R. Lyon-Sud,
BP 12, 69-Oullins, France*

Received 20 December 1971

We report here the presence in human milk fat globules membranes of 5'-nucleotidase, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ and Mg^{2+} ATPases, and phosphodiesterase which are marker enzymes for the plasma membrane. Thiamine-pyrophosphatase, lactose and lactosamine synthetase were also found, which are usually considered as Golgi apparatus marker enzymes. Lastly, glucose-6-phosphatase, NADH-cytochrome *c* reductase and RNase, characteristic enzymes of the endoplasmic membrane, were also present.

1. Introduction

Il paraît bien acquis, actuellement, que les globules lipidiques du lait bovin sont enveloppés dans une membrane plasmique provenant des cellules de la glande mammaire. Les preuves en ont été apportées par des études morphologiques et biochimiques mettant en jeu des caractérisations de lipides et de protéines [1] et des déterminations d'activité enzymatique [2, 3]. Il ne semble pas que des études similaires aient été effectuées dans le lait maternel. Le but de cette note est de présenter une étude sur la teneur en enzymes des membranes des globules lipidiques (MGL) du lait maternel.

2. Matériel et méthodes

Les laits colostraux, prélevés entre le 3^e et le 10^e jour après la parturition sont centrifugés, à température ambiante, pendant 1 hr à 2500 g. La crème est lavée dans 10 fois son volume d'un tampon Tris-HCl 0.01 M pH 7,2, puis soumise à un barattage lent au Polytron, à 0°. Après formation des granules de beurre, le babeurre est dilué 10 fois dans le tampon précédent et centrifugé 1 hr à 40.000 g. Le culot

de membranes ainsi obtenu est lavé dans 30 fois son volume de tampon, recentrifugé dans les mêmes conditions et remis en suspension dans le sérum physiologique à une concentration de 4 mg des protéines par ml.

Les enzymes suivants ont été dosés, dans le lait total, le lait écrémé et la suspension de membranes: RNase [4], phosphodiesterase non spécifique [5], ATPases activés par Na^+ , K^+ ou Mg^{2+} [6], thiamine-pyrophosphatase [7], le phosphate libéré étant dosé selon Ueda et Wada [8], glucose-6-phosphatase, 5'-nucléotidase et NADH-cytochrome *c* réductase [9], nucléotide-pyrophosphatase avec, pour substrat, l'UDP-glucose [10] ou le NADH [11] et la xanthine-oxydase [12].

Les milieux d'incubation des glycosyltransférases sont constitués, pour un volume final de 260 μl , de tampon pipérazine-glycylglycine pH 6,5 (concentration finale 0,028 M), MnCl_2 (8 mM), UDP-galactose (0,04 mM) contenant 0,1 μCi d'UDP-galactose-[1-³H] (N.E.N., 1500 mCi/mmole) et de 25 μl de la suspension enzymatique (200 μg de protéines).

Après 40 min d'incubation à 37°, l'activité endogène est déterminée en dosant la radioactivité du précipité obtenu sur filtre (Whatman GF/B) par l'acide trichloracétique à 10%, lavé par un mélange

Tableau 1
Activités enzymatiques du lait total, du lait écrémé et des membranes des globules lipidiques.

Enzymes	Lait total	Lait écrémé	Membranes
RNase	40	40	56
Phosphodiesterase non spécifique	$0,4 \times 10^{-2}$	$0,3 \times 10^{-2}$	4×10^{-2}
ATPases (activées par $\text{Na}^+ \text{-K}^+$)	3×10^{-3}	—	60×10^{-3}
ATPases (activées par Mg^{2+})	0,20	0,10	1,4
Thiamine pyrophosphatase	3×10^{-3}	2×10^{-3}	$4,4 \times 10^{-3}$
Galactosyltransférase (accepteur endogène)	30	30	40
<i>N</i> -acétyllactosamine synthétase	1000	1000	115*
<i>N</i> -acétyllactosamine synthétase	—	—	52**
Lactose synthétase	—	—	0*
Lactose synthétase	—	—	23**
Glucose-6-phosphatase	0	$0,3 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}
NADH-cytochrome <i>c</i> réductase	2×10^{-3}	2×10^{-3}	9×10^{-3}
5'-Nucléotidase	$0,4 \times 10^{-3}$	0	4×10^{-3}
Nucléotide pyrophosphatase	0	—	0
Xanthine oxydase	0	0	0,02

Les activités enzymatiques sont données en $\mu\text{mole/min/mg}$ de protéines, sauf en ce qui concerne la RNase dont l'unité représente une ΔE_{260} de 0,001 par min d'incubation et les glycosyltransférases dont l'activité est exprimée en cpm/mg de protéines et par min d'incubation.

* Sans α -lactalbumine.

** Avec α -lactalbumine (1 mg/ml).

méthylal-méthanol (4/1). Dans le cas de la *N*-acétyllactosamine synthétase ou de la lactose synthétase, 10 μl d'une solution de *N*-acétyl-glucosamine ou de glucose (2 mM) sont ajoutés et éventuellement 25 μl d'une solution d' α -lactalbumine (250 μg). Après incubation, 20 μl du milieu sont soumis à une électrophorèse à haut voltage (60 V/cm) à pH 6,5 durant 40 min et la radioactivité restant au point de départ est déterminée. Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry.

3. Résultats et discussion

Les lavages successifs auxquels ont été soumises la crème et les MGL permettent d'exclure les risques de contamination par les enzymes solubles du lait.

Les résultats rapportés dans le tableau 1 corres-

pondent à une expérience type. Les activités enzymatiques ont pu varier du simple au double dans les diverses préparations membranaires réalisées, mais la répartition générale des enzymes reste la même. D'autre part, il est évident que les enzymes typiquement membranaires doivent voir leur activité spécifique diminuer dans le lait écrémé, par rapport au lait total. Ainsi, les enzymes marqueurs classiques des membranes plasmiques, 5'-nucléotidase et ATPases, se retrouvent dans les MGL avec un enrichissement considérable en activité spécifique. Les ATPases, insensibles à l'ouabaine, ont une activité nettement plus élevée que celles du lait bovin, contrairement à la 5'-nucléotidase [3]. Nous n'avons pu mettre en évidence de nucléotides-pyrophosphatases, alors qu'elles ont été dosées dans le lait bovin [3] et dans les membranes plasmiques du foie de rat [11]. Par contre, les phosphodiesterases non

spécifiques, considérées également comme caractéristiques des membranes plasmiques du foie de rat [13], existent dans les MGL avec une activité relativement élevée.

Mis à part ces enzymes qui confirment l'importance des membranes plasmiques dans les MGL, nous avons pu doser deux enzymes caractéristiques du réticulum endoplasmique, la glucose-6-phosphatase et la NADH-cytochrome *c* réductase. De même, à côté des RNases solubles, il existe dans le lait maternel, une RNase membranaire, comme dans les microsomes du foie de rat [14].

La présence des membranes golgiennes nous est suggérée par les activités thiamine pyrophosphatase et surtout *N*-acétyllactosamine synthétase qui en est l'enzyme marqueur type [15, 16], en particulier dans la glande mammaire [17]. Nous avons d'ailleurs vérifié que l' α -lactalbumine modifiait l'affinité de la transférase vis à vis du glucose et de la *N*-acétylglucosamine.

Il est intéressant de constater qu'il existe également activité de transfert du galactose sur accepteur endogène similaire à celle qui a déjà été montrée dans les microsomes de divers tissus ou organes.

Enfin, les MGL contiennent une activité xanthine oxydase, un des principaux enzymes du lait bovin, considéré d'ailleurs comme enzyme microsomique [2]. La présence de cet enzyme dans le lait maternel est discutée; il est de fait que nous n'avons pu le mettre en évidence ni dans le lait total ni dans le lait écrémé, ce qui confirme d'ailleurs sa localisation exclusivement membranaire.

En conclusion, si les MGL du lait maternel sont constituées principalement de membranes plasmiques des cellules de la glande mammaire, elles contiennent

également des éléments de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Cette hétérogénéité n'est d'ailleurs pas incompatible avec le mode de sécrétion des lipides du lait.

Bibliographie

- [1] T.W. Keenan, D.J. Morre, D.E. Olson, W.N. Yunghans et S. Patton, *J. Cell Biol.* 44 (1970) 80.
- [2] R.M. Dowben, J.R. Brunner et D.E. Philpott, *Biochim. Biophys. Acta* 135 (1967) 1.
- [3] S. Patton et E.G. Trams, *FEBS Letters* 14 (1971) 230.
- [4] S. Green et O. Bodansky, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2613.
- [5] A.I. Lansing, M.L. Belkhome, W.E. Lynch et I. Lieberman, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 1772.
- [6] G. Avigland et S. England, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 1511.
- [7] M. Yamazaki et O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 2934.
- [8] I. Ueda et T. Wada, *Anal. Biochem.* 37 (1970) 169.
- [9] H. Schachter, I. Jabbal, R. Hudgin, L. Pinteric, E.J. McGuire et S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 1090.
- [10] L.H. Schliselfeld, J. van Eys et O. Touster, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 811.
- [11] J.R. Skidmore et E.G. Trams, *Biochim. Biophys. Acta* 219 (1970) 93.
- [12] L.I. Hart, M.A. McGartoll, H.R. Chapman et R.C. Bray, *Biochem. J.* 116 (1970) 851.
- [13] O. Touster, N.N. Aronson, Jr., J.T. Dulaney et H. Hendrickson, *J. Cell. Biol.* 47 (1970) 604.
- [14] T. Scott-Burden et A.O. Hawtrey, *Biochem. J.* 115 (1969) 1063.
- [15] D.J. Morre, L.M. Merlin et T.W. Keenan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37 (1969) 813.
- [16] B. Fleisher, S. Fleisher et H. Ozawa, *J. Cell. Biol.* 43 (1969) 59.
- [17] P.N. Campbell, *FEBS Letters* 7 (1970) 1.