

50376
1981
50

50376
1981
50

N° d'ordre : 891

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DE LILLE I

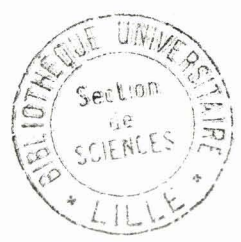
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

en Biochimie

par

Anick LEFEVRE



RECHERCHES SUR L'EXCLUSION MUTUELLE DE LA SIALYLATION ET DE LA FUCOSYLATION DES GLYCOCONJUGUES



Soutenu le 16 avril 1981 devant la Commission d'Examen

Président	M. J. MONTREUIL
Rapporteur	M. A. VERBERT
Examineur	M. B. FOURNET

Je tiens à remercier tous ceux
dans le laboratoire, qui m'ont
accordé leur amitié et conseillé
pendant ce travail.

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 Physicochimique et Moléculaire des Glucides Libres et Conjugués) sous la direction du Professeur Jean MONTREUIL.

A B R E V I A T I O N S

Asn	:	L-Asparagine
CMP	:	Cytosine monophosphate
Dol	:	Dolichol
Fuc	:	L-Fucose
Gal	:	D-Galactose
GalNAc	:	N-Acétyle-D-galactosamine
GDP	:	Guanosine diphosphate
Glc	:	D-Glucose
GlcNAc	:	N-Acétyle-D-glucosamine
GlcUA	:	Acide-D-glucuronique
Hyl	:	Hydroxylysine
Hyp	:	Hydroxyproline
Man	:	D-Mannose
NeuAc	:	Acide N-acétylneuraminique
Ser	:	L-Sérine
Thr	:	L-Threonine
Tf	:	Transférane
UDP	:	Uridine diphosphate
Xyl	:	D-Xylose

*Les structures des oligosaccharides appelés GII et GIII
et du glycopeptide GIV sont données dans la figure 19 (pages 36 et 37).*

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	p. 3
1 - <u>STRUCTURE DES GLYCOPROTÉINES</u>	p. 3
I - <u>STRUCTURE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES</u>	p. 3
A) <u>GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE</u>	p. 5
B) <u>GLYCANNES DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE</u>	p. 5
II - <u>STRUCTURE DES GLYCANNES DES O-GLYCOSYLPROTEINES</u>	p. 7
A) <u>LIAISON α-GalNAc-(1 + 3)-Ser (Thr)</u>	p. 7
B) <u>LIAISON β-Xyl-(1 + 3)-Ser (Thr)</u>	p. 9
III - <u>REMARQUES</u>	p. 11
2 - <u>BIOSYNTÈSE DES GLYCOPROTÉINES</u>	p. 13
I - <u>MECANISME DE LA REACTION DE GLYCOSYLATION</u>	p. 13
II - <u>LOCALISATION DES GLYCOSYL-TRANSFERASES</u>	p. 14
A) <u>FORME MEMBRANAIRE</u>	p. 14
B) <u>FORME SOLUBLE</u>	p. 15
III - <u>REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES</u>	p. 15
A) <u>MECANISMES GENERAUX</u>	p. 15
1) Au niveau génétique.....	p. 15
2) Au niveau enzymatique.....	p. 16
3) Au niveau du sucre activé.	p. 16

B) <u>BIOSYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTEINES</u>	p. 18
1) Déclenchement de la biosynthèse	p. 18
2) Maturation	p. 21
3) Elongation	p. 23
a) Addition du galactose	p. 23
b) Terminaison des chaines : sialylation et fucosylation de la N-acétyllactosamine terminale	p. 23
C) <u>BIOSYNTHESE DES O-GLYCOSYLPROTEINES</u>	p. 27
1) Initiation : transfert de la première GalNAc sur la sérine ou la thréonine de la chaîne peptidique	p. 29
2) Elongation de la chaîne	p. 29
IV - <u>CONCLUSION</u>	p. 33

TRAVAUX PERSONNELS

1 - <u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	p. 35
I - <u>MATERIEL</u>	p. 35
A) <u>LES ACCEPTEURS</u>	p. 35
B) <u>Les GLYCOSYL-NUCLEOTIDES</u>	p. 35

II - <u>METHODES</u>	p. 38
A) <u>FRACTIONNEMENT CELLULAIRE</u>	p. 38
1) Préparation des microsomes de foie de Rat	p. 38
2) Préparation des microsomes de foie de Porc	p. 38
3) Dosage des enzymes marqueurs	p. 39
B) <u>DESIALYLATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE</u>	p. 40
1) Désialylation chimique	p. 40
2) Désialylation enzymatique	p. 40
C) <u>IDENTIFICATION DES PRODUITS FORMES LORS DE LA</u> <u>REACTION DE GLYCOSYLATION</u>	p. 41
1) Précipitation	p. 41
2) Chromatographie sur papier	p. 42
3) Electrophorèse	p. 46
4) Méthode de STOFFYN et al.....	p. 46
a) Marquage du galactose terminal	p. 46
b) Sialylation	p. 47
c) Séparation des éthers méthyliques du galactose	p. 47

2 - RÉSULTATS p. 49

I - <u>COMPARAISON DU TAUX DE SIALYLATION PAR LA SIALYLTRANSFERASE</u> <u>MICROSOMALE DE FOIE DE RAT D'ACCEPTEURS DE TAILLE DIFFERENTE</u> ...	p. 49
A) <u>INTRODUCTION</u>	p. 49

B) <u>DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES</u>	p. 50
1) Fonctionnement de l'enzyme	p. 50
a) Concentration en Triton X 100	p. 50
b) Concentration en enzyme	p. 52
2) Concentration en accepteur	p. 52
3) Concentration en glycosylnucléotide	p. 55
C) <u>RESULTATS OBTENUS</u>	p. 57
1) Comparaison de la vitesse de sialylation des différents accepteurs	p. 57
2) Les accepteurs biantennés sont-ils mono ou disialylés ?	p. 59
3) Expérience de compétition	p. 62
D) <u>CONCLUSION</u>	

II) <u>ETUDE DE LA SIALYLATION ET DE LA FUCOSYLATION DE LA N-ACETYLLACTOSAMINE ET DE SES DERIVES</u>	p. 64
A) <u>CONDITIONS UTILISEES</u>	p. 64
1) Choix de la source d'enzyme	p. 64
2) Choix des accepteurs	p. 66

B) <u>RESULTATS</u>	p. 66
1) Sialylation	p. 66
2) Fucosylation	p. 68
3) Identification du produit formé lors de la fucosylation de la N-acétyllactosamine sialylée	p. 72
C) <u>CONCLUSION</u>	p. 73

CONCLUSION GENERALE	p. 77
---------------------------	-------

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Ce travail a pour but d'étudier la régulation des deux dernières étapes de la biosynthèse des N-glycosylprotéines, sialylation et fucosylation. En effet, l'acide sialique et le fucose sont exposés à la surface de la molécule et ont ainsi un rôle biologique très important à jouer.

Notre recherche s'est développée dans deux directions :

- Comparaison du taux de sialylation d'accepteurs de taille différente.
- Etude de l'hypothèse de l'équipe de HILL (34), (exclusion mutuelle de l'acide sialique et du fucose) avec des accepteurs de petite taille.

Nous avons utilisé des méthodes différentes de celles des autres auteurs :

- Emploi de systèmes enzymatiques microsomaux réellement impliqués dans la biosynthèse des glycoprotéines et non d'enzymes extraits de liquides biologiques dont la spécificité peut être différente.
- Utilisation d'accepteurs micromoléculaires, permettant ainsi la caractérisation des produits de glycosylation par chromatographie sur papier.

- Etude systématique de la dégradation des précurseurs glycosyl nucléotidiques.

L'exposé de ces travaux sera précédé de généralités concernant la structure et la biosynthèse des glycoprotéines.

GENERALITES

1 - STRUCTURE DES GLYCOPROTÉINES

Les glycoprotéines sont constituées par l'association covalente d'un glycanne avec une fraction peptidique. Il existe deux grands types de glycoprotéines qui diffèrent par leur structure propre et le type de liaison glucide - protéine :

les N-glycosylprotéines dans lesquelles les glycannes sont liés N-glycosidiquement à un résidu d'asparagine, et les O-glycosylprotéines où la fraction glucidique est conjuguée O-glycosidiquement à un hydroxy-amino-acide.

I - STRUCTURE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES

Ces glycannes possèdent tous une partie interne constituée par un noyau pentasaccharidique, dont la structure est représentée dans la figure 1. Sur ce noyau viennent se greffer en 4 et 4', soit des résidus de mannose (type oligomannosidique), soit des résidus de N-acétyllactosamine (type N-acétyllactosaminique).

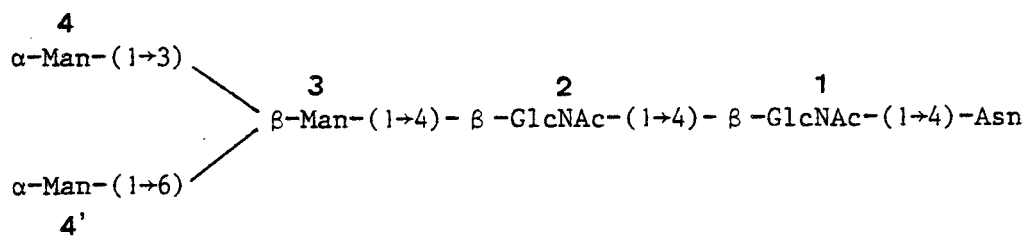


Figure 1 : Structure du noyau pentasaccharidique des N-glycosylprotéines.

A - GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE

Dans ces structures qui ne contiennent que du mannose et de la N-acétylglucosamine, le nombre de résidus de mannose peut varier de 3 à 9, mais le mode de branchement reste analogue à celui qui est représenté dans la figure 2.

Certains glycanes contiennent des résidus de N-acétylglucosamine supplémentaires en position terminale non réductrice. (51). Ces structures sont de type intermédiaire entre les types oligomannosidique et N-acétyllactosaminique. Dans la figure 3 est représentée la structure d'un glycopeptide de l'ovalbumine qui est un exemple de glycopeptide de type oligomannosido-N-acétyllactosaminique ou type mixte.

B - GLYCANNES DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE

Ces glycanes contiennent en plus de la N-acétylglucosamine et du mannose, des résidus de galactose, de fucose et d'acide N-acétylneuraminique en nombre variable. La structure de base représentée dans la figure 4, peut-être substituée par :

- un ou plusieurs résidus de fucose branchés, soit en position 6 sur la GlcNAc 1 , soit en position 3 sur les résidus 5 et 5' de GlcNAc.

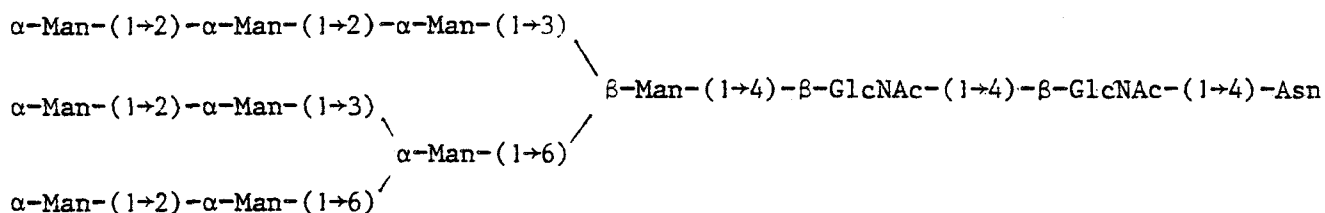


Figure 2 : Structure du glycanne de l'unité A de la thyroglobuline (23)

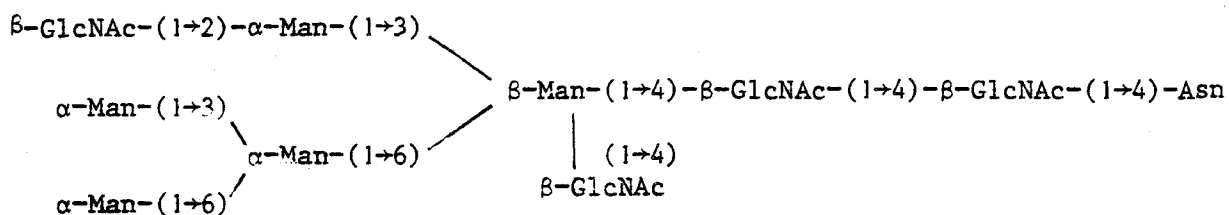


Figure 3 : Structure d'un glycopeptide de l'ovalbumine (51)

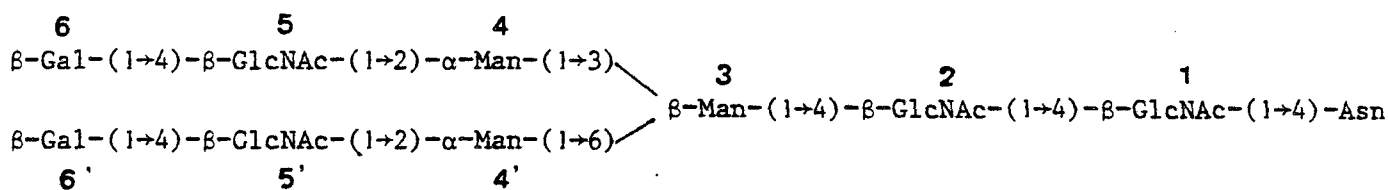


Figure 4 : Structure de base des glycannes de type N-acétyllactosaminique

- un ou plusieurs résidus d'acide N-acétylneuraminique liés soit en position 3, soit en position 6 sur les résidus de Gal 6 et 6'.

- une ou plusieurs branches de N-acétyllactosamine supplémentaires, (sialylées, fucosylées ou non), en position 4 sur le Man 4 et en position 6 sur le Man 4', donnant des structures tri et tétraantennées.

A titre d'exemple, la structure de quelques glycopeptides classiques est donnée dans la figure 5.

II - STRUCTURE DES GLYCANNES DES O-GLYCOSYLPROTEINES

Contrairement au cas des N-glycosylprotéines dans lesquelles il n'existe qu'un seul type de liaison glycanne-amino-acide, les O-glycosylprotéines présentent une grande variété de types de conjugaison. En effet plusieurs monosaccharides (GalNAc, Man, Gal, Xyl) et plusieurs amino-acides (Ser, Thr, Hyl, Hyp) sont impliqués dans les points d'attache. Nous nous limiterons aux O-seryl et O-thréonyl glycosides.

A - LIAISON α -GalNAc- (1 \rightarrow 3)-Ser (Thr)

On trouve ce type de liaison dans les glycoprotéines

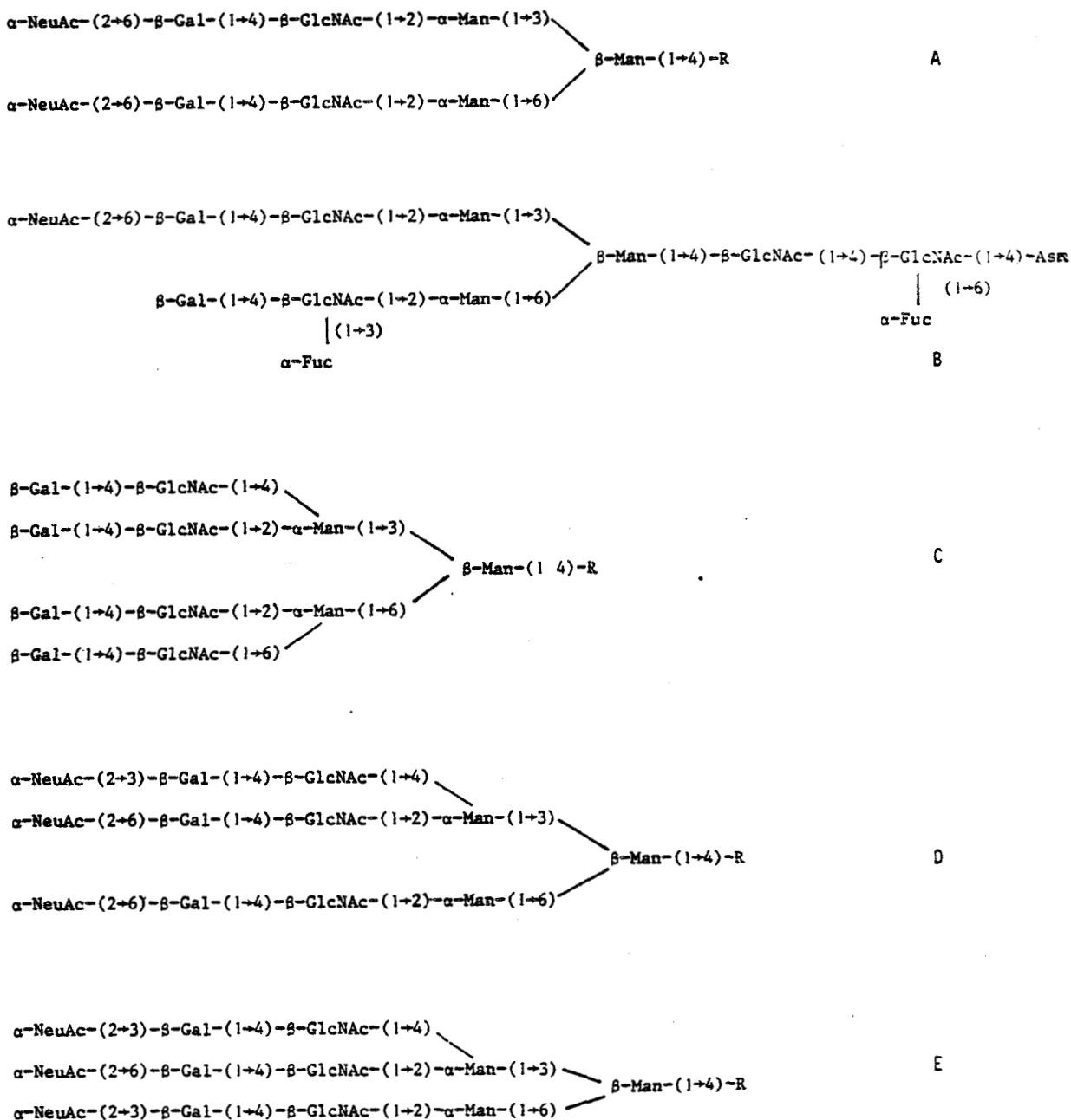


Figure 5 : Structure de quelques glycopeptides classiques de type N-acétyllactosaminique

(R : $\beta\text{-GlcNAc-(1\rightarrow4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1\rightarrow4)-Asn}$)

- A : Glycopeptide de la sérotransferrine humaine (47)
- B : Glycopeptide de la lactotransferrine humaine (48)
- C : Glycopeptide désialylé de la glycoprotéine acide α_1 humaine (orosomucoïde) (13)
- D : Glycopeptide de la glycoprotéine acide α_1 humaine (25)
- E : Structure du glycanne de la fêtuine de veau (33)

dites de "type mucine". Sur ce premier résidu de GalNAc viennent se greffer, soit un résidu de β Gal en position 3, soit un résidu d' α -NeuAc en position 6. Dans le premier cas, on obtient le glycoprotide β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc-(1 \rightarrow 3)-Ser (Thr) qui représente le noyau commun à de nombreux glycanes qui en dérivent par substitution. Sur le résidu de Gal peuvent se brancher :

- un résidu de α Fuc en position 2
- un résidu de α NeuAc en position 3
- un résidu de α GalNAc en position 3
- un résidu de β GalNAc en position 6 généralement sulfaté

Il existe aussi des structures contenant des résidus de N-acétyllactosamine liés en position 6 sur la première α GalNAc.

Dans la figure 6 sont représentés à titre d'exemple le glycanne de la mucine sous maxillaire de Porc (A^+) (8) et celui de la mucine sous maxillaire de mouton (4).

Les spécificités de groupe sanguin peuvent être portées par des glycopeptides de "type mucine", mais leur structure est beaucoup plus complexe que celles des mucines. Un exemple est représenté dans la figure 7.

B - LIAISON β -Xyl-(1 \rightarrow 3)-Ser

Ce type de liaison est rencontré dans les mucopolysaccharides (ou glycosaminoglycanes). Ce sont de grands polymères à structure répétitive.

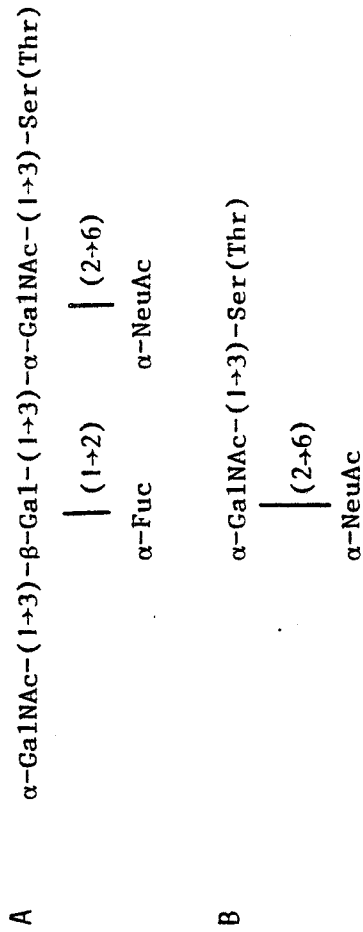


Figure 6 : Structures de "type mucine".

A : Glycopeptide de glande sous-maxillaire de Porc
(ayant une activité de groupe A) (8)

B : Glycopeptide de glande sous-maxillaire de Mouton (4)

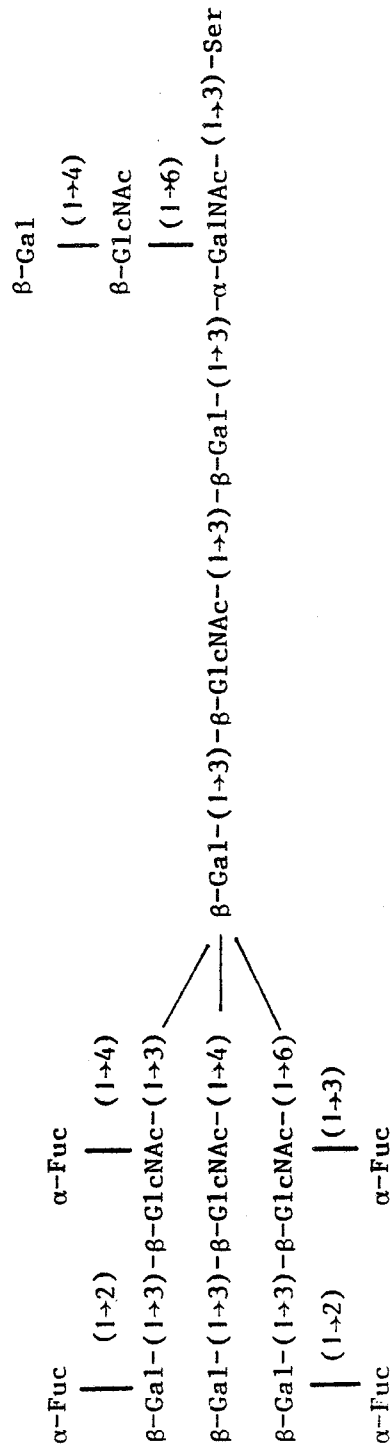


Figure 7 : Structure du mégaloglycane des substances de
groupe sanguin de spécificité Le B. (12)



Un disaccharide constitue généralement le motif de base (38) (figure 8).

III - REMARQUES

Avant d'aborder l'étude de la biosynthèse des glycoprotéines, il est nécessaire de faire quelques remarques :

- Dans le cas des N-glycosylprotéines comme dans celui des O-glycosylprotéines la partie du glycanne liée à la protéine est toujours la même (noyau). Par contre il existe une grande variation au niveau de l'extrémité des chaînes (glycannes bi, tri, tétraantennés, avec un ou plusieurs résidus d' α NeuAc, un ou plusieurs résidus d' α Fuc). Cette partie externe semble être impliquée dans les mécanismes de reconnaissance.

- Il existe des règles strictes de substitution : un oligosaccharide donné ne peut accepter qu'un petit nombre de monosaccharides, généralement avec un type de liaison bien déterminé. Par exemple l'extrémité N-acétyllactosaminique des N-glycosylprotéines peut être substituée soit par un résidu de α Fuc en position 3 sur la GlcNAc 5 ou 5', soit par un résidu d' α NeuAc en position 3 ou 6 sur le Gal 6 ou 6'. La présence d' α NeuAc et celle de α Fuc étant, sur une même branche mutuellement exclusives. Un autre exemple, est le cas de la β GlcNAc 1 qui ne peut être substituée que par un résidu de α Fuc, et celui-ci est toujours lié en position 6 .

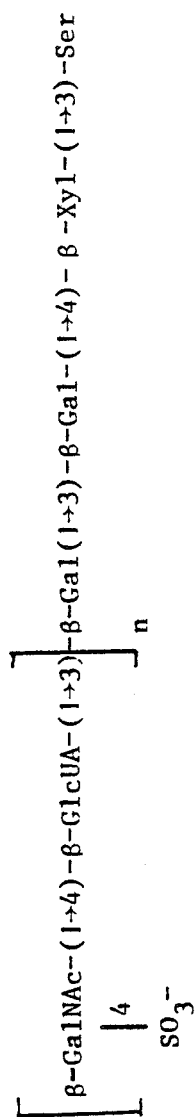


Figure 8 : Structure du chondroïtine-4-Sulfate

n = 12 à 20 (38)



Dans le cas des O-glycosylprotéines de "type mucine", l' α NeuAc est toujours lié en position 6 sur la première GalNAc alors qu'il est toujours lié en position 3 sur le Gal voisin. Ce résidu de Gal peut aussi être substitué par un Fuc en position 2 mais la présence simultanée d' α NeuAc et de α Fuc sur un galactose n'a jamais été décrite. Par contre il n'existe aucune exclusion entre un résidu d' α Fuc lié sur le galactose et un résidu d' α NeuAc lié sur la N-acétylgalactosamine.

Ces règles de substitution observées pour les structures glycaniques laissent supposer l'existence de mécanismes de régulation au niveau de leur biosynthèse.

2. BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTÉINES

I - MECANISME DE LA REACTION DE GLYCOSYLATION

La réaction de glycosylation se déroule comme représenté ci-dessous :



Accepteur glycosylé + activateur.

Le composé activateur est généralement un nucléoside di(mono) phosphate. Dans les premières étapes de la biosynthèse des N-glycosylprotéines c'est un lipide de type dolichol.

Chaque monosaccharide est porté par un nucléoside phosphate spécifique. La structure de quelques monosaccharides activés est donnée à titre d'exemple :

CMP- β -NeuAc, GDP- β -Fuc, UDP- α -Gal.

Les glycosyltransférases sont spécifiques du monosaccharide qu'elles reconnaissent et de la liaison qu'elles forment (40).

II - LOCALISATION DES GLYCOSYLTRANSFERASES

A - FORME MEMBRANAIRE

Les glycosyltransférases sont des enzymes membranaires. Il est généralement admis que la biosynthèse des glycoprotéines se déroule à la face interne du réticulum endoplasmique. Le déclenchement de la glycosylation a lieu alors que la protéine est encore fixée sur le ribosome (réticulum endoplasmique rugueux). La maturation et l'élongation des chaînes se déroulent dans le réticulum endoplasmique lisse puis dans les vésicules de Golgi. (figure 18 page 34).

Il existe des glycosyltransférases ancrées dans la membrane plasmique, leur site actif étant tourné vers l'extérieur de la cellule (ectoenzymes). Elles jouent probablement un rôle dans la vie sociale de la cellule (mécanismes de reconnaissance et d'adhésion) et dans la réparation des glycoconjugués de surface. Elles peuvent être aussi bien responsables du déclenchement de la synthèse (7) que de l'élongation des chaînes glycaniques (46), (6).

B - FORME SOLUBLE

De nombreux liquides biologiques, le lait, l'urine, le sérum par exemple, contiennent des glycosyltransférases. Leur rôle n'est pas clairement défini. Ne sont-elles pas seulement le résultat d'une solubilisation d'enzymes membranaires ? Il faut cependant remarquer que ce sont généralement ces glycosyltransférases qui sont utilisées pour l'étude des mécanismes de la biosynthèse des glycoprotéines ; en effet elles sont plus facile à purifier que les enzymes membranaires, ne nécessitant pas l'emploi de détergents.

III - REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES

La biosynthèse des glycoprotéines peut être régulée soit par des mécanismes généraux, existant pour chaque réaction enzymatique (contrôle génétique, contrôle de la concentration en précurseur, par exemple), soit par des mécanismes spécifiques de chaque étape de glycosylation.

A - MECANISMES GENERAUX

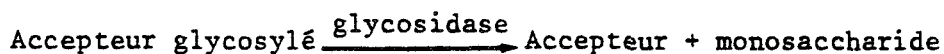
1) Au niveau génétique

C'est après de nombreux travaux sur les glycosyltransférases que ROSEMAN (40) a émis l'hypothèse : "one gene, one linkage " ; c'est-à-dire qu'une glycosyltransférase (correspondant à l'expression d'un seul gène) est responsable de la formation d'un seul type de liaison glycanique.

Le contrôle génétique peut aussi être exercé par la chaîne peptidique acceptrice (figure 9). Par exemple SCHACHTER (44), décrit le cas de malades dont le sérum ne contient pas d' α_1 anti-trypsine : en effet cette glycoprotéine n'est pas excrétée du foie où elle est synthétisée car sa partie glucidique est de type oligomannosidique, alors qu'elle est de type N-acétyllactosaminique dans le cas de sujets sains (19). Toutes les autres glycoprotéines de ces malades sont normalement glycosylées. C'est probablement une différence de séquence primaire ou de conformation de la chaîne protéique qui est à l'origine du blocage de la maturation de la chaîne glycanique.

2) Au niveau enzymatique

Le taux de glycosylation dépend non seulement de la glycosyltransférase mais aussi de la glycosidase responsable de la réaction :



3) Au niveau du sucre activé

Il existe des enzymes capables de dégrader les nucléotides-sucres (49), comme les Dol P-P -oligosaccharides (7). Ces enzymes contrôlent donc directement la biosynthèse des glycoprotéines.

Les mécanismes de transport des glycosylnucléotides, depuis le cytoplasme où ils sont généralement synthétisés, jusque dans le réticulum endoplasmique sont mal connus. Pourtant de nombreux auteurs pensent que ce passage est un facteur "clef" contrôlant la concentration en nucléotide-sucres au voisinage du site actif de l'enzyme.

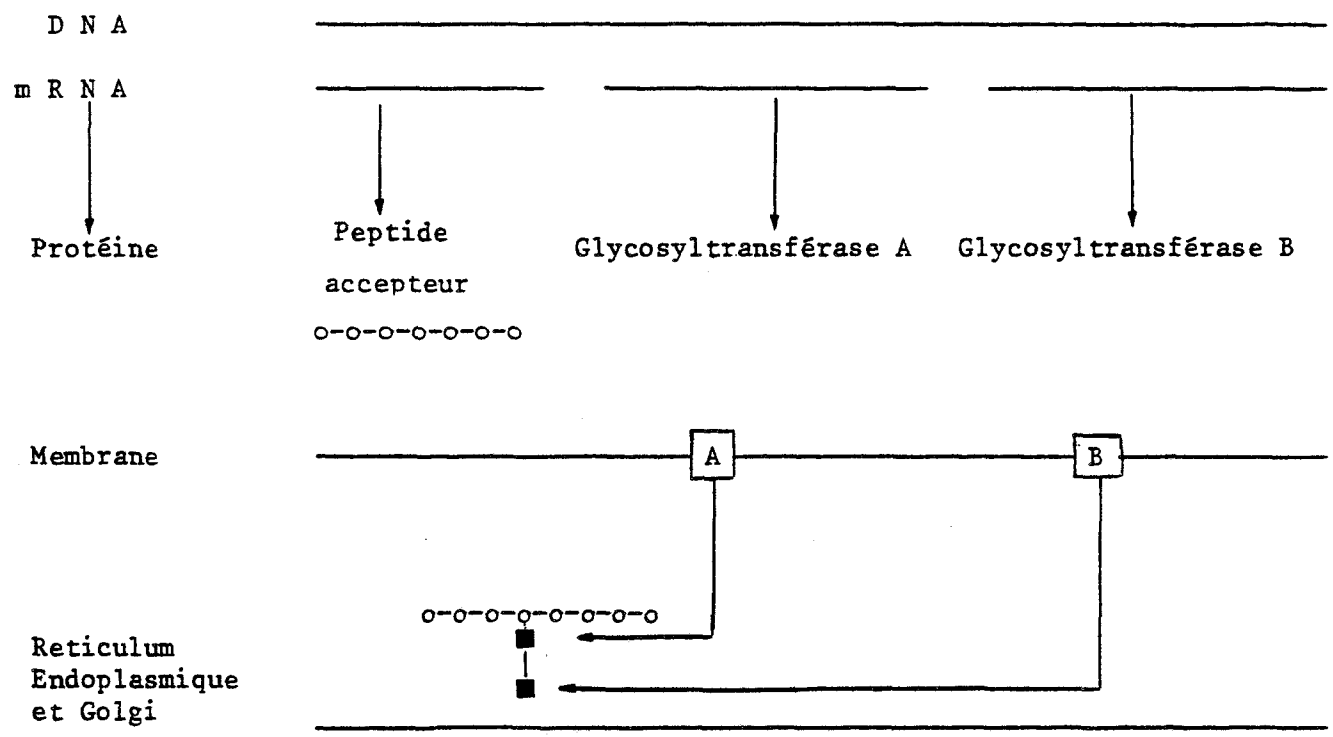


Figure 9 : Contrôle génétique de la biosynthèse des glycoprotéines (45)



B - BIOSYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTEINES

1) Déclenchement de la biosynthèse

La première étape consiste en un transfert en bloc d'un oligosaccharide porté par un dolichol sur une asparagine de la chaîne peptidique. Cet oligosaccharide est formé par le noyau pentasaccharidique substitué par des résidus de Man et de Glc. La biosynthèse des intermédiaires lipidiques à partir du Dol-P et le transfert du glycanne sur la protéine sont représentés dans la figure 10.

Ce schéma est complexe ; les résidus d' α Man peuvent être apportés sous deux formes différentes de sucres activés : GDP- α Man et Dol-P- β -Man (figure 11). Ce sont les travaux de CHAPMAN et al. (9) qui décrivent un lymphome incapable de synthétiser le Dol-P-Man qui ont permis d'obtenir ce résultat. Dans ce cas l'intermédiaire lipidique formé est Dol-P-P-GlcNac₂-Man₅-Glc₃, car les résidus de glucose sont ensuite ajoutés à la structure incomplètement mannosylée.

Ces trois résidus de glucose terminaux, servent probablement de signal au transfert de l'oligosaccharide sur la protéine.

La structure primaire de la chaîne peptidique acceptrice au voisinage de l'Asn est confirmée par les travaux de RONIN et al. (39) : c'est Asn-X-Ser où X peut-être n'importe quel acide aminé sauf la proline. De plus le résidu d'asparagine est généralement situé dans un β Turn (2, 3).

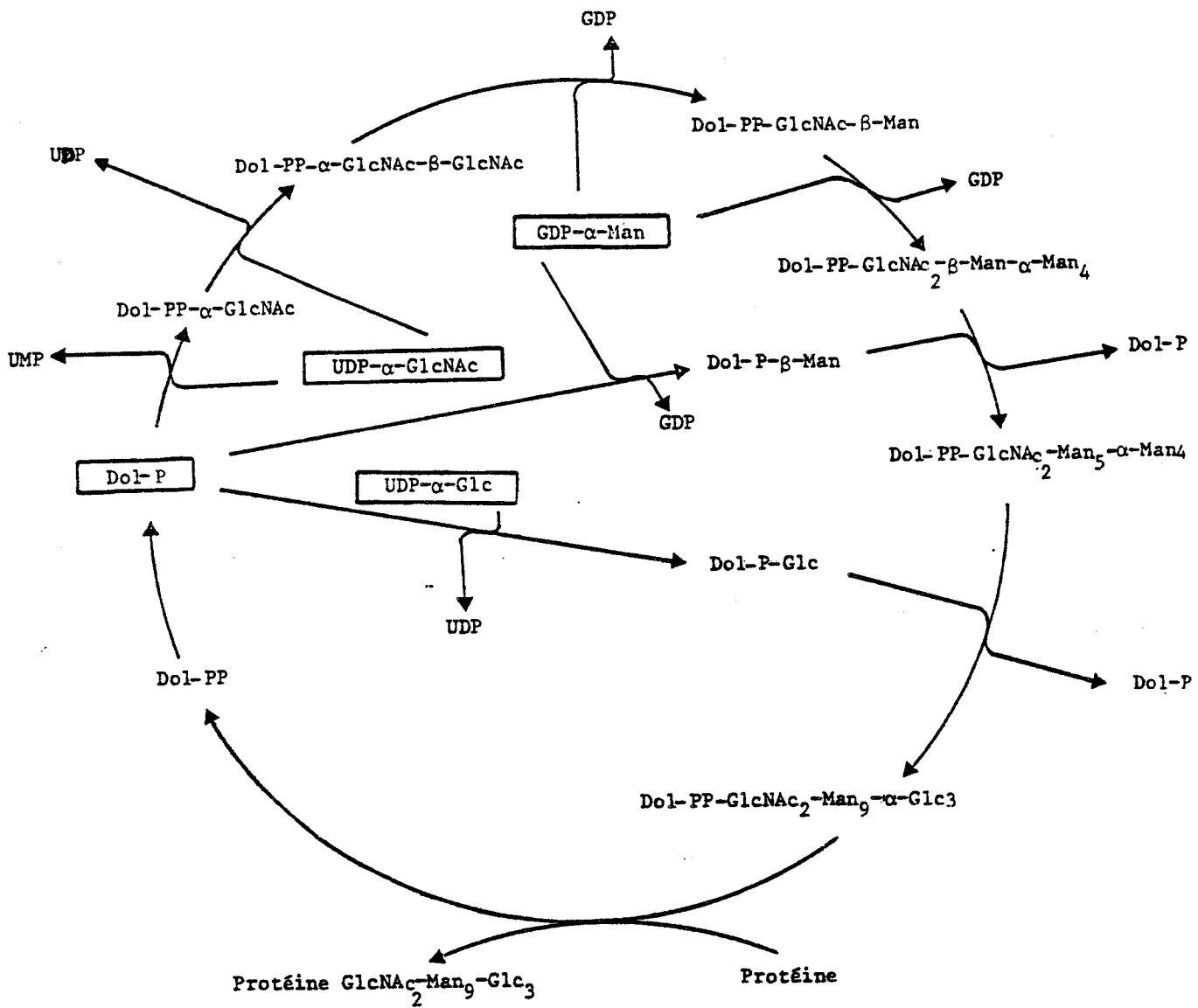


Figure 10 : Le cycle des dolichol-phosphates (18).



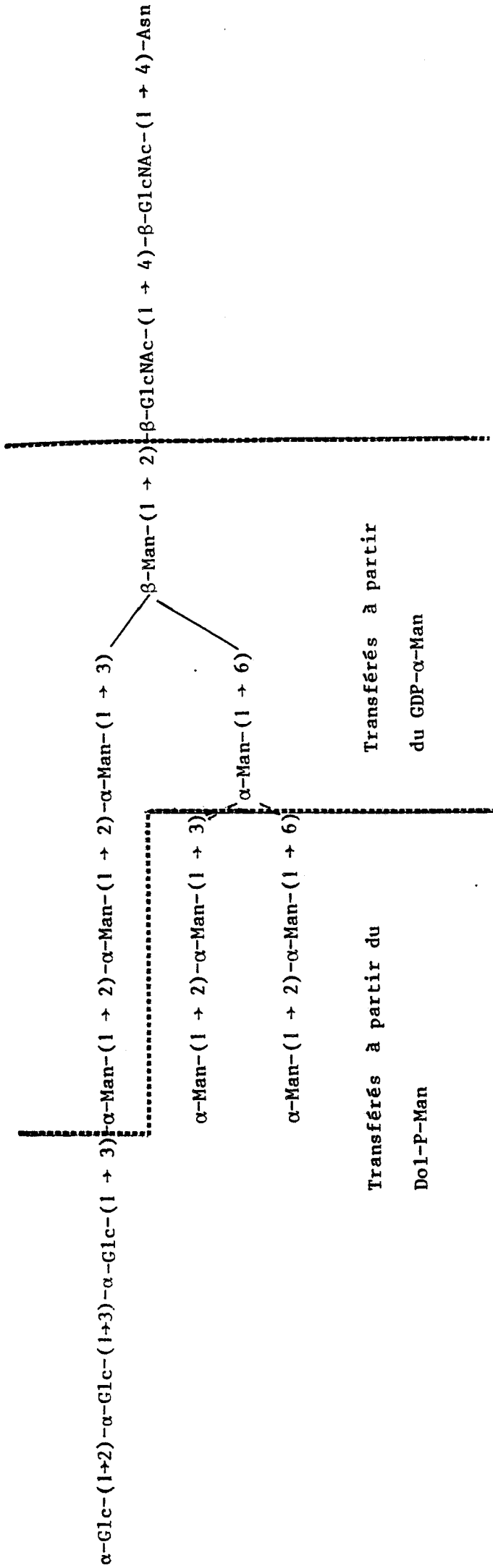


Figure 11 : Structure de la glycoprotéine obtenue à la fin du cycle des Dolichols (18).



2) Maturation

Immédiatement après son transfert sur la protéine l'oligosaccharide est déglucosylé par des enzymes spécifiques (14). Les étapes suivantes sont connues grâce aux travaux de HARPAZ et SCHACHTER (16,17) et sont représentées dans la figure 12.

Il y a tout d'abord hydrolyse des résidus de α Man liés (1 \rightarrow 2). Ce qui libère l'oligosaccharide "favori" de la GlcNAc Tf I ; en effet cet enzyme ne peut fonctionner que si un au moins des deux résidus de α Man branché sur le Man 6 en position 3 ou 6 est démasqué.

La présence du premier résidu de GlcNAc 5 rend alors possible l'hydrolyse de ces deux résidus de α Man. L'existence d'une ou plusieurs α -mannosidases dépendant de l'action préalable de la GlcNAc Tf I a été montrée dans les vésicules golgiennes de foie de rat, par l'équipe de SCHACHTER (17).

La GlcNAc Tf II nécessite aussi l'action préalable de la GlcNAc Tf I : sur des cellules de Hamster résistantes à la lectine de Phaseolus vulgaris (n'ayant donc pas de résidu de GlcNAc exposé), SCHACHTER et ses collaborateurs (32) prouvent qu'il y a déficience en GlcNAc Tf I alors que le taux de GlcNAc Tf II est normal.

L'existence de la GlcNAc Tf III n'a jamais encore été prouvée. HARPAZ et SCHACHTER (17) le font intervenir car la présence d'un résidu de β GlcNAc en position 4 sur le β Man bloque l'action de la GlcNAc Tf I comme celle de la GlcNAc Tf II (figure 12). Ces résultats sont en bon accord avec ceux de l'équipe de KOBATA (51) montrant que les structures de type mixte ont toujours un résidu de GlcNAc en position 4 sur le β Man (figure 3).

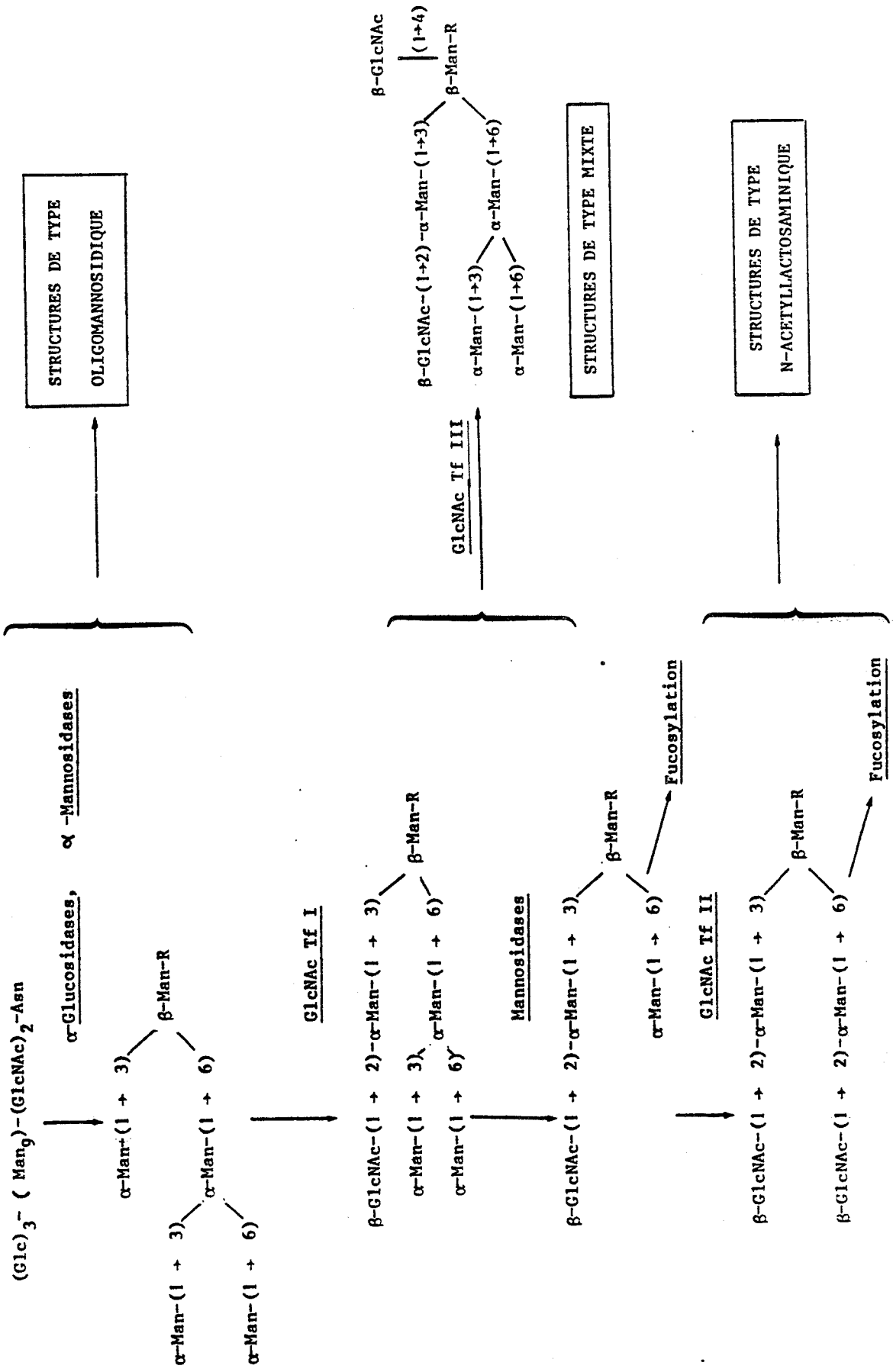


Figure 12 : Maturation des glycopeptides de type N-acétyllactosaminique, d'après SCHACHTER.



La fucosylation en position 6 sur le résidu de GlcNAc situé au point d'attache ne peut avoir lieu qu'après la fixation de GlcNAc sur le Man 4 par la GlcNAc Tf I (figure 12) (54).

De plus aucune structure de type mixte fucosylée n'a été décrite. Il semble donc que l'existence d'un résidu de GlcNAc en position 4 du β Man bloque l'addition de α Fuc comme celle de β GlcNAc.

3) Elongation

a) Addition du galactose

Les résidus de β Gal sont transférés en position 4 sur les GlcNAc terminales. Les mécanismes de régulation de cette étape sont mal connus. Ils ont été étudiés par RAO et MENDICINO (36) à l'aide d'un enzyme isolé de ganglions lymphatiques de Porc et sont représentés dans la figure 13. L'affinité de cet enzyme est dix fois plus faible pour un glycanne biantenné monogalactosylé que pour ce même glycanne non galactosylé. Si le galactose est substitué par un résidu d'acide sialique l'affinité de l'enzyme diminue encore. Ces auteurs ne précisent pas sur quelle branche le premier résidu de Gal est fixé. SCHACHTER (43) dans une revue générale récente émet l'hypothèse que la galactosylation s'effectue d'abord sur la GlcNAc 5', se basant sur des études structurales. Mais cette hypothèse reste à démontrer.

b) Terminaison des chaînes : sialylation et fucosylation de la N-acétyllactosamine terminale

Ces deux étapes sont les dernières de la biosynthèse des N-glycosylprotéines, mais non les moindres. L'acide sialique et le fucose, étant les résidus les plus exposés, jouent un rôle important comme signaux de reconnaissance.

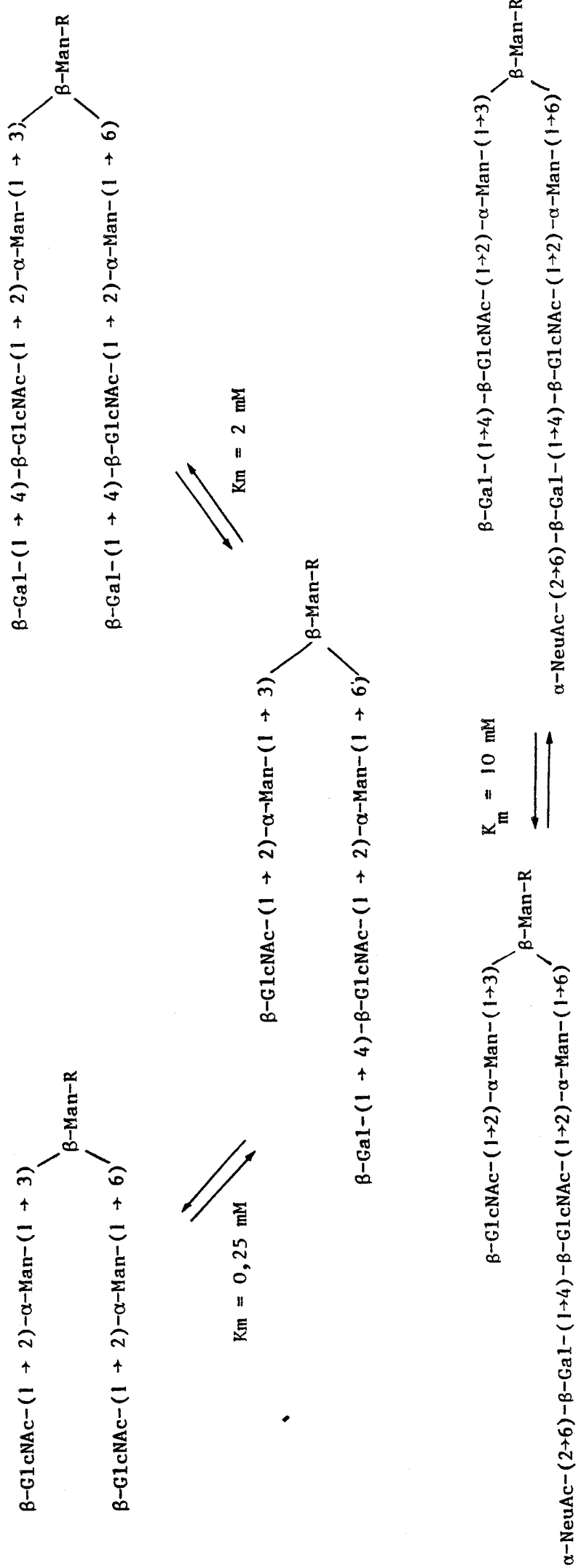


Figure 13 : Etude de la spécificité de la galactosyl-transférase
 de ganglions lymphatiques de Porc (36)

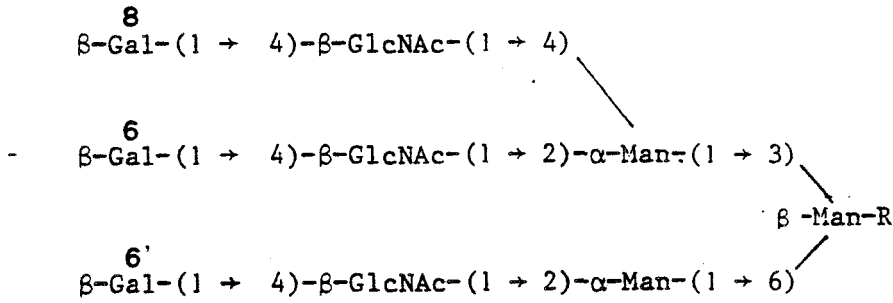


L' α NeuAc se fixe sur le résidu de Gal terminal en position 3 ou en position 6. La plupart des glycoprotéines sont sialylées en position 6, mais il existe des structures uniquement sialylées en position 3 (gonadotropine) et d'autres sialylées à la fois en (2 → 3) et en (2 → 6) comme l'orosomucoïde, qui est représenté dans la figure 5.D. Pourtant il n'a jamais été encore mis en évidence de sialyltransférase ajoutant l' α NeuAc en position 3 sur les résidus de Gal des N-glycoprotéines.

Le Fuc se fixe sur le résidu de GlcNAc 5 ou 5' uniquement en position 3. Cette affirmation n'est basée que sur des études structurales. En effet aucun auteur n'a encore démontré la nature de la liaison formée par les fucosyltransférases microsomales.

Comme RAO et MENDICINO l'ont fait pour le transfert de Gal, VAN DEN EIJNDEN et al. (53) ont étudié, par R.M.N., le taux de sialylation in vitro de chaque branche de glycopeptides désialylés bi et triantennés de l'orosomucoïde. Leurs résultats sont présentés dans la figure 14 : il faut remarquer que dans le cas du glycopeptide biantenné comme dans celui du triantenné, le résidu de Gal 6 est complètement sialylé alors que le Gal 6' l'est très faiblement.

Ces résultats peuvent s'expliquer par la conformation très différente des 2 branches, celle liée en position 6 du β Man étant beaucoup plus mobile que l'autre (30). Il faut aussi noter que ce n'est pas sur la même branche que se fixent préférentiellement l'acide sialique et le galactose.



Taux de Sialylation			
	Gal 6	Gal 6'	Gal 8
Glycane biantenné	100 %	< 10 %	
Glycane triantenné	100 %	0	80 %

Figure 14 : Spécificité de transfert de l'acide sialique sur des glycopeptides tri et biantennés, par une sialyltransférase purifiée à partir du colostrum bovin (53).

Ces résultats ne permettent pas d'expliquer comment est synthétisé l'orosomucoïde où le Gal 6 est sialylé en position 6 et le Gal 8 en position 3.

Récemment HILL et ses collaborateurs ont étudié les mécanismes de régulation au niveau de la terminaison des chaînes des N-glycosylprotéines. (5). Les résultats qu'ils ont obtenus sont rassemblés dans la figure 15. Il faut remarquer que les enzymes utilisés par ces auteurs sont hautement purifiés et qu'ils ne résolvent pas les produits formés pour en déterminer la structure. De plus ces enzymes sont isolés du lait, humain ou bovin.

Ces résultats permettent de conclure qu'il existe des chemins privilégiés pour la biosynthèse d'un produit. Par exemple le composé difucosylé (à la fois sur le Gal en position 2 et la GlcNAc en position 3) ne peut-être obtenu que s'il y a d'abord transfert sur le Gal (figure 15). D'autre part, certaines réactions sont mutuellement exclusives comme la sialylation (en position 6 du Gal) et la fucosylation (en position 3 du GlcNAc) sur une même extrémité N-acétyllactosaminique (figure 15).

C - BIOSYNTHESE DES O-GLYCOSYL-PROTEINES

Il ne semble pas y avoir d'intermédiaires lipidiques participant à la biosynthèse des O-glycosylprotéines. Chaque monosaccharide est ajouté successivement par une glycosyltransférase spécifique.

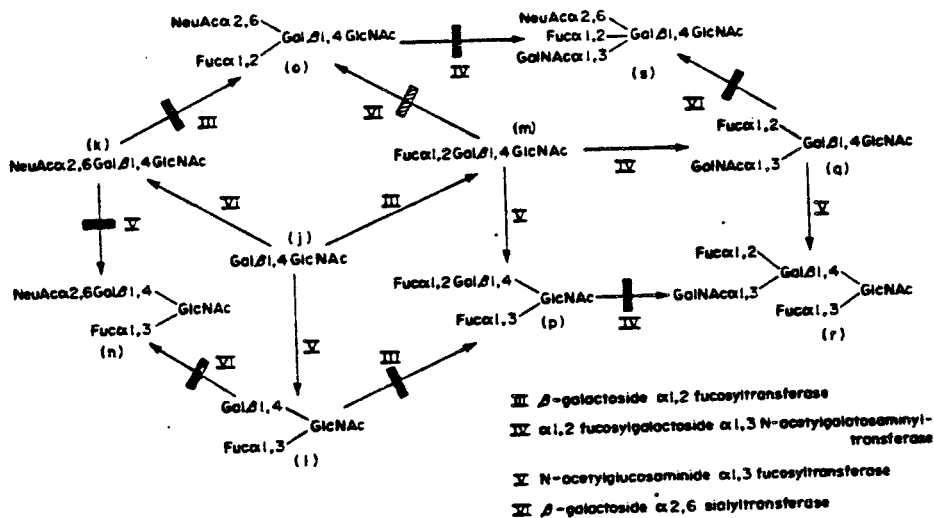


Figure 15 : Schéma proposé par l'équipe de HILL (5) pour la terminaison des chaînes glycaniques des N-glycosylprotéines.

- : la réaction est impossible
- ▨ : la réaction est très lente

Les enzymes ont été purifiées à partir de glandes sous-maxillaires de Porc (III et IV), du lait humain (V) et du colostrum bovin (VI).

(Gal β 1,4GlcNAc schématise l'extrémité N-acétyllactosaminique de la sérotransferrine humaine qui est utilisée comme accepteur).



Nous nous bornerons à décrire la biosynthèse des glycoprotéines de "type mucine" ; en effet la plupart des glycosyltransférases ont été purifiées à partir de glandes sous-maxillaires de Porc et de Mouton.

1) Initiation : transfert de la première GalNAc sur la sérine ou la thréonine de la chaîne peptidique

C'est une étape clef, mais sa régulation est mal connue. La nature des acides aminés situés à proximité du résidu de Ser (ou Thr) n'a pas été déterminée. Mais l'action de l'enzyme nécessite une chaîne peptidique intacte (20). La structure secondaire de la protéine semble donc jouer un rôle important.

2) Elongation de la chaîne

D'après SCHACHTER et al. (42), le transfert de β Gal en position 3 du résidu de GalNAc situé au point d'attache ne peut se faire que si ce résidu n'est pas sialylé. Ces auteurs concluent à un rôle possible de cet acide sialique comme signal de terminaison. Dans les glandes sous maxillaires de Mouton où l'activité de la sialyltransférase est plus grande que celle de la galactosyltransférase, la structure glycanique trouvée est la suivante :



Par contre la structure de la mucine de glandes sous-maxillaires de Porc est plus complexe, car la galactosyltransférase est très active (figure 6). L'acide sialique est ajouté ensuite.

Comme ils l'ont fait pour les N-glycosylprotéines, HILL et ses collaborateurs ont étudié la terminaison des chaînes glycaniques des O-glycosylprotéines. (5). Leurs résultats sont présentés dans la figure 16. Ils en déduisent la voie de biosynthèse la plus probable pour les mucines de glandes sous maxillaires de Porc et Mouton (figure 17).

La dernière étape de la biosynthèse de la mucine de glande sous maxillaire de Porc est le transfert d'un résidu d' α GalNAc sur une structure déjà sialylée et fucosylée. TAKASAKI et al. (52) montrent que cette réaction n'est pas possible, en utilisant un enzyme purifié du lait humain. Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par une différence entre les conditions de réaction utilisées par les deux équipes. Il ne faut cependant pas négliger l'hypothèse d'une différence de spécificité entre l'enzyme de glandes sous maxillaires de Porc et celle du lait humain.

Il existe une sialyltransférase ajoutant l' α NeuAc en position 3 du β Gal dans les glandes sous-maxillaires de Porc (41), pourtant les structures trouvées dans ces glandes ne sont pas sialylées en position 3 du Gal. Cette observation est en bon accord avec les résultats de la figure 16, montrant qu'il existe une exclusion mutuelle entre l' α NeuAc et l' α Fuc branchés sur un même résidu de β Gal.

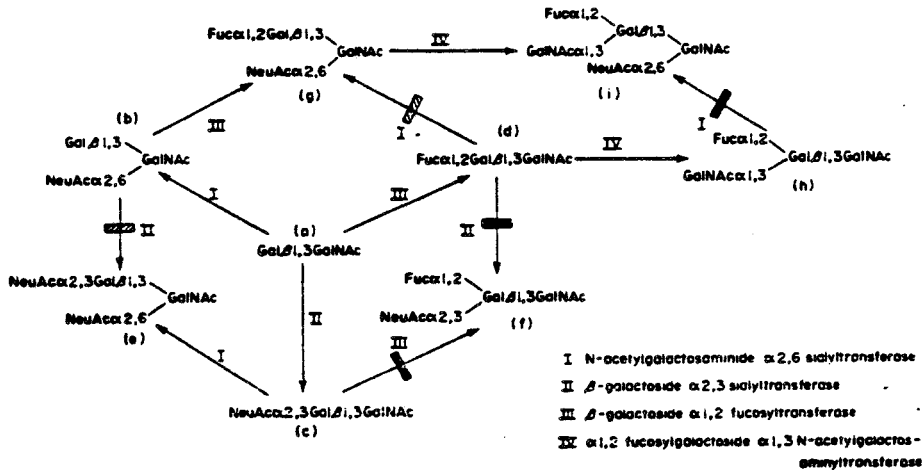


Figure 16 : Schéma proposé par l'équipe de HILL (5) pour la biosynthèse des chaînes glycaniques des O-glycosylprotéines.

- : la réaction est impossible
- ▨ : la réaction est très lente

Tous les enzymes utilisés ont été purifiés à partir de glandes sous-maxillaires de Porc. (Gal β 1,3GlcNAc schématise la chaîne glycanique de la glycoprotéine antigéle du poisson de l'Antarctique qui a été utilisée comme accepteur).



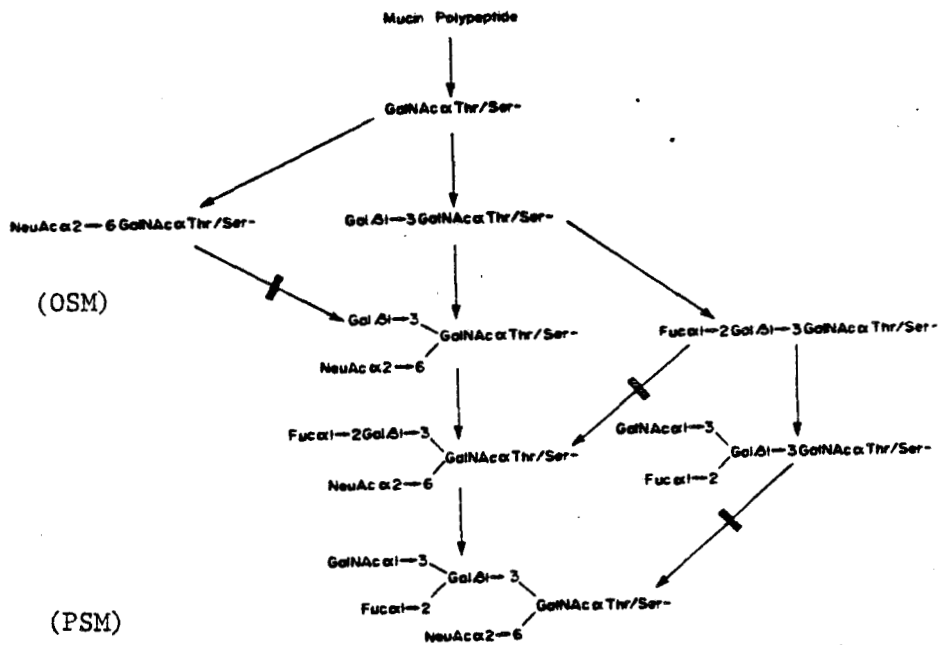


Figure 17 : Voie de biosynthèse des mucines de glandes sous-maxillaires de Mouton (OSM) et de Porc (PSM) proposée par l'équipe de HILL (5)

- : la réaction est impossible
- ▬ : la réaction est très lente

IV - CONCLUSION

- Un schéma récapitulatif de la biosynthèse des N-glycosylprotéines est représenté dans la figure 18.

- La plupart des étapes de la biosynthèse n'ont été décrites que dans un petit nombre de systèmes. N'est-il pas trop tôt pour généraliser ? En particulier pour l'étude des mécanismes de régulation, il existe probablement des voies mineures utilisées quand la voie majeure est bloquée permettant ainsi la biosynthèse de composés vitaux pour la cellule.

- Les enzymes responsables de la biosynthèse des glycoprotéines sont membranaires. Leur sous-compartmentation et l'ordre dans lequel ils sont arrangés dans la membrane dirigent peut-être l'ordre des glycosylations successives autant que leur propre spécificité (étudiée in vitro).

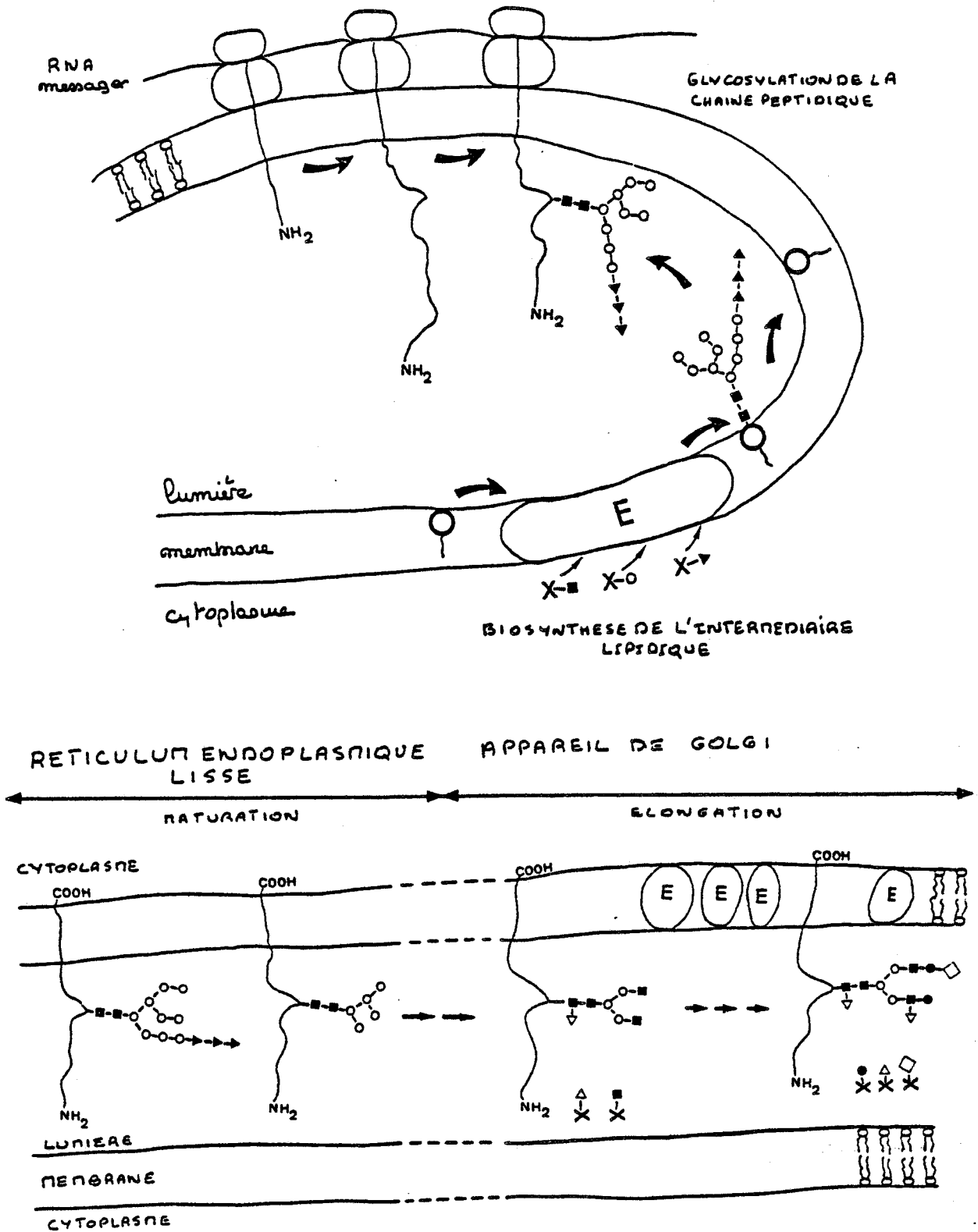


Figure 18 : Schéma récapitulatif de la biosynthèse des N-glycosylprotéines.

En haut : Initiation de la glycosylation dans le réticulum endoplasmique rugueux.

En bas : Maturation et élongation dans le réticulum endoplasmique lisse puis dans les vésicules de Golgi (cas d'une protéine membranaire).

(■ : GlcNAc ; ○ : Man ; ▴ : Glc ; ● : Gal ; ◇ : NeuAc, ▾ : Fuc ; X : Nucléotide ; ○ : Dol ; E : Enzyme).

BUS
LILLE

TRAVAUX PERSONNELS

1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATERIEL

A) LES ACCEPTEURS

La structure des oligosaccharides, des glycopeptides et des glycoprotéines utilisés pour les expériences décrites dans ce mémoire est représentée dans la Figure 19. Ils nous ont été fournis par Monsieur Pierre SINAY (Professeur à Orléans), Madame Geneviève SPIK (Professeur à Lille), Monsieur Gérard STRECKER (Maître de Recherches au CNRS) et nous les remercions vivement.

B) LES GLYCOSYLNUCLEOTIDES

Le GDP $\{^{14}\text{C}\}$ Fuc (activité spécifique 118 mCi/mmol) et le CMP $\{^{14}\text{C}\}$ NeuAc (activités spécifiques 304 mCi/mmol et 1,2 mCi/mmol) nous ont été fournis par AMERSHAM (Grande - Bretagne).

Tous les autres réactifs utilisés dans ce mémoire sont d'origine commerciale. Le $\{^3\text{H}\}$ BH_4K nous a été fourni par le CEA (FRANCE) à une activité spécifique de 20 Ci/mmole.

Les enzymes nous ont été fournis par SIGMA (USA) (neuraminidase de Clostridium perfringens insolubilisée sur Sepharose 4B) et par KABI (Suède) (galactose oxydase).

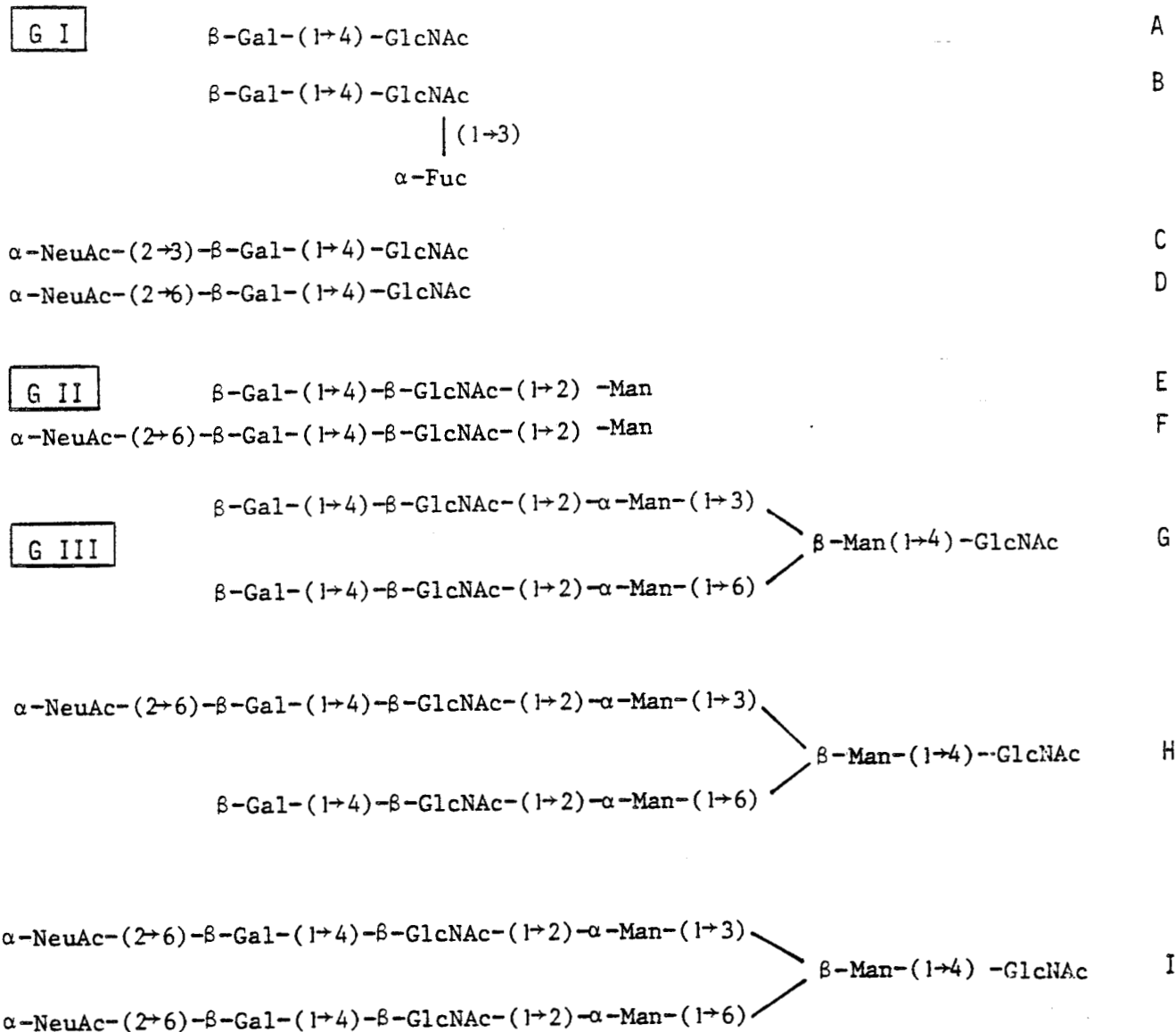


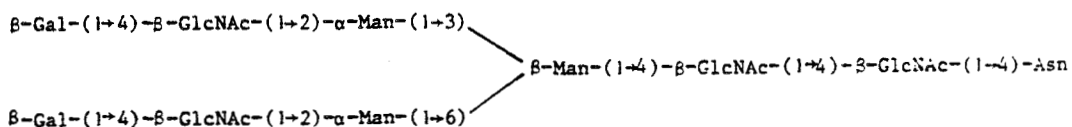
Figure 19 A : Structure des accepteurs oligosaccharidiques :

A et B ont été synthétisés chimiquement, C a été isolé de l'urine de patients atteints de sialidose. D a été purifié du colostrum de Vache. E et F résultent d'une acétolyse partielle de la fraction IV de COHN. G, H et I proviennent de l'urine de malades atteints de gangliosidose à GM₇

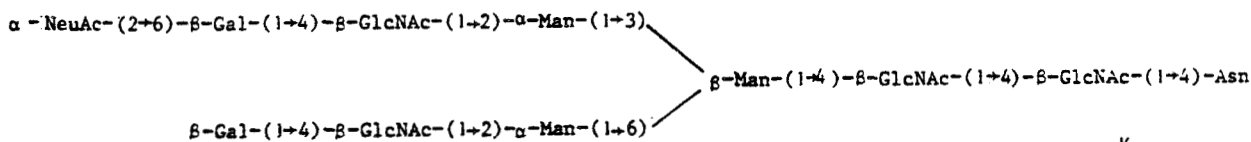
A et B nous ont été donnés par P. SINÁV,
C, E, F, G, H, I par G. STRECKER,
D par J.C. MICHALSKI.



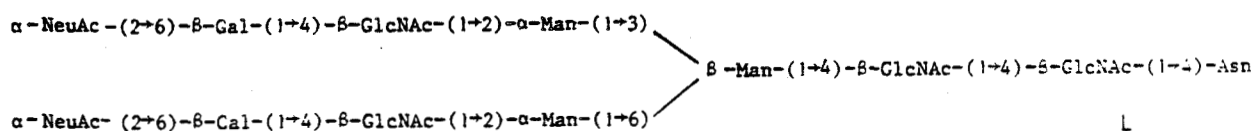
G IV



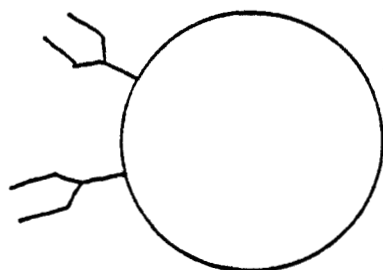
J



K

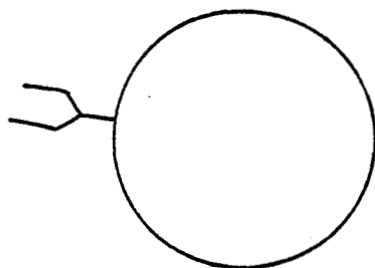


L



SEROTRANSFERRINE HUMAINE
(2 glycanes identiques à L
par molécule)

M



SEROTRANSFERRINE DE LAPIN
(1 seul glycanne identique à L
par molécule)

N

Figure 19 B : Structure des accepteurs glycopeptidiques et glycoprotéiniques : J, K, L et M nous ont été fournis par G. SPIK. J, K, et L proviennent d'une hydrolyse pronasique de la sérotransferrine humaine, suivie d'une hydrolyse neuraminidase, partielle pour K, totale pour J. La sérotransferrine de Lapin (N) native, et désialylée enzymatiquement a été préparée par V. MICHEL.

BUS
LILLE

II - METHODES

A) FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

1) Préparation des microsomes de foie de Rat

Tampon A : Tris maléate pH 7,4, 50 mM
Saccharose, 250 mM

Tampon B : Tris maléate pH 7,4 500 mM

(Toutes les opérations sont réalisées à 4°C).

Un rat de race WISTAR est tué par décapitation, son foie est rapidement prélevé, lavé dans le tampon A, pesé et broyé dans un appareil de FISCHER. Le broyat est homogénéisé dans 70 ml de tampon A (pour 7 g de foie) à l'aide d'un appareil de POTTER-ELVEJEHM (5 allers et retours du piston, 500 tours/minute). L'homogénat est tout d'abord centrifugé à 1000 g pendant 10 mn (pour sédimenter les gros débris cellulaires et les cellules entières) puis, en continuité à 10 000 g pendant 20 mn (afin d'obtenir un culot contenant, les noyaux, les mitochondries et les lysosomes).

Le surnageant est prélevé et centrifugé à 105000 g pendant 60 mn, (toutes ces opérations sont effectuées avec une centrifugeuse BECKMAN L₂65B, rotor SW 50).

Le culot microsomal est homogénéisé avec l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE dans du tampon B. Une fois le dosage de protéines réalisé par la méthode de LOWRY et al. (29), cet homogénat de microsomes est dilué à 30 mg de protéines par ml, réparti en petites fractions (200 µl) qui sont conservées par congélation à - 20°C.

2) Préparation des microsomes de foie de Porc

Le foie est prélevé directement sur l'animal, à l'abattoir et transporté jusqu'au laboratoire dans du tampon A, à 4°C. Il est coupé en petits morceaux, haché, broyé puis filtré sur plusieurs épaisseurs de gaze.

Il est ensuite homogénéisé (5 allers et retours du piston dans un appareil de POTTER - ELVEJEHM) et centrifugé à 22500 g pendant 10 mn. Le surnageant ainsi obtenu est centrifugé à 115000 g pendant une heure afin d'obtenir un culot de microsomes. Toutes les autres opérations sont identiques à celles réalisées pour la préparation des microsomes de foie de Rat.

3) Dosage des enzymes marqueurs

Pour chaque préparation nous avons réalisé un dosage des enzymes marqueurs dans l'homogénat et dans chaque fraction subcellulaire :

- Mitochondries : succinate-deshydrogénase dosée par la méthode de PENNINGTON (35)
- Lysosomes : N-acétylglucosaminidase, par la méthode d'ARONSON et al (1)
- Microsomes : Glucose-6-Phosphatase par la méthode de RAY (37). Le dosage du phosphore libéré par cet enzyme est réalisé par la méthode de CHEN et al (10).

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de LOWRY et al (29).

La répartition de ces enzymes marqueurs dans les différentes fractions subcellulaires obtenues, permet de contrôler l'intégrité des microsomes, ainsi que leur contamination par les lysosomes (qui contiennent les glycosidases) : l'activité de la N-acétylglucosaminidase n'est jamais supérieure à 15 % (de son activité totale dans l'homogénat de départ) dans la fraction microsomale.

B) DESIALYLATION DE LA SÉROTRANSFERRINE HUMAINE

1) Désialylation chimique :

La désialylation chimique est réalisée suivant le protocole suivant : 20 mg de sérotransferrine humaine sont solubilisés dans 2 ml d'acide sulfurique 0,1 N, puis incubés à 80°C pendant 1 heure. La solution est ensuite neutralisée par du carbonate de baryum (le sulfate de baryum ainsi formé est éliminé par centrifugation), dialysée contre de l'eau puis lyophilisée. La désialylation de la sérotransferrine est vérifiée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation suivant la méthode de ZANETTA et al (55).

2) Désialylation enzymatique :

Nous utilisons dans ce cas une neuraminidase de Clostridium perfringens immobilisée sur Sepharose 4B, d'origine commerciale (SIGMA, USA) : 20 mg de sérotransferrine humaine sont solubilisés dans 4 ml de tampon (citrate 0,1 M pH 5,1 , 0,02 % azide de Sodium), et recyclés sur la colonne de neuraminidase pendant 24 heures à 37°C. Ensuite, le produit est élué, dialysé, lyophilisé et sa structure est déterminée comme dans le cas de la désialylation chimique.

C) IDENTIFICATION DES PRODUITS FORMES LORS DE LA REACTION DE
GLYCOSYLATION

Les incubations standard sont réalisées dans les conditions suivantes (pour 100 μ l d'incubat) :

- Sialyltransférases de foie de Porc et de Rat

Tampon Tris maléate pH 7,4	5 μ mol
Triton X 100	1 %
Accepteur	0 - 200 nmol
CMP { 14 C } NeuAc	0,33 nmol (130 000 cpm)
Enzyme : 30 μ l de microsomes (1 mg de protéines totales)	

- Fucosyltransférase de foie de Porc

Le milieu d'incubation est le même que pour la sialyltransférase en ce qui concerne le tampon, le triton, l'accepteur oligosaccharidique et l'enzyme. Il contient en outre :

MgCl ₂	1 μ mol
UMP	2 μ mol
GDP { 14 C } Fuc	0,5 nmol (200 000 cpm)

Dans tous les cas l'incubation est réalisée pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C.

1) Méthode par précipitation

Cette méthode, très rapide, a été utilisée pour tester les activités glycosyltransférales des microsomes lors de leur préparation ou après une longue période de congélation.

L'accepteur utilisé est une glycoprotéine désialylée. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml d'acide phosphotungstique (5 % dans HCl 2 N). Le matériel acido-précipitable est recueilli sur filtre de fibre de verre WHATMAN GF 83. Le filtre est ensuite rincé abondamment par de l'acide trichloracétique (5 % dans l'eau), par de l'eau, puis par de l'éthanol absolu. La radioactivité retenue sur le filtre est déterminée en scintillation liquide dans un mélange scintillant à base de toluène (LIPOLUMA, LUMAC, FRANCE).

2) Chromatographie sur papier

Cette méthode a été utilisée pour la plupart des expériences décrites dans ce mémoire, puisque c'est la seule qui permet de suivre la glycosylation d'accepteurs micromoléculaires. Dans le cas d'accepteurs macromoléculaires, elle permet de connaître le taux de dégradation du précurseur glycosylnucléotidique.

L'incubation est réalisée comme décrit précédemment. Elle est arrêtée dans la glace, les échantillons sont déposés sur des feuilles de papier WHATMAN 3 puis soumis à une chromatographie descendante. Dans tous les cas un témoin froid est déposé à côté de l'incubat puis, après chromatographie ce témoin est révélé à l'oxalate d'aniline, permettant ainsi d'identifier le produit formé lors de la réaction de glycosylation. Nous avons utilisé plusieurs types de système-solvant de chromatographie, dont la composition est donnée ci-après. Après séchage, les feuilles de papier WHATMAN sont découpées en bandes de 1 cm de large, et la radioactivité est déterminée en scintillation liquide.

Les systèmes-solvants utilisés sont les suivants :

- Système-solvant n° 1 : Pyridine/Acétate d'éthyle/Acide acétique/eau (5/5/1/3) (28).
- Système-solvant n° 2 : Ethanol/Acétate d'ammonium 1 M, 7/3

La migration dans ces deux systèmes des produits résultant de sialylation et de fucosylation sont données respectivement dans les tableaux 1 et 2.

Pour la détection des produits résultant de sialylation, deux autres systèmes-solvants ont été utilisés : dans ces systèmes le CMP-NeuAc est le NeuAc migrent très vite alors que les oligosaccharides sialylés ne migrent pratiquement pas.

- Système-solvant n° 3 : Propanol/Butanol/HCl 0,1 N (2/1/1).
- Système-solvant n° 4 : Acétate d'éthyle/Acide acétique/Acide formique/eau (18/3/1/4).

La séparation des dérivés mono et disialylés de l'oligosaccharide biantenné G III s'effectue par migration bidimensionnelle : l'incubat est déposé sur une feuille de papier WHATMAN 3. La première migration est effectuée dans le système-solvant n° 1. Le produit n'ayant pas migré est soumis à une migration dans le système solvant n° 2.

TABLEAU 1 : Migration, par rapport à l'acide sialique des composés témoins sialylés et du CMPNeuAc

Système - Solvant Témoins	Système solvant N°1 (5/5/1/3)	Système solvant N°2 (7/3)
Glycoprotéine sialylée	0	0
G IV Sialylé	0	0,11
G III Disialylé	0	0,31
G III Monosialylé	0,06	0,50
CMP-NeuAc	0,38	0,48
G II sialylé (2 → 6)	0,39	0,73
(2 → 6) Sialyl- lactose	0,54	0,79
(2 → 6) Sialyl- N-acétyllactosamine	0,65	0,89
(2 → 3) Sialyl- lactose	0,80	0,92
(2 → 3) Sialyl- N-acétyllactosamine	0,89	1
NeuAc	1	1



TABLEAU 2 : Migration par rapport au fucose des composés témoins fucosylés,
 du GDP Fuc et du Fuc-P (Fucose-1-Phosphate produit de dégradation
 du GDP Fuc)

Système-solvant Témoins	Système solvant n°1 (5/5/1/3)	Système solvant n° 2 (7/3)
GDP -Fuc	0,11	0,28
Fuc -P	0,29	0,43
Fucosyllactose	0,39	0,72
Fucosyl-N- acétyllactosamine	0,57	0,90
Fuc	1	1



3) Electrophorèse

Nous avons utilisé cette méthode pour séparer les glycopeptides G IV mono et disialylés. Cette électrophorèse est réalisée dans une cuve en toit avec un tampon citrate pH 2,4,10 V/cm, pendant une nuit. Les composés radioactifs sont identifiés par rapport à la migration de témoins froids révélés à la ninhydrine.

4) Méthode de STOFFYN et al. (50)

Cette méthode permet de déterminer l'isomérisation de la liaison formée par les sialyltransférases. Elle est basée sur la séparation des différents éthers triméthyliques du galactose.

a) marquage du galactose terminal

L'accepteur désialylé (2 mg de G II) est incubé avec 20 unités de galactose-oxydase (KABI) dans un tampon phosphate pH 7, 0,1 M (200 µl) pendant 2 heures à 37°C. 1 mCi de $\{^3\text{H}\}$ KBH_4 est ensuite ajoutée. Après 2 h à température ambiante, un grand excès BH_4K froid est ajouté pour compléter la réduction. Après 2 h à température ambiante, la réaction est arrêtée par addition dans le tube de résine échangeuse de cations (DOWEX 50 x 8 forme H⁺). Après filtration le produit est évaporé à sec, à l'évaporateur rotatif. Le borate est éliminé par 3 codistillations successives avec du méthanol. Le résidu sec est repris dans l'eau et chromatographié sur une colonne de Biogel P 6 (1,5 x 35 cm, débit 7 ml/heure) dans l'eau. Les fractions radioactives, et donnant un test positif au phénolsulfurique sont recueillies puis lyophilisées.

b) Sialylation

Le composé est ensuite sialylé dans les conditions classiques d'incubation puis séparé de l'oligosaccharide non sialylé par chromatographie préparative sur papier (système solvant n°2). Après élution le composé est lyophilisé.

c) Séparation des éthers méthyliques du Gal

Le produit est méthylé selon la méthode d'HAKOMORI (15) puis soumis à une hydrolyse acide totale (acide trifluoroacétique 4 N, 4 heures, 100°C). Les dérivés méthylés du $\{^3\text{H}\}$ Gal sont séparés par chromatographie sur couche mince de silice (support aluminium, 20 cm x 20 cm, MERK) dans un système solvant 500/9 (Acétone/Ammoniaque 4,5 M). Ils sont identifiés par rapport à des témoins non marqués révélés par pulvérisation à l'orcinol-sulfurique. Ces témoins ont été préparés à partir des dérivés O-méthylglycosides du Gal qui nous ont été fournis par Yves LEROY.

Après migration, le chromatogramme est séché puis découpé en bandes de 0,5 cm de large. La radioactivité est comptée en scintillation liquide (LIPOLUMA). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 20 ; ils montrent sans ambiguïté que l'acide sialique est lié en position 6 sur le galactose terminal de l'oligosaccharide G II.

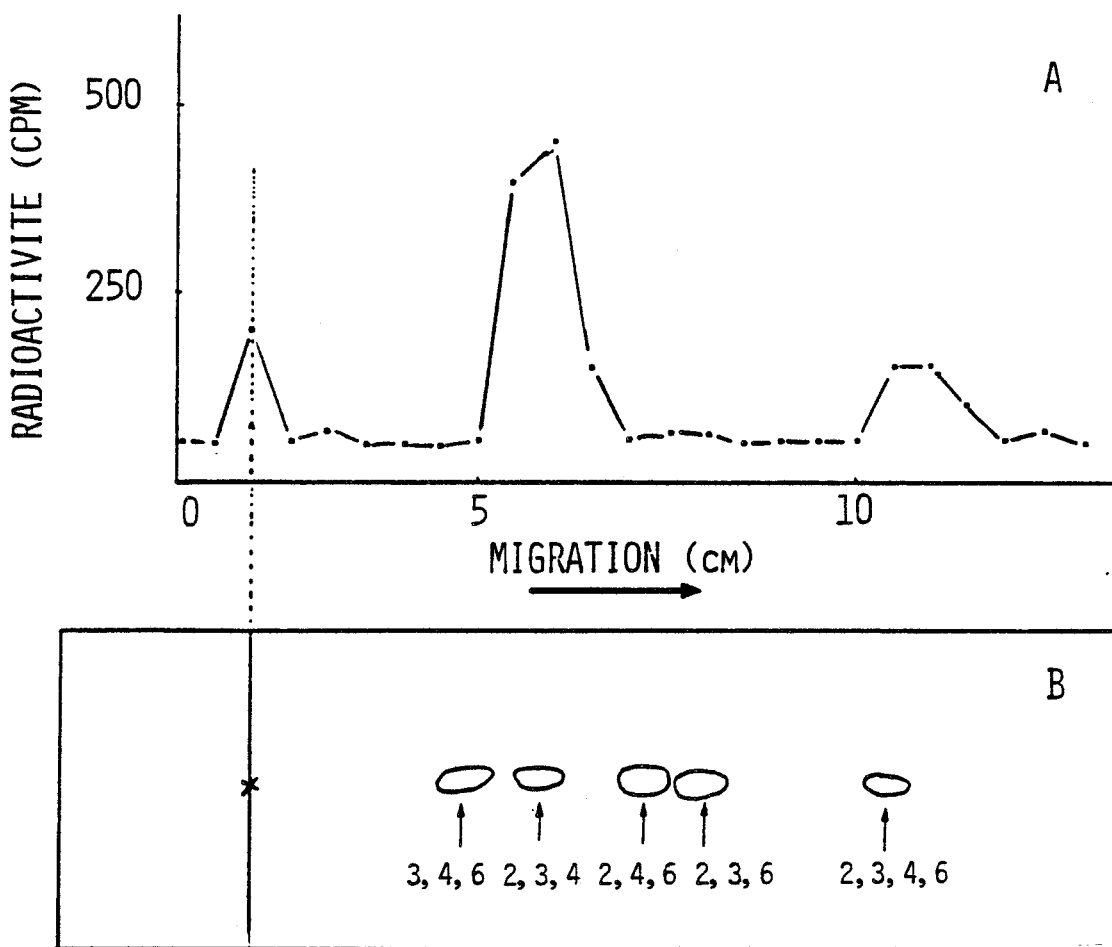


Figure 20

- A : Profil chromatographique obtenu lors de la détermination de l'isomérisation de la liaison formée par la sialyltransférase de foie de Porc (oligosaccharide G II) par la méthode de STOFFYN (50)
- B : Migration des témoins triméthyl et perméthyl-galactoses.

2 - RÉSULTATS

I - COMPARAISON DU TAUX DE SIALYLATION PAR LA SIALYLTRANSFERASE MICROSOMALE DE FOIE DE RAT, D'ACCEPTEURS DE TAILLE DIFFERENTE

A) INTRODUCTION

Dans ce travail nous avons voulu montrer l'influence de la taille de l'accepteur glucidique sur son taux de sialylation. La gamme étudiée va de la N-acétyllactosamine (dissaccharide) jusqu'à la sérotransferrine humaine désialylée (glycoprotéine possédant deux glycannes de type N-acétyllactosaminique par molécule). La structure de ces différents accepteurs est représentée sur les figures 19 A et B (page 36 et 37).

Nous avons tout d'abord déterminé les conditions optimales de fonctionnement de la sialyltransférase. Nous avons étudié dans quelles zones de concentration aussi bien en accepteur qu'en glycosylnucléotide, il était préférable de comparer le taux de sialylation des composés.

Puis nous avons tenté d'expliquer les résultats obtenus par une différence au niveau du nombre des résidus d'acide sialique transférés sur les accepteurs biantennés, la plupart des auteurs (34, 53) décrivant la disialylation comme une réaction très lente ou même impossible. Dans le même but nous avons réalisé une expérience de compétition entre deux composés ayant un taux de sialylation différent.

B) DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES

1) Fonctionnement de l'enzyme

Nous utilisons comme source d'enzyme des fractions microsomales de foie de Rat dont la préparation et la contamination par d'autres organites, lysosomes en particulier, a été décrite page 39.

a) Concentration en Triton X 100

La plupart des auteurs incubent la sialyltransférase de foie de Rat à pH 7,4. Nous avons repris ces conditions en utilisant le tampon tris maléate. Cet enzyme ne nécessite pas l'addition d'ions dans son milieu d'incubation. Par contre, étant fortement accroché à la membrane, sa solubilisation est indispensable. Nous avons étudié l'influence de la concentration en triton X 100 sur son activité. Etant donné les résultats obtenus (figure 21), nous avons fixé la concentration en Triton à 1/100 pour toutes les expériences réalisées par la suite.

Sur cette figure est aussi représentée la concentration en acide sialique libre qui est le témoin de la dégradation du CMP-NeuAc. Cette dégradation est d'origine chimique (environ 30 % de la dégradation totale au bout d'une heure) et enzymatique. Elle varie suivant la concentration en CMP-NeuAc réellement disponible. Son taux est le même quelque soit l'accepteur étudié, elle ne gêne donc pas la comparaison de la sialylation des différents composés.

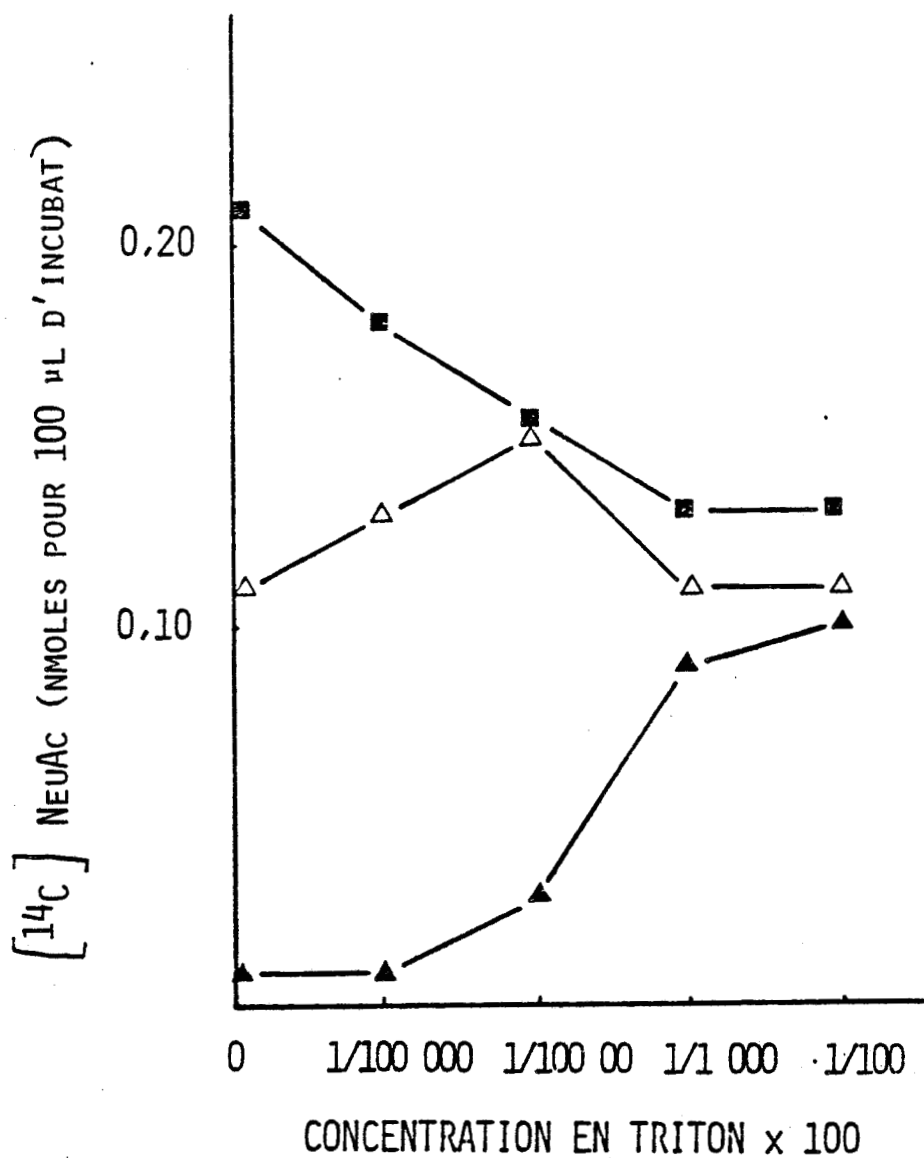


Figure 21 : Influence de la concentration en triton sur le transfert de $\{^{14}\text{C}\}$ -NeuAc sur la sérotransferrine humaine désialylée (Incubation standard de 30 minutes, 25 nmoles de sérotransferrine humaine désialylée)

- ▲-▲ : $\{^{14}\text{C}\}$ - NeuAc transféré sur la glycoprotéine
- △-△ : $\{^{14}\text{C}\}$ - NeuAc sous forme de CMP- $\{^{14}\text{C}\}$ - NeuAc
- : $\{^{14}\text{C}\}$ - NeuAc libre provenant de la dégradation du précurseur glycosylnucléotidique.



Cette étude de la dégradation du précurseur nucléotidique est rarement réalisée par les autres auteurs, qui ne séparent pas le CMP-NeuAc et le NeuAc après l'incubation ; alors que lors de temps d'incubation de plusieurs heures, la dégradation n'est pas négligeable.

b) Concentration en enzyme

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 22 : la variation du taux de sialylation en fonction de la concentration en enzyme est encore linéaire pour 30 μ l de fraction microsomale (correspondant environ à 1 mg de protéines). Dans les expériences suivantes nous utiliserons toujours cette concentration.

2) Concentration en accepteur

Nous avons ensuite déterminé la concentration en accepteur permettant d'approcher la vitesse maximale de fonctionnement de l'enzyme, à cette concentration en CMP-NeuAc.

Les résultats sont présentés dans la figure 23 : les courbes obtenues pour tous les composés ont sensiblement la même allure. Nous obtenons un plateau à environ 70 nmoles de substrat pour 100 μ l d'incubat. Dans les études ultérieures nous avons utilisé la concentration de 100 nmoles pour 100 μ l d'incubat ; en effet ces conditions présentent plusieurs avantages : la vitesse de sialylation est proche de son maximum, une faible variation de la concentration en substrat n'entraîne que de faibles variations au niveau du taux de transfert, et de plus certains substrats n'étant disponible qu'en faible quantité, nous avons réalisé une économie, permettant de réaliser d'autres expériences.

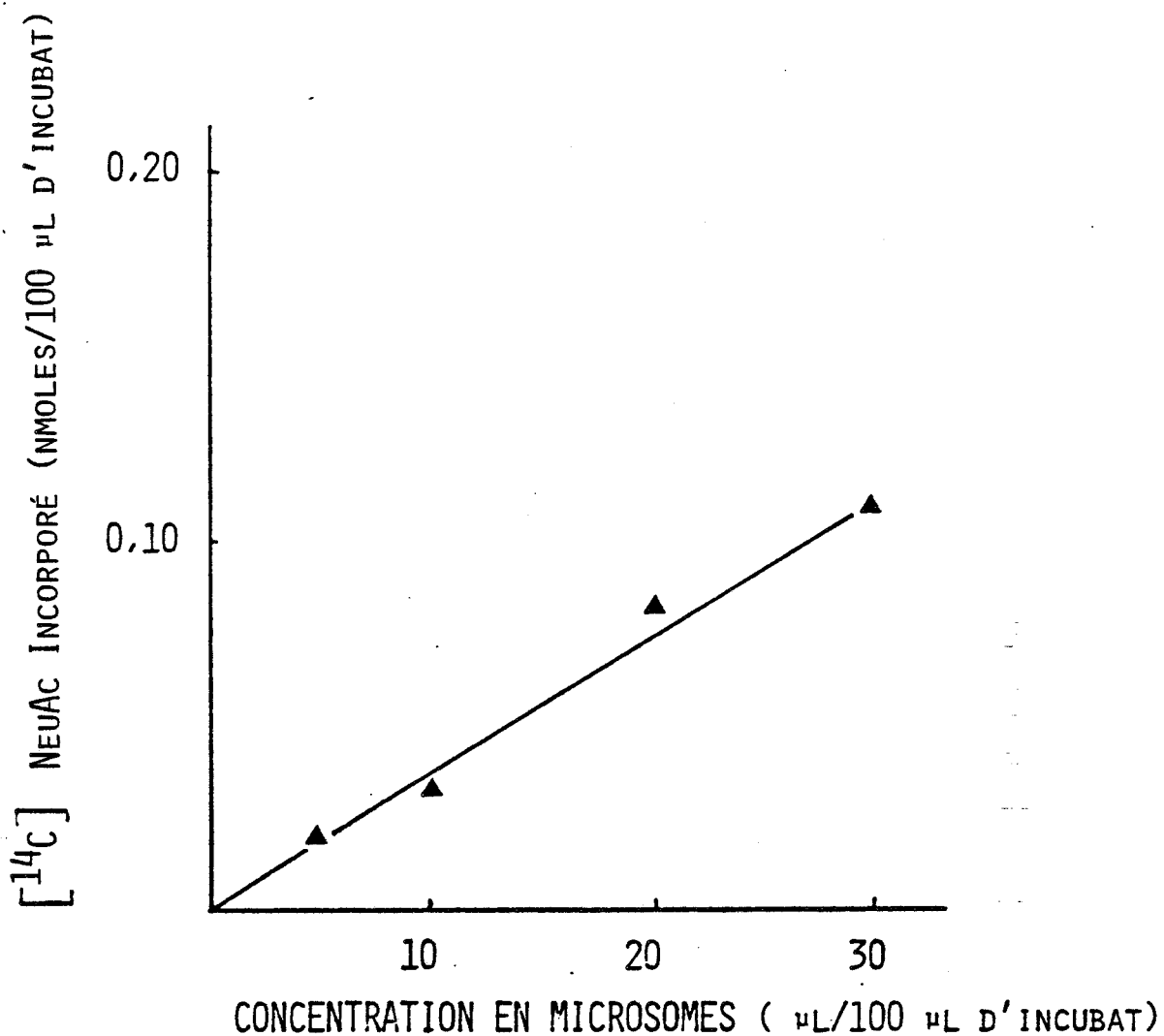


Figure 22 : Influence de la concentration en enzyme (microsomes de foie de Rat à la concentration de 30 mg/ml de protéines) sur le transfert de [¹⁴C]-NeuAc sur la sérotransferrine humaine désialylée (25 nmoles) dans les conditions standard d'incubation (temps d'incubation : 30')

BUS
VILLE

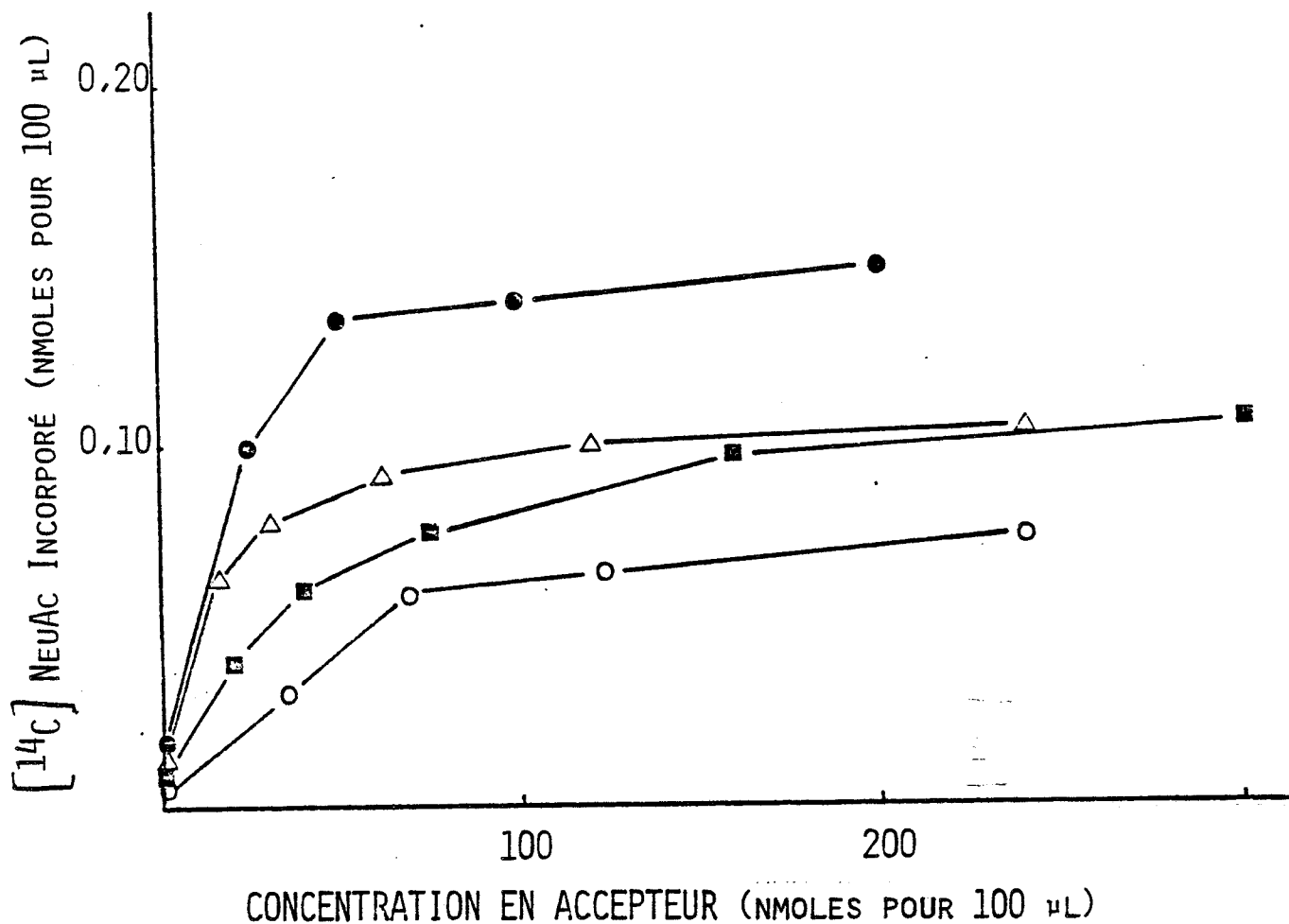


Figure 23 : Etude de la concentration en accepteur (exprimée en nmoles de Gal terminal) permettant d'obtenir le V_{max} (pour 0,33 nmoles de CMP- ^{14}C -NeuAc pour 100 µl d'incubat). Le temps d'incubation est de 30'.

- : N-acétyllactosamine
- : G III
- △-△-△: G IV
- : Sérotransferrine humaine désialylée chimiquement.

Pour une meilleure comparaison des différents composés, nous avons exprimé les concentrations en moles de Gal accepteur et non en moles d'accepteur car certains de ces produits possèdent 2 ou même 4 résidus de Gal capable d'être substitués par du NeuAc alors que certains n'en possèdent qu'un seul.

La figure 23 ne permet pas la comparaison du taux de sialylation des divers accepteurs car la concentration en CMP-NeuAc (0,33 nmoles pour 100 μ l d'incubat) est beaucoup trop faible comparée aux concentrations en accepteurs utilisées.

3) Concentration en glycosylnucléotide

Nous avons déterminé la concentration optimale en CMP-NeuAc en utilisant les conditions d'incubation définies précédemment :

- | | |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| - Tampon tris maléate pH 7,4 | 5 μ moles |
| - Triton | 1/100 |
| - Accepteur : sérotransferrine humaine désialylée | 25 nmoles (100 nmoles de Gal accepteur) |
| - Enzyme : microsomes de foie de Rat | 1 mg de protéines |

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 24 : nous obtenons un K_m de 30 nmoles. Pour être dans les meilleures conditions de fonctionnement de l'enzyme, tout en limitant notre consommation en substrat radioactif nous utiliserons pour les expériences suivantes la concentration de 83 nmoles pour 100 μ l d'incubat.

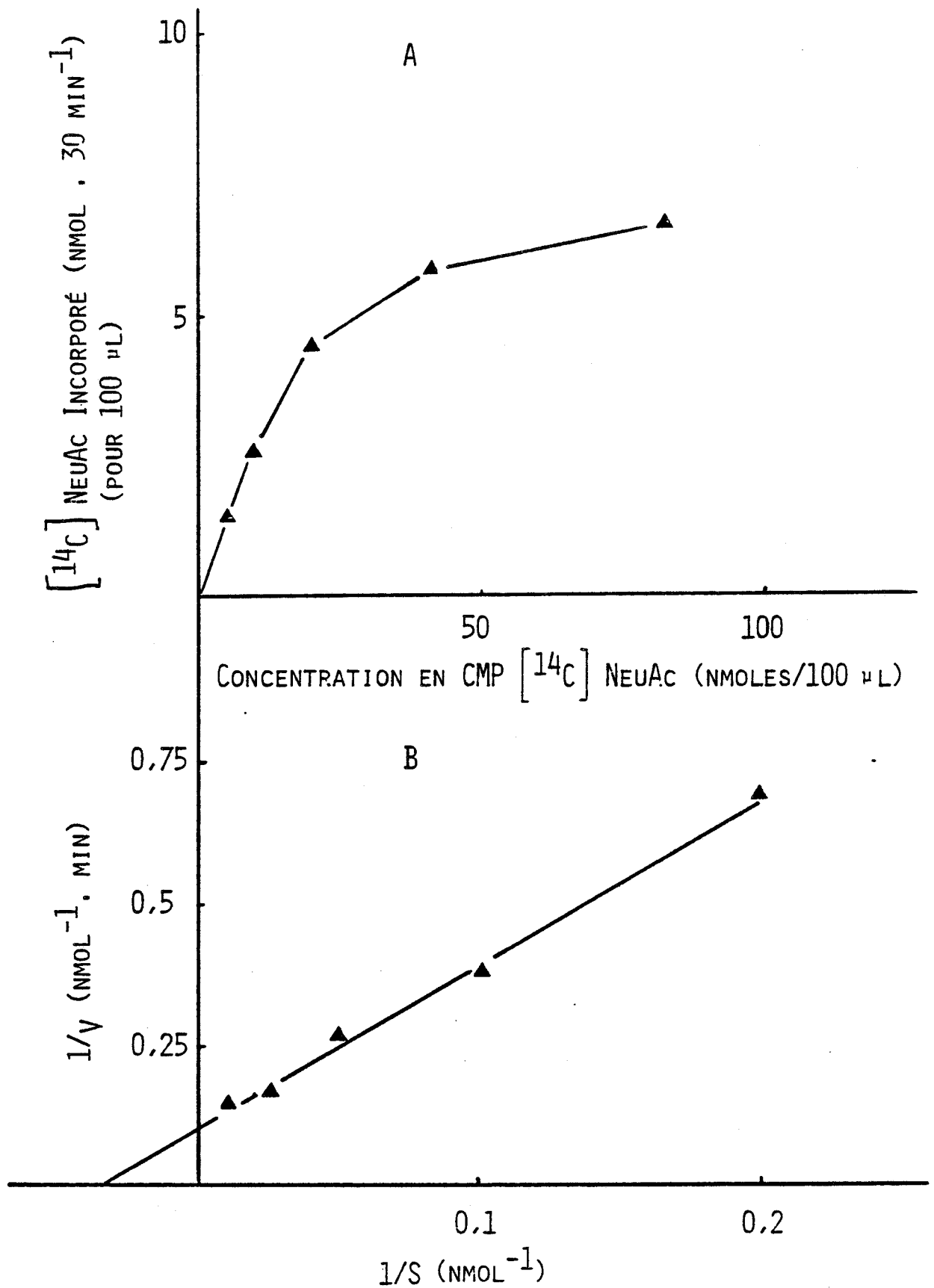


Figure 24 : Détermination de la concentration optimale en CMP-¹⁴C-NeuAc

A : Représentation directe

B : Représentation des inverses

$1/K_m = 0,03 \text{ nmol}^{-1} \rightarrow K_m = 30 \text{ nmol}/100 \text{ } \mu\text{l d'incubat}$

$1/v_{max} = 0,10 \text{ nmol}^{-1} \cdot \text{min} \rightarrow v_{max} = 10 \text{ nmol}/100 \text{ } \mu\text{l d'incubat pour 30 minutes.}$



C) RESULTATS OBTENUS

1) Comparaison de la vitesse de sialylation des différents accepteurs

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 25. Les expériences ont toutes été réalisées au moins deux fois et l'erreur est d'environ 2 %. La dégradation chimique ou enzymatique du CMP-NeuAc a été contrôlée dans toutes les expériences et ne dépend pas du type d'accepteur présent dans le milieu d'incubation : il reste environ 30 % du CMP-NeuAc (25 nmoles) non dégradé après 2 heures d'incubation à 37°C.

Les résultats obtenus montrent que :

- la vitesse de sialylation est la même pour toutes les glycoprotéines désialylées étudiées, quelque soit la méthode utilisée pour la désialylation, qu'elles aient un ou deux glycanes biantennés par molécule. La conformation de la chaîne peptidique ne semble donc pas avoir d'importance (la désialylation chimique est dénaturante) ; d'autre part la sialylation d'un glycanne ne semble avoir aucune influence sur la sialylation de l'autre.
- les courbes obtenues pour l'oligosaccharide biantenné (G III), l'oligosaccharide G II et les glycoprotéines désialylées ont sensiblement la même allure. Par contre la N-acétyllactosamine est sialylée à une vitesse plus faible alors que le glycopeptide (G IV) l'est à une vitesse significativement plus élevée. Il n'est pas possible de tirer des conclusions à partir de ces résultats, sans avoir déterminé si les accepteurs biantennés sont mono ou disialylés.

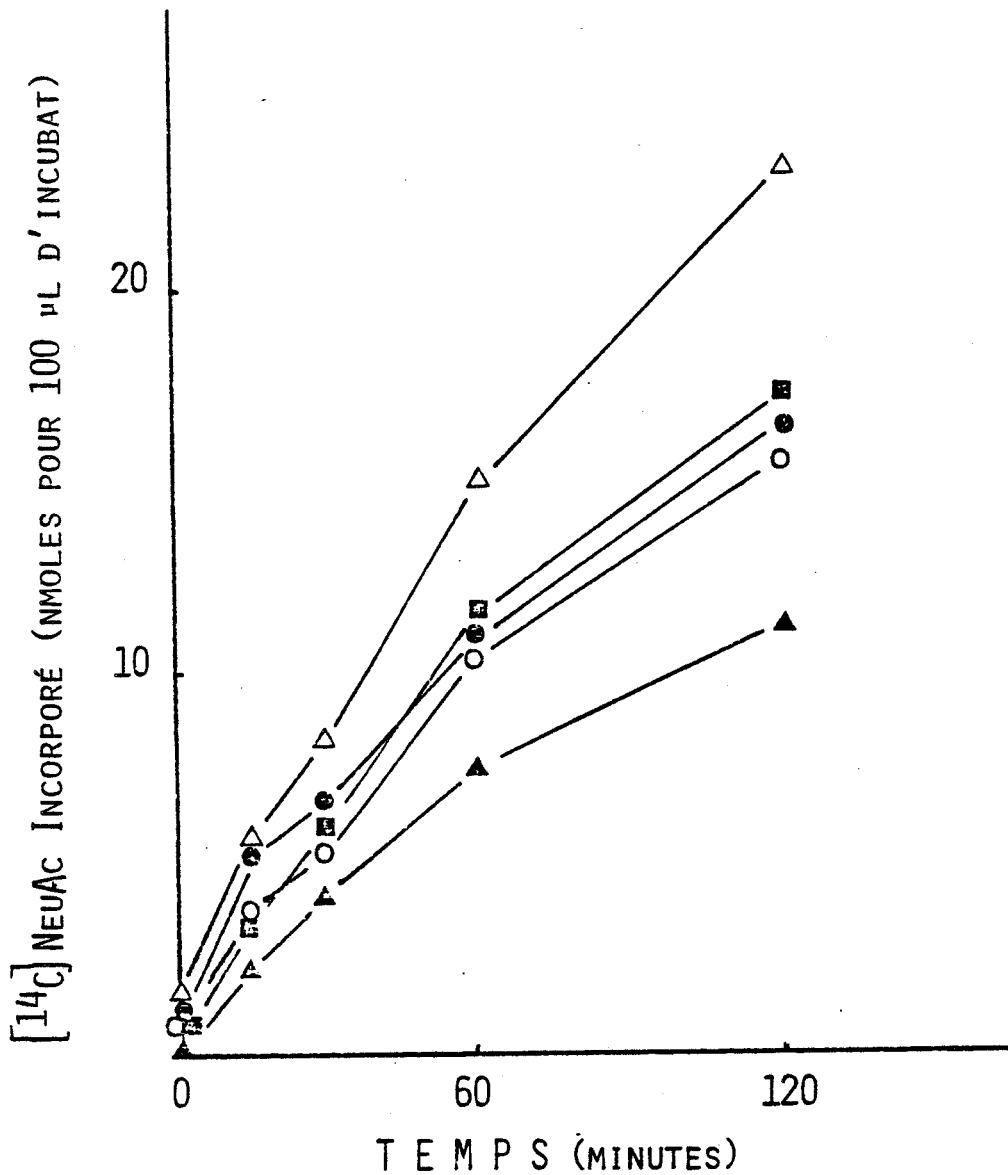


Figure 25 : Comparaison des cinétiques d'incorporation d'acide sialique sur des accepteurs de taille différente (CMP NeuAc = 83 nmoles pour 100 µl d'incubat, [Accepteur], exprimée en Gal : 100 nmoles pour 100 µl d'incubat).

- ▲-▲- : G I (N-acétyllactosamine)
- : G II (β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-Man)
- : G III (oligosaccharide biantenné)
- △-△- : G IV (asparaginyglycopeptide biantenné)
- : Sérotransferrine humaine ou de lapin (désialylée chimiquement ou enzymatiquement).



2) Les accepteurs biantennés sont-ils mono ou disialylés ?

Dans la figure 26 sont représentés les résultats obtenus pour les composés G III et G IV (les méthodes utilisées pour séparer ces composés sont décrites respectivement p 45 et 46). Ils permettent de conclure que la différence entre les vitesses de sialylation des deux composés est seulement due à la vitesse de disialylation ; en effet la cinétique de monosialylation est la même pour l'oligosaccharide et le glycopeptide, alors que la disialylation du glycopeptide est beaucoup plus rapide.

Nous avons essayé de trouver une méthode permettant de connaître la vitesse de sialylation des glycanes portés par les glycoprotéines; pour cela nous avons tout d'abord tenté de séparer la sérotransferrine de lapin disialylée et désialylée (cas le plus simple puisque cette glycoprotéine ne possède qu'un seul glycanne biantenné), - par des méthodes électrophorétiques aussi bien sur plaque d'acétate (pH 8,9) qu'en gel de polyacrylamide (pH 5,5) nous avons obtenu des séparations insuffisantes pour être détectées par la suite en radio-activité.

- La chromatographie d'affinité sur Ricine (lectine reconnaissant le galactose) insolubilisée n'a pas permis d'obtenir de rétention de la glycoprotéine désialylée.

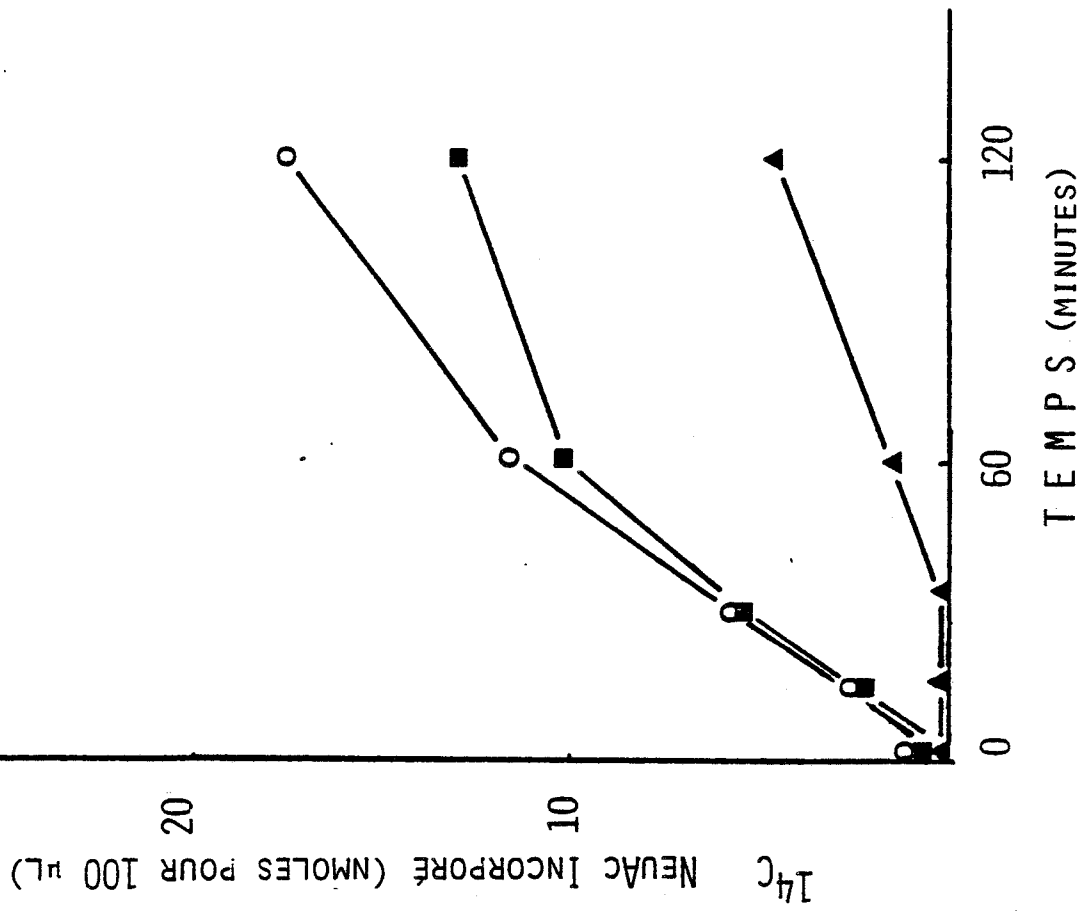
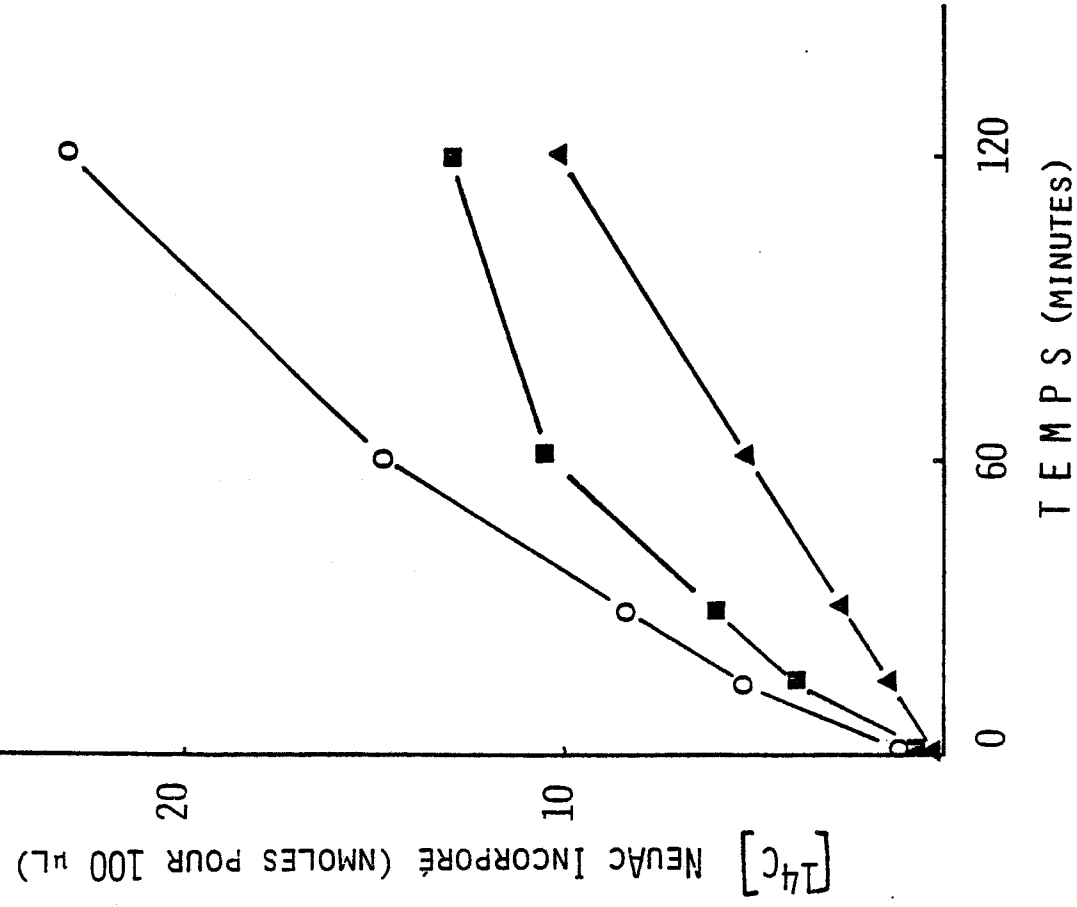


Figure 26 : Comparaison des cinétiques de transfert de l'oligosaccharide G III (B) et l'oligosaccharide G IV (A)
 o-o-o : Transfert total
 ▲-▲-▲ : Formation du dérivé disialylé
 ■-■-■ : Formation du dérivé monosialylé



Comme il est facile de séparer les oligosaccharides mono et disialylés, nous avons tenté de détacher le glycanne de la protéine après avoir réalisé la sialylation dans les conditions classiques (avec du (^{14}C) CMP-NeuAc).

- Par hydrazynolyse suivie de N- réacétylation une partie de la radio-activité ne semble plus liée à l'oligosaccharide.
- Par action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase isolée d'un Basidiomycète qui nous a été fournie par Stéphane BOUQUELET : nous n'avons pas obtenu de libération quantitative de la partie glycanne, peut-être à cause de la trop faible quantité de substrat présent ou de la mauvaise affinité de l'enzyme pour les composés sialylés.

Il faut remarquer que les résultats obtenus en ce qui concerne la disialylation sont différents de ceux de VAN DEN EIJNDEN et al. (53). Alors qu'ils obtiennent la sialylation d'un Gal à 90 % en 45 mn, l'autre n'est pratiquement pas sialylé. Dans notre cas après 120 mn d'incubation, plus de 40 % de la radioactivité est portée par un glycopeptide disialylé. La cinétique observée pour la disialylation semble montrer que l'enzyme reconnaît indifféremment les composés désialylés et monosialylés.

La disialylation de l'oligosaccharide biantenné (G III) ne commence qu'après une latence de 30 mn, semblant montrer que dans ce cas, contrairement à celui du glycopeptide, c'est le composé monosialylé qui est reconnu préférentiellement par l'enzyme. Il serait intéressant d'étudier la sialylation de glycannes ou de glycopeptides monosialylés de structure connue pour mieux comprendre ces phénomènes.

Les résultats obtenus montrent qu'il est difficile de comparer la spécificité de systèmes enzymatiques aussi différents qu'une sialyltransférase microsomale de foie de rat et une sialyltransférase purifiée à partir de colostrum bovin. Nos résultats sont en bon accord avec les études structurales, puisque la plupart des glycoprotéines biantennées (non fucosylées) sont disialylées.

3) Expérience de compétition

Pour utiliser une autre approche dans la comparaison de la sialylation des différents accepteurs, nous avons réalisé une expérience de compétition entre G IV et G II en les incubant ensemble, à une concentration égale et semblable à celle utilisée dans les expériences précédentes. Les résultats sont représentés dans la figure 27 : nous observons que la vitesse initiale de sialylation du glycopeptide ne varie pratiquement pas alors que celle de l'oligosaccharide est 4 fois plus faible. Lorsque nous réalisons la somme des 2 courbes représentant le transfert sur chaque composé en présence de l'autre, nous obtenons une courbe semblable à celle obtenue pour G IV lorsqu'il est incubé seul. Cela semble prouver que nous sommes dans des conditions optimales pour l'enzyme (proches du V_{max}).

Ces résultats permettent de conclure que l'enzyme a une affinité plus grande pour le substrat glycopeptidique que pour l'oligosaccharide. Il serait très intéressant de montrer si l'influence du petit accepteur sur le grand se fait au niveau de la mono ou de la disialylation.

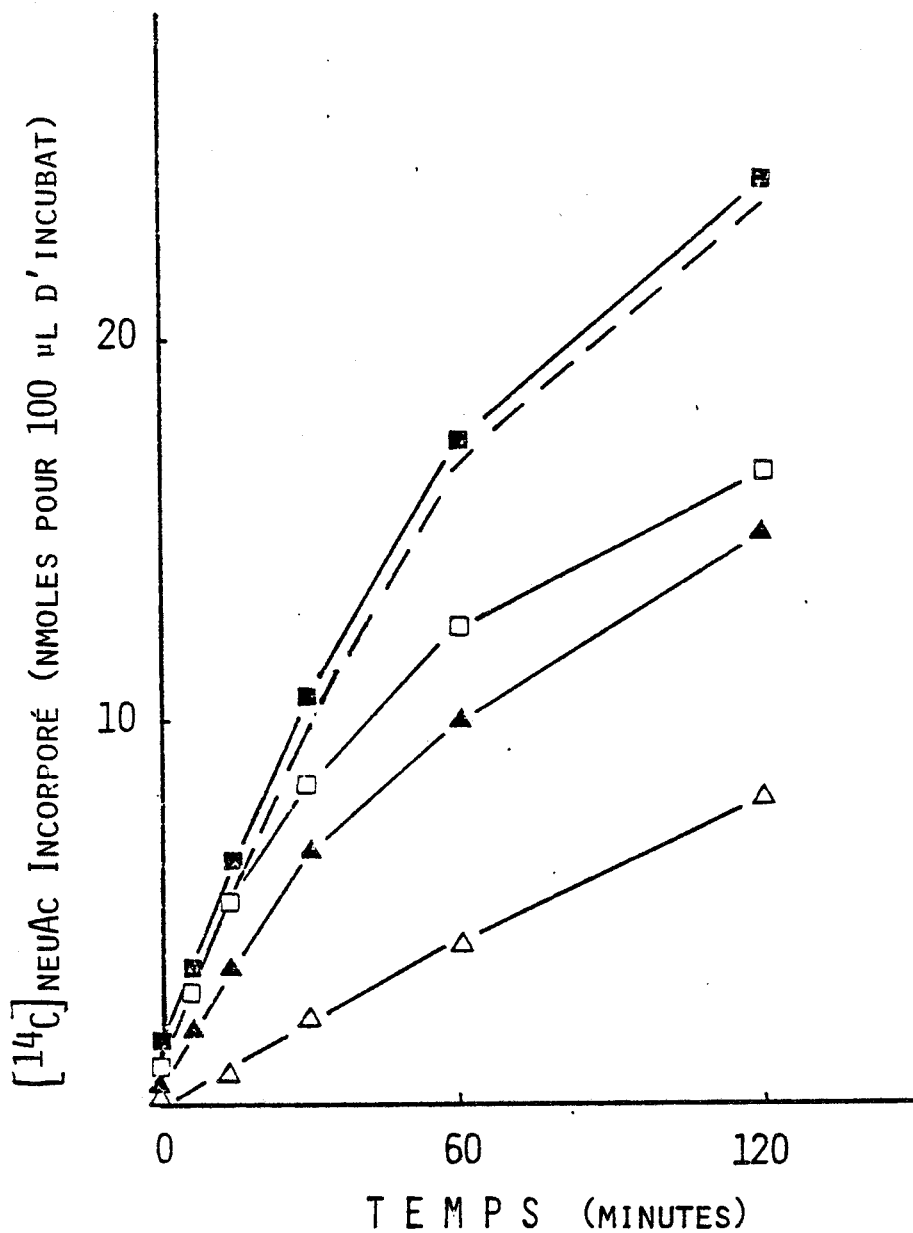


Figure 27 : Expérience de compétition entre le glycopeptide biantenné (G IV) et l'oligosaccharide (G II)

- : Incorporation sur G IV seul
- ▲-▲- : Incorporation sur G II seul
- : Incorporation sur G IV en présence de G II
- △-△- : Incorporation sur G II en présence de G IV
- : Somme de l'incorporation sur G II et sur G IV en présence de l'autre composé.



D) CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de différence considérable entre les vitesses de sialylation des accepteurs testés.

L'étude du nombre de résidus d'acide sialique fixés sur les accepteurs biantennés semble prouver que la disialylation des glycopeptides est plus rapide que celle des oligosaccharides. Il serait très intéressant d'étendre la gamme d'accepteurs aux glycopeptides tri et tétraantennés, et de trouver une méthode permettant de savoir si les glycoprotéines sont mono ou disialylées.

II - ETUDE DE LA SIALYLATION ET DE LA FUCOSYLATION DE LA N-ACÉTYLLACTOSAMINE ET DE SES DERIVES

Nous avons entrepris ce travail dans le but de vérifier, avec des accepteurs micromoléculaires, l'hypothèse de HILL et ses collaborateurs (34), concernant la sialylation et la fucosylation des accepteurs de type N-acétyllactosaminique. Ces auteurs démontrent que la présence simultanée d'acide sialique et de fucose sur une même branche de N-acétyllactosamine est impossible, en utilisant des glycosyltransférases purifiées à partir de lait humain et de colostrum bovin.

A) CONDITIONS UTILISEES

1) Choix de la source d'enzyme

Etant donné la spécificité de la fucosyltransférase de foie de Rat décrite par l'équipe de SCHACHTER (54), qui n'ajoute du fucose que sur la GlcNAc 1 des glycanes biantennés, nous avons

Cherché une autre source d'enzyme. Les mêmes auteurs décrivent une fucosyltransférase dans les microsomes de foie de Porc capable de fucosyler l'extrémité N-acétyllactosaminique des N-glycosylprotéines (24). En outre les microsomes de foie de Porc contiennent aussi une sialyltransférase très active (22). Comme nous l'avons fait pour la sialyltransférase de foie de Rat, nous avons déterminé les conditions optimales d'incubation pour les glycosyltransférases de foie de Porc, elles sont les suivantes :

Sialyltransférase :

le milieu d'incubation contient :

tampon tris maleate pH 7,4 : 5 μ moles

Triton X 100 : 1 %

CMP $\{^{14}\text{C}\}$ NeuAc : 0,33 nmoles (130 000 cpm)

Accepteur : de 0 à 200 nmoles

Enzyme : 30 μ l de microsomes (1 mg de proteines)

Dans un volume total de 100 μ l, incubation standard

1 heure à 37°C.

Fucosyltransférase :

Le milieu d'incubation est le même que précédemment en ce qui concerne le tampon, le triton X 100, l'accepteur oligosaccharidique et l'enzyme. Il contient en outre :

MgCl₂ : 1 μ mole

UMP : 2 μ moles

GDP $\{^{14}\text{C}\}$ Fuc : 0,5 nmoles (200 000 cpm).

Nous ajoutons du chlorure de magnésium car le fonctionnement de l'enzyme nécessite la présence d'ions divalents. L'UMP sert d'inhibiteur à la dégradation du précurseur nucléotide-sucré. D'autres auteurs utilisent le GTP (24), mais nous n'avons pas obtenus de bons résultats avec ce composé.

2) Choix des accepteurs

Nous avons utilisé des accepteurs de petite taille, afin de les caractériser en chromatographie sur papier par rapport à des témoins de structure connue. Ces composés sont des dérivés sialylés ou fucosylés de la N-acétyllactosamine ou de l'oligosaccharide G II, (β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)-Man).

Pour chaque expérience de glycosylation nous avons utilisé plusieurs concentrations en accepteur, sans obtenir de modification dans la spécificité des enzymes. Nous nous bornerons à décrire des résultats qualitatifs. Dans certains cas nous comparerons la vitesse de glycosylation des composés.

B) RESULTATS

1) Sialylation

Les résultats obtenus en chromatographie sur papier (solvant 5/5/1/3) sont représentés dans la figure 28. Dans le cas de la N-acétyllactosamine nous obtenons un produit migrant comme la (2 \rightarrow 6) sialyl N-acétyllactosamine. Nous n'observons pas la formation de composé sialylé en position 3 sur le Gal.

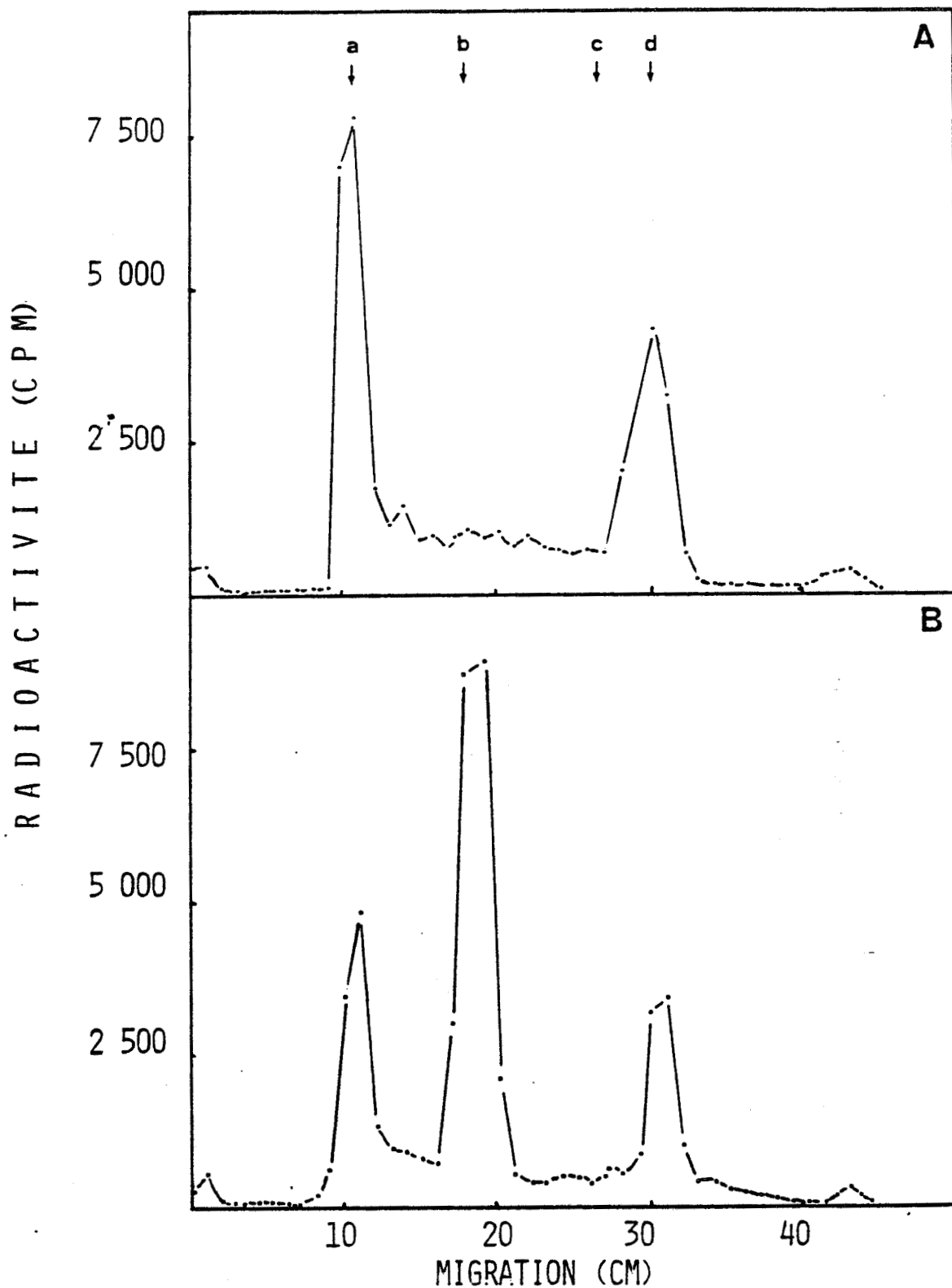


Figure 28 : Profils chromatographiques obtenus lors de la sialylation de la N-acétyllactosamine et de ses dérivés (incubation 1 H, solvant n° 1, 5/5/1/3, 40 H).

- A : Témoin sans accepteur, ou accepteurs suivants :
- α -NeuAc-(2→3)- β -Gal-(1→4)-GlcNAc (100 nmoles)
 - β -Gal-(1→4)-GlcNAc
 - I (1→3) (100 nmoles)
 - α -Fuc
- B : N-acétyllactosamine (100 nmoles)
 (migration des témoins : a : CMP-NeuAc, b : (2→6)
 sialyl N-acétyllactosamine, c : (2→3)sialyl N-acétyllactosamine,
 d : NeuAc).



Nous obtenons le même profil chromatographique dans le cas de la N-acétyllactosamine sialylée, fucosylée et dans le cas du témoin ne contenant pas d'accepteur. Le petit pic de radio-activité au trait de départ correspond à une incorporation endogène d'acide sialique. Etant donné l'énorme bruit de fond, dû à une mauvaise migration du $\text{CMP}\{^{14}\text{C}\}$ NeuAc, nous avons utilisé un autre système solvant de chromatographie pour analyser plus précisément les résultats. (figure 29)

Dans ce solvant (18/3/1/4), il n'y a pas séparation du CMP-NeuAc et du NeuAc et ces deux composés migrent très vite. Par contre les oligosaccharides sialylés ont une migration lente. Dans le cas de la fucosyl-N-acétyllactosamine, il y a formation d'un produit migrant comme la sialyl N-acétyllactosamine. Ce qui est dû à une légère dégradation de l'accepteur (environ 5%) qui a été vérifiée par méthylation puis analyse par spectrométrie de masse.

L'isomérisation de la liaison formée par la sialyltransférase de microsomes de Porc sur la N-acétyllactosamine a été déterminée par la méthode de STOFFYN (50) : il n'y a formation que de 2,3,4 O-Méthyl Gal, l'acide sialique est donc bien lié en position 6 sur le Gal.

2) Fucosylation

Dans la figure 30 sont représentés les résultats obtenus après chromatographie dans le système solvant n°1. D'autres systèmes solvants ont été utilisés pour vérifier que certains produits formés n'étaient pas masqués par le $\text{GDP}\{^{14}\text{C}\}$ Fuc ou le $\{^{14}\text{C}\}$ -Fuc 1P. (Butanol, système n°3, 18/3/1/4, système n°4, 2/1/1, par exemple. Nous n'avons obtenu que des résultats négatifs.

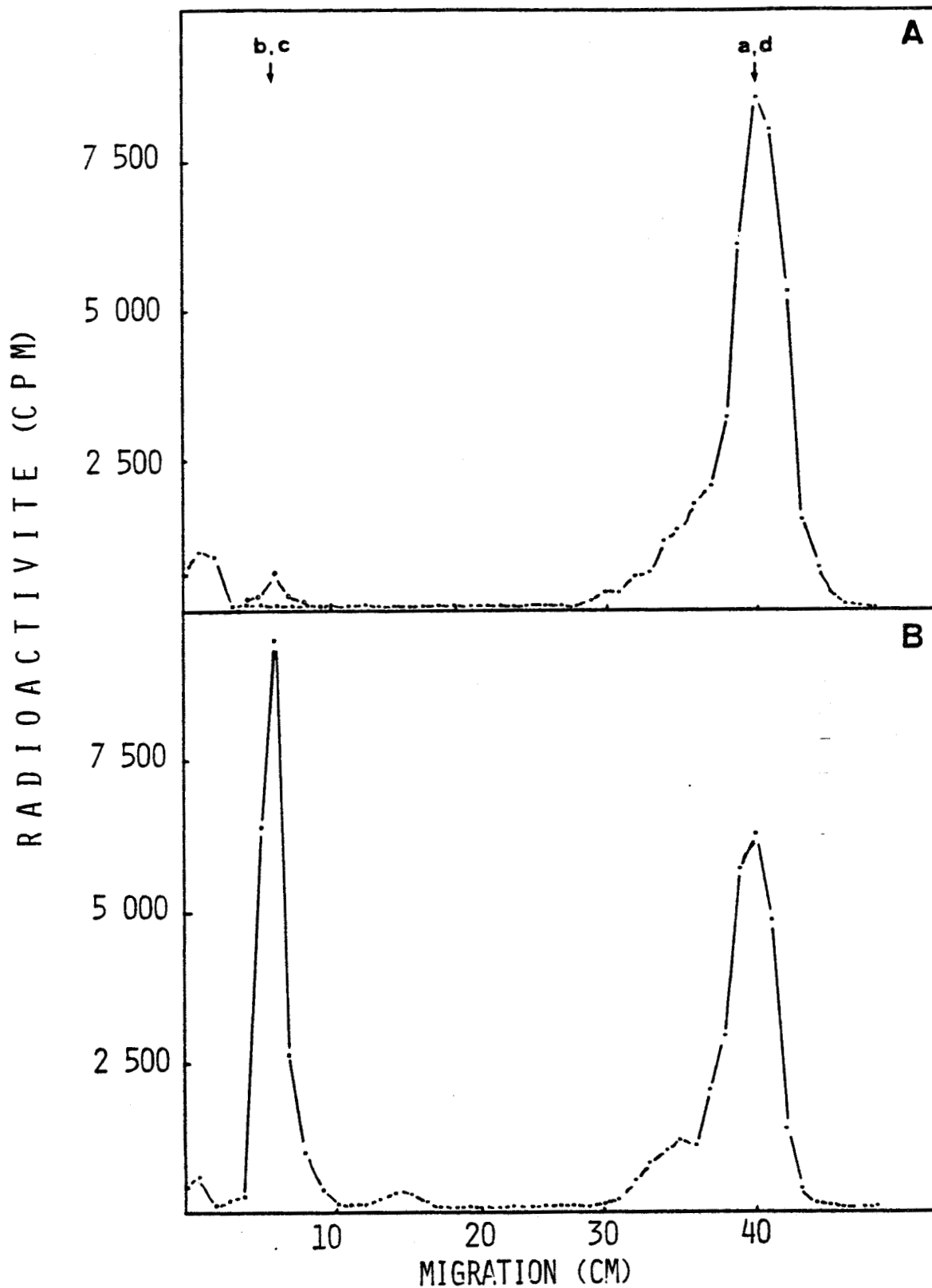


Figure 29 : Profils chromatographiques obtenus lors de la sialylation de la N-acétyllactosamine et de ses dérivés (solvant n° 2, 18/3/1/4).

A ----- : Témoin sans accepteur ou sialyl N-acétyllactosamine

- - - - - : Fucosyl N-acétyllactosamine

B ----- : N-acétyllactosamine

(Migration des témoins ; a : CMP-NeuAc ; b : (2+6) sialyl N-acétyllactosamine ; c : (2+3)-sialyl N-acétyllactosamine ; d : NeuAc).



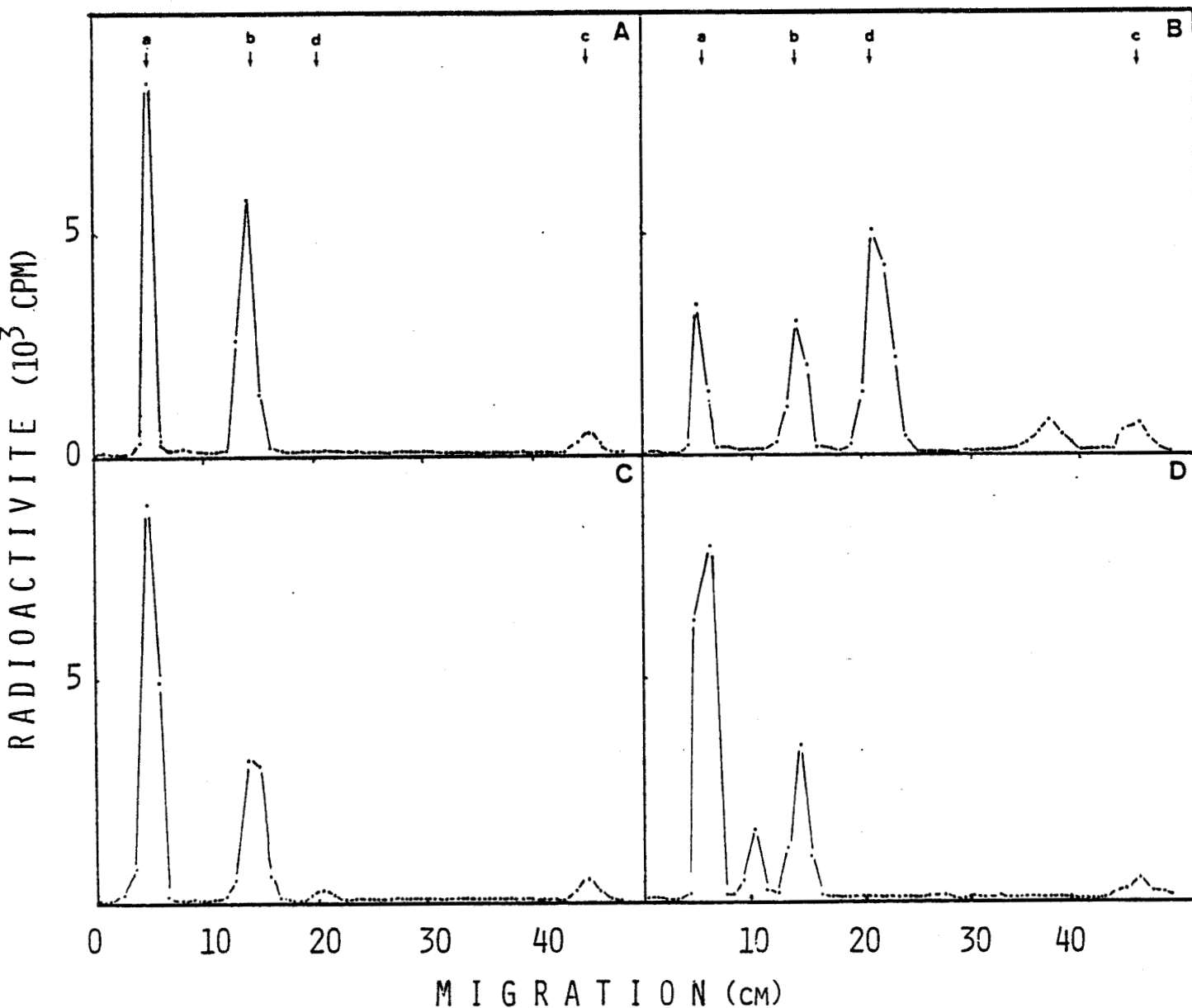
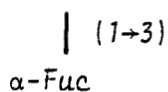


Figure 30 : Profils chromatographiques obtenus lors de la fucosylation de la N-acétyllactosamine et de ses dérivés (Incubation 1 H, migration solvant 5/5/1/3, 18 H).

- A : Témoin sans accepteur
- B : N-acétyllactosamine (100 nmoles)
- C : Fucosyl N-acétyllactosamine (100 nmoles)
- D : Sialyl N-acétyllactosamine (100 nmoles)

(migration des témoins : a : GDP-Fuc ; b : Fuc-P ; c : Fuc
d : β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc



Dans le cas de la fucosylation de la N-acétyllactosamine, nous obtenons un pic radioactif migrant comme la fucosyl N-acétyllactosamine et un petit pic correspondant à la fucosylation d'un monosaccharide (figure 30 B). Pour identifier ce pic, nous avons réalisé des expériences de fucosylation du galactose et de la N-acétylglucosamine. Seul l'obtention de galactose fucosylé est possible. De plus cette réaction est inhibée par le N-éthylmaléimide (125 nmoles/100 µl) comme l'est la fucosyltransférase ajoutant le Fuc en position 2 sur le Gal, du plasma ou des lymphocytes de rat (11, 21). Enfin, lorsque nous réalisons des expériences de fucosylation de la N-acétyllactosamine en présence de N-éthylmaléimide, l'intensité du pic radioactif correspondant à la N-acétyllactosamine fucosylée ne varie pas alors que le petit pic correspondant au dissaccharide disparaît complètement.

Il existe probablement deux fucosyltransférases dans les microsomes de foie de porc, comme l'ont déjà décrit SCHACHTER et ses collaborateurs (31) mais l'enzyme fucosylant les résidus de GlcNAc semble avoir beaucoup plus d'affinité pour la N-acétyllactosamine. Il serait très intéressant de mettre au point une méthode de séparation analogue à celle de STOFFYN (50), mais pour les dérivés méthylés de la N-acétyllactosamine, afin de confirmer ce résultat et de connaître l'isomérisation de la liaison formée sur la GlcNAc.

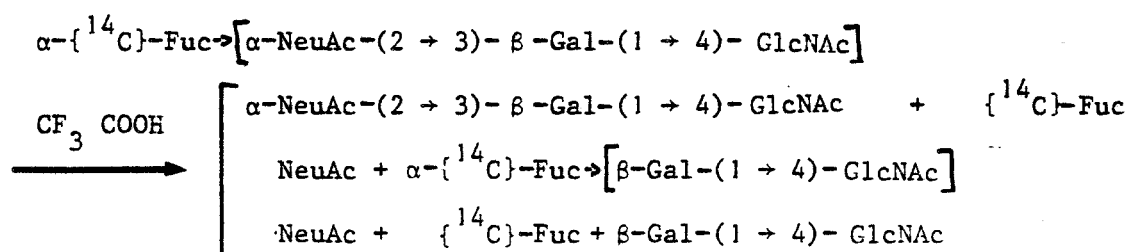
La fucosylation de la N-acétyllactosamine fucosylée (figure 30 C) donne un petit pic migrant comme la fucosylN-acétyllactosamine témoin provenant d'une légère dégradation de cet accepteur.

Lors de la fucosylation de la N-acétyllactosamine sialylée (figure 30 D), nous obtenons un pic migrant nettement plus lentement que la N-acétyllactosamine fucosylée. Ce produit apparait avec une vitesse beaucoup plus lente que la N-acétyllactosamine fucosylée. Pour obtenir le même taux de transfert (à un temps donné) il faut environ 10 fois plus d'accepteur sialylé que de N-acétyllactosamine.

3) Identification du produit formé lors de la fucosylation de la N-acétyllactosamine sialylée

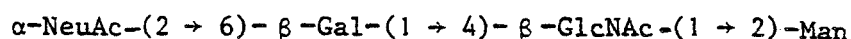
Comme nous ne possédons pas une quantité de produit suffisante pour en faire l'étude par méthylation et spectrométrie de masse, nous avons réalisé une expérience d'hydrolyse acide partielle pour déterminer sa structure, après l'avoir isolé par chromatographie préparative sur papier.

En admettant que le produit formé est la N-acétyllactosamine sialylée et fucosylée une hydrolyse acide douce ($CF_3 COOH$, 0,1 N, 80°C 10') libère de l'acide sialique et du fucose suivant la réaction :



La chromatographie sur papier dans le solvant 5/5/1/3 du produit d'hydrolyse donne le résultat représenté dans la figure 31 : nous obtenons à la fois un produit migrant comme le témoin fucosyl-N-acétyllactosamine froid et un produit migrant comme le fucose. Nous avons donc obtenu la fucosylation d'un produit sialylé.

L'expérience de fucosylation décrite ici a été réalisée avec de la N-acétyllactosamine sialylée en position 3 sur le Gal. Nous obtenons les mêmes résultats avec le composé :



L'isomérisation de la liaison entre l'acide sialique et le galactose ne semble donc pas importante pour la reconnaissance par la fucosyltransférase.

C) CONCLUSION

Ces résultats semblent en contradiction avec ceux de l'équipe de HILL (34). Pourtant, est-il possible de comparer la spécificité d'une fucosyltransférase isolée du lait humain sur une glycoprotéine sialylée, avec celle d'un enzyme non purifié de microsome de foie, sur des structures oligosaccharidiques sialylées ?

Certains auteurs ont décrit l'existence de structures à la fois sialylées et fucosylées portées par la glycoprotéine fucosylée majeure du cerveau de rat (27). D'autre part, ils ont montré que le

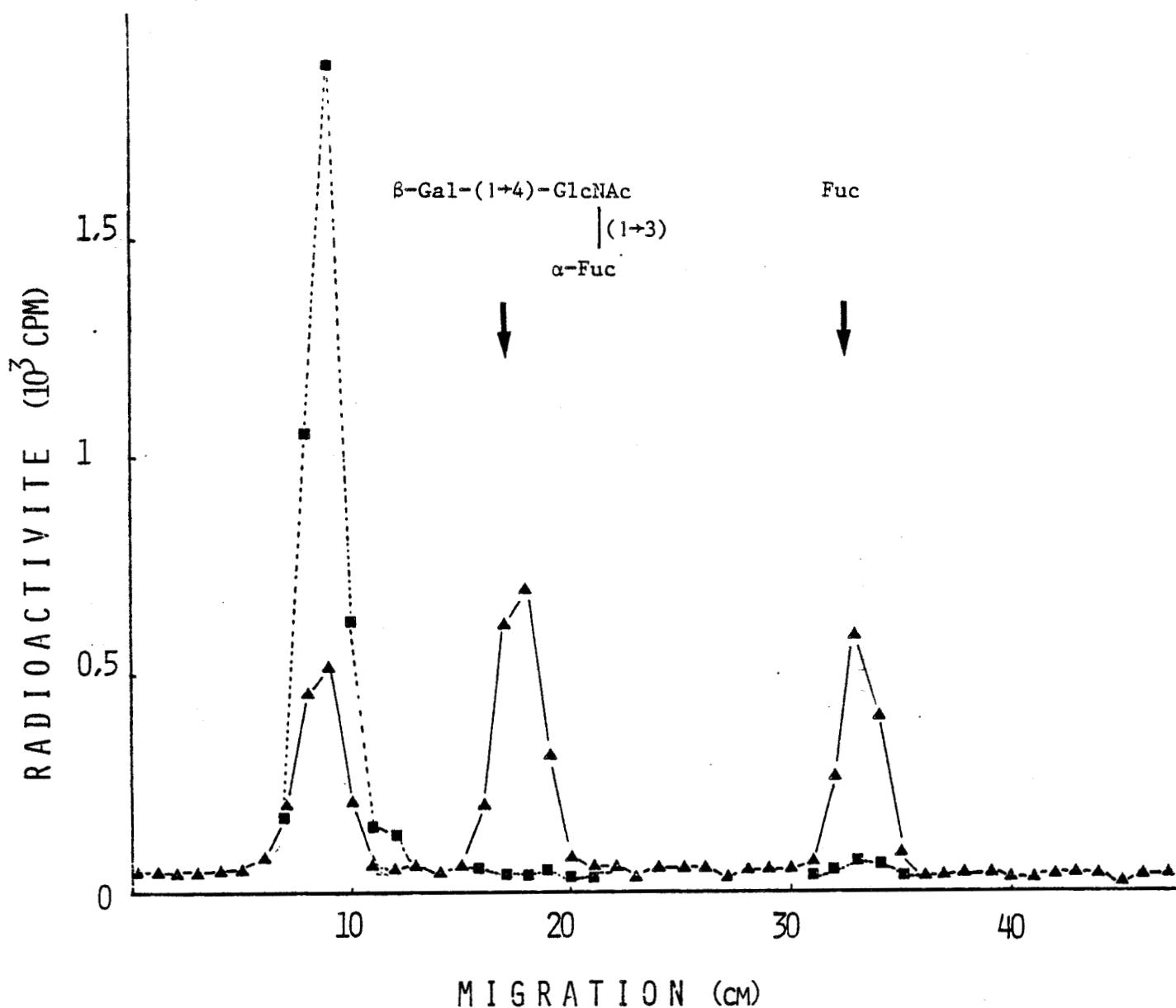


Figure 31 : Profil chromatographique obtenu lors de la migration en solvant 5/5/1/3 (migration 14 H) du produit d'hydrolyse par CF₃ COOH du composé obtenu par fucosylation de la sialyl-N-acétyllactosamine.

- : Témoin avant l'hydrolyse
- ▲-▲-: Produit de l'hydrolyse.



que le taux de fucosylation des glycoprotéines du cerveau était beaucoup plus grand que dans d'autres organes comme le foie ou le rein (26). Cette voie de biosynthèse permettant la formation de composés mineurs dans le foie, peut donc devenir plus importante dans d'autres organes.

Un tableau récapitulatif des résultats obtenus aussi bien pour la sialylation que la fucosylation est représenté dans le tableau III. Il serait très intéressant de préciser ces résultats en déterminant sans ambiguïté la structure des produits formés par la (ou les) fucosyltransférase(s) de foie de Porc.

SUBSTRATS	SIALYLTRANSFERASE	FUCOSYLTRANSFERASE
β -Gal-(1→4)-GlcNAc	+	+
β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)-Man	+	+
β -Gal-(1→4)-GlcNAc (1→3) α -Fuc	-	-
α -NeuAc-(2→3)- β -Gal-(1→4)-GlcNAc	-	+
α -NeuAc-(2→6)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)-Man	-	+

Figure 32 : Etude de la sialylation et de la fucosylation de la N-acétyllactosamine et de ses dérivés

CONCLUSION GENERALE

Le premier chapitre de ce mémoire montre qu'il existe de nombreuses sortes de N-glycosylprotéines de type N-acétyllactosaminique différant principalement par le nombre de résidus d'acide sialique et de fucose exposés à la surface de la molécule.

Les études des voies de biosynthèse décrivent des sialyl et fucosyltransférases responsables de la formation de chaque liaison. Mais les études de la régulation de cette biosynthèse, décrivant pourquoi certaines molécules sont persialylées, d'autres fucosylées, d'autres à la fois sialylées et fucosylées n'en sont qu'à leur début ; c'est dans ce cadre que s'inscrivent les résultats que nous décrivons ici.

Il est difficile de conclure qu'il existe une variation nette au niveau des taux de sialylation d'accepteurs de taille différente, par contre la disialylation d'un glycopeptide semble être plus rapide que celle de l'oligosaccharide correspondant. Il serait intéressant d'étudier la vitesse de sialylation d'une glycoprotéine désialylée comportant des glycannes bi ou triantennés, le problème étant de séparer le produit formé de la glycoprotéine de départ afin de déterminer sa structure, comme nous l'avons fait pour les accepteurs oligosaccharidiques et glycopeptidiques.

Les résultats obtenus pour la sialylation de la N-acétyllactosamine et de ses dérivés montrent que s'il est impossible de sialyler ou de fucoxyler le composé fucoylé, comme de sialyler la N-acétyllactosamine sialylée, par contre ce dernier accepteur peut être fucoylé. Il reste maintenant à déterminer si le fucose est lié sur la N-acétylglucosamine ou sur le galactose et en quelle position. Pour celà, il est nécessaire de mettre au point une méthode permettant de déterminer la structure d'une quantité de produit extrêmement faible (le GDP-Fuc, précurseur de la réaction n'étant commercialisé que sous forme radioactive avec une forte radioactivité spécifique). Il serait aussi très intéressant d'essayer de fucoxyler une glycoprotéine persialylée. Dans ce cas, le réisolement de la molécule est indispensable, puisque le fucose peut être aussi lié à une N-acétylglucosamine interne de la molécule.

BIBLIOGRAPHIE

(Les nombres écrits entre parenthèses renvoient aux pages de citation des auteurs).

- 1 - ARONSON, Jr. N.N., DE DUVE, C. (1968) J. Biol. Chem., 243, 4564-4573. (39)
- 2 - AUBERT, J.P., BISERTE, G., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1976) Arch. Biochem. Biophys., 175, 410-418. (18)
- 3 - BEELEY, J.G. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 1051-1055. (18)
- 4 - BERTOLINI, M., PIGMAN, W. (1970) Carbohydr. Res., 14, 53-60. (9, 10)
- 5 - BEYER, T.A., REARICK, J.I., PAULSON, J.C., PRIEELS, J.P., SADLER, J.E., HILL, R.L. (1979) J. Biol. Chem., 254, 12531-12541. (27, 28, 30, 31, 32)
- 6 - CACAN, R. (1979) Thèse de Doctorat es Sciences, Lille. (14)
- 7 - CACAN, R., HOFACK, B., VERBERT, A. (1980) Eur. J. Biochem., 106, 973-980. (14, 16)
- 8 - CARLSON, D.M. (1968) J. Biol. Chem., 243, 616-626. (9, 10)
- 9 - CHAPMAN, A., TROWBRIDGE, I.S., HYMAN, R., KORNFELD, S. (1979) Cell, 17, 509-515. (18)
- 10 - CHEN, R.S., TORIBARA, T.Y., WARNER, H. (1956) Anal. Chem., 28, 1756-1758. (39)
- 11 - CHOU, T.H., MURPHY, C., KESSEL, D. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 74, 1001-1006. (71)

- 12 - FEIZI, T., KABAT, E.A., VICARI, G., ANDERSON, B., MARSH, W.L.
(1971) *J. Immunol.*, 106, 1578-1592. (10)
- 13 - FOURNET, B., STRECKER, G., MONTREUIL, J., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G.
SCHMID, H., BINETTE, J.P. (1978) *Biochemistry*, 17, 5206-5214. (8)
- 14 - GRINNA, L.S., ROBBINS, P.W. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 8814-8818.
(21)
- 15 - HAKOMORI, S.I. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)*, 55, 205-208. (47)
- 16 - HARPAZ, N., SCHACHTER, H. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 4885-4893.
(21)
- 17 - HARPAZ, N., SCHACHTER, H. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 4894-4902. (21)
- 18 - HEMMING, F. (1980) Conférence donnée à Lille lors des écoles de
l'EMBO. (19, 20)
- 19 - HERCZ, A., (1979) In : Proceedings Fifth International Symposium
on Glycoconjugates, 143-144. (16)
- 20 - HILL, H.D.J., SCHWYZER, M., STEINMAN, H.M., HILL, R.L. (1977)
J. Biol. Chem., 252, 3799-3805. (29)
- 21 - HOFLACK, B., CACAN, R., VERBERT, A. (1978) *Eur. J. Biochem.*, 88,
1-6. (71)
- 22 - HUDGIN, R.L., SCHACHTER, H. (1971) *Can. J. Biochem.*, 49, 829-836. (65)
- 23 - ITO, S., YAMASHITA, K., SPIRO, R.G., KOBATA, A. (1977) *J. Biochem.*
(Tokyo), 81, 1621-1631. (6)
- 24 - JABBAL, I., SCHACHTER, H. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 5154-5161. (65, 66)

- 25 - KARAMANOS, Y., FOURNET, B., MONTREUIL, J., SCHMID, K., Van HALBEECK, H.,
DORLAND, L., VLIAGENTHART, J.F.G. (1980) Communication au Congrès
d'Automne de Chimie Biologique - Villeneuve d'Ascq - 23 - 24 Septembre.
(8)
- 26 - KRUSIUS, T., FINNE, J. (1977) Eur. J. Biochem., 78, 369-379. (75)
- 27 - KRUSIUS, T., FINNE, J. (1978) Eur. J. Biochem., 84, 395-403. (73)
- 28 - FISHER, F.G., NEBEL, G.G. (1955) Z. Physiol. Chem., 302, 10-18. (42)
- 29 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951)
J. Biol. Chem., 193, 265-273. (38, 39)
- 30 - MONTREUIL, J., FOURNET, B., SPIK, G., STRECKER, G. (1978) C.R. Acad.
Sci., 387, 837-840. (25)
- 31 - MUNRO, J.R., NARASIMHAN, S., WETMORE, S., RIORDAN, J.R., SCHACHTER, H.
(1975) Arch. Biochem., Biophys., 169, 269-277. (71)
- 32 - NARASIMHAN, S., STANLEY, P., SCHACHTER, H. (1977) J. Biol. Chem., 252,
3926-3935. (21)
- 33 - NILSON, B., NORDEN, N.E., SVENSSON, S. (1979) J. Biol. Chem., 254,
4545-4553. (8)
- 34 - PAULSON, J.C., PRIEELS, J.P., GLASGOW, L.R., HILL, R.L. (1978)
J. Biol. Chem., 253, 5617-5624. (1, 49, 64)
- 35 - PENNINGTON, R.J. (1961) Biochem. J., 80, 649-654. (39)
- 36 - RAO, A.K., MENDICINO, J. (1978) Biochemistry, 17, 5632-5638. (23, 24)
- 37 - RAY, T.K. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 196, 1-9. (39)

- 38 - RODEN, L. (1980) In : "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans". W.J. LENNARTZ (Ed.), Plenum Press, N.Y. p. 267-371. (11, 12)
- 39 - RONIN, C., BOUCHILLOUX, S., GRANIER, C., VAN RIETSCHOTEN, J. (1978) FEBS Letters, 96, 179-182. (18)
- 40 - ROSEMAN, S. (1970) Chem. Phys. Lipids, 5, 270-297. (14, 15)
- 41 - SADLER, J.E., REARICK, J.I., PAULSON, J.C., HILL, R.L. (1979) J. Biol. Chem., 254, 4434-4443. (30)
- 42 - SCHACHTER, H., MCGUIRE, E.J., ROSEMAN, J. (1971) J. Biol. Chem., 246, 5321-5328. (29)
- 43 - SCHACHTER, H., ROSEMAN, S. (1980) In : The Biochemistry of Glycoprotein and Proteoglycans". W.J. LENNARTZ (Ed.), Plenum Press, N.Y. p. 85-160. (23)
- 44 - SCHACHTER, H. (1981) In : Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases, J.W. CALLAHAN and J.A. LOWDEN (Eds.) Raven Press, New York. (16)
- 45 - SCHACHTER, H. (Septembre 1980) Conférence donnée à Lille lors des Ecoles de l'EMBO. (17)
- 46 - SHUR, B.D., ROTH, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta, 415, 475-512. (14)
- 47 - SPIK, G., VANDERSYPPE, R., FOURNET, B., BAYARD, B., CHARET, P., BOUQUELET, S., STRECKER, G., MONTREUIL, J. (1974) Actes Coll. Intern., N° 221, C.N.R.S. Paris, 483-500. (8)
- 48 - SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., MONTREUIL, J., (1980) Eur. J. Biochem. Sous Presse. (8)

- 49 - SPIK, G., SIX, P., MONTREUIL, J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 584, 203-215. (16)
- 50 - STOFFYN, P., STOFFYN, A. (1979) *Carbohydr. Res.*, 74, 279-286. (46, 71)
- 51 - TAI, T., YAMASHITA, K., KOBATA, A. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78, 434-440. (5, 6, 21)
- 52 - TAKASAKI, S., YAMASHITA, K., KOBATA, A. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 6086-6091. (30)
- 53 - VAN DEN EIJNDEN, D.H., JOZIASSE, D.H., DORLAND, L., VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G., SCHMID, K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 839-845. (25, 26, 49)
- 54 - WILSON, J.R., WILLIAMS, D., SCHACHTER, H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 909-916. (23, 64)
- 55 - ZANETTA, J.P., BRENNENRIDGE, W.C., VINCENDON, G. (1972) *J. Chromatogr.*, 69, 291-304. (40)

