

50376  
1978  
157

50376  
1978  
157

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DE LILLE 1

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3<sup>e</sup> CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Pierre SIX

## RECHERCHES SUR LES GLYCOSYL - NUCLEOTIDES.

- 1 - DEGRADATION CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES.
- 2 - INCIDENCE SUR LA MESURE DES ACTIVITES DES GLYCOSYLTRANSFERASES SERIQUES
- 3 - ETUDE PARTICULIERE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES PYROPHOSPHATASES DU SERUM DE RAT.



Présenté le 10 octobre 1978, devant la Commission d'Examen

Président : J. MONTREUIL  
Rapporteur : G. SPIK  
Examineurs : S. BOUQUELET  
J. KREMBEL  
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 au C.N.R.S. n° 217 "Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués"), sous la responsabilité de Monsieur le Professeur MONTREUIL et sous la direction de Mademoiselle SPIK, Maître de Conférences.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique

à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I

Vous m'avez fait l'honneur de m'accepter dans votre Laboratoire pour préparer cette thèse et vous m'avez prodigué de nombreux conseils.

Je vous exprime ma profonde gratitude.

A Mademoiselle G. SPIK

Maître de Conférences de Chimie Biologique

à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I

Pour réaliser ce travail, vous m'avez guidé inlassablement.

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Messieurs les Docteurs Stéphane BOUQUELET, René CACAN, Bernard FOURNET et André VERBERT pour leur précieuse collaboration, ainsi qu'à l'ensemble du personnel du Laboratoire et plus particulièrement pour la réalisation technique de ce travail, à Madame Myriam CONIEZ, Monsieur Yves LEROY, Monsieur Jean-Pierre DECOTTIGNIES, Mademoiselle Brigitte MAHIEU, Madame Joselyne CLERSON et Madame Jocelyne CELEN.

## ABREVIATIONS UTILISEES

AMP, ADP, ATP	:	adénosine mono, di et triphosphate
AMPc	:	adénosine monophosphate cyclique
Ci, mCi, $\mu$ Ci	:	curie, $10^{-3}$ curie, $10^{-6}$ curie
CMP, CDP, CTP	:	cytidine mono, di et triphosphate
CMPc	:	cytidine monophosphate cyclique
CoA	:	coenzyme A
DEAE-cellulose	:	diéthylaminoéthyl cellulose
EDTA	:	acide éthylène diamine tétra-acétique
FAD	:	flavine adénine dinucléotide
fig	:	figure
g, mg, $\mu$ g	:	gramme, $10^{-3}$ gramme, $10^{-6}$ gramme
GMP, GDP, GTP	:	guanosine mono, di et triphosphate
h	:	heure
ions :		
- Ca <sup>++</sup>	:	calcium
- Co <sup>++</sup>	:	colbalt
- Cu <sup>++</sup>	:	cuivre
- Eu <sup>+++</sup>	:	europium
- Mg <sup>++</sup>	:	magnésium
- Mn <sup>++</sup>	:	manganèse
- Ni <sup>++</sup>	:	nickel
- Pr <sup>+++</sup>	:	praseodyme
- Zn <sup>++</sup>	:	zinc
IMP, IDP, ITP	:	inosine mono, di et triphosphate
M, mM, $\mu$ M	:	molaire, $10^{-3}$ molaire, $10^{-6}$ molaire
mn	:	minute
N	:	normal
NAD	:	nicotinamide adénine dinucléotide

P ou Pi : phosphate

p-NPP, bis p-NPP : para-nitrophényl phosphate, bis para-nitrophényl phosphate

Pi : pyrophosphate inorganique

SDS : dodecyl sulfate de sodium

t/mn : tours par minute

TDP : thymidine diphosphate

Tris : 2 amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

UMP, UDP, UTP : uridine mono, di et triphosphate

XDP : nucléoside diphosphate

XDPY : dinucléotide

## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 1

GÉNÉRALITÉS 5

DÉFINITIONS 6

LOCALISATION DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES 9

I - ÉTUDE DES GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASES 9

A - LES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES SOLUBLES 9

1 - Dans le sérum humain 9

2 - Dans les autres milieux biologiques 9

B - LES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES MEMBRANAIRES 9

1 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des cultures de cellules 11

2 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des homogénats cellulaires 11

3 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des membranes plasmiques 13

a - Mise en évidence des activités nucléotide pyrophosphatasiques des membranes plasmiques 13

b - Répartition des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des membranes plasmiques 13

c - Origine des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases présentes au niveau des membranes plasmiques 14

4 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases microsomales 14

5 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des noyaux 15

6 - Les nucléotide pyrophosphatases mitochondriales 15

II - ÉTUDE DES GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES 15

A - LA GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASE SOLUBLE 15



III - CONCLUSIONS

SPECIFICITE DE SUBSTRAT DE LA NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE
--

17

I - DÉGRADATION DES GLYCOSYL-NUCLÉOTIDES

17

II - DÉGRADATION D'AUTRES SUBSTRATS

20

III - RELATIONS ENTRE LES ACTIVITÉS GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-DIPHOSPHATE  
PYROPHOSPHATASIQUES, GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLA-  
SIQUES, PHOSPHODIESTÉRASIQUES ET PHOSPHATASIQUES

20

A - RELATIONS ENTRE LES ACTIVITES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE  
PYROPHOSPHATASIQUES, PHOSPHODIESTERASIQUES ET PHOSPHATASIQUES

20

1 - Dans les liquides biologiques 212 - Au niveau des membranes plasmiques 223 - Au niveau de différents organes 224 - Au niveau des cultures de cellules 23B - RELATIONS ENTRE LES ACTIVITES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE  
HYDROLASIQUES, GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASIQUES ET PHOSPHO-  
DIESTERASIQUES

23

C - CONCLUSIONS 26

PURIFICATION DE LA NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE
--

27

I - PURIFICATION DE LA NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASE DES LIQUIDES  
BIOLOGIQUES

27

II - <u>PURIFICATION DE LA NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASE DES MEMBRANES PLASMIQUES</u>	27
--	----

III - <u>PURIFICATION DE LA NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASE DES MICROSOMES</u>	29
---	----

IV - <u>PURIFICATION DE LA NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASE DES NOYAUX</u>	30
--	----

V - <u>CONCLUSIONS</u>	30
------------------------	----

<u>ETUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES</u>	31
---	----

I - <u>ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES DES GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASES</u>	31
---	----

<u>A - VALEURS DU pH OPTIMUM D'ACTIVITE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES</u>	31
<u>B - VALEURS DES <math>K_m</math> DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES</u>	33
<u>C - TEMPERATURE</u>	33
<u>D - STABILITE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES</u>	33
<u>E - EFFECTEURS DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES</u>	35
1 - <u>Effecteurs des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des liquides biologiques</u>	35
2 - <u>Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques du foie de Rat</u>	35
3 - <u>Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques et du réticulum endoplasmique du foie de Rat</u>	36
4 - <u>Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase au niveau des microsomes du foie de Rat</u>	36
5 - <u>Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase des noyaux et des microsomes du foie de Rat</u>	37

6 - <u>Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase des noyaux du foie de Rat</u>	37
7 - <u>Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase du cerveau de mouton</u>	39
8 - <u>Conclusions</u>	41
II - <u>ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES DES GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES</u>	41
A - <u>VALEURS DU pH OPTIMUM D'ACTIVITE DES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES</u>	41
B - <u>VALEURS DES Km DES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES</u>	41
C - <u>TEMPERATURE</u>	41
D - <u>STABILITE</u>	41
E - <u>EFFECTEURS DES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES</u>	42
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p>ELEMENTS DE STRUCTURE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES</p> </div>	49
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p>REGULATION ENTRE LES ACTIVITES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASIQUES ET GLYCOSYLTRANSFERASIQUES</p> </div>	51
I - <u>RÉGULATION ENTRE LES ACTIVITÉS GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASIQUES ET GLYCOSYLTRANSFÉRASIQUES</u>	51
A - <u>AU NIVEAU DES LIQUIDES BIOLOGIQUES</u>	51
B - <u>AU NIVEAU DES CULTURES DE CELLULES</u>	51
C - <u>AU NIVEAU D'ORGANES</u>	52

D - <u>AU NIVEAU D'HOMOGENATS CELLULAIRES</u>	53
E - <u>AU NIVEAU DES MEMBRANES</u>	54
F - <u>AU NIVEAU DES MICROSOMES</u>	57
II - <u>RÉGULATION ENTRE LES ACTIVITÉS NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASIQUES ET GLYCOSYLTRANSFÉRASIQUES</u>	58
III - <u>RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ GLYCOSYL-NUCLÉOTIDE-MONOPHOSPHATASE HYDROLASIQUE</u>	60
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;">           ROLE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES         </div>	62
TRAVAUX PERSONNELS	65
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;">           MATERIEL ET METHODES         </div>	66
I - <u>MATÉRIEL</u>	66
A - <u>LES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES</u>	66
B - <u>LES SERUMS</u>	66
C - <u>LES ACCEPTEURS DES GLYCOSYLTRANSFERASES SERIQUES</u>	66
II - <u>MÉTHODES</u>	67
A - <u>MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES</u>	67
1 - <u>Conditions de la réaction de dégradation chimique des glycosyl- nucléotides</u>	67
2 - <u>Conditions de la réaction de dégradation enzymatique des des glycosyl-nucléotides</u>	67
3 - <u>Séparation chromatographique et électrophorétique des produits de la dégradation chimique et enzymatique</u>	67
4 - <u>Identification des produits de la dégradation chimique et enzymatique</u>	68

a - <u>Identification des glycosyl-nucléotides</u>	68
b - <u>Identification des monosaccharides-1 phosphates</u>	68
c - <u>Identification des monosaccharides libres</u>	69
d - <u>Identification des monosaccharides-1-2 phosphates cycliques</u>	69
α) <i>comportement chromatographique et électrophorétique</i>	69
β) <i>révélations</i>	69
γ) <i>hydrolyse et identification des produits de la réaction</i>	70
δ) <i>dosage des différents constituants</i>	71
5 - <u>Dosage des produits de dégradation</u>	71
B - <u>ACTION DES CATIONS (<math>Mn^{++}</math> et <math>Mg^{++}</math>) SUR LA DEGRADATION CHIMIQUE</u>	71
<u>ET ENZYMATIQUE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES</u>	
1 - <u>La dégradation chimique</u>	71
2 - <u>La dégradation enzymatique</u>	72
C - <u>ACTION DES INHIBITEURS DE LA DEGRADATION CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE</u>	72
<u>DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES</u>	
1 - <u>Cinétique de la dégradation chimique et enzymatique de</u>	72
<u>1'UDP-Gal en présence d'UMP</u>	
2 - <u>Effet de différentes concentrations en UMP sur la dégradation</u>	72
<u>chimique et enzymatique de 1'UDP-Gal</u>	
D - <u>MESURE DES ACTIVITES GLYCOSIDASQUES SUR LES ACCEPTEURS</u>	72
<u>GLYCOPROTEIQUES</u>	
1 - <u>Mesure des activités glycosidasiques du sérum humain et du</u>	73
<u>sérum de Rat sur les accepteurs glycoprotéiques avant la</u>	
<u>réaction de transfert</u>	
2 - <u>Mesure des activités glycosidasiques sur des accepteurs</u>	73
<u>glycoprotéiques après la réaction de transfert</u>	
E - <u>MESURE DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DES SERUMS</u>	73
F - <u>VARIATIONS DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DES SERUMS</u>	74
<u>EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS <math>Mn^{++}</math></u>	
G - <u>VARIATIONS DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DES SERUMS</u>	74
<u>EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN UDP-Gal</u>	
H - <u>VARIATIONS DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DES SERUMS</u>	74
<u>EN PRESENCE D'INHIBITEURS DES ACTIVITES PYROPHOSPHATASIQUES</u>	

III - <u>SÉPARATION PAR ÉLECTROFOCALISATION DES ACTIVITES NUCLEOTIDE</u>	74
<u>PYROPHOSPHATASIQUES DU SÉRUM DE RAT</u>	
1 - <u>Dosage des protéines</u>	75
2 - <u>Activité phosphodiésterasique</u>	75
3 - <u>Activité phosphatasique</u>	76
4 - <u>Activité pyrophosphatasique</u>	76
RÉSULTATS	77
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; display: inline-block; text-align: center;"> DEGRADATION CHIMIQUE  DES  GLYCOSYL-NUCLEOTIDES </div>	78
I - <u>IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE DES COMPOSÉS "X"</u>	78
A - <u>COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE</u>	78
B - <u>REVELATIONS</u>	78
C - <u>CONCLUSIONS</u>	81
II - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES CONSTITUANTS DES COMPOSÉS "X"</u>	81
A - <u>IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ET DOSAGE</u>	81
B - <u>IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	81
C - <u>CONCLUSIONS</u>	81
III - <u>VARIATIONS DU TAUX DE DÉGRADATION CHIMIQUE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES</u>	82
A - <u>EN PRESENCE D'IONS Mn<sup>++</sup></u>	82
B - <u>EN PRESENCE D'IONS Mg<sup>++</sup></u>	85
C - <u>CONCLUSIONS</u>	85
IV - <u>DISCUSSION</u>	85
V - <u>CONCLUSIONS</u>	97

DEGRADATION ENZYMATIQUE  
DES  
GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

99

I - <u>IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION</u>	99
A - <u>LES MONOSACCHARIDES-1 PHOSPHATES</u>	99
B - <u>LES MONOSACCHARIDES</u>	100
C - <u>L'UMP</u>	100
D - <u>CONCLUSIONS</u>	100
II - <u>POURCENTAGE DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS <math>Mn^{++}</math></u>	100
A - <u>SERUM HUMAIN</u>	100
B - <u>SERUM DE RAT</u>	101
C - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	111
III - <u>POURCENTAGE DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS <math>Mg^{++}</math></u>	111
A - <u>SERUM HUMAIN</u>	117
B - <u>SERUM DE RAT</u>	117
C - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	117
IV - <u>POURCENTAGE DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE L'UDP-GAL EN FONCTION DU TEMPS</u>	124
A - <u>SERUM HUMAIN</u>	124
B - <u>SERUM DE RAT</u>	126
C - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	126
V - <u>VARIATIONS DE LA DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE L'UDP-GAL SUIVANT LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT</u>	126
A - <u>SERUM HUMAIN</u>	126
B - <u>SERUM DE RAT</u>	128
C - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	128

VI - POURCENTAGE DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE L'UDP-GAL EN FONCTION 128  
DU TEMPS ET EN PRÉSENCE D'UN INHIBITEUR

- A - SERUM HUMAIN 128  
B - SERUM DE RAT 128  
C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS 129

ACTIVITES GLYCOSIDASQUES  
DES SERUMS

134

I - MESURE DES ACTIVITÉS GLYCOSIDASQUES DES SÉRUMS SUR DES ACCEPTEURS  
GLYCOPROTÉIQUES AVANT LA RÉACTION DE TRANSFERT 134

II - MESURE DES ACTIVITÉS GLYCOSIDASQUES DES SÉRUMS SUR DES 134  
ACCEPTEURS GLYCOPROTÉIQUES APRÈS LA RÉACTION DE TRANSFERT

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS 134

ACTIVITES GALACTOSYLTRANSFERASIQUE  
ET NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASIQUE  
DES SERUMS

136

I - VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFERASIQUE EN PRÉSENCE 136  
DE CONCENTRATIONS VARIABLES EN IONS  $Mn^{++}$

- A - SERUM HUMAIN 136  
B - SERUM DE RAT 137  
C - DISCUSSION 137  
D - CONCLUSION 137



II - <u>VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUE EN FONCTION</u>	140
<u>DU TEMPS</u>	
A - <u>SERUM HUMAIN</u>	140
B - <u>SERUM DE RAT</u>	140
C - <u>DISCUSSION</u>	141
D - <u>CONCLUSIONS</u>	141
III - <u>VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUE DES SÉRUMS</u>	144
<u>EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN UDP-GAL</u>	
A - <u>SERUM HUMAIN</u>	144
B - <u>SERUM DE RAT</u>	144
C - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	145
IV - <u>VARIATIONS DES ACTIVITÉS GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUES EN</u>	148
<u>PRÉSENCE D'INHIBITEURS</u>	
A - <u>VARIATIONS DES ACTIVITES GALACTOSYLTRANSFERASIQUES EN PRESENCE</u>	148
<u>DE CONCENTRATIONS VARIABLES EN UMP</u>	
1 - <u>Sérum humain</u>	148
2 - <u>Sérum de Rat</u>	148
3 - <u>Discussion</u>	149
4 - <u>Conclusions</u>	149
B - <u>VARIATIONS DES ACTIVITES GALACTOSYLTRANSFERASIQUES EN PRESENCE</u>	149
<u>DE CONCENTRATIONS VARIABLES EN PPi</u>	
1 - <u>Sérum humain</u>	149
2 - <u>Sérum de Rat</u>	154
3 - <u>Discussion et conclusions</u>	154
C - <u>VARIATIONS DES ACTIVITES GALACTOSYLTRANSFERASIQUES EN FONCTION</u>	157
<u>DU TEMPS</u>	
1 - <u>Sérum humain</u>	157
2 - <u>Sérum de Rat</u>	157
3 - <u>Discussion</u>	157
4 - <u>Conclusions</u>	160

ELECTROFOCALISATION

DU

SERUM DE RAT

161

I - HYDROLYSE DU BIS-PNPP PAR LES ENZYMES PRÉSENTS DANS LE SÉRUM  
DE RAT

161

II - HYDROLYSE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES PAR LES ENZYMES PRÉSENTS  
DANS LE SÉRUM DE RAT

161

A - GLYCOSYL-NUCLEOSIDES-DIPHOSPHATES

161

B - GLYCOSYL-NUCLEOSIDES-MONOPHOSPHATES

162

C - DISCUSSION

162

D - CONCLUSIONS

164

CONCLUSIONS GENERALES

165

BIBLIOGRAPHIE

168

## INTRODUCTION

La mise en évidence par LELOIR (1) des glycosyl-nucléotides a constitué une découverte fondamentale en ce qui concerne le métabolisme intermédiaire des glycoconjugués. En particulier, l'utilisation des glycosyl-nucléotides radioactifs a permis à de nombreux auteurs d'effectuer sur différents substrats des réactions de transfert de monosaccharides marqués et de déterminer ainsi l'activité des glycosyltransférases.

Au cours des travaux entrepris au Laboratoire qui ont porté sur la détermination des glycosyltransférases du sérum humain et du sérum de Rat, PIETTE (2) a mis en évidence un système enzymatique capable d'hydrolyser les glycosyl-nucléotides en monosaccharides libres.

Notre travail a consisté à reprendre cette étude et, en particulier, à caractériser et à doser les activités des enzymes impliqués dans cette dégradation. Les résultats que nous avons obtenus grâce à l'utilisation d'une méthodologie simple et sûre permettent, d'une part, de dire que tous les glycosyl-nucléosides diphosphates sont d'abord dégradés en monosaccharides-1-phosphates par une glycosyl-nucléotide pyrophosphatase (EC 3.6.1.9) puis en monosaccharides libres sous l'action de la phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1.) et, d'autre part, de définir les interactions de ces enzymes avec l'activité des glycosyltransférases.

Cette glycosyl-nucléotide pyrophosphatase introduit dans la mesure des activités glycosyltransférasiques une cause d'erreur dont beaucoup d'auteurs ne tiennent pas compte. Nous avons recherché, par la suite, l'existence d'autres causes d'erreur, en particulier, nous avons étudié, d'une part, l'influence du milieu d'incubation sur la réaction de transfert et, d'autre part, la stabilité des précurseurs et des produits néoformés.

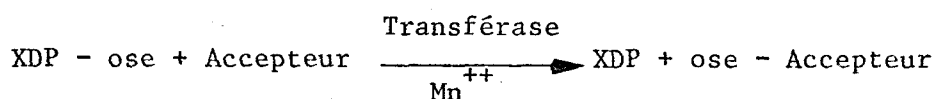
En amont de la réaction de transfert, les glycosyl-nucléotides peuvent subir une hydrolyse par la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase ou être transformés par des isomérases ou des épimérases, les accepteurs de nature glycopeptidique ou glycoprotéique peuvent être progressivement dégradés par des glycosidases

et dévoiler de nouveaux sites sur lesquels ne pourront plus se greffer les monosaccharides à transférer.

De plus, certains glycosyl-nucléotides sont instables dans les conditions d'incubation, ils peuvent subir une dégradation chimique plus ou moins importante.

En aval de la réaction de transfert, des glycosidases peuvent éliminer tout ou en partie les monosaccharides au fur et à mesure de leur transfert sur l'accepteur.

Il s'ensuit que la réaction de transfert, schématisée par de nombreux auteurs sous la forme :



est comme le montre la fig. 1 p. 4 beaucoup plus complexe.

Après avoir évalué l'importance de ces différentes causes d'erreur, nous avons essayé de les réduire, voire de les éliminer. Les résultats obtenus nous permettent de montrer d'une part l'existence d'une régulation entre la galactosyltransférerase et la nucléotide pyrophosphatase au niveau du sérum humain et du sérum de Rat et d'autre part, l'importance de la dégradation chimique.

Enfin des essais de purification par électrofocalisation des nucléotide pyrophosphatases du sérum de Rat ont été entrepris et ont permis de conclure à l'existence d'isoenzymes.

Avant d'exposer nos travaux, nous rappellerons quelques généralités concernant les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases.

Les résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet des communications et des publications suivantes :

#### I - COMMUNICATIONS

G. SPIK, P. SIX, P. DEBEIRE, R. CACAN, A. VERBERT et J. MONTREUIL

Dégradation enzymatique et chimique des glycosyl-nucléotides au cours de la détermination des activités glycosyltransférasiques.

- Journées biochimiques Franco-Belges à Lille (24-26 juin 1976)
- VI Journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides à Grenoble (23-25 septembre 1976).
- VII Journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides à Pont-à-Mousson (24-27 octobre 1977).

P. SIX, S. BOUQUELET, T. SAWICKA, G. SPIK et J. MONTREUIL

Etude de quelques propriétés des nucléotide pyrophosphatases du sérum de Rat normal.

- Forum des Jeunes à Lyon (5-9 juillet 1977).

G. SPIK, P. SIX, S. BOUQUELET, T. SAWICKA et J. MONTREUIL

Degradation of nucleoside diphosphate sugars by human and rat serum. Properties of the serum nucleotide pyrophosphatase.

- Congrès de Biochimie de Woods Hole (septembre 1977)

## II - PUBLICATIONS

1 - Dégradation of nucleoside diphosphate sugars by human and rat serum. Properties of the serum nucleotide pyrophosphatases

G. SPIK, P. SIX, S. BOUQUELET, T. SAWICKA and J. MONTREUIL

Fourth International Symposium on Glycoconjugates at Woods Hole (USA), 27 septembre-1er octobre 1977

Proc. Int. Colloq. Glycoconjugates, 1977 (in press)

2 - Chemical and enzymic degradations of nucleoside mono and diphosphate sugars  
Determination of the degradation rate during the glycosyltransferase assays

G. SPIK, P. SIX and J. MONTREUIL

Biochim. Biophys. Acta (soumis à publication)

3 - Enzymic degradation of nucleoside mono and diphosphate sugars. Isoelectric focusing separation of 8 glycosyl-nucleotide pyrophosphatase isoenzymes from rat serum.

P. SIX, S. BOUQUELET, T. SAWICKA, G. SPIK and J. MONTREUIL

Biochim. Biophys. Acta (soumis à publication)

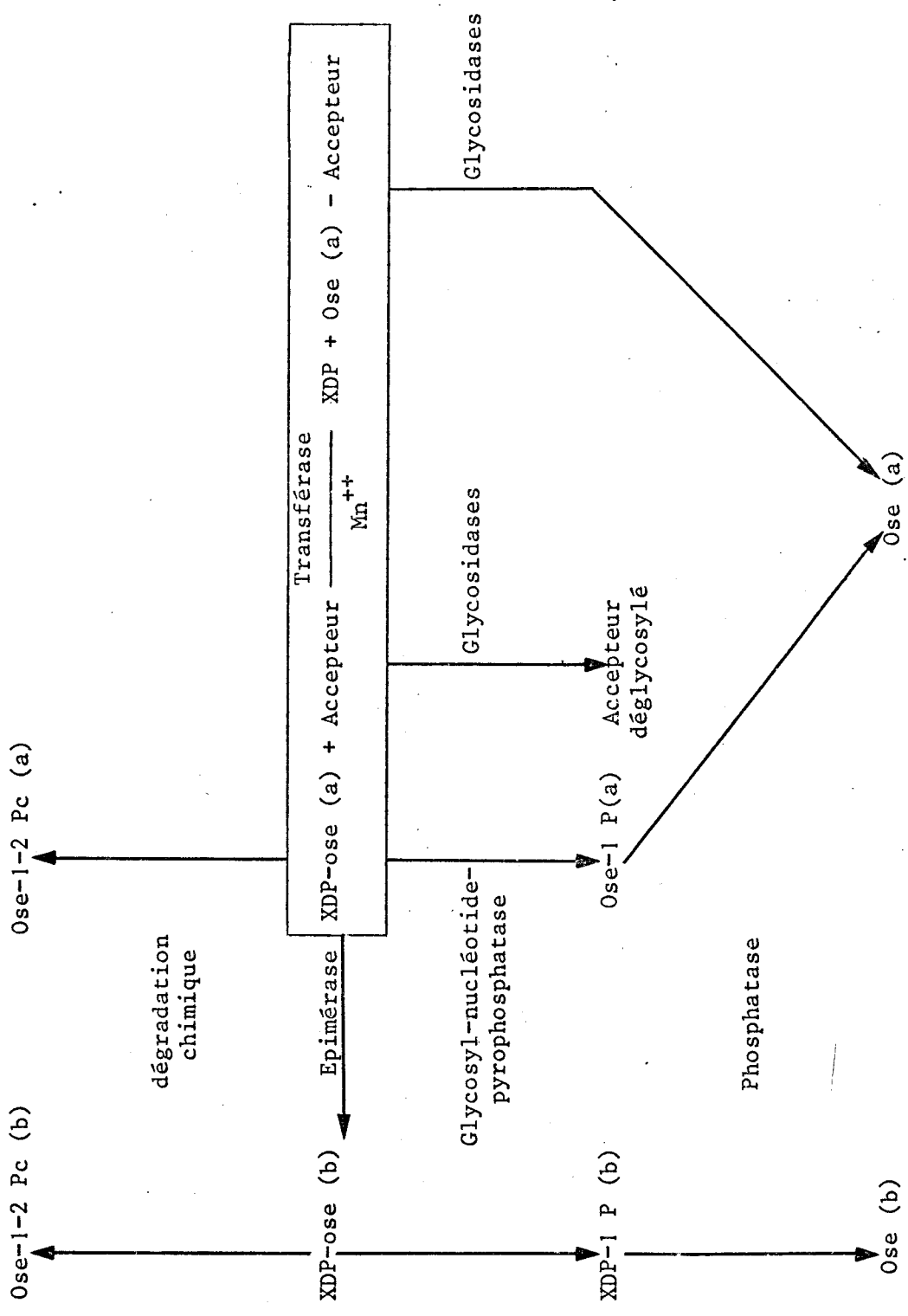


FIGURE 1

Voies possibles d'utilisation de la partie monosaccharidique des glycosyl-nucléotides lors des réactions de transfert.

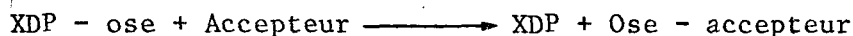
## GÉNÉRALITÉS

## DÉFINITIONS

Nous rappellerons la définition des enzymes utilisés dans ce mémoire.

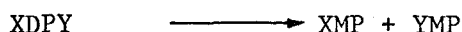
### I - LES GLYCOSYLTRANSFERASES (EC 2.4. .)

Les glycosyltransférases sont des enzymes qui catalysent d'une manière générale la réaction suivante :



### II - LES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASES OU DINUCLEOTIDES NUCLEOTIDOHYDROLASES (EC 3.6.1.9)

Les glycosyl-nucléoside-diphosphate pyrophosphatases, encore appelées glycosyl-nucléotide pyrophosphatases et les dinucléotides nucléotidohydrolases sont responsables de la dégradation des glycosyl-nucléoside diphosphates et des dinucléotides. La coupure s'effectue au niveau de la liaison pyrophosphate (Voir Fig. 2 p. 8).



### III - LES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES

Les glycosyl-nucléoside-monophosphate hydrolases ou CMP-ANAN hydrolases coupent le CMP-ANAN et libèrent de l'acide sialique et du CMP. La coupure est différente de la précédente, car il n'y a pas de liaison pyrophosphate.



### IV - LA PYROPHOSPHATASE INORGANIQUE OU PYROPHOSPHATE PHOSPHOHYDROLASE (EC 3.6.1.1).

La pyrophosphatase inorganique est un enzyme qui coupe le pyrophosphate inorganique et libère 2 molécules d'orthophosphate (Fig. 2 p. 8).

### V - L'ATP-ase ou ATP phosphohydrolase (EC 3.6.1.3)

L'ATP-ase libère à partir d'ATP, une molécule d'ADP et une molécule d'orthophosphate (Fig. 2 p. 8).

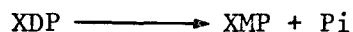
### VI - LA NUCLEOSIDE-TRIPHOSPHATE PYROPHOSPHOHYDROLASE

Certains nucléosides triphosphates comme l'ATP, l'UTP, le GTP, l'ITP et le CTP peuvent être dégradés en XMP et P<sub>i</sub> par une nucléoside triphosphate pyrophosphohydrolase (Fig. 2 p. 8).



VII - LA NUCLEOSIDE DIPHOSPHATASE OU NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE PHOSPHOHYDROLASE  
(EC 3.6.1.6)

La nucléoside diphosphatase coupe les nucléosides diphosphates et libère de l'orthophosphate (Fig. 2 p. 8).



VIII - LA 5'NUCLEOTIDASE OU 5'RIBONUCLEOTIDE PHOSPHOHYDROLASE (EC 3.1.3.5)

La 5'nucléotidase ou 5'ribonucléotide phosphohydrolase libère de l'orthophosphate à partir de 5'ribonucléotides (Fig. 2 p. 8).

IX - LA PHOSPHODIESTERASE OU DIESTER ORTHOPHOSPHORIQUE PHOSPHOHYDROLASE (EC 3.1.4.1)

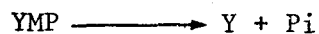
La phosphodiesterase I coupe la liaison phosphate du côté 3'OH du monosaccharide alors que la phosphodiesterase II coupe celle du côté 5'OH.

X - LES PHOSPHATASES OU MONOESTER PHOSPHORIQUE PHOSPHOHYDROLASE

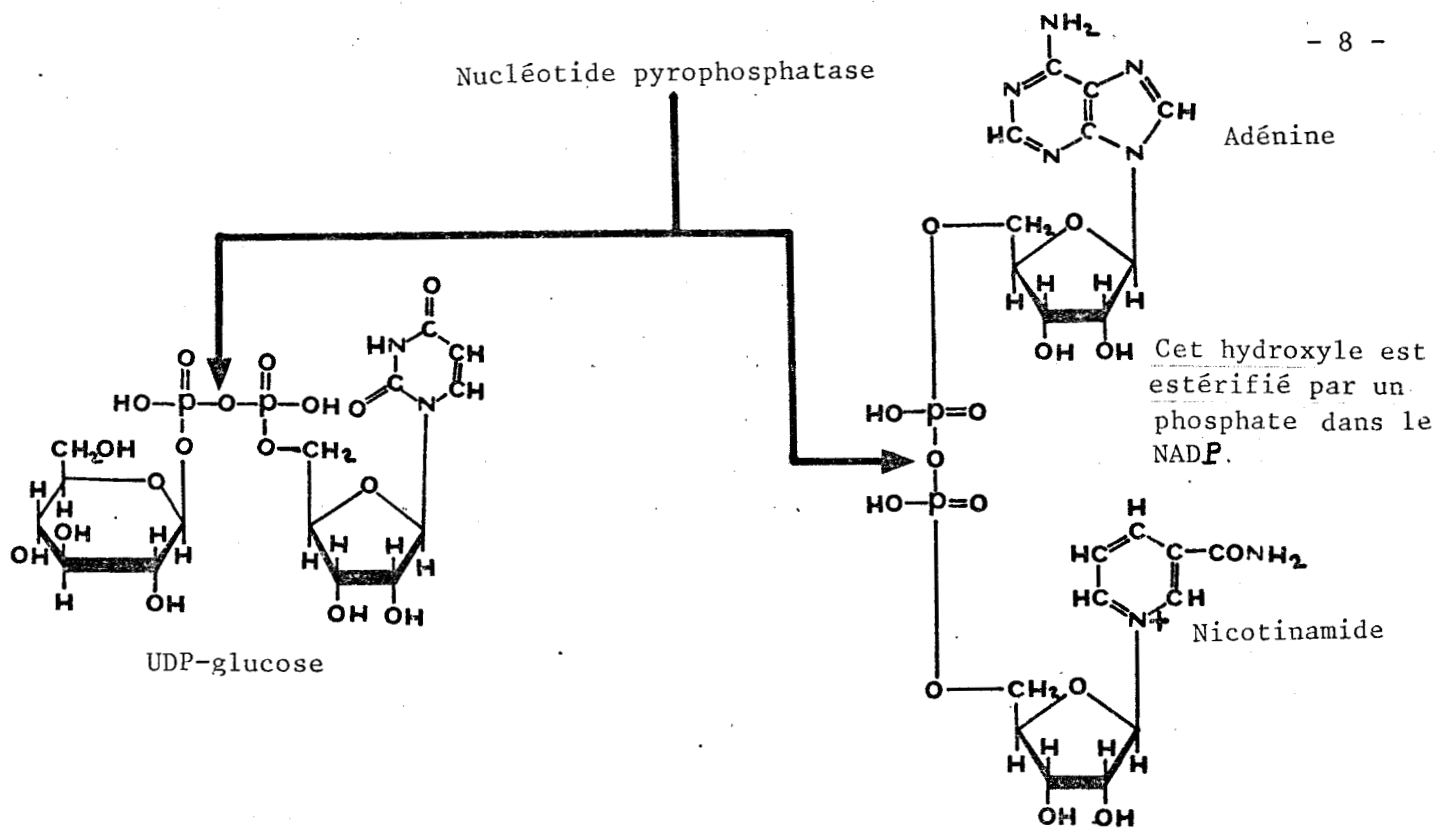
A - La phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1)



B - La phosphatase acide (EC 3.1.3.2)

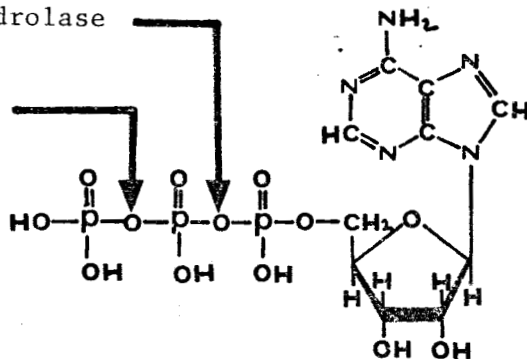


Nucléotide pyrophosphatase

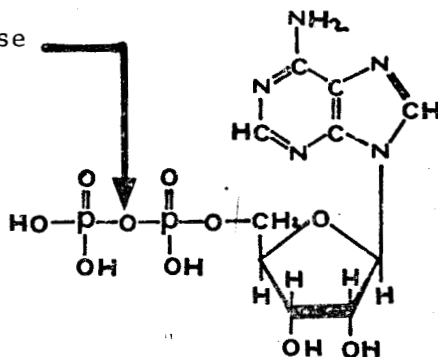


Nucléoside triphosphate pyrophosphohydrolase

ATP ase



Nucléoside diphosphatase



5' Nucléotidase

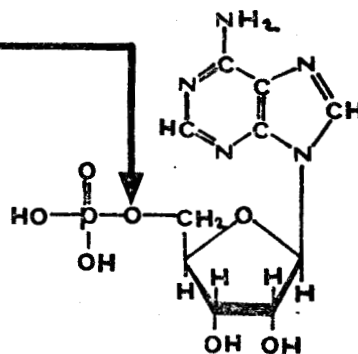


Fig. 2

## LOCALISATION DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES

Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases sont des enzymes qui ont été mis en évidence dans le règne animal, végétal et chez les bactéries. En ce qui nous concerne, nous nous limiterons à décrire celles présentes chez les animaux et chez l'homme.

Les pyrophosphatases possèdent un spectre d'action très large, néanmoins, il a été possible de différencier celles qui hydrolysent des substrats inorganiques comme le pyrophosphate et qui ne nous intéressent pas particulièrement dans le cadre de notre travail, de celles qui possèdent une activité sur les glycosyl-nucléosides-mono ou diphosphates et les dinucléotides.

Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases existent sous forme soluble dans de nombreux milieux biologiques ou sous forme incorporée à différentes membranes cellulaires. Jusqu'à présent, ces dernières ont été de beaucoup les plus étudiées. Nous nous proposons de décrire rapidement leurs principales caractéristiques.

### I - ÉTUDE DES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASES

#### A - LES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES SOLUBLES

##### 1 - Dans le sérum humain

Une nucléotide pyrophosphatase dégradant l'UDP-Gal a été étudiée au niveau du sérum humain par MOOKERJEA (3). Son activité est nettement plus faible que celle présente dans le sérum de Rat. La présence de cette activité dans le sérum humain est confirmée par HAUGEN et SKREDE (4) qui utilisent comme substrat de l'UDP-Glc.

##### 2 - Dans les autres milieux biologiques

BROWNLEE et WHEAT (5) mettent en évidence en 1960, une glycosyl-nucléotide pyrophosphatase dans le plasma sérial bovin, capable de dégrader l'UDP-Glc. Récemment, en 1977, HAUGEN et SKREDE (6) étudient cette activité sur le même substrat : l'UDP-Glc, dans différents milieux biologiques humains. Les résultats donnés dans le tableau I p. 10 montrent que l'enzyme est présent dans le plasma

TABLEAU

Activité de la nucléotide pyrophosphatase, de la phosphodiesterase I et de la phosphatase alcaline dans différents liquides biologiques humains selon HAUGEN et SKREDE (6). (Unité :  $\mu\text{moles/l/mn}$  ; durée d'incubation : 1 h).

Liquides biologiques humains	Nucléotide pyrophosphatase (UDP-Glc)	Phosphodiesterase I (Thymidine-5' monophospho-p-nitrophénylester)	Phosphatase alcaline (p-nitrophényl phosphate)
Sérum	5,4	20	10,5
Liquide cérébro-spinal	0,6	7	1
Urine	0,01	0,3	1,6
Bile	0,6	12,5	19,4
Plasma séminal	80	273	293
Lait	0	2	172



séminal où l'activité est très élevée et dans le sérum, l'activité est très faible dans le liquide cérébro-spinal, la bile et l'urine et n'existe pas dans le lait.

## B - LES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES MEMBRANAIRES

De nombreux auteurs ont étudié les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques au niveau de cellules entières, broyées et de différentes fractions obtenues à partir de celles-ci.

### 1 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des cultures de cellules

#### a - Cellules intactes

En 1974, DEPPERT et al. (7) mettent en évidence à la surface des cellules de rein de Hamster une glycosyl-nucléotide pyrophosphatase qui dégrade l'UDP-Gal et le GDP-Fuc mais qui est sans action sur le CMP-ANAN. Cet enzyme est présent à la surface des cellules car les glycosyl-nucléotides ne peuvent pas franchir la barrière membranaire qui est en outre imperméable aux monosaccharides-1 phosphates.

#### b - Cellules broyées

SELA et al. (8) en 1972, travaillent sur des cultures de cellules d'embryons d'Hamster doré. Ils montrent que ces milieux contiennent un enzyme responsable de la dégradation de l'UDP-GlcNAc et de l'UDP-GalNAc en monosaccharides 1 phosphates. Ils étendent par la suite leur démonstration à d'autres nucléotides : le GDP-Man, le GDP-Fuc et l'UDP-Glc (9).

### 2 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des homogénats cellulaires

Au niveau des cellules broyées du sang humain : érythrocytes, thrombocytes et lymphocytes, HAUGEN et SKREDE (6) mesurent les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasique (UDP-Glc), phosphodiésterasique et phosphatasique. Les résultats donnés dans le tableau 2 p.12 montrent que l'activité UDP-Glc pyrophosphatasique est faible par rapport à l'activité phosphodiésterasique. A taux égal de protéines, l'activité UDP-Glc pyrophosphatasique des érythrocytes et des thrombocytes est environ 2 fois plus élevée que celle du sérum mais ne représente que 1,5 p. 100 de l'activité présente au niveau du tissu hépatique.

Dans les milieux ascitiques de Souris Balb/c les précurseurs nucléotidiques ne sont que faiblement hydrolysés, par contre, les surnageants de lymphocytes normaux broyés possèdent la propriété d'hydrolyser l'UDP-Gal à un

TABLEAU 2

Activité de la nucléotide pyrophosphatase, de la phosphodiesterase I et de la phosphatase alcaline au niveau des cellules du sang humain selon HAUGEN et SKREDE (6). (Unité : nmoles/g de protéines/mn ; durée d'incubation : 1 h).

Cellules	Nucléotide pyrophosphatase (UDP-Glc)	Phosphodiesterase I (Thymidine-5'-monophospho- p-nitrophénylester)	Phosphatase alcaline (p-nitrophenyl phosphate)
Erythrocytes	14	542	158
Thrombocytes	60	647	915
Lymphocytes	-	2.176	1.676



taux assez élevé (43 p. 100). L'hydrolyse s'arrête au stade de l'ose-1 phosphate, en effet, la présence de galactose est pratiquement nulle dans les surnageants des cellules tumorales YC 8 et dans les surnageants des lymphocytes de Souris porteuses de la tumeur YC 8 tandis qu'elle représente 9 p. 100 de la radioactivité dans les surnageants de lymphocytes normaux (10).

### 3 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des membranes plasmiques

#### a - Mise en évidence des activités nucléotide pyrophosphatasiques des membranes plasmiques.

En 1964, EMMELOT et al. (11) mettent en évidence une nucléotide pyrophosphatase active sur le NAD, au niveau des membranes plasmiques du foie de Rat. LANSING et al. (12) confirment sa présence et tendent de la différencier de celle présente au niveau du réticulum endoplasmique. Quelques années plus tard, SKIDMORE et TRAMS (13) montrent qu'elle est active sur le NAD, sur le palmityl Co-A et sur l'UDP-Glc, sa répartition est à peu près identique à celle de la 5'nucléotidase, enzyme marqueur des membranes plasmiques. Cette nucléotide pyrophosphatase n'est pas un enzyme soluble adsorbé au niveau des membranes plasmiques, en effet, les fractions préparées en milieu isotonique possèdent une forte activité spécifique qui n'est pas modifiée lorsque l'on passe d'un milieu hypotonique à un milieu isotonique.

#### b - Répartition des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des membranes plasmiques

EVANS (14), BISCHOFF et al. (15) au niveau des hépatocytes de Rat, SELA et al. (8), DEPERT et al. (7) dans les cultures de cellules, ABNEY et al. (16) au niveau des lymphocytes de rate de Souris, montrent que la nucléotide pyrophosphatase est un enzyme présent au niveau des membranes plasmiques.

Pour effectuer leur démonstration, ABNEY et al. (16) utilisent des lymphocytes de rate de Souris. La membrane plasmique de ces lymphocytes est imperméable aux glycosyl-nucléotides cependant, ajoutés dans le milieu d'incubation, ils sont rapidement hydrolysés, il faut donc admettre qu'il existe une nucléotide pyrophosphatase à l'extérieur de cette membrane plasmique. DEPERT et al. (7) sont arrivés aux mêmes conclusions en utilisant des cellules de rein de Hamster. Enfin, grâce à la technique de marquage des protéines membranaires à l'iode  $^{125}\text{I}$ , BISCHOFF et al. (15) confirment que cette nucléotide pyrophosphatase se trouve bien à la surface des cellules (14 - 17 - 18 - 19).

c - Origine des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases présentes au niveau des membranes plasmiques.

TRAN-THI et al. (20) pensent que la nucléotide pyrophosphatase du réticulum endoplasmique peut atteindre la surface de l'hépatocyte. Dans cette éventualité, il est possible d'envisager une relation entre l'enzyme situé dans le réticulum et celui de la membrane plasmique. Afin de vérifier cette hypothèse, des cinétiques de synthèse de ces 2 enzymes ont été réalisées au niveau du foie de Rat perfusé, en présence de leucine tritiée. Au départ, la radioactivité de l'enzyme purifié à partir du réticulum endoplasmique est beaucoup plus élevée que celle présente au niveau de la membrane plasmique, puis elle diminue rapidement, alors que celle de la membrane plasmique continue à augmenter. Le transfert du marquage de l'enzyme du réticulum endoplasmique à celui de la membrane plasmique peut être complètement arrêté par l'addition de vinblastine au milieu de perfusion. Ces résultats suggèrent donc qu'il existe une relation entre l'enzyme du réticulum endoplasmique et celui de la membrane plasmique.

4 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases microsomaux

Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases ne sont pas seulement présentes au niveau des membranes plasmiques, elles le sont aussi au niveau d'autres systèmes membranaires, tels que les microsomes.

En particulier, la NADH pyrophosphatase, solubilisée à partir de la fraction microsomale du foie de Rat à l'aide du Triton X 100 par BACHORIK et DIETRICH (21) possède environ 60 p. 100 de l'activité nucléotide-pyrophosphatase de la cellule totale. Cette activité, localisée essentiellement au niveau du réticulum rugueux ne peut provenir comme le démontrent BISCHOFF et al. (22) d'une contamination par les membranes plasmiques. Une localisation identique est obtenue par PUHAKAINEN et HÄNNINEN (23) en 1976, pour l'UDP-GlcAU pyrophosphatase du foie de Rat. Puis, la même année, ISHIBASHI et al. (24) démontrent qu'au niveau des microsomes de cobayes, il existe des quantités variables de nucléotide pyrophosphatase, capable d'hydrolyser les nucléotide-sucres, même dans les conditions de synthèse des glycolipides (25 - 26) ou des glycoprotéines ( 3 - 7 ).



### 5 - Les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des noyaux

Une localisation des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases au niveau des noyaux des cellules ne peut pas être exclue. En effet, JACOBSON et KAPLAN (27) mettent en évidence une NAD pyrophosphatase, en 1957, au niveau des noyaux et des microsomes du foie de différents animaux. Dans ces mêmes fractions, lors de leurs études sur le métabolisme des nucléotides, SCHLIESELFELD et al. (28) découvrent en 1965, une UDP-Glc pyrophosphatase. Pour ces auteurs, la pyrophosphatase des noyaux pourrait être le précurseur de la pyrophosphatase des microsomes. Cependant, en 1966, OGAWA et al. (29) prétendent que l'enzyme microsomal et l'enzyme nucléaire sont différents car leurs besoins respectifs en ions métalliques ainsi que leur spécificité de substrat sont différents. Enfin, les études cinétiques et les études d'inhibition de LAU et WONG, réalisées sur l'UDP-GlcAU pyrophosphatase partiellement purifiée permettent de conclure qu'il s'agit vraisemblablement du même enzyme, probablement en provenance des membranes plasmiques (30).

### 6 - Les nucléotide pyrophosphatases mitochondriales

Les mitochondries sont des organites cellulaires dans lesquels le métabolisme est particulièrement important. Dans le foie de Rat, il a été démontré que l'activité relative spécifique de la nucléotide pyrophosphatase est très élevée dans la fraction mitochondriale légère (31).

## II - ÉTUDE DES GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES

La localisation de l'enzyme responsable de la dégradation du CMP-ANAN a été étudiée plus tardivement que celle de l'enzyme responsable de la dégradation des autres glycosyl-nucléotides. Aussi, à présent, nous ne savons pas si l'enzyme qui dégrade le CMP-ANAN est le même que celui qui dégrade les autres glycosyl-nucléotides, cependant, comme ce dernier, il existe sous une forme soluble et sous une forme membranaire.

### A - LA GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASE SOLUBLE

La CMP-ANAN hydrolase a été mise en évidence récemment dans le sérum humain par CHATTERJEE et al. (32). Ces derniers auteurs signalent une augmentation d'activité de cet enzyme dans le sérum lorsque les sujets sont affectés par le cancer de l'ovaire. Cette augmentation d'activité est sans doute due au passage de l'enzyme des cellules malignes de l'ovaire dans le système circulatoire.

## B - LA GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASE MEMBRANAIRE

La CMP-ANAN hydrolase a été localisée à la fois dans les fractions nucléaires et mitochondriales des foies de Rat et de Mouton par SHOYAB et BACHHAWAT (33), au niveau des membranes plasmiques du foie de Rat par KEAN et BIGHOUSE (34) et au niveau des membranes plasmiques du rein de Hamster par VAN DIJK et al. (35). Cet enzyme est localisé à la surface des hépatocytes (36) et son site actif est dirigé vers l'extérieur de la cellule. Son activité spécifique augmente en fonction de la purification qui a été suivie par la mesure des activités des enzymes marqueurs. Les rendements obtenus lors de l'isolement de ces membranes sont faibles et par conséquent ne permettent pas d'affirmer que l'enzyme se trouve exclusivement au niveau de ces membranes.

Dans les cas de tumeurs de l'ovaire, l'activité spécifique de la CMP-ANAN hydrolase des homogénats cellulaires diminue fortement par rapport aux témoins correspondants alors que celle du sérum augmente. Lorsqu'il y a régression de la tumeur, cette activité diminue dans le sérum mais reste plus élevée que celle mesurée chez des sujets sains (32).

## III - CONCLUSIONS

La glycosyl-nucléotide pyrophosphatase et la CMP-ANAN hydrolase sont des enzymes solubles ou membranaires. Ils sont localisés en particulier au niveau des membranes plasmiques, des mitochondries et des noyaux des cellules de différents animaux. De plus la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase a été mise en évidence au niveau des microsomes. En raison de la difficulté de préparer des fractions pures, il est difficile de savoir si la faible activité mesurée dans certaines fractions ne résulte pas d'une contamination par d'autres fractions.

SPECIFICITE DE SUBSTRAT DE LA NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE
--

La spécificité de substrat de la nucléotide pyrophosphatase a été étudiée par de nombreux auteurs, chez différents animaux et au niveau de divers organes. Les substrats utilisés sont très souvent des glycosyl-nucléotides, mais aussi des composés qui possèdent un ou plusieurs résidus de phosphate dans leur molécule.

### I - DÉGRADATION DES GLYCOSYL-NUCLÉOTIDES

Différents liquides biologiques comme le sérum et le plasma séminal, les cultures de cellules et différentes fractions cellulaires du foie de Rat : membranes plasmiques, microsomes et noyaux possèdent une glycosyl-nucléotide pyrophosphatase capable de dégrader différents glycosyl-nucléotides. Le Tableau 3 p. 18 montre que cet enzyme est actif quelque soit la partie nucléotidique ou monosaccharidique du glycosyl-nucléotide, il n'est cependant pas actif sur le CMP-ANAN, dans le cas du rein de Hamster (7). Son activité est 2 fois plus grande sur l'UDP-GlcNAc que sur l'UDP-Glc et l'UDP-GlcAU dans le cas du cerveau de mouton (37) et plus faible sur l'UDP-GlcNAc que sur les 2 autres glycosyl-nucléotides dans le cas de la fraction microsomale du foie de Rat, comme le montre le tableau 4 p. 19. D'autre part, le tableau 5 p. 19 montre qu'à concentration presque identique de substrat, et pour des glycosyl-nucléotides comportant une même partie monosaccharidique, le composé le plus dégradé est l'UDP-Glc, le moins dégradé est le TDP-Glc.

Nous pouvons donc conclure que bien que tous les glycosyl-nucléosides-diphosphates soient dégradés par la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase, les activités spécifiques varient suivant leur partie monosaccharidique et suivant leur partie nucléotidique.

TABLEAU 3

Spécificité de substrat de la nucléotide pyrophosphatase chez différents animaux et au niveau de divers organes.

Animal	Organe	Localisation	Référence	Glycosyl-nucléotides hydrolysés	Autres substrats hydrolysés	Autres substrats non hydrolysés
Homme		sérum	- MOOKERJEA (3) - HAUGEN et SKREDE (6)	- UDP-Gal - UDP-Glc	- Déphospho-CoA - Thymidine-5' (p-NPP)	
Taureau		Plasma séminal	- BROWNLEE <u>et al.</u> (5)	- UDP-Glc	- DPN, DPNH - FAD - CDP-Choline	
Mouton	Cerveau		- PATTABIRAMAN <u>et al.</u> (37)	- UDP-GlcNAc - UDP-Glc - UDP-GlcAU		
Hamster	Rein		- DEPERT <u>et al.</u> (7)	- UDP-Gal - GDP-Fuc		- CMP-ANAN
		Cultures de cellules	- SELA <u>et al.</u> (8) - SELA <u>et al.</u> (9)	- UDP-GlcNAc - UDP-GalNAc - UDP-Glc - GDP-Man - GDP-Fuc		
Souris	Foie	Membranes plasmiques	- EVANS <u>et al.</u> (42)	- UDP-Gal - UDP-GlcNAc	- NAD - ATP - dThymidine-5' (p-NPP)	
Rat	Foie	Membranes plasmiques	- SKIDMORE <u>et al.</u> (13) - DECKER <u>et al.</u> (38)	- UDP-Glc - UDP-Glc	- NAD, NADH - CoA - ATP-UTP	
		Membranes plasmiques et réticulum endoplasmique	- BISCHOFF <u>et al.</u> (15)	- UDP-Glc	- Thymidine-5' (p-NPP) - NAD, NADH - UTP, ATP	- Thymidine-3' (p-NPP) - Nucléosides-mono P - Glycérol P - Glc-6 P
		Noyaux	- SCHLIESELFELD <u>et al.</u> (28)	- UDP-Glc - GDP-Glc - TDP-Glc - ADP-Glc - UDP-GlcAU - GDP-Man	- p-NPP - bis-p-NPP - ADP - ATP-UTP - NAD-NADP	
			- OGAWA <u>et al.</u> (29)	- UDP-GlcAU - UDP-Glc - UDP-GlcNAc	- NAD, NADH, NADP - FAD - ATP, UTP	
		Noyaux et microsomes	- LAU <u>et al.</u> (30)	- UDP-GlcAU	- NAD, NADH, NADP	
		Microsomes	- BACHORIK <u>et al.</u> (21)	- UDP-GlcNAc - UDP-Glc - ADP-ribose	- NAD, NADPH - p-NPP - bis-p-NPP - ATP	
			- OGAWA <u>et al.</u> (29)	- UDP-GlcAU - UDP-Glc - UDP-GlcNAc	- NAD, NADH - NADP, NADPH	
			- MOOKERJEA <u>et al.</u> (3)	- UDP-Gal		
			- PUHAKAINEN <u>et al.</u> (3)	- UDP-GlcAU - UDP-Glc - UDP-GlcNAc	- NAD, NADH - NADP, NADPH	
		Sérum	- MOOKERJEA (3)	- UDP-Gal		

BIS  
LITE

TABLEAU 4

Dégradation de différents substrats par la nucléotide pyrophosphatase de la fraction microsomale du foie de Rat.

Substrat	Activité spécifique PUHAKAINEM <u>et al.</u> (23)	Activité spécifique OGAWA <u>et al.</u> (29)
UDP-GlcAU	100	100
UDP-Glc	85	88
UDP-GlcNAc	78	71
NAD	48	30
NADH	87	110
NADP	41	26
NADPH	82	-

TABLEAU 5

Dégradation de différents substrats par la nucléotide pyrophosphatase des noyaux du foie de Rat, selon SCHLIESELFELD et al. (28).

Substrat	Concentration en substrat (mM)	Activité spécifique %
UDP-Glc	0,20	100
GDP-Glc	0,20	70
TDP-Glc	0,21	46
ADP-Glc	0,21	93
UDP-GlcAU	0,28	89
GDP-Man	0,30	43
p-NPP	1,93	7,6
bis-p NPP	1,33	0,76
NAD	0,51	75
NADP	0,51	40
ADP	0,63	28
ATP	0,67	18,8
UTP	0,63	20,2

NB : La valeur de 100 correspond à la formation de 96  $\mu$ moles d' $\alpha$ -D-GlcAU-1 P/  
mn/g.de protéines.



## II - DÉGRADATION D'AUTRES SUBSTRATS

De nombreux auteurs ont étudié simultanément l'activité de la nucléotide pyrophosphatase sur les glycosyl-nucléotides, sur les dinucléotides et sur d'autres composés mono ou polyphosphorylés, comme le montre le tableau 5 p. 19. En ce qui concerne l'activité de cet enzyme sur les dinucléotides, nous pouvons dire qu'elle est importante, bien qu'il existe des variations suivant que le substrat choisi est le NAD, le NADH, le NADP ou le NADPH, comme le montrent les tableaux 4 et 5 p. 19. Quant aux activités mesurées sur l'ATP, l'UTP, le bis-p-NPP et le pNPP, elles sont faibles ; BACHORIK et al. (21), au niveau des microsomes du foie de Rat estiment que l'ATP, le bis-p-NPP et le p NPP sont hydrolysés respectivement à 3 - 0,31 et 0,04 p. 100 de la vitesse du NADH. L'activité sur les nucléosides-3' P est pratiquement nulle, de même que celle sur le p-nitrophényl-thymidine-3'-P.

La nucléotide pyrophosphatase qui dégrade les glycosyl-nucléotides possède donc une activité sur les dinucléotides. La dégradation des autres composés mono ou poly-phosphorylés serait due à d'autres activités enzymatiques, cependant, sur ce point, tous les auteurs ne semblent pas partager le même avis, en conséquence, nous allons développer leurs différentes argumentations.

## III - RELATIONS ENTRE LES ACTIVITÉS GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASIQUES, GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASIQUES, PHOSPHODIESTÉRASIQUES ET PHOSPHATASIQUES

Les relations entre les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques phosphodiéstérasiques et phosphatasiques ont été étudiées par les auteurs plus particulièrement dans certains liquides biologiques, au niveau des membranes plasmiques du foie de Rat et au niveau de divers organes humains ou de Rat. En ce qui concerne les relations de l'activité de la CMP-ANAN hydrolase avec les autres activités, elles ont été plus spécialement abordées au niveau du rein de veau et du foie de Rat.

### A - RELATIONS ENTRE LES ACTIVITES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASIQUES, PHOSPHODIESTERASIQUES ET PHOSPHATASIQUES

### 1 - Dans les liquides biologiques

L'UDP-Glc est dégradé enzymatiquement par le sérum humain normal, avec formation de Glc-1 P, le déphospho-CoA est dégradé avec formation de 5'AMP (4). L'enzyme responsable de cette dégradation possède un certain nombre de propriétés de la nucléotide pyrophosphatase isolée du foie de Rat par DECKER et BISCHOFF (38).

Un autre substrat : la thymidine-5'-monophospho-nitrophényl ester est hydrolysé par ce même sérum, l'enzyme responsable de cette dégradation est une phosphodiesterase. Il est remarquable que ces 2 activités : nucléotide pyrophosphatase et phosphodiesterase possèdent le même pH optimum : 9,8 et une inhibition identique par l'EDTA. De plus, l'UDP-Glc (1 mM) inhibe fortement et de manière compétitive la phosphodiesterase I dont la présence est confirmée dans le sérum humain par HYNIE et al. (39).

Ces 2 types d'activité ont été mesurés dans d'autres milieux biologiques humains (6). Les résultats donnés dans le tableau 1 p. 11 montrent que les activités nucléotide pyrophosphatase et phosphodiesterase I du plasma séminal sont environ 10 fois supérieures à celles du sérum et que l'activité phosphodiesterase est supérieure à l'activité nucléotide pyrophosphatase dans tous les liquides étudiés.

Ces 2 activités peuvent être dûes à 2 enzymes différents, mais étant donné qu'ils partagent de nombreuses propriétés et surtout que leurs substrats respectifs sont mutuellement compétitifs, il est tentant d'affirmer que les 2 activités puissent être attribuées au même enzyme (6).

Il est important de remarquer d'autre part, qu'il existe une relation étroite entre la phosphodiesterase I et les phosphatases alcalines, en particulier dans les cas de lésion des os, la thymidine-5'-monophospho-nitrophényl ester peut être dégradée par les phosphatases alcalines (4). De plus, dans les cas de cirrhose hépatique, l'activité de la phosphodiesterase I suit parallèlement l'activité des phosphatases alcalines, bien que dans certains tissus animaux, ces 2 activités aient pu être séparées (40).

Si nous considérons l'effet d'un agent dénaturant comme l'urée, nous constatons qu'à la concentration de 3 M, il inhibe complètement les phosphatases alcalines du sérum de patients atteints de maladie du foie ou de lésions osseuses, alors qu'il inhibe seulement partiellement la phosphodiesterase, il inhibe à 50 p. 100 les phosphatases alcalines de l'intestin de veau où aucune activité phosphodiesterasique n'a été décelée. La question posée reste donc la même que précédemment, nous ne savons pas s'il s'agit d'un ou de plusieurs enzymes.

Enfin, dans le plasma sérial bovin, une nucléotide pyrophosphatase est capable d'hydrolyser l'UDP-Glc en Glc-1 P qui n'est pas hydrolysé en Glc. Il est donc possible dans certains cas de différencier les activités nucléotide pyrophosphatasiques des activités phosphatasiques.

## 2 - Au niveau des membranes plasmiques

La nucléotide pyrophosphatase a été isolée pour la première fois par DECKER et BISCHOFF (38), à partir des membranes plasmiques du foie de Rat. Elle coupe la liaison pyrophosphate des glycosyl-nucléotides et du déphospho-Co A (41), elle possède en outre une activité phosphodiesterasique (14 - 38).

Afin de savoir si les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques et phosphodiesterasiques sont dues au même enzyme, EVANS et al. (42) ont purifié cette nucléotide pyrophosphatase en gel de polyacrylamide, ils n'ont obtenu qu'une seule bande qui possède les 2 activités, il s'agirait par conséquent du même enzyme. ABNEY et al. (16) apportent une conclusion identique, ils ajoutent d'autre part, que si les 2 activités sont dues à des enzymes différents, ces enzymes doivent être vraisemblablement très voisins.

## 3 - Au niveau de différents organes

JATO-RODRIGUEZ et al. (43) montrent que l'UDP-Gal pyrophosphatase de l'endomètre de Rat est inhibée par l'oestradiol. Ce composé inhibe aussi, mais à un taux plus faible l'hydrolyse du NADH. Le problème posé par ces auteurs est de savoir s'il s'agit ou non du même enzyme.

D'autre part, les activités nucléotide pyrophosphatasique et phosphodiesterasique I ont été évaluées par HAUGEN et SKREDE (6) dans un certain nombre d'organes humains. Les résultats donnés dans le tableau 6 p. 24 montrent



que les 2 activités considérées sont élevées dans le foie et dans le rein. Le rapport entre l'activité de la nucléotide pyrophosphatase et celle de la phosphodiesterase varie suivant les organes étudiés. Cependant, ce rapport ne varie pas de façon significative lorsque les mesures sont effectuées à partir de différents organes du Rat, comme l'indique le tableau 7 p. 25. De plus, l'activité phosphodiesterasique est plus élevée dans les organes de Rat que dans les organes humains correspondants. Enfin, la répartition de la nucléotide pyrophosphatase et de la phosphodiesterase I est totalement différente de celle de la phosphatase alcaline, au niveau des différents organes. La nucléotide pyrophosphatase et la phosphodiesterase sont donc peut être des isoenzymes.

#### 4 - Au niveau des cultures de cellules

Les travaux de SELA et al. (8) montrent que les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques et phosphatasiques de différentes lignées cellulaires de Hamster, transformées, ont des exigences en ions divalents différentes et un pH optimal différent, de plus, l'une ou l'autre activité enzymatique peut être bloquée sélectivement. L'activité glycosyl-nucléotide pyrophosphatasique est bloquée dans les lignées cellulaires transformées par le virus du Sarcome de Roux ou le Siman virus 40, l'activité phosphatasique l'est dans les lignées cellulaires transformées par le virus du polyome ou après traitement par un agent chimique cancérigène : la diméthyl-nitrosamine.

#### B - RELATIONS ENTRE LES ACTIVITES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASIQUES, GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASIQUES ET PHOSPHODIESTERASIQUES

Dans les préparations de membranes plasmiques du cortex de rein de veau, la CMP-ANAN hydrolase est enrichie de la même façon que la phosphodiesterase I. Des propriétés sont identiques pour les 2 enzymes : pH, effet des cations divalents, effet de l'EDTA,  $K_m$  (13 - 35 - 38 - 42).

Cependant, KEAN et BIGHOUSE (34) montrent que le CMP-ANAN n'est pas hydrolysé par la phosphodiesterase de venin de serpent, ni par la phosphatase alcaline.

D'autre part, les CMP-ANAN hydrolases du cortex de rein de veau et du foie de Rat (33 - 34) sont inhibées par les nucléotides-monosaccharides, ce qui pourrait laisser supposer l'existence d'une relation avec la nucléotide pyrophosphatase.

TABLEAU 6

Activité de la nucléotide pyrophosphatase, de la phosphodiesterase I et de la phosphatase alcaline au niveau de différents organes humains selon HAUGEN et SKREDE (6). (Les activités sont exprimées en  $\mu$ -moles/g de protéines/mn).

Organes	Nucléotide pyrophosphatase (UDP-Glc)	Phosphodiesterase I (Thymidine-5'-monophospho- p-nitrophénylester)	Phosphatase alcaline (p-nitrophényl phosphate)
Foie	35	47	195
Estomac	3	7	35
Intestin grêle	5	21	331
Gros intestin	2	3	30
Pancréas	6	66	40
Rein	88	93	364
Rate	2	9	122
Muscle strié	0,9	1	0,5

N.B. : Les pH utilisés pour les mesures d'activité de la nucléotide pyrophosphatase et de la phosphodiesterase I sont respectivement : 9,2 et 8,5, la durée d'incubation est de 1 h.



TABLEAU 7

Activité de la nucléotide pyrophosphatase, de la phosphodiesterase I et de la phosphatase alcaline au niveau de différents organes de Rat selon HAUGEN et SKREDE (6). (Les activités sont exprimées en  $\mu$ moles/g de protéines/mn).

Organes	Nucléotide pyrophosphatase (UDP-Glc)	Phosphodiesterase I (Thymidine-5'-monophospho- p-nitrophénylester)	Phosphatase alcaline (p-nitrophényl phosphate)
Foie	60	110	26
Estomac	40	77	28
Intestin grêle	46	101	556
Gros intestin	48	93	142
Rein	89	215	1 419
Testicule	8	21	209
Epididyme	118	228	294
Prostate	31	69	496
Vésicule séminale	18	35	230
Cerveau	3	9	62
Poumon	12	29	273
Rate	10	19	13
Muscle cardiaque	13	24	84
Muscle strié	4	7	2

N.B. : Les pH utilisés pour les mesures d'activité de la nucléotide pyrophosphatase et de la phosphodiesterase I sont respectivement : 9,2 et 8,5. La durée d'incubation est de 1 h.



Récemment, VAN DIJK et al. (36) ont trouvé des répartitions différentes pour la phosphodiesterase I et la CMP-ANAN hydrolase, dans les sous-fractions obtenues à partir des membranes plasmiques du foie de Rat, le CMP-ANAN n'est donc pas hydrolysé par le complexe non spécifique phosphodiesterase-nucléotide pyrophosphatase décrit par EVANS et al. (42).

#### C - CONCLUSIONS

Les différents résultats obtenus par les auteurs ne nous permettent pas à présent d'affirmer avec certitude que les activités nucléotide-pyrophosphatases et phosphodiesterases sont dues au même enzyme. Il pourrait s'agir d'un complexe enzymatique. Afin de résoudre ce problème, il s'avère nécessaire de procéder à des purifications plus poussées, comme l'ont fait VAN DIJK et al. (36) dans le cas de la CMP-ANAN hydrolase.

## PURIFICATION DE LA NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE

De nombreux essais de purification de la nucléotide pyrophosphatase ont été proposés par différents auteurs. Notre but n'est pas de les décrire en détail, mais simplement de retracer les grandes lignes de quelques étapes de purification.

### I - PURIFICATION DE LA NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASE DES LIQUIDES BIOLOGIQUES

En 1973, PIETTE (2) a mis en évidence dans les sérums (Homme et Rat), un système enzymatique capable d'hydrolyser les glycosyl-nucléotides, il a fractionné les protéines du sérum sur colonne de Séphadex G-100 et a obtenu 2 pics. L'activité nucléotide pyrophosphatasique a été localisée dans le 1er pic (Fig. 3 p. 28).

### II - PURIFICATION DE LA NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASE DES MEMBRANES PLASMIQUES

La purification de la nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques du foie de souris a été effectuée par EVANS et al. (42) en 1973, en gradient de saccharose et par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'un détergent anionique : le N-dodécyl-sarcosinate. Il a ainsi été possible de séparer les protéines des glycoprotéines. La nucléotide pyrophosphatase, de masse moléculaire 130.000, est de nature glycoprotéinique.

Il paraît probable que cet enzyme ne soit pas associé aux phospholipides car EVANS et GURD (44) montrent qu'une faible proportion seulement de ces composés pénètrent à l'intérieur du gradient et d'autre part que la nucléotide pyrophosphatase migre plus loin dans le gel que la 5'nucléotidase qui ne s'associe pas aux phospholipides.

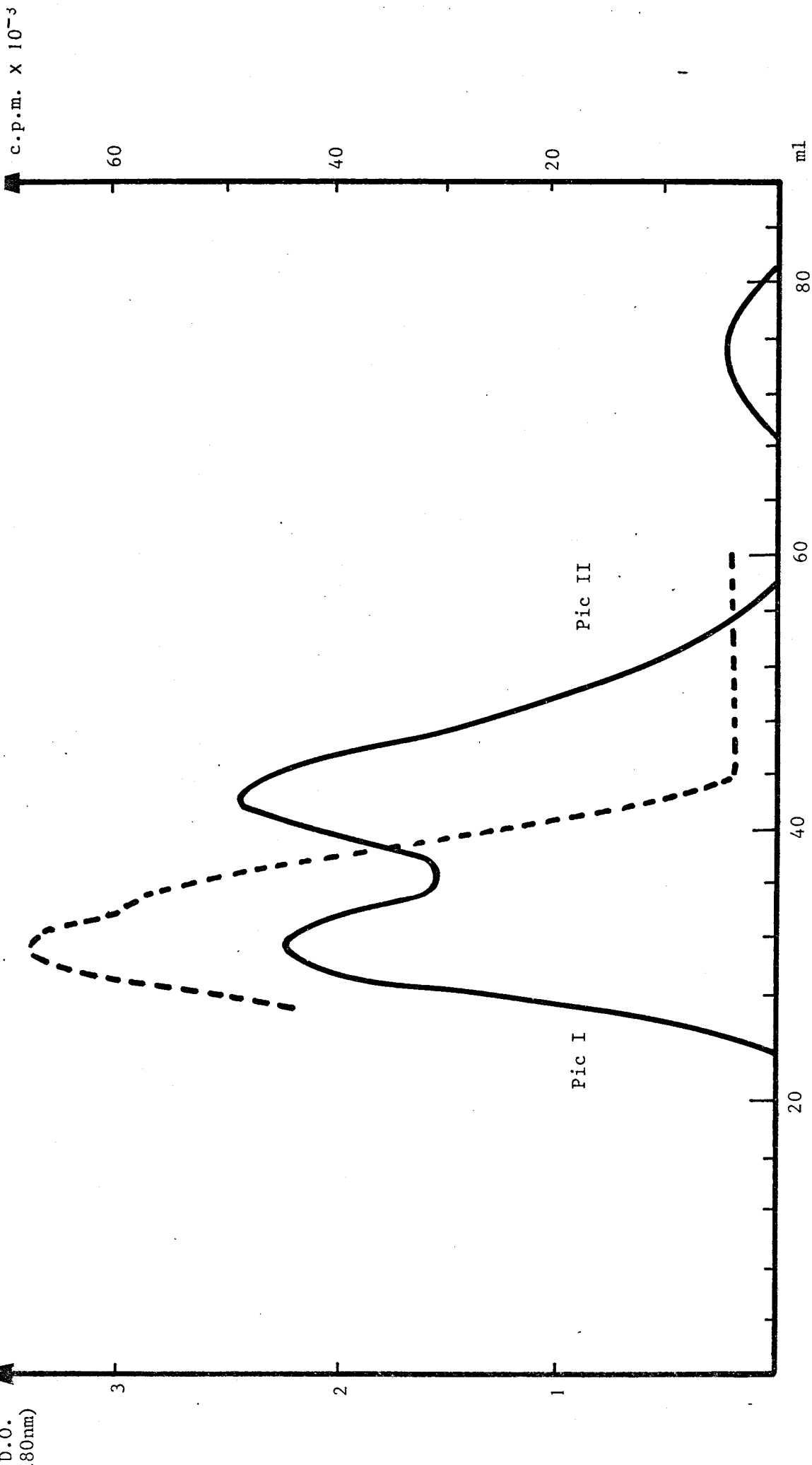


FIGURE 3

MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DE L'UDP-Gal AU NIVEAU DU PIC I - DU FRACTIONNEMENT DU SERUM SUR SEPHADEX G 100.

— Densité optique à 280 nm

- - - - - Radioactivité en c.p.m. 10<sup>-3</sup>



Des essais de solubilisation par la trypsine, de la nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques et du réticulum endoplasmique du foie de Rat ont été entrepris en 1975 par BISCHOFF et al. (22), il n'y a pas, dans ces conditions, de modification apparente des propriétés catalytiques. Des purifications de l'ordre de 2.000 fois ont été obtenues après passage sur DEAE-cellulose, chromatographie d'affinité avec l'AMP comme ligand, passage sur Sephadex G 200 et électrophorèse en gel de polyacrylamide. La nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques, et celle du réticulum endoplasmique ont été isolées et se présentent en électrophorèse, comme des protéines solubles, homogènes, avec des mobilités identiques à 3 pH différents.

La technique utilisée par ABNEY et al. (16) fait intervenir l'action lactoperoxydasique et le marquage à l'iode  $^{125}\text{I}$  de la surface des cellules de la rate de souris et des lymphocytes de thymus. Les extraits cellulaires, obtenus par l'action de détergents, sont mélangés à un antisérum purifié anti-nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques du foie de souris et les immuno-précipités sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Un seul composé majeur radioactif a été obtenu, sa masse moléculaire est comprise entre 110 et 130.000.

### III - PURIFICATION DE LA NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASE DES MICROSOMES

La solubilisation de la fraction microsomale du foie de Rat a été réalisée en présence de Triton X 100, indispensable pour éviter l'aggrégation des protéines, et la purification de l'UDP-Glc pyrophosphatase a été effectuée par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose, par filtration, sur gel de Sepharose-4 B et enfin par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide, en présence de SDS 0,1 p. 100 (21). La préparation a ainsi été purifiée 176 fois.

TRAN-THI et al. (20) ont obtenu récemment, sous forme homogène la NAD pyrophosphatase du réticulum endoplasmique et celle des membranes plasmiques du foie de Rat. Leurs propriétés physico-chimiques, biochimiques et immunologiques sont presque identiques, de plus, elles sont l'une comme l'autre associées à de larges fragments de membranes (22).

#### IV - PURIFICATION DE LA NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASE DES NOYAUX

L'UDP-GlcAU pyrophosphatase des noyaux et celle des microsomes du foie de Rat ont été soumises aux mêmes procédés de purification par LAU et WONG (30). La solubilisation par le Triton X 100 des fractions cellulaires obtenues par centrifugation différentielle ont été suivies de chromatographies sur DEAE-cellulose et Sepharose-4 B. L'enzyme des noyaux et celui des microsomes possèdent en commun de nombreuses propriétés : mêmes courbes d'élution à la sortie des colonnes, pH optimum de 9,4, inhibition par différents nucléotides et l'EDTA, affinité vis-à-vis de l'UDP-GlcAU et du NAD. Ces auteurs concluent qu'il s'agit d'un seul et même enzyme qui provient d'une contamination par la nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques.

#### V - CONCLUSIONS

BISCHOFF et al. (22) puis TRAN-THI et al. (20) démontrent que la NAD pyrophosphatase des membranes plasmiques du foie de Rat est identique à celle du réticulum endoplasmique tandis que LAU et WONG (30) démontrent que l'UDP-GlcAU pyrophosphatase des noyaux est la même que celle du réticulum endoplasmique, nous pouvons donc conclure que s'il n'y a pas de spécificité étroite de l'enzyme vis-à-vis du substrat utilisé, les activités au niveau des membranes plasmiques, microsomes et noyaux sont identiques. Il se peut aussi que l'enzyme retrouvé dans le milieu biologique provienne également des membranes plasmiques.



ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES ENZYMATIQUES  
DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES

Des études ont été entreprises afin de préciser les conditions optimales d'action des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases, elles concernent l'analyse du pH optimum d'action, de la stabilité à la température et des effecteurs.

Nous différencierons dans notre exposé les activités glycosyl-nucléoside-diphosphate pyrophosphatasiques et les activités glycosyl-nucléoside-monophosphate hydrolasiques.

I - ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES DES GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASES

A - VALEURS DU pH OPTIMUM D'ACTIVITE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES

Les valeurs optimales de pH obtenues par différents auteurs pour l'activité des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases de milieux biologiques, de différentes fractions cellulaires et de différentes cultures de cellules ont été rassemblées dans le tableau 8 p. 32. Ces valeurs varient dans tous les cas entre 8 et 9,8 et montrent le caractère alcalin de l'activité de cet enzyme.

Dans le tampon Tris (0,1 M)/HCl et à 10 mM de  $MgCl_2$ , de même que dans le tampon glycine/NaOH, la valeur du pH optimum d'activité de la nucléotide pyrophosphatase est de 9,7. Cette valeur ne change pas lorsqu'on ajoute au tampon glycine/NaOH, 10 mM de  $MgCl_2$  mais l'activité mesurée diminue de 85 p. 100 par rapport à celle trouvée dans les conditions décrites ci-dessus. Il importe donc de comparer l'effet de plusieurs tampons sur la réaction enzymatique et d'analyser l'influence de chaque composé ajouté au milieu d'incubation.

## Valeurs du pH optimum d'activité des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases

Origine	Glycosyl-nucléotides	Autres substrats utilisés	pH optimum	Références
<b>Milieux biologiques</b>				
- Plasma séminal bovin	UDP-Glc		8,9	BROWNLEE et WHEAT (5)
- Sérum humain	UDP-Glc		9,8	HAUGEN et SKREDE (6)
<b>Foie de rat</b>				
- Membranes plasmiques		NAD	9,3 à 9,6	SKIDMORE et TRAMS (13)
- Membranes plasmiques et réticulum endoplasmique	UDP-Glc	NAD	9,7	BISCHOFF <u>et al.</u> (15)
- Microsomes		NAD	9	BACHORIK et DIETRICH (21)
	UDP-GlcAU		8,9	PUHAKAINEN et HANNINEN (23)
- Microsomes et noyaux	UDP-GlcAU		9,4	LAU et WONG (30)
- Noyaux	UDP-Glc		8,5 à 8,8	SCHLIESELFELD <u>et al.</u> (28)
		NAD	8,0 à 8,8	SCHLIESELFELD <u>et al.</u> (28)
<b>Foie de souris</b>				
- Membranes plasmiques	UDP-Gal, UDP-GlcNAc		9,6	EVANS <u>et al.</u> (42)
	UDP-Gal		9,6	ABNEY <u>et al.</u> (16)
<b>Cerveau de mouton</b>	UDP-GlcNAc, UDP-Glc UDP-GlcAU		8,9	PATTABIRAMAN <u>et al.</u> (37)



## B - VALEURS DES Km DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES

A présent, les valeurs de Km des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases que nous connaissons, ne concernent que quelques glycosyl-nucléotides. Les valeurs données dans le tableau 9 p. 34 montrent qu'elles sont comprises entre 1,4 et  $2,4 \times 10^{-4}$  M pour l'UDP-Glc, quelque soit l'origine de l'activité enzymatique, GEREN et EBNER (45) donnent des valeurs plus élevées : 3 à  $8 \times 10^{-4}$  M, entre  $2$  et  $4 \times 10^{-4}$  M pour l'UDP-GlcAU, la valeur la plus forte a été trouvée dans les noyaux par LAU et WONG (30), et entre 3 et 4 pour l'UDP-GlcNAc dans le cerveau de mouton.

Des valeurs de Km et de Vmax relative ont été calculées par BISCHOFF et al. (22) à la fois pour l'UDP-Glc, pour des dinucléotides et des composés possédant plusieurs résidus de phosphate dans leur molécule. Les valeurs de Km de la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques et du réticulum endoplasmique sont approximativement du même ordre de grandeur pour l'UDP-Glc que pour le NAD, le NADH, et la thymidine-5'-p-nitrophényl phosphate. La valeur du Km est nulle pour la thymidine-3'-p-nitrophényl phosphate et presque nulle pour le bis-p-nitrophényl phosphate. Quant aux vitesses maximales d'hydrolyse, elles atteignent les valeurs les plus grandes lorsque le substrat utilisé est la thymidine-5'-p-nitrophényl phosphate, elles deviennent nulles lorsque ce composé est remplacé par la thymidine-3'-p-nitrophényl phosphate, elles sont faibles pour l'ATP et l'UTP.

## C - TEMPERATURE

La plupart des mesures d'activité des glycosyl-nucléotides pyrophosphatases sont effectuées à la température de 37°C.

## D - STABILITE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES

La nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques et du réticulum endoplasmique du foie de Rat est stable en pH alcalin, en présence de 5 mM de  $MgCl_2$  et à 4°C (22). Une inactivation considérable est décelée lorsqu'elle est maintenue à pH inférieur à 6 pendant une courte durée. Elle peut être lyophilisée et conservée sans perte d'activité.

L'UDP-Glc pyrophosphatase du plasma séminal bovin demeure stable après 1 an de congélation (5).

TABLEAU 9

## Valeurs des Km des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases

Origine	Glycosyl-nucléotides	Autres substrats utilisés	Km (10 <sup>-4</sup> M)	Vmax. relative	Références
Milieux biologiques					
- Plasma séminal bovin	UDP-Glc		2,1		BROWNLEE et WHEAT (5)
Foie de Rat					
- Membranes plasmiques	UDP-Glc	NADH	0,89	60	SKIMORE et TRAMS (13)
		Thymidine-5' (pNPP)	2,4	100	BISCHOFF et al. (22)
		Thymidine-3' (pNPP)	1,5	0	
		bis-p-NPP	0	0,6	
		NAD	2,8	27	
		NADH	2,0	40	
		ATP	2,8	4,5	
		UTP	3,0	7	
	UDP-Glc	ATP	3 à 8		DECKER et BISCHOFF (38)
		UTP	3 à 8		
		UTP	3 à 8		
Reticulum endoplasmique					
	UDP-Glc		1,4	60	BISCHOFF et al. (22)
		Thymidine-5' (pNPP)	1,3	100	
		Thymidine-3' (pNPP)	0	0	
		bis-p-NPP	-	0,6	
		NAD	2,4	25,6	
		NADH	1,7	31,2	
		ATP	0,7	5,6	
		UTP	-	-	
	UDP-Glc		1,49		BACHORIK et DIETRICH (21)
	ADP-Ribose		1,89		
		NAD	3,12		
		NADH	0,46		
	UDP-GlcAU		2,1		PUHAKAINEN et HANNINEN (23)
	UDP-GlcAU		2,5		LAU et WONG (30)
Noyaux	UDP-GlcAU		4,0		LAU et WONG (30)
Cerveau de mouton	UDP-GlcNAc		3,25		PATTABIRAMAN et al. (37)



E - EFFECTEURS DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES

1 - Effecteurs des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases des liquides biologiques

a - Plasma séminal bovin

Les ions  $Mg^{++}$  sont des activateurs de l'UDP-Glc pyrophosphatase du plasma séminal bovin ; à la concentration de 20 mM, elle est activée d'un facteur 8 (5), il est important de signaler que dans ce milieu, aucune activité phosphatase n'a été décelée.

Les chlorures de  $Ni^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Ca^{++}$  et  $Mn^{++}$  ne sont que de faibles activateurs de cet enzyme, les chlorures de  $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Fe^{++}$  et  $Fe^{+++}$  n'ont aucune activité.

L'EDTA a une action fortement inhibitrice.

b - Sérum

HAUGEN et SKREDE (6) montrent que les ions  $Mg^{++}$  activent peu l'UDP-Glc pyrophosphatase du sérum mais favorisent la dégradation chimique de l'UDP-Glc à pH supérieur à 9,5 ; ils préconisent donc de ne pas utiliser d'ions divalents, à cause de la difficulté d'évaluer cette dégradation non enzymatique.

2 - Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques du foie de Rat

a - Composés sans effet

Les ions  $Mg^{++}$  à la concentration de 0 à 10 mM et les ions  $Co^{++}$  à la concentration de 0 à 1 mM à pH 7,5 ou 9,6, n'ont aucun effet sur la NAD pyrophosphatase des membranes plasmiques du foie de Rat, qui possède une activité sur l'UDP-Glc (13).

b - Activateurs

Le phosphate inorganique (20 mM) produit une légère activation de la NAD pyrophosphatase des membranes plasmiques du foie de Rat. Celle-ci reste inexploquée (13).

c - Inhibiteurs

La nicotinamide (100 mM) et le PPI (10 mM) inhibent la NAD pyrophosphatase des membranes plasmiques du foie de Rat à 50 p. 100 (13). D'autre part, l'UDP-Glc, le CoA et le NAD inhibent compétitivement la NADH pyrophosphatase, ce qui laisse supposer que ces différents composés sont des substrats pour le même enzyme.

Une préincubation de cet enzyme pendant 5 mn, en présence d'EDTA (1 mM) produit une inhibition de l'ordre de 80 p. 100.

3 - Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques et du réticulum endoplasmique du foie de Rat

a - Activateurs

BISCHOFF et al. (22), en 1975, contrairement à SKIDMORE ET TRAMS (13) démontrent que la NAD-pyrophosphatase des membranes plasmiques et celle du réticulum endoplasmique du foie de Rat nécessitent la présence d'ions  $Mg^{++}$  ou  $Ca^{++}$ , les besoins en ions divalents sont identiques pour les 2 enzymes.

b - Inhibiteurs

L'EDTA est un puissant inhibiteur des activités mentionnées ci-dessus.

4 - Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase au niveau des microsomes du foie de Rat

a - Composés sans effet

BACHORIK et DIETRICH (21) montrent en 1972 que les ions  $Mg^{++}$ , à la concentration de  $10^{-3}M$  sont des activateurs de l'UDP-Glc pyrophosphatase de la fraction microsomale du foie de Rat. En 1975, MOOKERJEA et YUNG (3) démontrent que les ions  $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  et  $Ca^{++}$  n'ont aucun effet sur l'UDP-Gal pyrophosphatase de la même fraction.

L'UMP, le CMP et le CDP n'ont aucun effet.

b - Inhibiteurs

La NADH pyrophosphatase de la fraction microsomale du foie de Rat est inhibée de manière compétitive par l'UDP-Glc et l'ADP-ribose (21).

A 10 mM d'EDTA, PUHAKAINEN et HÄNNINEN (23) montrent que l'UDP-GlcAU pyrophosphatase conserve 25 p. 100 de son activité.

Lorsque le tampon Tris/HCl est remplacé par du tampon citrate ou phosphate, la dégradation de l'UDP-GlcAU est réduite (23).

L'effet des nucléotides cycliques : AMPc et GMPc sur l'UDP-Gal pyrophosphatase de la fraction microsomale du foie de Rat a été étudié au Laboratoire par DEBEIRE (46). Ses résultats nous montrent que ces composés agissent directement sur l'UDP-Gal pyrophosphatase en l'inhibant et en prolongeant ainsi la durée de vie du précurseur glycosyl-nucléotidique qui servira de substrat pour la galactosyltransférase, ce qui explique l'augmentation du taux de transfert. De plus, les effets de l'AMPc et du GMPc sont comparables, ils ne sont pas dans ce cas antagonistes selon l'hypothèse de GOLDSBERG (47).

En outre, il est intéressant de noter que le di-butyryl AMPc n'a aucun effet de protection du glycosyl-nucléotide et ne stimule pas l'activité galactosyltransférase.

#### 5 - Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase des noyaux et des microsomes du foie de Rat

LAU et WONG (30) ont étudié l'effet de différents composés sur l'UDP-GlcAU pyrophosphatase des noyaux et sur celle des microsomes. Les résultats donnés dans le tableau 10 p. 38 montrent que les taux d'inhibition pour l'une et l'autre fraction sont du même ordre de grandeur et que le GlcAU-1P et le GlcAU ne sont pratiquement pas des inhibiteurs à la concentration de 0,3 M. L'UDP-Glc a un effet inhibiteur moins important que le GDP-Glc qui a lui-même un effet plus faible que le CDP-Glc, ce qui nous permet de signaler l'importance de la partie nucléotidique des glycosyl-nucléotides dans les phénomènes d'inhibition.

#### 6 - Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase des noyaux du foie de Rat

##### a - Activateurs

Les ions  $Mg^{++}$  et les ions  $Co^{++}$  sont des activateurs de l'UDP-GlcAU pyrophosphatase des noyaux du foie de Rat (29). La concentration optimale en ions  $Mg^{++}$  est comprise entre 10 et 15 mM, celle en ions  $Co^{++}$  est de 0,21 mM. Il faut noter cependant que cet enzyme fonctionne en l'absence d'ions divalents.

TABLEAU 10

Action de différents effecteurs sur l'UDP-GlcAU pyrophosphatase des noyaux et des microsomes du foie de Rat selon LAU et WONG (30).

(La concentration utilisée en UDP-GlcAU est de 0,14 mM, celle de chacun des inhibiteurs est de 0,3 M).

Inhibiteur	Inhibition d'activité en p. 100	
	Noyaux	Microsomes
GlcAU	2	0
GlcAU-1 P	2	0
Uridine	8	14
UMP	26	28
UDP	48	75
ADP	81	89
ATP	84	82
GDP-Glc	73	58
CDP-Glc	60	49
UDP-Glc	17	18
UDP-Gal	22	24
UDP-GlcNAC	13	13
Nicotinamide	1	3
NAD	59	68
NADH	83	71
NADP	39	51
NADPH	80	69
Ac. L. ascorbique	0	0
MgCl <sub>2</sub>	4	5
EDTA	85	100





## b - Inhibiteurs

L'activité de l'UDP-Glc pyrophosphatase des noyaux du foie de Rat est inhibée par l'UDP-GlcAU, la nicotinamide, le NAD, le NADP, le 5'AMP, l'ADP, l'ATP et l'UTP. L'inhibition de cet enzyme par le 5'AMP et la nicotinamide est de type compétitif. L'ADP, l'ATP et l'UTP sont des inhibiteurs non compétitifs (29).

Le glycolle est aussi un inhibiteur de cette activité. Quant à l'EDTA, il inhibe fortement mais non complètement cette activité.

## 7 - Effecteurs de la nucléotide pyrophosphatase du cerveau de Mouton

### a - Composés sans effet

Les ions  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  et  $Ni^{++}$  n'ont aucun effet sur l'UDP-GlcNac pyrophosphatase présente au niveau du cerveau de Mouton (37).

### b - Activateurs

Les ions  $Co^{++}$  et  $Mn^{++}$  sont des activateurs de l'enzyme décrit ci-dessus, ils augmentent son activité respectivement d'un facteur 3 et d'un facteur 2.

### c - Inhibiteurs

Les inhibiteurs de l'UDP-GlcNac pyrophosphatase présente au niveau du cerveau de mouton sont donnés dans le tableau 11 p. 40. Les résultats obtenus, montrent que la plupart des composés utilisés sont fortement inhibiteurs lorsqu'ils sont employés à la concentration de  $10^{-3}M$  (37), cependant, à cette même concentration, en présence de GlcNac-1P on ne retrouve que 9 p. 100 de l'activité totale, si le GlcNac-6P remplace le GlcNac-1P, l'activité mesurée est alors de 90 p. 100, autrement dit, l'inhibition varie suivant la position du phosphate sur le monosaccharide.

Certains ions sont de puissants inhibiteurs de cette activité : ce sont les ions  $Mg^{++}$ ,  $Cu^{++}$  et  $Zn^{++}$ .

L'EDTA, à la concentration de  $2 \times 10^{-3}M$  produit une inhibition de 70 p. 100.

TABLEAU 11

Effet de différents glycosyl-nucléotides, nucléotides et monosaccharides-phosphates sur l'UDP-GlcNAc pyrophosphatase du cerveau de mouton. Selon PATTABIRAMAN et al. (37)

Composés ajoutés	Concentrations (M)			% d'activité
Aucun			0	100
UDP-GlcAU	10 <sup>-3</sup>			47
UDP-Glc	10 <sup>-3</sup>			53
NAD	10 <sup>-3</sup>			60
NADP	10 <sup>-3</sup>			65
ATP	10 <sup>-3</sup>			4
ATP		10 <sup>-4</sup>		22
ATP			5 x 10 <sup>-5</sup>	34
ATP			2 x 10 <sup>-5</sup>	51
UTP	10 <sup>-3</sup>			4
UTP		10 <sup>-4</sup>		33
UTP			5 x 10 <sup>-5</sup>	50
UTP			2 x 10 <sup>-5</sup>	66
GTP		10 <sup>-4</sup>		72
CTP		10 <sup>-4</sup>		54
ITP		10 <sup>-4</sup>		77
ADP	10 <sup>-3</sup>			11
ADP		10 <sup>-4</sup>		28
UDP	10 <sup>-3</sup>			14
UDP		10 <sup>-4</sup>		30
AMP	10 <sup>-3</sup>			41
UMP	10 <sup>-3</sup>			98
GlcNAc-1 P	10 <sup>-3</sup>			9
GlcNAc-1 P		5 x 10 <sup>-4</sup>		48
GlcNAc-6 P	10 <sup>-3</sup>			90



## 8 - Conclusions

Les effets de nombreux activateurs et inhibiteurs ont été analysés sur les glycosyl-nucléotide-diphosphate pyrophosphatases et les résultats obtenus sont quelque fois contradictoires. Il importe en fait de considérer l'origine de l'enzyme, sa concentration et celle de l'effecteur utilisée par l'auteur, d'autre part, de prendre garde aux effets indirects que peuvent avoir ces effecteurs sur l'activité enzymatique mesurée.

## II - ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES DES GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES

### A - VALEURS DU pH OPTIMUM D'ACTIVITÉ DES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES

En 1969, SHOYAB et BACHHAWAT (33) trouvent un pH optimal de 9,0 pour la CMP-ANAN hydrolase du foie de mouton. Ce résultat est retrouvé en 1974 par KEAN et BIGHOUSE (34) au niveau du foie de Rat et de mouton, et en 1976 par VAN DIJK et al. (35) au niveau du rein de veau. Ces derniers auteurs signalent que ce pH est aussi élevé que celui donné pour les nucléotides pyrophosphatases (13 - 14 - 22 - 38 - 42).

### B - VALEURS DES Km DES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES

VAN DIJK et al. (35) en 1976, donnent une valeur de Km de  $0,47 \pm 0,21$  mM pour la CMP-ANAN hydrolase du rein de veau. Cette valeur est en accord avec celle donnée par KEAN et BIGHOUSE (34) : 0,41 à 0,58 mM pour le foie de Rat. Cependant ces valeurs sont 5 à 6 fois plus élevées que celle obtenues par SHOYAB et BACHHAWAT (33) pour le foie de mouton.

### C - TEMPERATURE

La CMP-ANAN hydrolase du rein de veau présente un maximum d'activité à 45°C (35).

### D - STABILITÉ

La CMP-ANAN hydrolase est stable à - 20°C (34). Des congélations et décongélations successives n'entraînent pas ou seulement une légère perte d'activité.

A haute température, elle est très labile.

## E - EFFECTEURS DES GLYCOSYL-NUCLEOSIDE-MONOPHOSPHATE HYDROLASES

KEAN et BIGHOUSE (34) ont étudié l'inhibition de la CMP-ANAN hydrolase du foie de Rat par quelques nucléosides, bases libres et phosphates. Les résultats détaillés dans le tableau 12 p. 44 montrent que l'inhibition se produit lorsque le monosaccharide est attaché à la base, celle-ci augmente avec le degré de phosphorylation. De fortes concentrations de ces composés produisent des inhibitions élevées.

Le CMP produit une inhibition presque totale, lorsqu'il est utilisé à une concentration égale à celle du substrat (3 mM). Les bases libres, l'uracile et la cytosine n'ont pas d'effet sur la CMP-ANAN hydrolase, l'AMPc et le CMPc peu d'effet.

Si le Pi, utilisé à une concentration qui produit une légère inhibition est remplacé par le PPi, à la même concentration (6,5 mM), l'inhibition devient très importante.

Les monosaccharides : Man, Gal, GlcNAc ou leurs dérivés-1P (0,86 mM) n'ont aucun effet, de même que l'acide sialique.

Ces mêmes auteurs ont analysé l'effet de glycosyl-nucléotides sur cette même activité. Les résultats donnés dans le tableau 13 p. 45 montrent que tous les glycosyl-nucléotides produisent une inhibition comprise entre 60 et 90 p. 100, des résultats identiques ont été trouvés par VAN DIJK et al. (35) avec la CMP-ANAN hydrolase du rein de veau. Puis, ils ont entrepris une étude sur les effets des groupements sulfhydryls réduits et oxydés et des composés à groupement SH. Les résultats exposés dans le tableau 14 p. 46 montrent que les composés à groupement sulfhydryl inhibent l'activité de la CMP-ANAN hydrolase, mais il faut des quantités élevées de ces composés pour obtenir une inhibition semblable à celle obtenue avec les nucléotides-sucres ou les nucléosides-phosphates. Les composés réduits sont de puissants inhibiteurs.

L'incubation dûe à l'EDTA suggère l'existence de métaux comme groupement prosthétique. D'autre part, le fait que des composés à groupement sulfhydryl, exogènes inhibent cet enzyme, suggère qu'un métal joue un rôle essentiel.

VAN DIJK et al., en 1976 (35) ont repris l'étude des nucléotides sur la CMP-ANAN hydrolase du rein de veau. Les résultats donnés dans le tableau 15 p. 47 montrent que l'action inhibitrice de ces différents composés devient plus

expressive lorsque la préparation enzymatique est incubée en présence de faibles concentrations de CMP-ANAN (0,35 mM) plutôt qu'en présence de concentrations maximales (3,9 mM). Comme précédemment, l'inhibition augmente lorsque l'on utilise de fortes concentrations en nucléotides. A 3,9 mM en CMP-ANAN, le degré d'inhibition augmente dans l'ordre : nucléoside, nucléoside mono, di et triphosphate. A des concentrations plus faibles en CMP-ANAN, cet effet est seulement observé avec les dérivés de l'adénosine. Le CMP produit une inhibition de 40 p. 100 lorsque le CMP-ANAN est utilisé à de faibles concentrations, mais reste sans effet si le CMP-ANAN est utilisé à de fortes concentrations.

VAN DIJK et al. (35) ont enfin analysé l'action de quelques autres effecteurs. Les résultats donnés dans le tableau 16 p. 48 montrent qu'il y a une stimulation par les ions  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  et le Triton X 100, inhibition par l'EDTA et le  $\beta$ -mercaptoéthanol.

De faibles concentrations en ions  $\text{Mn}^{++}$  inhibent l'enzyme, ce résultat est différent de celui décrit par SCHOYAB et BACHHAWAT (33).

Quelle que soit l'origine des glycosyl-nucléoside-monophosphate hydrolases, elles sont inhibées par les glycosyl-nucléosides-diphosphates, par les nucléosides-mono ou polyphosphorylés et par l'EDTA. Il importe de remarquer que les inhibiteurs des CMP-ANAN hydrolases sont aussi des inhibiteurs des nucléotides pyrophosphatases.

TABLEAU 12

Inhibition de la CMP-ANAN hydrolase du foie de Rat par quelques nucléosides, bases libres et phosphates selon KEAN et BIGHOUSE (34).

(Le CMP- $^{14}\text{C}$  ANAN (3,0 mM) est incubé en présence des composés non marqués pendant 15 mn, en présence de membranes plasmiques (0,025 à 0,063 mg de protéines/tube)).

Composés ajoutés	Concentration (mM)	Inhibition %
Uracile	0,86	0
Uracile	0,86	7,5
UMP	0,86	26
UDP	0,86	76
UTP	0,86	83
UDP-Gal	0,86	31
Cytosine	0,86	1,0
Cytidine	0,86	6,9
CMP	0,86	37
CDP	0,86	64
CTP	0,86	84
CMP cyclique	3,25	3
AMP cyclique	3,25	19
CMP	3,8	96
Pi	6,5	5
PPi	6,5	82
PPi	0,86	41



TABLEAU 13

Inhibition de la CMP-ANAN hydrolase du foie de Rat par les glycosyl-nucléotides selon KEAN et BIGHOUSE (34).

(Le CMP- $^{14}\text{C}$  ANAN (3,2 mM) est incubé en présence de glycosyl-nucléotides (2,9 mM) pendant 20 mn avec l'enzyme purifié des membranes plasmiques (0,053 mg de protéines/tube).

Glycosyl-nucléotides	Inhibition %
UDP-Glc	70
UDP-Gal	66
UDP-GalAU	79
UDP-GlcAU	76
UDP-Man	61
UDP-GlcNAc	58
GDP-Man	85
GDP-Glc	83
TDP-Glc	74



TABLEAU 14

Effet des groupements sulfhydryls réduits et oxydés, et des composés à groupement SH sur l'activité de la CMP-ANAN hydrolase du foie de Rat selon KEAN et BIGHOUSE (34).

(Les composés indiqués sont incubés avec du CMP- $^{14}\text{C}$  ANAN (3,0 mM) en présence de membranes plasmiques (0,038 mg de protéines/tube)).

Composés ajoutés	Inhibition %
Groupements sulfhydryls réduits et oxydés (25 mM)	
- Glutathion réduit	62
- Glutathion oxydé	15
- Dithiothréitol réduit	84
- Dithiothréitol oxydé	0
- Cystéine	80
- S-éthylcystéine	0
- Mercaptoéthanol	46
Composés à groupement SH (2,5 mM)	
- N-éthylmaléimide	5,8
- 5,5'-Dithiobis	16,3
- p-chloromercuribenzoate	7,2
- Iodoacétamide	0,0





TABLEAU 15

Effet des nucléotides et des glycosyl-nucléotides sur la CMP-ANAN hydrolase du rein de veau selon VAN DIJK et al. (35).

Composés ajoutés	Concentration (mM)	Activité enzymatique résiduelle par rapport au contrôle	
		CMP-ANAN 0,35 mM	CMP-ANAN 3,9 mM
Contrôle	-	100	100
ATP	0,5	51	75
	1,0	-	63
CTP	0,5	52	91
	1,0	-	65
GTP	0,5	-	98
	1,0	-	64
ADP	0,5	75	78
	1,0	-	77
CDP	0,5	48	87
	1,0	-	53
AMP	0,5	70	83
	1,0	-	82
CMP	0,5	56	95
	1,0	-	95
AMPc	0,5	59	82
	1,0	-	89
Cytidine	0,5	56	108
	1,0	-	101
UDP-Gal	0,5	77	84
	1,0	65	67
UDP-GlcNAc	0,5	82	90
	1,0	56	80



TABLEAU 16

Effet de différents effecteurs sur la CMP-ANAN hydrolase du rein de veau selon VAN DIJK et al. (35).

Composés ajoutés	Activité enzymatique %
Contrôle	100
1 % Triton X 100	137
5 mM Ca <sup>++</sup>	150
5 mM Ca <sup>++</sup> + 1 % Triton X 100	176
5 mM Mg <sup>++</sup>	133
5 mM Mg <sup>++</sup> + 1 % Triton X 100	165
1 mM Mn <sup>++</sup>	90
5 mM Mn <sup>++</sup>	98
5 mM Mn <sup>++</sup> + 1 % Triton X 100	132
1 mM Zn <sup>++</sup>	90
1 mM Ni <sup>++</sup>	13
0,1 mM EDTA	91
1,0 mM EDTA	1
1 mM β-mercaptoethanol	78
5 mM β-mercaptoethanol	40



## ELEMENTS DE STRUCTURE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES

Nous ne possédons que quelques renseignements concernant la composition des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases.

La composition de la nucléotide pyrophosphatase-phosphodiesterase des membranes plasmiques du foie de Souris a été étudiée par EVANS et al. (42) en 1973, elle est de nature glycoprotéinique.

L'analyse des acides aminés donnés dans le tableau 17 p. 50 montre que les acides aminés polaires : acide aspartique, acide glutamique, lysine, sérine, arginine, thréonine, histidine constituent 49 p. 100 de la glycoprotéine totale, qui possède une polarité plus grande que les autres protéines de membranes (48). De plus, il n'y a pas de résidus de cystéine, ni de cystine, et la présence de groupements thiols ne peut pas être exclue à présent.

L'analyse quantitative de cette glycoprotéine à l'antrone montre qu'elle contient 5 p. 100 de sucres neutres. L'analyse des monosaccharides aminés révèle la présence de glucosamine, mais l'absence de galactosamine. L'existence d'acide sialique permet de dire qu'il s'agit d'une sialoglycoprotéine, son poids moléculaire d'après EVANS (42) est de 130.000.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide des membranes plasmiques et du réticulum endoplasmique, réalisées en présence de SDS ont permis d'obtenir une seule bande correspondant à l'activité nucléotide pyrophosphatase. Le poids moléculaire de l'enzyme de l'une et l'autre origine est évaluée à 137.000 (22).

TABLEAU 17

Composition en acides aminés et en monosaccharides de la nucléotide pyrophosphatase des membranes plasmiques de Souris selon EVANS (42)

Acides aminés	Nombre de résidus
Lys	96
Arg	85
His	33
Asp	110
Thr	62
Ser	69
Glu	167
Pro	61
Gly	59
Ala	75
Val	70
Met	24
Ileu	69
Leu	130
Tyr	48
Phé	70
Monosaccharides	Nombre de résidus
GlcNH <sub>2</sub>	51
NANA	22

REGULATION ENTRE LES ACTIVITES GLYCOSYL-  
NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASIQUES ET  
GLYCOSYLTRANSFERASIQUES

Des études préalables ont montré que la réaction de transfert du galactose sur des accepteurs, à partir de l'UDP-Gal, ainsi que la réaction de dégradation de ce glycosyl-nucléotide en Gal-1 P et en UMP et la réaction de dégradation du Gal-1 P en Gal se produisaient simultanément ( 7 - 49 - 50 - 51 - 52 ). Ces 3 réactions peuvent jouer un rôle régulateur dans la biosynthèse des glycoprotéines et des glycolipides ( 53 ).

C'est ce rôle régulateur que nous allons décrire au niveau de différents milieux biologiques et de différentes fractions cellulaires.

I - RÉGULATION ENTRE LES ACTIVITÉS GLYCOSYL-NUCLÉOSIDE-DIPHOSPHATE  
PYROPHOSPHATASIQUES ET GLYCOSYLTRANSFÉRASIQUES

A - AU NIVEAU DES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Une forte activité galactosyltransférase a été mise en évidence dans les liquides ascitiques et dans les sérums de Souris porteuses du lymphome YC-8 ( 54 ). Des expériences récentes ont permis de détecter la présence de cette activité dans les surnageants des lymphocytes de Souris porteuses de la tumeur YC-8 et son absence dans les surnageants de lymphocytes normaux ( 10 ). Il est peu probable que le transfert puisse s'effectuer à partir du galactose libre, d'autant que dans les milieux ascitiques, l'UDP-Gal n'est pas hydrolysé. L'activité galactosyltransférase n'implique donc pas la nécessité d'une dégradation du précurseur glyco-nucléotidique, cependant, lorsque ces 2 activités sont en présence, elles provoquent une disparition plus rapide du précurseur dans le milieu.

B - AU NIVEAU DES CULTURES DE CELLULES

SELA et al. ( 8 ) expliquent les différences de catabolisme des glycosyl-nucléotides des cellules normales et transformées de Hamster par des différences d'activité de transfert sur des accepteurs cellulaires.

Afin d'obtenir un transfert maximal de galactose sur les gangliosides, en présence de cellules d'embryon de Souris Balb/c 3T3 en culture, COLEMAN et al. ( 26) remarquent qu'il est nécessaire de travailler à un pH de 5,3 pour réduire l'activité de l'UDP-Gal pyrophosphatase dont le pH optimum d'activité est de 7,8.

L'incorporation de galactose radioactif sur la fraction acido-précipitable des cellules du rein de Hamster augmente parallèlement à la quantité de galactose produite par dégradation de l'UDP-Gal pendant l'incubation ( 7 ). Ceci suggère que la plus grande partie, sinon la totalité de l'incorporation s'est produite après la pénétration du galactose dans les cellules puisque les membranes plasmiques sont imperméables à la fois à l'UDP-Gal et au Gal-1 P. Dans ce cas, l'activité de transfert dépend de l'activité nucléotide pyrophosphatasique.

#### C - AU NIVEAU D'ORGANES

Certaines hormones jouent un rôle dans la régulation de la biosynthèse des glycoprotéines.

L'oestradiol augmente par exemple, la synthèse et l'utilisation des glycosyl-nucléotides ( 55) ainsi que le taux de glycoprotéines et de glycosaminoglycannes, au niveau de l'utérus de lapins ayant subi une ablation d'ovaires ( 56 ).

De même, l'administration d'oestradiol à des Rats ayant subi une ablation d'ovaires, augmente fortement les activités galactosyl et sialyl-transférasiques au niveau de l'endomètre ( 57 ). En fait, l'ablation des ovaires a pour effet d'augmenter de 2 fois l'activité UDP-Gal pyrophosphatasique de l'endomètre et l'administration d'oestradiol entraîne une diminution de cette activité ( 43 ). Les variations d'activité de cette nucléotide pyrophosphatase peuvent influencer directement la biosynthèse des glycoprotéines dans la cellule ( 7 - 8 - 50 - 51 ).

La régulation de l'UDP-Gal pyrophosphatase par les hormones ovariennes suggère que cet enzyme puisse jouer un rôle dans la maintien d'une certaine réserve de glycosyl-nucléotides au niveau de l'endomètre. C'est cette réserve qui permettra l'augmentation de synthèse des glycoprotéines et des glycosamino-glycannes. L'effet de l'oestradiol est annulé par la progestérone. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par ENDO et YOSIZAWA ( 55 - 56 )

au niveau de l'utérus de lapin.

Quant à la CDP-Choline, elle a pour effet de bloquer l'activité UDP-Gal pyrophosphatasique de l'endomètre de Rat, et donc de protéger l'UDP-Gal, il en résulte une augmentation de la vitesse de transfert du galactose sur ces accepteurs (57).

#### D - AU NIVEAU DES HOMOGENATS CELLULAIRES

De grandes différences dans les mesures d'activité des glucuronyl-transférases de différents animaux ont été observées par plusieurs auteurs (58 - 59 - 60) ; elles sont dûes à la présence d'une nucléotide-pyrophosphatase très active dans les conditions de transfert et non à la présence d'une  $\beta$ -glucuronidase, très peu active dans les mêmes conditions.

Pour différentes espèces animales étudiées, les activités UDP-GlcAU pyrophosphatasiques mesurées dans les homogénats de foie décroissent dans l'ordre suivant : rat, souris, singe, lapin et cobaye. Au niveau du foie de Cobaye, l'activité de transglucuronidation est très importante et l'activité UDP-GlcAU pyrophosphatasique très faible ; chez le Rat, c'est l'inverse alors que chez la Souris et le Lapin, les valeurs sont intermédiaires. Il existe donc des relations entre ces 2 activités enzymatiques dans les différentes espèces animales considérées. Sur ces bases, la forte activité pyrophosphatasique de l'homogénat de rein de Rat peut expliquer le faible taux de transglucuronidation (61).

L'EDTA provoque une inhibition de l'UDP-GlcAU pyrophosphatase, et simultanément une activation de l'enzyme de transfert qui est d'autant plus forte que l'activité pyrophosphatasique est plus grande avant l'inhibition. Des préincubations avec de l'EDTA apportent clairement la preuve que le transfert est accru à cause de l'inhibition de la pyrophosphatase et non à cause de d'une activation directe du transfert. En conséquence, il est nécessaire de bloquer l'UDP-GlcAU pyrophosphatase par de l'EDTA (10 mM) pour mesurer les activités glucuronyltransférases. Les effets de l'EDTA et de l'ATP sur ces 2 activités au niveau des homogénats de foie de Rat et de Souris sont donnés dans les tableaux 19 et 20 p. 55. Nous remarquons tout d'abord qu'il est nécessaire d'incuber les préparations en présence d'EDTA (10 mM) et d'ATP (0,36 mM) pour obtenir une inhibition totale de l'UDP-GlcAU pyrophosphatase de l'homogénat du foie de Rat qui est très active ; dans ces conditions, il n'y a pratiquement pas

d'activation de la glucuronyltransférase. Lorsqu'une préincubation est effectuée avec ces mêmes composés, l'activité glucuronyltransférasique est augmentée de 2 à 3 fois. Cette augmentation n'est pas décelée au niveau de l'homogénat du foie de Souris, ce qui peut s'expliquer par le fait que dans ce cas, l'UDP-GlcAU pyrophosphatase est peu active et donc ne détruit pas la totalité du substrat de la transférase.

KIRSCHBAUM et BOSMANN ( 62 ) ont montré que l'acide folique augmentait l'activité de plusieurs glycosyl transférases, entre autres, celle des galactosyltransférases du rein et du foie de Rat. En utilisant une préparation de galactosyltransférase, isolée du lait, GEREN et EBNER ( 45 ) démontrent qu'en fait l'acide folique n'active pas la galactosyltransférase mais inhibe la pyrophosphatase. Les accepteurs de galactose utilisés sont la fêtuine et la N-acétyl-glucosamine. Lorsque l'acide folique est utilisé à la concentration de 1,4 mM ou l'AMP à la concentration de 5 mM, il y a augmentation du transfert de galactose si l'UDP-Gal est employé à la concentration de 1,5  $\mu$ M, celle-ci est nulle si cette concentration passe à 0,6 mM. La vitesse maximale de l'UDP-Gal pyrophosphatase est environ 100 fois plus élevée que celle de la galactosyltransférase, bien que leurs Km soient comparables.

Pour GEREN et EBNER ( 45 ), la nucléotide pyrophosphatase coupe la liaison pyrophosphate des glycosyl-nucléotides mais n'hydrolyserait pas rapidement le CMP-ANAN, c'est ainsi qu'ils expliquent que KIRSCHBAUM et BOSMANN ( 62 ) n'observent pas d'augmentation de l'activité sialyltransférasique en présence d'acide folique.

#### E - AU NIVEAU DES MEMBRANES

Les nucléotide pyrophosphatases et les glycosyl transférases sont des enzymes présents au niveau des cytomembranes, ils exercent des actions concertées sur les glycosyl-nucléotides pour qu'il y ait un contrôle des réactions de glycosylation des protéines et des lipides ( 3 ). Le taux cellulaire de glycosyl-nucléotide serait contrôlé d'une part, par un mécanisme de feedback, comme l'a démontré KORNFELD ( 53 ), selon le schéma 1 p. 56, et d'autre part, par la nucléotide pyrophosphatase qui empêcherait l'accumulation excessive des précurseurs glyco-nucléotidiques.



TABLEAU 19

Action de l'EDTA et de l'ATP sur les activités UDP-GlcAU pyrophosphatasiques et glucuronyltransférasiques de l'homogénat de foie de Rat. Selon WONG et LAU (61).

Inhibiteurs	Inhibition de l'UDP-GlcAU pyrophosphatase	Activité glucuronyltransférasique en p.100
EDTA (10 mM)	100	100
EDTA (10 mM) (avec préincubation)	100	270
ATP (0,36 mM)	100	Faible activation
ATP (0,36 mM) (avec préincubation)	100	140

TABLEAU 20

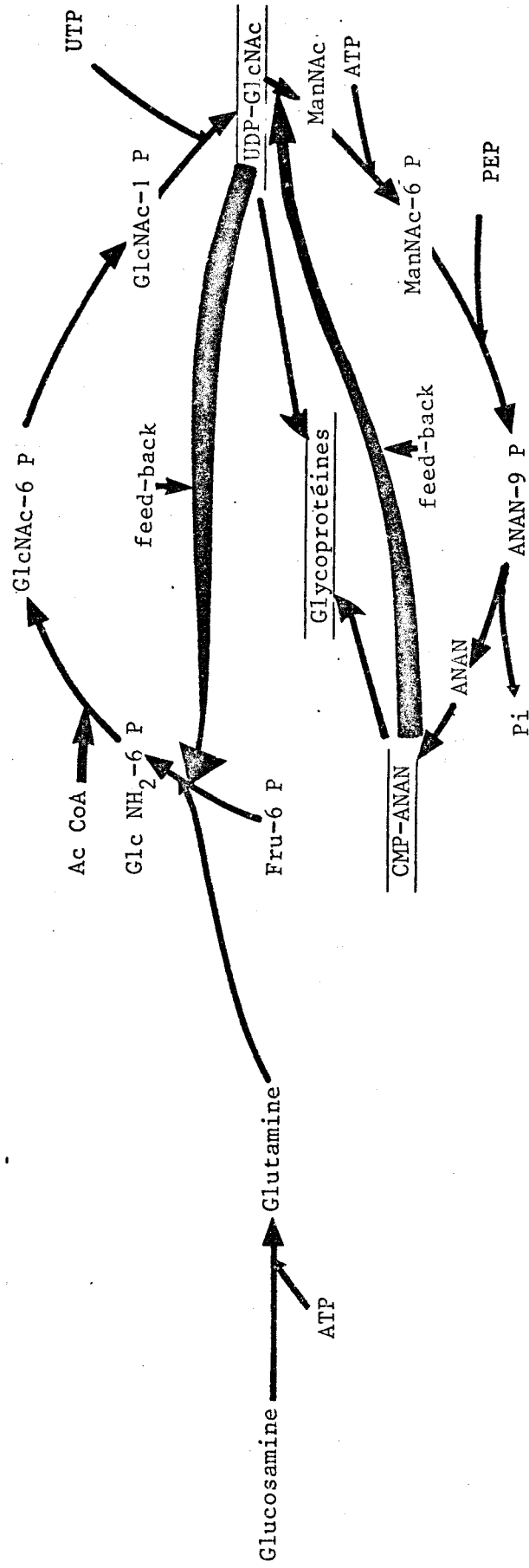
Action de l'EDTA et de l'ATP sur les activités UDP-GlcAU pyrophosphatasiques et glucuronyltransférasiques de l'homogénat de foie de Souris. Selon WONG et LAU (61).

Inhibiteurs	Inhibition de l'UDP-GlcAU pyrophosphatase	Action glucuronyltransférasique en p.100
EDTA (10 mM) (avec préincubation)	100	100
ATP (0,36 mM) (avec préincubation)	100	100



SCHEMA 1

Contrôle du taux cellulaire d'UDP-Ose par un mécanisme de Feed-back, selon KORNFIELD ( 52 ).



## F - AU NIVEAU DES MICROSOMES

L'UDP-Gal pyrophosphatase des membranes microsomales du foie de Rat est faiblement inhibée par la CDP-Choline, elle l'est davantage par le CTP, le GTP, l'ATP, le CDP-Glc et le GDP-Glc. Tous ces composés, y compris la CDP-choline stimulent de la même manière la galactosyltransférase. L'UMP, le CMP et le CDP stimulent aussi cette activité mais sans inhiber l'UDP-Gal pyrophosphatase. Le fait que la CDP-choline stimule la galactosyltransférase plus efficacement que le CDP suggère que la choline puisse jouer un rôle complémentaire ( 3 ), d'autre part, la CDP-choline peut provoquer la saturation de la galactosyltransférase, en utilisant une concentration d'UDP-Gal beaucoup plus faible.

Dans différentes fractions membranaires, l'UDP-Gal pyrophosphatase et la galactosyltransférase agissent simultanément et donc peuvent exercer un contrôle sur la biosynthèse des glycoconjugués. Il est important de remarquer que si des nucléotides sont capables d'inhiber l'activité nucléotide pyrophosphatase, ils peuvent aussi avoir un effet direct sur la transférase. Ces conclusions rejoignent celles de POGELL et LELOIR ( 63 ) et celles d'OGAWA et al. ( 29 ) concernant l'activation de la glucuronyltransférase par les nucléotides au niveau des microsomes du foie de Rat, des homogénats de foie de souris et de foie foetal de Cobaye.

L'inhibition des transférases peut être due à un phénomène d'inhibition par excès de substrat ( 50 - 64 - 65 ), d'où le danger de travailler avec des quantités de substrat trop importantes au niveau des systèmes membranaires complexes.

De fortes concentrations en UDP-Gal peuvent inhiber la galactosyltransférase des homogénats du foie de Rat et celle du sérum ( 50 - 64 ). De même, la mannosyltransférase peut présenter un comportement différent à faible et à forte concentration en GDP-Man ( 66 ).

PUHAKAINEN et HÄNNINEN ( 23 ) montrent que le système galactosyltransférase-pyrophosphatase est complexe, en effet, en présence d'un accepteur exogène de la glucuronyltransférase : le 4 nitrophénol, la formation de GlcAU-1 P et de GlcAU est légèrement réduite ; le GlcAU-1 P, le 4 nitrophénylglucuronide et le GlcAU libre sont produits dans les taux suivants : 78 : 2,3 : 1. Lorsque l'on ajoute dans le milieu 10 mM d'EDTA pour diminuer l'activité nucléotide pyrophosphatase, les taux deviennent : 19 : 2,6 : 1. Le taux d'hydrolyse du précurseur est donc supérieur au taux de transfert, même en présence d'un accepteur exogène ; il s'avère en conséquence nécessaire de contrôler cette dégradation.

## II - RÉGULATION ENTRE LES ACTIVITÉS NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASIQUES ET PHOSPHATASIQUES

Dans les extraits de cellules de Hamster, il existe une nucléotide-pyrophosphatase capable de dégrader l'UDP-GlcNAc et l'UDP-GalNAc en monosaccharides-1 phosphates et une phosphatase qui hydrolyse ces derniers composés en monosaccharides libres. La figure 4 p. 59 montre que plus de 50 p. 100 des glycosyl-nucléotides sont hydrolysés pendant la 1ère minute de réaction, la plus grande partie de la radioactivité est alors retrouvée au niveau des monosaccharides-1 phosphates. Après 3 minutes de réaction, les monosaccharides-1 phosphates sont dégradés par la phosphatase.

Au niveau des extraits de cellules de Hamster transformées, il y a blocage de la formation des monosaccharides libres. En particulier, dans le cas des cellules transformées par le virus du sarcome de Rous ou le Simian virus 40, l'activité nucléotide pyrophosphatasique est bloquée et donc la phosphatase ne peut plus agir par absence de substrat (Fig. 4 p. 59). Dans le cas des cellules transformées par le virus du polyome ou par la diméthyl-nitrosamine, il y a accumulation de monosaccharides-1 phosphates par suite du blocage de l'activité phosphatasique (Fig. 4 p. 59). L'hydrolyse complète est alors réalisée en mélangeant les extraits de cellules transformées dans lesquels la nucléotide pyrophosphatase est bloquée, avec ceux dans lesquels la phosphatase n'agit pas.

Lorsque l'on réalise le mélange des extraits de cellules normales et de cellules transformées, il n'y a pas inhibition des activités nucléotide pyrophosphatasiques et phosphatasiques des cellules normales. Le blocage des activités des enzymes de dégradation dans les cellules transformées ne semble donc pas résulter de la présence d'inhibiteurs. Des résultats identiques sont obtenus avec le GDP-Man, le GDP-Fuc et l'UDP-Glc (8 - 9).

La phosphatase joue en fait un rôle important, car elle favorise la dégradation des glycosyl-nucléotides en hydrolysant au fur et à mesure de leur formation les monosaccharides-1 phosphates.

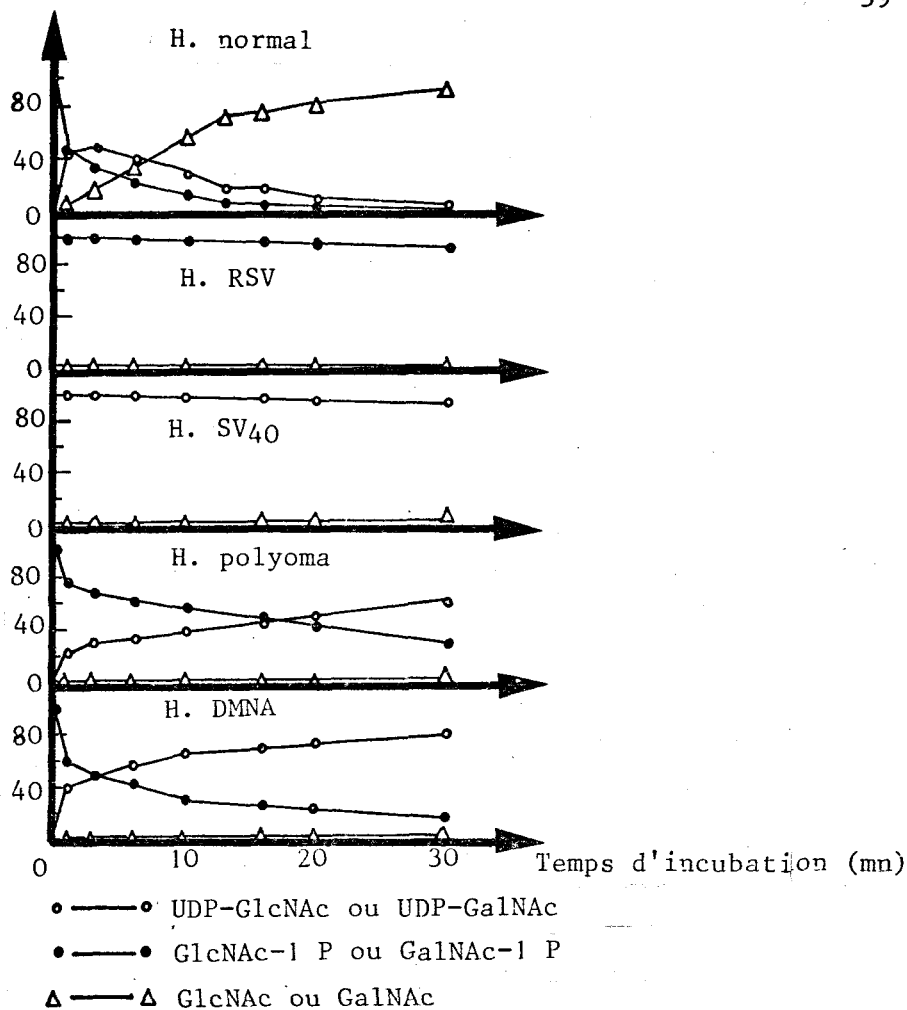


FIGURE 4

Hydrolyse de l'UDP-GlcNAc et de l'UDP-GalNAc par différents extraits cellulaires (8).

- H. normal : extrait des cellules de Hamster normal
- H. RSV : extrait des cellules de Hamster transformées par le virus du Sarcome de Roux
- H. SV40 : extrait des cellules de Hamster transformées par le Simian Virus 40
- H. polyoma : extrait des cellules de Hamster transformées par le virus du polyome
- H. DMNA : extrait des cellules de Hamster transformées par la diméthylnitrosamine.

### III - RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ GLYCOSYL-NUCLÉOTIDE-MONOPHOSPHATASE HYDROLASIQUE

Les facteurs qui régulent la synthèse et la dégradation enzymatique du CMP-ANAN sont importants au niveau du contrôle du métabolisme des composés à acides sialiques. De nombreuses études ont montré le rôle important du CMP-ANAN dans la biosynthèse des glycoprotéines et des gangliosides, mais nos connaissances sont peu développées en ce qui concerne les mécanismes de régulation.

FERWERDA et al. (67) précisent que la cellule possède un "pool" de CMP-ANAN, compris entre 25,5 et 27 n.moles par g. de poids humide, au niveau du rein de Rat. Il résulte d'une compartimentation et par conséquent la concentration *in vivo* peut prendre des valeurs 2 à 3 fois plus élevées. La concentration en CMP-ANAN qui peut servir de substrat dans les réactions de transfert d'acide sialique résulte d'un équilibre entre les réactions de formation et de dégradation de ce composé.

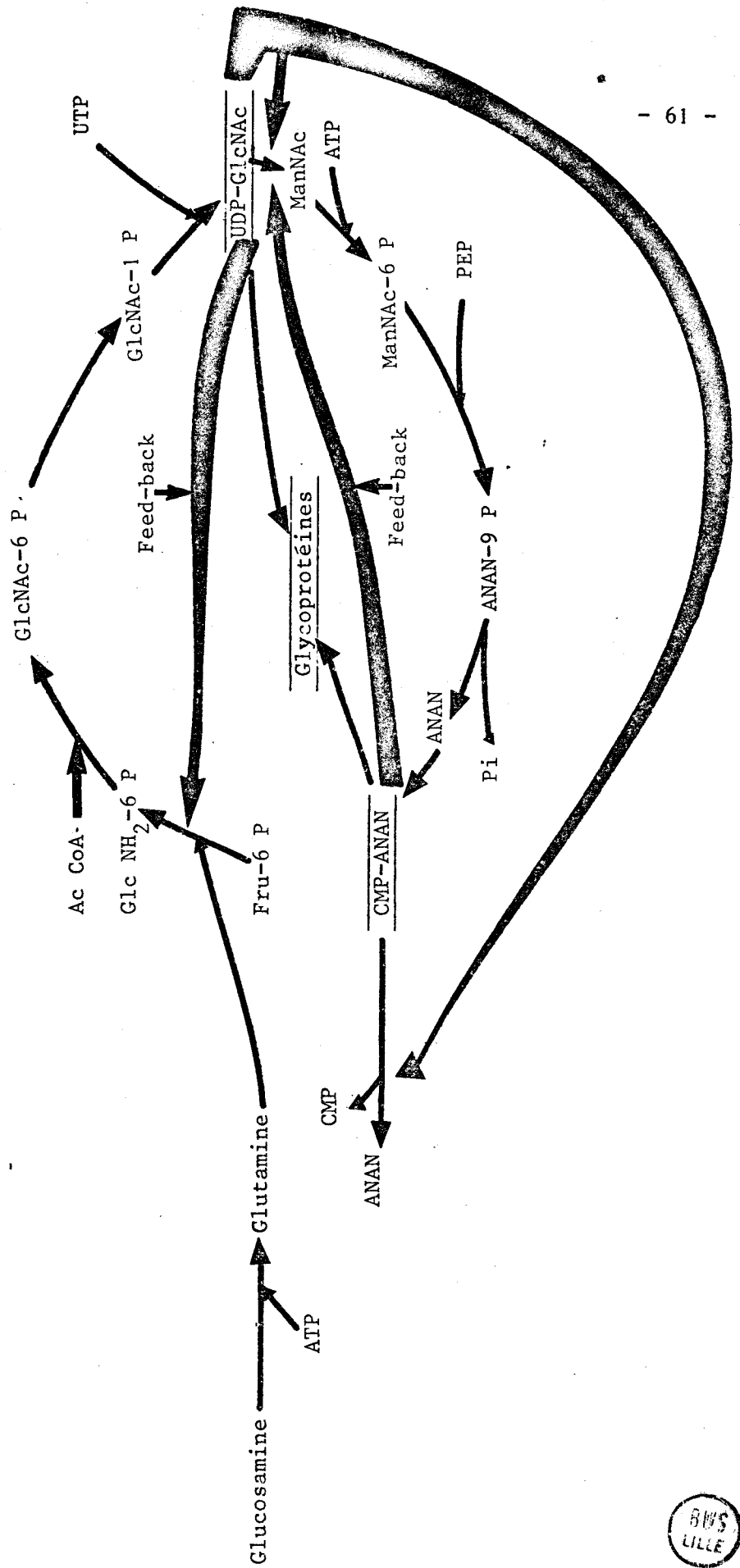
Il est remarquable que le CTP, à la concentration de 1 mM inhibe complètement la CMP-ANAN hydrolase et qu'à la même concentration, la vitesse de réaction de la CMP-ANAN synthétase devienne maximale (34).

Les études préalables de KORNFIELD et al. (53) avaient montré que le CMP-ANAN est un inhibiteur de l'un des enzymes impliqués dans les différentes étapes du métabolisme intermédiaire des acides sialiques : l'UDP-GlcNac-2-épipimérase. Les recherches de KEAN et BIGHOUSE (34) précisent un aspect supplémentaire de cette régulation. La conséquence de l'inhibition de la 2-épipimérase serait une accumulation relative d'UDP-GlcNac, or ce composé est un inhibiteur de la CMP-ANAN hydrolase. L'UDP-GlcNac, à la concentration de 0,3 mM inhibe la CMP-ANAN hydrolase à 50 p. 100 mais aussi et à un même taux l'UDP-GlcNac-2-épipimérase. Ainsi, l'inhibition de la formation d'UDP-GlcNac, produite par le CMP-ANAN selon un mécanisme de feedback, peut être renforcée par l'action de l'UDP-GlcNac sur l'hydrolase (Schéma 2 p. 61).

Ces différentes réactions montrent la complexité des phénomènes de régulation. Un contrôle de la quantité de CMP-ANAN disponible est nécessaire pour qu'il y ait une régulation de la sialylation intracellulaire des glycoprotéines et des gangliosides.

SCHEMA 2

Contrôle du taux cellulaire d'UDP-Ose par un mécanisme de Feed-back selon KORNFIELD (52) et par accumulation d'UDP-GlcNac selon KEAN et BIGHOUSE (34).



## ROLE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASES

Le rôle qui peut être attribué aux activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques n'est pas très bien défini.

La nucléotide pyrophosphatase du foie de Rat pourrait jouer d'après SCHLIESELFELD et al. ( 28 ) un rôle dans la régulation de la concentration des nucléotides pyrophosphates et dans la conversion de l'UDP-GlcAU en GlcAU qui est un précurseur métabolique de l'acide ascorbique et du L-xylose. La nucléotide pyrophosphatase présente à la surface des lymphocytes et des cellules de mammifères fonctionnerait en empêchant l'entrée des nucléotides dans les cellules ( 68 ). Quant à celle présente au niveau des membranes plasmiques, elle jouerait un rôle important dans le métabolisme des nucléotides de la surface cellulaire et un rôle dans l'adhésion cellulaire, car cette activité est absente au niveau des cellules transformées ( 8 - 69 ). Enfin, HAUGEN et SKREDE ( 6 ) lui attribuent un rôle de transport car elle est présente en grande quantité dans le tractus intestinal, génital et dans les reins.

La polarité du CMP-ANAN et le caractère hydrophobe des membranes ne nous permettent pas de comprendre facilement comment cette molécule peut atteindre l'extérieur de la membrane cellulaire ( 67 ). En fait, plusieurs raisons peuvent être invoquées pour justifier la présence de la CMP-ANAN hydrolase en tant qu'ectoenzyme au niveau des cellules du foie et du rein ( 35 ).

- 1 - Le CMP-ANAN peut être dégradé à l'extérieur de la cellule puis les produits de dégradation pénètrent à l'intérieur de celle-ci et sont réactivés.
- 2 - Cet enzyme protège la cellule vis-à-vis de l'influence du CMP-ANAN extracellulaire, au niveau de la biosynthèse intracellulaire des sialoglycoprotéines et sialoglycolipides.
- 3 - Il donne à la cellule, la possibilité de réguler le contenu en acides sialiques des glycoprotéines et des glycolipides ectocellulaires, en influençant l'activité de la sialyltransférase ectocellulaire dont la présence est démontrée par plusieurs auteurs, par la concentration en CMP-ANAN ( 70 - 71 - 72 - 73 ).



4 - Il permet aux cellules de réguler le contact cellulaire. D'après la théorie de ROSEMAN ( 74), le contact cellulaire serait dû à des complexes enzyme-substrat, entre les glycosyltransférases d'une cellule et les glycoprotéines ou glycolipides de l'autre cellule. L'addition de glycosyl-nucléotides diminue ou supprime le contact cellulaire. La régulation de la concentration en CMP-ANAN par l'hydrolase peut par conséquent jouer sur le temps de vie du complexe enzyme-substrat et ainsi réguler le contact cellulaire.

Lors de la mesure des activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatases, les auteurs n'ont souvent envisagé la dégradation que d'un ou de 2 glycosyl-nucléotides et lorsqu'ils en choisissaient plus de 2, ceux-ci étaient différents d'une étude à l'autre. En ce qui nous concerne, afin de mieux comprendre les phénomènes de régulation qui interviennent lors de la biosynthèse des glycoprotéines, nous avons choisi comme source d'enzymes : le sérum humain et le sérum de Rat et nous avons recherché l'effet des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases sur les glycosyl-nucléotide pyrophosphatases sur les glycosyl-nucléotides suivants : l'UDP-Glc, l'UDP-GlcAU et sur l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc, le GDP-Man, le GDP-Fuc ainsi que sur le CMP-ANAN, qui sont particulièrement impliqués dans la biosynthèse du glycanne de la sérotransferrine humaine ( 75) (Fig. 5 p. 64). Au cours de cette étude, une dégradation non enzymatique de certains glycosyl-nucléotides a été mise en évidence, nous allons décrire son importance.

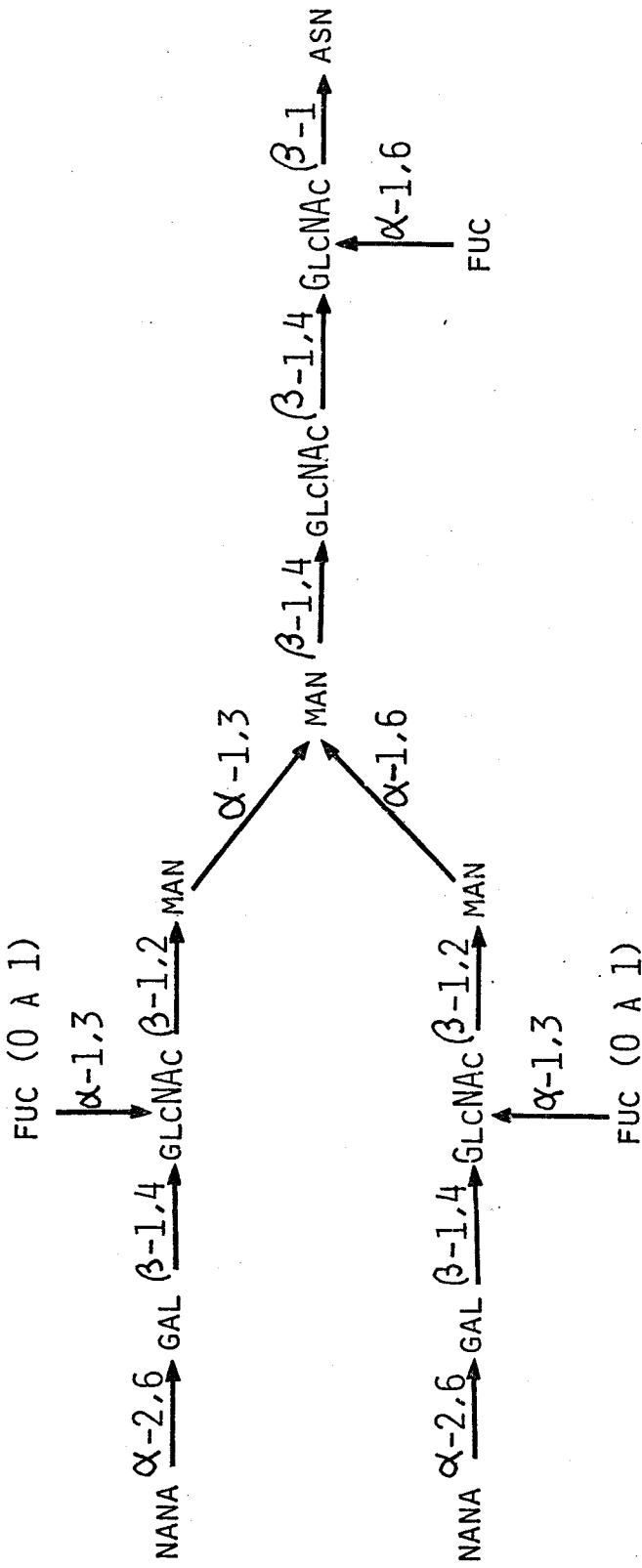


FIGURE 5

Structure primaire des glycanes de la lactotransferrine humaine (G. SPIK, R. VANDERSYPPE, B. FOURNET, B. BAYARD, P. CHARET, S. BOUQUELET, G. STRECKER et J. MONTREUIL) (75).



TRAVAUX PERSONNELS

## MATERIEL ET METHODES

### I - MATÉRIEL

#### A - LES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

Les différents glycosyl-nucléotides : UDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  Glc, UDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  Gal, UDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  GlcNAc, UDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  GlcAU, GDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  Man, GDP-L- $\{^{14}\text{C}\}$  Fuc, CMP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  ANAN sont fournis par le Radiochemical Centre d'Amersham. Ils présentent les caractéristiques suivantes : UDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  Glc : 296 mCi/m.mole, 24  $\mu\text{Ci/ml}$  ; UDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  Gal : 290 mCi/m.mole, 24  $\mu\text{Ci/ml}$  ; UDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  GlcNAc : 300 mCi/m.mole, 25  $\mu\text{Ci/ml}$  ; UDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  GlcAU : 321 mCi/m.mole, 25  $\mu\text{Ci/ml}$  ; GDP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  Man : 154 mCi/m.mole, 25  $\mu\text{Ci/ml}$  ; GDP-L- $\{^{14}\text{C}\}$  Fuc : 140 mCi/m.mole, 26  $\mu\text{Ci/ml}$  ; CMP-D- $\{^{14}\text{C}\}$  ANAN : 214 mCi/m.mole, 25  $\mu\text{Ci/ml}$ .

#### B - LES SERUMS

##### 1 - Sérum de Rat\*

Des rats Wistars sont tués par décapitation et le sang est recueilli. Ces rats ne sont pas à jeûn. Le sang est ensuite placé à 4°C pendant 2 h, puis centrifugé à 2.000 t/mn pendant 10 mn, le sérum est alors récupéré.

##### 2 - Sérum humain\*\*

Le sérum humain est préparé à partir de sang total de la même manière que le sérum de Rat.

#### C - LES ACCEPTEURS DES GLYCOSYLTRANSFERASES SERIQUES

L'Ovomucoïde total\*\*\* a été utilisé comme accepteur de la galactosyltransférase du sérum de Rat et du sérum humain. Ce composé est une glycoprotéine qui a été préparée suivant la méthode de FREDERICQ et DEUTSH (76) à partir du blanc d'oeuf de Poule.

---

\* Nous remercions M. Cl. Dissous de nous avoir fourni les sérums de Rat.

\*\* Nous remercions M. B. Brunet de nous avoir fourni le sérum humain.

\*\*\* Nous remercions Mme. M. Coniez de nous avoir fourni cette préparation.

## II - MÉTHODES

### A - MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

#### 1 - Conditions de la réaction de dégradation chimique des glycosyl-nucléotides

La dégradation chimique des glycosyl-nucléotides a été déterminée de la manière suivante : à 10 µl d'une solution renfermant l'un des différents  $\{^{14}\text{C}\}$  glycosyl-nucléotides (10.000 cpm environ), on ajoute 90 µl de tampon Tris ajusté à pH 7,3 avec de l'acide chlorhydrique (N), à la température de 37°C, pour obtenir une concentration finale de 150 mM, on ajoute lors de la préparation de ce tampon, du sulfate de manganèse afin d'obtenir une concentration finale de 40 mM. Après 1 h d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par addition de 30 µl d'EDTA (0,3 M) et par brusque refroidissement dans la glace. Les produits de dégradation sont analysés par chromatographie sur papier et par électrophorèse.

#### 2 - Conditions de la réaction de dégradation enzymatique des glycosyl-nucléotides

La dégradation enzymatique des glycosyl-nucléotides a été déterminée comme suit : à 10 µl d'une solution renfermant l'un des différents  $\{^{14}\text{C}\}$  glycosyl-nucléotides (10.000 cpm environ), on ajoute 60 µl de tampon Tris, ajusté à pH 7,3 avec de l'acide chlorhydrique (N), à la température de 37°C, pour obtenir une concentration finale de 150 mM, on ajoute lors de la préparation de ce tampon du sulfate de manganèse afin d'obtenir une concentration finale de 40 mM, puis 30 µl de sérum humain (2 mg de protéines) ou 30 µl de sérum de Rat (2,78 mg de protéines). Dans les tubes témoins, les 30 µl de sérum sont remplacés par 30 µl de tampon Tris. Après une incubation de 1 h à 37°C, la réaction est arrêtée par addition de 30 µl d'EDTA (0,3 M), et par brusque refroidissement dans la glace. Les produits de dégradation sont analysés par chromatographie sur papier et par électrophorèse.

#### 3 - Séparation chromatographique et électrophorétique des produits de la dégradation chimique et enzymatique

##### a - Séparation chromatographique

Le contenu de chaque microtube (130 µl) est déposé sur une feuille de papier Whatman n° 3, puis une chromatographie descendante est réalisée dans le système solvant : acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique (5:5:1:3) (77).

pendant une durée de 20 h pour le GDP-Man et le GDP-Fuc, de 24 h pour l'UDP-Glc, l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc et le CMP-ANAN et de 42 h pour l'UDP-GlcAU.

Les chromatographies préparatives sont effectuées dans les mêmes conditions que précédemment. Des dépôts de 25 ml sont effectués sur une longueur de 20 cm.

#### b - Séparation électrophorétique des produits de dégradation

Les produits de dégradation des glycosyl-nucléotides peuvent être séparés en électrophorèse à pH 3,5 dans le tampon de DAVIDSON et SMELLIE (78) : acide citrique (0,015 M)/citrate trisodique (0,05 M), sous une tension de 800 V pendant une durée de 5 h 30.

#### 4 - Identification des produits de la dégradation chimique et enzymatique

##### a - Identification des glycosyl-nucléotides

Les glycosyl-nucléotides, marqués au {<sup>14</sup>C} sont repérés par rapport aux témoins correspondants (100 µg), déposés latéralement sur le chromatogramme ou électrophorégramme et révélés à l'oxalate d'aniline. Ces tâches apparaissent brunes, après un séjour de 10 mm dans une étuve à 100°C et fluorescentes en lumière ultra-violette.

##### b - Identification des monosaccharides-1 phosphates

###### α) comportement chromatographique et électrophorétique

Le comportement chromatographique et électrophorétique des monosaccharides-1 phosphates a été étudié en utilisant les méthodes de chromatographie et d'électrophorèse décrites précédemment au paragraphe 3.

###### β) révélations

Le repérage des monosaccharides-1 phosphates radioactifs a été réalisé par comparaison de leur vitesse de migration, à celle des monosaccharides témoins correspondants, non marqués, après révélation à l'oxalate d'aniline et un séjour de 20 mm en étuve à 100°C. Le réactif de HANES et ISHERWOOD (79), au molybdate d'ammonium a aussi été employé, c'est un réactif spécifique des composés possédant du phosphate.

*γ) dosage des différents constituants*

Après révélation des bandes latérales des chromatogrammes préparatifs, les bandes centrales sont éluées à l'eau pendant 6 heures, puis les sucres sont dosés selon les techniques classiques (MONTREUIL et SPIK (80)) et le phosphore est dosé par la méthode de ALLEN (81).

c - Identification des monosaccharides libres

Le repérage des différents sucres radioactifs a été réalisé par comparaison de leur vitesse de migration, à celle des monosaccharides témoins correspondants, non marqués, révélés à l'oxalate d'aniline.

D'autre part, ces monosaccharides libres sont élués à l'eau pendant 6 heures, puis l'éluat est concentré par séchage à l'air, sous hotte, déposé sur papier Whatman n° 3 et chromatographié dans le solvant de PARTRIDGE (82), en présence des témoins correspondants non marqués.

d - Identification des monosaccharides-1-2 phosphates cycliques

*α) comportement chromatographique et électrophorétique*

Les monosaccharides-1-2 phosphates cycliques sont soumis aux méthodes chromatographique et électrophorétique décrites antérieurement au paragraphe 3.

*β) révélations*

Différentes révélations ont été effectuées sur les monosaccharides-1-2 phosphates cycliques : révélation à l'oxalate d'aniline, au réactif de HANES et ISHERWOOD (78), et au tri-phényl-tétrazonium (83).

Le tri-phényl tétrazonium est un composé qui réagit spécifiquement avec les monosaccharides à condition qu'ils puissent exister sous forme 1-2 énediol, donc à la condition que la fonction réductrice et l'hydroxyle du C<sub>2</sub> soient libres. Le réactif est le suivant : à 1 volume de solution à 2 p. 100 de tri-phényl-tétrazonium, on ajoute 1 volume de solution de soude normale.

Après avoir chromatographié sur papier Whatman n° 3, dans le système solvant : acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3) on pulvérise le réactif décrit ci-dessus. Après passage en étuve à 70°C, en

atmosphère saturée d'eau, les monosaccharides apparaissent sous forme de tâches rouges. Puis, après plusieurs jours d'exposition à la lumière, le fond du papier devient rouge, les monosaccharides non réducteurs restent blancs, et les composés qui possèdent leur OH libre en 1 et en 2 prennent une coloration rouge plus intense que le papier.

γ) hydrolyse et identification des produits de la réaction

\*) Hydrolyse du Glc-1-2 phosphate cyclique, du Gal-1-2 phosphate cyclique et du GlcAU-1-2 phosphate cyclique

A 200 µg de composé-1-2 phosphate cyclique, séché à l'évaporateur rotatif, on ajoute 0,5 ml d'acide chlorhydrique normal, que l'on porte à 100°C pendant 1 h.

Les hydrolysats du Glc-1-2 phosphate cyclique et du Gal-1-2 phosphate cyclique sont passés sur colonne de Duolite, 1 cm x 8 cm, lavés par 10 ml d'eau et concentrés à l'évaporateur rotatif dans un ballon de 25 ml, le résidu est enfin repris par 5 ml d'eau.

L'hydrolysat du GlcAU-1-2 phosphate cyclique est additionné de méthanol anhydre, puis concentré à l'évaporateur rotatif afin d'éliminer l'acide chlorhydrique ; cette opération est effectuée plusieurs fois. Le résidu sec est alors repris par 5 ml d'eau.

\*) Réduction et hydrolyse des composés-1-2 phosphates cycliques

A 300 µg de Glc-1-2 phosphate cyclique, de Gal-1-2 phosphate cyclique ou de GlcAU-1-2 phosphate cyclique, séché à l'évaporateur rotatif, on ajoute 1 ml de solution contenant 1 mg de borohydrure de potassium en solution aqueuse, ajustée à pH 7 par de l'acide formique. Après 2 heures de réaction, le produit est passé sur colonne de Dowex 50 x 8, 1 cm x 8 cm, puis concentré à l'évaporateur rotatif. Au résidu obtenu, on ajoute 1 ml de méthanol distillé et anhydre, puis on concentre jusqu'à l'obtention d'un résidu sec ; cette manipulation est effectuée 3 fois. Les résidus sont ensuite hydrolysés suivant le protocole détaillé ci-dessus ; les hydrolysats sont enfin traités respectivement suivant les modes opératoires décrits précédemment.

\*) Identification des produits de réaction

Aux produits obtenus, d'une part après hydrolyse, d'autre part, après hydrolyse et réduction, on ajoute 50 µg de méso-inositol. Après lyophilisation, une trifluoroacétylation directe est effectuée : 200 µl de dichlorométhane sont ajoutés, puis 200 µl d'anhydride trifluoroacétique (84). Le mélange est alors



chauffé à 150°C pendant 5 mn au bain de sable, puis refroidi sous courant d'eau et à nouveau chauffé pendant 5 mn à 150°C. Les produits sont injectés sur une colonne de verre de 3 m de longueur et de 0,2 mm de diamètre intérieur, remplie d'O.V. 210 à 5 p. 100 sur Varaport 30. Le gaz vecteur est l'azote, dont le débit est réglé à 10 ml/mn. L'injecteur et le détecteur sont chauffés à la température de 220°C, la programmation de température de la colonne croît de 110°C à 210°C soit 1°C par mn. Les produits sont identifiés par rapport à des témoins.

#### δ) dosage des différents constituants

Les sucres sont dosés suivant les techniques classiques (MONTREUIL et SPIK (80)), le phosphore est dosé par la méthode de ALLEN (81).

#### 5 - Dosage des produits de dégradation

Après migration, et au niveau de chaque dépôt, les chromatogrammes ou électrophorégrammes sont découpés en bandes de 6 cm de largeur. Chaque bande est ensuite coupée en bandelettes de 1 cm x 6 cm ; ces bandelettes sont alors découpées en petits morceaux de papier que l'on dispose dans des piluliers contenant 10 ml de liquide scintillant Permablend III. La composition de ce produit est la suivante : 5,5 g de Permablend III, contenant 91 p. 100 de 2,5 diphényl oxazol (PPO) et de 9 p. 100 de bis MSB auquel on ajoute du toluène pour obtenir 1 l de liquide scintillant.

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un Nuclear Chicago de type Unilux. Les précomptages sont effectués avant chaque manipulation. Pour chaque constituant, les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité en prenant comme base, la radioactivité totale du glycosyl-nucléotide introduit dans le milieu d'incubation.

### B - ACTION DES CATIONS ( $Mn^{++}$ et $Mg^{++}$ ) SUR LA DEGRADATION CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

#### 1 - La dégradation chimique

Le protocole est le même que celui décrit dans le paragraphe précédent : conditions de la réaction de dégradation chimique des glycosyl-nucléotides, à la différence près, que les concentrations finales en ions divalents :  $Mn^{++}$  ou  $Mg^{++}$  varient de 0 à 40 mM.

## 2 - La dégradation enzymatique

Le mode opératoire utilisé pour déterminer la dégradation enzymatique des glycosyl-nucléotides, en présence de sérum humain et de sérum de Rat, est à peu près identique à celui donné dans le paragraphe précédent ; la seule différence est due à l'utilisation de concentrations variables en ions divalents :  $Mn^{++}$  ou  $Mg^{++}$ , de 0 à 40 mM.

### C - ACTION DES INHIBITEURS DE LA DEGRADATION CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

#### 1 - Cinétiques de la dégradation chimique et enzymatique de l'UDP-Gal en présence d'UMP

Les cinétiques de la dégradation chimique et enzymatique de l'UDP-Gal, en présence d'UMP sont réalisées de la manière suivante :

A 10  $\mu$ l d'une solution renfermant de l'UDP- $\{^{14}C\}$ -Gal (10.000 cpm environ), on ajoute 10  $\mu$ l d'UMP pour obtenir une concentration finale de 2 mM, 50  $\mu$ l de tampon Tris, ajusté à pH 7,3 avec de l'acide chlorhydrique (N), à la température de 37°C pour obtenir une concentration finale de 150 mM, on ajoute lors de la préparation de ce tampon, du sulfate de manganèse afin d'obtenir une concentration finale de 40 mM, et enfin 30  $\mu$ l de sérum humain (2 mg de protéines) ou de sérum de Rat (2,78 mg de protéines). Dans les tubes témoins, l'UMP est remplacé par du tampon Tris. Les temps d'incubation varient de 0 à 60 mn. La réaction est arrêtée par 30  $\mu$ l d'EDTA (0,3 M) et par brusque refroidissement dans la glace. Les différents produits sont analysés par chromatographie sur papier.

#### 2 - Effet de différentes concentrations en UMP sur la dégradation chimique et enzymatique de l'UDP-Gal

Le protocole est le même que le précédent, mais la concentration en UMP varie de 0 à 10 mM.

### D - MESURE DES ACTIVITES GLYCOSIDASQUES SUR LES ACCEPTEURS GLYCOPROTEIQUES

1 - Mesure des activités glycosidasiques du sérum humain et du sérum de Rat sur les accepteurs glycoprotéiques avant la réaction de transfert

A 10  $\mu$ l d'une solution d'Ovomucoïde total (500  $\mu$ g) on ajoute 60  $\mu$ l de tampon Tris, ajusté à pH 7,3 avec de l'acide chlorhydrique (N) à la température de 37°C, on ajoute lors de la préparation de ce tampon, du sulfate de manganèse afin d'obtenir une concentration finale de 20 mM, puis 30  $\mu$ l de sérum humain (2 mg de protéines) ou 30  $\mu$ l de sérum de Rat (2,78 mg de protéines). Les temps d'incubation ont été les suivants : 0, 1 h, 3 h, 6 h et 12 h. La réaction est arrêtée par brusque refroidissement dans la glace. Les produits sont analysés par chromatographie sur papier.

2 - Mesure des activités glycosidasiques sur des accepteurs glycoprotéiques après la réaction de transfert

Après la réaction de transfert du  $\{^{14}\text{C}\}$  galactose sur l'Ovomucoïde total, celui-ci est élué du papier chromatographique et utilisé comme substrat de la  $\beta$ -D-galactosidase du sérum. 500  $\mu$ g de  $\{^{14}\text{C}\}$ -Ovomucoïde sont ajoutés au milieu d'incubation contenant le tampon Tris/HCl, pH 7,3, 20 mM de  $\text{MnSO}_4$  et 30  $\mu$ l de sérum humain ou de sérum de Rat. Le protocole est ensuite le même que celui donné dans le paragraphe précédent.

E - MESURE DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUES DES SERUMS

La mesure de l'activité galactosyltransférasiques du sérum humain et du sérum de Rat a été réalisée de la manière suivante :

A 10  $\mu$ l d'une solution d'UDP- $\{^{14}\text{C}\}$ Gal (10.000 cpm environ), on ajoute 10  $\mu$ l d'une solution d'Ovomucoïde total (500  $\mu$ g), 50  $\mu$ l de Tampon Tris, pH 7,3 pour obtenir une concentration finale de 150 mM, on ajoute lors de la préparation de ce tampon, du sulfate de manganèse afin d'obtenir une concentration finale de 20 ou 40 mM, et enfin 30  $\mu$ l de sérum humain ou de sérum de Rat. La durée d'incubation est de 1 h. La réaction est arrêtée suivant le protocole donné précédemment.

F - VARIATIONS DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DES SERUMS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS  $Mn^{++}$

Le milieu d'incubation renfermant des quantités variables de  $MnSO_4$  de 0 à 40 mM est identique à celui utilisé pour la mesure de l'activité galactosyltransférasique des sérums.

G - VARIATIONS DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DES SERUMS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN UDP-Gal

Afin d'étudier les variations de l'activité galactosyltransférasique des sérums en fonction de la concentration en substrat, nous avons ajouté à l'UDP-Gal radioactif, de l'UDP-Gal non marqué afin d'obtenir des concentrations finales de 0 à 1 mM. La durée d'incubation est de 1 h. La réaction est arrêtée comme précédemment. Les produits sont analysés par chromatographie sur papier.

H - VARIATIONS DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE DES SERUMS EN PRESENCE D'INHIBITEURS DES ACTIVITES PYROPHOSPHATASIQUES

Les variations d'activité galactosyltransférasique des sérums ont été mesurées en présence d'UMP et de PPI. Les milieux d'incubation utilisés sont les suivants : à 10  $\mu$ l d'une solution renfermant de l'UDP- $\{^{14}C\}$  Gal (10.000 cpm), on ajoute 10  $\mu$ l d'UMP ou de PPI, pour obtenir une concentration finale comprise entre 0 et 10 mM, 10  $\mu$ l d'une solution d'Ovomucoïde total (500 g), 40  $\mu$ l de tampon Tris/HCl, pH 7,3 pour obtenir une concentration finale de 150 mM, on ajoute lors de la préparation de ce tampon, du sulfate de manganèse afin d'obtenir une concentration finale de 20 mM et enfin 30  $\mu$ l de sérum humain (2 mg de protéines) ou de sérum de Rat (2,78 mg de protéines). La durée d'incubation est de 1 h. La réaction est arrêtée comme précédemment.

III - SÉPARATION PAR ÉLECTROFOCALISATION DES ACTIVITÉS NUCLÉOTIDE PYROPHOSPHATASIQUES DU SÉRUM DE RAT

Le sérum de Rat a été soumis à une électrofocalisation de manière à séparer les différentes activités nucléotide-pyrophosphatases. Pour ceci, une colonne d'électrofocalisation de 110 ml est préparée. La solution anodique, située en bas de la colonne contient : 0,2 ml d'acide orthophosphorique, 14 ml d'eau distillée, 12 g de sucre "Analar". La solution cathodique située en haut de la colonne contient : 0,2 ml d'éthylènediamine et 10 ml d'eau distillée.

La solution légère est constituée de 0,7 ml d'ampholines de pH : 3,5 à 10 et de 2,5 ml de sérum de Rat que l'on complète à 60 ml, avec de l'eau. La solution dense renferme : 1,8 ml d'ampholines de pH : 3,5 à 10, 40,2 ml d'eau distillée et 28 g de sucrose "Analar". La colonne est ensuite mise sous tension : 24 h à 400 Volts, puis 18 h à 750 Volts. Pendant la manipulation la colonne est réfrigérée à + 4°C par circulation d'éthylèneglycol. Après stabilisation de la colonne, des fractions de 2 ml sont recueillies sur collecteur puis dialysées contre de l'eau à + 4°C pendant 48 h. Chaque fraction est ensuite concentrée dans des ultrogaines UH 100 Schleicher et Schüll.

### 1 - Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué sur chaque fraction, selon la méthode de UDENFRIED et al. (85).

#### a - Réactifs

##### a) solution de fluorescamine

De 15 à 30 mg de fluoran (ROCHE) sont solubilisés dans 100 ml d'acétone (l'acétone doit être redistillé ou de qualité pour microscopie électronique)

##### β) solution tampon borate de sodium 0,2 M, pH 9

Une solution 0,2 M d'acide borique est amenée à pH 9,0 par de la soude.

#### b - Mode opératoire

50 µl de la solution à doser sont mélangés avec du tampon borate de sodium de façon à avoir un volume final de 150 µl. On ajoute ensuite 50 µl de la solution de fluorescamine. Cette solution doit être ajoutée très rapidement car la fluorescamine possède une solubilité minimale dans l'eau, elle se décompose dans l'eau en 1 mn, en donnant un composé non fluorescent.

La fluorescence émise, stable pendant 4 heures est mesurée dans un spectrofluorimètre : longueur d'onde d'excitation : 390 nm, longueur d'onde d'émission : 475-490 nm. Les mesures sont faites par rapport à une gamme étalon de sérum albumine bovine.

### 2 - Activité phosphodiésterasique

A 50 µl de solution enzymatique, on ajoute 100 µl de bis para-nitrophényl-phosphate (bis PNPP) (15 mM) en solution dans du Tris (150 mM) et 50 µl de tampon

Tris (150 mM), pH 7,5. L'incubation dure 4 h 30. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml d'une solution de carbonate de sodium M. La lecture est faite au spectrophotomètre Zeiss, à la longueur d'onde de 400 nm.

### 3 - Activité phosphatasique

Le protocole est à peu près identique au précédent, le bis PNPP est remplacé par le PNPP (para-nitrophényl phosphate) à la même concentration.

### 4 - Activité pyrophosphatasique

A 10  $\mu$ l de glycosyl-nucléotide radioactif (10.000 cpm environ) on ajoute 50  $\mu$ l de solution enzymatique et 30  $\mu$ l de Tris pour obtenir une concentration finale de 150 mM, contenant du  $MgSO_4$  pour obtenir une concentration finale de 10 mM, ajusté à la température de 37°C, à pH 7,3. Le temps d'incubation est de 1 h à 37°C. La réaction est arrêtée comme précédemment et les milieux d'incubation sont immédiatement déposés sur papier Whatman 3 et soumis à la chromatographie descendante dans les conditions précédemment décrites.

## RÉSULTATS

DEGRADATION CHIMIQUE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES
---

Lors de l'étude de la dégradation de l'UDP-Gal par les enzymes du sérum, un composé "X" a été mis en évidence par chromatographie sur papier, dans les solutions témoins ne renfermant pas de sérum. L'identification de ce composé qui ne pouvait résulter que d'une dégradation chimique a été entreprise. Cette étude a été étendue par la suite à tous les glycosyl-nucléotides. Trois d'entre eux seulement sont dégradés chimiquement dans les conditions d'incubation : données p. 67.

## I - IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE DES COMPOSÉS "X"

### A - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE

En chromatographie descendante, dans le solvant : acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3), les composés "X" formés à partir de l'UDP-Glc, de l'UDP-Gal et de l'UDP-GlcAU migrent environ 2 fois moins loin que ces derniers composés (Tableau 21 p. 79). Ils ont un comportement chromatographique différent des monosaccharides-1 phosphates.

### B - REVELATIONS

Les composés "X" se révèlent après pulvérisation d'oxalate d'aniline et après un séjour de 20 mn à l'étuve à 100°C. Des tâches brunes apparaissent, elles sont fluorescentes en lumière ultraviolette.

Ces composés se révèlent aussi, après pulvérisation du réactif de HANES et ISHERWOOD (79). Des tâches jaunes de phosphomolybdate d'ammonium apparaissent, après un temps de 1 à 2 mn ; elles deviennent bleues sur fond blanc, après exposition des chromatogrammes à la lumière ultraviolette.

Ces composés "X" ne se révèlent pas au réactif au tri-phényl tétrazonium.



TABLEAU 21

Rg. des différents produits de dégradation des glycosyl-nucléotides dans le solvant : acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3).

<u>UDP-Glc</u>		<u>GDP-Man</u>	
Pic W	: 0,21	GDP-Man	: 0,08
UDP-Glc	: 0,26	Man-1 P	: 0,26
Glc-1 P	: 0,37	Man	: 1
Pic V	: 0,45		
Glc-1-2 Pc	: 0,50		
Glc	: 1		
<u>UDP-Gal</u>		<u>GDP-Fuc</u>	
Pic W	: 0,18	GDP-Fuc	: 0,10
UDP-Gal	: 0,26	Pic X'	: 0,18
Gal-1 P	: 0,35	Fuc-1 P	: 0,29
Gal-1-2 Pc	: 0,50	Pic X	: 0,40
Gal	: 1	Fuc	: 1
<u>UDP-GlcNAc</u>		<u>CMP-ANAN</u>	
Pic W	: 0,13	CMP-ANAN	: 0,31
UDP-GlcAU	: 0,23	ANAN	: 1
GlcNAc-1 P	: 0,33		
GlcNAc	: 1		
<u>UDP-GlcAU</u>			
Pic W	: 0,10		
UDP-GlcAU	: 0,19		
GlcAU-1 P	: 0,29		
GlcAU-1-2 Pc	: 0,48		
GlcAU	: 1		

NB : Représentation graphique (Fig. 6 p. 80)



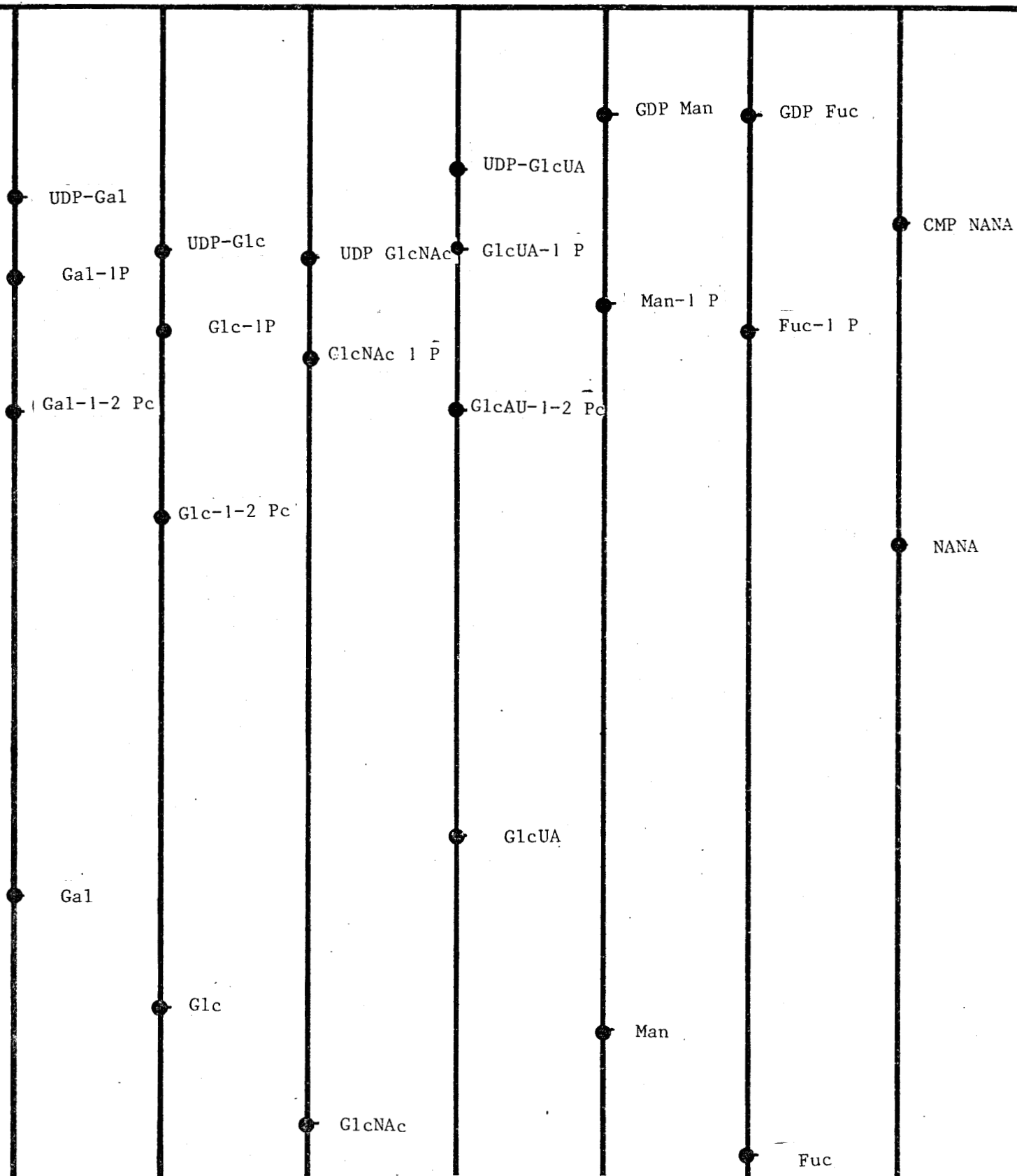


FIGURE 6

Migration des différents composés de dégradation des glycosyl-nucléotides dans le solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

Temps de chromatographique : 20 h pour le GDP-Man et le GDP-Fuc

24 h pour 1'UDP-Gal, 1'UDP-Glc, 1'UDP-GlcNAc et le CMP-ANAN

42 h pour 1'UDP-GlcUA



### C - CONCLUSIONS

Nous pouvons conclure que ces composés "X" renferment des monosaccharides, de l'acide phosphorique et que l'OH en 2 du monosaccharide est bloqué.

## II - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES CONSTITUANTS DES COMPOSÉS "X"

### A - IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ET DOSAGE

Après hydrolyse des composés "X" dans les conditions décrites précédemment, des chromatographies dans le système solvant de PARTRIDGE (82) ont été réalisées. Les composés "X" formés à partir de l'UDP-Glc, de l'UDP-Gal et de l'UDP-GlcAU contiennent respectivement du Gal, du Glc et du GlcAU.

D'autre part, le dosage des différents constituants de ces composés "X" a été effectué. Les résultats obtenus révèlent la présence d'une mole de monosaccharide pour une mole d'acide phosphorique.

### B - IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

L'hydrolyse des composés "X" a conduit à la libération de Gal, Glc et GlcAU, identifiés par chromatographie en phase gazeuse.

La réduction de ces mêmes constituants, suivie de l'hydrolyse, a permis de mettre en évidence, comme précédemment le Gal, le Glc et le GlcAU. Il n'y a donc pas eu de réduction de ces composés, alors que dans les mêmes conditions, les monosaccharides témoins étaient réduits.

Les composés "X" possèdent donc leur fonction réductrice bloquée.

### C - CONCLUSIONS

Les composés "X" formés à partir de l'UDP-Gal, de l'UDP-Glc et de l'UDP-GlcAU sont différents des monosaccharides-1 phosphates correspondants en raison de leur vitesse de migration différente d'une part en chromatographie dans le système solvant : acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3) et d'autre part, en électrophorèse dans le tampon de DAVIDSON et SMELLIE (78), qui nous a permis en outre de mettre en évidence une tâche d'UMP. Cette tâche d'UMP nous confirme le fait que la coupure s'est faite entre les 2 phosphates du glycosyl-nucléotide, une première preuve en avait déjà été apportée lors du dosage sucre-phosphore.

Ces composés "X" ne se réduisent pas, ils ont par conséquent leur fonction réductrice bloquée ; leur hydroxyle en 2 est lui aussi bloqué ; ces composés correspondent donc aux monosaccharides-1-2 phosphates cycliques (Fig. 7 p. 83).

NUNEZ et BARKER (86) qui ont aussi étudié les produits de la dégradation des glycosyl-nucléotides, ont identifié les produits de la dégradation chimique de l'UDP-Gal et de l'UDP-Glc par RMN  $\{^{13}\text{C}\}$ . Ils ont mis en évidence de l'UMP et les monosaccharides-1-2 phosphates cycliques correspondants. Puis ils ont fait subir à ces derniers composés, les traitements suivants : HCl 0,1 M, 5 mn, 100°C ou  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 1 M, 1 h, 25°C et ont obtenu un composé dont la migration électrophorétique correspondait à celle du Gal-2 P ou Glc-2 P. L'étude en RMN et l'analyse en électrophorèse ont montré que la formation de Gal-2 P était 2 fois plus importante quantitativement que celle du Gal-1 P. Ces méthodes de coupure chimique apportent une preuve supplémentaire de la liaison du phosphate sur les carbones 1 et 2 du monosaccharide ; le second résultat que l'on peut en tirer est que la liaison entre le phosphate et le carbone 1 du sucre est plus fragile que celle entre le même phosphate et le carbone 2.

Les méthodes que nous avons employées pour déterminer la structure des composés-1-2 phosphates cycliques et celles utilisées par NUNEZ et al. (86) sont différentes mais complémentaires.

### III - VARIATIONS DU TAUX DE DÉGRADATION CHIMIQUE DES GLYCOSYL-NUCLÉOTIDES

Des études sur la dégradation chimique de tous les glycosyl-nucléotides ont été effectuées en présence de différentes concentrations d'ions divalents :  $\text{Mn}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ .

#### A - EN PRESENCE D'IONS $\text{Mn}^{++}$

L'UDP-GlcNac, le GDP-Man et le CMP-ANAN sont stables en présence de concentrations croissantes en  $\text{MnSO}_4$  de 0 à 40 mM à pH 7,3 (Tableau 22 p. 84).

Il n'en est pas de même pour l'UDP-Glc, l'UDP-Gal et l'UDP-GlcAU. En effet, ces 3 glycosyl-nucléotides se dégradent en monosaccharides 1-2 phosphates cycliques. La formation de Glc-1-2 phosphate cyclique et de

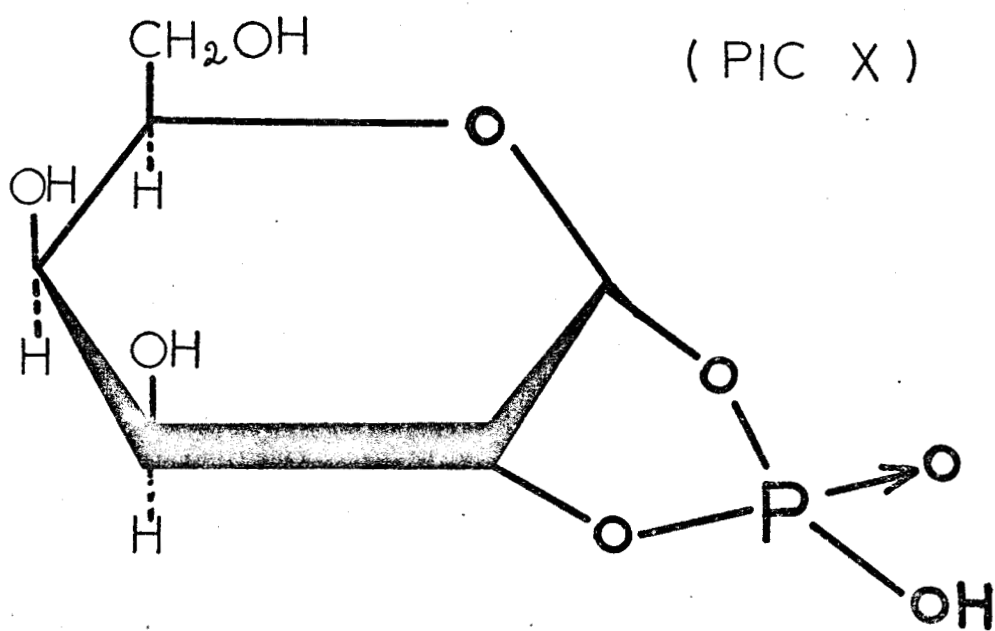


FIGURE 7

Schéma général des monosaccharides-1-2 monophosphates cycliques

Galactose-1-2 monophosphate cyclique



TABLEAU 22

Effet de différentes concentrations en ions  $Mn^{++}$  sur la dégradation chimique des glycosyl-nucléotides.

	Glycosyl-nucléotides												
	UDP-GlcNAc				GDP-Man			GDP-Fuc				CMP-ANAN	
Mn SO <sub>4</sub> (mM)	Pic W	UDP-GlcNAc	GlcNAc-1 P	GlcNAc	GDP-Man	Man-1 P	Man	GDP-Fuc	Fuc-1 P	Pic Y	Fuc	CMP-ANAN	ANAN
0	2,1	97,1	0,7	0	99,9	0	0	92,4	2,5	1,4	3,5	95,1	4,8
5	2,7	96,5	0,6	0	99,6	0	0,1	92,2	3,7	1,3	3,3	94,9	5,0
10	2,7	96,6	0,6	0	99,7	0	0,1	91,5	5,0	1,2	3,3	94,9	5,1
20	3,0	96,0	0,8	0	99,6	0	0,2	90,3	5,5	1,3	4,7	95,0	4,9
40	3,2	93,7	2,9	0	97,8	1,0	0,1	88,3	6,4	4,7	12,9	94,8	5,0
Témoin	2,4	97,0	0,5	0	100	0	0	92,5	2,3	1,4	3,6	95,0	5,0



GlcAU-1-2 phosphate cyclique est linéaire et croît de 0 à 40 p. 100, pour des concentrations en  $MnSO_4$  de 0 à 40 mM (Tableau 23 p. 86 et figures 8 et 9 p. 87 et p. 88), la formation de Gal-1-2 phosphate cyclique est presque linéaire et croît de 5 à 45 p. 100 pour les mêmes concentrations en  $MnSO_4$  que celles utilisées précédemment (Tableau 23 p. 86 et figure 10 p. 89).

Le GDP-Fuc est lui aussi instable, puisque à 40 mM en  $MnSO_4$ , la somme des taux de Fuc-1 P et de Fuc, atteint à peu près 20 p. 100 (Tableau 22 p. 84 et fig. 11 p. 90).

#### B - EN PRESENCE D'IONS $Mg^{++}$

Lorsque les ions  $Mn^{++}$  sont remplacés par les ions  $Mg^{++}$ , aux mêmes concentrations, l'UDP-GlcNAc, le GDP-Man et le CMP-ANAN demeurent stables ; le GDP-Fuc n'est plus dégradé en Fuc et le taux de Fuc-1 P observé ne varie pas. La dégradation de l'UDP-Gal, de l'UDP-Glc et de l'UDP-GlcAU en composés-1-2 phosphates cycliques correspondants reste linéaire et relativement faible, pratiquement de l'ordre de 5 p. 100 (Tableaux 24 p. 91 et 25 p. 92).

#### C - CONCLUSIONS

Les ions  $Mg^{++}$  seront utilisés préférentiellement aux ions  $Mn^{++}$ . Lorsque les réactions nécessitent l'utilisation des ions  $Mn^{++}$ , ils seront employés à la concentration la plus faible, si possible inférieure à 20 mM.

### IV - DISCUSSION

OGAWA et al. en 1966 (29), DEPERT et al. en 1974 (7), HAUGEN et SKREDE en 1976 (4), MOREL et al. en 1976 (54) ont remarqué que l'UDP-Gal se dégradait dans leurs milieux d'incubation en un composé "X" dont la nature chimique n'a pas été identifiée. Nous avons par les différentes méthodes décrites précédemment identifié ce composé au Gal-1-2 phosphate cyclique (Fig. 7 p. 83), la confirmation en a été apportée par NUNEZ et BARKER en 1976 (86). L'UDP-Gal n'a pas été le seul composé envisagé par ces auteurs, ils se sont intéressés à l'UDP-Glc et ont démontré qu'il y avait aussi formation de Glc-1-2 phosphate cyclique. Nous avons obtenu les mêmes conclusions. Puis nous avons envisagé le cas de l'UDP-GlcAU, celui-ci à son tour se dégrade chimiquement pour libérer de l'UMP et du GlcAU-1-2 phosphate cyclique.

NUNEZ et BARKER (86) et nous-mêmes, avons démontré que tous les nucléosides diphosphates sucres utilisés sont stables en solution aqueuse

TABLEAU 23

Effet de différentes concentrations en ions  $Mn^{++}$  sur la dégradation chimique des glycosyl-nucléotides.

Mn SO <sub>4</sub> (mM)	Glycosyl-nucléotides														
	UDP-Gal					UDP-Glc					UDP-GlcAU				
	Pic W	UDP-Gal	UDP-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal	Pic W	UDP-Glc	Glc-1 P	Glc-1-2 Pc	Glc	Pic W	UDP-GlcAU	GlcAU-1 P	GlcAU-1-2 Pc	GlcAU
0	2,0	91,4	1,8	4,7	0,2	5,7	93,1	0	1,2	0	3,0	92,4	0	4,5	0
5	2,1	91,3	1,6	5,0	0,2	5,6	89,8	0	4,5	0	3,1	87,3	0	9,5	0
10	1,9	90,8	2,0	23,5	0,2	4,5	86,4	0	9,0	0	2,7	82,7	0	14,5	0
20	2,1	72,5	1,6	23,5	0,2	3,8	79,3	0	16,7	0	2,9	74,0	0	23,0	0
40	2,1	52,6	1,9	43,1	0,2	5,6	62,1	0	32,2	0	2,3	57,0	0	40,6	0
Témoin	2,1	91,6	1,6	4,5	0	3,6	93,2	0	3,1	0	3,5	88,9	0	7,5	0





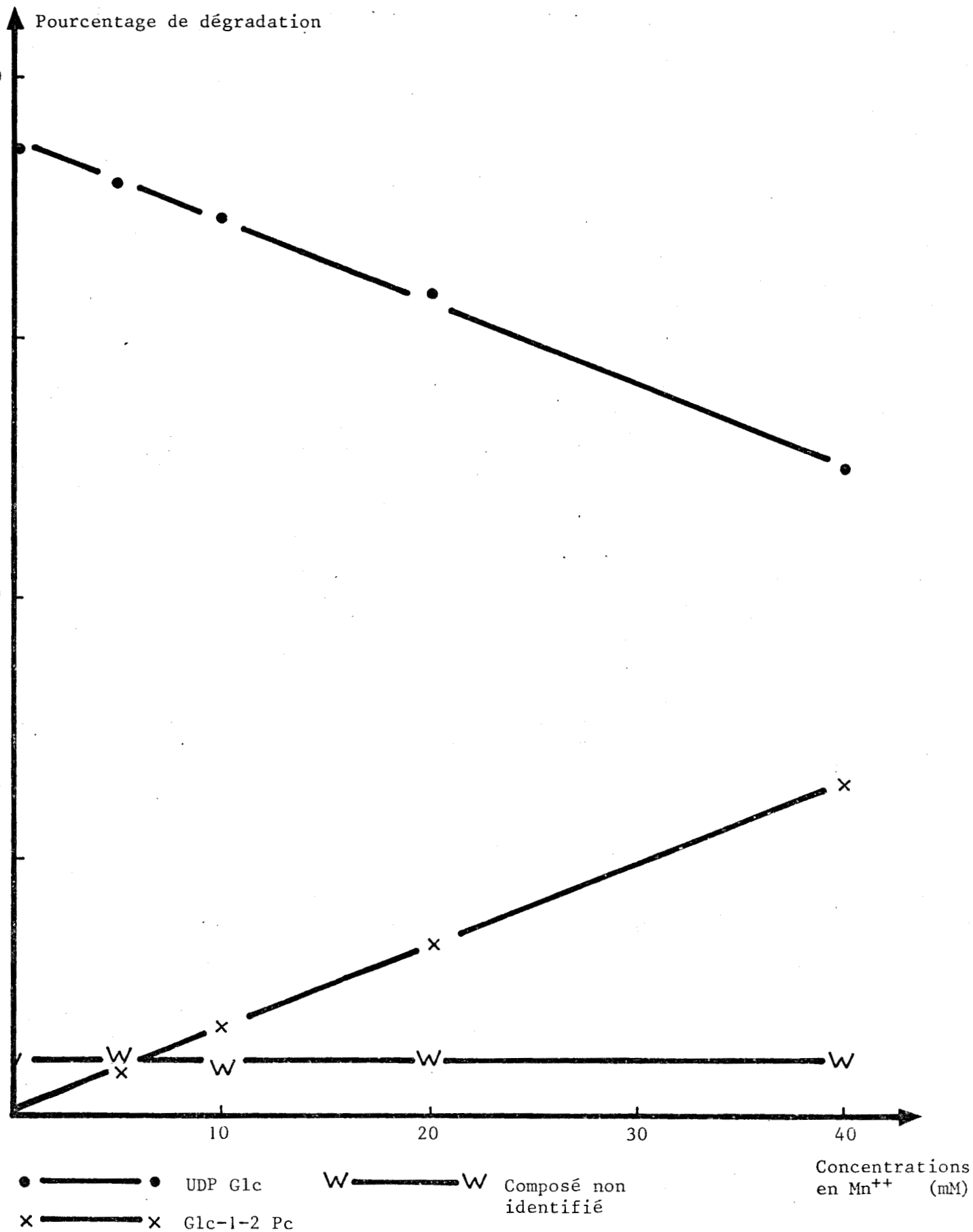
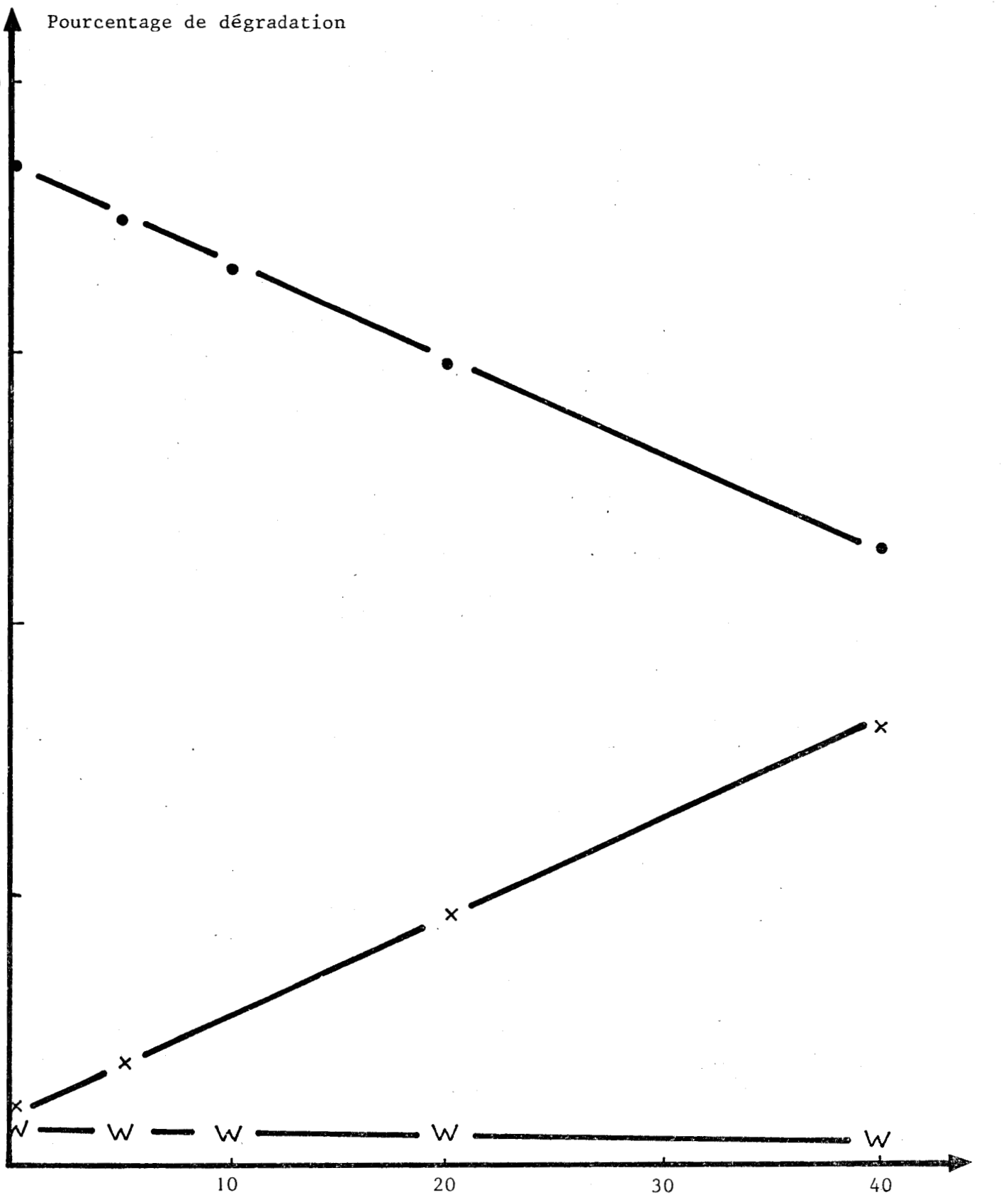


FIGURE 8



EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS  $Mn^{++}$  SUR LA DEGRADATION CHIMIQUE DE L'UDP-Glc.



● —●— UDP Glc AU    W —W— Composé non identifié  
x —x— Glc AU-1-2 Pc

Concentrations en Mn<sup>++</sup> (mM)

FIGURE 9



EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS Mn<sup>++</sup> SUR LA DEGRADATION CHIMIQUE DE L'UDP-Glc AU.

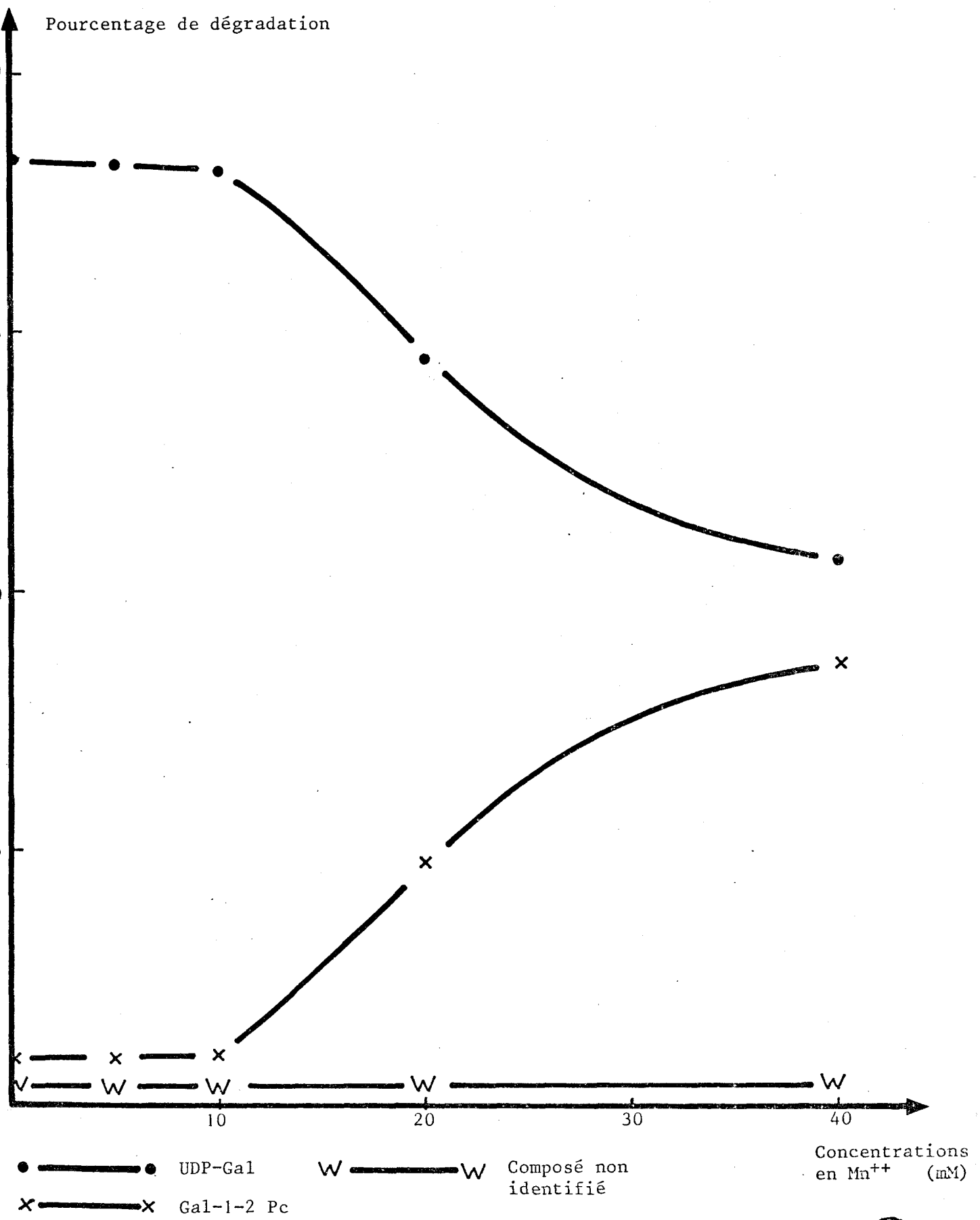


FIGURE 10

EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS Mn<sup>++</sup> SUR LA DEGRADATION CHIMIQUE DE L'UDP-Gal.



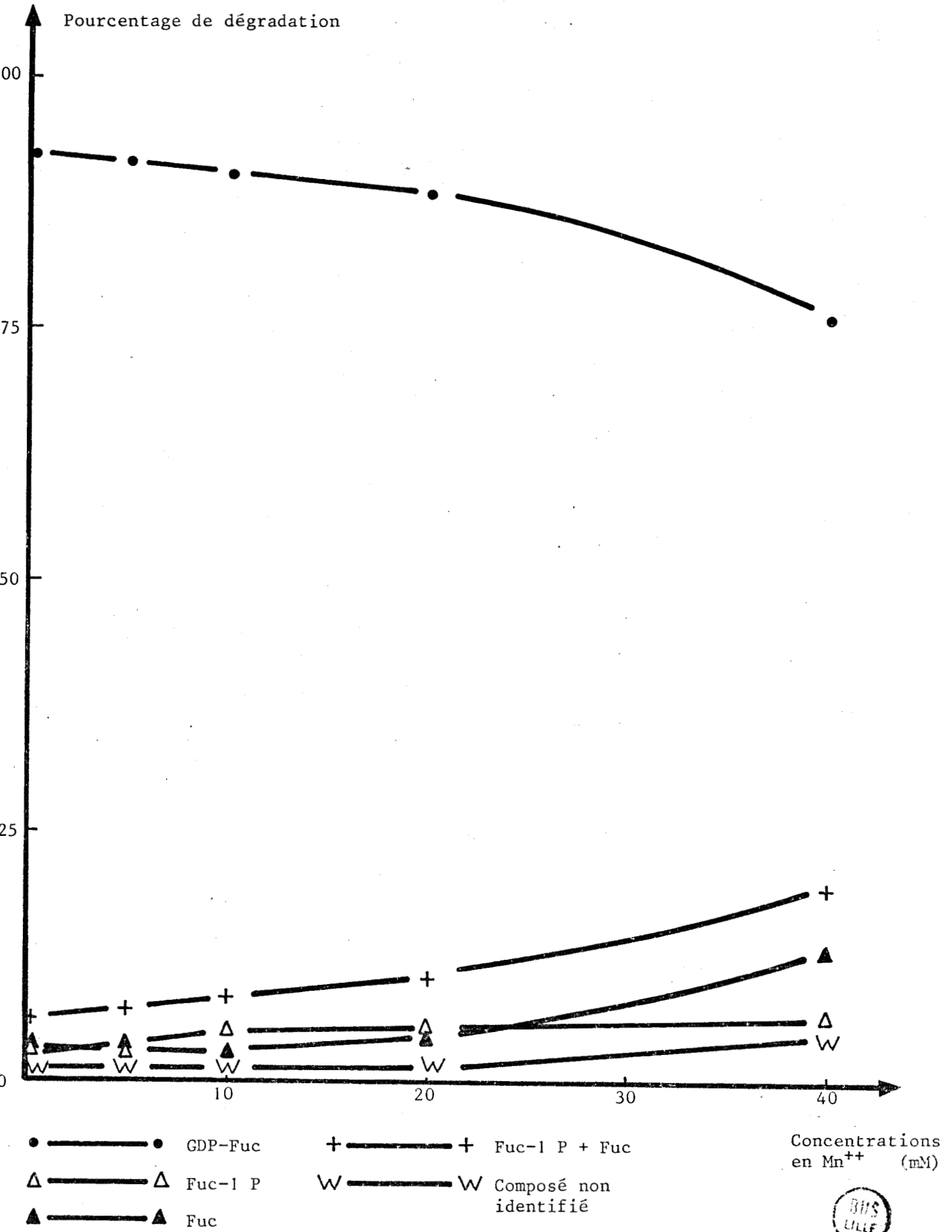


FIGURE 11

EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS Mn<sup>++</sup> SUR LA DEGRADATION CHIMIQUE DU GDP-Fuc.

TABLEAU 24

Effet de différentes concentrations en ions Mg<sup>++</sup> sur la dégradation chimique des glycosyl-nucléotides.

Mg Cl <sub>2</sub> (mM)	Glycosyl-nucléotides															
	UDP-GlcNAc				GDP-Man				GDP-Fuc				CMP-ANAN			
	Pic W	UDP-GlcNAc	GlcNAc-1 P	GlcNAc	GDP-Man	Man-1 P	P	Man	GDP-Fuc	Fuc-1 P	Pic Y	Fuc	CMP-ANAN	ANAN	ANAN	ANAN
0	3,0	93,2	3,8	0	98,5	1,4	0	95,0	2,3	2,5	0	95,2	4,7			
5	3,3	93,1	3,6	0	98,6	1,4	0	91,1	3,3	5,4	0	95,3	4,6			
10	3,1	94,1	2,8	0	98,1	1,8	0	91,9	3,1	4,9	0	94,3	5,5			
20	3,0	93,8	3,2	0	98,4	1,5	0	92,1	3,9	3,9	0	94,6	5,3			
40	2,6	94,9	2,4	0	97,4	2,5	0	92,3	3,1	4,4	0	95,0	4,8			
Témoin	3,4	93,0	3,6	0	98,7	1,3	0	93,9	2,1	3,8	0	95,4	4,5			



TABLEAU 25

Effet de différentes concentrations en ions  $Mg^{++}$  sur la dégradation chimique des glycosyl-nucléotides.

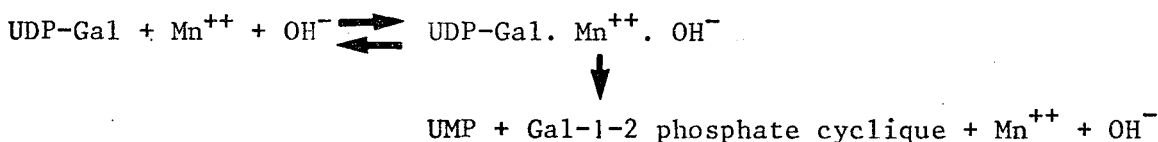
Mg $Cl_2$ (mM)	Glycosyl-nucléotides															
	UDP-Gal						UDP-Glc						UDP-GlcAU			
	Pic W	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal		Pic W	UDP-Glc	Glc-1 P	Glc-1-2 Pc	Glc		Pic W	UDP-GlcAU	GlcAU-1 P	GlcAU-1-2 Pc
0	2,4	93,6	0	3,9	0	3,8	93,8	0	2,3	0		3,8	91,4	0	4,6	0
5	2,3	93,6	0	4,0	0	3,3	94,2	0	2,4	0		4,2	89,9	0	5,8	0
10	2,0	92,3	0	5,6	0	3,3	93,3	0	3,4	0		3,9	90,8	0	5,2	0
20	3,0	89,1	0	7,8	0	2,8	93,1	0	4,0	0		3,3	88,6	0	8,0	0
40	2,0	86,6	0	11,2	0	4,8	89,1	0	5,9	0		3,7	87,6	0	8,6	0
Témoin	1,7	92,1	0	6,1	0	5,9	91,0	0	3,0	0		3,5	88,9	0	7,5	0



tamponnée à pH neutre.

En présence d'ions métalliques, l'UDP-Gal et l'UDP-Glc subissent une dégradation par un mécanisme décrit par NUNEZ et al. (86) et auquel nous avons nous-mêmes pensé (voir schéma 3 p. 94), faisant intervenir l'attaque du 2-OH du sucre sous forme pyranose, sur le groupement  $\beta$ -phosphate du nucléotide pour former un phosphate-1-2 cyclique et de l'UMP. Quand l'UDP-Gal, l'UDP-Glc et l'UDP-GlcAU sont sous forme pyranique, le groupement 2-OH est en position équatoriale et la structure pyranique peut se tordre pour faciliter la formation d'un cycle à 5 sommets constituant le phosphate cyclique. La décomposition plus rapide de l'UDP-Gal est probablement due à la présence du groupement 4-OH en position axiale, ce qui donnerait au produit cyclique une configuration plus étendue. Des effets analogues ont été observés lors de l'hydrolyse des glycosides (BE MILLER, 1967) (87).

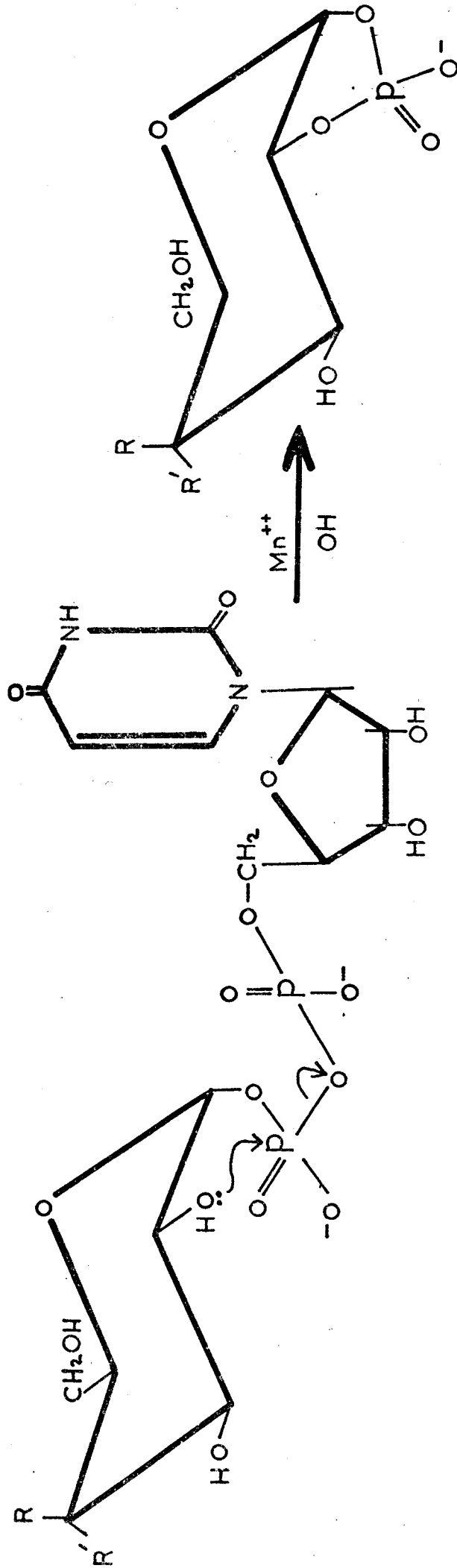
Des complexes entre l'UDP-Gal et les ions  $Mn^{++}$  ont déjà été décrits (BERLINER et WONG, 1976 ; KHATRA et al., 1974) (88 - 89), de même qu'entre l'UDP-Glc et les ions  $Mn^{++}$  (DWECK, 1973) (90). Ces auteurs proposent la formation d'un complexe sans l'intervention des  $OH^-$ , celui-ci ne semble pas satisfaisant d'après les valeurs des constantes de dissociations obtenues. NUNEZ et BARKER (86) proposent alors la formation du complexe suivant :



La stoechiométrie de ce complexe n'est pas connue.

La vitesse de réaction à pH : 7,5 augmente d'environ 12 fois, quand la concentration en  $Mn^{++}$  passe de 10 à 50 mM, lorsque l'UDP-Gal est utilisé à la concentration de 20 mM. A 200 mM en  $Mn^{++}$ , le système n'est pas encore à saturation (86). Ceci est en fait très important, car c'est peut être ce qui explique pourquoi, lors des réactions de transfert, il faut travailler avec des concentrations relativement élevées en ions  $Mn^{++}$ .

La réaction dépend de la concentration en ions  $OH^-$ . PALADINI et LELOIR (91) ont démontré en 1952 qu'un pH suffisamment élevé peut entraîner la dégradation de l'UDP-Gal et de l'UDP-Glc, sans qu'il y ait besoin d'ions métalliques et ceci conformément au schéma 3 p. 94. Dans ce cas, il faut un pH supérieur à 8,6 car à ce pH, nous avons démontré que les glycosyl-nucléotides



+ UMP

SCHEMA 3

Mécanisme de formation des monosaccharides-1-2 monophosphates cycliques.

(NUNEZ et BARKER (86))





considérés sont stables ; c'est ce que confirment HAUGEN et SKREDE ( 6 ) : l'hydrolyse non enzymatique de l'UDP-Glc est peu importante en dessous de pH 9, elle augmente progressivement entre les pH 9 et 10 et très rapidement à pH supérieur 10. Nous avons aussi remarqué que plus le pH est élevé, plus la concentration en ions  $Mn^{++}$  doit être faible pour obtenir le même pourcentage de dégradation. D'autre part, à des valeurs de pH suffisamment basses, voisines de 6,5, NUNEZ et al. ( 86 ) trouvent que la décomposition peut se produire si l'ion métallique approprié est présent en concentration suffisamment élevée.

En présence de fortes concentrations en ions  $Mg^{++}$  à pH 7,3, nous avons démontré que l'UDP-Gal n'est pas dégradé, la même conclusion est apportée par NUNEZ et BARKER ( 86 ). Il en est de même pour l'UDP-Glc et l'UDP-GlcAU. Cependant si le pH atteint la valeur de 9, HAUGEN et SKREDE ( 6 ) montrent que la dégradation de l'UDP-Glc est fortement activée par les ions  $Mg^{++}$  à la concentration de 4 mM ; BROWNLEE ( 5 ) avait démontré antérieurement l'inverse : l'UDP-Glc, en présence d'enzyme porté à ébullition n'est pas dégradé chimiquement à pH 9, même en présence d'ions  $Mg^{++}$ .

NUNEZ et BARKER ( 86 ) ont déterminé la vitesse de dégradation de l'UDP-Gal (20 mM) à pH 7,5 en présence de différents ions métalliques (20 mM) à 37°C. Les valeurs de la demi-durée de vie :  $t_{1/2}$  et de la constante de dissociation observée : Kobs. sont données dans le tableau 26 p. 96.

Les ions métalliques les plus actifs sont l' $Eu^{3+}$  et le  $Pr^{3+}$ , puisqu'ils catalysent la dégradation de l'UDP-Gal, à peu près 10 fois plus rapidement que ne le font les ions  $Mn^{++}$  à pH 7,5.

Il serait plus intéressant de savoir si les ions  $Eu^{++}$  peuvent remplacer les ions  $Mn^{++}$  en tant que cofacteurs des galactosyltransférases.

En présence de dicyclohexylcarbodiimide, l'UDP-Glc et l'UDP-Gal peuvent aussi former les monosaccharides-1-2 phosphates cycliques correspondants (KHORANA et al., 1957 (92) ; PRIHAR et BEHRMAN, 1973 (93)).

En outre, nous avons remarqué que des congélations et décongélations successives ont pour effet d'augmenter le taux de formation des composés-1-2 phosphates cycliques à partir de l'UDP-Gal, de l'UDP-Glc et de l'UDP-GlcAU, en l'absence d'ions divalents ou de tout autre agent chimique, et d'autre part que ces composés-1-2 phosphates cycliques ne se forment pas à partir des monosaccharides-1 phosphates correspondants.

TABLEAU 26

Constante de vitesse observée pour la dégradation et la demi-durée de vie de l'UDP-Gal à 37°C, en présence de différents ions métalliques, d'après NUNEZ et BARKER (86).

	Mn	Mg	Ca	Ni	Cu	Co	Zn	Eu	Pr
Kobs. x 10 <sup>-4</sup> (min <sup>-1</sup> )	70	0	3,0	22,0	2,4	26,9	23,3	700	700
t 1/2 (h)	1,7	-	38,5	5,3	48,1	4,3	5,0	0,17	0,17

N.B. : UDP-Gal : 20 mM

ion métallique : 20 mM



En 1957, KHORANA et al. (92) avaient démontré que le GDP-Man ne peut pas produire du Man-1-2 phosphate cyclique car l'hydroxyle en 2 est en position axiale, nous avons retiré de notre travail, la même conclusion.

Dans le cas du GDP-Fuc, la formation de Fuc-1-2 phosphate cyclique n'est pas observée. D'après NUNEZ et al. (86), le GDP-Fuc ne formerait pas de complexe, facilitant la libération du GMP, ou les contraintes stériques requises pour la formation du Fuc-1-2 phosphate cyclique seraient trop grandes. Nous avons fait les mêmes observations, mais nous avons pu mettre en évidence 2 autres composés mineurs, quantitativement trop faibles pour les identifier, il se pourrait que l'un d'entre eux soit du fuc-1-2 P cyclique, qui instable, donne naissance très rapidement au Fuc ou au Fuc-P. D'autre part, en présence d'ions  $Mn^{++}$ , nous avons mis en évidence une libération de Fuc-1 P et de Fuc, à partir du GDP-Fuc, ce qui pourrait confirmer l'hypothèse ci-dessus, car nous ne voyons pas très bien comment le GDP-Fuc pourrait produire sans faire appel aux mécanismes précédemment exposés, du Fuc-1 P et du Fuc, d'autant que dans les mêmes conditions, le GDP-Man est parfaitement stable ; le  $CH_3$  en  $C_6$  du Fucose, serait il à l'origine d'un mécanisme de dégradation totalement différent ? NUNEZ et BARKER (86) n'ont pas mis en évidence de Fuc-1 P et par conséquent avaient toutes les raisons de penser que le Fuc-1-2 phosphate cyclique ne pouvait pas exister.

En ce qui concerne l'UDP-GlcNAc, celui-ci ne peut pas être dégradé chimiquement, avec formation de monosaccharide-1-2 phosphate cyclique ; il est impossible que la cyclisation puisse se faire, l'hydroxyle en 2 du sucre étant bloqué par un radical NAc.

## V - CONCLUSIONS

Trois glycosyl-nucléotides : l'UDP-Gal, l'UDP-Glc et l'UDP-GlcAU sont dégradés par voie chimique, avec formation de monosaccharide-1-2 phosphate cyclique, suivant les conditions de pH et de concentration en ions  $Mn^{++}$  utilisées. Plus le pH et la concentration en ions  $Mn^{++}$  sont élevés, plus la dégradation est importante.

Lorsque des incubations sont effectuées à pH 7,3, dans les conditions d'action des glycosyltransférases ou des nucléotides pyrophosphatases, il faut tenter d'éviter cette dégradation chimique, qui est une cause d'erreurs supplé-

mentaires et pour ceci, travailler avec des concentrations minimales en ions  $Mn^{++}$  surtout dans les cas d'utilisation des 3 glycosyl-nucléotides décrits ci-dessus.

Il serait intéressant d'entreprendre des recherches afin de savoir si ces composés-1-2 phosphates cycliques sont susceptibles de se former "in vivo".

DEGRADATION ENZYMATIQUE  
DES  
GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

Des études préalables réalisées par PIETTE en 1973 ( 2 ) au Laboratoire, ont montré que les glycosyl-nucléotides se dégradent en monosaccharides libres, lorsque les incubations sont effectuées en présence de sérum humain ou de Rat. Nous avons repris ce travail en choisissant pour but de déterminer si les glycosyl-nucléotides sont directement dégradés en monosaccharides libres ou s'ils le sont après formation de composés intermédiaires.

Pour réaliser ce travail, l'électrophorèse en tampon borate qu'utilisait PIETTE ( 2 ) a été remplacée par la chromatographie dans le système solvant : acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau ( 5 : 5 : 1 : 3 ). Les produits de dégradation ont été identifiés. Le même système de séparation a été utilisé pour mesurer les variations d'activité en présence de différents effecteurs.



## I - IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION

### A - LES MONOSACCHARIDES-1 PHOSPHATES

Le repérage des monosaccharides-1 phosphates a été réalisé par comparaison de leur vitesse de migration à celle des témoins correspondants, non marqués, après révélation à l'oxalate d'aniline et séjour de 20 mn en étuve à 100°C.

Un autre réactif a été employé, c'est celui de HANES et ISHERWOOD ( 79 ), au molybdate d'ammonium. Les tâches apparaissent jaunes, puis bleues, en lumière ultraviolette ; ce réactif est plus spécifique des oses-1 phosphates que le précédent.

Les dosages de sucres et phosphore ont permis d'établir l'existence d'une mole de monosaccharide pour une mole d'acide phosphorique.

## B - LES MONOSACCHARIDES

Le repérage des différents sucres radioactifs a été réalisé par comparaison de leur vitesse de migration, à celle des monosaccharides témoins correspondants, non marqués, révélés à l'oxalate d'aniline.

Après élution, concentration et chromatographie dans le solvant de PARTRIDGE (82), en présence des témoins correspondants non marqués, chaque sucre libre a été identifié au sucre du glycosyl-nucléotide considéré.

## C - L'UMP

Après électrophorèse des milieux d'incubation à pH : 3,5 dans le tampon de DAVIDSON et SMELLIE (78), une tâche visible en lumière ultraviolette peut être observée, sa migration est identique à celle de l'UMP témoin.

## D - CONCLUSIONS

Le système chromatographique que nous avons employé nous permet d'affirmer que les glycosyl-nucléotides ne sont pas directement dégradés en monosaccharides libres, des composés intermédiaires ont été mis en évidence : les monosaccharides-1 phosphates et l'UMP. La dégradation enzymatique se fait donc en 2 étapes : il y a tout d'abord action d'une glycosyl-nucléotide pyrophosphatase qui libère les monosaccharides-1 phosphates, puis action d'une phosphatase sur ces derniers composés..

L'électrophorèse en borate utilisée par PIETTE ( 2 ) ne permettait pas de séparer les glycosyl-nucléotides des monosaccharides-1 phosphates.

## II - POURCENTAGE DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS $Mn^{++}$

Les activités enzymatiques de dégradation des glycosyl-nucléotides ont été étudiées, en présence de différentes concentrations en ions  $Mn^{++}$  pendant une durée d'incubation de 1 h.

### A - SERUM HUMAIN

Lorsque la concentration en ions  $Mn^{++}$  croît de 0 à 40 mM en présence de sérum humain, les glycosyl-nucléotides suivants : l'UDP-Gal, l'UDP-Glc et l'UDP-GlcAU sont dégradés chimiquement en sucres-1-2 phosphates cycliques. Cette dégradation est linéaire à partir de 10 mM en  $Mn^{++}$ , son maximum atteint environ 25 p. 100 (Tableau 27 p. 102). Elle ne se produit pas avec les autres glycosyl-nucléotides (Tableau 28 p. 103).

La dégradation enzymatique de tous les glycosyl-nucléotides en monosaccharides-1 phosphates est observée qu'elle que soit la concentration en ions  $Mn^{++}$ , comprise entre 0 et 40 mM (Fig. 12 p. 104). Cependant, elle est maximale pour une concentration nulle en ions  $Mn^{++}$ .

Lorsqu'on détermine le pourcentage de dégradation enzymatique totale des glycosyl-nucléotides, en mesurant simultanément le taux du monosaccharide-1 phosphate et celui du monosaccharide libre correspondant, celui-ci varie de 30 à 60 p. 100 sauf en ce qui concerne l'UDP-GlcAU, pour lequel la variation est comprise entre 60 et 85 p. 100 (Fig. 13 p. 105). Il s'ensuit donc qu'entre 0 et 40 mM en  $Mn^{++}$ , la phosphatase alcaline du sérum est très peu active. Comme le montre le tableau 29 p. 107, la dégradation enzymatique minimale de chaque glycosyl-nucléotide étudié varie suivant la concentration en ions  $Mn^{++}$ .

La dégradation du CMP-ANAN est de l'ordre de 5 à 10 p. 100, elle est nettement plus faible que celle des autres glycosyl-nucléotides, quelque soit la concentration en ions  $Mn^{++}$  utilisée.

Compte tenu de ces dégradations chimiques et enzymatiques, pour disposer dans le milieu du taux maximum de glycosyl-nucléotide non dégradé (voir fig. 14 p. 106), il faut choisir les concentrations en ions  $Mn^{++}$  à utiliser. Les valeurs optimales à utiliser pour obtenir une dégradation minimale du glycosyl-nucléotide sont données dans le tableau 30 p. 107.

#### B - SERUM DE RAT

Lorsque la concentration en ions  $Mn^{++}$  croît de 0 à 40 mM, en présence de sérum de Rat, l'UDP-Gal, l'UDP-Glc et l'UDP-GlcAU sont dégradés chimiquement en composés-1-2 phosphates cycliques, ce taux de dégradation est faible de l'ordre de 5 p. 100 à 40 mM en  $Mn^{++}$  (Tableau 31 p. 108), les autres glycosyl-nucléotides ne sont pas dégradés chimiquement (Tableau 32 p. 109).

Dans les mêmes conditions, tous les glycosyl-nucléotides sont dégradés enzymatiquement, y compris le CMP-ANAN (Fig. 15 p. 110). Après 1 h d'incubation, le taux de chaque monosaccharide-1 phosphate est maximum à 0 mM en  $Mn^{++}$  et minimum à 10 mM en  $Mn^{++}$ . Le taux de GlcNAc-1 P reste nettement plus élevé que celui des autres monosaccharides-1 phosphates.

Contrairement aux autres composés, le taux d'acide sialique est maximum entre 5 et 10 mM en  $Mn^{++}$ , et minimum à 0 mM en  $Mn^{++}$ .

TABLEAU 27

Effet de différentes concentrations en ions  $Mn^{++}$  sur le taux de dégradation enzymatique produit par les enzymes présents dans le sérum humain.

Mn $SO_4$ (mM)	Glycosyl-nucléotides																				
	UDP-Gal									UDP-Glc									UDP-GlcAU		
	Pic W	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal	Pic W	UDP-Glc	Glc-1 P	Glc-1-2 Pc	Glc	Pic W	UDP-GlcAU	GlcAU-1 P	GlcAU-1-2 Pc	GlcAU	Pic W	UDP-GlcAU	GlcAU-1 P	GlcAU-1-2 Pc	GlcAU	
0	2,3	47,5	43,7	3,2	3,2	2,0	45,8	47,5	1,5	3,1	3,3	10,1	71,8	3,3	11,4	3,3	10,1	71,8	3,3	11,4	
5	2,2	48,6	42,8	3,0	3,2	4,8	61,4	30,7	1,6	1,3	3,5	11,6	68,1	4,5	12,2	3,5	11,6	68,1	4,5	12,2	
10	2,8	51,0	36,3	6,5	3,3	4,7	63,3	26,6	2,8	2,4	2,9	23,4	58,7	4,6	10,2	2,9	23,4	58,7	4,6	10,2	
20	2,4	42,2	40,1	11,0	4,1	6,4	53,8	28,6	7,2	3,8	3,7	18,3	57,9	9,9	10,1	3,7	18,3	57,9	9,9	10,1	
40	3,1	42,6	29,6	21,8	2,7	5,5	42,1	31,8	17,6	2,9	2,4	17,2	54,2	20,4	5,7	2,4	17,2	54,2	20,4	5,7	
Témoin	2,7	89,9	3,2	4,1	0	3,6	93,2	0	3,1	0	3,5	88,9	0	7,5	0	3,5	88,9	0	7,5	0	





TABLEAU 28

Effet de différentes concentrations en ions  $Mn^{++}$  sur le taux de dégradation enzymatique produit par les enzymes présents dans le sérum humain.

	Glycosyl-nucléotides												
	UDP-Glc NAc				GDP-Man			GDP-Fuc				CMP-ANAN	
$Mn SO_4$ (mM)	Pic W	UDP-GlcNAc	GlcNAc-1 P	GlcNAc	GDP-Man	Man-1 P	Man	GDP-Fuc	Fuc-1 P	Pic Y	Fuc	CMP-ANAN	ANAN
0	2,0	61,0	32,9	4,0	44,2	51,5	4,2	45,6	40,1	1,6	12,6	94,9	5,0
5	3,4	62,9	30,7	2,9	43,1	52,3	4,6	48,2	37,8	1,7	12,2	94,9	4,9
10	2,5	63,5	30,0	3,9	52,5	42,6	4,8	59,4	25,8	3,5	11,2	91,8	7,9
20	2,7	59,4	34,1	3,7	56,6	37,9	5,4	56,8	30,0	1,4	11,7	90,8	8,9
40	4,1	57,2	35,6	3,0	60,3	35,4	4,2	60,8	28,5	1,5	9,0	93,7	6,2
Témoin	2,2	94,9	2,8	0	100	0	0	92,5	2,4	1,7	3,2	95,0	5,0



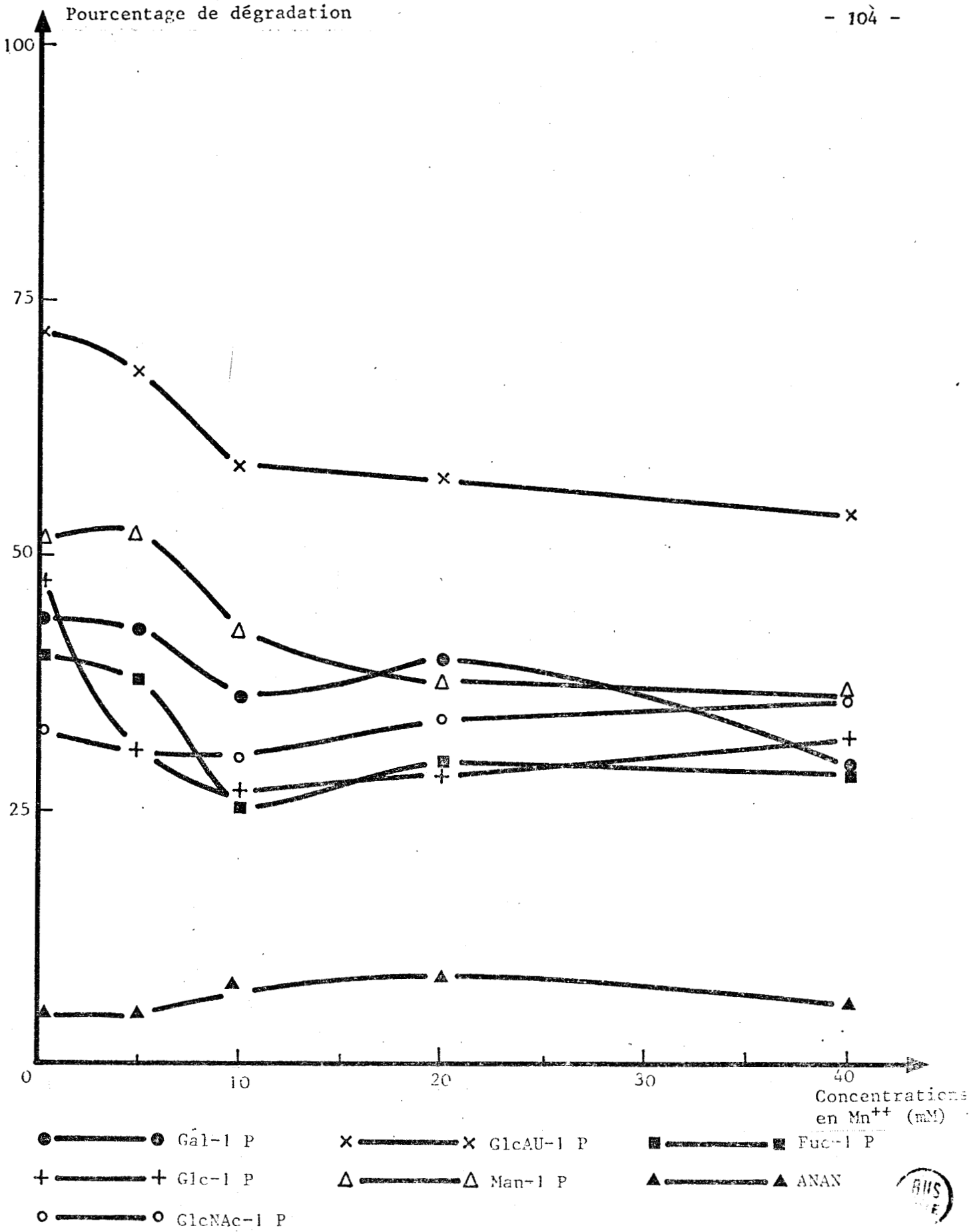


FIGURE 12

EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS Mn<sup>++</sup> SUR LE TAUX DE FORMATION DES MONOSACCHARIDES - 1 PHOSPHATES PRODUITS PAR LES ENZYMES DU SERUM HUMAIN .



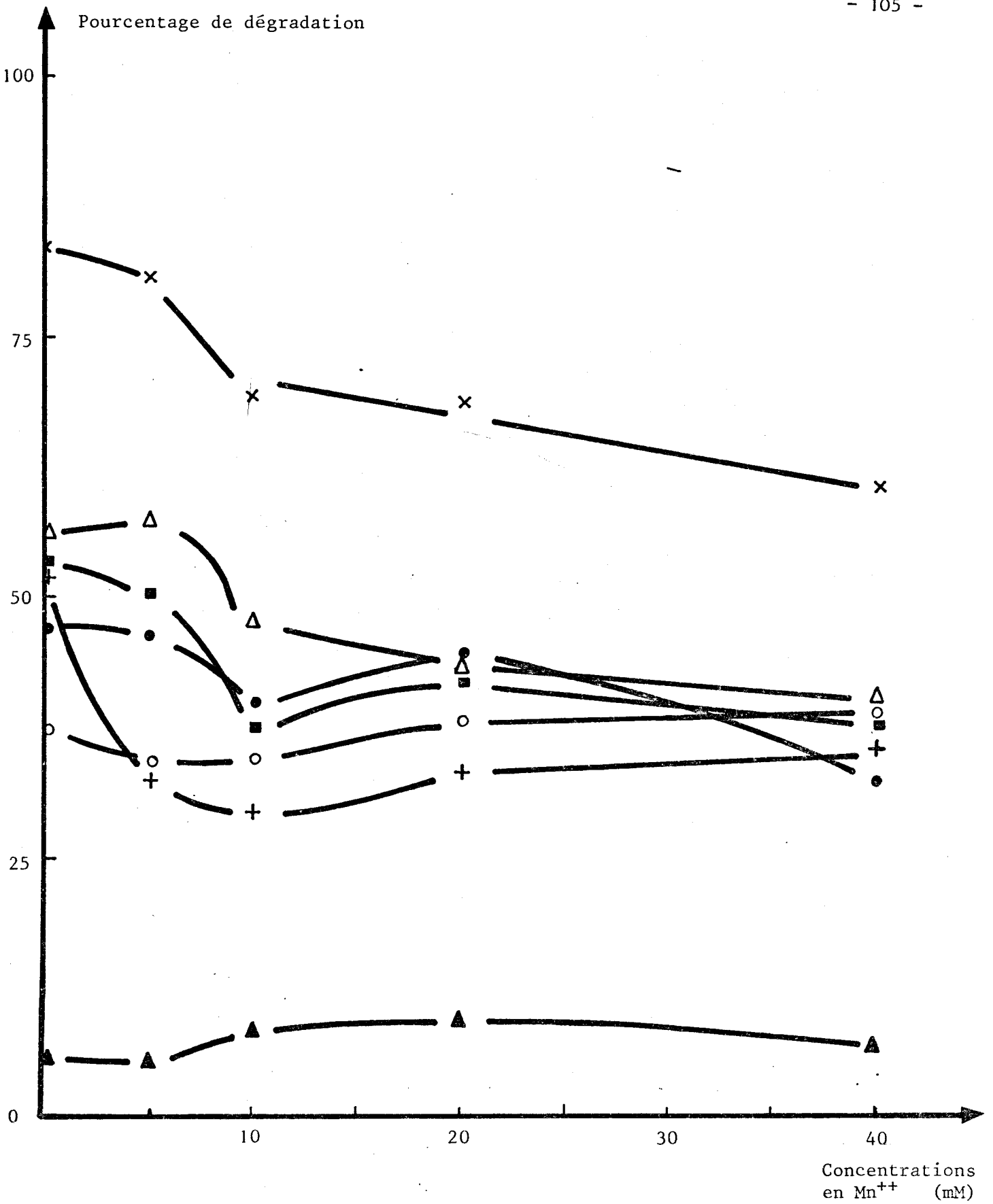


FIGURE 13



EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS Mn<sup>++</sup> SUR LE TAUX DE DEGRADATION ENZYMATIQUE TOTALE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES PRODUITE PAR LES ENZYMES DU SERUM HUMAIN.

TABLEAU 29

Concentrations en ions  $Mn^{++}$ , entraînant une dégradation enzymatique minimale des glycosyl-nucléotides, en présence de sérum humain.

Monosaccharides-1 P + Monosaccharides libres	Concentration en $MnSO_4$ (mM)
GlcNAc-1 P + GlcNAc	5
Glc-1 P + Glc	10
Gal-1 P + Gal	40
Man-1 P + Man	40
Fuc-1 P + Fuc	40
GlcAU-1 P + GlcAU	40

TABLEAU 30

Concentrations en ions  $Mn^{++}$ , entraînant une dégradation chimique et enzymatique minimale des glycosyl-nucléotides, en présence de sérum humain.

Glycosyl-nucléotides	Concentration en $MnSO_4$ (mM)
CMP-ANAN	0 à 5
UDP-GlcNAc	5 à 10
UDP-Glc	10
UDP-Gal	10
UDP-GlcAU	10
GDP-Fuc	10 à 40
GDP-Man	40

TABLEAU 31

Effet de différentes concentrations en ions  $Mn^{++}$  sur le taux de dégradation enzymatique produit par les enzymes présents dans le sérum de rat.

Mn SO <sub>4</sub> (mM)	Glycosyl-nucléotides														
	UDP-Gal					UDP-Glc					UDP-GlcAU				
	Pic W	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal	Pic W	UDP-Glc	Glc-1 P	Glc-1-2 Pc	Glc	Pic W	UDP-GlcAU	GlcAU-1 P	GlcAU-1-2 Pc	GlcAU
0	2,1	2,9	24,4	5,4	65,1	5,4	0	27,8	3,7	63,0	2,3	0	2,6	3,4	91,6
5	1,9	0	10,2	4,0	83,8	3,5	4,0	0	1,5	90,9	2,8	0	3,1	4,1	89,9
10	2,2	0	0	3,4	94,3	4,6	3,7	0	2,4	89,3	2,0	0	2,3	4,3	91,2
20	2,0	0	0	3,8	94,1	4,8	2,9	3,7	4,0	84,5	2,2	0	2,6	5,6	89,4
40	2,2	0	0	4,7	93,0	4,0	0	18,1	6,7	71,1	1,5	0	6,4	8,5	83,5
Témoin	2,2	93,1	0	4,6	0	3,6	93,2	0	3,1	0	3,5	88,9	0	7,5	0

TABLEAU 32

Effet de différentes concentrations en ions  $Mn^{++}$  sur le taux de dégradation enzymatique produit par les enzymes présents dans le sérum de rat.

Mn SO <sub>4</sub> (mM)	Glycosyl-nucléotides												
	UDP-GlcNAc				GDP-Man			GDP-Fuc				CMP-ANAN	
	Pic W	UDP-GlcNAc	GlcNAc-1 P	GlcNAc	GDP-Man	Man-1 P	Man	GDP-Fuc	Fuc-1 P	Pic Y	Fuc	CMP-ANAN	ANAN
0	2,6	3,8	75,4	18,1	2,8	29,1	68,0	0,9	4,7	2,0	92,3	6,5	93,4
5	2,6	3,9	36,4	57,0	2,4	0	97,5	1,7	0	0	98,2	1,2	98,7
10	3,1	4,4	22,3	70,1	3,2	0	96,7	2,0	0	0	97,9	1,9	98,0
20	2,5	3,8	36,0	57,7	3,2	0	96,7	2,5	0	0	97,5	7,9	92,0
40	3,1	4,4	58,8	33,6	3,9	6,8	89,2	4,0	3,5	0,8	91,5	11,8	88,1
Témoin	2,2	94,9	2,8	0	100	0	0	92,5	2,4	1,7	3,2	95,0	5,0



Lorsqu'on détermine le pourcentage de dégradation enzymatique totale des glycosyl-nucléotides, en mesurant la somme des monosaccharides-1 phosphates et des monosaccharides libres formés, celui-ci atteint des valeurs comprises entre 90 et 100 p. 100 (Fig. 16 p. 112). Ceci s'explique par la présence d'une phosphatase alcaline très active ; elle présente son maximum d'activité à 10 mM en  $Mn^{++}$  pour tous les glycosyl-nucléotides autres que le CMP-ANAN. Après 1 h d'incubation, tous les glycosyl-nucléotides sont dégradés.

### C - DISCUSSION

La dégradation enzymatique des glycosyl-nucléotides, étudiée de manière comparative en présence de sérum humain ou de sérum de Rat, montre que la dégradation est beaucoup plus importante dans le sérum de Rat que dans le sérum humain. Cependant, cette différence d'activité entre les 2 sérums semble être due à une phosphatase alcaline très active dans le sérum de Rat, qui déplace l'équilibre de réaction dans le sens de la dégradation. Il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de ces activités phosphatasiques et de comparer ensuite les activités pyrophosphatasiques.

La dégradation enzymatique des glycosyl-nucléotides, très importante au niveau du sérum de Rat, diminue d'environ 25 p. 100 la dégradation chimique de l'UDP-Gal, de l'UDP-Glc et de l'UDP-GlcAU, par rapport à celle du sérum humain.

Les profils des courbes de dégradation du CMP-ANAN sont nettement différents des profils des courbes de dégradation des autres glycosyl-nucléotides (Fig. 15 p. 110 et Fig. 16 p. 112). Cette différence peut être due soit au fait qu'il n'y ait pas de liaison pyrophosphate dans le CMP-ANAN soit au fait que la CMP-ANAN hydrolase soit différente de la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase.

### III - POURCENTAGE DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS $Mg^{++}$

La dégradation des glycosyl-nucléotides a été étudiée de manière comparative entre le sérum humain et le sérum de Rat, en présence d'un second effecteur : le magnésium, celui-ci est utilisé à différentes concentrations comprises entre 0 et 40 mM. Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux 33 p. 113, 34 p. 114, 35 p. 115 et 36 p. 116.

TABLEAU 33

Effet de différentes concentrations en ions  $Mg^{++}$  sur le taux de dégradation enzymatique produit par les enzymes présents dans le sérum humain.

Mg $Cl_2$ (mM)	Glycosyl-nucléotides														
	UDP-Gal					UDP-Glc					UDP-GlcAU				
	Pic W	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal	Pic W	UDP-Glc	Glc-1 P	Glc-1-2 Pc	Glc	Pic W	UDP-GlcAU	GlcAU-1 P	GlcAU-1-2 Pc	GlcAU
0	2,0	45,2	44,2	3,9	4,5	4,1	44,3	43,5	2,2	5,7	3,6	12,8	67,7	3,1	12,7
5	1,6	20,1	63,7	3,6	10,9	7,4	23,6	55,4	1,9	11,5	3,4	0	70,1	3,7	22,7
10	1,5	13,0	63,6	3,9	17,8	6,6	14,3	57,1	2,5	19,3	3,1	0	64,1	4,5	28,2
20	2,8	8,6	64,8	5,1	18,5	7,2	11,9	58,0	2,6	20,0	2,9	0	56,1	4,2	36,7
40	2,6	8,2	64,3	6,9	17,9	5,0	17,1	53,7	4,1	19,9	3,0	0	54,8	4,4	37,6
Témoin	1,7	92,1	0	6,1	0	5,9	91,0	0	3,0	0	3,5	88,9	0	7,5	0





TABLEAU 34

Effet de différentes concentrations en ions Mg<sup>++</sup> sur le taux de dégradation enzymatique produit par les enzymes présents dans le sérum humain.

Mg Cl <sub>2</sub> (mM)	Glycosyl-nucléotides																
	UDP-GlcNAC						GDP-Man				GDP-Fuc				CMP-ANAN		
	Pic W	UDP-GlcNAC	GlcNac-1 P	GlcNac	GDP-Man	Man-1 P	Man	GDP-Fuc	Fuc-1 P	Pic Y	Fuc	GDP-Fuc	Fuc-1 P	Pic Y	Fuc	CMP-ANAN	ANAN
0	2,1	58,4	36,2	3,1	45,0	48,9	5,9	40,0	40,0	1,9	16,5	40,0	40,0	1,9	16,5	93,2	6,7
5	2,4	52,8	40,3	4,4	40,6	51,2	8,0	35,2	30,7	2,8	31,2	35,2	30,7	2,8	31,2	90,5	9,3
10	2,4	49,1	44,0	4,3	35,0	54,4	10,5	26,2	40,8	0,4	32,5	26,2	40,8	0,4	32,5	91,3	8,5
20	2,1	29,6	60,4	7,8	16,8	64,1	19,0	17,6	24,8	2,0	55,5	17,6	24,8	2,0	55,5	88,6	11,3
40	2,7	22,3	67,7	7,2	10,7	60,1	29,1	10,8	29,0	1,5	58,5	10,8	29,0	1,5	58,5	85,5	14,4
Témoin	3,4	93,0	3,6	0	98,7	1,3	0	93,9	2,1	3,8	0	93,9	2,1	3,8	0	95,4	4,5



TABLEAU 35

Effet de différentes concentrations en ions  $Mg^{++}$  sur le taux de dégradation enzymatique produit par les enzymes présents dans le sérum de rat.

Mg $Cl_2$ (mM)	Glycosyl-nucléotides														
	UDP-Gal					UDP-Glc					UDP-GlcAU				
	Pic W	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal	Pic W	UDP-Glc	Glc-1 P	Glc-1-2 Pc	Glc	Pic W	UDP-GlcAU	GlcAU-1 P	GlcAU-1-2 Pc	GlcAU
0	1,5	2,0	31,0	4,1	61,2	4,4	3,3	25,7	1,7	64,7	2,2	0	3,0	3,3	91,4
5	1,4	2,0	27,1	4,1	65,3	5,7	3,9	22,6	1,9	65,7	2,5	0	2,9	3,8	90,6
10	1,3	1,8	25,3	3,5	67,9	6,2	2,6	22,5	2,9	65,7	2,5	0	3,5	3,1	90,8
20	1,0	2,0	23,8	3,7	69,4	6,8	1,9	23,0	1,8	66,3	2,5	0	2,9	4,3	90,1
40	1,0	2,0	24,0	3,5	69,3	4,9	2,9	18,6	3,3	70,2	2,2	0	3,6	3,9	90,2
Témoin	1,7	92,1	0	6,1	0	5,9	91,0	0	3,0	0	3,5	88,9	0	7,5	0



TABLEAU 36

Effet de différentes concentrations en ions  $Mg^{++}$  sur le taux de dégradation enzymatique produit par les enzymes présents dans le sérum de rat.

Mg $Cl_2$ (mM)	Glycosyl-nucléotides												
	UDP-GlcNAc				GDP-MAN			GDP-Fuc				CMP-ANAN	
	Pic W	UDP-GlcNAc	GlcNAc-1 P	GlcNAc	GDP-Man	Man-1 P	Man	GDP-Fuc	Fuc-1 P	Pic Y	Fuc	CMP-ANAN	ANAN
0	2,7	3,4	74,9	18,9	4,3	26,7	68,8	1,7	1,3	2,8	94,0	4,7	95,2
5	4,8	1,9	70,0	23,2	3,2	27,0	69,7	2,3	5,2	2,9	89,4	4,3	95,6
10	5,8	1,8	71,3	21,0	3,5	25,1	71,2	2,9	7,1	1,7	88,2	3,1	96,8
20	5,7	1,5	67,5	25,2	3,4	24,3	72,2	2,4	5,8	1,4	90,3	7,5	92,5
40	4,5	2,7	67,7	24,9	4,0	18,4	77,5	5,1	1,5	0	93,3	7,7	82,3
Témoin	3,4	93,0	3,6	0	98,7	1,3	0	93,9	2,1	3,8	0	95,4	4,5



#### A - SERUM HUMAIN

Lorsque la concentration en ions  $Mg^{++}$  croît de 0 à 40 mM, le taux des monosaccharides-1 phosphates, formés à partir des différents glycosyl-nucléotides étudiés précédemment varie de 25 à 70 p. 100 ; le taux de Fuc-1 P dans le milieu est le plus faible (Fig. 17 p. 118). Les taux maximum et minimum de monosaccharides-1 phosphates présents dans le milieu sont donnés dans les tableaux 37 et 38 p. 119.

Lorsqu'on détermine le pourcentage de dégradation enzymatique totale des glycosyl-nucléotides, en mesurant la somme des monosaccharides-1 phosphates et des monosaccharides libres formés, celui-ci atteint des valeurs comprises entre 40 et 95 p. 100 ; il est minimum pour tous les glycosyl-nucléotides étudiés, à 0 mM en  $Mg^{++}$  (Fig. 18 p. 120).

La phosphatase alcaline est plus active sur le Fuc-1 P que sur les autres nucléotides (Fig. 17 p. 118 et Fig. 18 p. 120). La fig. 19 p. 121 montre que l'UDP-GlcAU est le glycosyl-nucléotide le plus dégradé par le sérum humain, elle montre aussi qu'entre 20 et 40 mM en  $Mg^{++}$ , les deux GDP-sucre : GDP-Man et GDP-Fuc sont dégradés de façon identique.

#### B - SERUM DE RAT

Lorsque la concentration en ions  $Mg^{++}$  croît de 0 à 40 mM, le taux des monosaccharides-1 phosphates, formés à partir des différents glycosyl-nucléotides étudiés précédemment, varie entre 0 et 95 p. 100.

Le pourcentage de chaque monosaccharide-1 P varie peu lorsque la concentration en ions  $Mg^{++}$  augmente (Fig. 20 p. 122) ; le pourcentage de GlcNAc-1 P, mesuré dans le milieu est de beaucoup le plus élevé, or, lorsque nous déterminons le pourcentage de dégradation enzymatique totale de l'UDP-GlcNAc, celui-ci atteint des valeurs comprises entre 90 et 95 p. 100 (Fig. 21 p. 123) nous pouvons donc déduire que la phosphatase alcaline du sérum de Rat est moins active sur la GlcNAc-1 P que sur les autres monosaccharides-1 phosphates. Après 1 h d'incubation, tous les glycosyl-nucléotides sont entièrement dégradés.

La dégradation chimique est très faible.

#### C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

En présence d'ions  $Mg^{++}$ , la dégradation chimique des glycosyl-nucléotides par le sérum humain est beaucoup plus faible qu'en présence d'ions  $Mn^{++}$  ; ceci est dû à une activation de la dégradation enzymatique totale en présence des ions  $Mg^{++}$ . Cette dégradation chimique est pratiquement inexistante,

TABLEAU 37

Concentrations en ions  $Mg^{++}$ , entraînant la formation du taux maximum de monosaccharides-1 P dans le milieu, en présence de sérum humain.

Monosaccharides-1 P	Concentration en $MgSO_4$ (mM)
Fuc-1 P	0 et 10
Gal-1 P	5
GlcAU-1 P	5
Glc-1 P	20
Man-1 P	40
GlcNAc-1 P	40

TABLEAU 38

Concentrations en ions  $Mg^{++}$ , entraînant la formation du taux minimum de monosaccharides-1 P dans le milieu, en présence de sérum humain.

Monosaccharides-1 P	Concentration en $MgSO_4$ (mM)
Gal-1 P	0
Glc-1 P	0
GlcNAc-1 P	0
Man-1 P	0
ANAN	0
GlcAU-1 P	20
Fuc-1 P	20



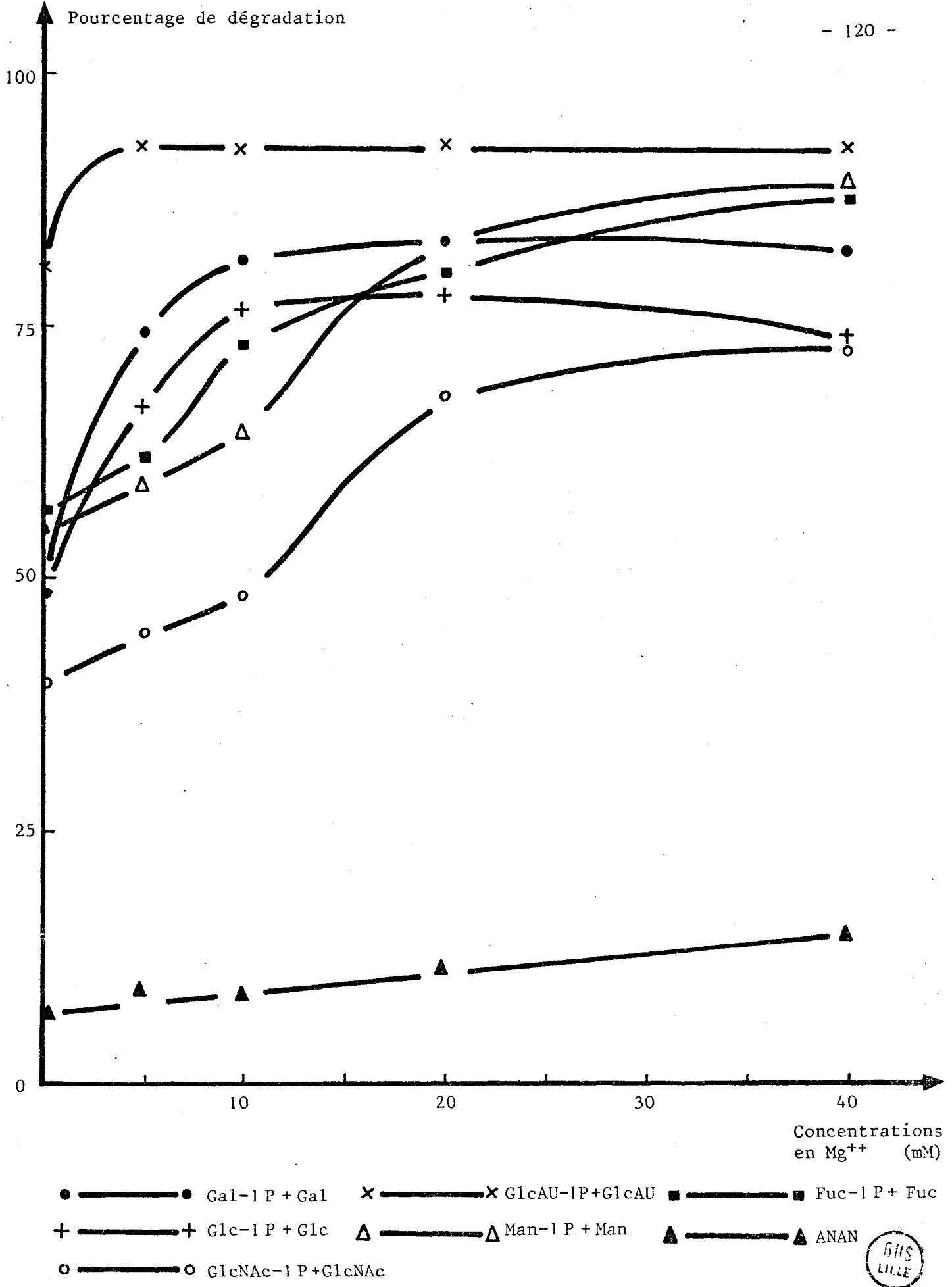


FIGURE 18

EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS Mg<sup>++</sup> SUR LE TAUX DE DEGRADATION ENZYMATIQUE TOTALE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES PRODUITE PAR LES ENZYMES DU SERUM HUMAIN.



lorsque nous travaillons avec du sérum de Rat, en présence d'ions  $Mn^{++}$  ou  $Mg^{++}$ , en raison des activités pyrophosphatasiques et phosphatasiques élevées.

La dégradation enzymatique totale des glycosyl-nucléotides est nettement accrue en présence de sérum humain, lorsque les ions  $Mg^{++}$  sont présents à la concentration de 10 mM ; cette augmentation d'activité résulte d'une légère activation de la pyrophosphatase, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par PITKÄNEN et al. (94), et d'une activation plus importante de la phosphatase alcaline.

Dans le cas du sérum de Rat, la dégradation des glycosyl-nucléotides en monosaccharides-1 phosphates ne varie pas ou très peu, lorsque la concentration en ions  $Mg^{++}$  augmente de 0 à 40 mM (voir fig. 20 p. 122). Comme dans le cas des ions  $Mn^{++}$ , le pourcentage de GlcNac-1 P dans le milieu est plus élevé que celui des autres monosaccharides-1 phosphates, or lorsque nous déterminons le pourcentage de dégradation enzymatique totale de l'UDP-GlcNac, celui-ci atteint des valeurs comprises entre 90 et 95 p. 100, nous pouvons donc confirmer que la phosphatase alcaline du sérum de Rat est moins active sur le GlcNac-1 P que sur les autres monosaccharides-1 P. Quant au CMP-ANAN, il est dégradé par le sérum de Rat, en présence d'ions  $Mn^{++}$  ou  $Mg^{++}$ , ou en leur absence, il est faiblement dégradé par le sérum humain dans les mêmes conditions.

Tous les glycosyl-nucléotides sont dégradés par les enzymes du sérum de Rat, ils le sont tous mais plus faiblement par le sérum humain. Pour étudier les activités nucléotides pyrophosphatasiques et phosphatasiques, il est préférable de travailler en présence d'ions  $Mg^{++}$ , à la concentration de 10 mM plutôt qu'en présence d'ions  $Mn^{++}$ .

#### IV - POURCENTAGE DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE L'UDP-GAL EN FONCTION DU TEMPS

##### A - SERUM HUMAIN

La fig. 22 p. 125 montre qu'à 40 mM en  $Mn^{++}$ , l'UDP-Gal est dégradé à plus de 90 p. 100 après 1 h d'incubation, le taux de Gal-1 P est supérieur à 50 p. 100, le taux de Gal-1-2 phosphate cyclique, de l'ordre de 30 p. 100 et le taux de Gal, égal à 10 p. 100. La formation de Gal-1 P est linéaire pendant les 40 premières minutes de réaction.

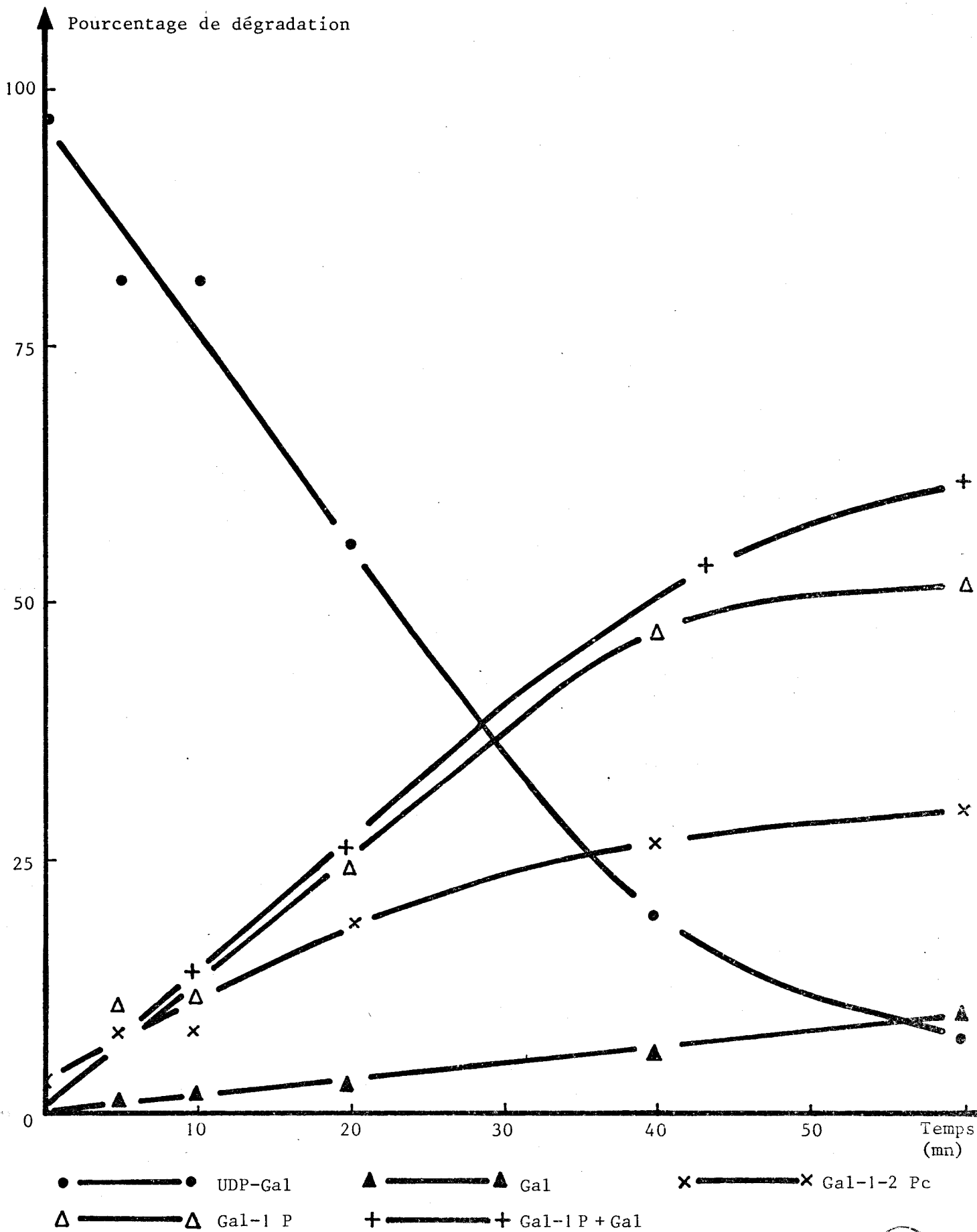


FIGURE 22

CINETIQUE DE DEGRADATION DE L'UDP-Gal PAR LES ENZYMES PRESENTS DANS LE SERUM HUMAIN.





## B - SERUM DE RAT

La dégradation de l'UDP-Gal par le sérum de Rat à 40 mM en  $Mn^{++}$  est totale après 20 mn de réaction (Fig. 26 p. 127).

Le taux de Gal-1 P est maximum après 5 mn de réaction, puis il décroît à cause de l'activité très grande de la phosphatase alcaline.

La dégradation chimique de l'UDP-Gal en Gal-1-2 phosphate cyclique est très faible.

## C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La dégradation de l'UDP-Gal par le sérum de Rat est 3 fois plus rapide que la dégradation par le sérum humain.

La compétition entre la dégradation enzymatique et la dégradation chimique observée dans le cas du sérum humain, n'existe pas dans le cas du sérum de Rat, en raison des activités pyrophosphatasique et phosphatasique élevées dans ce dernier.

## V - VARIATIONS DE LA DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE L'UDP-GAL SUIVANT LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

### A - SERUM HUMAIN

Dans cette expérience, nous avons ajouté des quantités croissantes d'UDP-Gal non marqué en présence d'une quantité fixe d'UDP-Gal radioactif, le tableau 39 p.130 montre que le nombre de pico-moles de Gal-1 P et de Gal formées en présence de sérum humain augmente lorsque la concentration en UDP-Gal croît. Pour les concentrations en UDP-Gal de 5 et 10  $\mu M$ , il y a proportionnalité entre les quantités de Gal-1 P formées et proportionnalité entre les quantités de Gal formées, le tableau des pourcentages nous montre qu'à l'une et l'autre concentration, le taux de chacun des composés  $\{^{14}C\}$  formés ne varie pratiquement pas, autrement dit, c'est dans cette zone de concentration en UDP-Gal qu'il faut travailler si l'on souhaite régulariser par du substrat non marqué, l'activité de la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase.

Quant à la dégradation chimique, elle est de plus en plus importante suivant que la concentration en UDP-Gal croît, elle est presque linéaire de 1 à 1000  $\mu M$  et pratiquement identique à celle obtenue en absence de sérum. A 1000  $\mu M$  en UDP-Gal, la dégradation enzymatique de l'UDP-Gal devient très faible par rapport à la dégradation chimique, il y a inhibition de la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase par excès de substrat.

#### B - SERUM DE RAT

Dans le cas du sérum de Rat, pour les concentrations en UDP-Gal de 5 et 10  $\mu\text{M}$ , le tableau 40 p. 131 montre qu'il y a proportionnalité entre les quantités de Gal-1 P formées et proportionnalité entre les quantités de Gal formées, les pourcentages de produits formés, marqués radioactivement ne varient pas d'une concentration d'UDP-Gal à l'autre, c'est donc la zone de concentration à utiliser, si l'on veut ajouter de l'UDP-Gal non marqué dans les milieux d'incubation. Il ne reste de l'UDP-Gal non dégradé que lorsque celui-ci est présent à forte concentration : 1 000  $\mu\text{M}$ . La somme des activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques et phosphatasiques est très supérieure à la dégradation chimique à 100  $\mu\text{M}$  en UDP-Gal ; à 1 000  $\mu\text{M}$ , la dégradation chimique devient importante vis-à-vis de la dégradation enzymatique totale.

#### C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques et phosphatasiques du sérum de Rat sont plus élevées que celles du sérum humain, surtout pour des concentrations en UDP-Gal de l'ordre de 100 et 1 000  $\mu\text{M}$ . A ces concentrations, la dégradation chimique est très importante. La concentration d'UDP-Gal à utiliser dans le cas du sérum humain comme dans celui du sérum de Rat doit être de 5 à 10  $\mu\text{M}$ .

### V - POURCENTAGE DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE L'UDP-GAL, EN FONCTION DU TEMPS ET EN PRÉSENCE D'UN INHIBITEUR

#### A - SERUM HUMAIN

L'UMP à la concentration de 2 mM a pour effet de bloquer complètement l'action de la pyrophosphatase et par suite, celle de la phosphatase. Dans ces conditions, le taux de Gal-1-2 phosphate cyclique devient supérieur à 50 p. 100 (Fig. 24 p. 132). Cette dégradation chimique est linéaire pendant les 40 première minutes de réaction.

#### B - SERUM DE RAT

Comme précédemment, l'UMP a bloqué la dégradation enzymatique de l'UDP-Gal ; seule persiste la dégradation chimique (Fig. 25 p. 133).

C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A 40 mM en ions  $Mn^{++}$  et à 2 mM en UMP, l'activité nucléotide pyrophosphatasique et par suite l'activité phosphatasique du sérum humain ou du sérum de Rat sont complètement bloquées. Dans ces 2 cas, la dégradation chimique devient très importante.

TABLEAU 39

variations de la dégradation enzymatique de l'UDP-Gal par les enzymes présents dans le sérum humain, suivant la concentration en UDP-Gal. (Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale).

	UDP-Gal non marqué		{ <sup>14</sup> C}-UDP-Gal	{ <sup>14</sup> C}-Gal-1 P	{ <sup>14</sup> C}-Gal-1-2 Pc	{ <sup>14</sup> C}-Gal
	μM	pico-moles				
Sémoins	0	0	62,6	4,3	33,0	0
	1.000	90.000	65,3	3,1	31,6	0
Sérum humain	0	0	16,7	48,5	17,3	17,4
	1	90	47,4	19,1	26,1	7,2
	5	450	33,0	35,6	20,6	10,8
	10	900	30,7	36,9	22,0	10,3
	100	9.000	57,3	10,0	28,8	3,7
	1.000	90.000	64,3	4,7	30,1	0,8

(Les résultats sont exprimés en pico-moles)

	UDP-Gal non marqué		UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal
	μM	pico-moles				
Sémoins	0	0	26,1	1,8	13,8	0
	1.000	90.000	58.797,4	2.791,3	28.453,3	0
Sérum humain	0	0	6,9	20,3	7,2	7,2
	1	90	62,4	25,1	34,4	9,6
	5	450	162,3	175,1	101,3	52,6
	10	900	289,1	347,5	207,2	97,0
	100	9.000	5.180,9	904,2	2.604,0	334,5
	1.000	90.000	57.896,9	4.231,9	27.102,6	720,3



TABLEAU 40

variations de la dégradation enzymatique de l'UDP-Gal par les enzymes présents dans le cerveau de Rat, suivant la concentration en UDP-Gal. (Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale).

	UDP-Gal non marqué		$\{^{14}\text{C}\}$ -UDP-Gal	$\{^{14}\text{C}\}$ -Gal-1 P	$\{^{14}\text{C}\}$ -Gal-1-2 Pc	$\{^{14}\text{C}\}$ -Gal
	$\mu\text{M}$	pico-moles				
moins	0	0	62,6	4,3	33,0	0
	1.000	90.000	65,3	3,1	31,6	0
Cerveau de Rat	0	0	1,0	9,9	6,8	82,2
	1	90	0	4,6	7,9	87,4
	5	450	0	3,7	6,1	90,1
	10	900	0	4,2	5,4	90,3
	100	9.000	0	12,9	11,7	75,3
	1.000	90.000	37,5	13,0	26,5	22,9

(Les résultats sont exprimés en pico-moles)

	UDP-Gal non marqué		UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal
	$\mu\text{M}$	pico-moles				
moins	0	0	26,1	1,8	13,8	0
	1.000	90.000	58.797,4	2.791,3	28.453,3	0
Cerveau de Rat	0	0	0,4	4,2	2,8	34,4
	1	90	0	6,1	10,4	115,2
	5	450	0	18,2	30,0	443,1
	10	900	0	39,6	50,9	850,4
	100	9.000	0	1.166,4	1.057,9	6.808,5
	1.000	90.000	33.765,7	11.705,4	23.861,1	20.619,6



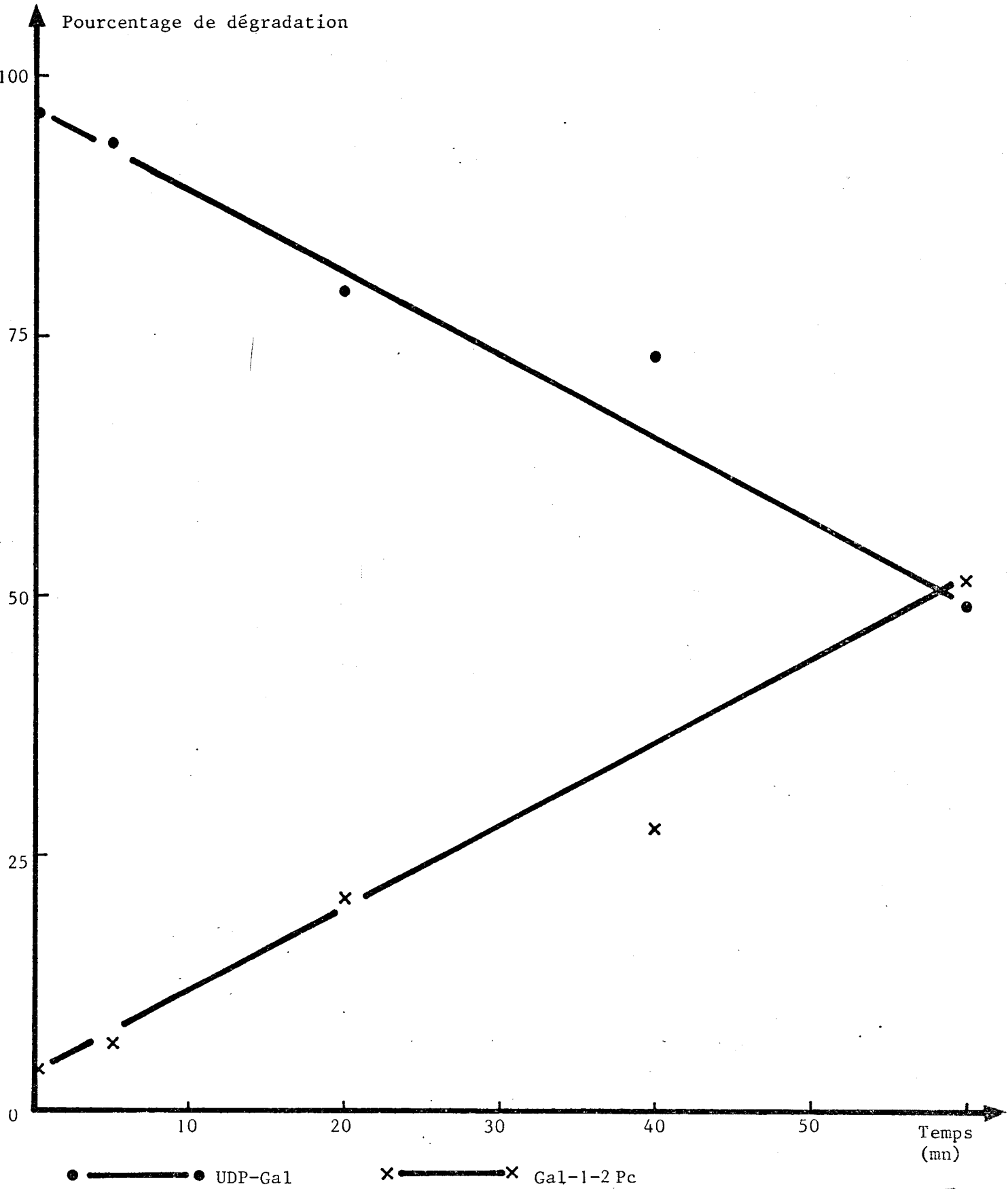


FIGURE 24

CINETIQUE DE DEGRADATION DE L'UDP-Gal PAR LES ENZYMES PRESENTS DANS LE SERUM HUMAIN, EN PRESENCE D'UMP (2 mM).



## ACTIVITES GLYCOSIDASQUES DES SERUMS

La mesure des activités glycosidasiques du sérum humain et du sérum de Rat sur l'Ovomucoïde a été effectuée avant et après transfert de galactose. Avant transfert, car des N-acétyl glucosaminidases peuvent couper les N-acétyl glucosamines terminales de la partie glycanique et ainsi empêcher le transfert de galactose ; après transfert, car des galactosidases peuvent couper les résidus de galactose immédiatement après leur transfert.

### I - MESURE DES ACTIVITÉS GLYCOSIDASQUES DES SÉRUMS SUR DES ACCEPTEURS GLYCOPROTÉIQUES AVANT LA RÉACTION DE TRANSFERT

La révélation des chromatogrammes au réactif à l'oxalate d'aniline et au nitrate d'argent de TREVELYAN et al. (95) montre qu'il n'y a pas de libération de monosaccharides à partir de l'Ovomucoïde par les glycosidases du sérum humain ou du sérum de Rat, si elle existe, elle est très faible et nous n'avons pas pu la déceler, même après de longues durées d'incubation.

### II - MESURE DES ACTIVITÉS GLYCOSIDASQUES DES SÉRUMS SUR DES ACCEPTEURS GLYCOPROTÉIQUES APRÈS LA RÉACTION DE TRANSFERT

Aucune libération de galactose n'a été décelée dans cette expérience, même après de longues durées d'incubation.

### III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'activité des glycosidases du sérum humain ou du sérum de Rat est relativement faible, nous n'avons pas pu mettre en évidence de produits de dégradation de l'Ovomucoïde avant et après transfert du galactose.

Des résultats analogues ont été obtenus par KIM et al. (96) qui ont étudié les activités glycosidasiques endogènes des homogénats de la muqueuse intestinale de Rat pendant la détermination des activités glycosyltransférases. Ces auteurs ont conclu que l'hydrolyse des liaisons glycosidiques des monosaccharides terminaux radioactifs est minimale.

Nous pouvons donc conclure que la compétition entre les activités glycosidasiques et glycosyltransférasiques, si elle existe, est très faible et qu'il n'est pas nécessaire dans le cas des sérums étudiés de bloquer les activités glycosidasiques par les glycono-lactones correspondantes.



ACTIVITES GALACTOSYLTRANSFERASIQUE  
ET NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASIQUE  
DES SERUMS

L'Ovomucoïde total est une glycoprotéine qui possède 5 résidus de GlcNAc en position terminale non réductrice, sur lesquels peuvent venir se greffer des résidus de Gal (97). Nous avons choisi ce composé comme accepteur du Gal pour notre étude des galactosyltransférases du sérum humain et du sérum de Rat.

Nous avons fait varier les activités galactosyltransférasiques en fonction de la concentration en ions  $Mn^{++}$ , en fonction du temps et en fonction de la concentration en UDP-Gal dans le milieu, afin d'obtenir un transfert maximum en présence de l'un et l'autre sérum.

Les réactions de transfert ne sont pas les seules à diminuer la concentration en UDP-Gal du milieu d'incubation, il se produit simultanément une dégradation enzymatique de ce composé. Nous avons essayé de bloquer cette dégradation par des effecteurs, pour mesurer le transfert dans ces conditions.

La méthode chromatographique que nous avons utilisée pour mettre en évidence les dégradations chimique et enzymatique nous permet aussi de mesurer le taux de transfert, en effet, l'accepteur étant de nature glycoprotéinique, il ne migre pas, d'autre part, le pourcentage de transfert sur des accepteurs endogènes est négligeable.

I - VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFERASIQUE EN PRÉSENCE  
DE CONCENTRATIONS VARIABLES EN IONS  $Mn^{++}$

A - SERUM HUMAIN

Lorsqu'il y a transfert de Gal sur l'Ovomucoïde total, à partir de sérum humain, il se produit simultanément une dégradation de l'UDP-Gal. Les taux de transfert et de dégradation varient suivant la concentration en  $Mn^{++}$  utilisée.

A 0 mM en  $Mn^{++}$ , il n'y a aucun transfert, celui-ci augmente ensuite progressivement lorsque la concentration en  $Mn^{++}$  passe de 0 à 40 mM. Simultanément, le taux de Gal-1 P diminue lorsque la concentration en  $Mn^{++}$  passe de 0 à 15 mM, puis reste stable lorsqu'elle passe de 15 à 40 mM (Fig. 26 p. 138).

Le taux de transfert du Gal sur l'Ovomucoïde est maximum à 40 mM en  $Mn^{++}$ , concentration à laquelle il y a disparition complète de l'UDP-Gal, après 1 h d'incubation.

Le taux de Gal-1-2 phosphate cyclique augmente au fur et à mesure que la concentration en ions  $Mn^{++}$  augmente, mais reste inférieur au taux observé précédemment en l'absence de transfert (Fig. 13 p. 105). Le taux de Gal diminue lentement, quand la concentration en ions  $Mn^{++}$  augmente.

Ces résultats sont en accord avec les précédents et confirment qu'il n'est pas nécessaire de travailler en présence de  $Mn^{++}$ , lorsqu'on s'intéresse exclusivement à la dégradation ; pour le transfert, ils deviennent indispensables.

#### B - SERUM DE RAT

La figure 27 p. 139 montre que le pourcentage de transfert du Gal sur l'Ovomucoïde total est linéaire et augmente de 0 à 10 p. 100 lorsque la concentration en  $Mn^{++}$  croît de 0 à 40 mM.

Le taux de Gal-1 P décelé dans le milieu est minimum et presque nul pour des concentrations en  $Mn^{++}$  comprises entre 5 et 15 mM ; ceci résulte d'une activité maximale de la phosphatase alcaline dont l'optimum se trouve à 5 mM en  $Mn^{++}$ , puis lorsque la concentration en  $Mn^{++}$  augmente, l'activité de celle-ci diminue comme cela avait déjà été démontré dans le cas du sérum humain.

#### C - DISCUSSION

Lors du transfert de galactose, la somme des pourcentages de dégradation de l'UDP-Gal en Gal-1 P et en Gal diminue lorsque la concentration en ions  $Mn^{++}$  augmente, cependant, cette diminution est plus faible dans le cas du sérum de Rat que dans le cas du sérum humain.

#### D - CONCLUSION

Pour effectuer des mesures de dégradation enzymatique, il n'est pas nécessaire de travailler en présence d'ions  $Mn^{++}$ , leur absence permet de limiter la dégradation chimique. Cependant la présence d'ions  $Mn^{++}$  à une concentra-

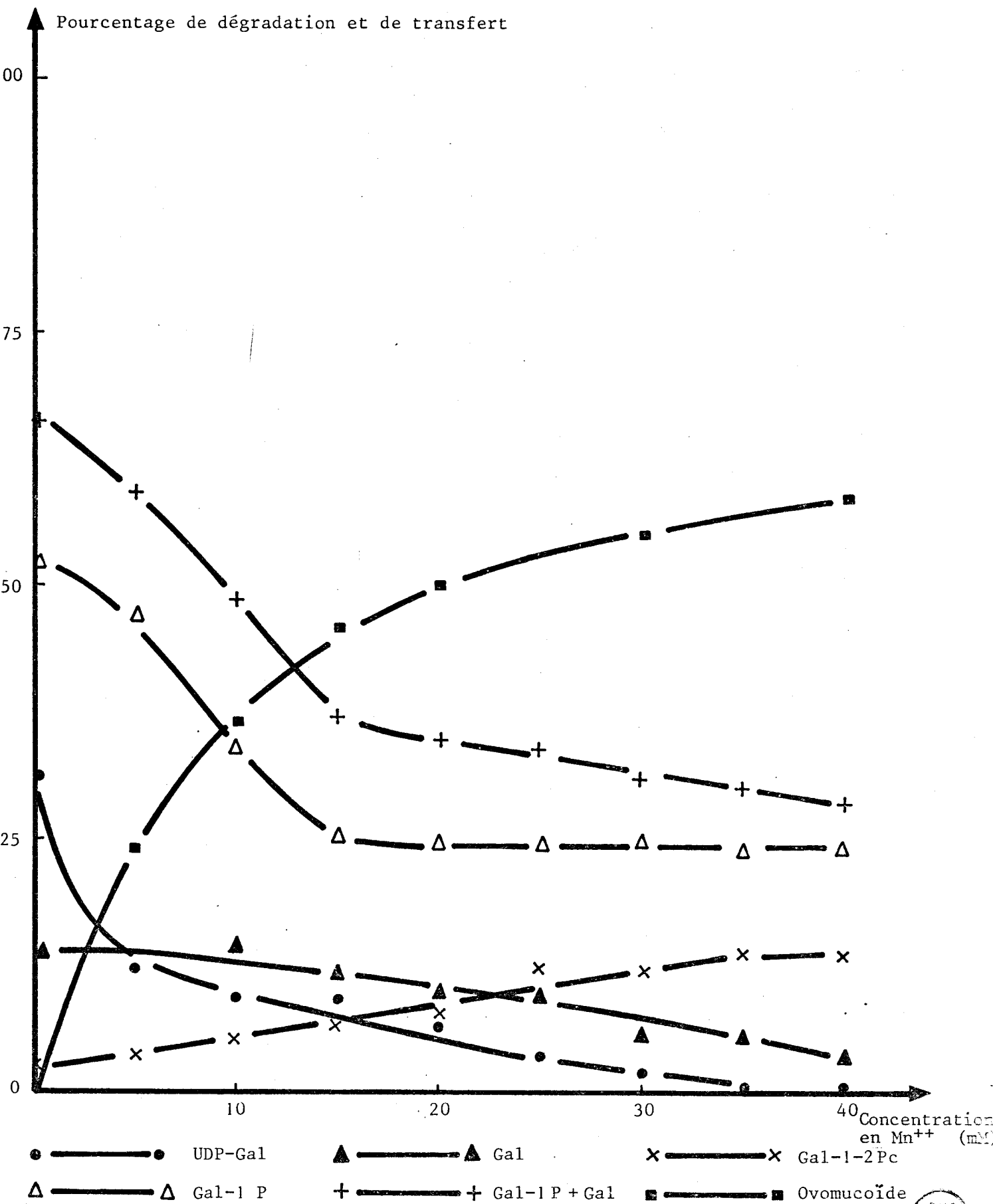


FIGURE 26

EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS Mn<sup>++</sup> SUR LE TAUX DE DEGRADATION DE L'UDP-Gal ET SUR LE TAUX DE TRANSFERT DU Gal SUR L'OVOMUCOÏDE PRODUITS PAR LES ENZYMES DU SERUM HUMAIN.



tion égale ou supérieure à 20 mM est indispensable pour que le transfert puisse se faire. Une conclusion identique a été obtenue par de nombreux auteurs.

## II - VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUE EN FONCTION DU TEMPS

### A - SERUM HUMAIN

La figure 28 p.142 montre qu'à une concentration de 40 mM en ions  $Mn^{++}$ , après un temps d'incubation de 40 mn, le taux de transfert du Gal sur l'Ovomucoïde par les enzymes présents dans le sérum humain est maximum et voisin de 50 p. 100.

L'UDP-Gal est complètement dégradé après un temps d'incubation de 1 h.

La vitesse de formation du Gal-1 P est linéaire et relativement importante pendant les 20 premières minutes de réaction, puis est à nouveau linéaire mais avec une valeur nettement plus faible.

Le pourcentage de galactose augmente faiblement dans le milieu au cours du temps.

Le Gal-1-2 phosphate cyclique se forme rapidement pendant les 20 premières minutes de réaction, comme le Gal-1 P puis augmente très faiblement.

### B - SERUM DE RAT

La figure 29 p.143 montre qu'à une concentration de 40 mM en ions  $Mn^{++}$ , le pourcentage de transfert du Gal sur l'Ovomucoïde est maximum et l'UDP-Gal complètement dégradé dans le milieu après un temps de réaction de 10 mn.

La vitesse de formation du Gal-1 P est très grande, le taux maximum de Gal-1 P est décelé dans le milieu, après un temps de réaction de 5 mn, puis il décroît pour former du Gal. Le taux de Gal, en fin d'incubation atteint 80 p. 100.

La dégradation chimique est peu importante.

### C - DISCUSSION

En comparant les figures 22 p. 125 et 28 p. 142, on remarque qu'en présence ou en absence d'accepteur, le pourcentage de formation du Gal, par les enzymes présents dans le sérum humain, ne varie pas au cours du temps, cependant, en présence d'accepteur, le taux de formation du Gal-1 P a considérablement diminué à peu près de moitié, et le taux de Gal-1-2 phosphate cyclique a diminué du tiers par rapport à la même expérience sans accepteur.

En ce qui concerne le sérum de Rat, l'UDP-Gal est dégradé 2 fois plus rapidement en présence d'Ovomucoïde qu'en son absence. Le taux de Gal-1 P dans le milieu est maximum après un temps de réaction de 5 mn et légèrement supérieur à celui formé en absence d'Ovomucoïde ; ceci pourrait résulter d'une légère activation de la pyrophosphatase par l'accepteur, qui jouerait un rôle secondaire d'effecteur, compte tenu du fait que les courbes de formation du Gal et du Gal-1-2 P cyclique restent identiques, en présence ou en absence d'accepteur puis après un temps de réaction de 5 mn, le taux de Gal-1 P décroît plus rapidement en présence d'Ovomucoïde qu'en son absence, ce qui apporte la preuve de la compétition entre la dégradation enzymatique et le transfert.

### D - CONCLUSIONS

Dans le cas du sérum de Rat, la somme des taux de Gal-1 P et de Gal est maximale après 10 mn de réaction, alors que dans le cas du sérum humain, elle ne l'est pas encore après 1 h d'incubation.

Le pourcentage maximum de transfert du Gal sur l'Ovomucoïde par les enzymes du sérum de Rat est obtenu après un temps de réaction de 10 mn alors qu'il faut attendre 40 mn dans le cas du sérum humain.

Le taux de transfert du Gal sur l'Ovomucoïde en présence de sérum de Rat reste nettement inférieur à celui obtenu en présence de sérum humain. La galactosyltransférase du sérum humain serait elle plus active que celle du sérum de Rat ou est-ce la forte activité glycosyl-nucléotide pyrophosphatase qui explique ce résultat ?.

### III - VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUES DES SÉRUMS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN UDP-GAL

#### A - SÉRUM HUMAIN

Lorsque la concentration en UDP-Gal varie dans le milieu de 0 à 100  $\mu\text{M}$ , la quantité de galactose fixée sur l'Ovomucoïde par les enzymes présents dans le sérum humain augmente et atteint un palier à partir de 100  $\mu\text{M}$  en UDP-Gal, cette concentration de 100  $\mu\text{M}$  permet d'obtenir un transfert maximal (Tableau 41 p. 146). Si nous considérons les résultats exprimés en pourcentages, nous constatons que lorsque la concentration en UDP-Gal croît de 100 à 1000  $\mu\text{M}$ , le pourcentage de radioactivité sur l'Ovomucoïde diminue environ d'un facteur 10, ce qui ne signifie pas qu'il y a moins de résidus de galactose fixés mais qu'il y a 10 fois plus de résidus non marqués qui sont fixés.

Il est remarquable qu'aux concentrations en UDP-Gal de 5 et 10  $\mu\text{M}$ , les pourcentages de transfert, de dégradation enzymatique par la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase et par la phosphatase et de dégradation chimique restent sensiblement identiques, ceci signifie que lorsque l'on ajoute 2 fois plus de substrat dans le milieu, les enzymes ont dans ce cas précis, une activité 2 fois plus grande, la dégradation chimique est elle aussi 2 fois plus importante, ce qui n'entraîne aucune modification des pourcentages des produits marqués et c'est donc dans cette zone de concentration qu'il faut travailler.

A 1000  $\mu\text{M}$ , en UDP-Gal, il reste dans le milieu à la fin de l'incubation, une grande quantité d'UDP-Gal, bien que la dégradation chimique ait été très importante.

#### B - SÉRUM DE RAT

Lorsque la concentration en UDP-Gal varie dans le milieu de 0 à 100  $\mu\text{M}$ , la quantité de galactose fixée sur l'Ovomucoïde par les enzymes présents dans le sérum de Rat augmente, nous observons une proportionnalité entre 5 et 100  $\mu\text{M}$  en UDP-Gal ; à 1000  $\mu\text{M}$  il semble que nous n'ayons pas encore atteint le palier, bien qu'il reste dans le milieu de l'UDP-Gal (Tableau 42 p. 147).

Aux concentrations en UDP-Gal de 0 à 10  $\mu\text{M}$ , les pourcentages de chacune des activités enzymatiques ou chimiques restent sensiblement identiques

ce qui signifie que nous pouvons travailler en présence d'UDP-Gal non marqué pour régulariser les activités jusqu'à la concentration de 10  $\mu\text{M}$ .

De 100 à 1000  $\mu\text{M}$  en UDP-Gal, les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques et phosphatasiques deviennent très importante ; à 1000  $\mu\text{M}$  l'UDP-Gal n'est plus entièrement dégradé bien que la dégradation chimique soit très importante.

### C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Afin de régulariser les activités enzymatiques de transfert ou de dégradation, il peut être intéressant d'ajouter de l'UDP-Gal non marqué, à l'UDP-Gal radioactif, mais il faut choisir les concentrations à utiliser ; dans le cas du sérum humain comme dans celui du sérum de Rat, les meilleures concentrations semblent être de 5 à 10  $\mu\text{M}$ .

Nous avons montré précédemment, en utilisant exclusivement de l'UDP-Gal radioactif que le taux de transfert du galactose sur l'Ovomucoïde, en présence du sérum humain, est supérieur à celui obtenu en présence du sérum de Rat. Deux raisons peuvent expliquer ce résultat : ou la galactosyl-transférase du sérum humain est plus active que celle du sérum de Rat, ou la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase du sérum de Rat, beaucoup plus active que celle du sérum humain dégrade très rapidement le précurseur glyco-nucléotidique et empêche ainsi le transfert du monosaccharide.

Grâce à cette expérience, en travaillant à 1000  $\mu\text{M}$  d'UDP-Gal, nous constatons que les quantités de galactose transférées sur l'Ovomucoïde sont identiques en présence des 2 sérums : homme et Rat, or, c'est à cette concentration seulement que l'UDP-Gal n'est plus entièrement dégradé en présence du sérum de Rat. Ceci nous permet de penser que la galactosyltransférase du sérum de Rat n'est pas moins active que celle du sérum humain, au contraire, elle l'est peut être davantage car si à 1000  $\mu\text{M}$  en UDP-Gal, le transfert dû au sérum humain est maximum, celui dû au sérum de Rat n'a pas encore atteint son maximum, ce transfert reste quand même relativement faible par rapport à la quantité d'UDP-Gal non dégradé dans le milieu, en effet, sachant que l'Ovomucoïde possède un poids moléculaire de 27.600, nous avons pu établir que nous fixons seulement 1 résidu de galactose sur 10 molécules d'Ovomucoïde total soit 1 résidu de galactose sur 50 N-acétyl glucosamines terminales.

Variations du transfert de galactose sur l'Ovomucoïde total et de la dégradation enzymatique de l'UDP-Gal par les enzymes présents dans le sérum humain suivant la concentration en UDP-Gal. (Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale).

	UDP-Gal non marqué		{ <sup>14</sup> C}-Ovomucoïde	{ <sup>14</sup> C}-UDP-Gal	{ <sup>14</sup> C}-Gal-1 P	{ <sup>14</sup> C}-Gal-1-2 Pc	{ <sup>14</sup> C}-Gal
	µM	pico-moles					
Témoins	0	0					
	1.000	90.000		62,6 65,3	4,3 3,1	33,0 31,6	0 0
Sérum humain	0	0	37,4	12,4	24,5	16,3	9,4
	1	90	39,7	13,3	23,4	13,3	10,3
	5	450	40,4	12,9	22,9	14,0	9,5
	10	900	37,2	14,0	24,6	13,9	10,2
	100	9.000	18,3	39,5	15,0	22,2	4,7
1.000	90.000	1,9	64,0	4,6	28,1	1,1	

(Les valeurs sont exprimées en pico-moles)

	UDP-Gal non marqué		Ovomucoïde	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal
	µM	pico-moles					
	0	0					
	1.000	90.000		26,1 58.797,4	1,8 2.791,3	13,8 28.453,3	0 0
Sérum humain	0	0	15,6	5,2	10,2	6,8	3,9
	1	90	52,3	17,5	30,8	17,5	13,6
	5	450	198,7	63,4	112,6	68,9	46,7
	10	900	350,3	131,8	231,7	130,9	96,1
	100	9.000	1.654,6	3.571,5	1.356,3	2.007,3	424,9
1.000	90.000	1.710,8	57.626,8	4.141,9	25.301,7	990,5	





Variations du transfert de galactose sur l'Ovomucoïde total et de la dégradation enzymatique de l'UDP-Gal par les enzymes présents dans le sérum de Rat suivant la concentration en UDP-Gal. (Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale).

	UDP-Gal non marqué		{ <sup>14</sup> C}-Ovomucoïde	{ <sup>14</sup> C}-UDP-Gal	{ <sup>14</sup> C}-Gal-1 P	{ <sup>14</sup> C}-Gal-1-2 Pc	{ <sup>14</sup> C}-Gal
	µM	pico-moles					
Témoins	0 1.000	0 90.000		62,6 65,3	4,3 3,1	33,0 31,6	0 0
Sérum de Rat	0 1 5 10 100 1.000	0 90 450 900 9.000 90.000	6,6 7,6 7,2 7,9 8,1 1,9	0 0 0 0 0 40,9	4,2 4,1 3,8 4,7 11,5 11,7	6,0 6,3 6,0 6,2 10,2 26,2	83,1 81,9 82,9 81,2 70,1 19,2

(Les résultats sont exprimés en pico-moles)

	UDP-Gal non marqué		Ovomucoïde	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal
	µM	pico-moles					
Témoins	0 1.000	0 90.000		26,1 58.797,4	1,8 2.791,3	13,8 28.453,3	0 0
Sérum de Rat	0 1 5 10 100 1.000	0 90 450 900 9.000 90.000	2,8 10,0 35,4 74,4 732,4 1.710,8	0 0 0 0 0 36.827,1	1,8 5,4 18,7 44,3 1.039,8 10.534,9	2,5 8,3 29,5 58,4 922,3 23.590,9	34,7 107,9 407,7 764,8 6.338,3 17.288,1



En ce qui concerne la dégradation chimique, nous avons remarqué que celle-ci est toujours plus faible en présence de sérum de Rat qu'en présence de sérum humain ; ce résultat reste valable pour des concentrations en UDP-Gal de 0 à 100  $\mu\text{M}$ , le rapport est d'environ un demi, cependant, à la concentration de 1.000  $\mu\text{M}$ , elle est pratiquement la même pour les 2 sérums.

#### IV - VARIATIONS DES ACTIVITÉS GALACTOSYL TRANSFÉRASIQUES EN PRÉSENCE D'INHIBITEURS

Les réactions de transfert, réalisées précédemment en présence de sérum et d'Ovomucoïde, ont été reprises avec addition d'UMP et de PPI, à différentes concentrations comprises entre 0 et 10 mM.

##### A - VARIATIONS DES ACTIVITÉS GALACTOSYL TRANSFÉRASIQUES EN PRÉSENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES EN UMP

###### 1 - Sérum humain

La figure 30 p. 150 montre que la dégradation de l'UDP-Gal en Gal-1 P et par suite en Gal, est complètement bloquée à 0,5 mM en UMP, la concentration en ions  $\text{Mn}^{++}$  étant de 20 mM. D'autre part, le transfert est maximum à 0,1 mM en UMP ; pour des concentrations en UMP supérieures, la galactosyl transférase est inhibée, bien que l'UDP-Gal soit de moins en moins dégradé.

La figure 31 p. 151 met en évidence l'augmentation de dégradation chimique de l'UDP-Gal en Gal-1-2 phosphate cyclique, lorsque la concentration en UMP croît de 0 à 2 mM, puis sa stabilisation pour des concentrations supérieures à 2 mM.

###### 2 - Sérum de Rat

Pour obtenir un blocage complet de la dégradation de l'UDP-Gal en Gal-1 P et par suite en Gal, par le sérum de Rat, à 20 mM en  $\text{Mn}^{++}$ , il faut une concentration d'UMP de 5 mM, soit une concentration 10 fois supérieure à celle utilisée dans le cas du sérum humain (Fig. 33 p. 153).

La dégradation chimique de l'UDP-Gal en Gal-1-2 phosphate cyclique augmente lorsque la concentration en UMP croît de 0 à 2 mM, puis atteint un

palier. La figure 32 p. 152 montre que le pourcentage de transfert de Gal, à 0,3 mM en UMP, est maximum et 3 fois supérieur à celui obtenu sans UMP. A des concentrations supérieures à 0,3 mM, la galactosyltransférase est inhibée bien que l'UDP-Gal soit de moins en moins dégradé.

### 3 - Discussion

La concentration en UMP nécessaire pour bloquer la dégradation enzymatique du sérum de Rat est 10 fois supérieure à celle nécessaire pour bloquer la dégradation enzymatique du sérum humain ; ceci confirme le fait que la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase du sérum de Rat est plus active que celle du sérum humain.

Dans le cas du sérum humain, comme dans celui du sérum de Rat, la dégradation chimique atteint un palier à 2 mM en UMP.

Le maximum de transfert du Gal est obtenu pour des concentrations en UMP différentes suivant le sérum utilisé : 0,1 mM en UMP pour le sérum humain et 0,3 mM pour le sérum de Rat ; dans ces conditions le taux de transfert est augmenté de 300 p. 100 par rapport à celui obtenu sans UMP, dans le cas du sérum de Rat et n'augmente que de 50 à 60 p. 100 dans le cas du sérum humain.

En fait, l'activation du transfert s'effectue pour une concentration en UMP inférieure à celle nécessaire pour le blocage total de la dégradation enzymatique. Le maximum de transfert est obtenu pour une certaine concentration en UMP, c'est à partir de cette valeur que l'UDP-Gal sera progressivement protégé et que son taux augmentera en conséquence dans le milieu.

### 4 - Conclusions

Dans toute expérience, il importe de rechercher la concentration en UMP qui stimule le transfert ou celle qui bloque la dégradation, ces 2 valeurs peuvent être différentes, un excès de ce composé inhibe les 2 activités.

## B - VARIATIONS DES ACTIVITES GALACTOSYLTRANSFERASIQUES EN PRESENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES EN PPI

### 1 - Sérum humain

Lorsque nous ajoutons des quantités croissantes de PPI, de 0 à 10 mM dans le milieu d'incubation contenant du sérum humain, nous ne voyons pas de modifications importantes des taux de dégradation de l'UDP-Gal en Gal-1 P, en

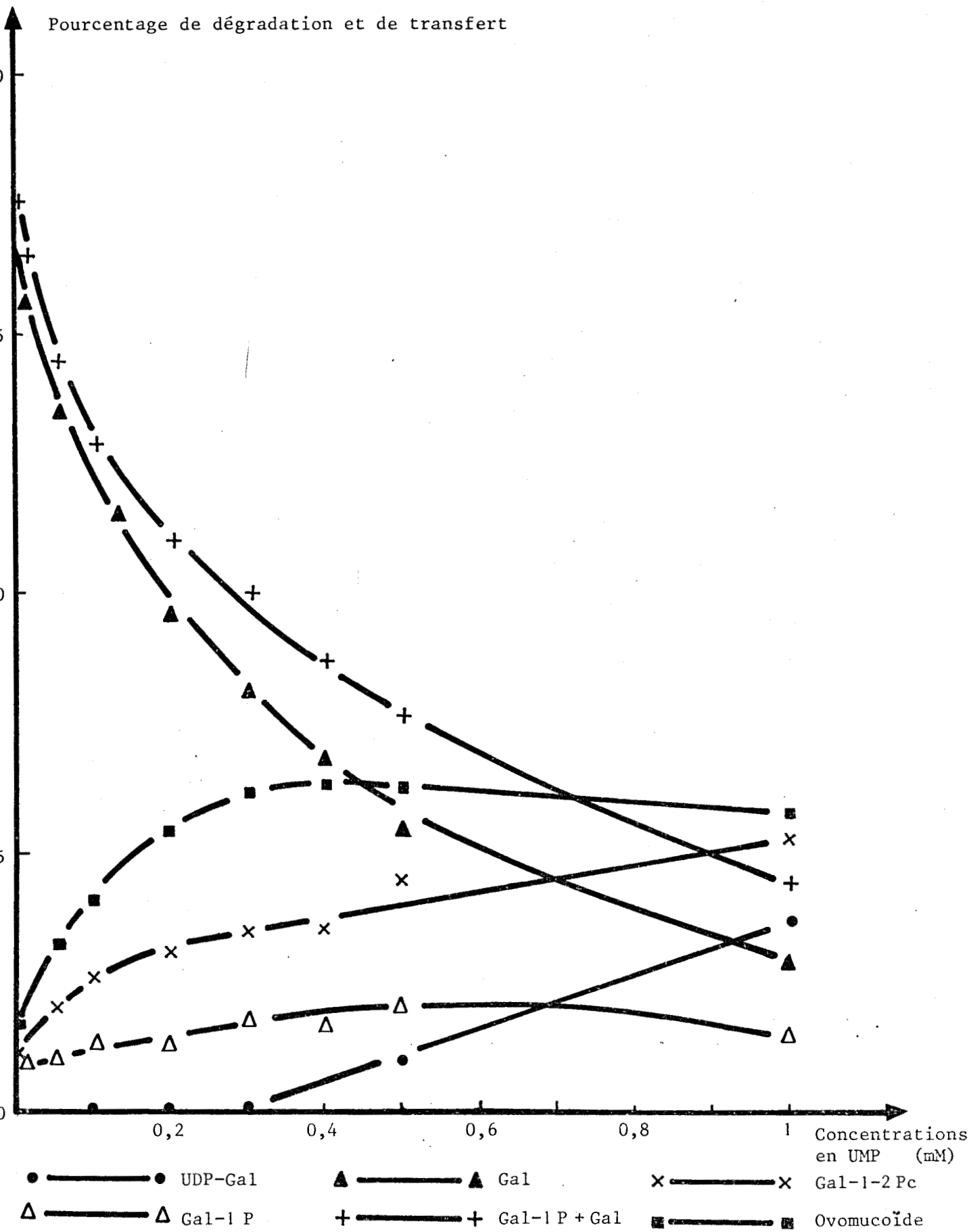


FIGURE 32

EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN UMP SUR LE TAUX DE DEGRADATION DE L'UDP-Gal ET SUR LE TAUX DE TRANSFERT DU Gal SUR L'OVOMUCOÏDE PRODUITS PAR LES ENZYMES DU SERUM DE RAT.



Gal et en Gal-1-2 Pc. Quant au transfert de galactose, il n'est pas modifié sauf à la concentration en PPI de 10 mM, concentration à laquelle l'UDP-Gal n'est plus entièrement dégradé (Tableau 43 p. 155), ce transfert devient alors 4 fois plus faible.

## 2 - Sérum de Rat

Le transfert du galactose sur l'Ovomucoïde commence à diminuer, lorsque nous travaillons en présence de sérum de Rat avec une concentration en PPI de 1 mM. A 10 mM en PPI, ce transfert est à peu près 10 fois plus faible qu'aux concentrations de 0 à 0,5 mM. Quant aux dégradations chimiques et enzymatiques de l'UDP-Gal, elles ne varient pas qu'il y ait ou non du PPI (Tableau 44 p. 156).

## 3 - Discussion et conclusions

A 10 mM, le PPI est plus actif sur la galactosyltransférase du sérum de Rat que sur celle du sérum humain, à cette même concentration, nous remarquons qu'en présence de sérum de Rat, l'UDP-Gal est entièrement dégradé en raison des fortes activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques et phosphatasiques alors qu'en présence de sérum humain, 10 p. 100 de l'UDP-Gal est préservé.

Quelque soit la concentration en PPI utilisée, nous n'avons décelé aucun effet de ce composé sur les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques et phosphatasiques du sérum humain et du sérum de Rat. D'après HORDER (98-99) le sérum humain est capable d'hydrolyser le PPI, l'enzyme responsable de cette dégradation est la pyrophosphatase inorganique. Nous n'avons pas mesuré l'importance de cette hydrolyse et donc nous ne savons pas à présent si l'effet d'inhibition sur la galactosyltransférase est dû à l'action du PPI ou du phosphate libéré après l'hydrolyse compte tenu du fait que si le PPI était entièrement dégradé en phosphate, la concentration de ce dernier composé serait 2 fois plus élevée que celle du PPI lui-même.

Enfin, nous pouvons remarquer une fois de plus que la dégradation chimique est entre 3 et 4 fois plus importante que celle obtenue en présence de sérum de Rat.

TABLEAU 43

Variations des activités galactosyltransférasiques du sérum humain en présence de concentrations variables en P<sub>i</sub>. (Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale).

Concentration en P <sub>i</sub> (mM)	Ovomucoïde	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal
0	35,5	0	37,5	14,0	12,8
0,01	30,0	0	41,5	14,5	13,9
0,05	32,1	0	39,7	13,7	14,3
0,1	31,9	0	39,6	14,1	14,3
0,2	32,2	0	39,3	14,4	14,0
0,3	32,0	0	39,7	14,6	13,6
0,4	31,7	0	40,1	14,5	13,5
0,5	30,4	0	41,3	14,8	13,9
1	30,9	0	41,0	13,0	14,9
2	32,6	0	36,7	18,9	11,7
5	29,6	0	37,4	18,7	14,6
10	8,3	10,8	46,8	16,2	17,7

TABLEAU 44

Variations des activités galactosyltransférasiques du sérum de Rat en présence de concentrations variables en PPI. (Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale).

Concentration en PPI (mM)	Ovomucoïde	UDP-Gal	Gal-1 P	Gal-1-2 Pc	Gal
0	9,1	0	1,1	3,9	85,8
0,01	9,0	0	2,0	3,9	85,0
0,05	9,1	0	1,8	3,8	85,2
0,1	9,1	0	1,7	3,9	85,2
0,2	9,3	0	1,8	4,0	84,8
0,3	9,1	0	1,8	4,3	84,7
0,4	9,2	0	1,6	4,3	84,8
0,5	9,3	0	1,5	3,9	85,2
1	7,3	0	2,8	4,0	84,8
2	5,5	0	2,6	4,2	87,6
5	5,1	0	1,6	3,7	89,4
10	1,3	0	3,6	2,9	92,0



## C - VARIATIONS DES ACTIVITES GALACTOSYLTRANSFERASIQUES EN FONCTION

### DU TEMPS

Des cinétiques de transfert du Gal sur l'Ovomucoïde ont été effectuées en présence d'UMP (2 mM), la concentration en ions  $Mn^{++}$  étant de 40 mM, afin d'effectuer une étude comparative avec les résultats obtenus dans les mêmes conditions, en absence d'UMP.

#### 1 - Sérum humain

La figure 34 p. 158 montre que l'UMP a eu pour effet de bloquer complètement l'action de la pyrophosphatase et celle de la phosphatase. Cependant, la galactosyltransférase est à son tour inhibée, la vitesse initiale de transfert est linéaire et beaucoup plus faible que celle obtenue en absence d'UMP (Fig. 28 p. 142).

Après un temps de réaction de 1 h, il subsiste de l'UDP-Gal dans le milieu d'incubation et le taux de Gal-1-2 phosphate cyclique s'est stabilisé.

#### 2 - Sérum de Rat

La dégradation enzymatique de l'UDP-Gal est complètement bloquée comme dans le cas précédent (Fig. 35 p. 159). La dégradation chimique croît linéairement en fonction du temps, de même que le transfert du Gal sur l'Ovomucoïde ; la vitesse initiale de ce transfert est plus faible en présence d'UMP qu'en son absence (Fig. 35 p. 159 et Fig. 29 p. 143), bien que le pourcentage maximal de transfert soit environ 2 fois plus grand. Après un temps de réaction de 1 h, il subsiste plus de 50 p. 100 d'UDP-Gal dans le milieu.

#### 3 - Discussion

L'UMP, inhibiteur de la dégradation enzymatique de l'UDP-Gal favorise la dégradation chimique qui devient importante dans tous les cas considérés ; il diminue les vitesses initiales de transfert mais augmente le pourcentage final de fixation du Gal sur l'Ovomucoïde dans le cas du sérum de Rat, ce qui laisse supposer que dans le cas du sérum humain, le pourcentage de transfert pourrait aussi en présence d'UMP, prendre une valeur supérieure à celle obtenue en son absence, pour des temps de réaction supérieurs à 1 h.

La présence d'UMP évite une dégradation totale de l'UDP-Gal ; à 1 h de réaction, un pourcentage de ce glycosyl-nucléotide, supérieur à 50 p. 100 peut encore être mesuré, il y a donc un effet de protection.



#### 4 - Conclusions

A 2 mM en UMP et 40 mM en  $Mn^{++}$ , la galactosyltransférase des sérums humain et de Rat n'est pas complètement bloquée. Il aurait été intéressant de faire des cinétiques aux concentrations en UMP produisant une activation maximale des galactosyltransférases.

ELECTROFOCALISATION  
DU  
SERUM DE RAT

Les glycosyl-nucléotides diphosphates sont hydrolysés par les enzymes du sérum de Rat en monosaccharides-1 phosphates, le CMP-ANAN qui est un glycosyl-nucléotide monophosphate est dégradé en monosaccharide libre.

Afin de déterminer si l'hydrolyse est due à un enzyme de spécificité large ou à plusieurs enzymes, un échantillon de sérum de Rat a été soumis à une électrofocalisation et les activités glycosyl-nucléotide pyrophosphatasiques ont été mesurées en utilisant 5 glycosyl-nucléotides radioactifs différents dont le CMP-ANAN. En vue d'effectuer un repérage rapide des activités, le bis-PNPP non marqué, qui possède des liaisons phosphodiesteres comme le CMP-ANAN a été utilisé.

I - HYDROLYSE DU BIS-PNPP PAR LES ENZYMES PRÉSENTS DANS LE SÉRUM DE RAT

L'utilisation du bis-PNPP et du PNPP sur les fractions obtenues après électrofocalisation du sérum de Rat a permis de mettre en évidence 8 pics d'activité phosphodiesterasique (I à VIII) dont l'un possède une activité monophosphoestérasique (Pic V) (Fig. 36 p. 163).

II - HYDROLYSE DES GLYCOSYL-NUCLÉOTIDES PAR LES ENZYMES PRÉSENTS DANS LE SÉRUM DE RAT

A - GLYCOSYL-NUCLEOSIDES DIPHOSPHATES

L'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc, le GDP-Man et le GDP-Fuc sont essentiellement dégradés au niveau des pics d'activité phosphodiesterasiques III et V, obtenus après électrofocalisation du sérum de Rat. L'activité spécifique obtenue au niveau du pic V est supérieure à celle obtenue au niveau du pic III, à cause de la présence de la phosphatase alcaline dans ce pic. Le point isoélectrique de chaque pic est donné dans la figure 36 p. 163.

## B - GLYCOSYL-NUCLEOSIDES-MONOPHOSPHATES

Le CMP-ANAN est dégradé au niveau des pics II, V et VII (Fig. 36 p. 163). L'activité spécifique la plus élevée se trouve au niveau du pic V.

## C - DISCUSSION

Après électrofocalisation du sérum de Rat, l'activité spécifique de dégradation des glycosyl-nucléosides-diphosphates est très importante au niveau du pic V qui contient l'activité phosphatasique or, c'est au niveau de ce pic que l'on retrouve la plus forte dégradation du CMP-ANAN, qui n'implique pas l'action de la phosphatase.

Au niveau de ce pic V, les activités phosphodiésterasiques et phosphatasiques ne sont pas séparées, mais dans les autres pics aucune activité phosphatasique n'a été décelée. Nous pouvons donc dire que la phosphatase et la phosphodiésterase sont très vraisemblablement des enzymes différents. La même conclusion est apportée par HAUGEN et SKREDE ( 6 ) qui ont mis en évidence au niveau de divers organes humains, des répartitions différentes pour ces 2 enzymes, cependant, ceux-ci signalent que dans le cas de lésions des os, la phosphatase peut avoir une activité phosphodiésterasique sur la thymidine-5'-PNPP.

Au niveau du pic III, il y a libération de monosaccharides-1 phosphates, au niveau du pic V, il y a libération de monosaccharides-1 phosphates dans un premier temps, puis ensuite seulement de monosaccharides libres, la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase est donc différente de la phosphatase. De plus, SELA et al. ( 8 ) ont montré que dans les cultures de cellules, il est possible de bloquer sélectivement l'un ou l'autre enzyme, et BROWNLEE et WHEAT ( 5 ) ont découvert dans le plasma sérial bovin une nucléotide-pyrophosphatase (UDP-Glc), sans qu'il y ait d'activité phosphatasique.

Pour plusieurs auteurs : DECKER et al. ( 38 ), EVANS ( 42 ) et ABNEY et al. ( 16 ), la nucléotide pyrophosphatase est le même enzyme que la phosphodiésterase. Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de dire qu'il y a correspondance entre les pics d'activité III et V pour ces 2 enzymes.

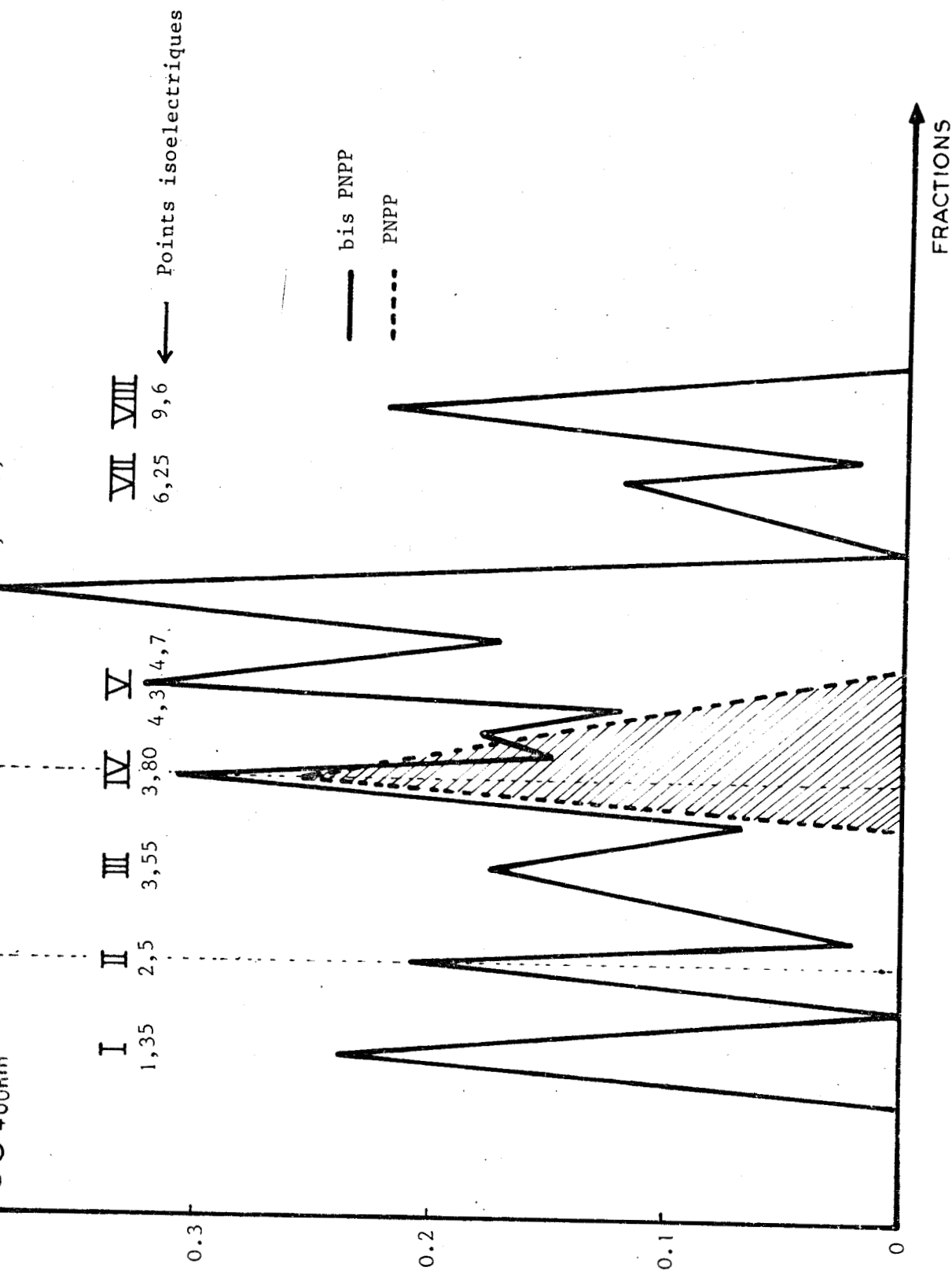


FIGURE 36

Electrofocalisation du sérum de Rat



La CMP-ANAN hydrolase et la phosphodiesterase des membranes plasmiques du cortex de rein de veau ont des propriétés identiques et sont enrichies de la même manière ( 13 - 35 - 38 - 42 ), cependant la CMP-ANAN hydrolase est différente de la phosphodiesterase de venin de serpent (34), de plus VAN DIJK et al. (36) affirment que CMP-ANAN hydrolase et la phosphodiesterase sont des enzymes différents car ils ont pu les séparer. Le pic V obtenu après électrofocalisation du sérum de Rat, possède non seulement des activités phosphodiesterasique, phosphatasique, glycosyl-nucléotide pyrophosphatasique, mais en plus une activité CMP-ANAN hydrolasique ; 2 autres pics qui possèdent une activités phosphodiesterasique présentent aussi une activité CMP-ANAN hydrolasique, ce sont les pics II et VII.

#### D - CONCLUSIONS

L'électrofocalisation du sérum de Rat nous a permis de séparer des isoenzymes de la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase, des isoenzymes de la phosphodiesterase et des isoenzymes de la CMP-ANAN hydrolase, cependant cette étude doit être complétée afin de déterminer les relations précises entre les isoenzymes des différentes activités, étant donné la répartition similaire de certains pics d'activité.

## CONCLUSIONS

Notre travail s'inscrit dans le cadre des recherches entreprises au Laboratoire sur la détermination des activités glycosyltransférasiques des milieux biologiques. Les résultats préliminaires obtenus par PIETTE (2) avaient mis en évidence dans le sérum humain et dans le sérum de Rat, un système enzymatique capable d'hydrolyser les glycosyl-nucléotides en monosaccharides libres. Compte tenu de l'importance de ces enzymes dans les mécanismes de régulation de la biosynthèse des glycoprotéines, nous avons poursuivi cette étude. En particulier, nous avons cherché à déterminer "*in vitro*" l'importance de la dégradation des glycosyl-nucléotides au cours de la réaction de biosynthèse d'un groupement glycanique.

Les principaux résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - Le sérum humain et le sérum de Rat contiennent une ou des glycosyl-nucléotide pyrophosphatases capables d'hydrolyser en monosaccharides-1 phosphates, les glycosyl-nucléosides-diphosphates suivants : UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GlcAU, UDP-GlcNAC, GDP-Man et GDP-Fuc. Les monosaccharides-1 phosphates sont ensuite hydrolysés par des phosphatases, présentes dans les 2 sérums, en monosaccharides libres.

Une glycosyl-nucléoside monophosphate hydrolase présente dans les 2 sérums libère de l'acide N-acétyl neuraminique à partir du CMP-ANAN. Les activités glycosyl-nucléoside-monophosphate hydrolasiques et glycosyl-nucléoside-diphosphate pyrophosphatasiques du sérum de Rat sont nettement plus élevées que celles du sérum humain.

2 - Le pourcentage de dégradation des glycosyl-nucléosides-mono et diphosphates marqués au  $\{^{14}\text{C}\}$  en  $\{^{14}\text{C}\}$  monosaccharides-1 phosphates et en  $\{^{14}\text{C}\}$  monosaccharides libres peut être facilement déterminé pour chaque glycosyl-nucléotide après séparation chromatographique sur papier dans le système solvant de FISHER et NEBEL (77) et mesure de leur radioactivité.

3 - Les dégradations enzymatiques des glycosyl-nucléosides-mono et diphosphates par les sérums sont fonction du pH et de la concentration en ions  $\text{Mn}^{++}$ .

4 - Dans les conditions généralement utilisées pour les déterminations des activités glycosyltransféra-siques (pH 7 ; 20 à 40 mM en  $Mn^{++}$ ), l'UDP-Gal, l'UDP-Glc et l'UDP-GlcAU subissent une dégradation chimique en monosaccharides-1-2 monophosphates cycliques et en UMP.

Cette dégradation chimique augmente en fonction du pH, de la concentration en ions  $Mn^{++}$  et en fonction de la concentration en substrat. Elle peut se produire à pH 7, en l'absence d'ions  $Mn^{++}$ , à la suite de congélations et décongélations successives.

5 - Au cours des réactions de transfert du  $\{^{14}C\}$  galactose de l'UDP- $\{^{14}C\}$  Gal sur l'Ovomucoïde utilisé comme accepteur, nous avons déterminé la compétition qui existe entre les 3 processus de décomposition de l'UDP-Gal : décomposition chimique en galactose-1-2 monophosphate cyclique, hydrolyse enzymatique en galactose-1 phosphate par la glycosyl-nucléotide pyrophosphatase et enfin transfert du galactose sur l'Ovomucoïde par la galactosyltransférase. Les résultats obtenus ont montré qu'en présence de sérum de Rat, la dégradation de l'UDP-Gal en galactose-1 phosphate et en galactose libre est très importante, alors que la dégradation chimique et le transfert du galactose sur l'Ovomucoïde sont faibles. En présence de sérum humain qui possède une activité glycosyl-nucléotide pyrophosphatasique plus faible, la dégradation chimique et le transfert du galactose sur l'Ovomucoïde sont plus élevés.

6 - L'étude de l'inhibition de l'activité glycosyl-nucléotide pyrophosphatasique dans les 2 sérums a été effectuée en utilisant comme inhibiteur de l'UMP à des concentrations variables. Les résultats obtenus montrent que de faibles concentrations en UMP ont pour effet d'augmenter le taux de transfert, par contre, des concentrations trop élevées inhibent l'activité galactosyltransféra-sique des sérums et font augmenter la dégradation chimique du glycosyl-nucléotide.

7 - Le pyrophosphate souvent utilisé comme inhibiteur des nucléotides pyrophosphatases s'est révélé n'avoir aucun effet sur l'activité glycosyl-nucléotide pyrophosphatasique du sérum humain et du sérum de Rat. A la concentration de 10 mM, il possède même un effet inhibiteur de l'activité galactosyltransféra-sique.

8 - Une inhibition partielle de l'activité glycosyl-nucléotide pyrophosphatasique des 2 sérums a été obtenue par addition dans le milieu d'incubation d'une quantité relativement importante (1 mM) d'UDP-Gal froid. Dans ces conditions, le transfert du galactose sur l'Ovomucoïde atteint les mêmes proportions dans le sérum de Rat que dans le sérum humain.

9 - L'électrofocalisation du sérum de Rat a permis de mettre en évidence dans un premier temps la présence de 8 formes isoenzymatiques de la phosphodiesterase, la présence de 2 formes isoenzymatiques de la glycosyl-nucléoside-diphosphate pyrophosphatase (Pics III et V), actives sur l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc, le GDP-Man et le GDP-Fuc, et la présence de 3 formes isoenzymatiques de la glycosyl-nucléoside-monophosphate hydrolase (Pics II, V et VII), actives sur le CMP-ANAN. Des recherches plus poussées sont néanmoins nécessaires pour affirmer qu'une même protéine enzymatique possédant une spécificité très large est capable d'hydrolyser des nucléosides-mono et diphosphates.

10 - L'ensemble des recherches d'ordre méthodologique que nous avons réalisées a permis de mettre au point un protocole expérimental de dosage des activités glycosyltransférasiques des milieux biologiques ou des membranes, qui tient compte des causes d'erreur dues à la présence des activités nucléotide pyrophosphatasiques et de la dégradation chimique. Les résultats nous permettent à présent, d'une part, d'envisager la comparaison des dosages des activités glycosyltransférasiques dans des milieux biologiques provenant de sujets sains et pathologiques et d'autre part de poursuivre l'analyse de facteurs possédant un rôle dans la régulation de la biosynthèse des glycoprotéines.



**BIBLIOGRAPHIE**

	Réf.	Pages
ABNEY E.R., EVANS W.H. et PARKHOUSE M.E. Biochem. J., 1976, <u>159</u> , 293-299	16	13, 22, 29 32, 162
ALLEN R.J.L. Biochem. J., 1940, <u>74</u> , 858	81	69, 71
BACHORIK P.S. et DIETRICH L.S. J. Biol. Chem., 1972, <u>247</u> , 5071-5078	21	14, 17, 20, 29, 21, 34, 36
BAKER A.P., SAWYER J.L., MUNRO J.R., WEINER G.P. et HILLEGRASS L.M. J. Biol. Chem., 1972, <u>246</u> , 5173-5179	65	57
BAREL-RAMNICEANU M. et MOREL E. C.R. Acad. Sci., Paris, 1976, <u>t. 282</u> , 1999-2002	10	13, 51
BAYARD B., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., ADAM-CHOSSON A., SPIK G. et MONTREUIL J. Unpublished results	97	136
BE MILLER J.N. Adv. Carbohydr. Chem., 1967, <u>22</u> , 25-42	87	93
BERLINER L.J. et WONG S.S. Biochemistry, 1975, <u>14</u> , 4977-4982	88	93
BISCHOFF E., LIERSCH M., KEPPLER D. et DECKER K.F.A. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1971, <u>351</u> , 729-736	17	13
BISCHOFF E., TRANH-THI T.A. et DECKER K.F.A. Eur. J. Biochem., 1975, <u>51</u> , 353-361	22	14, 29, 33, 34, 36, 41, 49
BISCHOFF E., WILKENING J., TRANH-THI T.A. et DECKER K.F.A. Eur. J. Biochem., 1976, <u>62</u> , 279-283	15	13, 17, 32

	Réf.	Pages
BOSMANN H.B. Biochim. Biophys. Acta, 1974, <u>339</u> , 438-441	71	62
BROWNLEE S.T. et WHEAT R.W. J. Biol. Chem., 1960, <u>235</u> , 3567-3569	5	9, 18, 32, 33, 34, 35, 95, 162
CAPALDI R.A. et VANDERKOOI G. Proc. Natl. Acad. Sci. US., 1972, <u>69</u> , 930-932	48	49
CARLSON D.M., DAVID J. et RUTTER W.J. Arch. Biochem. Biophys., 1973, <u>157</u> , 605-612	52	51
CHATTERJEE S.K., BHATTACHARYA M. et BARLOW J.J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, <u>80</u> , 826-832	32	15, 16
COLEMAN P.L. et FISHMAN P.H. Biochem. Biophys. Acta, 1967, <u>135</u> , 573-579	26	14, 52
DAVIDSON J.N. et SMELLIE R.M.S. Biochem. J., 1952, <u>52</u> , 594	78	68, 81, 100
DEBEIRE Ph. Thèse de 3e Cycle, Lille, 1977	46	37
DECKER K.F.A. et BISCHOFF E. FEBS-Letters, 1972, <u>21</u> , 95-98	38	17, 21, 22, 23, 34, 41, 162, 164
DE DUVE C.B., PRESSMAN B.C. et GIANETTO R. Biochem. J., 1955, <u>60</u> , 604	31	15
DEPERT W., WERCHAU H. et WALTER G. Proc. Natl. Acad. Sci., 1974, <u>71</u> , 3068-3072	7	11, 13, 14, 17, 18, 51, 52, 85

	Réf.	Pages
DOBSON J.G., RUBIO R. et BERNE R.M. Circ. Res., 1971, <u>29</u> , 375-384	68	62
DOMSCHKE W., LIERSCH M. et DECKER K.F.A. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1971, <u>352</u> , 85-88	18	13
DUTTON G.J. et GREIG C.G. Biochem. J., 1957, <u>66</u> , 52	58	53
DWECK R.A. Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, Oxford, England, Clarendon Press, p. 256, 1973	90	93
ELLIS L.C. et NEWCOME R.W.S. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1964, <u>116</u> , 61	59	53
EMMELOT P., BOS C.J., BENEDETTI E.L. et RUMKE Ph. Biochim. Biophys. Acta, 1964, <u>90</u> , 126	11	13
ENDO M. et YOSIZAWA Z. Arch. Biochem. Biophys., 1968, <u>127</u> , 586-589	55	52
ENDO M. et YOSIZAWA Z. Arch. Biochem. Biophys., 1973, <u>156</u> , 397-403	56	52
EVANS W.H. Nature, 1974, <u>250</u> , 391-394	14	13, 22, 41
EVANS W.H. et GURD J.W. Biochem. J., 1973, <u>133</u> , 189-199	44	27

	Réf.	Pages
EVANS W.H., HOOD D.O. et GURD J.W. Biochem. J., 1973, <u>135</u> , 819-826	42	18, 22, 23, 26, 27, 32, 41, 49, 50, 162, 164
FERWERDA W., VAN DIJK W., BLOCK C.M. et HEIJLMAN J. Abstr. Commun. Meet. Febs 10, Paris, Abstr. n° 980, 1975, Soc. Chim. Biol. Paris.	67	60, 62
FISHER F.G. et NEBEL G.G. Z. Physiol. Chem., 1955, <u>302</u> , 10-18	77	165
FREDERICQ E. et DEUTSCH H.F. J. Biol. Chem., 1949, <u>181</u> , 507	76	66
GEREN L.M. et EBNER K.E. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1973, <u>59</u> , 14-21	45	33, 54
GOLDBERG N.D., DIETZ S.B. et O'TOOLE A.G. J. Biol. Chem., 1969, <u>244</u> , 4458	47	37
HANES C.S. et ISHERWOOD F.A. Nature, 1949, <u>164</u> , 1107	79	68, 78, 99
HAUGEN H.F. et SKREDE S. Scand. J. Gastroent., 1976, <u>11</u> , 121-127	4	9, 21, 85
HAUGEN H.F. et SKREDE S. Clin. Chem., 1977, <u>23</u> , 1531-1537	6	9, 10, 11, 12, 18, 21, 22, 24 25, 32, 35, 95 162
HORDER M. Clin. Chim. Acta, 1972, <u>42</u> , 373-381	98	154
HORDER M. Clin. Chim. Acta, 1973, <u>49</u> , 383-388	99	154

	Réf.	Pages
HORDER M. Biochim. Biophys. Acta, 1973, <u>321</u> , 329-335	100	154
HUDGIN R.L. et SCHACHTER H. Can. J. Biochem., 1971, <u>49</u> , 838-846	64	57
HYNIE I., MEUFFELS M. et POZNANSKI M.J. Clin. Chem., 1975, <u>21</u> , 1383-1390	39	21
HYNIE I. et ZBARSKY S.H. Canad. J. Biochem., 1970, <u>48</u> , 1141-1150	40	21
ISHIBAH I T., ATSUTA T. et MAKITA A. Biochim. Biophys. Acta, 1976, <u>429</u> , 759-767	24	14
ISHIBAH I T., KIJIMOTO S. et MAKITA A. Biochim. Biophys. Acta, 1974, <u>337</u> , 92-106	25	14
JACOBSON K.B. et KAPLAN M.O. J. Biol. Chem., 1957, <u>226</u> , 427	27	15
JATO-RODRIGUEZ J.J. Ph. D. Thesis, 1974, University of Santiago of Compostela (Spain)	51	51
JATO-RODRIGUEZ J.J. et MOOKERJEA S. Arch. Biochem. Biophys., 1974, <u>162</u> , 281-292	50	51, 52, 57
JATO-RODRIGUEZ J.J., NELSON J.D. et MOOKERJEA S. Biochem. Biophys. Acta, 1976, <u>428</u> , 639-646	43	22, 52
KALCKAR H.M. et HAKOMORI S. Proc. Natl. Acad. Sci. US., 1972, <u>69</u> , 1647a	69	62

	Réf.	Pages
KEAN E.L. et BIGHOUSE J.J. J. Biol. Chem., 1974, <u>249</u> , 7813-7823	34	16, 23, 41, 42, 44, 45, 46, 60, 164
KHATRA B.S., HERRIES D.G. et BREW K. Eur. J. Biochem., 1974, <u>44</u> , 537-560	89	93
KHORANA H.G., TENER G.M., WRIGHT R.S. et MOFFATT I.G. J. Am. Chem. Soc., 1957, <u>79</u> , 430	92	95, 97
KIM Y.S., PERDOMO J. et WHITEHEAD J. J. of Clin. Investig., 1972, <u>51</u> , 2024	96	134
KIRSCHBAUM B.B. et BOSMANN H.B. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1973, <u>50</u> , 51	62	54
KORNFELD S., KORNFELD R., NEUFELD E.F. et O'BRIEN P.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1964, <u>52</u> , 371-379	53	51, 54, 60
LANSING A.I., BELKHODE M.L., LYNCH W.E. et LIEBERMAN I. J. Biol. Chem., 1967, <u>242</u> , 1772	12	13
LATHE G.H. et WALKER M. Biochem. J., 1968, <u>70</u> , 705	60	53
LAU Y.K. et WONG K.P. Biochim. Biophys. Acta, 1974, <u>334</u> , 431-437	30	15, 17, 30, 32, 33, 34, 37, 38
LELOIR L.F. et CARDINI C.E. J. Am. Chem. Soc., 1957, <u>79</u> , 6340	1	1
LIERSCH M., GROTELÜSCHEN H. et DECKER K.F.A. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1971, <u>352</u> , 267-274	19	13
MONTREUIL J. et SPIK G. Microdosage des glucides. Monographies Lab. Chim. Biol., Faculté des Sciences, Lille, 1968	80	69, 71

	Réf.	Pages
MOOKERJEA S. et YUNG J.W.M. Arch. Biochim. Biophys., 1975, <u>166</u> , 223-236	3	9, 14, 18, 36, 54, 57
MOREL E. C.R. Acad. Sci., Paris, 1976, <u>t. 282</u> , 317-320	54	51, 85
NELSON J.D., JATO-RODRIGUEZ J.J. et MOOKERJEA S. Arch. Biochem. Biophys., 1975, <u>169</u> , 181-191	57	52, 53
NUNEZ H.A. et BARKER R. Biochemistry, 1976, <u>15</u> , 3843-3847	86	82, 85, 93, 94, 95, 96, 97
OGAWA H., SAWADA M. et KAWADA M. J. Biochem., 1966, <u>59</u> , 126-134	29	15, 17, 19, 37, 39, 57, 85
PALADINI A.C. et LELOIR L.F. Biochem. J., 1952, <u>51</u> , 426	91	93
PARTRIDGE S.M. Biochem. J., 1948, <u>42</u> , 238	82	69, 81, 100
PATTABIRAMAN T.N., SEKHARA V. et BACHHAWAT B.K. Biochim. Biophys. Acta, 1964, <u>83</u> , 74-83	37	17, 18, 32, 34, 39, 40
PIETTE R. DEA Biochimie, Lille 1973	2	1, 27, 99, 100, 165
PITKÄNEN E. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1960, <u>12</u> , 143	94	124
POGELL B.M. et LELOIR L.R. J. Biol. Chem., 1961, <u>236</u> , 293-298	63	57



	Réf.	Pages
PRIHAR H.S. et BEHRMAN E.J. Biochemistry, 1973, <u>12</u> , 997-1005	93	95
PUHAKAINEN E. et HÄNNINEN O. Acta Chem. Scand., 1977, <u>31</u> , 125-129	23	14, 17, 19, 32, 34, 37, 57
RICHARD M., BROQUET P. et LOUISOT P. J. Mol. Cell. Cardiol., 1972, <u>4</u> , 465-475	66	57
ROSEMAN S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1962, <u>48</u> , 438-441	74	63
ROTH S., McGUIRE E.J. et ROSEMAN S. J. Cell. Biol., 1971, <u>51</u> , 536-547	70	62
SCHLIESELFELD L.H., VAN EYS J.V. et TOUSTER O. J. Biol. Chem., 1965, <u>240</u> , 811	28	15, 17, 19, 32, 62
SCHOYAB M. et BACHHAWAT B.K. Indian. J. Biochem., 1969, <u>6</u> , 56-62	33	16, 23, 41, 43
SELA B., LIS H. et SACHS L. J. Biol. Chem., 1972, <u>247</u> , 7585-7590	8	11, 13, 18, 51, 52, 58, 62, 162
SELA B. et SACHS L. FEBS-Letters, 1973, <u>30</u> , 100-104	9	11, 18, 58
SHUR B.D. et ROTH S. Biochim. Biophys. Acta, 1975, <u>415</u> , 473-512	73	62
SKIDMORE J.R. et TRAMS E.G. Biochim. Biophys. Acta, 1970, <u>219</u> , 93-103	13	13, 17, 23, 32, 34, 35, 36, 41, 164

ZANETTA J.P. et VINCENDON C.

Réf.	Pages
84	70

Actes du Colloque International n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 Juin 1973, Vol. I p. 47. Ed. C.N.R.S., Paris, 1974.

