

65

BIOCHIMIE CELLULAIRE. — *Fractionnement d'un homogénat de nerf sciatique de Souris normale, Trembler et quaking sur gradient continu de saccharose.* Note (*) de **Danielle Darriet, Béatrice de Nechaud, Michel Rabaud, Claude Jeantet, Claude Cassagne et Jean-Marie Bourre**, présentée par Paul Mandel.

Deux fractions membranaires, caractérisées par des critères biochimiques [quantité et densité du matériel particulaire, localisation des protéines spécifiques de la myéline — Po, P₁ et Pr — et des activités enzymatiques de la 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphohydrolase (CNP) et de la 5'-nucléotidase] ont été isolées d'un homogénat de nerf sciatique de Souris normale, Trembler et quaking, jeunes et adultes par centrifugation sur gradient continu de saccharose.

La fraction à 0,58-0,60 M de saccharose, la plus riche en matériel particulaire, renferme la myéline. La fraction à 0,7-0,75 M renfermerait la membrane plasmique de la cellule de Schwann qui synthétise la myéline.

CELLULAR BIOCHEMISTRY. — *Fractionation on a Continuous Sucrose Gradient of a Sciatic Nerve Homogenate from Normal, Trembler and Quaking Mice.*

Two fractions, characterized by biochemical criteria [quantity and density of particulate material, localization of myelin specific protein—Po, P₁ and Pr—and of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNP) and of 5'-nucleotidase], were isolated from sciatic nerve homogenate of normal, Trembler and quaking, young and adult Mice, on a continuous sucrose gradient.

The fraction, at 0.58-0.6 M, the richest in membrane particles contains the myelin. The fraction at 0.7-0.75 M should contain the plasma membrane of the Schwann cell which synthesizes myelin.

INTRODUCTION. — L'objectif de ce travail est l'étude biochimique de la transformation de la membrane plasmique de la cellule de Schwann en myéline dans le nerf sciatique de Souris normale et ses perturbations chez les mutants dysmyéliniques quaking et Trembler (1).

Pour cela, il faut pouvoir séparer la myéline des autres types membranaires qui lui sont reliés ([2], [3]). Les techniques de fractionnement du tissu nerveux sur gradient continu de saccharose en rotor zonal, applicables à des homogénats de cerveau de Souris [4] ou de nerf sciatique de Lapin [2] ne peuvent être utilisées dans le cas du nerf sciatique de Souris en raison de la faible quantité de matériel disponible.

Une méthode de fractionnement sur gradient continu de saccharose, adaptée à ce problème, a donc été mise au point. Les fractions obtenues ont été analysées quant à leur contenu en protéines spécifiques de la myéline (Po, P₁ et Pr) et en enzymes : 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphohydrolase (CNP) et 5'-nucléotidase. La CNP est considérée comme l'une des enzymes les plus spécifiques de la myéline et la 5'-nucléotidase, si elle est également présente dans la myéline, reste plus caractéristique de la membrane plasmique [5].

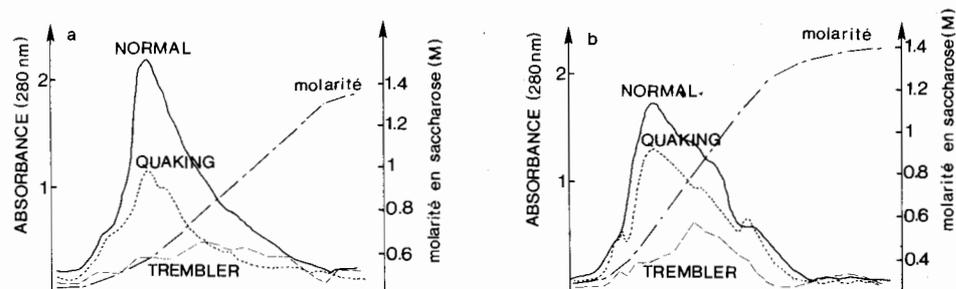
MÉTHODOLOGIE. — Les nerfs sciatiques de Souris sont homogénéisés dans l'eau distillée avec un broyeur de tissu en verre fritté et le matériel non cassé est éliminé par une centrifugation de 10 mn à 500 × g. L'ensemble des particules membranaires est concentré par une centrifugation de 1 h à 150 000 × g. Le culot ainsi obtenu (C150), est remis en suspension dans 0,4 ml d'eau distillée et déposé sur un gradient continu de saccharose de 3,4 ml préparé à partir de saccharose 2 M et d'eau distillée. Ce gradient est centrifugé 4 h à 150 000 × g. Il est ensuite collecté par le haut en 12 fractions et l'absorbance à 280 nm est suivie en permanence à l'aide d'un « ISCO UA 5 ». L'indice de réfraction est mesuré sur chaque fraction.

Pour l'analyse des protéines, les fractions des gradients sont lyophilisées et délipidées selon la technique de Greenfield et coll. [6]. Les gels d'électrophorèse sont préparés selon la technique de Laemmli [7]. Les gels sont séchés entre deux membranes à dialyse en

cellophane et analysés par densitométrie. L'évaluation quantitative est faite par pesée des différents pics. La nomenclature utilisée est celle de Greenfield et coll. [8].

L'activité nucléotidasique (E.C.3.1.3.5) est mesurée selon la méthode décrite par Cammer et coll. [9] mais au lieu d'être homogénéisés dans un tampon, les échantillons sont en suspension dans l'eau distillée en présence de différentes concentrations de saccharose.

L'activité CNPasique (E.C.3.1.4.37) est mesurée par la méthode de Sogin [10].



Profil de densité de la fraction C150 des nerfs sciatiques de Souris normale, Trembler et quaking après gradient continu de saccharose. (a) Souris adultes (3 mois). (b) Souris jeunes (15 à 18 jours). Souris normale (—); Souris Trembler (---); Souris quaking (----); molarité de saccharose (-.-.-). Quatre expériences ont été réalisées avec les Souris normales adultes et jeunes et avec les Souris Trembler adultes; trois avec les Souris Trembler jeunes et quaking adultes; deux avec les Souris quaking jeunes.

Density profiles of the sciatic nerve P150 fraction from normal, Trembler and quaking Mice after centrifugation on a continuous sucrose gradient. (a) Adult Mice (3 months). (b) Young Mice (15 to 18 days). Normal Mice (—); Trembler Mice (---); quaking Mice (----); sucrose molarity (-.-.-).

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Le matériel particulaire d'un homogénat de nerf sciatique de Souris normale se répartit sur gradient continu de saccharose selon un continuum dont le maximum est à 0,58 M dans le tissu d'animaux adultes (*fig. a*) et à 0,55 M dans le tissu d'animaux jeunes (*fig. b*). La quantité de matériel présente dans la région 0,75 M est relativement plus abondante sur les gradients des nerfs sciatiques de Souris normales jeunes que sur les gradients des nerfs sciatiques normaux adultes. Certains de ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux obtenus dans le cas du nerf sciatique de Lapin par centrifugation sur rotor zonal, où le maximum est à 0,57 M [3]. Une augmentation de densité du maximum d'absorbance en fonction de l'âge a également été retrouvée dans le cerveau de Souris normale [4] et dans le tronc cérébral de Rat, alors que l'on observe un phénomène contraire dans la moelle de Rat [11].

Le profil d'absorbance obtenu avec les nerfs sciatiques de Souris quaking est superposable au profil de Souris témoin (*fig., a et b*) mais la quantité de matériel particulaire récupérée dans la région 0,58 M est réduite à 80% de la valeur normale chez les animaux jeunes (*fig., b*) et de 50% chez les animaux adultes (*fig., a*).

Au lieu d'un seul pic, le continuum observé avec les nerfs sciatiques de Souris Trembler adultes (*fig., a*) montre quatre épaulements faiblement marqués à 0,58, 0,75, 0,94 et 1,02 M. La quantité de matériel récupérée dans la région 0,58 M est extrêmement faible sur les gradients Trembler. Elle représente respectivement 20 et 10% de la normale chez les jeunes et les adultes. Le maximum de matériel particulaire est à 0,75 M sur les gradients des nerfs sciatiques Trembler adultes et jeunes (*fig., a et b*).

Le tableau résume les caractéristiques des fractions obtenues sur gradient avec les nerfs sciatiques des Souris normales, Trembler et quaking, adultes et jeunes.

Sur le gradient des nerfs sciatiques normaux, la quantité des protéines spécifiques de la myéline (Po, P₁ et Pr) suit une courbe en corrélation étroite avec le profil d'absorbance à 280 nm dont le maximum se situe à 0,6 M. Il en est de même sur les gradients des nerfs sciatiques de Souris quaking. Ces trois protéines ont des taux extrêmement réduits dans les différentes fractions des nerfs sciatiques de Souris Trembler (résultat non montré) mais le maximum reste à 0,6 M.

TABLEAU

Localisation sur gradient des maximums des protéines spécifiques de la myéline (Po, P₁ et Pr) et des activités des enzymes marqueurs CNP et 5'-nucléotidase. Les résultats indiquent la molarité à laquelle se situe le maximum des protéines ou des activités totales des enzymes sur les différents gradients. Activité spécifique de la CNP = μ mole de NADPH/mn/mg de protéine +/- déviation standard. Activité spécifique de la 5'-nucléotidase = nmole de Pi/mn/mg de protéine +/- déviation standard. n.d. = non déterminé. Les chiffres entre parenthèses donnent le pourcentage de l'activité totale des enzymes dans la fraction du gradient dont la molarité est portée sur le tableau. Même nombre d'expériences que pour la figure.

Localization of maxima of specific myelin proteins (Po, P₁ and Pr) and of the marker enzyme activities (CNP and 5'-nucleotidase) on the gradient. The results show the molarity at which the protein and total enzymatic maxima are located on the gradient. CNP specific activity = μ mole of NADPH/min./mg protein. 5'-nucleotidase specific activity = nmole of Pi/min./mg protein. n.d. = not determined. The figures in brackets give the percentage of the total enzyme activity in the fraction of the gradient, the molarity of which is shown in the table.

Protéines Localisation du maximum de Po, P ₁ et Pr	2' 3'-cyclique nucléotide 3'-phosphohydrolase		5'-nucléotidase		
	Maximum de l'activité totale	Activité spécifique au maximum de l'activité totale	Maximum de l'activité totale	Activité spécifique au maximum de l'activité totale	
Normal :					
Jeunes	n.d.	0,6 M (32)	4,9 ± 0,3	0,75 M (30)	25 ± 6
Adultes	0,6 M	0,6 M (28)	4,4 ± 0,6	0,7 M (31)	45 ± 10
Trembler :					
Jeunes	n.d.	0,6 M (30)	2,7 ± 0,2	0,6-0,8 M (20-22)	45 ± 8
Adultes	0,6 M	0,6-0,7 M (14-16)	4,3 ± 0,6	0,7 M (18)	220 ± 40
Quaking :					
Jeunes	n.d.	0,6 M (33)	1,2 ± 0,3	0,75 M (41)	15 ± 4
Adultes	0,6 M	0,6 M (25)	2,4 ± 0,5	0,7 M (22)	50 ± 5

Cette fraction à 0,6 M contient le plus fort pourcentage de l'activité totale de la CNP récupérée sur les gradients, autour de 30% en moyenne, aussi bien pour les nerfs sciatiques de Souris normale et quaking jeunes et adultes que des Souris Trembler jeunes. Dans le cas des nerfs sciatiques de Souris Trembler adultes, les fractions à 0,6 et 0,7 M contiennent respectivement 14 et 16% de l'activité totale de la CNP. Le maximum de l'activité totale de la CNP a également été trouvé à 0,6 M dans le nerf sciatique de Lapin fractionné sur gradient continu de saccharose en rotor zonal [2]. L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la fraction membranaire localisée à 0,58-0,6 M renferme la myéline. L'activité spécifique de la CNP se restaure avec l'âge dans la fraction 0,6 M (myéline) des nerfs sciatiques Trembler adultes mais reste réduite de 50% dans la fraction 0,6 M des gradients quaking. Par contre, dans un homogénat de nerf sciatique de Souris Trembler, l'activité spécifique de la CNP diminue avec l'âge chez l'adulte; cette diminution est plus marquée chez la Souris Trembler que chez le Souris quaking [12].

La fraction 0,75 M des gradients contient 30% de l'activité totale de la 5'-nucléotidase dans le cas des Souris normales jeunes et 41% de cette activité dans le cas des Souris quaking jeunes. Dans les gradients de nerfs sciatiques de Souris Trembler jeunes, trois fractions entre 0,6 et 0,8 M contiennent de 20 à 22% de l'activité totale de la 5'-nucléotidase. Avec les nerfs sciatiques de Souris adultes, c'est la fraction à 0,7 M qui renferme la plus grande partie de l'activité totale de la 5'-nucléotidase. Elle représente environ 30% du total de l'activité pour les gradients des nerfs sciatiques de Souris normales et quaking adultes mais seulement 18% du total pour les gradients des nerfs sciatiques de Souris Trembler. La même dissociation entre les maximums des activités totales CNP et 5'-nucléotidase a déjà été trouvée sur gradient continu de saccharose en rotor zonal dans le nerf sciatique de Bœuf [3].

Ces éléments, en plus des données quantitatives précédemment soulignées, montrent une évolution en fonction de l'âge des particules membranaires localisées dans la région 0,7-0,75 M et sont en faveur de la présence, à ce niveau, d'une membrane plasmique de cellule de Schwann qui synthétise la myéline.

En conclusion, la fraction 0,58-0,6 M contiendrait la myéline et la fraction 0,7-0,75 M une membrane intermédiaire entre la membrane plasmique de cellule de Schwann et la myéline. Ces deux fractions sont altérées dans les nerfs sciatiques de Souris Trembler.

(¹) L'anomalie primitive siège, pour les deux mutants, dans la cellule de Schwann. Il existe une prolifération schwannienne en bulbe d'oignon dans le nerf sciatique de Souris Trembler qui est absente dans le nerf sciatique de Souris quaking [1].

(*) Remise le 10 janvier 1983, acceptée après révision le 11 avril 1983.

[1] A. J. AGUAYO, G. M. BRAY et S. C. PERKINS, *Annals N.Y. Acad. Sc.*, 1979, p. 512.

[2] J. M. MATTHIEU, T. V. WAEHNELDT, H. F. DE WEBSTER, M. BENY et G. E. FAGG, *Brain Res.*, 170, 1979, p. 123.

[3] Y. LONDON, *Biochim. Biophys. Acta*, 282, 1972, p. 195.

[4] J. M. BOURRE, C. JACQUE, A. DELASSALLE, J. NGUYEN-LEGROS, O. DUMONT, F. LACHAPPELLE, M. RAOUL et N. BAUMANN, *J. Neurochem.*, 35, 1980, p. 458.

[5] K. SUZUKI, in *Neurological Mutations Affecting Myelination*, N. BAUMANN, éd., Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1980, p. 333.

[6] S. GREENFIELD, W. T. NORTON et P. MORELL, *J. Neurochem.*, 18, 1971, p. 2119.

[7] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 227, 1970, p. 680.

[8] S. GREENFIELD, S. BROSTOFF et E. L. HOGAN, *J. Neurochem.*, 34, 1980, p. 453.

[9] W. CAMMER, S. R. SIROTA, T. R. ZIMMERMANN et W. T. NORTON, *J. Neurochem.*, 30, 1980, p. 367.

[10] D. C. SOGIN, *J. Neurochem.*, 27, 1976, p. 1333.

[11] T. V. WAEHNELDT et J. D. LANE, *J. Neurochem.*, 35, 1980, p. 566.

[12] J. M. MATTHIEU, E. COSTANTINO-CECCARINI, M. BENY et J. REIGNER, *J. Neurochem.*, 35, 1980, p. 1345.

D. D., M. R. et C. C. : *Institut de Biochimie cellulaire et Neurochimie du C.N.R.S.*,
1, rue Camille-Saint-Saëns, 33077 Bordeaux Cedex;

B. de N. et C. J. : *Collège de France*,
11, place Marcellin-Berthelot, 75006 Paris;

J.-M. B. : *I.N.S.E.R.M. U 26, Hôpital Fernand Vidal*,
75475 Paris Cedex 10