

CHROM. 13,918

Note

Fractionnement des microsomes d'hépatocytes par isotachophorèse

G. AZZAR, A. DEGIULI, J. P. BENEDETTO et R. GOT*

Laboratoire C.N.R.S. de Biologie et Technologie des Membranes, Université Claude Bernard-Lyon I, 69622 Villeurbanne (France)

(Reçu le 16 février 1981; manuscrit modifié reçu le 10 avril 1981)

Le fractionnement des membranes biologiques est fondé essentiellement sur l'ultracentrifugation isopycnique. Toutefois, cette technique atteint vite ses limites lorsqu'il s'agit de séparer entre elles des vésicules membranaires d'origines diverses. Ainsi en est-il du sous-fractionnement de microsomes: ce sédiment, obtenu par ultracentrifugation différentielle en saccharose 0.25 M d'un surnageant post-mitochondrial, est en effet, un mélange complexe de membranes lisses ou granulaires du reticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et de membranes plasmiques, dont les densités apparentes sont assez voisines. Or, ces membranes sont constituées, en proportion variable, de substances polaires, phospholipides, protéines et, éventuellement, acide sialique, acide α -cétonique relativement fort. Ces constituants confèrent aux membranes des charges de surface caractéristiques qui devraient permettre de les différencier.

Effectivement, divers essais de fractionnement de cellules, d'organites cellulaires ou de vésicules membranaires par électrophorèse ont été réalisés. Les méthodes les plus utilisées mettent en oeuvre un appareillage complexe d'électrophorèse en film liquide¹⁻³. Récemment, des techniques d'électrophorèse de zone en gradient de densité, utilisant un appareillage moins compliqué, ont été appliquées aux microsomes de foie de rat⁴, aux membranes plasmiques de foie⁵ ou d'entérocytes de rat⁶, ou aux membranes pourpres d'*Halobacterium halobium*⁷. Ces méthodes, d'un coût relativement modeste, ont apporté des résultats prometteurs dans la caractérisation ou le fractionnement des membranes. Mais, ces méthodes, simples à utiliser, ont un pouvoir de résolution limité que l'on ne peut guère améliorer car elles dépendent de peu de facteurs. Au contraire, l'isotachophorèse est une méthode qui met en jeu de nombreux paramètres, pH, force ionique, capacité tampon, mais également mobilité des ions meneur et terminal, nature du contre-ion. Outre que cette variété de paramètres expérimentaux lui donne de grandes possibilités d'adaptation, son pouvoir de résolution est très élevé de par son principe même qui interdit le chevauchement des zones de migration.

C'est pourquoi nous avons cherché à appliquer cette technique du sous-fractionnement difficile d'hépatocytes de chat.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

La fraction microsomique est préparée par ultracentrifugation différentielle selon une méthode déjà décrite⁸. Cette fraction n'est pas contaminée par la phase soluble. Outre le reticulum endoplasmique, on y retrouve environ 50% de l'appareil de Golgi et 40% des membranes plasmiques.

La séparation par isotachophorèse est réalisée dans la colonne Isco (Modèle 212) pour électrophorèse préparative en gradient de densité.

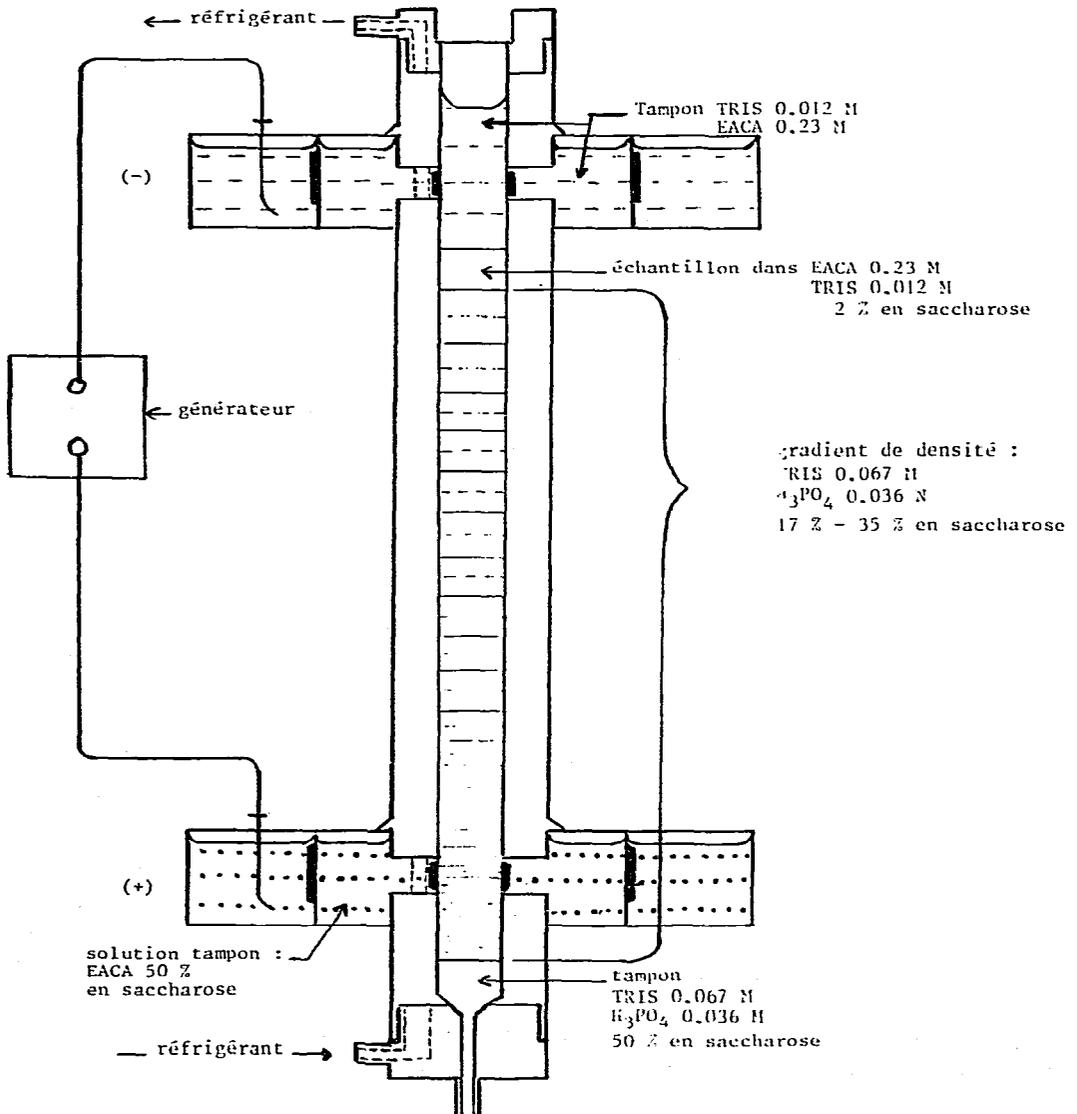


Fig. 1. Vue schématique de la colonne d'isotachophorèse au départ d'une expérience, montrant en particulier la distribution des ions. EACA = Acide ϵ -aminocaproïque.

Méthodes

La disposition des ions et de l'échantillon à fractionner est schématisée sur la Fig. 1. L'ion meneur est l'anion phosphate, l'ion terminal, l'acide ϵ -aminocaproïque et le contre-ion, le Tris. Un gradient linéaire de saccharose (0.5–1 *M*) est établi dans la colonne au-dessus d'une butée de saccharose 1.45 *M*. Les membranes microsomiques (5 mg de protéines), remises en suspension dans 1.5 ml de l'ion terminal contenant 2% de saccharose, sont déposées sur le gradient. La migration se fait durant 90 min, à puissance constante (1200 V, 8 mA). La colonne est réfrigérée par une circulation d'eau glacée. A la fin de l'expérience, la colonne est éluée par le bas et des fractions de 2 ml sont récupérées.

Dans chaque fraction, sont dosées les protéines par la méthode de Hartree⁹, ainsi que les activités enzymatiques suivantes: galactosyltransférase, sialyltransférase et NADPH-cytochrome *c* reductase selon des méthodes déjà décrites^{8,10}, adénylate cyclase par une technique radioisotopique (The Radiochemical Centre, Amersham, Grande-Bretagne).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Devant l'absence de données expérimentales sur l'application de l'isotachophorèse au fractionnement de membranes biologiques, un premier problème résidait dans le choix du système des ions qui est fondamental dans cette technique. Cependant, certaines études électrophorétiques^{4,5} avaient montré le caractère anionique à pH 8 de vésicules membranaires et situaient leur mobilité électrophorétique dans la zone de celle des protéines globulaires. C'est pourquoi, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés sur l'isotachophorèse des protéines. Après de nombreux essais, nous avons adopté le système utilisé par Jefferis et Butwell¹¹ sur les IgD. Le système est constitué du phosphate comme ion meneur, du Tris comme contre-ion et comme ion terminal, de l'acide ϵ -aminocaproïque, qui présente également l'intérêt de protéger les protéines membranaires d'un clivage protéolytique éventuel durant le processus de fractionnement.

D'autre part, le gradient linéaire de saccharose est établi à des concentrations plus élevées que celles utilisées dans les expériences d'électrophorèse de membranes déjà décrites⁴⁻⁶, 0.5–1 *M* au lieu de 0.44–0.73 *M*, ceci afin d'obtenir une meilleure stabilisation des zones.

Un point important doit être signalé. Dans l'isotachophorèse de protéines, il est classique d'utiliser des Ampholines jouant ainsi le rôle d'espaceurs. En l'occurrence, la présence d'Ampholines entraîne l'apparition de bandes très fines qui, à l'analyse montraient des compositions enzymatiques identiques; il s'agit vraisemblablement d'une séparation artéfactuelle due à la formation de complexes entre les Ampholines et les vésicules membranaires. L'emploi de ces espaceurs est donc à proscrire.

Après 90 min de migration dans les conditions indiquées, les membranes microsomiques se répartissent dans la colonne sur une douzaine de cm. L'éluion permet d'obtenir 11 fractions de 2 ml qui sont analysées individuellement pour leur contenu en protéines et pour leur teneur en enzymes considérées comme caractéristiques du reticulum endoplasmique (NADPH-cytochrome *c* reductase), de l'appareil de Golgi (galactosyl- et sialyltransférase) et des membranes plasmiques (adénylate cyclase). La récupération des protéines est de l'ordre de 90%, le rendement des activités enzyma-

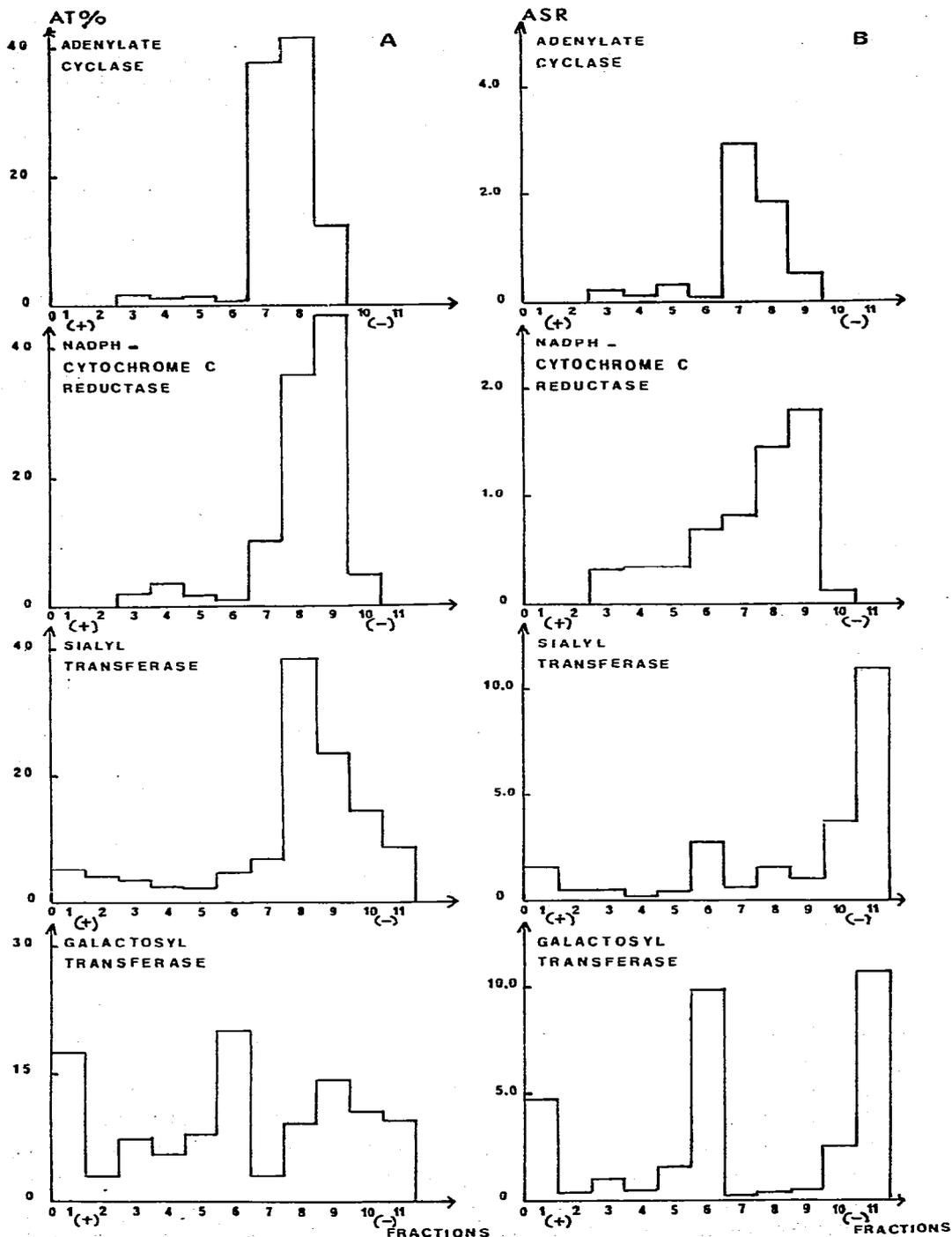


Fig. 2. Distribution des activités enzymatiques dans les fractions séparées par isotachophorèse à partir de microsomes d'hépatocytes de chat. Par rapport à l'activité contenue dans l'échantillon de départ, pour chaque enzyme, la colonne A donne le pourcentage de récupération et la colonne B le facteur d'enrichissement. AT = activité totale déposée sur la colonne; ASR = activité spécifique relative.

tiques étant similaire. Trois expériences ont été réalisées successivement dans des conditions identiques: elles sont parfaitement reproductibles. La distribution des activités enzymatiques est donnée dans la Fig. 2. Les fractions sont numérotées dans l'ordre inverse de leur migration, c'est-à-dire que la fraction 1 est celle qui a le plus migré, dont la mobilité électrophorétique est la plus élevée. La Fig. 3 donne la répartition des protéines.

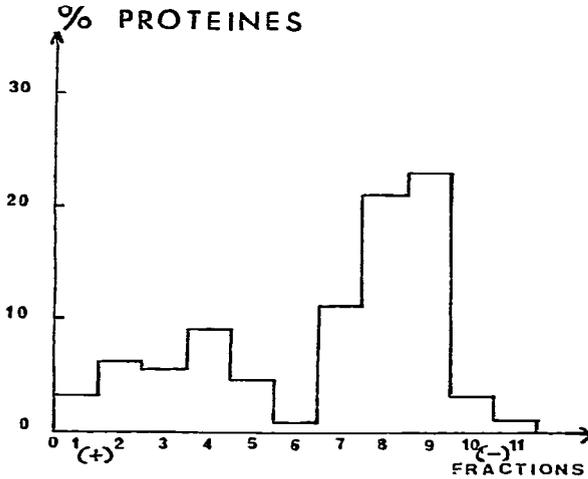


Fig. 3. Répartition des protéines dans les différentes fractions.

Constatons tout d'abord, que la NADPH-cytochrome *c* reductase et l'adénylate cyclase —au niveau desquelles se retrouve normalement l'essentiel des protéines— sont nettement décalées l'une par rapport à l'autre. En effet, le pic majeur de NADPH-cytochrome *c* reductase se localise, avec un facteur d'enrichissement voisin de 2, dans la fraction 9 qui est peu contaminée par l'adénylate cyclase ou les enzymes golgiens. L'adénylate cyclase voit son activité maximale dans la fraction 7, avec une activité spécifique relative voisine de 3. Cette fraction contient cependant, une petite partie du reticulum endoplasmique.

Mais les résultats sont particulièrement spectaculaires à propos des enzymes golgiens. En effet, les fractions 10 et 11 contiennent exclusivement les deux glycosyltransférases avec des activités spécifiques relatives voisines de 11. La galactosyltransférase présente encore un facteur d'enrichissement élevé, égal à 10, dans la fraction 10 qui contient un peu de NADPH-cytochrome *c* reductase (activité spécifique relative inférieure à 1) et de la sialyltransférase avec un facteur d'enrichissement voisin de 3. Ainsi, les deux enzymes golgiens ne présentent pas la même répartition. Ce fait a déjà été constaté après purification des mêmes microsomes par chromatographie d'affinité¹². D'ailleurs, la préparation classique d'appareil de Golgi d'hépatocytes par ultracentrifugation isopycnique conduit à 3 fractions dont la teneur en galactosyltransférase est sensiblement différente¹³.

Ainsi, cette méthode, appliquée à des microsomes, a permis d'obtenir une fraction contenant du reticulum endoplasmique très peu contaminé par les membranes plasmiques ou l'appareil de Golgi. Mais elle conduit surtout à des vésicules golgiennes de haute pureté, présentant un facteur d'enrichissement par rapport à une fraction

microsomique d'autant plus élevé que le taux de protéines golgiennes y est relativement faible.

Le sous-fractionnement de microsomes pose une problème difficile que l'ultra-centrifugation isopycnique, pratiquement seule méthode utilisée actuellement, ne résout qu'imparfaitement. Il faut dire que cette fraction très hétérogène est un mélange de vésicules membranaires d'origine différente et de densités apparentes voisines. Or, l'isotachophorèse, dont c'est, à notre connaissance, la première utilisation à un fractionnement membranaire, semble avoir apporté une solution simple et rapide, au moins en ce qui concerne la purification de l'appareil de Golgi. Son application à la préparation d'organites cellulaires bien différenciés devrait s'avérer particulièrement fructueuse.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. Hanning, dans T. Gerritsen (Rédacteur), *Modern Separation Methods — Macromolecules and Particles*, Wiley-Interscience, New York, 1969, pp. 45–69.
- 2 K. I. Ryan, H. Keland et E. L. Thomas, *J. Cell Biol.*, 49 (1971) 235–251.
- 3 A. K. Mircheff, C. H. van Os et E. M. Wright, *Membrane Biochem.*, 1 (1978) 177–185.
- 4 D. Blad, L. Winqvist et G. Dallner, *J. Cell Sci.*, 23 (1977) 285–297.
- 5 D. Blad-Holmberg, *Biochim. Biophys. Acta*, 553 (1979) 25–39.
- 6 C. H. van Os, H. R. de Jonge, M. D. de Jong, W. E. J. M. Ghijsen et J. A. L. I. Walters, *Biochim. Biophys. Acta*, 600 (1980) 730–738.
- 7 L. Eisenbach et M. Eisenbach, *Anal. Biochem.*, 92 (1979) 228–295.
- 8 G. Azzar, M. Rougier, G. Berthillier et R. Got, *Biochimie*, 58 (1976) 285–295.
- 9 E. Hartree, *Anal. Biochem.*, 48 (1972) 422–427.
- 10 G. Berthillier et R. Got, *Biochimie*, 59 (1977) 85–89.
- 11 R. Jefferis et A. J. Butwell, *Sci. Tools*, 22 (1975) 1–8.
- 12 G. Azzar et R. Got, *FEBS Lett.*, 96 (1978) 164–166.
- 13 J. J. M. Bergeron, D. H. Ehrenreich, P. Siekevitz et G. E. Palade, *J. Cell Biol.*, 59 (1973) 73–88.