

ÉTUDE COMPARATIVE DE LA BIOSYNTÈSE DES PHOSPHATIDYLCHOLINES DANS LES NEURONES ET LES CELLULES GLIALES DU CERVEAU DE POULET

L. FREYSZ* and P. MANDEL

Centre de Neurochimie du CNRS, 11, rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

Received 25 November 1973

The activity of CDP-choline 1,2-diglyceride phosphocholine transferase was studied in chick brain neurons and glial cells. The specific activity was 2.7-fold higher in the neurons than in the glial cells. Both cell types had an optimum activity at pH 8.0. Mg^{2+} and Mn^{2+} activated the enzyme, while Ca^{2+} was inhibitory. CDP-ethanolamine and CMP were competitive inhibitors. The apparent K_M of the enzyme for the CDP-choline was found to be 0.39×10^{-4} M in the neurons and 0.17×10^{-4} M in the glial cells. This suggests the existence of isoenzymes for the CDP-choline 1,2-diglyceride phosphocholine transferase in chick brain.

1. Introduction

Nous avons montré antérieurement qu'au cours du développement du cerveau de Poulet l'activité de la CDP-choline 1,2-diglycéride phosphocholine transférase (EC 2.7.8.2) évolue parallèlement à l'accroissement des lécithines [1]. Par ailleurs, le K_M apparent déterminé pour la CDP-choline sur des homogénats de cerveaux diminue de façon notable entre le 11^{ème} et le 13^{ème} jour de la vie embryonnaire lorsque débute la différenciation et la prolifération des cellules gliales, suivie des phénomènes de myélinisation. Cette augmentation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat suggère soit la levée d'une inhibition compétitive, soit la néosynthèse d'une nouvelle isoenzyme localisée probablement au niveau des cellules gliales, soit l'apparition des deux phénomènes simultanément. Dans le but de préciser la nature du phénomène, nous avons étudié la cinétique de la CDP-choline 1,2-diglycéride phosphocholine transférase dans les neurones et les cellules gliales du cerveau de poulet adulte.

2. Techniques

Nos essais ont porté sur des cerveaux de Poulets adultes de race Leghorn. Après décapitation, les hémisphères cérébraux sont immédiatement prélevés et traités en vue soit de la préparation des microsomes par la méthode de Horrocks [2], soit de l'isolement des neurones et des cellules gliales par la méthode de Sellinger et coll. [3]. Chaque fraction cellulaire est lavée deux fois par du tampon Tris-HCl 0,02 M pH 8,00, EDTA 10^{-3} M. En vue de l'étude des lipides, les culots cellulaires sont extraits par du C-M 2:1 selon Folch [4]. Le cholestérol est déterminé par la réaction de Lieberman [5] et les phospholipides par dosage du phosphore selon Chen et coll. [6] après minéralisation par un mélange acide sulfurique-perhydrol. Le fractionnement et la détermination des divers phospholipides sont réalisés par chromatographie sur colonne [7] suivie d'une chromatographie sur couche mince [8]. Le résidu d'extraction des lipides sert à la détermination du DNA par la méthode de Burton [9].

Pour la détermination de l'activité de la CDP-choline 1,2-diglycéride transférase, les culots cellulaires sont broyés à l'aide d'un homogénéiseur du type Potter-Elvehjem dans le tampon Tris-HCl 0,02 M pH 8,00 EDTA 10^{-3} M et centrifugés à 105 000 g

* Chargé de Recherche au CNRS.

pendant 45 min. Les culots sont relavés dans les mêmes conditions, puis rehomogénéisés dans le tampon précédent à raison de 1 ml pour 1 à 3 mg de protéines. La concentration en protéine est évaluée par la méthode de Lowry et coll. [10] et l'activité de la CDP-choline 1,2-diglycéride phosphocholine transférase déterminée par la technique de Mudd et coll. [11] tel que nous l'avons rapporté récemment [1].

3. Résultats et discussion

L'observation microscopique en contraste de phase de la fraction neurone montre que les cellules sont en bon état de conservation et similaires à celles obtenues pour le cerveau de Rat [2, 8]. Il en est de même de la fraction gliale, celle-ci renfermant cependant quelques débris cellulaires.

L'étude de la composition chimique (tableau 1) révèle une nette différence entre les deux types de cellules. Rapporté au DNA, soit en première approximation à l'échelle cellulaire, le taux de protéine est environ 2,9 fois plus élevé dans les cellules gliales que dans les neurones. La teneur en lipides et en phospholipides est en moyenne cinq fois supérieure dans les cellules gliales, tandis que celle en cholestérol est 7,5 fois plus élevée. Des différences analogues ont

été rapportées pour les deux types cellulaires du cerveau de Rat [7, 12]. Ces différences sont non seulement le reflet de l'aspect morphologique des deux types cellulaires, mais également celui de leur structure chimique. En effet, lorsqu'on évalue les résultats par rapport aux protéines, les teneurs en lipides, en cholestérol et en phospholipides sont en moyenne 1,5, 2,8 et 1,7 fois plus élevées dans les cellules gliales que dans les neurones. La distribution des divers phospholipides est similaire dans les neurones et les cellules gliales, les phosphatidylcholines accusant le taux le plus élevé, les phosphatidylinositols et les cardiolipides les taux les plus faibles. Notons également que la répartition des divers phospholipides dans les neurones et les cellules gliales est analogue à celle rapportée pour les deux types cellulaires du cerveau de Rat [1, 12] et de Lapin [13].

La durée d'incubation pour la détermination de l'activité de la CDP-choline 1,2-diglycéride phosphocholine transférase a été fixée à 30 min; dans ces conditions d'incubation la biosynthèse des phosphatidylcholines reste linéaire pendant 60 min (fig. 1).

Tableau 1
Composition chimique des neurones et des cellules gliales du cortex cérébral de Poulet adulte.

	Neurones	Cellules gliales
Protéines	62,0	178,0
Lipides totaux	29,0	128,6
Cholestérol	3,2	26,0
Phospholipides	16,1	79,0
Cardiolipides	0,9 (5,6)	4,0 (5,1)
Phosphatidyléthanolamines*	5,0 (31,0)	25,3 (32,0)
Phosphatidylinositols	0,8 (4,9)	3,8 (4,8)
Phosphatidylsérines	1,3 (8,1)	7,0 (8,8)
Phosphatidylcholines*	6,7 (41,6)	31,6 (40,0)
Sphingomyélines	1,3 (8,1)	7,4 (9,3)

Les résultats sont exprimés en mg par mg de DNA. Les valeurs entre parenthèses représentent le taux de chaque phospholipide par rapport aux phospholipides totaux.

* Inclus les plasmalogènes.

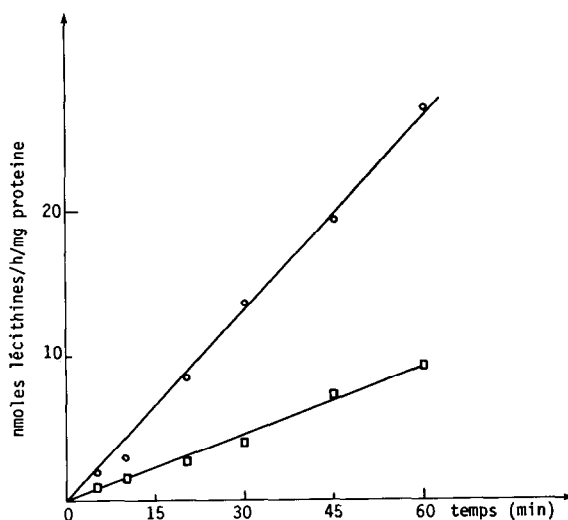


Fig. 1. Synthèse des lécithines en fonction du temps. Le milieu d'incubation contient: 150 μ moles de Tris-HCl pH 7,2, 20 μ moles de Mg^{2+} , 10 μ moles de mercaptoéthanol, 7,5 μ moles de diglycérides, 0,015% de Tween, 0,05 μ moles de CDP-choline radioactive ($1,04 \times 10^6$ coups/min/ μ moles) et 0.1 ml d'homogénat cellulaire contenant 0,1 à 0,2 mg de protéines dans 1 volume final de 2 ml. (○—○—○) Neurones; (□—□—□) cellules gliales.

Tableau 2

Activité de la CDP-choline 1,2-diglycérade phosphocholine transférase dans les neurones et les cellules gliales du cortex cérébral de Poulet adulte.

Lécithines formées	Neurones	Cellules gliales
nmoles/h/mg protéines	28,1	9,6
nmoles/h/mg DNA	1741	1729

Les conditions d'incubation sont identiques à celles de la fig. 1.

L'activité de la CDP-choline 1,2-diglycérade transférase rapportée à 1 mg de protéine est en moyenne 2,7 fois plus élevée dans les neurones, cependant évaluée par cellule, on note que la capacité de synthèse de lécithine est du même ordre de grandeur dans le neurone que dans la cellule gliale (tableau 2) ce qui s'explique par la taille beaucoup plus grande des cellules gliales. Le pH optimal de l'enzyme est de 8,0 pour les deux types de cellules, du même ordre de grandeur que celui rapporté pour l'enzyme de cerveau et de foie de Rat [14, 15]. L'enzyme de chaque type cellulaire a un besoin absolu en ions Mn^{2+} ou Mg^{2+} . Dans les deux types cellulaires la concentration optimale est 5 mM pour les ions Mn^{2+} et 25 mM pour les ions Mg^{2+} . Les ions Ca^{2+} par contre, provoquent une inhibition de 100% à une concentration de 1 mM, résultats en accord avec ceux de McCaman et Cook [14]. Le CMP et la CDP-éthanolamine se révèlent être des inhibiteurs compétitifs (fig. 2). A une concentration de 0,25 mM le taux

d'inhibition dans les neurones et les cellules gliales est de 53% pour le CMP et de 40% pour la CDP-éthanolamine. La régulation de la synthèse des lécithines est donc assurée pour une part du moins par un effet de rétro-inhibition d'un des produits de la réaction.

L'étude de l'affinité de l'enzyme pour la CDP-choline révèle que le K_M apparent est en moyenne de $0,39 \times 10^{-4}$ M pour l'enzyme neuronal et de $0,17 \times 10^{-4}$ M pour l'enzyme des cellules gliales (fig. 3). Cette différence pourrait résulter soit de la concentration plus importante en inhibiteurs compétitifs du type CMP, CDP-éthanolamine, dans les neurones, soit de la présence d'une enzyme spécifique à chaque type cellulaire. Nous pensons que cette deuxième hypothèse soit à retenir, car les lavages intensifs des homogénats cellulaires devraient éliminer quantitativement les analogues structuraux de la CDP-choline. Par ailleurs, le K_M apparent de la CDP-choline 1,2-diglycérade phosphocholine transférase des microsomes du cerveau (site de localisation de l'enzyme) contenant un mélange de microsomes des deux types cellulaires, est égal à la somme arithmétique des K_M des enzymes des neurones et des cellules gliales (tableau 3). Il semble donc que le cerveau de Poulet contienne au moins deux isoenzymes de la CDP-choline 1,2-diglycérade phosphocholine transférase dont l'une serait localisée préférentiellement dans les neurones et l'autre essentiellement dans les cellules gliales.

La capacité de synthèse des lécithines du réticulum endoplasmique de chaque type cellulaire étant similaire telle qu'elle apparaît à la lumière de la mesure

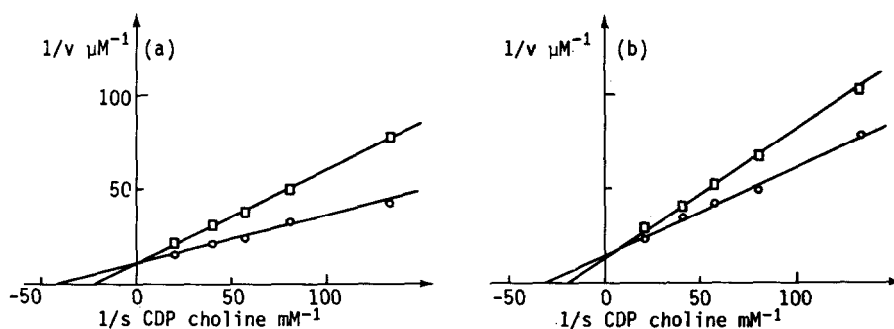


Fig. 2. Inhibition compétitive de la CDP-choline diglycérade phosphocholine transférase de microsomes du cerveau de Poulet par la CDP-éthanolamine et le CMP. Représentation graphique selon Lineweaver-Burk. a) $\circ-\circ-\circ$, CDP-éthanolamine = 0; $\square-\square-\square$, CDP-éthanolamine = 0,230 mM. b) $\circ-\circ-\circ$ CMP = 0; $\square-\square-\square$ CMP = 0,230 mM. Les conditions d'incubation sont identiques à celles de la fig. 1.

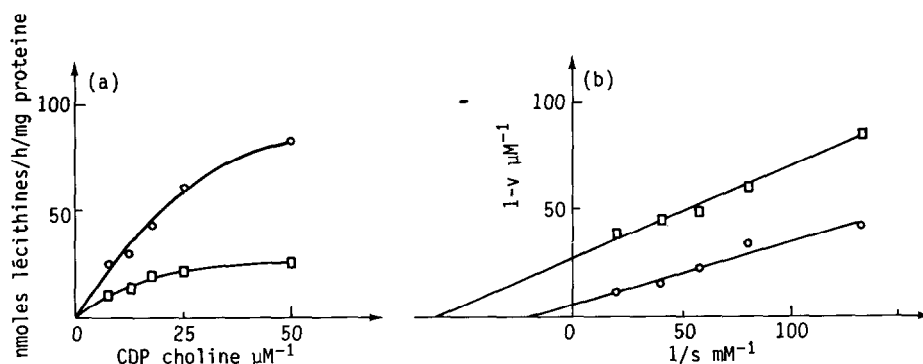


Fig. 3: a) Cinétique de la phosphocholine diglycéride transférase en fonction du substrat (CDP-choline); b) représentation graphique selon Lineweaver-Burk. (○—○—○) Neurones; (□—□—□) cellules gliales. Les conditions d'incubation sont identiques à celles de la fig. 1.

Tableau 3

K_M apparent de la CDP-choline 1,2-diglycéride phosphocholine transférase du cerveau de Poulet pour la CDP-choline.

Neurones	$0,39 \pm 0,11 \times 10^{-4}$ M
Cellules gliales	$0,17 \pm 0,03 \times 10^{-4}$ M
Microsomes	$0,28 \pm 0,07 \times 10^{-4}$ M

Chaque valeur représente la moyenne de 6 expériences. Les conditions d'incubation sont identiques à celles de la fig. 1.

de l'activité de la phosphocholine diglycéride transférase, suggère que le renouvellement des phosphatidylcholines des neurones est plus intense que celui des cellules gliales, ce dernier type cellulaire accusant un taux de lécithine 5 fois supérieur à celui des neurones et étant également le lieu de synthèse des composés des gaines de myéline [16, 17]. Une telle hypothèse est en accord avec nos résultats antérieurs montrant que les demi-vies des phosphatidylcholines des neurones sont plus courtes que celles des composés correspondants des cellules gliales [18].

Bibliographie

- [1] Freysz, L., Lastennet, A. et Mandel, P. (1972) *J. Neurochem.* 19, 2599.
- [2] Horrocks, L. (1969) *J. Neurochem.* 15, 483.
- [3] Sellinger, O.Z., Ascurra, J.M., Johnson, D.E., Ohlsson, W.G. et Lodin, Z. (1971) *Nature New Biol.* 230, 253.
- [4] Folch, J., Lees, M. et Sloane-Stanley, G. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 497.
- [5] Libermann, C. (1885) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 18, 1803.
- [6] Chen, P.S., Toribara, T. et Warner, H. (1956) *Anal. Chem.* 28, 1756.
- [7] Freysz, L., Bieth, R., Judes, C., Sensenbrenner, M., Jacob, M. et Mandel, P. (1968) *J. Neurochem.* 15, 307.
- [8] Nussbaum, J.L., Neskovic, N.M. et Mandel, P. (1969) *J. Neurochem.* 16, 927.
- [9] Burton, K. (1956) *Biochem. J.* 62, 315.
- [10] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- [11] Mudd, J.B., Van Golde, L.M. et Van Deenen, L.L.M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 176, 547.
- [12] Norton, W.T. et Poduslo, S.E. (1971) *J. Lipid Res.* 12, 84.
- [13] Hamberger, A. et Svennerholm, L. (1971) *J. Neurochem.* 18, 1821.
- [14] McCaman, R.E. et Cook, K. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3390.
- [15] Weiss, S.B., Smith, S.W. et Kennedy, E.P. (1958) *J. Biol. Chem.* 231, 53.
- [16] Jungalwala, F.B. et Dawson, R.M.C. (1971) *Biochem. J.* 123, 683.
- [17] Miller, E.K. et Dawson, R.M.C. (1972) *Biochem. J.* 126, 823.
- [18] Freysz, L., Bieth, R. et Mandel, P. (1969) *J. Neurochem.* 16, 1417.