

BBA 66811

GLUCOKINASE MICROSOMIQUE DU FOIE DE RAT

LOCALISATION DANS UNE FRACTION RICHE EN APPAREIL DE GOLGI

G. BERTHILLIER, P. DUBOIS ET R. GOT

Laboratoire de Biochimie, I. E.R no. 66, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621 Villeurbanne (France)

(Received August 4th, 1972)

SUMMARY

Microsomal glucokinase of rat liver. Localisation in a Golgi-rich fraction

Glucokinase activity was previously found to be associated with a microsomal fraction of rat liver. Zonal centrifugation has been used to determine the localisation of this glucokinase. The fraction which contains 60% of glucokinase activity shows also 37% of UDPgalactose:*N*-acetylglucosamine galactosyltransferase activity. These enzymic activities are purified 10- and 6.5-fold over the crude microsomal fraction, respectively. Morphologically the fraction consists mainly of smooth membranes with bilsacs and tubular elements. These results suggest that this fraction is derived from the Golgi apparatus. It does not contain appreciable amounts of enzymes such as glucose-6-phosphatase and 5'-nucleotidase. The level of thiamine pyrophosphatase is higher (50%). The function of this glucokinase bound to a Golgi-rich fraction of rat liver is discussed.

INTRODUCTION

A côté de 4 hexokinases solubles à fort (glucokinase) et faible K_m , il existe dans le foie de rat, une activité glucokinase liée à des particules cellulaires¹. Diverses méthodes de fractionnement cellulaire ont montré que cette activité était liée aux microsomes caractérisés par leur forte teneur en glucose-6-phosphatase et par une étude morphologique¹.

La solubilisation maximale de l'activité glucokinase obtenue par le Triton X-100 amène à envisager une localisation membranaire.

Le but de ce travail est de préciser la fraction submicrosomique contenant cette activité glucokinase, de la caractériser à l'aide d'enzymes marqueurs et d'un examen par microscopie électronique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

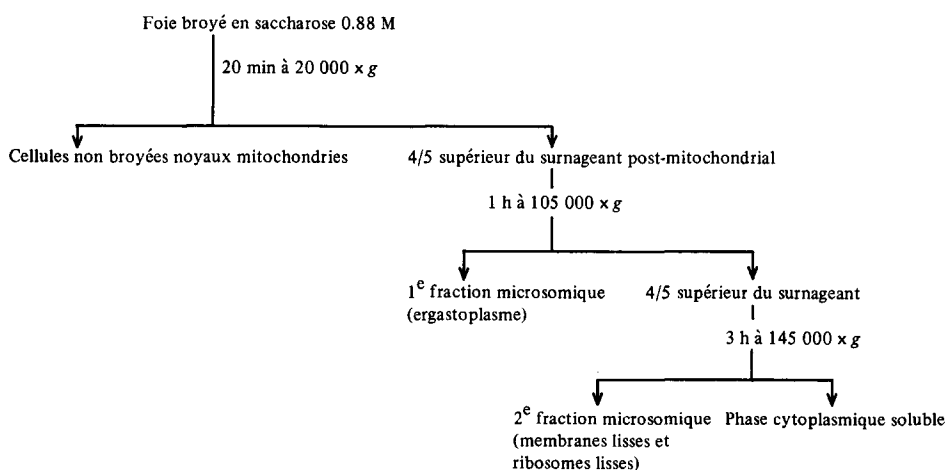
Les rats mâles, de souche Wistar, pesant 250–300 g et nourris à volonté, sont tués par décapitation. Le foie est aussitôt prélevé et plongé dans une solution glacée du tampon de broyage, dilacéré et lavé plusieurs fois par ce tampon.

L'homogénat est obtenu en broyant le tissu dans le tampon approprié à la méthode de fractionnement utilisé (1 g de tissu frais dans 3 ml de tampon) à l'aide d'un broyeur Potter-Elvehjem équipé d'un piston en téflon (3 passages de 30 s).

*Méthodes**Fractionnement cellulaire*

(a) En saccharose 0.25 M². La solution de broyage est constituée par un tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 8) 0.25 M en saccharose, contenant de l'EDTA (4 mM) et du mercaptoéthanol (4 mM). Après deux centrifugations à $600 \times g$, puis $25\,000 \times g$ destinées à éliminer les noyaux, les cellules non broyées, les mitochondries et les lysosomes, une centrifugation d'une heure à $105\,000 \times g$ permet d'obtenir un culot de microsomes qui est lavé deux fois par le tampon. Cette fraction, considérée comme une fraction microsomique totale, sert de référence dans le Tableau I.

(b) En saccharose 0.88 M³. On utilise le même tampon de broyage que dans la méthode précédente, mais 0.88 M en saccharose. Le fractionnement, réalisé dans une centrifugeuse Spinco (Modèle L) est résumé dans le schéma suivant :



Les deux fractions microsomiques obtenues sont lavées deux fois par le tampon.

(c) Préparation des fractions submicrosomiques par un gradient discontinu de saccharose^{4,5}. L'homogénat est préparé dans un tampon phosphate 0.1 M (pH 7.5), 0.25 M en saccharose, contenant de l'EDTA (4 mM), du mercaptoéthanol (4 mM), du MgSO_4 (1 mM), du glucose (5 mM) et 1% de dextran (poids moléculaire 200 000–275 000, B.D.H., Grade A). A partir de cet homogénat, les microsomes sont préparés comme précédemment², lavés et remis en suspension dans le tampon sans dextran, contenant une concentration de 45% en saccharose. 10 ml de la suspension sont déposés au fond d'un tube de rotor SW 25-I (ultracentrifugeuse Spinco). Puis, on

dépense dans l'ordre: 6.5 ml d'une solution à 35% de saccharose dans le tampon de broyage, 6.5 ml d'une solution à 30%, 5 ml d'une solution à 25% et 2.5 ml de tampon.

Après centrifugation, pendant 16 h à $64\,000 \times g$ du gradient discontinu ainsi constitué, les zones obtenues sont aspirées, par le haut, à l'aide d'une seringue, diluées dans le tampon de broyage et centrifugées 1 h à $110\,000 \times g$. Les sédiments sont lavés une fois dans le même tampon.

Dosages enzymatiques

(a) Glucokinase (ATP:D-glucose 6-phosphotransférase, EC 2.7.1.2). Cet enzyme est dosé spectrophotométriquement selon une méthode précédemment décrite¹. Brièvement, on dose le glucose 6-phosphate formé, grâce à une réaction de déshydrogénation catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, dans laquelle le NADP⁺ est transformé en NADPH, ce qui entraîne une augmentation de l'absorbance à 340 nm⁶. Le dosage se fait en présence d'un excès de 6-phosphogluconate déshydrogénase, afin d'éliminer l'interférence éventuelle de cet enzyme⁷. Le milieu réactionnel est constitué de tampon Tris-HCl 0.08 M (pH 8), contenant du NADP⁺ (0.55 mM), de l'ATP (3.7 mM), du MgCl₂ (7.4 mM), de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (0.05 unité), de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (0.05 unité), de l'EDTA (0.01 mM), du mercaptoéthanol (0.01 mM), du Triton X-100 (0.1%). A 2.8 ml de ce milieu, à 30 °C, sont ajoutés 100 µl de tampon dans la cuve témoin et 100 µl de la préparation enzymatique dans la cuve de dosage. La réaction est initiée par addition de 200 µl d'une solution 1.5 M de glucose. On enregistre la cinétique correspondante pendant 5 min, la pente de la partie linéaire de la courbe étant prise comme vitesse initiale.

(b) Glucose-6-phosphatase⁸ (D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase, EC 3.1.2.9). A 40 µl de milieu réactionnel constitué de tampon maléate 0.06 M (pH 6.5) contenant du glucose 6-phosphate (25 mM), 0.02 µCi de [U-¹⁴C]glucose 6-phosphate (C.E.A., lot No. 3876, 52 Ci/mole) et du Triton X-100 (0.15%), on ajoute, à 37 °C, 10 µl de la préparation enzymatique.

La réaction est arrêtée après un temps variable par addition de 10 µl d'HCl 1 M. Des fractions aliquotes (20 µl) de chaque essai sont déposées sur une feuille de papier MN 214, imbibée de tampon acétate de pyridine (pH 6.5). Une électrophorèse à haut voltage (60 V/cm) est alors réalisée à ce pH, pendant 30 min, dans l'appareil Pherograph. La feuille est ensuite séchée et des zones de 3 cm de diamètre sont découpées au niveau des dépôts. La radioactivité restant au point de départ) [¹⁴C]glucose) est mesurée dans un compteur à scintillation liquide Packard Tri-Carb. Le liquide scintillateur est constitué de toluène (Merck) contenant 5 g/l de 2,5-diphenyloxazole et 0.3 g/l de 1,4-bis-2,4-méthyl-5-phényloxasolylbenzène.

(c) 5'-Nucléotidase (5'-ribonucléotide phosphohydrolase, EC 3.1.3.5). A 40 µl de milieu réactionnel contenant du tampon glycolle 0.12 M (pH 8.5), de l'AMP (7.4 mM), 0.02 µCi de [U-¹⁴C]AMP (C.E.A., lot No. 3776, 240 Ci/mole) et du MgCl₂ (12 mM), on ajoute à 37 °C, 10 µl de la préparation enzymatique⁸. La réaction est arrêtée par congélation brutale dans l'azote liquide. La détermination de l'activité est effectuée comme ci-dessus.

(d) Thiamine pyrophosphatase (thiamine pyrophosphate phosphohydrolase, EC 3.6.1.-). On dose le phosphate libéré, à 37 °C, en tampon Tris 0.04 M (pH 8.5) contenant du MgCl₂ (4 mM), à partir du pyrophosphate de thiamine (2 mM). La méthode de dosage utilisée est celle de Ueda et Wada⁹ qui comprend une extraction par le

chloroforme et l'isobutanol, la coloration étant obtenue par un réactif vanadomolybdique.

(e) Galactosyltransférase (UDPGalactose:*N*-acétylglucosamine galactosyltransférase, EC 2.4.1-).

On détermine le transfert de [^3H]galactose à partir d'UDP[^3H]galactose, à la *N*-acétylglucosamine, qui sert alors d'accepteur exogène, pour donner de la *N*-[^3H]acétyllactosamine. A 260 μl du milieu réactionnel constitué de tampon pipérazine glycylglycine 0.028 M (pH 6.5), contenant de l'UDP-galactose ($3.8 \cdot 10^{-2}$ mM), 0.1 μCi d'UDP[^3H]galactose (N.E.N., lot No. 489.096, 1500 Ci/mole), du MgCl_2 (2 mM), du Triton X-100 (0.74%) et de la *N*-acétylglucosamine (2 mM), sont ajoutés 40 μl de la préparation enzymatique. Après incubation à 37 °C, la réaction est arrêtée par congélation brutale dans l'azote liquide et l'activité est déterminée comme dans le cas de la glucose-6-phosphatase. Dans les conditions d'électrophorèse utilisées, l'UDP-galactose migre de 8-10 cm vers l'anode alors que la lactosamine synthétisée, substance non chargée, reste au point de départ.

Chaque fois que cela a été possible, les dosages enzymatiques ont été réalisés sur les fractions dès leur obtention. Dans les autres cas, les fractions submicrosomiques ont été congelées dans l'azote liquide. Des vérifications ont montré que les fractions conservent alors intégralement leur activité après décongélation.

Dosages chimiques

Les taux de protéines sont déterminés par la méthode du biuret. Les acides ribonucléiques sont dosés à 260 nm après extraction par HClO_4 0.5 M à 70 °C du précipité obtenu par l'acide trichloracétique à 5%¹⁰.

Microscopie électronique

Le culot de la fraction riche en appareil de Golgi est fixé pendant 30 min à 4 °C dans l'acide osmique à 1% dans un tampon véronal-acétate de sodium 0.1 M (pH 7.4), contenant du CaCl_2 (2.4 mM) et du NaCl (0.06 mM) comme le préconisent Fleisher et Fleisher¹¹. Après inclusion à l'araldite, les coupes sont faites sur un ultramicrotome Sorvall type MT 1, montées sur grille de cuivre, colorées à l'acétate d'uranyle associé au citrate de plomb. Les observations sont effectuées sur un microscope électronique JEM 7.

RÉSULTATS

Caractérisation enzymatique

Nous avons montré, dans un travail antérieur, (1) que les microsomes totaux renferment 5-10% de la cytochrome oxydase, moins de 20% de la phosphatase acide et sont dépourvus de glucose-6-phosphate déshydrogénase. L'homogénat total contenant une glucokinase soluble, nous nous référons à la fraction microsomique totale pour le calcul de l'activité récupérée et de l'activité spécifique relative dans chaque fraction.

Le fractionnement en saccharose 0.88 M montre que la 2^e fraction microsomique, c'est-à-dire les membranes agranulaires, contient 8 fois plus de glucokinase que les membranes granulaires, environ 60% de l'activité présente dans les microsomes totaux. L'activité spécifique y est 2.3 fois plus élevée que dans les microsomes totaux et 3.8 fois plus que dans les membranes granulaires (Tableau I).

TABLEAU I

RÉPARTITION DE LA GLUCOKINASE ENTRE LES DEUX FRACTIONS MICROSOMIQUES OBTENUES DANS LE FRACTIONNEMENT EN SACCHAROSE 0.88 M

Les chiffres donnés dans les tableaux représentent les valeurs obtenues dans une expérience type. Les variations relatives correspondant à divers essais ne dépassent pas plus ou moins 15% dans les pourcentages de répartition et plus ou moins 25% dans les valeurs spécifiques relatives.

Fractions	Activité totale (U.I.)	Glucokinase (pourcentage d'activité récupérée)	Activité spécifique* relative
Microsomes totaux	$1.3 \cdot 10^{-2}$	100	1
1 ^e fraction microsomique	$0.1 \cdot 10^{-2}$	7.7	0.65
2 ^e fraction microsomique	$0.78 \cdot 10^{-2}$	60	2.3

* Rapport de l'activité spécifique de chaque fraction à celles des microsomes totaux², utilisés comme témoin.

Le Tableau II donne les résultats obtenus dans le fractionnement en gradient discontinu réalisé à partir de microsomes préparés en présence de phosphate et de dextran qui ont la propriété de protéger les structures golgiennes⁵.

Près de 60% de l'activité glucokinasiqne initiale se retrouvent dans la Fraction 2 du gradient (densité 1.12) avec un facteur de purification de 10. Cette fraction contient également 50% de la thiamine pyrophosphatase et 37% de la *N*-acétyllactosamine synthétase. Le pourcentage de récupération de cette galactosyltransférase est relativement faible dans la Fraction 2, mais il faut noter que les autres fractions du gradient en contiennent beaucoup moins. De plus, le facteur de purification 6.5 est pratiquement 5 fois plus élevé dans cette fraction que dans les autres.

Si actuellement, le rôle de la thiamine pyrophosphatase comme enzyme marqueur de l'appareil de Golgi est contesté¹², il semble bien, au contraire, que l'activité de transfert du galactose sur la *N*-acétylglucosamine soit caractéristique de cet organelle cellulaire^{8,13}. Notons également que seulement 5.5% de glucose-6-phosphatase, enzyme type du réticulum endoplasmique, dont l'activité est faible dans l'appareil de Golgi¹⁴, se situent dans la Fraction 2, avec une activité spécifique inférieure à celle des microsomes totaux.

Microscopie électronique

L'examen au microscope électronique de coupes ultrafines a permis de contrôler l'aspect morphologique de la fraction riche en appareil de Golgi (Fraction 2 du Tableau II). Cette fraction est constituée de vésicules de taille très variable (0.1–0.5 μ m) en relation ou non avec des tubules épars. Certains tubules sont plus ou moins dilatés à leur extrémité. Il n'y a pas de mitochondries, même altérées, ni de membranes granulaires. Les nombreuses coupes observées, provenant de diverses parties, sont très homogènes (Figs 1 et 2).

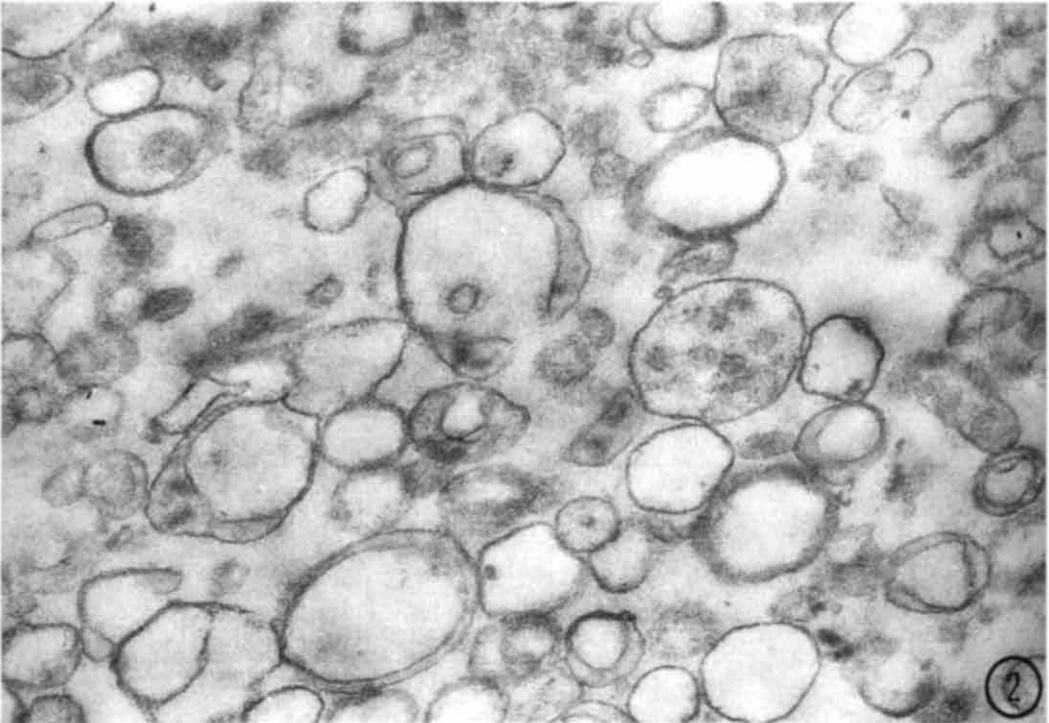
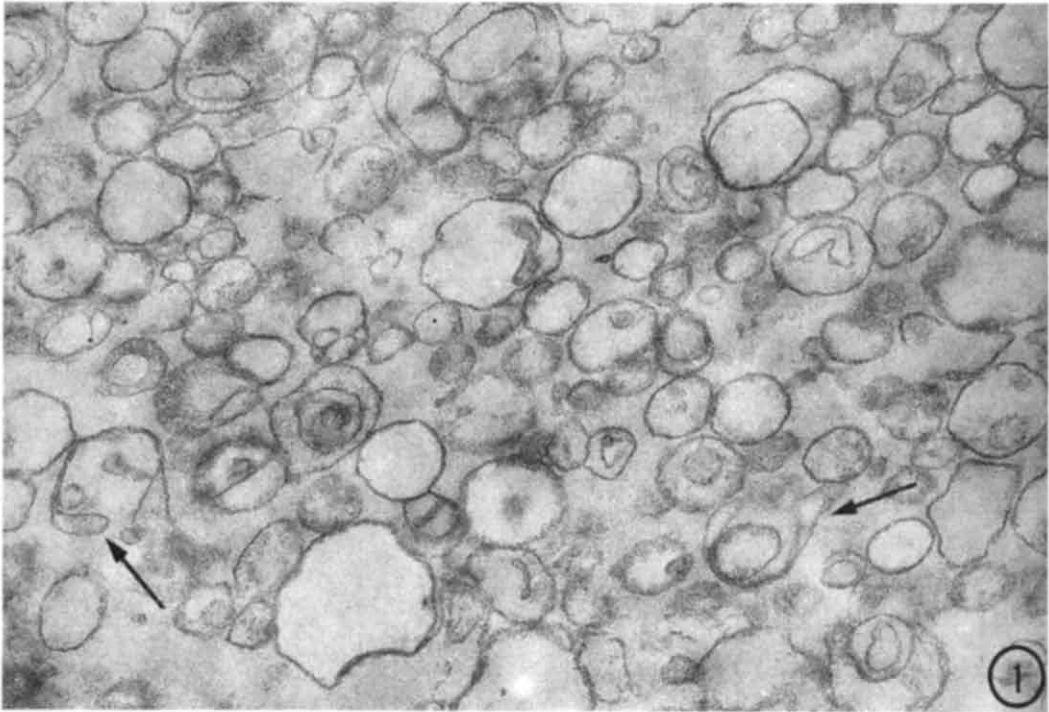
DISCUSSION

Si l'on se réfère au dosage de l'UDP-galactose:*N*-acétylglucosamine galactosyltransférase, la Fraction 2 du gradient discontinu (Tableau II) est une fraction riche en appareil de Golgi, comme le confirment sa faible densité apparente et le fait qu'elle

TABLEAU II

RÉPARTITION DE DIVERSES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES ENTRE LES FRACTIONS OBTENUES PAR GRADIENT DISCONTINU DE SACCHAROSE À PARTIR DE MICRO-
SOMES PRÉPARÉS EN PRÉSENCE DE PHOSPHATE ET DE DEXTRAN
Pour chaque enzyme, la première colonne donne le pourcentage d'activité récupérée dans chaque fraction par rapport à l'activité des microsomes totaux
conservés dans les mêmes conditions. La deuxième colonne donne l'activité spécifique relative.

Fractions	Densité	Glucokinase	Thiamine pyrophosphatase	N-Acétyllactosamine synthétase	5'-Nucleotidase	Glucose-6-phosphatase
1	1.1	16.5	5	0	—	—
2	1.12	59	10	50	7.5	—
3	1.14	0	—	16.5	0.8	0.89
4	1.16	0	—	20	2.3	31
5	1.20	0	—	20	1.2	44
6	Sédiment	17	1.75	0	—	0.89
						2.9
						0.27

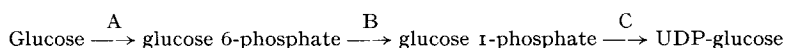


ne contienne que le vingtième de la glucose-6-phosphatase des microsomes initiaux. Ajoutons que cette fraction est celle pour laquelle le rapport RNA/protéine est le plus faible. Aucune membrane granulaire n'est mise en évidence par la microscopie électronique. La principale contamination serait due aux membranes plasmiques (15% de la 5'-nucléotidase) que l'on peut localiser dans la fraction suivante (Fraction 3).

Puisque l'essentiel de la glucokinase membranaire s'y retrouve avec le taux de purification le plus élevé, il semble donc que l'on peut localiser cet enzyme dans l'appareil de Golgi.

A partir de cette localisation, on peut émettre des hypothèses sur le rôle de cette glucokinase qui possède des propriétés régulatrices assez particulières^{15,16}. Une certaine similitude entre ses caractéristiques et celles de la phosphofructokinase ont permis d'envisager un rôle régulateur dans la glycolyse¹⁵, mais le caractère membranaire de cet enzyme paraît peu compatible avec son intervention dans une voie métabolique soluble.

Il paraît plus plausible de considérer que cette glucokinase est le premier enzyme d'un système multienzymatique organisé qui conduirait à l'UDP-glucose selon le schéma suivant :



A = glucokinase, B = phosphoglucomutase, C = UDPglucose pyrophosphorylase.

L'UDPglucose pourrait servir de substrat à une glucosyltransférase catalysant le transfert de glucose afin de former l'unité disaccharidique glucosylgalactose liée à l'hydroxylysine dans le collagène, ou encore à une glycogène synthétase, ces deux enzymes étant microsomiques. En effet, des travaux préliminaires effectués au laboratoire ont montré une incorporation de glucose dans du glycogène et du collagène exogènes. Nous cherchons actuellement à compléter ces résultats qui feront l'objet d'une publication ultérieure.

RÉSUMÉ

Il existe, dans les hépatocytes de rat, une activité glucokinase liée aux microsomes. La localisation submicrosomique de cet enzyme a été précisée par des méthodes d'ultracentrifugation de zones. La fraction qui contient 60% de l'activité glucokinase possède aussi 37% de l'UDPgalactose: *N*-acétyllactosamine galactosyltransférase. Ces deux activités enzymatiques sont purifiées respectivement 10 et 6,5 fois par rapport à la fraction microsomique totale. Du point de vue morphologique, la fraction est constituée principalement de membranes lisses avec des bissacs et des éléments en tubules. Ces résultats suggèrent que cette fraction est dérivée de l'appareil de Golgi. Elle ne contient pas de quantités notables de glucose-6-phosphatase et de 5'-nucléotidase. Le taux de thiamine pyrophosphatase est plus élevé (50%). Le rôle de cette glucokinase liée à une fraction riche en appareil de Golgi est discuté.

Fig. 1. Fraction 2 du Tableau II. Présence de vésicules à paroi lisse ayant parfois l'aspect de bissac (flèches). Noter l'absence de mitochondries et de membranes granulaires. Coloration acétate d'uranyle associé au citrate de plomb. $\times 50\,000$.

Fig. 2. Aspect en bissac de formations membranaires parfaitement lisses. Coloration acétate d'uranyle associé au citrate de plomb. $\times 65\,000$.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Berthillier, G., Colobert, L., Richard, M. et Got, R. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 206, 1-10
- 2 Appelmans, F., Wattiaux, R. et de Duve, C. (1955) *Biochem. J.* 59, 438-445
- 3 Got, R., Frot-Coutaz, J., Colobert, L. et Louisot, P. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 157, 599-606
- 4 Spear, P. G., Keller, J. M. et Roizman, B. (1970) *J. Virol.* 5, 123-131
- 5 Bouchilloux, S., Chabaud, O., Michel-Bechet, M., Ferrand, M. et Athouel-Haon, A. M. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 314-320
- 6 Grossbard, L. et Schimke, R. T. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3546-3560
- 7 McLean, P. et Brown, J. (1966) *Biochem. J.* 98, 874-882
- 8 Schachter, H., Jabbal, I., Hudgin, R. L., Pinteric, L., McGuire, E. J. et Roseman, S. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1090-1100
- 9 Ueda, I. et Wada, T. (1970) *Biochemistry* 37, 169-174
- 10 Munro, H. N. et Fleck, A. (1966) *Analyst* 91, 78-88
- 11 Fleischer, B. et Fleischer, S. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 219, 301-319
- 12 Cheetham, R. D., Morre, D. J., Pannek, C. et Friend, D. S. (1971) *J. Cell Biol.* 49, 899-905
- 13 Morre, D. J., Merlin, L. M. et Keenan, T. W. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 813-819
- 14 Cheetham, R. D., Morre, D. J. et Yungmans, W. (1970) *J. Cell Biol.* 44, 492-500
- 15 Berthillier, G. et Got, R. (1970) *FEBS Lett.* 8, 122-124
- 16 Berthillier, G. et Got, R. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 258, 88-98