

N° d'ordre : 663

50376
1977
149

50376
1977
149

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DE LILLE 1

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

en Biochimie

par

Philippe DEBEIRE



EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LES ACTIVITES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES

Soutenu le 25 novembre 1977, devant la Commission d'Examen

Président et Rapporteur : J. MONTREUIL

Examineurs : G. SPIK

: A. VERBERT

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé du C.N.R.S. n° 217 "Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués") (Directeur : Professeur J. MONTREUIL), sous la direction de Monsieur A. VERBERT et avec la collaboration de Messieurs R. CACAN et B. HOFLACK.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Page 1

GENERALITES

3

I - LES EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES

3

A - HISTORIQUE

3

B - LES NUCLEOTIDES CYCLIQUES : SECONDS MESSAGERS HORMONAUX

4

1 - LE CONCEPT DE SECOND MESSAGER HORMONAL

4

2 - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LES ENZYMES

6

C - LES NUCLEOTIDES CYCLIQUES : REGULATEURS DE LA VIE SOCIALE DE LA CELLULE

7

1 - ROLE DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES DANS LA CROISSANCE

7

CELLULAIRE

a - L'AMPC

7

b - Le GMPc

7

2 - ROLE DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES DANS LA MORPHOLOGIE

8

CELLULAIRE

3 - LES NUCLEOTIDES CYCLIQUES ET LA TRANSFORMATION

8

CELLULAIRE

a - Métabolisme de l'AMPC dans les cellules transformées

8

b - Rôle de l'AMPC dans le contrôle de la croissance tumorale

9

c - Relations entre l'AMPC et les antigènes de surface de la cellule saine et transformée

9

d - Métabolisme du GMPc dans les cellules transformées

10

A - <u>DEFINITION DES GLYCOSYLTRANSFERASES</u>	11
1 - <u>PRECURSEURS NUCLEOTIDIQUES</u>	11
2 - <u>ACCEPTEURS</u>	11
3 - <u>PROPRIETES CATALYTIQUES DES GLYCOSYLTRANSFERASES</u>	11
a - <i>Influence du pH</i>	11
b - <i>Influence des ions</i>	13
c - <i>Influence de la température</i>	13
d - <i>Inhibiteurs et activateurs nucléotidiques des glycosyltransférases</i>	13
e - <i>Influence des détergents</i>	15
B - <u>LOCALISATION CELLULAIRE DES GLYCOSYLTRANSFERASES</u>	15
1 - <u>LES GLYCOSYLTRANSFERASES INTRACELLULAIRES</u>	15
a - <i>Microsomales</i>	16
b - <i>Mitochondriales</i>	16
c - <i>Nucléaires</i>	16
2 - <u>LES ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES</u>	18
C - <u>LES INTERMÉDIAIRES LIPIDIQUES DANS LA GLYCOSYLATION</u>	
<u>DES PROTEINES</u>	18
1 - <u>LES DOLICHOLS</u>	18
2 - <u>ROLE DES DOLICHOLS DANS LA SYNTHÈSE DES GLYCOPROTEINES</u>	20
III - <u>EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LA BIOSYNTHESE DES GLYCOCONJUGUES</u>	20
A - <u>EXPERIENCES IN VIVO</u>	21

B - <u>EXPERIENCES IN VITRO</u>	Page 22
TRAVAUX PERSONNELS	24
MATERIEL ET METHODES	25
I - <u>FRACTIONNEMENT CELLULAIRE</u>	25
A - <u>PREPARATION D'UNE FRACTION MICROSOMALE BRUTE</u>	25
1 - <u>PRINCIPE</u>	25
2 - <u>REACTIFS</u>	25
3 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	25
B - <u>PREPARATION DE FRACTIONS SUB-MICROSOMALES</u>	27
1 - <u>PRINCIPE</u>	27
2 - <u>REACTIFS</u>	27
3 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	29
II - <u>MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES</u>	29
A - <u>MESURE DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE</u>	29
1 - <u>PRINCIPE</u>	29
2 - <u>REACTIFS</u>	29
a - <i>Milieu d'incubation enzymatique</i>	29
b - <i>Nucléotides et dérivés</i>	30
3 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	30
a - <i>Mesure de l'activité galactosyltransférase</i>	30
b - <i>Mesure de la dégradation de l'UDP-¹⁴C-galactose</i>	31

B - <u>MESURE DE L'ACTIVITÉ SIALYLTRANSFERASIQUE</u>	Page 31
1 - <u>PRINCIPE</u>	31
2 - <u>REACTIFS</u>	31
a - <i>Milieu d'incubation enzymatique</i>	31
b - <i>Nucléotides et dérivés</i>	32
3 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	32
a - <i>Mesure de l'activité sialyltransférasique</i>	32
b - <i>Mesure de la dégradation du CMP-¹⁴C-NANA</i>	32
C - <u>MESURE DE LA DEGRADATION EVENTUELLE DE L'AMP_C</u>	
<u>AU COURS DES INCUBATIONS</u>	32
D - <u>SYSTEME REGENERATEUR D'ENERGIE</u>	32
RESULTATS ET DISCUSSION	34
I - <u>EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE GALACTOSYL-</u>	
<u>FERASIQUE MICRODOMALE</u>	34
A - <u>EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LA GALACTOSYL-</u>	
<u>TRANSFERASE DE LA FRACTION MICRODOMALE BRUTE</u>	34
1 - <u>CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSFERT A 37°C</u>	34
2 - <u>EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE GALACTO-</u>	
<u>SYLTRANSFERASIQUE A 37°C</u>	36
3 - <u>CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSFERT A 20°C</u>	39
4 - <u>EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE GALACTO-</u>	
<u>SYLTRANSFERASIQUE A 20°C</u>	39
5 - <u>EFFETS DE DIVERS DERIVES NUCLEOTIDIQUES SUR L'ACTIVITE</u>	
<u>GALACTOSYLTRANSFERASIQUE</u>	43

<u>B - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES ET DE LEURS DERIVES SUR L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE RUGUEUX</u>	Page 46
1 - <u>CINETIQUE DE LA REACTION</u>	46
2 - <u>EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES ET DE LEURS DERIVES</u>	46
<u>C - RECHERCHE D'UNE REGULATION DE LA GALACTOSYLTRANS- FERASE PAR LES NUCLEOTIDES CYCLIQUES, VIA UN SYSTEME PHOSPHO- DEPHOSPHO</u>	48
1 - <u>ETUDE DU SYSTEME</u>	48
2 - <u>RESULTATS</u>	48
<u>II - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE SIALYL- TRANSFERASIQUE MICROSOMALE</u>	48
A - <u>ETUDE CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSFERT</u>	48
B - <u>EFFETS DES NUCLÉOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITÉ SIALYLTRANSFÉRASIQUE</u>	51
CONCLUSIONS	54
BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

Les nucléotides cycliques (principalement l'AMPc et le GMPc) ont pris une importance considérable durant ces dernières années. Ils régulent de nombreux métabolismes cellulaires ainsi que la morphologie et la croissance des cellules saines et transformées par virus ou par agent chimique. Ces nucléotides sembleraient aussi intervenir, en régulant l'activité des glycosyltransférases (SUDO et ONODERA) (1), dans la biosynthèse des glycoconjugués membranaires (ROBERTS et al.) (2, 3). De plus, GOLBERG (4) suggère qu'il existe dans la cellule un équilibre entre l'AMPc et le GMPc qui, en outre, semblent être antagonistes.

Notre travail a été orienté vers l'étude des effets *in vitro* des nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) sur les activités galactosyl- et sialyltransférasiques des microsomes de foie de Rat, l'étude de l'action du GMPc revêtant un caractère original.

Avant de décrire nos travaux personnels, nous rappellerons dans les généralités les connaissances acquises sur les nucléotides cycliques et sur les mécanismes de la biosynthèse des glycoconjugués.

Les résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet des communications et mémoires suivants :

COMMUNICATION

- G. SPIK, P. SIX, Ph. DEBEIRE, R. CACAN, A. VERBERT et J. MONTREUIL -
Dégradation enzymatique et chimique des glycosyl-nucléotides au cours de la détermination des activités glycosyl-transférasiques (1976) L'Actualité Chimique, Suppl. 7, 7.

PUBLICATIONS

- A. VERBERT, R. CACAN, Ph. DEBEIRE et J. MONTREUIL - Peculiar
behavior of ectosialyltransferase toward exogenous acceptors (1977) FEBS-Letters,
74, 234-238

- Ph. DEBEIRE, B. HOFACK, R. CACAN, A. VERBERT et J. MONTREUIL -
Effect of cyclic nucleotides in *in vitro* assays of rat liver galactosyltransférase
(1977) BIOCHIMIE, 59, 473-477

GENERALITES.

I - LES EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES

A - HISTORIQUE

C'est en 1956 que l'AMP cyclique (adénosine-3',5'-monophosphate cyclique) fut découvert par le groupe de SUTHERLAND, lors de leurs recherches sur les mécanismes de la glycogénolyse hépatique (RALL et al.) (5).

WOSILAIT et SUTHERLAND (6) remarquèrent en premier lieu que l'inactivation de la phosphorylase hépatique s'accompagne de la perte de deux molécules de phosphate par molécule d'enzyme. Ils notèrent également que l'activation de la phosphorylase se fait par l'incorporation de phosphate dans la molécule, cette réaction nécessitant la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} . D'autre part, l'adrénaline et le glucagon augmentent cette incorporation (RALL et al.) (7). Enfin, le groupe de SUTHERLAND découvrit le facteur responsable de l'activation de cette phosphorylase : l'AMPc, le second messenger hormonal. En effet, le point d'impact des hormones comme l'adrénaline et le glucagon est l'adényl cyclase, enzyme assurant la synthèse de l'AMPc à partir d'ATP et en présence d'ions Mg^{++} (SUTHERLAND et al.) (8). L'AMPc ainsi synthétisé va activer la phosphorylase, par l'intermédiaire d'une phosphorylase kinase (RILEY) (9). Par la suite, MARINETTI et al. (10) montrèrent que cette enzyme se trouve dans la membrane plasmique de la cellule hépatique et que sa stimulation par des agents extracellulaires comme le glucagon et l'adrénaline entraîne une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire. Le taux d'AMPc intracellulaire est également régi par la phosphodiesterase cyclique, enzyme dégradant l'AMPc en 5'-AMP, en présence d'ions Mg^{++} (SUTHERLAND et RALL) (11).

L'AMPc a pris une importance considérable durant ces dernières années. A partir d'un rôle relativement restreint dans la glycogénolyse hépatique, il apparait maintenant être un agent clef de nombreux métabolismes dans le règne animal et même dans les microorganismes.

D'autres nucléotides cycliques ont été par la suite découverts dans les organismes : le GMP cyclique (guanosine-3',5'-monophosphate cyclique) (ASHMAN et al. (12) ; PRICE et al. (13)), l'UMP cyclique (uracile-3',5'-monophosphate cyclique) et l'IMP cyclique (inosine-3'5'-monophosphate cyclique) (STEINER et al.) (14). Ces nucléotides cycliques sont présents dans les organismes à des taux très nettement inférieurs à ceux de l'AMPc. C'est surtout sur le GMPc que les recherches se sont orientées ces dernières années. Comme pour l'AMPc, le GMPc a été détecté dans de nombreux tissus d'origines différentes (ISHIKAWA et al. (15) ; GOLDBERG et al. (16)). L'enzyme responsable de la synthèse du GMPc est la guanyl cyclase qui utilise le GTP comme substrat et qui ne fonctionne qu'en présence de Mn^{++} . Le GMPc est hydrolysé par une phosphodiesterase cyclique qui semble être analogue à la phosphodiesterase hydrolysant l'AMPc (MARKS) (17).

Il apparaîtrait que dans de nombreux phénomènes de régulation, les taux d'AMPc et de GMPc intracellulaires sont inversement proportionnels. Cet antagonisme serait à l'origine de nombreuses régulations métaboliques (GOLDBERG et al.) (18).

Dans la suite de notre introduction, nous passerons en revue les principaux effets de l'AMPc, et nous mentionnerons également ceux du GMPc, bien que les travaux entrepris dans cette voie soient assez fragmentaires.

B - LES NUCLEOTIDES CYCLIQUES : SECONDS MESSAGERS HORMONAUX

I - LE CONCEPT DE SECOND MESSENGER HORMONAL

De nombreuses hormones n'agissent pas directement sur les mécanismes cellulaires, mais par l'intermédiaire de l'AMPc (Tableau I, p.5). C'est le système adényl cyclasique membranaire qui est la clef de ce mécanisme. En effet, ces hormones ne pénètrent pas à l'intérieur de la cellule cible, mais agissent sur l'adényl cyclase membranaire. Il s'en suit une modification du taux d'AMPc

TABLEAU I

HORMONES UTILISANT L'AMPc COMME SECOND MESSAGER. D'APRES ROBISON et al. (19)

HORMONE	TISSU
Catécholamines	Différents tissus
Glucagon	Foie, ilots pancréatiques, tissu adipeux
ACTH (corticostimuline)	Tissu adipeux et cortex
LH ou ICSH (gonado-stimuline)	Tissus ovarien et testiculaire
Hormone de la parathyroïde	Rein et tissu osseux
TRF (facteur libérateur de la thyroïdrotrophine)	Hypophyse antérieure
TSH (thyroïdrotrophine)	Tissu thyroïdien
MSH (hormone stimulant les mélanocytes)	Peau de grenouille
Histamine	Cerveau
Sérotonine	<u>Fasciola hepatica</u>



intracellulaire, qui selon le tissu concerné, conduit à une modification du développement ou du fonctionnement de la cellule. Ce sont les travaux de POHL et al. (20), de BIRBAUMER et al. (21, 22) et de RODBELL et al. (23, 24, 25), qui ont permis de préciser la nature du système adényl cyclasique notamment dans les hépatocytes et dans les cellules adipeuses.

Ce n'est qu'en 1970 que GOLDBERG (26) réussit à mettre en évidence dans le coeur de Rat, une augmentation de la concentration en GMPc intracellulaire suite à une perfusion d'acétylcholine, la concentration en AMPc intracellulaire diminuant légèrement dans ces conditions. D'autre part l'adjonction d'isoprotérénol (un analogue de la noradrénaline) provoque une diminution de la concentration de GMPc intracellulaire et une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire. Des essais identiques, mais *in vitro*, n'ont pas été couronnés du même succès. En effet, il semblerait que le système guanyl cyclasique soit détruit en grande partie durant l'homogénéisation du tissu et pendant l'incubation enzymatique (MARKS) (27).

Il semble donc que différentes hormones contrôlent les taux d'AMPc et de GMPc intracellulaires de telle façon que lorsque le taux d'AMPc augmente, le taux de GMPc diminue ou inversement. Il faut néanmoins remarquer que les résultats restent trop fragmentaires pour pouvoir généraliser ce concept.

2 - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LES ENZYMES

L'AMPc régule l'activité de très nombreuses enzymes, par l'intermédiaire de systèmes phospho-déphospho (pour revue générale, voir ROBISON et al. (28)). Les points d'impact de l'AMPc sont des protéines kinases. Ces protéines kinases ont pour rôles de phosphoryler d'autres enzymes qui de ce fait deviennent actives et peuvent réguler de nombreux métabolismes.

L'existence de protéines kinases dépendantes du GMPc a été récemment mis en évidence (KUO et GREENGARD (29) ; HOFMANN et SOLD (30)). KUO et al. (31) remarquent

un fait important : une protéine kinase dépendante du GMPc, isolée du poumon foetal de Cobaye, n'est active qu'en présence d'un "modulateur", dont on ne connaît pas la nature, extrait à partir du même tissu ou du foie de Rat. Ce modulateur inhibe la protéine kinase dépendante de l'AMPc isolée du même tissu.

C - LES NUCLEOTIDES CYCLIQUES : REGULATEURS DE LA VIE SOCIALE

DE LA CELLULE

1 - ROLE DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES DANS LA CROISSANCE CELLULAIRE

a - L'AMPc. ABELL et MONAHAN (32) ont analysé dans leur revue générale les résultats obtenus par différents auteurs concernant les corrélations existantes entre l'AMPc et la division cellulaire. Ils en déduisent principalement trois conclusions :

- L'addition d'AMPc à une culture de cellules n'induit pas de divisions cellulaires.
- L'addition d'AMPc à une culture de lymphocytes stimulés par des agents mitogènes, entraîne une inhibition de la division cellulaire.
- Enfin, le taux intracellulaire d'AMPc et le taux de la synthèse de DNA sont inversement reliés.

Nous allons voir dans les chapitres suivants, que dans le cas de cellules transformées, on retrouve les mêmes phénomènes.

b - Le GMPc. Le GMPc fait partie des médiateurs contrôlant la croissance de la cellule (HADDEN et al.) (33). Dans le cas de fibroblastes et de lymphocytes en culture, une augmentation de GMPc intracellulaire est en corrélation avec la prolifération de ces cellules (HADDEN et al. (34) ; SEIFERT et RUDLAND (35)). D'autre part, pour les lymphocytes, différentes lectines mitogènes induisent une augmentation du taux de GMPc intracellulaire (SCHUMM et al.) (36). L'addition exogène de GMPc ou de ses dérivés induit une synthèse accrue de DNA et favorise la croissance cellulaire (WHITFIELD et al. (37) ; SEIFERT et RUDLAND (38)).

Enfin, JOHNSON et HADDEN (39), se fondant sur le fait que le GMPc stimule l'activité RNA polymérasique I et diminue l'activité RNA polymérasique II dans les noyaux de lymphocytes stimulés ou non par des phytohémagglutinines, suggèrent que le GMPc peut être assimilé à un messenger portant de la membrane plasmique au noyau "le signal de la mitose".

L'AMPc et le GMPc semblent donc réguler la croissance cellulaire de façon antagoniste, selon l'hypothèse de GOLDBERG. Le mécanisme de cette régulation, par l'intermédiaire des cyclases et des diestérases, n'est pas encore connu.

2 - ROLE DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES DANS LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE

PUCK et al. (40) montrent que l'incubation de cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) avec du db AMPc provoque une transformation morphologique de ces cellules, qui acquièrent une allure fibroblastique. Cette conversion serait due à une réorganisation du système microtubulaire.

D'autre part, lorsque l'on incube des fibroblastes en culture avec de l'AMPc, le fibroblaste voit sa morphologie changer, sa taille et son adhésivité avec le substratum augmenter (JOHNSON et PASTAN (41) ; JOHNSON et al. (42)).

La morphologie cellulaire étant en relation étroite avec les constituants de la membrane plasmique, l'AMPc joue probablement un rôle dans la biosynthèse de ces constituants et influe donc indirectement sur la morphologie cellulaire. Nous verrons dans le chapitre suivant, que l'AMPc modifie de la même façon de nombreux caractères morphologiques de la cellule transformée.

3 - LES NUCLEOTIDES CYCLIQUES ET LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

a - *Métabolisme de l'AMPc dans les cellules transformées.* Un certain nombre de travaux récents ont montré que dans les cellules tumorales ou dans les cellules transformées par des virus *in vitro*, le taux d'AMPc intracellulaire est inférieur à celui des cellules non transformées (GRANNER et al. (43) ; HEIDRICK et RYAN (44) ; OTTEN et al. (45) ; SHEPPARD (46)).

D'autre part l'activité adényl cyclasique ou la réponse de l'adényl cyclase à différents stimuli sont modifiées dans les cellules transformées (SCHIMMER (47) ; PEERY et al. (48) ; BURK (49)). Enfin, CLARK et al. (50) notent que l'activité phosphodiésterasique cyclique est considérablement diminuée dans les cellules transformées.

Le métabolisme de l'AMPc est modifié dans les cellules transformées, mais le processus par lequel s'opère cette modification n'est pas encore connu à ce jour.

b - Rôle de l'AMPc dans le contrôle de la croissance tumorale. Différents auteurs ont montré que l'addition de db AMPc au milieu de culture de cellules tumorales provoque une inhibition de croissance de celles-ci, inhibition variant selon le type de la tumeur (CHO-CHUNG (51) ; JOHNSON et al. (52) ; SHEPPARD (53)). Ces auteurs montrent que l'addition d'AMPc ou de ses dérivés au milieu de culture entraîne une "réversion" vers le phénotype de certaines propriétés morphologiques de la cellule transformée. D'une autre façon, l'élévation des taux intracellulaires d'AMPc, par la stimulation de l'adényl cyclase ou par l'inhibition de la phosphodiésterase, inhibe la croissance de ces cellules transformées.

c - Relations entre l'AMPc et les antigènes de surface de la cellule saine et transformée. La surface cellulaire se modifie lorsque l'on transforme des cellules par des virus. Notamment, sur la surface de la cellule transformée, il existe des récepteurs de la phytohémagglutinine de germe de blé, tandis que ces récepteurs sont masqués dans le cas de la cellule saine (BURGER) (54). SHEPPARD (55) montre que des fibroblastes de souris 3T3, transformés par le virus du polyome, deviennent moins agglutinables par la phytohémagglutinine de germe de blé si l'on ajoute au milieu de culture du db AMPc et de la théophylline (inhibiteur de la phosphodiésterase cyclique). Cette agglutinabilité réaugmente si ces facteurs sont retirés du milieu de culture. Par cette approche, cet auteur en déduit que l'AMPc influence l'architecture de la surface cellulaire.

KURTH et BAUER (56, 57) utilisent des cellules tumorales de souris, obtenues à partir d'une tumeur induite par le virus de ROUS. Ces cellules tumorales possèdent des antigènes de surface spécifiques. Après traitement par le db AMPc, ces cellules deviennent moins agglutinables par la concanavoline A et leurs antigènes de surface sont quantitativement modifiés.

d - Métabolisme du GMPc dans les cellules transformées. NESBITT et al. (58) ont montré que le taux de GMPc intracellulaire ainsi que l'activité guanyl cyclasique diminuent lors de la transformation de fibroblastes par des virus. Dans ces conditions expérimentales, le GMPc n'a donc pas un comportement opposé à celui de l'AMPc. Il semble donc que l'on ne puisse généraliser le concept de GOLDBERG, basé sur l'antagonisme existant entre l'AMPc et le GMPc.

Remarque : il faut noter que certains auteurs se sont attachés à étudier le devenir des nucléotides cycliques ajoutés au milieu de culture. L'AMPc ne peut pénétrer dans la cellule, que lorsqu'il est présent à de fortes concentrations (10^{-3} M) dans le milieu de culture. En effet, il est rapidement dégradé à la surface externe des cellules par une phosphodiesterase cyclique (GORIN et BRENNER) (59). KAUKEL et HILZ (60) montrent que l'efficacité supérieure du db AMPc sur l'AMPc est due à deux faits.

- le db AMPc est plus résistant aux phosphodiesterases extra- et intracellulaires.

- le db AMPc, après qu'il ait pénétré dans la cellule, est dégradé par une estérase en monobutyryl AMPc (mb AMPc), qui présente les mêmes affinités que l'AMPc pour les protéines kinases.

Il est donc très important, lorsque l'on étudie les effets des nucléotides cycliques, de connaître leurs devenir et les produits de leurs métabolismes.

II - GENERALITES SUR LA SYNTHÈSE DES GLYCOCONJUGUES

A - DEFINITION DES GLYCOSYLTRANSFERASES (pour références, voir la revue générale de LOUISOT et al. (61)).

Les glycosyltransférases sont des enzymes chargées de transférer des oses sur des accepteurs très variés. La réaction générale peut s'écrire de la façon suivante :

glycosyl-nucléotides + accepteur \longrightarrow accepteur glycosylé + nucléoside (di) phosphate.

1 - PRECURSEURS NUCLEOTIDIQUES

La liste des principaux glycosyl-nucléotides est donnée dans le tableau II (p. 11).

2 - ACCEPTEURS

Quand aux accepteurs, ils sont de natures très diverses. Ils peuvent être de natures protéinique, lipidique, glycoprotéinique, glycolipidique, osidique ou mucopolysaccharidique.

Dans la suite de notre mémoire nous nous limiterons aux glycosyltransférases responsables de la synthèse des glycoprotéines en excluant toutefois les glycosyltransférases des liquides biologiques.

3 - PROPRIETES CATALYTIQUES DES GLYCOSYLTRANSFERASES

a - *Influence du pH.* La plupart des glycosyltransférases fonctionnent dans une zone de pH assez large. Les maximums d'activités des glycosyltransférases se situent à des pH variables selon les tissus et les espèces animales étudiées. La galactosyltransférase microsomale pancréatique de Rat montre une activité maximale pour un pH entre 7 et 8 (RONZIO) (62). La mannosyltransférase mitochondriale de foie de Souris a un pH optimal de 7,4 (MORELIS et LOUISOT) (63). La fucosyltransférase solubilisée à partir de la muqueuse intestinale de Rat, a un pH optimal de 5,5 (LOUISOT et al.) (64).

TABLEAU II

LISTE DES PRINCIPAUX NUCLEOSIDES DIPHOSPHO- OSES (ou dérivés d'oses)
IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES HOLOSIDES, HETEROSIDES, POLYOSIDES
ET GLYCOCONJUGUES DES BACTERIES, VEGETAUX ET ANIMAUX. D'APRES LOUISOT
et al. (65).

GLUCIDES TRANSPORTÉS	APPELLATIONS USUELLES	APPELLATIONS COMPLÈTES
Pentoses	UDP-L-arabinose UDP-D-xylose	uridine-diphosphate-L-arabinose uridine-diphosphate-D-xylose
6-désoxy-oses	GDP-L-fucose dTDP-L-rhamnose GDP-6-désoxy-D-talose	guanosine-diphosphate-L-fucose désoxythymidine-diphosphate-L-rhamnose guanosine-diphosphate-6-désoxy-D-talose
Hexoses	UDP-D-glucose ADP-D-glucose CDP-D-glucose GDP-D-glucose dTDP-D-glucose	uridine-diphosphate-D-glucose adénosine-diphosphate-D-glucose cytidine-diphosphate-D-glucose guanosine-diphosphate-D-glucose désoxythymidine-diphosphate-D-glucose
	GDP-D-mannose	guanosine-diphosphate-D-mannose
	UDP-D-galactose	uridine-diphosphate-D-galactose
D-hexosamines	UDP-D-glucosamine UDP-N-acétyl-D-glucosamine UDP-N-acétyl-D-galactosamine dTDP-N-acétyl-D-glucosamine	uridine-diphosphate-D-glucosamine uridine-diphosphate-N-acétyl-D-glucosamine uridine-diphosphate-N-acétyl-D-galactosamine désoxy-thymidine-diphosphate-N-acétyl-D- glucosamine
Acides D-uroniques	UDP-acide-D-glucuronique UDP-acide-D-galacturonique UDP-acide-L-iduronique GDP-acide-D-mannuronique	uridine-diphosphate-acide-D-glucuronique uridine-diphosphate-acide-D-galacturonique uridine-diphosphate-acide-L-iduronique guanosine-diphosphate-acide-D-mannuronique
Polyols	CDP-glycérol CDP-ribitol	cytidine-diphosphate-glycérol cytidine-diphosphate-ribitol
Acides sialiques	CMP-acide sialique	cytidine-monophosphate-acide sialique



b - *Influence des ions.* La présence d'ions divalents est souvent nécessaire pour le fonctionnement des glycosyltransférases. Ces ions divalents sont principalement le Mn^{++} , le Mg^{++} ou le Ca^{++} (SCHACHTER et al. (66) ; SPIRO (67) ; BERNACKI et BOSMANN (68)). Le rôle de ces cations à l'échelon moléculaire n'a pas encore été élucidé. Il est possible qu'ils forment des complexes stables avec les glycosyl-nucléotides.

c - *Influence de la température.* Beaucoup de glycosyltransférases ont un maximum d'activité à 30°C. On note cependant quelques exceptions comme la fucosyltransférase de la muqueuse intestinale qui a une activité optimale pour une température de 23°C (LOUISOT et al.) (69).

d - *Inhibiteurs et activateurs nucléotidiques des glycosyltransférases.* Plusieurs auteurs ont étudié l'influence de divers dérivés nucléotidiques sur les activités glycosyltransférasiques, mais ils n'ont guère trouvé de loi générale. Se fondant sur les travaux de KEPLER et al. (70), qui ont mesuré les taux des nucléotides pyrimidiques dans le foie de rat, BERNACKI (71) montre que la sialyltransférase microsomale de foie de Rat est *in vitro* activée par l'UDP (à une concentration existante *in vivo*). Il montre également que le CMP est un inhibiteur compétitif de cette sialyltransférase (figure 1, p. 14). MOOKERJEA et YUNG (72) montrent que la stimulation de l'activité galactosyltransférasique microsomale par des nucléotides peut être également due à une inhibition de l'UDP-galactose pyrophosphatase par ces nucléotides : l'UDP galactose serait donc protégé, et l'activité galactosyltransférasique accrue. Ces auteurs essaient de discriminer les effets de ces nucléotides mais n'y parviennent que partiellement. Ces résultats ont été confirmés au laboratoire à propos de l'ectogalactosyltransférase (VERBERT et al.) (73). Enfin LOUISOT et al. (74) montrent que l'emploi de GDP en système acellulaire *in vitro* permet d'inhiber complètement les activités mannosyltransférasiques.

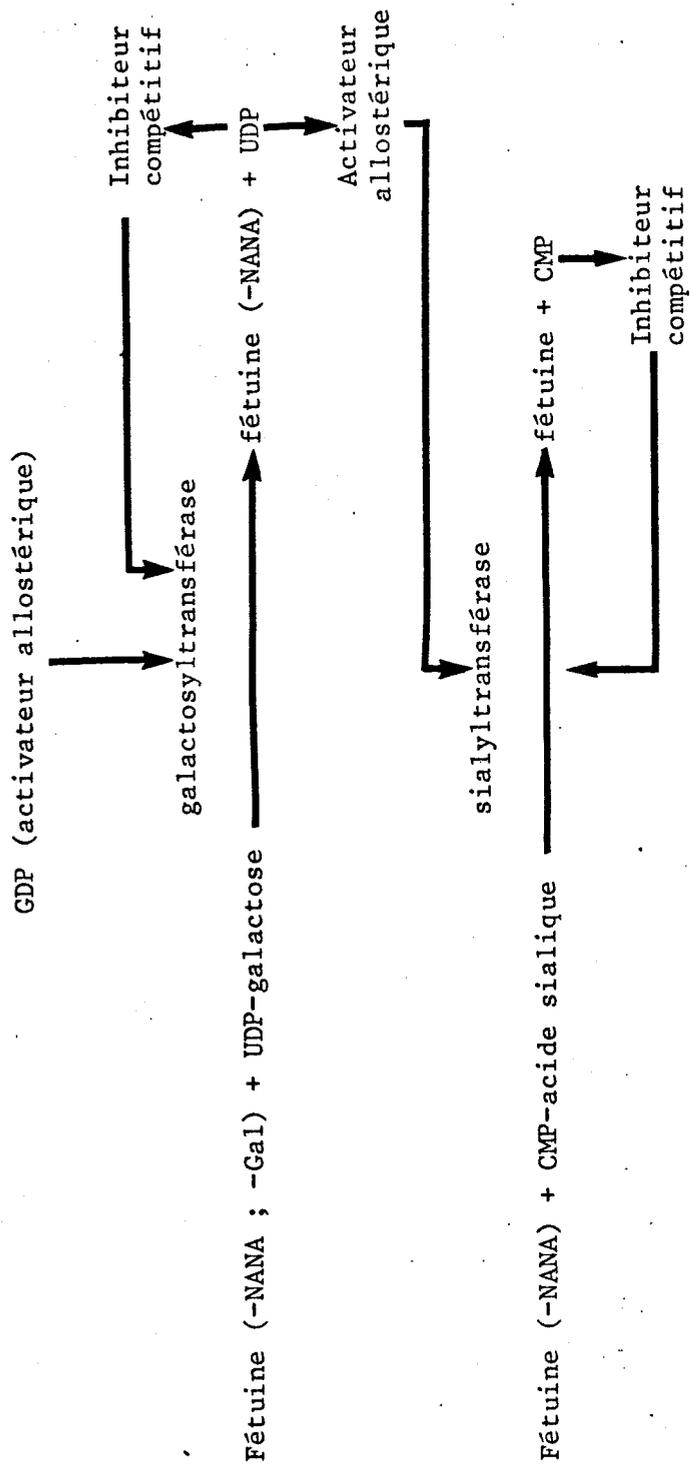


FIGURE 1

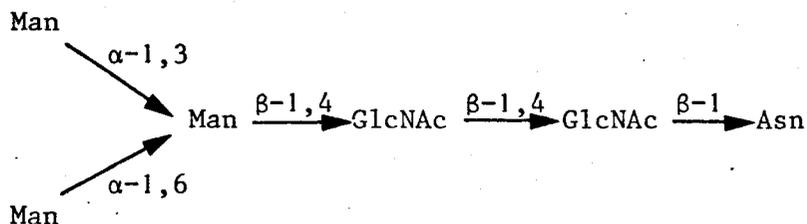
Régulation des activités glycosyltransférasiques par des nucléotides. D'après BERNACKI (75).

e - *Influence des détergents.* C'est un fait général que les enzymes membranaires sont activées par les détergents. Ces détergents altèrent l'organisation protéine-lipide de la membrane et de ce fait "solubilisent" ces enzymes en augmentant leur activité. Les glycosyltransférases microsomales sont activées par des détergents comme le Triton X 100 (SCHACHTER et al.) (76). D'autres auteurs comme MOOKERJEA et YUNG (77) utilisent la lysolecithine afin de stimuler la galactosyltransférase microsomale de foie de Rat. D'une autre façon, ils préincubent les membranes microsomales avec de la phospholipase A, ce qui a pour effet de générer la lysolécithine dans les membranes et d'activer la galactosyltransférase. Ces auteurs en déduisent que le rôle de la lysolécithine dans l'activation de l'enzyme est probablement lié à la solubilisation de la membrane, qui de ce fait conduirait à une meilleure interaction enzyme-substrat. La lysolécithine pourrait avoir un rôle de régulation dans les systèmes glycosyltransférasiques.

B - LOCALISATION CELLULAIRE DES GLYCOSYLTRANSFERASES.

1 - LES GLYCOSYLTRANSFERASES INTRACELLULAIRES

Il est tout d'abord nécessaire de rappeler les dernières acquisitions concernant la structure des glycoprotéines. MONTREUIL (78) propose que les glycannes liés à la protéine par des liaisons de type N-glycosidique possèdent un noyau pentasaccharidique commun :



Trois grands problèmes persistent à ce jour :

- On ne peut pas discriminer la synthèse des glycoprotéines solubles de celle des glycoprotéines membranaires.

- On ne connaît pas de structure glycanique de glycoprotéine membranaire de type N-glycosidique.

- Enfin, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, on ne sait pas dans quelles proportions les glycoprotéines de type N-glycosidique sont synthétisées par l'intermédiaire des dolichols.

Nous allons passer en revue la localisation cellulaire des glycosyltransférases responsables de la biosynthèse de ces glycoprotéines.

a - Microsomales. SCHACHTER et al. (79) montrent que dans le foie, le branchement du trisaccharide suivant : NANA \longrightarrow Gal \longrightarrow GlcNAc, sur le noyau pentasaccharidique précédant (p. 15) se fait d'une manière séquencée par l'intermédiaire de trois glycosyltransférases, la sialyl-, la galactosyl- et la N acétyl glucosaminyltransférase. Ces trois enzymes sont localisées dans l'appareil de Golgi. Ils en déduisent un mécanisme de biosynthèse des glycoprotéines solubles secrétées par le foie (figure 2, p. 17). KIM et al. (80) précisent que dans le cas de la synthèse des mucines intestinales, les glycosyltransférases sont présentes dans la fraction microsomale lisse. La glycoprotéine ainsi synthétisée est accumulée dans l'appareil de Golgi et ensuite excrétée.

b - Mitochondriales. Les travaux de MORELIS et al. (81) sur le foie et de BROQUET et al. (82) sur le cerveau permettent d'affirmer l'existence d'une mannosyltransférase propre à la mitochondrie. Dans le cas d'hépatocytes, la mannosyltransférase est localisée sur la membrane interne mitochondriale.

c - Nucléaires. Les travaux de RICHARD et al. (83) permettent d'affirmer la présence de glycosyltransférases dans le noyau. Leur rôle n'est pas

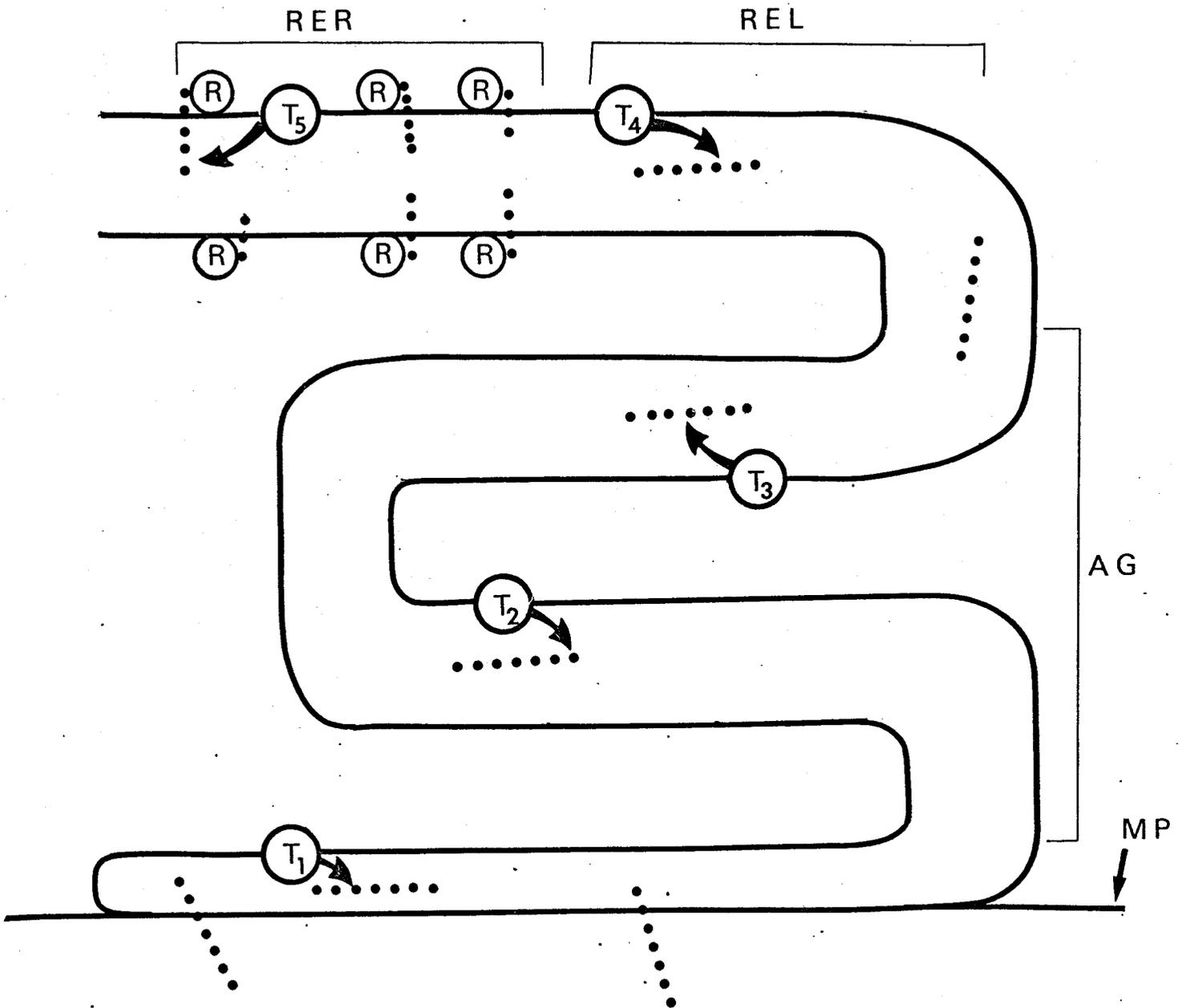


FIGURE 2

Mécanisme hypothétique de la biosynthèse et de la sécrétion de glycoprotéines par le foie. Abréviations : RER : réticulum endoplasmique rugueux ; REL : réticulum endoplasmique lisse ; MP : membrane plasmique ; AG : appareil de Golgi ; R : ribosome ; T₁ : sialyltransférase ; T₂ : galactosyltransférase ; T₃ : N-acétyl glucosaminyltransférase ; T₄ et T₅ : glycosyltransférases branchant les sucres internes du glycanne. D'après SCHACHTER et al. (84).

encore connu à ce jour.

2 - LES ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES

Les ectoglycosyltransférases sont des enzymes membranaires dont les sites actifs sont en contact avec le milieu extracellulaire (DE PIERRE et KARNOVSKY (85)). Ces enzymes posséderaient des rôles biologiques très importants, notamment dans l'adhésion et la reconnaissance cellulaire (ROSEMAN (86) ; ROTH et al. (87) ; McLEAN et BOSMANN (88)), dans la reconnaissance de glycoprotéines (JAMIESON et al. (89) et dans la réparation ou la synthèse de glycoconjugués membranaires (BERNACKI (90), VERBERT et al. (91, 92)). Récemment au laboratoire, CACAN et al. (93) ont mis en évidence un inhibiteur intracellulaire des sialyltransférases qui leurs ont permis d'émettre une hypothèse sur la régulation de cette enzyme : inhibée à l'intérieur des cisternes, l'ectosialyltransférase ne deviendrait active qu'à la surface cellulaire sur laquelle elle parviendrait par le processus de "membrane flow".

C - LES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES DANS LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES.

La glycosylation des protéines peut se faire par un transfert direct du monosaccharide sur la protéine à partir du nucléotide-sucre ou bien par l'intermédiaire d'un lipide. D'après PARODI et LELOIR (94), l'intermédiaire lipidique serait nécessaire pour brancher des glycanes de type N-glycosidique sur une protéine.

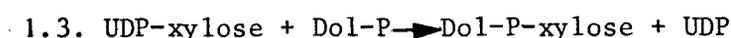
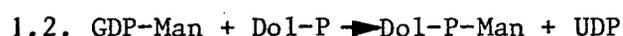
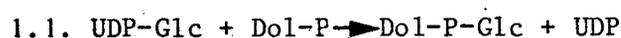
1 - LES DOLICHOLS

Le lipide responsable de ce mécanisme dans les cellules eucaryotiques est le dolichol. Le dolichol est un long polyprénol ($n = 17-21$). Ce composé peut se trouver tel quel ou en parti estérifié par des acides gras. Le dolichol est largement répandu dans les tissus animaux, dans toutes les fractions cellulaires, spécialement au niveau du noyau (DALLNER et al. (95)). Le tableau III (p. 19) résume les différentes fonctions des dolichols.

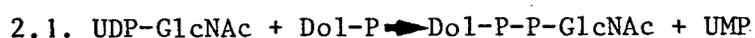
TABLEAU III

Role des dolichol phosphates dans la synthèse des glycoprotéines. D'après PARODI et LELOIR (96).

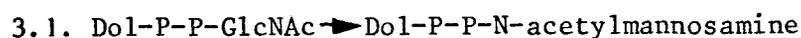
1 - Synthèse de dolichol monophospho-sucres



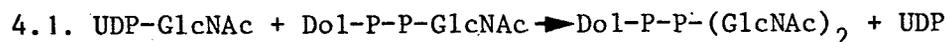
2 - Synthèse de dolichol pyrophospho-sucres



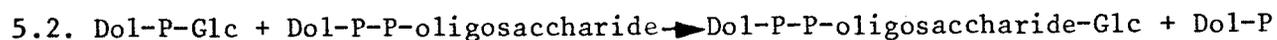
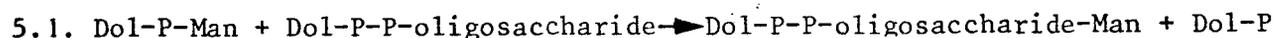
3 - Transformation de la partie osidique



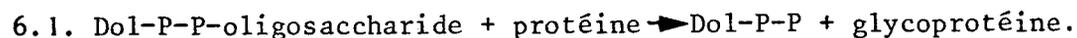
4 - Transfert direct de nucléotides-sucres à des dolichols pyrophospho-sucres



5 - Transfert du monosaccharide des dolichol monophospho-monosaccharides à des dolichols pyrophospho-oligosaccharides



6 - Transfert d'oligosaccharides provenant de dolichol pyrophospho-oligosaccharides à des protéines



2 - ROLE DES DOLICHOLS DANS LA SYNTHÈSE DES GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines synthétisées via les dolichols-pyrophospho-oligosaccharides semblent être du type N-glycosidique (PARODI et LELOIR (97)). Mais il n'est pas certain que la totalité de ces glycoprotéines sont synthétisées de cette manière. En effet LUCAS et al. (98) constatent que seulement 10 p. 100 de l'ovalbumine synthétisée par les microsomes d'oviducte de poule l'est par l'intermédiaire des dolichols.

L'oligosaccharide $(\text{Man})_3 \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{GlcNAc}$ ayant été greffé sur la protéine, on pense que les sucres "terminaux", c'est à dire le galactose et l'acide sialique sont transférés directement sur la glycoprotéine à partir des nucléotides-oses. En effet, jusqu'à présent les dérivés dolichols du galactose et de l'acide sialique n'ont pu être mis en évidence.

III - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LA BIOSYNTHESE DES GLYCO-CONJUGUES.

Dans les chapitres précédents nous avons vu que les nucléotides cycliques ont différents effets sur de nombreux paramètres de la croissance cellulaire, des métabolismes des cellules animales, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

D'un autre côté, il est actuellement bien établi que les glycoprotéines de surface jouent un rôle primordial dans la vie de la cellule (ROTH et al. (99)).

Dans cette optique, différents auteurs utilisant des cultures de cellules saines et transformées, se sont employés à montrer quelles relations existent entre les nucléotides cycliques et les glycoconjugués de surface, ou entre les nucléotides cycliques et les glycosyltransférases cellulaires. Il n'est actuellement pas possible de discriminer les glycosyltransférases responsables de la biosynthèse des glycoconjugués membranaires de celles qui sont responsables de la biosynthèse de glycoprotéines solubles excrétées par la cellule. Différents auteurs se sont attachés à suivre les modifications des glycoconjugués membranaires induites par

les nucléotides cycliques. D'un autre côté d'autres auteurs se sont efforcés d'analyser l'impact des nucléotides cycliques sur les glycosyltransférases elles-mêmes. Ces expérimentations sont peu nombreuses et fragmentaires.

A - EXPERIENCES IN VIVO

BAIG et ROBERTS (100) traitent des cellules ovariennes d'Hamster chinois par le db AMPc et étudient la composition en glycoprotéines de la membrane plasmique. Ils notent que le db AMPc cause de profondes altérations dans la composition en glucides de la membrane plasmique. Mais ils ne peuvent pas dire si dans la cellule normale et dans la cellule traitée par le db AMPc, les glycoprotéines sont les mêmes mais en quantités différentes ou bien si l'action du db AMPc a induit des modifications au niveau des oligosaccharides des glycoprotéines ou des glycolipides.

SHEININ et al. (101) ajoutent du db AMPc dans le milieu de culture de fibroblastes 3T3 sains et transformés par des virus. Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'addition de db AMPc provoque une réversion des propriétés des fibroblastes transformées vers le phénotype et modifie de nombreuses propriétés de la cellule saine. Ces auteurs montrent que le db AMPc ne modifie pas l'incorporation de glucosamine dans les glycoprotéines membranaires mais ils notent une modification profonde dans les glycosphingolipides.

HAKAMORI et al. (102) étudient les changements de morphologie et de croissance induits par l'AMPc sur des fibroblastes transformés. Ils montrent que l'AMPc entraîne une profonde modification dans l'organisation membranaire (ou dans la synthèse) des sialyl-galactosyl-glycoprotéines.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'addition d'AMPc à une culture de cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO), provoque une transformation morphologique de ces cellules, qui acquièrent une allure fibroblastique. ROBERTS et al. (103) montrent que des modifications des glycoconjugués de surface accompagnent

cette modification morphologique induite par l'AMPc : les glycopeptides à fucose de surface de la cellule non traitée contiennent plus d'acide sialique que ceux de la cellule traitée par l'AMPc.

On peut conclure de toutes ces expériences que le taux d'AMPc intracellulaire régit soit la composition en glucides des glycoconjugués membranaires, ou (et) le taux de synthèse de ces glycoconjugués. Il fallait donc, par des expériences *in vitro* étudier l'impact des nucléotides cycliques sur les enzymes responsables de la synthèse de la partie glycannique des glycoprotéines.

B - EXPERIENCES IN VITRO

Se fondant sur le fait que les taux de glycosyltransférases sont modifiés dans des cellules transformées par des virus (GRIMES (104) ; BOSMANN (105) ; CUMAR et al. (106)), et sur le fait que les glycoprotéines de surface sont modifiées dans les cellules transformées, SUDO et ONODERA (107) ont étudié dans des cellules saines et transformées par des virus, les réponses des glycosyltransférases au db AMPc.

Ces auteurs mesurent les activités des glycosyltransférases, sur la cellule entière, sur les membranes plasmiques ou sur la fraction microsomale. Ils montrent que le db AMPc inhibe la galactosyl- et la sialyltransférase de surface des cellules transformées :

- leurs expérimentations sur la cellule entière montre que le db AMPc inhibe la galactosyl et la sialyltransférase de surface des cellules transformées, mais n'a pas d'activité sur les glycosyltransférases de surface des cellules saines.

- ils préparent des membranes plasmiques de cellules saines et transformées. Dans la cellule transformée, la galactosyltransférase est stimulée par le db AMPc, tandis que dans la cellule saine elle est légèrement inhibée. Ces résultats sont donc contradictoires, et ces auteurs attribuent cela à des artefacts de préparation des membranes plasmiques.

- Enfin, le db AMPc stimule la galactosyltransférase microsomale des deux types de cellules, mais n'a aucun effet sur la sialyltransférase microsomale. SUDO et ONODERA (108) suggèrent que l'AMPc pourrait avoir un effet direct sur les glycosyltransférases microsomales, et que cet effet pourrait être à l'origine des modifications des glycoconjugués de surface et de l'augmentation de synthèse des mucopolysaccharides induits par l'AMPc (ROBERTS et al. (109) ; GOGGINS et al. (110)).

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

I - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

A - PREPARATION D'UNE FRACTION MICROSOMALE BRUTE

1 - PRINCIPE

La fraction microsomale brute est préparée à partir d'un homogénat de foie de Rat. Après une première centrifugation différentielle à 20 000 g visant à éliminer les cellules intactes, les noyaux et les mitochondries, une seconde centrifugation différentielle à haute vitesse (150 000 g) nous fournit la fraction microsomale brute.

Toutes les opérations sont effectuées à + 4°C.

2 - REACTIFS

Solution A (milieu d'homogénéisation) :	tampon Tris-HCl	10 mM ; pH 7,4
	Saccharose	0,25 M
	MgCl ₂	0,5 mM

3 - MODE OPERATOIRE

Trois rats de race SPRAGUE-DAWLEY, âgés de trois mois, sont tués par décapitation et leurs foies sont rapidement prélevés et lavés dans le milieu A.

Les foies sont ensuite broyés dans un appareil de FISCHER et le broyat ainsi obtenu, (3 foies correspondant à 20 g de broyat), est homogénéisé dans 100 ml de milieu A. L'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un appareil de POTTER-ELVEJEHM (10 courses du piston, 500 tours/min). L'homogénat est ensuite centrifugé à 20 000 g pendant 10 min (centrifugeuse BECKMAN J21 ; rotor JA-20 ; 11 000 tours/min). Le surnageant post-mitochondrial est ensuite centrifugé à 150 000 g pendant 90 min (centrifugeuse BECKMAN L2 65B ; rotor SW50-1 ; 45 000 tours/min). Les culots ainsi

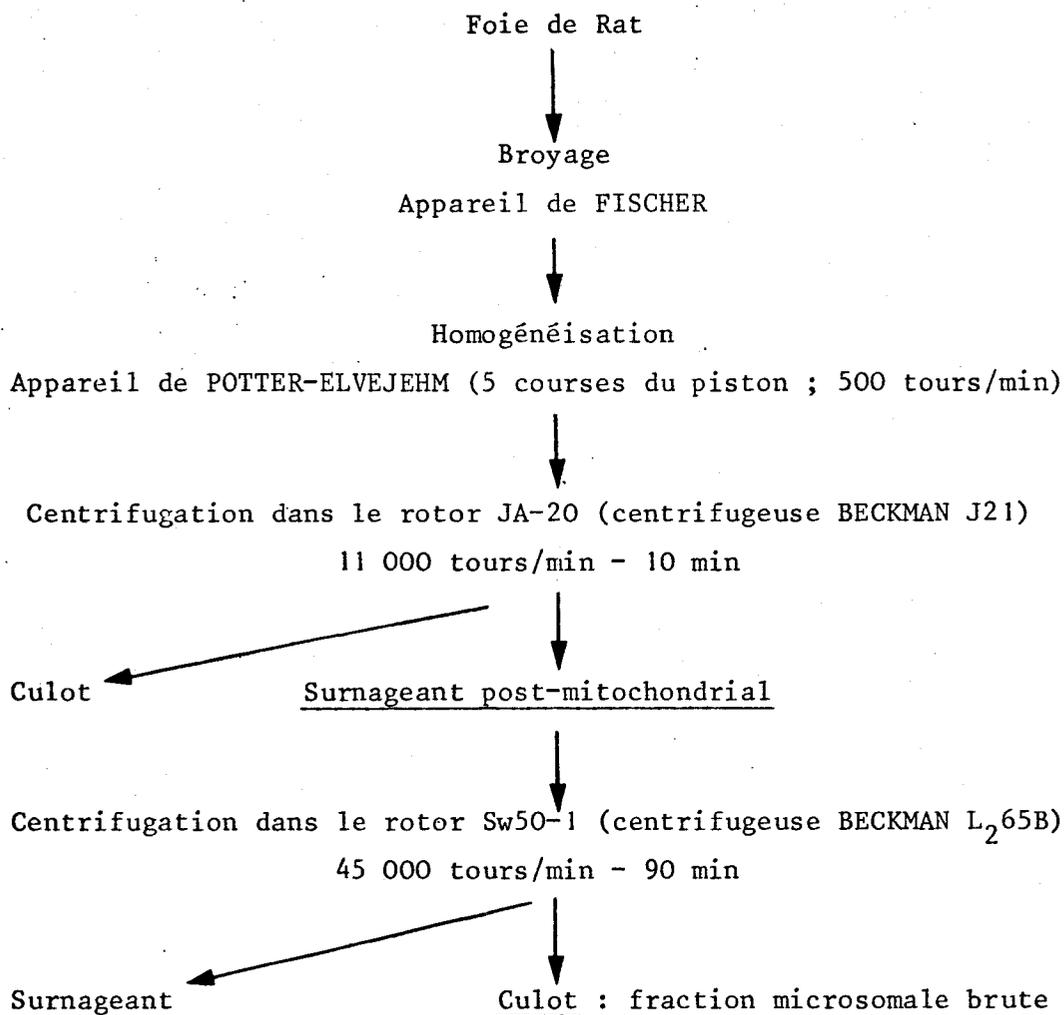


FIGURE 3

Préparation de la fraction microsomale brute



3 - MODE OPERATOIRE

Le surnageant post-mitochondrial est déposé sur 10 ml de solution B et est centrifugé à 105 000 g pendant 1 heure (centrifugeuse BECKMAN L₂65B ; rotor SW-27 ; 26 000 tours/min). Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans la solution C (1,6 M en saccharose). La formation du gradient est décrite dans la figure 4 (p. 29). Les tubes sont centrifugés pendant 3 heures à 140 000 g (centrifugeuse BECKMAN L₂65B ; rotor 60 Ti ; 45 000/min). La fraction enrichie en réticulum endoplasmique lisse est utilisée immédiatement comme source de galactosyl-transférases.

II - MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A - MESURE DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE

1 - PRINCIPE

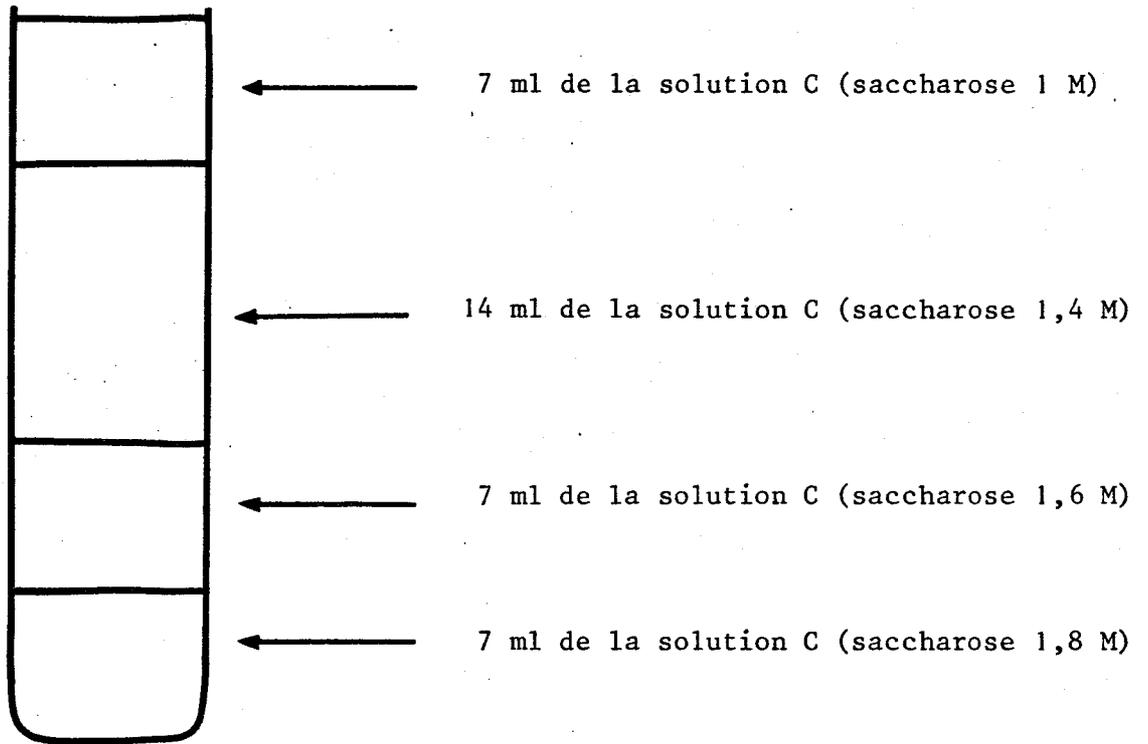
L'activité galactosyltransférasique est mesurée par l'incorporation de ¹⁴C-galactose, provenant du précurseur nucléotidique, l'UDP-¹⁴C-galactose, sur des accepteurs endogènes ou exogènes. L'ovomucoïde est choisi comme accepteur exogène, car il possède sur sa partie glycanique, 5 N-acétyl glucosamines en positions terminales non réductrices (BAYARD et MONTREUIL) (111).

D'autre part, on mesurera la dégradation du précurseur nucléotidique pour chaque essai enzymatique.

2 - REACTIFS

a - Milieu d'incubation enzymatique.

Tampon cacodylate de sodium	0,1 M ; pH 7,4
NaCl	0,154 M
MnCl ₂	10 mM
UDP- ¹⁴ C-galactose	0,4 μM
UDP-galactose	5,6 μM



Centrifugation dans le rotor 60 Ti 45.000 tours/min - 3 heures

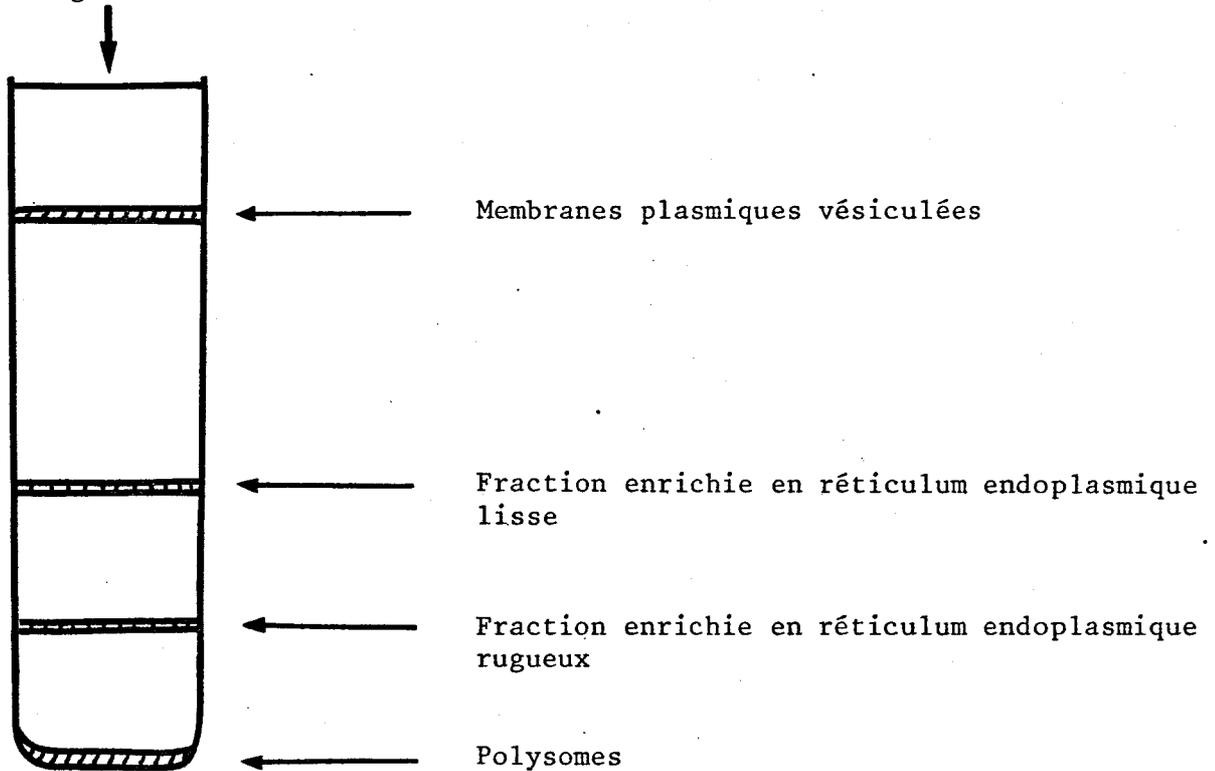


FIGURE 4

Préparation de fraction sub-microsomaux



Après addition d'UDP-galactose non radioactif, la radioactivité spécifique est de 40 mCi/mM. Une incubation enzymatique se fait dans un volume final de 100 μ l. Les culots de microsomes sont resuspendus dans le tampon suivant,

Tampon cacodylate de sodium	0,1 M ; pH 7,4
NaCl	0,154 M

afin d'avoir une concentration de l'ordre de 12 mg de protéines par ml. Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de LOWRY (112).

Dans le cas où l'on utilise un accepteur exogène, on ajoute 1,5 mg d'ovomucoïde dans les 100 μ l de l'incubat enzymatique.

b - Nucléotides et dérivés. La concentration en nucléosides, nucléotides et nucléotides cycliques sera précisée pour chaque expérimentation. Elle variera généralement de 10^{-6} à 10^{-3} M.

3 - MODE OPERATOIRE

Les températures et les durées des incubations enzymatiques seront précisées pour chaque expérimentations.

a - Mesure de l'activité galactosyltransférasique. Après incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par refroidissement à 0°C et par addition de 2 ml d'acide phosphotungstique à 5 p. 100 dans 1'HCl 2N. Le matériel acido-précipitable est recueilli sur filtre de fibre de verre WHATMAN GF-83. Le filtre est ensuite lavé abondamment par de l'acide trichloroacétique et ensuite par de l'éthanol absolu à 0°C. Après séchage, la radioactivité retenue sur filtre est mesurée par comptage dans le milieu scintillant suivant :

Toluène	1	1
PPO	5	g
POPOP	0,5	g

b - Mesure de la dégradation de l'UDP-¹⁴C-galactose. Après chaque incubation, 10 µl de l'incubat sont prélevés et soumis à une chromatographie papier pendant 18 heures dans le système solvant suivant : acétate d'éthyl-pyridine-acide acétique glacial-eau (5/5/1/3), méthode décrite par SPIK et al. (113). Après séchage, le chromatogramme est découpé en bandes de 1 x 5 cm et la radioactivité de chaque fraction est mesurée par comptage en scintillation liquide dans le même milieu scintillant que précédemment. Dans certains cas, pour mieux localiser l'UDP-¹⁴C-galactose, on dépose sur le dépôt de l'incubat de l'UDP-³H-galactose.

B - MESURE DE L'ACTIVITÉ SIALYLTRANSFERASIQUE

1 - PRINCIPE

L'activité sialyltransférase est mesurée par l'incorporation de ¹⁴C-acide N-acétyl neuraminique (NANA) provenant du précurseur nucléotidique, le CMP-¹⁴C-NANA, sur des accepteurs endogènes ou exogènes. L'orosomucoïde désialylé est choisi comme accepteur exogène.

D'autre part on mesurera également la dégradation du précurseur nucléotidique pour chaque essai enzymatique.

2 - REACTIFS

a - *Milieu d'incubation enzymatique.* Le milieu d'incubation est identique à celui employé pour les mesures des activités galactosyltransférases. Seuls le précurseur nucléotidique et l'accepteur exogène diffèrent. L'orosomucoïde a été désialylé par une hydrolyse acide (H₂SO₄ 0,01 N, 100°C, 30 min). La désialylation effective a été vérifiée par analyse chromatographique en phase gazeuse*. Le CMP-¹⁴C-NANA utilisé possède une activité spécifique de 214 mCi/mM. On ajoute 0,02 µCi de CMP-¹⁴C-NANA pour un volume final de 100 µl.

* Nous remercions Monsieur B. FOURNET pour l'orosomucoïde qu'il nous a fourni et pour les analyses chromatographiques en phase gazeuse qu'il a bien voulu effectuer sur nos accepteurs.

b - Nucléotides et dérivés. La concentration en nucléosides, nucléotides et nucléotides cycliques sera précisée pour chaque expérimentation. Elle variera généralement de 10^{-6} à 10^{-3} M.

3 - MODE OPERATOIRE

a - Mesure de l'activité sialyltransférasique. On récupère le matériel acido-précipitable et l'on mesure la radioactivité retenue sur filtre de la même façon que pour la mesure de l'activité galactosyltransférasique.

b - Mesure de la dégradation du CMP-¹⁴C-NANA. Après chaque incubation, 10 µl de l'incubat sont prélevés et soumis à une chromatographie papier dans le système solvant suivant : acétate d'éthyl-pyridine-acide acétique glacial-eau (5/5/1/3). Après séchage, le chromatogramme est découpé en bandes de 1 x 5 cm et la radioactivité de chaque fraction est mesurée par comptage en scintillation liquide dans le même milieu que précédemment (p. 30). Nous avons choisi ce système parce qu'il permet de bien séparer le CMP-NANA du NANA, bien qu'il existe un fond de radioactivité élevé entre ces deux composés.

C - MESURE DE LA DEGRADATION EVENTUELLE DE L'AMPc AU COURS DES INCUBATIONS

La non dégradation de l'AMPc ajouté aux milieux d'incubations a été contrôlée par électrophorèse selon la méthode décrite par VERBERT et CACAN (114).

D - SYSTEME REGENERATEUR D'ENERGIE

Afin de vérifier si les nucléotides cycliques pouvaient réguler les activités galactosyltransférasiques par l'intermédiaire d'un système phospho-déphospho, nous avons procédé à une préincubation de la fraction microsomale pendant 30 min à 37°C en présence d'ATP (10^{-3} M) et d'AMPc (10^{-3} M). Nous avons

utilisé un système régénérateur d'ATP (phosphocréatine 20 mM et phosphocréatine kinase 1 mg/ml) afin de compenser la dégradation de l'ATP ajouté au milieu d'incubation. Le bon fonctionnement de ce système a été contrôlé en ajoutant à l'incubation de l'³H-ATP, dont l'intégrité à la fin de la préincubation a été vérifiée par électrophorèse selon la méthode décrite par VERBERT et CACAN (115).

Après cette préincubation, l'activité galactosyltransférase a été déterminée selon le protocole décrit précédemment, pendant 4 min, à 20°C.

RESULTATS ET DISCUSSION

Différentes études ont montré que l'AMPc et le db AMPc modifient *in vivo* la biosynthèse des glycoconjugués (GOGGINS et al. (116) ; ROBERT et al. (117) ; SUDO et al. (118)). Nous avons pour notre part étudié les effets *in vitro* des nucléotides cycliques (AMPc, GMPc, db AMPc) sur les activités galactosyl- et sialyltransférasiques microsomales de foie de Rat, en tenant compte que divers nucléotides phosphates peuvent affecter ces activités enzymatiques (RICHARD et al. (119) ; KO et al. (120) ; MOOKERJEA et YUNG (121)).

I - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANS- FERASIQUE MICROSOMALE

A - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LA GALACTOSYLTRANS- FERASE DE LA FRACTION MICROSOMALE BRUTE

1 - CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSFERT A 37°C

La figure 5 (p. 35) montre que le maximum d'incorporation de ^{14}C -galactose sur les accepteurs endogènes et exogènes est déjà atteint au bout de 5 min d'incubation. On remarque que, dans nos conditions expérimentales, l'ovomucoïde incorpore trois fois plus de ^{14}C -galactose que les accepteurs endogènes.

L'étude de la dégradation du précurseur nucléotidique (figure 5, p. 35) montre que tout l'UDP-galactose présent au début de la réaction est totalement dégradé en moins de 5 min d'incubation en UMP et galactose-1-P. Le galactose-1-P est ensuite lui-même hydrolysé en galactose et phosphate.

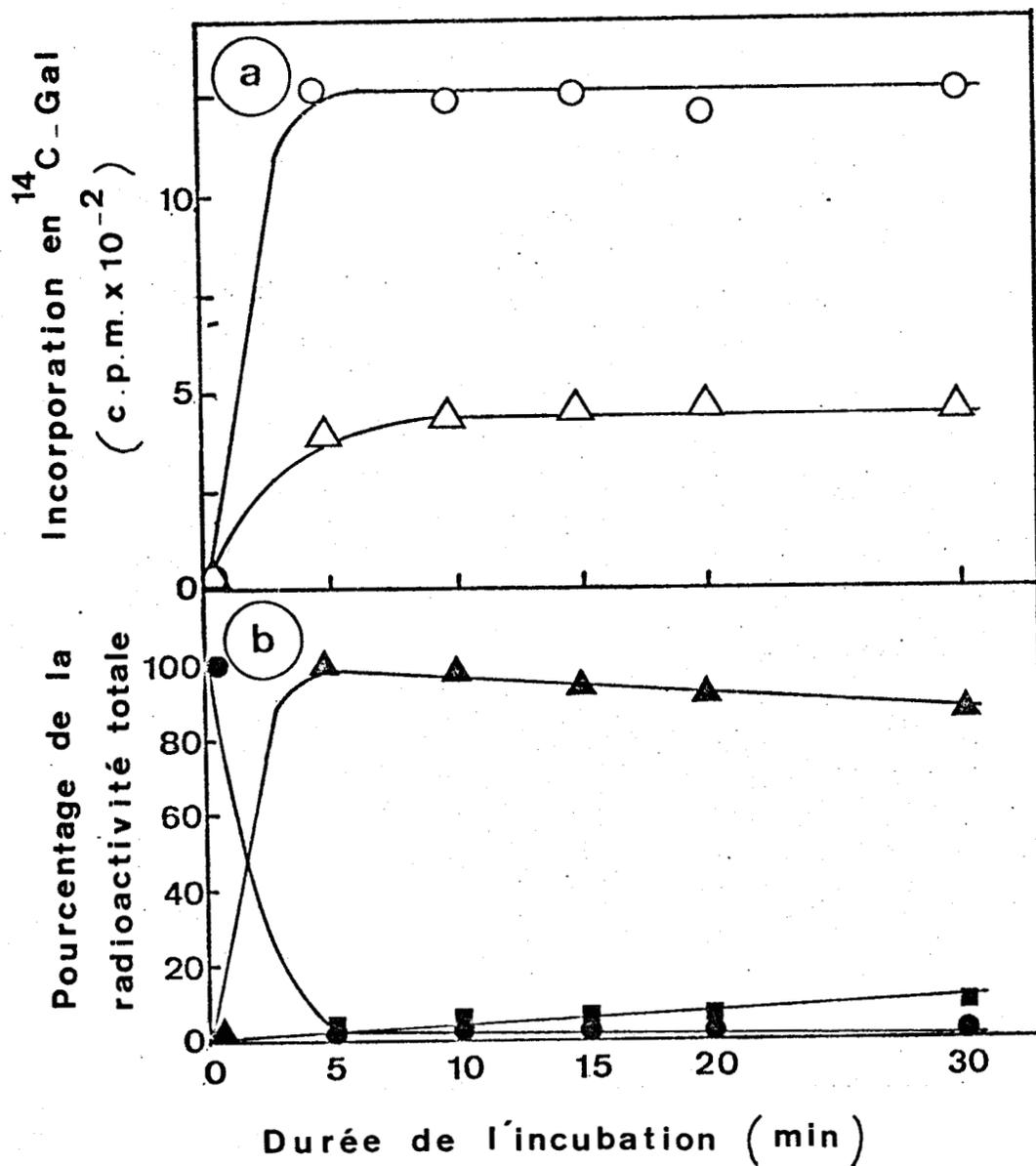


FIGURE 5

- a - Etude cinétique de l'incorporation de ^{14}C -galactose sur des accepteurs endogènes (Δ - Δ) et sur l'ovomucoïde (O-O).
- b - Etude cinétique de la dégradation de l'UDP-galactose (O), de la formation de galactose-1-P (Δ - Δ) et de galactose (\square - \square).



L'UDP-galactose étant totalement hydrolysé au bout de 5 min d'incubation, la galactosyltransférase ne peut plus fonctionner. Des résultats similaires ont été rapportés par MOOKERJEA et YUNG (122). Ces auteurs constatent également que la réaction de transfert atteint un plateau au bout d'un temps très court (10 min). Pour ralentir la dégradation du précurseur, certains auteurs utilisent des nucléosides monophosphates comme inhibiteurs de pyrophosphatases (PATT et GRIMES (123) ; BISCHOFF et al. (124) ; VERBERT et al. (125)). Le but de notre travail étant de déterminer les effets des nucléotides cycliques sur l'activité galactosyltransférase, nous ne pouvions introduire un nucléoside monophosphate dans le milieu réactionnel.

2 - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANS- FERASIQUE A 37°C

On procède à des incubations enzymatiques à 37°C pendant 10 min, avec des doses croissantes de nucléotides cycliques (AMPc, GMPc et db AMPc) de 10^{-6} M à 10^{-3} M.

La figure 6 (p. 37) montre que l'addition de doses croissantes d'AMPc ou de GMPc au milieu d'incubation provoque une augmentation de l'activité galactosyltransférase. Par contre l'addition de db AMPc ne modifie pas l'activité enzymatique.

L'étude de la dégradation du précurseur nucléotidique indique qu'il n'y a plus d'UDP-galactose présent dans le milieu d'incubation à la fin de la réaction, aussi bien dans les incubats enzymatiques témoins que dans les incubats contenant les nucléotides cycliques.

On peut déduire trois conclusions de cette série de manipulations.

a - L'effet de stimulation observée peut donc être du soit à un effet direct des nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) sur la galactosyltransférase, soit à un effet indirect via une protection de l'hydrolyse du précurseur.

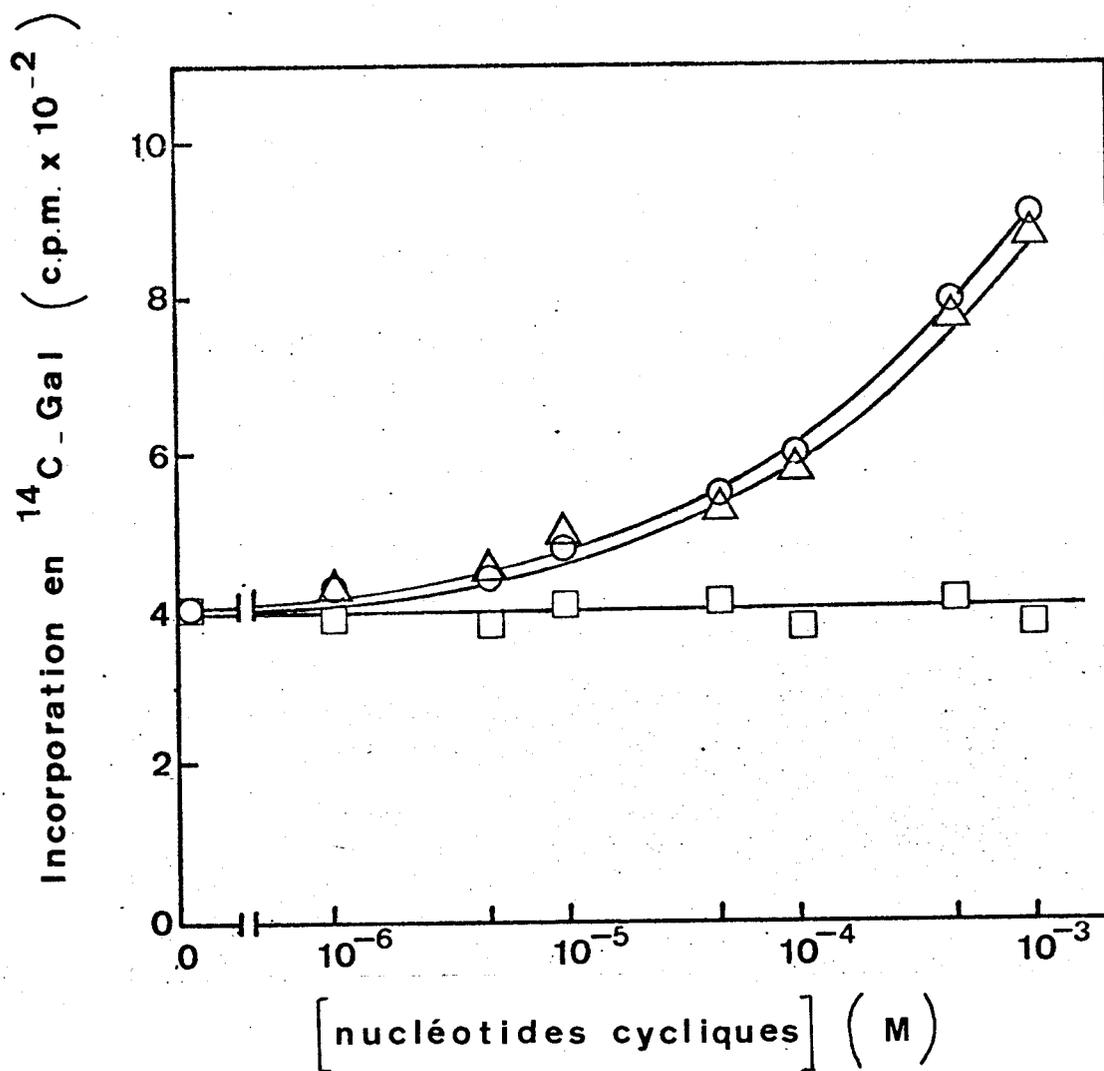


FIGURE 6

Effets des nucléotides cycliques sur l'incorporation en ^{14}C -galactose sur l'ovomucoïde (O-O) AMPc, (Δ - Δ) GMPc, (\square - \square) db AMPc. Les concentrations des nucléotides cycliques sont représentées selon une échelle logarithmique. Les incubations se font à 37°C pendant 10 min.



par les nucléotides cycliques. Ce dernier effet conduirait donc à une durée de vie plus longue du précurseur dans le milieu d'incubation et de ce fait la galactosyltransférase fonctionnerait pendant un temps plus long et l'activité galactosyltransférasique serait accrue.

b - On remarque que le db AMPc n'a pas d'effet sur l'activité galactosyltransférasique. Des dérivés de l'AMPc, tels que le dibutyryl AMPc (db AMPc) sont employés parce qu'ils pénètrent mieux dans la cellule et que d'autre part, ils sont moins hydrolysés par la phosphodiesterase cyclique (POSTERNAK et al. (126) ; FALBRIARD et al. (127)). Ces dérivés possèdent des propriétés identiques à l'AMPc, mais sont moins actifs que l'AMPc dans des extraits tissulaires et plus actifs dans le tissu intact (HENION et al.) (128). Dans notre cas, le db AMPc ne stimule pas l'activité galactosyltransférasique contrairement à l'AMPc.

c - Comme nous l'avons vu dans les généralités, l'AMPc et le GMPc se comportent souvent de manière antagoniste. Dans notre cas, ces nucléotides cycliques stimulent de la même façon l'activité galactosyltransférasique.

Dans la suite de notre expérimentation, il devenait essentiel de pouvoir localiser l'impact des nucléotides cycliques. Pour cela, il fallait que l'UDP-galactose ne soit plus le facteur limitant de la réaction, c'est-à-dire qu'à la fin de l'incubation enzymatique il soit présent en quantité suffisante pour que la cinétique de réaction de la galactosyltransférase soit encore linéaire. Nous ne pouvions employer d'inhibiteur de la dégradation du précurseur nucléotidique (UMP ou autres nucléosides monophosphates) de peur de fausser les effets des nucléotides cycliques. En abaissant la température de réaction à 20°C, nous allons voir que la réaction de transfert est linéaire jusqu'à 6 min.

3 - CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSFERT A 20°C

La figure 7 (p. 40) montre qu'à 20°C, la réaction de transfert possède une cinétique linéaire jusqu'à 6 min. A 6 min, il reste 25 p. 100 de l'UDP-galactose initial dans le milieu d'incubation. En dessous de ce taux, la réaction de transfert ne semble plus évoluer, tandis que le taux d'UDP-galactose continue de diminuer.

En abaissant la température à 20°C, la réaction de transfert et la réaction d'hydrolyse du précurseur ont diminuées. A 5 min, il reste environ 25 p. 100 du précurseur nucléotidique, alors qu'à 37°C, tout le précurseur nucléotidique était hydrolysé à ce temps. Dans la suite de nos expériences, nous travaillerons à 20°C et les incubations dureront 4 min, car de cette manière l'UDP-galactose ne sera plus le facteur limitant de la réaction de transfert. Il sera alors possible de comparer valablement les activités galactosyltransférasiques.

4 - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE A 20°C

Nous avons procédé à des incubations enzymatiques à 20°C pendant 4 min, en utilisant des doses croissantes de nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) de 10^{-6} M à 10^{-3} M. La figure 8 (p. 41) montre que les nucléotides cycliques ne stimulent plus l'activité transférasique, contrairement aux observations précédentes (à 37°C pendant 10 min). Par contre, on observe une protection de l'hydrolyse du précurseur aussi bien par l'AMPc que par le GMPc. Le taux du précurseur n'étant plus un facteur limitant (supérieur à 25 p. 100), cette protection de l'UDP-galactose ne se traduit pas par une augmentation du transfert.

Lorsque l'on étudie la cinétique d'incorporation de 14 C-galactose sur l'ovomucoïde à 20°C, on remarque qu'à 3 min, l'incorporation est la même en présence ou en absence de nucléotides cycliques (figure 9 a, p. 42). A 3 min,

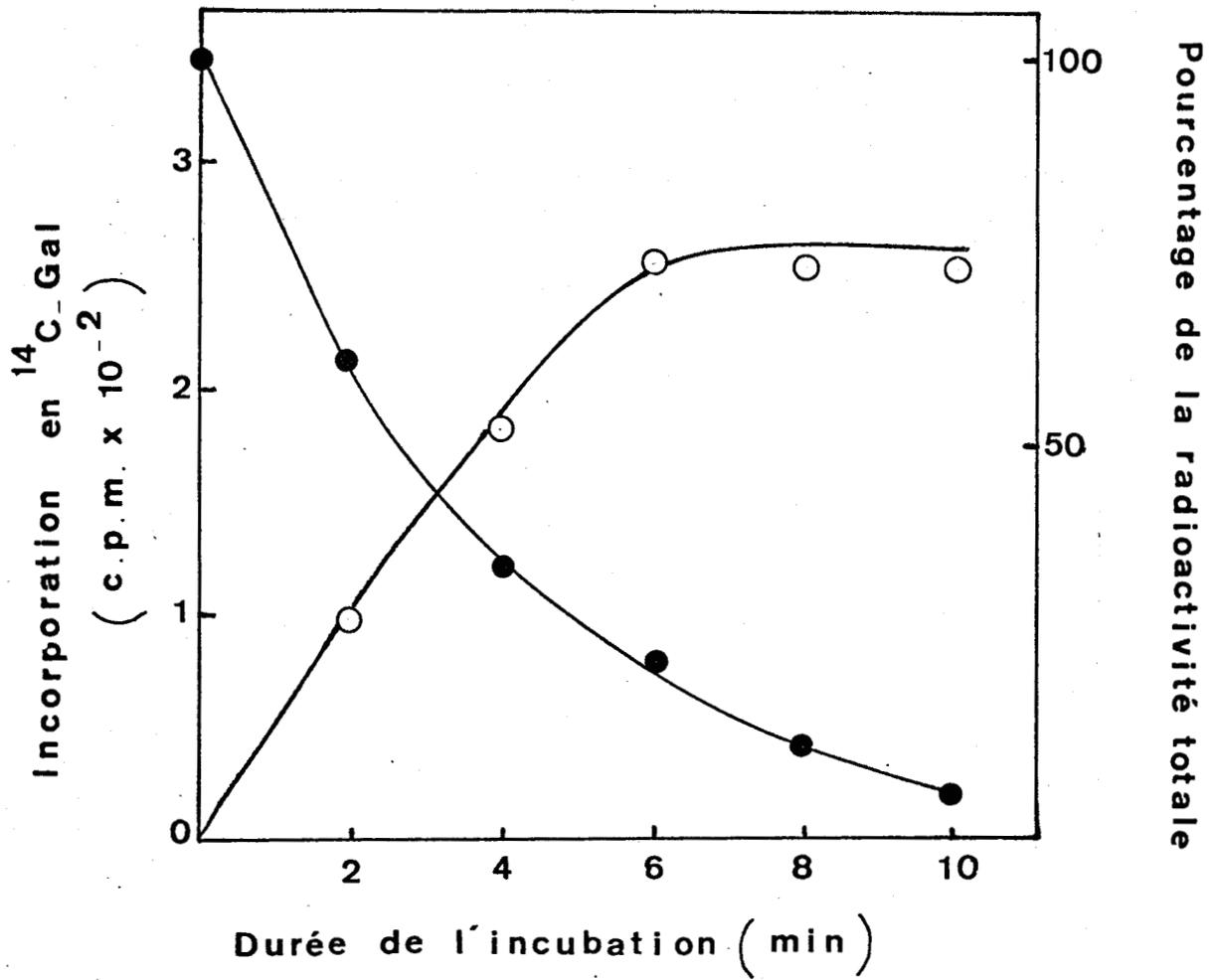


FIGURE 7

Etude cinétique à 20°C de l'incorporation de ^{14}C -galactose sur l'ovomucoïde (○-○) et de la dégradation de l'UDP-galactose (●-●).



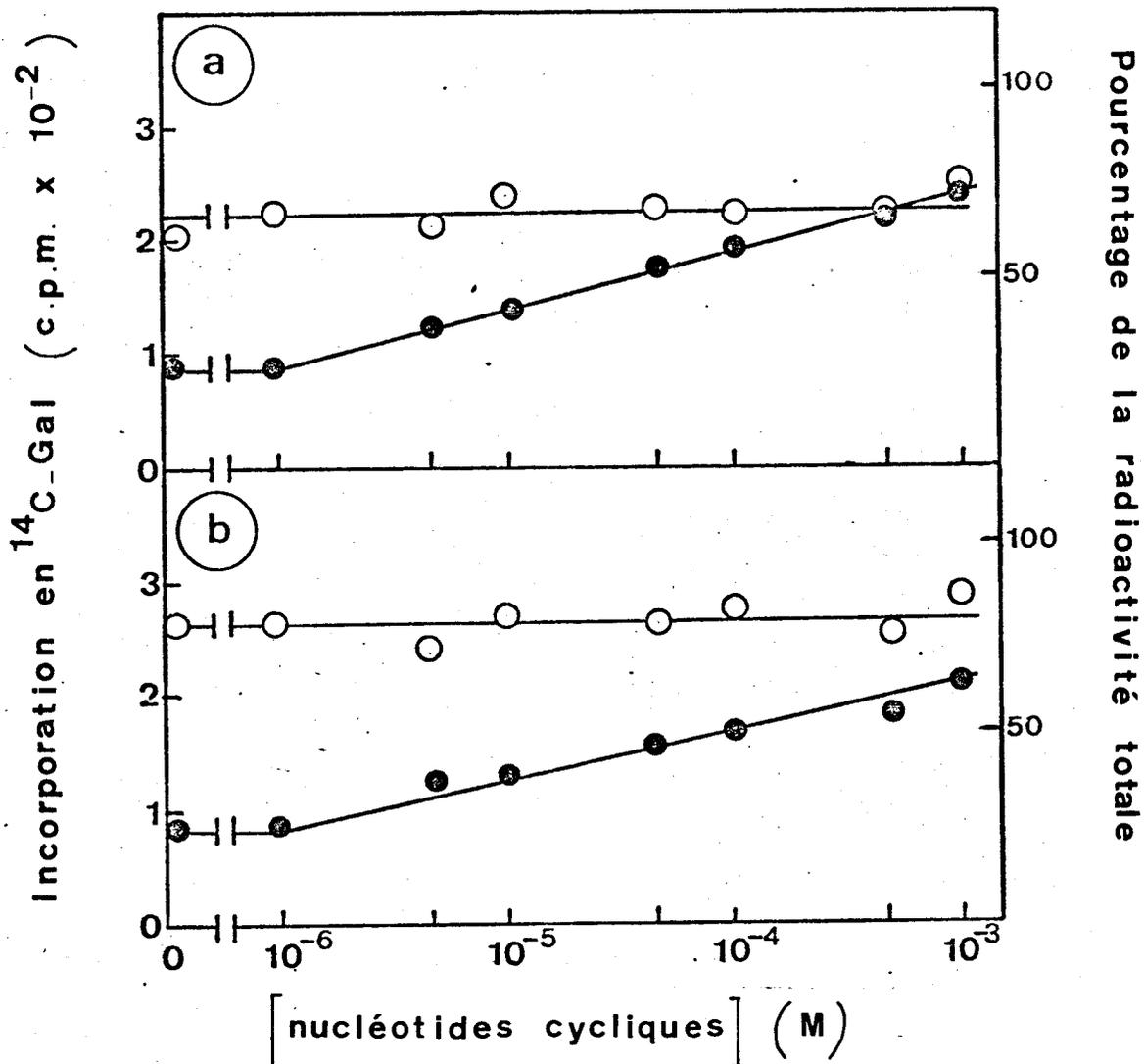


FIGURE 8

Effets de l'AMPc (a) et du GMPc (b) sur l'incorporation en ¹⁴C-galactose sur l'ovomucoïde (○—○) et sur la dégradation de l'UDP-galactose (●—●). Les concentrations des nucléotides cycliques sont représentées selon une échelle logarithmique. Les incubations se font à 20°C pendant 4 min.



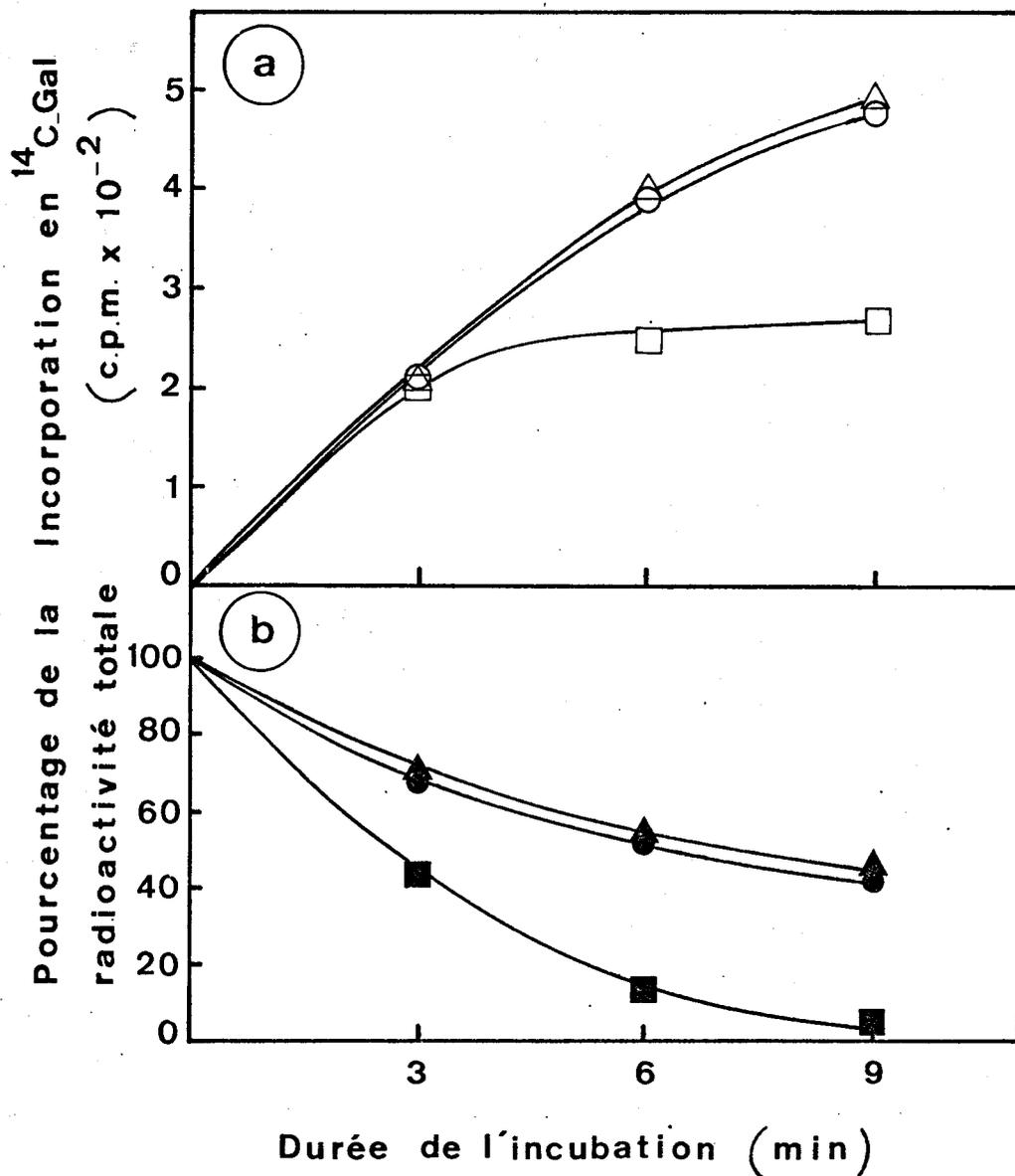


FIGURE 9

Etudes cinétiques à 20°C. de l'incorporation de ^{14}C -galactose sur l'ovomucoïde (a) et de la dégradation de l'UDP-galactose (b) en présence de nucléotides cycliques (10^{-3}M)

a - Témoin (\square), AMPc (\circ), GMPc (\triangle)

b - Témoin (\blacksquare), AMPc (\bullet), GMPc (\blacktriangle)



le taux d'UDP-galactose présent dans le milieu d'incubation, supérieur à 25 p. 100, n'est pas un facteur limitant des activités galactosyltransférasiques (figure 9 b, p. 42). A 6 min et à 9 min, les activités galactosyltransférasiques en présence de nucléotides cycliques sont supérieures à celle du témoin, car les nucléotides cycliques protègent l'UDP-galactose.

Certains nucléosides ou nucléotides étant des inhibiteurs de pyrophosphatases (MOOKERJEA et YUNG) (129), il était intéressant de savoir si l'effet protecteur du au nucléotides cycliques était spécifique.

D'autre part il est important de noter que les nucléotides cycliques ne sont que très peu dégradés durant l'incubation. Ce sont donc bien les nucléotides cycliques et non leurs produits de dégradation qui inhibent l'UDP-galactose pyrophosphatase.

5 - EFFETS DE DIVERS DERIVES NUCLEOTIDIQUES SUR L'ACTIVITE GALACTOSYL-TRANSFERASIQUE

La figure 10 (p. 44) montre que les nucléosides 5'-monophosphates ont des effets identiques à ceux des nucléotides cycliques. Par contre les bases et les nucléosides n'augmentent pas l'activité galactosyltransférasique.

Dans la figure 11 (p. 45), nous voyons que ce sont le GMP et l'AMP qui protègent le plus l'UDP-galactose. Puis viennent ensuite les nucléotides cycliques. Les autres dérivés n'inhibent pas ou peu la pyrophosphatase. Ce sont donc bien les effets protecteurs de l'UDP-galactose qui entraînent une augmentation de l'activité galactosyltransférasique. On peut déduire plusieurs conclusions de ces expériences :

Premièrement, l'effet de protection de l'UDP-galactose n'est pas spécifique des nucléotides cycliques.

Deuxièmement, le GMPc et l'AMPc ont des effets comparables.

Troisièmement, le db AMPc n'a d'action ni sur l'activité galactosyltransférasique ni sur la pyrophosphatase (figure 10 a, p. 44 ; figure 11a, p. 45). Il

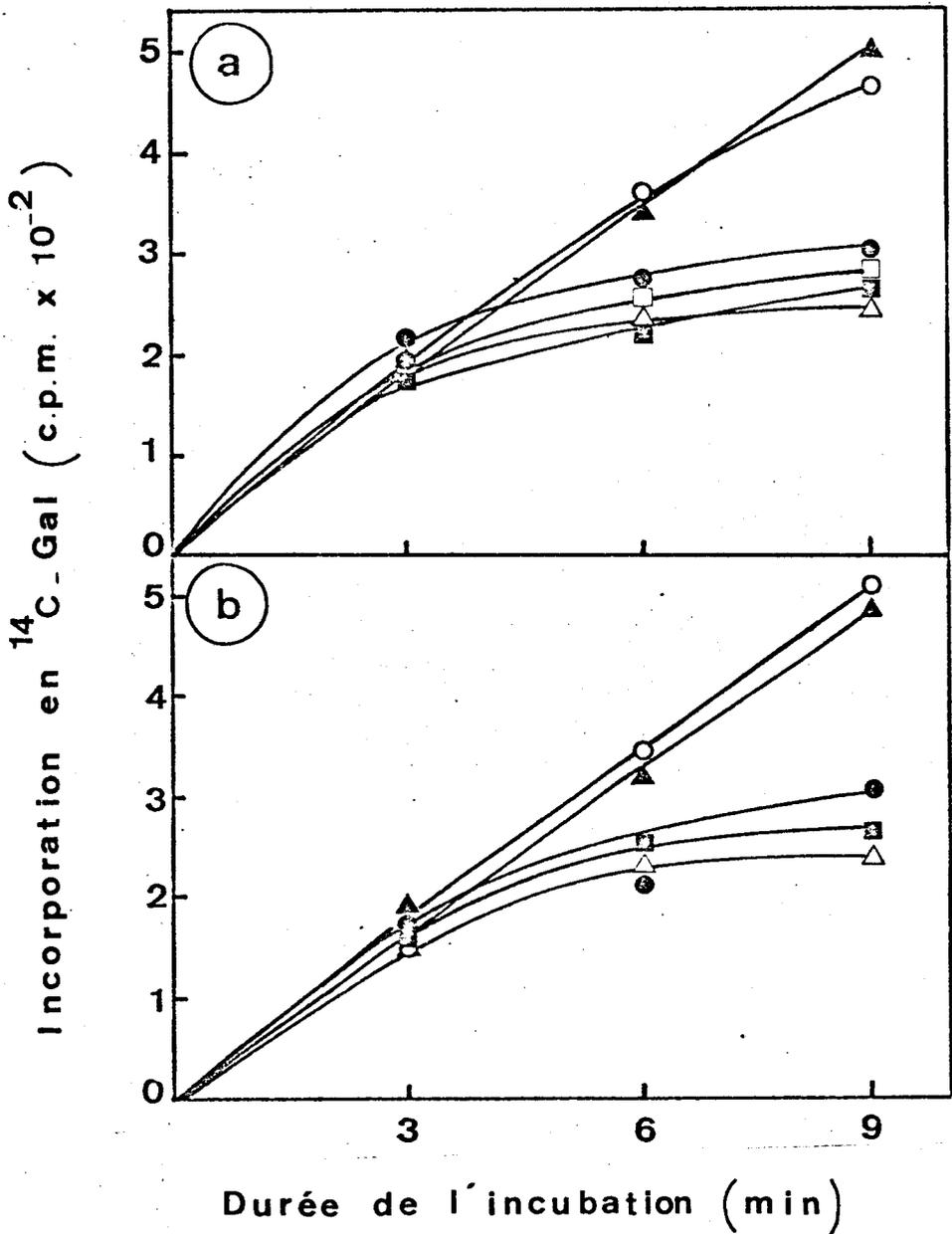


FIGURE 10

Etudes cinétiques à 20°C de l'incorporation de ¹⁴C-galactose sur l'ovomucoïde en présence de divers dérivés nucléotidiques (10⁻³)

- a - Témoin (●-●), AMPc (○-○), dbAMPc (□-□), AMP (▲-▲), Adénosine (■-■), Adénine (△-△).
- b - Témoin (●-●), GMPc (○-○), GMP (▲-▲), Guanosine (■-■), Guanine (△-△).



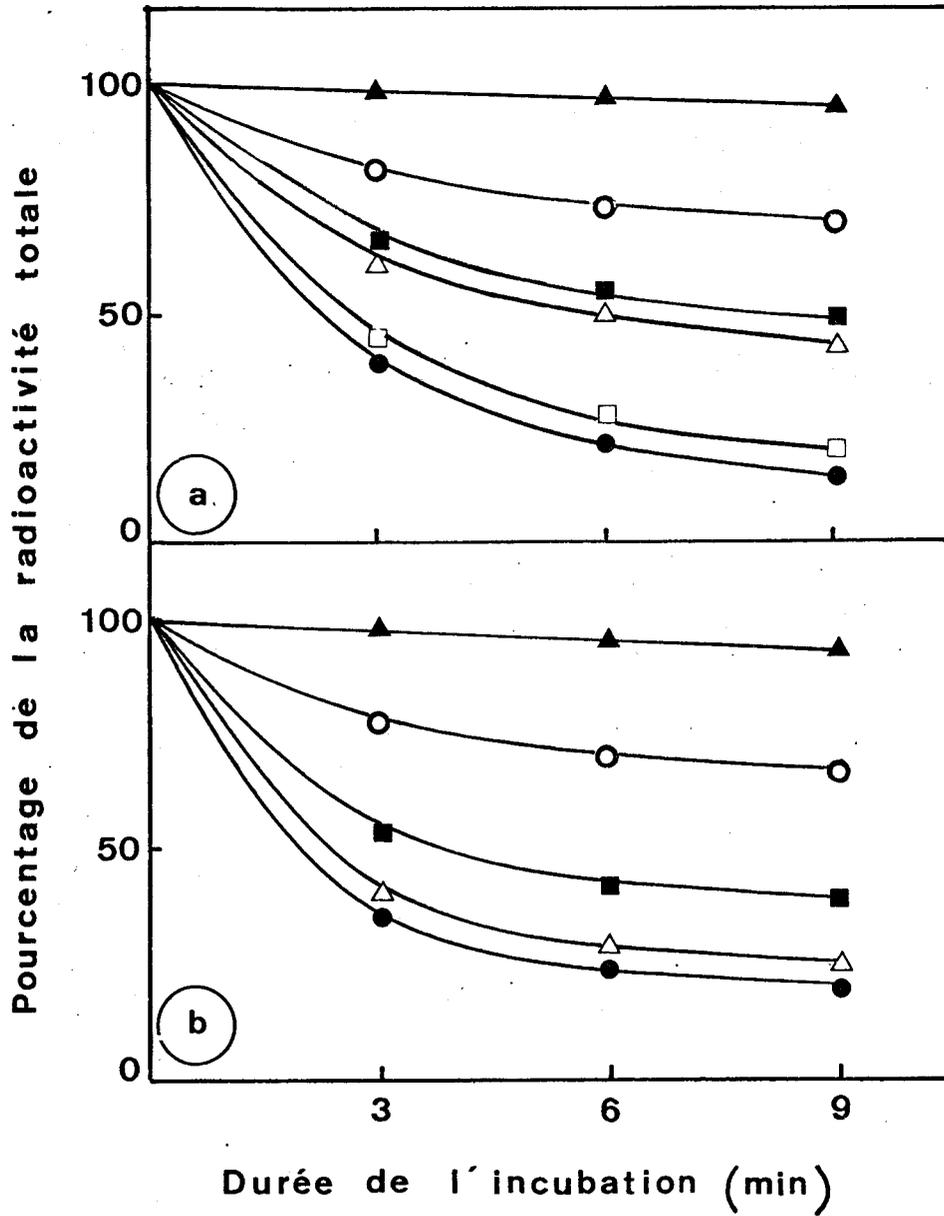


FIGURE 11

Etudes cinétiques de la dégradation de l'UDP-galactose en présence de divers dérivés nucléotidiques ($10^{-3}M$)

a - Témoin (●-●), AMPc (○-○), db AMPc (□-□), AMP (▲-▲), Adénosine (■-■), Adénine (△-△).

b - Témoin (●-●), GMPc (○-○), GMP (▲-▲), Guanosine (■-■), Guanine (△-△).



semblerait donc que seuls des dérivés phosphorylés et non substitués comme le db AMPc puissent inhiber l'UDP-galactose pyrophosphatase.

B - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES ET DE LEURS DERIVES SUR L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE LISSE

Nous venons de voir, dans le cas d'une fraction microsomale brute, que les effets des nucléotides cycliques sur l'activité galactosyltransférasique ne sont dus uniquement qu'à une protection du précurseur. Afin de démontrer clairement que les nucléotides cycliques n'ont pas d'effets directs sur la galactosyltransférase, nous avons procédé aux mêmes expériences mais sur une préparation membranaire enrichie en réticulum endoplasmique lisse.

1 - CINETIQUE DE LA REACTION

La figure 12 (p. 47) montre que la réaction à 37°C est dans ce cas linéaire jusqu'au moins 45 min. L'UDP-galactose pyrophosphatase est beaucoup moins active dans ce cas. Après 45 min d'incubation, 40 p. 100 de l'UDP-galactose initial est encore présent dans l'incubat. Ceci est dû au fait que nous avons éliminé l'UDP-galactose pyrophosphatase provenant des membranes plasmiques (EVANS et al.) (130).

2 - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES ET DE LEURS DERIVES

On procède à des incubations enzymatiques à 37°C pendant 45 min. Dans ces conditions, l'UDP-galactose n'est plus le facteur limitant de la réaction de transfert. La figure 13 (p. 47) montre que les nucléotides cycliques (AMPc, GMPc) et leurs dérivés 5'-monophosphates (AMP, GMP) n'ont pas d'effets sur l'activité galactosyltransférasique.

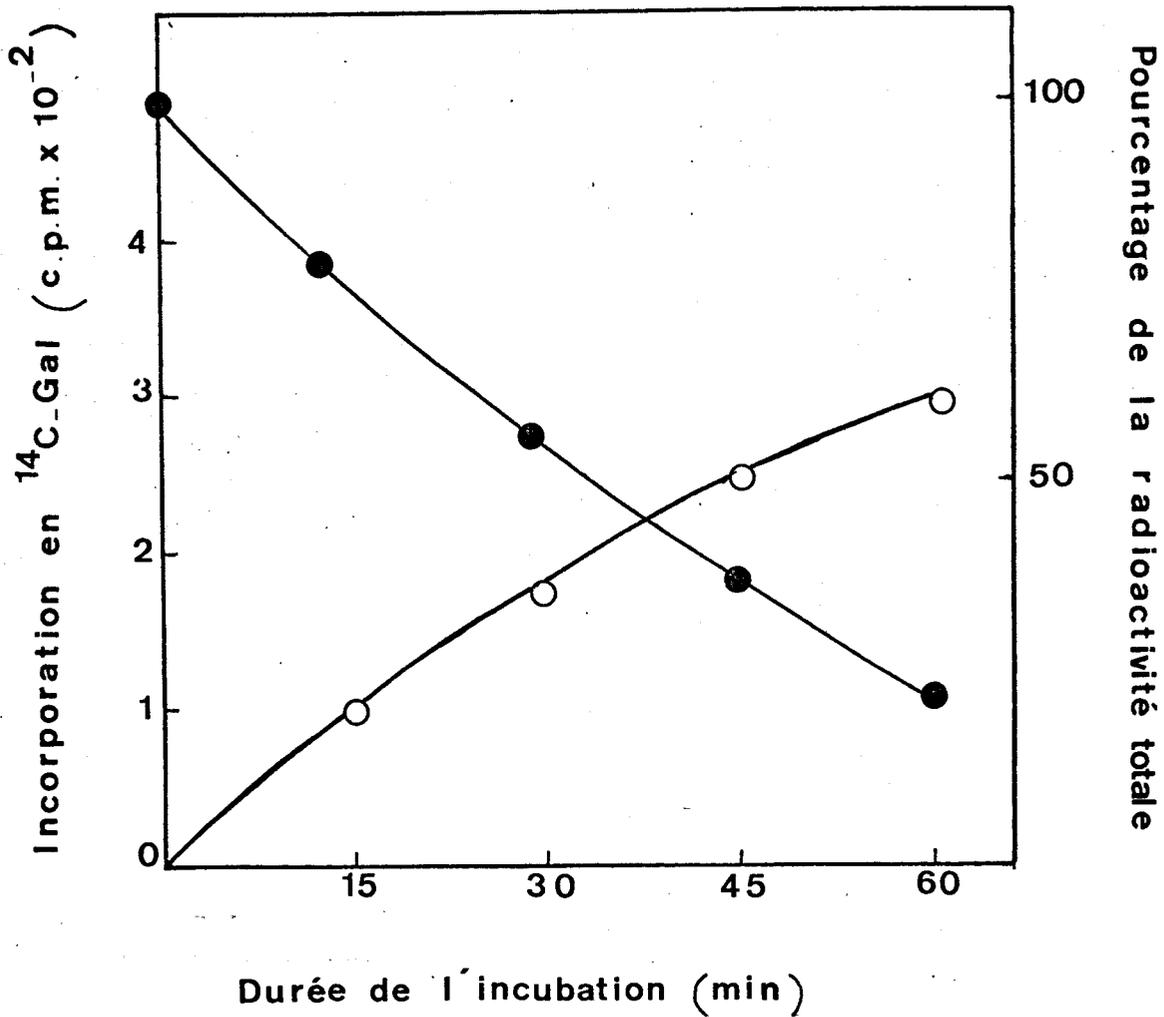


FIGURE 12

Etudes cinétiques de l'incorporation de ^{14}C -galactose sur l'ovomucoïde (○—○) et de la dégradation de l'UDP-galactose (●—●) avec une préparation membranaire enrichie en réticulum endoplasmique lisse.

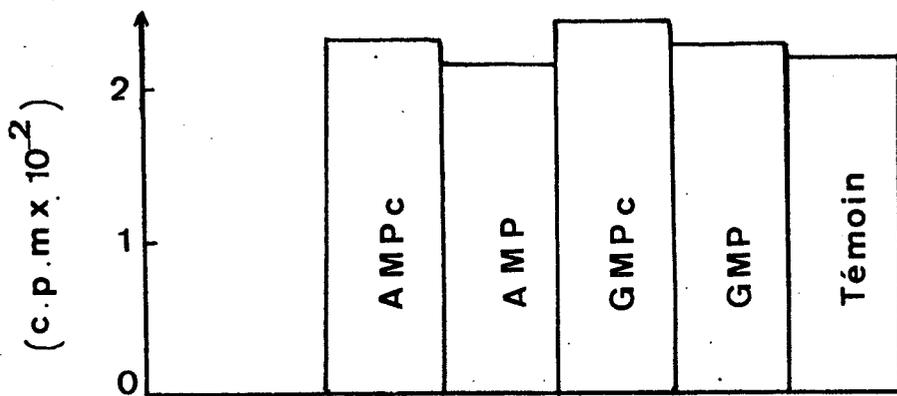


FIGURE 13

Effets des nucléotides cycliques et des nucléoside 5'-monophosphates (10^{-3}M) en ^{14}C -galactose sur l'ovomucoïde. La durée des incubations est de 45 min.



C - RECHERCHE D'UNE REGULATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE PAR LES NUCLEOTIDES CYCLIQUES, VIA UN SYSTEME PHOSPHO-DEPHOSPHO

1 - ETUDE DU SYSTEME

Nous ne pouvions ajouter au milieu d'incubation une concentration d'ATP supérieure à 10^{-3} M. En effet, au dessus de cette concentration, l'ATP inhibe l'activité galactosyltransférasique (figure 14, p. 49). Ceci peut être dû au fait que l'ATP complexant le manganèse (KATO et al. (131)), la galactosyltransférase ne peut plus fonctionner. Nous nous sommes donc placés à une concentration en ATP de 10^{-3} M, en utilisant un système régénérateur d'ATP.

2 - RESULTATS

Dans ces conditions, aucune stimulation à 4 min à 20°C, n'a été observée.

II - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE SIALYLTRANSFERASIQUE MICROSOMALE

A - ETUDE CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSFERT

La figure 15a(p. 50) montre que le maximum d'incorporation de ^{14}C -NANA sur les accepteurs endogènes et exogènes est atteint au bout de 20 minutes d'incubation. Dans nos conditions expérimentales, l'orosomucoïde incorpore trois fois plus de ^{14}C -NANA que les accepteurs endogènes.

L'étude de la dégradation du CMP-NANA montre qu'à 20 min, il ne reste environ que 15 p. 100 du précurseur nucléotidique, (figure 15b, p. 50). A ce temps, la réaction de transfert est maximale.

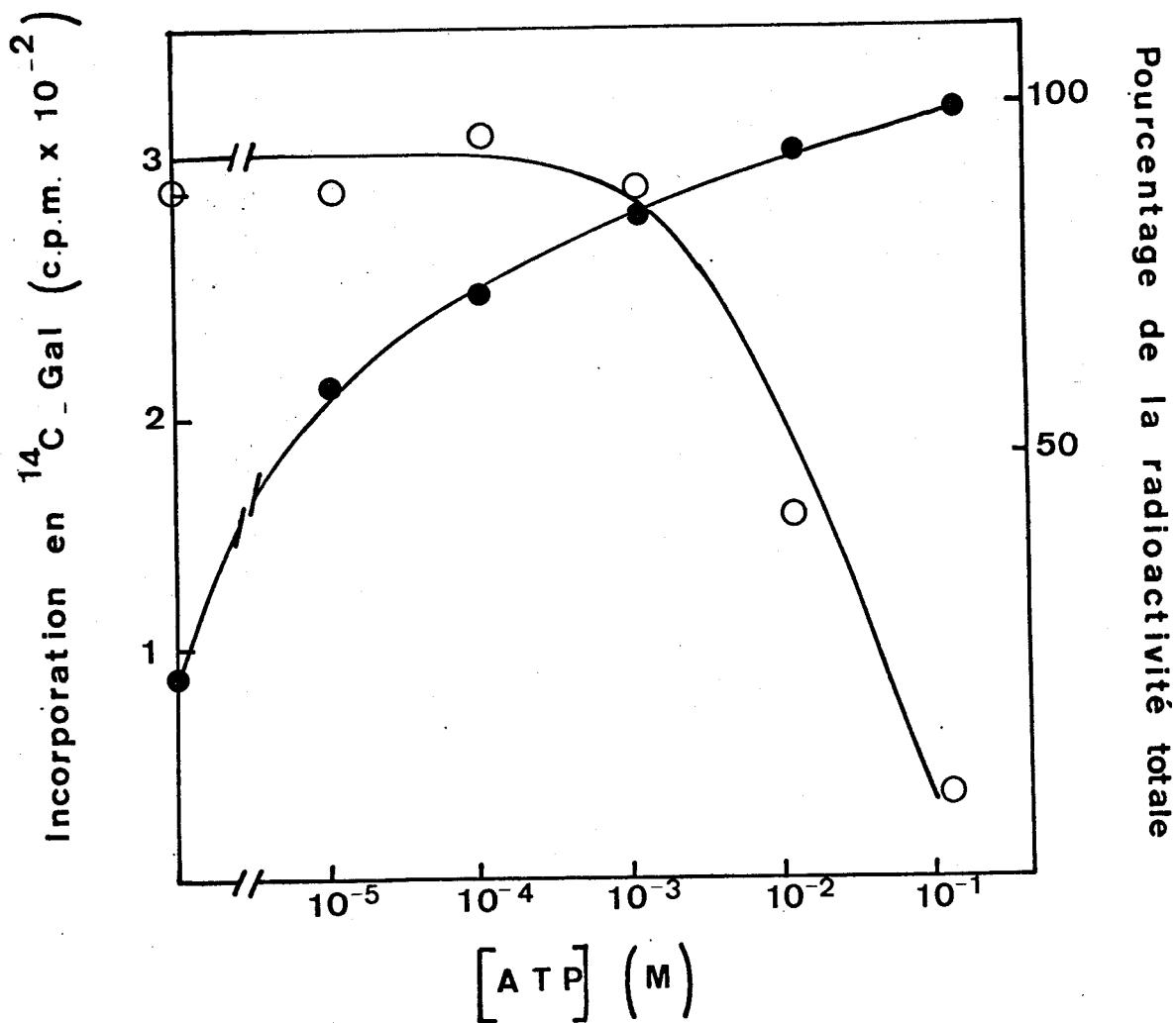


FIGURE 14

Effet de l'ATP sur l'incorporation en ¹⁴C-galactose sur l'ovomucoïde (○-○) et sur la dégradation de l'UDP-galactose (●-●). Les concentrations d'ATP sont représentées selon une échelle logarithmique. Les incubations se font à 20°C pendant 4 min.

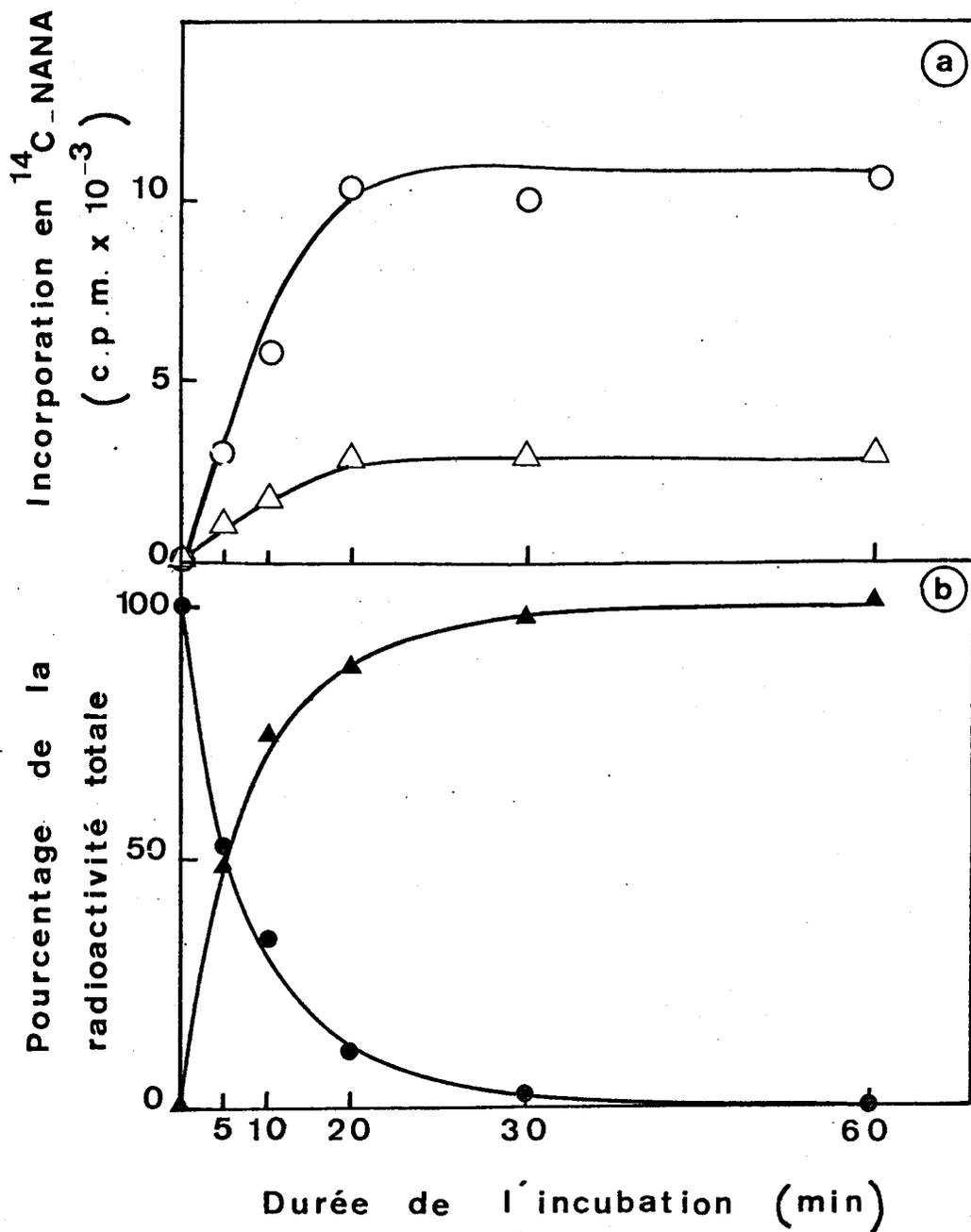


FIGURE 15

a - Etudes cinétiques de l'incorporation du $^{14}\text{C-NANA}$ sur des accepteurs endogènes (Δ - Δ) et sur l'orosomucoïde (O-O).

b - Etudes cinétiques de la dégradation du CMP-NANA (●-●) et de la formation de NANA (\blacktriangle - \blacktriangle).

Les incubations se sont à 37°C .



B - EFFETS DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR L'ACTIVITE

SIALYLTRANSFERASIQUE

Lorsqu'on étudie la cinétique d'incorporation de ^{14}C -NANA sur l'orosomucoïde désialylé à 37°C , on remarque qu'à 15 min, l'incorporation est la même en présence ou en absence de nucléotides ou de nucléotides cycliques (figure 16a, p. 52). Le CMP-NANA est encore présent en quantité suffisante pour qu'il ne soit pas le facteur limitant de la réaction (supérieur à 15 p. 100) (figure 16b, p. 52).

On remarque cependant que le CMP semble être un inhibiteur de la sialyltransférase. En effet, le fait d'ajouter du CMP au milieu d'incubation diminue l'incorporation de ^{14}C -NANA, alors que le CMP-NANA est encore présent en quantité suffisante. Ceci confirme les résultats obtenus par BERNACKI (132) qui considère le CMP comme un inhibiteur compétitif de la réaction.

Enfin au bout d'une heure d'incubation, on remarque que les différents taux d'incorporation du ^{14}C -NANA pour chaque nucléotide, sont en relation avec leurs différents effets de protection du CMP-NANA (figure 16a, 16b, p. 52).

Il apparaît donc que, comme dans le cas de la galactosyltransférase, la stimulation observée après addition de nucléotides cycliques n'est due qu'à une protection du précurseur, l'incorporation maximale étant limitée par la dégradation du précurseur.

Parmi tous les nucléotides monophosphates le CMP joue un rôle d'inhibiteur comme il a été décrit par BERNACKI. A cet égard, nous avons voulu vérifier si le CMP cyclique avait un effet particulier. La figure 17 p. 53 montre que le CMPc ne permettait pas une stimulation comparable aux autres nucléotides cycliques (AMPc, GMPc, UMPc), due vraisemblablement à un effet inhibiteur provenant du CMP formé par la dégradation partielle de CMPc au cours de la réaction.

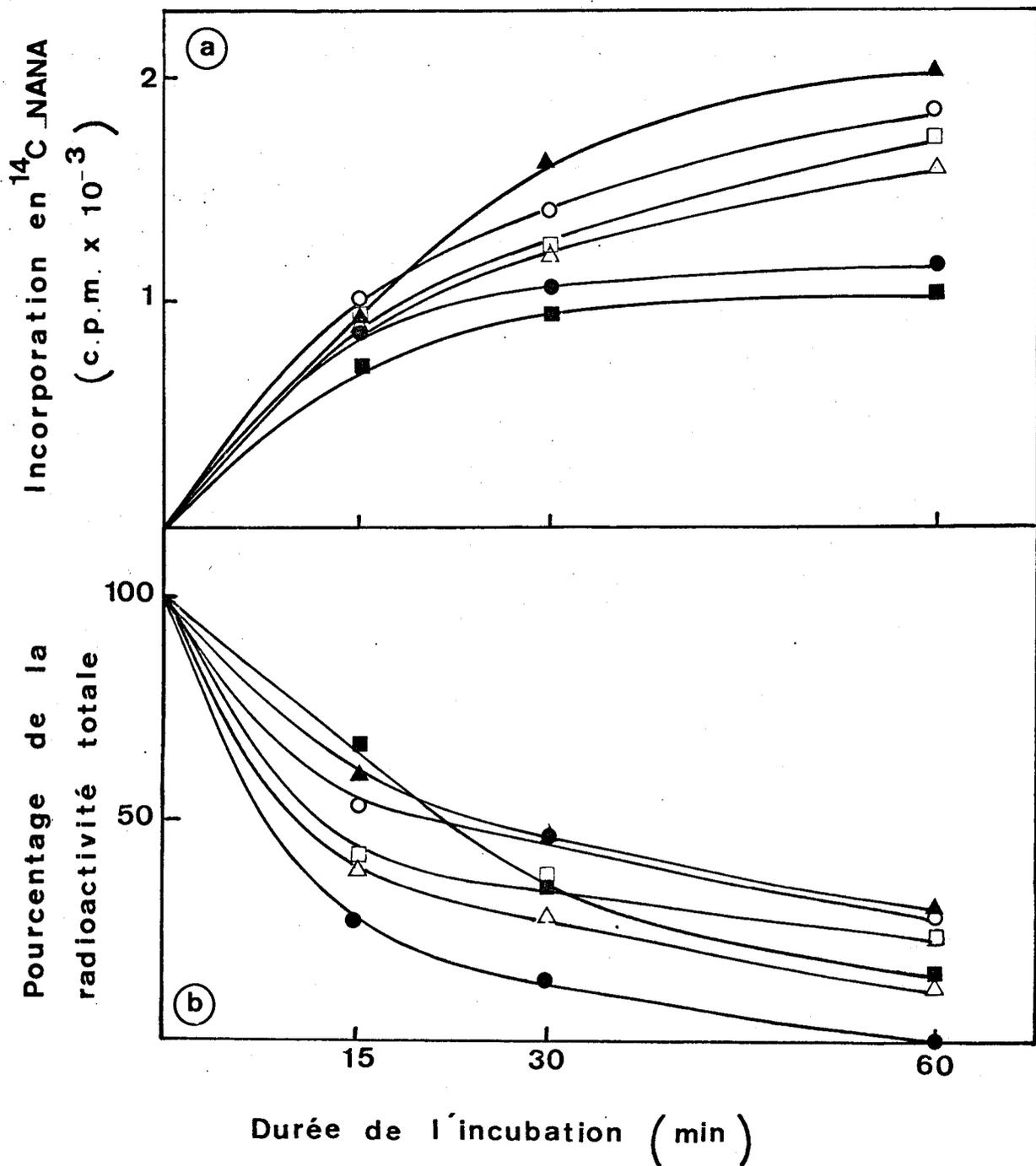


FIGURE 16

Etudes cinétiques de l'incorporation de ¹⁴C-NANA sur l'orosomucoïde (a) et de la dégradation du CMP-NANA (b) en présence de divers dérivés nucléotidiques (10⁻³M). Les incubations se font à 37°C.

Témoin (●-●), AMPc (▲-▲), AMP (○-○), GMPc (△-△), dbAMPc (□-□), CMP (■-■).



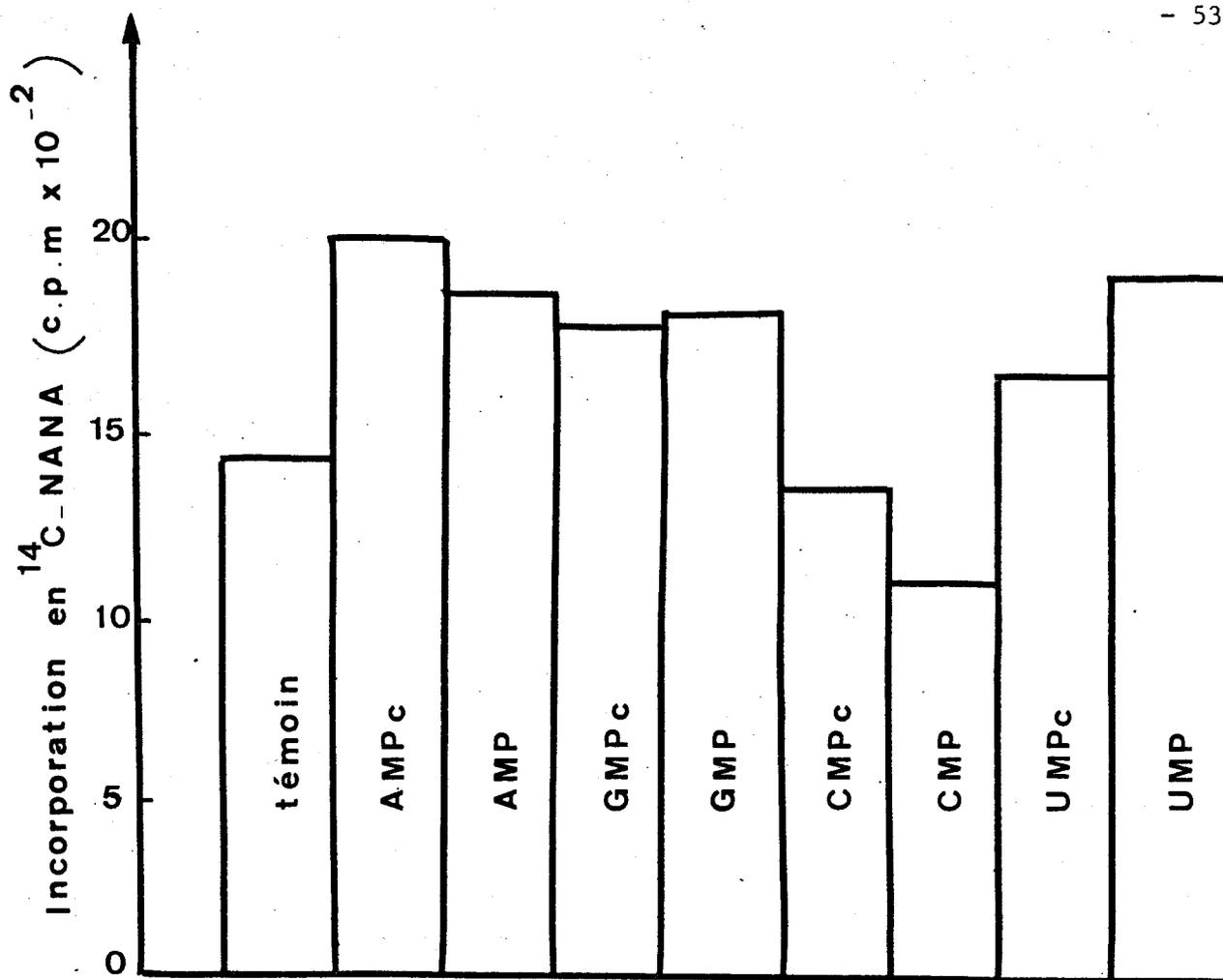


FIGURE 17

Effets de divers dérivés nucléotidiques (10^{-3}M) sur l'incorporation de ^{14}C -NANA sur l'orosomucoïde.

Les incubations se font à 37°C et durent 1 heure.



CONCLUSIONS

Des études que nous avons réalisées sur les effets des nucléotides cycliques sur les activités glycosyltransférasiques, les conclusions suivantes peuvent être tirées.

1 - L'AMPc et le GMPc stimulent l'activité galactosyltransférasique, non pas en agissant directement sur la galactosyltransférase, mais en prolongeant la durée de vie du précurseur nucléotidique, via une inhibition de l'UDP-galactose pyrophosphatase.

2 - Cependant cet effet n'est pas spécifique des nucléotides cycliques, mais il est observé également avec les nucléoside 5'-monophosphates. Il est intéressant de noter que le db AMPc, utilisé souvent à la place de l'AMPc, n'a pas d'effet de protection du précurseur nucléotidique et ne stimule pas l'activité galactosyltransférasique. En outre l'AMPc et le GMPc ont des effets comparables et ne sont donc pas, dans notre cas, antagonistes selon l'hypothèse de GOLDBERG.

3 - Afin de démontrer clairement que les nucléotides cycliques n'ont pas d'effets directs sur la galactosyltransférase, nous avons étudié leurs effets sur une fraction cellulaire enrichie en réticulum endoplasmique rugueux et ne montrant qu'une très faible activité pyrophosphatasique. Dans ces conditions, où à nouveau le précurseur n'est plus le facteur limitant, les nucléotides cycliques n'ont pas d'effets sur l'activité galactosyltransférasique.

4 - En outre, les nucléotides cycliques ne semblent pas réguler l'activité galactosyltransférasique, via un système phospho-déphospho.

5 - Comme pour la galactosyltransférase, les nucléotides cycliques stimulent l'activité sialyltransférasique en prolongeant la durée de vie du précurseur nucléotidique.

De nombreux auteurs étudiant les glycosyltransférases intracellulaires, utilisent des fraction microsomiales possédant des activités glycosyl-nucléotides pyrophosphatasiques. Ce fait doit être pris en considération lorsque l'on mesure des activités glycosyltransférasiques car d'une part une faible activité transférasique peut être due à une dégradation importante du précurseur nucléotidique et d'autre part lorsque l'on compare des activités glycosyltransférasiques, il faut prendre en considération le fait que le précurseur nucléotidique peut être le facteur limitant de la réaction.

BIBLIOGRAPHIE

	Réf.	Pages
ABELL C.W., MONAHAN T.M.		
(1973) J. Cell. Biol., <u>59</u> , 549	32	7
ASHMAN D.F., LIPTON R., MELICOW M.M., PRICE T.D.		
(1963) Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>11</u> , 330	12	4
BAIG M.M., ROBERTS R.M.		
(1973) Biochem. J., <u>134</u> , 329	3 100	1 21
BAYARD B., MONTREUIL J.		
(1974) Actes du Colloque International n° 221 du CNRS sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1975, CNRS PARIS, 209	111	29
BERNACKI R.J.		
(1974) J. Cell. Physiol., <u>83</u> , 457	90	18
BERNACKI R.J.		
(1975) Eur. J. Biochem., <u>58</u> , 477	71 75 132	13 14 51
BERNACKI R.J., BOSMANN H.B.		
(1973) Eur. J. Biochem., <u>33</u> , 49	68	13
BIRNBAUMER L., POHL S.L., RODBELL M.		
(1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 1857	21	6
BIRNBAUMER L., POHL S.L., RODBELL M.		
(1972) J. Biol. Chem., <u>247</u> , 2038	22	6
BISCHOFF E., TRAN-THI T.A., DECKER K.F.A.		
(1975) Eur. J. Biochem., <u>51</u> , 353	124	36
BOSMANN H.B.		
(1972) Biochem. Biophys. Res. Comm., 523	105	22

	Réf.	Pages
BROQUET P., MORELIS R., LOUISOT P.		
(1975) J. Neurochem., <u>24</u> , 989	82	16
BURGER M.M.		
(1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>62</u> , 994	54	9
BURK R.R.		
(1968) Nature, 219, 1272	49	9
CACAN R., VERBERT A., HOF Lack B., MONTREUIL J.		
(1977) FEBS-Lett., <u>81</u> , 53	93	18
CHO-CHUNG Y.S.		
(1974) Cancer Res., <u>34</u> , 3492	51	9
CLARK J.F., MORRIS H.P., WEBER G.		
(1973) Cancer Res., <u>33</u> , 356	50	9
CUMAR F.A., BRADY R.O., KOLODNY E.H., McFARLAND V.W., MORA P.T.		
(1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>757</u> , 67	106	22
DALLNER G., BEHRENS N.H., PARODI A.J., LELOIR L.F.		
(1972) FEBS-Lett., <u>24</u> , 315	95	18
DE PIERRE J.W., KARNOVSKI M.L.		
(1973) J. Cell. Biol., <u>56</u> , 275	85	18
EVANS W.H.		
(1974) Nature, <u>250</u> , 391	130	46
FALBRIARD J.G., POSTERNAK T., SUTHERLAND E.W.		
(1967) Biochim. Biophys. Acta, <u>148</u> , 99	127	38
GOGGINS J.F., JOHNSON G.S., PASTAN I.		
(1972) J. Biol. Chem., <u>247</u> , 5759	110 116	23 34

	Réf.	Pages
GOLDBERG N.D., DIETZ S.B., O'TOOLE A.G. (1969) J. Biol. Chem., <u>244</u> , 4458	16	4
GOLDBERG N., HADDOX M.K., HARTLE D.K., HADDON J.W. in Proceedings of the Fifth International Congress of Pharmacology, San Francisco, 1972, (KARGER, BASEL, 1973) vol. 5, 146	4 18 26	1 4 6
GORIN E., BRENNER T. (1976) Biochim. Biophys. Acta, <u>451</u> , 20	59	10
GRANNER D., CHASE L.R., AURBACH G.D., TOMKINS G.M. (1968) Science, <u>162</u> , 1018	43	8
GRIMES W.J. (1970) Biochemistry, <u>9</u> , 5083	104	22
HADDEN J.W., HADDEN E.M., HADDOX M.K., GOLDBERG N.D. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>69</u> , 3024	33 34	7 7
HAKOMORI S., GAHMBERG C.G., LAINE R.A., KIEHN D. (1974) In "Membrane Transformations in Neoplasia" Ed. by J. SCHULTZ and R.E. BLOCK p. 69	102	21
HEIDRICK M.L., RYAN W.L. (1971) Cancer Res., <u>31</u> , 1313	44	8
HENION W.F., SUTHERLAND E.W., POSTERNAK T. (1967) Biochim. Biophys. Acta, <u>148</u> , 106	128	38
HOFMANN F., SOLD G. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun, <u>49</u> , 1100	30	6
ISHIKAWA E., ISHIKAWA S., DAVIS J.W., SUTHERLAND E.W. (1969) J. Biol. Chem., <u>244</u> , 6371	15	4

	Réf.	Pages
JAMIESON G.A., URBAN E.L., BARBER A.J. (1971) Nature New Biol., <u>234</u> , 5	89	18
JOHNSON G.S., FRIEDMAN R.M., PASTAN I. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>68</u> , 425	52	9
JOHNSON L.D., HADDEN J.W. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun, <u>66</u> , 1498	39	8
JOHNSON G.S., MORGAN W.D., PASTAN I. (1972) Nature New Biol., <u>236</u> , 247	42	8
JOHNSON G.S., PASTAN I. (1972) J. Natl. Cancer Inst., <u>48</u> , 1377	41	8
KATO K., KOBAYASHI M., SATO S. (1975) J. Biochem., <u>77</u> , 811	131	48
KAUKEL E., HILZ H. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun, <u>46</u> , 1011	60	10
KEPPLER D., RUDIGIER J., DECKER K. (1970) Anal. Biochem., <u>38</u> , 105	70	13
KIM Y.S., PERDOMO J., NORDBERG J. (1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 5466	80	16
KO G.K.W., RAGHUPATHY E. (1973) Biochim. Biophys. Acta, <u>313</u> , 277	120	34
KUO J.F., KUO W., SHOJI M., DAVIS C.W., SEERY V.L., DONNELLY T.E. (1976) J. Biol. Chem., <u>251</u> , 1759	31	6
KUO J.F., GREENGARD P. (1970) J. Biol. Chem., <u>245</u> , 2493	29	6
KURTH R., BAUER H. (1973) Nature New Biol., <u>243</u> , 243	56	10

	Réf.	Pages
KURTH R., BAUER H.		
(1973) Differentiation, <u>1</u> , 323	57	10
LOUISOT P., RICHARD M., GATEAU O.	61	11
(1976) Ann. Biol. Clin., <u>34</u> , 243	64	11
	65	12
	69	13
	74	13
LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.		
(1951) J. Biol. Chem., <u>193</u> , 265	112	30
LUCAS J.J., WAECHTER C.J., LENNARZ W.J.		
(1975) J. Biol. Chem., <u>250</u> , 1992	98	20
McLEAN R.J., BOSMANN H.B.		
(1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>72</u> , 310	88	18
MARINETTI G.V., RAY T.K., TOMASI V.		
(1969) Biochem. Biophys. Res. Commun, <u>36</u> , 185	10	3
MARKS F.		
(1973) Biochim. Biophys. Acta, <u>309</u> , 349	27	6
MONTREUIL J.		
(1975) P. Appl. Chem., <u>42</u> , 431	78	15
MOOKERJEA S., YUNG J.W.M.		
(1974) Biochem. Biophys. Res. Commun, <u>57</u> , 815	77	15
MOOKERJEA S., YUNG J.W.M.	72	13
(1975) Arch. Biochem. Biophys., <u>166</u> , 223	121	34
	122	36
	129	43
MORELIS R.		
1974) Biochim. Biophys. Acta, <u>373</u> , 10	81	16
MORELIS R., LOUISOT P.		
(1973) Biochimie, <u>55</u> , 671	63	11

	Réf.	Pages
NESBITT J.A., ANDERSON W.B., MILLER Z., PASTA I., RUSSEL T.R., GOSPODAROWICZ D.		
(1976) J. Biol. Chem., <u>251</u> , 2344	58	10
OTTEN J., JOHNSON G.S., PASTAN I.		
(1971) Biochem. Biophys. Res. Commun, <u>44</u> , 1192	45	8
PARODI A.J., LELOIR L.F.	94	18
(1976) TIBS, <u>1</u> , 58	96 97	19 20
PATT L.M., GRIMES W.J.		
(1974) J. Biol. Chem., <u>249</u> , 4157	123	36
PEERY C.V., JOHNSON G.S., PASTAN I.		
(1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 5785	48	9
POHL S.L., BIRNBAUMER L., RODBELL M.		
(1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 1849	20	6
POSTERNAK T., SUTHERLAND E.W., HENION W.F.		
(1962) Biochim. Biophys. Acta, <u>65</u> , 558	126	38
PRICE T.D., ASHMAN D.F., MELICOW M.M.		
(1967) Biochim. Biophys. Acta, <u>138</u> , 452	13	4
PUCK T.T., WALDREN C.A., HSIE A.W.		
(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>69</u> , 1943	40	8
RALL T.W., SUTHERLAND E.W., BERTHET J.		
(1957) J. Biol. Chem., <u>224</u> , 463	7	3
RALL T.W., SUTHERLAND E.W., WOSILAIT W.D.		
(1956) J. Biol. Chem., <u>218</u> , 483	5	3

	Réf.	Pages
RICHARD M., BROQUET P., GOT R., LOUISOT P. (1971) Biochimie, <u>53</u> , 107	119	34
RICHARD M., MARTIN A., LOUISOT P. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun, <u>64</u> , 108	83	16
RILEY G.A. (1963) Fed. Proc., <u>22</u> , 258	9	3
ROBERTS R.M., WALKER A., CETORELLI J.J. (1973) Nature New Biol., <u>244</u> , 86	2 103 109 117	1 21 23 34
ROBISON G.A., BUTCHER R.W., SUTHERLAND E.W. (1971) In cyclic AMP (ROBISON G.A., BUTCHER R.W. et SUTHERLAND E.W., Ed), p. 17 et p. 91, Academic Press, N.Y.	19 28	5 6
RODBELL M., KRANS M.J., POHL S.L., BIRNBAUMER L. (1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 1861	23	6
RODBELL M., KRANS M.J., POHL S.L., BIRNBAUMER L. (1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 1872	24	6
RODBELL M., BIRNBAUMER L., POHL S.L., KRANS M.J. (1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 1877	25	6
RONZIO R.A. (1973) Biochim. Biophys. Acta, <u>313</u> , 286	62	11
ROSEMAN (1970) Chem. Phys. Lipids, <u>5</u> , 270	86	18
ROTH S., McGUIRE E.J., ROSEMAN S. (1971) J. Cell. Biol., <u>51</u> , 536	87 99	18 20

	Réf.	Pages
SCHACHTER H., JABBAL I., HUDGIN L., PINTERIC L., McGUIRE E.J.,	66	13
	76	15
ROSEMAN S.	79	16
	84	17
(1970) J. Biol. Chem., <u>245</u> , 1090		
SCHIMMER B.P.		
(1972) J. Biol. Chem., <u>247</u> , 3134	47	9
SCHUMM D.E., MORRIS H.P., WEBB T.E.		
(1974) Eur. J. Cancer, <u>10</u> , 107	36	7
SEIFERT W.E., RUDLAND P.S.		
	35	7
(1974) Nature, <u>248</u> , 138	38	7
SHEININ R., YOGESWARAN G., MURRAY R.K.		
(1974) Exptl. Cell Res., <u>89</u> , 95	101	21
SHEPPARD J.R.		
	53	9
(1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>68</u> , 1316	55	9
SHEPPARD J.R.		
(1972) Nature New Biol., <u>236</u> , 14	46	8
SPIK G., SIX P., DEBEIRE P., CACAN R., VERBERT A., MONTREUIL J.		
(1976) L'Actualité chimique, Suppl. <u>7</u> , 7	113	31
SPIRO R.G.		
(1970) Ann. Rev. Biochem., <u>39</u> , 599	67	13
STEINER A.L., PARKER C.W., KIPNIS D.M.		
(1970) J. Clin. Invest., <u>49</u> , 43	14	4
SUDO T., ONODERA K.		
	1	1
	107	22
(1975) Exptl. Cell Research, <u>91</u> , 191	108	22
	118	34

	Réf.	Pages
SUTHERLAND E.W., RALL T.W.		
(1958) J. Biol. Chem., <u>232</u> , 1077	11	3
SUTHERLAND E.W., RALL T.W., MENON T.		
(1962) J. Biol. Chem., <u>237</u> , 1220	8	3
VERBERT A., CACAN R.		
(1972) Biochimie, 54, 1491	114 115	32 33
VERBERT A., CACAN R., DEBEIRE P., MONTREUIL J.		
(1977) FEBS-Letters, <u>74</u> , 234	92	18
VERBERT A., CACAN R., MONTREUIL J.		
(1976) Eur. J. Biochem., <u>70</u> , 49	73 91 125	13 18 36
WHITFIELD J.F., MAC MANUS J.P., FRANKS D.J., GILLAN D.J., YOU DALE T.		
(1971) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., <u>137</u> , 453	37	7
WOSILAIT W.D., SUTHERLAND E.W.		
(1956) J. Biol. Chem., <u>218</u> , 469	6	3