

BIOCHIMIE CELLULAIRE. — *Présence des sous-unités α et β de la tubuline dans la myéline de cerveau de Souris.* Note (*) de **Béatrice de Néchaud, Claude Jeantet et Jean-Marie Bourre**, présentée par François Gros.

La myéline de cerveau de Souris préparée selon la méthode de Norton et Poduslo contient les sous-unités α et β de la tubuline. Ces sous-unités, distinctes des protéines de Wolfgram ω_1 et ω_2 ont été séparées par isoélectrofocalisation et par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les cartes peptidiques des sous-unités ainsi séparées confirment leur identification.

CELLULAR BIOCHEMISTRY. — Identification of α and β Tubulin Subunits in Mouse Brain Myelin.

α and β subunits of tubulin were demonstrated in purified Mouse brain myelin by two-dimensional gel electrophoresis and by peptide mapping.

INTRODUCTION. — On sait que la tubuline provenant du cerveau des Mammifères ou des cellules neuronales isolées paraît composée d'un grand nombre de sous-espèces. La présence de tubuline dans des préparations de membranes du tissu nerveux a été décrite par plusieurs auteurs ([1] à [7]). Or la myéline est une structure membranaire du système nerveux qui peut être isolée en quantité importante et avec un degré satisfaisant de pureté. De ce fait, la présence de tubuline dans la myéline a pu être proposée ([8], [10]). Nous rapportons ici l'identification dans la myéline de cerveau de Souris des deux sous-unités de la tubuline, représentées chacune par plusieurs isoformes.

MÉTHODOLOGIE. — La myéline est préparée par la méthode de Norton et Poduslo [11].

— Les électrophorèses monodimensionnelles en gel de polyacrylamide et en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) sont réalisées dans un système discontinu dérivé de celui de Laemmli [12]. La plaque de gel est composée d'un gel de concentration (acrylamide : 4% ; Tris-HCl pH 6,8 : 0,125 M ; SDS : 0,1%) surmontant un gel de séparation (acrylamide : 8% ; Tris-HCl pH 8,8 : 0,375 M ; SDS : 0,1%).

— Les électrophorèses bidimensionnelles sont faites selon la technique d'O'Farrell [13].

— La carte peptidique a été obtenue par protéolyse ménagée par la protéase V_8 de *Staphylococcus aureus* [14].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (fig. 1) permet une bonne résolution des protéines de myéline dans la zone dite « des hauts poids moléculaires ».

La présence de protéines migrant comme l'actine et comme la tubuline ([8], [9]) est confirmée. De plus, dans nos conditions de séparation, les sous-unités α et β de la tubuline ne sont visibles que dans la préparation de myéline. Par contre, le doublet ω_1 et ω_2 des protéines de Wolfgram occupe une position intermédiaire entre la tubuline et l'actine, il n'y a pas superposition de ω_2 et de la tubuline comme dans les gels de Reig et coll. [10]. Donc, même si la protéine de Wolfgram ω_2 est apparentée à la tubuline [3], il n'en demeure pas moins que la myéline contient des protéines de même poids moléculaire que les deux sous-unités α et β de la tubuline. Ces sous-unités de tubuline sont retrouvées après électrophorèse bidimensionnelle (fig. 2). Dans la zone correspondant aux points isoélectriques et aux poids moléculaires des sous-unités de tubuline, deux tâches (fléchées α et β sur la figure) ont été révélées. Les protéines qui leur correspondent, hydrolysées selon la technique de Cleveland et coll. [14], présentent des cartes peptidiques identiques à celles des sous-unités de tubuline d'extrait soluble de cerveau séparées par le même procédé. Il faut, toutefois, remarquer que les sous-unités de tubuline de myéline migrent

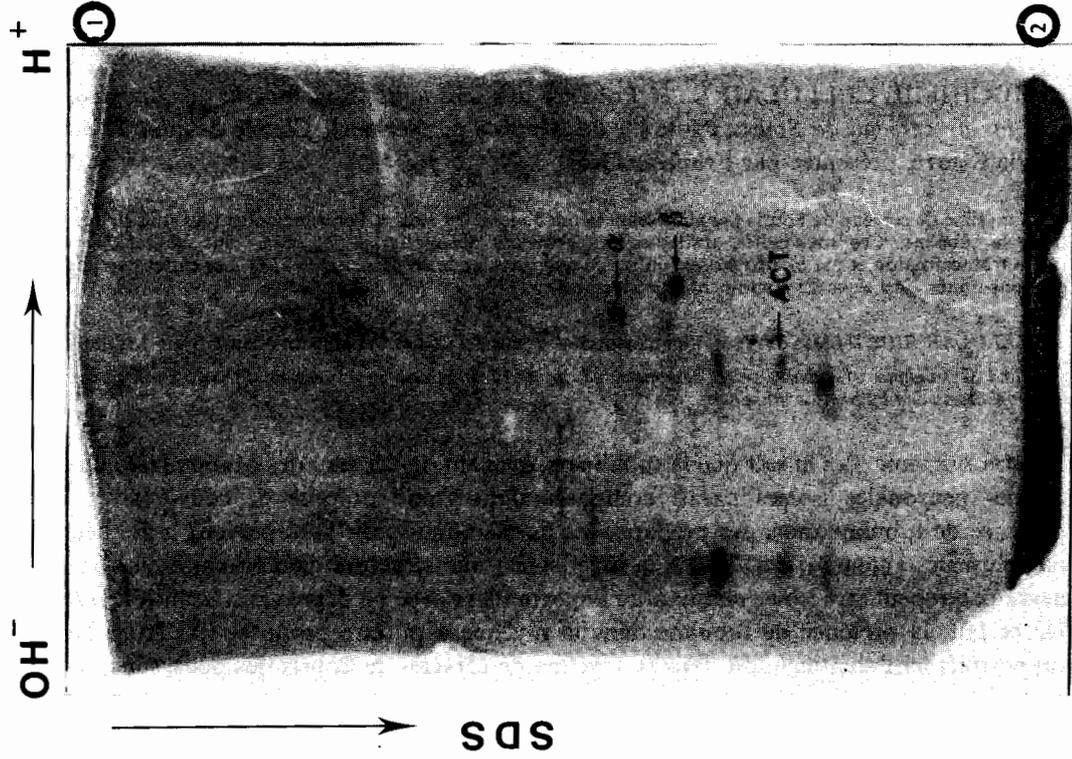


Fig. 2

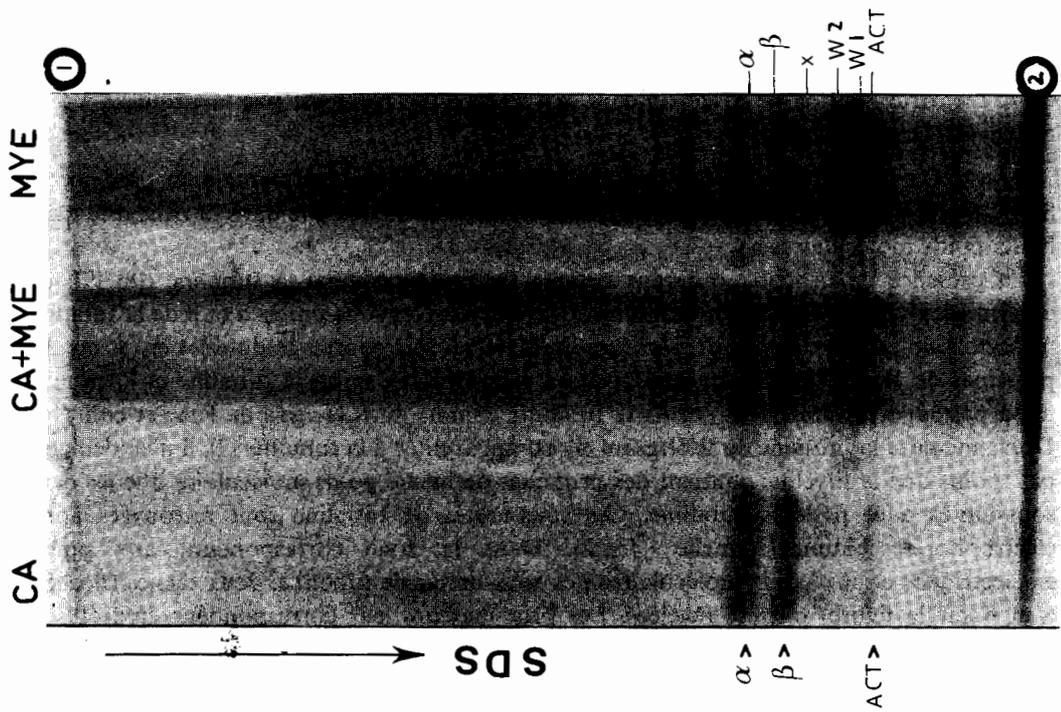


Fig. 1

EXPLICATION DE LA FIGURE

Fig. 1. — Électrophorégramme en gel de polyacrylamide en présence de SDS. (1), limite entre le gel de concentration et le gel de séparation; (2), front du bleu de bromophénol. La distance entre (1) et (2) est de 6,5 cm; CA, tubuline partiellement purifiée à partir d'un extrait soluble de cerveau de Souris par un cycle d'assemblage (don d'Annie Wolff); MYE, préparation de myéline de cerveau de Souris; CA + MYE, mélange des deux. Les constituants de la myéline sont dénommés d'après Waehnelde et Malotka [9]. α , sous-unités α de la tubuline; β , sous-unités β de la tubuline; ACT, actine; ω_1 et ω_2 , doublet de Wolfgram; X, constituant non identifié.

Fig. 1. — SDS gel electrophoresis profiles of Mouse brain myelin (MYE) isolated according to Norton and Poduslo [11], of soluble brain extract tubulin (CA) partially purified by one cycle of self assembly (kind gift of Annie Wolff) and of a mixture of both (CA + MYE). (1), is the limit between the stacking gel (4.5% acrylamide; 0.125 M TRIS-HCl pH 6.8; 0.1% SDS) and the separating gel (8% acrylamide; 0.375 M TRIS-HCl pH 8.8; 0.1% SDS). (2), is the Bromophenoldye front. Distance between (1) and (2) is 6.5 cm. The components of brain myelin are tentatively named according to Waehnelde and Malotka [9]. α , tubulin α subunit; β , tubulin β subunit; ACT, actin; ω_1 and ω_2 , Wolfgram protein doublet; X, unidentified component.

Fig. 2. — Séparation par électrophorèse bidimensionnelle de myéline de cerveau de Souris. La première dimension est une isoélectrofocalisation. Le gradient de pH va de 6,75 à l'extrémité OH^- à 4,25 à l'extrémité H^+ . La seconde dimension est une migration dans un gel à 0,1% de SDS composé d'un gel de concentration de 2 cm et d'un gel de séparation de 24 cm. ACT, actine; α , sous-unités α de la tubuline; β , sous-unités β de la tubuline. Ces identifications ont été confirmées par la carte peptidique des taches découpées du gel en utilisant la technique de Cleveland et coll. [14].

Fig. 2. — Twodimensional gel electrophoresis of Mouse brain myelin (according to O'Farrell [13]). First dimension: isoelectrofocusing between pH 6.75 (OH^-) and pH 4.25 (H^+). Second dimension: slab gel composed of a 2 cm long stacking gel (5% acrylamide; 0.125 M TRIS-HCl pH 6.8; 0.1% SDS) and a 24 cm long separating gel (8% acrylamide; 0.375 M TRIS-HCl pH 8.8; 0.1% SDS). ACT, actine; α , tubulin α subunit; β , tubulin β subunit. These identifications were confirmed by peptide mapping using Cleveland et al. technique [14].

en donnant des tâches moins étalées que celles de tubuline provenant d'extrait soluble. Nous supposons que cela reflète une moindre microhétérogénéité et nous nous proposons de dénombrer les isoformes de tubuline de la myéline par une méthode d'isoélectrofocalisation à haute résolution [15].

(*) Remise le 6 décembre 1982.

- [1] H. FEIT et S. BARONDES, *J. Neurochem.*, 17, 1970, p. 1355.
- [2] J. R. LAGNADO, C. LYONS et G. WICKREMASINGHE, *F.E.B.S. Letters*, 17, 1971, p. 254.
- [3] A. L. BRITZ et R. E. FINE, *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, 71, 1974, p. 4472.
- [4] S. E. KORNGUTH et E. SUNDERLAND, *Biochim. Biophys. Acta*, 393, 1975, p. 110.
- [5] M. ESTRIDGE, *Nature*, 268, 1977, p. 59.
- [6] P. T. KELLY et C. W. COTMAN, *J. Cell Biol.*, 79, 1978, p. 173.
- [7] I. GOZES et U. Z. LITTAUER, *F.E.B.S. Letters*, 99, 1979, p. 86.
- [8] I. GOZES et C. RICHTER-LANDSBERG, *F.E.B.S. Letters*, 95, 1978, p. 169.
- [9] T. V. WAEHNELDT et J. MALOTKA, *Brain. Res.*, 189, 1980, p. 582.
- [10] J. A. REIG, J. M. RAMOS, M. COZAR, J. S. AGUILAR, M. CRIADO et J. MONREAL, *J. Neurochem.*, 39, 1982, p. 507.
- [11] W. T. NORTON et S. E. PODUSLO, *J. Neurochem.*, 21, 1973, p. 740.
- [12] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 227, 1970, p. 680.
- [13] P. H. O'FARRELL, *J. Biol. Chem.*, 250, 1975, p. 4007.
- [14] D. W. CLEVELAND, S. G. FISCHER, M. W. KIRSCHNER et U. K. LAEMMLI, *J. Biol. Chem.*, 252, 1977, p. 1102.
- [15] A. WOLFF, P. DENOULET et C. JEANTET, *Neurosc. Letters*, 31, 1982, p. 323.

B. N. et C. J. : Collège de France, 75231 Paris Cedex 5;

B. N. et J.-M. B. : I.N.S.E.R.M. U. 134, Hôpital de la Salpêtrière, 75651 Paris Cedex 13.