

## MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR D'UDP-GLUCOSE DANS LES MEMBRANES MICROSOMIQUES DES HEPATOCYTES DE RAT

J. FROT-COUTAZ, G. BERTHILLIER et R. GOT

*Laboratoire de Biochimie des Membranes (ER. CNRS No. 66), Université Claude Bernard,  
Lyon I, 69621 Villeurbanne, France*

Received 3 December 1974

### Summary

Rat liver microsomal membranes have been shown to contain a biosynthetic pathway of UDP-glucose. In addition, they are able to bind UDP-glucose in a reversible manner. As UDP-glucose is also metabolized in these membranes, the study of the binding has been performed with a microsomal Triton X 100 extract. This reversible binding depends on pH (maximum at pH 8.1) and manganous ions, and disappears at pH 6.5. It exhibits a high affinity ( $K_{diss} = 3 \mu M$ ), and a narrow specificity for UDP-glucose. Proteolytic digestion inhibits the binding up to 90%, showing that the UDP-glucose receptor has a proteic nature.

These binding characteristics have been also found in the membranes themselves, indicating that the detergent solubilization does not destroy the protein binding capacity.

### 1. Introduction

Au cours de travaux récents effectués sur le métabolisme membranaire de l'UDP-glucose [1,2], il nous est apparu que ce métabolite se fixait réversiblement sur les microsomes de foie de rat. Ce fait expérimental nous a conduit à rechercher la présence éventuelle d'un récepteur membranaire spécifique de ce nucléotide sucre. Le but de cette note est de donner les principales caractéristiques de cette fixation et de préciser la nature du récepteur.

### 2. Matériel et méthodes

La pureté de la fraction microsomique, préparée selon une méthode précédemment décrite [3], a été vérifiée par le dosage des enzymes marqueurs classiques [4].

La fixation d'UDP-glucose sur les membranes est évaluée en incubant la fraction microsomique (2 mg de protéines), dans un tampon Bicine pH 8.1, 40 mM, en présence d'1  $\mu$ Ci d'UDP-glucose  $^{14}$ C (U) (Radiochemical Centre Amersham, radioactivité spécifique

260 mCi/mmol) et de  $MnCl_2$  1 mM. Après 40 min à température ambiante, le milieu est dilué 10 fois par le tampon approprié, puis centrifugé 45 min à 105 000 g. Le culot membranaire est lavé une fois dans les mêmes conditions, repris dans 200  $\mu$ l de tampon et séché à 50°C dans des flacons de comptage. Après dissolution par 1 ml de soluène, la radioactivité est déterminée par addition de 10 ml de liquide scintillateur (PPO 4 g, diméthyl POPOP 0.1 g, toluène 1 litre). Dans ces conditions, les rendements de comptage sont de 80%.

Un extrait soluble est préparé en homogénéisant les microsomes (6.7 mg de protéines/ml) dans un tampon MES pH 6.5, 10 mM, contenant du NaCl (0.15 M) et du Triton X 100 (0.17% - v/v). Après 1 hr de centrifugation à 200 000 g, un surnageant limpide est obtenu qui contient 25% des protéines initiales. Les fixations sont réalisées en incubant à température ambiante, 0.400 mg des protéines ainsi solubilisées dans 0.4 ml du milieu choisi, en présence d'UDP-glucose  $^{14}$ C. Après des temps déterminés, la radioactivité liée est séparée de la radioactivité libre par filtration sur colonne de Sephadex G 50 (1.2 X 28 cm) équilibrée par le tampon d'incubation. La radioactivité

des fractions éluées est déterminée sur des parties aliquotes comme ci-dessus.

L'identité du constituant radioactif lié est vérifiée sur un complexe obtenu par filtration en tampon volatil, triméthylamine acide acétique pH 8.3, 0.2 M; le complexe est rompu par passage à pH acide et l'analyse des produits libérés est réalisée par chromatographie en couche mince de PEI cellulose avec LiCl 0.3 M comme solvant [5].

L'action de la pronase (B-grade, Calbiochem) est réalisée en ajoutant au milieu d'incubation 0.010 ml d'une solution de pronase à 1 mg/ml.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Lowry et al. [6].

### 3. Résultats et discussion

Pour la mise en évidence d'un récepteur membranaire, la méthodologie classique consiste à étudier la fixation de radioactivité au niveau membranaire en présence du ligand marqué. Toutefois, dans notre cas, une difficulté particulière se présente du fait qu'il existe dans les membranes microsomiques un transfert de glucose, à un accepteur endogène, à partir d'UDP-glucose. Par conséquent, la radioactivité apparue au

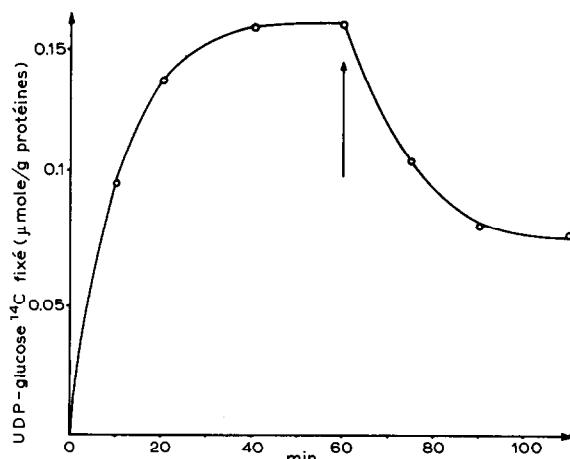


Fig.1. Cinétique de fixation de l'UDP-glucose. Le milieu d'incubation contient, pour un vol final de 0.4 ml : 0.4 mg de protéines,  $4 \times 10^{-6}$  mmol d'UDP-glucose  $^{14}\text{C}$ ,  $50 \times 10^{-3}$  mmol de tampon Bicine (*N*, *N'*-Bis-(2-hydroxyéthyl)-glycine pH 8.1,  $0.36 \times 10^{-3}$  mmol de  $\text{MnCl}_2$ . La température d'incubation est de 20°C. La flèche verticale indique l'addition de  $340 \times 10^{-6}$  mmol d'UDP-glucose dans le but d'effectuer une dilution isotopique.

niveau membranaire pouvait être due à une fixation de glucose par liaison covalente à l'accepteur endogène [2]. C'est pourquoi nous avons été amené à travailler tout d'abord sur un extrait soluble obtenu en traitant les membranes par le Triton X 100.

Fig.1 représente la cinétique de fixation d'UDP-glucose à une macromolécule de cet extrait.

La dilution isotopique réalisée après 60 min d'incubation met en évidence la réversibilité de la fixation.

La variation de la quantité d'UDP-glucose lié en fonction du pH est donnée sur la fig.2. Un optimum très net apparaît à pH 8.1. La fixation est pratiquement nulle à pH 6.5. Il est intéressant de préciser que l'UDP-glucose fixé au pH optimum est partiellement libéré par incubation subséquente à pH 6.5.

La constante de dissociation a été déterminée selon Scatchard [7] (fig.3), les concentrations en UDP-glucose variant de  $1.25 \times 10^{-3}$  mM à  $40 \times 10^{-3}$  mM. On obtient ainsi une valeur de  $3 \times 10^{-3}$  mM pour la constante de dissociation du complexe.

Les résultats du tableau 1 montrent qu'un cation divalent est nécessaire à la fixation d'UDP-glucose. Le

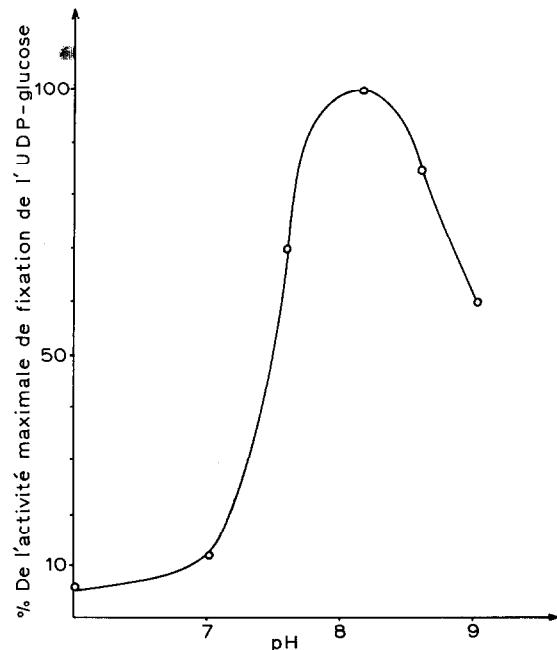


Fig.2. Action du pH sur la fixation d'UDP-glucose. Les milieux d'incubation sont identiques à ceux de la fig.1 excepté pour les pH inférieurs à 7 où le tampon utilisé est le tampon MES (acide morpholinoéthansulfonique).

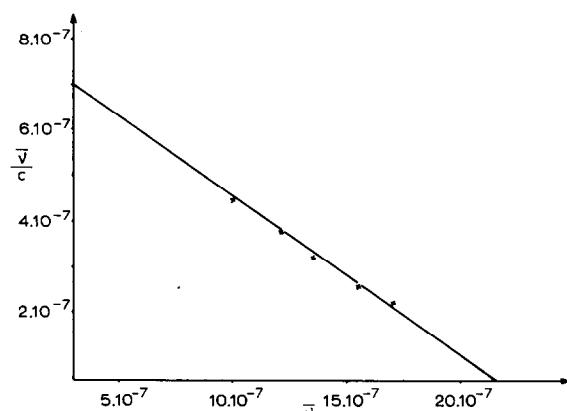


Fig. 3. Représentation selon Scatchard de la fixation d'UDP-glucose. Les conditions d'incubations sont les mêmes que celles de la fig. 1 sauf en ce qui concerne la concentration en UDP-glucose  $^{14}\text{C}$  qui varie de  $1.25 \times 10^{-3}$  mM à  $40 \times 10^{-3}$  mM.

manganèse s'avère le plus efficace et à un degré moindre le calcium alors que le magnésium, le cobalt et le zinc sont sans action. L'inhibition obtenue avec l'EDTA confirme ce rôle du manganèse.

La spécificité de fixation est démontrée par des essais dans lesquels l'UDP-glucose  $^{14}\text{C}$  est mis en compétition avec des nucléotides sucre qui en diffèrent soit par le nucléotide, soit par le sucre. Bien que la concentration des compétiteurs soit 2.5 fois supérieure à celle du ligand marqué, seuls l'UDP-*N*-acétylglucos-

amine et le GDP-glucose entraînent une légère diminution de la radioactivité liée (tableau 1). Par contre, des expériences similaires, réalisées avec l'UDP ou le glucose, mettent en évidence une importante inhibition de la fixation. Il semble donc que le centre actif du récepteur possède des propriétés stériques adaptées à la reconnaissance du constituant nucléotidique aussi bien que glucidique de l'UDP-glucose.

La métabolisation possible de l'UDP-glucose au niveau microsomial nécessite de vérifier la nature de la radioactivité fixée. La chromatographie sur PEI-cellulose permet de séparer l'UDP-glucose des autres métabolites, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate et glucose. Toute la radioactivité, libérée à pH acide, se retrouve au niveau de l'UDP-glucose.

Après 40 min d'incubation en présence de pronase, on ne retrouve, dans le pic d'exclusion de la colonne de Sephadex G 50, que 10% de la radioactivité d'un témoin incubé dans les mêmes conditions, mais sans pronase. Ce résultat confirme la nature protéique du constituant membranaire capable de fixer l'UDP-glucose.

Tous ces résultats ont été obtenus sur un extrait Triton. Nous avons alors cherché si les caractéristiques de fixation de l'UDP-glucose sur la protéine membranaire solubilisée se retrouvaient au niveau de la membrane intacte. Les résultats du tableau 2 confirment que les microsomes sont effectivement capables de fixer de l'UDP-glucose, à pH 8.1, en présence de  $\text{Mn}^{2+}$

Tableau 1  
Action de diverses substances sur la fixation d'UDP-glucose

Composition des milieux	Nombre de $\mu\text{mol}$ d'UDP-G fixées /mg de protéines/min d'incubation
Milieu complet*	$40 \cdot 10^{-7}$
+ UDP-galactose (25 $\mu\text{M}$ )	$42 \cdot 10^{-7}$
+ UDP- <i>N</i> -Acétylglucosamine (25 $\mu\text{M}$ )	$29 \cdot 10^{-7}$
+ UDP-Mannose (25 $\mu\text{M}$ )	$41 \cdot 10^{-7}$
+ GDP-Glucose (25 $\mu\text{M}$ )	$33 \cdot 10^{-7}$
+ ADP-Glucose (25 $\mu\text{M}$ )	$37 \cdot 10^{-7}$
+ Glucose (25 $\mu\text{M}$ )	$18 \cdot 10^{-7}$
+ UDP (25 $\mu\text{M}$ )	$12.5 \cdot 10^{-7}$
+ EDTA (5 mM)	$9.6 \cdot 10^{-7}$
Milieu sans cations divalents	$8 \cdot 10^{-7}$
+ $\text{Ca}^{++}$ (1 mM)	$21.5 \cdot 10^{-7}$
+ $\text{Zn}^{++}$ (1 mM)	$7.3 \cdot 10^{-7}$
+ $\text{Co}^{++}$ (1 mM)	$9.5 \cdot 10^{-7}$
+ $\text{Mg}^{++}$ (1 mM)	$8 \cdot 10^{-7}$

\* Le milieu d'incubation est identique à celui de la fig. 1.

Tableau 2

Action de différents traitements sur la libération de l'UDP-glucose  $^{14}\text{C}$  fixé au niveau des membranes microsomiques des hépatocytes de rat

Microsomes témoins	Lavage à pH 6.5	Lavage par EDTA 5 mM	Dilution isotopique
0.08	0.042	0.04	0.032

Les microsomes sont incubés comme il est indiqué dans le paragraphe 'Matériel et méthodes'. Les dilutions sont effectuées soit par le tampon d'incubation (microsomes témoins), soit par ce même tampon contenant de l'EDTA (EDTA 5 mM) ou  $325 \cdot 10^{-6}$  mmol d'UDP-glucose (dilution isotopique 85), soit dans le tampon MES pH 6.5. Les résultats sont exprimés en nanomoles d'UDP-glucose fixé par mg de protéines.

(1 mM) et que cette fixation est partiellement réversible puisque la dilution isotopique, l'acidification du milieu ou l'addition d'EDTA libèrent plus de 50% de la radioactivité. Il est vraisemblable que la radioactivité non libérée correspond au glucose  $^{14}\text{C}$  lié par liaison covalente à la suite du transfert à un accepteur endogène évoqué plus haut [2].

Ainsi, la protéine réceptrice d'UDP-glucose peut être solubilisée par le Triton X 100 sans perte de son activité de fixation. Divers récepteurs membranaires, pour l'insuline [8], des glycoprotéines désialylées [9] ou l'acétylcholine [10], ont pu être solubilisés dans des conditions similaires, sans dénaturation.

La présence de sites de fixation de l'UDP-glucose dans les membranes microsomiques des hépatocytes de rat amène évidemment à s'interroger sur leur signification physiologique. Rappelons que, dans ces membranes, l'UDP-glucose est au centre d'un système métabolique relativement complexe, comprenant, d'un côté, sa biosynthèse et de l'autre, son utilisation.

Il est plausible d'envisager que le récepteur spécifique fait partie de ce système.

Deux hypothèses pourraient alors être émises: 1) la protéine réceptrice assure, par rétro-inhibition, la régulation de la biosynthèse, selon un processus de modification conformationnelle analogue à ceux proposés pour l'action de l'insuline [11]; 2) la protéine réceptrice est impliquée dans un système de transport de l'UDP-glucose permettant l'accès de ce substrat donneur aux diverses glucosyltransférases membranaires [2], puisque les membranes microsomiques sont imperméables à de tels anions [12].

Des travaux sont en cours afin de déterminer les propriétés du récepteur et de préciser son rôle physiologique.

## Bibliographie

- [1] G. Berthillier et R. Got (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 362, 390-402.
- [2] G. Berthillier, G. Azzar et R. Got (1974) *European J. Biochem.*, sous presse.
- [3] G. Berthillier, L. Colobert, M. Richard et R. Got (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 206, 1-16.
- [4] G. Berthillier, P. Dubois et R. Got (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 293, 370-378.
- [5] A. Schweigger (1962) *J. Chromatogr.* 9, 374-377.
- [6] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* 7, 265-275.
- [7] G. Scatchard (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
- [8] P. Cuatrecasas (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1980-1991.
- [9] A. G. Morell et J. H. Scheinberg (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48, 808-815.
- [10] J. C. Meunier, R. Sealock, R. Olsen et J. P. Changeux (1974) *European J. Biochem.* 45, 371-374.
- [11] P. Cuatrecasas (1973) *Fed. Proc.* 32, 1838-1846.
- [12] R. Nilson, E. Peterson et G. Dallner (1973) *J. Cell. Biol.* 56, 762-776.