

# Magnésium et membranes érythrocytaires \*)

De *M. Levy*

Laboratoire des Membranes Biologiques Université Paris VII, Paris, France

## Zusammenfassung

Einige Autoren haben den Einfluß von  $Mg^{2+}$  auf die Bindungsrate von Hämoglobin und einiger glykolytischer Enzyme an die Erythrocytenmembran beschrieben, ohne den Wirkungsmechanismus zu erklären. Wir konnten zeigen, daß der Gehalt an membrangebundenem Mg keine Unterschiede aufweist bei stark schwankenden Gehalten an glykolytischen Enzymen und Hämoglobin. Diese Ergebnisse schließen die Möglichkeit aus, daß Mg direkt an Bindungsprozessen dieser Proteine an die Membran beteiligt ist. Weiter wird gezeigt, daß  $Mg^{2+}$  fest an die Membran gebunden ist.

## Summary

Some authors have shown the influence of  $Mg^{2+}$  on the rate of binding of hemoglobin and some glycolytic enzymes on the erythrocyte membrane, without explaining the mechanism of this action.

We showed that the level of membrane magnesium does not significantly differ in membrane preparations showing largely different levels of glycolytic enzymes and hemoglobin. This result excludes the possibility of  $Mg^{2+}$  directly participating in the binding of these extrinsic proteins to the membrane. This work further showed that  $Mg^{2+}$  is strongly linked to the membrane.

## Résumé

Certains auteurs, ont mis en évidence l'influence du  $Mg^{2+}$  sur le taux de fixation de l'hémoglobine et de certains enzymes de la glycolyse sur la membrane érythrocytaire, sans toutefois en préciser le mécanisme.

Nous avons montré que la teneur en  $Mg^{2+}$  ne diffère pas significativement dans des préparations de membranes présentant des teneurs très différentes en enzymes de la glycolyse et en hémoglobine. Le résultat exclut la possibilité d'une participation directe du  $Mg^{2+}$  dans la liaison de ces protéines extrinsèques à la membrane.

Les recherches montrent en outre que le  $Mg^{2+}$  est fortement lié à la membrane.

\* \* \*

## Introduction

Comme toutes les membranes, les membranes érythrocytaires possèdent deux sortes de protéines, les protéines intégrales fortement liées et les protéines extrinsèques plus aisément détachables de la membrane. Parmi ces dernières figurent les

enzymes de la glycolyse et une partie de l'hémoglobine. Pour certaines d'entre elles le lieu de fixation à la membrane se situe sur la Bande 3, protéine intégrale de la membrane; c'est le cas de la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase [1, 2], de l'aldolase [3, 4] et de l'hémoglobine [5]. Ces auteurs évaluent ainsi le nombre de sites où se fixent les protéines à la membrane: pour la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase [1]  $1,3 \cdot 10^6$  sites/cellule, pour l'aldolase [4]  $7 \cdot 10^6$  sites/cellule et pour l'hémoglobine [5]  $1,4 \cdot 10^6$  sites/cellule.

La Bande 3 ne semble pas être le seul lieu de fixation des protéines à la membrane: pour la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase [1]  $1,3 \cdot 10^6$  avec la F Actine, cette fixation étant inhibée par la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase [7].

Pour les autres enzymes de la glycolyse, les sites précis de fixation à la membrane restent encore à déterminer. Dans le cas de la phosphofructokinase, *Higashi* et coll. [8], arrivent toutefois à la conclusion que cette enzyme pourrait également se fixer sur la Bande 3.

Le rattachement de ces différentes protéines à la membrane exige certaines conditions de pH et de force ionique qui diffèrent suivant l'enzyme étudiée.

En ce qui concerne la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase, son maximum de rétention se situerait vers pH 6,6 pour *Mitchell* et coll. [9] alors que pour *Duchon* et *Collier* [10] il se situerait à pH 7. Dans le cas de l'aldolase *Mitchell* et coll. [9] montrent qu'à pH 8,2 le degré de rétention de l'enzyme est plus faible qu'à pH 7,4. Il y a 6 fois plus de phosphofructokinase fixée à pH 7,0 qu'à pH 7,5 [11]. Pour la pyruvate kinase l'optimum de rétention se situe à pH 7,0 alors qu'à pH 8,5 l'enzyme est complètement détachée [10]. Pour la lactico-déshydrogénase, l'optimum se situe à pH 7,0; l'enzyme est totalement détachée à pH 8,0 [10]. Pour la phosphoglycérate kinase l'optimum de pH se situe vers 6,0, la fixation décroît à 7,0 et est nulle à pH 8,5 [10]. Le pH optimum de rétention de l'hémoglobine se situe vers pH 5,8.

\*) Résultats présentés au 3<sup>e</sup> Symposium International sur le Magnésium, Baden-Baden, 22.—28. 8. 1981.

Les différences de comportement entre ces protéines vis-à-vis de leur fixation à la membrane apparaissent plus nettement lorsqu'on examine l'effet de la force ionique. On peut alors distinguer 2 types de protéines. Les unes sont fixées à basse osmolarité de l'ordre de 5 à 10 mOsm; c'est le cas de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase comme le montrent *Duchon* et coll. [10] *Mitchell* et coll. [9] et *Shin* et *Carraway* [12] et de l'aldolase [10, 12, 13]; c'est aussi le cas de l'hémoglobine [9]. D'autres enzymes au contraire se retrouvent sur la membrane à une osmolarité plus élevée de l'ordre de 80 mOsm. C'est le cas de la triose phosphate isomérase [10], de la phosphoglycérate kinase [10, 14, 15], de la pyruvate kinase [13] et de la lactico-déshydrogénase [10].

Une série d'auteurs ont par ailleurs mis en évidence l'influence du magnésium sur le degré de rétention de certaines de ces protéines à la membrane. *Duchon* et *Collier* [10], *Schrier* [16] et *Bramley* et *Coleman* [17] s'accordent à penser que le magnésium interviendrait dans la fixation de l'hémoglobine. *Schrier* [16] montre que le magnésium ajouté au moment de la préparation des membranes favorise la fixation de la phosphoglycérate kinase; *Duchon* et *Collier* [10] montrent que le magnésium favorise celle de la pyruvate kinase, alors qu'il est sans effet sur celle de l'aldolase. Dans le cas de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase les résultats sont contradictoires: pour *Kant* et *Steck* [2], *Duchon* et *Collier* [10], *Shin* et *Carraway* [12] le magnésium serait sans effet sur le degré de rétention de l'enzyme; pour *Schrier* [16], *Mc Daniel* et *Kirtley* [18], des membranes préparées en présence de magnésium lieraient moins d'enzyme; toutefois lorsque les membranes ont été préalablement soniquées, le magnésium favoriserait la rétention de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, *Schrier* [16].

Aucune explication n'ayant pu être donnée sur le mécanisme par lequel le magnésium favoriserait la fixation de certaines protéines extrinsèques, nous avons émis l'hypothèse que le magnésium pourrait intervenir directement dans leur fixation à la membrane. Pour la vérifier nous avons cherché s'il existait une relation positive entre:

- les teneurs en magnésium membranaire
- et les teneurs correspondantes en enzymes de la glycolyse et en hémoglobine.

Pour cette étude nous avons fait appel à des fantômes d'érythrocytes présentant des teneurs différentes en hémoglobine et en enzymes de la glycolyse. La comparaison a porté sur des fantômes

blancs et rouges préparés à partir d'un même échantillon de sang selon la technique de *Bramley*.

## Matériel et méthodes expérimentales

### Produits utilisés

L'hémoglobine de sang de bœuf (type I), le NADH, l'ATP, le D-glucose, le D-fructose-6-phosphate, le DL-glycéraldéhyde-3-acide phosphorique sont des produits Sigma. Le glycérate-2-phosphate, le glycérate-3-phosphate, le glycérate-2-3-diphosphate, le fructose-1-6-diphosphate, le phosphoenolpyruvate, le NADP, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49), l'aldolase (EC 4.1.2.13), la triose phosphate isomérase (EC 5.3.1.1.), la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.8), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12), la 3-phosphoglycérate kinase (EC 2.7.2.2), la lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27), la pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) et l'énolase (EC 4.2.1.11) sont des produits Boehringer Mannheim.

### Préparation des membranes érythrocytaires

Les membranes à 80 mOsm et à 10 mOsm sont préparées selon la technique de *Bramley* et coll. [17] sur un même échantillon de sang 0<sup>+</sup> citraté, 1 heure après son prélèvement.

### Comptage des membranes érythrocytaires

Les membranes sont comptées au compteur Coulter selon la technique décrite par *Dodge* et coll. [19].

### Dosage de l'hémoglobine

Le dosage de l'hémoglobine dans les membranes érythrocytaires est fait par comparaison avec une droite étalon d'hémoglobine de sang de bœuf selon la technique décrite par *Dodge* et coll. [19].

### Dosage des protéines

Les protéines sont déterminées par la méthode de *Lowry* et coll. [20].

### Dosage des phospholipides

Les phospholipides sont extraits des membranes selon la technique de *Folch* et coll. [21]. Le phosphore est déterminé par la technique de *Fiske* et *Subbarow* [22]. Un facteur de 25 est utilisé pour convertir le phosphore en phospholipides.

### Dosage du magnésium

Il se fait par photométrie de flamme, en absorption atomique (IL 353) après 3 minéralisations par  $H_2O_2$  à 110 volumes pendant 4 heures à  $100^\circ C$ .

### Dosage des ATPases

La  $(Na^+, K^+)$ -ATPases et la  $(Ca^{2+}, Mg^{2+})$  ATPases sont mesurées selon Wins et Schoffeniels [23] en présence de  $300 \times 10^7$  fantômes pour 3 ml de milieu. L'hydrolyse de l'ATP est mesurée par différence entre le phosphate inorganique présent dans le milieu au temps 0 et après 60 mn d'incubation; le Pi est déterminé par la méthode de Beremblum et Chain [24].

### Dosage des enzymes de la glycolyse

L'hexokinase, l'aldolase, la triose phosphate isomérase, la phosphoglycérate kinase et la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase sont dosées selon Schrier [16]. La glucose-6-phosphate isomérase, la phosphofruktokinase, la phosphoglycérate mutase, l'énolase et la pyruvate kinase sont dosées selon WU et Racker [25]. La mesure de ces enzymes nécessite, pour 1 ml de milieu, de  $2,5 \times 10^7$  à  $200 \times 10^7$  fantômes préalablement éclatés par passage de  $-20^\circ C$  à  $0^\circ C$ .

Tous les résultats expérimentaux sont rapportés à  $10^{10}$  fantômes.

### Résultats expérimentaux et discussion

Dans un premier temps nous avons vérifié que les préparations de membranes présentent bien les caractéristiques définies par Bramley et Coleman à savoir que l'activité de l'ATPase  $(Na^+, K^+)$  est plus élevée dans les fantômes blancs préparés à 10 mOsm;  $2,77 \mu\text{mol Pi/h}/10^{10}$  fantômes que dans les fantômes rouges préparés à 80 mOsm où la valeur s'abaisse à  $0,010 \mu\text{mol Pi/h}/10^{10}$  fantômes.

Nous avons montré en outre que les fantômes rouges ont une teneur en protéines plus élevée:  $19,5 \text{ mg}/10^{10}$  fantômes contre  $5,5 \text{ mg}/10^{10}$  fantômes dans les blancs; que la teneur en phospholipides est identique:  $2,99 \text{ mg}/10^{10}$  fantômes dans les rouges et  $3,05 \text{ mg}/10^{10}$  fantômes dans les blancs et que la  $(Ca^{2+}, Mg^{2+})$  ATPase a une valeur très voisine dans les 2 types de fantômes:  $0,86 \mu\text{mol Pi/h}/10^{10}$  fantômes dans les rouges et  $0,70 \mu\text{mol Pi/h}/10^{10}$  fantômes dans les blancs.

Le tableau 1 donne la teneur en  $Mg^{++}$ , en enzymes de la glycolyse et en hémoglobine dans

Tab. 1: Comparaison entre la teneur en magnésium de deux types de fantômes d'érythrocytes et les teneurs correspondantes en enzymes de la glycolyse et en hémoglobine.

	Fantômes à 80 mOsm (rouges)	Fantômes à 10 mOsm (blancs)
<b>ENZYMES DE LA GLYCOLYSE*</b> ( $\mu\text{moles de substrat utilisé}/\text{min}/10^{10}$ fantômes)		
Hexokinase	0,09	0,01
Glucose-6-phosphate isomérase	23,43	24,27
Phosphofruktokinase	0,12	0,01
Aldolase	1,11	2,63
Triose phosphate isomérase	19,10	0,06
Glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase	10,27	24,07
Phosphoglycérate kinase	1,22	0,16
Phosphoglycérate mutase	8,03	0,07
Enolase	1,68	0,11
Pyruvate kinase	8,50	0,21
<b>HEMOGLOBINE**</b> ( $\text{mg}/10^{10}$ fantômes)	9,90	0,007
<b>MAGNESIUM***</b> ( $\mu\text{g}/10^{10}$ fantômes)	1,38 ( $\sigma = 0,50$ )	1,60 ( $\sigma = 0,59$ )

\* Moyenne de 3 expériences; \*\* Moyennes de 3 expériences; \*\*\* Moyenne de 9 expériences.

les 2 types de fantômes d'érythrocytes. Il en ressort que :

— la teneur en hémoglobine que est de 0,007 mg/10<sup>10</sup> fantômes (soit 85 × 10<sup>2</sup> molécules/fantômes) dans les blancs, s'élève à 9,90 mg/10<sup>10</sup> fantômes (soit 12 × 10<sup>6</sup> molécules/fantômes) dans les rouges.

Certaines enzymes telles l'héxokinase, la triose phosphate isomérase, la phosphoglycérate kinase, la phosphoglycérate mutase, l'énolase et la pyruvate kinase ont des activités plus élevées dans les fantômes rouges alors que d'autres enzymes telles l'aldolase et la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase ont des activités plus élevées dans les fantômes blancs, la glucose-6-phosphate déshydrogénase présentant la même activité enzymatique dans les 2 types de fantômes.

En dépit de ces différences de composition la teneur en Mg<sup>++</sup> des 2 types de fantômes ne diffère pas significativement (t = 0,83; P > 0,10). Elle est égale à 1,38 µg/10<sup>10</sup> fantômes (soit 3,5 × 10<sup>6</sup> molécules/fantômes) dans les rouges et 1,60 µg/10<sup>10</sup> fantômes (soit 4,0 × 10<sup>6</sup> molécules/fantômes) dans les blancs.

Ces résultats semblent exclure l'hypothèse que le magnésium puisse participer d'une manière directe à la fixation de l'hémoglobine ou de certaines enzymes de la glycolyse à la membrane.

Ils montrent par ailleurs que la liaison du magnésium à la membrane est insensible aux variations de force ionique. Ceci s'explique si l'on admet avec *Romero* [24] et *Dunn* [27] qu'elle résulte de la formation de complexes, le magnésium membranaire assurant ainsi la cohésion interne de la membrane [28, 29].

## Bibliographie

- [1] *Kant, J. A., Steck, T. L.*: Specificity in the association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with isolated human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* **248** (1973) 8457—8464.
- [2] *Yu, J., Steck, T. L.*: Associations of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **250** (1975) 9176—9184.
- [3] *Strapazon, E., Steck, T. L.*: Binding of rabbit muscle aldolase to band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **15** (1976) 1421—1424.
- [4] *Strapazon, E., Steck, T. L.*: Interaction of the aldolase and the membrane of human erythrocytes. *Biochemistry* **16** (1977) 2966—1971.
- [5] *Shaklai, N., Yguerabide, J., Ranney, H.*: Interaction of hemoglobin with red blood cell membranes as shown by a fluorescent chromophore. *Biochemistry* **16** (1977) 5586—5597.
- [6] *Morton, D. J., Clarke, F. M., Masters, C. J.*: An electron microscope study of the interaction between fructose diphosphate aldolase and actin-containing filaments. *J. Cell Biol.* **74** (1977) 1016—1023.
- [7] *Yelman, D. R., Harris, B. G.*: Localization and membrane association of aldolase in human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **199** (1980) 186—196.
- [8] *Higashi, T., Richards, C. S., Uyeda, K.*: The interaction of phosphofructokinase with erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* **254** (1979) 9542—9550.
- [9] *Mitchell, C. D., Mitchell, W. B., Hanahan, D. J.*: Enzyme and hemoglobin in human erythrocyte stroma. *Biochim. Biophys. Acta* **104** (1965) 348—358.
- [10] *Duchon, C., Collier, H. B.*: Enzyme activities of human erythrocyte ghosts: effects of various treatments. *J. Memb. Biol.* **6** (1971) 138—157.
- [11] *Karadshah, N. S., Uyeda, K.*: Changes in allosteric properties of phosphofructokinase bound to erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* **252** (1977) 7418—7420.
- [12] *Shin, B. C., Carraway, K. L.*: Association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **248** (1973) 1436—1444.
- [13] *Tillmann, W., Cordua, A., Schröter, W.*: Organization of enzymes of glycolysis and of glutathione metabolism in human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **382** (1975) 157—171.
- [14] *Schrier, S. L.*: Studies of the metabolism of human erythrocyte membranes. *J. Clin. Invest* **42** (1963) 756—766.
- [15] *Schrier, S. L.*: ATP synthesis in human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **135** (1967) 591—598.
- [16] *Schrier, S. L.*: Organization of enzymes in human erythrocyte membranes. *Amer. J. Physiol.* **210** (1965) 139—145.
- [17] *Bramley, T. A., Coleman, R.*: Effects of inclusion of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, EDTA or EGTA during the preparation of erythrocyte ghosts by hypotonic haemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **290** (1972) 219—228.
- [18] *McDaniel, C. F., Kirtley, M. E.*: The interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* **249** (1974) 6478—6485.
- [19] *Dodge, J. T., Mitchell, C., Hanahan, D. J.*: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **100** (1963) 119—130.
- [20] *Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.*: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265—275.
- [21] *Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H.*: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226** (1957) 497—509.
- [22] *Fiske, C. H., Subbarow, Y.*: *J. Biol. Chem.* **66** (1925) 375—382.
- [23] *Wins, P., Schoffeniels, E.*: Studies on red cell ghost ATPase systems: properties of a (Mg<sup>2+</sup> + Ca<sup>2+</sup>)-dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **120** (1966) 341—350.
- [24] *Beremblum, J., Chain, E.*: *Biochem. J.* **32** (1938) 295—305.
- [25] *Wu, R., Racker, E.*: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. *J. Biol. Chem.* **234** (1959) 1029—1035.